



---

**BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM**  
**VEGYÉSZMÉRNÖKI ÉS BIOMÉRNÖKI KAR**  
**OLÁH GYÖRGY DOKTORI ISKOLA**

## **BIOFINOMÍTÓ TECHNOLÓGIÁINAK OPTIMÁLÁSA**

PhD értekezés tézisei

**Hetényi Kata**

Témavezető: Dr. Sevella Béla  
Konzulens: Dr. Németh Áron

Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék  
Fermentációs Kísérletiüzemi Labor

2010

---

## 1 BEVEZETÉS

Napjaink egyik legégetőbb problémája a hagyományos, többnyire fosszilis anyag- és energiaforrások kiváltása könnyen és olcsón beszerezhető, ipari, mezőgazdasági, környezetvédelmi és gazdasági szempontból előnyösebb alternatívákkal. Az 1970-es években felmerülő olajkrízis a megújuló nyersanyagokra és a biomassza alapú technológiákra terelte a figyelmet, majd az Európában tapasztalható mezőgazdasági túltermelés és az EU által vállalt CO<sub>2</sub>-kibocsátás csökkentés új hajtóerőt adott a biotechnológiai kezdeményezéseknek. Emellett a mezőgazdasági nyersanyagok nem élelmiszercélú felhasználása a fenntartható fejlődés jegyében világszerte elindított egy új irányvonalat, amely olyan üzemek létrehozását tűzi ki célul, amelyekben megújuló nyersanyag(ok)ból kiindulva széleskörűen felhasználható termék(ek) állítható(k) elő, minél kevesebb fosszilis energiát felhasználva, és minél kevesebb mellékterméket/hulladékot kibocsátva. A fenti elképzelés jegyében született meg az ún. *biofinomító* koncepció, amely már nevében is a kőolaj finomítókra reflektál, és olyan alternatívát nyújt azokkal szemben, amelyben a megújuló, biomassza alapú nyersanyagok találkoznak a környezet- és erőforrásbarát technológiákkal, egy komplex, gazdaságos egységet alkotva.

A *tejsavat* mint megújuló nyersanyagokból fermentációs úton előállítható terméket az utóbbi évtizedben egyre növekvő mértékben igényli a piac mind élelmiszeripari, mind polimergyártási célból, és utóbbi felhasználása révén a következő évtizedekben akár egy millió tonnás nagyságrendű iparág alapanyagává is válhat. A tejsav ugyanis egy ún. platform-alkotó vegyület, amelyből egy-két egyszerű szintetikus lépés útján előállítható számos olyan termék, amelyeket korábban kőolaj alapú technológiák segítségével termeltek. Az egyik fő termék a tejsav polimerizációjával nyerhető, biológiailag lebontható műanyag, a politejsav (PLA – poly lactic acid), amely fizikai tulajdonságaiban az utóbbi évek fejlesztései révén egyre inkább versenyképes a petrokémiai úton előállított műanyagokkal.

Doktori munkám során több olyan projektbe is alkalmam nyílt bekapcsolódni, amelyek célja megújuló nyersanyagokból kiinduló biofinomító egység(ek) létrehozása volt. E búza vagy cukorcirok alapú üzemek jövődő főterméke a tejsav ill. annak származékai, így kutatásaim a tervezett biofinomító(k) tejsav fermentációs egységeinek technológiai szempontú fejlesztésére irányultak. A cél olyan technológiai megoldások kidolgozása volt, amelyek a rendelkezésre álló kétféle alapanyagra egyaránt alkalmazhatók, és költséghatékony termelést tesznek lehetővé, ezáltal a tejsavra mint fermentációs termékre épülő további termelő egységeket integrálva a létrejövő komplexum akár ún. III. fázisú biofinomítóvá léphet elő, amely flexibilisen alkalmazkodik a piaci igényekhez és az éppen rendelkezésre álló nyersanyagokhoz.

## 2 IRODALMI HÁTTÉR

A biofinomítók kombinálják a termeléshez szükséges biotechnológiai és vegyipari technológiákat, és biomassza eredetű nyersanyagokat használnak ipari köztitermékek gyártására<sup>1</sup>. A biofinomítók nyersanyagait, technológiáit és főtermékeit úgy célszerű megválasztani, hogy a körülményeknek és igényeknek megfelelően rugalmasan módosítható legyen az adott üzem.

Egy lehetséges biofinomító főtermék a széleskörűen felhasználható, platform alkotó *tejsav*. A tejsav ipari előállítására több évtizedes múltra tekint vissza, és habár kőolaj alapú szintetikus előállítás is meghonosodott a '60-as években, a megújuló nyersanyagokból kiinduló, optikailag tiszta L(+)- vagy D(-)-izomert eredményező fermentációs tejsavtermelés nagyobb jelentőséggel bír jelenleg. Elsősorban élelmiszeripari alkalmazása fontos, de 2002 óta nagy ugrás tapasztalható a műanyag iparban történő felhasználásában is, és az elkövetkezendő 20 évben akár egy millió tonnás mennyiségben előállított biotermékké léphet elő. A tejsav dimerjéből gyűrűfelfnyíló polimerizációval előállítható *politejsav* (PLA) egy sokrétűen alkalmazható, biológiailag lebontható műanyag, amely lebonthatóságának, termoplasztikus tulajdonságának és egyéb kedvező fizikai paramétereinek köszönhetően válik egyre reálisabb alternatívának a korábbi kőolaj alapú műanyagok piacán<sup>2</sup>.

A *tejsav fermentációs* kutatások irodalma bőséges, és számos publikáció, ipari szabadalom és ipari törzsekre benyújtott oltalom látott napvilágot az elmúlt 60 évben. Ipari szempontból természetesen olyan törzsek alkalmazása célszerű, amelyek homofermentatív metabolikus útvonalon keresztül állítják elő a rendelkezésre álló szénforrásból a tejsavat, és ezen keresztül a növekedésükhöz és fenntartásukhoz szükséges energiát (1 mol cukor átalakításából 2 mol tejsav és 2 mol ATP keletkezése mellett).

Habár a legtöbb jelenlegi kutatás baktériumok használatával zajlik, a *fonális gombák*, például a *Rhizopus*, *Mucor*, *Monilia* törzsek szintén képesek tejsavtermelésre a glükóz aerob hasznosításával. A fonális gombákkal történő tejsavtermelés hátránya, hogy adott körülmények között hajlamosak élesztősejtes metabolizmusra, illetve a tejsavtermelés mellett a rendelkezésre álló szénforrás egy részét a növekedés szénforrásaként is hasznosítják, így csökkentve a tejsavhozamot.

A bakteriális tejsavtermelést végző ún. tejsavbaktériumok a *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* és *Enterococcus* nemzetségekbe tartoznak. A legtöbb iparban használt tejsavbaktérium törzs szabadalommal védett, és többségük a *Lactobacillus* nemzetségbe tartozik. A tejsavbaktériumok nagy része csak az *egyszerű szénhidrátok* (mono- vagy diszacharidok) asszimilációjára képes, így a keményítő, cellulóz vagy lignocellulóz alapú fermentációkat megelőzően a poliszacharidok fizikai és/vagy kémiai előkezelése, valamint enzimes bontása elengedhetetlen. Az egyik útvonal, a leggyakrabban alkalmazott technika, a hidrolízis és fermentáció elkülönült, egymást követő megvalósítása (SHF – Separate Hydrolysis and Fermentation), de egyre elterjedtebb megoldás a szimultán cukrosítás és fermentáció (SSF – Simultaneous Saccharification and Fermentation) is, amelynél a két folyamat párhuzamosan zajlik. A keményítő közvetlen hasznosítására (direkt fermentációra) képesek az *amilolitikus* tejsavbaktériumok (ill. a fonális gombák egy része), amelyek rendelkeznek a keményítő bontásához szükséges elfolyósító és cukrosító enzimekkel. A *Lactobacillus* nemzetségbe tartozó törzsek hátránya, hogy leginkább *mezofil* körülmények között (45°C-ig) képesek növekedésre és tejsavtermelésre, így ipari alkalmazásuk során nagy a kockázata a befertőződésnek.

A *termofil* tejsavtermelés már évtizedek óta foglalkoztatja mind a kutatókat, mind az ipart. A termofil vagy termotoleráns baktériumokkal (vagy fonális gombákkal) zajló fermentációk előnye,

<sup>1</sup> B. Kamm, M. Kamm (2004) Principles of biorefineries, *Applied Microbiology and Biotechnology* **64**: 137-145

<sup>2</sup> Y.-J. Wee, J.-N. Kim, H.-W. Ryu (2006) Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications, *Food Technology and Biotechnology* **44**: 163-172

hogy magas hőmérsékleten csökkenthető a fertőzés kockázata, valamint elvileg magasabb produktivitás és konverzió érhető el az alkalmazott törzsekkel. Egy másik fő szempont a már említett keményítő alapú technológiákban alkalmazható szimultán cukrosítás és fermentáció lehetősége termofil törzsekkel, amelyek hőmérsékleti optima egybeesik az ipari cukrosító enzimek optimumával. A legszélesebb körben alkalmazott törzsek a *B. coagulans* fajhoz tartoznak, ezek között szabadalommal védett, iparilag alkalmazható törzsek is találhatóak, de jó eredményeket értek el a már termofilnek is tekinthető *Bacillus stearothermophilus* vagy *Geobacillus stearothermophilus* törzsekkel is<sup>3</sup>.

A biotechnológiai tejsavtermeléshez ideális *nyersanyag* olcsó, kevés szennyezést tartalmaz, gyorsan előállítható, jó terméshozamú, kevés mellékterméket eredményez, kevés előkezelést igényel és egész évben elérhető. A lehetséges szénforrások cukortartalmú (pl. cukornád, cukorrépa, cukorcirok, tejsavó), keményítőtartalmú (pl. búza, kukorica, burgonya), vagy lignocellulóz-tartalmú nyersanyagok, amelyek szénhidrát tartalmát a baktériumok tejsavtermelésre hasznosítják. A tejsavbaktériumokra azonban jellemző a komplex tápanyagigény, mivel egyes növekedési faktorok (pl. B vitaminok és aminosavak) szintézisére nem képesek. A növekedéshez és tejsavtermeléshez szénforrás mellett nitrogénforrásra van szükségük, elsősorban peptidek és aminosavak formájában (szerves nitrogénforrás), illetve elengedhetetlen számukra a vitamin és ásványi anyag kiegészítés. Ipari szempontból tehát a megfelelő, könnyen hasznosítható szénforrás mellett elengedhetetlen a tápközeg kiegészítő komponenseinek alkalmas megválasztása, és a tápközeg optimalása.

A *búza* magas keményítőtartalma révén megfelelő első generációs fermentációs alapanyag. Tejsavtermelésre történő felhasználása nem új keletű: irodalmi adatok<sup>4</sup> alapján megfelelő enzimes előkezelések után a búza keményítőtartalma szénforrásként, vízdoldható és vízdoldhatatlan fehérjetartalma (glutén) nitrogénforrásként szolgálhat, azonban minden esetben szükségesnek találtatott egyéb kiegészítés (élesztő kivonat) alkalmazása is a hatékony termeléshez. A manapság itthon is elterjedőben lévő, magas cukortartalmú *cukorcirok* növény szintén alkalmas nyersanyaga lehet a tejsav fermentációs kutatásoknak. A növény szárából préseléssel vagy extrahálással nyerhető, glükózt, fruktózt és szacharózt tartalmazó lé sokoldalúan felhasználható fermentációs nyersanyag: etanol, metanol és aminosav fermentációs kutatásokon felül tejsavtermelésre is alkalmazták korábban<sup>5</sup>. Magas cukortartalma mellett azonban elhanyagolható a fehérjetartalma, így kiegészítő tápanyagok hozzáadása szükséges. A növény ipari felhasználhatósága ellen szól a Magyarországon évente egyszeri kampányszerű betakarítása valamint préselési és tárolási problémái. A növény szárán található vad mikroorganizmusok ugyanis az aratás során a lébe kerülve a cukortartalom igen drasztikus csökkenését és a lé gyors romlását okozhatják. A növény hosszú távú tárolása ipari szinten nem megoldott, kisebb léptékben alkalmazható a lé nagy töménységűre történő bepárlása, kémiai vagy hőkezelése, illetve a szecskázott növény silózása.

A *hőmérséklet* és *pH* fontos faktorok mind a szaporodásra, mind a tejsavtermelésre nézve, így az olcsó nyersanyagok feltérképezése mellett ezen paraméterek meghatározása is hozzájárul a hatékony, gyors és iparilag versenyképes bakteriális tejsavtermeléshez. Az irodalom számos olyan tanulmányt tartalmaz, ahol a fermentáció kinetikai leírásába integrálják a pH és a hőmérséklet

<sup>3</sup> H. Danner, R. Braun (1999) Biotechnology for the production of commodity chemicals from biomass, *Chemical Society Reviews* **28**: 395-405

<sup>4</sup> K. Hofvendahl, C. Akerberg, G. Zacchi, B. Hahn-Hagerdal (1999) Simultaneous enzymatic wheat starch saccharification and fermentation to lactic acid by *Lactococcus lactis*, *Applied Microbiology and Biotechnology* **52**: 163-169

<sup>5</sup> Richter K., Berthold C. (1998) Biotechnological Conversion of Sugar and Starchy Crops into Lactic Acid, *Journal of Agricultural Engineering Research* **71**: 181-191

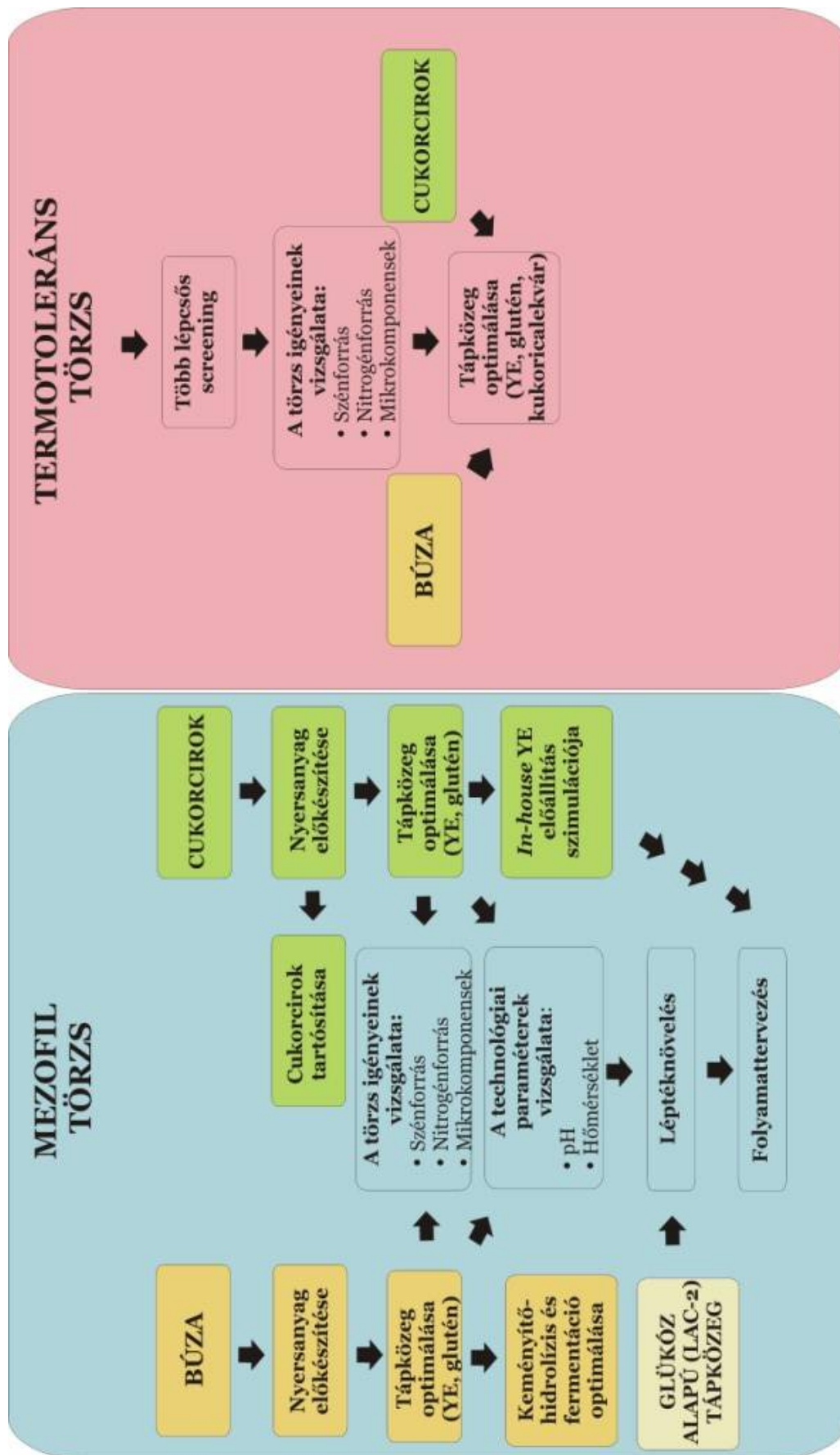
hatását. A tejsavtermelésre vonatkozó első kinetikai leírást Luedeking és Piret<sup>6</sup> adta, ezen példán keresztül vezetve be a növekedéshez kapcsolt és nem kapcsolt termékkepződés fogalmát a primer metabolitok esetében. Ezt a modellt dolgozták át az elmúlt évtizedekben, beleépítve a pH, a hőmérséklet, az oxigén-szint, a disszociálatlan tejsav és a szubsztrát okozta inhibíció és a különböző tápközeg-komponensek tejsavtermelésre gyakorolt hatásával. Míg a hőmérséklet szabályozása általában nem jelent gondot a fermentációk esetében, a pH a fermentáció egyik kritikus szabályozási kérdése. pH-szabályozás nélkül értéke folyamatosan csökken a tejsav képződése közben, egy kritikus értéket elérve pedig leállítja a mikrobiális tevékenységeket. A pH állandó értéken tartása több módon is megoldható: a tejsav semlegesíthető valamilyen lúg vagy pufferelő közeg segítségével, vagy eltávolítható extrakció, adszorpció vagy elektrodialízis útján. A tejsavbaktériumok optimális működési pH-tartománya általában 5 és 7 között található.

Doktori munkám célja egy biofinomító fermentációs egységeinek technológiai fejlesztése volt, amelynek főterméke tejsav, nyersanyaga pedig lehet akár glükóz, akár búzakeményítő, akár a cukorcirok növény kipréselt leve. A biofinomító egyik melléktermékéül (elvi szinten) a tejsav fermentációhoz szükséges élesztőkivonatot választottam, amelynek nyersanyagául a cukorcirok valamely része szolgálhat.

A tejsav fermentációt két útvonalon keresztül közelítettem meg (*1. ábra*): egy mezofil technológia kidolgozása volt a fő irány, majd megvizsgáltam a magasabb hőmérsékleten (termofil körülmények között) zajló tejsavtermelés lehetőségét is. A mezofil tejsavtermelési technológia kifejlesztése során foglalkoztam a különböző nyersanyagokból összetett tápközegek optimalálásával, a mikroba tápanyagigényeinek felmérésével, a fermentáció technikai paramétereinek beállításával, és a kész technológia léptéknövelésével. A termofil tejsavtermelés kidolgozásához végeztem két több lépcsős screeninget, és a kiválasztott törzset próbáltam adaptáltatni a két tápközegre. Végül megvizsgáltam a tejsavtermelésben kulcsfontosságú kiegészítő komponens, az élesztőkivonat előállításának lehetőségeit.

---

<sup>6</sup> R. Luedeking, E. L. Piret (1959) A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH, *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering* **1**: 393-412



1. ábra: A kutatási téma áttekintő ábrája

### 3 KÍSÉRLETI MÓDSZEREK

#### Törzsek

A mezofil tejsavtermeléssel kapcsolatos kísérletekben két törzs szerepelt: *Lactobacillus* sp. TUB B-207 és *Lb.* sp. MKT-878 (NCAIM B02375). A termofil tejsavtermelési kísérleteket 21 törzsszel kezdtem meg: *Bacillus coagulans* (DSM 1, 2308, 2311, 2312, 2314, 2350, 2356, 2383, 2384, 2385), *B. smithii* (DSM 2319), *B. stearothermophilus* (DSM 2334, 2349), *Geobacillus stearothermophilus* (DSM 22<sup>T</sup>, 297, 456, 494, 2027, 2313, 3299, 5934).

#### Tápközegek

A törzsgyűjteményi ajánlásnak megfelelően a *Lactobacillus* törzsek felélesztésére és fenntartására MRS (De Man, Rogosa és Sharpe<sup>7</sup>), a *Bacillus*, *Geobacillus* törzsek esetében nutrient tápközeget alkalmaztam.

A glükóz alapú kísérleteket az ún. Lac-2 tápközegen végeztem, amely nitrogénforrásként élesztőkivonatot és kukoricalekvárt tartalmaz. A búza alapú tápközeghez BL55-ös búza finomlisztet használtam, amelyet a kísérletek egy részében egy korábbi tanszéki kísérletben meghatározott módon frakcionáltam, enzimes kezelés mellett, elválasztva a glutén frakciót a búza keményítőtartalmától. A kísérletek másik részében a glutén frakciót nem szeparáltam, hanem enzimes kezeléssel tettem vízdoldhatóvá és felhasználhatóvá a tápközeg nitrogénforrásaként. A cukorcírok alapú kísérletekhez négyféle préselt lé állt rendelkezésemre: Monori édes, Sucrosorgho, Autan és Urja fajtákból. Az enzimes előkezelésekhez (búzafrakcionálás, keményítő- és fehérjehidrolízis) a következő enzimeket alkalmaztam a gyártó (Novozyme) által megadott mennyiségben és körülmények között: Shearzyme® 500 L (xilanáz), Termamyl® SC ( $\alpha$ -amiláz), SAN®Super 240 L (glüko-amiláz és proteáz), Alcalase® 2.4 L FG (proteáz), Neutrase® 0.8L (proteáz). Az optimalálási kísérletek során különböző szénforrásokat (búzakeményítő, cukorcíroklé, glükóz, szacharóz, xilóz) egészítettem ki nitrogéntartalmú összetevőkkel (kukoricalekvár, élesztőkivonat, glutén), illetve mikrokomponensekkel (vitaminok, sók, aminosavak). A tápközegek sterilizése (a szűrővel sterilizett aminosavak és vitaminok kivételével) 120°C-on, 20 perc hőntartással történt. A szénforrásokat a többi komponenstől elszeparálva kezeltem.

#### Fermentáció

A tápközeg optimalálási feladatok során rázatott lombikos kísérleteket végeztem, 100/200 mL léptékben. A nagyobb léptékű fermentációkhoz a következő fermentorokat alkalmaztam: B. Braun Biostat® Q (500-800 mL), B. Braun Biostat® M (1000-1800 mL), B. Braun Biostat® U (15-20 L), B. Braun Biostat® 300D (150-230 L). A pH-szabályozást CaCO<sub>3</sub>, 20% NH<sub>4</sub>OH, 20% NaOH, 20% trimetil-amin, 20% dimetil-amin és 25% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> adagolásával oldottam meg.

#### Analitika

A fermentációs minták elemzésére Waters Breeze HPLC System berendezést használtam. A savas minták esetében alkalmazott módszer: mozgófázis 5 mM-os H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> oldat (0,5 mL/min), BioRad Aminex HPX-87H oszlop, 65 °C, detektor hőmérséklete 40°C. A cukorminták esetében alkalmazott módszer: mozgófázis Millipore víz (0,6 mL/min), BioRad Aminex HPX-87P oszlop, 85°C, detektor hőmérséklete 40°C.

A sejtnövekedés nyomonkövetése az optikai denzitás (A<sub>600</sub>) mérésével zajlott fotometriásan.

<sup>7</sup> De Man, Rogosa, Sharpe (1960) Medium for the cultivation of lactobacilli, *Journal of Applied Bacteriology* **23**: 130-135



## 4 EREDMÉNYEK

A doktori dolgozatomban bemutatott téma egy biofinomító fermentációs egységeinek technológiai szempontú optimalálása, amely többféle nyersanyagon, különböző törzsekkel, mezofil és termofil körülmények között zajlott, és a nyersanyagok, ill. kiegészítő komponensek előkezelési, előállítási és tárolási problémáját is magában foglalta. Az alábbiakban összefoglalom az egyes témakörökben elért eredményeket.

### Kísérletek glükóz alapú, Lac-2 tápközegen

Két mezofil tejsavtermelő törzs (*Lactobacillus* sp. TUB B-207 és a *Lactobacillus* sp. MKT-878) vizsgálata zajlott egy korábban tejsavtermelésre optimált ún. Lac-2 tápközegen, amelyek közül az MKT-878 jelű bizonyult eredményesebbnek mind hozam, mind produktivitás szempontjából (0,88 g/g, 3,52 g/L\*h). A törzssel laboratóriumi léptékben (0,8 L) párhuzamos kísérleteket végeztem, amelyek alapján elmondható, hogy a fermentáció kis szórással reprodukálható. 0,8-20-200 L léptéksorban léptéknövelést végezve a termékhozam a fermentációs lépték növekedtével javult, a produktivitás pedig továbbra is meghaladta az ipari szempontból elégséges 3 g/L\*h értéket.

### Búza alapú fermentációk

A búza frakcionálása után a búza hidrolizált keményítőtartalmán folytattam kísérleteket. Kiegészítés nélkül a fermentációk csak igen lassan, gyenge produktivitás mellett zajlottak, így szükségesnek ítéltém a tápközeg kiegészítését nitrogéntartalmú komponensekkel: a különböző koncentrációban alkalmazott élesztőkivonat, kukoricalekvár és élesztő autolizátum közül az élesztőkivonat nyújtotta a legjobb eredményt, ~120 g/L glükóz mellett 20 g/L mennyiségben (2 g/L összes nitrogéntartalommal).

Az élesztőkivonat egy részének kiváltására proteázos emésztés után felhasználtam a búzában található vízdoldhatatlan fehérjét (glutén) is nitrogénforrásként, majd egy 3<sup>2</sup> kísérleti terv keretein belül optimaltam a glutén és élesztőkivonat mennyiségét a produktivitás maximalizálása szempontjából. Az optimális beállítás (16 g/L glutén és 8 g/L élesztőkivonat) mellett 0,88 g/g hozamot és 3,54 g/L\*h produktivitást sikerült elérni, amelyet 0,8-1,5-15 literes léptékben is sikerült reprodukálnom. Ez a produktivitás csak a glükóz-tejsav konverziót tartalmazza, a fermentációt megelőző hidrolízis idejével kiegészítve ez az érték a felére csökken.

A szeparált hidrolízis és fermentáció (SHF) mellett górcső alá vettem egyéb technikákat is. A *Lb. amylovorus* és a *Rhizopus oryzae* törzsekkel korábban végzett direkt fermentációs eljárás elégtelensége miatt a szimultán cukrosítás és fermentáció (SSF) lehetőségét vizsgáltam, amely során a cukrosítás és fermentáció párhuzamosan zajlik, így kevesebb fermentorkapacitást igényel, valamint az alacsony glükóz koncentrációnak köszönhetően elkerülhető az esetleges szubsztráthinhibíció. Hátránya viszont, hogy az alkalmazott törzs pH és hőmérsékleti optimuma eltér a cukrosító enzimétől, és mivel a nulla közeli cukor koncentráción a növekedési és termékképzési sebesség is nulla közeli, így jóval lassabban zajlik mindkét folyamat. Ennek kiküszöbölésére alkalmaztam és optimaltam egy ún. kombinált hidrolízis és fermentáció (CHF) elnevezésű technikát, amelynél a hidrolízis és fermentáció térben egy helyen, de időben eltolva zajlik: a cukrosítás megkezdése után időben eltolva történik a tápközeg inokulálása. Az optimális beoltási időpont meghatározásához több kísérleti beállítást (0, 12, 24, 36 óra) is kipróbáltam, majd egy korábban kidolgozott fermentációs kinetikai modellt, valamint egy irodalmi és kísérleti adatok alapján felállított keményítő hidrolízisre vonatkozó kinetikai leírást alkalmaztam az optimum pont meghatározásához. A kapott empirikus modellel szimulálva a különböző beoltási időpontokat egy a produktivításra nézve maximumos görbe adódott, amely megadta az optimális beoltási időpontot (14 óra). Ezzel a beállítással pedig a hidrolízis idejével is bekalkulálva csaknem elértem a 3 g/L\*h produktivítás értéket.



### **Cukorcirok alapú fermentációk**

A négyféle cukorcirok fajtából származó lé cukortartalmát és előkezelési lehetőségeit vizsgálva a fermentációk alapanyagául a centrifugálással előkezelt Monori édes levét választottam, mivel ez a lé tartalmazta a legtöbb fermentálható cukrot (szacharóz, glükóz, fruktóz). A 2009-es aratás során ez a fajta azonban már nem mutatott ilyen jó cukorhozamot, így a kísérleteket a Sucrosorgho fajtából nyert lével folytattam.

A cukorcirok tartósítási lehetőségeit vizsgálva kis léptékben a lé fagyasztása, nagyobb léptékben a hősterilizáció vagy savanyítása (pH 2,0-2,5) tűnik járható útnak. A cukorcirok szecska tartósítására vonatkozó fizikai, kémiai és biológiai kezelések közül a kombinált kezelések mutattak jobb eredményt, a cukorfogyás megakadályozása azonban továbbra sem megoldott.

Mivel a cukorciroklé fehérjetartalma elhanyagolható, a cukorcirok alapú tápközeget nitrogénforrás kiegészítéssel optimaláltam. A ~120-130 g/L cukortartalmú 2008-as Monori édes lé optimalálási kísérlete során 20 g/L élesztőkivonat bizonyult elégségesnek. Az élesztőkivonat mennyiségének csökkentésére szintén egy 3<sup>2</sup> kísérleti tervben vizsgáltam a glutén és élesztőkivonat együttes alkalmazásának lehetőségét, és az optimális beállítás (16 g/L glutén, 6 g/L élesztőkivonat) 0,99 g/g termékhozamot és 3,04 g/L\*h produktivitást eredményezett. A magasabb cukortartalmú, 2009-es aratású Sucrosorgho lé esetében ez a beállítás azonban nem volt megfelelő, így célszerűnek tűnt a törzs szén-, nitrogén- és mikrokomponens-forrás igényét megvizsgálni.

### **A törzs tápanyagigényének vizsgálata**

A fentiek alapján 120 g/L szénforrás szinten 16 g/L glutén (2 g/L összes nitrogéntartalom) és 6 ill. 8 g/L élesztőkivonat mennyiség tűnt szükségesnek, amelyből az élesztőkivonat mikrokomponens forrás szerepet töltött be. Az élesztőkivonat kiváltására negatív tesztek alkalmazásával vizsgáltam a törzs vitamin- és aminosavigényét. Hat vitamin és három aminosav esszenciálisnak bizonyult, ill. további 9 hiánya esetében lelassul a tejsavtermelés. Ezen kiegészítő komponensek együttes alkalmazásával sem sikerült azonban az élesztőkivonathoz hasonló eredményt elérni, így azt nem sikerült kiváltani.

A szénforrás, nitrogénforrás és élesztőkivonat kölcsönhatását több válaszfelület módszerrel végzett kísérleten keresztül vizsgálva úgy találtam, hogy a szénforrás szintjének emelésével a nitrogénigény lineárisan nő, míg a mikrokomponensek (élesztőkivonat) igénye 60 g/L cukorkoncentrációig szintén linearitást mutat, a fölött azonban a szénforrás szintjétől független.

A magasabb cukor koncentrációjú (~150-180 g/L) cukorciroklére alkalmazva a fenti összefüggést 24 g/L glutén és 8 g/L élesztőkivonat kiegészítés mellett végeztem kísérletet, és 3,54 g/L\*h produktivitást értem el. Az eredmény laboratóriumi léptékben reprodukálható, és 0,5-1,8-18 L léptékig stabilan növelhető.

### **pH és hőmérséklet mint technológiai paraméter vizsgálata**

A fermentáció közben keletkező tejsav közömbösítésére és az állandó pH fenntartására öt különböző ágenst alkalmaztam. A kalcium-karbonátos, ammónium-hidroxidos, nátrium-hidroxidos, trimetil-aminos és dimetil-aminos szabályozások közül az ammónium-hidroxid és trimetil-amin adta a legjobb eredményt. Az ammónium-hidroxidos szabályozás hátránya, hogy a magas ammónium-laktát inhibeáló hatással bír, így a magasabb cukortartalmú cukorciroklevén folytatott fermentációk produktivitása romlik. A kalcium-karbonátos puffereles feldolgozási szempontból nem előnyös, valamint magas kalcium-laktát koncentráció mellett fellépett egy új jelenség, amely valószínűleg a kalcium-laktát kicsapódásából fakad: adott laktát koncentráció felett a fermentálé szilárd masszába állt, megakadályozva a fermentáció teljes lefutását. A két technika kombinált alkalmazásával kiküszöbölhető mindkét probléma: 22 g/L kalcium-karbonát adagolásával, majd ammónium-hidroxidos lúgadagolással 0,85 g/g hozamot és 3,55 g/L\*h produktivitást sikerült elérni 180 g/L glükóz tartalmú Lac-2 tápközegen.

Az optimális pH és hőmérséklet megállapítását egy 4<sup>2</sup> kísérleti terv keretein belül végeztük: a kapott produktivitás eredményekre Gauss-felületet illesztve az optimális hőmérséklet 35,5°C-nak, a

pH-optimum 7,0 értéknek adódott. A törzs pH-optimuma azonban igen tág tartományban mozog, így az idáig alkalmazott 5,8-6,0 tartományt alkalmaztam a további kísérletekhez.

### Termofil tejsavtermelés

Első körben egy többlépcsős screening során 10 *Bacillus coagulans* törzsből a DSM 2356 jelű törzset választottam ki, amely 52 °C-on, magas glükóz koncentráció mellett is képes homofermentatív módon tejsavat termelni. Irodalmi adatok alapján a *Bacillus/Geobacillus stearothermophilus* törzsek szintén alkalmasnak tűntek termofil tejsavtermelésre, így egy újabb szűrővizsgálatot állítottam fel, megvizsgálva három korábbi *B. coagulans* törzset, egy *B. smithii* törzset, és tíz *Bacillus/Geobacillus stearothermophilus* törzset. A többlépcsős screening során ismét a DSM 2356 jelű törzs került kiválasztásra, amely képes a magas szacharóz tartalmú tápközegben is tejsavtermelésre, akár 55°C-on is.

A tápközeg optimalálásához felmértem a törzs nitrogén- és mikrokomponens igényeit 120 és 180 g/L szénforrás szinten is, valamint megkíséreltem az élesztőkivonat egy részének kiváltását kukoricalékvárral és gluténnal (válaszfelület módszer segítségével). Az eredmények alapján 120 g/L cukortartalomhoz 20, 180 g/L cukortartalomhoz 30 g/L élesztőkivonat adagolása szükséges, és más nitrogénforrással nem sikerült kiváltani ezt a mennyiséget.

### Limitáló tényezők

Mind a mezofil, mind a termotoleráns törzs esetében felleptek olyan limitáló tényezők, amelyek meghatározóak a technológiai tervezés folyamatában. Ezeket a hatásokat foglalja össze az 1. táblázat.

1. Táblázat: A mezofil és termotoleráns törzsre vonatkozó limitáló/inhibeáló tényezők összefoglalása

	Mezofil törzs ( <i>Lactobacillus</i> sp. MKT-878)	Termotoleráns törzs ( <i>Bacillus coagulans</i> DSM2356)
<b>A tápközeg optimalálás előtt limitáló szubsztrátok</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Nitrogénforrás</li> <li>▪ Mikrokomponens-forrás</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Mikrokomponens-forrás</li> <li>▪ Részben nitrogénforrás</li> </ul>
<b>Termék inhibíció</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ &gt;30 g/L tejsav titer: tejsav szabad formában</li> <li>▪ 110-120 g/L tejsav titer: kalcium-laktát, nátrium-laktát</li> <li>▪ &gt;110-130 tejsav titer: ammónium-laktát</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ &gt;20 g/L tejsav titer: tejsav szabad formában, kalcium-laktát (ehhez adaptálódhatnak a sejtek)</li> <li>▪ &gt;80-100 g/L tejsav titer: ammónium-laktát</li> </ul>
<b>Szubsztrát inhibíció</b>	Nincs, de magasabb kezdeti cukorkoncentráció alacsonyabb hozamot eredményez	Nincs, de magasabb kezdeti cukorkoncentráció alacsonyabb hozamot eredményez

A mezofil törzs esetében ezen a tényezők hatását az alkalmasan megválasztott technikával sikerült kiküszöbölni, a termotoleráns törzsnél jelentkező termék-inhibíció elkerüléséhez azonban további vizsgálatok szükségesek (pH-szabályozás módosítása, tejsav folyamatos eltávolítása, fermentlé hígítása, fed-batch vagy folytonos technika alkalmazása).

## 5 TÉZISEK

1. Sikeresen optimaláltam egy búza alapú tápközeget, a cukrosított keményítőt szénforrásként, a búza fehérje tartalmának *egy részét* nitrogénforrásként, és élesztőkivonatot mikrokomponens-forrásként alkalmazva, és megállapítottam, hogy ~120 g/L glükózt tartalmazó keményítőhidrolizátumhoz 16 g/L glutén (kb. 2 g/L összes nitrogéntartalommal) és 8 g/L élesztőkivonat kiegészítés szükséges, ezáltal 3,54 g/L\*h produktivitás és 0,88 g/g tejsav hozam érhető el. A technika reprodukálhatónak és léptéknövelhetőnek bizonyult. (Hetényi et al., 2010d)
2. Összevettem a direkt fermentáció, a szeparált hidrolízis és fermentáció (SHF), valamint a szimultán cukrosítás és fermentáció (SSF) előnyeit és hátrányait, majd kidolgoztam egy kombinált (keményítő)hidrolízises és fermentációs (CHF) technikát, és 14 órában állapítottam meg az inokulálás optimális időpontját. Az így kidolgozott technikával a korábban optimalált búza alapú tápközegen a hidrolízis idejét is figyelembe véve 2,88 g/L\*h produktivitást sikerült elérni. (Hetényi et al., 2010a)
3. Optimaláltam egy cukorciroklé alapú tápközeget, ahol a ciroklé cukortartalma szénforrásként, a hozzáadott glutén nitrogénforrásként, az élesztőkivonat mikrokomponens-forrásként szolgált, és megállapítottam, hogy ~ 120 g/L invertált szacharóz tartalmú cukorcirokléhez 16 g/L glutén (kb. 2 g/L összes nitrogéntartalommal) és 6 g/L élesztőkivonat kiegészítés szükséges, ezáltal 3,04 g/L\*h produktivitás, illetve 0,99 g/g tejsav hozam érhető el. A technika szintén reprodukálhatónak és léptéknövelhetőnek bizonyult. (Hetényi et al., 2010c)
4. A két tápközeg optimalálás eredményei nyomán felmértem az alkalmazott *Lactobacillus* sp. MKT-878 (NCAIM B02375) törzs adott szénforrás mennyiséghez tartozó nitrogén- és mikrokomponens-igényét, és meghatároztam az esszenciális vitaminokat és aminosavakat:
  - szénforrás mennyiségével egyenes arányban nő a törzs nitrogénforrás igénye, míg mikrokomponens-igénye 60 g/L cukorkoncentrációig lineárisan nő, a fölött állandó az értéke. (Hetényi et al., 2010e)
  - a tejsavtermelés szempontjából 6 vitamin esszenciális az alkalmazott törzs számára: a biotin, a nikotinsav, a pantoténsav, a piridoxin, a riboflavin és a tiamin.
  - a tejsavtermelés szempontjából 3 aminosav esszenciális (aszparaginsav, glutaminsav, szerin) az alkalmazott törzs számára, míg további 6 aminosav hiánya esetén lassul a növekedés és a tejsavtermelés (arginin, izo-leucin, leucin, metionin, fenilalanin, prolin, triptofán, tirozin, valin).
  - az esszenciális mikrokomponensek nagy száma miatt megállapítottam, hogy az élesztőkivonat teljes kiváltása ezekkel gazdaságilag nem kifizetődő, azonban az élesztőkivonat mennyisége jelentősen csökkenthető, ha csak a mikrokomponens forrás szerepet tölti be.
5. Megállapítottam, hogy magas szénforrás tartalmú (>120 g/L) tápközegen végzett fermentációk esetében a pH-szabályozás ammónium-hidroxid alkalmazásával az ammónium-laktát okozta termékgátláshoz vezet, míg kalcium-karbonát alkalmazásával a kalcium-laktát kicsapódása és a fermentálé „beállása” révén a fermentáció leállása következik be. A két pH-szabályozási mód kombinálásával (22 g/L kezdeti kalcium-karbonát adagolásával) mindkét probléma kiküszöbölhető. (Hetényi et al., 2010b)
6. Megvizsgáltam a *Lactobacillus* sp. MKT-878 (NCAIM B02375) törzs pH- és hőmérsékleti optimumát, és úgy találtam, hogy az optimális értékek: 35,5 °C és pH 7,0. (Hetényi et al., 2010b)

7. Egy több lépéses screening során kiválasztott *Bacillus coagulans* DSM2356 jelű termotoleráns baktériummal végzett fermentációs kísérletek során megállapítottam, hogy
- a törzs képes szacharóz, glükóz és fruktóz szénforráson is növekedni, akár 180 g/L induló cukorkoncentráció mellett is.
  - szaporodás szempontjából a mikroaerofil környezetet részesíti előnyben.
  - élesztőkivonatot alkalmazva nitrogénforrásként 20 g/L és 30 g/L kiegészítés szükséges 120 g/L, illetve 180 g/L cukorkoncentráció mellett.
  - az élesztőkivonatot más nitrogénforrással kombinálva a másik nitrogénforrás hatása nem szignifikáns a tejsavtermelésre nézve.
  - ammónium-hidroxidos szabályozást alkalmazva 80 g/L tejsav koncentráció már termékgátlást okoz, míg kalcium-karbonátos szabályozás mellett a keletkező kalcium-laktát nem inhibeálja a termelést.

## 6 KÖVETKEZTETÉSEK, ALKALMAZÁSI LEHETŐSÉGEK

A kidolgozott tejsav-fermentációs eljárás(ok) felhasználása két futó projektben is megvalósulhat. „A cukorcirok integrált mezőgazdasági termelési, tárolási, feldolgozási és logisztikai rendszerének kidolgozása” c. projekt keretein belül 2011 végéig egy agrár-ipari modell kialakításában veszünk részt, a konzorciumi partnerek eredményeinek felhasználásával, beleértve a tejsav-fermentációs és az élesztőkivonat-előállító technológia fejlesztéseit is. A Nemzeti Kutatási és Technológiai Hivatal által támogatott munka közvetett célja a termelést és az egyre bővülő felhasználást folyamatosan támogatni képes kutatás-fejlesztési és innovációs háttér megteremtése.

Egy a Nitrokémia Zrt. által Balatonfüzfő Gyártelepre tervezett búzaalapú biofinomító hosszú távú célja olyan jó minőségű és olcsó platformvegyület (tejsav) előállítása, amely megfelelő alapanyag lehet egy biodegradálható műanyag (politejsav – PLA) előállító technológia számára, és lehetővé teszi egy környezetbarát, fehér vegyipari egység létrehozását.

Kutatási munkám keretét ez a két elképzelés adta, és elsősorban a tervezett biofinomító(k) tejsav-fermentációs technológiai szempontú fejlesztésére irányult. A globális cél egy olyan technológiai megoldás kidolgozása volt, amely a rendelkezésre álló kétféle alapanyagra egyaránt alkalmazható, és költséghatékony termelést tesz lehetővé, ezáltal a tejsavra mint fermentációs termékre épülő további termelő egységeket integrálva a létrejövő komplexum akár ún. III. fázisú biofinomítóvá léphet elő.

A fermentációs egység kidolgozásánál tehát mindenképp egy hatékony és olcsó fermentációs eljárás kidolgozása volt a célom, kétféle nyersanyagból kiindulva, és a fermentációs tápközegen kívül megvizsgálva az egyéb technológiai paramétereket is.

## 7 KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

### Írott közlemények

#### *Folyóirat cikkek*

K. Hetényi, Á. Németh, B. Sevela (2010a) Investigation and modeling of lactic acid fermentation on wheat starch via SSF, CHF and SHF technology, *Periodica Polytechnica* (beküldve)

K. Hetényi, Á. Németh, B. Sevela (2010b) Role of pH-regulation in lactic acid fermentation: second steps in a process improvement, *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, IF (2009): 1,742, I: 0 (beküldve)

K. Hetényi, K. Gál, Á. Németh, B. Sevela (2010c) Use of sweet sorghum juice for lactic acid fermentation: preliminary steps in a process optimization, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **85**: 872-877, IF (2009): 2,045, I: 0

K. Hetényi, Á. Németh, B. Sevela (2010d) First steps in the development of a wheat flour based lactic acid fermentation technology. Culture medium optimization, *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* **24**: 195-201, IF (2009): 0,387, I: 0

K. Hetényi, Á. Németh, B. Sevela (2008a) Examination of medium supplementation for lactic acid fermentation, *Hungarian Journal of Industrial Chemistry* **36**: 49-53

Hetényi K., Németh Á., Sevela B. (2008b) Fehér biotechnológiai kutatások, *Magyar Kémiai Folyóirat, Kémiai Közlemények*, **114**: 102-106

### **Szabadalom**

Hetényi K. Zs., Németh Á., Sevela B., Kovács L. P., Bodnár Zs. (2010d) Eljárás haszonnövények fermentációs felhasználására tejsav és származékainak előállítása céljából, P1000061 (bejelentés: 2010. január)

### **Konferencia előadások**

Hetényi K., Németh Á., Sevela B., Tejsavbaktérium tápanyagigényének technológiai szempontú vizsgálata, Műszaki Kémiai Napok '10, Veszprém, 2010. április 27-29.

Hetényi Kata, Biofinomító technológiáinak optimalálása, Szent-Györgyi Albert Szakkollégium, A Biotechnológia a biológia, a kémia és a mérnöki tudományok találkozása c. konferencia, Budapest, 2010. március 20.

Hetényi K., Biofinomító technológiáinak optimalálása, Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar Oláh György Doktori Iskolájának VII. konferenciája, Budapest, 2010. február 4.

Hetényi, K., Németh, Á., Sevela, B., Lactic acid fermentation on wheat flour via SHF and SSF technology, 2nd Central European Forum for Microbiology (CEFARM), Keszthely, 2009. október 7-9 (angol nyelvű), abstract: *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* **56** (2009) 167-168

Hetényi K., Németh Á., Sevela B., Tejsav fermentációs tápközeg vitamin kiegészítése, Magyar Mikrobiológiai Társaság 2008. évi Nagygyűlése, XI. Fermentációs Kollokvium, Keszthely, 2008. október 15-17., abstract: *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* **56** (2009) 36

Hetényi K., Németh Á., Sevela B., Tejsav fermentációs tápközeg kiegészítésének vizsgálata, Műszaki Kémiai Napok '08, Veszprém, 2008. április 22-24.

Hetényi K., Németh Á., Sevela B., Tejsav termelő technológia fejlesztése, Műszaki Kémiai Napok '07, Veszprém, 2007. április 25-27.

**Poszterek**

K. Hetényi, K. Gál, Á. Németh, B. Sevela, Use of sweet sorghum juice for lactic acid production, Műszaki Kémiai Napok '09, Veszprém, 2009. április 21-23; Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar Oláh György Doktori Iskolájának, Budapest, 2009. február 4.

K. Hetényi, B. Sevela, Cost effective lactic acid production on wheat flour, Pannon Mérnöknapok, Veszprém, 2008. február 27-28; Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar Oláh György Doktori Iskolájának V. konferenciája, Budapest, 2008. február 8.

K. Hetényi, Á. Németh, B. Sevela, Researches on Renewable Resources at BUTE ABFS F-labor, 5th Croatian Professional and Scientific Conference on Biotechnology with International Participation, Stubicke Toplice, 2007. május 9-10.

**Diplomamunka**

K. Hetényi (2007) Laboratóriumi léptékű tejsav termelési technológia lépéseinek vizsgálata, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, témavezetők: Sevela Béla, Németh Áron