

SAVÓ ALAPÚ EGYSEJTFEHÉRJE ELŐÁLLÍTÁS

ÁSVÁNYI B. – SZIGETI J. – VARGA L.

Nyugat-Magyarországi Egyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar
Élelmiszertudományi Intézet-H-9200 Mosonmagyaróvár, Lucsony u. 15-17.

Bevezetés

A világ savó termelésének mintegy 50%-át hasznosítják csupán különböző termékekben. A 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. Magyarországon a kérődzők tejéből előállított sajtok és túrófélések gyártása során mintegy 0,5 milliárd l savó keletkezik.

A savó fontos környezeti problémát jelent, mivel nagy mennyiségben keletkezik és magas szerves anyag tartalommal rendelkezik, amelyet a BOI = 30 000 – 50 000 ppm és KOI = 60 000 – 80 000 ppm értéke is mutat. Nagyjából a savóban található laktóz felelős a magas BOI és KOI értékekért, ami abból is látható, hogy a savó fehérje mentesítése csak kb. 10 000 ppm-el csökkenti a KOI-t.

A savóban számos hasznos anyag pl. laktóz (4.5-5% v/v), fehérje (0.6-0.8% v/v), lipidek (0.4-0.5% v/v), ásványi sók (a száraz anyag 8-10%-a), laktát (0.05% v/v), citromsav, NPN anyagok (karbamid, húgysav), a B-vitamin csoport elemei, stb található, amelyek alkalmassá teszik arra, hogy a különböző fermentációs folyamatokban szubsztátumként alkalmazzák.

A keletkezett nagymennyiségű savó egyik lehetséges felhasználási alternatívája az egysejtfehérje (Single Cell Protein) előállítás. A művelet során a sajtsavót egysejtfehérje előállítására alkalmas élesztőtörzzsel (pl. *Kluyveromyces*) oltják be. Az élesztő megfelelő arányú szaporodását és növekedését a savó mintegy 4-5% körüli laktóztartalma is biztosítja, oly módon, hogy az élesztő β -galaktozidáz (laktáz) enzime segítségével a savóban található laktózt (4-O- β -D-galaktopyranosyl-D-glucose) galaktózra, illetve glükózra bontja. A savó megfelelő beltartalma fontos, mivel a tápanyaghiány csökkenti a laktáz mennyiségét. A folyamat előrehaladtával - az élesztőszaporodás következtében - a savó fehérjében és vitaminokban feldúsul.

Anyag és módszer

Vizsgálatainkban a *Kluyveromyces* nemzetség két fajának törzseit (*Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* LAF4 /Hansen/; *Kluyveromyces lactis* KE 231 /KÉKI 1223/) hasonlítottuk össze az egysejtfehérje előállításra való alkalmasság szempontjából.

Első lépésben az irodalomban közölt és egysejtfehérje előállítására alkalmas élesztőfajokat (pl. *Kluyveromyces*, *Candida*, *Torula*, *Saccharomyces* /Irvine – Hill, 1985/) a rendelkezésre álló szubsztátum (sajtsavó), környezeti igényük (pH, hőmérséklet, rH stb), valamint egyéb termelési paraméterek (fermentáció módja, fajlagos szaporodási hányados, hozam, generációs idő, stb) alapján vizsgáltuk.

A kiválasztott két faj törzseit (*Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* LAF4 /Hansen/; *Kluyveromyces lactis* KE 231 /KÉKI 1223/) vákuumzárásos, dupla ampullás, liofilezett formában szereztük be a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti gyűjteményéből (Budapest, Somlói u. 14-16.). A törzseket az előírásoknak megfelelően rehidratáltuk, majd LYP (laktóz, élesztő, pepton) táptalajra oltottuk. Az inkubáció (30°C, 48

h) eltelve után GYP (glükóz, élesztőkivonat, pepton) táptalajra átolva tiszta tenyészeteket készítettünk. Az átoltásokat havonta elvégeztük.

A savó alapon történő egysejtfehérje-előállításra, mind az édes, mind a savanyú sajt savó egyaránt alkalmas. A savó jellege a sajtgyártás módjától függ, amely esetben a legmeghatározóbb faktor az a pH, amelyen az alvadékot leválasztják a savótól. Kísérleteink során édes savóval dolgoztunk, melynek átlagos pH értéke 6.3 volt. A vizsgálatokhoz beszerzett sajt savót mélyfagyasztottuk -75°C -ra, így annak beltartalma nem változott és a kísérletek a későbbiekben reprodukálhatóak voltak. A kísérletek megkezdése előtt a savót szobahőmérsékleten felolvasztottuk, majd háromszori ismétléssel 10 percig 80°C -on frakcionáltan hőkezeltük.

A kísérleti berendezés egy BIOFLO III[®] (New Brunswick, USA) automata vezérlésű batch/continuous fermentor volt. A beállított paraméterek felügyeletét a fermentorhoz kapcsolt számítógéppel és a hozzá tartozó AFS (Advanced Fermentation Software 3.42) programmal követhettük nyomon. A fermentum megfelelő levegőztetéséről egy VISA (Germany) típusú szabályozható kapacitású légpumpa gondoskodott, melyet 0,22 μm -es baktériumszűrőn (Millipore, Kanada) keresztül csatlakoztattunk a fermentorhoz. Mintavevő egységként egy MX3[®]-as típusú biosamplert (New Brunswick, USA) használtunk. A kémhatás beállítását 1 N NaOH, illetve 1 N HCl oldatokkal végeztük.

A fermentort összeszerelés után 121°C -on 15 percig autoklávban hőkezeltük. A kísérletek indulásakor a frakcionáltan hőkezelt és szobahőmérsékletre hűtött savót a reaktorterébe töltöttük majd a fermentoron az 1. táblázatban látható paramétereket állítottuk be.

1. táblázat: Az egysejtfehérje előállítás során beállított paraméterek

<i>Paraméter</i>	<i>Mértékegység</i>	<i>Beállított érték</i>
Keverés	1/min	300
Hőmérséklet	$^{\circ}\text{C}$	30
Kémhatás	pH	4,5
Oldott oxigén	%	Mért

Az inokulumban az élesztőőmot Densimat (bioMérieux, France) készülék segítségével állítottuk be úgy, hogy a savóban a kezdeti sejtszám 10^5 élesztősejt/ml legyen.

A beoltás után néhány perc keverést követően a fermentor zárófedélbe integrált mintavevőjének segítségével mintát vettünk.

Egysejtfehérje előállítás közben a tápoldat levegőztetése és kevertetése következtében a felületi feszültségcsökkentő anyagok hatására hab képződik (Kovács et al., 1979), mely esetben indokolt a mechanikus habtörés, vagy kémiai habzsgátlók adagolása. A habzás csökkentésére felületaktív ANTIFOAM-Y30 emulziót használtunk.

Eredmények és értékelésük

Az egysejtfehérje előállítási folyamatot szakaszos rendszerben, 48 órán keresztül végeztük. Mintavétel 4 óránként történt az automata mintavevő segítségével. A mintákból meghatároztuk az élesztőtörzsek által elért maximális szárazanyagot: a mintából meghatározott mennyiséget lecentrifugáltunk (5000 1/min; 10 min) majd a felülúszót leöntöttük és az üledéket felszuszpendáltuk. Ezt a folyamatot többször ismételtük végül az üledéket ismert súlyú edénybe öntöttük át és szárítószekrényben 105°C -on súlyállandóságig szárítottuk. A visszamérés után a szárazanyag mennyisége kiszámítható.

Az egysejtfehérje előállítási folyamatot minden törzs esetében három ismétléssel végeztük. A kapott eredményeket g/l-es értékekre átszámolva (2. és 3. táblázat) és koordináta rendszerben ábrázolva megkapjuk az egyes törzsekre vonatkozó sebességi görbét.

2. táblázat: az SCP előállítás során mért paraméterek
Kluyveromices lactis KE 231 törzs esetében

Idő (h)	Élesztő száraz tömeg (g/l)	Tartalom (%)			
		Laktóz	Glükóz	Galaktóz	Etanol
0	4,79167	4,49380	0,00081	0,00493	0,02119
4	6,37500	4,36707	0,00195	0,00548	0,00890
8	7,45833	4,38430	0,00179	0,00509	0,00787
12	8,70833	4,40154	0,00163	0,00471	0,00684
16	10,41667	3,97687	0,00491	0,00214	0,03605
20	10,83333	3,20301	0,00703	0,00237	0,03191
24	11,91667	2,42915	0,00916	0,00261	0,02776
28	13,54167	0,30755	0,01317	0,00354	0,15490
32	14,62500	0,15445	0,02569	0,00357	0,11319
36	15,16667	0,00136	0,03822	0,00360	0,07149
40	13,45833	0,00494	0,03953	0,00381	0,06008
44	11,33333	0,00304	0,04966	0,00407	0,04040
48	10,20833	0,00114	0,05979	0,00433	0,02072

3. táblázat: az SCP előállítás során mért paraméterek
Kluyveromices marxianus var. *Marxianus* LAF 4 törzs
esetében

Idő (h)	Élesztő száraz tömeg (g/l)	Tartalom (%)			
		Laktóz	Glükóz	Galaktóz	Etanol
0	4,25000	4,03126	0,00061	0,07116	0,00198
4	7,83333	4,03737	0,00000	0,07076	0,00203
8	8,95833	4,01450	0,00000	0,06762	0,00150
12	10,41667	3,99180	0,00000	0,06447	0,00096
16	11,91667	3,63412	0,00156	0,06168	0,00764
20	14,58333	3,11310	0,00070	0,05677	0,05548
24	15,54167	2,59216	0,00000	0,05187	0,10332
28	16,41667	1,81331	0,00188	0,04731	0,02903
32	17,45833	1,54340	0,00547	0,04581	0,02294
36	18,91667	1,27366	0,00906	0,04431	0,01685
40	20,25000	0,75576	0,01271	0,04049	0,01205
44	19,79167	0,54240	0,01026	0,03818	0,00603
48	17,75000	0,32925	0,00782	0,03586	0,00000

A fajlagos szaporodási sebesség (μ_{\max}) meghatározási módjai közül a sebességi görbét általában az esetünkben is alkalmazott sejttömeg, vagy a vele arányos optikai denzitás mérése esetén alkalmazzák. A szaporodás exponenciális szakaszában a $\mu = \mu_{\max}$ állandó érték, azaz ekkor a szaporodási sebesség egyenesen arányos a sejttömeggel.

A *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* LAF4 /Hansen/, illetve a *Kluyveromyces lactis* KE 231 /KÉKI 1223/ esetében kapott μ_{\max} értékek 0,37, illetve 0,29 h⁻¹ volt. Az előbbi értékekből az (1) összefüggés alapján kiszámíthatjuk a törzsek exponenciális szaporodási szakaszára jellemző generációs időket.

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (1)$$

ahol,

t_g = generációs idő,

μ = fajlagos szaporodási hányados

Az általunk vizsgált törzsek esetében t_g 1,8 h (*Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* LAF4), illetve 2,3 h (*Kluyveromyces lactis* KE 231) volt. Az egysejtfehérje előállítás során a rövidebb generációs idővel rendelkező törzssel rövidebb idő alatt elérhető a kívánt sejtszám, melyet a léptéknövelés és a folyamat optimalizálása során figyelembe kell venni, üzemi szinten pedig jelentős költségmegtakarítást eredményezhet.

Kísérleteink során a laktóz-, glükóz-, galaktóz- és etanol tartalom változását is nyomon követtük (2-3. táblázat). A törzsek a szubsztrátként szolgáló laktóz szinte teljes mennyiségét felhasználták légzésük és növekedésük során. A megfigyelhető laktóz tartalom csökkenés fordítottan arányos az élesztők szaporodásának tendenciájával.

A glükóz és galaktóz a laktóz enzimes bontása során keletkező két egyszerű cukor, melyek közül a glükózt az élesztő a légzés első lépésében használja fel.

Az etanol tartalom a szénhidrátok fermentatív úton történő bontásakor megnövekedhet, melyet a számunkra kedvezőtlen Cabtree-, illetve Custers-hatás okozhat. Az egysejtfehérje-előállítás során úgy kell irányítanunk a folyamatot, hogy az élesztő oxidatív úton (légzés) bontsa le a savó laktóztartalmát. Ezt megfelelő levegőztetéssel a Pasteur-effektus által érhetjük el. Ekkor az etanol szintje az általunk is mért alacsony szinten marad.

Levegő jelenlétében az egységnyi tápanyagra vonatkoztatott szaporulat 5-10-szer nagyobb szemben az anaerob viszonyokkal. Az élesztő viszont a glükózt oxidatív úton lassabban bontja mint erjedésszerű úton, ami szintén az egysejtfehérje előállítás egyik nehézsége.

A törzsek által elérhető maximális szárazanyag mennyisége (a 2-3. táblázatban kiemelve) *Kl. marxianus* esetében 20,25 g/l, *Kl. lactis* esetében pedig 15,16 g/l. Átlagosan 50% fehérje tartalommal számolva ez 10, 12,5 g/l, illetve 7,58 g/l fehérjét jelent, mely értékek az irodalmi adatokkal összehasonlítva (34,3 g/l Ben-Hassan – Ghaly, 1995; 18,3 g/l Sinclair – Cantero, 1990; 13,5 - 12,2 g/l Mahmoud – Kosikowski; 25,2-27,0 g/l Wassermann et al., 1961) átlagos értéknek mondhatók.

Következtetések és javaslatok

Az eredmények alapján látható, hogy az általunk vizsgált két törzs közül a *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* LAF4 /Hansen/ törzs az egysejtfehérje előállítás szempontjából kedvezőbb eredményekkel rendelkezik, mint a *Kluyveromyces lactis* KE 231 /KÉKI 1223/ törzs. Üzemi szinten történő alkalmazásra tehát az előbbi törzset javasoljuk az általunk meghatározott paraméterek (1. táblázat) megtartása mellett.

A kísérlet kivitelezéséhez segítséget nyújtott az OMFB Biotechnológiai pályázatán nyert anyagi támogatás.

Szakirodalom jegyzéke:

Ben-Hassan, R. M. – Ghaly, A. E. (1995): Continuous production of Single Cell Protein from cheese whey lactose using *Kluyveromyces fragilis*. American Society of Agricultural Engineers. 38(4), 1121-1127 p.

Irvine, D. M. – Hill, A. R. (1985): Cheese Technology, 523-565 p. in Blanch, H. W.– Drew, S.– Wang, D. I. C. (ed.), *Comprehensive Biotechnology*, vol. 3. Pergamon Press, Oxford – New York – Toronto – Sydney – Frankfurt 548 p.

Kovács B. Gyimesi J. - Sólyom L. (szerk.) (1979): Élesztő- és Szeszipari Kézikönyv. Mezőgazdasági Könyvkiadó, Budapest. 142-143 p.

Mahmoud, M. M. – Kosikowski F. V. (1982): Alcohol and single cell protein by *Kluyveromyces* in concentrated whey permeates with reduced ash. *J. of Dairy Sci.* 65 (11): 2082-2087 p.

Sinclair, C. G. – Cantero, D. (1990): Fermentation modelling. In *Fermentation: A Practical Approach*, eds. B. McNeil and L. M. Harvey. Oxford, England: IRL Press.

Wsserman, A. E. – Hampson, J. W. – Alvare, N. F. (1961): Large scale production of yeast to whey. *J. of Water Pollution Control Fed.* 33 (10): 1090-1094 p.