

Celluláz enzimek hatása
a szekunder rostok tulajdonságaira

Biotechnológia a papíriparban

Dienes Dóra

Témavezető: Dr. Réczey Istvánné docens



M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2
Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Mezőgazdasági Kémiai Technológia Tanszék
2006

1. Bevezetés, célkitűzések

Az emberiség kulturális fejlődése során egyre többrétűbb a kapcsolata a növényi sejtfal legfőbb komponensével, a cellulózzal. A fafeldolgozás, papír- és textilipar nemcsak az emberi élet számos területén felhasznált cellulóz alapú anyagokat, termékeket szolgáltatja, hanem hatalmas mennyiségű cellulóz-tartalmú hulladékot is termel.

A hulladékpapír-feldolgozás jelentősége

A papír alapanyaga a kémiai és/vagy mechanikai úton előállított cellulóz. Az ún. primer rostok mellett a hulladékpapír egyre jelentősebb rostforrást képvisel a papíripar számára. A papír újrahasznosításával csökkenthető a fakitermelés, az energia-felhasználás, a kibocsátott szennyezőanyag mennyisége, valamint a hulladék-elhelyezés problémája. Néhány szemléltető adat: 1 t papír reciklált rostból történő előállításával 25-30 m³ víz, 20-30 fa, kb. 4000 kWh elektromos áram takarítható meg, emellett a kisebb vegyszerfelhasználás miatt a környezetszennyezés is jelentősen csökken.

A világ összes papírtermelése és -fogyasztása a XX. században 30-szorosára emelkedett (2000-ben a termelés kb. 320 millió t volt). A feldolgozott alapanyagok összetétele is jelentős változáson ment keresztül: míg 1900-ban és még 1950-ben is kb. 90% volt a primer rost aránya, a század végére ez a ráta már csupán kb. 50% volt. A termelés megoszlására jellemző, hogy a jó minőségű primer rostanyagok gyártása a nagy erdőségekkel rendelkező fejlett országokra koncentrálódik. A hulladékpapír feldolgozásának aránya az egyes országokban jelentősen eltér. Az EU tagállamok közül Magyarország átlagon felüli arányban használ fel szekunder rostokat (2003-ban 68%).

Enzimek alkalmazása

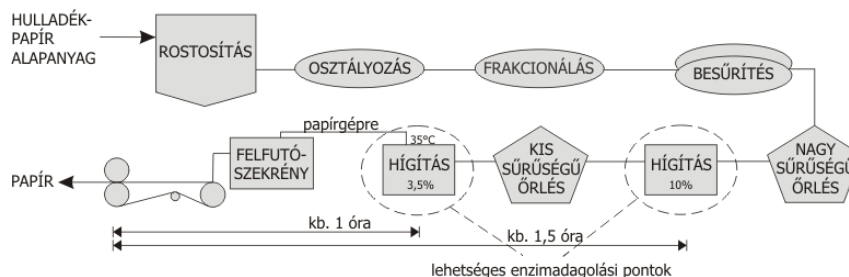
Az enzimek, azaz katalitikus biomolekulák (fehérjék) alkalmazását specifikus aktivitásuk és környezetbarát jellegük indokolja. Felhasználásuk lehetőségét a biokémia, mikrobiológia, molekuláris biológia és genetika terén elért fejlődés biztosította. Az enzimek cellulóz- és papíripari alkalmazásának „sikertörténete” a xilanázokkal végzett biofehérítés, mely nemcsak kisebb vegyszerfelhasználást, de csökkentett veszélyes anyag-kibocsátást, és minőség-javulást is eredményezett.

A dolgozat célkitűzései

A hulladékpapír újrahasznosítása kiemelkedően nagy arányban megvalósul, de korántsem problémamentes. A dolgozat témája e cellulóz-hulladék felhasználásának elősegítése biotechnológiai úton.

Az értekezésben tárgyalt PhD munka célja a szekunder rostok víztelenedésének javítása enzimes kezeléssel. Előkísérletekben megvizsgáltuk egyes celluláz, hemicelluláz és amiláz (mázolt papír alapanyag esetén) enzimek hatékonyságát. Mind az e témát tárgyaló irodalom, mind saját „screening” kísérleteink alapján a további, részletes kísérleti munka alanya –a szekunder rostok mellett- a celluláz enzimkomplex volt. A bemutatott kísérletek döntő hányada a celluláztermelő mikrobák közül a jó enzimtermelési tulajdonságokkal jellemzett és széleskörben tanulmányozott lágy korhadást okozó fonalas gomba, a *Trichoderma reesei* celluláz komplexének ill. egyes komponenseinek hatását vizsgálja.

A BME Mezőgazdasági Kémiai Technológia Tanszék „Non-food” kutatócsoportja 1999-ben kezdett együttműködni a Papíripari Kutatóintézet Kft.-vel a szekunder rostok enzimes kezelése témában. A magyarországi papírgyártás és papírfogyasztás egyik fő termékcsoportja az ún. csomagolópapírok, köztük a zsákpapír. PhD munkám fókuszában a hulladékpapír-alapú zsákpapír-gyártás állt, a szekunder rostok víztelenedésének és a papír légáteresztésének javítását célozva a szilárdsági tulajdonságok minél kisebb mértékű gyengülése mellett. Az enzimes kezelések eszköze egyrészt az adott célra kereskedelmi forgalomban lévő, ill. más területen felhasznált kereskedelmi cellulázok, valamint saját fermentálású enzimkomponensek voltak. Az eddig e területen nem vizsgált enzimekkel végzett kísérletek célja a korábbi eredmények (Pergalase A40) alapján tett feltételezések bizonyítása/elvetése. A munka nehézsége a vizsgált szubsztrát összetételében jelentkező variabilitás, minek következtében „általános érvényű” következtetések nem vonhatók le.



Csomagolóanyag-gyártás egyszerűsített folyamatábrája - Dunapack Rt.

2. A kísérletekben alkalmazott szubsztrát és tesztelt enzimek

Szubsztrát Az enzimes kísérletek szubsztrátjaként Dunakraft 90R zsákpapírt (Dunapack Rt.) alkalmaztunk. Alapanyag-összetétele: 8% tiszta (technikai) cellulóz, 25% egyszer felhasznált kraft feltárással előállított cellulóz (un. nátronpapír), 67% hulladék hullám-csomagolóanyag.

Enzimek A szekunder rostok víztelenedésének javítására felhasznált enzimek kereskedelmi enzimek, ill. saját fermentálású enzimek voltak.

A Pergalase A40 kereskedelmi enzimek készítmény *Trichoderma* celluláz és hemicelluláz komponenseket tartalmaz. A gyártó (Genencor) ajánlása szerint alkalmas rostszuszpenzió víztelenedésének javítására, különösen hulladékpapír feldolgozása esetén. Javasolt felhasználási körülmények: 40-65°C; pH 4,5-6,5; reakcióidő 0,5-2 óra; rostszűrűség 2-4%. Világosbarna folyadék.

Az IndiAge Super L kereskedelmi enzimek készítmény genetikailag módosított mikroorganizmus által termelt, *T. reesei* Cel12A endoglükánáz (EGIII) tartalmaz. Az IndiAge Super L a textilipar számára, szövetek végkikészítésére kifejlesztett enzim. Jellemzői (a gyártó, Genencor által megadva): optimális pH 4,9-5,5 (alkalmazható pH 4,5-7,5); optimális hőmérséklet 40-45°C (alkalmazható 30-50°C). Borostyánsárga folyadék.

Az Ecostone N400 (AB Enzymes Oy) kereskedelmi enzimek készítmény *Melanocarpus albomyces* Cel45A endoglükánáz komponenset tartalmaz. Textilipari felhasználásra (farmeráru kikészítésére) tervezett enzim. Barna folyadék.

A CBD szerepét az egyedi EG enzimkomponensek felhasználása esetén vizsgáltuk. A *T. reesei* Cel7B-t (EGI), ill. Cel7B core-t (EGI katalitikus doménje) tartalmazó fermentálé előállítása genetikailag módosított *T. reesei* QM9414 törzssel történt glükóz-tartalmú táptalajon. A szelektív expressziót a Cel7B (EGI) promóterét helyettesítő konstitutív promóter tette lehetővé. Míg a két *T. reesei* rekombinánsban (TrCel7B és TrCel7Bcore rekombináns) az endogén celluláz termelését a magas glükóz-koncentráció represszálta, addig a célkomponens az *Aspergillus nidulans* gliceraldehid-foszfát-dehidrogenáz (GPD, a glikolízis egyik kulcsenzime) gén (*gpdA*) promóterének szabályozása alatt termelődött.

Rhodothermus marinus Cel12A kis molekulatömegű (28,5 kDa), cellulóz-kötő domént nem tartalmazó endoglükánáza 90°C-os hőmérséklet optimummal rendelkezik. Az *E. coli*-ban expresszált termofil enzimet tartalmazó fermentáléval végzett kísérletekkel az enzimkomponens nagyszűrűségű őrlés előtti adagolásának lehetőségét vizsgáltuk (a papírgyártás ezen szakaszában a rostszuszpenzió hőmérséklete 90°C feletti).

3. A kezelések hatásának vizsgálata

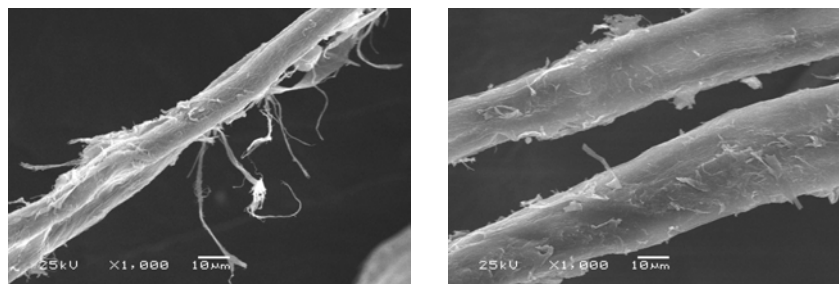
Rostjellelmezők

A szekunder rostok víztelenedésének jellemzése Schopper-Riegler őrlésfok méréssel történt (ISO szabvány). Az őrlésfok a papíriparban a köztitermék, a rostsuszpenzió víztelenedésének jellemzésére használt mérőszám.

A papírgyártás során (szárítás) a rostok szerkezete megváltozik, veszítenek képlékenysükből, merevebbek, keményebbek lesznek, azaz elszarusodnak. A folyamatban a rostok pórusai bezáródnak, ellaposodnak, így kevésbé képesek a víz megkötésére, a vízben való duzzadásra, emiatt szilárdságuk is romlik. Kísérleteinkben az enzimés kezelés hatását a rostok duzzadási készségére a vízvisszatartás (WRV) mérésével követtük nyomon (TAPPI szabvány).

A rostsuszpenzió frakcionálása Bauer-McNett rostosztályozóval történt. A rosthosszúság átlagokat és a rosthosszúság eloszlását Kajaani FS-100 rost-analizátorral határoztuk meg.

A rostfelület jellemzését pásztázó elektron-mikroszkópos (SEM) analízissel végeztük (JSM-5600 LV típus). A mintatartóra szárított, platinával bevont minták vizsgálata 25 kV gyorsítófeszültséggel történt.



Referencia (A) és celluláz enzimmel kezelt (B) szekunder rostok elektron-mikrográfja.

Papír fizikai és mechanikai tulajdonságai

Az enzimés kezelések fizikai és mechanikai tulajdonságokra gyakorolt hatásának megállapítása a rostsuszpenzióból szabványos körülmények között készült próbalapokon (Rapid-Köthen lapképző), meghatározott paraméterű légtérben klimatizált mintákon való mérésekkel történt (ISO szabványok szerint). Vizsgált jellemzők: légáteresztését (Gurley denzométer), repesztő-, szakító- és tépőszilárdság.

4. Eredmények

Értekezésemben szekunder rostok tulajdonságainak javításával foglalkoztam, melyet biotechnológiai úton, kereskedelmi, ill. saját fermentálású celluláz enzimek alkalmazásával valósítottam meg. Kísérleti eredményeim a következők:

1. A *Trichoderma reesei* Cel12A (EGIII) komponenst tartalmazó, a textilipar számára forgalmazott enzimméztípus, az IndiAge Super L (Genencor) eredményesen alkalmazható a szekunder rostok víztelenedésének javításában.
2. A *Trichoderma reesei* cellulázkomplex endoglükánázai közül a kis molekulatömegű, mindössze 0,1-0,2% arányban termelt, cellulóz-kötő doménnel nem rendelkező Cel12A (EGIII) a szekunder rostok víztelenedésének javításában eredményesebb, mint a két fő endoglükánáz, azaz a Cel7B (EGI) és a Cel5A (EGII).
3. A döntően másodlagos rostokból álló papír (Dunakraft 90R) légáteresztése mind *T. reesei* teljes celluláz komplexszel (Pergalase A40), mind egyedi Cel12A (EGIII) endoglükánázzal (IndiAge Super L) szignifikánsan javítható. Ez a tulajdonság a zsákpapír-gyártás szempontjából kiemelkedően fontos.
4. Egy adott celluláz enzim hatása a szekunder rostok tulajdonságaira még hasonló eredet (gomba/bakteriális), molekulaméret, molekuláris szerkezeti felépítés (CBD jelenléte/hiánya) esetén sem tervezhető egy másik enzimmolekula hatásából.
5. Genetikailag módosított *T. reesei* QM9414 által, az endogén cellulázok glükóz-repressziója mellett szelektíven termelt TrCel7B (EGI) és TrCel7B core tartalmú fermentlé alkalmas közvetlenül, azaz tisztítás és egyéb feldolgozás nélkül felhasználva szekunder rostok tulajdonságainak javítására.
A TrCel7B (EGI) és annak katalitikus doménje a szilárdságban nem okoz romlást döntően másodlagos rostokból álló papír (Dunakraft 90R) esetén.
6. A RmCel12A kis molekulatömegű (28,5 kDa), cellulóz-kötő domént nem hordozó endoglükánázt tartalmazó fermentlé -hőmérsékletében a nagysűrűségű őrlést és az azt követő szakaszokat modellező kísérletek alapján- alkalmas közvetlenül felhasználva szekunder rostok víztelenedésének javítására.

5. Alkalmazási lehetőségek

A hulladékpapír-feldolgozás javításában az 1980-as évektől vizsgált a celluláz enzimek alkalmazása. Az ún. szekunder rostokban található kisméretű, finom rostok nagy fajlagos felületük miatt nagy mennyiségű vizet kötnek meg, mely hatást a rostok felületén levő fibrillák és kolloid anyagok fokozzák. A rostok víztelenedése a papírgép szitaszakaszán jelentősen lassabb, mint primer rostok feldolgozása esetén. Az ebből adódó kényszerű sebességcsökkentés a papírgépen limitálja a termelékenységet.

A feleslegben levő kis rostok, fibrillák enzimes hidrolízisével bekövetkező őrlésfok-növekedés kihasználható a papírgép sebességének növelésében ill. kisebb rostsűrűség alkalmazható a felfutószekrényben. Utóbbi egyenletesebb lapszerkezet kialakítását teszi lehetővé, mely növeli a papír szilárdságát. Az enzimes kezelés következtében gyengébb minőségű alapanyag felhasználása is lehetővé válik. A papírgyártás során az őrlés előtti enzimadagolás következtében a víztelenedés javítása mellett az őrlhetőség is javítható, azaz fokozható az őrlés mértéke (a szilárdság növelése érdekében) vagy csökkenthető az őrlő berendezés energia-felvétele.

A papírgyártásban a rostok víztelenedésének javítása jelentős termelés-növelést tesz lehetővé; pl. 10%-os víztelenedés-javulás a papírgép sebességének 5-10%-os növelését eredményezi. A kereskedelmi enzimek készítmények mindmáig magas ára miatt a saját fermentálású, feldolgozást nem igénylő enzimek alkalmazása potenciális alternatívát jelent. A laboratóriumi kísérletek eredményeinek alátámasztása érdekében a későbbiekben szükséges a felhasznált enzimek, fermentlevek léptéknövelt, papírgépen történő vizsgálata.

6. Az értekezés témakörében készült publikációk

Folyóiratcikkek

Egyházi, A., Dienes, D., Réczey, K., *Biotechnológia a papíriparban*, Papíripar 43, 138-142, 1999

Dienes, D., Kemény, S., Egyházi, A., Réczey, K., Improving the capability of the Schopper–Riegler freeness measurement, *Measurement*, 38, 194-203, 2005

Dienes, D., Egyházi, A., Réczey, K., Treatment of recycled fiber with *Trichoderma* cellulases, *Industrial Crops and Products*, 20, 11–21, 2004

Dienes, D., Börjesson, J., Ståhlbrand, H., Réczey, K., Production of *Trichoderma reesei* Cel7B and its catalytic core on glucose medium and its application for the treatment of secondary fibers, *Process Biochemistry*, 41, 2092-2096, 2006

Dienes, D., Börjesson, J., Hägglund, P., Tjerneld, F., Lidén, G., Réczey, K., Ståhlbrand, H., Identification of a trypsin-like serine protease from *Trichoderma reesei* QM9414, *Enzyme and Microbial Technology*, közlésre elfogadva

Konferencia kiadvány összefoglalók

Dienes, D., Egyházi, A., Réczey, K., Cellulases and hemicellulases in the recycled paper production, *Proceedings of the 3rd International Congress on Materials Made from Renewable Natural Resources*, Erfurt, Germany, 2001

Dienes, D., Egyházi, A., Réczey, K., Enzimek alkalmazása a papírrrost tulajdonságainak javítására, *Műszaki Kémiai Napok konferenciakiadvány*, Veszprém, 2000

Dienes, D., Egyházi, A., Réczey, K., Papíripari rostsuszpenzió víztelenedésének javítása enzimes kezeléssel, *Vegyészkonferencia'99 konferenciakiadvány*, Kolozsvár, 1999

Poszterek, előadások

Dienes, D., Réczey, K., *Trichoderma reesei* alkalikus szerin proteáz azonosítása és jellemzése, *Műszaki Kémiai Napok '05*, Veszprém, 2005

Dienes, D., Balogh, E., Réczey, K., Textilipari kereskedelmi enzimek készítmények papíripari alkalmazásának vizsgálata, *Műszaki Kémiai Napok'04*, Veszprém, 2004

Dienes, D., Ramchuran, S., Karlsson, E., N., Réczey, K., Holst, O., Effect of *T. reesei* Cel12A and *R. marinus* Cel12A on drainage of recycled fibre COST E23 action Workshop, *Biotechnology for a Sustainable Pulp and Paper Industry*, Tuscia University, Viterbo, Italy, 2003

- Dienes, D., Egyházi, A., Réczey, K., Effect of fungal endoglucanases on secondary fiber properties, 25th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, Breckenridge, Colorado, USA, 2003
- Dienes, D., Egyházi, A., Sárdi, Z., Réczey, K., *Trichoderma* endoglükánázok hatása a szekunder rost tulajdonságokra, Műszaki Kémiai Napok, Veszprém, 2002
- Dienes, D., Egyházi, A., Sárdi, Z., Réczey, K., Treatment of recycled fiber with *Trichoderma* cellulases, International Congress & Trade Show Green-Tech 2002 with the European Symposium Industrial Crops and Products, The World Horticultural Exhibition Floriade, Holland, 2002
- Dienes, D., Egyházi, A., Sárdi, Z., Réczey, K., Treatment of recycled fiber with *Trichoderma reesei* endoglucanases, "Power of microbes in industry and environment", Croatian, Hungarian and Slovenian Symposium on Industrial Microbiology and Microbial Ecology, Opatija, Croatia, 2002
- Dienes, D., Egyházi, A., Réczey, K., Schopper-Riegler őrlésfok mérésének standardizálása, Műszaki Kémiai Napok '01, Veszprém, 2001
- Dienes, D., Egyházi, E., Réczey, K., Modification of pulp and paper properties with enzymatic treatment, 23rd Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, Breckenridge, Colorado, CO, USA, 2001
- Dienes, D., Egyházi, A., Réczey, K., Polyánszky, É., Hernádi, A., Juhász, É., Improvement of pulp drainage by enzymatic treatment, 8th International Conference on Biotechnology in Pulp and Paper Industry Helsinki, Finland, 2001
- Egyházi, A., Dienes, D., Réczey, K., Enzymes in the recycled paper production, 8th International Conference on Biotechnology in Pulp and Paper Industry, Helsinki, Finland, 2001
- Dienes, D., Egyházi, A., Réczey, K., Cellulases and hemicellulases in the recycled paper production, 3rd International Congress on Materials Made from Renewable Natural Resources, Erfurt, Germany, 2001
- Dienes, D., Egyházi, A., Réczey, K., Biotechnológia alkalmazása a hulladékpapír újrahasznosításában, Ipari Nyílt Nap, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Budapest, 2001
- Dienes, D., Kemény, S., Papíripari rostsuszpenzió enzimes kezelésének és Schopper-Riegler őrlésfok mérésének standardizálása, Kemometria '01 Konferencia, Pécs, 2001
- Dienes, D., Egyházi, A., Réczey, K., Hernádi, S., Polyánszky, É., Lele, I., Improvement of drainage using *Trichoderma* cellulases, 28th International Annual Symposium, Bled, Slovenia, 2001

Dienes, D., Enzimek a hulladékpapír feldolgozásban, Országos Felsőoktatási Környezettudományi Diákkonferencia, Debrecen, 2000

Dienes, D., Egyházi, A., Réczey, K., Enzimek alkalmazása a papírrost tulajdonságainak javítására, Műszaki Kémiai Napok 2000, Veszprém, 2000

Dienes, D., Hulladékpapír újrahasznosítása, enzimes kezelés, "Lippay János - Vas Károly" Tudományos Ülésszak, Budapest, 2000

Dienes, D., Egyházi, A., Réczey, K., Szekunder rostok enzimes kezelése, Nemzetközi Környezetvédelmi Szakmai Diákkonferencia, Mezőtúr, 2000

Dienes, D., Egyházi, A., Réczey, K., Papíripari rostszuszpenzió víztelenedésének javítása enzimes kezeléssel, Vegyészkonferencia '99, Kolozsvár, 1999

Réczey, K., Egyházi, A., Dienes, D., Improving the quality of secondary fiber pulp and paper by using enzymatic treatment, Biotechnology for the Conversion of Lignocellulosics Conference, Kwa-Zulu, Natal, South-Africa, 1999