



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet
Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszék

*A Yarrowia lipolytica élesztőfaj citromsav szintézisének
technológiai elemzése*

Szakdolgozat

Tolnai Máté

Élelmiszermérnök BSc

„Ha három madár ül egy kerítésen,
és kettő elhatározza, hogy elrepül,
hány madár marad a kerítésen?

A válasz: három.

A tanulság: attól, hogy elhatározol valamit,
még nem teszed meg.”

Robert Toru Kiyosak

Budapest

2023

**Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet**

Szak neve: BSc Élelmiszermérnöki

Szakirány: Sör- és szeszipari technológia

Szakedolgozat készítés helye: Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék

Hallgató: Tolnai Máté

**A szakdolgozat címe: *A Yarrowia lipolytica* élesztőfaj citromsav szintézisének
technológiai elemzése**

Konzulensek: Dr. Csernus Olívia, egyetemi adjunktus

Dr. Kohári-Farkas Csilla, egyetemi adjunktus

Beadás dátuma: 2023. április 28.

szakedolgozat készítés helyének vezetője

Dr. Nguyen Duc Quang

konzulensek

Dr. Csernus Olívia

Dr. Kohári-Farkas Csilla

Dr. Kun Szilárd

modul szerinti tanszék vezetője

TARTALOMJEGYZÉK

1	BEVEZETÉS	1
2	CÉLKITŰZÉSEK	2
3	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
3.1	A citromsav általános jellemzése	3
3.2	A citromsav alkalmazási területei	6
3.3	Bioszintézis és fermentáció	8
3.4	<i>Aspergillus niger</i> citromsav termelése és technológiai lehetőségei	10
3.4.1	Felületi fermentáció.....	10
3.4.2	Szilárd fázisú fermentáció	11
3.4.3	Szubmerz fermentáció	12
3.5	A citromsav kinyerésének folyamata	13
3.6	A <i>Yarrowia</i> nemzetség általános jellemzése	14
4	EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK	18
4.1	Tápközeg összetétel hatása.....	18
4.1.1	Szénforrás	18
4.1.2	Nitrogénforrás	21
4.1.3	Foszforforrás	21
4.1.4	Nyomelemek	22
4.2	Hőmérséklet	24
4.3	Kémhatás	24
4.4	Levegőztetés és oxigénigény	25
4.5	Különböző fermentációs technológiák.....	25
5	ÖSSZEFOGLALÁS	27
6	IRODALMI HIVATKOZÁS	29

1 BEVEZETÉS

A citromsav (*citric acid*) piaci területe az egyik legnagyobb és leggyorsabban növekvő szegmense a biotechnológiai iparnak. A citromsav előállítására szolgáló mikrobiológiai eljárások során jellemzően az *Aspergillus niger* fonalagombát alkalmazzák termelő szervezetként melasz szénforráson. A többi szerves savval ellentétben a citromsavat kizárólag fermentációs úton állítják elő. A citromsav mikrobiális előállítása azonban bonyolult és környezetvédelmi szempontból nem biztonságos folyamat; ugyanis a technológia során nagy mennyiségű, ásványi savakat, szerves ballasztanyagokat és cianidokat tartalmazó szennyvíz keletkezik, valamint szilárd hulladékok (elsősorban gipsz) halmozódnak fel (Anastassiadis és mtsai. 2008).

Az elmúlt 40 évben a kutatók érdeklődése az élesztőgombákra irányult, mint potenciális citromsav termelő szervezetekre. Az élesztőgombák között a *Yarrowia* nemzetség modellszervezeteként ismert *Yarrowia lipolytica* élesztőfaj hasznosítási lehetőségeinek és a számos értékes, iparilag hasznos metabolit termelésének megismerésére előtérbe került. Kezdetben ez az élesztőfaj azért keltette fel a kutatók figyelmét, mert n-alkánokat tartalmazó közegben – ami akkoriban elérhető és olcsó szubsztrátumnak számított – is képes citromsavat termelni. A világ olajpiacán bekövetkezett változások miatt azonban ennek a szubsztrátumnak a használata gazdaságilag kedvezőtlené vált, ezért új megoldásokat kellett feltérképezni, s végül a technológia fejlesztése és a megújuló erőforrások hasznosítása, mint például a repceolaj, a glükóz, a glicerín, az etanol stb. eredményezett kedvezőbb citromsav hozamot. A citromsav ipari szintű előállítása során lényeges tényező a termelő szervezet mellett a megfelelő fermentációs tápközeg összetétel és egyéb technológiai paraméterek (kémhatás, hőmérséklet, oldott oxigén koncentráció stb.) kiválasztása (Finogenova és mtsai. 2005).

Ehhez kapcsolódóan a kutatómunkám a *Yarrowia lipolytica* élesztőfaj citromsavtermelésének megismerését, a fermentációs technikák összehasonlítását, valamint a termelési tényezők hatásainak és a fejlesztési lehetőségek feltérképezését célozta.

2 CÉLKITŰZÉSEK

A jelenlegi tanulmány célja, hogy bemutassam a *Yarrowia lipolytica* élesztőgomba citromsav termelésének és fejlesztési irányvonalainak eddigi kutatásait, mind magyar, mind külföldi tanulmányok vonatkozásában. A szakdolgozati kutatómunkám során az alábbi részfeladatokat tűztem ki célul:

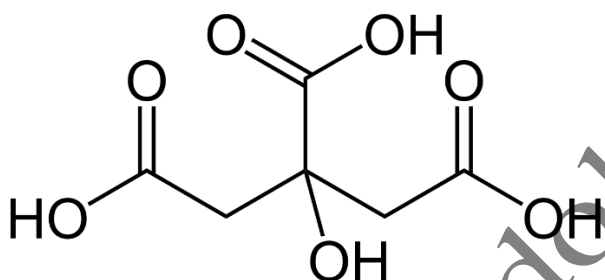
- A mikrobiális és kémiai citromsav szintézis összehasonlítása. A termelési lehetőségek előnyeinek és hátrányainak ismertetése.
- A mikrobiális citromsav előállítás termelő szervezetei: a fonalgomba és élesztőgomba fajok termelési profiljának elemzése.
- A fermentációs rendszerek összetétele: szén- és nitrogénforrás hatása.
- A fermentációs rendszerek környezeti tényezőinek: kémhatás, hőmérséklet, oldott oxigén koncentráció stb. hatása.
- A fermentációs technikák összehasonlítása és fejlesztési lehetőségeik.

Kutatásom során számos (szám szerint 42 darab) magyar és idegennyelvű (angol) tudományos munkát, folyóirat cikkeket, egyetemi jegyzeteket és disszertációkat olvastam át és dolgoztam fel. A hivatkozások nagy szórást mutatnak, mind földrajzi elhelyezkedést tekintve (többsége az Egyesült Államokban készült, de vannak kutatások az ázsiai és az európai földrésről is), mind a publikációk évszámát tekintve. Fontosabb és jelentőségteljesebb kutatásokat már az 1970-es években is folytattak, de a nemzetközi hivatkozások javarésze a 2000-es és 2010-es évekből származik. A folyóirati cikkek keresése és gyűjtése a Science Direct, Journal of Applied Microbiology, Research Gate és a Semantic Scholar online adatbázisokból történt. A Science Direct egy olyan webhely, amely hozzáférést biztosít a holland Elsevier kiadó tudományos (és orvosi) publikációinak nagy bibliográfiai adatbázisához. Több mint 18 millió tartalomnak ad otthont, többek között 4.000 tudományos folyóirat cikkeiből és több mint 30 millió e-könyvből válogathat kedvére az olvasó. A Journal of Applied Microbiology egy nyílt hozzáférésű, lektorált, tudományos folyóirat, melyet az Open Science Publishers LLP ad ki kéthavonta (évente 6 alkalommal). A ResearchGate egy 2008-ban alapított, díjmentes internetes oldal, amely a különféle tudományágzatokban tevékenykedő kutatók számára lett kifejlesztve. Ezen portálok közül a Semantic Scholar az egyetlen, amely kitűnik a többi jelenlévő közül, lévén, hogy ez egy mesterséges intelligencia által vezérelt, tudományos keresőprogram, melyet az Allen Institute for AI fejlesztett ki még 2015-ben.

3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 A citromsav általános jellemzése

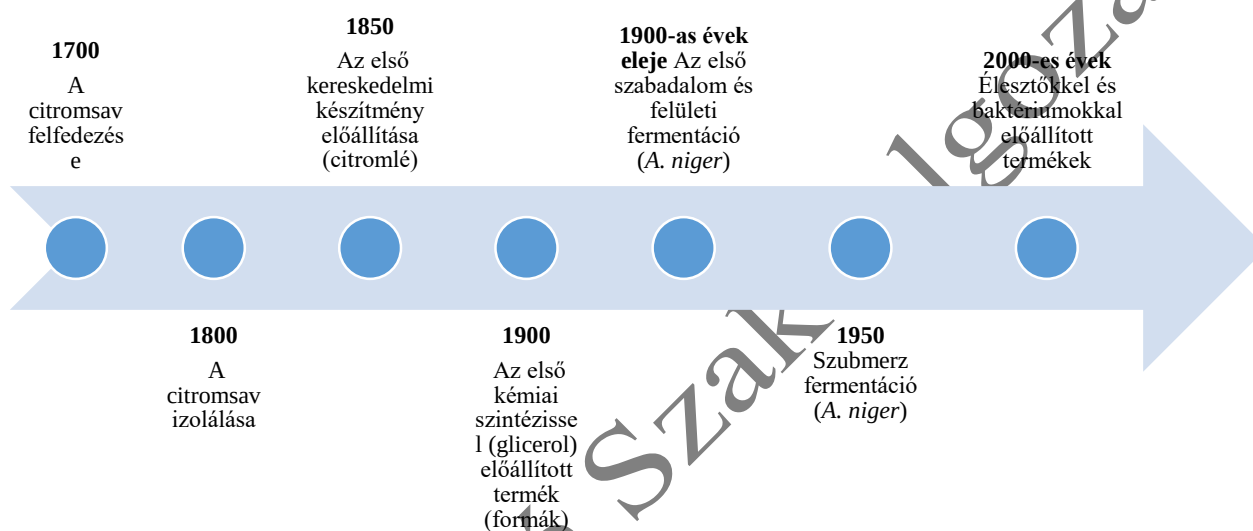
A **citromsav** (összegképlete $C_6H_8O_7$, molekulatömege 192 g/mol) másnéven 2-hidroxi-1,2,3,-propántrikarboxil sav, amely a második legjelentősebb fermentált ipari termék az etanol után (1. ábra).



1. ábra: A citromsav képlete (Internet 1)

A citromsav története (2. ábra) egészen a középkorig (VIII. század) vezethető vissza, amikor is Abu Musa Jabir Ibn Hayyan arab tudós, alkimista elsőként tett említést a citrom savanyú ízét okozó vegyületről. Később Carl W. Scheele (1784) svéd kémikus izolálta a citromsavat érett citrom levéből és kristályosította. Az első kereskedelmi készítmény 1860-ban készült. A citromsavat kalciumsókkal történő kicsapásos módszerrel nyerték ki (Abou-Zeid és Ashy 1984). A módszert egészen 1920-ig alkalmazták (Milsom 1987). Eközben 1880-ban Grimaux és Adams glicerinnél szintetizálta a citromsavat, de ez a kémiai módszer nem eredményezte a versenyképes kereskedelmi forgalomba kerülés lehetőségét, ezért más alternatív termelési útvonalakra volt szükség (Max és mtsai. 2010). Egy évtizeddel később, Wehmer (1893) német kémikus és mikológus írta le a biológiai úton történő citromsavszintézist. Kísérletei során a citromsav túltermelését *Penicillium glaucum* fonalgombafaj oxálsav fermentációja során mutatta ki. 1913-ban Zahorsky szabadalmat szerzett a citromsavgyártásra, ahol termelő szervezetként a *Sterigmatoocystis niger* (későbbi nevén *Aspergillus niger*) fonalgombát használta (Zahorsky 1913). Ezt követően az *Asperillus niger* faj citromsav termelésének feltérképezésére számos kutatás irányult, amelynek eredményeként egyre hatékonyabb termelési rendszereket fejlesztettek ki. Az 1900-as évek elején Currie (1916; 1917) a szilárd fázisú felületi citromsav fermentáció során kedvező citromsav hozamokat ért el. A csökkentett nedvességtartalom a fonalgomba anyagcsere

folymatainak igen kedvez, ugyanis az természetes élőhelyének (komposzt, korhadó fák stb.) tulajdonságaihoz hasonlít. A citromsav egyre szélesebb alkalmazási köre miatt nagy érdeklődés mutatkozott a citromsav ipari mennyiségben történő előállítása iránt. Az 1950-es években sikerült kialakítani a szubmerz (süllyesztett) fermentációt, ami ipari szinten el is terjedt. A technológia előnyeként említhető, hogy kevesebb helyet igényel, kevésbé munkaigényes és nagyobb termelési hozamot biztosít (Grewal és Kalra 1995).



2. ábra: A citromsav történetének legfontosabb eseményeinek idővonala (Anastassiadis és mtsai 2008)

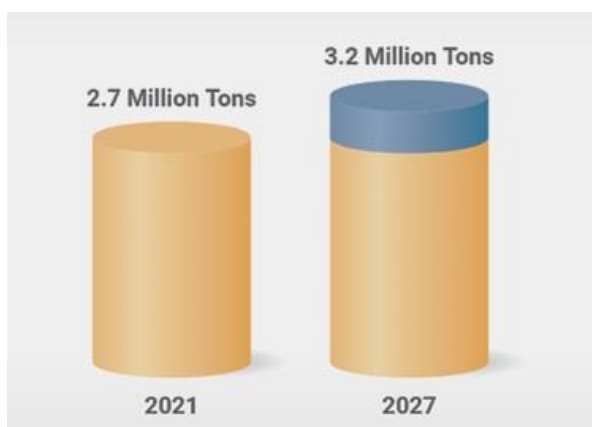
A citromsav (3. ábra) fehér, kristályos, kellemesen savanyú ízű anyag. Háromértékű karbonsav, sóinak nagy a pufferkapacitása, a három disszociációs lépcső miatt széles tartományban használható. Komplexképzésre hajlamos, ezáltal fémionok megkötésére alkalmas. Nem korrozív, de elég erős sav. Biológiaiag bontható (a citrát pufferek penészedésre hajlamosak). Vízben jól oldódik, oldata kellemes savanyú ízű.

A citromsav természetes úton az élő szervezetekben megtalálható vegyület, a sejtek metabolizmusának részét képezi (Pécs és mtsai. 2011). A citromsav a trikarbonsav ciklus (másnéven is ismert, mint Szent-Györgyi-Krebs ciklus, citrátkör) intermediere. Egyes citrusfélék (lime, citrom) félig érett termésében a szárazanyagnak akár a 8%-át is elérheti a citromsav (Portmann és mtsai. 1971)



3. ábra: A citromsav fehér, kristályos formában

1989-ben a citromsav- és a citrátok világtermelése körülbelül 0,5 millió tonnát tett ki. 2015-ben ez meghaladta a 2 millió tonnát (Markit 2015). 2015-ben Kína adta a világ termelésének 59%-át és a világ exportjának 74%-át. A 2005-től 2010-ig tartó időszakban jelentősen megnőtt a termelés, amely pedig példátlanul alacsony árakhoz vezetett, amely 2015-ben 700 USD/tonna értékben érte el a mélypontot (CCM 2016). 2021-ben a citromsav világpiaci össztermelése elérte a 2,7 millió tonnát. Ezen tényezők miatt a citromsav piaci volumene az előrejelzések szerint 2027-re elérheti a 3,2 milliárd USD-t, és várhatóan az 2,78%-os CAGR-t (Compound Annual Growth Rate = Összetett Éves Növekedési Ráta) (4. ábra) (Campos és mtsai. 2023).



4. ábra: A citromsav teljes éves termelésének jelene és jövője (Campos és mtsai. 2023)

Az elmúlt években bekövetkezett gazdasági növekedés, az urbanizáció és az átalakult életmód miatt a készitalok és a feldolgozott élelmiszerek iránti hajlandóság fokozódott. Ez a citromsav iránti megnövekedett kereslethez is vezetett a különböző iparágakban. Ezen kívül a mindennapi termékek előállítása során a mesterséges anyagok egészségre gyakorolt kedvezőtlen hatásának csökkentésének érdeke a természetes összetevők használatának irányába történő elmozdulást eredményezte (Behera és mtsai. 2021).

A szerves savak a harmadik legnagyobb csoportot képviselik a fermentációs termékek között. A megújuló szénforrásokból mikrobiális folyamatokkal előállítható, sokféleképpen tovább alakítható platform molekuláknak igen kiváló példái a szerves savak. Hagyományosan ezeket egyes baktériumcsoportok (például tejsavbaktériumok), valamint gombák (például *Aspergillus niger*) alkalmazásával termelik. Ezen szerves savak elsődleges anyagcseretermékek, bioszintézisük az energiatermeléshez vagy a növekedéshez kötött. A savtermelés általában hiányos anyagcserét jelez – a szénforrás oxidációja nem megy végig szén-dioxidig és vízig. Anaerob organizmusoknál nem az oxidáció hiányos, hanem speciális, kis energianyereségű reakciók fordulnak elő (homofermentatív tejsavtermelők, homoacetogének).

3.2 A citromsav alkalmazási területei

A citromsav teljesen biztonságos, GRAS (*generally recognised as safe*) minősítésű szerves sav. A napi maximum beviteli mennyisége nincsen korlátozva. Az élelmiszeriparban elsősorban savanyúságot szabályozó anyagként, ízesítőszerként (sav-cukor arány beállítása) alkalmazzák E330 néven. Mivel a citromsav sok gyümölcs természetes összetevője, így igen jól illeszkedik az élelmiszerek ízprofiljába. A lekvárok, zselék, de még az édes töltelékek készítésénél a citromsav az, amely elősegíti a zselésedési folyamatot és kiemeli a gyümölcsök természetes ízét. Nagyon jól oldódik, így tömény szirupokban is alkalmazható. A savanyító hatása miatt tartósít, lassítja az élelmiszerek romlását. A savanyítás az élelmiszerek tulajdonságaira, ezáltal a feldolgozási paraméterekre, például a főzési időre és hőmérsékletre is hatással van. A citromsav stabilizálja az emulziókat, megakadályozza a zsír elválását. A sajtoknál javítja és egységesíti a textúrát, csökkenti ragadóságot az íz befolyásolása nélkül (Kiss és mtsai. 2018).

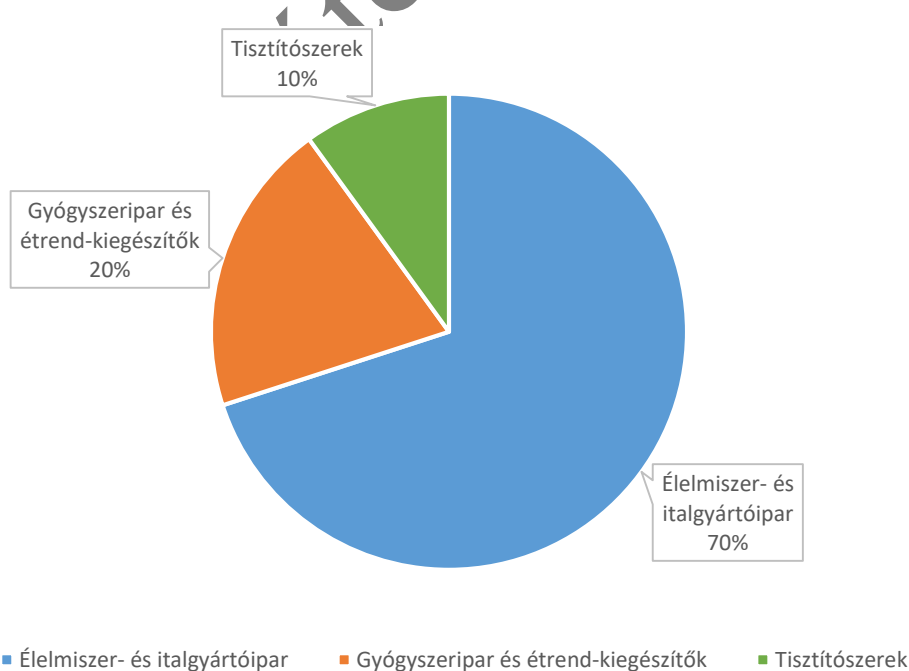
A kutatások során leírásra került, hogy ugyan önállóan nincs antioxidáns hatása, azonban elősegíti a környezetében jelenlévő többi antioxidáns vegyület hatását. A citromsavat

kelátképző tulajdonság is jellemzi, megköti a fémionokat és ezzel megakadályozza a fémkatalizált barnulási és ízromlási folyamatokat. A fagyasztott és konzerv gyümölcsök esetében már 0,1-0,3% citromsav hozzáadása is gátolja (vagy késlelteti) az oxigén hatására történő elszíneződést és ízromlást. A savas tartományban (pH 3,0-3,5 alatt) a zavarosságot okozó pektineket is kicsapja. Nátrium-citrát formában is széleskörűen alkalmazzák, például tejtermékekben (Fekete és mtsai. 2013).

A gyógyszeriparban a kalcium és vas bevitelét segíti elő citrát-komplex formájában. A citromsav nátrium sója véralvadásgátló hatású (megköti a kalciumot a vérből). A kozmetikumokban tartósítószerként is alkalmazzák. A tisztító- és mosószerek gyártásánál a víz lágyítására polifoszfátok helyett pedig kiválóan alkalmazható, nem okoz eutrofizációt (Pécs és mtsai. 2011).

Egyéb hasznosítási területei között említhető a műanyagipar és a fémipar is. A műanyagiparban a vinil- és cellulózgyantáknál lágyítók (citromsav-észterek) formájában alkalmazzák. A fémiparban felülettisztításra, rozsdamentesítésre, passziválásra (salétromsav helyett), galvanizáló fürdők adalékaként alkalmazzák (Fekete és mtsai. 2013).

Becslések szerint az élelmiszer- és italgyártóipar használja fel az előállított citromsav 70%-át, a gyógyszeripar és az étrend-kiegészítők 20%-ot, míg a maradék 10%-ot tisztítószerek gyártására használják fel (5. ábra) (Cavallo 2017).



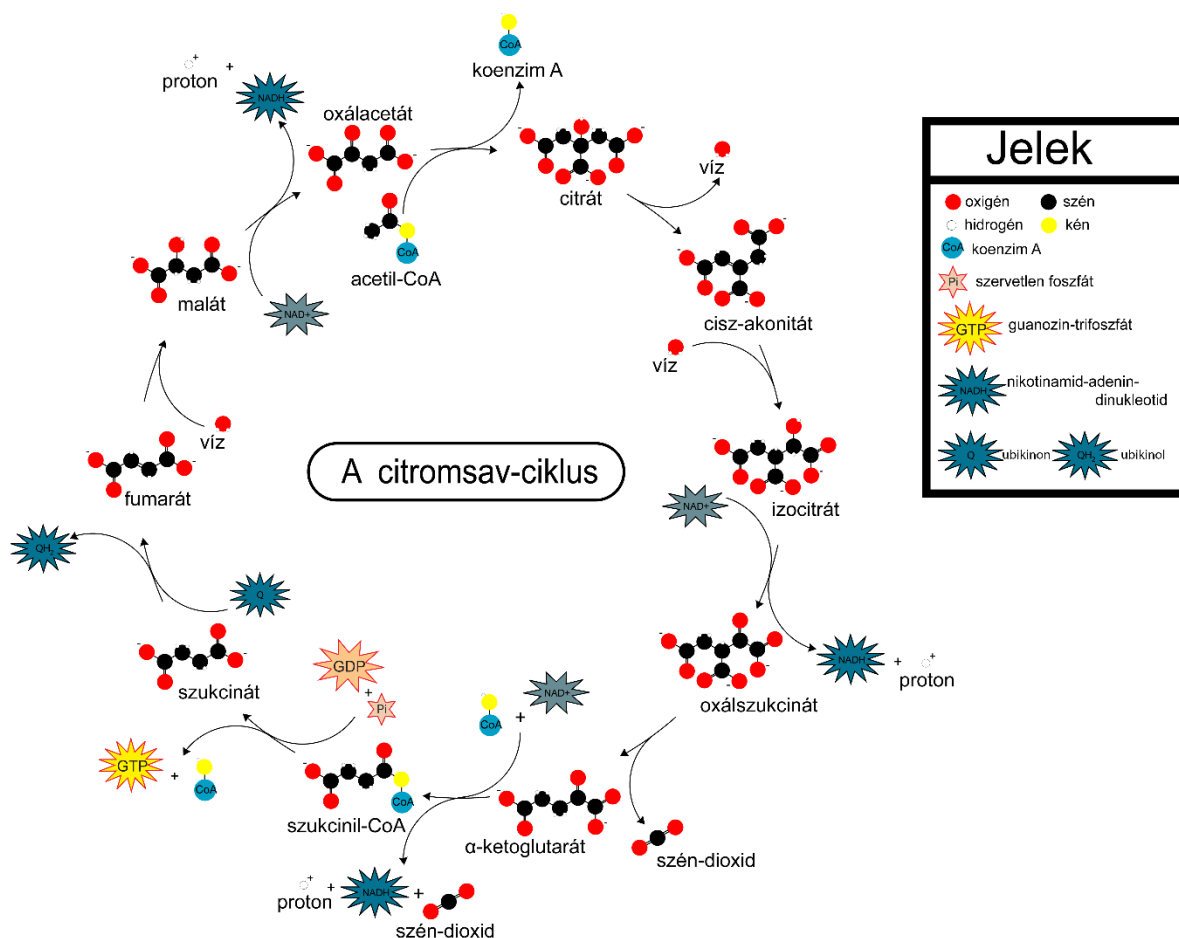
5. ábra: Az ipar által előállított citromsav főbb hasznosítási területei (Cavallo 2017)

3.3 Bioszintézis és fermentáció

Az iparban hagyományosan *Aspergillus niger* fonalas tömlősgomba (Ascomycetes) törzsekkel termeltetik a kereskedelmi forgalomban elérhető citromsavat. Az elmúlt 30 évben azonban a kutatók érdeklődése az új termelő szervezetek, baktériumok (*Bacillus licheniformis*, *Arthrobacter paraffinens*, *Corynebacterium* sp.) és élesztőgombák (*Candida tropicalis*, *C. oleophila*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. citroformans*, *Yarrowia lipolytica*) iránt lényegesen nőtt. A termelő törzsekkel szembeni követelmény, hogy izocitromsav és a glükonsav termelés elnyomható legyen, valamint az anaplerotikus reakciók megfelelően működjenek. A potenciális termelő törzsek mellett további kutatási irányvonal az alapanyag árának csökkentése, így a különböző szubsztrátumok, akár ipari melléktermékek, maradványok hasznosítása. A tényezők, amelyek bizonyítottan jelentős hatással vannak a citromsavtermelésre: a fermentációs közeg (szénforrás, nitrogén- és foszforforrás, nyomelemek), oldott oxigén koncentráció (levegőztetés mértéke), a pH és a hőmérséklet (Pálfi és mtsai. 2020).

A citromsav termelés a glikolízissel veszi kezdetét, amely során a szénforrásból (1 mol glükóz) piruvát (2 mol) keletkezik. A piruvátból ezt követően a citromsav prekursor anyagai, az oxálecetsav és az acetil-koenzim-A alakul ki. A folyamat meghatározó lépése a Cleland-Johnson reakció, ahol a piruvát acetil-CoA-vá történő átalakulása során felszabaduló CO₂ a másik piruváton kötődik meg, amelynek eredményeként oxálecetsav jön létre. A citrát-kör indító lépése során a citrát-szintáz enzim katalizált reakció a prekursor anyagokból citromsavat eredményez (Krebs és mtsai. 1953).

Az oxálecetsav nem csupán a citromsav ciklus során, hanem az anaplerotikus (feltöltő) anyagszerepe során is keletkezik. Ennek hatására az elméleti 66%-os citromsav hozam helyett lényegesen kedvezőbb 90%-os citromsav hozam érhető el. A Cleland-Johnson reakció során keletkezett szén-dioxid anaplerotikus megkötését (oxálecetsav és malát képződését) a piruvát dekarboxiláz enzim katalizálja. Az enzim eukariótákban jellemzően a mitokondriumban található, azonban az *Aspergillus niger* esetén mitokondriális és citoszolikus formában is jelen van. Az anaplerotikus szén-dioxid megkötés nagyrészt a citoszolban játszódik le. A citoszolban található malát-dehidrogenáz enzim hatására az oxálecetsav maláttá (almasavvá) alakul. A reakció NADH-igényét a glikolízis fedezi. Az *Aspergillus* termelő törzseknél a glikolízis végterméke tehát nem piruvát, hanem malát (6. ábra) (Baldwin és Krebs, 1981).



6. ábra: A citromsav-ciklus (Baldwin és Krebs 1981)

Az izocitromsav a citrát-ciklusban keletkezik, közvetlenül a citromsav-szintézis után, az aconit-hidratáz (AH) enzim által katalizált reakció során. Emiatt a vad élesztőkben, így a *Yarrowia* élesztőknél is a citromsavval együtt termelődik (Kamzolova és mtsai. 2015). Az izocitromsav másodlagos metabolitként a citromsav hozamot csökkenti, továbbá az izocitromsav jelenléte a végtermék kristályosodására kedvezőtlenül hat (Aurich és mtsai. 2012, Rywinska és mtsai. 2013). A citromsav és izocitromsav királis vegyületek, így azok elválasztása igen bonyolult műveleteket igényel (Heretsch és mtsai. 2008).

A citrát-szintáz (CS) az az enzim, ami a citromsavat oxalacetátból és acetyl-CoA-ból alakítja át, majd negatívan modulálja az ammónium-ionkoncentrációját a közegben (Il'chenko és mtsai. 2002). Ezért fontos a magas szén/nitrogén arány biztosítása, hogy a szénfelesleg a stacionárius növekedési fázisban a citromsav előállítására irányuljon. Ráadásul az izocitrát-dehidrogenáz (NAD-IDH), az izocitromsavból α-ketoglutarátot előállító enzim, allosztérikusan aktiválódik az adenzin-monofoszfát (AMP) hatására. Ha a nitrogén

korlátozott, az enzim AMP-deamináz hasítja az AMP-t, és NH_4^+ ionokat termel, melyek viszont negatívan szabályozzák a NAD-IDH-t. Ily módon mind a citromsav, mind az izocitromsav felhalmozódik a mitokondriumban (Papanikolaou és mtsai. 2013).

3.4 *Aspergillus niger* citromsav termelése és technológiai lehetőségei

Nagyüzemi méretekben három módon: *felületi*, *szubmerz* és *szilárd fázisú fermentációval* történhet a citromsav gyártása.

3.4.1 Felületi fermentáció

A felületi fermentációnál a fonalgomba micéliumai a sekély tálcákban lévő tápoldat felszínén szövedéket hoznak létre. A tálcák felülete 5-8 m², amelyen a tápoldat 5-20 cm-es réteget alkot. A tálcák anyaga alumínium vagy rozsdamentes acél, mert a rendszer savasodásának hatására máskülönben más fémekből a sav fémionokat oldana ki. A tálcákat egymás fölött állványokon olyan kialakítású kamrákban helyezik el, amelyek lehetővé teszik a közel aszeptikus (az adott folyamatra ártalmas mikroorganizmusoktól mentes) működést (Soccol és mtsai. 2006).

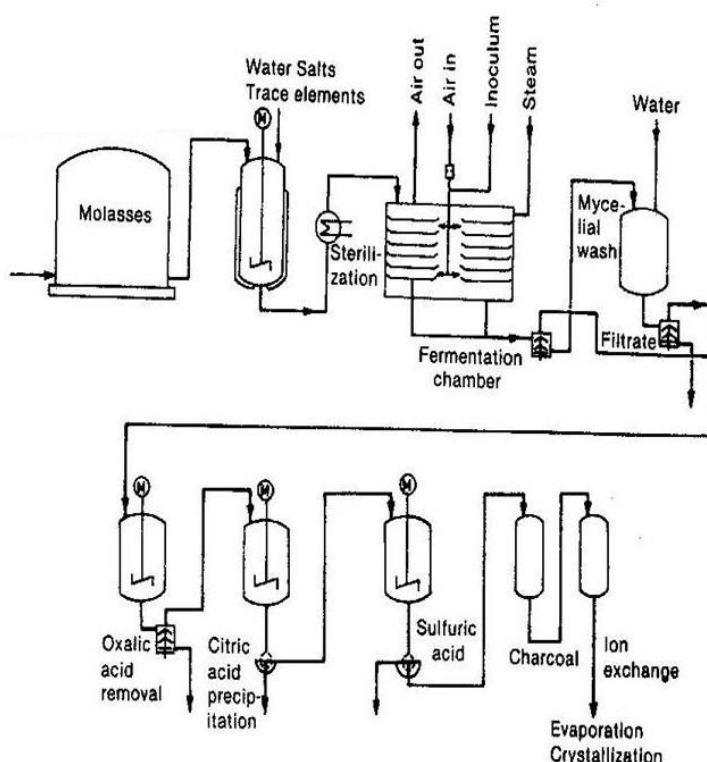
A tápoldat szénforrás, jellemzően glükóz tartalmát 15-25 %-ra állítják be. Amennyiben a szénforrás melasz, úgy a használat előtt hígítják (15 %-os cukor tartalomig), a kémhatását pedig 3,5-re viszik le (befertőződés kockázatának csökkentése), majd a csíramentesítés és tisztítás (fémionoktól mentesítés) után a lehűtött tápoldatot a tálcákba szivattyúzzák. A fonalgomba leoltása megoldható közvetlenül spóra szuszpenzióval (100-150 mg spóra/m²) valamint a levegővel befúvatott spórákkal is. A citromsavfermentáció időtartama alatt a tálcákra steril levegőt fúvatnak (Pécs és mtsai. 2011).

A nagy oltási spóra koncentráció lerövidíti a termékképzés előtti növekedési szakaszt és a morfológiát inkább a fonalas növekedés irányába tolja el (a pelletképződés helyett). A termelő fonalgomba sporulációja csökkenti (vagy gátolja) a citromsavképződést. Ezért a körülményeket úgy állítják be, hogy a micélium hosszabb ideig növekedjen a spórázás megindulása nélkül. Ez az ammóniumion-koncentráció növelésével és nemionos detergenssek hozzáadásával érhető el (Pécs és mtsai. 2011).

A citromsav fermentáció általában 8-12 nap alatt játszódik le. A lé feldolgozásának első lépése a micélium elválasztása a folyadéktól. Félfolytonos fermentációnál friss tápoldatot adnak a micélium szövedékhez, ezáltal csökkentik a növekedés lag szakaszának hosszát. A

micélium ismételt használata attól függ, hogy a törzs mennyire hajlamos autolízisre (Pécs és mtsai. 2011).

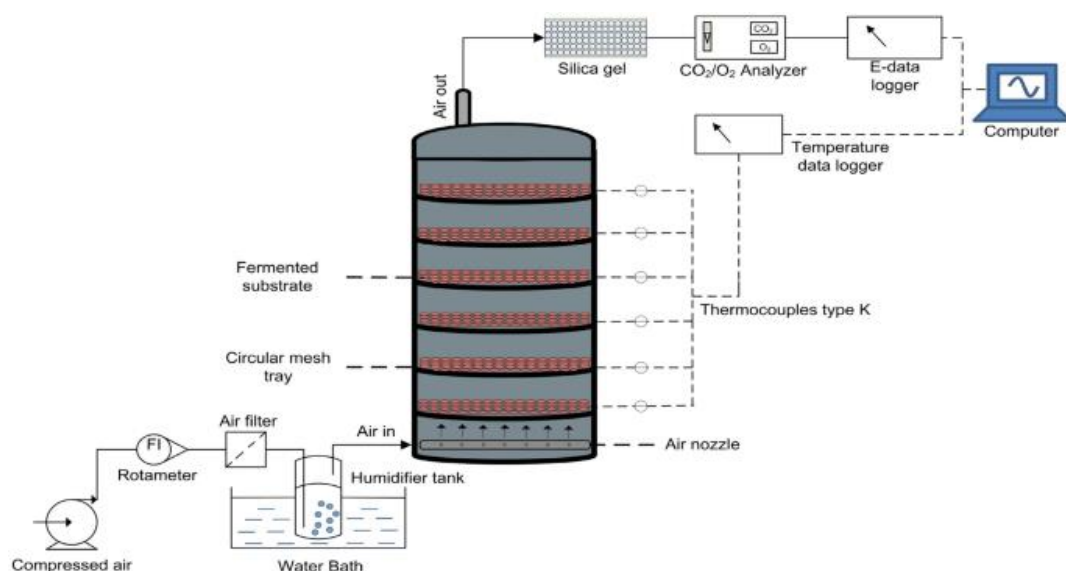
A felületi technológia egyik változata a többlépcsős fermentáció (7. ábra). A tápoldat az egymás fölötti tálcák között gravitációsan folyik lefelé és a legalsóról elvett fermentlét dolgozzák fel. A tálcák között folyamatosan steril levegőt fúvatnak át. A konverzió hatásfoka cukorra számolva 65-75 %, a „reaktor” produktivitása 7-8 kg citromsav/m³*nap. Alacsonyabb, mint a szubmerz eljárásnál, viszont a költségek is kisebbek (Darasa 2016).



7.ábra: Felületi fermentáció (Darasa 2016)

3.4.2 Szilárd fázisú fermentáció

A szilárd fázisú fermentáció (solid state fermentation, SSF) (8. ábra) a környezet szempontjából előnyös, mert csökkenti a hulladék kibocsátást. A különböző magas szénhidrát tartalmú mezőgazdasági és ipari hulladékok (cellulózban gazdag rostok, szalma, korpa, cukornád bagasz stb.) hozzáadott értéket tartalmazó termékekké alakíthatók egy vagy több cellulózbontó törzs (mono- vagy kevert kultúra) alkalmazásával. A megfelelő termelékenységhez meg kell oldani a megfelelő levegőztetést, ezzel a metabolikus hő eltávolítását és a páratartalom szabályozását.



8. ábra: Szilárd fázisú fermentáció (Manan és Webb 2017)

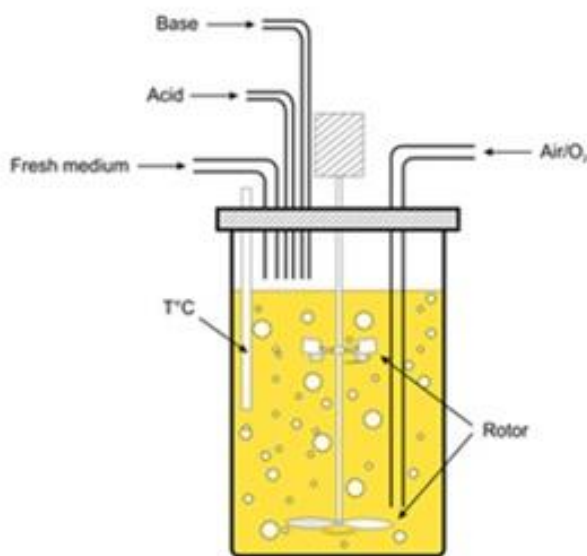
Nagyon fontos a szemcseméret megválasztása. Kisebb szemcseméret növeli a kitermelést és csökkenti a fermentáció időtartamát. A fermentációt legtöbbször tálcákon hajtják végre. A szilárd anyagot gőzzel sterilizálják, majd a felületére oltják a spórákat (Kumar és mtsai. 2003). A fermentáció 10-15 napon át tart a szubsztrátum bonthatóságától és a lebontási sebességtől függően. A penészgombák már a spórák csírázásától kezdve extracelluláris enzimeket, mint lignocellulóz bontó enzimeket (cellulázok, hemicellulázok) termelnek és a citromsav mellett (Manan és Webb 2017).

3.4.3 Szubmerz fermentáció

A citromsav termelésének túlnyomó részét szubmerz fermentációval (9. ábra) állítják elő. Ennek számos előnye van a felületi vagy a szilárd fázisú fermentációhoz képest, így kisebb a munkaerőigény, nagyobb a konverzió és a produktivitás, alacsonyabbak a költségek, kisebb a befertőződés kockázata (Stanbury és mtsai. 2013).

A szubmerz fermentáció szigorúan szabályozott környezeti körülmények között történik. A steril, fémionoktól mentesített tápoldat cukortartalma 15-20 %, ami általában melasz, szacharóz, glükóz vagy fruktóz. Nitrogén forrásként ammónium szulfátot vagy ammónium nitrátot használnak. A nyomelemek koncentrációját is pontosan be kell állítani, különösen a vas, a cink, a réz és a mangán ionokét. Kritikus a mangánion koncentrációja, ezt 2 µg/l alatt kell tartani. A fermentor beoltása történhet spóra szuszpenzióval vagy

előszaporított pelletes tenyésztettel. Ez utóbbi esetben a lag szakasz és az egész fermentáció mintegy 12 órával lerövidül (Pécs és mtsai. 2011).



9. ábra: Szubmerz fermentáció (Civish 2000)

A fermentációs idő a szénforrástól függően lehet 5-8 nap, de elnyúlhat akár 10-15 napra is. A fermentáció során előbb egy növekedési szakasz figyelhető meg, a cukorhasznosítás a sejttömeg növekedését szolgálja (2-3 nap a pelleték képződés). Azután a termékképzési fázis (5-8 nap) során az intenzív citromsavtermelés mellett csak kis sejtnövekedés észlelhető.

3.5 A citromsav kinyerésének folyamata

A fermentáció végén 10-13 % citromsav halmozódik fel. A technológia második szakasza, a feldolgozás a tisztított céltermék kinyerése. A műveletsorban meg kell szabadulni a szilárd fázistól (sejtek), a termékhez hasonló kis molekulájú szennyezésektől (pl. oxálsav) és nem utolsósorban a víztől.

1. A biomassza elválasztása

A szűrhetőség szempontjából a pelletes szerkezet az ideális, a szuszpenzió newtoni folyadékként viselkedik. A micéliumokat általában vákuum dobszűrővel választják el. Ha szűrősegédanyagra is szükség van, az ásványi anyagok helyett gyakran növényi melléktermékeket (pelyva, szalmatörök) használnak.

2. Oxalátmentesítés

A citromsav-fermentáció során a leggondosabban vezetett fermentációs technológia mellett is mindig képződik kis mennyiségű oxálsav. A szűrt fermentlé első kezelése ennek elválasztására szolgál. Az elválasztás elve azon alapul, hogy a kalcium-oxalát rosszul oldódik vízben, így az oxálsav mésztejjel reagáltatva kicsapható. A gondot az jelenti, hogy ugyanez igaz a citrátra is, abból is csapadék képződik. A megoldás a kalciumhidroxid fokozatos hozzáadása, amivel „megtitráljuk” a fermentlevet. Kevés kalcium-hidroxid bevitelével az oxalát leválik, míg az egybázisú (mono-)kalcium-citrát (a hárombázisúval ellentétben) elég jól oldódik.

3. A citromsav kicsapása

A citromsav elválasztásának klasszikus módja a kicsapás kalcium-citrát formájában. Ehhez további mésztejet adagolnak az oldatba, ami teljes mértékben semlegesíti a savat és trikalcium-citrát képződik. A kicsapás menetét befolyásoló technológiai paraméterek:

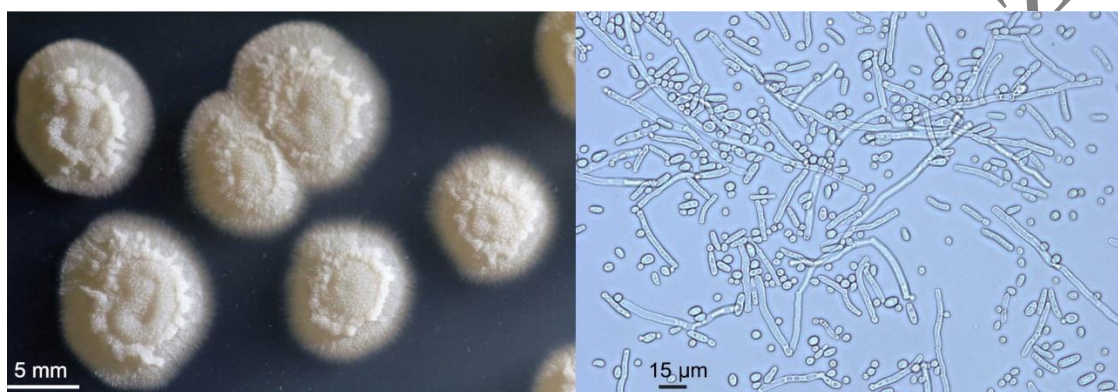
- a citromsav koncentrációja
- a hőmérséklet
- a pH
- a kalcium-hidroxid adagolás üteme (Pécs és mtsai 2011).

3.6 A *Yarrowia* nemzetség általános jellemzése

A legutóbbi filogenetikai besorolás szerint a *Yarrowia* nemzetség (10. ábra) a *Saccharomycetes* osztályban, a *Saccharomycetales* rendben helyezkedik el és a *Wickerhamiella* testvércsoportja (Kurtzman 2011). A nemzetség modellszervezeteként is ismert *Yarrowia lipolytica* igen széleskörűen vizsgált élesztőgomba faj.

Ivartalan szaporodása multilaterális sarjadzással történik. Sejtjei gömb vagy elipszoid alakúak, gyakran megnyúltak. Környezeti viszonyoktól függően hifákat hoz létre, amelyek közepén helyezkedik el a mikropórussal rendelkező szeptum. Anamorf alakja a *Candida lipolytica*. A *Y. lipolytica* erős lipolitikus és proteolitikus-aktivitással rendelkezik. A környezetében található zsírokat, lipideket, fehérjéket szén- és energiaforrásként igen hatékonyan hasznosítja, ami miatt az élelmiszerek romlását idézi elő. Groenewald és munkatársai (2013) kutatásuk során számos élelmiszer-mátrixban, mint tejtermékekben

(sajtok, joghurtok), húskészítményekben, továbbá üdítőitalokban, alkoholos italokban (borok), gyümölcsökön és zöldségeken, majonézben, saláta öntetekben, hűtött és fagyasztott élelmiszerekben is izolálták. Hazai és nemzetközi kutatások alapján láthatóvá vált, hogy az említett élelmiszerekben igen gyakori élesztőgombafaj. Fleet (2006) tanulmányában leírtak alapján az élesztőfaj a joghurtok esetén a mikrobiota 15%-át, a hűtött körülmények között tárolt baromfihús és –belsősegek esetén 39%-át, marhahús esetében pedig akár 69%-át is kiteheti. A *Yarrowia* élesztők életképességét emellett kommunális és ipari szennyvizekben is kimutatták.



10. ábra: *Yarrowia lipolytica* élesztőtelepek PCA táptalajon (Plate Count Agar) (baloldal) és a sejtek mikroszkopikus (1000x nagyítás) felvétele (jobboldal) (Zinjarde és mtsai. 2014)

Kedvezőtlen tulajdonságai ellenére ma már az élelmiszeriparban, a biotechnológiában és más ipari ágazatokban is hasznosítják az anyagcsere-termékeit (Patrignani és mtsai. 2011):

- enzimek (lipáz, proteáz, foszfátáz, inulináz, stb.),
- pigmentek, antioxidánsok (karotinoidok),
- szerves savak (citromsav),
- cukor-alkoholok (mannit, eritrit),
- aminosavak (lizin)

A *Y. lipolytica* olajos élesztő, ami azt jelenti, hogy sejtjei több mint 20% zsírtartalmúak. A lipideket többnyire triacil-gliceridként (TAG) tárolják. Ezen fiziológiai tulajdonsága teszi őt különösen érdekessé a lipidszármazékok előállításában. A termelés optimalizálása, valamint a genetikailag módosított törzs(ek) lehetőséget adnak a nagy mennyiségű eikozapentaénsav (EPA) előállítására (Portmann és Wilson 1971). Az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság (EFSA) (2019) biztonságosnak nyilvánította és elfogadta a lengyel Skotan S. A. vállalat által fejlesztett *Y. lipolytica* élesztő biomasszákat tartalmazó

étrend-kiegészítő (3 g/nap 10 éves kor alatt és 6 g/nap fiataloknak és felnőtteknek) kereskedelmi forgalomba hozatalát (Szűcs 2019). Az élesztőfaj egyéb alkalmazási potenciálja között említhető a tisztítószer- és gyógyszeripar, de akár a környezetvédelemben (olajos szennyvizek kezelése) bioremedációs célokra is hasznosítható.

Az élesztőfaj újszerű kutatási területei körében az elmúlt évek publikációinak jelentős része a bioszintézis útvonalak (metabolit termelést befolyásoló tényezők) részletesebb feltérképezéséhez, valamint a genetikailag módosított törzsek fejlesztéséhez (expressziós rendszerek) kapcsolódott (Zhu és Jackson 2015). Az ipari ágazatok szerves sav iránti igénye egyre nagyobb mértékben nő. A *Y. lipolytica* kiválóan hasznosítható gazdaságilag értékes szerves savak: piroszőlősav, citrát-kör intermedierei (citromsav, izocitromsav, α -ketoglutársav, borostyánkősav) termelésére (Gaillardin és mtsai. 2000).

A *Y. lipolytica* ipari alkalmazásának úttörője a British Petroleum (BP) volt. 1957-ben kezdett el a kiváló minőségű fehérje, úgynevezett „single cell protein” (SCP), egysejtfehérje-előállítás területén tevékenykedni annak érdekében, hogy a növekvő népesség számára elegendő tápanyagkészletet biztosítson. Az ezt követő években kezdték el a *Candida lipolytica*-t és a *C. tropicalis*-t e területen alkalmazni. Szardínián építettek egy évi 100.000 tonna termelésére alkalmas üzemet, azonban a termék bizonyított biztonságossága ellenére az olasz hatóságok megtagadták az engedélyeket. E kudarc és a nyersanyagok árának nagymértékű emelkedése miatt a BP úgy döntött, hogy SCP termékeit humán élelmezésre való alkalmazása helyett haszonállatok takarmányozására fejleszti tovább, ehhez kapcsolódóan kiemelkedő számú és mértékű biztonsági vizsgálatot végzett (Groenewald és mtsai. 2013).

2009-től a lengyel Skotan SA vállalat termel Európában *Y. lipolytica* biomasszát takarmányélesztőként való használat céljából (1200 tonna/év) (Rywinska és mtsai. 2013).

Mirbagheri és munkatársai (2012) tanulmányából kiderül, hogy a *Y. lipolytica* még az általánosan alkalmazott *Aspergillus niger*-nél is hatékonyabban alkalmazható citromsavtermelésre. A citromsav termeléséhez magas citrát-szintáz-aktivitás (CS) és más trikarbonsav-ciklus (TCA) enzimek alacsony aktivitása szükséges, hogy elkerülhető legyen a citromsav további metabolizmusa a cikluson keresztül (Finogenova és mtsai 2002, Kamzolova és mtsai 2011). A citromsav bioszintézise emellett egy olyan folyamat, ami csak közvetett módon kapcsolódik a növekedési szakaszhoz, ezért szükséges a növekedés és a szintézis időben vagy térben történő szétválasztása (Elmer és Gaden 1959).

Ezen kívül egyéb szerves savak termelésére is kiválóan alkalmas, például izocitromsav, α -ketoglutársav, piroszölősav, borostyánkősav és ecetsav termelésére is (Zhou és mtsai. 2012).

A *Y. lipolytica*-t mannit-, eritrit- és arabinit termelésére is alkalmazzák (Tomaszewska és mtsai. 2012). A *Y. lipolytica*-val termeltetett eritritet felhasználják élelmiszeradalékként, édesítőszerként, ízfokozóként, nedvesítőszerként, stabilizátorként, sűrítőanyagként, kelátképzőként és állományjavítóként (Groenewald és mtsai. 2013).

Mivel a *Y. lipolytica* nagy mennyiségű lipidet képes felhalmozni sejten belül az úgynevezett lipidtestekben, így a kutatások már lipofil komponensek túltermeltetésére is irányultak. A linolénsav a legfőbb *Y. lipolytica*-val termeltetett többszörösen telítetlen zsírsav, de a génszűrés segítségével fejleszthetők olyan rekombináns törzsek is, amelyek túltermelik például az eikozapentaénsavat (EPA), dokozaheksaénsavat, arachidonsavat, konjugált linolénsavat vagy a γ -linolénsavat is (Zhang és mtsai. 2012).

A *Y. lipolytica*-t alkalmazzák karotinoidok termeltetésére is, amit élelmiszerek és takarmányok természetes színezőanyagként és stabilizátorként használnak fel (Bailey és mtsai. 2008; Sharpe és mtsai. 2008).

Szintén használható aromavegyületek, például 3-hidroxi- γ -dekalakton, 2-feniletil acetát és γ -dekalakton előállítására, utóbbinak jellegzetes barackíze van (Bialecka-Florjanczyk és mtsai. 2012).

A *Y. lipolytica* alkalmas terápiás és ipari fehérjék és enzimek termelésére is. LIP2 lipáza az exokrin hasnyálmirigy-elégtelenség terápiás anyagként szolgálhat (Turki és mtsai. 2010). Használják lizoszómális tárolási betegségek kezelésénél használható enzimek termelésére (Geysens és Vervecken 2011) és gyógyszerek költséghatékony gyártásában használatos epoxid-hidrolázok termelésére is (Botes és mtsai. 2007).

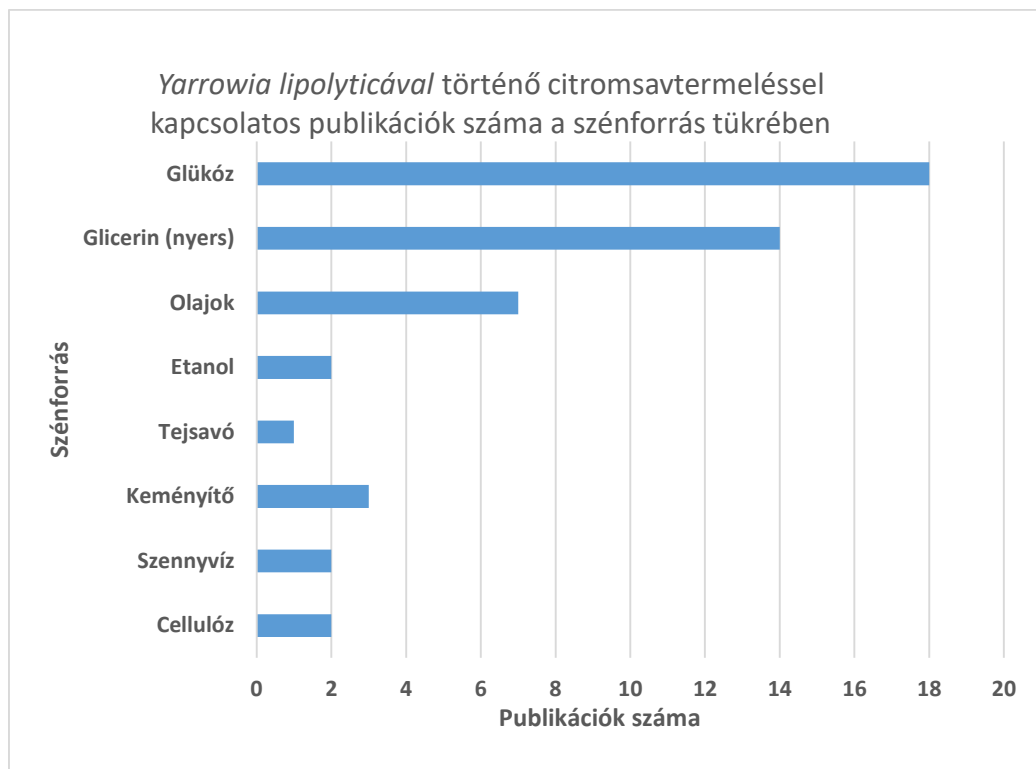
4 EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

4.1 Tápközeg összetétel hatása

4.1.1 Szénforrás

A szénhidrátok körében többnyire könnyen hasznosítható cukrokat, mint glükózt, fruktózt, szacharózt, valamint összetettebb agro-ipari melléktermékeket/hulladékokat, mint melaszt, búzakupát, kukoricacsutkát, sőt akár trópusi gyümölcsök maradványait (kakaó, banán, szója és ananász) hasznosítanak a *Y. lipolytica* citromsavtermelésének tanulmányozása során. A technológia költségeinek szempontjából kritikus tényező az alapanyag jellege és amennyiben az alapanyag természete igényli, úgy az előkezelés kivitelezése. A melasz kiváló szénforrás, szacharóz tartalma mintegy negyven százalék és nitrogén tartalma is elegendő. Gondot jelentenek azonban az általában jelentős mennyiségű, a cukorrépa termesztése során a talajból fölvetett fémionok, mint a vas, a mangán és a cink ionok. A szénhidrátban (cellulóz, hemicellulóz) gazdag agro-ipari növényi maradványok komplex tápanyagforrásként lehetőséget kínálnak a mikrobiális citromsavtermelésre, tekintettel ezen anyagok bőséges mennyiségben és viszonylag olcsóbban történő elérhetőségére.

Az 11. ábra összefoglalja azokat a szénforrásokat (cellulóz, szennyvíz, keményítő, tejsavó, etanol, olajok, glicerín, glükóz), amelyeket a leginkább használtak citromsav előállításához a *Y. lipolytica* esetén. A szénforrás típusa és mennyisége is jelentős mértékben befolyásolhatja a citromsav hozamot, a termelékenységet és a citromsav/izocitromsav arányt is (Fickers és mtsai. 2005).



11. ábra: A *Y. lipolytica*-val történő citromsavtermeléssel kapcsolatos publikációk száma és szénforrásainak típusai az elmúlt két évtizedből. (Liu és mtsai. 2014)

Kedvező termelési profilt ezidáig az olajok, alkoholok, glükóz, glükóz-hidrol, keményítő és cellulóz-hidrolizátumok, melasz, invertcukor-keverékek vagy akár az agroipari szennyvizek esetén írtak le (Liu és mtsai. 2014).

Yalcina és munkatársai (2009) a *Y. lipolytica* NBRC 1658 és a *Y. lipolytica* 57 törzs citromsav termelési profilját hasonlították össze glükóz táptalajon. A *Y. lipolytica* 57 törzs nagy citromsav hozamot eredményezett.

Az alábbi 1. táblázat néhány vad típusú és mutáns *Y. lipolytica* törzs citromsavtermelésének eredményeit szemlélteti különböző szénforrásokon.

1. táblázat: A citromsav termelékenység és a citromsav/izocitromsav arány alakulása különböző szénforrásokon (Cavallo és mtsai 2017)

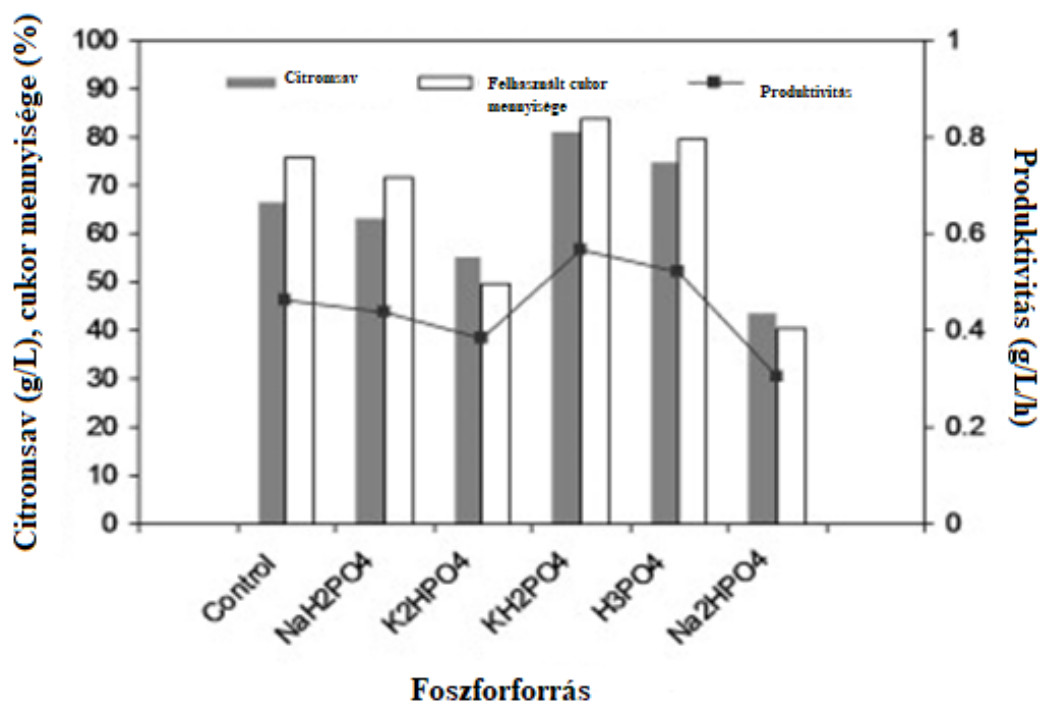
Törzs	Szénforrás	Kézdeti szubsztát koncentráció (g/L)	Fermentáció időtartama (h)	Végleges citromsav koncentráció (g/L)	Citromsav / Izocitromsav aránya	Végleges termelékenység (g/L* ^h)	Referencia
NRRL-Y1095	Glikóz	150	96	50	7	0,54	Rane és Sinns (1993)
ACA-YC 5031	Glikóz	30	72	1,9	N/A	0,03	Papanikolaou és mtsai (2009)
ACA-YC 5028	Glikóz	30	98	8,2	N/A	0,08	Papanikolaou és mtsai (2009)
W29	Glikóz	30	142	18	N/A	0,13	Papanikolaou és mtsai (2009)
H222	Glikóz	160	42	62	10,1	1,48	Moeller és mtsai (2010)
VKM 2373 (WT)	Napraforgó olaj	20	144	68	1,2	1,05	Kanzolova, Finogenova és Morgunov (2008)
N15 (M)	Napraforgó olaj	20	144	150	30	1,56	Kanzolova, Finogenova és Morgunov (2008)
WT A-101 (WT)	Tiszta glicerín	150	100	66,5	3,7	0,65	Rywinska és mtsai (2010)
W 1.31 (M)	Tiszta glicerín	150	100	82	24	0,79	Rywinska és mtsai (2010)
AWG7 (M)	Tiszta glicerín	150	100	82,9	27	0,66	Rywinska és mtsai (2010)
W 1.31	Tiszta glicerín	150	100	82	24	0,79	Rywinska és mtsai (2010)
W 1.31	Nyers glicerín	150	100	63,9	20	0,65	Rywinska és mtsai (2010)
N15	Tiszta glicerín	170	144	98	30	1,14	Kanzolova és mtsai (2011)
N15	Nyers glicerín	100	144	71	12,7	0,89	Kanzolova és mtsai (2011)
NG40/UV7	Tiszta glicerín	20	192	115	25	0,6	Morgunov, Kanzolova és Lunina (2013)
NG40/UV7	Nyers glicerín	20	192	112	21	0,58	Morgunov, Kanzolova és Lunina (2013)
LGAM (S)7	Glikóz	34	134	10,5	N/A	0,08	Papanikolaou és mtsai (2009)
LGAM (S)7	Glikóz	42	140	15	N/A	0,11	Papanikolaou és mtsai (2009)
LGAM (S)7	Glikóz	52	220	20,1	N/A	0,09	Papanikolaou és mtsai (2009)
LGAM (S)7	Glikóz	150	555	42,9	N/A	0,08	Papanikolaou és mtsai (2009)
ACA-YC 5033	Nyers glicerín	70	187	28	N/A	0,15	André és mtsai (2009)
ACA-YC 5033	Nyers glicerín	90	220	31,2	N/A	0,14	André és mtsai (2009)
ACA-YC 5033	Nyers glicerín	120	275	50,1	N/A	0,18	André és mtsai (2009)

4.1.2 Nitrogénforrás

A *Y. lipolytica* egyformán jól hasznosítja a szerves és a szervetlen nitrogénforrásokat: az ammónium és a nitrát sókat, a karbamidot, a melasz nitrogén tartalmú vegyületeit. A nitrogén limitáció hatására az izocitromsav-szintézis csökkenthető. A szabályozó mechanizmusoknál már említésre került, hogy az NH_4^+ ionok korlátozott jelenléte növeli a foszfo-fruktokináz aktivitást, ezzel serkenti a sejtek növekedését és fokozza a citromsavtermelést. Az anyagcsere során az ammónia elfogyasztásával a közeg savanyodik, ami fokozza a citromsavképződést, míg a pigment és nyálkaképződés csökken. Ettől tisztább a termék és egyszerűbb a feldolgozás (Kavšček és mtsai. 2015).

4.1.3 Foszforforrás

Az oldható foszfátok a foszfo-fruktokináz deregulálását eredményezik, ezáltal beindítják a glikolízist és elősegítik a citromsav és oxálsav képződést (13. ábra) (Mostafa és mtsai. 2012).



13. ábra: A foszforkoncentráció hatása a citromsavtermelésre
(Mostafa és mtsai 2012)

4.1.4 Nyomelemek

A vas, a mangán és a cink ionoknak szabályozó hatást fejtenek ki a morfológiára és a citromsavtermelésre is (Kumar és mtsai. 2021)

Finogenova és munkatársai (2002) arról számoltak be, hogy az alacsony vaskoncentráció az izocitromsav képződését, továbbá lassú sejtbiomassza növekedést, és piruvát-karboxiláz aktivitás csökkenését eredményezte. Míg, ha nagy koncentrációban biztosított a vas jelenléte, úgy mivel az az akonitáz enzim kofaktora is, az a citromsav tovább alakulását fokozza. Az optimális koncentráció a szaporodási szakaszban $\sim 2000 \mu\text{g Fe/liter}$, később, a savtermelő szakaszban viszont csak $50\text{-}200 \mu\text{g/l}$. A melasz szénforrás estében a vastartalmat ioncserével csökkentik. Menet közben a vasionokat K-ferrocianid hozzáadásával lehet megkötni, komplex formában pedig könnyen eltávolítható a rendszerből. Morgunov és munkatársai (2018) kísérleteik során arról számoltak be, hogy az általuk vizsgált *Y. lipolytica* intenzív citromsavtermeléséhez nagy mennyiségű ($2,0 - 2,5 \text{ mg/g}$) intracelluláris vasra volt szükség. Azonban, ha a sejten belül a vasfrakció elérte a $7,0 \text{ mg/g}$ értéket, úgy a citromsavtermelés teljesen gátolt volt.

Yalcina és munkatársai (2009) tanulmányuk során a *Y. lipolytica* K57 törzs esetében a citromsavtermelés fermentációs közeghez adagolt cink sótól nőtt, nagyobb termelékenységet 0.008 g/liter cink-koncentrációnál érték el.

A fémion koncentráció szempontjából fontos a bioreaktor anyaga is. Ha a fermentor nem jó minőségű rozsdamentes acélból készül, akkor a sav hatására vas és más fémionok oldódnak ki (Yalcina és mtsai. 2009)

A tápközeg hatásának összegzéseként az alábbi táblázat az egyes komponensek határértékeit és hatásuk irányát szemlélteti a *Y. lipolytica* citromsavtermelésére vonatkozóan (2. táblázat).

2. táblázat: Tápközeg egyes komponenseinek hatása (Soccol és mtsai. 2006)

Tényező neve	Pozitív hatás	Szint	Negatív hatás
Szénforrás	Szacharóz	14-22%	Keményítő
	Glükóz		Xilóz
	Fruktóz		Arabinóz
	Galaktóz		Szorbit
			Piroszőlősav
Foszforforrás	Kálium-dihidrogén-foszfát	alacsony (0,5-5,0 g/L)	
Nitrogénforrás	Ammónium-nitrát	25% alatt (0,1-4,0 g/L)	Magas koncentrációk (biomassza termelés)
	Ammónium-szulfát		
	Pepton		
	Maláta kivonat		
	Karbamid		
Nyomelemek	Cink	alacsony (0,02-0,025%)	Mangán (1 ppm)
	Réz		
	Magnézium-foszfát		
Alacsonyabb rendű alkoholok	Metanol	1-4%	
	Etanol		
	n-propanol		
	Izopropanol		
	Metil-acetát		
Olajok és zsírok		0,05-3%	
Ionok és ásványi sók	FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,01-0,1 g/L	
	CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,001-0,02 g/L	
	MnSO ₄ · 4 H ₂ O	0,005-0,05 g/L	
	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,002-0,008 g/L	
Egyéb vegyületek	Kalcium-fluorid		Kálium-ferrocianid
	Nátrium-fluorid		Kvaterner ammónium vegyületek
	Kálium		Amin-oxidok
	3-hidroxi-2-naftoinsav		
	4-metil-umbelliferon		
	Benzoesav		
	2-naftoinsav		
	Vas-cianid		
	EDTA		
	Vermikulit		
	H ₂ O ₂		

4.2 Hőmérséklet

A *Yarrowia lipolytica* általában 32–34°C között képes növekedni (Nicaud 2012), de az optimális hőmérséklet 26°C és 30°C között van (Cavallo és mtsai 2017). Ez a hőmérséklet azonban nem feltétlenül azonos a metabolitok termelésének optimális növekedési hőmérsékletével (Bozdemir és Ozbas 2010).

A hőmérsékletet jellemzően 28-33 °C tartományban szabályozzák, e fölött az oxálsav képződése nő, alacsonyabb hőfokon pedig lelassul a folyamat. Moeller és munkatársai (2007) megfigyelték, hogy a *Y. lipolytica* H222 törzs a 30°C és 34 °C között tartományban kedvezőbben növekedett, míg a citromsav-termelésnek a 30 °C kedvezett. Hasonló eredményeket figyelt meg Yalcin, Bozdemir és Ozbas (2010) is. Finogeva és munkatársai (2002) kísérletei során a *Y. lipolytica* N1 növekedése és citromsav termelése még 35 °C-on is megfigyelhető volt glükóz tartalmú szubmerz rendszerben.

4.3 Kémhatás

Egyéb környezeti tényező, amelyet szabályozni kell a citromsav termelése során, az a fermentációs rendszer kémhatásának alakulása. Az élesztők esetében az optimális pH-tartomány magasabb, mint a fonális gombáknál (pH=2-3). Ennek magyarázata, hogy a pH=4,5 alatti értékek befolyásolhatják az élesztősejt membránjának permeabilitását, ami mind a szubsztrátum, mind a termék alacsony transzportját eredményezi (Morgunov és mtsai. 2013). Zhang és munkatársai (2018) kísérleteik során szintén megerősítették, hogy *Y. lipolytica* W29 törzs esetén a pH szabályozásával a citromsav és a lipidtermelés fokozható. A pH tehát - különösen a vad típusú törzsek esetén - nagy hatással van a citromsav/izocitromsav arányra.

A szakirodalmak alapján a *Y. lipolytica* optimális pH-tartománya 4,5-7 között található (Moeller és mtsai. 2007, Morgunov, Kamzolova és Lunina 2013). Kamzolova és munkatársai (2008) a tápközeg kémhatásának vizsgálata során megállapították, hogy a pH szabályozás serkentette a citromsav transzportját a sejtmembránon keresztül, míg az izocitromsav transzportja már pH-függetlennek bizonyult. Esetükben a *Y. lipolytica* VKM Y-A 2373 törzs megközelítőleg egyenlő arányban termelt citromsavat és izocitromsavat pH=4,5 értéken, míg pH=6 értéken túlnyomórészt izocitromsav keletkezett. Finogeva és munkatársai (2000) által végzett kísérlet során a *Y. lipolytica* NBRC 1658 és *Y. lipolytica* K57 törzs citromsav-

termelését pH=4,2 – 8,5-ös tartományban követték nyomon, majd megállapították, hogy a citromsav-termelésnek a pH=5.2 – 7.0 tartomány, a 30 °C és 2 g/L NH₄Cl jelenlét kedvezett.

4.4 Levegőztetés és oxigénigény

A *Y. lipolytica* oxigén igénye nem nagy, de nagyon érzékeny az oldott oxigén szint csökkenésére. Ha csak átmenetileg, de néhány percre az oldott oxigén koncentráció: 20-30 relatív % alá csökken, akkor a citromsavtermelés lelassul és megáll. A levegőztetés növelése után az anyagcsere, a sejtek növekedése újraindul, de a citromsavtermelés nem, vagy csak nagyon kis sebességgel (Pécs és mtsai. 2011).

A túl nagy áramlási sebesség hatására csökkenhet az anaplerotikus reakciókhoz szükséges szén-dioxid szint, másrészt erős párologást idézhet elő. A levegőt a kevertetett reaktorokban 0,5-1 liter/perc árammal táplálják be, de tiszta oxigén befűvatasára is lehetőség van. A termelési folyamat elején kevesebb levegő is elegendő, később azonban növelni kell a levegőztetés mértékét. Az oxigén bevitelét jelentősen befolyásolja termelő törzs oxigénigénye, a hőmérséklet, a nyomás és a tápanyag összetétele is.

A *Y. lipolytica* szigorúan aerob élesztő, ezért a levegőztetés alapvető fontosságú tényező. Az elégtelen oxigénellátás a CS enzim működésképtelenségéhez vezethet, így közvetlenül befolyásolja a citromsav szintézist (Il'chenko és mtsai. 2002, Rywinska és mtsai. 2012).

Több publikáció szerzője is pozitív hatással számolt be arról, hogy az oldott oxigén nagyobb mennyisége a citromsav szintézisnek kedvez, az izocitromsav szintézist pedig csökkentti (Okoshi és mtsai. 1987, Rywinska és mtsai. 2012). A citromsavtermelési optimum az 50–80%-os telítettség tartományon belül bizonyult kedvezőnek (Morgunov, Kamzolova és Lunina 2013). Amennyiben kevertetett és levegőztetett reaktorban valósul meg a citromsav-termelés, úgy a kevertetés sebessége is hatással van az oldott oxigén szintre. A magasabb fordulatszámon indított kevertetés a levegőbuborékok rövidebb tartózkodási idejét eredményezi a fermentációs rendszerben, ami a termelés csökkenéséhez vezet (Makri, Fakas és Aggelis 2010).

4.5 Különböző fermentációs technológiák

A fermentációs technológiákat tekintve a rátáplálásos (feed-batch) és az ismételt inokulum leoltás (repeat-batch) bizonyulnak ígéretesebb lehetőségeknek a termelékenység növelésének szempontjából. Arzumanov és munkatársai (2000) által végzett kísérletsorozatban a *Y.*

lipolytica VKM Y-2373 törzs citromsavtermelését követték nyomon szakaszos technika esetén. Az inokulum ismétlődő rátáplálása során a tápközegből az élesztősejteket időközönként eltávolították (24, 48 és 72 órás ciklusokban) és friss inokulummal (20, 50 és 80 %) azt ismételten leoltották. A technika jobb eredményeket mutatott, mint önmagában a szakaszos fermentáció, és a citromsav hozamot is sikeresen növelte. A termelés során a citromsav hozam körülbelül 10%-kal volt magasabb. A rendszer 32 napon át megtartotta működőképességét. Kedvezőbb citromsav hozamot a 72 óránként, 50-80 % inokulum leoltási ráta mutatott, ez esetben a citromsav koncentráció elérte a 105 g/liter értéket.

A folyamatos citromsav termelés optimalizálását szilárd hordozóhoz rögzített *Y. lipolytica* esetén többek között glükóz szubsztrátumon is nyomon követték (Kautola és mtsai. 1991, Rane és Sims 1995). Ekkor ugyan nagyobb citromsav koncentráció érhető el, de az élesztősejtek életképességének és aktivitásának hosszabb távon történő fenntartása nehéz. Arzumanov és társai (2000) emellett arra is rámutattak, hogy a folytonos rendszerek időtartama az alapanyagtól is függ, így például az etanolon történő gyorsabb ütemben zajlik le, mint glükózon.

Carsanba és munkatársai (2019) a vad típusú *Y. lipolytica* törzsek körében jelenleg magasabb citromsav-termelést a K57 törzs esetén értek el. Jelenleg azonban nincs másik vad típusú *Y. lipolytica* törzs, amely elérte volna a citromsavra jellemző 72,12 g/liter koncentrációt és a 0,77 g/g hozamot glükóz szubsztrátum jelenlétében, szakaszos fermentáció során. A *Y. lipolytica* K57 törzs akár nagyüzemi citromsavtermelésre is alkalmas lehet magas szénhidrát tartalmú növényi maradványokon is.

A citromsav/izocitromsav szintézis szabályozásának másik lehetséges irányvonala a mutáns *Yarrowia* törzsek alkalmazása. Mind az akonit-hidratáz (AH) gének megszakítása, mind az izocitrát-liáz (IL) túltermelése az izocitromsav szintézis csökkenéséhez és a citromsav szint növekedéséhez vezethet (Forster és mtsai. 2007).

5 ÖSSZEFOGLALÁS

A gyógyszer-, élelmiszer- és vegyipar széles körben alkalmazza a citromsavat, mivel biztonságos anyagként ismerik el, emellett kellemesen savas ízű, magas a vízdoldhatósága, valamint egyéb mellett jó kelátképző és pufferképző képességgel rendelkezik. A citromsav széles felhasználási skálája és az új, feltörekvő alkalmazásai indokoltá teszik a globális termelésének éves növekedését, ezáltal a mikrobiális kutatási (és ipari) terület folytonos fejlődést igényel, hogy kielégítse a folyamatosan növekvő keresletet.

Bár a jól bevált technológia átalakítása (a penészgombákkal történő termelésből átalakulni az élesztőgombákkal történő termelésre) jelentős beruházásokkal járna, de az erőfeszítés kompenzálható, ha a citromsav termelése egy biofinomító szerkezet részévé válik, amelyben az enzimeket, az egysejtű fehérjéket és az egysejtű olajokat egyidejűleg állítják elő, így a folyamat jövedelmezőbb és környezetbarátabb lenne (Cavallo és mtsai 2017). És míg az *Aspergillus niger*, mint legfőbb ipari citromsavtermelő egység növényi- és emberi patogén (kórokozó), addig a *Yarrowia lipolytica* megkapta a GRAS minősítést (Generally Recognized as Safe = általánosságban elismerten biztonságos).

Az *A. niger* és a *Y. lipolytica* eltérő módon termelik a citromsavat, valamint ipari felhasználásukban, alkalmazásukban is különbségek mutatkoznak:

Metabolizmus: Az *A. niger* az oxidatív trikarbonsav (TCA) cikluson keresztül termeli a citromsavat, míg a *Y. lipolytica* a glioxilát- és a trikarbonsav (TCA) ciklusokon keresztül.

Szubsztrátumfelhasználás: Az *A. niger* a szénforrások széles skáláját fel tudja használni, beleértve a glükózt, szacharózt, valamint a melaszt a citromsav előállításához, a *Y. lipolytica* viszont a cukrokon kívül zsírsavakat, szénhidrogéneket és glicerint is képes hasznosítani. Ezen szubsztrátumok alkalmazásakor a citromsav hozam elérheti a 140 g/L mennyiséget is. (Yuzbasheva és mtsai. 2021)

Ipari alkalmazásuk: Az iparban a legelterjedtebb citromsavtermelő az *A. niger*, felhasználják az élelmiszeriparban, a gyógyszeriparban, valamint a tisztítószer gyártásához is. Ezzel szemben a *Y. lipolytica* potenciálisan alkalmazható bioüzemanyagok és más egyéb biotermékek előállítására.

A *Y. lipolytica* optimális növekedési hőmérséklete 34 °C alatt van és nagymennyiségben képes többek között citromsavat, izocitromsavat és α -ketoglutársavat termelni, illetve meglehetősen toleráns az alacsony pH-értékkel szemben (a növekedéshez és citromsavtermelés maximalizálásához optimális kémhatás a 4,5-7 pH-értéktartományban helyezkedik el). Egy ipari, folyamatos technológiai folyamat megvalósítása azonban a mai napig nehézségekbe ütközik. Mivel azon hígítási arányokkal, ahol a *Y. lipolytica* kultúra maximális fajlagos termelékenységgel rendelkezik, ott lehetetlen kinyerni elég magas termékkoncentrációt a közegből (Arzumanov és mtsai 2000).

A publikációk áttekintése azt bizonyítja, hogy a kutatók nagy erőfeszítéseket tettek annak érdekében, hogy a citromsavtermeléshez felhasznált drága nyersanyagokat olcsóbb szubsztrátumokkal helyettesítsék. Ez különös módon a *Y. lipolytica* különböző törzseire igaz, hiszen a *Yarrowia* képes citromsavat termelni például mezőgazdasági melléktermékekből vagy maradványokat is felhasználhat a hatékony termelésre (pl. glicerint vagy növényi olajokat). A termelékenységet fokozhatja a táptalaj összetétele is, viszont a szubsztrátum kiválasztása mellett felügyelni kell a környezeti paramétereket is (pl. hőmérséklet és kémhatás) (Cavallo és mtsai. 2017).

Annak ellenére, hogy a citromsav nagyüzemi előállítása továbbra is főként *A. nigerrel* történik, a *Y. lipolytica* egy lenyűgöző alternatíva lehet az ipar számára, köszönhetően annak, hogy a fonalgombákhoz képest könnyebb a tenyésztetősége, magasabb a termelékenysége, a felhasznált szubsztrátumokra vonatkozó minőségi követelmények alacsonyabbak (gazdaságosabbak), valamint a *Y. lipolytica* egysejtűségéből adódóan könnyebb a törzsképzés lehetősége. Ezen pozitív tényezők mind hozzájárulnak ahhoz, hogy az élesztőkkel (különösképpen a *Yarrowia lipolytica*-val) történő citromsavgyártás az ipar számára egy kedvező alternatíva legyen.

6 IRODALMI HIVATKOZÁS

- Anastassiadis S., Aivasidis A., Wandrey C. (2002): Citric acid production by *Candida* strains under intracellular nitrogen limitation, Appl. Microbiol. Biotechnol. 60 (1–2):81–87
- Arzumanov, T., Shishkanova, N. & Finogenova, T. (2000): Biosynthesis of citric acid by *Yarrowia lipolytica* repeat-batch culture on ethanol. Appl Microbiol. Biotechnol. 53, 525–529. <https://doi.org/10.1007/s002530051651>
- Baldwin JE, Krebs H. (1981): The evolution of metabolic cycles, Nature. 291(5814):381-2.
- Behera, BC, Mishra, R, Mohapatra, S. (2021): Microbial citric acid: Production, properties, application, and future perspectives. Food Frontiers. 62– 76. <https://doi.org/10.1002/fft2.66>
- Botes AL, Labuscagne M, Roth R, et al. (2007): Recombinant yeasts for synthesizing epoxide hydrolases. International Patent Application WO 2007/010403 A2.
- Carsanba E., Papanikolaou S., Fickers P., Agirman B., Erten H. (2019) Citric Acid Production by *Yarrowia lipolytica*. In: Sibirny A. (eds) Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21110-3_4
- Carsanba, Erdem & Papanikolaou, Seraphim & Fickers, Patrick & Erten, Hüseyin. (2019): Screening Various *Yarrowia lipolytica* Strains for Citric Acid Production. Yeast, <https://doi.org/10.1038/291381>
- Currie J.N. (1917): The citric acid fermentation of *Aspergillus niger*. J Biol Chem; 31:15–37.
- EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (2019): Safety of *Yarrowia lipolytica* yeast biomass as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283
- Ema Cavallo, Hernán Charreau, Patricia Cerrutti, María Laura Foresti (2017): *Yarrowia lipolytica*: a model yeast for citric acid production, FEMS Yeast Research, Volume 17, Issue 8 <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox084>

- Groenewald M., Boekhout T., Neuvéglise C., Gaillardin C., van Dijck P.W.M., Wyss M. (2013): *Yarrowia lipolytica*: Safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. Critical Reviews in Microbiology, 40 (3):187-206. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/1040841X.2013.770386>
- Groenewald M., Smith M.T. (2013): The teleomorph state of *Candida deformans* Langeron & Guerra and description of *Yarrowia yakushimensis* comb. nov. Antonie van Leeuwenhoek, 103 (5):1023-1028. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-013-9882-8>
- Groenewald, M. et al. (2014): *Yarrowia lipolytica*: Safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. Critical Reviews in Microbiology 40:187-206
- H.S. Grewal, K.L. Kalra (1995): Fungal production of citric acid, Biotechnology Advances, Volume 13, Issue 2, Pages 209-234, ISSN 0734-9750, DOI: [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(95\)00002-8](https://doi.org/10.1016/0734-9750(95)00002-8).
- Heretsch P., Thomas F., Aurich A., Krautscheid H., Sicker D., Giannis A. (2008): Syntheses with a chiral building block from the citric acid cycle: (2R,3S)-isocitric acid by fermentation of sunflower oil. Angewandte Chemie-International Edition In English, 47:1958-1960. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200705000>
- Internet1: <http://citromsavnagyker.com/citromsav/>
- Internet2: <https://www.livescience.com/54282-lemon-nutrition.html>
- Internet3: <https://microcal-origin.software.informer.com/6.0/>
- Kamzolova S.V., Chiglintseva M.N., Lunina J.N., Morgunov I.G. (2012): α -Ketoglutaric acid production by *Yarrowia lipolytica* and its regulation. Applied Microbiology and Biotechnology, 96:783-791. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-012-4222-x>
- Kamzolova S.V., Yusupova A.I., Vinokurova N.G., Fedotcheva N.I., Kondrashova M.N., Finogenova T.V., Morgunov I.G. (2009): Chemically assisted microbial production of succinic acid by the yeast *Yarrowia lipolytica* grown on ethanol. Applied Microbiology and Biotechnology, 83:1027-1034. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-009-1948-1>
- Kamzolova, S. V., Shishkanova, N. V., Morgunov, I. G., Finogenova, T. V. (2003): FEMS Yeast Res. 3

- Kavšček, Martin & Bhutada, Govindprasad & Madl, Tobias & Natter, Klaus. (2015): Optimization of lipid production with a genome-scale model of *Yarrowia lipolytica*, BMC Systems Biology, 9. 10.1186/s12918-015-0217-4
- Kumar, L.R., Yellapu, S.K., Tyagi, R.D. et al. (2021): Optimization of trace elements in purified glycerol for microbial lipid and citric acid production by *Yarrowia lipolytica* SKY7, Syst. Microbiol. and Biomanuf. 1, 76–89. <https://doi.org/10.1007/s43393-020-00006-8>
- Kurtzman C.P., Fell J.W. (2006): Yeast systematics and phylogeny-implications of molecular identification methods for studies in ecology. 11-30. p. In: Rosa C.A., Péter G. (Szerk.) Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. Berlin: Springer, 579 p. ISBN: 9783540309857
- Kurtzman C.P., Fell, J.W., Boekhout T. (2011): The Yeasts, a Taxonomic Study. Ötödik kiadás. Amsterdam: Elsevier, 2080 p. ISBN: 9780444521491
- Manan and Webb (2020): Bioresour. Bioprocess 7:16 <https://doi.org/10.1186/s40643-020-00307-9>
- Morgunov I.G., Kamzolova S.V., Lunina J.N. (2018): Citric Acid Production by *Yarrowia lipolytica* Yeast on Different Renewable Raw Materials. Fermentation. (2):36. <https://doi.org/10.3390/fermentation4020036>
- Mostafa, Yasser & Alamri, Saad (2012): Optimization of date syrup for enhancement of the production of citric acid using immobilized cells of *Aspergillus niger*, Saudi journal of biological sciences, 19. 241-6. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.01.004>.
- Papanikolaou S., Aggelis G (2010): *Yarrowia lipolytica*: A model microorganism used for the production of tailor-made lipids. European Journal of Lipid Science and Technology. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200900197>
- Papanikolaou S., Aggelis G. (2011): Lipids of oleaginous yeasts. Part II: technology and potential applications. European Journal of Lipid Science and Technology, 113:1052-1073. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.201100015>
- Pécs M., Ballagi A. (2011): Biotermék technológia
- Portmann, J.E., és K.W. Wilson (1971): The Toxicity of 140 Substances to the Brown Shrimp and Other Marine Animals
- Rane, K. D., Sims, K. A. (1993): Enzyme Microb. Technol.

- Rane, K., & Sims, K.A. (2004): Citric acid production by *Yarrowia lipolytica*: Effect of nitrogen and biomass concentration on yield and productivity, *Biotechnology Letters*, 18, 1139-1144
- Rywińska A, Rymowicz W. (2010): High-yield production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* on glycerol in repeated-batch bioreactors. *J Ind Microbiol Biotechnol*. DOI: [10.1007/s10295-009-0687-8](https://doi.org/10.1007/s10295-009-0687-8).
- Soccol, Carlos & Vandenberghe, Luciana & Rodrigues, Cristine & Pandey, Ashok. (2006): New Perspectives for Citric Acid Production and Application, *Food Technology and Biotechnology*, 44.
- Svetlana V. Kamzolova, Nadezda V. Shishkanova, Igor G. Morgunov, Tatyana V. Finogenova (2003): Oxygen requirements for growth and citric acid production of *Yarrowia lipolytica*, *FEMS Yeast Research*, Volume 3, Pages 217–222, [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(02\)00188-5](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(02)00188-5)
- Tomaszewska L., Rywinska A., Gladkowski W. (2012): Production of erythritol and mannitol by *Yarrowia lipolytica* yeast in media containing glycerol. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39:1333-1343. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-012-1145-6>
- Yalcin, Seda & Bozdemir, M.. (2009). Effects of Different Fermentation Conditions on Growth and Citric Acid Production Kinetics of two *Yarrowia lipolytica* Strains. *Chemical & Biochemical Engineering Quarterly*
- Zahorsky B. (1913): U.S. Patent; 1065358.
- Zhang B., Rong C., Chen H., Song Y., Zhang H., Chen W. (2012): De novo synthesis of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microbial Cell Factories*, 11:51. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-11-51>
- Zinjarde, SS. (2014): Food-related applications of *Yarrowia lipolytica*, *Food Chemistry* 152: 1-10

KONZULTÁCIÓS NYILATKOZAT

Tolnai Máté (hallgató Neptun azonosítója: RZ26P8) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a szakdolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A szakdolgozatot a záróvizsgán történő védeésre javaslom / nem javaslom.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem

Kelt: 2023. április 24.

 
Belső konzulensek

NYILATKOZAT

a szakdolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Tolnai Máté
A Hallgató Neptun kódja: RZ26P8
A dolgozat címe: *A Yarrowia lipolytica élesztőfaj citromsav szintézisének technológiai elemzése*
A megjelenés éve: 2023
A konzulens tanszék neve: Biomérnöki és Erjedésipari Technológia Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott szakdolgozat egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, s az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

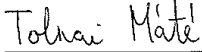
Ha a fenti nyilatkozattal valótlan állítottam, tudomásul veszem, hogy a Záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkor szellemi tulajdonkezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem könyvtári repozitori rendszerébe.

Kelt: 2023. április 24.


Hallgató aláírása