

SZAKDOLGOZAT

Sárkány Richárd

2024



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Budai Campus
Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet

Aspergillus törzsek "on-site" enzimtermelése
növényi rostmaradványokon

Belső konzulens: Dr. Kohári-Farkas Csilla

egyetemi adjunktus

Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet

Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék

Készítette: Sárkány Richárd

Biomérnök BSc.

Budapest

2024

TARTALOMJEGYZÉK

1	BEVEZETÉS	1
2	A MUNKA CÉLJA	2
3	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
3.1	A növényi háztartási maradványok jelentősége és kihívásai.....	3
3.2.1	A cellulóz.....	5
3.2.2	A hemicellulóz	6
3.2.3	A lignin.....	6
3.2.4	A pektin	6
3.3	Fonalgombák a biotechnológiában.....	7
3.3.1	<i>Aspergillus</i> nemzetség	8
3.4	A lignocellulóz-bontó enzimek és mechanizmusaik	8
3.4.1	A cellulóz hidrolízis.....	9
3.4.2	A xilán hidrolízis	10
3.4.3	A pektin hidrolízis.....	11
3.4.4	A lignin bontása	11
3.5	A növényi biomassa előkezelése	12
3.6	Az „on-site” fermentáció	13
4	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	15
4.1	Felhasznált anyagok.....	15
4.1.1	Mikroorganizmusok	15
4.1.2	Tápközegek.....	15
4.1.3	Oldatok és pufferek	17
4.2	Alkalmazott módszerek.....	17
4.2.1	Törzsfenntartás	17
4.2.2	Inokulum tenyészetek készítése	18
4.2.3	Enzimaktivitások gyors screenelése	18
4.2.4	Mikrobiális rostbontás és enzimfermentáció	18
4.2.5	Enzimaktivitások mérése.....	19
4.2.5.1	β -glükózidáz aktivitás	19
4.2.5.2	CMCáz, endo- β -xilanáz és pektináz aktivitás mérése	20
4.2.6	Redukáló cukortartalom meghatározása.....	21
5	EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	22
5.1	A törzsek gyors screenelése	22
5.2	Előszelektált <i>Aspergillus</i> törzsek teljesítménye szubmerz rendszerben.....	24
5.2.1	Beoltási technikák hatása a törzsek aktivitásprofiljára.....	24
5.2.2	A mikrobiális rostbontás hatékonysága	28
5.3	A növelt rosttartomány hatása az <i>Aspergillus niger</i> F.00632 enzimtermelésére	29
6	ÖSSZEFOGLALÁS.....	31
7	IRODALOMJEGYZÉK.....	33

1 BEVEZETÉS

A bolygónk népességének növekedése és ennek hatásaként a primer (kőolaj, földgáz, szén) energiaforrások nagyléptékű kitermelése az éghajlatváltozás jelenségeit, az extrém időjárási viszontagságokat (aszályok, hirtelen esőzések, hidegbetörések stb.) nagyban erősítik. A világszintű kihívások a fenntarthatóbb energiarendszerek kutatására és fejlesztésére kényszerítik az emberiséget. A hosszabb távon igénybe vehető, megújuló források körében a biomassza alapú energetikai termékek (biogáz, biohidrogén, bioetanol, bioáram stb.) az elmúlt évtizedekben egyre nagyobb figyelemben részesülnek. A bioetanol a fosszilis tüzelőanyagok környezetkímélőbb folyékony üzemanyag-alternatívájának mutatkozik (Lin *et al.* 2006).

A növényi biomassza évente megújuló, nagy mennyiségben és könnyen elérhető, magas szénhidráttartalommal rendelkező anyag, ennek köszönhetően alternatív szubsztrátumként gazdaságilag is vonzó üzemanyag lehetőséget biztosít. A növényi biomassza magába foglalja az energianövényeket, a mezőgazdasági növényi maradványokat, az erdészeti és fafeldolgozási maradványokat, az algabiomasszát, a háztartási kommunális (élelmiszer) és zöld hulladékot (ágak, gallyak, levelek) (Agbor *et al.* 2011).

A növényi biomassza magas energiatartalma több módon, közvetlenül és átalakítási folyamatokat követően hasznosítható. A növényi biomassza összetett és igen ellenálló lignocellulóz szerkezettel rendelkezik. A hatékony szerkezetbontás és a szénhidrátok hozzáférhetőségének növelése ma még további kutatásokat igényel. A növényi biomassza az etanolfermentáció előtt előkezelést és cukrosítást igényel. Az előkezelés történhet kémiai, fizikai és biológiai úton, valamint kettő és annál több eljárás kombinálásával is megvalósulhat. A biológiai előkezelés sok szempontból előnyösebb a többinél, azonban ennek a módszernek is megvannak a saját nehézségei, amelyeket a kutatók célzott kísérletekkel próbálnak kiküszöbölni.

A technológiai kihívások (lassú folyamat, alacsony szénhidrát hozam) csökkentésére az egyik megoldási lehetőség lehet az “on-site” eljárás alkalmazása, azaz a technológiába integrált enzimtermelés és a növényi lignocellulóz-struktúra mikrobiális bontása.

2 A MUNKA CÉLJA

A kutatás a másodgenerációs etanolfermentáció technológiai eljárásába integrált enzimtermelésnek és mikrobiális rostbontásnak a megismerésére, a törzsek szelektálására, valamint a szelektált törzsek teljesítményének növelésére irányult.

Az alábbi részfeladatokat tűztem ki célul:

1. Szubmerz tenyésztési technikák hatása az *Aspergillus* törzsek enzimtermelésére. Az extracelluláris enzimaktivitás profilok (endo- β -glükánáz, β -glükozidáz, endo- β -xilanáz, pektináz) elemzése és a törzsek szelektálása.
2. A növényi rostkoncentráció hatása a szelektált *Aspergillus* törzsek enzimtermelésére és a rostbontásra.
3. Néhány környezeti tényező hatása (hőmérséklet és a kémhatás) a szelektált *Aspergillus* törzsek enzimtermelésére és a rostbontásra.

3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 A növényi háztartási maradványok jelentősége és kihívásai

Az ember által már tovább nem hasznosítható, biológiailag lebomló, szerves maradványok egyik fajtája a növényi hulladék. Általában ezek közé tartoznak a háztartási élelmiszerhulladékok, mint a készételek, a gyümölcsök és zöldségek és azok maradványai (megbarnult termények, héjak, száraz, levelek), a kenyerek és egyéb pékáruk. A globális gyümölcs- és zöldségtermelés éves szinten több millió tonnára becsülhető és ez évről évre további növekedést mutat. A friss gyümölcsök és zöldségek több mint 80 %-ban nedvességet tartalmaznak, ezért a rendkívül romlandó élelmiszerek közé tartoznak (Toushik *et al.* 2017).

A növényi maradványok szerkezeti felépítését tekintve, azoknak jelentős részét az úgynevezett lignocellulóz mátrix teszi ki. A lignocellulóz struktúrát alkotó komponensek biotechnológiai úton hasznosnak bizonyulnak. A maradványok megfelelő kezelését követően az értékes komponensek extrakcióval kinyerhetők (mint például az illóolajok, az aromaanyagok, a poliszacharidok stb.), valamint biofeldolgozással, akár hidrolízissel a felszabadított egyszerű cukrok (elsősorban glükóz) etanollá alakíthatók. A növényi maradványok nagy előnye, hogy ez a fajta biomassa a környezetben igen nagy mennyiségben áll rendelkezésre. Sőt, a világ megújuló biomassa készletének közel felét cellulózban gazdag növényi biomassa teszi ki. A mezőgazdasági és élelmiszeripari tevékenységek, valamint a jelenlegi élelmiszerfogyasztási szokások folyamatos nyersanyag utánpótlást biztosítanak, így éves szinten a több millió tonna cellulózban gazdag biomassa termelődik (Toushik *et al.* 2017). A háztartási élelmiszerhulladékok közel 46 %-a az elpazarolt gabonafélékből, 41 %-a pedig az eldobott gyümölcsökből és zöldségekből áll össze.

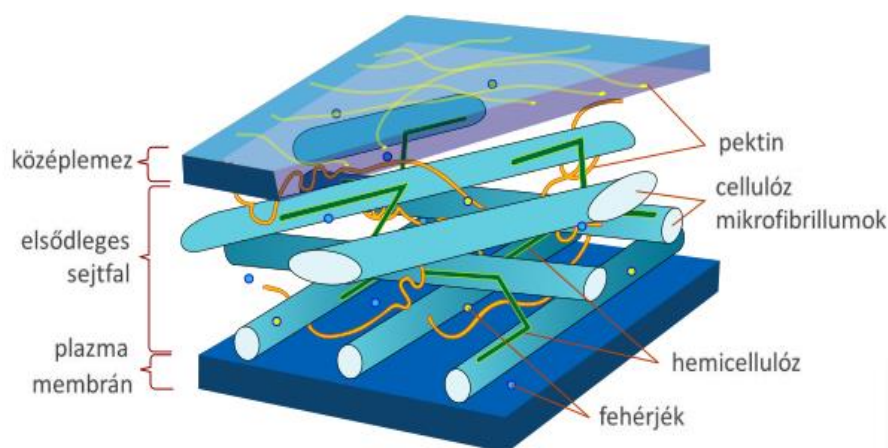
A növényi maradványokat alkotó szénhidrátok (a cellulóz, a hemicellulózok is) táplálékforrásként szolgálnak az olyan élőlények számára, mint a baktériumok, archaeák, gombák, rovarok és egyéb állat fajták (és azokkal szimbiózisban élő bélflóra baktériumok). Ezek az élőlények rendelkeznek a lignocellulóz biomassa hasznosításához szükséges enzimkészlettel, amelyek segítségével képesek azt glükózzá és egyéb oldható cukrokká alakítani. Ezeket az enzimeket számos élelmiszeripari területen és más ipari ágazatokban is hasznosítják, mint például a gyümölcs- és zöldséglé készítésében, a növényi olajok feldolgozásában, borászatban, sörfőzésben és sütőiparban, sőt textilek készítésénél, gyógyászati termékek előállításánál, bioenergetikai termékek fejlesztésénél is.

A lehetőségek által a növényi hulladék a legolcsóbb és legkönnyebben elérhető alternatív energiaforrássá alakítható a bolygónkon (Toushik *et al.* 2017).

3.2 A lignocellulóz szerkezeti tulajdonságai

A lignocellulóz egy általános szó a fás és nem fás szárú növények kulcsfontosságú szerkezeti összetevőinek leírására. A növényi biomassa bősége miatt a legígéretesebbnek mutató megújuló szerves erőforrásnak is tekinthető (Toushik *et al.* 2017).

A lignocellulóz három fő alkotórésze, a szénhidrát polimerek: a cellulóz, a hemicellulózok, valamint az aromás vegyületek: a lignin. Ezek mellett kis mennyiségben tartalmaz pektint, nitrogénvegyületeket és ásványi anyagokat is. Az összetevők arányát befolyásolja a növényi biomassa fajtája, termesztési helye, kora és hasznosított része is. Mindezek a komponensek hatással vannak a harmadlagos szerkezet kialakítására és annak tulajdonságaira is. A komponensek különböző (első- és másodrendű) kötésekkel rendelkeznek, melyek hozzájárulnak a kompakt, környezeti hatásokkal szemben ellenálló szerkezet kialakításához (Toushik *et al.* 2017, Megyeri 2019). A növényi maradványok eltérő mennyiségű cellulózt, hemicellulózt és lignint tartalmaznak, melyek meghatározzák a biomassa emészthetőségét.



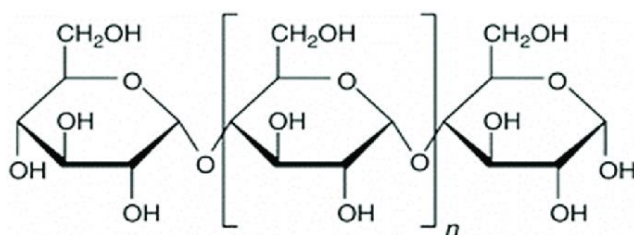
1. ábra: A növényi sejtfal szerkezete (Internet 1.)

Egy adott növényi biomassa ellenállóképessége függ a szénhidrát-összetevők közötti kapcsolatokról, a cellulóz kristályosságától és polimerizációs fokától, a hozzáférhető felületről (vagy porozitástól), a lignin arányától, a cellulózon található hemicellulóz burkolattól. Ez a

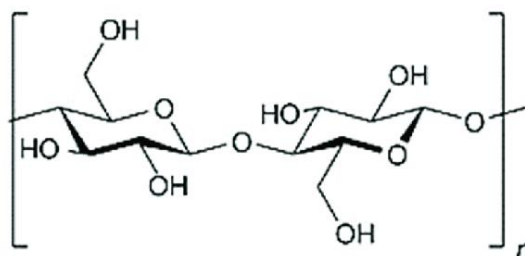
változékonyság határozza meg az adott biomassza emészthetőségének/hidrolízisének lehetőségeit (Agbor *et al.* 2011).

3.2.1 A cellulóz

Egy lineáris homopoliszacharid, amely β -1,4-glikozidos kötésekkel összekapcsolt D-glükopiranoz alegységekből áll. Az ismétlődő egység a diszacharid csoportba tartozó cellobióz. A $(C_6H_{10}O_5)_n$ a cellulóz kémiai képletét szimbolizálja, ahol az „n” a glükózcsoporthoz számát jelöli, melyet polimerizációs foknak neveznek. Az egyes glükóz egységek egymáshoz képest 180° -kal el vannak forgatva. A cellulóz inter- és intramolekuláris hidrogénkötések és van der Waals erők által stabilizált makromolekula, nagyfokú rendezettséggel. Vízen oldhatatlan, kémiaiilag stabil és viszonylag ellenálló az enzimekkel szemben is. A növényi biomassza csaknem 40 %-át a cellulóz polimerek teszik ki (Toushik *et al.* 2017, Réczey 2012).



(a)



(b)

2. ábra: A keményítő (a) és a cellulóz (b) kémiai szerkezete (Samir *et al.* 2022)

A cellulóz-láncok (körülbelül 36) hidrogén-hidakkal kapcsolódnak össze és alkotnak mikrofibrillumokat. Mindegyik cellulóz-lánc átlagosan 100-15000 glükózmolekulát tartalmaz, amelyek molekuláris súlya 10-150 kDa között van. A gyümölcsök és zöldségek sejtfalának poliszacharid tartalmát tekintve, azok körülbelül 20 %-tól 35 %-ig cellulózt (száraz tömegben mérve) tartalmaznak (Toushik *et al.* 2017, Réczey 2012).

3.2.2 A hemicellulóz

A hemicellulóz olyan poliszacharid. A felépítő molekulák és azok aránya igen nagy eltérést mutathatnak növény fajtánként és részenként is. Az alkotóelemei között található a D-xilóz, a D-galaktóz, a D-mannóz, a D-glükóz, az L-arabinóz, L-fukóz, L-rhamnóz, L-galaktóz a 4-O-metil-glükuronsav, D-glükuronsav, a D-galakturonsav stb. A hemicellulózt különböző cukrokból álló rövid oldalláncú ágak jellemzik (Réczey 2012). A hemicellulózok van der Waals kölcsönhatások révén szorosan fogja közre a cellulóz-láncokat. A ligninhez kovalens köteseken keresztül kapcsolódik.

A xilán a legnagyobb mennyiségben előforduló hemicellulóz polimer az egysziklevelű növényeken belül (a xiloglukán pedig a kétsziklevelűeknél).

A gyümölcsök és zöldségek sejtfal poliszacharidjainak körülbelül a 15-19 %-át (száraz tömegben mérve) hemicellulóz teszi ki. A hemicellulóz láncokban körülbelül 500-30000 cukoregység található, nagyjából 30 kDa molekulatömeggel. Az évelő és az egynyári növényekben a hemicellulózok alkotják a biotömeg 25-35 %-át (Andral *et al.* 2018, Toughik *et al.* 2017, Réczey 2012).

3.2.3 A lignin

Az aromás vegyületek a cellulózhoz és a hemicellulózokhoz is egyaránt kötődnek. Fő funkciója a növényfal szerkezetének erősítése, átjárhatatlanság gátlása, valamint a mikrobiális támadás és az oxidatív stresszel szembeni védelem. Elsősorban a cellulóz és hemicellulóz komplexek között és körül helyezkednek el, kitöltik a hézagokat és ragasztó anyagként működnek. A lignin a gyümölcsökben és a zöldségekben kis mennyiségben van jelen (kevesebb, mint 2 % száraz tömegben) (Toughik *et al.* 2017, Réczey 2012).

3.2.4 A pektin

A pektin a természetben megtalálható legösszetettebb poliszacharid család. A kétszikűeknél és nem magvas egyszikűeknél 35 %-át, a fűféléknél 2-10 %-át, a fás szöveteknél pedig legfeljebb 5 %-át teszi ki az elsődleges növényi sejtfalnak. A gyümölcsök és a zöldségek tartalmazzák a legnagyobb mennyiségben a pektint, alulérett vagy éppen érett állapotban a körülményektől függően a száraztömeg körülbelül 35-40 %-át (Mohen 2008). A pektin

elhelyezkedése a sejtfalon belül a cellulóz mikrofilamentumok között található, magasabb rendű növényekben a pektin glikozidos makromolekulái alkotják a középső lamella fő komponensét.

A pektin a galakturonsavban gazdag növényi sejtfalszerkezetalkotó poliszacharidok családjába tartozik. Vázát α -1,4-glikozidos kötésekkel összekapcsolt D-galakturonsav (D-GalA) egységek, származékok képezik, melyeknek oldalláncain többnyire L-arabinóz, D-xilóz, D-galaktóz és L-ramnóz molekulák találhatók (Mohen 2008). Kémiaiailag a pektin GalA egységei részben észterezettek. A pektin két nagy csoportra osztható: magas észter- vagy magas metoxiltartalmú (HM) pektin és alacsony észter- vagy alacsony metoxiltartalmú (LM) pektin. A viselkedése az élelmiszerekben az észterezett és nem észterezett GalA arányától és az észterezés mértékétől függ. Az *American Chemical Society* (ACS) 4 különböző osztályba sorolta fizikai-kémiai jellemzőit tekintve: protopektin, protopektin és pektinsav köztes állapot, pektinsav és pektin. A protopektin vízben nem oldódik, ellenben a pektinsav és pektin részben vagy teljesen oldható (Toushik *et al.* 2017, Mohen 2008).

3.3 Fonalasgombák a biotechnológiában

A fonalgombák széles körben elterjedt biotechnológiai alkalmazása három tulajdonságnak köszönhető: enzimkészletük változatosságának, a speciális poszt-transzkripció módosítási szerkezetnek (amely elősegíti a glikozilációt és a fehérje helyes feltekeredését), valamint az általánosan elismert és biztonságos (GRAS) kategóriába sorolt fajok széles tartományának (Gong *et al.* 2023).

A növényi sejtfalat lebontó fonalgombák fontos szerepet játszanak az ökoszisztéma tápanyag körforgásában. Számos extracelluláris enzimet termelnek, változatos katalitikus aktivitással rendelkeznek, amely által képesek a cellulóz tartalmú alapanyagok hidrolízisére. Enzimeik lehetnek intracellulárisak és extracellulárisak. A lignocellulóz-bontó enzimek ezen túl lehetnek hidrolitikusak, amelyek felelősek a poliszacharidok bontásáért; és oxidatívok, amelyek pedig a lignin bontásában vesznek részt. A biológiai lebontási folyamat során az enzimek szinergikus hatásokkal hatnak egymásra, ezáltal megy végbe a növényi biomassza részbeni, vagy akár teljes lebontása. A hátránya, hogy hosszú időt igényel, ezért ipari alkalmazása (adaptálása) még nem terjedt el. A bontás során a mikroorganizmusok a növényi poliszacharidok egy részét hasznosítják, mely cukorvesztést idéz elő. Ez a másodgenerációs

bioetanol előállításánál kifejezetten hátrányos a redukáló cukor hozam csökkenése miatt (Andral *et al.* 2018).

Három gombacsoport létezik, melyek különböző hatással és lebomlási mechanizmussal rendelkeznek: lágyrothadást, barnarothadást és fehérrothadást okozó gombák. A fehér- és lágyrothadást okozó gombák képesek a lignocellulóz biomassa hatásosabb lebontására. A barna rothadást okozó gombák elsősorban a cellulózt támadják meg, míg a fehér- és lágyrothadást okozó gombák a lignint és a cellulózt egyaránt megtámadják (Agbor *et al.* 2011).

3.3.1 *Aspergillus* nemzetség

Az *Aspergillus* nemzetség az egyik leggyakrabban előforduló és intenzíven kutatott lágyrothadás okozó fonalgombába. Az első ismert felhasználása Ázsiából ered, ahol arra a célra használták, hogy a növényi táplálékok ízletessége és emészthetősége javuljon. Ez a folyamat manapság *koji* néven ismert és a modern világban kereskedelmi célú fermentáció alapját szolgálja. A folyamatban a fonalgombába a kiválasztott enzimeivel (amilázok, proteázok stb.) a fehérjéket aminosavakra, a keményítőt pedig egyszerű cukrokra bontja (Golman és Osmani, 2008). A kedvező tulajdonságainak és enzimek készletének köszönhetően ma már kulcsfontosságú szerepe van a különböző ipari ágazatokban, mint például az élelmiszer-, a gyógyszer (antibiotikum és immunosuppresszív gyógyszerek) -, a szerves savak (citromsav), az ital-, a bioetanolgyártásban is. Ezáltal gazdasági lábnyoma is igen jelentős (Sohail *et al.* 2009, Goldman és Osmani 2008).

Az *Aspergillus* nemzetség hidrolitikus enzim készletének hatása a lignocellulóz biomassa bontásánál is jól hasznosítható. Sohail és munkatársai (2009) által végzett kutatás során a 160 környezeti mintában izolált mikroorganizmus körében az *Aspergillus* nemzetség volt a leggyakoribb. A törzsgyűjteményből egyedül 9 *Aspergillus niger* és 1 *A. flavus* izolátum mutatta a cellulóz, hemicellulóz és pektin bontáshoz szükséges enzimek egyidejű jelenlétét.

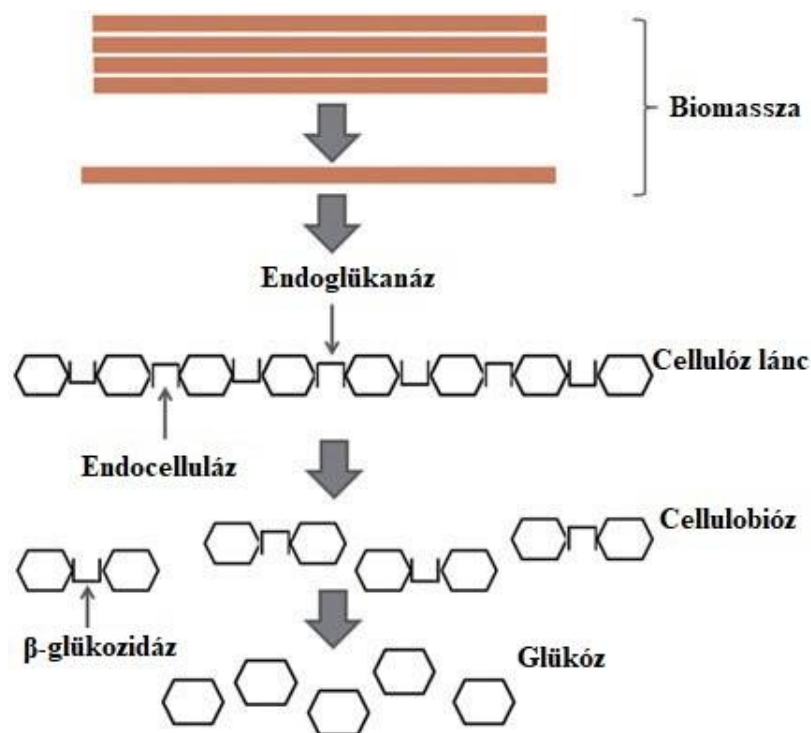
3.4 A lignocellulóz-bontó enzimek és mechanizmusaik

Az enzimek olyan molekulák, amelyek valamilyen katalitikus funkciót töltenek be. A különlegességük abban rejlik, hogy felgyorsítják a kémiai reakciókat akár szignifikáns mennyiség nélkül (Horowitz 1918). Az enzimeket régóta használják biológiai katalizátorként az élelmiszer-feldolgozás terén. Az enzimek ipari elterjedése a keményítő hidrolízis útján az

élelmiszeriparban az 1960-as években kezdődött el. Napjainkban az aktív kutatásoknak köszönhetően folyamatosan javul az egyes enzimek hasznossága az élelmiszeriparban. A kereskedelmi enzimek az alábbi organizmusokból származnak: csaknem fele ($< 50\%$) származik élesztő- és fonalasgombákból, több mint egyharmada ($< 35\%$) baktériumból, a többi ($> 15\%$) pedig növényi vagy állati eredetű. A kereskedelmi forgalomban kapható enzimek piaci értéke már elérte és 2014-ben meg is haladta az 1 milliárd USD-t, és 2020-ra 6,2 milliárd USD lett világszerte. Az iparban az enzimtermelésen belül, a hidroláz enzimek rendelkeznek a világpiac 77-85 %-val (Toushik *et al.* 2017).

3.4.1 A cellulóz hidrolízis

Az enzimatisz hidrolízis hatékonyságát nagyban befolyásolja a cellulóz polimerizáció foka (DP), a kristályosság, a részecskeméret és a felület hozzáférhetősége.



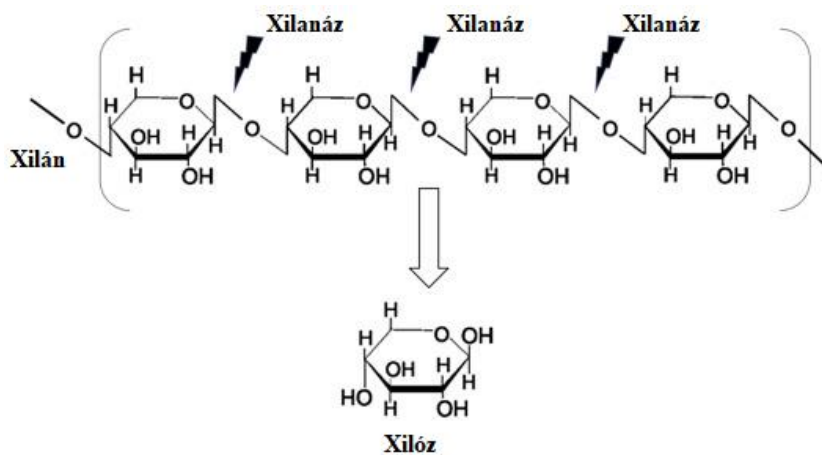
3.ábra: A cellulóz enzimatisz degradációjának lépései (del Pulgar 2013).

A cellulóz lebontást glikozid-hidroláz (GH) enzimek hajtják végre, amelyek kiegészítő katalitikus aktivitással rendelkeznek. A cellulázok különböző specifikításokkal hidrolizálják a cellulózrost glükóz egységeit összekötő β -1,4-glikozidos kötéseket. A CBM felelős az enzimnek a kristályos cellulózhoz való kötődéséért. A CBM egy hajtogatott szénhidrátkötő

modul (CBM), amely egy rugalmas linkerrel kapcsolódik a katalitikus doménhez. A hidrolízis során olyan elsődleges termékeket állítanak elő, mint a glükóz, a cellobióz és oligoszacharidok. A celluláz enzimkomplexet az endoglukanázok, az exoglukanázok és a β -glükozidázok alkotják (Andral *et al.* 2018, Campioni 2018). Az endoglukanáz véletlenszerűen támadja meg a cellulóz rostok alacsony kristályszerkezetű területeit, szabad végződéseket hozva létre (redukáló és nem redukáló) és ezzel csökkenti a polimerizációs fokot. Az exoglukanáz (cellobiohidroláz) cellobióz egységeket távolít el, a β -glükozidáz (cellobiáz) pedig hidrolizálja a cellobiózt és ezáltal glükóz monomereket szabadít fel. Az enzimkomplex szinergens hatása csökkenti a cellobióz gátló hatását (Campioni 2018).

3.4.2 A xilán hidrolízis

A hemicellulóz hidrolízise többféle enzim együttműködését igényli. Ez a szinergikus tevékenység nemcsak a hemicellulóz komplexitása miatt szükséges, hanem a hemicellulóz többi növényi sejtfa komponenseivel lévő kapcsolata miatt is.

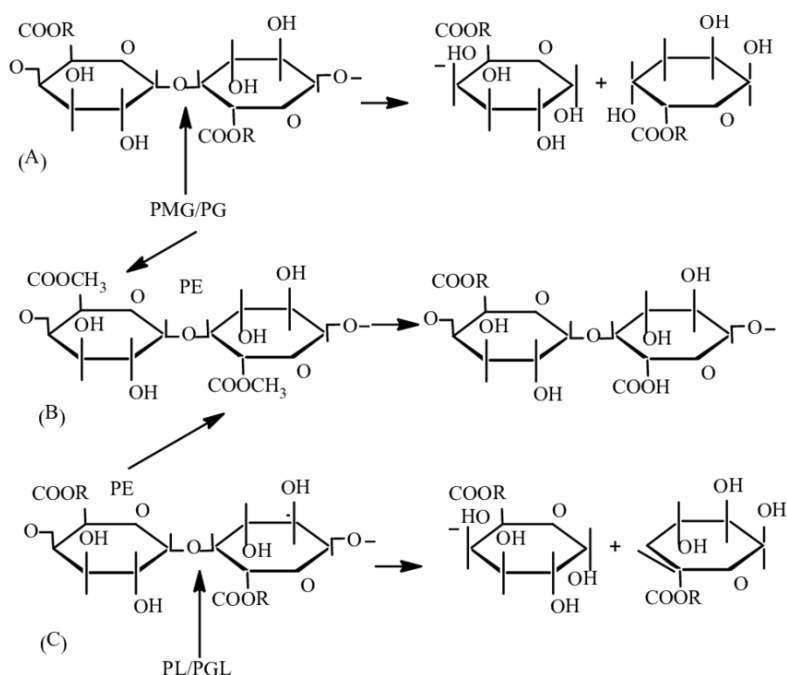


4. ábra: A xilanáz működési mechanizmusa (Ashok *et al.* 2013).

A xilán lebontásában két enzim szerepe kiemelt jelentőségű, ez az endo-1,4- β -xilanáz és az exo-1,4- β -xilozidáz. Az endo- β -1,4-xilanáz hidrolizálja az oldhatatlan xilán láncokat kisebb oldható xilo-oligoszacharidra (XOS). A β -xilozidázok az oldható xilánt hidrolizálják. A β -xilozidázok hatékonyak a monoszacharidokra történő lebontásban is, amely során xilóz egységek szabadulnak fel (Andral *et al.* 2018, Campioni 2018).

3.4.3 A pektin hidrolízis

A sejtfalban található pektin különböző kötéseinek felhasadását a pektinázek hajtják végre. Három nagy csoportba sorolhatók: pektin depolimerázok, amelyek hidrolizálják α -1,4-glikozidos kötéseket; a pektin-liázok, amelyek elhasítják az α -1,4-glikozidos kötéseket a galakturonsav (GalA) egységek transzeliminációjával, és a GalA nem redukáló végén telítetlen kötéssel rendelkező galakturonidot képeznek; a pektinészterázok (pektin-metilészterázok), amelyek katalizálják a GalA-egységekben lévő metilcsoport deészterezését. A pektinázek hatásmechanizmusok szerint endo- és exo-pektinázekre osztották fel (Toushik *et al.* 2017).



5 ábra: A pektinázek hatásmechanizmusa (Kantharaj *et al.* 2017)

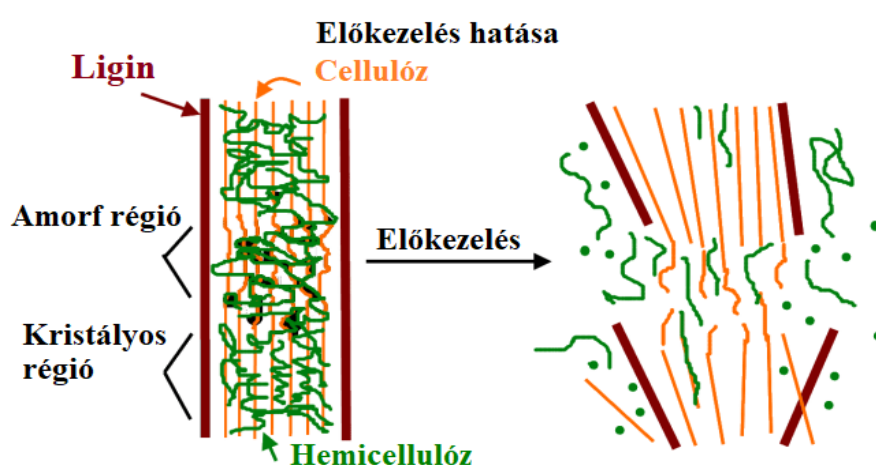
3.4.4 A lignin bontása

A lignin eltávolítása nagyban elősegíti a cellulóz és a hemicellulóz hidrolízisét. A sejtfalban lévő lignin polimerek lebontására képes enzimek két nagy családja, a peroxidázok és a fenol-oxidázok. A peroxidázok hem glikoproteinek, amelyek oxidálószerként hidrogén-peroxidot igényelnek, és három nagy csoportba sorolhatók: lignin-peroxidáz, mangán-peroxidáz, és a verzatil-peroxidáz (Ruiz-Dueñas *et al.* 2008). Ezek az enzimek képesek a lignin polimerek fenolos és nem fenolos aromás részeinek lebontására. A fenol-oxidáz megfelel a multiréz fehérje enzimnek, a lakkáznak, amely a lignin fenolos vegyületeket közvetlenül, a nem fenolos vegyületeket pedig közvetetten, aktív redox mediátorok segítségével oxidálja. A

glioxál-oxidáz, az aril-alkohol-oxidáz és a glükóz-oxidáz, szintén képes a lignin polimerek bontására (Toushik *et al.* 2017).

3.5 A növényi biomassza előkezelése

Az előkezelési módszerek általánosított osztályozása; fizikai, kémiai, biológiai és kombinált (kettőnél több módszer előnyeinek ötvözése) előkezelés. Ez utóbbi fizikai-kémiai valamint biokémiai előkezelési módszerek, amelyek általában hatékonyabbnak bizonyulnak a növényi biomassza bontása során (Agbor *et al.* 2011).



6. ábra: A lignocellulóz biomassza előkezelésének hatása (Muley *et. al* 2017).

A különböző mechanikai módszerekkel történő méretcsökkentés, mint az aprítás, a darálás, az őrlés által az enzimesen támadható felület, a szénhidrátok hozzáférhetősége növelhető, továbbá a polimerizáció mértéke (DP) és a cellulóz kristályossága csökkenthető. Önmagában azonban nem elegendő a hatékony degradáció eléréséhez. A kémiai módszerek között vannak savas, lúgos és semleges természetűek. A savak, lúgok, szerves oldószerek és ionos folyadékok jelentős hatást gyakorolnak a lignocellulóz biomassza szerkezetére, azonban a módszerek jelentős vegyszer igénnyel rendelkezhetnek és a vegyszerek eltávolítása az előkezelés költségeit tovább növelheti. A biológiai előkezelések a szerkezet lazítására, a cellulózt körül ölelő hemicellulózok, valamint aromás vegyületek mikrobiális vagy enzimes eltávolítására irányulnak. A biológiai kezelés viszonylag hosszú időn át tart, nem kedvező az elérhető degradációs hatékonyság, helyigénye miatt további problémát jelent alkalmazásának kiterjesztése az iparban. Hátrány az is, hogy a hozzáférhető szénhidrátok egy részét a mikroorganizmusok anyagcseretevékenységeik fenntartásához hasznosítják. A biológiai

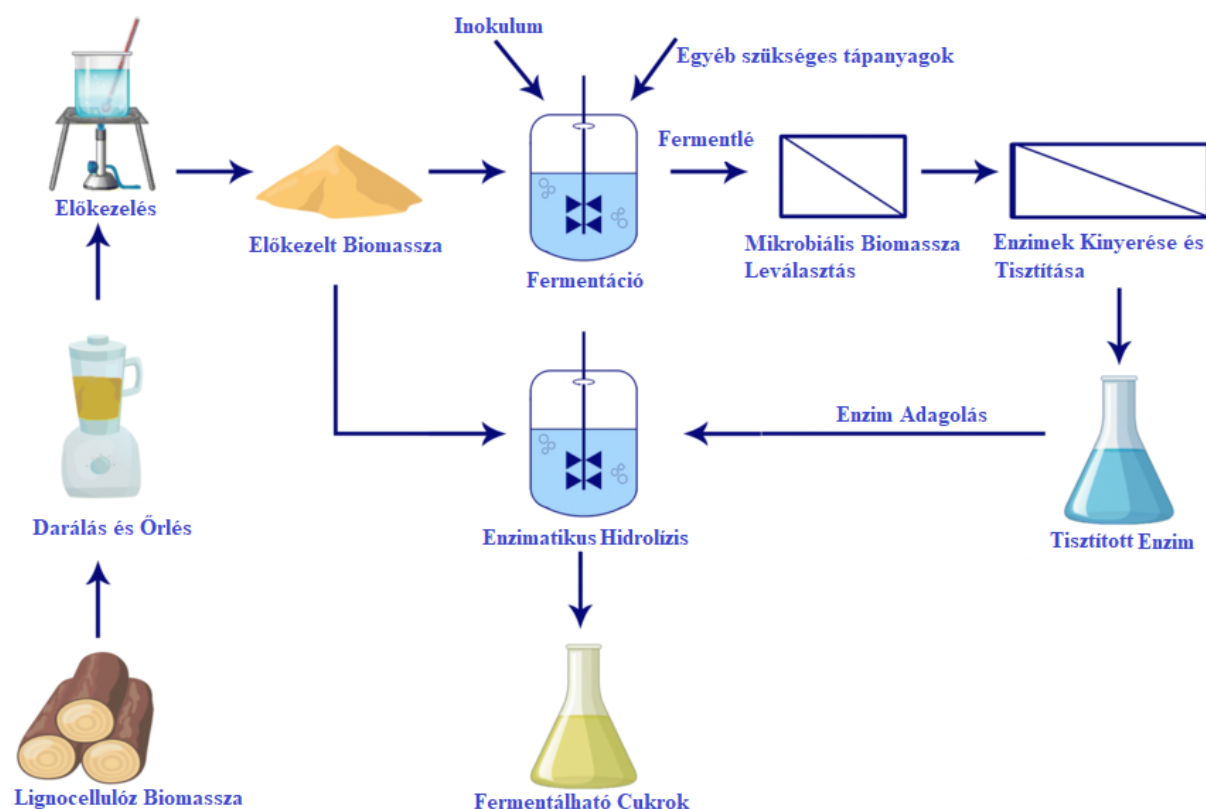
előkezelés más előkezelési módszerrel kombinálva vagy alacsony lignin tartalmú biomassza esetén önmagában is alkalmazható (Agbor *et al.* 2011).

3.6 Az „on-site” fermentáció

A mikrobiális enzimek előállításának két általános technikája a szubmerz fermentáció (submerged fermentation, SF) és a szilárd fázisú enzimfermentáció (solid state fermentation, SSF). A szubmerz fermentáción belül ismert a szakaszos, rátáplálásos, folytonos technika. A SSF eljárás csökkentett nedvességtartalmú környezetben valósul meg. Ez utóbbi a természeti mintákból izolált penészgombáknak kiváló szaporodási feltételeket és enzimtermelést biztosít. A fermentációs eljárások kiválasztása során mérlegelni kell az eljárások előnyeit és a hátrányait is, ugyanis az SSF eljárás során a penészgombák jellemzően kedvezőbb enzimszintézist mutatnak, azonban az eljárás során a környezeti igények nehezebben szabályozhatók. Ezen túl az enzimtermelő szervezetnél ismerni kell a tápanyag szükségletet, a termelt enzim konstruktív vagy induktív természetet, az enzimtermelést elősegítő adalékok szerepét, a környezeti paramétereket a megfelelő biokémiai folyamatok fenntartásához (Pécs 2023).

A lignocellulóz biomasszából az értékes szénhidrátok kinyerése és azok cukrosítása igen összetett folyamatot igényel. A mikrobiális rostbontás hiába rendelkezik ígéretes környezeti előnyökkel, azonban a szerkezetbontás hatékonysága továbbra is alacsonyabb a vártnál, továbbá időigényesebb folyamat (Nogueira *et al.* 2022). A biofeldolgozási folyamatba integrált, úgynevezett 'on-site' enzimfermentáció a felmerülő problémákra részbeni megoldást kínál. A lignocellulóz-bontó szervezetek tenyésztése és az enzimszintézis a cellulózban gazdag szubsztrátumon (például búzaszalmán, kukoricacsutkán stb.) történik. A növényi biomassza nagyobb léptékben indított biodegradációja során a környezeti feltételekhez adaptálódott tenyészet, vagy a tenyészet által termelt (és tisztított) enzim(ek) kerülnek leoltásra. A biológiai előkezelés hatékonysága ezáltal bizonyos mértékben növelhető (Kolasa *et al.* 2014). Az enzimek helyben történő előállításán és az olcsó szubsztrátum alkalmazásán túl további kedvező tulajdonsága az eljárásnak, hogy az enzimtárolás és a szállítás elhagyásra kerül (Hao *et al.* 2016). Nogueira és munkatársai (2022) életciklus-hatásvizsgálatot(LCIA) végeztek, amely azt mutatta ki, hogy az 'on-site' fermentációs eljárás kevésbé terheli a környezetet a helyszíni enzimgyártás megvalósítható akár több mikroorganizmus (szinergens kölcsönhatás) együttes tenyésztésével, genetikailag módosított törzs tenyésztésével is (Kolasa *et al.* 2014).

Alriksson és munkatársai (2009) kutatásuk során egy rekombináns *Aspergillus niger* D15 törzs endoglükánáz Cel7B enzim termelését követték nyomon cukornád bagasz és lucfenyő fa hidrolizátumaiban. A hidrolizátumok kiváló növekedési tápközegeként szolgáltak. A kísérlet során a kontroll tápközegehez (5 g/l élesztőkivonat, 0,4 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 g/l glükóz, 2 g/l kazamínosav, 0,5 g/l KCl, 1,5 g/liter KH_2PO_4 , 6 g/l NaNO_3 , és 1 ml/l nyomelem-oldat) képest lényegesen magasabb endoglükánáz aktivitást sikerült elérniük. A rekombináns törzs emellett más, a növényi biomasszából származó vegyületeket is hasznosított vagy átalakított, mint például az ecetsavat, a furán aldehideket és fenolos vegyületeket, amelyek gátló hatást fejtenek ki az etanologén élesztőre (*Saccharomyces cerevisiae*) az etanolfermentáció során.



7. ábra Az enzim "on-site" előállításának és alkalmazásának sematikus ábrázolása (Dey *et al.* 2022).

4 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Felhasznált anyagok

4.1.1 Mikroorganizmusok

A fonalagomba törzseket a Mezőgazdasági és ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye (NCAIM, Budapest) biztosította.

Törzsek

- *Aspergillus awamori* F.00030, F.00720
- *Aspergillus brasiliensis* F.00892
- *Aspergillus niger* F.00632, F.00714, F.00721, F.00735, IMI 303386

4.1.2 Tápközegek

Törzsfenntartáshoz

1. táblázat: Burgonyakivonat-dextróz agar (PDA) és tápleves (PDB)

burgonyakivonat-dextróz por	24 g
*bakteriológiai agar (agar esetén)	15 g
desztillált víz	1000 ml

A PDB táplevest 150 ml-ként 500 ml-es Erlenmeyer lombikokba öntöttem szét. Az Erlenmeyer lombikok száját vattadugóval és fólia használatával zártam le. A tápközegek sterilizése 121°C-on 15 percen át tartott.

Törzsek előzetes szelektálásához

2. táblázat: A celluláz, xilanáz és pektináz aktivitás kimutatása

karboximetil-cellulóz (CMC) agarlemez	
karboximetil-cellulóz (CMC)	2,5 g
húsból emésztett pepton	1,25 g
élesztőkivonat	1,25 g
dikálium-hidrogén-foszfát	0,25 g
magnézium-szulfát heptahidrát	0,25 g
bakteriológiai agar.	3 g
desztillált víz	250 ml

xilán agarlemez	
bükkfa eredetű xilán	2,5 g
húsból emésztett pepton	1,25 g
élesztőkivonat	1,25 g
dikálium-hidrogén-foszfát	0,25 g
magnézium-szulfát heptahidrát	0,25 g
bakteriológiai agar.	3 g
desztillált víz	250 ml

pektin agarlemez	
alma pektin	2,5 g
húsból emésztett pepton	1,25 g
élesztőkivonat	1,25 g
dikálium-hidrogén-foszfát	0,25 g
magnézium-szulfát heptahidrát	0,25 g
bakteriológiai agar.	3 g
desztillált víz	250 ml

A komponenseket minden esetben 250 ml desztillált vízben, mágneses kevertetés és melegítés (agar oldódása) mellett oldottam. A szelekciós agarokat 500 ml-es csavaros üvegekbe öntöttem, majd azokat 121 °C-on 15 percen át autoklávoztam.

A törzsek előtenyésztéséhez és az enzimfermentációhoz

3. táblázat: A módosított PDB összetétele

növényi rostokat tartalmazó mPDB	
burgonya kivonat-dextróz por	24 g
növényi rost* előtenyésztésnél fermentációnál	30 g 100-300 g (50 g léptékben)
desztillált víz	1000 ml

** a gyümölcs- és zöldségmaradványok előkészítése laboratóriumi présgéppel történt. A rostállományt hasznosítottam a kísérletek során.*

A törzsek előtenyésztése PDB táplevesben és annak módosított változatában (mPDB) történt. A módosított tápleves növényi rostokat tartalmazott. A tápleveseket 150 ml-ként 500 ml-es Erlenmeyer lombikokba öntöttem szét. A lombikok száját vattadugóval és fóliával zártam le. A sterilizálás 121 °C-on 15 percen át autoklávban történt.

4.1.3 Oldatok és pufferek

A kísérletek során az alábbi oldatokat és puffereket használtam.

4. táblázat: Oldatok és pufferek összetétele

OLDAT	ÖSSZETÉTEL	MENNYISÉG	
jód oldat (0,1 n)	jód	6,5 g	
	kálium jodid	12,5 g	
	desztillált víz	100 ml	
nátrium-klorid oldat (1 M)	NaCl	29,22 g	
	desztillált víz	500 ml	
kongóvörös oldat (0,5 %)	kongóvörös indikátor	0,5 g	
	desztillált víz	100 ml	
Triton-X 100-oldat (0,01 %)	Triton-X 100	0,01 ml	100 ml
McIlvaine puffer	0,2 M Na ₂ HPO ₄	71,66 g	1000 ml
	0,1 M citromsav-monohidrát	21,008 g	1000 ml
Somogyi I. oldat	vízmentes Na ₂ SO ₄	288 g	
	KNaC ₄ H ₄ O ₆ ·4H ₂ O	24 g	
	NaHCO ₃	32 g	
	Na ₂ SO ₄	48 g	
	desztillált víz	1600 ml	
Somogyi II. oldat	Na ₂ SO ₄	72 g	
	Cu(II)-szulfátot	8 g	
	desztillált víz	400 ml	
Nelson reagens	ammónium-molibdátot	100 g	
	H ₂ SO ₄	84 ml	
	nátrium-hidrogén-arzenátot	12 g	
	desztillált víz	1800 ml	

4.2 Alkalmazott módszerek

4.2.1 Törzsfenntartás

A törzsek átoltását PDA agarlemezre havonta végeztem el steril körülmények között, lamináris fűle alatt. Az átoltás során friss tenyészetekből 2*2 cm agardarabokat vágtam ki

lelángolt szike segítségével, majd az agardarabokat az új agarlemezek közepére helyeztem át. Az átoltást követően az agarlemezeket 28 °C-on inkubáltam 72-96 órán át. Ezt követően a friss tenyészeteket 4°C-on tároltam.

4.2.2 Inokulum tenyészetek készítése

A PDB és mPDB tápleveseket a törzstenyészetekből előkészített konídium szuszpenziókkal oltottam le. A konídium szuszpenzió előkészítése során 3 ml 0,01%-ban Triton-X 100 nem ionos felületaktív anyagot tartalmazó vizes oldatban mostam le a 2*2 cm-es agardarabokról a konídiumokat. A mosást üveggyöngyös rázatás (vortex) segítette. A leoltást követően a lombikokat rázóinkubátorba (Bisan Es-60/20) helyeztem. A szubmerz tenyésztés 28 °C-on, 180 fordulat/perc rázatási sebességen 48 órán át tartott.

4.2.3 Enzimaktivitások gyors screenelése

A fonalgomba törzsek endo- β -glükánáz (CMCáz), endo- β -xilanáz és pektináz aktivitásának kimutatása és annak intenzitása szelekciós agarlemezeken történt, agardiffúziós módszerrel. A törzsenként előkészített konídium szuszpenziókból 100 μ l-t a megszilárdult szelekciós agarlemezekbe vajt mélyedésekbe oltottam. Az agarlemezeket 28 °C-on 48 órán át inkubáltam. A módszer lényege, hogy amennyiben a tenyészetek körül feltisztulási zóna jelenik meg, úgy abból az enzimtermelés meglétére, mértékéből pedig az intenzitására következtethetünk. Az eredmény jobb észlelhetőségéért érdemes előhívást, az agarlemezek festését alkalmazni. A CMCáz aktivitás esetén 30 percre az agarlemezeket kongóvörös oldattal árasztottam el. A mosást 1 M-os NaCl oldattal végeztem el. Az endo- β -xilanáz aktivitás kimutatásánál az agarlemezeket 30 percre 0,1 n-os jód oldattal árasztottam el. A színekpző oldatot ezesetben desztillált vízzel távolítottam el. A pektináz aktivitás esetén a feltisztulási zóna jól láthatósága miatt festést nem alkalmaztam (festés esetén szintén a 0,1 n-os jód oldat szükséges). Az agarlemezek száradását követően a feltisztulási zóna nagysága (a szubsztrátum lebomlásának mérték) alapján a törzseket rangsoroltam.

4.2.4 Mikrobiális rostbontás és enzimfermentáció

A törzstenyészeteket első körben a 10 % rosttartományt tartalmazó PDB táplevesekbe oltottam le. Az inokulum beoltási rátája 10 % volt. A rostállomány kezelése 30 °C-on, 7-es kiindulási pH értéken és egy héten át tartott. A mintavételezés a 3., az 5. és a 7. napon történt.

A kedvezőbb eredményeket mutató törzsekkel megismételtam meg a kísérletet, azonban már növelt rosttartalom jelenlétében. A rosttartalmat 5 (m/v) % léptékben, 10 és 30 (m/v)% között növeltem. A növényi rostok hatását emellett vizsgáltam olyan rendszerben is, ahol a PDB táplevest desztillált vízzel váltottam ki. Ezen esetekben az enzimermentáció és rostbontás beállításai, az időtartam és a mintavételezés az előzőekkel azonos módon történt.

4.2.5 Enzimaktivitások mérése

A szubmerz fermentációs rendszerekből vett mintákat 1,5 ml-es Eppendorf csövekben 14000 fordulat/perc sebességen centrifugáltam, majd a folyadék frakciókból mértem a CMCáz, a β -glükózidáz, az endo- β -xilanáz és a pektináz aktivitást.

4.2.5.1 β -glükózidáz aktivitás

A méréshez összeállított reakcióelegyeket a 5. táblázat tartalmazza.

5. táblázat: A β -glükózidáz aktivitás méréséhez szükséges reakcióelegyek

	McIlvaine puffer (pH 7,5) (ml)	Szubsztrátum (0,15 M pNGP*) (ml)	Desztillált víz (ml)	Minta (ml)
Műszervak	0,3	0,7		
Enzimvak	0,3	0,2	0,5	
Szubsztrátvak	0,3	0,5		0,2
Minta	0,3	-	0,5	0,2

*pNGP: p-nitrofenil- β -D-glükopiranozid

Az enzimes reakció 5 percen keresztül 55 °C-on történt. A reakciót 5 ml 0,1 M töménységű Na_2CO_3 oldat hozzáadásával állítottam le. A β -glükózidáz széles szubsztrátspecifitással rendelkezik, ezáltal képes az analitikai célokra használt szintetikus, kromogén szubsztrátkészítménynek, a paranitrofenil- β -D-glükopiranozidnak a hasítására. A reakció során paranitrofenol (PNP) szabadul fel, mely sárgás színt eredményez. A mintákat spektrofotometriásan (UNICAM, Alpha Helios) 405 nm hullámhosszon mértem. Egy enzimaktivitási egység (U) megegyezik 1 μmol felszabadított redukáló cukorral (glükóz) percenként (Attri *et al.* 2014).

Enzimaktivitást az alábbi képlettel számoltam ki:

$$\beta\text{-glükózidáz (U/ml)} = \frac{[A(\text{átl}) - A(\text{ev}) - A(\text{sv})] * h * V(r)}{[V(m) * t * a]}$$

ahol,

- A(átl): a párhuzamos minták abszorbanciájának átlaga,
- A(ev): az enzimvak abszorbanciája,
- A(sv): a szubsztrátvak abszorbanciája,
- h: a hígítás mértéke,
- V(r) A reakcióelegy térfogata (2 ml),
- V(m) A minta térfogata (0,2 ml),
- t: reakcióidő (5 perc),
- a: p-nitrofenil- β -D-glükopiranozid oldat kalibrációs egyenesének meredeksége (0,9815)

4.2.5.2 CMCáz, endo- β -xilanáz és pektináz aktivitás mérése

A CMC-áz aktivitás mérésénél 1,8 ml 1 %-os CMC- oldatot, az endo- β -xilanáz aktivitás mérésénél 1,8 ml 1 %-os bükkfa eredetű xilán tartalmazó oldatot, a pektináz aktivitás mérésénél pedig 1 %-os almapektin oldatot pipettáztam a félkémcsövekbe. Az oldatokat 55 °C-os vízfürdőbe helyeztem és a reakciót 0,2 ml felülúszó hozzáadásával indítottam el. A reakció 10 percen át tartott. Az elegyekhez 4:1 arányban Somogyi I. és II. oldat keverékét pipettáztam, majd azokat 15 percen át forrásban lévő vízfürdőben tartottam. Ezt követően az elegyeket hűtöttem és a kivált pelyhes csapadékot centrifugálással, 14000 fordulat/perc sebességen távolítottam el. A centrifugálás 10 percen át tartott. Az enzimaktivitás mérése a Somogyi-Nelson redukáló cukortartalom mérés szerint történt.

Az enzimaktivitásokat az alábbi egyenlet segítségével számítottam ki:

$$\text{CMCáz/xilanáz/pektináz (U/ml)} = \frac{[A(\text{átl}) - A(\text{ev}) - A(\text{sv})] * h * V(r)}{[V(m) * t * a]}$$

ahol,

- A(átl): a párhuzamos minták abszorbanciájának átlaga
- A(ev): az enzimvak abszorbanciája,
- A(sv): a szubsztrátvak abszorbanciája,
- h: a hígítás mértéke
- V(r) A reakcióelegy térfogata (2 ml)
- V(m) A minta térfogata (0,2 ml)
- t: reakcióidő (10 perc)
- a: hígítási sorra állított kalibrációs egyenes meredeksége
($a_{\text{glükóz}} = 6,7879$; $a_{\text{xilóz}} = 9,0011$; $a_{\text{pektin}} = 7,064$)

4.2.6 Redukáló cukortartalom meghatározása

A mikrobiális rostbontás során felszabadított redukáló cukrok mennyiségi meghatározása Somogyi-Nelson módszerrel történt. A módszer hátterében egy redoxi reakció áll, amely során a Cu(II)-ionok Cu(I)oxidokká redukálódnak, míg a szabad glikozidos hidroxilcsoportok oxidálódnak. A reakciót lúgos közeg és a redukáló cukrok jelenléte katalizálja, eredményként pedig téglavörös csapadék keletkezik. Az elegyben található Cu(I)oxidot a továbbiakban az arzenomolibdenát oxidálja, ezáltal stabil, kék színű komplex jön létre. Ezta színváltozás spektrofotometriásan, 540 nm hullámhosszon mérhető (Somogyi, 1951, 1945, Nelson, 1944).

A méréshez adott redukáló cukorra kalibráció felállítása szükséges. A méréseimhez a glükóz 0,5 (m/V)%-os törzsoldatát használtam. A 10 tagú hígítási sor elkészítéséhez a törzsoldatot 100-szorosára hígítottam. Az oldatokban 0 ml-től 2 ml-ig 0,2 ml-es léptékben növeltem a hígított törzsoldat mennyiségét. Az oldatok térfogatát 2 ml-re desztillált vízzel egészítettem ki. Ezután az oldatokhoz 2 ml Somogyi I. és II. oldatot adtam 4:1 arányban, majd azokat 15 percre 100 °C-os vízfürdőbe helyeztem. A hűtés után az elegyekhez további 2 ml Nelson-reagenst és 4 ml desztillált vizet pipettáztam. A reakció során CO₂ keletkezik és a felszabaduló buborékok fénytörése mérési hibához vezet. A buborékokat ultrahangos kezeléssel vagy pasztőr pipetta segítségével óvatosan távolítottam el. A kalibráló oldatok abszorbanciája spektrofotometriásan 540 nm-en mérhető.

A minták ismeretlen redukáló cukortartalmának számításához az alábbi egyenlet alkalmazható:

$$\text{Redukáló cukortartalom (g/L)} = (A/a) \cdot h \cdot c/1000$$

ahol,

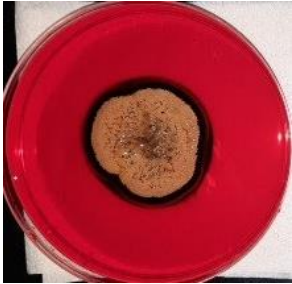
- A: a minta abszorbanciája
- a: glükózra állított kalibrációs egyenes meredeksége (a=1,6155)
- h: a hígítás mértéke
- c: a glükóz törzsoldat koncentrációja

5 EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK

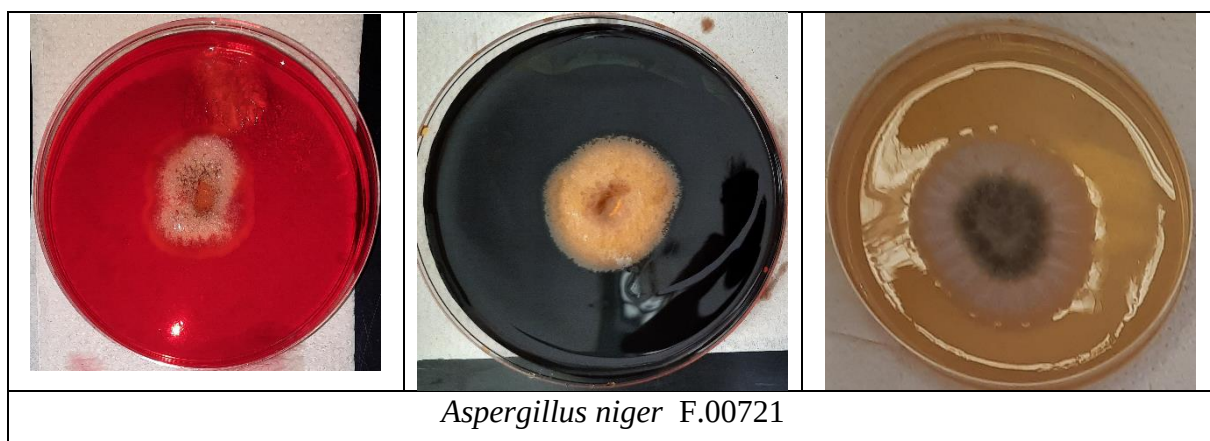
5.1 A törzsek gyors screenelése

Elsőként a fonalgomba törzsek enzimaktivitásait és azok erősségét teszteltem egyedüli szénforrásként karboximetil-cellulózt (CMC), bükkfa eredetű xilánt és almapektint tartalmazó agarlemezeken 28 °C-on.

A screenelés eredményeit 96 órát követően az alábbi 8. ábra szemlélteti.

CMCáz aktivitás	Xilanáz aktivitás	Pektináz aktivitás
		
<i>Aspergillus awamori</i> F.00030		
		
<i>Aspergillus niger</i> F.00632		
		
<i>Aspergillus niger</i> F.00714		

		
<i>Aspergillus awamori</i> F.00720		
		
<i>Aspergillus niger</i> F.00735		
		
<i>Aspergillus brasiliensis</i> F.00892		
		
<i>Aspergillus niger</i> IMI 303386		



8. ábra: Növényi rostbontásban szerepet játszó enzimek kimutatása a kísérleti körülmények között (8 fonalagomba törzs esetén)

Az agarlemezeken a fonalagombák telepnövekedése és az azok körül megjelenő feltisztulási zóna a szubsztrátum hasznosítására és az enzim szintézisére utalt. Az *Aspergillus* törzsek hidrolitikus aktivitást mutattak a szelekciós agarlemezeken.

A törzseket rangsorolása során 3 törzset emeltem ki: *Aspergillus niger* F.00632, *Aspergillus brasiliensis* F.00892, *Aspergillus awamori* F.00030, amelyekkel a továbbiakban a szubmerz, rázatott enzimfermentáció hatékonyságát növényi rosttartalom jelenlétében követtem nyomon.

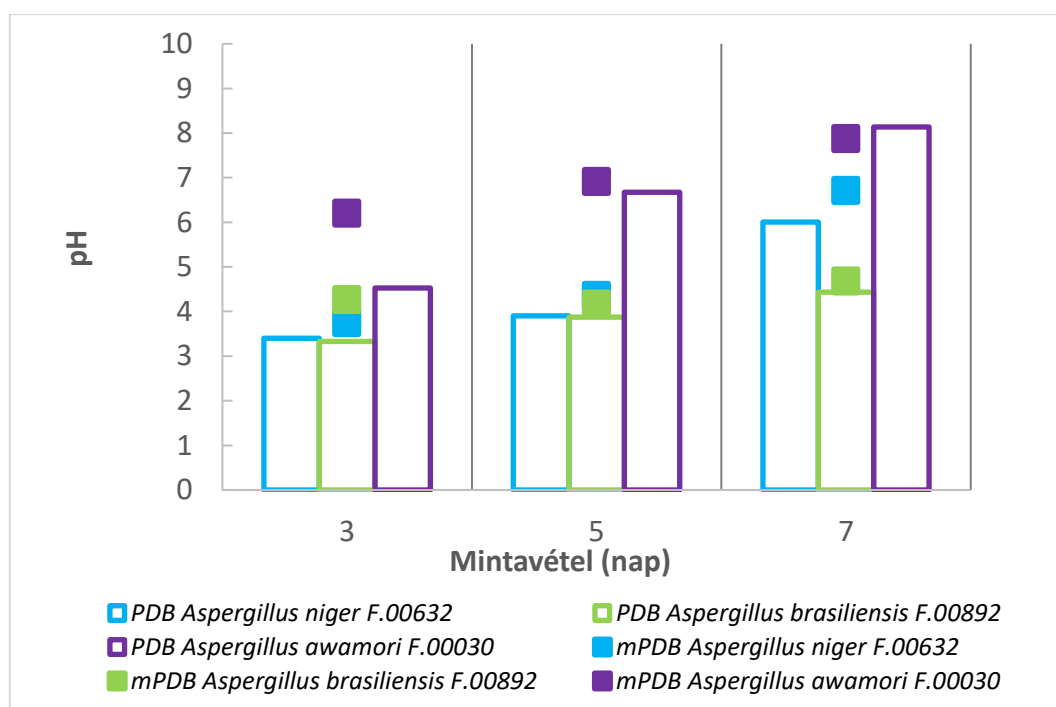
5.2 Előszelektált *Aspergillus* törzsek teljesítménye szubmerz rendszerben

5.2.1 Beoltási technikák hatása a törzsek aktivitásprofiljára

A kísérlet során célom volt, hogy megismerjem a szelektált *Aspergillus* törzsek tenyésztési módjának hatását az enzimtermelésre és a növényi rostok bontására vonatkozóan. A tenyésztést az alaptáplevesben (PDB, pH 7) és a 3 (m/v) %-ban gyümölcs és zöldség rostállományt tartalmazó, módosított alaptáplevesben (továbbiakban mPDB, pH 7) indítottam el 28 °C-on, 180 rpm rázatási sebességen. Mind a két esetben a törzsek pelletes tenyészetét 10 (m/v)%-ban növényi rostokat tartalmazó szubmerz fermentációs rendszerekbe (pH 7) oltottam le.

A szubmerz rendszerekben a termelt szerves savak jelenléte miatt savasodást tapasztaltam a fermentáció elején (a 3. napon). Ezt követően az *A. awamori* F.00030 törzsnél a kémhatás gyorsabb, míg az *A. brasiliensis* F.00892 törzsnél és az *A. niger* F.00632 törzsnél

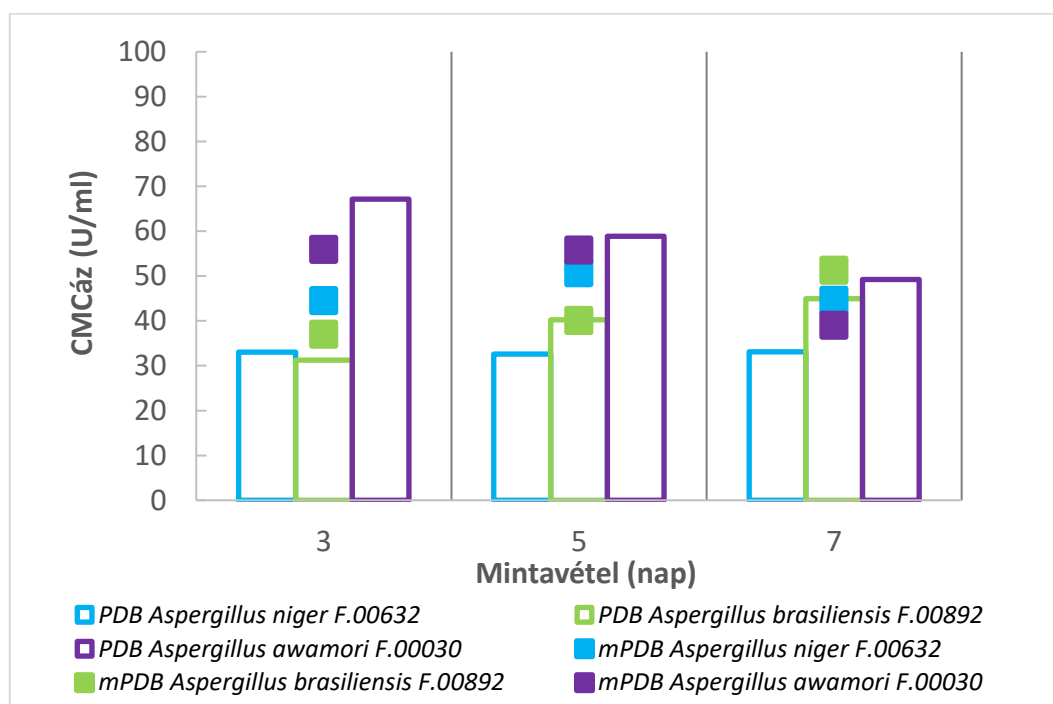
pedig lassabb növekedést mutatott. A kémhatás időbeni és a fajok közötti eltérése a szerves savak termelésének és azok hasznosítási dinamikájában keresendő. A fermentáció végén (7. napon) a kémhatást az *A. brasiliensis* F.00892 törzs esetén enyhén savas tartomány (pH 4,4-4,7), az *A. niger* F.00632 törzs esetén semleges tartomány (pH 6-6,7), az *A. awamori* F.00030 törzs esetén pedig enyhén lúgos tartomány (pH 7,9-8,1) jellemezte. A két különböző táplevesben tenyésztett gomba kultúrák lényegesen nem gyakoroltak hatást a fermentációs rendszerek kémhatásának alakulására (9. ábra).



9. ábra. A beoltási technika hatása a szubmerz, rázatott rendszerek kémhatásának alakulására

A rendszer kémhatása, a törzsek morfológiai tulajdonságai és az enzimtermelés között összefüggést tapasztaltam. Az alaptáplevesben előtenyésztett *A. awamori* F.00030 törzset kisebb pelleték jellemezték és a kezdeti savasabb környezetben a 3. napon 70 U/ml egységet közelített a CMCáz aktivitás. A rendszer lúgos tartományba történő eltolódása az aktivitás csökkenését eredményezte. A másik két törzs esetében nagyobb pelleték jelentek meg. Esetükben a kémhatás lassabb növekedése a CMCáz aktivitás kisebb léptékű növekedését okozta. A CMCáz aktivitás az *A. brasiliensis* F.00892 törzsnél 45 U/ml körüli értéket, az *A. niger* F.00632 törzsnél 30 U/ml körüli értéket mutatott a 7. napon. A módosított alaptáplevesben tenyésztett kultúrák esetén kisebb aktivitás eltérések mutatkoztak. A növényi rostok jelenléte láthatóan az *A. niger* F.00632 törzsnek jobban kedvezett, az 5. napon 20 U/ml

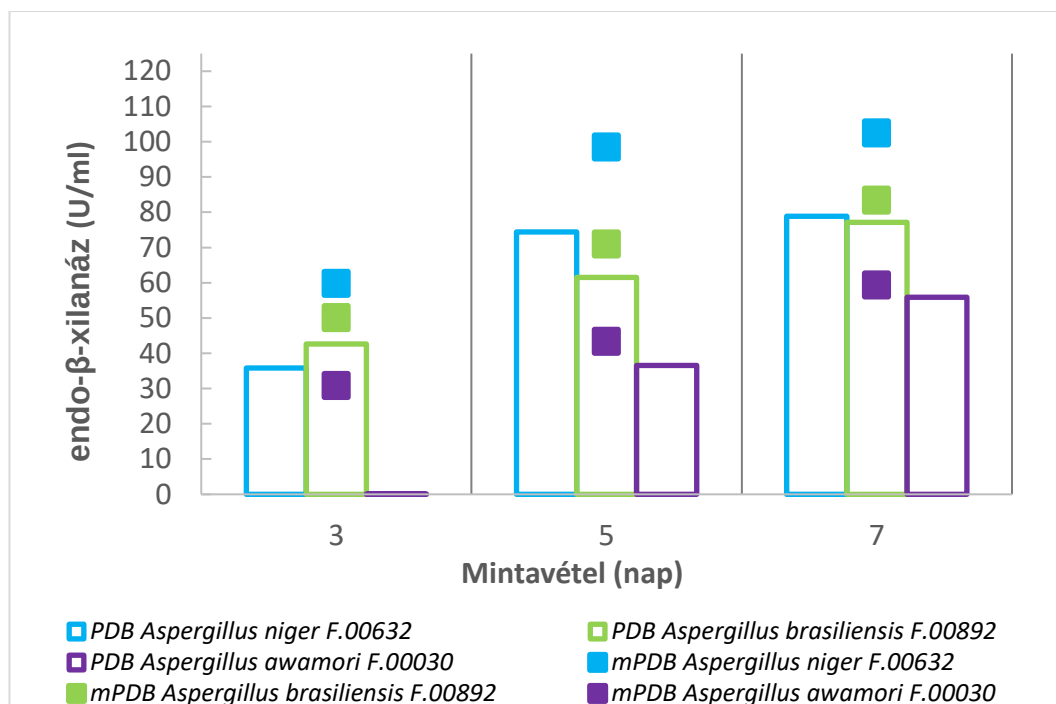
egységgel nagyobb CMCáz aktivitást mértem. Ez a növekedés azonban az *A. awamori* F.00030 törzs teljesítményét továbbra sem érte el (10. ábra). Cavka és Munkatárai (2014) rostiszapon indított etanolfermentációt követtek nyomon, ahol a szimultán cukrosítás és erjesztés (SSF) során *Aspergillus niger* eredetű hidrolitikus enzimeket és etanologén *Saccharomyces cerevisiae* élesztőt használtak. A fermentációs rendszer rostiszapban előtenyésztett *A. niger* kultúrával történő leoltása lényegesen növelte a CMCáz aktivitást.



10. ábra. A beoltási technika hatása a szubmerz, rázatott rendszerek CMCáz aktivitására

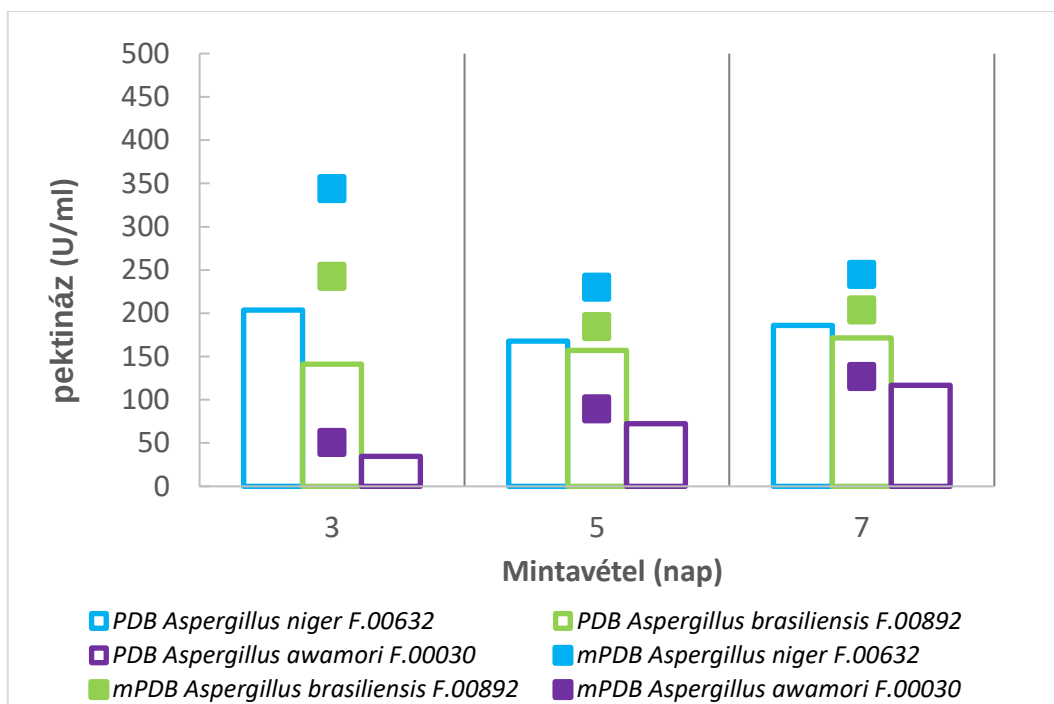
A β -glükoszidáz aktivitás az *Aspergillus* törzseknél igen alacsony értékeket mutatott a szubmerz kezelés során. Az értékek 0,1 és 0,5 U/ml között alakultak.

Az endo- β -xilanáz szintézise során mind a három törzsnél és mind a kétféle beoltási technika esetén időbeni növekedést tapasztaltam. Az alaptáplevesben tenyésztett kultúrák beoltását követően a fermentációs közegben nagyobb aktivitást az *A. niger* F.00632 törzs mutatott, amelyet az *A. brasiliensis* F.00892 törzs és az *A. awamori* F.00030 törzs követett. Az *A. niger* F.00632 és az *A. brasiliensis* F.00892 törzs esetén az endo- β -xilanáz aktivitás a 7. napon 77-79 U/ml értéken tetőzött. Az előindukált kultúrák beoltását követően már a 3. napon lényegesebb aktivitásnövekedés jellemezte a szubmerz rendszereket. Az *A. niger* F.00632 törzsnél a fermentáció elején mért 60 U/ml érték a fermentáció végére 102 U/ml értékre nőtt (11. ábra).



11. ábra. A beoltási technika hatása a szubmerz, rázatott rendszerek endo- β -xilanáz aktivitására

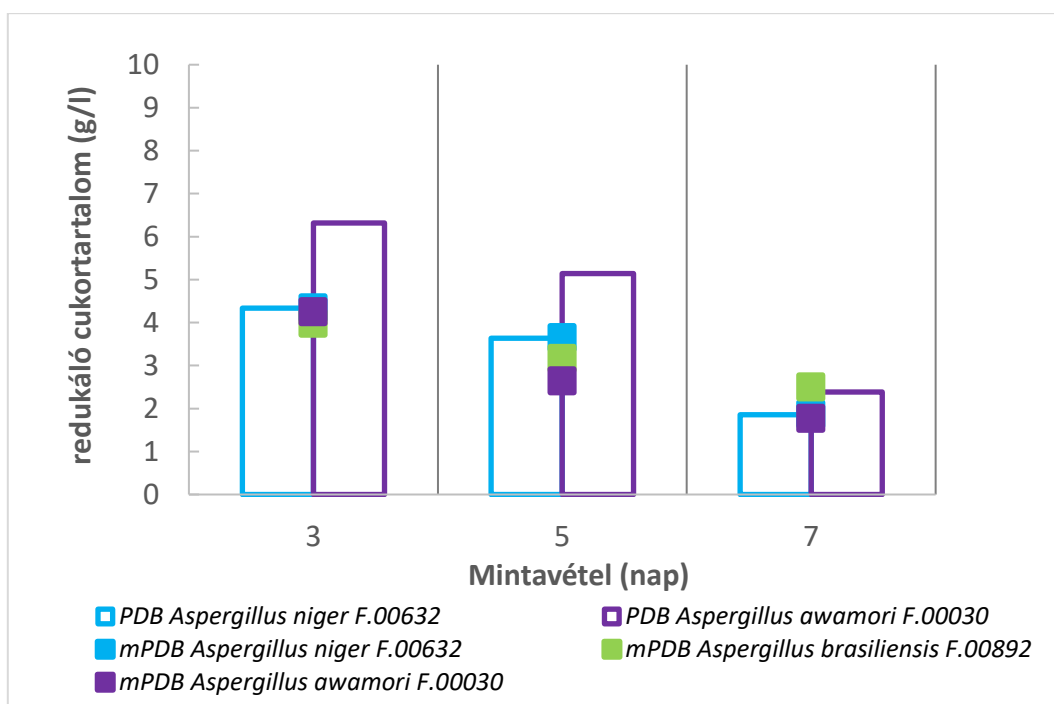
A pektináz aktivitás mind a három törzs esetén igen eltérő profilt mutatott a fermentáció időtartama alatt. Az alaptáplevesben tenyésztett *A. niger* F.00632 törzs alkalmazása során a 3. és a 7. nap között 170 és 200 U/ml egység között ingadozott a pektináz aktivitás. Az *A. brasiliensis* F.00892 és az *A. awamori* F.00030 törzsnél az aktivitás nőtt. Az *A. brasiliensis* F.00892 törzsnél 140 U/ml értékről 171 U/ml értékre, az *A. awamori* F.00030 törzsnél pedig 40 U/ml értékről 120 U/ml értékre nőtt. A módosított inokulumban történő előtenyésztésnek jelentősebb hatása nem volt az *A. awamori* F.00030 törzs enzimtermelésére. Ezzel szemben a másik két törzs enzimaktivitásának nagyságán is jól látható, hogy az előindukált inokulum milyen mértékben járult hozzá a fokozottabb enzimtermeléshez. Az *A. niger* F.00632 törzsnél a pektináz aktivitás 245 U/ml, az *A. brasiliensis* F.00892 törzsnél 204 U/ml értéket ért el (12. ábra). Sohail és munkatársai (2009) környezeti mintából izolált *Aspergillus* törzsek esetén szintén igen magas pektináz aktivitást mutattak ki.



12. ábra. Beoltási technika hatása a gomba törzsek pektináz aktivitására (U/ml)

5.2.2 A mikrobiális rostbontás hatékonysága

A törzsek teljesítményét az aktivitásprofilok és az oldatba vitt redukáló cukortartalom szerint értékeltem. A mikrobiális rostbontás során a redukáló cukortartalom alakulását az alábbi 13. ábra szemlélteti.

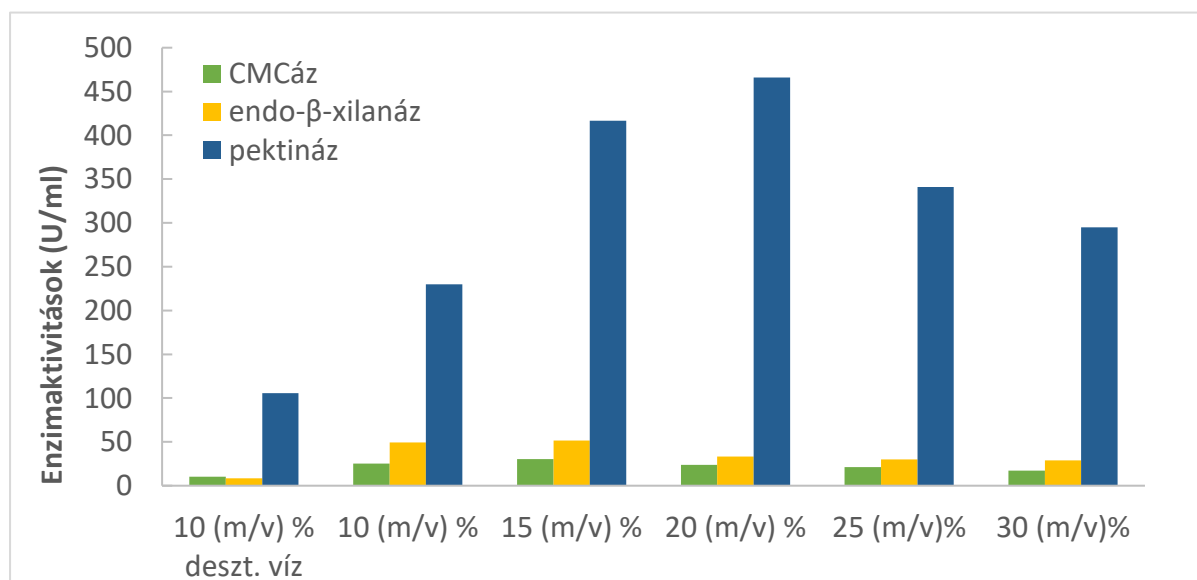


13. ábra. A redukáló cukortartalom alakulása (g/l)

Az oldatba vitt cukortartalom alakulására nem csupán a törzsek enzimtermelésének hatékonysága és a beoltási technika fejtett ki hatást, hanem az anyagcserefolyamataik fenntartásához szükséges energia fedezése is, amit az egyszerű cukrok (elsősorban glükóz) hasznosítása tett ki. A szubmerz rendszerekben jellemzően a 72. óráig nőtt a redukáló cukrok mennyisége, amelyet követően lényeges csökkenésnek indult. A nem előindukált *A. awamori* F.00030 törzsnél, ahol a CMCáz aktivitás is jóval magasabb értéket ért el a többi törzshöz képest, a cukortartalom meghaladta a 6 g/l értéket. A rostok szemmel láthatóan aprózódtak, sőt a 72. órában szinte csak a pelleték jellemezték a szubmerz rendszert. Ezzel szemben, az előindukált oltókultúrák esetén az oldott cukortartalom mind a három esetben kisebbnek bizonyult, aminek az oka abban keresendő, hogy a már rendelkezésre álló enzimek a rostok bontását egyből megkezdték, ezáltal az oldatba vitt cukrok fokozatos hasznosítására került sor. Az előindukált tenyészetek alkalmazása tehát enzimfermentáció esetén előnyösnek tekinthető, azonban az erjeszthető cukrok kinyerése szempontjából a kezelés időtartama során nagyobb cukorvesztést eredményezhet.

5.3 A növelt rosttartomány hatása az *Aspergillus niger* F.00632 enzimtermelésére

Az eddigi eredmények arra mutattak rá, hogy a növényi rostok jelenlétében (3 m/v %, mPDB) tenyésztett törzsek közül az *A. niger* F.00632 törzs mutatott kedvezőbb aktivitásprofil.



14. ábra. *Aspergillus niger* F.00632 enzim aktivitása különböző rosttartalom mellett

Az enzimtermelés és az oldatba vitt erjeszthető cukrok mennyiségének növelése érdekében a továbbiakban a fermentációs közegek rosttartalmának hatását 10-30 (m/v) %

között követtem nyomon. A kísérlet során az 5. napon értem el nagyobb aktivitás értékeket, amelyeket az 14. ábra szemléltet. A kontrollként az oltókultúrát növényi rostokat és vizet tartalmazó szubmerz rendszerbe oltottam le. Arra kerestem a választ, hogy az alaptápleves a rostok mellől elhanyagolható-e, ami a termelési folyamatok költségeinek csökkentését segítené. Láthatóan a burgonyakivonat és a glükóz jelenléte igen fontos szerepet tölt be, azt aktivitásokat többszörösré növelte.

A rosttartalom növelése a pektináz aktivitására fejtett ki számottevő hatást, míg a CMCáz és az endo- β -xilanáz aktivitás nem tapasztaltam nagyobb növekedést. Az enzintermelésnek a 10-20 (m/v) % rosttartalom kedvezett, azonban efelett a törzs teljesítménye csökkent. A CMCáz és az endo- β -xilanáz esetén a 15 (m/v) % rosttartalmú közegben 30,4 U/ml és 51,7 U/ml értéket mértem. A pektináz számára ennél kedvezőbb rosttartalom a 20 (m/v) % volt, ahol 466 U/ml értéket mértem. A β -glükozidáz aktivitás továbbra is igen elhanyagolható volt.

6 ÖSSZEFOGLALÁS

A cellulózban gazdag növényi biomasszára egyre értékesebb anyagként tekinthetünk egy olyan világban, ahol az energiaszegénység és a szerves hulladékok mennyisége jelentős kihívást okoz. A mezőgazdasági és élelmiszeripari termelési folyamatok során nagy mennyiségben keletkeznek növényi maradványok, ezért gazdaságos megoldás lehet a üzemanyag célú hasznosításuk, és ezzel a fosszilis üzemanyagok részbeni kiváltása. A hasznosításuknál a komplex szerkezet megbontása nélkülözhetetlen, amire ma már több módszer is létezik. Ezek közül az egyik a biológiai előkezelés, ami nem jár vegyszerhasználattal, viszont még nem tart ott a technológia, hogy gazdaságosan, nagy termelési hatékonysággal (erjeszthető cukorhozam szempontjából) lehessen alkalmazni. Hazai és nemzetközi szinten is folynak az ezen irányú kutatások, ahol többek között természeti mintákból izolált mikroorganizmusok enzimtermelését, rostbontási hatékonyságát növényi biomassza típusonként, vagy azok keverékében monitorozzák.

A kutatómunkám során arra kerestem a választ, hogy az *Aspergillus brasiliensis*, az *Aspergillus niger*, az *Aspergillus awamori* fajokhoz tartozó, összesen 8 fonalgomba törzs milyen lignocellulóz-bontó tulajdonsággal rendelkezik növényi rostállományon, különböző fermentációs technikák alkalmazása esetén.

Első kísérletsorozatban screeneléssel megfigyeltem, hogy az agarlemezeken kinőtt gombatelepek nagysága és az azok körül megjelent feltisztulási zónák kiterjedése alapján mely törzsek tudják nagyobb mértékben hasznosítani a rendelkezésükre álló, egyedüli szénforrásokat, mint a karboximetil-cellulózt (CMC), az almapektint és nyírfaxilánt, valamint mutatnak lignocellulóz-bontó enzimaktivitást. A törzsek rangsorolása során az *Aspergillus niger* F.00632, az *Aspergillus brasiliensis* F.00892 és az *Aspergillus awamori* F.00030 törzs bizonyosult jobbnak 28 °C-on, 96 órát követően.

A következő kísérlet kitűzött célja volt megállapítani, hogy a kiválasztott törzsek milyen biodegradációs tulajdonsággal rendelkeznek és milyen extracelluláris enzimaktivitásokat mutatnak (endo- β -glükánáz, β -glükózidáz, xilánáz, pektináz) normál és előindukált szubmerz rendszerekben. A normál rendszerekben a törzsek tenyésztése PDB táplevesben, míg az előindukált rendszerekben pedig 3 % (m/v)-ban növényi rostokat tartalmazó módosított PDB táplevesben (mPDB) történt. A beoltási technikáknál törzsenként 10 % (m/v) tenyészetet oltottam le 10 % (m/v) növényi rostot tartalmazó mPDB fermentációs rendszerekbe. A kísérlet

rávilágított arra, hogy a fermentlé kémhatása, a törzsek morfológiai tulajdonságai és az enzimtermelés között összefüggés található. Az *A. awamori* F.00030 törzset kisebb pelleték jellemezték és a rendszer lúgos tartományba történő változása az aktivitás csökkenését okozta. A másik két törzs nagyobb pelleték volt a jellemző és a kémhatás lassabb növekedése a CMCáz aktivitás kisebb léptékű növekedését váltotta ki. A másik észrevétel az, hogy az előindukálás kifejezetten előnyösnek bizonyul enzimfermentáció terén, viszont a már rendelkezésre álló enzimek azonnali rostbontást eredményeztek, ami az erjeszthető cukrok kinyerése szempontjából hátrányosnak bizonyul.

A törzsek közül az *Aspergillus niger* F.00632 törzs rendelkezik a kedvezőbb aktivitásprofillal. A legmagasabb mért értékek előindukált tenyészetnél jelentek meg. Az endo- β -glükánáznál (CMCáz) az 5. napon volt 50,7 U/ml az endo- β -xilanáz a 7. napon 102,3 U/ml, a pektináznál pedig 244,5 U/ml.

Érdemes megemlíteni, hogy az enzimaktivitási eredmények ellenére az *Aspergillus awamori* F.00030 törzs rendelkezett nagyobb erjeszthető cukor hozammal. A mikrobiális kezelés 3. napján a mért redukáló cukortartalom 6,3 g/l volt.

Az enzimaktivitás és cukorkihozatal növelése érdekében a következő kísérletsorozat az optimális rosttartalom vizsgálatára irányult. Itt két különböző arány is jónak számított attól függően, hogy melyik enzim termelése a célunk. A CMCáz és az endo- β -xilanáz esetén a 15 % (m/v) rosttartalmú szubmerz rendszer eredményezett nagyobb enzimaktivitást, ami 51,7 U/ml és 30,4 U/ml volt. A pektináznál a 20 % (m/v) rosttartalmú szubmerz rendszer mutatott nagyobb értéket, a mért aktivitás 466 U/ml volt.

Az ezidáig publikált hazai és nemzetközi kutatások (nemzetség és faj szintjén) is megerősítik a kísérleti munka eredményeit, miszerint a szelektált *Aspergillus* törzsek nagy potenciált mutatnak a lignocellulóz-bontó enzimek termelésében és a növényi rostok (növényi biomassza) bontásában. Az előindukált tenyészetek alkalmazásával hatásosabb enzimtermelés érhető el, azonban az erjeszthető cukorhozam szempontjából ez nem minden esetben jelent kedvező hatást. A biológia rendszerek használata során kihívást okoz a kezelés időtartamának optimalizálása. A továbbiakban javaslom az *Aspergillus niger* F.00632 törzs enzimtermelésének és biodegradációs teljesítményének további kutatását más összetételű lignocellulóz biomasszán, esetleg lignocellulóz biomassza keverékeken, valamint a rostbontás időtartamának monitorozását.

7 IRODALOMJEGYZÉK

1. Horowitz B. (1918). What are enzymes? The scientific monthly, Vol. 6, No. 3. Pages 253-259
2. Mohnen D. (2008): Pectin structure and biosynthesis, current opinion in plant biology, Volume 11, Issue 3 Pages 266-277, ISSN 1369-5266, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.03.006>.
3. Réczey Istvánné Csorba K. (2012): Lignocellulózok biofinomítása és konverziója második generációs üzemanyagalkohollá [MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS]
4. Megyeri G. (2019): Lignocellulóz hidrolízise és továbbhasznosítása ionos folyadékban Enzimek segítségével 12., DOI: 10.118136/PE.2019731
5. Campioni T. S. (2018): Development of bioprocess for fibrolytic fungal enzymes production from lignocellulosic residues and its application on kraft pulp biobleaching and xylooligosaccharides production OAI: [repositorio.unesp.br:11449/180469](http://repositorio.unesp.br/11449/180469) Online Access: <http://hdl.handle.net/11449/180469>
6. Tousek S. H., Kyung-Tai L., Jin-Sung L., Keun-Sung K. (2017): Functional applications of lignocellulolytic enzymes in the fruit and vegetable processing industries 585-585 DOI: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13636>
7. M, Rezić T, Marđetko N, Kracher D, Ludwig R, Šantek B. (2018). Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. DOI: 10.1002/elsc.201800039. PMID: 32624871; PMCID: PMC6999254.
8. Hao F., Chen Z., Shaolin C. (2016). Single cell oil production by *Mortierella isabellina* from steam exploded corn stover degraded by three-stage enzymatic hydrolysis in the context of on-site enzyme production, Bioresource Technology, Volume 216, Pages 988-995, ISSN 0960-8524, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.051>.
9. Kolasa M., Ahring B.K., Lübeck P.S., Lübeck M. (2014). Co-cultivation of *Trichoderma reesei* RutC30 with three black *Aspergillus* strains facilitates efficient hydrolysis of pretreated wheat straw and shows promises for on-site enzyme production. Bioresour Technol. 2014 Oct;169:143-148. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.06.082. PMID: 25043347.
10. Lin, Y., Tanaka, S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: Current state and prospects. Applied Microbiology Biotechnology Volume 69, 627–642. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253005-0229-x>
11. Agbor V. B., Nazim C., Sparling R., Berlin A., Levin D. B. (2011). Biomass pretreatment: Fundamentals toward application, biotechnology advances, Volume 29, Issue 6, Pages 675-685, ISSN 0734-9750, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.005>
12. Sohail M., Naseeb S., Sherwani S., Sultana S., Aftab S., Shahzad S., Khan S. (2009). Distribution of hydrolytic enzymes among native fungi: *Aspergillus* the pre-dominant genus of hydrolase producer. Pakistan Journal of Botany. 41. 2567-2582.

13. Goldman, G.H., & Osmani, S.A. (Eds.). (2007). The *Aspergilli*: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods (1st ed.). CRC Press. DOI: <https://doi.org/10.1201/9781420008517>
14. Gong, Z.; Zhang, S.; Liu, J. (2023). Recent advances in chitin biosynthesis associated with the morphology and secondary metabolite synthesis of filamentous fungi in submerged fermentation. *Journal of fungi*, 9, 205. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof9020205>
15. Attri, S., Garg, G. (2014). Isolation of microorganisms simultaneously producing xylanase, pectinase and cellulase enzymes using cost effective substrates. *Journal of Innovative Biology*. 1. DOI: 045-050.
18. Nelson, N. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *The journal of biological chemistry*, 153, 375-380.
19. Somogyi M. (1951) Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry* 195:19–23.
20. Somogyi, M. (1945). A new reagent for the determination of sugars. *Journal of Biological Chemistry*, 160(1), 61–68. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)43097-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)43097-9)
21. Miller LG (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analitical Chemistry* 31:426-428
22. Dey, P., Rangarajan, V., Singh, J. (2022). Current perspective on improved fermentative production and purification of fungal cellulases for successful biorefinery applications: a brief review. *Biomass Conversion. Biorefinery*. 12, 967–995 (2022). DOI: <https://doi.org/10.1007/s13399-020-01227-6>
23. Internet 1.: File: [Plant cell wall diagram-en.svg](#) - Wikipedia
24. Samir A., Ashour F., Hakim A., Bassyouni M. (2022). Recent advances in biodegradable polymers for sustainable applications. *Materials Degradation*. 6. 10.1038/s41529-022-00277-7.
25. Alriksson B, Rose SH, van Zyl WH, Sjöde A, Nilvebrant N, Jönsson LJ (2009). Cellulase production from spent lignocellulose hydrolysates by recombinant *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology* 75. <https://doi.org/10.1128/AEM-02479-08>
26. Ruiz-Dueñas FJ, Morales M, García E, Miki Y, Martínez MJ, Martínez AT. (2008) Substrate oxidation sites in versatile peroxidase and other basidiomycete peroxidases. *J Exp Bot*. 2009;60(2):441-52. DOI: 10.1093/jxb/ern261. PMID: 18987391.
27. G.P. Nogueira, R.S. Capaz, T.T. Franco, M.O.S. Dias, C.K.N. Cavaliero (2022). Enzymes as an environmental bottleneck in cellulosic ethanol production: Does on-site production solve it? *Journal of Cleaner Production*, Volume 369, 133314, ISSN 0959-6526, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.133314>.
28. Pécs Miklós (2023). *Biatermék technológia BME VBK*

NYILATKOZAT

a záródolgozat/szakdolgozat/diplomadolgozat/portfólió¹ nyilvános hozzáféréseiről és eredetiségéről

A hallgató neve: Sárkány Richárd
A Hallgató Neptun kódja: A9OTLR
A dolgozat címe: *Aspergillus* törzsek „on-site” enzimtermelése növényi rostmaradványokon
A megjelenés éve: 2024
A konzulens intézetének neve: Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet
A konzulens tanszékének a neve: Biomérnöki és Erjedéssipari Technológia Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott záródolgozat/szakdolgozat/diplomadolgozat/portfólió² egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, és az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

Ha a fenti nyilatkozattal valótlan állítottam, tudomásul veszem, hogy a záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkori szellemi tulajdon-kezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem könyvtári repozitori rendszerébe. Tudomásul veszem, hogy a megvédett és

- nem titkosított dolgozat a védelmet követően
- titkosításra engedélyezett dolgozat a benyújtásától számított 5 év eltelté után nyilvánosan elérhető és kereshető lesz az Egyetem könyvtári repozitori rendszerében.

Kelt: 2024 év 04 hó 10 nap

Sárkány Richárd

Hallgató aláírása

¹ A megfelelő dolgozattípus meghagyása mellett a többi típus törlendő.

NYILATKOZAT

Sárkány Richárd (hallgató Neptun azonosítója: A9OTLR) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a szakdolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A szakdolgozatot a záróvizsgán történő védeésre javaslom / nem javaslom.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem

Kelt: Budapest, 2024. április 16.



belső konzulens