

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

***KLUYVEROMYCES MARXIANUS ÉLESZTŐ TÖRZSEK FEJLESZTÉSE
BIOETANOL TERMELÉS CÉLJÁBÓL***

A jelölt neve: Varga - Erdei Éva

Témavezetők:

Prof. Dr. Pócsi István

Prof. Dr. Nagy János



DEBRECENI EGYETEM
Kerpely Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2011.

1. A doktori értekezés előzményei és célkitűzései

A fosszilis energiahordozók kimerülésével, a gazdasági szempontok és a környezetvédelem előtérbe kerülésével, egyre nagyobb szerepet kap életünkben a megújuló energiák felhasználása.

A bioetanol az egyik lehetséges megújuló energiaforrás, amely fokozott alkalmazásával csökkenthető a fosszilis energiaforrások felhasználásával előidézett környezetszennyezés. A mezőgazdasági termékek és melléktermékek hasznosítására alapozott termelés az utóbbi években érte el azt a technológiai színvonalat, ami révén a bioetanol a kőolajtermékek mellett gazdaságilag is reális alternatívává vált az energiapiacra.

A bioetanol előállítására alapanyagként szolgálhatnak keményítő- illetve cukortartalmú növények, például a kukorica vagy a cukornád, illetve fásszárú növények is, melyek jórészt cellulózt tartalmaznak. A cellulóz alapú előállításhoz nem csupán termesztett növényeket használhatnak, hanem nagyon fontos szerep hárul a mezőgazdasági hulladékokra (szőlővenyige, kukoricaszár, gyümölcsfák nyesevédei, fakéreg, szalma, faipari hulladékok) is. Ezek felhasználásakor maga az alapanyag előállítása nem jelent plusz ráfordítást illetve környezeti terhelést. Mindezek mellett a megfelelő technológia alkalmazása elengedhetetlen ahhoz, hogy minél kevesebb energia ráfordítással minél több etanolt tudjanak előállítani.

A bioetanolt gyártó országok között vezető szerepet tölt be az Amerikai Egyesült Államok és Brazília, ahol elsősorban kukoricából illetve cukornádból állítják elő a bioetanol. Az Amerikai Egyesült Államokhoz hasonlóan Magyarországon is kukoricát dolgoznak föl erre a célra. A kész bioetanolt vagy bioüzemanyagként lehet hasznosítani, vagy éter és izobutilén hozzáadásával etil-tercier-butiléter (ETBE) állítható elő, amelyet oktánszámnövelőként használnak.

A bioetanol előállításakor technológiailag kedvezőbb, illetve gazdaságosabb, ha termotoleráns mikroorganizmusok alkalmazásával, magasabb hőmérsékleten folyik az etanoltermelés. Ennek egyik formája az alapanyag enzimes emésztését és a mikroorganizmussal történő fermentálást összevonó ún. SSF (egyidejű szacharifikáció és fermentáció; simultaneous saccharification and fermentation) technológia. Az alapanyagként felhasznált kukoricaszemek kb. 60 %-a keményítő, amely hidrolíziséhez használt amiláz és glükóamiláz enzimek optimális működési hőmérséklete kb. 60 °C, viszont a fermentációt végző élesztőké kb. 30 °C. A termelés gazdaságosabb, ha az enzimes kezelés után nem kell a rendszert az élesztőgombák miatt nagymértékben lehűteni, hanem egy termotoleráns

fermentáló törzs alkalmazásával, viszonylag magas hőmérsékleten (50-55 °C) egybevonható a két lépés.

A termotoleráns élesztők között kiemelkedő a *Kluyveromyces marxianus* hőtűrése. A *K. marxianus* törzsek biotechnológiai jelentősége a jövőben nőni fog széles szubsztrátspektrumuknak, hőtoleranciájuknak, valamint nagy növekedési rátájuknak köszönhetően (Singh *et al.*, 1998b). Ezen törzsek jó etanol termelőnek bizonyultak SSF (simultaneous saccharification and fermentation - egyidejű szacharifikáció és fermentáció) és immobilizációs kísérletekben is, mely a jövőbeni ipari felhasználásukra nézve biztató (Love *et al.*, 1998). Irodalmi adatok alapján a *K. marxianus* törzsek hőtűrése még tovább fokozható, azaz elképzelhető, hogy még inkább meg lehetne közelíteni a keményítő hidrolízését végző enzimek optimális működési hőmérsékletét (Fonseca *et al.*, 2008).

A PhD projektem célja termotoleráns *K. marxianus* élesztőtörzsek fejlesztése volt a gazdaságosabb bioetanol termelés érdekében. Irodalmi adatok szerint az egyik legjobb hőtűrésű törzs a *K. marxianus* IMB3 (Banat és Marchant, 1995), amely képes 52 °C-on növekedni és 50 °C-on etanolt termelni. Eredetileg mi is ezzel a törzzsel szerettünk volna dolgozni, de ezt már az iparban használják (Singh *et al.*, 1998a), így csak a vele dolgozó kutatócsoport számára hozzáférhető. Ezért mi az NCYC (National Collection of Yeast Cultures) törzsgyűjtemény ajánlására a CBS712 törzset használtuk fel a kutatómunkánkhoz. Ennek a törzsnek az előnyei közé tartozik, hogy genomjának 20 %-át már megszekvenálták (Llorente *et al.*, 2000) és termotoleranciája is figyelemre méltó.

Kutatómunkám során az alábbi célokat tűztem ki és valósítottam meg:

- A *K. marxianus* CBS712 törzs fermentációs paramétereinek (pH, az inokulum mennyisége, oxigénigény, kiindulási glükóz koncentrációja) optimalizálása.
- A törzs hőtűrésének és általános stressz tűrésének vizsgálata illetve növelése.
- Egy jobb hőtűrésű mutáns izolálása a szülői törzs fokozatosan növelt hőmérsékleten történő tenyésztésével.
- A mutáns taxonómiai és morfológiai vizsgálata.
- A szülői és a mutáns törzs széleskörű összehasonlítása, valamint az ipari szempontból fontos kitermelési százalékok megállapítása.

2. A kutatás módszerei

2.1. *K. marxianus* CBS712 (NCYC 2791) és E1 mutáns törzsek tenyésztése és fenntartása

A *K. marxianus* CBS712 törzset az NCYC (National Collection of Yeast Culture) törzsgyűjteményből vásároltuk. A *K. marxianus* E1 mutánst mi állítottuk elő a CBS712 törzsből. A törzseket YPD és YM tápagaron 30 °C-on tenyésztjük a napi gyakorlati munka céljára.

Az YPD táptalaj összetétele:

- 1 % élesztő kivonat (BBL™),
- 2 % pepton (Difco),
- 2 % glükóz,
- 2 % agar.

Az YM táptalaj összetétele:

- 0,3 % élesztő kivonat (BBL™),
- 0,3 % maláta kivonat,
- 0,5 % pepton (Difco),
- 1 % glükóz,
- 2% agar.

Az YPD és az YM táptalajok pH-ja egyaránt 5,5. A törzset a törzsgyűjteményben 20 % glicerinnel kiegészített YM tápoldatban - 70°C-on tároljuk.

2.2. A termotoleráns *K. marxianus* E1 mutáns létrehozása és identifikálása

A *K. marxianus* CBS712 törzs egyedi telepeit YPD agar táptalajról oltottuk le 5 ml YPD tápoldatba és 48 °C-on 3 Hz rázási frekvenciával inkubáltuk 2 napig. A tenyészeteket, amelyek növekedést mutattak átoltottuk friss YPD tápoldatba és ugyanilyen körülmények (48 °C, 3 Hz) között inkubáltuk szintén 2 napig. Ezt az átoltást megismételtük egymás után 10 alkalommal, majd a legjobban növekvő tenyészetet kiszélesztettük YPD agarra. Ebből egy egyedi telepet (E1) választottunk ki a további vizsgálatokra.

Az E1 mutáns taxonómiai identifikációját Barnett és munkatársai (1990) kritériumai és módszerei alapján vizsgáltuk és erősítettük meg.

2.3. A termotoleráns fenotípus stabilitásának vizsgálata

A *K. marxianus* E1 mutánst YPD tápoldatban tenyésztettük nem szelektív körülmények között (30 °C, 3 Hz) 2 napig, aztán a tenyészetet friss YPD tápoldatba oltottuk és inkubáltuk ugyanezen körülmények (30 °C, 3 Hz, 2 nap) között. Mindezt tízszer megismételtük és ezután teszteltük a növekedését 48 °C-on. Az E1 mutáns képes volt 48 °C-on újra növekedni, azaz megtartotta termotoleráns fenotípusát.

2.4. *K. marxianus* CBS712 és az E1 mutáns törzsek növekedésének vizsgálata

A növekedési vizsgálatokat YPD tápoldatban végeztük, melynek az összetétele és pH-ja megegyezett a YPD táptalajával az agar kivételével. Ezen kívül MYFM tápoldatban (Hack és Marchant, 1998b) - kiegészítve a megfelelő mennyiségű glükózzal - is elvégeztük a növekedési vizsgálatokat.

Az MYFM tápoldat összetétele:

- 3 g l⁻¹ élesztő kivonat (BBLTM),
- 2 g l⁻¹ pepton (Difco),
- 2 g l⁻¹ KH₂PO₄,
- 2 g l⁻¹ (NH₄)₂SO₄,
- 1 g l⁻¹ MgSO₄* 7H₂O,
- 1 g l⁻¹ MgSO₄* H₂O.

Az előtenyészethez 1 telepet YPD vagy MYFM tápoldatba inokuláltunk (100 ml-es lombik 10 ml táptalajt tartalmazott). Az inkubálás körülményei: 30 °C, 24 óra, 3 Hz. A törzs növekedését az optikai denzitás fotometriás mérésével követtük. Az előtenyészet optikai denzitásának meghatározása után (600 nm-en: OD₆₀₀: 2,1.) a főtenyészethez 100 ml YPD vagy MYFM tápoldatot OD₆₀₀: 0,1 optikai denzitásnak megfelelő sejtmennyiséggel inokuláltunk; a főtenyészetet 250 ml-es lombikban ráztuk. A növekedés vizsgálata 30, 35, 40, 45, 46, 47 és 48 °C-on történt.

2.5. Az etanol termelés vizsgálata, optimalizációja és mérése

A *K. marxianus* CBS 712 és E1 törzseket 100 ml MYFM tápoldatot tartalmazó 250 ml-es lombikban inkubáltuk 3 Hz-en. A kiindulási glükóz koncentrációk 0,51, 0,71, 0,91, 1,11,

1,30 és 1,51 mol l⁻¹ voltak. Mindegyik kiindulási glükóz koncentrációnál egyenként megvizsgáltuk az etanol termelést 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 és 48 °C-on a tenyésztés 16., 24. és 38. órájában.

Az etanol mennyiséget HP 5890 series II típusú gázkromatográfval mértük le, amely automata mintavevővel volt ellátva. Az injektálást 225 °C-on végeztük. A mérés 35 °C-on HP-5-ös kapilláris oszlopon történt (30 m*0,32 mm, 0,25 µm) nitrogén gáz, mint vivőgáz használatával (1 ml min⁻¹). A belső standard 0,166 mol l⁻¹ izopropanol volt. A kalibrációs görbét 0,09-0,86 mol l⁻¹ etanolt használva készítettük el, amely tartományban lineáris volt a változás, $r = 0,9997$. A mérést Dr. Gyémánt Gyöngyi egyetemi adjunktus (Szervetlen- és Analitikai Kémia Tanszék) segítségével végeztük el.

2.6. A glükóz mérése vékonyréteg kromatográfia segítségével

Az 5 µl mintát (fermentlevet) HPTCL szilika gél 60 (20x20cm) lemezen az alábbi közegben futtattuk meg: 30 ml diklórmétán, 25 ml metanol, 6 ml víz. Az előhívást 10 %-os kénsavas abszolút etanollal végeztük el. Száradás után hőlégenderilizátorban volt a lemez 120 °C-on 5 percig. Fényképezés után a kiértékelés Dr. Lázár István egyetemi docens (Szervetlen- és Analitikai Kémia Tanszék) által kifejlesztett CPAtlas 1.0 program segítségével történt (<http://sites.google.com/site/lazaristvan99/>). A kalibrációs görbét 0,03-0,3 mol l⁻¹ glükóz felhasználásával készítettük el, ahol lineáris volt a változás, $r = 0,9998$.

2.7. Konverziós ráta számítása

A konverziós ráta értékeket az alábbi képlet alapján számoltuk ki: $[(A/(B-C))/2]*100$, ahol A a termelt etanol mennyisége (mol l⁻¹), B a kezdeti glükóz koncentráció (mol l⁻¹), C a maradék glükóz koncentráció (mol l⁻¹). A 2 mol l⁻¹ etanol (mol l⁻¹ glükóz)⁻¹ az elméleti maximális etanol kihozatal.

2.8. A sejtek GSH és GSSG tartalmának meghatározása

Az élesztősejteket a 2.4. fejezetben leírtak alapján tenyésztettük, majd 50 ml tenyészetet lecentrifugáltunk (4000 g, 10 perc, 4 °C). A sejteket 4 ml 5 % (v/v) – os 5'-szulfoszalicilsav oldatban tártuk föl (10 perc inkubálás 4 °C-on). A mintákat centrifugáltuk (10000 g, 10 perc,

4°C) és a felülúszót trietanol-aminnal való közömbösítés után használtuk föl a méréseinkhez (Emri *et al.*, 1997).

A sejtek oxidált glutation (GSSG) tartalmának a méréséhez az Anderson (1985) által kidolgozott „rate assay” eljárást használtuk. A reakcióelegy ebben az esetben az alábbi összetételű volt: 115 mmol l⁻¹ nátrium-foszfát puffer (pH: 7,5), 50 mmol l⁻¹ EDTA, 0,6 mmol l⁻¹ 5,5'-ditio-*bis*(2-nitrobenzoesav) (DTNB), 0,2 mmol l⁻¹ NADPH, 1,5 kU l⁻¹ GR (1 unit, az az enzim mennyiség, mely 1 perc alatt 1 μmol GSSG-t redukál), 10 % (v/v) minta. A DTNB redukálódását 412 nm-en spektrofotometriás módszerrel követtük nyomon. A minták GSH tartalmát előzetesen 2-vinilpiridines kezeléssel (185 mmol l⁻¹, 1 óra, pH 6,0-7,0) reagáltattuk el.

A GSH tartalom meghatározása szintén Anderson (1985) módszere alapján történt. Ebben az esetben a minták teljes glutation (GSH+GSSG) tartalmát mértük, a 2 vinilpiridines kezelés elhagyásával. Így a GSSG mennyiségének és a teljes glutation tartalom ismeretében meg tudtuk határozni a GSH tartalmat.

A mért GSH és GSSG értékeket a sejtek fehérje tartalmára vonatkoztattuk és nmol mg⁻¹ protein mértékegységben adtuk meg.

2.9. A sejtek trehalóz tartalmának meghatározása

A szülői és a mutáns törzsek egyedi telepeit külön-külön, összesen 6 - 6 lombikban MYFM táptalajban tenyésztettük 30 °C-on 3 Hz fordulatszám 8 órán át, a 2.4. fejezetben leírtaknak megfelelően. 8 óra eltelté után a szülői törzs egyedi telepeit tartalmazó 6 és a mutáns egyedi telepeit tartalmazó 6 lombikból 3 - 3 lombikot kiválasztottunk és áttettünk egy 47 °C-os rázógépbé. A 30 °C-on maradó 3 szülői és 3 mutáns törzset tartalmazó lombikot kontrolloknak neveztük el, míg a 47 °C-on levőket hőkezelt tenyészeteknek. Mintákat vettünk, mind a kontroll, mind a kezelt tenyészetekből 0, 30, 60, 90 és 180 perc eltelté után. A trehalózt 100 mg sejtéből (DCM) nyertük ki Ferreira és munkatársai (1997) módszerei alapján.

A sejteket üveggyöngy segítségével tártuk föl. A feltárt sejtekre 2 ml forrásban lévő abszolút etanolt tettünk és 2 perc várakozás után centrifugáltuk maximális fordulatszám (8000 g) 10 percig. A felülúszót átpipettáztuk Eppendorf csőbe és vártunk, amíg az etanol elpárolog a csőből. Az extraktumot vízben oldottuk föl és a trehalóz tartalmának a meghatározását nagy nyomású folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel végeztük el. A készülék (Hewlett-Packard 1090 II. folyadék kromatográf) dióda soros detektorral és automata mintavevővel volt ellátva. A mozgó fázis acetonitril és víz 60:40 arányú elegye volt;

a folyási ráta 1 ml perc^{-1} . A eluens abszorbanciáját $\lambda=190$ és 200 nm hullámhosszon detektáltuk ChemStation szoftver segítségével. A trehalóz identifikálásához és mennyiségi meghatározásához α,α -D-trehalóz-dihidrátot (Senn Chemicals) használtunk standardként. A mérések lineárisak voltak az $1\text{-}100 \text{ mg ml}^{-1}$ -es koncentrációtartományban, $r = 0,9997$. Ezen méréseket Dr. Gyémánt Gyöngyi egyetemi adjunktus (Szervetlen- és Analitikai Kémia Tanszék) segítségével végeztük el.

2.10. Etanol stressz, oxidatív stressz és ozmotikus stressz tolerancia vizsgálat

A *K. marxianus* CBS 712 és E1 törzsek előtenyésztéseit különböző hőmérsékleten tenyésztettük: 37 és $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. Ezen előtenyésztetek 3 ml -ével inokuláltuk a 250 ml -es lombikokat, amelyek $100 \text{ ml } 210 \text{ g l}^{-1}$ glükózt tartalmazó MYFM tápoldatot tartalmaztak. Ezen tápoldatban vizsgáltuk külön-külön az etanol ($0,65$, $1,09$ és $1,38 \text{ mol l}^{-1}$), a nátrium-klorid ($1,0$, $1,25$, $1,5$ és $2,0 \text{ mol l}^{-1}$), a kálium-klorid ($1,0$, $1,25$, $1,5$ és $2,0 \text{ mol l}^{-1}$) és a hidrogén-peroxid (5 , $7,5$ és 10 mmol l^{-1}) toleranciát. Az inkubálás körülményei 3 Hz , 24 óra , $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ voltak. A növekedést az optikai denzitás 600 nm -en (OD_{600}) mért változásával követtük nyomon.

2.11. Válaszfelület meghatározó módszer (response surface methodology - RSM)

A maximális etanol termeléshez szükséges tenyésztési hőmérsékletet, kiindulási glükóz koncentrációt és fermentációs időt RSM segítségével határoztuk meg mind a szülői, mind a mutáns törzs esetében. Ennek érdekében 8 különböző hőmérsékleten (35 , 37 , 39 , 41 , 43 , 45 , 47 és $48 \text{ }^{\circ}\text{C}$) és 6 ($0,51$, $0,71$, $0,91$, $1,11$, $1,30$ és $1,51 \text{ mol l}^{-1}$) kiindulási glükóz koncentráció mellett megmértük a termelt etanol mennyiségét a tenyésztés $12.$, $24.$ és $38.$ órájában.

A mért etanol koncentrációkat (c_{etanol} ; mol l^{-1}) a $\log(c_{\text{etanol}}+0,1)$ függvénnyel transzformáltuk. A transzformált adatokra másodfokú lokális polinomiális regresszióval (second order local polynomial regression; LOESS), az R 2.12.1 statisztikai programcsomag (<http://www.R-project.org>) segítségével illesztettünk egy függvényt. Az illesztésnél a $c_{\text{etanol}} + 0,1$ értékekkel súlyoztunk és $7 \text{ }^{\circ}\text{C}$ felelt meg 1 mol l^{-1} glükóz koncentrációváltozásnak. Az illesztett függvény értékeinek visszatranszformálásával kapott függvényt tekintettük válaszfelületnek, ennek a maximumát kerestük.

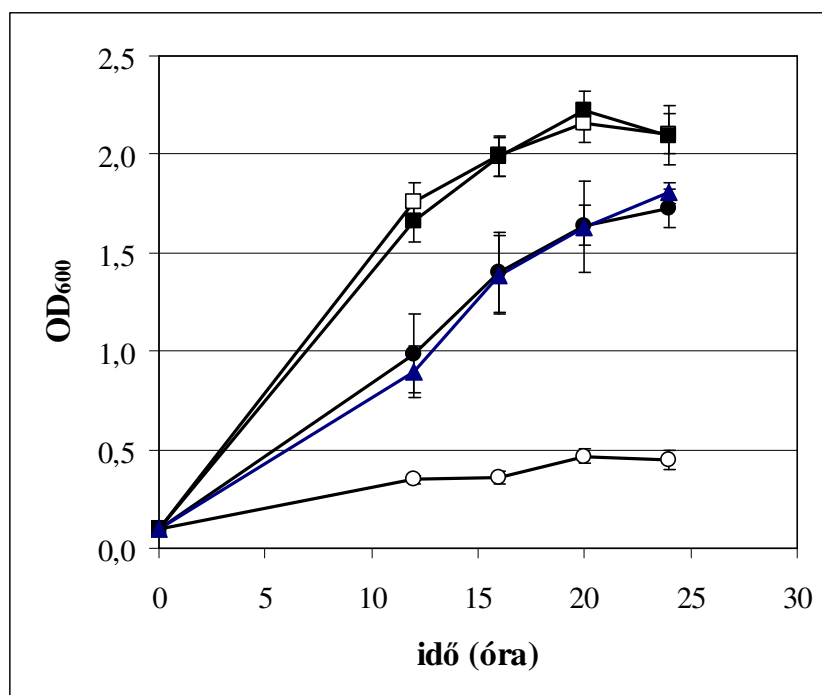
A két törzs etanol termelése közötti maximális különbséghez tartozó tenyésztési hőmérsékletet, kezdeti glükóz koncentrációt és tenyésztési időt a két válaszfelület különbségéből határoztuk meg.

A válaszfelület meghatározó módszert (RSM) Dr. Antal Károly főiskolai docens (Eszerházy Károly Főiskola, Zoológiai Tanszék) segítségével alkalmaztuk.

3. Eredmények összefoglalása

3.1. A *Kluyveromyces marxianus* termotoleráns E1 mutáns létrehozása és identifikálása

Létrehoztam a *K. marxianus* termotoleráns E1 mutáns törzset egyre növekvő hőmérsékleten történő átoltással. A mutáns 48 °C-on való növekedése figyelemre méltó és ezt a tulajdonságát többszöri, alacsony hőmérsékleten végrehajtott passzálás után is megtartotta. A mutáns morfológiai vizsgálatok kiderült, hogy különbözik a szülői CBS712 törzstől. Mind alacsonyabb (37 °C), mind pedig magasabb (47 °C) hőmérsékleten a mutáns kerekebb formájú és kisebb, mint a szülői törzs. Taxonómiai identifikációját Barnett és munkatársai (1990) kritériumai és módszerei alapján vizsgáltuk meg és megerősítettük, hogy *K. marxianus*.



1. ábra: A *Kluyveromyces marxianus* CBS712 szülői törzs (□, ○) és az E1 mutáns törzs (■, ●) növekedése 45 °C-on (□, ■) és 48 °C-on (○, ●), valamint az E1 törzs növekedése 48 °C-on 10-szeres 30 °C-on végrehajtott átoltás után (▲) MYFM tápoldatban. A növekedést az optikai denzitás 600 nm-en mért változásával határoztuk meg. Az ábra 6 független mérés átlagát és szórását tartalmazza.

3.2. A *K. marxianus* CBS712 szülői és E1 mutáns törzsek fermentációs paramétereinek az összevetése

A két törzs fermentációs paramétereinek az összehasonlítására, valamint az etanol termelés optimum pontjának meghatározására az RSM módszert választottuk, hiszen ezen analízis segítségével egyszerre több paraméter egyidejű optimalizálására nyílik lehetőség (Lee és Chen, 1997). A vizsgálat elvégzéséhez mind a szülői, mind az E1 mutánst egyre növekvő hőmérsékleten (35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 és 48 °C) teszteltük 0,51, 0,71, 0,91, 1,11, 1,30, 1,51 mol l⁻¹ kiindulási glükóz koncentrációt alkalmazva 3 Hz fordulatszámra. A fermentáció során mintákat vettünk a tenyésztés 12., 24. és a 38. órájában.

Meghatároztam az etanol termelés hatékonyságát jelző konverziós ráta értékeket is. Ezen érték számításához elengedhetetlen a maradék glükóz mennyiségének a megállapítása, melyet vékonyréteg kromatográfiával (VRK) határoztam meg.

A kísérletekből származó adatokra az R 2.12.1. statisztikai program segítségével egy 3 változós másodfokú polinomot illesztettünk. A kapott modell alapján a vizsgált tartományban a maximális etanol kihozatal a szülői törzs esetében 1,05 mol l⁻¹ etanol, ami 1,03 mol l⁻¹ kiindulási glükóz koncentrációnál 44,2 °C-on a fermentáció 30. órájában várható. Az E1 mutáns esetében ugyenezen érték 0,97 mol l⁻¹ etanol, ami 1,09 mol l⁻¹ kiindulási glükóz koncentrációnál 44,8 °C-on a fermentáció 31. órájában valószínűsíthető. A modell alapján a legnagyobb különbség a szülői és a mutáns törzs között 1,09 mol l⁻¹ kiindulási glükóz koncentrációnál 47,2 °C-on a fermentáció 35. órájában van. (2. ábra).

Ahhoz, hogy a gyakorlatban is megerősítsük ezen értékek helyességét, lemértük a termelt etanol, a maradék glükóz és a biomassza mennyiségét a modell által előrejelzett pontokon. Az eredményeket a 1. táblázatban foglaltam össze.

- Optimális körülmények között (1,06 mol l⁻¹ kiindulási glükóz koncentráció, 44 °C) az etanol termelés és a biomassza mennyisége hasonló a CBS712 (1,1±0,1 mol l⁻¹, 51±9 g l⁻¹) és az E1 mutáns törzs (1,0±0,1 mol l⁻¹, 42±9 g l⁻¹) esetében. Az etanol termelési értékek közel megegyeznek a modell alapján várt értékekkel: a CBS712 törzs esetében a várt érték 1,05 mol l⁻¹, az E1 mutáns esetében pedig 0,97 mol l⁻¹ volt.
- Megnövelt hőmérsékleten (47 °C, 1,09 mol l⁻¹ kiindulási glükóz koncentráció) az E1 termotoleráns mutáns által termelt etanol koncentrációja és biomassza mennyisége (0,6±0,1 mol l⁻¹, 42±8 g l⁻¹) jóval meghaladta a szülői törzsét (0,3±0,1 mol l⁻¹, 29±7 g l⁻¹) (1. táblázat)

	A termelt etanol mennyisége (mol l ⁻¹)		A maradék glükóz mennyisége (mol l ⁻¹)		A biomassa mennyisége (g l ⁻¹)		Konverziós ráta értékek (%)	
	Szülői törzs	E1 mutáns törzs	Szülői törzs	E1 mutáns törzs	Szülői törzs	E1 mutáns törzs	Szülői törzs	E1 mutáns törzs
Optimális körülmények	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,24 ± 0,04	0,26 ± 0,04	51 ± 9	42 ± 9	67 ± 6	63 ± 6
47 °C	0,3 ± 0,1 ^c	0,6 ± 0,1 ^{b,c}	0,54 ± 0,06 ^c	0,36 ± 0,04 ^{b,c}	29 ± 7 ^c	42 ± 8 ^b	27 ± 9 ^c	41 ± 7 ^{b,c}

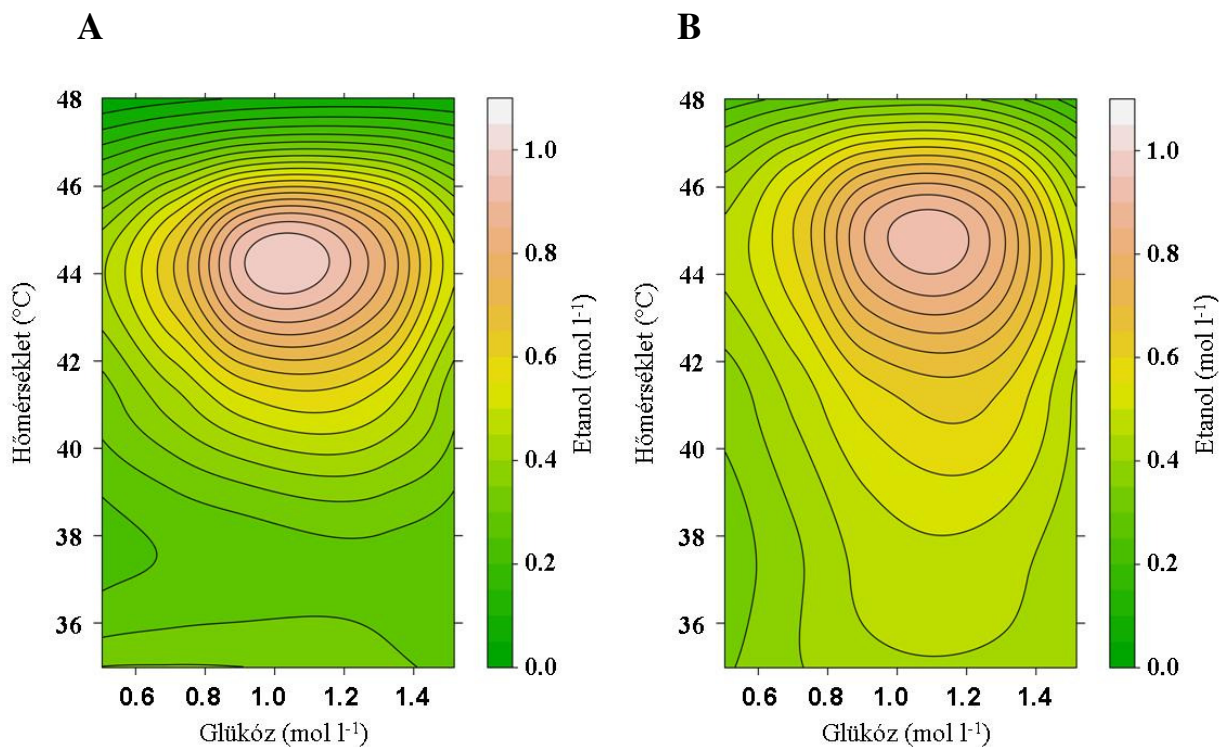
1. táblázat: A *Kluyveromyces marxianus* CBS712 szülői és E1 mutáns törzs etanol termelési adatainak összehasonlítása optimális körülmények és magas hőmérsékleten való tenyésztés között ^a.

^a – Az optimális etanol termelési értékek meghatározása 1,06 mol l⁻¹ kiindulási glükóz koncentrációnál és 44 °C-on történt. A termelési értékek legnagyobb különbségének a meghatározása 1,09 mol l⁻¹ kiindulási glükóz koncentrációnál és 47 °C-on végeztük el. A mintavételek és egyben az analízis időpontjai az inkubációs idő 30. órájában (optimális körülmények) és 35. órájában (magas hőmérsékleti körülmények) voltak.

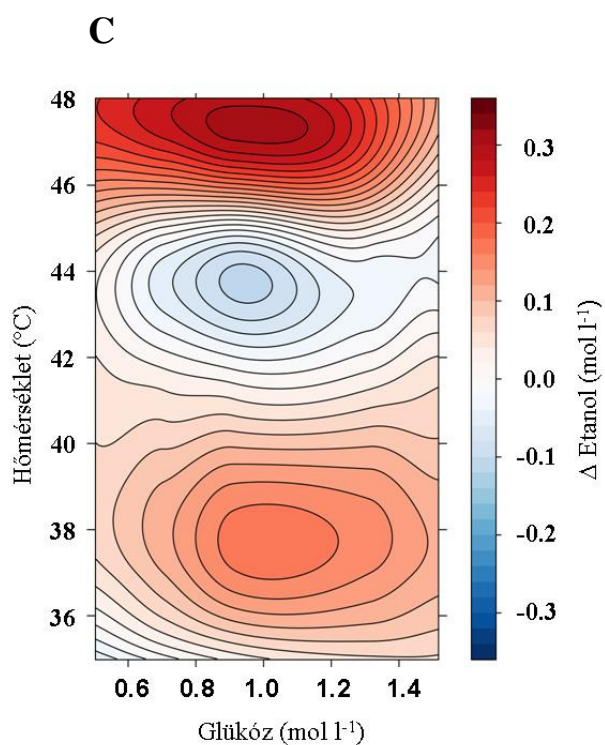
^b – Szignifikáns a különbség ($p < 0,05$) a szülői és a mutáns törzs között.

^c – Szignifikáns a különbség ($p < 0,05$) az optimális (44 °C) és a magas hőmérsékleten (47 °C) végrehajtott fermentáció között.

A táblázat 6-6 egymástól független kísérlet átlagát és szórását tartalmazza. A szignifikancia vizsgálatokhoz a Student-féle *t*-tesztet használtuk.



2. ábra: Az adatokra illesztett felületek.



A rész: Az etanol termelés a hőmérséklet és a kiindulási glükóz koncentráció függvényében a fermentációs idő 30. órájában a *K. marxianus* CBS712 törzs esetében.

B rész: Az etanol termelés a hőmérséklet és a kiindulási glükóz koncentráció függvényében a fermentációs idő 30. órájában a *K. marxianus* E1 termotoleráns mutáns törzs esetében.

C rész: A mutáns és a szülői törzs etanol termelési adatai közötti különbség a hőmérséklet és a kiindulási glükóz koncentráció függvényében.

A *K. marxianus* CBS712 és E1 mutáns törzs maximális etanol kihozatali értékei összevethetőek az iparban használt IMB3 és a Limtong és munkatársai (2007) által vizsgált DMKU3-1042 törzsével. Az IMB3 törzs 4,3 % (w/v) ($0,93 \text{ mol l}^{-1}$) etanolt állít elő melasz tartalmú tápoldatban 16 % (w/v) ($0,08 \text{ mol l}^{-1}$) kiindulási glükóz tartalomnál 45 °C-on (Banat *et al.*, 1992). A DMKU3-1042 törzs szintén 45 °C-on 4,93 % (w/v) ($1,07 \text{ mol l}^{-1}$) etanolt termel, ahol 8 % (w/v) ($0,04 \text{ mol l}^{-1}$) cukortartalmú cukornád szirupot használtak tápoldatként (Limtong *et al.*, 2007).

Mindemellett abban az esetben amikor az IMB3 törzs 14 % (w/v) ($0,77 \text{ mol l}^{-1}$) glükózon, mint szénforráson növekszik, az etanol kihozatali értéke eléri az 5,9 % (w/v) ($1,28 \text{ mol l}^{-1}$) értéket is 45 °C-on (Banat *et al.*, 1992). Ebben az esetben a konverziós ráta értéke 87 %, amely jelentősen nagyobb, mint amit a CBS712 (67 ± 6 %) és E1 mutáns törzs (63 ± 6 %) esetében értünk el 45 °C-on. Növelve a hőmérsékletet a CBS712 szülői és E1 mutáns törzs konverziós ráta értékei csökkennek, bár a mutáns 47 °C-on még 41 ± 7 % konverziós rátával állít elő etanolt.

3.3. A *K. marxianus* E1 mutáns fiziológiai vizsgálata

Elvégeztem a *K. marxianus* E1 mutáns fiziológiai vizsgálatát, annak érdekében, hogy megállapítsuk, milyen változások állnak a törzs termotoleranciájának a hátterében. Először megvizsgáltam a szülői és a mutáns törzs redukált glutation (GSH) és az oxidált glutation (GSSG) tartalmát, de a két törzs között ebben a tekintetben nem volt szignifikáns az eltérés.

Végül megállapítottuk, hogy a sejtek megnövekedett trehalóz koncentrációja állhat a fokozott hőtűrése hátterében (2. táblázat).

Inkubációs idő (perc)	Trehalóz tartalom {mg (g száraztömeg) ⁻¹ }			
	30 °C		47 °C	
	Szülői törzs	E1 mutáns törzs	Szülői törzs	E1 mutáns törzs
0	12 ± 2	30 ± 3 ^a	11 ± 2	30 ± 2 ^a
30	11 ± 2	34 ± 2 ^a	9 ± 2	31 ± 2 ^a
60	9 ± 2	30 ± 2 ^a	11 ± 1	35 ± 3 ^{a,b}
90	9 ± 2	32 ± 3 ^a	37 ± 3 ^b	57 ± 2 ^{a,b}
180	14 ± 3	28 ± 2 ^a	35 ± 2 ^b	59 ± 2 ^{a,b}

2. táblázat: A hőstressz hatása a *Kluyveromyces marxianus* CBS712 szülői és E1 mutáns törzs trehalóz tartalmára.

^a - Szignifikáns a különbség ($p < 0,05$) a szülői és a mutáns törzs trehalóz tartalma között.

^b - Szignifikáns ($p < 0,05$) a trehalóz tartalom növekedése a 0 órás adatokkal összehasonlítva.

A táblázat három egymástól független kísérlet átlagát és szórását tartalmazza. A szignifikancia vizsgálatokhoz a Student-féle *t*-tesztet használtuk.

Érdekes módon Nwaka és munkatársai (1994) nem találtak szoros kapcsolatot a trehalóz akkumuláció és a megnövekedett termotolerancia között *S. cerevisiae*-ben. Munkájukban arra utalnak, hogy a megnövekedett trehalóz szintézis csak az első gyors válasz a hőstresszre és a hősokkproteinek a felhalmozódása szükséges a hosszabb ideig tartó hő elleni védelemre. Mi is megvizsgáltuk a hősokkproteineket SDS-poliakrilamid gélelektroforézis segítségével és a gélképen nem találtunk különbséget a CBS712 és az E1 mutáns törzs hősokk fehérjéinek sávintenzitása között.

Meglepő módon ezt a termotoleranciát megnövekedett etanol, ozmotikus és oxidatív stressz érzékenység kísérte (3. táblázat).

		OD ₆₀₀ (%)	
		37 °C inokulum	45 °C inokulum
<i>K. marxianus</i> CBS712	1 mol l ⁻¹ KCl	87 ± 7	90 ± 1
	1,25 mol l ⁻¹ KCl	77 ± 7	84 ± 2
	1,5 mol l ⁻¹ KCl	76 ± 6	71 ± 8
	2 mol l ⁻¹ KCl	22 ± 5	20 ± 4
<i>K. marxianus</i> E1	1 mol l ⁻¹ KCl	85 ± 8	95 ± 2
	1,25 mol l ⁻¹ KCl	77 ± 9	90 ± 1
	1,5 mol l ⁻¹ KCl	72 ± 9	48 ± 7
	2 mol l ⁻¹ KCl	15 ± 5	15 ± 1
<i>K. marxianus</i> CBS712	1 mol l ⁻¹ NaCl	83 ± 7	92 ± 2
	1,25 mol l ⁻¹ NaCl	68 ± 7	76 ± 4
	1,5 mol l ⁻¹ NaCl	44 ± 6	22 ± 3
	2 mol l ⁻¹ NaCl	14 ± 1	10 ± 1
<i>K. marxianus</i> E1	1 mol l ⁻¹ NaCl	83 ± 3	81 ± 2
	1,25 mol l ⁻¹ NaCl	38 ± 3	23 ± 3
	1,5 mol l ⁻¹ NaCl	18 ± 4	13 ± 3
	2 mol l ⁻¹ NaCl	14 ± 3	11 ± 1
<i>K. marxianus</i> CBS712	5 mmol l ⁻¹ H ₂ O ₂	81 ± 3	72 ± 12
	7,5 mmol l ⁻¹ H ₂ O ₂	19 ± 2	10 ± 1
	10 mmol l ⁻¹ H ₂ O ₂	13 ± 1	11 ± 1
<i>K. marxianus</i> E1	5 mmol l ⁻¹ H ₂ O ₂	81 ± 5	14 ± 3
	7,5 mmol l ⁻¹ H ₂ O ₂	19 ± 1	11 ± 1
	10 mmol l ⁻¹ H ₂ O ₂	14 ± 2	10 ± 1
<i>K. marxianus</i> CBS712	0,65 mol l ⁻¹ EtOH	87 ± 4	97 ± 3
	1,09 mol l ⁻¹ EtOH	19 ± 2	22 ± 6
	1,38 mol l ⁻¹ EtOH	10 ± 1	10 ± 1
<i>K. marxianus</i> E1	0,65 mol l ⁻¹ EtOH	41 ± 4	61 ± 6
	1,09 mol l ⁻¹ EtOH	16 ± 1	13 ± 3
	1,38 mol l ⁻¹ EtOH	11 ± 1	10 ± 1

3. táblázat: A *Kluyveromyces marxianus* CBS712 szülői és E1 termotoleráns mutáns törzsek stressztolerancia vizsgálata. A növekedést az optikai denzitás 600 nm-en mért értékével jellemeztük és a kapott adatokat a stresszmentes kulturák növekedéséhez, mint 100 %-hoz viszonyítottuk.

A táblázat három egymástól független kísérlet átlagát és szórását tartalmazza.

Számos kutató tapasztalta, hogy a megnövekedett trehalóz koncentráció csökkentette bizonyos stressz válaszokban fontos enzimek működését. Sampetro és Uribe (2004) azt tapasztalta a *K. lactis* vizsgálata közben, hogy a megnövekedett koncentrációban jelenlévő trehalóz a sejtek viszkozitásának a növekedéséhez vezet. Ez az állapot védelmet nyújt a fehérjéknek a hőstressz ellen, ellenben ha a hőmérséklet csökken és ez a megnőtt viszkozitás megmarad a sejtekben a nagy trehalóz koncentráció miatt, akkor ez az állapot nagymértékben gátolja és károsítja a fehérjék működését. Következésképpen ha a stresszhatásnak vége, és ezt nem kíséri a trehalóz gyors hidrolízise, akkor számos létfontosságú enzim károsodhat.

Ezen eredmények is azt támasztják alá, hogy a stresszhatás elmúltával a sejtek tartósan megnövekedett trehalóz szintje számos enzimet inaktivál. Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy az E1 mutáns folyamatosan megnövekedett trehalóz tartalma magyarázza a tapasztalt NaCl, KCl, H₂O₂ és etanol érzékenységet.

4. Új tudományos eredmények

- Munkám során előállítottam a termotoleráns *K. marxianus* E1 mutáns törzset, majd átfogó jellemzést végeztem el a *K. marxianus* CBS712 szülői és E1 mutáns törzsek etanol termelési paramétereit illetően.
- Analizáltam a válaszfelület meghatározó módszer (RSM) segítségével a szülői és az E1 mutáns törzs optimális etanol fermentációs paramétereit. Meghatároztam az optimális kiindulási glükóz koncentrációt, a fermentáció hosszát és az etanol termelés gazdaságosságát jelző konverziós ráta értékeket. Feltérképeztem, hogy a hőmérséklet növelése valamint a különböző kiindulási glükóz koncentráció miképpen befolyásolja az etanol termelő képességet.
- Az eredményekből és ezek irodalmi adatokkal történő összehasonlításából kitűnik, hogy a *K. marxianus* E1 mutáns jövőbeni alkalmazásával valószínűleg gazdaságosabbá tehető az iparban a bioetanol előállítására használt SSF technológia, bár ennek megerősítésére még további vizsgálatokat kell végrehajtani.
- Elvégeztem a *K. marxianus* E1 mutáns fiziológiai vizsgálatát, annak érdekében, hogy megkeressem az okát a törzs megnövekedett termotoleranciájának. Megvizsgáltam a szülői és a mutáns törzsek redukált (GSH) és oxidált (GSSG) glutation tartalmát, valamint a hősokkproteinek mennyiségét, de ebben a tekintetben nem találtam különbséget a két törzs között. Végül megállapítottam, hogy a mutáns sejtek megnövekedett trehalóz koncentrációja állhat a törzs fokozott hőtűrése hátterében. Meglepő módon a termotolerancia növekedését az etanol, ozmotikus és oxidatív stressz érzékenység fokozódása kísérte.

5. Az eredmények gyakorlati hasznosíthatósága

Munkám során létrehoztam a termotoleráns *Kluyveromyces marxianus* E1 mutáns törzset, amely 48 °C-on képes növekedni, etanolt termelni és az optimális etanol termelése bár alacsonyabb hőmérsékleten van, az iparban való alkalmazás szempontjából ez a megnövekedett hőtűrés értékes tulajdonság.

A *K. marxianus* CBS712 szülői és az E1 mutáns törzsek fermentációs paramétereinek átfogó jellemzésekor meghatároztam többek között az optimális kiindulási glükóz koncentrációt, a fermentációs időt, az etanol termelő képességet, a konverziós rátákat és a törzsek növekedésének felső hőmérsékleti határát. A legnagyobb termelt etanol koncentráció a szülői törzs esetében 1,1 mol l⁻¹, a mutáns esetében pedig 1,0 mol l⁻¹ volt (1. táblázat), ami összevethető az iparban alkalmazott IMB3 törzs által termelt 5,5-7,2 % (w/v) (1,19-1,56 mol l⁻¹) értékkel (Singh *et al.*, 1998a; Banat *et al.*, 1992).

Megállapítható, hogy a célunkat, a termotoleráns *K. marxianus* mutáns törzs előállítását és jellemzését, elvégeztük. Feltételezhető, hogy az E1 törzs alkalmazásával a bioetanol előállítására használt SSF technológia a jövőben gazdaságosabbá tehető. Mindezek igazolása további feladataink között szerepel. A továbbiakban szeretnénk tesztelni az E1 mutáns bioetanol termelő képességét különféle laboratóriumi és, lehetőség szerint, ipari fermentációs rendszerekben. Ezen kísérletekben kukorica keményítőt szeretnénk alapanyagként felhasználni.

Az E1 mutáns termotoleranciájának okát keresve megállapítottuk, hogy a folyamatosan magas intracelluláris trehalóz szint okozza a mutáns fokozott hőtűrését. Mindemellett megvizsgáltuk a szülői és a mutáns törzsek redukált (GSH) és oxidált (GSSG) glutation tartalmát is, de nem találtunk különbséget ebben a tekintetben a két törzs között. Meglepő módon a hőtűrés növekedését az etanol, ozmotikus és oxidatív stressz érzékenység fokozódása kísérte.

Ezen eredmények alapján úgy tűnik, hogy sem a trehalóz, sem a glutation metabolizmus átalakítása nem célravezető stratégia egy megnövekedett stressztoleranciával rendelkező *K. marxianus* törzs létrehozásakor. A *K. marxianus* E1 mutáns továbbfejlesztése érdekében szabályozhatjuk bizonyos környezeti stressz válaszokért felelős gének expresszióját vagy megnövelhetjük bizonyos hősokkproteinek termelődését, továbbá megkísérelhetjük az ubiquitin fehérje túltermelését is egy erős promoter felhasználásával a *K.*

marxianus E1 törzsben. Az ubiquitin egy olyan kis móltömegű (8,5 kDa) fehérje, melynek fontos szerepe van a fehérjék lebontásában, a sejtciklus szabályozásában és a környezeti stressz válaszokban. A *S. cerevisiae* esetében az ubiquitin túltermeltetésével sikerült megnövelni az etanol és az ozmotikus stressz tűrést (Hiraishi *et al.*, 2006; Arnason és Ellison, 2004). Mivel az SSF technológiában az élesztő szélsőséges és változó hő-, ozmotikus- és pH viszonyoknak van kitéve, az általános stressz-tolerancia jövőbeni növelése a mutáns értékes tulajdonsága lehet.

6. Publikációk az értekezés témakörében

Anderson, M.E.: 1985. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods in Enzymology*. 113: 548–555.

Arnason, T. – Ellison, J.M.: 2004. Stress Resistance in *Saccharomyces cerevisiae* Is Strongly Correlated with Assembly of a Novel Type of Multiubiquitin Chain. *Molecular and Cellular Biology*. 14. 12: 7876-7883.

Banat, I.M. – Nigam, P. – Marchant, R.: 1992. Isolation of thermotolerant, fermentative yeasts growing at 52°C and producing ethanol at 45 °C and 50 °C. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 8: 259-263.

Banat, I.M. – Marchant, R.: 1995. Characterisation and potential industrial applications of five novel thermotolerant fermentative yeast strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 11: 304-306.

Barnett, J.A. – Payne, R.W. – Yarrow, D.: 1990. Yeast characteristics and identification. Cambridge. Cambridge University Press. 145.

Emri, T. – Pócsi, I. – Szentirmai, A.: 1997. Glutathione metabolism and protection against oxidative stress caused by peroxides in *Penicillium chrysogenum*. *Free Radical Biology and Medicine*. 23: 809-814.

Ferreira, J.C. – Paschodin, Vpnia M.F. – Panek, A.D. – Trugo, L.C.: 1997. Comparison of three different methods for trehalose determination in yeast extracts. *Food Chemistry*. 60: 251-254.

Fonseca, G.G. – Heinzle, E. – Wittmann, C. – Gombert, A. K.: 2008. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 79: 339–354.

Hack, C.J. – Marchant, R.: 1998b. Characterisation of a novel thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*: development of an ethanol fermentation process. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 20: 323-327.

Hiraishi, H. – Mochizuki, M. – Takagi, H.: 2006. Enhancement of stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of ubiquitin ligase Rsp 5 and ubiquitin conjugating enzymes. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 70. 11: 2762-2765.

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*. 98: 3367-3374.

Llorente, B. – Malpertuy, A. – Blandin, G. – Artiguenave, F. – Wincker, P. – Dujon, B.: 2000. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 12. *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*. *FEBS Letters*. 487: 71–75.

Love, G. – Gough, S. – Brady, D. – Barron, N. – Nigam, P. – Singh, D. – Marchant, R. – McHale, A.P.: 1998. Continuous ethanol fermentation at 45°C using *Kluyveromyces marxianus* IMB3 immobilized in Calcium alginate and kissiris. *Bioprocess Engineering*. 18: 187-189.

Nwaka, S. – Kopp, M. – Burgert, M. – Deuchler, I. – Kienle, I. – Holzer, H.: 1994. Is thermotolerance of yeast dependent on trehalose accumulation? *FEBS Letters*. 344: 225-228.

Sampedro, J.G. – Uribe, S.: 2004. Trehalose-enzyme interactions result in structure stabilization and activity inhibition. The role of viscosity. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 256/257: 319–32.

Singh, D. – Banat, I.M. – Nigam, P. – Marchant, R.: 1998a. Industrial scale ethanol production using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* IMB3 in an Indian distillery. *Biotechnology Letters*. 20: 753-755.

Singh, D. – Nigam, P. – Banat, I.M. – Marchant, R. – McHale, A.P.: 1998b. Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part II – Use of

Kluyveromyces marxianus IMB3. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 14: 823-834.

7. Az értekezés témájában született publikációk

Tudományos közlemény idegen nyelvű, nemzetközi folyóiratban:

Erdei, É.-Molnár, M.-Gyémánt, Gy.-Antal, K.-Emri, T.-Pócsi, I.-Nagy, J.: 2011. Trehalose overproduction affects the stress tolerance of *Kluyveromyces marxianus* ambiguously. *Bioresour. Technol.* 102. 14:7232-7235. ISSN: 0960-8524. (IF:: 4,25).

Tudományos közlemény magyar nyelvű lektorált folyóiratban:

Erdei É.-Molnár M.-Gyémánt Gy.-Harangi J.-Nagy J.-Pócsi I.: 2009: *Kluyveromyces marxianus* termotoleráns élesztő CBS712 törzsének jellemzése. *Acta Agr. Debr.* 35.: 7-13. ISSN 1587-1282.

Erdei É.-Pócsi I.-Molnár M.-Gyémánt Gy.-Nagy J.: 2010: Konverziós ráta értékek meghatározása a *Kluyveromyces marxianus* CBS712 törzs etanol termelésének jellemzéséhez. *Acta Agr. Debr.* 42.:23-27. ISSN 1587-1282.

Magyar nyelvű lektorált konferencia kiadvány:

Erdei É.-Molnár M.-Gyémánt Gy.-Nagy J.-Pócsi I.: 2010. *Kluyveromyces marxianus* termotoleráns élesztő törzs etanol termelő képességének jellemzése. [In: Ferencz Á. (szerk.) Erdei Ferenc V. Tudományos Konferencia.] Kecskemét. II. Kötet. 963-967. ISBN: 978-963-7294-75-4.

Idegen nyelvű lektorált konferencia kiadvány:

Erdei, É.-Molnar, M.-Gyémánt, Gy.-Pócsi, I.-Nagy, J.: 2009. Fermentation characteristics of the yeast strain *Kluyveromyces marxianus* CBS712. [In: Nagy, K.-Márialigeti, K. (ed.) .2nd Central European Forum for Microbiology.] Keszthely. Hungary. *Acta Microbiol. et Immunol. Hung.* 56:143-144. (Suppl). ISSN: 1217-8950.

Tudományos közlemény magyar nyelvű nem lektorált folyóiratban:

Erdei É.: 2010. A bioetanol, mint alternatív energiaforrás. [In: Molnár Z. (szerk.)
Agrofórum] 21. 4.: 58-60.