

Budapesti Corvinus Egyetem Élelmiszertudományi Kar
Sör- és Szeszíparti Tanszék



Élelmiszertudományi Kar

**Vegyes kultúrás inulin fermentáció
hatékonyságának növelése**

TDK dolgozat



TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KMR-2010-0005
TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0023

Farkas Csilla
I.évf. MSc. hallgató

Témavezető:
Dr.Habil.Nguyen Duc Quang
egyetemi docens

Budapest
2012.

TARTALOMJEGYZÉK

1	BEVEZETÉS	2
2	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
2.1	MEGÚJULÓ/MEGÚJÍTHATÓ ENERGIAFORRÁSOK SZÜKSÉGESSÉGE	4
2.2	BIOETANOL	5
2.2.1	Általános jellemzői.....	5
2.2.2	Bioetanol fajták: első- és másodgeneráció.....	6
2.2.3	Világpiaci helyzet.....	6
2.3	CSICSÓKA ALAPÚ BIOETANOL GYÁRTÁSTECHNOLÓGIÁJA.....	8
2.3.1	Nyersanyag: a csicsóka	8
2.3.1.1	Inulin	10
2.3.2	Fermentációs lehetőségek inulin szubsztrátumra	11
2.3.2.1	Vegyes kultúras inulin fermentáció.....	12
3	KÍSÉRLETI RÉSZ	15
3.1	CÉLKITŰZÉSEK	15
3.2	KÍSÉRLETI HELY	15
3.3	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	16
3.3.1	<i>Kluyveromyces marxianus</i> élesztőtörzs fenntartása	16
3.3.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> élesztőtörzs rehidratálása.....	16
3.3.3	Inokulum tápoldat előállítása	16
3.3.4	Csicsóka cefre előállítás	16
3.3.5	Kísérlettervezés.....	17
3.3.6	Szénhidráttartalom meghatározás	18
3.3.6.1	Redukáló cukortartalom meghatározás (Somogyi-Nelson módszer).....	18
3.3.6.2	HPLC technika	20
3.3.7	A fermentáció	21
3.3.8	Etil-alkohol koncentráció meghatározása	22
3.4	KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK.....	23
3.4.1	Fermentációs profil	23
3.4.2	Optimális szubsztrátum koncentráció és inokulum méret meghatározása	24
3.4.3	Optimum munkapont validálása	29
3.4.4	A különböző beoltási technikák vizsgálata	29
4	ÖSSZEFOGLALÁS.....	34
5	IRODALOMJEGYZÉK	36

1 BEVEZETÉS

“A természetben nincsenek sem jutalmak sem büntetések: következmények vannak.”

/Robert Green Ingersoll/

A fennálló civilizációs szint fejlődésében elsődleges szerepet játszanak a fosszilis (megkövült) energiaforrások (szén, kőolaj, földgáz stb.), melyek az évmilliók során az élő szervezetek által megkötött napenergiát tárolják a Föld mélyén. A nem megújuló, primer energiaforrások kitermelése és felhasználása az elmúlt évtizedekben földtörténeti léptékűre növekedett, melynek következményeként lokális, regionális és globális, az egész Föld bolygót átölelő problémák jelentkeztek. Ide sorolnám a geopolitika jelentőségét, a közel-kelet politikai rendszerének instabilitását, az energia függőséget, az energiaellátás bizonytalanságát, valamint a drasztikus mértékű üvegházhatású gázok kibocsátását és az ebből eredő klímaváltozást [Gyulai, 2007; Sánchez and Cardona, 2008].

A közlekedésszektorban a fosszilis energia iránti igénye, a villamos-, és a hőenergia-szolgáltató szektor mellett, kielégíthetetlen mértékben emelkedik. A fosszilis energiaforrások mintegy 80,0 %-át motorhajtóanyag gyártásra használják fel, melyből körülbelül 61,2 % jut a közlekedési szektorba [IEA, 2009]. Ez megmagyarázza, hogy a fejlett országokban az üvegházhatású gázok kibocsátásának közel 30 %-ért, Magyarországon pedig 10-15%-ért a közlekedési ágazat a felelős [Potori, 2008]. Földünk mintegy 900 milliós járműállománnyal rendelkezik, mely 2050-re akár 2 milliárdra is növekedhet, s ezzel párhuzamosan a szén-dioxid kibocsátás elérheti a 2-3 gigatonnát. A technológia intenzív fejlesztésének köszönhetően a forgalomba kerülő gépkocsik fogyasztása folyamatosan csökken, azonban a Föld lakosságának növekedésével párhuzamosan nő a gépjárművek száma [Kerényi, 2006]. Becslésekre hagyatkozva a szén 155 évre, a kőolaj 42 évre, a gáz pedig 64 évre elegendő, s napjainkban is már szemmel látható, hogy egyre több ország kőolajkitermelése az önellátást, illetve a gépjármű-motorokban felhasználható minőséget nehezen képes biztosítani [Kacz-Neményi, 1998]. Ezek alapján mind a gazdaságpolitika, mind fenntartható életmód biztosításának érdekében a közeljövőben ösztönözni kell az alternatív, megújuló és környezetbarát üzemanyagforrások felkutatását és alkalmazását a fosszilis motorhajtó-üzemanyagok kiegészítésére vagy részben való helyettesítésére.

Napjainkban világszinten a legelterjedtebb alternatív megoldást a bioüzemanyagok szolgáltatják, melyek részleges megoldást nyújtanak az energiaéhség csillapítására és a természeti károk enyhítésére. Sajnos a javarészt előállított szacharóz- és keményítő alapú elsőgenerációs bioetanol nyersanyagforrásként olyan mezőgazdasági kultúrnövények szolgálnak, amelyek az emberi

táplálékkal megegyeznek. Ez természetesen komoly konfliktusok kialakulásához vezet egyes országokban illetve országok közötti gazdasági, társadalmi illetve politikai hozzáállás terén. A probléma kezelésére a kutatók és a gyártók újabb nyersanyagforrások után folytatnak kutatásokat, amelyek gazdaságosan szolgálhatnak a bioüzemanyag gyártására. A csicsóka növény - kedvező beltartalmi és termesztési tulajdonságai révén- potenciális nem-keményítő alapú nyersanyagforrását képezhetné a bioetanol gyártásnak. Problémaként merül fel, hogy a klasszikus *Saccharomyces cerevisiae* élesztőtörzs nem vagy csak csekély inulináz aktivitással rendelkezik, s emiatt a csicsókában nagy mennyiségben jelenlévő tartalékszénhidrátnak, az inulinnak (polimer vegyület) az erjesztését vontatottan és kevésbé hatékonyan képes megvalósítani.

Kutatómunkám során két élesztőtörzsnek –*Saccharomyces cerevisiae* és *Kluyveromyces marxianus*- a kedvező tulajdonságait ötvöztem az inulin vegyes (kevert) kultúras erjesztése során. A biotechnológia számos területén kedvező eredményeket értek el megfelelő mikroorganizmusok társításával, így ebben az esetben is segítséget nyújthat. A fermentáció hatékonyságának fokozása érdekében Szimultán Szacharifikációt és Fermentációt (SSF) alkalmaztam, továbbá a fermentációs paraméterek közül a szubsztrátum koncentráció és a vegyes kultúra beoltási mennyiség által az etanol koncentrációt és a kihozataalt optimáltam.

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Megújuló/megújítható energiaforrások szükségessége

A fosszilis energiahordozók által kiváltott globális kihívások nem oldhatóak meg azzal a szintű, jelenleg is tapasztalható gondolkodásmóddal, amely létrehozta azokat. A „fenntartható” fejlődés felé kell fordulni, melyben az elsődleges szerepet a megújuló/megújítható energiaforrások szolgálják. Természetesen fontos hozzátenni, hogy a környezetvédelmi szempont mellett egyes nemzeteket szigorú szabályozási rendszer kötelez (pl.: EU Direktívák) ezen energiaformák használatára.

A megújuló/megújítható energiaforrások ugyanonnan, ugyanolyan mennyiségben és minőségben ismételten kinyerhetőek vagy újratermelésük biztosított [Hancsók, 2004]. Ide sorolnám a nap-, a szél-, a víz-, a geotermikus energiát, a biomasszából származó energiát, továbbá az árapály energiát illetve a hulladékhőből származó energiát is. A világszintű energiafogyasztásban részesedésük még alacsonynak mondható, arányuk azonban folyamatosan növekszik. Magyarországon jelenleg 3,2-3,6 %-át teszik ki az energiafelhasználásnak [Bai, 2004; Gógös, 2005].

A biomassza a világ negyedik legelterjedtebb energiaforrása a szén, a kőolaj illetve a földgáz után. Meghatározása alapján, a biomassza igen tág gyűjtőfogalom, ugyanis valamely élettérben egy adott pillanatban jelen lévő szerves anyagok és élőlények összességét foglalja magába [<http://www.bitesz.hu/biomassza/biomassza-fogalma-hasznositasa.html>]. Aránya a megújuló energiaforrások között 92% -ot tesz ki hazánkban, szemben az Európai Unió 69%-val. A biomassza termelés számára kedvezőnek mondható éghajlati- és domborzati adottságaiknak köszönhetően mintegy 350-360 millió tonnára tehető a biomassza készletünk, melyből éves szinten 110 millió tonna újratermelődik [Büki, 2010]. Elsősorban élelmiszerként, takarmányként, és ipari alapanyagként kerül feldolgozásra. Napjainkban egyre nagyobb hangsúlyt kap energetikai célú hasznosítása: villamos energiaként, hőenergiaként illetve bioüzemanyagként [Kaszab, 2010].

A bioüzemanyagok részleges, alternatív megoldást nyújtanak a globális problémák mérséklésére. Bio-motorhajtóanyagnak kell tekinteni a bioetanolt, a biodízel, a biogázt, a biometanolt, a biometilétert, a bio-ETBE-t (etil-tercier-butiléter), a bio-MTBE-t (metil-tercier-butiléter), a szintetikus bioüzemanyagokat, a biohidrogént és a tiszta növényi olajokat [42/2005. (III.10.) Kormányrendelet].

2.2 Bioetanol

2.2.1 Általános jellemzői

A bioetanol (a „bio” előtag a nyersanyagforrásként felhasznált növényre utal), olyan etanolból (etil-alkohol, „spiritusz”; kémiai képlete: $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) álló alternatív, folyékony üzemanyag, melyet biológiailag megújuló energiaforrások (növények) felhasználásával nyernek abból a célból, hogy benzint helyettesítő, vagy annak adalékaként szolgáló motorhajtó-üzemanyaghoz jussanak. A közlekedési ágazatban alkalmazzák: tiszta etanolként; benzinhez keverve különböző térfogatszázalékokban; ETBE (Etil Tercier Butil Éter) formájában; E85 keverékként alkalmazva a rugalmasan hajtott motorokkal rendelkező (FFV, Flexible Fuel Vehicle) gépjárművekben; gázolajhoz illetve biodízelhez adalékanyagként hozzáadva [Hoschke,2011].

Általánosságban elmondható, hogy a motorbenzinhez képest az energiatartalma csupán 60-65 %, így azonos úthosszon a gépjármű fogyasztása megnő. Továbbá a kenőképessége is rosszabb (állítólag ricinusolajjal keverve javítható), amely gyakoribb olajcserét és az alkatrészek kopásának fokozottabb veszélyét eredményezheti. Nagy gőznyomása és alacsony párolgáshője miatt hidegindítási problémákkal kell számolni.

A kedvezőtlen tulajdonságokat enyhíti, hogy a magas oktánszámnak köszönhetően az égés tökéletesebb lesz, s lecsökken az üvegházhatású gázok emissziója. Vizsgálatok alapján felére-harmadára mérsékelhető az üvegházhatású gázok és a savas esőzésért felelős kén-dioxid koncentrációja a légkörben. A rákos megbetegedésekért felelős aromás szénhidrogének mennyisége is kedvező mértékben korlátozható. A fosszilis üzemanyagokhoz képest jobb lebomlási tulajdonságokkal bír [Hancsók *et al.*, 2006; Popp, 2007]. Továbbá széleskörű nyersanyagbázissal rendelkezik, ugyanis a mezőgazdasági kultúrnövények vagy az erre a célra termesztett energianövények mellett, olyan alapanyagok is felhasználhatóak, amelyek élelmiszeripari- illetve takarmányozási célra egyáltalán nem alkalmasak, mint például a fuzáriummal fertőzött gabona, s ezáltal a nemzetközi és hazai piacon fellépő értékesítési problémák kivédhetőek [Sánchez and Cardona, 2008].

Kulcsfontosságú kérdés, hogy a felhasználás vagy a teljes életciklus alatt vizsgáljuk meg a felhasznált energia mennyiségét. A felhasználás során egyértelműen pozitív az energiamérleg. A „karbon semlegesség” ebben a fázisban érvényesül, ugyanis az égés során ugyanannyi szén-dioxid kerül a levegőbe, mint amennyit a növény teljes életciklusa során fotoszintézis útján megkötött. A teljes életciklus szemszögéből árnyékot vet az alapanyag előállítása, a feldolgozása valamint a késztermék szállítása során felhasznált nagymennyiségű, elsősorban fosszilis energia. A nitrogén vegyületek kibocsátása a fosszilis energiahordozókhoz képest magasabb, amely az előállítás fázisában képződik, s megfelelő technológia választásával a kibocsátott szint csökkenthető.

2.2.2 Bioetanol fajták: első- és másodgeneráció

A bioetanol legelterjedtebb és legátfogóbb csoportosítási formája, miszerint a bioetanol milyen más felhasználási céllal konkuráló vagy nem konkuráló mezőgazdasági alapanyagból állítható elő, amely alapján beszélhetünk első, illetve második generációs bioetanolról.

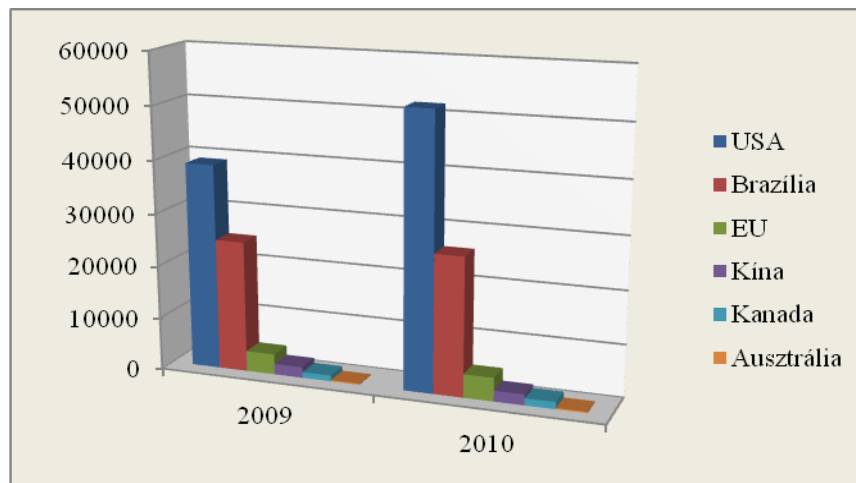
Világszerte a megtermelt elsőgenerációs bioetanol alapanyagforrásként olyan szacharóz- (cukornád [Macedo *et al.*, 2008], a cukorrépa [Ogbonna *et al.*, 2001], a cukorcirok [Mamma *et al.*, 1995] illetve ipari melléktermékek, mint a tejsavó [Dragone *et al.*, 2009] vagy a melasz [Roukas, 1996] stb.) és keményítő tartalmú (gabonafélék: kukorica, búza [Pesson *et al.*, 2009], kapásnövények: burgonya, manioka [Kosugi *et al.*, 2009] stb.) mezőgazdasági növények szolgálnak, melyek az élelmezésben elsődleges szerepet töltenek be. Napjainkban számos ellenvetés fogalmazódik meg ezen alternatív üzemanyagforrással szemben. Kérdésként merült fel, hogy érdemes-e olyan alapanyagot felhasználni alternatív üzemanyag előállítás céljára, melynek csak meghatározott része dolgozható fel, s a nyert energia csak töredék részét képezi a teljes energiaellátásnak. Továbbá megéri-e korlátozni a világ élelmiszer célú növénytermesztését, miközben az emberiség létszáma -az éhezők számával együtt- folyamatosan emelkedik [Rathmann *et al.*, 2010].

A „zöld” üzemanyag hosszabb távú fenntartása érdekében a kutatók és a gyártók alternatív nyersanyagforrások felé fordulnak. A másodgenerációs bioetanol nyersanyagforrása elsősorban a lignocellulóz tartalmú (gabona szalma, kukorica szár stb.) növények [Lin and Tanaka, 2006]. Az ezen alapuló bioetanol gyártástechnológia több szempontból is kedvezőbb, ugyanis az alapanyag nagyobb mennyiségben és olcsóbban áll rendelkezésre, valamint a növény szinte teljes mértékű felhasználására van lehetőség, azonban a gyártástechnológia még nem kifejlett az alacsony hatékonyság valamint a drágasága (pl.: előkezelés) miatt.

Az elmúlt időszakban a kutatók körében egyre nagyobb hangsúlyt kapott a csicsóka. Napjainkban ezen nem-keményítő alapú, inulin tartalmú szubsztrátum energiahatékonyabb és költségkímélőbb etanollá konvertálása kutatási fázisban található.

2.2.3 Világpiaci helyzet

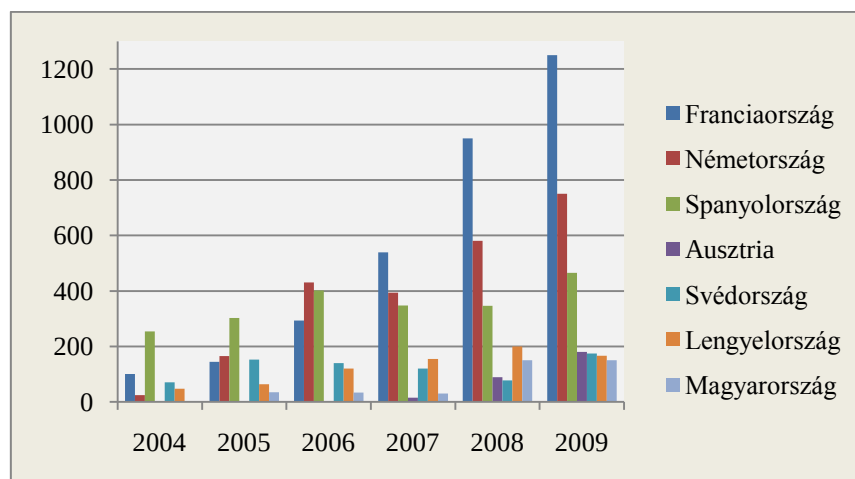
Napjainkban a két vezető bioetanol termelő az Amerikai Egyesült Államok (51900 millió liter/év) és Brazília (26200 millió liter/év), akik mellett az Európai Unió (4455 millió liter/év), Kína (2050 millió liter/év), illetve Kanada (1350 millió liter/év) is nagy mennyiségű termelési kapacitással rendelkezik (**1.ábra**).



1. ábra: Bioetanol termelés a világon (2009-2010) [millió liter/év]

Forrás: <http://ethanolrfa.org/pages/World-Fuel-Ethanol-Production> alapján

Az Európai Unió a bioüzemanyagokra vonatkozóan szigorú szabályozási rendszert (EU Direktívák) alakított ki, amely fontos szerepet tölt be a bio-motorhajtóanyagok hosszabb távú elterjedésében és a biomassa fokozott termelésében.



2. ábra: Bioetanol termelés az Európai Unióban (2004-2009)[millió liter/év]

Forrás: <http://www.biofuels-platform.ch/en/infos/eu-bioethanol.php> alapján

A **2. ábra** alapján a bioetanol termelő uniós tagállamok között felállított sorrendben Franciaország (1250 millió liter/év), Németország (750 millió/ liter), Spanyolország (465 millió liter/év), Svédország (175 millió liter/év), illetve Magyarország (150 millió liter/év) termelési kapacitása is kiemelkedő. Ennek ellenére az Európai Unió még nem versenyképes a tengerentúli bioüzemanyagok gyártásával szemben, ugyanis a bioetanol előállítási költségeit meghatározó az alapanyagár és az energiafogyasztás jóval magasabbak a benzinéhez képest [Biofuels Platform, 2010].

Magyarországon 2010. november elején fogadták el az úgynevezett Bioüzemanyag törvényt (CXVII. Törvény), amely alapján az energia felhasználásban 13 %-ra kell megemelni a megújuló energiaforrások arányát, a közlekedési ágazatban pedig 10%-ra a 2009/28/EK uniós irányelv alapján. Látszólag a törvény a hazai bioetanol iparnak kedvezne, azonban megvalósítása akadályokba ütközik. A Parlament 2011. július 5-én nettó 40 Ft/liter jövedéki adót szavazott meg az E85 (85% etanol, 15% benzin) bioüzemanyagnak, amely áfával együtt 50 Ft-ot tesz ki. A magyar fogyasztókra jellemző érzékenység következtében a fogyasztás legalább egyharmadával visszaesett.

2.3 Csicsóka alapú bioetanol gyártástechnológiája

Az etanol előállítása történhet szintetikus úton, a kőolaj krakkolása során előállított etilénből víz-addíciója révén (5%), illetve a -napjainkban globális szinten elterjedt- magas szénhidráttartalmú növények (95%) erjesztésével.

A csicsóka alapú bioetanol gyártástechnológiája az élelmiszeripari finomszesz előállításához közel hasonló lépésekből tevődik össze: előkészítés, cefrézés, fermentáció, desztilláció, finomítás illetve a maradványanyag hasznosítása [Boucin, 2009].

2.3.1 Nyersanyag: a csicsóka

A csicsóka (*Helianthus tuberosus* L.) a fészkesvirágzatúak (*Compositae*) családjába tartozó gumós, évelő növény. Különböző tájegységeken más-más néven ismert, mint: tótrépa, csókapityóka, kocirépa, patada, jeruzsálemi articsóka stb. [Horváth, 2002].



3. ábra: A csicsóka (virág, szár és gumó)

Forrás: <http://www.fotohaz.hu/fotoarena/showphoto.php?photo=130981>

<http://www.herbalyoga.com/csicsoka.html>

A csicsóka legfontosabb részei a megvastagodott szárképletei, a gumók, melyek sárga, vörös, piros és fehér árnyalatban fordulnak elő. Hazánk éghajlati adottságai mellett magot nem érlel, így gumójával, mint vegetatív szaporító szervével termesztethető. A gumók hosszúsága 6-12 cm,

szélességük pedig 3-5 cm. A gumók nem közvetlenül a tövön, hanem az 5-20 cm hosszú száron ülnek [Fogarassy, 2001].

A gumók beltartalmi összetételét tekintve, általánosságban 80-85 %-ban vizet, 11-20 %-ban szénhidrátot (70-90% inulin, továbbá glükóz, fruktóz és szacharóz) illetve 1-2 %-ban fehérjét tartalmaznak [Ayerbe *et al.*,1993; Kays&Nottingham, 2008]. Vitaminokban (pl.: A-, B₁-, B₂-, B₆-, C, D-vitamin), ásványi anyagokban (pl.: Ca, K, Mg, P, Zn stb.), nyomelemekben (pl.: Fe, Cu, Mn, Zn stb.) gazdag, illetve esszenciális aminosavakat (lizin, arginin, hisztidin, cisztein, triptofán, aszparagin stb.) is tartalmaz [Szambelan, 2003].

A csicsóka kedvező tulajdonságai révén jelenleg nemcsak állati takarmányként és emberi táplálékként szolgál, hanem potenciális nyersanyagforrását képezi a fosszilis üzemanyag alternatív helyettesítésére szolgáló bioetanolnak. A szesziparban a gumó és a szár feldolgozása által bioüzemanyagot és biogázt tudnak előállítani [Kays&Nottingham, 2008; Kosaric *et al.*, 1983].

A mezőgazdasági kultúrnövények termőföldjeiért nem verseng, ugyanis képes olyan éghajlati- és talajviszonyok (gyenge minőségű marginális terület) mellett is megteremni, ahol más élelmezési növények nem.[Bajpai and Margaritas, 1983; Kozmics, 1885]. Termesztése extenzív módon is megvalósítható, így csökkenti a teljes életciklus alatt felhasznált fosszilis energia és a kibocsátott károsanyag mennyiségét. Kiváló növekedési és bokrosodási tulajdonsága miatt a gyomokat elpusztítja maga körül. Növénybetegségekkel és a kártevőkkel szemben ellenálló.

1. táblázat: A bioetanol alapanyagok legfontosabb gazdasági mutatói

Forrás: Bai,2004; Lakner, 2003

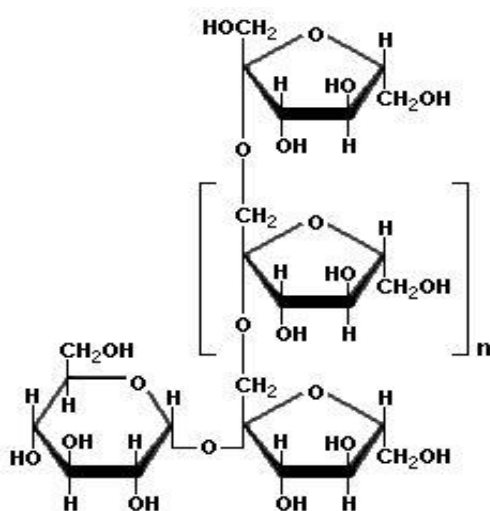
Növény	Termésátlag (t/ha)	Átlagos bioetanol hozam (l/ha)	Feldolgozási költség (Ft/l)	Bioetanol önköltsége (Ft/l)
Cukorépa	40	4000	30	110-120
Cukorcirok	35	3500	30	60-70
Burgonya	20	2000	40	300-350
Őszi búza	5	1500	40	110-120
Kukorica	6	2300	40	90-100
Csicsóka	50	4200	40	70-80

A bioetanol egyes nyersanyagforrásaival összevetve (1.táblázat) elmondható, hogy az éves termésátlaga mintegy 50 tonna/hektár, s az etanol kihozatala 4000-6000 liter/tonna . A csicsóka piaci ára alacsonyabb a kukoricáéhoz képest. A belőle előállított bioetanol önköltsége 20-30 Ft/l-rel, míg a kukorica esetében 40-50 Ft/l-rel haladja meg a benzin önköltségét.

Jelenleg igen szerény a termőterülete, azonban a kedvező alkoholkimotozatal miatt érdemes lenne hazánkban az „időjárásálló” és „igénytelen” növény marginális területeken történő termesztése [Bai, 2004; Göögös, 2005; Laczó, 2008].

2.3.1.1 Inulin

A csicsóka alapú alkoholos fermentáció szénforrása az inulin (4. ábra), amely β -2,1 glikozidos kötéssel kapcsolódó D-fruktóz egységekből épül fel, s mindegyik poliszacharid indító molekulája egy α -1,2 glikozidos kötéssel kapcsolódó glükóz molekula, α -D-glükopiranoz alakban [Franck, 2005; Niness, 1999; Hoschke, 2011].



4.ábra: Az inulin és a frukto-oligoszacharidok szerkezete

Forrás: http://mkk.szie.hu/dep/aeet/tanweb/tapelet/szenhid_html/poliszah.htm

Világszerte több mint 36 ezer növény képes inulintermelésre, s ezen természetes inulinforrások közé tartozik többek között a cikória (*Cichorium intybus*), az örménygyökér (*Inula helinium*), a csicsóka (*Helianthus tuberosus* L.), a gyermekláncfű (*Taraxacum officinaee*), a hagyma (*Allium cepa*), a fokhagyma (*Allium sativum*), a közönséges bojtorján (*Arctium lappa*), az agave (*Agave spp.*), a yacon (*Smallanthus souchifolius spp.*) stb.

A csicsóka növényben az inulin a gumó parenchimasejtjeinek vakuólumaiban keletkezik, a föld feletti részek tároló sejtjeinek citoplazmájában található glükóz, fruktóz, illetve szacharóz molekulák átalakulásával.

Az inulin a közelmúltban kapott figyelmet a fruktóz szirup előállítás, a frukto-oligoszacharid (FOS) gyártás, illetve a bioetanol fermentáció szénhidrát forrásaként [Zhao *et al.*, 2010].

2.3.2 Fermentációs lehetőségek inulin szubsztrátumra

A fermentációs iparban elterjedt, klasszikus *Saccharomyces cerevisiae* élesztőtörzs nem vagy csak csekély inulináz aktivitással rendelkezik, így nem tudja hatékonyan az inulint monoszacharidokká konvertálni, majd azokat etanollá fermentálni. Ennek oka, hogy az inulin olyan polifruktán vegyület, mely közvetlenül nem erjeszthető. A keményítővel ellentétben nem képes a szubsztrátum az elcsírizesedésre, s ellenáll a keményítőtörő enzimekkel (amilázok, glükóamilázok) szemben [Zhang *et al.*, 2010; Guiraud, 1982].

A polimer molekula egyszerű, erjeszthető szénhidrátokká történő hidrolízise történhet savas illetve enzimes úton. Thuesombat és munkatársai (2007) a savasan elhidrolizált csicsókalevek *Saccharomyces cerevisiae* fajélesztővel végzett szakaszos fermentációjával 88 %-os biokonverziós hatékonyságot értek el. Az enzimes hidrolízis során csakis mikrobiális eredetű inulináz enzim alkalmazható. Kondor és munkatársai (2010) a pépesített csicsókagumó *Aspergillus niger* eredetű kereskedelmi inulináz enzimkészítmény által enzimatis inulin hidrolízist, majd a hidrolizátum *Saccharomyces cerevisiae* fajélesztővel történő szakaszos fermentációját hajtották végre, amely során a hidrolízis hatékonysága elérte a 96,7 %-ot, míg a fermentáció biokonverziós foka az elméleti etanol hozamnak 80 %-a volt.

Az inulin alkoholos fermentációja során elhanyagolható a savas vagy enzimes előkezelés, ha olyan mikroorganizmust alkalmazunk, mely inulináz enzimtermelése révén a poliszacharid molekulát etanollá konvertálja. Ezt közvetlen alkoholos fermentációnak nevezzük [Bajpai&Bajpai, 1989; Pekic *et al.*, 1985]. A fermentációs eljárás előnye, hogy csökkenti a bioetanol gyártási költségeit (drága sav vagy nehezen kinyerhető enzim stb.).

Inulináz enzim termelésre képes a gombák között például az *Aspergillus niger* 817 [Nakamura *et al.*, 1996], az *Aspergillus ficuum* [Ettalibi and Barratti, 1987], egyes baktériumok, mint a *Bacillus circulans*, a *Clostridium acetobutylicum* ABKn8 [Efstathion *et al.*, 1986] illetve egyes élesztőtörzsek, mint a *Pichia guilliermondii* [Gong *et al.*, 2007], a *Kluyveromyces marxianus* [Ohta *et al.*, 1993] vagy a *Cryptococcus aureus* [Dilipkumar *et al.*, 2011] stb.

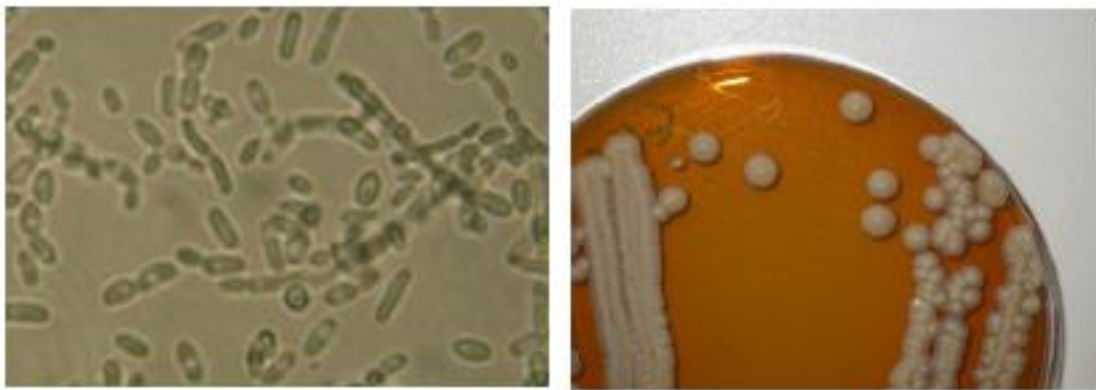
Napjainkban egyre nagyobb hangsúlyt fektetnek a *Kluyveromyces marxianus* élesztőtörzsre, melyet az eddigiek során különböző fermentációs eljárásokban alkalmazták magas inulináz enzimtermelése és hőtűrő képessége, valamint gyors növekedési és ülepedési tulajdonsága miatt: szakaszos fermentáció; rátáplásos (fed-batch) fermentáció; folytonos fermentáció; rögzített β -galaktozidáz enzimmal végzett fermentáció; Ca-alginát gélbezárás, szimultán cukrosítás és erjesztés (SSF), vegyes (kevert) kultúrák fermentáció stb. [Bollok *et al.*, 2000]. A probléma, amely miatt ezen élesztőtörzs még nem terjedt el a fermentációs iparban, hogy a *Kluyveromyces marxianus* alacsonyabb alkoholtűrő- és erjesztő képességgel rendelkezik a *Saccharomyces cerevisiae*

fajélesztőhöz képest [Lane and Morrissey, 2010]. A két élesztőtörzs tulajdonságainak ötvözése révén hatékonyabb és költségkímélőbb fermentáció megvalósítására nyílik lehetőség.

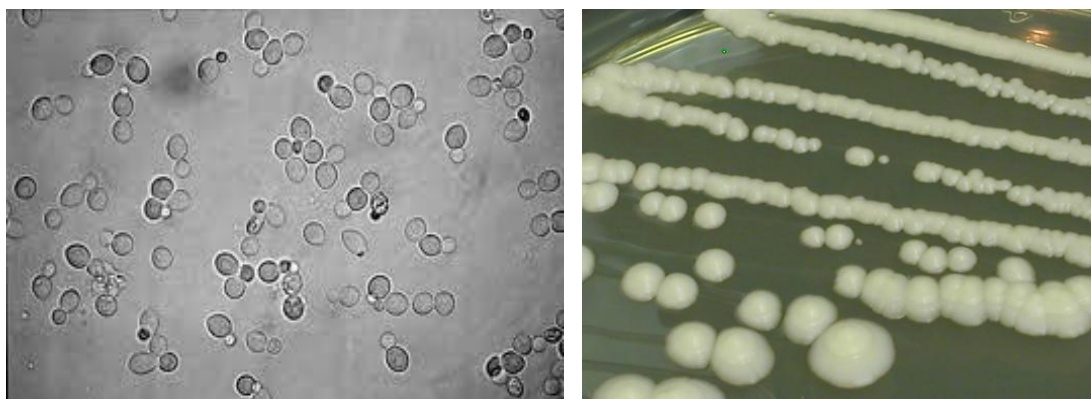
2.3.2.1 Vegyes kultúrás inulin fermentáció

A kevert (vegyes) kultúrás erjesztés során a tápközegben kettő, vagy annál több mikroorganizmus van jelen, így több lépésből álló átalakításokra képesek, amelyre egyetlen mikroorganizmusból álló szintenyészet képtelen lenne.

A rendszertani besorolást tekintve, a *Saccharomyces cerevisiae* és a *Kluyveromyces marxianus* fakultatív anaerob élesztőtörzs a *Saccharomycetaceae* családba tartozik, melyből filogenetikai hasonlóságuk következik. Mindkét élesztőtörzs GRAS besorolású (Generally Recognized As Safe) [Chassang-Douillet *et al.*, 1973; Hensing *et al.*, 1995].



5. ábra: *Kluyveromyces marxianus* élesztőtörzs morfológiája (bal), illetve 24-48 órás tenyésztete YPD tápagaron (jobb) [Forrás: Varga, 2011]



6. ábra: *Saccharomyces cerevisiae* élesztőtörzs morfológiája (bal), illetve 24-48 órás tenyésztete PDA tápagaron (jobb)

[Forrás: http://www.uwyo.edu/virtual_edge/lab13/fungi_results.htm]

A két élesztőtörzs szinergista, egymást kiegészítő kölcsönhatása révén a csicsóka esetében ígéretes eredményeket értek el az inulin vegyes kultúrás erjesztése során. A *Kluyveromyces marxianus* széles enzimmérszletének köszönhetően számos szubsztrátumon képes (glükóz, fruktóz,

szacharóz, laktóz, maltóz, inulin stb.) szaporodni illetve fermentálni azokat. Az élesztőtörzs által termelt extracelluláris endo- és exoinulináz enzim (**2.táblázat**) a hidroláz enzimesoportba tartozik, s azon belül a glükózidázok közé sorolható [Bonciou, 2011]. Az exo-inulináz (β -D-fruktán-fruktanohidroláz, EC.3.2.1.80) az inulin molekula fruktóz-láncvégétől kiindulva terminális fruktóz egységeket hasít le. Az endo-inulináz (2,1- β -D-fruktán-fruktanohidroláz, EC.3.2.1.7) az inulin lánc belsejében véletlenszerűen, DP=2-9 tagszámú frukto-oligoszacharidokat és D-fruktóz molekulákat képez bontás közben [Catana *et al.*, 2007; Rocha *et al.*, 2006].

2. táblázat: *Kluyveromyces marxianus* által termelt enzimek

[Forrás: Lane *et al.*, 2010]

ENZIM	TÖRZS	SZAKIRODALOM
β -galaktozidáz	<i>K. marxianus</i> CBS 7894	Pinheiro <i>et al.</i> , 2003
Inulináz	<i>K. marxianus</i> CDBB-L278	Szczodrak, 2000
Termostabil celluláz	<i>K. marxianus</i> NBRC 0219	Hong <i>et al.</i> , 2007
Laktát dehidrogenáz	<i>K. marxianus</i> KM1	Pecota <i>et al.</i> , 2007
Endopoligalakturonáz	<i>K. marxianus</i> BKM Y-719	Siekstele <i>et al.</i> , 1999
L-galaktozidáz	<i>K. marxianus</i> CBS 6556	Bergkamp <i>et al.</i> , 1993

Az erjeszthető cukrokká lebontott polifruktán vegyületet a *Kluyveromyces marxianus* alacsonyabb hatékonysággal és vontatottan konvertálja etanollá az alacsonyabb alkoholtűrő- és erjesztő képessége miatt a *Saccharomyces cerevisiae* fajélesztőhöz képest [Lane and Morrissey, 2010]. Negro és munkatársai (2007) összehasonlító elemzést végeztek a *Kluyveromyces marxianus* és a *Saccharomyces cerevisiae* fermentációs képességéről, ahol szubsztrátként csicsókagumót alkalmaztak. A *Saccharomyces cerevisiae* esetében a fermentációt megelőzően savas hidrolízist végeztek, ekkor a fermentáció csupán 8-9 órát vett igénybe. Ezzel szemben a *Kluyveromyces marxianus* magas inulináz enzimaktivitása révén nem igényelt előkezelést, azonban a fermentáció ideje mintegy 30 órára kitolódott.

A külföldi tanulmányok valamint a Budapesti Corvinus Egyetem Sör- és Szeszipari Tanszékének kutatócsoportja által elért eredmények is igazolják, hogy a vegyes kultúras fermentáció által a rendelkezésre álló inulin mennyiségének kedvezőbb a felhasználása, továbbá magasabb etanol kihozatal, illetve rövidebb fermentációs idő valósítható meg, mely által a bioetanol előállítás energia- és költség igényeit mérsékelhetjük. Szambelan és munkatársai (2004) tanulmányuk során megállapították, hogy a kevert (vegyes) kultúrák alkalmazásával az elméleti etanol hozam 2-12%-kal megnövelhető a monokultúras fermentációkhoz képest.

A fermentáció hatékonysága a két élesztőtörzs egyidejű alkalmazásával, az úgynevezett Szimultán Szacharifikáció és Fermentáció (SSF) technológiájával növelhető [Yu *et al.*, 2008]. Az SSF és az SHF (Külön Cukrosítás és Fermentáció) technológia közötti különbség, hogy az SSF esetében a cukrosítás és a fermentáció ugyanabban a fermentorban egyidejűleg megy végbe, ezáltal a bioreaktor kapacitás kihasználtsága nő. Az alkoholos fermentáció ideje lerövidül, továbbá magasabb etanol hozamot érhetünk el. [Chang *et al.*, 2008]. A folyamat végbemehet a fermentációs közeghez hozzáadott mikrobiális eredetű inulináz enzim és jó fermentációs képességű mikroorganizmusok által, illetve megfelelő mikroorganizmusok kevert kultúrájának alkalmazásával. A *Saccharomyces cerevisiae* és a *Kluyveromyces marxianus* egyidejű használata révén a szubsztrátum gátlás mérséklődik [Chang *et al.*, 2008] illetve a termotoleráns (hőtűrő) *Kluyveromyces marxianus* élesztőtörzs lehetővé teszi, hogy a fermentáció a cukrosítás optimális hőmérsékletéhez közeli hőmérsékleten menjen végbe, s ezáltal a szennyeződés veszélye, illetve a hűtési költségek is lecsökkennek [Bertillon *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2010]. A *Kluyveromyces* nemzetségbe tartozó egyes élesztők hőtűrőbbeknek bizonyultak, mint a *Saccharomyces* törzsek [Hacking *et al.*, 1984]. A *Saccharomyces cerevisiae* optimális erjesztési hőmérséklete 30-35°C [Kádár *et al.*, 2004], addig a *Kluyveromyces marxianus* 40°C felett is képes alkoholtermelésre, s maximális szaporodási hőmérséklete 47°C [Anderson *et al.*, 1986], 49°C [Hughes *et al.*, 1984] vagy akár 52 °C is lehet [Banat *et al.*, 1992].

Az etanol kihozatal tovább fokozható az inulin fermentáció megfelelő működési paramétereinek (szubsztrátum koncentráció, kevert kultúra beoltási mennyiség stb.) optimalizálásával. A fermentációs iparban a kiválóan alkalmazható kísérlettervezéses alapon történő optimalizálást célszerű használni.

3 KÍSÉRLETI RÉSZ

3.1 Célkitűzések

Jelenleg a forgalomban kapható bioetanol túlnyomó része szacharóz vagy keményítő alapú, melyet az iparban kizárólag a *Saccharomyces cerevisiae* élesztőtörzsek alkalmazásával állítanak elő. Sajnos az élelmiszeripar, amely az emberiség számára a táplálékot biztosítja, szintén keményítő alapanyaggal dolgozik, így az elmúlt évtizedekben jelentős feszültséget gerjesztett a társadalom körében a bioetanol gyártása. A megoldást a második vagy nem-keményítő alapú bioetanol előállítás technológiájának fejlesztése nyújtaná. A csicsóka-alapú bioetanol gyártástechnológiájával már régóta foglalkoznak a kutatók, de sajnos számos korlát miatt nem terjedt el vagy még nem vált megvalósíthatóvá ipari méretekben. Az egyik korlát talán a fermentációs folyamat hatékonysága, amely az alkalmazott *Saccharomyces cerevisiae* élesztő törzsekkel - csekély inulináz aktivitásuk miatt - nem fokozható. A kevert kultúras erjesztési technológiát már számos területen sikeresen alkalmazták (például: a joghurt gyártásnál), azonban az inulin-alapú bioetanol előállításánál még kevésbé tanulmányozott terület. A Sör- és Szeszipari Tanszék kutatócsoportja intenzíven foglalkozik a csicsóka-alapú bioetanol gyártásával. Kapcsolódva a témához, a TDK dolgozatomban különböző mérnöki optimálással foglalkoztam a fermentáció hatékonyságának fokozása érdekében.

A következő feladatokat tűztem ki célul:

1. Inulin-alapú vegyes kultúras fermentáció profiljának tanulmányozása.
2. Az optimális szubsztrátum koncentráció és beoltás mennyiség meghatározása központi elrendezésű kísérlettervezési módszerrel a maximális etanol koncentráció és biokonverziós hatásfok elérésére.
3. Optimális beoltási technikák kidolgozása a vegyes kultúras inulin-alapú fermentáció hatékonyságának fokozására.

3.2 Kísérleti hely

Kutatómunkámat a Budapesti Corvinus Egyetem Élelmiszertudományi Karának Sör- és Szeszipari Tanszékén a Fermentációs Laboratóriumban hajtottam végre, mely kimagasló felszereltsége révén biztosította a kísérleteimhez szükséges anyagokat és berendezéseket.

3.3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.3.1 *Kluyveromyces marxianus* élesztőtörzs fenntartása

A fermentációs kísérleteimhez a Sör- és Szeszipari Tanszék törzsgyűjteményében megtalálható, a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményéből származó *Kluyveromyces marxianus* Y00959 fakultatív anaerob élesztőtörzset alkalmaztam.

Életképességének fenntartása érdekében havonta végeztem átoltást YPD ferdeagarra lamináris fülke alatt, lelángolt oltókacs segítségével. Az átoltást követően 30°C-on 24 órára inkubátorba helyeztem, majd a használatba vételig 4°C-on tároltam.

3.3.2 *Saccharomyces cerevisiae* élesztőtörzs rehidratálása

A Sör- és Szeszipari Tanszéken megtalálható Levuline FB típusú szárított *Saccharomyces cerevisiae* fajélesztőt alkalmaztam fermentációs kísérleteimhez. A szárított élesztő rehidratálása során a főzőpohárba kimért 0,5 g szárított élesztőhöz 100 ml enyhén langyos csapvizet adtam, majd mágnes keverő segítségével alacsony fordulatszám mellett óvatosan kevertettem a sejtszuszpenziót 15-20 percen át.

3.3.3 Inokulum tápoldat előállítása

A *Kluyveromyces marxianus* élesztőtörzs felszaporításához szükséges inokulum táptalaj előállításánál táramérlegem 10,0 g élesztőkivonatot, 20,0 g glükózt illetve 20,0 g peptont mértem ki mérőpoharakban, majd ezen összetevőket 1000 ml desztillált vízben oldottam fel mágneses kevertetés alkalmazásával. Az elkészült táplevest mérőhenger segítségével 250 cm³-es térfogatú lombikokba osztottam szét 100 ml-enként. A lombikokat vattadugóval és celofán papírral zártam le, s végezetül autoklávban steriliztem azokat.

3.3.4 Csicsóka cefre előállítás

Erjesztési kísérleteimhez a Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet (KÉKI) biztosította a ~70 (m/m) %-os szárazanyagtartalmú csicsóka koncentrátumot, mely 52 % inulint, 9,6 % szacharózt, 3,6 % fruktózt, illetve 1,28 % glükózt foglalt magába. A fermentációt megelőző enzimikus hidrolízis nélküli, natív csicsóka cefrék extrakttartalmának beállítása meghatározott mennyiségű csicsóka koncentrátum és csapvíz elegyítésével történt.

3.3.5 Kísérlettervezés

Az optimálási kísérlettervezés lehetővé teszi az ok-okozati összefüggések matematikai leírását, a függő és a független változók közötti kapcsolat illetve a független változók közötti kölcsönhatás feltérképezését, s ezáltal a maximum (optimum) pont eléréséhez szükséges optimális működési paraméterek kialakítását [Aktas *et al.*, 2006; Myers and Montgomery, 2002]. Független változónak (faktornak) nevezzük az olyan mérhető vagy minősíthető változó mennyiséget, amely adott időpontban meghatározott értéket vesz fel és segítségével a vizsgált objektum működése befolyásolható, tehát hatást gyakorol az optimalizációs paraméterre [Kemény, 1986].

A független faktorok kódolt értéket vesznek fel:

$$x_i = (X_i - X_o) / \Delta X_i$$

ahol: X_i : i -edik faktor kódolt értéke; X_o : i -edik faktor értéke az alapszinten; ΔX_i : i -edik faktor variációs intervalluma.

A fermentációs iparban az optimum munkapont meghatározására a központi elrendezésű kísérlettervezést (Central Composite Design, CCD) a Hatásfelület-analízissal (Response Surface Methodology, RSM) együttesen alkalmazzák. A CCD által a centrumpont és a tőle megfelelő lépéstávolságra (+1 és -1) elhelyezkedő pontok mellett a tengelyeken úgynevezett csillagpontok ($+\alpha$ és $-\alpha$) találhatóak [Box and Wilson, 1951]. Segítségükkel különböző faktorkombinációk állíthatók fel az optimalizálni kívánt független változók adott értéktartományán belül. A felállított kísérleti terv pontjai a háromdimenziós koordináta-rendszerben kerülnek ábrázolásra, melyre válaszfelületet illetve görbült felületet kapunk. A kísérleti eredmények alapján a statisztikai elemzésre épülő ANOVA (Analyses of Variance, varianciaanalízis) segítségével megállapítható a felállított modell adekváttsága, az egyes faktorok optimalizálandó paraméterre gyakorolt hatása illetve a faktorok közötti kapcsolat.

A regresszió becslésére alkalmazott másodfokú polinom a következőképpen néz ki:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j$$

ahol, Y : válasz (függő változó) értéke, β_i : a regressziós koefficiens, X_i : független tényező értéke.

Az optimálási kísérlet tervemben független tényezőkként a szubsztrátum koncentrációt (x_1 érték) és a kevert kultúra beoltási mennyiségét (x_2 érték) választottam, melyeknek különböző kombinációinak hatását vizsgáltam meg. Független változónak (y érték) az etanol koncentrációt vettem. A felállított regressziós modell statisztikai elemzése a Statistica 9.0 for Windows szoftvercsomag segítségével történt. A modell illeszthetőségének vizsgálatát az ANOVA alapján a Fischer-féle F -próbával végeztem el. A regressziós hipotézis vizsgálatában pedig Student-féle t -próbát alkalmaztam.

3.3.6 Szénhidráttartalom meghatározás

Fermentációs kísérleteim során az általam előállított, meghatározott szubsztrátum koncentrációjú csicsóka cefrék kezdeti és az erjesztés során csökkenő redukáló cukortartalmának és szénhidráttartalmának folyamatos nyomonkövetéséhez a Somogyi-Nelson módszert, valamint HPLC technikát alkalmaztam.

3.3.6.1 Redukáló cukortartalom meghatározás (Somogyi-Nelson módszer)

Redukáló cukroknak nevezzük azokat a szénhidrátokat, melyek szabad, lekötetlen glikozidos hidroxilcsoporttal rendelkeznek (mint pl.: glükóz, fruktóz, laktóz, maltóz stb.) Meghatározásukra számos módszer létezik, melyek közül az egyik klasszikus, a mai napig széles körben alkalmazott eljárás a Somogyi-Nelson módszer.

A módszer elméleti alapját képezi, hogy a lúgos közegben jelenlévő Cu(II)-ionokat a redukáló cukrok Cu(I)-oxid téglavörös csapadékká redukálják, miközben a szabad glikozidos hidroxilcsoportok oxidálódnak. A keletkező Cu(I)-oxidot az arzenomolibdát komplex redukálja, s ezáltal tartós, jellegzetes kék szín képződik, mely színváltozást spektrofotométer segítségével 540 nm-en mérünk meg [Nelson 1944; Somogyi 1945,1951].

Anyagok:

▪ Somogyi I. reagens:

A Somogyi I. reagens előállításnak első lépéseként a táramérlegen letárazott 2000 ml-es főzőpohárba 288,0 g vízmentes nátrium-szulfátot (Na_2SO_4) mértem ki, melyet az előzőleg felforralt, majd szobahőmérsékletűre lehűtött desztillált víznek 1000 ml-jével oldottam fel mágneses kevertetés alkalmazásával. A folyamatos kevertetés során a mérőpoharakban kimért 24,0 g kálium-nátrium tartarátot ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), a 48,0 g nátrium-karbonátot (Na_2CO_3), illetve a 32,0 g nátrium-hidrogén-karbonátot (NaHCO_3) hozzáadtam, majd végezetül a desztillált víz fennmaradó részével 1600 ml-re egészítettem ki a főzőpohár tartalmát. Felhasználásáig termosztátban tároltam 27°C-os hőmérsékleten [Somogyi, 1945, 1951].

▪ Somogyi II. reagens:

A Somogyi II. reagens készítése során táramérlegen letárazott 1000 ml-es főzőpohárba kimértem 72,0 g vízmentes nátrium-szulfátot (Na_2SO_4), melyet a felforralt, majd szobahőmérsékletűre lehűtött desztillált víz 300 ml-jével oldottam fel mágneses kevertetés alkalmazásával. A folyamatos kevertetés mellett 8,0 g réz-szulfátot ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) adtam hozzá, s a teljes feloldódást követően a főzőpohár tartalmát a fennmaradó desztillált vízzel egészítettem ki 400 ml-re [Somogyi, 1945, 1951].

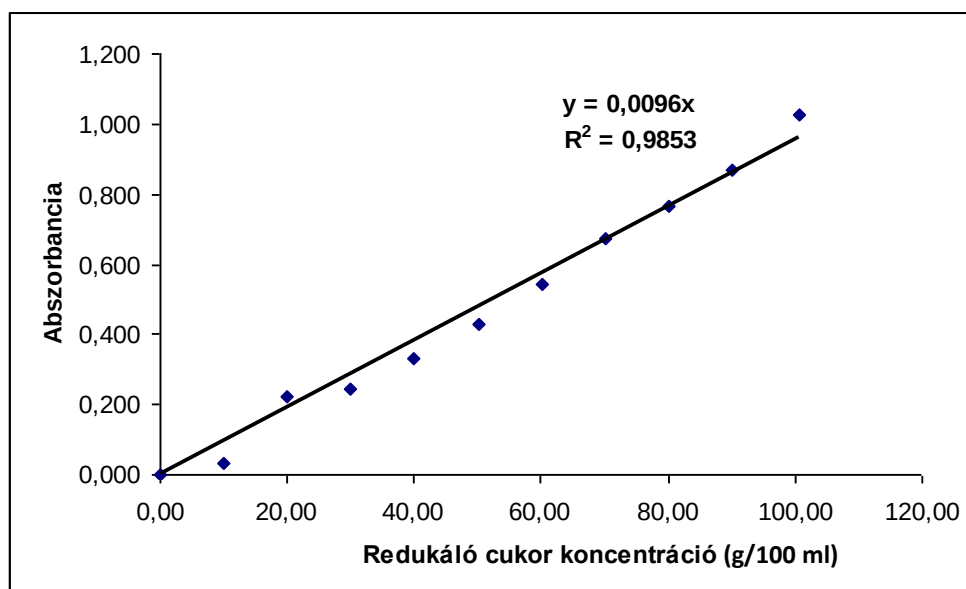
▪ *Nelson reagens:*

A Nelson reagens készítésének első lépéseként a táramérlegen letárazott főzőpohárba kimértem 100,0 g ammónium-molibdátot ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), melyet 1500 ml desztillált vízzel oldottam fel. Az oldódást szintén mágneses kevertetéssel segítettem elő. Ezt követően 84,0 ml tömény kénsavat (cc. H_2SO_4) adtam hozzá. Táramérlegen egy 250 ml-es főzőpohárba 12,0 g nátrium-hidrogén-arsenátot mértem ki, melyet 100 ml desztillált vízzel oldottam fel. A két oldat elegyítését követően a térfogatot 2000 ml-re egészítettem ki. A Nelson reagenst barna üvegben, 37°C-on 24-48 órán keresztül tároltam a felhasználás előtt [Nelson, 1944].

A módszer menete:

Analitikai mérlegen 0,5 g (0,50028 g) fruktózt mértem ki egy főzőpohárba, melyet egy kevés desztillált vízzel feloldva maradéktalanul átöblítettem egy 100,0 ml-es mérőlombikba, majd a lombikot desztillált vízzel jelig töltöttem. A kapott fruktóz oldatból hígítási sort készítettem. Első lépésben 100-szoros hígítást végeztem, s 2*10 darab kémcsőbe (párhuzamos mérést végezve) fruktóz oldatot pipettáztam, úgy, hogy a bemért mennyiség 2,0 ml-től indult, s 0,2 ml-ként csökkent. A bemért mennyiségek térfogatát 2,0 ml-re egészítettem ki desztillált vízzel. Egy darab kémcsőbe csak 2,0 ml desztillált vizet pipettáztam, ez volt a vakminta. Somogyi oldat készítése során Somogyi I. és Somogyi II. reagenst 4:1 arányban kevertem össze, s mindegyik kémcsőbe 2,0 ml mennyiséget pipettáztam. Ezt követően 15 percre a forrásban lévő vízfürdőbe helyeztem a félkémcsőveket, majd szobahőmérsékletűre lehűtöttem azokat. A kémcsővekbe 2,0 ml Nelson reagenst pipettáztam, majd térfogatukat további 4 ml desztillált vízzel egészítettem ki. Az elegyeket alaposan megkevertem, hogy a képződő szén-dioxid eltávozzon. A minták fényáteresztőképességét, abszorbanciáját spektrofotométer (UNICAM, Alpha Helios) segítségével 540 nm-en mértem meg, s a továbbiakban a kapott abszorbancia értékek és cukor koncentrációk alapján felállított kalibrációs egyenessel határoztam meg az oldatok redukáló cukortartalmát. A kapott kalibrációs egyenest a **5. ábrán** szemléltettem.

A kapott pontokra lineáris, regressziós egyenest illesztve könnyen meghatározható a számunkra ismeretlen oldatok fruktóz koncentrációja.



7. ábra: Somogyi-Nelson kalibrációs egyenes

Látható, hogy az R^2 (determinációs koefficiens) értéke 98,53 %, amely bizonyítja a felállított regressziós modell illeszkedését.

3.3.6.2 HPLC technika

A HPLC (High Performance Liquid Chromatography) olyan elválasztás-technika, melynél az elválasztás alapja egy álló- és egy vele nem elegyedő mozgó fázis közötti megoszláskülönbség. Meghatározott, kismennyiségű minta nagynyomáson történő, impulzusszerű beinjektálását követően a mozgó fázissal (eluens) haladó minta komponensei közül egyes komponensek a kromatográfiás oszlop álló fáziséval interakcióba lépnek, visszamaradnak, s így az oszlophossznak megfelelő távolságot más-más idő alatt teszik meg. A visszatartás idejét, azaz a retenció időt a detektor méri, s a detektor jel nagyságának az idő függvényben való ábrázolása révén kromatogramot, elúciós függvényt tudunk felvenni [Amtmann, 2011]. A normál fázisú kromatográfiás elválasztás a vizsgált minta komponenseinek polaritásán alapul, ahol az álló fázis poláros, míg a mozgó fázis apoláros tulajdonságú.

A Sör- és Szeszipari Tanszék Fermentációs laboratóriumában található Thermo Fisher Scientific Corporation által gyártott Surveyor típusú HPLC készüléket alkalmaztam, melynek paraméterei a következők:

- Oszlop: Aminex-87H (Bio-Rad, USA)
- Eluens: 0,005 n H_2SO_4
- Integráló szoftver: ChromQuest 5.0
- Detektor: RI és PDA
- Oszlop hőmérséklet: 45 °C

- Detektor hőmérséklet: 40 °C
- Áramlási sebesség: 0,6 ml/perc
- Eluálási mód: izokromatikus

A módszer menete:

A csicsóka cefrék szénhidráttartalmának meghatározásához a beoltást megelőzően, illetve a beoltást követően 24 órás időközönként, lamináris fülke alatt steril pipettahegyek alkalmazásával, a lombikokból 1,0 ml mintát pipettáztam az Eppendorf csövekbe. A mintákat 15 percen keresztül 14 ezres fordulatszámon centrifugáltam, majd a felülúszóból pipetta segítségével 250 µl mennyiséget pipettáztam a mintatartókba.

A vizsgálandó komponensek (glükóz, fruktóz, oligoszacharidok, inulin, etanol) ismeretlen koncentráció értékeinek mintánkénti meghatározására kalibrációs egyenest készítettem megfelelő standardokat használva.

3.3.7 A fermentáció

A fermentációt megelőzően az elkészített csicsóka cefrék mért pH értékét 21 %-os foszforsav (H_3PO_4) segítségével 3,5 érték alá vittem, annak érdekében, hogy megakadályozzam a fermentáció számára nemkívánatos, káros mikroorganizmusok (baktériumok, penészek) elszaporodását. A szakirodalom alapján, a *Kluyveromyces marxianus* legmagasabb inulináz enzimaktivitását 3,2-5,0 pH tartomány között állapították meg, tehát az általam végrehajtott pH csökkentés nem fejtett ki esetleges gátló hatást [Pessoa and Vitolo, 1999]. A komplex tápsó (UVAVITAL, 20-25 g/hl) alkalmazásával a *Saccharomyces cerevisiae* és a *Kluyveromyces marxianus* élesztőtörzs életfunkcióihoz és elszaporodásához szükséges vitaminokat (tiamin, bioetin, niacin, folsav stb.) és tápanyagokat biztosítottam.

A csicsóka cefrék élesztőtörzsekkel történő beoltása 1:1 arányban történt abszorbancia érték alapján. A rehidratált *Saccharomyces cerevisiae*, illetve az inokulum táplevesben felszaporított *Kluyveromyces marxianus* esetén 100 µl mennyiséget 50-szeresre hígítottam fel desztillált víz segítségével, majd spektrofotométer alkalmazásával 600 nm-en megmértem a fényáteresztő képességüket, s meghatároztam mindkét élesztőtörzsre a beoltási mennyiséget. A beoltást követően összeráztam a beoltott cefréket, majd kotyogókkal láttam el a lombikokat, melyeket termosztátban 30°C-on tároltam. Az általam olvasott tanulmányok alapján ezen a hőmérsékleten mindkét élesztő törzs jól fermentálja a szénhidrátokat etanollá [Bajpai&Margaritas, 1987; Nonklang *et al.*, 2007; Ohta *et al.*, 1993;].

Az erjesztést megelőzően illetve az erjesztés során 24 órás időközönként lamináris fülke alatt 5,0 ml mintát vettem ki kémcsövekbe a Somogyi-Nelson redukáló cukortartalom meghatározásához illetve 1,0 ml mintát Eppendorf csövekbe a HPLC analízishez.

3.3.8 Etil-alkohol koncentráció meghatározása

A beoltott csicsókacefrék etil-alkohol koncentrációváltozásának nyomonkövetésére ismert koncentrációjú etil-alkohol elegyeket készítettem, s a már ismertetett HPLC technikát alkalmaztam. A kapott kalibrációs egyenes segítségével a beoltás előtt és a fermentáció 24 órás periódusaiban vett minták etil-alkohol koncentrációja gyorsan kiszámítható.

A leerjedt cefre alkoholtartalmát a Sör- és Szeszipari Tanszék Technológiai laboratóriumában található Büchi Distillation Unit K-350-es lepárló és Anton Paar DMA 35N alkoholmérő készülék segítségével határoztam meg.

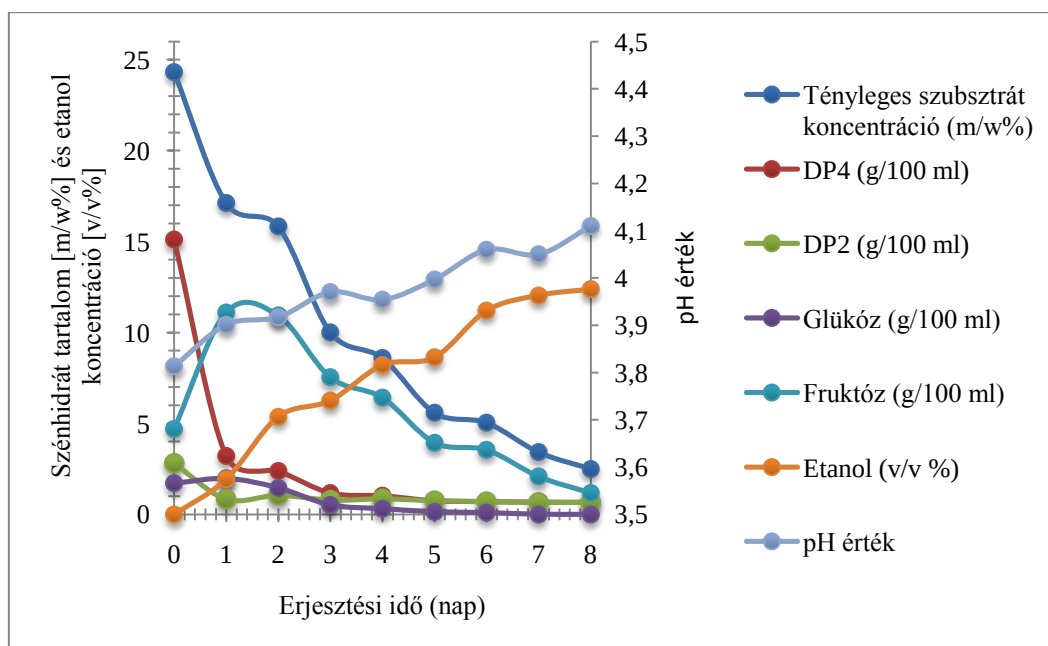
A módszer leírása:

Egy 100,0 cm³-es mérőlombikot a leerjedt cefrével jelig töltöttem, majd a Büchi Distillation Unit K-350-es lepárló desztilláló csövébe maradéktalanul átöntöttem a lombik tartalmát. A desztilláló csőbe pár csepp habzágátlót (Foamsol) cseppentettem. A desztilláció időtartama 3 percet vett igénybe. A desztillátum térfogatát 100 cm³-re egészítettem ki desztillált vízzel, majd alaposan összeráztam a lombikok tartalmát. Szobahőmérsékletű vízfürdőben lehűtöttem a lombikokat, ugyanis az Anton Paar DMA 35N készülék 20°C-ra van kalibrálva. A mért alkoholkoncentrációkat térfogatszázalékban (v/v %) kaptam meg.

3.4 KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK

3.4.1 Fermentációs profil

A TDK munkámban célul tűztem ki a vegyes kultúras erjesztés optimalizálását, így fontosnak tartottam az erjesztés profiljának felvételét. A kísérletben 25 (m/w) % szubsztrátum koncentrációjú (pH=3,81) cefrét előkészítettem, majd UVAVITAL komplex tápsó adagolása után beoltottam kb. 30,0 ml mennyiségű *Saccharomyces cerevisiae* és *Kluyveromyces marxianus* 1:1 arányú kevert kultúrájával. A fermentációs kísérlet reprodukálhatóságának ellenőrzése végett három párhuzamos mérést végeztem el. Az erjesztés kimenetelének nyomonkövetése érdekében naponta vettem mintákat és analizáltam azokat. A redukáló cukortartalom mérésére Somogyi-Nelson módszert, az egyes szénhidrátartalomra pedig HPLC technikát alkalmaztam. Továbbá megmértem a cefre pH érték és etanol koncentráció változását. A kapott eredményeket a **8. ábra** szemléleti.



8. ábra: Fermentációs profil

Az alkoholos fermentáció folyamatát nyolc napon keresztül vizsgáltam. Megállapítottam, hogy a kevert kultúra beoltását követő napon az élesztősejtek nagy hatékonysággal bontották le az inulint és konvertálták etanollá. A kevert kultúrában lévő két élesztőtörzs szinergista kölcsönhatása révén minimalizálódott a fruktózra értendő végtermék inhibíció, ugyanis amíg a *Kluyveromyces marxianus* az inulint gyorsan egyszerű cukrokká (glükóz, fruktóz) bontotta, a *Saccharomyces cerevisiae* fajélesztő az egyszerű cukrokat kiemelkedő erjesztőképessége révén etanollá fermentálta. A fermentációs profil alapján az első nap a cefrében lévő DP4 mennyisége hirtelen lecsökkent 15,11 g/100 ml-ről 3,21 g/100 ml mennyiségre, míg a fruktóz (11,11 g/100 ml) és a glükóz (1,98

g/100 ml) koncentrációja tetőzött. Az alkoholos fermentáció harmadik napjára a cefre alkoholtartalma elérte a 6,26 (v/v) % etanolkoncentrációt, mely már gátló hatást fejtett ki a kevert kultúra, főként a *Kluyveromyces marxianus* élesztősejtek fermentációs hatékonyságára. A fermentációs profilon is látható, hogy a kevert kultúra kezdeti intenzív inulin konvertálása inentől kezdve lelassult. A hatodik naptól a tápközeg etanoltartalma meghaladta 10 (v/v) %-os etanolkoncentrációt. A nyolcadik nap végére a kiejedt natív csicsóka cefre alkoholtartalma elérte a 12,33 (v/v) %-ot, amely 78,7 % biokonverziós fokot jelent.

3.4.2 Optimális szubsztrátum koncentráció és inokulum méret meghatározása

Az előzetes kísérletek alapján azt tapasztaltam, hogy a kiejedt cefre etanol koncentrációja nagymértékben függ a kiindulási cefre cukortartalmától és a beoltott tenyészet mennyiségétől, így a kutatásaim során célul tűztem ki ezen faktorok hatásának vizsgálatát.

3. táblázat: Központi elrendezésű kísérletterv és kapott eredmények

Kísérlet száma	Szubsztrátum koncentráció (g/100ml)	Beoltási mennyisége (OD ₆₀₀ *ml)	Etanol koncentráció (v/v %)	Biokonverziós fok (%)
1.	27	129	10,64	60,98
2.	25	163	9,43	60,68
3.	25	97	10,02	63,19
4.	20	175	9,48	72,29
5.	20	129	10,33	79,22
6.	20	129	10,19	78,11
7.	20	85	10,22	78,39
8.	15	163	8,38	86,20
9.	15	97	8,07	83,82
10.	13	129	7,95	90,86

Gyakorlatban válaszfelületi kísérlettervezési módszert alkalmaztam az optimális szubsztrátum koncentráció és inokulum méret meghatározására. Kísérletsorozatomban optimálandó paramétereiként a kiejedt cefre etanol koncentrációját és a biokonverziós fokot választottam. A válaszfelületi kísérlettervezési módszerek közül a központi elrendezésű kísérlettervezést alkalmaztam két független faktoral. A teljes kísérlettervet és kapott eredményeket **3. táblázatban** foglaltam össze.

A kapott eredmények értékelésére a Statistica 9.0 for Windows szoftvercsomagot alkalmaztam. Az etanol koncentrációra és biokonverziós fokra vonatkozó ANOVA eredményeket a **4. és 5. táblázat** szemlélteti.

4.táblázat: ANOVA eredmények az etanol koncentrációra

Faktor	SS	df	MS	F	p
Szubsztrátum koncentráció (m/w%) (L)	5,7275	1	5,7275	546,3391	0,0272
Szubsztrátum koncentráció (m/w%) (Q)	1,8815	1	1,8815	179,4755	0,0474
Beoltási mennyiség (OD ₆₀₀ *ml)(L)	0,2273	1	0,2273	21,6844	0,1346
Beoltási mennyiség (OD ₆₀₀ *ml)(Q)	0,6135	1	0,6135	58,5268	0,0827
1L by 2L	0,2098	1	0,2098	20,0189	0,1399
Illeszthetőség (Lack of Fit)	0,7710	3	0,2570	24,5172	0,1471

5.táblázat: ANOVA eredmények a biokonverziós fokra

Faktor	SS	df	MS	F	p
Szubsztrátum koncentráció (m/w%) (L)	981,3656	1	981,3476	1592,227	0,0159
Szubsztrátum koncentráció (m/w%) (Q)	16,8812	1	16,8826	27,3748	0,1201
Beoltási mennyiség (OD ₆₀₀ *ml) (L)	9,3791	1	9,3810	15,2363	0,1596
Beoltási mennyiség (OD ₆₀₀ *ml) (Q)	22,8061	1	22,836	37,0941	0,1036
1L by 2L	6,1372	1	6,1764	10,0514	0,194852
Illeszthetőség (Lack of Fit)	18,1445	3	6,0487	9,8136	0,2295

A felállított modell illeszkedésének vizsgálata az előző táblázatokban feltüntetett Fischer-féle F teszt eredményei alapján történt. Megállapítottam, hogy az etanol koncentráció esetében a Lack of Fit F-értéke 24,5172 volt, amelyhez $p = 0,1471$ érték tartozott. Ez azt jelenti, hogy a mért adatok alapján az általam alkalmazott modell illeszkedése 85 % valószínűséggel felel meg. A biokonverziós foknál a kapott F-érték 9,813 és $p = 0,2295$ arra ad következtetést, hogy a biokonverziós fok esetén az illeszkedés csupán 77 % megbízhatósággal rendelkezik. Tekintettel arra, hogy biológiai rendszerekkel végeztem a kísérleteimet, ezen eredmények jóknak mondhatók.

A modell illeszkedésének vizsgálatát az egyes faktorok hatásainak vizsgálata követte. Megállapítottam, hogy a szubsztrátum koncentráció szignifikáns hatást gyakorolt az etanol koncentráció és a biokonverziós fok alakulására 95 % konfidencia szinten. A faktorok hatásait a **6. táblázat** és **7. táblázat** tartalmazza.

6. táblázat: Különböző faktor hatása az etanol koncentrációra

Faktor	Hatás	Standard hiba	t(1)	p	- 95 % konfidencia szint	+ 95 % konfidencia szint
Konstans.	10,2780	0,0724	141,9132	0,0044	9,3577	11,4375
Szubsztrátum koncentráció (m/w%) (L)	1,7017	0,0728	23,3729	0,0272	0,7766	2,6314
Szubsztrátum koncentráció (m/w%) (Q)	-1,2928	0,0964	13,3968	0,0474	-2,5170	-0,0624
Beoltási mennyiség (OD ₆₀₀ *ml)(L)	-0,3433	0,0737	-4,6567	0,0752	-1,2801	0,5017
Beoltási mennyiség (OD ₆₀₀ *ml)(Q)	-0,7729	0,1010	-7,6503	0,0827	-2,0567	0,5527
1L by 2L	-0,4578	0,1023	-4,4742	0,1399	-1,7581	0,8329

Az inulin-alapú fermentáció során az etanol koncentráció változására a felállított modellben szereplő elsőfokú illetve négyzetes szubsztrátum koncentráció, míg biokonverziós fok esetében csak az elsőfokú szubsztrátum koncentráció esetében érvényesült a kiváltott hatás 95 % megbízhatósággal. Megfigyelésre került, hogy a beoltási mennyiség növelése a termékben lévő etanol koncentráció, valamint biokonverziós fok csökkenését váltja ki. A két általam vizsgált független faktor egymásra gyakorolt hatása 85% valószínűséggel szignifikanciát mutatott az etanol koncentrációra vonatkozóan.

7. táblázat: Különböző faktor hatása a biokonverziós fokra

Faktor	Hatás	Standard hiba	t(1)	p	- 95 % konfidencia szint	+ 95 % konfidencia szint
Konstans	78,7073	0,5553	141,7321	0,0044	71,6511	85,7624
Szubsztrátum koncentráció (m/w%) (L)	-22,2745	0,5582	-39,9023	0,0159	-29,3677	-15,1834
Szubsztrátum koncentráció (m/w%) (Q)	-3,8609	0,7393	-5,2336	0,1201	-13,2639	-5,5243
Beoltási mennyiség (OD ₆₀₀ *ml)(L)	-2,2067	0,5653	-3,9033	0,1596	-9,3899	-4,9760
Beoltási mennyiség (OD ₆₀₀ *ml)(Q)	-4,7146	0,7746	-6,0902	0,1036	-14,5614	-5,1255
1L by 2L	-2,4838	0,7846	-3,1645	0,1948	-12,453	-7,4863

A modellben szereplő koefficiensek meghatározására regresszió analízist alkalmaztam a Statistica 9.0 for Windows szoftvercsomag segítségével. A kapott eredményeket a **8. és 9. táblázatban** szemléltettem.

8. táblázat: Regressziós koefﬁciensek és statisztikai próbái (etanol koncentráció)

Faktor	Regressziós koefﬁciens	Standard hiba	t(1)	p	- 95 % konfidencia szint	+ 95 % konfidencia szint
Konstans	-12,4409	1,4986	-8,3014	0,0763	-31,4831	6,6013
Szubsztrátum koncentráció (m/w%) (L)	1,3846	0,0872	15,8607	0,0040	0,2754	2,4938
Szubsztrátum koncentráció (m/w%) (Q)	-0,0258	0,0019	-13,396	0,0474	-0,0503	-0,0013
Beoltási mennyiség (OD ₆₀₀ *ml)(L)	0,1153	0,0136	8,4238	0,0752	-0,0586	0,2892
Beoltási mennyiség (OD ₆₀₀ *ml)(Q)	-0,0004	0,00004	-7,6503	0,0827	-0,0009	0,0002
X ₁ x X ₂	-0,0014	0,0003	-4,4742	0,1399	-0,0053	0,0025

9. táblázat: Regressziós koefﬁciensek és statisztikai próbái (biokonverziós fok)

Faktor	Regressziós koefﬁciens	Standard hiba	t(1)	p	- 95 % konfidencia szint	+ 95 % konfidencia szint
Konstans	40,1649	11,4911	3,4953	0,1773	-105,8430	186,1771
Szubsztrátum koncentráció (m/w%) (L)	1,8496	0,6693	2,7633	0,2210	-6,6552	10,3528
Szubsztrátum koncentráció (m/w%) (Q)	-0,0773	0,0147	-5,2335	0,1201	-0,2657	0,1116
Beoltási mennyiség (OD ₆₀₀ *ml)(L)	0,6833	0,1049	6,5096	0,0970	-0,2653	0,2892
Beoltási mennyiség (OD ₆₀₀ *ml)(Q)	-0,0021	0,0003	-6,0910	0,1036	-0,6503	0,0002
X ₁ x X ₂	-0,0075	0,0023	-3,1645	0,1948	-0,0385	0,0025

Látható, hogy az etanol koncentráció esetében (8. táblázat) a Student-féle t-próba alapján csupán a b₁, b₂ és b₃ koefﬁcienseknél kaptam 95 % megbízhatósági szintet. A b₀ és b₄ becslése 90 %-kal, míg a b₅ csak 85 %-kal mondható biztosnak. Sajnos a biokonverziós fok esetén egyik regressziós koefﬁciens becslése sem érte el a 95 % megbízhatósági szintet.

Az eredményeket összefoglalva a következő másodfokú, polinomikus modelleket javaslom az etanol koncentráció és biokonverziós fok változásának leírására:

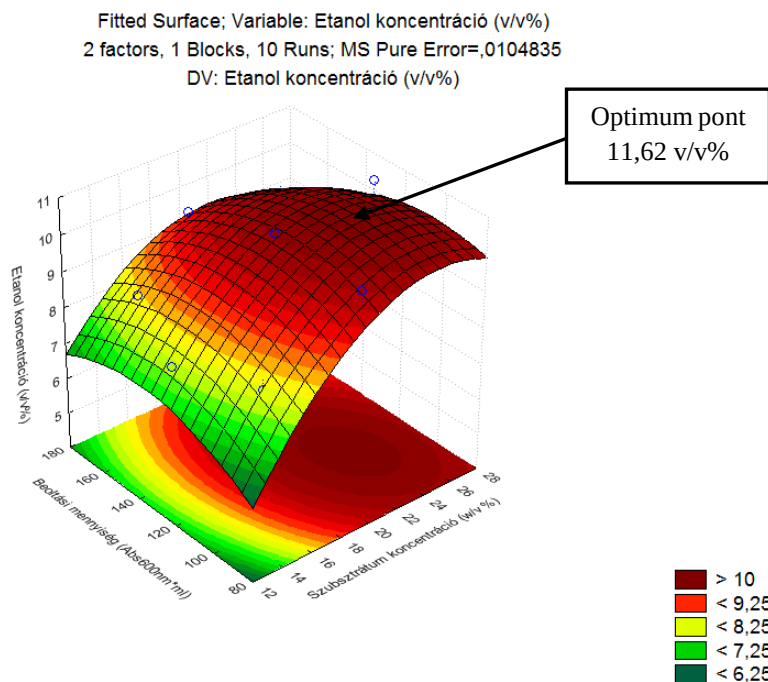
$$Z = -12,4409 + 1,3846x - 0,0258x^2 + 0,1153y - 0,0004y^2 - 0,0014xy$$

ahol: Z: etanol koncentráció (v/v%), x: szubsztrátum koncentráció (m/w%), y: kevert kultúra beoltási mennyiség (OD₆₀₀*ml)

$$Z = 40,1649 + 1,8496x - 0,0773x^2 + 0,6833y - 0,0021y^2 - 0,0075xy$$

ahol: Z: biokonverziós fok (%), x: szubsztrátum koncentráció (m/w%), y: kevert kultúra beoltási mennyisége (OD₆₀₀*ml)

Az optimum pont meghatározásához az etanol koncentráció változását vettem figyelembe, ugyanis a levont következtetések alapján a csicsóka cefre kiindulási szubsztrátum koncentrációja és a vegyes kultúra beoltási inokulum mennyisége ezen optimalizációs paraméterre fejtett ki nagyobb hatást. A mért eredményeket háromdimenziós koordináta-rendszerben ábrázoltam, s a pontokra görbült felületet illesztettem, amely alapján a **9. ábrán** szemléltetett válaszfelületet kaptam.

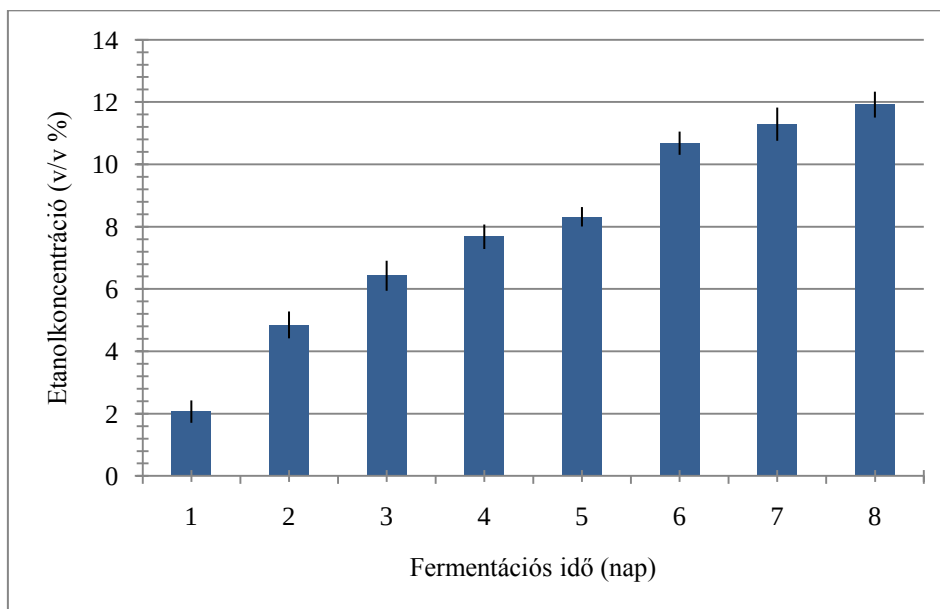


9. ábra: Válaszfelület az etanol koncentrációra [v/v%]

A bemutatott felület alapján a termékben elérhető maximális etanol koncentráció a 24 (m/v) % szubsztrátum koncentráció és 120 OD₆₀₀*ml beoltási mennyiség metszéspontjánál érhető el, így ezt a pontot tekintem optimális munkapontnak. Ebben az esetben a Statistica 9.0 for Windows szoftvercsomag segítségével becsültem meg az elérendő a maximális etanolkoncentrációt. Ezen érték 11,62 (v/v) % lenne, mely a 95 % konfidencia intervallumon becsült 9,11 (v/v) % és 12,12 (v/v) % közé esik. Az optimum pont ellenőrzése végett megerősítő kísérleteket végeztem el.

3.4.3 Optimum munkapont validálása

Az optimum munkapont validálására három párhuzamos kísérletet hajtottam végre az előző fejezetnek megfelelően. Az erjesztés során kapott eredmények alapján az etanol koncentráció alakulását az **10. ábrán** szemléltettem.



10. ábra: Az etanolkoncentráció alakulása a fermentáció során

Látható, hogy az etanolkoncentráció folyamatosan növekedett a vegyes kultúras fermentáció során, s a 6. napra már meghaladta a csicsóka cefre alkoholtartalma a 10,5 (v/v)%-ot. A standard hibával együtt is megállapítottam, hogy az általam végrehajtott kísérlet sorozatban kapott eredmények (10,67 %, 11,29 % és 11,91%) a 9,11 (v/v) % és 12,12 (v/v) % becslési 95 % konfidencia intervallumba estek. Ezek alapján a modellt hitelesnek tekintettem. Gyakorlatban azonban a natúr csicsóka szénhidráttartalma 15-20 (m/w) % között mozog, így javasolnám a 17-18 (m/w)% extrakttartalmú cefre készítését és annak megfelelő mennyiségű tenyészet beoltásának alkalmazását.

3.4.4 A különböző beoltási technikák vizsgálata

A szakirodalmak tanulmányozása során számos esetben találkoztam az inulin-alapú bioetanol előállításánál alkalmazott rátáplálásos, úgynevezett fed-batch fermentációval. Ezalatt a fermentációs közeghez megfelelő időközönként történő szubsztrátum mennyiség hozzáadagolását kell érteni. Ekkor merült fel, hogy a kevert kultúra egyszeri hozzáadása mellett, a meghatározott időzítéssel végrehajtott inokulum mennyiség betáplálása, milyen hatást fejtene ki az etanol koncentrációra, valamint a biokonverziós fokra.

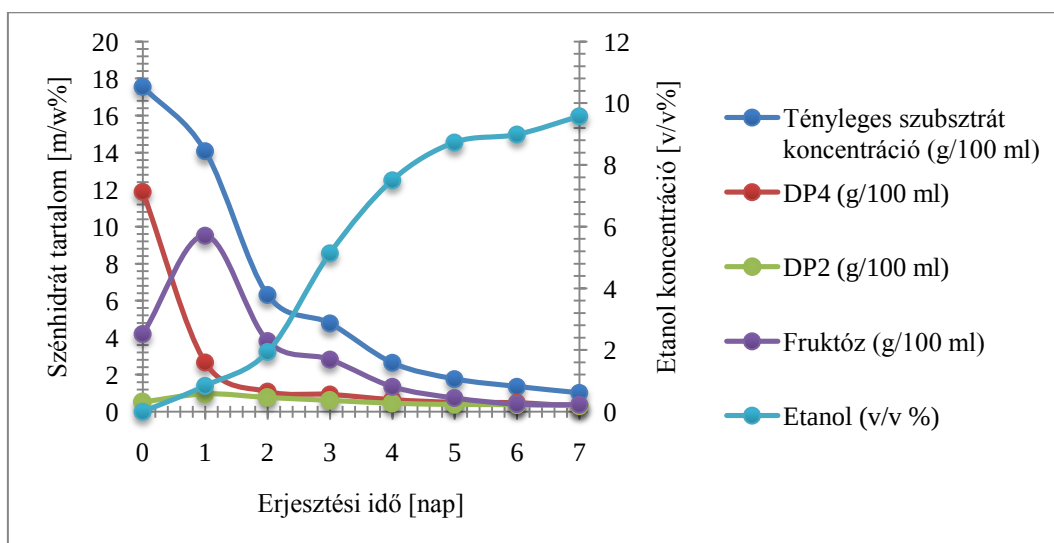
Természetesen fontos megemlíteni, hogy a feltételezett hatékonyság növelése érdekében a meghatározott időpontokban betáplált inokulumban a *Saccharomyces cerevisiae* szárított élesztő friss rehidratálásból, míg a *Kluyveromyces marxianus* friss tenyészetből származott.

A kísérleti sémát a **10. táblázat** szemlélteti.

10. táblázat: Különböző beoltási technika sémája

Kísérlet	Beoltási mennyiség (ml)			
	0. nap	1. nap	2. nap	3. nap
1.	1	-	-	-
2.	2/3	1/3	-	-
3.	2/3	-	1/3	-
4.	2/3	-	-	1/3

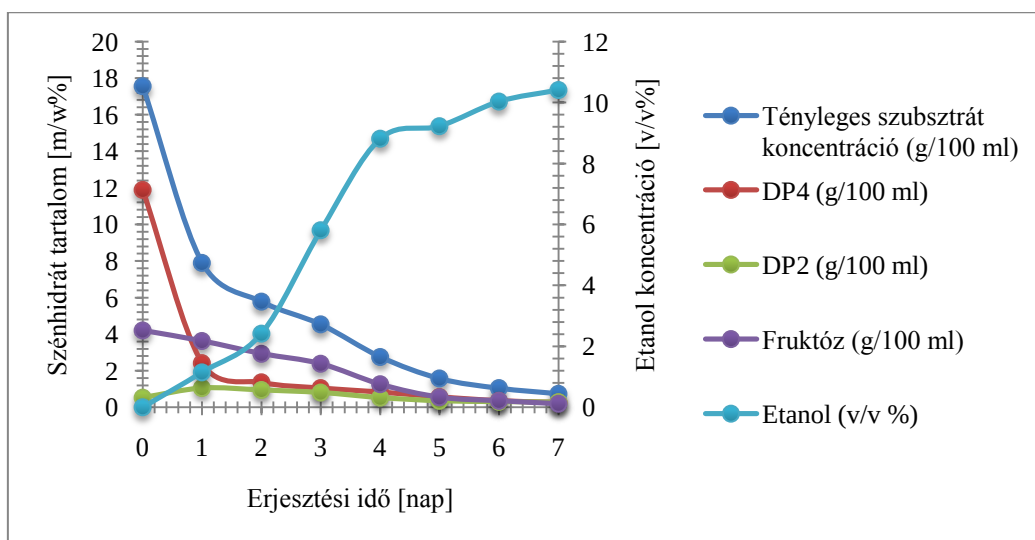
A fermentációkat 17,5 (m/w) % szubsztrátum tartalmú, beállított pH=3,75 és komplex tápsóval kiegészített csicsóka cefrével végeztem. A kísérleteim során mindegyik esetre két párhuzamos fermentációt hajtottam végre, azzal a céllal, hogy egyidejűleg ellenőrizni tudjam kísérleteim reprodukálhatóságát.



11. ábra: 1. beoltási kísérlet hatása az inulin fermentációra

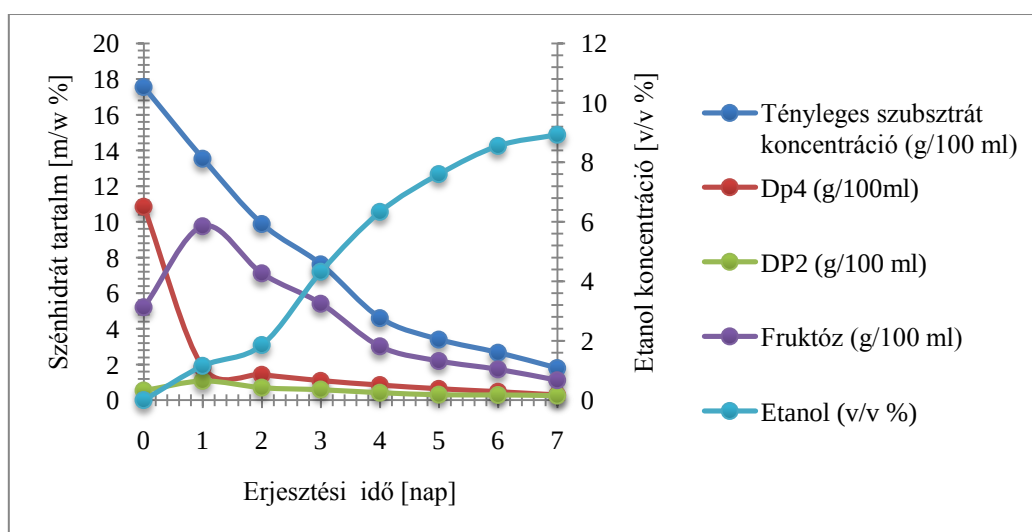
Az első esetben mind a teljes inokulum mennyiségét (30,0 ml) egyszerre adtam hozzá a fermentációs közeghez. A fermentáció kimenetele az **11. ábrán** látható. A kísérlet során a kiejedt cefre etanol koncentrációja 9,58 (v/v) % volt, míg az elméleti etanol kihozatalhoz képest a tényleges etanol kihozatal elérte a 84,4 % -ot.

A második esetben a fermentáció kezdetekor a fermentációs közeghez az inokulum mennyiség 2/3 részét, míg a második nap a maradék 1/3 részét (10,0 ml) adtam hozzá. A beoltási technika eredményességét a **12. ábra** szemlélteti.

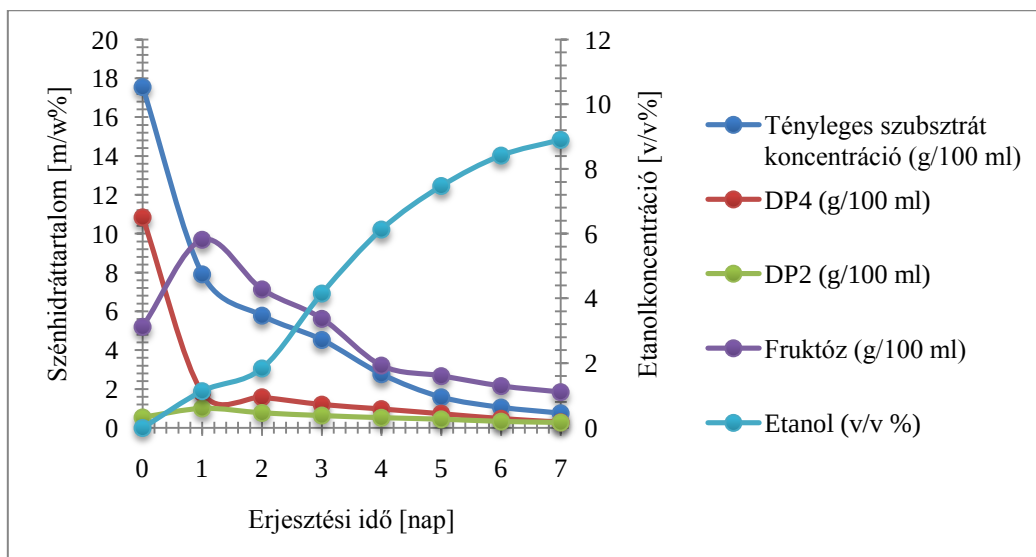


12. ábra: 2. beoltási kísérlet hatása az inulin fermentációra

Azt tapasztaltam, hogy a fermentáció első napján nem növekedett számottevően a fruktóz koncentráció, így az alkohol koncentráció sem. Ennek hatására a friss tenyészet hozzáadása lökést adott a fermentációnak, amelynek eredményeképpen a hetedik nap végére az etanolkoncentráció meghaladta 10 (v/v) %-ot (10,41 v/v %), s a biokonverziós fok pedig 91,77 %-ot mutatott. Ennek az lehet a magyarázata, hogy kisebb mennyiségű *Kluyveromyces marxianus* miatt kevesebb fruktóz keletkezett, így a szubsztrátum gátlás nem érvényesült a *Saccharomyces cerevisiae* esetén, valamint az alacsony alkoholtartalom még nem befolyásolta a *Kluyveromyces marxianus* élesztő tevékenységét.



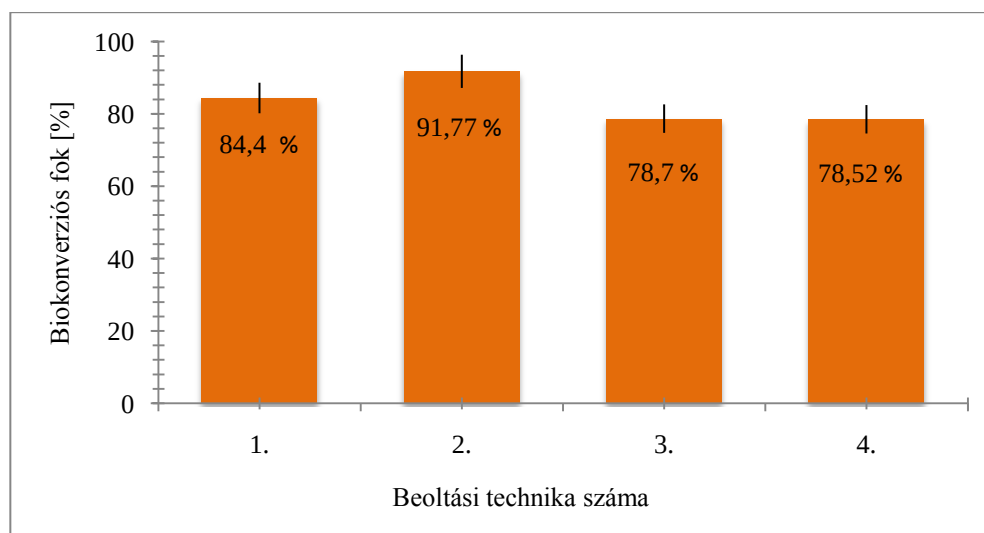
13. ábra: A 3. beoltási kísérlet hatása az inulin fermentációra



14. ábra: A 4. beoltási kísérlet hatása az inulin fermentációra

A **13. és 14. ábrán** bemutatott harmadik és negyedik kísérletsorozatnál szintén azt tapasztaltam, hogy a fermentáció 2. és 3. napjánál már elég magas volt az etanolkoncentráció, amely mérgező hatást fejtett ki a *Kluyveromyces marxianus* élesztősejtek számára. Így ezen kísérletek végén csupán kb. 9 (v/v) % etanolkoncentrációt értem el 78,7 % és 78,51 % biokonverziós fok mellett.

Mind a négy beoltási technikáról elmondható, hogy magas etanol koncentrációkat és biokonverziós fokokat eredményezett, azonban a második kísérletsorozatnál értem el a legmagasabb értékeket, ugyanis a kiejert csicsóka cefrében mért 10,41 (v/v)% alkoholtartalom mellett 91,77 %-os biokonverziós kaptam. A **15. ábra** szemlélteti a beoltási kísérletek során elért biokonverziós fokok értékeit.



15. ábra: Biokonverziós fok változása különböző beoltási technika esetén

Elmondható, hogy a beoltási technikával fokozni tudtam a fermentáció hatékonyságát, ugyanis a biokonverziós fokot 80 %-ról 90 % fölé emeltem. Azt azonban meg kell erősítenem, hogy ezzel az eredménnyel még nem mérítettem ki az inulin-alapú kevert kultúrák erjesztésben elérhető maximumot. Megítélésem szerint a kísérlettervezésen alapuló inulin fermentáció optimalizálása által még tovább növelhető a biokonverziós fok.

4 ÖSSZEFOGLALÁS

TDK kutatómunkám az inulin-alapú bioetanol gyártástechnológia fejlesztésére fókuszált, amely magába foglalta az optimalizációs feladatok megoldását a fermentáció hatékonyságának fokozása céljából. Kísérleteim során az alábbi eredményeket értem el:

A *Saccharomyces cerevisiae* és *Kluyveromyces marxianus* élesztők alkalmazásával vegyes kultúrák etanol erjesztést valósítottam meg, melynek szénforrásaként az inulin szubsztrátum szolgált. Azt tapasztaltam, hogy a fermentáció során a két élesztő faj jól kiegészítette egymást: a *Kluyveromyces marxianus* magas inulináz aktivitásának köszönhetően a cefrében lévő inulin és fruktooligoszacharidok gyorsan hidrolizálódtak erjeszthető cukrokká, amelyeket a *Saccharomyces cerevisiae* hatékonyan konvertált etanollá. A vegyes erjesztésű, 25 (m/w) % extrakttartalmú cefrével 11-12 (v/v) % etanol koncentrációjú termék érhető el. Tehát megerősítettem, hogy a két élesztő faj társítható és vegyes kultúrák erjesztésénél nagyobb biokonverziós hatásfokot kaptam, mint monokultúrák erjesztés esetén.

A fermentáció hatékonyságának fokozására faktoriális kísérlettervezési módszert alkalmaztam. A két független faktorként a szubsztrátum koncentrációt és beoltás mennyiséget választottam, a függő változó pedig kiejert cefre etanol koncentrációja és a biokonverziós hatásfok volt. A függő változók változásának leírására másodfokú polinomikus egyenletet választottam. A válaszfelületi kísérlettervezési módszerek közül a központi elrendezésű kísérlettervezést alkalmaztam. Az optimalizációs kísérlet tervezésénél illetve a kapott eredmények értékelésénél a Statistica 9.0 For Windows szoftercsomagot használtam. Többlépéses kísérletsorozat után a következő modellt választottam az etanol koncentráció és biokonverziós hatásfok leírására:

$$Z = -12,4409 + 1,3846x - 0,0258x^2 + 0,1153y - 0,0004y^2 - 0,0014xy$$

ahol: Z: etanol koncentráció (v/v%), x: szubsztrátum koncentráció (m/w%), y: kevert kultúra beoltási mennyiség (OD₆₀₀*ml)

$$Z = 40,1649 + 1,8496x - 0,0773x^2 + 0,6833y - 0,0021y^2 - 0,0075xy$$

ahol: Z: biokonverziós fok (%), x: szubsztrátum koncentráció (m/w%), y: kevert kultúra beoltási mennyisége (OD₆₀₀*ml)

A statisztikai és matematikai elemzésen alapuló ANOVA eredmények alapján megállapítottam, hogy az etanol koncentráció esetén a modell 85%, a biokonverziós hatásfok esetében pedig, csak 77% az illesztés valószínűsége. A két független faktor közül a szubsztrátum koncentráció 95 % megbízhatósággal befolyásolta az etanol koncentráció és a biokonverziós hatásfok alakulását.

A regressziós modell alapján grafikusán is ábrázoltam a kapott eredményeket az etanol koncentrációra és a biokonverziós hatásfokra. Azt tapasztaltam, hogy a szubsztrátum koncentráció növelésével a biokonverziós hatásfok csökken, ezért az optimum munkapont meghatározásához az etanol koncentráció változását vettem figyelembe. Ezek alapján a becsült maximális etanolkoncentrációt (11,62 v/v%) a 24 (m/w) % extrakttartalmú csicsókacefre és 120 OD₆₀₀*ml beoltási mennyiség alkalmazásával értem el. Ezen érték 95 % konfidencia intervalluma: 9,11 (v/v) % és 12,12 (v/v) %.

A becsült optimum munkapont validálására kísérleteket végeztem és azt tapasztaltam, hogy a fermentáció 6. napjában érhető el az modell segítségével becsült maximális etanol koncentráció. Ennek alapján megállapítottam, hogy az általam felállított modell alkalmas az etanol koncentráció és biokonverziós hatásfok leírására. Tekintettel, hogy a natúr csicsókaextraktum szénhidráttartalma 15 (m/w) % és 20 (m/w) % között mozog, a további kísérletekben 17-18 (m/w) % szubsztrátumtartalmú cefréket alkalmaztam.

Megvizsgáltam a különböző beoltási technikák hatását a vegyes kultúras erjesztés hatékonyságára. Megállapítottam, hogy mind a négy esetben kedvező eredményekre tettem szert, mind a biokonverziós fok, mind az etanol koncentráció terén. A második beoltási technikánál értem el a legmagasabb etanol koncentrációt (11,41 v/v%) és biokonverziós fokot (91,77%) a 17,5 (m/w)% extrakttartalmú csicsóka cefre mellett. Ennek magyarázata talán az, hogy az inokulum 2/3 részének beoltását követően a következő nap a maradék 1/3 rész fermentációs közeghez adásával friss élesztősejteket jutattam be a rendszerbe, amely által megelőzhető a szubsztrátum gátlás a *Saccharomyces cerevisiae* illetve és végtermék gátlás a *Kluyveromyces marxianus* számára. Így növelhető a fermentációs rendszer hatékonysága 78 %-ról 91 %-ra.

Megállapítottam, hogy a kapott eredmények laboratóriumi méretűek, de megalapozhatják az inulin-alapú vegyes kultúras etanol erjesztés fejlesztését. Természetesen még sok kísérleti munkára lenne szükség az ipari technológia megvalósításához, amelyet jövőben szeretnék folytatni.

5 IRODALOMJEGYZÉK

- Aktas, N., Boyaci, H. et al.** (2006): Optimization of lactose utilization in deproteinated whey by *Kluyveromyces marxianus* using response surface methodology (RSM), *Bioresource Technology*, Volume 97, Pages 2252–2259.
- Anderson, P. J., McNell, K., Watson, K.** (1986): High-efficiency carbohydrate fermentation to ethanol at temperatures above 40°C by *Kluyveromyces marxianus var. marxianus* isolated from sugar mills, *Applied and Environmental Microbiology*, Volume 51, Issue 6, Pages 1314-1320.
- Amtmann M.** (2010): Intenzív folyadékkromatográfia, előadás jegyzet.
- Bai A.** (2004): A bioetanol-előállítás gazdasági kérdései, *Agrártudományi Közlemények*, 2004/14. szám, 30-38. oldal.
- Bajpai, P., Margaritis, A.** (1983): Effect of sugar concentration in Jerusalem artichoke extraction *Kluyveromyces marxianus* growth and ethanol production, *Applied and Environmental Microbiology*, Volume 52, Issue 2, pages 723-725.
- Bajpai, P., Bajpai, P. K.** (1989): Utilization of Jerusalem artichoke for fuel ethanol production using free and immobilized cells, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, Volume 11, Issue 2, Pages 155-168.
- Banat, I. M., Marchant, R.** (1995): Characterization and potential industrial applications of five novel, thermotolerant, fermentative, yeast strains, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Volume 11, Issue 3, Pages 304-306.
- Bertilsson, M., Olofsson, K., Lidén, G.** (2009): Prefermentation improves xylose utilization in simultaneous saccharification and co-fermentation of pretreated spruce, *Biotechnology for Biofuels*.
- Bollók, M., Réczey K., Zacchi, G.** (2000): Simultaneous Saccharification and Fermentation of Steam-Pretreated Spruce to Ethanol, *Applied Biochemistry and Biotechnology* Volume 84–86, Pages 69-80.
- Boucín, C., Tabacarn, C., Bahrim, G.** (2009): Yeasts isolation and selection from bioethanol production from inulin hydrolyses, *Innovative Romanian Food Biotechnology*, Volume 6, Issue of March.
- Box, G.E.P. Wilson, K.B.** (1951): On the experimental attainment of optimum conditions. *J. R. Statist. Soc.*, 13: 1-45.
- Büki G.** (2010): Megújuló energiák hasznosítása, Magyar Tudományos Akadémia, Budapest, <http://www.scribd.com/doc/46063155/Megujulo-energiak-hasznositasa-MTA>
- Catana, R., Eloy, M. et al.** (2007): Stability evaluation of an immobilized enzyme system for inulin hydrolysis, *Food Chemistry*, Volume 101, Issue 1, Pages 260-266.
- Chassang-Douillet, A., Ladet, J. et al.** (1973): Remarques sur le metabolisme respiratoire de *Kluyveromyces marxianus* Van Der Waalt, *Journal of Basic Microbiology*, Volume 13, Issue 3, Pages 193-199.
- Chi, Z., Chi, Z., Zhang, T. et al.** (2009): Inulinase- expressing microorganisms and applications of inulinases, *Applied and Environmental Microbiology*, Volume 82, Issue 2, Pages 211–220.
- Chang, B., Yuan, W. et al.** (2008): Ethanol production from Jerusalem artichoke juice using selfflocculating yeast, *Abstracts / Journal of Biotechnology* Page 272.
- Dilipkumar, M., Rajasimman. M., Rajamohan, N.** (2011): Optimalization of inulinase production by *Streptomyces sp.* solid state fermentation using statistical designs, *Biotechnology Research International*.

- Dragone, G., Mussatto, S. I. et al.** (2009): Characterisation of volatile compounds in an alcohol beverage produced by whey fermentation, *Food Chemistry*, Volume 112, Pages 929-935.
- Efstathion, I., Reyset, G., and Truffaut, N.** (1986): A study of inulinase activity in the *Clostridium acetobutylicum* strain ABKn8, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Volume 25, Pages 143-149.
- Ettalibi, M., Baratti, J. C.** (2001): Sucrose hydrolysis by thermostable immobilized inulinases from *Aspergillus ficuum*, *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 28, Issues 7-8, Pages 596-601.
- Fogarassy Csaba** (2001): *Energianövények a szántóföldön*, Gödöllő.
- Franck, A.** (2005): Inulin. In polysaccharides and polyamides in the food industry, 1st ed.: Steinbüchel A. and Rhee S.K. (eds.), Wiley-VCH, Weinheim, Pages 281-322.
- Guiraud, J. P., Caillaud, J. M., Galzy, P.** (1982): Optimization of alcohol production from Jerusalem artichoke, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Volume 14, Issue 2, Pages 81-85.
- Gong, F., Sheng, J. et al.** (2007): Inulinase production by marine yeast *Pichia guilliermondii* and inulin hydrolysis by the crude inulinase, *Journal of Industrial Microbiology&Biotechnology*, Volume 34, Issue 3, Pages 179-185.
- Gógös Z.** (2005): Biomassza potenciál és hasznosíthatósága Magyarországon, „Biomassza-energia a mezőgazdaságból” Hőenergia, Villamos energia és Hajtóanyag a szántóföldről, háromhatár konferencia magyar előadásai (kivonat), Nyitra, Szlovák Köztársaság, http://www.fvmmi.hu/doc/hirek/494_konf_kiad.pdf
- Gyulai I.** (2007): A biomassza-dilemma, Magyar Természetvédők Szövetsége; második, átdolgozott kiadás, <http://www.mtvsh.hu/dynamic/biomassza-dilemma2.pdf>
- Hancsók J., Krár M. et al.** (2006): Újgenerációs bio-motorhajtóanyagok I., *Magyar Kémikusok Lapja*, 61. évfolyam, 8. szám, 260–264. oldal.
- Horváth Gy.** (2002): Zöltség- és fűszer- különlegességek termesztése., Budapest, Mező-gazda
- Hoschke Á.** (2011): Sör – és szeszipari technológiák II., előadás anyag.
- Hughes, D. B., Tudrosaen, N.J., Moye, C.J.** (1984) The effect of temperature on the kinetics of ethanol production by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus*, *Biotechnology Letters*, Volume 6, Pages 1–6.
- International Energy Agency** (2009): Key world energy statistics http://www.iea.org/textbase/nppdf/free/2009/key_stats_2009.pdf
- Kacz K., Neményi M.** (1998): *Megújuló energiaforrások*. Mezőgazdasági Szaktudás Kiadó, Budapest.
- Kaszab I.** (2010): Környezetbarát tömegközlekedés bioetanollal., III. Megújuló Energia Fórum-Biomassza 2010.
- Kays, S. J., Nottingham, S. F.** (2008): Biology and chemistry of Jerusalem artichoke: *Helianthus tuberosus* L., Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, Pages 1-148.
- Kádár ZS., Szengyel ZS., Réczey K.** (2004): Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. *Industrial Crops and Products*., Volume 20, Pages 103–110.
- Kemény S.** (1985): *Kísérletek tervezése és értékelése*, Budapest.
- Kerényi A.** (2006): A fenntartható fejlődés néhány világméretű gondjáról. <http://www.sci.u-szeged.hu/eghajlattan/baba/Kerenyi.pdf>

- Kondor, A., Dallos, A.** (2010): Bioethanol and biogas production from Jerusalem artichoke by consecutive processing, Third International Symposium on Energy from Biomass and Waste, Venice.
- Kosaric, N., Cosentino, G. P. et al.** (1984): The Jerusalem artichoke as an agricultural crop., Biomass, Volume 5, Issue 1, Pages 1-36.
- Kosugi, A., Kondo, A. et al.** (2009): Production of ethanol from cassava pulp via fermentation with a surface-engineered yeast strain displaying glucoamylase, Renewable Energy, Volume 34, Issue 5, Pages 1354-1358
- Laczó F.** (2008): Bioüzemanyagok előállításának lehetőségei Magyarországon., Környezettudományi Központ, Budapest, <http://www.ktk-ces.hu/biouzemanyag.pdf>
- Lane, M., Morrissey, J. P.** (2010): *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow, Fungal Biology Reviews, Volume 24, Issues 1-2, Pages 17-26.
- Lin, Y., Tanaka, S.** (2006): Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. Applied Microbiology and Biotechnology, Volume 69, Pages 627-642
- Macedo, I., Seabra, J. E. A., Silva J.E.A.R.** (2008): Green house gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020 Biomass and Bioenergy Volume 32, Issue 7, Pages 582-595.
- Mamma, D., Koullas, D. et al.** (1996): Bioethanol from sweet sorghum: Simultaneous saccharification and fermentation of carbohydrates by a mixed microbial culture, Process Biochemistry, Volume 31, Issue 4, Pages 377-381.
- Myers, R. H., Montgomery, D. C.** (2002): Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments, második kiadás, A Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, INC.
- Nakamura, T., Ogata, Y. et al.** (1996): Ethanol production from Jerusalem artichoke tubers by *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Fermentation and Bioengineering, Volume 81, Issue 6, Pages 564-566.
- Nelson, N.** (1944): A photometric adaptation for the Somogyi method for the determination of glucose, J. Biol. Chem., 153, 375-380.
- Niness, K. R.** (1999): Inulin and oligofructose: What are they?, The Journal of Nutrition, Pages 1402-1406.
- Nonklang, S., Sophon Boonlue et al.** (2007): Genetic engineering of *Kluyveromyces marxianus* for ethanol fermentation. The 23rd International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology.
- Ohta, K., Hamada, S., Nakamura, T.** (1993): Production of high concentrations of ethanol from inulin by simultaneous saccharification and fermentation using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*, Applied and Environmental Microbiology, Volume 59, Issue 3, Pages 729-733.
- Pessoa, A., Vitolo, M.** (1999): Inulinase from *Kluyveromyces marxianus*: culture medium composition and enzyme extraction, Braz. J. Chem. Eng., Volume 16, Issue .
- Popp, J.** (2007): A bioüzemanyag-gyártás nemzetközi összefüggései. Agrárgazdasági tanulmányok, 6.szám, Budapest, Agrárgazdasági Kutató Intézet.
<http://www.avacongress.net/ava2007/presentations/pl1/4.pdf>
- Potori N.** (2008): Kilátások a főbb növényi termékek világpiacán. AKII, Budapest.
- Rathmann, R., Szklo, A., Schaeffer, R.** (2010): Land use competition for production of food and liquid biofuels: An analysis of the arguments in the current debate, Renewable Energy, Volume 35, Pages 14-22.

- Rochta, J.R., Catana, R. et al.** (2006): Design and characterisation of an enzyme system for inulin hydrolysis, *Food Chemistry*, Volume 95, Issue 1, Pages 77-82.
- Roukas, T.** (1996): Ethanol production from non-sterilized beet molasses by free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells using fed-batch culture, *Journal of Food Engineering*, Volume 27, Issue 1, Pages 87-96.
- Somogyi, M.** (1945): A new reagent for the determination of sugars, *J. Biol. Chem.*, 160, Pages 61-68.
- Somogyi, M.** (1951): Notes on sugar determination, *J. Biol. Chem.*, 195, Pages 19-23.
- Sánchez, O. J., Cardona, C.A.** (2008): Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks, *Bioresource Technology*, Volume 99, Issue 13, Pages 5270-5295.
- Pekic, B., Slavica, B. et al.** (1985): Effect of pH on the acid hydrolysis of Jerusalem artichoke inulin, *Food Chemistry*, Volume 17, Issue 3, Pages 169-173.
- Szambelan, K., Novak, J., Chrapkowska, K.J.** (2004): Comparison of bacterial and yeast ethanol fermentation yield from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers pulp and juices., *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, Volume 3, Issue 1, Pages 45-53.
- Thuesombat, P., Thanonkeo, P. et al.** (2007): The batch ethanol fermentation of Jerusalem artichoke using *Saccharomyces cerevisiae*, *KMITL Science and Technology Journal*, Volume 7, Issue 2, Pages 93-96.
- Varga-Erdei É.** (2011): *Kluyveromyces marxianus* élesztő törzsek fejlesztése bioetanol termelés céljából, Egyetemi doktori (PhD) értekezés, Debreceni Egyetem.
- Yu, J., Jiang, J. et al.** (2008): Simultaneous saccharification and fermentation of raw Jerusalem artichoke tubers to ethanol using an inulinase-hyperproducing yeast *Kluyveromyces cicerisporus*. *Journal of Biotechnology* 136S, S422
- Yuan, W., Chang, B., et al.** (2010): Ethanol Production from Jerusalem artichoke by SSF Fermentation using *Kluyveromyces cicerisporus*., *Special Abstracts/Journal of Biotechnology*, 150S (2010) S1–S576, Page 367.
- Zhang, T., Chi, Z. et al.** (2010): Bioethanol production from hydrolysates of inulin and the tuber meal of Jerusalem artichoke by *Saccharomyces* sp. W0., *Bioresource Technology*, Volume 101, Issue 21, Pages 8166-8170.
- Zhao, C. H., Zhang, T. et al.** (2010): Single cell oil production from hydrolysates of inulin and extract of tubers of Jerusalem artichoke by *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a., *Process Biochemistry*, Volume 45, Issue 7, Pages 1121-1126.

Internetes források:

- http://www.uwyo.edu/virtual_edge/lab13/fungi_results.htm (2012.03.18)
- <http://www.bitesz.hu/biomassza/biomassza-fogalma-hasznositasa.html> (2012.03.18)
- <http://www.fotohaz.hu/fotoarena/showphoto.php?photo=130981> (2011.06.24)
- <http://www.herbalyoga.com/csicsoka.html> (2011.04.24)
- http://mkk.szie.hu/dep/aeet/tanweb/tapelet/szenhid_html/poliszah.htm (2011.04.22)
- <http://www.biofuels-platform.ch/en/infos/eu-bioethanol.php> alapján (2011.03.12)
- <http://ethanolrfa.org/pages/World-Fuel-Ethanol-Production> (2011. 03.12)

Kormányrendeletek:

- 42/2005. (III.10) Kormányrendelet

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Habil. Nguyen Duc Quang tanár úrnak kitartó támogatását, segítőkészségét illetve hasznos szakmai tanácsait, melyek ösztönzően hatottak TDK munkám elvégzése során.

Továbbá köszönet illeti a Sör-és Szeszíparti Tanszéken oktató tanárait, akik gyakorlati és elméleti órákon a biotechnológia és fermentációs technológiák terén megalapozták és elmélyítették tudásomat.