

PhD értekezés tézisei

**XILANÁZ ENZIMEK ELŐÁLLÍTÁSA  
SZILÁRD FÁZISÚ FERMENTÁCIÓVAL ÉS  
PAPÍRIPARI HASZNOSÍTÁSUK**

KÉSZÍTETTE

**SZENDEFY JUDIT**

TÉMAVEZETŐ

**DR. SZAKÁCS GYÖRGY**

KONZULENS

**PROF. LEW CHRISTOPHER**

BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM

MEZŐGAZDASÁGI KÉMIAI TECHNOLÓGIA TANSZÉK

BUDAPEST, 2005

## **1. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK**

A nyers cellulóz hagyományos fehéritése során klórt használnak, mely a ligninnel kimosható klór-lignint, a lignin lebomlási termékekkel pedig klór-fenolokat képez. A nagy környezeti terhelést jelentő klórozott vegyületek - köztük dioxinok is - megjelennek a fehérités szennyvizében, valamint a szennyvíziszapban, ezért szükségessé vált a klórt teljesen vagy részben kiváltó környezetbarát fehéritési eljárás(ok) bevezetése. A xilanázos előkezeléssel kiegészített kémiai fehérités (biofehérités) jelenleg az egyetlen ipari méretben is használt biotechnológiai megoldás a nyers cellulóz fehéritésére. A papíripari gyakorlatban cellulázmentes, vagy cellulázban szegény xilanáz készítményekre van szükség, mivel a xilanáz mellett jelenlevő celluláz a biofehérités során ronthatja a papír szilárdságtani tulajdonságait.

A biofehéritéshez használt kereskedelmi enzimeket sülyesztett fermentációval (Submerged Fermentation, SF) állítják elő, melyet a felhasználás előtt a nyert enzim elválasztása, sok esetben tisztítása követ. A szilárd fázisú fermentáció (Solid State Fermentation, SSF) sok enzim előállításának és alkalmazásának, az SF-nél gazdaságosabb lehetőségét nyújtja.

Doktori munkám elsődleges célkitűzése nyers cellulóz biofehéritésére felhasználható, SSF-ben termelt xilanáz enzimmészítmények előállítása volt, minimális celluláz kísérőenzim

tartalommal. Vizsgáltam az enzimekben gazdag, tisztítatlan fermentumok közvetlen alkalmazhatóságát biofehérítésre, mely lehetőséget nyújt az enzimes kezelés költségének jelentős csökkentésére. A kutatásokat a Dél-Afrikai Cellulóz- és Papíripari Vállalat (SAPPI) Biotechnológia Laboratóriumával együttműködve végeztük.

## **2. KÍSÉRLETI MÓDSZEREK**

### **2.1 Szilárd fázisú fermentáció**

Fonalgombákat 500 ml-es Erlenmeyer lombikban tenyésztettünk, ugyanazon az eukaliptusz, illetve bagasz (cukornád extrahálási maradék) nyers cellulóz szubsztráton, melyen a biofehérítést is végeztük. Ezzel szubsztrátspecifikus enzimkomplex indukálódását, illetve a nyert fermentum közvetlen alkalmazhatóságát kívántuk biztosítani.

### **2.2 Statisztikai kísérlettervek**

A xilanáz termelés optimalizálásához kétszintes részfaktortervet és válaszfelület módszert használtunk. A kísérlettervek felépítéséhez és elemzéséhez a Statistica for Windows 2000 (StatSoft, Inc.) programot használtuk.

### **2.3 Biofehérítés**

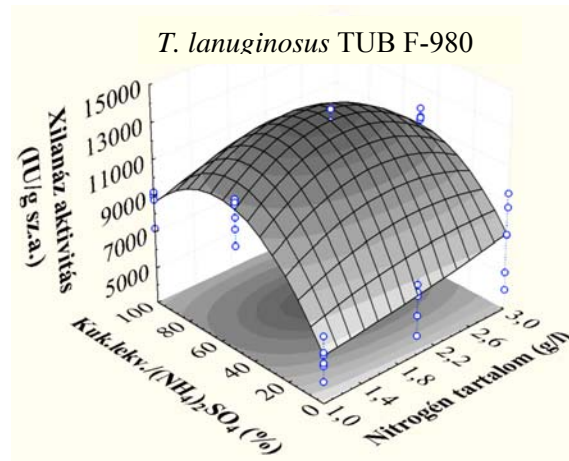
A kémiai fehérítést megelőző xilanázos kezelést a nyers fermentumokkal különböző SSF anyag/cellulóz tömegarányban (1/50-1/400), a kereskedelmi enzimekkel 5 IU/g adagolással végeztük. A kezelt nyers cellulóz minták fehérségét a 457 nm hullámhosszú fény irányított reflexiója alapján mértük.

### 3. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

A PhD dolgozatomban bemutatott munka új eredményei a következő tézispontokban foglalhatók össze:

- [1] Kimutattam, hogy *Thermomyces lanuginosus* és *Aspergillus oryzae* törzseket eukaliptusz, illetve bagasz nyers cellulózon, szilárd fázisú fermentációban tenyésztve, a nyert fermentumok a termelt xilanázok elválasztása és tisztítása nélkül, közvetlenül alkalmazhatók a fermentáció szubsztrátjával azonos nyers cellulóz biofehérítésére. A legeredményesebb törzsek fermentumaival a kereskedelmi (SF) enzimekkel azonos biofehérítési eredményeket lehet elérni.
  
- [2] Megállapítottam, hogy a két vizsgált szubsztráton (eukaliptusz és bagasz cellulóz) a *T. lanuginosus* törzsek átlagosan több xilanázt termelnek, mint az *A. oryzae* törzsek, azonban az *A. oryzae* xilanázok eredményesebben működnek a biofehérítés során.
  
- [3] A leghatékonyabb izolátumok (*T. lanuginosus* TUB F-980, *A. oryzae* NRRL 3485 és *A. oryzae* NRRL 1808) xilanáz termelését SSF-ben optimalizálva megállapítottam, hogy a nitrogénadagolás mind eukaliptusz, mind bagasz cellulóz esetén elengedhetetlen a nagy mennyiségű xilanáz termeléshez.

Szerves és szervetlen nitrogénforrások (kálium-nitrát, ammónium-nitrát és ammónium-szulfát, illetve kukoricaekvár és szójaliszt) hatását a xilanáz termelésre egymástól függetlenül, és részfaktortervvel egymás mellett vizsgálva megállapítottam, hogy a nitrogénforrások egymás hatását befolyásolják. Válaszfelület módszerrel optimalizálva a xilanáz termelést igazoltam, hogy két nitrogénforrás megfelelő arányú adagolásával - a fellépő kölcsönhatások következtében - lényegesen magasabb xilanáz termelés érhető el, mintha csak egy nitrogénforrás mennyiségét növelnénk.



[4] Kimutattam, hogy két adagolt nitrogénforrás mennyiségét és arányát változtatva, az SSF során kialakuló pH érték szabályozható, így az optimalizált nitrogénforrás egyben az enzim termelés számára kedvező pH érték kialakításán keresztül is növelheti a xilanáz hozamot.

Az SSF egyik hátránya a süllyesztett fermentációval szemben, hogy a fermentoros pH szabályozás nem megoldott, ezért különös jelentősége van, hogy a nitrogénforrások minőségi és mennyiségi változtatásával befolyásolható a tenyésztés pH értéke.

[5] Az *A. oryzae* NRRL 1808-as törzs xilanázzal párhuzamosan termelődő, az eredményes biofehérítésben feltehetően szerepet játszó  $\beta$ -xilozidáz,  $\alpha$ -arabinofuranozidáz és  $\alpha$ -galaktozidáz termelését  $2^{4-1}$  részfaktortervvel vizsgálva megállapítottam, hogy bagasz cellulózon a kísérőenzimek és a xilanáz termelésének, a nitrogénigényt és a kiindulási pH értéket tekintve hasonló paraméterek kedveznek, így ezen a szubsztráton hozamuk egyidejűleg növelhető.

- 
- [6] Megállapítottam, hogy a legeredményesebb *A. oryzae* törzsek (NRRL 3485, NRRL 1808) SSF-ben termelt xilanázainak pH és hőmérséklet optimuma (mindkét esetben pH 6,5, illetve 65 °C) magasabb, mint a szakirodalomban eddig leírt *A. oryzae* (SF) xilanázok hasonló jellemzői. A hőstabilitást enzim extraktumban és SSF anyag jelenlétében is mérve, kimutattam, hogy az SSF anyag gátolja az enzimek termikus inaktiválódását, jelenlétében mindkét xilanáz stabil 50 °C-on, egy órán keresztül. A leírt paraméterek feltehetően szerepet játszanak e két *A. oryzae* xilanáz eredményes működésében a biofehérítés során.
- [7] Megállapítottam, hogy a biofehérítés során eredményesen működő xilanázok (*T. lanuginosus* TUB F-980, *A. oryzae* NRRL 3485, illetve *A. oryzae* NRRL 1808 xilanázai) szintjét az SSF fermentumokban táptalaj optimalizálással a másfélszeresére-duplájára növelve, a nyers fermentumok biofehérítő hatásában is javulást lehetett elérni. Az eukaliptusz cellulóz optimalizált táptalajú SSF enzimes kezelése, a kizárólag kémiai fehérítéshez képest, az azonos fehérség eléréséhez szükséges klór-dioxid mennyiségét 25-35 %-kal csökkentette, mely a biofehérítés kiemelkedő eredményességét bizonyítja.



#### **4. ALKALMAZÁSI LEHETŐSÉGEK**

Kísérleti eredményeink az SSF enzimekkel történő alternatív biofehérítés ipari alkalmazásának eléréséhez nyitnak meg számos utat. Az SSF, szemben a süllyesztett fermentációval, nem igényel intenzív keverést és levegőztetést, a tenyésztés egyszerű berendezésben megvalósítható, továbbá az általunk kidolgozott biofehérítési eljárásnál nem szükséges a termelt xilanázok elválasztása és tisztítása. Ezért a xilanázban gazdag, nyers SSF fermentumok a kereskedelmi (SF) enzimekkel elért fehérséget lényegesen alacsonyabb enzimkezelési költséggel biztosíthatják. Az SSF anyag jelenléte az extrahált állapotban hőérzékeny enzimeket is alkalmassá teheti biofehérítésre.

---

## 5. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

### 5.1 Cikkek

1. Christopher, L., Bissoon, S., Singh, S., Szendefy, J., Szakacs, G., Bleach-enhancing abilities of *Thermomyces lanuginosus* xylanases produced by solid state fermentation. *Process Biochem.* **40**, **2005**, 3230-3235.
2. Szendefy, J., Szakacs, G., Christopher, L. Potential of solid-state fermentation enzymes of *Aspergillus oryzae* in biobleaching of paper pulp. (2005). Közlésre benyújtva az *Enzyme and Microbial Technology* c. folyóirathoz.
3. Szendefy, J., Szakacs, G., Christov, L. Biobleaching efficiency of *Aspergillus oryzae* xylanases produced by solid substrate fermentation. In Lignocellulose Biodegradation, B.C. Saha & K. Hayashi, eds, *ACS Symp. Ser. 889*, American Chemical Society, Washington, DC, **2004**, 316-338.
4. Szendefy, J., Szakacs G., Kemeny S., Christov, L. *In situ* solid-state fermentation and utilization of xylanase in pulp bleaching. In Applications of Enzymes to Lignocellulosics, S.D.Mansfield & J.N. Saddler, eds, *ACS Symp. Ser. 855*, American Chemical Society, Washington, DC, **2003**, 255-284.

5. Szendefy, J., Szakács, G., Christov, L. Xilanáz enzimek termelése termofil fonalagombákkal szilárd fázisú fermentációban. *Acta Biol. Debrecina* **2000**, 129-134.

## 5.2 Előadások

1. Szendefy, J., Szakács, G. and Christov, L. Potential of *Aspergillus oryzae* xylanases produced by solid substrate fermentation for biobleaching of pulp, **ACS Symposium on Advances in Biodegradation and Biotransformation of Lignocellulosics**, **2003**, March 23-27, New Orleans, LA, USA
2. Szendefy, J., Szakács, G., Kemény, S. and Christov, L. *In-situ* solid-state fermentation and utilization of xylanase in pulp bleaching. **ACS Symposium on Xylans, Mannans and other Hemicelluloses**, American Chemical Society, **2002**, Apr. 7-11, Orlando, Florida
3. Szakács, G., Bogár, B., Szendefy, J., Christov, L. and Tengerdy, R.P. Production of alpha-amylase and xylanase by solid substrate fermentation. **AMI Symposium on Microbial Biotechnology**, Association of Microbiologists of India, Trivandrum Chapter, **2002**, Jan.16, Trivandrum, India

4. Szakács, G., Bogár, B., Szendefy, J., Christov, L. and Tengerdy, R.P. Production of alpha-amylase and xylanase by solid substrate fermentation. **Pacificchem, 2000**, Dec.14-19, Honolulu, Hawaii

### **5.3 Poszterek**

1. Szakacs, G., Szendefy, J., Christov, L. Biobleaching efficiency of thermostable fungal xylanases produced by solid state fermentation. **9<sup>th</sup> International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, 2004**. Oct. 10-14, Durban, South Africa
2. Szendefy, J., Szakács, G. and Christov, L. Screening of thermophilic fungi in solid state fermentation for xylanase production, **International Conference on the Emerging Frontiers at the Interface of Chemistry and Biology (ICB-2003), 2003**, Apr. 28-30, Trivandrum, India
3. Szendefy, J., Szakács, G. and Christov, L. Production of xylanase by solid substrate fermentation. **II. Magyar Mikológiai Konferencia, 2002**, Máj. 29-31, Szeged

4. Maré, J.E., Szendefy, J., Szakács, G., du Preez, J.C. and Christov, L. Isolation and evaluation of xylanases from thermophilic and thermotolerant microorganisms in pulp bleaching. **8<sup>th</sup> International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry** , 2001, June 4-8, Helsinki, Finland
  
5. Szakács, G., Szendefy, J. and Christov, L. Screening of thermophilic fungi in solid state fermentation for xylanase production. **International Conference on New Horizons in Biotechnology**, 2001, Apr. 18-21, Trivandrum, India
  
6. Szendefy, J., Szakács, Gy. és Christov, L. Xilanáz enzim termelése termofil fonalagombákkal szilárd fázisú fermentációban. **IX. Fermentációs Kollokvium**, 2000, Okt. 5-8, Debrecen

## 6. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBE KÖZVETLENÜL NEM ILLESZKEDŐ PUBLIKÁCIÓK

### 6.1 Előadások

- 1 Szendefy, J., Bényi, T., Domonkos, D., Szakács, G. és Csiszár, E. Termofil fonalagombák vizsgálata indigóval színezett farmerszövetek kőmosást helyettesítő enzimes kezelésére. **XXII. Kémiai Előadói Napok, 1999**, November 1-3, Szeged.
2. Szakács, G., Tengerdy, R. P., Urbánszki, K., Szendefy, J., and Halász, D. Comparison of corn fiber hydrolysis by a crude solid substrate fermentation enzyme and Celluclast 1.5L. **Recent Advances in Fermentation Technology (RAFT III), 1999**, Nov. 13-16, Sarasota, Florida, USA