

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

ÁSVÁNYI BALÁZS

MOSONMAGYARÓVÁR

2005

NYUGAT-MAGYARORSZÁGI EGYETEM  
MEZŐGAZDASÁG- ÉS ÉLELMISZERTUDOMÁNYI KAR  
MOSONMAGYARÓVÁR  
Élelmiszertudományi Intézet

Az állati termék előállítás biológiai, technológiai, ökológiai,  
takarmányozási és ökonómiai kérdései Doktori Iskola

Doktori Iskola vezető:

Dr. Schmidt János  
egyetemi tanár, MTA levelező tagja

Az állati eredetű termékek feldolgozása és minőségbiztosítása  
program

Program- és témavezető:

Dr. Szigeti Jenő  
egyetemi tanár

EGYSEJTFEHÉRJE-ELŐÁLLÍTÁS OPTIMALIZÁLÁSA  
*KLUYVEROMYCES* TÖRZSEK ALKALMAZÁSA ESETÉN

Készítette:

ÁSVÁNYI BALÁZS

Mosonmagyaróvár  
2005

EGYSEJTFEHÉRJE-ELŐÁLLÍTÁS OPTIMALIZÁLÁSA  
KLUYVEROMYCES TÖRZSEK ALKALMAZÁSA ESETÉN

Írta:  
ÁSVÁNYI BALÁZS

Készült a Nyugat-Magyarországi Egyetem Mezőgazdaság és  
Élelmiszertudományi Kar  
Az állati termék előállítás biológiai, technológiai, ökológiai,  
takarmányozási és ökonómiai kérdései Doktori Iskola  
Az állati eredetű termékek feldolgozása és minőségbiztosítása programja  
keretében

Témavezető: Dr. Szigeti Jenő, CSc

Elfogadásra javaslom (igen / nem)

(aláírás)

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

Mosonmagyaróvár,

.....  
a Szigorlati Bizottság elnöke

Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom (igen /nem)

Első bíráló (Dr. Csapó János, DSc) igen /nem

(aláírás)

Második bíráló (Dr. Fenyvessy József, CSc) igen /nem

(aláírás)

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

Mosonmagyaróvár,

a Bírálóbizottság elnöke

A doktori (PhD) oklevél minősítése.....

Az EDT elnöke

## TARTALOMJEGYZÉK

KIVONAT.....	6
1. BEVEZETÉS .....	7
1.1. Célkitűzések .....	9
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....	10
2.1. A sajt savó hazai és külföldi helyzete .....	10
2.2. A sajt savó, mint környezetszennyező melléktermék .....	12
2.3. A sajt savó, mint tápoldat.....	14
2.4. A sajt savó hasznosítása az egysejtfehérje-előállításban.....	16
2.5. Az egysejtfehérje, mint takarmány.....	18
2.6. A sajt savóból történő egysejtfehérje-előállítás rövid története ....	20
2.6.1. A Le Bel eljárás.....	21
2.6.2. A Vienna eljárás .....	22
2.6.3. Újabb távlatok az SCP előállításban .....	22
2.7. Az SCP előállítás hazai vonatkozásai .....	24
2.7.1. Az SCP előállítás gazdasági vonatkozásai Magyarországon	25
2.8. Az SCP előállítás jogi háttere.....	26
2.9. Kutatások a sajt savó alapú egysejtfehérje-előállításban .....	27
2.10. A sajt savó alapú egysejtfehérje-előállítás .....	32
2.10.1. A sajt savó előkészítése.....	32
2.10.2. Fermentációs eljárások .....	34
2.11. Abiotikus tényezők.....	36
2.11.1. Hőmérséklet .....	36
2.11.2. Kémhatás.....	37
2.11.3. Levegőztetés.....	37
2.11.4. A keverés fordulatszámja .....	38
2.11.5. Habzás .....	39
2.12. Az alkalmazott élesztő .....	40
2.13. A növekedés dinamikáját meghatározó hatások .....	41
2.14. Enzimes folyamatok az egysejtfehérje-előállítás során .....	43
2.15. A genetikai tervezés .....	47
2.16. Az alkalmazott élesztők morfológiája.....	48
3. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	49
3.1. Anyagok .....	49
3.1.1. Táptalajok.....	49
3.1.2. Oldatok .....	50
3.1.3. Élesztőtörzsek.....	50
3.1.4. Sajt savó .....	52
3.2. Eszközök .....	53

## Tartalomjegyzék

---

3.3. Módszerek .....	56
3.3.1. A vizsgálandó törzsek kiválasztása .....	56
3.3.2. Tiszta tenyészetek készítése .....	57
3.3.3. Inokulum preparáció .....	57
3.3.4. Az egysejtfehérje-előállítási kísérlet menete.....	57
3.3.5. Telepszám meghatározás.....	59
3.3.6. Szárazanyag tartalom meghatározás .....	60
3.3.7. Laktóz, glükóz, galaktóz és etanol tartalom meghatározása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) segítségével ...	61
3.3.8. Hozamkonstansok .....	61
3.3.9. Statisztikai módszerek.....	62
3.3.10. Maximális fajlagos szaporodási sebesség meghatározása ..	62
3.3.11. Generációs idő.....	63
3.3.12. Az eredő folyadékoldali oxigénabszorpciós együttható, a telítési oxigén koncentráció, valamint a légzési sebesség meghatározása .....	63
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELESÜK .....	65
4.1. A kiválasztott élesztőtörzsek .....	65
4.2. Az optimális fermentációs paraméterek megadása .....	65
4.3. A törzsek által elért maximális telepszám és maximális fajlagos szaporodási sebesség .....	67
4.4. Tápanyagok felhasználása.....	74
4.4.1. A tápoldat glükóz tartalma .....	75
4.4.2. A tápoldat galaktóz tartalma .....	78
4.4.3. A tápoldat etanol tartalma .....	81
4.4.4. A tápoldat laktóz tartalma .....	83
4.5. Generációs idő.....	86
4.6. A törzsek szelektálása a termelési mutatók alapján .....	86
4.6.1. Maximális szárazanyag produkció .....	88
4.6.2. Hozamkonstansok .....	92
4.7. Az élesztők oxigénigénye.....	98
4.7.1. Dinamikus $K_L$ meghatározás .....	99
5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK .....	107
6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	108
7. SUMMARY .....	111
8. IRODALOMJEGYZÉK.....	114
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	133
10. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN ÍRT TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK, ELŐADÁSOK .....	134

### **KIVONAT**

A világban tapasztalható trendhez hasonlóan Magyarországon is a keletkezett sajtsavónak csupán 50%-át hasznosítják a takarmányozásban, illetve a humán táplálkozásban. A keletkezett nagy mennyiségű sajtsavó egyik lehetséges felhasználása az egysejtfehérje (SCP - Single Cell Protein) előállítás. A folyamat során fermentorokban, aerob körülmények között élesztőket szaporítanak sajtsavót alkalmazva tápoldatként, amely a takarmányozásban és a humán táplálkozásban felhasználható. Kísérleteink egy üzemi körülmények között hasznosítható SCP előállításra alkalmas élesztőtörzs kiválasztására irányultak. Ennek során öt élesztőtörzset hasonlítottunk össze szakaszos fermentációs kísérletekben. A szaporodási és termelési mutatók statisztikai értékelése után kiválasztottuk az általunk megadott fermentációs paraméterek mellett SCP előállítására leginkább alkalmas törzset.

### **ABSTRACT**

Like in other parts of the world, only approximately 50% of the cheese whey produced is used for human and animal nutrition purposes in Hungary. An alternative to the traditional uses of cheese whey is the production of single-cell protein (SCP). Under aerobic conditions in specially designed fermenters, selected yeast strains are grown in cheese whey, which results in a fermentation liquid used as feed and food. The main objective of our research was to select a yeast strain suitable for use in commercial production of SCP. Therefore, trials were run batchwise in order to compare the growth and production parameters of five different yeast strains. Specific operating conditions have finally been identified for efficient production of SCP by the best performing strain.

## 1. BEVEZETÉS

Magyarországon a kérődzők tejéből előállított sajt-, és túróféleségek gyártása során mintegy 970 millió dm<sup>3</sup> édes-, vagy savanyú sajt savó képződik. Ennek a mennyiségnek elenyésző hányada kerül vissza az állattartásba, mint takarmány-kiegészítő. A nevezett melléktermékek mennyiségének mintegy felét dolgozzák fel csupán az iparban – különösen az élelmiszer- és takarmányipar bír jelentőséggel – a fennmaradó rész pedig vizeinkbe, vagy mezőgazdasági hasznosítású földterületeinkre kerül károsítva az ottani ökoszisztémát.

A kisebb kapacitással rendelkező üzemek, de sokszor a multinacionális cégek is a keletkezett sajt savó „elhelyezésének könnyebb útját” választják, számolva az ezzel járó „többlet költséggel”. A szennyvíztisztító berendezésekbe vezetett sajt savó nagy biológiai oxigénigényével és savanyító hatásával erősen rontja az oxidációs medencék szervesanyag-lebontó hatásfokát (Borgardt és mtsai., 1998; Hobman, 1984; Sienkiewicz és Riedel, 1990).

A savóféleségek magas víztartalma gazdaságtalanná teszi elszállításukat, pl. porítás céljára, amely korábban általánosan alkalmazott eljárás volt a sajt savó hasznosítására. Ehhez járul a porítás esetén jelentkező rendkívül magas porítási energiaköltség is, így ezen eljárás a realizálható árat figyelembe véve gazdaságtalan.

A sajt savó hasznosításának köre rendkívül széles, az élelmiszeripartól kezdve, a gyógyszeriparon át egészen a biogáz előállításig alkalmazzák alapanyagként, ám az így feldolgozott volumen is csak mintegy 50%-a a világ éves sajt savó termelésének.

A keletkezett nagymennyiségű sajtsavó egyik lehetséges felhasználási alternatívája az egysejtfehérje (Single Cell Protein - SCP) előállítás, amely során a sajtsavót élesztőgombával (pl. *Kluyveromyces*) oltják be. A sajtsavón elszaporodó élesztő fehérjévé (a sejttömeg mintegy 50%-a) konvertálja annak legfőbb komponensét a laktózt. Az így előállított termék magas biológiai értékű (mintegy 87%), megfelelő előkezelés után a humán táplálkozásban (mint étrend kiegészítő) és az állati takarmányozásban (monogasztrikus állatoknál a teljesítmény javítására, kérődzők esetében, mint a bendőműködést kedvezően befolyásoló fehérjetakarmány) egyaránt felhasználható.

Az SCP előállítási céllal az 50-es évektől széleskörű kutatás folyt, azonban alkalmazása a nehezen megvalósítható gazdaságosság miatt háttérbe szorult.

A környezetterhelés csökkentésére irányuló erőfeszítések következtében a nagy volumenben keletkező sajtsavó hasznosításának továbbra is fennálló problémája indokolja a további kutatásokat.

A géntechnikák rohamos elterjedése a biotechnológiában az eddigi eljárások új útjait tárják elénk, jóllehet a technológiai folyamatok alapjait nem változtatták meg. A jövőben a molekuláris szintű technikák segítségével létrehozott új mikroba törzsek, és a hagyományos biotechnológiai eljárások együttes alkalmazása várható, annak ellenére, hogy az alkalmazott mikroorganizmusok által örökített tulajdonságok esetenként nem stabilak.



### 1.1. Célkitűzések

Munkánk célja egy sajtsavó alapú SCP előállítására alkalmas, üzemi körülmények között is használható élesztőtörzs kiválasztása volt. A kiválasztást első lépcsőben a vizsgált törzsek szaporodási tulajdonságai (maximális telepszám  $N_{max}$ , maximális fajlagos szaporodási sebesség  $\mu_{max}$ ) alapján végeztük, ezért meg kívántuk határozni azon optimális fermentációs paramétereket, amelyek biztosítják ezen mutatók legkedvezőbb értékeit.

Kísérleteink során megvizsgáltuk a fermentációban tápoldatként alkalmazott sajtsavó glükóz-, galaktóz-, etanol-, illetve laktóz tartalmát is.

Második lépcsőben a termelési mutatók jelentették a további szelekció alapját, ezért az optimális fermentációs paraméterek alkalmazása mellett meg kívántuk határozni a maximális szárazanyag ( $x_{max}$ ), és a hozamok (sejttömeg hozamállandó  $dx/dt$ ; biomassza hozam  $Y_{x/s}$ ) értékeit is.

Az általunk megadott optimális fermentációs paraméterek alkalmazása az új biotechnológiai módszerekkel együtt biztosíthatja az eddig csak ritkán megvalósított gazdaságos SCP előállítást.

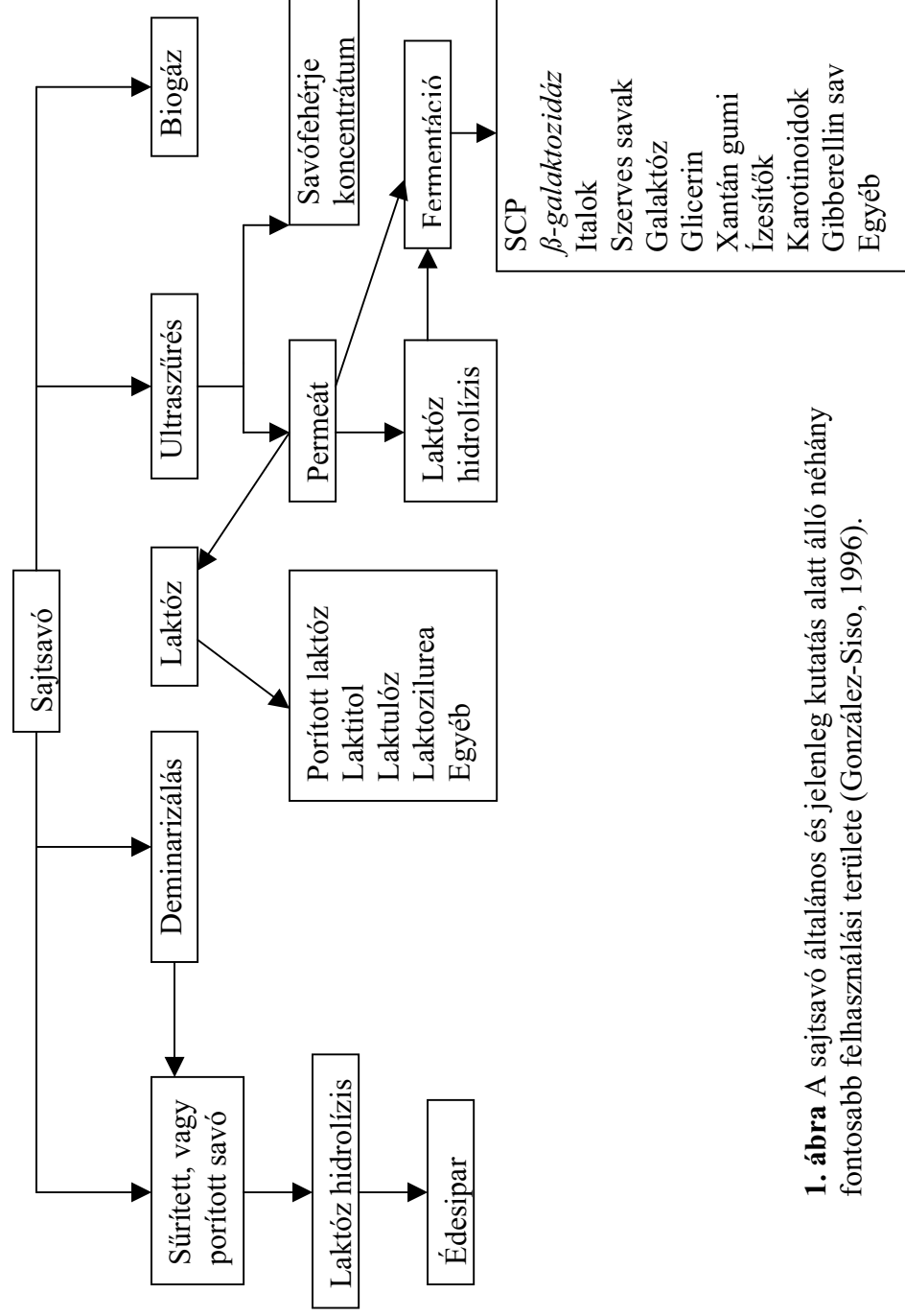
## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. A sajtsavó hazai és külföldi helyzete

A világ sajtsavó termelésének mintegy 50%-át hasznosítják csupán különböző termékekben. Az EU-ban ennek a mennyiségnek 45%-át közvetlenül folyékony formában, 30%-át porított savó formájában, 15%-át laktóz forrásként, vagy laktózmentesített melléktermékként, a maradékot pedig savófehérje koncentrátumként használják fel (González-Siso, 1996). Megközelítőleg 4.8%-kal a laktóz a leggyakoribb szénhidrát a sajtsavóban. A sajtsavó és a laktóz hasznosíthatósága sokrétű. Alkalmazzák csecsemő tápszerekben, pékárukban, tej- és cukrászipari készítményekben, állati takarmányként, különböző laktóz származékok alapanyagaként és néhány ipari fermentációban (Yang and Silva, 1995).

Közvetlen felhasználását megnehezíti szacharózhoz viszonyított gyengébb édesítő ereje és gyenge oldhatósága (mintegy tizede a szacharózénak), valamint az, hogy csak kevés mikroorganizmus képes egyedüli szén-, és energiaforrásként hasznosítani (Becerra és mtsai., 2004). A sajtsavó felhasználásának néhány lehetőségét az 1. ábra mutatja.

A hasznosítás biztató útját jelentette az élelmiszeriparban keletkező szennyvizek iszapmedencékben, biológiai oxidációval történő kezelése. Az így előállított egysejtfehérje felhasználásának kezdete az 1980-as évek végére tehető (May és mtsai., 1990). Az eljárás a magas költségek miatt azonban háttérbe szorult.



**1. ábra** A sajt savó általános és jelenleg kutatás alatt álló néhány fontosabb felhasználási területe (González-Siso, 1996).

Jelenleg fokozatos növekedés figyelhető meg a sajtermelésben, amely hazánkban évente mintegy 970 millió liternyi, 46600 tonna laktóz tartalmú sajtsavó (1 kg sajt elkészítésekor 9 kg sajtsavó keletkezik) keletkezését eredményezi. Az állati hulladékok kezelésének és hasznosításukkal készült termékek forgalomba hozatalának állategészségügyi szabályairól szóló 71/2003 (VI. 27.) FVM rendelet szerint a tej és a tejtermékek állati eredetű takarmány-alapanyagoknak minősülnek. A mezőgazdasági termékek ökológiai termeléséről szóló szabályozás (2277/2003/EK) értelmében pedig a sajtsavó felhasználható állati takarmányként, azonban Magyarországon az utóbbi időben az állattenyésztés olyan mértékben csökkent, hogy a keletkező melléktermék-mennyiségnek csak elenyésző hányadára lehet szükség erre a célra. A keletkezett mennyiségnek – hasonlóan a külföldi trendhez – mintegy a felét hasznosítják csupán takarmányozási céllal, amely esetben szállítása veszteséges, mivel annak költsége is a tejüzemeket terheli. Másik alternatíva a sajtsavó elszállíttatása: a Csongrád Megyei Településtisztasági Kft. engedéllyel rendelkezik élelmiszeripari hulladékok átvételére vonatkozóan; információink szerint a 02 05 EWC kódszámú al csoportba tartozó folyékony tejipari hulladékokat 13400 Ft/tonna költséggel veszik át, és az ATEV Fehérjefeldolgozó Rt. legközelebbi telephelyére szállítják a szerződésben rögzített befogadói megállapodás alapján.

### **2.2. A sajtsavó, mint környezetszennyező melléktermék**

A tejipar melléktermékeként számontartott sajtsavó a sajtgyártás során marad vissza a kazein kicsapátása és eltávolítása után. A tej

mennyiségének mintegy 85-95%-át adja, és megőrzi tápanyagtartalmának 50-55%-át.

Csupán a volumenek érzékeltetése végett: egy tejpgazdaság, amely 100 t tejet dolgoz fel naponta kb. ugyanannyi mennyiségű szerves anyagot juttat a csatornába, mint egy 55.000 fős város (Sienkiewicz és Riedel, 1990). Annak ellenére, hogy a sajtsavó hasznosításának számos lehetőségét vizsgálták az utóbbi 50 évben, a keletkezett mennyiségnek kb. 50%-át még mindig szennyvízként kezelik.

A sajtsavó magas biológiai oxigénigénnyel rendelkezik (BOI: 40–60 g/dm<sup>3</sup>), amely kedvezőtlenül hat a szennyvíztisztító üzemek biológiai folyamataira is (Borgadts és mtsai., 1998; Sienkiewicz és Riedel, 1990; Belem és Lee, 1998). Nagyonbrészt a sajtsavóban található laktóz felelős a magas BOI és KOI (biológiai és kémiai oxigénigény) értékekért, amely abból is látható, hogy a sajtsavó fehérje-mentesítése csak kb. 10 g/dm<sup>3</sup>-el csökkenti a KOI-t (Mawson, 1994). A sajtsavó laktóz tartalmának egysejtfehérjévé, etanollá, vagy biogázzá alakítása 75%-kal csökkenti a BOI-t.

Az SCP előállítás során a mikróbák a sajtsavó laktóztartalmát szinte teljes egészében felhasználják, és jelentős – mintegy 50% – protein tartalmuk következtében jelentősen növelik a végtermék fehérjetartalmát, ezáltal piacképes terméket eredményeznek. Mégis, a legtöbb esetben az így visszamaradó folyadék hasznosítása is problémát jelent (Mawson, 1994).

A savótermelés növekedésének, koncentrálódásának következtében, valamint a szennyvíz minőségére vonatkozó szigorú

törvényi előírások miatt sürgőssé vált e probléma megoldása (Sienkiewicz és Riedel, 1990).

### 2.3. A sajtsavó, mint tápoldat

Mivel a sajtsavó a tej komponenseit csak kis mennyiségben tartalmazza (6-7%, az eredeti 12-13%-kal szemben), általában mellékterméknek tekintik. A sajtsavóban számos hasznos anyag (laktóz 4.5-5% m/v, fehérje 0.6-0.8% m/v, lipidek 0.4-0.5% m/v), ásványi sók (a szárazanyag 8-10%-a), tejsav (0.05% m/v), citromsav, NPN anyagok (karbamid, húgysav) találhatóak (Coton, 1976; Kosikowski és Wierzbicki, 1973; Kosikowski, 1979; Yves, 1979; García Bilbao, 1981; Anon, 1983c; Marwaha & Kennedy, 1988;). Gazdag továbbá vitaminokban is (tiamin: 0.4 mg/dm<sup>3</sup>, riboflavin: 1.4 mg/dm<sup>3</sup>, pyridoxin: 0.5 mg/dm<sup>3</sup>, kobalamin: 1.5 µg/dm<sup>3</sup>, nikotinsav: 2 mg/dm<sup>3</sup>, folsav: 50 µg/dm<sup>3</sup>, aszkorbinsav: 9 mg/dm<sup>3</sup>) (Csapó és Csapó-Kiss, 1999). Irvine és Hill (1985) a sajtsavó beltartalmi mutatóinak vizsgálatakor az 1. táblázatban közölt eredményeket kapták.

1. táblázat A tej főbb komponenseinek megoszlása a sajtgyártás során

	Zsír	Fehérje	Szénhidrát (laktóz)	Hamu	Összesen
100 kg tej tartalmaz [kg]	3.8	3.3	5.0	0.7	12.8
10 kg sajt tartalmaz [kg]	3.3	2.6	0.2	0.2	6.3
Visszanyerés (%)	86	78	4	26	49
90 kg sajtsavó tartalmaz [kg]	0.5	0.7	4.8	0.5	6.5
Visszanyerés (%)	14	22	96	74	51

Ghaly és Kamal (2004) vizsgálatai szerint a sajtsavó szárazanyag tartalma  $67 \text{ g/dm}^3$  ( $57 \text{ g/dm}^3$  illékony anyag,  $10 \text{ g/dm}^3$  hamu), amelyből mintegy  $50 \text{ g/dm}^3$  a laktóz. A legnagyobb arányban jelenlévő laktóz hasznosítása érdekében a savófeldolgozási folyamatok számos származék előállítására irányulnak (2. táblázat).

**2. táblázat** Egyes savóféleségek és származékaik laktóz tartalma

Savóféleségek	Laktóz tartalom
Szárított sajtsavó (édes)	63.0-75.0%
Szárított sajtsavó (savanyú)	61.0-70.0%
Csökkentett laktóztartalmú sajtsavó (szárított)	52.0-58.0%
Demineralizált sajtsavó (szárított)	70.0-80.0%
Tejtermékek	65.0-85.0%
Savófehérje koncentrátum (szárított)	10.0-55.0%
Savófehérje izolátum (szárított)	0.5% (átlag)
Cheddar-típusú sajtsavó	4.5-5.1%
Cottage Cheese savó	4.5-4.9%

Forrás: American Dairy Products Institute, (1992)

Beltartalmi mutatói a sajtsavót alkalmassá teszik arra, hogy a különböző fermentációs folyamatokban tápoldatként alkalmazzák (González-Siso, 1996; Marwaha and Kennedy, 1988).

A savó édes, vagy savanyú jellege a sajtgyártás módjától függ, amely esetben a legmeghatározóbb faktor az a pH érték, amelyen az alvadékot leválasztják a sajtsavótól. A kemény és félkemény sajtok (Gouda, Edami, Cheddar, Ementali) gyártása során melléktermékként édes sajtsavó (pH 5.9-6.5) keletkezik. Savanyú sajtsavót (pH 4.4-4.8)

friss sajtok (Feta, Ricotta, Mozzarella), túró és kazein gyártása során nyerhetünk. A savanyú sajtsavó több tejsavat, hamu alkotórészt és kevesebb fehérjét tartalmaz, mint az édes sajtsavó (Kosikowski, 1979).

Sajtsavó alapú SCP előállítására mind az édes, mind a savanyú sajtsavó egyaránt alkalmas, melyek néhány beltartalmi paraméterét a 3. táblázat szemlélteti (Kosikowski, 1979).

**3. táblázat** A különböző típusú sajtsavók hozzávetőleges összetétele

Összetevő	Édes sajtsavó	Savanyú sajtsavó
	%	
Össz. szárazanyag	6.35	6.50
Protein (N × 6.38)	0.80	0.75
Laktóz	5.00	4.85
Zsír	0.50	0.04
Hamu	0.50	0.80
Tejsav	0.05	0.40

A humán táplálkozásban történő felhasználás (pékárúk, jégkrémek, levesporok) kizárólag precízen adagolt mennyiségben lehetséges savanyú ízük, és magas sótartalmuk miatt (Kosikowski, 1979; Mawson, 1994).

#### **2.4. A sajtsavó hasznosítása az egysejtfehérje-előállításban**

Az agrár ágazatban és az iparban képződött hulladékok és melléktermékek miatti egyre fokozódó aggodalom, felkeltette az érdeklődést ezen anyagok kereskedelmi szempontból értékes termékekké történő konvertálása iránt (Leman és mtsai., 1990).



A fejlődő országokban, mint India, ahol a konvencionális fehérje források egy főre jutó éves mennyisége lecsökkent, és a takarmányipar sem megfelelően kiépített, az egysejtfehérje (SCP) előállítás egy kiegészítő lehetőséget jelenthet az élelmiszeripari termékek és abraktakarmányok volumenének növelésében (Kahlon és mtsai., 1990).

Az SCP (Single-Cell Protein) kifejezés a különböző mikroorganizmusok szárított sejtjeire utal, amelyeket nagy volumenben szaporítanak és emberi, valamint állati táplálékokban, fehérjeforrásként alkalmaznak (Hang és Woodams, 1981).

A sajt savóban található laktóz enzimes hidrolízise a legígéretesebb biotechnológiai eljárás szénhidrát tartalmának kiaknázására (Sienkiewicz és Riedel, 1990; Castillo, 1990). A folyamatnak azonban gátat szab az enzim magas költsége, amelynek legfőbb forrása a *Kluyveromyces lactis* élesztő (Gekas és López, 1985; Machado és Linardi, 1990; Stred'ansky és mtsai., 1993). Az olcsó és könnyen hozzáférhető szubsztrát kiválasztása, az alkalmas mikroorganizmus és annak optimális termelési körülményei, valamint a hatékony feldolgozás biztosíthatják azon magas költségek csökkentését, amelyet az enzim kinyerése jelent (Muniswaran és mtsai., 1994).

Egysejtű algák, gombák és baktériumok a fő forrásai azon mikrobiális fehérjének, amely még napjainkban is SCP-ként alkalmaznak (Anupama és Ravindra, 2000). A legfőbb tulajdonsága ezen egysejtű organizmusoknak a jelentős fehérje tartalom, amely száraz tömegük 40-80%-át teszi ki. Az SCP előállítás során a sajt savóban található fehérje, illetve nitrogén tartalmú anyagok SCP-vé konvertálhatók, amely magas biológiai értékű (mintegy 87%), aminosav összetételénél fogva (lizin,

metionin, triptofán, valin, leucin, izoleucin, treonin, fenilalanin, hisztidin, cisztein, aszparaginsav, szerin, glutaminsav, prolin, arginin, alanin) sokkal jobban hasonlít az állati fehérjéhez, mint a növényi fehérjéhez, és általában könnyen emészthető (Ghaly és mtsai., 2004). A laktózt, mint szubsztrátot hasznosító, ezáltal a sajtsavon növekedni képes élesztőket több kísérletben alkalmazták SCP előállítására, mint más mikroorganizmusokat (Ghaly and Kamal, 2004).

### **2.5. Az egysejtfehérje, mint takarmány**

A takarmányozásban alkalmazott mikrobiális eredetű kiegészítők magas fehérje (nyers fehérje 25-78%) és vitamin tartalmuk (tiamin /B<sub>1</sub>/:20 µg/g; riboflavin /B<sub>2</sub>/:50 µg/g; niacin /B<sub>3</sub>/: 330 µg/g; piridoxin /B<sub>6</sub>/: 40 µg/g) miatt bírnak jelentőséggel. Az utóbbi évtizedek kutatásai az állattenyésztés legnagyobb költségét jelentő fehérjeszegény keveréktakarmányok, vagy takarmány-kiegészítők SCP-vel történő részleges kiváltására irányultak.

A technológiai fejlesztések révén a gazdaságos előállítás lehetősége adott, azonban az átállás nem valósítható meg a törvényi szigorítások (állati eredetű fehérjék takarmányozásának korlátozása) révén bekövetkező hiány fellépésének ütemében. Egysejtfehérje termelésére vonatkozóan a legutolsó adatot Helmeczi (1994) közölte, mely szerint a világ éves SCP termelése a fehérje forrásként általánosan alkalmazott szójadara termelésének 1%-a, halliszttermelésnek pedig 12%-a.

Sokszor tévesen ítélik meg az SCP takarmányozásban betöltött jelentőségét. Nem a takarmány fehérje komponensének SCP-vel való

teljes kiváltása a cél, hanem megfelelő előkészítés után a konvencionális fehérjeforrásokkal kombinálva egy gazdaságosabb, olcsóbb takarmányozási struktúra kialakítása.

Takarmányozási célú SCP előállítására nem csak élesztők (pl. *Kluyveromyces*, *Torula*), hanem algák (pl. *Chlorella*, *Spirulina*), baktériumok (pl. *Alcaligenes*, *Cellulomonas*, *Methylophilus*) és fonalas gombák (pl. *Fusarium*, *Penicillium*) is alkalmasak (Stringer, 1985; Anthony, 1982), azonban legnagyobb jelentőséggel az élesztők bírnak.

Ahogy az SCP előállítására alkalmas mikroorganizmusok, úgy a szaporítás alapjául szolgáló tápoldat (és ezáltal a szubsztrát is) sokféle lehet. Számos kísérlet történt különböző mezőgazdasági hulladékok ilyen irányú hasznosítására.

Hang és mtsai. (2003) kukorica szilázs csurgalékán *K. marxianus* élesztőt szaporítottak el, és az így kapott végterméket abraktakarmányként hasznosították. Az elért hozam mintegy 13 g élesztő száraz tömeg/dm<sup>3</sup> volt.

Chanda és Chakrabarti (1996) karalábé (*Brassica campestris*), mustár (*Brassica nigra*), retek (*Raphanus sativus*) és karfiol (*Brassica oleracea* var. botrytis) leveleinek áztatóvizéből nyert fehérjementesített sűrítményen szaporítottak el *Saccharomyces*, *Candida* és *Torula* élesztőket. Az így kapott biomassza mennyisége mintegy 12.5 g/dm<sup>3</sup> volt.

Becerra és González-Siso (1996) kukoricadara és búzakorpa fehérjementesített savóval történő elkeverése után kapott szuszpenzió *Kluyveromyces lactis* fajt szaporítottak. Az így elért maximális cukorkonverzió, mintegy 0.43 g élesztő száraz tömeg/g laktóz volt.

Az élesztők nukleinsav tartalma általában 8-10%, amely takarmányozási szempontból nem toxikus (Sista és Srivastava, 1981). Davis (1973) vizsgálatai szerint az élesztőgombák segítségével előállított SCP nukleinsav tartalma takarmányozási szempontból teljesen jelentéktelen.

### **2.6. A sajtsavóból történő egysejtfehérje-előállítás rövid története**

A sajtsavóból történő mikrobiális biomassza előállítása az 1940-es évekig nyúlik vissza. Franciaországban, Ausztriában, Amerikában és Németországban folyt néhány modellüzem fejlesztése és működtetése (Sienkiewicz és Riedel, 1990; Mawson, 1994). A számos leírt módszer közül a Vienna és a Le Bel eljárás volt a legkiemelkedőbb (Moulin és Galzy, 1984). Az élelmezési céllal történő mikrobiális biomassza sajtsavó alapú előállítása Franciaországban kezdődött a Fromageries Le Bel vállalatnál 1958 körül (a szabadalom 1955-re datálódik) (Yves, 1979; Moulin és Galzy, 1984) Ez az eljárás jelentette az SCP előállítás klasszikus példáját, amely által az élelmezési és takarmányozási célú ipari melléktermékek értéke növekedett. Három élesztő fajt (*Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis* és *Torulopsis bovina*) szaporítottak egyidejűleg sajtsavó permeátumon. Teljes sajtsavót nem alkalmazhattak erre a célra, mert ezek a mikroorganizmusok nem képesek metabolizálni annak fehérjetartalmát, továbbá a fehérjetartalom elősegíti az élesztő flokkulációját, amely gátolja a fermentációt. A sajtsavótól függően néhány esetben nitrogén és foszfor adagolására volt szükség (Kosikowski, 1979).

### **2.6.1. A Le Bel eljárás**

A Le Bel eljárás esetében folyamatos fermentációt alkalmaztak több mint egy éven keresztül, leállás nélkül 3.5 pH értéken és 38°C-on. A magas hőmérséklet és az alacsony pH a kontamináció veszélyének csökkentése miatt szükséges. (Castillo, 1990). A megfelelő mikrobiológiai biztonság elérése érdekében a sajtsavót 80°C-on pasztörizálni szükséges. Az etanol termelés elkerülése végett a fermentáció során magas oxigén-transzfert kell elérni (Mawson, 1994). Ilyen esetben az oxigén nem limitáló faktor, a *Kluyveromyces* faj mégis termel kis mennyiségű etanolt, amelyet a *T. bovina* használ fel, mivel ez utóbbi a laktózt, mint szubsztrátot hasznosítani nem képes (Moulin és Galzy, 1984).

A hozam az élesztő száraz tömegére vonatkoztatva a felhasznált laktóz tömegének mintegy 50%-a. Az élesztő biomassza centrifugálás, 85°C-on történő plazmolizálás és porítás segítségével nyerhető ki. A kapott biomassza mintegy 48-52% fehérjét (kiegyensúlyozott aminosav tartalommal /lizin, metionin, triptofán, valin, leucin, izoleucin, treonin, fenilalanin, hisztidin, cisztein, aszparaginsav, szerin, glutaminsav, prolin, arginin, alanin/) tartalmaz, és gazdag vitaminokban (tiamin, riboflavin, pantoténsav, piridoxin, ciano-kobalamin, biotin, folsav, C-vitamin, E-vitamin, niacin). Ilyen tulajdonságokkal rendelkező termék, korábban „Protibel” néven volt forgalomban (Yves, 1979). A biomasszát elsősorban állati takarmány kiegészítőként használták, de a humán táplálkozásban is jelentőséggel bírt (Mawson, 1994).

A Le Bel vállalat éves SCP termelése mintegy 2300 t volt, és terméküket 10 éven keresztül használták a humán táplálkozásban, amely

abból adódott, hogy az alkalmazott sajt savó, mint nyersanyag eredete és íze emberi fogyasztásra alkalmassá teszik az ilyen SCP-ből készült termékeket (Olsen és Allerman, 1991).

Az élesztő biomassza tápértékének növelése céljából metioninban gazdag *Kluyveromyces lactis* mutánst izoláltak, amely képes volt növekedni savó permeátumon. (Pellón és Hernandez, 1986; Kitamoto és Nakahara, 1994).

### **2.6.2. A Vienna eljárás**

A Vienna eljárásban egyetlen fajt a *Candida intermedia*-t alkalmazták, amely mint különösen oxidatív, jó laktóz metabolizáló élesztő ismert (Meyrath és Bayer, 1979; Moulin és Galzy, 1984). Jóllehet korábban általánosan elterjedt volt a *Kluyveromyces* és *Candida* törzsek használata (Mawson, 1988, 1994), más élesztő fajok alkalmazásának lehetőségét is megvizsgálták (Kosikowski, 1979; Yves, 1979; Friend és Shahani, 1979; Sandhu és Waraich, 1983; Pellón és Hernandez, 1986). Később néhány keverék kultúra alkalmazásának lehetőségére is rámutattak (Carlotti és mtsai., 1991a, 1991b; Kallel-Mhiri és mtsai., 1994). Az eljárással előállított élesztőt elsősorban pékárukban alkalmazták.

### **2.6.3. Újabb távlatok az SCP előállításban**

A magas előállítási költségek és a szűk piaci szegmens következtében az SCP ipari méretű előállítása visszaszorult. A kutatás azonban folyamatos volt, és a biotechnológia fejlődése következtében a 80-as években az SCP előállítás újabb lendületet vett, amikor is egyes

országokban (pl. USA, Franciaország, Izrael) egész iparág alakult ki az élesztők előállítására, azok takarmánykiegészítő, valamint táplálkozási célú felhasználására. Újra előtérbe került a tejipari melléktermékek SCP-ként történő hasznosítása is (Caton és mtsai., 1989). Az SCP ipari méretekben történő előállításával ebben az időszakban azon vállalatok kezdtek el foglalkozni, amelyek az élelmiszeripartól kezdve a petrokémiáig jelentős anyagi erőforrásokkal rendelkeztek.

A Nutrisearch vállalat által 1983-ban alkalmazott eljárásban pékélesztő előállítása céljából *Saccharomyces cerevisiae-t* szaporítottak el sajt savó tápoldaton. A módszer alapján a laktóz immobilizált laktáz enzimmel történő hidrolízise jelentette, amelyet a glükóz és galaktóz fermentatív úton történő hasznosítása követett (Castillo, 1990). A diauxiás növekedés elkerülése végett a fermentációt rátáplálásos módszerrel végezték, ennek ellenére még levegőztetett körülmények között is keletkezett etanol (Champagne and Goulet, 1988).

Az Amoco cég humán felhasználásra alkalmas élesztő előállításával foglalkozott, melynek alapja etanol fermentáció volt.

Az Exxon a Nestlé-vel együttműködésben élesztők és baktériumok által előállított étkezési minőségű fehérje gyártásának lehetőségét tanulmányozta.

További jelentősebb cégek, melyek SCP előállítással foglalkoztak: a Cuban sugar (Kuba); Pekilo (Finnország), RHM, ICI, BF (Anglia); Amoco, Philips (USA); Hoechst (Németország), ANIC (Olaszország).

A legnagyobb igény SCP-előállítására a takarmányipar felől érkezett, amely egy biztonságosan alkalmazható, megfelelő növekedést biztosító fehérje forrást igényelt. Ezen iparág jellegéből adódóan

megfelelő technológiai háttérrel és gazdasági környezetet biztosított az SCP előállítás számára. (Stringer, 1985)

Ipari méretekben gyártott termékek voltak még a „Lavera-élesztő”, az „Alkan-élesztő G”, vagy a tiszta paraffin bázison előállított „Tropina” nevű készítmények.

### **2.7. Az SCP előállítás hazai vonatkozásai**

A magyarországi takarmányipart már 20-25 éve foglalkoztatja az élesztő eredetű SCP nagyobb mérvű felhasználása, azonban a magas előállítási költségek miatt a kérődző takarmányozás-technológiában nem terjedt el. Takarmányiparunk import szárított élesztővel dolgozik, de rendkívül kis mértékben.

A hazánkban elenyésző mennyiségben (kevesebb, mint 1%) előállított SCP alapja nagyrészt sajtsavó, mivel nagy mennyiségben áll rendelkezésre, könnyen és olcsón beszerezhető. Ezen kedvező tulajdonságok miatt a sajtsavó alkalmazása üzemi méretű technológiák esetében más potenciális SCP szubsztráthoz viszonyítva (pl. metán, n-alkánok, cellulóz) egy gazdaságosabb üzemeltetés alternatíváját kínálják.

Magyarországon több helyen (pl. Nagykanizsa, Bakonszeg) történtek kísérletek az élesztőkkel előállított SCP takarmánykiegészítőként történő alkalmazására. Ezen közepméretű üzemek szezonális jelleggel és kis kapacitással működnek, azonban technológiájuk mindenképpen példa értékű.



### **2.7.1. Az SCP előállítás gazdasági vonatkozásai Magyarországon**

Az olcsóbb fehérjeforrás előállítása a gazdálkodásban alapvető érdek:

- egyrészt a tej feldolgozásánál nagy mennyiségű sajtsavó keletkezik, amely beltartalmánál fogva rendkívül értékes takarmány és szubsztrátum is egyben.
- másrészt az állattenyésztés (hús, tej előállítás) legnagyobb költségtényezője a fehérje típusú takarmányalkotók.

Az emberi táplálék 46.1%-a növényi, 53.9%-a pedig állati fehérje (Kovács, 2002). Táplálékaink aminosav-harmonizálása érdekében rendkívül fontos az állati fehérje, tekintettel arra, hogy a növények az esszenciális aminosavakat sokszor kedvezőtlen összetételben tartalmazzák. Számos növényi fehérje ilyen vonatkozásban nem teljes értékű, a gabonafehérjék pl. lizinben szegények, hüvelyes növények pedig kevés metionint tartalmaznak.

Magyarországon is elterjedt az SCP humán táplálkozásban történő alkalmazása, elsősorban terápiás készítmények formájában. A budapesti Vireco vállalat folyamatos kutatás és termékfejlesztés révén számos ilyen termékkel rendelkezik (pl. étkezési élesztőpehely, mikroelemmel dúsított inaktív élesztőpor, folsavval és piridoxinnal dúsított élesztőtabletta).

Jelenleg Magyarországon Bakonszegen, az Awasi Rt. kórógyi juhászati telephelyén folyik sajtsavó alapú egysejtfehérje-előállítás. Információink alapján a sajtsavó 38 Ft-os literenkénti feldolgozási költsége az elérhető többlettermelést figyelembe véve még gazdaságos.

## **2.8. Az SCP előállítás jogi háttere**

Jóllehet az egysejtfehérje előállítás alapjai korábbra nyúlnak vissza, de csak az 1970-es évektől végeztek kiterjedt kutatásokat az SCP táplálkozásban és takarmányozásban betöltött szerepéről, alkalmazásának újabb lehetőségeiről. Ebben az időszakban jelentkezett új igényként az előállított termékek toxikológiai vizsgálata. Problémát jelentett azonban, hogy ennek módszertana az SCP termékek esetében hiányzott.

Az első irányelveket az ENSZ Protein Advisory Group (PAG) szervezete (Anon, 1974a, 1974b, 1983a) közölte. Az IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) már sokkal kiegyensúlyozottabb követelményrendszert alkotott (Anon, 1974c, Hoogerheide és mtsai., 1979). Az Európai Gazdasági Közösség (EGK) irányelvei részletesen foglalkoztak a szénhidrát szubsztráton előállított termékek problémájával (Anon, 1983b). A United States Specific Committee of the Food Safety Council (Anon, 1978) – mely koncepciójában nagyon hasonlított a PAG, IUPAC és EGK irányelveihez – már definiálta az élelmiszer és takarmány adalékokra vonatkozó, kiértékelő eljárásokat. A PAG 6. irányelve, amely közvetlenül az előzetes klinikai vizsgálatokkal foglalkozik, kiemelve a termékek humán toleranciáját és táplálkozási értéküket, már lefektette a szükséges vizsgálati követelmények alapjait. Az irányelveket elsősorban az SCP-re gondolva alkották meg. Későbbi felülvizsgálatának célja az volt, hogy függetlenül a termékek eredetétől és természetétől, azok újszerűségét és biztonságát figyelembe véve az előírt toxikológiai vizsgálati követelményrendszerén könnyítsen. Ezt a koncepciót vitte tovább

irányelveiben az EGK, amely a szigorú toxikológiai vizsgálatokat csak a szénhidrogénekből származó SCP-re, és hasonló eredetű termékekre terjesztette ki. Az Európai Unióban a Tanács 1982. június 30-ai „82/471/EGK irányelve a takarmányozási célra felhasznált egyes termékekről” foglalkozik „az állati, vagy növényi eredetű kivonatokon tenyésztett élesztőkkel”.

Eddig kevés, az SCP készítmények rutin toxikológiai vizsgálatával foglalkozó publikáció jelent meg. Jóllehet ezek a szabályozó testületek elveire épültek, azonban sem anyagi (a kutatóhelyek részéről), sem szellemi (a szakfolyóiratok részéről) támogatásra nem találtak. Kivételt csupán a szokatlan eltérések felbukkanása, valamint az új anyagok megjelenése jelentett. Az SCP toxikológiai tanulmányozásával kapcsolatban tehát kevés referenciával rendelkezünk. A gyakorlatban az ilyen jellegű vizsgálatok alapjául a British Petrol egy korábbi munkája szolgál, amelyet „TROPINA” nevű készítményük esetében végeztek (de Groot, 1970a, 1970b, 1971). A teljeskörű vizsgálatok hiánya következtében az előbb említett készítmény mellett más termékek (pl. Liquipron, Pruteen) esetében is, elsősorban a szubsztrátokból származó maradványok (pl. alkánok) miatt számos komoly problémával szembesültek, melyet Belucci (1980) tekintett át. Az új SCP termékek bevezetése teljeskörű toxikológiai vizsgálat hiányában felelősséggel elképzelhetetlen.

### **2.9. Kutatások a sajt savó alapú egysejtfehérje-előállításban**

A sajt savó alapon történő egysejtfehérje-előállítás újabb lehetőségeit mind a mai napig kutatják, amelyeknek a korábban vázolt

környezetterhelési problémák újabb lendületet adtak. Jóllehet a folyamat alapjait már a XX. sz. közepén lefektették, számos kérdés nyitott maradt (pl. alkalmazható fajok köre, reaktor mérete és típusa, levegőztetés foka), amelyek megválaszolására a 70-80-as években kiterjedt kutatásokat folytattak. Napjainkban a molekuláris szintű technikák és a biotechnológia rohamos fejlődése újabb kérdéseket (pl. új, alternatív anyagcsere utak felfedezése; rekombináns törzsek alkalmazhatósága SCP előállítás céljára) vetettek fel, amelyek megválaszolása napjaink kutatási feladatai közé tartozik.

Sajtsavó alapú egysejtfehérje előállítására alkalmas fermentor típusoknak az utóbbi évtizedekben számos változata alakult ki, melyek ismertetése meghaladná a dolgozat kereteit. A készülékek diverzitása egyrészt a folyamatok jellegének (szakaszos, rátáplálásos szakaszos /fed batch/, ismételt fed batch, félfolytonos, vagy folytonos), másrészt az alkalmazott élesztőfajok eltérő igényeinek köszönhető. A laboratóriumi körülmények között alkalmazott modellfermentorok mellett, rázatott kultúrákkal is kedvező eredményeket értek el.

Ghaly és mtsai. (1993) kiterjedt kutatásokat folytattak sajtavó alapon történő szakaszos egysejtfehérje-előállításra. Modelljük kidolgozása során részletesen foglalkoztak a laktóz metabolizmusával, az oxigén felhasználással és az előállítható biomassza mennyiségével. Kísérleteikben kevert-levegőztetett fermentort alkalmaztak. A szubsztrátként használt sajtavó 6.4% szárazanyagot, 5% laktózt, 1.7% össz nitrogént, és 0.9% ásványi anyagot tartalmazott. A beállított pH 4.9 volt, a levegőztetés 2 VVM (percenként bejuttatott levegő és a reaktor térfogatának hányadosa), a keverés fordulatszáma pedig 350 1/min. Az

így elért maximális sejtkoncentráció  $4.6 \times 10^8$  sejt/cm<sup>3</sup> volt. Kísérleteink során mi is ezt az értéket tekintettük bázisnak.

Berruga és mtsai-nak (1997) szintén sikerült elérni az  $1 \times 10^8$  sejt/cm<sup>3</sup> értéket savó permeátumon (laktóz tartalom 4.8%) szaporított *Kluyveromyces marxianus* esetében (rázatott kultúra 30 °C-on, 100 1/min fordulaton).

Barba és mtsai. (2001) egy egyszerű modellt alakítottak ki *Kluyveromyces lactis* különböző volumenű (10, 100, 1000 dm<sup>3</sup>) fermentációs folyamatainak modellezésére. Kísérleteiket 30 °C-on, 2 VVM levegőztetés, valamint 4-es pH mellett szakaszos és félfolyamatos rendszerben végezték.

Sandhu és Waraich (1983) 4% laktóz tartalmú sajtsavón, rázatott kultúrákban (pH 6, hőmérséklet 28 °C, fordulatszám 220 1/min) hasonlítottak össze *Brettanomyces anomalus*, *Kluyveromyces fragilis*, *Trichosporon cutaneum*, ill. *Wingea robertsii* fajokat az SCP előállításra való alkalmasság szempontjából. A kísérletek során tápanyag kiegészítést alkalmazva az elért maximális hozam a szubsztrát mennyiségére vonatkoztatva *Wingea robertsii* esetében volt a legnagyobb, mintegy 89%.

Castrillo és Ugalde (1993) különböző fiziológiai paraméterek, mint a szénhidrát fluxus, fajlagos oxigénfogyasztás, metabolizmus hatását vizsgálta a biomassza produktivitás vonatkozásában. Kísérleteiben sajtsavó bázison (laktóz tartalom 40 g/dm<sup>3</sup>) *Kluyveromyces marxianus* élesztőfajt szaporítottak kemosztát rendszerben. Az alkalmazott Chemap bioreaktoron beállított fermentációs paraméterek a

következők voltak: pH 3.5, hőmérséklet 30 °C, levegőztetés 2.8 VVM. A termelt biomassza mennyisége mintegy 10.5 g/dm<sup>3</sup> volt.

Ghaly és Singh (1989) kevert-levegőztetett reaktort terveztek a sajtsavó BOI és KOI igényének csökkentésére, melynek során a sajtsavón elszaporított *K. fragilis* által termelt SCP-t takarmányozásra használták. Az eljárást szakaszos és folyamatos módon is kiviteleztek. A 24 órás fermentációk alatt a kétféle eljárás hozama között alig volt különbség: 34.9, g/dm<sup>3</sup>, ill. 33.8 g/dm<sup>3</sup>. Az egysejtfehérje-előállítás az alkalmazott élesztő optimális igényeihez képest alacsony hőmérsékleten (21 °C) végezték. A kiindulási pH 5, az oldott oxigén mintegy 4.8 g/dm<sup>3</sup> volt.

Gálvez és mtsai. (1990): *K. fragilis* fajjal végeztek SCP előállítást. Tápoldatként reemulgeált savófehérje koncentrátumot (whey protein concentrates – WPC) alkalmaztak, amelyet ammónium-szulfáttal, kálium hidrogén-foszfáttal és vitaminokkal (tiamin, riboflavin, biotin) egészítettek ki. A folyamatot 18 órán keresztül 30 °C-on, 1 VVM levegőztetés és 400 1/min fordulatszámú keverés mellett végezték. A kísérletek során megvizsgálták az előállított fehérje aminosav összetételét.

Bachhawat és mtsai. (1996) a sajtsavóban található laktóz hasznosításának új módszerét dolgozták ki. Az általuk alkalmazott sajtsavó laktóz tartalma 5% volt, amelyen *Kluyveromyces fragilis* élesztőt szaporítottak el. Az így kapott nagy sejtkoncentrációjú szuszpenzióban az élesztősejteket cetil-trimetilammonium bromid (CTAB) segítségével permeabilizálták, és az így szabaddá váló laktáz enzimet használták a továbbiakban a sajtsavóban található laktóz bontására. Az elmúlt két

évtized során a teljes, vagy permeabilizált sejtek használata, főleg az „étkezési” minőségű *Kluyveromyces fragilis* esetében nagy népszerűségnek örvendett (Joshi, 1987; Declaire és mtsai., 1987; Brodsky és Grootwassink, 1986; Champluvier és mtsai., 1988).

A *Kluyveromyces* faj segítségével előállított SCP tehát a takarmányozásban és a humán táplálkozásban egyaránt hasznosítható. Az utóbbi esetben azonban a nukleinsav tartalom okoz problémát, mivel jelentős mennyiségben elfogyasztva húgysav felhalmozódáshoz, vérrög, valamint vesekő kialakuláshoz vezethet. A sejtfa eltávolítása pedig rossz emészthetősége és toxikológiai problémák miatt lényeges. A *Kluyveromyces fragilis* által előállított fehérje - ellentétben a savófehérjével - kén tartalmú aminosavakban és triptofánban szegény. A két fehérjeforrás keverésével az SCP táplálkozási értéke növelhető. (Gálvez és mtsai., 1990)

Mivel a sajt savó szerves nitrogén tartalmú anyagait aminosavak, polipeptidek és fehérjék alkotják, amelyek mind a protoplazma potenciális alkotóelemei, ezért a szerves nitrogén mérése nem jelzi a nem mikrobiális eredetű szerves nitrogén protoplazmává történő konverziójának nagyságát, vagy hatékonyságát (Ghaly és Kamal, 2004).

Ahmad és Holland (1995) *K. lactis* esetében a keverés fordulatszámának 200 1/min-ről 700 1/min-re növelésével, szakaszos rendszerben 0.52-0.58 1/h  $\mu_{\max}$  (maximális fajlagos szaporodási sebesség) értékeket ért el, és McAleary (1987) eredményeivel összhangban megállapította, hogy a kiindulási cukor koncentrációnak 4% (m/v) értékig nincs hatása a maximális fajlagos szaporodási sebességre.

## **2.10. A sajtsavó alapú egysejtfehérje-előállítás**

### **2.10.1. A sajtsavó előkészítése**

Az előzőekben láthattuk, hogy az egysejtfehérje-előállítás technológiáját mind a mikroorganizmus, mind az alkalmazott szubsztrát, nagyban meghatározza. Sajtsavó alapú egysejtfehérje-előállításban a kiindulási alapanyag összetételétől függően annak előkészítése szükséges. A szakirodalomban számos utalást találunk a savóféleségek különböző kezelésére. Üzemi körülmények között ezen eljárások jelentős költségtöbbletet jelenthetnek, de a megfelelő hatékonyság elérése érdekében bizonyos esetekben (pl. a sajtsavó magas fehérje tartalma) elengedhetetlenek.

Abd-Alla és El-Tantawy (1997) az alvadék leválasztása és sajtruhán való átszűrése után kapott szűrlet pH-ját 4.7-re állították be (10%-os foszforsavval), és 115 °C-on 5 percig hőkezelték a savófehérje kicsapátása érdekében. A kicsapódott fehérjét centrifugálással leválasztották, és az így kapott sajtsavót használták további vizsgálataik során.

Ghaly és Singh (1989), valamint Becerra és mtsai. (2004) a teljes sajtsavót 121 °C-on 105 kPa nyomáson 15 percig hőkezelték, majd az így kapott steril sajtsavót töltötték a fermentor puffertartályába.

Édes sajtsavó előállítása céljából Bachhawat és mtsai. (1996) a tejet 37 °C-ra melegítették, majd oltót adtak hozzá, és az így kapott keveréket 1 h keresztül az előbbi hőfokon inkubálták. A tejet sajtruhán átszűrve lecentrifugálták (6000g 15 min). Miután a felülúszó pH-ját 6.8-ra állították be 70 °C-on 2 percig hőkezelték, és a kicsapódott fehérjét ismételt centrifugálással eltávolították.



Gálvez és mtsai. (1990) porított sajtsavót szuszpendáltak desztillált, ioncserélt vízben, majd az így kapott sajtsavót ásványi anyagokkal és élesztőkivonattal dúsítva pH 5 mellett 121 °C-on 15 percig sterilizálták.

Castrillo és Ugalde (1993) hasonló módon a tápoldatként szolgáló sajtsavót savópor rekombinálásával állították elő, melyet előzetesen fehérjementesítettek (pH 4.0; 120°C; 1.2 bar; 30 min).

Sandhu és Waraich (1983), valamint Barba és mtsai. (2001) a nagy mennyiségű sajtsavót először durva papírszűrőn átengedték, majd a kapott szűrletet megsterilizálták. A szerzők által alkalmazott eljárás figyelemreméltó, hiszen az üzemi körülmények között nehezen megvalósítható sterilitás egyedül szűrési technikák kombinációjával érhető el gazdaságosan.

Berruga és mtsai. (1997) tangenciális szűréssel előállított savó permeátumot alkalmaztak kísérleteikben, amelynek előnyös tulajdonsága a különösen alacsony csíraszám.

Mansour és mtsai. (1993), valamint Ghaly és mtsai. (1993) kísérleteik megkezdése előtt a sajtsavót 70 °C-on 45 percig pasztőrözték, majd 1°C-on 30 percig hűtötték. Az egész folyamatot háromszor ismételték.

Kísérleteink során mi is az utóbbihoz hasonló sajtsavó előkészítést alkalmaztunk, mivel könnyen kivitelezhető, és szemben pl. a szűrési technikákkal, nem igényel különleges gépi berendezéseket.

### 2.10.2. Fermentációs eljárások

A sajtsavót, előkészítés után a kísérleti reaktorba töltik, melynek számtalan típusa ismeretes. Laboratóriumi körülmények között általában kevert-levegőztetett reaktorokat alkalmaznak (Ghaly és Singh, 1989; Gálvez és mtsai., 1990; Castrillo és Ugalde, 1993; Barba és mtsai., 2001; Mansour és mtsai., 1993; Ghaly és mtsai., 1993; Ben-Hassan és Ghaly, 1995; Silva-Satisteban és Filho, 2005; Bellaver és mtsai., 2004; Ghaly és mtsai., 2005).

Az inokulálás során a sajtsavót élesztőszuszpenzióval oltják be. Az inokulum mennyiségét meghatározza a folyamat jellege és az alkalmazott mikroorganizmus.

A folyamatos (continuous) fermentáció nyílt rendszernek tekinthető. Ennek során a bioreaktorba folyamatosan vezetik be a steril tápoldatot, és egyidejűleg ugyanannyi mennyiségű átalakított fermentlevet vesznek el a rendszerből a benne lévő mikroorganizmusokkal együtt.

Ghaly és mts. (2005), valamint Castrillo és Ugalde (1993) kísérleteiben az inokulum mennyisége a teljes reaktor térfogat 14% v/v-a volt (1.04 dm<sup>3</sup>/h áramlási sebesség). Mahmoud és Kosokowski (1982) *Kluyveromyces* élesztőkkel végzett kísérleteikben 1% inokulumot alkalmazott. Ben-Hassan és Ghaly (1995) *K. fragilis* élesztővel végzett folyamatos fermentációt, melynek során az inokulum mennyisége 20% v/v volt (4.8 h átlagos tartózkodási idő).

Szakaszos (batch) fermentációt zárt rendszernek tekinthetjük, amely esetben T=0 időpontban a fermentorban a sterilizett tápoldatot mikroorganizmusokkal beoltják, és optimális fiziológiai körülmények

között tartják. A biomassza és a metabolit koncentráció állandóan változik. A batch fermentáció kinetikájában négy jellemző fázist különíthetünk el: a lag, a gyorsuló log, az exponenciális és a stacioner-fázist (Moser, 1981; Ghaly és mtsai., 2005). Meg kell említenünk, hogy ötödikként egy hanyatló fázist is megkülönböztethetünk, de mire a folyamat ezt a szakaszt eléri, a fermentációt általában leállítják. Ghaly és Kamal (2004) szerint, ha a folyamat végső célja a sejtbiomassza-előállítás, akkor a fermentáció 16 óra elteltével leállítható, amikor a laktóz 88%-át az élesztők felhasználták és a maximális sejtszám elérte a  $10^8$  CFU/cm<sup>3</sup> nagyságrendet.

Ahmad és Holland (1995) szakaszos rendszerben *Candida utilis* élesztővel végzett fermentáció során az inokulum mennyiségét 0.2 és 5% v/v között változtatták. A legkedvezőbb eredményt (legrövidebb lag fázis: 1 óra) 5% v/v inokulum mennyiség mellett érték el. Ugyanekkora inokulum mennyiséggel dolgozott Hang és mtsai. (2003) *K. marxianus* törzsekkel végzett szakaszos fermentáció során. Moon és mtsai. (1978), ill. Ghaly és Kamal (2004) sajtsavó alapú szakaszos fermentációt folytattak, melynek során az inokulum mennyisége 10% v/v volt, akár csak Silva-Santisteban és Maugeri Filho (2005) kísérleteiben, akik *K. marxianus* enzimtermelését vizsgálták. Ghaly és Singh (1989) *K. fragilis* élesztővel végzett kísérleteket a sajtsavó BOI értékének csökkentésére, melynek során 4% v/v inokulum mennyiséget alkalmaztak. Az előbbi mikroorganizmust alkalmazták Bachhawat és mtsai. (1996) édes sajtsavó laktóz tartalmának hidrolíziséhez. Az inokulum mennyisége 5% v/v volt. Berruga és mtsai. (1997) kilenc *K. marxianus* törzset hasonlított össze szakaszos fermentációkban, amelyek során a kiinduló sejtkoncentrációt

$10^4$  CFU/cm<sup>3</sup> értékre állították be. Ugyanekkora sejtkoncentrációt ( $2 \times 10^4$  CFU/cm<sup>3</sup>) alkalmazott Chanada és Chakrabarti (1996) különböző eredetű szennyvizek élesztőkkel történő szakaszos fermentációjában.

A sajt savó alapú egysejtfehérje-előállítás során az általánosan alkalmazott szakaszos (batch), illetve folyamatos (continuous) fermentációk mellett a szakaszos-rátáplálásos (fed-batch) eljárásra is találunk példát a szakirodalomban (Paraskevopoulou és mtsai., 2003, Barba és mtsai., 2001, Samuelov és mtsai., 1999).

Laboratóriumi kísérletekben rázatos kultúrákkal is kedvező eredményeket értek el (Szciodrak, 2000). Ross és mtsai. (2004) a laktóz lebontásában közreműködő enzimeket vizsgálta rázatos kultúrákban (30°C, 36 h, 150 l/min).

## **2.11. Abiotikus tényezők**

### **2.11.1. Hőmérséklet**

Az SCP előállítás során *K. marxianus* számára optimális hőmérséklet 30-35 °C között található (Vananuvat és Kinsella, 1975; Delaney és mtsai., 1975; Bernstein és mtsai., 1977; Paraskevopoulou és mtsai., 2003). Bellaver és mtsai. (2004), ill. Silva-Santisteban és Maugeri Filho (2005) *K. marxianus* enzimaktivitásának szakaszos, illetve folyamatos rendszerben történő vizsgálatakor 30°C-ot alkalmazott, amely esetben az enzimaktivitást megfelelőnek találta. A laktáz enzim hőfok optimuma mintegy 38 °C (Gasztonyi, 1992), azonban az élesztők számára az optimális alacsonyabb hőmérséklet fenntartása üzemi körülmények között könnyebben megvalósítható.

### **2.11.2. Kémhatás**

Az optimális élesztő szaporodáshoz – különösen a *Kluyveromyces* nemzetség esetében – enyhén savas közeg szükséges (pH 4-5). Ghaly és Kamal (2004) szerint a pH érték 4.0 és 5.0 között tartása szükséges a *K. fragilis* szaporodása és túlélése érdekében. Berstein és mtsai. (1977) felismerték, hogy a pH 4.5 körüli értéken tartása kiküszöböli azon lehetséges kontamináció veszélyét, amelyet a 6.0 pH felett szaporodó baktériumok jelentenek. Silva-Santisteban és Maugeri Filho (2005) *K. marxianus* enzimaktivitásának fermentációs vizsgálatokor kísérleteikben pH 3.5 értéket állítottak be.

### **2.11.3. Levegőztetés**

Az aerob fermentációk esetén a legelterjedtebb fermentortípus a kevert-levegőztetett reaktor. Ezt a klasszikus keverős fermentort általában a gyógyszeripar alkalmazza, de a legtöbb laborberendezés is ilyen kivételű. Laboratóriumi körülmények között a fermentációs rendszerek oxigén ellátását úgy oldjuk meg, hogy a reaktortérben elhelyezett levegőelosztón keresztül komprimált levegőt fúvatunk keresztül a fermentlén (Sevella, 2001a), és a tápoldatot folyamatosan keverjük. Ez a megoldás általában elegendő oxigén abszorbcíót biztosít. Egysejtféherje-előállítás során az élesztők légzéséhez szükséges oxigént a levegőztetés által biztosíthatjuk. Amennyiben a légzés gátolt, a galaktóz (és esetleg más cukrok) felhasználásának hatékonysága csökken (Goffrini és mtsai., 2002; Donnini és mtsai., 1992; Ulery és mtsai., 1991), amely akár a 20%-ot is elérheti. Az élesztők oxigénigénye megközelítőleg 5 mmol O<sub>2</sub>/l/min oldott oxigén (Lichtfield, 1989). Szakasos rendszerben –

mint a kísérleteink során is alkalmazott – az élesztők egyes szaporodási fázisára jellemző azok oxigén fogyasztása. A lappangási szakaszban a fajlagos oxigénfogyasztás jellemző értéke:  $\delta=0.3200 \times 10^{-12}$  mg O<sub>2</sub>/sejt/óra. Az exponenciális szakaszban a legintenzívebb ez a légzés, a fajlagos oxigénfogyasztás  $\delta=2.1400 \times 10^{-12}$  mg O<sub>2</sub>/sejt/óra. Az állandósult szakaszban a fajlagos oxigénfogyasztás mintegy  $\delta=2.1400 \times 10^{-12}$  mg O<sub>2</sub>/sejt/óra értéket vesz fel. Az elhalási szakaszra csekély mértékű -  $\delta=0.0028 \times 10^{-12}$  mg O<sub>2</sub>/sejt/óra – fajlagos oxigénfogyasztás jellemző. (Mansour és mtsai., 1993)

Ghaly és Kamal (2004) 1 ill. 3 VVM levegőztetést tartott megfelelőnek SCP előállítás során. Ghaly és mtsai. (1989) szerint 0.3 mg/dm<sup>3</sup> az a kritikus érték, amely alatt a mikroorganizmusok fajlagos oxigén fogyasztása függ a közeg oxigén koncentrációjától. Silva-Santisteban és Maugeri Filho (2005) *K. marxianus* fajjal végzett kísérleteiben 1, ill 2 VVM-es levegőztetést alkalmazva a kedvezőbb eredményt az előbbi esetben érték el.

Megjegyzendő, hogy az aerob folyamatok során a levegőztetés mellett a keverés fordulatszámát is figyelembe kell venni, hiszen a fermentor típusától függően a fordulatszám túlzott növelése a tápoldat oldott oxigén szintjét csökkentheti, tehát a kívánt folyamatokkal ellentétes hatást érünk el.

#### **2.11.4. A keverés fordulatszáma**

A keverés funkciója többretű. Biztosítja az energiabevitelt a folyadékba, eldiszpergálja a levegőztető gázt, elválasztja a gáz és folyadék fázist, elkeveri a fermentlé oldott és nem oldott komponenseit.

E funkciók miatt a folyadékot állandóan mozgásban kell tartani. A bevitt mechanikai energia hővé alakul. Az energia átadás funkció azért fontos, mert az egységnyi fermentor térfogatba bevitt energia határozza meg elsődlegesen az oxigén abszorpciós viszonyokat. Ebből a szempontból tehát a bevitt energiát növelni kell. Másrészt gazdaságossági szempontokat figyelembe véve egy lehetséges minimumra is törekednünk kell.

Ghaly és mtsai. (2005) sajtsavó fermentáció kinetikai modellezésekor végzett kísérleteikben 200, 400, ill. 600 1/min fordulatszámú keverést alkalmaztak. A legkedvezőbb eredményt (biomassza mennyisége: 37 g/dm<sup>3</sup>) 600 1/min fordulaton érték el. Silva-Santisteban és Maugeri Filho (2005) *K. marxianus* enzimtermelését vizsgálták az általunk is használt Bioflo III. (New Brunswick, USA) automata vezérlésű batch/continuous fermentorban, melynek során különböző keverőelemeket alkalmazva az 50 1/min fordulatszámú keverést folyamatosan 550 1/min-re növelték. A legnagyobb enzim aktivitást és biomassza koncentrációt 450 1/min fordulat mellett érték el. Bellaver és mtsai. (2004) a nagy fordulatszámú keverést (700 1/min) kis levegőztetéssel kombinálták (0.5 VVM) mind szakaszos, mind folyamatos rendszerben *K. marxianus* enzimtermelésének vizsgálatokor.

### **2.11.5. Habzás**

Az SCP előállításánál során olyan anyagok keletkeznek, amelyek csökkentik a felületi feszültséget, és a levegőztetés hatására a tápoldat felszínén nagy mennyiségű hab képződik. Sok esetben elegendő a mechanikus habtörés (pl. Frings-féle mechanikus habtörő, vagy

Fundafoam habszeparátor), sajt savó alapú SCP előállítás esetén azonban legtöbbször kémiai habzást gátlók (pl. Struktol, Glanapon) adagolására is szükség van a hab jellegének ismeretében.

A folyamat során keletkezett hab egy olyan kolloid rendszer, melyben a levegőbuborékok diszpergálva vannak a folyamatos folyadék fázisban. Ha a levegőt a tápoldat keverőelemei közelébe juttatjuk be, az megfelelő buborék visszatartást eredményez. A buborékképzés és stabilizálás elősegíti a nagy molekulatömegű felületaktív anyagok képződését, amelyek a habfilm réteg dinamikus felületének tulajdonságait meghatározzák (Prins, 1988). A fehérje tartalmú közegek – mint a sajt savó alapú SCP is – tulajdonságait meghatározza a felület nagysága, amely a nagy mennyiségű gáz folyadékban tartását segíti elő, illetve egy ellenálló felületi filmréteg, amely segít leküzdeni a folyadékban ébredő külső és belső erőket (Damodaran, 1997).

## **2.12. Az alkalmazott élesztő**

Az első kísérletekben, melyek a sajt savó élesztőkkel történő fermentálására irányultak, a laktóz előzetes enzimes hidrolízisét végezték, mivel az alkalmazott *Saccharomyces cerevisiae* nem rendelkezik azon enzimekkel, amelyek ezt a folyamatot végzik. Az enzimes bontás révén létrejött glükóz és galaktóz tartalmú tápoldatban azonban a *Saccharomyces cerevisiae* diauxiás növekedést mutatott, amely korlátozta az e fajjal végzett SCP előállítási technológia elterjedését (Porro és mtsai., 1992a).

Az ezt követő genetikai kísérletek a laktóz lebontásához szükséges enzimszisztéma új fajokban történő expressziójára irányultak.



Protoplast fúzióval létrehozták a *S. cerevisiae* és a *K. lactis* hibridjét (Farahnak és mtsai., 1986). Az így létrehozott rekombináns törzsek azonban genetikailag instabilak voltak, és kis szaporodási sebesség jellemezte őket (Porro és mtsai., 1992b).

A későbbiekben a *Kluyveromyces* (régábbi nevén: *Candida*) fajokat alkalmazták a sajtsavó alapú SCP előállítás során, mivel ezek az élesztők rendelkeztek a laktóz hidrolíziséhez szükséges enzimekkel, ezáltal a laktóz jelentős költséggel járó előzetes enzimes bontása elhagyható volt.

Bellaver és mtsai. (2004) *K. marxianus*-t szakaszos rendszerben szaporítva nem tapasztalt alkohol termelést, amely jelzi, hogy ez a faj sokkal inkább Cabtree-negatív, mint közeli rokona a *K. lactis*, vagy más Cabtree-negatív élesztő, ezért alkalmas sajtsavó alapú SCP előállításra. A *Kluyveromyces* fajoknak jellemző tulajdonsága a magas fehérje tartalom, mintegy 53% (v/v) (Choi és Park, 1999). További előnyük, hogy az élesztősejtek gyorsan leülepednek, flokkuláció és szedimentáció által könnyen leválaszthatók (Hang és mtsai., 2003).

### **2.13. A növekedés dinamikáját meghatározó hatások**

Az élesztő szaporodás sokrétű mikrobiológiai folyamat. Érdemes áttekinteni azon biotechnológiai szempontból jelentősebb hatásokat, amelyek az alkalmazott faj növekedésének dinamikáját meghatározzák.

Sokszor – különösen oligoszacharidok esetében – az élesztőfajok szaporodása aerob körülmények között folyik, nem pedig anaerobiózis, vagy olyan folyamatok által, amelyek során légzést nem folytatnak. Ez esetben a fermentáció gátolt. A cukrok felhasználásának ezt az oxigéntől

való függését nevezzük Kluyver effektusnak. Az ilyen „légzéstől-függő” fajokat pedig Kluyver-effekt pozitív fajoknak. Az effektus oka a cukortranszport rendszer kis aktivitásában keresendő, amely esetben a fermentációhoz szükséges magas szubsztrát szint nem biztosított, szemben az energiatermelő légzéssel, amely kevesebb szubsztrátot igényel. A Kluyver-effektus tényleges definíciója félreérthető, hiszen a standard fermentációs tesztekben Durham csövet alkalmaznak, és nem különítik el, hogy a fermentáció során történt-e szaporodás, vagy sem. Az effektust számos egyéb tényező is befolyásolja (Fukuhara, 2003): pl. légzés hiányában az erősen aerob fajoknál az oxidációs-redukációs viszonyok kiegyensúlyozatlansága, vagy esetenként az oxigén hatása a glikolitikus enzimek szintjére (Sims és Barnett, 1991), de említhetnénk az enzimek cukrokkal szembeni affinitásának változását is anaerob viszonyok között (Barnett, 1992).

Az egysejtfehérje-előállítás során úgy kell irányítanunk a fermentációt, hogy az élesztő oxidatív úton (légzés) bontsa le a sajtsavó laktóztartalmát. Ezt megfelelő levegőztetéssel, a Pasteur-effektus által érhetjük el, amely a fermentáció légzés általi gátlását jelenti. Egysejtfehérje-előállítás során az élesztőknek ezt a tulajdonságát hasznosítjuk. A Kluyver-effektus tehát a Pasteur-effektus egy speciális esete.

A kísérleteinkben is alkalmazott *K. lactis* aerob körülmények között, galaktózt tartalmazó közegben jól szaporodik. Ez a faj általában Kluyver-effekt pozitív (a legtöbb laboratóriumi törzs), de ismertek Kluyver-effekt negatív változatai is. A Kluyver-effektusnak ezt a

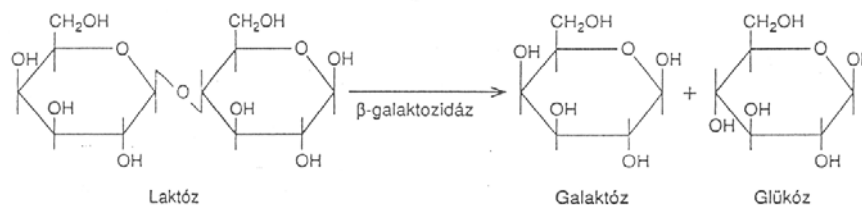
törzsektől függő változását más élesztők esetében is kimutatták. (Fukuhara, 2003)

A glükóz tartalmú tápoldatokban az élesztők oxigén-limitált környezetben alkoholos fermentációt folytatnak. Ez a jelenség „Cabtree effektus”-ként ismert (de Deken, 1966), és hosszú-, valamint rövidtávú változatát különböztetjük meg. Az előbbit nagy növekedési sebesség mellett (szakaszos mód, kemosztát fermentáció, vagy nagy hígítási sebesség mellett), az utóbbit pedig a rendszerben jelen lévő cukorfelesleg esetében figyelhetjük meg, akár ipari bioreaktorok esetében is (van Urk és mtsai., 1990, Kiers és mtsai., 1998).

#### **2.14. Enzimes folyamatok az egysejtfehérje-előállítás során**

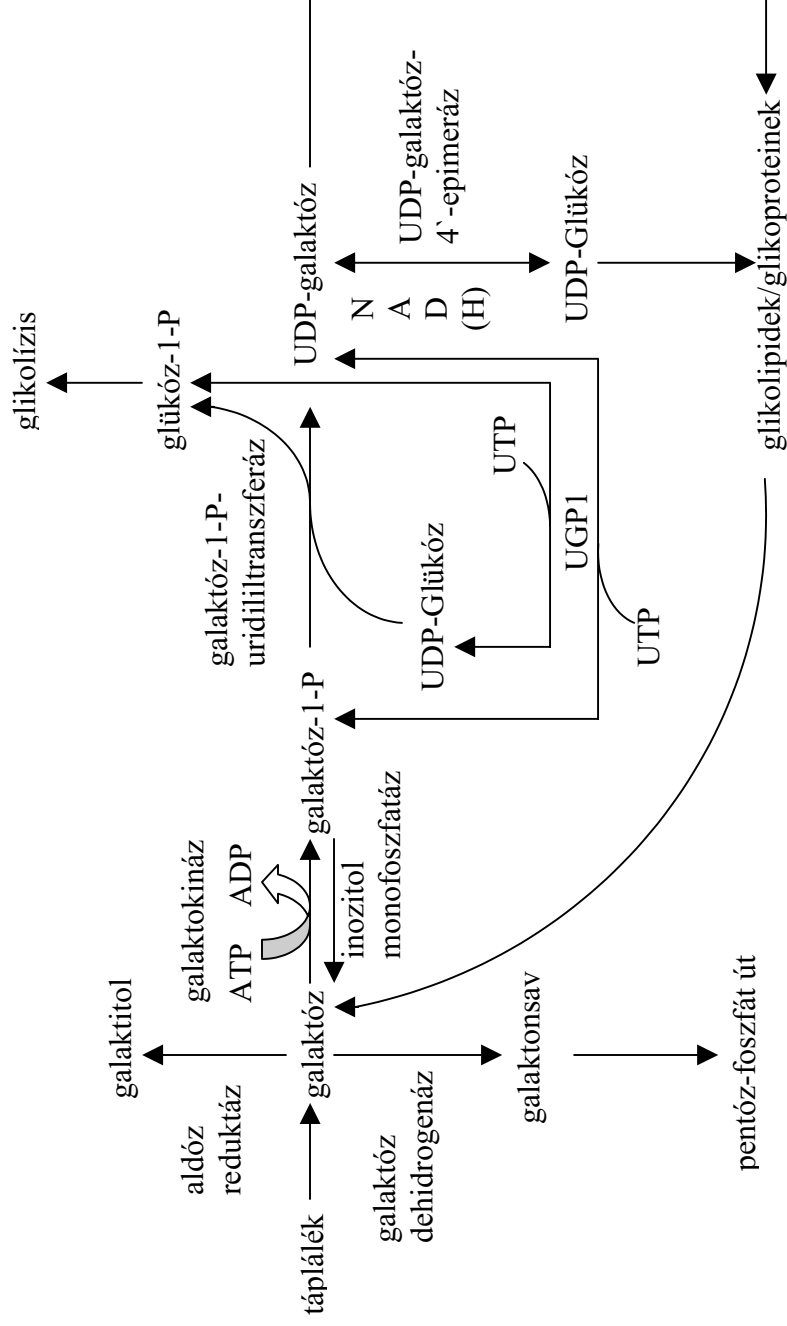
A laktóz bontásában szerepet játszó  $\beta$ -galaktozidáz, vagy laktáz (EC 3.3.1.23) enzim az élelmiszer- és gyógyszeripar egyik legtöbbször alkalmazott enzime, amely a laktózt glükózzá és galaktózzá hidrolizálja (Belem és Lee, 1998; Gekas és Lopez-Leiva, 1985) (2. ábra). Az enzim tejipari alkalmazása számos technológiai és környezetvédelmi előnnyel jár, amelyek közül kiemelkedő a sokféle szubsztrát (pl. laktóz oldatok, sajtsavó, sovány tej) használatának lehetősége (Jurado és mtsai., 2002). Élesztők enzimeit általában a semlegeshez közeli pH értékű termékek, pl. tej és édes sajtsavó esetében alkalmazzák (Harju, 1987).

Számos referenciát találunk az irodalomban arra vonatkozóan, hogy a szaporodás célját szolgáló közeg tulajdonságai hogyan befolyásolják a *K. marxianus*  $\beta$ -galaktozidáz termelését, amelyek közül jónéhány az oldott oxigén tenziójának fontosságát emeli ki (Barberis és Gentina, 1998; Schneider és mtsai., 2001; Barberis és Segovia, 2002).

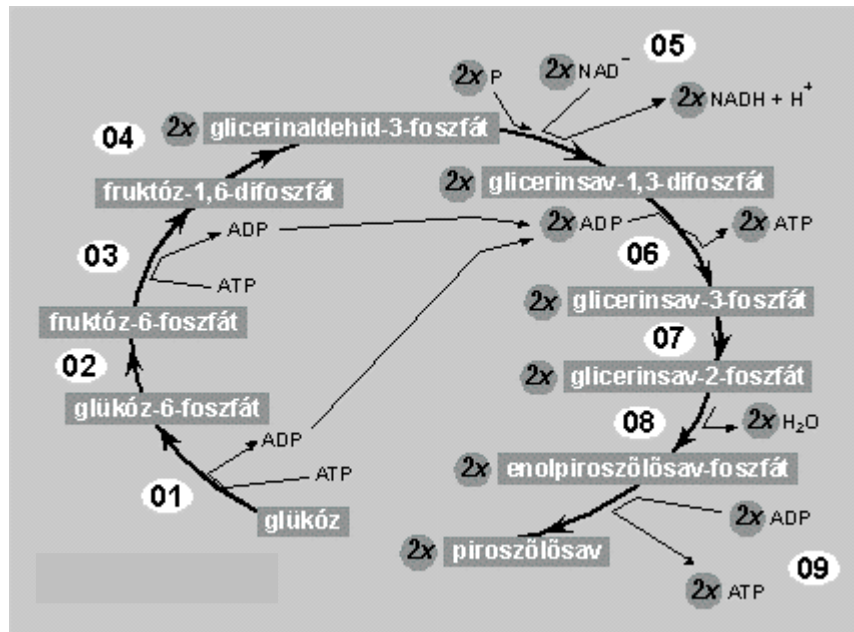


2. ábra A  $\beta$ -galaktosidáz laktóz bontásának sematikus ábrázolása

A laktóz felhasználás első lépése két kapcsolt gén által közvetített folyamat. A *LAC12* gén kódolja a laktóz permeázt, amely a laktóz sejtmembránon történő átjutásában játszik szerepet (Chang és Dickson, 1998). A *LAC4* gén pedig a  $\beta$ -galaktosidázt kódolja, amely a laktóz hidrolízisét végzi (Sheetz és Dickson, 1981). A keletkezett hexózok glükóz-6-foszfáttá alakulnak, a glükóz közvetlenül hexokináz segítségével (Prior és mtsai., 1993), a galaktóz pedig a Leloir úton (Cardini és Leloir, 1953; Leloir, 1951; Riley és Dickson, 1984) (3. ábra), amelyet követően belépnek a glikolízis folyamatába (4. ábra). Az ábrából látható, hogy a folyamatban galaktokináz, galaktóz-1-P-uridililtranszferáz és UDP-galaktóz-4'-epimeráz enzimek játszanak szerepet.



3. ábra Galaktóz metabolizmus a Leloir úton (Ross és mtsai., 2004)



**4. ábra** A glükóz bontása a glikolízis során  
 (<http://www.hupe.hu/szerv/tanszekek/kio/im/oktat/SEJTBIO/glikolizis/gliko.html>, 2005)

Mesterséges körülmények között a *LAC12* gén által kódolt laktóz-permeáz alkalmas arra, hogy felvegye a laktózt és a galaktózt, koncentráció grádienszt idézve elő (Riley és mtsai., 1987).

Egy olyan törzs, amely nem tartalmazza a *LAC4* gént a laktózt, mint egyedüli szénforrást nem, viszont egyéb alternatív szénforrást képes hasznosítani (Lodi és Donnini, 2005).

A közegben a galaktóz és laktóz kis koncentrációja esetén az előbbi inhibítorként játszik szerepet. A két szénhidrát forrás nagy koncentrációja viszont nem csökkenti a  $\beta$ -galaktozidáz aktivitását. (Kim és mtsai., 2004). Ghaly és mtsai. (2005) szerint a laktóz 1.9 g/dm<sup>3</sup> alatti, illetve 75

$\text{g/dm}^3$ -nél nagyobb koncentrációja gátolja az élesztősejtek növekedését. Legnagyobb szaporodási sebességet ( $\mu_{\text{max}}$ )  $30\text{-}75 \text{ g/dm}^3$  laktóz koncentrációk esetén mérték.

Az élesztőkben a galaktóz lebontásának új, ismeretlen biokémiai útjait csak a közelmúltban kutatták intenzíven (Ideker és mtsai., 2001; Yildirim és Mackey, 2003; Lai és Elsas, 2000; Nobelman és Lengeler, 1996; Schneider és mtsai., 1995), amelyeket Lai és Klapa (2004) tekintett át. Újabb kutatások (Ross és mtsai., 2004) is igazolták, hogy az élesztőkben a galaktóz lebontásának léteznek „transzferáz-független” útjai, amelyek célja a gal-1-P (galaktóz-1-foszfát) mennyiségének csökkentése. A folyamat egyes összefüggései azonban nem tisztáztak.

### **2.15. A genetikai tervezés**

Az élesztők azon tulajdonsága, hogy a különböző cukrokat asszimilálni képesek, meghatározza ipari szénforrásokon történő alkalmazásukat. A cukortranszport rendszer genetikai tervezése racionális lehetőség a hasznosítható cukrok skálájának szélesítésére. A genomok szekvenciájáról számos adattal rendelkezünk, amely lehetőséget teremt az élesztők cukor transzportját meghatározó gének azonosítására. Nem mindegyik élesztő faj alkalmas azonban genetikai manipulációra. A *K. lactis* Kluyver-effektust nem mutató mutánsának létrehozására irányuló kísérletek sikertelenül zárultak (Entian és Barnett 1983). A molekuláris szintű technikák terjedése révén egyre több kísérleti munkával találkozunk az élesztők esetében is (pl. Mauersberger és mtsai., 2001).

### **2.16 Az alkalmazott élesztők morfológiája**

A kísérleteink során alkalmazott *K. marxianus (fragilis)* (anamorf alakja a *Candida kefyr* szin. *Candida pseudotropicalis*), illetve *K. lactis* (anamorf alakja a *Candida sphaerica*) telemorf élesztők GYP táptalajon kifejlődött jellemző telepei kidomborodóak, simák és krémszínűek (erősen spórázó tenyészetben piros árnyalatúak). A Gram reakció szerint vegetatív szaporodásuk bimbózással történik (Ghaly és mtsai., 2004). Spóráik bab alakúak, és a felszakadó sporangiumból könnyen kiszabadulnak (Deák, 1998).

Összefoglalóan elmondhatjuk, hogy az 50-es évek közepétől számos általunk is vizsgált fajjal történtek kísérletek egysejtfehérje előállítására. Napjainkra a termelés visszaszorult, amit legtöbbször a gazdaságtalan előállítással indokolnak. Ennek ellentmondani látszik az a tény, hogy még a 80-as évek végén is számos vállalat foglalkozott egysejtfehérje-előállítással. A publikációk a gazdaságtalan előállítás kapcsán legtöbbször a magas energia költségeket említik, és nem állítják kontrasztba az élesztők biológiai potenciáljának kihasználásával. Az olajár-robbanás után érthetetlen módon, az addig n-alkánokon gazdaságosan végzett üzemi szintű egysejtfehérje-előállítással párhuzamosan az egyéb tápoldatokat alkalmazó technológiák is háttérbe szorultak.



### 3. ANYAG ÉS MÓDSZER

Vizsgálatainkat a Nyugat-Magyarországi Egyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Karának Élelmiszertudományi Intézetében található Deutscher AkkreditierungsRat által akkreditált (DAR regisztrációs szám: DAP-PL-3042.00) mikrobiológiai laboratóriumában végeztük.

#### 3.1. Anyagok

##### 3.1.1. Táptalajok

###### LYP (laktóz-élesztő-pepton) leves

20 g laktóz  
10 g élesztő  
20 g pepton  
1000 cm<sup>3</sup> forralt deszt. víz

###### LYP (laktóz-élesztő-pepton) agar

20 g laktóz  
10 g élesztő  
20 g pepton  
20 g agar  
1000 cm<sup>3</sup> forralt deszt. víz

###### GYP (glükóz-élesztő-pepton) agar

10 g glükóz  
10 g élesztő  
10 g pepton  
20 g agar  
1000 cm<sup>3</sup> forralt deszt. víz

###### YGC (élesztő, glükóz, chloramphenicol) agar

5 g élesztő  
20 g glükóz  
15 g chloramphenicol  
1000 cm<sup>3</sup> forralt deszt. víz

### **3.1.2. Oldatok**

#### 1 mólus NaOH oldat

40 g NaOH

1000 cm<sup>3</sup> forralt deszt. víz

Pontos koncentrációt a bemért mennyiség ezred gramm pontossággal történő megadásával határoztuk meg.

#### 1 mólus HCl oldat

83.5 cm<sup>3</sup> 37%-os HCl

916.5 cm<sup>3</sup> forralt deszt. víz

#### Fiziológiás sóoldat

0.9% NaCl

A decimális hígítási sorhoz kémcsövekbe kiadagolva (9 cm<sup>3</sup>/kémcső)

#### Suspension Medium (bioMérieux<sup>®</sup>, France)

0.85% NaCl

Habzágátló: Antifoam-Y30 emulzió (Agromilk Kft. Székesfehérvár)

A táptalajok és oldatok elkészítését az „ÉTI-ML-SOP-03-0 Munkautasítás a táptalajok és hígítófolyadékok készítéséhez” vizsgálati utasítás szerint végeztük.

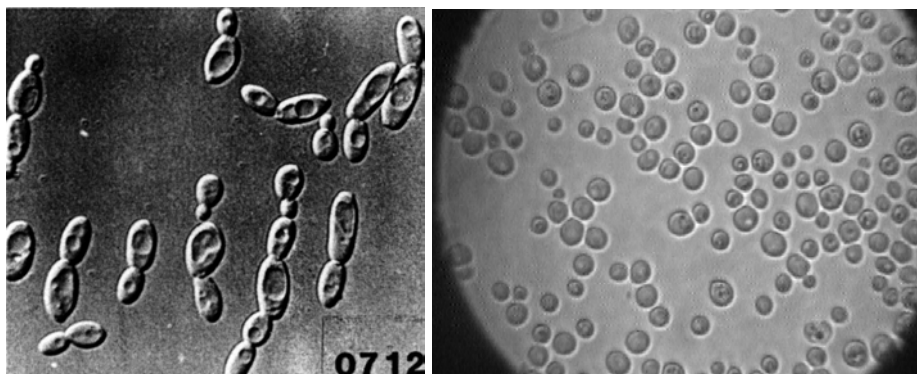
### **3.1.3. Élesztőtörzsek**

A vizsgálatra kiválasztott törzseket a 4. táblázat tartalmazza.

**4. táblázat** A kísérletek során alkalmazott élesztőtörzsek

Élesztőtörzs		Forrás
<i>Kluyveromyces fragilis</i> ( <i>marxianus</i> )	NCAIM Y 00697	Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Gyűjteménye, Hungary
<i>Kluyveromyces fragilis</i> ( <i>marxianus</i> )	NCAIM Y 0463	
<i>Kluyveromyces lactis</i>	NCAIM Y 00260	
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NCAIM Y 00933	
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	LAF 4	Chr. Hansen, Hørsholm Denmark

A *K. marxianus*, illetve *K. lactis* mikroszkópos képét a 5. ábra szemlélteti.



forrás: Barnett; Payne; Barrow (1983) forrás: saját felvétel

1

2

**5. ábra** *K. marxianus* DIC (Differential interference contrast ) mikroszkópos (1), illetve a *K. lactis* fénymikroszkópos (natív preparátum) (2) képe

Rendszertani besorolás

A kísérleteinkben alkalmazott *K. marxianus*, illetve *K. lactis* fajok rendszertani besorolása a 18S rRNS részleges szekvenciájának elemzése alapján.

Ország: *FUNGI*

Tagozat: *Eumycota*

Altagozat: *Ascomycotina*

Osztály: *Hemiascomycetes* (Kurtzman és Fell, 1998)

Rend: *Saccharomycetales*

Család: *Saccharomycetaceae*

Nemzetség: *Kluyveromyces* (van der Walt, 1956)

Faj: *Kluyveromyces marxianus*

*Kluyveromyces lactis*

#### 3.1.4. Sajtsavó

A kísérleteink során használt édes sajtsavót az Awassi Rt. kunszentmártoni tejüzeméből szereztük be, és meghatároztuk annak főbb beltartalmi mutatóit (5. táblázat).

**5. táblázat** Az alkalmazott sajtsavó néhány beltartalmi mutatója

Savfok (SH°)	5.90
Sűrűség (g/cm <sup>3</sup> )	1.02
Zsír (%)	0.30
Zsírintes száraz anyag (%)	6.35
Fehérje (%)	1.04
Laktóz tartalom (%)	4.97
pH	6.30

### 3.2. Eszközök

G/433617 Kutató mikroszkóp (Karl Zeiss AG, Germany)

A tenyészetek jellegzetes telepeiből készített preparátum mikroszkópos vizsgálatát 40x nagyítású száraz, illetve 120x nagyítású immerziós objektívvel végeztük.

WTB Binder KB-53 termosztát (Binder GmbH, Germany)

A szintenyészetek előállításához és a kísérletekhez szükséges friss tenyészetek szaporításához (30 °C).

U 41085 Ultrafagyasztó (New Brunswick Scientific, USA)

A kísérletekhez használt sajtsavót a változatlan beltartalmi értékek megőrzése céljából a felhasználásig -75°C tároltuk.

Densimat (bioMérieux<sup>®</sup>, France)

Optikai denzitás mérést 550 nm-en végeztük.

BIOFLO III<sup>®</sup> fermentor (New Brunswick Scientific, USA)

Az SCP előállítás során alkalmazott automata vezérlésű batch/continuous fermentor 1.25 dm<sup>3</sup> hasznos reaktor térfogattal rendelkezett, amely teljes egészében zártan sterilizálható, így biztosítva az utófertőződés elkerülését. A zárófedelébe integrálva található a hőmérő, a levegőztető gyűrű csomója, a Hannan típusú pH elektróda, a habzásgátló adagolását vezérlő érzékelő, a sav- és lúgadagoló csomói, az Ingold típusú oldott oxigén-mérő, a folyamatos keverést biztosító egyenáramú motor, a kondenzátor, illetve a mintavevő egység. A reaktortér

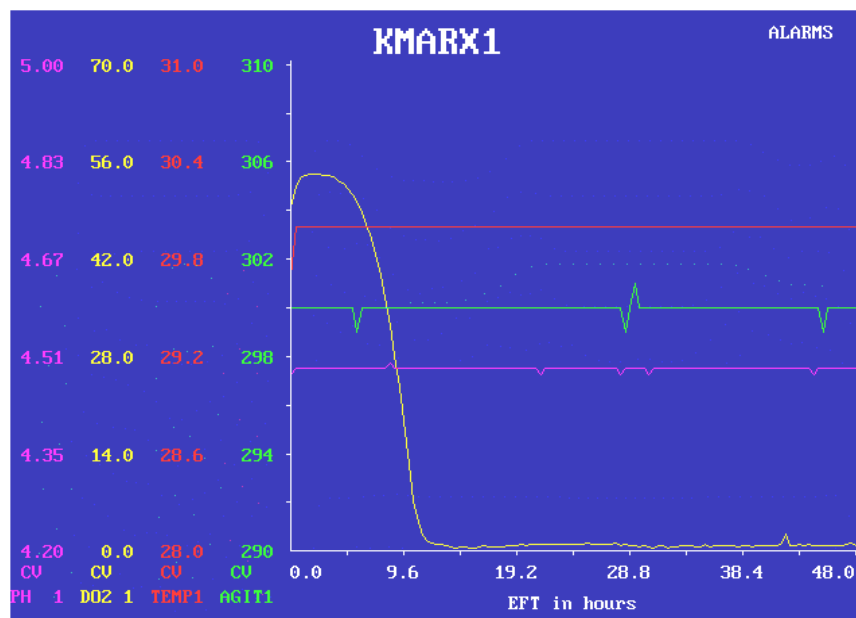
hűtése/fűtése érdekében a berendezés duplikatúrával ellátott. Négy perisztaltikus pumpa segítségével a tápoldathoz sav, lúg, habzágató adalék, illetve friss tápoldat (folyamatos, vagy rátáplálásos szakaszos fermentációk esetében) adagolható.

### Szoftverek

A beállított paraméterek (pH, keverés fordulatszáma, levegőztetés, hőmérséklet) felügyeletét Advanced Fermentation Software<sup>®</sup> 3.42 (New Brunswick Scientific, USA) programmal végeztük (6. ábra).

A kísérlet adatainak statisztikai feldolgozását és az eredmények ábrázolását Microsoft<sup>®</sup> Excel 2000 (Microsoft Corporation 1983-1999.), Microsoft<sup>®</sup> MicroCal Origin 3.0 (MicroCal Software InC. 1991-1993.), illetve Statistica 6.1 (StatSoft) szoftverek segítségével végeztük.

A nagyhatékonyságú folyadékkromatográf által mért adatok feldolgozásához Jasco Brown 1.5 HPLC kiértékelő szoftvert (JMBS Development, USA) használtunk.



**6. ábra** A fermentációs paraméterek (pH: pH 1; oldott oxigén (%): DO2 1; hőmérséklet: Temp1; keverés fordulatszáma (1/min): Agit1) folyamatábrája az egysejtfehérje-előállítás során (Advanced Fermentation Software<sup>®</sup> 3.42)

Wisa<sup>®</sup> légpumpa (ASF Thomas Industries, Germany)

A szabályozható kapacitású légpumpát 0.22 µm-es baktériumszűrő (Millipore, U.S.A.) közbeiktatásával csatlakoztattunk a fermentorhoz. A légpumpa kapacitása 100 és 1400 dm<sup>3</sup>/h között változtatható. A beállított levegő mennyisége a készüléken elhelyezett, rotaméterrel összekapcsolt szabályozó szelep segítségével tovább finomítható.

MX3<sup>®</sup>-as mintavevő egység (New Brunswick Scientific, USA)

A biosampler egy szabályozott fordulatszámú perisztaltikus pumpán keresztül kapcsolódott a fermentor reaktortéréhez. A legfeljebb

12 darab, egyenként maximum 20 cm<sup>3</sup> levett minta tárolására szolgáló fiolák köré szigetelő öv helyezhető, mely a hűtő egységgel együtt biztosítja a minták programozható, állandó hőmérsékleten tartását (-4°C – +4°C).

Merck-Hitachi L-7100 LaChrom gradiens nagyhatékonyságú folyadékkromatográf (HPLC) (Hitachi High Technologies America, Inc., Life Sciences Division., USA)

Webeco autokláv (Webeco, Bad Schwartau, Germany)

A táptalajok, hígítófolyadékok, valamint a fermentor reaktortérének sterilizálásához (121 °C, 15 min).

### **3.3. Módszerek**

#### **3.3.1. A vizsgálandó törzsek kiválasztása**

Nyers, vagy fehérjementesített sajt savó alapon történő egysejtfehérje előállításához Irvine and Hill, (1985) szerint a következő nemzetségek képviselői használhatók:

- *Kluyveromyces*
- *Candida*
- *Torula*

A korábbi besorolások szerint a *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces bulgaricus*, *Saccharomyces lactis* és a *Saccharomyces fragilis* nevű élesztőket a *Kluyveromyces marxianus* szinonimájává redukálták, vagy annak változatává tették. Később néhányat (pl. *Kluyveromyces lactis*) ismét önálló fajként ismertek el



(Deák, 1998). A vizsgálatok céljára kiválasztott öt törzset a 4. táblázat tartalmazza.

### **3.3.2. Tiszta tenyészetek készítése**

A dupla ampullás, vákuumzárásos, liofilezett preparátumokat bioprotektív lamináris boxban az előírásoknak megfelelően  $0.3 \text{ cm}^3$  fiziológiás sóoldatban rehidratáltuk, majd LYP levesbe oltva 48 óráig,  $30^\circ\text{C}$ -on inkubáltuk. A levesekből LYP agarra oltottunk tiszta tenyészetek előállítására céljából.

### **3.3.3. Inokulum preparáció**

A tiszta tenyészetek esetében az átoltásokat havonta elvégeztük, és minden kísérlet előtt 72 órával vonáskultúra formájában friss tenyészeteket készítettünk GYP táptalajon. Az inokulálás előtt minden esetben a telepekből készített festett preparátum mikroszkópos vizsgálatát is elvégeztük. A kísérlet indításakor a petricsészében elszaporított élesztő-tenyészetet  $5 \text{ cm}^3$ -nyi Suspension Medium-ban szuszpendáltuk. Az inokulum sejtkoncentrációját Densimat készülék segítségével úgy állítottuk be, hogy a sajtavóban a kezdeti koncentráció  $10^6$  élesztősejt/ $\text{cm}^3$  legyen. Lodi és Donnini (2005) kísérleteiben ugyanilyen nagyságrendű, míg Ross és mtsai. (2004) kisebb ( $5 \times 10^5$  élesztősejt/ $\text{cm}^3$ ) inokulum koncentrációt alkalmazott.

### **3.3.4. Az egysejtfehérje-előállítási kísérlet menete**

A kb.  $60 \text{ dm}^3$  édes sajtavóból első lépésben 2 mm pórusnagyságú szűrőn átszűrve eltávolítottuk az alvadékdarabokat, majd a kísérleti

berendezés kapacitásának megfelelően 1.5 dm<sup>3</sup>-es adagokban ultrafagyasztottuk (-75 °C). A kísérlet megkezdése előtt 24 órával a sajtsavót szobahőmérsékleten felolvasztottuk. A kísérőflóra, valamint a zavaró fehérjetartalom eliminálása végett 75 °C-on 45 percig pasztöröztük, majd 1 °C-ra hűtöttük. A folyamatot háromszor ismételtük, és a sajtsavót a felhasználásig steril zárható tetejű üveglombikokban tároltuk. Az alkalmazott sajtsavóelőkészítés megfelel Mansour és mtsai. (1993), valamint Ghaly és mtsai. (1993) által alkalmazott eljárásnak.

A fermentort összeszerelés után 121 °C-on 15 percig autoklávban hőkezeltük a megfelelő sterilitás elérése céljából. Az SCP előállítási kísérlet indításakor az előkészített sajtsavót a reaktortérbe töltöttük, majd az általunk optimálisnak tartott paramétereket (30 °C hőmérséklet, pH 4.5, 300 1/min fordulatszámú keverés, illetve 2.0 VVM /a percenként bejutatott levegő és a reaktor térfogatának hányadosa/ levegőztetés) állítottuk be a fermentoron.

Miután a rendszer elérte és stabilan tartotta a beállított paramétereket, az inokulumot a sajtsavóhoz adagoltuk, és megkezdtük a folyamat számítógépes programmal történő regisztrálását.

Az egysejtfehérje-előállítási folyamatot szakaszos rendszerben, 48 órán keresztül végeztük. Mintavétel 4 óránként történt az automata mintavevő segítségével, amely a levett mintákat (kb. 20 cm<sup>3</sup>) a folyamat végéig +2°C-on tartotta.

Az SCP előállítási kísérletet minden törzs esetében háromszor ismételtük. A folyamatot mindig azonos fordulatszámú keveréssel, hőmérsékleten és pH értéken, de eltérő levegőztetés mellett végeztük. A levegőztetés intenzitása azért bír jelentőséggel, mert az SCP-előállítási

rendszer lényeges jellemzője a benne lévő aerob anyagcserét folytató élesztők légzési tevékenysége. Az oxigén ugyanis, mint fő elektron akceptor a rendszert jellemző kontroll és állapotváltozókkal kapcsolatos. Így az általunk is detektált oldott oxigén koncentráció, vagy a fermentlére és technológiai körülményekre jellemző oxigén átviteli koefficiens (OTR – oxygen transfer rate), kontroll változók lehetnek, míg a légzési sebesség ( $dC/dt$ ), és a fajlagos légzési sebesség ( $Q$ ) a tenyészet fiziológiai állapotát jellemző állapotváltozók. A levegőztetés a kísérletek első szakaszában 2 VVM (percenként bejuttatott levegő és a reaktor térfogatának hányadosa), a későbbiekben pedig 0.5, 1, ill. 1.5 VVM volt.

### 3.3.5. Telepszám meghatározás

Az élesztők számának meghatározását az „ÉTI-ML-SOP-VU-FM-1.0 Élesztő és penész szám meghatározása tej és tejtermékekben” vizsgálati utasítás szerint végeztük.

A mintákból elkészítettük a decimális hígítási sorokat  $10^8$  tagig. Az utolsó három tagból 1-1  $\text{cm}^3$ -nyi mennyiségeket steril petri-csészébe pipettáztunk, majd YGC szelektív táptalajjal agarlemezeket öntöttünk, amelyeket szilárdulás után  $30\text{ }^\circ\text{C}$ -on 48 óráig inkubáltuk. Minden hígítás esetében 3 párhuzamos leoltást végeztünk. Kiértékelésnél a kapott lemezenkénti telepszámok súlyozott számtani átlagát határoztuk meg a következő képlet alapján:

$$\bar{c} = \frac{\sum c}{(n_1 + 0,1 \cdot n_2) * V * d}, \text{ ahol}$$

$\bar{c}$  a telepszám súlyozott középértéke (CFU – Colony Forming Unit/ $\text{dm}^3$ )

- $\Sigma c$  a számításba bevont valamennyi lemez telepeinek összege (legalacsonyabb és az azt követő kiértékelhető hígítási fokok)
- $n_1$  a legalacsonyabb kiértékelhető hígítási fokhoz tartozó lemezek száma
- $n_2$  a következő kiértékelhető hígítási fokhoz tartozó lemezek száma
- $d$  a legkisebb kiértékelt hígítási szint
- $V$  az inokulum mennyisége ( $\text{cm}^3$ )

A számolás során a 10 és 300 közötti telepet tartalmazó lemezeket vettük figyelembe.

### ***3.3.6. Szárazanyag tartalom meghatározás***

A szárazanyag mennyiségének meghatározását Deák és mtsai. (2002) által kidolgozott módszer szerint végeztük. A homogenizált mintákból  $10 \text{ cm}^3$ -nyi mennyiséget centrifugacsövekbe mértünk, majd  $5000 \text{ g}$  mellett  $10$  percig centrifugáltuk. A felülúszót eltávolítva a leülepedett élesztősejteket desztillált vízben felfuszpendálva újabb centrifugálást végeztünk. A folyamatot háromszor ismételtük, majd az utolsó centrifugálást követően az üledékeket desztillált vízzel - előzetesen század g pontossággal lemért - kb.  $20 \text{ g}$  kvarchomokot tartalmazó alumínium edényekbe mostuk, és  $105 \text{ }^\circ\text{C}$ -on tömegállandóságig szárítottunk. A visszamérések során kapott eredményekből a szárazanyag mennyisége meghatározható.

Az alkalmazott módszer megegyezik AOAC (1975) által leírt módszerrel.

### **3.3.7. Laktóz, glükóz, galaktóz és etanol tartalom meghatározása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) segítségével**

Vizsgálatainkat a Nyugat-Magyarországi Egyetem „Élelmiszertudományi Intézet és Magyar Tejgazdasági Kísérleti Intézet Kft. – akkreditált Központi Laboratóriumának” analitikai részlegében végeztük.

A mintákból kis mennyiséget (kb. 4 cm<sup>3</sup>) kivéve és 0.45 µm-es fecskendőszűrőn keresztül átszűrve, 150 µl-es inzerteket tartalmazó hasított gumimembránnal zárt fiolákat töltöttünk meg. A laktóz, glükóz, galaktóz és etanol mennyiségét a szűrletből HPLC segítségével határoztuk meg. A műszert minden mérés előtt kalibráltuk (minimum 3 pontos kalibráció, a kalibráló oldatok koncentrációja lefedte a mérési tartományt /0-5%; 0-50 g/dm<sup>3</sup>/) A vizsgálatok során Supelcogel H kolonnát, illetve 0,1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> eluent alkalmaztunk. A kolonnát 75 °C-on termosztáltuk. Az áramlási sebesség 0.5 cm<sup>3</sup>/min volt és az eluátumból refraktív index törésmutató detektorral mértük a laktóz, glükóz, galaktóz és etanol mennyiségét.

A folyadékkromatográfiás vizsgálatok kismértékű szervessav termelést is kimutattak, jóllehet az élesztők a rendszerben jelen lévő tej- és ecetsavat, valamint az etanolt képesek teljesen felhasználni szaporodásuk során (Hang és mtsai., 2003; Ásványi és mtsai., 2005c).

### **3.3.8. Hozamkonstansok**

A fermentáció egy bizonyos szakaszában a sejttömeg és a szusztrátkoncentráció között lineáris összefüggés van, azaz:

$$dx/dS = -Y$$

ahol,  $Y$ : Herbert által bevezetett hozamkonstans.

A negatív előjel magyarázata, hogy sejttömeg csak szubsztrát rovására keletkezhet. Az előző összefüggés analógiájára az egész fermentációt jellemző hozam ( $Y_{x/s}$ ) mellett kiszámíthatjuk a sejttömeg ( $Y_x$ ) hozamállandóját is ( $Y_x = dx/dt$ )

### **3.3.9. Statisztikai módszerek**

Az eredménykiértékelést a statisztikai módszerek közül az egy, illetve kéttényezős varianciaanalízis segítségével végeztük el, az általános lineáris modellt alkalmazva. Ennek során meghatároztuk a négyzetösszeg ( $SS$ ), szabadságfok ( $df$ ), szórásnégyzet ( $S^2$ ), számított  $F$  érték ( $F$ ), a szabadságfokok alapján meghatározott  $F$  érték ( $F_{krit}$ ) adatokat.

Az átlagértékek közötti szignifikáns különbséget ( $LSD_{95\%}$ ) Ducan-féle post-hoc módszerrel (Ducan, 1975) határoztuk meg, 5% elsőfajú hiba mellett, amelynek előnye a független változókra alkalmazható t-teszttel szemben, hogy a vett minták számát is figyelembe veszi.

### **3.3.10. Maximális fajlagos szaporodási sebesség meghatározása**

A sejtszámlálások során kapott eredményeket (7. ábra) logaritmizálva, és az idő függvényében ábrázolva egy nyújtott S görbét, az exponenciális szaporodási görbét kapjuk. A maximális fajlagos szaporodási sebesség ( $\mu_{max}$ ) meghatározása ennek lineáris szakaszából történik regresszióval, amely megfelel a mikroba szaporodás exponenciális fázisának. A meredeksége ( $m$ ), illetve az  $R^2$  értékének

kiszámítását követően az előbbiből, a Student féle t-eloszlás kritikus értékeit tartalmazó táblázat segítségével a maximális fajlagos szaporodási sebesség ( $\mu_{\max}$ ) meghatározható a

$$\mu_{\max} = t_{0,05} \cdot m$$

összefüggés alapján.

### **3.3.11. Generációs idő**

Az előző fejezetben leírt módszerrel meghatározott maximális fajlagos szaporodási sebesség ( $\mu$ ) és generációs idő ( $t_g$ ) között a kapcsolat függvényeszerű, így ez utóbbi a

$$t_g = \ln 2 / \mu$$

összefüggés segítségével megadható.

### **3.3.12. Az eredő folyadékoldali oxigénabszorpciós együttható, a telítési oxigén koncentráció, valamint a légzési sebesség meghatározása**

A eredő folyadékoldali oxigénabszorpciós együttható ( $K_L a$ ) meghatározását Sevilla (2001b) módszere szerint végeztük. A dinamikus  $K_L a$  meghatározás során a mikróbák légzését leíró

$$dC/dt = K_L a \times (C^* - C) - xQ \quad (\text{kg O}_2/\text{m}^3 \times \text{h}) \quad [1]$$

összefüggésből indultunk ki, ahol:

a: térfogategységre jutó anyagátadási felület ( $\text{cm}^{-1}$ )

$K_L a$ : eredő folyadékoldali oxigénabszorpciós együttható ( $\text{h}^{-1}$ )

$C^*$ : telítési oxigén koncentráció ( $\text{mg}/\text{dm}^3$ )

C: aktuális oldott oxigén koncentráció ( $\text{mg}/\text{dm}^3$ )

x: sejttömeg (g)

Q: fajlagos légzési sebesség ( $\text{h}^{-1}$ )

## Anyag és módszer

---

A fermentor levegőztetését egy adott időpontban leállítva az oldott oxigén (C) csökkenő értékei által meghatározott egyenes iránytangense a légzési sebességet (dC/dt) adja.

Az [1] egyenletet linearizálva a:

$$C = -1/K_L a(dC/dt + xQ) + C^*$$

egyenletet kapjuk, amelyet grafikusán ábrázolva a  $K_L a$  és  $C^*$  értéke kiszámítható.



## 4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

### 4.1. A kiválasztott élesztőtörzsek

A szakirodalomban közölt adatok alapján és a 3.3.1. alfejezetben leírt metodikával két élesztőfajt (*Kluyveromyces marxianus*, illetve *Kluyveromyces lactis*) tartottunk alkalmasnak sajt savó alapú egysejtfehérje előállításra. A két faj vizsgálati céllal megvásárolt öt törzsének (4. táblázat) mindegyike elérhető Magyarországon (közülük 4 magyarországi törzsgyűjteményben), melyeket a későbbi üzemi alkalmazás lehetősége miatt ítéltünk lényegesnek.

### 4.2. Az optimális fermentációs paraméterek megadása

Kísérleteink első fázisában a kiválasztott törzsekkel szakaszos egysejtfehérje-előállítást végeztünk az általunk optimálisnak ítélt fermentációs paraméterek (6. táblázat) mellett (Ásványi és mtsai., 2005a).

**6. táblázat** Az egysejtfehérje-előállítás során alkalmazott paraméterek

Paraméter	Beállított érték
Keverés (1/min)	300±1
Hőmérséklet (°C)	30±0.1
pH	4.5±0.01
Levegőztetés	0.5-2 VVM <sup>1</sup>
Oldott oxigén (mg/ dm <sup>3</sup> )	Mért

<sup>1</sup>VVM: percenként bejuttatott levegő és a reaktor térfogatának hányadosa

A hőmérséklet hatása az Arrhenius-összefüggés értelmében jelentkezik, annak ellenére, hogy a mikroba metabolizmusa számtalan

## Eredmények

---

elemi, molekuláris szintű lépés eredője. A hőmérséklet a növekedésen túl a termékképzésre is hatással van. Gyakran a növekedés és a termékképződés hőfokoptimuma nem esik egybe. Esetünkben is igaz ez a megállapítás, hiszen az élesztő enzimtermelésének hőfokoptimuma mintegy 38 °C, míg a szaporodás optimális intervalluma ennél 5-8 °C-al alacsonyabb. Ez természetesen a tenyésztett mikrobán túl a környezet egyéb tényezőitől (pH, fermentlé összetétele) is függ. A teljes egysejtfehérje-előállítás folyamat optimális hőmérsékletének, illetve hőmérséklet profiljának meghatározása olyan optimumkeresési feladat, amely a matematikai modellezés segítségével megoldható. Kísérleteink során a reaktortér hőmérsékletét 30°C-on tartottuk a duplikatúrával ellátott alapi rész segítségével.

A fermentlé pH értékének hatása elsődlegesen a sejtmembrán anyagtranszport-folyamataira irányul. Mivel a folyamat során a pH-t szabályoztuk, ezért kontroll változóként vehetjük figyelembe. Gyakran a pH az a környezeti tényező, amely a rendszer idegen mikrobákkal történő befertőződését meggátolja, azonban soha nem hagyatkozhatunk csupán erre a rendszer csíra mentességének fenntartásánál. A tápoldat kémhatását a fermentor folyamatos szabályozással pH 4.5 értéken tartotta, oly módon, hogy a pH-mérő impulzusai alapján 1 mólos NaOH-t, vagy, 1 mólos HCl-ot adagolt a reaktortérbe. A pH érték a fermentáció kezdetén gyorsan emelkedett, mivel az élesztők a sajtsavóban található tejsavat felhasználják és más savas kémhatású végtermék nem keletkezik, ezért a kísérlet indítását követően a savfelhasználás fokozottabb, mint a későbbi szakaszokban.

A reaktortér kis mérete és a flooding kiküszöbölése érdekében a keverés fordulatszámát 300 1/min értéken tartottuk.

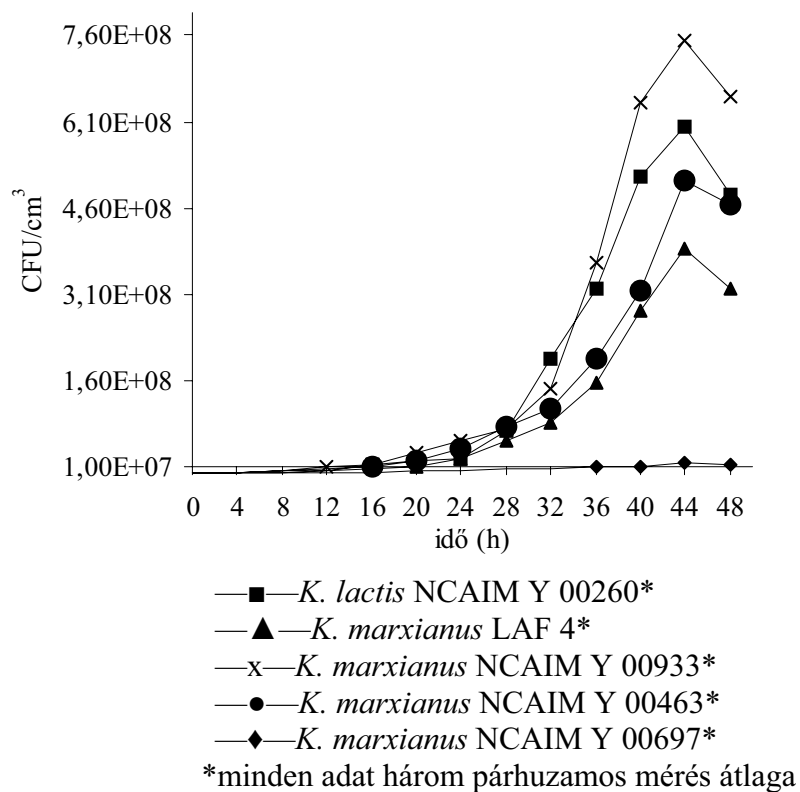
Az élesztő szaporítására használt tápoldat a cukor és fehérjevegyületeken kívül különböző – részben ismeretlen – felületaktív anyagokat is tartalmaz. Ezeket vagy már az eredeti tápoldat tartalmazza, vagy a folyamat során keletkeznek, esetleg magából az élesztősejtből jutnak ki. Egysejtfehérje-előállítás közben a tápoldat levegőztetése és keverése következtében a felületi feszültségcsökkentő anyagok hatására hab képződik, amely az élesztőszaporítás folyamatára hátrányos, mivel csökken a hasznos térfogat és a levegőztetés hatásfoka. Ilyen esetben indokolt a mechanikus habtörés, vagy kémiai habzásgátlók adagolása. A habzás csökkentésére felületaktív Antifoam-Y30 emulziót alkalmaztunk.

### **4.3. A törzsek által elért maximális telepszám és maximális fajlagos szaporodási sebesség**

A vett mintákból meghatároztuk az élesztő telepszámot

Ennek kettős célja volt:

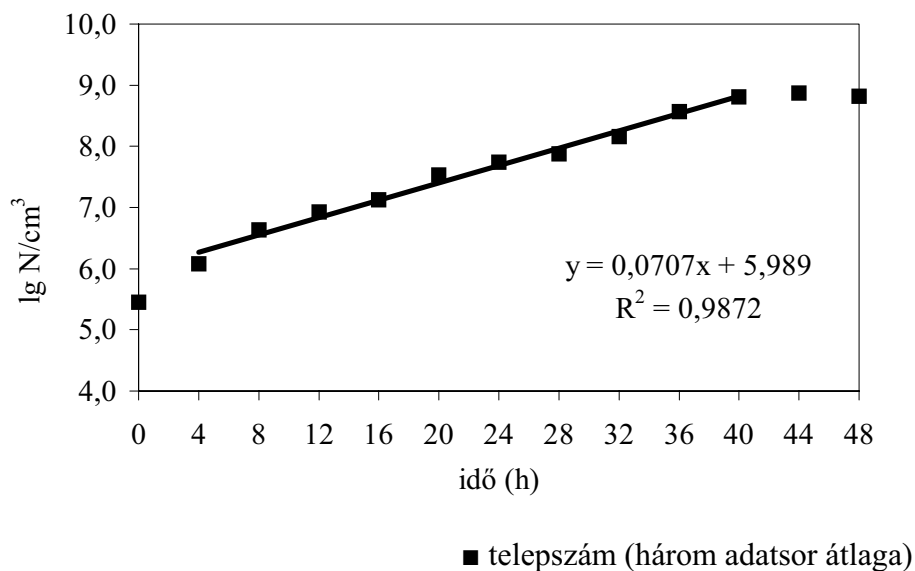
- egyrészt megállapítottuk, hogy az általunk vizsgált élesztőtörzsek azonos szaporodási feltételek mellett elérték-e a szakirodalomban közölt maximális sejtszám ( $N_{max}$ ) értékeket,
- másrészt meghatározhattuk a törzsek maximális fajlagos szaporodási sebességét ( $\mu_{max}$ ), vagyis kiválaszthattuk a szaporodás szempontjából egysejtfehérje előállításra leginkább alkalmas törzset.



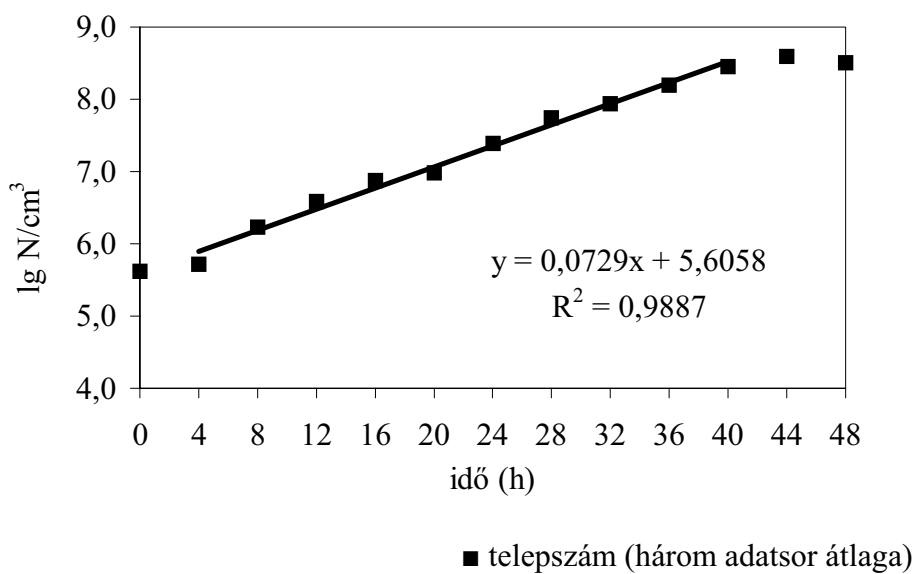
7. ábra Szaporodási görbék a vizsgált törzsek esetében

A 7. ábra adataiból látható, hogy a vizsgált törzsek esetében a maximális telepszámot a folyamat 44. órájában kaptuk.

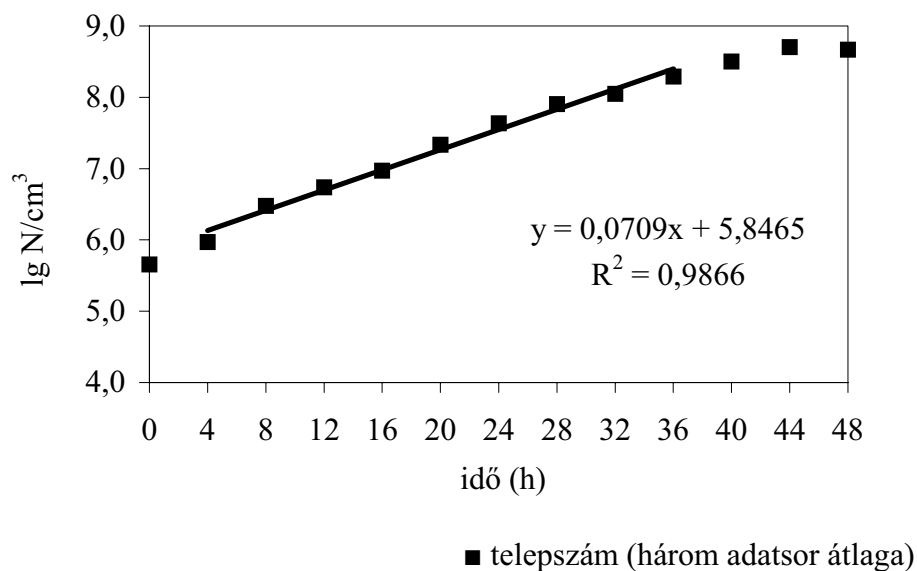
A 3.3.10. fejezetben leírt módszer segítségével a maximális fajlagos szaporodási sebesség ( $\mu_{max}$ ) az egyes törzsek esetében kiszámítható (8-12. ábrák; 7. táblázat).



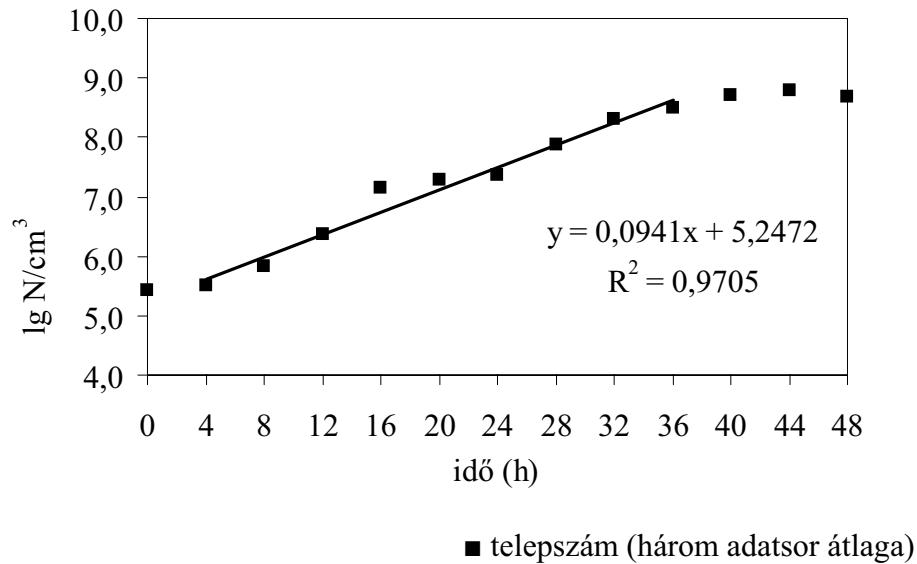
**8. ábra** A  $\mu_{\max}$  érték meghatározása *K. marxianus* NCAIM Y 00933 törzs esetében



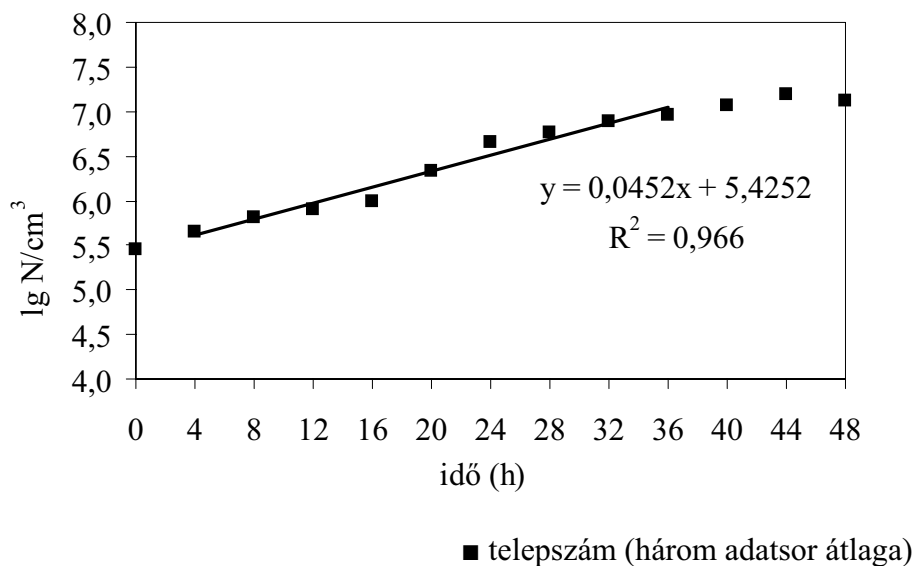
**9. ábra** A  $\mu_{\max}$  érték meghatározása *K. marxianus* LAF 4 törzs esetében



10. ábra A  $\mu_{\max}$  érték meghatározása *K. marxianus* NCAIM Y 00463 törzs esetében



11. ábra A  $\mu_{\max}$  érték meghatározása *K. lactis* NCAIM Y 0260 törzs esetében



**12. ábra** A  $\mu_{\max}$  érték meghatározása *K. marxianus* NCAIM Y 00697 törzs esetében

A telepszám meghatározást minden törzs esetében háromszor ismételtük, majd a három független párhuzamos adatsort a 3.3.9. alfejezetben leírtak szerint értékeltük ki. (8. táblázat).

A maximális sejtszámok logaritmusának átlagértékeit és azok 95%-os konfidencia-intervallumát a 13. ábra szemlélteti.

## Eredmények

**7. táblázat** A maximális sejtszámok logaritmusa ( $\log N_{\max}$ ) és a fajlagos szaporodási sebesség ( $\mu_{\max}$ ) értékek az egysejtfehérje-előállítás során

Törzs	$\log N_{\max}^*$ (log CFU/ml)	$\mu_{\max}^*$ (1/h)
<i>Kluyveromyces lactis</i> NCAIM Y 00260	$8.78 \pm 0.04^a$	$0.217 \pm 0.014^a$
<i>Kluyveromyces marxianus</i> LAF 4	$8.57 \pm 0.15^b$	$0.168 \pm 0.006^b$
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NCAIM Y 00933	$8.87 \pm 0.08^a$	$0.163 \pm 0.007^b$
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NCAIM Y 00463	$8.67 \pm 0.21^b$	$0.163 \pm 0.007^b$
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NCAIM Y 00697	$7.17 \pm 0.10^c$	$0.104 \pm 0.007^c$

\* Az adatok három párhuzamos mérés középértékei  $\pm$  standard hiba. <sup>abcd</sup> az eltérő kitevőjű értékek azonos oszlopon belül szignifikánsan különböznek ( $P < 0.05$ ).

**8. táblázat** Maximális sejtszám-értékek varianciaanalízise

Tényezők	SS	df	S <sup>2</sup>	F	F <sub>krit.</sub>	LSD <sub>95%</sub>
Csoportok között	5.968	4	1.492	88.000	3.480	0.237
Csoporton belül	0.169	10	0.017			
Összesen	6.137	14				

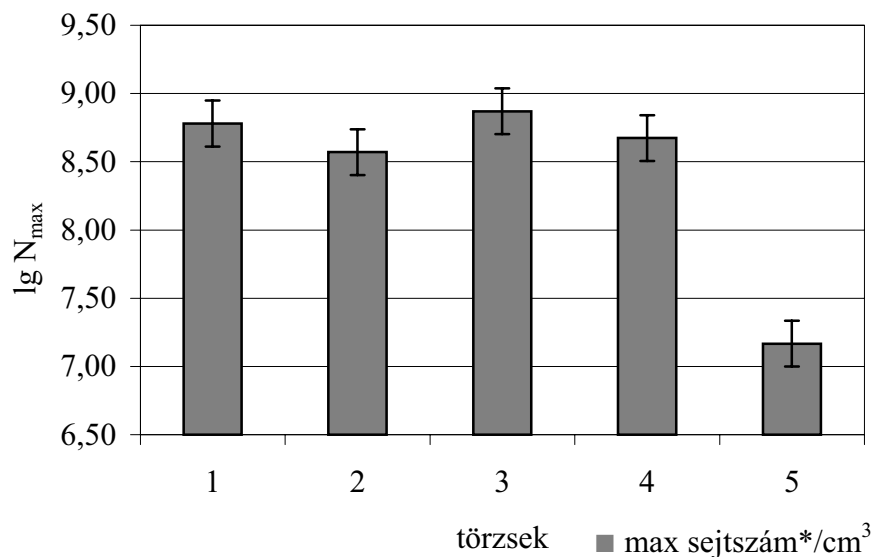
A 7. táblázat adataiból megállapítható, hogy a maximális sejtszámok tekintetében a *K. marxianus* LAF 4, illetve a *K. marxianus* NCAIM Y 00463 törzsek eredményei, szignifikánsan kisebbek a *K. marxianus* NCAIM Y 00933, valamint a *K. lactis* NCAIM Y 00260 törzsek eredményeinél. A *K. marxianus* NCAIM Y 00697 eredménye minden törzshöz viszonyítva szignifikánsan kisebb.

A maximális fajlagos szaporodási sebesség esetében a *K. lactis* NCAIM Y 00260, illetve a *K. marxianus* NCAIM Y 00697 törzsek



## Eredmények

különböznek szignifikánsan a csoport többi tagjától. Míg az előbbi törzs a csoport átlagánál nagyobb, addig az utóbbi kisebb  $\mu_{\max}$  értékeket mutatott.



1 *K. lactis* NCAIM Y 00260

2 *K. marxianus* LAF 4

3 *K. marxianus* NCAIM Y 00933

4 *K. marxianus* NCAIM Y 00463

5 *K. marxianus* NCAIM Y 00697

\*három párhuzamos adatsor átlaga

**13. ábra** A maximális sejtszámok átlagértékei és azok 95%-os konfidencia-intervalluma.

Alvarez és Ricano (1979) *K. marxianus* fajt alkalmazva kísérleteiben, 37 °C-on, pH 4.5 mellett a  $\mu_{\max}$  értékét 0.21 1/h-ban állapították meg, amely megfelel eredményeinknek. Ben-Hassan és mtsai. (1992), Mansour és mtsai. (1993), illetve Ghaly és mtsai. (2005) az előzőekkel azonos fermentációs paraméterek mellett a  $\mu_{\max}$  értékét 0.2 1/h-ban közölték.

Bellaver és mtsai. (2004) galaktózt, illetve laktózt alkalmazva egyedüli szénforrásként a  $\mu_{\max}$  értékét mindkét esetben  $0.44 \pm 0.03$  1/h-nak találta, amely jóval nagyobb az általunk közölt értékeknél. Hasonló értékeket ( $0.043 \pm 0.03$  1/h) értek el Barba és mtsai. (2001)

Az előzőekben már szoltunk a géntechnikák segítségével létrehozott új törzsek fokozott szaporodási sebességéről. A *K. lactis* és *S. cerevisiae* hibridjével 4% (m/v) laktózt tartalmazó sajt savóban  $\mu_{\max} = 0.43$  1/h értéket ért el (Ostergaard és mtsai., 2000).

Lodi és Donnini (2005) *K. fragilis* fajt alkalmazva kísérleteikben  $8.4 \times 10^8$  CFU/cm<sup>3</sup> sejtszámot a fermentáció 72. órájában érték el. Berruga és mtsai. (1997) nyolc *K. marxianus* törzset hasonlított össze azonos fermentációs paraméterek mellett (30 °C, 100 1/min fordulatszámú keverés), amelynek során minden törzs esetében elérték az  $1 \times 10^8$  CFU/cm<sup>3</sup> maximális sejtszámot.

Ghaly és mtsai. (2005) *K. marxianus* esetében 1 VVM levegőztetést alkalmazva egy nagyságrenddel kisebb ( $4.95 \times 10^7$  CFU/cm<sup>3</sup>) maximális sejtkoncentrációt közöltek.

Ben-Hassan és Ghaly (1995) a fermentációs körülményektől függően  $4.28 \times 10^7 - 1.13 \times 10^9$  sejt/cm<sup>3</sup> maximális sejtszámot értek el, amelyek közül az utóbbi egy nagyságrenddel meghaladja az általunk közölt értékeket.

#### 4.4. Tápanyagok felhasználása

A fermentálé tápanyagai környezeti tényezőkként szerepelnek és fontosak a mikróbák anyagcsere-termelése és növekedése szempontjából.

Nem hagyhatjuk figyelmen kívül azonban a mennyiségi és minőségi tulajdonságokat sem, hiszen ezek segítik elő az induktív tulajdonságok manifesztálódását a számtalan genotípus lehetősége közül. Megjegyzendő, hogy a szubsztrátok, hasonlóan a pH-hoz, kontroll és állapotváltozóként is szerepelhetnek. A szubsztrát felhasználási sebességek, és a fajlagos szubsztrát felhasználási sebességek állapotváltozók, és hatással lehetnek a növekedési sebességre. Ilyen esetekben limitáló szubsztrátról beszélünk. Ezt a funkciót kísérleteinkben a laktóz töltötte be, hiszen a  $\beta$ -galaktozidáz szubsztrátjaként, kimerülését követően a rendszer hanyatló fázisa következett. Érdekes tehát nyomon követni a teljes, vagy az enzimesen bontott (glükóz + galaktóz) formában jelenlévő laktóz mennyiségét, hiszen így következtethetünk a folyamat egyes fázisaira, valamint az alkalmazott mikroorganizmusok anyagcsere-folyamatának jellemző vonásaira.

Az egyes törzsek esetében HPLC segítségével meghatároztuk a tápoldat glükóz, galaktóz és laktóz tartalmát, valamint a termelt maximális etanol mennyiségét. A maradékcukor tartalom a laktóz lebontásának hatékonyságát, míg az etanol termelődése a nem megfelelő oxigénellátás következtében fellépő fermentatív szénhidrátbontást, esetenként a diauxiás növekedést jelzi (Ásványi és mtsai., 2005b).

### **4.4.1. A tápoldat glükóz tartalma**

Kísérleteink során a 3.3.7. alfejezetben leírt módszerrel meghatároztuk a tápoldat glükóz tartalmát, majd az eredményeket a 3.3.9. alfejezetben leírtak szerint értékeltük ki (9-10. táblázat; 14. ábra).

**9. táblázat** A tápoldat glükóz tartalma (%) az egysejtfehérje-előállítás végén a vizsgált törzsek esetében

Glükóz tartalom (%)			
Törzsek	Átlag*	Szórás	Variancia
<i>K. lactis</i> NCAIM Y 00260	1.7E-04 <sup>a</sup>	±2.9E-04	8.5E-08
<i>K. marxianus</i> LAF 4	3.3E-04 <sup>b</sup>	±3.1E-04	9.8E-08
<i>K. marxianus</i> NCAIM Y 00933	1.7E-05 <sup>c</sup>	±2.9E-05	8.3E-10
<i>K. marxianus</i> NCAIM Y 00463	7.6E-04 <sup>d</sup>	±9.2E-04	8.4E-07
<i>K. marxianus</i> NCAIM Y 00697	2.9E-04 <sup>b</sup>	±5.0E-04	2.5E-07

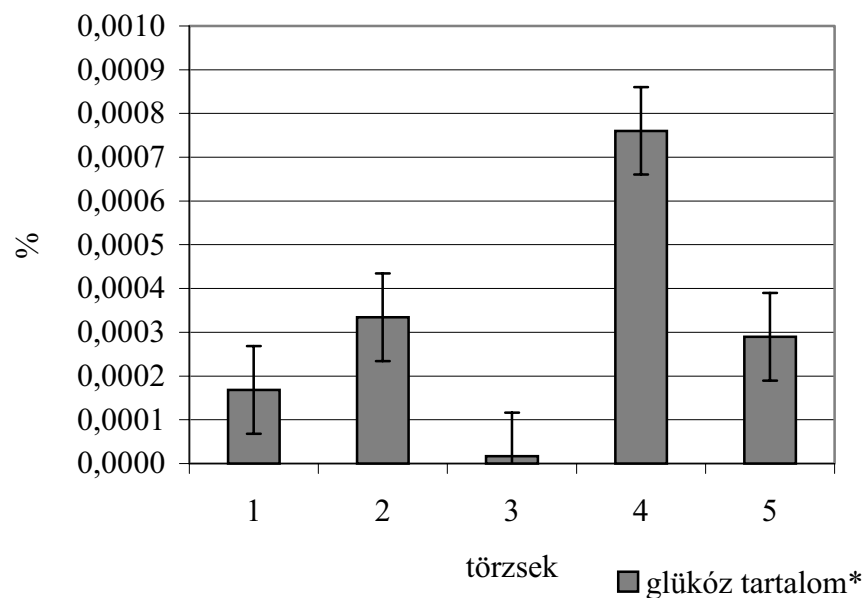
\*három párhuzamos adatsor átlaga <sup>abcd</sup> az eltérő kitevőjű értékek azonos oszlopon belül szignifikánsan különböznek ( $P < 0.05$ )

**10. táblázat** A végső glükóz tartalom (%) varianciaanalízise

Tényezők	SS	df	S <sup>2</sup>	F	F <sub>krit.</sub>	LSD <sub>95%</sub>
Csoportok között	9.6E-06	4	2.4E-06	9.435	3.478	9.2E-04
Csoporton belül	2.5E-06	10	2.5E-07			
Összesen	1.2E-05	14				

A 9. táblázat adataiból látható, hogy a *K. marxianus* NCAIM Y 00463 törzs eredménye mindegyik vizsgált törzs átlagánál szignifikánsan nagyobb volt. A kisebb értékeket mutató törzsek közül a *K. marxianus* LAF 4 és a *K. marxianus* NCAIM Y 00697 törzs átlagai nem különböznek egymástól, viszont szignifikánsan nagyobbak bizonyultak a *K. lactis* NCAIM Y 00260, illetve a *K. marxianus* NCAIM Y 00933 törzsek eredményeinél.

## Eredmények



1 *K. lactis* NCAIM Y 00260

2 *K. marxianus* LAF 4

3. *K. marxianus* NCAIM Y 00933

4 *K. marxianus* NCAIM Y 00463

5 *K. marxianus* NCAIM Y 00697

\*három párhuzamos mérés átlaga

**14. ábra** A tápoldat glükóz tartalmának (%) átlagértékei és azok 95%-os konfidencia intervalluma az egysejtfehérje-előállítás végén a vizsgált törzsek esetében

A szakirodalomban az élesztőkkel végzett sajtsavó alapú egysejtfehérje előállítás során a tápközeg glükóz, illetve galaktóz tartalmára vonatkozóan nem találtunk adatot. A publikációkban közölt kísérletek eredményeinek segítségével csupán az egyes részfolyamatokra következtethetünk.

Bailey et al (1982) 5% glükóz tartalmú tápoldatban a felhasználás maximumát élesztőtől függően a 12. és 22. órában érte el. Lark és mtsai. (1997) 115 g/dm<sup>3</sup> koncentrációjú tápoldatban *K. marxianus* élesztőt szaporított, amely az általunk is alkalmazott hőmérsékleten (30 °C) az

## Eredmények

---

inokulálástól számított 8 órán belül felhasználta a teljes glükóz mennyiségét. Bellaver és mtsai. (2004) 25, illetve 14 g/dm<sup>3</sup> glükóz tartalmú oldatokban *K. marxianus* élesztőt szaporítva azt tapasztalták, hogy a folyamat 4. illetve 6. órájára ezen élesztőfaj, a kiindulási glükóz mennyiségének szinte 100%-át felhasználja, és a továbbiakban a folyamat végéig az általunk is tapasztalt alacsony glükóz tartalmakat regisztráltak. Merico és mtsai. (2004) kísérleteikben *K. lactis* élesztőt szaporítottak 2% glükóz tartalmú tápoldatban, amelynek során az általunk tapasztaltnál kevesebb, mintegy 2.68 mg/cm<sup>3</sup> maximális biomassa mennyiséget értek el.

### 4.4.2. A tápoldat galaktóz tartalma

A 3.3.7. alfejezet alapján HPLC segítségével meghatározott galaktóz tartalom eredményeket a 3.3.9. alfejezetben leírtak szerint értékeltük ki (11-12. táblázat; 15. ábra).

**11. táblázat** A tápoldat galaktóz tartalma (%) az egysejtfehérje-előállítás végén a vizsgált törzsek esetében

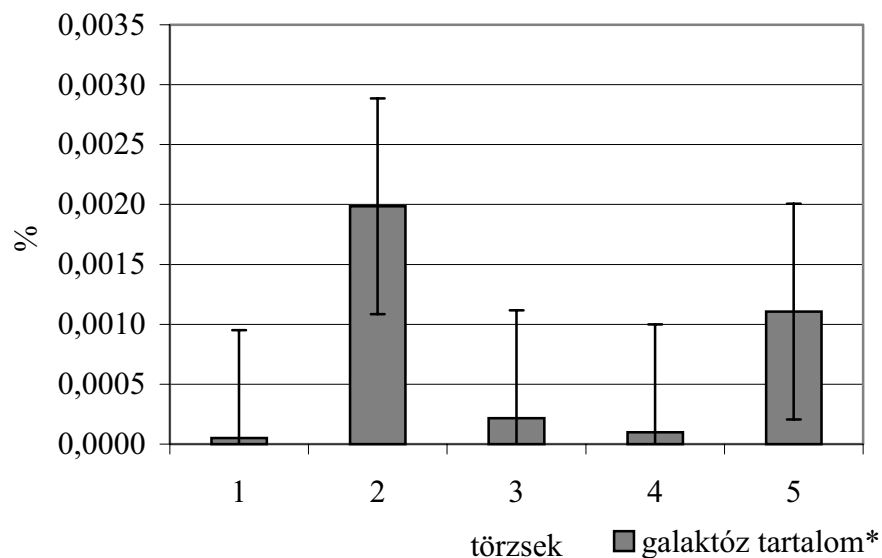
Galaktóz tartalom (%)			
Törzsek	Átlag*	Szórás	Variancia
<i>K. lactis</i> NCAIM Y 00260	5.0E-05 <sup>a</sup>	±8.7E-05	7.5E-09
<i>K. marxianus</i> LAF 4	2.0E-03 <sup>b</sup>	±6.5E-04	4.20E-07
<i>K. marxianus</i> NCAIM Y 00933	2.2E-04 <sup>ac</sup>	±3.8E-04	1.42E-07
<i>K. marxianus</i> NCAIM Y 00463	1.0E-04 <sup>a</sup>	±1.7E-04	3.0E-08
<i>K. marxianus</i> NCAIM Y 00697	1.1E-03 <sup>c</sup>	±1.4E-03	1.96E-06

\*három párhuzamos adatsor átlaga <sup>abcd</sup> az eltérő kitevőjű értékek azonos oszlopon belül szignifikánsan különböznek (P < 0.05)

**12. táblázat** A végső galaktóz tartalom (%) varianciaanalízise

Tényezők	SS	df	S <sup>2</sup>	F	F <sub>krit.</sub>	LSD <sub>95%</sub>
Csoportok között	9.06E-06	4	2.27E-06	4.498	3.478	0.001
Csoporton belül	5.04E-06	10	5.04E-07			
Összesen	1.41E-05	14				

A 11. táblázat adataiból látható, hogy a *K. marxianus* LAF 4 törzs eredménye mindegyik vizsgált törzs átlagától szignifikánsan nagyobbnak mutatkozott. A *K. marxianus* NCAIM Y00933 és a *K. marxianus* NCAIM Y 00697 törzs átlagai között nem találtunk szignifikáns különbséget. A *K. lactis* NCAIM Y00260 és a *K. marxianus* NCAIM Y 00463 törzs eredményei a *K. marxianus* LAF 4, illetve a *K. marxianus* NCAIM Y 00697 átlagaihoz viszonyítva szignifikánsan kisebbek voltak.



1 *K. lactis* NCAIM Y 00260

2 *K. marxianus* LAF 4

3. *K. marxianus* NCAIM Y 00933

4 *K. marxianus* NCAIM Y 00463

5 *K. marxianus* NCAIM Y 00697

\*három párhuzamos mérés átlaga

**15. ábra** A tápoldat galaktóz tartalmának (%) átlagértékei és azok 95%-os konfidencia intervalluma az egysejtfehérje-előállítás végén a vizsgált törzsek esetében

Bailey és mtsai. (1982) 5% galaktóz tartalmú tápközegben végeztek élesztő szaporítást, amelynek során a folyamat 28., illetve a 38. órájában vett mintákból, galaktóz már nem volt kimutatható. Eredményeikkel összhangban, kísérleteink során a *K. lactis* NCAIM Y 00260, illetve a *K. marxianus* NCAIM Y 00463 törzsek esetében az SCP előállítási folyamat végére (48 h) galaktóz szintén nem volt kimutatható. Merico és mtsai. (2004) kísérleteikben *K. lactis* élesztőt szaporítottak 2% galaktóz tartalmú tápoldatban, melynek során a 2.64 mg/cm<sup>3</sup> maximális biomassza mennyiséget érték el. Ross és mtsai. (2004) galaktóz



## Eredmények

hasznosítására alkalmas, módosított *Saccharomyces* törzsekkel végzett kísérleteik szerint, az élesztők egy csoportja a folyamat 6. órájára a kiindulási laktóz (0.0005-0.002%) mennyiségének 85 %-át felhasználják, míg a többi élesztő esetében a t=0 és a 24. órában mért galaktóz tartalom között nem volt szignifikáns különbség.

### 4.4.3. A tápoldat etanol tartalma

A 3.3.7. alfejezetben leírt módszerrel meghatározott etanol tartalmak eredményeit a 3.3.9. alfejezetben leírtak szerint értékeltük ki (13-14. táblázat; 16. ábra).

**13. táblázat** A törzsek által termelt maximális etanol tartalom (%) a tápoldatban

Etanol tartalom (%)			
Törzsek	Átlag*	Szórás	Variancia
<i>K. lactis</i> NCAIM Y 00260	0.268 <sup>a</sup>	±0.125	0.016
<i>K. marxianus</i> LAF 4	0.045 <sup>a</sup>	±0.035	0.001
<i>K. marxianus</i> NCAIM Y 00933	0.271 <sup>a</sup>	±0.300	0.090
<i>K. marxianus</i> NCAIM Y 00463	0.351 <sup>a</sup>	±0.515	0.266
<i>K. marxianus</i> NCAIM Y 00697	0.191 <sup>a</sup>	±0.130	0.017

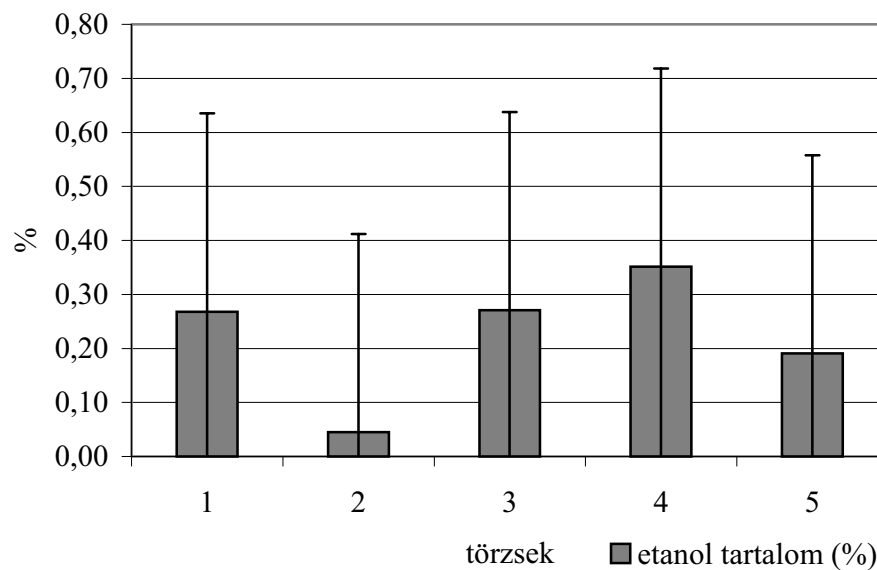
\*három párhuzamos adatsor átlaga <sup>a</sup>az eltérő kitevőjű értékek azonos oszlopon belül szignifikánsan különböznek (P < 0.05)

**14. táblázat** A maximális etanol tartalom varianciaanalízise

Tényezők	SS	df	S <sup>2</sup>	F	F <sub>krit.</sub>	LSD <sub>95%</sub>
Csoportok között	0.160	4	0.040	0.515	3.478	-
Csoporton belül	0.779	10	0.078			
Összesen	0.940	14				

## Eredmények

A tápoldatban mért maximális etanol tartalmak esetében a vizsgált törzsek között nem találtunk szignifikáns különbséget.



- 1 *K. lactis* NCAIM Y 00260  
2 *K. marxianus* LAF 4  
3 *K. marxianus* NCAIM Y 00933  
4 *K. marxianus* NCAIM Y 00463  
5 *K. marxianus* NCAIM Y 00697  
\*három párhuzamos mérés átlaga

**16. ábra** A tápoldat maximális etanol tartalmának (%) átlagértékei és azok 95%-os konfidencia intervalluma a vizsgált törzsek esetében

Az általunk mért etanol tartalmak összhangban vannak Becerra és mtsai. (2004), van Urk és mtsai. (1988), valamint Møller és mtsai. (2002) által közölt adatokkal (0.15-0.37%; 0.023%; 0.20%).

Kiers és mtsai. (1998), valamint Bellaver és mtsai. (2004) *K. lactis*, illetve *K. marxianus* élesztőket glükóz alapon szaporítva nem tapasztaltak etanol termelést, amely szerintük a vizsgált törzsek esetében a hosszútávú Cabtree-effektus hiányának következménye.

## Eredmények

Cortés és mtsai. (2005) *K. marxianus* esetében 12.3 g/dm<sup>3</sup> maximális etanol mennyiséget közölt, amely jóval nagyobb az általunk mért értékeknél.

### 4.4.4 A tápoldat laktóz tartalma

A 3.3.7. alfejezetben leírt módszerrel meghatározott laktóztartalmak eredményeit a 3.3.9. alfejezetben leírtak szerint értékeltük ki (15-16. táblázat; 17. ábra).

**15. táblázat** A tápoldat laktóz tartalma (%) az egysejtfehérje-előállítás végén a vizsgált törzsek esetében

Laktóz tartalom (%)			
Törzsek	Átlag*	Szórás	Variancia
<i>K. lactis</i> NCAIM Y 00260	1.099 <sup>a</sup>	±0.283	0.080
<i>K. marxianus</i> LAF 4	1.149 <sup>a</sup>	±0.313	0.098
<i>K. marxianus</i> NCAIM Y 00933	1.532 <sup>b</sup>	±0.077	0.006
<i>K. marxianus</i> NCAIM Y 00463	1.368 <sup>ab</sup>	±0.140	0.020
<i>K. marxianus</i> NCAIM Y 00697	1.576 <sup>b</sup>	±0.258	0.067

\*három párhuzamos adatsor átlaga <sup>abc</sup> az eltérő kitevőjű értékek azonos oszlopon belül szignifikánsan különböznek (P < 0.05)

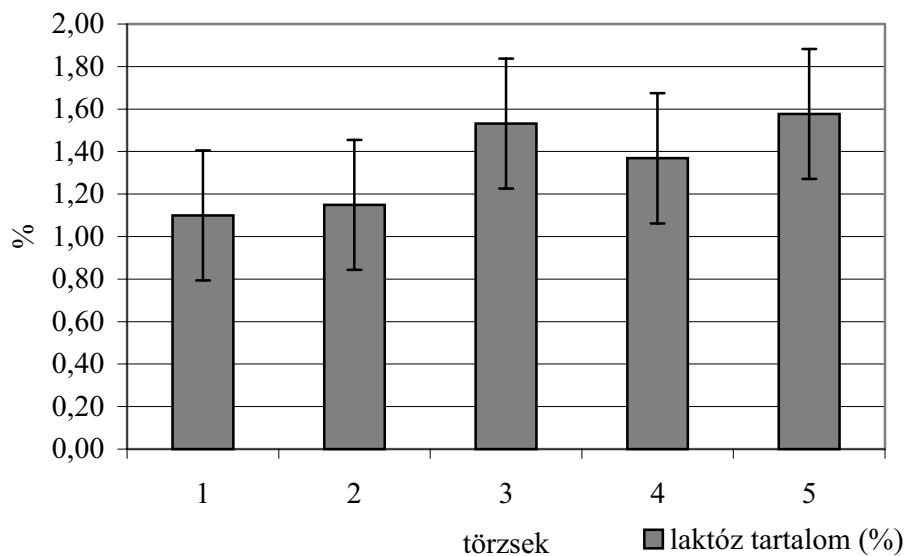
**16. táblázat** A végső laktóz tartalom (%) varianciaanalízise

Tényezők	SS	df	S <sup>2</sup>	F	F <sub>krit.</sub>	LSD <sub>95%</sub>
Csoportok között	0.928	4	0.232	4.291	3.478	0.433
Csoporton belül	0.541	10	0.054			
Összesen	1.469	14				

A végső laktóz tartalom átlagértékei esetében (17. ábra) a *K. lactis* NCAIM Y 00260, illetve a *K. marxianus* LAF 4, törzsek átlagai szignifikánsan kisebbnek mutatkoztak a *K. marxianus* NCAIM Y00933,

## Eredmények

illetve a *K. marxianus* NCAIM Y 00697 törzsek eredményeinél, és nem mutattak szignifikáns különbséget a *K. marxianus* NCAIM Y 00463 törzs átlagához képest.



- 1 *K. lactis* NCAIM Y 00260                      2 *K. marxianus* LAF 4  
3. *K. marxianus* NCAIM Y 00933            4 *K. marxianus* NCAIM Y 00463  
5 *K. marxianus* NCAIM Y 00697            \*három párhuzamos mérés átlaga

**17. ábra** A tápoldat laktóz tartalmának (%) átlagértékei és azok 95%-os konfidencia intervalluma az egysejtfehérje-előállítás végén a vizsgált törzsek esetében

A laktóz felhasználás %-os értékeit a 17. táblázat tartalmazza.

**17. táblázat** Laktóz felhasználás az egysejtfehérje-előállítás során a vizsgált törzsek esetében

<b>Laktóz felhasználás (%)</b>	
<b>Törzsek</b>	<b>Átlag*</b>
<i>K. lactis</i> NCAIM Y 00260	98
<i>K. marxianus</i> LAF 4	99
<i>K. marxianus</i> NCAIM Y 00933	99
<i>K. marxianus</i> NCAIM Y 00463	99
<i>K. marxianus</i> NCAIM Y 00697	98

\*három párhuzamos adatsor átlaga

A 17. táblázatban látható, hogy a laktóz felhasználás a vizsgált törzsek esetében 98-99% volt, amely eredmények megegyeznek Ghaly és mtsai. (2005), Ghaly és Kamal (2004), Ghaly és mtsai. (1993), valamint Ben-Hassan (1991) által közölt adatokkal (99%). Ghaly és mtsai. (1992), Chanda és Chakrabarti (1996), valamint Szczodrak (2000) kísérleteikben a laktóz felhasználás hatékonyságát kisebbnek találták (96%, illetve 95-99%). Becerra és mtsai. (2004) az általunk tapasztalt eredményeknél jóval kisebb (59%) laktóz felhasználási értékeket közölt. Ben-Hassan és Ghaly (1995) által közölt laktóz felhasználás hatékonysága a fermentációs körülményektől függően 74-99% volt. Mahmoud és Kosikowski (1982) *K. fragilis* fajt aerob és anaerob viszonyok között szaporítva, az előbbi esetben 99.7%, az utóbbiban pedig 60.9% laktóz felhasználást mértek.

#### 4.5. Generációs idő

A 3.3.11. alfejezet szerint meghatározott generációs idők a 18. táblázatban láthatók.

**18. táblázat** Generációs idő ( $t_g$ ) az egysejtfehérje-előállítás során a vizsgált törzsek esetében

Törzsek	$t_g^*$ (h)
<i>K. lactis</i> NCAIM Y 00260	3.2
<i>K. marxianus</i> LAF 4	4.1
<i>K. marxianus</i> NCAIM Y 00933	4.2
<i>K. marxianus</i> NCAIM Y 00463	4.2
<i>K. marxianus</i> NCAIM Y 00697	6.6

\*három párhuzamos adatsor átlaga

Lodi és Donnini (2005) *K. lactis* faj esetében 2 órás generációs időt közölt, amely az általunk ugyanennél a fajnál közölt időtartamnál jelentősen rövidebb.

#### 4.6. A törzsek szelektálása a termelési mutatók alapján

A maximális fajlagos szaporodási sebességek ( $\mu$ ) alapján a két legjobb eredményt mutató törzset (*Kluyveromyces lactis* NCAIM Y 00260 ill. *Kluyveromyces marxianus* LAF 4) választottunk ki további SCP előállítási kísérletek céljára, amelyek metodikája megegyezett a 3.3.4. alfejezetben leírtakkal.

Kísérleteink során 0.5, 1.0 és 1.5 VVM-es levegőztetést alkalmaztunk, amelyek meghatározásakor a szakirodalomban közölt adatokat, és a későbbi üzemi szintű alkalmazás lehetőségét is figyelembe

## Eredmények

---

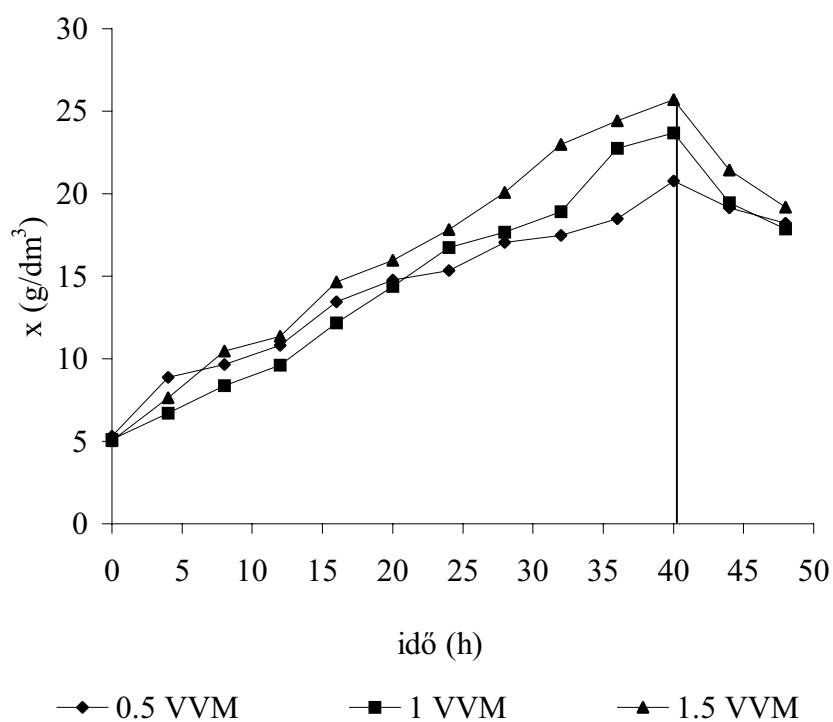
vettük. Utóbbi esetben a léptéknövelés során egyre nehezebben valósítható meg a megfelelő oxigén ellátás. Üzemi körülmények között a 100-450 m<sup>3</sup>-es kevert-levegőztetett reaktorokat felhasználó fermentációs technológiák esetében maximálisan 1 VVM-es levegőztetés biztosítható. A levegőztetés kisebb hatásfokát a kísérleteink során is alkalmazott kevert-levegőztetett reaktorokban némileg kompenzálhatjuk a keverés intenzitásának növelésével. Ügyelnünk kell azonban arra, hogy nagyobb értékeknél a keverő „megszalad”, és a gázbuborékok diszpergálás nélkül haladnak át a reaktoron. Az elérhető OTR (oxygen transfer rate) értéke mintegy 2-2.5 kgO<sub>2</sub>/m<sup>3</sup>×h. Az oxigén tápoldatba, illetve fermentlébe történő anyagátadási folyamatát, valamint a mikrobák által történő felvételét alapvetően meghatározza annak stagnáló folyadékfilmeken át történő diffúziója. A folyamatot elemi anyagátadási lépések jellemzik:

1. A gázbuborék a főtömegéből az oxigén molekula diffúzióval jut a gáz/folyadék határfelületre.
2. Ismét diffúzióval adódik át a gázbuborékot burkoló – stagnáló – folyadékfilmen.
3. Gyakran a folyadék főtömege is ellenállást képvisel, mert bár az oxigén keverés által, tehát konvekcióval jut keresztül, azonban sokszor a keveredés nem tökéletes, így ez a folyamat sem pillanatszerű.
4. A mikrobákat körülvevő folyadékfilm ellenállása szintén nem elhanyagolható.
5. A mikroba, vagy mikrotömeg, esetenként a telep belsejébe történő diffúzív oxigén transzport esetében is fellép ellenállás.

6. Végül ellenállásnak tekinthetjük az oxigén hasznosulás „reakcióellenállását” is, tehát azt, hogy a mikroba légzése is időben bizonyos sebességgel jellemezhető folyamat.

#### 4.6.1. Maximális szárazanyag produkció

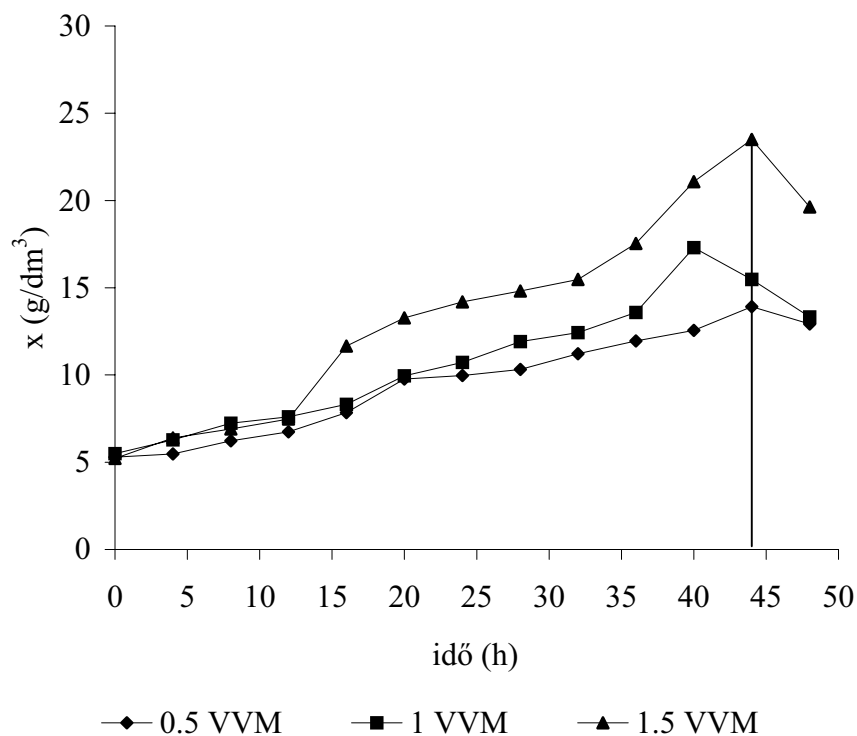
A vett mintákból a 3.3.6. alfejezetben leírt módszerrel meghatározásra került sejttömegeket ( $x$ ), az idő függvényében ábrázolva a 18-19. ábrákat kaptuk.



\*három párhuzamos adatsor átlaga

**18. ábra** Szárazanyag\* változása 0.5-1.5 VVM levegőztetési szintek mellett az SCP-előállítás során *K. lactis* NCAIM X 00260 törzs esetében





\*három párhuzamos adatsor átlaga

**19. ábra** Szárazanyag\* változása 0.5-1.5 VVM levegőztetési szintek mellett az SCP-előállítás során *K. marxianus* LAF 4 törzs esetében

A szárazanyag változását nyomon követő ábrákból (18-19. ábra) kitűnik, hogy növekvő levegőztetés hatására növekedett az elérhető maximális szárazanyag mennyisége is.

*K. lactis* NCAIMY 00260 törzs esetében a termékképzés csúcsa a 40. óránál található, míg a *K. marxianus* LAF 4 törzs a maximális szárazanyag mennyiséget az 1.0 VVM-es levegőztetési szint kivételével (40. óra) a 44. órában éri el.

## Eredmények

A törzsek által az egyes levegőztetési szinteken elért maximális átlagos szárazanyag mennyiségek eredményeit a 3.3.9. alfejezetben leírtak szerint értékeltük ki (19-20. táblázat; 20. ábra).

**19. táblázat** A maximális szárazanyag-produkció ( $x_{\max}$ ) a vizsgált törzsek esetében

Levegőztetés (VVM)	$x_{\max}$ (g/dm <sup>3</sup> )					
	<i>K. lactis</i> NCAIM Y 00260			<i>K. marxianus</i> LAF 4		
	Átlag*	Szórás	Variancia	Átlag*	Szórás	Variancia
<b>0,5</b>	20.78 <sup>aA</sup>	±1.02	1.04	13.92 <sup>aB</sup>	±2.47	6.10
<b>1</b>	23.67 <sup>abA</sup>	±3.59	12.91	17.29 <sup>aB</sup>	±4.97	24.68
<b>1,5</b>	25.71 <sup>bA</sup>	±3.20	10.22	23.50 <sup>bA</sup>	±3.64	13.27

\*három párhuzamos adatsor átlaga <sup>ab</sup> az eltérő kitevőjű értékek azonos oszlopon belül szignifikánsan különböznek ( $P < 0.05$ ) <sup>AB</sup> az eltérő kitevőjű értékek azonos soron belül szignifikánsan különböznek ( $P < 0.05$ )

**20. táblázat** A maximális szárazanyag értékek varianciaanalízise

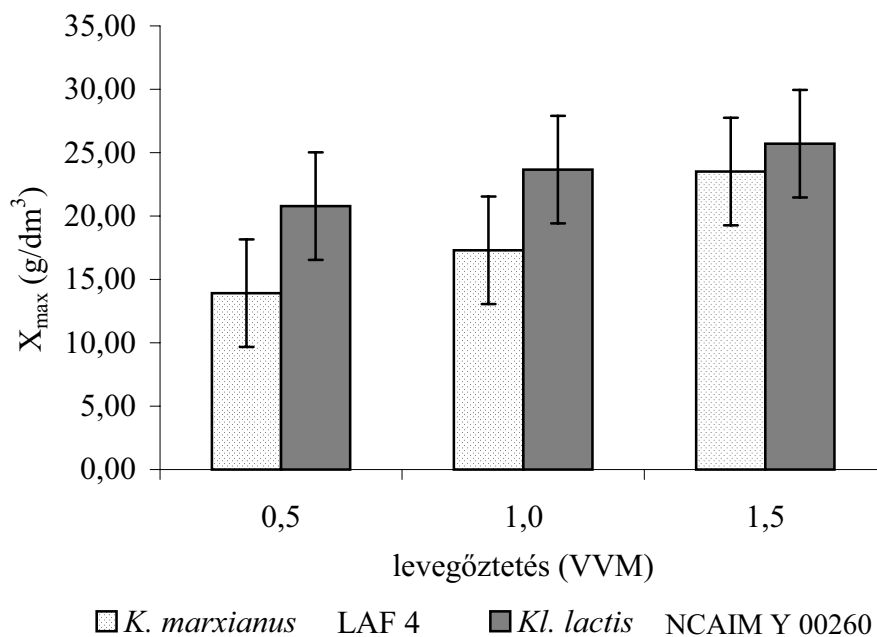
Tényezők	SS	df	S <sup>2</sup>	F	F <sub>krit.</sub>	LSD <sub>95%</sub>
Levegőztetés	158.90	2	79.45	6.99	3.88	4.23
Törzsek	119.36	1	119.36	10.50	4.75	3.45
Kölcsönhatás	19.65	2	9.82			
Belül	136.44	12	11.37			
Összesen	434.35	17				

A 19. táblázat adataiból megállapítottuk, hogy mind a *K. lactis* NCAIM Y 00260, mind pedig a *K. marxianus* LAF 4 törzs 1.5 VVM-es levegőztetési szinteken szignifikánsan nagyobb értékeket mutattak. Az

## Eredmények

előbbi törzs a 0.5, az utóbbi pedig a 0.5 és 1.0 VVM-es levegőztetések átlagértékeihez képest.

Az egyes törzsek, maximális szárazanyag mennyiségére gyakorolt hatását vizsgálva a 0.5 és 1.0 VVM-es levegőztetései szinteken találtunk szignifikáns különbséget a két törzs átlagai között.



**20. ábra** A maximális szárazanyag ( $x_{\max}$ ) értékei és azok 95%-os konfidencia intervalluma

Bellaver és mtsai. (2004) *K. marxianus* esetében szakaszos fermentációban  $22 \text{ g/dm}^3$  maximális szárazanyagot ( $x_{\max}$ ) mértek, amely összhangban van az általunk közölt adatokkal. Sinclair és Cantero (1990) a szaporodás exponenciális szakaszából nyert adatok alapján az élesztősejtek tömegének maximális koncentrációját  $18.3 \text{ g/dm}^3$  értéknek adja meg. Wasserman és mtsai. (1961) által végzett kísérletekben *S.*

*fragilis* élesztőt fehérjementesített nyers sajsavón szaporítva a  $\text{dm}^3$ -kénti biomassza mennyisége 25.2-27.0 g volt, amely értékek összhangban vannak kísérleti eredményeinkkel.

Ghaly és mtsai. (2005), valamint Ben-Hassan és Ghaly (1995) 34  $\text{g}/\text{dm}^3$  maximális értéket közöltek, amely jelentősen nagyobb, mint az általunk mért és a szakirodalomban megtalálható adatok.

Mahmoud és Kosikowski (1982) *K. bulgaricus*, illetve *K. fragilis* élesztőket aerob körülmények között sajsavó permeátumon szaporítva 13.5-12.2  $\text{g}/\text{dm}^3$  biomassza értékeket közölt, amely eredmények kisebbek az általunk közölt adatoknál. Az utóbbi faj esetében Ghaly és Singh (1989), valamint Chanda és Chakrabarti (1996) hasonló értékeket (13.09-15.2  $\text{g}/\text{dm}^3$ , illetve 11  $\text{g}/\text{dm}^3$ ) érték el. Hang és mtsai. (2003) *K. marxianus*-sal végzett 48 órás fermentációt követően  $13 \pm 0.03 \text{ g}/\text{dm}^3$  maximális szárazanyag koncentrációt mértek.

### 4.6.2. Hozamkonstansok

Kísérleteink során a laktóz, mint szubsztrát (S) változásával egyidejűleg a sejttömeg (X) változását is nyomon követtük. A fermentáció egy bizonyos szakaszában a sejttömeg és szubsztrátkoncentráció között lineáris összefüggés van, tehát a 3.3.8. fejezet alapján a hozamok ( $Y_{x/s}$ ;  $Y_x$ ) kiszámíthatók.

A növekvő levegőztetések mellett mért szárazanyag mennyiségeket ábrázoltuk az idő függvényében, majd a lineáris szakaszból regresszióval meghatároztuk a sejttömeg hozamállandóinak ( $dx/dt$ ) értékeit, amelyeket ezután a 3.3.9. alfejezetben leírtak szerint értékeltük ki (21-22. táblázat; 21. ábra).

**21. táblázat** Sejttömeg hozamállandók (dx/dt) a vizsgált törzsek esetében

Levegőztetés (VVM)	dx/dt (g/dm <sup>3</sup> ×h)					
	<i>K. lactis</i> NCAIM Y 00260			<i>K. marxianus</i> LAF 4		
	Átlag*	Szórás	Variancia	Átlag*	Szórás	Variancia
<b>0.5</b>	0.338 <sup>aA</sup>	±0.084	0.007	0.207 <sup>aB</sup>	±0.057	0.003
<b>1</b>	0.499 <sup>bA</sup>	±0.031	0.001	0.233 <sup>aB</sup>	±0.084	0.007
<b>1.5</b>	0.520 <sup>bA</sup>	±0.043	0.002	0.365 <sup>bB</sup>	±0.040	0.002

\*három párhuzamos adatsor átlaga <sup>ab</sup> az eltérő kitevőjű értékek azonos oszlopon belül szignifikánsan különböznek (P < 0.05) <sup>AB</sup> az eltérő kitevőjű értékek azonos soron belül szignifikánsan különböznek (P < 0.05)

**22. táblázat** A sejttömeg hozamállandók varianciaanalízise

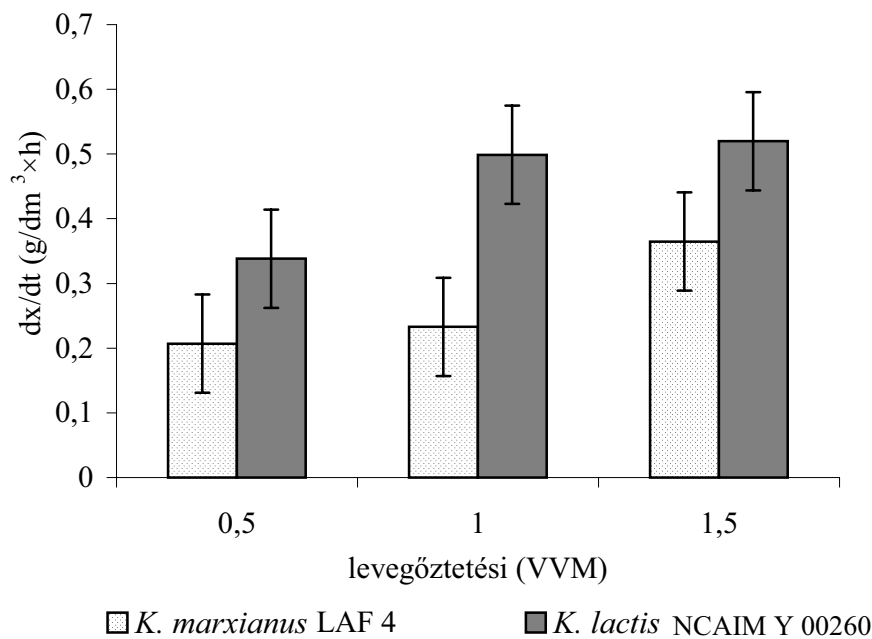
Tényezők	SS	df	S <sup>2</sup>	F	F <sub>krit.</sub>	LSD <sub>95%</sub>
Levegőztetés	0.087	2	0.043	11.912	3.885	0.075
Törzsek	0.153	1	0.153	41.987	4.747	0.062
Kölcsönhatás	0.016	2	0.008			
Belül	0.044	12	0.004			
Összesen	0.298	17				

A 21. táblázat eredményeiből megállapíthatjuk, hogy a *K. lactis* NCAIM Y 00260 törzs átlagai az 1.0 és az 1.5 VVM-es levegőztetési szinteken szignifikánsan nagyobbak voltak a 0.5 VVM-es levegőztetés esetében meghatározott átlagoknál. A *K. marxianus* LAF 4 törzs pedig az 1.5 VVM-es levegőztetési szinten szignifikánsan nagyobb átlagértékeket

## Eredmények

mutatott a 0.5 és 1.0 VVM-es levegőztetés esetében számított átlagokhoz képest.

A törzsek hatását vizsgálva megállapíthatjuk, hogy a *K. lactis* NCAIM Y 00260 törzs átlagértékei mindhárom levegőztetési szinten szignifikánsan nagyobbak voltak.



**21. ábra** A sejtömeg hozamállandók (dx/dt) értékei és azok 95%-os konfidencia intervalluma

González-Siso és mtsai. (1996) kísérletei során a *K. lactis* faj sejtömeg hozamállandója 0.40 g/dm<sup>3</sup>×h volt, amely megfelel eredményeinknek. A Pincherio és mtsai. (2000) által *Kluyveromyces* törzsek esetében közölt 0.060 g/dm<sup>3</sup>×h érték az általunk számítottnál kisebb, akárcsak a Merico és mtsai. (2004) által *K. lactis* élesztő esetében elért eredmények (0.225 g/dm<sup>3</sup>×h).

## Eredmények

Kísérleteink során a szubsztrát (laktóz) koncentrációjának változását is nyomon követtük, így a 3.3.8. alfejezetben leírt módszer alapján a törzsekre vonatkoztatott biotermék hozamok megadhatók (23. táblázat). Az eredményeket a 3.3.9. alfejezetben leírtak szerint értékeltük ki (24. táblázat; 22. ábra).

**23. táblázat** Biotermék hozamok (dx/dS) a vizsgált törzsek esetében

Levegőztetés (VVM)	dx/dS (g/g)					
	<i>K. lactis</i> NCAIM Y 00260			<i>K. marxianus</i> LAF 4		
	Átlag*	Szórás	Variancia	Átlag*	Szórás	Variancia
<b>0.5</b>	0.413 <sup>aA</sup>	±0.051	0.003	0.293 <sup>aB</sup>	±0.043	0.002
<b>1</b>	0.547 <sup>bA</sup>	±0.093	0.009	0.437 <sup>bB</sup>	±0.044	0.002
<b>1.5</b>	0.674 <sup>cA</sup>	±0.134	0.018	0.536 <sup>bB</sup>	±0.103	0.011

\*három párhuzamos adatsor átlaga <sup>abc</sup> az eltérő kitevőjű értékek azonos oszlopon belül szignifikánsan különböznek (P < 0.05) <sup>AB</sup> az eltérő kitevőjű értékek azonos soron belül szignifikánsan különböznek (P < 0.05)

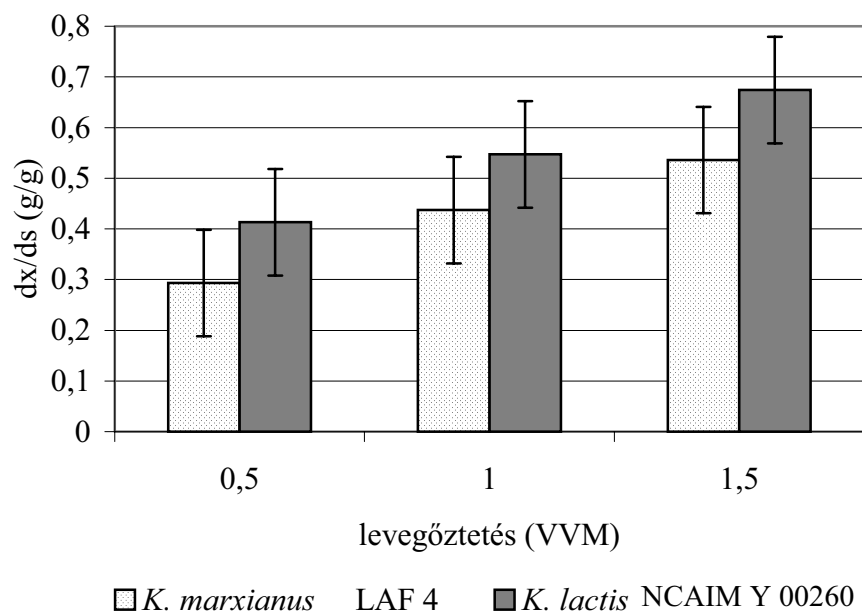
**24. táblázat** A biotermék hozamok varianciaanalízise

Tényezők	SS	df	S <sup>2</sup>	F	F <sub>krit.</sub>	LSD <sub>95%</sub>
Levegőztetés	0.191	2	0.096	13.147	3.885	0.105
Törzsek	0.068	1	0.068	9.312	4.747	0.680
Kölcsönhatás	0.001	2	0.000			
Belül	0.087	12	0.007			
Összesen	0.347	17				

## Eredmények

A 23. táblázat eredményeiből megállapíthatjuk, hogy a növekvő levegőztetés nagyobb biomassza hozamokat eredményezett. *K. lactis* NCAIM Y 00260 törzs esetében a különbségek minden levegőztetési szinten szignifikánsak voltak. A *K. marxianus* LAF 4 törzs eredményeit vizsgálva az 1.0, illetve 1.5 VVM-es levegőztetési szintek értékei a 0.5 VVM-es szint átlagértékeihez képest mutatkoztak szignifikánsan nagyobbak.

A törzsek hatását vizsgálva a *K. lactis* NCAIM Y 00260 törzs átlagait mindhárom levegőztetési szinten szignifikánsan nagyobbak találtunk.



**22. ábra** A biomassza hozamok (dx/ds) értékei és azok 95%-os konfidencia intervalluma



## Eredmények

---

Eredményeinket a szakirodalomban közölt adatokkal összehasonlítva megállapíthatjuk, hogy azok megfelelnek Bellaver és mtsai. (2004), Ghaly és mtsai. (2005), valamint Ben-Hassan és Ghaly (1995) által közölt adatoknak, amelyek *K. marxianus* esetében a biomassza hozamot ( $Y_{x/s}$ )  $0.49 \pm 0.02$ , illetve  $0.339-0.743$  g élesztő/g laktóz értékben állapítják meg, a levegőztetéstől, és a keverés fordulatszámától függően. Walker és O'Neil (1990) a termelt biomassza hozamkoefficiensét  $0.44-0.51$  g élesztő/g laktóz értékben adja meg, amely eredmények szintén megfelelnek az általunk közölt adatoknak. Adataink összhangban vannak továbbá Moresi és Patete (1988), illetve Bernstein és mtsai. (1977) adataival ( $0.28-0.58$ ,  $0.45-0.52$ ).

Bernstein és Everson (1973), illetve Atkin és mtsai. (1976)  $0.58$ , illetve  $0.67$  g/g  $Y_{x/s}$  értéket közölt. Kísérleteink során mi is hasonló értékeket ( $0.547$ ,  $0.674$  g/g) tapasztaltunk *K. lactis* NCAIM Y 00260 törzs esetében  $1.0$ , illetve  $1.5$  VVM levegőztetés mellett.

Harju és mtsai. (1976) által közölt  $Y_{x/s}=0.35-0.45$  g/g értékek összhangban vannak a kísérleteinkben *K. marxianus* LAF 4 törzs esetében számított átlagértékekkel.

Barba és mtsai. (2001) különböző reaktortérfogatok mellett *K. lactis* faj esetében  $Y_{x/s}=0.35 \pm 0.07$  g/g értéket ért el, míg Becerra és González-Siso (1996) ugyanezen faj esetében a  $0.43 \pm 0.04$  g/g biomassza hozamot közölt, amely eredmények elmaradnak az általunk ennél a fajnál közölt értékeknél. Alvarez és Ricano (1979) szintén hasonló biomassza hozamot közölt ( $0.33$  g/g).

Bellaver és mtsai. (2004) *K. marxianus* esetében a biomassza termelést ( $Y_{x/s}$ )  $0.49 \pm 0.02$  g élesztő/g laktóz értékben közölte. Ghaly és

## Eredmények

---

mtsai. (2005), valamint Ben-Hassan és Ghaly (1995) ugyanennél a fajnál 0.339-0.743 g/g  $Y_{x/s}$  mennyiségeket állapítottak meg, a levegőztetéstől és a keverés fordulatszámától függően. Becerra és González-Siso (1996) *K. lactis* fajjal végzett kísérleteiben a biomassza hozam  $0.43 \pm 0.04$  g/g volt. Walker és O'Neil (1990) a termelt biomassza hozamkoefficiensét 0.44-0.51 g élesztő/g laktóz értékben adja meg.

### 4.7. Az élesztők oxigénigénye

A vizsgált élesztőtörzsek eredményeiből arra következtethetünk, hogy a fermentációk oxigén limitáltak voltak, hiszen a nagyobb mértékű levegőztetés nagyobb szárazanyag tartalmat eredményezett, tehát az oxigén valóban hatással van a fajlagos növekedésre.

A kísérleteink során is mért kis oldott oxigén koncentrációk (0,1-0,32 mg/dm<sup>3</sup>) esetén a légzési sebesség lineárisan függ a tápközeg oldott oxigén szintjétől.

Az oxigén limitációra tekintettel a vizsgált két törzs esetében meghatároztuk a legnagyobb levegőztetési szinten (1.5 VVM) elérhető légzési sebességet ( $dc/dt$ ), eredő folyadékoldali oxigénabszorpciós együttható ( $K_L a$ ), illetve a telítési oxigén koncentráció ( $C^*$ ) értékét.

A mikróbák oxigén igényét a légzési sebességgel ( $dc/dt$ ), vagy a fajlagos légzési sebességgel ( $Q$ ) jellemezhetjük, melyek mindegyike kielégített igényt, valóságos légzési sebességet jelent (Sevella, 2001a). Az SCP előállítás során az oldott oxigén koncentráció változásának sebességét az abszorpció és a légzés sebességének eredője határozza meg a 3.3.12. alfejezetben is tárgyalt

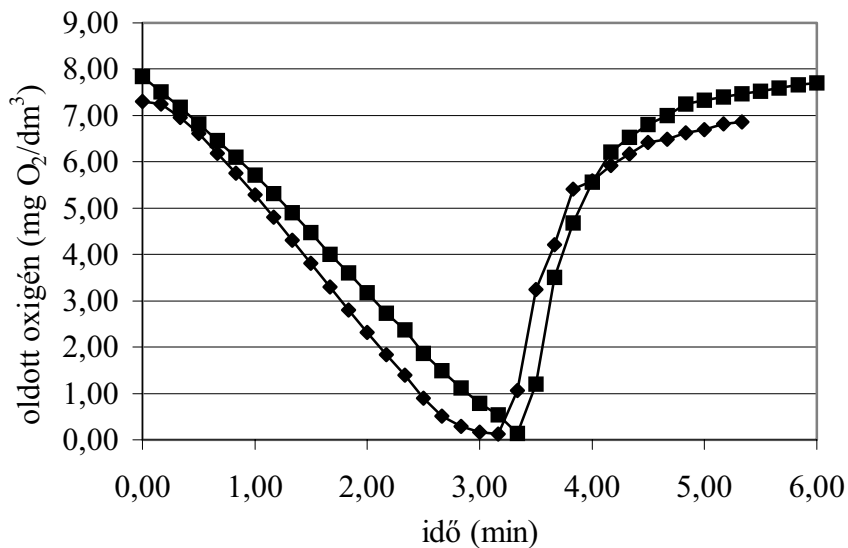
$$dC/dt = K_L a \times (C^* - C) - xQ \quad (\text{kg O}_2/\text{m}^3 \times \text{h})$$

összefüggés alapján, ahol:

$K_{La} \times (C^* - C)$  az oldódási sebesség,  $xQ$  pedig a fogyasztási sebesség. Optimális esetben az abszorpció és a légzés között dinamikus egyensúly áll be. A fermentáció folyamán viszont az élesztők multiplikációja következtében az oxigén igény, valamint az  $x$ ,  $Q$ ,  $K_{La}$  és  $C^*$  folyamatos változást mutat, így ez az egyensúly eltolódik. Egy adott időpontban a  $K_{La} \times (C^* - C) > xQ$ , ekkor  $dC/dt > 0$ , vagyis az oldott oxigén koncentráció növekedne. Ekkor viszont a  $C^* - C$  hajtóerő csökkenne mindaddig, amíg az egyensúly be nem áll. Ez a gondolatmenet az egyensúly  $K_{La} \times (C^* - C) < xQ$  esetén történő felbomlására is alkalmazható. Tehát mindenképpen kialakul egy  $C$  egyensúlyi oldott oxigén koncentráció a fermentációs rendszerben.

### **4.7.1. Dinamikus $K_{La}$ meghatározás**

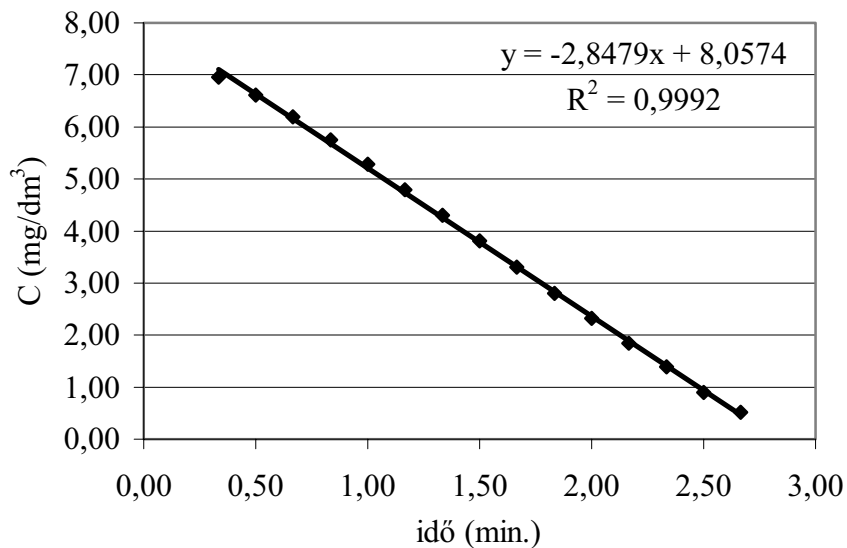
A folyamat során a  $C$  nem állandó, jellemző változást mutat, amelynek az idő függvényében történő grafikus ábrázolása megteremti a  $C^*$  és  $K_{La}$  meghatározásának lehetőségét. A Dinamikus  $K_{La}$  meghatározáskor kapott oldott oxigén koncentrációkat a vizsgált törzsek esetében a 23. ábra szemlélteti.



- oldott oxigén szintje\* *K. marxianus* LAF 4 esetében
- ◆ oldott oxigén szintje\* *K. lactis* NCAIM Y 00260 esetében
- \*az adatok három párhuzamos mérés átlagai

**23. ábra** Dinamikus  $K_L$  meghatározás

Mivel a levegőztetés leállítását követően  $dC/dt = -xQ$ , ahol  $x$  és  $Q$  gyakorlatilag állandó, a görbe leszálló szakasza egyenes, melynek iránytangense a légzési sebességet adja (24. ábra).

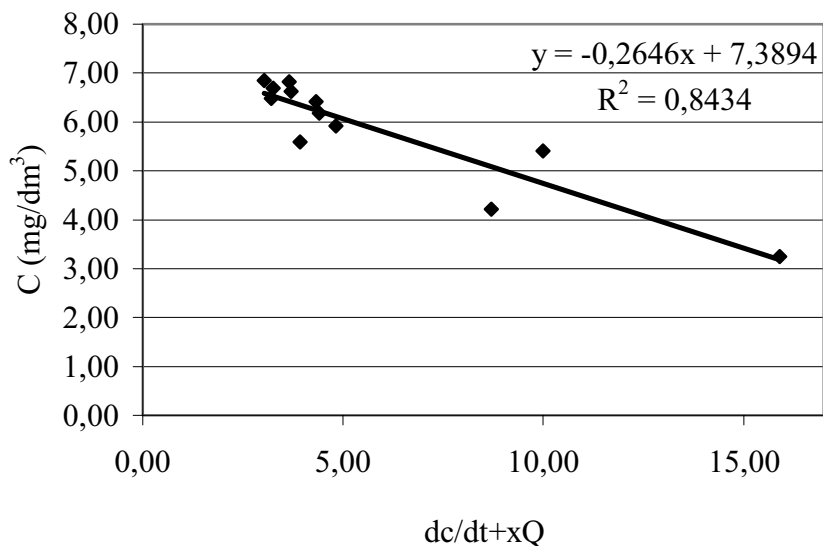


◆ oldott oxigén szintje\* *K. lactis* NCAIM Y 00260 esetében  
 \*az adatok három párhuzamos mérés átlagai

**24. ábra** C-t diagram *K. lactis* NCAIM Y 00260 esetében

A 24. ábra görbéjére illesztett egyenes egyenletéből a lezálló ágra meghatározott légzési sebesség (dC/dt) *K. lactis* NCAIM Y 00260 törzs esetében  $2.85 \text{ mg O}_2/\text{dm}^3 \times \text{min}$ .

A 3.3.12. alfejezet alapján az [1] egyenletet linearizált formájának grafikus ábrázolása után a  $K_{L,a}$  és  $C^*$  értéke kiszámítható (25. ábra).



◆ oldott oxigén szintje\* *K. lactis* NCAIM Y 00260 esetében  
 \*az adatok három párhuzamos mérés átlagai

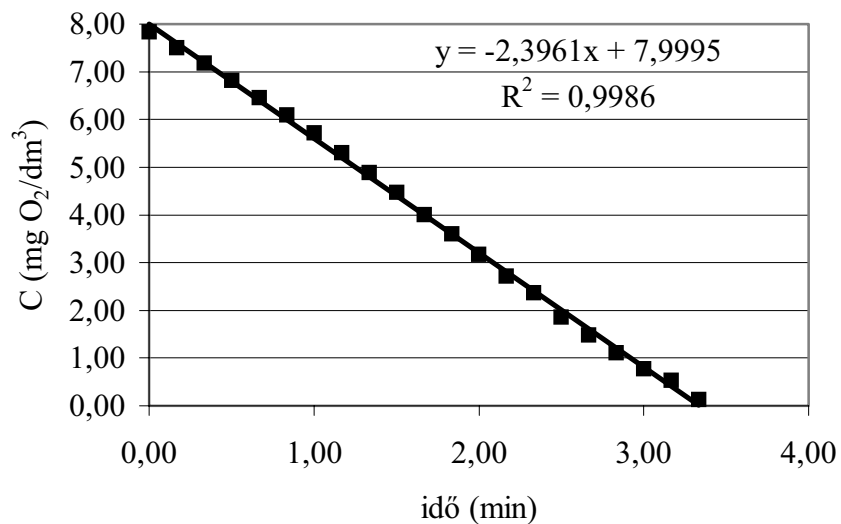
**25. ábra** A  $K_L a$  értékének meghatározása *K. lactis* NCAIM Y 00260 törzs esetében

A 25. ábra görbéjére illesztett egyenes egyenlete alapján:

$$1/ K_L a = 0.265, \text{ tehát } K_L a = 3.78 \text{ min}^{-1} (227 \text{ h}^{-1})$$

Az egyenes egyenletébe a  $dC/dt$  értékét behelyettesítve a  $C^*$  értéke megadható, amely *K. lactis* NCAIM Y 00260 törzs esetén  $6.63 \text{ mg/dm}^3$ .

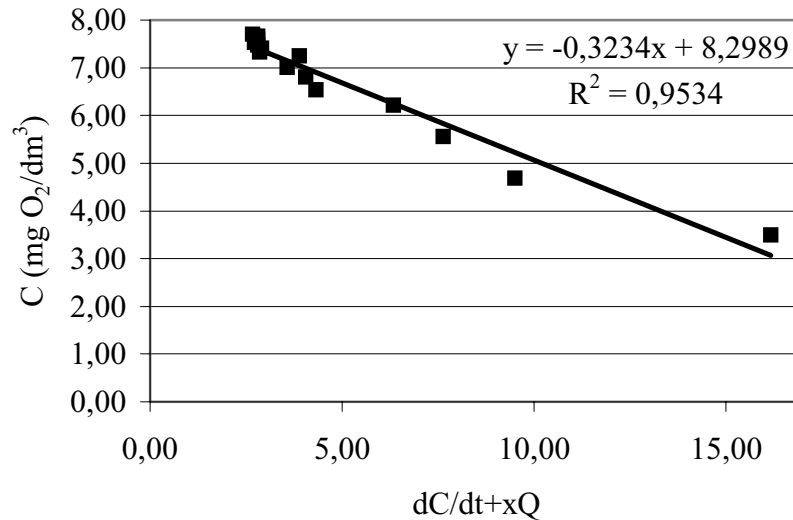
Hasonló gondolatmenetet követve *K. marxianus* LAF 4 törzs esetében, a 23. ábra leszálló ágából a légzési sebesség szintén meghatározható (26. ábra).



■ oldott oxigén szintje\* *K. marxianus* LAF 4 esetében  
 \*az adatok három párhuzamos mérés átlagai

**26. ábra** C-t diagram *K. marxianus* LAF 4 esetében

A C-t diagram pontjaira, lineáris regresszióval illesztett egyenes egyenletéből meghatározott légzési sebesség (dC/dt) *K. marxianus* LAF 4 törzs esetében  $2.40 \text{ mg O}_2/\text{dm}^3 \times \text{min}$ .



■ oldott oxigén szintje\* *K. marxianus* LAF 4 törzs esetében  
 \*az adatok három párhuzamos mérés átlagai

**27. ábra** A  $K_{La}$  értékének meghatározása *K. marxianus* LAF 4 törzs esetében

A 27. ábra görbéjére illesztett egyenes egyenlete alapján:

$$1/K_{La} = 0.32, \text{ tehát } K_{La} = 3.12 \text{ min}^{-1} (187 \text{ h}^{-1})$$

Az egyenes egyenletébe a  $dC/dt$  értékét behelyettesítve  $C^*$  értéke *K. marxianus* LAF 4 törzs esetében  $7.5 \text{ mg/dm}^3$ -nek adódott.

Egy adott tápoldatban elvileg a  $C^*$  telítési oxigénkoncentráció meghatározott érték (az oxigén beoldódás sebessége csak a  $K_{La}$  tényezőn keresztül befolyásolható), azonban a kísérletek ismétlése során nem lehetséges minden esetben teljesen homogén sajtavót biztosítani, ezért annak értéke (és ezáltal a  $K_{La}$  értéke is) kismértékben eltérhet. Ehhez még a fermentáció során adagolt anyagoknak a  $K_{La}$  értékére gyakorolt hatása is hozzájárul. A kísérleteink során alkalmazott habzásgátló



irányítottan helyezkedik el a gáz/folyadék határfelületen, ezáltal csökkenti a felületi feszültséget és a buborékok átmérőjét. Az anyagátadási felület növelése révén a  $K_L a$  értékére is növelő hatásuk van. Ugyanakkor, mivel a határfelületen irányítottan elhelyezkedő "merev" stagnáló felületaktív anyag-film jön létre, amely egyrészt a folyadék elemek mozgását gátolja, másrészt növeli a buborék folyadék oldali ellenállását, mintegy megnövelve a stagnáló folyadékfilm vastagságát, ezért  $K_L$  értéke csökkenni fog felületaktív anyagok jelenlétében. Végeredményben a két ellentétes hatás eredője határozza meg, hogy egy adott felületaktív anyag jelenlétében csökken-e, vagy növekszik a  $K_L a$  értéke (Sevella, 2001a).

A  $K_L a$  értékére a léptéknövelés folyamán is figyelemmel kell lenni. A keverős reaktorok esetében a szakirodalom egy sor összefüggést ad meg annak becslésére, azonban nehéz olyan általánosan használható kifejezés megadása, amelynek használata helyettesítené az adott bioreaktor oxigén abszorpciós viszonyainak kísérletes tanulmányozását.

A fajlagos légzési sebesség a szaporított élesztőtörzstől függő változó, így annak eltérései kísérleteink során jól értelmezhetők.

Ghaly és mtsai. (1993, 2005), illetve Ghaly és Singh (1989) kísérleteikben az általunk mért értékeknél kisebb, 4.0, 5.5, illetve 1.6 mg/dm<sup>3</sup> telítési oxigén koncentrációt mértek sajt savó alapon elszaporított *K. marxianus* faj esetében. Ugyanezen fajt 3 VVM-es levegőztetés mellett édes sajt savón szaporítva Ghaly és Kamal (2004) 2.49 mg/dm<sup>3</sup> minimális oldott oxigén szintet detektáltak. Ez is alátámasztja azt a megfigyelést, hogy a levegőztetésnek – a fermentor kialakítása, a keverés

## Eredmények

---

intenzitása és a tápközeg tulajdonságain túl – közvetlen hatása van az oldott oxigén szintjére. Kísérleteink során a szerzők által is közölt paramétereket és 1.5 VVM levegőztetést alkalmazva kisebb oldott oxigén koncentrációt mértünk (0,1-0,32 mg/dm<sup>3</sup>). Az általunk közölt eredmények összhangban vannak Ghaly és mtsai. (1992), illetve Porges (1953) adataival (0.3 mg/dm<sup>3</sup>).

Castrillo és Ugalde (1993) kísérleteik során 700 1/min keverés mellett a  $K_{La}$  számított értéke 900 h<sup>-1</sup> volt, míg Fiechter és mtsai. (1981) 500 1/min keverési fordulatszámot alkalmazva 200 és 500 h<sup>-1</sup> közötti  $K_{La}$  értéket közölt. Silva-Santisteban és Filho (2005) vizsgálatai szerint a  $K_{La}$  értékének növelésével, mind az enzimaktivitás, mind pedig a biomassza tömege növelhető. Kísérleteikben az általunk is alkalmazott BioFlo III (New Brunswick Scientific) fermentort használták, és *K. marxianus* esetében a keverőelem típusától függően a  $K_{La}$  értékét 102 h<sup>-1</sup>-nak találták.

Az irodalmi adatokból kitűnik, hogy keverési fordulatszám redukálásával a  $K_{La}$  értéke is csökken, így a kísérleteink során alkalmazott 300 1/min fordulátú keverés esetében számított  $K_{La} = 187$ -227 h<sup>-1</sup> értékek elfogadhatóak.

Vananuvat és Kinsella (1975), valamint Meiering és mtsai. (1982) szerint a kis intenzitású levegőztetés a keverés fordulatszámának 700-800 1/min értékig történő növelésével kompenzálható, melynek hatására a hozam, a laktóz felhasználás és a fajlagos szaporodási sebesség is növekedhet. Knight és mtsai. (1972) szerint ilyen magas fordulatszámok esetében akár 1 VVM-es levegőztetés is alkalmazható.

## 5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. A *Kluyveromyces lactis* NCAIM Y 00260, *Kluyveromyces marxianus* LAF 4, *Kluyveromyces marxianus* NCAIM Y 00933, *Kluyveromyces marxianus* NCAIM Y 0463, illetve *Kluyveromyces marxianus* NCAIM Y 00697 élesztőtörzsek esetében meghatároztuk azokat az optimális fermentációs paramétereket (hőmérséklet: 30°C, pH: 4.5, keverés fordulatszáma: 300 1/min, illetve 2.0 VVM intenzitású levegőztetés), amelyek az adott törzs esetében az egysejtfehérje előállítás során biztosítják a maximális élesztő élősejtszámot, és maximális fajlagos szaporodási sebességet. Az optimális termelési paraméterek mellett meghatároztuk a fermentálé glükóz-, galaktóz-, valamint etanol tartalmát és megállapítottuk a laktóz átalakítás hatékonyságát.
2. Édes savó alapú szakaszos egysejtfehérje-előállítás során 30°C-os hőmérsékletet, 4.5-es pH-t, 300 1/min fordulatszámú keverést, illetve 0.5, 1.0, 1.5 VVM levegőztetést alkalmazva meghatároztuk a *Kluyveromyces lactis* NCAIM Y 00260, illetve a *Kluyveromyces marxianus* LAF 4 törzsek esetében elérhető maximális szárazanyag termelést, és biomassza hozamot, valamint a légzési sebességet.
3. Sajtsavó alapú egysejtfehérje előállítására a *Kluyveromyces lactis* NCAIM Y 00260 törzset találtuk a legalkalmasabbnak.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

A Magyarországon évente keletkező mintegy 970 millió dm<sup>3</sup> édes, vagy savanyú sajtavó egy része a monogasztrikus állatok takarmányozásában jut szerephez, vagy az élelmiszeriparban kerül feldolgozásra. Ez a mennyiség azonban az össz volumennek csupán a felét teszi ki. Nagy része a csatornahálózatba, vagy természetes vizeinkbe kerül, súlyosan károsítva az ottani ökoszisztémát.

A sajtavóban található leggyakoribb szénhidrát, a laktóz hasznosításának egyik lehetséges alternatívája az egysejtfehérje (single-cell protein – SCP) előállítás, melynek során a fermentorokban a sajtavót élesztőgombával oltják be, amely azután aerob körülmények között elszaporodva fehérjévé (az élesztő tömegének mintegy 50%-a) konvertálja annak laktóz tartalmát (mintegy 5%). Az ilyen módon feldolgozott sajtavó világviszonylatban is kevesebb, mint 1%.

Az SCP előállítás kapcsán az 50-es évektől széleskörű kutatás folyt, azonban alkalmazása a nehezen megvalósítható gazdaságosság miatt háttérbe szorult.

A környezetterhelés csökkentésére irányuló erőfeszítések következtében a nagy volumenben keletkező sajtavó hasznosításának továbbra is fennálló problémája indokolja a további kutatásokat.

A jövőben a molekuláris szintű technikák segítségével létrehozott új mikroba törzsek, és a hagyományos biotechnológiai eljárások együttes alkalmazása várható.

Vizsgálataink célja egy SCP előállítására alkalmas, üzemi körülmények között is használható élesztőtörzs kiválasztására irányult.

## Összefoglalás

---

Munkánk során az optimális fermentációs paramétereket (hőmérséklet, kémhatás, keverés, levegőztetés), a szaporodási (maximális telepszám  $/N_{\max}/$ , fajlagos szaporodási sebesség  $/\mu_{\max}/$ ), valamint termelési mutatókat (maximális szárazanyag  $/x_{\max}/$ , hozamok  $/dx/dt$ ;  $Y_{x/s}/$ ) határoztuk meg.

Kísérleteinket a Nyugat-Magyarországi Egyetem Élelmiszertudományi Intézetének Akkreditált Élelmiszervizsgáló laboratóriumában végeztük. A kísérleti berendezés egy MX3-as (New Brunswick) mintavevővel összekapcsolt BioFlo III. (New Brunswick, USA) automata vezérlésű batch/continuous fermentor volt. Az élesztő szaporítást édes sajt savon (pH 6.3, laktóztartalm 50 g/dm<sup>3</sup>) végeztük 30 °C, pH 4.5, 300 1/min fordulatszámú keverés, illetve 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 VVM (a percenként bejutatott levegő és a reaktor térfogatának hányadosa) levegőztetés mellett.

A vizsgált paraméterek esetében a három párhuzamos adatsor eredményeit statisztikai módszerekkel, egy-, illetve kéttényezős varianciaanalízissel dolgoztuk fel, az általános lineáris modellt alkalmazva. Az átlagértékek közötti szignifikáns különbségeket Ducan-féle post-hoc módszerrel határoztuk meg, 5% elsőfajú hiba mellett.

A vizsgált törzsek (*Kluyveromyces lactis* NCAIM Y 00260, *Kluyveromyces marxianus* NCAIM Y 00697 *Kluyveromyces marxianus* NCAIM Y 0463, *Kluyveromyces marxianus* NCAIM Y 00933, illetve *Kluyveromyces marxianus* LAF 4) között a szaporodási tulajdonságok tekintetében szignifikáns különbségek mutatkoztak.

A legkedvezőbb eredményeket mutató két törzset (*Kluyveromyces lactis* NCAIM Y 00260, *Kluyveromyces marxianus* LAF 4  $/\mu_{\max}=0.217$ ,

illetve 0.168 1/h/) további vizsgálatoknak vetettük alá, amelyek során 0.5, 1.0, 1.5 VVM-es levegőztetések mellett meghatároztuk az SCP előállítás szempontjából jelentőséggel bíró termelési mutatókat.

A maximális szárazanyag produkció ( $x_{\max}=25.71$ ), és a hozamok ( $dx/dt=0.520 \text{ g/dm}^3 \times \text{h}$ ;  $Y_{x/s}=0.674 \text{ g/g}$ ) tekintetében is a *K. lactis* NCAIM Y 00260 eredményei bizonyultak kedvezőbbnek.

Az eredményekből arra következtethetünk, hogy az SCP előállítás oxigén limitált volt, amelyet a termelési mutatók különböző levegőztetési szinteken (0.5, 1.0, 1.5 VVM) meghatározott átlagértékeinek szignifikáns különbségei is alátámasztottak.

Az oxigén-limitációra való tekintettel a továbbiakban dinamikus  $K_{La}$  meghatározást végeztünk, melynek során *Kluyveromyces lactis* NCAIM Y 00260, illetve *Kluyveromyces marxianus* LAF 4 esetében megadtuk a légzési sebesség ( $dC/dt$ ), az eredő folyadékoldali oxigénabszorpciós együttható ( $K_{La}$ ), valamint a telítési oxigén koncentráció ( $C^*$ ) értékeit. Az előbbi mutatók tekintetében szintén a *lactis* NCAIM Y 00260 eredményei bizonyultak kedvezőbbnek ( $dC/dt=2.85 \text{ mg O}_2/\text{dm}^3 \times \text{min}$ ;  $K_{La}=227 \text{ h}^{-1}$ ;  $C^*=6.63 \text{ mg/dm}^3$ ).

Az eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a szaporodási, valamint a termelési mutatók alapján - a vizsgált törzsek közül - sajtsavó alapú egysejtfehérje (SCP) előállításra a *Kluyveromyces lactis* NCAIM Y 00260 törzset találtuk a legmegfelelőbbnek, melynek üzemi szintű alkalmazását az általunk meghatározott SCP előállítási paraméterek (30 °C, pH 4.5, 300 1/min fordulatszámú keverés, illetve 1.5 VVM levegőztetés) mellett javasoljuk.

## 7. SUMMARY

Approximately 970 million dm<sup>3</sup> of sweet and sour whey are produced annually in Hungary. Only half of this huge amount of whey is fed to monogastric animals or processed by the food industry. The remainder is dumped into drains or surface waters, causing damage to local ecosystems.

An alternative to the traditional uses of whey (and particularly its major carbohydrate, lactose) is the production of single-cell protein (SCP). During manufacture of SCP, whey is poured into fermenters and is then inoculated with appropriate yeasts, which convert the lactose content of whey (about 5%) into protein (50% of yeast cell mass) under aerobic conditions. Less than 1% of the annual global whey output is processed in this way.

Starting in the 1950s, intensive research activity had been focused on the issues of SCP production but then it largely slowed down due to economic reasons.

However, because of the efforts made worldwide to reduce environmental load, the question of whey utilization has recently become a high-priority research topic again.

The use of genetically engineered novel microbial strains together with traditional biotechnological processes is expected in the future.

The objective of our research was to find a yeast strain suitable for use in commercial production of SCP. The optimum levels of fermentation conditions [temperature, pH, agitation, airflow rate],

## Summary

---

growth characteristics [maximum viable cell count ( $N_{\max}$ ), maximum specific growth rate ( $\mu_{\max}$ )], and production parameters [maximum total solids concentration ( $x_{\max}$ ), production rate ( $dx/dt$ ), biomass yield ( $Y_{x/S}$ )] were determined during the experiments.

The trials were carried out in the accredited food-testing laboratory of the Institute of Food Science at the University of West Hungary. The fermentation equipment consisted of an automated BIOFLO III batch/continuous fermenter (New Brunswick Scientific, USA) and an MX3 Biosampler (New Brunswick). Fermentations were run batchwise using sweet whey (pH 6.3, 50 g/dm<sup>3</sup> lactose content) as raw material. Temperature, pH, and agitation were set at 30°C, 4.5, and 300 rpm, respectively. Airflow rate was at 0.5, 1.0, 1.5, or 2.0 VVM (air volume/medium volume per min).

The data obtained ( $n = 3$ ) were subjected to one-way and two-way analysis of variance using the general linear model procedure. Significant differences among the means were determined by using Duncan's post-hoc test at  $P < 0.05$ .

There were significant differences ( $P < 0.05$ ) in growth characteristics between the strains tested, i.e., *Kluyveromyces lactis* NCAIM Y 00260, *K. marxianus* NCAIM Y 00697, *K. marxianus* NCAIM Y 00463, *K. marxianus* NCAIM Y 00933, and *K. marxianus* LAF 4.

*Kluyveromyces lactis* NCAIM Y 00260 and *K. marxianus* LAF 4, the strains reaching the highest  $\mu_{\max}$  values (0.217 and 0.168 1/h, respectively), were further tested for major production parameters at airflow rates of 0.5, 1.0, and 1.5 VVM.



## Summary

---

*Kluyveromyces lactis* NCAIM Y 00260 proved to be superior to all the other strains in terms of maximum total solids concentration (25.71 g/l), production rate (0.520 g/dm<sup>3</sup>×h) and biomass yield (0.674 g/g).

It was concluded from the results that SCP production was limited by the availability of oxygen because the production parameters obtained at different airflow rates (0.5, 1.0, and 1.5 VVM) were significantly different ( $P < 0.05$ ).

Because of oxygen limitation, the liquid-phase oxygen absorption coefficient ( $K_{L}a$ ) was then dynamically determined and, thus, respiration rate (dc/dt),  $K_{L}a$ , and saturation oxygen concentration ( $C^*$ ) were obtained for both *K. lactis* NCAIM Y 00260 and *K. marxianus* LAF 4. The results of *K. lactis* NCAIM Y 00260 (dc/dt = 2.85 mg O<sub>2</sub>/dm<sup>3</sup>×min;  $K_{L}a = 227$  1/h;  $C^* = 6.63$  mg/dm<sup>3</sup>) were superior to those of *K. marxianus* LAF 4.

In conclusion, on the basis of growth and production properties, of all the *Kluyveromyces* strains tested, *K. lactis* NCAIM Y.00260 proved to be the strain most suitable for use in SCP production from cheese whey. Its commercial use is recommended under the following operation conditions: temperature of 30°C, pH of 4.5, agitation of 300 rpm, and airflow rate of 1.5 VVM.

## 8. IRODALOMJEGYZÉK

- Abd-Alla, M.S. and El-Tantawy, R.B.A.** (1997): Single cell protein from salted whey. *Annals of Agric. Sci. Moshtohor.* 35, 421-433.
- Ahmad, M.N. and Holland, C.R.** (1995): Growth kinetics of single-cell protein in batch fermenters. *J. of Food Eng.* 26, 443-452.
- Alvarez, J. and Ricano, J.** (1979): Modelling and optimal control of an SCP fermentation process. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 9, 149-154.
- American Dairy Products Institute** (1992): Ingredient Description Brochure
- Anon** (1974a): PAG Guideline No. 6 for preclinical testing of novel sources of protein. *PAG Bull.* 4, 17-31.
- Anon** (1974b): PAG Guideline No. 15 on nutritional and safety aspects of novel protein sources for animal feeding. *PAG Bull.* 4, 11-17.
- Anon** (1983a): PAG/UNU Guideline No. 6 for preclinical testing of novel sources of protein. *Food Nutr. Bull.* 5, 60-66.
- Anon** (1983b): PAG/UNU Guideline No. 15 on nutritional and safety aspects of novel protein sources for animal feeding. *Food Nutr. Bull.* 5, 67-70.
- Anon** (1983c): Les produits obtenus a partir du lactosérum, *Revue Laitiere Francaise.* 422, 44-47.
- Anon** (1974c): Proposed guidelines for testing of single cell protein destined as major source of animal feed. General standards of identity for SCP to be used in animal feed. Specific standards of identity of SCP prepared from hydrocarbons. *IUPAC Technical Report No.* 12.

- Anon** (1978): Proposed system for food safety assessment. *Food Cosmetic Toxicol.* 16, Suppl. 2, 1-136.
- Anthony, C.** (1982): The biochemistry of methylotrophs. Academic Press. London. United Kingdom. 328-338.
- Anupama X. and Ravindra, P.** (2000): Value added food: single cell protein. *Biotechnology Advances.* 18, 459-479.
- AOAC** (1975): *Official methods of analysis* (12th ed.) Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Ásványi, B., Reichart, O., Szigeti, J. and Varga L.** (2005a): Screening and selection of *Kluyveromyces* strains for use in batch production of single-cell protein from cheese whey. *Milchwissenschaft.* (közlésre elfogadva)
- Ásványi, B., Szigeti, J. és Varga L.** (2005b): A savó, mint tejipari melléktermék élesztőgombákkal történő hasznosítása. *Acta Agronomica Óváriensis.* (közlésre elfogadva)
- Ásványi, B., Szigeti, J. és Varga L.** (2005c): *Kluyveromyces* törzsek összehasonlítása sajtsavó alapú szakaszos egysejtfehérje-előállítás során. *Acta Agronomica Óváriensis.* (közlésre elfogadva)
- Atkin, C., Ritter, L.D. and Ordal, A.J.** (1976): Continuous propagation of *Trichosporon cutaneum* in cheese whey. *Appl. Microbiol.* 15, 1388-1344.
- Bachhawat, N., Gowda, L.R. and Baht S.G.** (1996): Single step method of detergent-permeabilized *Kluyveromyces fragilis* for lactose hydrolysis. *Proc. Biochem.* 31,21-25.
- Bailey, R.B., Benitez, T. and Woodward, A.** (1982): *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to catabolite repression: use in

cheese whey hydrolysate fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 631-639.

**Barba, D., Beolchini, F., Del Re, G., Di Giacomo, G. and Veglio F.** (2001): Kinetic analysis of *Kluyveromyces lactis* fermentation on whey: batch and fed-batch operations 36,531-536.

**Barberis, S.E. and Gentina, J.C.** (1998): Effect of dissolved oxygen level on lactase production by *Kluyveromyces fragilis*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 73, 71-73.

**Barberis, S.E. and Segovia, R.F.** (2002): Maximum volumetric production of  $\beta$ -galactosidase by *Kluyveromyces fragilis* in fed-batch culture with automatic control. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 77, 706-710.

**Barnett J.A., Barnett L., Payne R.W. and Yarrow D.** (1983): Yeasts: characteristics and identification. Cambridge University Press. 344-345 p.

**Barnett, J.A.** (1992): Some controls on oligosaccharide utilization by yeasts. The physiological basis of the Kluyver effect. *FEMS Microbiol. Lett.* 79, 371-378.

**Becerra, M. and González-Siso, M.I.** (1996): Yeast  $\beta$ -galactosidase in solid-state fermentations. *Enzyme and Microbial Technology* 19, 39-44.

**Becerra, M., Rodríguez-Belmonte, E., Cerdán, M.E. and González-Siso, M.I.** (2004): Engineered autolytic yeast strains secreting *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase for production of heterologous proteins in lactose media

**Belem, M.A.F. and Lee, B.H.** (1998): Production of bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: an alternative. *Cit. Rev. Food Sci. Nutr.* 38, 598-656.

**Bellaver, L.H., Barbosa De Carvalho, N.M., Abrahão-Neto, J. and Gombert, A.K.** (2004): Ethanol formation and enzyme activities

around glucose-6-phosphate in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 exposed to glucose or lactose excess. FEMS Yeast Research. 4, 691-698.

**Belluci, P.** (1980): La Bioproteine. Feltrinelli. Milano.

**Ben-Hassan, R. M. and Ghaly, A. E.** (1995): Continuous production of Single Cell Protein from cheese whey lactose using *Kluyveromyces fragilis*. American Society of Agricultural Eng. 38, 1121-1127.

**Ben-Hassan, R.M.** (1991): Cheese whey fermentation for single cell protein production and pollution potential reduction. Unpublished PhD thesis, Department of Agricultural Engineering Technical University of Nova Scotia, Halifax, NS.

**Ben-Hassan, R.M., Ghaly, A.E. and Ben-Abdallah, N.** (1992): Metabolism of cheese whey lactose by *K. fragilis* for energy and growth under batch condition. Appl. Biochem. Biotechnol. J. 33, 97-115.

**Ben-Hassan, RM, Ghaly, A.E. and Mansour, M.H.** (1991): A microcomputer-based oxygen measurement and control system for fermentation processes. Appl. Bbiochem. Biotechnol. 30, 233-234.

**Bernstein, S. and Everson T.C.** (1973): Protein production from acid whey via fermentation. In: Proceedings of the National Symposium on Food Process Waste, 4th Environmental Protection Agency Technology Series No. EPA66012-73-031. USEPA, College Park, M.D.

**Bernstein, S., Tzeng, C.H. and Sisson, D.** (1977): The Commercial fermentation of cheese whey for production of protein and/or alcohol. Biotechnol. Bioeng. Symp. 7, 1-9.

**Berruga M.I., Jaspe A. and SanJose C.** (1997): Selection of Yeast Strains for Lactose Hydrolysis in Dairy Effluents. International Biodeterioration & Biodegradation. Vol. 40. No. 2 4, 119-123 p.

- Borgardts, P., Krischke, W. Trosch, W. and Brunner, H.** (1998): Integrated bioprocess for the simultaneous production of lactic acid and dairy sewage treatment. *Bioprocess Eng.* 19, 321-329.
- Brodsky, J.A. and Grootwassink, J.W.D.** (1986): Development and evaluation of whole-cell yeast lactase for use in dairy processing. *J. Food Sci.* 54, 897-902.
- Cardini, C.E. and Leloir, L.F.** (1953): Enzymatic phosphorylation of galactosamine and galactose. *Arch. Biochem. Biophys.* 45, 55-64.
- Carlotti, A., Jacob, F., Perrier, J. and Poncet, S.** (1991a): Yeast production from crude sweet whey by a mixed culture of *Candida kefyr* and *Candida valida* LY497. *Biotechnol. Lett.*, 13, 437-440.
- Carlotti, A., Poncet, S., Perrier, J. and Jacob, F.** (1991b): Microbial interaction during the production of yeast on crude sweet whey. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 37, 389-394.
- Castillo, F.J.** (1990): Lactose metabolism by yeasts. In Verachtert, H. and De Mot, R. (eds.) Marcel Dekker, New York. 297-320.
- Castrillo J.I. and Ugalde U.O.** (1993): Patterns of energy metabolism and growth kinetics of *Kluyveromyces marxianus* in whey chemostat culture. *Appl. Biochem. and Biotechnol.* 40, 386-393 p.
- Caton J.S., Williams, J.E., Beaver, E.E., May, T. and Beliea, R.L.** (1989): Effects of dairy biomass protein on ruminal fermentation and site and extent of nutrient digestion in lambs. *J. Anim. Sci.* 67, 2762.
- Champagne, C.P. and Goulet, J.** (1988): Growth of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in lactose-hydrolysed cheese-whey ultrafiltrate. *Can Inst. Food. Sci. Technol.*, 21, 545-548.

- Champluvier, B., Kamp, B. and Rouzhet, P.G.** (1988): Preparation and properties of  $\beta$ -galactosidase confined in cells of *Kluyveromyces* sp. *Enz. Microbiol. Technol.* 10, 611-615.
- Chanda, S. and Chakrabarti, S.** (1996): Plant origin liquid waste: a resource for single-cell protein production by yeast. *Biores. Technol.* 57, 51-54.
- Chang, Y. and Dickson, R.** (1998): Primary structure of the lactose permease gene from the yeast *Kluyveromyces lactis*. *J. of Biol. Chem.* 263, 16696-16703.
- Choi, M.H. and Park, Y.H.** (1999): Growth of *Pichia guilliermandii* A9 an osmotolerant yeast, in waste birn generated from kimchi production. *Biores. Technol.* 70, 231-236.
- Cortés, G., Trujillo-Roldán, M.A., Ramírez, O.T. and Galindo, E.** (2005): Production of  $\beta$ -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* under oscillating dissolved oxygen tension. *Proc. Biochem.* 40, 773-778.
- Coton, S.G.** (1976): Recovery of dairy waste. In Birch, G.G., Parker K.J. and Morgan, J.T. (eds.) *Food from Waste.* Appl. Sci. Publishers. UK. 221-231.
- Csapó, J. és Csapó-Kiss, Zs.** (1999): Tej és tejtermékek az emberi táplálkozásban. Oktatási jegyzet. SzFSz JATE Szegedi Élelmiszeripar Főiskolai Kar, Élelmiszertechnológia és Környezetgazdálkodás Tanszék, Szeged. 341.
- Damodaran, S.** (1997): Protein-stabilized foams and emulsions. In Damodaran, S., Paraf, A. (eds.), *Food proteins and their application.* Marcel Dekker Inc. New York. 57-110.
- Davis, P.** (1973): The place of SCP in Man's diet. In *Proc. Int. Symp. on Single-cell protein*, 7-9 November 1973, Rome, organised by Stanford Res. Inst., CA, USA.

- de Deken, R.H.** (1966): The Cabtree effect: a regulatory system in yeast. *J. Gen. Microbiol.* 44, 149-156.
- de Groot, A.P., Til, H.P. and Feron, V.J.** (1970a): Safety evaluation of yeast grown on hydrocarbons. I. One year feeding study in rats with yeast grown on gas-oil. *Food Cosmetic Toxicol.* 8, 267-276.
- de Groot, A.P., Til, H.P. and Feron, V.J.** (1970b): Safety evaluation of yeast grown on hydrocarbons. II. One year feeding study in rats with yeast grown on pure *n*-paraffins. *Food Cosmetic Toxicol.* 8, 499-507.
- de Groot, A.P., Til, H.P. and Feron, V.J.** (1971): Safety evaluation of yeast grown on hydrocarbons. III. Two-year feeding and multigeneration study in rats with yeast grown on gas-oil. *Food Cosmetic Toxicol.* 9, 787-800.
- Deák T., Lukacsovics F., Reichardt O., Román M., Varga B.** (2002): Sejttömegmérés. **Lukacsovics F.** (*szerk.*) Mikrobiológiai gyakorlatok. Egyetemi jegyzet. Kertészeti Egyetem, Budapest. 147.
- Deák, T.** (1998): Élesztőgombák a mezőgazdaságban és az iparban. Mezőgazdasági Szaktudás Kiadó, Budapest. 80-84.
- Declaire, M., Decat, W. and Van Huynh, N.** (1987): Comparison of various permeabilization treatments on *Kluyveromyces* by determining in situ  $\beta$ -galactosidase activity. *Enz. Microbiol. Technol.* 9, 300-302.
- Delaney, R. A. M., Kennedy, R. B. and Waley, D.** (1975): Composition of *Saccharomyces fragilis* biomass grown on lactose permeate. *J. Sci. Food Agric.* 26, 1177-86.
- Donnini, C., Lodí, T., Ferrero, I., Algeri, A.A. and Puglisi, P.P.** (1992): Allelism of *IMP1* and *GAL2* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 174, 3411-3415.



- Ducan, D.B.** (1975): t-tests and intervals for comparison suggested by the data. *Biometrics*. 31, 339-359.
- Entian, K.D. and Barnett, J.A.** (1983): Some genetical and biochemical attempts to elucidate the energetics of sugar uptake and explain the Kluyver effect in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Curr. Genet.* 7, 323-325.
- Farahnak, F., Seki, T., Ryu, D.Y. and Ogrydziak, D.** (1986): Construction of lactose-assimilating and high ethanol producing yeasts by protoplast fusion. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 362-367.
- Fiechter, A., Fuhrmann, G.F. and Käppeli, O.** (1981): Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. *Advances in Microbial Physiology*. 22, 123-183.
- Friend, B.A. and Shahani, K.M.** (1979): Whey fermentation. *New Zealand J. Dairy Sci. Technol.* 14, 143-155.
- Fukuhara, H.** (2003): The Kluyver effect revisited. *FEMS Yeast Research*. 3, 327-331.
- Gálvez, A., Jesus Ramirez, M. and García-Garibay, M.** (1990): *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*. 40, 252-261.
- García Bilbao, J.L.** (1981): Aprovechamiento de suero de leche desproteinizado y de materiales nitrogenados de desecho por algunas levaduras. *Alimentaria*. 119, 65-69.
- Gasztonyi, K.** (1992): *Enzinkémia*. **Gasztonyi, K., Lásztity, R.** (szerk.): *Élelmiszer-kémia 1. Mezőgazda Kiadó, Budapest*. 539-540.
- Ghaly A.E., Ben-Hassan R.M., Mansour M.H. and Nassar M.A.** (1993): Modelling batch production of Single Cell Protein from cheese whey. II: Lactose metabolism. *Appl. Biochem. and Biotechnol.* 43, 15-36 p.

- Ghaly, A. E. and Kamal, M. A.** (2004): Submerged yeast fermentation of acid cheese whey for protein production and pollution potential reduction. *Water Research*. 38, 631-644.
- Ghaly, A. E., Kamal, M. A. and Correia, L. R.** (2005): Kinetic modelling of continuous submerged fermentation of cheese whey for single cell protein production. *Biores. Technol.* 96, 1143-1152.
- Ghaly, A. E., Kok, R. and Ingrahm, J. M.** (1989): Growth rate determination of heterogenous microbial population in swine manure. *Appl. Biochem. Biotechnol. J.* 22, 59-78.
- Ghaly, A.E., Ben-Hassan, R.M. and Ben-Abdallah, N.** (1992): Utilization of cheese whey lactose by *K. fragilis* for energy and growth under continuous fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol. J.* 36, 13-34.
- Ghaly, A.E. and Singh, R.K.** (1989): Pollution potential reduction of cheese whey through yeast fermentation. *Appl. Biochem. And Biotechnol.* 22, 181-203.
- Gekas, V. and López, L.** (1985): Hydrolysis of lactose: A literature review. *Proc. Biochem.* 20, 2-12.
- Goffrini, P., Ferrero, I. and Donnini, C.** (2002): Respiration-dependent utilization of sugars in yeasts: a determinant role of sugar transporters. *J. Bacteriol.* 184, 427-432.
- González-Siso, M.I.** (1996): The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Biores. Technol.* 57, 1-11.
- Hang, D.J., Woodams, E.E. and Hang, L.E.** (2003): Utilization of corn silage juice by *Kluyveromyces marxianus*. *Biores. Technol.* 86, 305-307.
- Hang, Y.D. and Woodams, E.E.** (1981): Rapid removal of lactic acid from wastewater by a flocculent yeast. *J. Food Sci.* 46, 1498-1499.

- Harju, M.** (1987): Lactose hydrolysis. *B. Int. Dairy Fed.* 212, 50-54.
- Harju, M., Heikonen, M. and Kreula, M.** (1976): Nutrient supplementation of Swiss cheese whey for the production of feed yeast. *Milchwissenschaft.* 31, 530-534.
- Helmeczi B.** (1994): *Mezőgazdasági mikrobiológia. Mezőgazda Kiadó.*
- Hobman, P.G.** (1984): Review of processes and products for utilization of lactose in deproteinated milk serum. *J. Dairy Sci.* 67, 2630-2653.
- Hoogerheide, J.C., Yamada, K., Littlehiles, J.D. and Ohno, K.** (1979): Guidelines for testing of single-cell protein destined as protein source for animal feed II. *Pure Appl. Chem.* 51, 2537-2560.
- Ideker, T., Thorsson, V., Ranish, J.A., Christmas, R. and Buhler, J.** (2001): Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network. *Science.* 292, 929-934.
- Irvine, D. M. and Hill, A. R.** (1985): Cheese Technology. In **Blanch, H. W., Drew, S. and Wang, D.I.C.** (eds.), *Comprehensive Biotechnology*, Pergamon Press, Oxford – New York – Toronto – Sydney – Frankfurt 3, 523-565.
- Joshi, M.S., Gowda, L.R. and Baht, S.G.** (1987): Permeabilization of yeast cells (*Kluyveromyces fragilis*). *Biotechnol. Lett.* 9, 549-554.
- Jurado, E., Camacho, F., Luzón, G. and Vicaria, J.M.** (2002): A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technol.* 31, 300-309.

- Kahlon S.S., Kalra K.L. and Grewal, H.S.** (1990): Single-cell protein: current status. *Indian J. Microbiol.* 30, 13-28. p.
- Kallel-Mhiri, H., Valance, C., Engasser, J.M. and Milco, A.** (1994): Yeast continuous mixed cultures on whey permeate and hydrolysed starch. *Proc. Biochem.*, 29,381-386.
- Kiers, J., Zeemann, A.M., Luttk, M., Thiele, C., Castrillo, J.I., Steensma, H.Y., Van Dijken, J.P. and Pronk, J.T.** (1998): regulation of alcoholic fermentation in batch and chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis* CBS 2359. *Yeast.* 14, 459-469.
- Kim, C.S., Ji, E. and Oh, D.** (2004): A new kinetic model of recombinant  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* for both hydrolysis and transgalactosylation reactions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316, 738-746.
- Kitamoto, H.K. and Nakahara, T.** (1994): Isolation of an l-methionine-enriched mutant of *Kluyveromyces lactis* grown on whey permeate. *Proc. Biochem.* 29, 127-131.
- Knight, J.H., Smith, W. and Mickle, J.B.** (1972): Cheese whey disposal using *Saccharomyces fragilis* yeast. *Cultured Dairy Prod. J.* 1, 17-18.
- Kosikowski, F. V.** (1979): Whey utilization and whey products. *J. Dairy Sci.* 62, 1149-1160.
- Kosikowski, F.V. and Wierzbicki, L.E.** (1973): Lactose hydrolysis of raw and depasteurised Milks by *Saccharomyces lactis* lactase. *J. Dairy Sci.* 56, 146-150.
- Kovács F. (2002):** Állati eredetű élelmiszer-előállítás - élelmiszerbiztonság – életminőség. *Magyar Tudomány* 2002/9, 1141.
- Kurtzmann, C.P. and Fell, J.W.** (1998): The yeasts, a taxonomic study. 4th ed., Elsevier, Amsterdam.

- Lai, K. and Elsas, L.J.** (2000): Over-expression of human UDP-glucose pyrophosphorylase rescues galactose-1-phosphate uridylyltransferase-deficient yeast. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 271, 392-400.
- Lai, K. and Klapa, M.I.** (2004): Alternative pathways of galactose assimilation: could inverse metabolic engineering provide an alternative to galactosemic patients? *Metabolic Eng.* 6, 239-244.
- Lark, N., Xia, Y., Qin, C., Gong, C.S. and Tsao, G.T.** (1997): Production of ethanol from recycled paper sludge using cellulase and yeast, *Kluyveromyces marxianus*. *Biomass and Bioenergy.* 12, 135-143.
- Lehman, J., Bednarski, W. and Tomasik, J.** (1990): Influence of cultivation condition on the composition of oil produced by *Candida curvata*. *Biol. Wastes.* 31, 1-15 p.
- Leloir, L.F.** (1951): Enzymatic transformation of uridine diphosphate glucose into galactose derivative. *Arch. Biochem. Biophys.* 33, 186-194.
- Lichtfield H.J.** (1989): Single Cell Protein. In *A Revolution in Biotechnology*, ed. J. L Marx. Cambridge Univ. Press.
- Lodi, T. and Donnini, C.** (2005): Lactose-induced cell death of  $\beta$ -galactosidase mutants in *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Research.* 5, 727-734.
- Machado, K.M. and Linardi, U.R.** (1990): Production of amylase and  $\beta$ -galactosidase by yeasts. *Arch. Biol. Technol.* 33, 247-253
- Mahmoud, M.M. and Kosikowski, F.V.** (1982): Alcohol and single cell protein by *Kluyveromyces* in concentrated whey permeates with reduced ash. *J. of Dairy Sci.* 65, 2082-2087.
- Mansour, M.H., Ghaly, A.E., Ben-Hassan, R.M. and Nassar, M.A.** (1993): Modelling batch production of Single Cell Protein from

cheese whey. I.: *Kluyveromyces fragilis* growth Applied Biochemistry and Biotechnology. 43, 1-14.

**Marwaha, S. S. and Kennedy, J. F.** (1988): Review: whey-pollution problem and potential utilisation. Int. J. Food Sci. Technol. 23, 323-336.

**Mauersberger, S., Wang, H., Gaillardin, C., Barth, G. and Nicaud, J.** (2001): Insertional mutagenesis in the n-alkan-assimilating yeast *Yarrowia lipolytica*: generation of tagged mutations in genes involved in hydrophobic substrate utilization. J. Bacteriol. 183, 5102-5109.

**May, T., Williams, J.E., Caton, J.S. and Beaver, E.E.** (1990): Nutrient intake and digestion as influenced by wash water solids as a protein source for lambs fed orchardgrass hay. J. Anim. Sci. 68,3886-3896.

**Mawson, A. J.** (1994): Bioconversions for whey utilisation and waste abatement. Biores. Technol. 47, 195-203.

**Mawson, A.J.** (1988): Yeast biomass production from acid whey permeate. Biotechnol. Lett. 10, 503-508.

**McAlery, G.** (1987): Mass transfer studies in batch fermentation. PhD thesis. The Queen's University of Belfast. Belfast, Northern Ireland.

**Meiring, A.G., Azi, F.A. and Gregory, K.F.** (1982): Microbial protein production from whey and cassava. Trans ASAE. 25, 586-593.

**Merico, A., Capitanio, D., Vigentini, I., Ranzi, B.M. and Compagno, C.** (2004): How physiological and cultural conditions influence heterologous protein production in *Kluyveromyces lactis*. J. of Biotechnol. 8, 139-146.

- Meyrath, J. and Bayer, K.** (1979): Biomass from whey. In: Rose, A.H. (Ed.) *Microbial Biomass. Economic Microbiol.* London, Academic Press. 4, 207-269.
- Møller, K., Bro, C., Piškur, J., Nielsen, J. and Olsson, J.** (2002): Steady-state and transient-state analyses of aerobic fermentation in *Saccharomyces kluyveri*. *FEMS Yeast Res.* 2, 233-244.
- Moon N.J., Hammond, E.G. and Glatz, B. A.** (1978): Conversion of cheese whey and whey permeate to oil and single-cell protein. *J. of Dairy Sci.* 61, 1537-1547.
- Moresi, M. and Patete, M.** (1988): Cinetica del processo di crescita di *K. fragilis* su siero di latte. *Ann. Microbiol.* 38, 1-15.
- Moser, A.** (1981): Kinetics of batch fermentation, *Bioprozeßtechnik.* Springer Verlag, New York. 241-279.
- Moulin, G. and Galzy, P.** (1984): Whey, a potential substrate for biotechnology. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 1, 29-34.
- Muniswaran, P.K.A., Selvakumar, P. and Charyulu N.C.L.N.** (1994): Production of cellulases from coconut coir pith in solid-state fermentation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 60, 147-151.
- Nobelmann, B. and Lengeler, J.W.** (1996): Molecular analysis of the *gat* genes from *Escherichia coli* and of their roles in galactitol transport and metabolism. *J. Bacteriol.* 178, 6790-6795.
- Olsen, J. and Allerman, K.** (1991) La biomasa microbiana como fuente de proteína. In *Biología Básica*, ed. J.Bu'Lock and B. Kristiansen. Editorial Acribia S.A., Spain, 285-308.
- Ostergaard, S., Olsson, L. and Nielsen, J.** (2000): Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* *Microbiol. and Mol. Biol. Rev.* 64, 34-50.
- Paraskevopoulou, A., Adhanasiadis, I., Kanellaki, M., Bekatorou, A., Blekas, G. and Kiosseoglou, V.** (2003): Functional

properties of single cell protein produced by kefir microflora. Food research International. 36, 431-438.

**Pellón, J.E. and Hernandez,** (1986): Aplicaciones en el sector alimentario. In la ingeniería Genética y sus Aplicaciones, ed. J. Pellón. Editorial Acribia S.A., Spain, 145-158.

**Pinheiro, R., Belo, I. and Mota, M** (2000): Air pressure effects on biomass yield of two different *Kluyveromyces* strains. Enzyme and microbial Technol. 26, 756-762.

**Porges, N.** (1953): Yeast: A valuable product from wastes. J. of Chemical Education 30, 562-565.

**Porro, D., Martegani, E., Ranzi, B.M. and Alberghina, L.** (1992a): Development of high cell density cultures of engineered *Saccharomyces cerevisiae* cells able to grow lactose. Biotechnol. Tech. 14, 1085-1088.

**Porro, D., Martegani, E., Ranzi, B.M. and Alberghina, L.** (1992b): Lactose/whey utilization and ethanol production by transformed *Saccharomyces cerevisiae* cells. Biotechnol. Bioeng. 39, 799-805.

**Prins, A.** (1988): Principles of foam stability. In Dickson, E., Stainsby, G. (eds.), Advances in food emulsions and foams. Elsevier Appl. Sci. London. 91-122.

**Prior, C., Mamessier, P., Fukuhara, H., Chen, X.J. and Wésolowsky-Louvel, M.** (1993): The hexokinase gene is required for transcriptional regulation for the glucose transporter gene RAG1 in *Kluyveromyces lactis*. Mol. Cell. Biol. 13, 3882-3889.

**Riley, M.I. and Dickson, R.C.** (1984): Genetic and biochemical characterisation of the galactose gene cluster in *Kluyveromyces lactis*. J. Bacteriol. 158, 705-712.



- Riley, M.I., Sreekrisana, K., Bhairi, S. and Dickson, R.C.** (1987): Isolation and characterisation of mutants of *Kluyveromyces lactis* defective in lactose transport. *Mol. Gen. Genet.* 208, 145-151.
- Ross, K.L., Davis, C.N. and Fridovich-Keil, J.L.** (2004): Differential roles of the Leloir pathway enzymes and metabolites in defining galactose sensitivity in yeast. *Mol. Gen. Metabolism.* 83, 103-116.
- Samuelov, N.S., Datta, R., Jain, M.K. and Zeikus, G.** (1999): Whey fermentation by *Anaerobiospirillum succiniproducens* for production on a succinate-based animal feed additive. *Appl. and Environm. Microb.* 65, 2260-2263.
- Sandhu, D.K. and Waraich, M.K.** (1983): Conversion of cheese whey to Single Cell Protein. *Biotechnology and Bioengineering.* 25, 797-808 p.
- Schneider, A.L.S., Merkle, R., Carvalho-Jonas, M.F., Jonas, R. and Furlan, S.** (2001): Oxygen transfer on  $\beta$ -galactosidase production by *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol. Lett.* 23, 547-550.
- Schneider, K.H., Jakel, G., Hoffmann, R. and Giffhorn, F.** (1995): Enzyme evolution in *Rhodobacter sphaeroides*: selection of a mutant expressing a new galactitol dehydrogenase and biochemical characterization of the enzyme. *Microbiol.* 141, 1865-1873.
- Sevella, B.** (2001a): Biomérnöki műveletek és folyamatok. Műegyetemi kiadó. 325-327.
- Sevella, B.** (2001b): Biomérnöki műveletek példatár. Műegyetemi kiadó. 150-152.
- Sheetz, R.M. and Dickson, R.C.** (1981): *LAC4* is the structural gene for  $\beta$ -galactosidase in *Kluyveromyces lactis*. *Genetics.* 98, 729-745.

- Sienkiewicz, T. and Riedel, C. L.** (1990): Whey and whey utilization. WEB Fachbuchverlage. Leipzig, Germany.
- Silva-Santisteban, B.O.Y. and Filho, F.M.** (2005): Agitation, aeration and shear stress as key factors in inulinase production by *Kluyveromyces marxianus*. Enzyme and Microbial Technol. 36, 717-724.
- Sims, A.P. and Barnett, J.A.** (1991): Levels of activity of enzymes involved in anaerobic utilization of sugars by six yeast species: observations towards understanding the Kluyver effect. FEMS Microbiol. Lett. 61, 295-298.
- Sinclair, C.G. and Cantero, D.** (1990): Fermentation modelling. In **McNeil, B. and Harvey, L.M.** (eds.) Fermentation: A Practical Approach. IRL Press. Oxford, England. 345-359.
- Sista, V.R. and Srivastava, G.C.** (1981): Single-cell protein – its relevance in an Indian context. Ind. J. Microbiol., 21, 259-264.
- Stred'anský, M., Tomaska, M., Sturdík, E. and Kemnický, L.** (1993): Optimisation of  $\beta$ -galactosidase extraction from *Kluyveromyces marxianus*. Enzyme Microb. Technol. 15, 1063-1065.
- Stringer D.A.** (1985): Acceptance of Single –cell protein for animal feeds. In **Blanch, H. W., Drew, S. and Wang, D. I. C.** (eds.), Comprehensive Biotechnology, Pergamon Press, Oxford – New York – Toronto – Sydney – Frankfurt 4, 685-694.
- Szczodrak, J.** (2000): Hydrolysis of lactose in whey permeate by immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. J. Molecular Catal. 10, 631-637.
- Ulery, T.L., Mangus, D.A. and Jaehning, J.A.** (1991): The yeast *IMP1* gene is allelic to *GAL2*. Mol. Gen. Genet. 230, 129-135.

- van der Walt, J.P.** (1956): *Kluyveromyces* – a new yeast genus of the *Endomycetales*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 22, 265-272.
- van Urk, H., Mark, P.R., Scheffers, W.A. and Dijken, J.P.**, (1988): Metabolic responses of *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066 and *Candida utilis* CBS 621 upon transition from glucose limitation to glucose excess. *Yeast* 4, 283-291.
- van Urk, H., Voll, W.S.L., Scheffers, W.A. and van Dijken, J.P.** (1990): Transient-state analysis of metabolic fluxes in Cabtree-positive and Cabtree-negative yeasts. *Appl. Environm. Microbiol.* 56, 281-287.
- Vananuvat P. and Kinsella, J.E.** (1975): Production of yeast protein from crude lactose by *Saccharomyces fragilis*. Batch culture and continuous culture studies. *J. Food Sci.* 40, 336-341.
- Walker, G.M. and O'Neal, J.D.** (1990): Morphological and metabolic changes in the yeast *K. marxianus var. marxianus* NRLLy 2415 during fermentation of lactose. *J. of Chemical Technol. and Biotechnol.* 49, 75-89.
- Wasserman, A. E., Hampson, J. W. and Alvare, N. F.** (1961): Large scale production of yeast to whey. *J. Water Pollut. Control Fed.* 33, 1090-1094.
- Yang, S. T. and Silva, E. M.** (1995): Novel products and new technologies for use of a familiar Carbohydrate, milk lactose. *Journal of Dairy Science.* 78, 2541-2562.
- Yildirim, N. and Mackey, M.C.** (2003): Feedback regulation in the lactose operon, a mathematical modelling study and comparison with experimental data. *Biophys. J.* 84, 2841-2851.
- Yves, V.** (1979): La lactoserum. Materie premiere noble pour les industries alimentaires humaines et animales. *Revue Laitiere Francaise.* 372, 27-39.

## Szakirodalom

---

<http://www.hupe.hu/szerv/tanszekek/kio/im/oktat/SEJTBIO/glikolizis/gliko.html>, 2005

*71/2003 (VI. 27.) FVM rendelet* Az állati hulladékok kezelésének és hasznosításukkal készült termékek forgalomba hozatalának állat-egészségügyi szabályai.

*2277/2003/EK* A mezőgazdasági termékek ökológiai termeléséről.

## 9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetem fejezem ki Dr. Schmidt Jánosnak, a doktori iskola vezetőjének, hogy PhD képzésben való részvételem támogatta.

Külön köszönet illeti program- és témavezetőmet, Dr. Szigeti Jenőt iránymutatásáért, tanácsaiért, dolgozatom javítását szolgáló kritikai észrevételeiért, valamint hogy megteremtette számomra a kutatómunka elvégzésének feltételeit.

Köszönetet mondok opponenseimnek, Dr. Csapó Jánosnak, Dr. Fenyvessy Józsefnek és Dr. Turcsán Zsoltnak, dolgozatom színvonalasabbá tételét szolgáló kritikai megjegyzéseikért, tanácsaikért.

Dr. Varga László, és Dr. Reichart Olivér docens Uraknak megköszönöm a tudományos közlemények és szakfordítások elkészítéséhez nyújtott segítségüket, és a szakmai konzultációk lehetőségét.

Köszönetem fejezem ki Herpai Zoltánnak és Győrik Mártának, valamint a Magyar Tejgazdasági Kísérleti Intézet dolgozóinak, a vizsgálatokban nyújtott segítségükért.

A Nyugat-Magyarországi Egyetem Élelmiszertudományi Intézetében dolgozó kollégáim, Dr. Krász Ádám, Dr. Farkas László, Dr. Ajtony Zsolt, Molnár Noémi, Kovács Renáta, Reisinger Katalin, Lökösházi Éva, Szabó Lászlóné segítő tanácsai, valamint Ankhelyi Istvánné, Göncz Ferencné és Németh Ferenc laboratóriumi munkában nyújtott segítsége nagyban segítette munkámat.

Köszönet illeti családomat, akik erkölcsi és anyagi segítséget nyújtottak munkám során.

## 10. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN ÍRT TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK, ELŐADÁSOK

### TUDOMÁNYOS KONFERENCIÁKON, ÜLÉSEKEN TARTOTT ELŐADÁSOK (ORAL PRESENTATIONS)

#### Magyarul

Kovács, P., Szigeti, J. és **Ásványi, B.** (2003): Savó alapú egysejtfehérje előállítás. OMFB Szakmai beszámoló. Budapest.

### TUDOMÁNYOS KONFERENCIA KIADVÁNYOKBAN MEGJELENT ÖSSZEFOGLALÓK (ABSTRACTS)

#### Magyarul

**Ásványi, B.** és Szigeti, J. (2003): Egysejtfehérje előállítására alkalmas élesztők szaporodásának összehasonlítása. MTA ÉKB – KÉKI – MÉTE 312. Tudományos Kollokvium előadásainak rövid kivonata. Budapest, 2003. szeptember. 284, 6.

**Ásványi, B.** és Szigeti, J. (2002) Tejipari melléktermékek fehérje- és vitamintartalmának dúsítása (Enrichment of protein and vitamin contents in dairy by-products). *XXIX. Óvári Tudományos Napok "Agrártermelés – Életminőség"*. Az előadások és poszterek összefoglaló anyaga, Élelmiszer-tudományi Szekció, Mosonmagyaróvár, 100.

#### Angolul

**Ásványi, B.**, Bugyi, G., Daróczi, L., Kovács, R., Szigeti, J. és Varga, L. (2003) Growth of yeast strains during batch production of single-cell protein from cheese whey. *1st FEMS Congress of European Microbiologists*. Abstract Book, Ljubljana, 103–104.

**Ásványi, B.**, Kovács, R., Szigeti, J., Varga, L. és Kovács, P. (2003) Selection of *Kluyveromyces* strains for batch production of single-cell protein from cheese whey. *23rd International Specialised Symposium on Yeasts "Interaction Between Yeasts and Other Organisms"*. Book of Abstracts, Budapest, 156.

Kovács, R., Vecseri-Hegyész, B., **Ásványi, B.**, Varga, L., Szigeti, J., Daróczy, L. és Bugyi, G. (2003) Manufacture of honey beer with *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces pastorianus*. *1st FEMS Congress of European Microbiologists*. Abstract Book, Ljubljana, 117–118.

Kovács, R., Vecseri-Hegyész, B., **Ásványi, B.**, Varga, L., Szigeti, J., Daróczy, L. és Bugyi, G. (2003) Suitability of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces pastorianus* for use in honey beer production. *23rd International Specialised Symposium on Yeasts "Interaction Between Yeasts and Other Organisms"*. Book of Abstracts, Budapest, 188.

**Ásványi, B.**, Szigeti, J. és Varga, L. (2004) Suitability of *Kluyveromyces* spp. for use in single-cell protein production from sweet cheese whey. *American Dairy Science Association – American Society of Animal Science – Poultry Science Association 2004 Joint Annual Meeting*. Abstracts, St. Louis, Missouri: *Journal of Animal Science* **82** (Supplement 1) / *Journal of Dairy Science* **87** (Supplement 1) / *Poultry Science* **83** (Supplement 1) 384.

**TUDOMÁNYOS KONFERENCIÁK TELJES  
TERJEDELEMBEN MEGJELENT ANYAGAI (PAPERS  
PUBLISHED IN PROCEEDINGS)**

**Magyarul**

**Ásványi, B.**, Szigeti, J. és Varga, L. (2003) Élesztőtörzsek szaporodásának összehasonlítása szakaszos egysejtfehérje-előállítási folyamatban (Comparing the growth of yeast strains during batch production of single-cell protein). *31. Műszaki Kémiai Napok*. Az előadások teljes terjedelemben megjelent anyagai, Veszprém, 295–299.

**Ásványi, B.**, Szigeti, J. és Varga, L. (2004) Savó alapú egysejtfehérje előállítás (Single-cell protein production from cheese whey). *XXX. Óvári Tudományos Napok "Agrártermelés – Harmóniában a Természettel"*. Az előadások és poszterek teljes terjedelemben megjelent anyagai, Élelmiszer-tudományi Szekció, Mosonmagyaróvár, Compact Disc. (Az előadások és poszterek összefoglaló anyaga, Élelmiszer-tudományi Szekció, Mosonmagyaróvár, 102.)

### **LEKTORÁLT TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK (PEER REVIEWED PAPERS)**

#### **Magyarul**

**Ásványi, B.**, Szigeti, J. és Varga, L. (2005) A savó, mint tejipari melléktermék élesztőgombákkal történő hasznosítása (Utilization of whey as a dairy byproduct by yeasts). *Acta Agronomica Óváriensis* **47** (2) (közlésre elfogadva).

**Ásványi, B.**, Szigeti, J. és Varga, L. (2005) *Kluyveromyces* törzsek összehasonlítása sajtsavó alapú szakaszos egysejtfehérje-előállítás során (Comparison of *Kluyveromyces* strains in terms of suitability for use in batch production of single-cell protein from cheese whey). *Acta Agronomica Óváriensis* **47** (2) (közlésre elfogadva).

#### **Angolul**

**Ásványi, B.**, Reichart, O., Szigeti, J. és Varga, L. (2006) Screening and selection of *Kluyveromyces* strains for use in batch production of single-cell protein from cheese whey. *Milchwissenschaft* **61** (accepted for publication).

### **TUDOMÁNYOS DOLGOZATOK, DIPLOMADOLGOZATOK, DISSZERTÁCIÓK (THESES AND DISSERTATIONS)**

#### **Magyarul**

**Ásványi B.** és Szigeti, J. (2005) Savó alapú szakaszos egysejtfehérje-előállítás. *Diplomadolgozat* Mosonmagyaróvár, 42 pp.