

KERPELY KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Témavezetők:

Prof. Dr. Pócsi István

az MTA doktora

Prof. Dr. Nagy János

az MTA doktora

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

Készítette:

Varga - Erdei Éva

doktorjelölt

Debrecen

2011

***KLUYVEROMYCES MARXIANUS* ÉLESZTŐ TÖRZSEK**

FEJLESZTÉSE BIOETANOL TERMELÉS CÉLJÁBÓL

Értekezés a doktori (PhD.) fokozat megszerzése érdekében
az agrártudományok tudományágban

Írta: Erdei Éva okleveles biológus/biotechnológus

Készült a Debreceni Egyetem **Kerpely Kálmán Doktori Iskolája**
(Növénytermesztés és kertészeti tudományok doktori programja) keretében

Témavezetők: Prof. Dr. Pócsi István és Prof. Dr. Nagy János

A doktori szigorlati bizottság:

Név	Tud. fokozat
Elnök: Prof. Dr. Sinóros-Szabó Botond	DSc.
Tagok: Dr. Bisztray György Dénes	PhD.
Dr. Rátonyi Tamás	PhD.

A doktori szigorlat időpontja: 2011. június 15. 11 óra.

Az értekezés bírálói:

Név	Tud. fokozat
.....	
.....	

A bírálóbizottság:

Név	Tud. fokozat	Aláírás
Elnök:		
Tagok:		
.....		
.....		
Titkár:		

Az értekezés védésének időpontja: 2011.....

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	6
1. BEVEZETÉS.....	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	10
2.1. Biológiai eredetű energiaforrások.....	10
2.1.1. Biológiai eredetű energiaforrások csoportosítása (bioüzemanyagok, fűtőanyagok)	10
2.1.1.1. Első generációs bioüzemanyagok	11
2.1.1.2. Második generációs bioüzemanyagok	12
2.1.1.3. Harmadik generációs bioüzemanyagok	13
2.1.1.3.1. Bioüzemanyag <i>Trichosporon fermentas</i> -ból	13
2.1.1.3.2. Bioüzemanyag algákból.....	13
2.2. A bioüzemanyagokhoz, főként a bioetanolhoz fűződő gazdasági és politikai megfontolások.....	14
2.2.1. Bioüzemanyagok, főként bioetanol előállítás az Amerikai Egyesült Államokban és Brazíliában	15
2.2.2. Bioetanol termelés Magyarországon	16
2.3. Bioetanol, mint bioüzemanyag	17
2.4. A bioetanol előállítása	18
2.3. A <i>Kluyveromyces marxianus</i>	23
2.3.1. A <i>K. marxianus</i> taxonómiai és filogenetikai helyzete	23
2.5.2. A <i>K. marxianus</i> biotechnológiai jelentősége és alkalmazhatósága	25
2.6. Az élesztők hőstressz válasza	27
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	29
3.1. <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS712 (NCYC 2791) és E1 mutáns törzsek tenyésztése és fenntartása	29
3.2. A termotoleráns <i>K. marxianus</i> E1 mutáns létrehozása és identifikálása	29
3.3. A termotoleráns fenotípus stabilitásának vizsgálata	30
3.4. <i>K. marxianus</i> CBS712 és az E1 mutáns növekedésének vizsgálata	30
3.5. A sejtméret meghatározása	31
3.6. A biomassa mennyiségének a meghatározása	31
3.7. Az etanol termelés vizsgálata és optimalizációja	31

3.8. Az etanol tartalom mérése	32
3.9. A maradék glükóz mérése.....	32
3.9.1. A glükóz mérése vékonyréteg kromatográfia segítségével	32
3.9.2. A glükóz mérése glükóz oxidáz enzim segítségével	32
3.10. Konverziós ráta kiszámítása	33
3.11. Fiziológiai vizsgálatok	33
3.11.1. A sejtek trehalóz tartalmának meghatározása.....	33
3.11.2. A sejtek GSH és GSSG tartalmának meghatározása	34
3.11.3. Etanol, oxidatív és ozmotikus stressz tolerancia vizsgálat	34
3.11.4. A fehérjetartalom meghatározása	35
3.11.5. Hőstressz fehérjék kimutatása	35
3.11.5.1. Az élesztősejtek feltárása üveggyöngy segítségével	35
3.11.5.2. SDS-PAGE	36
3.12. Statisztikai módszerek	37
3.12.1 Általános statisztikai módszerek.....	37
3.12.2. Válaszfelület meghatározó módszer (Response surface methodology, RSM)	
.....	37
2.13. Felhasznált vegyszerek	38
4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK	39
4.1. A <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS712 és a termotoleráns E1 mutáns törzsek	
jellemzése.....	39
4.1.1. A <i>K. marxianus</i> CBS712 szülői törzs bemutatása	39
4.1.1.1. A szülői törzs növekedésének a vizsgálata	40
4.1.2 A <i>K. marxianus</i> termotoleráns E1 mutáns törzs létrehozása és vizsgálata....	41
4.1.2.1. Az E1 mutáns fenotípus stabilitásának és növekedésének vizsgálata ...	41
4.1.3. A <i>K. marxianus</i> CBS712 és E1 mutáns törzsek morfológiai vizsgálata.....	42
4.1.4. Az etanol termelés optimalizálása a válaszfelület meghatározó módszer	
(RSM) segítségével a <i>K. marxianus</i> CBS 712 és E1 mutáns törzsek esetében	43
4.1.4.1. A termelt etanol koncentrációja	44
4.1.4.2. A maradék glükóz mennyiségének a meghatározása	46
4.1.4.3. A száraztömeg adatok	50
4.1.4.4. A <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS712 szülői és E1 mutáns törzs	
fermentációs paramétereinek az összevetése	53
4.2. Fiziológiai vizsgálatok	57

4.2.1. Trehalóz tartalom meghatározása	57
4.2.2. A GSH és GSSG tartalom meghatározása	59
4.2.3. Stressz tolerancia vizsgálatok	60
4.2.4. Hőstresszfehérjék vizsgálata	62
5. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK.....	64
6. ÚJ ÉS ÚJSZERŰ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	66
7. ÖSSZEFOGLALÁS (magyar nyelven).....	67
8. ÖSSZEFOGLALÁS (angol nyelven)	70
9. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK	72
10. PUBLIKÁCIÓK AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN.....	87
11. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	89
12. NYILATKOZATOK	90

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
NCYC	National Collection of Yeast Culture
YPD	Yeast extract, Peptone, Dextrose (élesztő kivonat, peptone, cukor)
YM	Yeast extract, Malt (élesztő kivonat, maláta)
OD	optikai denzitás
HP	Hewlett Packard
HPTLC	High Pressure Thin Layer Chromatography – nagy nyomású vékonyréteg kromatográfia
kU	kilo Unit
DCM	szárazanyag tartalom (dry cell mass)
GSH	redukált glutation
GSSG	oxidált glutation
GR	glutation reduktáz
EDTA	etilén-diamid-tetraecetsav
DTNB	5,5'-ditio- <i>bis</i> (2-nitrobenzoesav)
NADPH	nikotinamid-adenine-dinukleotid foszfát
BSA	borjú szérum albumin
PMSF	α -toluil-szulfonil-fluorid (fenil-metil-szulfonil-fluorid)
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SDS-PAGE	SDS-poliakrilamid gélelektroforézis
TRIS	trisz-(hidroximetil)-amino-metán
TEMED	N,N,N,N-tetrametil-etiléndiamid
APS	ammónium-perszulfát
RSM	Response Surface Methodology – válaszfelület meghatározó módszer

1. BEVEZETÉS

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 fás szárú 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 nyesei, 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 bioetanol 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 bioetanol 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 törzsszel 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) optimalizálását, valamint a törzs hőtűrésének és általános stressz tűrésének vizsgálatát illetve növelését.

Célom volt továbbá egy jobb hőtűrésű mutáns izolálása a szülői törzs fokozatosan növelt hőmérsékleten történő tenyésztésével. A mutáns sikeres izolálása után annak taxonómiai és morfológiai vizsgálata.

Ezen kívül a szülői és a mutáns törzs széleskörű összehasonlítása, valamint az ipari szempontból fontos kitermelési százalékok megállapítása.

Végül a termotoleráns *K. marxianus* mutáns mikrobiális élettani módszerekkel történő vizsgálata:

- Az intracelluláris trehalóz tartalom meghatározása.
- A GSH, GSSG tartalom meghatározása.
- A hősokk proteinek kimutatása.
- Etanol, oxidatív és ozmotikus stressz tolerancia vizsgálata.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Biológiai eredetű energiaforrások

A növekvő iparosodás és motorizáció következményeként világszerte folyamatosan emelkedik a kereslet a kőolaj-alapú üzemanyagok iránt (Agrawal, 2007). Egy 2009-es felmérés alapján a világ energiafogyasztásának a 80 %-át a fosszilis üzemanyagok teszik ki és ebből 58 %-ot a szállítási szektor használ (Escobar *et al.*, 2009). Ennek következtében nagy mértékben megnőtt az üvegház hatású gázok mennyisége a légkörben. Mindez kedvezőtlen hatással van Földünk klímájára, melynek hatására bekövetkező klímaváltozás negatív következményei a sarkkörüi jéghegyek olvadása, a tengerszint növekedése, a biodiverzitás csökkenése (Zhao *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2010; Prasad *et al.*, 2007).

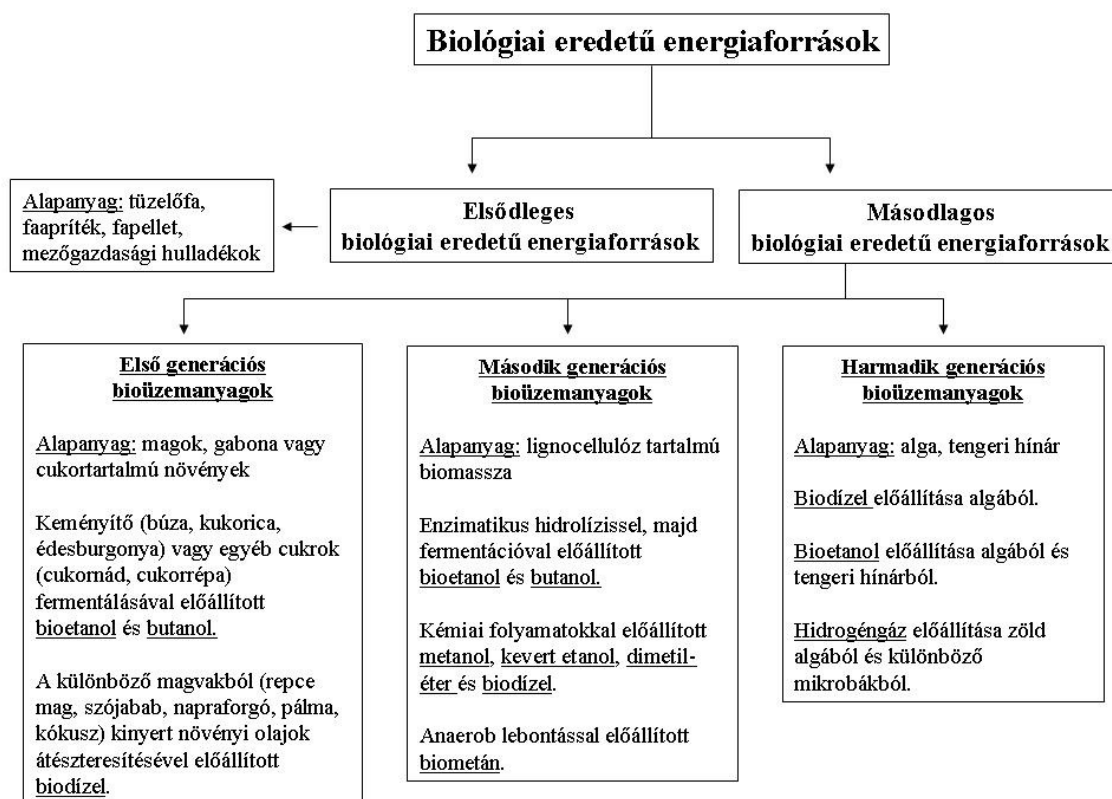
Ahhoz, hogy kevesebb káros anyag kerüljön a légkörbe szükség van egy alternatív, megújuló, fenntartható, hatékony és gazdaságos üzemanyagra. A bioüzemanyagok helyettesíthetik a fosszilis üzemanyagokat, hiszen rendelkeznek az előbb felsorolt tulajdonságokkal, valamint nagy előnyük, hogy könnyen integrálhatóak a már meglévő rendszerekbe.

2.1.1. Biológiai eredetű energiaforrások csoportosítása (bioüzemanyagok, fűtőanyagok)

A biológiai eredetű energiaforrásokat csoportosíthatjuk halmazállapotuk szerint. Ez alapján megkülönböztetünk folyékony (bioetanol, biodízel, metanol), gáz (hidrogén, metán) és szilárd (faapríték, fapellet) halmazállapotú bioüzemanyagokat és fűtőanyagokat (Demirbas, 2008).

Egy másik csoportosítás elsődleges és másodlagos biológiai eredetű energiaforrásokat különít el. Az elsődleges biológiai eredetű energiaforrásokat elsősorban fűtésre, főzésre vagy elektromos áram előállítására használják, amelyet fa, faapríték és fapellettel elégetésével nyernek. A másodlagos biológiai eredetű energiaforrásokat más néven bioüzemanyagoknak is nevezzük, melyen belül három

csoportot különböztetünk meg az előállításukhoz használt alapanyag és technológia alapján: első, második és harmadik generációs bioüzemanyagok (1. ábra).



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

Habár a bioüzemanyagok számos előnyös tulajdonsággal rendelkeznek, mindezek mellett számos kihívással kell még megküzdenie az országoknak az előállítás és a kereskedelem területén. Mindenekelőtt megfelelő és gazdaságosan működő alapanyagtárolókat és az alapanyagot szállító transzporthálózatokat kell létrehozni. A megfelelő előállítási technológia kifejlesztése is elengedhetetlen a hatékony működéshez. Szükséges új törvények bevezetése a bioüzemanyagok bekeverési arányáról, a támogatásokról és az esetleges adókedvezményekről.

2.1.1.1. Első generációs bioüzemanyagok

Az első generációs bioüzemanyagokat különböző cukor- vagy keményítő tartalmú gabonából és egyéb növényekből állítják elő, például kukoricából (Nicolic *et al.*, 2010, Mojovic *et al.*, 2006), búzából (Talebina *et al.*, 2010), rizsből (When-Hua C.

et al., 2011), cukornádból (Furtado *et al.*, 2011; Cardona *et al.*, 2010), cukorrépából (Santek *et al.*, 2010; Panella, 2011.), maniókából (Shanavas *et al.*, 2011), valamint árpából (Li *et al.*, 2011).

A legjobban ismert első generációs bioüzemanyag a bioetanol, amely előállításához a fermentálható cukrokat az előbb felsorolt gabonákból nyerik ki általában enzimes hidrolizálással, majd pedig élesztő segítségével fermentálják etanollá (Sánchez és Cardona, 2008). A bioetanolt lepárlással különítik el a többi komponenstől, majd a víztelenítés után fosszilis üzemanyagokhoz keverik, vagy önmagában használják üzemanyagként.

A első generációs bioüzemanyagok csoportjába tartozik a biodízel is, melyet közvetlenül növényi olajból átészterezésével állítanak elő. Az átészterezéshez lúgos, savas vagy enzimes katalizátorokat használnak, valamint a biodízel mellett glicerín is keletkezik melléktermékként.

Számos ország nagy mennyiségben állít elő első generációs bioüzemanyagokat, viszont ennek költségei folyamatosan emelkednek, amiatt, hogy az alapanyag megtermeléséhez földterületeket kell elvonni az élelmezésre szánt gabona és növény termesztéstől. Mindezért egyre több ország helyezi előtérbe a nem ehető biomasszából történő bioüzemanyag előállítást.

2.1.1.2. Második generációs bioüzemanyagok

A második generációs bioüzemanyagok előállításához alapanyagként használják a mezőgazdaságból származó lignocellulóz tartalmú biomasszát és más mezőgazdasági hulladékokat (Kádár *et al.*, 2004), valamint a nem étkezésre szánt növényi biomasszát is, például fűvet, fákat (Bollók *et al.*, 2000), papírt (Lark *et al.*, 1997). A lignocellulóz tartalmú biomasszából történő bioüzemanyag gyártás esetében az előkezelési és konverziós technológiák szerepe megnő az első generációs bioüzemanyag előállításához képest (Stevens, 2004), hiszen a lignocellulóz egy olyan komplex kémiai struktúrával rendelkezik, mely hatékony megbontása a glükóz molekulák felszabadítása érdekében bonyolult és gondosan megtervezett technológiai folyamatokat igényel.

2.1.1.3. Harmadik generációs bioüzemanyagok

A harmadik generációs bioüzemanyagok előállításakor különböző mikrobákat - főleg a *Trichosporon* genust - és mikroalgákat használnak föl és vizsgálják a kutatók.

2.1.1.3.1. Bioüzemanyag *Trichosporon fermentas*-ból

Számos mikroorganizmusról - élesztőkről, fonalas gombákról, mikroalgákról - tudjuk, hogy képesek akkumulálni különböző vegyületeket, például olajokat és zsírsavakat is.

Zhu és munkatársai (2008) melaszon tenyésztették a *Trichosporon fermentas*-t lipidtermeléshez. Ebben a projektben a kutatók részletesen megvizsgálták és optimalizálták az alapanyag összetevőit, a pH-t és a hőmérsékletet, valamint megállapították a megfelelő szén:nitrogén arányt a legjobb lipid kihozatal érdekében.

Huang és munkatársai (2009) a rizs feldolgozásakor keletkezett keményítő tartalmú hulladékból mikrobiális olajat állítottak elő. Ezt az alapanyagot kénsavas áztatásnak és hidrolizálásnak kellett alávetni, hogy felhasználható legyen a *Trichosporon fermentas* számára. Az előkezelt masszát először detoxifikáció - a kénsav eltávolítása – nélkül próbálták meg felhasználni, majd később detoxifikációs előkezeléssel, lúgosítással és az egyéb paraméterek optimalizálásával sikerült növelniük a lipidkihozataalt (Huang *et al.*, 2009).

A mikrobiális lipidek - hasonlóan a növényi olajokhoz - főleg palmitin-, sztearin- és oleinsavat, valamint telítetlen zsírsavakat tartalmaznak, így a növényi olajok átészterezéséhez használt technológia ugyanúgy használható a mikrobiális lipidekre is a biodízel előállításához.

Az élesztők lipidtermelő képességének kihasználása új lehetőségeket nyithat meg a megújuló energiaforrásból származó bioüzemanyagok előállítása terén.

2.1.1.3.2. Bioüzemanyag algákból

A zöldalga (Chloropyta) nemzetségen belül a mikroalgák csoportja bizonyult a legalkalmasabbnak a bioüzemanyag előállítására. A mikroalgák, a többi algafajhoz hasonlóan nemcsak a légkörből képesek megkötni a szén-dioxidot, hanem az oldott formákból - nátrium-karbonátból (Na_2CO_3) és nátrium-hidrogénkarbonátból (NaHCO_3)

- is fel tudják ezt venni (Colman és Rotatore, 1995; Suh és Lee, 2003). Természetes körülmények között a mikroalgák tolerálják és asszimilálják a légkörben a nagy, akár 150 000 ppmv (parts per million by volume) mennyiségben jelenlévő szén-dioxidot is (Brown, 1996).

Miao és Wu (2006) a mikroalgák családjába tartozó *Chlorella protothecoides* vizsgálatakor észrevette, hogy nitrogénéhezés alatt nagyon sok olajat termel és halmoz föl a sejtekben. Ezen fölhalmozott olajat először eltávolítják a sejtekből, majd átészteressítéssel biodízzellé alakítják.

2.2. A bioüzemanyagokhoz, főként a bioetanolhoz fűződő gazdasági és politikai megfontolások

A kőolajmezők folyamatos kimerülésével – a kitermelés évente 4-5%-kal csökken (Alektett *et al.*, 2003) - egyre nagyobb szükség lesz a bioüzemanyagokra, amelyek jelentős mértékben hozzájárulhatnak a világ mostani és a jövőben növekvő energiaszükségleteinek a kielégítéséhez, valamint csökkenthetik a kipufogógázok mennyiségét, s ezzel élhetőbb környezetet teremthetnek.

Szerte a világon folyamatban vannak olyan kutatások, amelyek arra irányulnak, hogy kifejlesszék a legmegfelelőbb alternatív üzemanyagot, amely függetlenítheti a rászoruló országokat a kőolaj importjától, és amely összhangban van az adott ország agrárgazdasági fejlesztéseinek céljaival is (Fulton *et al.*, 2004; Pickett *et al.*, 2008). 1980 és 2005 között a bioüzemanyag termelés évi 4,4-ről 50,1 millió literre növekedett világszerte (Armbruster *et al.*, 2006; Murray, 2005), és előreláthatólag ez a jövőben még tovább fog emelkedni. Az Európa Tanács 2007 márciusában támogatta azt a kötelező célt, hogy 2020-ra a tagállamok teljes energiafogyasztásának a 20 %-a megújuló energiaforrásokból kell, hogy származzon. Ezen kívül kötelező célként tűzte ki az összes tagállam számára, hogy 2020-ra a szállítási szektor által elhasznált üzemanyag minimum 10 %-a bioüzemanyag legyen (EU Directive 2009).

Ahhoz, hogy ezt a célt elérjék, a tagállamoknak számos gazdasági, pénzügyi és infrastruktúrális intézkedést kellett meghozniuk (Pelkmans *et al.*, 2006). Számos tagállam jelentős összegekkel támogatta azon kutatásokat, amelyek újszerű alapanyagok termelésbe vonására és versenyképes technológia kialakítására irányultak (NEXANT., 2007).

Mindezek mellett, ha az adott ország kormánya adókedvezményekkel és egyéb támogatási rendszerekkel segíti a bioüzemanyagok előállítását és a forgalomba hozatalát, akkor ezek versenyképesé válhatnak a fosszilis energiahordozókkal szemben.

2.2.1. Bioüzemanyagok, főként bioetanol előállítás az Amerikai Egyesült Államokban és Brazíliában

A bioetanol előállításában a vezető szerepet az Amerikai Egyesült Államok és Brazília tölti be (1. Táblázat). Az Amerikai Egyesült Államokban főként kukoricából, Brazíliában pedig cukornádból folyik a bioetanol gyártása. Ezzel összhangban mindkét országban nagy befektetésekkel folyik mind az első, mind a második generációs bioetanol gyártás további fejlesztése (Larson, 2008.).

Az Amerikai Egyesült Államok törvényben hagyta jóvá, hogy 2022-re a cél a 36 milliárd gallon bioetanol előállítása évente, melyből 15 millió gallon kukorica keményítőből, a további 21 millió gallon pedig cellulóz tartalmú alapanyagból kell hogy származzon (Naik *et al.*, 2010).

Brazília a világ legnagyobb cukornád előállító országa, így nem meglepő, hogy a bioetanol előállítási ágazata erre épül. Brazília nemzeti fejlesztési tervének keretein belül próbálja megvalósítani a cukornád további nemesítését annak érdekében, hogy minél gazdaságosabb legyen belőle a bioetanol előállítása (Furtado *et al.*, 2011). Az országban egy úgynevezett „zöld üzemanyag” – ot előállító program is folyamatban van, melynek célja biodízel előállítása mezőgazdasági hulladékokból, valamint az olajgyártáskor keletkezett melléktermékekből (Duailibe, 2010). Ezen kívül a brazil kormány 2017-re szeretné bevonni a bioetanol termelésbe a szántóföldi területeinek a 2,5 %-át (ma ez 1,4 %) (Duailibe, 2010). Aggasztó viszont az a 2011. január 20-án megjelent tanulmány, amelyben leírják, hogy a brazil Alagoas állam 28 000 négyzetkilométeres területének durván fele esőerdő volt és mára ez a szám 13,1 %-ra csökkent, tehát évente 3736 hektár esőerdőt veszítünk el (Araujo és Moura, 2011).

Az országok éves bioetanol termelése (millió U.S. gallon)				
Sorrend	Ország / régió	2007	2008	2009
1.	Egyesült Államok	6 498,60	9 000,00	10 750,00
2.	Brazília	5 943,87	7 053,39	7 264,73
3.	Európai Unió	570,30	733,60	1 039,52
4.	Kína	486,00	501,90	541,55
5.	Thaiföld	79,20	89,80	435,20
6.	Kanada	211,30	237,70	290,59
7.	India	52,80	66,00	91,67
8.	Kolumbia	74,90	79,30	83,21
9.	Ausztrália	26,40	26,40	56,80
10.	Egyéb	83,00	128,39	247,27
	A világon az összes megtermelt mennyiség	14 026,37	17 916,48	20 221,83

1. táblázat: A világ bioetanol előállító országainak termelési adatai. (Forrás: Renewable Fuels Association-RFA. 2007, 2010.)

2.2.2. Bioetanol termelés Magyarországon

Magyarországon Győrben és Szabadegyházán működik bioetanol gyár, valamint 2010 augusztusában rakták le az alapkővét a harmadik magyar bioetanol előállító üzemnek Dunaföldváron. Hazánknak kedvező mezőgazdasági adottságai vannak ahhoz, hogy gabonanövényeket köztük kukoricát termeljen. Magyarországon 2008-ban kukoricából a 2007. évinél 11%-kal nagyobb területen közel 9 millió tonna termett. Az őszi betakarítású növények közül a kukorica termésátlaga (7470 kg/ha hozam) növekedett a legnagyobb mértékben: duplájára nőtt a 2007. évi terméshez képest (KSH, 2009). Ha a kukoricára épülő bioetanol termelést megnövelnénk hazánkban, akkor ennek az előnye az lenne, hogy előreláthatólag stabilizálná az általában exportgondokkal küzdő magyar kukoricatermelést. Ebben az esetben az intervenciók tartalékok termelésbe kerülnének és a termelőknek nem lenne szükségük

kényszertárolási támogatásra, amely a költségvetés számára is kedvezőbb lenne. Hátrányai között szerepel viszont, hogy előreláthatólag egy - két kevés termést hozó év nagy valószínűséggel megtörné a bioetanol termelést Magyarországon, amelyet (ha már elfogytak az intervenciós tartalékok) csak importtal lehetne stabilizálni. Új technológiák fejlesztése és megvalósítása mellett szól, hogy így függetleníteni lehetne a bioetanol termelést a gabonanövényektől. Ilyen lehet például az, hogy cellulóz alapanyagú mezőgazdasági hulladékokból (szőlővenyige, gyümölcsfák nyesedékei, fakéreg, faipari hulladékok) állítsunk elő bioetanol.

2.3. Bioetanol, mint bioüzemanyag

A belsőégésű motorok hajtására - ha bioetanol is szeretnénk használni - az optimális bekeverési arány a 85:15 (benzin:bioetanol), de a maximum 80:20 (benzin:bioetanol) lehet anélkül, hogy a motor károsodna. A tiszta bioetanol is alkalmas üzemanyagként, de hátrányai között szerepel, hogy az etanol energiatartalma kisebb a benzinénél (1 liter etanol = 0,65 liter benzin), ezért ugyanakkora távolság megtételéhez több etanol kell, mint benzin. További hátránya, hogy a bioetanol roncsolja a festék-, gumi és- műanyag alkatrészeket, így meg kell oldani, hogy az etanol ne érintkezzen ezen részekkel. A bioetanol bioüzemanyagként történő alkalmazásának környezetvédelmi szempontból fontos előnyei vannak. A bioetanol-benzin keverékkel üzemeltetett gépjárművek CO- és SO₂-emissziója kisebb, mint a csak benzinnel hajtott gépkocsiké. Továbbiakban mellette szól még, hogy az alacsonyabb üzemi hőmérséklet miatt az alkoholos motorok élettartama hosszabb, valamint a benzin oktánszámát a hozzákevert etanol megnöveli, amely az egyik legnagyobb előnye (Sági, 1998).

A bioetanol előállításának és felhasználásának környezetbarát mivoltát erőteljesen befolyásolja a szállítási szektor. Számos, főként amerikai és brazil tanulmány, valamint tudományos publikáció jelent meg a bioüzemanyagok szállításának különböző alternatíváiról. A legelterjedtebb szállítási forma a teherautóval és a vasúton történő szállítás, de a tanulmányok arra világítanak rá, hogy csővezetékek kiépítésével gazdaságosabbá tudják tenni a transzportot (Leal és Agosto, 2011; Junginger *et al.*, 2011; Gauder *et al.*, 2011).

2.4. A bioetanol előállítása

A bioetanol előállítása történhet különböző cukortartalmú alapanyagokból, gabonákból, magvakból (kukorica, búza, cukorrépa) valamint lignocellulóz tartalmú biomasszából is. A 2. táblázatban foglaltam össze, hogy a különböző alapanyagokból átlagosan mennyi bioetanol nyerhető ki.

Alapanyag	Bioetanol liter (tonna alapanyag) ⁻¹
Cukornád	70
Cukorrépa	110
Édes burgonya	125
Burgonya	110
Manióka	180
Kukorica	360
Rizs	430
Árpa	250
Búza	340
Cukorcirok	60
Kipréselt cukornád és egyéb cellulóz tartalmú biomassza	280

2. táblázat: Különböző alapanyagok bioetanol kihozatala (Linoj Kumar *et al.*, 2006 nyomán)

A bioetanol termelése különböző technológiákkal történhet, de mindegyik technológiának a kiindulási lépése az alapanyag előkezelése. Az első generációs bioetanol előállítás esetében a cukortartalmú alapanyag előkezelése az aprítás, őrlés és savas vagy lúgos áztatás. A lignocellulóz alapú bioetanol termeléskor a lignocellulóz előkezelése többféle módon valósulhat meg. Az aprítás után a cél a lignin és a hemicellulóz eltávolítása, annak érdekében, hogy a maradék cellulózból enzimatikus kezelés után glükóz egységek szabaduljanak föl.

A legelterjedtebb előkezelési módszer a gőzrobbantás (Sun és Cheng, 2002). Ezen módszer alkalmazásakor 160-270 °C-os (0,7-5 MPa nyomáson) telített vízgőzzel

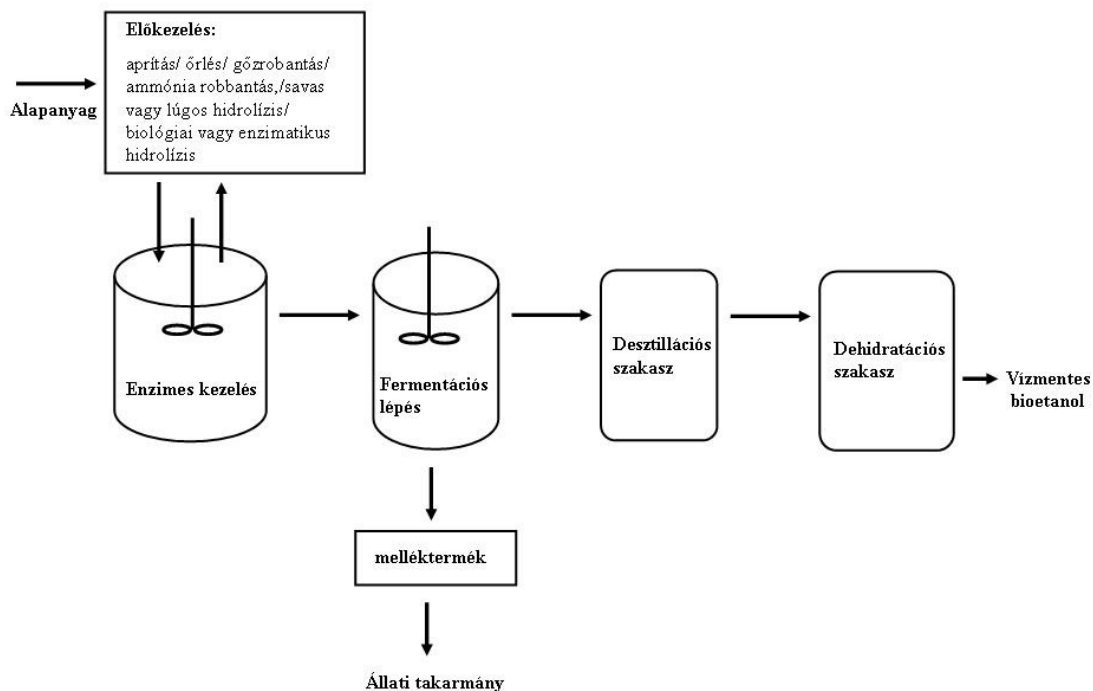
kezelik a lignocellulóz biomasszá, majd a gőzt egy szűk szelepen át rövid idő alatt kilövelik, expandáltatják. Tehát a gőz először bediffundál a lignocellulóz forgácsba, majd onnan robbanásszerűen eltávozik, így a lignocellulóz struktúra szétesik, a cellulóz kristályossága csökken, aminek következtében a hozzáférhető felület jelentősen megnő. Ha ehhez a gőzhöz $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{SO}_2/\text{CO}_2$ elegyet is kevernek, megnő a robbanás hatékonysága, így a hemicellulóz eltávolítása is hatékonyabb lehet (Ben-Ghedalia és Miron, 1981).

Egy további módszer az ammóniás gőzrobbantás (Ammonium fiber explosion, AFEX), amely során folyékony ammóniát használnak. Ez a technika tovább növeli a gőzrobbantás hatékonyságát (Prasad *et al.*, 2007).

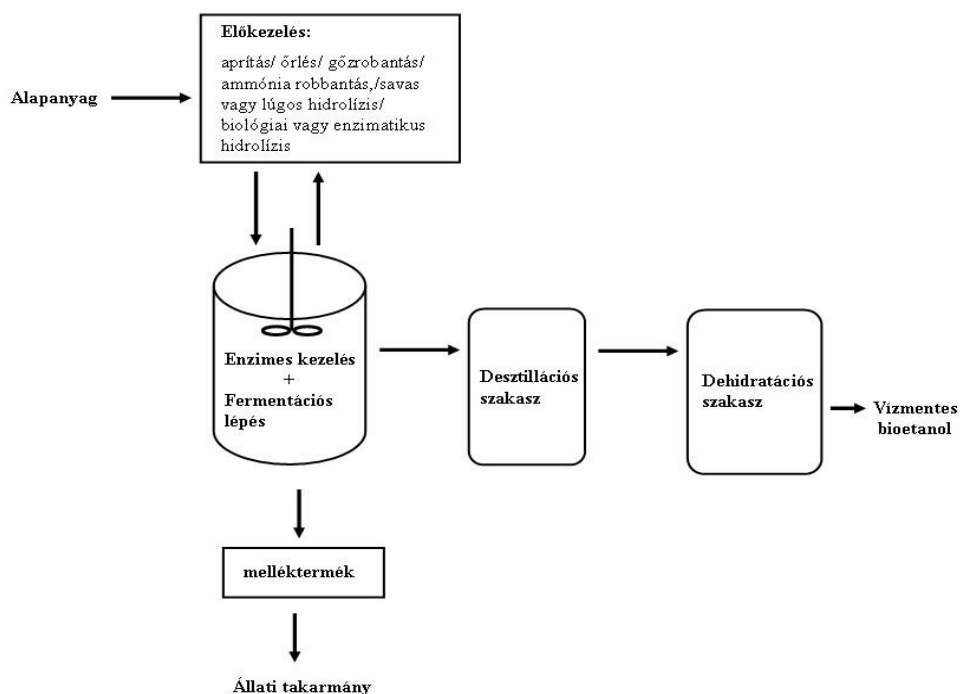
A savas előkezeléskor koncentrált formában használják a savakat, melyek toxikus, maró és veszélyes vegyületek, így e folyamat speciális reaktorok használatát követeli meg. E kezelés után a savakat visszanyerik és újra fölhasználják (Tarkow és Feist, 1969).

Egy másik előkezelési módszer a lúgos hidrolízis, mely során a maró lúgok hatására a molekulák közötti észter kötések felbomlanak, így xilán, hemicellulóz és egyéb biopolimer komponensek szabadulnak föl (Prasad *et al.*, 2007).

Az előkezelési eljárások közé tartozik még a biológiai és az enzimes előkezelés. A biológiai előkezelés alatt különböző mikroorganizmusokat használnak a lignocellulóz lebontására, többek között a *Phanerochaete chrysosporium* gombát, mely lignin peroxidázt termel szén és nitrogén éhezés alatt és ezáltal képes a lignin lebontására (Blanchette, 1991). Enzimes előkezelés esetén többnyire celluláz, valamint hemicelluláz enzimeket használnak.



2. ábra: Az SHF (separate hydrolysis and fermentation - szeparált hidrolízis és fermentáció) technológia (Wright, 1988. nyomán).



3. ábra: Az SSF (simultaneous saccharification and fermentation - egyidejű szacharifikáció és fermentáció) technológia (Wright, 1988. nyomán).

A következő lépés, mind az első, mind a második generációs bioetanol előállításakor a szacharifikáció (elcukrosítás), ahol enzimek (cellulázok, endo-, exo-glükanázok, cellobiohidrolázok, β - glükanázok, α és a β -amilázok - az alapanyagtól függően) segítségével tovább folyik a polimereknek a lebontása egészen a monoszacharidokig. Ezt követi a fermentáció, ahol az általunk legmegfelelőbbnek tartott mikroorganizmus átalakítja a glükózt etanollá. Az utolsó lépés a desztilláció és a dehidratáció, melynek eredménye a vízmentes bioetanol. Az előállításkor keletkezett mellékterméket {kukoricarost, DDGS (distillers dried grains with solubles – szárított szemes takarmány) vagy CGF („corn gluten feed” – kukorica glutén takarmány)} állattenyésztő telepeken hasznosítják.

A fermentációt vagy a szacharifikációtól szeparáltan (előkezelés, enzimatisz hidrolízis) vagy azzal egyidejűleg, egy reaktorban lehet véghezvinni. Ez alapján megkülönböztetünk két technológiát: az SHF-t (separate hydrolysis and fermentation), azaz szeparált hidrolízist és fermentációt, vagy az SSF-t (simultaneous saccharification and fermentation), azaz egyidejű szacharifikációt és fermentációt (Hahn-Hagerdal *et al.*, 2006) (2., 3. ábra). Ezen kívül a világ számos kutatója az úgynevezett Consolidate Bioprocessing (CBP), azaz az állandósított biofeldolgozási technológiát tartja a leginkább környezetkímélőnek és gazdaságosnak. Utóbbi technológia abban különbözik a többi, használatban lévő technológiától, hogy itt a cél az, hogy létrehozzanak egy olyan mikroba közösséget, mely használatával egyetlen lépésben végre lehet hajtani az előkezelést, a szacharifikációt és a fermentációt (Cardona és Sánchez, 2007). Tehát egy olyan mikroba közösségre van szükség, mely képes a keményítő, a cellulóz lebontására, hidrolizálására és mindemellett megfelelő hatékonysággal végzi az etanol előállítását (Lynd *et al.*, 1999, 2002).

További jelentős kutatások folynak a cellulóz, mint alapanyag minél gazdaságosabb feldolgozása érdekében. Yue és munkatársai (2011) olyan eljárást dolgoztak ki, ahol az alapanyag előkezelése egy folyamatosan kevertetett tank-reaktorban történik anaerob körülmények között. Ez az eljárás a cellulóz tartalmú alapanyagok gyorsabb lebontását teszi lehetővé. Yuan és munkatársainak (2011) sikerült létrehozniuk egy olyan kétrétegű enzim pellet rendszert, amely képes a hemicellulóz lebontásából származó xilózt xilulózzá átalakítani, így megkönnyíteni a glükózzá való konverzióját. Emellett ez a rendszer folyamatosan biztosítja a megfelelő mikrokörnyezetet mind az enzim, mind a mikroorganizmus működéséhez. Ezen kívül számos olyan tudományos publikáció jelenik meg szerte a világban, amelyek olyan

mikroorganizmusok, főként élesztők kifejlesztésére irányulnak, amelyek egyszerre képesek a cellulóz alapú biomasszát lebontani és belőle etanolt előállítani (Brethauer *et al.*, 2010; Dmytruk *et al.*, 2008; Wilkins *et al.*, 2008; Grange *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2011).

Az iparban használt SHF és SSF rendszerekben a fermentációt főként baktériumokkal és élesztőkkel végzik, hiszen ők a legalkalmasabbak a gazdaságos etanol termelésére. A fonalas gombákkal leginkább az enzimátikus előkezelést végzik, hiszen ők rendelkeznek olyan enzimekkel - főként cellulázokkal - melyekkel ez a lépés egyszerűbbé és hatékonyabbá tehető. Ilyen fonalas gombák például a *Trichoderma reesei* és *Aspergillus niger*.

A baktériumok anaerob vagy fakultatív anaerob körülmények között hexózokból és pentózokból fermentálnak etanolt, de nagy hátrányuk az, hogy kis glükóz és etanol toleranciával rendelkeznek. Számos baktériumban, köztük az Enterobacteriaceae családba tartozó fakultatív anaerob *Escherichia coli*-ban (Ingram, 1987), *Klebsiella oxytoca*-ban (Burchhardt és Ingram, 1992), valamint az aneareob *Zymomonas mobilis*-ban (Mohagheghi *et al.*, 2002) is hajtottak már végre olyan genetikai manipulációt, mellyel alkalmasabbá tették őket az etanol termelésre.

A legelterjedtebb és a legjobban ismert etanolt fermentáló mikroorganizmusok az élesztők, ezek közül is a *Saccharomyces cerevisiae*. A *S. cerevisiae* egy jól ismert és alaposan tanulmányozott modellszervezet, továbbá széles körben használják az ipari fermentációkban is. Az előnyös tulajdonságai között szerepel, hogy stabilan, nagy mennyiségben képes etanolt fermentálni valamint az, hogy nem termel egyéb, a bioetanol előállítását gátló melléktermékeket, például glicerint vagy ecetsavat. Hátránya viszont az, hogy mindezt csak alacsony hőmérsékleten (30 °C-on) és viszonylag sok idő (3-4 nap) alatt tudja véghezvinni. Ezen kívül a lignocellulóz biomassza lebontásakor keletkező pentózokat sem képes felhasználni. Természetesen az élesztőkutatók világszerte foglalkoznak azzal, hogy a bioetanol előállítás a *S. cerevisiae* használatával még gazdaságosabb legyen. Például Hahn-Hagerdal és munkatársai (2007) különböző genetikai manipulációval próbálják pentózhasznosítónak tenni a *S. cerevisiae*-t. Ezen kívül számos kutató foglalkozik termotoleráns *S. cerevisiae* törzsek kifejlesztésével (Araque *et al.*, 2008; Sree *et al.*, 2000).

Hogy miért is fontos a magas fermentációs hőmérséklet az etanol ipari előállítása során? Mert az enzimés kezelés 50-60 °C -on zajlik, ez a hőmérsékleti tartomány az, amelyen a használt enzimek (cellulázok, β - glükánázok, α és a β -

amilázok) optimálisan működnek. A fermentációs lépésben használt mikroorganizmusok (például *S. cerevisiae* törzsek) viszont nem tudnak ilyen magas hőmérsékleten életben maradni, így vissza kell hűteni a rendszert, ami jelentős költséget von maga után. Ezen költség csökkentésére az SSF technológia, illetve az ebben a rendszerben használt termotoleráns élesztő nyújthat megoldást. Az SSF technológia előnyei között szerepel, hogy nincs szükség két különálló reaktorra, hanem egyben végrehajtható a szacharifikációs és a fermentációs lépés is. Ennek kivitelezése csak akkor gazdaságos, ha nem kell nagymértékben hűteni a rendszert (Ballesteros *et al.*, 1993). Ez azonban csak akkor érhető el, ha olyan élesztőt alkalmazunk, amely termotoleráns, tehát magas hőmérsékleten (40-50 °C) is jól szaporodik, továbbá életképessége nem csökken ilyen hőmérsékleten és jól tűri és termeli az etanolt. A termotoleráns élesztők között két fajt érdemes megemlíteni: a *Kluyveromyces marxianus*-t és a *Hansenula polymorpha*-t.

A *H. polymorpha* termotoleráns élesztővel főként Andrii A. Sibirny és kutatócsoportja foglalkozik. Az élesztőt alkalmas etanol termelőnek ítélték meg és jelenleg a termotoleranciájának vizsgálatával, valamint ennek a további fokozásával foglalkoznak. Ezenkívül különböző genetikai manipulációkkal próbálják a *H. polymorpha* xilóz és cellobióz hasznosítását növelni (Ryabova *et al.*, 2003; Ishchuk *et al.*, 2009; Voronovsky *et al.*, 2009).

2.3. A *Kluyveromyces marxianus*

2.3.1. A *K. marxianus* taxonómiai és filogenetikai helyzete

Először 1888-ban E. C. Hansen írta le a *K. marxianus* élesztő fajt és *Saccharomyces marxianus*-nak nevezte el, arról a személyről (Marxról), aki először izolálta szőlőről (Lodder és Kreger-Van Rij, 1952). Lodder és Kreger-Van Rij 1952-ben megjelent monográfiájukban tíz *S. marxianus* törzset írtak le, ezen élesztők között volt a *Zygosaccharomyces marxianus*, melyet 1922-ben H. Schnegg helyezett el a Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) törzsgyűjteménybe és típustörzssé nyilvánította. Később ez a törzs lett a CBS712. Az előbb említett tíz törzs közé tartozott még a *Saccharomyces fragilis*, melyet 1909-ben kefirből izolált Jörgensen és amely képes a pektint bontani (Lodder és Kreger-van Rij, 1952).

E tíz törzs további tanulmányozása során kiderült, hogy jelentős különbségek mutatkoznak az aszkuszok morfológiában, a pszeudohifa képzésben, valamint a különféle cukrok fermentációs képességében is, így tehát elkerülhetetlen volt ezek újbóli rendszerezése (van der Walt, 1970). 1956-ban van der Walt végezte el ezt a munkát és írta le az új genust *Kluyveromyces* néven, a típusfaj pedig a *Kluyveromyces polyporus* lett. A *The Yeasts, a taxonomic study* (Lodder, 1970) című tanulmány második kiadásában 1970-ben a *Kluyveromyces* genus 18 fajt tartalmazott, míg a harmadik kiadásban már csak 11-et. A legutóbbi kiadásában (Kurtzman és Fell, 1998) újragondolták a besorolást és a *Kluyveromyces* taxon fejezete már 15 fajt foglal magába.

A gyors és hatékony génszekvencia vizsgálatok bevezetése óta természetessé vált a fajok konzervatív szekvenciák alapján történő besorolása, klasszifikációja. A *Kluyveromyces* taxonnal foglalkozó legutóbbi tanulmányok már többgénes szekvencia analíziseket is használnak a különböző fajok filogenetikájának vizsgálatára, tehát a fenotípusos megjelenés alapján történő osztályozás már teljesen a háttérbe szorult a taxonómiai kutatásokban (Kurtzman és Robnett, 2003). A konzervatív gének szekvencia azonosságán alapuló besorolás szerint jelenleg a *Kluyveromyces* genusban hat fajt találunk és az új típusfaj a *K. marxianus* (Kurtzmann, 2003; Lachance, 2007) (4. ábra).

	Laktóz felhasználás	Inulin termelés	Maximum növekedési hőmérséklet
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	35°C
<i>Kluyveromyces aesturii</i>	-	-	35°C
<i>Kluyveromyces nonfermentans</i>	-	-	42°C
<i>Kluyveromyces wickerhamii</i>	-	-	37°C
<i>Kluyveromyces lactis</i>	+	-	37°C
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	+	+	52°C
<i>Kluyveromyces dobzhanskii</i>	-	-	35°C

4. ábra: A *Kluyveromyces marxianus* és a hozzá közelálló élesztők filogenetikai kapcsolata és néhány jellemezője. Forrás: Lane és Morrissey, 2010 és Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) culture collection database (<http://www.cbs.knaw.nl/>)

A *Kluyveromyces* genus és ezen belül a *K. marxianus* faj ploiditása nem teljesen tisztázott. Hagyományosan, az ebbe a genusba tartozó fajokat egyöntetűen haploidnak tekintjük (Johannsen, 1980; Steensma *et al.*, 1998), de a mostanában megjelent molekuláris munkákat tartalmazó publikációk arra világítanak rá, hogy ez nem minden esetben igaz. Például a Ribeiro és munkatársai (2007) által megjelentetett publikáció azt sugallja, hogy a széles körben használt *K. marxianus* CBS 6566 törzs diploid. Mindez azt jelzi, hogy a *K. marxianus* haploid és diploid formái is jelen lehetnek a kutatásokban és az ipari technológiai folyamatokban is (Hong *et al.*, 2007; Nonklang *et al.*, 2009).

2.5.2. A *K. marxianus* biotechnológiai jelentősége és alkalmazhatósága

Először is fontos megemlítenünk, hogy a *K. marxianus* törzsekkel foglalkozó tanulmányok többsége nem tekintette céljának a törzs biokémiájának, anyagcseréjének, vagy fiziológiájának a vizsgálatát. A legtöbb elérhető publikáció az organizmus

lehetséges ipari használatával foglalkozik anélkül, hogy részletesen vizsgálná mi történik a sejten belül. Ez nem véletlen, hiszen ezen törzsek számos olyan tulajdonsággal rendelkeznek, melyeket részletes molekuláris biológiai vizsgálatok nélkül is azonnal föl tud használni az ipar.

A *K. marxianus* törzsek egyik jelentősége, hogy az iparban nagy mennyiségben használt enzimeket képesek gazdaságosan termelni, így például inulinázt (Rouwenhorst *et al.*, 1990), β -galatozidázt (Martins *et al.*, 2002), β -glükózidázt (Leclerc *et al.*, 1987) és az endopoligalakturonázt (Jia és Wheals, 2000).

A *K. marxianus*-t heterológ protein termelésre is alkalmazzák. Általánosságban azt mondhatjuk, hogy a *S. cerevisiae* a leggyakrabban használt élesztő, melyet heterológ proteinek előállítására használnak (Gellisen és Hølenberg, 1997; Porro *et al.*, 2005), de számos publikáció azt bizonyítja, hogy a *K. marxianus* törzsek is egyre inkább alkalmassá tehetők erre a célra. A *K. marxianus* NBRC 0219 és 0541 törzseivel termotabil cellulázt (Hong *et al.*, 2007), valamint a KM1 törzsszel laktát dehidrogenázt (Pecota *et al.*, 2007) állítottak elő.

Mindezek mellett bioremediációs kísérletekben is hatékonyan alkalmaztak *K. marxianus* törzseket; például a szennyvíz laktóz és cukortartalmának az eltávolításához az NRRL Y-610 (Hang *et al.*, 2003), valamint különböző festékanyagok biológiai megkötésére az IMB3 törzset (Meehan *et al.*, 2000) használták fel.

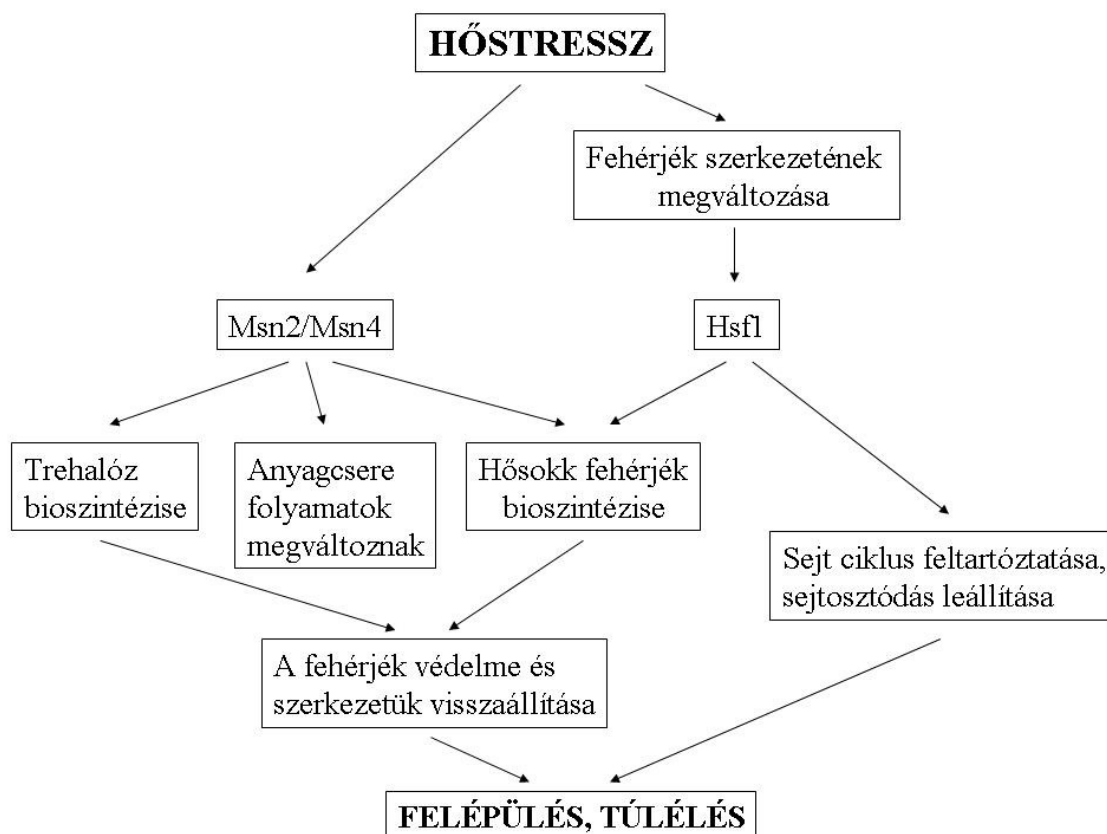
A *K. marxianus*-ról tudjuk, hogy egy termotoleráns faj, így viszonylag magas hőmérsékleten (45-50°C) is képes növekedni. Nem képes viszont az életben maradásra szigorúan anaerob körülmények között, de oxigénlimitált vagy teljesen aerob körülmények között, megfelelő cukortartalom mellett, nagy mennyiségben képes az etanol termelésére. Ezen tulajdonsága és az ehhez társuló gyors növekedése (Groeneveld *et al.*, 2009), továbbá széles szubsztrátspektruma alkalmassá teszi az ipari folyamatokban való alkalmazásra, elsősorban a bioetanol termelésre. Az utóbbi időben a magas hőmérsékleten történő - SSF technológiát alkalmazó - bioetanol előállításra nagy figyelmet fordítottak a szakemberek a hűtési költség lehetséges csökkentése miatt (Abdel-Banat *et al.*, 2010). Indiában a szeszgyártásban már használják a *K. marxianus* IMB3-as törzset (Singh *et al.*, 1998a).

2.6. Az élesztők hőstressz válasza

Ahhoz, hogy a *K. marxianus*-t minél magasabb hőmérsékleten történő etanol előállítására használjuk, szükségünk van arra, hogy megismerjük a hőstressz válaszának az elemeit és mechanizmusát.

Hőstressz hatására a sejtfelszínen lévő fehérjék szerkezete megváltozik, és ez az első jel a sejtek számára, hogy változás következett be a környezetben. A hőstressz válasz elsődleges szabályozó elemei a hősokk transzkripciós faktorok (Hsf) (Morimoto *et al.*, 1996). Az eukarióta szervezetekben előforduló hősokk transzkripciós faktorok közül a *S. cerevisiae*-ben és a *K. lactis*-ban is a Hsf1 nevűt azonosították, amelynek kulcsfontosságú szerepe van a hőstressz válaszban (Nieto-Sotelo *et al.*, 1990). Hőstressz hatása alatt a Hsf1 kötődik a DNS lánc megfelelő promóter régióihoz, ami megindítja a hősokk fehérjék szintézisét, melyek mint chaperon fehérjék védelmet nyújtanak a létfontosságú sejtalkotóknak. A Hsf1 ezidő alatt képes szabályozni a sejtciklust is a sejt védelme érdekében úgy, hogy a sejtosztódás folyamatát leállítja.

Hőstressz idején a Hsf1 mellett két másik transzkripciós faktor is szerepet játszik a védekezésben: az Msn2 és az Msn4. Ezek mellett, hogy indukálják a hősokk proteinek szintézisét, részt vesznek az anyagcsere folyamatok módosításában és a trehalóz bioszintézisében is (5. ábra).



5. ábra. Az élesztők hőstressz válasza (Trott A. és Morano K.A., 2003. nyomán)

A trehalózt az élesztősejt elsődlegesen tartalékszénhidrát forrásként használja és az, mint könnyen hasznosítható szénforrás a spórákban is megtalálható. Logaritmikus fázisban a trehalóz mennyisége nagyon kicsi a sejtekben, viszont hőstressz hatására ez ugrásszerűen megnő (Thevelein és Hofmann, 1995). A trehalóz védő hatást fejt ki a fehérjékre úgy, hogy blokkolja a hő indukálta protein aggregációt, valamint gátolja azon fehérjék szerkezetének a megváltozását, melyekhez kötődött.

Mindemellett a glutation (GSH, γ -glutamil-ciszteinil-glicin) mint antioxidáns, szabadgyök semlegesítő molekula is részt vesz a hőstressz elleni védekezésben.

E folyamatok gyors és összehangolt működése révén a sejt képes túlélni a hősokk kiváltotta stresszt.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. *Kluyveromyces 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 a CBS712 törzsből hoztuk létre a 3.2. fejezetben leírtak alapján. A törzseket YPD és YM tápagon 30 °C-on tenyésztettük a napi gyakorlati munka céljára.

A YPD táptalaj összetétele:

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

A YM táptalaj összetétele:

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

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

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

A *K. marxianus* CBS712 törzs 100 darab 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.

3.3. 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 újra és inkubáltuk ugyanezen körülmények (30 °C, 3 Hz., 2 nap) között. Mindezt tízszer megismételtük és ezután teszteltük a növekedését újra 48 °C-on. Az E1 mutáns képes volt újra 48 °C-on növekedni, azaz megtartotta termotoleráns fenotípusát.

3.4. *K. marxianus* CBS712 és az E1 mutáns 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 azt 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 x 7H₂O,
- 1 g l⁻¹ MgSO₄ x 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 voltak.

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.

3.5. A sejtméret meghatározása

A *K. marxianus* CBS 712 és E1 törzseket 37 és 47 °C-on 3 Hz mellett MYFM tápoldatban tenyésztettük a 3.4. fejezetben leírtak szerint. A mintákat a sejtnövekedés logaritmikus fázisában vettük a leoltást követő 8. órában. Három független kísérletben 100-100 sejtnek a hosszúságát és a szélességét mértük le a mikroszkópi fénykép alapján. A fényképeket tárgylemez mikrométer (CETI) segítségével készítettük el. Egy beosztás 0,01 mm-nek felelt meg.

3.6. A biomassza mennyiségének a meghatározása

A biomassza mennyiségét úgy határoztuk meg, hogy 5 ml mintát szűrtünk át egy megfelelő pólusméretű (0,45 µm) szűrőpapíron, majd a kiszűrt sejteket 24 óráig 70 °C-on szárítottuk és ezt követően a száraz sejttömeget fél órán belül lemértük (Rouwenhorst *et al.*, 1988).

3.7. Az etanol termelés vizsgálata és optimalizációja

A *K. marxianus* CBS 712 és E1 törzseket 100 ml MYFM tápoldatot tartalmazó 250 ml-es lombikban inkubáltuk 3 Hz rázatási frekvencia mellett. 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.

3.8. Az etanol tartalom mérése

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.

3.9. A maradék glükóz mérése

3.9.1. 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 hőlégsterilizátorban 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, $r = 0,9998$.

3.9.2. A glükóz mérése glükóz oxidáz enzim segítségével

A glükóz mennyiség meghatározására a Leary és munkatársai (1992) által kidolgozott „rate assay”-t használtuk. A reagens összetevői (11 mmol l⁻¹ fenol, 0,76 mmol l⁻¹ 4-aminoantipirin, 4 kU l⁻¹ glükóz oxidáz és 1 kU l⁻¹ peroxidáz) 0,1 mol l⁻¹ pH=6,6 foszfát pufferben voltak feloldva. A reakcióközeg 10 µl mintát (fermentlé) és 1 ml reagenst tartalmazott; ezen reakció 1 perc alatt játszódott le, amelynek terméke 500 nm-en detektálható volt. Az adatok kiértékelése kalibrációs görbe segítségével történt, amit 0,03-0,3 mol l⁻¹ glükóz felhasználásával készítettünk el ($r = 0,9997$).

3.10. Konverziós ráta kiszámítása

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 ($\text{mol l}^{-1} \text{ glükóz}^{-1}$) az elméleti maximális etanol kihozatal.

3.11. Fiziológiai vizsgálatok

3.11.1. 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 fordulatszámon 8 órán át, a 3.4. fejezetben leírtaknak megfelelően. 8 óra eltelte 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 rázógéphez. 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 eltelte után. A trehalózt 100 mg sejtéből (DCM) nyertük ki Ferreira és munkatársai (1997) módszerei alapján.

A sejteket üveggyöngy segítségével tártuk föl a 3.11.5.1. fejezetben leírtak alapján. A feltárt sejtekre 2 ml forrásban lévő abszolút etanolt tettünk és 2 perc várakozás után centrifugáltuk maximális fordulatszámon (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.

3.11.2. A sejtek GSH és GSSG tartalmának meghatározása

Az élesztősejteket a 3.4. 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.

3.11.3. Etanol, oxidatív és ozmotikus stressz tolerancia vizsgálat

A *K. marxianus* CBS 712 és E1 törzseket különböző hőmérsékleteken, 37 és 45 °C-on tenyésztettük elő. Ezen előtenyészetek 3 ml-ével inokuláltuk a 250 ml-es lombikokat, amelyekben 100 ml 210 g l⁻¹ glükózt tartalmazó MYFM tápoldat volt. Ezen tápoldatban vizsgáltuk külön-külön az etanol (0,65, 1,09 és 1,38 mol l⁻¹), a nátrium-klorid (1,0, 1,25, 1,5 és 2,0 mol l⁻¹), a kálium-klorid (1,0, 1,25, 1,5 és 2,0 mol l⁻¹), és a

hidrogén-peroxid (5, 7,5 és 10 mmol l⁻¹) toleranciát. Az inkubálás körülményei 3 Hz, 24 óra, 37 °C voltak. A növekedést az optikai denzitás 600 nm-en (OD₆₀₀) mért változásával követtük nyomon.

3.11.4. A fehérjetartalom meghatározása

A fehérjetartalom meghatározását Bradford reagenssel hajtottuk végre. A reakcióközegben 100 µl megfelelő hígítású mintához 1 ml Bradford reagenst adtunk és a színintenzitás változását 595 nm hullámhosszon detektáltuk. A kalibrációs görbe elkészítéséhez 0-25 µg ml⁻¹ szarvasmarha szérum albumint (BSA) használtunk. Ebben a tartományban a változás lineáris volt, $r = 0,9997$.

3.11.5. Hőstressz fehérjék kimutatása

3.11.5.1. Az élesztősejtek feltárása üveggyöngy segítségével

A *K. marxianus* CBS 712 és E1 törzseket a 3.4. fejezetben leírtak alapján tenyésztettük 25, 30, 37, 47 és 48 °C-on 24 órán át. A sejteket centrifugáltuk (4000 g, 10 perc, 4 °C), majd a pellethez hozzáadtunk annyiszor 100 µl puffert (50 mmol l⁻¹ nátrium-foszfát pH 7,4, 1 mmol l⁻¹ PMSF, 1 mmol l⁻¹ EDTA, 5 % glicerin), ahány ml tenyészetet centrifugáltunk. Ezen kívül még proteáz-inhibítor koktélt (Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország) is használtunk a fehérjék védelme érdekében {(1 ml 20 g élesztősejt)⁻¹}

Ezek után a jégen tartott pellethez hozzáadtuk a savval előkezelt 710-1180 µm nagyságú üveggyöngyöket majd 30 másodperc vortexes kezelés után 30 másodpercre jégre tettük a mintát. Ezt a ciklust 20-szor ismételtük meg, miközben mikroszkóp segítségével nyomon követtük a sejtfeltárás menetét.

A feltárt sejteket centrifugáztuk (8000 g, 15 perc, 4°C) és a felülúszót azonnal SDS-poliakrilamid gélelektroforézis segítségével analizáltuk.

3.11.5.2. SDS-PAGE

A fehérjemintákat az SDS gélre való felvitel előtt redukáló mintapufferrel hőkezeltük (5 perc, 100 °C-os vízfürdő).

A redukáló mintapuffer összetétele:

- 10 % (w/v) glicerin,
- 2 % (w/v) TRIS/HCl puffer (0,5 mol l⁻¹, pH 6.8),
- 2,5 % (w/v) brómfenolkék oldat,
- 5 % (w/v) merkaptotanol.

A fehérjék elválasztásához 12,5 % (w/v)-os poliakrilamid gél (Laemmli, 1970) és Mini-PROTEAN II (Bio-Rad, USA) készüléket használtam.

A főgél összetétele (12,5 %):

- 4,2 ml 30 % (w/v) akrilamid oldat,
- 2,5 ml TRIS/HCl puffer (1,5 mol l⁻¹, pH 8.8),
- 0,1 ml 10 % (w/v) SDS oldat,
- 3,02 ml desztillált víz,
- 5 µl TEMED,
- 50 µl 10 % (w/v) APS.

A gyűjtőgél alkotói (5 %):

- 0,44 ml 30 % (w/v) akrilamid oldat,
- 0,83 ml TRIS/HCl puffer (0,5 mol l⁻¹, pH 6.8),
- 33 µl 10 % (w/v) SDS oldat,
- 2,03 ml desztillált víz,
- 2 µl TEMED,
- 16,7 µl 10 % (w/v) APS.

A tankpuffer összetétele:

- 1,5 % (w/v) TRIS,
- 0,5 % (w/v) SDS,
- 7,2 % (w/v) glicin (pH 8,3).

A fehérje molekulatömegének meghatározásához a Page Ruler Protein Standards-t használtam (MBI Fermentas, Németország). Amikor a minta a gyűjtőgélben volt 100 V-ot, majd amikor már a főgélben van 200 V feszültséget használtunk a mintában lévő fehérjék szétválasztásához. Az elektroforézist követően Coomassie Brilliant Blue festési eljárással tettük láthatóvá a fehérjesávokat.

3.12. Statisztikai módszerek

3.12.1 Általános statisztikai módszerek

A statisztikai elemzésekhez minden esetben 3-5 független mérés átlagát és azok szórását határoztuk meg. A szignifikancia vizsgálatához a Student-féle t-tesztet használtuk, ahol $p < 5 \%$ valószínűségi szinteken jelentkező különbségeket tekintettük szignifikánsnak.

3.12.2. 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 °C), és 6 (0,51, 0,71, 0,91, 1,11, 1,30 és 1,51 mol l⁻¹) kiindulási glükóz koncentráció mellett megmértük a termelt etanol mennyiségét a tenyésztés 12., 24. és 38. órájában (3. és 4. táblázatok).

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 °C felelt meg 1 mol l⁻¹ glükóz

koncentrációváltozásnak. Az illesztett függvény értékeinek visszatranszformálásával kapott függvényt tekintettük válaszfelületnek, és 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 szülői és az E1 mutáns törzs optimum pontjához közel ($1,06 \text{ mol l}^{-1}$ kiindulási glükóz koncentráció, 44°C , a fermentációs idő 30 óra) 6-6 egymástól független, párhuzamos fermentációt végeztünk, annak érdekében, hogy megerősítsük a maximum etanol kihozatali értéket a gyakorlatban is. Mivel a szülői és a mutáns törzs optimum pontjai között a különbség nem nagy, így a maximum pontok pontosabb összehasonlítása érdekében a kísérletet egyazon időpontban és ugyanabban a rázógépben végeztem el.

Elvégeztük a 6-6 egymástól független, párhuzamos fermentációt mind a szülői, mind a mutáns törzssel a legnagyobb különbségeket adó paraméterek mellett is ($1,09 \text{ mol l}^{-1}$ kiindulási glükóz koncentráció, 47°C , a fermentációs idő 35 óra).

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

2.13. Felhasznált vegyszerek

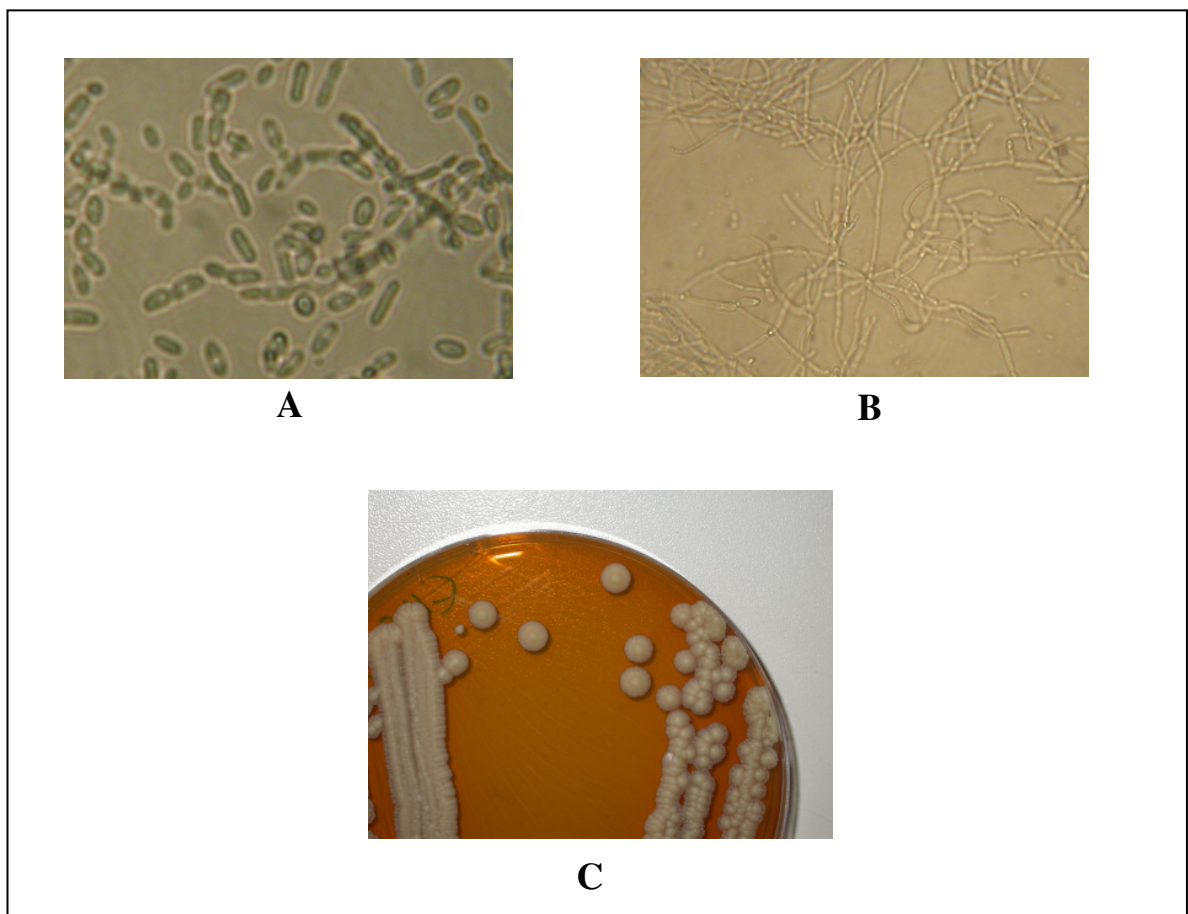
A kísérleteinkben felhasznált vegyszerek mindegyike analitikai minőségű volt, és hacsak máshogyan nem lettek jelölve, a Sigma-Aldrich Kft. (Budapest, Magyarország) és a Spektrum-3D Kft. (Debrecen, Magyarország) termékei voltak.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

4.1. A *Kluyveromyces marxianus* CBS712 és a termotoleráns E1 mutáns törzsek jellemzése

4.1.1. A *K. marxianus* CBS712 szülői törzs bemutatása

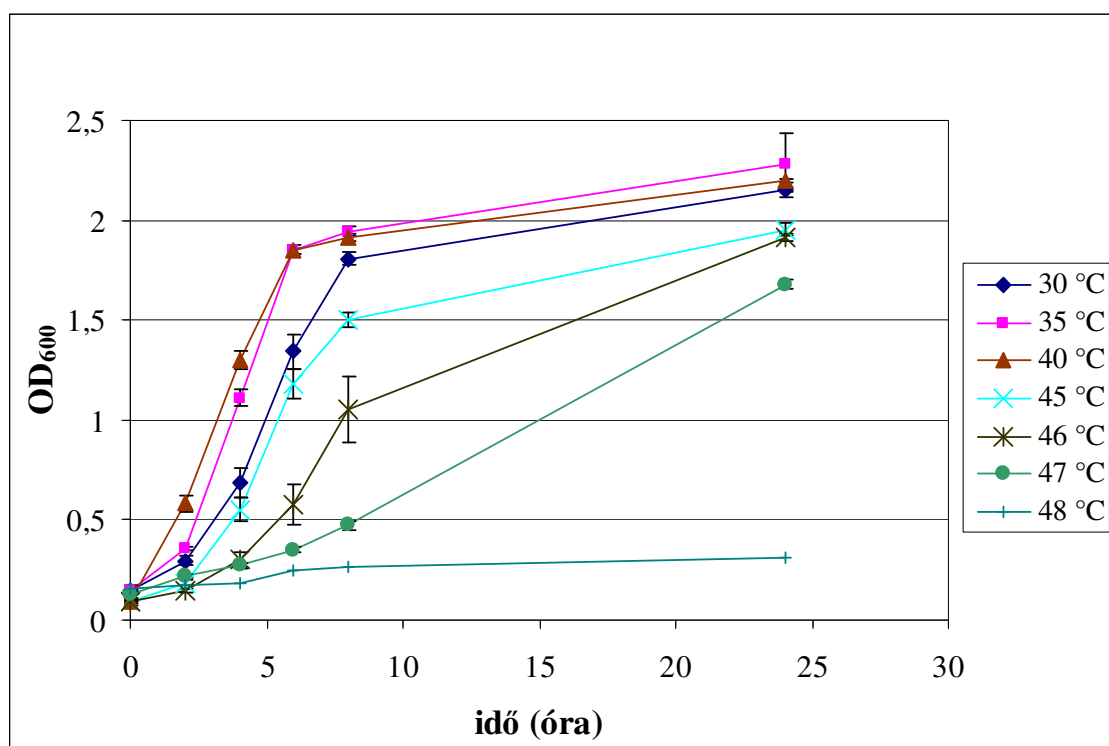
A *K. marxianus* CBS712 törzsről ismert, hogy komplett tápoldatban bimbózó és pszeudohifás növekedésre is képes. E morfológiai jellemzőt YPD tápoldatban teszteltük (6. ábra). Azt tapasztaltuk, hogy a pszeudohifás növekedés az idősebb tenyészetekre jellemző, mely jól látható az 6. ábra B jelű fényképén.



6. ábra: A *Kluyveromyces marxianus* CBS712 törzs bimbózó (A) és pszeudohifás növekedése (B) YPD tápoldatban, továbbá felületi tenyészet (C) YPD tápagaron. Az A képen a süllyeszett kultúra 20 órás korában, a B képen 48 órás korában látható.

4.1.1.1. A szülői törzs növekedésének a vizsgálata

A törzs növekedését először az élesztőgenetikában rutinszerűen használt körülmények között, azaz 30 °C –on vizsgáltuk YPD tápoldatban. Az etanol termelés szempontjából fontos hőmérsékleti tartomány eléréséig (45 °C) csak néhány hőfokon, a hőmérséklet nagy léptékű emelésével teszteltük. Intenzív növekedést tapasztaltunk 30, 35 és 40 °C-on is (7. ábra). Figyelemre méltó, hogy a törzs 45 °C-on megfigyelhető növekedése nem tér el drasztikusan az alacsonyabb hőmérsékleteken (35 és 40 °C) tapasztalttól, amely azért fontos, mert a *K. marxianus* iparban már használt törzseit (IMB3, IMB4) is 45 °C-on alkalmazzák (Hack és Marchant, 1998b; Banat és Marchant, 1995). 45 °C fölött fokenként emeltük a hőmérsékletet, és 48 °C-on a törzs már csak csekély növekedést mutatott (OD₆₀₀: 0,156 kiinduló tenyészet, 24 órás tenyészet OD₆₀₀: 0,315) (7. ábra).



7. ábra: *Kluyveromyces marxianus* CBS712 törzs növekedése különböző hőmérsékleten YPD tápoldatban az optikai denzitás 600 nm-en történő meghatározásával.

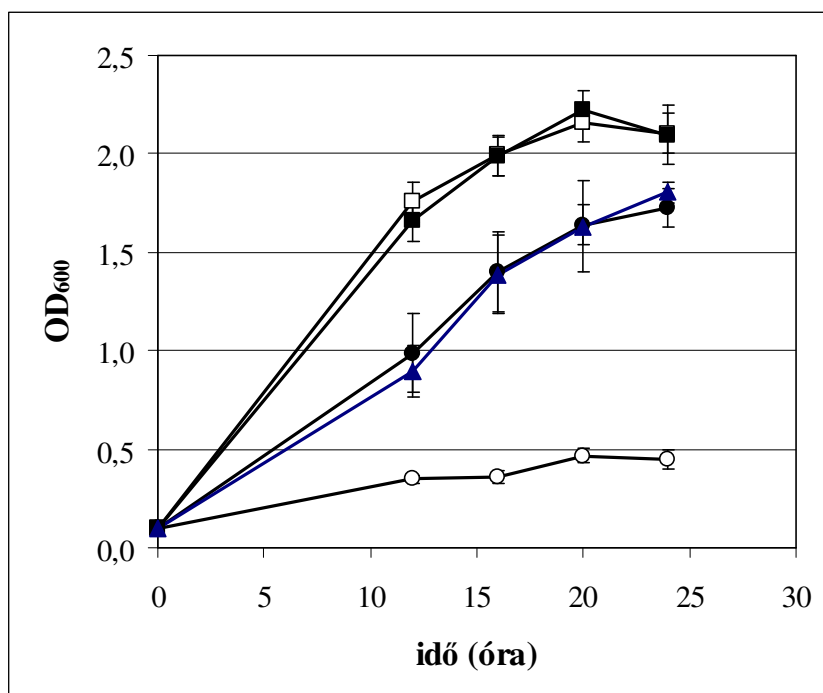
Minden egyes hőmérsékletnél 3 mérés átlagát és szórását mutatja az ábra.

4.1.2 A *K. marxianus* termotoleráns E1 mutáns törzs létrehozása és vizsgálata

Célunk egy olyan mutáns törzs létrehozása volt, amely az ipari hasznosítás számára értékesebb tulajdonságokkal rendelkezik, mint a CBS 712 törzs. A termotoleráns E1 mutánt a CBS712 törzsből hoztuk létre egyre növekvő hőmérsékleten történő tenyésztéssel.

4.1.2.1. Az E1 mutáns fenotípus stabilitásának és növekedésének vizsgálata

Az E1 mutáns növekedése MYFM tápoldatban a 48 °C-nál alacsonyabb hőmérsékleteken teljesen hasonló, mint a szülői törzsé. 48 °C-on viszont csak a mutáns képes a növekedésre (8. ábra). Ezt az utóbbi tulajdonságát még akkor is képes volt megtartani, amikor 10-szer egymást követően, nem szelektív körülmények (30 °C) között passzáltuk és utána újra 48 °C-ra oltottuk át (8. ábra).



8. 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 való átoltás után (▲) MYFM tápoldatban. Az ábra 6 független mérés átlagát és szórását tartalmazza.

Hasonló adaptációs kísérletet végeztek el Ballesteros és munkatársai (1993) a *K. marxianus* LG törzzsel. Sikertelenül nekik e törzs termotoleranciáját megnövelni 42 °C-ról 47 °C-ra. Ezen eredményt ugyanazzal a módszerrel sikerült elérniük, mint amit mi is alkalmaztunk az E1 mutáns kialakításakor, tehát az élesztőt folyamatosan, egyre magasabb hőmérsékleten tenyésztették, és így az adaptálódott a megnövekedett hőmérsékletre.

4.1.3. A *K. marxianus* CBS712 és E1 mutáns törzsek morfológiai vizsgálata

Az E1 mutáns vizsgálatoknál felfigyeltünk arra, hogy a szülői és a mutáns törzs sejtjei morfológiailag különböznek. Általánosságban elmondható, hogy a mutáns sejtjei kerekesebbek, mint a szülői sejtjei.

37 °C-on tenyésztve a törzseket a mutánsok szignifikánsan szélesebbek, mint a szülői sejtjei (mutáns: $5,3 \pm 0,5 \mu\text{m}$, szülői: $3,2 \pm 0,6 \mu\text{m}$) .

Magas hőmérsékleten, 47 °C-on, a szülői törzs sejtjei kerekesebb lettek (hosszúság: $10 \pm 0,7 \mu\text{m}$, szélesség: $5,5 \pm 1,5 \mu\text{m}$), a 37 °C-on tapasztalathoz képest (hosszúság: $9,8 \pm 1,1 \mu\text{m}$, szélesség: $3,2 \pm 0,6 \mu\text{m}$). Az E1 mutáns sejtjei az ilyen magas hőmérsékleten kisebbek voltak (hosszúság: $8,3 \pm 1 \mu\text{m}$, szélesség: $4,6 \pm 0,6 \mu\text{m}$) és hosszúságuk szignifikánsan csökkent, az alacsonyabb hőmérsékleten növekedett sejtjeihez képest (hosszúság: $9,9 \pm 0,7 \mu\text{m}$, szélesség: $5,3 \pm 0,5 \mu\text{m}$).

Minden egyes mérés esetében 100 sejtet vizsgáltam meg.

4.1.4. Az etanol termelés optimalizálása a válaszfelület meghatározó módszer (RSM) segítségével a *K. marxianus* CBS 712 és E1 mutáns törzsek esetében

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 fordulatszámon. A fermentáció során mintákat vettünk a tenyésztés 12., 24. és a 38. órájában.

4.1.4.1. A termelt etanol koncentrációja

A vett minták etanol tartalmát meghatároztuk a 3.8. fejezetben leírtak szerint és a 3. és 4. táblázatban összesítettük.

Hőmérséklet (°C)	Idő (h)	Etanol (mol l ⁻¹)					
		Kiindulási glükóz koncentráció (mol l ⁻¹)					
		0,51	0,71	0,91	1,11	1,31	1,51
35 °C	16	0,12	0,20	0,17	0,14	0,15	0,09
	24	0,22	0,36	0,26	0,25	0,18	0,18
	38	0,42	0,36	0,49	0,04	0,44	0,37
37 °C	16	0,08	0,13	0,15	0,17	0,21	0,15
	24	0,15	0,18	0,24	0,25	0,29	0,03
	38	0,27	0,26	0,22	0,21	0,34	0,30
39 °C	16	0,07	0,07	0,08	0,12	0,18	0,18
	24	0,18	0,22	0,29	0,17	0,23	0,22
	38	0,22	0,20	0,30	0,28	0,25	0,23
41 °C	16	0,06	0,08	0,08	0,09	0,14	0,18
	24	0,20	0,35	0,47	0,47	0,50	0,27
	38	0,27	0,37	0,39	0,45	0,43	0,32
43°C	16	0,18	0,24	0,32	0,39	0,25	0,15
	24	0,37	0,44	0,75	0,9	0,65	0,25
	38	0,31	0,35	0,56	0,69	0,54	0,35
45 °C	16	0,25	0,34	0,43	0,50	0,35	0,19
	24	0,37	0,49	0,84	0,87	0,63	0,37
	38	0,24	0,36	0,77	0,82	0,52	0,37
47 °C	16	0,03	0,04	0,08	0,05	0,04	0,04
	24	0,12	0,16	0,21	0,18	0,18	0,19
	38	0,09	0,13	0,24	0,33	0,27	0,32
48 °C	16	0	0	0	0	0	0
	24	0	0	0	0	0	0
	38	0	0	0	0	0	0

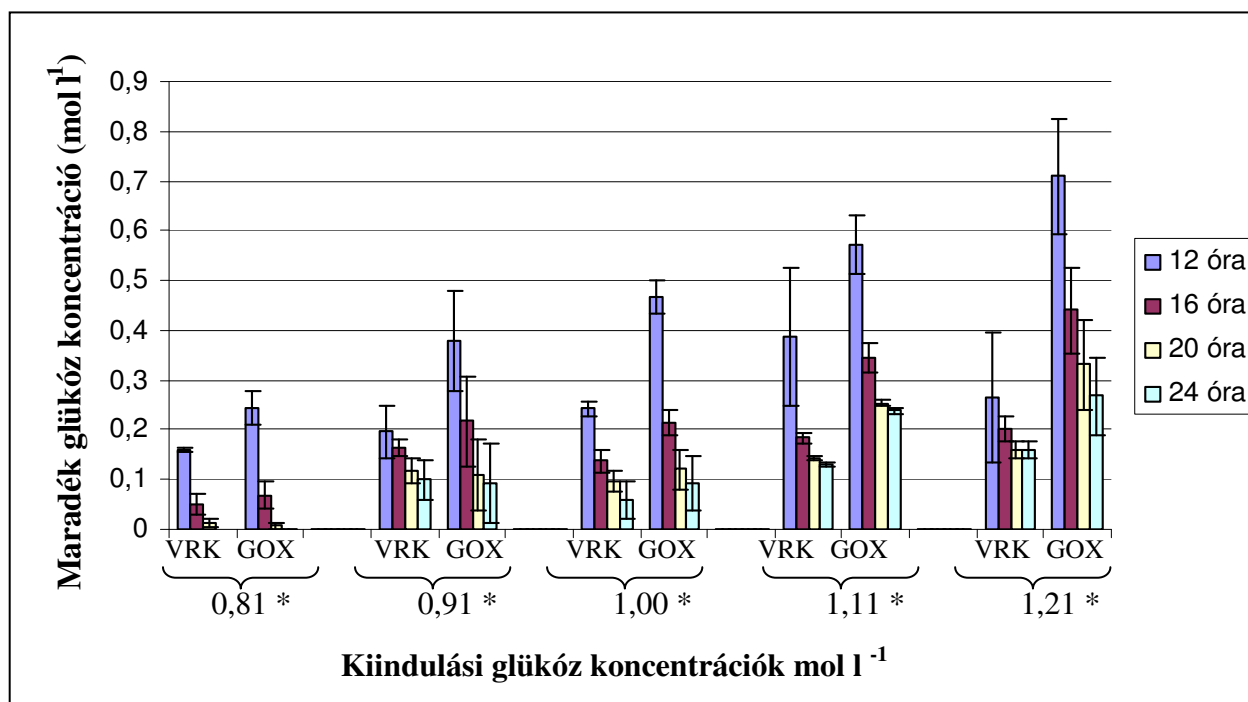
3. táblázat: A *Kluyveromyces marxianus* CBS712 törzs etanol termelési adatai az RSM analízishez.

Hőmérséklet (°C)	Idő (h)	Etanol (mol l ⁻¹)					
		Kiindulási glükóz koncentráció (mol l ⁻¹)					
		0,51	0,71	0,91	1,11	1,31	1,51
35 °C	16	0,01	0,15	0,22	0,24	0,23	0,19
	24	0,26	0,34	0,38	0,38	0,37	0,32
	38	0,31	0,44	0,30	0,37	0,34	0,40
37 °C	16	0,19	0,20	0,25	0,28	0,27	0,26
	24	0,34	0,28	0,40	0,45	0,41	0,30
	38	0,23	0,31	0,38	0,45	0,36	0,45
39 °C	16	0,08	0,11	0,26	0,18	0,14	0,14
	24	0,18	0,15	0,51	0,48	0,46	0,22
	38	0,20	0,38	0,38	0,37	0,47	0,25
41 °C	16	0,07	0,12	0,19	0,26	0,20	0,28
	24	0,37	0,35	0,50	0,47	0,51	0,53
	38	0,43	0,47	0,23	0,55	0,37	0,44
43 °C	16	0,15	0,13	0,20	0,38	0,34	0,12
	24	0,30	0,35	0,65	0,69	0,49	0,34
	38	0,24	0,26	0,57	0,67	0,43	0,25
45 °C	16	0,23	0,25	0,27	0,39	0,24	0,19
	24	0,42	0,47	0,75	0,81	0,69	0,35
	38	0,30	0,37	0,65	0,86	0,69	0,39
47 °C	16	0,11	0,07	0,14	0,13	0,10	0,09
	24	0,33	0,32	0,50	0,46	0,46	0,19
	38	0,31	0,37	0,58	0,59	0,50	0,39
48 °C	16	0,03	0,03	0,04	0,04	0,04	0,04
	24	0,07	0,09	0,12	0,12	0,12	0,17
	38	0,25	0,26	0,39	0,33	0,23	0,01

4. táblázat: A *Kluyveromyces marxianus* E1 mutáns etanol termelési adatai az RSM analízishez.

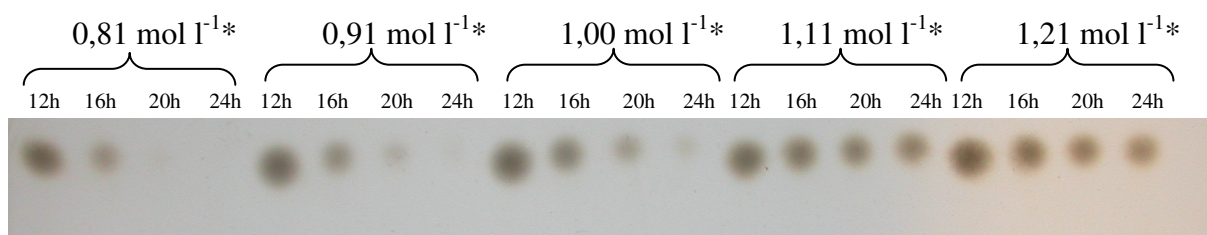
4.1.4.2. A maradék glükóz mennyiségének a meghatározása

A termelés gazdaságossága nemcsak attól függ, hogy milyen magas hőmérsékleten tudunk etanolt termelni, hanem az alkalmazott glükóz hasznosításának a mértékétől is. Ennek érdekében meg kellett határoznunk a maradék glükóz mennyiségét, amelyből később a konverziós ráta értékeket ki tudtuk számolni. A maradék glükóz koncentrációjának a megállapításánál elengedhetetlen volt a lehető legpontosabb eredményt adó módszer alkalmazása. Kísérleteinkben ezért vékonyréteg kromatográfiával (VRK) (10. ábra) és glükóz oxidáz enzim segítségével is meghatároztuk a maradék glükózt (9. ábra). A 9. és a 10. ábra adatai a 45 °C-on végzett fermentáció eredményeit mutatja a szülői törzssel. Ezeket a kísérleteket magasabb hőmérsékleten is elvégeztem (46, 47, 48 °C-on) és hasonló tendenciát tapasztaltam, mint a 45 °C-on végzett kísérletben. A 9. ábra jól szemlélteti, hogy szignifikáns a különbség a vékonyréteg kromatográfiával és a glükóz oxidáz enzim segítségével meghatározott maradék glükóz koncentráció között.



9. ábra: A maradék glükóz mennyisége vékonyréteg kromatográfia (VRK) és glükóz-oxidáz enzim (GOX) felhasználásával 45 °C-on. {*: kiindulási glükóz koncentráció (mol l⁻¹) }.

Az ábra 3 független mérés átlagát és szórását tartalmazza.



10. ábra: A maradék glükóz mennyisége VRK lemezen. *: 0,81, 0,91, 1,00, 1,11, 1,21 mol l⁻¹ kiindulási glükóz koncentráció mellett láthatjuk a glükóz fogyását a fermentáció 12., 16., 20. és 24. órájában.

A maradék glükóz mennyiségének meghatározásánál az alkalmazott két módszer között jelentős különbséget tapasztaltunk; a glükóz oxidáz enzimmel végzett vizsgálatok végig jelentősen nagyobb értéket mutattak a VRK segítségével meghatározott értékekhez képest (9. ábra). Feltételezésünk, illetve kontroll kísérleteink szerint ennek az az oka, hogy a fermentáció alatt olyan vegyületek termelődnek, amelyek befolyásolják az enzimes mérést. Hipotézisünk szerint a fermentáléban számos olyan, az élesztő által termelt extracelluláris enzim és anyag található, amelyeknek a hatásait a glükóz oxidázra és a peroxidázra nem ismerjük. Ez alapján a VRK-val végzett vizsgálatokat tekintjük megbízható adatoknak (7. ábra).

A szülői és a mutáns törzs mintáiból az RSM analízishez meghatároztuk a maradék glükóz koncentrációt a 3.9.1. fejezetben leírtak szerint és az adatokat összesítettük a 5. és 6. táblázatban.

Hőmérséklet (°C)	Idő (óra)	Maradék glükóz mennyisége (mol l ⁻¹)					
		Kiindulási glükóz koncentráció (mol l ⁻¹)					
		0,51	0,71	0,91	1,11	1,31	1,51
35 °C	16	0,25	0,32	0,58	0,86	0,95	0,27
	24	0,17	0,24	0,31	0,51	0,57	0,95
	38	0	0	0,11	0,16	0,49	0,86
37 °C	16	0,19	0,25	0,70	0,84	0,85	1,10
	24	0,13	0,20	0,32	0,59	0,78	0,99
	38	0	0,04	0,13	0,16	0,71	0,92
39 °C	16	0,20	0,25	0,65	0,80	0,84	1,12
	24	0,10	0,14	0,30	0,47	0,72	0,99
	38	0	0,12	0,22	0,27	0,68	0,95
41 °C	16	0,20	0,28	0,66	0,83	0,91	1,20
	24	0,02	0,09	0,24	0,44	0,48	0,90
	38	0	0,11	0,21	0,25	0,45	0,81
43 °C	16	0,15	0,19	0,67	0,66	0,86	0,93
	24	0	0,08	0,15	0,37	0,63	0,86
	38	0	0,09	0,17	0,11	0,44	0,77
45 °C	16	0,19	0,22	0,69	0,91	1,04	1,24
	24	0,08	0,14	0,24	0,39	0,64	0,94
	38	0	0,04	0,21	0,09	0,55	0,88
47 °C	16	0,27	0,34	0,72	0,95	1,08	1,35
	24	0,16	0,21	0,35	0,88	0,99	1,26
	38	0,11	0,19	0,26	0,32	0,81	1,13
48 °C	16	0	0	0	0	0	0
	24	0	0	0	0	0	0
	38	0	0	0	0	0	0

5. táblázat: A *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 törzs maradék glükóz mennyiségének adatai az RSM analízishez.

Hőmérséklet (°C)	Idő (óra)	Maradék glükóz mennyisége (mol l ⁻¹)					
		Kiindulási glükóz koncentráció (mol l ⁻¹)					
		0,51	0,71	0,91	1,11	1,31	1,51
35 °C	16	0,24	0,27	0,53	0,88	1,10	1,30
	24	0,15	0,20	0,25	0,47	0,54	1,09
	38	0,0	0,01	0,11	0,21	0,50	1,06
37 °C	16	0,17	0,28	0,49	0,90	1,06	1,30
	24	0,16	0,18	0,34	0,48	0,54	1,16
	38	0,0	0,01	0,11	0,21	0,48	1,06
39 °C	16	0,16	0,26	0,44	0,98	1,09	1,31
	24	0,0	0,19	0,30	0,46	0,49	1,08
	38	0,0	0,13	0,28	0,44	0,47	1,05
41 °C	16	0,19	0,28	0,70	1,00	1,07	1,30
	24	0,06	0,19	0,23	0,42	0,48	0,97
	38	0,0	0,11	0,24	0,34	0,44	0,98
43 °C	16	0,27	0,38	0,51	0,64	0,95	1,01
	24	0,0	0,15	0,22	0,37	0,70	0,95
	38	0,0	0,08	0,09	0,18	0,37	0,85
45 °C	16	0,26	0,39	0,55	0,80	0,82	1,15
	24	0,01	0,16	0,26	0,36	0,53	0,99
	38	0,0	0,11	0,21	0,12	0,46	0,93
47 °C	16	0,23	0,35	0,69	0,94	1,13	1,42
	24	0,15	0,20	0,40	0,82	0,92	1,20
	38	0,10	0,16	0,24	0,25	0,68	0,88
48 °C	16	0,28	0,30	0,73	0,79	0,92	1,15
	24	0,18	0,21	0,32	0,66	0,80	0,98
	38	0,05	0,16	0,25	0,38	0,79	0,96

6. táblázat: A *Kluyveromyces marxianus* E1 mutáns törzs maradék glükóz mennyiségének adatai az RSM analízishez.

4.1.4.3. A száraztömeg adatok

Az etanol termelés vizsgálatával párhuzamosan a biotömeg mennyiségét is meghatároztuk. A száraztömeg mennyiségének a mérését a 3.6. fejezetben leírtak szerint Rouwenhorst és munkatársai (1988) módszere alapján végeztük el. Ahogyan azt a növekedési görbék alapján vártuk, a biotömeg mennyisége a hőmérséklet növelésével párhuzamosan csökkent.

Az adatokat a 7. és a 8. táblázatban összesítettük.

Hőmérséklet (°C)	Idő (óra)	Szárastömeg mennyisége (g l ⁻¹)					
		Kiindulási glükóz koncentráció (mol l ⁻¹)					
		0,51	0,71	0,91	1,11	1,31	1,51
35 °C	16	36,9	30,9	38,2	36,3	35,2	38,1
	24	49,5	53,4	51,4	50,2	50,5	50,2
	38	51,8	59,6	49,4	51,2	51,8	54,5
37 °C	16	31,05	38,4	43,9	43,9	49,6	49,3
	24	51,3	55,5	62,4	58,8	53,9	58,1
	38	58,7	57,0	48,8	48,0	49,9	47,8
39 °C	16	36,4	42,6	37,6	41,8	46,6	49,9
	24	54,6	52,8	51,9	53,4	46,4	59,0
	38	58,0	58,3	58,0	58,5	65,5	49,0
41 °C	16	35,7	42,5	39,5	46,5	54,5	56,2
	24	54,8	58,0	61,5	59,0	64,0	60,3
	38	49,3	39,0	58,8	58,8	59,3	57,8
43 °C	16	41	41,7	46,2	47,7	48,5	56,2
	24	52,0	54,5	57,3	56,8	58,5	59,3
	38	51,0	58,3	51,0	57,8	58,8	53,0
45 °C	16	33,5	37,2	43,7	55	54,7	53
	24	56,3	61,3	60,8	61,0	57,3	45,3
	38	59,0	58,5	58,0	58,8	58,5	58,3
47 °C	16	27,5	32,2	39,2	35,2	44,7	48
	24	29,5	31,0	38,8	40,3	48,5	55,3
	38	41,3	53,8	39,3	35,3	47,5	36,3
48 °C	16	0	0	0	0	0	0
	24	0	0	0	0	0	0
	38	0	0	0	0	0	0

7. táblázat: A *Kluyveromyces marxianus* CBS712 törzs szárastömeg adatai az RSM analízishez.

Hőmérséklet (°C)	Idő (óra)	Szárastömeg mennyisége (g l ⁻¹)					
		Kiindulási glükóz koncentráció (mol l ⁻¹)					
		0,51	0,71	0,91	1,11	1,31	1,51
35 °C	16	34,5	45,5	50,3	55,5	51,8	53,8
	24	36,8	44,3	54,5	50,8	53,0	53,3
	38	43,8	61,3	45,3	62,0	48,3	53,5
37 °C	16	41,0	19,0	33,8	36,0	43,5	38,5
	24	27,3	32,0	31,5	34,5	38,8	43,5
	38	45,8	53,5	57,0	59,5	60,3	59,5
39 °C	16	42,3	43,8	39,3	47,3	30,5	32,3
	24	54,5	31,0	42,5	44,3	39,3	43,0
	38	50,5	54,3	59,8	60,8	68,3	56,8
41 °C	16	35,0	40,8	38,8	38,3	30,8	30,5
	24	40,5	33,8	36,0	35,3	37,8	41,5
	38	50,3	64,5	56,0	60,3	66,8	57,8
43 °C	16	47,0	47,3	47,3	45,8	47,3	42,0
	24	30,5	33,3	25,5	35,5	35,8	44,5
	38	55,5	56,8	53,8	62,0	63,0	62,3
45 °C	16	42,3	49,5	49,5	47,0	56,8	46,3
	24	46,8	47,0	46,8	49,3	56,0	56,8
	38	49,5	48,3	55,0	60,5	53,0	60,5
47 °C	16	47,5	57,0	53,0	48,3	40,5	42,5
	24	49,0	49,0	56,3	49,5	41,3	41,8
	38	54,5	54,0	52,8	66,0	66,0	65,5
48 °C	16	32,3	34,0	63,8	46,0	32,5	38,0
	24	62,5	58,5	47,0	65,3	53,5	54,8
	38	48,0	46,3	50,8	55,0	50,8	45,5

8. táblázat: A *Kluyveromyces marxianus* E1 törzs szárastömeg adatai az RSM analízishez.

4.1.4.4. A *Kluyveromyces marxianus* CBS712 szülői és E1 mutáns törzs fermentációs paramétereinek az összevetése

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 $1,05 \text{ mol l}^{-1}$, ami $1,03 \text{ mol l}^{-1}$ kiindulási glükóz koncentrációnál $44,2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ -on a fermentáció 30. órájában figyelhető meg. Az E1 mutáns esetében a maximális etanol koncentráció $0,97 \text{ mol l}^{-1}$, ami $1,09 \text{ mol l}^{-1}$ kiindulási glükóz koncentrációnál $44,8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ -on a fermentáció 31. órájában észlelhető (11. ábra).

A modell alapján a legnagyobb különbség a szülői és a mutáns törzs között $1,09 \text{ mol l}^{-1}$ kiindulási glükóz koncentrációnál $47,2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ -on a fermentáció 35. órájában van (11. ábra).

Ahhoz, hogy a gyakorlatban is megerősítsük ezen értékek helyességét, lemértük a termelt etanol, a maradék glükóz és a biomassa mennyiségét a modell által megadott pontokon a 3.12.2. fejezetben leírtak szerint. Az eredményeket a 9. táblázatban foglaltam össze.

A termelt etanol mennyiségének adatait, illetve a kiindulási - és a maradék glükóz koncentrációt felhasználva konverziós ráta értékeket számoltunk a 3.10. fejezetben leírtaknak megfelelően. A 9. táblázatból láthatjuk, hogy optimális körülmények esetén nincs nagy különbség a szülői és a mutáns törzs etanoltermelése között, viszont $47 \text{ }^{\circ}\text{C}$ -on a mutáns törzsszel gazdaságosabb az etanol termelés.

	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}

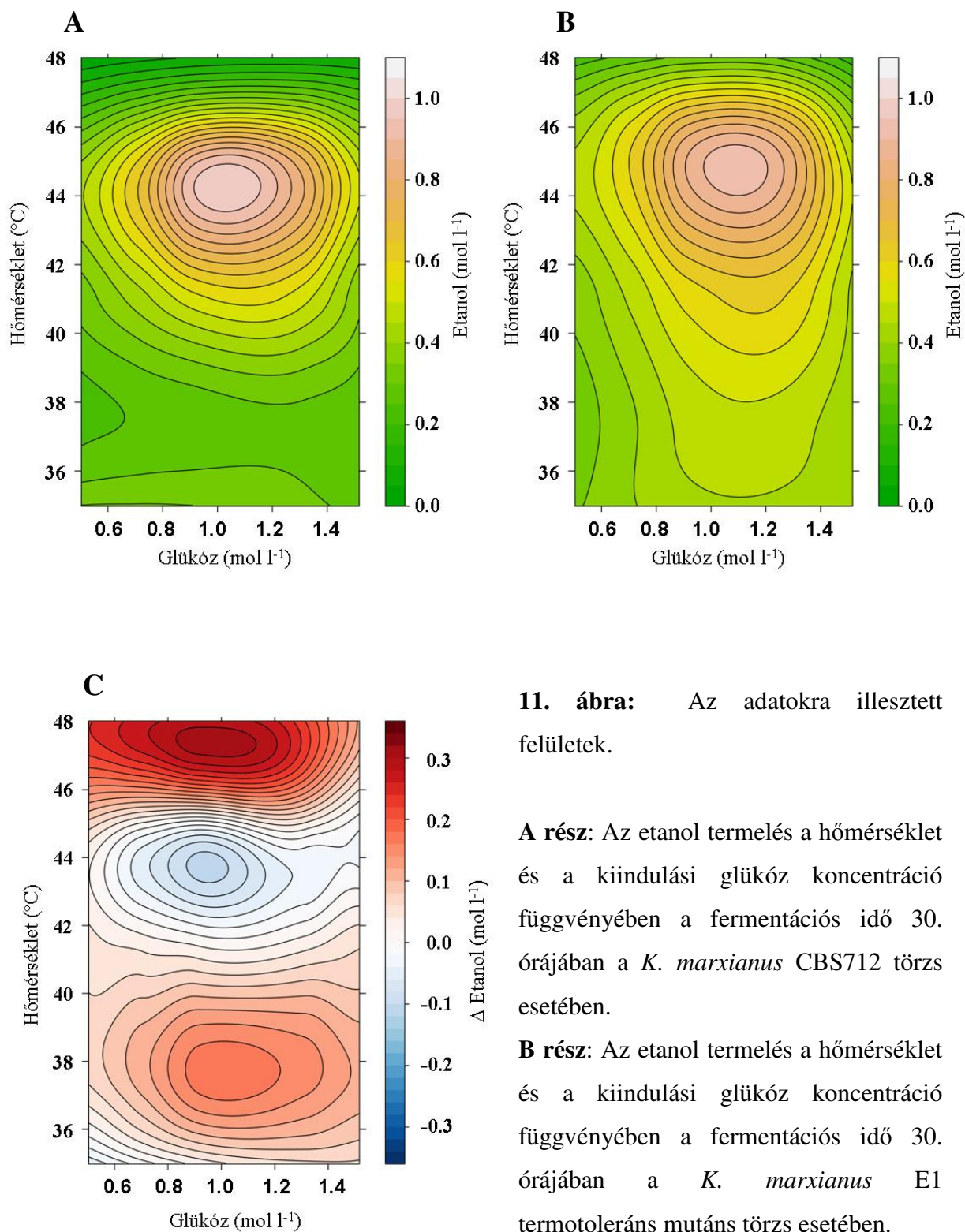
9. táblázat: A *Kluyveromyces marxianus* CBS712 szülői és E1 mutáns törzs etanol termelési adatainak összehasonlítása optimális körülmények és magas hőmérsékleten való tenyésztés esetén ^a.

^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 meghatározását 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.



11. 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.

Optimális körülmények között ($1,06 \text{ mol l}^{-1}$ kiindulási glükóz koncentráció, 44°C) az etanol termelés és a biomassza mennyisége hasonló a CBS712 ($1,1 \pm 0,1 \text{ mol l}^{-1}$, $51 \pm 9 \text{ g l}^{-1}$) és az E1 mutáns törzs ($1,0 \pm 0,1 \text{ mol l}^{-1}$, $42 \pm 9 \text{ g l}^{-1}$) esetében (9. táblázat).

A termelt etanol koncentrációk közel megegyeznek a modell alapján várt értékekkel: a CBS712 törzs esetében a várt érték $1,05 \text{ mol l}^{-1}$, az E1 mutáns esetében pedig $0,97 \text{ mol l}^{-1}$ volt.

Megemelt hőmérsékleten (47°C , $1,09 \text{ mol l}^{-1}$ kiindulási glükóz koncentráció) az E1 termotoleráns mutáns törzs által termelt etanol koncentráció és biomassza mennyiség ($0,6 \pm 0,1 \text{ mol l}^{-1}$, $42 \pm 8 \text{ g l}^{-1}$) jóval meghaladta a szülői törzsét ($0,3 \pm 0,1 \text{ mol l}^{-1}$, $29 \pm 7 \text{ g l}^{-1}$) (9. táblázat, 11. ábra).

A *K. marxianus* CBS712 és E1 mutáns törzsek maximális etanol kihozatali értékei összevethetőek az iparban használt IMB3 és a Limtong és munkatársai (2007) által vizsgált DMKU3-1042 törzsszel. 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 45°C -on $4,93 \%$ (w/v) ($1,07 \text{ mol l}^{-1}$) etanolt termelt, mikor 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 ($67 \pm 6 \%$) és E1 mutáns törzs ($63 \pm 6 \%$) 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 $41 \pm 7 \%$ konverziós rátával állít elő etanolt.

4.2. Fiziológiai vizsgálatok

4.2.1. Trehalóz tartalom meghatározása

Annak érdekében, hogy tovább tudjuk növelni az E1 mutáns termotoleranciáját és etanol termelő képességét, elengedhetetlen, hogy fényt derítsünk arra, milyen fiziológiai változások mentek végbe az E1 mutánsban, ami a megnövekedett hőtűréséhez vezetett.

Első lépésként megvizsgáltuk a szülői és a mutáns törzsek trehalóz tartalmát, hiszen a trehalóznak fontos szerepe van a hőstressz elleni védekezésben (Riberio *et al.*, 1999). E disszacharid - összehasonlítva más cukrokkal - a leghatékonyabb védelmet biztosítja a fehérjék denaturációja és aggregációja ellen erős hőhatás esetén (Ding *et al.*, 2009).

A 10. táblázatból jól látszik, hogy a hősokk megnövelte mindkét törzs trehalóz tartalmát. Az E1 mutáns trehalóz tartalma szignifikánsan nagyobb volt, mint a szülői törzsé, mind kontroll körülmények között (30 °C), mind pedig a megnövelt hőmérsékleten (47 °C) tenyésztve (10. táblázat). Az E1 mutáns trehalóz termelő vagy lebontó folyamataiban játszódhatott le tehát olyan változás, amely azt eredményezte, hogy a mutánsban folyamatosan magas volt a trehalóz tartalom, ami feltételezhetőleg megvédte a hőstressz káros hatásaitól.

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}

10. 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 utaltak, hogy a megnövekedett trehalóz szintézis csak az első gyors válasz a hőstresszre és a hősokkproteinek felhalmozódása szükséges a hosszabb ideig tartó hő elleni védelemre. Mi is megvizsgáltuk a hősokkproteineket SDS-poliakrilamid gélelektroforézis segítségével (12. ábra) és nem találtunk különbséget a CBS712 és az E1 mutáns törzs hősokk fehérjéinek mennyisége között (bővebben a 4.2.4. fejezetben).

4.2.2. A GSH és GSSG tartalom meghatározása

A glutation (GSH, γ -glutamil-ciszteinil-glicin) mint antioxidáns, szabadgyök semlegesítő molekula számos redox reakcióban és detoxifikációs mechanizmusban részt vesz, amely révén fontos sejtvédő funkcióval rendelkezik. Ezen kívül fontos szerepet játszik az élesztők oxidatív (Penninckx, 2000), környezeti (Lindquist és Kim, 1996) és hőstressz (Sugiyama *et al.*, 2000) válaszaiban egyaránt, ezzel megvédi a sejteket a stressz okozta károsodásoktól.

Sugiyama és munkatársai (2000) a *S. cerevisiae* élesztőt vizsgálva, azt találták, hogy hő sokk indukálta a glutation szintézist, azért, hogy a glutation megvédje a mitokondriális DNS-t az oxidatív károsodásoktól. Így mi is megvizsgáltuk mindkét törzs sejtjeinek redukált (GSH) és oxidált (GSSG) glutation tartalmát, valamint ezekből az adatokból kiszámítottuk az intracelluláris GSH/GSSG arányokat különböző hőmérsékleteken. Azt tapasztaltuk, hogy a két törzs GSH és GSSG koncentrációi és GSH/GSSG arányai között kicsi volt a különbség (11. táblázat). A megnövekedett hőmérséklet csökkentette a GSH tartalmat, és a GSH/GSSG arány ugyanolyan mértékben volt nagyobb, illetve kisebb mindkét törzs esetében (11. táblázat).

Hőmérséklet (°C)	GSH {nmol (mg protein) ⁻¹ }		GSSG {nmol (mg protein) ⁻¹ }		GSH/GSSG	
	szülői	mutáns	szülői	mutáns	szülői	mutáns
25	127 ± 13	119 ± 14	1,0 ± 0,2	0,6 ± 0,2 ^a	127 ± 28	198 ± 70
30	52 ± 6	63 ± 7	0,7 ± 0,4	0,4 ± 0,1	74 ± 43	157 ± 43 ^a
37	36 ± 4	32 ± 2	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,1 ^a	60 ± 12	80 ± 21
47	32 ± 3	18 ± 3 ^a	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,2	80 ± 41	60 ± 41

11. táblázat: A hőstressz hatása a *Kluyveromyces marxianus* CBS712 szülői és E1 mutáns törzs sejtjeinek a GSH és GSSG tartalmára továbbá a GSH/GSSG egyensúlyára.

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

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

4.2.3. Stressz tolerancia vizsgálatok

Annak érdekében, hogy megállapítsuk azt, hogy az E1 mutáns törzs a termotoleráns tulajdonságán kívül, milyen egyéb stressz toleranciával rendelkezik még, különböző stresszorok jelenlétében vizsgáltuk a növekedést. A stressz tolerancia vizsgálatokat különböző koncentrációjú etanol, NaCl, KCl, és H_2O_2 jelenlétében végeztük el, 37 és 45 °C-on tenyésztett inokulumok felhasználásával (12. táblázat). A százalékos értékek megállapításánál a 100 % a stresszorok nélküli növekedés volt.

Abban az esetben, amikor a 37 °C-on növekedett előtenyésztéssel inokuláltuk a főtenyészeteket a mutáns törzsnél 50 %-osnál nagyobb gátlást tapasztaltunk az alábbi stresszorok esetében: 2 mol l⁻¹ KCl, 1,25 mol l⁻¹ NaCl, 7,5 mmol l⁻¹ H_2O_2 és 1,09 mol l⁻¹ etanol. A szülői törzs ugyanezen körülmények között jobban tolerálta a NaCl és az etanol okozta stresszt, mint a mutáns.

Amikor a 45 °C-on növekedett inokulumot használtunk mind a mutáns, mind a szülői törzs H_2O_2 érzékenysége megnőtt. A NaCl és a KCl esetében nem volt szignifikáns különbség a mutáns és a szülői törzs között.

Amikor összehasonlítottuk, hogy vajon a 37 °C-on vagy a 45 °C-on növekedett inokulum volt-e kedvezőbb hatással a főtenyészetek stressztoleranciájára azt tapasztaltuk a mutáns esetében, hogy az etanol tolerancia szignifikánsan növekedett 0,65 mol l⁻¹ etanol jelenlétében, mikor a 45 °C-on növesztett előtenyészetet alkalmaztuk (12. 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

12. táblázat: A *Kluyveromyces marxianus* CBS712 szülői és E1 termotoleráns mutáns törzsek stressz tolerancia 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 leírta, hogy a megnövekedett trehalóz koncentráció csökkentette bizonyos stressz válaszokban fontos enzimek működését. Sampedro és Uribe (2004) azt tapasztalta a *K. lactis* vizsgálata közben, hogy a megnövekedett koncentrációban jelenlévő trehalóz a sejtek viszkozitásának a növekedéséhez vezetett. Ez az állapot védelmet nyújtott a fehérjéknek a hőstressz ellen, ellenben ha a hőmérséklet csökkent és ez a megnőtt viszkozitás megmaradt a sejtekben a nagy trehalóz koncentráció miatt, akkor ez az állapot nagymértékben gátolta és károsította a fehérjék működését. Következésképpen, ha a stresszhatás elmúltával nem következik be a trehalóz gyors hidrolízise, akkor számos létfontosságú enzim gátlódhat illetve károsodhat.

Sebolella és munkatársai (2004) azt találták egy fontos antioxidáns enzim, a glutation-reduktáz vizsgálatakor *S. cerevisiae* modellszervezetben, hogy a nagy trehalóz tartalom gátolta az enzim működését etanol stressz alatt. Ezenkívül másik két létfontosságú enzimre, a citoszolikus pirofoszfatazra és a glükóz 6-foszfát dehidrogenázra is ugyanilyen hatással van a megnövekedett trehalóz tartalom.

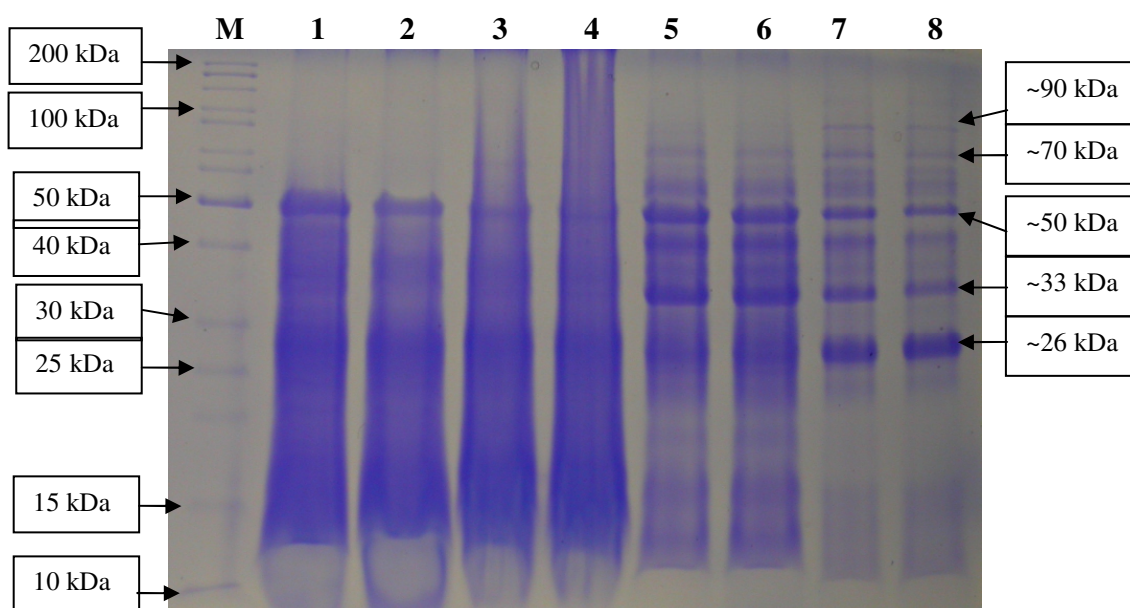
Ezen eredmények is azt támasztják alá, hogy a stresszhatás elmúltával a sejtek tartósan megnövekedett trehalóz szintje számos enzimet inaktivál. Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy az E1 mutáns folyamatosan megnövekedett trehalóz tartalma magyarázhatja a tapasztalt NaCl, KCl, H₂O₂ és etanol érzékenységet.

4.2.4. Hőstresszfehérjék vizsgálata

A *K. marxianus* CBS712 szülői és E1 termotoleráns mutáns törzsek hőstresszfehérjéit mutattuk ki a 3.11.5. fejezetben leírt módszer alapján SDS-poliakrilamid gélelektroforézis segítségével. Ahogyan az a 12. ábrán látható, nincs különbség a szülői és mutáns törzs fehérjéinek mérete és a sávintenzitása között. Az 50 kDa nagyságú mérettartományban lévő fehérje/fehérjék jól láthatóan minden egyes hőmérsékleten megfigyelhetők, míg a megközelítőleg 33 kDa nagyságú fehérje/fehérjék a 37, 47 és 48 °C-on tenyésztett mindkét törzs esetében ugyanolyan mennyiségben van jelen. Ezen fehérjék méretük alapján nem hősokkfehérjék.

A megközelítőleg 26, 70 és 90 kDa nagyságú, méretük alapján azonosított hősokkproteinek csak a 47 és 48 °C-on tenyésztett CBS712 és E1 mutáns törzsekben vannak jelen, viszont intenzitásbeli különbség nem fedezhető föl a szülői és a mutáns

törzsek között. Ezen eredmények arra utalnak, hogy a mutáns törzs a megnövekedett hőtűrését nem a hősokkproteinek felhalmozásának köszönheti.



12. ábra: *Kluyveromyces marxianus* CBS712 és E1 mutáns törzsek feltárt mintáinak SDS-PAGE képe Coomassie Brilliant Blue festékkel festve. Minden sáv 5 µg fehérjét tartalmaz.

M: Page Ruler fehérje standard, 1.: *K. marxianus* CBS712 25 °C-on tenyésztve, 2.: *K. marxianus* E1 mutáns 25 °C-on tenyésztve, 3.: *K. marxianus* CBS712 30 °C-on tenyésztve, 4.: *K. marxianus* E1 mutáns 30 °C-on tenyésztve, 5.: *K. marxianus* CBS712 37 °C-on tenyésztve, 6.: *K. marxianus* E1 mutáns 37 °C-on tenyésztve, 7.: *K. marxianus* CBS712 47 °C-on tenyésztve, 8.: *K. marxianus* E1 mutáns 48 °C-on tenyésztve.

5. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

Munkám során létrehoztam a termotoleráns *K. marxianus* E1 mutáns törzset a 3.2 fejezetben leírtak szerint. A mutáns törzs 48 °C-on képes növekedni és etanolt termelni.

A *K. marxianus* CBS712 szülői és az E1 mutáns törzsek fermentációs paramétereinek átfogó jellemzésekor meghatároztam többek között a megfelelő kiindulási glükóz koncentrációt, a fermentációs időt, az etanol termelő képességet, a konverziós rátákat és a növekedés 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 (9. 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).

Feltételezhető, hogy az E1 törzs alkalmazásával a bioetanol előállítására használt SSF technológia a jövőben gazdaságosabbá tehető. Ennek megerősítése 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 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 megkísérélhetjük az ubiquitin fehérje túltermelését is egy erős promotor 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 túltermelésével 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 stressztolerancia jövőbeni növelése a mutáns értékes tulajdonsága lehet.

6. ÚJ ÉS ÚJSZERŰ 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.

7. ÖSSZEFOGLALÁS (MAGYAR NYELVEN)

A fosszilis energiaforrások kimerülőben vannak világszerte: irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a kőolajmezők kitermelése évente 4-5 %-kal csökken. Ezenkívül a kőolajszármazékok környezetre gyakorolt negatív hatása - üvegházhatás, klímaváltozás - miatt is elengedhetetlen életünkben a megújuló energiaforrások alkalmazása. A megújuló energiaforrások közül a bioüzemanyagok integrálhatóak a legkönnyebben a már meglévő rendszerekbe. Használatukkal csökkenthető a légkörben az üvegház hatásért felelős gázok mennyisége, valamint hozzájárulnak a szállítási szektor egyre növekvő energiaszükségletének a kielégítéséhez is.

A PhD munkám keretében termotoleráns *Kluyveromyces marxianus* élesztő törzsek fejlesztésével foglalkoztam a bioetanol termelés gazdaságosságának a javítása céljából. A bioetanol előállításakor ugyanis technológiailag kedvezőbb, illetve gazdaságosabb, ha termotoleráns mikroorganizmusok alkalmazásával magasabb hőmérsékleten folyik az etanol termelés.

Kutatásaim eredményeképpen 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 (30 °C) végrehajtott passzálás után is megtartotta. A mutáns morfológiai vizsgálatakor kiderült, hogy különbözik a szülői CBS712 törzstől. Mind alacsonyabb (37 °C), mind pedig magasabb (47 °C) hőmérsékleten a mutáns sejtjei kerekesebb formájúak és kisebbek, mint a szülői törzs sejtjei. A mutáns taxonómiai identifikációját Barnett és munkatársai (1990) kritériumai és módszerei alapján vizsgáltuk meg és megerősítettük, hogy *K. marxianus*.

Az E1 mutáns optimális etanol termelési paramétereinek a megállapítására, valamint a szülői törzzsel való összehasonlítására az RSM módszert használtuk. Ezen módszer alkalmazásához szükség volt mindkét törzs etanol termelési adataira a fermentáció 12., 24. és a 38. órájában 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 és 48 °C-on 0,51, 0,71, 0,91, 1,11, 1,30 és 1,51 mol l⁻¹ kiindulási glükóz koncentrációkat alkalmazva. Mindezen mérési pontokon meghatároztam a termelt etanol és a biomassa mennyiségét. Kiszámoltam továbbá az etanol termelés hatékonyságát jelző konverziós ráta értékeket is. Ezen értékek számításához elengedhetetlen volt a maradék glükóz mennyiségének a

megállapítása. A maradék glükóz tartalmat vékonyréteg kromatográfiával (VRK) határoztam meg.

Az RSM analízis révén kapott modell alapján a vizsgált tartományban a maximális etanol kihozatal a szülői törzs esetében $1,05 \text{ mol l}^{-1}$ etanol, ami $1,03 \text{ mol l}^{-1}$ kiindulási glükóz koncentrációnál $44,2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ -on a fermentáció 30. órájában várható. Az E1 mutáns esetében ugyenezen érték $0,97 \text{ mol l}^{-1}$ etanol, ami $1,09 \text{ mol l}^{-1}$ kiindulási glükóz koncentrációnál $44,8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ -on a fermentáció 31. órájában valószínűsíthető. A modell alapján a legnagyobb különbség a szülői és a mutáns törzs között $1,09 \text{ mol l}^{-1}$ kiindulási glükóz koncentrációnál $47,2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ -on a fermentáció 35. órájában van. Annak érdekében, hogy megerősítsem ezen elméleti etanol kihozatali értékeket, a gyakorlatban is elvégeztem a számított RSM optimumokon az etanol kihozatalok meghatározását:

- Optimális körülmények között ($1,06 \text{ mol l}^{-1}$ kiindulási glükóz koncentráció, $44 \text{ }^{\circ}\text{C}$) az etanol termelés és a biomassza mennyisége hasonló a CBS712 ($1,1 \pm 0,1 \text{ mol l}^{-1}$, $51 \pm 9 \text{ g l}^{-1}$) és az E1 mutáns törzs ($1,0 \pm 0,1 \text{ mol l}^{-1}$, $42 \pm 9 \text{ g l}^{-1}$) esetében. Az etanol termelési értékek közel megegyeznek a modell alapján várt értékekkel, ami a CBS712 törzs esetében $1,05 \text{ mol l}^{-1}$, az E1 mutáns esetében pedig $0,97 \text{ mol l}^{-1}$ volt.
- Megnövelt hőmérsékleten ($47 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $1,09 \text{ mol l}^{-1}$ kiindulási glükóz koncentráció) az E1 termotoleráns mutáns által termelt etanol koncentráció és biomassza mennyiség ($0,6 \pm 0,1 \text{ mol l}^{-1}$, $42 \pm 8 \text{ g l}^{-1}$) jóval meghaladta a szülői törzsét ($0,3 \pm 0,1 \text{ mol l}^{-1}$, $29 \pm 7 \text{ g l}^{-1}$).

Ezután elvégeztem az E1 mutáns fiziológiai vizsgálatát annak érdekében, hogy megállapítsam a megnövekedett termotoleranciájának az okát. Olyan vegyületeket vizsgáltam, melyről irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy fontos szerepet játszanak a hőstresszválaszban. Először megvizsgáltam a redukált glutation (GSH) és az oxidált glutation (GSSG) tartalmát, de a két törzs között ebben a tekintetben nem volt szignifikáns az eltérés. Az SDS-poliakrilamid géliképen sem találtam különbséget a mutáns és a szülői törzs hősokk fehérjéinek a sávintenzitása között.

A trehalóz tartalom vizsgálatakor viszont kiderült, hogy a mutánsnak mind a kontroll körülmények között ($30 \text{ }^{\circ}\text{C}$), mind pedig a megnövelt hőmérsékleten ($47 \text{ }^{\circ}\text{C}$) lényegesen nagyobb volt a trehalóz tartalma, mint a szülői törzsé. Az E1 mutáns törzs trehalóztermelő vagy - lebontó folyamataiban játszódhatott le tehát olyan változás, amely a megnövekedett trehalóz tartalom révén megvédte a sejteket a hőstressz káros hatásaitól.

Nemvárt módon a trehalóz tartalom növekedését a NaCl, KCl, H₂O₂ és etanol stressz érzékenység fokozódása kísérte a mutáns esetében. Munkámnak ezen eredménye rávilágít arra, hogy sem a trehalóz, sem a glutation metabolizmus megváltozásával nem lehet az általános stressztoleranciát növelni a *K. marxianus* élesztő esetében. Az egyik lehetséges út arra vonatkozóan, hogy továbbfejlesszük a *K. marxianus* E1 mutánst az, ha szabályozzuk bizonyos környezeti stressz válaszokért felelős gének expresszióját, vagy megnöveljük bizonyos hősokkproteinek termelődését.

8. ÖSSZEFOGLALÁS (ANGOL NYELVEN)

The fossil energy sources are exhausted worldwide: according to the literary data there is 4-5 % reduction per year in the production of crude oil. In addition, the utilization of renewable energy is crucial in our life due to the negative effects of oil derivatives on the environment (for example greenhouse effect, climate change). Using biofuel may reduce the amount of greenhouse gases in the air and contributes to the achievement of increasing energy needs of transport sector.

The aim of my PhD project was to develop a thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* strain in order to produce the highest amount of ethanol possible at temperature higher than those applied currently in industrial production. A profitable way to produce ethanol is the application of thermotolerant yeasts.

A *K. marxianus* thermotolerant E1 mutant was developed. The growth rate of the E1 strain at 48 °C in liquid cultures is exceptional. The thermotolerance of E1 was heritable as indicated by the unchanged growth rates recorded at 48 °C even after 10 subsequent passages at 30 °C incubation temperature. During the investigation of the morphology we revealed that the E1 strain differs from the CBS712 parental strain, however the E1 mutant was identified as *K. marxianus* following the methods and criteria of Barnett *et al.* (1990).

We determined the optimal conditions of maximal ethanol production of the E1 mutant strain and compared this to the parental strain by using the response surface methodology (RSM). To optimize ethanol yields, *K. marxianus* strains were cultivated in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml MYFM broth. The selected starting glucose concentrations were 0.50, 0.71, 0.91, 1.11, 1.31 or 1.51 mol l⁻¹ and the fermentation temperature was set to 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 or 48 °C. Samples were taken at 16, 24 and 38 h incubation times. I investigated the produced ethanol concentration and the biomass production at these points.

The conversion rates (ethanol yield %) were calculated from the residual glucose concentration and from the amount of produced ethanol. The residual glucose concentration was determined by Thin Layer Chromatography (TLC).

As demonstrated by response surface methodology (RSM), maximal ethanol concentrations were expected at similar variables for the parental and mutant strains,

namely at 1.03 mol l⁻¹ starting glucose concentration, 44.2 °C incubation temperature and at 30 h incubation time for the parental strain, and in mutant yeast cultures incubated at 44.8 °C for 31 h with a starting glucose concentration of 1.09 mol l⁻¹. The most significant difference in ethanol yields was expected in cultures containing 1.09 mol l⁻¹ glucose and incubated at 47.2 °C for 35 h.

- The ethanol and biomass productions of the mutant and parental strains were quite similar {1.0±0.1 vs. 1.1±0.1 mol l⁻¹ (4.6±0.5 vs. 5.1±0.5 w/v %) and 42±9 vs. 51±9 g l⁻¹, respectively)} when cultured under nearly optimal production conditions {44 °C, 1.06 mol l⁻¹ (19.1 w/v %) glucose}.
- The E1 mutant produced more ethanol and biomass when the incubation temperature was elevated to 47 °C at 1.09 mol l⁻¹ (19.6 w/v %) starting glucose concentration {0.6±0.1 vs. 0.3±0.1 mol l⁻¹ (2.8±0.5 vs. 1.4±0.5 w/v %) and 42±8 vs. 29±7 g l⁻¹, respectively)}.

We carried out physiological studies on the E1 mutant in order to understand the background of its thermotolerant property. The compounds that play important roles in the heat stress response were investigated.

At first we measured the intracellular glutathione and glutathione disulphide contents, but we did not find any difference between the two strains in this regard. When we investigated the heat shock proteins by SDS PAGE, there were no differences between the protein band intensities of the mutant and the parental strains.

The increased thermotolerance of the E1 mutant was explained by a significantly elevated trehalose production under either thermal stress (47 °C) or unstressed conditions (30 °C). The anabolic or catabolic processes of the trehalose metabolism might have changed in the E1 mutant which resulted in the persistently higher trehalose concentration. This change presumably protected the cells against heat stress.

Unexpectedly, the increased trehalose content of the E1 cells was accompanied by an enhanced sensitivity of the mutant to NaCl, ethanol, KCl and H₂O₂ stress. According to these results, neither trehalose nor glutathione metabolisms seems to be a good target to engineer thermotolerant *K. marxianus* strains with an increased general stress tolerance.

Future strain development programs should aim at other targets, providing this yeast with a wider spectrum of stress tolerances. The expression of the stress response genes should be regulated or the amount of the heat shock protein must be increased.

9. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

Abdel-Banat, B.M.A. – Hoshida, H. – Ano, A. – Nonklang, S. – Akada, R.: 2010. High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? *Applied Microbiology and Biotechnology*. 85: 861-867.

Agrawal A.K.: 2007. Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. *Progress in Energy and Combustion Science*. 33: 233-71.

Aleklett, K. – Campbell, C.J.: 2003. The peak and decline of world oil and gas production. *Mining and Energy*. 18: 35-42.

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

Araujo, M.L. – Moura, P.B.: 2011. január 20. Bioethanol has dirty footprint in Brazil. *Nature*. 469: 299.

Araque, E. – Parra, C. – Rodríguez, M. – Freer, J. – Baeza, J.: 2008. Selection of thermotolerant yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production. *Enzyme and Microbial Technology*. 43: 120-123.

Armbruster, W.J. – Coyle, W.T.: 2006. Pacific food system outlook 2006-2007: the future role of biofuels. Singapore: Pacific Economic Cooperation Council, http://www.pecc.org/food/pfso-singapore2006/PECC_Annual_06_07.pdf

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.

Ballesteros, I. – Oliva, J.M. – Ballesteros, M. – Carrasco, J.: 1993. Optimization of the simultaneous saccharification and fermentation process using thermotolerant yeasts. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 39/40: 201-211.

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.

Ben-Ghedalia, D. – Miron, J.: 1981. The effect of combined chemical and enzyme treatment on the saccharification and in vitro digestion rate of wheat straw. *Biotechnology and Bioenergy*. 23: 823-831.

Blanchette, R.A.: 1991. Delignification by wood-decay fungi. *Annual Review Phytopathology*. 29: 381-398.

Brethauer, S. – Wyman, C.E.: 2010. Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. *Bioresource Technology*. 13. 101: 4862-4874.

Brown, L.M.: 1996. Uptake of carbon dioxide from flue gas by microalgae. *Energy Conversion and Management*. 37. 6-8: 1363-1376.

Bollók, M. – Réczey, K. – Zacchi, G.: 2000. Simultaneous Saccharification and Fermentation of Steam-Pretreated Spruce to ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 84.86: 69-80.

Burchhardt, G. – Ingram, L.O.: 1992. Conversion of xylan to ethanol by ethanologenic strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella oxytoca*. *Applied and Environmental Microbiology*. 58: 1128–1133.

Cardona, C.A. – Quintero, J.A. – Paz, I.C.: 2010. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. *Bioresource Technology*. 101: 4754–4766.

Cardona, C.A. – Sánchez, Ó. J.: 2007. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology*. 98: 2415-2457.

Colman, B. – Rotatore, C.: 1995. Photosynthetic inorganic carbon uptake and accumulation in two marine diatoms. *Plant, Cell and Environment*. 18.8: 919-924.

Demirbas, A.: 2008. Comparison of transesterification methods for production of biodiesel from vegetable oils and fats. *Energy Conversion and Management*. 49: 125-130.

Ding, J. – Huang, X. – Zhang, L. – Zhao, N. – Yang, D. – Zhang, K.: 2009. Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 85: 253–263.

Dmytruk, V.O. – Dmytruk, V.K. – Abbas, A.C. – Voronovsky, Y.A. – Sibirny, A.A.: 2008. Engineering of xylose reductase and overexpression of xylitol dehydrogenase and xylulokinase improves xylose alcoholic fermentation in the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha*. *Microbial Cell Factories*. 7: 21-30.

Duailibe, K.A.: 2010 december 23/30. Brazil has renewable energy success. *Nature*. 468: 1041.

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.

Escobar, J.C. – Lora, E.S. – Venturini, O.J. – Yanez, E.E. – Castillo, E.F. – Almazan, O.: 2009. Biofuels: environment, technology and food security. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 13: 1275-1287.

EU. Directive 2009/28/EC of The European Parliament and of The Council of 23 April 2009 on the promotion of the use of energy from renewable sources and amending and subsequently repealing Directives 2001/77/EC and 2003/ 30/EC. Off J European Union; 2009: 16-62.

Fekete, A. – Emri, T. – Gyetvai, A. – Gazdag, Z. – Pesti, M. – Varga, Zs. – Balla, J. – Cserhádi, Cs. – Emődy, L. – Gergely, L. – Pócsi, I.: 2007. Development of oxidative stress tolerance resulted in reduced ability to undergo morphologic transitions and decreased pathogenicity in a t-butylhydroperoxide-tolerant mutant of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Research*. 7: 834–847.

Ferreira, J.C. – Paschodin, V. 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.

Fulton, L. – Howes, T. – Hardy, J.: 2004. Biofuels for transport: an international perspective. Paris: *International Energy Agency (IEA)*.

Furtado, A.T. – Scandiffio, M.I.G. – Cortez, L.A.B.: 2011. The Brazilian sugarcane innovation system. *Energy Policy*. 39: 156–166.

Gauder, M. – Graeff-Hönniger, S. – Claupein, W.: 2011. The impact of a growing bioethanol industry on food production in Brazil. *Applied Energy*. 88: 672 - 679.

Gellissen, G. – Hollenberg, C.P.: 1997. Application of yeasts in gene expression studies: A comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis*—a review. *Genetics*. 190: 87–97.

Grange, D.C. – Haan, R. – Zyl, W.H.: 2010. Engineering cellulolytic ability into bioprocessing organisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 87: 1195-1208.

Groeneveld, P. – Stouthamer, A.H. – Westerhoff, H.V.: 2009. Super life – how and why ‘cell selection’ leads to the fastest-growing eukaryote. *FEBS Journal*. 276: 254–270.

Hack, C.J. – Marchant, R.: 1998a. Ethanol adaptation in a thermotolerant yeast strain *Kluyveromyces marxianus* IMB3: *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 20: 227-231.

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.

Hahn-Hagerdal, B. – Galbe, M. – Gorwa-Grauslund, M.F. – Lide’n, G. – Zacchi G.: 2006. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology*. 24. 12: 549-556.

Hahn-Hagerdal, B. – Karhumaa, K. – Fonseca, C. – Spencer-Martins, I. – Gorwa-Grauslund, F.M.: 2007. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 74: 937-953.

Hang, Y.D. – Woodams, E.E. — Hang, L.E.: 2003. Utilization of corn silage juice by *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresource Technology*. 86: 305–307.

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.

Hong, J. – Wang, Y. – Kumagai, H. – Tamaki, H.: 2007. Construction of thermotolerant yeast expressing thermostable cellulase genes. *Journal of Biotechnology*. 130: 114–123.

Huang, C. – Zong, M.H. – Hong, W. – Liu, Q.P.: 2009. Microbial oil production from rice straw hydrolysate by *Trichosporon fermentans*. *Bioresource Technology*. 100: 4535-4538.

Huang, C. F. – Jiang, Y.F. – Guo, G.L. – Hwang, W.S.: 2011. Development of a yeast strain for xylitol production without hydrolysate detoxification as part of the integration of co-product generation within the lignocellulosic ethanol process. *Bioresource Technology*. 102: 3322-3329.

Ingram, L.O.: 1987. Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 53: 2420–2425.

Ishchuk, O.P. – Voronovsky, A.Y. – Abbas, C.A. – Sibirny, A.A.: 2009. Construction of *Hansenula polymorpha* strains with improved thermotolerance. *Biotechnology and Bioengineering*. 104: 911-919.

Jia, J. – Wheals, A.: 2000. Endopolygalacturonase genes and enzymes from *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*. *Current Genetics*. 38: 264–270.

Johannsen, E.: 1980. Hybridization studies within the genus *Kluyveromyces* van der Walt emend. van der Walt. *Antonie Van Leeuwenhoek* 46.: 177–189.

Junginger, M. – Dame, J. – Zarrilli, S. – Mohamed, F.A. – Marchal, D. – Faaij, A.: 2011. Opportunities and barriers for international bioenergy trade. *Energy Policy*. 39: 2028-2042.

Kádár, Zs. – Szengyel, Zs. – Réczey, K.: 2004. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. *Industrial Crops Production*. 20: 103–110.

Központi Statisztikai Hivatal Gyorstájékoztató: A fontosabb növényi kultúrák előzetes terméseredményei, 2008., 2009. január 13.

Kurtzman, C.P.: 2003. Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the Saccharomycetaceae, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorhizula*. *FEMS Yeast Research*. 4: 233–245.

Kurtzman, C.P. – Fell, J.W.: 1998. The yeasts: a taxonomic study, 4th edn. Elsevier, Amsterdam.

Kurtzman, C.P. – Robnett, C.J.: 2003. Phylogenetic relationships among yeasts of the ‘*Saccharomyces* complex’ determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Research*. 3: 417–432.

Lachance, M.A.: 2007. Current status of *Kluyveromyces* systematics. *FEMS Yeast Research*. 7: 642–645.

Lane, M.M. – Morrissey, P.J.: 2010. *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister’s shadow. *Fungal Biology Reviews*. 1-2. 24:17-26.

Lark, N. – Xia, Y. – QIN, C.G. – Gong, C.S. – Tsao, G.T.: 1997. Production of ethanol from recycled paper sludge using cellulase and yeast, *Kluyveromyces marxianus*. *Biomass and Bioenergy*. 12: 135-143.

Larson, E.D.: 2008. Biofuel production technologies: status, prospects and implications for trade and development. Report No. UNCTAD/DITC/TED/2007/10. United Nations Conference on Trade and Development, New York and Geneva.

Leal, C.I. – D’Agosto A.M.: 2011. Modal choice evaluation of transport alternatives for exporting bio-ethanol from Brazil. *Transportation Research Part D*. 16: 201-207.

Leary, N.O. – Pembroke, A. – Duggan, P.F.: 1992. Improving accuracy of glucose oxidase procedure for glucose determinations on discrete analyzers. *Clinical Chemistry*. 38: 298-302.

Leclerc, M. – Chemardin, P. – Arnaud, A. – Ratomahenina, R. – Galzy, P. – Gerbaud, C. – Raynal, A. – Guérineau, M.: 1987. Comparison of the properties of the purified beta-glucosidase from the transformed strain of *Saccharomyces cerevisiae* TYKF2 with that of the donor strain *Kluyveromyces fragilis* Y610. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 9: 410–422.

Lee, S.L. – Chen, W.C.: 1997. Optimization of medium composition for the production of glucosyltransferase by *Aspergillus niger* with response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology*. 21: 436-440.

Li, Z. – Liu, Y. – Liao, W. – Chen, S. – Zemetra, R.S.: 2011. Bioethanol production using genetically modified and mutant wheat and barley straws. *Biomass and Bioenergy*. 35: 542-548.

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.

Lindquist S. – Kim G.: 1996. Heat shock protein 104 expression is sufficient for thermotolerance in the yeast. *Proceedings of the National Academy Sciences (USA)* 93: 5301-5306.

Linoj Kumar, N.V. – Dhavala, P. – Goswami, A. – Maithel, S.: 2006. Liquid biofuels in South Asia: resources and technologies. *Asian Biotechnology and Development review*.

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.

Lodder, J.: 1970. The yeasts: a taxonomic study, 2nd edn. NHPC, Amsterdam

Lodder, J. – Kreger-van Rij, N.J.W.: 1952. The yeasts: a taxonomic study. NHPC, Amsterdam.

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.

Lynd, L.R. – Weimer, P.J. – van Zyl, W.H. – Pretorius, I.S.: 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 66. 3: 506–577.

Lynd, L.R. – Wyman, C.E. – Gerngross, T.U.: 1999. Biocommodity engineering. *Biotechnology Progress*. 15: 777–793.

Martins, D.B. – de Souza, C.G. – Simões, D.A. – de Moraes, M.A.: 2002. The b-galactosidase activity in *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 decreases by high concentrations of galactose. *Current Microbiology*. 44: 379–382

Meehan, C. – Banat, I.M. – McMullan, G. – Nigam, P. – Smyth, F. – Marchant, R.: 2000. Decolorization of Remazol Black-B using a thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* IMB3. *Environmental International*. 26: 75–79.

Miao, X.L. – Wu, Q.Y.: 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology*. 97: 841-846.

Mohagheghi, A. – Evans, K. – Chou, Y.Z. – Zhang, M.: 2002. Cofermentation of glucose, xylose, and arabinose by genomic DNA-integrated xylose/arabinose fermenting strain of *Zymomonas mobilis* AX101. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 98. 100: 885–898.

Mojovic, L. – Nikolic, S. – Rakin, M. – Vukasinovic, M.: 2006. Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates. *Fuel*. 85: 1750–1755.

Morimoto, R.I. – Kroeger, P.E. – Cotto, J.J.: 1996: The transcriptional regulation of heat shock genes: A plethora of heat shock factors and regulatory conditions. Birkhauser Verlag, Boston 139-163.

Murray, D.: 2005. Ethanol's potential: looking beyond corn. Washington DC, USA: Earth Policy Institute, <http://www.earthpolicy.org/Updates/2005/Update49.htm>

Naik, S.N. – Goud, V.V. – Rout, P.K. – Dalai, A.K.: 2010. Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review. *Renewable Sustainable Energy Reviews*. 14: 578-597.

NEXANT.:2007. Liquid biofuels: substituting for petroleum. USA: NEXANT, INC., http://www.chemsystems.com/reports/search/docs/prospectus/MC_Biofuels_Pros.pdf

Nieto-Sotelo, J. – Wiederrecht, G. – Okuda, A. – Parker, C.S.: 1990. The yeast heat shock transcriptional activation domain whose activity is repressed under nonshock conditions. *Cell*. 62: 807-817.

Nigam, P.S. – Singh, A.: 2011. Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*. 37: 52-68.

Nikolic, S. – Mojovic, L. – Pejin, D. – Rakin, M. – Vukasinovic, M.: 2010. Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates by free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. *Biomass and Bioenergy*. 34: 1449-1456.

Nonklang, S. – Ano, A. – Abdel-Banat, B.M. – Saito, Y. – Hoshida, H. – Akada, R.: 2009. Construction of flocculent *Kluyveromyces marxianus* strains suitable for high-temperature ethanol fermentation. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 73: 1090–1095.

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.

Panella, L.: 2010. Sugar Beet as an Energy Crop. *Sugar Technology*. (September and December 2010) 12(3–4):288–293 DOI 10.1007/s12355-010-0041-5.

Pecota, D.C. – Rajgarhia, V. - da Silva, N.A.: 2007. Sequential gene integration for the engineering of *Kluyveromyces marxianus*. *Journal of Biotechnology*. 127: 408–416

Pelkmans, L. – Portouli, E. – Papageorgiou, A. – Georgopoulos, P.: 2006. Impact assessment of measures towards the introduction of biofuels in the European Union. Report of Work Package 4 of the PREMIA project.

Penninckx, M.: 2000. A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses. *Enzyme and Microbial Technology*. 26: 737–742.

Pickett, J. – Anderson, D. – Bowles, D. – Bridgwater, T. – Jarvis, P. – Mortimer, N. – Poliakoff, M. – Woods, J.: 2008. Sustainable biofuels: prospects and challenges. London, UK: *The Royal Society*, <http://royalsociety.org/document.asp?id; 2008. 7366>.

Porro, D. – Sauer, M. – Branduardi, P. – Mattanovich, D.: 2005. Recombinant protein production in yeasts. *Molecular Biotechnology*. 31: 245–259.

Prasad, S. – Singh, A. – Jain, N. – Joshi, H.C.: 2007. Ethanol production from sweet sorghum syrup for utilization as automotive fuel in India. *Energy and Fuels*. 21. 4: 2415–2420.

Prasad, S. – Singh, A. – Joshi, H.C.: 2007. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resources and Conservation Recycling*. 50: 1–39.

Ribeiro, M.J.S. – Leão, L.S.C. – Morais, P.B. – Rosa, C.A. – Panek, A.D.: 1999. Trehalose accumulation by tropical yeast strains submitted to stress conditions. *Antonie van Leeuwenhoek*. 75: 245–251.

Ribeiro, O. – Gombert, A.K – Teixeira, J.A. – Domingues, L.: 2007. Application of the Cre-loxP system for multiple gene disruption in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Journal of Biotechnology*. 131: 20–26.

Rouwenhorst, R.J. – Hensing, M. – Verbakel, J. – Scheffers, W.A. - van Dijken, J.P.: 1990. Structure and properties of the extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Applied Environmental Microbiology*. 56: 3337–3345.

Rouwenhorst, R.J. – Visser, L.E. – Van Der Baan, A.A. – Scheffers, W.A. – Van Dijken, J.P.: 1988. Production, distribution, and kinetic properties of inulinase in continuous cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Applied Environmental Microbiology*. 54: 1131-1137.

Ryabova, O.B. – Chmil, O.M. – Sibirny, A.A.: 2003. Xylose and cellobiose fermentation to ethanol by the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *FEMS Yeast Research*. 4: 157-164.

RFA: Renewable fuels Association. (Industry Statistics: Annual World Ethanol Production by Country). 2007, 2010.

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.

Santek, B. – Gwehenberger, G. – Santek, M.I. – Narodoslawsky, M., Horvat, P.: 2010. Evaluation of energy demand and the sustainability of different bioethanol production processes from sugar beet. *Resources Conservation and Recycling*. 54: 872–877.

Sági: 1998. Mezőgazdaságunk útja az Európai Unióba. 1.füzet: Energiahasznosítás a mezőgazdaságban.

Sánchez, Ó.J. – Cardona, C.A.: 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*. 99: 5270-5295.

Sebollela, A. – Louzada, P.R. – Sola-Penna, M. – Sarone-Williams, V. – Coelho-Sampaio, T. – Ferreira, S.T.: 2004. Inhibition of yeast glutathione reductase by trehalose: possible implications in yeast survival and recovery from stress. *International Journal Biochemistry and Cell Biology*. 36: 900–908.

Shanavas, S. – Padmaja, G. – Moorthy, S.N. – Sajeev, M.S. – Sheriff, J.T.: 2011. Process optimization for bioethanol production from cassava starch using novel eco-friendly enzymes. *Biomass and Bioenergy*. 35: 901-909.

Singh, A. – Pant, D. – Korres, N.E. – Nizami, A.S. – Prasad, S. – Murphy, J.D.: 2010. Key issues in life cycle assessment of ethanol production from lignocellulosic biomass: challenges and perspectives. *Bioresource Technology*. 101. 13: 5003-5012.

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.

Sree, K.N. – Sridhar, M. – Suresh, K. – Banat, I.M. – Rao V.L.: 2000. Isolation of thermotolerant, osmotolerant, flocculating *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production. *Bioresource Technology*. 72: 43-46.

Steensma, H.Y. – de Jongh, F.C.M. – Linnekamp, M.: 1998. The use of electrophoretic karyotypes in the classification of yeasts: *Kluyveromyces marxianus* and *K. lactis*. *Current Genetics*. 14: 311–317.

Stevens, D.J. – Worgetten, M. – Saddler, J.: 2004. Biofuels for transportation: an examination of policy and technical issues. *IEA Bioenergy Task 39, Liquid Biofuels Final Report*. Canada. 2001-2003.

Sugiyama, K. – Kawamura, A. – Izawa, S. – Inoue, Y.: 2000. Role of glutathione in heat-shock-induced cell death of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*. 352: 71-78.

Suh, I.S. – Lee, C.G.: 2003. Photobioreactor engineering: design and performance. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 8. 6: 313-321.

Sun, Y. – Cheng, J.: 2002. Hydrolysis of lignocellulosic material for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*. 83: 1-11.

Talebna, F. – Karakashev, D. – Angelidaki, I.: 2010. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology*. 101: 4744–4753.

Tarkow, H. – Feist, W.C.: 1969. A mechanism for improving the digestibility of lignocellulosic materials with dilute alkali and liquid NH₃. In: Advance chemistry series Washington, DC: American Chemical Society. 95: 197-218.

Thevelein, J.M. – Hohmann, S.: 1995. Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast? *Trends in Biochemical Science*. 20: 3-10.

Trott, A. – Morano, K.A.: 2003. Yeast stress responses. Springer – Verlag kiadó, Németország, 71-107.

Voronovsky, A.Y. – Rohulya, O.V. – Abbas, C.A. – Sibirny, A.A.: 2009. Development of strains of the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha* capable of alcoholic fermentation of starch and xylan. *Metabolic Engineering*. 11. 4-5: 234-242.

Van der Walt, J.P.: 1956. *Kluyveromyces* - a new yeast genus of the Endomycetales. *Antonie van Leeuwenhoek*. 22: 265–272.

Van der Walt, J.P.: 1970. *Kluyveromyces* van der Walt emend. van der Walt. In: Lodder J (ed) The yeasts: a taxonomic study, 2nd edn. NHPC, Amsterdam. 316–378.

Wen-Hua, C. – Ben-Li, P. – Ching-Tsung, Y. – Wen-Song, H.: 2011. Pretreatment efficiency and structural characterization of rice straw by an integrated process of dilute-acid and steam explosion for bioethanol production. *Bioresource Technology*. 102: 2916–2924.

Wilkins, M.R. – Mueller, M. – Eichling, S. – Banat, I.M.: 2008. Fermentation of xylose by thermotolerant yeast strains *Kluyveromyces marxianus* IMB2, IMB4, and IMB5 under anaerobic conditions. *Process Biochemistry*. 43: 346-350.

Wright, J.D.: 1988. Ethanol from Biomass by Enzymatic Hydrolysis. *Chemical Engineering Process*. 84: 62-74.

Yuan, D. – Rao, K. – Relue, P. – Varanasi, S.: 2011. Fermentation of biomass sugars to ethanol using native industrial yeast strains. *Bioresource Technology*. 102: 3246-3253.

Yue, Z. – Teater, C. – MacLellan, J. – Liu, Y. – Liao W.: 2011. Development of a new bioethanol feedstock e Anaerobically digested fiber from confined dairy operations using different digestion configurations. *Biomass and Bioenergy*. 35: 1946-1953.

Zhao, R. – Bean, S.R. – Wang, D. – Park, S.H. – Schober, T.J. – Wilson, J.D.: 2009. Small-scale mashing procedure for predicting ethanol yield of sorghum grain. *Journal of Cereal Science*. 49. 2: 230-238.

Zhu, L.Y. – Zong, M.H. – Wu, H.: 2008. Efficient lipid production with *T. fermentas* and its use for biodiesel preparation. *Bioresource Technology*. 99: 7881-7885.

10. PUBLIKÁCIÓK AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN

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.

A kutatási témához közvetlenül nem kapcsolódó publikációk

Tudományos közlemény idegen nyelvű, lektorált, magyar folyóiratban:

Erdei É.-Pusztahelyi, T.-Miskei, M.-Barna, T.-Pócsi I.: 2008. Characterisation and heterologous expression of an age-dependent fungal/bacterial type chitinase of *Aspergillus nidulans*. *Acta Microbiol. et Immunol. Hung.* 55. 3: 351-361. ISSN 1217-8950.

Magyar nyelvű lektorált konferencia kiadvány:

Erdei É.: 2007. *Aspergillus nidulans* kitináz B (ChiB) jellemzése és a *chiB* gén heterológ expressziójának kidolgozása. [In: Sramkó G.-Mészáros I. (szerk.) 2007. április 4-6. XXVIII. Országos Tudományos Diákköri Konferencia.] Absztrakt. 84. ISBN 978-963-473-043-9.

Idegen nyelvű nem lektorált konferencia kiadvány:

Erdei É.-Pusztahelyi, T.-Barna, T.-Pócsi, I.: 2008. Characterisation and heterologous expression of an *Aspergillus nidulans* age-dependent chitinase (ChiB). 2008. június 30. - július 4. Central European Summer Course, Biology of pathogenic *Candida* species: genetics, genomics, diagnostics. Szeged, Hungary. abstract: 44.

11. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni témavezetőimnek, Prof. Dr. Nagy Jánosnak és Prof. Dr. Pócsi Istvánnak, hogy lehetőséget biztosítottak doktori munkám elvégzéséhez, valamint hasznos tanácsokkal segítettek szakmai fejlődésem. Külön köszönettel tartozom Dr. Molnár Mónikának, aki hasznos tanácsaival mindvégig segítette munkámat.

Köszönet illeti Dr. Emri Tamást és Dr. Antal Károlyt, akik statisztikai és szakmai tanácsokkal segítettek munkámat, valamint Dr. Gyémánt Gyöngyit és Dr. Lázár Istvánt akik szintén segítségemre voltak.

Köszönöm témavezetőim támogatását abban, hogy az ERASMUS program keretében egy három hónapos szakmai tanulmányúton vehettem részt a leuveni Katholieke Universiteit Molekuláris Sejtbiológiai Tanszékén, ahol Prof. Dr. Johan Thevelein és Yudi Yang irányításával betekintést nyerhettem az élesztők termotoleranciájának különböző módszerekkel történő vizsgálatába.

Végül, de nem utolsó sorban nagyon köszönöm férjem és családom támogatását, amely nagymértékben hozzájárult a doktori munka és a dolgozat elkészítéséhez.

12. NYILATKOZATOK

NYILATKOZAT

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Agrártudományi Centrum Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Karán a Kerpely Kálmán Növénytermesztési, kertészeti és Regionális Tudományok Doktori Iskola keretében készítettem el a Debreceni Egyetem AGTC MÉK doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2011

.....

a jelölt aláírása

NYILATKOZAT

Tanúsítom, hogy Erdei Éva doktorjelölt 2007 - 2011 között a fent megnevezett Doktori Iskola keretében irányításommal – irányításunkkal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult, az értekezés a jelölt önálló munkája. Az értekezés elfogadását javaslom – javasoljuk.

Debrecen, 2011

.....

a témavezető(k) aláírása