

Konverziós ráta értékek meghatározása a *Kluyveromyces marxianus* CBS712 gomba törzs etanol termelésének jellemzéséhez

Erdei Éva^{1,4} – Pócsi István¹ – Molnár Mónika² – Gyémánt Gyöngyi³ – Nagy János⁴

Debreceni Egyetem

Természettudományi és Technológiai Kar,

¹Mikrobiális Biotechnológiai és Sejtbiológiai Tanszék

³Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék, Debrecen

²Nyíregyházi Főiskola, Agrár és Molekuláris Kutató Intézet,

Nyíregyháza

⁴Debreceni Egyetem

Agrár- és Gazdálkodástudományok Centruma,

Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási

Kar, Földhasznosítási, Műszaki és Területfejlesztési Intézet,

Debrecen

erdeie@yahoo.com

ÖSSZEFOGLALÁS

A *Kluyveromyces marxianus* CBS712 törzs jellemzésének keretében különböző paraméterek mellett vizsgáltuk az etanol termelést. Az etanol termelés hatékonyságának meghatározására konverziós rátákat állapítottunk meg. Ezen érték meghatározásához elengedhetetlen a maradék glükóz mennyiségének a vizsgálata, amely megállapítására két különböző módszert választottunk: a vékonyréteg kromatográfiát (VRK) és a glükóz-oxidáz enzimet felhasználó módszert. Kísérleteink során a VRK módszer bizonyult a megfelelőbbnek, így ezen adatokat, illetve az etanol termelési értékeket felhasználva konverziós ráta értékeket határoztunk meg. A legmagasabb konverziós ráta 55,3%: 45 °C-on 5,6% (v/v) etanolt termelve, amely értékek összevethetők az iparban alkalmazott IMB törzsekével.

Kulcsszavak: *Kluyveromyces marxianus*, etanol, glükóz

SUMMARY

The ethanol production of the *Kluyveromyces marxianus* CBS712 strain was investigated among different kind of condition. We defined the conversion rate in order to know the efficiency of the ethanol production. To determine this value, it is crucial to characterize the residual glucose concentration. We chose two method to determine the amount of residual glucose. The first method is the thin layer chromatography (TLC) and the second method is the method of the glucose-oxidase enzyme. We found that the TLC method is reliable than the other method. The conversion rates were determined from these values and the ethanol values. The maximal ethanol production of the characterized *Kluyveromyces marxianus* CBS712 strain (5.6% (v/v) ethanol at 45 °C, 55.3% conversion rate) is comparable to those strains which are applied in industrial ethanol production nowadays.

Keywords: *Kluyveromyces marxianus*, ethanol, glucose

BEVEZETÉS

A fosszilis energiaforrások kimerülöben vannak, így életünkben egyre nagyobb szerepet kapnak a megújuló energiaforrások.

Az egyik lehetséges ilyen energiaforrás a bioetanol. Számos országban gazdaságilag számottevő szerepet tölt be a bioetanol termelés, például Brazíliában, az Amerikai Egyesült Államokban és Indiában is. A trópusi területeken meghatározó bioetanol előállítási technológia az SSF (simultaneous saccharification and fermentation), melynek általános előnye, hogy az enzimes kezelés és a fermentációs lépés egybevonásával jelentős energia takarítható meg. Ezen technológia alkalmazása során kedvező, ha minél magasabb hőmérsékleten folyik a termelés (Singh et al., 1998b), amit nagy hőtűrő képességű élesztők felhasználásával lehet elérni. A termotoleráns élesztők közül kiemelkedő a *Kluyveromyces marxianus* hőtűrése, melynek IMB3 törzsét az iparban már használják 45 °C-on (Singh et al., 1998a).

Kísérleteink során mi is arra törekszünk, hogy – az SSF technológiához alkalmazkodva – az általunk használt *Kluyveromyces marxianus* CBS712 törzs a lehető legmagasabb hőmérsékleten a lehető leggazdaságosabban termeljen etanolt. Az etanol termelés gazdaságosságának mutatója a konverziós ráta, melynek értékét a fermentáció végén megmaradó kiindulási anyag (a mi esetünkben a glükóz) mennyiségéből és a termelt etanoltól állapíthatjuk meg. Kritikus pont tehát, hogy ezen értékeket a lehető legpontosabb módszerekkel határozzuk meg.

Az etanol mérése gázkromatográfia történik, amely egy olyan analitikai módszer, amellyel ezred százalék pontossággal meg lehet határozni az anyagok mennyiségét.

A maradék glükóz mennyiségének a meghatározására két módszert választottunk: a vékonyréteg kromatográfiát (VRK) és a glükóz-oxidáz enzimet fölhasználó módszert. A VRK esetében a minta egy adott lemezen (HPTCL-szilika gél) és egy meghatározott közegben fut, majd az előhívás után a lemezen látható a mintában lévő glükóz mennyisége egy fekete pontként, mely pont színének intenzitásából meghatározható a mennyisége. Az enzimes módszer esetében a glükóz-oxidáz (GOD) a glükózt glükonsavvá alakítja. A reakcióban keletkező hidrogén-peroxidot (H_2O_2) a peroxidáz (POD) bontja és a Trinder-féle indikátor reakcióban 500 nm-en jól mérhető színes kondenzációs termék keletkezik. Az abszorbancianövekedés arányos a minta glükóz koncentrációjával. Ezen módszerek felhasználásával a konverziós ráta értékek meghatározása a lehető legpontosabb lesz.

Jelen dolgozat a vékonyréteg kromatográfiás módszert (VRK) hasonlítja össze a glükóz-oxidáz enzimet fölhasználó módszerrel a maradék glükóz mennyiségének a meghatározására. Ezen értékek, illetve a korábban meghatározott etanol termelési adatok fölhasználásával konverziós ráta értékeket számoltam, mely érték az etanol termelés hatékonyságának a mutatója.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Az etanol termelés vizsgálata

Az etanol termelést MYFM tápoldatban (3 g/l élesztő kivonat (BBLTM), 2 g/l pepton (Difco), 2 g/l KH_2PO_4 , 2 g/l $(NH_4)_2SO_4$, 1 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g/l $MgSO_4 \cdot H_2O$.) végeztük, amely tápoldatot kiegészítettük az adott kísérletnek megfelelő mennyiségű glükózzal (Hack és Marchant, 1998). Az előtenyészethez 1 telepet MYFM tápoldatban inokuláltunk (100 ml-es lombik 50 ml tápoldat és 10g/l glükózt tartalmazott). Az inkubálás körülményei: 45 °C, 24 óra, 200 rpm. A 250 ml-es lombikban rázatott 100 ml tápoldatot, amelyet a megfelelő mennyiségű glükózzal kiegészítettünk, 3 ml előtenyészettel inokuláltuk. Az etanol koncentráció meghatározása 12, 16, 20, illetve 24 órás tenyészetekből történt. A törzs etanol termelését 45 °C, 46 °C, 47 °C és 48 °C-on vizsgáltuk.

Az etanol mérése gázkromatográffal történt HP-5-ös oszlopon, 1% izopropanolt használva belső standardként.

A glükóz mérése vékonyréteg kromatográfia segítségével

Az 5 μ l minta (fermentlé) HPTCL szilika gél 60 (20x20 cm) lemezen az alábbi közegben lett megfuttatva: 30 ml diklórmetán, 25 ml metanol, 6 ml víz. Az előhívás 10%-os kénsavas abszolút etanolban történt.

Száradás után hőlégsterilizátorban 120 °C-on 5 percig volt a lemez. Fényképezés után a kiértékelés dr. Lázár István által kifejlesztett CPAtlas 1.0 program segítségével történt.

A glükóz mérése glükóz-oxidáz enzim segítségével

A reagens összetevői (11 mM fenol, 0.76 mM 4-aminoantipirin, 4kU/l glükóz oxidáz és 1kU/l peroxidáz) 0.1 M pH 6.6 foszfát pufferben vannak feloldva. A reakcióközeg 10 μ l mintát (fermentlé) és 1 ml reagenst tartalmaz; ezen reakció 1 perc alatt játszódik le, amelynek eredménye 500 nm-en detektálható. Az adatok kiértékelése a kalibrációs görbéhez viszonyítva történik (Leary et al., 1992).

EREDMÉNYEK

A *Kluyveromyces marxianus* CBS712 törzs etanol termelésének vizsgálata során a célunk az, hogy megtaláljuk azokat a termelési paramétereket, amelyeket alkalmazva a lehető legmagasabb hőmérsékleten a lehető leggazdaságosabban tudjunk etanolt termeltetni. Előkísérleteinkben megvizsgáltuk a *Kluyveromyces marxianus* CBS712 törzs növekedését, ahol azt tapasztaltuk, hogy a törzs 45 °C-on való növekedése nem tér el drasztikusan az alacsonyabb hőmérsékleteken (35 °C és 40 °C) tapasztalhatótól. Ezzel párhuzamosan megmértük a termelt etanol mennyiségét, melynek a maximuma 20, 24 óránál található, és optimalizáltuk a kiindulási glükóz koncentrációt (160-240 g/l). Főkísérleteinkben ezért 45 °C, 46 °C, 47 °C és 48 °C-on vizsgáltuk az etanol termelést (1. ábra) annak érdekében, hogy megállapítsuk, mi az a legmagasabb hőmérséklet, ahol az élesztő a legtöbb etanolt termeli.

A termelés gazdaságossága nemcsak attól függ, hogy milyen magas hőmérsékleten tudunk etanolt termelni, hanem az alkalmazott glükóz hasznosításának mértékétől is. Ennek érdekében meg kell határozni a maradék glükóz mennyiségét, amelyből konverziós rátákat tudunk számolni. A maradék glükóz mennyiségének meghatározásánál elengedhetetlen a lehető legpontosabb eredményt adó módszer alkalmazása. Kísérleteinkben ezért vékonyréteg kromatográfiával (VRK) (3. ábra) és glükóz-oxidáz enzim segítségével is meghatároztuk a maradék glükózt (2. ábra). A 2. és a 3. ábra adatai a 45 °C-on végzett fermentáció eredményeit mutatják, mert ezen a hőmérsékleten kaptam a legmagasabb etanol termelési értékeket, valamint a leggazdaságosabb konverziós ráta adatokat. Ezeket a kísérleteket magasabb hőmérsékleten is elvégeztem (46 °C, 47 °C, 48 °C-on), és hasonló tendenciát tapasztaltam, mint a 45 °C-on végzett kísérletben. Ezen adatokat felhasználva állapítottuk meg a konverziós ráta értékeket (4. ábra). Minden egyes ábrán 3 párhuzamos mérés átlagát és szórását tüntettem fel.

1. ábra: *Kluyveromyces marxianus* CBS712 törzs etanol termelése növekvő hőmérsékleten

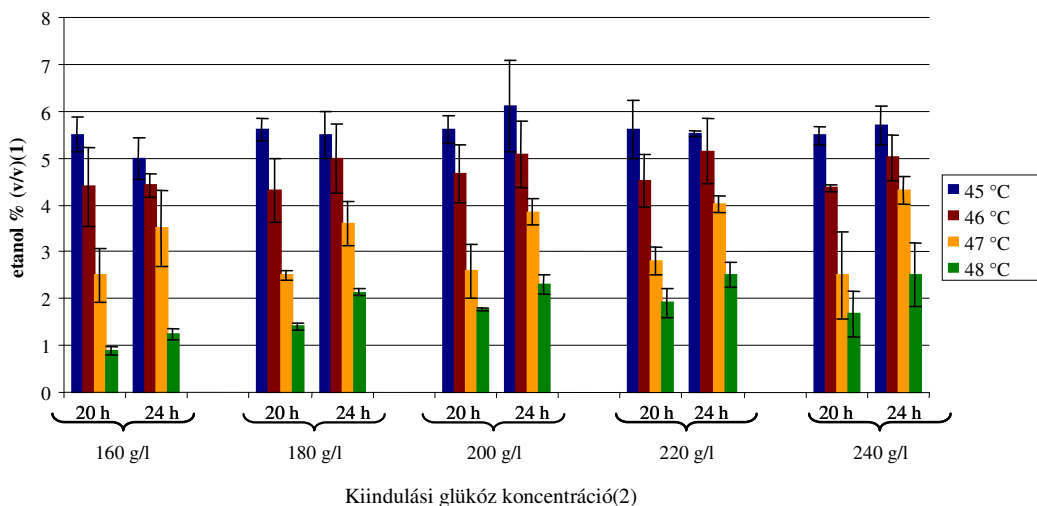


Figure 1: Ethanol production of the *Kluyveromyces marxianus* CBS712 strain at increasing temperature
Ethanol % (v/v)(1), initial glucose concentration(2)

2. ábra: A maradék glükóz mennyisége vékonyréteg kromatográfia (VRK) és glükóz-oxidáz enzim (Glu-ox.) felhasználásával 45 °C-on

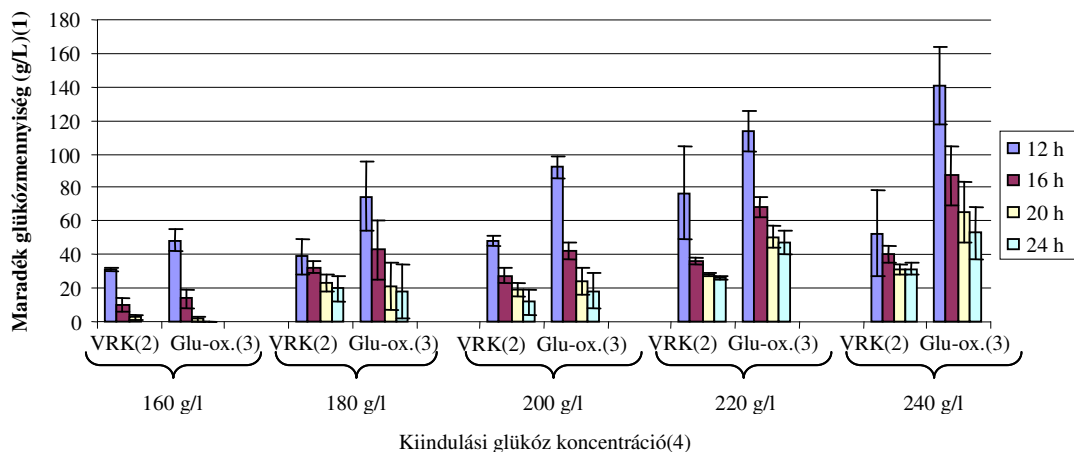
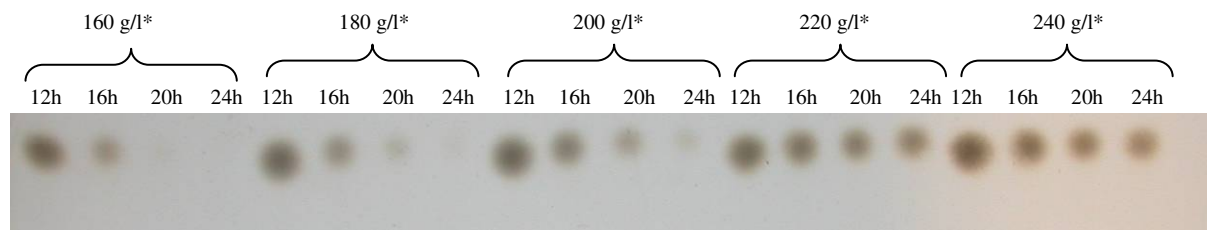


Figure 2: Determination of amount of residual glucose with Thin Layer Chromatography (TLC) and glucose-oxidase enzyme (Glu-ox.) at 45 °C
Amount of residual glucose(1), Thin Layer Chromatography (TLC)(2), glucose-oxidase enzyme (Glu-ox.)(3), initial glucose concentration(4)

3. ábra: A maradék glükóz mennyisége VRK lemezen



* 160 g/l, 180 g/l, 200 g/l, 220 g/l, 240 g/l kiindulási glükóz koncentráció mellett láthatjuk a glükóz fogyását a fermentáció 12., 16., 20. és 24. órájában(1)

Figure 3: The amount of residual glucose on TLC layer
160 g/l, 180 g/l, 200 g/l, 220 g/l, 240 g/l initial glucose concentration(1)

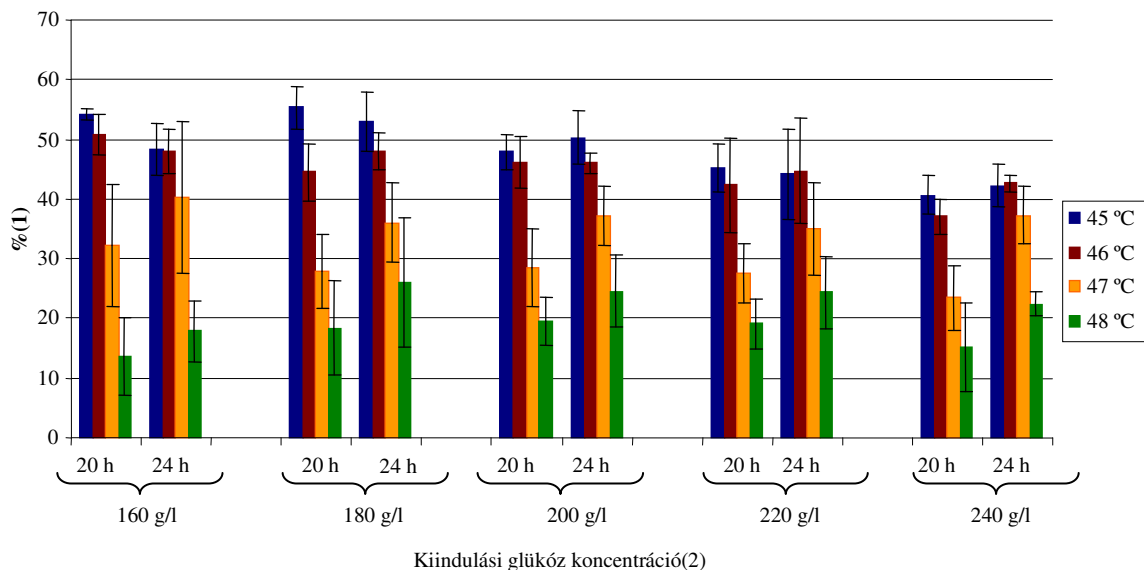
4. ábra: *Kluyveromyces marxianus* CBS712 törzs konverziós rátái az adott hőmérsékleteken


Figure 4: Conversion rate of the *Kluyveromyces marxianus* CBS712 strain at the given temperature
Percent of conversion rate(1), initial glucose concentration(2)

KÖVETKEZTETÉSEK

A *Kluyveromyces marxianus* CBS712 törzs etanol termelését 45 °C, 46 °C, 47 °C és 48 °C-on vizsgáltuk emelkedő glükóz koncentráció (160-240 g/l) mellett. Az eredményekből kitűnik, hogy a termelt etanol mennyiségét csak kismértékben befolyásolja az egyre magasabb glükóz koncentráció; alapvetően a hőmérséklet a meghatározó tényező. A legmagasabb etanol koncentrációt 45 °C-on mértük, 6,11% (v/v) (1. ábra). Ez az érték összevethető az iparban alkalmazott IMB3 törzs által termelt 6-7,2% (v/v) értékkel (Singh et al., 1998a; Banat et al., 1992).

A maradék glükóz mennyiségének meghatározásánál az alkalmazott két módszer között jelentős különbséget tapasztaltunk; a glükóz oxidáz enzimmel végzett vizsgálatok végig egy megnövekedett értéket mutattak a VRK segítségével meghatározott értékekhez képest (2. ábra). Feltételezésünk, illetve a dolgozat terjedelmi korlátai miatt nem részletezhető kontroll kísérleteink szerint ennek oka, hogy a fermentáció alatt egy olyan vegyület termelődik, amely befolyásolja az enzim mérést. Valószínűleg a fermentációban 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, annál is inkább, hiszen itt nincs semmilyen tényező, ami befolyásolhatja a meghatározást, kizárólag és egyértelműen csak a glükóz, mint meghatározandó anyag látható a

VRK lemezen (3. ábra). Az adatokból kitűnik, hogy a fermentáció előrehaladtával a maradék glükóz mennyisége csökken, összhangban az etanol mennyiségének a növekedésével (45 °C-on 180 g/l glükózból kiindulva 12 óránál 39 g/l glükóz mellett 3,84% (v/v) etanol volt, míg 24 óránál 19,7 glükóz mellett 5,49% (v/v) etanol volt).

A termelt etanol mennyiségének adatait, illetve a kiindulási és a maradék glükóz koncentrációt felhasználva konverziós ráta értékeket számoltunk, amely érték az etanol termelés hatékonyságának a legfontosabb mutatója (4. ábra). A legmagasabb értéke 55,3% volt 45 °C-on, amely esetben a fermentációs közeg 180 g/l kiindulási glükózt tartalmazott. Habár az iparban alkalmazott IMB3 törzs konverziós ráta értékei ennél magasabbak (70-80%) (Banat et al., 1992; Banat és Marchant, 1995), figyelembe véve, hogy az általunk vizsgált CBS712 törzs genetikailag módosítatlan, nem mondható rossz kiindulási értéknek.

Összességében elmondhatjuk, hogy a *Kluyveromyces marxianus* CBS712 törzset jellemeztük etanol termelő képesség szempontjából, valamint kiszámoltuk a konverziós ráta értékeket, amihez vékonyréteg kromatográfia segítségével határoztuk meg a maradék glükóz mennyiségét. A *Kluyveromyces marxianus* CBS712 törzs ezen etanol termelési adatai már genetikai módosítás előtt is összevethetőek az iparban használt *Kluyveromyces marxianus* IMB3 törzsével, amely tény biztató a távlati ipari alkalmazását tekintve.

IRODALOM

- 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.
- Hack, C. J.-Marchant, R. (1998): 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.
- Leary, N. O.-Pembroke, A.-Duggan, P. F. (1992): Improving accuracy of glucose oxidase procedure for glucose determinations on discrete analyzers. *Clin. Chem.*, 38. 298-302.
- 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. 8. 753-755.
- Singh, D.-Nigam, P.-Banat, I. M.-Marchant, R.-McHale, A. P. (1998b): Review: Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part II – Use of *Kluyveromyces marxianus* IMB3: *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14. 823-834.