



Élelmiszertudományi Kar

Sör- és Szeszipari Tanszék

***Thermomyces lanuginosus* törzsek xilanáz
aktivitásának vizsgálata szubmerz és szilárd fázisú
fermentációk során**

TDK dolgozat

BORS MÁRTON
Biomérnök 4. évfolyam

***Témavezető:* Bujna Erika, egyetemi tanársegéd**

Budapest

2013

TARTALOM

1. BEVEZETÉS	3
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
2.1. <i>Thermomyces lanuginosus</i>	5
2.2. A hemicellulolitikus enzimek.....	6
A xilanolitikus enzimek	7
2.3. A xilanáz enzim.....	7
2.3.1. A xilanáz enzim előfordulása	8
2.3.2. <i>Thermomyces lanuginosus</i> eredetű xilanáz	9
2.3.3. Enzimműködést befolyásoló tényezők	9
2.3.4. A xilanáz enzim bioszintézisének szabályozása	10
2.3.5. Xilanáz fermentációk megvalósítása különböző termelő törzsekkel	11
2.3.6. A xilanáz biotechnológiai felhasználása	11
2.3.7. A xilán alapú bioetanol előállítás	12
2.4. A sörtörköly alkalmazhatósága xilanáz fermentációhoz.....	13
2.4.1. A sörtörköly kémiai összetétele	14
2.4.2. A sörtörköly biotechnológiai felhasználhatósága	14
2.4.3. A sörtörköly egyéb felhasználása.....	15
3. A KÍSÉRLET CÉLJA	16
4. KÍSÉRLETI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	17
4.1. A felhasznált mikroorganizmusok	17
4.2. Alkalmazott tápközegek	17
4.3. Mikrobatenyésztési módszerek	19
4.3.1. Törzsfenntartás	20
4.3.2. Szkrínelés	20
4.3.3. Inokulum tenyészet elkészítése	20
4.3.4. Szubmerz enzimfermentációk	20
4.3.5. Szilárd fázisú enzimfermentáció	21
4.4. Analitikai módszerek.....	21
4.4.1. Alkalmazott pufferek, reagensek.....	21
4.4.2. Xilanáz enzimaktivitás meghatározása	22
4.4.3. pH mérés	23
4.5. Kísérlettervezés	23

5. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	25
5.1. <i>Thermomyces lanuginosus</i> törzsek szkrínelése xilanáz aktivitásra.....	25
5.2. Xilóz kalibráció.....	26
5.3. <i>Thermomyces lanuginosus</i> törzsek rangsorolása.....	27
5.4. A pH változása az egy hetes fermentáció során.....	28
5.5. A sörtörköly alkalmazhatóságának vizsgálata xilanáz fermentációhoz.....	29
5.6. A szén- és nitrogénforrás koncentrációjának optimálása.....	30
5.7. A xilanáz enzim aktivitás mérés optimális működési körülményeinek meghatározása	34
5.7.1. Megfelelő pH kiválasztása	35
5.7.2. Hőmérséklet optimum	36
5.8. Szilárd fázisú fermentáció.....	37
5.9. Szubmerz és szilárd fázisú fermentáció összehasonlítása.....	39
6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	40
IRODALOMJEGYZÉK	42

1. BEVEZETÉS

Napjainkban egyre nagyobb teret hódít a környezetbarát technológiák fejlesztése. A mikroorganizmusok, valamint azok anyagcseretermékei nemcsak termékek előállításában használatosak, hanem nagy szerepet játszanak a hulladékok lebontásában, szennyvízkezelésben, illetve ipari melléktermékek feldolgozásában egyaránt.

A mikrobák segítségével megvalósított biokonverziók ipari méretekben való alkalmazásának nagy előnye, hogy nem, vagy sokkal kevesebb melléktermék keletkezik a folyamatok során. Az ipari termelés során keletkezett melléktermékekre leggyakrabban már hulladékként tekintenek. Ezek hasznosítása igen gazdaságos megoldás, mivel az alapanyag beszerzési ára nagyon alacsony. Ilyen nyersanyag többek között a kukoricacsutka vagy a sörtörköly, amelyek élelmiszeripari célú felhasználásra már alkalmatlanok. Több tanulmányban is bizonyították, hogy a kukoricacsutka jelentős xilán tartalmának köszönhetően kiváló xilanáz enzimtermelésre (Purkathofer, 1993; Su, 2011). A sörgyártás során keletkező mellékterméknek, a sörtörkölynek is számos alkalmazási lehetősége létezik. Nemcsak állati takarmánnyként hasznosítható, hanem nagy hemicellulóz tartalmának köszönhetően ez a nyersanyag is felhasználható xilanáz termelésre.

A xilanáz enzimet elterjedten alkalmazzák a papíriparban, ahol a hagyományos klór felhasználásával történő papírfehérítés során számos környezetkárosító klórozott vegyület keletkezik. A papír xilanáz enzimmel való biofehérítése által, jóval kevesebb melléktermék kerül a szennyvízbe. A xilanáz enzim hatásmechanizmusát tekintve a xilán poliszacharidból - melyet a növényi rostok nagy százalékban tartalmaznak - a xilobióz mellett, 5 szénatomos xilóz egységeket szabadít fel. Ez a monoszacharid bizonyos élesztők (pl. *Pichia stipitis*) segítségével etil-alkohollá fermentálható, majd a fermentlé lepárlása után bioetanolként hasznosítható. A második generációs bioetanol előállítása, a cukor- és keményítő alapú anyagok felhasználása helyett, az élelmiszeriparban felhasználásra nem kerülő nyersanyagok alkalmazásával történik.

Egy enzimreakció során a magasabb hőmérséklet (bizonyos mértékig) növeli a reakció sebességét, így jobb kihozatalra számíthatunk. Ehhez azonban hőstabil enzimre van szükség. A *Thermomyces lanuginosus* egy termofil fonalasgomba, így magasabb hőmérsékleti

körülmények között is életképes. Ennek köszönhetően termelt enzimei is termostabilak, így számos ipari eljárásban alkalmazhatók.

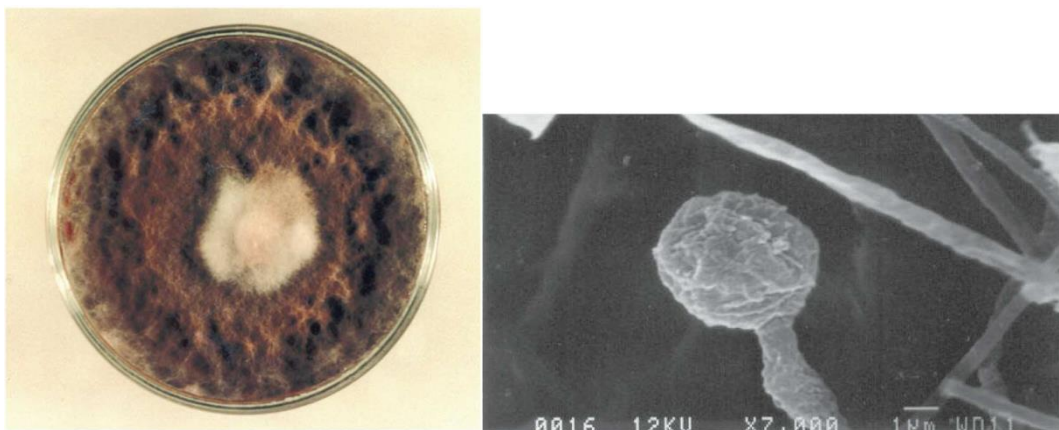
TDK munkám készítése során az imént említett gyártási melléktermékek - kukoricacsutka, sörtörköly- alkalmazhatóságát vizsgáltam xilanáz enzimtermelés szempontjából különböző *Thermomyces lanuginosus* törzsek segítségével, valamint a fermentációs tápközeg és technológia optimalásával az enzimtermelés fokozását céloztam meg.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. *Thermomyces lanuginosus*

A *Thermomyces lanuginosus* egy termofil fonalagomba. Különböző tápagarokon is gyors növekedésre képes, 45-50°C-os környezetben. Optimális növekedési hőmérséklete 48-52°C, de ennél szélesebb tartományban, 35-55°C is megfelelő növekedést mutat. Még 68°C-os hőmérsékleten is életképes tud maradni. Először 1899-ben izolálta Tsiklinskaya kerti talajjal beoltott burgonyáról, majd 52-53°C-on fehér kenyéren növesztette. A *Thermomyces lanuginosus* telep- és sejtmorfológiája az 1. ábrán látható. Ez a gomba az egész világon megtalálható, komposztált zöldségekben, állati ürülékben egyaránt. A szerves növényi hulladékok lebontásához számos extracelluláris enzimet szintetizál. Különböző törzseiről bebizonyosodott, hogy kimagasló extracelluláris xilanáz, illetve egyéb hemicelluláz enzim termelőképesége van. Ezek az enzimek felelősek a hemicellulóz alkotók hidrolíziséért. A hemicellulóz komponensei között a xilán van jelen legnagyobb mennyiségben, ezért is a lebontását végző xilanáz tanulmányozásának nagy jelentősége van (Singh et al., 2003).

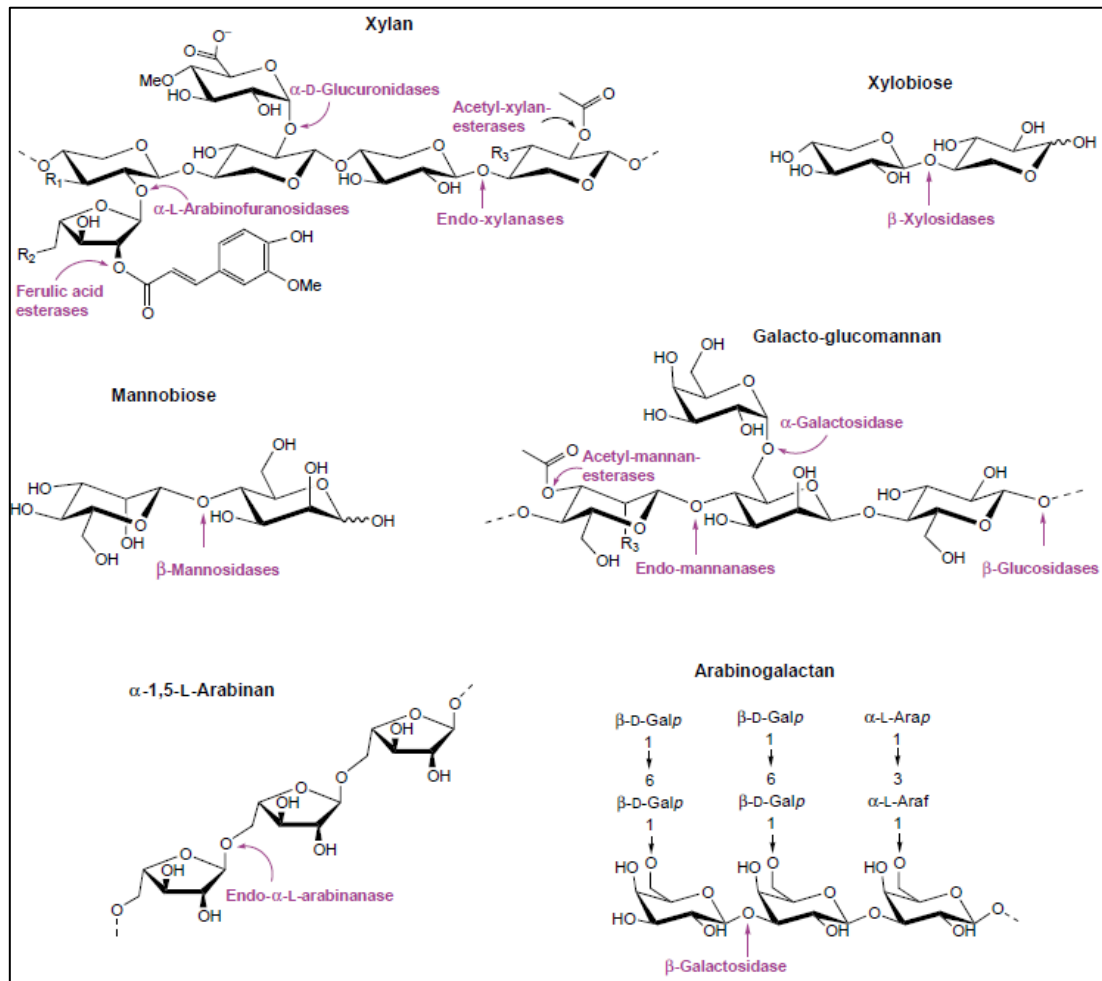
A *Thermomyces lanuginosus* a hemicellulázokon kívül egyéb extracelluláris enzimet is képes szintetizálni, α -amilázt, glükóamilázt, α - és β -galaktozidázt, invertázt, lipázt valamint proteázt, melyeket számos ipari eljárásban alkalmaznak (Nguyen et al., 2011).



1. ábra: *Thermomyces lanuginosus* SSBP telep- (PDA agar, 7 nap, 50°C) és sejtmorfológiája (Singh et al., 2003)

2.2. A hemicellulolitikus enzimek

A növényi hulladékok legnagyobb részét a növények vázanyagai alkotják, melyek közül ipari szempontból a cellulóz, a hemicellulóz és a lignin a legfontosabbak. A cellulóz D-glükóz egységekből β -1,4-es glikozidkötésekkel felépülő poliszacharid. A hemicellulóz azon poliszacharidokat foglalja magába, amelyek a cellulózon kívül résztvesznek a sejtfa felépítésében. Szerepük a cellulóz szálak hálózatából álló sejtfa váz rögzítése a cellulózmolekulákhoz kapcsolódva. A hemicellulóz degradációjához a komplex felépítésének következtében, számos enzim szükséges. Ezeket a hemicellulóz hidrolízisében szerepet játszó enzimeket, hemicellulázoknak nevezzük. A két legjelentősebb hidroláz enzim a β -D-xilanáz, valamint az endo-1,4- β -D-mannanáz. A különböző kémiai kötések hidrolíziséért felelős enzimek a 2. számú ábrán láthatók. (Shallom & Shoham, 2003)



2. ábra: Hemicellulóz komponensek és hemicellulázok (Shallom & Shoham, 2003 nyomán)

Hemicellulázokat számos baktérium és gomba is képes szintetizálni. Aerob mikroorganizmusok közül például az *Aspergillus* és *Trichoderma* gomba fajok nagy koncentrációban és több fajta enzimet képesek előállítani. Az említett gombák így számos hemicellulóz polimert monoszacharidokká, diszacharidokká hidrolizálnak, és az így keletkezett termékeket a környezetükben élő mikroorganizmusok is felhasználhatják anyagcseréjükhöz.

Aerob baktériumok közül a *Bacilli* és a *Cellvibro* fajok is képesek hemicellulázokat termelni, elsősorban poliszacharid gerincet bontó enzimeket, melyek hidrolízis termékei a nagyobb oligoszacharidok. Ezeknek a teljes lebontásáért a baktériumok intracelluláris enzimei a felelősek.

Végül pedig anaerob baktériumok is képesek hemicelluláz szintézisre, például a *Clostrida*, melyre a hemicelluláz mellett, celluláz enzimtermelés is jellemző.

Biotechnológiai felhasználhatóságukat tekintve széleskörűen alkalmazhatók állati takarmányok előkezelésében, a papírgyártás során, de a legnagyobb kihívást jelenti a lignocellulóz összetevők alkalmazása megújuló energiaforrásként. (Shallom & Shoham, 2003)

A xilanolitikus enzimek

A xilanolitikus enzimek végzik a hemicelluláz egyik fő komponensének, a xilán poliszacharidnak a degradációját. A xilán azon poliszacharidok gyűjtőneve, melyekben β -1,4-D-xilopiranoz egységek a fő alkotók. A xilanáz, más néven, endo-1,4- β xilanáz a xilán poliszacharid 1,4- β -D-glikozidos kötéseinek hidrolízisét katalizálja. A xilán eredetétől függően tartalmaznak még arabinozil, 4-O-metilglükuronsav és acetil csoport egységeket. A xilán teljes lebontásához tehát a xilanázon kívül egyéb enzimek is közreműködnek: α -glükoronidáz, α -arabinozidáz, β -xilozidáz, észteráz (Poutanen et al., 1987). Endo-1,4- β -xilanáz (EC 3.2.1.8) és β -xilozidáz (EC 3.2.1.37) termelésére számos mikroba képes (Shallom & Shoham, 2003).

2.3. A xilanáz enzim

A xilanáz enzim (E.C.3.2.1.8, endo-1,4- β -D-xilanáz), egy hidroláz enzim, amely a xilán poliszacharid β -1,4 kötéseinek hidrolízisét katalizálja. A xilanáz enzim véletlenszerűen támadja a xilán vázat. A hidrolízis terméke rövidebb szénláncú oligomerek, valamint xilobióz és xilóz (Singh et al., 2003).

2.3.1. A xilanáz enzim előfordulása

Xilanáz termelő mikroorganizmusokat nemcsak a gombák, hanem a baktériumok között is találhatunk. A BRENDA enzim információs rendszerben rengeteg mikroorganizmust találtam, amelyeknél xilanáz enzim aktivitást találtak. Ezek közül néhány példát felsoroltam az 1. számú táblázatban. Utána pár példával ismertetem néhány xilanáz termelő mikroba felhasználási lehetőségeit.

1. táblázat: Xilanáz enzim előfordulása

Mikroorganizmus	Hivatkozás
<i>Acetobacter junii</i>	Lo et al. (2010)
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	Saripan & Reungsang et al. (2013)
<i>Staphylococcus sp.</i>	Gupta et al. (2000)
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Smith et al. (2009)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Purkarthofer et al. (1993)
<i>Penicillium citrinum</i>	Dutta et al. (2007)
<i>Aspergillus niger</i>	Smith et al. (2009)

Lo és társai (2010) az *Acetobacter junii* F6-02 mikrobát használták fel kutatásuk során, melyben hidrogén fermentációt vizsgáltak különböző enzimatikusan hidrolizált xilán szubsztrátumok esetén. Ezzel a xilanáz termelő baktériummal végezték a hidrolízist, majd a hidrogén előállításához *Clostridium butyricum* CGS5 törzset alkalmaztak. Az *A. junii* F6-02-t Dél-Taivanban, talajból sikerült izolálni, Bushnell Haas tápközeg segítségével amit karboximetil-cellulózzal, és xilánnal egészítettek ki.

A *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* KKU ED-1 egy elefánt trágyából izolált mikroba, amire jellemző hogy számos szénforrásból (glükóz, maltóz, xilóz, galaktóz, fruktóz, arabinóz, xilán) képes hidrogént előállítani. Saripan és Reungsang (2013) kutatásuk során optimálták a KKU ED-1 törzs biohidrogén termelését. A fermentáció optimális körülményei: pH 7,0, hőmérséklet 55°C, valamint a xilán koncentráció 15 g/L.

Aspergillus niger és *Thermomyces lanuginosus* eredetű xilanázt alkalmaznak a cellulóz, illetve hemicellulóz alapú bioetanol gyártás előkezelési lépéseként, a hatékonyabb etanol fermentáció érdekében (Smith et al., 2009).

2.3.2. *Thermomyces lanuginosus* eredetű xilanáz

A többi termelő mikroorganizmussal szemben a *Thermomyces lanuginosus* nagyságrendekkel nagyobb mennyiségű xilanázt képes szintetizálni, így gazdaságosan is megvalósítható ipari fermentációja.

Számos rázott lombikos fermentációval bebizonyosodott, hogy a szénforrás szignifikáns hatással van a xilanáz enzimtermelésre. Több tanulmányban olvasható hogy a kukoricacsutka őrlemény bizonyult a legjobb szubsztrátnak *Thermomyces lanuginosus* xilanáz termelésének szempontjából (Singh et al, 2003; Purkarthofer et al., 1993). Singh és munkatársai (2003) munkájuk során 22 *T. lanuginosus* törzs xilanáz termelését vizsgálták rázott lombikos technológiával, szénforrásként pedig a kukoricacsutka mellett, nyírfa eredetű xilánnal egészítették ki az enzimfermentációhoz használt tápközeget. A legtöbb törzs esetében nagyobb aktivitás értékeket értek el a kukoricacsutka alapú fermentációknál, a legmagasabb értéket SSBP törzs alkalmazásával kapták.

2.3.3. Enzimműködést befolyásoló tényezők

A *Thermomyces lanuginosus* eredetű xilanáz enzim működését befolyásoló tényezőket a BRENDA enzim információs rendszer segítségével gyűjtöttem össze. A *Thermomyces lanuginosus* eredetű xilanáz enzim pH optimuma a BRENDA információi alapján 6,5, stabilitását pedig pH=5-8,3 környezetben képes megőrizni. A legtöbb mikroba esetén pH=5-6,5 közé tehető az enzim pH optimuma, azonban egyes *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* és *Bacillus* törzsek esetén lúgos pH=7,5-9 értéknél optimális a xilanáz működése, sőt pH=9-10 közegben is hatékonyan működik egy *Bacillus* eredetű xilanáz enzim (Beg et al, 2001).

Lin és társai (1999) kutatása során a *T. lanuginosus* SSBP törzsének tulajdonságait, többek között hőtűrő képességét vizsgálták. Az enzim 3 órán keresztül, 60°C-os inkubációt követve is 100%-os enzimaktivitást mutatott. Stephens és társai (2007) munkásságának köszönhetően, tudjuk, hogy 10 perces 80°C-on történő inkubálás után az enzim elveszíti aktivitásának 90%-t.

Eltarthatóságát tekintve, szobahőmérsékleten 7 hétig, hűtőszekrényben 4°C-on 9 hónapon keresztül megőrzi aktivitását (Smith et al., 2009).

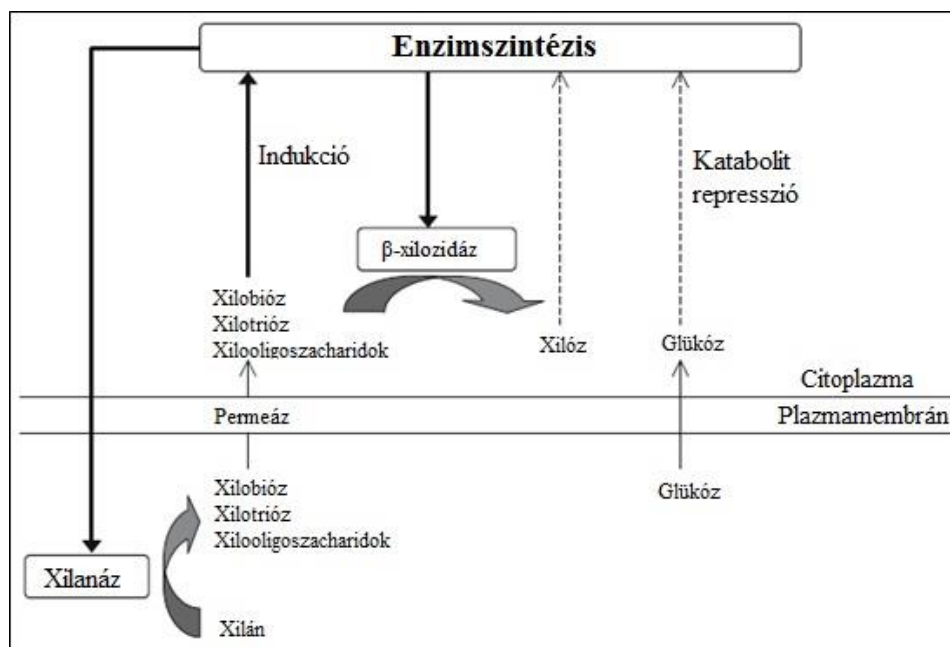
Az optimális enzimműködés egyik felétele, hogy a minimalizáljuk a reakcióelegyben a gátló anyagok jelenlétét. A xilanáz enzim inhibitorai a következők: Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} ,

Pb^{2+} , dietil-dikarbonát. Továbbá gátolja az enzimműködést az enzim egyik terméke, a xilobióz növekvő koncentrációja.

A BRENDA információs rendszerben nem található kofaktora a *T. lanuginosus* eredetű xilanáz enzimnek. Azonban a *Streptomyces thermocarboxydus*-szal végzett kísérletek során Tween 80, 0,5%-os koncentrációban való alkalmazásával 38%-kal nagyobb enzimaktivitást értek el (Kim et al., 2010). *Aspergillus niger* enzimaktivitásának vizsgálat esetén, 70mM $CaCl_2$ koncentrációnál a xilanáz enzim aktivitása 50%-kal növekedett (Fournier et al., 1985). Su és munkatársai (2011) kutatása során *T. lanuginosus* SDYKY-1 törzsének xilanáz termelését optimalták, mely során kimutatták, hogy a vizsgált törzs esetén, a Tween 80 és $CaCl_2$ jelenléte negatívan hatott az enzimtermelésre.

2.3.4. A xilanáz enzim bioszintézisének szabályozása

A xilanáz enzim szintézisének feltételezhető sémája a 3. számú ábrán látható. Az elmélet szerint az induktor molekulák (xilobióz, xilotrióz, xilooligoszacharidok) indukálják az enzimszintézist.



3. ábra: Xilanáz enzimszintézis szabályozás sematikus ábrája (Polizeli et al., 2005 nyomán)

Az extracelluláris xilanáz enzim a tápközegben lévő xilán poliszacharid hidrolizálását katalizálja, melynek terméke xilobióz, xilotrióz valamint xilooligoszacharidok. A permeáz elősegíti ezeknek a molekuláknak a transzportját a sejtbe. A citoplazmában a β -xilozidáz enzim xilóz egységekre bontja a xilanáz hidrolízis termékeit. A xilóz növekvő koncentrációja gátló hatással van az enzimszintézisre. Ha glükóz is van a rendszerben akkor a xilanolitikus enzimek, nem expresszálódnak nagy mértékben. Ennek oka, hogy a glükózt könnyebben hasznosítja a szervezet, és így nem szükséges a xilánt bontó enzimek előállítása (Polizeli et al., 2005).

2.3.5. Xilanáz fermentációk megvalósítása különböző termelő törzsekkel

A szakirodalomban már számos cikket találhatunk különböző mikrobákkal végzett xilanáz fermentációkról. Mandalari és munkatársai (2007) *Talaromyces stipitatus* és *Humicola grisea* fajokkal élelmiszeripari melléktermékek (búzakorpa és sörtörköly) alkalmazhatóságát vizsgálták xilanáz fermentációhoz. A sikeres kísérlettel bebizonyították, hogy mindkét melléktermék használható alapanyagnak xilanáz termeltetés során.

Su és társai (2011) a *Thermomyces lanuginosus* SDYKY-1 törzsét vizsgálták szubmerz enzimfermentáció során, ahol szénforrásként kukoricacsutkát alkalmaztak. Kísérleteik során többek között keresték az ideális nitrogénforrást, valamint a tápközeg összetevőinek hatását. Eredményeik között beszámoltak róla, hogy a legjobb nitrogénforrásnak az élesztőkivonat bizonyult, ezenkívül azt figyelték meg, hogy a Tween-80, valamint a CaCl_2 hozzáadásával csökkent a xilanáz enzimtermelés.

Sonia és munkatársai (2005) szintén a *Thermomyces lanuginosus* D₂W₃ törzs xilanáz enzimtermelését vizsgálták szilárd fázisú fermentációk során. Az alkalmazott szubsztrátok közül a cirokkal érték el a legjobb eredményeket. A xilanáz termelésen kívül α -galaktozidáz, β -xilozidáz valamint pektináz termelésről is beszámoltak.

2.3.6. A xilanáz biotechnológiai felhasználása

A xilanáz biotechnológiai alkalmazása az utóbbi évtizedekben igen nagy figyelmet kapott. A xilán hidrolízis termékeinek, - xilóz és oligoszacharidok - lehetséges élelmiszeripari felhasználása sűrítő illetve zsírpótló anyagként, továbbá fagyálló adalékanyagként történhet. A gyógyszeriparban a xilánt alkalmasnak találták tabletták gyártásához, valamint különböző komponensekkel együttesen felhasználható olyan tabletták készítéséhez, melyek késleltetett

hatóanyag felszívódást biztosítanak. Továbbá a xilán hidrolízisének termékei feldolgozási műveletek során, mesterséges, alacsony kalóriatartalmú édesítőszerre alakíthatók.

A környezetvédelmi előírások következtében a papíriparban, a fehérítés során csökkenteni kell a klór felhasználását, ezért a művelet megvalósítására egyéb megoldásokat kellett keresni. A xilanáz jól alkalmazható a cellulóz tisztítására. A xilanázos kezelésnek köszönhetően csökken a kémiai vegyszer fogyasztása, így csökken a környezetszennyező hulladékok mennyisége, ezen felül jobb tisztaságú papír állítható elő. Az enzimes bontásnak köszönhetően a lignin és a szénhidrátlánc közötti kötések is lebontásra kerülnek, így a lignin elválasztható a cellulóztól.

A xilanáz továbbá kulcs szerepet játszik a növényi sejtfal eltávolításában, zöltségek áztatásánál, gyümölcslevek és bor derítésében, az olaj kinyerésben földalatti bányákban, az aroma és színanyagok, növényi olaj és keményítő extrakciójában, és növeli a hatékonyságát a mezőgazdasági szilázs gyártásnak.

A xilanáz továbbá összetevője az „Ultraflo L” ipari enzimnek, melyet *Humicola insolens* egyik törzsével termeltek. Ez egy hőstabil β -glükánázt is tartalmazó enzimekészítmény, amelyet a sörkészítés során a cefrézésénél alkalmaznak, hogy biztosítsa a β -glükánok, pentozánok hatékony lebontását.

A *Trichoderma ciride* eredetű tisztított xilanáz felhasználásánál megfigyelték, hogy indukálta az etilén és két másik kórokozó ellenes fehérje bioszintézisét a dohányban. Ebből arra következtettek, hogy ez a xilanáz talán szerepet játszik a növényi védekező mechanizmus indukálásában. A xilanáz a csírázó növényi magban elsődlegesen a tartalék tápanyagot alakítja át asszimilálható terméké.

A xilanáz továbbá hasznosan alkalmazható a takarmányiparban, valamint pékáruk készítése során. A pékáruk készítésénél a xilanáz a tészta glutén frakciójára hat és segíti a víztartalom eloszlását a termékben, ezáltal jelentősen javul a kenyér minősége és élettartama (Singh et al., 2003; Kulkarni et al., 1999).

2.3.7. A xilán alapú bioetanol előállítás

A lignocellulóz alapú bioetanol gyártás hatékonysága jelentősen javítható, ha nemcsak a cellulóz frakció hidrolízisét végezzük, hanem az egyéb szénhidrát polimerek, mint például a xilán biokonverzióját is megvalósítjuk. A hagyományos cellulóz feldolgozás során a hemicellulózt a ligninnel együtt eltávolítják, és csak a fennmaradt cellulózzal dolgoznak.

Azonban ha a hemicellulóz frakció lebontásával további etanollá fermentálható monoszacharidok keletkezhetnek, növelhető lenne a kihozatal.

A hidrolízist különböző előkezelési lépések előzik meg, annak érdekében, hogy az enzimes hidrolízis során a poliszacharid könnyen elérhetővé váljon. Számos ilyen módszert alkalmaznak: a biomassza áztatása kis koncentrációban savat vagy lúgot tartalmazó fűtött vízfürdőben; hidrogén-peroxidos, kén-dioxidos kezelés; illetve magas nyomáson végzett kezelési lépések.

A xilán polimer bontása történhet baktériumok, gombák illetve enzimek segítségével. Az említett hidrolízis terméke lehet fermentálható monoszacharid, amelyből további lépésekkel etanol, xilitol, tejsav és egyéb kémiai összetevők nyerhetők. A xilán teljes hidrolíziséhez különböző enzimek szükségesek (xilanáz, α -glükuronidáz, acetilxilán észteráz, β -xilozidáz stb.). Ipari szempontból, az előkezelési lépéseket figyelembe véve célszerű olyan enzimeket alkalmazni, amelyek lehetőleg termotabilak, valamint használhatók alacsonyabb pH tartományban is.

A hidrolízis után a következő lépés a keletkezett xilóz monoszacharidok fermentálása etanollá. A klasszikus etanol fermentációknál alkalmazott élesztők, *Saccharomyces cerevisiae* és *Zymomonas mobilis* a hat szénatomos glükózból hatékonyan állítanak elő etanolt. Azonban a xilán bontása után keletkező xilóz, öt szénatomos monoszacharid, amit ezek az élesztők nem képesek hasznosítani. A legtöbb xilóz hasznosításra is képes mikroorganizmusra alacsonyabb kihozatalú és lassabb etanol termelés jellemző.

A nagy hatékonyságú etanol fermentációt molekuláris biológiai módszerekkel próbálják elérni. Az egyik stratégia alapján olyan *S. cerevisiae* törzseket próbálnak létrehozni, amelyek képesek xilóz hasznosítására. Az előállítás költségét jelentősen csökkentené olyan génmódosított mikroorganizmus alkalmazása, amely képes a xilán hidrolizálására, valamint a xilóz alapú etanol fermentációra is (Deutschmann és Dekker, 2012).

2.4. A sörtörköly alkalmazhatósága xilanáz fermentációhoz

Napjainkban egyre inkább törekszenek az ipari termelésben a melléktermékek további hasznosítására, a környezetvédelmi szempontok miatt csökkenteni a hulladékot. A sör a világ ötödik legnagyobb mennyiségben fogyasztott itala, egy 2002-es felmérés során a világ éves sörtermelése 1,34 milliárd hektoliter volt. A három legnagyobb sörgyártó ország, az Amerikai Egyesült Államok (23 milliárd hl.), Kína (18 milliárd hl.) és Németország (10,5 milliárd hl.).

2002-ben körülbelül 1,7 millió tonna sörtörköly keletkezett, melyet kedvező összetétele miatt számos területen próbálnak hasznosítani (Mussatto et al., 2006).

2.4.1. A sörtörköly kémiai összetétele

A sörtörköly kémiai összetevőit nézve, a héj, a magház és a maghéj komponenseiből tevődik össze. Igen gazdag cellulózban, nem cellulitikus poliszacharidokban, valamint ligninben, ezenkívül fehérjék és lipidek is előfordulnak a törkölyben. A héja jelentős mennyiségben tartalmaz kovasavat, valamint polifenol komponenseket. A törkölyben jelentős mennyiségű ásványi anyag, vitamin és aminosav is található. Az ásványi anyag koncentrációja (kalcium, kobalt, réz, vas, magnézium, mangán, foszfor, kálium, szelén, nátrium, kén) kisebb, mint 0,5%. Vitamintartalmát nézve biotint (0,1 ppm), folsavat (0,2 ppm), niacint (44 ppm), pantoténsavat (8,5 ppm), riboflavint (1,5 ppm), tiamint (0,7 ppm) és piridoxint (0,7 ppm) tartalmaz (Mussatto et al., 2006).

2.4.2. A sörtörköly biotechnológiai felhasználhatósága

A törköly összetevői között találhatók emészthető és emészthetetlen szerves komponensek, ennek köszönhetően potenciális szubsztrát a mikroorganizmusoknak, melyek a sörtörköly hasznosítására számos enzimet szintetizálnak, hogy hozzájussanak a létfenntartásukhoz szükséges egyszerű szénhidrátokhoz, aminosavakhoz és egyéb vegyületekhez. Biotechnológiai alkalmazására rátérve, a sörtörköly, fehérje, poliszacharid és nedvességtartalmának köszönhetően ideális mikrobák tenyésztésére, illetve enzintermelésre. Nagy hemicellulóz tartalmának (30-35%) köszönhetően, szaporíthatók rajta olyan mikrobák, amelyek képesek hemicellulitikus enzimek (xilanáz, α -L-arabinofuranozidáz, észteráz) szintézisére. Már több beszámolót is találhatunk, amelyben a mikrobákat sikeresen szaporították sörtörköly tartalmú tápközegben, mint például: *Bifidobacterium adolescentis* 94BIM, *Lactobacillus* sp., *Streptomyces*, *Pleurotus ostreatus*, *Penicillium janczewskii*, *Penicillium brasilianum* és még egyéb fajok. Továbbá megfelelő tápközegként szolgál mikrobák izolálására, valamint ismeretlen törzsek szelekciója során (Mussatto et al., 2006; Aliyu et al., 2010).

Amilolitikus enzimeket termelő mikrobákat is szaporíthatunk ezen a mellékterméken amiloglukozidáz, valamint β -amiláz termelés céljából (Mussatto et al., 2006).

Mandalari és társai (2007) *Humicola grisea*, valamint *Talaromyces stipitatus* mikrobákkal végzett rázott lombikos fermentációja során sikeresen termeltek xilanáz, feruloyl

észteráz enzimeket, így bebizonyosodott, hogy a sörtörköly alkalmazható xilanáz fermentációra.

2.4.3. A sörtörköly egyéb felhasználása

Jelentős fehérje és rost tartalmának köszönhetően a sörtörkölyt gyakran használják az állati takarmányozásban. Amennyiben emberi fogyasztásra akarjuk alkalmazni, először lisztet kell belőle készíteni. Alacsony ára és magas tápanyag tartalma miatt nagy figyelmet fordítottak emberi fogyasztásban való használatára. Alkalmazhatóságát vizsgálták teljes kiőrlésű kenyérként való elkészítésnél, valamint kekszekben, aperitif snackben is. A sörtörkölyből készített magas fehérje tartalmú lisztből már sikeresen készítettek számos pékárut (kenyér, muffin, sütemény, palacsinta). Azonban csak korlátozott mennyiségben alkalmazható ez a liszt fehérjetartalom növelésére, színe és aromája miatt.

Egy másik alkalmazási lehetősége az energiatermelésben lehetséges. A sörtörköly fermentációs úton való kezelésével biogáz nyerhető, melynek összetétele: 60-70%-a metán, ezenkívül szén-dioxid, valamint kis mennyiségben nitrogén, és szén-monoxid. A törköly közvetlen elégetésével, az égetési folyamatot megelőzően, előkezelési lépésként le kell csökkenteni a törköly nedvességtartalmát 55% alá. További probléma az égetés során képződő nitrogén-oxid mennyisége.

Továbbá vizsgálták a sörtörköly alkalmazhatóságát papíripari nyersanyagként. A kísérletek sikeresnek bizonyultak, mivel jó minőségű papír törlőt, névjegykártyát, valamint poháralátétet készítettek belőle (Mussatto et al., 2006).

3. A KÍSÉRLET CÉLJA

A *Thermomyces lanuginosus* termofil fonalas gomba számos enzim szintézisére képes, többek között xilanáz aktivitása is bizonyított. Az enzim papíripari alkalmazásán túl, fontos szerepet játszhat a környezetvédelemben, különböző melléktermékek hasznosításával, valamint a bioetanol előállításában is az összetett szénhidrátok lebontásával.

A kísérleti munkám során célul tűztem ki a rendelkezésemre álló 12 *Thermomyces lanuginosus* törzs közül a xilanáz enzimet termelők kiválasztását, s a xilanáz szintézisre képes törzsek rangsorolását enzim termelésük szempontjából. A szakirodalom alapján (Su. et al., 2011) a *Thermomyces lanuginosus* eredetű xilanáz szintézisére legjobbnak talált kukoricacsutka szénforrás mellett, vizsgálni kívántam a sörtörköly alkalmazhatóságát xilanáz enzim termelés céljából.

A legjobb enzim termelő törzs kiválasztása után az enzimtermelés fokozását központi elrendezésű kísérleti tervek segítségével és válaszfelület módszer alkalmazásával szeretném megvalósítani, különös figyelmet fordítva az optimális szén- és nitrogénforrás koncentrációjának meghatározására.

Célul tűztem ki továbbá az aktivitás mérés optimális körülményeinek - hőmérséklet, pH – meghatározását.

Végül a szubmerz fermentációk vizsgálata mellett, szilárd fázisú fermentációk megvalósítását és összehasonlítását tervezem, kukoricacsutka, valamint sörtörköly alkalmazásával.

A KÍSÉRLETEK HELYE

A kísérleteket a Budapesti Corvinus Egyetem Élelmiszertudományi Karának Sör- és Szeszipari Tanszékének Fermentációs Laboratóriumában végeztem.

4. KÍSÉRLETI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. A felhasznált mikroorganizmusok

TDK munkám készítése során különböző törzsgyűjteményekből származó, 12 db *Thermomyces lanuginosus* törzs (2. táblázat) xilanáz aktivitását vizsgáltam.

2. táblázat: Az alkalmazott *T. lanuginosus* törzsek

ATCC 16455	ATCC 34626	ATCC 36350
ATCC 44 008	ATCC 84 400	CBS 288.54
CBS 395.62	DSM 5826	IMI 096 218
IMI 110 803	IMI 131 010	IMI 140 524

ATCC: (American Type Culture Collections)

CBS: (Centraalbureau voor Schimmelculture)

DSM: (Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH)

IMI: (International Mycological Institute)

4.2. Alkalmazott tápközegek

Törzsfenntartás

A *T. lanuginosus* törzsek fenntartásához kereskedelmileg forgalmazott burgonya-glükóz agart (PDA) (Micromedia) alkalmaztam, melynek komponenseit a 3. számú táblázat tartalmazza.

3. táblázat: A törzsfenntartáshoz alkalmazott PDA tápagar összetétele

Összetevők	Mennyiség
burgonya	500 g/l
glükóz	20 g/l
agar	15 g/l

A kész tápközegből 24 g-ot mértem 1000 ml-be, s 121 °C-on 15 percig autoklávoztam.

Szkrínelési tápagar**4. táblázat: Szkríneléshez alkalmazott tápagar összetevői**

Összetevők	Mennyiség
xilán	5 g/l
pepton	5 g/l
élesztőkivonat	5 g/l
K ₂ HPO ₄	1 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g/l
agar	20 g/l

Inokulum tápközeg**5. táblázat: Az inokulum tenyészet készítéséhez alkalmazott tápközeg**

Összetevők	Mennyiség
glükóz	20 g/l
L-aszpargin	4 g/l
KH ₂ PO ₄	3 g/l
K ₂ HPO ₄	2 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g/l
Vogel féle nyomelem oldat (Vogel, 1956)	1 ml/l

Fermentációs tápközégek**6. táblázat: Szubmerz fermentációs alaptápközeg összetevői**

Összetevők	Mennyiség
KH ₂ PO ₄	3 g/l
K ₂ HPO ₄	2 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g/l
Vogel-féle nyomelem oldat	1 ml/l

A fermentációs tápközégeket (6. számú táblázat) további szén- és nitrogénforrásokkal egészítettem ki. Szénforrásként kukoricacsutka, valamint sörtörköly őrleményt alkalmaztam,

nitrogénforrásként élesztőkivonatot adtam hozzá. E komponensek pontos mennyiségét az egyes kísérleti beállításoknak megfelelően, az „Eredmények értékelése” fejezetben részletezem.

A szilárd fázisú fermentáció esetén 5,0 g száraz szubsztrátumot nedvesítettem tápoldattal (7. táblázat).

7. táblázat: Szilárd fázisú fermentáció tápoldatának összetétele

Összetevő	Koncentráció
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10,0 g/l
KH_2PO_4	3,0 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g/l
$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5 g/l
Vogel-féle nyomelemoldat	1 v/v %

A sörtörköly

A Sör- és Szeszipari Tanszék gyakorlati bázisán található félüzemi sörfőzdében, pilseni malátából készített sör mellékterméke. A sörtörköly 60°C-on történő szárítás, és durva őrlés (2,5mm) után került felhasználásra.

Kukoricacsutka

A kukorica feldolgozása során keletkezett csutkából készült, felaprított, kíméletesen szárított és pormentesített alomként forgalomba hozott (gyártó cég: Fiesta) termék.

4.3. Mikrobatenyésztési módszerek

A mikroba eredetű befertőzések elkerülése végett, a mikrobiológiai laborfeladatokat steril körülmények között, lamináris box alatt végeztem.

4.3.1. Törzsfenntartás

A *T. lanuginosus* törzsek időnkénti átoltása szükséges. Ennek során a bespórázott tenyészetből steril szikével egy agar darabot kivágva, PDA ferde agarra vagy Petri csészében lévő tápközeg felületére helyeztem. 50 °C-on 10 napig inkubáltam, majd hűtőszekrényben 4 °C-on tároltam további felhasználásig.

4.3.2. Szkrínelés

A szkrínelés során a 12 *T. lanuginosus* törzs xilanáz szintézisét vizsgáltam. A tápagar (4. számú táblázat) elkészítésénél egyedüli szénforrásnak a xilánt választottam, így csak a xilanáz szintézisre képes törzsek életképesek az agaron. A beoltott agarlemezeket 47 °C-on termosztáltam. A szaporodást 3 nap után vizsgáltam.

4.3.3. Inokulum tenyészet elkészítése

A ferde agaros tenyészetekről végeztem az inokulum tápközegek beoltását. (A tápközeg összetételét az 5. számú táblázat tartalmazza.) 5,0 ml 1%-os Triton X-100 oldatot a tenyészetre pipettáztam, majd vortex keverővel 1 percre kevertettem. A konídiumokat tartalmazó Triton X-100 oldattal oltottam be a tápközegeket. Ezt követően rázóinkubátorban 47 °C-on, 2 napon keresztül szaporítottam.

4.3.4. Szubmerz enzimermentációk

A kísérletek elvégzéséhez, a fermentációs alaptápközegeket kiegészítettem különböző mennyiségű szén- és nitrogénforrással. Az autoklávval sterilizett tápközegeket 5,0 ml 48 órás inokulummal oltottam be. A fermentációt 7-10 napig folytattam a *T. lanuginosus* optimális növekedési hőmérsékletén, 47°C-on rázóinkubátorban 220 rpm fordulatszámon. Az enzimtermelés alakulását naponkénti mintavétellel követtem. Az enzimaktivitás mérése a papírszűrővel leszűrt fermentléből történt.

4.3.5. Szilárd fázisú enzimfermentáció

A szilárd fázisú fermentációt 300 ml-es Erlenmeyer lombikokban valósítottam meg, amibe 5,0 g szilárd szubsztrátumot mértem be. A 7. táblázatban található sóoldatból 20,0 ml-rel benedvesítettem a szubsztrátot, így a kezdeti nedvességtartalmat 80%-ra állítottam be. A tápközeg sterilizése 121°C-on 30 percig tartó autoklávozással történt. A fermentáció indítása 2,0 ml 48 órás inokulummal történt, ezt követően 47 °C-os termosztátba helyeztem a lombikokat.

Az enzimaktivitás méréséhez a kezdeti nedvességtartalmat kiegészítettem 100,0 ml-re, 0,2% koncentrációjú Triton X-100 oldattal. Az 1 órás extrahálás 37°C-on, rázóinkubátorban történt 120 rpm rázatás mellett. Ezt követően 10 perces 8000 rpm centrifugálás következett, majd az enzim aktivitását a felülúszóból mértem.

4.4. Analitikai módszerek

4.4.1. Alkalmazott pufferek, reagensok

Xilán szubsztrátum

1%-os koncentrációjú nyírfaxilán oldat készítése során 0,05 M Na-citrát pufferben (pH=5,3) feloldott xilánt kevertettem, miközben forralásig melegítettem, majd 6 órán keresztül mágneses keverő segítségével szobahőmérsékleten kevertettem. Tárolás: 4°C-on 1 hétig lehetséges.

0,05 M Na-citrát puffer (pH 5,3):

1000 ml puffer készítéséhez 196 ml 0,1 M NaOH és 804 ml 0,1 M Na-citrát oldatot használtam. A pontos pH beállítás érdekében Seven Multi Mettler Toledo pH mérővel ellenőriztem az oldat pH-ját. Tárolás: 4°C-on.

0,05 M Na-citrát puffer (pH 6,5):

1000 ml puffer készítéséhez 463 ml 0,1 M NaOH és 537 ml 0,1 M Na-citrát oldatot használtam. A pontos pH beállítás érdekében Seven Multi Mettler Toledo pH mérővel ellenőriztem az oldat pH-ját. Tárolás: 4°C-on.

Somogyi I reagens:

A reagens készítéséhez bemértem 288 g vízmentes Na_2SO_4 -t, amit 1 liter felforralt desztillált vízben feloldottam. Hozzáadtam 48 g Na_2CO_3 -t, 32 g NaHCO_3 -t és az egészet felforralt desztillált vízzel 1600 ml-re feltöltöttem. Tárolás 27 °C-on.

Somogyi II reagens:

72 g Na_2SO_4 -t 300 ml felforralt desztillált vízben feloldottam, majd 8g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ -t adtam hozzá. Felforralt desztillált vízzel 400 ml-re kiegészítettem. Tárolás: 27 °C-on.

Nelson reagens:

100 g ammónium-molibdátot 1800 ml desztillált vízben feloldottam. Hozzáadtam 84 ml cc. H_2SO_4 -t és 12 g Na_2H -arzenátot, melyet előzőleg 100 ml desztillált vízben feloldottam. Az oldatot 1-2 napig sötét üvegben 37 °C-on, majd szobahőmérsékleten tároljuk.

4.4.2. Xilanáz enzimaktivitás meghatározása

Az aktivitás meghatározásához összemértem a reakció elegyeket a 8. táblázat alapján az enzim (fermentlé) hozzáadása nélkül. 50°C-on előinkubáltam, majd 0,2 ml megfelelően hígított minta hozzáadásával indítottam az enzimreakciót, melynek ideje 10 perc. Az enzimműködés leállítása forró vízfürdővel történt. A felszabadult xilóz mennyiségi meghatározását redukáló cukortartalom mérésével, Somogyi-Nelson módszer segítségével végeztem. A xilán rossz oldhatósága miatt az oldat opálos, ezért a fotometriás mérés előtt 14000 rpm fordulatszámon 10 percig centrifugáltam. Abszorbancia mérést 540 nm-n, Helios alpha (Unicam) spektrofotométer segítségével végeztem.

8. táblázat: Reakcióelegyek

	Szubsztrát	Enzim(fermentlé)	Desztillált víz
Műszervak	-	-	2 ml
Szubsztrátvak	1,8 ml	-	0,2 ml
Enzimvak	-	0,2 ml	1,8 ml
Minta	1,8 ml	0,2 ml	-

Somogyi-Nelson redukálócukor tartalom mérés

2 ml megfelelően hígított mintához 2 ml 4:1 arányú Somogyi I. és Somogyi II. reagens elegyét pipettáztam, majd 15 percet forraltam. Ezt követően hideg vízfürdőben lehűtöttem a mintákat, majd 2 ml Nelson reagenst valamint 4 ml desztillált vizet adtam hozzá. Az így kapott oldat abszorbanciáját spektrofotométerrel mértem.

Az enzimaktivitás számítása a következő képlet alapján történt:

$$\text{Aktivitás} \left[\frac{U}{cm^3} \right] = \frac{\text{abszorbancia} \cdot \text{hígítás} \cdot 1000 \frac{\mu mol}{mmol}}{5perc \cdot 150,13 \frac{mg}{mmol} \cdot \text{meredekség} \left[\frac{1}{mg} \right] \cdot 0,2cm^3}$$

$$\text{Aktivitás} \left[\frac{U}{g} \right] = \frac{\text{xilanáz aktivitás} \left[\frac{U}{cm^3} \right] \cdot \text{extrakciós térfogat} (100cm^3)}{\text{bemért szárazanyag} (5g)}$$

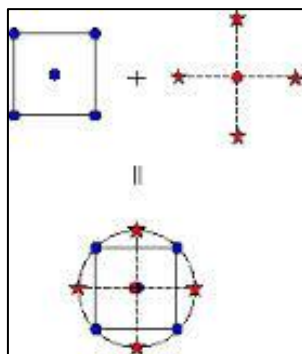
1 unit az a xilanáz enzim mennyiség, amely 1 perc alatt 1 μ mol xilózt szabadít fel a reakció körülményei között. (Szendefy, 2005)

4.4.3. pH mérés

A pH értékek meghatározását SevenMulti Mettler Toledo pH mérő segítségével végeztem. A méréseket minden esetben pufferek segítségével történő kalibráció előzött meg.

4.5. KísérlettervezésKözponti kompozíciós kísérleti terv (Central Composite Design, CCD)

A tápközeg összetételének optimalálására központi elrendezésű kísérleti tervet készítettem a Statsoft Statistica program segítségével. A terv alapja egy 2p típusú teljes faktorterv, amit csillagpontokkal kiegészítve megkapjuk a kompozíciós tervet (4.ábra). A módszer előnye, hogy a faktorokat nem egyenként változtatva közelítünk az optimumhoz, hanem az együttes hatásukat figyelembe véve határozhatjuk meg a legkedvezőbb paramétereket.



4. ábra: Központi kompozíciós kísérleti terv felépítése

Két faktor esetén a gomba enzimtermelését leíró válaszfelület modellegyenlete a következőképpen néz ki:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_1^2 + b_4x_2^2 + b_5x_1x_2$$

- Y= függő változó (enzimaktivitás)
- b= regressziós együtthatók
- x= független változók (x_1 :sörtörköly, x_2 :élesztőkivonat).

A statisztikai elemzésnél a „Hogyan használjuk a STATISTICA programot” című könyvet (Kemény, S., Deák, A., Komka, K., Vágó, E.) használtam segítségként.

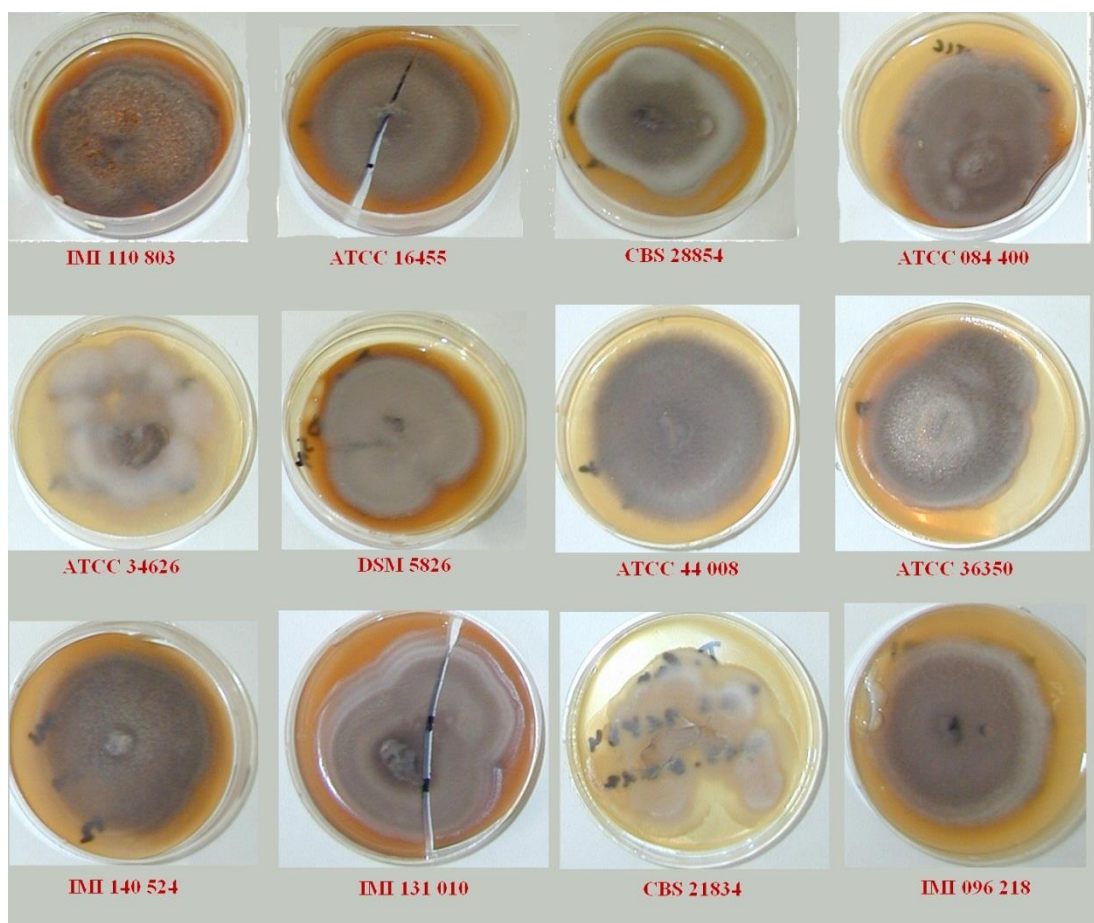
5. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

5.1. *Thermomyces lanuginosus* törzsek szkrínélése xilanáz aktivitásra

A kísérletek első lépéseként arra a kérdésre kerestem a választ, hogy a rendelkezésemre álló 12 db *Thermomyces lanuginosus* törzs közül melyek képesek xilanáz szintézisre.

Ehhez egy szkrínelő tápagart készítettem, melynél a kizárólagos szénforrás xilán volt. Amennyiben a mikroba képes a kívánt xilanáz enzimet előállítani, abban az esetben szaporodni fog, tehát telepnövekedés továbbá, a telep körül feltisztulási zóna látható.

A szkrínelési táptalajon kinőtt törzsek telepmorfológiáját az 5. számú ábrán láthatjuk.



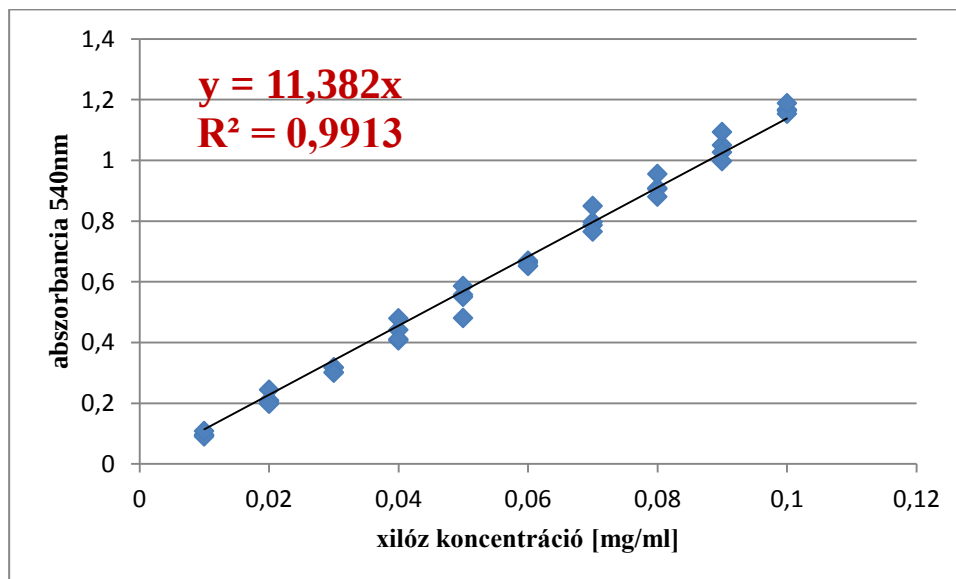
5. ábra: *T. lanuginosus* telepek xilán tartalmú tápagaron

A 3 napos telepekre 0,1%-os kongó vörös oldatot pipettáztam, majd 30 perc után leöntöttem és 1 M NaCl oldattal lemostam a felületet. A xilánt hasznosító törzseknél a telepek körül feltisztulási zóna látható. A szkrínelés során bebizonyosodott, hogy mind a 12 vizsgált törzs képes xilanáz enzimet előállítani, ezt bizonyítja a törzsek nagymértékű elszaporodása, valamint a feltisztulási zóna a telepek körül.

5.2. Xilóz kalibráció

Az xilanáz aktivitás mérése az enzimreakció során felszabadult xilóz mennyiségi meghatározásán alapul, melyet Somogyi-Nelson módszerrel valósítottam meg. Ehhez szükséges ismert koncentrációjú xilóz oldatokból egy kalibrációs egyenes készítése.

A kalibráció során 100 µg/ml xilóz oldatból hígítási sort készítettem 4 párhuzamos méréssel, elvégeztem a Somogyi – Nelson féle redukáló cukortartalom meghatározást. A kapott abszorbancia értékekre Microsoft Excel táblázatkezelő program segítségével regressziós egyenest illesztettem, melyet a 6. számú ábra tartalmaz, a kalibrációs egyenes egyenletével együtt.



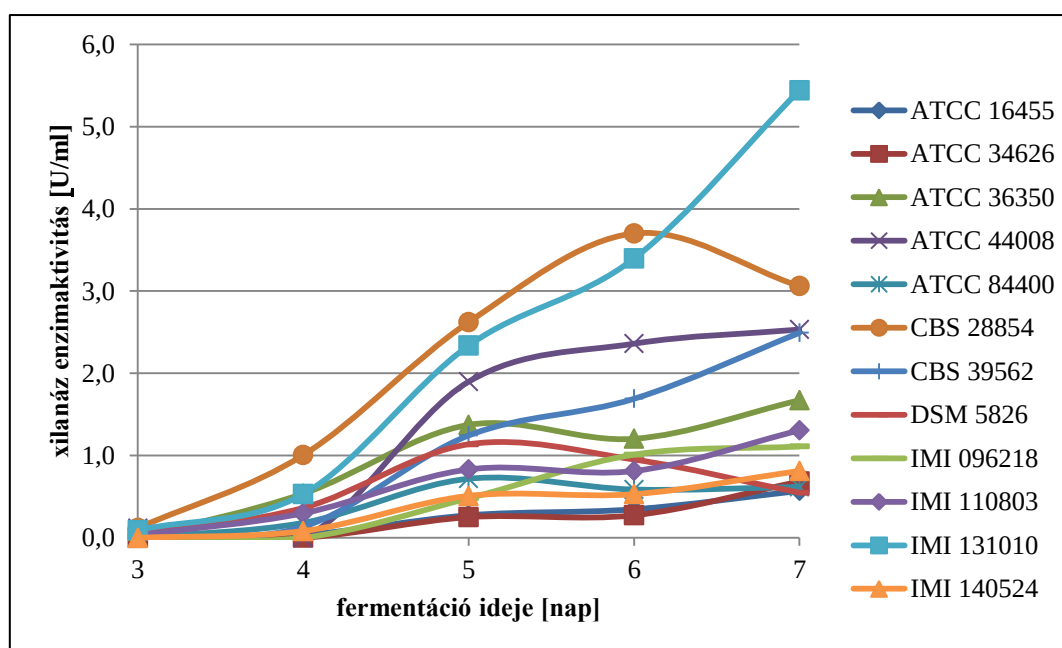
6. ábra: A xilóz kalibrációs egyenese

5.3. *Thermomyces lanuginosus* törzsek rangsorolása

A törzsek rangsorolásához (xilanáz termelésük szempontjából) rázott lombikos szubmerz fermentációt végeztem, 500 ml-es Erlenmeyer lombikokban. A fermentációs alap tápközeg összetevőit a 6. számú táblázat tartalmazza, melyet 5% kukoricacsutka őrléménnyel egészítettem ki.

A kísérlet során a 12 törzs termelőképességén kívül, azt is vizsgáltam, hogy alakulnak az enzim aktivitás értékek az idő függvényében. Ez utóbbi gazdasági szempontból is jelentős, mivel a fermentációs idő csökkentésével anyagilag kedvezőbbé tehető a fermentáció megvalósítása, különösen termofil mikroorganizmusok esetén.

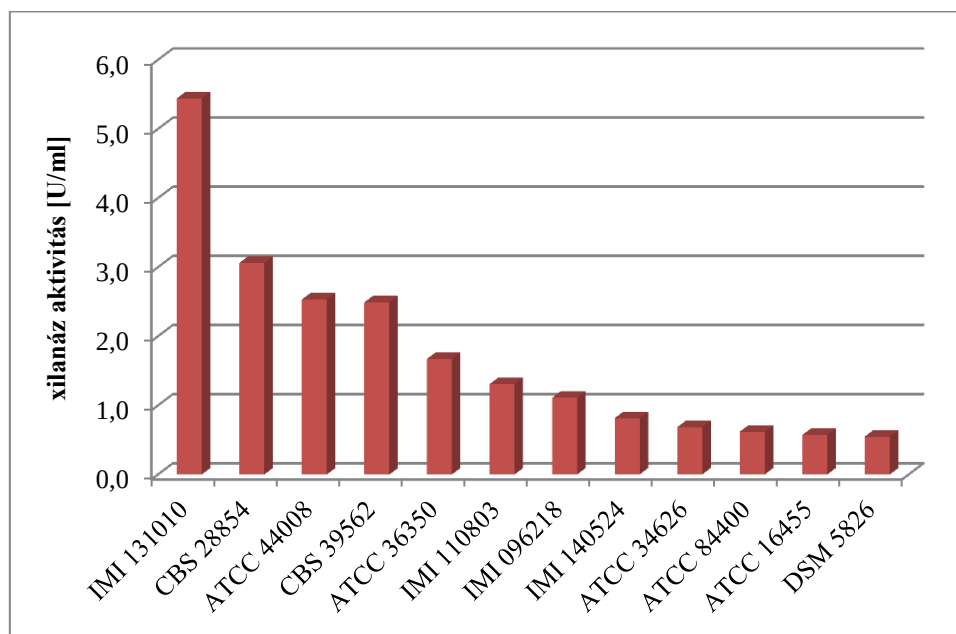
Ennek vizsgálata céljából, 7 napos fermentációt valósítottam meg. A harmadik naptól kezdve napi mintavételezéssel, aktivitás, valamint pH méréssel követtem nyomon a fermentációt, melynek aktivitás értékeit az egyes törzsek esetén az idő függvényében ábrázoltam (7. ábra).



7. ábra: Különböző *T. lanuginosus* törzsek xilanáz termelése kukoricacsutka alapú szubmerz fermentáció során

A diagramon jól látható, hogy a kukoricacsutka őrléménnyel szubmerz körülmények között mindegyik törzs mutatott xilanáz aktivitást, melyek a hatodik, hetedik napon érték el a legmagasabb értékeket a fermentáció ideje alatt. A legjobb aktivitást az IMI 131010 törzs esetén mértem. A kukoricacsutka magas xilán tartalmának köszönhetően indukálja a mikroba

xilanáz termelését. Ezen kívül számos tanulmányban (Su et al., 2005; Purkarthofer, et al., 1993) a kukoricacsutkát találták a legalkalmasabb szénforrásnak *T. lanuginosus* xilanáz fermentációja során. A hetedik napon mért aktivitás értékeket egy további diagramon ábrázoltam, a jobb átláthatóság végett (8. ábra). Az eredmények alapján megállapítható, hogy kukoricacsutka alkalmazásával a vizsgált törzsek közül az IMI 131010, a CBS 288.54, a ATCC 44008 és a CBS 395.62 mutatta a legjobb xilanáz aktivitást.

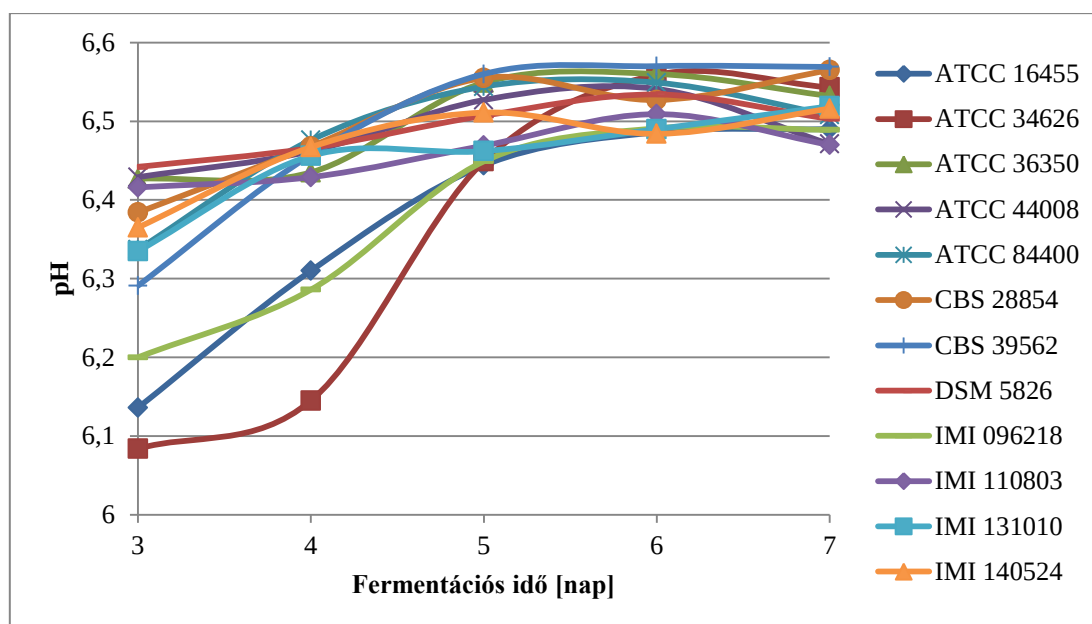


8. ábra: *T. lanuginosus* törzsek rangsora xilanáz aktivitásuk alapján

A 4 legjobban teljesítő törzs kiválasztása után, a további kísérleteimhez már csak ezeket a törzseket vizsgáltam.

5.4. A pH változása az egy hetes fermentáció során

Az 5% kukoricacsutkán megvalósított fermentáció során a harmadik és hetedik nap között napi mintavételezéssel követtem nyomon a fermentációs közeg pH változását. Eredményeimet a 9. ábrán mutatom be.

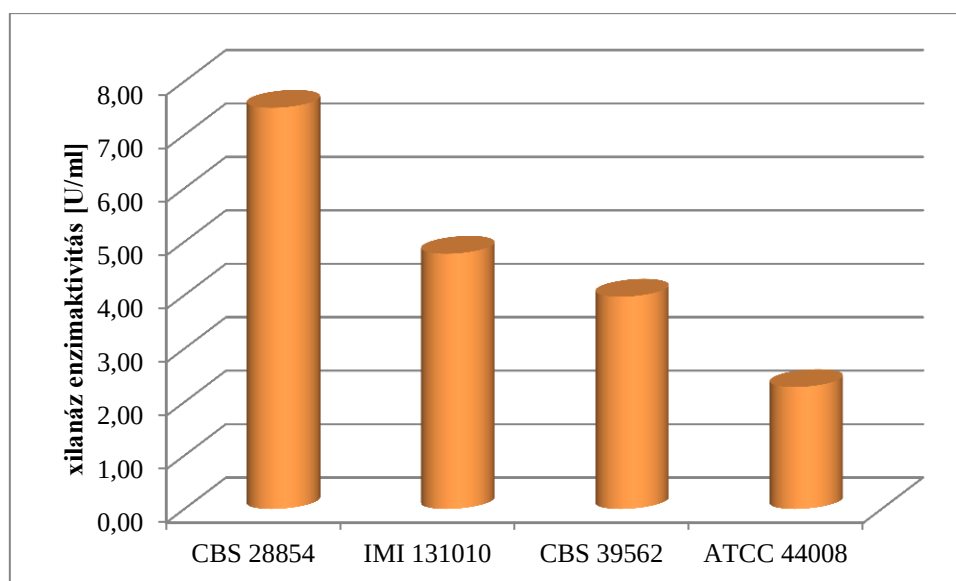


9. ábra: A pH változása kukoricacsutka alapú szubmerz fermentáció során

A fermentáció ötödik napjától az összes törzs esetén a fermentlé pH-ja beállt 6,4-6,6 közötti értékre, amely meg is maradt a fermentáció leállításáig. A *T. lanuginosus* xilanáz enzimének pH optimuma 6,5 körüli érték (BRENDA), így a tápközeg kémhatása igen kedvező az enzim megfelelő működéséhez.

5.5. A sörtörköly alkalmazhatóságának vizsgálata xilanáz fermentációhoz

A következő kísérlet során célom a sörgyártás melléktermékeként keletkezett sörtörköly alkalmazhatóságának vizsgálata xilanáz termelés céljából. A törzsgyűjteményben lévő 12 *T. lanuginosus* törzsből további vizsgálatok során már csak a 4 legnagyobb xilanáz aktivitást mutató törzsszel foglalkozok. A sörtörköly alkalmazhatóságának vizsgálatán túl további célom a 4 törzs közül kiválasztani a legjobbat, amellyel a későbbiekben kísérletes optimálással tervezem fokozni a xilanáz termelést.



10. ábra: Különböző *T. lanuginosus* törzsek xilanáz aktivitása a sörtörköly alapú fermentáció 7. napján

A sörtörkölyvel végzett fermentáció eredményei alapján is azt tapasztaltam, hogy a maximális enzimtermelés a hetedik napon érhető el. Ezen aktivitás értékeket mutatom be a 10. ábrán a különböző törzsek esetén. A sörtörkölyön elért maximális enzimaktivitás 7,5 U/ml, míg kukoricacsutka esetén a CBS 288.54 törzsszel csupán 3 U/ml értéket kaptam. A kukoricacsutkán az IMI 131010 törzsszel kapott maximális érték (5,4 U/ml) is elmarad a sörtörkölyön végzett fermentáció eredményeitől. Az eredmények alapján megállapítható hogy a *T. lanuginosus* CBS 288.54 törzse mutatta a legnagyobb enzimaktivitást, ezért további kísérleteimnél már csak ezt a törzset használtam fel.

A fermentáció eredményei alapján arra a következtetésre jutottam, hogy a sörtörköly alkalmazható xilanáz fermentáció szénforrásaként, ezen felül a törzsek nagyobb enzimaktivitást mutattak, mint a szakirodalomban (Su et al., 2011) sokat használt kukoricacsutka esetén.

5.6. A szén- és nitrogénforrás koncentrációjának optimalálása

A továbbiakban az enzimaktivitást fokozása érdekében a szén- és nitrogénforrás mennyiségének optimalálását végeztem el központi kompozíciós kísérleti terv alkalmazásával. Az optimalálási kísérleteknél az alap tápközeget a sörtörkölyön kívül, élesztőkivonattal egészítettem ki. A fermentáció megkezdése előtt egy központi kompozíciós elrendezésű kísérleti tervet generáltam Statsoft Statistica program segítségével. A vizsgált két mennyiségi

faktor a sörtrököly és az élesztőkivonat koncentráció. Matematikai statisztikai számításokkal, válaszfelület módszerrel választ kaphatunk a kérdésre, hogy mekkora hatással befolyásolja a vizsgált 2 változó az enzimtermelést, valamint a módszer segítségével a szén és nitrogénforrás optimális koncentrációja is meghatározható. A kísérletet egy blokkban végeztem, a centrumponthoz tartozó értékeket a szakirodalomra támaszkodva (Su et al., 2011) választottam: szénforrást 35 g/l, a nitrogénforrást 3g/l-es koncentrációra állítottam be, előbbinél a léptéknek 15 g/l –t, míg utóbbinál 1,5 g/l –t választottam. Az így generált kísérleti tervet a 9. számú táblázat tartalmazza.

Továbbá arra a kérdésre kerestem a választ, hogy a fermentációs idő meghosszabbításával, növelhető-e még az enzimkihozatal. Ezért a fermentációt nem állítottam le a 7. nap után, hanem 10 napig folytattam. A fermentáció nyomon követése érdekében a 3. és 7 nap között minden nap, valamint a fermentáció utolsó, 10. napján mintavételezést és aktivitásmérést végeztem, melynek eredményei szintén a 9. táblázatban láthatók.

9. táblázat: Központi kompozíciós kísérleti terv és a 10 napon mért aktivitás értékek

Kísérleti szám	Sörtrököly koncentráció [g/l]	Élesztőkivonat koncentráció [g/l]	Aktivitás [U/ml]
1	20	1,5	7,65
2	20	4,5	11,53
3	50	1,5	14,47
4	50	4,5	12,05
5	13,8	3	7,88
6	56,2	3	12,35
7	35	0,88	12,21
8	35	5,12	10,97
9	35	3	12,06
10	35	3	13,56

A legmagasabb értékeket a 10 napos mintáknál értem el, ezért a statisztikai elemzést ezekre a mintákra végeztem. A statisztikai elemzés első lépéseként a varianciaanalízissel értékeltem, hogy a vizsgált változók szignifikáns hatással vannak-e az enzimtermelésre. Az analízis eredményeit a 10. számú táblázat tartalmazza.

10. táblázat: Varianciaanalízis eredménye

Faktor	SS	df	MS	F	p
sörtörköly (L)	23,37628	1	23,37628	29,28633	0,005648
sörtörköly (Q)	6,62974	1	6,62974	8,30588	0,044923
élesztő (L)	0,01073	1	0,01073	0,01344	0,913283
élesztő (Q)	0,99080	1	0,99080	1,24129	0,327649
1L by 2L	9,91784	1	9,91784	12,42529	0,024341
Error	3,19279	4	0,79820		
Total SS	43,14135	9			

A varianciaanalízis alapján megállapítható hogy a sörtörköly koncentrációja (a vizsgált tartományban) a 10. napi minták vizsgálatával 95%-os megbízhatósági szinten szignifikáns hatással van. Az élesztőkivonat koncentrációja a statisztikai elemzés alapján nem befolyásolja jelentősen a xilanáz termelést, azonban az sörtörköly és az élesztőkivonat lineáris hatása között szignifikáns kölcsönhatás mutatkozott.

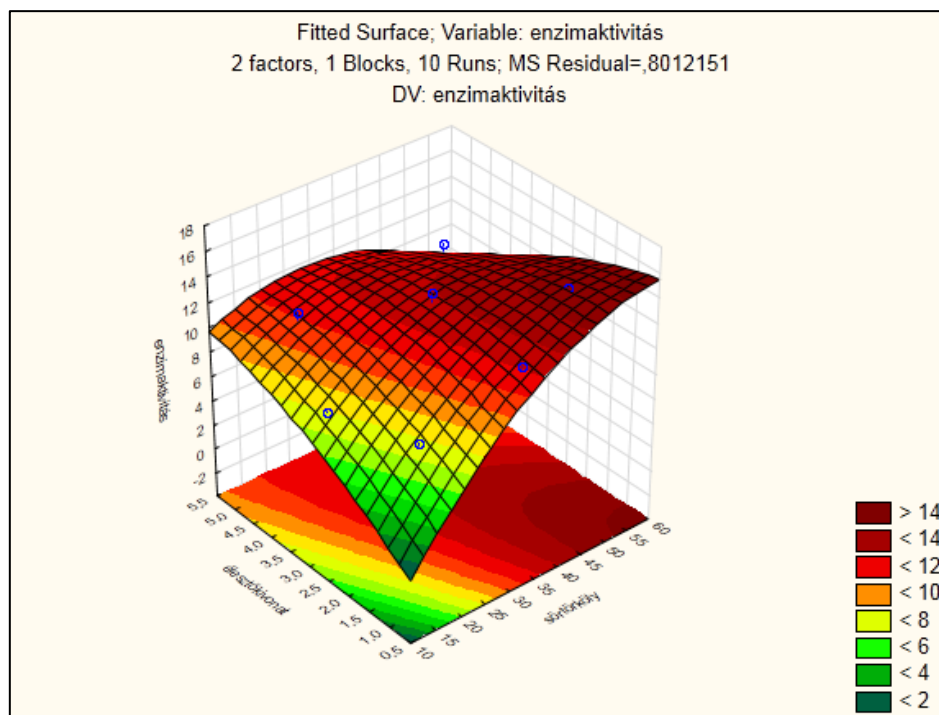
A 10 napos aktivitás értékekre regresszióanalízis segítségével másodfokú polinomot illesztettem, melynek egyenlete:

$$Y = 12,81 + 1,71x_1 - 1,21x_1^2 - 0,04x_2 - 0,47x_2^2 - 1,57x_1x_2$$

A varianciaanalízis eredménye alapján (11. táblázat) megállapítottam a nem szignifikáns hatásokat, mely tagokat elhagyva a következő egyenletet kapjuk:

$$Y = 12,81 + 1,71x_1 - 1,21x_1^2 - 1,57x_1x_2$$

Az eredményként kapott válaszfelület a 11. ábrán látható.



11. ábra: Az enzimaktivitás alakulása a sörtörköly és élesztőkivonat függvényében a becsült modell alapján

Az eredmények alapján megállapítható, hogy a sörtörköly mennyiségének növelésével fokozható az enzimtermelés. Az élesztőkivonat koncentrációjának nem volt szignifikáns hatása a vizsgált tartományban, azonban az alkalmazott sörtörköly és nitrogénforrás között negatív kölcsönhatás mutatkozott. A válaszfelület ábráján látható továbbá, hogy a sörtörköly koncentrációjának növelésével, valamint az élesztőkivonat mennyiségének csökkenésével érhető el nagyobb xilanáz enzimaktivitás.

A maximális aktivitást a 3. pontbeli beállítással értem el, melynél 50 g/l sörtörkölyt és 1,5 g/l élesztőkivonatot használtam.

Az eredményeim alapján ismét felállítottam egy kísérleti tervet, ahol az 50 g/l-nél nagyobb sörtörköly koncentrációt, valamint 1,5 g/l-nél kisebb élesztőkivonat koncentrációt alkalmaztam az enzimtermelés fokozására irányuló kísérletemhez (11. táblázat). Az egyes kísérleti beállításoknál a 10. napon kapott eredményeimet is a 11. táblázatban mutatom be.

11. táblázat: A 2. kompozíció kísérleti terv beállításai és a mért enzim aktivitás értékek

Kísérleti szám	Sörtörköly koncentráció [g/l]	Élesztőkivonat koncentráció [g/l]	Aktivitás [U/ml]
1	50	0,5	15,30
2	50	1	17,41
3	70	0,5	20,00
4	70	1	18,91
5	45,86	0,75	14,83
6	74,14	0,75	13,43
7	60	0,396	19,33
8	60	1,1	19,79
9	60	0,75	17,32
10	60	0,75	13,14

A vizsgált tartományban a statisztikai számításokkal nem sikerült szignifikáns eredményt elérnem, azonban az aktivitás értékek további növekedést mutattak. Az eddigi legjobb aktivitás értékeket 70 g/l sörtörköly, valamint 0,5 g/l élesztőkivonat koncentráció beállítással értem el (20,0 U/ml), azonban a 8. számú beállítással is – 60 g/l sörtörköly és 1,1 g/l élesztőkivonat - közel azonos eredményre jutottam.

Az eredmények alapján megállapítható hogy a vizsgált tartományban sem az élesztőkivonat, sem pedig a sörtörköly koncentrációjának nincs szignifikáns hatása a xilanáz termelésre. Azonban az eredmények alapján megfigyelhető hogy a sörtörköly koncentrációjának optimuma 60-70 g/l között valószínű.

A továbbiakban érdemes lehet az élesztőkivonat helyett más nitrogénforrások hatását vizsgálni az enzimtermelésre.

5.7. A xilanáz enzim aktivitás mérés optimális működési körülményeinek meghatározása

Az enzimaktivitás méréshez optimális pH és hőmérséklet meghatározása céljából egy újabb fermentációt indítottam, a *T. lanuginosus* 288.54 törzsszel, a következő sörtörköly és élesztőkivonat koncentráció beállítással: sörtörköly: 70 g/l; élesztőkivonat: 0,25 g/l. A fermentációt 5,0 ml 24 órás inokulum tenyészzel oltottam be. Az optimális paraméterek meghatározásához a fermentáció 10. napján vett minta szűrletét használtam.

5.7.1. Megfelelő pH kiválasztása

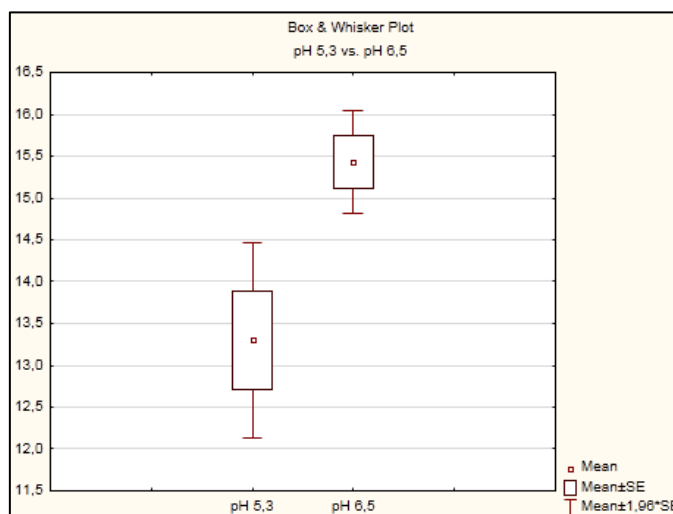
Az enzimaktivitás méréséhez 2 különböző - a szakirodalomban leggyakrabban előforduló – Na-citrát puffert alkalmaztam: pH 6,5 és 5,3.(Bailey et al., 1992; Purkarthofer, 1993)

Először a megfelelő pH puffer kiválasztásával kezdtem a mérést (12. táblázat).

12. táblázat: A pH vizsgálatának eredményei

Minta	pH 5,3	pH 6,5
1	12,9	15,8
2	14,2	16,1
3	11,8	15,0
4	14,3	14,8
Átlag	13,3	15,4

A kísérlet eredményeit kétmintás t-próba segítségével, statisztikailag is megvizsgáltam, a Statsoft Statistica program használatával.



12. ábra: A különböző pH értéken kapott enzimaktivitások eltérésének bemutatása Box & Whiskers ábrázolással

A 12. ábra szemlélteti a két különböző pH-n mért aktivitás értékek különbségét, melyet kétmintás t-próba segítségével statisztikailag is igazolni kívántam (13. táblázat).

13. táblázat: Kétmintás t-próba eredményei

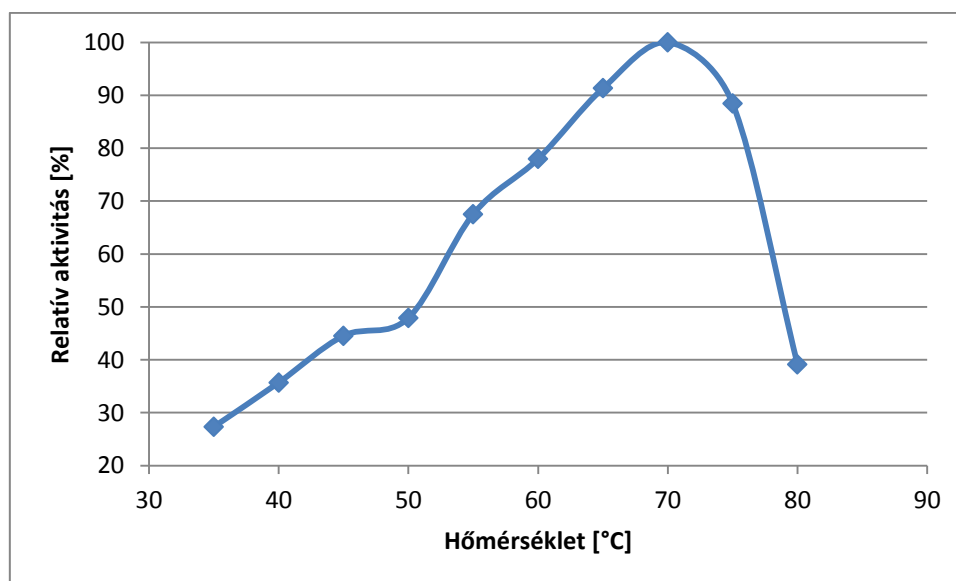
Átlag _{pH 5,3}	Átlag _{pH 6,5}	t	df	p	F (variancia)	p (variancia)
13,3	15,4	-3,17	6	0,019	3,61	0,319

A statisztikai számítások során kétmintás t-próbával vizsgáltam a két minta várható értékét, valamint F-próbával a két minta szórásának azonosságát néztem. A t-próba 95%-os megbízhatósági szinten szignifikáns ($p=0,019$) eredményt adott. A statisztikai próbával bebizonyosodott, hogy a vizsgált pufferek segítségével mért enzimaktivitás szignifikánsan különbözik egymástól. Az F-próba eredménye nem szignifikáns ($p>0,05$), így a nullhipotézist elfogadjuk, vagyis a két minta szórása azonos, így megtartható a t-próba eredménye is.

A pH 6,5-s puffer alkalmazásával közel 16%-os aktivitás-növekedést értem el, így a továbbiakban ezt a puffert használtam az aktivitás mérések során.

5.7.2. Hőmérséklet optimum

Miután beállítottam az optimális pH-t, a következő lépésben az aktivitás méréséhez szükséges optimális hőmérsékletet kerestem. A mérést 35-80 °C tartományban vizsgáltam, 5°C-os léptékekkel. Az eredményeimet a 13. ábrán mutatom be.



13. ábra: A xilanáz aktivitás hőmérséklet optimuma

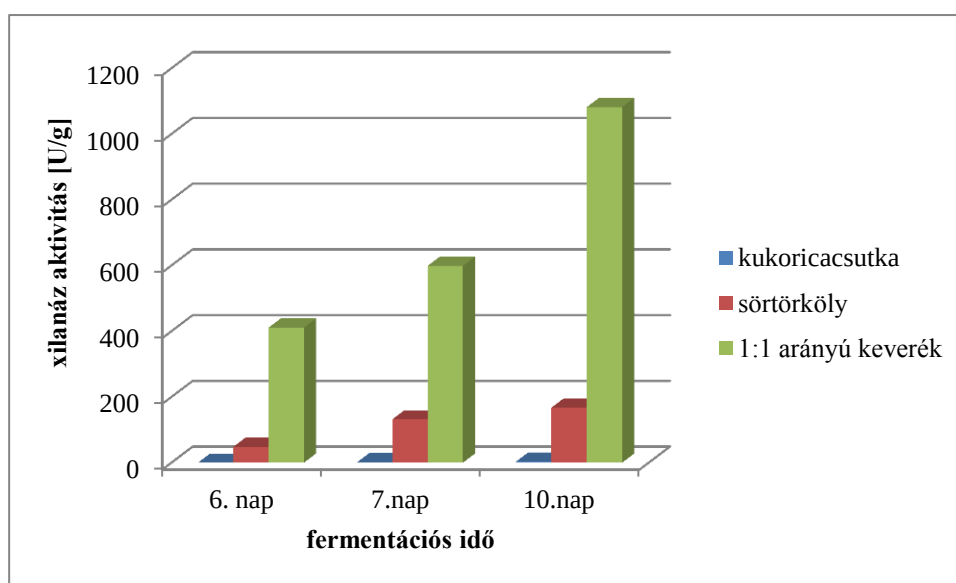
Az ábra jól mutatja, hogy az aktivitás mérés optimális hőmérséklete 70°C. Li és társai (2005) ugyanezt a törzset alkalmazták kutatásukhoz, mely során tisztított xilanáz enzim tulajdonságait is vizsgálták. A hőmérséklet optimumot keresve, szintén a 70°C-on tapasztalták a *T. lanuginosus* CBS 288.54 törzs legnagyobb xilanáz aktivitását.

5.8. Szilárd fázisú fermentáció

A szubmerz fermentációkat követően, a következő kísérlet a szilárd fázisú xilanáz fermentáció megvalósítása volt. A kísérlet során a kukoricacsutka, a sörtörköly illetve a kettő 50-50 százalékos arányú keverékét, mint szubsztrátot, vizsgáltam xilanáz termelés szempontjából. A fermentáció indítása 2 ml 2 napos inokulum tenyésztéssel történt.

Az aktivitás mérése, a fermentáció leállításával jár, így a fermentációt 9 lombikban valósítottam meg, azaz minden egyes mintavételhez az egy lombikban lévő fermentációs közeget használtam fel. A szilárd fázisú fermentáció jellemzésére az aktivitás értékeket U/g mértékegységben számítottam ki.

A *Thermomyces lanuginosus* szilárd fázisú fermentációját három különböző szubsztrátum összeállítással vizsgáltam, xilanáz enzim termelés céljából. A fermentációt a 6, a 7 valamint a 10 napon történő mintavételezéssel követtem, az aktivitás értékeket öt párhuzamos méréssel ellenőriztem, melynek átlagolt értékeit a 14. ábrán mutatom be.



14. ábra: Xilanáz aktivitás alakulása különböző tápközegeken szilárd szubsztrátumú fermentáció során

A diagram (14.ábra) szemléletesen megmutatja az alkalmazott szubsztrátumok közötti különbséget. A legjobb szubsztrátumnak a kukoricacsutka – sörtörköly 50-50%-os keveréke bizonyult. A fermentáció hatodik és tizedik napja között az aktivitás értékek minden esetben fokozatosan növekedtek. A maximális értékeket a fermentáció tizedik napján értem el, ekkor

kukoricacsutkán 3,25 U/g, sörtörkölyön 167,38 U/g, míg keverékükön 1081,63 U/g xilanáz aktivitást mértem.

A kukoricacsutkás közegben a *T. lanuginosus* növekedése is látványosan elmaradt a másik kettő szubsztrátumon növekedőkhöz képest (15. ábra.).



15. ábra: *T. lanuginosus* 5. napos szilárd fázisú fermentáció

A sörtörkölyös szubsztráton már szépen növekedett a *T. lanuginosus*, ami az aktivitás értékekben is megmutatkozik. Azonban a kukoricacsutka és a sörtörköly 50-50%-os keverékének alkalmazása eredményezett kimagasló értékeket. A továbbiakban érdemes lehet, egyéb xilán tartalmú alapanyagok keverékét vizsgálni xilanáz termelés szempontjából. Sonia munkatársaival (2005) kutatásai során a következő szilárd szubsztrátumokat vizsgálták, *Thermomyces lanuginosus* xilanáz termelésének szempontjából: földimogyoróhéj, rizsszalma, búzakorpa, juta szálak, búzaszalma, valamint cirok szalma. A legalkalmasabbnak a cirok szalma bizonyult, mely alkalmazásával kimagasló aktivitás értékeket értek el (10145 U/g). A sörtörköly alapú szilárd fázisú fermentációval hasonló eredményt értem el (167 U/g) mint amit földimogyoróhéj alkalmazásával mértek (164 U/g). A sörtörköly és kukoricacsutka keverék alapú fermentáció (1081 U/g) már hatásosabb szubsztrátnak bizonyult, mint a juta szálak (402 U/g).

5.9. Szubmerz és szilárd fázisú fermentáció összehasonlítása

Kísérleteim során, szubmerz és szilárd fázisú fermentációkat egyaránt sikeresen megvalósítottam a *Thermomyces lanuginosus* CBS 288.54 törzs alkalmazásával. A két módszer eredményeit összevetve megfigyelhető, hogy a legjobb aktivitás értékeket a fermentáció tizedik napján értem el, a rövidebb ideig tartó fermentációk jelentősen alacsonyabb eredményeket mutatnak. Így gazdasági szempontból nem tudunk a fermentációs idő lerövidítésével költséget csökkenteni, ehelyett érdemes kiválasztani azt a fermentációs technológiát, amellyel a lehető legjobb enzimtermelést érhetünk el.

A kísérleteim során a *T. lanuginosus* CBS 288.54 törzsével végzett fermentációk aktivitás értékeinek összehasonlítását a 14. táblázatban mutatom be.

14. táblázat: *T. lanuginosus* CBS 388.54 törzzsel végzett szubmerz és szilárd fázisú fermentációk összehasonlítása

	Szubmerz	Szilárd szubsztrátumú
Kukoricacsutka	3,06 U/ml	3,25 U/g
Sörtörköly	7,51 U/ml	167,38 U/g
Sörtörköly-kukoricacsutka	-	1081,63 U/g
Sörtörköly-élesztőkivonat	20 U/ml	-

Az aktivitás értékek alapján kimagasló eredményt értem el a sörtörköly és a kukoricacsutka keverékével szilárd fázisú fermentáció során. Szubmerz fermentációk során az alacsony élesztőkivonat (0,5 g/l), és a magas (70 g/l) sörtörköly koncentrációval értem el a legjobb eredményeket, az aktivitás mérés optimális paramétereinek beállításával pedig további aktivitás növekedést értem el.

Összeségében elmondható, hogy a *Thermomyces lanuginosus* CBS 288.54 törzzsel a kezdeti 4 U/ml xilanáz aktivitás a tápközeg optimalizációs kísérletek eredményeként szubmerz fermentációnál 5-szoros aktivitás növekedést eredményezett.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A *Thermomyces lanuginosus* termofil fonalas gomba számos enzim – köztük a xilanáz - szintézisére képes, melyek széleskörűen alkalmazhatók a különböző iparágakban. A xilanáz enzim hatásmechanizmusát tekintve a xilán poliszacharidból - melyet a növényi rostok nagy százalékban tartalmaznak - a xilobióz mellett, 5 szénatomos xilóz egységeket szabadít fel. Ez a monoszacharid bizonyos élesztők segítségével etil-alkohollá fermentálható, majd a fermentlé lepárlása után bioetanolként hasznosítható. A xilanáz, papíripari alkalmazásán túl, tehát fontos szerepet játszhat a környezetvédelemben, különböző melléktermékek hasznosításával, valamint a bioetanol előállításában is az összetett szénhidrátok lebontásával.

A munkám során a *T. lanuginosus* xilanáz termelését vizsgáltam különböző fermentációs kísérletek során, olyan nagy mennyiségben képződő ipari mellékterméknek alkalmazásával, melyek élelmiszeriparban felhasználásra már nem kerülnek, pl. kukoricacsutka, sörtörköly. A xilanáz aktivitás mérése xilán szubsztrátumból az enzimreakció során felszabadult xilóz mennyiségi meghatározásán alapul, melyet Somogyi-Nelson módszerrel valósítottam meg. Ismert koncentrációjú xilóz oldatokból elkészítettem egy kalibrációs egyenest, mely segítségével számolható az aktivitás.

A rendelkezésemre álló 12 *T. lanuginosus* törzs vizsgálata során bebizonyosodott, hogy mindegyik, bár eltérő mennyiségben, de képes a xilanáz enzim szintézisére. Rangsoroltam őket xilanáz termelésük szempontjából kukoricacsutka alapú szubmerz fermentáció során, ami alapján a *T. lanuginosus* IMI 131010 törzs bizonyult a leghatékonyabb termelőnek, a CBS 288.54, az ATCC 44008 és a CBS 395.62 törzsek előtt.

Ezt követően egy a sörgyártás során keletkezett mellékterméknek, a sörtörkölynek vizsgáltam az alkalmazhatóságát xilanáz fermentációkhoz. A négy legjobb termelőképességű törzset alkalmaztam ennek kiderítéséhez. Mind a négy törzsszel sikeres volt a fermentáció, közülük a CBS 288.54 törzs mutatta a legnagyobb aktivitást. A sörtörkölyön elért maximális enzimaktivitás 7,5 U/ml, míg kukoricacsutka esetén a CBS 288.54 törzsszel csupán 3 U/ml értéket kaptam. A kukoricacsutkán az IMI 131010 törzsszel kapott maximális érték (5,4 U/ml) is elmarad a sörtörkölyön végzett fermentáció eredményeitől.

A továbbiakban központi kompozíciós kísérleti tervet alkalmaztam az enzimtermelés szempontjából optimális szén és nitrogénforrás koncentrációnak meghatározására. A kísérletek során a legjobb eredményt a következő beállítással értem el: sörtörköly

koncentráció: 70 g/l; élesztőkivonat koncentráció: 0,5 g/l. A varianciaanalízis alapján megállapítható hogy a sörtörköly koncentrációja (a vizsgált tartományban) a 10. napi minták vizsgálatával 95%-os megbízhatósági szinten szignifikáns hatással van az enzimtermelésre. Az élesztőkivonat koncentrációja a statisztikai elemzés alapján nem befolyásolja jelentősen a xilanáz termelést, azonban a sörtörköly és az élesztőkivonat lineáris hatása között szignifikáns kölcsönhatás mutatkozott.

A szén- és nitrogénforrás mennyiség optimalálása után az enzimműködés megfelelő környezeti paramétereit vizsgáltam. Az aktivitás mérése pH 6,5 környezetben, 16%-kal nagyobb aktivitást eredményezett, mint pH 5,3 értéken. Megállapításomat kétmintás t-próba segítségével, statisztikailag is megvizsgáltam és igazoltam. Az optimális hőmérséklet vizsgálatánál a legmagasabb aktivitás értéket 70 °C –os hőmérsékleten mértem.

Végül pedig a kukoricacsutkán és sörtörkölyön, valamint keverékükön valósítottam meg szilárd fázisú fermentációt. Eredményeimnek köszönhetően bebizonyosodott, hogy a *T. lanuginosus* CBS 288.54 törzse alkalmazható erre a célra, ezen felül jobb eredményeket értem el, mint szubmerz fermentációk során. A legjobb szubsztrátumnak a kukoricacsutka – sörtörköly 50-50%-os keveréke bizonyult. A maximális értékeket a fermentáció tizedik napján értem el, ekkor kukoricacsutkán 3,25 U/g, sörtörkölyön 167,38 U/g, míg keverékükön 1081,63 U/g xilanáz aktivitást mértem.

A továbbiakban érdemes lehet a szilárd fázisú fermentáció összetételének optimalálása, valamint egyéb szubsztrátumok, illetve azok keverékeit vizsgálni enzim termelésük szempontjából.

IRODALOMJEGYZÉK

- Aliyu, S. and Bala, M. (2010):** Brewer's spent grain: A review of its potentials and applications. *African Journal of Biotechnology*. 10: 324-331
- Bailey, M. J., Biely, P., Poutanen, K., (1992):** Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*, 23: 257-270
- Beg, Q. K., Kapoor, M., Mahajan, L., Hoondal, G. S. (2001):** Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 56: 326–338
- Deutschmann, R., Dekker R.F.H. (2012):** From plant biomass to bio-based chemicals: Latest developments in xylan research. *Biotechnology Advances* 30: 1627–1640
- Dutta, T., Sengupta, R., Sahoo, R., Sinha Ray, S., Bhattacharjee, A., Ghosh, S. (2007):** A novel cellulase free alkaliphilic xylanase from alkali tolerant *Penicillium citrinum*: production, purification and characterization: *Appl. Microbiol.* 44: 206-211
- Fournier, R., Frederick, M.M., Frederick, J.R., Reilly, P.J. (1985):** Purification and characterization of endo-xylanases from *Aspergillus niger*. III. an enzyme of pI 3.65. *Biotechnol. Bioeng.* 27: 539-546
- Gupta, S., Bhushnan, B., Hoondal, G.S. (2000):** Isolation, purification and characterization of xylanase from *Staphylococcus* sp. SG-13 and its application in biobleaching of kraft pulp. *J. Appl. Microbiol.* 88: 325-334
- Kim, D.; Han, M.; Oh, H.; Park, D.; Kim, S.; Lee, S.; Shin, D.; Son, K.; Bae, K.; Park, H. (2010):** Catalytic properties of a GH10 endo-beta-1,4-xylanase from *Streptomyces thermocarboxydus* HY-15 isolated from the gut of *Eisenia fetida*. *J. Mol. Catal. B* 62: 32-39
- Kemény, S., Deák, A., Komka, K., Vágó, E. (2011):** Hogyan használjuk a STATISTICA programot? Kiadó: Perfact-Pro Kft.
- Kulkarni, N., Shendye, A., Rao, M. (1999):** Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews* 23: 411-456
- Lin, J., Ndlovu, L.M., Singh, S., Pillay, B. (1999):** Purification and biochemical characteristics of beta-D-xylanase from a thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus* – SSBP. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 30: 73-79

- Lo, Y.C., Lu, W. C., Chen, C. Y., Chang, J. S. (2010):** Dark fermentative hydrogen production from enzymatic hydrolysate of xylan and pretreated rice straw by *Clostridium butyricum* CGS5. *Bioresource Technology* 101: 5885–5891
- Mandalari, G., Bisignano, G., Lo Curto, R.B., Waldron, K.W., Faulds, C.B. (2007):** Production of feruloyl esterases and xylanases by *Talaromyces stipitatus* and *Humicola grisea* var. *thermoidea* on industrial food processing by-products. *Bioresource Technology* 99: 5130–5133
- Mussatto, S.I., Dragone, G., Roberto, I.C. (2006):** Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. *Journal of Cereal Science*, 43: 1-14
- Nguyen, Q. D., Bujna, E., Á. Hoschke, Rezessy-Szabó., J. M. (2011:)** Thermophilic Fungus *Thermomyces lanuginosus*: Current Review on Potential Source for Thermostable Enzymes. Chapter II. In: *Biotechnology of Microbial Enzymes*. Editors: Vijai Kumar Gupta et al. Nova Science Publishers, Inc. ISBN: 978-1-62100-131-7 pp. 21-56
- Polizeli, M. L. T. M., Rizzatti, A. C. S., Monti, R., Terenzi, H. F. J., Jorge, A., Amorim, D. S. (2005):** Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 67: 577–591
- Poutanen, K., Rättö, M., Puls, J. and Viikari, L. (1987):** Evaluation of different microbial xylanolytic systems. *Journal of Biotechnology*. 6: 49-60
- Purkharthofer, H., Sinner, M. and Steiner, W. (1993):** Cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus*: Optimization of production in submerged and solid-state culture. *Enzyme Microb. Technol.* 15: 677-682
- Saripan, A. F., Reungsang, A. (2013):** Biohydrogen production by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* KKU-ED1: Culture conditions optimization using xylan as the substrate. *International Journal of Hydrogen Energy* 38: 6167-6173
- Szendefy, J. (2005):** Xilanáz enzimek előállítása szilárd fázisú fermentációval és papíripari hasznosításuk (Phd értekezés)
- Shallom, D. and Shoham, Y. (2003):** Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology* 6: 219–228
- Singh, S., Madlala, A. M., Prior, B. A. (2003):** *Thermomyces lanuginosus*: properties of strains and their hemicellulases. *FEMS Microbiology Reviews*. 27: 3-16

Smith, W.A., Thompson, D.N., Thompson, V.S., Radtke, C.W., Carter, B. (2009): Assessment of xylanase activity in dry storage as a potential method of reducing feedstock cost. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 154, 108-122

Sonia, K.G., Chadha, B.S., Saini, H.S. (2005): Sorghum straw for xylanase hyper-production by *Thermomyces lanuginosus* (D₂W₃) under solid-state fermentation. *Bioresource Technology* 96: 1561–1569

Stephens, D.E., Rumbold, K., Permaul, K., Prior, B.A., Singh, S. (2007): Directed evolution of the thermostable xylanase from *Thermomyces lanuginosus*. *J. Biotechnol.* 127: 348-354

Su, Y., Zhang, X., Hou, Z., Zhu, X., Guo, X. and Ling, P. (2011):Improvement of xylanase production by thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* SDYKY-1 using response surface methodology. *New Biotechnology*, 28: 40-46

Vogel, H.J. (1956): A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). *Microb. Genet. Bull.* 13: 42-43

Internetes hivatkozások:

BRENDA enzim információs adatbázis: <http://www.brenda-enzymes.org/>

Fungal Genomics Project: <http://fungalignomics.concordia.ca/>

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, Bujna Erika Tanárnőnek a segítséget és a felkészítést a dolgozatom megvalósításához, valamint a Sör- és Szeszipari Tanszék munkatársainak, akikhez bármikor fordulhattam hasznos tanácsért.