



Élelmiszertudományi Kar

Sör- és Szeszipari Tanszék

RÁTÁPLÁLÁSOS TECHNIKA ALKALMAZÁSA AZ INULIN ALAPÚ ETANOL ELŐÁLLÍTÁSÁBAN

TDK Dolgozat

DÉNES KÁLMÁN

Élelmiszermérnök MSc. II. évfolyam



TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KMR-2010-0005

TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0023

A projekt elnevezése:

**Eredetvédett pálinkák előállításának
és nyomonkövetési rendszerének
kutatás-fejlesztése**

Futamideje:

2009.10.01.-2013.09.30.

Konzorciumi tagok:

WESSLING

WESSLING Hungary Kft.



Budapesti Corvinus
Egyetem



Magyar Kereskedelmi
és Széchenyi Kft.



Kiskőrösi
Kereskedelmi és
Széchenyi Kft.



A projekt a Nemzeti Kutatási és Technológiai Hivatal támogatásával valósult meg.

Témavezető: Dr. Habil. Nguyen Duc Quang
egyetemi docens

**Budapest
2012**

TARTALOMJEGYZÉK

1	BEVEZETÉS.....	3
2	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
2.1	A GLOBÁLIS PROBLÉMÁK ÉS A MEGÚJULÓ ENERGIAFORRÁSOK KAPCSOLATA.....	5
2.2	A BIOETANOL, MINT MEGÚJULÓ ENERGIAFORRÁS.....	7
2.3	AZ INULIN, MINT BIOETANOL NYERSANYAG	10
2.4	A <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> ÉS A <i>KLUYVEROMYCES MARXIANUS</i> ÉLESZTŐK.....	12
2.5	VEGYES KULTÚRA ALKALMAZÁSA.....	14
2.6	ETANOL FERMENTÁCIÓS TECHNOLÓGIÁK	15
2.6.1	<i>Szakaszos technológia.....</i>	15
2.6.2	<i>Folytonos technológia.....</i>	16
2.6.3	<i>Rátáplálásos technológia.....</i>	17
2.6.4	<i>Fél-folytonos technológia.....</i>	17
3	KÍSÉRLETI CÉLKITŰZÉSEK	18
4	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	19
4.1	KÍSÉRLETI HELY.....	19
4.2	VIZSGÁLT ÉLESZTŐ FAJOK	19
4.2.1	<i>Kluyveromyces marxianus fenntartása.....</i>	19
4.2.2	<i>A Saccharomyces cerevisiae törzs alkalmazása.....</i>	19
4.3	FELHASZNÁLT ANYAGOK.....	20
4.3.1	<i>Malátás ferdeagar</i>	20
4.3.2	<i>Inokulum táptalaj.....</i>	20
4.3.3	<i>Somogyi I és II reagens.....</i>	20
4.3.4	<i>Nelson reagens.....</i>	20
4.3.5	<i>Szubsztrátum.....</i>	20
4.4	ALKALMAZOTT MÓDSZEREK	21
4.4.1	<i>Inokulum előállítása.....</i>	21
4.4.2	<i>Fermentáció</i>	21
4.4.3	<i>Szénhidrátok meghatározása</i>	22
4.4.3.1	<i>Somogyi-Nelson módszer</i>	22
4.4.3.2	<i>Folyadékkromatográfiás eljárás.....</i>	22
4.4.4	<i>Etanol koncentráció meghatározása</i>	23
5	EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	24
5.1	SZAKASZOS FERMENTÁCIÓS TECHNOLÓGIA.....	24
5.1.1	<i>Monokultúrák alkalmazása szakaszos fermentációban</i>	24
5.1.2	<i>Az inulin szimultán cukrosításának és erjesztésének megvalósítása.....</i>	26
5.2	RÁTÁPLÁLÁSOS FERMENTÁCIÓS TECHNOLÓGIA	28
5.3	FÉL-FOLYTONOS FERMENTÁCIÓS TECHNOLÓGIA	34
6	ÖSSZEFOGLALÁS	38
	IRODALOMJEGYZÉK.....	40

1 BEVEZETÉS

A századunkban jelentkező globális problémák sokaságát az ember és az emberi negatív tevékenységek idézték elő, amelyre Csányi Vilmos (biológus, biokémikus), a Magyar Tudományos Akadémia rendes tagja is rávilágít az egyik tőle származó kijelentésében:

„Az ember, aki szerényen sapiensnek, bölcsnek nevezi magát, noha bolondok bolondja, képtelen korlátozni populációjának méreteit, képtelen megakadályozni a haszontalannak vagy károsnak ítélt anyagok felhalmozódását, képtelen alacsony szinten tartani az energiafelhasználását és képtelen békésen együtt élni a bioszférával, amelyből vétetett.”

A jelentkező negatív változások, mint a klímaváltozás, az energia- és nyersanyagéhség, az üvegházhatású gázok (főleg a szén-dioxid) egyre nagyobb mértékű kibocsátása, a növekvő természetrombolás, stb. kezelésének az egyik lehetősége a fosszilis energiaforrások felváltását szolgáló megújuló, valamint megújítható energiák felkutatása és alkalmazása.

Ilyen megújuló, alternatív energiaforrások a bioüzemanyagok, melyek közül az egyik legnagyobb potenciállal a bioetanol rendelkezik. Előállítás napjainkban döntően cukor- és keményítő alapú nyersanyagokra támaszkodik (pl.: kukorica, búza, cukornád, cukorrépa, stb.), amely miatt egyre élesedő ellentét alakult ki a „biofuel ipar” és az élelmiszeripar, valamint a társadalom bioetanol ellenes rétege között. Az ellentétek enyhítésének egyik lehetősége új, a bioetanol előállítás számára hasznosítható nyersanyagok, ipari melléktermékek felkutatása és bevezetése. Ennek érdekében egyre intenzívebb kutatások folynak új nyersanyagok alkalmazására, például cellulóz alapú etanol előállításra, ipari szennyvizek és hulladékok hasznosítására, különböző mezőgazdasági melléktermékek vizsgálatára vagy éppen inulin alapú bioetanol előállítására.

Ezek közül az egyik ígéretes irány lehet az inulin alapú etanol gyártásának bevezetése, amely inulin (fruktóz-polimer) egyes növényekben nagy mennyiségben megtalálható tartalék szénhidrát. A hazai klíma- és talajviszonyok mellett jól termesztethető csicsóka, amely rendkívül kedvező beltartalmi és termesztési tulajdonságokkal rendelkezik, potenciális nyersanyagforrás lehet. Ennek ellenére ipari méretekben történő hasznosítása azonban még nem terjedt el, a feldolgozása és fermentációja során jelentkező problémák miatt. Az egyik probléma abban keresendő, hogy jelenleg az ipari etanol gyártásban alkalmazott élesztőgombák (pl.: *Saccharomyces cerevisiae*) inulináz aktivitásuk hiánya miatt nem képesek az inulint közvetlenül hidrolizálni és fermentálni. Megoldást nyújthat a hagyományos enzimes és vegyszeres hidrolízis mellett, egy multikultúrás fermentáció megvalósítása. A vegyes tenyészetben magas inulináz aktivitással rendelkező és erős etanol erjesztő képességű mikroorganizmusok felhasználása valósulna meg.

Az etanolos fermentáció döntően négy különböző erjesztési technológiával (szakaszos, rátáplálásos, folytonos és fél-folytonos) valósítható meg. Az ipari etanol gyártásban túlnyomó részt a hagyományos, szakaszos fermentációs technikát alkalmazzák, főleg egyszerű megvalósítása, valamint alacsony beruházási és üzemeltetési költsége miatt. Azonban hosszú improduktív állásidő jellemzi, amely a technika hatékonyságát, produktivitását jelentősen csökkenti. A termelékenység javítása és az állásidő mérséklésére a fél-folytonos vagy folytonos technológia nyújthat megoldást, melyet általában magas produktivitás és hozam jellemez. Ipari méretű megvalósításakor a befertőződés és az élesztők degenerálódásának veszélye problémákat okozhat. A szakaszos és a folytonos technika ötvöztetésének tekinthető a fél-folytonos fermentáció (szakaszos erjesztések sorozata), amely a két technológia kedvező tulajdonságait próbálja egyesíteni. Az ipari etanol fermentációban még viszonylag ritkán alkalmazott eljárás, azonban más biotechnológiai folyamatoknál egyre nagyobb sikerrel hasznosítják.

A rátáplálásos technika a fermentációs folyamatok során fellépő szubsztrátum- és termékátvitel kiküszöbölésére, megelőzésére kifejlesztett technológia. A rátáplálásos eljárásnak köszönhetően sok esetben elérhető a szubsztrátum hasznosítás növekedése és az erjesztés hatásfokának javulása. A technika a glükóz alkoholos fermentálásában sikerrel alkalmazható, melyet több irodalmi adat is bizonyít. Azonban a vegyes kultúrák, inulin alapú etanol gyártásban történő sikeres alkalmazhatósága még kevésbé tanulmányozott.

Kapcsolódva a témához, kutatómunkámban a különböző fermentációs technikák vizsgálatát tűztem ki célul, a hatékony inulin alapú bioetanol előállításának elérése érdekében.

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 A globális problémák és a megújuló energiaforrások kapcsolata

A múlt század óta fokozatosan erősödő és az egyre nagyobb problémákat felvető globális változások, valamint ezek kezelése korunk egyik legsürgetőbb kihívása, kérdése, melyre tudósok és kutatók ezrei keresik a választ. A globális szinten megfigyelhető változások közé tartozik többek között a rohamosan növekvő népesség (túlnépesedés), a bővülő termelés, a jelentkező anyag- és energiaválság és az ún. „környezeti válság”. Utóbbi gyűjtőfogalomként szolgál mind az üvegházhatás és az „ózonlyuk” problémájára, a biodiverzitás csökkenésére, valamint a savas esők és a környezetszennyezés kifejezésére, vagyis a természetes (természeti) egyensúly felborulására (Kuthi, 2001).

A jelentkező problémák egyik kiváltó okaként tekinthető a Föld kapacitásain túlnyúló és a korábbiaknál intenzívebb népességnövekedés, amelynek következtében a becslések szerint 2050-re bolygónk lélekszáma elérheti a 11-12 milliárd főt. A növekvő népesség igényeinek kielégítése természetesen növekvő anyag- és energiafelhasználást idéz elő, melyet az energiaszektor minden bizonnyal egyre nehezebben fog tudni biztosítani. Ennek pedig következménye a természeti erőforrások még drasztikusabb kiaknázása és a környezet további terhelése, minőségének romlása. Ez minden bizonnyal beláthatatlan következményekkel járhat, hiszen földi környezetünk terhelése ma is hatalmas méreteket öltött, melynek hatása már most is jól megfigyelhető az üvegházhatás erősödésében, az éghajlati változásokban, a biológiai diverzitás csökkenésében vagy éppen a légköri savasodásban (Ballesteros *et al.*, 2006; Farkas, 2010; Kerényi, 1995; Kuthi, 2001).

A népességrobbanás következtében megnövekedett lélekszám ellátásához egyre nagyobb volumenű termelés szükségeltetik, ami újabb és újabb problémákat indukálhat pl.: növekvő hulladéktermelődést, csökkenő termőterületeket, élelmezési problémákat, stb. (Farkas, 2010; Kerényi, 1995; Kuthi, 2001).

További jelentős problémákat okoz a fosszilis tüzelőanyagok (szén, kőolaj, földgáz, tőzeg) egyeduralkodása az energiaszektorban, ugyanis elégetésük során nagy mennyiségű káros anyag kerül a környezetünkbe, például korom, szén-monoxid, kén-dioxid, nitrogén-oxidok, ólomvegyületek és a klímaváltozás egyik felelőseként ismert szén-dioxid. Arrhenius már 1896-ban megjegyezte, hogy a légkör szén-dioxid koncentrációjának növekedése klímaváltozással jár (Jankó *et al.*, 2010). Az ipari forradalom óta pedig a CO₂ légköri mennyisége fokozatosan növekszik, döntően a közlekedési ágazat nagymértékű kibocsátása miatt. Az előbbieken felsorolt káros anyagok jelenléte pedig már a legtávolabbi vidékeken is kimutatható (Kerényi, 1995;

Kuthi, 2001; Wyman, 1996). Ezeken felül probléma a fosszilis energiahordozókkal, hogy nem megújuló. Hasonló mértékű kiaknázásuk előbb-utóbb kimerülésükhöz és hiányukhoz fog vezetni (Kerényi, 1995), amely további piaci áremelkedésüket idézi elő.

Ezen problémák kezeléskörének egyik kis szelete lehet a fosszilis energiaforrások felváltását célzó programok, melyek fő küldetése a megújuló energiaforrások minél szélesebb körben történő alkalmazásának szorgalmazása. Ilyen megújuló energiaforrás a napenergia, a szélenergia, a vízenergia, a geotermikus energia és a biomasszából nyerhető energia, melyek hasznosításával a CO₂ és egyéb üvegházhatású gázok kibocsátása jelentősen csökkenthető, a környezet megóvható, az egyes országok energiafüggősége (pl.: kőolaj importja) pedig mérsékelhető. Továbbá egyes területek gazdasági fellendülésének is a kulcsát jelenthetnék, például Magyarországot is (jelentős geotermikus és biomassza alapú energiabázis). Azonban a megújuló, megújítható energiák hasznosítása még viszonylag alacsony. Magyarországon arányukat a teljes energiafelhasználásnak ~3,2-3,6 %-a közé becsülik (Bai, 2002; Bailey, 1996; Farkas, 2011; Kazai & Varga, 2007).

A környezetbarát energiaforrások közé tartozik a biomasszából nyert energia, amelyet az egyik legígéretesebb területnek tartanak a megújuló energiaforrások között. Jelenleg hazánkban a megújuló energiák közül legnagyobb mértékben a biomasszát hasznosítják (Büki, 2010; Fogarassy, 2001). Hasznosításának egyik lehetősége a különböző motorhajtó üzemanyagok előállítása, például bioetanol, biometanol, biodízel, biogáz, biometiléter, biohidrogén, bio-ETBE (bio-etil-tercier-butiléter), bio-MTBE (bio-metil-tercier-butiléter) és tiszta növényi olajok gyártása (42/2005. Kormányrendelet).

A bioüzemanyagok megítélése napjainkban még sokszor sajnós érdekektől és lobbiktól függően más és más (sokan még mindig „az egyik legszennyezőbb energiaforrás”-nak tartják). Az azonban az egyik fontos előnyük, hogy teljes energiamérlegük pozitív, vagyis felhasználásukkal több energia nyerhető, mint amennyit előállításuk során befektetnek (Bai, 2002; Kazai & Varga, 2007; Laczó, 2008).

Összességében tehát elmondható, hogy a fenntartható fejlődés biztosítására, a jelentkező globális problémák orvoslására és az egyre az egyre növekvő energiaigények kielégítésére elkerülhetetlen lesz a megújuló energiaforrások kiaknázása és hasznosítása. Ezért a környezetbarát energiák felkutatása és alkalmazásuk ösztönzése napjaink fontos célja kell, hogy legyen.

2.2 A bioetanol, mint megújuló energiaforrás

A bioüzemanyagok egyik legismertebb képviselője az alkoholos fermentációval előállított bioetanol, amely gyártási mennyiségének fokozatos növekedése révén egyre nagyobb szerepet tölt be a motorhajtó üzemanyagok piacán.

Az etil-alkohol (C_2H_5OH), amely mindenki számára jól ismert vegyület, egy színtelen, vízben jól oldódó folyadék. Bioetanolnak csak akkor tekinthető, ha „biológiailag megújuló energiaforrások (növények) felhasználásával benzint helyettesítő vagy annak adalékaként szolgáló motorhajtó üzemanyagként állítják elő” (Hoschke, 2010). Az előállított bioetanolnak többféle hasznosítása ismert, alkalmazzák önmagában, tiszta etanol formájában, különböző arányban benzinhez keverve (pl.: 85 %-ban E85 üzemanyagot kapva), adalékként való használata ETBE formájában, valamint gázolajhoz vagy biodízelhez keverve (Bailey, 1996; Hoschke, 2010).

A bioetanolnak köszönhetően az üzemanyag oktánszáma növelhető, és az égés tökéletesebbé tehető a nagyobb oxigéntartalom révén, ezáltal pedig a káros anyagok kibocsátása mérsékelhető. Azonban mindenképp meg kell említeni, hogy a bioetanol energiatartalma kisebb, mint a benziné, ezért ugyanakkora úthossz megtételéhez több alkohol elégetésére van szükség, vagyis a gépjármű fogyasztása növekszik. Ez a többlet üzemanyag-szükséglet az irodalmi adatok alapján körülbelül 30 %-os (Bai, 2002; Bailey, 1996; Hancsók *et al.*, 2006; Sánchez & Cardona, 2008; Wyman, 1996). Ez Magyarországon azt jelenti, hogy egy autó üzemanyagköltsége, amely 100 km-en 7 liter üzemanyagot fogyaszt, 95-ös benzin (430 Ft/l átlaggal számolva) esetén 3010 Ft, míg E85-ös bioüzemanyag (372 Ft/l átlaggal számolva) esetén 3385 Ft, ahol a fogyasztás 9,1 literre emelkedik a többletfogyasztás miatt. Vagyis a Magyar Parlament 2011. július 5.-i döntésével, amikor nettó 40 Ft/l jövedéki adót (ÁFA-val együtt 50 Ft/l) fogadott el az E85 bioüzemanyag esetén, gyakorlatilag a bioüzemanyag elterjedését és az addig folyamatosan növekvő „fogyasztását” gyakorlatilag derékba törte (Farkas, 2011). Ez a döntés azért is vitatható, mivel az Európai Unió célja, hogy az energiaellátásban a bioenergia részaránya ~20 %-ra növekedjen a 2020. évre (Laczó, 2008). Ehhez igazodva a Magyar Országgyűlés 2010. év novemberében fogadta el a Bioüzemanyag Törvényt, amely alapján a közlekedésben felhasznált összes energia ~10 százalékának megújuló energiaforrásokból kell származnia (2010. évi CXVII. Törvény).

A világon előállított bioetanol mennyisége folyamatosan növekszik, amely növekedéshez Európa, és azon belül nagymértékben Magyarország is hozzájárul. A világ legnagyobb bioetanol előállító államai az USA (~52 milliárd liter/év) és Brazília (~26 milliárd liter/év). Mellettük még említésre méltó mennyiségű bioetanolt termel az Európai Unió (~4,5 milliárd liter/év), Kína (~2 milliárd liter/év) és Kanada (1,3 milliárd liter/év). Az adatok alapján az EU-t tekinthetjük a világ harmadik legnagyobb bioetanol előállítójának, amelyen belül kiemelkedő mennyiségű

bioüzemanyagot állít elő Franciaország, Németország, Spanyolország, Svédország és nem utolsósorban Magyarország (Biofuels Platform, 2010; Farkas, 2011).

Az idehaza előállított bioetanol mennyisége folyamatosan növekszik, akárcsak a gyártóüzemek száma és kapacitása is. Az elmúlt években mindössze két jelentősebb bioetanol is előállító üzem működött hazánkban, a Hungrana Keményítő- és Izocukorgyártó és Forgalmazó Kft. (~190 millió liter/év) és a Győri Szeszgyár (~30 millió liter/év). Azonban az idei évben megnyitotta kapuit a Pannonia Ethanol Zrt. dunaföldvári üzeme is, ahol kb. 240 millió liter éves gyártási kapacitással terveznek. Ezzel a magyarországi bioetanol termelési volumen megduplázódott. Továbbá az Ethanol Europe Renewables Ltd. bejelentette, hogy Mohácson egy kb. 240 millió liter kapacitással működő üzemet kíván létesíteni a 2013. év végére, amellyel Magyarország az Európai Unió bioetanol nagyhatalmai közé léphet elő (Farkas, 2011; Hoschke, 2010; HVG, 2012a; HVG, 2012b).

Természetesen itt felmerül a kérdés, hogy a hirtelen bekövetkező gyártásbővülés számára a szükséges kukorica mennyiség mindig rendelkezésre fog e állni, hiszen például az idei évben, az aszályos időjárás miatt, a kukorica mennyisége a megszokott termés körülbelüli fele volt (kb. 3-3,5 millió tonna), ezért az ország akár még behozatalra is szorulhat (Origo, 2012). Azonban ilyen magas nyersanyag igény mellett a bő- vagy átlagos termésű években sem lesznek a gazdáknak értékesítési gondjaik, vagyis a feleslegek felszívása megtörténhet a piacról, amely a bioetanol előállításának egy rendkívül pozitív tényezője a hazai agrárium számára.

További problémája a hazai, illetve európai bioetanol iparnak, hogy a bioüzemanyagok előállítási költsége, a mai technológiák és alapanyagok alkalmazása mellett, lényegesen magasabb, mint a benzin esetében. Ezért az egyes országok kormányai a versenyképesség fenntartása érdekében külön támogatják a bioüzemanyagokat, például teljes vagy részleges adómentesség formájában (Kazai & Varga, 2007). Ebből is láthatjuk, hogy a bioetanol és a bioüzemanyagok az egyes országok politikai és gazdaságpolitikai stratégiáiban nagyon fontos szerepet töltenek be, hiszen egyelőre nincs más alternatíva rövidtávon a fosszilis eredetű üzemanyagok teljes vagy részleges helyettesítésére, felváltására (Fogarassy, 2001; Political Capital & Green Capital, 2008).

Az elmúlt években egyre többen, egyre többféle nyersanyag alkalmazhatóságát vizsgálták a bioetanol előállítására. Ezeket a nyersanyagokat alapvetően két csoportba sorolhatjuk, egyrészt vannak a közvetlenül erjeszthető szénhidrátokat tartalmazó nyersanyagok és melléktermékek, mint például a cukornád, a cukorrépa, a cukorcirok vagy éppen a melasz. A másik csoportba a közvetlenül nem erjeszthető szénhidrátokat tartalmazó nyersanyagok és melléktermékek tartoznak. Ilyen alapanyag például a kukorica, a búza, a burgonya, a fa- és papíripari melléktermékek, a kommunális hulladékok, a csicsóka vagy a cikória stb. (Hoschke, 2010; Kádár *et al.*, 2004; Kosugi *et al.*, 2009; Laczó, 2008; Nigam *et al.*, 2001; Timilsina & Shrestha, 2011; Wyman, 1996).

Látható, hogy a bioetanol előállításához sokféle nyersanyag és melléktermék laboratóriumi vagy fél-üzemi hasznosítása vetődik fel. A felhasznált alapanyagok szerint megkülönböztethető az ún. első generációs bioetanol, amely döntően cukor- és keményítő tartalmú nyersanyagokból kerül előállításra, és a második generációs bioetanol, melynek gyártásához főleg lignocellulózt, inulint és egyéb komponenseket tartalmazó növények kerülnek felhasználásra.

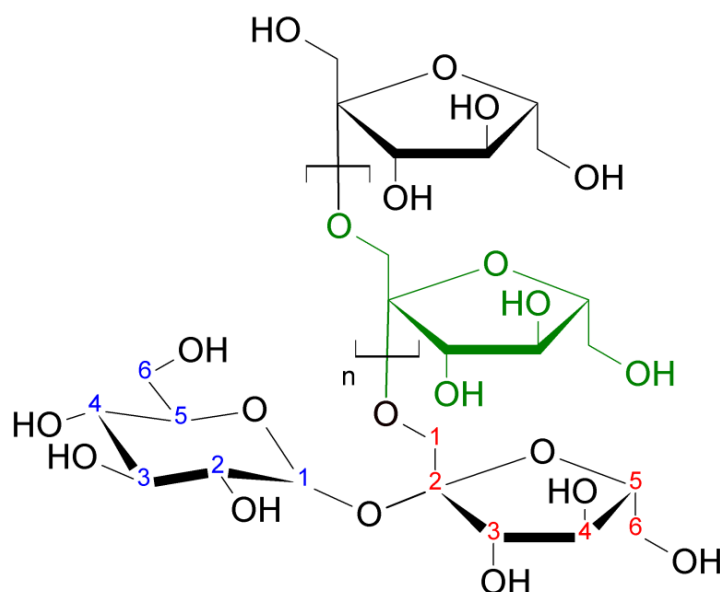
Nagyüzemi méretekben gyakorlatilag kétféle gyártástechnológiát (közvetlen és közvetett fermentáció) alkalmaznak. Közvetlen fermentációt értelemszerűen akkor alkalmaznak, ha az alapanyag a fermentáló mikroorganizmus számára közvetlenül erjeszthető szénhidrátot tartalmaz, például glükózt, fruktózt, szacharózt vagy maltózt. Ekkor "elegendő" a nyersanyag feltárása és cefrézése után, a kapott cefrét valamilyen etanolos fermentációt végző élesztővel beoltani (pl.: *Saccharomyces cerevisiae* törzsszel), amely anaerob körülmények között a rendelkezésére álló egyszerű cukrokat etanollá alakítja ($C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 C_2H_5OH + 2 CO_2$). Az erjedés végeztével a kapott alkoholos, ún. érett cefrét desztillálják, ~95-96 v/v% alkoholtartalomig. A kapott etanol-víz elegyet ezután dehidratálják, és végül bioetanolként vagy egyéb származékként hasznosítják. Ezt az eljárást alkalmazzák például a biofuel nagyhatalomnak számító Brazíliában, a cukornád alapú bioetanol gyártása során (Hoschke, 2010; Laczó, 2008).

A másik lehetőség, amikor valamilyen közvetlenül nem fermentálható alapanyagból (döntően keményítőtől) indulnak ki, ekkor ún. közvetett fermentációs technológiát alkalmaznak, ugyanis az összetett szénhidrát előzetes lebontása, hidrolízise szükséges a hatékony erjesztés megvalósulásához. A hidrolízis folyamata technológiától függően történhet enzim(ek) (pl.: α -amiláz; glükóamiláz stb.) vagy sav(ak) segítségével. A hidrolízis után kapott cukrokat pedig a már közvetlen fermentációs technológiánál leírtak szerint konvertálják etanollá. Ezt az eljárást alkalmazzák az iparban leggyakrabban, hiszen a világon előállított bioetanol döntő többsége keményítő alapú (Hoschke, 2010; Laczó, 2008).

Az elmúlt években a cukor és keményítő alapú bioetanol előállítása egyre fokozódó ellentétbe került az élelmiszeriparral (azonos alapanyagbázis) és a társadalom egy részével, hiszen sokan az árrobbanások és éhínségek egyik okozójának a nyersanyagok üzemanyag célú felhasználását tartják (Steinbusch *et al.*, 2009; Tilman *et al.*, 2009). Többek között ezen ellentétek enyhítése és új nyersanyagok alkalmazásának bevezetése érdekében újabb és újabb kutatások indultak hasznosítható alapanyagok megtalálására, így például a cellulóz vagy éppen az inulin alapú etanol előállítására.

2.3 Az inulin, mint bioetanol nyersanyag

Az inulin alapú bioetanol előállításában rejlő potenciálok az elmúlt években egyre nagyobb figyelmet kaptak, az inulin hidrolízise során nyerhető nagy mennyiségű egyszerű cukornak köszönhetően. Kémiaailag az inulin (1. ábra) fruktóz egységekből felépülő poliszacharid, amelyben a fruktóz egységek β -(2,1) kötésekkel kapcsolódnak össze. A lineáris polimer végéhez egy glükóz molekula kapcsolódik, α -(1,2) glikozidos kötéssel (Hoschke, 2010).



1. ábra Az inulin szerkezete és felépítése (<http://hu.wikipedia.org/wiki/Inulin>)

Az inulin, mint növényi tartalék szénhidrát, közvetlen fermentációjára nincs mód, ezért mindenképp szükséges az összetett molekula erjesztés előtti hidrolízise, egyszerű cukrokká történő lebontása. Ezen előkészítési folyamat megvalósítása viszont még lényegesen költségesebb, mint a keményítő esetében, hiszen a keményítő feldolgozásában már elterjedt technológiai fejlesztések (pl.: hőstabil enzimek, jet cooker, stb.) az inulin esetében még nem következtek be.

Az inulin lebontását inulináz enzimek segítségével végezhetjük el, melyek lehetnek exo- vagy endo-hatásúak. Az etanol ipar számára előbbi, vagyis az exo-inulinázok a fontosabbak, hiszen az inulin lánc fruktozil végén kezdik meg a hasítást és egy-egy fruktóz molekulát tesznek szabaddá (Hoschke, 2010).

A növények döntő többségének tartalék szénhidrátja glükóz polimer (keményítő), azonban vannak olyanok, melyek tartalékaikat fruktóz polimer (inulin) formájában raktározzák. Ilyen például az örménygyökér (*Inula helinium*), a cikória (*Cichorium intybus*), az agave (*Agave spp.*), a gyermekláncfű (*Taraxacum officinaee*), a fokhagyma (*Allium sativum*) vagy éppen a csicsóka (*Helianthus tuberosus*) (Angeli et al., 2000; Farkas, 2011).

Az előbbieken a teljesség igénye nélkül említett növények közül az egyik legkedvezőbb termesztési és beltartalmi tulajdonságokkal a csicsóka (2. ábra) rendelkezik, amelyet az egyik „legigénytelenebb” és „legszívósabb” növényként tartanak számon.



2. ábra A csicsóka szára és gumója

(www.en.wikipedia.org/wiki/Jerusalem_artichoke; www.mcorreia.wordpress.com)

A csicsóka Észak-Amerikából származik, évelő, gumós növény. Számos kedvező tulajdonsággal rendelkezik, többek között például magas a szénhidráttartalma, a hazai klíma- és talajviszonyok között jól termesztethető, talajigénye lényegesen kisebb a gabona növényekénél. Említésre méltó jellemzői közé tartozik még többek között, hogy „szélsőséges” talajokon is képes termést hozni, akár homokban is termesztethető (erózióvédő hatás), vagyis talajjal szembeni igénytelenség jellemzi, így nem versenyez a kultúrnövényekkel a termékeny szántóföldekért. Jó a szárazság- és fagytűrése, amely a napjainkban megfigyelhető szélsőséges időjárási viszonyok közepette rendkívül fontos lehet. Tápanyagigénye tíz tonna gumóhozamra vetítve ~30-40 kg N, ~13 kg P és ~75-80 kg K, továbbá nagyfokú betegségekkel és kártevőkkel szembeni ellenálló képesség jellemzi. A csicsóka ~11-20 m/m% szénhidrátot tartalmaz, amelynek ~70-90 %-a inulin, valamint ~10-13 % szacharóz, ~3,5-5 % redukáló cukor és ~1-2 m/m% fehérje található benne (Angeli *et al.*, 2000; Bai, 2002; Bajpai & Bajpai, 1991; Borsos *et al.*, 1994; Kays & Nottingham, 2008; Kosaric & Vardar-Sukan, 2001; Yuan *et al.*, 2008).

A csicsókában az inulin döntően a gumóban és kisebb mennyiségben a szárban található meg (Angeli *et al.*, 2000; Pátkai & Barta, 2002; Kosaric & Vardar-Sukan, 2001). Vagyis ~50 t/ha átlagterméssel számolva (egyes adatok alapján akár 90-100 t/ha termésmennyiség is elérhető),

~8-12 tonna szénhidrát nyerhető ki a csicsókából, amely a kukorica esetén jellemző keményítő hozamhoz (5-7 t/ha) képest jobbnak tekinthető (Bai, 2002; Farkas, 2011).

Összességében tehát megállapítható, hogy az inulin potenciális nyersanyagforrás lehet a bioetanol ipar számára, melynek hazai körülmények között történő biztosítására az egyik legmegfelelőbb növény a csicsóka. A csicsóka mind beltartalmi, mind agronómiai tulajdonságait tekintve kedvező jellemzőkkel rendelkezik, ezért érdemes lenne termőterületeinek növelése, valamint felhasználásának fokozása.

Szakirodalmi információk alapján az inulin fermentációs módjait két csoportba sorolhatjuk, vannak a közvetlen és közvetett fermentációs módszerek, melyek jellegét döntően az határozza meg, hogy az alkalmazott mikroorganizmus(ok) rendelkezik-e inulináz aktivitással vagy sem.

Ha olyan mikroorganizmust használnak az erjesztéshez, amely nem rendelkezik inulináz aktivitással, akkor szükséges az inulin előzetes hidrolízise a hatékony fermentáció megvalósításához. Ez történhet savas vagy enzimes hidrolízis révén, amely kezelés azonban jelentősen megnöveli a bioetanol amúgy sem alacsony előállítási költségeit (Kays & Nottingham, 2008). A legtöbb esetben közvetett fermentációs módszerrel valósul meg az inulin hidrolízise, mivel az ipari etanol gyártásban alkalmazott, szinte egyeduralkodó faj, a *Saccharomyces cerevisiae* nem rendelkezik inulináz aktivitással, így az inulin előkezelése elkerülhetetlen (Guiraud *et al.*, 1982; Zhang *et al.*, 2010).

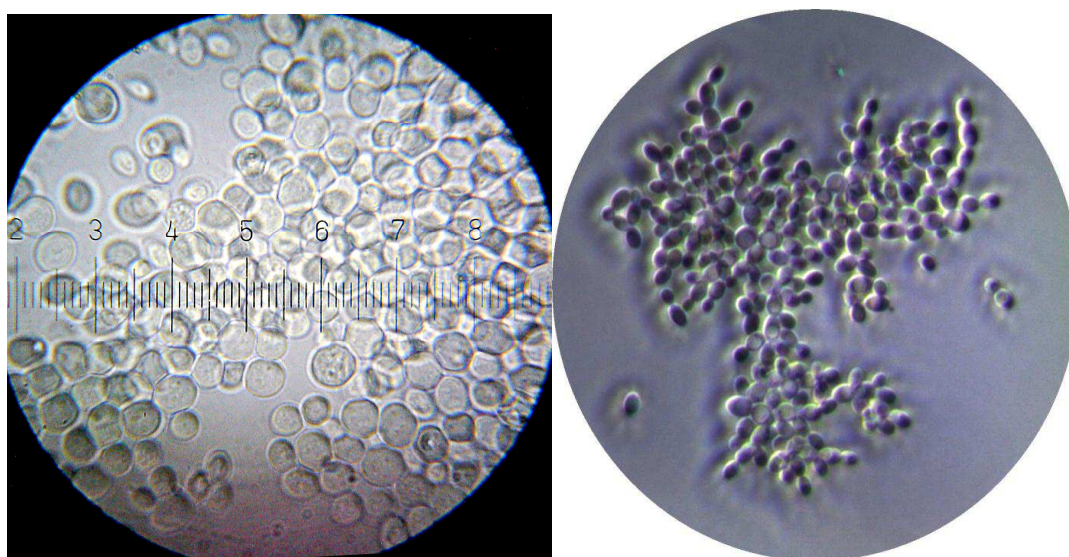
Abban az esetben, amikor olyan mikroorganizmust használnak, amely rendelkezik inulináz aktivitással, nem szükséges az inulin előkezelése, hiszen annak fermentálása közvetlenül is megvalósítható, ezzel pedig a fermentáció költségei csökkenthetők (Bajpai & Bajpai, 1989; Pekic *et al.*, 1985). Ilyen inulináz aktivitással rendelkező mikroorganizmus többek között az *Aspergillus*, a *Bacillus*, a *Candida*, a *Clostridium*, a *Kluyveromyces*, a *Penicillium*, a *Pseudomonas*, vagy például a *Staphylococcus* is (Chi *et al.*, 2009; Gong *et al.*, 2007; Kays & Nottingham, 2008; Nakamura *et al.*, 1996; Singh *et al.*, 2006).

2.4 A *Saccharomyces cerevisiae* és a *Kluyveromyces marxianus* élesztők

Kutatómunkám során, az előbbieken felsorolt fajok közül a *Kluyveromyces marxianus*-t (3. ábra), mint jól ismert, magas inulináz aktivitással rendelkező mikroorganizmust és a *Saccharomyces cerevisiae* (3. ábra) élesztőgombát vizsgáltam, amelyet az erjedési iparból jól ismert, magas etanol fermentáló képesség jellemez.

Mindkét élesztőgomba az ipar számára kedvező, de eltérő tulajdonságokkal rendelkezik, annak ellenére, hogy filogenetikailag rendkívül közel állnak egymáshoz, hiszen mindketten a

Saccharomycetaceae családba tartoznak. A *Saccharomyces* élesztő kedvező tulajdonságai közé tartozik például az erős etanol fermentáló képesség, a kis mennyiségű melléktermékképzés, a magas etanol- és ozmotikus-tolerancia, az erjesztés megvalósítása széles hőmérsékleti és pH körülmények mellett, stb. (Bely, 2008; Deák, 1998; Hoschke, 2010; Philippidis, 1996). Azonban a *Saccharomyces cerevisiae* törzsek nem rendelkeznek inulináz aktivitással, ezért nem képesek az inulinból a számukra hasznosítható monoszacharidok képzésére (Deák, 1998). A tudományos kísérletekben ezért, e faj alkalmazása esetén, az inulin savas vagy enzimes kezelése után végezték el az etanolos fermentációt. Erre jó példa Guiraud és munkatársai (1982) által publikált munka, amelyben magas hőmérsékleten és savas közegben történő hidrolízis után végezték el az inulin fermentációját a *Saccharomyces cerevisiae* segítségével.



3. ábra A *Saccharomyces cerevisiae* és *Kluyveromyces marxianus* élesztők morfológiája
(<http://microbewiki.kenyon.edu>; <http://kluyveromyces.com/>)

Hasonló módon történő kezelés után valósult meg a csicsókalé fermentálása Thuesombat és munkatársai (2007) által megvalósított vizsgálatokban is, ahol *Saccharomyces cerevisiae* fajélesztővel ~88 %-os konverziós hatásfokot értek el. Természetesen inulináz enzimes előkezelés után is végeztek etanolos erjesztést. Szambelan és társainak 2004-es tanulmányában az enzimatisz hidrolízis után ~80-84 %-os hatásfokkal valósult meg a fermentáció. Hasonló eredményeket (~80 % konverziós hatásfok) kaptak Kondor és Dallos (2010) is, akik *Aspergillus niger* eredetű inulináz enzimmal végezték el a pépesített csicsókagumó inulinjának hidrolízisét. Néhány esetben a *Saccharomyces* törzseket natív, előkezelés nélküli inulin fermentálása esetén tanulmányozzák, viszont ezek a törzsek általában valamilyen módosítással lettek nemesítve (pl.: az inulináz enzimet kódoló gén beépítése). Azonban azt tapasztalták, hogy ezen törzsek még nem képesek hatékonyabban fermentálni a hagyományos eljárásoknál, törzseknél (Lim *et al.*, 2010).

A kísérleteimben használt másik élesztőgomba a *Kluyveromyces marxianus* volt, melynek számunkra legjelentősebb tulajdonsága, hogy magas inulináz aktivitással rendelkezik, ezért azon felül, hogy az ipari enzimtermelésben sikeresen hasznosítható, az inulin alapú bioetanol előállítás egyik ígéretes mikroorganizmusa lehet. A faj rendkívül széles enzimszisztemmel rendelkezik, ebből következően pedig széles a számára hasznosítható szubsztrátumok bázisa. A *Kluyveromyces* élesztő az egyik leggyorsabb szaporodási sebességgel rendelkezik az eukarióta mikroorganizmusok között. Többek között ezen tulajdonságai miatt alkalmazzák savó és laktóz szubsztrátumokon oligonukleotidok előállítására, valamint etanolos fermentálásra, továbbá ipari enzimbioszintézisek (pl.: inulináz, β -galaktozidáz, pektinázok) előállítására, vagy éppen különböző papíripari hulladékok és szennyvíziszapok kezelésére. Egy másik, az élesztők körében szintén egyedülálló sajátossága, hogy extrém magas, akár 40-50 °C feletti hőmérsékleten is képes szaporodni és élettevékenységet folytatni (Banat & Marchant, 1995; Belem & Lee, 1999; Deák, 1998; Fonseca *et al.*, 2008; Kays & Nottingham, 2008; Lane & Morrissey, 2010; Rech & Ayub, 2007).

A *Kluyveromyces marxianus* alkalmazásának problémája viszont, hogy etanol képző képessége és az alkohollal szembeni toleranciája lényegesen alacsonyabb, mint a *Saccharomyces cerevisiae* esetén tapasztaltak. Ezért a két faj társításával, szinergens hatásuk révén az inulin fermentációja hatékonyabbá tehető.

2.5 Vegyes kultúra alkalmazása

Vegyes kultúrák erjesztés során a szubsztrátum alkoholos fermentálását két vagy több mikroorganizmus használatával valósítják meg (Gutierrez-Correa *et al.*, 1998).

A monokultúrák alkalmazása nem előnyös az inulin fermentációja során, hiszen a *Saccharomyces* élesztő nem rendelkezik inulináz aktivitással, míg a *Kluyveromyces* fajt csak gyenge etanol erjesztő képesség jellemzi. Ezért a két különböző élesztő együttes, vegyes kultúrában való alkalmazásával az inulin fermentációja hatékonyabban megvalósítható, mint tiszta tenyészetekkel. A vegyes tenyészeteket már sokszor, sok helyen alkalmazták különböző ipari és laboratóriumi kísérletek során, melyekkel az esetek többségében jobb eredményeket értek el, mint tiszta tenyészetek használata esetén (Guo *et al.*, 2010; Mamma *et al.*, 1996; Szambelan *et al.*, 2004).

Az inulin alapú etanol előállításában a különböző vegyes kultúrák hatását vizsgálta Szambelan és munkatársai (2004), akik a *Zymomonas mobilis* baktérium, valamint a *Saccharomyces cerevisiae* párosítását végezték el a magas inulináz aktivitással rendelkező *Kluyveromyces fragilis* élesztővel. A vegyes kultúrák esetében kapott eredmények 2-12 %-kal voltak magasabbak, mint a tiszta tenyészetek alkalmazásakor kaptak. Nakamura és társai (1996) pedig az *Aspergillus niger* 817

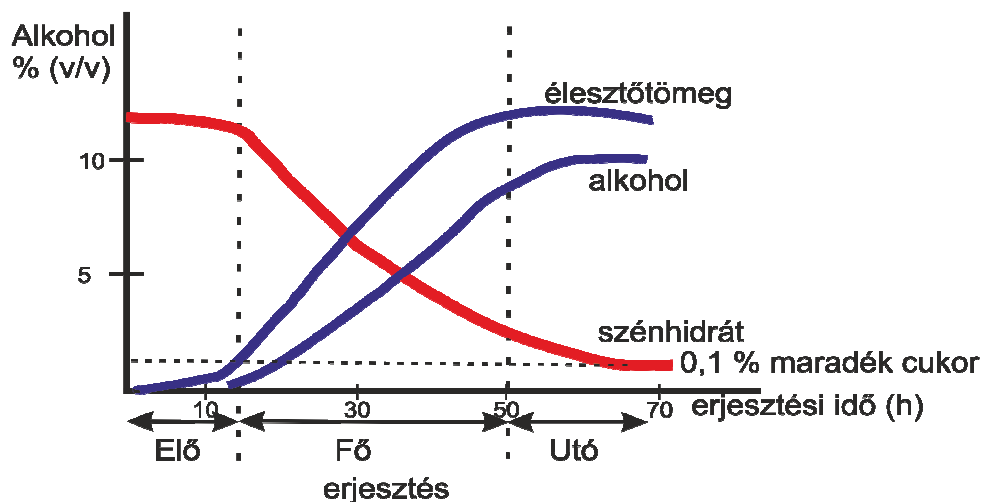
törzs és a *Saccharomyces cerevisiae* 1200 törzs társításával végeztek kísérleteket, csicsóka alapú szubsztrátumot használva. A fermentáció hatásfoka 80 % körül alakult. Ge és Zhang (2005) pedig az extrém magas etanolt is jól tűrő *Saccharomyces cerevisiae* Z-06 törzs és egy újonnan izolált, kivételesen magas inulináz aktivitással rendelkező penészgomba, az *Aspergillus niger* SL-09 törzs társítását és inulin fermentálását vizsgálták. A biokonverziós hatásfokok ~80-90 % között alakultak.

2.6 Etanol fermentációs technológiák

Az etanol előállítására négy fő fermentációs technológiát különböztethetünk meg, melyeket több-kevesebb sikerrel vizsgálnak, használnak laboratóriumi vagy éppen már ipari körülmények között. Ez a négy típus a szakaszos (batch), a rátáplálásos (fed-batch), a fél-folytonos (semi-continuous) és a folytonos (continuous) fermentációs technológia (Caylak & Sukan, 1998).

2.6.1 Szakaszos technológia

A szakaszos fermentációs technológia a klasszikus, napjainkban is leggyakrabban alkalmazott eljárás az etanol előállítására, mivel beruházási költségei alacsonyak, nem igényel jelentős szabályozást és egyszerűen megvalósítható. A technológia során a szubsztrátumot és az élesztőt egyszerre töltik a fermentorba, amelyben állandó a cefre térfogata. Az erjesztés vezetése és az üzemeltetés lényegesen könnyebb, mint a többi technológia esetén. A fermentációs technika lefutási görbéje a 4. ábrán látható.



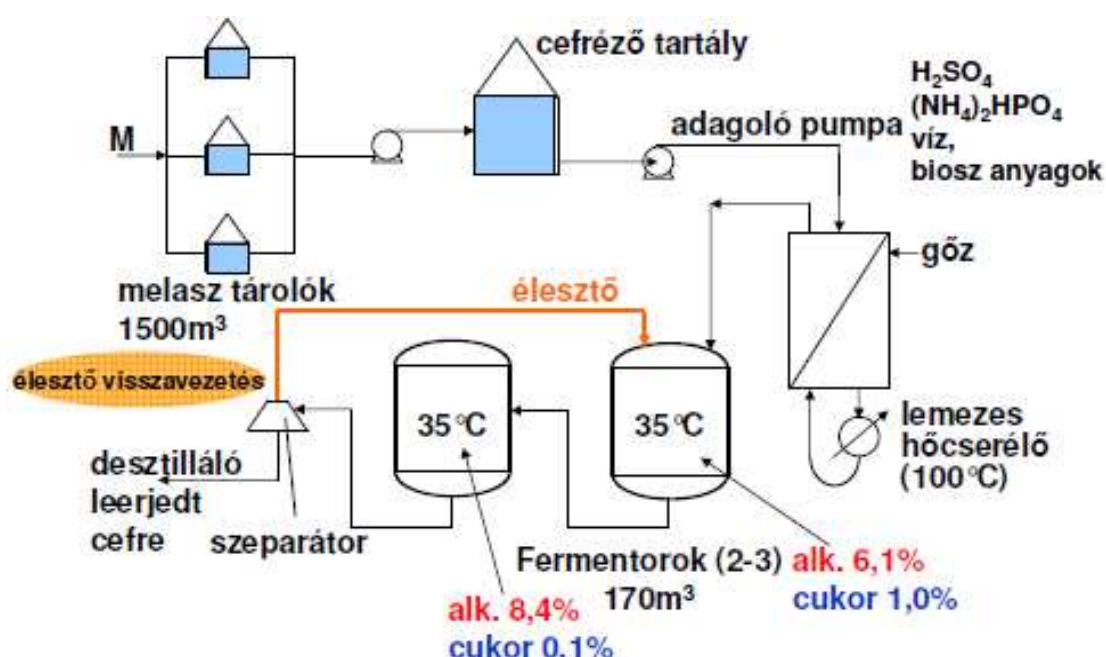
4. ábra A szakaszos fermentáció időbeni lefutása (Hoschke, 2010)

A technikát nagy flexibilitás jellemzi, viszont a termelés sok esetben kis hatásfokú. A fermentációs idő viszonylag hosszú, továbbá nagy a munkaerő igénye, és nagy hátránya a viszonylag hosszú improduktív állásidő. Továbbá kezdetben nagyobb a befertőződés kockázata a kezdeti alacsony élesztő és etanol koncentráció miatt. Ezeken felül a fermentáció során esetleg fellépő szubsztrátum- és termékgtlás káros hatásait is figyelembe kell venni (Caylak & Sukan, 1998; Hoschke, 2010; Kays & Nottingham, 2008; Rudolf *et al.*, 2009).

2.6.2 Folytonos technológia

Folytonos technológia során a fermentorba táplált közeg tartalmazza a szubsztrátumot, az élesztőt és az egyéb szükséges tápanyagokat. A tápközeget folyamatosan adagolják a rendszerbe, miközben a leerjedt cefrét, amely tartalmaz etanolt, maradék cukrokat és élesztősejteket is, folyamatosan elvezetik. Amennyi szubsztrátumot betáplálunk, annyit el is vezetünk, ezért a térfogat állandó, a cefre minősége és a technológiát jellemző paraméterek pedig közel állandóak.

A technika előnyei közé tartozik, hogy a termelésben egy tartós „exponenciális” szakasz biztosítható (nagyobb produktivitás), valamint magas hozam és jó műszerezettség jellemzi. Bizonyos esetekben (pl.: rögzített sejtes rendszerek) nagy a befertőződés veszélye, ennek ellenére a technológiát nagy üzembiztonság jellemzi, mivel a rendszerben általában viszonylag állandó és magas az etanol, valamint az élesztő koncentrációja.



5. ábra DDL (Danish Distilleries Ltd.) folytonos fermentációs technológia (Hoschke, 2010)

További jellemzői, hogy nagyobb a belső mutáció valószínűsége, valamint a beruházási és üzemeltetési költségei is magasabbak. Ezeken túl pedig szükséges egy növelt életképességű és extrém alkoholtűrő élesztő alkalmazása is (Caylak & Sukan, 1998; Hoschke, 2010; Kays & Nottingham, 2008; Rudolf *et al.*, 2009).

2.6.3 Rátáplálásos technológia

A rátáplálásos fermentációs technológia a szakaszos és a folytonos technikák kombinációja, amelynél alacsonyabb kezdeti szénhidrát koncentrációból indulnak ki, és az erjesztés során friss szubsztrátumot adagolnak (állandó, változó vagy periódikus módon) a rendszerhez, ezáltal alacsony szinten tartva a szacharidok koncentrációját. Ennek köszönhetően pedig a szubsztrátum akár teljes konverziója is megvalósulhat. Terméklevétel nincs, csak a fermentáció befejeződése után, ezért a rátáplálásig a cefre mennyisége folyamatosan nő. Egy másik lehetőség, amikor a szubsztrátum helyett vagy mellett a felhasznált élesztőt is hozzátáplálják a fermentorban lévő szubsztrátumhoz.

Legnagyobb előnye a rátáplálásos technológiának, hogy az alacsonyabb koncentrációjú szubsztrátum fokozatos adagolásával a különböző gátlások (szubsztrátum- és termékgtátlás) csökkenthetők, megelőzhetők, ezzel pedig a fermentáció határfoka és produktivitása javítható, a fermentációs idő csökkenthető. A szakaszos technológiához hasonlóan, itt is nagynak mondható az improduktív állásidő, valamint jelen esetben is nagyobb a kiindulási befertőződés veszélye a kezdeti alacsony etanol és élesztő koncentráció miatt (Caylak & Sukan, 1998; Cheng *et al.*, 2009; Kays & Nottingham, 2008; Rudolf *et al.*, 2009).

2.6.4 Fél-folytonos technológia

A fél-folytonos fermentációs technológiában, amely gyakorlatilag szakaszos erjesztések sorozata, a fermentlé egy részét (~10-20 %-ot) a fermentorban hagyják, amely még annyi élesztőt tartalmaz, hogy a maradék cefréhez adagolt friss szubsztrátum erjesztése ismét meg tud indulni, vagyis jelen esetben az élesztő inokulum mennyisége folyamatosan változik.

A technológia nagy előnye, hogy nem szükséges új, friss inokulum vezetése az újabb fermentáció megkezdése előtt, valamint ennek köszönhetően az improduktív idő jelentősen csökkenthető, mivel a két fermentációs folyamat között a tisztítási és sterilizációs szakasz is kimarad. Azonban, ahogy a folytonos technológiánál, úgy jelen esetben is nagy problémákat okozhat a befertőződés, valamint a mutáció magas kockázata (Caylak & Sukan, 1998; Kays & Nottingham, 2008).

3 KÍSÉRLETI CÉLKITŰZÉSEK

Az egyre intenzívebben tapasztalható globális változások kezelésének lehetőségei egyre intenzívebben foglalkoztatják a XXI. század kutatóit. A jelentkező problémák megoldási folyamatának egyik szelete a fosszilis energiaforrások részleges vagy teljes felváltását célzó megújuló energiaforrások felkutatása és minél szélesebb körben történő bevezetése. A közlekedési ágazatban ilyen megújuló energiaforrások a bioüzemanyagok, melyek közül a legelterjedtebb a bioetanol. A biofuel előállításában az egyik alternatív, hasznosítható alapanyag az inulin, amely esetében viszont jelentős problémák tapasztalhatók a fermentálási folyamatban, hiszen az ipari etanol gyártásban alkalmazott élesztő törzsek nem képesek az inulint közvetlenül fermentálni és hatékonyan hasznosítani.

Kutatómunkám célja volt az inulin fermentáció hatékonyságának tanulmányozása különböző beoltási módszerek alkalmazása mellett. Szakaszos (batch) erjesztési technológia során vizsgáltam a *Saccharomyces cerevisiae* és a *Kluyveromyces marxianus* monokultúra erjesztési tevékenységét, valamint az inulin szimultán cukrosításának és erjesztésének a fermentációs hatékonyságra gyakorolt hatását.

Célul tűztem ki az ipari és biotechnológiai folyamatokban kipróbált rátáplálásos (fed-batch) fermentációs technológia tanulmányozását, amelyet a fermentáció hatékonyságának növelése és az erjesztési idő csökkentése érdekében sok esetben sikerrel alkalmaztak. Kísérleteket terveztem natív inulin alapú szubsztrátum alkalmazása esetén a fed-batch eljárás lefutási görbéjének megállapítása és a technológia sikerességének vizsgálata érdekében. Szintén célom volt a különböző kiindulási szénhidrát koncentrációk és a különböző rátáplálási időszakok hatásának vizsgálata, valamint annak megállapítása, hogy a beoltási élesztőmennyiség rátáplálásos adagolása befolyásolja-e az inulin hasznosításának mértékét.

A szakaszos és rátáplálásos technológia során kapott eredmények alapján célul tűztem ki egy fél-folytonos (semi-continuous) fermentációs technológia kidolgozását és lefutásának modellezését. A felállított (elméleti) modell alapján pedig a fél-folytonos technológia laboratóriumi körülmények között történő megvalósítását, vizsgálatát.

4 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Kísérleti hely

Kutatómunkám kísérleteit a Budapesti Corvinus Egyetem Élelmiszertudományi Karának (BCE-ÉTK), Sör- és Szeszipari Tanszékén végeztem, melyet korszerű analitikai módszerek alkalmazása és nagyszerű infrastruktúra jellemez.

4.2 Vizsgált élesztő fajok

Munkám során a *Kluyveromyces marxianus* és a *Saccharomyces cerevisiae* élesztőgomba fajok fermentációs tulajdonságait vizsgáltam.

4.2.1 *Kluyveromyces marxianus* fenntartása

A vizsgált *Kluyveromyces marxianus* Y00959 törzs a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményéből származott. Fenntartása malátás ferdeagaron, 4 C-on történt. A törzset 1-2 hónapos időszakonként oltottam át másik ferdeagarra, lelángolt oltókacs segítségével, lamináris fülke alatt. A frissen átoltott ferdeagaros tenyészetet 24 órán keresztül inkubátorban tartottam, ahol 30°C hőmérsékletet biztosítottam az élesztő számára.

4.2.2 A *Saccharomyces cerevisiae* törzs alkalmazása

Kísérleteimhez a Sör- és Szeszipari Tanszéken található Levuline FB típusú, szárított *Saccharomyces cerevisiae* törzset használtam fel, melyből közvetlenül a fermentációs kísérlet beoltási fázisa előtt ~1 g mennyiséget rehidratáltam, ~100 cm³ csapvízben. A sejtek vízfelvételét mágneses keveréssel segítetttem.

4.3 Felhasznált anyagok

4.3.1 *Malátás ferdeagar*

A *Kluyveromyces* élesztő fenntartása malátás ferdeagaron (15 g/l agar, 10 g/l glükóz, 5 g/l pepton, 3 g/l élesztőkivonat és 3 g/l malátakivonat) történt. A tápközeget 5,0 cm³ mennyiségként kémcsövekbe mértem, melyeket sterilizálás után ferdén tároltam az agar megszilárdulásáig. A ferdeagart felhasználásáig 4 °C-on tároltam.

4.3.2 *Inokulum táptalaj*

A *Kluyveromyces marxianus* felszaporítását a számára ideális tápközegekben (10 g/l élesztőkivonat, 20 g/l glükóz és 20 g/l bakteriális pepton) hajtottam végre. Az elkészített tápoldatot 250 cm³-es lombikokba osztottam szét, egy-egy lombikba ~100 cm³ oldatot mérve, melyeket ezután autoklávban csíráztattam.

4.3.3 *Somogyi I és II reagens*

A reagensok elkészítését Somogyi által publikáltak alapján végeztem el (Somogyi, 1945; Somogyi, 1951).

4.3.4 *Nelson reagens*

A reagens elkészítését Nelson által leírtakat követve hajtottam végre (Nelson, 1944).

4.3.5 *Szubsztrátum*

A fermentációs kísérletekhez csicsóka sűrítményt használtam fel, melyet a Food, Future, Fuel Kft. biztosított számomra. A koncentrátum szárazanyag-tartalma ~70 m/m% volt, amely körülbelül 52 % inulint, 9,6 % szacharózt, 3,6 % fruktózt és 1,3 % glükózt tartalmazott.

4.4 Alkalmazott módszerek

4.4.1 Inokulum előállítása

A malátás ferdeagarról a *Kluyveromyces* törzset oltókacs segítségével oltottam át az inokulum táptalajba, melyet ezután rázó termosztátba helyeztem (30 °C, 120 rpm). Az élesztő felszaporítása ~12 órát vett igénybe.

4.4.2 Fermentáció

A rendelkezésre álló csicsóka sűrítményből csapvíz adagolásával készítettem el az erjesztendő szubsztrátumot, melynek pH értékét 3,5 alá csökkentettem, foszforsav (21 %-os H_3PO_4) segítségével. Ezáltal kívántam az erjedés során esetleg jelentkező káros mikroorganizmusok (baktériumok, penészek) felszaporodását megakadályozni (Panyik & Béli, 2008). A kísérlet szempontjából a szubsztrátum hővel történő csíráltatása nem volt kívánatos, hiszen a hőkezelés a technológia költségeit jelentősen megnövelné (Bekers *et al.*, 2007).

Az élesztő számára szükséges ásványi és egyéb anyagokat, valamint a vitaminokat komplex UVAVITAL tápsó (inaktív élesztő, vitaminok, aminosavak, peptidek, mikroelemek, telítetlen zsírsavak, ammónium-sók) adagolásával biztosítottam. Ajánlott alkalmazási mennyisége 20-25 g/hl, ezért felhasználásának mértékét a készített szubsztrátum mennyiségének függvényében határoztam meg.

Az így kapott cefrét, az alkalmazott fermentációs technológia függvényében, különböző mennyiségenként osztottam szét 500 cm³-es Erlenmeyer-lombikokba, melyekben az erjesztés végbement. A cefrét ezután abszorbancia érték alapján oltottam be a két élesztő fajjal (rehidratált *Saccharomyces cerevisiae* és felszaporított *Kluyveromyces marxianus*). A különböző társítási arányok hatásának előzőleg elvégzett vizsgálatánál a leghatékonyabbnak a két faj 1:1 arányú alkalmazása bizonyult, ezért eme keverési arányban végeztem el a cefre beoltását (Dénes, 2010). A beoltott szubsztrátumokat jól összeráztam, a lombikokra kotyogót helyeztem, és végül 30 °C-os termosztátba tettem őket, amely hőmérséklet az inulináz termelésének és az alkoholos erjesztés lefutásának is kedvező (Shady *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2006; Vrasenic *et al.*, 2002). Az erjesztési folyamatokat minden esetben párhuzamos kísérletsorozatban végeztem el, melyeknél 24 óránként mintát vettem és elemeztem.

4.4.3 Szénhidrátok meghatározása

A naponta vett mintákból a redukáló cukrok mennyiségét Somogyi-Nelson módszerrel és HPLC technikával vizsgáltam. A nagyobb polimerizációs fokú szénhidrátok koncentrációját pedig nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiás technika segítségével határoztam meg.

4.4.3.1 Somogyi-Nelson módszer

A redukáló cukrok gyors mennyiségi meghatározását Somogyi és Nelson által publikált módszerrel határoztam meg, amelyben a redukáló cukrok lúgos közegben a réz(II)-ionokat réz(I)-ionokká redukálják, mely réz(I)-ionokat arzenomolibdát komplex segítségével redukáltam. A folyamat következtében egy intenzív, tartós, kék színeképződés megy végbe, amely színváltozást spektrofotometriásan vizsgáltam (Nelson, 1944; Somogyi, 1945; Somogyi, 1951).

A cukor koncentráció és az abszorbancia érték közötti összefüggés meghatározására ismert koncentrációjú glükóz oldatokat készítettem, melyek fényáteresztő képességét 540 nm-en vizsgáltam. A kapott mérési adatokra, lineáris, regressziós egyenest illesztettem, melynek segítségével a továbbiakban már ismeretlen koncentrációjú oldatok redukáló cukor tartalma könnyedén és gyorsan meghatározható.

4.4.3.2 Folyadékkromatográfiás eljárás

A nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) technika a vegyületek azonosítására, elválasztására, valamint mennyiségi meghatározására használt kromatográfiás eljárás. A mérés során a vizsgálandó mintát (mozgó fázis) nagy nyomással nyomják keresztül a különböző tölteteket tartalmazó kolonnán, oszlopon (álló fázis), majd az oszlop alján egy detektor segítségével mérik a vizsgált molekulák retenciós (visszatartási) idejét. A retenciós idő nagysága a két fázis közötti kölcsönhatástól függ. A detektor által továbbított jel az elúciós diagram vagy kromatogram (Amtmann, 2011).

Méréseimet a Thermo Fisher Scientific Corporation által gyártott Surveyor típusú HPLC berendezésen végeztem el, melynek jellemzői a következők:

Oszlop: Aminex-87H (Bio-Rad, USA)

Eluens: 0,005 n H₂SO₄

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 műszer segítségével határoztam meg a mintákban található különböző szénhidrátok (glükóz, fruktóz, szacharóz, oligoszacharidok, inulin) mennyiségét. Az egyes anyagok koncentrációját, a műszerhez már korábban meghatározott kalibrációs összefüggések (koncentráció és kromatográfiás terület közötti összefüggés) ismeretében, a mérés során meghatározott kromatográfiás területekből határoztam meg.

4.4.4 Etanol koncentráció meghatározása

Az erjedés során HPLC technika segítségével követtem nyomon az etil-alkohol mennyiségének alakulását. A mérési folyamatot, a kalibrációs összefüggés ismeretében, hasonlóképpen végeztem el, mint a szénhidrát koncentrációk meghatározása esetén tettem.

A fermentáció végén az etanol koncentrációját Büchi Distillation Unit K-350-es lepárló és Anton Paar DMA 35N alkoholmérő készülékek segítségével is megmértem.

5 EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

5.1 Szakaszos fermentációs technológia

Kutatómunkám során elsőként összehasonlítottam a különböző szakaszos (batch) fermentációs technikákat és alkalmazhatóságukat az inulin alapú etanol előállításában. A kísérleteimben nyomon követtem a különböző szénhidrátok (erjeszthető cukrok, szacharóz, oligoszacharidok és inulin) és az etanol koncentrációjának alakulását, mellyel az egyes erjesztési módok jellemzői jól megfigyelhetők. A fermentáció során a teljes cefremennyiséget (~300 cm³) oltottam be az adott élesztő inokulummal.

Az inulin erjesztését négy különböző technikával valósítottam meg, tiszta *Kluyveromyces marxianus*, tiszta *Saccharomyces cerevisiae* monokultúrával, a két faj vegyes kultúrájával, valamint a *Saccharomyces cerevisiae* és ipari inulináz enzimmészítmény együttes alkalmazásával. A kapott eredményeket az 1. táblázatban foglaltam össze. A feltüntetett eredmények két párhuzamos kísérlet átlagából származnak.

1. táblázat Különböző beoltási módszerek hatása az etanol fermentációjára

Beoltás	Kezdeti cukor koncentráció m/v%	Etanol koncentráció v/v%	Maradék cukor koncentráció m/v%	Konverziós hatásfok %
<i>S. cerevisiae</i>	12,84	4,71	2,80	56,8
<i>Kl. marxianus</i>	12,84	5,60	1,25	67,5
<i>S. cerevisiae</i> + Inulináz	12,84	6,40	1,10	77,1
Vegyes kultúra*	12,84	6,33	1,14	76,3

**Saccharomyces cerevisiae* és *Kluyveromyces marxianus* 1:1 arányú vegyes kultúrájának alkalmazása

Megállapítható, hogy a monokultúrás erjesztéseknél szignifikánsan alacsonyabb biokonverziós hatásfokok (56,8 % és 67,5 %) érthetők el. Továbbá, azt tapasztaltam, hogy az exogén inulináz enzim adagolásával olyan hatás váltható ki, mint a vegyes erjesztés esetén, így mind a két esetben megvalósult a szimultán cukrosítás és erjesztés.

5.1.1 Monokultúrák alkalmazása szakaszos fermentációban

A *Saccharomyces cerevisiae* és a *Kluyveromyces marxianus* monokultúrák alkalmazásakor az elkészített natív cefrét értelemszerűen csak az egyik törzzsel oltottam be. A fermentációs adatok

(1. táblázat) az előbbi faj használata esetén mutatták a legalacsonyabb etanol koncentrációt (~4,7 v/v%) és biokonverziós hatásfokot (~57 %). Látható, hogy az erjesztés végén viszonylag magas, közel 3 m/v% volt a maradék, hasznosítatlan szénhidrát mennyisége a cefrében, amely azt jelenti, hogy az élesztő nem használta fel a jelen lévő szénforrások több mint 20 %-át. Ennek minden bizonnyal az a magyarázata, hogy az élesztő nem rendelkezik inulináz aktivitással, így nem tudta hatékonyan hasznosítani a nagyobb polimerizáltságú frukto-oligoszacharidokat és az inulint.

A szakirodalomban több adat is található a *Saccharomyces cerevisiae* alkalmazására az inulin fermentációjához, melyek többségében csak az inulin előkezelése, hidrolízise után alkalmazzák. Thuesombat és munkatársai által 2007-ben publikálták azon eredményeket, amelyben a csicsóka alapú szubsztrátumot savas hidrolízis után fermentálták, ~88 %-os hatásfokot elérve.

Néhány esetben pedig arra is találhatunk példát, hogy a *Saccharomyces* törzseket natív, előkezelés nélküli inulin fermentálása esetén tanulmányozzák. Ilyen például Lim és munkatársai által közölt 2010-es eredmények, amelyekben a *Saccharomyces cerevisiae* KCCM50549 nemesített törzset vizsgálták. Bebizonyították, hogy a KCCM50549 képes az eddigieknél lényegesen hatékonyabban fermentálni az elbontatlan inulint. Azonban a törzssel elért maximális konverziós hatásfok csupán ~70 % volt. Ennek ellenére ez az eredmény lényegesen jobb, mint az eddig publikált, *Saccharomyces cerevisiae* NCYC62 és Y841 törzsekkel végzett fermentációk során kapott eredmények (Pourrat *et al.*, 1983; Schorr-Galindro *et al.*, 2000).

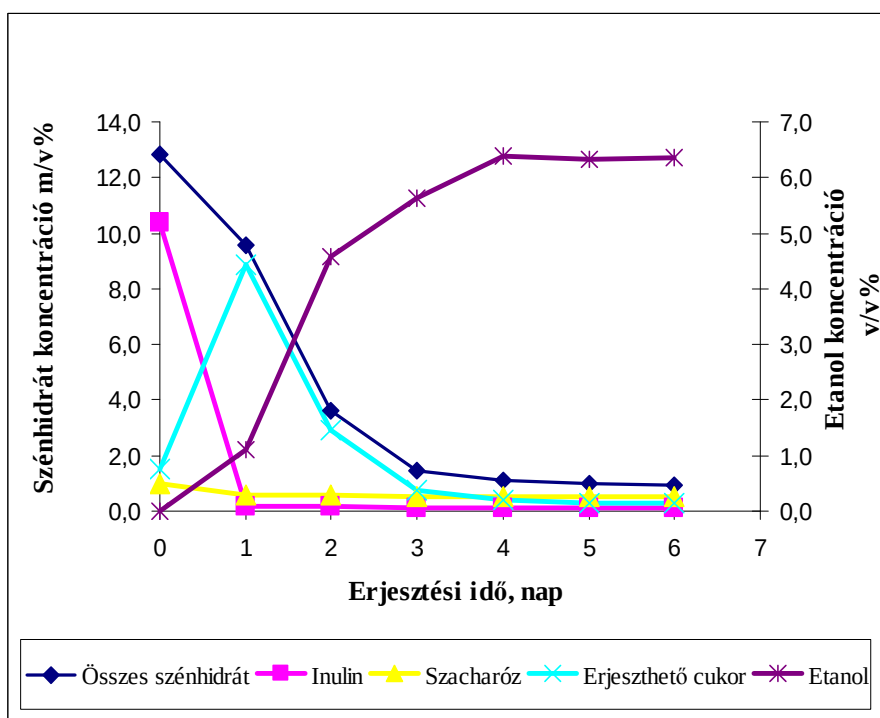
Ezzel ellentétben a *Kluyveromyces* monokultúra hasznosította a rendelkezésére álló szénhidrátok több mint 90 %-át, hiszen a kiindulási 12,84 m/v% kezdeti szénhidrát koncentrációhoz képest a maradék szacharidok mennyisége csupán 1,25 m/v% volt az erjesztés végén. Továbbá, a termékben detektált etanol koncentrációja (5,6 v/v%) is jóval magasabb volt, mint a *Saccharomyces* élesztő esetén, azonban a kapott konverziós hatásfok csupán 67,5 % volt.

A *Kluyveromyces marxianus* egyik kedvező tulajdonsága az ipar számára, hogy nagy mennyiségben képes különböző enzimeket szintetizálni, mint például a számunkra legfontosabb inulináz enzimet (Rouwenhorst *et al.*, 1990) vagy éppen β -glükózidázt, β -galaktozidázt, stb. (Leclerc *et al.*, 1987; Martins *et al.*, 2002). Ezért sokszor vizsgálták már a faj törzstípusait natív inulin fermentációjában, hiszen képes az inulint közvetlenül erjeszteni és hasznosítani. Ilyen volt a Bajpai és Margaritis (1983) által végzett tanulmány is, amelyben a *Kluyveromyces marxianus* UCD (FST) 55-82 törzs inulin fermentáló és növekedő képességét vizsgálták különböző szénhidrát koncentrációjú (50-300 g/l) cefrék esetén. Az eltérő beállításoknál kapott maximális etanol koncentrációk 21 és 102 g/l között alakultak. Átfogó vizsgálatokat végeztek Yuan és munkatársai (2008) arra vonatkozóan, hogy a *Kluyveromyces marxianus* ATCC8554 törzs etanol termelését milyen mértékben befolyásolja, ha a fermentációs közeget tenger-, illetve édesvízzel

készítik el. A tanulmányban a törzsről több érdekes információt is megtudhatunk, például a pH, a hőmérséklet vagy éppen a levegőztetés törzsre gyakorolt hatásáról.

5.1.2 Az inulin szimultán cukrosításának és erjesztésének megvalósítása

A következő kísérletben a *Saccharomyces* élesztőt inulináz enzimmel (*Aspergillus niger* eredetű, Novozyme AS, Dánia) közösen/együtt/együttesen adagoltam a natív cefréhez. A felhasznált enzim aktivitása 10 ezer U/ml volt, amelyből ~2-3 ezer U mennyiséget használtam fel a technológiában. A módszerrel megvalósítható az inulin szimultán cukrosítása és erjesztése, vagyis a nagyobb polimerizáltságú szénláncok elbontása az inulináz enzim révén, és a keletkező egyszerű cukrok etanollá alakítása az élesztőnek köszönhetően. Az egyidejűleg megvalósuló hidrolízis és fermentáció folyamata a 6. ábrán látható.

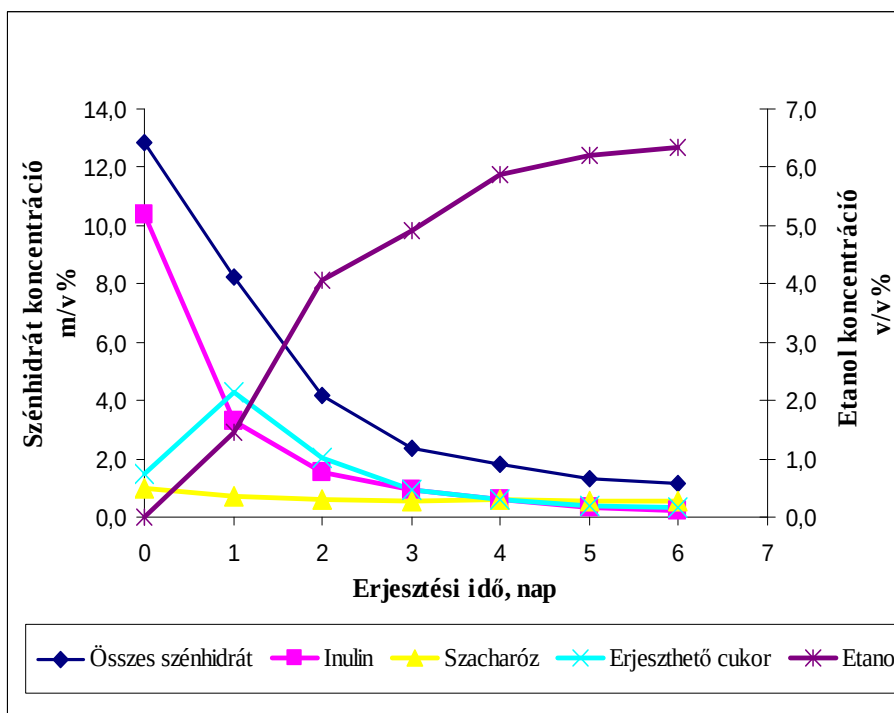


6. ábra Szimultán cukrosítás és erjesztés *Saccharomyces cerevisiae* és inulináz enzim együttes alkalmazása esetén

Eme beoltási technikával látható, hogy lényegesen jobb eredményeket értem el, mint a monokultúrák alkalmazása esetén, hiszen a maradék szénhidrátok mennyisége csupán 1,1 m/v%, míg a keletkezett etanol mennyisége 6,4 v/v% volt. Ennek köszönhetően a fermentáció hatásfoka meghaladta a 77 %-ot.

Szintén magas konverzióval valósult meg a fermentáció abban az esetben is, amikor Szambelan és munkatársai (2004) a *Saccharomyces cerevisiae* Bc16a és D₂ törzsek etanol termelését vizsgálták a csicsóka (Albik típusú) alapú szubsztrátum inulináz enzimes kezelése mellett, a kapott konverziós hatások ~72-80 % között alakultak. Bekers és munkatársai (2008) a *Saccharomyces cerevisiae* erjesztő tevékenységét tanulmányozták csicsóka eredetű szubsztrátumot alkalmazva. Az élesztő erjesztő tevékenysége lényegesen jobb volt, mint a másik vizsgált faj, a *Zymomonas mobilis* 113 "S" törzs teljesítménye.

Hasonlóan jó eredményeket kaptam abban az esetben is, amikor a két élesztő fajt együtt, vegyes kultúrában használtam, hiszen ekkor is megvalósítható az inulin egyidejű cukrosítása és erjesztése. Jelen esetben viszont nem hozzáadott enzimek készítmény végzi az inulin hidrolízisét, hanem a *Kluyveromyces* élesztő által termelt inulináz. A fermentációs folyamat lefutása a 7. ábrán követhető nyomon.



7. ábra Szimultán cukrosítás és erjesztés vegyes kultúra alkalmazása esetén

A vegyes kultúra esetében kapott eredmények hasonlóan mutatkoztak az „enzimes” technológiában megfigyeltekhez, hiszen a hasznosítatlan szénhidrátok mennyisége jelen esetben is csupán 1,14 m/v%, míg a keletkezett etanol mennyisége 6,33 v/v% volt. Ezáltal a vegyes kultúrák technika hatásfoka is jóval nagyobb volt (76,3 %) a monokultúrák technikák esetében tapasztaltakhoz képest.

A két fermentációs görbét vizsgálva viszont látható, hogy míg az „enzimes” technológia során már 96 óra után elértem a közel maximális hatásfokot, addig a vegyes kultúra esetén ehhez közel 144 óra volt szükséges.

A vegyes kultúrák segítségével megvalósított etanol fermentációt már sokan, sokféle mikroorganizmus társításával tanulmányozták. Az inulin erjesztését is már több faj párosításával vizsgálták, így például a *Saccharomyces cerevisiae* különböző törzseit társították már többek között *Aspergillus niger*, *Kluyveromyces fragilis*, *Pichia pastoris* vagy éppen *Kluyveromyces marxianus* törzsekkel is (Farkas, 2011; Ge & Zhang, 2005; Ohta *et al.*, 1993; Szambelan *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2010).

Az esetek többségében a vegyes kultúrák alkohol fermentáció lényegesen jobb eredményt mutatott, mint a monokultúrák alkalmazása, ezt erősítették meg Farkas (2011) által közölt eredmények is, aki vegyes erjesztést alkalmazva (*Kluyveromyces marxianus*:*Saccharomyces cerevisiae*), 25 m/v%-os cefre esetén, ~11-12 v/v% etanol koncentrációt tapasztalt a kiejert cefrében. Hasonlóan kedvező eredményeket kaptak Szambelan és társai (2004) is, akik vegyes kultúrákat használva, az inulin erjesztésénél kapott etanol koncentrációját 2-12 %-kal tudták megnövelni, a tiszta tenyészetek alkalmazása esetén kapott alkohol mennyiségekhez képest.

Összességében tehát megállapítható, hogy az inulin szimultán cukrosításának és erjesztésének megvalósításával elérhető annak hatékony hasznosítása. Továbbá a *Kluyveromyces marxianus*:*Saccharomyces cerevisiae* vegyes kultúrával, valamint az élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) inulináz enzimmal történő együttes alkalmazása esetén ~10-20 %-kal jobb hatásfok mutatkozik, mint monokultúrák használata esetén. A vegyes fermentáció előnye, hogy nem szükséges drága enzimek alkalmazása a hatékony erjesztés megvalósításához, míg az „enzimes” erjesztés előnye, hogy a fermentációs idő jelentősen csökkenthető. Ennek ellenére az inulin fermentáció tanulmányozását a vegyes kultúrák erjesztés irányába tartom kedvezőbbnek fejleszteni, mivel az exo-inulináz enzimek gyártását a legtöbb nagy enzimgyártó cég leállította vagy korlátozta. Várhatóan ezen enzimek beszerzése a jövőben egyre nehezebb és költségesebb lesz, így az enzimes technológia gazdaságtalanná válhat.

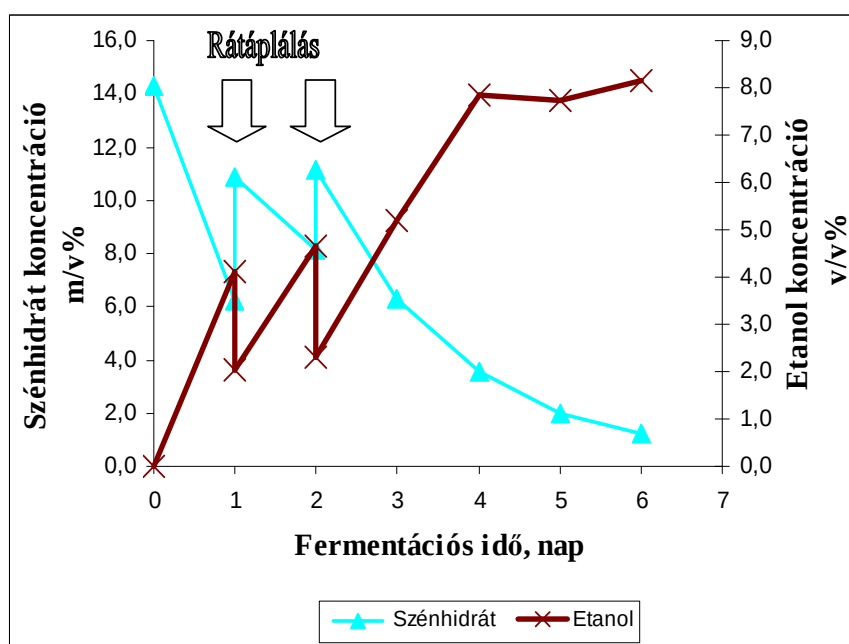
5.2 Rátáplálós fermentációs technológia

A biokonverziós hatásfok növelése és a fermentációs idő esetleges csökkentése érdekében kísérleteket végeztem rátáplálós (fed-batch) technológiát alkalmazva. A fed-batch technológia alkalmazásával a szakirodalomban több helyen is találkoztam. A rátáplálós technika sikeres alkalmazása fellelhető a sajtsavó alapú egysejt-fehérje előállításában, a tejsavó alapú etanol

gyártásban, az oligonukleotidok előállításában vagy éppen az extracelluláris inulináz termelésében (Barba *et al.*, 2001; Belem & Lee, 1999; Ferrari *et al.*, 1994; Hensing *et al.*, 1994).

A technológia során ~ 100 vagy $\sim 150 \text{ cm}^3$ mennyiségű cefréből indultam ki, attól függően, hogy hány alkalommal történt a friss szubsztrátum adagolása. Ha egy alkalommal, akkor a teljes cefremennyiség feléből, vagyis $\sim 150 \text{ cm}^3$ szubsztrátumból indultam ki, míg ha kétszer végeztem el a rátáplálást, akkor $\sim 100 \text{ cm}^3$ cefrét használtam. A rátáplálások következtében a végső cefre mennyiség minden esetben $\sim 300 \text{ cm}^3$ volt.

Az első kísérletsorozatban a friss szubsztrátum adagolását az erjesztés első két napján végeztem el, $\sim 100\text{-}100 \text{ cm}^3$ mennyiséget hozzáadva a kiindulási $\sim 100 \text{ cm}^3$ cefréhez. A cefrét az erjesztés megindításakor oltottam be a *Saccharomyces cerevisiae* és a *Kluyveromyces marxianus* élesztők 1:1 arányú vegyes kultúrájával, $180 \text{ OD}_{600\text{nm}} \cdot \text{cm}^3$ mennyiségben, amely azt jelenti, hogy az élesztő inokulum optikai denzitásának és felhasznált mennyiségének szorzata 180. A fed-batch technológia fermentációs görbáját a 8. ábra szemlélteti.



8. ábra Rátáplálós fermentációs technika lefutási görbéje

Megfigyelhető, hogy a friss szubsztrátum adagolásának hatására a szénhidrátok mennyisége megnő, míg a cefrében lévő etanol koncentrációja lecsökken. Ennek köszönhetően csökkenthető, netán meg is szüntethető a fermentáció során esetlegesen fellépő szubsztrátum- és/vagy termékgátlás, hiszen a fermentálandó inulin mennyiségét kisebb adagokban juttatjuk a rendszerbe (Cheng *et al.*, 2009; Roukas, 1991; Thomas & Ingledew, 1992).

A kísérletsorozat során kapott eredményeket a 2. táblázatban foglaltam össze, melyben láthatjuk, hogy különböző kezdeti szénhidrát koncentrációjú ($\sim 11\text{-}14\text{-}16 \text{ m/v\%}$) cefréket vizsgáltam.

2. táblázat Rátáplálós fermentációs technológia alkalmazása a vegyes kultúrák alkoholos erjesztés esetén

Kezdeti szénhidrát koncentráció m/v%	Rátáplált szénhidrát koncentráció m/v%		Etanol koncentráció v/v%	Maradék cukor koncentráció m/v%	Konverziós hatásfok %
	1. nap	2. nap			
10,89	9,75	15,56	6,22	0,97	79,8
14,32	15,52	14,21	8,16	1,37	86,5
16,09	17,63	20,53	8,64	2,93	73,9

A táblázatban szereplő értékek két párhuzamos kísérlet átlagából származnak

A konverziós hatásfokok ~74 és 86,5 % között alakultak, melyeket úgy határoztam meg, hogy az összes bevitt szénhidrát mennyiségéből számított elméleti összes etanol mennyiséghez viszonyítottam a kapott etanol koncentrációt. Legjobb eredményt a ~14,3 m/v% kezdeti szénhidrát koncentráció esetén kaptam, ahol 8,16 v/v% etanol és 1,37 m/v% maradék szacharid mennyiség volt megfigyelhető. A konverziós hatásfok 86,5 % volt, amely közel 10 %-kal magasabb, mint a szakaszos fermentáció során kapott legjobb, ~77 %-os érték. Leggyengébb eredményt a ~16,09 m/v% kezdeti koncentráció esetén értem el, amikor a maradék szénhidrát mennyisége (~2,9 m/v%) viszonylag magas volt. Ez megmutatkozott az elért konverziós hatásfokban is, hiszen az a többi eredménytől elmaradva, csupán ~74 % volt. Azonban ez az érték is alig pár százalékkal maradt el a szakaszos fermentáció során kapott legjobb eredményektől (~76-77 %).

Ge és Zhang (2005), az inulináz enzimet kivételesen nagy mennyiségben termelő, újonnan izolált *Aspergillus niger* SL-09 és a kimagaslóan nagy etanol termelő képességgel rendelkező *Saccharomyces cerevisiae* Z-06 törzsek fed-batch technológiában való alkalmazását vizsgálták. A csicsóka alapú szubsztrátumok szimultán cukrosítása és erjesztése révén a technológia hatásfoka ~90 %-os volt.

A rátáplálós és szakaszos fermentációs technika hatékonyságát vetették össze Cheng és munkatársai (2009), akik a két technológiát a *Saccharomyces cerevisiae* által végzett, glükóz alapú etanol előállításában vizsgálták. Azt tapasztalták, hogy 2 g/l*h glükóz adagolás mellett a fed-batch technológia lényegesen jobb rendszerként működik, mint a szakaszos technika, hiszen a keletkező etanol mennyisége szignifikánsan nagyobb volt.

A kapott eredményekből megállapítható, hogy a rátáplálós technológia segítségével sikerült az erjesztés hatásfokát növelni. Ezért az inulin alapú bioetanol előállításában a fed-batch technika kedvezőbb lehet, mint a hagyományos fermentációs technológia.

Rátáplálós technika során lehetőség van az élesztő adagolására, ezért tanulmányoztam ennek az eljárásnak a hatását is. A technológia során ~150 cm³ cefrét készítettem, melyre a fermentáció

első napján további $\sim 150 \text{ cm}^3$ friss szubsztrátumot adagoltam. A párhuzamosan végzett kísérletsorozat során az egyik esetben a kiindulási cefrét $90 \text{ OD}_{600\text{nm}} \cdot \text{cm}^3$, míg a másik esetben $180 \text{ OD}_{600\text{nm}} \cdot \text{cm}^3$ mennyiségű vegyes kultúrával oltottam be. Az első esetben az erjesztés első napján további $90 \text{ OD}_{600\text{nm}} \cdot \text{cm}^3$ vegyes kultúrát adtam a rendszerhez. A kiindulási szubsztrátum koncentráció $13,76 \text{ m/v\%}$, a rátáplált friss szubsztrátum pedig $16,01 \text{ m/v\%-os}$ volt minden esetben. Így a két eljárás gyakorlatilag csak a kezdetben beoltott élesztő inokulum mennyiségében tért el egymástól. A kapott eredményeket a 3. táblázatban tüntettem fel.

3. táblázat Az élesztőmennyiség rátáplálásának hatása az inulin fermentációjára

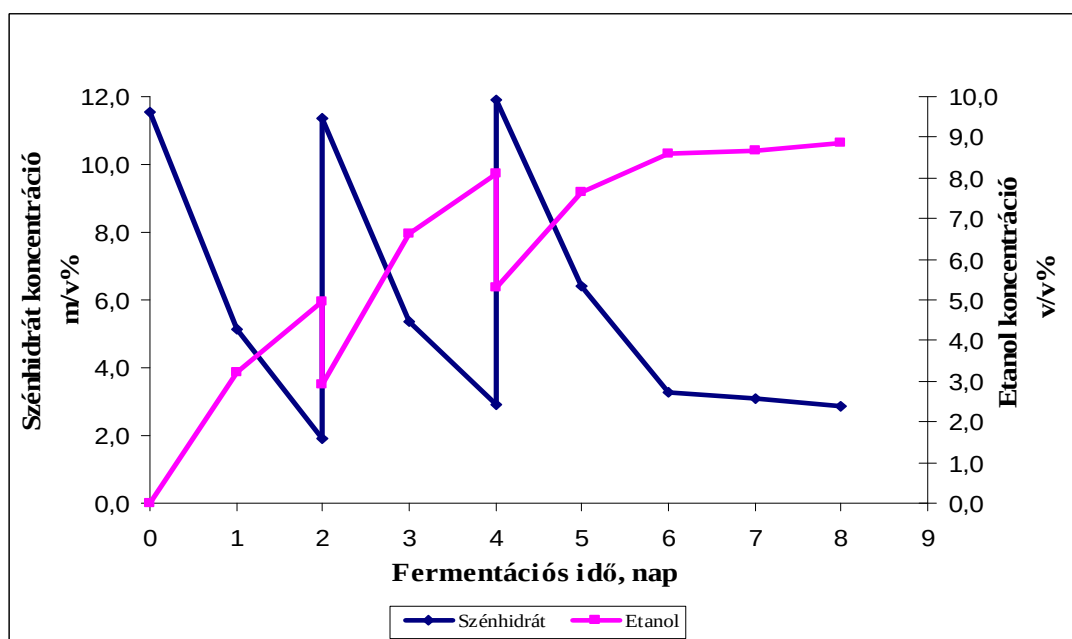
Beoltási élesztő mennyiség $\text{OD}_{600\text{nm}} \cdot \text{cm}^3$	Rátáplált élesztő mennyiség $\text{OD}_{600\text{nm}} \cdot \text{cm}^3$	Kezdeti szénhidrát konc. $\text{m/v\%}$	Rátáplált szénhidrát konc. $\text{m/v\%}$	Etanol konc. $\text{v/v\%}$	Maradék cukor konc. $\text{m/v\%}$	Konverziós hatásfok %
90	90	11,35	16,01	6,16	0,84	69,3
180	-	11,35	16,01	6,62	0,80	74,8

A táblázatban szereplő adatok két párhuzamos kísérletsorozat átlagából adódtak.

Az eredményekből láthatjuk, hogy a két különböző beoltási élesztőmennyiség esetén a maradék, hasznosítatlan szénhidrát mennyisége közel azonos volt ($0,84$ és $0,80 \text{ m/v\%}$), vagyis mindkét esetben körülbelül azonos mértékben hasznosították az élesztők a rendelkezésükre álló szénhidrátokat. Ezzel szemben viszont a $90 \text{ OD}_{600\text{nm}} \cdot \text{cm}^3$ kezdeti élesztő mennyiség esetén az elért etanol koncentráció $6,16 \text{ v/v\%}$, míg a másik esetben $6,62 \text{ v/v\%}$ volt, $69,3 \%$ és $74,8 \%$ biokonverziós hatásfok mellett.

Az eredmények alapján azt mondhatjuk, hogy az általam vizsgált kísérleti beállítások mellett az élesztő rátáplálásának alkalmazásával nem tudtam az inulin fermentációjának hatékonyságát növelni, tehát előnyösebb az alkalmazandó inokulum teljes mennyiségét az erjesztés kezdetén a szubsztrátumhoz adagolni. Azonban mindenképp érdemes megjegyezni, hogy más kísérleti körülmények mellett az élesztő rátáplálós adagolása is kedvező eredményt adhat.

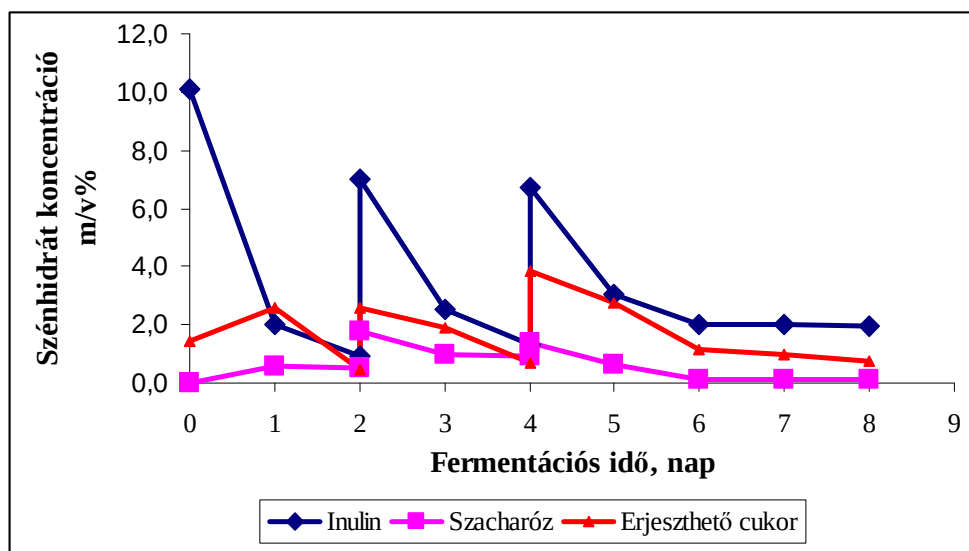
Egy másik kísérletsorozatban arra voltam kíváncsi, hogy milyen hatással van a fermentáció hatásfokára és idejére, ha kétnaponta végzem el a friss szubsztrátum adagolását. A kiindulási cefre mennyisége $\sim 100 \text{ cm}^3$ volt, melyet $180 \text{ OD}_{600\text{nm}} \cdot \text{cm}^3$ koncentrációban oltottam be a vegyes kultúrával. Jelen esetben az erjesztés megindítását követő második és negyedik napon történt meg a $\sim 100\text{-}100 \text{ cm}^3$ friss szubsztrátum adagolása. Az erjedés lefutási görbéje a 9. ábrán látható.



9. ábra Fed-batch technológia lefutási görbéje, kétnaponta történő szubsztrátum adagolás esetén

A kétnaponta végzett rátáplálás esetén látható, hogy a szénhidrát mennyisége két nap alatt lecsökkent ~ 2 m/v% köré, míg az etanol koncentrációja a második napon közel 5 v/v% volt. Ekkor történt meg a friss szubsztrátum adagolása úgy, hogy a rátáplálás után a cefre szénhidrát koncentrációja körülbelül a kiindulási koncentrációval ($\sim 11,5$ m/v%) azonos legyen. A szubsztrátum adagolásának hatására a cefre szénhidrát mennyisége $\sim 11,3$ m/v%-ra nőtt, míg az etanol koncentrációja értelemszerűen lecsökkent, $\sim 2,9$ v/v%-ra. Ezután az újabb ~ 100 cm³ szubsztrátum adagolását a 4. napon végeztem el, amely idő alatt a szénhidrát mennyisége ismét lecsökkent ($\sim 2,9$ m/v%), míg az etanol mennyisége megnőtt ($\sim 8,1$ v/v%). A rátáplálás következtében a szénhidrátok mennyisége ismét megugrott ($\sim 11,9$ m/v%), az etanol mennyisége pedig lecsökkent ($\sim 5,3$ v/v%). Továbbá látható, hogy a negyedik naptól kezdve a szénhidrátok mennyiségének csökkenése nagyon intenzív, egészen a hatodik napig, ám ezután gyakorlatilag megtorpan a fermentáció. A további időpontokban vett mintákban a hasznosítatlan szénhidrátok koncentrációja jelentősen már nem változik. Ennek következtében pedig az alkohol koncentrációja sem növekedett jelentősen a cefrében.

Ha megvizsgáljuk, a cefrében lévő maradék szénhidrátok összetételét és mennyiségének alakulását (10. ábra) azt tapasztaljuk, hogy a hatodik napra gyakorlatilag megáll az inulin mennyiségének csökkenése.



10. ábra A különböző szénhidrátok mennyiségének alakulása az erjesztés során

Az erjesztés végén mért ~2,86 m/v% hasznosítatlan szénhidrát mennyiségből az inulin koncentrációja ~1,98 m/v%, vagyis a maradék szénhidrátok közel 70 %-át az elbontatlan inulin adja.

Ennek érdekessége, hogy az inulin mennyiségének alakulását az erjesztés során döntően a *Kluyveromyces* élesztő által termelt inulináz enzim és annak bontási tevékenysége határozza meg. Vagyis jelen esetben azt feltételezhetjük, hogy a fermentáció hatodik napjára valami történhetett az enzimmal, mivel az inulin hidrolízise gyakorlatilag megállt. Feltételezem, hogy az enzimet olyan gátló hatás érthette, amely blokkolta a működését. Az erjedő cefrében jelen esetben leginkább gátló hatással az etanol bír, amely az enzimet minden bizonnyal a megfelelő működésében károsan befolyásolta (Martín-Rendón *et al.*, 1989). Ezért azt mondhatjuk, hogy az erjesztés hatodik napjára, amikor az etanol koncentrációja már elérte a ~8 v/v%-ot, az inulináz enzim károsodott és nem tudta tovább bontani a nagyobb polimerizáltságú szacharidokat és az inulint. Ennek következtében pedig az erjesztés végén még mindig viszonylag nagy mennyiségű, hasznosítatlan szénhidrát volt mérhető a cefrében.

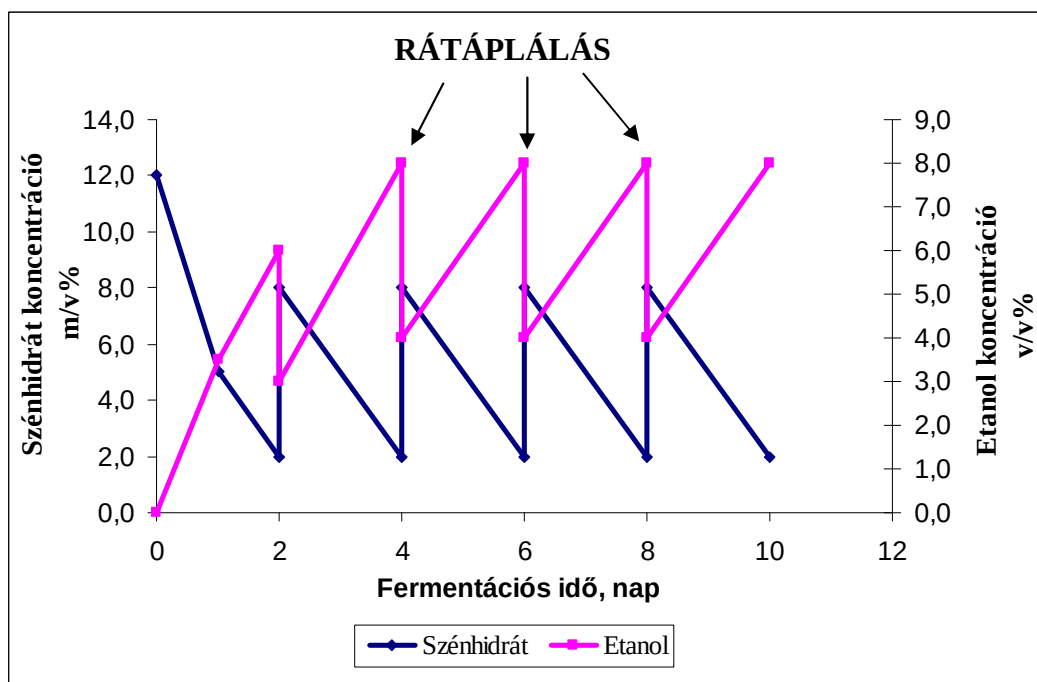
Ezek alapján tehát a rátáplálásos technológiában úgy kell megtervezni a szubsztrátum adagolását és koncentrációját, hogy a keletkező etanol mennyisége ne haladja meg a ~8 v/v% koncentrációt, mivel így megakadályozhatjuk, hogy az enzim működése és a fermentáció üteme jelentősen visszaszoruljon.

5.3 Fél-folytonos fermentációs technológia

A kutatómunkám egyik fontos kérdése volt, hogy az inulin alapú bioetanol előállítását milyen módon lehetne folytonossá tenni, ezzel pedig a termelékenység hatékonyságát növelni. Célom volt a rátáplálásos technológiában kapott eredmények alapján egy fél-folytonos technológia megtervezése és annak kísérleti körülmények között történő vizsgálata.

A fél-folytonos technológiában bizonyos időközönként megtörténne a cefre felének elvezetése és ugyanekkora mennyiségű friss szubsztrátum adagolása. A rátáplálásos technológiában tapasztaltak alapján a cefre szénhidrát koncentrációja körülbelül két nap alatt csökken $\sim 2\text{-}3$ m/v% alá, ezért az elvételt és a rátáplálást kétnaponta végezném el. A másik fontos tényező az alkohol gátló hatásának tompítása, amelynek koncentrációja, ha $\sim 8\text{-}9$ v/v% fölé emelkedik, a fermentáció üteme lassul, az inulin hidrolízise pedig megáll. Ezért célom volt, hogy az elvett cefrében az etanol mennyisége ne haladja meg a 8 v/v%-ot, de legyen legalább $\sim 4\text{-}5$ v/v%, amely körülbelül a gazdaságos etanol desztilláció határa (Sipos, 2010).

Ezek figyelembe vételével a fél-folytonos fermentációs technika koncepciók görbéje a 11. ábrán látható módon alakulna. Láthatjuk, hogy kétnaponta megtörténne az alkoholos cefre felének elvétele és a friss szubsztrátum adagolása, melynek következtében az etanol koncentrációja lecsökken, azonban az adagolt friss szénhidrátforrásnak köszönhetően az alkohol mennyisége újból $\sim 4\text{-}8$ % közé emelhető.



11. ábra Fél-folytonos fermentációs technológia koncepciók görbéje

A technológia elméleti kidolgozása után célom volt annak vizsgálata, hogy a technológia laboratóriumi körülmények mellett, a gyakorlatban is megvalósítható e. Továbbá célom volt ezen elvételi és rátáplálási ciklus ismételhetőségének vizsgálata és a fél-folytonos technológia tanulmányozása.

Az elméletben felállított körülmények (legalább 4-5 v/v%, de maximum 8 v/v% etanol tartalom) biztosítása érdekében a kísérleti folyamatot a következők szerint végeztem el: az elkészített ~12 m/v%-os, ~300 cm³ mennyiségű cefrét beoltottam a két élesztőfaj (*Saccharomyces cerevisiae* és *Kluyveromyces marxianus*) vegyes kultúrájával, 180 OD_{600nm} * cm³ mennyiségben. A fermentáció második napján elvettem az alkoholos cefre felét (~150 cm³) és megmértem annak alkohol koncentrációját, melyből közvetve meghatároztam az adagolandó friss szubsztrátum szénhidráttartalmát. A rátáplált szubsztrátum (~150 cm³) szénhidráttartalma révén tudtam a keletkező etanol mennyiségét szabályozni, befolyásolni és gyakorlatilag korlátozni, hogy ne emelkedjen az alkohol mennyisége ~8 v/v% fölé. A fél-folytonos fermentáció további szakaszában minden második napon elvégeztem az előbbieken leírt folyamatot.

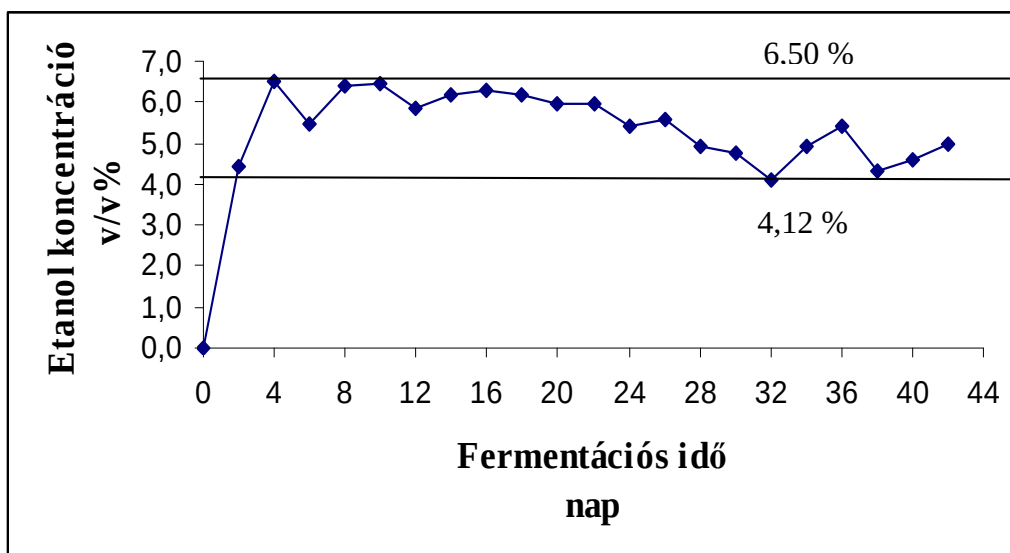
Az általam kidolgozott stratégia mentén megvalósított fél-folytonos technológiával végzett kísérletek során kapott eredményeket a 4. táblázatban foglaltam össze. A technológia során húsz ciklusban végeztem el a cefre felének elvételét és a friss szubsztrátum adagolását. Tehát a fél-folytonos fermentáció több mint 40 napig működött, amely rendkívül bízthatónak mondható, hiszen az élesztősejtek hosszú ideig képesek voltak az inulin hidrolízisére és a keletkező cukrok alkohollá alakítására.

A fermentációs folyamat során az élesztő biomassza mennyisége fokozatosan növekedett, vagyis az élesztő, alkoholos erjesztő tevékenysége mellett, képes volt szaporodni és friss, életerős, a közeghez már alkalmazkodott élesztősejteket képezni. Ez is kedvező hatással lehetett a rendszer hosszú ideig történő működésére.

4. táblázat Fél-folytonos fermentációs technológia során kapott eredmények

Fermentációs idő Nap	Rátáplálás előtt		Rátáplált szénhidrát konc. m/v%	Rátáplálás után	
	Szénhidrát konc. m/v%	Etanol konc. v/v%		Szénhidrát konc. m/v%	Etanol konc. v/v%
0	11,23	-	-	-	-
2	3,18	4,45	10,18	8,08	2,67
4	1,38	6,50	7,12	4,03	3,45
6	0,76	5,44	10,98	6,56	2,54
8	1,30	6,40	13,67	6,95	2,98
10	0,92	6,44	12,21	6,61	3,35
12	1,08	5,86	11,58	6,56	2,96
14	1,48	6,17	14,28	8,49	2,96
16	0,87	6,30	14,33	7,32	2,59
18	1,77	6,16	14,13	7,93	2,62
20	0,75	5,94	13,41	9,00	2,91
22	1,63	5,98	10,90	8,21	2,52
24	1,73	5,43	12,01	9,23	2,62
26	2,39	5,56	13,48	9,10	2,19
28	2,27	4,92	11,49	8,92	2,25
30	3,74	4,73	16,66	11,29	1,74
32	4,53	4,12	16,96	12,81	1,99
34	3,57	4,94	17,63	14,10	1,95
36	4,34	5,40	19,03	12,50	1,98
38	4,15	4,30	15,72	10,41	1,94
40	3,68	4,61	17,84	12,21	1,78
42	3,76	4,96	-	-	-

Az elvett cefre etanol koncentrációja 4,12 és 6,50 v/v% között alakult (12. ábra), vagyis minden elvételnél sikerült elérni a legalább 4,0 v/v%-os alkohol koncentrációt, amely a gazdaságos desztilláció határa, és sikerült fenntartani az inulináz enzim aktív tevékenységét is, hiszen rátáplálás után mindig megtörtént az inulin egyszerű cukrokká történő lebontása.



12. ábra Etanol koncentráció alakulása a fél-folytonos fermentáció során

A több mint negyven nap alatt az etanol koncentráció átlagos értéke közel 5,5 v/v% volt, amely értéknél az erjesztési folyamat első szakaszában magasabb, míg a második szakaszában alacsonyabb értékek voltak megfigyelhetők. Ebből arra is következtethetünk, hogy a rendszer hatékonysága csökkent, azonban érdemes megjegyezni, hogy a rátáplált szubsztrátum koncentrációja is nagyobb volt, így előfordulhatott, hogy a magasabb koncentrációk is gátló hatást fejtettek ki az élesztőkre. Ennek lehetett a következménye az is, hogy a hasznosítatlan szénhidrátok mennyisége a folyamat vége felé lényegesen magasabb volt, mint az erjesztés első 24 napján. Továbbá előfordulhatott, hogy az élesztők a hosszú fermentációs folyamat miatt kimerültek, ezért egyre kisebb hatékonysággal tudtak alkoholt képezni. Ennek megoldása lehet, ha bizonyos időközönként friss élesztőtenyészzel oltjuk be a rendszert, a friss élesztők pedig az erjesztést esetleg intenzívebben tudnák folytatni.

A fél-folytonos fermentációs kísérletekben kapott eredmények alapján mindenképp biztató, hogy az élesztősejtek hosszú ideig képesek voltak az inulin lebontására és az alkohol képzésére. Viszont a hatásfok csökkenésének okát egyértelműen nem lehet meghatározni, mert a kísérleti beállítások további finomításokat igényelnek.

A technológia másik nagy előnye, hogy a cefre alkoholtartalma a friss szubsztrátum adagolása után is legalább 1,5-2 v/v%, amely kellő biztonságot és védelmet nyújt az idegen, káros mikroorganizmusok ellen. Ezért nem szükséges a friss szubsztrátum sterilizése, csírátlantása a rátáplálás előtt, amely jelentős költségsökkentő hatású.

6 ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatómunkám során célom volt a különböző fermentációs technikák alkalmazásának vizsgálata az inulin alapú bioetanol előállításában. Három etanol erjesztési módszert vizsgáltam, a klasszikus szakaszos (batch), a rátáplálásos (fed-batch) és a fél-folytonos (semi-continuous) erjesztési technológiát.

A szakaszos fermentáció során négy beoltási technikát vizsgáltam, a *Kluyveromyces marxianus*, valamint a *Saccharomyces cerevisiae* monokultúrás erjesztését, továbbá az előbb említett két faj vegyes kultúrájának, valamint a *Saccharomyces cerevisiae* és ipari inulináz enzimmészítmény együttes alkalmazásának erjesztési tevékenységét. A leggyengébb eredményeket a tiszta tenyészetekkel kaptam, melyeknél a konverziós hatások $\sim 57\%$ és $\sim 67,5\%$ volt, míg a másik két esetben, amikor megvalósult az inulin szimultán cukrosítása és erjesztése, a fermentációs hatások $\sim 10\text{--}20\%$ -kal magasabbak voltak. A vegyes kultúrás etanol képzés előnye, hogy nem szükséges drága enzimmészítmény alkalmazása a hatékony fermentáció megvalósításához, míg az enzimes fermentáció előnye, hogy az erjedési idő jelentősen csökkenthető.

A rátáplálásos technológia során vizsgáltam a vegyes kultúra adagolásának, rátáplálásának hatását a fermentáció hatásfokára. Azt tapasztaltam, hogy a vegyes kultúra teljes mennyiségének beoltása az erjesztés kezdetén jobb eredményt mutatott, mint a felhasználandó élesztőmennyiség rátáplálásos adagolása az erjesztés során. Természetesen ezen megállapítás az általam alkalmazott kísérleti körülmények mellett állja meg a helyét. Vagyis hasonló beállítások mellett előnyösebb a teljes élesztőmennyiséget az erjesztés kezdetén a szubsztrátumhoz adni.

A szubsztrátum rátáplálásos adagolásának vizsgálata során a friss szubsztrátum cefréhez történő táplálását az első és második vagy a második és negyedik fermentációs napon végeztem el. A rátáplálás előnye, hogy az erjesztés során fellépő szubsztrátum- és termékátlás csökkenthető, esetleg megelőzhető. Abban az esetben, amikor az első két nap végeztem el a friss szubsztrátum adagolását, a konverziós hatások a bevitt szénhidrátmennyiség függvényében, $\sim 74\%$ és 86% között alakultak. Legjobb eredményt a $\sim 14,3\text{ m/v\%}$ -os cefre esetén kaptam, amelynél a konverziós hatások közel 10% -kal magasabbak voltak, mint szakaszos fermentáció esetén. A kapott eredményekből megállapítható, hogy a rátáplálásos technológia segítségével sikerült az erjesztés hatásfokát növelni, így a fed-batch fermentációs technika alkalmazása kedvezőbb lehet, mint a hagyományos fermentációs eljárás az inulin alapú bioetanol előállításában.

A továbbiakban, amikor kétnaponta végzem el a friss szubsztrátum adagolását, a fermentáció lefutásából arra következtettem, hogy a hatodik napra a fermentációs folyamat megtorpant és az etanol mennyisége már nem növekedett jelentősen. A maradék szénhidrátok összetételének vizsgálata során viszont látható volt, hogy a cefrében lévő hasznosítatlan szénhidrátok közel

70 %-át az inulin adja, tehát hidrolízise a hatodik napra megállt. Ennek magyarázata az lehet, hogy az etanol koncentrációja már elérte azt a kritikus értéket, amely roncsolta és működésében gátolta a cefrében lévő inulináz enzimet. A tapasztaltak alapján tehát a rátáplálásos technológiában úgy kell megtervezni a szubsztrátum adagolását és koncentrációját, hogy a keletkező etanol mennyisége ne haladja meg a ~8-9 v/v%-os értéket. Ily módon megakadályozhatjuk, hogy az enzim működése és a fermentáció üteme jelentősen visszaessen.

A rátáplálásos technológiában kapott eredmények alapján célom volt egy fél-folytonos technológia megtervezése és vizsgálata. A fed-batch eljárásnál tapasztaltak alapján megtörtént a fél-folytonos fermentáció elméleti lefutásának modellezése, amely alapjául szolgált a laboratóriumi beállításaimnak. A fél-folytonos technológia során hússzor végeztem el a cefre felének elvételét és a friss szubsztrátum adagolását. A fermentáció tehát több mint 40 napig működött, vagyis az élesztősejtek hosszú ideig képesek voltak az inulin hidrolízisére és a keletkező cukrok alkohollá alakítására. Az elvett cefrében az etanol mennyisége ~4,12 és 6,50 v/v% között alakult. Minden elvételnél sikerült elérni a legalább 4,0 v/v%-os alkohol koncentrációt, amely a gazdaságos desztilláció határa, és ezzel párhuzamosan sikerült megőrizni az inulináz enzim aktivitását is. A technológia nagy előnye, hogy a cefre alkoholtartalma a friss szubsztrátum adagolása után is legalább 1,5-2 v/v%, amely kellő biztonságot és védelmet nyújt a káros mikroorganizmusokkal szemben, ezért nem szükséges a friss szubsztrátum csírátlanítása a rátáplálás előtt, amely jelentős költségekkel járna.

A kapott eredmények alapján tehát kijelenthető, hogy a szakaszos fermentációs technika felváltható a fed-batch technológiával, hiszen utóbbival az erjesztés hatásfoka jelentősen növelhető, valamint további fejlesztésekkel még hatékonyabbá tehető. A rátáplálásos technika során kapott eredmények bízató alapot szolgáltathatnak egy hatékony és produktívabb inulin alapú, fél-folytonos etanol fermentációs technika kidolgozásához.

IRODALOMJEGYZÉK

- 42/2005. Kormányrendelet:** A bioüzemanyagok és más megújuló üzemanyagok közlekedési célú felhasználásának egyes szabályairól
- 2010. évi CXVII. Törvény:** A megújuló energia közlekedési célú felhasználásának előmozdításáról és a közlekedésben felhasznált energia üvegházhatású gázkibocsátásának csökkentéséről
- Amtmann M.** (2010): Intenzív folyadékkromatográfia, előadás jegyzet
- Angeli I., Barta J. et al.** (2000): A gyógyító csicsóka, Mezőgazda Kiadó, Budapest, 40- 145.
- Bai A.** (2002): A biomassza, mint energiaforrás, Energiagazdálkodás, 43. évf., 4. szám, 15-17.
- Bailey B.K.** (1996): Performance of ethanol as a transportation fuel, In: Wyman, C.E. Handbook on bioethanol: Production and utilization, Taylor & Francis, Washington, 37-60.
- Bajpai P., Bajpai P. K.** (1989): Utilization of Jerusalem artichoke for fuel ethanol production using free and immobilized cells, Biotechnology and Applied Biochem., Vol. 11, 2:155-168.
- Bajpai P.K., Bajpai P.** (1991): Cultivation and utilization of Jerusalem artichoke for ethanol, single cell protein, and high-fructose syrup production, Enzyme Microb. Technol., 13, 359-362.
- Bajpai P., Margaritis A.** (1983): Effect of sugar concentration in Jerusalem artichoke extraction *Kluyveromyces marxianus* growth and ethanol production, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 52, 2: 723-725.
- Ballesteros I., Negro M.J. et al.** (2006): Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw, Applied Biochemistry and Biotechnology, 130, 496-508.
- Banat I. M., Marchant R.** (1995): Characterization and potential industrial applications of five novel, thermotolerant, fermentative, yeast strains, Word Journal of Microbiology and Biotechnology Vol. 11, 3: 304-306.
- Barba D., Beolchini F. et al.** (2001): Kinetic analysis of *Kluyveromyces lactis* fermentation on whey: batch and fed-batch operations 36,531-536.
- Bekers M., Grube M. et al.** (2007): Carbohydrates in Jerusalem artichoke powder suspension, Nutrition & Food Science, Vol. 37, 1: 42-49.
- Bekers M., Upite D. et al.** (2008): Fermentation of Jerusalem artichoke by *Zymomonas* and *Saccharomyces*, Nutrition and Food Science Vol. 38, 2: 128-135.
- Belem M., Lee B.** (1999): Fed-batch fermentation to produce oligonucleotides from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey, Process Biochemistry, Vol. 34, 501–509.
- Bely M., Stoeckle P. et al.** (2008): Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii* – *Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation, Int. J. of Food Microbiology, 122, 312-320.
- Biofuels Platform** (2010): Production of bioethanol in the EU, <http://www.biofuels-platform.ch/en/infos/eu-bioethanol.php>

- Borsos J., Pusztai P. et al.** (1994): Szántóföldi Növénytermesztés, Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem, Kertészeti Kar, Budapest (mek.oszk.hu/01200/01216/01216.rtf)
- Büki G.** (2010): Megújuló energiák hasznosítása, Magyar Tudományos Akadémia, Budapest, <http://www.scribd.com/doc/46063155/Megujulo-energiak-hasznositasa-MTA>
- Caylak B., Sukan V.** (1998): Comparison of different production processes for bioethanol, Turk. J. Chem. 22: 351-359.
- Cheng N. G., Hasan M. et al.** (2009): Production of ethanol by fed-batch fermentation, Pertanika Journal Science & Technology 17, 2: 399 – 408.
- Chi Z., Zhang T. et al.** (2009): Inulinase-expressing microorganisms and applications of inulinases, Appl. Microbiol. Biotechnol., 82, 211-220.
- Deák T.** (1998): Élesztőgombák a természetben és az iparban, Mezőgazdasági Szaktudás Kiadó, Budapest, 11-193.
- Dénes K.** (2010): Csicsóka alapú bioetanol előállítása kevert élesztő kultúrával, Szakdolgozat, Budapesti Corvinus Egyetem
- Farkas Cs.** (2011): Inulin-alapú bioetanol előállítás hatékonyságának fokozása a fermentáció optimalizálásával, Szakdolgozat, Budapesti Corvinus Egyetem
- Farkas J.** (2010): A XXI. század kihívásai és kihatásai az élelmiszergazdaságra, előadásanyag
- Ferrari MD, Loperena L et al.** (1994): Ethanol production from concentrated whey permeate using a fed-batch culture of *Kluyveromyces fragilis*. Biotechnol Lett 16: 205–210.
- Fogarassy Cs.** (2001): Energianövények a szántóföldön, Szent István Egyetem Gazdaság- és Társadalomtudományi Kar Európai Tanulmányok Központja, Gödöllő, 10-103.
- Fonseca G.G.; Heinze E. et al.** (2008): The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential, Appl. Microbiol. Biotechnol. 79: 339-354.
- Ge X. Y., Zhang W. G.** (2005): A Shortcut to the Production of High Ethanol Concentration from Jerusalem Artichoke Tubers, Food Technol. Biotechnol., Vol. 43, 3: 241–246.
- Gong F., Sheng J. et al.** (2007): Inulinase production by marine yeast *Pichia guilliermondii* and inulin hydrolysis by the crude inulinase, J. of Ind. Microb. & Biotech., Vol. 34, 3: 179-185.
- Guiraud J. P., Caillaud J. M. et al.** (1982): Optimalization of alcohol production from Jerusalem artichoke, Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 14, 2: 81-85.
- Guo X., Zhou J. et al.** (2010): Improved ethanol production by mixed immobilized cells of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* from cheese whey powder solution fermentation, Appl. Biochem. Biotechnol., 160, 532-538.
- Gutierrez-Correa M., Portal L. et al.** (1999): Mixed culture solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse, Biores. Techn., 68, 173-178.

- Hancsók J., Krár M. et al.** (2006): Újgenerációs bio-motorhajtóanyagok I., Magyar Kémikusok Lapja, 61. évf., 8. szám, 260–264.
- Hensing M, Vrouwenvelder H et al.** (1994): Production of extracellular inulinase in high-celldensity fed-batch cultures of *Kluyveromyces marxianus*, Appl. Microbiology Biotechnology, 42: 516–521.
- Hoschke Á.** (2010): Sör- és Szeszípari Technológia II. előadásanyaga
- HVG** (2012a): Bioetanol-üzem épül Mohácson, hvg.hu/kkv/20120523_bioetanol_mohacs
- HVG** (2012b): Olcsóbb lett és határidő előtt kész lett a bioetanol üzem Dunaföldváron, hvg.hu/kkv/20120525_bioetanol_uzem
- Jankó F., Móricz N. et al.** (2010): Klímaváltozás: Tudományos viták és a társadalomföldrajz feladatai (1. rész), Földrajzi Közlemények, 134., 405-418
- Kays S.J., Nottingham S.F.** (2008): Biology and chemistry of Jerusalem artichoke: *Helianthus tuberosus* L., Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, 1-148.
- Kazai Zs., Varga K.** (2007): Bioüzemanyagok a környezeti és gazdasági fenntarthatóság tükrében, Energia Klub Memorandum, no. 5.
- Kádár Zs., Szengyel Zs. et al.** (2004): Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol, Industrial Crops and Products, 20, 103-110.
- Kerényi A.** (1995): Általános Környezetvédelem: Globális gondok, lehetséges megoldások, Mozaik Kiadó, Szeged, 21-270.
- Kondor A., Dallos A.** (2010): Bioethanol and biogas production from Jerusalem artichoke by consecutive processing, 3th Internat. Symposium on Energy from Biomass and Waste, Venice
- Kosaric, N., Vardar-Sukan, F.** (2001): Potential source of energy and chemical products. In: The Biotechnology of Ethanol: Classical and Future Applications Ed: Roehr M., Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim-New York-Chichester-Brisbane-Singapore-Toronto, 89-226.
- 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, Vol. 34, 5:1354-1358.
- Kuthi A.** (2001): Globális problémák, Ökológiai Intézet a Fenntartható Fejlődésért Alapítvány, Miskolc, http://www.ecolinst.hu/letoltok/kiadvanyok/globalis_problemak.pdf
- Laczó F.** (2008): Bioüzemanyagok előállításának lehetőségei Magyarországon, <http://www.ktk-ces.hu/biouzemanyag.pdf>
- Lan M.M., Morrissey J.P.** (2010): *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow, Fungal Biology Reviews 24: 17-26.

- Leclerc M., Chemardin P. et al.** (1987): Comparison of the properties of the purified beta-glucosidase from the transformed strain of *Saccharomyces cerevisiae* TYKF2 with that of the donor strain *Kluyveromyces fragilis* Y610. *Appl. Biochemistry and Biotechnology*. 9: 410-422.
- Lim S-H., Ryu J-M. et al.** (2010): Ethanol fermentation from Jerusalem artichoke powder using *Saccharomyces cerevisiae* KCCM50549 without pretreatment for inulin hydrolysis, *Bioresource Technology*, 102, 2109-2111.
- Mamma D., Koullas, D. et al.** (1996): Bioethanol from sweet sorghum: simultaneous saccharification and fermentation of carbohydrates by a mixed microbial culture, *P. Biochem.*, Vol. 31, 4: 377-381.
- Martins D.B., de Souza C.G. et al.** (2002): The β -galactosidase activity in *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 decreases by high concentrations of galactose, *C. Microb.*, 44: 379-382.
- Martín-Rendón E., Jiménez J., et al.** (1989): Ethanol inhibition of *Saccharomyces* and *Candida* enzymes, *Current Genetics*, 15: 7-16.
- Nakamura T., Ogata Y. et al.** (1996): Ethanol production from Jerusalem artichoke tubers by *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*, *J. of Ferm. and Bioeng.* Vol. 81, 6: 564-566.
- Nelson, N.** (1944): A photometric adaptation for the Somogyi method for the determination of glucose, *J. Biol. Chem.*, 153, 375-380.
- Nigam J.N.** (2001): Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*, *Journal of Biotechnology*, Vol. 87, 1: 17-27.
- Ohta K., Hamada S. et al.** (1993): Production of high concentrations of ethanol from inulin by simultaneous saccharification and fermentation using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 59, 3: 729-733.
- Origo** (2012): Elvitte a kukoricatermést az aszály, <http://www.origo.hu/gazdasag/20121004-elvitte-a-kukoricatermest-az-aszaly.html>
- Panyik G., Béli G.** (2008): Gyümölcspálinka gyártása, jövedéki ismeretek, FVM Vidékfejlesztési, Képzési és Szaktanácsadási Intézet, Budapest, 51-56.
- Pátkai, Gy., Barta, J.** (2002): Nutritive value of different Jerusalem artichoke varieties, *Abstracts of 9th Seminar on Inulin*, Budapest, 9-10.
- Pekic B., Slavica B. et al.** (1985): Effect of pH on the acid hydrolysis of Jerusalem artichoke inulin, *Food Chemistry*, Vol. 17, 3: 169-173.
- Philippidis G.P.** (1996): Cellulose bioconversion technology, In: Wyman, C.E. *Handbook on bioethanol: Production and utilization*, Taylor & Francis, Washington, 253-286.
- Political Capital, Green Capital** (2008): Lehet-e Magyarország bioetanol-nagyhatalom? Összefoglaló háttéranyag, <http://www.greencapital.hu/>

- Pourrat H., Barthomeuf C. et al.** (1983): Ethanol production from Jerusalem artichoke by strains of *Saccharomyces cheresiensis* and *Saccharomyces beticus*, Industries Alimentaires et Agricoles (ISSN 019-9311) 100: 187-190.
- Rech R., Ayub M.A.Z.** (2007): Simplified feeding strategies for fed-batch cultivation of *Kluyveromyces marxianus* in cheese whey, Process Biochemistry 42: 873-877.
- Roukas T .** (1991). Production of Citric acid from beet molasses by immobilized cells of *Aspergillus niger*, Journal of Food Science 56, 878-880.
- Rouwenhorst R.J., Hensing M. et al.** (1990): Structure and properties of the extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 Appl. Env. Microbiology. 56: 3337-3345.
- Rudolf A., Karhumaa K. et al.** (2009): Ethanol production from traditional and emerging raw materials, In: Yeast Biotechnology: Diversity and Applications, Chapter 23, 489-515.
- Sánchez O. J., Cardona C.A.** (2008): Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks, Bioresource Technology, Vol. 99, 13: 5270-5295a.
- Schorr-Galindo S., Ghommidh C. et al.** (2000): Influence of yeast flocculation on the rate of Jerusalem artichoke extract fermentation, Current Microbiology, Vol. 41, 2: 89-95.
- Shady T.S.M., Hauka F.I.A. et al.** (2000): Inulin hydrolysis by *Kluyveromyces marxianus* inulinase produced on some agricultural wastes, Egypt. J. Microbiol., 139-154.
- Singh R.S., Dhaliwal R. et al.** (2006): Poduction of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 using root extract of *Asparagus racemosus*, Process Biochemistry, 41, 1703-1707.
- Sipos B.** (2010): A bioetanol környezetgazdasági és környezeti hatásai – A keményítő és cellulóz alapú technológiák összehasonlítása, Diplomamunka, Környezetmérnök MSc.
- Somogyi, M.** (1945): A new reagent for the determination of sugars, J. Biol. Chem., 160, 61-68.
- Somogyi, M.** (1951): Notes on sugar determination, J. Biol. Chem., 195, 19-23.
- Steinbusch K.J.J., Arvaniti E. et al.** (2009): Selective inhibition of methanogenesis to enhance ethanol and n-butyrate production through acetate reduction in mixed culture fermentation, Bioresource Technology, 100, 3261-3267.
- Szambelan K., Nowak J., Czarnecki Z.** (2004): Use of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed with *Kluyveromyces fragilis* for improved ethanol production from Jerusalem artichoke tubers, Biotechnology Letters, 26: 845-848.
- Szambelan, K., Nowak, J., Jelen, H.** (2005): The composition of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) spirits obtained from fermentation with bacteria and yeasts, Engineering in Life Sciences, Vol. 5, 1: 68–71.
- Thomas K.C., Ingledew W.M.** (1992): Production of 21% (v/v) ethanol by fermentation of Very High Gravity (VHG) wheat mash, J. of Industrial Microb. and Biotechnology, 10, 61-68.

- Thuesombat P., Thanonkeo P. et al.** (2007): The batch ethanol fermentation of Jerusalem artichoke using *Saccharomyces cerevisiae*, KMITL Science and Techn. J., Vol. 7, 2: 93-96.
- Tilman D., Socolow R. et al.** (2009): Beneficial biofuels-the food, energy, and environment trilemma, Science, 325, 270-271.
- Timilsina G. R., Shrestha A.** (2011): How much hope should we have for biofuels?, Energy, Vol. 36, 4: 2055-2069.
- Vrasenic D., Kurtanek Z. et al.** (2002): Optimisation of inulinase production by *Kluyveromyces bulgaricus*, Food Technol. Biotechnol., 40, 67-73.
- Wyman C.E.** (1996): Ethanol production from lignocellulosic biomass: overview, In: Wyman, C.E. Handbook on bioethanol: Production and utilization, Taylor & Francis, Washington, 1-18.
- Yuan W.J., Zhao X.Q. et al.** (2008): Ethanol fermentation with *Kluyveromyces marxianus* from Jerusalem artichoke grown in salina and irrigated with a mixture of seawater and freshwater, Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072.
- 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, Vol. 101, 21:8166-8170.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton is szeretnék köszönetet mondani a Budapesti Corvinus Egyetem **Sör- és Szeszipari Tanszékének** a kutatási lehetőségért, valamint hogy a kutatáshoz a tárgyi eszközöket rendelkezésemre bocsátotta. Továbbá külön köszönöm **Dr. Habil. Nguyen Duc Quang** témavezetőmnek a szíves útmutatását, munkáját és segítségét, amelyekkel kutatómunkámat támogatta és ösztönözte.