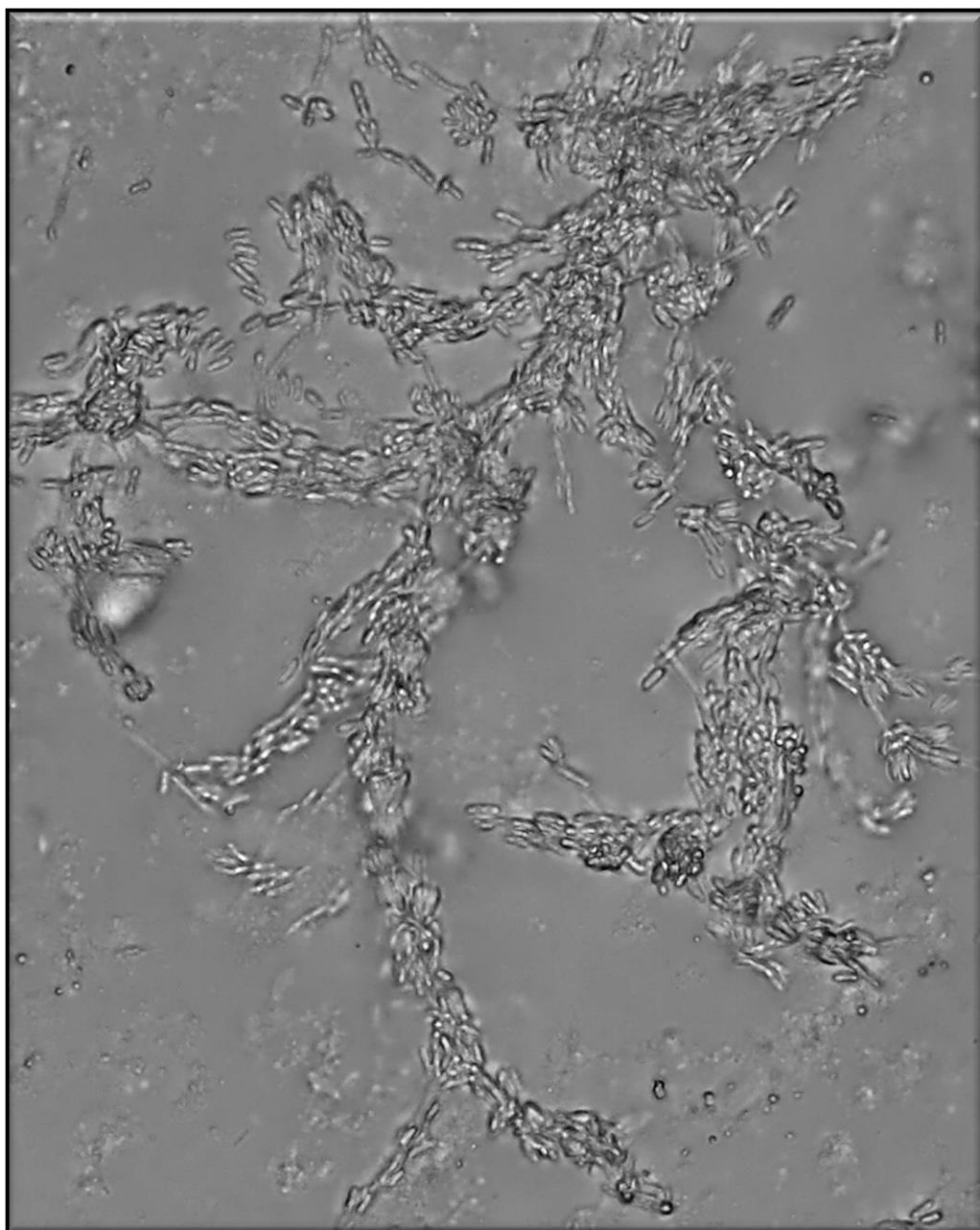




Vanádium(V)-ion hatásának vizsgálata a *Saccharomyces bayanus* mikro-, makro-morfológiájára és alkohol kihozatalára

Szolyka Levente

Témavezető: Kovásznai-Oláh Richárd

*A képen a hallgató által gyűjtött egy vélhetően a *Kloeckera* nemzetségbe tartozó élesztőtörzs mikroszkópos képe (20x) látható.

36. OTDK Biológia Szekció

Vanádium(V)-ion hatásának vizsgálata a *Saccharomyces bayanus* mikro-, makro- morfológiájára és alkohol kihozatalára

SZOLYKA LEVENTE

Szent Miklós Görögkatolikus Gimnázium és Kollégium

12. évfolyam

Témavezető:

Kovásznai-Oláh Richárd



DEBRECENI EGYETEM

TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS TECHNOLÓGIAI KAR

BIOTECHNOLÓGIAI INTÉZET

MULTIDISZCIPLINÁRIS BIOTECHNOLÓGIAI ÉS SEJTBiológiai

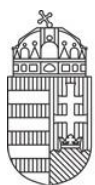
INTÉZETI RÉSZLEG

Debrecen

2023

A pályamunka a Nemzeti Tehetség Program a „Nemzet Fiatal Tehetségeiért
Ösztöndíj” keretében készült el.

Pályázati azonosító: NTP-NFTÖ-22-A2-0022



KULTURÁLIS ÉS INNOVÁCIÓS
MINISZTERIUM



1. Tartalomjegyzék

2.	Rövidítésjegyzék.....	6
3.	Kivonat.....	7
4.	Bevezetés és célkitűzések	8
5.	Irodalmi áttekintés.....	9
5.1.	A vanádium jelenléte az ökoszisztémában, szerepe az élő szervezetekben	9
5.2.	A fermentáció lefolyását befolyásoló tényezők	14
6.	Anyagok és módszerek	15
6.1.	Táptalajok, hígító oldatok és sejtszuszpenziók előállítása.....	15
6.2.	Gram-festés	17
6.3.	Vad és ipari élesztő törzsek	17
6.4.	Vanadát-ion toxicitási teszt	22
6.5.	Kondicionáltatás.....	22
6.6.	Fermentációs kísérletek	23
6.7.	Alkoholtartalmi meghatározás gázkromatográfiával.....	23
6.8.	Mikroszkópos morfológiai felvételezés, képelemzés	24
6.9.	Statisztikai elemzés.....	24
7.	Eredmények.....	25
7.1.	Izolátumok identifikálása	25
7.2.	Toxicitási-tesztek	26
7.3.	Fermentációs kísérletek	27
8.	Diskusszió.....	31
9.	Kitekintés.....	33
10.	Összefoglalás	34
11.	Köszönetnyilvánítás	35
12.	Irodalomjegyzék	36
13.	Tételes szerzői hozzájárulás	38

2. Rövidítésjegyzék

SDA	Sabouraud-féle dextrózós táptalaj
SDA+C	Sabouraud-féle dextrózós táptalaj klóramfenikollal
SDB	Sabouraud-féle dextrózós tápleves
SDB+C	Sabouraud-féle dextrózós tápleves klóramfenikollal
SDB-150	módosított Sabouraud-féle dextrózós táptalaj 150 g·L⁻¹ szacharózzal
CMA	kukoricalisztes táptalaj
TP	Twines peptonoldat
MIC	minimális teljes mikroba növekedésgátló koncentráció

3. Kivonat

Kutatócsoportunk részben a fitoremediációs területeken nevelt növények új hasznosítási lehetőségeire fókuszál, különös tekintettel az alkohol-előállításra. Különbség a korábbi technikákhoz képest, hogy nem csak hőenergiát, hanem több célú felhasználásra alkohol is nyerhető. A vanádium a környezetben számos esetben szennyezőként van jelen (meddőhányók, alumínium-gyártás).

Munkánk során célunk volt a vanadát-ion hatásának feltárása a *S. bayanus* morfológiájára és alkohol-kihozatalára. Ezen túl vad élesztőtörzsek izolálása, biokémiai karakterizációja és az így nyert törzsek kondicionáltatása és összehasonlítása a fajélesztőkkel.

A vad törzsek izolálását erjesztett gyümölcsből végeztük. Sikeresen izoláltunk négy élesztőtörzset, amelyeket morfológiai és biokémiai sajátosságok alapján identifikáltunk; megvizsgáltuk a maximális alkohol-kihozatalukat. Ezen eredmények alapján szelektáltunk két magas alkohol-kihozatalú törzset (8,7–9,2 (V/V) %), amelyekre elvégeztük a vanadát-toxicitási tesztet. Ennek alapján megállapítottuk a vanadát-ion minimális teljes növekedés-gátló koncentrációt (MIC) a vizsgált törzsekre. A magasabb alkohol-kihozatalú izolált törzset kondicionáltattuk 130 mg/L vanádium-koncentrációig. A vizsgált törzsekre elvégeztük a fermentációs kísérleteket.

A vad típusú és a fajélesztő törzsek nem mutattak jelentős eltérést a toxicitási tesztek és az alkohol-kihozatal esetében. A kondicionáltatott törzseknél eltérést tapasztaltunk a fermentáció időtartamában, ugyanis ezen törzseknél maximális alkohol-kihozatal 2-3 nappal korábbi alakult ki. A vizsgált törzsek MIC₅₀-értéke 50 és 100 mg/L közé esik.

A kondicionáltatott törzsek morfológiai vizsgálata során a kontrollokban rendre tipikus élesztő sejteket találtunk, míg a kezelt mintákban álhifás formák jelentek meg. Az általunk tanulmányozott sejtvonalak 0–50 mg/L tartományú vanadát-iont tartalmazó fermentációs táptalajon alkalmasak bioremediációs- és hidrometallurgiai felhasználásra.

4. Bevezetés és célkitűzések

A környezetvédelem célja az emberi tevékenység káros hatásainak visszaszorítása. Az általunk vizsgált átmeneti fém, a vanádium, sok esetben szennyezőként van jelen a környezetben, például szénbányák meddőhányói, kőolaj-finomítók és az alumínium-gyártás által. Hazánkban számos bánya működött a múltban és működik jelenleg is, amelyek meddőhányókat hagynak maguk után. Kutatásunk során ezek fitoremediációjának új lehetőségeire koncentráltunk, amely igazán fontos, akut probléma különösen a vanádium esetében. Klasszikus fitoremediációban, a rehabilitálni kívánt területen, olyan növényeket nevelnek, amelyek képesek nagy mennyiségben a kívánt fém-iont abszorbeálni (hiperakkumulátorok). Majd betakarítás után a növényi részeket elégetik, ennek során csekély mennyiségű hőenergia keletkezik, valamint a hamuból és füstből a ritka fém kinyerhető.

Munkacsoportunk meglátása szerint, folyamatos biomassza begyűjtés mellett, egy alacsony vanádium tartalmú, jó alkohol-kihozatalú szubsztrát nyerhető, ezzel növelve az adott területen az energia-termelést. A maradék cellulóz-biomassza és a fermentáció során nyert szilárd biomassza folyamatos centrifugálásával a szilárd maradékot és a pelleteket hulladékégetőben elégetve a vanádiumot kivonhatjuk a korábbi hidrometallurgiai úton.

A magas alkohol-kihozatal eléréséhez elengedhetetlen egy nagy vanádium-tűrésű élesztő faj. Előkísérleteink megmutatták, hogy a szubsztrát magas vanádium-tartalma hatására a *Saccharomyces bayanus* fajélesztő tipikus élesztőformából pseudohifás, majd valódi hifás morfológiai formába alakul át. Ezek biofilmet képezve csökkentik az alkohol-kihozataalt.

Munkánk során célunk volt a vanádium(V)-ion minimális teljes növekedésgátló koncentráció meghatározása a vizsgált élesztőtörzsekre decimális hígítási sort alkalmazva. A kísérletsorozat által tanulmányoztuk az alkohol-kihozatal változását a vanádium(V)-ion koncentráció gradiens függvényében, meghatároztuk a fermentáció során nyert összes sejtszámot. A fermentáció lefolyását gravimetriás módszerrel nyomon követtük. Az alkoholtartalmi meghatározáshoz a laboratóriumunkban elérhető módszereket összevetettük.

Ezentúl célul tűztük ki a sarjadzó élesztők mikro-morfológiai változását vanádium(V)-ion koncentráció gradiens segítségével vizsgálni. Továbbá vad élesztőtörzsek izolálását, biokémiai karakterizációját, az így nyert törzsek kondicionáltatását és azok vanádium-tűrőképességének összehasonlítását a fajélesztőkével. Az így nyert adatok az alap kutatás részét képezik, amelyek felhasználhatóak az ipari biotechnológia számos területén.

5. Irodalmi áttekintés

5.1. A vanádium jelenléte az ökoszisztémában, szerepe az élő szervezetekben

A vanádium vizes oldatokban elsősorban a +2; +3; +4; +5 oxidációs számokkal fordul elő; természetes rendszerekben legfőképp a +4; +5 jellemző. A vanádium +5 oxidációs számmal pervanadil-ionként (VO_2^+), és a vanadilsav (H_3VO_4) savmaradék-ionjaiként, vanadát-oxoanionok formájában (H_2VO_4^- / HVO_4^{2-} / VO_4^{3-}); +4 oxidációs számmal pedig vanadil-ionként (VO^{2+}) van jelen.

Azt, hogy a vizes oldatban a vanádium-ion melyik formája jelenik meg, a pH és a vanádium-koncentráció határozza meg. Semleges pH-nál a vanádium(V)-ion esetében a foszfáthoz hasonló vanadát forma dominál. A vanádium számtalan szerves és szervetlen ligandummal képez komplexet, amely reakció a vanádium környezetbe jutásának fontos lépése. Szervetlen ligandum például a halogén-, a kén- és a szén források. A szerves vegyületek közül például a humuszban található huminsavak és fulvosavak oxigén-tartalmú csoportjaival képez komplexet. [1]

A vanádium környezetbe jutásának számos természetes és mesterséges forrása van. A vanádium természetes forrásaként szolgál a mállás, mely során a csapadék folyamatosan mossza a vanádiumot a kőzetekből a talajba és a vizekbe. A Föld vulkanikus aktivitásának hatására vanadil-ion kerül a légkörbe, valamint a vizekbe. Például a tenger alatti vulkánok fontos forrása a tengervíz vanádium-tartalmának. [1] A vanádium környezetbe jutásában óriási szerepe van az emberiség ipari tevékenységének. A vanádium-kibocsátáshoz hozzájáruló ipari tevékenységek a következők: [2]

- Vanádium-bányászat [2]
- Acélkohászat [2]
- Alumínium gyártás (vörösiszap) [3]
- Szénbányászat [2]
- Kőolaj-kitermelés, finomítás [2]
- Fosszilis energiaforrások elégetése [2]

A vanádium egy olyan elem, mely széles körben megtalálható épp úgy a földkéregben, mint a tengerekben és a rétegvizekben. Ezen túl fellelhető a pala- és kőolajban, például a porfirin gyűrűkkel alkotott komplexben. A vanádium mindenütt jelen van a környezetben, ennek okán minden élőlényben általánosan jelen van. A tengervízben a vanadát (ált. H_2VO_4^-) átlagosan $c = 30 \text{ nM}$ koncentrációban fordul elő (a molibdént követően

a második leggyakoribb fém a tengervizekben), amely részben nélkülözhetetlen energiaforrásként szolgál a tengeri élőlények számára (mikroalgák, aszcídiák). Ezen túl, a vanadát szerepet játszik a halogenidek hipohalogén-savakká alakításában (többek között tengeri hínárokból), ezáltal a halogenidek és/vagy szingulett oxigén légkörbe jutásában, amelynek következményei lehetnek a légkör kémiájára nézve.

Néhány szárazföldi élőlény (zuzmók és gombák) tartalmaznak egy *amavadin* nevű, aktív funkcióval rendelkező vanádiumvegyületet. Számos baktérium faj használja ki a redox egyensúlyt a V^{5+} (ált. $H_2VO_4^- / VO^{3+}$) és V^{4+} (ált. VO^{2+}) között. A bakteriális aktivitással összefüggésben figyelemre méltó az *Azotobacter*-ben lévő vanádium-nitrogenáz, amely felelős a légköri nitrogén ammónium-ionná alakításáért. Azt, hogy a vanádium alacsony koncentrációban nélkülözhetetlen-e az ember (és esetleg más emlősök) számára, mint a foszfát antagonistája és következésképpen a foszfátázok szabályozója, még nem tisztázták végérvényesen. [4]

Hazánkban a pécs-vasasi külfejtéses szénbányák bányászati és bányászattal felhagyott területein végeztek geokémiai vizsgálatot. A nyomelemvizsgálatok során a vanádium koncentrációja a vizsgált mintákban 60–479 mg/kg között van széntelepekben, ami a felső földkéreg átlagának 0,62–4,94-szerese. A vanádium felső földkéregbeli átlaga 97 mg/kg. A vanádium a szénben előforduló ásványokban (pl. muszkovit), illetve szerves kötésben is előfordul. Ez utóbbit mutatja, hogy a legnagyobb vanádium-koncentrációkat kivétel nélkül a kőszenes rétegekben mérték. [5]

1. táblázat Pécs-vasasi lelőhelyek átlagértékei és azok viszonya a felső földkéreg, illetve a szénhamu világátlagához képest. [5]

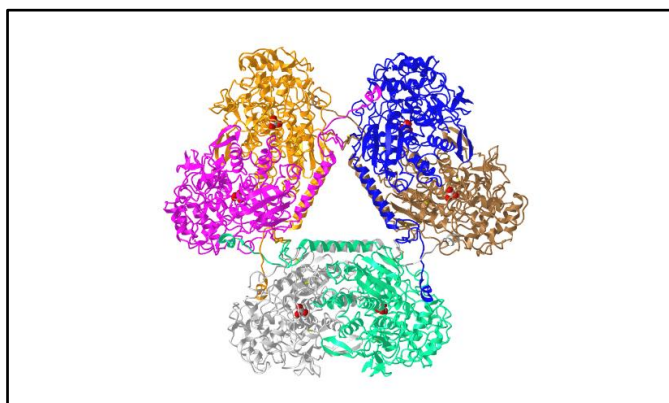
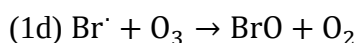
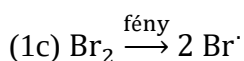
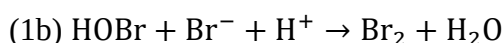
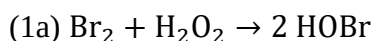
Vanádium-koncentráció	Lelőhelyek
200,3	Pécs-Vasas átlag (mg/kg)
108,1	Székvölgy átlag (mg/kg)
106,8	Felsőnyárád átlag (mg/kg)
97	Felső kéreg átlag (mg/kg)
155	Szénhamu világátlag (mg/kg)
2,1	Pécs-Vasas dúsulás (a felső kéreg átlagára normálva)
1,3	Pécs-Vasas dúsulás (szénhamu világátlagra normálva)
1,1	Székvölgy dúsulás (a felső kéreg átlagára normálva)
0,7	Székvölgy dúsulás (szénhamu világátlagra normálva)
1,1	Felsőnyárád (a felső kéreg átlagára normálva)
0,7	Felsőnyárád (szénhamu világátlagra normálva)

Szintén jelentős vanádium-terhelésre lehet számítani a kőolaj-finomítás során. [6]
A kőolaj-finomítás során keletkező nehéz fűtőolaj fémtartalma a kiindulási kőolaj fémtartalmának négy-ötszöröse. A kőolaj kémiaiilag kötött vanádium-tartalmát sóatlanítással nem lehet eltávolítani. A finomítás során jelentős részecske-kibocsátás történik, amely jelentős mennyiségben tartalmaz nehézfémeket. Ez jelentős problémát okoz az egészségi ártalom miatt (légszennyezés). [7]

2. táblázat Két EU finomító vanádiumkibocsátása [7]

Finomítói kapacitás (millió tonna/év)	Vanádium-kibocsátás	
	Fajlagos terhelés, t/Mt feldolgozott kőolaj	Koncentrációtartomány (mg/nm ³)
15,3	0,327	0,3-2,1
12,3	1,66	0,05-5,1

A vanádiumnak számos enzimben van szerepe. A vanadát-függő haloperoxidáz (lásd 1. ábra) enzimet tengeri algákból és fonalas gombákból izolálták, de bizonyos kékbaktériumokban is előfordul. A haloperoxidáz enzim katalizálja a halogenidek oxidációját hipohalogén-savakká két elektron leadásával (1a). Ezek a keletkező hipohalogenitek erős oxidáló szerek, amelyek valószínűleg az algák parazitaellenes reakcióiban vesznek részt. A hipohalogén-savak később elemi halogénné válnak színproporciós folyamat során (1b). Az elemi halogén a légkörben fény hatására halogéngyökké bomlik (1c). Ezek pedig hozzájárulnak az ózonréteg károsodásához (1d), ezért a túlzott műtrágyázás miatt kialakult algavirágzásoknál figyelembe kell venni a meteorológiai szempontokat. [4]

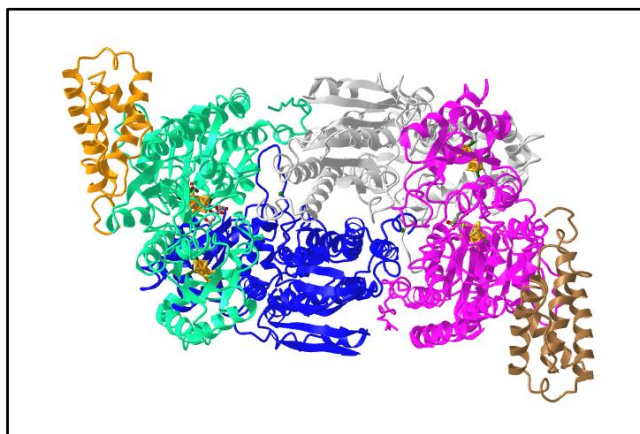
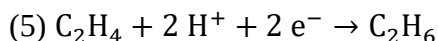
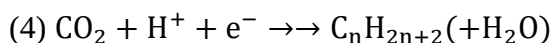
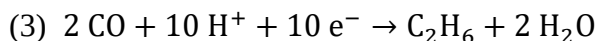
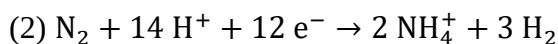


**1. ábra A vanadát-függő bromoperoxidáz enzim szerkezete (Ascophyllum nodosum) [8]
(Az alegységek különböző színekkel; közepükön pirossal a vanadát-ion)**

Egy másik vanádiumot tartalmazó enzim a vanádium-függő nitrogenáz (lásd 2. ábra), amelyet a nitrogén kötő [2] aerob baktériumból, az *Azotobacter vinelandii*-ből izoláltak, ezen kívül olyan molibdén hiányos baktériumokból, amelyek egyébként molibdént alkalmaznak az enzimekben (pl. *Rhodobacter capsulatus*).

Számos más a *Nostocaceae* családba tartozó baktérium törzs és szimbionta kékbaktérium is mutat vanádium-függő nitrogenáz aktivitást. A nitrogenáz hatására képződő ammóniumionok később hasznosulnak, mint aminosavak, majd azok a fehérjék szintézisében töltik be szerepüket.

A vanádium-függő nitrogenáz az enzim molibdén analógjával szemben hatékonyan redukálja a szén-monoxidot és szén-dioxidot szénhidrogénekké, az etént etánná, valamint a HCN enzimátikus redukcióját is végzi. [4]



2. ábra A vanádium-függő nitrogenáz [9]

(Az alegységek különböző színekkel; közepükön sárgával a vanádium komplex formájában)

A vanádium számos talajban, földalatti víztározóban, kutakban élő baktériumok számára energiaforrásként szolgál a vanádium(V)-formából (ált. H_2VO_4^-) vanádium(IV)-formává (ált. VO^{3+}) alakulása által. [4]

A vanádium növényekben elsősorban a levelekben jelenik meg (~10-15 ppm), a magvakban és a termésekben csak alacsonyabb koncentrációban van jelen (néhány ~1-5ppm).

A vanádium alacsony koncentrációban (<2 mg/talaj kg) serkentően hat a klorofill szintézisre. A növények az elsődleges forrásai a vanádium táplálékláncba jutásának azáltal, hogy közvetlenül felveszik a talajból és akkumulálják azt. [10]

A vanádium az ultranyomelemek közé sorolható. [10] A vanádium a biológia folyamatok széles körében részt vesz, melyek a következők:

- *Glükóz- és lipid-anyagcsere:* a vanádium gátolja az inzulinreceptor β -alegységének defoszforiláló-enzimét (protein-tirozin-foszfataz), ezáltal elősegíti a sejt glükózfelvételét, ha van jelen inzulin. [10]
- *Csökkenti a vérplazma koleszterin és triglicerid szintjét.* [10]
- *Vizelethajtó.* [10]
- *Antikarcinogén.* [10]
- *Összehúzza az ereket.* [10]
- *A hemoglobin és a mioglobin oxigén-affinitását növeli.* [10]
- *Befolyásolja számos enzimrendszer működését:* foszfatazokat (foszfodiészteráz, glükóz-6-foszfataz), ATP-ázokat ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -pumpa, miozinok), ATP-szintetázokat, peroxidázokat, ribonukleázokat, ribozimeket, helikázokat, protein kinázokat és oxidoreduktázokat. [10] [11] [11] [12]

Az emberi szervezet a vanádiumot az emésztőrendszeren és légzőrendszeren keresztül veszi fel. Az átlagos napi vanádium bevitel 2 mg. A vanadát a sejtekbe a foszfátion csatornákon keresztül jut be. Toxikológiai és gyógyászati szempontból különösen érdekes a vanadát-foszfát analógia.

Fiziológias körülmények között elsősorban a HPO_4^{2-} és a H_2VO_4^- ionok fordulnak elő. Ezen anionok méretükben hasonlóak, számos reakcióban hasonlóan viselkednek (pl. észterképzés), „*ionos mimikri*” figyelhető meg, viszont némileg eltér a fehérjék aktív centrumához való kötődés a vanadát és a foszfát esetében. [12] [4]

A vanádium toxicitása a számos pozitív hatása ellenére a dózis mértékében rejlik. Magas vanádium dózissnál megfigyelték az oxidatív foszforiláció gátlását. A vanádium vegyületek genotoxikus hatása is megmutatkozott, amely a kromoszóma aberrációban és DNS-szál törésben jelenik meg. [10]

5.2. A fermentáció lefolyását befolyásoló tényezők

A fermentációs eljárások kulcskérdése a megfelelő nitrogén- és szénforrás biztosítása, amellyel nem csak a megfelelő szubsztrát ellátottságot, hanem a megfelelő sejtmorfológiát is biztosítani kell, hogy a mikroorganizmus mindig tipikus élesztősejtes formában legyen.

Az élesztőgombák fontos jelátviteli mechanizmusa a cAMP-függő protein-kináz-A (cAMP-PKA) útvonal, amely szabályozza az élesztő növekedését, morfológiáját, spóráképzését, szekunder-metabolit termelését és környezeti stressztűrését. [13] A cAMP-PKA a *Saccharomyces cerevisiae* szénhidrát-háztartásának elsődleges szabályozója. Ezen rendszer segítségével a sejt érzékeli a környezetben lévő tápanyagok (pl. glükóz) mennyiségét. A cAMP-PKA szabályozó mechanizmus károsodása rontja a sejt környezeti stressztűrését, például a tápanyaghiánnyal szembeni érzékenységet. A többszörös stresszhatással szembeni érzékenység (beleértve a hő- és oxidatívstresszt) korrelál a sejt cAMP-szintjével. [14]

A cAMP-PKA által szabályozott fejlődési válasz abban nyilvánul meg, hogy a sejtek megnyúlnak, unipoláris módon sarjadzanak és a fizikai kapcsolat megmarad az anyasejt és a leánysejt között. A diploid sejtek hifaképzésének adekvát ingere a nitrogénhiány, míg a haploid sejtek számára pedig a glükóz hiánya. Ha a fermentáció során a nitrogén-forrás mennyiségét csökkentjük és a glükóz mennyiségét növeljük, akkor a cAMP-PKA jelátviteli útvonal számos transzkripciós faktoron keresztül a fonalas növekedéshez szükséges glükoproteid (FLO11 sejtfaladhezin) szintjét növeli, így az élesztősejt valódi hifás növekedést mutat. A kialakult hifás forma pedig biofilmet alkotva rontja fermentáció hatásfokát, ezzel csökkenti az alkohol kihozatalát. [15] [16]

A vanádium fermentációra gyakorolt hatásának vizsgálatát a szakirodalomban alul reprezentáltnak találtuk. Így célul tűztük ki, hogy a munkánk folyamán a vanádium(V)-ion hatását vizsgáljuk, *Saccharomyces cerevisiae* és *S. bayanus* fajvonalokon.

6. Anyagok és módszerek

6.1. Táptalajok, hígító oldatok és sejtszuspenziók előállítása

A *folyékony táptalajok* és hígító oldatok elkészítéséhez 1000 mL tisztított vízben felvettük az alábbi táblázatban megadott anyagokat (G-45-ös szájú mintatartó üvegben), majd a pH-t kalibrált pH-mérő mellett az előírt pH-ra állítottuk. Ezután validált ciklus szerint 2 atm nyomáson, 121 °C-on autoklávoztuk, 15 percen keresztül. A fentiekhez hasonlóan készültek a *szilárd táptalajok*, azzal az eltéréssel, hogy az üvegekbe 20 g agart mértünk be, majd ½ órás duzzasztási időt követve a fentiek szerint jártunk el (pH, sterilizálás).

A szilárd táptalajokat, miután 45-47 °C-ra visszahűltek, 9 cm átmérőjű Petri-csészébe megöntöttük az aszepszis szabályai szerint. A felhasznált lemezeket 24 órán át pihentettük a kondenzvíz keletkezés elkerülése végett.

3. táblázat A felhasznált táptalajok és hígító oldatok összetételei

Táptalaj/hígító neve	Összetevő neve	Mennyiség
SDA	dextróz	40 g·L ⁻¹
	pepton	10 g·L ⁻¹
	agar	20 g·L ⁻¹
	pH	5,6±0,2
SDA+C	dextróz	40 g·L ⁻¹
	pepton	10 g·L ⁻¹
	agar	20 g·L ⁻¹
	klóramfenikol	0,05 g·L ⁻¹
	pH	5,6±0,2
SDB	dextróz	20 g·L ⁻¹
	pepton	10 g·L ⁻¹
	pH	5,6±0,2
SDB 2x	dextróz	40 g·L ⁻¹
	pepton	20 g·L ⁻¹
	pH	5,6±0,2
SDB+C	pH	5,6±0,2
	pepton	10 g·L ⁻¹
	klóramfenikol	0,05 g·L ⁻¹
	pH	5,6±0,2
SDB-150	szacharóz	150 g·L ⁻¹
	pepton	5 g·L ⁻¹
	MgCl ₂ ·6 H ₂ O	1,67 g·L ⁻¹
	pH	5,6±0,2

CMA	kukoricaliszt	40 g
	agar	20 g
	pH	5,6
	A kukorica lisztet 260 mL vízzel főzzük, dekantáljuk és a felülúszóhoz hozzáadjuk az agart, majd kiegészítjük 1000 mL-re.	
Ozmo-tolerancia teszt táplevese	szacharóz	250 g·L⁻¹
	pepton	5 g·L⁻¹
	K₂HPO₄	5 g·L⁻¹
	pH	7,0±0,2
TP	Triton X-100	10 mL·L⁻¹
	pepton	5 g·L⁻¹
	Na₃PO₄·12 H₂O	5 g·L⁻¹
	pH	6,8±0,2
0,85% NaCl-oldat	NaCl	8,5 g·L⁻¹
	pH	7,0±0,2

Az SDA és az SDB nem szelektíváló táptalajok gombák tenyésztésére. Az élesztő és fonalas szelektivitás elérhető a táptalaj klóramfenikollal való kiegészítéssel.

Sejtszuszpenziók törzsoldatának készítéséhez 15 mL-es Falcon centrifugacsőben 0,85%-os sóoldattal felvettünk egy Gram-festéssel igazolt telepet steril vattapálca segítségével az aszepszis szabályai szerint. Azt 1 percen keresztül Vortex segítségével szuszpendáltuk. A sejtszámot a laboratóriumunk által adaptált McFarland-típusú relatív sejtszám-meghatározással állapítottuk meg, melynek során UV/VIS-spektrofotométer (Shimadzu UV-1641) segítségével az abszorbancia értéket 600 nm-en $A = 0,600$ -ra állítottuk, amely 2 McF-nek felel meg. ($1 \text{ McF} = 1,0 \cdot 10^7$ élesztősejt.) A törzsoldat térfogatát, amelyet a kívánt szuszpenzió elkészítéséhez be kell mérnünk, úgy számítottuk ki, hogy a végoldat elmélet abszorbancia-értékét (0,060) elosztjuk a mért abszorbanciával és a kapott törtet szorozzuk a végtérfogattal (lásd alábbi egyenlet). Az így kapott sejtszuszpenziót használtuk minden általunk végzett kísérletben az inokuláláshoz.

$$V_{tzs} = \frac{0,060}{A_{tzs}} \cdot V_{veg}, \text{ ahol}$$

V_{tzs} : a törzsoldat térfogata; A_{tzs} : a törzsoldat abszorbancia értéke;

V_{veg} : a végoldat térfogata; $A_{veg} = 0,060$: a végoldat abszorbancia értéke.

6.2. Gram-festés

A Gram-festés technikáját mikroszkópos morfológia igazolásra használtuk, amennyiben a készítmény nem volt egynemű (nem tipikus élesztő formát mutatott, egyéb mikrobiológiai kontaminációt tartalmazott), akkor a készítményt elvetettük, a vizsgálatot friss készítményből végeztük el.

10 mL 0,85 %-os sóoldatban felvettünk egy makroszkóposan egynemű telepből kis mennyiségű sejtmintát, homogénre kevertük, majd oltókacs segítségével a tárgylemez felületére egyenletesen kihúztuk, vagyis kenetet készítettünk (preparátum).

Az így készült **preparátumot** tárgylemez szárítón vagy levegőn szárítottuk, majd lánggal fixáltuk. Először 2 percen keresztül festettük a mintát 0,5 %-os kristály-ibolyával, ezután 1 percig kezeltük Lugol-oldattal. Alkoholos mosást követően utófestést alkalmaztunk 0,5 %-os neutrális fuxinnal vagy safraninnal 3-4 percig. A festések között minden esetben vizes mosást végeztünk. A festett preparátumokat mikroszkópban immerziós 100x objektívvel vizsgáltuk. [17]

6.3. Vad és ipari élesztő törzsek

A környezeti mintákat a Tokaj-Hegyaljai Borvidék 5 különálló dűlőjéről gyűjtöttük Tokaj, Tarcál és Abaújszántó területéről 2022. 06.19-én hárslevelű, furmint, kövér, muskotály és kabar szőlő fajták leveléről és terméskezdeményéről (lásd 4. táblázat). A szőlőfajtákon túl almafajták terméskezdeményeiről is vettünk mintákat IDARED, REDSPUR, GOLDEN fajtákból, Rakamaz területén. A mintavételt steril pálcás vattatamponnal végeztük SDA+C transzport táptalajra 50 mL-es Falcon centrifugacsőbe.

A mintákat begyűjtés után hűtve (8 °C) tároltuk a laboratóriumba érkezésig. Ezután 24 órán keresztül 36 °C-on előinkubáltuk, majd a vattatamponokat 10 mL SDB+C dúsítóba helyeztük. A vattatamponokat 48 órán keresztül 36 °C-on inkubáltuk, majd a dúsító 1 mL-éből 0,85 % sóoldattal decimális hígítási sort készítettünk, s azok 100 µL-eit SDA lemezre oltottuk.

A 36 lemezekről 3 *mucor* törzset izoláltunk. Ennek hátterében a jelentős mennyiségű napsugárzás és a kevés csapadék miatti alacsony páratartalom állhat, így az izolációt lemosó technikával folytattuk a vattapálcás módszer sikertelensége miatt.

4. táblázat Mintavételi jegyzőkönyv

Minta sor-száma	Hely		Növény fajta	Növényi rész	Megjegyzés	Táptalaj
	Település, pontos terület	GPS koordniáták				
1.	Tolcsva, Nagynyakvágó	21°26'4.686" E 48°16'19.849" N	Hárs	Levél	4. tőke jobbról	SDA+C
2.	Tolcsva, Nagynyakvágó	21°26'5.046" E 48°16'29.849" N	Hárs	Levél	6. tőke balról	SDA+C
3.	Tolcsva, Nagynyakvágó	21°26'6.000" E 48°16'30.144" N	Hárs	Bogyó	2. tőke fentről jobboldalt	SDA+C
4.	Tolcsva, Nagynyakvágó	21°26'5.352" E 48°16'28.823" N	Hárs	Levél	7. betonoszlop 2. tőke fentről baloldalt	SDA+C
5.	Tolcsva, Nagynyakvágó	21°26'4.224" E 48°16'26.586" N	Hárs	Levél	4. betonoszlop 5. tőke letről baloldalt	SDA+C
6.	Tolcsva, Nagynyakvágó	21°26'3.264" E 48°16'24.660" N	Hárs	Levél	1. tőke letről baloldalt	SDA+C
7.	Tolcsva, Nagynyakvágó	21°26'2.652" E 48°16'25.338" N	Hárs	Levél	3. tőke letről baloldalt	SDA+C
8.	Tolcsva, Nagynyakvágó	21°26'2.226" E 48°16'26.051" N	Hárs	Levél	6. tőke fentről jobboldalt	SDA+C
9.	Tolcsva, Nagynyakvágó	21°26'1848" E 48°16'26.328" N	Hárs	Levél	2. tőke fentről baloldalt	SDA+C
10.	Tolcsva, Nagynyakvágó	21°26'3.041" E 48°16'19.849" N	Hárs	Levél	1. tőke; fentről jobboldalt	SDA+C
11.	Tolcsva, Rány	21°25'00.000" E 48°16'00.000" N	Furmint	Levél	letről 1. oszlop 2. tőke letről baloldalt	SDA+C
12.	Tolcsva, Rány	21°25'36.437" E 48°16'22.908" N	Besztercei szilva	Levél	–	SDA+C
13.	Tolcsva, Rány	21°25'36.394" E 48°16'22.806" N	Szilva	Bogyó	–	SDA+C
14.	Tolcsva, Petrács dűlő	21°27'31.895" E 48°17'40.593" N	Furmint	Levél	6. sor 9. tőke	SDA+C
15.	Tolcsva, Petrács dűlő	21°27'31.644" E 48°17'40.000" N	Furmint	Levél	13. sor 11. tőke	SDA+C
16.	Tokaj, Nagyszőlő/Teleki	21°23'8.098" E 48°6'18.803" N	Tarcal-10/ Kabar	Levél	1. tőke	SDA+C
17.	Tokaj, Nagyszőlő/Teleki	21°23'8.124" E 48°6'19.544" N	Tarcal-10/ Kabar	Levél	4. oszloptól 1. tőke felfelé	SDA+C
18.	Tokaj, Nagyszőlő/Teleki	21°23'8.184" E 48°6'19.716" N	Tarcal-10/ Kabar	Levél	5. oszlop előtt 2. tőke letről baloldalt	SDA+C
19.	Tokaj, Nagyszőlő/Teleki	21°23'8.297" E 48°6'20.628" N	Kövér szőlő	Levél	4. tőke	SDA+C
20.	Tokaj, Nagyszőlő/Teleki	21°23'8.322" E 48°6'20.675" N	Kövér szőlő	Bogyó	10. oszlop után 3. sor 6. tőke	SDA+C

21.	Tokaj, Nagyszőlő/Teleki	21°23'8.000" E 48°6'19.000" N	Furmint	Levél	7. tőke	SDA+C
22.	Tokaj, Nagyszőlő/Teleki	21°23'8.000" E 48°6'19.000" N	Furmint	Bogyó	8. tőke	SDA+C
23.	Abaújszántó, Agyag	21°11'16.487" E 48°15'44.712" N	Hárslevelű	Levél	3. sor 4. tőke letről baloldalt	SDA+C
24.	Abaújszántó, Agyag	21°11'16.235" E 48°15'44.964" N	Hárslevelű	Bogyó	3. sor 10. tőke	SDA+C
25.	Abaújszántó, Agyag	21°11'15.924" E 48°15'45.443" N	Hárslevelű	Levél	16. tőke 3. sor	SDA+C
26.	Abaújszántó, Agyag	21°11'15.521" E 48°15'45.774" N	Hárslevelű	Bogyó	21. tőke 3. sor	SDA+C
27.	Abaújszántó, Agyag	21°11'14.322" E 48°15'48.372" N	Muskotály	Levél	2. sor 1. tőke	SDA+C
28.	Abaújszántó, Agyag	21°11'14.406" E 48°15'48.323" N	Muskotály	Levél	3. sor 2. tőke	SDA+C
29.	Abaújszántó, Agyag	21°11'14.525" E 48°15'48.000" N	Muskotály	Bogyó	4. sor 2. tőke	SDA+C
30.	Abaújszántó, Agyag	21°11'14.201" E 48°15'48.030" N	Cseresznye	Bogyó	–	SDA+C
31.	Abaújszántó, Agyag	21°11'14.592" E 48°15'48.294" N	Muskotály	Levél	4. sor 3. tőke	SDA+C
32.	Abaújszántó, Agyag	21°11'14.785" E 48°15'48.096" N	Muskotály	Levél	4. sor 6. tőke	SDA+C
33.	Rakamaz, GY1	21°30'53.988" E 48°6'22.086" N	IDARED	Levél	2. sor 3. fa	SDA+C
34.	Rakamaz, GY1	21°30'54.312" E 48°6'22.007" N	IDARED	Termés	2. sor 5. fa	SDA+C
35.	Rakamaz, GY1	21°30'55.811" E 48°6'22.000" N	REDSPUR	Levél	6. sor 14. fa	SDA+C
36.	Rakamaz, GY1	21°30'54.144" E 48°6'23.393" N	GOLDEN	Levél	10. sor 2. fa	SDA+C
37.	Rakamaz, GY1	21°30'54.000" E 48°6'23.388" N	GOLDEN	Termés	10. sor 6. fa	SDA+C

Nyíregyházi és tokaji kiskertből gyűjtött szőlő (*Vitis vinifera*), alma (*Malus domestica*) illetve meggy (*Prunus cerasus*) termések TP oldattal való lemosásával, a lemosó oldatból decimális hígítási sort készítve SDA+C lemezre hármasszélesztést alkalmaztunk. Ezen lemezeken élesztőtelepek növekedését nem figyeltük meg, így a rendelkezésre álló, indító kultúrát nem tartalmazó cefréből végeztük a további izolálást.

Házi meggy (*Prunus cerasus*), szilva (*Prunus domestica*) valamint barack (*Prunus persica*) fermentált gyümölcsökből (cefre) sikeresen izoláltunk 4 *Saccharomycetales* rendbe tartozó sejtvonalat. A cefrékből steril 50 mL-es Falcon centrifuga csőbe mintát vettünk, azokat begyűjtés után hűtve (8 °C) tároltuk a laboratóriumba érkezétségig.

A mintákból 0,85 %-os sóoldattal decimális hígítást alkalmazva szuszpenziót készítettünk, ennek 10^4 – 10^6 tagjaiból 100 µL-es szélesztést alkalmaztunk SDA+C-re, ezzel monokolóniás sejtvonalatokat nyertünk 72 órás inkubációt követően (22,5 °C).

Elvégeztük az izolált élesztő törzsek identifikálását mikro-, makro-morfológiai, valamint biokémiai módszerekkel. Ezzel megbizonyosodhattunk arról, hogy *Saccharomyces*, *Candida* vagy *Rhodotorula* nemzetségbe tartozó sejtvonalatokat izoláltunk. Megvizsgáltuk az élesztőtelepek pigment tartalmát SDA és CMA táptalajon és mikroszkópos morfológiáját.

Az izolált törzseken nem tapasztaltunk pigment termelést így kizárhattuk a *Rhodotorula* fajokat. Ezt követően CMA táptalajra sávos szélesztést alkalmazva azt tapasztaltuk, hogy az izolált törzsek nem képeznek sem álhifákat sem valódi hifákat, ezzel megbizonyosodhattunk arról, hogy nem *Candida* nemzetségbe tartozó törzset izoláltunk.

A fermentációs kísérletek során az izolált törzsek alkohol termelést mutattak, ezzel meggyőződhattunk arról, hogy az izolált törzsek a *Saccharomyces* nemzetségbe tartoznak (lásd 5. táblázat).

5. táblázat A *Saccharomyces* spp. leválasztása biokémiai és morfológiai jegyek alapján.

Nemzetség		<i>Saccharomyces</i> spp.	<i>Candida</i> spp.	<i>Rhodotorula</i> spp.
Tulajdonság				
Pigment termelés	SDA	–	–	+
	CMA	–	–	+
Mikro-morfológia (CMA)	Élesztősejtes forma	+	+	+
	Álhifás forma	– (+!)	+	–
	Valódi hifás forma	– (+!)	+	–
Alkoholos erjedés glükózból		+	+/-	+
Telep típus (makro-morfológia)		Körkeresztmetszetű, domború, gombostűfejnyi, krémszínű telepek	Körkeresztmetszetű, domború, gombostűfejnyi, krémszínű telepek	Körkeresztmetszetű, domború, gombostűfejnyi, narancssárga telepek

6. táblázat API 20 C AUX élesztő identifikációs rendszer [18]

	Candida albicans	Candida kefyr	Kloeckera apiculata	Rhodotorula rubra	Saccharomyces cerevisiae 1	Saccharomyces cerevisiae 2
GLU	+	+	+	+	+	+
GLY	–	–	–	–	–	+/-
2KG	+	–	+	–	–	–
ARA	–	–	–	–	–	–
XYL	+	+	–	+	–	–
ADO	+	–	–	–	–	–
XLT	+	–	–	–	–	–
GAL	+	+	–	+/-	+	+
INO	–	–	–	–	–	–
SOR	+	+	–	–	–	+
MDG	+	+	–	–	–	+/-
NAG	+	–	–	–	–	–
CEL	–	–	+	–	–	–
LAC	–	+	–	–	–	–
MAL	+	+	–	+	+	+
SAC	+	+	–	+	+	+
TRE	+	+	–	+	–	–
MLZ	–	+	–	+	–	–
RAF	–	+	–	+	+	+
HYPH	+	–	–	–	–	–

7. táblázat Az izolált törzsek belső jelzései

Belső jelzés	Vélhető faj	Fermentált gyümölcs fajtája
SC_NYH_1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	meggy
SC_NYH_1_KONDI	kondicionáltatott sejtvonal	meggy
SC_NYH_2_1	?	szilva
SC_NYH_2_2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	szilva
SC_NYH_3	<i>Kloeckera apiculata</i>	barack

Megvizsgáltuk a vad törzsek maximális alkohol-kihozatalát optimális körülmények között (lásd 6.6. fejezet – **Fermentációs kísérletek**). Ez alapján szelektáltunk két magas alkohol-kihozatalú törzset. A vizsgálatokat a továbbiakban ezekkel a törzsekkel végeztük el.

A vad törzsek mellett szabadkereskedelmi forgalomban kapható ipari törzseket is alkalmaztunk, a *Saccharomyces bayanus*-t (forgalmazó: Bí-Bor-Ász Kft.) és a *Saccharomyces cerevisiae*-t (forgalmazó: Unikén Kft., belső jelzés: 6886-77-7). A *Saccharomyces cerevisiae* egy széleskörben alkalmazott élesztő az élelmiszeriparban (pl. péklesztő, sörlesztő, borlesztő). Ezen törzs optimális erjesztési hőmérséklete 15-30 °C; alkoholtűrő képessége 13,5 (V/V) %. [19]

A *Saccharomyces bayanus* kiemelten fontos élelmiszeripari faj, törzsei alkalmazást nyernek a fermentációs úton előállított alkoholos italok gyártásánál. A faj jellegzetessége a magas alkohol toleranciája, amellyel akár 16 (V/V) % alkoholtartalmú borok is előállíthatóak. Ezen kívül jellemző erre a törzsre, hogy kevésbé optimális körülmények között – alacsony hőmérséklet (12-18 C), magas SO₂ tartalom – is erjesztésre alkalmas. [20]

6.4. Vanadát-ion toxicitási teszt

Az izolált és ipari törzseket toxicitási tesztnek vetettük alá. Ezzel megállapíthatjuk a vanadát-ion a MIC értékét a vizsgált élesztő törzsekre nézve. A további kísérleteink ezen adatok alapján végeztük el.

A vanádium(V)-ion toxicitási tesztjeit a laboratóriumunk által adaptált *well plate* technikával végeztük, aerob közegben. A *well plate*-ek összeállításához először összemérjük az első bemérési táblában (8. táblázat) szereplő anyagokat 50 mL-es Falcon centrifugacsőbe, majd az így készített táplevesekből 1 mL-t felveszünk 24-well *plate* lyukaiba, melyeket a második bemérési táblában (9. táblázat) adtunk meg. Minden lyukat 10 μ L sejtszuszpenzióval inokulálunk (lásd 6.1. fejezet – **Sejtszuszpenziók**), kivéve a 6C és 6D, melyek negatív kontrollként szolgálnak. A pozitív kontroll a 6A és 6B. A teszt eredményeit 48 óra elteltével *plate reader* (Epoch) segítségével mértük le 570 nm-en.

8. táblázat Toxicitási teszt táplevesek bemérési táblája

Táplevesek (TPL)	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.
SDB 2x (mL)	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
0,85% sóoldat (mL)	12,25	12	11,75	11,5	11,25	12,5
V+5-törzsoldat 2 mg/mL (μ L)	250	500	750	1000	1250	0

9. táblázat Toxicitási teszt well-plate bemérési táblája

24-well plate	1.	2.	3.	4.	5.	6.
A	I.TPL	II.TPL	III.TPL	IV.TPL	V.TPL	VI.TPL
B	I.TPL	II.TPL	III.TPL	IV.TPL	V.TPL	VI.TPL
C	I.TPL	II.TPL	III.TPL	IV.TPL	V.TPL	II.TPL
D	I.TPL	II.TPL	III.TPL	IV.TPL	V.TPL	II.TPL

6.5. Kondicionáltatás

Az SC_NYH_1 belső jelzésű törzset kondicionáltattuk a vanadát-ionra. Ehhez rázatott midi kultúrát használtunk az alábbi tényezőkkel:

- végtérfogat: 100 mL;
- tápleves: SDB;
- inkubációs idő: 3 nap;
- hőmérséklet: 22,5 °C;
- tálc sebesség: 50 RPM.

A vanadát-ion koncentrációját háromnaponta emeltük 10 mg/L-vel. A készítményt 130 mg/L koncentrációig vittük el. A kezdő lépésben 1 mL sejtszuszpenzióval inokuláltunk (lásd 6.1. fejezet – **Sejtszuszpenziók**), minden további háromnapos átoltásnál 1 mL-t vittünk tovább az előző tenyészetből.

6.6. Fermentációs kísérletek

A fermentációs kísérleteket kilenctagú vanádium gradiensen végeztük el, rázatott midi kultúrában az alábbi paraméterek alapján:

- végtérfogat: 100 mL;
- tápleves: SDB-150;
- inkubációs idő: 7 nap;
- hőmérséklet: 22,5 °C;
- tálc sebesség: 50 RPM.

A gradienst az alábbi bemérési tábla alapján állítottuk elő 2 mg/mL koncentrációjú vanádium(V)-ion-oldatból (lásd 6.4. fejezet – **Toxicitási tesztek**) 100 mL végtérfogattal.

10. táblázat Fermentációs kísérlet bemérési tábla

Sorszám	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
Bemért térfogat (μL)	0	62,5	125	250	500	1000	1500	2000	2500

A kísérlet végén McFarland-típusú relatív sejtmeghatározással (lásd 6.1. fejezet – **Sejtszuszpenziók**) megmértük az összes sejtszámot.

A fermentáció teljes lekövetésére gravimetriás visszamérést alkalmaztunk. Ehhez naponként lemértük a fermentációs edény tömegét, majd visszaszámítottuk az előző napi értékből a tömegcsökkenést. Ennek alkalmazására az ad lehetőséget, hogy a fermentációs üveg fedőjén készített tűszelepen keresztül szén-dioxid távozik, amely csökkenti a tömeget.

6.7. Alkoholtartalmi meghatározás gázkromatográfiával

A nyert minták alkohol tartalmát *Chromatron Gaschromatograph 18.3* segítségével mértük az alábbi paraméterekkel:

- az alkalmazott oszlop: 2 m x 4 mm saválló acélcsőbe töltött *Charbowax 20 M 10%*, *Sephalcoport 80/100 mash-en*;
- vivőgázáram: 40 mL/perc;
- hőmérséklet: légtermosztát 125 °C *izotherm*;
- injektor/detektor hőmérséklet: 140 °C;
- a felvitt minta rendre: 5 μL;
- lineáris erősítés: 10⁹.

A kiértékeléshez 0-15 (v/v) %-os tartományban öt pontos kalibrációt alkalmaztunk, alkohol-víz elegyek segítségével, a kiértékelés a standard kalibráció módszerével történt.

6.8. Mikroszkópos morfológiai felvételezés, képelemzés

A fermentációs kísérletek során végpontosan ellenőriztük a sejtek mikro-morfológiáját a vanadát-ion koncentráció gradiens függvényében Bürker-kamra használatával, amelyre 25 μL mintát vittünk fel, 40x objektívet alkalmaztunk, majd képfelvételeztünk.

A gradiens tagjaihoz kapcsolódó adatpontokat 25 képen mért sejtszámok számtani közepeként adtuk meg. A felvételekből szekvenciát állítottunk elő *ImageJ–FiJi* nyílt-forráskódú képfeldolgozó szoftver segítségével. A sejtek nagy- és kistengelyeinek hosszát (μm) mértük. Az így nyert adatokat az MS Excel táblázatkezelő program segítségével értékeltük ki, a kis- és nagytengelyek koncentráció szerinti függvényeinek segítségével.

6.9. Statisztikai elemzés

Munkánk során hármas ismétléssel dolgoztunk, az adatpontokat számtani középpel, valamint annak szórásával definiáltuk. A vizsgálatainkban lineáris függvénnyel közelíthető összefüggéseket figyeltünk meg. Ezen összefüggés erősségét *Pearson-féle korrelációs együtthatóval* jellemeztük. A statisztikai vizsgálatokat MS Excel táblázatkezelő program beépített függvényeivel végeztük.

7. Eredmények

7.1. Izolátumok identifikálása

A négy sikeresen izolált élesztő sejtvonalból az identifikáció során kettő *Saccharomyces* nemzetségbe és egy a *Kloeckera* nemzetségbe tartozónak adódott. Egy sejtvonalat nem tudtunk az általunk alkalmazott módszerrel meghatározni (API 20 C AUX identifikációs rendszer).

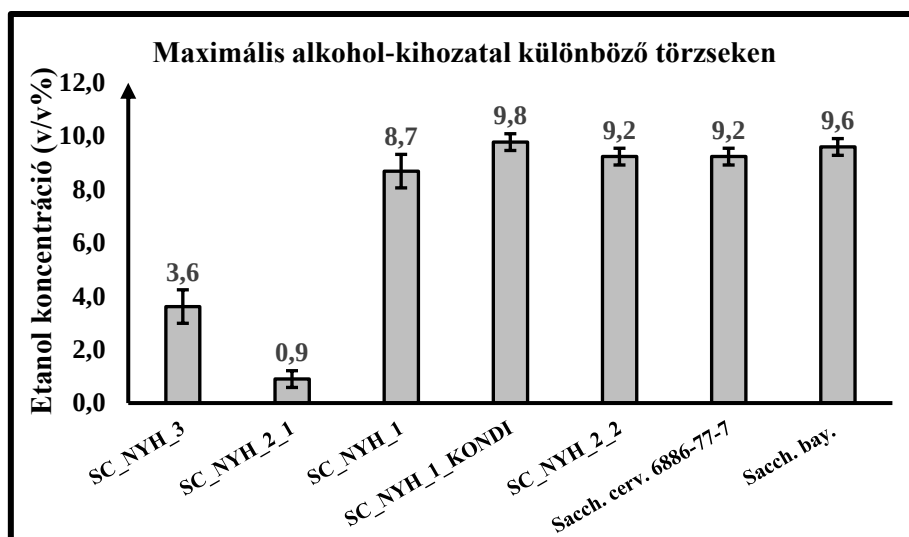
Az SC_NYH_1 és az SC_NYH_2_2 belső jelzésű törzsek (lásd 11. táblázat) morfológiai vizsgálta során azt tapasztaltuk, hogy nem termelnek pigmentet sem SDA, sem CMA táptalajon; CMA táptalajon 5 nap elteltével klasszikus élesztősejtes forma figyelhető meg. A telepek körkeresztmetszetűek, domború felületűek, gombostűfejnyi méretűek, krémszínűek voltak. *Anaerob* körülmények között glükózból alkoholos erjedés figyelhető meg. Az SC_NYH_2_2 belső jelzésű törzs szintén nem termel pigmentet; bipoláris, „citromalakú” élesztősejtes forma jellemző; CMA táptalajon 5 nap után hifát képez; a telepei körkeresztmetszetűek, domború felületűek, gombostűfejnyi méretűek, krémszínűek voltak; a glükózt kis mértékben alkoholosan erjeszti.

Az API 20 C AUX alapján adaptált biokémiai teszttel bizonyítást nyertek az általunk izolált törzsek identifikációi. A kapott szénhasznosítási adatokat az alábbi táblázat tartalmazza izolátumonként.

11. táblázat Izolátumok cukor-hasznosítási adatai

SC_NYH_1	+	–	–	–	–	–	–	+	–	+
SC_NYH_2_2	+	–	–	–	–	–	–	+	–	–
SC_NYH_3	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–
	GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR
SC_NYH_1	–	–	–	–	+	+	–	–	+	–
SC_NYH_2_2	–	–	–	–	+	+	–	–	+	–
SC_NYH_3	–	–	+	–	–	–	–	–	–	+
	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF	HYPH

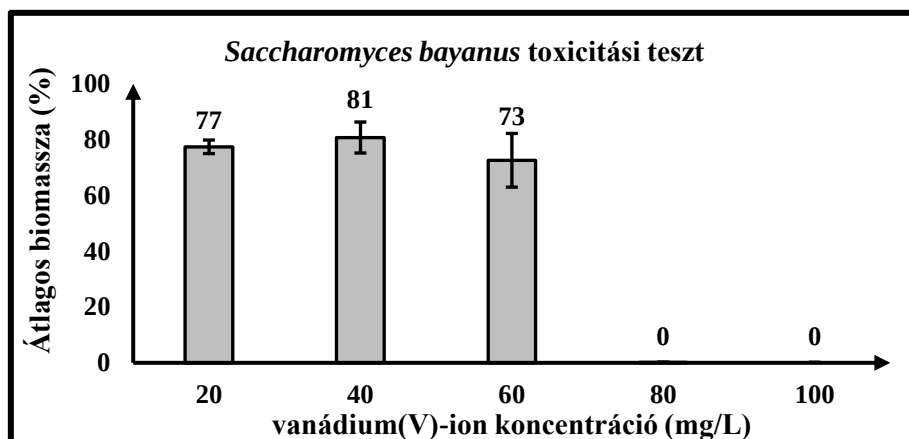
A kísérletek során alkalmazott törzseknek megvizsgáltuk a maximális alkohol-kihozatalát a kísérleti peremfeltételek mellett (lásd 6.6. fejezet – **Fermentációs kísérletek**). Azt tapasztaltuk, hogy az általunk *Saccharomyces*-ként identifikált törzsek jó alkohol-kihozattal rendelkeznek (8,7-9,2 (V/V) %). A kondicionáltatott törzs esetében az alkohol mennyiségét megközelítőleg 12,5 %-kal magasabbnak mértük (9,8 (V/V) %) (v.ö. 3. ábra).



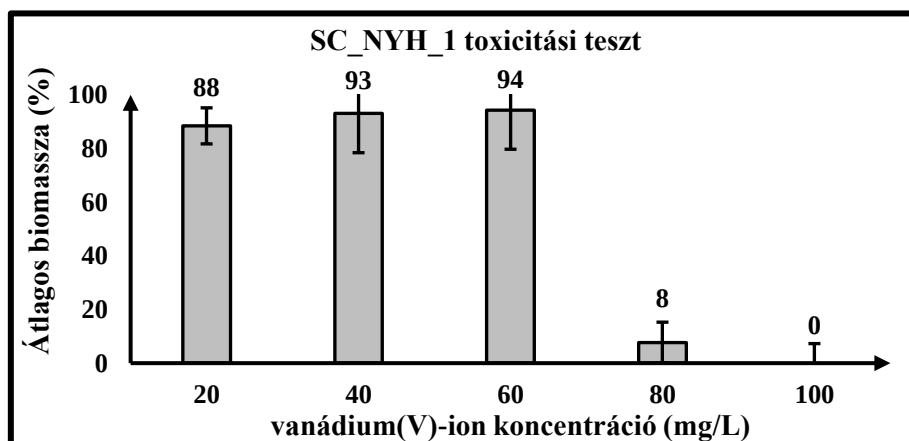
3. ábra Vizsgált törzsek maximális alkohol-kihozatala a kísérleti peremfeltételek mellett

7.2. Toxicitási-tesztek

A toxicitási tesztek során mindegyik általunk vizsgált törzs hasonló vanádát-tűrést mutatott. Az általunk vizsgált törzsek esetében a MIC érték 60 és 100 mg/L közé esik. A további kísérleteket ezen eredmények alapján végeztük el.



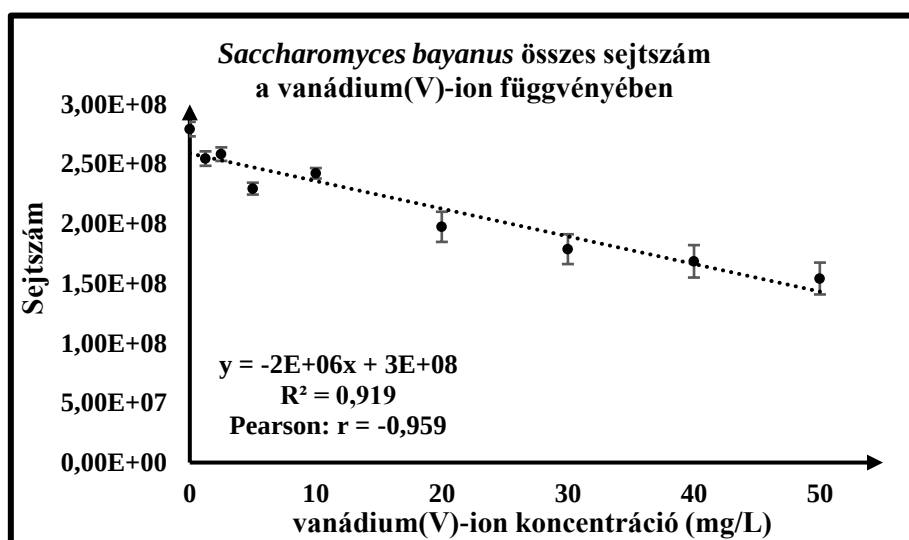
4. ábra A *Saccharomyces bayanus* ipari törzs toxicitási teszt adatai



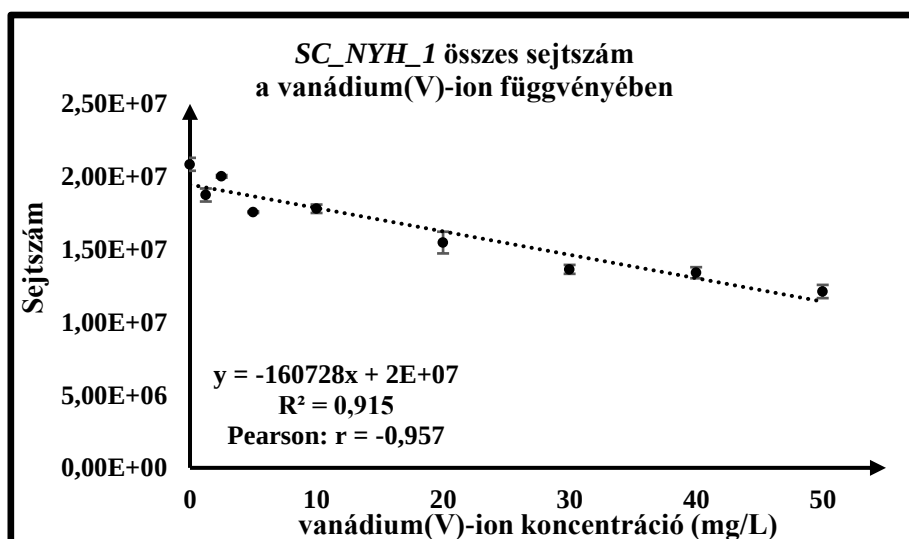
5. ábra Az SC_NYH_1 belső jelzésű törzs toxicitási teszt adatai

7.3. Fermentációs kísérletek

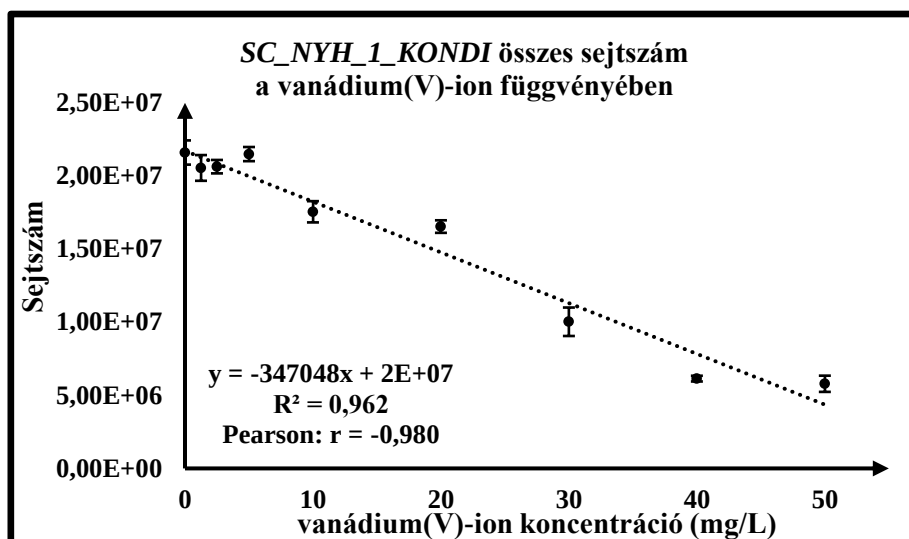
A fermentációt követően meghatároztuk az élesztősejtek koncentrációját. A *Saccharomyces bayanus* (6. ábra) és az SC_NYH_1 (7. ábra) törzs esetében a sejtszám a vanádium(V)-ion koncentráció növekedésével jelentősen – majd felére – csökken; sejtszám és az alkohol-kihozatal közötti kapcsolat lineáris összefüggéssel leírható. A kondicionáltatott törzsnél (8. ábra) a sejtszám lényegesen nagyobb mértékben csökken le, mint a kiindulási törzsnél. A legnagyobb biomassa-produkciót a *Saccharomyces bayanus* adta.



6. ábra A *Saccharomyces bayanus* ipari törzs összes sejtszáma a vanadát-ion koncentráció függvényében



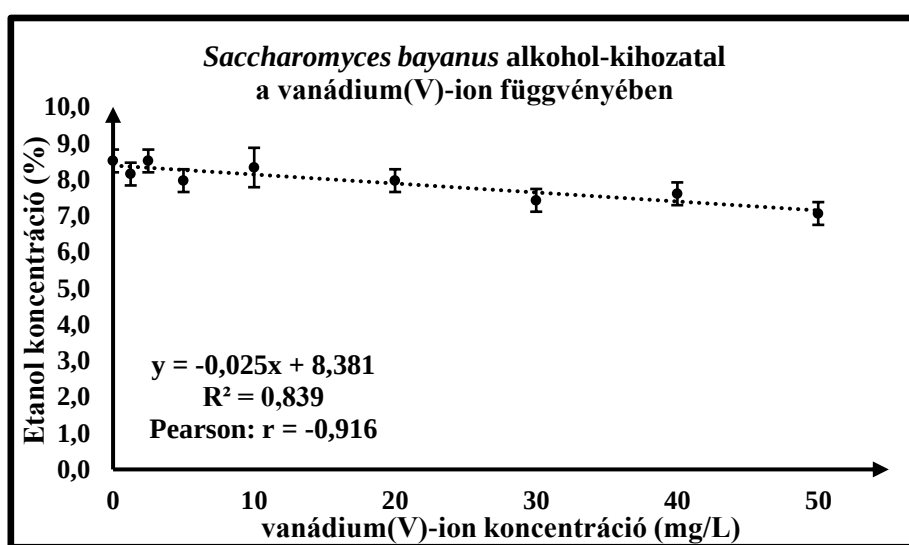
7. ábra Az SC_NYH_1 belső jelzésű törzs összes sejtszáma a vanadát-ion koncentráció függvényében



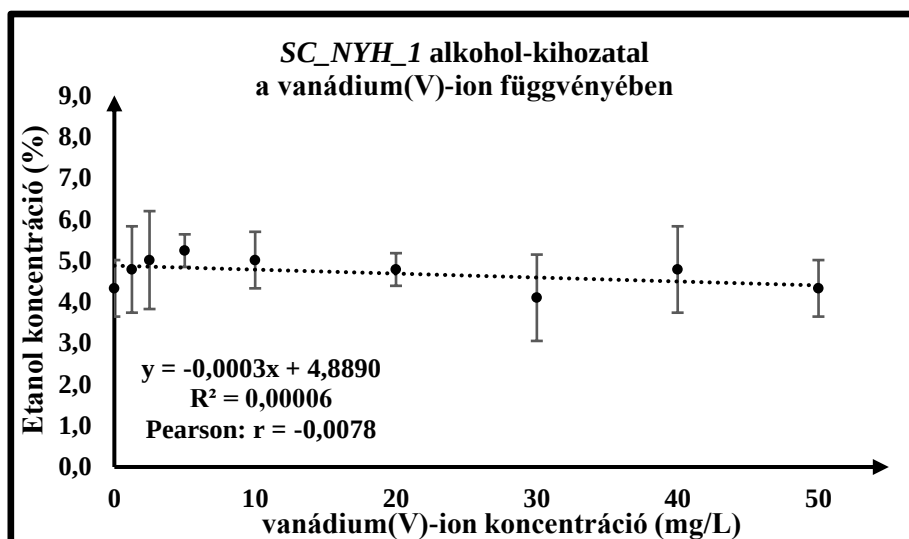
8. ábra Az SC_NYH_1_KONDI belső jelzésű törzs összes sejtszáma a vanadát-ion koncentráció függvényében

A fermentáció lezajlása után desztillációt követően megmértük az alkohol-kihozatalt. A *Saccharomyces bayanus* esetében (lásd 12. ábra) a vanádium(V)-ion koncentráció és az alkohol koncentráció között fordított arányosság lelhető fel, közöttük lineáris összefüggés van. Az SC_NYH_1 (lásd 13. ábra) és az SC_NYH_1_KONDI (lásd 14. ábra) törzsek alkohol-kihozatalát nem befolyásolja jelentős mértékben a vanádium(V)-ion koncentráció 0-50 mg/L tartományban.

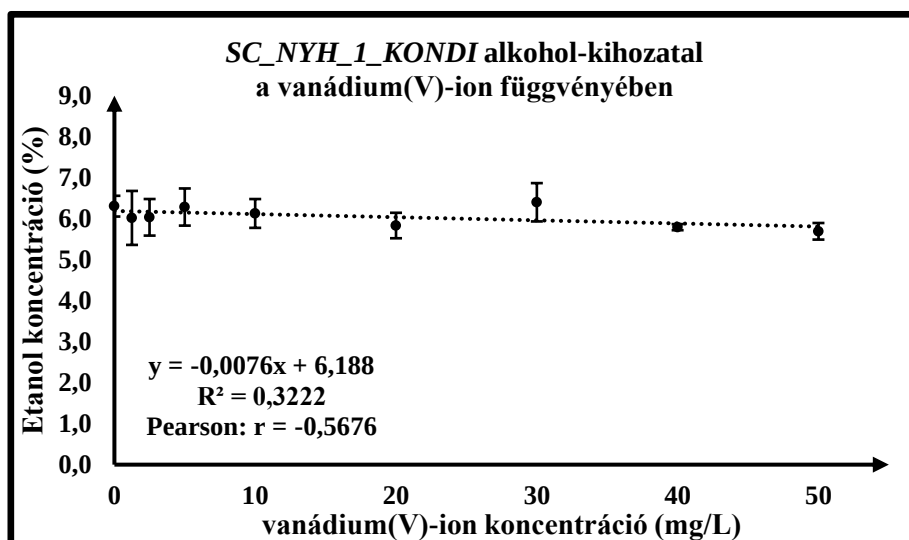
A fermentációs folyamatot gravimetrikus visszaméréssel követtük nyomon. A méréssel a kondicionáltatott törzs esetében a tömegcsökkenés a 4. napon konstanssá vált (konverzió); az összes többi vizsgált törzsnél a 6-7. napon.



9. ábra A *Saccharomyces bayanus* ipari törzs alkohol-kihozatala a vanadát-ion koncentráció függvényében



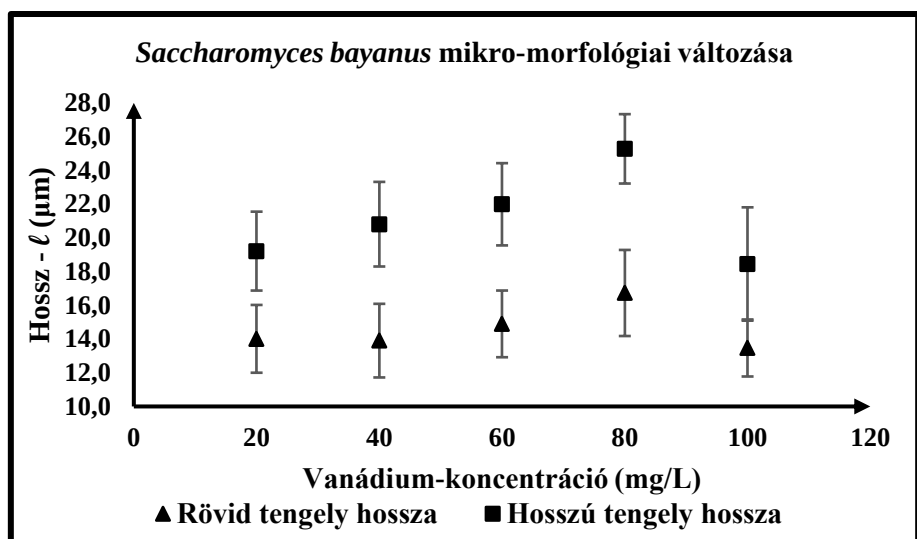
10. ábra Az SC_NYH_1 belső jelzésű törzs alkohol-kihozatala a vanadát-ion koncentráció függvényében



11. ábra Az SC_NYH_1_KONDI belső jelzésű törzs alkohol-kihozatala a vanadát-ion koncentráció függvényében

7.4. Morfológiai vizsgálat

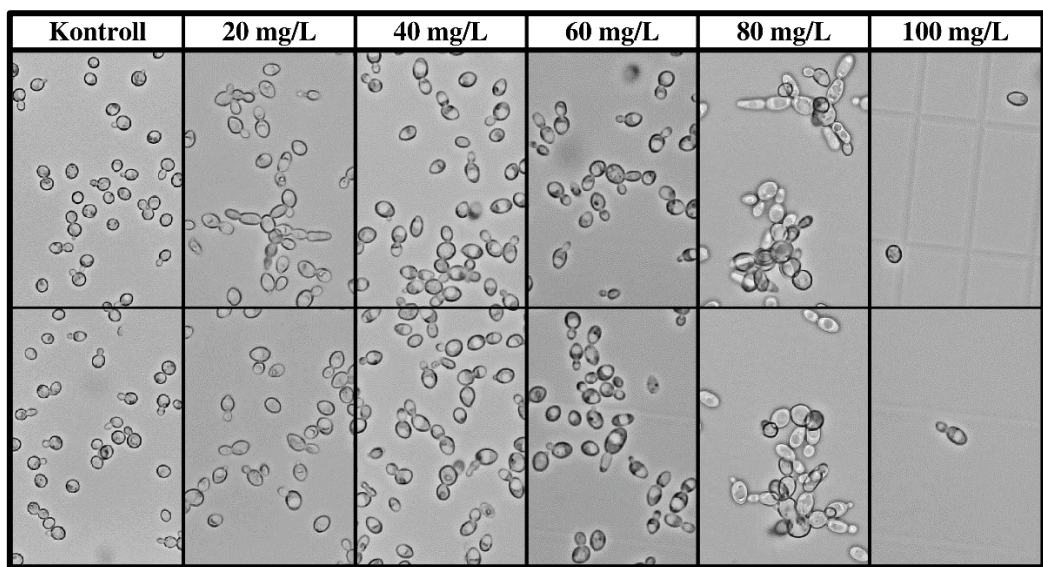
A fermentációs kísérletek során végpontosan ellenőriztük a *Saccharomyces bayanus* sejtmorfológiáját. Ehhez megmértük a sejtek nagy- és kistengelyeinek hosszát. Azt tapasztaltuk, hogy a vanádium(V)-ion koncentrációjának növekedésével nagyobb lesz a nagy- és kistengelyek különbsége. A fermentáció végpontján 80 mg/L koncentrációnál számos álhifás forma jelenik meg, míg 100 mg/L-nél a sejtek nagyon alacsony növekedést mutattak, megmaradnak a kezdeti morfológiai állapotban. 20 mg/L koncentrációs mintákban csak néhány álhifás forma fordult elő.



12. ábra A *Saccharomyces bayanus* sejtmorfológiai változása

12. táblázat *Saccharomyces bayanus* sejtek nagy- és kistengelyeinek hosszváltozása

Hosszú tengely hossza – ℓ_1 (μm)					
c (V+5) (mg/L)	20	40	60	80	100
átlag	19,2	20,8	22,0	25,3	18,4
szórás	2,3	2,5	2,4	2,1	3,4
Rövid tengely hossza – ℓ_2 (μm)					
c (V+5) (mg/L)	20	40	60	80	100
átlag	14,0	13,9	14,9	16,7	13,5
szórás	2,0	2,2	2,0	2,6	1,7
$\Delta\ell = \ell_1 - \ell_2$	17,2	18,6	20,0	22,7	16,8



13. ábra A *Saccharomyces bayanus* sejtmorfológiai változásáról készült képszekvencia

8. Diskusszió

Az izolálásunk kezdetben sikertelen volt, ugyanis a 2022. júniusi időjárás nem volt optimális az élesztők hajtáson való nagyszámú jelenlétéhez; ennek megfelelően cefréből izoláltunk élesztő-sejtvonalakat. Négy élesztőtörzset izoláltunk sikerrel, amelyek közül kettő a *Saccharomyces cerevisiae*, egy pedig a *Kloeckera apiculata* fajba tartozónak adódott, egy sejtvonalat nem tudtunk az általunk alkalmazott módszerrel identifikálni. A kísérleteket az SC_NYH_1 belső jelzésű izolátummal és a *Saccharomyces bayanus* fajélesztővel végeztük el.

Elvégeztük a vad és az ipari törzsek toxicitási tesztjeit. Ennek során azt tapasztaltuk, hogy a vanádium(V)-ion esetében a kontrollra indexált biomasszatömeg az SC_NYH_1 belső jelzésű törzs esetében kis mértékben – megközelítőleg 10%-kal – magasabb, mint a *Saccharomyces bayanus*-nál. A fermentációs kísérleteket ezen adatok alapján állítottuk össze.

A fermentációs kísérletekben végpontosan mértük a fermentlé összes sejtszámát, ezzel meghatározva a biomassza-produkciót. Ennek során azt az összefüggést vélhetjük felfedezni, hogy a vanádium(V)-ion koncentrációjának növekedésével fordítottan arányos a sejtszám mind a három vizsgált törzs esetében (lásd 9., 10., 11. ábra). A legnagyobb biomassza-produkciót a *Saccharomyces bayanus*-nál mértük.

A vanádium vélhetően befolyásolja cAMP-PKA útvonal működését, amely szabályozza az élesztősejtek növekedését. Eerre utalhat a szakirodalomban fellelhető foszfát-vanádium analógia („*ionos mimikri*”). A vanádium hasonlóan kapcsolódik a fehérjékhez, mint a foszfát, viszont nem látja el ugyan azon funkciót. Tehát meggátolja a foszfát fehérjéhez való kötődését és ezáltal az adott fehérje nem tudja ellátni feladatát.

A fermentáció befejeződésével desztilláció után meghatároztuk a fermentlé alkoholtartalmát. Ezen adatok alapján megállapítható, hogy a vanadát-ion koncentrációjának növekedésével kis mértékben csökken az alkohol-kihozatal (lásd 13., 14., 15. ábra). A három törzset összehasonlítva azt figyelhetjük meg, hogy a legnagyobb alkohol-kihozatalt a *Saccharomyces bayanus* adta, ezt követte a kondicionáltatott törzs (SC_NYH_1_KONDI). A 14. ábrán szereplő trenden kívüli eredmény oka a számos hígítási lépés során fellépett bemérési hiba.

Megfigyelhető a kondicionáltatott törzs esetében egy érdekes jelenség, ugyanis a biomassza mennyisége jelentősen lecsökken a vanadát-koncentráció emelkedésével, ezzel szemben ennél a sejtvonalnál az alkohol-kihozatal magasabb volt, mint a nem kondicionáltatott törzsnél.

A fermentáció végpontjában megvizsgáltuk a sejtek morfológiáját. Ebben azt tapasztaltuk, hogy a sejtek megnyúlnak, és álhifás formák alakulnak ki. A kontrollhoz képest a vanadát-ion koncentráció növekedésével a sejtek egyre megnyúltabbak; 80 mg/L koncentrációnál megjelenik számos álhifás sejtsoportosulás; 100 mg/L koncentrációnál a sejtek kevés osztódást végeznek, megmaradnak a kiindulási morfológiánál.

Néhány esetben álhifák megjelenését tapasztaltuk a kontrollban is. Feltételezzük, hogy ezt jelenséget a cAMP-PKA szabályzó szignál segítségével megjelenő sejtfaladhezinek (FLO11) megnövekedett mennyisége okozza, mely által pszeudohifák jelennek meg. Hosszabb inkubációs időt tartva valódi hifás alakok is kialakulhatnak. Ennek vélhető oka az, hogy a tápközegben magas a szénhidrát és alacsony a nitrogén tartalom, akkor a cAMP-PKA jelátviteli útvonal számos transzkripciós faktoron keresztül a fonalas növekedéshez szükséges glükoproteid szintjét növeli (lásd 1.2. fejezet – A fermentáció lefolyását befolyásoló tényezők), így a sejtek megnyúlnak, álhifás alakok jelennek meg. Ezt alátámasztja a nagy- és kistengelyek különbségének növekedése.

A fermentáció lefolyását gravimetrikus visszaméréssel vizsgáltuk. A kondicionáltatott törzs esetében eltérést tapasztaltunk a fermentáció időtartamában, ugyanis ezen törzseknél a konverzió időtartama 2-3 nappal rövidebbnek adódott (lásd 7.3. fejezet - **Fermentációs kísérletek**).

9. Kitekintés

További kutatási iránynak kijelölhetjük a következőket:

- a vanádium cAMP-PKA jelátviteli útvonalra gyakorolt hatásának molekuláris biológiai módszerekkel való vizsgálata (western blot);
- enzimaktivitás mérése (kataláz, peroxidáz, amiláz);
- a bioabszorpcióval megkötött vanadát-ion mennyiségi meghatározása ICP-OES vagy AAS segítségével;
- a sejtfalon bekövetkező változások elektron mikroszkópiás vizsgálata;
- újabb fém-ion toleráns törzsek előállítása;
- ko-kultúras fermentációs kísérletek;
- az izolátumok identifikációjának megerősítése szekvenálással.
(Terveink szerint a konferenciáig kivitelezhető.)

10. Összefoglalás

Sikeresen izoláltunk és identifikáltunk négy vadélesztő törzset, közülük két *Saccharomyces cerevisiae* fajba tartozót. A vanadát-tolerancia megközelítőleg azonos a vizsgált vad- és fajélesztők esetében.

A vad törzsek közül a legmagasabb alkohol-kihozatalú az SC_NYH_1_KONDI belső jelzésű és az SC_NYH_1 belső jelzésű törzs. A fő fermentációs kísérletekben a legmagasabb alkohol-kihozatalt és biomassa-produkciót a *Saccharomyces bayanus* adta, míg a legalacsonyabb biomassa-produkciót az SC_NYH_1_KONDI belső jelzésű törzs. Ez utóbbi ellenben közel 1 %-os alkohol-kihozatal növekedést mutat az SC_NYH_1 belső jelzésű törzshöz képest.

A konverzió időigénye az SC_NYH_1 kondicionáltatott törzs esetében a legkisebb. A sejtmorfológiai sajátosságok változása összefüggésbe hozható a vanadát-ion koncentráció növekedésével.

Az általunk tanulmányozott sejtvonalak 0-50 mg/L tartományú, vanadát-iont tartalmazó fermentációs táptalajon, alkalmasak lehetnek bioremediációs és hidrometallurgiai felhasználásra. Összességében azt a konklúziót vonhatjuk le, hogy a vanádium(V)-ion mind a három általunk vizsgált élesztő törzsre hasonlóképpen gyakorolt hatást.

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom:

Dr. Máthéné Dr. Szigeti Zsuzsa-nak a szakmai hozzájárulásáért, az értékes javaslataiért és meglátásaiért;

Kovácsnai-Oláh Richárd-nak, hogy lehetővé tette a kutatásaimat;

Galambos Dóra-nak a *Saccharomyces cerevisiae*-vel kapcsolatos adataiért;

Pózer Erik T.-nak a terepmunkában nyújtott segítségéért;

a *Nemzeti Tehetség Program „Nemzet Fiatal Tehetségeiért Ösztöndíj”*-ának a támogatásáért (Pályázati azonosító: NTP-NFTÖ-22-A2-0022).

12. Irodalomjegyzék

- [1] J.-H. Huang, F. Huang, L. Evans and S. Glasauer, "Vanadium: Global (bio)geochemistry," *Chemical Geology*, vol. 417, no. 1, pp. 68-89, 28 September 2015.
- [2] J. P. Gustafsson, "Vanadium geochemistry in the biogeosphere – speciation, solid-solution interactions, and ecotoxicity," *Applied Geochemistry*, vol. 102, no. 1, pp. 1-25, 14 January 2019.
- [3] M. Mišík, I. T. Burke, M. Reismüller, C. Pichler, B. Rainer, K. Mišíková, W. M. Mayes and S. Knasmueller, "Red mud a byproduct of aluminum production contains soluble vanadium that causes genotoxic and cytotoxic effects in higher plants," *Science of the Total Environment*, vol. 493, no. 1, p. 883–890, 15 September 2014.
- [4] D. Rehder, "Vanadium: Biological, Environmental, and Engineering Aspects," *Advances in Chemical Research*, vol. 2, no. 1, 8 January 2020.
- [5] K. Török, É. Bertalan, Z. Horváth és G. Falus, „Szénhamuminták geokémiai vizsgálata,” in *A hazai szénvagyron és hasznosítási lehetőségei*, Z. Püspöki, Szerk., Budapest, Magyar Bányászati és Földtani Szolgálat, 2018, pp. 238-246.
- [6] G. Gulyás, „Település szennyvíz nehézfém tartalma és annak hatása a szennyvíziszap mezőgazdasági hasznosításának lehetőségeire,” *PhD thesis, Pannon Egyetem*, 2020.
- [7] „3.9.1 Az eljárás célja és elve, 3.10.1 Energiaforrások, 4.1.2.1 Részecskékibocsátás,” in *Integrált Szennyezés-megelőzés és Csökkentés (IPPC) Referencia dokumentum az elérhető legjobb technikákról – tömörítvény a hazai sajátosságok figyelembe vételével Kőolaj - és gázfinomítók*, 2001, pp. 23, 24, 37.
- [8] “Brenda,” Leibniz Institute DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, 2022. [Online]. Available: https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=1.11.1.18&Suchword=&reference=&UniProtAcc=&organism%5B%5D=Ascophyllum+nodosum&show_tm=0. [Accessed 12 01 2023].
- [9] “Molecular Modelling Database,” National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/5N6Y>. [Accessed 12 01 2023].
- [10] D. Tripathi, V. Mani and R. P. Pal, “Vanadium in Biosphere and Its Role in Biological Processes,” *Biological Trace Element Research*, vol. 186, no. 1, pp. 52-67, 9 March 2018.
- [11] N. D. Chasteen, “The biochemistry of vanadium,” in *Copper, Molybdenum, and Vanadium in Biological Systems*, Vols. Structure and Bonding, vol. 53, Germany, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1983, pp. 105-138.
- [12] J. C. Pessoa, E. Garribba, M. F. Santos and T. Santos-Silvia, “Vanadium and proteins: Uptake, transport, structure, activity and function,” *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 301–302, no. 1, pp. 49-86.
- [13] Z.-B. Sun, S.-F. Yu, C.-L. Wang and L. Wang, “cAMP Signalling Pathway in Biocontrol Fungi,” *Current Issues in Molecular Biology*, vol. 44, no. 6, p. 2622–2634, 4 June 2022.

- [14] D. R. Creamer, S. J. Hubbard, M. P. Ashe and C. M. Grant, “Yeast Protein Kinase A Isoforms: A Means of Encoding Specificity in the Response to Diverse Stress Conditions?,” *Biomolecules*, vol. 12, no. 7, p. 958, 8 July 2022.
- [15] Ö. Kayikci and P. M. Magwene, “Divergent Roles for cAMP–PKA Signaling in the Regulation of Filamentous Growth in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus*,” *G3 Genes|Genomes|Genetics*, vol. 8, no. 11, p. 3529–3538, 1 November 2018.
- [16] P. J. Cullen and G. F. Sprague, Jr., “The Regulation of Filamentous Growth in Yeast,” *Genetics*, vol. 190, no. 1, p. 23–49, 1 January 2012.
- [17] R. Coico, *Current Protocols in Microbiology*, 15 October 2005.
- [18] “bioMérieux, Inc.,” Mediray, [Online]. Available: https://www.mediray.co.nz/media/15815/om_biomerieux_test-kits_package_insert-20210.pdf. [Accessed 12 01 2023].
- [19] „Unikén Kft.,” Pannon Szoftver Kft., 2012. [Online]. Available: http://unikenweb.helixshop.eu/termek/a-termek-1_e-kiszerelt-termek-f-kiszerelt-termek-1_f1-csomagolt-boraszati-termek-es-tartositoszerek/reszletek/boreleszto-univerzalis-20g-25db-ki-1-1015. [Hozzáférés dátuma: 12 01 2023].
- [20] „Bí-Bor-Ász Kft.,” [Online]. Available: <https://bi-bor.hu/termek-reszletek/fajeleszto-hidegturo-altalanos-20-g-3605>. [Hozzáférés dátuma: 12 01 2023].
- [21] “Molecular Modelling Database,” National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/5AA6>. [Accessed 12 01 2023].
- [22] “European Chemicals Agency,” [Online]. Available: <https://echa.europa.eu/hu/substance-information/-/substanceinfo/100.110.647>. [Accessed 12 01 2023].

13. Tételes szerzői hozzájárulás

**A 36. OTDK
BIOLÓGIA SZEKCIÓ FELHÍVÁSÁNAK
2. SZÁMÚ MELLÉKLETE
TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS**

Alulírott **Szolyka Levente** nyilatkozom, hogy a 36. OTDK-ra benyújtott „**Vanádium(V)-ion hatása a *Saccharomyces bayanus* mikro-, makro-morfológiájára és alkohol kihozatalára**” című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

Részfeladat	A részvétel mértéke (ötffokozatú skálán [#] jellemezve)
Kísérletek tervezése ¹	2
Táptalajok készítése, eszközök előkészítése ²	5
Természeti minták begyűjtése ³	5
Élesztőtörzsek izolálása, identifikálása ⁴	5
Toxicitási tesztek elvégzése	5
Fermentációs kísérletek elvégzése	5
Minták desztillálása, előkészítése ⁵	4
Alkohol-tartalom meghatározása ⁶	2
Morfológiai felvételek készítése ⁷	4
Morfológiai felvételek kiértékelése ⁸	4
Az adatok statisztikai feldolgozása, értelmezése ⁹	2

Kelt: Debrecen, 2023. 01. 23.



Pályamunkát benyújtó hallgató

(Szolyka Levente)

aláírása

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:



Témavezető

(Kovásnai-Oláh Richárd,

DE TTK Biotechnológiai Intézet)

aláírása

#Magyarázat:

A munkafolyamatokban való részvétel mértékét ötfokozatú skálán kérjük értékelni. A skála egyes értékeinek jelentése:

5 – Felkészítés után a feladat teljes egészét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

4 – Felkészítés után a feladat több mint felét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

3 – Felkészítés után a részfeladat felét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

2 – Felkészítés után a részfeladat kevesebb mint felét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

1 – A részfeladatot folyamatos segítséggel végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

¹*A szerző hallgató az általa végzett kísérletek tervezését nyomon követte; a módszer elsajátítását követően részben önállóan vitelezett ki kísérleteket.*

²*A felhasznált por táptalajok összeállítását és a készen vásárolt táptalajok elkészítését, sterilizálását; a kísérletekhez használt eszközök előkészítést, sterilizálását teljes mértékben a hallgató végezte önállóan.*

³*A pályamunka részét képező élesztő törzsekre vonatkozó anyagok begyűjtését teljes mértékben a hallgató végezte önállóan. Ehhez az ismerettségét felhasználva szervezte meg a minták begyűjtését.*

⁴*A begyűjtött minták feldolgozását, az élesztőtörzsek tisztítását, és biokémiai karakterizálását teljes egészében a hallgató végezte önállóan.*

⁵*A fermentációs kísérlet során nyert minták nagy részét a hallgató maga desztillálta, kivétel azokat melyek nem fértek bele a rendelkezésre álló nyíri időtartamba.*

⁶*A hallgató a rendelkezésre álló idő szűkössége miatt csak korlátozott számú mintát volt lehetősége önmaga lemérni.*

⁷*A morfológiai felvételek elkészítését nagyobb részt a hallgató végezte, azon kívül amikor a laborban egyéb teendője volt, ekkor témavezetője vette át a feladatot.*

⁸*A morfológiai felvételek kiértékelését – a képelemzést – a témavezetője által adott szempontrendszer alapján az interneten fellelhető anyagok segítségével önállóan végezte a hallgató.*

⁹*A statisztikai adatok feldolgozását részben a szerző hallgató végezte el; az adatok értelmezésében a témavezetője segítette.*