

Energia növények és növényi eredetű hulladék anyagok rothasztásának javítása gombás elő-kezeléssel

Palkó György* – Bezsényi Anikó* – Oláh József* – Rása Gábor* — Fővárosi Csatornázási Művek Zrt.

1. Bevezetés

A cellulóz szerkezetét és felépítését *Malherbe* és *Cloete* (2002) tanulmányában részletesen ismerteti. Cellulóz a földön előforduló leggyakoribb szerves anyag, mert a növények vázanyagának nagy része cellulóz. Pontosabban a fa 40%-a, a gyapot 50%-a, a len és a kender 80%-a. A cellulóz nem elágazó, lineáris, D-glükóz molekulákból álló polimer. A glükóz molekulákat β -1,4 glükozidos kötések kapcsolják össze. A polimerizációfok változó, 7 000 – 15 000 glükóz egység kapcsolódik össze. Az egyenes láncokat intermolekuláris hidrogén-kötések stabilizálják, amelyek a glükóz egységek hidroxil csoportjai között jönnek létre. Kristályos szerkezetben a rétegek között Van der Waals erő a meghatározó. A cellulóz mechanikailag erős, ezt a tulajdonságát komplex és rendezett szerkezete biztosítja. A hemicellulóz heterogén, nem lineáris poliszacharid. Az elágazó szerkezetének köszönhetően könnyebben bontható. A lignin aromás molekula, háromdimenziós fenil-propán polimer építi fel. A fenil-propán egységek között éter és szén-szén kötések találhatóak. A lignin szorosan kapcsolódik a cellulózhoz, ez okozza a növényi szövetek stabilitását. A lignint nehéz hidrolizálni, ráadásul megakadályozza az enzimek hozzáférését a cellulózhoz. A fa és fűfélék vázanyagát három fő kémiai alkotóelem építi fel: cellulóz, hemicellulóz, lignin, amelyek egy komplex struktúrát alkotnak.

A kutatások egyik iránya az új cellulázt termelő baktériumok, gombák identifikálására, vagy ismertebb törzsek cellulóz bontó képességének javítására irányul. A cellulóz bontás javítása az esetek jelentős részében géntechnikai úton történik. A jelentős tudományos eredmények ellenére a gyakorlatban cellulóz anyagok anaerob lebontásánál az új tudományos eredmények alkalmazására nagyon kevés példa van. A cellulóz anyagok lebontásának javítására inkább reaktor-technikai megoldásokat (elő-hidrolízis, reaktorok keverése, HRT optimalizálása stb.) alkalmaznak. A cellulóz rendkívül ellenálló az enzimes degradációval szemben, teljes lebontására viszonylag kevés mikroorganizmus képes. Többségük fonalas gomba (pl., *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Humicola*, *Melanocarpus*), köztük számos törzset ipari méretben celluláz enzimek előállítására használnak (*Jeffries*, 1993; *Malherbe és Cloete* 2002). Más szerzők is a *Trichoderma reesei* gomba QM6a törzséből kiindulva gén technikai átalakítással növelték a celluláz enzim-termelését (*Saev et al.*, 2009). *Harmsen et al.*, (2010) a cellulóz anyagok feltárásának mechanikai, kémiai, kémiai és mechanikai módszerek kombinációit részletesen elemzi. A feltárt anyagot tovább lehet kezelni enzimes módszerekkel, amikor a hidrolízis határfoka tovább javítható. Az *Ascomyceta* fonalalgombák közül a *Trichoderma* nemzetség fajainak van kiemelkedő cellulolitikus aktivitása (*T. viride*, *T. reesei*), az ipari cellulázok előállítása is nagyrészt ezekkel történik.

A kutatások másik iránya a farm-gazdaságok rothasztóinak ko-fermentációs optimalizálására irányul. A változó terhelési viszonyok és a változó szubsztrát összetétel miatt az elért eredmények szerények. Az anaerob ko-fermentáció során fellépő legnagyobb gond, hogy a betáplált szubsztrát összetétele, és ez által a reaktor terhelése sem állandó. Sok esetben a mikroorganizmusok nem tudnak alkalmazkodni a terhelés-ingadozásokhoz, ami a termelt biogáz mennyiség csökkenéséhez vezet. A ko-szubsztrát (élelmiszeripari és mezőgazdasági hulladékok) anyagok könnyen beszerezhetők és olcsók. Sokszor a biogáz üzem közvetlen a hulladékot termelő ipari vagy mezőgazdasági egység mellé épül. A megoldás hátránya, hogy nem lehet megjósolni hosszútávra a hulladékok mennyiségét és minőségét.

Lehtomäki (2006; 2007) vizsgálatai szerint a *csicsóka* (*Helianthus tuberosus*), *zöld pántlikafű* (*Reed Canarygrass*; *Phalaris arundinacea* L.) és *komócsin* (*Timothy Phleum pratense* L.) rendelkezik a legnagyobb metán potenciállal (2 900 – 5 400 m³ CH₄ ha⁻¹; gépkocsi km-ben 40 000 – 60 000 km ha⁻¹). Szarvasmarha-trágya és energia növények közös rothasztásnál a növényi anyagok arányát 40 %-ban optimalizálta. A szerző kifejti, hogy az energia növényeket – 30 – 40 % energia-növény adagolás

mellett – a szerves trágyákkal együtt eredményesen lehet rothasztani. A jó eredményeket a C/N arány növekedésével lehet magyarázni.

Krieg és Fischer néhány takarmány-növény fajlagos biogáz kihozatalát ismerteti, például kukorica-silónál 595, mezei fűnél 593, lucerna silónál 535, takarmány-répánál 681 és a répalevélnél 615 L/kg_{szervesa} értékeket mértek.

Linke (2003) mezofil körülmények mellett a fű-szilázs rothasztásánál a biológiai terhelést (OLR) 1,0 – 2,6 kg/m³·d érték között tartotta és a fajlagos biogáz hozam 430 – 470 L/kg_{betáplált} érték között változott. Cukorrépa mono-fermentációja esetében a terhelést 4,0 kg/m³·d értékre emelte és a metán-termelés 470 L/kg értéket érte el. A nagyobb terhelésnél a fenti két növény ko-fermentációja – a marhatrágyával történő közös rothasztás – esetén is stabil üzemelést és jó gázfejlődést lehetett biztosítani.

Ko-szubsztrát rothasztást végeztek szarvasmarhatrágya, fű-szilázs, cukorrépa levél és zabszalma adagolása mellett. A 30%-os növényi hulladék-adagolás mellett a reaktor térfogatra vonatkoztatott metán hozam 16 – 65 %-kal nőtt, a kontroll marhatrágya metán hozamához képest. A növényi hulladék arányának 40 %-ra történő növelésével a szerves-anyag terhelés 2-ről 4 kg/m³·d értékre nőtt és ezzel egy időben a metánhozam 4 – 12 %-kal csökkent. Ez a tapasztalat azt mutatja, hogy a reaktor terhelése a biogáz termelés szempontjából meghatározó (*Lehtomäki*, 2006).

A komposztálás folyamatában a megfelelő tápanyag (nitrogén és foszfor) jelenlétében a lignocellulóz származékok (szalma, energia-fű, széna és fű maradékok) lebontásában a különböző gomba törzsek meghatározó szerepet játszanak. A fenti megfigyelés és tapasztalat alapján a lignocellulóz származékok rövid idejű (5 – 6 nap) komposztálásánál a gomba törzsek a cellulózt feltájják, majd a feltárt anyagot anaerob úton tovább kezeljük. A tájékoztató jellegű szakaszos kísérletek egyértelműen bizonyították, hogy a komposztálással (gombás-feltárás) végzett előkezelés az anaerob folyamat beindulását és annak lefolyását jelentősen segíti.

A cellulóz tartalmú hulladékok (mezőgazdasági hulladékok, energia-fű, szilfium, ágnyesedék stb.) nehezen bonthatók, közvetlen anaerob rothasztásuk csak igen hosszú tartózkodási idővel valósítható meg gazdaságosan. A kísérletek célja, hogy a cellulóz tartalmú növényi hulladékok, energia növények anaerob bonthatóságát és a biogáz kihozatalát gombás előkezeléssel növeljük.

2. Mérési módszerek ismertetése

Az anaerob rothasztás ellenőrzésére a gyakorlatból jól ismert alapvizsgálatokat (pH; lúgosság; illósav, szárazanyag; szerves-anyag) alkalmaztuk. Az anaerob ellenőrzési módszerek jól ismertek, részletes ismertetésére nem térünk ki.

Az alapvizsgálatokat kiegészíti a speciális növényi szubsztrátok lebontásának nyomon követésére alkalmas celluláz enzim aktivitás mérése. A celluláz enzimaktivitás mérésénél régóta ismert módszert használtunk, melynek lényege, hogy a puffertolt CMC (karboxi metil cellulóz) oldathoz iszap mintát adunk, majd 30 °-on végzett inkubációt követően centrifugáljuk és celluláz enzim hatására képződött glükózt dinitro-szalícilsav reagens hozzáadása után fotometrikan mérjük. A celluláz enzim aktivitását mg glükóz/g_{iszap} nap formában fejezzük ki (*Thiel és Hattingh*, 1967)

A hidrolizálható szénhidrátokat fenol-kénsavas módszerrel határoztuk meg. A módszer lényege, hogy a hexózokkal a fenol szín-reakcióba lép és ezt követően fotometrikan a szénhidrát koncentráció mérhető (*Liu et al.*, 1973).

A cellulóz összetételnél vizsgáltuk a hollocellulóz, alfa-cellulóz, hemi-cellulóz és lignin tartalmat (*Hernádi*, 1980).

A tenyésztéses vizsgálatokat tájékoztató jelleggel végeztük, csak a fontosabb mikroszkópikus (valódi) gombafajok kimutatására szorítkoztunk. A komposztmintákból 10 – 10 g-ot 90 mL 1g/L-es nátrium-difoszfát-dekahidrát oldatban (Na₄P₂O₇·10H₂O) szuszpendáltunk, 30 percen keresztül, folyamatos keverés mellett. A nátrium-difoszfát-dekahidrát a szerves kolloidokat diszpergálja. Az 1:10 arányú homogenizált mintát tovább hígítottuk NaCl-oldattal (0,9%). Az utolsó hígítás (előzetes tesztelesek alapján 1:1000) 0,1 mL-ét oltottuk burgonya dextróz agarra (PDA), malátakivonat-agarra (MEA), karboxi-metil-cellulóz agarra (CMCA), Bengálrózsa-kloramfenikol agarra (RBCA), Czapek-Dox agarra (CDA) és zabpehelyagarra (OA). A táptalajok - az RBCA és a OA kivételével - 100 mg/L sztrepomicint tartalmaztak a baktériumok növekedésének gátlására. A táptalajokat 25, 37, 45 és 55°C-on inkubáltuk a mezofil és termotoleráns/termofil izolálásához. Az izolátumok azonosítását klasszikus

módszerekkel, makro- és mikromorfológiai jellemzőik alapján végeztük el. A meghatározáshoz *Watanabe* (2002), *Bánhegyi et al.* (1985-87), *Fassatióva* (1984) és *Salar et. al* (2007) határozókulcsait használtuk, a szükséges átoltásokat a szerzők ajánlásai alapján alkalmaztuk. A mikrostruktúrák vizsgálatának megkönnyítéséhez mikroszkópikus lemeztenyészeteket is készítettünk kiegészítő elemként. A mikromorfológiai elemzéshez Alpha DCM 510 kamerával felszerelt Zeiss Jenaval, a makromorfológiai vizsgálathoz Nikon Coolpix P5100 fényképezőgéppel kiegészített Nikon SMZ 1000 sztereomikroszkópot használtunk.

A cellulázaktivitás vizualizálására a CMCA táptalajokat három hőmérsékleten termosztáltuk: 37°C-on, 45°C-on és 55°C-on, majd a táptalajokat három nap után értékeltük úgy, hogy Lugol-oldattal festettük meg a felszínüket. A festés láthatóvá teszi a cellulózbontás nyomait. Ahol a celluláz enzimaktivitás magas, ott megfogyatkozik a táptalaj és halványan festődik csak barnára. A tesztet antibiotikummal (sztreptomycin) kezelt és antibiotikumot nem tartalmazó táptalajon is elvégeztük.

3. Néhány energia növény és növényi hulladék összetételének ismertetése

Néhány energia növény és növényi hulladék összetételét az *1/a* és az *1/b. táblázatok* mutatják be. Az egyes növényeknél és hulladékoknál a TOC összetételben nem mutatkozik nagy különbség. A foszfor és nitrogén összetételben jelentős eltérések jelentkeznek. A hemicellulóz a szilfium, energiafű és falomb hulladék esetében 25 % fölött van, ez egyúttal a jobb biológiai bonthatóságra mutat. Általában azok a növények kezelhetők könnyen anaerob úton, amelyeknél kicsiny a lignin és nagy a hemicellulóz tartalom.

A természetes elő-kezelés nem csak a táblázatban feltüntetett növényi hulladékok esetében, hanem valamennyi természetes körülmények között termelt növénynél, vagy növényi maradékoknál is elvégezhető. A gombás feltárásnak a rothasztásra kifejtett hatását részletesebben az energiafűnél (Szarvas-1fajta) és a silphiumnál vizsgáltuk.

1/a. táblázat Különböző eredetű növényi eredetű anyagok összetétele

Minta megnevezése	TOC	TN	TP	Száraz anyag	Szerves anyag
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	g/kg	g/kg
Szilfium (<i>Silphium perfoliatum</i> L.)	377 961	11 600	2 095	860,54	743,72
Energiafű (<i>Agropyron elongatum</i>)	417 499	6 890	839	917,71	829,20
Vegyes falomb-hulladék*	429 019	21 040	1 682	908,66	812,00
Arundó donax	451 552	9 000	2 183	913,90	849,73
Avar (vegyes eredetű) falevél**	411 871	14 370	1 530	931,08	715,13
Kukoricaszár (cső nélkül)	440 051	13 070	3 959	896,04	814,53
Fűzfa (levél + vékony gally <10 mm)	480 089	24 050	1 553	926,27	851,07

Megjegyzés: * vegyes lomb hulladék összetétele: akác, juhar, madár-cseresznye, hárs és nyárfa vékony leveles gallyak (< 10 mm) szárazanyagra vonatkoztatott keveréke; ** avar levél – juhar; platán, nyárfa, akác – egyenlő arányú keveréke;

1/b.táblázat Különböző eredetű növényi eredetű anyagok összetétele

Minta megnevezése	Hidrolizálható szénhidrát, mint glükóz	Lignin	Alfa-cellulóz	Hemi-cellulóz	Égéshő
	mg/kg				
Szilfium (<i>Silphium perfoliatum</i> L.)	70 400	17,4	34,9	37,2	17,0
Energiafű (<i>Agropyron</i>	164 300				18,4

elongatum)		19,7	51,6	26,2	
Vegyes falomb-hulladék	65 300	26,1	38,1	28,9	18,9
Arundo donax (olasz nád)	87 750	24,7	42,6	24,9	18,2
Avar (vegyes eredetű) falevél	62 000	24,3	43,5	12,3	16,4
Kukoricaszár (cső nélkül)	119 100	20,1	44,1	28,6	21,6
Fűzfa (levél + vékony gally <10 mm)	79 200	26,9	37,1	28,5	20,1

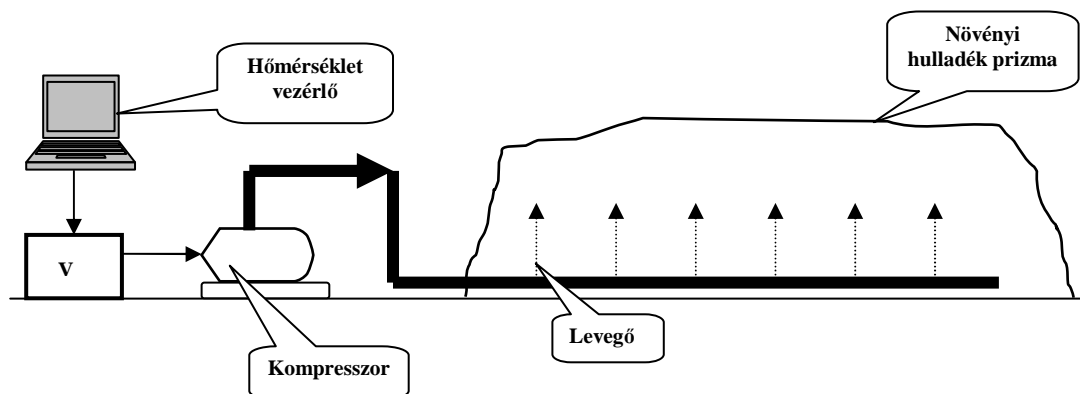
4. A gombás elő-kezelés ismertetése

Az 1.ábra szemlélteti a lignocellulóz tartalmú anyagok gombás feltárásának egyik lehetséges megoldását. Aprítógéppel a mezőgazdasági (kukorica-szár, napraforgó-szár, energia-fű, egyéb fűfélék, zöldség hulladék anyagok stb.) hulladékokat megaprítjuk (15 – 25 cm). Az elő-aprított mezőgazdasági hulladékot prizma alakú rakjuk (50 – 60 cm magas). A bekeverésnél a prizma alanyagához, ha szükséges tápanyag kiegészítés (N és P) adunk. A keverék nedvességét 60 % körüli értékre állítjuk. A prizma hőmérsékletét ventilátoros levegőztetéssel 30 – 40°C között tartjuk. Az 1.ábrán bemutatott előkezelés időtartama kb. 4 – 5 nap között változott. Újabb elő-kezelésnél az előző sarzsiban kifejlődött gombás kultúrát, mint oltó-anyagot (5 – 10% adagolás) alkalmazhatjuk. Így az előkezelés ideje kb. 3 napra lerövidíthető.

A feltárás mértékét vizuálisan (kialakul a sötét színű penész-gomba) is nyomon kísérhetjük. Az elő-kezelést 4 – 5 napnál nem célszerű tovább vinni, mert az aerob (levegőztetés) kezelés hatására a gombás feltárás termékeit az aerob termofil baktériumok légzéssel lebontják és rothasztásnál a könnyen-bontható szerves-frakció aránya és a gáztermelés csökken.

A feltárt cellulóz hulladékot a rothasztó berendezés kialakításának megfelelően 3 – 5 cm méretre aprítjuk. A rothasztóba a cellulóz hulladék mellé a ko-subsztrát elvnek megfelelően szennyvíziszapot, szerves trágyát, kommunális hulladék szerves frakcióját, vagy más hulladékokat adagolunk.

A gombás úton feltárt energiazsuzet kommunális szennyvíziszappal közösen fél-üzemi rothasztó berendezésben ($V = 4 \text{ m}^3$) először szakaszos, majd folyamatos üzemmód (napi elvétel és rátáplálás) mellett rothasztottuk. A szakaszos és a folyamatos kísérleteknél a feltárt energia-füzből a rothasztóba a szennyvíziszap szárazanyagának 30 %-át adagoltuk.



1. ábra Gombás előkezelő berendezés elvi vázlata

A gombás előkezelte növényi hulladékok rothasztását fél-üzemi rothasztó-berendezésben végeztük. A fél-üzemi rothasztó berendezés lehetővé tette, hogy a kevert szubsztrátra jellemző egyensúlyi viszonyokat (pH, illósav, lúgosság), az optimális fajlagos szerves-anyag terhelést, lebontás hatásfokot folyamatos üzemi viszonyok mellett kimérjük. A fél-üzemi rothasztó berendezésekben a keverést

belső keverők biztosították. A rothasztó berendezések kialakítása hagyományos volt, ezért annak részletes ismertetésétől eltekintünk.



1. kép Elő-aprított kezeletlen energiafű



2. kép Elő-aprított gombával-kezelt energiafű

A gombás előkezelés előtti és utáni állapotot az 1. és a 2. kép mutatja. Az elő-kezelést követően a laza szalma struktúra összeesett és a szál szerkezet pusztulását lehetett megfigyelni. A szálszerkezetet a gombák megtámadták és részben lebontották.

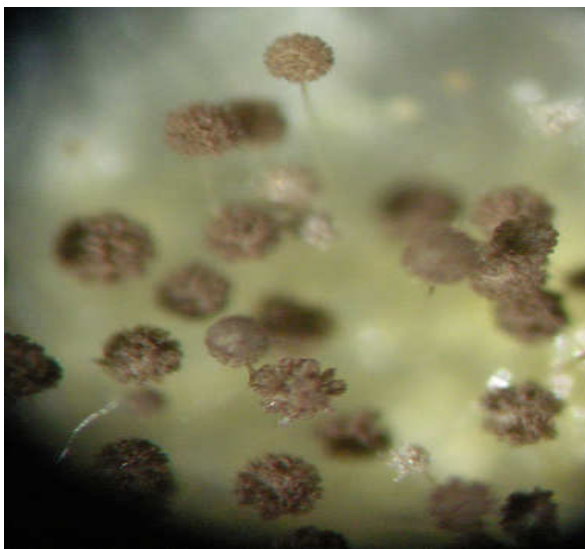
4.1. A gombás elő-kezelés biológiai alapjai és a mikrobiológiai vizsgálatok eredményei

A növényi sejtfalat az ún. lignocellulóz építi fel. A lignocellulóz vázanyag három fő komponensből a cellulózból, hemicellulózból és lignin polimerekből áll. A lignocellulóz komplex összetétele és szerkezete miatt sokféle enzim együttműködésére van szükség a növényi szerves anyag lebontásához. Egyes enzimeknek csak egy részét képes előállítani egy-egy gomba faj, így komplex, diverz közösség szükséges a lignocellulóz hatékonyabb enzimatis bontásához, és ebben a gombák szerepe kiemelkedő. A növényi szerves anyag lignocellulóz tartalmának degradációjában a természetben szinte mindenhol ugyanazok a közreműködő fajok, így a komposzt gombafajait is megtalálhatjuk más közösségekben, illetve élőhelyeken, ahol növényi eredetű szerves anyag lebontása szóba kerül. Ezek alapján nem meglepő, hogy a komposzt jellemző gombafajai jórészt a különböző talajtípusokban is megtalálhatóak.

2. táblázat Az azonosított fajok és megjelenésük különböző hőmérsékleten

IZOLÁTUMOKBÓL AZONOSÍTOTT FAJOK	Inkubálási hőmérséklet			
	25°C	37°C	45°C	55°C
<i>Absidia corymbifera</i> (Cohn) Sacc. & Trotter 1912		+		
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl. 1912	+			
<i>Alternaria</i> sp.				+
<i>Aspergillus flavus</i> Link 1809	+			
<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresenius 1863		+	+	
<i>Aspergillus nidulans</i> (Eidam) G. Winter 1884		+		
<i>Aspergillus niger</i> Tiegh. 1867 (3. kép)		+		
<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tirab. 1908	+			
<i>Bipolaris</i> sp. Shoemaker 1959	+			
<i>Chaetomium globosum</i> Kunze ex Fries 1829	+			

<i>Chaetomium thermophilum</i> La Touche 1950			+	+
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries 1952	+			
<i>Malbranchea cinnamomea</i> (Libert) Oorschot & de Hoog 1984			+	
<i>Myceliophthora thermophila</i> (Apinis) Oorschot 1977			+	+
<i>Paecilomyces variotii</i> Bainier 1907				+
<i>Penicillium diversum</i> Raper & Fennell 1948			+	+
<i>Rhizomucor pusillus</i> (Lindt) Schipper 1978			+	+
<i>Rhodotorula sp.</i> F.C. Harrison 1927	+			
<i>Scytalidium thermophilum</i> (<i>Torula-Humicola</i> komplex) (5-6. kép)		+	+	
<i>Thermomyces lanuginosus</i> P. Tsiklinsky 1899 (4. kép)			+	+
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai 1969	+	+		

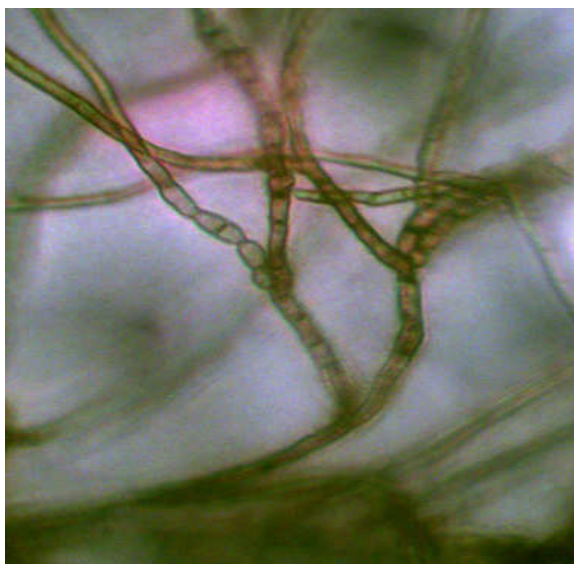


3. kép *Aspergillus niger* konídiumtartói, PDA, 37°C (8x, NIKON SMZ 1000)

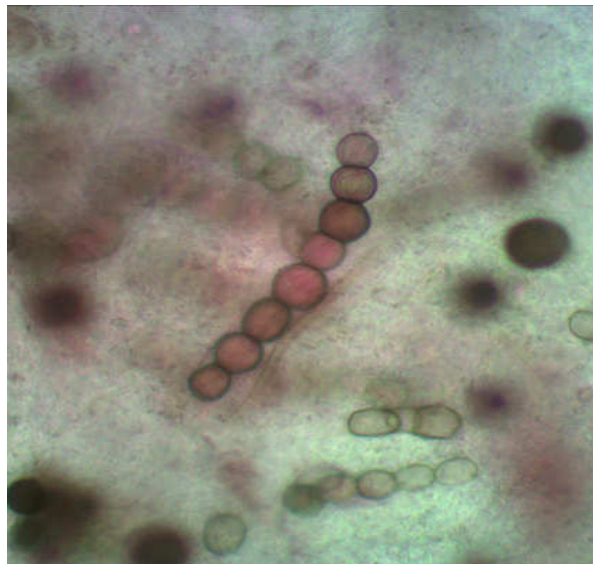


4. kép *T. lanuginosus* aleuriokonídiumok (tépett preparátum, savas fukszin, 500x, JENAVAL)

A meghatározott fajok (2.táblázat) többsége a komposztmintákra jellemző, ezek mellett kozmopolita, növényi szerves anyag bontására valamilyen fokon képes, de a komposzthoz szorosan nem kötődő fajokat is izoláltunk (*Bipolaris sp.*, *Rhodotorula sp.*, *Trichoderma harzianum*). A komposztra jellemző fajok közül az *Alternaria alternata*, az *Aspergillus flavus*, az *A. niger* (3. kép) és a *C. cladosporoides* a kiindulási (mezofil) stádiumban jelenik meg. A mezofil szakaszt követő, termofil fázis jellegzetes fajai: *Absidia corymbifera*, *A. fumigatus*, *Chaetomium thermophilum*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium diversum*, *R. pusillus*, *S. thermophilum* (*Torula-Humicola* komplex, 5 – 6. kép), *T. lanuginosus* (4. kép). A harmadik, poikiloterm (érés, lehülés) fázisban az *Aspergillus*-fajok proliferációja és különböző *Coprinus spp.* (tintagombák) megjelenése általános jelenség (Deacon, 2006). A *Coprinus*-fajok izolálása, illetve identifikációja ugyan kívül esett a vizsgálatok körén, de a minták tárolása során erős egyedei fejlődtek, így a *Coprinus cinereus* azonosíthatóvá vált. *Coprinus sp.* hifák egyes táplemezekén is növekedtek.



5. kép *Scytalidium thermophilum* toruloid hifa (táptalaj metszet, 500x, JENAVAl)



6. kép *Torula* forma (Savas fukszin, táptalaj metszet, 500x, JENAVAl)

A cellulózbontó gombafajok több enzimből álló celluláz enzimkomplexet termelnek. Az enzimkomplex képes a cellulózt glukózig, illetve oligoszacharid egységeig bontani. A cellulázoknak három fő típusa van. Az endoglukanázok (endo-(1,4)- β -d-glukanáz) a lánc belsejének amorf régióiban bontják oligoszacharidokra a cellulózmolekulát. Az exoglukanázok (cellobiohidralázok, exo-(1,4)- β -d-glukanáz) a láncok végéről hasítanak le cellobióz egységeket (általában kristályos cellulóz esetében). A cellobiázok (β -glukozidázok) glukózegységekre bontják a cellobiózmolekulát. Az enzimek induktívak, csak akkor szintetizálódnak, ha a cellulóz az egyetlen felvehető szénforrás a környezetben. Komplex cellulázrendszerrel csak kevés faj rendelkezik. (Deacon, 2006)

A hemicellulóz többféle pentóz vagy hexóz monomerből felépülő amorf anyag. A hemicellulóz néven ismert csoport elemeit a fő alkotó molekula alapján nevezik el, így xilán, galaktán, mannán stb. néven ismertek. Nagy változatosságot mutatnak polimerizációs fok és összetétel tekintetében. Ezeket a molekulákat a xilanáz, galaktozidáz stb. enzimek hidrolizálják. Ezek az enzimek, a cellulázokhoz hasonlóan – induktívak.

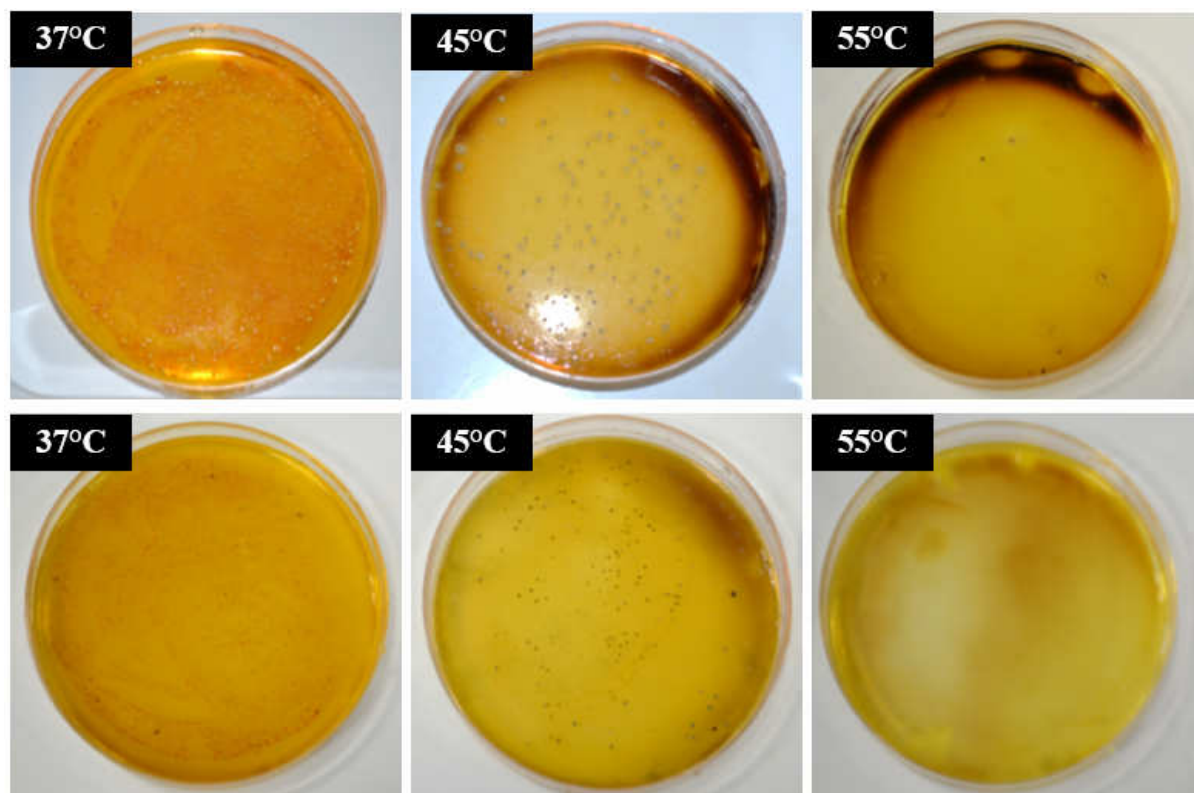
A pektin amorf, poligalakturonsav-metilészter szerkezetű poliszacharidok heterogén csoportja. Bontását a pektinázok (galakturonidázok) végzik.

A lignin bontásában is több enzim vesz részt. A lignin-peroxidáz (LiP) kationos gyököket képezve a lignin nem fenolos alegységeit oxidálja. A mangán-függő peroxidáz (MnP) a Mn(II)-iont oxidálja Mn(III)-ionná, amely kelátképzésre képes és a lignin fenolos alegységeivel lép reakcióba, így ez az enzim elengedhetetlen a lignin depolimerizációjához. A lakkáz oxido-reduktáz, amely aromás vegyületek, főként fenolos és szervesetlen molekulák oxidációját katalizálja. (Kubicek et al., 2007)

3. táblázat A termofil gombák lignocellulóz lebontásában résztvevő enzimeji (Maheshwari et al., 2000 alapján)

SZUBSZTRÁT	ENZIMEK	FAJOK
CELLULÓZ	Endoglukanázok (EGL)	<i>Chaetomium thermophilum</i> , <i>Myceliophthora thermophila</i> , <i>Scytalidium thermophilum</i>
	Cellobiázok / β -glukozidázok (BGL)	<i>Chaetomium thermophilum</i> , <i>Myceliophthora thermophila</i> , <i>Scytalidium thermophilum</i>

	Exoglukanázok / Cellobiohidralázok (CBH)	<i>Chaetomium thermophilum</i> , <i>Myceliophthora thermophila</i> , <i>Scytalidium thermophilum</i>
HEMICELLULÓZ	b-D-xilozidáz	<i>Scytalidium thermophilum</i>
	Xilanáz	<i>Chaetomium thermophilum</i> , <i>Malbranchea cinnamomea</i> , <i>Paecilomyces varioti</i> , <i>Scytalidium thermophilum</i> , <i>Thermomyces lanuginosus</i>
LIGNIN	Lakkáz	<i>Chaetomium thermophilum</i>



7. kép A Lugol-oldattal festett CMCA táptalajok. A lemezeket három hőmérsékleten termosztáltuk: 37°C-on, 45°C-on és 55°C-on, majd a táptalajokat három nap után értékeltük úgy, hogy Lugol-oldattal festettük meg a felszínüket. Ahol a celluláz enzimaktivitás magas, ott megfogyatkozik a táptalaj és halványan festődik csak barnára. A tesztet antibiotikummal (sztreptomycin; felső sor) kezelt és antibiotikumot nem tartalmazó (alsó sor) táptalajon is elvégeztük.

A CMCA táptalajok Lugol-oldatos festése során (7. kép) tapasztaltak – a várakozásnak megfelelően – szoros összefüggést mutattak a tenyésztés hőmérséklete és a cellulózbontás hatékonysága között. A táplemezt a 45 – 55°C-on az inoculum által termelt enzimek szinte teljesen lebontották, míg 37°C-on a lemez a kiindulási állapothoz állt közel. Az antibiotikummal kezelt táptalajok kevésbé degradálódtak, mint a párhuzamosan vizsgált, antibiotikum adagolás nélkül készített lemezek. Bár a cellulóz degradációjában a termofil gombáknak kiemelkedő a jelentősége, az Actinomyceták (pl. *Thermobifida cellulolytica*, *T. fusca*) ugyancsak kimagasló celluláz aktivitással rendelkeznek, így az antibiotikumot nem tartalmazó lemezek hatékonyabb lebontása valószínűleg ennek eredménye. A 3. táblázatban az azonosított termofil gombafajok lignocellulóz lebontásban résztvevő enzimjeit foglaltuk össze, amely alapján jól látszik, hogy a törzsek együttesen a komplex lignocellulózt alkotó molekulák szinte teljes spektrumát képesek lebontani és felhasználni.

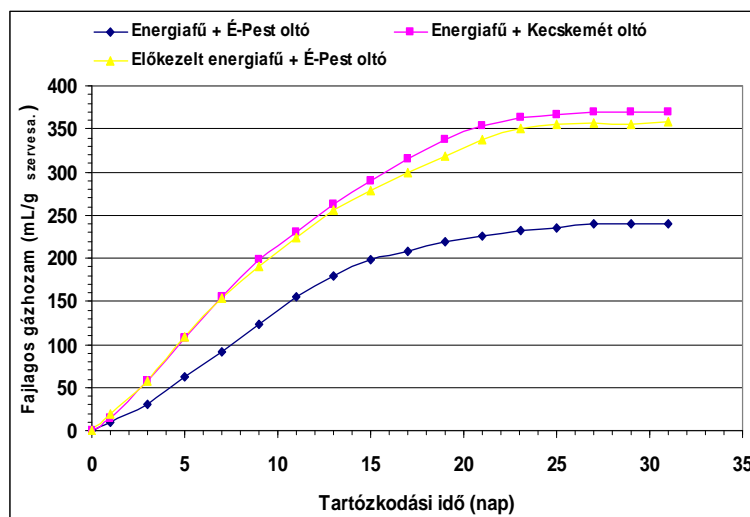
4.2. Szakasos anaerob rothasztási kísérletek

A kezeletlen aprított energiafű és a kezeletlen silphium szakasos anaerob bonthatóságát megvizsgáltuk kommunális szennyvíztelepről származó rothasztott oltó-iszap (É-Pest) és a gombatermelési hulladékok rothasztásából származó oltó iszap hozzáadása mellett (Kecskemét: Pilze-Nagy Kft.). A gombás előkezelésen átesett energiafű és silphium a szakasos rothasztását a fentiekben ismertetett oltó iszapokkal szintén vizsgáltuk. A vegyes gally és falomb keverék bonthatóságát az É-Pesti és a kecskeméti oltó iszappal vizsgáltuk. Ennél a hulladéknál a gombás elő-kezelést nem alkalmaztunk.

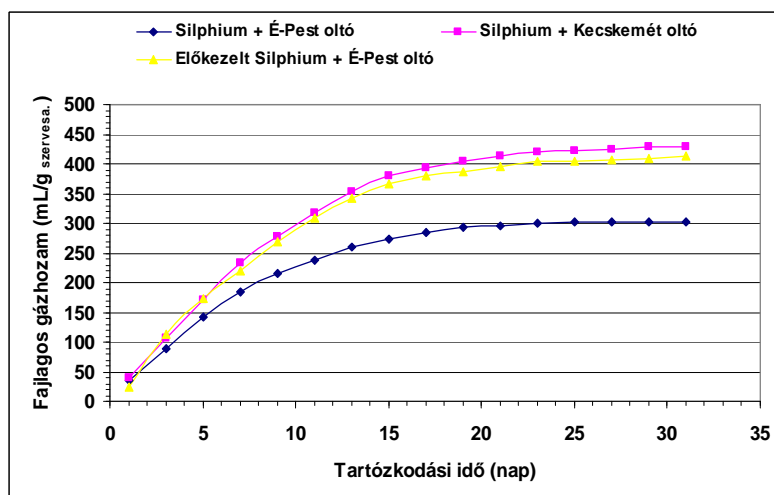
4. táblázat Néhány szubsztrát és különböző oltóanyagok alkalmazás esetében az anaerob rothasztókban mért celluláz enzimaktivitási értékek

Szubsztrát	Rothasztásnál alkalmazott oltó iszap	Fajlagos biogázhozam 31 napos rothasztásnál, a betáplált szerves-anyagra vonatk. (Nm ³ /kg)	Fajlagos celluláz enzim aktivitás mg glükóz/g _{iszap} nap	
			Rothasztás indítása	Rothasztás befejezése
–	É-pesti rothasztott iszap	–	110	–
–	Kecskemét (Pilze-Nagy Kft.) gomba termelésből származó hulladékok rothasztójának iszapja	–	286	–
Vegyes gally és falomb keverék	É-pesti rothasztott iszap	180	100	210
Vegyes gally és falomb keverék	Kecskemét (Pilze-Nagy Kft.) rothasztott iszap	235	217	835
Energiafű (<i>Agropyron elongatum</i>)	Kecskemét (Pilze-Nagy Kft.) rothasztott iszap	370	351	736
Energiafű (<i>Agropyron elongatum</i>)	É-pesti rothasztott iszap	240	195	343
Elő-kezelt gombás energiafű (<i>Agropyron elongatum</i>)	Kecskemét (Pilze-Nagy Kft.) rothasztott iszap	400	410	1066
Elő-kezelt gombás energiafű (<i>Agropyron elongatum</i>)	É-pesti rothasztott iszap	360	295	856
Szilfium (<i>Silphium perfoliatum</i> L.)	Kecskemét (Pilze-Nagy Kft.) rothasztott iszap	430	345	963
Szilfium (<i>Silphium perfoliatum</i> L.)	É-pesti rothasztott iszap	300	256	485
Elő-kezelt gombás szilfium (<i>Silphium perfoliatum</i> L.)	Kecskemét (Pilze-Nagy Kft.) rothasztott iszap	470	485	1250
Elő-kezelt gombás szilfium (<i>Silphium perfoliatum</i> L.)	É-pesti rothasztott iszap	410	422	1102

Megjegyzés: vegyes falomb-hulladék összetétele: akác, juhar, madár-cseresznye, hárs és nyárfa vékony leveles gallyainak keveréke (ø <10 mm) szárazanyagra vonatkoztatott egyenlő arányú keveréke;



2.ábra Energiafű szakaszos rothasztása különböző oltó-iszapok alkalmazása esetében



3.ábra Silphium szakaszos rothasztása különböző oltó-iszapok alkalmazása esetében

A kísérleti eredményeket a 4.táblázat, a 2. és a 3.ábra szemlélteti. Az energiafű (*Agropyron elongatum*) rothasztásánál jól látszik, hogy a gomba-termelésből származó hulladékok rothasztójának iszapja (Kecskemét) nagyobb celluláz aktivitással ($736 \text{ mg glükóz/g}_{\text{iszap}} \text{ nap}$) bír, mint az É-pesti oltóiszap ($343 \text{ mg glükóz/g}_{\text{iszap}} \text{ nap}$). Ennek megfelelően az anaerob lebontásban és gázfejlesztésben is lényegesen jobb eredményt mutat a gombás kecskeméti oltóiszap, mint az É-pesti. Az energiafűnél a betáplált szerves-anyagra vonatkoztatott gázhozam a gombás oltóval (Kecskemét) 370 , ugyanakkor az É-pesti oltóval pedig csak $240 \text{ Nm}^3/\text{kg}$ értéknek adódott. A gombás előkezelésen átesett energiafűnél a kecskeméti oltóval 400 , az É-pesti oltóval pedig $360 \text{ Nm}^3/\text{kg}$ értéket mértünk. Az energiafűnél a gombás kezelés hatására a gázhozam 240 -ról $360 \text{ Nm}^3/\text{kg}$ értékre nőtt. A gombás előkezelés a kecskeméti oltó iszagnál nem mutatott kiemelkedő gázfejlődés növekedést, hiszen az oltó iszap már eleve nagy celluláz aktivitással rendelkezett és így a gombás előkezelésnek már nem volt nagy jelentősége. Így például a gombás energiafű + kecskeméti oltó 400 , a kezeletlen energiafű + kecskeméti oltó pedig $370 \text{ Nm}^3/\text{kg}$ fajlagos gázhozamot mutatott. A fajlagos gázhozamban a gomba-rothasztásból származó oltó (Kecskemét) alkalmazásának előnye a rothasztott kommunális (É-pest) oltó iszappal szemben a silphium rothasztásánál is megmutatkozott (430 és $300 \text{ Nm}^3/\text{kg}$). A gombás feltáráson átesett silphium esetében a kecskeméti oltó esetében 470 , az É-pesti oltónál pedig $410 \text{ Nm}^3/\text{kg}$ értéket mértünk.

Egyértelműen megállapítható, hogy a kecskeméti gombás oltó iszappal indított rothasztásnál mindenesetben jobb eredményt lehetett elérni, mint a natúr energiafű vagy natúr silphium alkalmazása esetében. A gombás-előkezelés hatására a fajlagos gázhozam jelentősen javult, mind az energiafű, mind a silphium esetében. A gombás-előkezelés + a gomba-termelésből származó hulladékok rothasztójának oltójával (Kecskemét) mindenesetben nagyobb gázhozamot lehetett elérni, mint a kommunális oltóval hasonló feltételek között.

A kecskeméti gombás oltó iszappal, vagy a gombás elő-kezelésen átesett anyagok rothasztásánál a celluláz enzim aktivitás lényegesen nagyobb (>800 mg glükóz/g_{iszap} nap), mint a kommunális rothasztóból származó oltóval végzett rothasztásnál (<500 mg glükóz/g_{iszap} nap).

4.3. Fél-üzemi folyamatos rothasztási kísérletek

A fél-üzemi rothasztókban ($V = 4 \text{ m}^3$) a belső keverők voltak beépítve. A keverés folyamatos volt. Rothasztás előtt a növényi anyagokat (energiafű és silphium) <30 mm méretre aprítottuk.

A folyamatos megjelölés napi egyszeri elvételt és az elvételt, követő rátáplálást jelentette. A kísérleteknél szárazanyagra nézve $0,35$ növény/iszap szárazanyag tömegarányt állítottunk be. A HRT és az OLR szoros kapcsolatban van egymással. A kicsiny OLR értékhez nagy HRT, és fordítva nagy OLR értékhez kicsiny HRT tartozik. Tehát a folyamatos táplálású rendszert a HRT és az OLR paraméterekkel együtt kell jellemezni. A kiegyensúlyozott üzemelés érdekében törekedni kell, hogy a HRT és az OLR értéke állandó legyen.

A folyamatos rendszer anyagmérlegét az (1) egyenlet írja le:

$$\frac{dS_e}{dt} = \frac{F}{V} S_0 - \frac{\mu}{F} X_1 - \frac{F}{V} S_e \quad (1)$$

változás

a reaktorban = befolyó – elfogyasztott – elfolyó

ahol: F – a reaktor átfolyási sebessége (m^3/d); X_1 – a reaktorból elfolyó mikroorganizmus koncentráció (kg/m^3); μ – fajlagos szaporodási sebesség (d^{-1}); V – reaktor térfogat (m^3).

Egyensúlyi állapotot feltételezve az (1) egyenlet TOC-re felírva a következőképpen alakul:

$$\frac{F}{V} C_0 = \frac{\mu}{Y} X_1 + \frac{F}{V} C_{et} \quad (2)$$

ahol: C_0 – befolyó koncentráció TOC-ben kifejezve (kg/m^3); C_{et} – az elfolyó szubsztrát bonthatatlan TOC koncentrációja.

$\frac{\mu}{Y} X_1$ tag két részből tevődik össze: a keletkezett gázból ($\text{CH}_4 + \text{CO}_2$), mint reakció termékekből és a szubsztrát sejt szintézisre fordított szén hányadából.

Az elfolyó szubsztrát (C_e) széntartalmának meghatározásakor a gyakorlatban mindig hozzámérjük a lebontott szubsztrát baktérium szintézisre fordított „C” hányadát is. Ennek megfelelően: $C_e = C_{es} + C_{et}$. Ahol: C_{es} – a lebontott szubsztrát sejt szintézisre fordított „C” tartalma; C_{et} – a lebontatlan szubsztrát tényleges „C” tartalma.

A keletkezett gáz ($G_m - \text{kg}/\text{m}^3 \cdot \text{d}$), valamint a reaktorba befolyó (C_0) és az elfolyó (C_e) szubsztrát szerves széntartalmának ismeretében felírhatjuk az egyszerűsített szénmérleget:

$$\frac{F}{V} C_0 - \frac{F}{V} C_e = G_m \quad (3)$$

a reaktorba a reaktorból a gáz mért szén
befolyó szén elfolyó szén tartalma

A folyamatos kísérleteknél a gombás úton elő-kezelt energiafű és silphium ko-szubsztrát rothasztásának üzemi paramétereit a 5.táblázat mutatja.

5.táblázat A gombás úton elő-kezelt az energiafű és szilfium és a szennyvíziszap közös rothasztásának fél-üzemi paraméterei

A szubsztrát megnevezése	Szerves-anyag terhelés (kg/m ³ d)	HRT (d)	Növény/iszap szárazanyag arány (-)	Szerves-anyag lebontás (%)	Biogáz fejlődés a reaktorban (m ³ /m ³ d)
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
Gombás elő-kezelt energiafű + kommunális szennyvíz iszap (nyers + fölös iszap)	0,77	31	0,35	46	0,58 (0,42)
	1,54	31	0,35	40	1,25 (0,97)
	3,09	31	0,35	32	2,41 (1,92)
Gombás elő-kezelt silphium + kommunális szennyvíz iszap (nyers + fölös iszap)	0,76	31	0,35	48	0,85 (0,55)
	1,52	31	0,35	46	1,63 (1,20)
	3,04	31	0,35	39	2,85 (2,20)

Megjegyzés: Az (6). oszlop zárójeles adatai gombás elő-kezelés nélküli, kontroll minta értékei

A gombás elő-kezelt energiafű + kommunális szennyvíz iszap közös rothasztásánál a gázhozam 20 – 25 %-kal, a gombás elő-kezelt silphium + kommunális szennyvíz iszap rothasztásánál a gázhozam 30%-kal nagyobb volt, mint a kontroll kísérletnél (gombás elő-kezelés nélkül) mért érték.

Összefoglalás

Az üzembe helyezett fél-üzemi, gombás elő-kezelő berendezésnél a termofil aerob baktériumok tevékenységét a hőmérséklet-szabályozással tartjuk kézben és a termofil hőmérséklet kialakulását a befújt levegő mennyiségének növelésével akadályozzuk meg. Az elő-kezelést 4 – 5 napnál nem célszerű tovább folytatni, mert az aerob (levegőztetés) kezelés során a gombás feltárás termékeit az aerob termofil baktériumok lebontják és ezáltal a rothasztóban a könnyebben bontható frakció aránya és a gáztermelés csökken.

A cellulóz lebontásában meghatározó szerepet játszanak a természetben mindenütt jelenlévő gombafajok (*Asoergillus* spp., *Chaetomium thermophilum*, *Paecilomyces* spp., *Penicillium* spp., *R. pusillus*, *S. thermophilum*, *T. lanuginosus*), de a feltárásban részt vesznek termofil aerob baktériumok (*Streptomyces* sp., *Actinomyces* sp., *Thermobifida cellulolytica*, *Thermobifida fusca*) is. A természetes körülmények (talaj, cellulóz tartalmú növények: kukorica szár, gabona félek, fű félek, takarmány növények stb.) között jelenlévő gomba és termofil baktérium törzsek elszaporításával végezzük a cellulóz tartalmú anyagok elő-kezelését.

A kommunális iszaprothasztók cellulózbontó képessége lényegesen elmarad a cellulóz anyagokra adaptált vagy speciális cellulózt jól bontó anaerob rendszerek aktivitásától. A kecskeméti gombás oltó iszappal, vagy a gombás elő-kezelésen átesett anyagok rothasztásánál a celluláz enzim aktivitás lényegesen nagyobb (>800 mg glükóz/g_{iszap} nap), mint a kommunális rothasztóból származó iszap celluláz aktivitása (<500 mg glükóz/g_{iszap} nap).

A kísérleti eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy a kecskeméti gombás oltó iszappal indított rothasztásnál mindenesetben jobb eredményt lehetett elérni, mint a natúr energiafűhöz, vagy natúr silphiumhoz adagolt kommunális oltó iszappal. A kontrollhoz viszonyítva a gombás elő-kezelés hatására a gázhozam növekedés az energiafűnél 20 %, a silphium esetében pedig 30% volt.

Irodalom

Bánhegyi, J., - Tóth, S., - Ubrizsy, G., - Vörös, J. (1985a): Magyarország mikroszkopikus gombáinak határozókönyve. 1. – Akadémiai Kiadó Budapest

Bánhegyi, J., - Tóth, S., - Ubrizsy, G., - Vörös, J. (1985b): Magyarország mikroszkopikus gombáinak határozókönyve. 2.- Akadémiai Kiadó Budapest

Bánhegyi, J., - Tóth, S., - Ubrizsy, G., - Vörös, J. (1987): Magyarország mikroszkopikus gombáinak határozókönyve. 3. – Akadémiai Kiadó Budapest

Deacon, J. (2006): Fungal biology. 4th Edition. Blackwell Publishing

Fassatiova, O. (1984): Penészek és fonalassgombák az alkalmazott mikrobiológiában. Mezőgazdasági Kiadó

Hernádi, S. (1980): Papíripari anyagvizsgálat, Műszaki Könyvkiadó, Budapest, 1980

Harmsen, P., - Huijgen, W., - Bermudez, L., - Bakker, R. (2010): Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass.

http://www.biomassandbioenergy.nl/filesdwld/Literature%20review_FBR.pdf

Jeffries, T. W. (1993): Biodegradation of lignin and hemicelluloses. Institute for Microbial and Biochemical Technology, USDA Forest Service, Forest Products Laboratory, One Gifford Pinchot Drive, Madison, WI 53705-12398, U.S.A. In Biochemistry of microbial degradation Edited by COLIN RATLEDGE Department of Applied Biology, University of Hull, Hull, U.K. Kluwer Academic Publishers . Dordrecht / Boston / London, 233 - 277

<http://www.fpl.fs.fed.us/documnts/pdf1994/jeffr94b.pdf>

Krieg, A., - Fischer, T.,: Energie aus Gras <http://www.kriegfischer.de/texte/EnergieausGras.pdf>

Kubicek, C.P., - Druzhinina, I.S. (2007): The Mycota IV - Environmental and Microbial Relationships, 2nd Edition (The Mycota: A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research). Springer-Verlag

Lehtomäki, A. (2006): Biogas Production from Energy Crops and Crop Residues JYVÄSKYLÄ STUDIES IN BIOLOGICAL AND ENVIRONMENTAL SCIENCE 163 A. Lehtomäki, Department of Biological and Environmental Science, University of Jyväskylä, P.O. Boks 35, FI-40014 University of Jyväskylä, Finland

Lehtomäki, A., - Huttunen, S. - Rintala, J.A. (2007): Laboratory investigations on co-digestion of energy crops and crop residues with cow manure for methane production: Effect of crop to manure ratio. Resources, Conservation and Recycling, Vol. 51, 3, 591 – 609

Linke, B., (2003) Biogas from Energy Crops Results from Long-term Lab Scale Experiments. Potsdam, 58 LANDTECHNIK 5/2003

Liu, D., - Wong, P.T.S., - Dutka, B.J. (1973): Determination of carbohydrate in lake sediment by a modified phenol-sulfuric acid method, Water Research, Vol. 7, 741 – 746

Malherbe, S., - Cloete, T.E. (2002): Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. Reviews in Environmental Science and Biotechnology, Volume 1/2002, 105 – 114

Malherbe, S., - Cloete, T.E. (2002): Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. Reviews in Environmental Science and Biotechnology, Volume 1/2002, 105 – 114

Maheshwari, R., - Bharadwaj, G., - Bhat, M. K. (2000): "Thermophilic fungi: their physiology and enzymes," Microbiology and Molecular Biology Reviews, vol. 64, no. 3, pp. 461–488

Saev, M., - Koumanova, B., - Simeonov, Iv. (2009): Anaerobic co-digestion of wasted tomatoes and cattle dung for biogas production. Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy, 44, 1, 55-60

Salar, R. K., - Aneja, K.R. (2007) Thermophilic Fungi: Taxonomy and Biogeography. Journal of Agricultural Technology 3(1): 77-107

Thiel, P.G. – Hattingh, W.H.J. (1966): Determination of hydrolytic enzyme activities in anaerobic digesting sludge, Water Research, Vol. 1, 191 – 196

Watanabe, T. (2002): Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species. CRC Press