

ERDÉLYI TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI KONFERENCIA 2024

SAPIENTIA EMTE - MAROSVÁSÁRHELYI KAR

***A tejipari melléktermékek felhasználási
lehetőségei az alkoholos italok előállításá-
s során***

Hallgató: *Miklós Noémi Zsuzsanna, fenntartható biotechnológiák mesterszak, 2. év.*

Témavezetők: *Dr. Salamon Rozália-Veronika, egyetemi docens*

Dr. Albert Csilla, egyetemi docens

Dr. Bartos Hunor, egyetemi óraadó

Csíkszereda

2024

1. Bevezető.....	5
2. Célkitűzések	6
3. Irodalmi áttekintés.....	7
3.1. A savó keletkezése.....	7
3.2. A savó morfológiai tulajdonságai.....	7
3.3. A savó fiziko-kémiai tulajdonságai	9
3.4. A savó szerepe a fermentációban	10
3.5. A savókoncentrátum jellemzése	13
3.6. Az alkoholgyártás technológiája savó koncentrátumból.....	15
3.7. A savókoncentrátum erjesztésére alkalmas élesztők jellemzése	17
4. Anyag és módszer	21
4.1. Fermentációhoz alkalmazott mikroorganizmusok bemutatása, izolálása talajmintából	21
4.1.1. A kereskedelemről beszerzett <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (CHR Hansen-Viniflora	21
Merit) élesztő bemutatása	21
4.2. Az izolált élesztőtörzs bemutatása	21
4.3. A savókoncentrátum jellemzése és előkészítése	23
4.4. A lombik tenyészetek előkészítési körülményei	24
4.5. Analitikai módszerek.....	26
5. Eredmények és értékelésük.....	29
5.1. Mikroba törzsek szelekciójának eredményei	29
5.2. MALDI-TOF elemzés eredményei	29
5.3. Lombik tenyészetek analitikai vizsgálatainak eredményei	31
5.4. Optikai denzitás vizsgálatok eredményei.....	32
5.5. Az élesztő sejtszám meghatározás eredményei.....	33

5.6.A fermentált minták összalkohol tartalmának eredményei	34
5.7. A HPLC-mérés eredményei	35
7. Köszönetnyilvánítás	44
8. Szakirodalmi jegyzék	45

Tejipari melléktermékek felhasználási lehetőségei az alkoholos italok előállítása során

Miklós Noémi Zsuzsanna

Sapientia EMTE, Csíkszeredai Kar, Fenntartható Biotechnológiák Mesteri Szak, 2. év

E-mail: miklosanoemizsuzsanna@uni.sapientia.ro

Témavezetők:

dr. Albert Csilla, dr. Bartos Hunor, dr. Salamon Rozália-Veronika

Sapientia EMTE, Csíkszeredai Kar, Élelmiszertudományi Tanszék

E-mail: albertcsilla@uni.sapientia.ro, bartoshunor@uni.sapientia.ro, salamonrozalia@uni.sapientia.ro

Kivonat

A tej feldolgozása során nagy mennyiségű melléktermék (a tej 80-90%-a tejsavó) keletkezik, melynek szervesanyag tartalma magas. A tejsavó környezetszennyező hatása jelentős (KOI értéke: 0,8-102 g/l és BOI értéke: 0,6-60 g/l), viszont hasznos alapanyag lehet a megfelelő biotechnológiai módszerek alkalmazásával a bioetanol gyártásában.

Kutatásunk során vizsgáltuk a tejsavóból reverz ozmózis (RO) szűréssel kinyert savó koncentrátum (14-16% laktóz tartalom) felhasználási lehetőségét az alkoholgyártásban. Ennek érdekében két élesztőtörzs (*Saccharomyces cerevisiae* és *Pichia fermentans*) fermentációs hatékonyságát vizsgáltuk. A *S. cerevisiae* törzs kereskedeleméből (CHR-Hansen Viniflora Merit) míg a *P. fermentans* élesztő törzset a székelyszentléleki Gordon Prod. Kft. tejfeldolgozó üzem területéről izolált mikroba közösségből azonosítottuk (MALDI-TOF tömegspektrométerrel és 16S rRNS szekvencia elemzéssel). A fermentációs profil megismerésének érdekében vett mintáink, glükóz, galaktóz, tejsav, ecetsav és etanol tartalmát nagy teljesítményű folyadékkromatográffal (Agilent 1260 Infinity) vizsgáltuk.

A vizsgált törzsek etanol termelése a 12. fermentációs nap bizonyult a legmagasabbnak a *S. cerevisiae* törzs esetében 6,84%v/v míg a *P. fermentans* esetében a maximális etanol termelés 3,45%v/v volt. A mérési eredmények alapján elmondható, hogy a *P. fermentans* törzs a fermentáció 12 napjáig a rendelkezésre álló galaktóz mennyiség 46,5%-át használta fel, míg a fermentáció 24 napján csupán 17,75% galaktóz maradt a folyamatban.

1. Bevezető

Világszerte több mint 6 milliárd ember fogyaszt tejet vagy valamilyen tejterméket, 2013-ban közel 800 millió tonna volt a globális tejtermelés, ami 2025-re további 23%-al emelkedhet a 2013-as évhez képest (OECD-FAO, 2016).

A tej feldolgozása során az alkalmazott technológiai folyamat és az előállított tejterméktől függően különböző tejipari melléktermékek keletkeznek. Csapó és mtsai. (2014) szerint a tejipar fontosabb melléktermékei a sovány tej, az író és a savó, amelyek a tej főlézése, a vaj- és sajtgyártás során jönnek létre. Ezen melléktermékek megfelelő felhasználása mára már jelentős helyet foglal el az emberi táplálkozásban, az állatok takarmányozásában, valamint az iparban.

A tejipari melléktermékek mennyisége igen jelentős, így tárolásuk nagyon költséges, már csak a savó esetében a sajt és más kazein tartalmú tejtermék gyártása során a felhasznált tej 80-90%-a savóvá alakul át (Chandrapala és mtsai., 2014), ebből adódóan jelentős kiadással jár a savó tárolása. A tárolásból származó problémák, valamint a megfelelő újrahasznosítás technológia hiányában kényszerülnek a tejfeldolgozó üzemek eladni, továbbadni a melléktermékként keletkezett savót nyersanyagként más savót felhasználó üzemnek, illetve tápanyagként állattartó (sertésfarmot működtető) gazdáknak.

A tejipari melléktermékek szervesanyag-tartalma magas. A savó kémiai oxigén igényének (KOI) értéke 0,8 és 102 g/l között van, biológiai oxigén igényének (BOI) értéke pedig 0,6 és 60 g/l között változik. A felszíni vizekbe kibocsátott savó csökkent oldott oxigénhez, eutrofizációs folyamatokhoz és toxicitáshoz vezet, ami megváltoztatja a vízi ökoszisztémák fiziko-kémiai tulajdonságait (Ayed és mtsai., 2023).

2. Célkitűzések

A kutatásunk fő célja megvizsgálni, hogy a savó reverz ozmózis szűréséből származó retentátum amit továbbiakban savókoncentrátumnak nevezünk alkalmazható-e etanol előállításra. Ennek érdekében két élesztőtörzs (*Saccharomyces cerevisiae* és *Pichia fermentans*) fermentációs hatékonyságát vizsgáltuk. A *S. cerevisiae* törzs kereskedelemről (CHR-Hansen Viniflora Merit) míg a *P. fermentans* élesztő törzset a székelyszentléleki Gordon Prod. Kft. tejfeldolgozó üzem területéről izolált mikroba közösségből azonosítottuk.

A fő cél megvalósításának érdekében a következő mellékcélokat fogalmaztam meg:

- a glükóz és galaktóz metabolizáló képességek összehasonlítása
- az etanol, mint a célkomponens, előállítási hatásfokának vizsgálata
- a tejsav és ecetsav (mint más típusú fermentációt jelölő komponensek) jelenlétének és mennyiségének követése a fermentáció során.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. A savó keletkezése

A savó a tejipar legjelentősebb mellékterméke, amely a sajtkészítés során keletkezik. 100 liter tejből 80-90 liter savó keletkezik, vagyis a sajtgyártó létesítményekbe kerülő tej körülbelül 80–90%-a válik savóvá. A kutatók szerint világszerte 2018-ban 180–190 millió tonna savó keletkezett (Flinois és mtsai., 2019), és ez a mennyiség évi 1–2%-os növekedéssel 2030-ra 203–241 millió tonnára emelkedhet. Ebből csak az EU-n belül 40 millió tonnát állítanak elő (Zotta és mtsai., 2020).

Mivel a tejsavó, a sajt és kazein alapú tejtermékek gyártása során keletkező melléktermék, ezért nem meglepő, hogy a fermentáció után keletkezett savó tápanyagokban gazdag így a továbbiakban megfelelő technológiák alkalmazásával különböző termékek gyártásában hasznosítható (Panghal és mtsai., 2018). Adalékanyagként kerülhet feldolgozott élelmiszerekbe, péksüteményekbe, és takarmányozásra is használják, tápszerek és diétás termékek gyártására, de alkoholos italok előállítására is.

Napjainkban egyre több kutatásban bizonyítják a savó természetes állapotában megtalálható összetevők emberi szervezetre gyakorolt pozitív hatását, a teljesség igénye nélkül elég csak megemlíteni a savófehérjék kiemelkedő biológiai értékét, a bioaktív peptidek jelenlétét, a tejcukor prebiotikus hatását, vagy azt, hogy a savó nagyon fontos kalciumforrás (Román, 2010).

A tejsavó környezetre gyakorolt hatását vizsgálva azonban láthatjuk, hogy erősen szennyező, nagy szervesanyag-terheléssel bíró hulladék. A savó jelentős mértékű környezeti kockázatot jelent, ezért, ha a szennyvízbe kerül szükséges a szennyvíz tisztítása (Csapó, 2014).

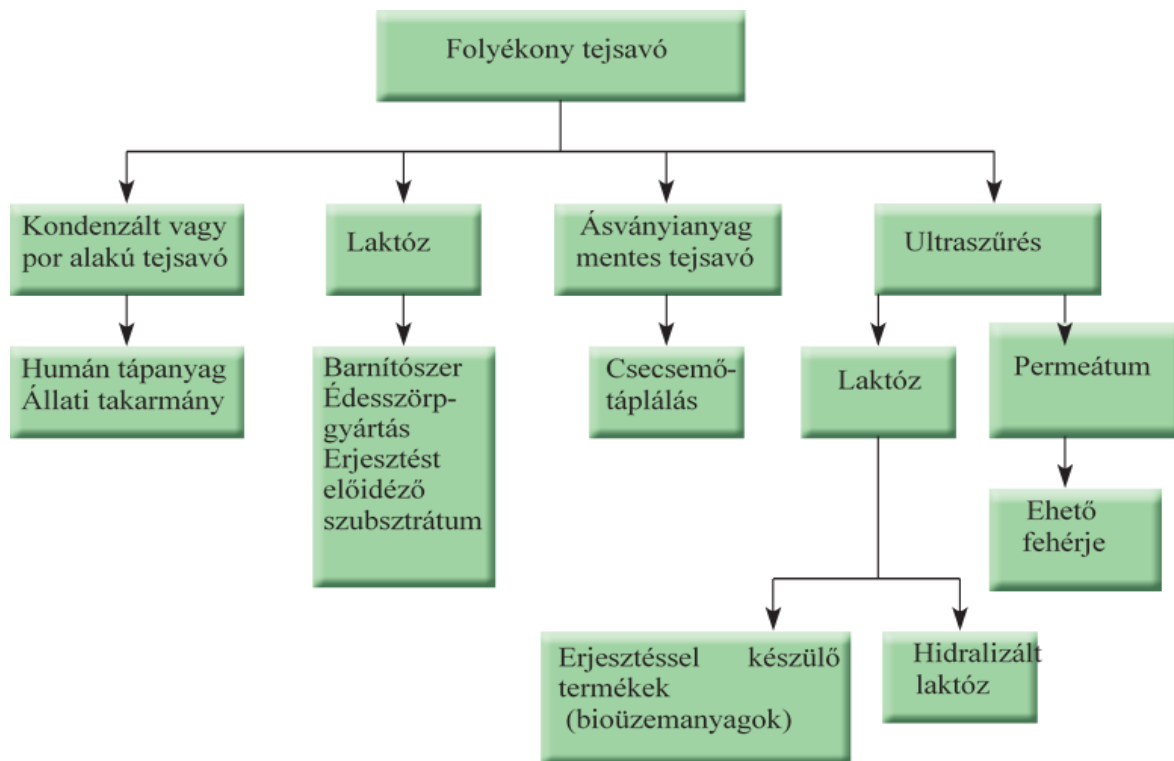
3.2. A savó morfológiai tulajdonságai

A savó morfológiai tulajdonságait nagyban befolyásolják tej feldolgozásának módszerei. A tejsavót tejjel vagy savval a tejsav fehérjéi közül nyerik ki miközben a kazein koagulál, így szűrés után sárgás-zöldes színű, kellemes illatú, enyhén savanykás ízű folyadékot kapunk (Mucsi, 2016). A kezeletlen tejsavó szervesanyag tartalma jelentős, igen magas a laktóz, fehérje, és ásványi anyag tartalma. A tejsavó keletkezésének körülményei és tápanyagtartalom minősége szerint megkülönböztetünk savanyú és édes tejsavót. Előbbi a tej savas alvasztása, utóbbi az oltós és a vegyes alvasztás során keletkezik.

Édes savó akkor keletkezik, amikor a tejet tejoltóval megalvasztják (tejoltós koaguláció). Az édes savó jellemzően 0,6–0,9% fehérjét, akár 0,3% zsírt, viszonylag nagy mennyiségű 4,5–5,2% laktózt, és 0,02–0,05% ásványi anyagot tartalmaz, illetve kémhatása 5,6–7 között változhat (Mulcahy, 2017).

Savanyú savót alvadásból, tejcukor tejsavvá történő erjesztésével állítják elő; például a görög joghurt gyártásban, vagy a savas kazein előállításánál hozzáadott savval. A savanyú savó jellemzően 0,6–0,8% fehérjét, az édes savóhoz viszonyítva kevesebb 4,4–4,6% laktózt, és 0,04–0,07% ásványi anyagot tartalmaz, illetve jóval savasabb, mint az édes savó, hisz a kémhatása 4,3 vagy ennél is alacsonyabb (Buchanan és mtsai., 2023).

Általában 9 liter tejsavó keletkezik 1 kg sajt előállításánál. A tejsavó nagy részéből tejsavóport készítenek. A tejsavóból készülhet édes tejsavópor, ásványi anyag mentes tejsavó, laktózmentes tejsavó, tejsavó fehérje-koncentrátum, tejsavó fehérje-kivonat és laktóz. Az utolsó két anyag a gyógyszer- és kozmetikai iparban kerül felhasználásra (Mucsi, 2016).



1. Ábra. A leggyakrabban alkalmazott tejsavó felhasználási lehetőségei (Mucsi, 2016)

3.3. A savó fiziko-kémiai tulajdonságai

A tej feldolgozásától, a tejsavó elválasztásáig, a savó összetétele (1. Táblázat) nagy eltéréseket mutat. Az édes savó a tej összes szárazanyagának körülbelül a felét tartalmazza, és értékes tápanyagok, mint laktóz, tejsavó fehérjék, ásványi anyagok és vitaminok forrása.

1. Táblázat Az édes és a savanyú savó kémiai összetétele (Roman, 2010)

Összetevők	Mértékegység	Édes savó	Savanyú savó
Összes szárazanyag	%	5,40-6,35	5,60-6,70
Tejcukor (laktóz)	%	4,1-5,0	3,8-4,6
Összes fehérje	%	0,8-1,0	0,8-1,0
Savófehérjék	%	0,6-0,7	0,6-0,7
Tejzsír	%	0,2	0,2
Ásványi anyagok	%	0,50-0,60	0,50-0,85
Cl	mg/L	1000-1640	1000
Na	mg/L	300-460	450-600
K	mg/L	1050-1700	1200-1800
Ca	mg/L	250-500	800-1100
Mg	mg/L	40-100	80-120
P	mg/L	350-550	500-700
Tiamin	mg/L	0,4	0,4
Riboflavin	mg/L	1,4	1,4
Piridoxin	mg/L	0,5	0,5
Kobalamin	mg/L	0,002	0,002
Nikotinsav	mg/L	0,85	0,85

Összetevők	Mértékegység	Édes savó	Savanyú savó
Folsav	mg/L	0,05	0,05
Pantoténsav	mg/L	3,4	3,4
Tejsav	%	max. 0,1	max. 0,8
pH		5,60-6,50	4,35-5,10
Fajlagos vezetőképesség	mS/cm	4,7-6,4	8,4

A tejsavó híg folyadék, melynek szárazanyag tartalma 6% körül van. A tej összetételét vizsgálva a savó a tej 80-90%-a, ezzel szemben a tej szárazanyagának 55%-a savóban található meg, beleértve az értékes savófehérjét és a laktózt is (Kankanamge, 2018).

3.4. A savó szerepe a fermentációban

Mikrobiológiai szempontból is fontos megvizsgálni a savót, mert értékes összetevőket tartalmaz, számos kereskedelmi felhasználása van, nemcsak a ricotta gyártásánál, hanem számos kereskedelembe lévő termék alapanyagát képezi. A tejben lévő mikroorganizmusok nagyrészt átkerülnek a savóba, ezek fontos szerepet játszanak a tejsavó alvadásában, fermentálásában, (Sattin és mtsai., 2016). A savas alvasztással készülő túrógyártás során a hőkezelt és beállított zsírtartalmú tejet vajkultúrával oltják be. A kultúra savtermelő mikrobái (pl. *Streptococcus lactis*, *S. cremoris* - homofermentatív tejsavbaktériumok) elszaporodnak, és enzimeik segítségével a tejcukorból tejsavat állítanak elő.

A tejsavóban a fő fermentálható szénhidrát a laktóz, amelyet a *Saccharomyces cerevisiae*, az etanol előállítására általánosan használt élesztőgomba nem képes hasznosítani. A *Kluyveromyces marxianus* a laktózt is erjesztő élesztőgombát a laktóz etanollá történő biokonverziójára használják (Hughes és mtsai., 2018).

Napjaink biotechnológiai ipara fokozatosan fejlődik. Gazdaságosabbnak mutatkoznak azon technológiák, melyek mikrobák segítségével állítják elő termékeiket, a vegyiparral szemben. Egyes szerves savak mikrobiális folyamatokkal közvetlenül előállíthatóak laktózból, tejsavóból

kinyerhetőek, a mikroorganizmusok metabolikus útvonalain keresztül (2. Táblázat). A legkeresettebb szerves savakat, így a citromsavat, az ecetsavat és a tejsavat mára már tejsavóból is előállítják (2. Táblázat). Laktózból még összetettebb szerves savak is előállíthatók, mint a hialuronsav. Az L-tejsavat szinte kizárólag a *Lactobacillus casei* tejsavbaktérium vagy az Laszkorbinsavat (C-vitamin) a *Kluyveromyces lactis* vagy *Saccharomyces cerevisiae* bizonyos rekombináns törzsei termelik (Gutiérrez-Méndez, 2020).

A *Candida lambica* és a *Prototheca zopfii* 24-27°C és 17-21°C-on 96 órán történő nevelése során a fermentációt követően a tápoldatot két szakaszban desztillálták.

2. Táblázat A kereskedelembe és iparban található tejsavóból előállított fontosabb szerves savak és jellemzői (Gutiérrez-Méndez, 2020)

Név	Forrása	Mikroorganizmus	Kultúra kondicionálása, eredmények
Ecetsav, C ₂ H ₄ O ₂	Tejsavó permeátum	<i>Clostridium thermolacticum</i> <i>Moorella thermoautotrophica</i>	Anaerob, 58 °C, pH 7,2, 300 h, 0,81 g g ⁻¹
		<i>Acetobacter aceti</i>	Aerob, 303 K, D = 0,141 h ⁻¹ , 96,9 g L ⁻¹ , 0,98 g g ⁻¹ , 4,82 g L ⁻¹ h ⁻¹
	Sajtsavó	<i>Propionibacterium acidipropionici</i>	Anaerob, 35 °C, pH 6,5, 78 h, 0,11 g L ⁻¹ ecetsav + 0,33 g L ⁻¹ propionsav
		<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Anaerob, 37 °C, 72 h, pH 6,5, 7 g L ⁻¹
Akrilsav, C ₃ H ₄ O ₂	Édes sajtsavó	<i>Clostridium propionicum</i>	Anaerob, +propionsav, + ecetsav, 33 °C, pH 7,1, 0,133 mmol g ⁻¹

Név	Forrása	Mikroorganizmus	Kultúra kondicionálása, eredmények
L-aszkorbinsav C ₆ H ₈ O ₆	Sajtsavó	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Aerob, 48 h, 30 °C, 30 mg L ⁻¹
	Galaktóz	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Aerob, 144 h, 30 °C, 0,40 g g ⁻¹ , 70 mg L ⁻¹
Propionsav, C ₃ H ₆ O ₂	Édes sajtsavó	<i>Propionibacterium acidipropionici</i>	Anaerob, 135 ± 6,5 g L ⁻¹
	Sajtsavó	<i>P. acidipropionici</i>	Fakultatív anaerob, 6,1 g L ⁻¹
		<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	Anaerob, 8,2 g L ⁻¹
		<i>P. acidipropionici</i>	Anaerob, 0,33 g L ⁻¹
Tejsav, C ₃ H ₆ O ₃	Édes sajtsavó	<i>Lactobacillus casei</i>	Anaerob, 36 h, pH 6,5, 37 °C, 33,73 g L ⁻¹
		<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Anaerob, 37 °C, pH 6,2, 200 rpm, 50 h, 143,7 g L ⁻¹
	Sajtsavó	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Anaerob, 37 °C, 72 h, pH 6,5, 42,62 g L ⁻¹
		Acetogén és fermentatív baktériumok vegyes kultúrája	Anaerob, 35 °C, HDT = 1 nap, 10,6 g L ⁻¹ nap ⁻¹
Vajsav, C ₄ H ₈ O ₂	Sajtsavó	<i>Clostridium beijerinckii</i>	Anaerob, 37 °C, pH 5,5, 0,08 g L ⁻¹ h ⁻¹
		<i>Clostridium butyricum</i>	Anaerob, + 5 g L ⁻¹ YE+ 50 µg L ⁻¹ biotin, 37 °C, pH 6,5, 19 g L ⁻¹

Név	Forrása	Mikroorganizmus	Kultúra kondicionálása, eredmények
Borostyánkősav, C ₄ H ₆ O ₄	Sajtsavó	<i>Anaerobiospirillum succiniciproducens</i>	Anaerob +CO ₂ , + Glu, pH 6,5, 39 °C, 36 h, 16,5 g L ⁻¹ , 0,33 g L ⁻¹ h ⁻¹
		<i>Actinobacillus succinogenes</i>	Anaerob +CO ₂ , 38 °C, pH 6,8, 48 h, 28 g L ⁻¹ , 0,44 g L ⁻¹ h ⁻¹
	Savó permeátum	<i>Enterobacter</i> sp.	Mikroaerob, + Gly, 34 °C, pH 7, 69 g L ⁻¹

3.5. A savókoncentrátum jellemzése

A savó koncentrálására nagyon vonzó alternatív módszer az ultraszűrés, mivel nem használ hőt, és ennek következtében nem jár fázis váltással, ami gazdaságosabbá teszi a koncentrálni folyamatot. Az ultraszűrés egy membránszeparációs eljárás, amelyet jellemzően makromolekulák szétválasztására használják, valamint alkalmazzák különböző tej összetevők kinyerésére és frakcionálására. Így ez az eljárás lehetővé teszi a molekulák méretén alapuló szétválasztását (fehérje, laktóz, ásványi anyagok stb.) (Baldasso és mtsai., 2011). A koncentrátum eléréshez édes savót használhatunk, aminek a savassága maximum 20 °T. A savó koncentrálnása elvégezhető 1/6 , 1/8, 1/10 és 1/12 közötti arányokban (3. táblázat), amelynek összetétele ezáltal egyenes arányban változik.

3. Táblázat A savó koncentrátum kémiai összetétele a koncentrálnási arány változásával (Mucsi, 2016)

Paraméterek	Koncentrálnási arány			
	1:6	1:8	1:10	1:12
Szárazanyag tartalom, %	38,0	51,0	63,0	74,0
Víz, %	62,0	49,0	37,0	26,0
Laktóz, %	29,4	38,9	47,5	55,3
Fehérje, %	5,4	7,0	9,1	10,9
Ásványi anyagok, %	2,4	3,7	4,6	5,3
Zsír, %	0,8	1,4	2,0	2,5

A koncentráció kiszámítása a fajsúly meghatározásával történik, korreláció van a fajlagos súly és a koncentrált tejsavó szárazanyag-tartalma között, melynek értékeit a 4. Táblázat összesíti.

4. Táblázat A nyers savó fajsúlya és szárazanyag tartalma közötti összefüggések (Mucsi, 2016)

Fajsúly, kg/m ³ 15 °C	Szárazanyag tartalom, %	Fajsúly, kg/m ³ 15 °C	Szárazanyag tartalom, %
1,025-1,028	5,5-6,5	1,175	39-42
1,050	11-12	1,200	44-47
1,075	17-19	1,225	48-51
1,100	21-25	1250	52-55
1,125	29-32	1,275	56-60
1,150	34-37	1,300	62-66

A koncentrátum elkészítéséhez háromtestes bepárló berendezést használnak, amelyben a savó melegítését és hűtését különböző hőmérsékleten végzik. A háromtestes bepárló esetében az édes savót 5 °C-ról felmelegítik mindhárom részben 81,5 °C-ra és visszahűtik 5 °C hőmérsékletre, változtatva az áramlási sebességet minden szakaszban koncentráltabb tejsavó távozik a gyűjtő tartályba, ahonnan szárító segítségével közel 98% szárazanyag tartalomig szárítják. Ezt a port takarmány-adalékként, vagy élelmiszerként sajtokhoz vagy pékárukhoz használják (Benali és Kudra, 2010).

Ahogy a tejsavó koncentráldódik egyre viszkózusabbá válik, szirupos állagtól a mézhez hasonló konzisztenciáig. A színe megváltozik a fehéres sárgástól a sárgás zöldig, a szárazanyag tartalma 80-85 %, ilyenkor kezd szoliddá válni (Mucsi, 2016).

A nanoszűrés olyan eljárás, amelyet az ásványi sók és a laktóz elválasztására használnak (5. Táblázat), miután előzőleg ultraszűréssel eltávolították a fehérjéket. Mind a fehérjék, mind a laktóz felhasználhatóak alapanyagként különféle termékek előállításához. A nanoszűrés további előnye, hogy a laktóz koncentrálással növeli a fermentálható szubsztrát koncentrációját a tejsavóban, ami lényegesen javítja a fermentáció és a desztilláció hatékonyságát (Risner és mtsai., 2018). Ezek a termékek lehetnek etil-alkohol, kefir jellegű erjesztett tejsavó italok stb. (Mucsi, 2016).

A laktóz-etanol biokonverzió kétlépcsős folyamat. Először a laktózt galaktózzá és glükózzá kell hidrolizálni, majd az alkoholos fermentáció következik (Hughes és mtsai., 2018).

5.Táblázat: A savó összetételének változása ultra- és nanoszűrés után (Cuartas-Uribe és mtsai., 2007; Benali és Kudra, 2010).

Paraméterek	Ultraszűrt savó	Nanoszűrt savó	Savópor bepárlás után
Összfehérje (g/L)	2,0-2,2	0	11
Laktóz (g/L)	41,9-52,0	1,9	76
Zsír (g/L)	1,08-1,29	1,23	1,5
Na (g/L)	0,35-0,37	0,28	0,5
K (g/L)	1,40-1,48	1,04	2,2
Mg (g/L)	0,07-0,09	0,009	0,15
Szulfátok (g/L)	0,09-0,012	0,004	-
Foszfátok (g/L)	0,51-0,6	0,062	-
pH	6,1-6,5	6,2	-
Vezetőképesség (mS/cm)	4,6-5,9	4,8	-

* Optimális paraméterek szűréskor: membrán nyomás= 20MPa, áramlási sebesség= 400 L/h.

3.6. Az alkoholgyártás technológiája savó koncentrátumból

A kézműves szeszes italok piaca az elmúlt 10 évben folyamatosan bővült, és az új termékek fejlesztése lehetővé teszi a lepárló üzemek számára, hogy gazdasági előnyre tegyenek szert. A sajtgyártásból származó savó nem alkalmas tejcukor porrá való feldolgozásra, mivel tejsavat és szulfátok tartalma, amelyek szárítás során megzavarják a kristályosodási folyamatot. A tejsavót etanol előállításra használják, amit később gyógyszerekben, parfümökben és tinktúrákban, valamint italokban hasznosítanak. Emellett számos kézműves szeszfőzde készít úgynevezett savó

vodka alkoholos italt, (a Black Cow és a Vermont White), melynek alapanyaga a tejsavó (Risner és mtsai., 2019).

A *Kluyveromyces marxianus* élesztő törzs és a *Candida kefir* ATC 14245 élesztő törzzsel végzett laboratóriumi vizsgálatokat végeztek koncentrált és nem koncentrált savó esetében is. Az eredmények azt mutatták, hogy a koncentrált savó permeátum 9,8% laktózt tartalmazott, míg a nem koncentrált savó laktóztartalma 4,9% volt. Az etanol termelés lineárisan nőtt, különösen a kísérlet tizedik órája után, az erjesztés teljes időtartama hatvan óra volt. A mikroorganizmusok katalizátorként való alkalmazása a *K. marxianus* esetében nagyobb etanol termelő képességgel rendelkezett, mint a *Candida kefir*. Az optimális körülménynek 4,8 pH, 30 °C bizonyult, ahol *K. marxianus* 5% v/v alkoholt volt képes előállítani. A *C. kefir* ugyanezen körülmények között 4,4 % v/v alkoholt termelt (Koushki és mtsai., 2012). A *K. marxianus* számos törzse képes a laktózt fermentálható cukormonomerekké (galaktóz és glükóz) bontani további feldolgozás nélkül. Az élesztőt a β -galaktozidáz enzime a laktóz metabolizáló képessége miatt ideális jelöltté teszi a tejsavó fermentációjára (Fonseca és mtsai., 2008). A felhasznált energia, víz, az erjesztés során keletkezett CO₂ tömege 8,4 kg erjesztett savó lepárlása esetén 0,44 kg-al kevesebb vízre volt szükség, mint malátából és árpából készült szeszes italok esetében (Risner és mtsai., 2018).

Az alkoholos tejsavó italok közé tartoznak a kis (1,5%-os) alkoholtartalmú italok, a tejsavó sör, a tejsavó bor és a tejsavó pezsgő. Az előbbieken felsorolt italokat a fogyasztók jól fogadták, és a kereskedelmi forgalomba kerülő gyártás folyamatban van.

A tejsavóból készülő viszonylag alacsony alkoholtartalmú (10-11%) italokat többnyire gyümölcs aromákkal készítik és hozzák forgalomba. Ezeket demineralizált (ásványianyagtartalom <1%) ultraszűrt savóból vagy tejsavópor savas oldatából készítik, melynek szárazanyagtartalma 26-28%. Az erjedés után visszamaradó savó szennyeződésekkel faszénrel távolítják el. Az édes tejsavópor készítésének egyik eljárása során a tejsavóból eltávolítják a fehérjét, majd 82 °C-on 5 percig melegítik, és körülbelül 22% dextrózt adnak hozzá a borban kívánt alkohol mennyiségétől függően. A *Saccharomyces cerevisiae* élesztőgomba segítségével a fermentáció hét nap alatt zajlik le szobahőmérsékleten. Mivel maga a tejsavó elegendő tápanyagot tartalmaz az élesztő növekedéséhez, nem adnak hozzá további tápanyagokat. Hasonlóan különböző típusú tejsavó alapú borok, mint popbor, tejsavó pezsgő, édes bor stb. készíthetők különböző élesztőtörzsek és feldolgozási körülmények mellett (Parekh, 2007).

A tejsavót különféle típusú tejsavó alapú sör félék készítésére is használják. A tejsavó vagy tejsavó koncentrátum gabonafélék megfelelő helyettesítő összetevőjeként használható sör és sörszerű termékek gyártásában. Nyomás alatti hosszan tartó hevítés hatására karamellhez hasonló íz alakul ki, amely hasonló a pörkölt maláta ízéhez és illatához (Broadway, 2015). Dietrich (1988) kifejlesztett egy sörhelyettesítőt, mely tartalmazó 5,4% maláta cefrét 2,5% fehérjementesített savót, ezt a keveréket *Saccharomyces lactis* élesztővel fermentálta. 5-7 nap elteltével a termék valódi sör ízzel és sörnek megfelelő jellemzőkkel rendelkezett.

A Carbery-eljárást a tejsavó ipari szeszesitalok történő átalakítására használják, ahol a végtermék típusától függően a desztilláció utáni folyamatokat változtatják a technológia szerint. A tejsavó/tejsavó-permeátumot a betáplálás után pasztörözik, majd lehűtik a meghatározott fermentációs hőmérsékletre. Innen átvezetik a tejsavót fermentációs tartályokba és beoltják *K. marxianusszal*. A kereskedelmi alkoholgyártás általános oltási aránya $1-5 \times 10^7$ sejt/ml (Kelsall és Lyons, 2003). A *K. marxianust* élesztőszaporítóedényekben előnevelik aerob körülmények között. A fermentációs tartályok hengerkúpos edények, melyek köpenyes hőcserélővel vannak ellátva a hőmérséklet szabályozása érdekében (hűtőfolyadékként etilén-glikol vagy más hűtőfolyadék használnak). A fermentációs tartályok mennyisége és mérete a gyártó létesítmény kapacitásától függően változik. Az erjedés során sűrített levegőt használnak a keveréshez. A fermentáció során a savó fajsúlyát figyelik. A tejsavó fajsúlya körülbelül $1,022 \text{ g/cm}^3$ -nél kezdődik, és az erjedés során $1,008 \text{ g/cm}^3$ -re csökken. Ez a sűrűség csökkenés annak köszönhető, hogy a tejsavóban lévő laktóz etanollá és CO_2 -á alakul. Az erjesztési idő 12 és 24 óra között változott. A fermentáció végén az erjesztett savót gravitáción alapuló elválasztási technológiával vagy más módszerrel, mint például centrifugálással választják el az élesztőtől. Az élesztő potenciálisan újra hasznosítható későbbi tételekhez, vagy tovább feldolgozható emberi vagy állati fogyasztásra (Kazalac, 2021).

3.7. A savókoncentrátum erjesztésére alkalmas élesztők jellemzése

A laktóz galaktózból és glükózból álló diszacharid, kémiaiilag O- β -D-galaktopiranozil-(1-4)- β -D-glükóz. A tejsavbaktériumok és enterobaktériumok mellett, amelyek a laktózt egyetlen szénforrásként képesek hasznosítani a különböző szállítórendszereken keresztül (Dudziak és mtsai., 2020), néhány gomba, például az *Aspergillus* (Brown és mtsai., 2018), *Candida*,

Trichoderma reesei (Pirayre és mtsai., 2020) és a *Kluyveromyces* nemzetség tagjai (Xia és mtsai., 2021) is mutatják ezt a metabolikus képességet. Ezekben a gombákban a laktóz két fő mechanizmuson keresztül hasznosul:

- a laktóz extracellulárisan D-glükózzá és D-galaktózzá hidrolizálódik, amelyeket ezt követően a gombák felvesznek
- a diszacharidot először a citoplazmába szállítja, és glükózzá valamint galaktózzá hidrolizálódik

A *K. marxianus* egyes törzsei képesek a laktózt a sejten kívül hidrolizálni (Varela és mtsai., 2017). Különböző kutatók gyakran hivatkoznak a *K. fragilis-re*, mint laktóz-fermentálóra; jelenleg azonban ez a *K. marxianus* szinonimája (Zoppellari és Bardi, 2013).

Számos tanulmány vizsgálta a *Candida pseudotropicalis* fermentációs szerveződő rendszer alkalmazását a laktóz etanollá alakításához (Domingues és mtsai, 2010). A *C. pseudotropicalis*, más néven *Candida kefir*, a *K. marxianus* anamorfja (ivartalan szaporodási állapota). A mozzarella tejsavóból izolált *Candida lambica*, szobahőmérsékleten képes az etanol előállítására, emellett magas etanol rezisztenciát mutat.

A *K. marxianus* faj nagyfokú genetikai variációval rendelkezik, és az egyes törzsek etanoltermelő képessége nagyon eltérő lehet (5. Táblázat). Ez valószínűleg annak köszönhető, hogy a faj számos élőhelyen jelen van (Fonseca és mtsai., 2008).

6. Táblázat Néhány *Kluyveromyces* nemzetségnek a sajtavóból történő etanol előállításának erjedései paraméterei (Carvalho és mtsai., 2021).

Élesztő	Szubsztrátum	Hozam (g/L*h)	Etanol (%v/v)	Erjesztési idő (h)	Erjesztési paraméterek
<i>Kluyveromyces marxianus</i> DSM 5422	Sajtsavó permeátum (120-170 g/L laktóz)	1,09	6	44	Folytonos erjesztés
<i>K. marxianus</i> MTCC1288	Nyers sajtavó (35 g/L laktóz)	0,1	0,26	22	Szakaszos erjesztés, 34 °C, pH 4,5, 500 ford.
<i>K. marxianus</i> CBS397	Ricotta sajtavó (45 g/L laktóz)	1,77	2,3	13	Anaerob erjedés, 37 °C, 200 ford., pH 5, 0-0.02% O ₂
<i>K. marxianus</i> ATCC 8554	Sajtsavó (98 g/L laktóz)	0,82	6,2	60	Szakaszos erjesztés (30 °C, pH 4,8)
Mikrobakonzorcium (<i>K. marxianus</i> szal és <i>Streptococcus</i>)	Nyers sajtavó (50 g/L laktóz)	1,25	7,6	48	Szakaszos erjesztés (30 °C, pH 4)

A *K. lactis* törzssel ellentétben a *S. cerevisiae*-ből hiányzik a β -galaktozidáz génje, bár néhány *S. cerevisiae* törzs képes intracelluláris α -galaktozidázt kiválasztani. Ezek a *S. cerevisiae* törzsek így egyedüli szénforrásként használhatják a melibiózt.

S. cerevisiae és *K. lactis* esetében a galaktóz a Leloir-útvonalon (6. ábra) keresztül katabolizálódik, amely egy négylépéses enzimatis reakciót foglal magában (Harrison és mtsai., 2021).

A *S. cerevisiae* elsősorban a laktóz hidrolízisét követően veszi fel a glükózt, és a glükóz jelenléte a galaktóz felvételéhez szükséges enzimek katabolikus elnyomását okozza. A galaktóz felvételéhez szükséges enzimek csak a glükóz kimerülése után szintetizálódnak. Annak ellenére, hogy a *S. cerevisiae*-t genetikailag módosították a β -galaktozidáz szintézisére és a katabolikus represszió csökkentésére, magát az élesztőt nem használják általában italgyártásra (Domingues és mtsai., 2010).

A *Saccharomyces cerevisiae* laktóz metabolizmusa csak géntechnológia segítségével történhet meg. Attól függően, hogy a tejcukor felhasználása hol történik, két esetet határolunk el egymástól:

- *intracellurális metabolizmus*: laktóz-felhasználó törzsnek (LAC+) a beépített LAC4-et és

LAC12 gének felelősek a laktóz metabolizmusáért (6. táblázat). Tehát a laktóz az bejut a sejtekbe, ahol cukormonomerekké, glükózzá és galaktózzá metabolizálódik.

- *extracellurális metabolizmus*: a *S. cerevisiae* által termelt heterológ β -galaktozidáz a külső közegbe szekretálódik, ahol a laktózt glükózzá és galaktózzá hidrolizálja. Az egyszerű cukrokat ezután szállítják a sejtekbe, ahol metabolizálódnak. Bár a glükózt glikolízisre irányítják, a galaktózt továbbítják a Leloir útvonalra (Carvalho és mtsai., 2021).

7. Táblázat *A sajtsavó alkoholos fermentációjára alkalmas génmódosított Saccharomyces cerevisiae élesztőtörzsek (Carvalho és mtsai., 2021).*

Élesztő	Szubsztrátum	Hozam (g/L*h)	Etanol (v/v)	Erjesztési idő (h)	Erjesztési paraméterek
<i>S. cerevisiae</i> LAC4 and LAC12 (AY- 51024M)	Koncentrált sajtsavó permeátum (laktóz 150 g/L)	0,53	8	120	Anaerob fermentáció
<i>S. cerevisiae</i> LAC4 and LAC12 (AY- 51024A)	Koncentrált sajtsavó permeátum (laktóz 150 g/L)	0,21	4,5	120	Anaerob fermentáció
<i>S. cerevisiae</i> LAC4 and LAC12 (AYGM)	Sajtsavó permeátum (laktóz 100 g/L)	0,742	4,45	60	Bioreaktor-szakaszos kultúra rátáplálás
<i>S. cerevisiae</i> LAC4 and LAC12 (NYCY869-A3)	Szintetikus laktóz (150 g/L)	1,5-2,0	8	-	Szakaszos fermentáció

4. Anyag és módszer

Laboratóriumi körülmények vizsgáltuk egy kereskedelembe megtalálható *S. cerevisiae* (CHR-Hansen Viniflora Merit), és a székelyszentléleki Gordon Kft. tejipari egység közeléből izolált élesztő galaktóz metabolizáló képességét alkoholos fermentáció során.

4.1. Fermentációhoz alkalmazott mikroorganizmusok bemutatása, izolálása talajmintából

4.1.1. A kereskedelemből beszerzett *Saccharomyces cerevisiae* (CHR Hansen-Viniflora Merit) élesztő bemutatása

A Viniflora Merit egy kiválasztott *Saccharomyces cerevisiae* törzs, amely erjesztési kapacitással rendelkezik. Ajánlott adagolás: 0,2 g/L (5 kg/250 hL). Felhasználás: 17 v/v % alkoholt tűrő képességgel rendelkezik, a cukrot etanollá képes átalakítani, továbbá nagyon alacsony S02- és illósav termeléssel, valamint 5-8 g/L glicerin termeléssel rendelkezik.

4.2. Az izolált élesztőtörzs bemutatása

4.2.1. Mintavétel

A Gordon Kft. közel 30 éve dolgozza fel a környéken tenyésztett tehenek és kecskék tejét. Az eltelt idő során a környezeti körülményekhez adaptálódott a mikrobiális közösség is. Ebből a megfontolásból a tejfeldolgozó üzem területének két helyszínéről vettünk mintát: - a savótároló tartály kifolyóinál található talajfelszínről és 30 cm mélységből, - a szennyvízülepítő mellett található talajfelszínről és 30 cm mélységből.

A mintákat steril spatulával, fedővel és címkével ellátott mintatároló edénybe (Petri csésze) helyeztük. A vizsgálat időpontjáig 4 °C-on, hűtőben tároltuk.

4.2.2. Mikroba törzsek tenyésztése

Az izoláláshoz használt talajmintát első lépésben hidratáltuk: a talajminta 1 grammját előbb 99 ml vízben szuszpendáltuk, majd az így kapott oldatot homogenizáltuk. A galaktóz metabolizálásának szelekciója érdekében módosított élesztőspecifikus táptalajt (YPG: 10 g/l élesztőkivonat, 20 g/l pepton, 20 g/l galaktózt, 20 g/l agar) tartalmazó Petri csészére szélesztettük a hígított oldat 100 µl térfogatát, a sejtek nevelését Memmert inkubátorban 30 °C-on, 72 órán keresztül végeztük. Az inkubálást követően morfológiai tulajdonságaik alapján szétválasztottuk a

mikrobiális konzorciumot tartalmazó Petri csészék tartalmát, majd az így kapott különálló telepekből négyes szélesztést alkalmazva szintenyészetet készítettünk, és az előbbiekben leírt módon inkubáltuk. A kutatás következő elemzési fázisáig a Petri csészéket 4 °C-on tároltuk.

4.2.3. Mikroba törzsek azonosítása

Az élesztő törzsek azonosítására MALDI-TOF elemzést végeztünk. A baktériumok összfehérjetartalma fajspecifikus, emiatt a mátrix-asszisztált lézer deszorpciós ionizációval kapcsolt tömegspektrometriával használható a baktérium nemzetségek azonosítására. A mikrobák jellegzetes, a taxonra jellemző fehérjeprofillal rendelkeznek, így a MALDI-TOF tömegspektrometria vizsgálat során keletkező tömegspektrum egy adott mikroba fajra, illetve nemzetségre jellemző. Az elemzés során kapott fehérjeprofil alapján a rendszer adatbázisához történő hasonlításal történik az azonosítás.

A 4.2.2. fejezetben leírása szerint előkészített mikroorganizmusok azonosítását MALDITOF (Bruker BioTyper™ MBT™ Smart) tömegspektrofotométeren végeztük. A mintákat (1-1 µL) először a berendezés mintahordozójára vittük fel, amelyre száradás után 1-1 µL térfogatú mátrixot (HCCA - α-ciano-4-hidroxi-fahéjsav) pipettáztunk. A mintákból a műszer lézere (tömeg/töltés intervallumát 0-1700 Da állítva) 100-100 felvétel készítése után átlagolva hozott eredményt. A mérés során a műszer mikroorganizmust meghatározó protokollját követtük, melynek eredményeit a 8. Táblázat szerint értelmeztük.

8. Táblázat MALDI-TOF BioTyper azonosítási értékeinek értelmezési tartománya

Találati érték	Leírás	Jelölés	Szín
2,30-3,00	Nagy valószínűségű fajazonosítás	+++	Zöld
2,00-2,299	Elfogadható nemzetség azonosítás	++	Zöld
1,70-1,99	Valószínű nemzetség azonosítás	+	Sárga
0,00-1,69	Nem megbízható azonosítás	-	Piros

4.3. A savókoncentrátum jellemzése és előkészítése

A kísérlet során alkalmazott savókoncentrátum a tejsavóból reverz ozmózis (RO) szűréssel kiválasztott retentátum volt melynek összetétele 14-16% laktóz.

9. Táblázat RO szűréssel kiválasztott retentátum (savókoncentrátum) összetétele

Retentátum		
Fehérje	(%)	0,610
NPN	(%)	0,870
Laktóz	(%)	12,55
Sav	(%)	0,198
Hamú tartalom	(%)	1,980
Zsírok	(%)	0,050
Össz szolid részecske	(%)	16,253

A fermentációs folyamat elindításának érdekében a savókoncentrátumhoz élesztő tápsót (CHR-Hansen BACTIV-AID 2.0, koncentráció: 0,1 g/L) adagoltunk és pasztörizáltuk (68 °C-on, 30 perc), majd 35 °C-ra hűtöttük. Ezt követően az enzimes hidrolízis elvégzése érdekében laktáz enzimet (CHR-Hansen NOLA™ - Fit 5500, 0,325%v/v) adagoltunk és egy órán át inkubátorban 35 °C-on 200 rpm ráztattuk. A laktáz enzim inaktiválását 68 °C-on 15 perces hőntartással végeztük. Az élesztő törzsek hőoptimumának biztosítása érdekében a savókoncentrátumot 35 °C-ra hűtöttük.

4.4. A lombik tenyészetek előkészítési körülményei

A földből vett és tisztított mintákból a MALDI-TOF elemzések során három mikroorganizmus a *Candida (Pichia)* nemzetséghez tartozott. Mindenik Petri csészéről (B, L, H) háromszoros ismétléssel, egyenként 200 ml savókoncentrátumot Erlenmeyer lombikba oltottuk be. A tenyészeteket 48 óráig 35 °C-on inkubáltuk, ezt követően két óránként spektrofotométeren mértük mindenik tenyészet optikai denzitását.

10. Táblázat: A vizsgált élesztőtörzsek fermentációs eljárása laboratóriumi körülmények között

	Műveletek	Vizsgált élesztő törzsek	
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Candida lambica (Pichia)</i>
1.	Az élesztő törzsek előkészítése.	A kereskedelembe kapható szárított élesztőt (CHR-Hansen Viniflora Merit) fiziológiás (0,9% NaCl) oldattal hidrolizáltam.	A tejfeldolgozó területéről származó talajból izolált, YPG táptalajon tenyésztett és Maldi-Tof elemzéssel azonosított élesztőt előnevelt 100-100 ml YPG tápoldatot tartalmazó Erlenmeyer lombikba (200 ml).

	Műveletek	Vizsgált élesztő törzsek	
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Candida lambica (Pichia)</i>
2.	Koncentrált savó előkészítése	A koncentrált savó a Gordon Kft tejfeldolgozó egységtől származik, melyet reverz ozmózis segítségével koncentráltak. A savókoncentrátumhoz beoltás előtt tápsót (CHR-Hansen BACTIVAID 2.0, 0,1 g/L) adagoltunk, 68 °C-on 30 perces tartással pasztörizáltuk , majd 35 °C-ra hűtöttük . Az enzimes hidrolízis érdekében laktáz enzimet (CHR Hansen NOLA™ - Fit 5500, 0,325 %v/v) adagoltunk) Meghatároztunk a tápoldat pH-ját és a szárazanyag tartalmát.	
3.	Fermentáció	Az előkészített tápoldatból háromszoros ismétléssel indítottuk el a fermentációs kísérletet. Ennek érdekében a tápoldatot (100 ml) beoltottuk külön-külön az előkészített élesztő törzsekkel (hidrolizált <i>S. cerevisiae</i> és előnevelt <i>C. lambica</i>). A fermentációt háromszoros ismétléssel végeztük. A beoltást követően meghatároztuk az optikai denzitás és a szárazanyag tartalmat. A fermentációt 30 °C-on és 200 rpm rázatás mellett végeztük 14 napon keresztül.	
4.	Mintavételezés	Mindenik fermentációs lombikból 14 napon keresztül 4, 8 illetve 12 órás intervallumokban mintát vettünk, melyből a glükóz, galaktóz, etanol, tejsav, ecetsav koncentrációjának meghatározását nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiával (Agilent 1260 Infinity) végeztük. A sejtek számát és életképességét Thoma kamrás sejtszámlálással illetve optikai denzitás méréssel követtük.	

Az eredményekből az élesztősejtek szaporodására, következtettünk. Ebből kiindulva kiválasztottuk a leginkább produktív törzset és kereskedelemben kapható *Saccharomyces cerevisiae* (CHR-Hansen Viniflora Merit) törzzsel párhuzamosan tovább vizsgáltuk az alkoholtermelést fermentáció révén, melynek menetét és eszközhasználatát a 10. Táblázatban részletezzük.

4.5. Analitikai módszerek

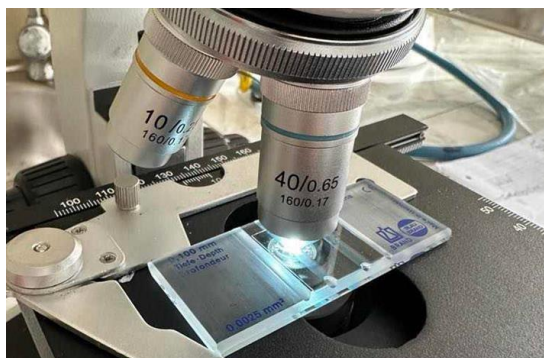
4.5.1. Optikai denzitás és telepszám mérések

Az optikai denzitást spektrofotométeren mértük. Az élesztősejtek sűrűség (OD_{600}) és a sejtszám közötti összefüggések megállapítását az alábbi módszerekkel végeztem.

4.5.2. Az élesztő sejtszám meghatározása

Az élő és halott élesztő sejtszámot mikroszkópon, Thoma kamra segítségével határoztuk meg (sejt/ml). A Thoma-féle osztásnál egy nagy négyzet területe 1 mm^2 , ezek mindegyike 16 kisebb négyzetből áll, így ezek területe $1/16\text{ mm}^2$, további osztással pedig a legkisebb négyzet területe $1/400\text{ mm}^2$.

- A telepképző egységek számának (CFU) meghatározására hígítási sort készítettünk, melynek 1 ml-ét szilárd agar lemezekre oltottuk, inkubáltuk, megfelelő idő elteltével a telepeket megszámláltuk.



2. Ábra Sejtszámlálás Thoma kamra alkalmazásával

4.5.3. A fermentlé összalkohol tartalmának meghatározása

A lombik tenyészetek alkohol tartalmát, desztillációs módszerrel (OIV-MA-AS312-01 szabvány szerint), a fermentációs időszakának 7. és 14. napján is megvizsgáltuk. A desztillációra

alkalmazott laboratóriumi berendezést 3. Ábra szemlélteti, a párlat alkohol tartalmának meghatározására Anton Paar rezgő-U-csöves denzimétert alkalmaztunk.



3.Ábra Desztillációra használt berendezés

4.5.4. A fermentlé glükóz, galaktóz, tejsav, ecetsav és etanol koncentrációjának meghatározása

A fermentáció során vett minták glükóz, galaktóz, tejsav, ecetsav, etanol koncentrációjának meghatározását nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás (High Performance Liquid Chromatography - HPLC) eljárással végeztük. A kalibrációs egyenes elkészítése érdekében öt pontos kalibrációt készítettünk, amit 10. Táblázatban foglaltunk össze.

11. Táblázat Standard oldatok hígítási sorozata

Komponens	Kalibrációs oldatok koncentrációi				
Galaktóz (g/L)	20,0	10,0	5,0	2,5	1,25
Glükóz (g/L)	20,0	10,0	5,0	2,5	1,25
Ecetsav (mM)	50,0	25,0	12,5	6,25	3,125
Tejsav (mM)	50,0	25,0	12,5	6,25	3,125
Hangyasav (mM)	50,0	25,0	12,5	6,25	3,125
Etanol (%v/v)	50,0	25,0	12,5	6,25	3,125

A minták előkészítését centrifugálással 14000 rpm-en 10 percig végeztük, majd a felülúszót 0,45 µm-es szűrőn átszűrtük, és a HPLC mintatartó üvegecskébe -20 °C elemzésig tároltunk.

A HPLC-s mérés körülményei: Agilent 1260 Infinity berendezésen, eluensként 0,008 N koncentrációjú kénsav oldatot használtunk 0,6 ml/perc áramlási térfogat mellett, az injektált minta térfogata 20 µl volt, az alkalmazott oszlop a Hi Plex H 300x7,7 mm (Agilent), az oszlop hőmérséklete 50 °C. A cukrokat RID detektoron, a savakat UV detektoron 210 nm rögzített hullámhosszon mértük.

5. Eredmények és értékelésük

5.1. Mikroba törzsek szelekciójának eredményei

A Gordon KFT tejfeldolgozó üzem talajmintáiból YPG táptalajra szélesztett minták 30 °C hőmérsékleten, 72 órán keresztül inkubálva élesztő telepek fejlődtek ki, melyeket a 3. Ábra szemléltet.



4.Ábra Talajmintából szélesztett és YPG táptalajon nevelt élesztő telepek

A YPG táptalajon kifejlődött élesztő telepekből lombik tenyészeteket készítettünk: 200 ml térfogatú Erlenmeyer lombikba savót tartalmazó tápoldatot és mindenik élesztő telepből oltottam át.

5.2. MALDI-TOF elemzés eredményei

A MALDI-TOF vizsgálatok eredményeit a 5. ábrában összegeztük. Az elemzés eredményként elmondható, hogy a vizsgált élesztőtörzsek fehérje profilja hasonlóságot mutat a *Candida lambica* törzshöz, amely a szakirodalmi adatok szerint metabolizmusa révén képes bontani a glükózt és a galaktózt.

12. Táblázat. A MALDI-TOF tömegspektrometriás azonosítás eredménye

Minta neve	Minta azonosítója	Organizmus (legvalószínűbb)	Pontszám érték	Organizmus (második legvalószínűbb)	Pontszám érték
C7 (+++)(A)	2 (Standard)	<i>Candida lambica</i>	2.12	<i>Candida lambica</i>	2.04
C10 (++)(A)	5 (Standard)	<i>Candida lambica</i>	2.12	<i>Candida lambica</i>	2.15

További azonosítás céljából az élesztő törzseket DNS szerinti azonosításra 16S rRNS szekvencia elemzéssel egy külső laboratóriumot (Eurofins BIOMI Kft.) kerestünk meg. A vizsgálat során a beküldött mintákból sikerült beazonosítani nukleotidok szerinti azonosság alapján a *Pichia fermentans* és *Candida californica* élesztőtörzseket valamint egy *Acetobacter malorum* baktérium törzset.

13. Táblázat: Az izolátumok DNS szerinti azonosításának eredményei

2inta	Találat	Azonosság (%)	Nukleotid eltérés
R	<i>Pichia fermentans</i> ATCC 10651	99,09	3/328
R1	<i>Pichia fermentans</i> ATCC 10651	99,09	3/331
R2	<i>Acetobacter malorum</i>	100	0/650

Tehát a genetikai vizsgálatok is megerősítették, hogy az általunk izolált élesztő törzs a *Candida lambica* ami azonos a *P. fermentans*sal ATCC 10651. A *Saccharomyces cerevisiae* mellett

(62,3%) a *P. fermentans* (46,4%) gyakran jelenik meg a természetes úton erjesztett tejtermékekben ugyanakkor egyike a leggyakrabban tenyésztethető élesztő fajoknak.



5. Ábra *Pichia fermentans* (*Candida lambica* anamorph) forrás: *Pichia fermentans, Viticulture and Enology* (ucdavis.edu)

A *P. fermentans* sejtek morfológiája: a sejtek rügyfakadással szaporodnak, tojásdad vagy ellipszoid alakúak, egyenként, párban vagy rövid láncokban fordulnak elő, egyszerű vagy összetett pszeudohifák. A telepek krémszínűtől a sárgásig változnak, növekedésük gyors, az érettséget 72 óra alatt érik el.

A *P. fermentans*-t mérsékelt etanol termelőként írták le, 5 %v/v körüli értéket ért el, és hatalmas mennyiségű poliszacharidot (akár 278 mg/ml, kb. 40%) és etil-acetátot (akár 256 mg/ml, majdnem hatszor nagyobb) termel a *S. cerevisiae*hoz képest. A *P. fermentans*-t különböző kombinációkban és körülmények között alacsony ecetsav termelőként írták le, a faj nem haladja meg a csak *S. cerevisiae*-vel történő erjesztés során elért savszinteket. Egy nemrégiben végzett vizsgálatban, amelyben egy *P. fermentans* törzset használtak inokulumként 1000 literes kísérleti méretű fermentációhoz, az *S. cerevisiae* kontrollhoz képest az etanol hozam enyhe csökkenését figyelték meg (12,80%v/v a 13,00%v/v-hez képest), valamint az illósavtartalom (20%) és az illékony vegyületek, mint az acetaldehid (10%) és a 2-metil-1-propanol (53%) növekedését (Vincente és mtsai.,2021)

5.3. Lombik tenyészetek analitikai vizsgálatának eredményei

Az élesztőtörzsek izolálását követően kiválasztottuk a két leginkább produktívabb élesztő izolátumot, amely *Pichia fermentans* Majd 3-3 azonos koncentrációjú savó koncentrátumot

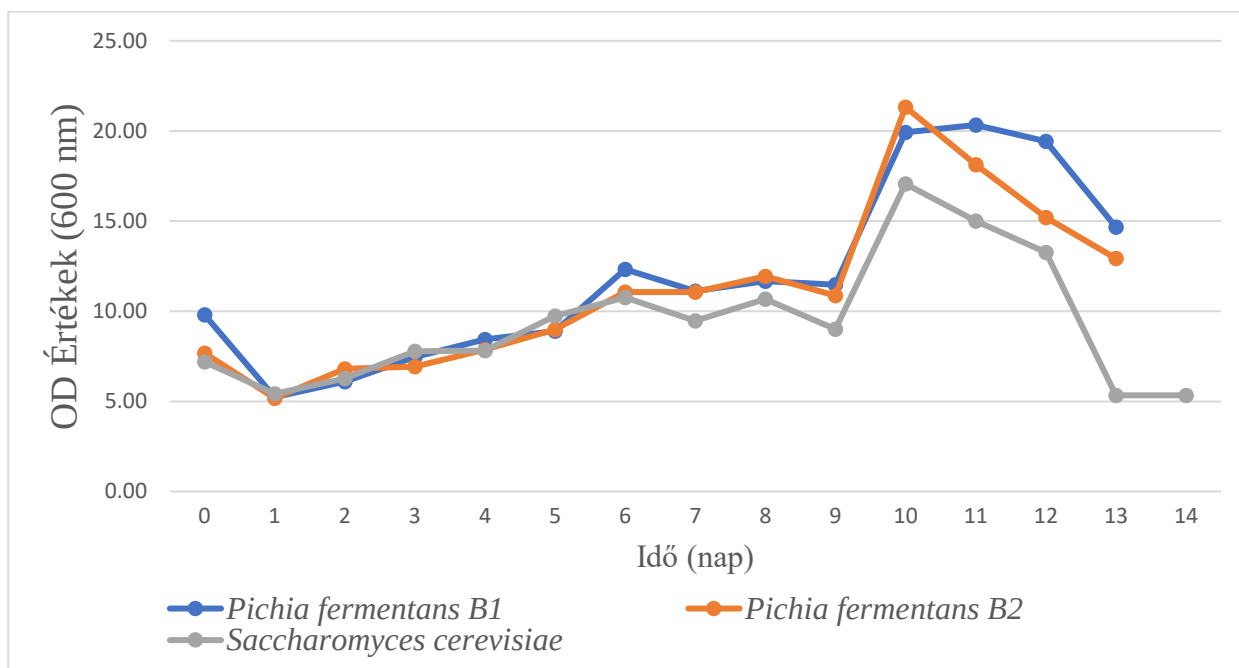
tartalmazó lombikba oltottuk be párhuzamosan a kereskedelembe kapható *S. cerevisiae* élesztő törzssel együtt. Összesen kilenc lombik tenyészet (6. Ábra) fermentációjának alakulását vizsgáltuk.



6.Ábra A *P. fermentans* ATCC 10651 B1, B2 és a *S. cerevisiae* fermentációs mintái

5.4. Optikai denzitás vizsgálatok eredményei

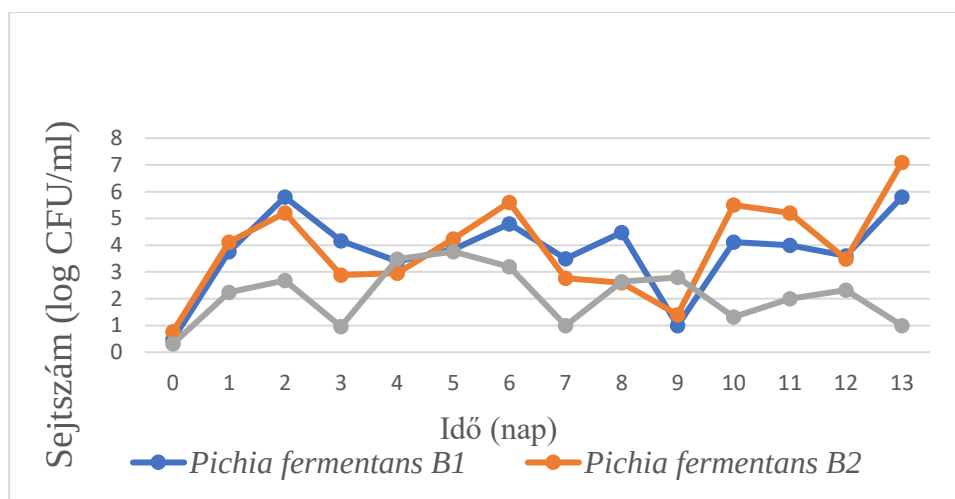
A 14 napig tartó fermentáció során minden nap meghatároztuk az optikai denzitás értékeit, melynek eredményeit a 7. ábrán szemléltetjük. A fermentáció során mindig magasabb OD értékek voltak jellemzőek a *P. fermentans* ATCC 10651 élesztőtörzsekkel beoltott minták esetében, a legmagasabb OD értéket a fermentáció 11 napján mértünk, ezt követően az értékek folyamatosan csökkentek. Megfigyelhető az is, hogy a *P. fermentans* ATCC 10651 B1 és az *P. fermentans* ATCC 10651 B2 minták OD értéke a fermentáció utolsó időszakában jóval magasabb értéket mutattak, mint a *S. cerevisiae* élesztővel beoltott minták.



7. Ábra: Az optikai densitás változása a fermentáció során

5.5. Az élesztő sejtszám meghatározás eredményei

A Thoma kamrás mikroszkópos vizsgálatokat csak egy-egy kiválasztott lombik tenyészetből ami *Pichia fermentans* B1, illetve *Pichia fermentans* B2 és a *Saccharomyces cerevisiae* élesztő gombát tartalmazta, amelyekben két hétig napi rendszerességgel figyeltük a sejtszám alakulását (8. Ábra).

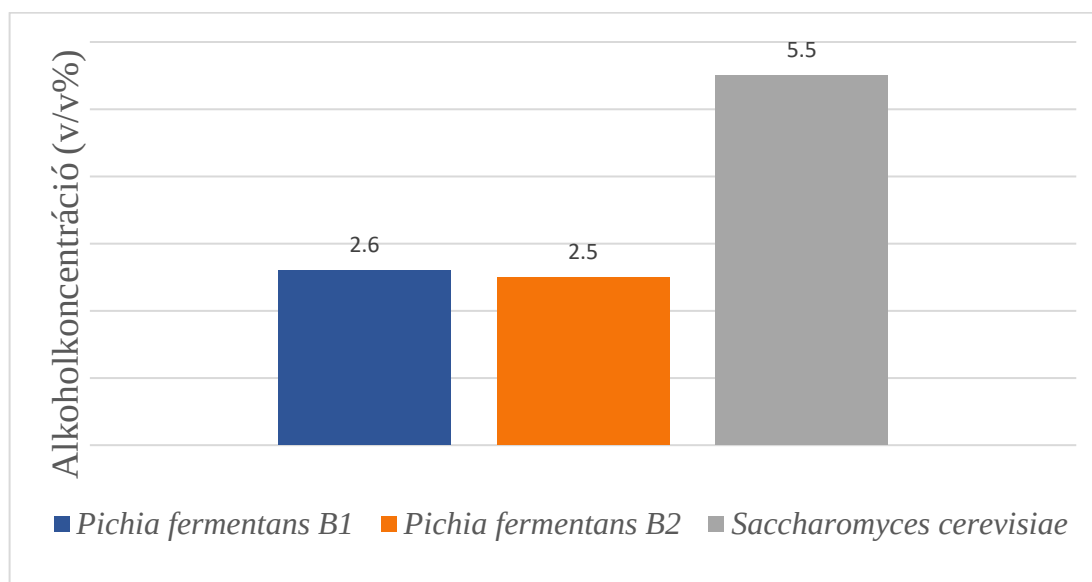


8.Ábra: A sejtszám változása a fermentáció során

Az eltelt idő alatt az élősejtszám a *P. fermentans* ATCC 10651 B2 lombik tenyészetben a kisebb nagyobb hanyatlás ellenére növekvő, míg a *P. fermentans* ATCC 10651 B1 és a *S. cerevisiae* tenyészetek esetében alig emelkedett vagy épp csökkent. Ennek oka a szubsztrátként hasznosított glükóz és galaktóz fogyasztásának köszönhető. Észlelhető az első napokban egy jelentős emelkedés, majd csökkenés, az előbbi a tenyészet számára könnyen hasznosítható cukor hasznosítására utal, majd ennek fogyása sejtszámra is negatívan hatott. A fermentáció következő 7. napján észlelhető újfent egy növekedési hullám, a fermentáció 9. napján látható egy mély zuhanás. A fermentáció 9. napján látható egy mély zuhanás, melynek oka, hogy a tenyészetben megváltoztak a körülmények, ugyanis fermentáció alatt a cukrok felhasználásával melléktermékek is képződtek, alkoholok, savak, melyek a pH és a hasznosítható szubsztrátként is befolyásolják a mikroorganizmusok további életfunkcióját.

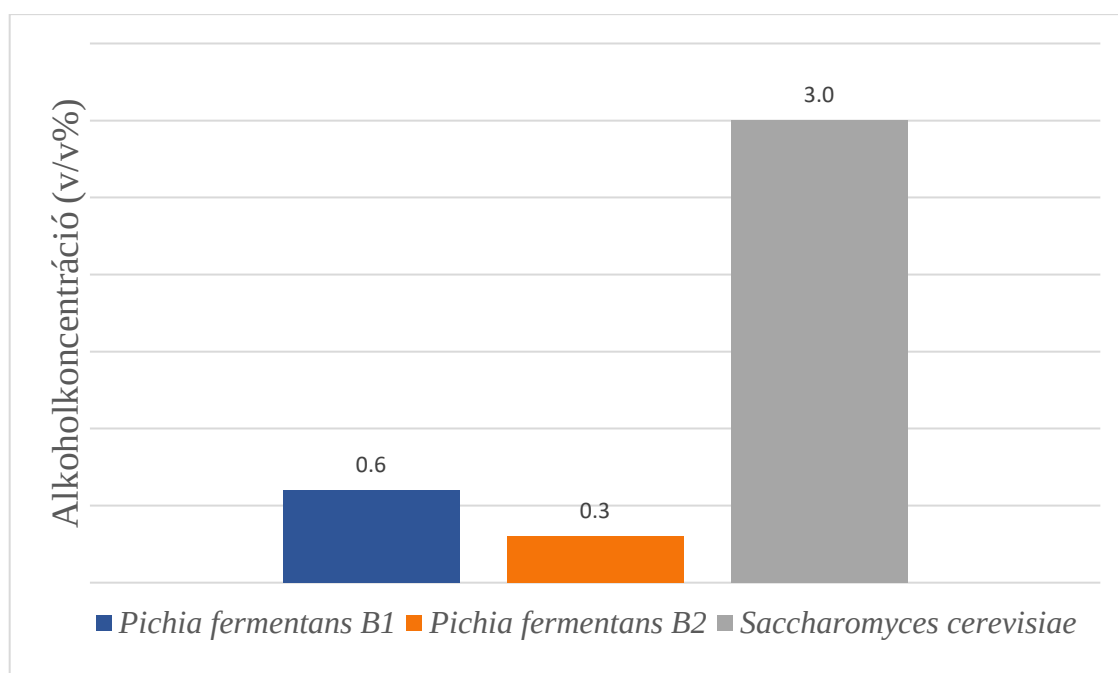
5.6. A fermentált minták összalkohol tartalmának eredményei

A különböző élesztő törzsekkel beoltott minták összalkohol tartalmát desztillációs módszer segítségével határoztam meg. Három minta alkohol koncentrációját a fermentáció 7. illetve 14. napján is (11. ábra) meghatároztam. Azt tapasztaltuk, hogy a fermentáció 7. napján az alkoholkoncentráció, több mint a kétszerese volt (5,5%v/v) a *S. cerevisiae*-t tartalmazó fermentlében, mint a *P. fermentans*-t tartalmazó minta esetében (2,6-2,5 %v/v).



9.Ábra: A minták alkoholtartalmának értékei a fermentáció 7. napján

Ennek ellenére a fermentáció utolsó szakaszában meglehetősen kevés alkohol mennyiséget mértem az első szakaszhoz képest. A minták közül átlagosan *S. cerevisiae* élesztőtenyészetek teljesítettek jobban (3,00%v/v), míg ezzel ellentétben a *P. fermentans* tenyészetek maximum 0,6%v/v-ot alkoholt értek el. Ez azzal magyarázható, ahogy a fermentáció második hetében olyan mikroba törzs (*Acetobacter malorum*) szaporodott el a tenyészetben, amely szubsztrátként hasznosította az eddig előállított alkoholt. Ezt a beoltásra alkalmazott telepek genetikai vizsgálata is igazolja, hisz a három laboratóriumba beküldött telep közül egy *Acetobacter malorum*-nak bizonyult. Azok a minták amelyek *S. cerevisiae* törzzsel voltak beoltva, ezen élesztők a glükózt hasznosítják és melléktermékként etilalkoholt állítanak elő, így nem meglepő, hogy az desztilláció során magas alkoholkoncentráció volt megfigyelhető ezekben a mintákba.

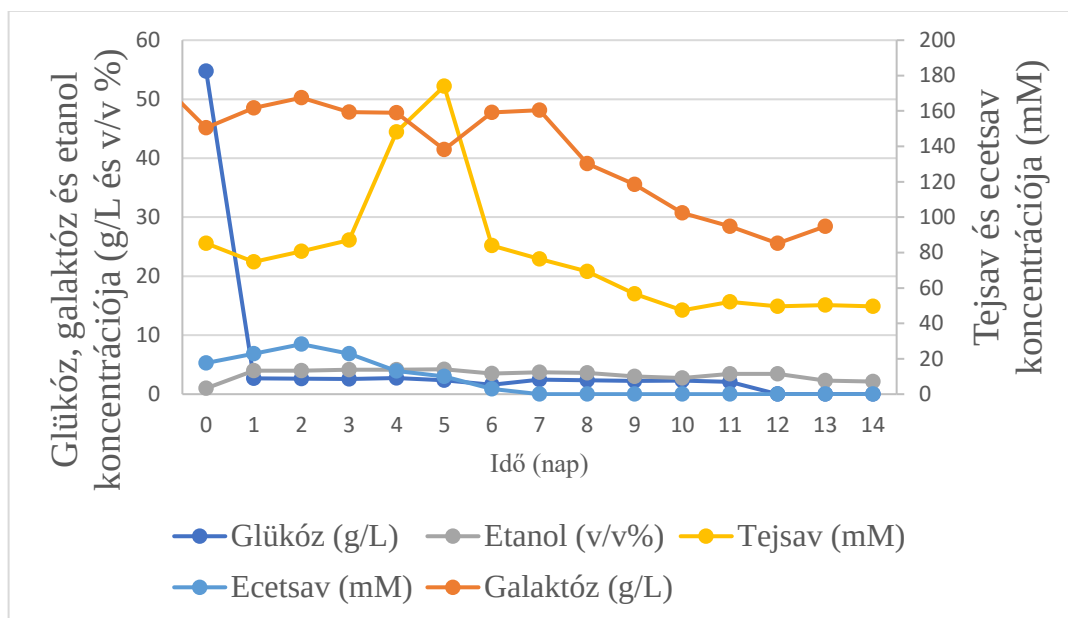


10.Ábra: A minták összalkoholtartalma a fermentáció 14.napján

5.7. A HPLC-mérés eredményei

A nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás eljárással a lombik tenyészetek különböző szerves komponenseit (glükóz, galaktóz, tejsav, ecetsav, etanol) vizsgáltam a fermentáció során. A felhasználható szubsztrátok koncentrációja a fermentáció előrehaladtával folyamatosan csökkent. Ez bizonyítja, hogy a mikrobák hasznosítják ezen szénhidrátokat szubsztrátként metabolizmusuk révén. A fermentáció közepén, azaz 7. napon a felhasználható szénhidrátok közül

a glükóz mennyisége jóval alacsonyabb a galaktózhoz képest. A vizsgált két szubsztrát (glükóz és galaktóz) fermentáció során észlelt koncentrációjának változása mutatja, hogy mindhárom vizsgált élesztőgomba nagyobb preferenciával hasznosítja a glükóz szénforrást, ellenben a galaktózzal.



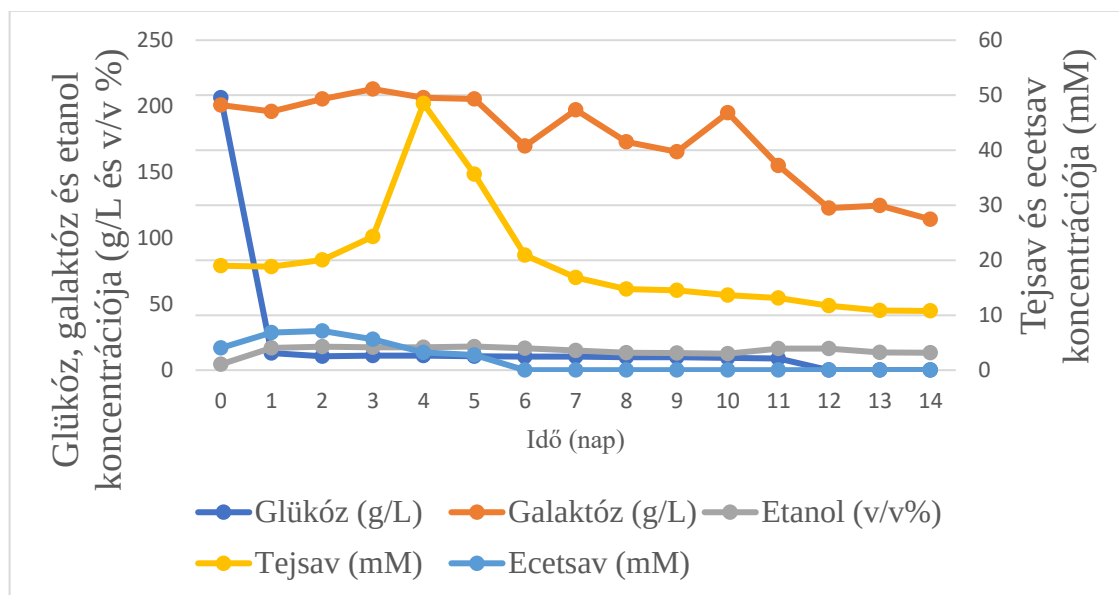
11.Ábra: A koncentrált savó minták *P. fermentans* ATCC 10651 B1 élesztővel való fermentációja során mért glükóz, galaktóz, etanol, tejsav, ecetsav változása

A kapott eredmények azt mutatják (11 ábra), hogy a fermentációs folyamat kezdetén a *P. fermentans* ATCC 10651 B1 minta esetén a kezdeti glükóz koncentráció 54,73 g/L volt, ami az idő függvényében teljesen elhasználódik, vagyis a fermentáció 12. órájáig teljesen elfogy. A szubsztrát kezdetben 53,2 g/L galaktóz koncentrációval rendelkezett, ami folyamatosan csökkent, de lassabban, mint a glükóz, és a fermentációs 14. napján még 28,44 g/L maradt a mintában.

Az etanol koncentrációja a legnagyobb növekedést az 5. napon mutatta (4,22 %v/v) majd a 12. napon, a mért időszak végén az etanol koncentrációja 2,13%v/v értékre csökkent. A tejsav koncentráció az elején csökken, majd az 5. nap hirtelen megugrik, elérve a legmagasabb 174,03 mM koncentrációt, ezután folyamatosan csökkenő tendenciát mutatva. Az ecetsav 17,7 mM koncentrációval kezdődik, majd az 5. nap csökkenni kezd, majd a fermentáció végén teljesen elhasználódik.

A fermentációs folyamat során a glükóz és a galaktóz fogy, vagyis a *P. fermentans* ATCC

10651 szubsztrátként használja a fermentációs folyamatban, amiből tejsavat, a fermentációs idő közepén a legmagasabb, míg az ecetsav csak a korai szakaszban van jelen és gyorsan elhasználódik.



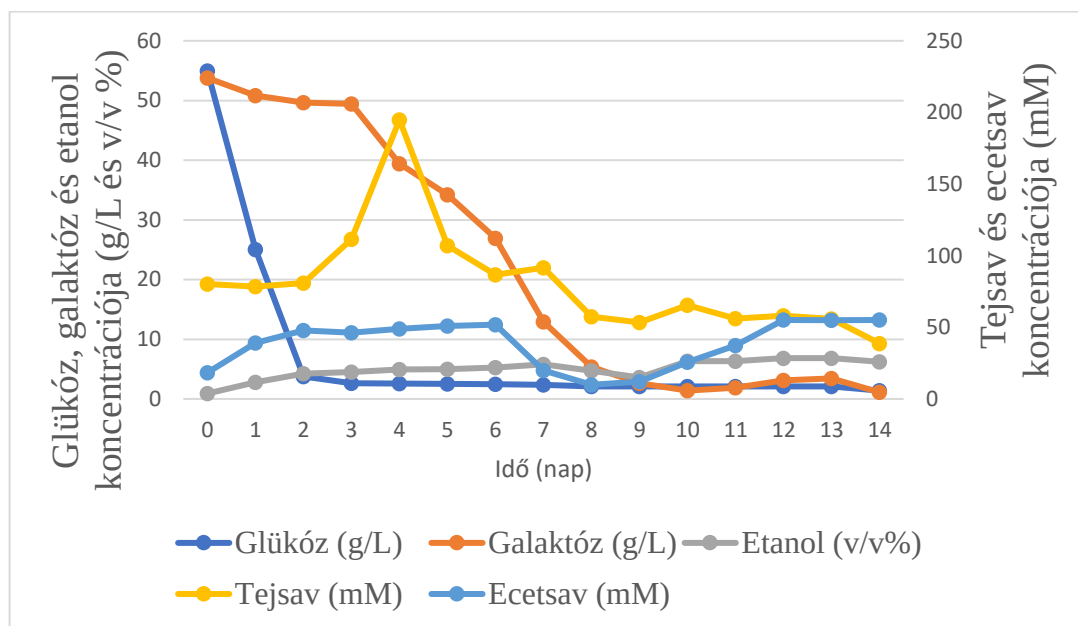
12.Ábra: A koncentrált savóminták *P. fermentans* ATCC 10651 B2 élesztővel való fermentációja során mért glükóz, galaktóz, etanol, tejsav, ecetsav változása

A *P. fermentans* ATCC 10651 B2-nek elnevezett lombikban (12. ábra) a fermentációs folyamat eredményeként elmondható, hogy a glükóz és fermentációs idő kezdetén 49,53 g/L koncentrációban van jelen, amely a 12. napon teljesen elhasználódik. A galaktóz ezzel szemben a legmagasabb értékekkel a 3. napon volt észlelhető 51,12 g/L viszont a 6. naptól folyamatos csökkenés volt megfigyelhető, amíg a 14. napon még mindig jelen volt 27,43 g/L koncentrációban.

Az etanol ebben az esetben gyorsan nőtt, a fermentációs folyamat második napján volt a legmagasabb 4,25%v/v, míg a 14. napi mérésnél 3,16 %v/v-ra csökkent.

A tejsav koncentrációja az első napokban nőtt, majd az 5. napon elérte a maximumot, (201,96 mM) ezt követően a koncentrációja folyamatosan csökken, de még a fermentáció végére is magas 44,86 mM érték látszik. Az ecetsav koncentrációja az első napokban növekszik a 6. napig, ezután gyorsan nullára csökken, így a fermentációs idő végére elhasználódik.

A glükóz és galaktóz a fermentációs folyamat során csökken, miközben az etanol koncentrációja, valamint a tejsav és etanol termelés növekedést mutat, míg az ecetsav a korai szakaszban magas, de gyorsan elhasználódik.



13.Ábra: A koncentrált savóminták *S. cerevisiae* élesztővel való fermentálása során mért glükóz, galaktóz, etanol, tejsav, ecetsav változása

A 13. ábra a *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) élesztő fermentációs folyamatának eredményeit mutatja. Az idő függvényében történő változások folyamatában megfigyelhető, hogy a glükóz koncentráció kezdetben magas 54,99 g/L, de a második naptól egyre csökken, majd a 4. mérésnél stabilitást mutat, majd alig változik, 2,08 g/L, a fermentáció utolsó mért napjában 1,39 g/L-re csökken.

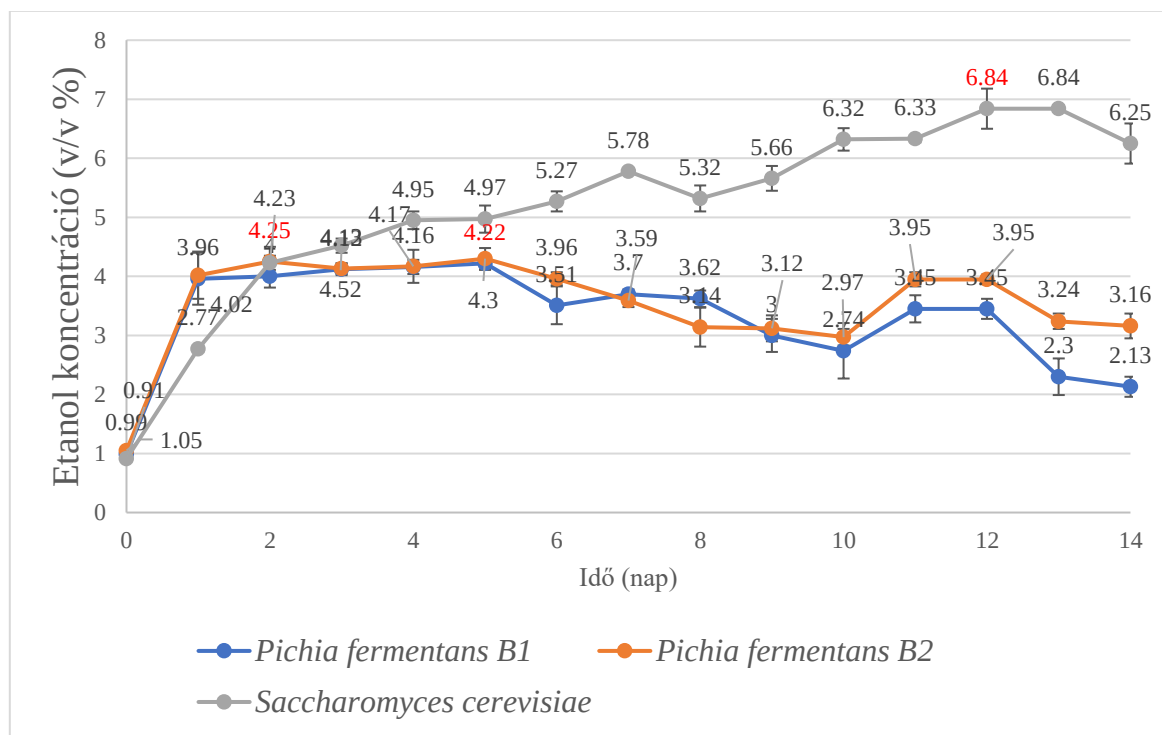
A galaktóz koncentrációja kezdetben szintén magas 53,78 g/L az első naptól csökkenést mutat, a fermentáció végén 1,12 g/L maradt.

Az etanol koncentrációja kezdetben alacsony, de folyamatos növekedést mutat az idő előrehaladtával, a 12. napon eléri a maximumot, ami 6,84%v/v-ot, majd az utolsó mérésnél 6,25% v/v etanolt mutat.

A tejsav koncentrációja kezdetben 80,31 mM, majd az 5. napon gyorsan nő, elérve a maximumot 194,87 mM. Ezután csökkenő tendenciát mutat, a fermentáció végére 38,77 mM értékre csökken.

Az ecetsav koncentrációja növekedést mutat a 7. napig, ami után gyorsan csökken, majd a 12. napon eléri a maximális 55,14 mM koncentrációt.

A glükóz és galaktóz fogyasztásának következményeként elmondható, hogy az etanol koncentrációja növekszik, a tejsav a fermentációs folyamat elején azaz a 4. napon éri el csúcspontját, míg az ecetsav a fermentáció 14. napján.



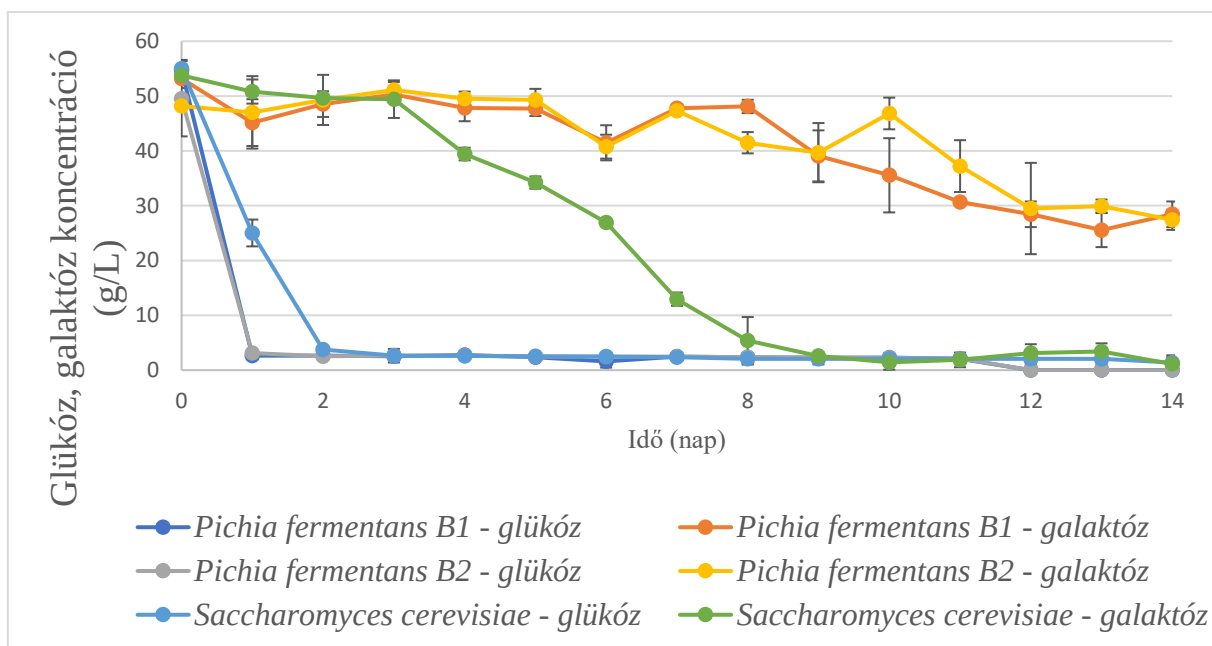
14.Ábra: Az etanol koncentráció változása *S. cerevisiae* élesztővel és a *P. fermentans* ATCC 10651 B1, *P. fermentans* ATCC 10651 B2 élesztővel való fermentálása során (háromszoros ismétlés átlaga és szórása van ábrázolva)

Az etanol koncentráció változása a két élesztőtörzs összehasonlításában azt mutatja (14. ábra), hogy a *P. fermentans* ATCC 10651 B1 a fermentációs folyamat során 4,22%v/v etanolt volt képes előállítani, ezt az értéket a fermentáció 5. napján mértük.

A *P. fermentans* ATCC 10651 B2 esetében az 4,25%v/v volt a legnagyobb mért érték és ebben az esetben ezt a maximális értéket az élesztő már a harmadik nap produkálta.

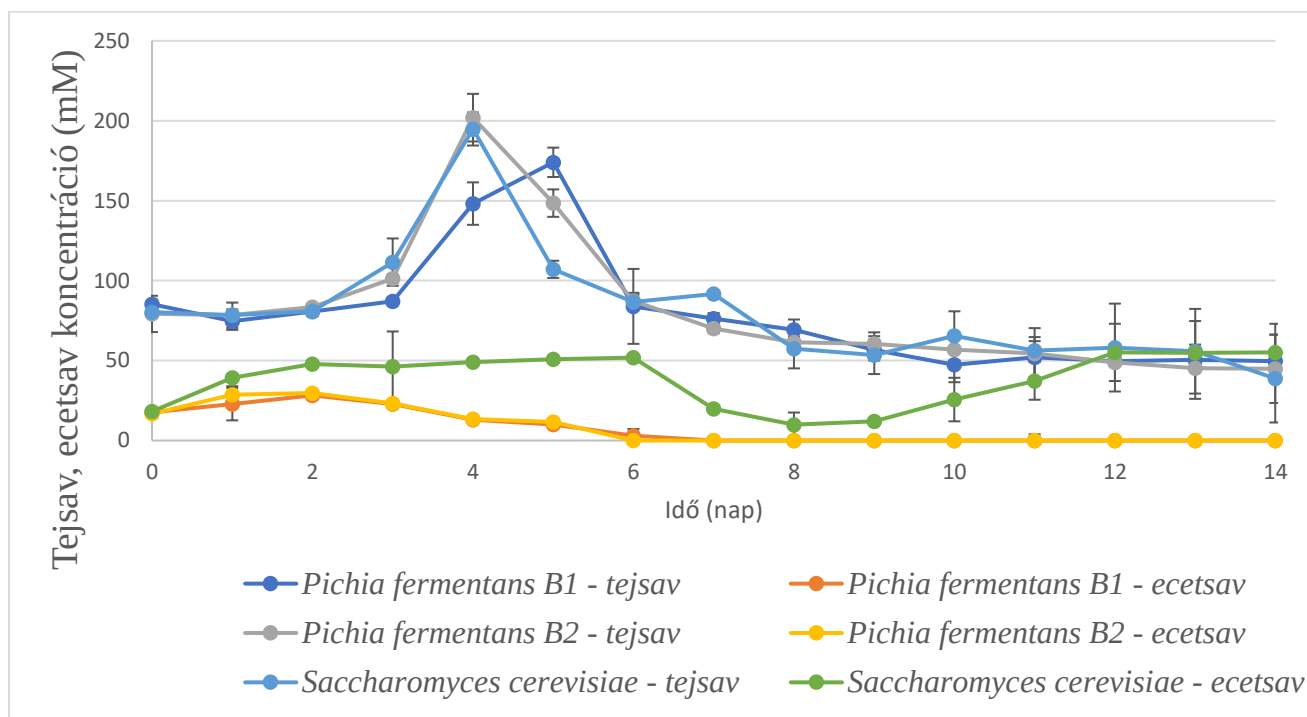
A *Saccharomyces cerevisiae* esetében volt a legnagyobb etanol termelés, amely elérte a 6,84%v/v etanol termelést, ezt a maximális értéket ez az élesztő törzs a fermentáció 12. napján érte el.

Tehát az alkalmazott élesztők közül a kereskedelemben található élesztő teljesített a legjobban, a *P. fermentans* ATCC 10651 B2 élesztő törzs csak 37,86%-al kevesebb etanolt volt képes előállítani. Sajnos a *P. fermentans* ATCC 10651 esetében a szakirodalmi értékeknél (5%v/v, Vincente és mtsai.,2021) is kisebb alkohol termelést tudtunk mérni (4,25%v/v), amit legfőképp a nem teljesen anaerob körülményeknek is tulajdoníthatunk.



15.Ábra: A szubsztrát fogyasztás a *S. cerevisiae* a *P. fermentans* ATCC 10651 B1 és a *Pichia fermentans* ATCC 10651 B2 élesztővel való fermentálása során (háromszoros ismétlés átlaga és szórása van ábrázolva)

Mindhárom vizsgált élesztőtörzs esetében elmondható, hogy képesek úgy a glükóz, mint a galaktóz metabolizálására (15. Ábra). Nagyobb fogyasztást mutat a glükóz esetében már a kezdeti időszakban is. A *P. fermentans* ATCC 10651 hasonló fogyasztási mintázatot mutatott mindkét típus esetében, amely főleg a 12. és 13. napon volt drasztikusabb a galaktózt nézve. A *Saccharomyces cerevisiae* galaktóz fogyasztási képessége már a kezdeti időszakban megmutatkozik, majd 53,79 g/L-ről 1,12 g/L-re csökken a negyedik napon. A *P. fermentans* ATCC 10651 B1 és B2 hasonló fogyasztási mintázatot mutat mind a glükóz, mint a galaktóz esetében, viszont gyorsabban fogyasztja a glükózt mint a galaktózt. A *Saccharomyces cerevisiae* a kezdeti időszakban jelentős mértékben fogyasztja a glükózt és a galaktózt is.



16.Ábra: A tejsav és ecetsav változása a *S. cerevisiae* a *P. fermentans* ATCC 10651 B1 és a *P. fermentans* ATCC 10651 B2 élesztővel való fermentálása során (háromszoros ismétlés átlaga és szórása van ábrázolva)

Mindhárom vizsgált élesztőtörzs képes tejsavat és ecetsav termelésre, a *P. fermentans* ATCC 10651 B1 és B2 törzsek hasonló mintázatot mutatnak, enyhén eltérő mértékben és sebességgel (16. Ábra). A *Saccharomyces cerevisiae* esetében az ecetsav termelés nagyobb tendenciát mutatott, és az idő előrehaladtával növekszik, viszont a tejsav hasonló mértékben változik.

6. Összefoglalás

Az elvégzett kísérlet alapján a következő következtetésre jutottam:

Pichia fermentans ATCC 10651 és a *Saccharomyces cerevisiae* hasonló metabolikus aktivitást mutat, a glükóz és galaktóz bontó tulajdonságaik tekintetében.

Mindkét törzs alkalmas melléktermékként etanolt, ecetsavat, tejsavat termelni

Az alkohol termelés szempontjából a *Saccharomyces cerevisiae* produktívabbnak bizonyult, mint a *Pichia fermentans* ATCC 10651.

A glükózt szénforrásként mindkét élesztőgomba nagyobb preferenciával fogyasztja.

A *Pichia fermentans* ATCC 10651 és a *Saccharomyces cerevisiae* esetében elmondható hasonlóság a metabolikus aktivitás tekintetében, viszont időben és a termékek koncentrációjában vannak különbségek.

A talajminták, amelyek közül kiválasztottunk egy törzset MALDI-TOF elemzés és DNS szekvencia elemzés segítségével kerültek azonosításra. A MALDI-TOF elemzés alapján vizsgált törzsek fehérje profilja *Candida lambica* törzshöz volt hasonló. A DNS szekvencia elemzések megerősítették, hogy a vizsgált élesztő törzsek közül a *Pichia fermentans* ATCC 10651 (*Candida lambica* anamorph) és *Candida californica* voltak a legjelentősebbek, míg egy baktérium törzs, az *Acetobacter malorum* is jelen volt.

A fermentációs kísérletek során három lombik tenyészetet állítottunk elő, melyeket *Saccharomyces cerevisiae* és *Pichia fermentans* ATCC 10651 B1, és *Pichia fermentans* ATCC 10651 B2 törzsekkel oltottunk be. Az optikai denzitás és sejtszám mérések alapján a *Pichia fermentans* ATCC 10651 törzsek magasabb növekedési arányt mutattak a fermentáció első szakaszában, azonban a későbbi szakaszban az optikai denzitás értékek csökkentek, valószínűleg a szubsztrát kimerülése miatt.

Az alkohol termelés, ami kutatásunk fő célkomponensét képezte kiderült, hogy a *Saccharomyces cerevisiae* élesztőtörzs a legnagyobb etanol koncentrációt érte el, 6,84%v/v, míg a *Pichia fermentans* ATCC 10651 B1 és B2 törzsek 4,22%v/v és 4,25%v/v etanolt termeltek, ami alacsonyabb a *Saccharomyces cerevisiae* esetében. Az *Acetobacter malorum* jelenléte az etanol csökkenését eredményezte a fermentáció későbbi szakaszában, mivel az a baktérium az alkoholt ecetsavvá alakította át.

A HPLC mérések arra engednek következtetni, hogy mindhárom élesztőtörzs képes volt glükóz és galaktóz hasznosítására, azonban a glükózt gyorsabban fogyasztották a galaktózzal szemben. Az etanol koncentráció a fermentáció első szakaszában növekedett, majd csökkent, majd a tejsav koncentráció az 5. napon érte el a csúcspontot.

A vizsgált élesztőtörzsek közül a *Saccharomyces cerevisiae* mutatta a legjobb fermentációs teljesítményt, különösen az etanol termelés szempontjából. *Pichia fermentans* ATCC 10651 törzsek szintén képesek voltak etanolt termelni, alacsonyabb koncentrációban, amelyet az *Acetobacter malorum* jelenléte befolyásolta, ami miatt a fermentáció későbbi szakaszában jelentősen csökkent.

A jövőbeni kutatások során érdemes lenne mélyebb vizsgálatokat végezni a fermentációs körülményeket illetően, valamint az *Acetobacter malorum* teljes mellőzése a folyamatból.

7. Köszönetnyilvánítás

Ezúton köszönetet szeretnék mondani elsősorban *dr. Salamon Rozália Veronika* Egyetemi docensnek, a laboratóriumban végzett munkámat végig követte, szakmai jótanácsokkal látott el, és emberileg is támogatott. Köszönöm a türelmét, a megértést és a szakmai tanácsokat, és *dr. Albert Csilla* egyetemi docenseknek, akik a nehéz időszakban is mindig biztatott és segítettek. *dr. Bartos Hunornak* aki a laborban végig segített.

Köszönöm a Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem Csíkszeredai Karának, ezen belül is az Élelmiszertudományi Tanszéknek és oktatóinak, hogy biztosították a kutatásomhoz szükséges eszközöket, valamint a székelyszentléleki Gordon Prod Kft.-nek a nyersanyagokat a kísérletek elvégzéséhez.

8. Szakirodalmi jegyzék

1. Ayed, L., Mhir, S., Asses, N. 2023. *Sustainable whey processing techniques: Innovations in derivative and beverage production*, Food bioscience., 102642. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102642>
2. Baldasso, C., Barros, T.C., Tessaro, I.C. 2011. *Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration*, In: Desalination, 1-3: 381-368 <https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.05.055>
3. Benali, M., Kudra, T. 2010. *Process Intensification for Drying and Dewatering*. Drying Technology. Inter-American Drying Conference. Canada. 10: 1128-1156.
4. Broadway, A. A., Mohd, N.A., Singh, A., Singh ,M. 2015. *Techlnology for manofacturing of whey beer by incorporating malt wort*. The allahabad farmer, 71: 34-37.
5. Brown, K., Harrison, J., Bowers, K. 2018. *Production of oxalic acid from Aspergillus niger and whey permeate*. Water Air Soil Pollut, 229 (5).
6. Buchanan, D., Martindale, W., Romeih, E., Hebishy, E. 2023. *Recent advances in whey processing and valorisation: Technological and environmental perspectives*. International of Dairy Technology, 2 (76): 291-308.
7. Carvalho, P., Costa, C.E., Baptista, S. L., Domingues, L. 2021. *Yeast cell factories for sustainable whey-to-ethanol valorisation towards a circular economy*. Biofuel Research Journal, 32: 1529-1549.
8. Chandrapala, J., Duke, M. C., Gray, S. R. 2015. *Properties of acid whey as a function of pH and temperature*. Journal of Dairy Science, 98: 4352–4363.
9. Cuartas-Uribe, B., Alcaina-Miranda, M. I., Soriano-Costa, E., Bes-Piá, A. 2007. *Comparison of the behavior of two nanofiltration membranes for sweet whey demineralization*, Journal of Dairy Science, 3: 1094-1101.
10. Csapó, J. 2014. *Tejipari technológia*. Scientia. Kolozsvár.

11. Dietrich, K.R. 1988. Whey containing malt wort as a raw material for preparation of malt whey beer. *Brauwissenschaft*, 26.
12. Domingues, L., Guimarães, P.M.R., Oliveira, C. 2010. *Metabolic engineering of Saccharomyces cerevisiae for lactose/whey fermentation*. Bioengineered Bugs. 1(3):164-171.
13. Dudziak, K., Szczerba, H., Komoń-Janczara, E., Waśko, A., Targoński, Z. 2020. *A novel biocatalyst, Enterobacter aerogenes LU2, for efficient production of succinic acid using whey permeate as a cost-effective carbon source*. Biotechnology of Biofuels, 13: 96.
14. Flinois, J. C., Dando, R., Padilla-Zakour, O. I. 2019. *Effects of replacing buttermilk with yogurt acid whey in ranch dressing*. Journal of Dairy Science, 9 (102): 7874–7883.
15. Fonseca, G.G., Heinzle, E., Wittmann, C. és Gombert, A.K. 2008. *The yeast Kluyveromyces marxianus and its biotechnological potential*. Applied Microbiology and Biotechnology, 79: 339–354.
16. Gutiérrez-Méndez, N. 2020. Introductory Chapter: Lactose. In: *Lactose and Lactose Derivatives*. IntechOpen. London. pp: 104-112.
17. Harrison, M.-C., LaBella, A.L., Hittinger, C.T., Rokas, A. 2021. *The evolution of the GALactose utilization pathway in budding yeasts*. Trends Genet, 38: 97–106.
18. Hughes, P., Risner, D., Goddik, M.L. 2018. *Whey to vodka. Whey - biological properties and alternative uses*. IntechOpen. London. pp:80-87.
19. Kankanamge, K. N. M. 2018. *Physico-chemical and functional properties of whey proteins as affected by the source of whey*. PhD. College of Health & Biomedicine, Faculty of Health, Engineering and Science. Victoria University, Melbourne.
20. Kazalac, J. 2021. *Potencijal korištenja sirutke u proizvodnji alkoholnog pića*. Diplomski rad. University of Zagreb. Faculty of Agriculture. Zagreb. pp:12-22.
21. Kelsall, D.R., Lyons, T.P. 2003. *Practical management of yeast: Conversion of sugars to ethanol*. In: Jacques KA, Lyons TP, Kelstall DR (eds). Alcohol Textbook. Nottingham University Press, pp. 121-133.
22. Koushki, M., Jafari, M., Azizi, M. 2012. *Comparison of ethanol production from cheese whey permeate by two yeast strains*, Journal of Food Science Technology, 49 (5):614-619.

23. Mucsi, I. 2016. *A Tejsavó felhasználása és marketingje*. Improvement of production and management processes. In: Dairy- cheese sector and dairy waste Management – why-whey. Tudás Alapítvány Hodmezővásárhely.
24. Mulcahy, E. M. 2017. *Preparation, Characterisation and functional applications of whey protein-carbohydrate conjugates as food ingredients*. PhD Thesis, University College Cork. Cork.
25. OECD-FAO. 2016. *Dairy and Dairy Products*. Agricultural Outlook 2016–2025. OECD. Paris. pp: 111-129.
26. Panghal, A., Patidar, R., Jaglan, S. 2018. *Whey valorization: Current options and future scenario – A critical review*. Nutrition & Food Science, 3: 520–535.
27. Parekh, J.V. 2007. *Small-scale utilization of whey*. In: Dairy India-sixth edition, P.R. Gupta and Sharad Gupta (ed). Dairy India Yearbook, New Delhi, pp. 245-246.
28. Pirayre, A., Duval, L., Blugeon, C., Firmo, C., Perrin, S., Jourdier, E., Margeot, A., Bidard, F. 2020. *Glucose-lactose mixture feeds in industry-like conditions: A gene regulatory network analysis on the hyperproducing Trichoderma reesei strain Rut-C30*. BMC Genom, 21:885.
29. Risner, D., Shayevitz, A., Haplala, K., Meunier-Goddik, L., Hughes, P. 2018. *Fermentation and distillation of cheese whey: Carbon dioxide-equivalent emissions and water use in the production of whey spirits and white whiskey*, Journal of Dairy Science, 4: 2963-2973
30. Risner, D., Tomasino, E., Meunier-Goddik, L., Hughes, P. 2019. *Volatile aroma composition of distillates produced from fermented sweet and acid whey*. Journal of Dairy Science, 1: 02-210.
31. Román András. 2010. *Tejsavó nano- és diaszűrésének vizsgálata*. PhD értekezés, Budapest, pp. 5-121.
32. Sattin, E., Andreani, N.A., Carraro, L., Lucchini, R., Fasolato, L., Telatin, A., Balzan, S., Novelli, E., Simionati, B., Cardazzo, B. 2016. *A multi-omics approach to evaluate the quality of milk whey used in ricotta cheese production*. Frontiers in Microbiology, 7 (1272)
33. Varela, J.A., Montini, N., Scully, D., Van der Ploeg, R., Oreb, M., Boles, E., Hirota, J., Akada, R., Hoshida, H., Morrissey, J.P. 2017. *Polymorphisms in the LAC12 gene explain*

lactose utilisation variability in Kluyveromyces marxianus strains. FEMS Yeast Research, 17(3).

34. Vicente, J., Calderón, F., Santos, A., Marquina, D., Benito, S. 2021. *High Potential of Pichia kluyveri and Other Pichia Species in Wine Technology*. International Journal of Molecular Sciences. 22(3): 1196.
35. Xia, J., He, J., Xu, J., Liu, X., Qiu, Z., Xu, N., Su, L. 2021. *Direct conversion of cheese whey to polymalic acid by mixed culture of Aureobasidium pullulans and permeabilized Kluyveromyces marxianus*. Bioresour Technolgy, 125443 (337).
36. Zoppellari, F., Bardi, L., 2013. *Production of bioethanol from effluents of the dairy industry by Kluyveromyces marxianus*. New Biotechnology, 30 (6):607-613.
37. Zotta, T., Solieri, L., Iacumin, L., Picozzi, C., Gullo, M. 2020. *Valorization of cheese whey using microbial fermentations*. Applied Microbiology and Biotechnology, 104 (7): 2749–2764.