



Különböző laktóz koncentrációk hatása *Kluyveromyces* élesztőtörzsek szaporodási tulajdonságaira és etanoltermelési képességére

KAPCSÁNDI VIKTÓRIA - BARABÁS ATTILA - SIK BEATRIX - AJTONY ZSOLT
- LAKATOS ERIKA

Széchenyi István Egyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar
9200 Mosonmagyaróvár, Vár tér 2.

ÖSSZEFOGLALÁS

Etil-alkohol különféle mezőgazdasági anyagokból, illetve melléktermékekből állítható elő. Ilyen melléktermék például a tejsavó is, mely a sajt és túrógyártás során keletkezik igen nagy mennyiségben (a felhasznált nyerstej 80-90%-a), folyadék formájában, s benne a leggyakrabban előforduló szénhidrát a laktóz. Kutatásaink célja olyan *Kluyveromyces* nemzetségbe tartozó laktóz hasznosító élesztőgombák vizsgálata volt, amelyek az optimális laktóz koncentráció meghatározása után alkalmasak lehetnek tejsavó alapú alkohol előállítására. Méréseink alkalmával a kiválasztott törzsek szaporodási, illetve laktóz bontási és ezzel egy időben, etanol termelési képességét hasonlítottuk össze, eltérő laktóz koncentrációk (50, 75-, 100- 125 g/l) mellett, laboratóriumi körülmények között (30 °C; 6,8 pH). A megfelelő időközönként vett mintákból IC-HPLC-RI módszerrel határoztuk meg az adott fermentlevek maradék laktóz tartalmát és az általuk termelt etanol mennyiségét. Méréseink során az öt *Kluyveromyces* élesztőtörzs szaporodása 50 és 100 g/l-es laktózkoncentráció esetén az irodalomnak megfelelő tendenciát mutat. Alkoholtermelés tekintetében a maximális kihozatalt 125 g/l-es laktózkoncentráció mellett a *Kluyveromyces marxianus* DSM 5422-es törzs (5,06%), valamint a *Kluyveromyces thermotolerans* DSM 3434 (4,62%) törzsek produkálták.

Kulcsszavak: *Kluyveromyces* törzsek, laktóz fermentálás, etil-alkohol előállítás

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Az etanol különféle mezőgazdasági termékekből és hulladékokból készülhet, (*Sadik és Halema, 2014*) azonban az előállított alkoholok árának kb. 40 %-át az alapanyagok költségei teszik ki, ezzel a technológia egyik kulcsfontosságú komponense (URL_1).

Világszerte éves viszonylatban mintegy 130 millió tonna savó keletkezik, melyet az élelmiszertermelés, állati takarmányozás vagy alkoholos italok előállítása során használnak fel (*Hadiyanto et al., 2014*). A tejsavó, amely a sajt és túrófélések gyártása során keletkezik (*Homonnay és Koncz, 2005*), fehérjében (6-10 g/l), laktózban (46-50 g/l), vitaminokban (0,13 g/l) és ásványi anyagokban (3,5 g/l) gazdag. A savó a tej térfogatának mintegy 85-95 %-t is kiteheti, tápanyagtartalmának pedig körülbelül 55 %-át megőrzi (*Dragone et al., 2008*), laktóz tartalma mintegy 4,5-5 %-ra tehető. (*Ariyanty és Hadyanto, 2013; Hadyanto et.al, 2014*). Azonban, ha szennyvízként tekintünk rá, az egyik legkörnyezetszennyezőbb anyagnak minősül magas kémiai és biológiai oxigén igénye miatt. (*Sulyok et al., 2013*)

A tejsavó többek között felhasználható etil-alkohol előállítására, melyet több szakirodalomban is megemlítenek, és ezen kutatások kezdetei az 1940-es évekre vezethetők vissza. *Kourkoutas et al. (2001, 2002)* annak a lehetőségét vizsgálták, hogy az erjesztett savó, mint alapanyag alkalmazható-e egy új, alacsony alkohol tartalmú ital előállítására. Vizsgálatainak célja volt többek között a savó ízének és aromájának javítása, hogy alkalmas alapanyagként szolgáljon alkoholtartalmú ital előállítására. A savó melasszal (1%) történő fermentációja során különböző laktóz koncentrációkat (4; 5; 6; 7; 10%), hőmérsékleteket (37°C; 45°C; 50 °C) és pH értékeket (6,0; 5,5; 5,0; 4,5; 4,0) alkalmaztak. A melaszos kiegészítés hatására több acetaldehid, etil-acetát, propanol, izobutanol és amil-alkohol keletkezett, melyek a végtermék érzékszervi tulajdonságait befolyásolták. *Grba et al. (2002)* öt különböző *K. marxianus* élesztőtörzssel kísérleteztek. Vizsgálataik során céljuk volt az élesztőtörzsek közül egyet kiválasztani, mely alkalmas savó alapú alkohol előállítására.

Ipari fermentációs folyamatoknál széles körben a *Saccharomyces cerevisiae* élesztőtörzset alkalmazzák, mely azonban nem rendelkezik laktóz metabolizációs rendszerrel, ezért nem képes a laktózt lebontani (*Domingues et al., 2010*). A tejcukrot hasznosító élesztőgombák közös jellemzője ugyanis a β -galaktozidáz, vagy más néven

laktáz enzim, mely a tejcukrot glükózzá és galaktózzá hidrolizálja (*Dagbagli és Goksungur, 2008*). A tejcukor etil alkohollá való fermentációját többnyire *K. marxianus* és a *K. fragilis* törzsek végzik (*Sulyok et al., 2013*). Mint minden élőlény, ezen élesztők is, csak megfelelő környezeti feltételek mellett képesek fenntartani életműködésüket. Több tanulmány foglalkozik ezen optimális értékek meghatározásával a *K. marxianus* törzs esetében is. (*Limtong et al., 2007; Nonklang et al., 2008; Hashem et al., 2013; Ariyanti és Hadyanto, 2013; Moreira et al., 2015*). Mindezek alapján kutatásaink során öt *Kluyveromyces* élesztőtörzs közül próbáltuk kiválasztani azt, amely az optimális laktóztartalmú tápközegben a legnagyobb etanol kihozataalt tudja produkálni és ez alapján alkalmas lehet további fermentációs kísérletekhez.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A kísérletek körülményei

A kísérleteink során *K. marxianus* DSM 5422, *K. marxianus* DSM 4908, *K. thermotolerans* DSM 3434, *K. lactis* var. *lactis* DSM 70799 és *K. lactis* van der Walt NCAIM Y.00258 törzseket alkalmaztuk. A törzseket Németországból a Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH-tól és a Budapesti Corvinus Egyetem (jelenleg Szent István Egyetem) Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményéből szereztük be.

A kísérletek során első lépésben a törzseket felélesztettük, majd ferde agaron tartottuk fenn. A törzsekből a felhasználáshoz 1 kacsnyit ezután az előre elkészített adott laktózkoncentrációjú (50; 75; 100; 125 g/L) táplevesbe (100 ml) oltva rázó vízfürdőben (120 rpm) 30 °C-on vizsgáltuk, amelyből adott időnként történt a mintavétel a szaporodási tulajdonságok vizsgálatához (lemezöntés), és a termelt etanol mennyiségének meghatározásához (analitika).

Mikrobiológiai vizsgálatok

A törzseket dupla ampullás, vákuumzárásos, liofilezett preparátumokat lamináris boxban fiziológiás sóoldatban (Suspension Medium, bioMérieux®) rehidratáltuk, majd a kísérlet során ferde agaron, +4 °C-on tartottuk fent. A ferde agar 18 g/l agar-agart, 10 g/l laktóz-monohidrátot, 5 g/l élesztőkivonatot és 5 g/l kazein peptont tartalmazott.

Kísérletink során a méréseinkhez különböző laktóz koncentrációjú táplevest [3 g/l élesztőkivonat, laktóz-monohidrát (50; 75; 100 és 125 g/l)], illetve a lemezöntéshez klóramfenikollal kiegészített laktózt tartalmazó táptalajt [5 g/l pepton, 5 g/l élesztőkivonat, 20 g/l laktóz-monohidrát, 0,2 g/l klóramfenikol és 15 g/l agar-agar] alkalmaztunk.

A mintavételezések 50- és 75 g/l-es laktóz koncentrációjú táplevesek esetében 12 óránként (0- 48. óra), míg a 100 és 125 g/l-es laktóz koncentrációjú táplevesek esetén 24 óránként (0-72. órában) történtek, lamináris box (FlowFAST V ISO Class III.) alatt.

A telepszámlálás során kapott 1mL térfogatú kultúrában talált elősejtszám tízes alapú *logaritmusa*t ($\lg N$) az idő függvényében ábrázolva szaporodási görbéket kaptunk. A fajlagos szaporodási sebességet (μ) a következő egyenlettel határoztuk meg:

$$\mu = \frac{1}{\lg N} \dots\dots(1)$$

A fajlagos szaporodási sebességből (μ) a generációs időt (tg) a 2. *képlet* segítségével határoztuk meg.

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

Analitikai vizsgálatok

A mintavételek után a fermentlevek laktóz és etanol koncentrációjának meghatározásául *Bakonyi* (2015) által kidolgozott méretkizárásos folyadékkromatográfias eljárást vettük alapul. A laktóz és etanol elválasztásához Supelcogel H (Supelco) ioncserés HPLC oszlopot használtunk. Az analitikai oszlop elé, annak élettartamának meghosszabbítására egy 4 cm hosszúságú Supelcogél H (Supelco) előtétoszlopot illesztettünk. Az alkalmazott elválasztástechnikai módszer paramétereit az 1. táblázat tartalmazza. A folyadékkromatográfias elemzésekhez a 0,1% H₂SO₄ oldatot pro analysis minőségű 96%-os kénsav (Merck) ionmentes vízzel (18MΩcm) történő hígításával állítottuk elő. A HPLC rendszerünk (oszlop: Supelcogel H, 300x7,8 mm; áram: 0,6 mL/min 0,1% H₂SO₄, oszlophőmérséklet: 35 °C) kalibrálásához

felhasznált, laktózt 0,05-5 mg/mL, míg etanolt pedig 0,05-5 µL/mL koncentrációkban tartalmazó analitikai mérőoldatainkat, analitikai tisztaságú laktóz monohidrát (≥ 99,5%, Fluka) és etanol (≥99,% Merck) a HPLC-s eluensnek előállításánál is alkalmazott 0,1% H₂SO₄ oldattal történő megfelelő arányú hígításával készítettük el.

1. táblázat A laktóz és etanol koncentrációk meghatározására alkalmazott HPLC módszer

Table 1. The HPLC method used to determine lactose and ethanol concentrations

A HPLC módszer specifikációja (1)	
Mozgófázis (2)	0,1% H ₂ SO ₄
Időtartam (3)	30 min
Injektált térfogat (4)	10 µL
Áramlási sebesség (5)	0,6 mL/min
Oszlop hőmérséklet (6)	35 °C
Detektor (7)	Törésmutató (RI)

(1) Specification of HPLC method (2) moving phase, (3) duration, (4) injected volume, (5) flow rate, (6) column temperature, (7) detector

A kapott érzékenység értékekből (a), a fermentlevekben mért csúcsterületekből (A) és a fermentlé hígításának mértékéből (V_{hig}) a 3. egyenlet alapján meghatároztuk a koncentráció értékeket (c).

$$c = \frac{A \cdot V_{hig}}{a} \quad (3)$$

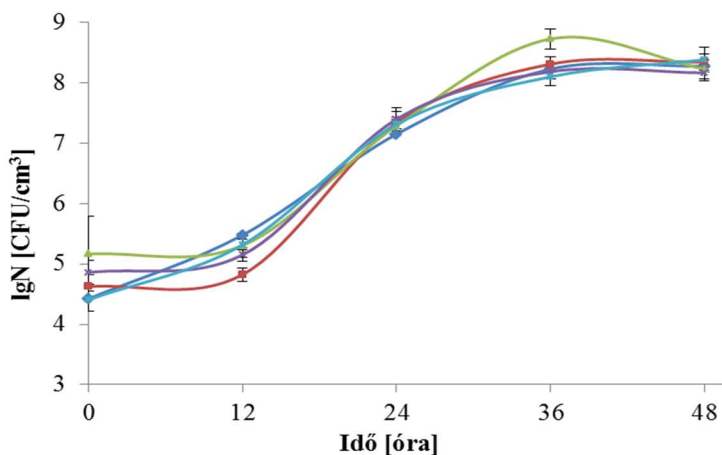
Statisztikai értékelés

Méréseinket 1 ismétlésben, 3 párhuzamos mintavétellel végeztük el. Az ábrák elkészítéséhez Microsoft Excel 2010-es programot használtunk.

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

Mikrobiológiai vizsgálatok eredményei

Az 50 g/l-es laktóztartalmú táplevesben szaporított élesztőtörzsek szakaszos szaporodási görbét mutatnak. Ahogy az 1. ábrán is látható, a görbe kezdeti lappangó fázisainak hossza között eltéréseket tapasztaltunk bizonyos törzsek esetében, ugyanis a *K. lactis* NCAIM Y. 00258, valamint a *K. lactis* var. *lactis* DSM 70799 törzsek lag fázisa a két mérési pont között nem kimutatható. A többi törzs esetében a szaporodási görbék a mérési pontok alapján egyértelműen beazonosíthatók. A görbék lefutása hozzávetőlegesen azonos, a maximális telepszámot a törzsek a folyamat 24-36. órája között érték el.

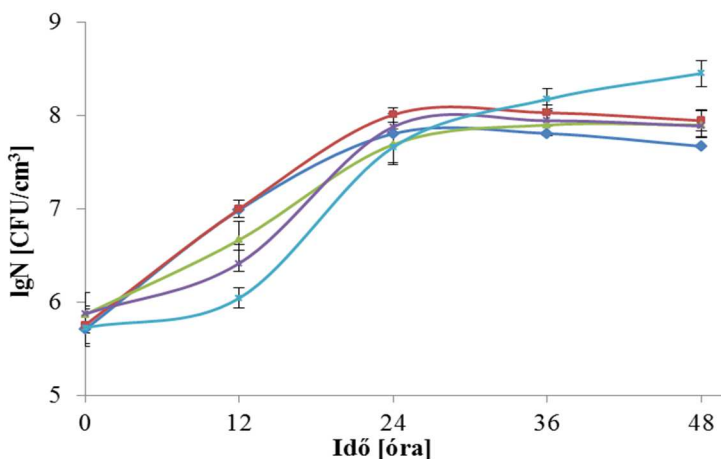


1. ábra *Kluyveromyces* törzsek szaporodási görbéi 50 g/l-es laktózkoncentráció mellett (*K. lactis* NCAIM Y.00258 (◆); *K. marxianus* DSM4908 (▲); *K. lactis* var. *lactis* DSM70799 (✱); *K. thermotolerans* DSM3434 (■); *K. marxianus* DSM5422 (✕))

Figure 1. Growth curves of *Kluyveromyces* strains with 50 g/l lactose concentration (*K. lactis* NCAIM Y.00258 (◆); *K. marxianus* DSM4908 (▲); *K. lactis* var. *lactis* DSM70799 (✱); *K. thermotolerans* DSM3434 (■); *K. marxianus* DSM5422 (✕))

A 2. ábrán a törzsek szaporodási görbéi láthatóak 75 g/l-es kiindulási laktóz koncentráció mellett. Ebben az esetben is megfigyelhető a szakaszos szaporodási görbe, és az eltérő lappangó szakaszokban való különbözőség is. Az ábra szerint lag fázist

egyedül a *K. lactis var. lactis* DSM 70799 törzs mutatott, ellentétben az 1. ábrán kapott eredménnyel, ahol ez a törzs ebben az időszakban nem mérhető lag fázist mutatott. Azonban mivel az első 24 órában csupán 3 mérés történt, előfordulhat hogy a többi törzs esetében is végbement a klasszikus szaporodási tendencia, és egy köztes mérési pont beiktatásával ez kimutatható lett volna. A maximális telepszámot ebben az esetben az élesztőtörzsek a folyamat 24-30. mérési időszaka között érték el, egy törzs kivételével (*K. lactis var. lactis* DSM 70799), amely még a mérés 72. órájában is szaporodási fázist mutatott a 24. órához képest.

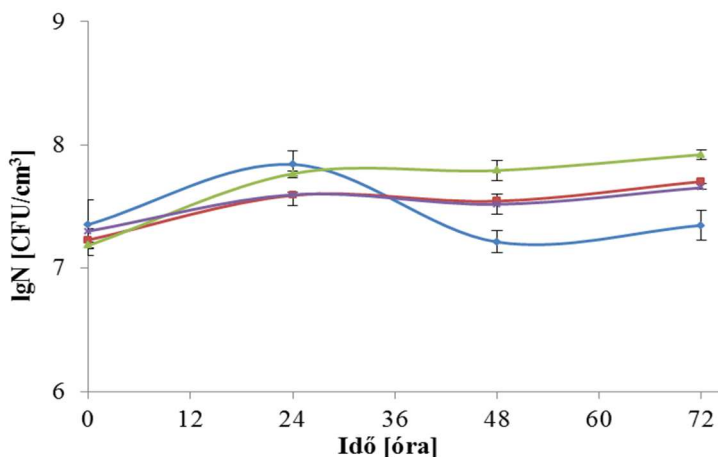


2. ábra A *Kluyveromyces* törzsek szaporodási görbéi 75 g/l-es laktózkoncentráció mellett (*K. lactis* NCAIM Y.00258 (◆); *K. marxianus* DSM4908 (▲); *K. lactis var. lactis* DSM70799 (*); *K. thermotolerans* DSM3434 (■); *K. marxianus* DSM5422 (×))

Figure 2. Growth curves of *Kluyveromyces* strains with 75 g/l lactose concentration (*K. lactis* NCAIM Y.00258 (◆); *K. marxianus* DSM4908 (▲); *K. lactis var. lactis* DSM70799 (*); *K. thermotolerans* DSM3434 (■); *K. marxianus* DSM5422 (×))

A 3. ábrán látható, hogy 100 g/l-es laktóz koncentrációjú táplevesek esetében jelentős eltéréseket tapasztaltunk a szaporodási görbék tekintetében, ugyanis egyik esetben sem mutatkoznak a szakaszos görbére jellemző tipikus fázisok, mindezek mellett a lappangó szakaszok teljes mértékben elmaradtak az általunk mért időszakban. A logaritmikusság szakaszok körülbelül a mérés 24. órájáig tartottak. Ezután sejtszám ingadozik az összes törzs esetében, ami adódhat a lemezöntéses sejtszám meghatározás módszertani hibájából. Az elmondható hogy a legnagyobb különbség a kezdeti és a végső sejtszám esetében a *K.*

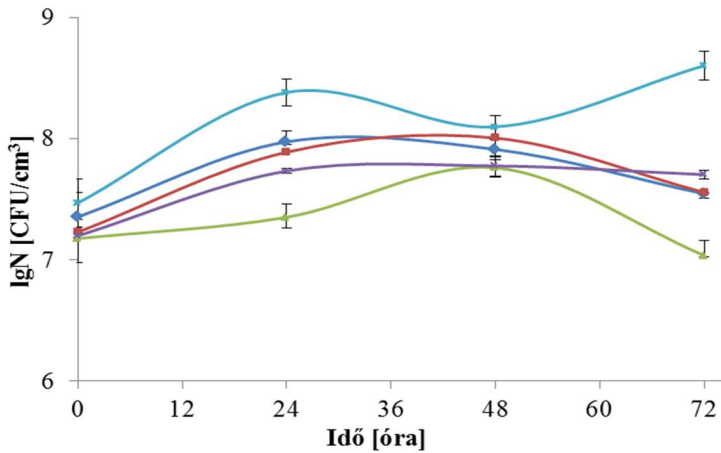
lactis var. *lactis* DSM70799 törzs szaporodása során mutatkozott. Itt szintén kiemelendő, hogy a tipikus fázisok csak az általunk beiktatott mérések alapján nem mutatkoztak meg. Sűrűbb mintavétel és szaporodási érték vizsgálata esetén, több köztes mérési pont beiktatásával ez kimutatható lett volna. Ez annak is betudható, hogy a kezdeni sejtszám nagyobb volt mint az előző esetekben, így a 100 g/l-es mennyiségű laktóz nem volt elegendő a sejtek további szaporodásához. Ugyanez figyelhető meg a 4. ábrán is.



3. ábra A *Kluyveromyces* törzsek szaporodási görbéi 100 g/l-es laktózkoncentráció mellett (*K. lactis* NCAIM Y.00258 (—◆—); *K. marxianus* DSM4908 (—▲—); *K. lactis* var. *lactis* DSM70799 (—*—); *K. thermotolerans* DSM3434 (—■—); *K. marxianus* DSM5422 (—×—))

Figure 3. Growth curves of *Kluyveromyces* strains with 100 g/l lactose concentration (*K. lactis* NCAIM Y.00258 (—◆—); *K. marxianus* DSM4908 (—▲—); *K. lactis* var. *lactis* DSM70799 (—*—); *K. thermotolerans* DSM3434 (—■—); *K. marxianus* DSM5422 (—×—))

A 4. ábrán látható, hogy a 125 g/l-es kiindulási laktóz koncentrációjú tápvelesben szaporított tenyészeteknél, több esetben hasonló tendenciát tapasztaltunk, mint a 100 g/l-es (3. ábra) tenyészetek esetében. Szintén elmondhatjuk, hogy a törzsek ebben az esetben sem az élesztőkre jellemző szakaszos szaporodási görbékét írják le. A legnagyobb szaporodási tendenciát szintén a *K. lactis* var. *lactis* DSM70799 törzs esetében mértünk.



4. ábra A *Kluyveromyces* törzsek szaporodási görbéi 125 g/l-es laktózkoncentráció mellett (*K. lactis* NCAIM Y.00258 (—◆—); *K. marxianus* DSM4908 (—▲—); *K. lactis* var. *lactis* DSM70799 (—*—); *K. thermotolerans* DSM3434 (—■—); *K. marxianus* DSM5422 (—×—))

Figure 4. Growth curves of *Kluyveromyces* strains with 125 g/l lactose concentration (*K. lactis* NCAIM Y.00258 (—◆—); *K. marxianus* DSM4908 (—▲—); *K. lactis* var. *lactis* DSM70799 (—*—); *K. thermotolerans* DSM3434 (—■—); *K. marxianus* DSM5422 (—×—))

A szaporodási görbék vizsgálata után meghatároztuk a hozzájuk tartozó fajlagos szaporodási sebességeket (μ) és generációs időket (t_g), amelyek mind fontosak az optimális szaporodási körülmények meghatározásához. A kapott értékek minden esetben két párhuzamos mérés adatsorának az átlagai.

Az 2. táblázat eredményeiből látszik, hogy a különböző laktóz koncentrációjú táplevesekben szaporított egyes élesztőtörzsek fajlagos szaporodási sebessége néhány esetben szignifikánsan eltér ($P \leq 0,05$). A *K. marxianus* DSM 4908 az 50 g/l-es laktóz koncentrációnál, a *K. lactis* var *lactis* DSM 70799 pedig a 75,- 100 és 125 g/l-nél mutatott szignifikáns eltérést a többi értéktől.

2. táblázat Fajlagos szaporodási sebességek (μ [1/óra]) a vizsgált törzsek esetében
 Table 2. Specific growth rates (μ [1/hour]) of examined strains

Élesztőtörzs (1)	A tápközeg laktóz tartalma (2)			
	50 g/l	75 g/l	100 g/l	125 g/l
<i>K. lactis</i> NCAIM Y. 00258	0,158 ± 0,056	0,141 ± 0,025	0,135 ± 0,008	0,130 ± 0,008
<i>K. lactis var.lactis</i> DSM 70799	0,159 ± 0,058	0,202 ± 0,065	0,144 ± 0,014	0,141 ± 0,016
<i>K. marxianus</i> DSM 5422	0,156 ± 0,051	0,141 ± 0,026	0,133 ± 0,004	0,132 ± 0,008
<i>K. marxianus</i> DSM 4908	0,151 ± 0,047	0,141 ± 0,024	0,131 ± 0,009	0,137 ± 0,009
<i>K. thermotolerans</i> DSM 3434	0,160 ± 0,059	0,138 ± 0,026	0,133 ± 0,006	0,131 ± 0,010

(1) yeast strains, (2) lactose content of culture medium (g/l)

A fajlagos szaporodási sebességek mellett, az élesztőtörzsek generációs idejét (3. táblázat) is meghatároztuk.

3. táblázat Generációs idő (t_g [óra]) a vizsgált törzsek esetében
 Table 3. Generation time (t_g [hour]) of examined strains

Élesztőtörzs (1)	A tápközeg laktóz tartalma (2)			
	50 g/l	75 g/l	100 g/l	125 g/l
<i>K. lactis</i> NCAIM Y. 00258	4,65	4,99	5,16	5,33
<i>K. lactis var.lactis</i> DSM 70799	4,65	3,61	4,82	4,95
<i>K. marxianus</i> DSM 5422	4,68	4,99	5,21	5,27
<i>K. marxianus</i> DSM 4908	4,81	4,99	5,31	5,08
<i>K. thermotolerans</i> DSM 3434	4,63	5,09	5,21	5,32

(1) yeast strains, (2) lactose content of culture medium (g/l)

A táblázatban látható, hogy a *K. lactis* törzsek esetében 3,61 – 5,33; a *K. marxianus* törzseknél 4,68 – 5,31; míg a *K. thermotolerans* törzs esetében 4,68 – 5,31 órás generációs időket tapasztaltunk.

Corona et al. (2016) *K. marxianus* esetében 4,521 órás, míg a *K. lactis* törzsnél Hun et al. (2013) 4,1 - 4,89 órás generációs időket közöltek.

Analitikai vizsgálatok eredményei

Kísérletünk során a szaporodási képességek mellett, a folyékony táplevesben szaporított élesztőtörzsek laktóz hasznosító és etanol termelő képességét is vizsgáltuk.

A 4. táblázat eredményeiből látszik, hogy a törzsek egyike sem volt képes az összes laktózt felhasználni. A maradék cukortartalom mennyiségéből következtethetünk, hogy az egyes törzsek milyen hatékonysággal voltak képesek lebontani a tejcukrot.

Elmondható, hogy míg alacsonyabb kiindulási laktóz koncentrációk mellett (50 és 75 g/l) a *K. lactis* NCAIM Y. 00258 és a *K. marxianus* DSM 5422 törzs hasznosította leghatékonyabban a laktózt, addig magasabb koncentrációk esetén (100 és 125 g/l) a *K. marxianus* DSM 5422 törzs mellett már a *K. thermotolerans* bizonyult hatékonynak a laktóz hasznosító képességek vizsgálatát tekintve.

4. táblázat Laktóz fogyasztás [%] a vizsgált *Kluyveromyces* törzsek esetében

Table 4. Lactose consumption [%] of examined *Kluyveromyces* strains

Élesztőtörzs (2)	A tápközeg laktóz tartalma (2)			
	50 g/l	75 g/l	100 g/l	125 g/l
<i>K. lactis</i> NCAIM Y. 00258	97,7	90,4	77,8	77,4
<i>K. lactis var.lactis</i> DSM 70799	72,1	41,2	67,0	55,6
<i>K. marxianus</i> DSM 5422	94,3	98,3	92,2	91,2
<i>K. marxianus</i> DSM 4908	8,7	7,5	21,7	11,4
<i>K. thermotolerans</i> DSM 3434	48,4	77,7	93,0	87,6

(1) yeast strains, (2) lactose content of culture medium (g/l)

Az egyes törzsek laktóz felhasználása 7,5 – 98,3% között volt. *Joshi et al.* (2011) munkájuk során *K. marxianus* DSM 5422-es törzs esetében 86,6 - 93,4%-os lakóz felhasználást közöltek, az általunk végzett kísérletek során, ugyanezen törzs estében mi 91,2 - 98,3%-os laktóz fogyasztást tapasztaltunk. *Salman és Mohammad* (2006) kísérleteik során 34 °C-on 4,5 pH-érték mellett 22 órás fermentációs idő mellett 86 %-os laktózfelhasználást detektáltak.

Az etanol mennyiségét (5. táblázat) 50 g/l és 75 g/l-es laktóz koncentrációjú fermentlevek esetén a 12. órától, míg a 100 és 125 g/l-es laktóz koncentrációjú minták esetében a 24. órától kezdve kezdtük mérni.

5. táblázat A vizsgált *Kluyveromyces* törzsek által termelt maximális etanol mennyiség [%]

Table 5. The maximum amount of produced ethanol [%] by examined *Kluyveromyces* strains

Élesztőtörzs (1)	A tápközeg laktóz tartalma (2)			
	50 g/l	75 g/l	100 g/l	125 g/l
<i>K. lactis</i> NCAIM Y. 00258	2,31 ± 0,04	3,23 ± 0,54	2,65 ± 0,09	3,77 ± 0,07
<i>K. lactis var.lactis</i> DSM 70799	2,36 ± 0,13	1,59 ± 0,50	2,28 ± 0,08	2,70 ± 0,10
<i>K. marxianus</i> DSM 5422	2,46 ± 0,10	3,49 ± 0,23	3,59 ± 0,02	5,06 ± 0,22
<i>K. marxianus</i> DSM 4908	2,33 ± 0,13	0	0	0,11 ± 0,01
<i>K. thermotolerans</i> DSM 3434	2,23 ± 0,75	2,88 ± 0,68	3,56 ± 0,10	4,62 ± 0,32

(1) yeast strains, (2) lactose content of culture medium (g/l)

A végső etanol kihozatal mérése során kapott maximális értékekből (5. táblázat) megállapíthatjuk, hogy a *K. marxianus* DSM 5422 törzs termelte 125 g/l-es kiindulási laktóz koncentráció mellett 30 °C-on a legtöbb etanolt (5,06 v/v%); amelyet ugyanezen kiindulási laktóz koncentráción a *K. thermotolerans* törzs követte 4,62 v/v% etanol kihozattal. Az eredmények alapján elmondhatjuk továbbá, hogy amíg 50 g/l-os kiindulási laktóz koncentráció esetén a törzsek által termelt maximális etil-alkohol mennyiségei között nem tapasztaltunk jelentős eltéréseket, addig ezt a tendenciát a további koncentrációk mellett nem figyelhetjük meg. Továbbá az is észrevehető, hogy bizonyos törzsek esetében (*K. marxianus* DSM 5422, illetve *K. thermotolerans* DSM 3434) a növekvő cukorkoncentrációkkal együtt a termelt maximális etanol mennyisége is növekszik, ellentétben a *K. marxianus* DSM 4908-as törzsszel, amely 50 g/l-os laktóz koncentráció felett már nem termel etanolt. Erre a törzsre vonatkozó, laktóz alapú etanoltermelési kísérletre vonatkozó irodalmak nem találhatóak, valószínű azért mert nem alkalmas ilyen inokulumon etil-alkohol előállításra. Ezek az eredmények az irodalmi adatokkal összevetve hasonló értékeket mutatnak, ugyanis *Mahmoud et al.* (1982) átlagosan 3,7-4,3 v/w%-os értékeket tudtak produkálni. *Hadiyanto et al.* (2014) pedig 5,46 g/l etanoltermelésről számoltak be 30 °C-on (40 °C-on 7,96 g/l) 4,8%-os laktózkoncentráció mellett.

KÖVETKEZTETÉSEK

Kísérleteink alapján tejsavó alapú etil-alkohol előállításra a *Kluyveromyces marxianus* DSM 5422, illetve a *Kluyveromyces thermotolerans* DSM 3434 élesztőtörzset találtuk legalkalmasabbnak. Eredményeink alapján elmondható, hogy a két törzs által termelt etanol mennyisége (4,62-5,05 %) még nem a legoptimálisabb kihozatal. További kísérleteink során törekednünk kell arra, hogy ezt az értéket legalább 10 %-ra növeljük, ugyanis további felhasználás (esetleg lepárlás) esetén ez a kihozatal még nem elegendő, ha a gazdasági szempontokat is figyelembe vesszük. A kísérleti paraméterek (hőmérséklet, pH érték, tápanyagok adagolása, időtartam) további optimalizálásával a végső etanol kihozatal is elérhető *Kluyveromyces* törzsek esetében.

Elmondható azonban, hogy az általunk kiválasztott élesztőtörzsek további kísérletek beállítása után mind laboratóriumi, mind ipari fermentációs rendszerekben egyaránt alkalmasak lehetnek tejsavó alapú etanol előállításra.

Effect of different lactose concentrations on growth and ethanol production of *Kluyveromyces* yeast strains

VIKTÓRIA KAPCSÁNDI - ATILA BARABÁS - BEATRIX SIK - ZSOLT AJTONY
– ERIKA LAKATOS

Széchenyi István University Faculty of Agricultural and Food Sciences,
Mosonmagyaróvár

SUMMARY

Ethanol can be produced from various agricultural materials or by-products. Such by-product is for example, whey which is produced in cheese- and curd cheese production in larger quantities in the form of a liquid and its most common carbohydrate is lactose.

The aim of our research was to investigate lactose utilizing *Kluyveromyces* yeast strains, which are suitable for whey-based ethyl alcohol production. In our experiments we compared the specific growth rate and lactose digestion and ethanol production of

the selected strains with different lactose concentrations under laboratory conditions. From the samples were determined the lactose and ethanol contents of the fermentation broth taken at appropriate intervals using the IC-HPLC-RI method. During our measurements, we sought to answer the question, that of the five *Kluyveromyces* strains we have studied, which is the most suitable for ethanol production.

Based on our measurements we can conclude that the most favorable results of the examined strains were shown *Kluyveromyces marxianus* DSM 5422 and *Kluyveromyces thermotolerans* DSM 3434.

Keywords: *Kluyveromyces* yeast strains, lactose fermentation, ethanol production

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

A kutatást az EFOP-3.6.1-16-2016-00017 „Nemzetköziesítés, oktatói, kutatói és hallgatói utánpótlás megteremtése, a tudás és technológiai transzfer fejlesztése, mint az intelligens szakosodás eszközei a Széchenyi István Egyetemen“ projekt támogatta.

A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával, valamint az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-17-4 Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával készült.



IRODALOMJEGYZÉK

Ariyanti, D. – Hadiyanto, H. (2013): Ethanol production from whey by *Kluyveromyces marxianus* in batch fermentation system: kinetics parameters estimation. *Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis*. 7, (3) 179-184.

Bakonyi I. (2015): Tejek és joghurtok laktóz, valamint meggy cefre glükóz és fruktóz tartalmának meghatározása IC-HPLC-RI módszerrel. Szakdolgozat, Nyugat-Magyarországi Egyetem Mezőgazdaság-és Élelmiszertudományi Kar, Mosonmagyaróvár

Corona, R.M. – Penagos, C.C. – Parga, M.C.C. – Navarrete, M.A. – Hernández, J.C.G. (2016): Analysis of the effect of agitation and aeration on xylitol production by

fermentation in bioreactor with *Kluyveromyces marxianus* using hydrolyzed tamarind seed as substrate. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 5, (6) 479-499.

Dagbagli, S. – Goksungur, Y. (2008): Optimization of β -galactosidase production using *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279 by response surface methodology. Electronic Journal of Biotechnology. 11, (4).

Domingues, L. - Guimarães, P. - Oliveira, C. (2010): Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for lactose/whey fermentation. Bioeng Bugs. 1, (3) 164–171.

Dragone, G. – Mussatto, S.I. – Oliveira, J.M. – José, A.T. (2009): Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. Food Chemistry. 112, 929–935.

Grba, S. – Tomas, S.V. – Stanzer, D. – Vahcic, N. – Skirlin, A. (2002): Selection of yeast strain *K. marxianus* for alcohol and biomass production on whey. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly. 16, 13-16.

Hadiyanto – Ariyanti, D. – Aini, A.P. – Pinundi, D.S. (2014): Optimization of ethanol production from whey through fed-batch fermentation using *Kluyveromyces marxianus*. Energy Procedia. 47, 108-112.

Hashem, M. - Zohri, A.N.A. – Ali, M.M.A. (2013): Optimization of the fermentation conditions for ethanol production by new thermotolerant yeast strains of *Kluyveromyces sp.* African Journal of Microbiology Research. 7, (37) 4550-4561.

Homonnay Zs. – Koncz K. (2005a): A tejsavóról másképpen. 1. rész: A tejsavó tápanyag összetétele. Élelmezési ipar. 59, (6) 129-133.

Hun, C.H. - Mohd Sueb, M.S. - Abd Malek, R. - Othman, Z. – Elsayed, E.A. – Ramili, S. – Elmarzughi, N.A. – Sarmidi, M.R. - Aziz, R. - El Enshasy, H.A. (2013): Bioprocess development for high cell mass production of the probiotic yeast-*Kluyveromyces lactis*. Journal of Pharmacy and Biological Science. 8, (3) 49-59.

Joshi, J. – Senatore, B. – Poletto, M. (2011): *Kluyveromyces marxianus* Biofilm in cheese whey fermentation for bioethanol production. Conference Paper, Conference: 10th International Conference on Chemical and Process Engineering, Chemical Engineering Transactions. 24, 493-498.

Kourkoutas, Y. – Dimitropoulou, S. – Kanellaki, M. – Marchant, R. – Nigam, P. – Banat, I.M. – Koutinas, A.A. (2002): High-temperature alcoholic fermentation of whey

using *Kluyveromyces marxianus* IMB3 yeast immobilized on delignified cellulosic material. *Bioresource technology*. 82, (2) 177-181.

Kourkoutas, Y. - Dimitropoulou, S. - Marchant, R. - Nigam, P. - Banat, I.M. - Kioseoglou, V. - Psarianos, C. - Koutinas, A.A. (2001): Whey liquid waste of dairy industry as raw material for fermentation with the thermophilic *Kluyveromyces marxianus* IMB3. 7th International Conference on Environmental Science and Technology, 226-233.

Limtong, S. – Sringiew, C. – Yongmanitchai, W. (2007): Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. [Bioresource Technology](#). 98, 3367-3374.

Mahmoud, M.M. – Kosikowski, F.V. (1986): Alcohol and single cell protein production by *Kluyveromyces* in concentrated whey permeates with reduced ash, *Journal of Dairy Science*. 65, (11) 2082–2087.

Moreira, N.L. – Santos, L.F. – Soccol, C.R. – Suguimoto, H.H. (2015): Dynamics of ethanol production from deproteinized whey by *Kluyveromyces marxianus*: An analysis about buffering capacity, thermal and nitrogen tolerance. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 58, 454-461.

Nonklang, S. – Abdel-Banat, B.M.A. – Cha-Aim, K. – Moonjai, N. – Hoshida, H. – Limtong, S. – Yamada, M. – Akada, R. (2008): High-temperature ethanol fermentation and transformation with linear DNA in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042. *Applied and Environmental Microbiology*. 74 (24) 7514-7521.

Sadik, M.W. – Halema, A.A. (2014): Production of ethanol from molasses and whey permeate using yeasts and bacterial strains. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 3, (3) 804-818.

Salman, Z. – Mohammad, O. (2006): Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*, *Biochemical Engineering Journal*. 27, (3) 295-298.

Sulyok E. – Biró Gy. – Tamás J. (2013): *Saccharomyces cerevisiae* szaporodáskinetikájának vizsgálata tejipari mellékterméken. *Agrártudományi Közlemények*. 51, 169-172.

Internetes hivatkozás:

URL¹: <http://docplayer.hu/7964151-Fekete-erzsebet-karaffa-levente-ipari-biotechnologia-lektoralta-dr-toth-laszlo-osztalyvezeto-teva-gyogyszergyar-zrt.html>

(Fekete E. – Karaffa L. (2013): Ipari Biotechnológia. Debreceni Egyetem, Természettudományi és Technológiai Kar Biomérnöki Tanszék 23-37.)

A szerzők levélcíme – Address of the authors:

Dr. Kapcsándi Viktória: kapcsandi.viktoria@sze.hu

Sik Beatrix: sik.beatrix@sze.hu

Dr. Ajtony Zsolt: ajtony.zsolt@sze.hu

Dr. Lakatos Erika: lakatos.erika@sze.hu

Széchenyi István Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar,
Élelmiszertudományi Tanszék
9200 Mosonmagyaróvár, Vár tér 2.

Barabás Attila: barabas.attila@gyorilikor.hu

Széchenyi István Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar,
Wittmann Antal Növény- Állat és Élelmiszertudományi Doktori Iskola
9200 Mosonmagyaróvár, Vár tér 2.