

SZAKDOLGOZAT

Nagy Boldizsár Péter

2024



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Budai Campus

Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék

Élelmiszertermérnöki alapképzési szak

Alkohol előállítás lehetőségének vizsgálata tejsavóból

Belső konzulens:	Dr. Kun Szilárd Egyetemi docens
Belső konzulens intézete/tanszéke:	Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék
Készítette:	Nagy Boldizsár Péter

2024

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés és célkitűzések	5
2	Irodalmi áttekintés	7
2.1	Sajtgyártás és a tejsavó kapcsolata	7
2.2	Tejsavó.....	7
2.2.1	Másodlagos savó termékek	9
2.3	Környezeti hatás	10
2.3.1	Bioüzemanyagok.....	11
2.3.2	Tejsavóból etanol	12
2.4	Az alkoholos erjesztés változói	12
2.4.1	Élesztő	13
2.4.2	pH.....	15
2.4.3	Ásványi anyagok – Cink szerepe	15
2.4.4	Szénhidrát profil.....	16
2.5	A nitrogén szerepe	17
2.5.1	Nitrogén a savóban.....	18
2.6	Koncentrált savó fermentációja	18
3	Anyagok és Módszerek.....	20
3.1	Felhasznált anyagok:	20
3.1.1	Tejsavó:	20
3.1.2	Enzimek:.....	20
3.1.3	Élesztők:	20
3.1.4	Tápsó:	21
3.1.5	YEPD tápleves vagy tápagar:.....	21
3.2	Módszerek	21
3.2.1	Szénhidrát teszt	21
3.2.2	Inokulum tápoldat készítés.....	22
3.2.3	Refrakció	22
3.2.4	pH mérés	22
3.2.5	Redukáló cukor tartalom mérése Schrool-Regenbogen módszerrel	22
3.2.6	HPLC mérés	23
3.2.7	Alkohol tartalom meghatározás.....	24

3.2.8	Sejtszámlálás Bürker kamra segítségével.....	24
3.3	Kísérleti körülmények.	24
3.3.1	Enzimes kísérletek.....	25
3.3.2	Erjesztési kísérletek.....	25
3.3.3	Léptéknövelés 2 literes fermentorban	25
4	Eredmények kiértékelése	27
4.1	Közvetlen és közvetett fermentáció megvalósítása	27
4.2	Enzimkészítmények.....	28
4.3	Optimális enzim adagolási mennyiség meghatározása	29
4.4	Ideális laktóz koncentráció kiválasztása.....	30
4.5	Ideális fajélesztő kiválasztása.....	31
4.6	A kiválasztott fajélesztők további vizsgálata.....	32
4.7	Különböző laktóz tartalmú savók erjesztése	33
4.8	Optimális tápanyag kiegészítés	34
4.9	Erjesztés optimalása fermentor rendszerhez.....	35
5	Következtetések és javaslatok.....	38
6	Összefoglalás	39
7	Irodalomjegyzék	41
8	Ábrák és táblázatok jegyzéke.....	45
8.1	Táblázatok jegyzéke	45
8.2	Ábrák jegyzéke	45

1 Bevezetés és célkitűzések

A sajtgyártás egyik nagy problémája, hogy rengeteg melléktermék keletkezik a folyamat során, több tejsavó jön létre, mint sajt. Régóta kérdés az, hogy mit lehetne kezdeni létrejövő nagy mennyiségű tejsavóval, ugyanis hulladékként terheli a környezetet és gazdasági szempontból is előnyös lenne felhasználni, hogy értékesíthető legyen. Ezért sok kutatás foglalkozik vele, milyen módszerekkel lehet kinyerni vagy átalakítani a tejsavó hasznosítható részeit. A savót már az ókorban is felhasználták például kenyérfőzés során, viszont az azóta elért technológiai fejlődés lehetővé teszi, hogy szélesebb skálán tudjuk hasznosítani. A szagdolgozatomban azt a témát fogom körüljárni és megvizsgálni, hogy a tejsavóban lévő laktózból, milyen fermentációs módszerrel lehet a leghatékonyabban alkoholt előállítani.

A kutatásom céljával azt tűztem ki, hogy optimálom a tejsavóból való etanol előállítás technológiai lépéseit laboratóriumi körülmények között. A tejsavóban az egyetlen szénforrás a laktóz. A laktóz feldolgozásának több módja is lehetséges. Én a biológiai úton való feldolgozás kivitelezését választottam. Ez közvetett vagy közvetlen fermentációt jelent ebben az esetben. Közvetlen fermentációnál olyan élesztő törzset kell alkalmazni, amely rendelkezik β -galaktozidáz hidroláz enzimmel és laktóz permeáz membrán transzport rendszerrel, mert ezek az élesztők képesek felhasználni a laktózt előkezelés – monomerjeire történő bontás – nélkül is. Ilyen élesztő törzs például a *Kluyveromyces marxianus*. A közvetett fermentáció során a laktózt hidrolizálni kell monomerjeire tehát glükózra és galaktózra, ezt enzimes vagy savas eljárással lehet megtenni. Az eljárás után keletkező egyszerű cukrokat jellemzően *Saccharomyces cerevisiae* élesztővel erjesztik alkohollá.

- A kutatás céljának elérése érdekében kétféle útvonalat vizsgáltam meg.
 - Az egyik a *Kluyveromyces marxianus* élesztő alkalmazásával történő fermentáció.
 - A másik pedig a laktóz enzimes hidrolízise és egy *Saccharomyces cerevisiae* törzs alkalmazásával történő fermentáció.
 - E vizsgálatok eredményeinek függvényében döntöttem el melyik úton haladok tovább a kutatás további vizsgálatai során.
- A további kísérletekhez is számos tényezőt számításba kell venni és meg kell vizsgálni mik a legjobb megoldások ahhoz, hogy elérjük az alapvető célkitűzést, vagyis az optimális tejsavó fermentálást. Ennek érdekében a következő feladatokat kívántam megvalósítani:

- Megfelelő enzinkészítmény kiválasztása az előkezeléshez. Egy olyan enzinkészítményre van szükségünk, amellyel a hidrolízis gyorsan és minél hatékonyabban végrehajtható.
- Olyan anyagcsere-tevékenységgel rendelkező élesztő törzs kiválasztása, amely képes a laktóz monomerjeinek optimális erjesztésére.
- Erjesztés körülményeinek optimalálása a kiválasztott élesztővel.
 - Hőmérséklet,
 - Tápanyag kiegészítés gyakoriságának,
 - Időtartalom szempontjából.,
- Léptéknövelés megvalósítása – 2 literes fermentorban.

2 Irodalmi áttekintés

2.1 Sajtgyártás és a tejsavó kapcsolata

A sajtkészítés olyan folyamat, amely során a tej összetevőit, különösen a zsír és fehérjetartalmát besűrítik. Ez egy lineáris folyamat, amely számos technológiai lépést foglal magában. Napjainkban a sajtkészítéshez sokféle különböző feldolgozási módszert alkalmaznak (SPĂLĂȚELU, 2012).

A sajtot a folyékony tejben megalvadtt fehérjékből készítik. Az alvadtt tej alvadékkot képez, amely a szilárd tejfehérjékből (főként kazeinből) áll. Az alvadás számos eljárással, többek között a tej felmelegítésével érhető el, sav hozzáadása, enzimek felhasználása, bakteriális beoltás és ezeknek a módszereknek bármilyen kombinációjával. Az előállított sajt típusát vagy stílusát nagymértékben meghatározza az a módszer, amellyel a sajtot elkészítik. Az alkalmazott alvadásmód és egyéb tényezők, mint például a tej forrása, az érlelés, a főzési lépések, az évszak, valamint az alvadék feldolgozásának módja.

2020-ban az amerikai sajtipar mintegy hatmillió tonna sajtot állított elő. Világszerte évente több mint huszonegy millió tonnát állítanak elő, ennek mintegy felét az Európai Unió országainak sajtgyártása teszi ki.

Az ipari létesítmények automatizáltak és egész évben egységes termékeket állítanak elő. A kézműves tejüzemek kézi folyamatokat alkalmaznak, és ez a termékek változását eredményezheti az év során. A sajtkészítési módszerek és méretek széles skálája ellenére a rendelkezésre álló sajtkészítési módok és fajták sokféleségében, van egy fontos közös vonásuk: mindannyian savót állítanak elő (Schaan, 2022).

2.2 Tejsavó

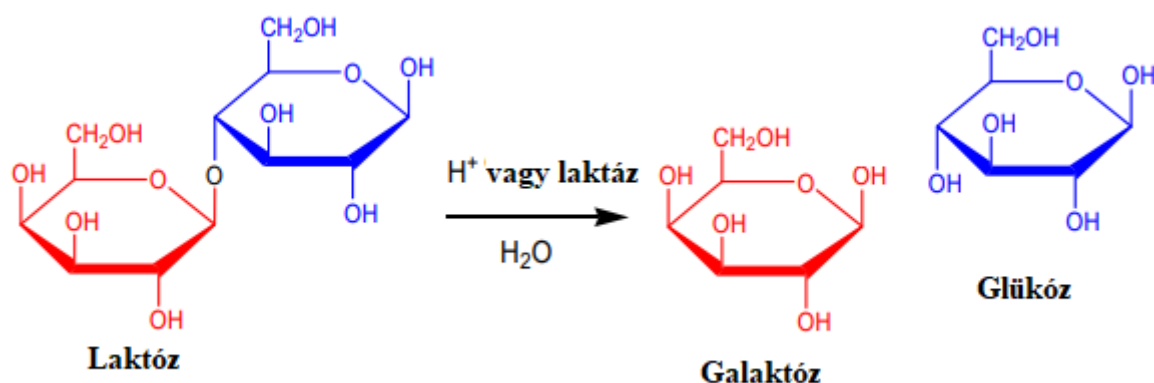
A tejsavó a sajtgyártás mellékterméke, és összetétele az előállított sajtok stílusától függően változhat. Minden kilogramm sajt előállítása közben körülbelül kilenc kilogramm savó keletkezik. A savó körülbelül 93-94% vízből, 4,5% laktózból, 0,6% fehérjéből, 0,5% ásványi anyagból és 0,05% zsírból áll. (Risner, 2018). A savó legfontosabb összetevői közé tartozik, a laktóz és az oldható fehérjék (Rosane Rosa de Souza *et al.*, 2010).

A savónak két fő kategóriája létezik, és ezek különböző sajtészítési eljárásokból származnak. A savanyú savó olyan sajtól származik, amelyhez a tej pH-értékét a kazeinek izoelektromos pontja alá csökkentik, ami a kazeinek megalvadását okozza. A savas sajtok közé tartozik például a paneer, a queso fresco és a túró. A savó másik kategóriája az édes savó. Az édes savó olyan sajtfeldolgozási eljárásból származik, amelynél enzimek csoportját, az oltót használják, amittől a kazein gellé alvad.

Az oltóanyaggal készült sajtok közé tartozik például a cheddar, a svájci és a provolone. (Schaan, 2022).

A másodlagos feldolgozás szempontjából a tejsavó legfontosabb összetevői a fehérje és a cukor. A tejsavófehérjék a következők: β -laktoglobulin, α -laktalbumin, immunglobulinok, szarvasmarha szérumalbumin, laktoferrin és laktoperoxidáz (Madureira *et al.*, 2007).

A legtöbb tejsavófehérje kb. 90 °C-ig oldódik, ahol érzékenyvé válnak a hődenaturációra (Schaan, 2022). A tejsavó fehérjetartalma a tej teljes fehérjetartalmának nagyjából 20 tömegszázalékát teszi ki (Madureira *et al.*, 2007). A laktóz mind a savanyú, mind az édes savó elsődleges cukorfajtája, és a savó összes szénhidrátjának körülbelül 95%-át teszi ki. A fennmaradó cukrokat glükóz, galaktóz és nyomokban különböző oligoszacharidok alkotják (Tsermoula *et al.*, 2021). A laktóz egy diszacharid, amely egy β -1,4-kötéssel köt össze egy glükóz- és galaktóz-monomert (1. ábra).



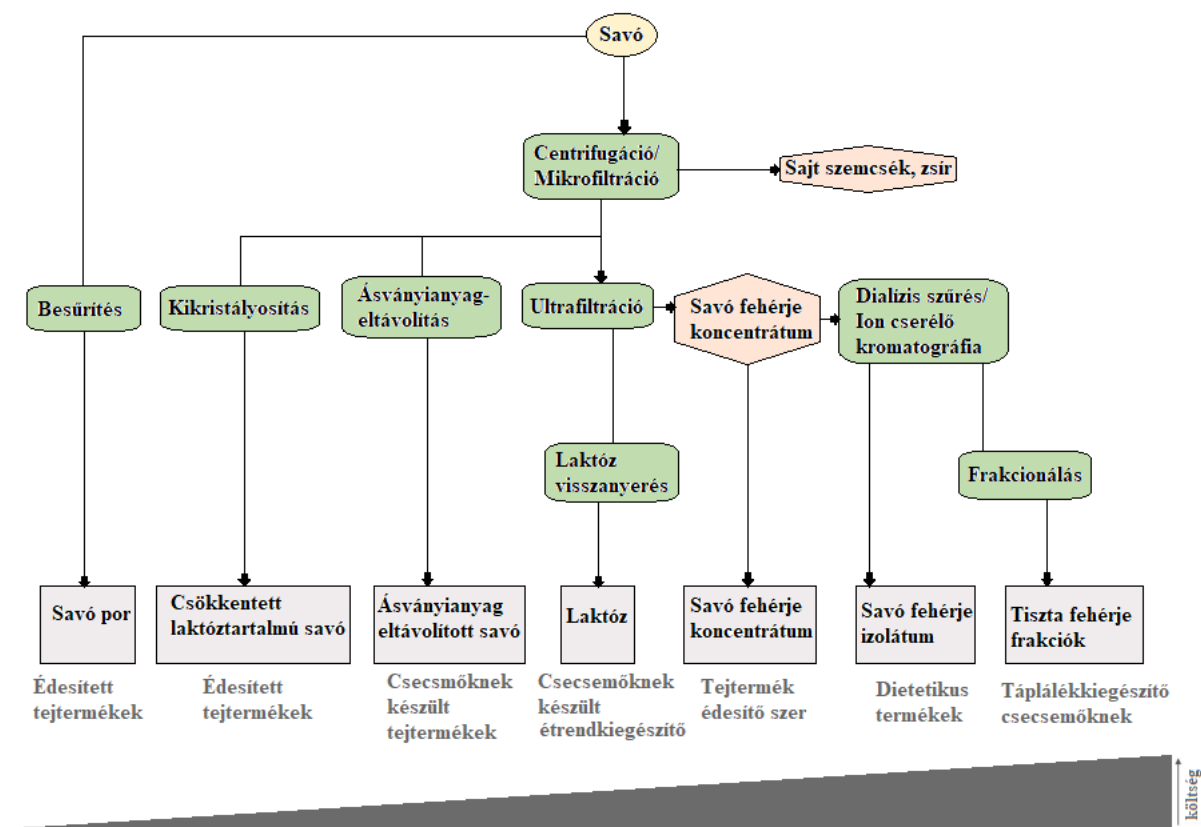
1. ábra: A laktóz hidrolízise glükózzá és galaktózzá (Prazares *et al.*, 2012)

A tejsavó felhasználható másodlagos termékek előállítására, de az indulási költségek és a legtöbb másodlagos feldolgozáshoz szükséges infrastruktúra jellemzően magas tőkebefektetést igényel. Emiatt sok tejfeldolgozó, különösen a kisebb volumenű termelők kénytelenek a savó ártalmatlanításának más, másodlagos feldolgozást nem igénylő módját megkeresni. Néhány tejüzem sikeresen értékesítette a savót állati takarmányozásra, de a savó jelentős része végül a kommunális vagy magán szennyvízbe kerül. A szerves hulladékkal szemben támasztott jelentős kezelési követelmények miatt azok a tejüzemek, amelyek a savójukat a szennyvízbe eresztik gyakran kötelesek díjat fizetni a helyi közműszolgáltatóknak az ártalmatlanításért. Ez a fajta ártalmatlanítás szintén környezeti hatással jár. Az akár 8-10%-os (w/v) szerves anyag tartalmú savónak nagyobb a negatív környezeti hatása, mint más szerves hulladékoknak, mint például az emberi szennyvíznek (Schaan, 2022). Lépéseket kell tenni a szennyvízrendszereken

keresztül ártalmatlanított savó környezetre gyakorolt káros hatásának csökkentésére (Prazeres *et al.*, 2012).

2.2.1 Másodlagos savó termékek

Másodlagos savótermékeket már azóta gyártanak, amióta sajtot is. Ami egyes történészek szerint a juhok házasításával kezdődött, 8000-10 000 évvel ezelőtt (Schaan, 2022). A korai sajtkészítők a savót a kenyérfőzéshez vagy tápanyagokban gazdag vízforrásként használhatták fel. Valójában a savót még ma is használják kenyérfőzéshez. Emellett kefir készítésére is (Pescuma *et al.*, 2015). A leggyakoribb másodlagos savótermékek a laktóz, elválasztásával vagy a fehérje folyékony savóból történő kivonásával készülnek. Ez a savó szárításával vagy különböző szűrési és centrifugálási lépések alkalmazásával érhető el. A tejsavófehérje a legnagyobb térfogatú másodlagos savófehérje-termék; 2020-ban az USA-ban a száraz savófehérje termelése meghaladta a 700 000 metrikus tonnát. A laktóz termelés valamivel több, mint 500 000 metrikus tonna volt. A tejsavóból származó laktóz és fehérjeporokat különböző tisztasági szintekre lehet frakcionálni a feldolgozáshoz használt technológia alapján (2. ábra). Általában minél speciálisabb technológiára van szükség, annál magasabb a költséggel jár a termék adott minőségének előállítása (Schaan, 2022).



2. ábra: Szárított tejsavó termékek előállítási ár szerint (Schaan, 2022)

A tejsavó fehérjepor és a laktóz előállítása jó gazdasági alternatívája a dömpingnek az ipari sajtgyártók számára. Ez szennyvízdíjak csökkenésének köszönhető, valamint a piacképes másodlagos termékek előállításának. Sajnos az infrastrukturális és technológiai költségek miatt a kézműves sajtgyártásban nem kivitelezhető, hogy kihasználják ezeket az előnyöket. Emiatt a fehérje és laktóz frakcionálás szinte kizárólag csak a nagyüzemi sajtgyártók számára elérhető. A 21. század fordulója óta a savó fermentálásának megvalósíthatósága a sajt és az alkoholipar találkozási pontja. A savó erjesztése és lepárlása viszonylag olcsón megvalósítható, összehasonlítva a fehérje és laktóz kivonáshoz képest, ami azt jelenti, hogy a kézműves tejüzemek kihasználhatják az előnyöket. Számos kereskedelmi célú alkoholos termék készül savóból és a jövőben várhatóan még több lesz. A savó felhasználásával előállított legelterjedtebb alkoholos termék a vodka, bár néhány gint is gyártanak savóból származó alkoholból. Példák a kereskedelmi forgalomban kapható savóalapú alkoholos italokra a Black Cow Vodka, a Bertha's Revenge, a Sheep Whey Vodka és a Norwhey Nordic Seltzer (Schaan, 2022).

2.3 Környezeti hatás

A fenntarthatóság lett az egyik legfontosabb szempont, amely alapján a vállalkozások, különösen a termelés alapú vállalkozások megítélésre kerülnek. Ez gyakran a vállalati társadalmi felelősségvállalásról szóló jelentés formájában jelenik meg (CSR). A CSR egy olyan dokumentum, amelyet a szervezetek kiadnak, hogy felvázolják a környezeti, gazdasági és etikai felelősségvállaláshoz való hozzájárulásukat. A sajtgyártó vállalatok sem képeznek kivételt. Például Tillamook 2022-es felelősség jelentése felvázolja a teheneik egészségének megőrzése érdekében tett intézkedéseiket, az alkalmazottak teljesítőképességét, valamint az ökológiai szempontokat.

A savó ártalmatlanításának megoldása továbbra is egy folyamatosan fennálló környezetvédelmi probléma. Mivel a savó újrafeldolgozásának fő módszerei a kisebb termelők számára nem gazdaságosak, ezért meg kell vizsgálni az alternatívákat. Néhányan támogatják a savó állati takarmányként való hasznosítását, vagy a talajban való elhelyezését. Mások a kommunális vagy magán víztisztítóba juttatják hulladékként. Sajnos ezek az ártalmatlanítási módszerek költségekkel járnak, mint például a szállítás, a tárolás és a szennyvízdíjak. Egyes esetekben a helyi önkormányzatok korlátozzák a kézműves tejüzemek termelését, vagy díjakat számítanak fel a környezetvédelmi szempontok érvényesülése érdekében. Emiatt a savó alacsony költségű és környezetkímélő hasznosításának alternatívái nagyon keresettek.

A tejsavó laktóz tartalma 4-5% (w/v), ennek megfelelően a biokémiai oxigéntartalom igény (BOD) 30-50 g/l körül van. A BOD az aerob mikroorganizmusok által igényelt oxigén mennyiségének mérőszáma a vízben lévő szerves anyagok lebontásához. A savónak a vízkezelésre gyakorolt relatív hatását szemléltetendő, a nyers szennyvíz jellemzően 0,150 - 0,600 g/l BOD-értékkel rendelkezik (Schaan, 2022). Ez azt jelenti, hogy a mikroorganizmusoknak körülbelül százszor több oldott oxigénre van szükségük a savó lebontásához, mint az emberi hulladék lebontásához. A savó teljes BOD-értékéhez hozzájáruló szerves vegyi anyagok többségének eltávolítása az ártalmatlanítás előtt jelentősen csökkenthetné a hulladékból származó károsanyag-kibocsátást (Risner *et al.*, 2018). Becslések szerint a savóban lévő cukornak az ártalmatlanítás előtti erjesztésével a tejüzemek akár 75%-kal is csökkenthetik a hulladékok BOD-értékét. A savó fermentálása jó lehetőségnek tűnik a kis tejüzemek számára. Mivel az erjesztés után a savóból az erjeszthető szénhidrátok akár 75%-a is eltávolítható, a savót csökkentett szennyvízdíjak és környezeti hatások mellett lehetne elhelyezni (Schaan, 2022).

2.3.1 Bioüzemanyagok

A fosszilis tüzelőanyagforrások elkerülhetetlen kimerülése, a világszerte rohamosan növekvő energiafogyasztás, a környezetszennyezés és a globális felmelegedés mind-mind az alternatív energiaforrások keresésének mozgatórugói. Az elmúlt évtizedben számos kutatás és fejlesztés irányult a biomassza alapú energiatermelésre, mint potenciális megújuló és környezeti szempontból fenntartható energiaforrásra. Az egyik legígéretesebb alternatív bioüzemanyag a bioetanol, amelyet a legtisztább folyékony üzemanyagként tartanak számon, és amelyet leginkább a közlekedési ágazatban használnak (Hirsch *et al.*, 2019).

A laktóz tartalma, elérhetősége és alacsony ára a tejsavót potenciális jelöltjévé teszi a bioüzemanyag előállításnak (Schaan, 2022). A tejsavót az 1980-as évek óta használják bioüzemanyag előállításra Új-Zélandon, és számos különböző üzemanyag terméket, köztük etanolt, butanolt, hidrogéngázt és lipidalapú üzemanyagokat is sikerrel használnak. Az erjesztéssel történő butanol gyártás *Clostridium* törzseket használ, hogy létrejöjjön az úgynevezett aceton-butanol-etanol (ABE) erjesztés. Ez a fermentációs típus egyszerre termel acetont, butanolt és etanolt, az arányok a kiindulási anyagtól függően változnak. Az ABE fermentáció szokásos módszere a lignocellulóz tartalmú alapanyagokra támaszkodik, de a kutatások szerint a savó előnyben részesítheti a butanol termelést az aceton és az etanol helyett (Raganati *et al.*, 2012).

A hidrogén üzemanyag előállítása bármilyen szénhidrátforrásból megvalósítható, és ez alól a laktóz, sem képez kivételt. A kutatók a *Rahnella aquatilis* pszichrofil baktériummal több, mint

3000 ml/g biomassa felhasználásával hidrogén gázt állítottak elő. Kimutatták, hogy a tejsavó permeátuma képes a bioüzemanyag termelésben ismert mikroalga faj, az *Auxenochlorella protothecoides* (korábban *Chlorella protothecoides*) szaporodásának elősegítésére. Az *A. protothecoides* növekedése akkor a leghatékonyabb a savóban, ha egyidejűleg történik az elcukrosítás és a fermentáció hidrolizáló enzimek alkalmazásával (Schaan, 2022).

2.3.2 Tejsavóból etanol

A bioetanol fermentáció a világ etanol termelésének több mint 80%-át teszi ki, és az Egyesült Államokban és Új-Zélandon már léteznek alkalmazott technológiák, amelyek évente több mint harmincmillió liter etanolt állítanak elő savóból és savó permeátum porból (Pescuma *et al.*, 2015). A tejsavóban lévő laktóz koncentrációja elegendő ahhoz, hogy körülbelül 1,5-3,5% (v/v) etanolt állítsanak elő. A laktózt nem lehet az alkoholgyártásban használt hagyományos élesztő törzsekkel erjeszteni (Schaan, 2022).

A *Kluyveromyces* élesztőtörzsek számos fajtája képes a β -1,4-láncot megbontani és a laktózt monomerekre hidrolizálni sajátos enzimkészletének köszönhetően, majd a glükózból és a galaktózból etanolt elő-állítani (1. ábra; Prazeres *et al.*, 2012). Emiatt a *Kluyveromyces marxianus*-fajt széles körben tanulmányozták az optimális savó fermentáció tekintetében. Számos módszert vizsgáltak a savóból történő etanol előállítására, beleértve a porított izolátumok használatát, a folyamatos erjesztést, a szakaszos erjesztést és a sejtek immobilizálását (Prazeres *et al.*, 2012). A *Kluyveromyces marxianus* cukor hasznosítási hatékonysága akár 95%-os, az alkoholtermelés hatékonysága pedig 91%-os is lehet (Koushki *et al.*, 2012). Ez azt jelenti, hogy a *Kluyveromyces marxianus* képes a savóban lévő laktóz szinte teljes mennyiségét felhasználni az etanol és a CO₂ előállítására. A *Kluyveromyces marxianus* kultúrával erjesztett savóból nyert etanol nagy részét bioüzemanyagként használják fel, de megállapították, hogy a *Kluyveromyces marxianus* segítségével emberi fogyasztásra szánt szeszes italt is elő lehet állítani, amelynek hasonló az illékony vegyület profilja, mint más, *Saccharomyces spp.* segítségével előállított alkoholos italoknak. Mivel a savó nem tartalmaz pektint vagy pektinszármazékokat, a folyamat során a metanol szennyezés kockázata elhanyagolható (Ohimain, 2016). Emiatt a *Kluyveromyces marxianus* kultúrával erjesztett savó etanol egyre nagyobb figyelmet kap a szeszesital-gyártók és a tejüzemek körében, mint egy alacsony költségű és fenntartható ital előállításának módszere (Schaan, 2022).

2.4 Az alkoholos erjesztés változói

A tejsavó erjesztésénél is vannak olyan fontos változók, mint minden más alkoholos erjesztés esetében. A változók közé tartozik az élesztőtörzs és annak bekeverési aránya, az erjesztési idő

és a hőmérséklet, kezdeti cukortartalom, asszimilálható nitrogén, ozmotikus stressz és még sok más (Mohd Azhar *et al.*, 2017). Minden egyes változót figyelembe kell venni, amikor egy gyártó alkoholos italokat készít. Mivel a sör előállításának folyamata eltér a borétól, az almaborétól vagy a szeszes italokétól, az erjesztési paramétereket minden italtípus esetében másképp kell figyelembe venni. A tejsavó erjesztése ebben a tekintetben nem különbözik, sőt, ezek a változók külön figyelmet igényelnek, mivel az erjesztett tejsavó minősége nem állandó. A kevésbé ismert kultúrák és új fermentálható extraktumok használatakor a táptalaj összetételét megváltoztató változók ellenőrzése alapvető fontosságú. A savó fermentálása esetében a legfontosabbnak ítélt változók a következők: az élesztőfaj, a savó pH-ja, a cink-tartalom, az oldható cukrok koncentrációja és a rendelkezésre álló nitrogén mennyisége. A savó erjesztéséhez választott élesztőtörzs alapvetően meghatározza az erjesztési stratégiát, mert kevés élesztőfaj képes a laktózt alkotó monomerjeire hidrolizálni, és a kapott cukrokat hatékonyan hasznosítani (1. ábra). A pH fontos, mert ha a savó túl savas vagy bázikus az adott élesztőkultúra számára, akkor az élesztőre gátló hatást fejthet ki, és a fermentáció lassú lesz vagy leáll (Diniz *et al.*, 2014).

A cinktartalom gyakran döntő tényező az erjedésben. A cinkionok ugyanis a legtöbb eukarióta sejt számára szükségesek a túléléshez esszenciális fehérjék, például a DNS és RNS felépítését segítő cink-ujjfehérjék szintéziséhez (Laity *et al.*, 2001). A túl kevés cink rossz erjesztési teljesítményt okoz, a túl sok pedig növelheti az egyesek által nemkívánatosnak tartott aromaanyagok, például a diacetil vagy az izoamil-acetát termelődését. A túl magas cukorkoncentráció az élesztősejtek ozmotikus stresszét okozhatja. Ha az erjeszthető cukorforrások korlátozottak, előfordulhat, hogy a szubsztrát nem elegendő a hatékony sejtnövekedés fenntartásához, és ez gyenge erjedési sebességet és befejezetlen erjedést eredményezhet.

A nitrogén rendelkezésre állását egyesek minden erjesztési rendszer kulcsfontosságú elemének tekintik. Elegendő nitrogén nélkül a fermentatív sejtek nem képesek növekedni, szaporodni vagy regenerálódni (Hill & Stewart, 2019). Azonban még a fermentálható közeg nagy nitrogéntartalma sem mindig hozzáférhető a mikroorganizmusok számára, ha az fehérje vagy polipeptid struktúrákban van megkötve (Schaan, 2022).

2.4.1 Élesztő

A *Kluyveromyces marxianus* az az élesztőfaj, amely egyedülállóan alkalmasnak tűnik arra, hogy savóból etanolt állítson elő. A *Kluyveromyces marxianus* az utóbbi években az egyik legismertebb nem- *Saccharomyces* élesztőfajjává vált (Lane & Morrissey, 2010). A *Kluyveromyces marxianus*, az ismert leggyorsabban növekvő eukarióta a Földön, figyelemre

méltó termotoleranciával rendelkezik (Mo *et al.*, 2019). És cukrok nagyon széles skáláját képes bontani, valamint az egyébként hozzáférhetetlen cukrok enzimatis hidrolízise útján történő etanolos erjesztésre is képes (Lane & Morrissey, 2010). A *Saccharomyces cerevisiae*-vel ellentétben a *Kluyveromyces marxianus* törzsek többsége nyilvánvalóan Crabtree-negatív (Bilal, 2022). Ami azt jelenti, hogy aerob körülmények között nem termel etanolt, még magas cukortartalmú környezetben sem, de anaerob környezetben alkoholt termel. Rendelkezik olyan génekkel, amelyek a Crabtree-pozitív élesztőfajokhoz kötődnek, de bebizonyosodott, hogy a *Kluyveromyces marxianus* inkább oxigéndús környezetben lélegzik és építi fel a sejtsűrűséget. Úgy tűnik, hogy ez törzsfüggő, mivel egyes *Kluyveromyces marxianus* törzsek aerob alkoholos erjedésre utaló jeleket mutattak. A *Kluyveromyces marxianus* azon kevés élesztőfajok egyike, amelyek képesek β galaktozidázt termelni és cukrokat etanollá fermentálni. A *Kluyveromyces marxianus* nem olyan etanol-toleráns, mint a *Saccharomyces spp.* így a fermentációs potenciál korlátozott, ha magasabb etanolkoncentráció elérésére törekszünk. Kimutatták, hogy a *Kluyveromyces marxianus* már 5-6%-os (v/v) etanol koncentráció esetén is csökkent fermentációs aktivitást mutat. Úgy tűnik, hogy a *Kluyveromyces marxianus* erjesztési teljesítménye 100 g/l és annál nagyobb cukorkoncentrációtól kezdődően csökken. Úgy tűnik azonban, hogy ez a tulajdonság szintén törzsfüggő (Schaan, 2022). Ugyanis ismert tény, hogy a *Kluyveromyces marxianus* fajnál nagyfokú az intraspecifikus variáció, nem csak a genetikai, hanem a fiziológiás tulajdonságaiban is (Leticia *et al.*, 2004). Limtong és társai által 2007-ben végzett kísérlet alapján a *Kluyveromyces marxianus* képes volt 6,78% etanol előállítására 40 Celsius fokos erjedési hőmérsékleten. A többszörösen telítetlen zsírsavakkal dúsított sejtek nagyobb toleranciát mutattak az etanollal szemben, mint az egyszeresen telítetlen zsírsavakkal dúsítottak, ami arra utal, hogy a membrán fluiditása fontos meghatározója lehet az élesztő etanol toleranciájának (Rosa & Sá-Correia, 1992).

A *Kluyveromyces marxianus* által végzett savó fermentáció optimális hőmérsékleti tartománya 30 és 40 °C között van (Lane & Morrissey, 2010). A magas hőmérsékleten történő etanol gyártás nagy figyelmet kapott, mivel a magas hőmérsékleten végzett fermentációs folyamatok jelentősen csökkentik a hűtési költségeket. A magas hőmérséklet további előnyei közé tartozik a hatékonyabb egyidejű elcukrosítás és fermentáció, az erjesztésről a desztillációra való folyamatos áttérés, a befertőződés kockázatának csökkenése, valamint a trópusi országokban való alkalmazhatóság. A *Saccharomyces cerevisiae* hagyományos törzsei számára megfelelő hőmérséklet azonban viszonylag alacsony (25-30 °C). Bár végeztek kutatásokat olyan *Saccharomyces cerevisiae* mutánsok után, amelyek magas hőmérsékleten is képesek hatékonyan etanolt termelni, csak szerény hőmérséklet-emelkedést, legfeljebb 40°C-ot sikerült

elérni. Alternatívaként a figyelem a termotoleráns élesztőfajokra irányult, amelyek képesek etanolt termelni magas hőmérsékleten. A *Kluyveromyces marxianus* törzsek különösen ígéretesnek tűnnek. Ezen a faj egyes tagjai 47°C-on, 49°C-on, sőt 52°C-on is képes növekedni, és 40°C feletti hőmérsékleten is etanolt termelni. A *Kluyveromyces marxianus* további előnyöket kínál, többek között magas növekedési sebességet, valamint azt a képességet, hogy sokféle, iparilag releváns szubsztrátot, például cukornádat, kukoricaszilázslevet, melaszt és tejsavóport is tudhasznosítani. Ezen előnyök miatt a *Kluyveromyces marxianus* jelenleg a *Saccharomyces cerevisiae* alternatívájaként népszerűsítik (Nonklang *et al.*, 2008).

2.4.2 pH

A savó pH-értéke a feldolgozás után általában 4,3 és 6,6 között van, az elkészített sajttípustól függően. A savanyú savó pH-ja általában alacsonyabb ebben a tartományban, az édes savóé pedig kevésbé savas, de a mikrobiális savasodás miatt szintén alacsony lehet. A kazein izoelektromos pontja és pKa értéke 4,6 pH körül van, és itt oldódik a legkevésbé. Így amikor a savó pH-ja 4,6 körül van, feltételezhető, hogy a körülmények a nem savófehérje maximális eltávolítását eredményezik kicsapással. A legtöbb élesztővel végzett erjesztés pH-ja a szőlőmust esetében akár 3,3, a sörlé esetében pedig 5,5 is lehet, míg egyes élesztők 2,0 pH értéket is tolerálják. (Schaan, 2022). Ezért még a pH-tartomány alsó határán lévő savas savó sem jelenthet akadályt a *Kluyveromyces marxianus* által történő erjesztés esetén. Az egyik *Kluyveromyces marxianus* törzsnél a pH 4,5 és 6,5 közötti eltérést vizsgálva optimális etanoltermelődést találtak (Diniz *et al.*, 2014).

2.4.3 Ásványi anyagok – Cink szerepe

Az erjeszthető szubsztrátok ásványi anyag tartalmát gyakran figyelmen kívül hagyják, annak ellenére, hogy az élesztő egészségének és az egyenletes, kiváló minőségű termék előállításának döntő tényezője. A fémionok és nyomelemek kofaktorként működhetnek az enzimek aktiválásában, befolyásolhatják a sejtmembrán stabilitását és áteresztőképességét, és módosíthatják az élesztő stresszreakcióit (Schaan, 2022). Emellett az ásványi kationokat összefüggésbe hozták az élesztő jobb életképességével, a megnövekedett etanoltermeléssel és a jobb flokkulációval. A cink, a kalcium és a magnézium azok az ionok, amelyekről megállapították, hogy a legnagyobb hatást gyakorolják a fermentatív egészségre, mind pozitív, mind negatív értelemben (Udeh *et al.*, 2014). Mindegyiknek pozitív hatása lehet, ha megfelelő a dózis, de magas koncentrációban komplikációkat okozhatnak. Például a 10 mg/l feletti cinkpótlási szinteknél kimutatták a magasabb rendű alkoholok, például az izoamil-acetát,

valamint a diacetil termelésének növekedését, mindkettő az erjesztett italok mellékizével hozható összefüggésbe (Schaan, 2022).

A cink az egyik legfontosabb esszenciális nyomelem minden állat számára, és a legtöbb mikroorganizmus számára, beleértve az élesztőt is. A *Saccharomyces cerevisiae* nevű élesztőfaj rendelkezik az egyik legjobban tanulmányozott plazma membránnal, a cink útjaival kapcsolatban (Williams, 2012). Az élesztősejtekről megállapították, hogy nagyon gyorsan és hatékonyan képesek felhalmozni az esszenciális ásványi ionokat. Például az élesztőnek sejtenként körülbelül 107 cink(II)-kationra van szüksége. Ez az intracelluláris koncentráció akár 0,3 mM is lehet, és kétezerszer nagyobb lehet, mint az extracelluláris környezet koncentrációja (Schaan, 2022). A cink(II) a *Saccharomyces cerevisiae*-ben a sejtek, szabályozó fehérjék, szerkezeti fehérjék és metalloproteinek metabolikus funkcióinak javításához szükséges ionként van jelen. Ezzel szemben a borban, sörben és desztillált szeszben lévő cink pótlása erjesztések során számos előnyös hatást mutatott az etanoltermelő szervezetek egészsége számára (Udeh *et al.*, 2014). Ezen előnyök közé tartozik a fokozott stresszválasz, az aromaaktív anyagok nagyobb koncentrációja és a gyorsabb fermentáció (Zhao & Bai, 2012). A cinkpótlás egyik legnagyobb előnye, a lepárlás szempontjából a megnövekedett etanoltolerancia és az azt követő etanoltermelés. Vizsgálatok kimutatták, hogy a cinkkel kiegészített fermentációkban az élesztősejtekben megnőtt a trehalóz és az ergoszterin koncentrációja (Zhao *et al.*, 2009). Mindkettőről tudható, hogy részt vesz az ozmotikus és etanol stresszel szembeni ellenállásban (Schaan, 2022). Ugyanebben a vizsgálatban a cinkkel kiegészített erjesztésekben az alkoholkoncentráció is nagyobb volt, mint a kontrolloknál, ami jól szemlélteti a cink alkoholtermelésre gyakorolt hatását. Azt is megállapították, hogy a glicerint, az alkohol bioszintézisének melléktermékének a termelése 58%-kal csökkent a kontrollhoz képest, ami arra utal, hogy a cink javítja az etanol termelési útvonalak szelekcióját az erjedés során (Zhao *et al.*, 2009).

2.4.4 Szénhidrát profil

A *Saccharomyces* fajok a cukrok széles skáláját képesek bontani, és nagy mennyiségű etanolt képesek előállítani, mivel nagy a cukor koncentráció és alkoholtűrő képességük. Az erjeszthető szénhidrátok koncentrációja fontos szempont minden alkoholos ital esetében. Ha a cukorkoncentráció nem megfelelő az erjesztő szervezet vagy az előállított ital számára, akkor a termék minősége romlik. A legtöbb sör erjedése 12-15% (w/v) cukortartalom körül kezdődik, míg egyes borok és szeszes italok erjedése 16-20% (w/v) vagy annál nagyobb cukortartalomnál kezdődik. A cukor hozzáadása az erjeszthető anyagokhoz a potenciális alkoholszint növelése vagy más érzékszervi tulajdonságok javítása érdekében széles körben elterjedt gyakorlat. A

cukor hozzáadása a savó szénhidrát koncentrációjának növelése érdekében utat biztosíthat az erjedési potenciál és az alkohol mennyiség növeléséhez, tekintettel a jelen lévő laktóz viszonylag alacsony szintjére. A *Kluyveromyces marxianus* egyik korlátja az, hogy viszonylag érzékeny mind az oldott cukor, mind az alkoholkoncentrációra. A legtöbb *Kluyveromyces marxianus* törzs maximális alkoholtűrése 6%-os alkoholtartalom körülinek tűnik az eddigi kutatásokból, az oldott laktóz legnagyobb tolerálható koncentrációja pedig a jelentések szerint 110-200 g/l (Schaan, 2022).

2.5 A nitrogén szerepe

A szabad amino nitrogén (SZAN) mennyisége az erjeszthető termékekben fontos mérőszám a sörfőzők és a borászok számára. Az oldatban lévő hasznosítható nitrogén elengedhetetlen az élesztősejtek szaporodásához, mivel az enzimek, a sejtmembránok felépítéséhez, valamint az RNS és a DNS bioszintéziséhez szükséges új fehérjék létrehozásához ezt használják az élesztő sejtek (Schaan, 2022). Az oldatban lévő nitrogén szükséges mennyisége vitatott, és nagymértékben függ a készülő terméktől, de vannak irányelvek, amelyeket általában követnek. A SZAN minimális koncentrációja a sörlében és a bormustban nagyobb, mint 100 mg/l, különben megnő a valószínűsége, hogy elnyúlik a lag-fázis. A SZAN optimális koncentrációja a sörlé esetében 200 és 250 mg/L között van (Hill & Stewart, 2019). A bor esetében az optimális nitrogénkoncentráció a jelentések szerint 190 mg/L körül van. A borászok gyakran használnak diammonium-foszfátot nitrogénforrás kiegészítésként, mivel a bormustban a SZAN szintje nem megbízható. Mind a sörlé, mind a bormust esetében a legnagyobb mennyiségben jelen lévő aminosav a prolin, amely az összes nem fehérje nitrogén 40-70%-át adhatja. A prolin egyedülálló a fehérjékben található nitrogéntartalmú monomerek között. Bár a prolin technikailag nem aminosav, az egyszerűség kedvéért gyakran az aminosavak közé sorolják. Az élesztő képes a prolin asszimilálására a fermentáció során, de prolin specifikus transzporterei elnyomódnak a preferált aminosavak jelenlétében. Mire a preferált aminosav források kimerülnek, már nincs elegendő oxigén a prolin katabolizmusának elvégzéséhez. (Schaan, 2022). Mivel a fermentáció többnyire anaerob módon zajlik, az élesztősejtek gyakran nem képesek a prolint mint amino-nitrogénforrást felhasználni, ami ahhoz vezet, hogy azt asszimilálhatatlannak tekintik. A sörlé és a must következő leggyakoribb aminosavai a glutaminsav, az arginin, a leucin és a lizin, amelyek mind könnyen asszimilálhatók az élesztők számára. Összesen mintegy húsz különböző aminosav található a sörlében és a bormustban, amelyeket az élesztőfajok az ammóniához hasonlóan hasznosítani tudnak (Hill & Stewart, 2019).

2.5.1 Nitrogén a savóban

A folyékony tejsavó nem fehérje nitrogéntartalmáról nincs elég kutatás. Hasonlóképpen, a folyékony savó SZAN-tartalmát sem vizsgálták. A savóporok nem fehérjetartalmát azonban vizsgálták, és megállapították, hogy az átlagos koncentráció jellemzően a szárazanyag 0,2%-a körül van (Modler, 2009). Azt is kimutatták, hogy nincs jelentős különbség a savas és az oltós savóporok szabad nitrogéntartalma között. A tejsavópor aminosavainak összetétele a tejet adó tehének takarmányától függően változik. Jellemzően a savópor-koncentrátum prolin-koncentrációja az összes aminosav tartalom 5 %-a körül van. Ez ellentétben áll a sör lével és a bormusttal, amelyekben a prolin a fő aminosav összetevő, és az összes nem fehérje nitrogén mintegy 70%-át teszi ki. A tejsavófehérjeporban a legnagyobb mennyiségben előforduló aminosavforrás a glutaminsav, ez az összes aminosavtartalom mintegy 15- 20%-át teszi ki. A leucin és az aszparaginsav a második leggyakoribb aminosavak a savópermeátumban, egyenként körülbelül 10%-os tömegszázalék arányban fordulnak elő. Bár a savó nem fehérje nitrogén összetétele nagymértékben elősegítheti az élesztő asszimilációját, a folyékony savóban még mindig alacsony lehet a SZAN. Ez az alacsony koncentráció azt jelezheti, hogy a savó-fermentációban egy további ammóniaforrás használata előnyös lehet a sejtnövekedés és az erjedési sebesség növelése szempontjából (Schaan, 2022).

2.6 Koncentrált savó fermentációja

A savó sűrítése a víz eltávolítása által magasabb cukortartalmat eredményez, és előkezelésként használható a savó erjesztésének elősegítésére. Az édes savó erjeszthető cukor tartalma sokkal alacsonyabb, mint például a legtöbb söré, és maximális elméleti alkoholtartalma 3,5-4,0% (v/v) körül van. Ha a cukortartalmat koncentráljuk membránszűréssel, fordított ozmózissal vagy centrifugálással akkor a savó alkoholhozama megnövelhető. A *Saccharomyces* egyes törzsei esetében az erjedési időt is növelheti a cukorkoncentrációval járó magasabb ozmotikus nyomás. Ugyanez a tulajdonság a *Kluyveromyces marxianus* erjesztéseknél korlátozott. Így a cukortartalom növelése a koncentrációt egy hagyományosabb szintre emelné, de ez az erjesztési teljesítmény rovására mehet. A korábban említettek szerint a tejsavó erjesztése esetén a laktózkoncentráció növelésének korlátai vannak. A tejsavópor koncentrátumok vagy sajtos tejsavóporok etanolos erjesztésekben való felhasználását is vizsgálták, némi sikerrel. A rehidratált savóporok fermentációhoz való használatának előnye az eredetileg is folyékony savóval szemben az, hogy a szilárd anyagok koncentrációja egyenletesebbé tehető. Koncentrált savóport használva a kutatók 10,5%-os alkoholtartalmat tudtak elérni. Úgy tűnt, hogy ez az

eredmény a keverék kezdeti pH-értékétől függ, az optimális pH-érték pedig összhangban van más kutatások eredményeivel, ez körülbelül ötös pH szintet jelent (Schaan, 2022).

3 Anyagok és Módszerek

3.1 Felhasznált anyagok:

3.1.1 Tejsavó:

16-17%-os laktóz koncentrátum (ultraszűrésen átesett permeátum). Egyes esetekben kiegészítettem laktózzal a koncentráció növelése érdekében, illetve egy kísérletnél 11%-osra hígítottam desztillált víz segítségével. A 16-17%-os permeátumok laktóz tartalma redukáló cukor tartalom méréseink alapján 16,51 g/100 ml volt, a 11%-osra hígított tápközegé pedig 10,89 g/100 ml volt.

3.1.2 Enzimek:

Ha-Lactase 5200/6500 (Chr. Hansen): Egy *Kluyveromyces lactis* törzsszel termeltetik, az optimális hőmérséklete 35-45°C, pH optimuma 6,5-8, az átlagos aktivitása pedig 5200 NLU/g.

NOLA Fit 5500 (Chr. Hansen): Ezt az élesztőt *Bacillus licheniformis* baktérium törzsszel termeltetik, a hőmérséklet optimuma 35-50°C az optimális pH tartománya pedig 5-7 között van, az átlagos aktivitása 5500 BLU/g.

Lactozyme Pure 6500L (Novozymes): Ezt az enzimet szintén egy *Kluyveromyces lactis* élesztő törzs termeli. Ennek az enzimnek a hőmérséklet optimuma 30-40°C, a pH optimuma 6,5-7,5 között van, az aktivitása pedig 6500 LAU/g.

3.1.3 Élesztők:

A vizsgálataim során elsősorban kereskedelemben megtalálható fajélesztőket használtam. Egy esetben a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményéből (NCAIM) szereztem be az alkalmazott törzset. A törzseket az 1. táblázatban mutatom be:

1. táblázat: A kutatás során használt fajlesztők

	Élesztők	Megnevezésük
1	Uvaferm PM (Lallemand)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
2	Uvaferm CM (Lallemand)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3	Danstil A (Lallemand)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
4	Thermosacc Dry (Lallemand)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
5	Anchor Exotics SPH (Anchor)	Hybrid yeast
6	Viniflora Melody (Chr, Hansen)	<i>Kluyveromyces thermotolerans</i> <i>Torulaspora delbrueckii</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
7	Viniflora Concerto (Chr, Hansen)	<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>
8	Biodiva (Lallemand)	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
9	Anchor VIN 13 (Anchor)	Hybrid yeast
10	Viniflora Merit (Chr, Hansen)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
11	X-thiol (Erbslöh)	Hybrid yeast
12	X-treme (Erbslöh)	Hybrid yeast
13	SafCEno HDA54 (Chr, Hansen)	Hybrid yeast
14	SafCEno GV S107 (Chr, Hansen)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
15	Flavia MP346 (Lallemand)	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
16	Turbo Yeast 48 (Alcotec)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
17	NCAIM Y.01070 (Egyetemi törzs gyűjtemény)	<i>Kluyveromyces marxianus</i>

3.1.4 Tápsó:

Uvavital (Uvaferm): Erre a készítményre az élesztő tápanyag szükségletének kiegészítése érdekében volt szükség. Az Uvavital egy száraz por formátumú tápsó, amelyet Természetes autolizált fajlesztőbázison gyártanak. Az összetevői: *Saccharomyces cerevisiae* élesztőszármazékok, ásványi sók, vitaminok.

3.1.5 YEPD tápleves vagy tápagar:

Összetétele: 0,5% élesztőkivonatot, 0,5% peptont, 1% glükózt tartalmazott. Tápagar esetében 1,5% mennyiségben agar-aggarral kiegészítve. Sterilizés: 121 °C-on 15 percig.

3.2 Módszerek

3.2.1 Szénhidrát teszt

Ezt a vizsgálatot a 16 kereskedelmi forgalomban megtalálható élesztőn végeztem el. Azt vizsgáltam, hogyan hasznosítják az élesztők a glükózt és a galaktózt, ezért élesztőnként 2 YEPD táplevest tartalmazó kémcsövet készítettem, az egyikhez 1 g/100 ml arányban glükózt a másikhoz ugyan ilyen adagolással galaktózt adtam. (Kettő párhuzamosan végeztem el.) A

YEPD tápleves kémhatását pH=7,0-ra állítottam be, majd hozzá adtam a brómkrezol bíbor indikátort 10 mg/l-es arányban, ezután a steril táplevest beoltottam (1% térfogat mennyiséggel) a vizsgálni kívánt élesztőkkel. Semleges pH értéken a tápleves színe az indikátor miatt lila, azonban amikor az élesztő elkezd felhasználni az adott szénhidrátot akkor az anyagcseretermékek csökkenteni kezdik a pH-t és a tápleves színe sárgásra változik. Ebből a színváltozásból lehet megállapítani, hogy az élesztő képes-e hasznosítani az adott szénhidrát forrást.

3.2.2 Inokulum tápoldat készítés

Az első kísérlet során végzett fermentációkhoz fel kellett szaporítanom egy *Kluyveromyces marxianus* törzset (NCAIM Y.01070). Ehhez el kellett készítenem a YEPD táplevest. Az élesztő törzs felszaporításához szükséges tápleves elkészítése során 500 ml térfogatú főzőpohárba 5,0 g élesztőkivonatot, 10,0 g glükózt és 5,0 g peptont mértem be táramérlegen. A komponenseket 1000 ml desztillált vízben oldottam fel, mágneses keverés mellett, majd 250 cm³ térfogatú lombikokba osztottam szét. A lombikokat vattadugóval és celofánnal zártam le, majd 121°C-on 15 percig autoklávoztam azokat, így biztosítottam a steril tápközeget.

3.2.3 Refrakció

Amikor a levegőben haladó fény, egy másik átlátszó közeg határához érkezik, akkor a fény egy része behatol a közegbe, a másik része pedig visszaverődik. A közegbe behatolt fény útját befolyásolja a közeg optikai sűrűsége, anyag összetétele és koncentrációja. Ezt az anyagra jellemző fénytörő képességet mérjük, amikor az anyagok refrakcióját vizsgáljuk. A mérésem során én digitális refraktométert használtam. Ezt a módszert használtam fel a tejsavó szárazanyagtartalmának a mérése során.

3.2.4 pH mérés

A laborban egy Mettler Toledo féle kombinált elektródú műszer állt a rendelkezésemre a pH mérésre. A műszert 7,0 és 4,0 pH-jú pufferek segítségével kalibráltam. A pH mérésére első sorban azért volt szükség, hogy megtudjam elér-e a tejsavó pH-ja az enzimmészítményeknek optimális értéket.

3.2.5 Redukáló cukor tartalom mérése Schrool-Regenbogen módszerrel

A szénhidrátok azon csoportját, amelyek szabad glikozidos hidroxil csoportot tartalmaznak, redukáló cukroknak nevezzük. A tejsavó mintáim redukáló cukortartalmának meghatározását a Schoorl-Regenbogen módszer szerint végeztem, melynek elve, hogy savas közegben a réz(II) ionok kálium-jodidból a jódot szabadabbá teszik, amit ezután nátrium-tioszulfát mérőoldattal

visszatitrálhatunk, és egy cukrot nem tartalmazó vak minta készítésének segítségével következtethetünk a redukáló cukrok mennyiségére:

$$0,016x^2 + 3,008x + 0,335 = \text{cukortartalom (mg/ml)}$$

Egy 300 cm^3 -es Erlenmeyer-lombikba 10 cm^3 Schoorl A majd 10 cm^3 Schoorl B oldatot pipettáztam, melyhez $0,5\text{ cm}^3$ mintát adagoltam. Az így elkészült oldatot desztillált vízzel 50 cm^3 -re egészítettem ki. A kész oldatokat felforraltam úgy, hogy a forrás kezdetétől számolva kettő percre forrni hagytam, majd ezután szobahőmérsékletűre hűtöttem. A már lehűlt oldathoz 10 cm^3 30%-os kálium-jodid oldatot és 10 cm^3 25%-os kénsavat pipettáztam. Ezután a bürettát $0,1\text{ mol}$ -os nátrium-tioszulfáttal töltöttem fel és szalmaszára színig titráltam a mintát. Mikor átcsapott a megfelelő színbe, két-három csepp, keményítő indikátort cseppentettem hozzá és addig titráltam, amíg az oldat fehérré nem vált. Végül a vak minta fogyásából kivonva az egyes minták fogyását, és a mérőoldat faktorával való szorzással megkaptam a korábban említett másodfokú egyenlet ismeretlen tagját:

$$x = (V_{\text{vak}} - V_{\text{minta}}) \cdot f \cdot Na_2S_2O_3$$

3.2.6 HPLC mérés

Kísérleteim során a szénhidrátok mennyiségi meghatározását Thermo Scientific Corporation Surveyor HPLC rendszer segítségével hajtottam végre. A kromatográfiás mérés körülményei:

- Elválasztó oszlop: Aminex HPX-87H töltetű oszlop
- Detektor: PDA (210 nm) RI detektor (410 nm)
- Integrátor program: ChromQuest 5.0
- Eluens: $0,005\text{ n H}_2\text{SO}_4$
- Eluens áramlási sebessége: $0,6\text{ ml/perc}$
- Futási idő: 20 perc
- Oszlop hőmérséklete: 45°C
- Detektor hőmérséklete: 45°C
- Injektált mintatérfogat: $15\text{ }\mu\text{l}$

A HPLC mérések első lépése az előkészítés volt. Minden egyes levett mintából körülbelül 1 ml -t eppendorf csövekbe pipettáztam, melyeket 10 percen át 14.000 -es fordulatszámon centrifugáltam. A centrifugált minták felülúszójából $500\text{ }\mu\text{l}$ -t átpipettáztam HPLC-s műanyag vidál csövekbe. A megfelelő értékeléshez szükség volt standardok készítésére is. Különböző szénhidrát standardokat alkalmaztam, ezek a glükóz, galaktóz és laktóz voltak. A standardok

segítségével meghatározható a retenciós idő, illetve elvégezhető a kalibráció. Ezen információk segítségével pedig meghatározhatók a koncentrációk.

3.2.7 Alkohol tartalom meghatározás

Az erjedő tejsavóban vízen és alkoholon kívül más anyagok is megtalálhatóak, melyek befolyásolják a sűrűséget, ezért lepárlással el kell választani az alkoholt az egyéb anyagoktól. Az alkoholtartalom mérését az erjedésben lévő savókból időközönként vett mintákból végeztem. A mérést azzal kezdtem, hogy 100 cm^3 -es desztilláló lombika bemértem a tejsavóból 50 ml-t. Ehhez szilikonolajat adtam habzástgátlóként és kiegészítettem 150 ml desztillált vízzel. Az így előkészített folyadékmintát Gibertini készüléken desztilláltam addig, amíg a kellő mennyiség össze nem gyűlt ahhoz, hogy a készülék automatikusan leálljon. A szedőlombikot jelleg töltöttem desztillált vízzel, majd alaposan összeráztam és ezután kézi DMA készülékkel már közvetlenül mérhető volt a párlat alkoholfoka, majd a kapott eredményt megszoroztam 2-vel mivel 100 ml helyett 50 ml mintát alkalmaztam.

3.2.8 Sejtszámlálás Bürker kamra segítségével.

A sejtszámláló kamrák speciálisan kiképzett tárgylemezek, amelyekben a sejtek mindig azonos körülmények között, gyorsan meghatározhatók. A sejtszámláló kamrák több fajtája ismeretes, én a Bürker-féle kamrát használtam (MSZ 3640/2-74). Az eljárás elve az, hogy ismert térfogatú folyadékban talált csíraszámából meghatározhatjuk a vizsgálati anyag egységnyi mennyiségében (g, cm^3) jelenlévő összes sejtszámot. A tárgylemez speciális hálórendszerrel ellátott és ez a hálórendszer a fedőlemez ráhelyezésével meghatározott térfogatú részeket alakít ki. Úgy kell alkalmazni, hogy először a csavarok óvatos lazításával ki kell emelni a Bürker-kamra fedőlemezét és puha száraz ronggyal (szarvasbőrrel) meg kell tisztítani. Ha szükséges, akkor alkoholos vattával is megtisztítjuk. A négyzetháló tisztítást nagyon óvatosan végezzük! Ezután és a vizsgálati minta teljes homogenizálása után a szükséges mennyiséget alkalmas pipettával a számlálókamrába cseppentjük, majd legalább 400 csírat megszámolunk úgy, hogy a tárgyasztal mozgatásával a hálórendszerben a vizsgált kamrák átlósan kövessék egymást. Ezt az eljárást az általam szaporított *Kluyveromyces marxianus* élesztőtörzs sejtszámának meghatározásához alkalmaztam. A szaporítás végén a sejtszám $1,77 \cdot 10^8$ sejt/ml volt.

3.3 Kísérleti körülmények.

3.3.1 Enzimes kísérletek

- Az enzimes kísérletek során 16% laktóz-koncentrációjú tejsavót alkalmaztam.
 - Egyik esetben különböző enzimkoncentrációkat használtam (0,1 ml/100 ml; 0,2 ml/100 ml; 0,3 ml/100 ml; 0,4 ml/100 ml; 0,5 ml/100 ml)
 - A másik esetben a szubsztrát koncentrációt változtattam. A 16%-os tejsavót kiegészítettem laktózzal. Az alkalmazott koncentrációk: 16%; 18%; 20%; és 23%; voltak. Ebben az esetben az enzim adagolást egyenesen arányosan növeltem a laktóz koncentráció növekedésével.
- A kísérletek 35°C-os hőmérsékleten történtek.
- Időközönként mintavételezést végeztem.
- A mintáknak a glükóz, galaktóz és laktóz tartalmát HPLC módszerrel mértem.

3.3.2 Erjesztési kísérletek

Az egyes erjesztési kísérletek pontos paramétereit az „Eredmények és értékelés” fejezetben írom le részletesen. Mivel a kísérletek egymásra épültek itt a kísérletek körülményeit általánosságban fogalmazom meg.

- A kísérletekhez 16%-os vagy 18%-os laktóz-koncentrációjú tejsavót használtam, amelynek a pH-ját 6-körüli értékre állítottam be, ezután a mikrobiológiai biztonság érdekében 15 percen keresztül 85°C-os hőmérsékleten pasztöröztem.
- Lehűtés után a tejsavót kimértem erjesztő edényekbe.
- Tejsavó enzimes kezelésen esett át vagy rögtön beoltásra került.
- Az enzimes kezelés 2-3 vagy 18 órán keresztül tartott és 35-37°C-os hőmérsékleten végeztem.
- A beoltás szárított fajélesztővel vagy előre felszaporított élesztő szuszpenzióval vagyis inokulummal történt.
- Az erjesztések 30°C-on változó időtartamig zajlottak.
- Időközönként megmértem a minták szárazanyag-, és alkoholtartalmát, valamint HPLC vizsgálatokat végeztem.

3.3.3 Léptéknövelés 2 literes fermentorban

- Szabályozható 2 literes ürtartalmú Biostat B-típusú fermentorrendszerben végeztem.
- Az erjesztés előkészítéséhez a tápközeget enzimesen előkezelttem, az erjesztés körülményei hasonlóak voltak az előző pontban (Erjesztési kísérletek) leírtakhoz.

- A különbséget az adta, hogy ennél a kísérletnél rendelkezésre állt a kevertetés, valamint a levegőztetés lehetősége is a fermentorrendszernek köszönhetően. Ezek pontos paramétereit a kísérlet leírásánál adom meg az „Eredmények és értékelés” fejezetben.

4 Eredmények kiértékelése

4.1 Közvetlen és közvetett fermentáció megvalósítása

Az első kísérletem azt a célt szolgálta, hogy megállapíthassam, melyik eljárás (közvetlen vagy közvetett erjesztés) a célravezetőbb a tejsavóból történő hatékony alkohol termelésre. Ehhez kettő fermentációt végeztem, az egyiket *Kluyveromyces marxianus* élesztővel a másikat *Saccharomyces cerevisiae* élesztővel enzimés előkezelés után.

A fermentációhoz tápközegként 11% laktóz koncentrációjú tejsavót használtam. Azért nem ennél többet, mert a szakirodalomban fellelhető információk alapján a *Kluyveromyces marxianus* élesztőtörzs esetében a 12-13%-os cukorkoncentráció már erősen csökkenő erjesztési teljesítményt eredményez. A *Saccharomyces* élesztővel erjesztetni kívánt mintához az előkezeléshez egy béta-galaktozidáz (Novozyme) enzimkészítményt használtam 0,3 ml/100 ml mennyiségben. A tápközeg pH-ja savasabb volt, mint az enzim optimális tartománya, 5,15 volt az eredeti pH szintje ezért 5 mólos NaOH-al pH=6-os-ra emeltem a tápközeg kémhatását. Az enzimés kezelést 18 órán át 37°C-on végeztem, majd *Saccharomyces cerevisiae* (Lallemand) szárított élesztőt használtam 2,5 g/l-es mennyiségben. Az erjesztést 30 Celsius fokon végeztem. A *Kluyveromyces* törzsszel történő erjesztésnél az induló sejtszámot $2,0 \cdot 10^7$ sejt/ml állítottam be felszaporított élesztőszuszpenzióval, majd és 30°C-os hőmérsékleten végeztem az erjesztést. Mindkét mintát kiegészítettem 10 g/hl mennyiségű Uvavital tápsóval, a *Kluyveromyces* mintát az erjedés 70. órájában a *Saccharomyces* mintát az erjedésének 52. órájában. Az erjesztések során mért adatokat a 2. és a 3. táblázatban mutatom be:

2. táblázat: Alkohol és szárazanyag-tartalom változás a *Saccharomyces* élesztővel végzett erjesztés során

Idő (óra)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
	Szárazanyag (m/m%)	Alkohol (V/V%)
0	15,7	0
52	7,2	5,8
144	6,0	6,85
192	5,8	6,95
312	5,7	6,95

3. táblázat: Alkohol és szárazanyag-tartalom változás a *Kluyveromyces* élesztővel végzett erjesztés során

Idő (óra)	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	
	Szárazanyag (m/m%)	Alkohol (V/V%)
0	15,7	0
70	12,5	1,22
162	11,9	1,34
210	11,5	1,34
330	11,5	1,76

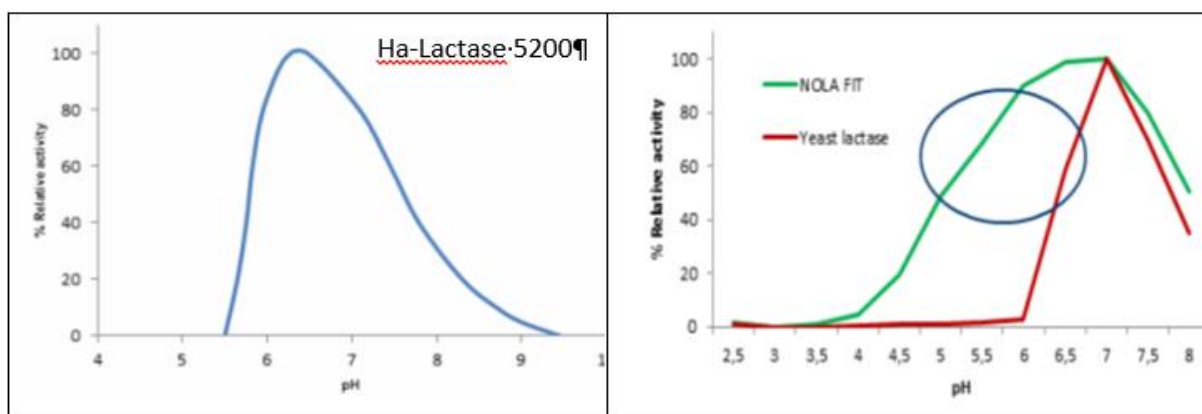
Az erjesztés időtartama alatt mért adatok alapján jól látható, hogy még ahhoz képest is, hogy csupán 11% laktóz koncentrációjú tejsavót használtunk tápközegként, az alkalmazott *Kluyveromyces* törzs messze alulmúlta a *Saccharomyces* fajélesztőt mind alkohol termelésben mind a szárazanyag felhasználás terén. Míg a *Saccharomyces* az erjedés 192. órájában elérte a 6,95 V/V% alkohol tartalmat addig a *Kluyveromyces* még a 330. órában is csak 1,76 V/V% alkoholt termelt. Az erjeszthető szárazanyag felhasználás tekintetében is hasonló volt a helyzet, a *Saccharomyces* maradék szárazanyag tartalma 5,7 m/m% volt, míg a *Kluyveromyces* mintában még 11,5 m/m% maradt a vizsgálat idejének a végére. Így egyértelmű volt a döntés és a közvetett fermentációs eljárás útvonalán haladtam tovább, a további kísérletekben ezt a technológiai módszert fogom optimalizálni.

4.2 Enzimb készítmények

Figyelembe véve az előző kísérlet eredményeit úgy döntöttem, hogy az enzimb készítmények alkalmazása és a *Saccharomyces* élesztővel való erjesztés útvonalán fogom a további vizsgálataimat elvégezni. Ehhez célom volt kiválasztani a legmegfelelőbb enzimb készítményt a laktóz hidrolizálásához.

Számos béta-galaktozidáz enzimb készítmény fellelhető a kereskedelmi forgalomban, én háromfélét választottam ki és ezeket hasonlítottam össze a fellelhető szakirodalmak, illetve a gyártók által megadott információk alapján. Az irodalmi adatok alapján megnéztem a három enzimb készítmény (Lactase 5200/6500, a NOLA Fit 5500, Lactozyme Pure 6500L) specifikációit és kiválasztottam a fermentáció paramétereire legjobban társíthatót. Az enzimb kiválasztásához kettő paraméter az, ami meghatározó számunkra, a hőmérséklet és a pH optimális tartománya. A legtöbb enzimb készítménynél az optimális hőmérséklet tartománya 35-45 Celsius fok között van a pH optimumuk pedig 6,0-7,0 közötti. A tejsavó pH-ja jellemzően 5,5-5,7 között van, ebből kifolyólag olyan enzimet kell választani a hidrolízishez, amely

alacsonyabb pH-n is képes megfelelő aktivitást mutatni. A gyártó által megadott adatok alapján ezt a feltételt a NOLA Fit 5500 nevű készítmény teljesíti legjobban, ezt az eredményt a 3. ábrán szemléltetem, ahol össze hasonlítják a jelleggörbáját a Ha-Lactase 5200 és egy élesztő laktáz enzim jelleggörbéjével. Az erjesztés során a pH még tovább csökken néhány tizeddel, ezt a körülményt mindenképpen számításba kell venni, ha a hidrolízist és az erjesztést eltoltan vagy szimultán szeretnénk végezni.



3. ábra: Különböző enzimesztítmények aktivitása a kémhatás függvényében (Chr. Hansen Ha-Lactase 5200 és NOLA Fit termékismertető)

Az enzimesztítmények hőmérséklet optimumai között nem volt különbség ezért ahhoz, hogy ez a paraméter megfelelő legyen, mind a hidrolízishez mind az erjesztéshez az élesztő kiválasztásával kell elérni. Az a hőmérséklet, ami az enzimeknél alsó optimális határ, tehát 35 Celsius fok, a legtöbb élesztőnél az erjesztési hőmérséklet felső határa, ezért ha szimultán akarunk erjesztetni, akkor olyan élesztőt kell választanunk, amely képes ezen a hőmérsékleten az alkohol termelésre, valamint számolnunk kell vele, hogy az enzim bontási sebessége alacsonyabb lesz.

4.3 Optimális enzim adagolási mennyiség meghatározása

Az adagolási mennyiség kiválasztásához figyelembe vettem a gyártó által meghatározott mennyiséget és ez alapján terveztem meg a további adagolási mennyiségeket, amelyek eredményeit össze hasonlítottam. A mérésekhez 16% laktóz tartalmú tejsavó koncentrátumot használtam és 35 Celsius fokon végeztem a hidrolíziseket. A szénhidrátok mennyiségi változását HPLC technikával követtem nyomon és a mért adatokat az 2. táblázatban tüntettem fel.

4. táblázat: Laktóz hidrolízise különböző enzimadagolás esetén
(Szénhidrát koncentrációk g/100ml egységben vannak megadva)

Idő (óra)	0,1 ml/100ml			0,2 ml/100ml			0,3 ml/100ml			0,4 ml/100ml			0,5 ml/100ml		
	Laktóz	Glükóz	Galaktóz	Laktóz	Glükóz	Galaktóz	Laktóz	Glükóz	Galaktóz	Laktóz	Glükóz	Galaktóz	Laktóz	Glükóz	Galaktóz
4	4,636	6,617	5,476	1,759	7,054	7,101	1,271	7,116	7,675	0,683	7,531	7,837	0,681	7,510	8,079
8	1,485	6,819	6,376	0,931	7,298	7,575	0,885	7,637	8,067	0,649	7,701	8,022	0,445	7,878	8,344
12	1,426	7,714	7,941	0,690	8,022	8,619	0,706	7,673	8,452	0,530	8,107	8,986	0,430	7,915	8,264
15	1,180	7,415	7,806	0,772	7,917	8,629	0,556	7,912	8,452	0,536	7,991	8,856	0,421	8,164	9,005
18	0,964	7,778	8,344	0,665	7,462	8,193	0,541	7,933	8,480	0,310	7,975	8,919	0,325	8,157	9,051
24	0,925	8,089	8,159	0,522	7,434	8,240	0,233	8,060	8,430	0,286	7,997	8,960	0,280	8,331	9,041

Az enzimes kezeléseket 24 órán keresztül végeztem. Minden adagolási mennyiségnél látható, hogy a laktóz, monomerjeire bomlik, vagyis glükózra és galaktózra. A mért adatok alapján jól látható hogy 0,3 ml/100 ml-es koncentrációnál és a felett nem történik, számottevő mennyiségi változás a megmaradt laktóz tekintetében. Azonban a 0,4 ml/100 ml-es adagolásnál a bontás sebessége nagyobb volt, mint a 0,3 ml-esnél, ezen adagolás mellett már a negyedik órában 1 gramm/100 ml alá csökkent a laktóz tartalom. Tehát ez a kettő adagolási mennyiség, ami megfontolandó a további kísérletekhez. Ennél nagyobb mennyiség nem indokolt 16%-os laktóz, koncentrációnál ugyanis érdemben nem növekszik a hidrolízis hatékonysága.

4.4 Ideális laktóz koncentráció kiválasztása

A következő mérések során azt vizsgáltam milyen koncentrációjú laktózt érdemes használni. Ez azért fontos kérdés, mert minél nagyobb a laktóz koncentrációja annál magasabb etanol tartalmú erjedési végtermék érhető el, és ez által a lepárlásra is alkalmasabb lesz. Viszont ha növeljük, a laktóz, koncentrációját felléphet a termékgátlás és ez rontja a hidrolízis határfokát, lelassul a laktóz bontása és nem tudjuk elérni a teljes konverziót, ezért meg kell találni azt a maximális koncentrációt ahol még a termékgátlás elfogadható mértékű. Az alapanyagunk most is 16%-os tejsavó koncentrátum volt, ezt porított tejsavó permeátum hozzáadásával dúsítottuk fel, hogy nagyobb koncentrációjú legyen a hidrolizálendő alapanyag. Az enzimadagolás kezdő mennyisége 0,4 ml/100 ml volt, ezt a mennyiséget egyenesen arányosan növeltük, ahogy növeltük a laktóz tartalmát. Itt is HPLC módszert használtunk a szénhidrát változás mérésére. Az adatokat a 3. táblázat tartalmazza.

5. táblázat: Laktóz koncentráció hatása az enzimes hidrolízisre
(Szénhidrát koncentrációk g/100ml egységben vannak megadva)

Idő (óra)	16%-0,4 ml/100ml			18%-0,5 ml/100ml			20%-0,6 ml/100ml			23%-0,8 ml/100ml		
	Laktóz	Glükóz	Galaktóz	Laktóz	Glükóz	Galaktóz	Laktóz	Glükóz	Galaktóz	Laktóz	Glükóz	Galaktóz
4	1,230	7,786	8,495	1,558	7,628	8,103	2,087	8,934	9,462	3,562	9,851	10,472
8	0,903	7,149	7,962	1,475	7,806	8,606	1,944	8,523	9,359	2,941	9,642	10,642
13	0,509	7,283	8,113	1,378	8,095	9,028	1,851	9,062	10,259	2,419	9,378	10,666
17	0,523	7,215	8,000	1,476	8,208	9,022	1,047	8,676	9,659	2,552	9,856	11,045
23	0,480	7,895	7,725	1,183	8,414	8,974	0,849	9,037	9,988	2,437	9,640	10,865
30	0,386	7,978	8,344	0,721	8,873	9,959	0,770	8,983	10,059	2,279	10,438	11,500

Látható, hogy az arányos enzimadagolás ellenére folyamatosan csökkent, a laktóz bontásának sebessége, ahogy növekedett a termék-koncentráció. Ráadásul a vizsgálat időtartama alatt, ahogyan növeltük a laktóz koncentrációt az enzimes kezelés végén a maradék laktóz mennyisége is egyre nagyobb lett. Ezeket az eredményeket figyelembe véve az állapítható meg, hogy a legideálisabb, ha 16%-os vagy 18%-os laktóz, koncentrációjú tejsavót alkalmazunk. Szóba jöhet még a 20%-os koncentráció, de érdemes figyelembe venni a felhasznált enzim mennyiségét a gazdaságosság szempontjából.

4.5 Ideális fajélesztő kiválasztása

Az általunk keresett fajélesztő egyik legfontosabb tulajdonsága, hogy a lehető leghatékonyabban tudja hasznosítani, a laktóz monomerjeit. A glükózt a legtöbb fajélesztő hatékonyan tudja felhasználni azonban a galaktózzal ugyanez nem mondható el, az extracelluláris glükóz magas koncentrációja a galaktóz hasznosításának katabolikus represszióját okozza (Domingues *et al.*, 1999). Tehát az általunk keresett starterkultúra kiválasztásában az lesz a döntő paraméter, hogy hogyan tudja hasznosítani a galaktózt. Összesen 16 fajélesztőt választottunk ki, amelyek megtalálhatók a kereskedelmi forgalomban, van köztük hibrid élesztő és olyan is, amely nem tartozik a *Saccharomyces* nemzetségbe. Ahhoz, hogy a 16 élesztő közül megtaláljuk azokat, amelyek jól tudják hasznosítani a glükózt és a galaktózt szénhidráttesztet végeztünk. Ha az élesztő képes felvenni az adott szénhidrátot, akkor a tápközeg színe megváltozik, lilából átváltozik sárga színűre. Ez a változás azért tud bekövetkezni, mert az élesztő által termelt metabolitok miatt a pH érték elmozdul, savasodni kezd a tápközeg. Az eredményeket a 4. táblázatban tüntettem fel.

6. táblázat: Egyes fájlesztők glükóz és galaktóz hasznosítása

	Fájlesztő	Glükóz	Galaktóz
1	Uvaferm PM	+++	-
2	Uvaferm CM	+++	-
3	Danstil A	+++	++
4	Thermosacc Dry	+++	+++
5	Anchor Exotics SPH	++	-
6	Melody	+++	-
7	Concerto	+++	++
8	Biodiva	+++	++
9	VIN 13	+++	+++
10	Merit	+++	+
11	X-thiol	++	-
12	X-treme	+++	-
13	HDA54	+++	-
14	GV S107	+++	-
15	Flavia	+++	-
16	Turbo Yeast	+++	+++

+++ : nagyon jó, ++ : jó, + : kicsi, - : nem

A 4. táblázatban látható eredményekből megállapítható, hogy mindegyik fájlesztő hatékonyan használta fel a tápközeg glükóz tartalmát. A galaktóz tekintetében egészen mást látunk ugyanis az összes vizsgált élesztő törzs kevesebb, mint fele tudta csak felvenni, összesen 7 féle élesztő. Három élesztő tudta nagyon jó hatékonysággal felvenni a galaktózt, a Turbo Yeast, a Thermosacc Dry és a VIN 13. Volt továbbá három élesztő, amelyek viszonylag jól hasznosították a galaktózt, ezek a Concerto, a Biodiva és a Danstil A fájlesztők voltak. A Merit nevű fájlesztő tudta valamilyen szinten hasznosítani a galaktózt de nem elég hatékonyan. A Concerto és a Biodiva nem *Saccharomyces* élesztők ezért ezeket nem vittem tovább a következő mérésekhez mivel tudjuk azt, hogy a nem *Saccharomyces* élesztők alkohol termelő képessége rosszabb, mint a *Saccharomyces cerevisiae* élesztőknek. Tehát a további mérésekhez a Turbo Yeast-et, a Thermosacc Dry-t a VIN 13-at és a Danstil A fájlesztőket használtam.

4.6 A kiválasztott fájlesztők további vizsgálata

Miután kiválasztottuk a fentebb említett négyféle élesztőt arra a kérdésre kerestem a választ, hogy ezek közül melyek rendelkeznek a legjobb alkoholtermelő képességgel. A vizsgálat során következők voltak a hidrolízis és az erjesztés körülményei:

- Tápközeg a fermentációhoz: 18% laktóz tartalmú tejsavó

- Enzimes hidrolízis 2 órán keresztül 0,4 ml/100ml mennyiségű enzimkészítménnyel 35 Celsius-fokon majd a 2 óra leteltével élesztő beoltás
- Élesztő mennyisége 2 g/l
- Tápsó mennyisége 0,4 g/l
- Tápsó fajtája: Uvavital-Lallemand
- Erjesztés: 30 Celsius fokon 100 órán keresztül

Az 5. táblázat tartalmazza a kísérlet során mért adatokat.

7. táblázat: Szárazanyag-, és alkoholtartalom változása különböző élesztőkkel végzett erjesztés során

Alkalmazott élesztők	Szárazanyag-tartalom (m/m%)			Alkohol (V/V%)		
	48 óra	76 óra	100 óra	48 óra	76 óra	100 óra
Turbo Yeast	13,1	10,6	10,2	7,0	9,0	9,0
VIN 13	16,2	14,1	12,6	4,8	6,6	7,4
Thermosacc Dry	15,3	13,0	11,8	5,6	7,4	8,0
Danstil A	15,9	13,8	12,2	5,2	6,8	7,6

A vizsgált négy élesztőtörzs száz órás erjesztése során méréseket végeztünk a szárazanyag tartalom valamint az alkohol tartalom alakulására vonatkozóan. A Turbo Yeast esetében volt a legalacsonyabb a szárazanyag tartalom az erjesztés végére (10,2 m/m%) tehát ez a törzs termelte a legtöbb alkoholt is (9,0 V/V%) a vizsgálat ideje alatt. A másik három vizsgált élesztő tápközegeiben a szárazanyag tartalom nem ment 11 m/m% alá és a minták alkohol tartalma még a második legjobban teljesítő élesztő esetében (Thermosacc Dry) is egy teljes térfogat százalékkal kevesebb volt, mint a Turbo Yeast-nél mért érték.

Tehát mindkét mért adat azt mutatta, hogy a Turbo Yeast starter kultúra végezte a legjobb anyagcsere tevékenységet tehát egyértelmű volt a döntés, hogy ezt a fajélesztőt fogjuk használni a további kísérletek során.

4.7 Különböző laktóz tartalmú savók erjesztése

Megvizsgáltuk, hogy az erjesztés szempontjából mi az optimális laktóz koncentráció, vagyis arra voltunk kíváncsiak meddig érdemes növelni a fermentációs tápközege koncentrációját. Ez azért lényeges, mert minél nagyobb a végtermék alkoholtartalma utána annál előnyösebb lehet a lepárlás szempontjából. Azonban az erjedés üteme szempontjából nem biztos, hogy előnyös a nagyon magas laktóz koncentráció tehát érdemes megvizsgálni mekkora az a legmagasabb koncentráció, ahol az erjedés még optimális értékeket mutat. Ehhez a méréshez elkészítettünk 16%-os, 18%-os, 20%-os, valamint 22%-os tápközegeket. Az erjedés

körülményei azonosak voltak az előző vizsgálatával, azokkal a különbségekkel, hogy itt az erjedés időtartama 130 óra volt az élesztő adagolását pedig a gyártó által megadott javaslat szerint végeztük, azaz 5 g/l élesztőt alkalmaztunk. Az erjedés során HPLC méréseket, szárazanyag-tartalom méréseket és alkoholtartalomra vonatkozó méréseket végeztünk, ezeket a mért adatokat a 6. és 7. táblázatban tüntettem fel.

8. táblázat: Egyes szénhidrátok mennyiségi változása a fermentáció során
(Szénhidrát koncentrációk g/100ml egységben vannak megadva)

Idő (óra)	16%			18%			20%			22%		
	Laktóz	Glükóz	Galaktóz	Laktóz	Glükóz	Galaktóz	Laktóz	Glükóz	Galaktóz	Laktóz	Glükóz	Galaktóz
18	0,287	0,682	6,162	0,409	0,948	7,101	0,376	3,066	8,163	1,908	5,173	8,805
72	0,081	0,042	0,115	0,166	0,085	0,517	0,413	0,065	3,913	0,710	0,070	9,224
96	0,013	0,013	0,004	0,124	0,081	0,109	0,308	0,082	2,405	0,702	0,067	6,049
130	0,060	0,053	0,036	0,127	0,032	0,047	0,196	0,145	1,009	0,570	0,141	5,801

9. táblázat: Az alkohol- és a szárazanyag-tartalom változása az erjesztés során

Idő (óra)	16%		18%		20%		22%	
	Alkohol (V/V%)	Szárazanyag (m/m%)	Alkohol (V/V%)	Szárazanyag (m/m%)	Alkohol (V/V%)	Szárazanyag (m/m%)	Alkohol (V/V%)	Szárazanyag (m/m%)
72	8,1	6,7	8,2	8,3	7,4	12,7	6,2	16,8
96	8,4	6,1	8,8	7,5	8,4	10,9	6,8	15,7
130	8,5	6,2	9	7,3	9,4	9,5	8,2	14,7

A kapott eredményekből jól látszik, hogy a laktóz, tartalom növelésével nem növekszik arányosan az alkoholtartalom. Látható a HPLC mérés alapján, hogy a 22%-os laktóz tartalmú mintában igen jelentős mennyiségű galaktóz maradt az erjedési időtartam végére (5,801). Az erjesztés sebessége jelentősen lecsökkent a nagyobb szubsztrát-koncentráció következtében. A legmagasabb alkohol tartalmat adott idő alatt a 20% laktóz tartalmú mintával érték el, ez 9,4 V/V%-ot jelent, azonban ennél a mintánál is maradt a tápközegben galaktóz (1,009) tehát az élesztő szénhidrát felhasználásának a hatásfoka csökkent. Tehát a 16%-os és a 18%-os mintákban volt megfigyelhető az, hogy nem csak a glükóz, hanem a galaktóz felhasználása is ideális volt az élesztőnek. A két minta között mért alkoholtartalom különbsége 0,5V/V% volt. Ennek az adatnak az ismeretében érdemes elgondolkoznunk, hogy megéri-e nagyobb koncentrációjú tejsavót használnunk, hiszen nincs szignifikáns különbség az alkohol termelés mennyiségét illetően.

4.8 Optimális tápanyag kiegészítés

Az általunk használt Turbo Yeast fajélesztő a csomagolásában eredetileg is tartalmaz tápanyag kiegészítést, viszont mi kíváncsiak voltunk, hogy érdemes-e további tápanyagot hozzá adni az

élesztőhöz annak érdekében, hogy minél ideálisabb legyen az erjedés. Erre a célra az Uvavital Lallemend komplex tápsót alkalmaztuk, ebben a tápsóban megtalálható az élesztő optimális működéséhez szükséges nitrogén valamint minden ásványi anyagot és vitamin forrást megfelelő arányban tartalmaz. A kísérletet a következő körülmények között végeztük:

- Tápközeg: 16% laktóz tartalmú tejsavó
- Enzimes hidrolízis 2 órán keresztül 0,4 ml/100ml mennyiségű enzimkészítménnyel 35 Celsius-fokon majd a 2 óra leteltével élesztő beoltás
- Élesztő: Turbo Yeast 5 g/l
- Tápsó: Az élesztővel együtt az erjesztés elején majd az erjedés 24. órájába és a 48. órájában, alkalmanként 20 g/hl-es mennyiségben
- Tápsó fajtája: Uvavital-Lallemend
- Erjesztés: 30 Celsius fokon 130 órán keresztül

A kísérlet alatt a szárazanyag tartalmat és az alkohol koncentrációt mértük. Az adatokat a 8. táblázatban mutatom meg.

10. táblázat: Erjesztés során történő tápanyag kiegészítés hatásának a vizsgálata

Idő (óra)	Tápanyagkiegészítés a 24. és a 48. órában		Tápanyagkiegészítés a 24. órában		Nem történt adagolás a 24. és a 48. órában	
	Alkohol (V/V%)	Szárazanyag (m/m%)	Alkohol (V/V%)	Szárazanyag (m/m%)	Alkohol (V/V%)	Szárazanyag (m/m%)
72	7,9	6,8	8,2	6,3	7,6	7,0
96	8,0	6,2	8,2	6,1	7,9	6,5
130	8,0	6,3	8,3	6,0	8,1	6,5

Az eredmények alapján az mondható el, hogy elég, ha csupán a 24. órában végzünk tápanyag kiegészítést ugyanis ezzel a módszerrel értük el a legmagasabb alkoholtartalmat (8,3 V/V%) adott idő alatt. Ha a 48. órában is végzünk kiegészítést, nem érünk el javulást, sőt még kicsivel rosszabb eredményeket kaptam (8,1 V/V%). Elmondható azonban, hogy nincs számottevő különbség az egyes eljárások között.

4.9 Erjesztés optimalálása fermentor rendszerhez

Azt szeretnénk volna elérni, ha az erjesztés a laboratóriumi mérethez képest egy nagyobb léptéknövelt szinten is optimális lenne. Ehhez egy jól szabályozható fermentor rendszerben vizsgáltuk az erjedést. A használt fermentor rendszer hasonlít az iparban is megtalálható fermentorokhoz. A fermentorról egy kép is látható a 4. ábrán, a rendszer számítógépről

vezérelhető. Ebben a rendszerben egy két literes fermentor található, lehetővé teszi számunkra a hőmérséklet és pH szabályozást, valamint a tápközeg levegőztetését is szabályozhatjuk, valamint a kevertetés mértékét és időtartamát.



4. ábra: B Braun Biostat B fermentor-rendszer

Az általunk végzett mérések elsődlegesen arra vonatkoztak, hogy megtudjuk a beoltás után mennyi ideig a legcélszerűbb levegőztetést végeznünk, valamint hogyan szabályozzuk az erjesztés közbeni paramétereket. Az általam bemutatott vizsgálat azokat a paramétereket mutatja, amik már az ideálisnak tekinthetők. A körülmények ezek voltak:

- Tápközeg: 16%-os laktóz tartalmú tejsavó
- Enzimes hidrolízis: 0,35 ml/100 ml-es adagolás, 2,5 óra 35 Celsius fokon majd ezt követően élesztős beoltás
- Élesztő: Turbo Yeast 5 g/l-es adagolás
- Erjesztés: 120 órán keresztül 30 Celsius fokon
- Levegőztetés: 50 percig a beoltás után 1 l/h mennyiséggel, további levegőztetés a 24. és a 48. órában 2 perc időtartamokra
- Tápsó: az élesztővel egyszerre majd a 24. és a 30. óra között 20 g/hl mennyiségben
- A megfelelő homogenitás érdekében 50 rpm fordulatszámmal kevertettük a tápközeget

Az erjesztést a korábban bemutatott módszerekkel vizsgáltuk és követtük nyomon, tehát HPLC analitikával, szárazanyag tartalom és alkoholtartalom méréssel. Az adatokat a 9. táblázatban láthatják.

11. táblázat: Szénhidrát-, alkohol- és szárazanyag-tartalom változása az erjesztés során

Idő (óra)	Laktóz (g/100ml)	Glükóz (g/100ml)	Galaktóz (g/100ml)	Alkohol (V/V%)	Szárazanyag (m/m%)
24	0,345	0,093	6,300	nincs adat	nincs adat
48	0,377	0,082	4,908	nincs adat	nincs adat
72	0,109	0,100	0,126	7,40	6,10
96	0,090	0,156	0,093	8,00	6,10
120	0,072	0,081	0,027	8,10	5,90

Az eredmények azt mutatják, hogy az erjesztés végére hasznosultak az enzimes hidrolízis hatására rendelkezésre álló cukrok. A szárazanyag-tartalom is elérte a laboratóriumi léptékkel végzett kísérletek során megfigyelhető mennyiséget. Az alkoholtartalom is hasonló eredményt mutatott a kisléptékű mérések eredményeihez viszonyítva, 8,1 V/V%-os értéket ért el. Ez alapján a konverzió faktora 0,50-0,52 volt.

5 Következtetések és javaslatok

Sikerült elérnem a célkitűzésemet és laboratóriumi körülmények között optimálnom a tejsavó erjesztés folyamatát és körülményeit. Világosan látszik az, hogy a *Saccharomyces cerevisiae* sokkal nagyobb hatékonysággal erjesztette a tejsavót az enzimes hidrolízist követően, mint a vizsgált *Kluyveromyces marxianus* törzs. Azonban érdemes lehet elgondolkozni azon, hogy milyen eredmények születnének, ha kevert kultúrák erjesztést végeznének egy *Saccharomyces* és a *Kluyveromyces* nemzetség egyik fajával. Ugyanis a kereskedelmi forgalomban lévő enzimekészítmények, amelyeket a laktóz, monomerjeire való bontása közben alkalmazunk igen jelentős költséget képviselnek. Tehát érdemes lenne megvizsgálni, hogy gazdaságosabb-e, ha enzimekészítmény helyett egy *Kluyveromyces* törzset alkalmazunk a laktóz hidrolíziséhez.

Az erjesztéseket és az enzimes kezeléseket egymáshoz képest időben eltolt módon végeztem. Azonban létezik olyan eljárás, amely során az erjesztés és a hidrolízis szimultán zajlik. Hasznos lenne kutatást végezni azzal kapcsolatban, hogy ilyen eljárás esetén lehetséges-e még hatékonyabb módon fermentálni a tejsavót, ugyanis elképzelhető, hogy így gyorsabban végbemenne a folyamat és ezzel időt nyernénk. Abban az esetben, ha az erjesztés folyamata gyorsabban végbemegy, gazdasági szempontból előnyre tehetnénk szert mivel a hidrolízishez és az erjesztéshez szükséges több mint 30°C-os hőmérséklet fenntartása jelentős energia befektetést igényel tehát nem elhanyagolható költség. Ehhez természetesen olyan starter kultúrát érdemes alkalmazni, amely optimálisan végzi az erjesztést a β -galaktozidáz enzim hőmérsékleti optimumán, ilyen lehet a Thermosacc Dry. Vagy pedig olyan enzimekészítményre lesz szükség, amelynek az aktivitása alacsonyabb hőmérsékleten is kielégítő. Alkalmas lehet a célra a Lactozyme Pure 6500L enzimekészítmény, viszont ennek a készítménynek a pH optimuma jelentősen magasabb, mint a tejsavó átlagos pH-szintje, ezért ha ezt alkalmazzák mindenképpen szükség lesz a pH szint beállítására a szimultán erjesztés és hidrolízis előtt.

Érdemes megemlítenem azt is, hogy az általam vizsgált körülmények és paraméterek laboratóriumi léptékre méretezve optimálisak. Ha félüzemi vagy üzemi szinten szeretnénk tejsavóból alkoholt előállítani, akkor érdemes e kutatás alapján tovább vizsgálódni és nagyobb léptékben kísérleteket végrehajtani. Tekintettel arra, hogy a kutatásom nem vizsgálta a gazdaságosság szempontjait mindenképpen javasolt tesztelni ezeket a paramétereket üzemi környezetben is és optimálni őket, a költséghatékonyság szempontját is figyelembe véve.

6 Összefoglalás

Szakdolgozatom témája a sajtgyártás során melléktermékként keletkezett tejsavó hasznosításának egyik lehetőségét vizsgálja. Az általam vizsgált felhasználás a tejsavó laktóz tartalmának hasznosításával történő alkohol előállítás. Azt a célt tűztem ki tehát, hogy megkeresem, milyen módszerrel lehet a leghatékonyabban etanolt előállítani a tejsavóból.

Az első vizsgálataimat azzal kapcsolatban végeztem, hogyan lehet hatékonyabban erjeszteni a koncentrált tejsavót, közvetlenül egy *Kluyveromyces marxianus* törzsszel vagy közvetett módon enzimes hidrolízis után egy *Saccharomyces cerevisiae* törzsszel. Azt az eredményt kaptam, hogy az alkalmazott *Saccharomyces* kultúra nagyobb sebességgel és alkoholtermelő képességgel végezte el a fermentációt.

A további vizsgálataimat tehát a közvetett erjesztés vonalán végeztem, ehhez először meg kellett keresnem a céljaimhoz megfelelő enzimekészítményt. A tejsavó jellemző pH-ja 5,0-5,5 közötti, a legtöbb készítmény pedig nem hatékony ilyen savas pH szinten ezért ez volt a meghatározó paraméter, amely alapján enzimekészítményt választottam. A gyártók által megadott információk alapján a NOLA Fit 5500 készítményt választottam a további kutatásokhoz, mivel ennek a készítménynek volt a pH optimuma a legmegfelelőbb ahhoz, hogy tejsavó tápközeghez felhasználjam.

A következő vizsgálat során azt néztem meg, milyen enzim adagolás mellett történik a leghatékonyabb és leggyorsabb biokonverzió. Ehhez különböző koncentrációkban alkalmaztam a készítményt és folyamatos mintavételezéseket végeztem, melyeket HPLC módszerrel mértem. Azt az eredményt kaptam, hogy a 0,4 ml/100ml-es adagolási mennyiség a legcélszerűbb 16% laktóz tartalmú tejsavó esetén.

Ezután azzal kapcsolatban végeztem méréseket, hogy a laktóz tartalom növelése hogyan befolyásolja az enzimekészítmény hatásfokát, fellép-e a termékgtátlás. Ehhez négy különböző tejsavó mintát készítettem 16%tól 23%-ig terjedő laktóz koncentrációval. Az enzim adagolást arányosan növeltem, ahogyan nőtt a szubsztrátum mennyisége. A vizsgálat végére azt az eredményt kaptam, hogy a laktóz növekedésével csökkent az enzim bontási képességének sebessége, valamint egyre nagyobb mennyiségben maradt bontatlanul laktóz tartalom a mintákban, így a legideálisabb, ha 16%-os vagy 18%-os laktóz koncentrációjú tejsavót alkalmazunk.

Ezt követően ki kellett választanom azokat a kereskedelmi forgalomban fellelhető élesztőket, amelyek képesek hasznosítani a laktóz monomerjeit. Ehhez 16 fajélesztőn végeztem el a

szénhidrát tesztet. A teszt végére az látszódt, hogy összesen 7 élesztő tudta hasznosítani a minták galaktóz tartalmát. A 7 élesztőből 6 tudta jól hasznosítani és ebből 4-et vittem tovább a következő kísérlethez mivel a másik két élesztő nem-*Saccharomyces* volt és ezek közismerten gyengébb alkohol termelő képességgel rendelkeznek.

A következő kísérletben azt vizsgáltam meg, hogy a kiválasztott 4 féle élesztő milyen alkohol termelő képességgel rendelkezik, melyik a leghatékonyabb. Az időközönként vett minták alkohol és szárazanyag-tartalmát mértem és azt az eredményt kaptam a 100 órás erjesztések végére, hogy a Turbo Yeast hasznosította legjobban a minták erjeszthető szárazanyag-tartalmát és ez a törzs termelte a legtöbb alkoholt.

Ezután megint a laktóz koncentráció növelésének hatását vizsgáltam, hogy érdemes-e nagyobb koncentrációjú savót erjeszteni a nagyobb alkohol kihozatal érdekében, vagy romlik-e az élesztő hatékonysága a megnövekedett szénhidrát tartalom hatására. Nyomon követtem a minták alkoholtartalmának és szárazanyag-tartalmának alakulását, valamint HPLC mérésekkel vizsgáltam a laktóz monomerjeinek hasznosulását. Megfigyelhető volt, hogy 18%-os koncentráció felett romlott az élesztő alkoholtermelő képessége és a galaktózt is egyre kevésbé hasznosította. Tehát 16%-os vagy 18%-os laktóz koncentráció alkalmazása a legcélszerűbb, a két minta esetében a nagyobb koncentráció összesen 0,5 V/V% alkoholtartalom növekedést eredményezett.

Ezután azt vizsgáltam meg, hogy növelhető-e az élesztő hatékonysága, ha többszörösen végzem tápanyag kiegészítést. Három mintát vizsgáltam, az elsőnél csak a beoltás során tettem tápsót a mintához, a másodiknál az erjedés 24. órájában is történt tápanyag kiegészítés, a harmadiknál pedig a 24. és a 48. órában is adagoltam tápsót. Azt az eredményt kaptam, hogy nincs szignifikáns különbség a minták alkoholtartalmát illetően a vizsgálat idejének a végén.

Az utolsó kísérletben azt szeretnénk volna elérni, ha az erjesztés a laboratóriumi mérethez képest egy nagyobb léptéknövelt szinten is optimális lenne. Ehhez egy jól szabályozható 2 literes fermentor-rendszerben vizsgáltuk az erjedést, ez a rendszer már hasonlít az iparban is alkalmazott fermentorokhoz. Az általam végzett mérések elsődlegesen arra vonatkoztak, hogy megtudjuk a beoltás után mennyi ideig a legcélszerűbb levegőztetést végeznünk, valamint hogyan szabályozzuk az erjesztés közbeni paramétereket. A vizsgálat végére sikerült optimálni az erjedés körülményeit léptéknövelt szinten is.

7 Irodalomjegyzék

- Bellaver, L. H. & Carvalho, N. M. B. & Abrahão-Neto, J. & Gombert, A. K., (2004). Ethanol formation and enzyme activities around glucose-6-phosphate in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 exposed to glucose or lactose excess. *FEMS Yeast Research*, [e-folyóirat] 4(7), pp. 691-698. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.01.004>
- Bilal, M., Ji, L., Xu, Y., Xu, S., Lin, Y., Iqbal, H. M. N., Cheng, H., (2022): Bioprospecting *Kluyveromyces marxianus* as a Robust Host for Industrial Biotechnology. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.851768>
- Chr. Hansen: Ha Lactase 5200 termékismertető. Letöltés dátuma: 2024. 11. 04. forrás: https://hjemmeriet.com/da/uploads/dokumenter/PI_GLOB_Ha-Lactase5200_450804_EN.pdf
- Chr. Hansen: NOLA Fit 5500 termékismertető. Letöltés dátuma: 2024. 11. 04. forrás: https://mtkiwebaruhaz.hu/users/default/mtki/imports/naverp/item_pdf/tnolafit5500.pdf
- Diniz, R. H. S., Rodrigues, M. Q. R. B., Fietto, L. G., Passos, F. M. L., & Silveira, W. B. (2014). Optimizing and validating the production of ethanol from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(2), 111–117.
- Domingues, L. & Dantas, M. M. & Lima, N. & Teixeira, J. A., (2000). Continuous ethanol fermentation of lactose by a recombinant flocculating *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Biotechnology and Bioengineering*, [e-folyóirat] 64(6), pp. 692-697. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19990920\)64:6<692::AID-BIT8>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19990920)64:6<692::AID-BIT8>3.0.CO;2-J)
- Hill, A. E., & Stewart, G. G. (2019). Free Amino Nitrogen in Brewing. *Fermentation* 2019, Vol. 5, Page 22, 5(1), 22.
- Hirsch, E. & Pataki, H. & Domján, J. & Farkas, A. & Vass, P. & Fehér, Cs. & Barta, Zs. & Nagy, Zs. K. & Marosi, Gy. J. & Csontos, I., 2019. Inline noninvasive Raman monitoring and feedback control of glucose concentration during ethanol fermentation. *Biotechnology Progress*, [e-folyóirat] 35(5), pp. 1-8. <https://doi.org/10.1002/btpr.2848>
- Koushki, M., Jafari, M., & Azizi, M. (2012). Comparison of ethanol production from cheese whey permeate by two yeast strains. *Journal of Food Science and Technology*, 49(5), 614–619.
- Laity, J. H., Lee, B. M., & Wright, P. E. (2001). Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Current Opinion in Structural Biology*, 11(1), 39–46.
- Lane, M. M., & Morrissey, J. P. (2010). *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal Biology Reviews*, 24(1–2), 17–26.

- Limtong, S. & Sringiew, C. & Yongmanitchai, W., 2007. Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresource Technology*, [e-folyóirat] 98(17), pp. 3367-3374. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.10.044>
- Madureira, A. R., Pereira, C. I., Gomes, A. M. P., Pintado, M. E., & Xavier Malcata, F. (2007). Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. *Food Research International* (Ottawa, Ont.), 40 (10), 1197.
- Modler, W. (2009). Pioneer paper: Value-added components derived from whey. *American Dairy Science Association*.
- Mohd Azhar, S. H., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Mohd Faik, A. A., & Rodrigues, K. F. (2017). Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10, 52–61.
- Mo, W., Wang, M., Zhan, R., Yu, Y., He, Y., & Lu, H. (2019). *Kluyveromyces marxianus* developing ethanol tolerance during adaptive evolution with significant improvements of multiple pathways. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 1–15.
- Nonklang, S. & Abdel-Banat, B. M. A. & Cha-aim, K. & Moonjai, N. & Hoshida, H. & Limtong, S. & Yamada, M. & Akada, R., 2008. High-Temperature Ethanol Fermentation and Transformation with Linear DNA in the Thermotolerant Yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042. *Applied and Environmental Microbiology*, [e-folyóirat] 74(24), pp. 7514–7521. <https://doi.org/10.1128/AEM.01854-08>
- Ohimain, E. I. (2016). Methanol contamination in traditionally fermented alcoholic beverages: the microbial dimension. *SpringerPlus*, 5(1), 1–10.
- Pescuma, M., de Valdez, G. F., & Mozzi, F. (2015). Whey-derived valuable products obtained by microbial fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(15), 6183–6196.
- Prazeres, A. R., Carvalho, F., & Rivas, J. (2012). Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management*, 110, 48–68.
- Raganati, F., Curth, S., Götz, P., Olivieri, G., & Marzocchella, A. (2012). Butanol Production from Lignocellulosic-based Hexoses and Pentoses by Fermentation of *Clostridium Acetobutylicum*. *Chemical Engineering Transaction*, 27, 91-96.
- Risner, D., Shayevitz, A., Haapala, K., Meunier-Goddik, L., & Hughes, P. (2018). Fermentation and distillation of cheese whey: Carbon dioxide-equivalent emissions and water use in the production of whey spirits and white whiskey. *Journal of Dairy Science*, 101(4), 2963–2973.

Risner D. (2018): *A Guide to the Fermentation and Distillation of Whey for Potable Spirit Production*. [PhD-értekezés] Oregon State University: Master of Science in Food Science and Technology

<https://www.researchgate.net/publication/385003993> Title *A Guide to the Fermentation and Distillation of Whey for Potable Spirit Production* Abstract Approved

Rosa, M. F. & Sá-Correia, I., (1992). Ethanol tolerance and activity of plasma membrane ATPase in *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, [e-folyóirat] 14(1), pp. 23-27. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(92\)90021-F](https://doi.org/10.1016/0141-0229(92)90021-F)

Schaan K. (2022): *Sweet Whey Fermentation: An Exploration of Optimizing the Alcohol Production of Kluyveromyces marxianus and Measuring the Nitrogen Content of Sweet Whey*. [PhD-értekezés] Oregon State University: Master of Science in Food Science and Technology https://ir.library.oregonstate.edu/concern/parent/2n49t8918/file_sets/ff365d46f

Souza, R. R. & Bergamasco, R. & Costa, S. C. & Feng, X. & Faria, S. H. B. & Gimenes, M. L., 2010. Recovery and purification of lactose from whey. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, [e-folyóirat] 49(11), pp. 1137-1143. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2010.08.015>

SPĂLĂȚELU, C., (2012): BIOTECHNOLOGICAL VALORISATION OF WHEY.

Innovative Romanian Food Biotechnology,10(3), pp 1. Elérhető:

https://www.researchgate.net/publication/268386063_Biotechnological_valorisation_of_whey

Tillamook County Creamery Association (TCCA). (2022). Tillamook 2021 Stewardship Report. Retrieved May 18, 2022.

https://assets.ctfassets.net/j8tkpy1gjh5/1TcCzJCLiTZPBVdxQRs3wd/ae1956f06b3044264bc104c0901b6d8a/TCCA_Stew_Design_051222_Final.pdf

Tsermoula, P., Khakimov, B., Nielsen, J. H., & Engelsen, S. B. (2021). WHEY – The waste-stream that became more valuable than the food product. *Trends in Food Science & Technology*, 118, 230–241.

Udeh, H. O., Kgatla, T. E., & Jideani, A. I. O. (2014). Effect of Mineral Ion Addition on Yeast Performance during Very High Gravity Wort Fermentation. *International Journal of Biological, Veterinary, Agricultural and Food Engineering*, 8(11).

Williams, R. J. P. (2012). Zinc in evolution. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 111, 104–109.

Zhao, X. Q., & Bai, F. W. (2012). Zinc and yeast stress tolerance: Micronutrient plays a big role. *Journal of Biotechnology*, 158(4), 176–183.

Zhao, X. Q., Xue, C., Ge, X. M., Yuan, W. J., Wang, J. Y., & Bai, F. W. (2009). Impact of zinc supplementation on the improvement of ethanol tolerance and yield of selfflocculating yeast in continuous ethanol fermentation. *Journal of Biotechnology*, 139(1), 55–60.

8 Ábrák és táblázatok jegyzéke

8.1 Táblázatok jegyzéke

1. táblázat: A kutatás során használt fajélesztők	21
2. táblázat: Alkohol és szárazanyag-tartalom változás a <i>Saccharomyces</i> élesztővel végzett erjesztés során	27
3. táblázat: Alkohol és szárazanyag-tartalom változás a <i>Kluyveromyces</i> élesztővel végzett erjesztés során	28
4. táblázat: Laktóz hidrolízise különböző enzimadagolás esetén (Szénhidrát koncentrációk g/100ml egységben vannak megadva)	30
5. táblázat: Laktóz koncentráció hatása az enzimes hidrolízisre (Szénhidrát koncentrációk g/100ml egységben vannak megadva)	31
6. táblázat: Egyes fajélesztők glükóz és galaktóz hasznosítása	32
7. táblázat: Szárazanyag-, és alkoholtartalom változása különböző élesztőkkel végzett erjesztés során	33
8. táblázat: Egyes szénhidrátok mennyiségi változása a fermentáció során (Szénhidrát koncentrációk g/100ml egységben vannak megadva).....	34
9. táblázat: Az alkohol- és a szárazanyag-tartalom változása az erjesztés során.....	34
10. táblázat: Erjesztés során történő tápanyag kiegészítés hatásának a vizsgálata	35
11. táblázat: Szénhidrát-, alkohol- és szárazanyag-tartalom változása az erjesztés során.....	37

8.2 Ábrák jegyzéke

1. ábra: A laktóz hidrolízise glükózzá és galaktózzá (Prazares et al., 2012)	8
2. ábra: Szárított tejsavó termékek előállítási ár szerint (Schaan, 2022)	9
3. ábra: Különböző enzimkészítmények aktivitása a kémhatás függvényében (Chr. Hansen Ha-Lactase 5200 és NOLA Fit termékismertető)	29
4. ábra: B Braun Biostat B fermentor-rendszer	36

Köszönetnyilvánítás

Szeretném kinyilvánítani a köszönetemet a konzulens tanáromnak Dr. Kun Szilárd egyetemi docensnek, az áldozatos munkájáért, a rengeteg segítségéért, a tanácsaiért, a támogatásáért és a rám áldozott idejéért és, hogy készségesen válaszolt minden kérdésemre.

NYILATKOZAT

A szakdolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Nagy Boldizsár Péter
A Hallgató Neptun kódja: RYQO9G
A dolgozat címe: Alkohol előállítás lehetőségének vizsgálata tejsavóból
A megjelenés éve: 2024
A konzulens intézetének neve: Magyar Agrár- és Élettudományi egyetem
A konzulens tanszékének a neve: Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott szakdolgozat egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, és az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

Ha a fenti nyilatkozattal valótlan állítottam, tudomásul veszem, hogy a záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkor szellemi tulajdon-kezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem MATER Hallgatói Dolgozatok repozitóriumba. Tudomásul veszem, hogy a megvédett és

- nem titkosított dolgozat a védelmet követően
- titkosításra engedélyezett dolgozat a benyújtásától számított 5 év eltelté után nyilvánosan elérhető és kereshető lesz az Egyetem MATER Hallgatói Dolgozatok repozitóriumban.

Kelt: Szentendre, 2024. év November hó 04. nap



Hallgató aláírása

NYILATKOZAT

Nagy Boldizsár Péter (hallgató Neptun azonosítója: RYQ09G) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a szakdolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A szakdolgozatot a záróvizsgán történő védeésre javaslom / nem javaslom¹.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem^{*2}

Kelt: Budapest, 2024. év november hó 04. nap



Dr. Kun Szilárd
belső konzulens

¹ A megfelelő aláhúzendó.

² A megfelelő aláhúzendó.