

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

MOLNÁR JUDIT

MOSONMAGYARÓVÁR

2019

SZÉCHENYI ISTVÁN EGYETEM
MEZŐGAZDASÁG-ÉS ÉLELMISZER-TUDOMÁNYI KAR
ÉLELMISZER-TUDOMÁNYI TANSZÉK

Wittmann Antal Növény-, Állat- és Élelmiszer-tudományi
Multidiszciplináris Doktori Iskola

Doktori Iskola vezető:

Prof. Dr. Ördög Vince DSc
egyetemi tanár

Pulay Gábor Élelmiszer-tudományi Doktori Program

Programvezető:

Prof. Dr. Varga László DSc
egyetemi tanár

Tudományos vezetők:

Prof. Dr. Varga László DSc
egyetemi tanár

Dr. habil. Ásványi Balázs PhD
egyetemi docens

**ÉLESZTŐTÖRZSEK SEJTTÖMEG PRODUKCIÓJÁNAK ÉS
FERMENTÁCIÓS AKTIVITÁSÁNAK BEFOLYÁSOLÁSA
NÖVÉNYI SZUBSZTRÁTOKKAL**

Készítette:

MOLNÁR JUDIT

Mosonmagyaróvár

2019

**ÉLESZTŐTÖRZSEK SEJTTÖMEG PRODUKCIÓJÁNAK ÉS
FERMENTÁCIÓS AKTIVITÁSÁNAK BEFOLYÁSOLÁSA
NÖVÉNYI SZUBSZTRÁTOKKAL**

**Írta:
MOLNÁR JUDIT**

**Készült a Széchenyi István Egyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszer-
tudományi Kar Wittmann Antal Növény-, Állat- és Élelmiszer-
tudományi Multidiszciplináris Doktori Iskola
Pulay Gábor Élelmiszer-tudományi Doktori Programja keretében
Témavezetők: Prof. Dr. Varga László és Dr. habil. Ásványi Balázs**

Elfogadásra javaslom (igen / nem)

(aláírás)

A jelölt a doktori szigorlaton.....%-ot ért el,

Mosonmagyaróvár,

**.....
a Szigorlati Bizottság Elnöke**

Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom (igen/nem)

Első bíráló (Dr.) igen/nem

(aláírás)

Második bíráló (Dr.) igen/nem

(aláírás)

Esetleg harmadik bíráló (Dr.) igen/nem

(aláírás)

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján%-ot ért el.

Mosonmagyaróvár,

A Bírálóbizottság elnöke

Doktori (PhD) oklevél minősítése.....

Az EDT elnök

TARTALOMJEGYZÉK

KIVONAT	7
ABSTRACT.....	9
1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS.....	11
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	13
2.1. Élelmiszer-biztonság és élelmiszeripari ellenőrzés	13
2.2. Takarmánybiztonság.....	15
2.3. Élelmiszeripari melléktermékek hasznosítása	15
2.4. A melasz, mint élelmiszeripari melléktermék	17
2.5. A kukoricalekvár, mint élelmiszeripari melléktermék.....	21
2.6. Növényi alapú tápoldatok hasznosítása az egysejt-fehérje előállításban	23
2.7. Fermentációs eljárások	24
2.8. Egysejt-fehérje előállítás fermentációval.....	27
2.9. Funkcionális élelmiszerek és funkcionális takarmányok.....	28
2.10. Egysejt-fehérjék felhasználása a humán táplálkozásban	30
2.11. Egysejt-fehérjék hasznosítása takarmányként, takarmány- adalékanyagként	31
2.12. Abiotikus tényezők szerepe a fermentációk során	33
2.12.1. Hőmérséklet	34
2.12.2. Kémhatás.....	34
2.12.3. Levegőztetés.....	35
2.12.4. A keverés fordulatszáma	35
2.12.5. Habzágatlás.....	36
2.13. Az élesztőgombák jelentősége és felhasználási lehetőségei.....	36
2.14. A <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	38
2.15. <i>Kluyveromyces marxianus</i>	39
2.16. Az élesztőgombák anyagsereútjai és az élesztőszaporodás jellemzői 40	
2.17. Vitaminok élettani hatásai	42

2.18.	Fermentációs folyamatokban használt mikroelemek és vitaminok	44
3.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	46
3.1.	Alkalmazott tápközegek	46
3.2.	Alkalmazott oldatok	47
3.3.	Wickerham-féle vitamin tápoldat kiválasztása	50
3.4.	Alkalmazott élesztőtörzsek.....	51
3.5.	Melasz	54
3.6.	Kukoricalekvár	54
3.7.	A kísérletek során alkalmazott eszközök.....	55
3.8.	Alkalmazott szoftverek.....	57
3.9.	Alkalmazott módszerek.....	58
3.9.1.	Élesztőtörzsek kiválasztása	58
3.9.2.	Tisztatényészetek készítése	59
3.9.3.	Az inokulum készítésének menete	59
3.9.4.	Az egysejt-fehérje előállítás folyamata	59
3.10.	A fermentációs folyamatokhoz kapcsolódó mérések és számolások .	64
3.10.1.	Élesztő-sejtszám meghatározás	64
3.10.2.	Nedves sejttömeg meghatározása.....	65
3.10.3.	Szárazanyag-tartalom meghatározása	65
3.10.4.	Élesztő fehérjetartalom meghatározása	65
3.10.5.	Tápoldat összes cukortartalmának meghatározása.....	66
3.10.6.	Az élesztőszaporodást jellemző paraméterek meghatározása	68
4.	EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	69
4.1.	Az egysejt-fehérje előállítás környezeti feltételeinek optimalizálása	69
4.2.	A szárazanyag-tartalom, a nedves sejttömeg és az élesztő-sejtszám értékeinek alakulása a fermentációs folyamatok során.....	72
4.3.	A fajlagos szaporodási sebesség és a generációs idő alakulása	79
4.4.	A tápoldat összes cukortartalmának és az élesztő fehérjetartalmának alakulása a fermentációs folyamatok során	82
4.5.	A fehérjehozamok alakulása.....	85

TARTALOMJEGYZÉK

5.	KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK.....	87
6.	ÖSSZEFOGLALÁS.....	89
7.	SUMMARY.....	91
8.	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	93
9.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	95
10.	IRODALOMJEGYZÉK.....	96

ÉLESZTŐTÖRZSEK SEJTTÖMEG PRODUKCIÓJÁNAK ÉS FERMENTÁCIÓS AKTIVITÁSÁNAK BEFOLYÁSOLÁSA NÖVÉNYI SZUBSZTRÁTOKKAL

KIVONAT

Kísérleteim célja az volt, hogy melasz és kukoricalevár tápoldaton optimalizáljam az élesztőgombákkal végzett egysejt-fehérje előállítás folyamatát, majd pedig vitaminoldat adagolásával tovább növeljem a végtermék-kihozataalt. A főbb vizsgált paraméterek a szárazanyag-tartalom, a nedves sejtömeg, az élesztő-sejtszám, az élesztő fehérjetartalom, illetve a tápoldat összes cukortartalma voltak. Az élesztőgombák szaporodását jellemző paraméterek közül a fajlagos szaporodási sebesség értékét, a generációs időt és a fehérjehozam-értéket határoztam meg. A vitaminadagolás a 3. nap végére mindkét szubsztráton növelte (melasz tápoldaton, átlagban, 9,2 g/100 g-ról 28,2 g/100 g-ra; kukoricalevár tápoldaton: 13,5 g/100 g-ról 24,2 g/100 g-ra) a *Kluyveromyces marxianus* DSM 4908 szárazanyag-termelését – miközben nem befolyásolta a nedves sejtömeg értékek alakulását – az optimalizált (kontroll) folyamathoz képest. Jóval kisebb mértékű serkentő hatás (13,6 g/100 g-ról 19,6 g/100 g-ra) volt megfigyelhető a *Saccharomyces cerevisiae* NCAIM Y.00200 törzs esetében, melasz tápközegben. Ennél a kísérleti beállításnál a nedves sejtömeg is nőtt a vitaminkiegészítés hatására. Az élesztő-sejtszám maximumértékek az optimalizált (kontroll) és a vitaminadagolásos

kísérletekben egyaránt 8,4–8,5 lg tke/cm³ között alakultak. Vitaminadagolás hatására a fajlagos szaporodási sebesség értékek nőttek, míg a generációs idők csökkentek, csakúgy, mint a tápoldat összes cukortartalma. Az élesztő-fehérjetartalmak viszont jelentős növekedést mutattak a fermentáció 72. órájára mind az optimalizált (kontroll) beállításnál, mind pedig vitaminadagolás esetében. A fehérjehozamok nem mutattak jelentős különbséget vitaminadagolás hatására, értékük 0,5–0,7 g/g között alakult.

INFLUENCE OF PLANT-BASED SUBSTRATES ON CELL MASS PRODUCTION AND FERMENTATION ACTIVITY OF YEAST STRAINS

ABSTRACT

The objective of this research was to optimize the process of single-cell protein (SCP) production with yeasts on molasses and corn steep liquor and, then, to further increase SCP yields through vitamin supplementation. During the trials, total solids content, wet cell mass, yeast cell count, yeast protein content, and total sugar content of the fermentation media were quantified. Concerning yeast growth, specific growth rates, generation times and protein yields were determined. The results showed that, by the end of day 3, vitamin supplementation increased dry matter production, without affecting wet cell mass, of *Kluyveromyces marxianus* DSM 4908 on both substrates (on molasses: from 9.2 to 28.2 g/100 g; on corn steep liquor: from 13.5 to 24.2 g/100 g, on average) as compared to the optimized (i.e., control) process. In contrast, a lower degree of stimulatory activity (from 13.6 to 19.6 g/100 g) was observed in the case of *Saccharomyces cerevisiae* NCAIM Y.00200 on molasses; however, the wet cell mass also increased significantly as a result of vitamin supplementation. The maximum values of yeast cell counts ranged between 8.4 and 8.5 log₁₀ cfu/cm³ under both control (i.e.,

optimized) and experimental (i.e., vitamin-enriched) conditions. Due to vitamin supplementation, the specific growth rates of yeasts in some trial settings increased significantly, whereas their generation times decreased considerably. The total sugar levels of fermentation media also decreased remarkably, whereas yeast protein contents increased significantly by the 72nd hour of both treatments (i.e., with and without vitamin addition). Ranging from 0.5 to 0.7 g/g, protein yields showed no considerable differences due to vitamin supplementation.

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

1950-ben 2,5 milliárd ember élt a Földön, míg 2050-re a népességszám meghaladja majd a 9 milliárdot. A 2010. évi 6,9 milliárd lakoshoz képest 40 esztendő leforgása alatt tehát várhatóan több mint 2 milliárd fővel nő a világ népessége. Ezzel együtt összességében 70–90%-kal növekszik a globális élelmiszer-szükséglet, amely elsősorban a kalóriabevittel és húsfogyasztással kapcsolatban jelent komoly, megoldandó feladatokat (Földművelésügyi Minisztérium, 2016). Az elmondottakkal összefüggésben, mind nagyobb figyelmet kell fordítani gazdasági haszonállataink vitamin- és ásványianyag-szükségletének maradéktalan kielégítésére, mert a növekvő élelmiszerigény biztosítása szempontjából egyre nagyobb jelentőséggel bír majd a megfelelő minőségű takarmányozás. Ezen a területen juthatnak szerephez az élesztőgombákkal vagy mikroalgákkal előállított egysejt-fehérjék (SCP, single-cell protein).

A fermentációs biotechnológia fejlődésével lehetővé vált az élelmiszer-előállítás során nagy mennyiségben keletkező, relatíve értéktelen melléktermékek (pl. melasz, kukoricalekvár stb.) értékes SCP-vé történő átalakítása, esetenként vitaminokkal történő dúsítás révén. Hazánkban is egyre népszerűbb ez utóbbi eljárás, amely gazdaságossági szempontból előrelépést jelent a vitaminokkal nem dúsított termékekhez képest.

Munkám célja első lépésben az volt, hogy laboratóriumi körülmények között optimalizáljam az SCP-előállítás folyamatát *Saccharomyces (S.) cerevisiae* NCAIM Y.00200 és *Kluyveromyces (K.) marxianus* DSM 4908 élesztőgomba-törzsek felhasználásával. Ezt az optimalizált folyamatot későbbi vizsgálataimban kontrollnak tekintettem. További célom volt, hogy vitaminoldat adagolásával növeljem az egysejt-fehérje kihozatalt az optimalizált (kontroll) folyamatokhoz képest. Kísérleteim során élesztő-sejtszám, nedves sejttömeg, szárazanyag, élesztőfehérje, tápoldat összes cukortartalom, fajlagos szaporodási sebesség, generációs idő és fehérjehozam értékeket határoztam meg és hasonlítottam össze.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Élelmiszer-biztonság és élelmiszeripari ellenőrzés

Az élelmiszerekre vonatkozó legfontosabb jogszabályi előírások világszerte egyre szigorodnak. E kritériumok közé sorolható a megfelelő táp-, élvezeti- és biológiai érték, valamint az élelmiszer-biztonság, mely utóbbi fogalom nemcsak mikrobiológiai, hanem toxikológiai-kémiai tulajdonságokat is magába foglal. Hazánkban az élelmiszer-biztonság alapvető követelményeit a Magyar Élelmiszerkönyv (Codex Alimentarius Hungaricus) fogalmazza meg, valamint az élelmiszerekről szóló, 2003. évi LXXXII. törvény tartalmazza. Ezek értelmében *“az élelmiszer biztonságáért és minőségéért az élelmiszer előállítója, illetve nem hazai előállítású élelmiszer esetében pedig az első magyarországi forgalomba hozó a fogyaszthatósági, illetve minőség megőrzési időtartam lejártáig felelős”* (URL¹).

Magyarországon jelenleg a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal végzi az élelmiszerek és takarmányok felügyeletét, ellenőrzését. Kiemelt feladata az élelmiszerekből, áttételesen pedig a takarmányokból származó egészségártalmak kockázatainak vizsgálata és értékelése, a nemzetközi és hazai kapcsolatok tartása, mindezen információkkal a kormányzat és a hatóságok munkájának segítése, valamint a fogyasztók teljes körű, hiteles tájékoztatása (URL²).

Az Európai Unió élelmiszerbiztonsági törekvéseinek, politikájának legfőbb célja az emberi egészség és az élelmiszerekhez kapcsolódó fogyasztói érdekek legmagasabb szintű védelmének biztosítása. Ennek érdekében az EU átfogó élelmiszerbiztonsági szabályozást alakított ki, amelyet a változó követelményeknek megfelelően folyamatosan fejleszt és módosít.

Az élelmiszerbiztonság fenntartása világszerte jelentős feladat. Ausztráliában például számos ok miatt vált indokolttá a hatékony élelmiszerbiztonsági szabályozó rendszer kialakítása, melynél cél volt az állami és regionális törvényi szabályozás ellentmondásainak feloldása, hatékonyságának növelése; az élelmiszeripari szabályozás költségeinek csökkentése; az élelmiszerekhez köthető betegségek növekvő tendenciájának megállítása (Martin et al., 2003). Azt is felismerték, hogy a meglévő szabályozás nem kellően hatékony az élelmiszerekhez kapcsolódó betegségek okozta egyre növekvő terhek csökkentésében. Érdeemes megjegyezni, hogy a Föld lakosságának több mint fele városokban él, így a fogyasztók egyre inkább támaszkodnak az élelmiszerpiacokra, hogy szükségüket biztonságos és tápláló élelmiszerekkel fedezhessék. Egészséges Városok Projektje részeként a WHO módszereket dolgozott ki a városi piacokon értékesített élelmiszerek biztonságosságának és minőségének javítására (Moy, 2001).

2.2. Takarmánybiztonság

A kiváló minőségű és biztonságos állati eredetű élelmiszerek előállításához elengedhetetlenek a minőségi és biztonságos takarmányok. Az egyre növekvő élelmiszer- és takarmánybiztonsági igényeknek különféle minőségirányítási rendszerek (pl. HACCP, TQM, ISO szabványrendszer) szakszerű alkalmazásával lehet megfelelni (Magda és Marsalek, 2000). A takarmánybiztonság elveinek érvényesülését az EU törvények által szavatolja, így hazánkban is szigorú ellenőrzés érvényesül ezen a területen. Az Európai Parlament és Tanács takarmányhigiéniáról szóló rendelete (183/2005/EK) összhangban áll a biztonságos takarmányok és takarmány-alapanyagok előállítására vonatkozó EU-útmutató 20-22. cikkével, amely elsősorban a helyes higiéniai gyakorlat kialakításáról szól, másrészt a HACCP rendszerek útmutatóinak kidolgozását segíti elő. Legfőbb célja, hogy motivációt jelentsen a takarmányok és takarmány-alapanyagok biztonságára irányuló intézkedések meghozatalára (URL³).

2.3. Élelmiszeripari melléktermékek hasznosítása

A biztonságos termékek előállításával egyenrangú feladat a környezet magas szintű és hatékony védelme, amit törvények és rendeletek is szabályoznak. Ennek egyik legfontosabb aspektusa az élelmiszeriparban keletkező melléktermékek és hulladékok megfelelő

kezelése, újrahasznosítása, mellyel hozzájárulhatunk környezetünk megóvásához. Az élelmiszeripari melléktermékek hasznosításával kapcsolatban számos közlemény található a nemzetközi szakirodalomban.

Guil-Guerrero et al. (2016) növényi eredetű élelmiszeripari melléktermékek étletanilag aktív hatóanyagainak állatokra gyakorolt egészségmegőrző hatását vizsgálták. A kiegészítésként használt melléktermékek pozitív hatással voltak az állatok immunológiai állapotára, vércukor-szintjére, karbamid-, kreatin- és triglicerid-szintjére, ill. a kortizolkoncentráció csökkenésére. Az izmok antioxidáns aktivitása is növekedést mutatott.

Nunes et al. (2016) olívaolaj gyártása során keletkező melléktermékek újrahasznosításának lehetőségeit kutatták, mivel ezek komoly környezetszennyezési problémát jelentenek, ugyanakkor hasznos hatóanyagtartalmuk miatt innovatív élelmiszerek fejlesztésére adnak lehetőséget.

Pal és Suresh (2016) a tengeri eredetű élelmiszer-alapanyagok melléktermékeiben előforduló kollagént használták funkcionális élelmiszer-összetevők kifejlesztésére. A „tenger gyümölcsei” számos nemzet étrendjében fontos szerepet töltenek be, mivel az emberi szervezet számára jól hasznosítható, jelentős fehérjetartalommal rendelkeznek, továbbá zselatintartalmuk is hasznosul.

Alzate et al. (2017) gyümölcsök és zöldségek feldolgozása során keletkező élelmiszeripari melléktermékek aktív hatóanyagait vizsgálták. Ezek hulladéknak tekinthetők és az ipar számára is

problémát jelenthet újrahasznosításuk, annak ellenére, hogy értékes komponenseket tartalmaznak, melyek az állati és emberi szervezet számára is hasznosak lehetnek. Kísérleteik során nagy karotinoid-, polifenol- és antioxidáns-tartalommal rendelkező melléktermék-féleségeket vizsgáltak, és eredményeik alapján öt, zöldség-melléktermék alapú, fiziológiásan aktív hatóanyag humán, illetve állati célú alkalmazására tettek javaslatot, funkcionális termékek fejlesztése céljából.

Salati et al. (2017) szőlőtörköly és sajt savó szubsztráton *Chlorella vulgaris* algabiomassza előállításának lehetőségét vizsgálták.

A kísérleteimben felhasznált melasz és kukoricalekvár a cukor-, ill. kukoricakeményítő-gyártás során keletkező melléktermékek. Újrahasznosításuk jellemzően a takarmányozás területén valósul meg, mivel számos, az állati szervezetben jól metabolizálódó komponenst tartalmaznak (pl. mono-, oligo- és poliszacharidok, fehérjék, vitaminok, ásványi anyagok stb.). Felhasználásuk emellett jelentős az élesztőiparban is, ahol növényi alapú tápoldatként alkalmazzák őket élesztőgombák szaporodásának serkentésére.

2.4. A melasz, mint élelmiszeripari melléktermék

Európában először a XIX. század közepén ültettek cukorrépat szacharóz kivonása céljából, őseink azonban számos egyéb anyagot, pl. kölest vagy juharszirupot is használtak édesítésre. 2007-ben

mintegy 120 országban gyártottak cukrot, melynek alapanyagául a cukorrépa és a cukornád szolgált. A világ legjelentősebb cukortermelői Brazília, India, az EU és Kína. Hazánkban a cukorfeldolgozó üzemek száma az utóbbi évtizedekben csökkent, jelenleg egyetlen feldolgozó, a Kaposvári Cukorgyár működik. A gyártás során roppant viszkózus, nehezen kezelhető, azonban kedvező beltartalmi értékekkel rendelkező melléktermék keletkezik, melynek összetételét az 1. táblázat szemlélteti.

1. táblázat: A melasz összetétele (Sólyom és Lásztity, 1980)

Összetevő	Koncentráció (%)
Víztartalom	16,5
Szacharóztartalom	51
Nitrogénmentes nemcukor anyagok:	
Invertcukor	1
Raffinóz	1
Nitrogéntartalmú anyagok:	
Szabad és kötött savak	
Színezőanyagok	19
Bioszanyagok	
Egyéb	
Ásványi anyagok (hamualkotórészek)	11,5
Összesen	100

A mellékterméket élettanilag hasznos hatóanyagtartalma miatt a takarmányozásban, a humán táplálkozásban és az élesztőgyártás területén egyaránt használják (Schmidt, 1993), melyre vonatkozóan számos szakirodalmi forrás közöl információkat.

Altun et al. (2015) méz, melasz és narancslé fogszuvasodást okozó hatását vizsgálták, melynek során 10-10 percig 20-20 cm³ melaszt, mézet és narancslevet kóstoltattak gyerekekkel. A narancslé és a melasz szignifikáns változást ($P = 0,017$) idézett elő a fogak szuvasodását illetően, míg a mézzel kapcsolatban a szerzők nem észleltek ilyen hatást ($P = 0,624$).

Fimbres-Durazo et al. (2013) 0, 60, 120, ill. 180 g/kg melaszt adagoltak kosoknak, a melasz mennyiségét és az alkalmazott mikroelemek (Cu, Fe, Zn és Mo) koncentrációját fokozatosan növelve a kísérletek során. Azt tapasztalták, hogy a melaszadagolás nem volt hatással az átlagos súlygyarapodásra, a vágási súlyra, valamint a gyomor és béltraktus tömegére. A legtöbb véredmény normál értéket mutatott, azonban a vér nitrogénszintje, a kreatin- és a koleszterinszint, az alkalikus foszfatáz- és a kreatin foszfokináz-szint csökkent a melasszal kiegészített diétában. A máj Zn- és Mo-koncentrációjában szintén változás tapasztaltak, Cu adagolása esetén pedig májkárosodást is kimutattak.

Moriel és Arthington (2013) úgy találták, hogy melasz alapú, metioninnal és nitrogénforrással kiegészített takarmányadalékuk jótékony hatást gyakorol a borjak növekedésére.

Lutoslawski et al. (2011) külső környezeti tényezők (pl. levegőztetés, pH) változtatása mellett vizsgálták melasz és vinasz biológiai lebomlását. A fermentációs folyamatok 38°C-on, vegyes mikrobatenyészetek – *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Rhodopseudomonas* és *Saccharomyces* fajok – felhasználásával zajlottak. A kezdeti pH-érték minden esetben 8,0 volt. A leghatékonyabb biológiai lebomlást kevert reaktorban érték el, ahol pl. a betaint teljes mértékben lebontották a mikroorganizmusok.

Wang et al. (2013) különböző eredetű (cukornád, szentjánoskenyér, szőlő és cirok) melaszfajták antimutagén hatását vizsgálták, és azt tapasztalták, hogy a szentjánoskenyér-melasz hatékonyan gátolja a mutációk kialakulását.

Történtek próbálkozások melasz alapú biodízelgyártásra is, mikroalgák felhasználásával, melynek során a melaszt *Chlorella protothecoides*-szel oltották be, majd enzimatis hidrolízissel segítették elő a mikroalgák maximális szaporodását a minél nagyobb biodízelhozam elérése érdekében. A maximálisan elérhető sejttömeg, olajtartalom és olajhozam rendre 70,9 g/dm³, 57,6% és 40,8 g/dm³ volt (Yan et al., 2011).

Cazetta et al. (2007) melaszt fermentáltak *Zymomonas mobilis* baktériumtörzsszel. Szakaszos eljárásuk során optimalizálták a hőmérsékletet és a melasz teljes redukálócukor-tartalmát. Legtöbb etanolt 30°C-on, 200 g/dm³ teljes redukálócukor-tartalom mellett sikerült előállítaniuk. Szintén etanoltermelés céljából, Ponce et al. (2016) cukornádmelasz alapú szakaszos fermentációt végeztek. A

170–250 g/dm³ cukorkoncentrációjú melaszokból 40–60 g/dm³ etilalkoholt tudtak előállítani.

2.5. A kukoricalevár, mint élelmiszeripari melléktermék

A kukoricalevár, a melaszhoz hasonlóan, a fermentációs biotechnológiában és a takarmányozásban egyaránt jól hasznosítható melléktermék, amely a kukorica nitrogéntartalmú- és bioszanyagait tartalmazza. A mikroorganizmusok élettevékenységére gyakorolt serkentő hatásával és a takarmányozás területén történő felhasználásával számos szakirodalmi forrás foglalkozik (Gyimesi és Sólyom, 1979).

Li et al. (2016b) a kukoricalevár-adagolás *Lactobacillus* fajokra gyakorolt hatását vizsgálták rizsszalma alapú fermentációs folyamatok során. Eredményeik szerint a kukoricalevár növelte a nyersfehérje- és csökkentette a rosttartalmat, továbbá egyes esetekben növelte a termelődött tejsav mennyiségét is. Megállapították, hogy a kukoricalevárral kevert takarmány haszonnal alkalmazható az állatok táplálóanyag-igényének fedezésére.

DeFrain et al. (2003) kukoricalevár és nyers szójabab keverékének tejelő szarvasmarhák takarmányozásában történő alkalmazhatóságát vizsgálták, 50–250 g/kg között változtatva a kukoricalevár mennyiségét. A legnagyobb kukoricalevár-koncentráció (250 g/kg) eredményezte a maximális egyensúlyi nedvesség tartalmat, csökkentve ugyanakkor az ureáz aktivitást.

Liu et al. (2015) citromsavat állítottak elő *Yarrowia lipolytica* SWJ-1b élesztőtörzs alkalmazásával. A nitrogén- és vitaminszükséglet fedezésére kukoricalevár-kiegészítést alkalmaztak, amely 1 g/dm^3 kukoricalevár-kiegészítés esetén $27,5 \text{ g/dm}^3$ citromsav produktumot eredményezett. Az 5 dm^3 -es reaktortérben 60 g/dm^3 glükózból $52,3 \text{ g/dm}^3$ citromsavat állítottak elő.

Wang et al. (2013) *Eschericia colit* inokuláltak melasz és kukoricalevár tápközegbe tejsav előállítás céljából, egyéb tápanyagok hozzáadása nélkül. A maximális termelés óránként $3,17 \text{ g/dm}^3$ volt.

Ha et al. (2003) *Lactobacillus casei* KH-1 szaporodási kinetikáját és tejsavtermelő képességét vizsgálták élesztőkivonat, kukoricalevárt, ill. glükózt tartalmazó tápközegekben. A tejsavbaktériumok optimális szaporodásához $1,28\%$ élesztőkivonat, $3,51\%$ kukoricalevár és $2,39\%$ glükóz szükségeltetett, míg a tejsavtermelésük $0,70\%$ élesztőkivonat, $1,71\%$ kukoricalevár és $2,22\%$ glükóz jelenlétében volt maximális.

Amado et al. (2017) kukoricalevárt és melaszt alkalmaztak *Streptococcus zooepidemicus* hialuronsav-termelésének serkentése céljából, melynek során a $\text{pH} = 6$ kémhatást, az 500 rpm (1/perc) fordulatszámot és az 1 vvm levegőztetési sebességet találták optimálisnak.

2.6. Növényi alapú tápoldatok hasznosítása az egysejt-fehérje előállításban

A fermentációs gyakorlatban nemcsak növényi alapú melléktermékeket hasznosítanak, hanem növényi alapú tápoldatokat is, melyek fiziológiásan aktív komponenseik révén stimuláló hatással vannak az élesztők szaporodására, így kiváló szubsztrátként szolgálnak az egysejt-fehérje előállításához.

Fontana et al. (1996) barnacukrot és cukornádlevet használtak tápközegként *Phaffia rhodozyma* élesztőfaj antioxidáns-termelésének vizsgálatokor. A kísérletek során kis mennyiségű (1 g/dm³) nitrogénpótlást is végeztek, amely kedvezően hatott a hozamértékekre.

De Gregorio et al. (2002) citromvelő alapú SCP- és pektinelőállítás folyamatát vizsgálták *Aspergillus niger* és *Trichoderma viride* felhasználásával, és mind a fehérjetartalmat, mind az enzimaktivitást *T. viride* esetében találták nagyobbak.

Lee és Kim (2001) különböző fermentációs rendszerekben, melasz alapon állítottak elő takarmányozási célra szánt SCP-t, *Candida utilis* felhasználásával. Rátáplálásos (fed-batch) fermentációval érték el a legkedvezőbb eredményeket, mellyel a biomassza produktum előállítási költsége 2,76 USD/kg-ra jött ki (Lee és Kim, 2001).

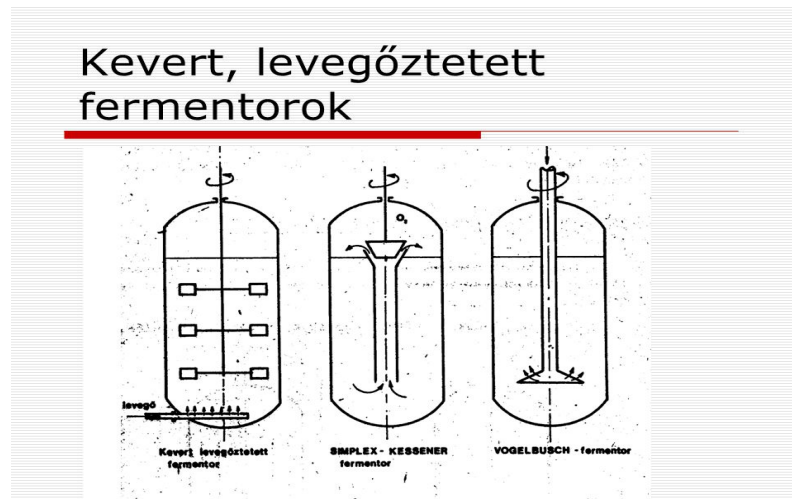
Patelski et al. (2015) ásványi anyagokkal (N, P, K és Mg) kiegészített cukornádpépet használtak különféle élesztőgomba fajok törzseinek szubsztrátjaként, SCP-előállítás céljából. A legnagyobb

biomasszamennyiséget a *Candida tropicalis* LOCK 0007 produkálta, 52,3%-os fehérjetartalommal.

2.7. Fermentációs eljárások

A mikroorganizmusokat elterjedten alkalmazzák biomassza, valamint különféle (elsődleges és másodlagos) anyagcseretermékek előállítására, illetve biotranszformációra. Ilyen típusú felhasználásuk évszázadokkal ezelőtt, a bor-, sör- és ecetgyártási eljárásokból alakult ki. Bizonyos metabolitok fermentációs úton történő előállítása jellemzően a II. világháború előtt zajlott, míg pl. egyes gyógyhatású (gyógyszeripari) komponensek gyártását a háborút követően lezajlott technikai és technológiai fejlődés teremtette meg. Az élelmiszerként és takarmányként egyaránt szóba jövő egysejt-fehérjék előállítása is immár több évtizedes múltra tekint vissza (Crueger és Crueger, 1987).

Az alkalmazott fermentációs eljárások és reaktortípusok szintén fejlődtek az idők folyamán. Napjainkban laboratóriumi körülmények között általában a kevert-levegőztetett reaktorokat preferálják (1. ábra).

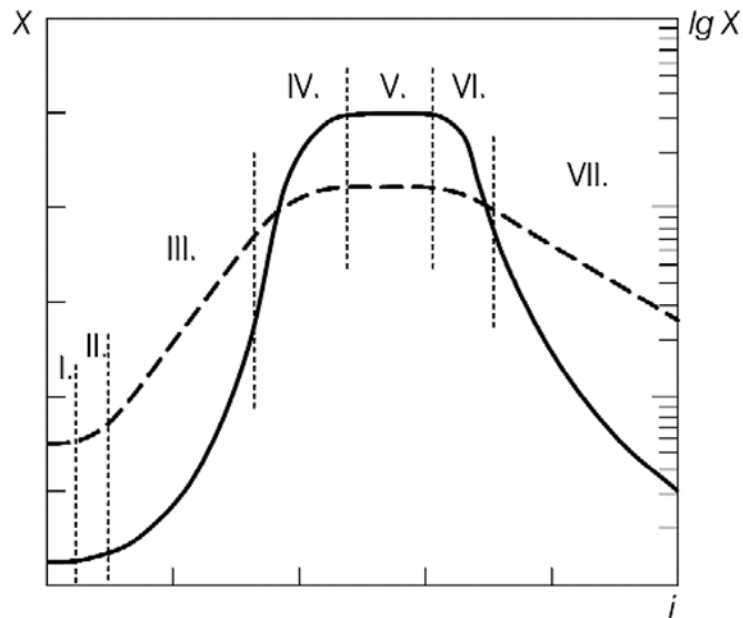


1. ábra: Kevert, levegőztetett fermentor (URL⁴)

A fermentációs folyamat első lépéseként a szubsztrátot mikrobaszuszpenzióval oltják be. Az inokulum mennyiségét egyrészt a folyamat jellege, másrészt az alkalmazott faj (törzs) jellemzői határozzák meg. Az eljárások közül a két legismertebb a folyamatos (continuous) és a szakaszos (batch) fermentáció.

A folyamatos fermentáció nyílt rendszernek tekinthető, ennél folyamatosan vezet be a bioreaktorba a steril tápoldatot (up-stream), mellyel egyidejűleg ugyanakkora mennyiségű átalakított fermentlevet vesznek ki (down-stream), a benne lévő mikroorganizmusokkal együtt. Ezzel szemben a szakaszos (batch) fermentáció zárt rendszer, melynél $T = 0$ időpontban mikroorganizmusokkal oltják be a fermentorban lévő sterilizett tápoldatot, majd optimális környezeti körülményeket állítanak be. A folyamat során az alkalmazott szubsztrát és a keletkezett biomassza koncentrációja állandóan

változik. Az általam is alkalmazott szakaszos fermentáció szaporodási kinetikájában hét fázis különíthető el: lappangási (lag), gyorsulási, exponenciális (log), lassulási, állandósult (stacioner), hanyatlási és pusztulási szakasz (2. ábra).



2. ábra: Mikroorganizmusok általános szaporodási görbéje zárt rendszerben (URL⁵)

Rajoka et al. (2006) *C. utilis* élesztőgomba szaporodási összefüggéseit vizsgálták szakaszos SCP-előállítás során, állandó keverés és levegőztetés mellett. Az oldott oxigén szintjét 50%-ra, a hőmérsékletet 35°C-ra, a szubsztrátkoncentrációt pedig 90 g/dm³-re állították be, és a rendszerhez 5% kukoricaekvánt adagoltak. A

tápközeg pH-értéke 6 volt. Az előállított, 29,71 Kcal/kg energiaértékű SCP-t a takarmányozásban jól hasznosíthatónak találták.

Yadav et al. (2014) sajt savóból állítottak elő SCP-t, *K. marxianus* és *C. krusei* kevert tenyészetének felhasználásával, szakaszos és folyamatos rendszerben. A kísérlet kezdetén beállították a fermentációs paramétereket: 40°C, pH 3,5, levegőztetett reaktortér. Folyamatos fermentációval 19%-kal több biomasszát sikerült nyerniük, mint szakaszos eljárással. A megtermelt SCP-t takarmányozási célra alkalmasnak ítélték.

Qu et al. (1992) *Trichosporon cutaneum* élesztő fajjal termeltettek SCP-t, a papírgyártás melléktermékeként keletkező hemicellulózból, mely szubsztrátot az alkalmazását megelőzően gőzzel előkezelték, aminek eredményeként 16,0-47,7 g/dm³ cukrot nyertek. A kiválasztott törzs (*T. cutaneum* 851) gyors növekedést mutatott a felhasznált táptalajon, így alkalmasnak bizonyult SCP előállítására. A *T. cutaneum* 851 mutáns törzsét alkalmazva, folyamatos rendszerben, dm³-enként 10,5 g/ sejttömeget értek el 47%-os fehérjetartalommal.

2.8. Egysejt-fehérje előállítás fermentációval

Kísérleteim megkezdése előtt számos szakirodalmi forrást áttanulmányoztam, hogy lássam, milyen növényi eredetű szubsztrátokat, élesztőtörzseket és fermentációs körülményeket alkalmaztak már SCP-előállítás során.

Coca et al. (2015) *Spirulina platensis* cianobaktérium faj felhasználásával vinasz szubsztráton állítottak elő SCP-t, levegőztetett fotobioreaktorban. Az óránkénti maximális fajlagos fehérjetermelés $6,5 \pm 0,7 \text{ g/dm}^3$ volt, viszont amikor nagy (2 g/dm^3) vinaszkoncentrációval dolgoztak, $3,6 \text{ g/dm}^3$ fehérjeproduktumot kaptak.

Pires et al. (2016) szintén vinaszt alkalmaztak tápközegként SCP előállításához, *S. cerevisiae* CCMA 0137 és *S. cerevisiae* CCMA 0188 felhasználásával. Nagy esszenciális aminosavtartalmat (3,78%) és kis nukleinsavkoncentrációt (2,38%) mértek, ami megfelelő alapul szolgált a takarmány-kiegészítőként történő alkalmazáshoz.

Ghaly et al. (2005) matematikai modellezést alkalmaztak *K. fragilis* SCP-előállítás során megfigyelhető szaporodási kinetikájának leírására. A modellt folytonos rendszerben tesztelték, 200, 400 és 600 rpm keverési fordulatszámokat alkalmazva, a levegőztetés mértékét pedig 1 és 3 vvm között változtatták. A biomassa-kihozatal 37 g/dm^3 volt.

2.9. Funkcionális élelmiszerek és funkcionális takarmányok

Az élelmiszerek és a takarmányok terápiás hatása nem új koncepció, mert már a XX. század elején előtérbe került a betegségek funkcionális takarmányok és élelmiszerek általi megelőzésének gondolata, elsősorban a vitaminokra fókuszálva, ezzel javítva a szervezet egészségi állapotát (Choudhary és Tandon 2009). Számos

országban próbálják ösztönözni az étlettanilag jótékony hatású élelmiszerek fogyasztását, aminek legfőbb célja a gyógyszerhasználat csökkentése.

A funkcionális élelmiszer fogalmát az egyes nemzetek más-más módon definiálják. A Japán Egészségügyi és Jóléti Minisztérium, az American Dietetic Association, a Health Canada, a Nemzetközi Élelmiszer-információs Tanács és az Észak-amerikai Élettudományi Intézet szintén rendelkezik önálló meghatározással. Az EU definíciója szerint a funkcionális élelmiszerek a megfelelő táplálkozás-élettani hatásaikon túlmenően a szervezetben egy, vagy több célfunkcióra is kimutatható hatással bírnak. Fogyasztásuk révén jobb egészségi állapot, vagy kedvezőbb közérzet és/vagy a betegségek kockázatának csökkenése érhető el. A funkcionális élelmiszerek csoportosítása eredetük, előállítási módjuk és az egészségre kedvező hatást gyakorló összetevőjük szerint történik. Eredetük szerint így megkülönböztetünk állati eredetű funkcionális élelmiszereket, mint pl. tej és tejtermékek (fermentált tejtermékek, savófehérjék), hal, halolaj, marha-, bányahús és tojás; növényi eredetű funkcionális élelmiszereket, pl. gyümölcsök és zöldségek, nagy fehérje- és rosttartalmú gabonafélék, olajos magvak. Az előállítás módja alapján ezek az élelmiszerek lehetnek teljes élelmiszerek, alapanyagok, hozzáadott adalékkal kiegészített élelmiszerek, dúsított élelmiszerek, megnövelt beltartalmi értékű élelmiszerek és valódi funkcionális élelmiszerek (Nagy et al., 2008).

A funkcionális takarmányok, illetve funkcionális takarmány-adalékanyagok szerepe napjainkban szintén nő, az állatokra kifejett

pozitív élettani hatásai miatt. E célra nemcsak az állati és növényi nyersanyagok alkalmasak, hanem egyes növényi hulladékok és az azokból előállított termékek (San Martin et al., 2016), élesztőgombák és mikroalgák (Huntley et al., 2015) is. Halak esetében funkcionális adalékanyagok (pl. exogén enzimek, probiotikumok, prebiotikumok) használatával a célfaj tömeggyarapodása, takarmányhasznosítása és stressztűrő képessége fokozható elsősorban (Encarnaçao, 2016).

Számos tanulmány foglalkozik az élesztők, illetve az egysejt-fehérjék állati szervezetre kifejtett pozitív hatásával (Lorenz et al., 2015), leginkább a koleszterinszintre és antioxidáns hatásra (Ogunremi et al., 2015), vagy az állatok tömeggyarapodására fókuszálva a kutatásokat (Tyagi et al., 2016). Egyes beszámolók szerint az élesztősejtfal por formában történő feldolgozásával és takarmány-adalékanyagként történő alkalmazásával növelhető a brojlercsirkék immunműködése (Li et al., 2016a), szelénrel dúsított élesztő adagolásával pedig a bikák teljesítménye (Fokkink et al., 2009). Az élesztőgombák vitaminokkal, mikrotápanyagokkal történő dúsításával növelhető az állati szervezet működésének hatékonysága és az állati eredetű termék minősége is.

2.10. Egysejt-fehérjék felhasználása a humán táplálkozásban

A humán szervezet fehérjeellátottságának mértéke az életminőség egyik meghatározó tényezője és egyben mérőeszköze (Kovács, 2002). Annak érdekében, hogy az emberi aminosav-készlet

teljes legyen, rendkívül fontos az állati eredetű fehérjék fogyasztása, ugyanis a növények az esszenciális aminosavakat sokszor kedvezőtlen összetételben és nem megfelelő mennyiségben tartalmazzák (Dublecz, 2011). A növényi fehérje nem mondható teljes értékűnek (Rodler, 2005).

SCP-eket először a II. világháború alatt alkalmaztak emberi fogyasztásra, Németországban és Oroszországban, a későbbiekben a fejlődő világ országaiban a humán táplálkozás kiegészítésére és egyes országokban terápiás készítmények formájában használták ezeket. A terápiás készítmények folyamatos kutatásának és fejlesztésének köszönhetően számos ilyen termék került forgalomba. Főként a szegény országokban, ahol gondot jelent a népesség megfelelő színvonalú fehérjeellátása, az SCP-ket – kiváló tápanyag-összetételüknek, fehérjetartalmuknak és kedvező zsírsav-összetételüknek köszönhetően – kiterjedten alkalmazzák.

2.11. Egysejt-fehérjék hasznosítása takarmányként, takarmány-adalékanyagként

Már egy évszázaddal ezelőtt is alkalmaztak különböző algafajokat a takarmányozásban, ami a biotechnológiai eljárások fejlődésével csak még jelentősebbé vált. A mikroalgák jelentősen növelik a humán táplálkozásra és takarmányozásra szánt termékek beltartalmi értékeit. Fő bioaktív komponenseik a fehérjék, a többszörösen telítetlen zsírsavak és a pigmentek. Hozzávetőleg 55–

65%-os fehérjetartalmának köszönhetően, elsősorban három alganemzetség, a *Chlorella*, a *Spirulina* és a *Dunaliella* alkalmazása terjedt el.

A mikroalgák számára kiváló táplálékul szolgálnak azok az élelmiszeripari melléktermékek, amelyek újrahasznosítása esetenként súlyos problémát jelent. González-Benito et al. (2009) mikroalgák SCP-termelő képességét vizsgálták cukoripari eredetű szubsztrátokon, szakaszos fermentációt alkalmazva. Eredményeik szerint 4 g/dm³ ideális táptalajjal és 2 g/dm³ hozzáadott vinasszal 2,2 g/dm³ *Spirulina maxima* biomassa volt előállítható, míg 5 g/dm³ vinaszkiegészítéssel 3,3 g/dm³, 10 g/dm³ vinaszadagolással pedig 3,7 g/dm³ mikrobatömeget termeltek.

Olsen et al. (2010) *Methylococcus capsulatus* élesztőgombával állítottak elő SCP-t, a melyet aztán takarmányozásra használtak fel.

Zepka et al. (2010) *Aphanothece microscopica* mikroalgafajt szaporítottak el rizs alapú szubsztráton. Az előállított SCP biológiai értéke 73,3%, emészthetősége 82,1%, fehérjetartalma pedig 60,2% volt. A szerzők jelentős változást tapasztaltak patkányok glikémiás indexében a biomasszával történő etetés hatására, a kontroll diétához képest, és emellett megfigyelték az SCP-vel etetett kísérleti állatok koleszterinszintjének csökkenését is.

Ugwuanyi (2008) *Bacillus* fajok (*B. coagulans*, *B. licheniformis* és *B. stearothermophilus*) szaporodási képességét, az előállított SCP minőségét és takarmányként történő hasznosíthatóságát vizsgálta. A fajlagos szaporodási sebesség értékek 1,98–2,63 1/h között alakultak.

Az SCP-hozam a hőmérséklet emelésével nőtt, a legnagyobb biomasszamennyiséget a *B. stearrowthermophilus* produkálta, 70°C-on.

Chiou et al. (2001) brojlércsirkéket takarmányoztak *A. niger* által előállított SCP-vel, ami növelte a vörösvértest-számot, a hemoglobin-, a hematokrit és az aminoszén-tartalmat, továbbá javult a súlygyarapodás is. A patológiai vizsgálatok nem tártak fel az SCP-etetéssel összefüggésbe hozható eltéréseket (Chiou et al., 2001).

Az előzőekben hivatkozott szakirodalmak is bizonyítják az egysejt-fehérjék funkcionalitását a humán élelmezés, de méginkább a takarmányozás területén.

2.12. Abiotikus tényezők szerepe a fermentációk során

A fermentációs eljárások során nemcsak a megfelelő élesztőfaj kiválasztása bír jelentőséggel, hanem a környezeti tényezők (hőmérséklet, kémhatás, levegőztetés, keverés, habzástáplálás) optimális mértékű biztosítása is. Ezek az abiotikus tényezők önmagukban is befolyásolják az élesztő szaporodását, de egymással is kölcsönhatásban állnak, és segíthetik vagy akadályozhatják a szaporodást. Mivel minden fermentációs eljárás során a maximális produktum elérése a cél, a tényezők összehangolt beállításával optimalizálni lehet a folyamatokat.

2.12.1. Hőmérséklet

Trigueros et al. (2016) *S. cerevisiae* var. *boulardii* felhasználásával sajtsavót fermentáltak szakaszos rendszerben, és optimalizált paraméterek (30°C, 5,5-es pH, 100 rpm) mellett 0,5 g/g hozamot (Y) értek el.

2.12.2. Kémhatás

Az élesztőgombák többségének optimális mértékű szaporodásához (enyhén) savas kémhatás szükséges. Buzás et al. (1989) a pH-érték *S. cerevisiae* szaporodására és etanoltermelésére gyakorolt hatását vizsgálták, és 3,5-5,0, ill. 4,0-4,5 pH-érték mellett érték el maximális sejtsűrűséget. Ennek alapján, melasz, gyümölcslevek és édes cirok fermentálásához a közeg pH-értékét 5,0-re állították be, a hőmérsékletet pedig 30°C-ra, míg az inokulum koncentrációja $3,5 \times 10^7$ /g volt.

Chen et al. (2015) licsibort állítottak elő *Torulaspora delbrueckii*, *Williopsis saturnus* és *K. lactis* törzsekkel. A fermentációs paraméterek optimalizálása során a pH-értéket 5,6-re állították be. A *T. delbrueckii* Prelude szaporodott leggyorsabban és termelte a legtöbb etanolt, míg a *W. saturnus* NCYC 22 fogyasztotta a legkevesebb cukrot és a legtöbb nitrogént.

2.12.3. Levegőztetés

Mind az ipari gyakorlatban, mind a kutatások során leggyakrabban alkalmazott fermentortípus a kevert-levegőztetett reaktor. A levegőztetést laboratóriumi körülmények között úgy valósítják meg, hogy a reaktortérben elhelyezett levegőelosztón keresztül levegőt buborékoltnak a fermentlébe, miközben a tápoldatot folyamatosan keverik. Az SCP-előállítás végző élesztők légzéséhez szükséges oxigén ily módon biztosítható, hogy a szubsztrátok (mono-, di-, illetve poliszacharidok) lebontása és felhasználása optimális legyen. Aerob folyamatok során a levegőztetés mellett a keverés fordulatszáma is fontos paraméter, túlzott mértékű növelése ui. csökkentheti a tápoldat oldott oxigén szintjét.

2.12.4. A keverés fordulatszáma

A keverés funkciói közé tartozik az energiabevitel a folyadékba, a levegőztető gáz diszpergálása, a gáz- és folyadékfázisok elválasztása, továbbá a fermentlé oldott, illetve nem oldott komponenseinek elkeverése. Ennek érdekében a folyadékot folyamatosan mozgásban kell tartani a fermentáció során. Az optimális fordulatszámot a reaktortér mérete nagyban befolyásolja.

Shen et al. (2012) *K. lactis*-szal végeztettek laktózbontást, fruktóz jelenlétében, melynek során a $\text{pH} = 6,8 \pm 0,2$ kémhatást, a 35-

40°C-os hőmérsékleti tartományt és a 200 rpm sebességű keverést találták legmegfelelőbbnek.

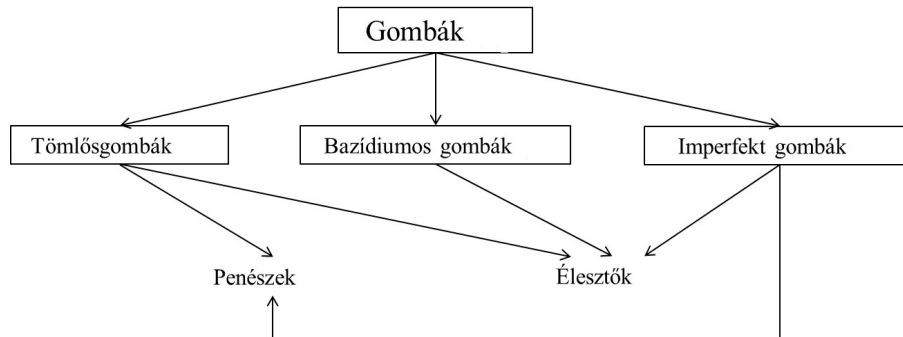
2.12.5. Habzásgátlás

SCP-előállítás során a levegőztetés hatására a tápoldat felszínén nagy mennyiségű hab képződik. Ennek megakadályozására vagy mechanikus habtörést, vagy kémiai habzásgátlókat alkalmaznak. A kémiai habzásgátlók alkalmazása mind a prokarióták, mind az eukarióták szaporodási sebességét befolyásolja. A szaporodás gyorsulása ugyan a biomasza hozamnövekedését eredményezi, azonban egyes esetekben káros hatással is lehet a sejtekre, ezért fontos a habzásgátlás mértékének optimalizálása a fermentációs folyamatok során (Routledge, 2012; Krige és Nicol, 2015).

2.13. Az élesztőgombák jelentősége és felhasználási lehetőségei

Az SCP-előállításához használatos gombák eukarióta mikroszervezetek, amelyek – a növényekhez és az állatokhoz hasonlóan – valódi sejtmaggal rendelkeznek (Gyimesi és Súlyom, 1979). Molekuláris biológiai vizsgálatok eredményei alapján a gombák az állatvilághoz állnak közelebb. Élelmiszeripari szempontból az élesztő- és penészgombáknak (3. ábra) a legfontosabbak. Az élesztőgombák az ismert gombafajoknak ugyan csak kis részét (kb. 1%-át) teszik ki, de felhasználási lehetőségeik messze túlmutatnak az

összes többi fajén, melyeknek döntő többsége fakultatív anaerob szervezet és jelentőségük leginkább az alkoholos erjesztéses folyamatokban nyilvánul meg (Deák, 2006).



3. ábra: Élesztő- és penészgombák helye a gombák rendszerében

Az élesztőgombák felhasználási lehetőségei sokrétűek, pl. antitestek előállítására is alkalmazzák némelyiket (Lee és Jeong, 2015). Ezen kívül nagy jelentőséggel bírnak az élelmiszeriparban, ahol azonban alkoholos erjesztő tevékenységükkel károkat is okozhatnak. Élettani tulajdonságaik közül legfontosabb a szénhidrátok erjesztése, illetve a szaporodási képességük. Az erjesztésen kívül nagy jelentőségű a saját sejttömegük megnövelése, az egysejt-fehérje előállítás. Egyes kutatásokban *K. marxianus* törzsek fejlesztésével is foglalkoznak bioetanol-termelés céljából (Varga-Erdei, 2011).

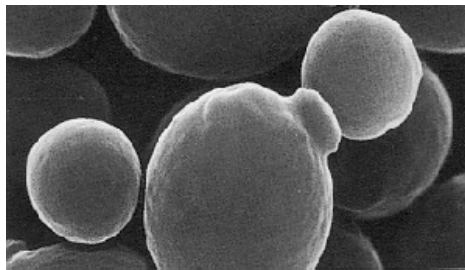
Fermentáció során a közreműködő mikroorganizmusok élettevékenységének és enzimeinek hatására különféle változások mennek végbe az anyagokban, amely folyamat létrejöttékor az élesztő akár 40-50-féle tápanyagot is igényelhet biológiailag elérhető

formában és megfelelő arányban (Kovács és Kovács, 2005). Ezzel a folyamattal alakíthatók ki a már előbbieken említett SCP-k, takarmány-adalékanyagok, illetve mikrotápanyaggal dúsított takarmányok (Molnár és Ásványi, 2017).

2.14. A *Saccharomyces cerevisiae*

Az élesztőgombákat régóta alkalmazzák a biokémiában, a genetikában, a sejtbiológiában, a biotechnológiában és az ipar számos területén. Legelterjedtebb és legalaposabban tanulmányozott fajuk a *S. cerevisiae*. Az általam is felhasznált tesztmikroba által termelt enzim a keményítőtöbontó α -amiláz. A könnyed hasznosítás érdekében a *S. cerevisiae*-t leginkább melasz tápoldaton használják, az ipari célnak megfelelően (Kutasi, 2007).

A *S. cerevisiae* megfelelő táptalajon kifejlődött telepei kidomborodóak, krémszínűek. Vegetatív szaporodása sarjadzással történik, sejtjei ovális alakúak (4. ábra).



4. ábra: *Saccharomyces cerevisiae* morfológiája (URL⁶)

2.15. *Kluyveromyces marxianus*

A tejcukor bontására alkalmas enzimeket képző *K. marxianus* szerepe egyre nő az iparban. A leggyakrabban tejipari élesztőként alkalmazott mikroba által termelt enzim a β -galaktozidáz, melynek pH-optimuma 6,5-7,0. A β -galaktozidáz a laktózt galaktózra és glükózra bontja (Sevella, 2012). Jó hasznosíthatósága elsősorban gyors szaporodásában, hőtűrésében, széleskörű cukorbontó képességében és kimagasló etanoltermelésében rejlik. Ezek a tulajdonságok alkalmassá teszik arra, hogy a kutatások fókuszába kerüljön (Lane és Morrissey, 2010). Használata leginkább a biotechnológiában szintén alkalmazott *K. lactis*-szal együtt terjedt el. A *K. marxianus* LYP táptalajon kifejlődött telepei kidomborodóak, sima felületűek és krémszínűek (5. ábra). Vegetatív szaporodása bimbózással történik, spórái bab alakúak.



5. ábra: *Kluyveromyces marxianus* telepmorfológiája (URL⁷)

2.16. Az élesztőgombák anyagcsereútjai és az élesztőszaporodás jellemzői

Az élesztők szaporodása, azaz sejtszámuk növekedése, az egyes sejtekben végbemenő anyagcsere-folyamatok eredménye. E folyamatok első lépése a tápanyagok és energiaforrások felvétele, illetve transzportja a sejtekbe, amely a sejtfalon keresztül valósul meg. A sejtfal a víz és a tápanyagok kisebb molekulái számára szabadon átjárható. Az oldott molekulák többségének plazmamembránon történő átjutását specifikus fehérjék (karrierek) segítik. Ez egyes esetekben közvetett diffúzióval, anyagcsere-energia igény esetében pedig aktív transzporttal valósul meg. Ekkor a sejt számára szükséges anyagok a külső koncentrációt meghaladó mértékben akkumulálódnak a citoplazmában. A citoplazmamembrán az anyagok felvételében és a sejtet érő külső tényezők érzékelésében is szerepet játszik. A sejtbe bejutott tápanyag metabolizálódik. Az átalakításban különböző anyagcsereutak vesznek részt, ezek a szubsztrátokat intermedierekké alakítják, majd az anyagcsere végtermékei képződnek belőlük.

A tápanyagok lebontásához vezető anyagcsereutakat katabolikus utaknak nevezzük, míg a sejt összetevő anyagainak szintézisét és felépítését anabolikus utaknak. Ezek a folyamatok a sejtekben szabályozott működés közepette mennek végbe. A katabolizmus energiát szolgáltat – ATP és redukált koenzimek formájában – a szintézishez, a sejt építő folyamataihoz. A keletkező elsődleges és másodlagos anyagcsere-termékek, továbbá átalakítási termékek

élelmiszer-, takarmányipari és biotechnológiai szempontból is nagy jelentőségűek.

A hasznosítható tápanyagok körét a mikroba-fajok genetikai tulajdonságai is befolyásolják. A környezeti feltételek, mint pl. az oxigén jelenléte vagy hiánya az anyagcsere módjára gyakorol hatást. A fakultatív anyagcserére képes mikroorganizmusok, pl. az általam is vizsgált élesztőgombák, aerob körülmények között légzést, anaerob körülmények között pedig erjesztést folytatnak. A szénhidrátok erjesztésének és az aerob légzésnek is a glikolízis a bevezető reakciósorozata. A központi intermedier, a piroszőlősav, vagy erjedési végtermékké alakul (pl.: tejsav, ecetsav, etilalkohol), vagy aerob esetben az acetyl-coenzim A-n keresztül a citromsavkörbe lép, ahol teljesen eloxidálódik szén-dioxiddá és vízzé. Az aerob légzés végső elektronakceptora a molekuláris oxigén (Deák, 2006).

Az SCP-t előállító élesztőgombák szaporodását jellemző paraméterek matematikailag értelmezhetők. E paraméterek közül különösen fontos a generációs idő és az abból eredő fajlagos szaporodási sebesség. Az élesztők szaporodását nem kizárólag az exponenciális szakaszban felírható összefüggések alapján értékelhetjük, mivel tápanyag-limitáció, toxikus metabolitok képződése és helyhiány miatt előbb-utóbb mindig bekövetkezik a hanyatló fázis. A hozamértékek a szubsztrát fogyasztásából és a sejttömeg gyarapodásából számíthatók ki.

Ghaly és El-Taweel (1997) folytonos fermentációval etanolt állítottak elő sajt-savóból, miközben a laktózkoncentrációt 50 g/dm^3 -

ről 150 g/dm³-re növelték. A sejtkoncentráció, a laktózfelhasználás és az etanoltermelés szignifikáns különbséget mutatott az idő és az alkalmazott szubsztrátok függvényében. A laktózfelhasználás mértéke 42 óra elteltével 83-99% között alakult. A maximális sejtkoncentráció 5,5 g/dm³, a legnagyobb etanoltermelés pedig 58 g/dm³ volt.

Kim et al. (1998) szintén folytonos fermentációt alkalmaztak, *K. fragilis* felhasználásával, takarmányozási célú SCP előállításra. A kísérletet kevert-levegőztetett reaktortérben végezték, az alkalmazott táptalaj 2,5% fruktózt tartalmazott. A maximális biomasszatermelés óránként 4,81 g/dm³ volt és ebben 0,42 g száraz biomasszát mértek, $5,5 \times 10^9$ /g élesztő-sejtszámmal. Az élesztő fehérjetartalma 50-55% volt.

2.17. Vitaminok élettani hatásai

A funkcionális takarmányok vitaminokkal történő kiegészítési lehetőségei között a dúsítás és a gazdagítás szerepel. Dúsítás során a meglévő vitaminok mennyiségének megnövelése történik, míg gazdagítás során új vitamin hozzáadása a cél.

Chen et al. (2017) B-vitaminok és a ginzengben előforduló, ginzenuzid Re nevű bioaktív hatóanyag kölcsönhatását vizsgálták patkányokon. Az eredmények alapján a szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy a B-vitaminkomplex tagjai számottevően csökkentik a ginzenuzid Re biológiai hozzáférhetőségét és a szervezetre gyakorolt vitalizáló hatását.

Daramola et al. (2015) piridoxin (B₆ vitamin), valamint melatonin, A- és C-vitamin hatását vizsgálták bakkecskék ivarsejtjeinek mozgékonyására a spermiumok mélyhűtése során. Eredményeik szerint a piridoxin önálló adagolása, ill. egyéb antioxidánsokkal kombinált alkalmazása is javította a spermatulajdonságokat a kontroll kezeléshez képest.

Sayed et al. (2012) szelén, valamint A-, C- és E-vitamin védő szerepét vizsgálták szintetikus adalékanyagok genotoxikus hatása ellen, egerekben. Hat állatcsoportot alakítottak ki, egy negatív és egy pozitív kontroll csoportot alkalmazva. Két csoportnak egyszeri dózist adagoltak, két csoport pedig 1–3 héten keresztül naponta kapott az adalékanyagokból. Az eredmények alapján a szelén- és a vitaminadagolás szignifikánsan csökkentette a szintetikus adalékanyagok genotoxicitását.

Eke et al. (2017) albínó patkányokkal végzett kísérleteik során megállapították, hogy a mikrohullámmal kezelt tápanyagok fogyasztása kedvezőtlenül befolyásolja a vérszérum antioxidáns enzimjeinek szintjét, ill. az A- és az E-vitamin koncentrációját. Eredmények alapján azt a következtetést vonták le, hogy a mikrohullámozott élelmiszerek csökkentik a szervezet antioxidánsok általi védelmét és hozzájárulhatnak az oxidatív stressz növekedéséhez, valamint egyes degeneratív betegségek kialakulásához.

2.18. Fermentációs folyamatokban használt mikroelemek és vitaminok

Az élesztőgombák a sejtjeikben akkumulált mikrotápanyagok jelentős részét szerves vagy komplex kötésben tartalmazzák, így azok felszívódása és hasznosulása nagyarányú, továbbá kevésbé toxikusak, az ízük pedig kellemes. A mikroelemek (pl. vas, króm, szilícium, titán stb.) élesztőkben, ill. SCP-ben történő dúsításával természetes eredetű mikroelem-források állíthatók elő (Suhajda et al., 2004).

A vas nélkülözhetetlen az élő szervezet számára. Egy átlagos, 70 kg-os ember teste 4-5 g vasat tartalmaz. Amennyiben normál vasellátottságról beszélünk, csak a fiziológiás vasvesztésüket kell pótolni táplálkozással, mivel ez a mikroelem a növényi és az állati eredetű élelmiszerekben is megtalálható (Pais, 1999). Suhajda et al. (2004) kísérleteik során *S. cerevisiae*-sejtek vasdúsítását végezték laboratóriumi fermentorban. A vas-(II)-kloridot (5 mg/g) a fermentáció optimális paramétereinek (1 vvm, 30°C, 460 rpm, pH 5) beállítását követően adagolták az élesztőszuspenzióhoz. A vizsgálati eredmények alapján, a pék- és sörélesztőnek a vas felvételéhez is energiára van szüksége és csekély szénforrás-kiegészítéssel fokozható a vasakkumuláció (Suhajda et al., 2004).

A mikroelemek mellett a vitaminok, főként a B-vitamincsoport használata jelentős a fermentációs biotechnológiában, a mikrobák jó vitaminhasznosítása, illetve a B-vitamiok fiziológiás hatásai miatt.

Xu et al. (2008) a vitamin-kiegészítésnek (B₁-, B₂-, B₅-, B₆- és H-vitaminok) *Lb. paracasei* NERCB 0401 tejsavtermelésére gyakorolt hatását vizsgálták, és azt tapasztalták, hogy a vitaminadagolás csaknem megduplázza (92%-kal megnövelte) a nevezett laktobacillusz-törzs tejsavsintézisét.

Liu et al. (2015) *Yarrowia lipolytica* SWJ-1b citromsavtermelését vizsgálták kukoricafehérjével kiegészített tápoldaton, nitrogén- és vitaminpótlás mellett. A kísérlet során alkalmazott 1 g/dm³ kukoricafehérje-adagolás 27,5 g/dm³ citromsavtermelést eredményezett. A szerzők ökonómiai szempontból is megfelelőnek ítélték a kukoricafehérjét nitrogén- és vitaminkiegészítésre.

Furutani et al. (1953) *Hansenula* élesztőfajok törzseinek vitaminszükségletét vizsgálták bioaktív komponensek (folsav, biotin, Ca-pantoténát, inozitol, niacin, p-aminobenzoésav, riboflavin, tiamin és piridoxin) felhasználásával. Vitaminoldatuk az általam is alkalmazott Wickerham vitaminoldatnak felelt meg (2. táblázat).

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Vizsgálataimat a Széchenyi István Egyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszer-tudományi Karának Élelmiszer-tudományi Tanszékén végeztem. Kísérleteimben optimalizáltam két, előzetesen kiválasztott élesztőgomba-törzs (*S. cerevisiae* NCAIM Y.00200 és *K. marxianus* DSM 4908) fermentációs paramétereit melasz és kukoricalekvár tápoldaton, amit a vitaminadagolt folyamatokhoz kontrollnak használtam. Ezt követően vitaminadagolást végeztem és minden esetben vizsgáltam az élesztő-sejtszám, a szárazanyag-tartalom, a nedves sejt tömeg, az élesztő fehérje és a tápoldat összes cukortartalom értékeit, továbbá az élesztők szaporodási paramétereit [fajlagos szaporodási sebesség (μ), generációs idő (t_g), ill. fehérjehozam ($Y_{x/s}$)].

3.1. Alkalmazott tápközegek

A tisztatenyészetek készítéséhez és a lemezöntéses élesztő-sejtszám meghatározáshoz alkalmazott táptalajok összetételét a 2. táblázat szemlélteti.

2. táblázat: Az alkalmazott tápközegek összetétele

Tápközeg neve	Összetevő	Mennyiség	Mértékegység
YGC (élesztő-glükóz-kloramfenikol) agar (Merck)	Élesztő	5	g/1000 cm ³
	Glükóz	20	
	Kloramfenikol	0,1	
	Agar	10-15	
YGC (élesztő-glükóz-kloramfenikol) tápleves (Merck)	Élesztő	5	g/1000 cm ³
	Glükóz	20	
	Kloramfenikol	0,1	
LYP (laktóz-élesztő-pepton) agar (Merck)	Élesztő	10	g/1000 cm ³
	Laktóz	20	
	Pepton	20	
	Agar	20	
LYP (laktóz-élesztő-pepton) tápleves (Merck)	Élesztő	10	g/1000 cm ³
	Laktóz	20	
	Pepton	20	

3.2. Alkalmazott oldatok

A fermentációs kísérletekhez és a mikrobiológiai vizsgálatokhoz használt oldatok főbb paramétereit, illetve a Wickerham-féle tápoldat összetételét a 3. és 4. táblázatban foglaltam össze. A decimális hígítási sor készítéséhez kémcsövenként 9 cm³ sóoldatot adagoltam ki, a növényi alapú tápoldatok hígításához pedig ugyanezt az oldatot 500 cm³-es üvegekben steriliztem és tároltam.

3. táblázat: Fermentációs kísérletekhez és mikrobiológiai vizsgálatokhoz használt oldatok

Tápoldat neve	Összetevő	Mennyiség	Mértékegység
1 M HCl-oldat	HCl (37%)	82,8	cm ³ /dm ³
1 M NaOH-oldat	NaOH	40	g/dm ³
Konyhasó-oldat	NaCl	6,5	g/dm ³
Habzágátló	Antifoam-Y30 emulzió	0,1	cm ³ /1000 cm ³

4. táblázat: A Wickerham-féle vitamin-törzsoldat összetétele (URL⁸; Furutani et al.,1953)

Összetevők	Koncentráció (mg / 100 cm ³)
Folsav	0,2
Biotin	0,2
Kalcium-pantotenát	40
Inozitol	200
Niacin	40
<i>p</i> -aminobenzoesav	20
Piridoxin-hidroklorid	40
Tiamin-hidroklorid	40
Riboflavin	20

A kémiai vizsgálatokhoz szükséges oldatok összetételét az 5. és 6. táblázatban foglaltam össze. Az oldatokat Csapó és Csapóné Kiss (2003) *Élelmiszer-kémia* c. könyvében leírtak szerint készítettem el.

5. táblázat: A Luff-Schoorl módszerhez szükséges oldatok összetétele

Táplódat neve	Összetevő	Mennyiség	Mértékegység
Carrez I. oldat	Cink-acetát	219	g/1000 cm ³
	Ecetsav	30	cm ³ /1000 cm ³
Carrez II. oldat	Kálium-hexaciano-ferrát (II)	106	g/1000 cm ³
	Citromsav	50	
Luff-Schoorl reagens	Nátrium-karbonát	143,8	g/1000 cm ³
	Réz-szulfát	25	
80%-os etil-alkohol oldat	Etil-alkohol (99,5%)	859,1	cm ³ /1000 cm ³
0,1 M HCl-oldat	HCl (37%)	8,2	cm ³ /1000 cm ³
4 M HCl-oldat	HCl (37%)	331,2	cm ³ /1000 cm ³
3%-os KI-oldat	KI	30	g/1000 cm ³
3 M H ₂ SO ₄ -oldat	H ₂ SO ₄ (96,5%)	167,4	cm ³ /1000 cm ³
0,1 M NaOH-oldat	NaOH	4	g/1000 cm ³
1%-os metilnarancs indikátor oldat	Metilnarancs indikátor	10	g/1000 cm ³
1%-os keményítő indikátor oldat	Keményítő	10	g/1000 cm ³
0,1 M Na ₂ S ₂ O ₃ -oldat	Na ₂ S ₂ O ₃	15,8	g/1000 cm ³

6. táblázat: A Kjeldahl-féle nitrogén-meghatározási módszerhez szükséges oldatok összetétele

Tápoldat neve	Összetevő	Mennyiség	Mértékegység
NaOH + Na ₂ S ₂ O ₃ × 5 H ₂ O lúgosító oldat	NaOH	500	g/1000 cm ³
	Na ₂ S ₂ O ₃ × 5 H ₂ O	25	
4% H ₃ BO ₃ -oldat	H ₃ BO ₃	40	g/1000 cm ³
Fenolftalein indikátor etil-alkoholos oldata	Fenolftalein	10	g/1000 cm ³
Keverék indikátor etil-alkoholos oldata	Metilvörös indikátor	1,3	g/1000 cm ³
	Metilénkék indikátor	0,6	
0,1 M H ₂ SO ₄ -oldat	H ₂ SO ₄	5,5	cm ³ /1000 cm ³

3.3. Wickerham-féle vitamin tápoldat kiválasztása

Kísérleteim megkezdése előtt számos olyan szakirodalmi forrást megvizsgáltam, amely dúsítási fermentációs folyamatok eredményeiről számolt be. Először a vas-klorid (FeCl₂ × 4 H₂O) tulajdonságait elemeztem. Végül a Wickerham-féle tápoldattal történő vitaminadagolás mellett döntöttem. Az oldatot úgy készítettem el, hogy 100 cm³ desztillált vízben feloldottam a vitaminoldat komponenseit (4. táblázat), majd 0,22 μm pórusátmérőjű fecskendőszűrő segítségével sterilre szűrtem. Az oldatból 1 cm³/dm³-t használtam a fermentációs folyamatok során.

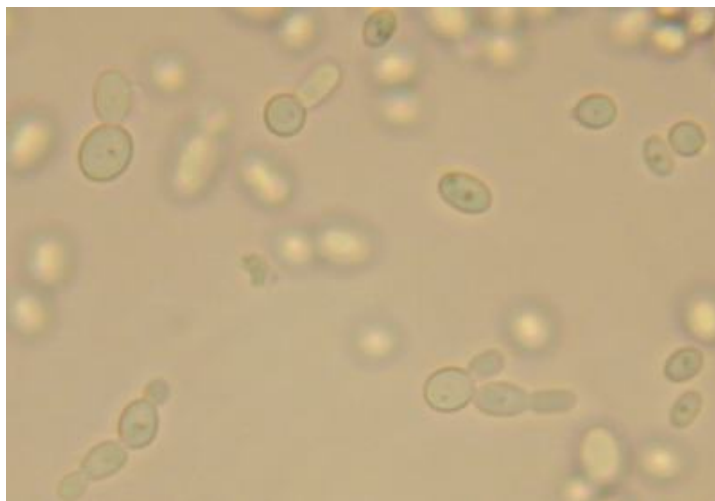
3.4. Alkalmazott élesztőtörzsek

Az általam használt élesztőgomba-törzsek egyes jellemzőit a 7. táblázatban foglaltam össze.

7. táblázat: Kiválasztott élesztőtörzsek beszerzési forrása

Törzs	Beszerzési forrás
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCAIM Y.00200	Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye (National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms; Budapest)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> DSM 4908	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSM; Braunschweig, Németország)

A *S. cerevisiae* és a *K. marxianus* mikroszkópi képét a 6. és a 7. ábra szemlélteti.



6. **ábra:** *Saccharomyces cerevisiae* fénymikroszkópos képe (URL⁹)



7. **ábra:** *Kluyveromyces marxianus* fénymikroszkópos képe (URL¹⁰)

A két faj rendszertani besorolása az alábbi:

Saccharomyces cerevisiae:

Ország: FUNGI

Törzs: *Ascomycota*

Osztály: *Hemiascomycetes*

Rend: *Saccharomycetales*

Család: *Saccharomycetaceae*

Nemzetség: *Saccharomyces*

Faj: *Saccharomyces cerevisiae*

Kluyveromyces marxianus:

Ország: FUNGI

Törzs: *Ascomycota*

Osztály: *Hemiascomycetes*

Rend: *Saccharomycetales*

Család: *Saccharomycetaceae*

Nemzetség: *Kluyveromyces*

Faj: *Kluyveromyces marxianus*

3.5. Melasz

A kísérleteimben felhasznált melaszt a Győri Szeszgyár és Finomító Zrt. bocsájtotta rendelkezésemre. A melasz főbb beltartalmi és mikrobiológiai jellemzőit a 8. táblázatban tüntettem fel. A cukortartalomra vonatkozó információkat a Győri Szeszgyár és Finomító Zrt.-től kaptam, míg a többi paraméter értékét magam határoztam meg.

8. táblázat: A melasz összetétele és mikrobiológiai minősége

Paraméter	Érték
pH-érték	7,35
Cukortartalom (BRIX %)	45
Sűrűség (g/cm ³)	1,38
Száranyag-tartalom (%)	71,5
Mikroorganizmus-szám (tke/cm ³)	5,5 × 10 ³
Élesztőgomba-szám (tke/cm ³)	3,1 × 10 ²

3.6. Kukoricalékvár

A kukoricalékvárt a soltvadkerti Kévés Kft.-től szereztem be. A kukoricalékvár gyártó által mért összetételi értékeit és általam meghatározott mikrobiológiai jellemzőit a 9. táblázat mutatja.

9. táblázat: A kukoricalevár összetétele és mikrobiológiai minősége

Paraméter	Érték
pH-érték	4,1
Száranyag-tartalom (%)	46,3
Cukortartalom (%)	Monoszacharidok: ≤ 5 Oligo- és poliszacharidok: ≤ 20
Mikrobaszám (tke/cm ³)	$7,6 \times 10^2$
Élesztőszám (tke/cm ³)	$1,0 \times 10^4$

3.7. A kísérletek során alkalmazott eszközök

G/433617 kutatómikroszkóp (Carl Zeiss, Jena, Németország). Fénymikroszkóppal végeztem a tenyészetek telepeiből készített preparátumok mikroszkópos képének vizsgálatát és Bürker-kamrával az inokulum sejtkoncentrációjának meghatározását.

KB-53 termosztát (Binder, Tuttlingen, Németország). A fermentációs kísérletekhez szükséges friss tenyészetek inkubálása 25°C-on történt.

Autokláv (Webeco, Bad Schwartau, Németország). A táptalajok és hígítófolyadékok, ill. a fermentor reaktortérének sterilizését 121°C-on, 15 percen keresztül végeztem.

Laboratóriumi centrifuga (Sigma, Osterode am Harz, Németország). A nedves sejtömeg meghatározását laboratóriumi

centrifugával végeztem, 5 percen keresztül, először 4000 rpm, majd 5000 rpm fordulatszámon.

Analitikai mérleg (Sartorius, Göttingen, Németország). Analitikai mérlegen mértem az üres centrifugacsövek és a sejttömeggel teli centrifugacsövek tömegét a centrifugálás előtt és azt követően.

Szárítószekrény (Chirana, Stará Turá, Szlovákia). A szárazanyag-tartalom meghatározására szolgáló mintákat szárítószekrényben szárítottam ki $105 \pm 1^\circ\text{C}$ -on, tömegállandóságig.

Desztilláló készülék (Parnas–Wagner, Haryana, India). Az élesztő fehérjetartalmának meghatározásához, a desztillálás folyamatában Parnas–Wagner féle desztilláló készüléket használtam.

Biostat A plus típusú fermentor (Sartorius). A fermentor 5 dm^3 hasznos reaktortérfogattal rendelkezett (8. ábra), melyet minden kísérlet előtt csomagolt, zárt állapotban steriliztem. A zárófedelére integrálva található a hőmérő, az oldottoxigén-mérő, a levegőztető és a pH-elektrod csatlakozója, a habzástgátló, valamint a sav- és a lúgbetáplálás csonkjai, ill. a folyamatos keverést biztosító motor, a kondenzátor, egy injektálásra alkalmas szeptum (inokulum beinjektálási helye) és a mintavevő egység csonkja. A mintvételi egység zárt rendszerű mintavételt lehetővé téve csatlakozott a fermentor fémtetejéhez. A reaktortér fűtése érdekében a berendezés fűtőköppennyel ellátott. A hűtést cirkulációs rendszerű merülő hűtő biztosította. A savat, a lúgot és a habzástgátlót perisztaltikus pumpák segítségével adagoltam. A légpumpát $0,22 \mu\text{m}$ -es pórusméretű

baktériumszűrő közbeiktatásával csatlakoztattam a fermentorhoz. A levegő mennyisége a készülékben elhelyezett rotaméterrel összekapcsolt szelep segítségével is szabályozható.



8. ábra: Biostat A plus típusú fermentor

3.8. Alkalmazott szoftverek

A fermentor mérőműszereinek (pH- és oldottoxigén-mérő) kalibrálását követően a berendezéshez tartozó BioPAT Trace (Sartorius) szoftverrel követtem nyomon a főbb paraméterek (pH, keverés fordulatszáma, levegőztetés, hőmérséklet) értékének fermentálás közbeni alakulását. Eredményeimet MS Excel programmal (Microsoft, Redmond, WA, USA) értékeltem, az optimalizált (kontroll) és a vitaminadagolásos folyamat eredményeinek szignifikancia-vizsgálatát pedig MicroCal Origin 3.0

szoftverrel (MicroCal Software, Northampton, MA, USA) végeztem, egytényezős varianciaanalízist alkalmazva (Szűcs, 2002).

3.9. Alkalmazott módszerek

3.9.1. Élesztőtörzsek kiválasztása

A *S. cerevisiae* törzseit többnyire alkohol és SCP előállítására alkalmazzák. A rendelkezésre álló *S. cerevisiae* törzsek közül az NCAIM Y.00200 jelűre esett a választásom. A *K. marxianus*-t leginkább laktóztartalmú tápközegeken tenyésztik, SCP-előállítás céljából, de minthogy növényi alapú szubsztráton történő hasznosítása is lehetséges, kísérleteimbe bevontam a *K. marxianus* DSM 4908 törzset.

A tesztmikrobák kiválasztása számos irodalmi forrás (El-Gendy et al., 2013; Fonseca et al., 2013; Trigueros et al., 2016) áttanulmányozását követően, a beszerzési lehetőségek figyelembe vételével történt. Az általam felhasznált törzsek ilyen célú alkalmazására nem találtam utalást a szakirodalomban, így a SzE-MÉK Élelmiszer-tudományi Tanszékén korábban lefolytatott kísérletek eredményeire alapoztam.

3.9.2. Tisztatenyészetek készítése

A kiválasztott élesztőtörzseket vákuumzárásos, dupla ampullás, fagyasztva szárított formában szereztem be. A liofilezett preparátumot először konyhasó-oldatban ($6,5 \text{ g/dm}^3 \text{ NaCl}$) rehidratáltam, majd YGC, illetve – *Kluyveromyces* esetében – YLC táplevesbe oltottam és inkubáltam 25°C -on, 48-72 órán keresztül. Ezt követően a táplevesekből YGC és YLC táptalajra oltottam tisztatenyészetek készítése céljából.

3.9.3. Az inokulum készítésének menete

Kísérleteim megkezdése előtt friss (24 órás) tenyészeteket állítottam elő és megvizsgáltam a kifejlődött telepek preparátumainak mikroszkópos képét. Ezt követően inokulumot készítettem úgy, hogy $50 \text{ cm}^3 \text{ NaCl}$ -oldatba ($6,5 \text{ g/dm}^3$) egy lemeznyi élesztőtenyészetet mostam, majd Bürker-kamra segítségével állítottam be az optimális (10^6 sejt/cm^3) sejtkoncentrációt (Albertin et al., 2011).

3.9.4. Az egysejt-fehérje előállítás folyamata

Minthogy a melaszt 11-12%-os (Kutasi, 2007) és 18%-os (El-Gendy et al., 2013) oldatként használják fermentációs célokra, saját kísérleteimben kétszeres, háromszoros és hétszeres hígítást alkalmaztam. A végleges tápoldatot háromszoros hígítással

készítettem, 2 dm³ mennyiségben, oly módon, hogy az előzetesen 80°C-on 15 percen keresztül hőkezelt melasz, ill. kukoricalekvár 655 cm³-éhez 1345 cm³ steril sóoldatot (6,5 g/dm³ NaCl) adagoltam.

A fermentor reaktorteret minden kísérlet előtt 121°C-on, 15 percig steriliztem zárt állapotban. A berendezés használata előtt elvégeztem a mérőműszerek kalibrálását, majd a reaktortérbe töltöttem a 2 dm³ szubsztrátot. Beállítottam az alkalmazni kívánt keverési fordulatszámot, levegőztetési sebességet, pH-értéket, hőmérsékletet és mértem az oldott oxigén szintjét.

Az oldott oxigén koncentrációját a fermentorhoz tartozó oldott oxigén mérővel mértem. Mivel e paraméter értékének alakulását számos tényező befolyásolta (pl. az alkalmazott tápközeg oldott oxigén szintje, az élesztő aktuális szaporodási szakasza, a keverés fordulatszáma, a levegőztetés mértéke stb.), azt nem adtam meg pontosan, azonban a végső értékek jellemzően 0,2–0,4 mg/dm³ között alakultak. Az egymást követő kísérleteknél egyszerre mindig csak egy fermentációs paramétert változtattam, amit a 10.-13. táblázatokban félkövér kiemeléssel jeleztem.

A 10. táblázatban a melasz és a *S. cerevisiae* NCAIM Y.00200 kombinációjának optimalizálási folyamatát mutatom be.

10. táblázat: Melasz és *Saccharomyces cerevisiae* NCAIM
Y.00200 esetében alkalmazott fermentációs paraméterek

Paraméter	I. beállított érték	II. beállított érték	III. beállított érték	IV. beállított érték	V. beállított érték
Hígítás	3 ×	2 ×	3×	3×	3×
Hőmérséklet (°C)	25	25	30	30	30
pH-érték	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5
Keverés fordulatszáma (1/min)	100	100	100	200	200
Levegőztetés (vvm)	1	1	1	1	1,5

Ezt követően elvégeztem a kukoricalekvár és a *S. cerevisiae* NCAIM Y.00200 optimalizációját, melynek részleteit a 11. táblázat tartalmazza.

11. táblázat: Kukoricalekvár és *Saccharomyces cerevisiae* NCAIM Y.00200 esetében alkalmazott fermentációs paraméterek

Paraméter	I. beállított érték	II. beállított érték	III. beállított érték	IV. beállított érték
Hígítás	2 ×	3 ×	3×	3×
Hőmérséklet (°C)	30	30	30	30
pH-érték	5,5	5,5	5,5	5,5
Keverés fordulatszáma (1/min)	200	200	300	400
Levegőztetés (vvm)	1,5	1,5	1,5	1,5

A *K. marxianus* DSM 4908 felhasználásával melasz és kukoricalekvár tápközegekben végrehajtott optimalizációs folyamatok körülményeit a 12.-13. táblázatok szemléltetik.

12. táblázat: Melasz és *Kluyveromyces marxianus* DSM 4908
esetében alkalmazott fermentációs paraméterek

Paraméter	I. beállított érték	II. beállított érték	III. beállított érték	IV. beállított érték	V. beállított érték	VI. beállított érték
Hígítás	2 ×	3 ×	3×	3×	3×	3×
Hőmérséklet (°C)	25	25	30	30	30	30
pH-érték	5,5	5,5	5,5	4,5	4,5	4,5
Keverés fordulatszáma (1/min)	300	300	300	300	300	300
Levegőztetés (vvm)	1	1	1	1	2	1,5

13. táblázat: Kukoricalékvár és *Kluyveromyces marxianus* DSM
4908 esetében alkalmazott fermentációs paraméterek

Paraméter	I. beállított érték	II. beállított érték	III. beállított érték	IV. beállított érték	V. beállított érték	VI. beállított érték
Hígítás	2 ×	3 ×	3×	3×	3×	3×
Hőmérséklet (°C)	25	25	30	30	30	30
pH-érték	5,5	5,5	5,5	4,5	4,5	4,5
Keverés fordulatszáma (1/min)	300	300	300	300	300	300
Levegőztetés (vvm)	1	1	1	1	2	1,5

A beállított paraméterek elérését követően az élesztőinokulumot a reaktortérbe juttattam. A fermentációs folyamatot 72 órán keresztül végeztem és kísérleteim során mintákat vettem, melyeknek meghatároztam a szárazanyag-tartalmát, nedves sejttömegét, élesztő-sejtszámát, valamint a tápoldat összes cukortartalmát és az élesztő fehérjetartalmát. Minden esetben 3 párhuzamos mérést végeztem. Vizsgáltam továbbá a fajlagos szaporodási sebesség értékét, valamint a generációs idő- és a fehérjehozam-értékeket.

A végleges, optimalizált paraméterekkel végzett kísérletek szolgáltak kontrollként, amelyeket aztán megismételtem úgy is, hogy a fermentálandó alapanyaghoz $1 \text{ cm}^3/\text{dm}^3$ Wickerham-vitaminoldatot adagoltam. A fermentációs folyamatok során a Crabtree effektus lehetősége nem merült fel, a kialakulására utaló jelenséget nem tapasztaltam.

3.10. A fermentációs folyamatokhoz kapcsolódó mérések és számolások

3.10.1. Élesztő-sejtszám meghatározás

Az élesztőgombák élősejt-számának meghatározása lemezöntéses módszerrel (Deák, 2006), YGC (Yeast–Glucose–Chloramphenicol) agaron (3. táblázat), $25 \pm 1^\circ\text{C}$ -os, 96–120 órás inkubálást követően történt. Egyes esetekben Bürker-kamrás sejtszámlálást is végeztem.

3.10.2. Nedves sejtömeg meghatározása

Nedves sejtömeg meghatározásokra a 0., 24., 48., és 72. órában került sor (Hegyi et al., 2013). Az először 4000 rpm, majd 5000 rpm fordulatszámon 5 percig végzett centrifugálást követően a felülúszót eltávolítottam és a maradék nedvességcseppeket szűrőpapír segítségével felitattam. A sejtömeggel teli centrifugacső és az üres centrifugacső analitikai mérlegen (Sartorius) mért tömegének különbsége adta a nedves sejtömeget.

3.10.3. Szárazanyag-tartalom meghatározása

A szárazanyag-tartalom meghatározását a 0., 24., 48., valamint 72. órában vett és kvarchomokkal elkevert mintákból, $105 \pm 1^\circ\text{C}$ -os szárítást alkalmazva végeztem, 3 g mintamennyiségek felhasználásával (Csapó és Csapóné Kiss, 2003).

3.10.4. Élesztő fehérjetartalom meghatározása

A fehérjetartalmat a Kjeldahl-féle nitrogénmeghatározás módszerével mértem, 1 g szárított minta felhasználásával (Csapó és Csapóné Kiss, 2003). Első lépésként kénsavas roncsolást alkalmaztam, majd desztillálást és titrálást végeztem. A mérésekhez az optimalizált (kontroll) és vitamindúsítást alkalmazó fermentációs

folyamatok 0., 24., 48. és 72. órájában vettem mintákat. A tápoldatból származó nitrogénmennyiséget kivontam a minta teljes nitrogéntartalmából, így kizárólag az élesztőre vonatkozó nitrogénmennyiséget kaptam, melyet minden esetben a következő képlettel határoztam meg:

$$\text{Nitrogén\%} = (S - L) \times 0,0028016 \times 100 / b, \text{ ahol}$$

S: a szedőlombikba tett 0,1 M H₂SO₄-oldat (cm³),

L: a titráláshoz fogyott 0,2 M NaOH-oldat (cm³),

0,0028016: 1 cm³ 0,1 M H₂SO₄-oldatnak megfelelő nitrogén tömege (g),

6,25: 1 g nitrogénnek megfelelő fehérje tömege (g),

b: a bemért anyag tömege (g).

Az így kapott százalékos eredményeket átszámoltam élesztőfehérje-értékekre (g/dm³).

3.10.5. Tápoldat összes cukortartalmának meghatározása

A tápoldat összes cukortartalmát a Luff-Schoorl módszerrel határoztam meg, a magasabb rendű cukrok invertálását követően, a 0., 24., 48. és 72. órában vett és szárított, 20-20 g tömegű mintákból (Csapó és Csapóné Kiss, 2003). A folyamat főbb lépései az alábbiak voltak:

1. A mintát mérőlombikba mértem.
2. Hozzáadtam desztillált vizet és 1 órán át rázógépből rázattam.
3. Hozzáadtam a Carrez I. és a Carrez II. oldatot.
4. Etanollal jelig töltöttem és leszűrtem.
5. A szűrletből melegítéssel elpárologtattam az etanol fő tömegét.
6. A bepárlási maradékot lehűlés után jelig töltöttem.
7. Áttöltöttem egy mérőlombikba.
8. Hozzáadtam néhány csepp metilnarancs indikátor oldatot és annyi 4 M HCl-oldatot, hogy az indikátor oldat színe pirosas legyen.
9. Hozzáadtam a 0,1 M HCl-oldatot, majd a lombikot intenzív forrásban lévő vízfürdőbe tettem 30 percre.
10. Gyorsan lehűtöttem 20°C-ra és 0,1 M NaOH-oldatot adtam hozzá, majd jelig töltöttem.
11. Összeráztam, majd a kivett mennyiséghez pipettáztam a Luff-Schoorl reagenst és szabad láng felett rázogattva forrásba hoztam 2 percen belül.
12. Az oldatot főzőpohárba töltöttem és azbesztes dróthálón 10 percig tovább forraltam.
13. 10 perc után rögtön lehűtöttem vízfürdőben.
14. A kihűlt oldatot lombikba adagoltam, hozzáadtam a 3%-os KI-oldatot és rázogattás közben óvatosan hozzáadtam a 3 M H₂SO₄-oldatot.
15. 0,1 M Na₂S₂O₃-oldattal megtráltam szalmasárga színig, majd hozzáadtam a keményítő indikátor oldatot és befejeztem a titrálást.
16. Ezzel az eljárással párhuzamosan vakpróbát is készítettem.
17. Az észlelt fogyás figyelembe vételével, az alábbi képlettel számoltam ki az eredményeket:

$$C = K \times (V - F) \times f / m \times 10, \text{ ahol}$$

K: táblázatból kikeresett cukortartalom (mg),

V: a vakpróbára fogyott 0,1 M Na₂S₂O₃ mérőoldat térfogata (cm³),

- F: az aliquot mintaoldatra fogyott 0,1 M Na₂S₂O₃ mérőoldat térfogata (cm³),
f: 0,1 M Na₂S₂O₃ mérőoldat faktora,
m: a titráláskor kipipettázott mintaoldatban lévő minta tömege (g).

3.10.6. Az élesztőszaporodást jellemző paraméterek meghatározása

Fajlagos szaporodási sebesség. Meghatároztam az élesztőgomba-törzsek fajlagos szaporodási sebesség értékeit, melyek a logaritmizált sejtszámok alapján felvett szaporodási görbék exponenciális szakaszára a legkisebb négyzetek módszerével illesztett egyenesek meredekségéből adódtak.

Fehérjehozam-értékek. A fehérjehozamot ($Y_{x/s}$) az élesztő fehérjetartalmának és a tápoldat összes cukortartalmának hányadosaként számítottam úgy, hogy az élesztő fehérjetartalom (g/100 g) változását (dX) elosztottam a tápoldat összes cukortartalmának (g/100 g) változásával (dS), azaz: $Y_{x/s} = dX / dS$.

Generációs idő. A szaporodási görbe exponenciális szakaszára vonatkoztatott generációs időt (t_g) minden egyes fermentációs folyamat során a $t_g = \ln 2 / \mu$ összefüggéssel számítottam.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1. Az egysejt-fehérje előállítás környezeti feltételeinek optimalizálása

Az optimalizációs folyamatok során alkalmazott hőmérséklet-, pH-, keverési fordulatszám- és levegőztetés-értékek mellett minden esetben kisebb szárazanyag-, nedves sejttömeg-, ill. élesztőfehérje-tartalmakat mértem, mint az optimalizált (kontroll) fermentációs folyamatok során. Ebből adódóan, az optimalizációs folyamatok szárazanyag-adatai ($\leq 7,80 \pm 0,03$ g/100 g) egyetlen esetben sem érték el az optimalizált (kontroll) szárazanyag-tartalmak legkisebb értékét ($8,66 \pm 0,01$ g/100 g). Ami a nedves sejttömeg eredmények alakulását illeti, azok az optimalizálási folyamat során $0,40 \pm 0,005$ g/12 cm³ körüli értéket mutattak, amely szintén elmaradt az optimalizált (kontroll) értékektől. Az előzőekhez hasonlóan, az élesztőfehérje adatok is különböztek, az optimalizálási folyamat során nem haladták meg a $20,0 \pm 0,1$ g/100 g-ot; és a szaporodást jellemző paraméterek ugyancsak kisebbnek bizonyultak az optimalizált (kontroll) eredményeknél.

Az optimalizált (kontroll) fermentációs paraméterek (14.-17. táblázat) meghatározását követően, csak az ezekből a kísérleti beállításokból származó, mért és számolt értékeket tüntettem fel az Eredmények és értékelésük fejezetben.

14. táblázat: Melasz és *Saccharomyces cerevisiae* NCAIM Y.00200
esetében alkalmazott végleges fermentációs paraméterek

Paraméter	Beállított értékek
Hígítás	Háromszoros
Hőmérséklet (°C)	30
pH-érték	5,5
Keverés fordulatszáma (1/min)	200
Levegőztetés (vvm)	1,5

15. táblázat: Kukoricalekvár és *Saccharomyces cerevisiae* NCAIM
Y.00200 esetében alkalmazott végleges fermentációs paraméterek

Paraméter	Beállított értékek
Hígítás	Háromszoros
Hőmérséklet (°C)	30
pH-érték	5,5
Keverés fordulatszáma (1/min)	400
Levegőztetés (vvm)	1,5

16. táblázat: Melasz és *Kluyveromyces marxianus* DSM 4908 esetében alkalmazott végleges fermentációs paraméterek

Paraméter	Beállított értékek
Hígítás	Háromszoros
Hőmérséklet (°C)	30
pH-érték	4,5
Keverés fordulatszáma (1/min)	300
Levegőztetés (vvm)	1,5

17. táblázat: Kukoricalekvár és *Kluyveromyces marxianus* DSM 4908 esetében alkalmazott végleges fermentációs paraméterek

Paraméter	Beállított értékek
Hígítás	Háromszoros
Hőmérséklet (°C)	30
pH-érték	4,5
Keverés fordulatszáma (1/min)	300
Levegőztetés (vvm)	1,5

Cáceres-Farfán et al. (2008) 4,7-es pH-értéket és 35°C-os hőmérsékletet alkalmaztak *K. marxianus* és *S. cerevisiae* keverttenyészetének háromszoros hígítású melaszon történő szaporításakor.

Traviña-Muñoz et al. (2013) *S. cerevisiae* esetében 200 rpm fordulatszámmal és 1 vvm levegőztetéssel 4,92 g/dm³ biomassza-hozamot értek el; El-Gendy et al. (2013) pedig ugyanezzel az

élesztőfajjal 5,6-es pH-érték és 100 rpm mellett kaptak optimális eredményeket, melasz tápközegen.

4.2. A szárazanyag-tartalom, a nedves sejttömeg és az élesztősejtszám értékeinek alakulása a fermentációs folyamatok során

Az optimalizált (kontroll) fermentációs folyamatok során vett mintákból meghatároztam a szárazanyag-tartalom, a nedves sejttömeg és az élesztősejtszám értékeket, majd vizsgálataimat megismételtem vitaminoldat kiegészítéssel is úgy, hogy az optimalizált (kontroll) paramétereken nem változtattam.

A szárazanyag-tartalom és a nedves sejttömeg időbeli alakulását a 18. és a 19. táblázatban foglaltam össze.

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

18. táblázat: Az optimalizált (kontroll) és a vitamin-kiegészítéssel végzett fermentációs folyamat végtermékének szárazanyag-értékei (g/100 g)[✧]

Idő (óra)	kísérleti beállítás*							
	A		B		C		D	
	Optimalizált (kontroll)	Vitamin- kiegészített	Optimalizált (kontroll)	Vitamin- kiegészített	Optimalizált (kontroll)	Vitamin- kiegészített	Optimalizált (kontroll)	Vitamin- kiegészített
0	6,18 ± 0,04 ^b	6,53 ± 0,01 ^a	2,91 ± 0,01 ^a	1,00 ± 0,5 ^b	3,12 ± 0,02 ^b	10,18 ± 0,02 ^a	5,00 ± 0,01 ^b	7,96 ± 0,01 ^a
24	8,28 ± 0,02 ^a	8,18 ± 0,02 ^b	3,60 ± 0,02 ^a	1,40 ± 0,35 ^b	4,32 ± 0,08 ^b	11,46 ± 0,01 ^a	8,50 ± 0,02 ^a	8,44 ± 0,01 ^b
48	12,15 ± 0,05 ^b	17,94 ± 0,05 ^a	5,51 ± 0,02 ^a	4,80 ± 0,10 ^b	6,80 ± 0,05 ^b	22,80 ± 0,15 ^a	10,50 ± 0,04 ^b	21,17 ± 0,01 ^a
72	13,62 ± 0,03 ^b	19,55 ± 0,02 ^a	8,66 ± 0,01 ^a	5,70 ± 0,20 ^b	9,16 ± 0,01 ^b	28,16 ± 0,07 ^a	13,47 ± 0,02 ^b	24,19 ± 0,01 ^a

[✧] Az adatok három mérés átlag ± szórás értékét jelölik

^{a,b} Az azonos kísérleti beállítás azonos sorában szereplő eltérő kisbetűk szignifikáns különbséget jeleznek ($P < 0,05$)

* *Saccharomyces cerevisiae* NCAIM Y.00200 melasz (A), ill. kukoricalevár (B) szubsztráton, valamint *Kluyveromyces marxianus* DSM 4908 melasz (C), ill. kukoricalevár (D) szubsztráton

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

19. táblázat: Az optimalizált (kontroll) és a vitamin-kiegészítéssel végzett fermentációs folyamat végtermékének nedves sejtömeg értékei (g/12 cm³)[✱]

Idő (óra)	kísérleti beállítás*							
	A		B		C		D	
	Optimalizált (kontroll)	Vitamin- kiegészített	Optimalizált (kontroll)	Vitamin- kiegészített	Optimalizált (kontroll)	Vitamin- kiegészített	Optimalizált (kontroll)	Vitamin- kiegészített
0	0,166 ± 0,001 ^b	0,302 ± 0,003 ^a	0,145 ± 0,005 ^a	0,132 ± 0,002 ^b	0,161 ± 0,001 ^a	0,105 ± 0,003 ^b	0,123 ± 0,003 ^a	0,125 ± 0,004 ^a
24	0,231 ± 0,002 ^b	0,423 ± 0,003 ^a	0,236 ± 0,002 ^a	0,153 ± 0,001 ^b	0,217 ± 0,002 ^a	0,128 ± 0,003 ^b	0,150 ± 0,003 ^a	0,153 ± 0,001 ^a
48	0,340 ± 0,010 ^b	0,726 ± 0,002 ^a	0,321 ± 0,003 ^a	0,248 ± 0,002 ^b	0,330 ± 0,018 ^a	0,237 ± 0,002 ^b	0,270 ± 0,004 ^a	0,250 ± 0,002 ^b
72	0,490 ± 0,032 ^b	0,932 ± 0,030 ^a	0,420 ± 0,020 ^a	0,381 ± 0,004 ^b	0,462 ± 0,008 ^a	0,328 ± 0,006 ^b	0,579 ± 0,017 ^a	0,371 ± 0,003 ^b

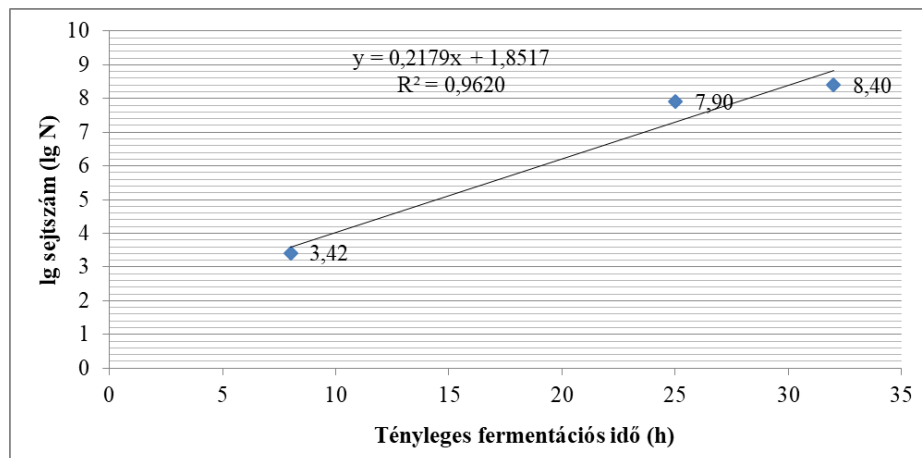
[✱] Az adatok három mérés átlag ± szórás értékét jelölik

^{a,b} Az azonos kísérleti beállítás azonos sorában szereplő eltérő kisbetűk szignifikáns különbséget jeleznek ($P < 0,05$)

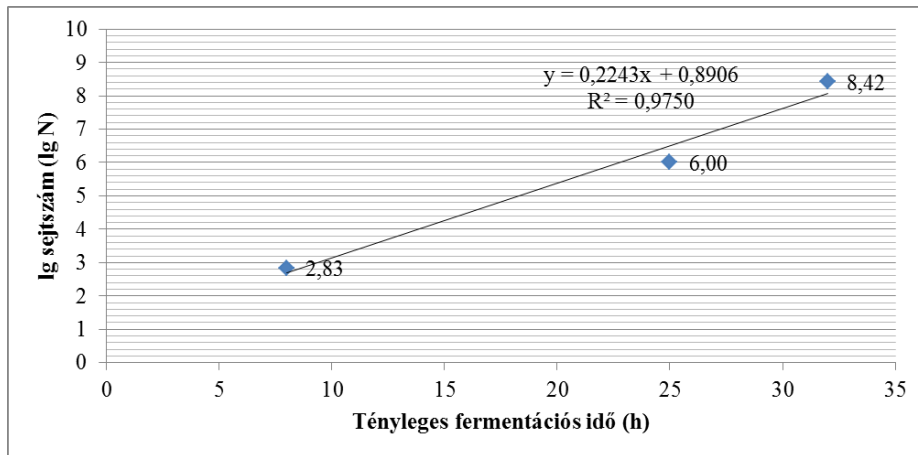
* *Saccharomyces cerevisiae* NCAIM Y.00200 melasz (A), ill. kukoricaekvár (B) tápoldaton, valamint *Kluyveromyces marxianus* DSM 4908 melasz (C), ill. kukoricaekvár (D) tápoldaton

A 18. táblázat adatai egyértelműen mutatják, hogy a vitaminadagolás a 3. nap végére mindkét szubsztráton hozzávetőleg 2-3-szorosára növelte ($P < 0,05$) a *K. marxianus* DSM 4908 szárazanyag-termelését. Hasonló, de jóval kisebb mértékű (kb. 50%-os) serkentő hatás volt megfigyelhető a *S. cerevisiae* NCAIM Y.00200 esetében, melasz tápközegben. Ez utóbbi kísérleti beállításnál nemcsak a szárazanyag-produkció, hanem a nedves sejttömeg is szignifikánsan nőtt ($P < 0,05$) a vitamin-kiegészítésnek köszönhetően (19. táblázat). Az észlelt jelenségek magyarázata elsősorban a tápoldatok eltérő összetételében keresendő.

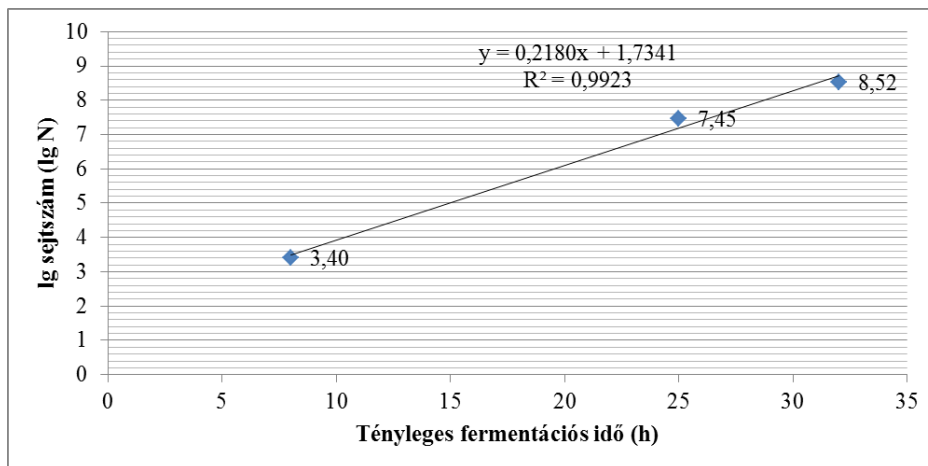
A szaporodás exponenciális szakaszában mért élesztősejtszámok logaritmizált átlagértékei ($n = 3$) a 9.-16. ábrán láthatók.



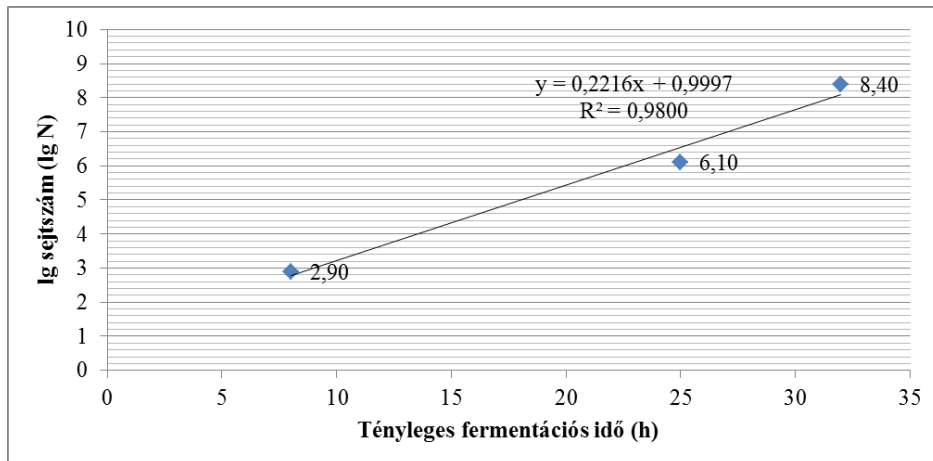
9. **ábra:** *Saccharomyces cerevisiae* NCAIM Y.00200 sejtszám-növekménye, az exponenciális szakaszban, melasz tápoldaton



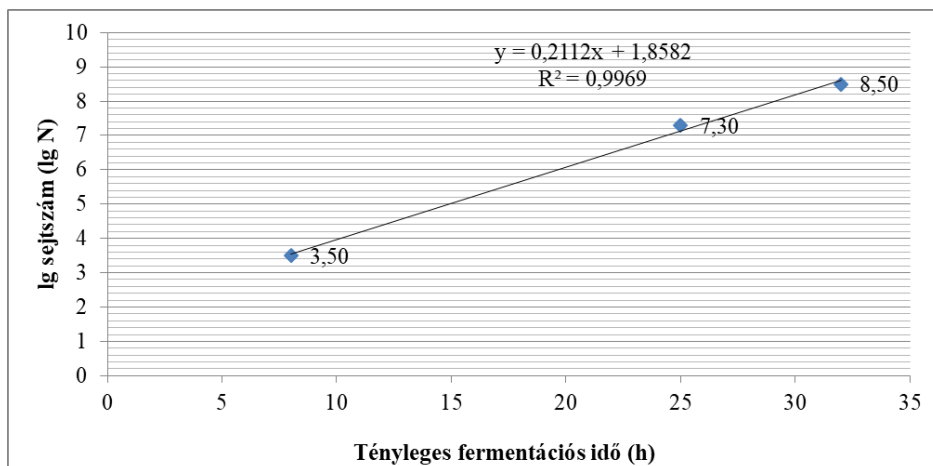
10. **ábra:** *Saccharomyces cerevisiae* NCAIM Y.00200 sejszám-növekménye, az exponenciális szakaszban, vitaminnal kiegészített melasz tápoldaton



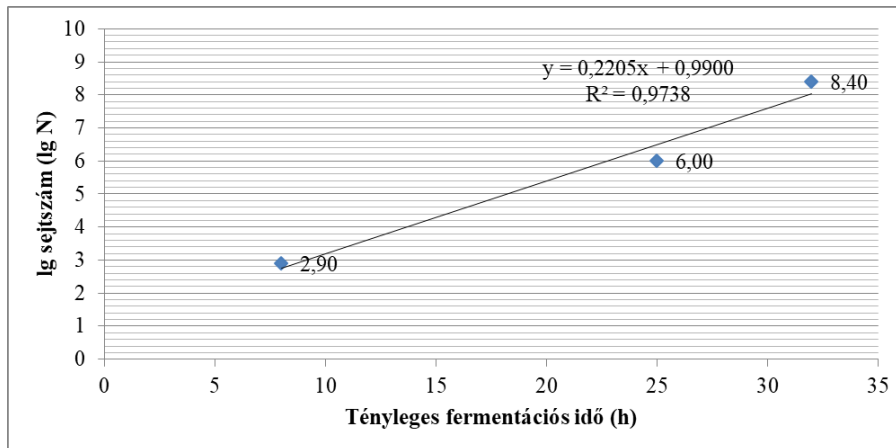
11. **ábra:** *Saccharomyces cerevisiae* NCAIM Y.00200 sejszám-növekménye, az exponenciális szakaszban, kukoricekvár tápoldaton



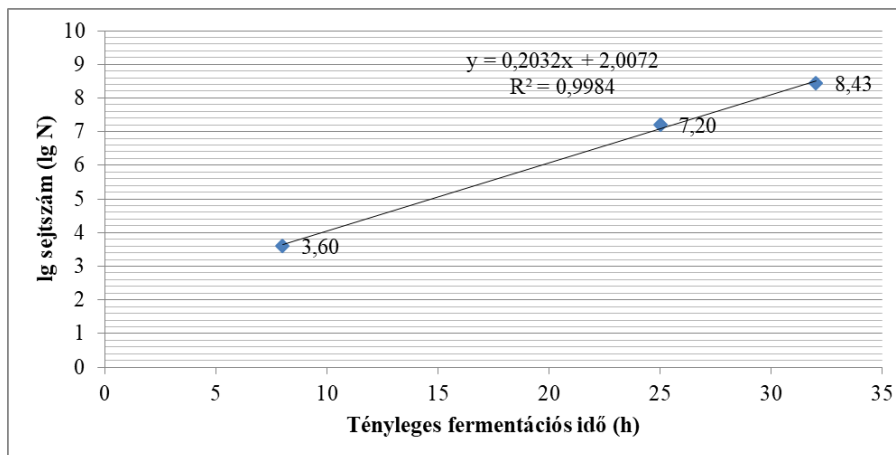
12. ábra: *Saccharomyces cerevisiae* NCAIM Y.00200 sejtszám-növekménye, az exponenciális szakaszban, vitaminnal kiegészített kukoricaekvár tápoldaton



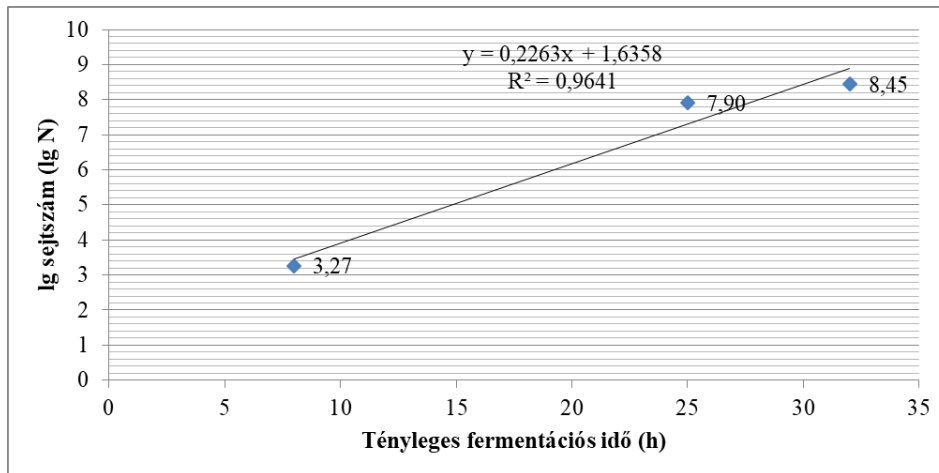
13. ábra: *Kluyveromyces marxianus* DSM 4908 sejtszám-növekménye, az exponenciális szakaszban, melasz tápoldaton



14. **ábra:** *Kluyveromyces marxianus* DSM 4908 sejtszám-növekménye, az exponenciális szakaszban, vitaminnal kiegészített melasz tápoldaton



15. **ábra:** *Kluyveromyces marxianus* DSM 4908 sejtszám-növekménye, az exponenciális szakaszban, kukoricalevár tápoldaton



16. ábra: *Kluyveromyces marxianus* DSM 4908 sejtszám-növekménye, az exponenciális szakaszban, vitaminnal kiegészített kukoricaekvár tápoldaton

Kim et al. (1998) folytonos fermentációval állítottak elő egysejt-fehérjét *K. fragilis* felhasználásával, és az általam tapasztaltnál több mint egy nagyságrenddel nagyobb maximális élősejt-számot mértek ($\lg 9,74 \text{ tke/cm}^3$).

4.3. A fajlagos szaporodási sebesség és a generációs idő alakulása

Az élősejt-számok logaritmizált értékeiből meghatároztam a fajlagos szaporodási sebességet mind a négy kísérleti beállításnál (20. táblázat).

20. táblázat: Élesztőgombák fajlagos szaporodási sebessége [μ (1/h)] az optimalizált (kontroll) és a vitamin-kiegészítéssel végzett fermentációs folyamatokban

Kísérleti beállítás	Optimalizált (Kontroll)	Vitaminadagolt
A	0,217 ^b	0,224 ^a
B	0,218 ^b	0,221 ^a
C	0,211 ^b	0,220 ^a
D	0,203 ^b	0,226 ^a

^{a,b} Az azonos kísérleti beállítás azonos sorában szereplő eltérő kitevők szignifikáns különbséget jeleznek ($P < 0,05$)

* *Saccharomyces cerevisiae* NCAIM Y.00200 melasz (A), ill. kukoricalékvár (B) tápoldaton, valamint *Kluyveromyces marxianus* DSM 4908 melasz (C), ill. kukoricalékvár (D) tápoldaton

A 20. táblázatban közöltekből látható, hogy a vitamin-kiegészítéssel végzett fermentációs folyamatokban nagyobb ($P < 0,05$) μ -értékek adódtak, mint az optimalizált (kontroll) folyamatokban, tehát a vitaminadagolás növelte a vizsgált élesztőgomba-törzsek szaporodási sebességét.

Traviña-Muñoz et al. (2013) *S. cerevisiae* felhasználásával állítottak elő biomasszát. Az élesztőgombák maximális fajlagos szaporodási sebessége 0,53 1/h volt, amelyet 1 vvm levegőztetés és 200 rpm fordulatszám mellett értek el. Hasonlóképpen, Fonseca et al. (2013) *K. marxianus* CBS 6556 szaporodási sebességét vizsgálták különböző cukoroldatokon, és a legjobb eredményt (0,49 1/h) 30°C-

on, glükóz szubsztráttal kapták. Ezek a μ -értékek jelentősen nagyobbak az én eredményeimnél (0,20–0,23 1/h).

Az élesztőgombák szaporodási tulajdonságainak további jellemzése érdekében a generációs időket is meghatároztam (21. táblázat).

21. táblázat: Élesztőgombák generációs idő értékei [t_g (óra)] a kontroll és a vitamin-kiegészítéssel végzett fermentációs folyamatokban

Kísérleti beállítás	Optimalizált (Kontroll)	Vitaminadagolt
A	3,19 ^a	3,09 ^b
B	3,17 ^a	3,13 ^b
C	3,28 ^a	3,15 ^b
D	3,41 ^a	3,06 ^b

^{a,b} Az azonos kísérleti beállítás azonos sorában szereplő eltérő kitevők szignifikáns különbséget jeleznek ($P < 0,05$)

* *Saccharomyces cerevisiae* NCAIM Y.00200 melasz (A), ill. kukoricalekvár (B) tápoldaton, valamint *Kluyveromyces marxianus* DSM 4908 melasz (C), ill. kukoricalekvár (D) tápoldaton

Látható, hogy a vitaminadagolás mind a négy kísérleti beállításnál csökkentette ($P < 0,05$) a generációs időt az optimalizált (kontroll) folyamatokhoz képest (21. táblázat). Ásványi (2005) négy *K. marxianus* és egy *K. lactis* törzsszel, savó alapon végzett SCP-

előállítási kísérleteket, és 3,2–6,6 óra közötti t_g -értékeket számolt, amelyek közel megegyeznek eredményeimmel ($t_g = 3,1$ – $3,4$ óra).

4.4. A tápoldat összes cukortartalmának és az élesztő fehérjetartalmának alakulása a fermentációs folyamatok során

Az optimalizált (kontroll) és a vitamin-kiegészítéssel végzett fermentációs folyamatok során, a 0., 24., 48. és 72. órában vett mintákból megmértem a fermentlé összes cukortartalmát és meghatároztam az élesztő fehérjetartalmát. Eredményeim a 22.-23. táblázatokban láthatók.

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

22. táblázat: Az optimalizált (kontroll) és a vitamin-kiegészítéssel végzett fermentációs folyamatokban alkalmazott tápoldatok összes cukortartalmának alakulása (g/100 g)[✧]

Idő (óra)	kísérleti beállítás*							
	A		B		C		D	
	Optimalizált (kontroll)	Vitamin- kiegészített	Optimalizált (kontroll)	Vitamin- kiegészített	Optimalizált (kontroll)	Vitamin- kiegészített	Optimalizált (kontroll)	Vitamin- kiegészített
0	53,4 ± 0,2 ^a	53,4 ± 0,2 ^a	24,3 ± 0,5 ^a	24,3 ± 0,5 ^a	53,4 ± 0,2 ^a	53,4 ± 0,2 ^a	24,3 ± 0,5 ^a	24,3 ± 0,5 ^a
24	33,5 ± 0,3 ^a	32,6 ± 0,2 ^b	10,6 ± 0,3 ^a	10,6 ± 0,3 ^a	32,6 ± 0,2 ^a	26,4 ± 0,1 ^b	10,5 ± 0,1 ^a	10,5 ± 0,1 ^a
48	10,5 ± 0,3 ^a	8,5 ± 0,1 ^b	5,6 ± 0,3 ^a	5,9 ± 0,5 ^a	8,5 ± 0,1 ^b	9,6 ± 0,3 ^a	6,4 ± 0,2 ^a	4,9 ± 0,4 ^b
72	0,6 ± 0,2 ^b	1,9 ± 0,4 ^a	0,6 ± 0,3 ^a	0,2 ± 0,1 ^a	1,9 ± 0,4 ^a	0,8 ± 0,7 ^a	0,3 ± 0,3 ^a	1,0 ± 0,5 ^a

[✧] Az adatok három mérés átlag ± szórás értékét jelölik

^{a,b} Az azonos kísérleti beállítás azonos sorában szereplő eltérő kisbetűk szignifikáns különbséget jeleznek ($P < 0,05$)

* *Saccharomyces cerevisiae* NCAIM Y.00200 melasz (A), ill. kukoricalevár (B) tápoldaton, valamint *Kluyveromyces marxianus* DSM 4908 melasz (C), ill. kukoricalevár (D) tápoldaton

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

23. táblázat: Az élesztő fehérjetartalmának (g/100 g)[✱] alakulása az optimalizált (kontroll) és a vitamin-kiegészítéssel végzett fermentációs folyamatban

Idő (óra)	kísérleti beállítás*							
	A		B		C		D	
	Optimalizált (kontroll)	Vitamin- kiegészített	Optimalizált (kontroll)	Vitamin- kiegészített	Optimalizált (kontroll)	Vitamin- kiegészített	Optimalizált (kontroll)	Vitamin- kiegészített
0	4,5 ± 0,4 ^a	4,5 ± 0,4 ^a	4,5 ± 0,4 ^a	4,5 ± 0,4 ^a	4,5 ± 0,4 ^a	4,5 ± 0,4 ^a	4,5 ± 0,4 ^a	4,5 ± 0,4 ^a
24	8,6 ± 0,2 ^a	8,9 ± 0,6 ^a	9,2 ± 0,3 ^a	9,1 ± 0,5 ^a	9,5 ± 0,2 ^a	9,6 ± 0,2 ^a	9,3 ± 0,1 ^a	8,9 ± 0,4 ^a
48	16,5 ± 0,2 ^a	17,0 ± 0,2 ^a	16,0 ± 0,2 ^a	16,2 ± 0,4 ^a	17,5 ± 0,6 ^a	16,2 ± 0,4 ^b	17,1 ± 0,3 ^a	16,0 ± 0,2 ^b
72	30,5 ± 0,3 ^a	28,0 ± 0,5 ^b	20,5 ± 0,2 ^a	20,2 ± 0,1 ^a	30,5 ± 0,1 ^a	30,1 ± 0,1 ^b	20,2 ± 0,3 ^a	20,0 ± 0,5 ^a

[✱] Az adatok három mérés átlag ± szórás értékét jelölik

^{a,b} Az azonos kísérleti beállítás azonos sorában szereplő eltérő kisbetűk szignifikáns különbséget jeleznek ($P < 0,05$)

* *Saccharomyces cerevisiae* NCAIM Y.00200 melasz (A), ill. kukoricalékvár (B) tápoldaton, valamint *Kluyveromyces marxianus* DSM 4908 melasz (C), ill. kukoricalékvár (D) tápoldaton

A 22. táblázatban közölt eredmények tanúsága szerint, a harmadik nap végére az optimalizált (kontroll) és a vitaminadagolt fermentációs folyamatok esetében is jelentősen csökkent a tápoldatok összes cukortartalma, amely egyértelműen azt mutatja, hogy az élesztőgomba törzsek jól hasznosították a rendelkezésükre álló szubsztrátokat. Ennek megfelelően, az élesztő fehérjetartalom értékek a fermentációs folyamatok 72. órájára nagymértékben megnövekedtek mindegyik kísérleti beállításnál (23. táblázat). A kontroll és a vitaminkiegészítéses kísérletek eredményei között viszont nem volt egyértelmű, tendenciózus különbség ($P > 0,05$) az összes cukor- és fehérjetartalom vonatkozásában.

4.5. A fehérjehozamok alakulása

A fermentációs kísérletek során mért tápoldat-cukortartalom (22. táblázat) és élesztő-fehérjetartalom (23. táblázat) értékekből kiszámoltam a fehérjehozamokat [$Y_{x/s}$ (g/g)], melyeket a 24. táblázatban tüntettem fel.

24. táblázat: Élesztőgombák fehérjehozam értékei [$Y_{x/s}$ (g/g)] a kontroll és a vitamin-kiegészítéssel végzett fermentációs folyamatokban

Kísérleti beállítás	Optimalizált (Kontroll)	Vitaminadagolt
A	0,5 ^a	0,5 ^a
B	0,7 ^a	0,6 ^a
C	0,5 ^a	0,5 ^a
D	0,6 ^a	0,7 ^a

^{a,a} Az azonos kísérleti beállítás azonos sorában szereplő azonos kisbetűk nem jeleznek szignifikáns különbséget ($P > 0,05$)

* *Saccharomyces cerevisiae* NCAIM Y.00200 melasz (A), ill. kukoricalékvár (B) tápoldaton, valamint *Kluyveromyces marxianus* DSM 4908 melasz (C), ill. kukoricalékvár (D) tápoldaton

Látható, hogy az általam alkalmazott mértékű vitaminadagolás se pozitívan, se negatívan nem befolyásolta a fehérjehozamokat ($P > 0,05$). Trigueros et al. (2016) sajtavót fermentáltak *S. cerevisiae* var. *boulardii* alkalmazásával, optimalizált paraméterek (30°C, pH 5,5, 100 rpm) mellett, és ilyen körülmények között 0,5 g/g hozamkonstans értéket tapasztaltak, ami közel megegyezett az általam számolt fehérjehozam értékekkel.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A vitamin-kiegészítés többnyire nagymértékben serkentette az élesztőgombák szárazanyag-termelését, különösen a *K. marxianus* DSM 4908 törzsét. A vitaminok jelenléte szignifikánsan növelte ($P < 0,05$) a fajlagos szaporodási sebesség (μ) értékeket is, illetve ebből adódóan csökkentette ($P < 0,05$) a generációs időket. *Kluyveromyces marxianus* esetében, kukoricaekvár tápoldaton, vitaminadagolás mellett tapasztaltam a legnagyobb μ -értéket (0,226 1/h) és a legrövidebb generációs időt (3,06 óra). Mivel ebben az esetben a szárazanyag-értékek is kedvezően alakultak vitaminoldat adagolásával, ezt az élesztőtörzs-tápoldat kombinációt javaslom további felhasználásra. A fermentációs kísérletek 72. órájában mért tápoldat-cukortartalom értékek a kontroll mintákban 0,3–1,9 g/100 g között, míg vitaminadagolás hatására 0,2–1,9 g/100 g között alakultak. A háromnapos folyamat végén mért élesztő fehérjetartalmak a kontrollokban 20,2–30,5 g/100 g körül, vitaminadagolással pedig 20,0–30,1 g/100 g között változtak. A vitaminkiegészítés tehát nem növelte meg ($P < 0,05$) az élesztők fehérjetartalmát, ill. fehérjehozamát (0,5–0,7 g/g), mindazonáltal az értekezésemben bemutatott módokon előállított SCP takarmány-adalékanyagként célszerűen felhasználható gazdasági haszonállataink fehérjeszükségletének kielégítésére. A fejlett technológiáknak köszönhetően egyre gyakrabban fordul elő, hogy nem csupán kérődző állatok takarmányozására teszik alkalmassá az élelmiszeripari

melléktermékek újrahasznosítása révén kialakított végterméket. A kísérleteim során előállított egysejt-fehérje tehát – az élesztőgombák sejtfalának bontását követően – szélesebb körben felhasználható.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteim célja az volt, hogy melasz és kukoricafehérje tápoldaton optimalizáljam az élesztőgombákkal végzett egysejt-fehérje előállítás folyamatát, majd pedig vitaminoldat adagolásával tovább növeljem a végtermék-kihozatalt. A főbb vizsgált paraméterek a szárazanyag-tartalom, a nedves sejtömeg, az élesztő-sejtszám, az élesztő fehérjetartalom, illetve a tápoldat összes cukortartalma voltak. Az élesztőgombák szaporodását jellemző paraméterek közül a fajlagos szaporodási sebességet, a generációs időt és a fehérjehozam-értéket határoztam meg. A vitaminadagolás a 3. nap végére mindkét szubsztráton növelte (melasz tápoldaton, átlagban, 9,2 g/100 g-ról 28,2 g/100 g-ra; kukoricafehérje tápoldaton: 13,5 g/100 g-ról 24,2 g/100 g-ra) a *Kluyveromyces marxianus* DSM 4908 szárazanyag-termelését az optimalizált (kontroll) folyamathoz képest. Jóval kisebb mértékű serkentő hatás (13,6 g/100 g-ról 19,6 g/100 g-ra) volt megfigyelhető a *Saccharomyces cerevisiae* NCAIM Y.00200 törzs esetében, melasz tápközegben. Ennél a kísérleti beállításnál a nedves sejtömeg is nőtt a vitaminkiegészítés hatására. Az élesztő-sejtszám maximumértékek az optimalizált (kontroll) és a vitaminadagolásos kísérletekben egyaránt 8,4–8,5 lg tke/cm³ között alakultak. Vitaminadagolás hatására a fajlagos szaporodási sebesség értékek nőttek, míg a generációs idők csökkentek, csakúgy, mint a tápoldat összes cukortartalma. Az élesztő-fehérjetartalmak viszont jelentős növekedést mutattak a fermentáció 72. órájára mind az optimalizált

(kontroll) beállításnál, mind pedig vitaminadagolás esetében. A fehérjehozamok nem mutattak jelentős különbséget vitaminadagolás hatására, értékük 0,5–0,7 g/g között alakult.

7. SUMMARY

The objective of this research was to optimize the process of single-cell protein (SCP) production with yeasts on molasses and corn steep liquor and, then, to further increase SCP yields through vitamin supplementation. During the trials, total solids content, wet cell mass, yeast cell count, yeast protein content, and total sugar content of the fermentation media were quantified. Concerning yeast growth, specific growth rates, generation times and protein yields were determined. The results showed that, by the end of day 3, vitamin supplementation increased dry matter production of *Kluyveromyces marxianus* DSM 4908 on both substrates (on molasses: from 9.2 to 28.2 g/100 g; on corn steep liquor: from 13.5 to 24.2 g/100 g, on average) as compared to the optimized (i.e., control) process. In contrast, a lower degree of stimulatory activity (from 13.6 to 19.6 g/100 g) was observed in the case of *Saccharomyces cerevisiae* NCAIM Y.00200 on molasses; however, the wet cell mass also increased significantly as a result of vitamin supplementation. The maximum values of yeast cell counts ranged between 8.4 and 8.5 log₁₀ cfu/cm³ under both control (i.e., optimized) and experimental (i.e., vitamin-enriched) conditions. Due to vitamin supplementation, the specific growth rates of yeasts in some trial settings increased significantly, whereas their generation times decreased considerably. The total sugar levels of fermentation media also decreased remarkably, while yeast protein contents increased significantly by the

72nd hour of both treatments (i.e., with and without vitamin addition). Ranging from 0.5 to 0.7 g/g, protein yields showed no considerable differences due to vitamin supplementation.

8. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Optimalizáltam az egysejt-fehérje (SCP) előállítás folyamatát hígított melasz tápoldaton, *Saccharomyces cerevisiae* felhasználásával. Optimalizált környezeti feltételek mellett (30°C hőmérséklet, 5,5 pH-érték, 200 rpm fordulatszám, 1,5 vvm levegőztetés) a *S. cerevisiae* NCAIM Y.00200 az átlagosan 17,8 g/100 g cukortartalmú tápoldaton 72 óra leforgása alatt 10,16 g/100 g fehérjetartalmú élesztő tömeget képzett 0,5 g/g fehérjehozamot produkálva.
2. Optimalizáltam az SCP-előállítás folyamatát hígított kukoricalekvár tápoldaton, *S. cerevisiae* alkalmazásával. Optimalizált környezeti feltételek mellett (30°C hőmérséklet, 5,5 pH-érték, 400 rpm fordulatszám, 1,5 vvm levegőztetés) a *S. cerevisiae* NCAIM Y.00200 az átlagosan 8,1 g/100 g cukortartalmú tápoldaton 72 óra leforgása alatt 6,83 g/100 g fehérjetartalmú élesztő tömeget képzett 0,7 g/g fehérjehozammal.
3. Optimalizáltam az SCP-előállítás folyamatát hígított melasz tápoldaton, *Kluyveromyces marxianus* felhasználásával. Optimalizált környezeti feltételek mellett (30°C hőmérséklet, 4,5 pH-érték, 300 rpm fordulatszám, 1,5 vvm levegőztetés) a *K. marxianus* DSM 4908 az átlagosan 17,8 g/100 g cukortartalmú

tápoldaton 72 óra leforgása alatt 10,16 g/100 g fehérjetartalmú élesztő tömeget képzett 0,5 g/g fehérjehozamot produkálva.

4. Optimalizáltam az SCP-előállítás folyamatát hígított kukoricalekvár tápoldaton, *K. marxianus* alkalmazásával. Optimalizált környezeti feltételek mellett (30°C hőmérséklet, 4,5 pH-érték, 300 rpm fordulatszám, 1,5 vvm levegőztetés) a *K. marxianus* DSM 4908 az átlagosan 8,1 g/100 g cukortartalmú tápoldaton 72 óra leforgása alatt 6,73 g/100 g fehérjetartalmú élesztő tömeget képzett 0,6 g/g fehérjehozammal.

5. Wickerham-féle vitaminoldat 1 cm³/dm³ koncentrációban történő alkalmazásával növelhető a *S. cerevisiae* NCAIM Y.00200 és a *K. marxianus* DSM 4908 fajlagos szaporodási sebessége ($P < 0,05$) – és ebből adódóan csökkenthető ugyanezen törzsek generációs ideje ($P < 0,05$) – hígított melasz, illetve kukoricalekvár tápoldatban történő szaporításuk során.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki Prof. Dr. Neményi Miklós akadémikus úrnak és Prof. Dr. Ördög Vince egyetemi tanár úrnak, a Wittmann Antal Növény-, Állat- és Élelmiszer-tudományi Multidiszciplináris Doktori Iskola vezetőjének, támogatásukért.

Köszönet illeti témavezetőimet, Prof. Dr. Varga László egyetemi tanár urat és Dr. Ásványi Balázs habilitált egyetemi docens urat, áldozatos munkájukért, kutatómunkám feltételeinek megteremtéséért.

Köszönetemet fejezem ki az SzE-MÉK Élelmiszer-tudományi Tanszékén dolgozó kollégáimnak disszertációm elkészítéséhez nyújtott segítségükért.

Szeretnék köszönetet mondani a Győri Szeszgyár és Finomító Zrt.-nek, a Magyar Tejgazdasági Kísérleti Intézet Kft.-nek, a Greiner Bio-One Hungary Kft.-nek és a Széchenyi István Egyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszer-tudományi Kara Víz- és Környezettudományi Tanszékének.

Köszönettel tarozom opponenseimnek, Mohácsiné Prof. Dr. Farkas Csilla egyetemi tanár asszonynak, Prof. Dr. Szigeti Jenő egyetemi tanár úrnak és Dr. Peles Ferenc Árpád adjunktus úrnak áldozatos bírálati munkájukért.

Köszönet illeti családtagjaimat, akik nemcsak anyagi támogatást nyújtottak számomra, hanem szellemi és erkölcsi támogatásukkal is hozzájárultak értékrendszerem kifinomultabbá tételéhez.

10. IRODALOMJEGYZÉK

- ALBERTIN, W., MARULLO, P., AIGLE, M., DILLMANN, C., DE VIENNE, D., BELY, M., SICARD, D. (2011): Population size drives industrial *Saccharomyces cerevisiae* alcoholic fermentation and is under genetic control. *Applied and Environmental Microbiology*. 77. pp. 2772-2784.
- ALTUN, C., MADEN, E. A., POLAT, G. G. (2015): The erosive effects of honey, molasses and orange juice on the primary teeth of children. *Pediatric Dental Journal*. 25. pp. 50-53.
- ALZATE, T. L. M., GONZÁLEZ, D., HINCAPIÉ, S., CARDONA, S. B. L., LONDONO-LONDONO, J., JIMÉNEZ-CARTAGENA C. (2017): The profile of bioactive substances in ten vegetable and fruit by-products from a food supply chain in Colombia. *Sustainable Production and Consumption*. 9. pp. 37-43.
- AMADO, I. R., VÁZQUEZ, J. A., PASTRANA, L., TEIXEIRA, J. A. (2017): Microbial production of hyaluronic acid from agro-industrial by-products: molasses and corn steep liquor. *Biochemical Engineering Journal*. 117. pp. 181-187.
- ÁSVÁNYI, B. (2005): Egysejtfehérje-előállítás optimalizálása *Kluyveromyces* törzsek alkalmazása esetén. Doktori (PhD) értekezés. Mosonmagyaróvár. 136 pp.
- BUZÁS, ZS., DALLMANN, K., SZAJÁNI, B. (1989): Influence of pH on the growth and ethanol production of free and

- immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biotechnology and Bioengineering*. 34. pp. 882-884.
- CÁCERES-FARFÁN, M., LAPPE, P., LARQUÉ-SAAVEDRA, A., MAGDUB-MÉNDEZ A., BARAHONA-PÉREZ L. (2008): Ethanol production from henequen (*Agave fourcroydes* Lem.) juice and molasses by a mixture of two yeasts. *Bioresource Technology*. 99. pp. 9036-9039.
- CAZETTA, M. L., CELLIGOI, M. A. P. C., BUZATO J. B., SCARMINO I. S. (2007): Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: effects of temperature and sugar concentration on ethanol production. *Bioresource Technology*. 98. pp. 2824-2828.
- CHEN, D., YAP, Z. Y., LIU, S. (2015): Evaluation of the performance of *Torulaspora delbrueckii*, *Williopsis saturnus*, and *Kluyveromyces lactis* in lychee wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 206. pp. 45-50.
- CHEN, Y. B., WANG, Y. F., HOU, W., WANG, Y. P., XIAO, S. Y., FU, Y. Y., WANG, J., ZHENG, S. W., ZHENG, P. H. (2017): Effect of B-complex vitamins on the antifatigue activity and bioavailability of ginsenoside Re after oral administration. *Journal of Ginseng Research*. 41. pp. 209-214.
- CHIOU, P. W. S., CHIU, S. W., CHEN, C. R. (2001): Value of *Aspergillus niger* fermentation product as a dietary ingredient for broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*. 91. pp. 171-182.

- CHOUDHARY, R., TANDON, R. V. (2009): Consumption of functional food and our health concerns. *Pakistan Journal of Physiology*. 5. pp. 76-83.
- COCA, M., BARROCAL, V. M., LUCAS, S., GONZÁLEZ-BENITO, G., GARCÍA-CUBERO, M. T. (2015): Protein production in *Spirulina platensis* biomass using beet vinasse-supplemented culture media. *Food and Bioproducts Processing*. 94. pp. 306-312.
- CRUEGER, W., CRUEGER, A. (1987): *Biotechnológia – Alkalmazott Mikrobiológia*. Mezőgazdasági Kiadó. Budapest. 360 pp.
- CSAPÓ, J., CSAPÓNÉ, KISS, ZS. (2003): *Élelmiszer-kémia*. Mezőgazda Kiadó. Budapest. pp. 18, 63-65, 125-134.
- DARAMOLA, J. O., ADEKUNLE, E. O., OKE, O.E., ONAGBESAN, O. M., IYASERE, O. S., WILLIAMS, T. J., JAMES, I. J., OYEWUSI I. K., OYEWUSI, J. A. (2015): Effects of pyridoxine supplementation or in combination with other antioxidants on motility, *in vitro* capacitation and acrosome reaction of goat buck spermatozoa during cryopreservation. *Small Ruminant Research*. 131. pp. 113-117.
- DE GREGORIO, A., MANDALARI, G., ARENA, N., NUCITA, F., TRIPODO, M. M., LO CURTO, R. B. (2002): SCP and crude pectinase production by slurry-state fermentation of lemon pulps. *Bioresource Technology*. 83. pp. 89-94.

- DEÁK, T. (2006): Élelmiszer-mikrobiológia. Mezőgazda Kiadó. Budapest. 382 pp.
- DEFRAIN, J. M., SHIRLEY, J. E., BEHNKE, K. C., TITGEMEYER E. C., ETHINGTON, R. T. (2003): Development and evaluation of a pelleted feedstuff containing condensed corn steep liquor and raw soybean hulls for dairy cattle diets. *Animal Feed Science and Technology*. 107. pp. 75-86.
- DUBLECZ, K. (2011): Állati termékek táplálkozás-élettani szerepe. Pannon Egyetem. (http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0059_allati_termek_tapl_elettani_szerepe/adatok.html: 2018.09.03.)
- EKE, B. C., JIBIRI, N. N., BEDE, E. N., ANUSIONWU, B. C., ORJI, C. E., ALISI, C. S. (2017): Effect of ingestion of microwaved foods on serum anti-oxidant enzymes and vitamins of albino rats. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. 10. pp. 1-4.
- EL-GENDY, N. S., MADIAN, H. R., ABU AMR, S. S. (2013): Design and optimization of a process for sugarcane molasses fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* using response surface methodology. *International Journal of Microbiology*, Article ID 815631, pp. 9.
- ENCARNAÇÃO, P. (2016): Functional feed additives in aquaculture feeds. *Aquafeed Formulation*. 15. pp. 217-237.
- FIMBRES-DURAZO, H., RAMÍREZ-ROMERO, R., MICHEL-GALLEGOS, J. C., KAWAS, L. R. (2013): Molasses level in

lamb high-energy diets on productive performance, blood chemistry, liver minerals and histopathology. *Livestock Science*. 157. pp. 113-124.

FOKKINK, W. B., HILL, T. M., BATEMAN II, H. G., ALDRICH, J. M., SCHLOTTERBECK, R. L. (2009): Selenium yeast for dairy calf feeds. *Animal Feed Science and Technology*. 153. pp. 228-235.

FONSECA, G. G., B. DE CARVALHO, N. M., GOMBERT, A. K. (2013): Growth of the yeast *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 on different sugar combinations as sole carbon and energy source. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97. pp. 5055-5067.

FONTANA, J. D., CZECZUGA, B., BONFIM, T. M. B., CHOCIAI, M. B., OLIVEIRA B. H., GUIMARAES M. F., BARON M. (1996): Bioproduction of carotenoids: the comparative use of raw sugarcane juice and depolymerized bagasse by *Phaffia Rhodozyma*. *Bioresource Technology*. 58. pp. 121-125.

FÖLDMŰVELÉSÜGYI MINISZTERIUM (2016): Magyarország Élelmiszergazdasági Programja (2016–2050). Földművelésügyi Minisztérium. Budapest. 56 pp. (<http://www.kormany.hu/download/7/30/d0000/%C3%89lelmiszergazdas%C3%A1gi%20strat%C3%A9gia%202016-2050.pdf>: 2018.09.03.)

- FURUTANI, Y., BETZ, F. R., HENDRIC, R. L. (1953): Vitamin requirements of *Hansenula* yeasts in relation to their phylogeny. *Journal of Bacteriology*. 65. pp. 276-280.
- GHALY, A. E., EL-TAWEEL, A. A. (1997): Kinetic modelling of continuous production of ethanol from cheese whey. *Biomass and Bioenergy*. 12. pp. 461-472.
- GHALY, A. E., KAMAL, M., CORREIA, L. R. (2005): Kinetic modelling of continuous submerged fermentation of cheese whey for single cell protein production. *Bioresource Technology*. 96. pp. 1143-1152.
- GONZÁLEZ-BENITO, G., BARROCAL, V., BOLADO S., COCA M., GARCÍA-CUBERO M. T. (2009): Valorisation of by-products from food industry, for the production of single cell protein (SCP) using microalgae. *New Biotechnology*. 255. p. S262.
- GUIL-GUERRERO, J. L., RAMOS, L., MORENO, C., ZÚNIGA-PAREDES, J. C., CARLOSAMA-YÉPEZ, M., RUALES, P. (2016): Plant-food by-products to improve farm-animal health. *Animal Feed Science and Technology*. 220. pp. 121-135.
- GYIMESI, J., SÓLYOM, L. (1979): Élesztő- és Szeszipari Kézikönyv. Mezőgazdasági Könyvkiadó. Budapest. 423 pp.
- HA, M., KIM, S., LEE, Y., KIM, M., KIM, S. (2003): Kinetics analysis of growth and lactic acid production in pH-controlled batch cultures of *Lactobacillus casei* KH-1 using yeast

extarct/corn steep liquor/glucose medium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 96. pp. 134-140.

HEGYI, GY., KARDOS, J., KOVÁCS, M., MÁLNÁSI-CRIZMADIA, A., MICSONAI, A., NYITRAY, L., PÁL, G., RADNAI, L., REMÉNYI, A., VENEKEI, I. (2013): Bevezetés a biokémiába gyakorlati jegyzet. TÁMOP-4.1.2.A/1-11/1-2011-0073 számú ELTE TTK projekt. p. 57.

HUNTLEY, M. E., JOHNSON, Z. I., BROWN, S. L., SILLS, D. L., GERBER, L., ARCHIBALD, I., MACHESKY, S. C., GRANADOS, J., BEAL, C., GREENE, C. H. (2015): Demonstrated large-scale production of marine microalgae for fuels and feed. *Algal Research*. 10. pp. 249-265.

KIM, J. K., TAK, K., MOON, J. (1998): A continuous fermentation of *Kluyveromyces fragilis* for the production of a highly nutritious protein diet. *Aquacultural Engineering*. 18. pp. 41-49.

KOVÁCS, F. (2002): Állati eredetű élelmiszer-előállítás – élelmiszerbiztonság – életminőség. *Magyar Tudomány*. 9. pp. 1141-1146.

KOVÁCS, I., KOVÁCS, T. (2005): Tápanyagok szerepe az élesztő tevékenységében: élesztőtápanyagok az erjesztésben. *Borászati füzetek*. 3. pp. 31-33.

KRIGE, A., NICOL, W. (2015): Continuous succinic acid fermentation by *Escherichia coli* KJ 122 with cell recycle. *Process Biochemistry*. 50. pp. 2004-2011.

- KUTASI, J. (2007): Fermentációs biotechnológia. Glia Kft. Budapest.
(<http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tkt/fermentacios/adatok.html>: 2018.09.03.)
- LANE, M. M., MORRISSEY, J. P. (2010): *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow. Fungal Biology Reviews. 24. pp. 17-26.
- LEE, B., KIM, J. K. (2001): Production of *Candida utilis* biomass on molasses in different culture types. Aquacultural Engineering. 25. pp. 111-124.
- LEE, Y. J., JEONG, K. J. (2015): Challenges to production of antibodies in bacteria and yeast. Journal of Bioscience and Bioengineering. 120. pp. 483-490.
- LI, X. H., CHEN, Y. P., CHENG, Y. F., YANG, W. L., WEN, C., ZHOU, Y. M. (2016a): Effect of yeast cell wall powder with different particle sizes on the growth performance, serum metabolites, immunity and oxidative status of broilers. Animal Feed Science and Technology. 212. pp. 81-89.
- LI, X., XU, W., YANG, J., ZHAO, H., PAN, C., DING, X., ZHANG, Y. (2016b): Effect of different levels of corn steep liquor addition on fermentation characteristics and aerobic stability of fresh rice straw silage. Animal Nutrition. 2. pp. 345-350.
- LIU, X., WANG, X., XU, J., XIA, J., LV, J., ZHANG, T., WU, Z., DENG, Y., HE, J. (2015): Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* SWJ-1b using corn steep liquor as a source of organic

- nitrogen and vitamins. *Industrial Crops and Products*. 78. pp. 154-160.
- LORENZ, E., SCHMACHT, M., STAHL, U., SENZ, M. (2015): Enhanced incorporation yield of cysteine for glutathione overproduction by fed-batch fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*. 216. pp. 131-139.
- LUTOSLAWSKI, K., RYZNAR-LUTY, A., CIBIS E., KRZYWONOS, M., MISKIEWICZ, T. (2011): Biodegradation of beet molasses vinasse by a mixed culture of microorganisms: effect of aeration conditions and pH control. *Journal of Environmental Sciences*. 23. pp. 1823-1830.
- MAGDA, S., MARSELEK, S. (2000): *Élelmiszeripar. Szaktudás Kiadó Ház. Budapest*. 220 pp.
- MARTIN, T., DEAN, E., HARDY, B., JOHNSON, T., JOLLY, F., MATTHEWS, F., MCKAY, I., SOUNESS, R., WILLIAMS, J. (2003): A new era for food safety regulation in Australia. *Food Control*. 14. pp. 429-438.
- MOLNÁR, J., ÁSVÁNYI B. (2017): Mikroelemmel dúsított élesztők felhasználási lehetőségei – irodalmi áttekintés. *Agrártudományi Közlemények*. 72. pp. 101-106.
- MORIEL, P., ARTHINGTON, J. D. (2013): Effects of molasses-based creep-feeding supplementation on growth performance of pre- and post-weaned beef calves. *Livestock Science*. 151. pp. 171-178.

- MOY, G. (2001): Healthy marketplace: an approach for ensuring food safety and environment health. *Food Control*. 12. pp. 499-504.
- NAGY, J., SCHMIDT, J., JÁVOR, A. (2008): *A Jövő Élelmiszerei és az Egészség*. Debreceni Egyetem. Debrecen. 197 pp.
- NUNES, M. A., PIMENTEL, F. B., COSTA, A. S. G., ALVES, R. C., OLIVEIRA, B. P. P. (2016): Olive by-products for functional and food applications: challenging opportunities to face environmental constraints. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 35. pp. 139-148.
- OGUNREMI, O. R., SANNI, A. I., AGRAWAL, R. (2015): Hypolipidaemic and antioxidant effects of functional cereal-mix produced with probiotic yeast in rats fed high cholesterol diet. *Journal of Functional Foods*. 17. pp. 742-748.
- OLSEN, D. F., JORGENSEN, J. B., VILLADSEN, J., JORGENSEN, S. B. (2010): Modeling and simulation of single cell protein production. *IFAC Proceedings Volumes*. 43. pp. 502-507.
- PAIS, I. (1999): *A Mikroelemek Jelentősége az Életben*. Mezőgazda Kiadó. Budapest. 104 pp.
- PAL, G. K., SURESH, P. V. (2016): Sustainable valorisation of seafood by-products: recovery of collagen and development of collagen-based novel functional food ingredients. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 37. pp. 201-215.
- PATELSKI, P., BERLOWSKA, J., DZIUGAN P., PIELECH-PRZYBYLSKA, K., BALCEREK, M., DZIEKONSKA, U., KALINOWSKA, H. (2015): Utilisation of sugar beet bagasse

- for the biosynthesis of yeast SCP. *Journal of Food Engineering*. 167. pp. 32-37.
- PIRES, J. F., FERREIRA, M. R. G., REIS, K. C., SCHWAN, R. F., SILVA, C. F. (2016): Mixed yeasts inocula for simultaneous production of SCP and treatment of vinasse to reduce soil and fresh water pollution. *Journal of Environmental Management*. 182. pp. 455-463.
- PONCE, G. H. S. F., NETO, J. M., DE JESUS, S. S., MIRANDA, J. C., FILHO, R. M., ANDRADE, R. R., MACIEL, M. R. W. (2016): Sugarcane molasses fermentation with in situ gas stripping using low and moderate sugar concentrations for ethanol production: experimental data and modeling. *Biochemical Engineering Journal*. 110. pp. 152-161.
- QU, Y. B., CHEN, H. Z., GAO, P. J. (1992): SCP production from steam exploded hemicellulose autohydrolysate by *Trichosporon cutaneum*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 73. pp. 386-389.
- RAJOKA, M. I., KHAN, S. H., JABBAR, M. A., AWAN, M. S., HASHMI, A. S. (2006): Kinetics of batch single cell protein production from rice polishings with *Candida utilis* in continuously aerated tank reactors. *Bioresource Technology*. 97. pp. 1934-1941.
- RODLER, I. (2005): Tápanyagtáblázat. Medicina Könyvkiadó. Budapest. 766 pp.

- ROUTLEDGE, S. J. (2012): Beyond de-foaming: the effects of antifoams on bioprocess productivity. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 3. pp. 1-7.
- SALATI, S., D'IMPORZANO, G., MENIN, B., VERONESI, D., SCAGLIA, B., ABBRUSCATO, P., MARIANI, P., ADANI, F. (2017): Mixotrophic cultivation of *Chlorella* for local protein production using agro-food by-products. *Bioresource Technology*. 230. pp. 82-89.
- SAN MARTIN, D., RAMOS, S., ZUFÍA J. (2016): Valorisation of food waste to produce new raw materials for animal feed. *Food Chemistry*. 198. pp. 68-74.
- SAYED, H. M., FOUAD, D., ATAYA, F. S., HASSAN, N. H. A., FAHMY, M. A. (2012): The modifying effect of selenium and vitamins A, C and E on the genotoxicity induced by sunset yellow in male mice. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 744. pp. 145-153.
- SCHMIDT, J. (1993): *Takarmányozástan*. Mezőgazda Kiadó. Budapest. 358 pp.
- SEVELLA, B. (2012): *Biomérnöki műveletek és folyamatok*. Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar, Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék. Budapest. 158 pp.
- SHEN, Q., YANG R., HUA, X., YE, F., WANG, H., ZHAO W., WANG, K. (2012): Enzymatic synthesis and identification of

- oligosaccharides obtained by transgalactosylation of lactose in the presence of fructose using β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. Food Chemistry. 135. pp. 1547-1554.
- SÓLYOM, L., LÁSZTITY, R. (1980): A Melasz. Mezőgazdasági Kiadó. Budapest. 233 pp.
- SUHAJDA, Á., HEGÓCZKI, J., TASS, A. E., JANZSÓ, B., VERECZKEY, G., BEZÚR, L. (2004): Vas dúsítása nem-szaporodó élesztőben. In: SIMON, L., SZILÁGYI, M. (Szerk.), Mikroelemek a táplálékláncban. Bessenyei György Könyvkiadó. Nyíregyháza. pp. 58-66.
- SZŰCS, I. (2002): Alkalmazott Statisztika. Agroinform Kiadó. Budapest. 550 pp.
- TRAVIÑA-MUÑOZ, D., PÁEZ-LERMA, J., RUTIAGA-QUIÑONES, O., GSCHAEDLER-MATHIS, A., SOTO CRUZ, N. (2013): Production of biomass of *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspota delbrueckii* changing aeration and agitation condition in batch reactor. 17th National Congress of Biotechnology and Bioengineering. June 23-28, 2013. Cancún. Mexico.
- TRIGUEROS, D. E. G., FIORESE, M. L., KROUMOV, A. D., HINTERHOLZ, C. L., NADAI, B. L., ASSUNÇÃO, G. M. (2016): Medium optimization and kinetics modeling for the fermentation of hydrolyzed cheese whey permeate as a substrate for *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. Biochemical Engineering Journal. 110. pp. 71-83.

- TYAGI, A., KUMAR, A., YADAV, A. K., SAKLANI, A. C., GROVER, S., BATISH, V. K. (2016): Functional expression of recombinant goat chymosin in *Pichia pastoris* bioreactor cultures: a commercially viable alternate. *LWT-Food Science and Technology*. 69. pp. 217-224.
- UGWUANYI, J. O. (2008): Yield and protein quality of thermophilic *Bacillus* spp. biomass related to thermophilic aerobic digestion of agricultural wastes for animal feed supplementation. *Bioresource Technology*. 99. pp. 3279-3290.
- VARGA-ERDEI, É. (2011): *Kluyveromyces marxianus* élesztő törzsek fejlesztése bioetanol termelés céljából. PhD Értekezés. Debreceni Egyetem. Debrecen. 90 pp.
- WANG, B., CHANG, L., KANG, Z., CHU, H., TAI, H., HUANG, M. (2011): Inhibitory effects of molasses on mutation and nitric oxide production. *Food Chemistry*. 126. pp. 1102-1107.
- WANG, Y., LI, K., HUANG, F., WANG, J., ZHAO, J., ZHAO, J., ZHAO, X., GARZA, E., MANOW, R., GRAYBURN, S., ZHOU, S. (2013): Engineering and adaptive evolution of *Escherichia coli* W for L-lactic acid fermentation from molasses and corn steep liquor without additional nutrients. *Bioresource Technology*. 148. pp. 394-400.
- XU, G., CHU, J., ZHUANG, Y., WANG, Y., ZHANG, S. (2008): Effects of vitamins on the lactic acid biosynthesis of *Lactobacillus paracasei* NERCB 0401. *Biochemical Engineering Journal*. 38. pp. 189-197.

- YADAV, J. S. S., BEZAWADA, J., AJILA, C. M., YAN, S., TYAGI, R. D., SURAMPALLI, R. Y. (2014): Mixed culture of *Kluyveromyces marxianus* and *Candida krusei* for single-cell protein production and organic load removal from whey. *Bioresource Technology*. 164. pp. 119-127.
- YAN, D., LU, Y., CHEN, Y., WU, Q. (2011): Waste molasses alone displaces glucose-based medium for microalgal fermentation towards cost-saving biodiesel production. *Bioresource Technology*. 102. pp. 6487-6493.
- ZEPKA, L. Q., JACOB-LOPES, E., GOLDBECK, R., SOUZA-SOARES L. A., QUEIROZ, M. I. (2010): Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Aphanothece microscopica* Nägeli. *Bioresource Technology*. 101. pp. 7107-7111.

URL¹:<http://elelmiszerlanc.kormany.hu/elelmiszerszabalyozas:2018.09.03>.

URL²:<http://portal.nebih.gov.hu/:2018.09.03>.

URL³:<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/PDF/?uri=CELEX:32005R0183&from=LV:2018.09.03>.

URL⁴:<http://slideplayer.hu/slide/2098697/:2018.09.03>.

URL⁵:http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/2011_0001_521_Elelmiszer-mikrobiologia/ch02.html:2018.09.03.

URL⁶:<https://www.benchfly.com/blog/saccharomyces-cerevisiae-a-k-a-budding-bakers-brewers-yeast/:2018.12.18>.

URL⁷:http://www.jcm.riken.jp/cgi-bin/jcm/jcmimg_view?jcm=2181&fid=A:2018.09.03.

URL⁸:http://doktori.bibl.u-szeged.hu/1138/1/PhD_dolgozat_Keszthelyi_Andrea.pdf:2018.09.03.

URL⁹:http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2007/nelson_andr/:2018.09.03.

URL¹⁰:http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/wineyeast/kluyveromyces_marxianus.html:2018.09.03.