



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

CELLULÁZ ENZIMEK TERMELÉSE ÉS JELLEMZÉSE KÜLÖNBÖZŐ ALKALMAZÁSOKHOZ

Ph.D. értekezés tézisei

Szijártó Nóra

Témavezető:
Dr. Réczey Istvánné

2007

1. BEVEZETÉS, A KUTATÁS CÉLJA

A növényi sejtfal alapvető szerkezeti poliszacharidja, a cellulóz, a legnagyobb mennyiségben előforduló szerves anyag földünkön. Következésképp, azon enzimek, amelyek képesek a cellulóz lebontására, illetve azon mikroszervezetek, amelyek képesek ilyen enzimek termelésére, kulcsszerepet töltenek be a szén földi körforgásában. A cellulóz ugyanakkor rendkívül ellenálló az enzimes degradációval szemben; teljes lebontására viszonylag kevés mikroorganizmus képes. Többségük fonalas gomba (pl., *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Humicola*, *Melanocarpus*), köztük számos, ipari gyakorlatban is jelentős celluláz termelő törzsszel.

A kereskedelmi célú celluláz termelés, amely alapvetően szubmerz fermentációval történik lévén az számos előnnyel bír a felületi eljárásokkal szemben, a 70-es évek elején kezdődött, majd az 1980-as években jelentek meg az első nagy volumenű ipari alkalmazások. A cellulázok felhasználása azóta is töretlenül és intenzíven növekszik, 23,000 tonnás éves termelésükkel és 125 millió USD éves forgalmukkal a cellulázok manapság vezető helyet foglalnak el az ipari enzimek piacán. Napjainkban az élelmiszeripar, a sörgyártás, borászat, a takarmányipar, a papír- és textilipar, valamint a kutatás-fejlesztési ágazatok használnak nagy mennyiségben cellulázokat. Ugyanakkor a szakértők egyetértenek abban, hogy a leglátványosabb és a celluláz enzimeket legnagyobb volumenben alkalmazó eljárások sorában hamarosan átveszik a vezető helyet az üzemanyagok, különböző kemikáliák, és egyéb nagy volumenben előállítandó termékek cellulózból kiinduló, fenntartható előállítási technológiái. Ezek az eljárások azonban sokkal olcsóbb enzimeket igényelnek, mint amilyen költségterheket a kereskedelmi forgalomban manapság beszerezhető cellulázok képviselnek.

Általánosan elfogadott elképzelések szerint a cellulázok (költség-) hatékony előállítása akkor lesz lehetséges, ha (i) jobban megismerjük a celluláz termelő törzs növekedési és enzimtermelési dinamikájának sajátosságait, összefüggésben az alkalmazott szénforrás mennyiségi viszonyaival és minőségi ismérveivel, (ii) olcsóbb fermentációs nyersanyagokat használunk, és (iii) nyitunk a jobb teljesítőképességű, avagy speciális tulajdonságú cellulázok megismerésének és alkalmazásának irányába.

Ilyen értelemben a jelen értekezés, amely hat tudományos publikáció összefoglalása, azért született, hogy kiszélesítse látókörünket a cellulázok termelésének és a termelt cellulázok jellemzőinek terén, elsősorban a potenciális felhasználás szemszögéből vizsgálva e kérdéseket. Éppen ezért a dolgozat nem csupán a jól ismert és ipari gyakorlatban is elterjedten alkalmazott mezofil celluláz termelő organizmussal, a *Trichoderma reesei* lágy rothasztó fonalas gombával foglalkozik, hanem kitekintést kínál a termotoleráns *Melanocarpus albomyces* gomba újonnan felfedezett cellulázainak irányába is. Olyan témák kerülnek megemlítésre, illetve körüljárásra a dolgozat keretein belül, mint (i) egy valódi celluláz termelő törzs növekedésének, illetve a kapcsolt enzimszekréciónak kinetikai vizsgálata konvencionális, valamint attól eltérő szénforrások és tápoldatok alkalmazása mellett, (ii) új típusú cellulázok jó szekréciós tulajdonságokkal bíró gazdaszervezetben való termeltetése, majd az enzimek tisztítása, illetve (iii) a termelt enzimek jellemzése, aktivitásuk, szubsztrát specificitásuk, és hidrolitikus potenciáljuk alapján.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Anyagok

Az oldatok és tápoldatok analitikai tisztaságú vegyszerek felhasználásával készültek. Fermentációs alapanyagként, illetve a hidrolízis kísérletek szubsztrátjaként különböző cellulóz készítményeket, lignocellulóz származékokat, illetve különböző melléktermékeket használtunk, úgy mint: ligninmentesített fenyőfapép, Solka Floc; Avicel; foszforsavban duzzasztott cellulóz; használt hullám hulladék papír; nedves oxidációval előkezelt kukoricaszár hemicellulóz frakciója (hidrolizátum); a melasz alapú élesztő-, illetve szeszgyártás maradéka (vinasz).

*Celluláz enzim fermentáció *T. reesei* törzsszel*

A celluláz fermentációs munkák során *T. reesei* Rut C-30 törzset használtunk, mint celluláz termelő mikroorganizmust. A fermentációk kivitelezése rázatott lombikban, 3 literes, illetve 30 literes laboratóriumi bioreaktorokban történt, 10 g/l szénforrást alkalmazva Mandels tápoldatban (28-30°C, pH 5-6, 200-350 rpm or 0.25 vvm). Egyedi esetekben a tápközeg kiegészítését szolgálták: az addicionális szénforrásként alkalmazott hemicellulóz hidrolizátum, a Mandels sók kiváltását célzó vinasz, illetve a pH kontrollt megvalósítani hivatott 0.1 M tris-maleát puffer.

M. albomyces cellulázainak termelése és tisztítása

A *M. albomyces* eredetű Cel7A és Cel45A endoglükánázok (EG), valamint a Cel7B cellobiohidroláz (CBH) (az egyes enzimsoportokba való besorolás a szubsztrát támadási módja és pozíciója szerint történt) termeltetése genetikailag módosított *T. reesei* törzssel laktóz tartalmú komplex nitrogén tápoldatban történt. A gének kifejeztetésére kétféle formában került sor: (i) az eredeti genetikai szekvencia szerint, illetve (ii) módosított formában, egy idegen, *T. reesei* eredetű cellulóz-kötő modul (cellulose binding modul, CBM) hozzácsatolásával az eredeti kódoló szekvenciához. A fermentlé szűrése és a fehérjék tisztítása után került sor az enzimek vizsgálatára.

Avicel és duzzasztott cellulóz hidrolízise M. albomyces cellulázaival

A *M. albomyces* eredetű cellulázok hidrolitikus tulajdonságainak vizsgálata az egyedi enzimek jellemzésén túlmenően enzimkeverékek viselkedésének tanulmányozását is magában foglalta. Az alkalmazott szubsztrátok kristályos (Avicel) és amorf (foszforsavban duzzasztott Avicel) cellulózok voltak (10 g/l). A hidrolízis kísérleteket 50 mM Na-foszfát pufferben (pH 6.0), 50°C-on végeztük, mágneses kevertetés mellett Eppendorf csövekben, 1.8 ml végső térfogatban. Az enzimek adagolása fehérje-dózis alapú volt: kristályos szubsztráton 5, 10, 20 mg/g dózisban, míg amorf szubsztráton 0.5, 1, 2, 5 mg/g dózisban. Minden vizsgált mintavételezési ponthoz egyedi enzimreakciót futtattunk.

Cellulóz bontó aktivitás meghatározása

A teljes, nem specifikus cellulóz bontó képességet szűrőpapír szubsztráttal szemben (filter paper degrading activity, FPA) mértük. A *M. albomyces* eredetű cellulázok EG jellegű aktivitását hidroxietil-cellulóz (HEC) és karboxi-metil-cellulóz (CMC) szubsztrátokkal szemben vizsgáltuk. A β -glükózidáz aktivitás méréséhez *p*-nitrofenil- β -D-glükopiranozid szubsztrátot alkalmaztunk.

3. AZ ÉRTEKEZÉS ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEI

Jelen doktori dolgozat keretein belül vizsgáltam: (i) cellulóz bontó enzimek fermentációs előállítását a kereskedelmi célú enzim termelési gyakorlatban legelterjedtebben alkalmazott *Trichoderma reesei* egyik ismert törzsével, illetve (ii) *Melanocarpus albomyces* eredetű új típusú cellulázok hidrolitikus tulajdonságait, amely enzimeket kereskedelmi céllal még nem termelik ugyan, de amelyek számos, cellulázokat alkalmazó ipari folyamatban jelenthetnek ígéretes alternatívát a jelen cellulázos technológiával szemben.

A bemutatott kutatások új tudományos eredményei, amelyek különböző területeken egészítik ki eddigi ismereteinket a celluláz enzimek világáról:

1. Sikerült kidolgoznunk egy olyan kétlépcsős fermentációs modellt, amelyben *T. reesei* Rut C-30 törzssel végzett fermentációs eljárás során az első lépcsőben glükózt, a második lépcsőben cellulózt alkalmazva szénforrásként lehetőség nyílik a nem indukált sejtek celluláz szekréciójának tanulmányozására, ami mintegy a válaszreakcióként jelentkezik az enzimek természetes szubsztrátjának impulzusszerű adagolása után. Ilyen módon értékes információ nyerhető a celluláz termelés dinamikájára. Elsőként igazoltuk hogy a *T. reesei* Rut C-30 pillanatszerűen képes metabolizmusát glükóz hasznosításról cellulóz hasznosítására átkapcsolni.
(I. közlemény, II. közlemény)
2. A *T. reesei* Rut C-30 törzssel Solka Floc szubsztráton végzett fermentációk mutatói jelentősen (max. 43% mértékben) javulnak, amennyiben a használt inokulum indukáló szubsztráton (Solka Floc) készült, nem indukáló szubsztrát (glükóz) helyett. Jelen tanulmány az első, amely számszerűsíti a inokulum készítés módjának (a használt szubsztrát minőségének) enzimtermelésre gyakorolt hatását.
(I. közlemény)
3. Jelen dolgozatban elsőként foglalkozunk a *Trichoderma* fermentációs tápközegeként leggyakrabban használt Mandels táptalaj nitrogén ellátottság szempontjából való vizsgálatával. Megállapítottuk, hogy annak nitrogén tartalma mintegy 10%-kal meghaladja a törzs valós nitrogén igényét, ami nagy léptékben végzett fermentációk során gazdaságossági szempontból fontos információnak ígérkezik.

4. (I. közlemény) Elsőként és sikeresen alkalmaztuk nedves oxidációval előkezelt kukoricaszár hemicellulóz hidrolizátumát, mint kiegészítő szénforrást *T. reesei* Rut C-30 törzssel végzett celluláz enzim fermentáció során. A lúgos közegben, 185°C-on, 5 percig végzett előkezelés hidrolizátumát használva a celluláz hozam 10%-kal javítható a kontrolhoz képest. E fermentációk során a 0.1 M trisz-maleát puffer alkalmas a rázatott lombikokban történő pH tartásra a pH 6 körüli tartományban.

(III. közlemény, IV. közlemény)

5. A hullám hulladék papír alkalmas fermentációs szénforrás *T. reesei* Rut C-30 törzssel végzett celluláz fermentáció során. A melaszon végzett szeszgyári illetve élesztőgyári technológia mellékterméke, a vinasz, képes a Mandels sók kiváltására a celluláz fermentációs technológiában, mint egyedüli tápsó-forrás.

(V. közlemény)

6. Elsőként vizsgáltuk a *M. albomyces* eredetű Cel7A, Cel7B, illetve Cel45A cellulázok hidrolitikus képességét. A vizsgált enzimek sokkal kevésbé aktívak kristályos cellulózon, mint amorf cellulózon. A CBH aktívabb kristályos szubsztráton, mint az EG enzimek, míg amorf szubsztráton fordított a sorrend. A vizsgált enzimek együtt egyértelmű szinergisztikus hatást mutatnak. Addicionális cellulóz kötő modult adva a cellulázokhoz a hidrolízis mutatók javulnak, a javulás mértéke hangsúlyosabb az endoglükanázok esetén, különösen kristályos szubsztráton. A Cel7B az alkalmazott körülmények között (pH 6.0, 50°C) aktívabb amorf szubsztráton, mint a hasonló *T. reesei* eredetű CBH. Az új típusú enzimektől jó termostabilitásuknak és nem-fiziológiás pH-t toleráló képességüknek jóvoltából magasabb pH és T mellett még jobb teljesítőképesség várható.

(VI. közlemény)

4. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

- I. **Szijártó, N.**, Lidén, G., Réczey, K. Effect of medium nitrogen content on cellulase production by *Trichoderma reesei*. Kézirat. Benyújtás előtt.
- II. **Szijártó, N.**, Szengyel, Zs., Lidén, G., Réczey, K. (2004) Dynamics of cellulase production by glucose grown cultures of *Trichoderma reesei* Rut C-30 as a response to addition of cellulose. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 113-116, 115-124. (IF: 0.805)
- III. Juhász, T., Szengyel, Zs., **Szijártó, N.**, Réczey, K. (2004) The Effect of pH on the cellulase production of *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 113-116, 201-211. (IF: 0.805)
- IV. **Szijártó, N.**, Varga, E., Réczey, K., Thomsen, A.B. Cellulase enzyme production by *Trichoderma reesei* Rut C-30 on the separated liquid stream from wet oxidation of corn stover. Közlésre benyújtva. *Enzyme Microbiol. Technol.* (IF: 1.705)
- V. **Szijártó, N.**, Faigl, Zs., Mézes, M., Bersényi, A., Réczey, K. (2004) Cellulase fermentation on a novel substrate (waste cardboard) and subsequent utilization of home-produced cellulase and commercial amylase in a rabbit feeding trial. *Ind. Crops Prod.* 20, 49-57. (IF: 0.746)
- VI. **Szijártó, N.**, Siika-aho, M., Tenkanen, M., Alapuranen, M., Vehmaanperä, J., Réczey, K., Viikari, L. Hydrolysis of amorphous and crystalline cellulose by heterologously produced cellulases of *Melanocarpus albomyces*. Közlésre benyújtva. *J. Biochem.* (IF: 1.827)

Egyéb közlemények:

Contreras, A.M.L., Martens, A.A., **Szijártó, N.**, Mooibroek, H., Claassen, P.A.M., van der Oost, J., de Vos, W.M. (2003) Production by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 of CelG, a cellulosomal glycoside hydrolase belonging to family 9. *Appl. Envir. Microbiol.* 69, 869-877. (IF: 3.818)

Eiben, Cs., Mézes, M., **Szijártó, N.**, Kustos, K., Gódor, S. (2003) Különböző dózisú celluláz enzimkiegészítés hatása a növevényulak termelésére. *Állattenyésztés és Takarmányozás* 52, 496-500.

Folyóiratban megjelent összefoglalók:

Eiben, Cs., Mézes, M., **Szijártó, N.**, Kustos, K., Gódor, S. (2004) Dose-response of dietary cellulase enzyme inclusion on the performance of fattening rabbits. *World Rabbit Science* 12, 55.

Eiben, Cs., **Szijártó, N.**, Mézes, M., Kustos, K., Gódor, S., Réczey, K. (2002) Effect of dietary cellulase enzyme supplementation on the performance of early-weaned rabbits. *World Rabbit Science* 10, 176.

Konferencia kiadványok:

Szijártó, N., Varga, E., Réczey, K., Thomsen, A.B. Előkezelt kukoricaszár hemicellulóz frakciójának hasznosítása celluláz enzim előállítására. *Műszaki Kémiai Napok '06*. Veszprém, 2006. április 25-27. pp. 113-116.

Szijártó, N., Varga, E., Réczey, K., Thomsen, A.B. Integrated process scheme for on-site production of cellulose degrading enzymes in the lignocellulose to ethanol process using wet oxidised corn stover as the substrate. *14th European Conference and Technology Exhibition on Biomass for Energy, Industry and Climate Protection*. Párizs, Franciaország, 2005. október 17-21. pp. 1851-1854.

Eiben, Cs., Mézes, M., **Szijártó, N.**, Kustos, K., Gódor-Surmann, K., Erdélyi, M. Dose-dependent effect of cellulase supplementation on performance of early-weaned rabbit. *8th World Rabbit Congress*. Puebla, Mexikó, 2004. szeptember 7-10. pp. 799-804.

Eiben, Cs., Mézes, M., **Szijártó, N.**, Kustos, K., Gódor, S. A különböző dózisú celluláz enzimkiegészítés hatása a növendéknyulak termelésére. *15. Nyúltenyésztési Tudományos Nap*. Kaposvár, 2003. május 28. pp. 105-110.

Szijártó, N., Kozma, K., Réczey, K. Celluláz enzim előállítása alternatív szubsztráton. *Műszaki Kémiai Napok '03*. Veszprém, 2003. április 8-10. pp. 311-315.

Juhász, T., **Szijártó, N.**, Szengyel, Zs., Réczey, K. Szerves savak és pH hatása *Trichoderma reesei* celluláz enzim termelésére. *Műszaki Kémiai Napok '03*. Veszprém, 2003. április 8-10. pp. 316-321.

Eiben, Cs., **Szijártó, N.**, Mézes, M., Kustos, K., Gódor, S., Réczey, K. A celluláz enzimmel történő takarmánykiegészítés hatása a korán elválasztott nyulak termelésére. *14. Nyúltenyésztési Tudományos Nap*. Kaposvár, 2002. május 22. pp. 77-82.

Előadások:

Szijártó, N., Kádár, Zs., Varga, E., Réczey, K. Sustainable production of bioethanol from lignocellulose wastes – research at BUTE. *GUTHEALTH Support Workshop*. Budapest, 2006. május 19.

Szijártó, N., Varga, E., Réczey, K., Thomsen, A.B. Előkezelt kukoricaszár hemicellulóz frakciójának hasznosítása celluláz enzim előállítására. *Műszaki Kémiai Napok '06*. Veszprém, 2006. április 25-27.

Szijártó, N., Tenkanen, M., Siika-aho, M., Vehmaanperä, J., Viikari, L., Réczey, K. *Melanocarpus albomyces* eredetű celluláz enzimek hidrolitikus tulajdonságainak vizsgálata. *MTA Élelmiszertudományi Komplex Bizottság Biomérnöki- és Poliszacharidkémiai Munkabizottságának Közös Előadói Ülése*. Budapest, 2005. november 29.

Szijártó, N., Hooman, S., Alapuranen, M., Kallio, J., Tenkanen, M., Siika-aho, M., Réczey, K., Vehmaanperä, J., Viikari, L. Hydrolytic properties of two novel cellulases of *Melanocarpus albomyces* expressed in *Trichoderma reesei*. *Renewable Resources and Biorefineries Conference*. Ghent, Belgium, 2005. szeptember 19-21.

Szijártó, N., Juhász, T., Szengyel, Zs., Réczey, K. Attractive combination of two waste streams: Waste paper and stillage concentrate utilization for low-cost cellulase enzyme fermentation. *4th International Symposium on Materials from Renewable Resources*. Erfurt, Németország, 2003. szeptember 11-12.

Szijártó, N., Kozma, K., Réczey, K. Celluláz enzim előállítása alternatív szubsztráton. *Műszaki Kémiai Napok '03*. Veszprém, 2003. április 8-10.

Juhász, T., **Szijártó, N.**, Szengyel, Zs., Réczey, K. Szerves savak és pH hatása *Trichoderma reesei* celluláz enzim termelésére. *Műszaki Kémiai Napok '03*. Veszprém, 2003. április 8-10.

Szijártó, N., Réczey, K. *Clostridium acetobutylicum* celluloszómájának genetikai vizsgálata. *Lippay János - Vas Károly Tudományos Ülésszak*. Budapest, 2000. november 6-7.

Szijártó, N., Gazdaságos ABE fermentáció megvalósításának lehetősége a *Clostridium acetobutylicum* celluloszómájának jelenléte és aktivitása alapján. *VI. Nemzetközi Környezetvédelmi Szakmai Diákkonferencia*. Mezőtúr, 2000. július 5-7.

Szijártó, N. Functional study of cellulase genes in the cellulosome of *Clostridium acetobutylicum*. *National Students' Conference of the Hungarian Scientific Society for Food Industry*. Mosonmagyaróvár, Hungary, April 26, 2000.

Poszterek:

Szijártó, N., Réczey, K., Somogyi, N., Kiss, I., Nagy, G., Vágvölgyi, Cs., Mihalik, E. Complex, connected biorefinery, bioenergy and bioremediation systems for the effective utilization of crops in southern Hungary. *29th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*. Denver, CO, USA, April 29 – May 2, 2007.

Szijártó, N., Varga, E., Deák, A., Kádár, Zs., Réczey, K. Mild chemical pretreatment of wheat straw to improve its susceptibility to enzymatic saccharification. *29th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*. Denver, CO, USA, April 29 – May 2, 2007.

Kádár, Zs., Varga, E., Csoknyai, B., **Szijártó, N.,** Réczey, K. Bioethanol production possibilities from hemp. *29th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*. Denver, CO, USA, April 29 – May 2, 2007.

Szijártó, N., Kádár, Zs., Benkő, Zs., Varga, E., Dienes, D., Réczey, K. Biorefinery Research at Budapest University of Technology and Economics. *European Conference on Biorefinery Research*. Helsinki, Finland, October 19-20, 2006.

Szijártó, N., Viikari, L., Siika-aho, M., Tenkanen, M., Vehmaanperä, J., Alapuranen, M., Réczey, K. Hydrolysis of amorphous and crystalline cellulose by heterologously produced neutral cellulases of *Melanocarpus albomyces*. *28th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*. Nashville, TN, USA, April 30 - May 3, 2006.

Szijártó, N., Varga, E., Réczey, K., Thomsen, A.B. Integrated process scheme for on-site production of cellulase enzymes in the lignocellulose to ethanol process using wet oxidised corn stover as the substrate. *14th European Conference and Technology Exhibition on Biomass for Energy, Industry and Climate Protection*. Paris, France, October 17-21, 2005.

Szijártó, N., Szengyel, Zs., Lidén, G., Réczey, K. Optimizing medium nitrogen content for cellulase production by *Trichoderma reesei*. *26th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*. Chattanooga, TN, USA, May 9-12, 2004.

Szijártó, N., Varga, E., Szengyel, Zs., Thomsen, A.B., Réczey, K. Utilization of separated liquid stream from wet oxidation of corn stover for cellulase production. *26th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*. Chattanooga, TN, USA, May 9-12, 2004.

Szijártó, N., Szengyel, Zs., Lidén, G., Réczey, K. Cellulase production by glucose grown cultures of *T. reesei* RUT C30 as a response to cellulose feed. *25th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*. Breckenridge, CO, USA, May 4-7, 2003.

Szijártó, N., Juhász, T., Szengyel, Zs., Réczey, K. Cellulase enzyme production on a novel fermentation substrate: Old corrugated cardboard (OCC). *24th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*. Gatlinburg, TN, USA, April 28 - May 1, 2002.

Szijártó, N., Faigl, Zs., Mézes, M., Bersényi, A., Réczey, K. Utilization of cellulases and commercial amylases for animal feed treatment. *Green-Tech 2003*. Floriade, The Netherlands, April 24-26, 2002.

Kádár, Zs., **Szijártó, N.**, Varga, E., Réczey, K. Potential for fuel ethanol production in Hungary. *Ist Biofuel Conference*. Veszprém, Hungary, May 8, 1998.

Filename: Szijarto_2007_tezisfuzet_magyar.doc
Directory: C:\Documents and Settings\Zsenike\Dokumentumok\My Received Files
Template: C:\Documents and Settings\Zsenike\Application
Data\Microsoft\Templates\Normal.dot
Title: Cbvcbv
Subject:
Author: user
Keywords:
Comments:
Creation Date: 2007.12.10. 11:55:00
Change Number: 4
Last Saved On: 2007.12.10. 12:50:00
Last Saved By: BME MGKT
Total Editing Time: 55 Minutes
Last Printed On: 2007.12.10. 13:53:00
As of Last Complete Printing
Number of Pages: 11
Number of Words: 2 530 (approx.)
Number of Characters: 17 463 (approx.)