

Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar
Sör- és Szeszzipari Tanszék



Élelmiszertudományi Kar

**Kevert kultúra hatása a tejsavó
etanolos erjesztésére**

TDK dolgozat

Csernyák Ferenc
IV. évf. BSc hallgató

Témavezetők:

Dr. Nguyen Duc Quang egyetemi docens
Rezessyné Dr. Szabó Judit egyetemi magántanár
Farkas Csilla PhD hallgató

Budapest
2014

TARTALOMJEGYZÉK

1	BEVEZETÉS.....	2
2	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
2.1	Biológiai eredetű energiaforrások	4
2.2	A bioetanol, mint alternatív üzemanyag	5
2.2.1	A bioetanol generációi	6
2.2.2	Bioetanol helyzete a világban	7
2.3	A tejsavó az ipari melléktermék.....	9
2.3.1	A tejsavó kezelése és felhasználási lehetőségei.....	9
2.4	A tejsavó alapú bioetanol előállítása	10
2.4.1	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	12
2.4.2	Vegyes kultúrárs laktóz fermentációja	12
3	KISÉRLETI RÉSZ	14
3.1	Célkitűzések.....	14
3.2	Kísérleti hely.....	14
3.3	Anyagok és módszerek.....	15
3.3.1	Alkalmazott mikroorganizmusok.....	15
3.3.1.1	A <i>Kluyveromyces</i> fajok/törzsek	15
3.3.1.2	A <i>Saccharomyces cerevisiae</i> fajlesztő	15
3.3.2	Felhasznált anyagok és reagensek	15
3.3.2.1	A malátás ferdeagar	15
3.3.2.2	A tejsavópor	15
3.3.2.3	Az inokulum tápoldat.....	16
3.3.2.4	Somogyi I és II reagens	16
3.3.2.5	Nelson reagens.....	16
3.3.3	Alkalmazott módszerek és berendezések	17
3.3.3.1	Az inokulum előállítása	17
3.3.3.2	A cefrekészítés és a fermentáció	17
3.3.3.3	Redukáló cukortartalom mérés	17
3.3.3.4	Szénhidráttartalom meghatározása (HPLC technika)	19
3.3.3.5	Az etanol koncentráció meghatározása	19
3.3.3.6	Kísérlettervezés.....	20
3.4	Eredmények és értékelésük.....	22
3.4.1	Különböző <i>Kluyveromyces</i> fajok/törzsek szelektálása	22
3.4.2	Tejsavópor koncentráció hatása a vegyes kultúrárs fermentáció alakulására.....	24
3.4.3	Az optimális tejsavópor koncentráció és beoltási arány meghatározása	28
3.4.4	A modellek hitelesítése	33
4.	ÖSSZEFOGLALÁS	35
5.	IRODALOM JEGYZÉK	37

1 BEVEZETÉS

A növekvő iparosodás és motorizáció hatására világszerte folyamatosan növekszik a kereslet a kőolaj-alapú (fosszilis) üzemanyagok iránt (Agrawal, 2007). Ennek következménye a fosszilis energiaforrás progresszív módon történő csökkenése, valamint az üvegházhatású gázok nagymértékű kibocsátása. A Föld klímaváltozásának legfőbb kiváltója a széndioxid, melyben világszinten a hő- és elektromos előállító, valamint a közlekedés szektor kétharmad részben felelős. A primer energiaforrások a fellelőhelyük és a kitermelésük miatt számos konfliktust gerjesztenek a világ politikájában, a gazdasági stabilitásban illetve a biztonsági ellátásban. Ezen üzemanyagok nem megújulóak, így várhatóan előbb-utóbb kimerülnek (Kacz-Neményi, 1998).

A bioüzemanyagok, melyek megújuló és fenntartható energiaforrásokon alapulnak, lehetőséget nyújtanak a fosszilis üzemanyagok helyettesítésére, valamint bizonyos mértékű kiváltására (Singh *et al.*, 2010; Prasad *et al.*, 2007; Kerényi, 1995). A legelterjedtebb alternatív megoldást az elsőgenerációs szacharóz- és keményítő alapú bioetanol jelenti. Azonban megfogalmazódtak olyan aggodalmak, amelyek szerint a globális bioüzemanyag kereslet növekedésével a fejlődő országokban veszélybe kerülhet és már került is a megfizethető élelmiszer (Laczó, 2008). Ezen nyersanyagok Európában és az USA-ban fontos szerepet töltenek be az emberek ételmezésében ezért versenyben vannak mind az élelmiszer- mind a bioüzemanyag-ipar igényeinek kielégítéséért. Az ételmezésre szánt földterületek elvonásának következménye a növények magasabb piaci ára, amely miatt a belőlük készült bioetanol költsége lényegesen magasabb, mint a fosszilis eredetű üzemanyagok előállításának a költsége (Hoschke, 2010). További problémát jelent, hogy az Európai Parlament elhatározta, hogy megszünteti az első generációs bioüzemanyag támogatásait és az elkövetkező időszakban kizárólag második vagy ennél magasabb generációs bioüzemanyag kutatás-fejlesztése és alkalmazása kerül a fókuszba. Így az új potenciális nyersanyag források felkutatása vagy a meglévő technológiák fejlesztése szintén főcélok között található. Többek között ezért is fontos az új technológiák fejlesztése és megvalósítása, hogy a bioetanol előállítását függetleníteni lehessen a keményítő alapú mezőgazdasági kultúrnövényektől. Egyik ilyen független és potenciális nyersanyag lehet a sajt-, túró- és kazeingyártás melléktermékeként keletkező tejsavó, melynek kezelésének szükségességét nagy mennyisége és magas szárazanyag-tartalma indokolja. Általában, 100 liter sajttejből 80-90 liter savó képződik. A Föld országainak éves savótermelését összesen 185-190 millió tonnára becsülik, és kb. évi 2 % növekedéssel

lehet számolni (Román, 2010). A tejsavó kezelésének egyik alternatív megoldása lehet a bioetanollá történő konvertálása. Sajnos jelenleg az alkohol fermentációs iparban alkalmazott *Saccharomyces cerevisiae* élesztőtörzs nem vagy csak csekély mértékű laktáz aktivitással rendelkezik, így csupán vontatottan képes a tejsavóban lévő laktózt lebontani, majd etanollá konvertálni (Panesar *et al.*, 2010). Ezzel szemben a *Kluyveromyces* nemzetség egyes képviselői megfelelő laktáz enzimaktivitást mutatnak, azonban kevésbé alkoholtűrőek. Ígéretes lehetőséget nyújthat a vegyes kultúras erjesztés, amelyet a biotechnológia számos területén (pl.: joghurtgyártás) már nagy hatékonysággal alkalmaznak. TDK dolgozatomban célul tűztam ki a vegyes kultúras alkoholos erjesztés vizsgálatát a tejsavó alapanyag esetében.

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Biológiai eredetű energiaforrások

A növekvő energiaigények kielégítésére döntően a fosszilis energiaforrások szolgálnak, melyek elégetésekor nagy mennyiségű szén-dioxid és egyéb mérgező anyag szabadul fel. A kutatási eredmények alapján a szén-dioxidot, mint az egyik legfőbb üvegházhatású gázt, a klímaváltozás fő okozójának tekintjük, melynek növekvő mennyisége döntően a közlekedési ágazat számlájára írható (Potori, 2008). Természetesen ne feledkezzünk meg arról sem, hogy a természetes üvegházhatású gázok tették élhetővé a Földet, hiszen ha nem lennének, akkor a bolygó átlagos hőmérséklete több mint 30°C-kal lenne hidegebb (Farkas, 2010; Wyman, 1996). Annak érdekében, hogy kevesebb káros anyag kerüljön a légkörbe, kell egy anyag, amely megújuló, fenntartható és hatékony. A bioüzemanyagok megfelelők erre a célra, mivel rendelkeznek ezen tulajdonságokkal és kiválthatják a jelenleg domináns fosszilis üzemanyagokat.

A biomassza felhasználási lehetőségeinek egyike az alkoholos fermentációval történő etanol (bioetanol) előállítás, melyet környezetkímélő, motorhajtó bioüzemanyagként hasznosítanak (Kerényi, 1995). Leggyakoribb és talán legfontosabb megállapítás, hogy teljes energiamérlegük pozitív (teljes élelciklusra számítva), vagyis kevesebb energiát fektetünk be előállításuk során, mint amennyit felhasználásukkal nyerünk (Kazai & Varga, 2007), s ezen mérleg az előállításnál keletkező hőenergia vagy a keletkező melléktermékek hasznosításával (pl. takarmányként) még tovább javítható (Laczó, 2008). A bioetanol és a biodízel előállítása napjainkban főként keményítő tartalmú nyersanyagok (melasz, kukorica, búza stb.) felhasználásával történik. Ezen nyersanyagok Európában és az USA-ban fontos szerepet töltenek be az emberek ételmezésében ezért versenyben vannak mind az élelmiszer- mind a bioüzemanyag-ipar igényeinek kielégítéséért. Az ételmezésre szánt földterületek elvonásának következménye, a növények magasabb piaci ára, amely miatt a belőlük készült bioetanol költsége lényegesen magasabb, mint a fosszilis eredetű üzemanyagok előállításának a költsége (Hoschke, 2010).

További probléma hogy az Európai Parlament az első generációs bioüzemanyag támogatásait korlátozni akarja, így új potenciális nyersanyag források felkutatása illetve a meglévő technológiák fejlesztése lesz a cél. Az egyik legdinamikusabban fejlődő terület a biomassza alapú energianyerés, amely szinte korlátlan mennyiségben áll rendelkezésünkre, ugyanakkor még megoldásra váró technológiai problémái vannak (Fogarassy, 2001).

Élelmiszeriparunkban képződő melléktermékek hasznosítása illetve új megújuló energiák felkutatása, megoldás lehet a jövő energiaszükségletének kielégítéséhez, a nem megújuló anyagok okozta globális problémák megoldásához. A sajtgyártás mellékterméke a tejsavó, melyek magas szárazanyag tartalma (melynek nagy része laktóz) és keletkező nagy mennyisége indokolja kezelését.

2.2 A bioetanol, mint alternatív üzemanyag

Az etanol (etil-alkohol - C_2H_5OH) egy színtelen, jellegzetes ízű, vízben jól oldódó, folyékony vegyület, amelyet akkor nevezhetünk bioetanolnak, ha biológiailag megújuló energiaforrások felhasználásával benzint helyettesítő vagy annak adalékanyagaként szolgáló motorhajtó üzemanyagot állítunk elő (Hoschke, 2010). A belsőégésű motorok hajtására használt bioetanol alacsonyabb hőmérsékleten ég, így annak élettartalma hosszabb, CO- és SO_2 -emissziója kisebb lesz. Hozzákeverve benzinnel pedig annak oktánszámát növeli, tökéletesebb égést biztosítva (Sági, 1998). A fogyasztók számára ugyanakkor legnagyobb előnye a piaci ára, amely kevesebb, mint a benziné, átlagosan 60-70 Forinttal.

Általánosságban elmondható, hogy a motorbenzinhez képest az energiatartalma csupán 60-65 %, így azonos úthosszon a gépjármű fogyasztásának növekedésével számolnunk kell. Továbbá a kenőképesége is rosszabb, amely gyakoribb olajcserét és az alkatrészek kopásának fokozottabb veszélyét eredményezheti. Nagy gőznyomása és alacsony párolgáshője miatt hidegindítási problémákkal kell számolni. A bekeverési arány a 85:15 (benzin:bioetanol), de maximum 80:20 anélkül, hogy a motor károsodna. Tiszta etanol is alkalmas üzemanyagként, ugyanakkor azt szemünk előtt kell tartani, hogy energia tartalma kisebb (65%-a a benzinnel) ezért ugyanakkor távolság megtételéhez, több kell mint benzinnél. A bioetanol üzemanyagként használva környezetvédelmi szempontból több előnyös tulajdonsággal rendelkezik.

A kedvezőtlen tulajdonságokat enyhíti, hogy a magas oktánszámnak köszönhetően az égés tökéletesebb lesz, s lecsökken az üvegházhatású gázok emissziója. Vizsgálatok alapján felére-harmadára mérsékelhető az üvegházhatású gázok és a savas esőzésért felelős kén-dioxid koncentrációja a légkörben. A rákos megbetegedésekért felelős aromás szénhidrogének mennyisége is kedvező mértékben korlátozható. A fosszilis üzemanyagokhoz képest jobb lebomlási tulajdonságokkal bír (Hancsók *et al.*, 2006; Popp, 2007). Továbbá széleskörű nyersanyagbázissal rendelkezik, ugyanis a mezőgazdasági

kultúrnövények vagy az erre a célra termesztett energianövények mellett, olyan alapanyagok is felhasználhatóak, amelyek élelmiszeripari- illetve takarmányozási célra egyáltalán nem alkalmasak, mint például a fuzáriummal fertőzött gabona vagy egyéb, az élelmiszeriparban keletkezett melléktermék s ezáltal a nemzetközi és hazai piacon fellépő értékesítési problémák kivédhetőek (Sánchez és Cardona, 2008).

Fontos szempont, hogy a felhasználás vagy a teljes életciklus alatt vizsgáljuk meg a felhasznált energia mennyiségét. A felhasználás során az energiamérleg pozitív. Ugyanis az égés során ugyanannyi szén-dioxid kerül a levegőbe, mint amennyit a növény teljes életciklusa során megkötött. A teljes életciklus oldaláról tekintve, azonban jelentős problémát jelent az alapanyag előállítása, a feldolgozása valamint a késztermék szállítása során felhasznált nagymennyiségű, elsősorban fosszilis energia (Farkas, 2010).

2.2.1 A bioetanol generációi

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

Az első generációs bioüzemanyagokat cukor- vagy keményítő tartalmú gabonákból vagy egyéb növényekből állítják elő, például kukoricából (*Mojovic et al.*, 2006), búzából (*Govumoni et al.*, 2013), rizsből (*Parameswaran et al.*, 2010), cukornádból (*Rajendran és Karuppan*, 2012), cukorrépából (*Santek et. al.*, 2010), maniókából (*Shanavas et al.*, 2011), valamint árpából (*Li et al.*, 2011).

A legjobban ismert és elterjedt elsőgenerációs üzemanyag a bioetanol, melyhez a fermentálható cukrokat az előbb felsorolt gabonákból nyerik ki általában enzimes hidrolízissel, majd élesztő segítségével fermentálják alkohollá. A bioetanolt lepárlással különítik el a többi komponenstől majd önmagában vagy más fosszilis üzemanyaggal használják (Sánchez és Cardona, 2008). Számos ország állít elő nagy mennyiségben etanolt, ennek költségei egyre emelkednek, mivel földterületeket kell elvonni az élelmezésre szánt gabonatermesztés elől, továbbá figyelembe kell venni az erkölcsi szempontokat, vagyis megéri-e korlátozni az élelmiszerre szánt növénytermesztést miközben az emberiség létszáma az éhezőkkel együtt folyamatosan növekszik (Maningat és Bassi, 2004).

Ezért kutatók és gyártók együtt próbálnak keresni megoldást az első generációs, keményítő alapú bioetanol kiváltására. A második generációs bioüzemanyagok

előállításához a mezőgazdasági és erdészeti melléktermékeket (pl. faforgács, búzaszalma, kukorciaszár stb.) vagy egyéb ipari lignocellulóz tartalmú biomasszát és hulladékokat használnak alapanyagként, mint például a papírt (Kovács *et al.*, 2009, Yamashita *et al.*, 2008). Többféle technológia áll rendelkezésre. A cellulóz alapú etanol előállítási technológiájának szerepe megnő az első generációs üzemanyag gyártásához képest, mivel a cellulóz egy komplexkémiai struktúra, melynek megbontása bonyolult és gondosan megtervezett munkát igényel. Ugyanakkor az ezeken alapuló bioetanol gyártása több szempontból is kedvezőbb, mivel az alapanyag szinte korlátlan mennyiségben áll rendelkezésünkre, miközben az élelmiszeriparral nem versenyez (Kádár *et al.*, 2004).

A harmadik generációs bioüzemanyagok előállítására különböző mikrobákat, főként *Trichosporon* nemzetség képviselőit és mikroalgákat használnak fel lipidek és zsírsavak szintéziséhez (Huang *et al.*, 2008).

Az elmúlt időszakban sok kutatás irányult a tejsavó alapú bioetanol fejlesztésére és lehetőségeinek feltárására. A sajtgyártás melléktermékeként, nagy mennyiségben áll rendelkezésre, környezetvédelmi szempontokat is figyelembe véve pedig kezelésre szorul magas szárazanyagtartalma miatt.

2.2.2 Bioetanol helyzete a világban

A bioetanol előállításában vezető szerepet tölt be az Amerikai Egyesült Államok és Brazília (**1. táblázat**). Az Amerika Egyesült Államokban főként kukoricát, Braziliában cukornádat használnak a bioetanol előállítására. A két féle alapanyagból való előállítást külön kell választani, ugyanis a cukornád alapú bioetanol termelés, tekintettel arra, hogy a cukorból túltermelés van a világban, nincs hatással a gabonaárakra és gyakorlatilag a cukor világpiaci árára sem. A kukorica alapú bioetanol előállítása az USA-ban valóban hatással volt és van a kukorica és ezáltal közvetlenül néhány élelmiszeripari termékre is. Ezt a hatást egyes szakértők 10% körülre teszik (Laczó, 2008). Mind az Európai Unióban mind az Egyesült Államokban intézkedéseket vezettek be a bioüzemanyagok részarányának növelésére. Az Unió célkitűzése, hogy az energiaellátásban 2020-ra a bioenergia 20 %-os részesedést teszi ki, mely átfogó politikai és gazdasági támogatottsággal érhető el (Laczó, 2008).

1. táblázat: A világ bioetanolt előállító országainak és régióinak termelési adatai
(Forrás: Renewable Fuels Association-RFA. 2011, 2012.)

A világ bioetanol termelése (millió U.S. gallon)			
Sorrend	Ország / régió	2011	2012
1.	Észak és Közép Amerika	14401	13768
2.	Dél Amerika	5772	5800
3.	Brazília	5573	5577
4.	Európa	1167	1139
5.	Ázsia	890	952
6.	Kína	555	555
7.	Kanada	462	449
8.	Ausztrália	87	71
9.	Afrika	38	42

Ugyanakkor, 2012-ben az irányelv módosítására több féle javaslatot terjesztettek be, melyek közül néhány elképzelés:

- 2020 után az adókedvezmény megszüntetése az első generációs üzemanyagok előállítására,
- Az üzemanyagokra előírt 10 %-os megújuló energia arányának csak felét lehetne teljesíteni első generációs bioüzemanyagokkal
- 2014.július 1-e után csak olyan gyárakat szabad telepíteni, melynek CO₂ megtakarítása minimum 60 %-os, a jelenleg működők esetében pedig 50 % lenne a cél 2018-ig (<http://www.euractiv.com/climate-environment/indirect-biofuels-emissions-scie-news-518023>).

Az Amerikai Egyesül Államok törvényben hagyta jóvá, hogy 2022-re a cél a 36 milliárd gallon bioetanol gyártása évente, melyből 15 milliárd gallon kukoricából, 21 milliárd pedig cellulóz tartalmú alapanyagból kell, hogy származzon (Naik *et al.*, 2010). Brazília a világ legnagyobb cukornád előállító országa, így nem meglepő, hogy a bioetanol gyártása is erre épül. 1980-ban a kőolajimport 20%-kal csökkent a cukornádból előállított etanol hatására (Crueger and Crueger, 1987). Nemzeti fejlesztési terveken keresztül Brazília azt próbálja megvalósítani, hogy a cukornádból való termelés még gazdaságosabb legyen (Furtado *et al.*, 2011). Aggasztó viszont, hogy a brazil Alagoas állam 28000 négyzetkilométeres

területének több mint felén esőerdő volt és ez mára 13,1%-ra csökkent, tehát évente 3736 hektár esőerdőt veszítünk el (Araujo és Moura, 2011).

Magyarországon Győrben és Szabadegyházán működik bioetanol gyár, valamint 2010-ben Dunaföldváron nyitott meg a harmadik bioetanol előállító üzem. Hazánknak kedvező mezőgazdasági adottságai vannak gabonanövények termesztésére, köztük a legjelentősebb a kukorica, így a bioüzemanyagokat jelenleg csaknem élelmiszerként is felhasználható növényekből állíthatják elő.

2.3 A tejsavó az ipari melléktermék

A sajt-, túró- és kazeingyártás melléktermékeként keletkező tejsavó kezelésének szükségességét nagy mennyisége és magas szárazanyag-tartalma indokolja. 100 liter sajttejből 80-90 liter savó képződik. A Föld országainak éves savótermelését összesen 185-190 millió tonnára becsülik, és kb. évi 2 %-os növekedéssel lehet számolni. A tej szárazanyag-tartalmának hozzávetőlegesen 50 %-a megjelenik a savóban, a tej és a tejtermék típusától függően a savó szárazanyag-tartalma 5,4 % és 6-7 % közé tehető, fő oldott összetevője a laktóz (Román, 2010).

2. táblázat: A savó átlagos összetétele (Csapó és Csapóné, 1998)

Komponens	Mennyiség (g/l tejsavó)
Szárazanyag	61
Tejcukor	48-62
Fehérje	8
Zsír	2
Ásványi anyagok	5-7

Sajtgyártás során a sok tejalkotórész a savóban marad ezért az gazdag fehérjében, laktózban, ásványi anyagokban és vitaminokban. Összetételét a **2. táblázat** szemlélteti.

2.3.1 A tejsavó kezelése és felhasználási lehetőségei

A múltban a tejsavóra, mint környezetre káros hatású melléktermékre tekintettek magas biológiai és kémiai oxigén igénye (BOI 35-45 kg/l; COI 60-80 kg/l) miatt. Közel 10⁸ tonna/év szinten keletkező nagy mennyisége miatt tárolása valamint semlegesítése jelentős problémát jelentett (von Stocker és Marison, 1993). Manapság, a kémiai illetve biológiai

előkezelés által a környezetszennyező hatásának csökkentése mellett, számos kereskedelmi forgalomban megtalálható termék előállítását szolgálja (Gupte és Nair, 2010). Felhasználási területei között említendő az élelmiszeripari termékek között a csecsemőtápszerek (25-40 % savópor), levesporok (50-70% savópor), sütőipari termékek (élesztőgyártás) valamint desszertek (3-10%) gyártása, mely során jelentős szerepet tölt be a termékek ízének, színének és állagának javításában (Csapó és Csapóné, 1998). A membrán technológia segítségével olyan magas fehérje és alacsony zsírtartalmú koncentrátumok gyárthatóak, melyek a funkcionális élelmiszerek alapanyagaiként használhatók fel. A technológia és a membránok további fejlődése lehetővé teszi, hogy a fehérjetartalom meghaladja a 80%-ot, melyet savófehérje izolátumnak is neveznek (Clark, 2005, Kelly *et al.*, 2000).

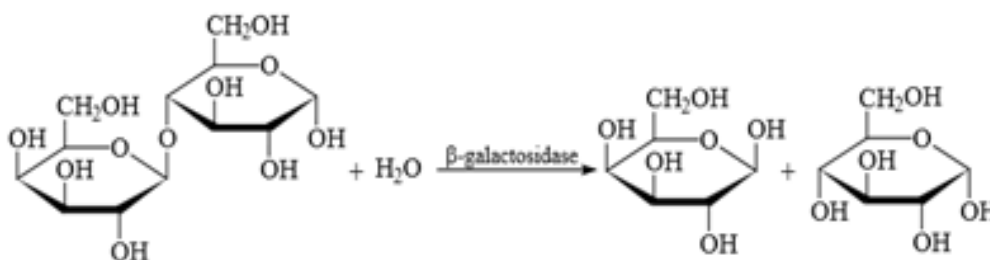
A tejsavó alapú etanol fermentáció során különböző szeszes italok, savó borok, alacsony alkohol tartalmú italok állíthatóak elő (Dragone *et al.*, 2009). Továbbá, a tejsavót és tejsavóport széleskörűen alkalmazzák a biotechnológia számos területén, ugyanis alternatív és potenciális bázisa lehet a bioüzemanyag (bioetanol, biobutanol, biohidrogén) előállításnak, a β -galaktozidáz vagy az egysejfehérje termelésnek (Christensen *et al.*, 2010, Siso, 1996).

2.4 A tejsavó alapú bioetanol előállítása

A tejsavóban jelenlévő egyetlen erjeszthető szénhidrát a laktóz, így a megvalósuló fermentáció szelektív folyamat, ugyanis olyan mikroorganizmus szükséges, melyet β -galaktozidáz termelés jellemez. A savó vitaminokban és ásványi anyagokban gazdag, melyek hozzájárulnak a sejtek élettani aktivitásának növeléséhez (Grba *et al.*, 1998, Zafar és Owais, 2006). Több kutatás irányul a tejsavó bioüzemanyag célú feldolgozásának irányába. Ilyen hasznos, a tejsavóból előállított energiahordozó végtermék lehet az etanol (Ozmihci és Kargi, 2008).

A laktóz alapú etanol fermentáció végbemehet közvetett illetve közvetlen úton. A természetben kevés mikroorganizmus képes egyetlen lépésben megvalósítani a diszacharidnak a glükóz és galaktóz monomer egységekre történő bontását, s ezen fermentálható cukrok gyors és hatékony etanollá alakítását. A fermentációs iparban kiemelt szerepű *Saccharomyces cerevisiae* nem (vagy csupán csekély mértékben) képes a laktóz hidrolízisére az alacsony β -galaktozidáz és a laktóz permeáz rendszer hiánya miatt (Zafar és Owais, 2006). Ennek megoldására az erjesztést megelőző cukrosítás során β -

galaktozidáz enzimkészítményt vagy β -galaktozidáz termelő mikroorganizmust adagolnak a fermentációs közeghez. Az ipari β -galaktozidáz enzimtermelés limitált, ugyanis az enzim a termelő baktériumokban és élesztőgombákban intracelluláris úton termelődik (Lilly, 1979), mely jelenleg az alacsony produktivitást, valamint a magas költséget jellemez. A termelékenység javítása érdekében különböző mikroorganizmusokat, mint például a *Streptococcus thermophilus*, az *Escherichia coli*, a *Candida pseudotropicalis* illetve *Kluyveromyces fragilis*, *K. lactis* vagy *K. marxianus* β -galaktozidáz szintetizáló képességét kihasználva tanulmányozzák azokat az alkoholos fermentáció terén (Bansal *et al.*, 2008).



1. ábra β -galaktozidáz (laktáz) enzim hatásmechanizmusa laktóz szubsztrátumon

Forrás: <http://nzic.org.nz/ChemProcesses/dairy/3H.pdf>

Napjainkban egyre nagyobb hangsúlyt fektetnek a *K. marxianus* élesztő faj tanulmányozására, melyet az eddigiek során különböző fermentációs eljárásokban alkalmaztak magas enzimtermelése és hőtűrő képessége, valamint gyors növekedési és ülepedési tulajdonsága miatt. A szakaszos (batch) fermentáció során a laktóz okozta inhibíció korlátozza a kiindulási szubsztrátum koncentrációt, s ezáltal visszaszorítja az etanolkihozatal fokozását. A rátáplásos (fed-batch) fermentáció által a szubsztrátum gátlása minimális szinten tartható (Ozmihci és Kargi, 2007). További fermentációs kísérletek folynak folytonos ejesztés; rögzített β -galaktozidáz enzimmal végzett fermentáció; Ca-alginát gélbezárás, szimultán cukrosítás és fermentáció (SSF), vegyes (kevert) kultúrák fermentáció stb. terén is (Bollok *et al.*, 2000). A probléma, amely miatt ezen élesztőtörzs még nem terjedt el a fermentációs iparban, hogy a *K. marxianus* alacsonyabb alkoholtűrő- és erjesztő képességgel rendelkezik a *S. cerevisiae* fajélesztőhöz képest (Lane and Morrissey, 2010).

2.4.1 *Kluyveromyces marxianus*

Először 1888-ban E. C. Hansen írta le a Marx által szőlőről izolált *Kluyveromyces marxianus* élesztő fajt, melyet felfedezője után *Saccharomyces marxianus*-nak nevezett el. Lodder és Kreger-Van Rij 10 különböző *Kl. marxianus* törzset jegyzett fel 1952-ben (Lodder és Kreger-Van Rij, 1952), amelyek tanulmányozása során kiderült, hogy jelentős különbségek mutatkoznak, többek között a cukrok fermentációs képességében. Az újrendszerezést van der Walt végezte el és határozta meg a genust *Kluyveromyces* néven (Van der Walt, 1970). A *The Yeasts, a taxonomic study* legutóbbi kiadásában már 15 fajt különböztettek meg (Kurtzman és Fell, 1998). A gyors és hatékony génszekvencia vizsgálatok óta természetessé vált a fajok konzervatív szekvenciái alapján történő besorolás, mely szerint a *Kluyveromyces* genusban 6 fajt találhatunk és az új típus faj a *Kluyveromyces marxianus* (Kurtzmann, 2003).

A törzs egyik nagy jelentősége, hogy képesek gazdaságosan termelni enzimeket, mint például inulinázt (Hensing *et al.*, 1993), β -galaktozidázt (Zhou *et al.*, 2013) valamint β -glükozidázt (Leclerc *et al.*, 1987). Fehérje- és zsírbontó képességének köszönhetően általánosan megtalálható tejtermékekben, azok természetes élőflórájaként, sok esetben együttműködve, szimbiózisban élve a tejsavbaktériumokkal (Witthuhn *et al.*, 2005). Továbbá heterológ fehérje termelésre is használják (Porro *et al.*, 2005). Mindezek mellett hatékonyan alkalmazzák ipari szennyvizek laktóz- illetve cukortartalmának eltávolításához is (Hang *et al.*, 2003).

Termotoleráns élesztő faj, így képes viszonylag magas 45-50 °C-on is növekedni (Brady *et al.*, 1997, Nonklang *et al.*, 2008). Banat és Marchant (1995) vizsgálatai alapján laktóz illetve tejsavó permeátumon is képes a növekedésre 52°C-on. Megfelelő cukortartalom mellett alkalmas nagy mennyiségű etanol termelésre. Ezen tulajdonságai illetve rendkívül gyors növekedése a szubsztrátum specifikusságának következtében kiválóan alkalmassá teszi ipari felhasználásra, főleg bioetanol termelésre (Groeneveld *et al.*, 2009). Az erjesztés hatékonysága többek között fokozható a fermentációs közeg tápanyag kiegészítésével (Janssens *et al.*, 1983). Indiában a szeszgyártásban már használatos a *K. marxianus* élesztő faj (Singh *et al.*, 1998).

2.4.2 Vegyes kultúrák laktóz fermentációja

Kevert vagy vegyes kultúrával végzett fermentációnak nevezzük azt az eljárást, amely során az alkoholképzést végző inokulum kettő vagy több mikroorganizmust tartalmaz

(Gutierrez-Correa *et al.*, 1999). A kevert kultúráknak további előnyei is vannak, például ellenállás a befertőzések ellen és a gyorsabb sejtnövekedés (Carlotti *et al.*, 1990). A technológiák fejlődésével számos sikert értek el kevert kultúrák alkalmazásával, megoldódott a szubsztrátum gátlás, például a keményítő alapú etanol előállításában, a vitaminyártásban vagy a sejtfehérje képzésében. Ahol alkalmazzák őket ott a legtöbb esetben jobb eredmény érhető el velük, mint monokultúrák erjesztéssel (Gou *et al.*, 2010; Kádár *et al.*, 2004). Ezekre jó példa lehet a csicsóka erjesztésénél alkalmazott *K. marxianus* és a *S. cerevisiae* által megvalósított fermentáció (Szambelan *et al.*, 2004, 2005), a lignocellulózok etanollá alakításában használt *Candida brassicae* és *S. cerevisiae*, valamint a *Candida shehatae* és *S. cerevisiae* tenyészetek (Lebeau *et al.*, 1997, Philippidis, 2006) vagy a szerves hulladékok etanollá alakításánál használt kevert kultúrák (Steinbusch *et al.*, 2009; Temudo *et al.*, 2009).

A kevert kultúrának köszönhetően, megvalósítható lenne a tejcukor párhuzamos cukrosítása és erjesztése, melyet igazolnak a *Kluyveromyces* nemzetség képviselőinek laktáz-negatív mikroorganizmusokkal, mint *S. cerevisiae* (Guo *et al.*, 2010) vagy *Zymomonas mobilis* (Gunasekaran és Kamini, 1991), végrehajtott társítása terén elért ígéretes eredmények. Gou és munkatársai (2010) bebizonyították, hogy a tejsavópor fermentációja során a *K. marxianus* törzs egyedüli alkalmazásával 3,8 v/v % etanol koncentrációt értek el, addig *S. cerevisiae*-vel kombinálva ez a koncentráció 5,3 v/v %-ra növekedett, melynél a maximális biokonverziós fok 80 % volt. Ezzel alátámasztották a vegyes kultúrák laktóz fermentáció során a két élesztő társíthatóságának lehetőségét, valamint az egymásra kifejtett pozitív szinergista hatásukat. Ennek köszönhetően a fermentációs idő csökkenése mellett, a szubsztrátum inhibíció visszaszorítható, az alkohol hozam növelhető, a költségek pedig csökkenthetőek, ugyanis a termotoleráns élesztő által a cukrosítás és a fermentáció megegyező hőmérsékleten (~30-35°C) valósul meg,

A géntechnológia eszközei által Magalhães-Guedes és munkatársai (2013) fehérjementesített tejsavó erjesztése során a legjobb eredményt a *S. cerevisiae* UFLA KFG33 (etanol túltermelő) és a *K. marxianus* UFLA KF22 társítása által, 16.02±0.11 g/l etanol koncentrációt értek el, 72 óra alatt 28°C-on rázatás (100 rpm) mellett. Folytonos üzemű bioreaktorban 11 g/l/h etanol kihozataalt ért el Domingues és munkatársai (1998) a rekombináns *S. cerevisiae*-vel (*K. marxianus* eredetű LAC4 β-galaktozidáz kódoló gén és LAC12 laktóz permeáz kódoló gén) végzett kísérleteik során, amely hétszer nagyobbnak bizonyult mint az eddigi folytonos üzemű eljárásoknál elért eredmények.

3 KISÉRLETI RÉSZ

3.1 Célkitűzések

Napjainkban a legelterjedtebb megoldás a fosszilis üzemanyagok kiváltására a bioetanol. Túlnyomórészt viszont első generációs etanolról van szó, ami szacharóz- és keményítő alapú melyet az iparban kizárólag *S. cerevisiae* élesztő törzs felhasználásával állítanak elő. Az ehhez felhasznált kultúrnövények az emberiség tápanyag szükségletének jórésztét elégítik ki (pl. kukorica, búza stb.) ezért sok feszültséget generált a népesség körében gyártása, melynek hatására kutatók és gyártók együtt keresik a megoldást kiváltására.

Az ipar egyik legértékesebb mellékterméke a tejsavó, mely éves szinten nagy mennyiségben keletkezik, s mindemellett magas szerves anyag tartalommal (laktóz) rendelkezik, alternatív lehetőséget nyújt az elsőgenerációs bioetanol részbeni kiváltásra. Azonban fermentációs iparban alkalmazott *S. cerevisiae* élesztőtörzs nem vagy csak csekély mértékű laktáz aktivitással rendelkezik, így csupán vontatottan képes a tejsavóban lévő laktózt lebontani, majd etanollá konvertálni. Ezzel szemben a *Kluyveromyces* nemzetség egyes képviselői megfelelő laktáz enzimaktivitást mutatnak, azonban kevésbé alkoholtűrőek. Ígéretes lehetőséget nyújthat a vegyes kultúras erjesztés, amelyet a biotechnológia számos területén már nagy hatékonysággal alkalmaznak. Kutatómunkám során a következő mérnöki feladatokat tűztem ki célul:

1. *Kluyveromyces* fajok/törzsek laktóz erjesztő képesség alapján történő szelektálása;
2. Tejsavó alapú vegyes kultúras fermentációs profilok tanulmányozása;
3. Optimális szubsztrátum koncentráció és beoltási arány meghatározása.

3.2 Kísérleti hely

Kísérleteimet a Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar (BCE-ÉTK) Sör- és Szeszipari Tanszékén végeztem mely kimagasló felszereltsége révén biztosította a kísérleteimhez szükséges anyagokat és berendezéseket.

3.3 Anyagok és módszerek

3.3.1 Alkalmazott mikroorganizmusok

3.3.1.1 A *Kluyveromyces* fajok/törzsek

A fermentációs kísérletek során a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzetközi Gyűjteményéből származó *Kluyveromyces marxianus* Y00959, *Kluyveromyces waltii* Y01184, *Kluyveromyces thermotolerans* Y00775, Y00798, Y00873 és Y00963 fakultatív, anaerob élesztőtörzseket alkalmaztam. Fenntartásuk malátás ferdeagaron, 4 °C-on történt. Törzsek átoltását havonta végeztem el, egy másik malátás ferdeagarra, lelángolt oltókacs segítségével, lamináris fülke alatt. A frissen átoltott ferdeagart inkubátorba helyezve 30 °C-on tároltam 24 órán át, majd 4 °C-on tároltam felhasználásig.

3.3.1.2 A *Saccharomyces cerevisiae* fajélesztő

A fermentációs kísérleteimhez a Sör-és Szeszipari Tanszéken található szárított Levuline FB típusú *Saccharomyces cerevisiae* élesztőt használtam fel, melyből főzőpohárban 1 g mennyiséget rehidratáltam, 100 ml langyos csapvízben, majd mágnes keverő segítségével óvatosan szuszpendáltam 15 percen keresztül. Az élesztő rehidratálását a beoltás előtt közvetlenül végeztem el.

3.3.2 Felhasznált anyagok és reagensek

3.3.2.1 A malátás ferdeagar

A törzsek fenntartása malátás ferdeagaron történt, melynek elkészítése a következőképp végeztem el: táramérlegen kimértem 0,3 g élesztőkivonatot, 0,3 g malátakivonatot, 0,5 g peptont, 1 g glükózt és 1,5 g agart, mely komponenseket 100 ml desztillált vízben oldottam fel, majd az tápközeget autokláv segítségével steriliztem. A steril csöveket ferdén elhelyezve vártam megszilárdulását. Ezt követően 4 °C-on tároltam a felhasználásig.

3.3.2.2 A tejsavópor

A kísérleteimben használt tejsavóport a Kálszer Bt. biztosította számomra, melynek paraméterei a minőségi bizonyítványa szerint a következők: pH=6,57; zsírtartalom 0,5g/100g; víztartalom 2,03g/100g; oldhatósági index 0,1/100cm³; fehérjetartalom 13,04g/100g.

3.3.2.3 Az inokulum tápoldat

A *Kluyveromyces* felszaporításához szükséges inokulum táptalaj előállításánál táramérlegen 10,0 g élesztőkivonatot, 20,0 g glükózt illetve 20,0 g peptont mértem ki mérőpoharakban, majd ezen összetevőket 1000 ml desztillált vízben oldottam fel mágneses kevertetés alkalmazásával. Az elkészült táplevest mérőhenger segítségével 250 cm³-es térfogatú lombikokba osztottam szét 100 ml-enként. A lombikokat vattadugóval és celofán papírral zártam le, majd autoklávba helyezve végeztem el a táptalajok sterilizését.

3.3.2.4 Somogyi I és II reagens

A Somogyi I reagens elkészítéséhez táramérlegen bemértem 288 g vízmentes nátrium-szulfátot (Na₂SO₄) egy 2 literes főzőpohárba, melyhez ezután 1 liter előzőleg felforralt, majd szobahőmérsékletre hűtött desztillált vizet adtam. A nátrium-szulfát feloldása után az oldathoz hozzáadtam 24 g kálium-nátrium-tartarátot (KNaC₄H₄O₆·4H₂O), majd 48 g nátrium-karbonátot (Na₂CO₃), s végül 32 g nátrium-hidrogén-karbonátot (NaHCO₃). Az anyagok feloldására mágneses keverőt használtam. Majd az előzőleg felforralt desztillált víz hozzáadásával pontosan 1600 ml-re egészítettem ki. Az oldatot 27 °C hőmérsékleten termosztátban tároltam a felhasználásáig (Somogyi, 1945, 1951).

A Somogyi II reagens előállításánál táramérlegen kimértem 72 g vízmentes nátrium-szulfátot (Na₂SO₄), melyet mágneses keverő segítségével oldottam fel 300 ml előzőleg felforralt, majd szobahőmérsékletre hűtött desztillált vízben. Az oldathoz ezután 8 g réz-szulfátot (CuSO₄·5H₂O) adtam, majd feloldódását követően a kapott oldat térfogatát 400 ml-re egészítettem ki (Somogyi, 1945, 1951).

3.3.2.5 Nelson reagens

A Nelson reagens készítésének első lépéseként a táramérlegen letárazott főzőpohárba kimértem 100,0 g ammónium-molibdátot ((NH₄)₆Mo₇O₂·4H₂O), melyet 1500 ml desztillált vízzel oldottam fel. Az oldódást szintén mágneses kevertetéssel segítetttem elő. Ezt követően 84,0 ml tömény kénsavat (cc. H₂SO₄) adtam hozzá. Táramérlegen egy 250 ml-es főzőpohárba 12,0 g nátrium-hidrogén-arsenátot mértem ki, melyet 100 ml desztillált vízzel oldottam fel. A két oldat elegyítését követően a térfogatot 2000 ml-re egészítettem ki. A Nelson reagenst barna üvegben, 37°C-on 24-48 órán keresztül tároltam felhasználás előtt (Nelson, 1944).

3.3.3 Alkalmazott módszerek és berendezések

3.3.3.1 Az inokulum előállítása

A malátás ferdeagarról lelángolt oltókacs segítségével a megfelelő *Kluyveromyces* élesztő fajt/törzset az elkészített inokulum táptalajba oltottam át lamináris box alatt, ezután rázó termosztátba helyeztem (30 °C, 120 rpm). Az élesztő szaporodása 12-24 órát vesz igénybe.

3.3.3.2 A cefrekészítés és a fermentáció

A cefrét, szubsztrátum koncentrációjának beállítása után UVALIN komplex tápsóval egészítettem ki melynek javasolt adagolási mennyisége 25-30 g/hl az élesztők élettevékenységéhez nélkülözhetetlen vitaminok és nyomelemek pótlása céljából, majd a cefrék pH értékét 21%-os foszforsav (H_3PO_4) segítségével 4,0 alá állítottam be. A magas savtartalom révén meggátoljuk a számunkra idegen és káros mikroorganizmusok (baktériumok, penészek) elszaporodását a cefrében (Panyik és Béli, 2008). A kimért cefrét (250 ml) OD_{600} érték alapján 1:1 arányban oltottam be a rehidratált *Saccharomyces cerevisiae* és az inokulum táptalajban felszaporított *Kluyveromyces* élesztőgombákkal. A kotyogókkal ellátott beoltott cefréket 2 óra levegőztetés után 30°C-os termosztátban tároltam, mely értéket több feljegyzés is alátámasztott mint optimális hőfok az erjesztés számára (Nonklang *et al.*, 2007; Hadiyanto *et al.*, 2014). Az erjesztéseket párhuzamos kísérletsorozatban végeztem el. Az erjesztések nyomon követésére a kiindulási, valamint 24 órás időközönként az erjedő cefrékből vett mintákat analizáltam.

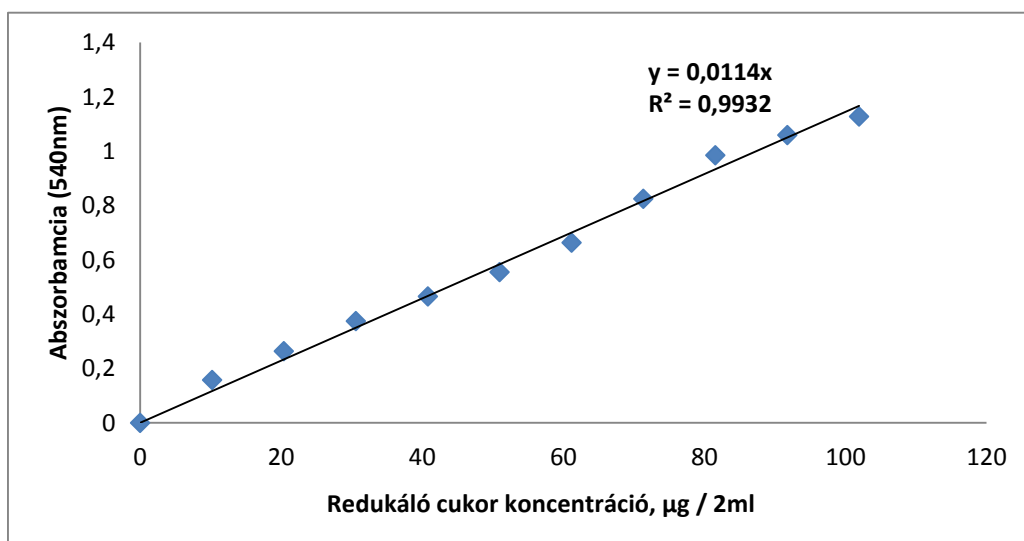
3.3.3.3 Redukáló cukortartalom mérés

A redukáló cukrok meghatározására többféle módszer létezik, köztük az egyik legrégebbi a klasszikus analitika a Somogyi-Nelson módszer.

A meghatározás elve, hogy a redukáló cukrok lúgos $Cu(II)$ redukálják és belőle Cu_2O -ot választanak ki. A keletkezett Cu_2O -ot foszfor vagy arzénomolibdát reagensben oldjuk, miközben a molibdát komplexet a Cu^+ ionok molibdénkékké redukálják. Az oldal színintenzitását fotometriásan (540nm) mérjük. Az arzénmolibdát előnyösebben alkalmazható, mert a kialakult szín stabilabb és az eredmények jobban reprodukálhatóbbak (Nelson 1944; Somogyi 1945,1951).

A mérés menete:

Analitikai mérlegen 0,5 g (0,50976 g) glükózt mértem ki egy főzőpohárba, melyet egy kevés desztillált vízzel feloldva maradéktalanul átöblítettem egy 100,0 ml-es mérőlombikba, majd a lombikot desztillált vízzel jelig töltöttem. A kapott oldatból hígítási sort készítettem. A bemért mennyiségek térfogatát 2,0 ml-re egészítettem ki desztillált vízzel. Egy darab félkémcsőbe vakmintát készítettem 2,0 ml desztillált vízzel. Somogyi oldat készítése során Somogyi I. és Somogyi II. reagenst 4:1 arányban kevertem össze, s mindegyik félkémcsőbe 2,0 ml mennyiséget pipettáztam. A kapott elegyet forrásban lévő vízfürdőbe helyeztem 15 percre, majd lehűtöttem szobahőmérsékletre. Az lehűlt oldathoz további 2,0 ml Nelson reagenst adtam, amely adagolása után a reakcióelegyet alaposan összeráztam, s végül a térfogatát 5,0 ml desztillált vízzel egészítettem ki. Az így kapott elegyből, a keletkező CO₂ keveréssel történő eltávolítása után, spektrofotométer (UNICAM, Alpha Helios) segítségével, 540 nm-en mért fényáteresztő képesség alapján határoztam meg az minták redukáló cukor tartalmát, majd felállítottam a regressziós egyenest (2. ábra).



2. ábra: A Somogyi-Nelson kalibrációs egyenese

A továbbiakban az egyenes segítségével meghatározható ismeretlen oldatok redukáló cukortartalma. Az R^2 értéke (0,9932) alátámasztja a modell illeszkedését.

3.3.3.4 Szénhidráttartalom meghatározása (HPLC technika)

A HPLC, avagy nagy teljesítményű folyadék-kromatográfia (angolul High Performance Liquid Chromatography) a biokémiában és analitikai kémiában vegyületek elválasztására, azonosítására és mennyiségi meghatározására gyakran használt kromatográfias eljárás.

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

- Oszlop: Aminex-87H (Bio-Rad, USA)
- Eluens: 0,005 n H₂SO₄
- Integráló szoftver: ChromQuest 5.0
- Detektor: RI és PDA
- Oszlop hőmérséklet: 45 °C
- Detektor hőmérséklet: 40 °C
- Áramlási sebesség: 0,6 ml/perc
- Eluálási mód: izokratikus

A mérés menete:

Az analizálandó mintából 1,0 ml-nyi mennyiséget pipetta segítségével Eppendorf csőbe mértem, majd a mintát negyed óráig 14 ezres fordulatszámon centrifugáltam. Ezt követően a felülúszó folyadékból 200 µl-t mértem ki egy mintatartóba, melyet ezután analizáltam. Az egyes szénhidrátok koncentrációját (glükóz, laktóz, galaktóz) , a műszerhez már korábban meghatározott kalibrációs egyenesek ismeretében, a mérés során meghatározott kromatográfias területekből határoztam meg.

3.3.3.5 Az etanol koncentráció meghatározása

A naponta vett minták alkohol tartalmának nyomon követésére a szénhidrát méréshez hasonlóan HPLC technikát alkalmaztam vagyis ismert koncentráció etil-alkohol elegy segítségével a kalibrációs egyenes felállítása után a minták koncentrációja is könnyedén meghatározható volt. A kiejedt cefrék végső alkoholtartalmát Büchi Distillation Unit K-350-es lepárló és Anton Paar DMA 35N alkoholmérő készülékkel állapítottam meg.

A mérés menete:

Egy 100,0 ml-es mérőlombikot jelig töltöttem a kiejedt cefrével, majd a lombik tartalmát a lepárló desztilláló csővébe töltöttem pár csepp habzágátló folyadék (Foamsol)

kísérletében. A desztilláció 3 percet vett igénybe. A lekondenzált komponenseket 100,0 ml-es mérőlombikba fogtam fel jeges fürdő segítségével, majd a lombik tartalmát lezárva, 20 °C-ra hűtöttem le, csapvízbe helyezve ugyanis a műszer erre a hőfokra van kalibrálva. A kondenzátum térfogatát desztillált vízzel 100,0 ml-re egészítettem ki, majd az Anton Paar DMA 35N alkohommérővel meghatároztam a cefre etanol koncentrációját térfogatszázalékban (v/v%) kifejezve.

3.3.3.6 Kísérlettervezés

A fermentációs iparban az optimum munkapont meghatározására a központi elrendezésű kísérlettervezést (Central Composite Design, CCD) alkalmazzák. Az RSM egy matematikai és statisztikai módszer, mellyel meghatározható az optimum munkapont a függő és független változók kapcsolatainak feltérképezésével (Khuri és Mukhopadhyay, 2010). Független változónak nevezzük az olyan mérhető vagy minősíthető paramétert, amely adott időpontban meghatározott értéket vesz fel és segítségével a vizsgált rendszer működése befolyásolható, tehát hatást gyakorol az optimum munkapontra (Kemény, 1986). A független faktorok kódolt értéket vesznek fel:

$$x_i = (X_i - X_0) / \Delta X_i$$

ahol: X_i : i -edik faktor kódolt értéke; X_0 : i -edik faktor értéke az alapszinten;

ΔX_i : i -edik faktor variációs intervalluma.

A CCD által a centrumpont és a tőle megfelelő lépéstávolságra (+1 és -1) elhelyezkedő pontok mellett a tengelyeken úgynevezett csillagpontok ($+\alpha$ és $-\alpha$) találhatóak. Segítségükkel különböző faktorkombinációk állíthatók fel az optimalizálni kívánt független változók adott értéktartományán belül (Box és Wilson, 1951). A felállított kísérletterv pontjai koordináta-rendszerben kerül ábrázolásra, melyre válaszfelület illeszthető. A eredmények alapján a statisztikai elemzésre épülő ANOVA (Analyses of Variance, variancia analízis) segítségével megállapítható a felállított modell illeszkedése, az egyes faktorok optimálandó paraméterre gyakorolt hatása illetve a faktorok közötti kapcsolat.

A regresszió becslésére alkalmazott másodfokú polinom a következő képlettel írható le:

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

ahol, Y : válasz (függő változó) értéke, β_i : a regressziós koefficiens,

X_i : független tényező értéke.

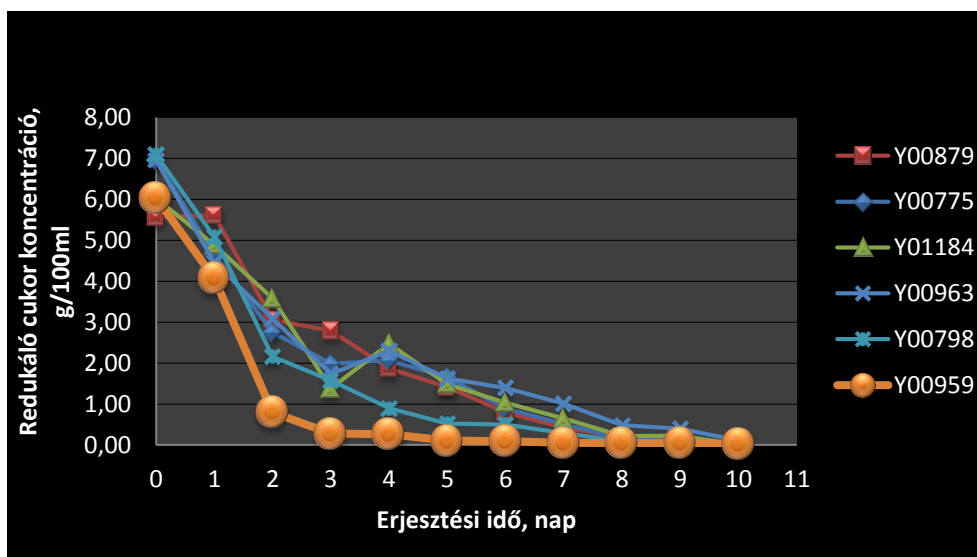
Az optimalizációs kísérlet tervemben független tényezőkként a szubsztrátum koncentrációt (x_1) és a kevert kultúra beoltási arányát (x_2) választottam, melyeknek különböző kombinációinak hatását vizsgáltam meg. Független változónak (y) az etanol koncentrációt és a biokonverziós fokot vettem. A felállított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

3.4 Eredmények és értékelésük

3.4.1 Különböző *Kluyveromyces* fajok/törzsek szelektálása

Kutató munkám céljából tűztam ki a vegyes kultúrák tejsavó erjesztésének vizsgálatát és fejlesztését, melynek első lépése a fermentációs profilok vizsgálata volt. Ennek érdekében elvégeztem első kísérletsorozatot, amibe 6 különböző *Kluyveromyces* élesztőtörzset választottam. A 10 (m/v)%-os tejsavópor cefrék elkészítése után pH értéküket beállítottam 4-re, majd komplex tápsó kiegészítése után elvégeztem a beoltást 1:1 arányban (OD₆₀₀ érték alapján) *S. cerevisiae* fajélesztővel kombinálva, majd 10 napos erjesztést végeztem. Az eredmények reprodukálhatóságának érdekében párhuzamos mérést hajtottam végre.

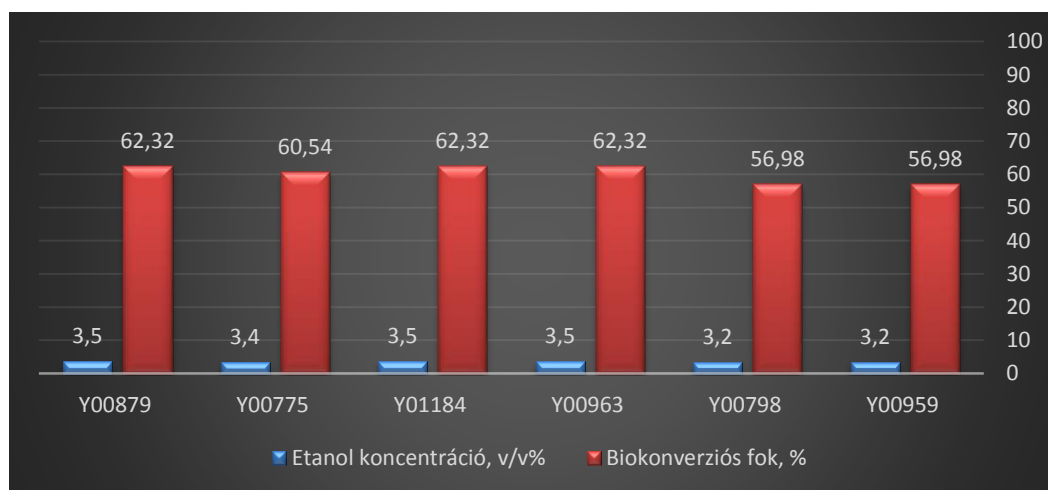
A vegyes kultúra alkalmazásával valósulhatna meg a laktóz gyors bontása erjeszthető cukrokká a *Kluyveromyces* fajok révén, majd a keletkező cukrok gyors etanollá konvertálása a *Saccharomyces cerevisiae* segítségével.



3. ábra: Fermentációs profilok

A kísérletemben szereplő törzseket különböző típus számmal jelöltem melyek a következők: *Kluyveromyces marxianus* Y00959, *Kluyveromyces waltii* Y01184, *Kluyveromyces thermotolerans* Y00775, Y00798, Y00873 és Y00963. A 24 óránkénti minták redukáló cukortartalmát Somogyi-Nelson módszerrel, az egyes cukrok és az etil-alkohol meghatározására HPLC technikát alkalmaztam. A kapott eredményeket ábrán szemléltettem (3. ábra). A fermentációt 10 napon keresztül követtem. Megállapítottam, hogy a vegyes kultúrák erjesztésénél a fellépő szinergista kölcsönhatásnak köszönhetően a

Kluyveromyces törzsek a laktáz aktivitásuk révén lebontják a laktózt egyszerű erjeszthető cukrokká (glükóz és galaktóz), melyeket a *S. cerevisiae* kiváló erjesztő képességével etanollá konvertál. Szambelan és munkatársai (2004) bizonyították, hogy a vegyes kultúrák képesek akár 2-12 (v/v)%-kal megnövelni az etanol kihozatait. A kiejert tejsavó cefrében 3,0-3,5 (v/v) % közötti alkoholtartalmat értem el, amely 56-63 % közötti biokonverziós fokot jelentett (4. ábra).



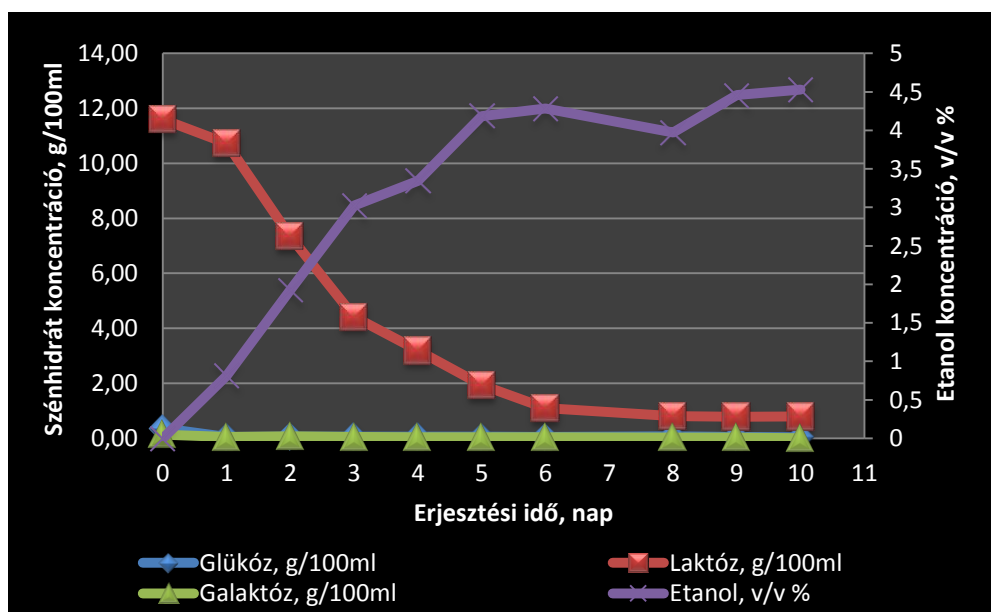
4. ábra: Az etanol koncentráció (v/v)% és biokonverziós fok (%) alakulása a különböző *Kluyveromyces* és *Saccharomyces cerevisiae* törzsek vegyes kultúrák erjesztése során

Ugyanakkor, a fermentációs profilokat tovább analizálva azt tapasztaltam, hogy a *K. marxianus* Y00959 és *S. cerevisiae* kombináció alkalmazása gyakorlatilag 4 nap alatt teljes mértékben átalakította a rendelkezésre álló szubsztrátumot etanollá. A kezdeti ~6,0 g redukáló cukor/100ml szubsztrát koncentráció a 4. napon már csak 0,24 g redukáló cukor/100 ml volt elérve a végső 3,2 v/v% etanol koncentrációt ami 56,98 % biokonverziós fokot eredményezett. A többi kombináció esetében ehhez 7-9 nap lenne szükséges a hasonló eredmény eléréséhez, ezért a további kísérleteimben ezt törzset használtam és vizsgáltam.

A kísérlet további érdekessége, hogy az élelmiszeriparban keletkezett folyékony tejsavó koncentrációja is hasonló laktóz koncentrációval rendelkezik, tehát mindenféleképpen további koncentrálásra van szükség a gazdaságosság növelésének érdekében.

3.4.2 Tejsavópor koncentráció hatása a vegyes kultúrák fermentáció alakulására

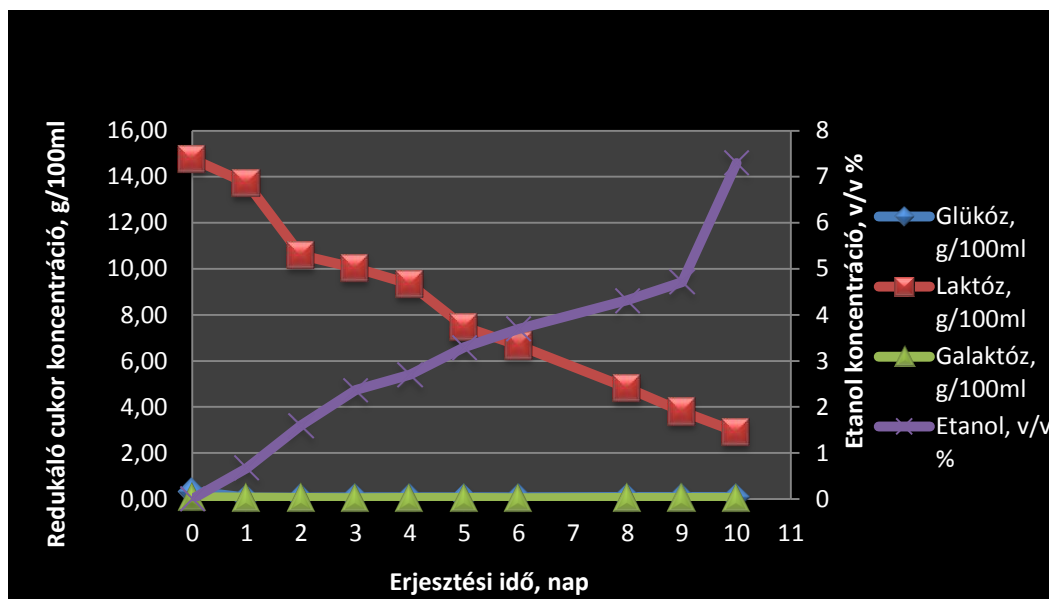
A továbbiakban megvizsgáltam a kevert kultúrával való etanolos erjesztési folyamatra gyakorolt különböző szubsztrátum koncentrációk hatását. Munkám során hasonló módon az eddigiekhez 10 (m/v)%, 15 (m/v)%, 20 (m/v)%, 25 (m/v)% és 30 (m/v)% tejsavópor cefréket készítettem és 1:1 arányba oltottam be azokat *K. marxianus* Y00959 törzs és *S. cerevisiae* élesztő kultúrával. Az erjesztés továbbra is 10 napig végeztem 30 °C-os termosztátban, a naponta vett minták analízisével pedig felállítottam a fermentációs profilokat.



5. ábra: A ~15 (m/v)%-os tejsavópor cefre fermentációs profilja

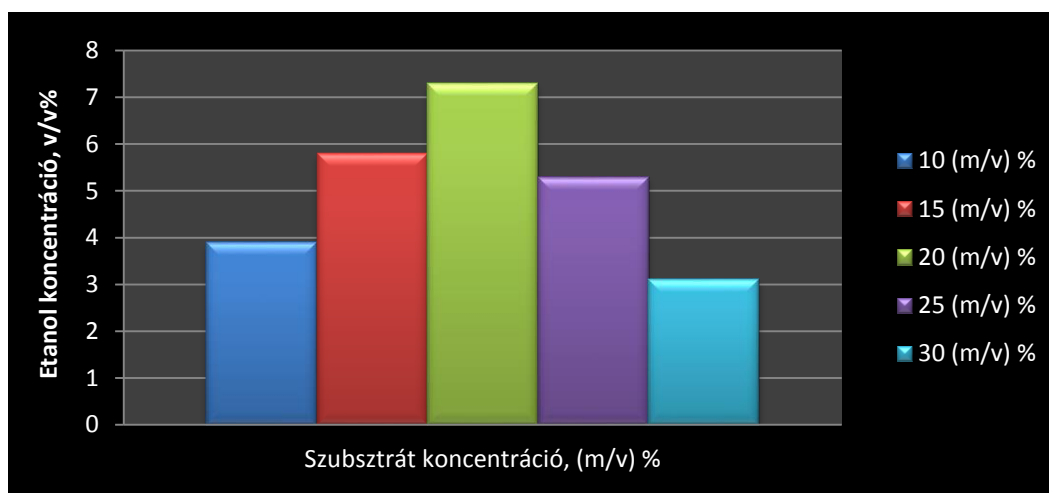
Az 5. ábrán látható fermentációs profil alapján, a kiindulási ~15 (m/v)% kezdeti tejsavópor mennyiség 5-6 nap alatt került leerjesztésre, mely mellett 4-4,5 (v/v)% alkohol hozamot értem el. A glükóz és a galaktóz koncentráció az egész fermentáció alatt minimális szintet mutat, melynek magyarázata, hogy a *K. marxianus* élesztő, magas laktáz aktivitása révén, hatékonyan bontotta a tejsavóban lévő laktózt, mely hidrolizált termékeket a *S. cerevisiae* rendkívül gyorsan konvertálta etanollá.

A mért eredmények és a további fermentációs profilok elemzése után, megállapítottam, hogy a tejsavópor mennyiségének további növelésével jelentősen emelkedett az etanol mennyisége a kiindulási ~20 (m/v) % szubsztrátum tartományon belül (6.ábra).



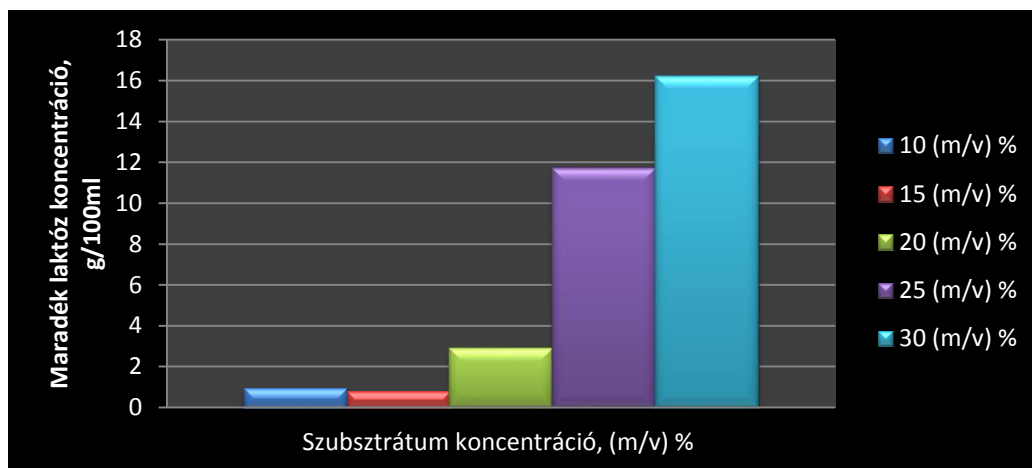
6.ábra: ~20 (m/v)%-os tejsavópor cefre fermentációs profilja

Ebben az esetben a leeresztett cefre lepárlása után 7,3 (v/v)% etanol koncentrációt mértem (7. ábra).



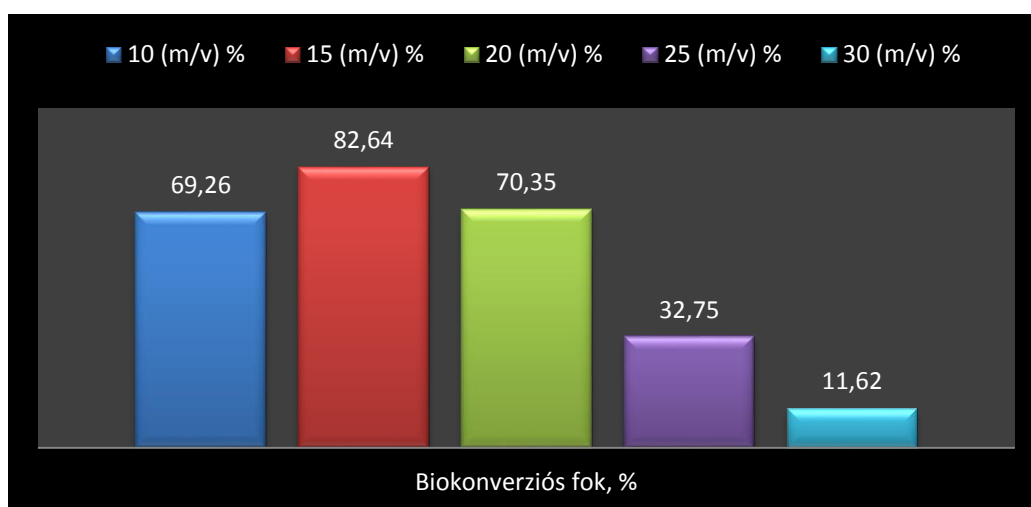
7. ábra: A szubsztrátum koncentráció hatása a keletkező etanol mennyiségére

Ugyanakkor az is megállapítható, hogy ezzel párhuzamosan, a szubsztrátum koncentráció növekedésével egyre nagyobb értéket mutatott a maradék laktóz mennyisége (8. ábra). Amíg alacsonyabb koncentrációnál a maradék szénhidrát koncentráció 0,79-2,98 g/100ml között alakult, addig a másik két magasabb szubsztrátum koncentrációnál már 11,73-16,21 g/100ml maradék laktóz volt mérhető az erjedés végén.



8. ábra: A szubsztrátum koncentráció hatása a maradék laktóz mennyiségére

Ezek alapján meghatározható egy optimális szubsztrátum koncentráció, melynél még az élesztők gazdaságosan képesek fermentálni. Ennek meghatározásához megvizsgáltam az egyes esetekben elért biokonverziós fokokat, melyek jól tükrözik a fermentáció hatékonyságát. Az elért eredményeket a következő **9. ábra** mutatja.



9. ábra: Biokonverziós fokok különböző szubsztrátum koncentráció esetében

A szubsztrátum mennyiségének további növelésével a kezdeti ~25 (m/v)% és 30 (m/v)%-os lombikokban az erjesztés nagymértékben lecsökkent vagy leállt, a fermentációk lefutása vontatottnak bizonyult. Ennek magyarázata, hogy élesztők nem tudták a közegben jelenlévő nagymennyiségű szénhidrátot erjesztetni a fennálló katabolit represszió miatt. A végső etanol koncentráció csupán 5,0 (v/v)% illetve 3,0 (v/v)% közé esett, melyet a kismértékű biokonverziós fokok (32,75 % és 11,62%) alátámasztanak.

Ennek alapján a megfelelő tejsavópor koncentráció értéke 15 (m/v) % és 20 (m/v) % között található, amely beleesik azon tartományba, melyet Raphael és munkatársai (2014) közöltek. Az eddigi kutatómunkák során bizonyítást nyert, hogy az alacsony kiindulási koncentráció mellett nem hajtható végre gazdaságosan a tejsavó (vagy tejsavó permeátum) alkoholos fermentációja az elérhető alacsony 3-4 (v/v)% körüli etanol koncentráció és a költséges desztillálási művelet miatt. A technológiában szükségesnek bizonyul a fermentációt magas laktóz koncentrációról indítani ultraszűréssel vagy diaszűréssel történő tejsavó koncentrálás, esetleg alternatív módon magas cukortartalmú (pl.: melasz) melléktermékekkel való kiegészítés- az etanol kihozatal maximalizálása érdekében (Oda és Nakamura, 2009). Természetesen az alkoholos erjesztés során végrehajtott tejsavó/tejsavó permeátum hatástalanítása során a visszamaradó laktóz mennyiségének minimális szinten tartását is figyelembe kell venni.

3.4.3 Az optimális tejsavópor koncentráció és beoltási arány meghatározása

A vegyes kultúrával végzett előzetes kísérletsorozat eredményei alapján megállapítottam, hogy az etanol koncentráció illetve a biokonverziós fok alakulására a kiindulási szubsztrátum koncentráció lényegi hatást gyakorol. Ezen faktor mellett a második független paraméternek az inokulumban jelenlévő *K. marxianus* arányát választottam feltételezve, hogy a laktóz gyorsabb hidrolízisével a represszió csökkenthető. Az optimális tartományok meghatározására a hatásfelületi kísérlettervezési módszerek közé tartozó kétfaktoros központi elrendezésű kísérlettervezést választottam. A cefrék előkészítése az eddigiekhez hasonlóan történt. A gyakorlatban megvalósított kísérlettervet és az eredményeket az **3. táblázat** foglalja össze.

3. táblázat: Kísérleti beállítások és kapott eredmények

Sorszám	F1	F2	R1	R2
	Szubsztrátum koncentráció (m/v%)	Beoltási arány (<i>K.marxianus</i>)	Etanol koncentráció (v/v %)	Biokonverziós fok (%)
1	10	1	3,3	77,35
2	12,5	1,5	4,4	82,51
3	12,5	0,5	4,1	76,88
4	15	2	5	78,13
5	15	1	4,2	65,63
6	15	1	4,6	71,88
7	15	0,5	4,1	64,07
8	17,5	1,5	5,1	68,31
9	17,5	0,5	3,3	44,20
10	20	1	4,4	51,57

A statisztikai kiértékelést a Statistica 9.0 for Windows szoftercsomaggal hajtottam végre. Az optimalizációs paraméterekre vonatkozó varianciaanalízis (ANOVA) eredményeket az **4. és 5. táblázat** szemlélteti.

A Fischer-féle F teszt alkalmas a felállított modell illeszkedésének vizsgálatára. A kapott eredmények alapján az Illeszthetőség (Lack of Fit) etanol koncentrációra vonatkozó F értéke 1,2490, a biokonverziós fokra vonatkozó F értéke pedig 1,4380 volt, melyekhez $p=0,5632$ illetve $p=0,5345$ érték tartozott. Ezek alapján a modellek illesztése csupán 44-47% megbízhatósággal rendelkezik.

4. táblázat: ANOVA eredmények (etanol koncentráció)

Faktor	SS	df	MS	F	p
Szubsztrátum koncentráció (m/w%)(L)	0,901071	1	0,9011	9,49075	0,0369
Szubsztrátum koncentráció (m/w%)(Q)	0,411469	1	0,4115	4,3339	0,1058
Beoltási arány (L)	1,068505	1	1,0685	11,2543	0,0284
Beoltási arány (Q)	0,050939	1	0,0509	0,5365	0,5045
1L by 2L	0,562500	1	0,562500	7,03125	0,229585
Illeszthetőség (Lack of Fit)	0,299768	3	0,099923	1,24903	0,563161

5. táblázat: ANOVA eredmények (biokonverziós fok)

Faktor	SS	df	MS	F	p
Szubsztrátum koncentráció (m/w%)(L)	238,1761	1	238,1761	12,1917	0,1776
Szubsztrátum koncentráció (m/w%)(Q)	28,9988	1	28,9988	1,4844	0,43754
Beoltási arány (L)	237,0099	1	237,0099	12,1321	0,1779
Beoltási arány (Q)	6,9228	1	6,9228	0,35436	0,6582
1L by 2L	85,4177	1	85,4177	4,3724	0,2839
Illeszthetőség (Lack of Fit)	84,2801	3	28,0934	1,4380	0,5345

A következő lépésben a két független faktor hatását és együttes hatását vizsgáltam, mely során megállapítottam, hogy a vegyes kultúrák tejsavó cefrék fermentációja során az etanol koncentráció változására az elsőfokú szubsztrátum koncentráció és az elsőfokú beoltási arány fejtett ki szignifikáns hatást 95% konfidencia intervallumon belül. Ez alapján, tehát a két faktor értékének a növelése a kiejert cefre elérhető alkoholtartalmát növeli. Ezzel szemben a biokonverziós foknál egy faktor sem mutatott szignifikáns hatást a 95% megbízhatósági szinten a megadott optimált intervallumon belül.

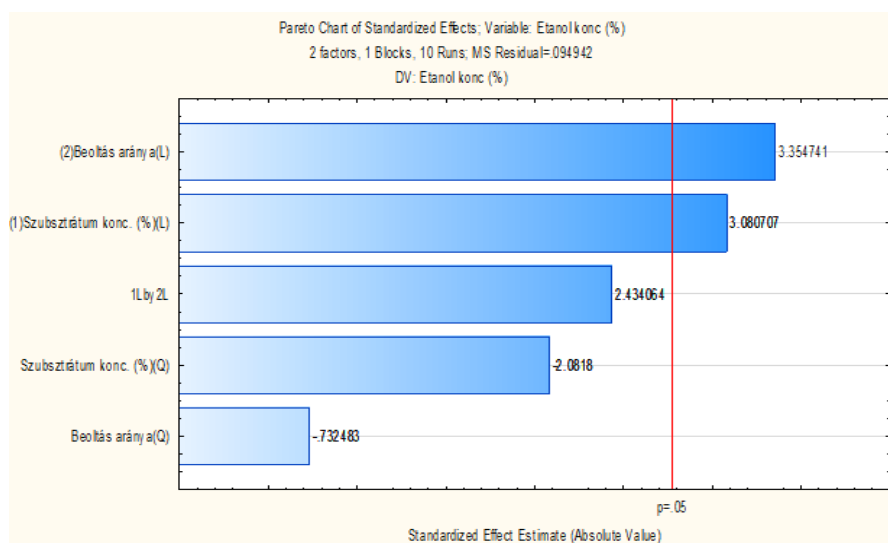
6.táblázat: Független faktorok hatása az etanol koncentráció alakulására

Faktor	Hatás	Standard hiba	t(4)	p	-95% konfidencia intervallum	95% konfidencia intervallum
Konstans	4,6736	0,1945	24,0253	0,0000	4,1335	5,2137
Szubsztrátum koncentráció (m/w%)(L)	0,7250	0,2353	3,0807	0,0369	0,0716	1,3784
Szubsztrátum koncentráció (m/w%)(Q)	-0,3081	0,1479	-2,0818	0,1058	-0,7189	0,1028
Beoltási arány (L)	1,1215	0,3343	3,3547	0,02844	0,1933	2,0497
Beoltási arány (Q)	-0,3824	0,5221	-0,7325	0,5045	-1,8321	1,0672
1L by 2L	1,1250	0,4622	2,4341	0,0717	-0,1583	2,4082

7.táblázat: Független faktorok hatása a biokonverziós fok alakulására

Faktor	Hatás	Standard hiba	t(1)	p	95% konfidencia intervallum	95% konfidencia intervallum
Konstans	72,8742	2,7904	26,1157	0,0244	37,4183	108,3301
Szubsztrátum koncentráció (m/w%)(L)	-11,7871	3,3758	-3,4917	0,1778	-54,6806	31,1063
Szubsztrátum koncentráció (m/w%)(Q)	-2,5864	2,1228	-1,2184	0,4375	-29,5598	24,387
Beoltási arány (L)	16,7033	4,7955	3,4831	0,1779	-44,2296	77,6363
Beoltási arány (Q)	-4,4585	8,6327	-0,5165	0,6328	-28,4266	19,5097
1L by 2L	13,8633	7,6418	1,8141	0,1439	-7,3537	35,0802

A levont következtetéseket alátámasztja az úgynevezett Pareto diagram (10. ábra), melyen látható, hogy az etanol koncentráció esetében a két független faktor, s azok közül is a *Kl. marxianus* beoltási aránya töltött be jelentős szerepet a kiváltott válaszreakció pozitív alakulásában.



10. ábra: Szubsztrátum koncentráció és *K. marxianus* beoltási arányának hatása Pareto diagramon (etanol koncentráció)

8. táblázat: Regressziós koefficiensek és statisztikai próbák (etanol kihozatal)

Faktor	Regressziós koeficiens	Standard hiba	t(1)	p	95% konfidencia intervallum	95% konfidencia intervallum
Konstans	1,1123	3,4258	0,3247	0,7617	-8,3993	10,6239
Szubsztrátum koncentráció (m/w%)(L)	0,5094	0,3776	1,3489	0,2487	-0,5391	1,5579
Szubsztrátum koncentráció (m/w%)(Q)	-0,0247	0,0118	-2,0818	0,1058	-0,0575	0,0082
Beoltási arány (L)	-2,9024	2,1504	-1,3497	0,2484	-8,8728	3,0679
Beoltási arány (Q)	-0,3340	0,4641	-0,7325	0,5045	-1,6285	0,9486
1L by 2L	0,3000	0,1232	2,4341	0,0717	-0,0422	0,6422

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

Faktor	Regressziós koeficiens	Standard hiba	t(1)	p	95% konfidencia intervallum	95% konfidencia intervallum
Konstans	110,8852	56,6418	1,9577	0,1219	-46,378	268,1481
Szubsztrátum koncentráció (m/w%)(L)	-0,7712	6,2437	-0,1235	0,9077	-18,106	16,5641
Szubsztrátum koncentráció (m/w%)(Q)	-0,2069	0,1958	-1,0570	0,3501	-0,750	0,3366
Beoltási arány (L)	-34,4098	35,5541	-0,9678	0,3879	-133,124	64,3041
Beoltási arány (Q)	-3,9631	7,6735	-0,5165	0,6328	-25,268	17,3420
1L by 2L	3,6969	2,0378	1,8141	0,1438	-1,961	9,3547

A Student féle t-próba alapján a felállított modellben szereplő regressziós koefficiensek között az etanol koncentráció esetében a b_5 koefficiensnél 95%, míg a b_2 koefficiensnél 90%, a b_1 és b_3 koefficiensnél pedig csupán 75% megbízhatósági szintet kaptam (8. és 9. táblázat). A biokonverziós fok esetében egyik regressziós koeficiens sem érte el a 95% konfidencia szintet, csupán a b_0 és a b_5 koeffiensek becslése mondható 75%-os megbízhatóságúnak.

Ezek alapján a következő leíró másodfokú, polinomikus modelleket javaslom, melyek az etanol koncentráció (Z_1) és a biokonverziós fok (Z_2) változására:

$$Z_1 = 1,1123 + 0,5094x - 0,0247x^2 - 2,9024y - 0,3340y^2 + 0,3000$$

ahol: Z: etanol koncentráció (v/v%), x: szubsztrát koncentráció (m/v%),

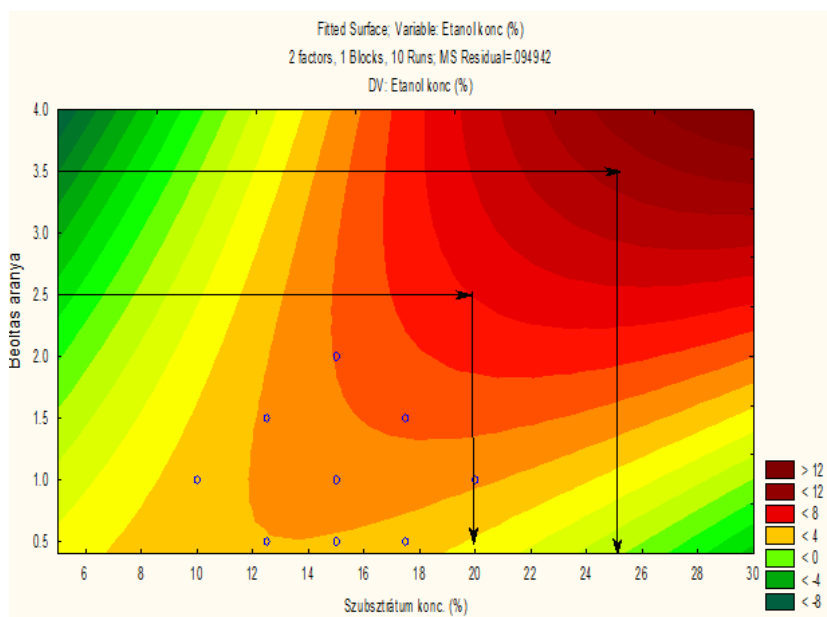
y: kevert kultúrában a *Kl. marxianus* aránya

$$Z_2 = 11,8852 - 0,7712x - 0,2069x^2 - 34,4098y - 3,9631y^2 + 3,6969xy$$

ahol: Z: biokonverziós fok (v/v%), x: szubsztrát koncentráció (m/v%),

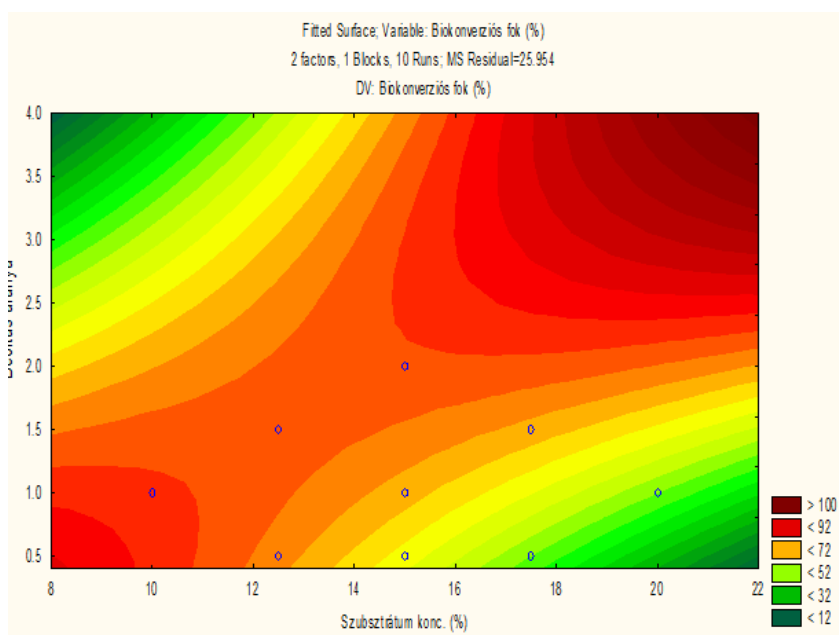
y: kevert kultúrában a *Kl. marxianus* aránya

Az optimum munkapont meghatározására a mért eredményeket kétdimenziós koordináta-rendszerben ábrázoltam, majd a felvett pontokra válaszfelületet illesztettem.



11. ábra: Válaszfelület (etanol koncentráció)

Megállapítható, hogy a szubsztrátum koncentráció emelése mellett a *K. marxianus* beoltási arányának növelésével az elméleti maximális etanol koncentráció fokozható. Ez alapján az optimum munkapontban ~8-10 (v/v)% közötti etanol koncentráció érhető el, mely a ~20-25 (m/v) % szubsztrátum koncentráció és 2,5:1 - 3,5:1 beoltási arány metszéspontjában becsülhető (11. ábra).



12. ábra: Válaszfelület (biokonverziós fok)

Jól látható az **12. ábrán**, miszerint ugyanezen paraméterek beállítása mellett a biokonverziós fok tovább javítható, mely feltételezhetően a szubsztrátum gátlás visszaszorításának köszönhető. A megfigyelhető, hogy a szubsztrátum koncentráció változásával egyenes arányban fejt ki pozitív hatását a vegyes kultúrában jelenlévő *K. marxianus* arányának növelése. Gyakorlati szempontból a technológia akkor tekinthető gazdaságosnak, ha a kiejert cefrében mért etanol koncentráció eléri az ~5-8 (v/v)% értéket.

3.4.4 A modellek hitelesítése

Az előzetes kísérlettervben a javasolt paramétereknek megfelelően végeztem el a felállított optimálási modellek validálását. A kísérletsorozat során a fermentációt és annak paramétereit az eddigiekhez hasonlóan hajtottam végre illetve állítottam be, melynek időtartama 6 nap volt. A beállításonként végzett két párhuzamos mérés során elért átlag eredményeit a **10. táblázatban** foglaltam össze.

10. táblázat: Beállított paraméterek és a kapott eredmények

Szubsztrát koncentráció m/v %	Beoltási arány	Etanol koncentráció v/v%	Biokonverziós fok %
17,5	3,0:1	5,35	72,33
20	2,5:1	5,4	65,63
22,5	3,0:1	5,25	55,21
25	3,5:1	4,65	44,07

A szubsztrátum koncentráció hatásának vizsgálatakor végzett 10 napos erjesztés során vett 6. napi (15 m/v %-nál 4,2 etanol v/v %, 20 m/v %-nál 3,5 etanol v/v % és 25 m/v % pedig 2,7 etanol v/v %) minták összehasonlításával megállapítható, hogy a *K. marxianus* arányának növelésével az etanol koncentráció fokozható, ezáltal pedig nagyobb biokonverziós fok érhető el. Ezen hatás a vegyes kultúrában jelenlévő nagyobb mennyiségű *K. marxianus* dinamikusabb laktóz hidrolízisével magyarázható.

A válaszfelület alapján javasolt beállítások közül a kiindulási 17,5 (m/v)% tejsavó cefre és 3,0:1 beoltási arány mellett 72,33 % biokonverziós fokot értem el, amely beleesik biokonverziós fok megjósolt intervallumába, ezáltal hitelesítve a felállított modellt. A hat napos fermentáció során a kívánt ~8-10 v/v% etanol tartalmat nem értem el, azonban a fermentációs idő növelésével megvalósítható lenne.

A szubsztrátum gátlásból adódóan ugyanakkor a kihozatal 20 (m/v) % felett nem fokozható a szakaszos fermentáció esetében.

Az elért eredményeim alapján további vizsgálatokat és kísérleteket tartok szükségesnek a tejsavó alapú bioetanol előállításának lehetőségére. Lehetséges módszer lehet a fehérjék kicsapátása illetve a rázatásos fermentáció. Ígéretes eredmények születtek például rátáplálásos technikával végzett monokultúrás erjesztés során Ozmichi és Kargi (2007) által, akik megállapították, hogy 125g laktóz/l felett katabolit represszió lép fel, megegyezve az általam meghatározott 20 (m/v) % tejsavópor értékével. Az elért legmagasabb etanol koncentráció 63g/l volt, melynek eléréséhez csupán 2-3 nap volt szükséges. Ezen alkohol kihozataalt kevert kultúra tovább fokozhatná.

4. ÖSSZEFOGLALÁS

TDK dolgozatom a tejsavó alapú vegyes kultúras fermentáció hatékonyságának fokozására, az alkohol kihozatal növelésére összpontosít.

A különböző *Kluyveromyces* faj/törzs és *S. cerevisiae* fájlesztő társíthatóságának vizsgálata során a legalkalmasabbnak a *K. marxianus* Y00959 törzs és *S.cerevisiae* vegyes kultúra bizonyult. Alátámasztást nyert a szinergista kölcsönhatásuk, miszerint a *K. marxianus* és a fájlesztő társítása során a *K. marxianus* kiemelt laktáz aktivitásának köszönhetően a laktózt dinamikusán glükóz és galaktóz egységekre bontja, míg a felszabaduló cukrokat a fájlesztő gyorsan etanollá konvertálja. Ez esetben a kiindulási 10 (m/v)% tejsavó cefre 1:1 arányban történő beoltása mellett 3,2 (v/v)% alkoholtartalmat és ~57% biokonverziós fokot értem el 30°C-on a 10 napos fermentációs kísérlet során.

A továbbiakban a szubsztrátum koncentrációk (10 m/v%, 15 m/v%, 20 m/v%, 25 m/v%, 30 m/v%) hatását tanulmányoztam. Megállapítottam, hogy a kiindulási tejsavó koncentráció nagy hatással van a keletkező etanol és az erjedés végén visszamaradó szénhidrát mennyiségére. Azt tapasztaltam, hogy a 20 (m/v)% szubsztrátum tartományon belül ~4-7 (v/v)% etanol koncentráció mellett 70-83% közötti biokonverziós fokot értem el. A 25-30 (m/v)% cefrék esetében a fellépő katabolit represszió visszaszorította az alkoholos erjedés folyamatát.

A következő lépésben az elérhető etanol koncentráció és biokonverziós fokozása során optimálást hajtottam végre. A faktoriális kísérlettervezés során a két független változónak (faktornak) a tejsavó koncentrációt és a *K. marxianus* beoltási arányát választottam, figyelembe véve az eddigi kísérletek eredményeit.

A faktorkombinációk gyakorlati eredményeinek statisztikai kiértékelését a Statistica 9.0 for Windows alkalmazásával végeztem. A kísérletsorozat alapján a az alábbi másodfokú, polinomikus modelleket kaptam:

$$Z_1 = 1,1123 + 0,5094x - 0,0247x^2 - 2,9024y - 0,3340y^2 + 0,3000$$

ahol: Z: etanol koncentráció (v/v%), x: szubsztrát koncentráció (m/v%),

y: kevert kultúrában a *Kl. marxianus* aránya

$$Z_2 = 11,8852 - 0,7712x - 0,2069x^2 - 34,4098y - 3,9631y^2 + 3,6969xy$$

ahol: Z: biokonverziós fok (v/v%), x: szubsztrát koncentráció (m/v%),

y: kevert kultúrában a *Kl. marxianus* arány

A modellek illeszkedésének vizsgálata a Fischer féle F-teszt alapján az $F_{\text{etanol}}:1,2490$ ($p_{\text{etanol}}:0,5632$), míg az $F_{\text{biokonverzió}}:1,4380$ ($p_{\text{biokonverzió}}:0,5345$) értékeket mutatott. Ez alapján a modellek 44-47% megbízhatóságúaknak tekinthetők. Varianciaanalízis (ANOVA) során

végzett faktorok hatásainak és együttes hatásainak vizsgálata alapján az etanol koncentráció változására az elsőfokú szubsztrátum koncentráció és elsőfokú beoltási arány gyakorolt szignifikáns hatást 95% konfidencia intervallumon belül. Tehát a két faktor értékének növelése által az alkohol kihozatal fokozható, mely következtetést a Pareto diagram is alátámaszt illetve kiemeli a *K. marxianus* beoltási arányának jelentős hatását. A biokonverziós fok esetében faktorok/faktorkombináció nem mutatott szignifikáns hatást. A Student-féle t-próba segítségével az optimalizációs modellekben szereplő regressziós koefficiensek között az etanol koncentráció esetében a b_5 95%, a b_2 90%, a b_1 és b_3 75% megbízhatósági szintet adott, míg a biokonverziós foknál a koefficiensek nem közelítették meg a 95-90% megbízhatósági szintet. Az optimum munkapont meghatározása kétdimenziós koordinátarendszerben válaszfelület illesztésével történt. Mindkét optimalizációs paramétert tekintve, az elérhető maximális értékek 20-25 (m/v)% és 2,5:1 – 3:1 *K. marxianus* beoltási arány mellett várható.

Az optimum munkapont validálása során a beállított paraméterek mellett bizonyítást nyert, miszerint a vegyes kultúrában a *K. marxianus* arányának növelése pozitív hatással van a tejsavó alapú szakaszos fermentáció kimenetelére. Az etanol koncentráció esetében hat nap alatt a jósolt ~8-10 (v/v)% tartományon kívül estek a mért értékek. A biokonverziós fok esetében a kiindulási 17,5 (m/v)% tejsavó cefre és 3:1 arányú beoltás mellett 72,33% biokonverziós fokot határoztam meg, mely beleesik a biokonverziós fok becsült intervallumába, ezáltal hitelesítve a felállított modellt.

Az elért eredmények biztatóak és megalapozhatják a tejsavó alapú vegyes kultúrák alkohol erjesztési technológia további fejlesztését.

5. IRODALOM JEGYZÉK

- Agrawal, A. K.:** 2007. Biofuels (alcohol and biodiesel) applications as fuels for internal combustions engines. Progress in Energy and Combustion Science. Volume 33, Pages 233-71.
- Araujo, M.L., Moura, P.B.:** 2011. Bioethanol's dirty footprint in Brazil. Nature. Volume 469, Pages 299.
- Banat, I. M., Marchant, R.:** 1995. Characterization and potential industrial applications of five novel, thermotolerant, fermentative, yeast strains, World Journal of Microbiology and Biotechnology, Volume 11, Issue 3, 304-306.
- Bansal, S., Oberoi H. S., Dhillon, G. S., Patil, R.T.:** 2008. Production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* MTCC 1388 using whey and effect of four different methods of enzyme extraction on β -galactosidase activity. Indian Journal of Microbiology. 48, 337-341.
- Bollók, M., Réczey K., Zacchi, G.:** 2000. Simultaneous Saccharification and Fermentation of Steam-Pretreated Spruce to Ethanol, Applied Biochemistry and Biotechnology Volume 84–86, Pages 69-80.
- Box, G.E.P. Wilson, K.B.:** 1951. On the experimental attainment of optimum conditions. J. R. Statist. Soc., 13: 1-45.
- Brady, D., Nigam, P., Marchant, R., Singh, D., McHale, A.P.:** 1997. The effect of Mn^{2+} on ethanol production from lactose using *Kluyveromyces marxianus* IMB3 immobilized in magnetically responsive matrices. Bioprocess Eng. 17, 31–4.
- Carlotti, A., Jacob, F., Perrier, J., Poncet, S.:** 1990. Yeast production from crude sweet whey by a mixed culture of *Candida kefir* LY496 and *Candida valida* LY497. Biotechnology Letters. Volume 13, Pages 437-440.
- Clark, P. J.:** 2005. Concentrating proteins from milk and meat. Food technology, Volume 59, Pages 80-83.
- Christensen, A.D., Kádár, Z., Popiel, P.O., Thomsen, M.H.:** 2011. Production of bioethanol from organic whey using *Kluyveromyces marxianus*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. Volume 38, Pages 283–289.
- Crueger, W., Crueger C.:** 1987. Biotechnológia, alkalmazott mikrobiológia. Mezőgazdasági kiadó, Budapest, 118-119 oldal.
- Csapó, J., Csapóné Kiss ZS.:** 1998. Tej és tejtermékek a táplálkozásban. Budapest: Mezőgazdasági Kiadó. 341-342 p.
- Domingues, L., Dantas, M.M., Lima, N., Teixeira J.A.:** 1998. Continuous ethanol fermentation of lactose by a recombinant flocculating *saccharomyces cerevisiae* strain. Biotechnology and bioengineering Volume 64, Pages 692-697.
- Dragone, G., Mussatto, S.I., Oliveira, J.M., Teixeira, J.A.:** 2009. Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. Food Chem. 112, 929–35.
- Farkas, Cs.:** 2010. Vegyes kultúrák inulin fermentáció hatékonyságának növelése. TDK dolgozat.
- Fogarassy, Cs.:** 2001. Energianövények a szántóföldön, Szent István Egyetem, Gazdasági- és Társadalomtudományi Kar Európai Tanulmányok Központja, Gödöllő, 10-103 oldal.
- Furtado, A.T., Scandiffio, M.I.G., Cortez, L.A.B.:** 2011. The Brazilian sugarcane innovation system. Energy Policy. Volume 39, Pages 156-166.

- Gou, X., Zhou, J., Xiao, D.:** 2010. Improved ethanol production by mixed immobilized cells of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* from cheese whey powder solution fermentation. Appl. Biochem., Volume 160, Pages 532-538.
- Govumoni, S.P.,Koti, S.,Kothagouni, S.Y.,Venkateshwar, S.,Linga, V.R.:** 2013. Evaluation of pretreatment methods for enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production. Carbohydrate Polymers, Volume 91, Pages 646-650.
- Grba,S., Vesna,T., Stanzer,D. :**1998. Selection of yeast strain *Kluyveromyces marxianus* for alcohol and biomass production on whey. Biochemical Engineering Journal. Volume 45, Pages 24-32.
- Groeneveld, P., Stouthamer, A., H., Westerhoff, H.V.:** 2009. how and why 'cell selection' leads to the fastest-growing eukaryote. FEBS Journal. Volume 276, Pages 254-270.
- Gunasekaran, P., Kamini, N.R.:** 1991. High ethanol productivity from lactose by immobilized cells of *Kluyveromyces fragilis* and *Zymomonas mobilis*. World J Microbiol Biotechnol. 7, 551–556.
- Gupte, A.M.,Nair, J. S.:** 2010. β -Galactosidase production and ethanol fermentation from whey using *Kluyveromyces marxianus* NCIM 3551.Journal of Scientific & Industrial Research. 69,855-859.
- Gutierrez-Correa, M., Portal, L. et al.:** 1999. Mixed culture solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse, Bioresource Techn., Volume 68, Pages 173-178.
- Hadiyanto, Dessy, A., Apsari, P.A., Desiyantri, S.P.:** 2014. Optimization of Ethanol Production from Whey Through Fed-Batch Fermentation Using *Kluyveromyces marxianus*. Energy Procedia. Volume 47, Pages 108-112.
- Hancsók J., Krár M. et al.:** 2006. Újgenerációs bio-motorhajtóanyagok I., Magyar Kémikusok Lapja, 61. évfolyam, 8. szám, 260–264 oldal.
- Hang, Y.D., Woodams, E.E., Hang L.E.:** 2003. Utilization of corn silage juice by *Kluyveromyces marxianus*. Bioresource Technology. Volume 86, Pages 305-307.
- Hensing, M.G.M., Rouwenhorst,R.J., Scheffers,W.A., van Dijken, J.P.:** 1993. Production and Localization of Inulinase in *Kluyveromyces* Yeast. Studies in Plant Science. Volume 3, Pages 241-250.
- Hoschke, Á.:** 2010. Sör- és szeszipari technológia II. előadás anyag.
- Huang, C., Zong, M.H., Hong, W., Liu, Q.P.:** 2009. Microbial oil production from rice straw hydrolysate by *Trichosporon fermentans*. Bioresource Technology. 100, 4535-4538.
- Janssens, J.H., Burris, N., Woodward, A., Bailey, R.B.:** 1983. Lipid-enhanced ethanol production by *Kluyveromyces fragilis*. Appl Environ Microbiol. 45, 598–602.
- Kacz K., Neményi M.:**1998. Megújuló energiaforrások. Mezőgazdasági Szaktudás Kiadó, Budapest.
- Kazai, Zs., Varga, K.:** 2007. Bioüzemanyagok a környezeti és gazdasági fenntarthatóság tükrében, Energia Klub Memorandum, no. 5.
- Kádár, Zs., Szengyel, Zs., Réczey, K.:** 2004. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. Industrial Crops and Products. Volume 20, Pages 103-110.

- Kelly, P. M., Kelly, J., Mehra, R., Oldfield, D. J., Ragett, E., O’Kennedy, B. T.:** 2000. Implementation of integrated membrane processes for pilot scale development of fractionated milk components. *Lait*, Volume 8, Pages 139-153.
- Kemény S.:** 1985. Kísérletek tervezése és értékelése, Budapest.
http://kkft.bme.hu/sites/default/files/Kiserletek_tervezese.pdf
- Kerényi, A.:** 1995. Általános Környezetvédelem: Globális gondok, lehetséges megoldások, Mozaik kiadó, Szeged, 21-270.
- Khuri, A. I., Mukhopadhyay, S.:** 2010. Response surface methodology. *WIREs Comp Stat*, 2, 128–149.
- Kovács, K., Szakács, G., Zacchi, G.:** 2009. Enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated spruce using crude *Trichoderma reesei* and *Trichoderma atroviride* enzymes. *Process Biochemistry*. Volume 44, Pages 1323-1329.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W.:** 1998. The yeasts: a taxonomic study. 4th edn. Elsevier, Amsterdam.
- Kurtzman, C.P.:** 2003. Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the *Saccharomycetaceae*, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorhynchus*. *FEMS Yeast Research*. Volume 4, Pages 233-245.
- Laczó, F.:** 2008. Bioüzemanyagok előállításának lehetőségei Magyarországon, <http://www.ktk-ces.hu/biouzemanyag.pdf>
- Lane, M., Morrissey, J. P.:** 2010. *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow, *Fungal Biology Reviews*, Volume 24, Issues 1-2, Pages 17-26.
- Lebeau, T., Jouenne, T., Junter, G.-A.:** 1997. Simultaneous fermentation of glucose and xylose by pure and mixed cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida shehatae* immobilized in a two-chambered bioreactor, *Enzyme and Microbial Technology*, 21, 265-272.
- Leclerc, M., Chemardin, P., Arnaud, A., Ratomahenina, R., Galzy, P., Gerbaud, C., Raynal, A., Guérineau, M.:** 1987. Comparison of the Properties of the Purified Beta-Glucosidase from the Transformed Strain of *Saccharomyces Cerevisiae* TYKF2 with that of the Donor Strain *Kluyveromyces Fragilis* Y610. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Volume 9, Pages 410-422.
- Li, Z., Liu, Y., Liao, W., Chen, S., Zemetra, R.S.:** 2011. Bioethanol production using genetically modified and mutant wheat and barley straws. *Biomass and Bioenergy*. Volume 35, Pages 542-548.
- Lilly, M.D.:** 1979. Production of intracellular microbial enzymes. *Applied Biochemistry and Bioengineering*. Volume 2, Pages 1-26.
- Lodder, J., Kreger-van Rij, N.J.W.:** 1952. The yeasts: a taxonomic study. NHPG, Amsterdam.
- Magalhães-Guedes et al.:** 2013. Ethanol production from deproteinized cheese whey fermentations by co-cultures of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *African Journal of Microbiology Research*. Volume 7, Pages 1121-1127.
- Maningat, C.C., Bassi, S.D.:** 2004. Fuel and alcohol production, *Encyclopedia of Grain Science*, Oxford, United Kingdom. Pages 405–414.

- Mojovic, L., Nikolic, S., Rakin, M., Vukasinovic, M.:** 2006. Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates. *Fuel*, Volume 85, Pages 1750-1755.
- Naik, S.N., Goud, V.V., Rout, P.K., Dalai A.K.:** 2010. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Volume 14, Pages 578-597.
- Nelson, N.:** 1944. A photometric adaptation for the Somogyi method for the determination of glucose, *J. Biol. Chem.*, Volume 153, Pages 375-380.
- Nonklang, S., Sophon Boonlue et al.:** 2007. Genetic engineering of *Kluyveromyces marxianus* for ethanol fermentation. The 23rd International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology.
- Nonklang, S., Abdel-Banat, B.M.A., Cha-Aim, K., Moonjai, N., Hoshida, H., Limtong, S., et al.:** 2008. High temperature ethanol fermentation and transformation with linear DNA in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042. *Appl Environ Microbiol.* 74, 7514–7521.
- Oda, Y., Nakamura, K.:** 2009. Production of ethanol from the mixture of beet molasses and cheese whey by a 2-deoxyglucose-resistant mutant of *Kluyveromyces marxianus*. *FEMS Yeast Res.* 9, 742–748.
- Ozmihci, S., Kargi, F.:** 2007. Continuous ethanol fermentation of cheese whey powder solution: effects of hydraulic residence time. *Bioprocess Biosyst Eng.* 30, 79–86.
- Ozmihci, S., Kargi, F.:** 2008. Ethanol production from cheese whey powder solution in a packed column bioreactor at different hydraulic residence times. *Biochemical Engineering Journal*, Volume 42, Pages 180-185.
- Panesar, S.P., Marwaha, S.S., Chopra, K.H.:** 2010. *Enzymes in food processing*, I.K. International Publishing House Ltd., New Delhi, Pages 57-60.
- Panyik G., Béli G.:** 2008. Gyümölcspálinka gyártása, jövedéki ismeretek, FVM Vidékfejlesztési, Képzési és Szaktanácsadási Intézet, Budapest, 51-56.
- Parameswaran, B., Raveendran, S., Reeta, R. S., Surender, V., Lalitha, D., Satya, N., Noble, K., Rajeev, K. S., Ashok, P.:** 2010. Bioethanol production from rice straw: An overview. *Bioresource Technology*, Volume 101, Pages 4767-4774.
- Philippidis, G.P.:** 1996. Cellulose bioconversion technology, In: Wyman, C.E. (ed) *Handbook on bioethanol: Production and utilization*, Taylor & Francis, Washington, Pages 253-286.
- Popp, J.:** 2007. A bioüzemanyag-gyártás nemzetközi összefüggései. *Agrárgazdasági tanulmányok*, 6.szám, Budapest, Agrárgazdasági Kutató Intézet. <http://www.avacongress.net/ava2007/presentations/pl1/4.pdf>
- Porro, D., Sauer, M., Branduardi, P., Mattanovich, D.:** 2005. Recombinant protein production in yeasts. *Molecular Biotechnology*. Volume 31, Pages 245-259.
- Potori N.:** 2008. Kilátások a főbb növényi termékek világpiacán. AKII, Budapest.
- Prasad, S., Singh, A., Joshi, H.C.:** 2007. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resources, Conservation and Recycling*. Volume 50, Pages 1-39.
- Raphael, H.S.D, Marina, Q.R.B. et al.:** 2014. Optimizing and validating the production of ethanol from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Volume 3, Pages 111-117.

- Rajendran, V., Karuppan, M.:** 2012. Sono-assisted enzymatic saccharification of sugarcane bagasse for bioethanol production. *Biochemical Engineering Journal*. Volume 63, Pages 1-9.
- RFA:** Renewable Fuels Association. (Industry statistics: World Fuel Etanol Production). 2011, 2012.
- Román András** (2010) Tejsavó nano- és diaszűrésének vizsgálata [egyetemi doktori disszertáció]. Budapesti Corvinus Egyetem, Budapest.
- Sági:** 1998. Mezőgazdaságunk útja az Európai Únióba. 1. füzet: Energiahasznosítás a mezőgazdaságban.
- Sánchez, Ó.J., Cardona, C.A.:** 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*. Volume 99, Pages 5270-5295.
- Santek, B., Gwehenberger, G., Santek, M.I., Narodslawsky, M., Horvat, P.:** 2010. Evaluation of energy demand and the sustainability of different bioethanol production processes from sugar beet. *Resources, Conservation and Recycling*. Volume 54, Pages 872-877.
- Shanavas, S., Padmaja, G., Moorthy, S.N., Sajeev, M.S., Sheriff, J.T.:** 2011. Process optimization for bioethanol production from cassava starch using novel eco-friendly enzymes. *Biomass and Bioenergy*. Volume 35, Pages 901-909.
- Singh, A., Pant, D., Korres, N.E., Nizami, A.S., Prasad, S., Murphy, J.D.:** 2010. Key issues in life cycle assessment of ethanol production from lignocellulosic biomass: Challenges and perspectives. *Bioresource Technology*. Volume 101, Pages 5003-5012.
- Singh, D., Banat, I.M., Nigam, P., Marchant, R.:** 1998. Industrial scale ethanol production using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* IMB3 in an Indian distillery. *Biotechnology Letters*. Volume 20, Pages 753-755.
- Siso, M.I.G.:** 1996. The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresource Technology*. Volume 57, Pages 4-11.
- Steinbusch, K.J.J., Arvaniti, E. et al.:** 2009. Selective inhibition of methanogenesis to enhance ethanol and n-butyrate production through acetate reduction in mixed culture fermentation, *Bioresource Technology*, Volume 100, Pages 3261-3267.
- Somogyi, M.:** 1945. A new reagent for the determination of sugars, *J. Biol. Chem.*, Volume 160, Pages 61-68.
- Somogyi, M.:** 1951. Notes on sugar determination, *J. Biol. Chem.*, Volume 195, Pages 19-23.
- Szambelan, K., Novak, J., Chrapkowska, K.J.:** 2004. Comparison of bacterial and yeast ethanol fermentation yield from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers pulp and juices., *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, Volume 3, Issue 1, Pages 45-53.
- Szambelan, K., Nowak, J., Jelen, H.:** 2005. The composition of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) spirits obtained from fermentation with bacteria and yeasts, *E. Life Sci.*, 5, No.1, Pages 68-71.
- Temudo, M.F., Mato, T. et al.:** 2009. Xylose anaerobic conversion by open-mixed cultures, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Volume 82, Pages 231-239.

- Van der Walt, J.P.:** 1970. *Kluyveromyces van der Walt* emend. van der Walt. In: Lodder J. (ed) *The yeasts: a taxonomic study*, 2nd edn. NHPC, Amsterdam. Pages 316-378.
- von Stocker, U. , Marison, I.W.:** 1993. Unconventional utilization of whey in Switzerland. *Bioprocess Engineering*, IRS Press, Oxford, United Kingdom. Pages 330–364.
- Witthuhn, R.C., Schoeman, T., Britz, T.J.:** 2005. Characterisation of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir grain mass cultivation. *International Dairy Journal*, Volume 15, Pages 383-389.
- Wyman, C.E.:** 1996. Ethanol production from lignocellulosic biomass: overview, In: Wyman, C.E. (ed) *Handbook on bioethanol: Production and utilization*, Taylor & Francis, Washington, 1-18.
- Yamashita, Y., Kurosumi, A., Sasaki, C., Nakamura, Y.:** 2008. Ethanol production from paper sludge by immobilized *Zymomonas mobilis*. *Biochemical Engineering Journal*. Volume 42, Pages 314-319.
- Zafar, S. Owais, M.:** 2006. Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*. *Biochem Engineering Journal*. Volume 27, Pages 295–298.
- Zhou, H., Xu, J., Chi, Z., Liu, G., Chi, Z.:** 2013. β -Galactosidase over-production by a mig1 mutant of *Kluyveromyces marxianus* KM for efficient hydrolysis of lactose. *Biochemical Engineering Journal*. 76, 17-24.

Internetes hivatkozások:

<http://nzic.org.nz/ChemProcesses/dairy/3H.pdf>

<http://www.euractiv.com/climate-environment/indirect-biofuels-emissions-scie-news-518023>

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Munkám végére érve, szeretném hálámat kifejezni segítőkézségéért és szakmai tanácsaiért témavezetőmnek, Dr. Habil Nguyen Duc Quang tanár úrnak valamint Farkas Csillának az útmutatásáért és önzetlen segítségéért.

Továbbá köszönettel tartozom Rezessyné Dr. Szabó Juditnak hasznos észrevételeiért a munkámmal kapcsolatban.

