



Sör- és Szeszipari Tanszék

Bioetanol előállítás lehetőségének tanulmányozása sörtörköly felhasználásával

TDK dolgozat

Krisán Ágnes Olga

III. évf. BSc hallgató

Témavezető:

Dr. Kun Szilárd

egyetemi adjunktus

**Budapest
2013.**

Tartalomjegyzék

1.	BEVEZETÉS	2
2.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
2.1	Elsőgenerációs bioetanol előállítási lehetőségei	6
2.2	Második generációs bioetanol előállítási lehetőségei	6
2.2.1	Előkezelés	8
2.2.2	Enzimes hidrolízis.....	10
2.2.3	Fermentáció.....	11
2.2.4	Desztilláció.....	11
2.3	Cellulóz alapú bioetanol előállítás sörtörköly felhasználásával.....	12
2.3.1	Sörtörköly.....	12
2.3.2	Sörtörköly bioetanol célú felhasználása.....	13
3.	MUNKA CÉLJA.....	16
4.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	17
4.1	Alkalmazott anyagok.....	17
4.1.1	Sörtörköly.....	17
4.1.2	Előkezeléshez alkalmazott mérőoldatok	17
4.1.3	Enzimek	17
4.2	Első kísérletsorozat - Előkezelések optimalizálása.....	18
4.3	Második kísérletsorozat – Enzimes hidrolízis és erjesztés.....	21
4.4	Harmadik kísérletsorozat – Cefrekonzentráció optimalizálása.....	21
4.5	Alkalmazott módszerek	23
4.5.1	Oldható extrakttartalom meghatározása cefrézéssel	23
4.5.2	Redukáló cukortartalom meghatározása - BCA módszer	23
4.5.3	Szénhidráttartalom meghatározása - HPLC	24
5.	KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE	26
5.1	Oldható extrakttartalom meghatározása cefrézéssel	26
5.2	Előkezelési vizsgálatok eredményei	27
5.2.1	Autoklávos előkezelések eredményei	27
5.2.2	Mikrohullámú kezelések eredményei	31
5.2.3	190°C-os kezelés eredményei	35
5.3	Második kísérletsorozat eredményei – enzimes hidrolízis és erjesztés eredményei.....	36
5.4	Harmadik kísérletsorozat – cefrekonzentráció optimalizálás eredményei.....	41
6.	KÖVETKEZTETÉSEK	43
7.	ÖSSZEFOGLALÁS.....	44
8.	FELHASZNÁLT IRODALOM.....	46

1. BEVEZETÉS

A bioüzemanyagok használatának ötlete nem új keletű. Nicolaus August Otto 1876-ban megalkotott első négyütemű Otto-motorjainak üzemanyaga is alkohol volt. Henry Ford 1925-ben a „jövő üzemanyagának” nevezte az etanolt: „A jövő üzemanyagát az utak mentén növő szömörce terméséből, almából, magvakból, fűrészporból – szinte mindenből elő lehet majd állítani. Minden fermentálható növényi rész potenciális üzemanyag.” (<http://hempcar.org/ford.shtml>) Arra számított, hogy a mezőgazdasági termékekből előállított etanol lesz a fő üzemanyaga a járműveknek.

A biodízel felhasználásának gondolata Rudolf Dieseltől, a dízelmotor feltalálójától származik. 1912-ben Diesel ezt írta: „A növényolaj üzemanyagként történő használata ma még jelentéktelen. Idővel azonban ezek a termékek ugyanolyan fontosak lesznek, mint a benzin és a kátrány termékek.”

(http://www.mtk.nyme.hu/fileadmin/user_upload/szti/biomotion/biofuels_in_hungary.pdf)

Az etanolt sokáig csak oktánszámnövelő üzemanyag-adalékként használták, a kőolajalapú nyersanyagok kedvező ára és a rendelkezésre álló nagy mennyisége miatt. A hetvenes években kirobbanó kőolajválság következtében egyre nagyobb érdeklődés mutatkozott a bioüzemanyagok iránt. A hirtelen áremelések miatt egyre sürgősebbé vált mindenki számára az alternatív üzemanyagok fejlesztése. Brazíliában ekkor indult be a Pró álcool program.

A népesség növekedésével, a környezetvédelem előtérbe kerülésével, a fosszilis energiahordozók kimerülésével egyre nagyobb szerephez jutnak a megújuló energiaforrások. Az egyik lehetséges megújuló energiaforrás a bioetanol, melyet mezőgazdasági termékekből és melléktermékekből állítanak elő. Ezek a termékek keményítő-, illetve cukortartalmú növények, valamint fás szárú növények lehetnek. Manapság a mezőgazdasági hulladékokat – cellulóz tartalmú anyagok – is fel tudják használni ilyen célokra, ezzel is javítva a gazdasági tényezőket és csökkentve a környezeti terhelést. Az elmúlt években a mezőgazdasági termékekre és melléktermékekre alapozott termelés elérte a megfelelő technológiai színvonalat, ennek következtében a bioetanol gazdaságilag is reális alternatívává lépett elő a kőolajtermékek mellett. A legfőbb bioetanol termelő országok az Amerikai Egyesült Államok és Brazília, a 2009-es és 2010-es években a világ bioetanol termelésének megközelítőleg 90%-át adták (<http://ethanolrfa.org/pages/World-Fuel-Ethanol-Production>). Az előbbi kukoricából, az utóbbi pedig cukornádból állítja elő a bioetanol. Magyarországon kukoricából történik az előállítás és a kész bioetanol vagy bioüzemanyagként használják, vagy éter és izobutilén hozzáadásával etil-tercier-butilétert (ETBE) állítanak elő, melyet oktánszámnövelőként hasznosíthatnak. A bioetanol optimális bekeverési aránya 85:15 (benzin:bioetanol). Anélkül, hogy a motor károsodna 80:20-as

arányig lehet elmenni. Mivel a bioetanol energiatartalma kevesebb, mint a benziné – 1 liter etanol 0,65 liter benzinnel egyenértékű –, így nagyobb mennyiséget kell felhasználni belőle. Viszont alacsonyabb üzemi hőmérsékleten működik, ennek köszönhetően a motor élettartama hosszabb lesz. Bioetanol alkalmazásakor kisebb a szén-monoxid és kén-dioxid emisszió, mint a benzinnél. (Varga-Erdei, 2011)

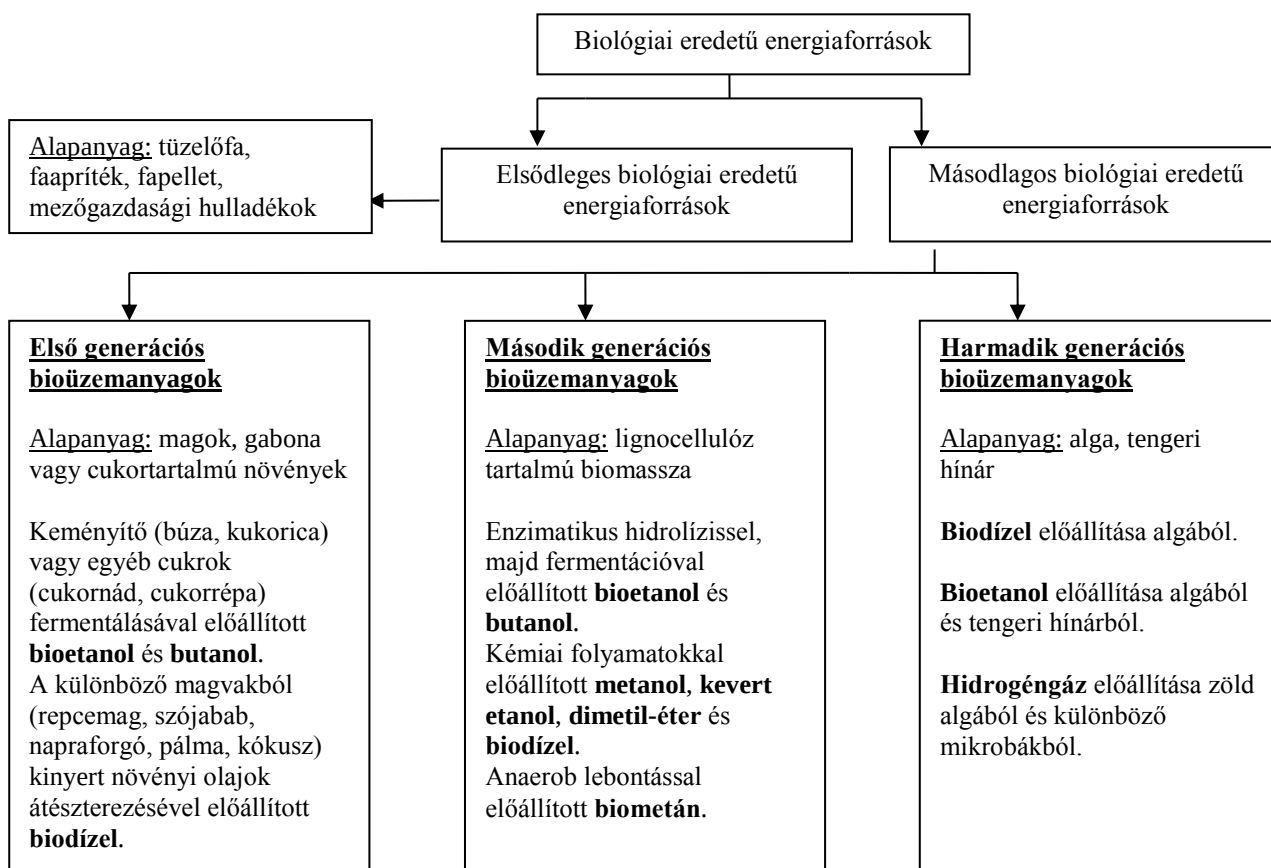
A bioüzemanyag termelés 1980 és 2005 között évi 4,4 millió literről 50,1 millió literre növekedett (Varga-Erdei, 2011). Az Európa Tanács 2007-ben támogatta annak az elfogadását, hogy 2020-ra az európai uniós tagállamok teljes energia fogyasztásának 20%-a megújuló energiaforrásból származzon.

A fentiek figyelembevételével, olyan a söriparban felmerülő mellékterméket kívántam kísérleteimben felhasználni, amely nagy mennyiségben áll rendelkezésre és nyersanyagként szolgálhat bioetanol előállítására.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A biomasszából előállított bioetanol, több mint 98,5% etil-alkoholt tartalmazó, nem denaturált termék (2003/30/EK irányelv), melyet biológiailag megújuló energiaforrásokból nyernek. A bioetanol üzemanyagként történő alkalmazásának különböző lehetőségei vannak: közvetlenül, speciális vagy módosított motorokban (Brazília, Svédország); különböző arányban keverve – benzinnel vagy éter üzemanyag adalékként (Fogarassy, 2001). A biológiai eredetű energiaforrásokat többféleképpen is csoportosíthatjuk. Halmazállapotuk szerint megkülönböztetünk gáz (hidrogén, metán), folyékony (bioetanol, biodízel, metanol) és szilárd (faapríték, fapellet) bioüzemanyagokat és fűtőanyagokat egyaránt (Demirbas, 2008).

Egy másik lehetséges csoportosítás szerint megkülönböztetünk elsődleges és másodlagos biológiai eredetű energiaforrásokat. Az elsődleges biológiai eredetű energiaforrásokat elektromos áram előállítására és fűtésre használják. Ezt az energiaforrást tüzelőfa, faapríték, fapellet, illetve különböző mezőgazdasági hulladékok elégetésével kapják.



1. ábra: A biológiai eredetű energiaforrások és bioüzemanyagok csoportosítása (Nigam és Singh, 2011.nyomán)

A másodlagos biológiai eredetű energiaforrásokat, bioüzemanyagokat további csoportokra oszthatjuk különböző szempontok alapján. Az 1. ábrán látható csoportosítás elsősorban az előállításához használt alapanyag és előállítási technológia alapján történt.

Az 1. táblázatban bemutatott csoportosítás pedig a bioüzemanyagok felismerésének és alkalmazásba vételének időrendje szerint történt.

1. táblázat: Bioüzemanyagok csoportosítása felismerésük és alkalmazásba vételük időrendje szerint (Hancsók *et al.*, 2006)

Első	Második	Harmadik	Negyedik
Generáció			
▪ Bioetanol ▪ Növényolajok ▪ Biodízelek ▪ Előzőek + kőolajalapú hajtóanyagok elegyei	▪ Biogázolajok (növényolajok izomerizáló hidrogénezése) ▪ Bioetanol lignocellulózból ▪ Stb.	▪ Szintetikus benzin és gázolaj (szintézisgázból) ▪ Bio- motorhajtóanyagok szintézisgázból ▪ Bioparaffinok szénhidrátokból ▪ Dimetil-éter ▪ Stb.	▪ Biohidrogén ▪ Biometanol ▪ Bioelektromos áram (közvetett módon energia-telepekhez) ▪ Stb.

A biofuel gyártás alapanyagai túlnyomórészt mezőgazdasági termények. Európában kukoricát, búzát és cukorrépát, Észak-Amerikában kukoricát és a búzát, de Ázsiában a batátát és a rizst, míg Afrikában a kasszavát is használják (Wheals *et al.*, 1999). A keményítőből – a gabonafélék és a kukoricakeményítő tartalma 60-75% - történő bioetanol előállítás technológiája széles körben elterjedt, főként Dél-Amerikában, élelmiszerhiányt, drágulást, éhínséget okozva. Ezen problémák miatt új megoldást kerestek a megújuló bioetanol gyártás terén. A bioetanol termelés számára a mezőgazdaság – a lignocellulóz tartalmú hulladékaival –, az élelmiszer- feldolgozás és az erdészet biztosíthatnak erjeszthető szénhidrát alapanyagokat.

Skóciában a sörfőzdék és a szeszfőzdék által termelt törköly, mint potenciális biomassza forrás került előtérbe a bioetanol termelés tekintetében. A cefretörkölyt eddig csak állati takarmányozásra használták. A törköly gazdag lignocellulóz forrás, amely átalakítható erjeszthető cukorrá a bioetanol előállításához. A cefrézett árpamaláta 80%-a sejtfal anyag, a fennmaradó rész főként fehérje. A sejtfal anyagának 16,8-21,9%-a cellulóz, 28,4-29,6%-a hemicellulóz és 21,7-23,0%-a savoldó lignin. A hemicellulóz frakció igen érzékeny a magas hőmérsékletre és a savas

kezelésekre. Az autohidrolízis legfeljebb 190°C-os hőmérsékleten eredményezi a hemicellulózok átalakítását oldott xilo-oligoszacharidokká (Carvalho *et al.*, 2004).

2.1 Elsőgenerációs bioetanol előállítási lehetőségei

Az alapvető különbség az első- és második generációs bioetanol előállítási technológiák között a felhasznált növényi alapanyagban van. Az elsőgenerációs bioetanol cukor, illetve keményítő alapú terményekből, míg a második generációs bioetanol cellulóz tartalmú növényi részekből készül. A cukor alapú bioetanol előállítás során – a cukorrépa és a cukornád esetében – először felaprítják a nyersanyagot, cefrét készítenek, amit élesztő hozzáadásával irányított körülmények között erjesztenek alkohollá. A keményítő alapú előállításnál – a gabonafélék és a kukorica esetében – mindenekelőtt a keményítőt cukorrá kell bontani, utána lehet a cukrot alkohollá fermentálni. Ehhez enzimes hidrolízist alkalmaznak, ahol ideális körülményeket biztosítanak az enzim optimális működéséhez, így a megfelelően feltárt, felaprított nyersanyag keményítő tartalma először elfolyósodik, majd cukrosodik.

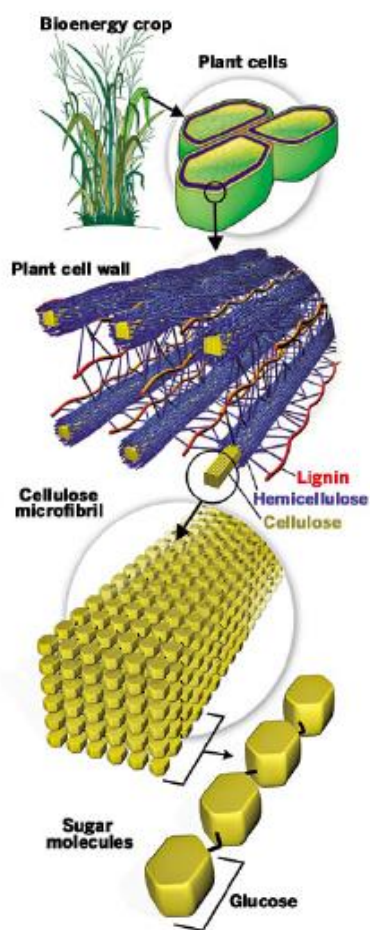
2.2 Második generációs bioetanol előállítási lehetőségei

Az elsőgenerációs technológiával szemben itt nem élelmezési célra is felhasználható termények az alapanyagai az előállításnak, hanem cellulóztartalmú növényi részek. Cellulóztartalmú alapanyagok lehetnek gabonaszárak, rostok, vagyis mezőgazdasági növényi hulladékok, illetve faforgács, újságpapír, faapríték is. Termelnek úgynevezett energianövényeket közvetlenül ilyen célra, illetve keresik az ipari és a lakossági szilárd hulladék alapú bioetanol gyártás megoldását. Ez javíthatja a technológia versenyképességét a fosszilis üzemanyagokkal szemben.

A lignocellulóz a legnagyobb mennyiségben előforduló biopolimer, mely a növények szerkezeti anyagának fő komponense. A főtömegét három fő polimer adja: cellulóz (szárazanyag 45%-a), hemicellulóz (szárazanyag 30%-a) és lignin (szárazanyag 25%-a) (2. ábra).

A cellulóz egy poliszacharid, mely β -D-glükóz egységekből épül fel. Szerkezetileg egyenes láncú polimer, mely 500-15000 glükóz egységből áll, ahol is a glükóz egységek β -1,4-es glikozidos kötéssel kapcsolódnak egymáshoz. Ismétlődő alapegysége a cellobióz diszacharid. A láncok között létrejövő Van der Waals kötések következtében különböző kristályos formák jönnek létre. A kristályos szálak egy oldhatatlan polimerbe vannak beágyazva, emiatt a cellulóz hidrolitikus

enzimek számára csak nehezen hozzáférhető. Az előkezelt cellulóz enzimatikus úton lebontható glükózra, amiből a továbbiakban etanol nyerhető.

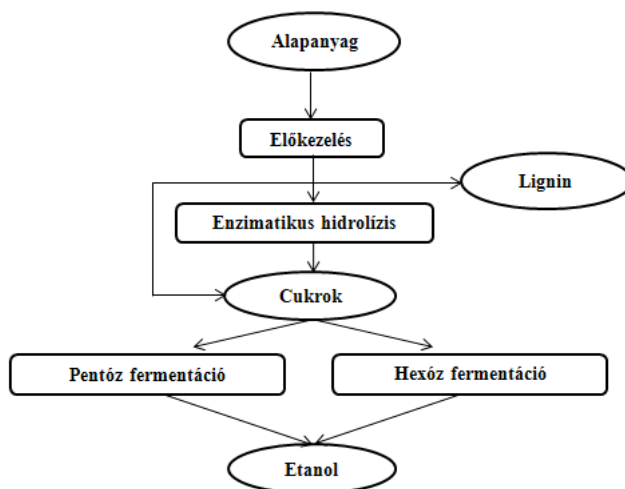


A hemicellulóz egy gyűjtőnév, mely kémiaiilag nem egységes heteropoliszacharidokat takar, amelyekben a monomerek különféle pentóz, ill. hexóz cukrok (pl. xilóz, mannóz, galaktóz, rhamnóz, arabinóz, glükóz, stb.) lehetnek, melyek aránya fajonként és növényi részenként változik. A hemicellulózok láncá rövidebb, mint a cellulózé, viszont nagyszámú oldallánccal rendelkezik a fővázon, így kevésbé kristályos, reaktív makromolekulák. Legfőbb alkotóelemei az L-arabinóz, D-galaktóz, D-glükuronsav, D-mannóz és D-xilóz, ezen kívül még L-fruktóz, L-rhamnóz és L-galaktóz is megtalálható oldalláncaiban. Idetartoznak a xilánok, xiloglükánok, mannánok, β -glükánok és az arabinogalaktánok. Lebontásához előkezelés szükséges.

A lignin fenil-propán alegységekből felépülő rendkívül változatos aromás polimerek gyűjtőneve. Három fő alkotóeleme van: fenil-propán származék p-kumaralkohol, koniferilalkohol és szinapil-alkohol monomerek. A nem- fosszilis szerves szén körülbelül 30%-a lignin formájában van jelen.

A lignin növeli a növény ellenálló képességét a mikrobiológiai behatásokkal szemben, gátolja a hidrolízist végző enzim működését, növeli a reakcióelegy sűrűségét és viszkozitását.

2. ábra: A lignocellulóz felépítése (Mádainé és Bokányi, 2013)



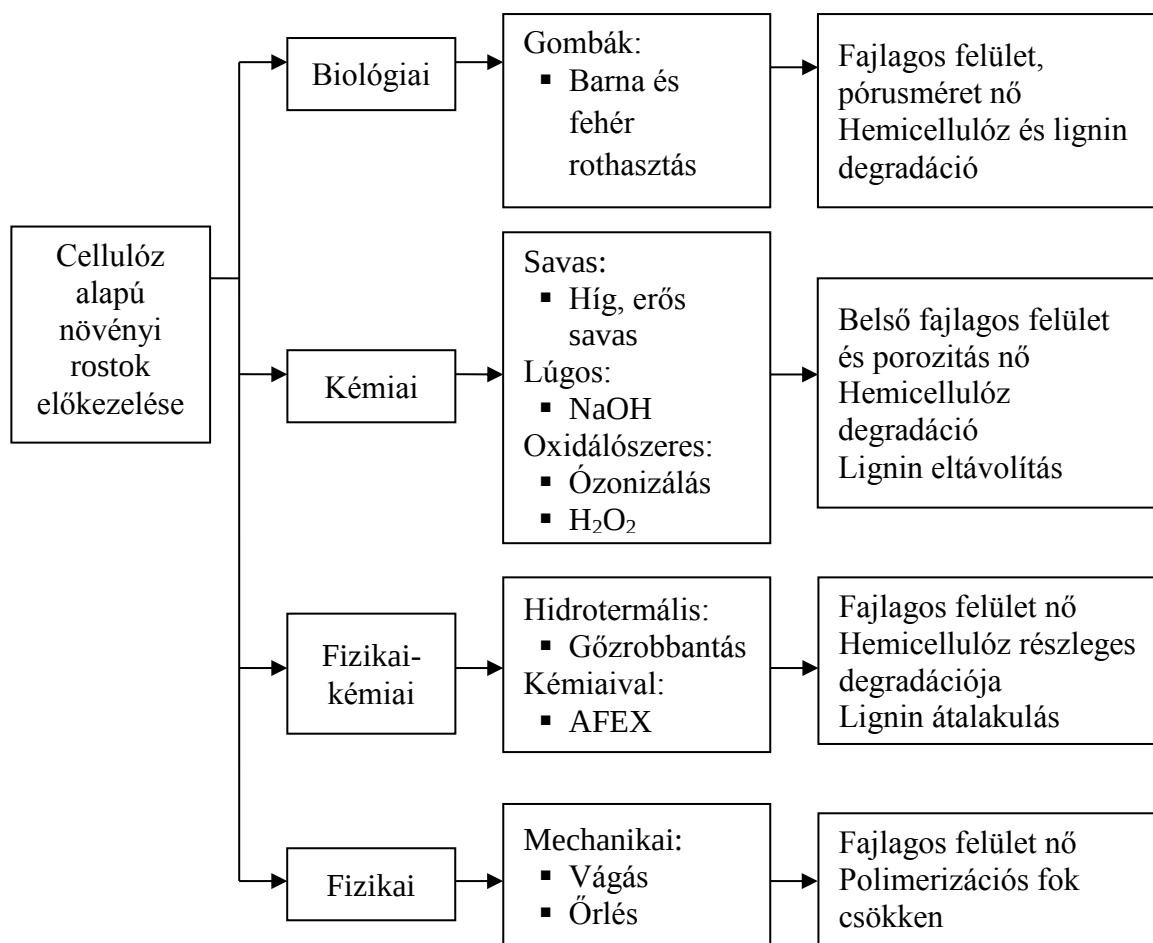
3. ábra: A lignocellulóz alapú bioetanol előállítás folyamata (Keshwani és Cheng, 2009 nyomán)

A második generációs eljárás jóval összetettebb, mint az első. Alapvetően négy fő lépésből áll. Melyek az előkezelés, az enzimes hidrolízis, a fermentálás és végül a desztillálás. A 3. ábra a lignocellulóz alapú bioetanol előállítás folyamatát mutatja be.

2.2.1 Előkezelés

Az első lépés a nyersanyagok előkezelése, ezzel csökkentve a természetes ellenálló képességet. A eljárások célja, hogy a lignocellulóz biomassa szerkezetét megbontva hozzáférhető legyen a cellulóz és a hemicellulóz a ligninnel alkotott komplexből. Az ideális előkezelés minimalizálja a cukrok degradációját és nem igényel drága, különleges reaktorokat. A lignint az eltávolítás után elégetik, így biztosítják a hőenergiát a technológiához, így csökkentve a szén-dioxid kibocsátást a folyamat egészére nézve (Donghai *et al.*, 2006).

A 4. ábra a legelterjedtebb előkezelési eljárásokat foglalja össze Talebnia és munkatársai (2010) nyomán.



4. ábra: A leggyakoribb előkezelési eljárások és lehetséges hatásaik

Első lépésben általában fizikai előkezelés történik – aprítás, őrlés (Keshwani és Cheng, 2009). A méret csökkentésével a fajlagos felület megnő, így jobban hozzáférhetővé válik a biomassa.

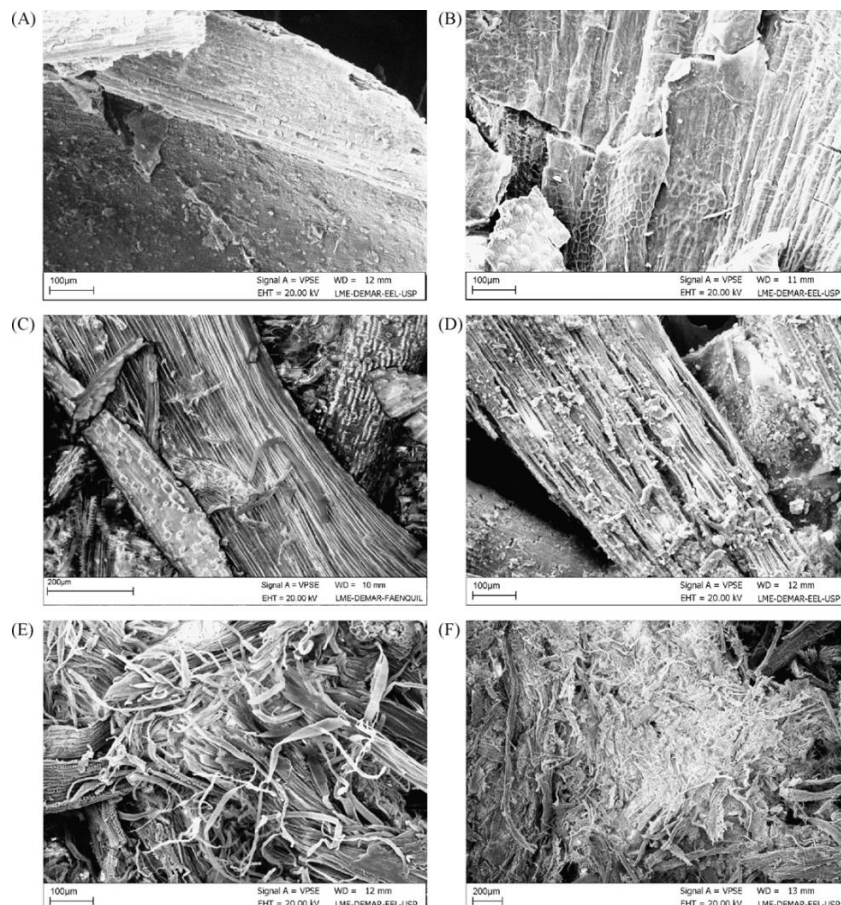
Széles körben ismert előkezelési eljárás a híg savas kezelés, az alacsony költségének és a hatékonyságának köszönhetően (Sipos, 2010). Használják lúgos hidrolízist is, mely során a molekulák közötti észter kötések bomlanak fel a lúg hatására, így xilán, hemicellulóz és biopolimer molekulák szabadulnak fel a lignocellulózból (Varga-Erdei, 2011).

Előkezelési célokra alkalmaznak még gőzrobbantást is, sőt ez a legelterjedtebb. Ebben az esetben 160-270°C-os telített vízgőzzel kezelik a biomasszát. Az ilyen hőmérsékletű telített vízgőz nyomásértéke 0,7-5 MPa között mozog. Van olyan eset is, amikor a gőzhöz még kénsav, kén-dioxid, szén-dioxid elegyet is kevernek, illetve használnak úgynevezett ammóniás gőzrobbantást is. Ezen adalékanyagok gőzrobbantások még nagyobb hatásfokúak. (Varga, 2011)

Beszédes és munkatársai (2012) például mikrohullámú előkezeléseket végeztek cukorrépa feldolgozás során keletkező hulladékon. Az ebből készült port desztillált vízbe, sósav oldatba, illetve nátrium-hidroxid oldatba tették. A mintáikat 2-8 percen át kezelték. A mikrohullámú kezelés után hét napos, 40°C-on történő enzimes hidrolízist végeztek. Az erjesztéshez *Saccharomyces cerevisiae* élesztőt alkalmaztak. Eredményeik kimutatták, hogy az 500 W teljesítményű, sósavas előkezelés eredményezte a legtöbb glükózt. A kezeletlen, különböző pH-jú minták hozamai között nem volt szignifikáns különbség. A 250 W teljesítményű mérésnél megfigyelték, hogy az időtartammal nő a kapott glükóz koncentráció. Két, négy és nyolc percig végezték az előkezelést. A legjobbnak a nyolc perces adódott.

A sörtörköly, mint lignocellulóz alapú biomassa bioetanol előállítására történő hasznosíthatóságával számos szakirodalom foglalkozik, amelyekben különböző előkezelési technológiákat alkalmaznak. (Ezeket részletesen a későbbiekben mutatom be.) Mussatto és munkatársai (2008) által készített elektronmikroszkópos felvételek (5. ábra) jól szemléltetik a lignocellulóz szerkezeten történő változásokat az előkezeléseknek köszönhetően.

Az elektronmikroszkópos felvételek 300 000-szeres nagyításban készültek. A felső kettő kép – (A) és (B) – az előkezelés nélküli mintákról készült. A bal oldali sem előkezelést sem enzimes kezelést nem kapott, míg a jobb oldali az enzimes kezelés utáni kép. A (C) és (D) ábrákon cellulignin (hemicellulóz nélküli rostok) található – előkezelést kapott –, ugyancsak az enzimes kezelés előtti a baloldalon, az utáni pedig a jobb oldalon.



5. ábra: Sörtörköly elektronmikroszkópos felvétele. (Mussatto *et al.*, 2008)

Az alsó két képen – (E) és (F) – a cellulózpép látható, az eddigi felállás szerint. A képen jól látszik az előkezelések hatása, hogy mennyivel hozzáférhetőbbé válik a biomassza a kezelések során.

2.2.2 Enzimes hidrolízis

Ezen lépés lényege, hogy az immár hozzáférhetőbb biomassza összetevőit monoszacharidokra bontsuk. Ezt a feladatot enzimek végzik. Mivel a cellulóz váz egy összetett szerkezet, ezért több enzim összehangolt működése szükséges a hidrolízishez. Ezek az enzimek a következők: endo- és exo-glükanázok, cellobiohidrolázok, β -glükózidázok. Attól függően, hogy milyen biomasszával dolgozunk a nyersanyag enzimes lebontásához α - és β -amilázokat is használnak. Az enzimes hidrolízis optimális paraméterei: 50°C körüli hőmérséklet és 4,5-6,0 közötti pH.

A lebontás során a hexozánokból a glükóz mellett mannóz és galaktóz, a pentozánokból xilóz és arabinóz is felszabadul.

2.2.3 Fermentáció

Az előkezelés és az enzimes hidrolízis következtében felszabadított cukrokat mikroorganizmusok segítségével etanollá fermentálják. Ehhez többféle mikroorganizmus is alkalmas.

A leggyakrabban alkalmazott ilyen célú mikroorganizmus a *Saccharomyces cerevisiae* élesztő. A *Saccharomyces cerevisiae* nem képes a pentózokat felhasználni, ennek megoldására genetikai manipulációval próbálták pentóz hasznosítóvá alakítani az élesztőt (Varga-Erdei, 2011). A *Saccharomyces cerevisiae* másik problémája, hogy optimális hőmérséklete 30°C, emiatt az enzimes eljárás után – mely 50°C-on történik – szükséges a rendszer visszahűtése. A költségek csökkentése céljából kutatások folynak a *Saccharomyces cerevisiae* termotoleránssá alakításával kapcsolatban, illetve más termotoleráns mikroorganizmusok felhasználhatósága kapcsán. Ilyen termotoleráns élesztők a *Kluyveromyces marxianus* és a *Hansenula polymorpha*, melyek képesek alkoholt termelni. (Varga-Erdei, 2011)

Xilóz hasznosításra képes mikroorganizmusok a *Candida*, a *Cryptococcus*, a *Kluyveromyces*, a *Pichia* és a *Pachysolen* nemzetségekből kerülnek ki. (White *et al.*, 2008) Az arabinózt és a xilózt az élesztősejtek ötszénatomos alkoholokká képesek erjeszteni. A xilánt és az arabinánt csak egyes fonalas gombák képesek megbontani.

A fermentáció sokféle úton történhet. Az egyik lehetőség az úgynevezett szakaszos hidrolízis és fermentáció – az SHF = separate hydrolysis and fermentation. Ekkor a hidrolízis és az erjesztés két egymást követő lépésben zajlik le. A kísérleteim során én ezt a fajta fermentációt alkalmaztam. Egy másik lehetőség a szimultán (azaz egyidejű) cukrosítás és fermentáció – az SSF = simultaneous saccharification and fermentation. Ennél a fermentációnál a hidrolízis és az erjesztés egyszerre zajlik. Ebben az esetben a termékgátlás csökken, mivel az élesztő rögtön felhasználja a hidrolízis során keletkező termékeket.

2.2.4 Desztilláció

Ahhoz, hogy az általunk kinyert etanol bioetanolként üzemanyag adalékként, vagy helyettesítőként felhasználható legyen szükséges a betöményítése. A desztilláció lépésénél az erjesztés során kapott etanol töményítése történik tisztaszesszé – azaz 96 térfogat százalékos alkohollá. Amennyiben vízmentes alkoholt szeretnénk előállítani, akkor vízelvonást kell alkalmazni. A vízelvonás két nagy csoportra osztható: kémiai vízkötésre és fizikai vízelvonásra. A kémiai vízkötésnél vagy egy vegyület (pl. a kalcium-hidroxid), vagy egy kristályvíz (pl. nátrium-

acetát kristályvizes formája) segítségével történik a vízelvonás. A fizikai vízelvonásnál több lehetséges megoldás is felmerülhet: a vákuumdesztillálás, az azeotróp desztillálás, mely történhet benzollal, benzol és benzin elegyével, illetve triklóretilénnel, valamint a szilárd „molekula szita” adszorbens alkalmazása.

2.3 Cellulóz alapú bioetanol előállítás sörtörköly felhasználásával

2.3.1 Sörtörköly

A sörtörköly (6. ábra) az édes cefre szűrését követően visszamaradó söripari melléktermék, mely az árpa maláta örleményéből és a pótanyagokból áll. Az Európai Unióban működő sörgyárak évente körülbelül 3,4 millió tonna sörtörkölyt termelnek (Gupta *et al.*, 2010).

Összetétele függ az árpa fajtájától, a betakarítási időtől, a malátától, a cefrézési feltételektől, a pótanyagok minőségétől és típusától (Gupta *et al.*, 2010). A rostos szövetek fő összetevői az arabinoxilán, a lignin és a cellulóz. A keményítő már csak csekély mennyiségben található meg a törkölyben, mivel a cefrézés során eltávolításra került.

A rost mellett Santos és munkatársai (2003) 24,2% fehérjét, 3,9% lipidet és 3,4% hamut is mértek a kemencében szárított sörtörköly esetében. A sörtörköly gazdag a cellulózon felül még fehérjében, illetve β -glükánban. Az előbb felsorolt fő összetevők mellett megtalálhatók még ásványi anyagok, vitaminok és aminosavak is a törkölyben. Az ásványi anyagok – kalcium, kobalt, réz, vas, magnézium, mangán, foszfor, kálium, szelén, nátrium, kén – mind 0,5%-nál kisebb mennyiségben van jelen. Vitaminként biotin (0,1 ppm), kolin (1800 ppm), folsav (0,2 ppm), niacin (44 ppm), pantoténsav



6. ábra: Sörtörköly

(8,5 ppm), riboflavin (1,5 ppm), tiamin (0,7 ppm), piridoxin (0,7 ppm) található meg. (Pomeranz és Dikeman 1976; Huige 1994) Fehérjéhez kötött aminosavként leucin, valin, alanin, szerin, glicin, glutaminsav, aszparaginsav található nagyobb mennyiségben, míg kisebb mennyiségben fellelhető még tirozin, prolin, treonin, arginin, lizin, cisztin, hisztidin, izoleucin, metionin, fenil-alanin, triptofán (Huige 1994).

Felhasználása széleskörű. Elsődlegesen takarmányozási célokra használják fel főleg szarvasmarháknál. Amellett, hogy magas tápértékű, a sörtörköly állítólag elősegíti a fokozott

tejtermelést a termelékenység befolyásolása nélkül (Gupta *et al.*, 2010). Használják nedves, illetve szárított formában is, ám az előbbi megjelenési forma rövid eltarthatósága miatt problémás.

Emberi fogyasztása segíthet egyes betegségek megelőzésében, úgymint a rák, a gyomor-bélrendszeri rendellenességek, cukorbetegség, illetve a szívkoszorúér-betegség. Potenciálisan fontos ételmszer-összetevő, különösen a fejlődő országokban, ahol a szegénység és az alultápláltság leginkább jelentkezik.

Viszonylag alacsony költsége és magas tápértéke miatt előszeretettel alkalmazzák müzlik, teljes kiőrlésű kenyerek, kekszek gyártásánál. A felhasználást megelőzi egy őrlés, mely során a szemcsés, darabos anyagból lisztet készítenek. Barna színe miatt, korlátozott a felhasználása. Mivel a késztermék ízét és fizikai tulajdonságait megváltoztatja, csak kis mennyiségben (5-10%) lehet alkalmazni.

Biotechnológiai alkalmazási lehetősége is van a sörtörkölynek. Szubsztrátumként használható fel *Pleurotus*, *Agrocybe*, *Lentinus* fajoknál. Kereskedelmi enzintermelésnél koji és szilárd fermentációk szubsztrátumaként szerepel. *Streptomyces avermitilis* esetében a xilanáz és ferulsav-észteráz enzim termelésekor, illetve *Bacillus subtilis* és *Bacillus licheniformis* esetében α -amiláz termelésénél.

Egyéb felhasználásról is lehet irodalmat találni, mint például habzágátlóként történő alkalmazása. A sörtörkölyből nyomás segítségével készített kivonatot a fermentorokban használják fel ilyen célra. Továbbá a sörléhez történő hozzáadásával nőtt a komló kihasználtsága anélkül, hogy a kész sör tulajdonságait befolyásolta volna (Gupta *et al.*, 2010). Hordozóanyagként történő felhasználásával kísérleteztek még a sörélesztők rögzítésekor.

2.3.2 Sörtörköly bioetanol célú felhasználása

A sörtörkölyben található sejtfali poliszacharidok hidrolitikus eljárások során - úgymint a hidrotermális, enzimátikus, vagy savas eljárások – bonthatók. A hidrolízis következtében a cellulózból glükóz, a nem cellulóz-tartalmú poliszacharidokból pedig xilóz, mannóz, galaktóz, arabinóz keletkezik. A szakirodalomban fellelhető néhány sörtörköly kémiai összetételére vonatkozó adatokat mutatja be a 2. számú táblázat.

A szakirodalomban sokféle, e söripari melléktermékkel kapcsolatos kutatásról lehet olvasni. Ezek közül néhányat szeretnék megemlíteni, Mussatto és munkatársai (2008) a hemicellulóz és lignin konverzióját figyelték meg. Egy kezeletlen mintával, illetve híg savas és híg lúgos mintákkal dolgoztak. Celluclast 1.5 L enzimet használtak fel a hidrolízishez 2%-os szubsztrát koncentrációval. A hidrolízis 45°C-on történt 96 órán keresztül. A vizsgálataik alapján megállapítható, hogy minél

alacsonyabb a hemicellulóz és a lignin-tartalom a mintában, annál nagyobb hatékonysággal megy végbe a cellulóz hidrolízise.

2. táblázat: A sörtörköly kémiai összetételére vonatkozó néhány adat a szakirodalom alapján
(Aliyu és Bala, 2011 nyomán)

Összetevő (% szárazanyag)	Kanauchi <i>et al.</i> (2001)	Russ <i>et al.</i> (2005)	Mussatto és Roberto (2006)	Mussatto <i>et al.</i> (2008)	Adeniran <i>et al.</i> (2008)	Khidzir <i>et al.</i> (2010)
Cellulóz	25,4	23-25	16,8	16,8±0,8	-	-
Hemicellulóz	-	30-35	28,4	28,4±2,0	-	-
Lignin	11,9	7,0-8	27,8	27,8±0,3	-	-
Fehérjék	24	19-23	15,3	-	2,4±0,2	6,4±0,3
Hamu	2,4	4-4,5	4,6	4,6±0,2	7,9±0,1	2,3±0,8
Extraktumok	-	-	5,8	-	-	-
Egyéb	21,8	-	-	22,4±1,2	-	-
Szénhidrátok	-	-	-	-	79,9±0,6	-
Nyersrost	-	-	-	-	3,3±0,1	-
Nedvességtartalom	-	-	-	-	6,4±0,2	-
Lipid	10,6	-	-	-	-	2,5±0,1
Összes szén	-	-	-	-	-	35,6±0,3
Összes nitrogén	-	-	-	-	-	1,025±0,05

White és munkatársai (2008) 10 százaléknyi mennyiségű sörtörkölyrel dolgoztak. Savas – kénsavas, salétromsavas és sósavas – előkezeléseket alkalmaztak 121 °C-on 15 percen keresztül, ennek alapján végeztem én is az autoklávos kezeléseimet. Az enzimes hidrolízist enzim koktéllal – celluláz, β -glükózidáz, hemicelluláz és xilanáz aktivitású – végezték 5 és 6-os pH érték között. A hidrolízis 50°C-on 130 rpm fordulatszámú rázó termosztátban 18 órán át történt. Az erjesztés 48 órán át 100 rpm fordulatszámú, 30°C-os rázó termosztátban folyt *Kluyveromyces marxianus* és *Pichia stipitis* törzsek alkalmazásával. Az erjesztés végén 8,3 és 5,9 g/l alkoholt kaptak a konverziós hatásfoktól függően.

Pierre és munkatársai (2011) hidrotermális előkezelést végeztek a sörtörkölyön 2, 3, 4, 5 és 7 bar nyomáson. Az előkezelések utáni enzimes hidrolízis az ő esetükben 16 órán keresztül tartott. Celluclast 1,5 L enzimet használtak ők is. Minél nagyobb nyomással kezelték a sörtörkölyt a hidrolízis során, annál jobb redukáló cukortartalmat, illetve glükóz hozamot értek el. Az általuk elvégzett előkezelések eredményei biztató alternatívát adhatnak ilyen típusú lignocellulóz alapú alapanyagok kezelésére.

Xiros és munkatársai megállapították, hogy a *Neurospora crassa* és a *Fusarium oxysporum* mikroorganizmusoknak kivételes képessége van a cellulóz és hemicellulóz átalakítás terén. Xiros és munkatársai 74g bioetanol kihozatalról írnak sörtörköly kilogrammonként (5,6 g/l), melyet az előbb megnevezett mikroorganizmusokkal értek el, mikroaerob körülmények között (Aliyu és Bala, 2011).

3. MUNKA CÉLJA

A népesség növekedésével, a környezetvédelmi problémák miatt, a fosszilis energiahordozók kimerülésével egyre nagyobb szerephez jutnak a megújuló energiaforrások. Az egyik lehetséges megújuló energiaforrás a bioetanol, melynek előállítására azok a mezőgazdaságban feleslegben termelt termények és melléktermékek használhatók fel, amelyek viszonylag nagy keményítő- vagy cellulóz tartalommal rendelkeznek.

Kísérleteimhez olyan alapanyagot kívántam alkalmazni, amely az ipari feldolgozás során nagy mennyiségben keletkezik. Ilyen alapanyag lehet a sörtörköly, ami söripari melléktermékként rendelkezésre állhat bioetanol előállítására.

Munkám célja a sörtörköly alkalmazhatóságának vizsgálata bioetanol előállítására, melynek keretében a következő feladatokat tűztem ki célul:

- A sörtörköly, mint alapanyag jellemzése
 - Maradék oldható extrakttartalom meghatározása cefrézési eljárással
- Az optimális előkezelési eljárás kidolgozása a sörtörköly feltárása érdekében különböző savas, lúgos előkezeléseket és kezelési eljárásokat alkalmazva
- Az egyes előkezelési eljárások kiválasztása után enzimes hidrolízis alkalmazásának vizsgálata
- Az etanol hozam növelési lehetőségének tanulmányozása a sörtörköly cefre szárazanyagtartalmának változtatásával

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Alkalmazott anyagok

4.1.1 Sörtörköly

A sörtörkölyt a Budapesti Corvinus Egyetem Élelmiszertudományi Karának Sör- és Szeszipari Tanszékén működő kísérleti sörüzemből kaptam. Száz százalékban Pilseni malátából készült sörle előállításából származik. A felhasználást megelőzően 60°C-on Labor MIM szárítószekrényben légszárazra szárítottam a nedves sörtörkölyt. A szárítást követően leőröltem szabványos EBC durvaőrlésű malommal (lyukátmérő=2,5 mm). Ily módon jutottam el a későbbiekben felhasznált sörtörkölyhöz.

4.1.2 Előkezeléshez alkalmazott mérőoldatok

A savas és lúgos előkezelésekhez különböző normalitású oldatokat készítettem el. A sósavból, salétromsavból és kénsavból 0,05; 0,1 és 0,2 N oldatokat állítottam össze. A kénsavból 1N oldatot is készítettem. Nátrium-hidroxidból 0,05; 0,1; 0,2 és 1N oldatokat használtam a vizsgálatokhoz. A mérőoldatok készítését elszívófülke alatt végeztem.

4.1.3 Enzimek

A poliszacharidok lebontásához általam használt enzimeket és tulajdonságaikat foglalja össze a 3. számú táblázat.

3. táblázat: Enzimek és jellemző paramétereik

	pH	Hőmérséklet (°C)	D* (% sz.a.-ra)	Sűrűség (g/ml)
Viscozyme L	3,3-5,5	25-55	0,05-0,1	1,2
Celluclast 1.5L	4,5-6,0	50-60	1 (társ. 0,2)	1,2
Cellobiáz (Novozyme 188)	4,5-6,0	45-50	0,2-0,6	1,2
Xilanáz	4,5-6,0	35-55	0,05-0,25	1,2

*D: adagolás

A Celluclast 1,5 L enzimkészítmény két enzimet tartalmaz – endo-1,4- β -glükanázt és exo-1,4- β -glükanázt, vagy más néven cellobiohidrolázt. Az előbbi a cellulóz lánc belsejében hidrolizálja a β -1,4-es glükozidos kötéseket véletlenszerűen, az utóbbi pedig a cellulóz lánc nem redukáló végéről hasítja le a cellobió egységeket. A keletkező cellobióz nem erjeszthető szénhidrát, ezért teljes konverzió elérése érdekében ajánlott egy cellobiáz enzimkészítménnyel együtt használni, mint például esetemen a Novozyme® 188 használata.

A Novozyme 188 enzimkészítmény β -glükozidáz enzim aktivitással rendelkezik, mely a cellobiózt hidrolizálja glükózzá.

A Viscozyme L egy multi-enzim komplex, mely a karbohidrolázok széles skáláját tartalmazza, ideértve az arabinázt, a cellulázt, a β -glükanázt, a hemicellulázt és a xilanázt.

4.2 Első kísérletsorozat - Előkezelések optimalizálása

A méréseim három nagy részre oszthatóak az előkezelések alapján.

Autoklávus kezelés

A lombikokba 10%-os mennyiségnek megfelelő sörtörkölyt mértem ki Sartorius ED3202S-CW típusú táramérleg segítségével. Ezután mindegyik lombikba mérőhengerrel kimértem a megfelelő savas, lúgos oldatot, illetve desztillált vizet - 4. táblázatban láthatók az összetételek.

4. táblázat: Autoklávus méréseket összefoglaló táblázat

	Kénsav (N)	Sósav (N)	Salétromsav (N)	NaOH (N)	Hőmérséklet (°C)	Időtartam (perc)
1.	0	0	0	0	121	15
2.	0,05	0	0	0	121	15
3.	0,1	0	0	0	121	15
4.	0,2	0	0	0	121	15
5.	0	0,05	0	0	121	15
6.	0	0,1	0	0	121	15
7.	0	0,2	0	0	121	15
8.	0	0	0,05	0	121	15
9.	0	0	0,1	0	121	15
10.	0	0	0,2	0	121	15
12.	0	0	0	0,05	121	15
13.	0	0	0	0,1	121	15
14.	0	0	0	0,2	121	15
15.	0	0	0	1	121	15

Ezen mennyiségeket – azaz a 10%-os törkölyarányt – White és munkatársai (2008) munkája alapján választottam. Mindegyik összeállításból két párhuzamos mintát készítettem.

Az autoklávos kezelés során 15 percig tartottam 121°C-on a mintákat. Az autoklávból kivéve a lombikokat, lehűtöttem, majd ezután beállítottam a kémhatásukat pH 5,0 értékre Mettler Toledo Seven Multi pH mérő segítségével. Ez a pH tartomány optimális az általam használt enzimek számára.

Mikrohullámos kezelés

Elkészítettem a 10% mennyiségű sörtörkölyt tartalmazó lombikokat, amelyekbe mérőhengerrel kimértem a megfelelő savas, lúgos oldatot, illetve desztillált vizet, - az 5. táblázat szerint.

5. táblázat: Mikrohullámos kezelést összefoglaló táblázat

	Kénsav (N)	Sósav (N)	Salétromsav (N)	NaOH (N)	Időtartam (perc)	Teljesítmény (W)
16.	0	0	0	0	15	180
17.	0,05	0	0	0	15	180
18.	0	0,2	0	0	15	180
19.	0	0	0,2	0	15	180
20.	0	0	0	0,05	15	180
21.	0	0	0	0	9	360
22.	0,05	0	0	0	9	360
23.	0	0,2	0	0	9	360
24.	0	0	0,2	0	9	360
25.	0	0	0	0,05	9	360
26.	0	0	0	0	5	540
27.	0,05	0	0	0	5	540
28.	0	0,2	0	0	5	540
29.	0	0	0,2	0	5	540
30.	0	0	0	0,05	5	540

A mérések során három teljesítményt – 180 W, 360 W és 540 W – alkalmaztam LG Combi intellowave típusú mikrohullámú készüléken. Ezen teljesítményeket Beszédes és munkatársai (2012) munkája alapján választottam ki, akik 250 és 500 Wattos teljesítményt használtak. A mérések időtartama a 180 W esetén 15 perc, a 360 W esetén 9 perc, míg az 540 W esetében már csak 5 perc volt. Az előbbi hivatkozásomnál a kezelések időtartama 2 és 8 perc közötti volt.

Esetemben azért rövidülnek a kezelések időtartamai, mert egyre hevesebben reagált a készítmény a mikrohullámos kezelésre.

Ebben az esetben is az előkezelések után elvégeztem a pH beállítását 5,0-ös értékre.

190°C-os kezelés

Az összemérés hasonlóan történt, mint az előbbieken. Ezt a mérést csak 0,1 N-os és 1 N-os kénsav oldattal végeztem el, illetve készítettem kontrollt is. A három összeállítást a 6. táblázat tartalmazza. A mérést SPC Science készülékben végeztem, mely egy fehérje roncsoló. A felfűtéssel együtt a mérés 28 percet vett igénybe, ebből a 190°C-on történő roncsolás időtartama 15 perc volt. A mintákat kétfelé osztottam, mivel a készülékhez használatos kémcsövekbe 20-20 ml-t lehetett tölteni. Habzágátlóként 2-2 csepp Foam solt adtam 20 ml-enként.

6. táblázat: A 190°C-os kezelést összefoglaló táblázat

	Kénsav	Sósav	Salétromsav	NaOH	Hőmérséklet (°C)	Időtartam (perc)
31.	0	0	0	0	190	15
32.	0,1	0	0	0	190	15
33.	1	0	0	0	190	15

Enzimes hidrolízis

Következő lépésként minden esetben kimértem a szükséges enzim mennyiségeket. Celluclast 1.5 L, cellobiáz és Viscozyme L enzimet alkalmaztam. Az alkalmazott enzim mennyiségeket a gyártó javasolt dózisa alapján választottam meg. Az enzimeket egybe mértem ki egy főzőpohárba, tízszeres hígítást alkalmazva, majd az így kialakult, jól összekevert enzim mixből pipettáztam ki a szükséges mennyiségeket, annak érdekében, hogy a lombikokba azonos arányú, mennyiségű enzim mix kerüljön. White és munkatársai (2008) munkája alapján 18 órás enzimes kezelést alkalmaztam, melynek színhelye egy 50°C-ra – az enzimek számára optimális hőmérséklet – és 100 rpm fordulatszámra beállított rázó termosztát volt.

Az enzim hozzáadás előtt és az enzimes kezelés lejárta után mindegyik lombikból mintát vettem, melyeket -18°C-on tároltam. Készítettem egy kezeletlen mintát is, egyik kezelésen sem esett át. A minták redukáló cukortartalmát BCA módszer segítségével vizsgáltam. A mintákban jelenlévő szacharidok elválasztását és koncentrációjuk megállapítását HPLC készülékkel végeztem.

4.3 Második kísérletsorozat – Enzimes hidrolízis és erjesztés

A HPLC mérési eredmények alapján kiválasztottam kezelési típusonként a legjobbnak adódott előkezeléseket. Ily módon öt autoklávos, egy 190°C-os, és három mikrohullámú kezelést választottam ki. Ezen előkezeléseket újra elvégeztem a megadott paraméterekkel, majd élesztővel történő beoltás után erjesztettem a mintákat.

Mindegyik kezelési típusnál – autoklávos, 190°C-os kezeléseknél 1-1, illetve a mikrohullámú kezelésnél teljesítményenként 1-1 – kontrollt is készítettem. Ebben az esetben is az enzimes kezelés előtt és után is vettem mintát, melyet -18°C-on tároltam.

Az enzimes kezelés után a minták pH-ját 3,5-es értékre állítottam be. Ez ideális az élesztő számára, illetve a cefrébe bekerülő egyéb mikroorganizmusok tevékenysége is gátlódik. Annak érdekében, hogy a megfelelő körülményeket biztosítsam az élesztőknek tápsót adagoltam a mintáimhoz. Lallemand gyártmányú Opti White tápsóval dolgoztam, melynek adagolása 30 g/hl.

Levuline ALS *Saccharomyces cerevisiae* élesztővel oltottam be a lombikjaim tartalmát, melynek adagolása szintén 30g/hl. A lombikok csavaros kupakjait lecseréltem kotyogókra, melynek az U cső részébe desztillált vizet töltöttem, az anaerob körülmények biztosítása végett. Az erjesztést 30°C-os termosztátba végeztem.

Az erjesztés alatt az 1., 2. és 5. napokon vettem mintát a redukáló cukortartalom szénhidrát összetétel és az alkoholtartalom meghatározásához.

4.4 Harmadik kísérletsorozat – Cefrekonzentráció optimalása

A második kísérletsorozat elvégzése utáni HPLC mérés eredményei alapján a legjobbnak adódó előkezelést választottam ki a harmadik kísérlet sorhoz.

Ezen kísérlet sor abban tér el az előbbiektől, hogy itt nem csak a White és munkatársai (2008) munkája alapján kiválasztott 10%-os sörtörköly arányt használtam, hanem egy 20 és egy 30%-os sörtörköly arányt is beállítottam. A kialakított öt csoportból kettőnél – egy kénsavval végzett csoportnál és egy kontroll csoportnál – az enzimes hidrolízist kihagytam, így kívántam vizsgálni az enzimes kezelés hatását az etanol kihozatalra. A kísérleti összeállítást a 7. számú táblázat mutatja be.

Elkészítettem a megfelelő koncentrációjú cefréket. Itt meg szeretném jegyezni, hogy a 30%-os sörtörköly aránnyal nehezen lehet dolgozni, mivel nehezen keverhető volt, nehéz volt a pH-t beállítani.

Az előkezelési idő letelte, és a lombikok lehűtése után a pH-t 5,0 értékre állítottam be azon három csoport esetében, melyek enzimes hidrolízist is kaptak.

A 18 órás enzimes hidrolízis lejárta után mindegyik lombikban – az enzimes hidrolízisben nem részesülőkben is – beállítottam a pH értéket 3,0-as körültre. A pH állítás után a 30g/hl-es adagolás szerint Opti White tápsót adtam mindegyik lombik tartalmához.

Levuline ALS szárított *Saccharomyces cerevisiae* élesztőt alkalmaztam, melynek adagolása 30g/hl. A lombikon a csavaros kupakot kotyogóra cseréltem, melynek U csövébe desztillált vizet töltöttem. A kotyogóval ellátott lombikokat 30°C-os termosztátba helyeztem.

7. táblázat: A harmadik kísérletsor összeállítása

1.	10% sörtörköly	0,2 N kénsavas autoklávós kezelés	enzimes hidrolízis
2.	20% sörtörköly		
3.	30 % sörtörköly		
4.	10% sörtörköly	0,2 N kénsavas autoklávós kezelés	enzimes hidrolízis
5.	20% sörtörköly		
6.	30% sörtörköly		
7.	10% sörtörköly	0,2 N kénsavas autoklávós kezelés	enzimes hidrolízis nélkül
8.	20% sörtörköly		
9.	30% sörtörköly		
10.	10% sörtörköly	kontroll autoklávós kezelés	enzimes hidrolízis
11.	20% sörtörköly		
12.	30% sörtörköly		
13.	10% sörtörköly	kontroll autoklávós kezelés	enzimes hidrolízis nélkül
14.	20% sörtörköly		
15.	30% sörtörköly		

Az erjesztés 5. napján a lombikokat kivettem a termosztátból és a mintákat ezután egy BÜCHI Distillation Unit K-350 nevű készülékkel ledesztilláltam. Ehhez 100 cm³ mintát mérőhengerrel kimértem és a készülék csövébe töltöttem. Két pasztörpipettányi Foam soalt – habzásgátlót – adtam hozzá, majd a készülékbe helyeztem. A desztillátumot egy hűtött 10 cm³-es mérőlombikba gyűjtöttem össze. A desztillálás után jelre töltöttem a desztillátumot tartalmazó mérőlombikot. Az alkoholtartalmat DMA készülék segítségével mértem meg.

4.5 Alkalmazott módszerek

4.5.1 Oldható extrakttartalom meghatározása cefrézéssel

A módszer alapelve:

Cefrézéssel oldatba viszem a törköly vízben oldható részeit, az így kapott „sörlevet” Anton Paar sör analízátorral vizsgálom.

Alkalmazott anyagok és eszközök:

sörtörköly, desztillált víz, őrlőmalom, cefréző kád hőmérővel, cefréző poharak, mérőhenger, táramérleg, főzőpohár, üvegbot, Ø 15 cm-es üvegtölcsér, redős szűrőpapír, Anton Paar sör analízátor

A módszer:

A szárítószekrényben előzetesen 60 °C-on kiszárított sörtörkölyt finomra őrlöm. A finomra őrlött törkölyből 25 g-ot cefréző pohárba mérek táramérleg segítségével, ehhez 250 ml 70 °C-os vizet adok és 1 órán át kevertetem ezen a hőfokon. Majd hűtés után 300 g-ra egészítem ki vízzel, redős szűrőpapír segítségével leszűröm és Anton Paar söranalízátorral megmérem a sűrűségét és az extrakttartalmát.

Az oldható extrakttartalom meghatározásához szükséges a sörtörköly nedvességtartalma, melyet automata nedvességtartalom mérővel állapítottam meg.

4.5.2 Redukáló cukortartalom meghatározása - BCA módszer

Reagensek:

1 A oldat:

Kimértem 150 mg 2,2-dikinolin-4,4-dikarboxilt Sartorius CP225D típusú analitikai mérleg segítségével és 7,16 g vízmentes nátrium-karbonátot Sartorius ED3202S-CW táramérleg segítségével. 100 ml desztillált vízben feloldottam, majd 115 ml-re kiegészítettem desztillált vízzel az oldatot egy mérőhengerben. (Rezessy-Szabó *et al.*, 2007)

2 B oldat:

3,5 g aszparaginsavat és 5 g vízmentes nátrium-karbonátot 100 ml desztillált vízben feloldottam. Egy másik főzőpohárban 1,09 g réz-szulfátot oldottam fel 40 ml desztillált vízben. A két oldatot összetöltés után 150 ml-re egészítettem ki desztillált vízzel

3 Etanol (96%-os)

Módszer leírása:

23 ml A oldat, 1 ml B oldat és 6 ml etanol összekeverésével jutottam el a mixhez. Mikrotiter lemezbe 40 µl (hígított) mintát és 160 µl mixet pipettáztam automatapipettával. A mikrotiter lemez tetejének felhelyezése után 30 percen keresztül 80°C-on tartottam. A 80°C-os hőmérsékleten tartás Melag típusú hőlégmenterizáló berendezésben történt. Ezután hűtés után abszorbancia mérést hajtottam végre 540 nm-en BIO-RAD Model 550 Microplate Reader készülék segítségével. A készüléket a Microplate Manager ® 4.0 elnevezésű program segítségével kezeltem.

Kalibráció:

A módszer használatához kalibráció szükséges. Ehhez 0,5g/100ml koncentrációjú glükóz oldatot készítettem. A glükóz oldatot 100 százszorosára hígítottam. Az alkalmazott hígítási sort a 8. táblázat szerint készítettem el.

8. táblázat: Alkalmazott hígítási sor

hígított glükóz oldat (µl)	40	32	24	16	8	0
desztillált víz (µl)	0	8	16	24	32	40
glükóz koncentráció (g/100ml)	0,005	0,004	0,003	0,002	0,001	0,000

4.5.3 Szénhidráttartalom meghatározása - HPLC

A HPLC olyan automatizált, nagynyomású kromatográfiás eljárás, amely nagy felbontású és ideális módszer számos anyag meghatározására. A kísérleteimben a biokonverzió során keletkezett cukrok jellemzésére használtam. A fagyasztásból felolvasztott mintáimból egy-egy eppendorf csőnyi mennyiséget vettem ki, melyet 10 percen át 14000-es fordulatszám mellett centrifugáltam Sigma 1-15 típusú centrifugában. A centrifugált mintákat 0,45 µm pórusméretű Millipore Durapore® szűrőn átszűrtem és HPLC-s műanyag minta csövekbe pipettáztam, melyeket teflonfedővel fedtem le.

A méréseket Thermo Scientific Corporation Surveyor HPLC készülékén végeztem. A készülék RI Plus detektorát használtam. Az alkalmazott oszlop egy Aminex HPX-87H típusú oszlop volt, melynek mérete 300 x 7,8 mm volt. Az oszlop töltete polisztirol-divinilbenzol, vagyis egy polimer-alapú mátrix. Az oszlopban méretkizárásos- és ligandumcsere-kromatográfia kombinációja elvén történik az elválasztás. Mozgófázisként 0,005N kénsav oldatot alkalmaztam. Mind a detektor, mind az oszlop hőmérsékletét 45°C-on tartottam. Az alkalmazott áramlási sebesség 0,6ml/perc volt. Az injektálási mennyiség 15 µl volt. A minták kiértékeléséhez külső standard-okat alkalmaztam. A szénhidrát standard-ok a következők voltak: fruktóz, glükóz, maltóz, maltotrióz, L-arabinóz, D-xilóz, cellobióz, szacharóz, galaktóz és mannóz. Továbbá alkohol standard-ot is alkalmaztam.

5. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

A kísérleteim során első lépésben megvizsgáltam cefrézési eljárással az általam használt sörtörköly maradék oldható extrakttartalmát. Ezt követően különböző kezelési eljárásokat – savas, lúgos hidrolízist autoklávos, mikrohullámú és 190°C-on történő kezeléssel kombinálva – alkalmaztam a sörtörköly összetett szerkezetének feltárására.

A feltárást követően az enzimes hidrolízist alkalmazásának lehetőségét is vizsgáltam a rendelkezésre álló enzimek felhasználásával. A következő lépésben az egyes kiválasztott előkezelésekkel elvégeztem a feltárást, majd enzimes hidrolízist alkalmaztam és a kezelt cefréket erjesztettem.

A harmadik kísérletsorozatban pedig arra kerestem a választ, milyen mértékben növelhető a cefrekoncentráció és ebből milyen etanol hozam érhető el.

5.1 Oldható extrakttartalom meghatározása cefrézéssel

A vizsgálat során cefrézéssel oldatban vittük a törköly vízben oldódó részeit és az így kapott szűrlet extrakttartalmát meghatároztuk Anton Paar söranalizátor segítségével.

Az oldható extrakttartalom meghatározásához szükséges képlet:

$$E_{szt} = \frac{(275 + 0,25 \cdot w_{szt}) \cdot P}{100 - P}, \text{ ahol}$$

E_{szt} : az oldható extrakttartalom a légszáraz törkölyben (%)

w_{szt} : a légszáraz törköly nedvességtartalma (%)

P: a szűrlet extrakttartalma (m/m%)

Az oldható extrakttartalom meghatározásához elvégzett cefrőzés eredményeként a szűrlet extrakttartalmát (P) kaptam meg. A nedvességtartalom meghatározással pedig a légszáraz törköly nedvességtartalmához (w_{szt}) jutottam.

Ezek segítségével pedig már a megadott képlettel kiszámolható az oldható extrakttartalom:

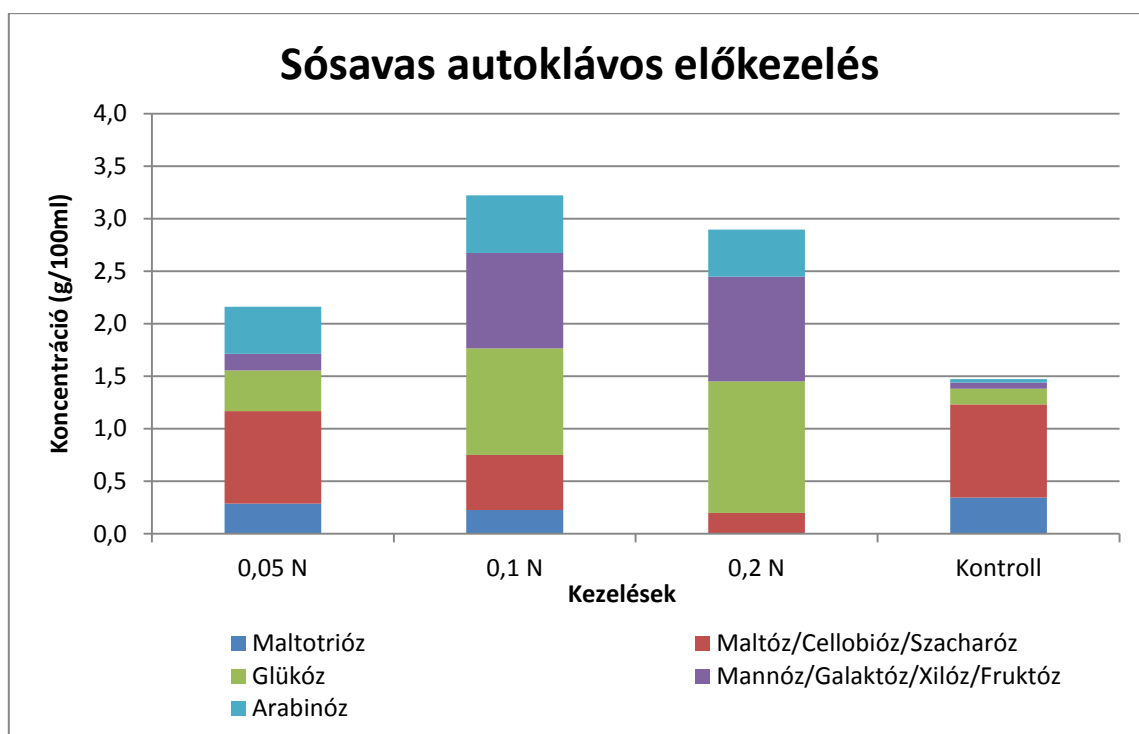
$$E_{szt} = \frac{(275 + 0,25 \cdot 2,66) \cdot 2,01}{100 - 2,01} = 5,65\%$$

Vagyis az általam használt légszáraz sörtörkölynek 5,65% az oldható extrakttartalma szárazanyag-tartalomra vonatkoztatva. Az általunk kapott érték megfelel a sörgyári gyakorlatban tapasztalt, illetve mért adatokkal.

5.2 Előkezeléses vizsgálatok eredményei

5.2.1 Autoklávós előkezelések eredményei

Elsőként az autoklávós előkezelések eredményeit mutatom be. Az autoklávós előkezeléseken belül végeztem sósavas, kénsavas, salétromsavas, nátrium-hidroxidos kezelést. Mindegyik esetben 0,05; 0,1 és 0,2 normalitású oldatokkal dolgoztam, illetve a nátrium-hidroxid esetében 1 N-os oldattal is.



7. ábra: Sósavas autoklávós előkezelések szénhidrát koncentrációi az enzimes hidrolízis előtt

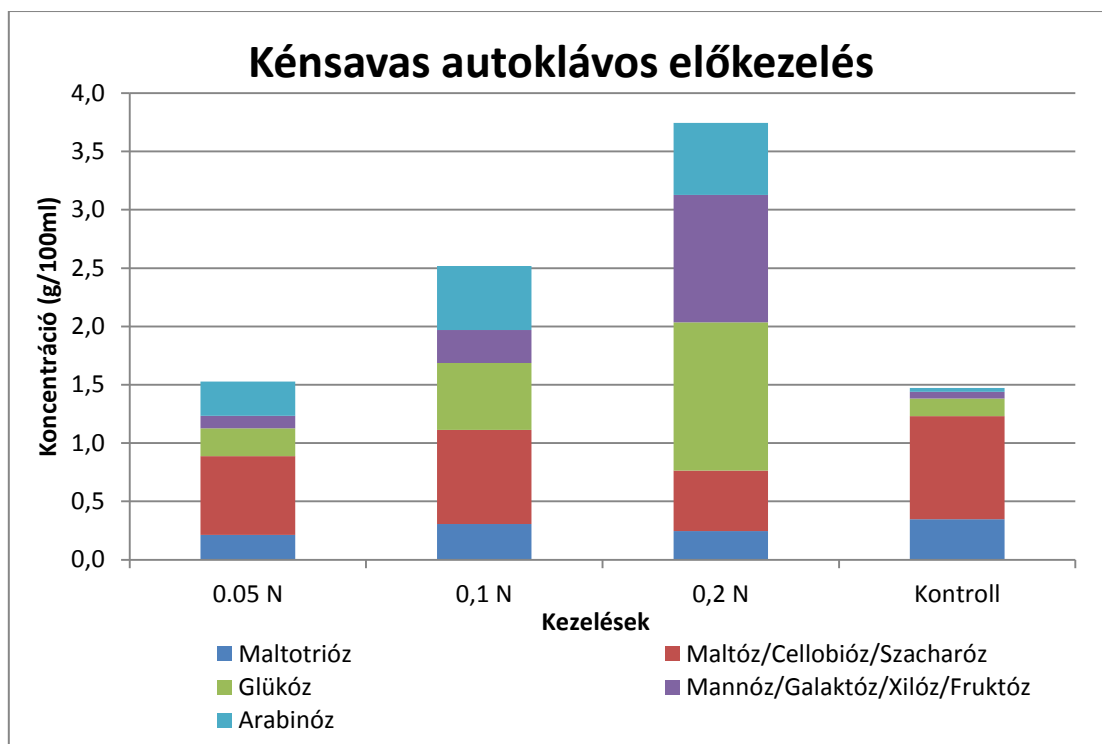
A sósavas kezelések eredményeként a mintákban 2,1 és 3,2 g/100ml közötti szénhidrát koncentrációkat mértem az általam vizsgált szénhidrátok tekintetében (7. ábra). A 0,1N sósavas kezelés adta a legnagyobb szénhidrát mennyiséget: a glükóz és a többi monoszacharidot tartalmazó csoport közel azonos mennyiségű volt, ezek mellett még arabinóz, diszacharidok és maltotrióz is volt a mintában. Ha a képződött glükóz mennyiséget nézzük, akkor egyértelműen a 0,2N kezelés

emelhető ki. Az ezt követően elvégzett enzimes kezelés hatására a maltóz, cellobióz, szacharóz, maltotrióz koncentráció is csökkent, míg a glükóz, mannóz, xilóz, galaktóz, fruktóz koncentráció növekedett. Az enzimes kezelés hatására a glükóz koncentrációja 2-szeresére nőtt a 0,05N-os sósavas autoklávus kezelés esetében.

A kénsavas eredmények esetében a 0,05N kénsav oldat 1,5 g/100ml cukor koncentrációt eredményezett, viszont a 0,1 és 0,2 normalitású oldatoknál a cukor koncentráció már 2,5 és 3,8 g/100ml értéket ért el az enzimes kezelés előtt (8. ábra). A BCA mérés eredményeként is e normalitású oldatok adták a jobb eredményeket. Növekvő tendencia figyelhető meg a növekvő normalitással.

Az enzimes kezelés hatására nőtt a glükóz és mannóz, galaktóz, xilóz, fruktóz koncentráció és csökkent viszont a maltotrióz, a maltóz, cellobióz, szacharóz, illetve az arabinóz koncentráció.

Megfigyelhető, hogy a glükóz koncentrációja a kénsav koncentrációjának növelésével egyre kevésbé nő az enzimes hidrolízist követően – 0,05 normálosnál 2,5-szeresére nő, a 0,1 normálosnál 1,4-szeresére, míg a 0,2 normálos esetében már csak 1,2-szeresére. Ez annak köszönhető, hogy az egyes mintákban kevesebb volt a lebontható szénhidrátok mennyisége. A mannóz/galaktóz/xilóz/fruktóz is ezt a tendenciát mutatja: a 0,05N esetén 2,75-szorosára, 0,1N esetén 1,94-szorosára, 0,2N esetén pedig 1,05-szorosára nőtt.

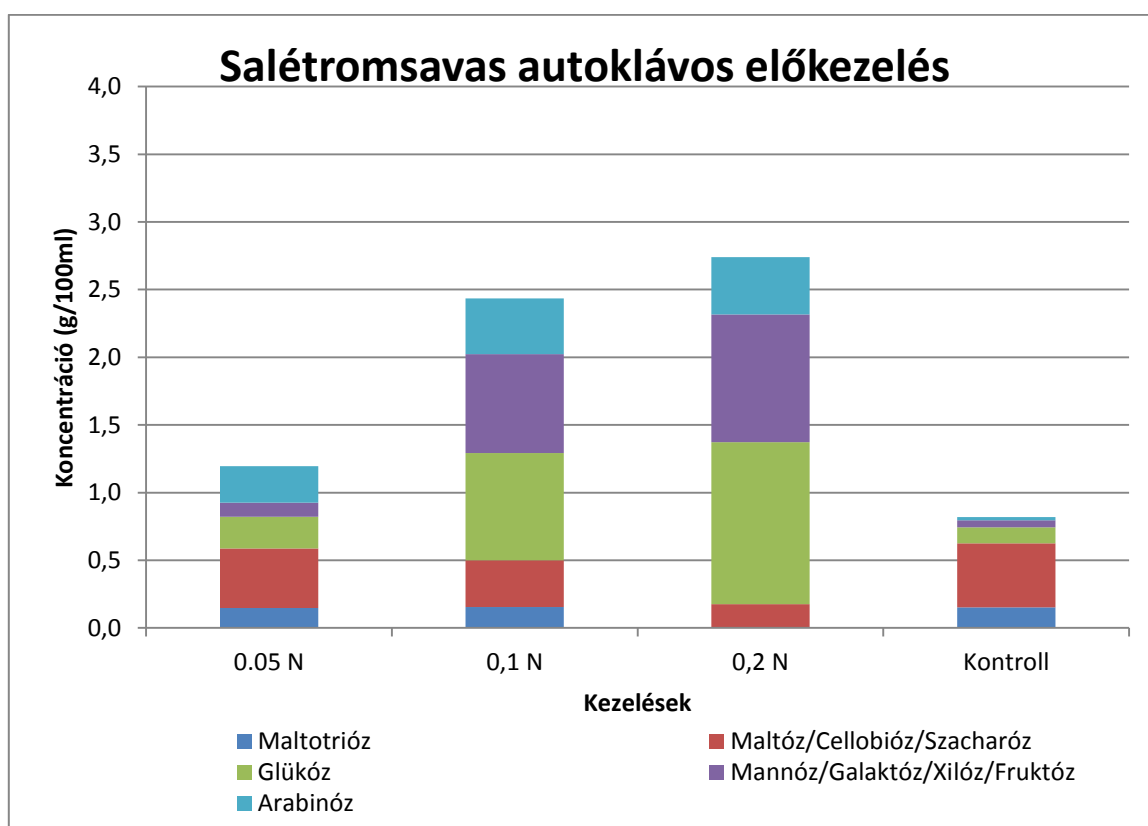


8. ábra: Kénsavas autoklávus előkezelések szénhidrát koncentrációi az enzimes hidrolízis előtt

A salétromsavas kezelés következtében a 0,05N salétromsav oldat esetében 1,5 g/100ml cukorkoncentráció adódott, míg a nagyobb normalitású oldatoknál 2,4 és 2,75 g/100ml (9. ábra). Itt is növekvő tendencia figyelhető meg – összhangban a BCA mérés során kapott eredményekkel. A 0,2N kezelés egyértelműen hatékonyabbnak bizonyult a glükóz, valamint a mannóz/galaktóz/xilóz/fruktóz csoport mennyiségének növekedése szempontjából, mint a többi kezelés. Ebben az esetben 1,2 g/100ml, míg a 0,1N kezelésnél 0,8 g/100ml glükóz keletkezett a savas hidrolízis során.

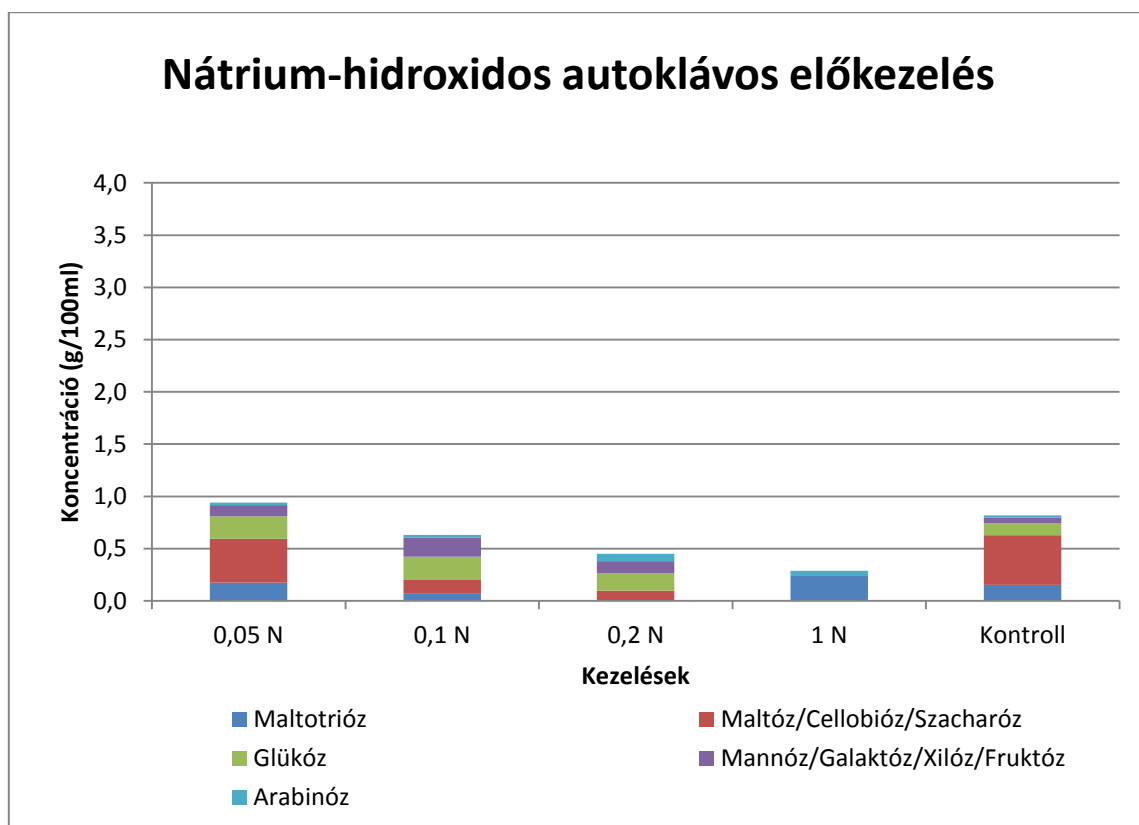
Az enzimes kezelés hatására itt is a maltóz, cellobióz, szacharóz és a maltotrióz koncentrációja csökkent, illetve a mannóz, galaktóz, xilóz, fruktóz és a glükóz koncentráció növekedett.

A salétromsavas előkezelésnél is megfigyelhető a kénsavas előkezelésnél leírt tendencia. A glükóz koncentrációja a 0,05N-os oldatnál 2,66-szorosára nőtt, a 0,1N-os esetében 1,65-szorosára. A mannóz/galaktóz/xilóz/fruktóz csoportnál a legkisebb normalitásúnál 2,61-szorosára, a 0,1N-osnál pedig 1,24-szorosára növekedett e szénhidrátok mennyisége. A maltóz/cellobióz/szacharóz csoport esetében és az arabinóznál is épp az ellenkezője figyelhető meg, a normalitás növelésével nő a koncentráció változása is.



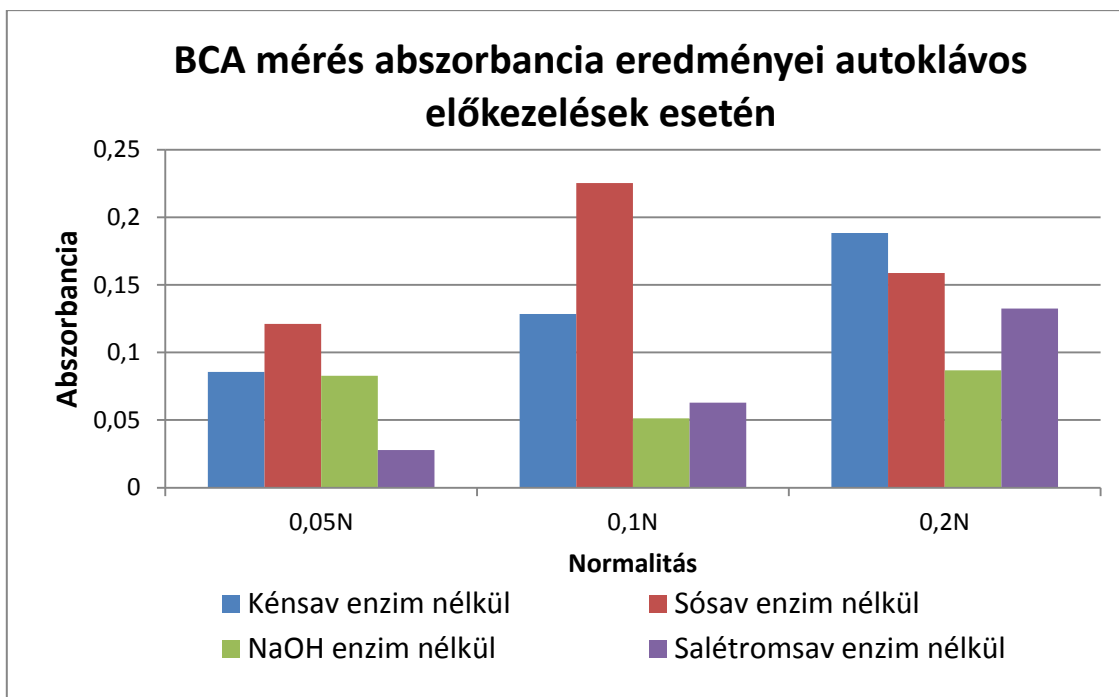
9. ábra: Salétromsavas autoklávós előkezelések szénhidrát koncentrációi az enzimes hidrolízis előtt

A nátrium-hidroxidos kezelés a többi előkezeléshez képest kevésbé volt sikeres. A legnagyobb elért teljes szénhidrát koncentráció értéke közel 1 g/100ml volt, amelyet a 0,05 N kezelés során kaptunk. A nátrium-hidroxid koncentráció növelésével csökkenő tendenciát mutattak az eredmények (10. ábra).



10. ábra: Nátrium-hidroxidos autoklávós előkezelések szénhidrát koncentrációi az enzimes hidrolízis előtt

A kapott eredmények tekintetében megállapítható, hogy az autoklávós kezelés savas kezeléssel kiegészítve sikeres volt mindhárom alkalmazott sav esetében összehasonlítva az eredményeket a kontroll mintákkal, ahol savas kezelés nem volt. A salétromsav, kénsav esetében a 0,2 normális, a sósavnál a 0,1 normális oldat alkalmazásakor kaptam a legnagyobb szénhidrátmennyiségeket. Ezen adatokat támasztják alá a BCA mérés abszorbancia értékei is (11. ábra). A nátrium-hidroxidos kezelés kombinálva az autoklávós kezeléssel nem mondható sikeresnek, mivel a kontroll esetén mért érték megközelíti a 0,05N NaOH oldattal végzett kezelésnél mért szénhidrát mennyiséget.



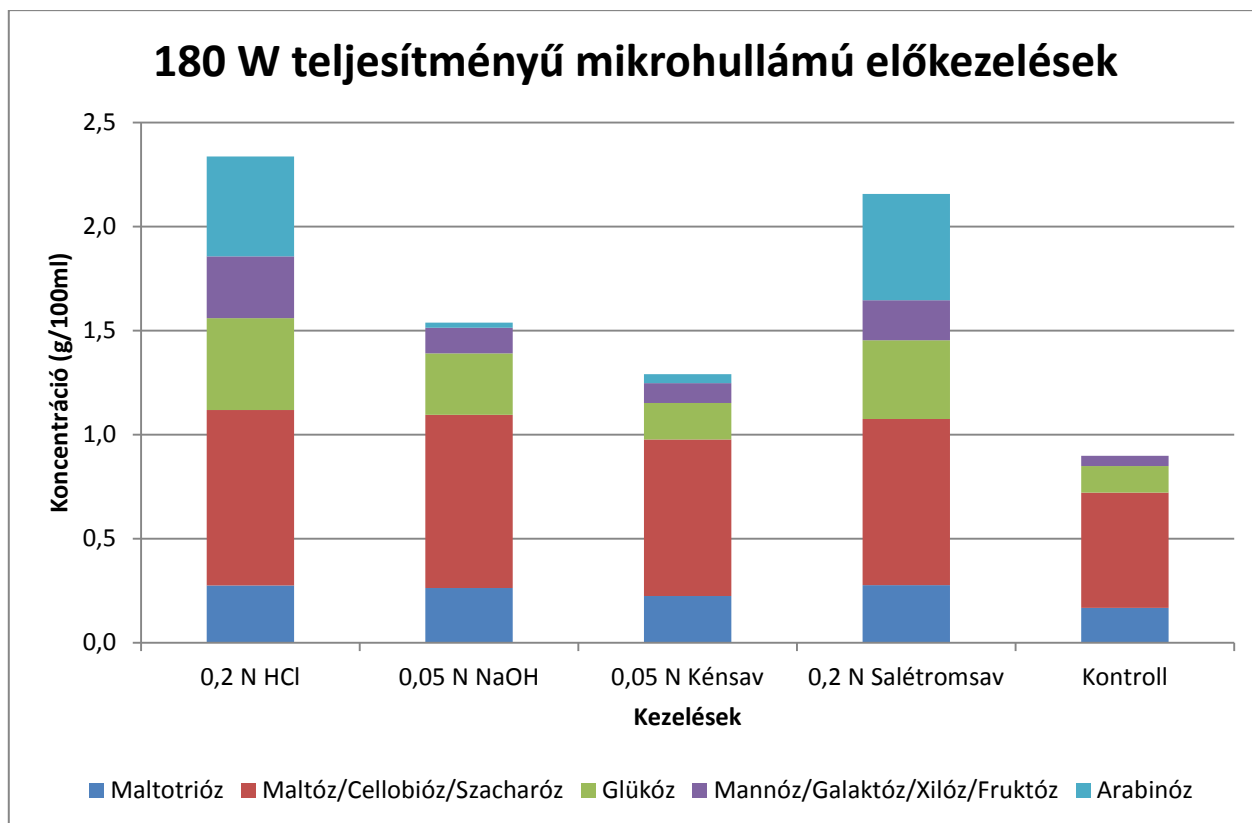
11. ábra: BCA mérés abszorbancia eredményei autoklávós előkezelések esetén

5.2.2 Mikrohullámú kezelések eredményei

A méréseket 0,2 N sósav és salétromsav, 0,05 N nátrium-hidroxid és kénsav oldattal végeztem. Ezen koncentrációkat a BCA mérések eredményei alapján választottam ki. Háromféle teljesítményű mikrohullámú kezelést alkalmaztam: 180W, 360W és 540 W. A kezelések időtartama változó volt: a 180W-os 15, a 360W-os 9, míg az 540W-os kezelés 5 percig tartott.

5.2.2.1 180 W teljesítményű mikrohullámmal végzett előkezelések eredményei

A 180 W teljesítményű mikrohullámú előkezelés során (12. ábra) az enzimés hidrolízis előtt a 0,2 normális sósav oldattal és a szintén 0,2 normális salétromsav oldattal értem el a legjobb eredményt. Legnagyobb mennyiségben a maltóz/cellobióz/szacharóz alkotta csoport volt jelen a kezelt mintákban. A glükóz kisebb koncentrációt mutatott ezekben a mintákban, mint az egyes autoklávós kezeléseknél.



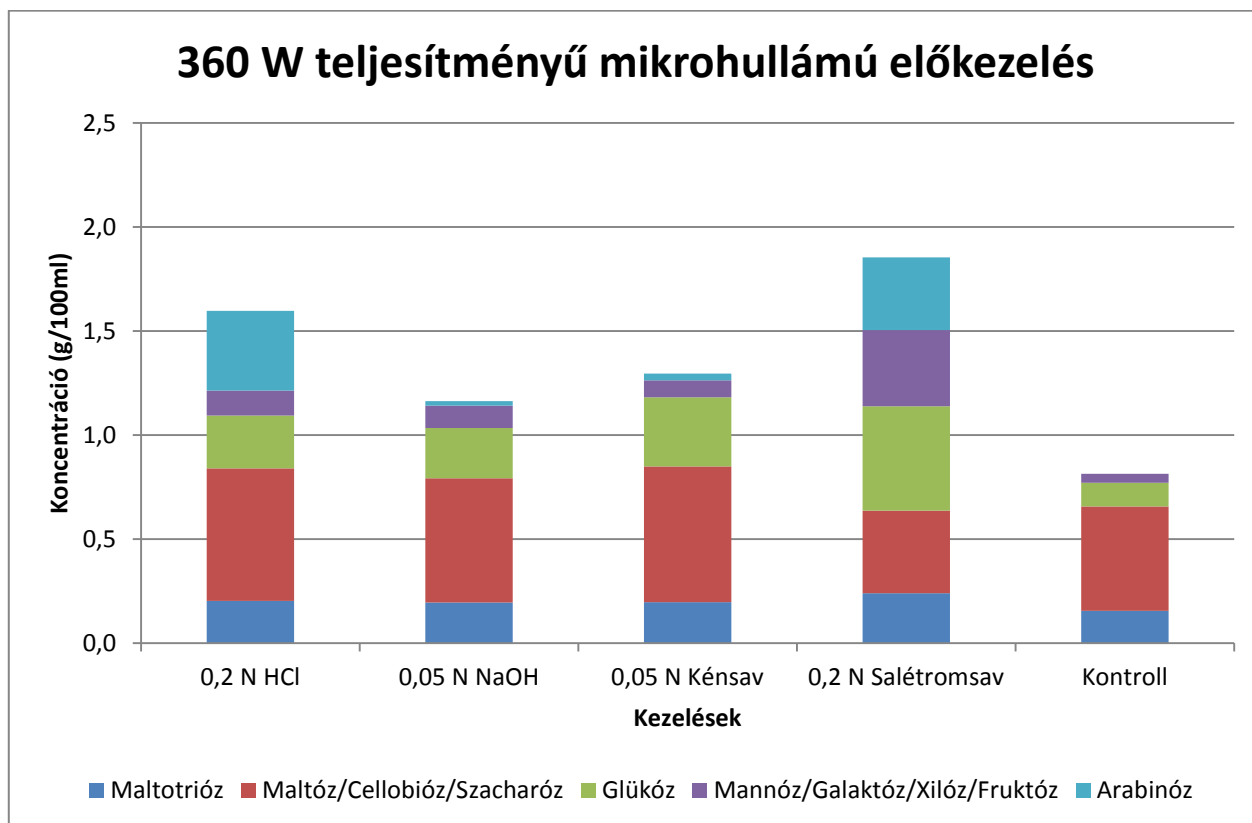
12. ábra: A 180 W teljesítményű mikrohullámú előkezelések során kapott szénhidrát koncentrációk

Az enzimes hidrolízis után a legjobb eredményt a 0,2 normális salétromsavval kezelt minta adta – 3,7g/100ml –, ezt a sósavval kezelt minta követte – körülbelül 1g/100ml koncentráció különbséggel. A maltóz/cellobióz/szacharóz mennyisége jelentősen csökkent az enzimes hidrolízis következtében, míg a glükóz és a mannóz/galaktóz/xilóz/fruktóz mennyisége nagymértékben növekedett. A mannóz/galaktóz/xilóz/fruktóz csoport koncentrációja a salétromsavas mérésnél változott a legnagyobb mértékben – 4,15-szorosára. A glükóz koncentrációjában a legnagyobb növekedés a kénsavas mintánál következett be.

5.2.2.2 360 W teljesítményű mikrohullámmal végzett előkezelések eredményei

A 360 W teljesítményű mikrohullámos kezelések során (13. ábra) az előkezelés után a legmagasabb szénhidrát koncentrációt a 0,2 normális salétromsav oldattal kezelt minta esetében értem el – 0,15 g/100ml különbséggel meghaladva a 0,2 normális sósavval kezelt minta koncentráció értékét. Ezekben a mintákban – kivéve a 0,2 normális salétromsavasat – is a maltóz/cellobióz/szacharóz mennyisége volt meghatározó. A kivételt képező kezelésnél a különböző detektált szénhidrát csoportok közel azonos mennyiségben voltak jelen.

Az enzimes hidrolízist követően a legjobb eredményt a 0,2 normális sósav oldatos minta adta – 2,8g/100ml – kimagaslóan a többi eredmény közül. A 360 W teljesítményű mikrohullámú előkezelésnél is jelentősen nő a glükóz koncentrációja – a kénsav esetében 2,5-szeresére nő, míg a sósavnál 5,7-szeresére az enzimes kezelés után. A mannóz/galaktóz/xilóz/fruktóz csoport mennyisége a sósavas minta kivételével a többi mintánál szinte nullára csökkent. A maltotrióz csak a kontroll esetében maradt meg az enzimes hidrolízis után.

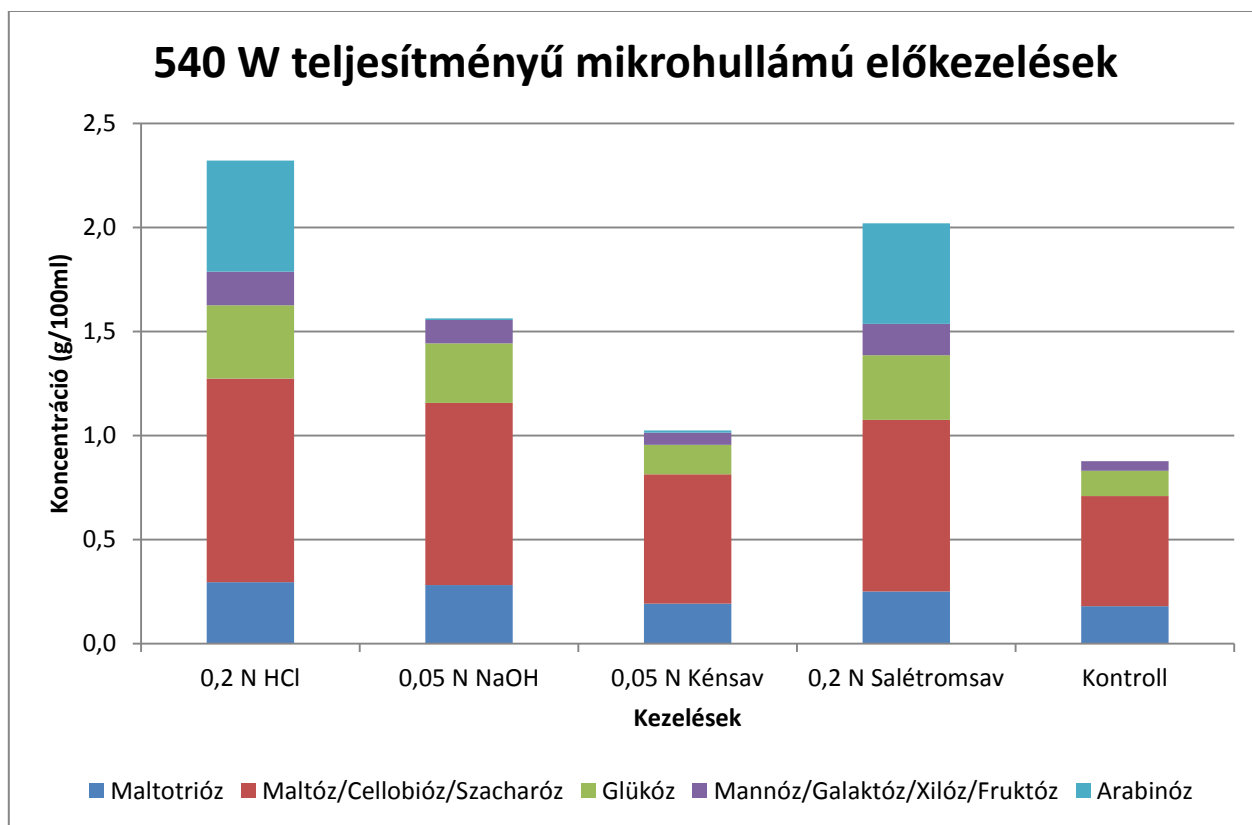


13. ábra: A 360 W teljesítményű mikrohullámú előkezelések során kapott szénhidrát koncentrációk

5.2.2.3 540 W teljesítményű mikrohullámmal végzett előkezelések eredményei

Az 540 W teljesítményű mikrohullámos kezelések során (14. ábra) az előkezeléssel ugyancsak a 0,2 normális sósavval és salétromsavval értem el a legjobb eredményeket. E mikrohullámú kezelés esetén is megfigyelhető, hogy a maltóz/cellobióz/szacharóz csoport jelentős mennyiségben van a kezelt mintákban. Az arabinóz a másik két teljesítményen végzett kezeléshez hasonlóan a sósavas és a salétromsavas kezelésnél jelenik meg nagyobb koncentrációban.

Az enzimés hidrolízist követően a sósavas minta szénhidrát koncentrációja kimagaslik a többi minta közül – 4 g/100ml-es – az öt követő salétromsavas minta is 1g/100ml koncentráció különbséget mutat hozzá képest.



14. ábra: Az 540 W teljesítményű mikrohullámú előkezelések során kapott szénhidrát koncentrációk

Az 540 W teljesítményű mikrohullámú előkezelésnél is a glükóz jelentősen, a mannóz/galaktóz/xilóz/fruktóz csoport kisebb mértékben növekedett az enzimés hidrolízis befejeztével. A glükóz koncentrációja a kénsav esetében 9,64-szorosára, salétromsav esetében 5,2-szeresére, míg a sósavnál 5,9-sszeresére nőtt. A mannóz/galaktóz/xilóz/fruktóz csoportnál 3,7-szeresére nőtt a koncentráció a sósav és a salétromsav esetében, míg a kénsav esetében 4,1-szeresére. A maltóz/cellobióz/szacharóz csoport koncentrációja csökkent, a maltotrióz elfogyott az enzimés hidrolízis végére.

A mikrohullámú kezelések összegzéseként elmondható, hogy mindegyik kezelés esetében a 0,2N sósav és a szintén 0,2N salétromsav mutatta a legjobb eredményeket (9. táblázat).

9. táblázat: Mikrohullámú kezelésekkel kapott cukor koncentrációk értékei az enzimes kezelés előtt

	180 W	360 W	540 W
0,2 N sósav	2,35 g/100ml	1,55 g/100ml	2,3 g/100ml
0,05 N nátrium-hidroxid	1,5 g/ 100ml	1,15 g/100ml	1,55 g/100ml
0,05 N kénsav	1,25 g/100ml	1,4 g/100ml	1,05 g/100ml
0,2 N salétromsav	2,2 g/100ml	1,7 g/100ml	2,05 g/100ml
kontroll	0,85 g/100ml	0,75 g/100ml	0,8 g/100ml

A mintákban legnagyobb mennyiségben maltóz/cellobióz/szacharóz alkotta csoport fordult elő. Az autoklávus kezeléshez képest általában a glükóz koncentráció kisebb volt e kezelés mintáiban.

Az enzimes kezelések során itt is a maltotrióz, maltóz, cellobióz, szacharóz mennyisége csökkent, míg – az előző folyamatoknak köszönhetően – a mannóz, galaktóz, xilóz, fruktóz és a glükóz mennyisége nőtt.

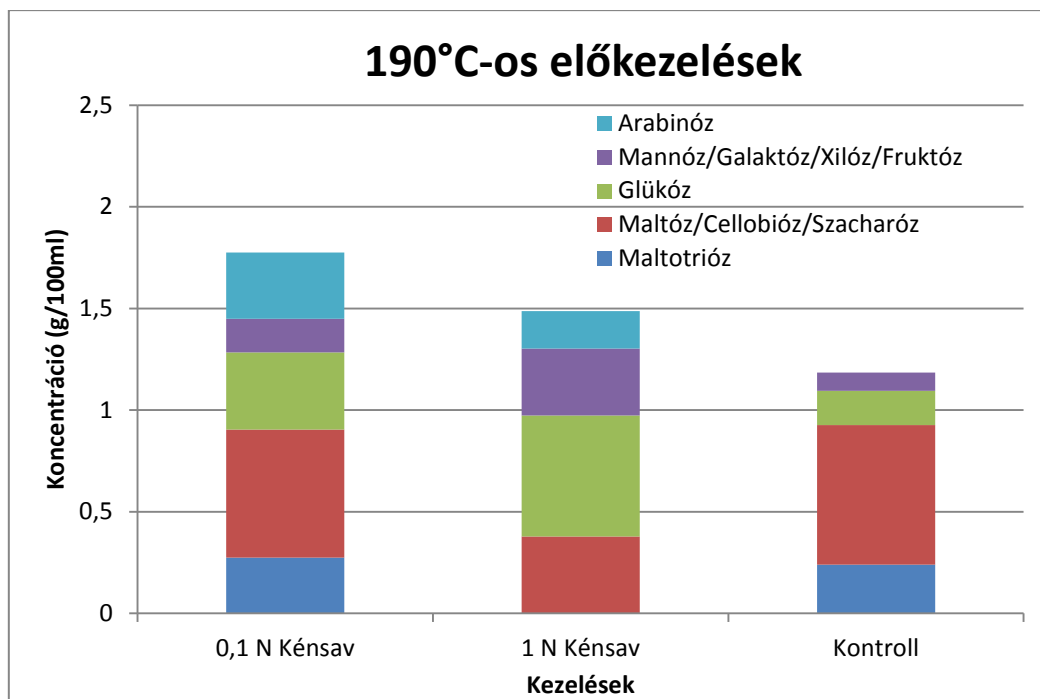
5.2.3 190°C-os kezelés eredményei

A 190°C-os előkezeléseket csak kénsavval végeztem. Azon belül 0,1 és 1 normalitású kénsav oldatokkal dolgoztam. Az előkezelés során 0,1 N kénsav oldattal nagyobb cukor koncentrációt értem el, mint az 1 N kénsav oldattal.

A 0,1N-os kénsavas minta legnagyobb mennyiségben maltóz/cellobióz/szacharóz alkotta csoportot (0,63 g/100ml) tartalmazta, melyet a glükóz (0,38 g/100ml) követett. Az 1N-os kénsavval kiegészített 190°C-os előkezelés következtében is ez a két szénhidrát csoport adta a legnagyobb mennyiséget, de ebben az esetben fordított sorrendben – a glükózból volt a legtöbb (0,6 g/100ml), melyet a maltóz/cellobióz/szacharóz csoport (0,4 g/100ml) követett. A kontroll minta szénhidrát tartalmának legnagyobb részét is a maltóz/cellobióz/szacharóz csoport adta. (15. ábra)

Itt is az eddig leírtak szerint – fordított arányban – változtak az egyes cukrok koncentrációi: a maltotrióz, maltóz, cellobióz, szacharóz mennyisége csökkent, illetve a glükóz, mannóz, galaktóz, xilóz, fruktóz mennyisége növekedett az enzimes kezelés után.

Mind a három előkezelés esetében az enzimes kezelés után magasabb cukor koncentrációkat mértem. A legnagyobb növekedés a 0,1 N kénsav oldat esetében volt. Itt jelentősen növekedett a glükóz koncentráció 0,38 g/100ml-ről, 1,98 g/100ml-re, illetve a mannóz, galaktóz, xilóz, fruktóz csoport is jelentős változást mutatott pozitív irányba 0,165 g/100ml-ről 0,45 g/100ml-re.



15. ábra: 190°C-os előkezeléseknél kapott szénhidrát koncentrációk

Összességében a legeredményesebbnek a 0,1 N kénsav oldattal végzett 190°C-os előkezelés bizonyult.

5.3 Második kísérletsorozat eredményei – enzimes hidrolízis és erjesztés eredményei

A második kísérletsorozat során az előző kísérletek eredményei alapján kiválasztott előkezeléseket alkalmaztam. Az enzimes hidrolízis után *Saccharomyces cerevisiae* élesztővel oltottam be a sörtörköly cefrét és 5 napos erjesztést végeztem.

Az autoklávós kezeléseket 0,1 normális sósavval, 0,2 normális kénsavval, 0,05 normális nátrium-hidroxiddal és 0,2 normális salétromsavval végeztem. A 190°C-os kezelést 0,1 normális kénsavval hajtottam végre. A mikrohullámú kezelést pedig mindhárom teljesítmény esetében 0,2 normál sósav oldattal végeztem.

Készítettem még egy autoklávós kontrollt, egy 190°C-os kontrollt és három – teljesítményenként egy-egy – mikrohullámú kontrollt, illetve egy kezeletlen mintát.

A kapott eredményeket 16-17. ábrákon szemléltetem. Az ábrák átláthatóságának megkönnyítése érdekében a kezelésekhöz sorszámokat társítottam, amelynek a magyarázatát a 10. táblázatban tüntettem fel.

10. táblázat: Sorszámokhoz tartozó kezelések

1.	Autoklávós, 0,1 N sósavval	8.	180 W-os, 0,2 N sósavval
2.	Autoklávós, 0,2 N kénsavval	9.	180 W-os, kontroll
3.	Autoklávós, 0,05 N NaOH-dal	10.	360 W-os, 0,2 N sósavval
4.	Autoklávós, 0,2 N Salétromsavval	11.	360 W-os, kontroll
5.	Autoklávós, kontroll	12.	540 W-os, 0,2 N sósavval
6.	190°C-os, 0,1 N kénsavval	13.	540 W-os, kontroll
7.	190°C-os, kontroll		

Az összes előkezelés közül a legmagasabb szénhidrát koncentrációt – 7,05g/100ml – a 180 W teljesítményű mikrohullámmal kezelt sósavas minta adta, melyet az autoklávós sósavas minta – 6,7g/100ml – és a szintén autoklávós salétromsavas minta – 6,5g/100ml – követte. Az autoklávós kénsavas kezeléssel 6g/100ml cukor koncentrációt értem el.

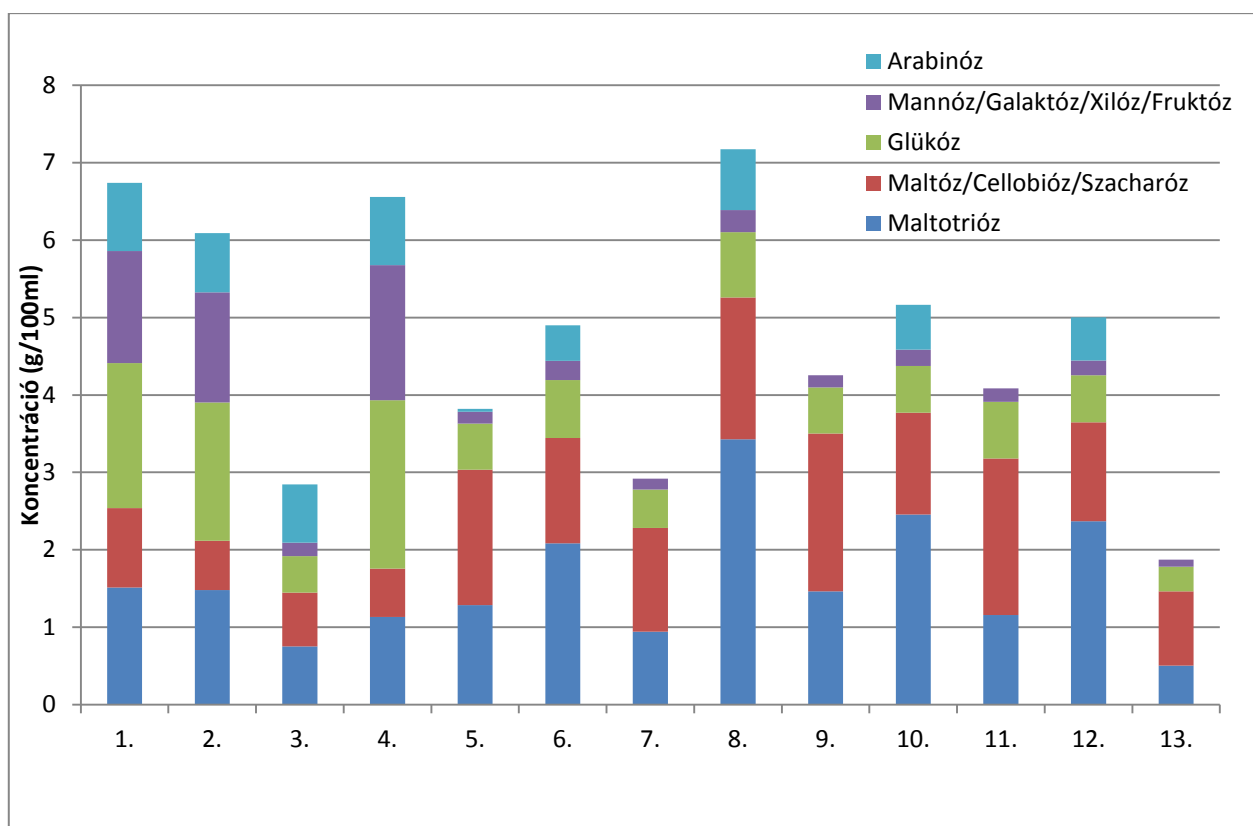
A 190°C-os kénsavas kezeléssel és a 360 W, illetve 540 W teljesítményű mikrohullámmal kezelt sósavas mintákkal 5g/100ml koncentrációt kaptam (16. ábra).

A négy legjobbnak adódott előkezelés következtében a cukor koncentráció körülbelül kétszeresére nőtt a kezeletlen mintához képest.

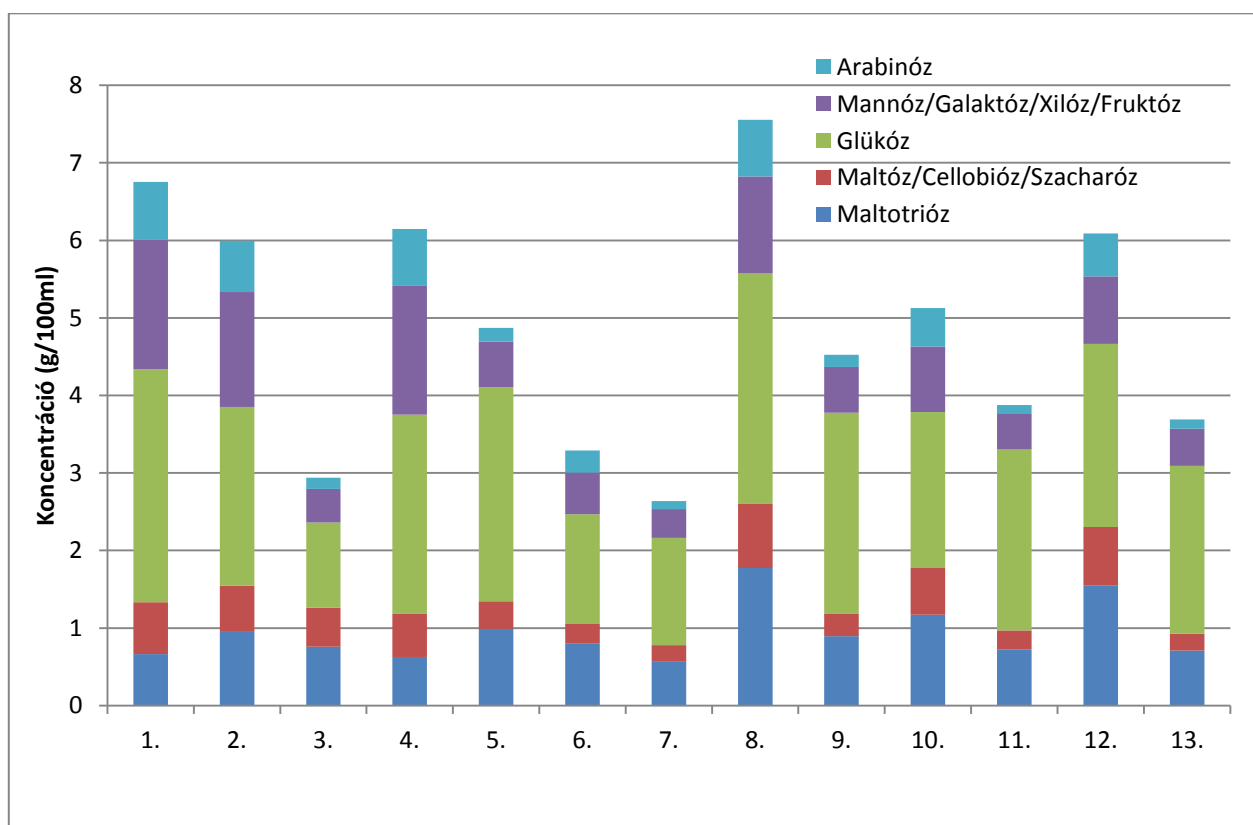
Az enzimes hidrolízist kapott minták diagramjáról is leolvasható az előbb kiemelt négy legjobb variáció. Az enzimes hidrolízisnek köszönhetően átalakult az előkezelés során kapott szénhidrátok aránya az egyes mintákban. Míg a legtöbb minta esetében az előkezelés után a maltóz/cellobióz/szacharóz csoport és a maltotrióz volt jelentős mennyiségben, az enzimes hidrolízis után már a glükóz és a mannóz/galaktóz/xilóz/fruktóz mennyisége dominált az egyes mintákban (17. ábra).

Ebben az esetben is a legmagasabb szénhidrát koncentráció a 180 W-os sósavas mintához tartozott, mely ebben az esetben már 7,5g/100ml. Ezt követik a 6,7g/100ml koncentrációval a sósavas autoklávós minta és a három 6g/100ml cukor koncentrációjú minta – kénsavas autoklávós, salétromsavas autoklávós és 540 W-os sósavas minta.

Az autoklávós mintáknál a kontroll minta cukor koncentrációja szinte kétszerese lett a nátrium-hidroxidos mintáénak (17. ábra).



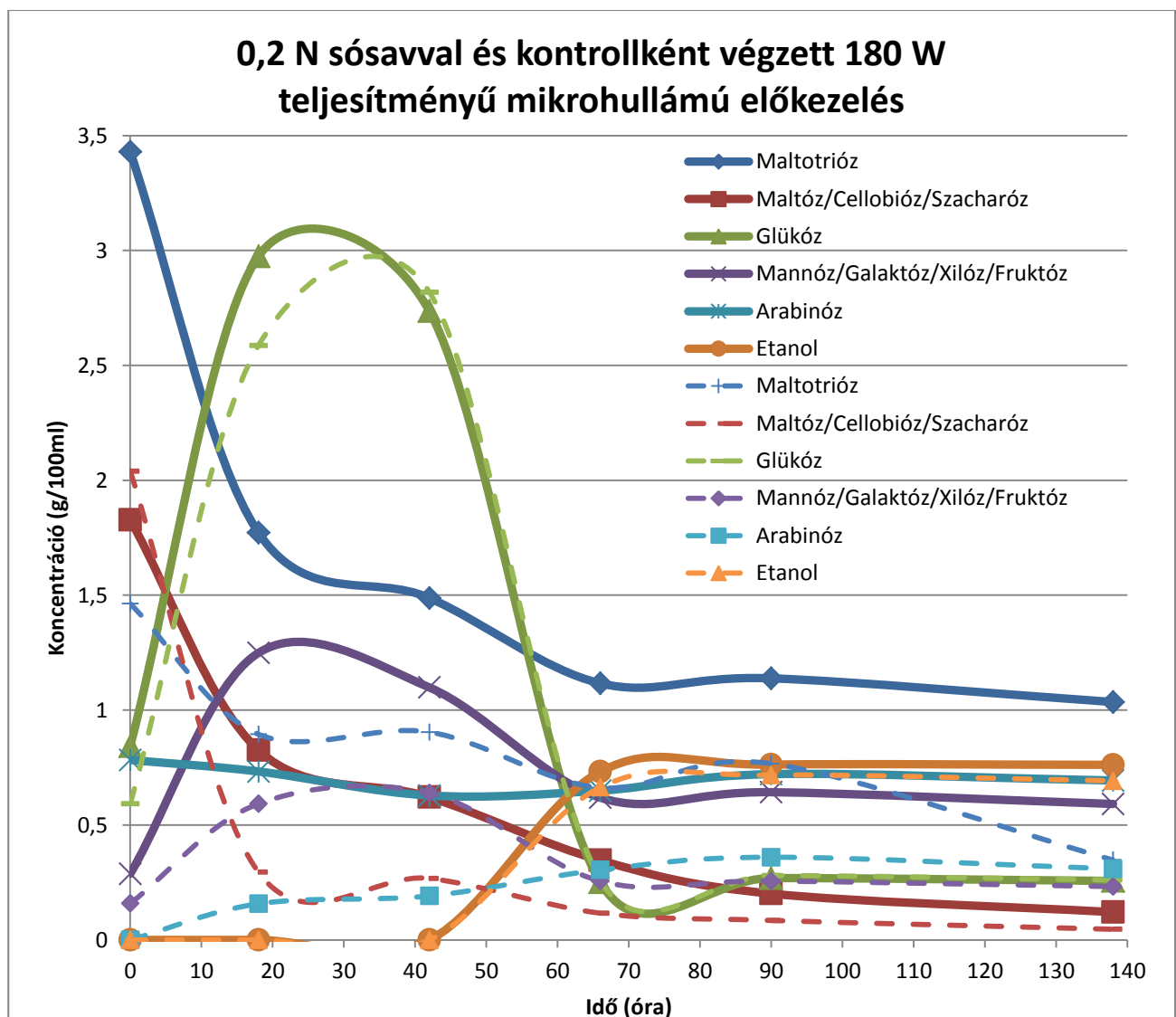
16. ábra: Előkezeléseket kapott minták szénhidrát koncentrációi



17. ábra: Enzimes hidrolízist kapott minták szénhidrát koncentrációi

A 18. ábrán szemléltetni szeretném a vizsgálat során végbemenő – a hidrolízis és az erjesztés folyamán – változásokat egy minta példáján. A folytonos vonalakkal a 0,2 normális sósavval végzett 180 W teljesítményű mikrohullámú előkezelés folyamán végbemenő változások követhetőek végig, míg a szaggatott vonalakkal a 180 W teljesítményű mikrohullámú előkezelés kontroll mintájának változása látható.

A 0. órás adat az előkezelés utáni állapotot mutatja be, a 18. órai az enzimes hidrolízis utánit. Ezt követően 24 óránként jönnek egymás után az 1., 2. napi minták és rá 48 óra múlva az 5. napi minták adatai.



18. ábra: A hidrolízis és az erjesztés során végbemenő változásokat szemléltetése

Leolvasható az ábráról, hogy a folyamatok során a maltotrióz és a maltóz/cellobióz/szacharóz mennyisége szépen csökken, a glükóz szint megnő az enzimes hidrolízis

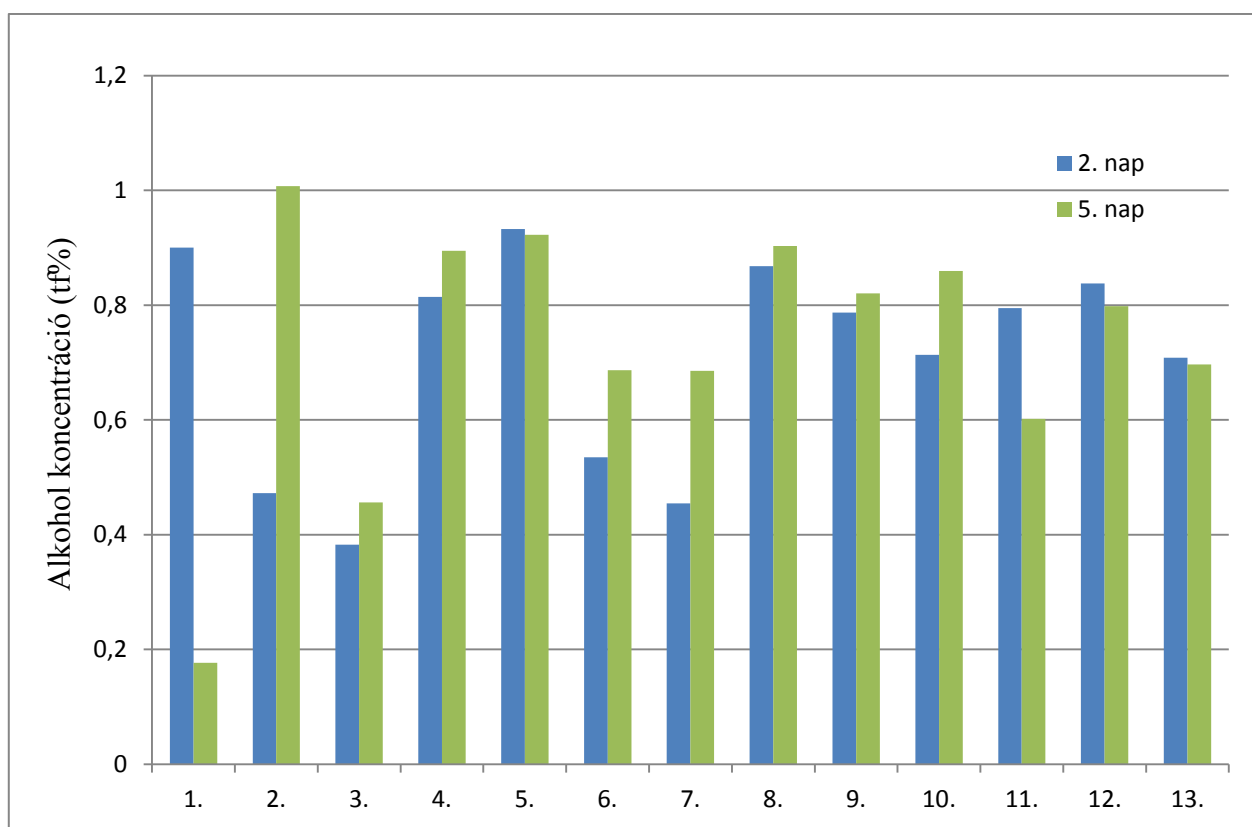
alatt, majd mikor az erjesztés beindul, rohamosan csökken. Az enzimes hidrolízis alatt a mannóz/galaktóz/xilóz/fruktóz szint is növekszik, majd az erjesztés következtében csökken. Az etanol mennyisége az 1. napról a 2. napra változott sokat, utána egy szinten maradt.

A folytonos és szaggatott vonalak hasonló lefutásúak, de a kontroll mintánál alacsonyabb értékeket kaptam.

A többi kezelés esetén is ehhez a mintához hasonló folyamatokat detektáltam, így hasonló diagramokat lehetne készíteni.

Etanol koncentráció változása

A 19. ábrán az etanol térfogat százalékban kifejezett értékének alakulását ábrázoltam az erjesztés folyamán. A kék oszlop a 2. napi, a zöld pedig az 5. napi értékeket mutatja.



19. ábra: A minták etanol koncentrációja az erjesztés 2. és 5. napján

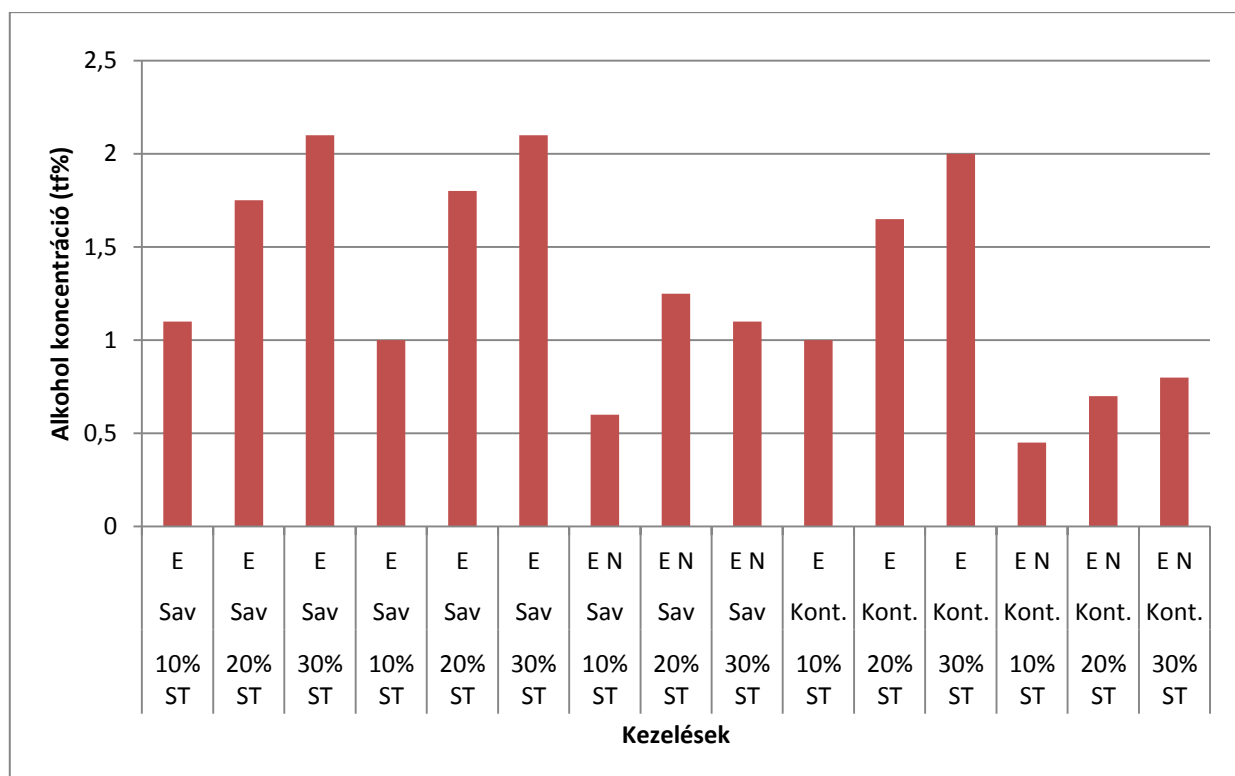
Az eredmények alapján megállapítható, hogy a 0,2 normális kénsavval végzett autoklávus kezeléshez tartozik a legjobb etanol kihozatal. A 0,1 normális sósavas autoklávus és a 0,2 normális salétromsavas autoklávus kezelések is ígéretes eredményeket mutatnak. Annak ellenére, hogy a

sósavas minta esetében az 5. napra jelentős mértékben csökkent az alkoholtartalom, amely valószínűleg egyéb mikroorganizmusok megjelenésének köszönhető. A mikrohullámos előkezelések közül a 180 W teljesítményen végzett kezelések esetén kaptuk a legjobb adatokat, melyeket a 360 W teljesítményűek követnek. Továbbá az is megfogalmazható, hogy a céljaink eléréséhez a nátrium-hidroxidos autoklávos, illetve a 190°C-os kezelések nem bizonyulnak megfelelőnek.

5.4 Harmadik kísérletsorozat – cefrekonzentráció optimalás eredményei

E vizsgálat során a célom az volt, hogy megfigyeljem, milyen mértékben nő az etanol koncentráció a törköly százalékos arányának növelésével. Ebben a kísérletsorozatban a második kísérletsorozat eredményei alapján kiválasztott előkezelést alkalmaztam. Ez az előkezelés a 0,2N kénsavval történő autoklávos kezelés volt. Az enzimés hidrolízis után *Saccharomyces cerevisiae* élesztővel oltottam be és 5 napos erjesztést végeztem. Az erjesztés 4. napján ledesztilláltam a mintákat.

A 20. ábra a ledesztillált minták etanol tartalmát mutatja be.



20. ábra: A ledesztillált minták etanol tartalma térfogat százalékban kifejezve

(E: enzimés, EN: enzim nélkül, ST: sörtörköly)

Az ábráról leolvasható, hogy a 30%-os sörtörköly arány mellett lettek a legmagasabbak az etanol tartalmak. Az enzimes kezelést is kapott minták – 1.-től a 6.-ig, illetve 13.-tól a 15.-ig – etanol tartalma magasabb lett, mint az enzimes kezelést nem kapottaké. A kénsavas mintáknál magasabb térfogat százalékot sikerült elérni, mint a desztillált vizes mintáknál. Ebből kifolyólag mind a savas hidrolízis, mind az enzimes hidrolízis szükséges az etanol kihozatal növelése érdekében. A sörtörköly aránnyal nőtt a cefrém etanol tartalma. A legjobb kihozatalt a 0,2N kénsavas oldattal kiegészített autoklávus kezeléssel értem el, azon belül is a 30%-os sörtörköly esetében. Az általam kapott eredményeket összehasonlítva a szakirodalomban talált adatokkal, ahol hasonló paramétereket alkalmaztak és így 20%-os törkölyarányt használva 5,8-8,3 g/l alkoholkoncentrációt kaptak megállapítható, hogy a vizsgálataim sikeresek voltak.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

Az előkezelések közül a 0,2N-os kénsavval történő autoklávus előkezelés enzimés hidrolízissel kiegészítve a legígéretesebb, így a további kísérletek kiindulási alapját képezheti.

A kísérletsorozataim során kapott eredmények alapján megállapítható, hogy a nagyobb sörtörköly arány esetén jobb etanol kihozatal érhető el, viszont figyelembe kell venni, hogy a 30%-os törköly arány már elég nehezen kezelhető volt. Mind a savas hidrolízis, mind az enzimés hidrolízis szükséges az etanol kihozatal növelése érdekében.

A kutatás továbbfejlesztésére a következő lehetőségeket látom:

- Az erjesztést olyan mikroorganizmus társításokkal, kevert kultúrákkal elvégezni, amelyek a cefrében jelenlévő szénhidrátok több fajtáját (pl. arabinóz, xilóz) képesek etanollá konvertálni.
- Megoldás lehet olyan *Saccharomyces* törzs nemesítése is, amely képes például a xilóz erjesztésére is.
- Az enzimés hidrolízis további optimalítása az adagolás, időtartamának tekintetében. Továbbá tervezem egyéb specifikus enzim készítmények, enzim komplexek kipróbálását.
- Szimultán cukrosítási és erjesztési technológia megvalósítását.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A söripar melléktermékeként keletkező nagymennyiségű sörtörköly – évente 3,4 millió tonna keletkezik belőle az Európai Unióban – alkalmas lehet második generációs, lignocellulóz alapú bioetanol előállításra. A lignocellulóz főtömegét három fő polimer adja: cellulóz, hemicellulóz és lignin. Ezek közül a cellulóz és a hemicellulóz használható fel, melyekhez csak előkezelések után lehet hozzáférni. A munkám célja az volt, hogy a sörtörkölyből történő bioetanol előállításához szükséges előkezeléseket tanulmányozzam.

A szakirodalmi adatok, ismeretek alapján három fő előkezelési eljárást választottam: autoklávós előkezelést, mikrohullámú kezelést és 190°C-os kezelést. A kezeléseket savas – sósavas, salétromsavas, kénsavas –, lúgos (nátrium-hidroxidos) és desztillált vizes közegben végeztem. Különböző koncentrációjú oldatokkal. Az előkezeléseket enzimes hidrolízis követte, melyet Celluclast 1.5L, Novozyme 188, Viscozyme L és xilanáz enzimekkel végeztem.

Az autoklávós előkezelések eredményei tekintetében megállapítható, hogy az autoklávós kezelés savas kezeléssel kiegészítve sikeres volt mindhárom alkalmazott sav esetében összehasonlítva az eredményeket a kontroll mintákkal, ahol savas kezelés nem volt. A salétromsav, kénsav esetében a 0,2 normális, a sósavnál 0,1 normális oldat alkalmazásakor kaptam a legnagyobb szénhidrátmennyiségeket. A nátrium-hidroxidos kezelés a többi előkezeléshez képest kevésbé volt sikeres. A mikrohullámos előkezelések esetében az alkalmazott teljesítmények közül a legjobbnak a 180W-os adódott. A teljesítményeken belül a 0,2N-os sósavas minták mutattak kiemelkedő eredményt. A 190°C-os előkezelés esetében a 0,1N-os kénsavas minta esetében tapasztaltam a legnagyobb szénhidrát koncentrációt. Az előkezeléseket követően elvégzett enzimes hidrolízis hatására a legtöbb esetben a maltóz, cellobióz, szacharóz, maltotrióz koncentráció is csökkent, míg a glükóz, mannóz, xilóz, galaktóz, fruktóz koncentráció növekedett.

A kapott eredmények alapján egy újabb kísérletsorozatot állítottam össze. Az előkezeléseket és az enzimes hidrolíziseket követően *Saccharomyces cerevisiae* élesztővel erjesztettem a mintákat. E kísérletsorozat esetében az enzimes hidrolízist megelőzően a 180W teljesítményű mikrohullámmal kezelt sósavas minta adta a legmagasabb szénhidrát koncentrációt, melyet az autoklávós sósavas minta követett. A négy legjobbnak adódott előkezelés esetén a szénhidrát koncentráció körülbelül kétszeresére nőtt a kezeltetlen mintához képest.

Az enzimes hidrolízis során a maltotrióz és a maltóz/cellobióz/szacharóz mennyisége megfelelően csökkent, a glükóz tartalom megnőtt, majd az erjesztés beindulását követően, rohamosan csökkent. Az enzimes hidrolízis alatt a mannóz/galaktóz/xilóz/fruktóz szint is

növekszik, majd az erjesztés következtében csökken. A cefrék etanol tartalma az 1. napról a 2. napra jelentős mértékű változást mutatott és ezt követően mennyisége már nem változott jelentős mértékben a fermentáció során. A legnagyobb etanol tartalmat 0,2 normális kénsavval végzett autoklávus kezelés, enzimes kezeléssel kiegészítve adta.

A következő kísérletsorozatban arra kerestem a választ, milyen mértékben nő az etanol koncentráció a törköly százalékos arányának növelésével. E vizsgálat során a második kísérletsorozat eredményei alapján kiválasztott előkezelést alkalmaztam. Ez az előkezelés a 0,2N kénsavval történő autoklávus kezelés volt. Az enzimes hidrolízis után *Saccharomyces cerevisiae* élesztővel oltottam be a cefréket. A 30%-os sörtörköly arány mellett lettek a legmagasabbak az etanol tartalmak. Az enzimes kezelést is kapott minták etanol tartalma magasabb lett, mint a kezelést nem kapottaké. A kénsavas mintáknál magasabb térfogat százalékot sikerült elérni, mint a desztillált vizes (kontroll) mintáknál. Ebből kifolyólag mind a savas hidrolízis, mind az enzimes hidrolízis szükséges az etanol kihozatal növekedése érdekében. A sörtörköly aránnyal nőtt a cefrém etanol tartalma. A legjobb kihozataalt a 0,2N kénsavas oldattal kiegészített autoklávus kezeléssel értem el, azon belül is a 30%-os sörtörköly esetében.

Ezen eredmények alapján megállapítható, hogy sikeres lépéseket tettem a sörtörköly bioetanol célú hasznosításával kapcsolatban és eredményeim megfelelő alapot nyújtanak a kutatás továbbfejlesztéséhez.

8. FELHASZNÁLT IRODALOM

ALIYU S., BALA M. (2011) Brewer's spent grain: A review of its potentials and applications. *African Journal of Biotechnology*. Volume 10: p. 324-331.

BESZÉDES S., TACHON A., LEMMER B., ÁBEL M., SZABÓ G., HODÚR C. (2012) Bio-fuels from cellulose by microwave irradiation. *Annals of faculty engineering Hunedoara. Romania*. Volume 2: p. 43-48.

CARVALHEIRO F., ESTEVES M. P., PARAJÓ J. C., PEREIRA H., GÍRIO F. M. (2004) Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain. *Bioresource Technology*. Volume 91, Issue 1: p. 93-100.

DEMIRBAS A. (2008) Comparison of transesterification methods for production of biodiesel from vegetable oils and fats. *Energy Conversion and Management*. Volume 49, Issue 1: p. 125-130.

DONGHAI SU, JUNSHE SUN, PING LIU, YANPING LÜ (2006) Effects of different pretreatment modes on the enzymatic digestibility of corn leaf and corn stalk. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. Volume 14, Issue 6: p. 796-801.

FOGARASSY CS. (2001) Energianövények a szántóföldön. *SZIE GTK Európai Tanulmányok Központja, Gödöllő*. p. 23-25.

GUPTA M., ABU-GHANNAM N., GALLAGHAR E. (2010) Barley for Brewing: Characteristic Changes during Malting, Brewing and Applications of its By-Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Volume 9, Issue 3: p. 318-328.

HANCSÓK J., KRÁR M., HOLLÓ A., THERNESZ A. (2006) Újgenerációs biomotorhajtóanyagok I. *Magyar Kémikusok Lapja*. Volume 61, Issue 8: p. 260-264.

HUIGE NJ. (1994) Brewery by-products and effluents. In: Hardwick WA, editor. *Handbook of brewing*. New York: Marcel Dekker. p. 501-50.

KESHWANI D. R., CHENG J. J. (2009) Switchgrass for bioethanol and other value-added applications: A review. *Bioresource Technology*. Volume 100, Issue 4: p. 1515-1523.

MÁDAINÉ ÜVEGES V., BOKÁNYI L. (2013) Bioetanol előállításának kutatása a Miskolci Egyetemen
(<http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:Pf52ihnFfGAJ:hulladekonline.hu/files/115+&hl=hu&gl=hu>, 2013)

MUSSATTO S. I., FERNANDES M., MILAGRES A. M. F., ROBERTO I. C. (2008) Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. *Enzyme and Microbial Technology*. Volume 43, Issue 2: p. 124-129.

NEMÉNYI M. (2012) Megújuló energiaforrások kutatás-fejlesztési tevékenysége a Nyugat-Magyarországi Egyetemen
(http://www.mtk.nyme.hu/fileadmin/user_upload/szti/biomotion/biofuels_in_hungary.pdf, 2012)

NIGAM P.S., SINGH A. (2011) Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*. Volume 37, Issue 1: p. 38: p. 52-68.

PIERRE G., SANNIER F., GOUDE R., NOUVIAIRE A., MAACHE-REZZOUG Z., REZZOUG S., MAUGARD T. (2011) Evaluation of thermomechanical pretreatment for enzymatic hydrolysis of pure microcrystalline cellulose and cellulose from Brewers' spent grain. *Journal of Cereal Science*. Volume 54, Issue 3: p. 305-310.

POMERANZ Y, DIKEMAN E. (1976) From barley to beer—a mineral study. *Brew Dig* 51: p. 30–32.

REZESSY-SZABÓ J. M., NGUYEN Q. D., HOSCHKE Á., BRAET C., HAJÓS GY., CLAEYSSSENS M. (2007) A novel thermostable α -galactosidase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* CBS 395.62/b: Purification and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*. Volume 1770, Issue: p. 55-62.

SANTOS M, JIMENEZ JJ, BARTOLOME B, GOMEZ-CORDOVES C, DEL-NOZAL M. J. (2003) Variability of brewer's spent grain within a brewery. *Food Chemistry. Volume 80, Issue 1*: p. 17–21.

SIPOS B. (2010) Lignocellulózok lebontása fermentálható cukrokká bioetanol gyártás céljából. *PhD disszertáció. Budapesti Műszaki Egyetem. Budapest*

TALEBNIA F., KARAKASHEV D., ANGELIDAKI I. (2010) Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology. Volume 101, Issue 13*: p. 4744-4753.

VARGA-ERDEI É. (2011) *Kluyveromyces marxianus* élesztő törzsek fejlesztése bioetanol termelés céljából. *PhD disszertáció. Debrecen*

WHEALS A. E., BASSO L. C., ALVES D. M. G., AMORIM H. V. (1999) Fuel ethanol after 25 years. *Trend sin Biotechnology. Volume 17, Issue 12*. p. 482-487.

WHITE J. S., YOHANNAN B. K., WALKER G. M. (2008) Bioconversion of brewer's spent grains to bioethanol. *Federation of European Microbiological Societies. Scotland*. p. 1175-1184.

Internetes hivatkozások:

Az Európai Parlament és a Tanács 2003/30/EK irányelve (<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2003L0030:20030517:HU:PDF>, 2013)

Hempcar: Henry Ford (<http://hempcar.org/ford.shtml>, 2012)

Renewable Fuels Association: World Fuel Ethanol Production (<http://ethanolrfa.org/pages/World-Fuel-Ethanol-Production>, 2012)