

**Budapesti Corvinus Egyetem
Élelmiszertudományi Kar
Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszék**

**ÉLESZTŐGOMBA SEJTEK NEHÉZFÉM BIOSZORPCIÓJA ÉS
ALKALMAZÁSUK A SZENNYVÍZTISZTÍTÁS HATÉKONYSÁGÁNAK
NÖVELÉSÉRE**

Kákonyi Ildikó

Doktori értekezés

Budapest
2011

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszer-tudományi Doktori Iskola

tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: **Dr. Fodor Péter**

az MTA doktora

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM

Élelmiszertudományi Kar

Alkalmazott Kémia Tanszék

Témavezető: **Dr. Maráz Anna**

Egyetemi tanár

A biológiai tudomány kandidátusa

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM

Élelmiszertudományi Kar

Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, azért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.

Az Iskola- és a témavezető jóváhagyó aláírása:



Az iskolavezető jóváhagyása



A témavezető jóváhagyása

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanács 2011. november 29-i határozatban a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke

Biacs Péter, DSc

Tagjai

Kosáry Judit, DSc

Magyar Ildikó, PhD

Vereczkey Gábor, CSc

Halász Anna, DSc

Opponensek

Rezessyné Szabó Judit, PhD

Nyeste László, DSc

Titkár

Magyar Ildikó, PhD

*“Négy ezredév után a nap kihűl,
Növényeket nem szül többé a föld;
Ez a négy ezredév hát a mienk,
Hogy a napot pótolni megtanuljuk.”
(Madách)*

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	VIII
1. BEVEZETÉS	1
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
2.1. Gombák alkalmazása biomassza előállítására és ipari hasznosítására	3
2.1.1. A biomassza előállítása gombákkal	3
2.2. A gombák tápanyag forrásai	4
2.2.1. Szénforrások.....	4
2.2.1.1. A keményítő, mint szénforrás	5
2.2.1.2. A tejsavó és laktóz, mint hasznosítható szénforrás.....	6
2.2.1.3. Gombák szénhidrát anyagcsere folyamatai	8
2.2.1.4. A laktóz hasznosítás folyamata mikrobáknál	11
2.2.2. Nitrogénforrás	13
2.3. A biomassza előállítást befolyásoló abiotikus tényezők.....	14
2.4. A mikrobák szaporodása fermentorokban	15
2.4.1. O ₂ tartalom meghatározás	15
2.4.2. pH meghatározás	16
2.5. A biomassza termeléshez kiválasztott élesztőgomba fajok jellemzése	16
2.5.1. Keményítőhasznosító élesztőgombák	16
2.5.2. Laktóz hasznosító élesztőgombák.....	18
2.6. A nehézfémek jellemzése környezeti toxikológiai szempontból.....	19
2.7. A talajok szennyeződése nehézfémekkel.....	21
2.7.1. A talajok nehézfém terhelésének jogi szabályozása az Európai Unióban és hazánkban.....	21
2.7.2. A nehézfémek természetes előfordulása a talajokban, tulajdonságaik és hatásuk	23
2.8. A mikroorganizmusok nehézfém megkötő képessége.....	26
2.8.1. A bioszorpció mechanizmusa.....	27
2.8.1.1. A sejt metabolizmusa révén történő fémmegkötés	27
2.8.1.2. A fémek sejtek általi akkumulációja a bioszorpció során.....	28
2.9. Gomba sejtfal felépítése.....	29
2.9.1. Élesztőgomba protoplasztok előállítása	31
2.9.2. Az élesztősejt hidrofób tulajdonsága és mérésének lehetőségei	32
2.10. A megkötött nehézfémek deszorpciójának lehetőségei	33
2.11. A sejtek rögzítése hordozókhoz	34
2.11.1. Sejtrögzítési módszerek.....	35
2.11.2. A hordozóval szembeni elvárások.....	37
2.11.3. A hidroxapatit (HAP), mint hordozó	38

2.11.4. Az immobilizálás előnyei és hátrányai.....	39
2.11.5. Rögzített mikroorganizmusok bioremediációs alkalmazása	39
2.11.6. Immobilizáláshoz alkalmazható mikroorganizmusok.....	40
3. CÉLKITŰZÉS.....	42
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	43
4.1. Élesztőtörzsek	43
4.2. Anyagok.....	44
4.2.1. Táptalajok.....	44
4.2.2. Oldatok	44
4.2.3. HAP kerámia tabletta	45
4.3. Módszerek.....	46
4.3.1. Törzsfenntartás	46
4.3.2. Inokulum készítése	46
4.3.3. Szárazanyag tartalom meghatározása.....	46
4.3.4. Sejteshozam és hozamkonstans meghatározása	46
4.3.5. Tápközeg optimálás kísérlettervezéssel	47
4.3.6. A sejtkoncentráció meghatározása az optimáláshoz	49
4.3.6.1. Glükózt, illetve laktózt alkalmazva szénforrásként	49
4.3.6.2. Keményítőt használva szénforrásként	50
4.3.7. Laboratóriumi fermentáció.....	50
4.3.8. Fénymikroszkópos vizsgálatok	52
4.3.9. Vitális festés	53
4.3.10. Fehérjetartalom meghatározása.....	53
4.3.11. Összes szénhidrát tartalom meghatározása	54
4.3.12. Etanoltartalom meghatározása	54
4.3.13. Élesztőgombák nehézfém szorpciója	55
4.3.14. Élesztősejtek fémkötő képességének meghatározása.....	56
4.3.15. Nehézfémek celluláris eloszlásának vizsgálata.....	57
4.3.15.1. A fémionok celluláris megoszlásának vizsgálata élő sejtekben	57
4.3.15.2. A fémionok celluláris megoszlásának vizsgálata szárított sejtekben	57
4.3.16. Élő sejtek rögzítése a hordozóra.....	57
4.3.17. Metilénkékes festés	58
4.3.18. A pH hatása az immobilizáció hatékonyságára.....	58
4.3.19. A sejtfelületi hidrofóbicitás meghatározása	58
4.3.20. Sejtfal kezelések optimálása rögzítés céljából	58
5. EREDMÉNYEK	60
5.1. Élesztőgomba törzsek szűrése keményítőhasznosítás szempontjából	60
5.2. Élesztőgomba törzsek szűrése laktóz hasznosítás szempontjából	62

5.3.	A kiválasztott élesztőtörzsek biomassza előállításának vizsgálata és optimalálása	63
5.3.1.	A glükóz és élesztőkivonat koncentrációk optimalálása.....	63
5.3.2.	A glükóz és az ammónium-szulfát koncentrációk optimalálása	67
5.3.3.	A keményítő és élesztőkivonat koncentrációk optimalálása.....	69
5.3.4.	A keményítő és az ammónium-szulfát koncentrációk optimalálása	72
5.3.5.	A laktóz és az élesztőkivonat koncentrációk optimalálása	74
5.3.6.	A laktóz és az ammónium-szulfát koncentrációk optimalálása	77
5.4.	A kiválasztott élesztőtörzsek biomassza termelésének vizsgálata és optimalálása rázatott fermentorban.....	79
5.4.1.	Glükóz és élesztőkivonat, ill. keményítő és élesztőkivonat optimalálása a biomassza termelésére	80
5.4.2.	Glükóz és élesztőkivonat, ill. laktóz és élesztőkivonat optimalálása biomassza termelésére	82
5.4.3.	Levegőztetés hatása a biomassza termelésére	84
5.5.	A pH hatása a biomassza termelésére.....	85
5.6.	Különböző fajokhoz tartozó élesztőgomba törzsek nehézfémek akkumuláció–	87
5.7.	Nehézfém adszorpciók vizsgálatok.....	87
5.8.	Az akkumulált nehézfémek sejten belüli megoszlása.....	92
5.8.1.	Élő sejtekben történő nehézfém megoszlás.....	92
5.8.2.	Inaktívált sejtekben történő nehézfém megoszlás	97
5.9.	Az élesztőgombák rögzítése hidroxipatit (HAP) hordozóhoz	99
5.9.1.	A sejtrögzítés szakaszainak meghatározása	99
5.9.2.	A pH hatása az immobilizálás hatékonyságára	102
5.9.3.	A sejtfa oldószeres és enzimikus kezelései	102
5.9.3.1.	Sejtfa kezelése optimalálása	103
5.9.3.2.	Kezelések optimális paraméterekkel az adhézio hatékonyságának növelésére	105
6.	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	111
7.	ÖSSZEFOGLALÁS	113
8.	SUMMARY	116
	IRODALOMJEGYZÉK	119

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

1. Mikroorganizmusok:

Deb. occidentalis: *Debaryomyces occidentalis* var. *occidentalis*

D. anomala: *Dekkera anomala*

G. candidum: *Geotrichum candidum*

K. lactis: *Kluyveromyces lactis*

K. marxianus: *Kluyveromyces marxianus*

L. kononenkoe: *Lipomyces kononenkoe*

R. mucilaginosa: *Rhodotorula mucilaginosa*

S. fibuligera: *Saccharomycopsis fibuligera*

S. cerevisiae: *Saccharomyces cerevisiae*

Schizo. pombe: *Schizosaccharomyces pombe*

2. Egyéb:

AES: AtomEmission Spectrometric (atomemissziós spektrometria)

BOI: Biológiai Oxigén Igény

DEAE-dextran: Di Ethyl Amino Ethyl-dextran

DDT: DithioTreitol

EDTA: Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (etiléndiamin-tetraecetsav)

HECAMEG: 6-O-(N-Heptylcarbamoyl)-methyl- α -D-glucopyranoside

ICP: Inductively Couples Plasma (induktív csatolású plazma)

KOI: Kémiai Oxigén Igény

MATH: Microbial Adhesion To Hydrocarbons (Mikrobák szénhidrogénekhez való adhéziója)

MATS: Microbial Adhesion To Solvents (Mikrobák oldószerekhez való adhéziója)

MGEÉ: milligramm-egyenérték

MOPS: 3-MorpholinoPropane-1-Sulfonic acid

SDS: Sodium Dodecyl Sulphate

1. BEVEZETÉS

Az emberiségnek a történelem során az volt a célja, hogy javítson életfeltételein. Szolgálatba állította a tudományok eredményeit – elsősorban a természettudományokét – és ezáltal egyre hatékonyabban alakította át környezetét saját céljainak megfelelően. Beavatkozásunk a környezetbe gyakran irreverzibilis változásokat eredményez, amely regionális és globális problémák forrása, és a földi élet alapjait is veszélyeztetheti. A XX. század végére a környezetbe kibocsájtott szennyező anyagok mennyisége és a természeti erőforrások felhasználása ugrásszerűen megnőtt, ebből kifolyólag szinte minden környezeti elem állapota romlott és ez már használatuk korlátozásával is együtt jár.

A környezetszennyezés elterjedésével egyre inkább nagyobb figyelem fordul a nehézfémekkel összefüggő veszélyek felé, ugyanis a mikroelemek és a toxikus nehézfémek felhalmozódása meghatározó humán egészségügyi, ökológiai, biológiai jelentőséggel bír. A mikroelemek és a nehézfémek környezeti kibocsájtása az ipari korszak fejlődésével többszörösére emelkedett, amelyben a közlekedés és az ipari tevékenység mellett a mezőgazdaság modernizációjával szintén potenciális nehézfém-szennyező forrássá vált (CSATHÓ, 1994; KÁDÁR, 1995).

Az utóbbi évtizedek kutatási eredményei, valamint a környezet állapotára vonatkozó felmérések (monitoring) igazolták, hogy az ipari körzetekben, városokban, közlekedési főútvonalak mentén, és sok esetben a szennyvizek, szennyvíziszapok mezőgazdasági területeken történő elhelyezésével kritikus mértékben megemelkedett talajaink nehézfém-tartalma. Magyarország legszennyezettebb területei alapvetően az erőteljesen iparosodott régiók. Ezen ipari körzetekben a környezetterhelés többszöröse az országos háttérterhelésnek.

A nehézfémekkel szennyezett területek alapvető környezeti problémát jelentenek. A talajok hosszú évekig képesek felhalmozni a nehézfémeket anélkül, hogy azok akut mérgező hatása nyilvánvaló lenne. Egy bizonyos terhelési szint felett szűrőkapacitásuk kimerül, áteresztővé válnak és maguk is szennyezőforrásként szerepelnek. A toxikus fémek megjelennek a vizekben, felvehetővé válnak a növény számára és bekerülve a táplálékláncba hosszútávon kimutatható károsodást okozhatnak. Magyarországon a lakossági vízhasználat több mint 90%-a felszín alatti vízből származik (PUZDER et al. 2001), ezért különösen fontos azon szennyeződések kezelése, mely során a talajvíz illetve a talajba került szennyező anyagok eltávolítása a cél.

Az ipari szennyvizek tisztítása és környezetbe való visszajuttatása nagyon költséges eljárás. Ezért szükséges olyan eljárások kidolgozása, amelyekkel könnyen, gyorsan és megfelelő

hatékonysággal tudjuk a szennyezést megszüntetni. Számos kémiai módszert dolgoztak ki e cél érdekében. A kémiai adszorbensek közül csak az ioncserélő gyanták jelentenek ökológiailag minimális kockázatot, ezek azonban nagyon költségesek. Ezért fokozódó igény mutatkozik az olcsó, környezet-kímélő alternatívák kutatása iránt. Így merült fel a biomassa bioszorbensként történő használata, mint gazdaságos és ökobarát lehetőség. Fontos, hogy ebben az eljárásban résztvevő mikroorganizmusok közül elsősorban azokra koncentráljunk, melyek élelmiszeripari és egyéb ipari melléktermékeken jól szaporodnak. Ennek egyik haszna, hogy a magas szerves anyag tartalmú melléktermékeken, folyamatvizeken elszaporított mikrobák egyrészt lebontják a környezetterhelő melléktermékeket, mint például a tejipari melléktermékként keletkező tejsavót, vagy a burgonya, ill. kukorica feldolgozásából származó keményítőt; másrészt az így előállított biomassa fémionkötő képessége révén szűrő szerepet is elláthat. A folyamatvízen előállított sejtek hordozón történő rögzítésével bioszorbensként is alkalmazhatóak lehetnek a nehézfémek kiszűrésére.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Gombák alkalmazása biomassza előállítására és ipari hasznosítására

Az iparban hasznosítani kívánt mikroorganizmusoknak számos elvárásnak kell megfelelniük. Így bármilyen fermentációs céllal kívánunk is alkalmazni egy mikrobát, a megfelelő tulajdonságokkal rendelkező törzs kiválasztásához egy alapos törzsszelekciót kell elvégeznünk. A kiválasztás során számos tényezőt kell figyelembe venni, mint pl. a gyors szaporodási sebesség, magas hozam, jó affinitás a szubsztrátummal szemben, genetikai stabilitás, jó pH és hőmérséklettűrés. Emellett még fontos, hogy a mikroba ne legyen toxikus és patogén.

A mikrobákkal megvalósított technológiák alapvető művelete a mikrobák elszaporítása. A technológia fő szempontjai a következők: a kívánt anyagot (fehérjét, molekulát, enzimet stb.) termelő mikrobafajt megtaláljuk (felfedezés), izoláljuk és azonosítjuk, majd ezekből a megfelelően termelő mikrobatörzset kiválasztjuk (screening). A kiválasztott törzsek tenyésztési körülményeit optimáljuk, végül üzemi körülmények között (scale-up) a fejlesztett mikroorganizmus adott pl. metabolit előállítását optimáljuk és a fermentléből vagy magából a mikrobasejtekből ezt az anyagot kinyerjük. Ez lehet *primer metabolit*, pl. alkoholok, szerves savak, vitaminok, enzimek, stb. A *szekunder metabolitok* pl. az antibiotikumok.

Mikroba sejteket szaporíthatunk abból a célból is, hogy a végtermék maga a sejtömeg legyen, az állati takarmányozásra vagy emberi fogyasztásra alkalmas biomassza (SCP, single cell protein) előállítása céljából. Az élelmiszeripari alkalmazások közül jól ismert a sütőélesztő vagy a különböző starter kultúrák előállítása, mely utóbbira jó példa a *Saccharomyces cerevisiae* törzseinek borászati és söripari starterként való előállítása. A sejtömeg elszaporításával indítható be a mikrobákkal történő fémkinyerés („mikrobiális kohászat”) elhagyott meddőkből, szennyvizekből, vagy alacsony fémtartalmú ércekből (KEVEI, 1999).

2.1.1. A biomassza előállítása gombákkal

A biomassza előállításánál, a kiválasztandó mikroorganizmusokhoz az alábbi kérdéseket kell figyelembe venni a screenelési eljárás megválasztásához vagy kidolgozásához:

- milyen folyamathoz szeretnénk kiválasztani mikrobát
- milyen szubsztrátumon szeretnénk biomasszát előállítani
- melyek azok a mikroorganizmusok, amelyek az adott szubsztrátumot hasznosítani képesek

- honnan lehet az adott mikrobát beszerezni (pl. közvetlen izolálással a talajból, vízből vagy valamilyen törzsgyűjteményből (BOZE et al, 2003).

Mivel ezek a kérdések nagyon általánosak, így számos mikroorganizmus szóba jöhet. A sejtömeg előállításához általában négyféle mikroorganizmust használnak: baktériumokat, élesztőket, penészeket és algákat. Ezek közül az élesztőgombák a legelterjedtebbek, a legtöbbet vizsgáltak és a leginkább elfogadottak. Előnyük a baktériumokhoz képest, hogy többségük nem toxikus és apatogének, valamint hogy nagyobbak, mint a baktériumok és ezért könnyebb őket elválasztani a fermentálótól. Viszont hátrányuk a lassúbb szaporodásuk (LU és WILKINS, 1996; STEPHEN és MACNAUGHTON, 1999).

2.2. A gombák tápanyag forrásai

A gombák tápanyagait mindazok a vegyületek jelentik, melyek a környezetből számukra közvetlenül vagy közvetett módon rendelkezésre állnak. A tápanyagok csoportosítása: 1. szénforrások; 2. nitrogénforrások; 3. vitaminok és más növekedési anyagok; 4. ásványi elemek.

Az élesztőgombák növekedéséhez, szaporodásához a szükséges tápanyagforrások közül a szén – és a nitrogénforrásokat kell kiemelni.

2.2.1. Szénforrások

A heterotróf szervezetek számára a szénhidrátok jelentik a legfontosabb szénforrást. Ezek mono-, oligo- vagy poliszacharidok formájában egyedülálló szerepet játszanak a természetben. A kisebb oligoszacharidok esetén is hatalmas a lehetséges monoszacharid kombinációk száma (LAINE, 1994), s ez eredményezi ezen vegyületek szerkezeti és funkcionális változatosságát, ami sokkal nagyobb, mint a hasonló méretű peptidek illetve nukleinsavak esetén lehetséges. Ezért játszhatnak az oligo- és poliszacharidok központi szerepet megannyi biológiai folyamatban.

A széles körben rendelkezésre álló szénforrásokat az egyes gombafajok nem egyformán tudják hasznosítani. A hasznosítási hatékonyság megítélésének egyik legegyszerűbb és egyben legkönnyebb módja a sejtszaporodás vizsgálata, hogyan alakul annak időbeli görbéje, hiszen a hatékonyabb C-forráson rövidebb *lag* fázist figyelhetünk meg.

A monoszacharidok széles körét a legtöbb gombafaj nagymértékben hasznosítja, míg ugyanezekből a cukrokból felépülő nagyobb molekulákat (pl. keményítő) már sokkal kevésbé, melyet e molekulák hidrolíziséhez szükséges enzim(ek) hiánya okoz (MANCZINGER és mtsi., 2003).

2.2.1.1. A keményítő, mint szénforrás

A keményítő a növényi szervezetek tartalék poliszacharidja, melyet szükség esetén gyorsan le tudnak bontani és energiatermelésre fordítani. A fő forrásai: búza, burgonya, kukorica, rizs, manióka, melyekben a keményítő granulátumok formájában van jelen, amelyek két alakban (lencse formájú nagy szemcsék és kis golyó formájú szemcsék) ismerhetők fel (FRENCH, 1984). A keményítő szemcse két, szerkezetileg különböző szénhidrátból, az amilózból, és amilopektinből áll.

Az amilóz a keményítő 17-24%-át teszi ki; rendszerint a szemcse belsejében található, és hosszú, elágazás nélküli, spirálszerűen csavarodott $\alpha - 1 \rightarrow 4$ kötésű (maltóz kötés), 60-2000 glükóz láncból áll. A különböző hosszúságú molekulák molekulásúlya 10.000 és 50.000 között van. Az amilóz a jóddal tiszta kék színeződést ad; vízbe kolloid oldatot képez, és csirizt nem képez. Nem teljes lebontásnál, például enzim lebontásnál maltóz diszacharid keletkezik.

Az amilopektin a keményítő 76-83%-át teszi ki. Az amilózzal ellentétben elágazó molekulaláncokból áll, amely túlsúlyban levő $\alpha - 1 \rightarrow 4$ kötés mellett $\alpha - 1 \rightarrow 6$ kötésekkel is rendelkezik. Általában az amilopektin láncok mintegy 15 glükóz egység után ágaznak el. Ez a térbelileg elágazó szerkezet szolgáltatja az amilopektin elcsirizesedő képességét. 6.000 – 40.000 glükóz egység mellett a molekulásúly 1 millió és 6 millió között van. Az amilopektin észterszerű kötésben mintegy 0,23% foszforsavat tartalmaz. A vizes oldat jóddal ibolyától tiszta vörösig színeződik. A keményítő íz és szagmentes (NARZISS, 1981).

A gombák amilázai többnyire extracelluláris enzimek. Ellentétben a cellulózzal, a keményítő nem kristályos szerkezetű, vízben parciálisan oldódik, duzzad, így lebontása könnyebb, mint a cellulózé. Ez is egyféle magyarázata lehet annak, hogy miért ilyen elterjedtek az amilázok a gombák világában. Ritkán az amilázok intracellulárisak is lehetnek, mint például a *Saccharomyces cerevisiae* sporuláció-specifikus glükoamiláza (PRETORIUS, 1991).

A keményítő lebontása

A komplex szerkezetből következik, hogy a keményítő lebontásához többféle enzim keverékére van szükség. Ezt az enzimkeveréket amilázkomplexnek nevezzük. Komponensei a következők: 1. α -amiláz vagy endo-1,4-glukán-glükánhidroláz, 2. glükoamiláz vagy exo-1,4-glukán-glükohidroláz, 3. α -1,4-glikozidáz. Az α -amiláz az α -1,4-glükánlánc belsejében random módon hasít, mintegy felaprózva a makromolekulát. A hidrolízis során két glükóz egységből álló diszacharid, maltóz is képződik nagy mennyiségben, melyet maltáz bont le glükózig. A glükoamiláz a glükánláncok nem

redukáló végéről egymás után glükóz egységeket hasít le. Ugyanez az enzim képes a bontással, bár lassabban, az α -1,6-os elágazásoknál továbbhaladni, így a molekula teljes lebontása megvalósulhat (KARKALAS, 1985).

2.2.1.2. A tejsavó és laktóz, mint hasznosítható szénforrás

A tejsavó

A mezőgazdaság is és élelmiszeripari termelés során számos olyan melléktermék keletkezik, melyek potenciális környezetszennyező anyagok, semlegesítésük hatalmas anyagi forrásokat emészt fel. Ilyen melléktermék a sajt- és túróféleségek gyártása során, világszerte éves szinten több mint 1,45 x 108 tonna mennyiségben keletkező tejsavó, melynek kémiai oxigénigénye értéke igen jelentős, a magas érték a tejcukor tartalomán kívül, a tejsavó fehérje- és zsírtartalmának is köszönhető (CASTILLO, 1990).

A tejsavó toxikus anyagoktól mentes és fehérjében (0,8 w/v %), tejcukorban (4,8 w/v %), vitaminokban (130 mg/l), valamint ásványi anyagokban (3,5 g/l) gazdag. Megközelítőleg 4,8%-kal a laktóz a leggyakoribb szénhidrát a tejsavóban (CSAPÓ és CSAPÓNÉ, 2002).

Takarmányként (pl. sertéseknek) (SCHINGOETHE, 1976) vagy trágyázószerként a mai napig használják a savót, de sok helyen egyszerűen a felszíni vizekbe vagy a csatornába öntötték. A tejsavó, ha szennyvízként tekintünk rá, az élelmiszeripar egyik legkörnyezetszennyezőbb mellékterméke. Magas szerves anyag tartalma miatt (BOI = 30 000-50 000 mg/l, KOI = 60 000-80 000 mg/l) nagyon fontos környezetvédelmi problémát jelent. Megoldás lenne olyan mikrobiális rendszerek kidolgozása, melyek alkalmasak ennek a gyakorlati problémákat jelentő szennyvíznek a kezelésére. Ennek egyik lehetséges útvonala a tejsavó alapú biomassza termelés, melynek alapját az képezi, hogy egyes élesztők nagy hatásfokkal képesek asszimilálni a tejsavó tejcukortartalmát, illetve képesek etanollá erjeszteni. Ez a lépés már jelentősen csökkenti a tejsavó KOI szintjét a rendszerből távozó széndioxidon keresztül, illetve megkönnyíti a további kezelést (GÖBLÖS, 2004).

A tejsavó azon tulajdonságát, hogy értékes anyagokat tartalmaz, és jó hatással van az emberi szervezetre, egyre inkább kezdik felfedezni. A XX. századtól egy újabb lehetséges hasznosítási területe a sajtsavónak a wellness és fitness ipar, amely nemrég fedezte fel a sajtsavó hasznosítási lehetőségeit, pl. a fogyókúra táplálék-kiegészítője melynek fogyasztása jóllakottság érzését kelti, serkenti az anyagcserét, ugyanakkor kevés és szinte teljes mértékben zsírmentes kalória felvételével jár. A sajtsavó a fogyókúra kiegészítésére is kiváló, mivel a természetes összetételét tekintve nagyon hasonló az

anyatejhez, ez a termék a legjobb és leginkább eredeti tápanyagok közé sorolható, amelyet az ember magához vehet (CSAPÓ és CSAPÓNÉ, 2002).

A laktóz

A tej legfontosabb szénhidrátja a laktóz (tejcukor). A laktóz mellett kis mennyiségben kimutatható rendszerint glükóz és galaktóz, továbbá – legfeljebb 0,1% mennyiségben – különböző 2-10 monoszacharidot tartalmazó oligoszacharid, amelynek felépítésében glükózon és galaktózon kívül L-fruktóz, N-acetil-D-glükózamin és N-acetil-D-galaktózamin, továbbá szíálsav vesz részt (CSAPÓ és CSAPÓNÉ, 2002).

A laktóz egy redukáló diszacharid (β -D-galaktopiranozil (1-4)-D-glükóz) molekula, mely hidrolizálva egy molekula glükózra és egy molekula galaktózra bomlik. Ez a diszacharid – néhány egzotikus gyümölcsön kívül – csak az emlősök tejében fordul elő. A tehéntej átlagosan 5% laktózt tartalmaz, amely két különböző, α és β módosulatban fordul elő. Az α -laktózban α -D-glükóz, a β -módosulatban β -D-glükóz kapcsolódik a β -D-galaktóz molekulához. A két módosulat kémiai tulajdonságai megegyeznek, fizikai tulajdonságaik (oldhatóság, forgatóképesség, olvadáspont) eltérőek. Ezek közül legfontosabb, hogy oldhatóságukban különböznek. A β -laktóz vízben való oldhatósága jóval nagyobb az α -laktóznál. A hőmérséklet növekedésével az oldhatóság fokozódik. Oldataik fajlagos forgatóképessége szintén különböző, a mutarotáció után beálló egyensúlyi állapotban $52,5^\circ$. A mutarotáció sebessége függ a hőmérséklettől és a pH-tól. Ezzel befolyásolni lehet, hogy a laktóz az oldatból milyen kristályok alakjában váljon ki. A tejcukor lúgokkal szemben nagyon érzékeny, már híg lúgos oldatban is bomlik. A bomlás során barna színű huminanyagok is keletkeznek. Savakkal szemben viszont nagyon ellenálló, nehezebben hidrolizálható, mint a répacukor. A β -galaktozidáz (laktáz) enzim D-galaktózra és D-glükózra hidrolizálja (GASZTONYI & LÁSZTITITY, 1993; BERLITZ & GROSCH, 1999).

A tejtermékek gyártása során, a tejben lévő vizet el kell távolítani a termék besűrítése érdekében. Ezt a koncentrációt különböző módokon végezhetjük, azonban mindig jelentős laktózvesztéssel jár. Míg a tejtermékeket a fogyasztók nagyra értékelik és ezért könnyen eladhatók, a laktóz alig tartalmaz valamennyi kereskedelmi értéket. Ezért az élelmiszergyártók nem tudják mit csináljanak vele, és igen gyakran ezt a cukrot a szennyvízzel együtt a folyókba juttatják. A cukor bekerülése a folyóvízbe környezeti egyensúlyi problémákat okozhat, ha a koncentrációja túlságosan magas, még olyan természetes anyag esetében is, mint a laktóz.

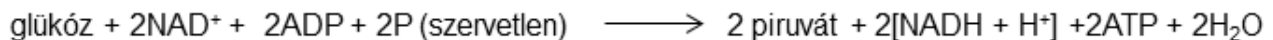
2.2.1.3. Gombák szénhidrát anyagcsere folyamatai

A szénhidrátok esszenciális szerepe a lebontó folyamatok és az energianyerés terén mutatkozik meg. Mivel az összes élesztőgomba heterotróf, nem képesek hasznosítani a légköri szén-dioxidot, így a szén, viszonylag bonyolult molekulák formájában, a környezetből kell felvenniük. A legalapvetőbb lebontási folyamat melynek során energia nyerhető: a glikolízissel kezdődik (NELSON, 2004).

Glikolízis

A glikolízis vagy más néven EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS (EMP) út a citoplazmában lejátszódó lebontó anyagcsere folyamat, melyet az 1930-as években írtak le először. Kémiai lépésit tekintve a piroszölősav képződéséig megegyezik az anaerob közegű glikolízissel. Amennyiben van elegendő oxigén a piruvát tovább oxidálódik: szén-dioxid, acetyl-Ko-A és NADH₂ keletkezik.

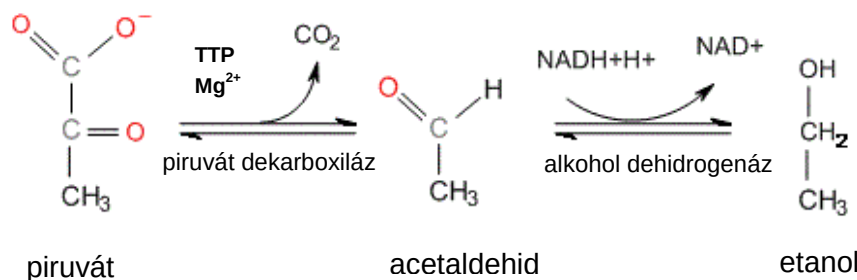
A teljes folyamat egyenlete a következő:



Anaerob körülmények között etanolos fermentáció megy végbe. A lehetséges lebontási útvonalakat a 1. ábra is mutatja.

Az etanolos fermentáció folyamata

Anaerob körülmények között az élesztőgombák a glikolízisből származó piruvátot alkoholos fermentáció keretén belül lebonthatják. A piruvát kétlépéses folyamatban alakul át etanollá. Az első lépésben a piruvát a piruvát-dekarboxiláz enzim segítségével dekarboxileződik. A második lépésben az acetaldehid etanollá redukálódik, a folyamatot az alkohol-dehidrogenáz enzim katalizálja. A folyamat végtermékei az etanol és a szén-dioxid lesznek (NELSON, 2004).



1. ábra A piruvát kétlépéses átalakulása etanollá

A Pasteur-effektus és a Crabtree-hatás

Anaerob körülmények között a metabolizmus fermentációra vált át. A fermentáció során a glikolízis felgyorsul, vagyis a glükóz lassabb aerob fogyasztása helyett gyors anaerob felhasználás

indul be. A jelenséget először Luis Pasteur figyelte meg. A sejtek azért fogyasztják gyorsabban a glükózt, hogy a kevésbé hatékony fermentáció során is elegendő mennyiségű ATP-t termeljenek. Ez a jelenség azonban csak akkor figyelhető meg, ha a glükóz-koncentráció alacsony, vagy valamilyen tápanyaghiányos állapot áll fenn, például nitrogén-hiány (WALKER, 1998). A Pasteur-effektus egy speciális esete a *Kluyver-effektus*. Sokszor – különösen oligoszacharidok esetében – az élesztőfajok szaporodása aerob körülmények között folyik, nem pedig anaerob, vagy olyan körülmények között, amelyek során légzést nem folytatnak. Ez esetben a fermentáció gátolt. A cukrok felhasználásának ezt az oxigéntől való függését nevezzük Kluyver-effektusnak. Az ilyen „légzéstől-függő” fajokat pedig Kluyver-effektusra nézve pozitív fajoknak. Az effektus oka a cukortranszport rendszer kis aktivitásában keresendő, amely esetben a fermentációhoz szükséges magas szubsztrát szint nem biztosított, szemben az energiatermelő légzéssel, amely kevesebb szubsztrátot igényel. A Kluyver-effektus tényleges definíciója félreérthető, hiszen a standard fermentációs tesztekben Durham csövet alkalmaznak, és nem különítik el, hogy a fermentáció során történt-e szaporodás, vagy sem. Az effektust számos egyéb tényező is befolyásolja (FUKUHARA, 2003): pl. légzés hiányában az erősen aerob fajoknál az oxidációs-redukációs viszonyok kiegyensúlyozatlansága, vagy esetenként az oxigén hatása a glikolitikus enzimek szintjére (SIMS és BARNETT, 1991), de említhetnénk az enzimek cukrokkal szembeni affinitásának változását is anaerob viszonyok között (BARNETT, 1992).

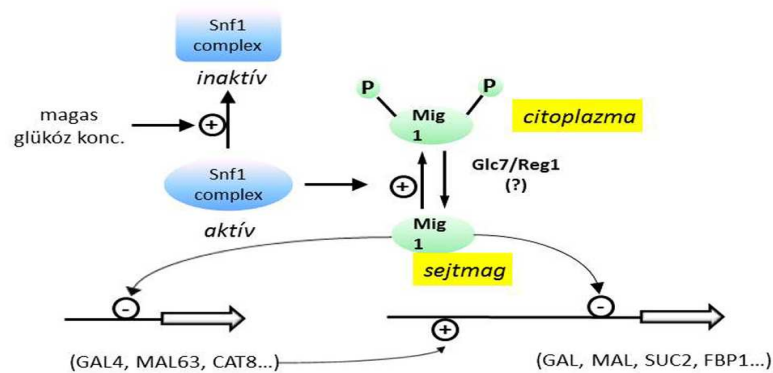
A másik jellegzetes tulajdonság az ún. *Crabtree-effektus* (reverz Pasteur-effektus). A magas cukorkoncentráció néhány mikroorganizmusnál a légzési útvonalak telítődéséhez vezet. Ilyenkor az élesztő nem képes felhasználni a felesleges cukrot a fő lebontó útvonalban, ezért egyszerűen az alternatív lehetőségként jelenlevő etanol fermentációs útvonalra „tolja” át a mennyiséget-még aerob körülmények között is.

A szabályozási jelenségek nem minden élesztőnél mutatkoznak, hanem csak az ún. glükóz érzékeny élesztőknél, amelyek közé a *S. cerevisiae* is tartozik. Ezekben a légzést kis koncentrációjú (<0,4%) glükóz már represszálja, függetlenül a molekuláris oxigén jelenlététől vagy hiányától. A nem erjesztő élesztők (pl. *Rhodotorula glutinus*, *Trichosporon cutaneum*) érzéketlenek a glükóz koncentrációra, kizárólag aerob légzést végeznek. Vannak átmeneti típusú élesztők (pl. *Candida tropicalis*, *Schizosaccharomyces pombe*), amelyek csak anaerob körülmények között erjesztenek (DEÁK, 1998).

A Pasteur – és Crabtree-effektusoknak komoly ipari jelentőségük van az élesztőgyártásban, szeszgyártásnál.

Glükóz represszió

A Crabtree-jelenség hátterében a glükóz- vagy katabolit represszió áll, melynek biokémiai mechanizmusában a ciklusos AMP (cAMP) játszik szerepet. A szénváz lebontásának szabályzásakor a legfontosabb szempont az időegység alatt felszabaduló energia mennyisége: a sejt a leggyorsabban hasznosuló szénforrást fogja felvenni és oxidálni, a lassabban hasznosulók lebontásához szükséges enzimek szintézise pedig gátolódik. A folyamat szigorúan transzkripciós szintű. Jellemzően, (de nem kizárólag) a glükózzal lehet kiváltani. A mechanizmus meglétét nagyszámú mikrobában sikerült kimutatni (GANCENDO, 1998; TRUMBLY, 1992). Élesztőben a glükóz repressziót a Mig1p nevű An-ujj fehérje közvetíti, mely a TUP1p és az SSN6p fehérjék kapcsolódva a represszálnak gének promoterének specifikus régiójához kötődik (2. ábra). Ezt a represszor komplexet az *snf1* gén által kódolt protein kínáz inaktíválhatja (CELENZA & CARLSON, 1986), represszálnak ezzel olyan géneket, mint a *SUC2* (invertáz) és *GAL* (galaktóz metabolizmus) (JOHNSTON, 1987). A Mig1p-hez hasonló aminosav-sorrendű Mig2p Zn-ujj fehérje szintén képes inaktíválni a *SUC2* gén kifejeződését, ám egyéb karbon represszió által szabályozott génre nem hat és az Snf1p kínáz sem szabályozza (LUTFIYYA & JOHNSTON, 1996).



2. ábra A glükóz represszió folyamata (JINSHENG, 1997 módosított ábrája)

A glükóz represszióban mutatott eltérő viselkedés számít a *S. cerevisiae*, valamint a *K. lactis* és *K. marxianus* közötti fő eltérésnek. A *S. cerevisiae* légzési mechanizmusára hatással van a glükóz mennyisége, míg a *K. lactis* esetében nem igazán mutatkozik glükóz represszió (WEIRICH et al., 1997), a fermentatív és az oxidatív metabolizmus egyszerre is történhet. A glükóz represszióval szemben mutatott érzékenység erősen törzsfüggő és több genetikai lókuszt hatása alatt áll.

A *K. lactis* laktóz metabolizmusáról érdemes tudni, hogy a tápközegben egyszerre jelenlevő glükóz és galaktóz gátolhatja a galaktóz felvételét. A *K. lactis* általában a glükózt hasznosítja először és csak ezt követően a galaktózt. A laktóz metabolizmusát egyébként két kapcsolt gén, a *LAC4* és a *LAC12* szabályozza, melyek a β -galaktozidázt és a laktóz-permeázt kódolják. Mikor a kódoló géneket *S. cerevisiae*-be vitték át, a sejtek képesek voltak laktózon is növekedni (SREEKRISHNA és DICKSON, 1985). A laktóz metabolizmus szabályozása a folyamatban részt vevő gének transzkripciójának szintjén zajlik. A folyamat egyik fontos génje a *Lac9* gén, mely a szabályozó folyamatban játszik szerepet. Minden olyan módosítás, amely növeli a *Lac9* gén aktivitását (ZENKE et al., 1993), segíti a glükóz gátló hatásának kiküszöbölését.

2.2.1.4. A laktóz hasznosítás folyamata mikrobáknál

A laktóz hasznosítás fő befolyásoló tényezői a pH és a hőmérséklet. A *Kluyveromyces marxianus* esetében a két tényezőben bekövetkező növekedés elősegíti, a laktóz hasznosulását; a laktóz, illetve az ammónia koncentrációja kevésbé számít. Különböző elemzéseket tanulmányozva megállapítható, hogy a laktóz felhasználás maximalizálása a következő feltételek teljesülése esetén lehetséges: 31°C-os hőmérséklet, 45 g/l savó koncentráció, 4 g/l összes ammóniasó koncentráció és 6-os pH-jú közeg. Ezen optimális működési feltételek teljesülése esetén 18 órás fermentációt követően a laktóz 95 %-a felhasználásra került (AKTAS, 2005).

A laktóz hasznosításához szükséges enzim vizsgálatok a *K. marxianus* IMB3 termotoleráns törzsben olyan β -galaktozidáz enzimet találtak, melynek optima pH 7,5-nél van, de jól működik pH 5 - 5,5-ön is. A legnagyobb aktivitást 50 °C-os működési hőmérsékleten mutatta, bár ekkor a felezési ideje kevesebb, mint 5 perc volt. 45 °C-os hőmérsékleten viszont - mely egyébként a törzs optimális fermentációs hőmérséklete - a felezési idő 15 perc körüli volt. A törzs a 20. és 25. óra között termelt maximális mennyiségű enzimet. Glükóz tartalmú közegben kis mennyiségű β -galaktozidáz aktivitást tudtak produkálni. Ez is azokat a korábbi vizsgálatokat támasztja alá, melyek szerint a *K. marxianus* esetében a laktóz felvételért és a β -galaktozidáz aktivitásért a laktóz a felelős (BRADY et al., 1995).

A laktóz egy megújuló szénforrás, hátránya hogy a gombák lassan, egyes gazdaságilag fontos fajok (a legtöbb élesztő, *A. niger*) (ELSHAFEI és ABDEL-FATAH, 2001) pedig egyáltalán nem tudják hasznosítani. Az *Escherichia coli* laktóz lebontásának szabályozása az operon-modell miatt tankönyvi ismeretnek számít, a baktériumok anyagcseréje (SHUSTER és DOUDOROFF, 1967; CHASSAY és THOMSON, 1983) azonban alapvetően különbözik az eukariótáétól.

Szaporodás és biomassza képzés laktózon

Számos tanulmány egybehangzó véleménye szerint a laktóz fogyasztás az első 10 órában a legnagyobb. A keletkezett biomassza, vagyis a szaporodás is ebben a fázisban van maximális értéken. A *K. marxianus* esetében végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy a növekedési ráta az exponenciális szakasz alatt érte el a csúcserőértéket, a fermentáció 12. óráját követően azonban jelentős csökkenés volt tapasztalható, amit nagy valószínűséggel a termékgátlás okozott. Az egyik legnagyobb hatása a szaporodásra a pH-nak van. Különböző törzsek esetében végzett szaporodási tanulmányok megállapították, hogy a törzsek jó reprodukciót mutatnak 4-es és 8-as pH között, de maximum 9-10-es pH-ig. Az oldott oxigén is döntő fontosságú tényező a szaporodás szempontjából. A növekvő oxigéntenzio a *K. marxianus* esetében növekvő szaporodási rátával társul, ami maximális biomassza képződéshez, ezzel párhuzamosan csökkenő etanol termeléshez vezet. Magasabb oldott oxigéntenzio esetén az oxigénfogyasztás is növekszik és a metabolizmus is egyre oxidatívabb jellegű lesz; következésképpen laktóztartalmú tápközegen nagyobb biomassza hozam érhető el. Alacsonyabb oldott oxigén esetén (0, ill. 1%) nagyobb etanol hozam érhető el, jelezvén, hogy ilyen feltételek mellett a *K. marxianus* glikolitikus (pl. fermentatív) metabolizmusra áll át (CORTÉS, 2005).

A *K. lactis* Crabtree-negatív élesztőgomba. Emiatt magas etanol hozamra képes anaerob és oxigénszegény aerob környezetben, míg teljesen aerob környezetben csak jelentéktelen mértékű fermentáció figyelhető meg, ez is többnyire a tápközeg és a növekedési ráta függvénye. A *K. lactis* esetében teljesen oxidatív feltételek teljesülése esetén nincs jelentős hatása a glükóz represszióknak (GONZÁLEZ-SISO, 1996).

2.2.2. Nitrogénforrás

A nitrogén elengedhetetlen elemnek bizonyul a strukturális fehérjék és funkcionális enzimek bioszintézisének, egyes forrásai, mint például az aminosavak, a sejtbe bejutva azonnal hasznosulnak (WALKER, 1998).

Hasznosítható nitrogénforrások:

- Szervetlen nitrogénforrások – két legalapvetőbb nitrogénforrást a nitrátok és az ammónium sók jelentik a gombák számára, hiszen ezek koncentrációja a környezetben igen jelentős is lehet.
- Szerves nitrogénforrások – a fehérjék, és így az aminosavak szolgálhatnak megfelelő szerves nitrogén-forrással. Gyakran használnak szójalisztet és kukoricafehérjét, mint N-forrást (NYESTE, 1993). Szerves nitrogénforrás alkalmazásakor gyorsabb a mikrobák fejlődése, ezért a legtöbb fermentációs folyamatban szerves nitrogénvegyületeket használnak. A gombák alapvetően képesek az aminosavak

felvételére és hasznosítására, bár különböző sebességgel és mértékben. Ezen kívül ide tartozik még a karbamid is, mely a sejten belül különböző degradációs folyamatok terméke (purin-, pirimidinbomlás stb.) lehet, vagy felvételi rendszerek biztosítják a külső karbamid-forrás bejutását.

2.3. A biomassa előállítás befolyásoló abiotikus tényezők

A fermentációs iparokban alkalmazott élesztőgombák termelőképessége alapvetően két tényezőtől függ: meghatározó szerepű a gombát jellemző genom, de ugyancsak döntő az a környezet, amelyben az élesztőket tenyésztjük.

Az adott élesztőgomba esetén tehát már a környezet az elsődleges meghatározó. A környezet fogalmába értjük a táptalajok minőségi és mennyiségi összetételét (beleértve az oldott oxigén szintet is aerob fermentációk esetén), és az ún. környezeti paramétereket: hőmérséklet, pH, redoxpotenciál viszonyok, stb. (SEVELLA, 2001).

A szaporodást befolyásoló egyik legfontosabb tényező a hőmérséklet. Az élesztők általában 0 és 45 °C között tudnak szaporodni, az egyes fajok szaporodási hőmérséklet tartománya azonban szűkebb és ritkán terjed ki 30 °C-nál többre.

Az optimális élesztő szaporodáshoz – különösen a *Kluyveromyces* nemzetség esetében – enyhén savas közeg szükséges (pH 4-5). Bernstein és mtsi. (1977) felismerték, hogy a pH 4.5 körüli értéken tartása kiküszöböli azon lehetséges kontamináció veszélyét, amelyet a pH 6.0 felett szaporodó baktériumok jelentenek.

Laboratóriumi körülmények között a fermentációs rendszerek oxigén ellátását úgy oldják meg, hogy a reaktortérben elhelyezett levegőelosztón keresztül komprimált levegőt fúvatnak át a fermentlén (SEVELLA, 2001), és a tápoldatot folyamatosan keverik. Más levegőztetési, keverési eljárások is léteznek, mint pl. rázott lombik, hurokreaktor, air-lift, jet-reaktor, stb. Az élesztők oxigénigénye megközelítőleg 5 mmol O₂/l/min oldott oxigén (LICHTFIELD, 1989).

Az aerob folyamatok során a levegőztetés mellett a keverés fordulatszámát is figyelembe kell venni, hiszen a fermentor típusától függően a fordulatszám túlzott növelése a tápoldat oldott oxigén szintjét csökkentheti, tehát a kívánt folyamatokkal ellentétes hatást érünk el. A keverés funkciója többcélú. Biztosítja az energia bevitelt a folyadékba, eldiszpergálja a levegőztető gázt, elválasztja a gáz és folyadék fázist, elkeveri a fermentlé oldott és nem oldott komponenseit. E funkciók miatt a folyadékot állandóan mozgásban kell tartani.

2.4. A mikrobák szaporodása fermentorokban

Az ipari fermentációk szakaszos, rátáplálásos, illetve folyamatos reaktorokban játszódhatnak le. A szakaszos reaktorba a fermentáció kezdetén minden komponenst behelyeznek, kivéve a légnemű anyagokat (pl. oxigén), a pH szabályozó anyagokat, illetve a habzásgátló szereket. A folyamat elindításához a reaktorban levő táptalajt beoltják. A folyamat során nincs betáplálás vagy elvétel. Egy ilyen zárt rendszerben különböző szaporodási fázisokat lehet megfigyelni, melyek hossza, egyáltalán jelenléte az adott mikroorganizmustól és a környezeti tényezőktől is függ.

A szaporodási fázis első szakasza az ún. lag-fázis, ahol a sejtkoncentráció még gyakorlatilag konstans. A lag-fázist számos tényező okozhatja. Amikor például a sejtek friss tápközegbe kerülnek, először adaptálódniuk kell, és majd csak ezután kezdik szaporodásra felhasználni a tápanyagokat. Másik magyarázat lehet a lag-fázisra, hogy a bejuttatott inokulum részben holt, vagy inaktív sejteket tartalmaz. Ha a tápoldat több szénforrást is tartalmaz és az egyik kimerülése után a következő csak indukció révén hasznosul, akkor két vagy több lag-fázis következik egymás után (pl. glükóz, laktóz). Ezt diauxiás szaporodásnak nevezzük (KEVEI és mtsi., 1999). A mikroorganizmusok általában egyszerre csak egy szénforrást hasznosítanak és új exponenciális fázis akkor alakul ki, mikor a mikroorganizmus elkezd az új C-forrást hasznosítani. Ekkorra az elsődleges anyagcsere-termékek - pl. az etanol - már létrejöttek. Mikor egy szubsztrát már korlátozni kezdi a szaporodási rátát, akkor alakul ki a lassuló szaporodási fázis. Ez a fázis egészen a nulla értékig csökken, amikor is elindul a stacioner fázis. A stacioner fázisban az összsejtszám gyakorlatilag változatlan marad, ennek ellenére fontos fázisnak számít, mert a másodlagos anyagcsere-termékek ekkor keletkeznek. Az utolsó fázis a pusztulási fázis. Ekkor a sejtek lizálni kezdenek, a szaporodási ráta folyamatosan csökken.

A rátáplálásos folyamatokban semmit nem távolítanak el a folyamat során, de egy szubsztrátot - ami általában szénforrás - fokozatosan juttatnak a reaktorba és így szabályozzák a rendszert.

Folyamatos reaktorban mind betáplálást, mind elvezetést egyaránt alkalmaznak, miközben a reakció térfogatát állandó értéken tartják. Ez a szakaszos reaktorokhoz képest eltérő szaporodási görbéket eredményez.

2.4.1. *O₂ tartalom meghatározás*

Szakaszos fermentáció során az oldott oxigén és a pH értékeit online elektródákkal mérik. Az oxigén elektródák működése a Clark-elven alapszik, melynek lényege, hogy az oldott oxigén redukálódik, ami áramlást idéz elő a cellában. Az áramlás arányos a tápközegben található oxigén

parciális nyomásával, ezáltal az oxigéntartalom meghatározható. Az elektróda tartalmaz egy platina katódot és egy ezüst referencia anódot. Légnemű anyagok számára átjárható membrán védi az elektródát a közeggel való közvetlen érintkezéstől, amin az O_2 viszont át tud jutni.

A szemipermeábilis membránon és az elektródát körülvevő vékony elektrolit rétegen átdiffundáló oxigénmolekulák a platina katódon a következő egyenlet szerint redukálódnak:



Ezzel egyidejűleg az ezüst anód oxidálódik, ami áramlást hoz létre. Ennek az erősségét egy polarográf rögzíti. Az áramlás arányos a tápközegben levő oxigén parciális nyomásával bár a meghatározásnál figyelembe kell venni, hogy a szenzor hőmérséklet-, nyomás- és tápközeg függő, éppen ezért a kalibrációt a fermentációs folyamat körülményeivel megegyező feltételek alatt kell végrehajtani.

2.4.2. pH meghatározás

A pH meghatározása KCl géllel töltött üvegelektrodával történt. Az elektróda nem igényel külön töltést. Használat előtt desztillált vízzel kell leöblíteni, majd az elektródot a mérendő mintába kell helyezni és az értéket leolvasni.

2.5. A biomassza termeléshez kiválasztott élesztőgomba fajok jellemzése

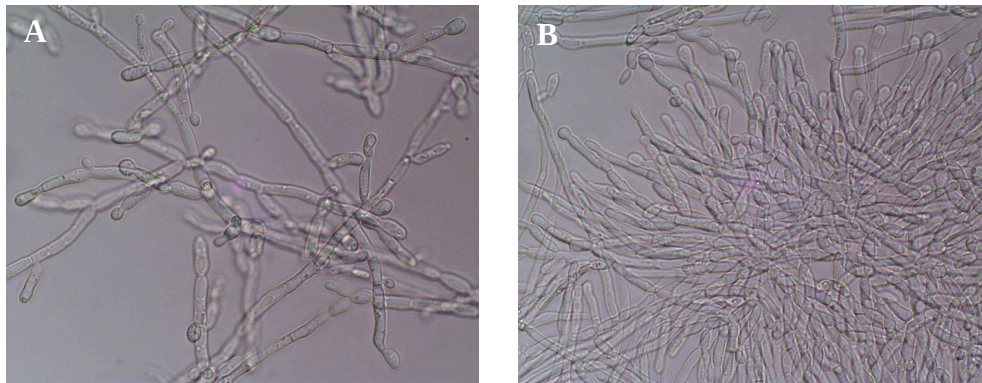
2.5.1. Keményítőhasznosító élesztőgombák

A keményítőhasznosító mikroorganizmusok közös jellemzője az amiláz enzim, mely a keményítő bontásáért felelős. Számos mikroba, főleg az élesztőgombák, termelői ennek az enzimnek. Több mint 150 élesztőgomba faj képes a keményítő degradációjára (MC CANN & BARNETT, 1986). Ebből a csoportból kerültek ki az általunk is alkalmazott élesztőgombák, a *S. fibuligera*, a *Deb. occidentalis* és a *Lipomyces kononenkoe*.

Saccharomycopsis fibuligera

A *Saccharomycopsis fibuligera* elsősorban keményítő hasznosítási képessége miatt jelentős a biotechnológiában. Olcsó szénhidrátforrásokon, mint pl. a burgonyakeményítő, jól fermentálható és a fermentáció során etanolt termel. Jó tulajdonságainak köszönhetően más területeken pl. SCP

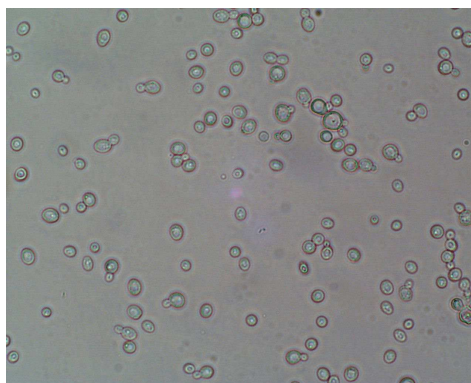
gyártásban is alkalmazzák (LEMMEL et al., 1980). A biomassza előállítás szempontjából előnyös tulajdonságai mellett fonalas jellege (5. ábra) alkalmassá teszi a hordozóhoz történő rögzítésre.



5. ábra *S. fibuligera* CCY 42-3-1 (A.) glükózon és (B.) keményítőn

Debaryomyces occidentalis var. *occidentalis*

A *Debaryomyces* (korábban *Schwanniomyces*) *occidentalis* (6. ábra) keményítóbontó élesztőgomba. Sarjadzó élesztő, melynek gyors szaporodása és könnyű fermentálhatósága előnyös ipari szempontból (BOZE et al., 1989).



6. ábra *Deb. occidentalis* Y758 bimbózó planktonikus sejtjei

Lipomyces kononenkoe

A *Lipomyces kononenkoe* keményítő bontó élesztőgomba jellegzetessége, hogy szükség esetén képes egy vagy több extracelluláris keményítóbontó enzim előállítására. A *L. kononenkoe* fajon belül két olyan törzset (CBS5608 és IGC4051) írtak le, melyek a keményítő teljes hidrolízisére képes

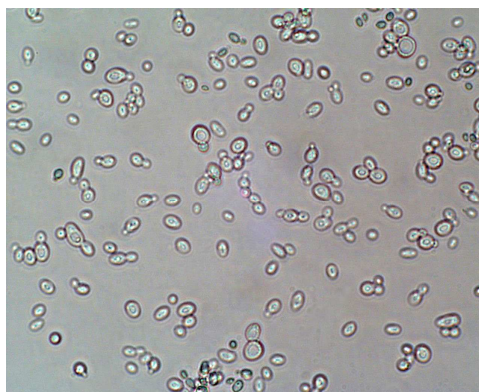
keményítóbontó enzimrendszert állítanak elő (SPENCER & VAN, 1979), erjesztésre azonban nem képes (KURTZMAN, 2000).

2.5.2. *Laktóz hasznosító élesztőgombák*

A laktóz hasznosító mikroorganizmusok közös jellemzője a β -galaktozidáz enzim, mely a laktóz bontásáért felelős. A penészgombák közül ide sorolható az *Aspergillus niger* és az *Aspergillus oryzae*, valamint számos élesztőgomba (GEKAS & LEIVA, 1985). Utóbbi csoportból érdemes megemlíteni a *Kluyveromyces lactis*, a *Kluyveromyces marxianus* és a *Dekkera anomala*-t.

Kluyveromyces lactis

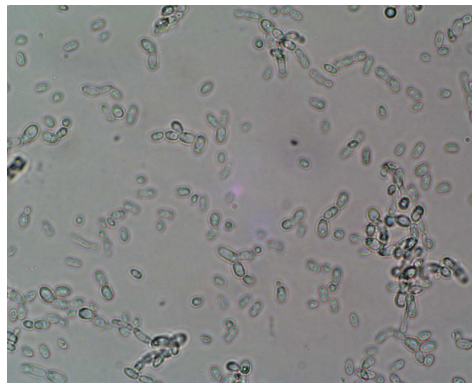
A *K. lactis* (7. ábra) genetikai tanulmányozásának kezdeti lépései van der Walt nevéhez fűződnek. Az 1960-as években már több tanulmányban is szerepelt, melyek elsődleges célja a β -galaktozidáz szabályozásának megismerése volt. Akkoriban az élesztőgomba neve *Saccharomyces lactis* volt (WALT, 1984). Korábban a *K. lactis* a *K. marxianus*-hoz közelállónak vélték, de a későbbi taxonómiai vizsgálatok megállapították, hogy két különböző fajról van szó (WOLF, 1996); manapság a különálló fajként jegyzik őket (KURTZMAN, 2000). A *Kluyveromyces lactis* a *Saccharomyces cerevisiae* versenytársa. Viszont a *K. lactis* szénforrások széles választékát képes asszimilálni és a *S. cerevisiae*-hez képest sokkal több szubsztrátumon tud növekedni. Szigorúan anaerob körülmények között a legtöbb *K.lactis* törzs képtelen növekedni, bár anaerob körülmények között glükózon és fruktózon megfigyelt növekedésről már olvasható az irodalomban (ENTIAN & BARNETT, 1983), és az is bizonyított, hogy a légzési rendszer génjei nem érzékenyek a glükóz represszióra. Ilyen körülmények között a *K. lactis* glükózt fermentálva etanolt állít elő (FUKUHARA és mtsi., 2000).



7. ábra *Kluyveromyces lactis* NU

Kluyveromyces marxianus

Erről a fajról (8. ábra) főleg az utóbbi időben jelentek meg olyan publikációk, melyekben inkább a laktózhassznosításán van a hangsúly, mint a fiziológiai jellemzésén (GUSTAVO et al., 2008). Ennek az lehet az oka, hogy ugyanazon faj törzsein belül is lehetnek nagy eltérések, ezért igen nehéz általános következtetéseket levonni. Viszont a rendelkezésre álló irodalmakból levonható, hogy a *K.marxianus* egyik törzse, az IMB3, 45°C-on is képes volt megfelelő mennyiségű etanolt termelni (BARRON et al., 1995). Olívia és mtsi. (2005) 42°C-on végzett SSF folyamatnál mutattak ki magas etanol hozamot.



8. ábra *Kluyveromyces marxianus* NB

Dekkera anomala

A *Dekkera* fajok jellemző, különleges tulajdonsága, hogy alkoholos erjesztésük aerob körülmények közt fokozódik és nagy mennyiségű ecetsavat képeznek (Custers effektus). Tenyészetek emiatt gyorsan elpusztulnak, fenntartásukhoz a savat CaCO_3 -tal kell lekötöni. A *D. anomala* a glükózt anaerob körülmények között erjeszti, és nagyon lassan szaporodik minden táptalajban. Képes a laktóz és a szukcinát asszimilációjára is (DEÁK, 1998).

2.6. A nehézfémek jellemzése környezeti toxikológiai szempontból

A nehézfémek a földkéreg természetes alkotóelemei. Mennyiségük a Föld teljes tömegéhez viszonyítva elenyészően kicsi (RANKAMA és SAHAMA, 1968; NYILASI, 1980). Előfordulnak a talajban, vizekben és a légkörben egyaránt. Az élőlények szervezetébe táplálékfogyasztás, vízfogyasztás, valamint légzés útján kerülnek be (PAPP és KÜMMEL, 1992).

A nehézfémek definiálására több kísérlet is történt, többek között sűrűségük, rendszámuk vagy relatív atomtömegük, néha kémiai tulajdonságuk illetve toxikusságuk alapján. A két leggyakoribb

elnevezés mindenesetre a sűrűség, illetve a toxikusságuk alapján történt. Sűrűség szerint nehézfémeknek szokás nevezni a $4,5 \text{ g/cm}^3$ -nél, más források szerint 5 g/cm^3 -nél nagyobb sűrűségű fémeket és ötvözeit (JOHN, 2002). A periódusos rendszerben a könnyű fémek után következnek, a legnagyobb csoportot alkotva. Ide soroljuk többek között a cinket, higanyt, kadmiumot, nikkelt, rezt, ólmot, volfrámot, ill. a színesfémeket és a ritka földfémeket is (NEUMÜLLER, 1983). Napjainkban a nehézfém kifejezés köznap szöhasználatban összekapcsolódott a toxikus elem fogalmával (SIMON et al., 1998). A toxikus elemek olyan fémek vagy félfémek, melyek biológiai hatása bizonyos koncentrációtartományban, illetve a fölött negatív.

Az élő szervezetek zavartalan működéséhez kis mennyiségben szükség van nehézfémekre. Sok elem esetében meghatározhatjuk azt a legkisebb koncentrációt, amely alatt már hiány lép fel, ill. azt a legmagasabb koncentrációt, amely fölött az elem már negatív hatással bír az élőlények életműködését illetően (KAIM és SCHWEDERSKI, 1994). Egyes nehézfémek enzimalkotók, ill. enzimreakciók katalizátorai (NYILASI, 1980). Hiányuk esetében a sejtfunkciókban zavarok lépnek fel (KÁDÁR, 1995).

A nehézfémek káros hatásai is közismertek. Az élőlények nem ismerik fel a nehézfémeket, így azok felhalmozódhatnak a táplálékláncban, eljuthatnak az emberi szervezetbe, veszélyeztetve annak egészségi állapotát. A nehézfémek komplexeket képezhetnek a szerves molekulákkal, ezért nagy aktivitással vesznek részt az elektron átviteli és anyagcsere folyamatokban (FÖRSNTER, 2002). A szervezet sem kémiai, sem biológiai úton nem képes a nehézfémeket semlegesíteni, elbontani. Biorezisztensek. Csak a kiválasztással, kiürüléssel távoznak lassan-lassan a szervezetből (BORGWARDT, 1994).

PAPP és KÜMMEL (1992) a nehézfémeket élettani hatásuk szerint a következő főbb csoportokba sorolták: mérgező anyagok (zavarják vagy megakadályozzák az anyagcsere-folyamatokat az enzimek blokkolása vagy a biológiai membránok megtámadása révén), teratogén anyagok (az embrionális fejlődést károsítják, az utódoknál születési rendellenességek lépnek fel), mutagén anyagok (az öröklődési információkat irreverzibilisen megváltoztatják), rákkeltő anyagok (a genetikai rendszer megváltoztatása következtében rákos megbetegedések lépnek fel). További kockázatot jelent az emberi szervezetre az, hogy a nehézfémek nem csak a környezetben, hanem a szervezetben is képesek akkumulálódni. Ugyanakkor a nehézfémek értékesek is, így visszanyerésük és újbóli felhasználásuk az emberiség érdekében áll, mind környezetvédelmi, mind gazdasági szempontból. Ezért a környezetben különböző módon kikerülő nehézfémek eltávolítása feltétlenül szükséges, egyrészt visszanyerésükhöz és újrahasznosításukhoz, másrészt a toxicitásuk miatt, ami jelentős károkat jelent a környezetre nézve.

2.7. A talajok szennyeződése nehézfémekkel

A nehézfémek és vegyületeik a környezeti toxikus hatások szempontjából világszerte a figyelem középpontjában állnak (VALKO és mtsi., 2005). Ennek oka, hogy a fejlett ipari és mezőgazdasági technológiák, a növekvő urbanizáció nem nélkülözhetik a különböző vegyi anyagok felhasználását. Sajnos ennek nem csak az előnyeit, hanem az egyre fokozottabban jelentkező negatív hatásait is tapasztalhatjuk (AKSU, 2005).

A talajok nehézfém tartalma két forrásból ered. Egyrészt természetes nehézfém tartalmukból, másrészt az emberi tevékenység eredményeként bekövetkező talajszennyezésből. A nehézfémek átlagos koncentrációja a talajban lényegesen kisebb, mint a földköpenyt alkotó nemfémes elemeké, átmeneti fémeké, vagy akár az alkáli fémeké, eloszlásuk pedig egyenetlen (NYILASI, 1980). A természetes állapotú, nem szennyezett talajokban a toxikus fémek döntő hányada általában a talajképző kőzetekből származik, azaz „geokémiai szennyezőanyagok” (CSATHÓ, 1994). A mezőgazdasági termelés során műtrágyák (elsősorban foszfátok), talajjavító anyagok (mész), peszticidek felhasználásával, szerves trágyák, híg trágyák, szennyvíziszapok kihelyezésével, szennyezett öntözővízzel kerülhetnek nehézfémek a termőtalajokba (ADRIANO, 1986). Az ipari eredetű szennyvíziszapok toxikus nehézfém-tartalma viszonylag magas és az iszapban kelátok és komplexek formájában vannak jelen, melyek mikrobiológiai detoxikációja lassú. Ilyen iszapokkal végzett trágyázás jelentősen növeli a növényi nehézfém-tartalmat és a növényi károsodás is nő, ami azzal magyarázható, hogy az iszapban jelenlévő komplexképzők segítségével nő a fémek oldhatósága (BARTH et al., 1968).

2.7.1. A talajok nehézfém terhelésének jogi szabályozása az Európai Unióban és hazánkban

A környezetre toxikus vegyületek, így a nehézfémek koncentrációjának talajban való káros mértékű megemelkedése szükségszerűvé tette, hogy megállapításra kerüljön a nehézfémek, és más talajszennyező vegyületek azon koncentrációja, amelyek mai tudásunk szerint nem idézik elő az élőszervezetek károsodását.

Az EU-ban 2000. XII. 22-én hatályba lépett az EU vízpolitikáról szóló ún. Víz Keretirányelv (<http://www.euvki.hu/>), majd mindehhez kapcsolódóan hazánkban a felszín alatti vizek és a földtani közeg minőségi védelméről 2004. aug. 06-ig a 33/2000. (III. 17.) Korm. rendelet, jelenleg pedig 219/2004. (VII. 21.) Korm. rendelet előírásai az irányadók, amelyek az alábbi határértékekre adnak megfogalmazást (http://net.jogtar.hu/jr/gen/hjegy_doc.cgi?docid=A0400219.KOR):

1. (A) háttér-koncentráció: reprezentatív érték; egyes anyagoknak a természetes vagy ahhoz közeli állapotban általában előforduló koncentrációja a felszín alatti vízben, illetve a talajban;
2. (Ab) bizonyított háttér-koncentráció: meghatározott anyagnak adott térségre jellemző, vizsgálatokkal megállapított tényleges koncentrációja a felszín alatti vízben, a földtani közegben;
3. (B) szennyezettségi határérték: jogszabályban előírt, olyan szennyezőanyag-koncentráció a felszín alatti vízben, a földtani közegben, amelynek bekövetkeztekor a földtani közeg, a felszín alatti víz szennyezettnek minősül. Kidolgozásakor figyelembe vették a talajok multifunkcionalis voltát, és a felszín alatti vizek szennyezéssel szembeni érzékenységét;
4. (D) kármentesítési célállapot határérték: hatósági határozatban előírt koncentráció, amit a kármentesítés eredményeként kell elérni;
5. (E) egyedi szennyezettségi határérték: hatósági határozatban megállapított szennyezettségi határérték azokon a területeken, ahol az (Ab) bizonyított háttér-koncentráció meghaladja a (B) szennyezettségi határértéket. Az (E) egyedi szennyezettségi határérték nem lehet szigorúbb a (B) szennyezettségi határértéknél és nem lehet enyhébb a vizsgálattal megállapított tényleges szennyezettségi koncentrációnál, illetve a (D) kármentesítési célállapot határértéknél.

Hazánkban a felszín alatti vizek minőségének védelméről szóló 219/2004. (VII. 21.) Korm. rendelet (http://www.kvvm.hu/cim/documents/219_2004_1031.pdf) végrehajtását segíti a felszín alatti víz és a földtani közeg minőségi védelméhez szükséges határértékekről szóló 10/2000. (VI. 2.) KöM-EüM-FVM-KHVM együttes miniszteri rendelet, amelynek környezetvédelmi határértékeiről a 1. táblázat ad tájékoztatást (http://www.geo-log.hu/uploads/docs/6_2009_kvvm.pdf).

1. táblázat Hatályos környezetvédelmi- és szennyvíz elhelyezési határértékek Magyarországon

Nehéz-fémek	Környezetvédelmi határértékek 219/2004. Korm. rend. 2007.aug.07-től)		Szennyvíziszap elhelyezési határértékek			
	10/2000.KöM-EüM-FVM-KHVM együttes r.		(2001. júl. 1-től)	Adszorpciós kapacitás mgé/100g talaj		
	A (háttér)	B (szennyezettségi)		5-15	15-25	25-35
As	10	15	15	7	10	15
Cd	0,5	1	1	1	2	3
Co	15	30	30	50	50	50
Cr	30	75	75	75	100	100
Cu	30	75	75	74	100	100
Hg	0,15	0,5	0,5	1	1	1
Ni	25	40	40	50	50	50
Pb	25	100	100	100	100	100
Zn	100	200	200	200	250	300

2.7.2. *A nehézfémek természetes előfordulása a talajokban, tulajdonságaik és hatásuk*

A nehézfémek természetes összetevőként is jelen vannak a talajokban. A talaj elemösszetétel vizsgálatok azt bizonyítják, hogy a periodusos rendszer valamennyi eleme megtalálható benne. A leggyakrabban előforduló és toxikusságuk miatt vizsgált nehézfémek a következők: Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Zn) ionos illetve más formákban fordulnak elő a talajban (SIMON, 1998).

Az ipari szennyvizek elsősorban a következő nehézfémeket tartalmazzák: Pb, Cr, Cd, Ni, Zn, As, Hg, Cu és Ag (SHAREEF, 2009). A szennyvizek nehézfémektől történő tisztítása alapvető feladat, mivel egyrészt a természetes vizekbe kerülve az ökoszisztémára jelent veszélyt, másrészt pedig a csatornarendszerbe kerülve negatív hatást gyakorol a biológiai szennyvíztisztításra (MOHAMED et al., 2008). Általában, a szennyvizekben kis koncentrációban előforduló nehézfémek nincsenek káros hatással a mikroorganizmusok életműködésére, sőt, azok szükséges mikrotápanyagok is egyben (MULLEN et al., 1989; LIEHR et al., 1994). A nehézfémek magas koncentrációban toxikusak az élő szervezetekre (BATTISTONI et al., 1993; CODINA et al., 1994). A mikroorganizmusok jóval érzékenyebbek a nehézfém szennyezésre, mint az ugyanabban a talajban előforduló növények és állatok (GILLER et al., 1998). Általánosságban elmondható, hogy a gombák jobban tűrik a nehézfém szennyeződést, mint a baktériumok, és az aktinomicéták (HIROKI et al., 1992).

A továbbiakban csak azokat a nehézfémeket (Cd, Cr, Cu, Ag, Pb, Ni, Zn) tárgyalom részletesebben, amelyekkel kutató munkám során is foglalkoztam.

Kadmium (Cd)

A kadmium a legveszélyesebb nehézfém szennyezők közé sorolható. A litoszférában átlagos mennyisége 0,2 mg/kg. A szennyezetlen talajok kadmium tartalma 0,06-11 mg/kg között változik, átlagosan 0,53 mg/kg. Ennél magasabb kadmium tartalom már emberi tevékenység következtében fellépő szennyeződésnek tulajdonítható pl. bányászati tevékenység és kohászati melléktermék is lehet (GYŐRI, 1997; SIMON, 1998).

Az iparban könnyen olvadó ötvözetek előállítására valamint vastárgyak korrózió védelmére használják. Élelmiszeripari alkalmazását nagymértékben korlátozza, hogy savakkal érintkezve oldható kadmium sók keletkeznek, amelyek erősen toxikusak. Felhasználják továbbá az akkumulátor-, gumi-, és festékgyártásban, valamint műanyagok stabilizálására (ADRIANO, 1986).

A kadmium, mint toxikus elem felhalmozódik a vesében és a csontképzési folyamat enzimeit gátolja. Csontritkulást és nyálkahártya – károsodást okoz. Az emberi szervezetből csak tíz év alatt ürül ki. A kutatások szerint a kadmium a fehérjékkel stabilis komplexet képezve gátolja azok hatását.

Japánban vált ismerté az általa okozott betegség (Itai-Itai kór), amikor a lakosság szennyezett bányavízzel öntözött rizst fogyasztott (KÁDÁR, 1991).

Króm (Cr)

A króm mennyisége a litoszférában átlagosan 200 mg/kg, míg felszíni talajokban 5-1000 mg/kg tartományban változik. A krómvegyületeket napjainkban főként ferrokróm termékek (vas-króm ötvözetek), korrózió- és saválló speciális ötvözetek és rozsdamentes krómacél gyártásához, réz megmunkáláshoz alkalmazzák (<http://www.kockazatos.hu/anyag/kr%C3%B3m>).

Ionja a természetben kétféle oxidációs állapotban fordul elő leggyakrabban: Cr^{3+} és Cr^{6+} formájában, melyek átalakulhatnak egymásba a talaj redoxi viszonyaitól függően. A Cr^{3+} jóval kevésbé toxikus és a növények számára nehezebben felvehető, mint a Cr^{6+} , mely erősen karcinogén és mutagén. Hatása főleg azért veszélyes, mert vízben jól oldódik, könnyedén átjut a sejtmembránon és erős oxidálószer. A bőrre kerülve kelést okoz, belélegezve tüdőrákot okozhat, és májkárosító hatása van (PAIS, 1998).

Réz (Cu)

A litoszféra réztartalma átlagosan 50 mg/kg. A talajvíz 0,01-2,8 mg/dm³ rézet tartalmazhat, míg a mezőgazdasági talajokban 1-50 mg/kg található ebből az elemből (GYŐRI, 1997).

A réz volt az első és több évezreden keresztül gyakorlatilag az egyetlen fém, amelyet nagy mennyiségben használt az ember. Rézzel szennyezhetik a környezetet a galvanizáló üzemek szennyvizei, a mezőgazdaságban használt réztartalmú permetezőszerek, a fa impregnálására vagy festésére használt réztartalmú készítmények, a réz vízvezetékek és a réz főzőedények is (PÁL, 1993).

Mivel vízben jól oldódik, így gyakran történnek mérgezések. Az EPA (Environmental Protection Agency) 1,3 mg/l-ben határozta meg az ivóvízben a megengedett rézkoncentrációt. Túl sok réz hasmenést és emésztési problémákat okozhat, máj – és vesekárosító hatása van.

Ezüst (Ag)

Az ezüst megengedett mennyisége országonként változó pl. Magyarország talajaiban 0,3 g/t; szennyezettségi határértéke 2 g/t. Szántóföldön hasznosítani kívánt szennyvízben Magyarországon megengedhető határértéke 100 µg/l (KöM, 2000).

A legfontosabb felhasználási területei a nemesfémek közé való besorolásából erednek. Ékszerek, étkészletek, egészségügyi műszerek, kémiai felszerelések készülnek belőle. Nagy mennyiségű ezüstöt használt a filmes fényképészet, de a digitális technológiák fölöslegessé teszik. A

történelem során az ezüstöt számos kultúrában használták konzerváló szernek és gyógyszernek. Az első világháború idején ezüstvegyületeket használtak fertőzések megelőzésére. Az ezüst-kolloid, az ezüst egyetlen formáját, melyet biztonságosan alkalmaztak sebek, égések kezelésére fertőzések megelőzése céljából. Széles körű használata az antibiotikumok felfedezésével kiment a divatból (JOHN, 2009).

A legtöbb élőlényből, így az emberi szervezetből is kimutatták, de biológiai szerepe nem ismert. Bár túladagolva káros hatású, elemi állapotában nem mérgező (FUNG and BOWEN, 1996).

Ólom (Pb)

Az ólom Pb^{2+} ionok formájában fordul elő a vízben, illetve a talajban. Átlagos mennyisége a földkéregben 12,5 mg/kg, a mezőgazdasági talajokban 29 mg/kg, bár széles intervallumban ingadozhat (2-2000 mg/kg) (KöM, 2000).

Előnyös tulajdonságai miatt lőszerek gyártásánál használják, illetve az autók akkumulátoraiban is széleskörűen előfordul. Radioaktív sugárzástól védő mellényeket, ruhákat szintén ólomból gyártanak, régebben ólomból készítettek vízvezetékcsövet, ónnal keverve óntárgyakat és forrasztóönt (lágyforraszt) (75%-a ón, 25%-a ólom) készítenek belőle. Az ólomszennyezés forrásai általában az ólomtartalmú üzemanyagok elégetése, a fémkohók és ólomfeldolgozó üzemek, a szénégetés, az ólomtartalmú hulladékok, az Pb-akkumulátorok és elemek, szennyvíziszapok valamint a Pb-tartalmú peszticidek lehetnek. Az utóbbi években az ólommentes hajtóanyagok elterjedése óta, a közúti forgalomból ered emisszió lényegesen csökkent (FILEP és mtsi., 1999).

Az élővizekben toxikus hatású. Szélsőségesen oxidáló körülmények között oldhatatlan Pb^{4+} oxiddá, vagy vegyes oxidokká alakulhat. A rézhez hasonlóan a talajban felhalmozódhat, mivel nincs olyan kémiai folyamat, amely véglegesen eltávolítja a talaj-talajvíz rendszerből.

Az ólom humán- és állategészségügyi szempontból erősen toxikus elem. A táplálékkal és a belélegzett levegővel jut az ember szervezetébe. Elsősorban a májban, a csontokban és a fogakban halmozódik fel.

Nikkel (Ni)

A nikkel viszonylag ritka elem, a földkéreg 0,085%-át teszi ki. A nem szennyezett talajok általában 5-50 mg/kg nikkelt tartalmaznak. Fémolvasztók és Ni-feldolgozó üzemek környezetében azonban a feltalaj szennyezettsége 1000-5000 mg/kg értéket is elérhet (FILEP és mtsi., 1999).

A nikkelt az acélipar, a galvánipar és az elektromos ipar hasznosítja. Ezekből a forrásokból főként az ipari szennyvizekbe; a kommunális szennyvíziszapokból és komposztokból pedig közvetlenül

a talajra/talajba kerül. A kőolaj és a nikkeltartalmú üzemanyagok elégetésénél mérgező Ni-karbonil jut a levegőbe. Az 1950-es évek óta megnövekedett nikkel-emisszió összefügg az olaj nagymértékű (és fokozódó) felhasználásával.

Néhány állatfaj számára esszenciális nyomelem. A táplálékokkal felvett nikkel káros hatását embereknél nem tapasztalták, a nikkelporok (Ni-oxid, -szulfid, -karbonát por) és a Ni-karbonillal szennyezett levegő tartós belélegzése viszont tüdőkárosodást okoz (FILEP és mtsi., 1999).

Cink (Zn)

A cink átlagos mennyisége a litoszférában 80 mg/kg. A világ szennyezetlen talajainak cinktartalma 10–300 mg/kg, átlagos mennyisége 50 mg/kg. A hazai szennyezetlen talajok túlnyomó többségének cinktartalma <25-100 mg/kg, a hazai háttérérték 100 mg/kg (ALLOWAY, 1990, KÁDÁR, 1998, SIMON, 1999). A cink a talajokban általában Zn^{2+} ion formájában fordul elő, de más ionos és szerves vegyületei is ismertek. Leginkább alumínium- és vas-oxidokhoz, illetve az agyagásványokhoz kötött, a növények elsősorban a víz oldható és könnyen kicserélhető formáit tudják felvenni (ALLOWAY, 1990; SZABÓ et al. 1987).

A talajok *cinkmérlege* az iparilag fejlett országokban általában pozitív. A fokozatosan növekvő cinktöbbletet a bányászat, kohászat, fosszilis tüzelőanyagok elégetése (légköri ülepedés), és a mezőgazdasági tevékenység okozza. Cink juthat a termőtalajokba foszfátműtrágyákból, komposztokból, szennyvíziszapokból és egyes peszticidekből (ALLOWAY, 1990; GYŐRI, 1984).

A cink vegyületeinek mérgező hatása változó. A cinkoxid gőzök légzőszervi panaszokat, a vízben oldódó és nagymennyiségben a szervezetbe kerülő cink sók hányást, hasmenést okozhatnak (PAIS, 1999).

2.8. A mikroorganizmusok nehézfém megkötő képessége

Az utóbbi időben egyre kiterjedtebb kutatások folynak az irányba, hogy az algákat, baktériumokat, a gombákat illetve a magasabb rendű növényeket alkalmazzanak a talajok, szennyvizek megtisztítására nehézfémektől.

A nehézfémek eltávolítása a környezetből jelenleg általában fizika-kémiai eljárásokon alapuló technikákkal történik, mint például precipitációval, koagulációval, redukcióval, adszorpcióval, ioncserés eljárással és különböző membrántechnikákkal. Ezen technikák egy része azonban a környezeti szennyezéseknél leggyakoribb 1-100 mg/l-es fémkoncentráció tartományban nem elég hatékony és/vagy túl drága (ECCLES, 1999). A legjobban bevált módszer az aktivált szénrel való

adszorpció, bár ez is meglehetősen költséges. Ezért napjainkban egyre nagyobb figyelmet szentelnek az olcsó, környezetkímélő alternatívák kutatása iránt. Így merült fel a mikrobiális biomassza bioszorbensként történő használata, mint gazdaságos és ökobarát lehetőség.

2.8.1. A bioszorpció mechanizmusa

A nehéz fémionokat mind az élő, mind a holt biomassza képes megkötni (SAG et al., 1999; 2000). A mikroorganizmusok nehézfém felvétele függ a környezettől, így hatással van rá többek között a pH, a hőmérséklet és egyéb ionok jelenléte (POOLE et al, 1989). A fémfelvételt természetesen nem csak a mikroorganizmus fajtája, hanem a szaporodási körülmények is befolyásolják. E körülmények meghatározzák a sejttösszetételt, és így a fémmegkötési képességet is (DOSTALEK et al., 2004). Az elsősorban szénhidrátokból, fehérjékből és lipidekből álló sejtfalban számos funkciós csoport található, amelyek a fémionok megkötéséért felelősek. Ilyen csoportok a karboxil-, hidroxil-, szulfát-, foszfát, és aminocsoportok. A mikroorganizmusok nehézfém felvétele történhet: szorpció és/vagy komplex képződés útján, passzív módon, vagy pedig az anyagcserétől függően, azaz bioakkumuláció révén, aktív módon. Annak alapján, hogy hol megy végbe a fémfelvétel, beszélhetünk sejtfalon kívüli (extracelluláris) akkumulációról, sejtfalon történő fémmegkötésről és intracelluláris akkumulációról (VEGLIO & BEOLCHINI, 1997). A mikrobák nehézfém felvételében fontos szerepe van az ioncserének is, amely a nehézfém és a sejtfalban található Ca^{2+} -, Mg^{2+} - és K^{2+} ionok között zajlik le. Ez az ioncsere megfigyelhető a penészeknél (KAPOOR & VIRARAGHAVAN, 1997), a baktériumoknál (LOPEZ et al., 2000) és az élesztőknél is (SINGLETON & SIMMONS, 1996).

2.8.1.1. A sejt metabolizmusa révén történő fémmegkötés

Passzív fémmegkötésre mind az élő, mind pedig az inaktivált biomassza képes, míg az aktív akkumuláció inkább az élő sejteknél fordul elő (BISHNOI & GARIMA, 2005). A passzív folyamat megnehezíti az élő sejtekkel történő fémrögzítést, mert az így bejutott fémek gyakran toxikusak a sejtre nézve, és egy bizonyos koncentráció fölött tönkreteszik a rendszert. Ugyanakkor előnyös lehet, ha a bejutott fémion olyan átalakuláson megy át, amelynek során a toxikusból kevésbé toxikus, vagy atoxikus formává alakul (SHUMATE & STRANDBERG, 1985). Ez az utóbbi folyamat miatt mindenképp érdemes megvizsgálni az élő sejtekkel történő fémmegkötést.

A passzív bioszorpció két, vagy három lépésből áll (SINGLETON és SIMMONS, 1996; ENGL és KUNZ, 1995). Az első lépés a sejtfalon található negatív töltésű funkciós csoportok általi fémmegkötés (pl. extracelluláris poliszacharidok vagy fehérjék révén), majd a fémionok

megközelítőleg 3-5 perces sejtfalon keresztüli áramlása. A második lépés a sejtmembránon keresztül a sejt belsejébe történő transzport. Ezen lépések során számos fizikai és kémiai folyamat játszódik le, például a fizikai és kémiai adszorpció, az ioncsere, a koordináció, a komplex-, és kelátképzés, valamint a mikroprecipitáció (GADD et al., 1988). A harmadik lépés a citoplazmában történő akkumuláció (PARK et al., 2003).

2.8.1.2. A fémek sejtek általi akkumulációja a bioszorpció során

a) Sejtfalon kívüli (extracelluláris) akkumuláció

Számos prokarióta (baktériumok, Archaea) és eukarióta (alga, gomba) mikroorganizmus képes az ún. extracelluláris poliszacharidok (EPS) kiválasztására. Ilyenek pl. az egyszerű poliszacharidok, glükoproteinek, lipopoliszacharidok, stb. Az EPS-ek jelentős mennyiségben rendelkeznek anion funkciós csoporttal, melyek megkötik a fémionokat. A legtöbb irodalom a baktériumok (pl. *Bacillus megaterium*, *Acinetobacter*, stb.) EPS-einek fémkötésével foglalkozik (LIU et al., 2001), ugyanakkor a gombákéval kapcsolatban kevés tanulmány született (FLEMMING & WINGENDER, 2001). SHU és mtsi. (1999) *Aureobasidium pullulans* dimorf gomba EPS-einek hatását vizsgálták a Pb^{2+} ionok eltávolításában. Eredményeik azt mutatták, hogy azoknál a sejteknél, ahol ezek az anyagok jelen voltak, az oldatban lévő Pb^{2+} ionokat 90%-át kötötték meg, melyek a sejtek felületén akkumulálódtak. Míg azok a sejtek, melyekből kivonták ezeket az EPS-eket, sokkal kisebb koncentrációban kötötték meg a Pb^{2+} ionokat, ezek sejten belül halmozódtak fel.

b) Sejtfelületen történő fémmegkötés

A sejtfal arra törekszik, hogy az elsőként kerüljön kapcsolatba a fémionokkal, kivéve pl. a baktériumoknál, ahol a sejtfalat extracelluláris rétegek is borítják. A sejtfal révén történő fémmegkötés lehet: a sejtfal funkcionális csoportjai (foszfátok, karboxilok, aminok) között kialakuló *stöchiometrikus kölcsönhatás*; és adszorpció vagy szervesen precipitáción keresztül történő *fizikokémiai szervesen lerakódás* (VOLESKY, 1990a,b; LIU et al., 2002). BRADY és DUCAN (1994) *S. cerevisiae*-vel végzett kísérleteik során megállapították, hogy a sejtfalában lévő amino-, karboxil-, ill. hidroxil csoportok nagy szerepet játszanak a Cu^{2+} ionok megkötésében, ugyanis ezen csoportok blokkolása csökkentette az élesztőgomba Cu^{2+} ionok felvételi kapacitását.

c) Intracelluláris akkumuláció

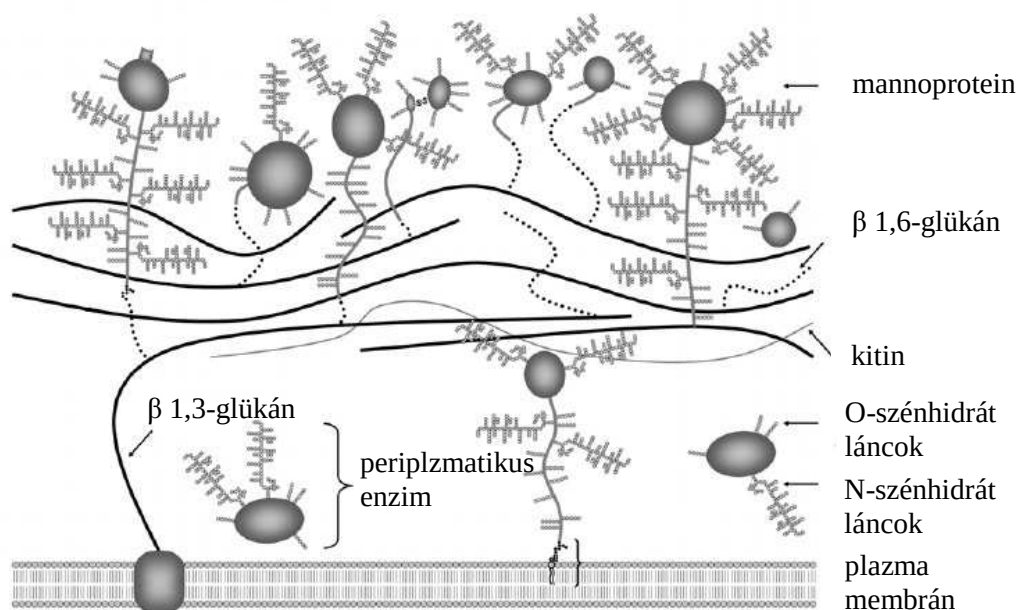
Amikor az extracelluláris fémionok koncentrációja magasabb az intracellulárisokénál, a fémionok elenyésző mennyisége szabad diffúzióval is bejuthat a sejt intracelluláris terébe a

sejtmembránon keresztül. Ezen kívül a fémionok bejuthatnak még a sejtfal természetes szétroncsolásával (pl. autolízis) vagy mesterséges kezelésével (pl. mechanikus kezelés). Ez a folyamat független az anyagcserétől, míg az intracelluláris akkumuláció/csapadékképzés, egy anyagcserefüggő folyamat, főként az élő biomasszára érvényes. A fémionok döntő többsége transzport segítségével került át a membránon. Az elmúlt évtizedben számos irodalom született a *S. cerevisiae*-ben lejátszódó fémion transzportról, mely szerint a pékélesztő két vagy több szubsztrát-specifikus transzport rendszerrel rendelkezik. Kevés fémion jelenléte korlátozta a *S. cerevisiae* magas affinitású rendszerét. Ezzel szemben egy vagy több alacsony affinitású rendszer játszotta a fő szerepet, amikor sok fémion állt rendelkezésre. A legújabb genetikai vizsgálatok azonosították az ionfelvételben közreműködő transzkripció és post-transzkripció szabályzó mechanizmusokat, illetve a fémionok szállításában szerepet játszó géneket is (EIDE, 1997; DIFFELS et al., 2006).

Sejten belül a fémionok különböző sejtrészekbe kerülnek pl. a mitokondriumba, vakuólumba (JIANLONG, 2006). PEREGOL és HOWELL (1997) *S. cerevisiae* és *S. pombe* élesztőgombák fémfelvételi mechanizmusának vizsgálatokor megállapították, hogy a folyamatban szerepet játszó gének és termékeik direkt és indirekt módon is befolyásolják a fémfelvételt és a szállítást is. VIJVER és mtsi. (2004) rámutattak arra, hogy a fémek megkötése sejten belül történhet: különböző zárványok képzése révén és hőstabil fehérjék segítségével. Az előbbiekre beleértendő a következő háromtípusú granulátumok: A típus, kalcium-foszfátok amorf lerakódásai/üledékei pl. Zn szemcséi; B típus, elsősorban foszfátsavat, valamint akkumulált Cd-t, u-t, g-t és Ág-t tartalmaz; C típus, a felesleges vas tárolása hemosziderinként. A hőstabil fehérjék lehetnek metallothioneinek (MT), glutationok (GSH), fitokelatinok és labilis szulfidok (PEREGOL and HOWELL, 1997; GHARIEB and GADD, 2004).

2.9. Gomba sejtfal felépítése

A gombasejt talán legsajátosabban szerveződött eleme a sejtfal. Evolúciós helyzetétől függetlenül minden gombacsoportra (még a nyálkagombákra is) jellemző sejtalkotó (KEVEI, 1999). A 9. ábra a *Saccharomyces cerevisiae* sejtfalának vázlatos összetételét mutatja be.



9. ábra A *S. cerevisiae* sejtfalának felépítése (SCHREUDER et al., 1996)

Az élesztőgombák sejtfalában a fő komponensek a glükánok, mannánok, kitin és fehérjék. Ezeken a csoportokon belül az egyes komponensek szerkezete fajonként változik.

A sejtfal eredetű mannánoligoszaharidot a sejtfal más poliszaharidjaihoz (β -glükánok) kapcsolódva a sejtfal külső rétegében található mannán proteinek összessége adja (sejtfal kb. 40%-a) (OSUMI et al., 1998). A gombasejtfal mannánjainak alaplánca α -(1-6) kötésekkel kapcsolódó mannóz egységekből áll, amelyhez rövid oldalláncok kapcsolódnak többnyire α -(1-2), ritkábban α -(1-3) kötésekkel. A sejtfelszíni fehérjék szénhidrát oldalláncai számos foszfodiészter hidat tartalmaznak, amely a sejtfelszín negatív töltését biztosítja. A fehérjék oldalláncainak fontos szerepe van a sejtfal hidrofíli-hidrofób tulajdonságának meghatározásában is (KLIS et al., 2002). A fehérjék az élesztősejtfalban mannán komplex formájában találhatók. Többségük enzim és nem szerkezetalkotó elem, nem strukturális fehérje. A mannoproteinek a kémiai kötődésük és annak módja szerint három csoportba sorolhatók (DE GROOT et al., 2005). Az első csoportba tartoznak azok a fehérjék, melyek a sejtfal poliszacharidjaihoz kovalensen kötődnek és glükonázzal kivonhatók. A második csoportba tartoznak azok a kovalensen kötődő sejtfal fehérjék, melyek 30 mM NaOH oldat segítségével vonhatók ki. Ezt a két csoport még GPI – és ALS (alkali-sensitive) kötődő fehérjéknek is szokták nevezni. A harmadik csoportba soroljuk azokat a fehérjéket, amelyek a sejtfal szerkezeti elemeihez diszulfidhidakkal vagy egyéb nem kovalens kötésekkel kapcsolódnak (MRSA et al., 1997). A tisztított sejtfalból forró SDS-el és merkaptotetanollal (MRSA et al., 1997) vagy dithiothreitol (DTT)

(CAPPELLARO al., 1998) segítségével kivonhatók. A sejtfal fehérjék emellett még fontos szerepet játszanak a flokkulációban, a biofilm képzésben, a sejtek hidrofóbicitásában, amely fontos szerepet tölt be az adhézióban és a sörgyártásban is (REYNOLD, T. B. 2001; SHIMOI, H., 2002; STRAVER, M. H., 1996). A sejtfalfelszíni fehérjék szénhidrát oldalláncai számos foszfodiészter hidat tartalmaznak.

A másik jellemző szénhidrát az élesztősejtfal mannán-protein rétege alatt helyezkedik el, melyben a β -(1-3)-glükán (sejtfal kb. 50%-a) spirális rugószerű térhálóját kb. 1500 glükóz molekulából álló polimer szálak β -(1-6) lánc közötti kötésekkel alkotják (KLIS és mtsi., 2002; KLIS 2006). Ez adja a sejt merevségét és alakját. A szálakat egy glikoprotein réteg fedi, fölötté pedig egy lazább, 1,6-foszfodiészter kötésekkel rögzített mannán háló helyezkedik el. Ebben a mannán hálóban helyezkednek el a mannán-enzim komplexek, amelyek kovalens kötésekkel vagy gyengébb kölcsönhatásokkal rögzülnek (WALKER, 1998).

Különböző rendszertani egységekbe sorolt szervezetek sejtfalának kémiai összetétele jelentős eltérést mutat. A *Zygomycota* fajok sejtfala kitin-kitozán tartalmú. A *Chytridiomycota* sejtfalában kitin-glukán (cellulóz) található. Az *Ascomycota* sejtfalában kitin-glukán, a rokon imperfekt fajoknál a fal hasonló, a tömlős *Saccharomyces* és az imperfekt *Candida* élesztőgombák glukán-mannán sejtfal összetétellel jellemezhetők. A *Basidiomycota* fonalas csoportjánál a kitin-glukán az uralkodó falpolimer, az egysejtű bazidiumos élesztőgombák és imperfektjeik (*Rhodotorula*) sejtfala a kitin-mannán polimer (ALEXOPUOLOS et al., 1996; KEVEI és KUCSERA, 1998).

A sejtek kora, fiziológiai állapota és a tenyésztés körülményei is befolyásolják a sejtfalszerkezetet, melyet a sejtfaloldó enzimekkel szembeni érzékenység is jelez (NECAS, 1971).

2.9.1. Élesztőgomba protoplasztok előállítása

Már az 1900-as évek elején megjelent az első közlés arról, hogy egy mikroba eredetű extracelluláris enzim a gombasejtfal kitin komponensének lebontására képes (BENECKE, 1905), majd nem sokkal később GAJA (1914, 1919) leírta, hogy az éti csiga (*Helix pomatia*) gyomornedve megemésztí az élesztősejtfalat. Fél évszázaddal később, EDDY és WILLIAMSON (1957) az ún. csigaenzim segítségével élesztőgombából protoplasztokat állítottak elő, melyeket ozmotikusan stabilizált közegben életben is tartottak. Azt is megfigyelték, hogy a logaritmikus szaporodási fázisban lévő sejtek sokkal érzékenyebbek a sejtfaloldó hatással szemben, mint a stacioner állapotú sejtek. BURGER és mtsi. (1961) szulfidhíd reagens alkalmazásával meggyorsították és teljesé tették a protoplasztképzést, ami feltehetően a sejtfal proteinek közti diszulfid kötések redukálása révén a külső sejtfalréteg fellazítását eredményezte. Így az alsó fibrilláris réteg jobban hozzáférhetővé vált a

sejtfaloldó enzimek, elsősorban a glükánázok számára (FALCONE & NICKERSON, 1956). A helikáznak nevezett készítmény több mint 30 féle enzimet tartalmaz, köztük glükánázokat, mannázokat, kitinázt és kevés proteázt (HOLDEN & TRACEY, 1950).

A sejtfaloldó enzimek hatására a sejtfal hosszabb-rövidebb idő alatt részlegesen vagy teljesen leoldódik, ettől a sejt deformálhatóvá válik, viszkózus folyadékcseppként viselkedik. Lekerekített, gömbölyű alakját a felületi feszültség alakítja ki. A szakirodalomban a sejtfaluktól csak részlegesen megfosztott, de már ozmotikusan érzékeny sejteket BRENNER és mtsi. (1958) szferoplasztoknak nevezték míg protoplasztnak a teljesen „csupasz”, csak sejtmembránnal határolt sejteket hívják. E két fogalmat gyakran szinonimaként kezelik.

A protoplasztok a környezet ozmotikus viszonyaival szemben érzékenyek, csak a citoplazmával megegyező (izoozmózis) vagy ahhoz közel eső ozmolaritású oldatban tarthatók életben, ún. ozmotikus stabilizátorok (mint pl. a szorbitol, mannitol, szacharóz, KCl, stb.vizes oldatai) alkalmazása szükséges. Kisebb ozmolaritás (hipoozmózis) esetében a protoplasztok megduzzadnak, hiperozmózis oldatban összezsugorodnak, majd mindkét esetben lizálnak (EDDY és WILLIAMSON, 1957; ARNOLD és GARRISON, 1979; BACHMANN és BONNER, 1959).

2.9.2. Az élesztősejt hidrofób tulajdonsága és mérésének lehetőségei

A mikrobasejtek sejtfelszíni tulajdonságai (pl. a sejtfelszíni hidrofobicitás) számos jelenségben (aggregáció, flotáció és adhézió) részt vesznek, melyek fontos szerepet játszanak a természetvédelemben (pl. bioremediáció, vízkezelés), a biotechnológiában (pl. immobilizált sejteket alkalmazó reaktorok, söripar), az orvostudományban (pl. implantátumok biokompatibilitása, foglepedék) és a folyamattervezésben (DENGIS & RHOUXET, 1997).

Az irodalomban többféle módszer is található a sejtek hidrofóbicitásának meghatározására. Ugyanakkor egyik módszer sem kizárólagosan a sejtfelszíni hidrofóbicitást írja le, hiszen az alkalmazott kísérleti paraméterek is nagymértékben befolyásolják a megfigyelt hidrofób kölcsönhatást, valamint egyéb nem hidrofób hatások is zavarhatnak (ROSENBERG et al., 1980). Általánosságban elmondható, hogy a hidrofil sejtek hidrofil, míg a hidrofób sejtek hidrofób szubsztrátumokhoz kötődnek jobban. Amennyiben a szubsztrátum és a sejtfelszín töltése azonos, a taszító elektrosztatikus kölcsönhatások hátrányosan befolyásolják a kötődést.

A sejtfelszíni hidrofóbicitás meghatározására leggyakrabban a szénhidrogénekhez való adhézió mérését alkalmazzák, melyet ROSEBERG és mtsi. írtak le először 1985-ben és MATH módszernek nevezték el. Az adhézió során bonyolult van der Waals erők és elektrosztatikus kölcsönhatások hatnak.

A sejtfelszín struktúrája alapvetően meghatározza a hidrofób vagy hidrofil jelleget. A MATH módszer azonban nemcsak a sejtfelszín hidrofób jellegét jellemzi, hanem részben a sejtfelszínen lévő molekulák töltési tulajdonságait is. A sejtek különböző pH értékű pufferben való szuszpendálásával meg lehet változtatni a sejtfelszíni csoportok protonálódásának mértékét, mellyel befolyásolható a sejtfelszínen lévő elektrosztatikus kölcsönhatások nagysága is (VAN DER MEIT et al., 1993).

A MATH módszer továbbfejlesztését jelentette a MATS módszer kidolgozása. Ez a vizsgálat a sejtek egyrészt apoláris és poláris, másrészt elektron donor, illetve elektron akceptor oldószerekhez való affinitásán alapul. A mérés során meghatározzuk, hogy az adott oldószerek a sejtek hány százalékát távolítja el a vizes fázisból. Abból kifolyólag, hogy a sejtek természetes közege általában vizes, a sejtek nem tekinthetők hidrofóbnak, inkább amfipatikusak. A mérés során nem kaphatunk olyan eredményt sem, amely azt feltételezi, hogy a sejtfal kizárólag elektron felvételre vagy leadásra képes, de meghatározhatjuk, hogy az adott sejt esetében melyik jelleg a domináns (GOLDBERG et al., 1990).

2.10. A megkötött nehézfémek deszorpciójának lehetőségei

A megkötött nehézfémek felszabadítása (deszorpciója) fontos szempont lehet az értékes nehézfémek (pl. Ag, U) visszanyerése céljából. A mikroorganizmusok bioszorbensként való felhasználhatósága nemcsak attól függ, hogy milyen jól kötik a fémionokat, hanem attól is, hogy a biomassa mennyire jól regenerálható. Ahhoz, hogy a biomassa több bioszorpció - deszorpció ciklusban újra felhasználható legyen, a biomassa regenerálására roncsolás-mentes visszanyerés szükséges. A regeneráció nagymértékben megnöveli a folyamat gazdaságosságát. Roncsolásos visszanyerés a biomassa pirometallurgiai kezelésével vagy erős savban vagy lúgban történő feloldásával történhet (BRIERLEY et al., 1985). Ezek a kezelések azonban lehetetlenné teszik az újra felhasználást.

A megkötött nehézfémek visszanyerésére számos lehetőség ismert a szakirodalomból. Az elválasztási módszerek lehetnek: a) nem toxikusak, b) biomasszát nem károsítók és c) olyanok, melyek minimális koncentrációban alkalmazva maximális fémvisszanyerést tesznek lehetővé (WILHELM, 1996).

Híg (<0,1 M) ásványi savak, pl. HCl, H₂SO₄, HNO₃ és a szerves savak (pl. CH₃COOH) nagy hatékonysággal távolítják el a rézet és kadmiumot baktériumokból, élesztő- és fonalasgombákból valamint az uránt *Zoogloe ramigera*, *Rhizopus arrhizus* és *Saccharomyces cerevisiae*-ből (STRANDBERG et al., 1981; TSEZOS, 1984; NORBERG és PERSSON, 1984; DE ROME és GADD,

1987). Magasabb savkoncentrációnál a biotömegtartalom károsodhat és csökkenhet a fémfelvételi képesség (WILHELM & DUNCAN, 1996).

Szerves komplex-képző anyagok hatásos deszorbensek lehetnek és nincs kedvezőtlen hatásuk a biotömegtartalom épségére. 0,1M EDTA jó hatékonysággal távolítja el a nehézfémeket és az uránt baktériumokból és algákból, élesztő- és fonalas gombákból (HORIYOSHI et al., 1979, DUNN és BULL, 1983). Az EDTA-s kezelés annak megkülönböztetésére is használható, hogy felületi komplexképzés, vagy a fém intracelluláris felvétele történt-e (LAWSON et al., 1984). *Penicillium digitatum*-ban az EDTA-s kezelés növelte a biotömegtartalom kapacitását a következő adszorpcióban (GALUN et al., 1983).

Más szerves anyagokat, pl. 8-hidroxikinolin használtak Cu eltávolítására és nitrilotricetsavat, valamint dietiléntriaminpentaecetsavat Cd eltávolítására gombákból (KUREK et al., 1982, MOWEL és GADD, 1984).

Gazdasági szempontból a karbonátok alkalmasak leginkább a nem roncsolásos fémvisszanyerésre. A Na- és ammónium-bikarbonátok nagyon hatékonyak voltak urán eltávolítására és a biotömegtartalom adszorpciós kapacitása növekedett a kezelés után. A kialakult pH viszonyok mellett csak kis károsodás éri a biotömegtartalmat (GALUN et al., 1983; TSEZOS, 1984).

Más ionok jelenléte nyilvánvalóan befolyásolja a deszorpciót, pl. szulfát ionok jelenléte akadályozta az urán eltávolítását *Rhizopus arrhizus*-ból a sejtfal kitin struktúráját megváltoztatva és megkötve az uránt (TSEZOS, 1984). OMAR és mtsi. (1997) La, Ag, Co, Zn, Cd, U, Cr, Pb, Ba deszorpcióját vizsgálták 0,1 M Na₂CO₃ eluensként való alkalmazása során *Myxococcus xanthus* és *S. cerevisiae* biotömegtartalom felhasználásával. A legjobb visszanyerést U esetén tapasztalták, mely a két tesztmikrobánál nagyjából azonos mértékű, 94,5% -os volt. A többi fém 18-22%-ban deszorbeálódott mindkét teszt-biotömegtartalom esetén. A jó urán deszorpció oka az, hogy az uránium karbonát jelenlétében [UO₂(OH)₃]¹⁻ és [UO₂(CO₃)₃]⁴⁻-et képez.

2.11. A sejtek rögzítése hordozókhoz

Saját természetes környezetükben a mikroorganizmusok komoly változásokat képesek túlélni, amennyiben képesek alkalmazkodni az adott környezethez. A túlélés egyik formája, hogy a sejtek felületekhez kötődnek (AKIN, 1987) vagy egymással kapcsolódnak (pl. biofilm, granulátumok) (SANCHEZ, 1994). Erre a tulajdonságukra alapozva az 1980-as évek elején intenzív kutatómunka folyt enzimek, sejtek immobilizálását megoldó eljárások kidolgozására. A sejtek és enzimek rögzítésének technológiája folyamatosan fejlődött majd az 1990-es években tetőzött. A biotechnológia bővülésének

és a géntechnológia fejlődésének következtében a sejtek és enzimek immobilizálása iránti lelkesedés újraéledt (BICKERSTAFF, 1997).

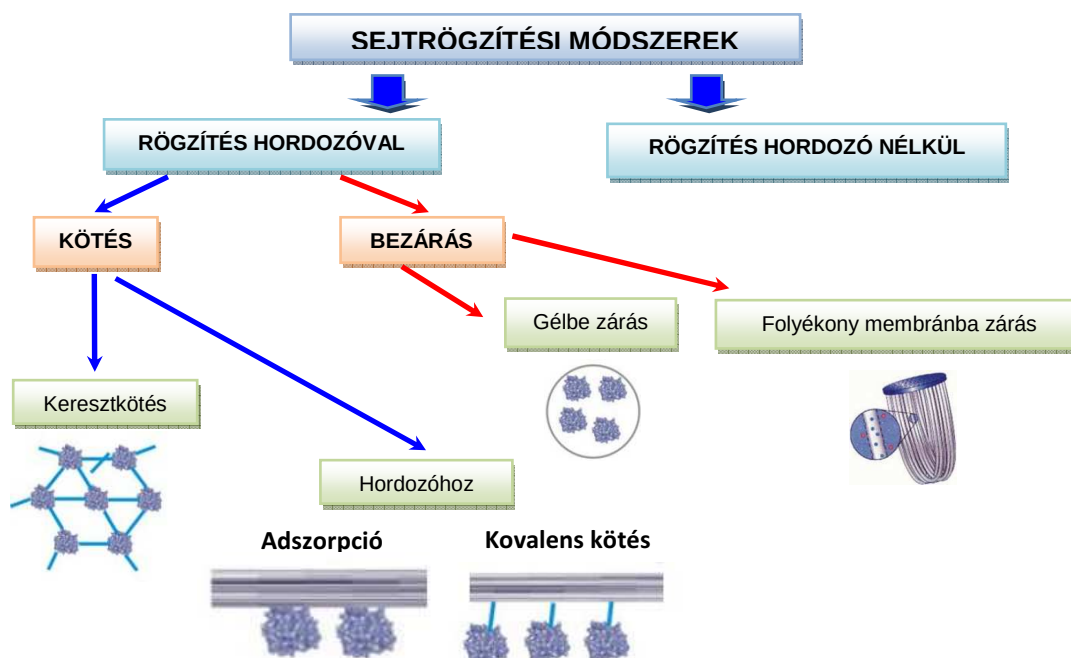
A rögzítő eljárások elterjedtek a fermentáló folyamatokban, a bioreaktorokban egyaránt kiszorítva a hagyományos szabadsejtes műveleteket. Az immobilizációs technikák előnye, hogy nagy sejtsűrűséget lehet elérni a lebontó vagy átalakító folyamatokban, és a művelet végén olcsón és hatékonyan el lehet távolítani a sejteket.

2.11.1. Sejtrögzítési módszerek

Számos sejtrögzítési módszer az enzimek rögzítési technikáinak módosításával, fejlesztésével jött létre. Azonban a sejtek nagyobb mérete és az eltérő környezeti paraméterei befolyásolták ezeket a módszereket és számos újat eredményeztek (RAMAKRISHNA & PRAKASHAM, 1999). A sejtek rögzítése négy alapelv szerint történhet:

- Adsorpció előformázott hordozóhoz
- Kovalens kötés előformázott hordozóhoz
- A sejtek egymással való keresztkötése bi- vagy multifunkcionális reagensekkel
- Bezárás részecskébe, rostokba vagy mikrokapszulába

A rögzítési módszereket a 10. ábra mutatja be.



10. ábra Sejtrögzítési módszerek

Rögzítés adszorpcióval

A sejtek természetétől és a környezettől függően használhatunk szilárd hordozókat (pl.: granulátumokat: zeolit, üveggyöngy, égetett agyag, stb.) a sejtek adhéziójára, vagy adszorpciójára. Ennek a módszernek a legfőbb vonzereje az egyszerűsége és a gyors kivitelezhetősége. A kötést befolyásolja a sejtet körülvevő oldat pH-ja, a sejt fiziológiai állapota, a sejt típusa és annak környezete is. A sejtek és az oldat között válaszfal nincs, állandó a sejtek leválása (és újrarögzülése), ezért figyelembe kell azt venni, hogy ez a módszer nem megfelelő olyan alkalmazásban, ahol a rendszerből kiáramló oldatnak sejtmentesnek kell lennie (KLEIN & ZIEHR, 1990; WILLAERT et al. 1996; BICKERSTAFF, 1997). Az adszorpció rögzítéshez használt hordozók lehetnek szerves és szervetlen adszorpció hordozók. Tipikus szerves hordozók az ion-cserélő gyanták (szintetikus polimerek), a cellulóz származékok és a lektinek. Gyakran alkalmazott szervetlen hordozó a porózus üveg és a kerámia (pl. hidroxipatit tartalmú kerámia – biokerámia) (BRODELIUS & VANDAMME, 1991).

Rögzítés kovalens kötéssel

A sejt hordozóhoz történő rögzítése kovalens kötéssel a következő módon lehetséges: (1) a mátrixon található reakció csoporton keresztül vagy (2) egy vegyület segítségével, ami a sejtet a hordozóhoz köti pl. a glutáraldehiddel kombinált zselatin. Az irreverzibilis kovalens kötéssel rögzített sejteket tartalmazó rendszernek előnye, hogy a diffúzió nincs benne korlátozva, és kevésbé van kitéve az új sejtek kiáramlásának (mint adszorpció esetén), ugyanakkor hátránya, hogy az összekötést biztosító vegyületek rendkívül mérgezőek és károsítják a sejteket (BRODELIUS & VANDAMME, 1991).

Rögzítés keresztkötéssel

A mikroorganizmusok sejtfaa szabad amino- és/vagy karboxil-csoportokkal rendelkezik. A keresztkötés könnyen kialakítható ezek között olyan bi- vagy multifunkcionális reagensekkel, mint a glutáraldehid vagy a toulén diizocianát. A mikrobacejtek rögzíthetők ionos kötéssel is úgy, hogy polielektrolitok hozzáadásával flokkulációt váltanak ki (RAMAKRISHNA & PRAKASHAM, 1999). Önmagában ritkán alkalmazzák ezt a rögzítési módszert, viszont gélbezárással kombinálva stabilabbá teszi a gél szerkezetét (BRODELIUS & VANDAMME, 1991).

Rögzítés gélbezárással

Egyszerűsége és kiváló sejtviisszatartó képessége miatt az egyik legalkalmasabb rögzítés típus olyan gél kialakítása, melybe a sejteket különböző polimerek *in situ* térhálósítása segítségével zárjuk

be. Az ilyen térhálós polimerek egyaránt lehetnek egy- és többkomponensűek. Természetes gélek (mint pl.: az agar, agaróz, alginát, karrageenan, kollagén, glükán, zselatin), kémiaiilag módosított természetes polimerek (pl.: cellulóz acetát) és szintetikus gélek és polimerek (poliakrilamid, poliazetidin, polihidroxi-etilmetakrilát, stb.) mind alkalmazhatók sejtek immobilizálására, bezárására (AKIN, 1987; PHILIPS & POON, 1988).

Rögzítés folyékony membránba zárással

Ebben az esetben egy kétfázisú bezárás történik, ahol a gát, - ami immobilizálja a sejteket – egy folyadék/folyadék fázis határfelülete két nem elegyedő folyadék között (WILLAERT et al., 1996).

Komplex rögzítési eljárások

A sejtek rögzítése történhet több (kettő esetleg három) módszer kombinációjával is, amellyel kihasználható mindkét eljárás előnye. Az előbbieket során említett keresztkötéses rögzítést csak másik immobilizálási módszerrel kombinálva alkalmazzák.

Leggyakoribb komplex eljárások:

- flokkulálás + adszorpció
- adszorpció + keresztkötés
- ionos kötés + adszorpció + fémkelát

2.11.2. A hordozóval szembeni elvárások

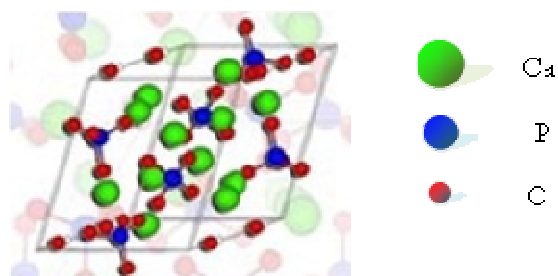
A rögzített sejtes rendszerben való használathoz a hordozónak az alábbi feltételeknek kell megfelelnie:

- a hordozó legyen könnyen kezelhető és regenerálható (NORTON és D'AMORE, 1994)
- a hordozó tartsa meg a jó mechanikai, kémiai, biológiai és hő stabilitását; enzimek, oldószerek, nyomásváltozások vagy a nyíróerő ne károsítsa könnyen (KOURKUTAS et al., 2004)
- a hordozó és a rögzítési technika legyen egyszerű, költséghatékony és lépték növelhető (KOURKUTAS et al., 2004)
- a hordozó anyaga nem lehet toxikus (KOURKUTAS et al., 2004; NORTON és D'AMORE, 1994)

2.11.3. A hidroxipatit (HAP), mint hordozó

A hidroxipatit az apatitok csoportjába tartozó, a következő kémiai képlettel rendelkező szervetlen anyag: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, melynek elnevezése kalcium-hidroxi-foszfát. Szerkezete hexagonális dipiramisos ionkristály (11. ábra).

Fizikai tulajdonságai közé tartozik, hogy szilárd, merev, de törékeny, keménysége: 5 (Mohs féle keménységi skála), színe: lehet fehér, hamuszürke, sárgás ill. sárgászöld.



11. ábra A hidroxipatit kristályszerkezete

A hidroxipatit előfordulása

A HAP a fogak és csontok fő ásványi összetevője. A gerincesek legfontosabb vázanyaga, de a tojáshéj és tengeri élőlények (korallak, kagylók) is tartalmaznak HAP-ot. A csontszövet szerves alkotórésze a kollagén, ami sok foszfátcsoportot tartalmaz. Ebbe a mátrixba épül be a hidroxipatit (ZENG et al., 2007).

A hidroxipatit előállítás

A HAP előállítására biológiai anyagokat (tojáshéj, algák, korall) és szintetikus anyagokat használnak. A biológiai anyagoknak az előnye, hogy porózus szerkezetű, a csonthoz hasonló anyag állítható elő. Az algákból mikroporózus, míg a korallokból makroporózus szerkezetű HAP keletkezik, viszont hátrányuk, hogy nem kívánt szennyeződések tartalmaznak (ZENG et al., 2007).

A hidroxipatit felhasználása

A HAP jó bioaktivitással és biokompatibilitással rendelkező, a kemény vagy lágy szövetbe könnyen beépülő csontszerű anyag, melyet implantátumok, foggyökér, műcsontok előállítására használnak (LEE et al., 2004). Felhasználják a víztisztításban, ioncserélő és adszorpciós képességével könnyen megkötö a vízben lévő nehézfémeket (ONJIA, 2005).

2.11.4. Az immobilizálás előnyei és hátrányai

A sejtrögzítés előnyei (DERVAKOS & WEBB, 1991; PILKINGTON et al., 1998; WILLAERT et al., 1996):

- a. A rögzített élő sejtek képesek a hordozó anyagban vagy annak felületén szaporodni.
- b. Fokozott biológiai stabilitás. Ellenállóbbak a pH változással és a gátlószerekkel szemben.
- c. Nagy sejtkoncentráció és a nagy hígítási fokkal működő folyamatos fermentáció együttesen csökkentheti a mikrobiális fertőzés veszélyét, illetve a sejtek kimosódását, valamint nagyobb termékhozamot eredményez.
- d. A rögzített sejteket egyszerű elválasztani a reakcióközegtől.

A sejtrögzítés hátrányai (DERVAKOS & WEBB, 1991; WILLAERT et al., 1996):

- a. A szaporodó sejtek kiszabadulhatnak az immobilizáló anyagból, ha szétfeszítik azt.
- b. A diffúziós barrier a mátrix, vagy a nagy sejtsűrűség miatt növekedhet.
- c. Megnövekedett termékátlás.
- d. Gazdaságosság. A legtöbb rögzítési módszer túl költséges ahhoz, hogy nagyléptékű feldolgozásban alkalmazzák.

2.11.5. Rögzített mikroorganizmusok bioremediációs alkalmazása

A toxikus nehézfémek eltávolításával foglalkozó kutatók hamar felismerték az immobilizációs módszerek előnyeit. Számos ilyen eljárásban alkalmaznak sejtrögzítő módszereket a reakcióidő és a hatékonyság növelése érdekében (HEITKAMP, 1990).

HEITKAMP és mtsi. (1990) a p-nitrofenol lebontását optimalizálták három *Pseudomonas* faj egy speciális kovaföldre rögzítését követően bioreaktorban. Hasonló immobilizáló felületet találtak alkalmasnak HALLAS és mtsi. (1992) a glifozát (N-foszfometilglicin) bontására szennyvízből.

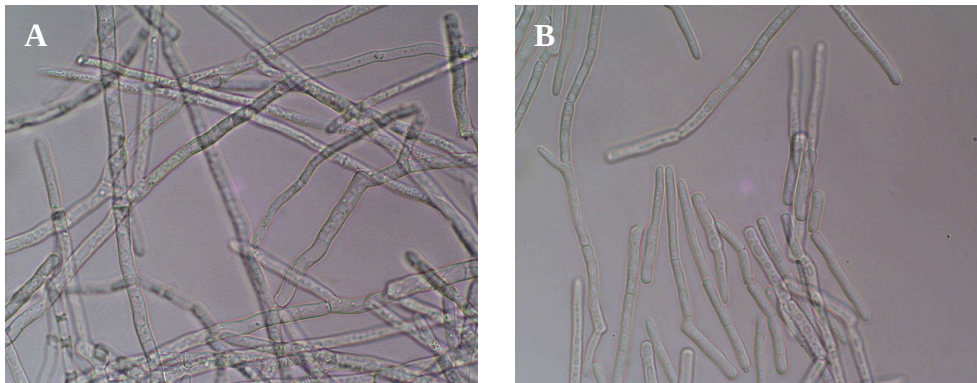
A sejtek, enzimek természetétől, és a kísérletek céljától nagymértékben függ, hogy melyik felületi rögzítésen vagy bezáráson alapuló eljárás a célszerűbb (AKIN, 1987) pl. CHANG és mtsi. (1999) megfigyelték, hogy a Ca-alginát gyöngyökbe rögzített sejtek kadmium kötőképessége jobb volt, mint amikor ugyanezen sejteket poliakrilamid gélbe zárták. Szende és mtsi. (2010) Ca-alginát gyöngyökbe zárt *Saccharomyces cerevisiae* sejtekkel eredményesen távolították el a kadmiumot vizes oldatból.

2.11.6. Immobilizáláshoz alkalmazható mikroorganizmusok

A 2.5.1. és a 2.5.2. pontokban leírt élesztőgomba fajok mellett további fajokat választottam ki sejtrögzítés céljából. Ezek a fajok különböző sejtmorfológiával rendelkeznek (pl. a bimbódzás, a hasadás, pszeudohifa vagy hifa képzése és a flokkulációs tulajdonság), melyeknek jelentősége lehet a hordozó felületéhez való rögzülés hatékonyságának szempontjából.

Geotrichum candidum

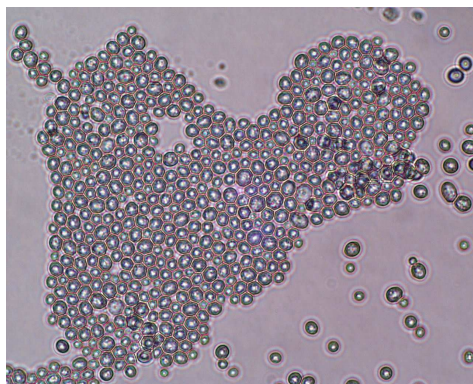
A *Geotrichum candidum* (telemorf: *Galatomyces geotrichum*) hifákat képez, melyek a stacioner fázisban láncokat alakítanak ki az arthrokonídiumokból (12. ábra).



12. ábra *Geotrichum candidum* NU (A.) hifák és (B.) arthrokonídiumok

Saccharomyces cerevisiae

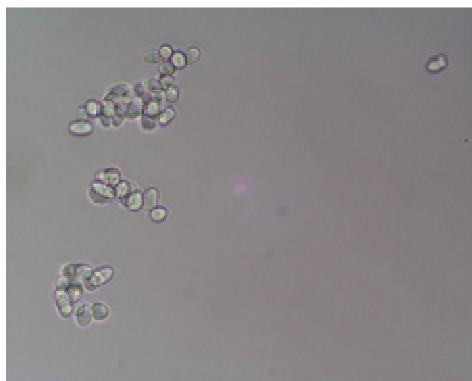
A *Saccharomyces cerevisiae* fajhoz számos különböző élettani és technológiai tulajdonságokkal rendelkező törzs tartozik, amelyek sejtfal szerkezetükben is lényegesen különbözhetnek egymástól. Az alsóerjesztésű sörélesztőkre a flokkulációs képesség jellemző, míg a sherry készítésre használt élesztőtörzsek, valamint a tokaji szamorodni érésekor kialakuló hártvaképző élesztőtörzsek filmet alakítanak ki a borok felületén. A TD 04 hártvaképző élesztőgomba törzset (13. ábra) választottuk ki sejtrögzítési célra, mert a sejtfelületi jellemzői eltérnek a normális sejtektől és ebben az esetben nem a lektin-típusú fehérjék felelősek ezért. Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszéken folyó korábbi vizsgálati eredményekből ismert, hogy a sejtfal hidrofil-hidrofób jellemzői függenek a sejtek fiziológiai állapotától is (KOVÁCS és MARÁZ, 2003, 2005).



13. ábra *Saccharomyces cerevisiae* TD 04 biofilm képző törzs (készítette: Kovács Mónika)

Schizosaccharomyces pombe

Ez egy tipikus hasadó élesztőgomba faj (14. ábra). Nem csak a sejtosztódásában, hanem a sejtfal felépítésében is eltér más élesztőgomba fajoktól. A flokkulens törzs galaktóz-specifikus lektin-típusú fehérjéket tartalmaz a sejtfelületen, amelyek hidrofób tulajdonságot kölcsönöznek a sejteknek (MARAZ & GELETA, 2001).



14. ábra *Schizo. pombe* RIVE 4-2-1 (flokkuláló sejtek)

3. CÉLKITŰZÉS

Munkám során különböző laktóz - és keményítőhasznosító élesztőgombákat vizsgáltam azzal a céllal, hogy megállapítsam előállítható-e belőlük olyan biomassza, mely alkalmas a nehézfém ionok akkumulációjára, valamint regenerálható és költséghatékony bioszorbens kifejlesztése.

Céljaim a következők voltak:

- 1) Olyan élesztőgomba törzsek szelektálása, melyek hatékonyan asszimilálják a laktózt ill. a keményítőt, és alkalmasak nehézfémek megkötésére
- 2) Különböző törzsek fémmegkötő képességének vizsgálata élő, ill. szárított biomassza alkalmazásával, Cr, Cd, Ni, Cu, Pb, Ag nehézfém ionok esetén
- 3) A megkötött nehézfémek sejten belüli lokalizációjának meghatározása, valamint a fémek reszorpciójára/visszanyerésére alkalmas eljárások kidolgozása
- 4) A szelektált élesztőgomba törzsek és tenyésztési körülményeinek optimálása biomassza termelési célból laboratóriumi körülmények között, rázatott tenyészeteknél. Hozam és hozam konstans meghatározása
- 5) Az élesztőgombák nagy bioszorpciós képességét kihasználva olyan bioszorbens kifejlesztése, amely regenerálható és a jelenleg alkalmazott hordozókhoz képest kisebb költséggel előállítható
- 6) A biomasszát alkotó sejtekre vonatkozó immobilizálási eljárások laboratóriumi vizsgálata, azok továbbfejlesztése vagy új eljárás kifejlesztése. A kidolgozott immobilizációs technológia laboratóriumi megvalósítása

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Élesztőtörzsek

A kísérleteimhez a 2. táblázatban feltüntetett mikroorganizmusokat használtam, melyeket az izolálást követően a Budapesti Corvinus Egyetem Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszékén tároltuk.

2. táblázat A kísérletek során alkalmazott élesztőgomba törzsek

C-forrás hasznosítás	Faj	Törzs
Laktóz	<i>Dekkera anomala</i>	DMB ^a VT
	<i>Kluyveromyces lactis</i> var. <i>lactis</i>	DMB NU
	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	DMB NB
Keményítő	<i>Debaryomyces occidentalis</i> var. <i>occidentalis</i>	CCY ^b 47-1-4
		CCY 47-1-3
		CCY 47-1-6
		NCAIM ^c Y 276
		NCAIM Y 981
		NCAIM Y 758
		NCAIM Y 772
		CCY 47-2-1
		CCY 47-2-2
		CCY 47-2-8
	<i>Lipomyces kononenkoe</i>	CCY 33-4-1
	<i>Lipomyces starkeyi</i>	CCY 33-1-1
	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	CCY 42-3-1
Szacharóz	<i>Geotrichum candidum</i>	DV
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	BT
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PM 322
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	RIVE 4-2-1

^aDMB: Department of Microbiology and Biotechnology, Corvinus University of Budapest

^bCCY: Czechoslovak Culture Collection of Yeasts, Bratislava

^cNCAIM: National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms

A törzsek fenntartása YEPD - agaron történt – ferde agar – (0,5% (w/v) élesztőkivonat, 0,5% (w/v) pepton, 1% (w/v) glükóz, 1,5%(w/v) agar). Az élesztőgombákat 24-48 órát inkubáltam majd 5°C-on tartottam fenn a törzseke, melyeket havonta átoltottam.

4.2. Anyagok

4.2.1. Táptalajok

Élesztőkivonat-glükóz-pepton (YEPA) táptalaj

0,5% élesztőkivonat (Merck, Darmstadt, Németország)

1% glükóz (Reanal, Budapest, Magyarország)

0,5% pepton (Difco)

Keményítő táptalaj (YEPA)

0,5% élesztőkivonat (Merck, Darmstadt, Németország)

1% vízzeloldható keményítő (Reanal, Budapest, Magyarország)

0,5% pepton (Difco)

Szintetikus minimál táptalaj

0,5 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Reanal, Budapest, Magyarország)

0,1 % KH_2PO_4 (Reanal, Budapest, Magyarország)

0,05 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Reanal, Budapest, Magyarország)

1 % glükóz

0,1 % Wickerham vitamin oldat

4.2.2. Oldatok

Wickerham vitamin oldat:

0,2 mg	folsav
0,2 mg	biotin
40 mg	Ca-pantotenát
200 mg	inozitol
40 mg	niacin
20 mg	p-amino-benzoesav
40 mg	piridoxin HCl
20 mg	riboflavin
100 ml	desztillált víz

Habzászátló: Antifoam-Y30 emulzió (Agromilk Kft., Székesfehérvár)

Mc Ilvain puffer:

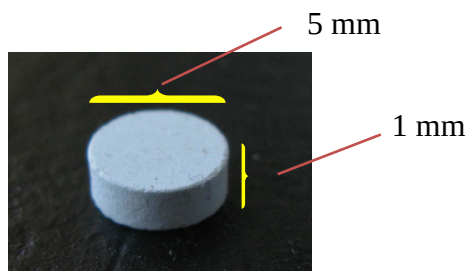
Komponensek:

pH	0,1 M citromsav oldat (%)	0,2 M Na ₂ HPO ₄ oldat (%)
3	79,6	20,4
4	61,4	38,6
5	48,6	51,4
6	35,8	64,2
7	13,0	87,0

A kiválasztott pH érték beállításához az elkészített 0,1 M citromsav és a 0,2 M Na₂HPO₄ oldatokból az adott pH értéknek megfelelő mennyiségeket mértem össze.

4.2.3. HAP kerámia tabletta

HAP (hidroxiapatit) kerámia tablettát (5mm átmérőjű és 1mm magas) használtam a sejtrögzítéses kísérleteimben (15. ábra).



15. ábra HAP kerámia tabletta

A HAP tablettát szilárd közegben a kalcium hidroxid [(Ca(OH)₂] vizes oldatának foszforsavas [H₃PO₄] reakciójával állítják elő:



A száraz port nyomáson, két szakaszban, egy kézi hidraulikus ólomlap (SPRUT 10/185, Latvia) segítségével tablettává alakítják. Ezután 1100°C-on 1 órán át hőkezelik. A tabletta, előírásoknak megfelelő, kristályos szerkezetét és kémiai tartalmát diffraktométeren (Rikagu Ultima+Japan) keresztül ellenőrzik (ARANOV et al., 2006).

4.3. Módszerek

4.3.1. *Törzsfenntartás*

A tiszta tenyészetek esetében az átoltásokat havonta elvégeztem, és minden kísérlet előtt 48 órával a törzsekből egy - egy kacsnyi sejtet ferde YEPD táptalajra oltottam ki.

4.3.2. *Inokulum készítése*

Az inokulálás előtt minden esetben a telepekből készített festett preparátum mikroszkópos vizsgálatát is elvégeztem. A kísérlet indításakor a ferde agaron elszaporított élesztő-tenyészetből 2-2 kacsnyit 25 – 25 ml steril tápközeget tartalmazó Erlenmeyer-lombikba szuszpendáltam. A lombikokat ezután 30°C-on rázattam 16 órán keresztül. Közvetlenül a kísérlet megkezdése előtt a sejteket kicentrifugáltam a tápközegből (Type BR 4i centrifuga, JOUAN SA, St. Herblain, Franciaország). A centrifugálást 4000 rpm-en, 5 percig végeztem. Ezután a sejteket desztillált vízzel mostam, újra centrifugáltam, majd 10 ml desztillált vízbe vettem őket vissza és meghatároztam a szuszpenzió sejtsűrűségét Bürker-kamrás sejszámolással. Az így kezelt törzsek szolgáltak minden további kísérlet alapjául.

4.3.3. *Szárazanyag tartalom meghatározása*

A szárazanyag mennyiségének meghatározása során a homogenizált mintákból 10 ml mennyiséget centrifugacsövekbe mértem, 4000 rpm-en 10 percig centrifugáltam. A felülúszót eltávolítva a leülepedett élesztősejteket desztillált vízben felszuszpendálva újabb centrifugálást végeztem. A folyamatot háromszor ismételtam meg, majd az utolsó centrifugálást követően az üledékeket desztillált vízzel – előzetesen század gramm pontossággal lemért – Petri csészékre mostam és 105°C-on tömegállandóságig szárítottam. A visszamérések során kapott eredményekből a szárazanyag mennyisége meghatározható.

4.3.4. *Sejteshozam és hozamkonstans meghatározása*

A sejt tömeg lemérése után a hozamot (Y) a következő összefüggés alapján számítottam ki:

$$Y = \Delta X / \Delta S$$

ahol ΔX a száraz sejt tömeg változás (g/l)
 ΔS a szubsztrátum koncentráció változása (g/l)

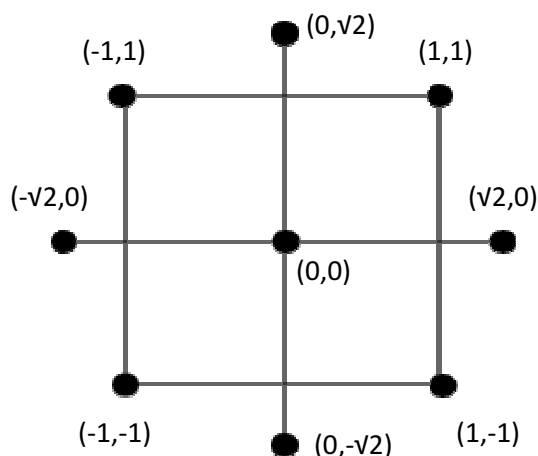
Mivel a kiindulási sejttömeg elhanyagolható a képződöthöz képest, valamint a tenyésztés a teljes szubsztrát tartalom elfogyásáig történt, ezért $\Delta X = X$ (képződött sejttömeg) és $\Delta S = S_0$ (kiindulási szubsztrát koncentráció), azaz $Y = X/S$.

Minden mérést háromszor ismételt meg.

A mért száraz sejttömeg értékeket (X) a kiindulási szubsztrátkoncentráció (S_0) függvényében ábrázolva az így meghatározott regressziós egyenes meredeksége adja meg a *hozamkonstans értéket*. A hozamkonstans információt ad arról, hogy a szubsztrátum hasznosulását befolyásolja-e annak koncentrációja, például a koncentráció növekedésével fellép-e szubsztrátgátlás. Minél jobban közelít a hozamkonstans értéke az 1-hez, annál kisebb mértékű a szubsztrátgátlás.

4.3.5. *Tápközeg optimálás kísérlettervezéssel*

Kísérleteimben első lépésként a fermentációs közegben fontos szerepet betöltő szén- és nitrogénforrás optimális mennyiségét kívántam meghatározni. Szénforrásként glükózt, laktózt vagy keményítőt, míg nitrogénforrásként élesztőkivonatot illetve ammónium-szulfátot alkalmaztam. Előzetes kísérletek eredményei alapján 1,5 (w/v)% glükóz/laktóz/keményítő és 0,5 (w/v)% élesztőkivonat/ammónium-szulfát koncentrációkat választottam munkapontnak. Továbbá azt tapasztaltam, hogy 1 (m/v)% szén- illetve 0,3 (m/v)% nitrogénforrás koncentráció változása szignifikánsan okozza a sejtszám (abszorbancia) változását. Az optimálási feladat megvalósításához központi elrendezésű kísérleti tervet (Central Composite Design - CCD) alkalmaztam melyet elterjedten használnak ipari optimálásokhoz (MONTGOMERY, 2004). Ennek oka, hogy egyszerű és viszonylag kevés kísérleti beállítással megfelelő pontosságú és gyors eredményeket ad, valamint figyelembe veszi a faktorok között kölcsönhatásokat. A módszer magába foglalja a kísérletek megtervezését és matematikai-statisztikai értékelését. Kísérleteimben függő változónak közvetetten a biomassa tömeget (sejtkoncentráció) választottam, az általam mért adat a szaporodás során a tápoldatban bekövetkező abszorbancia változás volt. Kilenc pontos kísérleti tervet állítottam össze a megadott séma alapján, melyet az 16. ábra szemléltet.



16. ábra Központi elrendezésű kísérleti terv

Számszerűsítve minden egyes törzsnél a 3. táblázatban feltüntetett kísérleti beállításokat alkalmaztam. Az alkalmazott C-forrás középponti értéke 15 g/L és léptéke 10 g/L, míg a N-forrás középponti értéke 5 g/L és léptéke 3 g/L.

3. táblázat: Központi elrendezésű kísérleti terv a maximális sejtszám eléréséhez

Tápközeg száma	Kódolt faktor		Természetes faktor	
	x_1	x_2	C-forrás g/L	N – forrás g/L
1	0	0	15	5
2	0	$\sqrt{2}$	15	9,2
3	$\sqrt{2}$	0	29,2	5
4	0	$-\sqrt{2}$	15	0,8
5	$-\sqrt{2}$	0	0,8	5
6	1	1	25	8
7	1	-1	25	2
8	-1	-1	5	2
9	-1	1	5	8

A maximális biomassa tömeg változásának leírására teljes másodrendű polinom modellt alkalmaztam az alábbi egyenlet szerint:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_1^2 + b_4x_1x_2 + b_5x_2^2$$

Ahol Y (OD_{595nm} vagy biomassa) a függő változó,
 b_i a regressziós koefficiensek,
 x_1 (szén-forrás) és x_2 (nitrogén-forrás) a független változók

A b_i koefficiensek meghatározására regressziót hajtottam végre, mely Statistica 9.0 programmal történt.

4.3.6. A sejtkoncentráció meghatározása az optimáláshoz

4.3.6.1. Glükózt, illetve laktózt alkalmazva szénforrásként

Az optimáláshoz Multiskan Ascent (Thermo Electro Corporation, 17. ábra) mikrolemezes denzitométert használtam, mely a szaporodás online követését teszi lehetővé. A műszer használható mind a 96 zsebes, mind pedig a 384 zsebes mikrotiter lemezzel. A 96 zsebes mikrotiter lemez esetén a műszer 4 A (abszorbancia) értékig mér, és az abszorbancia értékek meghatározásához három különböző szűrő használható 340 és 850 nm között. A Multiskan Ascent linearitása $\pm 2\%$. A mérések mind lépegetve (stepping mode) mind folyamatosan (continuous mode) kivitelezhetőek. Az egyes minta mérések ideje 14 másodperc az előbbi, és 9 másodperc az utóbbi esetében. A műszer pontossága a Thermo Electron Corporation leírása szerint $\pm 1\%$ illetve 0,003 A a 0-2 A értékek között, és $\pm 2\%$ magasabb abszorbancia tartományban.



17. ábra Multiskan Ascent mikrolemezes szaporodásmérő

Munkám során a 96 zsebes mikrotiter lemezt használtam az optimalizálós méréseimhez, amelyben a kísérleteket mérésenként két törzzsel, három párhuzamos méréssel tudtam megvalósítani. A szaporodást 24 órán át követtem nyomon 30 perces mintamérési intervallummal, 30 °C-on, 595 nm hullámhosszon.

A mérés során 30 ml 24 órás sejtenyészetet lecentrifugáltam majd átmostam steril desztillált vízzel. A sejteket 30 ml desztillált vízzel újra szuszpendáltam, és meghatároztam a szuszpenzió sejtsűrűségét Bürker-kamrás sejtszámolással. A sejtszámot hígítással 10^7 sejt/cm³-re állítottam be. Az előzőleg meghatározott 9 különböző, kétszeres koncentrációjú (lásd módosított táplevesek összetevőinél) tápoldatokból 500 µl-t mértem egy-egy Eppendorf csőbe, ehhez 500 µl sejtsuszpenziót

pipettáztam. Vakpróbaként az 500 μl tápoldathoz a sejtszuszpenzió helyett desztillált vizet adtam. A mikrotiter lemez zsebeibe 300 μl -t pipettáztam az egyes szuszpenziókból.

A méréseket Excel táblázatban értékeltem ki, majd STATISTICA 9.0 programmal elvégeztem a Fitted Surface Response elemzést. A kapott eredmények alapján eldöntöttem az optimálás további irányát.

4.3.6.2. *Keményítőt használva szénforrásként*

A keményítő oldat opálos, ezt figyelembe véve a benne lévő sejtek szaporodásának mérésére a Multiskan Ascent berendezés alkalmatlan. További nehézséget okozott, hogy a keményítőn való szaporodáskor a mikrobák oxigén igénye magas, melyet a mikrotiter fotométer nem tud biztosítani.

A zavarosság változásának megállapítása ebben az esetben fotométerrel történt, a törzseket kémcsőben tenyésztettem.

A mérés során 30 ml 24 órás sejtenyészetet lecentrifugáltam majd átmostam steril desztillált vízzel. A sejteket 30 ml desztillált vízzel újra szuszpendáltam, és meghatároztam a szuszpenzió sejtsűrűségét Bürker-kamrás sejtszámolással. A sejtszámot hígítással 10^7 sejt/ cm^3 -re állítottam be. Kilenc kémcsőbe 2,5 ml dupla koncentrációjú, előzőleg meghatározott kilenc különböző mennyiségű keményítőt és nitrogén-forrást tartalmazó táplevest, illetve 2,5 ml desztillált vizes sejtszuszpenziót mértem. A kémcsöveket 30°C -on enyhe rázás mellett inkubáltam. Az abszorbancia meghatározása 610 nm-en Secomam (Secomam, Uvi Light XT2, Franciaország) fotométerrel történt óránként. Minden esetben két párhuzamos mérést végeztem. Az adatokat előbb Excel, majd Statistica 9.0 programmal értékeltem ki.

4.3.7. *Laboratóriumi fermentáció*

A biomassa előállítás során alkalmazott MonitShaker nevű rázatógép (Kambič, Slovenia) egy batch fermentor, amely $0,34 \text{ dm}^3$ hasznos térfogattal rendelkezik, szabályozható hőmérsékleti és rázási feltételeket biztosít a teljes fermentáció során.

A tápközegben oldott oxigén meghatározása egy online működő, sterilizálható oldott-oxigén elektródával (ApliSens Sensor Innovation) történt. Az elektróda Clark-elve szerint működik. Az elektródákat minden mérés előtt 24 órára desztillált vízbe helyeztem, polarizáció céljából, majd a sterilizálást követően kétpontos kalibrációt végeztem. A 0 %-os pO_2 értékhez az elektródákat oxigénmentes, nátrium-szulfittal telített desztillált vízbe helyeztem. A 100 %-os érték meghatározásához a desztillált vizet tartalmazó lombikokat rázattam (maximális oldott O_2). Ezen kívül

a fermentáció megkezdése előtt 100 %-os pO_2 értékre egy pontos kalibrációt végeztem el, hogy a rendszert a tápközeg feltételeihez igazítsam.

A pH értéke szintén online működő és sterilizálható kombinált elektródákkal (ApliSens Sensor Innovation) történt. A pH meghatározásánál is kétóránként történt a mintavétel. Az elektróda egy KCl-dal töltött üvegelektrod, így külön töltést nem igényel. Ahhoz, hogy megfelelő értékeket lehessen kapni, kétpontos kalibrációt kellett alkalmazni. Az alsó határérték egy 4-es pH-jú, a felső egy 7-es pH-jú pufferoldat, melyeket előzetesen készítettem el (pHydrin Tri-chek Buffer Capsule Set, Micro essential laboratory Inc. Brooklyn N.Y., 11210 USA). Az elektródák a MonitShaker szoftverével együttműködve minden 30. percben rögzítették az aktuális O_2 és pH értékeket.

1000 ML sterilizálható, polikarbonát lombikokat használtam fermentációs kísérleteim során (18. ábra). A polikarbonát ellenálló alkoholokkal, növényi olajakkal, semleges és savas sókkal szemben.

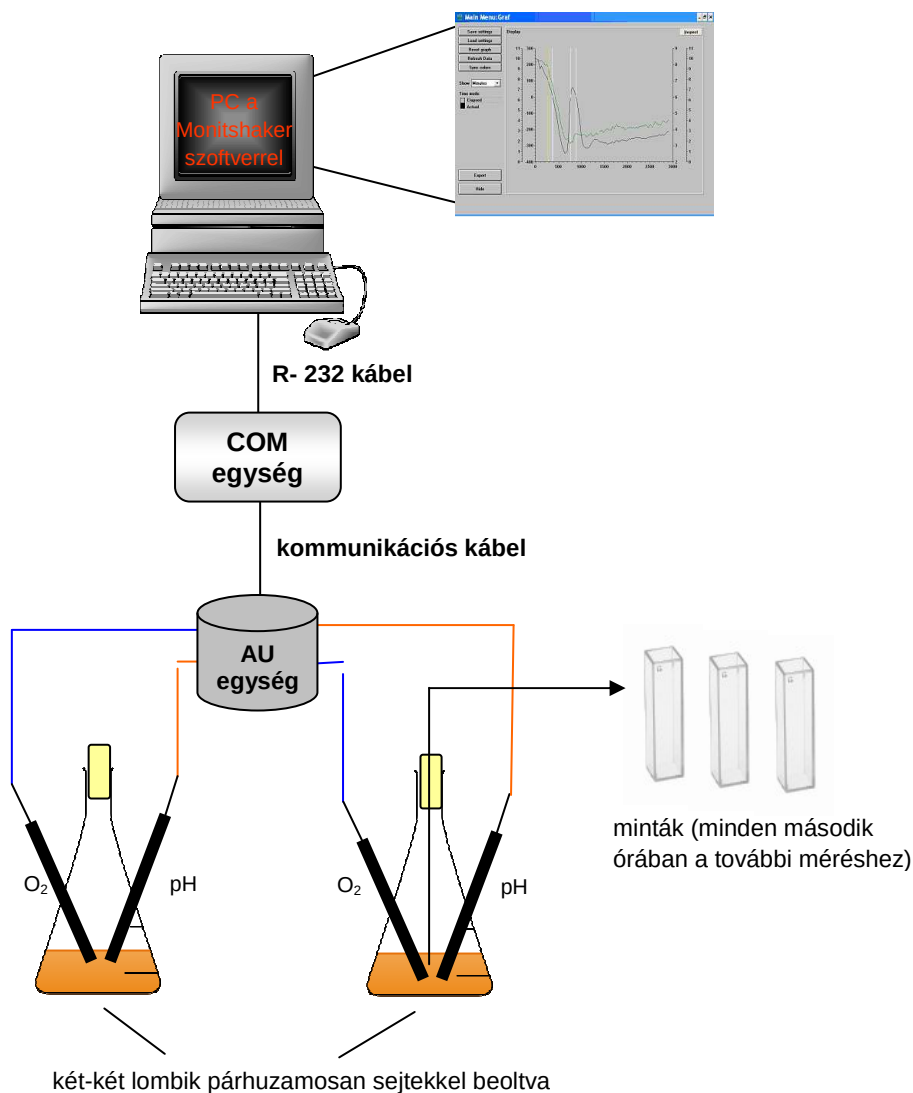


18. ábra Polikarbonát lombik

A műszer vezérlését a MonitShaker 1.5 (BIA d.o.o Laboratory and Process Equipment Company Ltd., Slovenia) szoftver biztosítja. A mért adatok feldolgozása Excell-ben, statisztikai értékelésük pedig Statistica 9.0 programban történt.

A mérés során 30 ml 24 órás sejtenyészetet lecentrifugáltam majd átmostam steril desztillált vízzel. A sejteket 30 ml desztillált vízzel újra szuszpendáltam, és meghatároztam a szuszpenzió sejtsűrűségét Bürker-kamrás sejtszámolással. A sejtszámot hígítással $5 \cdot 10^6$ sejt/ cm^3 -re állítottam be. A kísérleteket 1 literes Erlenmeyer-lombikokban végeztem, melyekbe 300 ml steril tápközeg került. A lombikok tetejét laza gyapotvatta dugóval zártam le, hogy a steril állapot biztosítva legyen, ugyanakkor a szén-dioxid ki tudjon jutni. A lombikokból két óránként mintát vettem, amelyeknél meghatároztam az

abszorbanciát, emellett a pH-t, összecukor-, fehérje- és etanol tartalmat is mértem majd Bürker-kamrás módszerrel meghatároztam az élő- és összsejtszámot. Minden esetben párhuzamos mérést is végeztem a pontosabb eredmények érdekében. A teljes folyamatot a 19. ábra szemlélteti.



19. ábra A fermentor és a mérőrendszer folyamatábrája

4.3.8. Fénymikroszkópos vizsgálatok

A mikroszkópos vizsgálatoknak két szerepe is volt a kísérletek során. Egyrészt a starter kultúrákból kivett minták sejtszámát mikroszkóppal határoztam meg Bürker-kamra segítségével és ez alapján állítottam be a lombikok kezdeti sejtszámát $5 \cdot 10^6$ értékre, másrészt a fermentáció során levett mintákban mikroszkóp segítségével állapítottam meg az élő/holt sejtarányt. Mindegyik vizsgálat Carl

Zeiss mikroszkópon (Olympus SZX7, Németország) történt. A kezdeti sejtszám beállításához a starterkultúrákból vett mintákat 100-szorosra hígítottam. A hígított mintából ezután 10 µl-t a Bürker-kamrára helyezve és 40x-es objektívet használva határoztam meg a starter kultúra sejtszámát.

4.3.9. *Vitális festés*

A kétóránként levett minták esetében az élő és holt sejteket megkülönböztetésére alkalmaztam ezt a festési eljárást, melynek lényege, hogy az élő sejtek sejtmembránja nem ereszti át a Rhodamine-B nevű festéket, nem festődnek meg, így a mikroszkóp alatt fehér színben fognak megjelenni. A holt sejtek sejtmembránja azonban áteresztővé válik, ennek következtében a mikroszkóp alatt bordó színűekké válnak. 50 µl mintához 5 µl Rhodamin-B oldatot cseppentettem, majd 10 µl-t rápipettáztam a Bürker-lemezre, leszámoltam 10 mezőben az élő és holt sejteket, végül a meghatároztam az élő és holt sejtek százalékos arányát.

4.3.10. *Fehérjetartalom meghatározása*

A minták fehérjetartalmának meghatározásához a Micro-Biuret módszert alkalmaztam (http://biology.clc.uc.edu/fankhauser/labs/Cell_Biology/Microbiuret/Microbiuret.htm). Lényege, hogy a módszer során a mintához Micro-Biuret reagenst adtam, melynek rézionjai a fehérje peptidkötéseivel komplexet képeztek, az oldat kékes színűvé vált. A szín intenzitása pedig arányos volt a jelenlevő fehérje koncentrációjával.

Micro-Biuret reagens:

„A” oldat:

40 g NaOH
100 ml desztillált víz (NaOH feloldásához)

„B” oldat:

400 mg CuSO₄
40 ml desztillált víz (CuSO₄ feloldásához).

- 1) a „B” oldatot először kiegészítem desztillált vízzel 150 ml-re.
- 2) a „B” oldatot keverés mellett óvatosan az „A” oldathoz öntöm

Fehérjetartalom méréséhez sejtmentes felülúszóra volt szükség, ezért a meghatározás előtt a mintákat centrifugáltam. A felülúszóból 2 ml-t kvarcküvetába pipettáztam, majd hozzáadtam 1 ml Micro-Biuret reagenst. A mintákat Secomam XT2 spektrofotométeren, 310 nm-es hullámhosszon mértem, vakoldattal szemben, mely felülúszó helyett desztillált vizet tartalmazott. A kapott értékeket a kalibrációs egyenes egyenletébe behelyettesítve és az esetleges hígításokkal visszaszorozva megkaptam

az adott minta fehérjetartalmát. Ahhoz, hogy a minták fehérjetartalmát pontosan meg tudjam határozni, kalibrációs egyenesre volt szükség. Ennek elkészítése során élesztőkivonatot készítettem, melynek koncentrációja megegyezett a fermentációs táptalajokban megtalálható élesztőkivonat koncentrációjával (5 mg/ml). Hígítási sort készítettem, majd az értékeket 310 nm-en olvastam le és ez alapján készítettem el a kalibrációs egyenest.

4.3.11. *Összes szénhidrát tartalom meghatározása*

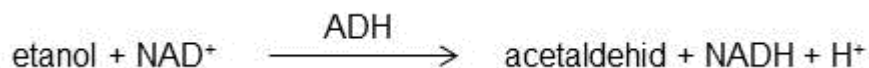
Összcukor tartalom meghatározásához a fenolos módszert alkalmaztam (HERBERT et al. 1971). A módszert az 1950-es években fejlesztették ki, eredetileg tiszta cukoroldatok méréséhez, de a későbbiekben összes szénhidráttartalom meghatározására is használni kezdték. A módszer során 1 ml mintát kémcsőbe pipettáztam, adtam hozzá 1 ml 5 %-os fenolt, 5 ml 96%-os kénsavat, majd 10 percig elszívófülke alatt hagytam állni, ezután 20 percig 30°C-ra tettem. A 20 perc leteltével 490 nm-en mértem a vakoldathoz képest a színváltozást. A vakoldat a minta kivételével mindkét másik komponenst tartalmazta.

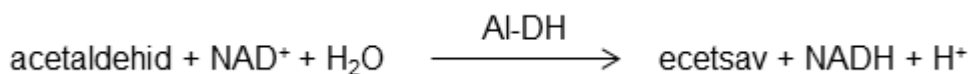
Ahhoz, hogy a minták szénhidrát tartalmát meghatározzam, szükség volt kalibrációs egyenesre is. Kalibráció során ismert koncentrációjú glükóz, illetve laktóz oldatot készítettem, ebből hígítási sort csináltam és a sor tagjaihoz az előbbiekben leírt mennyiségben adtam fenolt, illetve kénsavat, majd az állási idő letelte után 490 nm-en mértem az abszorbanciát. A kapott értékek alapján megszerkeszthető volt a kalibrációs egyenes.

4.3.12. *Etanoltartalom meghatározása*

A minták etanoltartalmának meghatározására a Megazyme cég (Megazyme International Ireland Ltd., Ireland) Ethanol Assay Kit-jét használtam.

A módszer két egymást követő reakción alapszik. Az első reakcióban - melyet az alkohol-dehidrogenáz (ADH) enzim katalizál - az etanoltól és a hozzáadott NAD^+ -ból acetaldehid és $\text{NADH} + \text{H}^+$ lesz. Az ezt követő reakcióban az acetaldehidből és a NAD^+ -ból ecetsav és $\text{NADH} + \text{H}^+$ keletkezik. A katalizálást ebben az esetben az aldehid-dehidrogenáz enzim (Al-DH) végzi. Az így képződött NADH mennyiségét lehet mérni a 340 nm-es hullámhosszon, ebből állapítható meg az etanol tartalom. A folyamat elve:





A módszer 0,25 és 12 µg etanol tartalom között lineáris. Ez azt jelenti, hogy a mintákat úgy kell hígítani, hogy a 0,1 ml felhasznált mintában 0,01 és 0,12 g/l között legyen az etanol koncentrációja.

A minták hígítása után elkészítettem a vak oldatot és a mérendő mintát. Összekevertem az oldatokat, majd 2 perc múlva leolvastam az abszorbanciát (A_1). Az alkohol dehidrogenáz hozzáadása után elindítottam a reakciót. Kb. 5 perc eltelte után ismét leolvastam az abszorbanciát (A_2).

Az etanol tartalmat a következő egyenlettel számoltam ki:

$$c = \frac{2,54 * 46,07}{6300 * 1 * 0,10 * 2} * \Delta A_{\text{etanol}}$$

Ahol:

2,54 = össztérfogat (ml)
 46,07 = etanol molekulatömege (g/mol)
 6300 = NADH extinkciós koefficiense 340 nm-en ($1 * \text{mol}^{-1} * \text{cm}^{-1}$)
 1 = fényút hossza (cm)
 0,10 = minta térfogata (ml)
 2 = 2 mol NADH keletkezik minden mol etanolból
 $\Delta A_{\text{etanol}} = A_2 - A_1$ abszorbancia különbség. Mind a vak, mind a minta esetében meg kell határozni az $A_2 - A_1$ különbséget (ΔA), majd a minták abszorbancia-különbségeiből kivonni a vak abszorbancia-különbségét és így megkapható a ΔA_{etanol} .

4.3.13. Élesztőgombák nehézfém szorpciója

A kísérlet során laboratóriumi körülmények között előállított modell oldatot alkalmaztam, mely a következő fémeket tartalmazta: króm (CrCl_3), réz (CuCl_2), kadmium ($\text{CdCl}_2 * 2,5\text{H}_2\text{O}$), ezüst (AgNO_3) és cink (20 mM ZnCl_2). Az oldat pontos összetételét a 27. táblázatban tüntettem fel. A szárított élesztőgomba sejteket a modell oldatban szuszpendáltam úgy, hogy a sejtkoncentráció 20 mg/ml legyen. A szuszpenziót 30°C-on 80 rpm-mel 30 percig rázattam. Kezelés után a sejteket 4000 rpm-es centrifugálással elválasztottam a felülúszótól, melynek fémtartalom meghatározása ICP-AES berendezéssel történt.

4.3.14. Élesztősejtek fémkötő képességének meghatározása

Élő és a hővel inaktivált (szárított) sejteket a következő fémek hatásának tettem ki: ezüst, króm (VI), ólom, réz, nikkel és kadmium, amelyeket az alábbi sók oldatainak formájában alkalmaztam: 20 mM AgNO₃, 20 mM K₂CrO₄, 20 mM Pb(NO₃)₂, 20 mM CuSO₄, 20 mM NiCl₂ és 20 mM CdSO₄.

A fémkötést a következő módon határoztam meg:

A felülúszó fémtartalma ICP-AES (ICAP-61, Thermo Jarrel Ash, USA) mérési technikával került meghatározásra, amelyet a Budapesti Corvinus Egyetem Élelmiszertudományi Kar Alkalmazott Kémia Tanszékén végeztek el. Az ICP-AES a legmodernebb műszeres analitikai módszerek közé tartozik. A gyorsaság, ill. a csekély zavaróhatás miatt az ICP sugárforrással működő spektrométerek ideális analitikai rendszerek kémiai elemek vizes és nem vizes oldatokból történő meghatározására. A kontroll fémoldat és a felülúszó fémtartalmának különbsége utal a fémkötés mértékére. Az ICP-AES méréssel kapott adatok megadták, hogy a felülúszóban mennyi fémion maradt ml-enként (C_t). Ha ezt az adatot kivonom az összes (totál) oldatba vitt fémion koncentrációjából (C_i), akkor a sejt által megkötött fémionok mennyiségét (C_k) kapom meg. Ha ezt az értéket elosztom a sejtek tömegével (M), akkor megkaptam a törzs fémmegkötő képességét mg/g szárazanyagban (Q).

$$(C_i - C_t) / M = Q$$

Fémkötés mérése szárított és élő biomassza esetén

Szárított biomassza előállítása:

A 24 órás YEPD táplevesben tenyésztett élesztő szuszpenzióból 1 ml-t 300 ml YEPD táplevesbe oltottam. Az élesztősejteket 180 rpm-mel rázatva, 30 °C-on tenyésztettem 24 órán keresztül. A sejteket lecentrifugáltam, átmostam őket steril desztillált vízzel, majd újra centrifugáltam. A nedves sejttömeget Petri-csészébe rétegeztem és 80°C-on tömegállandóságig szárítottam. A megszáradt sejttömeget dörzsmozsárban homogenizáltam.

Élő biomassza előkészítése:

A méréshez 20 mg száraz sejttömeggel egyenértékű, 24 órán keresztül 30°C-on YEPD táplevesben tenyésztett sejteket használtam.

A biomasszák előállítást követően a szárított sejtekből szuszpenziót készítettem: 20 mg száraz sejttömeghez 1 ml 20 mM-os fémionokat tartalmazó oldatot adtam, majd 30°C-on 80 rpm-mel 30

percig rázattam. Ezt követően a sejteket 5 percig centrifugáltam 4000 rpm-mel és a felülúszót leöntöttem, melynek fémtartalom meghatározása ICP-AES méréssel történt.

4.3.15. Nehézfémek celluláris eloszlásának vizsgálata

4.3.15.1. A fémionok celluláris megoszlásának vizsgálata élő sejtekben

Az egyes sejtalkotókból a fémionok kinyerésére WHITE és GADD (1986) módosított módszerét alkalmaztam a következő módon (VARGA & MARAZ, 2002): 20 mg/ml szárított élesztőhöz 20 mM-os nehézfém oldatot mértem. A szuszpenziót 30 °C-on fél órán át 80 rpm fordulatszámmal rázattam. Ezt követően a sejteket centrifugálással elkülönítettem a felülúszótól, majd kétszer mostam őket ionmentes vízzel. A sejtfalhoz ionosan kötött kationok eltávolításához a sejteket 50mM EDTA- Na_2 (pH7) oldattal mostam. Az intracellulárisan oldott fémek kivonására 0,7 M-os sorbitol-DEAE-dextran-t használtam. A citoplazma membrán teljes permeabilizációját a sejtek Malachit-zöld festékkel való megfestésével ellenőriztem. A teljes membrán szétesését metil-alkoholos kezeléssel sikerült elérni.

Viszonylag magas nehézfém és biomassa koncentrációt használtam a fémek celluláris eloszlásának pontos detektálására. A mikroelem tartalom meghatározása ICP-AES méréssel történt.

4.3.15.2. A fémionok celluláris megoszlásának vizsgálata szárított sejtekben

A fémek sejtes megoszlásának meghatározásához a szárított sejteket a 4.3.14. fejezetben leírtak szerint készítettem elő. Kontrollként élő sejteket használtam.

Az oldható frakcióban megkötött fémek meghatározásához mind az élő, mind a szárított sejtek esetében a sejteket 0,7M pH7-es MOPS pufferrel kétszer átmostam. Szárított sejteknél azt a frakciót, melyet mosással nem tudtam eltávolítani, szervesen kötött frakciónak tekintettem. Az élő sejtek sejtfalhoz ionosan kötött frakcióját a nehézfémek deszorpciójával határoztam meg. A megmaradt, fémmel dúsított, sejtalkotókat intracelluláris frakciónak tekintettem.

4.3.16. Élő sejtek rögzítése a hordozóra

A rögzítés első lépésében a 4.3.2. fejezetben leírtak alapján az élesztő törzsekből inokulumot készítettem. Mindegyik kémcsőbe 1 db tablettát helyeztem, melyekhez 1-1 ml szuszpenziót adtam, majd 30 °C-on 80 rpm fordulatszámmal rázattam őket. 4 és 24 óra elteltével metilénkék festékkel megfestettem a sejteket és mikroszkóposan vizsgáltam a hidroxipatit tablettákon való kötődésüket.

4.3.17. *Metilénkékes festés*

A tablettákat 5 másodpercig desztillált vízben mostam, a sejteket etanol: éter (1:1) keverékében fixáltam, majd 5 másodpercig metilénkék festékekkel (0,3 g metilénkék + 30 ml 96%-os etilalkohol; oldódás után d.vízzel 1000 ml-re kiegészíteni, majd szűrőpapíron átszűrni) megfestettem őket. A felesleges festéket desztillált vízzel leöblítettem. A sejtek szaporodását és a tablettához való tapadásukat sztereo mikroszkóp (Olympus SZ2 ILST) alatt vizsgáltam.

4.3.18. *A pH hatása az immobilizáció hatékonyságára*

A pH hatásának vizsgálatához a 4.3.2. pontban leírtak szerint inokulumot készítettem. 20mM MOPS foszfát puferral pufferelt YEPD közegekben (pH5, 6 és 7) vizsgáltam a sejtek rögzülését a tablettához. Kontrollként nem pufferelt közeget alkalmaztam. Az inkubálás 30°C-on 80 rpm-mel történt. 24, 48 és 72 óra elteltével kivettem 1-1 tablettát az oldatból, metilénkékekkel megfestettem és sztereo mikroszkóp alatt vizsgáltam a tabletták sejtekkel való lefedési arányát.

4.3.19. *A sejtfelületi hidrofóbicitás meghatározása*

A hidrofóbicitás meghatározása van der MEI et al., (1993) módosított módszere alapján történt. A vizsgálandó törzsek sejtjeiből a 4.3.2. fejezet alapján inokulumot készítettem. Ezt követően kicentrifugáltam a sejteket majd 10 mM-os KH₂PO₄ (pH 3,3) poláros oldószerben szuszpendáltam kb. OD₆₀₀=0,5-ös értékre, majd 10%-os xilol hozzáadása után intenzíven kevertem. A vizes fázis keverés előtti és keverés utáni OD értékének mérésével, az alábbi egyenlet alapján meghatároztam a törzsek hidrofóbicitási indexét (H_i):

$$H_i = \log (A_t/A_0 * 100)$$

ahol A_t: vizes fázis OD₆₀₀ értéke keverés előtt

A₀: vizes fázis OD₆₀₀ értéke keverés után

A sejtek felszíne H_i > 2 felett hidrofóbnak tekinthető.

4.3.20. *Sejtfal kezelések optimálása rögzítés céljából*

A 4.3.2. alfejezetben leírtak szerint inokulumot készítettem. A sejteket YEPD tápoldatba oltottam, majd a sejtszámot 10⁷ sejt/ml koncentrációra állítottam be. Ezután a 4. táblázatban feltüntetett

oldószerekkel és enzimekkel kezeltem a sejtfalat, majd meghatározott időközönként mértem a sejtekből kioldott fehérjék (4.3.10. alfejezet) ill. szénhidrátok (4.3.11. alfejezet) mennyiségét.

4.táblázat A sejtfalkezeléseknél alkalmazott reagensek és paramétereik

Reagensek		Koncentráció	Kezelési idők	Hatás meghatározása
I.Detergensek	Hecameg (Merck)	5 mM	1, 2, 3, 4, 5 óra	feloldott fehérje koncentráció mérése
	SDS (Reanal)	1%	15, 30, 45, 60 perc	feloldott szénhidrát koncentráció mérése
	Szarkozin (Reanal)	1%	15, 30, 45, 60 perc	feloldott szénhidrát koncentráció mérése
II. Proteázok	Pronáz (Merck)	200 µg/ml	30, 60, 90, 120 perc	feloldott szénhidrát koncentráció mérése
	Proteináz K (Sigma)	200 µg/ml	30, 60, 90, 120 perc	feloldott szénhidrát koncentráció mérése
III. Sejtfal oldó enzim	Lysing enzim (Sigma)	250 µg/ml 500 µg/ml	15, 30, 45, 60 perc	feloldott szénhidrát koncentráció mérése

5. EREDMÉNYEK

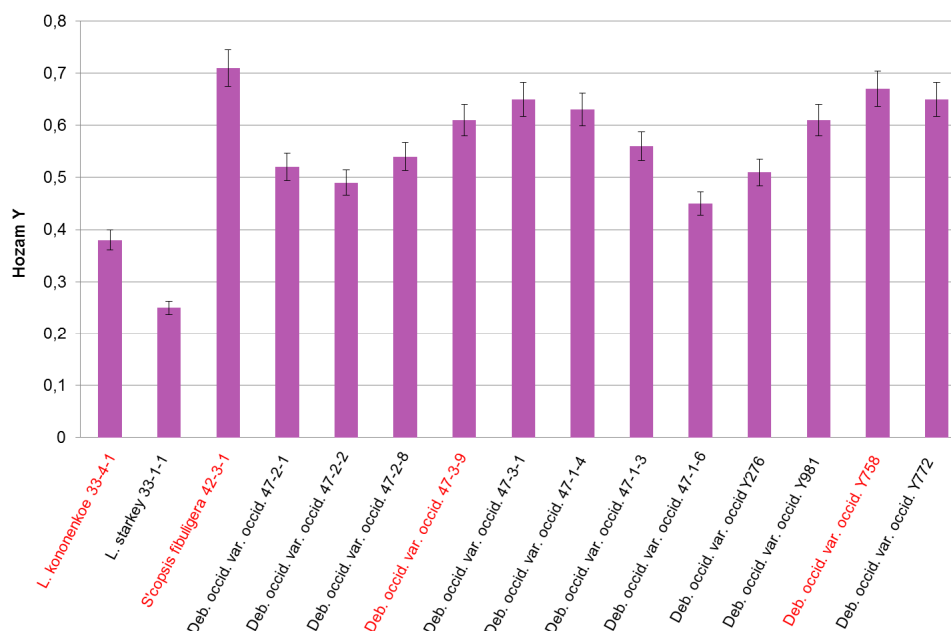
Az élesztőgombák nagy előnye, hogy sokféle és olcsó táptalajon tenyészthetők, fermentálhatók, sejtméretük a baktériumokénál jóval nagyobb és biodiverzitásuk egyik jellemzője sejtfaluk összetételének és szerkezetének sokfélesége. A környezetvédelem szempontjából óriási jelentőséggel bírnak azok az élesztőfajok, amelyek lehetővé teszik több folyamat összekapcsolását. Ilyenek például a keményítő, illetve a laktóz tartalmú melléktermékeken szaporodni képes fajok, amelyek később majd bioszorbensként, vagy biofilterként is hasznosíthatók (ERGAS & CARDENAS-GONZÁLEZ, 2004).

5.1. Élesztőgomba törzsek szűrése keményítőhasznosítás szempontjából

Keményítőt számos mezőgazdasági termék magas koncentrációban tartalmazza, ezért olcsó és jó szubsztrátot képez a mikroorganizmusok számára. A keményítő bontását különböző exo- és endo-amilázok végzik. Az α -amilázok az élesztőgombák közül elsősorban a *Lipomyces*, *Debaryomyces* és *Saccharomycopsis* fajoknál fordulnak elő, azonban pH és hőmérséklet optimumuk jelentősen eltérhet egymástól.

A keményítőt, mint egyedüli szénforrást tartalmazó táptalajokon való szaporodási képesség volt az elsődleges szempont a keményítőbontó élesztőgomba fajok/törzsek szűrése (screenelése) során. A szűréshez a 2. táblázatban feltüntetett 4 élesztőgomba fajhoz tartozó 15 törzset vizsgáltam meg keményítő szénforrást tartalmazó táptalajokon való szaporodás szempontjából. Valamennyi törzs jól szaporodott keményítőn, de a termelt biomassza szempontjából eltéréseket tapasztaltunk. A kiválasztott törzseknél meghatároztam a sejthozamot keményítő táplevesben. Naponta azonos időpontban vettem mintákat, melyekből száraz sejttömeget mértem. A méréseket addig az időpontig végeztem, amíg a mért száraz sejttömegben már csökkenés következett be. A mért sejttömegek maximális értékét használtam fel a hozam, illetve a hozam konstansok kiszámításánál.

A 20. ábrán bemutatott eredmények szerint a *Lipomyces* fajok kivételével mindegyik vizsgált faj törzsei meghaladták a 0,4-es biomassza hozamot keményítő C-forráson.



20. ábra Keményítőhasznosító törzsek szaporodása keményítő C-forráson

A *Lipomyces* nemzetséghez tartozó törzsek kisebb hatékonysággal használták fel a keményítőt, mint a *S. fibuligera* CCY 42-3-1 törzs, melynél a hozamkonstans is a legmagasabb tartományba tartozott. A *Deb. occidentalis* törzsek hasonló hatékonysággal bírtak, a hozamkonstans 0,5 – 0,7 között volt (KÁKONYI és mtsi., 2006).

A kapott eredmények alapján az alábbi törzseket választottam ki a további vizsgálatokhoz:

Saccharomycopsis fibuligera CCY 42-3-1

Debaryomyces occidentalis var. *occidentalis* Y758

Debaryomyces occidentalis var. *occidentalis* CCY 47-3-9

Lipomyces kononenkoe CCY 33-4-1

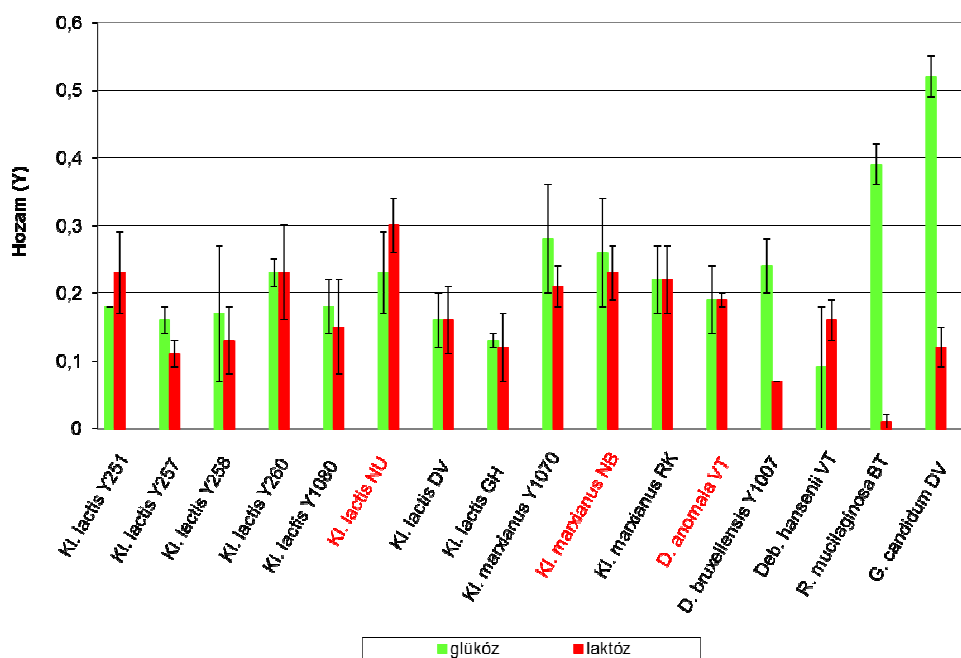
A *S. fibuligera* CCY 42-3-1 azért lett kiválasztva, mert ez mutatta a legjobb biomassza hozamot. Egysejtű sarjadzó élesztőgomba, amely a keményítőt aerob úton (légzéssel) bontja le.

A *Deb. occidentalis* törzsek morfológiájukban hasonlítanak a *S. fibuligera* törzsekhez, azonban ezek képesek a keményítő anaerob erjesztésére is.

A *L. kononenkoe* CCY 33-4-1-et azért választottam ki, mert fonalasodása révén hasznos lehet az immobilizálás szempontjából. A *S. fibuligera* CCY 42-3-1-hez hasonlóan ez a faj sem képes erjesztéssel asszimilálni a keményítőt.

5.2. Élesztőgomba törzsek szűrése laktóz hasznosítás szempontjából

A tejipari melléktermékek nagyrészt laktóz szénforrást tartalmaznak, ezért olyan fajok törzseit szűrtem laktóz tartalmú táptalajon való szaporodás szempontjából, amelyek ezt a szénforrást hasznosítani képesek. A törzsek egy része törzsgyűjteményben fenntartott törzs volt, másrészüket pedig korábban, tanszékünkön VASDINYEI (2003) tejtermékek felületéről izolálta. A *K. lactis* és *K. marxianus* fajok a legismertebbek ilyen szempontból és biotechnológiai alkalmazásuk is sokrétű. A *Dekkera* és *Debaryomyces* nemzetségekhez tartozó fajoknál is jellemző lehet a laktóz hasznosítás, de a *Rhodotorula*, *Schizosaccharomyces* és *Geotrichum* fajoknál nem ismert. Vizsgálataim igazolták ezeket a faji vagy nemzetségi jellemzőket, mivel a tejtermékekről izolált törzsek egyike sem volt képes a laktózt egyedüli szénforrásként hasznosítani, valószínűleg a tejtermékek tejsav tartalmát asszimilálva tudtak szaporodni. Valamennyi *Kluyveromyces* törzs jól szaporodott azonban laktózon, de a termelt biomassa szempontjából eltéréseket tapasztaltam (21. ábra).



21. ábra Laktóz hasznosító élesztőgomba törzsek szaporodása glükózon és laktózon

Legjobbnak a tejtermékekből izolált törzsek, a *K. lactis* NU, a *K. marxianus* NB és a *D. anomala* VT bizonyultak, ezért ezeket választottam ki további vizsgálatokhoz, mint legnagyobb sejthozamot mutató törzseket. Egyes törzsek szaporodása laktózon megközelítette, sőt esetenként meg is haladta a glükózon mutatott szaporodást, ami laktofíliára utal (KÁKONYI és mtsi., 2005).

5.3. A kiválasztott élesztőtörzsek biomassa előállításának vizsgálata és optimalálása

A szén- és nitrogén források jelentős szerepet játszanak a mikroorganizmusok növekedésében. Céлом volt a szén- és nitrogénforrások koncentrációjának és arányának optimalálása. Központi elrendezésű kísérlettervezési módszert alkalmaztam a táptalajkomponensek optimális koncentrációjának meghatározására.

A kísérlet során különböző szerves és szervetlen N-forrásokat (élesztőkivonat és ammonium-szulfát) kombináltam különböző C-forrásokkal (glükóz, keményítő és laktóz). Kontroll kísérlet folyamán glükózon való szaporodást vizsgáltam élesztőkivonat, majd ammónium-szulfát jelenlétében. Továbbiakban glükóz helyett keményítő szénforráson ismételtam meg a kísérletet *S. fibuligera* CCY 42-3-1, *Deb. occidentalis* Y758, *Deb. occidentalis* CCY 47-3-9 és *L. kononenkoe* CCY 33-4-1 törzsekkel, ill. laktóz szénforráson *K. lactis* NU, *K. marxianus* NB és *D. anomala* VT élesztőgombák esetén.

Méréseim során hasonló szaporodási görbéket kaptam az egyes törzseknél, ezeket vettem alapul a matematikai modell alkalmazásához. Optimális értékelésnél, általános elvként, a szaporodási stacioner fázis kezdeténél kapott értékekkel végeztem el a sztatistikai értékelést. A glükóz és laktóz hasznosító törzseknél a szaporodási kinetika meghatározása Multiskan berendezés segítségével történt a 4.3.6.1. pontban, míg a keményítő hasznosítóknál a 4.3.6.2. pontban leírtak szerint.

5.3.1. A glükóz és élesztőkivonat koncentrációk optimalálása

A monoszaharidok közül a glükóz a gombák döntő többsége számára jól hasznosítható szénforrás. Jó alapanyagnak számít mind a légzés, mind pedig a fermentáció folyamán, hiszen bármely élesztő számára minden enzimatis hidrolízis nélkül hozzáférhető (Nelson, 2004).

Munkám során a következő élesztőgomba törzseket alkalmaztam ennél a kísérletnél: *S. fibuligera* CCY 42-3-1, *L. kononenkoe* CCY 33-4-1, *Deb. occidentalis* CCY 47-3-9, *Deb. occidentalis* Y758, *K. lactis* NU, *K. marxianus* NB és *D. anomala* VT.

Az optimalálás során a stacioner fázis kezdeti értékeinél meghatározott OD₅₉₅ értékeket a 5. táblázat mutatja.

5. táblázat: OD_{595nm} értékek egyes törzseknél különböző glükóz és élesztőkivonat koncentrációk mellett a stacioner fázis elérésénél

Kísérleti pont		OD _{595nm}						
		<i>K. lactis</i> NU	<i>K. marxianus</i> NB	<i>D. anomala</i> VT	<i>S. fibuligera</i> CCY 42-3-1	<i>L. kononenkoe</i> CCY 33-4-1	<i>Deb. occidentalis</i> CCY 47-3-9	<i>Deb. occidentalis</i> Y758
glükóz (g/L)	élesztő kivonat (g/L)	15 óra	7 óra	8 óra	6 óra	23 óra	8 óra	8 óra
15	5	1,07	1,37	1,18	1,22	1,39	1,08	2,60
15	9,2	0,94	1,31	1,26	1,17	1,28	0,94	1,99
29,2	5	0,99	1,33	1,22	1,21	1,24	1,12	2,43
15	0,8	0,84	0,92	0,88	1,15	1,29	1,09	2,70
0,8	5	0,36	0,34	0,33	1,12	1,52	1,16	2,83
25	8	1,00	1,20	1,40	1,26	1,29	1,09	1,98
25	2	1,03	1,27	1,28	1,27	1,27	1,19	2,67
5	2	0,82	0,82	0,81	1,21	1,28	1,19	2,67
5	8	0,75	0,80	0,77	1,24	1,15	1,25	2,33

A *S. fibuligera* CCY 42-3-1 mutatta a leggyorsabb növekedést. Itt a sejtek már 6 óra elteltével beléptek a stacioner fázisba, nem sokkal utána követte ezt a *Deb. occidentalis* Y758 és a *Deb. occidentalis* CCY 47-3-9 is, majd a *K. marxianus* NB, a *D. anomala* VT, nem sokkal utánuk pedig a *K. lactis* NU, míg a *L. kononenkoe* CCY 33-4-1 csak jóval később, 23 óra után került ugyanebbe az állapotba.

A kiválasztott modell alapján regressziós analízist végeztem a STATISTICA 9.0 szoftver csomag segítségével. Variancia analízis után (ANOVA) elvégeztem a lineáris regressziót a modellben szereplő együtthatók meghatározására. A kapott eredményeket a 6. táblázatban mutatom be.

6. táblázat: Regressziós koefficiens (b_i) és a valószínűségi (p) értékek különböző törzseknél

	<i>K. lactis</i> NU		<i>K. marxianus</i> NB		<i>D. anomala</i> VT		<i>S. fibuligera</i> CCY 42-3-1		<i>L. kononenkoe</i> CCY 33-4-1		<i>Deb. occidentalis</i> CCY 47-3-9		<i>Deb. occidentalis</i> Y758	
	15 óra		7 óra		8 óra		6 óra		23 óra		8 óra		8 óra	
	b_i	p	b_i	p	b_i	p	b_i	p	b_i	p	b_i	p	b_i	p
b_0	0,29	0,43	-0,08	0,87	0,28	0,48	1,11	0,01	1,29	0,02	1,18	0,01	2,56	0,00
b_1	0,07	0,10	0,11	0,05	0,07	0,09	0,01	0,67	0,00	0,95	-0,01	0,54	0,00	0,79
b_2	-0,00	0,13	0,00	0,09	-0,00	0,16	-0,00	0,88	0,00	0,75	0,00	0,38	-0,00	0,94
b_3	0,06	0,57	0,16	0,31	0,03	0,83	0,02	0,76	0,06	0,56	0,02	0,83	0,12	0,10
b_4	-0,00	0,52	-0,01	0,35	-0,00	0,85	-0,00	0,84	-0,01	0,40	-0,00	0,92	-0,02	0,04
b_5	0,00	0,89	0,00	0,90	0,00	0,64	0,00	0,79	0,00	0,60	-0,00	0,46	-0,00	0,10

A 95%-ban szignifikáns értékeket pirossal jelöltem.

Ennek alapján a következő leíró modelleket tartom elfogadhatónak:

$$Y_{KL} = 0,29 + 0,07 \cdot x_1 + 0,06 \cdot x_1^2$$

$$Y_{KM} = -0,08 + 0,11 \cdot x_1 + 0,16 \cdot x_1^2 - 0,01 \cdot x_1 \cdot x_2$$

$$Y_{DA} = 0,28 + 0,07 \cdot x_1 + 0,03 \cdot x_2$$

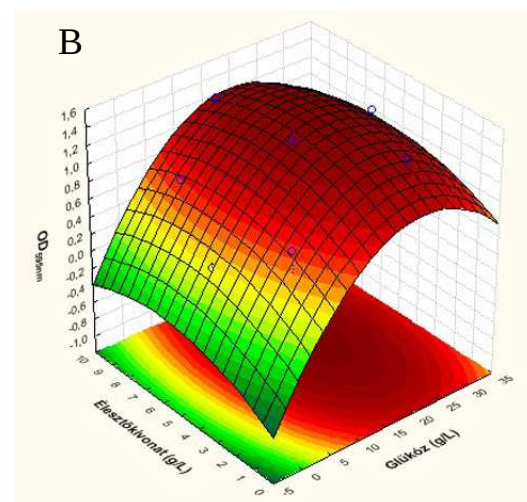
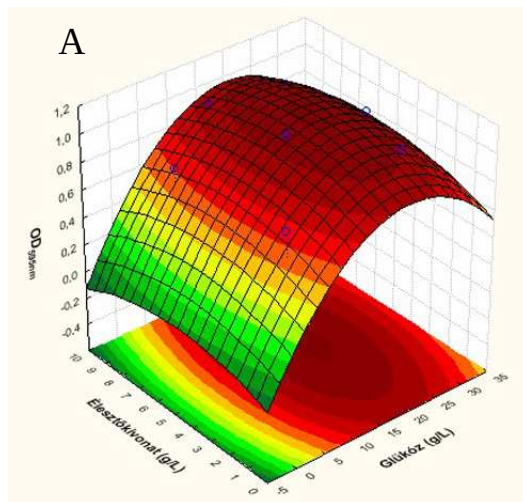
$$Y_{SF} = 1,11 + 0,01 \cdot x_1 + 0,02 \cdot x_1^2$$

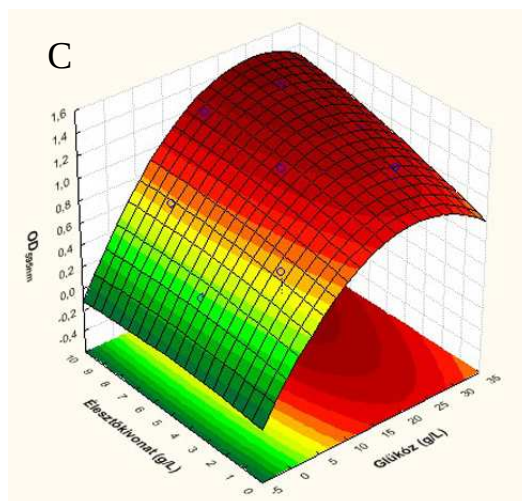
$$Y_{LK} = 1,29 + 0,06 \cdot x_1^2 - 0,01 \cdot x_1 \cdot x_2$$

$$Y_{DO_{ccy}} = 1,18 - 0,01 \cdot x_1 + 0,02 \cdot x_1^2$$

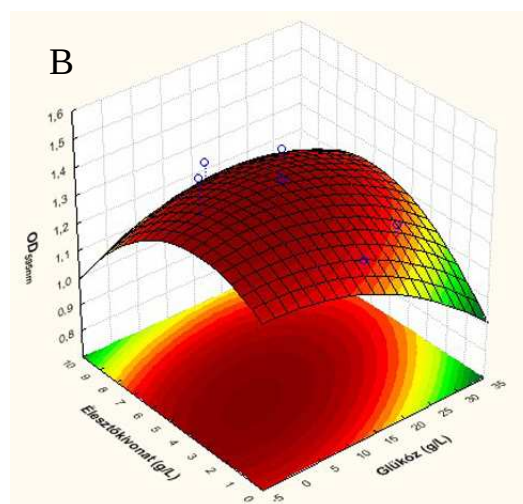
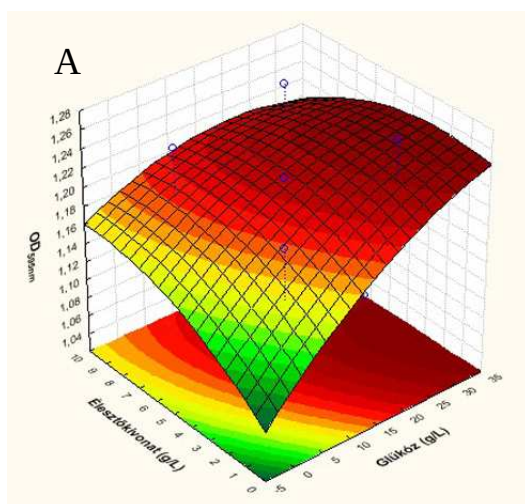
$$Y_{DO_y} = 2,56 + 0,12 \cdot x_1^2 - 0,02 \cdot x_1 \cdot x_2$$

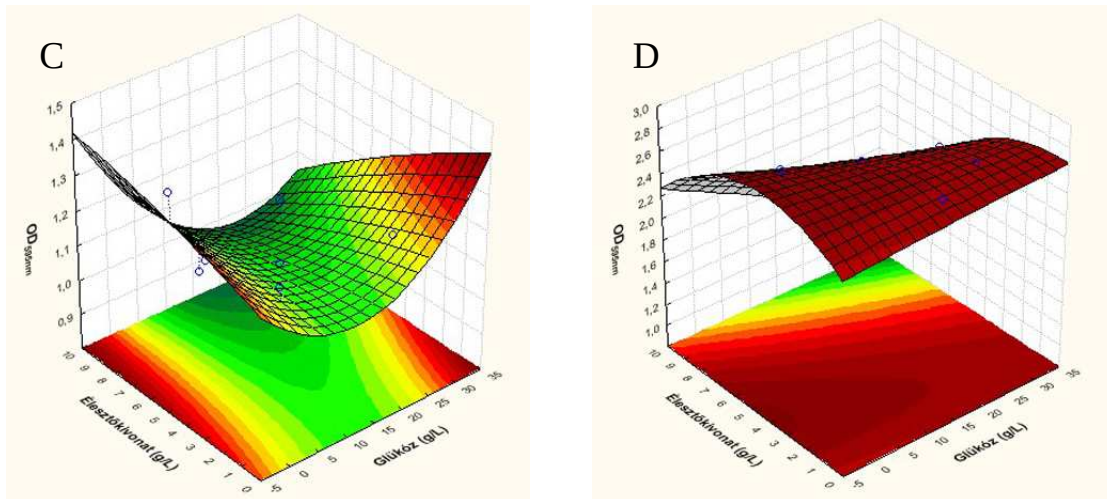
A sejttömeg alakulását a glükóz és az élesztőkivonat koncentráció függvényében a 22-23. ábrákon mutatom be:





22. ábra *K. lactis* NU (A.), *K. marxianus* NB (B.) és *D. anomala* VT (C.) sejtömeg alakulása a glükóz és az élesztőkivonat koncentráció függvényében





23. ábra *S. fibuligera* CCY 42-3-1 (A.), *Deb. occidentalis* Y758 (B.), *Deb. occidentalis* CCY 47-3-9 (C.) és *L. kononenkoe* CCY 33-4-1 (D.) sejtömeg alakulása a glükóz és az élesztőkivonat koncentráció függvényében

5.3.2. A glükóz és az ammónium-szulfát koncentrációk optimalálása

Ebben a kísérletben a *S. fibuligera* CCY 42-3-1, a *Deb. occidentalis* CCY 42-3-1 és a *Deb. occidentalis* Y758 élesztőgomba törzsekkel dolgoztam, ahol az ammónium-szulfát glükózzal való együttes hatását vizsgáltam a biomassza hozamára nézve. A *L. kononenkoe* CCY 33-4-1 nagyon rosszul szaporodott szervesetlen nitrogénforráson, ezért nem lehetett mérni a szaporodását sem glükóz -, sem pedig keményítő és ammónium-szulfát kombinációban (5.3.4. fejezet).

A kiválasztott modell alapján regressziós analízist, majd a modellben szereplő együttthatók meghatározására lineáris regressziót végeztem. A kapott eredményeket a 6-7. táblázatok mutatják.

6. táblázat: OD_{595nm} értékek egyes törzseknél különböző glükóz és ammónium-szulfát koncentrációk jelenléte mellett a stacioner fázis elérésénél

Kísérleti pont		OD _{595nm}		
		<i>S. fibuligera</i> CCY 42-3-1	<i>Deb. occidentalis</i> CCY 47-3-9	<i>Deb. occidentalis</i> Y758
glükóz (g/L)	ammónium szulfát (g/L)	24 óra	24 óra	24 óra
15	5	0,75	0,72	1,91
15	9,2	1,04	0,77	2,16
29,2	5	1,06	0,78	1,86
15	0,8	0,98	0,97	1,57
0,8	5	1,08	0,89	1,29
25	8	1,02	0,81	2,00
25	2	0,77	0,82	1,68
5	2	1,17	0,85	1,74
5	8	0,93	0,78	2,03

7. táblázat: Regressziós koeficiens (b_i) és a valószínűségi (p) értékek különböző törzseknél

Regressziós koeficiens	<i>S. fibuligera</i> CCY 42-3-1 24 óra		<i>Deb. occidentalis</i> CCY 47-3-9 24 óra		<i>Deb. occidentalis</i> Y758 24 óra	
	b _i	p	b _i	p	b _i	p
b ₀	1,74	0,00	1,15	0,00	1,24	0,09
b ₁	-0,07	0,03	-0,02	0,22	0,05	0,36
b ₂	0,00	0,06	0,00	0,27	-0,00	0,38
b ₃	-0,18	0,05	-0,10	0,12	0,04	0,81
b ₄	0,01	0,10	0,01	0,17	0,00	0,92
b ₅	0,00	0,06	0,00	0,66	0,00	0,95

A 95%-ban szignifikáns értékeket pirossal jelöltem

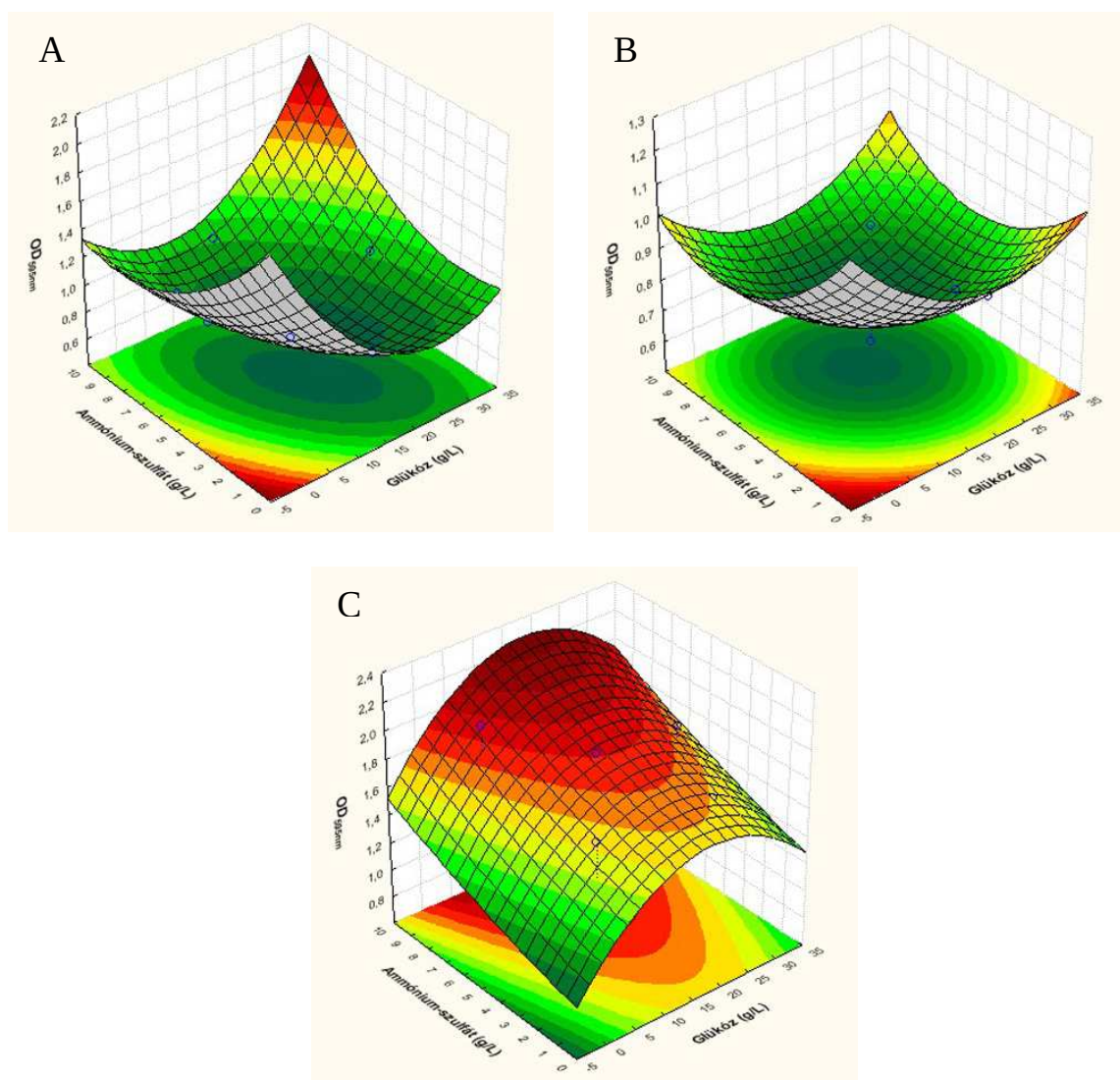
Ennek alapján a következő leíró modelleket tartom elfogadhatónak:

$$Y_{SF} = 1,72 - 0,07 \cdot x_1 - 0,18 \cdot x_1^2 + 0,01 \cdot x_1 \cdot x_2$$

$$Y_{DOccy} = 1,15 - 0,02 \cdot x_1 - 0,10 \cdot x_1^2 + 0,01 \cdot x_1 \cdot x_2$$

$$Y_{DOy} = 1,24 + 0,05 \cdot x_1 + 0,04 \cdot x_1^2$$

A sejttömeg alakulását a glükóz és az ammónium-szulfát koncentráció függvényében 24. ábrákon mutatom be:



24. ábra *Deb. occidentalis* CCY 47-3-9 (A), *S. fibuligera* CCY 42-3-1 (B) és *Deb. occidentalis* Y758 (C) sejttömeg alakulása a glükóz és az ammónium-szulfát koncentráció függvényében

5.3.3. A keményítő és élesztőkivonat koncentrációk optimalizálása

Ennél a kísérletnél a *S. fibuligera* CCY 42-3-1, a *L. kononenkoe* CCY 33-4-1, a *Deb. occidentalis* CCY 42-3-1 és a *Deb. occidentalis* Y758 élesztőgomba törzsekkel dolgoztam, melynek során a keményítő és az élesztőkivonat együttes hatását vizsgáltam a biomassza termelésre nézve. A kapott eredményeket a 8. táblázat mutatja.

8. táblázat: OD_{595nm} értékek egyes törzseknél különböző keményítő és élesztőkivonat koncentrációk jelenléte mellett a stacioner fázis elérésénél

Kísérleti pont		OD _{595nm}			
		<i>S. fibuligera</i> CCY 42-3-1 20 óra	<i>L. kononenkoe</i> CCY 33-4-1 20 óra	<i>Deb. occidentalis</i> CCY 47-3-9 20 óra	<i>Deb. occidentalis</i> Y758 7 óra
keményítő (g/L)	élesztőkiv. (g/L)				
15	5	2,04	0,71	2,48	1,15
15	9,2	2,29	0,98	2,38	1,16
29,2	5	1,32	0,77	2,78	2,46
15	0,8	1,51	0,56	2,00	2,36
0,8	5	1,42	0,61	1,59	1,21
25	8	2,30	0,89	2,77	2,50
25	2	2,11	0,83	2,67	2,44
5	2	1,20	0,95	2,14	2,06
5	8	2,11	0,86	2,12	2,12

A *Deb. occidentalis* Y758 mutatta a leggyorsabb növekedést, a kultúra már 7 óra után elérte a stacioner fázist. Ezzel szemben a másik három törzs csak 20 óra elteltével került ugyanebbe az állapotba. A kapott eredményekre másodfokú polinomot illesztve kaptam meg a regressziós koeficienseket és a valószínűségi értékeket, melyeket a 9. táblázatban tüntettem fel.

9. táblázat: Regressziós koeficiens (b_i) és a valószínűségi (p) értékek különböző törzseknél

Regressziós koeficiens	<i>S. fibuligera</i> CCY 42-3-1 20 óra		<i>L. kononenkoe</i> CCY 33-4-1 20 óra		<i>Deb. occidentalis</i> CY 47-3-9 20 óra		<i>Deb. occidentalis</i> Y758 7 óra	
	b_i	p	b_i	p	b_i	p	b_i	p
b_0	0,38	0,67	0,92	0,13	1,46	0,08	3,25	0,09
b_1	0,12	0,18	-0,01	0,75	0,06	0,31	-0,11	0,42
b_2	-0,00	0,29	0,00	0,81	-0,00	0,58	0,00	0,26
b_3	0,18	0,53	-0,07	0,62	0,10	0,58	-0,55	0,27
b_4	0,00	0,98	0,01	0,57	-0,01	0,59	0,05	0,29
b_5	-0,01	0,38	0,00	0,72	0,00	0,82	0,00	1,00

Ennek alapján a következő leíró modelleket tartom elfogadhatónak:

$$Y_{SF} = 0,38 + 0,12 \cdot x_1 + 0,18 \cdot x_1^2 - 0,01 \cdot x_2^2$$

$$Y_{LK} = 0,92 - 0,01 \cdot x_1 - 0,07 \cdot x_1^2 + 0,01 \cdot x_1 \cdot x_2$$

$$Y_{DOccy} = 1,46 + 0,06 \cdot x_1 + 0,10 \cdot x_1^2 - 0,01 \cdot x_1 \cdot x_2$$

$$Y_{DOy} = 3,25 - 0,11 \cdot x_1 - 0,55 \cdot x_1^2 + 0,05 \cdot x_1 \cdot x_2$$

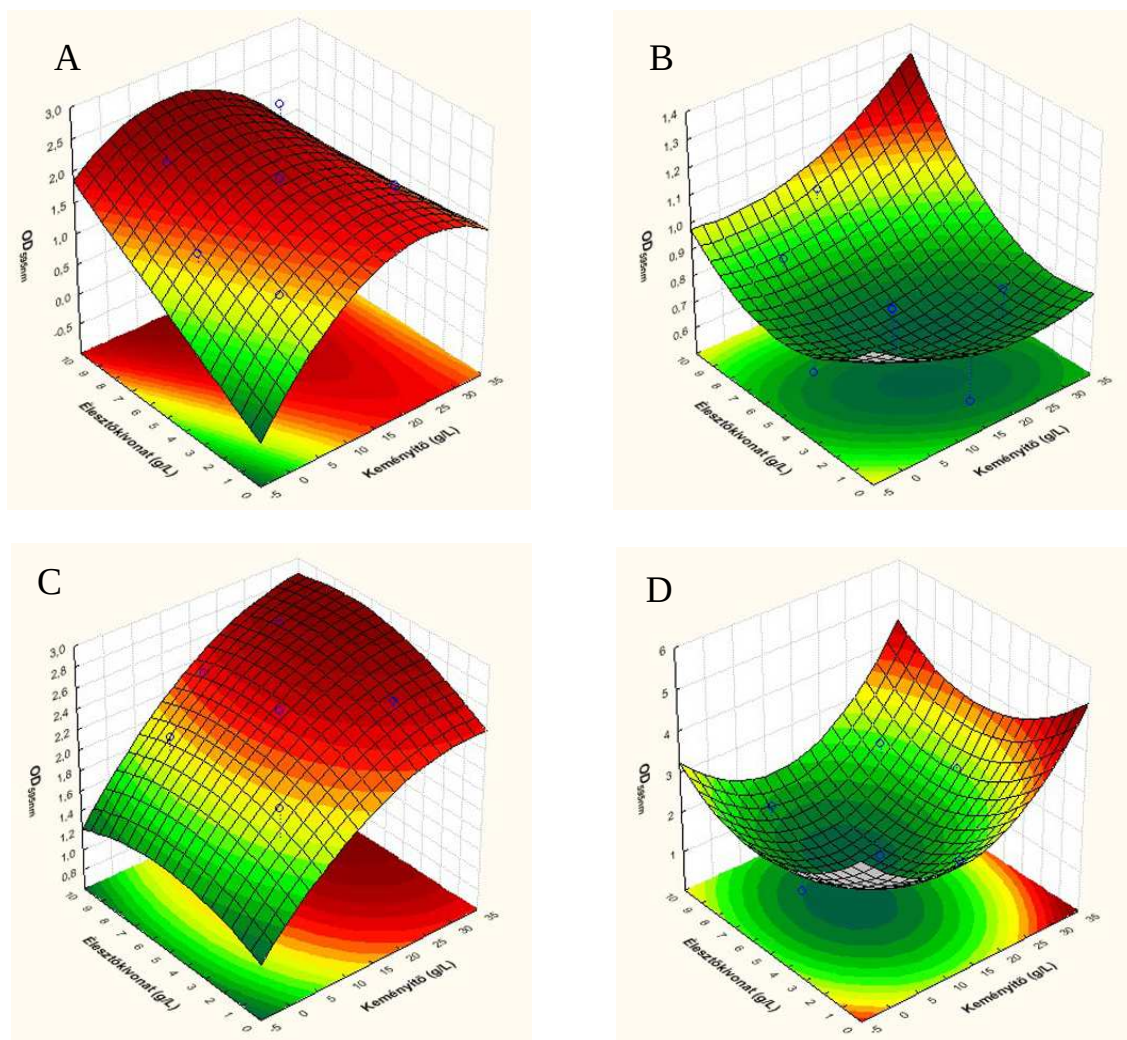
A *S. fibuligerea* CCY 42-3-1 esetében egyik regressziós együttható sem mutatott jelentős hatásokat a 95%-os szignifikancia szint mellett. Egyes tényezők hatása azt mutatja, hogy az élesztőkivonat koncentrációjának megnövelése és a keményítő koncentrációjának csökkentése magasabb biomassza hozamot kellene eredményeznie.

A *L. kononenkoe* CCY 33-4-1 esetében sem mutatott egyik regressziós együttható sem jelentős hatásokat a 95%-os bizonyossági szint mellett, viszont az eredményekből levonhatjuk azt a következtetést, hogy a két faktor koncentrációjának növelése a biomassza növekedését eredményezi.

A *Deb.occidentalis* CCY 43-3-9 élesztőgomba esetében a b_0 és b_5 értékek úgy tűnik, hogy 95%-ban szignifikánsak. Ez azt jelenti, hogy a két tényező kölcsönhatásban áll egymással a vizsgált tartományon belül. A kapott eredményekből levonhatjuk azt a következtetést, hogy az élesztőkivonat optimuma a 0,4% - 0,7% közötti tartományba esik, és a keményítő koncentráció megnövelése a biomassza emelkedését eredményezheti.

A *Deb.occidentalis* Y758 esetében az élesztőkivonat koncentráció optimuma 0,7%, míg a keményítő koncentrációjának az optimuma 2,1% kellene, hogy legyen az optimális biomassza eredményezés érdekében.

A sejttömeg alakulását a keményítő és az élesztőkivonat függvényében a 25. ábrán mutatom be. A kapott felületekről leolvasható a két faktor optimális értéke az egyes törzsek esetében: *S. fibuligera* CCY 42-3-1 (keményítő 25 g/L és élesztőkivonat 8 g/L); *L. kononenkoe* CCY 33-4-1 (keményítő 30 g/L és élesztőkivonat 15 g/L), *Deb. occidentalis* CCY 47-3-1 (keményítő 30 g/L és élesztőkivonat 7 g/L); *Deb. occidentalis* Y758 (keményítő 23 g/L és élesztőkivonat 7 g/L).



25. ábra *S. fibuligera* CCY 42-3-1 (A.), *L. kononenkoe* CCY 33-4-1 (B.), *Deb. occidentalis* CCY 47-3-9 (C.), és *Deb. occidentalis* Y758 (D.) sejtömeg alakulása a keményítő és az élesztőkivonat koncentráció függvényében

5.3.4. A keményítő és az ammónium-szulfát koncentrációk optimalizálása

Ehhez a kísérlethez a *S. fibuligera* CCY 42-3-1, *Deb. occidentalis* CCY 47-3-9 és a *Deb. occidentalis* Y758 keményítő hasznosító törzseket választottam ki. A kapott eredményeket a 11-12. táblázatokban és 26. ábrán mutatom be.

11. táblázat OD_{595nm} értékek egyes törzseknél különböző keményítő és ammónium-szulfát koncentrációk jelenléte mellett a stacioner fázis elérésénél

Kísérleti pont		OD _{595nm}		
		<i>S. fibuligera</i> CCY 42-3-1	<i>Deb. occidentalis</i> CCY 47-3-9	<i>Deb. occidentalis</i> Y758
keményítő (g/L)	ammónium szulfát (g/L)	10 óra	8 óra	12 óra
15	5	0,99	0,74	1,69
15	9,2	0,95	0,69	1,74
29,2	5	0,88	0,73	1,63
15	0,8	0,94	0,93	1,58
0,8	5	0,89	0,54	1,01
25	8	0,89	0,69	1,52
25	2	1,03	0,86	1,74
5	2	1,02	0,74	1,49
5	8	0,95	0,46	1,25

12. táblázat: Regressziós koeficiens (b_i) és a valószínűségi (p) értékek különböző törzseknél

Regressziós koeficiens	<i>S. fibuligera</i> CCY 42-3-1 10 óra		<i>Deb. occidentalis</i> CCY 47-3-9 8 óra		<i>Deb. occidentalis</i> Y758 12 óra	
	b_i	p	b_i	p	b_i	p
b_0	0,89	0,01	0,79	0,00	1,05	0,06
b_1	0,01	0,39	0,02	0,06	0,07	0,11
b_2	-0,00	0,41	-0,00	0,07	-0,00	0,14
b_3	0,01	0,85	-0,07	0,07	0,00	0,99
b_4	-0,00	0,84	0,00	0,33	-0,00	0,90
b_5	-0,00	0,65	0,00	0,27	0,00	0,94

A 95%-ban szignifikáns értéketket pirossal jelöltem.

Ennek alapján a következő leíró modelleket tartom elfogadhatónak:

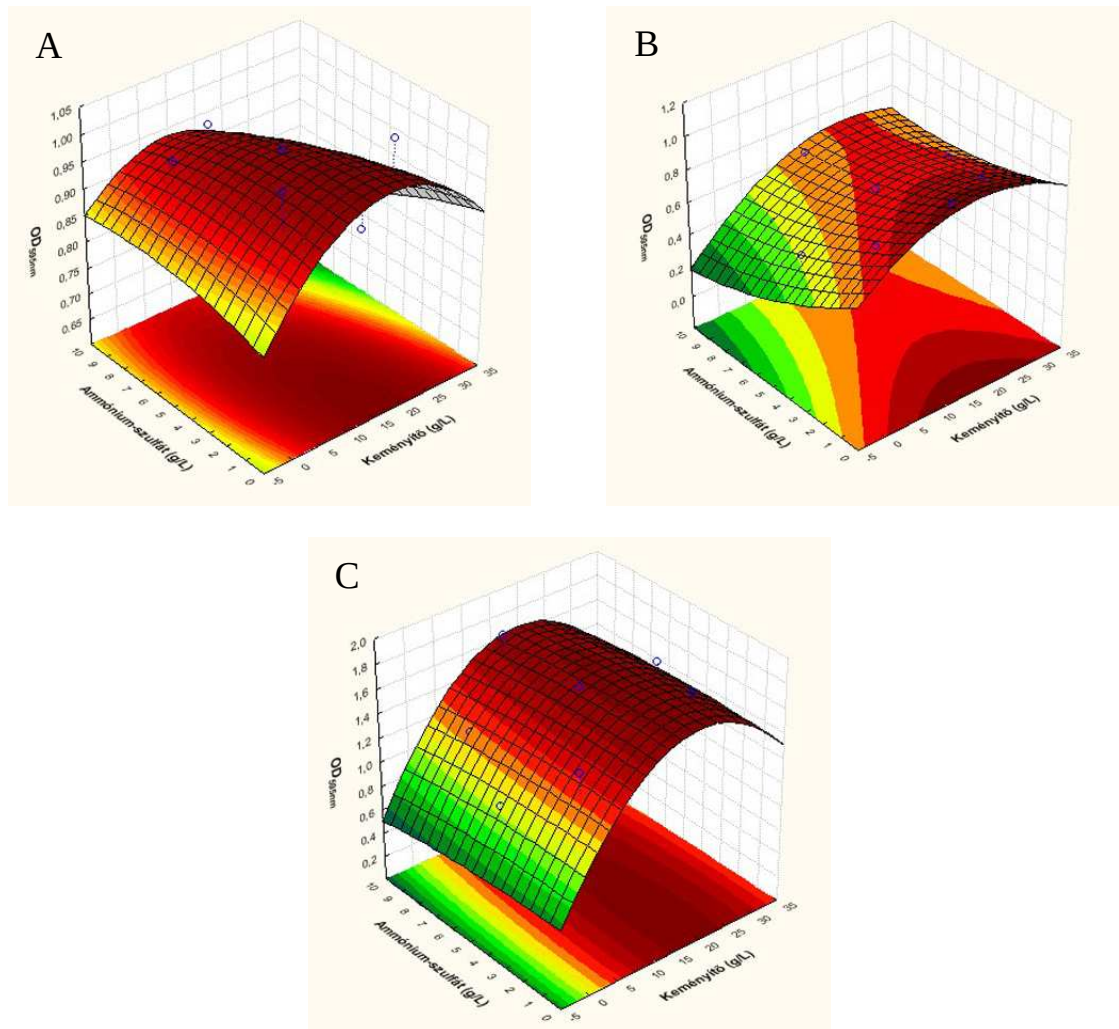
$$Y_{SF} = 0,89 + 0,01 \cdot x_1 + 0,01 \cdot x_1^2$$

$$Y_{DOccy} = 0,79 + 0,02 \cdot x_1 - 0,07 \cdot x_1^2$$

$$Y_{DOy} = 1,05 + 0,07 \cdot x_1$$

A sejttömeg alakulását a keményítő és az ammónium-szulfát koncentráció függvényében a 26. ábrakon mutatom be. A kapott felületekről leolvasható a két faktor optimális értéke az egyes törzsek

esetében: *S. fibuligera* CCY 42-3-1 (keményítő 25 g/L és élesztőkivonat 8 g/L); *Deb. occidentalis* CCY 47-3-1 (keményítő 30 g/L és élesztőkivonat 7 g/L); *Deb. occidentalis* Y758 (keményítő 23 g/L és élesztőkivonat 7 g/L).



26. ábra *S. fibuligera* CCY 42-3-1 (A), *Deb. occidentalis* CCY 47-3-9 (B), és *Deb. occidentalis* Y758 (C) sejttömeg alakulása a keményítő és az ammónium-szulfát koncentráció függvényében

5.3.5. A laktóz és az élesztőkivonat koncentrációk optimalálása

Ehhez a kísérlethez a *K. lactis* NU, *K. marxianus* NB és a *D. anomala* VT laktóz hasznosító törzseket választottam ki. A kapott eredményeket a 13-14. táblázatokban és 27. ábrán tüntettem fel.

13. táblázat OD_{595nm} értékek egyes törzseknél különböző laktóz és élesztőkivonat koncentrációk jelenléte mellett a stacioner fázis elérésénél

Kísérleti pont		OD _{595nm}		
		<i>K. lactis</i> NU	<i>K. marxianus</i> NB	<i>D. anomala</i> VT
laktóz (g/L)	élesztő kivonat (g/L)	25 óra	13 óra	15 óra
15	5	0,82	1,18	1,21
15	9,2	1,13	1,13	1,33
29,2	5	0,73	1,48	1,48
15	0,8	0,72	0,87	0,83
0,8	5	0,47	0,30	0,29
25	8	1,24	1,38	1,38
25	2	0,69	1,14	1,16
5	2	0,64	0,74	0,75
5	8	1,40	0,75	0,73

A 13. táblázat adataiból látható, hogy az exponenciális fázis végének eléréséhez laktóz szénforráson a törzsek kb. kétszer több időt igényeltek, mint glükózon (5. táblázat). A kapott regressziós koeficienseket és valószínűségi értékeket a 14. táblázat mutatja.

14. táblázat Regressziós koeficiens (b_i) és a valószínűségi (p) értékek különböző törzseknél

Regressziós koeficiens	<i>K. lactis</i> NU 25 óra		<i>K. marxianus</i> NB 13 óra		<i>D. anomala</i> VT 15 óra	
	b_i	p	b_i	p	b_i	p
b_0	0,44	0,51	0,19	0,61	0,14	0,74
b_1	0,03	0,62	0,06	0,11	0,07	0,12
b_2	-0,00	0,75	0,00	0,21	0,00	0,20
b_3	-0,02	0,92	0,08	0,47	0,07	0,57
b_4	0,01	0,51	-0,01	0,43	-0,01	0,58
b_5	-0,00	0,71	0,00	0,47	0,00	0,52

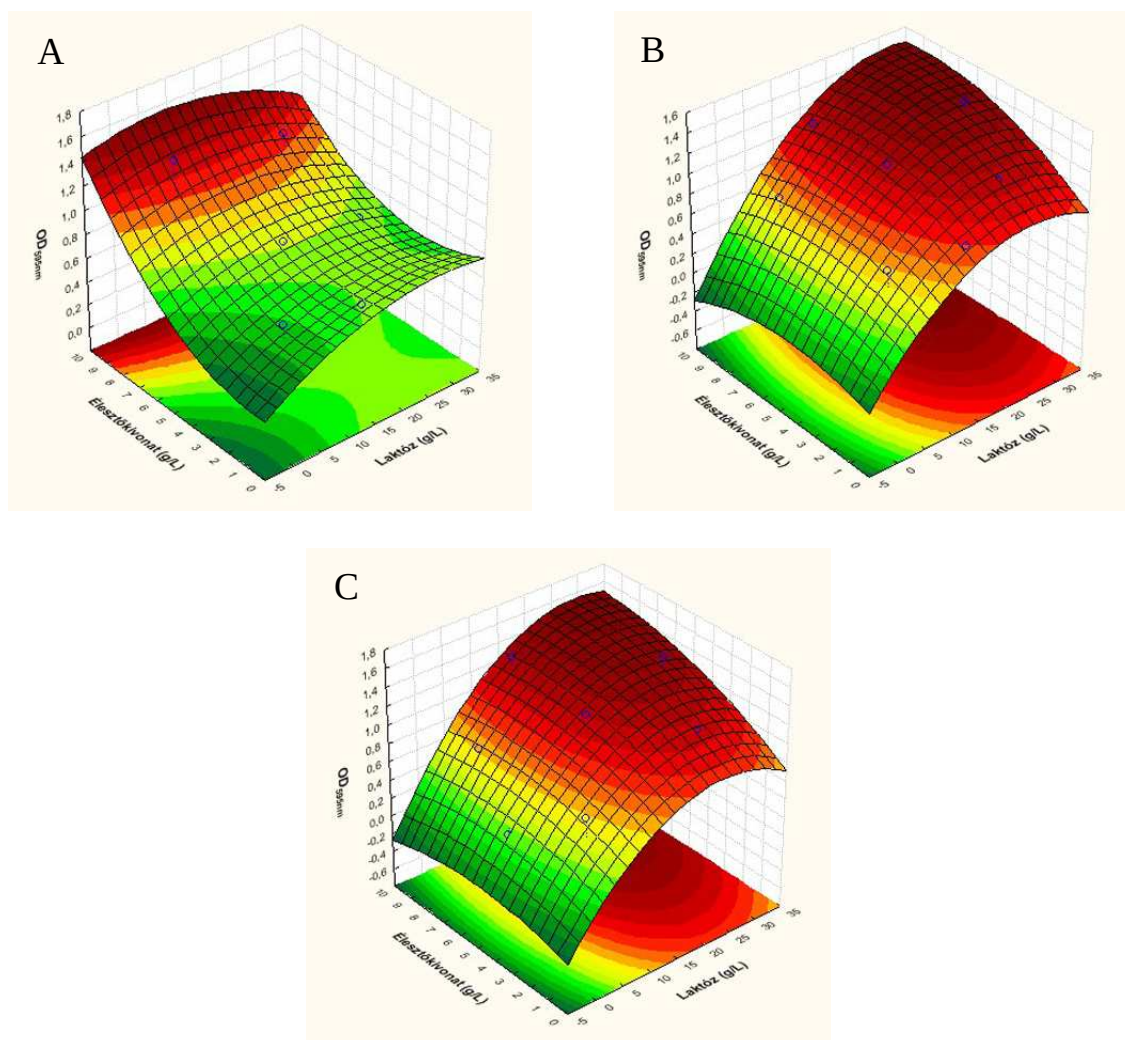
Ennek alapján a következő leíró modelleket tartom elfogadhatónak:

$$Y_{KL} = 0,44 + 0,03 \cdot x_1 - 0,02 \cdot x_1^2 + 0,01 \cdot x_1 \cdot x_2$$

$$Y_{KM} = 0,19 + 0,06 \cdot x_1 + 0,08 \cdot x_1^2 - 0,01 \cdot x_1 \cdot x_2$$

$$Y_{DA} = 0,14 + 0,07 \cdot x_1 + 0,07 \cdot x_1^2 - 0,01 \cdot x_1 \cdot x_2$$

Az optimálisnak vélt értékek alapján a *K. lactis* NU esetében maximális biomassza hozamot laktóz C-forráson 1,5-2%-os laktóz tartalom mellett érhetünk el, és az élesztőkivonat koncentrációjának növelésével a keletkező biomassza mennyiség is növekedhet. A 27. ábrákon láthatjuk a biomassza alakulását, laktóz és élesztőkivonat függvényében.



27. ábra *K. lactis* NU (A.), *K. marxianus* NB (B.) és a *D. anomala* VT (C.) sejttömeg alakulása a laktóz és az élesztőkivonat koncentráció függvényében

5.3.6. A laktóz és az ammónium-szulfát koncentrációk optimalálása

Mivel a laktóz - élesztőkivonat kombinációkban a *K. marxianus* NB lényegesen gyorsabb szaporodást mutatott, mint a *K. lactis* NU törzs, ezért ezt a kísérletet csak a *K. marxianus* NB és a *D. anomala* VT törzsekkel végeztem el. A kapott eredményeket a 15-16. táblázatban tüntettem fel.

15. táblázat OD_{595nm} értékek egyes törzseknél különböző laktóz és ammónium - szulfát koncentrációk jelenléte mellett a stationer fázis elérésénél

Kísérleti pont		OD _{595nm}	
		<i>K. marxianus</i> NB	<i>D. anomala</i> VT
laktóz (g/L)	ammónium szulfát (g/L)	45 óra	45 óra
15	5	0,68	0,71
15	9,2	0,69	0,69
29,2	5	0,69	0,68
15	0,8	0,73	0,69
0,8	5	0,39	0,41
25	8	0,72	0,66
25	2	0,71	0,69
5	2	0,55	0,55
5	8	0,54	0,55

16. táblázat: Regressziós koefficiens (b_i) és a valószínűségi (p) értékek különböző törzseknél

Regressziós koefficiens	<i>K. marxianus</i> NB 45 óra		<i>D. anomala</i> VT 45 óra	
	b _i	p	b _i	p
b ₀	0,45	0,00	0,36	0,01
b ₁	0,03	0,01	0,03	0,01
b ₂	0,00	0,01	0,00	0,01
b ₃	-0,02	0,22	0,02	0,49
b ₄	0,00	0,28	0,00	0,53
b ₅	0,00	0,66	0,00	0,63

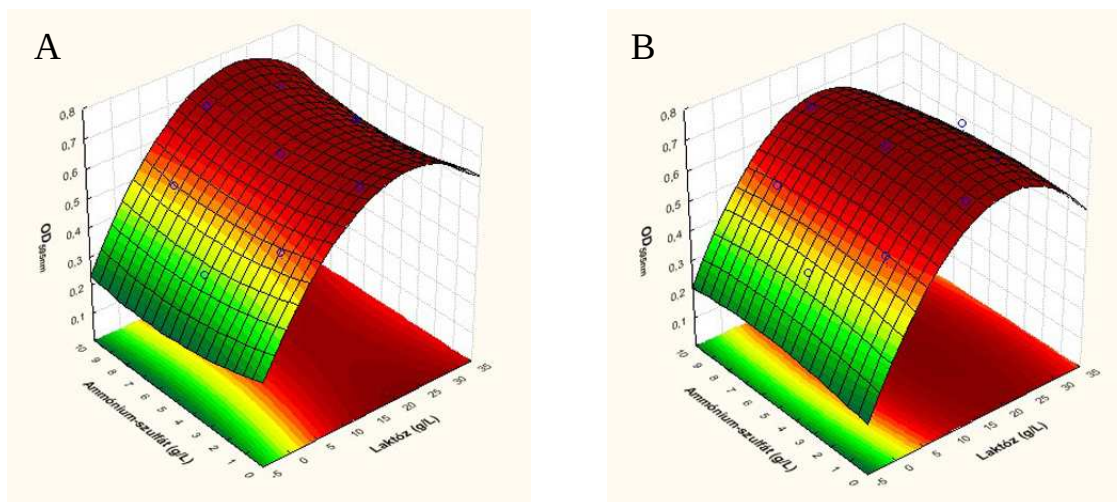
A 95%-ban szignifikáns értéketket pirossal jelöltem.

Ennek alapján a következő leíró modelleket tartom elfogadhatónak:

$$Y_{KM} = 0,45 + 0,03 \cdot x_1 - 0,02 \cdot x_1^2$$

$$Y_{DA} = 0,36 + 0,03 \cdot x_1 + 0,02 \cdot x_1^2$$

A 16. táblázatból leolvasható, hogy mindkét törzs esetében a regressziós koeficiensek 95%-os szignifikancia szinten voltak. A kapott felületekről (28. ábra) leolvasható a két faktor optimális értéke: *K. marxianus* NB (laktóz 23 g/L és ammónium-szulfát 5 g/L), *D. anomala* VT (laktóz 23 g/L és ammónium-szulfát 5 g/L).



28. ábra *K. marxianus* NB (A) és *D. anomala* VT (B) sejttömeg alakulása

Az optimális tápközeg összetételeit az alkalmazott élesztőgomba törzsek esetében különböző C- és N- források mellett a 17. táblázatban foglaltam össze.

A kapott eredményekből megállapítható, hogy ammónium-szulfát, mint fő N – forrás alkalmazása esetén a tápközegben *K. marxianus* NB és *D. anomala* VT maximális sejttömegének eléréséhez kevesebb mennyiségű laktóz szükséges, mint az élesztőkivonat használatánál. A *K. lactis* NU optimális tápközeg összetételét 20 g/L laktóz és 5 g/L élesztőkivonat koncentrációknál kaptam. Az optimális értékeket *K. marxianus* NB és *D. anomala* esetében 30 g/L laktóz és 8 g/L élesztőkivonat, ill. 23 g/L laktóz és 5 g/L ammónium-szulfát koncentrációk mellett értem el.

A keményítőhasznosító élesztőgombák esetében is hasonló a helyzet. A *S. fibuligera* CCY 42-3-1 esetében az optimális keményítő koncentráció 25 g/L, az élesztőkivonat koncentráció értéke pedig 8 g/L-re tehető. Ugyanennél a törzsnél 4 g/l ammónium-szulfát koncentráció mellett a keményítő koncentráció értéke 14 g/L. A *L. kononenkoe* CCY 33-4-1 optimális tápközeg összetételét 30 g/L keményítő és 7 g/L élesztőkivonat értékeknél kaptam. A *Deb. occidentalis* törzsek hasonló koncentrációban igényelnek keményítőt és élesztőkivonatot illetve ammónium-szulfátot az optimális biomassa eléréséhez. Vagyis a *Deb. occidentalis* CCY 47-3-1 esetén az optimális keményítő

koncentráció 30 g/L és az élesztőkivonat 7 g/L. Másik esetben a keményítő értéke 20 g/L, míg az ammónium-szulfáté 3 g/L. A *Deb. occidentalis* Y758 optimális tápközeg összetételét az első esetben 23 g/L keményítő és 7 g/L élesztőkivonat, valamint 22 g/L keményítő és 3,5 g/L ammónium-szulfát értékek mellett értem el.

17. táblázat: Optimális C - és N - forrás koncentrációk az élesztőgombák szaporodásánál

Törzsek	Laktóz g/L	Élesztő- kivonat g/L	Laktóz g/L	Ammónim - szulfát g/L	Keményítő g/L	Élesztő- kivonat g/L	Keményítő g/L	Ammónim - szulfát g/L
<i>K. lactis</i> NU	20	5	-	-	-	-	-	-
<i>D.anomala</i> VT	30	8	23	5	-	-	-	-
<i>K. marxianus</i> NB	30	8	23	5	-	-	-	-
<i>S. fibuligera</i> CCY 42-3-1	-	-	-	-	25	8	14	4
<i>L. kononenkoe</i> CCY 33-4-1	-	-	-	-	30	15	-	-
<i>Deb. occidentalis</i> CCY 47-3-1	-	-	-	-	30	7	20	3
<i>Deb. occidentalis</i> Y758	-	-	-	-	23	7	22	3,5

5.4. A kiválasztott élesztőtörzsek biomassza termelésének vizsgálata és optimalítása rázatott fermentorban

Mivel a mikrolemezes denzitométer segítségével csak a szaporodás detektálható, így annak érdekében, hogy nyomonkövessem az oxigén koncentráció és a pH változását is a fermentáció során, valamint léptéknövelést is végezzek, rázatott lombikos fermentációs kísérleteket végeztem MonitShaker készülékkel a 4.3.7. fejezetben leírtak szerint.

A mikrolemezes denzitometriás szaporodási kísérleteknél kapott regressziós koeficiensek alapján kiválasztottam azokat a kísérleti pontokat (18. táblázat), melyeknél rázatott fermentorban megvizsgáltam a szaporodást, közben pedig mértem a pH és az oldott oxigén-változást. A 5.2. fejezetben leírt mikrotiterlemezes szaporodásmérési kísérleteim során a N-forrás optimalására szerves (élesztőkivonat) és szervetlen (ammónium-szulfát) nitrogénforrást is alkalmaztam. Mivel a maximális

sejttömeg nagyobb volt élesztőkivonaton, mint ammónium-szulfáton, így a továbbiakban csak ezt a nitrogénforrást használtam.

18. táblázat Kísérleti pontok rázatott fermentorban történő C- és N- forrás optimalálása során

Tápközeg száma	x_1	x_2	C-forrás (g/L)	élesztőkivonat (g/L)
1	0	0	15	5
3	$\sqrt{2}$	0	29,2	5
6	1	1	25	8
7	1	-1	25	2
8	-1	-1	5	2

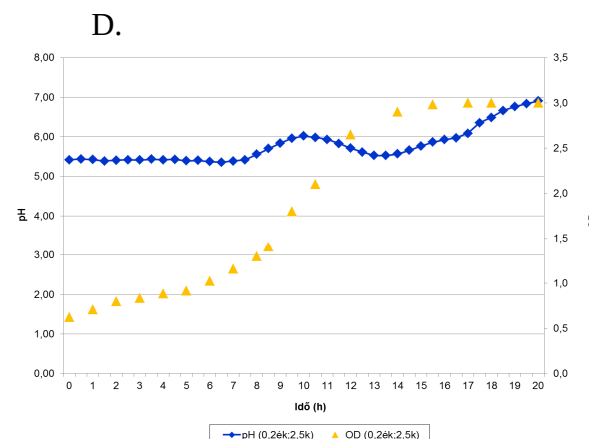
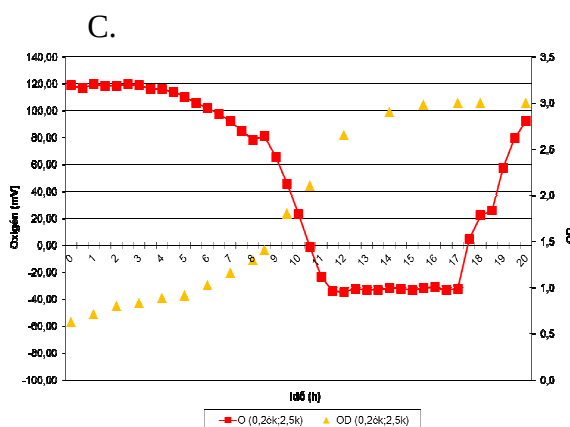
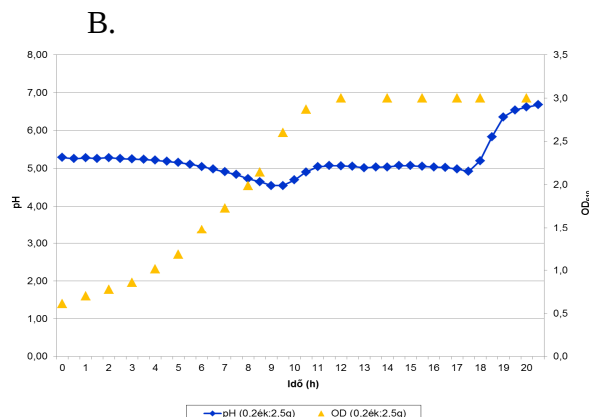
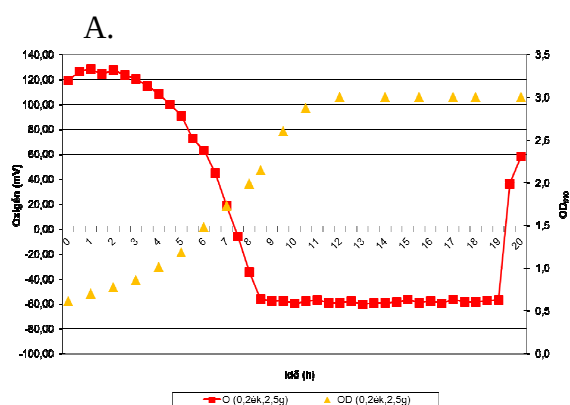
Kísérleteim folyamán az élesztőkivonat és glükóz kombinációkat minden élesztőgomba esetén elvégeztem. A *S. fibuligera* CCY 42-3-1, a *Deb. occidentalis* Y758 és a *Deb. occidentalis* CCY 47-3-9 törzseknél az élesztőkivonat mellett keményítőt alkalmaztam szénforrásként, míg a *K. lactis* NU, a *K. marxianus* NB és a *D. anomala* VT törzseknél laktóz volt a szénforrás.

5.4.1. Glükóz és élesztőkivonat, ill. keményítő és élesztőkivonat optimalálása a biomassza termelésére

A keményítőt hasznosító *S. fibuligera* CCY 42-3-1, *Deb. occidentalis*. Y 758 és *Deb. occidentalis* CCY 47-3-9 törzsek biomassza termelését glükóz, ill. keményítő C-forráson élesztőkivonat jelenléte mellett a 19. táblázatban foglaltam össze. Tipikus szaporodási görbéket láthatunk a példaként bemutatott *Deb. occidentalis* Y758 törzs esetében a 29. ábrán. A szaporodási görbéket összevetve elmondható, hogy hasonló növekedést rátát mutatattak mindkét C-forrás esetén és már a 7. óra környékén beléptek a stacioner fázisba.

19. táblázat OD_{610nm} értékek glükóz és élesztőkivonat jelenléte mellett a stacioner fázis elérésénél

Kísérleti pont		OD _{610nm}					
		glükóz			keményítő		
		<i>Deb. occidentalis</i> Y758	<i>Deb. occidentalis</i> CCY 47-3-1	<i>S. fibuligera</i> CCY 42-3-1	<i>Deb. occidentalis</i> Y758	<i>Deb. occidentalis</i> CCY 47-3-1	<i>S. fibuligera</i> CCY 42-3-1
C-forrás (g/L)	élesztő kivonat (g/L)	7 óra	7 óra	7 óra	7 óra	7 óra	7 óra
15	5	2,64	2,02	2,18	2,46	2,04	2,45
29,2	5	2,43	2,10	2,15	2,44	2,07	1,37
25	8	2,66	1,98	2,23	2,50	2,08	2,70
25	2	1,73	2,11	2,20	1,21	2,06	2,50
5	2	2,60	2,28	2,16	1,15	1,98	2,50



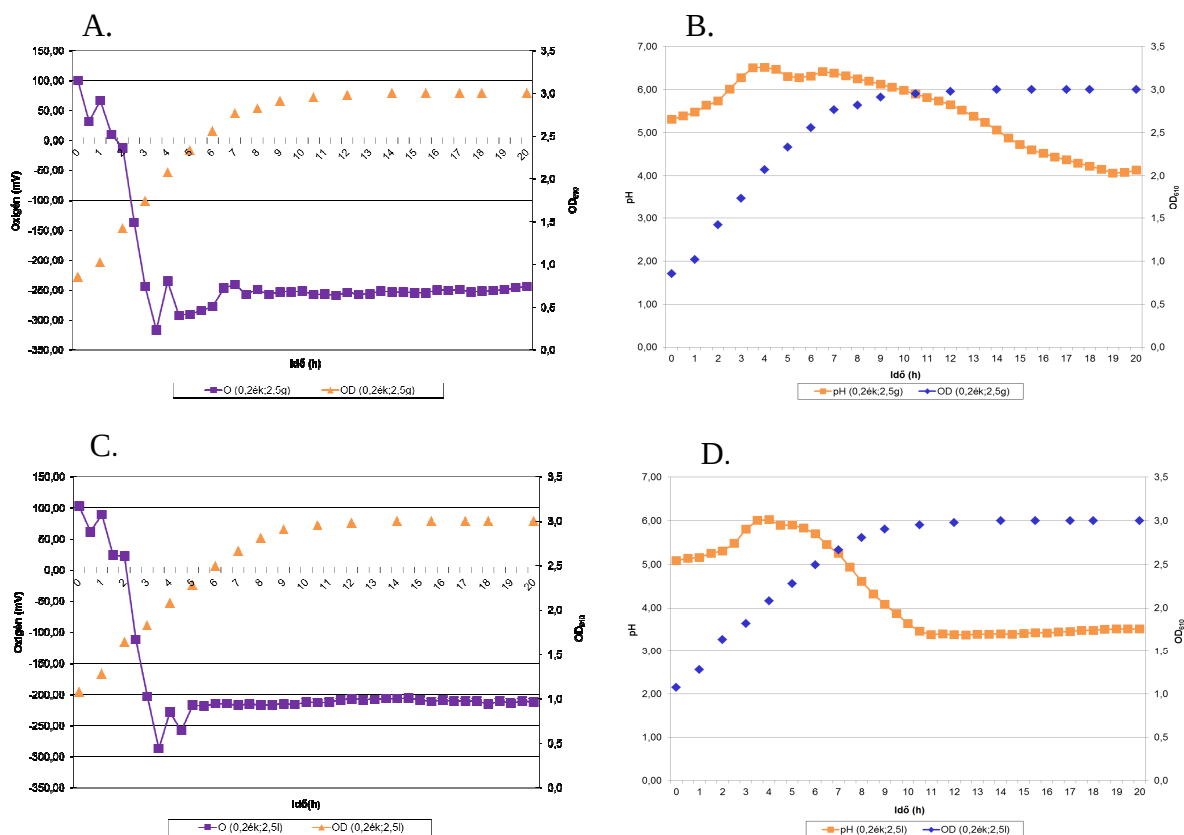
29. ábra A *Deb. occidentalis* Y758 törzs biomassza termelése, a pH és az oxigén tartalom változása 2,5 % glükóz és 0,2% élesztőkivonat (A, B) és 2,5 % keményítő és 0,2% élesztőkivonat (C, D) tartalmú táptalajban

5.4.2. Glükóz és élesztőkivonat, ill. laktóz és élesztőkivonat optimalása biomassza termelésére

A mérés során mindhárom laktóz hasznosító faj törzseire (*K. lactis* NU, *K. marxianus* NB és *D. anomala* VT) hasonló szaporodási görbéket kaptam, függetlenül attól, hogy az alkalmazott C-forrás glükóz vagy laktóz volt. A biomassza alakulását glükóz, ill. laktóz C-forráson élesztőkivonat jelenléte mellett a 20. táblázatban mutatom be. Tipikus szaporodási görbéket mutatok be példaként a *K. lactis* NU törzsnél a 30. ábrán.

20. táblázat OD_{610nm} értékek glükóz és élesztőkivonat jelenléte mellett a stacioner fázis elérésénél

Kísérleti pont		OD _{610nm}					
		glükóz			laktóz		
		<i>K. lactis</i> NU	<i>K. marxianus</i> NB	<i>D. anomala</i> VT	<i>K. lactis</i> NU	<i>K. marxianus</i> NB	<i>D. anomala</i> VT
C-forrás (g/L)	élesztő kivonat (g/L)	7 óra	7 óra	7 óra	7 óra	7 óra	7 óra
15	5	2,67	2,70	2,75	2,63	2,62	2,65
29,2	5	2,61	2,65	2,58	2,48	2,45	2,62
25	8	2,90	2,68	2,70	2,67	2,68	2,70
25	2	2,49	2,57	2,52	2,50	2,47	2,37
5	2	2,77	2,15	1,90	2,67	2,03	2,05



30. ábra *K. lactis* NU biomassza termelése, a pH és oxigén tartalom változása 2,5 % glükóz és 0,2% élesztőkoncent (A, B) valamint 2,5% laktóz és 0,2% élesztőkoncent (C, D) tartalmú táptalajban

A 30. ábra görbéi jól tükrözik, hogy mind glükóz (A, B) mind pedig laktóz (C, D) esetében, a növekedés kezdetén, gyakorlatilag sem lag fázis, sem indukciós szakasz nem volt megfigyelhető. A késői exponenciális fázist a C-források hasznosításától függően, 8-14 óra körül érte el a tenyészet. Az első 3-4 órában az oldott oxigén koncentrációja nagymértékben lecsökkent, ami azt eredményezte, hogy a légzési arány lecsökkent vagy leállt a légzés és valószínűleg elkezdődött az etanolos fermentáció is. A szaporodás korai exponenciális szakaszában a tenyészet anaerob körülmények között volt. Az oldott oxigén hirtelen leesése után, a közép exponenciális szakaszban, az oxigén koncentráció elkezdett növekedni, majd a törzsek a késői exponenciális és a stacioner szakaszokban aerobiózis alatt voltak. Ez a fermentálható C-források (glükóz, laktóz) nagy koncentrációjának, valamint az aerob körülmények között elfogyasztott – az anaerob körülmények alatt termelődött etanol koncentrációnak tulajdonítható etanol-asszimiláció volt. Az abban az esetben lehetséges, ha a mitokondrium funkcionál. A szaporodás exponenciális fázisában a táptalaj pH-ja kissé lecsökkent, ami a CO₂ termelésnek

tulajdonítható. Ha az élesztőkivonat feleslegben volt (C/N arány alacsony volt), a pH növekedésnek indult a késői exponenciális fázis után, ami az NH₃ termelés következménye.

Az optimális tápközeg összetételét az alkalmazott élesztőgomba törzsek esetében különböző C- és N- források mellett a 21. táblázatban foglaltam össze, míg az optimális C- és N-források mellett kapott biomassz és a hozam értékeket a 22. táblázatban tüntettem fel. Az eredmények szerint a legmagasabb értéket keményítő C-forráson a *Deb. occidentalis* Y758 törzsnél kaptam, míg laktóz C-forráson a *K. lactis* NU adta a legjobb biomassza hozamot.

21. táblázat Optimális C - és N - forrás koncentrációk az élesztőgombák szaporodásánál

Törzsek	Változók		Változók	
	Keményítő (g/L)	Élesztőkivonat (g/L)	Laktóz (g/L)	Élesztőkivonat (g/L)
<i>Kluyveromyces lactis</i> NU	-	-	25	8
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NB	-	-	25	8
<i>Dekkera anomala</i> VT	-	-	30	8
<i>Debaryomyces occidentalis</i> Y758	23	7	-	-
<i>Debaryomyces occidentalis</i> CCY 47-3-1	30	7	-	-
<i>Saccharomycopsis fibuligera</i> CCY 42-3-1	25	8	-	-

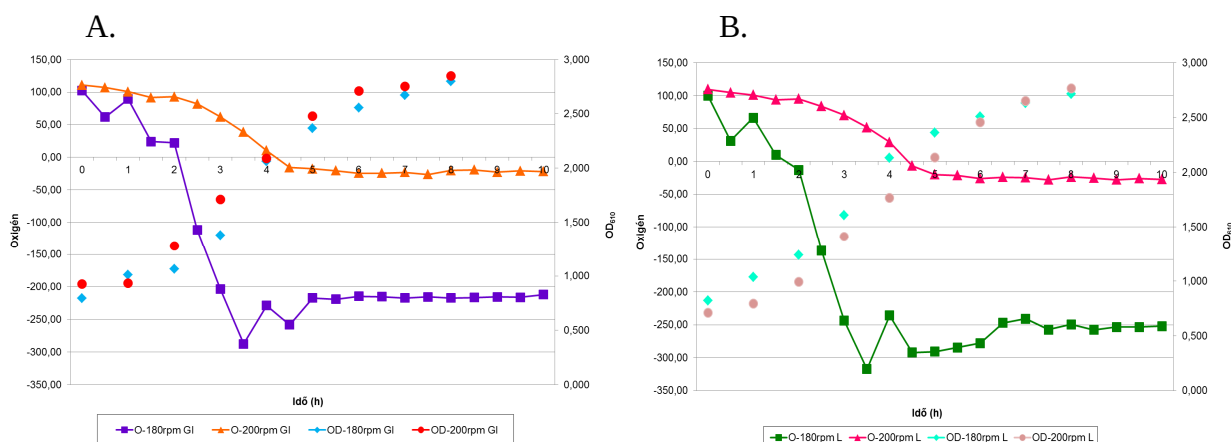
22. táblázat Optimális laktóz és keményítő koncentráció mellett kapott biomassza termelés

Törzsek	Táplódat összetevők			Biomassza (g/L)	Hozam _{C-forrás}
	Szénhidrát (g/L)		Élesztőkivonat (g/L)		
<i>K. lactis</i> NU	Laktóz	25	8	6,22	0,31
<i>K. marxianus</i> NB	Laktóz	25	8	6,52	0,26
<i>D. anomala</i> VT	Laktóz	30	8	7,57	0,25
<i>Deb. occidentalis</i> Y758	Keményítő	23	7	8,04	0,35
<i>Deb. occidentalis</i> CCY 47-3-9	Keményítő	30	7	6,68	0,22
<i>S. fibuligera</i> CCY 42-3-1	Keményítő	25	8	8,11	0,33

5.4.3. Levegőztetés hatása a biomassza termelésére

További kísérleteim folyamán a növekvő levegőztetésnek a biomassza termelésre történő hatását tanulmányoztam a rázógép fordulatszámának változtatásával, melyet 180 rpm-ről a

maximálisan alkalmazható 200 rpm-re növeltem (31. ábra). A levegőztetés növelése a táptalaj oldott oxigén koncentrációjának növekedését eredményezte, mely a biomassza kismértékű növekedésében is megmutatkozott. A törzsek az exponenciális fázis első szakaszában aerob körülmények között voltak, majd később, amikor az oxigén tenziója csökkent, a sejtek anaerob körülmények közé kerültek.



31. ábra *K. lactis* NU élesztőgomba szaporodása változó levegőztetés mellett A: 1,5% glükóz és 0,5% élesztőkivonat; B: 1,5 % laktóz és 0,5% élesztőkivonat

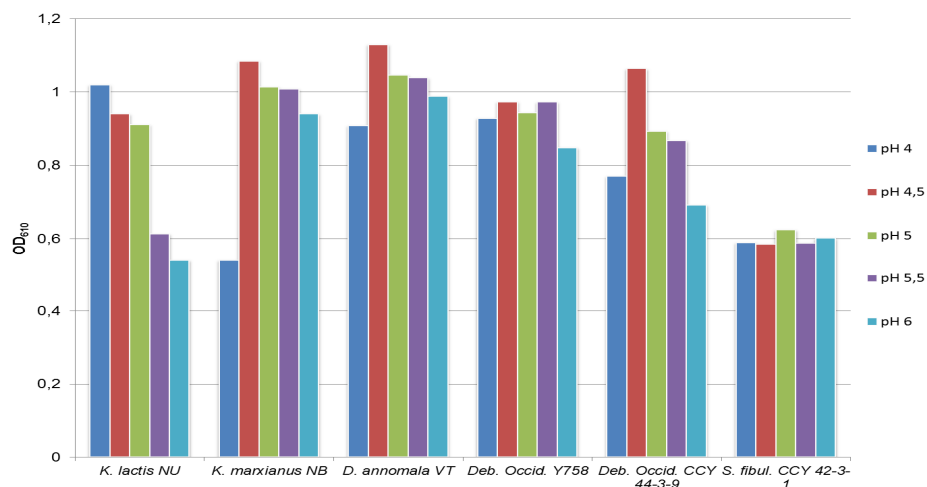
Ilyen körülmények között az etanol fermentáció volt a fő anyagcsere útvonal, amely alacsonyabb hozamot eredményez, mint a légzés. Az exponenciális fázis elején (6. óra), az exponenciális fázis közepén (16. óra) és a stacioner fázis elején (20. óra) 2-3 mg/l koncentrációban etanolt is ki tudtam mutatni. Tehát ekkor a sejtek átálltak erejsztésre, és ez indokolja azt, hogy a növekvő levegőztetés hatására a tápoldat megemelkedett oldott oxigén koncentrációja egyik esetben sem befolyásolta lényegesen a biomassza termelést.

5.5. A pH hatása a biomassza termelésére

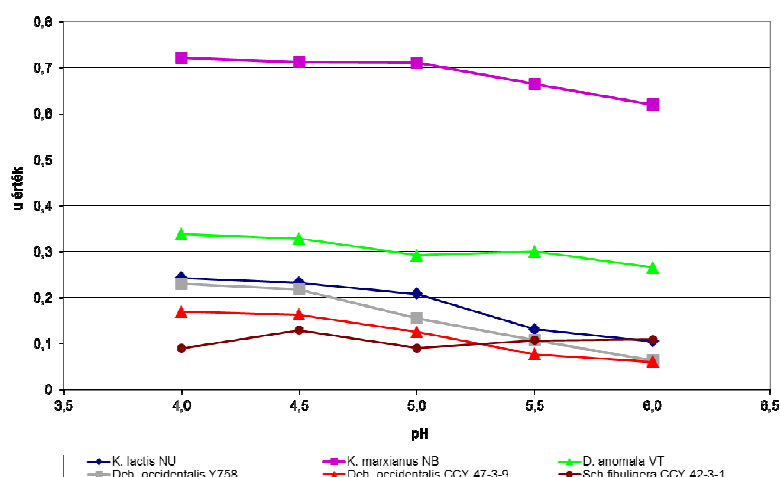
A fermentlé pH értékének hatása elsődlegesen a sejtmembrán anyagtranszport folyamatra irányul. Gyakran a pH az a környezeti tényező, amely a rendszer idegen mikrobákkal történő befertőződését meggátolja, azonban soha nem hagyatkozhatunk csupán erre a rendszer csíramentességének fenntartásánál.

A tápoldat kémhatásának optimalizálása a 4,0 és 6,0 közötti pH tartományokban 0,2 M citrát-foszfát (Mc Ilvan puffer) pufferral pufferolt közegben történt, ahol különböző pH értékek (4; 4,5; 5; 5,5; 6) hatását vizsgáltam a sejtek szaporodása szempontjából. A rázógép fordulatszámát 180 rpm-en tartottam. A kapott eredményeket a 32. illetve a 33. ábrákon tüntettem fel, melyek azt mutatják, hogy a

savas (4,0-4,5) pH tartomány bizonyult optimálisnak, amely igen kedvező az ipari fermentációban, ugyanis a fertőzés veszélye alacsony ebben a tartományban (KÁKONYI és mtsi., 2005).



32. ábra A kiválasztott törzsek szaporodása különböző pH-jú tápoldatokban a 20. órán



33. ábra A kiválasztott törzsek fajlagos szaporodása különböző pH-jú tápoldatokban

A biomassza előállítása közben, a tápoldat keverése következtében, a felületi feszültség csökkentő anyagok hatására hab képződik, amely az élesztőszaporítás folyamatára hátrányos, mivel csökken a hasznos térfogat és a levegőztetés hatásfoka. Ilyen esetben indokolt a kémiai habzásgátlók adagolása.

5.6. Különböző fajokhoz tartozó élesztőgomba törzsek nehézfémek akkumulációjának vizsgálata

A biológiai fémmegkötés egy azok közül a legígéretesebbeknek tűnő technológiák közül, amely az élő és az inaktívált mikroorganizmusokra is jellemző. Ezen mikroszervezetek akár nagyon híg oldatokból is képesek a fémionokat megkötni (1-100 mg/l tartományon belül) és azokat akkumulálni (VOLESKY, 2001). Így a fémaakkumulációt egyrészt élő, másrészt kíméletesen szárított, de elhalt sejteknél is vizsgáltam. Kísérleteimhez egysejtű sarjadzó, egysejtű hasadó illetve álhifás és valódi hifás fajok egy-egy törzsét választottam ki, összesen hetet. Szelektálás során fontos szempontnak tartottam többek között azt, hogy olyan törzseket vegyek be a fémkötésbe, melyek a biomassza termelés során jó keményítő és laktóz hasznosítónak bizonyultak, illetve figyelmebe vette azt is, hogy a törzsek eltérő morfológiával rendelkezzenek. A kiválasztott törzsek a következők voltak: *Kluyveromyces lactis* NU, *Dekkera anomala* VT, *Deb. occidentalis* Y 758, *Lipomyces kononenkoe* CCY 33-4-1, *Schizo. pombe* RIVE 4-2-1, *Geotrichum candidum* DV és *Rhodotorula mucilaginosa* BT (23. táblázat).

23. táblázat: A vizsgálatokhoz kiválasztott törzsek

Faj	Törzs	Morfológiai jellemző	Szénforrás hasznosítás
<i>Kluyveromyces lactis</i>	NU	Egysejtű sarjadzó	laktóz
<i>Dekkera anomala</i>	VT	Egysejtű sarjadzó	laktóz
<i>Debaryomyces occidentalis</i> var. <i>occidentalis</i>	NCAIM Y758	Egysejtű sarjadzó	keményítő
<i>Lipomyces kononenkoe</i>	CCY 33-4-1	álhifás	keményítő
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	RIVE 4-2-1	egysejtű, hasadó, flokkulens	glükóz
<i>Geotrichum candidum</i>	DV	fonalas	glükóz
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	BT	Egysejtű sarjadzó	glükóz

5.7. Nehézfém adszorpciós vizsgálatok

A korábbi vizsgálatok során meghatároztuk a nehézfémek azon koncentrációját, melyeket a további kísérleteim során alkalmazni fogok. Állandó biomassza koncentrációk mellett (kb. 10 mg/ml szárazanyag) a megkötött fémek aránya közel azonos nagyságrendű volt abban az esetben, ha az alkalmazott fémkoncentráció a 0,2 – 20 mM tartományba esett. Így a továbbiakban az élő – és szárított sejtek fémmegkötő képességének tanulmányozására 20 mM koncentrációt alkalmaztam.

A 4.3.14. fejezetben leírt módszer szerint az élesztőgomba törzsek élő és inaktívált sejtjeit különböző fémek hatásának tettem ki. 30 perces kezelés után, a felülúszó fémtartalmának ICP-AES mérése alapján kapott értékeket az 24. táblázatban foglaltam össze.

24. táblázat: Élő- és szárított élesztőgomba sejtek nehézfém kötése 20 mM nehézfém oldatban 20 mg/ml tömegű szárított biomassza koncentrációnál

Az oldat fém koncentrációja mg/ml (100%)		Törzsek	Élő sejtek által kötött fémek		Szárított sejtek által kötött fémek	
			koncentráció mg/g sz.a	%	koncentráció mg/g sz.a	%
Cr	1,04	<i>Kluyveromyces lactis</i> NU	37,12	76	31,87	62
		<i>Dekkera anomala</i> VT	31,43	61	27,34	59
		<i>Deb. occidentalis</i> Y758	18,19	35	24,05	43
		<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> BT	33,57	67	32,43	69
		<i>Schizo. pombe</i> RIVE 4-2-1	31,38	65	27,89	58
		<i>Lipomyces kononenkoe</i> CCY 33-4-1	43,27	82	30,15	58
		<i>Geotrichum candidum</i> DV	39,61	77	29,74	57
Ni	1,17	<i>Kluyveromyces lactis</i> NU	12,45	21	6,26	11
		<i>Dekkera anomala</i> VT	13,00	22	5,92	11
		<i>Deb.occidentalis</i> Y758	16,82	29	8,45	15
		<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> BT	6,44	12	6,83	12
		<i>Schizo. pombe</i> RIVE 4-2-1	9,81	18	7,81	14
		<i>Lipomyces kononenkoe</i> CCY 33-4-1	10,85	20	9,10	16
		<i>Geotrichum candidum</i> DV	23,89	44	6,73	11
Cu	1,27	<i>Kluyveromyces lactis</i> NU	16,77	27	27,21	44
		<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> BT	33,07	53	30,22	48
		<i>Schizo. pombe</i> RIVE 4-2-1	33,18	53	23,87	42
		<i>Lipomyces kononenkoe</i> CCY 33-4-1	43,22	69	25,90	40
		<i>Geotrichum candidum</i> DV	41,62	67	22,76	36
Ag	2,16	<i>Kluyveromyces lactis</i> NU	80,05	76	74,55	71
		<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> BT	72,32	69	69,18	66
		<i>Schizo. pombe</i> RIVE 4-2-1	95,66	91	69,85	67
		<i>Lipomyces kononenkoe</i> CCY 33-4-1	86,45	83	53,45	51
		<i>Geotrichum candidum</i> DV	88,83	85	13,53	11
Pb	4,14	<i>Kluyveromyces lactis</i> NU	76,15	37	20,85	10
		<i>Dekkera anomala</i> VT	31,67	16	187,50	92
		<i>Deb. occidentalis</i> Y758	59,32	29	113,22	55
		<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> BT	9,95	5	12,21	6
		<i>Schizo. pombe</i> RIVE 4-2-1	37,10	18	34,00	17
		<i>Lipomyces kononenkoe</i> CCY 33-4-1	34,31	17	34,45	17
		<i>Geotrichum candidum</i> DV	99,45	49	27,23	13
Cd	2,25	<i>Kluyveromyces lactis</i> NU	48,85	45	37,11	34
		<i>Dekkera anomala</i> VT	38,24	35	62,11	57
		<i>Deb. occidentalis</i> Y758	31,34	27	68,85	63
		<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> BT	55,41	51	38,12	35
		<i>Schizo. pombe</i> RIVE 4-2-1	45,91	41	49,02	44
		<i>Lipomyces kononenkoe</i> CCY 33-4-1	63,17	57	71,85	65
		<i>Geotrichum candidum</i> DV	79,35	72	25,38	23

A kapott eredmények alapján elmondható, hogy a legtöbb élesztőgomba faj törzsei a krómot és az ezüstöt 50% feletti hatékonysággal kötötték meg. Ettől csak kicsivel volt gyengébb a réz akkumulációja. Számos esetben a szárítás elősegítette a biomasszáék fémmegkötő képességét, míg máshol csökkenést okozott. Előbbire jó példa a *D. anomala* VT és a *Deb. occidentalis* Y 758, melyek szárított sejtes formában mind az ólom, mind pedig a kadmium esetében is sokkal nagyobb akkumulációs kapacitást mutattak, mint élő sejtes formáik. Ellenben a *G. candidum* DV élesztőgomba szárított sejtes formában a legtöbb fém rögzítésében nagyon alacsony hatásfok mutatkozott. Kadmium, ólom és nikkel esetében egyre inkább csökkent a sejtek fémmegkötési hatékonysága. Ennek alapján levonhatjuk azt a következtetést, hogy a legtöbb esetben a biomassza szárítása nem csökkentette a fémfelvételt, sőt egyes törzsek esetekben még növelte is annak hatékonyságát.

A leggyakoribb nehézfémeket tartalmazó magyarországi szennyvizek vizsgálatának egy átfogó felmérése során megállapították, hogy viszonylag alacsony fémtartalmú szennyvizeket kell megtisztítani, ugyanis a jelenleg rendelkezésünkre álló víztisztító berendezések alkalmazásuk során kis mennyiségben fémeket hagynak a tisztítandó vízben, ami további problémát jelent a környezetvédelem szempontjából (TAMÁS, 1995).

Tovább folytatva a kísérleteket meghatároztam a leggyakoribb környezetszennyező nehézfémek modell oldataiból a nehézfémek akkumulációját 4 gombafaj egy-egy törzsével (*K. lactis* NU, a *L. kononenkoe* CCY 33-4-1, a *Schizo. pombe* RIVE 4-2-1 és a *D. anomala* VT), különböző szárított biomassza mennyiségeket (2 – 20 mg/ml) alkalmazva. Laboratóriumi körülmények között készített modell oldatokban alkalmazott fémkoncentrációkat a 25. táblázatban foglaltam össze.

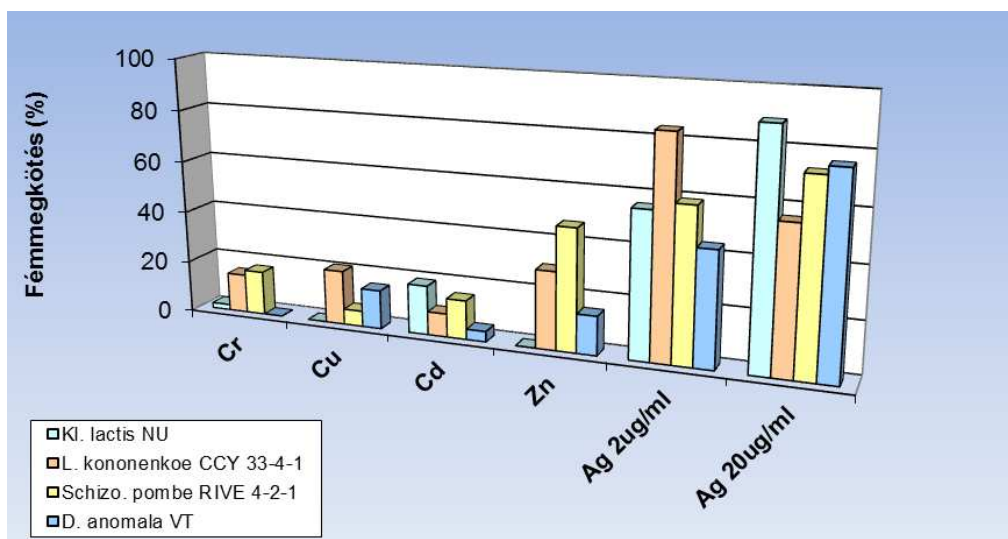
25. táblázat: Fémek mennyisége a modell oldatban

Fémek	Fémek koncentrációja az oldatban	
	($\mu\text{g/ml}$)	μmol
Cr	8,5	163
Cu	24	2648
Cd	1	9
Zn	21	321
Ag	2 vagy 20	19 vagy 185

Kis biotassza koncentrációk (2 mg/ml) esetén nagyon alacsony hatásfokot értem el, számos esetben a fémkötés nem is volt mérhető (26. táblázat és 34. ábra). Legjobbna a *L. kononenkoe* CCY 33-4-1 mutatkozott, amely az ezüst kivételével a nehézfémek 9-30 %-át kötötte meg. Az ezüst megkötését két fémkoncentrációnál is vizsgáltam (2 és 20 µg/ml), mindkét esetben nagyon jó akkumulációt tapasztaltam: kis koncentrációnál a *L. kononenkoe* CCY 33-4-1 (84%-os akkumuláció), míg magasabb koncentrációnál a *K. lactis* NU (89 %-os akkumuláció) volt a leghatékonyabb.

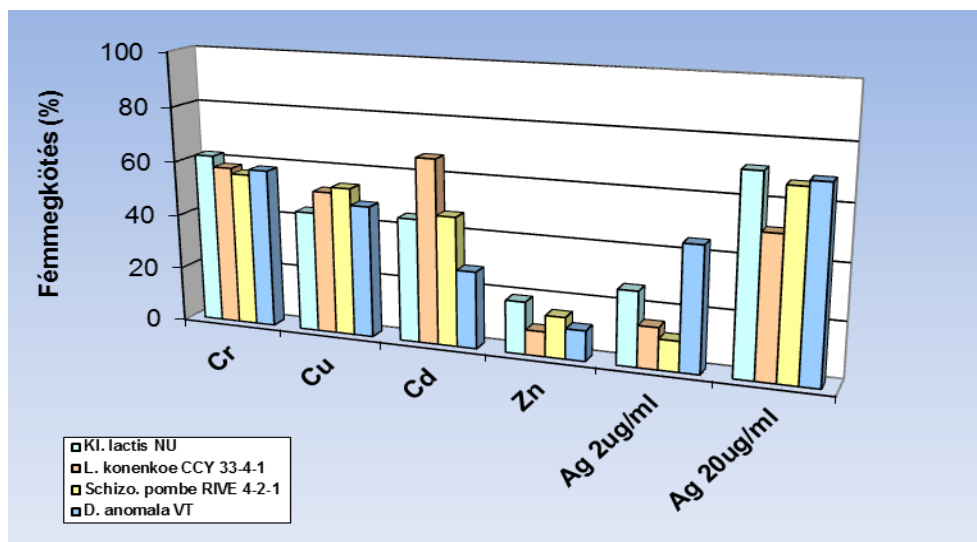
26. táblázat: Különböző élesztőgomba törzsek szárított sejtjeinek nehézfém megkötő képessége modell szennyvízben. Biotassza koncentrációk: 2 és 20 mg/ml

Fém ionok	Összes fém Konc. µg/ml	Törzsek	Megkötött fémek			
			2 mg/ml biotassza		20 mg/ml biotassza	
			µg fém/mg szárazanyag	%	µg fém/mg szárazanyag	%
Cr	8,5	<i>Kluyveromyces lactis</i> NU	0,10	2	0,26	62
		<i>Lipomyces kononenkoe</i> CCY 33-4-1	0,62	15	0,25	58
		<i>Schizo. pombe</i> RIVE 4-2-1	0,71	17	0,24	56
		<i>Dekkera anomala</i> VT	0,00	0	0,25	58
Cu	24	<i>Kluyveromyces lactis</i> NU	0,00	0	0,24	44
		<i>Lipomyces kononenkoe</i> CCY 33-4-1	2,53	21	0,53	52
		<i>Schizo. pombe</i> RIVE 4-2-1	0,72	6	0,62	54
		<i>Dekkera anomala</i> VT	1,82	15	0,80	48
Cd	1	<i>Kluyveromyces lactis</i> NU	0,00	0	0,07	45
		<i>Lipomyces kononenkoe</i> CCY 33-4-1	1,07	30	0,06	67
		<i>Schizo. pombe</i> RIVE 4-2-1	1,79	47	0,02	47
		<i>Dekkera anomala</i> VT	0,46	15	0,01	28
Zn	21	<i>Kluyveromyces lactis</i> NU	2,04	19	0,20	19
		<i>Lipomyces kononenkoe</i> CCY 33-4-1	0,99	9	0,10	9
		<i>Schizo. pombe</i> RIVE 4-2-1	3,14	15	0,16	15
		<i>Dekkera anomala</i> VT	0,05	4	0,11	11
Ag	2	<i>Kluyveromyces lactis</i> NU	0,60	56	0,03	27
		<i>Lipomyces kononenkoe</i> CCY 33-4-1	0,88	84	0,02	15
		<i>Schizo. pombe</i> RIVE 4-2-1	0,63	59	0,02	11
		<i>Dekkera anomala</i> VT	0,46	44	0,06	45
Ag	20	<i>Kluyveromyces lactis</i> NU	8,99	89	0,93	71
		<i>Lipomyces kononenkoe</i> CCY 33-4-1	5,62	56	0,67	51
		<i>Schizo. pombe</i> RIVE 4-2-1	7,34	73	0,86	67
		<i>Dekkera anomala</i> VT	7,61	76	0,88	69



34. ábra Nehézfémek sejten belüli akkumulációja 2 mg/ml száraz biomassza koncentráció mellett

Az élesztő biomassza koncentrációját mintegy 10-szeresre megemelve (20 mg/ml) lényeges emelkedést tapasztaltam a fém akkumulációban (26. táblázat és 35. ábra). Az ezüstöt valamennyi vizsgált faj törzsei 60% feletti hatékonysággal kötötték meg, ettől csak kissé volt gyengébb a króm akkumulációja. Ezt követte a réz és a kadmium akkumulációs hatékonysága, míg leggyengébben a cinket kötötték meg az élesztősejtek.



35. ábra Nehézfémek sejten belüli akkumulációja 20 mg/ml száraz biomassza koncentráció mellett

Donmez és Aksu (1999) különböző sejt morfológiával rendelkező élesztőgombákon (*S. cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Schizosaccharomyces pombe* és *Candida sp.*) tanulmányozták

Cu^{2+} ion akkumulációját. Kísérletekkel igazolták, hogy az egyes élesztőgombák Cu (II) felvételi kapacitása a következő sorrendben csökkent: *S. cerevisiae* (7,11 mg/g) > *K. marxianus* (6,44 mg/g) > *Candida sp.* (4,80 mg/g) > *S. pombe* (1,27 mg/g). Ugyanakkor az eredmények azt mutatták, hogy a *Candida sp.* és a *K. marxianus* nehézfém érzékenysége és a réz (II) bioakkumulációja sokkal hatékonyabb volt, mint a *S. cerevisiae* és a *S. pombe* fémmegkötése magasabb réz (II) koncentráció mellett.

Mivel a mikroorganizmusok sejtfal alkotóinak tulajdonsága függ a környezettől, a megkötött fémeket, a közeg paramétereinek megváltoztatásával, ki is lehet nyerni a rendszerből.

5.8. Az akkumulált nehézfémek sejten belüli megoszlása

Az inaktivált (elhalt) gomba sejteket tartalmazó biomassza nehézfém kötő kapacitását elsősorban a sejtfal biztosítja. A fémmegkötő képesség a sejtfal szerkezetén kívül függ az élőlény fajtájától, korától, fiziológiai érettségétől, környezetétől (pH, hőmérséklet), a fémion fiziológiai tulajdonságától, és más fémekkel, valamint kémiai vegyületekkel való kölcsönhatásától is (PASTARNAKIEWICZ, 2006). Ugyanakkor az inaktivált sejtömeg különböző fizikai és kémiai kezelésével (pl. melegítés, szárítás, lúgos kezelés), valamint ezek kombinálásával a fémakkumulációs képesség jelentősen növelhető.

5.8.1. Élő sejtekbentörténő nehézfém megoszlás

A nehézfémekkel dúsított élő sejtek vizsgálatánál az volt a cél, hogy meghatározzam a sejtfelületen akkumulált és az intracellulárisan dúsult nehézfémek arányát. A 4.3.15.1. pontban leírt módszer alapján az alábbi alkotóelem frakciókat kaptam:

Sejtfalhoz ionosan kötött frakció: EDTA- Na_2 kezeléssel nyert sejtkivonat

Citoszol frakció: szorbit-DEAE-dextrán kezeléssel nyert sejtkivonat

Kompartmentek által megkötött oldható frakció: 60%-os metanol kezeléssel kapott sejtkivonat

Szervesen kötött frakció: 60%-os metanol kezeléssel kapott sejtüledék

A frakcionált sejtek nehézfém koncentrációit a 27. táblázatban szárazanyagra vonatkoztatva, a 36-39. ábrákon pedig százalékos megoszlásban mutatom be.

Az élesztőgombák sejtfala viszonylag kis arányban kötötte meg azt a nehézfém frakciót, melynek deszorpciója szerves komplex képző vegyülettel (EDTA) történt. Ezt a frakciót a *G. candidum* NU tartalmazta a legmagasabb arányban, ugyanis itt kötődött meg az össz akkumulált fémek 11-23%-

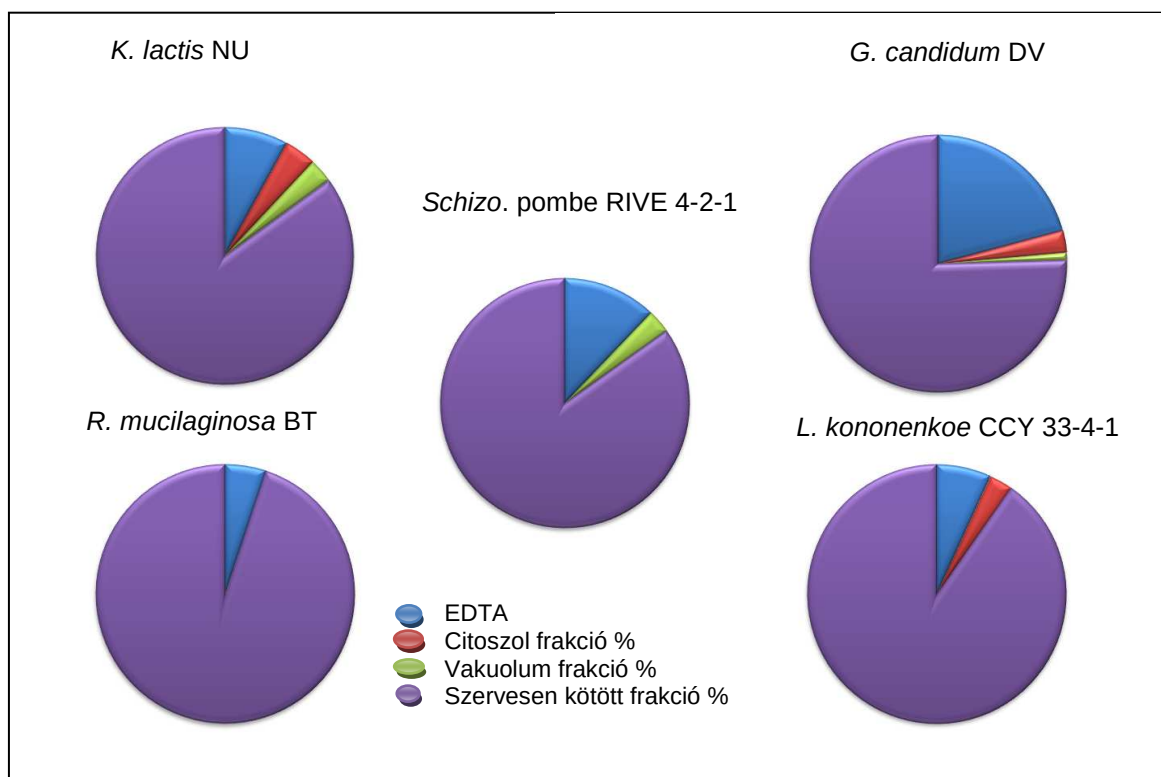
ka. Irodalmi adatok szerint a szerves komplex képző anyagok (pl. EDTA) hatásos deszorbensnek bizonyultak a különböző mikroorganizmus csoportokból történő fémkinyerésre (HORIKOSHI et al., 1979, DUNN és BULL, 1983, GALUN et al., 1983). Salinas és mtsi. (2000) 0,1M EDTA-t és 0,1M HCl-at használtak Cd visszanyerésére *Rhodotorula rubra* biomasszából. Deszorpciós vizsgálataik során azt tapasztalták, hogy a legnagyobb mennyiségű Cd 0,1M EDTA-val volt visszanyerhető, míg a 0,1M HCl hatékonysága kisebb volt.

A citoszolba oldott frakció fémtartalma nagyon alacsony arányt mutatott minden élesztőgomba törzs esetében. A vakuolum frakcióban, az ólom kivételével, minden esetben alacsony arányban akkumulálódtak a nehézfémek. A szervesen kötött frakcióban a fémek aránya 43 és 94% közé esett, itt volt a legmagasabb, ugyanis ez a frakció magába foglalta a sejtfal által megkötött és az intracellulárisan kötött szubfrakciókat is.

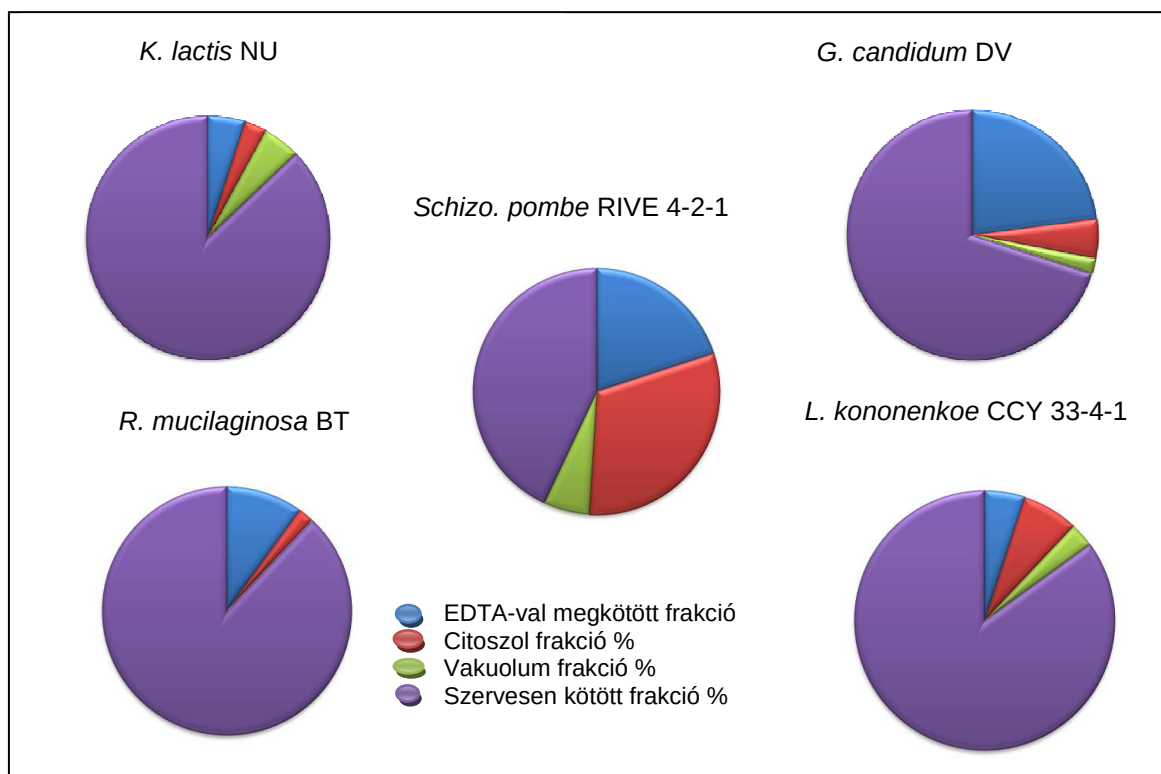
A fémek sejtes megoszlását WHITE és GADD (1986) *S. cerevisiae* Zn^{2+} fémion felvételén keresztül vizsgálták. Az általuk kapott eredmények azt mutatják, hogy a vakuolum frakció fémtartalma volt a legmagasabb (65%), majd a kötött frakcióban 39%, és a legkisebb arányban a citoszol frakcióban dúsultak fel a fémek, mindössze 5%-ban.

27. táblázat: A fémek sejten belüli megoszlása különböző élesztőgomba fajokban. Élő sejtek (15-25 mg/g sz.a.) kezelése 20mM nehézfém sóoldattal

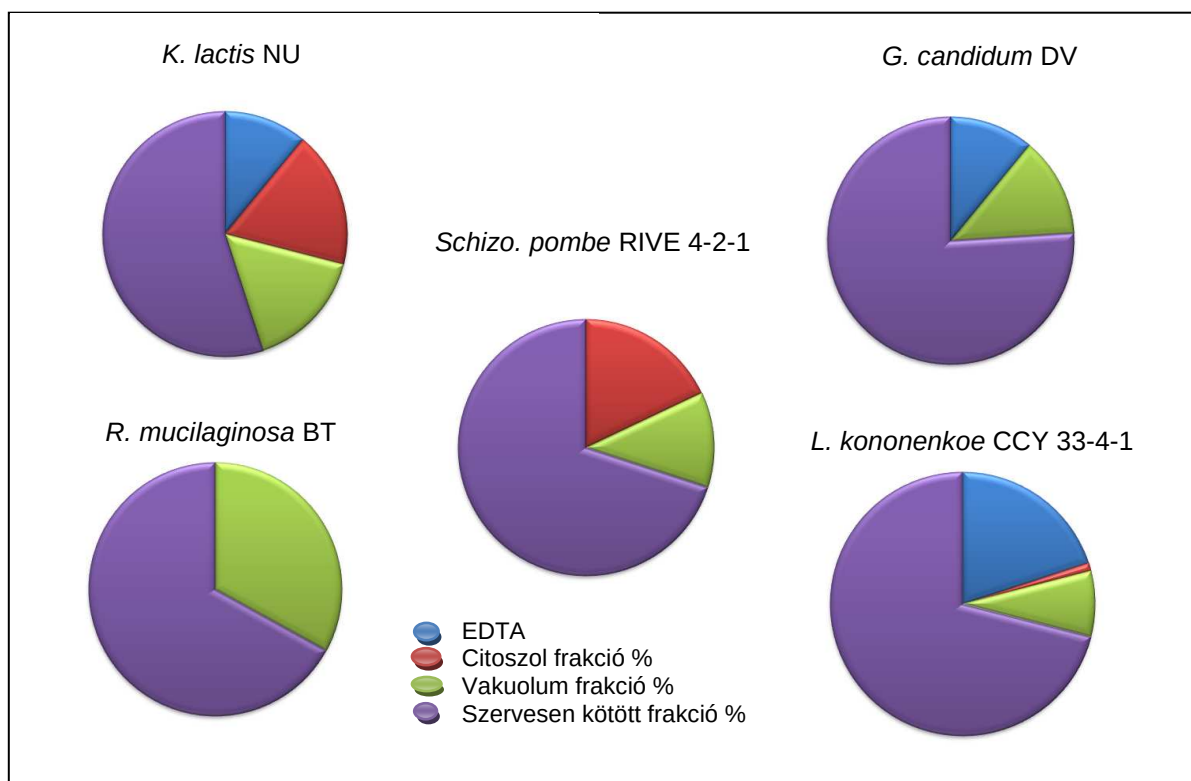
Fémek	Fajok	Összes kötött fém	EDTA-val megkötött sejtfafrakció	Citoszol frakció	Kompartmenteken belüli frakció	Szervesen kötött frakció
		mg/g szárazanyag				
Cu	<i>K. lactis</i> NU	10,28	0,82	0,45	0,31	8,67
	<i>G. candidum</i> NU	37,99	8,67	0,95	0,15	32,12
	<i>R. mucilaginosa</i>	12,69	0,64	0,02	0,05	11,98
	<i>L. kononenkoe</i> CCY 33-4-1	18,31	1,27	0,06	0,00	16,97
	<i>Deb. occidentalis</i> RIVE 4-2-1	13,82	1,65	0,10	0,44	11,63
Cr	<i>K. lactis</i> NU	11,66	0,54	0,32	0,59	10,21
	<i>G. candidum</i> NU	39,27	9,18	1,92	0,65	27,59
	<i>R. mucilaginosa</i>	5,86	0,58	0,10	0,01	5,17
	<i>L. kononenkoe</i> CCY 33-4-1	12,30	0,62	0,86	0,40	10,42
	<i>Deb. occidentalis</i> RIVE 4-2-1	4,15	0,82	1,30	0,25	1,78
Pb	<i>K. lactis</i> NU	45,12	5,12	8,32	7,00	24,68
	<i>G. candidum</i> NU	21,60	2,32	0,05	2,74	16,49
	<i>R. mucilaginosa</i>	3,02	0,00	0,00	1,01	2,01
	<i>L. kononenkoe</i> CCY 33-4-1	17,56	3,50	0,18	1,49	12,39
	<i>Deb. occidentalis</i> RIVE CCY 4-2-1	27,23	0,00	4,94	3,26	19,03
Ni	<i>K. lactis</i> NU	8,41	1,14	2,07	0,00	5,20
	<i>G. candidum</i> NU	32,01	5,82	4,51	2,88	18,80
	<i>R. mucilaginosa</i>	5,00	1,03	0,73	0,63	2,61
	<i>L. kononenkoe</i> CCY 33-4-1	11,65	0,72	0,15	1,39	9,39
	<i>Deb. occidentalis</i> CCY 4-2-1	9,48	2,58	0,26	0,01	6,63



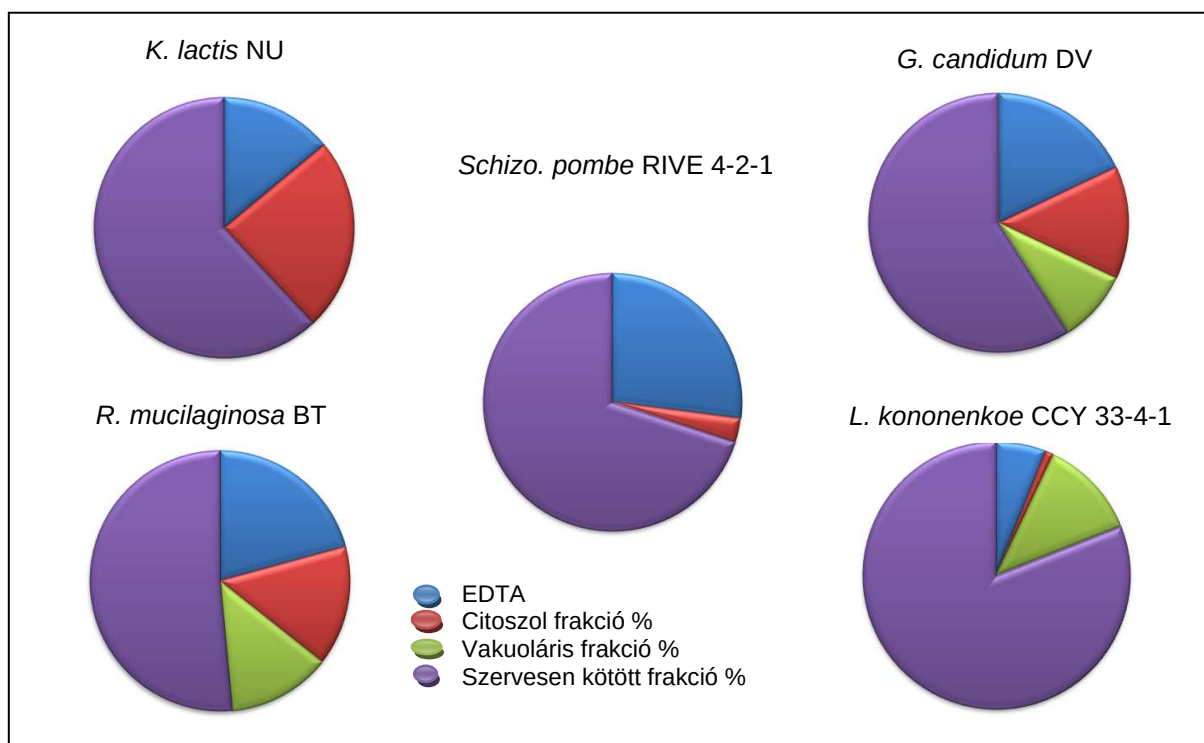
36. ábra A Cu sejten belüli eloszlása különböző élesztőgomba fajokban



37. ábra A Cr sejten belüli eloszlása különböző élesztőgomba fajokban



38. ábra A Pb sejten belüli eloszlása különböző élesztőgomba fajokban



39. ábra A Ni sejten belüli eloszlása különböző élesztőgomba fajokban

5.8.2. *Inaktívált sejtekben történő nehézfém megoszlás*

A sejtek szárítása alatt a sejtmembrán dezorganizálódna, azaz szétesik. Ezt figyelembe véve, a megkötött fémek elhelyezkedésének meghatározására itt más módszert alkalmaztam, mint az élő sejtek esetében. A kísérlet folyamán, kontrollként élő sejteket használtam.

Különösen az élő sejtek által megkötött fémeket eltávolítására elegendő volt a sejtek egy egyszerű MOPS pufferrel történő mosása, melynek során viszonylag nagy arányban távolítottam el az megkötött fémeket (4.3.15.2. fejezet). Szárított sejteknél a legszembetűnőbb különbségeket az oldott és a szervesen kötött frakciók között tapasztaltam, melyeket három élesztőgomba törzsön keresztül a 28. táblázatban szemléltetek. Megfigyelhető, hogy az oldott frakció fémionok aránya a szárított sejteknél drasztikusan lecsökkent, kivéve a Cr és a Ni esetében, melyek kicsivel magasabb arányban voltak jelen, de még így is jóval alul maradtak az élő sejtekéhez viszonyítva. A fémek 58 – 99%-ka a szárított sejteknél szervesen, míg az élő sejteknél főleg a sejtfalhoz kötődött, és csak 5 – 22%-uk dúsult fel intracellulárisan.

Rapoport és Muter (1995) *Candida utilis*-szel folytattak kísérleteket, melynek során a sejteket különböző mértékben szárították ki, majd inkubálták őket 18 órán keresztül Cr(VI) tartalmú pufferban. A kísérletek során azt tapasztalták, hogy a legkisebb nedvességtartalmú sejteknek volt a legnagyobb a Cr(VI) felvétele. Az eredmények azt mutatják, hogy a dehidrált sejtek elnyelési kapacitása jóval nagyobb, mint a sértetlen sejteké. Kimutatták, hogy ezen sejtek sejtfalának megnőtt az elektronnegativitása, aminek a segítségével a pozitív töltésű fémionokat meg tudják kötni a sejtfelszínen, ezzel is csökkentve a bejutásukat és toxicitásukat.

A kapott eredmények igazolják, hogy mind az élő, mind a szárított sejtek alkalmasak biomassza bioszorpció céljára, viszont a különböző fémek sejten belüli felhalmozódásában különbségek mutatkoznak.

28. táblázat: A megkötött nehézfémek oldható és szervesen kötő frakciói az élő – és hővel inaktivált (szárított) sejteknél.
Fém koncentráció: 20mM; biomassa koncentráció: 20 mg/ml szárazanyag

Fém konc. mg/ml (100%)	Törzsek	Összes kötött fém mg/g sz.a.		Pufferrel kioldható frakció				Élő sejtek				Szártott sejtek	
		Élő sejtek	Szártott sejtek	Élő sejtek		Szártott sejtek		Sejtfalhoz kötött frakció		Intracelluláris frakció		Kötött frakció	
				mg/g sz.a	%	mg/g sz.a	%	mg/g sz.a	%	mg/g sz.a	%	mg/g sz.a	%
Cu 1,271	<i>Kl. lactis</i> NU	15,06	11,48	2,15	13	1,76	17	12,27	76	2,31	11	8,30	83
	<i>D. anomala</i> VT	12,69	14,39	3,36	26	0,17	1	9,63	60	1,01	14	15,02	99
	<i>Deb. occidentalis</i> Y758	19,58	24,65	5,37	25	4,91	20	10,88	53	4,12	22	19,63	80
Cr 1,040	<i>Kl. lactis</i> NU	8,46	2,71	5,00	51	0,42	14	4,18	44	0,55	5	2,70	86
	<i>D. anomala</i> VT	7,38	8,68	6,80	62	0,42	13	3,17	32	0,70	6	2,81	87
	<i>Deb. occidentalis</i> Y758	6,48	7,35	2,48	43	1,04	19	2,25	46	0,96	11	4,42	81
Pb 4,144	<i>Kl. lactis</i> NU	47,01	64,68	11,47	23	12,50	25	31,74	64	7,25	13	38,45	75
	<i>D. anomala</i> VT	15,86	116,30	9,11	43	4,40	4	10,29	49	2,00	8	106,90	96
	<i>Deb. occidentalis</i> Y758	37,17	69,38	12,72	31	2,72	4	23,02	60	5,3	9	68,90	96
Ni 1,174	<i>Kl. lactis</i> NU	5,83	3,19	1,78	34	1,83	42	2,44	52	1,1	14	2,51	58
	<i>D. anomala</i> VT	5,92	2,97	1,54	39	0,89	29	2,46	64	0,8	17	1,26	71
	<i>Deb. occidentalis</i> Y758	8,28	4,12	2,38	36	1,63	28	3,36	55	0,8	9	4,10	72

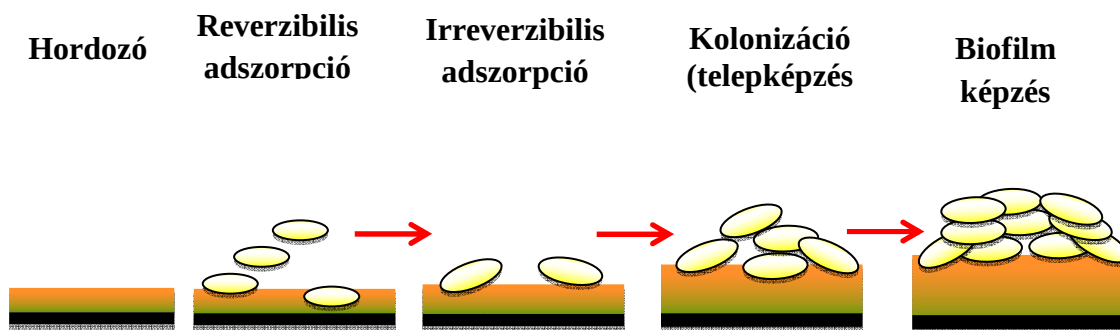
5.9. Az élesztőgombák rögzítése hidroxipatit (HAP) hordozóhoz

A kísérlethez olyan élesztőgomba fajokat választottam ki, melyek sejtmorfológiájuk tekintetében különböznek egymástól (bimbózás, hasadás, dimorfizmus, flokkuláció vagy biofilm képzés). Az ilyen morfológiával rendelkező sejtek különböző hordozókhoz való immobilizációs képességükben is eltérhetnek. A szelektált törzsek segítségével létrehozott biofilterrel érintkeztetjük a nehézfém-tartalmú veszélyes hulladékokat és ennek eredményeként a nehézfémek rögzített formában feldúsulnak, így további kezelhetőségük megjavul. Munkám során a hidroxipatit felületéhez való sejtrögzülést tanulmányoztam különböző reagensekkel való sejtfalkezelések kíséretében.

5.9.1. A sejtrögzítés szakaszainak meghatározása

Az élő sejtek hordozóra való rögzülése a következőképpen alakul (40. ábra):

- Reverzibilis adszorpció a hordozó felületéhez: ebben az esetben a tabletta enyhre rázogatása a sejtek leválását eredményezi
- Irreverzibilis adszorpció a hordozó felületéhez: a tabletta enyhre rázogatása hatására sem válnak le a sejtek a felületről
- Kolonizáció (telepképzés): A rögzült sejtek csoportokat alkotnak, és a megmaradnak a felületen
- Biofilm képzés: a sejtek egymással kapcsolódnak vagy több rétegben fonalakat képeznek



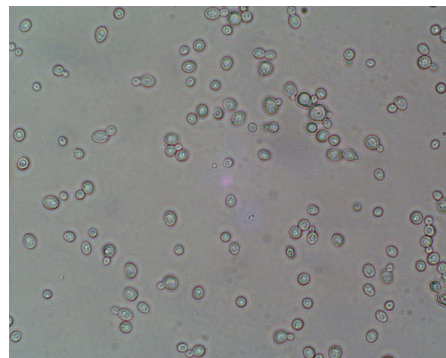
40. ábra Az immobilizálás lépései

A várt eredmények alapján megfigyelhető, hogy ezek a lépések az egysejtű és a fonalas gombák esetében különböztek egymástól. A *Deb. occidentalis* és a *S. fibuligera* törzsekkel kapott eredmények tisztán tükrözik (41. ábra), hogy mindkét törzs alacsony hatékonysággal rögzült a tablettákhoz, viszont

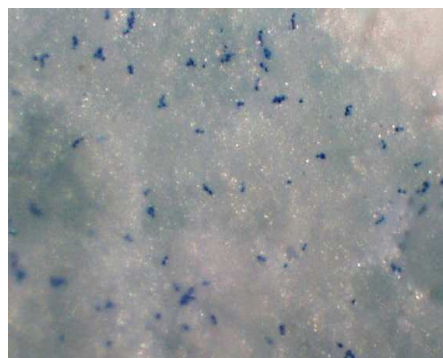
a fonalas fajok sokkal alkalmasabbak biofilm képzésre, mint a bimbódzó fajok. Ebből kifolyólag, feltételezhető, hogy az újjonnan képződött bimbódzó élesztőgomba sejtek azért váltak le a tableta felületéről, mert egysejtes formában voltak jelen a tápoldatban (KÁKONYI és mtsi., 2011).



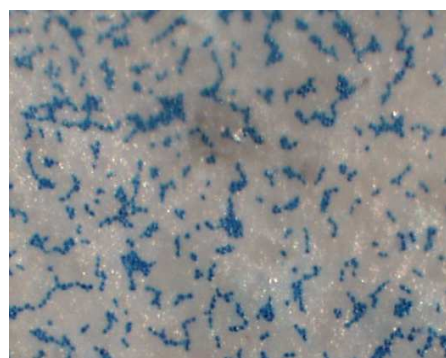
Csupasz HAP tabletta



Deb. occidentalis Y758 mikroszkópos képe



Y758 sejtek kötődése a felszínhez



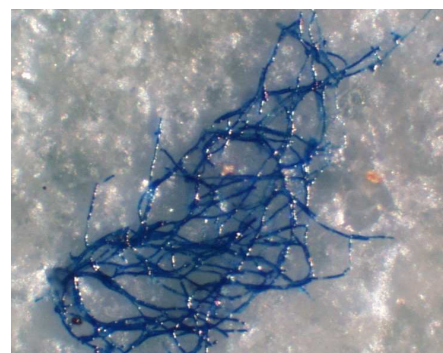
Y758 sejtek kolonizációja



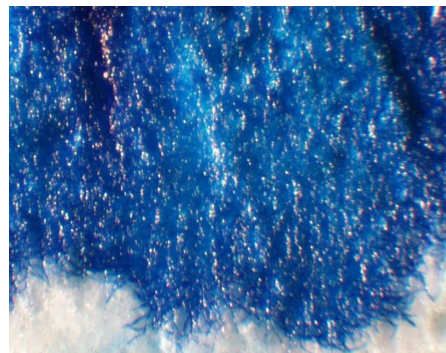
S. fibuligera CCY 42-3-1 mikroszkópos képe



CCY 42-3-1 kötődés a tablettához



CCY 42-3-1 kolonizációja

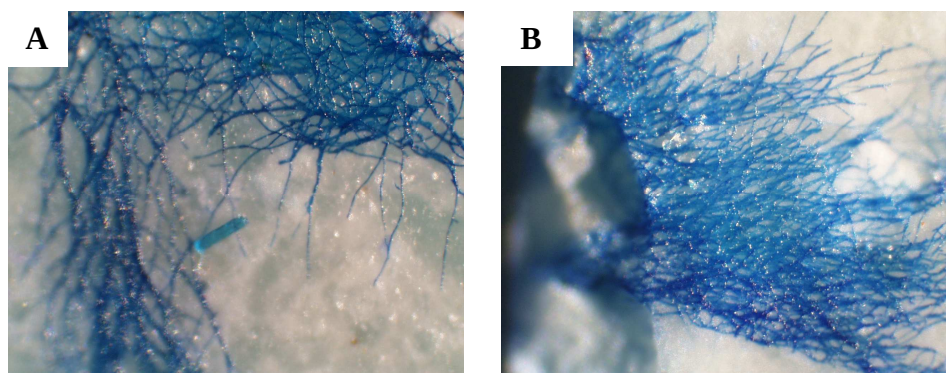


CCY 42-3-1 biofilm képzése

41. ábra *Deb. occidentalis* Y758 és az *S. fibuligera* CCY 42-3-1 rögzülése a HAP tablettához

5.9.2. A pH hatása az immobilizálás hatékonyságára

A továbbiakban a pH hatását is vizsgáltam a rögzülés hatékonysága szempontjából. Mivel a *S. fibuligera* CCY 43-2-1 mutatta a legjobb eredményeket a tablettákon való immobilizáció során, így ezt a törzset választottam ki az optimális pH meghatározásához is. A sejteket rögzülési képességét 20 mM foszfát pufferrel pufferelt 3 különböző pH tartományban vizsgáltam (pH5, 6 és 7), összehasonlítva a nem pufferelt közeggel. A mintákat 24, 48 és 72 óra elteltével vizsgáltam. Sem a pufferelt/nem pufferelt közeg, sem pedig a 24 és 48 órás mérések között nem tapasztaltam szembetűnő különbséget, ezért csak a 48 órás pH5-nél kapott eredményeket mutatom be a 42. ábrán.



42. ábra A pH hatása a *S. fibuligera* CCY 42-3-1 immobilizációs képességére (A) 48 órás YEPD kontroll pH 5; (B) 48 órás pufferelt YEPD pH 5

5.9.3. A sejtfal oldószeres és enzimes kezelései

Az Ascomycota élesztőgombák (ebbe a csoportba tartoznak az általam használt törzsek is) sejt falában vannak közös elemek is, ugyanakkor a különböző fajok sejtfalának szerkezete kémiai összetételében és a sejtfal komponensek arányának tekintetében eltérő lehet. Mégis mindegyik törzsre jellemző, hogy a sejtfal alkotók különböző töltésű molekulákat tartalmaznak, melyek meghatározzák a sejtfal elektromos töltését. Feltételezhető, hogy a sejtfalon végzett kezelések megváltoztatják annak töltését, ami előnyös lehet az immobilizálás szempontjából.

Továbbiakban azt vizsgáltam, hogyan módosul a sejtfal felületi tulajdonsága az alábbi 4 féle kezelés hatására:

1. Kezelések a sejtfalat enyhén roncsoló hatású oldószerekkel

- SDS és szarkozil: nagyarányú sejtfal fehérje feloldása
- Hecameg: erős oldószer révén magas arányban oldja fel a kovalensen kötött fehérjéket

2. Kezelés diszulfid redukáló ágenssel

DDT-t alkalmaztam mannoproteinek közötti diszulfid kötések redukálására

3. Proteázzal való kezelés. Ennek az volt a célja, hogy feloldjam a sejtfelületi fehérjéket és ezzel hozzáférhetővé tegyem a poliszacharidokat

- a) Pronáz: nagy aktivitású nem specifikus proteáz
- b) Proteináz K: nagyon aktív, nem specifikus proteáz

4. Kezelés sejtfal oldó enzim-komplex-szel

A lysing enzimet olyan koncentrációban alkalmaztam, melynél a sejtek még nem váltak ozmoszenzitívvé (az enzim csak részben oldotta fel a foszfomannoprotein réteget). Ehhez a kísérlethez a tabletták szűrése során a legjobbnak mutakozó *Saccharomycopsis fibuligera* CCY 42-3-1 törzset és egy laktóz hasznosító élesztőgombát, a *K. marxianus* NB-t választottam ki. Mivel a *K. lactis* NU és a *K. marxianus* NB sejtfal felépítése közel azonos, ezért csak az egyiket vizsgáltam a sejtrögzítés tekintetében.

5.9.3.1. Sejtfal kezelések optimalálása

Mindkét törzs esetében exponenciális fázisban lévő sejteket használtam, majd a sejtszámot 10^7 sejt/cm³ koncentrációra állítottam be YEPD tápoldatban. A kezelések során használt reagenseket (SDS, hecameg, szarkozin, pronáz, proteináz K, lysing enzim és DTT) különböző koncentrációkban alkalmaztam (4.3.20. alfejezet 4. táblázat), majd meghatározott időközönként mértem a sejtekből kiszabadult fehérjék és szénhidrátok mennyiségét, valamint vizsgáltam a sejtek ozmoszenzitivitását is. A kapott optimális értékeket a 29. táblázatban tüntettem fel.

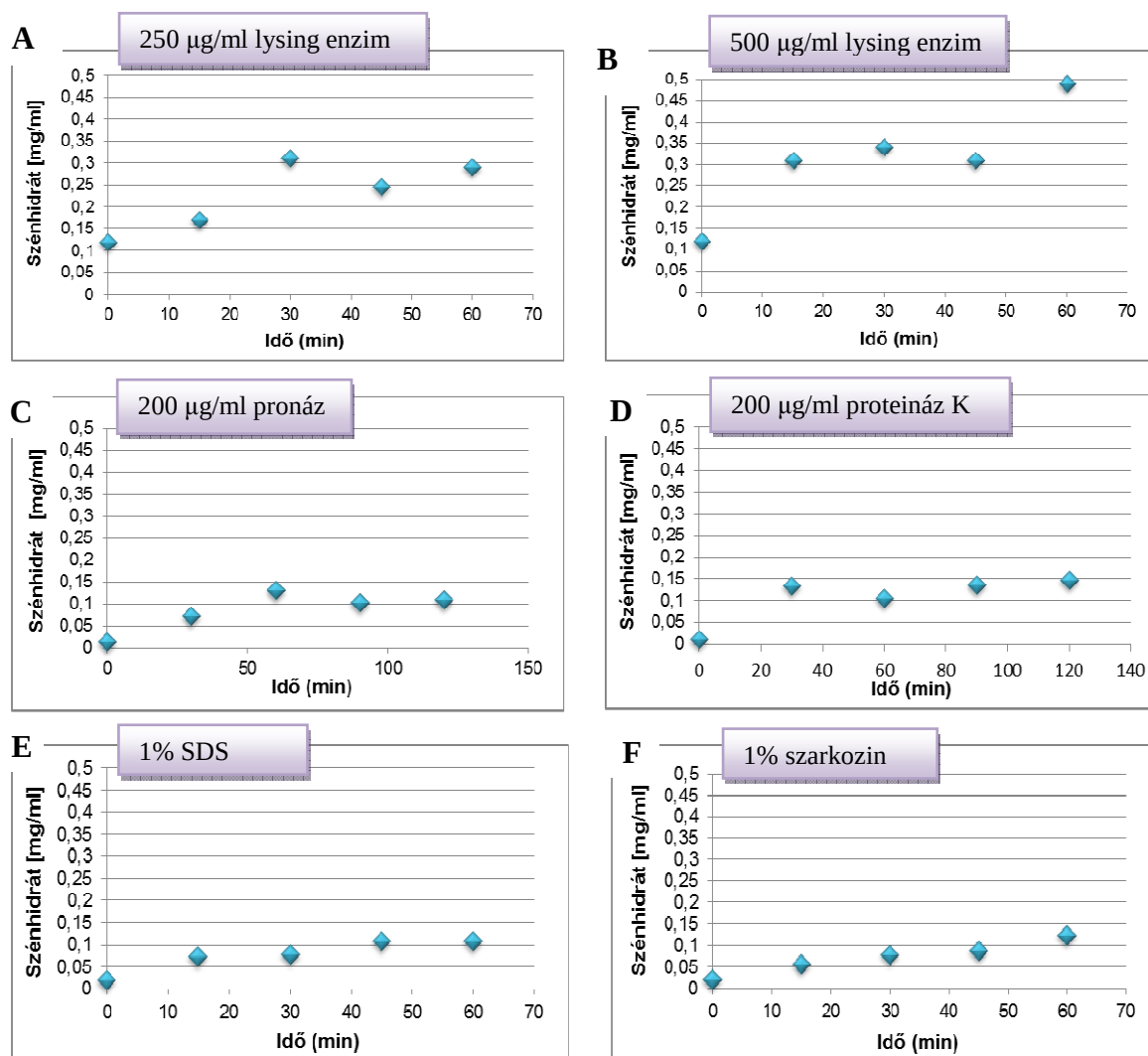
29.táblázat A sejtfal módosításához kiválasztott reagentek és optimális paraméterek

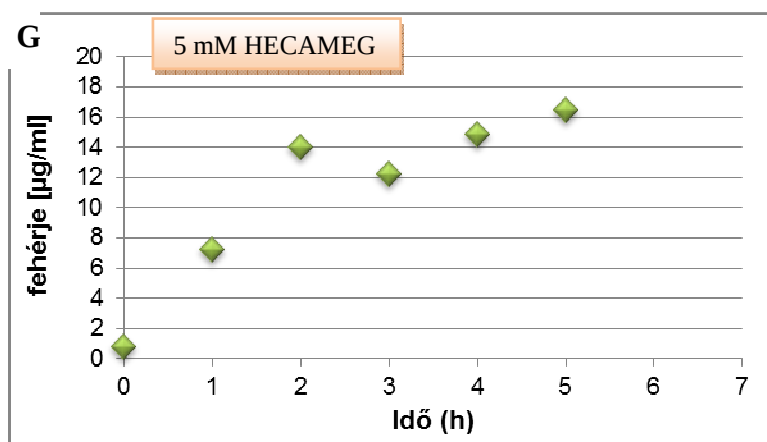
Reagentek		Koncentráció	Kezelési idő
I. Detergensek	Hecameg	5 mM	2 óra
	Szarkozin	1%	60 perc
II. Proteázok	Pronáz	200 µg/ml	120 perc
III. Sejtfal oldó enzim	Lysing enzim	250 µg/ml	60 perc
IV. Diszulfid redukáló ágens	DTT	5 mM	10 perc előkezelés

A kísérlet során alkalmazott SDS kezelés nem bizonyult hatékonynak, ezért a továbbiakban ezt az oldószert nem alkalmaztam. Mivel a pronáz segítségével több szénhidrátot sikerült eltávolítani, mint

a proteináz K-val, így a későbbiek során csak ezt használtam. A lysing enzimet két koncentrációban (250 $\mu\text{g/ml}$ és 500 $\mu\text{g/ml}$) is alkalmaztam, de ebből csak a 250 $\mu\text{g/ml}$ hozta meg a várt eredményt.

A legtöbb esetben a fehérje és a szénhidrát felszabadulása már az első 15-30 percben megtörtént és a további kezelések folyamán sem kaptam jobb eredményeket. A két törzs sejtjeinek kezelése során, nem tapasztaltam szembetűnő különbségeket a kezeléseik során, így csak a *S. fibuligera* CCY 42-3-1 élesztősejteken keresztül mutatom be a kapott eredményeket (43. ábra).





43. ábra A *S. fibuligera* CCY 42-3-1 sejt falának kezelése következtében felszabadult szénhidrát (A, B, C, D, E, F) és fehérje koncentrációk (G)

5.9.3.2. Kezelések optimális paraméterekkel az adhézio hatékonyságának növelésére

Ehhez a kísérlethez az 30. táblázatban feltüntetett reagensek optimális koncentrációját használtam a 4.3.20. pontban leírtak szerint, majd mértem a felszabadult sejtalkotók koncentrációját. A sejtek hidrofóbicitásának meghatározására MATH módszerét alkalmaztam a 4.3.19. alfejezetben leírtak szerint.

A vizsgálatokat kétféle tápoldatban ellenőriztem: a tápanyagokban gazdag YEPD-ben valamint ásványi anyagokat és cukrokat tartalmazó, minimál tápoldatban. Az utóbbi esetben hígítási sort készítettem az oldatból, azzal a céllal, hogy megvizsgáljam az ionerősség hatását az adhézióra. Az immobilizálás folyamat a 4.3.16. fejezetben leírtak szerint történt. 15 és 30 percig inkubáltam a sejteket, majd festettem őket metilénkék festékoldattal és mikroszkóp alatt vizsgáltam a sejtrögzülést. Mivel nem tapasztaltam különbséget a 15 és a 30 perces kezelések között, a továbbiakban csak 15 percig kezeltem a sejteket. A kapott eredményeket a 30. táblázatban és a 44. és 45. ábrákon mutatom be.

30. táblázat A *K. marxianus* NB és a *S. fibuligera* CCY 42-3-1 sejtfalkezelések optimális paraméterekkel

Reagensek		Koncentráció	Változások a kötődésben	
			<i>K. marxianus</i>	<i>S. fibuligera</i>
I. Detergensek	Hecameg	5 mM	-	++
		10 mM	-	+
	Szarkozin	1%	-	++
		2%	-	-
II. Proteázok	Pronáz	200 µg/ml	-	-
III. Sejtfal lítikus enzim	Lysing enzim	250 µg/ml	++	+++
IV. Kiegészítve diszulfid redukáló ágenssel (DTT)	kontroll: 10 perc DTT	5 mM	-	++
A/ Detergensek	+ Hecameg	10 mM	-	-
	+ Szarkozin	2%	-	++
B/ Proteázok	+ Pronáz	200 µg/ml	-	-
C/ Sejtfal oldó enzim	+ Lysing enzim	250 µg/ml	-	-

-: nincs adhézio
 +: gyenge adhézio
 ++: közepes adhézio
 +++: erős adhézio

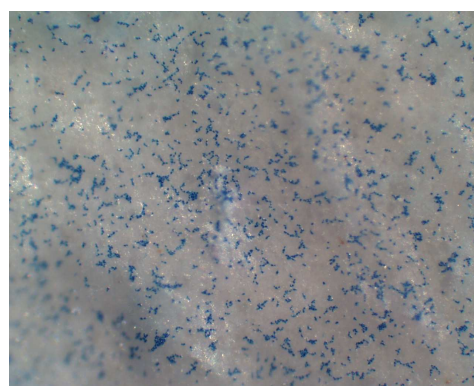
A kapott eredményekből jól látható, hogy önmagában a pronázzal való kezelés egyik törzs esetében sem bizonyult hatékonynak. A kezelést DTT-vel kiegészítve sem kaptam jobb eredményeket.

A *K. marxianus* NB esetében az alkalmazott detergensek önmagukban nem mutattak jelentősebb változást az adhézióra nézve, míg a DDT-vel való kombinációban csökkentették azt. Ezzel szemben a *S. fibuligera* CCY 42-3-1 sejtek kezelése megnövelte az adhéziót még DDT-vel kiegészítve is.

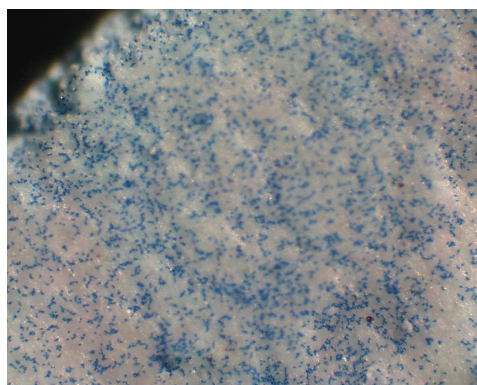
A sejtfal oldó enzimes kezelések mindkét törzs esetében a legjobb eredményeket mutatták és az adhézio előnyére váltak. Viszont a DTT kombinációs kezelés csökkentette az adhézio pozitív hatását.



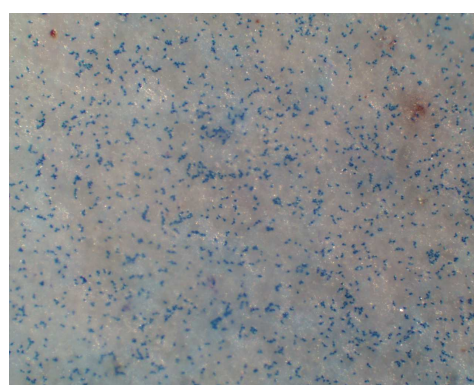
kontroll sejtek



DDT-s kezelés után

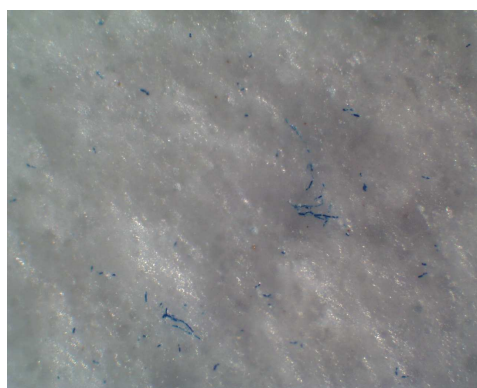


250 µg/ml lysing enzim

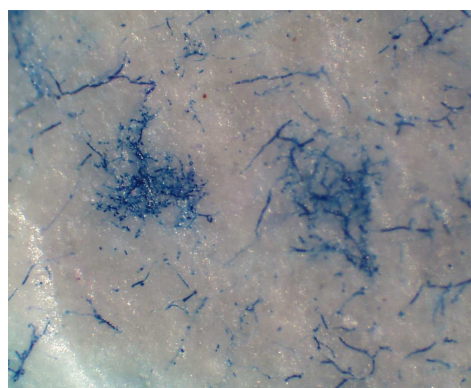


DTT + 250 µg/ml lysing enzim

44. ábra Mikroszkópos felvételek a sejtek adhéziójáról a *K. marxianus* NB sejtfalának különböző kezelése után



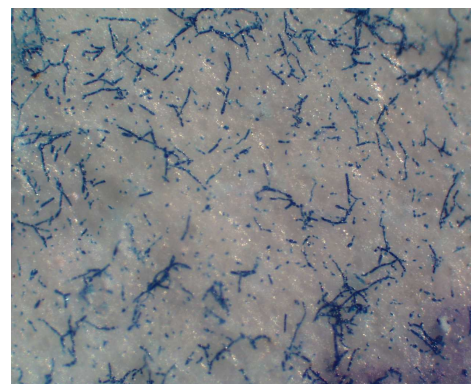
kontroll



DTT-s kezelés



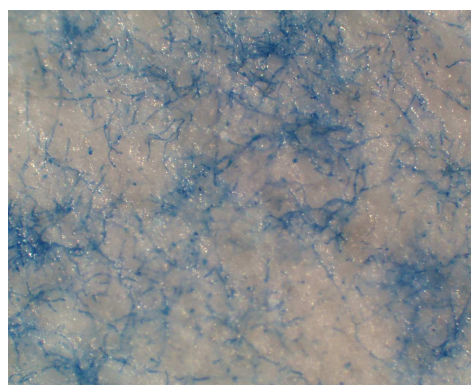
250 µg/ml lysing enzim



DTT+250 µg/ml lysing enzim



2% szarkozin



DTT + 2% szarkozin

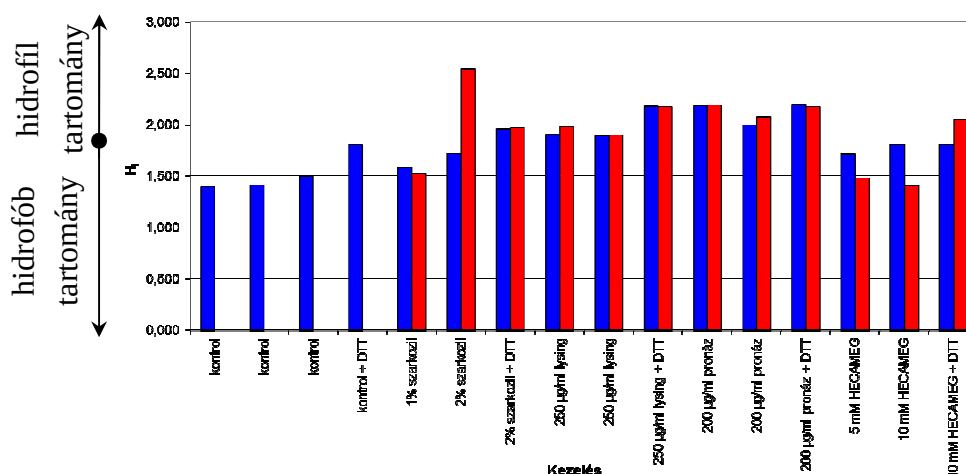
45. ábra Mikroszkópos felvételek a sejtek adhéziójáról a *S. fibuligera* CCY 42-3-1 sejtfalának különböző kezelése után

A hidrofóbicitás szempontjából mindkét élesztőgomba esetében hidrofób kontrollt is alkalmaztam. A sejteket az exponenciális fázisban vizsgáltam (31. táblázat).

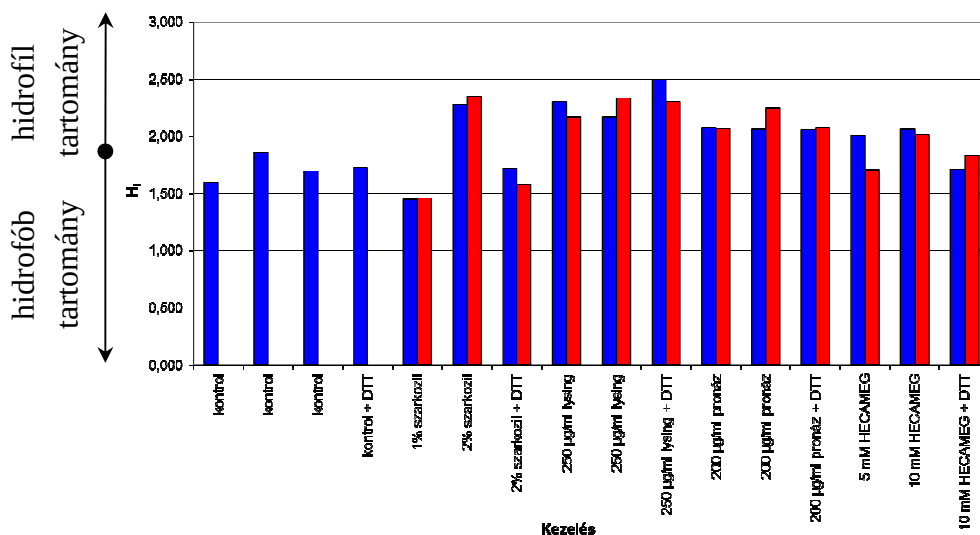
Az oldószeres kezelések esetében, kivéve a 2%-os szarkozilt, a sejtek megmaradtak hidrofób állapotukban. Mindkét törzs hasonló érzékenységgel reagált a pronázos kezelésekre, amely átbillentette a sejteket hidrofób állapotukból hidrofíllbe. A *K. marxianus* NB törzs sejtfal oldó enzimmal való emésztése csökkentette a sejtek hidrofóbicitását és így azok néhány esetben hidrofíllé váltak (46. és 47. ábra), míg a *S. fibuligera* CCY 42-3-1 törzs sejtfal kezelésénél a sejtek minden esetben hidrofíllé váltak (48. ábra).

31. táblázat A sejtfal kezelések eredményei

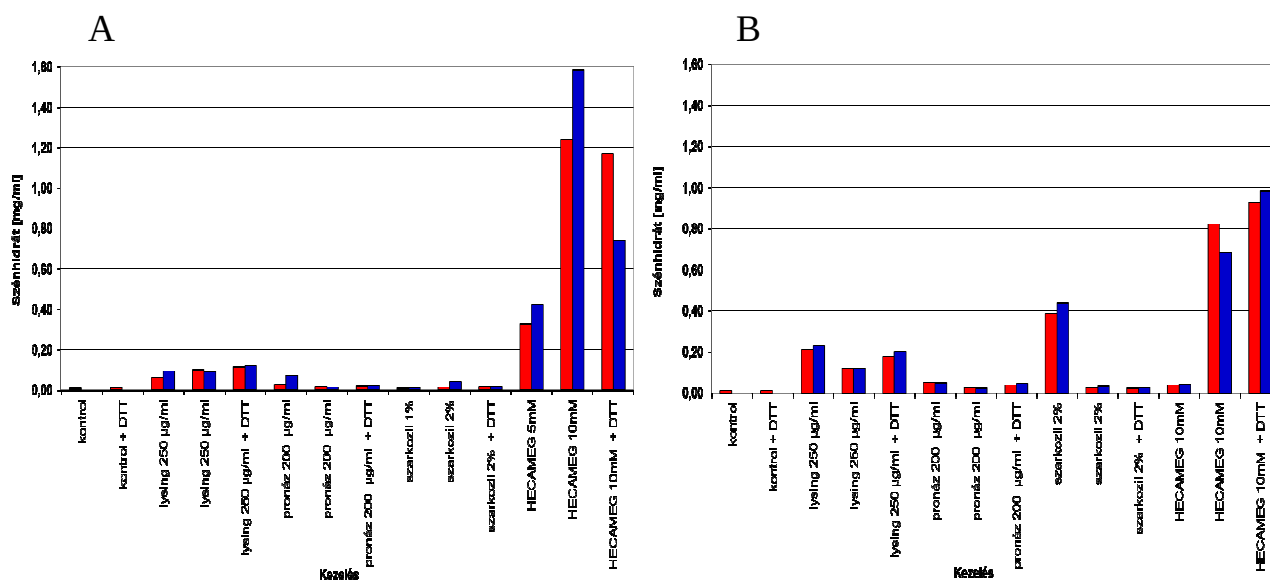
Reagens		Koncentráció	Idő	A hatás meghatározása
I. Detergensek	Hecameg	5 mM, 10 mM	1, 2 óra	feloldott fehérjék koncentráció mérése hidrofóbicitás
	Szarkozin	1%, 2%	30, 60 perc	feloldott szénhidrátok koncentráció mérése hidrofóbicitás
II. Proteázok	Pronáz	200 µg/ml	60, 120 perc	feloldott szénhidrátok koncentráció mérése hidrofóbicitás
III. Sejtfal oldó enzim	Lysing enzim	250 µg/ml	30, 60 perc	feloldott szénhidrátok koncentráció mérése hidrofóbicitás
IV. Diszulfid redukáló ágens	DTT (dithiothreitol)	5 mM	10 perc előkezelés	feloldott szénhidrátok koncentráció mérése hidrofóbicitás



46. ábra A sejtfal kezelések hatása a hidrofóbicitásra a *K. marxianus* NB sejtek esetében (kék oszlopok: hosszabb kezelési idő; piros oszlopok: rövidebb kezelési idő)



47. ábra A sejtfal kezelések hatása a hidrofóbicitásra a *S. fibuligera* CCY 42-3-1 sejtek esetében (kék oszlopok: hosszabb kezelési idő; piros oszlopok: rövidebb kezelési idő)



48. ábra A *K. marxianus* NB (A) és *S. fibuligera* CCY 42-3-1 (B) sejtfal kezelések következményeként felszabadult szénhidrát-tartalom

6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Különböző eredetű laktóz hasznosító élesztőgomba törzsek vizsgálatával kimutattam, hogy a tejtermékekről származó törzsek laktóz hasznosítás szempontjából adaptálódtak a környezethez, mivel közülük voltak szelektálhatók a legnagyobb biomassza hozamot mutató törzsek, sőt egyes törzseknél laktófilíát is kimutattam. A laktóz vagy keményítő hasznosítására képes élesztőtörzsek esetében meghatároztam azokat az optimális C- és N-forrás értékeket, amelyek az adott törzs esetében a biomassza előállítás során biztosítják a maximális biomassza hozamot: *S. fibuligera* CCY 42-3-1 (keményítő 25 g/L és élesztőkivonat 8 g/L, ill. 14 g/L keményítő és 4 g/L ammónium-szulfát); *L. kononenkoe* CCY 33-4-1 (30 g/L keményítő és 7 g/L élesztőkivonat); *Deb. occidentalis* CCY 47-3-1 (30 g/L keményítő és 7 g/L élesztőkivonat, ill. 20 g/L keményítő és 3 g/L ammónium-szulfát); *Deb. occidentalis* Y758 (23 g/L keményítő és 7 g/L élesztőkivonat, ill. 22 g/L keményítő és 3,5 g/L ammónium-szulfát). *K. lactis* NU (20 g/L laktóz és 5 g/L élesztőkivonat); *K. marxianus* NB és *D. anomala* (30 g/L laktóz és 8 g/L élesztőkivonat, ill. 23 g/L laktóz és 5 g/L ammónium-szulfát). Az optimális C- és N-források mellett meghatároztam az optimális pH-t is (4-4,5).

2. Mivel az élesztőket nehézfém ionok megkötésére kívántam alkalmazni, megállapítottam, hogy mind az élő, mind a hővel inaktívált (szárított) sejtek alkalmasak bioszorpció célra, a különböző fajokhoz tartozó törzsek között azonban esetenként lényeges különbségeket tapasztaltam egyrészt a különböző nehézfémek (Cr, Cu, Cd, Zn, Ag) akkumulációja, másrészt az élő és a szárított sejtek tekintetében. Megállapítottam, hogy a szárított sejtek a víztisztító berendezésekből kikerülő, a nehézfémeket alacsony koncentrációban tartalmazó vizek további hatékony tisztítására is képesek.

3. Élő élesztősejtek frakcionált feltárással meghatároztam az egyes sejtalkotók által akkumulált nehézfémek mennyiségét. Kimutattam, hogy a vizsgált 5 különböző élesztőfaj törzsei 70-90 %-ban sejtfalhoz kötötten akkumulálják a rezet. Hasonló arányt találtam a króm esetében a *Schizosaccharomyces pombe* RIVE 4-2-1 kivételével. Az ólom és nikkel esetében általában 10-20%-kal nagyobb volt a citoszolban és a vakuolumban akkumulálódott nehézfémek aránya.

4. Megállapítottam, hogy az élesztőgombák közül az álhifa képző fajok nagyobb hatékonysággal képeznek több sejtrétegű biofilmet a hordozó felszínén, mint az egysejtű sarjadzó fajok. Legjobb eredményt az egysejtű sarjadzó fajok közül a *Kluyveromyces marxianus* NB, míg az

álhifa képzők közül a *Saccharomycopsis fibuligera* CCY 42-3-1 törzsekkel értem el és kimutattam, hogy a rögzítés hatékonyságát a pH 5-7-es tartomány nem befolyásolja lényegesen. Míg a *Saccharomycopsis fibuligera* CCY 42-3-1 esetében mind a detergenssekkel, mind pedig a lysing enzyme (Sigma) sejtfaloldó enzimkomplex-szel történő kezelés megnövelte az adhézio hatékonyságát, addig a *Kluyveromyces marxianus* NB esetében csak a sejtfaloldó enzimkomplex-szel történő kezelés volt hatékony. Megállapítottam, hogy mindkét faj törzseinek tenyészetei a hidrofób kategóriába estek és a sejtfal dezorganizálásában hatékony kezelések hatására a sejtek hidrofillé váltak.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A kémiai környezetszennyezés mértéke ugrásszerűen emelkedik világszerte, amelynek egyik legfontosabb mutatója a nehézfémek felhalmozódása a talajban. Mobilis formáik bekerülhetnek a táplálékláncba, súlyos környezeti károkat és humán megbetegedéseket okozhatnak.

Kísérleteimet a Budapesti Corvinus Egyetem Élelmiszertudományi Karának Mikrobiológia és Biotechnológia tanszékén végeztem. Munkám során célul tűztem ki olyan élesztő biomassza kidolgozását, amely olcsó élelmiszeripari melléktermékeken (pl. tejsavó, keményítő) gazdaságosan előállítható és bioszorbensként nehézfém megkötésére alkalmazható legyen.

A kukorica ill. burgonya, valamint a tej feldolgozása során az élelmiszeriparban nagy mennyiségben keletkező olcsó melléktermékek, jelentős mennyiségű keményítőt és tejsavót tartalmaznak, melyeket magas biológiai oxigénigényük miatt veszélyes hulladékként tartanak számon (2000. évi XLIII. törvény). Egy részük megsemmisítésre kerül a szennyvíztárolókban, pedig ezek a termékek kiváló táptalajok lehetnének a mikroorganizmusok szaporodásához.

Különböző morfológiájú és sejtfalszerkezetű élesztőgombák között olyanokat kerestem, melyek a keményítőt, ill. a laktózt jól hasznosítják szénforrásként gazdaságos biomassza előállítására. A hagyományos táptalaj optimalizálási módszerek táptalaj- és időigényesek és nem képesek a valós optimum meghatározására az optimalizálásban résztvevő faktorok kölcsönhatása miatt. A mikroorganizmusok szaporodásának nyomonkövetésére számos módszer áll rendelkezésre. Ezen módszerek közül talán a turbiditás elvén működő eljárás az egyik legegyszerűbb, emellett gyors reagálási idővel rendelkezik. Az előnyeikhez tartozik még az automatizálhatósága és nagyszámú minta mérése. A gomba szaporodásának nyomonkövetésére a munkám során Multiskan (Thermo) berendezést használtam. A számítástechnika fejlődésével lehetőség nyílik arra, hogy különböző matematikai-statisztikai számítások alkalmazásával, korlátozott mérésekkel, megvalósíthatók a többfaktoros optimálások. Ennek alapján számos optimálási módszert dolgoztak ki és sikeresen megvalósítottak az ipari termelésében is, amelyekhez tartozik ún. válaszfelületi módszer (Response Surface Method: RSM), amely lehetővé teszi a különböző faktorok kombinált hatásának vizsgálatát. Az optimalizálást turbidimetria (Multiskan készülék) segítségével végeztem el. Kutatómunkám során központi elrendezésű kísérlettervezésű módszert (Central Composite Design: CCD) alkalmaztam a tápközegben lévő szén- és nitrogénforrás optimálására.

A keményítőt, mint szénforrást viszonylag kisszámú élesztőgomba faj hasznosítja, ezek közül a *Debaryomyces occidentalis* var. *occidentalis*, a *Saccharomycopsis fibuligera* és a *Lipomyces kononenkoe* fajok egy-egy törzsét vizsgáltam. Eredményeim szerint ez a *Saccharomycopsis fibuligera* CCY 42-3-1 és a *Debaryomyces occidentalis* var. *occidentalis* Y758 adták a legjobb biomassza hozamot. Az egyes tápanyag komponensek hatása azt mutatja, hogy az élesztőkivonat koncentrációjának növelése és ugyanakkor a keményítő koncentrációjának a csökkentése magasabb biomassza termelést eredményezett keményítő szénforrás esetén.

Mivel a laktóz hasznosítás genetikai szabályozás alatt áll, a tejtermékek mikroflóráját alkotó törzsek laktóz hasznosítása kedvezőbb lehet, ezért a laktóz hasznosítási vizsgálatok során törzsgyűjteményi törzsek mellett tejipari termékekből izolált törzseket is vizsgáltam. Az optimalizálás során 7 laktóz hasznosító élesztőfaj vizsgálatát végeztem el. A legjobb hozamot adó fajok a *Kluyveromyces lactis* NU, a *Kluyveromyces marxianus* NB és a *Dekkera anomala* VT voltak. Némely esetben magasabb hozamot kaptam laktóz szénforráson, mint glükózon. Ez laktófiília utal. A kísérletek során a C- és N-tartalmat, a pH-t valamint a levegőztetést optimalizáltam a magasabb hozam elérésének érdekében.

A levegőztetés növelése a táptalaj oldott oxigén koncentrációjának növekedését eredményezte, de nem befolyásolta szignifikánsan a biomassza termelést. A tejipari törzseknél sokkal jobb biomassza termelést értünk el.

Megvizsgáltam a különböző élesztőgomba fajok bioszorpciós és akkumulációs képességét. Laboratóriumi körülmények között modell fémoldatot állítottam elő, mely a következő fémeket tartalmazta: Ag, Cd, Cr, Cu, Ni. A fémakkumulációt egyrészt élő, másrészt kíméletesen szárított, de elhalt sejteknél is vizsgáltam. Elő kísérletek során beállítottam azt a sejt és fémkoncentrációt (2mM és 20mM), ahol a bioszorpciós hatást mérni lehet a megfelelő fémiot tartalmazó sóoldatok fémkoncentrációjának csökkenése alapján ICP berendezéssel. A megkötött fémek aránya csaknem független volt az oldat koncentrációjától és nem találtam lényeges különbséget az élő és szárított sejtek között. Ezért a szkrínélést 20 mM-os sóoldatokban végeztem a továbbiakban.

Az értékes nehézfémek kinyerése céljából kísérleteket végeztem a megkötött nehézfémek visszanyerésének kidolgozására. Megközelítőleg teljes mértékű deszorpciót eredményezett az EDTA (szerves komplex képző vegyület) alkalmazása.

Vizsgáltam a különböző sejtmorfológiával (dimorf, bimbózó, sarjadzó, biofilmképző vagy flokkulens) rendelkező élesztőgombák hidroxipatit (HAP) hordozóra való rögzülési képességét. A

legjobb eredményeket a dimorf élesztőgombák, a *S. fibuligera* CCY 42-3-1 és a *K. marxianus* NB adták.

A sejtek hidrofób jellege is előnyös volt a HAP tablettához való immobilizáció szempontjából. A rögzülés hatékonyságának növelése szempontjából a sejtfalon különböző kezeléseket alkalmaztam detergenssekkel, proteázokkal és lysing enzyme-vel. Eredményképpen azt kaptam, hogy a lysing enzyme-s kezelések és a detergenssek növelték a sejtek hordozóhoz való rögzülési képességét. A sejtfalon végzett kezelések elősegítették a sejtek biofilmképzését, ugyanakkor roncsolták is a sejtfalat, mely a sejtek hordozóról való leválását okozta. Az oldat pufferelése nem oldotta meg a problémát.

8. SUMMARY

Chemical pollution of the environment sharply increases globally, and one of the most significant indicators of this increasing pollution is the accumulation of heavy metals in the soil. In mobile forms they can enter the food chain, damaging the environment seriously and posing a risk to human health.

I did my experiments at the Corvinus University of Budapest, Faculty of Food Science, Department of Microbiology and Biotechnology. During my work I set a target to develop a yeast biomass, which is cheap food by-products (eg whey, starch) that can be produced economically and which can be used as biosorbent to remove heavy metal.

Among the yeasts with different morphology and cell-wall structure I was looking for strains which have good starch or lactose utilization ability for economical biomass production. The traditional nutrient solution optimization methods are solution and time-consuming and are not able to determine the real optimum because of the interaction of factors involved. To monitor the growth of microorganisms there are a number of methods available. Among all of these methods the principle of turbidity is one of the most simple procedures with fast response time. The further advantages of it are the automatization and the measuring of the large number of samples. Optimization was carried out by turbidimetric method (Multiskan, Thermo). The development of computer technology results in the opportunity to use different mathematical and statistical calculations with limited measurements to achieve a multifactorial optimization. It follows that many optimization methods have been developed and successfully implemented in industrial production, as well, which belong to the so called Response Surface Methodology (RSM), which makes the examination of the combined effect of different factors possible. During my research the Central Composite Design (CCD) was applied to the optimization of the carbon and nitrogen source of the medium.

There is a small number of yeast species which use starch as carbon source. The *Debaryomyces occidentalis* var. *occidentalis*, the *Saccharomycopsis fibuligera* and the *Lipomyces kononenkoe* species were examined. According to my results, the *Saccharomycopsis fibuligera* CCY 42-3-1 and *Debaryomyces occidentalis* var. *occidentalis* Y758 gave the best biomass yield. The effects of nutrient components show that increasing the concentration of the yeast extract and decreasing the concentration of starch at the same time resulted in a higher biomass production in the case of the starch carbon source.

Since lactose utilization is under strong genetic regulation, strains forming the microflora of dairy products could have improved properties regarding lactose utilization efficiency. Therefore strains not only from culture collections but also ones isolated earlier from dairy products were tested. Yeast strains belonging to three lactose utilizing species (*Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* and *Dekkera anomala*) were tested during optimization. Yield on lactose sometimes exceeded that of on glucose, which refers to lactofilia. During the experiments, the C- and N-content, pH and aeration was optimized to achieve a higher yield.

The increasing aeration resulted in the increase of the dissolved oxygen concentration in the culture medium but had no significant effect on biomass production. The dairy strains had much better production than the culture collections strains.

I examined the different yeast species and their accumulation and biosorption ability. A laboratory model of metal solution was prepared which contained the following metals: Ag, Cd, Cr, Cu, Ni. The metal accumulation was studied on the living and gently dried, but dead cells too. During the preliminary experiments I set the cell and metal concentrations (2mM and 20mM), where the effect of biosorption can be measured on the basis of the decreasing metal concentration of the metal content salt solution by ICP equipment. The bound metal ratio was nearly independent of the solution concentration and I found no significant differences between the living and dried cells. Therefore the screening afterwards was made in a 20 mM solution.

Experiments were carried out to develop the recovery method of the valuable heavy metal. The application of EDTA (complex-forming organic compound) resulted in almost complete desorption.

In the course of processing corn or potatoes, and milk in the food industry large amounts of cheap byproducts, containing significant amounts of starch and whey, are generated which due to high biological oxygen demand are considered as hazardous waste (Act XLIII of 2000). One part of them is destroyed in waste disposal tanks, but these products could be the excellent substrates for the reproduction of microorganisms.

Different yeast species having diverse cell morphology (budding, fission, dimorphic, being flocculent or film-forming) were tested regarding their immobilization potential on nanostructured hydroxyapatite (HAP) material. The best results were achieved with the dimorphic yeast species *Saccharomycopsis fibuligera* CCY 42-3-1 and *Kluyveromyces marxianus* NB.

The hydrophobic character of the cells was advantageous for immobilization on HAP. Chemical modification of the cell wall by detergents, proteases and cell wall lytic enzyme was tested as a possibility to increase immobilization efficiency. Treatment with cell wall lytic enzyme and certain

detergents improved the attachment of cells on the surface. HAP material, however, underwent chemical destruction during the incubation of cells aiming to produce biofilm or multiple layers of cells on the surface, and the detachment of cells was observed. The buffering of the incubation media did not solve the problem.

IRODALOMJEGYZÉK

- ADRIANO D.C. (1986): Trace elements in the terrestrial environment. Springer-Verlag. New York – Berlin – Heidelberg – Tokyo. p. 533.
- AKIN, C. (1987): Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 5, 319-367
- AKSU, Z. (2005): Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. Proc. Biochem. 40: 997 – 1026.
- AKTAS, N., BOYACI, H. et al. (2005): Optimization of lactose utilization in deproteinated whey by *Kluyveromyces marxianus* using response surface methodology (RSM). Bioresource Technology 97: 2252–2259.
- ALEXOPOULOS, C. J., MIMS, C. W. & BLACKWELL, M. (1996): Introductory Mycology 4. New York: John Wiley & Sons, 687-688. ISBN 0-471-52229-5.
- ALLOWAY, B.J. (ed). (1990): Heavy Metals in Soils. Blackie and Son Ltd. Glasgow and London. John Wiley and Sons Inc. New York.
- ARANOV, D., ROSEN, R., RON, E. Z., ROSEMAN, G. (2006): Tunable hydroxyapatite wettability: Effect on adhesion of biological molecules. Process Biochemistry 41, 2367–2372.
- ARNOLD, W. N., GARRISON, R. G. (1979): Isolation and characterization of protoplasts from *Saccharomyces rouxii*. J. Bacteriol. 137, 1386-1394.
- BACHMANN, B. J., BONNER, D. M. (1959): Protoplasts from *Neurospora crassa*. J. Bacteriol. 78, 550-556.
- BARNETT, J. A. (1992): Some controls on oligosaccharide utilization by yeasts. The physiological basis of the Kluyver effect. FEMS Microbiol. Lett. 79, 371-378.
- BARRON, N., BRADY, D., MARCHANT, R., MCHALE, L., MCHALE, A. P. (1995). Alginate-immobilized thermotolerant yeast for conversion of cellulose to ethanol. Intl Symp. On immobilized cells – basics and applications. Noordwijkerhout, the Netherlands, Nov 1995, p140
- BARTH, E. F., BRENNER, R. C. AND LEWIS, R. F. (1968): Chemical & biological control of nitrogen and phosphorus in wastewater effluent, J. of the Water Pollution Control Federation, 40(12), 2040 & 2054.
- BATTISTONI, P., FAVA, G., RUELLO, M. L. (1993): Heavy metal shock load in activated sludge uptake and toxic effects. Water Research, 27 (5): 821-827 pp
- BELEM, M. A. F. & LEE, B. H. (1998): Production of bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: an alternative. Cit. Rev. Food Sci. Nutr. 38, 598-656.

- BELLAVER, L.H., BARBOSA DE CARVALHO, N.M., ABRAHÃO-NETO, J. AND GOMBERT, A. K. (2004): Ethanol formation and enzyme activities around glucose-6-phosphate in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 exposed to glucose or lactose excess. FEMS Yeast
- BENECKE, W. (1905): Über *Bacillus chitinovor*, einen chitin zersetzenden, Spalpilz. Bot. Ztg. 63, 227.
- BERLITZ, H. D., GROSCH, W. (1999): Food Chemistry. Springer, Budapest, pp. 473-484.
- BERNSTEIN, S., TZENG, C.H. AND SISSON, D. (1977): The Commercial fermentation of cheese whey for production of protein and/or alcohol. Biotechnol. Bioeng. Symp. 7, 1-9.
- BICKERSTAFF, G. F. (1997): Immobilisation of Enzyme and Cells, Methods in Biotechnology Human Press, 1-12.
- BÍRÓ, GY. (1988): A tehéntej humánbiológiai szemszögből. Egészségtudomány, 32, 185-196.
- BISHNOI and GARIMA (2005): Fungus – An alternative for bioremediation of heavy metal containing wastewater: A review. Journal of Scientific & Industrial Research, Vol. 64, pp 93-100.
- BOZE, H., MOULIN, G., GALZY, P. (2003): Production of microbial biomass. University of Montpellier, France.
- BOZE, H., GUYOT, J. B., MOULIN, G., GALZY, P. (1989): In: Yeast as a main protagonist of biotechnology (eds. Maritini, A. and Vaughan-Martini, A.) Yeast 2: 117-121.
- BORGWARDT, S. (1994): Tests Performed on UNI Eco-Stone© Pavements of Various Ages: Expert Opinion. F. Von Langsdorff Licensing Limited.
- BRADY, D., MARCHANT, R., MCHALE, L., MCHALE, A. P. (1995). Isolation and partial characterization of β -galactosidase activity produced by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus* during growth on lactose-containing media. Enzyme Microb. Technol., vol. 17.
- BRENNER, S., DARK, F. A., GERHARDT, P., JEYMES, M. H., KANDLER, O., KELLENBERG, E., KLIENEBERGER-NOBEL, E., MC QUILLEN, K., RUBIO-HUERTOS, M., STARK, R. E., TOMCSIK, J. WEIBULL, C. (1958): Bacterial protoplasts. Nature 181, 1713-1715.
- BRIERLEY, C. L., KELLY, D. P., SEAL, K. J., BEST, D. J. (1985): In „Biotechnology” (I. J. Higgins, D.j. Best és Jones, J., eds.) pp. 163-212. Blackwell, Oxford.
- BRODELIUS, P., VANDAMME, E. J. (1991): Immobilized cell systems. 405-464. p. In: Rehm H. J., Reed G. (szerk.) Biotechnology. A Comprehensive Treatise in 8 Volumes. Volume 7/a. Weinheim: VCH
- BURGER, M., BACON, J. S. D. (1961): Observations on the form and location of invertase in the yeast cell. Biochem. J. 78, 504-511.

- CARDINI, C.E., LELOIR, L.F. (1953): Enzymatic phosphorylation of galactosamine and galactose. Arch. Biochem. Biophys. 45, 55- 64.
- CASTILLO, F. J. (1990): Lactose metabolism by yeasts. Yeast biotechnology and biocatalysis. 297-320.
- CELENZA, J. L., CARLSON, M. (1986): A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein kinase. Science 233: 1175-1180.
- CHANG, Y., DICKSON, R. (1998): Primary structure of the lactose permease gene from the yeast *Kluyveromyces lactis*. J. of Biol. Chem. 263, 16696-16703.
- CHANG, N. H., PARK, K. J., JIM, P. Y. (1999): Biotechnol. Bioeng. 63. 116
- CHASSY, B. M., THOMPSON, J. (1983): Regulation and characterization of the galactose-phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system in *Lactobacillus casei*. J. Bacteriol. 154: 1204-1214.
- CODINA, J. C., PEREZ-GARCIA, A., DE VICENTE, A. (1994): Detection of heavy metal toxicity and genotoxicity in wastewaters by microbial assay. Water Sci. Technol., 30: 145-151 pp.
- CORTÉS, G., TRUJILLO-ROLDÁN, M. A., RAMÍREZ, O.T., GALINDO, E. (2005): Production of β galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* under oscillating dissolved oxygen tension. Proc. Biochem. 40, 773-778.
- CRIST, R. H., OBERHOLSER, K., SHANK, N., NGUYEN, M. (1981): Nature of bonding between metallic ions and alga cell walls, Environ Sci technol, 15, 1212-1217.
- CSAPÓ, J., CSAPÓNÉ KISS ZS. (2002): Tej és tejtermékek a táplálkozásban. Budapest: Mezőgazda Kiadó. 464 p.
- CSATHÓ, P. (1994): A környezet nehézfém szennyezettsége és az agrártermelés. Tematikus szakirodalmi szemle. Akaprint, Budapest. 176 p.
- DE GROOT, P. W., RAM, A. F. AND KLIS, F. M. (2005). Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. Fungal Genet Biol 42, 657-75.
- DEÁK, T. (1998): Élesztőgombák a mezőgazdaságban és az iparban. Mezőgazdasági Szaktudás Kiadó, Budapest
- DERVAKOS, G. A., WEBB, C. (1991): On the merits of viable-cell immobilization. Biotechnology Advances, 9 (4) 559-612. p.
- DENGIS, P. B., ROUXHET, P. G. (1997): Surface properties of top- and bottom-fermenting yeast. Yeast, 13: 931-943.

- DIFFELS, J. F., SERET, M.-L., GOFFEAU, F., BARET, P.V. (2006): Heavy metal transporters in Hemiascomycete yeasts. *Biochimie* 88: 1639–1649
- DONMEZ G, AKSU Z. (1999): The effect of copper (II) ions on growth and bioaccumulation properties of some yeasts. *Process Biochem.* 35: 135–42
- DOSTALEK, P., PATZAK, M., MATEJKA, P. (2004): Influence of specific growth limitation on biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. Biodeteriation and Biodegradation*, 54 (2-3): 203-207 pp.
- ECCLES, H. (1999): Treatment of metal contaminated waste: why select a biological process? *Tibtech* 17, 462-465.
- EDDY, A. S., WILLIAMSON, D. H. (1957): A method of isolating protoplasts from yeasts. *Nature*, 179, 1252-1253.
- EIDE, D. (1997): Molecular biology of iron and zinc uptake in eukaryotes. *Curr Opin Cell Biol*; 9: 573–7.
- EIDE, D. (19989): The molecular biology of metal ion transport in *Saccharomyces cerevisia*. *Annu Rev Nutr*;18:441–69.
- ELSHAFEI, A. M, ABDEL-FATAH, O. M. (2001): Evidence for a non-phosphorylated route of galactose breakdown in cell-free extracts of *Aspergillus niger*. *Enzyme Microb. Technol.* 29: 76-83.
- ENGL, A., KUNZ, B. (1995): Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: effects of nutrient conditions. *J. Chem Technol. Biol.*, 63: 257-261 pp.
- ENTIAN, K. D., BARNETT, J. A. (1983): Some genetical and biochemical attempts to elucidate the energetics of sugar uptake and epylain the Klyver effect in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Curr Genet* 7: 323-325
- ERGAS, S. J., B. CÁRDENAS-GONZÁLEZ (2004) “Biofiltration: Past, Present and Future Directions,” *BioCycle*,45(6):35-39
- FALCONE, G., NICKERSON, W. J. (1956): Cell-wall manno-protein of baker’s yeast. *Science* 124, 272-273.
- FERRIS F. G., BEVERIDGE T. J. (1986): Site specificity of metallic ion binding in *Escherichia coli* K-12 lipopolysaccharide. *Can. J. Microbiol* 32, 52-55
- FISCHER, K. – BIPP, H. P. (1998): Utilization of biomass residues for the remediation of metal-polluted soils. *Environmental Science and Technology*, 32. k. 14. sz. p.2154-2161.
- FILEP, GY., KOVÁCS, B. és SZABÓ, I. (1999): A káros anyagok reakciói a hulladékot befogadó közetekkel, MÁFI tanulmánykötet.

- FLEMMING, H. C., WINGENDER, J. (2001): Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)-Part II: Technical aspects. *Water Sci. Technol.*, 43, 9-16.
- FRENCH, D. (1984): Organization of starch granules, *Starch: Chemistry and Technology*, Whistler R. L., Bemiller J. N., Paschall E. F. Academic Press, London, pp. 183-247.
- FUKUHARA, M. B., BREUNIG, K. D., BIANCHI, M. M. et al. (2000): Regulation of primary carbon metabolism in *Kluyveromyces lactis* *Enzyme and Microbial Technology* 26, 771-780.
- FUKUHARA, H. (2003): The Kluyver effect revisited. *FEMS Yeast Research*. 3, 327-331.
- FUNG, M. C., BOWEN, D. L. (1996): Silver products for medical indications: risk-benefit assessment. *Journal of toxicology. Clinical toxicology* 34 (1): 119–26.
- GADD, G. M., DE ROME, L. (1988): Biosorption of copper by fungal melanin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 29: 610-617.
- GADD, G. M. & WHITE, C. (1993): Microbial treatment of metal pollution - a working biotechnology? *Trends Biotechnol* 11, 353-359.
- GASZTONYI & LÁSZTITITY (1993): *Élelmiszerkémia* 1, 2. Mezőgazda kiadó, Budapest, pp. 106, 128-130.
- GALUN, M., KELLER, P., FELDSTEIN, H., GALUN, E., SIEGEL, S., SIEGEL, B. (1983): Recovery of uranium (VI) from solution using fungi II. Release from uranium loaded *Penicillium* biomass. *Water Air & Soil Pollut.*, 20, 227-85.
- GALUN, M.; GALUN, E.; SIEGEL, B Z.; KELLER, P.; LEHER, H. ET AL. (1987): Removal of metal ions from aqueous solutions by *Penicillium* biomass: Kinetic and uptake parameters, *Water, Air, Soil, Pollut.* 33, 359-371.
- GAJA, J. (1914): Sur l'action de quelques fermentssur les hydrates de carbone de la levure. *C. R. Seances Soc. Biol.* 77, 2-4.
- GAJA, J. (1919): Emploi des ferments dans les e'tudes de physiologie cellulaire. Le globule de levure depuille de sa membrane. *C. R. Seances Soc. Biol.* 82, 719-720.
- GANCENDO, J. M. (1998): Yeast carbon catabolite repression. *Microb. Mol. Biol. Rev.* 62: 334-361.
- GEKAS, V., LEIVA, L. (1985): Hydrolysis of lactose: A literature Review. *Process Biochemistry*. Ricknansworks. v.20, p. 2-12.
- GHARIEB, M. M, GADD, G. M. (2004): Role of glutathione in detoxification of metal (loid)s by *Saccharomyces cerevisiae*. *BioMetals*. 17:183–8.
- GILLER, K. E., WITTER, E., McGRATH, S. P. (1998): Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: A review. *Soil Biol. Biochem.*, 30 (10-11): 1389-1414 pp.

- GOLDBERG, S., DOYLE, R. J., ROSENBERG, M. (1990): Mechanism of enhancement of microbial cell hydrophobicity by cationic polymers. *Journal of Bacteriology* 172: 5650-5654.
- GONZÁLEZ-SISO, M.I. (1996): The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Biores. Technol.* 57, 1-11.
- GÖBLÖS SZ. (2004): Tejipari szennyvizek hatékony kezelése. Alkalmazott Kutatási Alapítvány Biotechnológiai Intézet.
- GUSTAVO, G. F., ELMAR, H., CHRISTOPH, W., ANDREAS, K. G. (2008): The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol*, 79: 339-354.
- GYÓRI, D. (1984): A talaj termékenysége. Mezőgazdasági Kiadó. Budapest.
- HALLAS L. E.; ADAMS W. J.; HEITKAMP M. A. (1992): *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 1215-1219
- HEITKAMP M. A.; CAMEL V.; REUTER T. J.; ADAMS W. J. (1990): *Appl. Env. Microbiol.*, 56, 2967-2973
- HERBERT, D., PHIPPS, P.J. AND STRANGE, R. E. (1971): Chemical Analysis of Microbial Cells. Microbiological Research Establishment, Porton, Nr. Salisbury, Wilts., England in *Methods in Microbiology*. 249-253.
- HIROKI M. (1992): Effects of heavy metal contamination on soil microbial populations. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 38: 141-147 pp.
- HOLDEN, M., TRACEY, M. V. (1950): A study of enzymes that can break down tobacco-leaf components. 2. Digestive juice of *Helix* on defined substrates. *Biochem. J.* 47, 407-414.
- HUANG, C. P., WESTMAN, D., QUIRK, K., HUANG, J. P. & MOREHART, A. L. (1988): Removal of cadmium (11) from dilute solutions by fungal biomass. *Particulate Sci. Technol.*, 6, 405-419.
- JIANLONG, W., CAN, C. H. (2006): Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review. *Biotechnology Advances* 24, 427 – 451.
- JINSHENG D., ROBERT C. D. (1997): Glucose represses the lactose–galactose regulon in *Kluyveromyces lactis* through a SNF1 and MIG1- dependent pathway that modulates galactokinase (GAL1) gene expression. *Nucleic Acids Research*, 1997, Vol. 25, No. 18
- JOHN, H. D. (2002): "Heavy metals" a meaningless term? (IUPAC Technical Report)" *Pure and Applied Chemistry*. Vol. 74, pp. 793-807. DOI:10.1351/pac200274050793
- JOHN, H. (2009): *Colloidal Silver: Medical Uses, Toxicology & Manufacture*, Clear Springs Press, LLC III.kiadás
- JOHNSTON, M. (1987): A model fungal gene regulatory mechanism: the GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 51: 458-476.

- KÁDÁR, I. (1991): A talajok és növények nehézfém-tartalmának vizsgálata. Környezet- és Természetvédelmi Kutatások. Budapest: A Környezet – és Területfejlesztési Minisztérium és az MTA Talajtani és Agrokémiai Kutató Intézete kiadványa. 104 p.
- KÁDÁR, I. (1995): A talaj-növény-állat-ember tápláléklánc szennyeződése kémiai elemekkel Magyarországon (KTM-MTA TAKI), Budapest, 387
- KÁDÁR, I. (1998): A szennyezett talajok vizsgálatáról. Kármentesítési kézikönyv 2. Környezetvédelmi Minisztérium. Budapest.
- KAIM W., SCHWEDERSKI B. (1994): Bioinorganic chemistry: Inorganic elements in the chemistry of life. Wiley Chichester.
- KAKONYI, I., KOVACS, M., KISKO, G., NGUYEN D. Q., MARAZ, A. (2005): Laktóz hasznosító élesztőgombák szaporodásának optimalizálása és fiziológiai vizsgálatuk. Lippay János-Ormos, Imre-Vass Károly Tudományos Ülésszak, Budapest, Kivonat
- KAKONYI, I., SZABO, O., KOVACS, M., NGUYEN, D. Q., KISKO, G., MARAZ, A. (2006): Optimzation of biomass production of starch utilizing yeast species. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, Volume 53, Number 3. Keszthely Book of abstracts
- KÁKONYI, I., KOVÁCS, M., MARÁZ, A. (2011): Immobilization of *Schizosaccharomyces pombe* on hydroxyapatite biomaterial: Enhancement of cell adhesion by different cell wall treatments and application of a flocculent strain. Acta Alimentaria (közlésre elfogadva)
- KAPOOR, A., VIRARAGHAVAN, T. (1997): Heavy metal biosorption sites in *Aspergillus niger*. Biores. Technol. 61. 221–227.
- KARKALAS, J. (1985): An improved enzymatic Method for the Determination of Native and Modified Starch, J Sci. Food Agric., 36, 1019.
- KEVEI, F., KUCSERA, J., MANCZINGER, L., VÁGVÖLGYI, CS. (1999): Mikrobiológia II. JatePress Szeged
- KLEIN, J., ZIEHR, H. (1990): Immobilization of microbial cells by adsorption. Journal Biotechnology, 16 (1) 1-16. p.
- KLIS, F. M., MOL, P., HELLINGWERF, K., BRUL, S. (2002): Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiology Reviews, 26: 239-256.
- KLIS, F. M., BOORSMA, A., DE GROOT, W. J. (2006): Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 23: 185-202.
- KOURKUTAS, Y., BEKATOROU, A., BANAT, I. M., MARCHANT, R., KOUTINAS, A. A. (2004): Immobilization technologies and support materials suitable in alcoholic beverages production: a review. Food Microbiology, 21 (4) 377-397. p.

- KOVACS, M., MARAZ, A. (2003): Molecular characterization and physiological analysis of film-forming wine yeast strains. 14th Intern. Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Balatonfüred Book of Abstract
- KOVACS, M., MARAZ A. (2005): Role of cell surface molecules in hydrophobicity and film formation of *Saccharomyces cerevisiae*. XXIVth Intern. Spec. Symp. On Yeasts, Spain. Book of Abstracts
- KUREK, E., CZABAN, J., BOLLAG, J.M. (1982): Appl. Environ. Microbiol. 43, 1011
- KURTZMAN, P., FELL, J. W. (1998): The Yeast- A taxonomic Study, Elsevier kiadó.
- LAINE, R. A. (1994): A calculation of all possible oligosaccharide isomers both branched and linear yields 1.05×10^{12} structures for a reducing hexasaccharide: the Isomer Barrier to development of single-method saccharide sequencing or synthesis system. Glycobiology, 4, 759-767
- LEE, J. H., LEE, K. S., CHANG, J. S., CHAO, W. S. (2004): Biocompatibility of Si-Substituted Hydroxyapatite. Key Engineering Materials Vols. 254-256, pp 135-138
- LELOIR, L. F. (1951): Enzymatic transformation of uridine diphosphate glucose into galactose derivative. Arch. Biochem. Biophys. 33, 186-194.
- LEMMEL, S. A., HEIMSCH, R. C. AND KORUS, R. A. (1980): Kinetics of growth and amylase production of *Saccharomycopsis fibuligera* on potato processing wastewater. Appl. Environ. Microbiol. 39 : 387-393.
- LICHTFIELD, H. J. (1989): Single Cell Protein. In A Revolution in Biotechnology, ed. J. L Marx. Cambridge Univ. Press.
- LIEHR, S. K., CHEN, H. J., LIN, S. H. (1994): Metals removal by algal biofilms. Wat. Sci. Tech., 30 (11): 59-68 pp.
- LIU, Y., LAM, MC., FANG, HHP. (2001): Adsorption of heavy metals by EPS of activated sludge. Water Sci. Technol. 43, 59-66.
- LIU, RX., TANG, HX., LAO, WX. (2002): Advances in biosorption mechanism and equilibrium modeling for heavy metals on biomaterials. Prog. Chem.,14, 87-92 (in Chinese).
- LOPEZ, A. et al. (2000): Effect of pH on the biosorption of nickel and other heavy metals by *Pseudomonas fluorescens* 4F39. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 24. 146–151.
- LU, Y., WILKINS, E. (1996): Heavy metal removal by caustic-treated yeast immobilized in alginate. Journal of Hazardous Materials 49: 165 – 179
- LUTFIYYA, L. L.; JOHNSTON, M. (1996): Two zinc-finger-containing repressors are responsible for glucose repression of *SUC2* expression. Mol. Cell. Biol. 16: 4790-4797.

- MANCZINGER, L., PÓCSI, I., VETTER, J. (2003): Gombaélettan. In JAKUCS, E. - VAJNA, L. (Szerk.): Mikológia. Budapest: Agroinform Kiadó és Nyomda, 139-195. o.
- MARAZ, A., GELETA, A. (2001): Ethanol induced cell aggregation (flocculation) and its physiological background in *Schizosaccharomyces pombe* RIVE 4-2-1. *Acta Biologica Hung.* 52, 231-239
- MC CANN, A. K. & BARNETT, J. A. (1986): *Yeast* 2:109-115.
- MERRIN, J. S., SHEELA, R., SASWATHI, N., PRAKASHAM, R. S. & RAMAKRISHNA, S. V. (1998): Biosorption of chromium (VI) using *Rhizopus arrhizus*. *Ind J Exp Biol*, 36, 105231055.
- MOHAMED, C., AMINA, S., HASSAN, E., FOUAD, S., MICHEL, P. (2008): Wastewater treatment by adsorption onto *Carpobrotus edulis* used as natural adsorbent. Institut Europeen des Membranes, CRNS, Montpellier, France.
- MONTGOMERY, D. C. (2004): Design and analysis of experiments, 5th edition. New York: Wiley;
- MULLEN, M. D., WOLF, D. C., FERRIS, F. G., BEVERIDGE, T. J., FLEMMING, C. A., BAILEY, G. W. (1989): Bacterial sorption of heavy metals. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55 (12): 3143-3149 pp.
- MUZARELLI, R. A. (1972): Chitin. Pergamon press, London.
- NARZISS, L. (1981): A sörgyártás. Budapest: Mezőgazdasági Kiadó. 17-98-188-220 pp.
- NECAS, O. (1971): Cell wall synthesis in yeast protoplasts. *Bacteriol Rev.* 35 149-170. Review.
- NELSON, D. L. (2004): *Lehninger Principals in Biochemistry*, 4th Edition. Palgrave Macmillan
- NEUMÜLLER, O. A. (1983): *Chemie-Lexikon*. J. Auflage. Franckh'she Verlagshanlung, Kosmos-Verlag, Stuttgart. 329. p.
- NORTON, S., D'AMORE, T. (1994): Physiological effects of yeast cell immobilization: applications for brewing. *Enzyme and Microbial Technology* 16 (5) 365-375. p.
- NYESTE, L. (1993): Biomérnöki műveletek és alapfolyamatok. Műegyetemi kiadó.
- NYILASI, L. (1980): Általános kémia. Budapest: Gondolat Könyvkiadó, 316 p.
- OLIVIA, J. M., BALLESTEROS, M., NEGRO, M. J., et al. (2004): Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 (J). *Process Biochemistry*, 39:1843-1848.
- OMAR, N. B., MERROUN, M. L., PENALVER, J. M. A. & MUNOZ, T. G. (1997): *Chemosphere*, 35, 2277-2283.
- ONJIA, I. S., A., J. M., S. R. (2005): Comparison of hydroxiapatit sorption properties towards

cadmium, lead, zinc and strontium ions.

PAIS, I. (1998): A mikroelemek biológiai szerepe. Egyetemi jegyzet. 50-51. o.

PARK, J. K., LEE, J. W., JUNG, J. Y. (2003): Cadmium uptake capacity of two strains of *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Enzyme and Microbial Technology*, 33 (4): 372-373 pp

PAPP, S., KÜMMEL, R. (1992): Környezeti kémia. Tankönyvkiadó, Budapest, 264-266.

PÁL, K. (2003): Réz a környezetben. Környezetvédelmi füzetek. BME OMIKK, 3-5, pp 79.

PASTERNAKIEWICZ, A. (2006): The growth of *Saccharomyces cerevisiae* yeast in cadmium enriched media. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.*, 5 (2): 39-45 pp.

PEREGOL, P., HOWELL, S. B. (1997): Molecular mechanisms controlling sensitivity to toxic metal ions in yeast. *Toxicol Appl Pharmacol*; 147:312–8.

PHILLIPS C. R., POON Y. C. (1988): Immobilization of Cells; Springer-Verlag Berlin Heidelberg (ISBN 3-540-18637-9)

PILKINGTON, H., MARGARITIS, A., MENSOUR, N., RUSSEL, I. (1998): Fundamentals of immobilised yeast cells for continuous beer fermentation: A review. *Journal of the Institute of Brewing*, 104 (1) 19-31. p.

PONTON, J., JONES, I. M. (1986): Analysis of cell wall extracts of *Candida albicans* by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and Western blot techniques. *Infect Immun* 53: 565-572.

PRETORIUS, I. S., LAMBRECHTS, M. G., MARMUR, J. (1991): The glucoamylase multigene family in *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*: an overview. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1991;26(1):53-76.

PRIOR, C., MAMESSIER, P., FUKUHARA, H., CHEN, X.J. AND WÉSOLOWSKY-LOUVEL, M. (1993): The hexokinase gene is required for transcriptional regulation for the glucose transporter gene RAG1 in *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Cell. Biol.* 13, 3882- 3889.

PUZDER, T., CSÁKI, F., GRUIZ, K., HORVÁTH, Z., MÁRTON, T. ÉS SAJGÓ, Z. (2001): Kármentesítési kézikönyv 4. Kármentesítési technológiák, Környezetvédelemi és Vízügyi Minisztérium.

RAMAKRISHNA, S. V., PRAKASHAM, R. S. (1999): Microbial fermentations with immobilized cells. *Curr. Sci.*, 77: 87-100

RANKAMA, D. and SAHAMA, T. H. G. (1968): Geochemistry. Chicago, Illinois: Univ. of Chicago Press. 912 pp.

- RAPOPORT, A., BOROVIKOVA, D., KOKINA, A., PATMALNIEKS, A., POLYAK, N., PAVLOVSKA, I., MEZINSKIS, G., DEKHTYAR, Y. (2011): Immobilisation of yeast cells on the surface of hydroxyapatite ceramics. *Process Biochemistry* 46, 665–670.
- REYNOLDS, T. B, FINK, G. R. (2001): Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science* 291: 878–881.
- RILEY, M. I. AND DICKSON, R. C. (1984): Genetic and biochemical characterisation of the galactose gene cluster in *Kluyveromyces lactis*. *J. Bacteriol.* 158, 705-712.
- ROSENBERG, M., GUTNICK, D., ROSENBERG, E. (1980): Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology letters*, 9: 29-33.
- ROSS, K. L., DAVIS, C. N., FRIDOVICH-KEIL, J. L. (2004): Differential roles of the Leloir pathway enzymes and metabolites in defining galactose sensitivity in yeast. *Mol. Gen. Metabolism*. 83, 103-116.
- SANCHEZ, J. M., ARIJO, S., MUNOZ, M. A., MORINIGO M. A., BORREGO, J. J. (1994): *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **41**, 480-486
- SCHINGOETHE, D. J. (1976): Whey utilization in animal feeding – summary and evaluation. *Journal of Dairy Science*, 59, 556-570. p.
- SCHREUDER, M. P., MOOREN, A. T., TOSCHKA, H. Y., VERRIPS, C. T. AND KLIS, F. M. (1996). Immobilizing proteins on the surface of yeast cells. *Trends Biotechnol* 14, 115-20.
- SEVELLA, B. (2001): Biomérnöki műveletek példatár. Műegyetemi Kiadó, 65031
- SHAREEF, K. M. (2009): Sorbents for contaminants uptake from aqueous solutions. Part I. Heavy metals. *World Journal of Agricultural Sciences*, 5 (S): 819-831 pp.
- SHEETZ, R. M., DICKSON, R. C. (1981): LAC4 is the structural gene for β -galactosidase in *Kluyveromyces lactis*. *Genetics*. 98, 729- 745.
- SHIMOI, H., SAKAMOTO, K., OKUDA, M. et al. (2002): The AWA1 gene is required for the foam-forming phenotype and cell surface hydrophobicity of sake yeast. *Appl Environ Microbiol* 68: 2018–2025.
- SUH, J. H., YUN, J. W., KIM, D. S. (1999): Effect of extracellular polymeric substances (EPS) on Pb^{2+} accumulation by *Aureobasidium pullulans*. *Bioprocess Biosyst Eng* 1999; 21:1–4.
- SHUMATE, S. E., STRANDBERG, G. W. (1985): Accumulation of metals by microbial cells. *Comprehensive Biotechnology*, Pergamon Press
- SHUSTER, CW., DOUDOROFF M. (1967): Purification of 2-keto-3-deoxy-6-phosphohexonate aldolases of *Pseudomonas saccharophila*. *Arch. Mikrobiol.* 59: 279-86.

- SIEGEL, S., KELLER, P., GALUN, M., LEHR, H., SIEGEL, B. & GALUN, E. (1986): Biosorption of lead and chromium by *Penicillium* preparations. *Water Air Soil Poll*, 27, 69-75.
- SIMON, L. PROKISCH, J. KOVÁCS, B. GYŐRI, Z. (1998): Phytoextraction of heavy metals from a galvanic und contaminated soil. In: *Soil Pullution* (Ed. Filep, Gy.) Agricultural Univ., Debrecen. 274-286. p.
- SIMON, L. (1999): Talajszennyeződés, talajtisztítás. *Környezetügyi Műszaki Gazdasági Tájékoztató*, 5. kötet. Környezetgazdálkodási Intézet. Budapest.
- SIMS, A. P. AND BARNETT, J. A. (1991): Levels of activity of enzymes involved in anaerobic utilization of sugars by six yeast species: observations towards understanding the Kluyver effect. *FEMS Microbiol. Lett.* 61, 295-298.
- SINGLETON, I., SIMMONS, P. (1996): Factors affecting silver biosorption by and industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 65. 21–28.
- SMITH, J. E., (2004): *Biotechnology*. Cambridge University Press.
- SPENCER, M. I. & VAN, U. N. (1979): *Eur. J. Appl. Microbiol.* 6: 241–250
- SREEKRISHNA, K. and DICKSON, R. C. (1985): Construction of strains of *Saccharomyces cerevisiae* that grow on lactose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 7909-7913
- STEPHEN, J. R., MACNAUGHTON, S. J. (1999): Developments in terrestrial bacterial remediation of metals. *Current Opinion in Biotechnology* 10: 230-233.
- STRAVER, M. H., KIJNE, J. W. (1996): A rapid and selective assay for measuring cell surface hydrophobicity of brewer's yeast cells. *Yeast* 12: 207–213
- SZABÓ, S. A., REGIUSNÉ, M. Á., GYŐRI, D., SZENTMIHÁLYI, S., (1987): Mikroelemek a mezőgazdaságban I. (Esszenciális mikroelemek). *Mezőgazdasági Kiadó*. Budapest.
- SZENDE, T., ANDRADA, M., CERASELLA, I., SILVIA, B., CORNELIA, M. (2011): Application of immobilized waste brewery yeast cells for Cd²⁺ removal. Equilibrium and kinetics. *J. Serb. Chem. Soc.* 76 (0) 1–11.
- TAMÁS, J. (1995): Nehézfémek eltávolítása szennyezett talajokból és szennyvíziszapokból Tanulmány. <http://gisserver1.date.hu>.
- THOMPSON, D.B. (2000): On the non-random nature of amylopectin branching, *Carboh. Polym.*, Vol. 43, pp. 223-239.
- TEZOS, M. & KELLER, D. M. (1983): Adsorption of radium 226 by biological origin adsorbents. *Biotechnol Bioeng*, 25, 201-215.

- TEZOS, M. & NOH, S. H. (1984): Extraction of uranium from sea water using biological origin adsorbent. *Can. J. Chem. Engng*, 62, 559-61.
- TRUMBLY, R. J. (1992): Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 6: 5-21.
- UESHIMA M, TANAKA S, NAKAMURA S, YAMASHITA K. (2002): Manipulation of bacterial adhesion and proliferation by surface charges of electrically polarized hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res.* 60:578–84.
- VAN DER MEI, H. C., BOS, R., BUSSCHER, H. J. (1993): Hydrophobic and electrostatic cell surface properties of thermophilic dairy Streptococci. *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (12): 4305-4312.
- VALKO, M., MORRIS, H., CRONIN, M. T. D. (2005): Metals Toxicity and Oxidative Stress. *Cur. Med. Chem.* 12: 1161-1208.
- VARGA, E., MARAZ, A. (2002): Yeast cells as sources of essential microelements and vitamins B₁ and B₂. *Acta Alimentaria*, Vol. 31 (4), pp. 393-405.
- VASDINYEI, R., DEÁK, T. (2003): Characterization of yeasts isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques. *International Journal of Food Microbiology* 86. pp. 123-130
- VEGLIO, F., BEOLCHINI, F. (1997): Removal of metals by biosorption: a review. *Hydrometallurgy*, 44, 301-16.
- VOLESKY, B. (1990a): Biosorption and biosorbents. In: Volesky, B. editor. *Biosorption of heavy metals*. Florida: CRC press, p. 3-5.
- VOLESKY, B. (1990b): Biosorption by fungal biomass. In: Volesky, B. editor. *Biosorption of heavy metals*. Florida: CRC press, p. 140-71.
- VOLESKY, B. (2001): Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. *Hydrometallurgy*. 59: 203–216 pp.
- ZENG, W., LI, X., YANG, QI., ZENG, G., SHEN, X., ZENG, Y. (2007): Adsorption of Cd(II) and Cu(II) from aqueous solution by carbonate hydroxylapatite derived from eggshell waste. *Journal of Hazardous Materials* 147, 534-539.
- ZENKE, F., ZACHARIAE, W., LUNKES, A. & BREUNIG, K. D. (1993): Gal80 proteins of *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae* are highly conserved but contribute differently to glucose repression of the galactose regulon, *Mol. Cell. Biol.* 13, 7566-7576.
- WALKER, G. M. (1998): *Yeast physiology and biotechnology*. John Wiley & Sons, Chichester

WALT J. P. VAN DER AND JOHANNSEN E. (1984): Genus 13. *Kluyveromyces* van der Walt emend – Van der Walt. In: Kreger-Van Rij N JV (ed) *The Yeasts*, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 224-251.

WEIRICH, J., GOFFRINI, P., KUGER, P., FERRERO, I., BREUNIG, K. D. (1997): Influence of mutations in hexose-transporter genes on glucose repression in *Kluyveromyces lactis*. *Eur. J. Biochem.* 249: 248–257

WHITE, C., GADD, G. M. (1987): The uptake and cellular distribution of zinc in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Gen. Microbiol.*, 133, 727-737.

WILLAERT, R. G., BARON, G. DE BACKER, L. (1996): Immobilized living cell systems. Modelling and experimental methods. Chichester, England: John Wiley & Sons 1-20. p.

WILHELMI, B. S. & DUNCAN, J. R. (1996): Reusability of immobilised *Saccharomyces cerevisiae* with successive copper adsorption–desorption cycles. *Biotechnol. Letter.* 18: 531–536.

WOLF, K. (1996): *Nonconventional Yeasts in Biotechnology*. Springer, ISBN 3-540-59482-5

Törvények, rendeletek:

10/2000. (VI. 2.) KöM-EüM-FVM-KHVM együttes miniszteri rendelet a felszín alatti víz és a földtani közeg minőségi védelméhez szükséges határértékekről

33/2000. (III. 17.) Korm. rendelet a felszín alatti vizek minőségét érintő tevékenységekkel összefüggő egyes feladatokról

219/2004. (VII. 21.) Korm. rendelet a felszín alatti vizek védelméről

A SZERZŐ TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEI

Folyóiratcikkek

IF-es folyóiratcikk:

I. Kákonyi, M. Kovács, A. Maráz (2011) Immobilization of *Schizosaccharomyces pombe* on hydroxyapatite biomaterial: Enhancement of cell adhesion by different cell wall treatments and application of a flocculent strain. *Acta Alimentaria* (közlésre elfogadva)

M. Magony, **I. Kákonyi**, A. Gara, P. Rapali, K. Perei, K. L. Kovács, G. Rákhely (2007) Overlaps between the various biodegradation pathways in *Sphingomonas subarctica* SA1. *Acta Biologica Hungarica* 58 (Suppl.), pp. 37–49. DOI: 10.1556/ABiol.58.2007.Suppl.4

Konferencia kiadványok

Nemzetközi konferencia (teljes)

Magony, M., Perei, K., **Kákonyi, I.**, Kovács, L. K., Rákhely, G. (2004) Biodegradation of xenobiotics. European Symposium on Environmental Biotechnology, ESEB., pp. 807–810. (ISBN 90 5809 653X)

Nemzetközi konferencia (összefoglaló)

I. Kákonyi, M. Kovacs, G. Kisko, A. Maraz (2005) Cellular distribution of accumulated heavy metals in different yeast species. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, Volume 52, Supplement, , Keszthely, konferencia kiadvány: 65.

I. Kákonyi, M. Kovacs, G. Kisko, A. Maraz (2006) Accumulation and Cellular Distribution of Heavy Metals in Different Ascomycetous and Basidiomycetous Yeasts. Food Micro 2006, food safety and food biotechnology: diversity and global impact, Bologna, Italy, konferencia kiadvány: 102.

I. Kákonyi, M. Kovacs, G. Kisko, A. Maraz (2006) Cellular distribution of accumulated heavy metals in different yeast species. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, Volume 53, Number 3, September, Keszthely, konferencia kiadvány: 285.

I. Kákonyi, K. Vida, M. Weissgerber, A. Maraz (2007) Comparison of stress sensitivity of *Kluyveromyces lactis* and *Kluyveromyces marxianus* under oxygen and carbon limitations. International Specialized Symposium on Yeasts From Alcoholic Beverages to Bioethanol for Transportation: a New Challenge for Fermenting Yeasts, Sorrento, Italy, konferencia kiadvány: 82.

I. Kakonyi, K. Vida, A. Maraz (2007) Influence of fermentation conditions on viability and ethanol production of *Kluyveromyces lactis* and *K. marxianus*. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, Volume 54, Supplement, Keszthely, konferencia kiadvány: 55.

A. Maráz, M. Kovács, **I. Kákonyi**, G. Kiskó. Yeast cells biosorbents for toxic heavy metals. 9th Congress of the Slovenian Biochemical Society and 5th Congress of the Slovenian Microbiological Society with International Participation 3rd CEFORM Central European Forum for Microbiology, Maribor, konferencia kiadvány: 69.

Magyar nyelvű (teljes)

I. Kakonyi, M. Kovacs, G. Kisko, A. Maraz (2006) *Kluyveromyces* és *Dekkera* élesztőgomba törzsek szaporodásának optimalizálása válaszfelület módszerrel. Márton Áron Tudományos Felolvasó ülés, Budapest, konferencia kiadvány: 50-59.

Magyar nyelvű (összefoglaló)

I. Kakonyi, M. Kovacs, G. Kisko, Q. D. Nguyen, A. Maraz (2005) Laktóz hasznosító élesztőgombák szaporodásának optimalizálása és fiziológiai vizsgálatuk. „Lippay János-Ormos Imre-Vass Károly” Tudományos Ülésszak, Budapest, konferencia kiadvány: 150-151.

Maráz Anna, Kovács Mónika, Kiskó Gabriella és **Kákonyi Ildikó** (2007) Mikrobák alkalmazása nehézfémek megkötésére szennyvízből. A kármentesítés aktuális kérdései, Budapest, konferencia kiadvány: 27-28.

I. Kakonyi, K. Vida, M. Weissgerber, A. Maraz (2007) *Kluyveromyces lactis* és *Kluyveromyces marxianus* szaporodását és etanolos erjesztését befolyásoló környezeti tényezők vizsgálata. „Lippay János-Ormos Imre-Vass Károly” Tudományos Ülésszak, Budapest, konferencia kiadvány: 64-65.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Külön köszönet illeti program és témavezetőmet, Dr. Maráz Annát iránymutatásáért, tanácsaiért, dolgozatom javítását szolgáló kritikai észrevételeiért, valamint hogy megteremtette számomra a kutatómunka elvégzéseinek feltételeit.

Köszönetet mondok Dr. Kiskó Gabriellának és Dr. Kovács Mónikának a sok gyakorlati tapasztalat átadásáért és segítő tanácsaikért.

Köszönettel tartozom Dr. Nguyen Duc Quangnak a szaporodás optimalizálásához nyújtott segítségéért.

A tanszék többi dolgozójának, akik mindig rendelkezésemre álltak, bármilyen kérdéssel fordultam is hozzájuk, és a legnehezebb pillanatokban is támaszul szolgáltak.

Végül, hálával tartozom férjemnek, családomnak, barátaimnak és mindazoknak, akik megértésükkel és támogatásukkal hozzájárultak a doktori dolgozat sikeres létrejöttéhez.