

Saccharomyces cerevisiae szaporodáskinetikájának vizsgálata tejipari mellékterméken

Sulyok Erika – Biró Györgyi – Tamás János

Debreceni Egyetem Agrár- és Gazdálkodástudományok Centruma, Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar,
Víz- és Környezetgazdálkodási Intézet, Debrecen
sulyokerika@agr.unideb.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

Évente Földünkön becslések szerint 185–190 millió tonna tejsavó képződik, és ez a mennyiség a következő években várhatóan tovább fog emelkedni. Nagy szárazanyag-tartalma miatt a tejsavó jelentős biokémiai oxigénigénnyel rendelkezik, ezért az élelmiszeripar egyik legkörnyezetszennyezőbb mellékterméke lenne, ha szennyvízként tekintenénk rá. A környezetvédelmi okon túl a savó hasznosításának szükségességét alátámasztja, hogy alkotórészei közül több is rendelkezik az emberi szervezet számára kedvező élettani hatással. A kukorica ill. burgonya, valamint a tej feldolgozása során az élelmiszeriparban nagy mennyiségben keletkező olcsó melléktermékek, jelentős mennyiségű keményítőt és tejsavót tartalmaznak, melyeket magas biológiai oxigénigényük miatt veszélyes hulladékként tartanak számon. Egy részük megsemmisítésre kerül a szennyvíztárolókban, pedig ezek a termékek kiváló táptalajok lehetnének a mikroorganizmusok szaporodásához. A hagyományos táptalaj optimalizálási módszerek táptalaj- és időigényesek és nem képesek a valós optimum meghatározására az optimalizálásban résztvevő faktorok kölcsönhatása miatt.

Kulcsszavak: *Saccharomyces cerevisiae*, szénhidrátforrás, laktóz

SUMMARY

By guess, annual volume of milk whey is 185–190 million tons and this volume probably will increase next years. Whey has significant biochemical oxygen demand due to its high organic matter content so whey as sewage is one of the most pollutant by-products in the food industry. Apart from environmental pollution, benefit of several whey constituents for human health is another reason to utilize whey. Corn and potato, as well as the processing of milk in the food industry in large quantities of by-products generated by low cost, substantial quantities of starch and lactic acid, which are due to high biological oxygen demand are considered as hazardous waste. Some of them are destroyed sewage storage tanks, and those products are excellent substrates for the growth of microorganisms could be. The traditional nutrient solution optimization methods are solution and time-consuming and are not able to determine the real optimum because of the interaction of factors involved.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, carbohydrate source, lactose

BEVEZETÉS

Minden élőlény igyekszik anyagcseréjét a lehető leghatékonyabban működtetni. Ehhez alapvető feltétel a gazdaságosság: csak azok a lebontó enzimek szintetizálódnak, melyekre de facto szükség van, és csak olyan mennyiségben, hogy fedezzék a fellépő folyamatok aktuális energia- és redukálóerő igényét. A szénváz lebontásának szabályozásakor a legfontosabb szempont az időegység alatt felszabaduló nettó energia mennyisége: a sejt a leggyorsabban hasznosuló szénforrást fogja felvenni és oxidálni, a lassabban hasznosuló lebontásához szükséges enzimek szintézise pedig gátlódik. A jelenséget karbon katabolikus szabályozásnak (represszió) nevezzük; szigorúan transzkripciós szintű folyamat. Jellemzően a glükózzal lehet kiváltani. Glükóz szénforrás jelenlétében tehát azok a gének, melyek más szénforrások lebontásához szükséges enzimeket kódolnak, gátolva vannak. A mechanizmus meglétét nagy számú mikrobán sikerült kimutatni. Eukarióták közül a *Saccharomyces cerevisiae*-ben tanulmányozták behatóan (Gencedo, 1998; Trumbly, 1992). A mikrobákkal megvalósított technológiák alapvető művelete a mikrobák elszaporítása. Ha az élesztősejteket folyékony táptalajba oltjuk, azt tapasztaljuk, hogy kezdetben a sejtszám nem változik. Egy idő múlva a szaporodás szemmel is látható, a szaporodási sebesség először gyorsul, majd egy ideig nem változik, végül csökkenni kezd

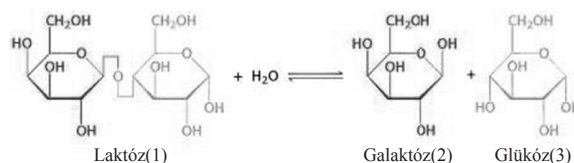
(Szép, 1979). Ha a populáció sejtszámát vagy koncentrációját az idő függvényében ábrázoljuk, jellegzetes S alakú szaporodási görbét kapunk, ami szakaszokra tagolható. A környezethez való alkalmazkodás idején a sejtek még nem szaporodnak, ez a lappangási (lag) szakasz. Az anyagcsere-folyamatok felgyorsulását követően indul meg a szaporodás, ami rövid átmeneti gyorsulási szakasz után az exponenciális szaporodási szakaszba jut, amelyben állandó fajlagos sebességgel folytatódik. Ez a szakasz optimális feltételek közt is csak néhány óráig tart, majd az említett korlátozó tényezők miatt a szaporodási sebesség csökken (lassulási szakasz), amíg a keletkező új sejtek és az elpusztuló sejtek száma kiegyenlítődik és a sejtpopuláció az állandósult (stacionárius) szakaszba jut. Hosszabb idő után az elpusztult sejtek száma már meghaladja a szaporodókat, és a sejtszám fokozatosan csökken (pusztulási szakasz) (Deák, 2006). Mikroba sejteket szaporíthatunk abból a célból is, hogy a végtermék maga a sejttömeg legyen, az állati takarmányozásra vagy emberi fogyasztásra alkalmas biomassa előállítására céljából. Az élelmiszeripari alkalmazások közül jól ismert a sütőélesztő vagy a különböző starter kultúrák előállítása, mely utóbbira jó példa a *Saccharomyces cerevisiae* törzseinek borászati és söripari starterként való előállítása (Kevei et al., 1999). A gombák tápanyagait mindazok a vegyületek jelentik, melyek a környezetből számukra közvetlenül vagy közvetett módon rendelkezésre állnak.

A tápanyagok csoportosítása: 1. szénforrások; 2. nitrogénforrások; 3. vitaminok és más növekedési anyagok; 4. ásványi elemek. Az élesztőgombák növekedéséhez, szaporodásához a szükséges tápanyagforrások közül a szén- és a nitrogénforrásokat kell kiemelni. A heterotróf szervezetek számára a szénhidrátok jelentik a legfontosabb szénforrást. Ezek mono-, oligo- vagy poliszacharidok formájában egyedülálló szerepet játszanak a természetben. A széles körben rendelkezésre álló szénforrásokat az egyes gombafajok nem egyformán tudják hasznosítani. A hasznosítási hatékonyság megítélésének egyik legegyszerűbb és egyben legkönnyebb módja a sejtszaporodás vizsgálata, hogyan alakul annak időbeli görbéje. A monoszacharidok széles körét a legtöbb gombafaj nagymértékben hasznosítja, míg ugyanezekből a cukrokból felépülő nagyobb molekulákat (pl. keményítő) már sokkal kevésbé, melyet e molekulák hidrolíziséhez szükséges enzim(ek) hiánya okoz (Manczinger et al., 2003). A mezőgazdasági és élelmiszeripari termelés során számos olyan melléktermék keletkezik, melyek potenciális környezetszennyező anyagok, semlegesítésük hatalmas anyagi forrásokat emészt fel. Ilyen melléktermék a sajt- és túrófeleségek gyártása során, világszerte éves szinten több mint $1,45 \times 10^8$ tonna mennyiségben keletkező tejsavó, melynek kémiai oxigénigény értéke igen jelentős, a magas érték a tejcukor tartalomán kívül, a tejsavó fehérje- és zsírtartalmának is köszönhető (Castillo, 1990). A tejsavó toxikus anyagoktól mentes és fehérjében (0,8 w/v %), tejcukorban (4,8 w/v %), vitaminokban (130 mg/l), valamint ásványi anyagokban (3,5 g/l) gazdag. Megközelítőleg 4,8%-kal a laktóz a leggyakoribb szénhidrát a tejsavóban (Csapó és Csapóné, 2002). A tejsavó, ha szennyvízként tekintünk rá, az élelmiszeripar egyik legkörnyezetszennyezőbb mellékterméke. Magas szervesanyag-tartalma miatt (BOI=30 000–50 000 mg/l, KOI=60 000–80 000 mg/l) nagyon fontos környezetvédelmi problémát jelent. Megoldás lenne olyan mikrobiális rendszerek kidolgozása, melyek alkalmasak ennek a gyakorlati problémákat jelentő szennyvíznek a kezelésére. Ezen nyersanyagok felhasználhatók fermentációs célra, azonban esetleg tartalmazhatnak olyan összetevőket, amelyek zavarják a fermentációt. Nagy léptékű ipari felhasználásuk pedig mennyiségi szempontból korlátozottan megoldható (Thomsen, 2005; Peters, 2007).

A tejsavónak számos alkalmazási területe létezik. A tejsavóban vagy az ultraszűrt savó szűrletében lévő laktóz élesztőgombák segítségével etil-alkohollá fermentálható, erre a célra leggyakrabban a *Kluyveromyces fragilis* és a *K. marxianus* törzseit alkalmazzák. A savóból anaerob körülmények mellett metán fejleszhető, ami biogázként használható. A tejcukrot, mint szénforrást az élesztők aerob feltételek mellett szubsztrátként hasznosítják saját sejtjük felépítéséhez. A savón szaporodva így az élesztők a laktózt fehérjévé konvertálják (a képződő biomassza kb. 50% fehérjét tartalmaz) – ez az ún. egysejt-fehérje (single cell protein, SCP) – mely az állati takarmányozásban és emberi táplálékként is felhasználható. A laktóz tehát megújuló szénforrás, hátránya viszont, hogy a gombák közül lassan, egyes gazdaságilag fontos fajok [a legtöbb élesztő, *S. cerevisiae*; *A. niger* – (Elshafei és Abdel-Farah, 2001)] pedig egyáltalán nem tudják hasznosítani. Ennek evo-

lúciós magyarázata lehet, hogy a laktóz a „legfiatalabb” cukor a természetben. A sajtavóban található laktóz enzimes hidrolízise a legígéretesebb biotechnológiai eljárás szénhidrát tartalmának kiaknázására (Sienkiewicz és Riedel, 1990). Laboratóriumi kísérletekben rázatott kultúrákkal is kedvező eredményeket értek el. Barrett et al. (2004) a laktóz lebontásában közreműködő enzimeket vizsgálta rázatott kultúrákban (30 °C, 36 h, 150 l/min). A laktóz diszacharid, amelynek monoszacharid komponensekre kell hidrolizálnia, hogy felszívódhasson. A laktózt bontó laktáz enzim a glükóz és a galaktóz közötti β 1-4 kötéseket bontja (1. ábra). A többi szénhidrátbontó enzim esetében a monoszacharid felszívódás határozza meg a felszívódás sebességét. A laktáz esetében más a helyzet, mert viszonylag lassabban hidrolizál, így a laktáz aktivitása limitálja a felszívódást. A lassúbb hidrolízis mellett a laktáz egyik sajátossága, hogy a szubsztrát-tejcukor bevitel növelésével nem növelhető az aktivitása, szemben pl. a szacharázzal, amelynél a nagyobb szacharózbevitel az enzim aktivitását fokozza. Sajátossága még a laktáz enzimnek, hogy az összes diszacharidbontó enzim közül a legszerűlekegyebb, s különböző patológiás hatásokra a legkönnyebben károsodik (Bodánszky, 2000).

1. ábra: A β -galaktozidáz laktóz lebontásának sematikus ábrázolása



Forrás: Belem és Lee, (1998); Gekas és Lopet-Leiva, (1985)

Figure 1: The β -galactosidase Schematic breakdown of lactose Lactose(1), Galactose(2), Glucose(3), Source: Belem and Lee (1998), Gekas and Lopet-Leiva (1985)

ANYAG ÉS MÓDSZER

A kísérlet során alkalmazott, törzsgyűjteményből származó élesztőfajt a Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Karának, Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye (NCAIM) bocsátotta rendelkezésünkre. Az élesztő faj fenntartása és szaporítása O.G.Y.E (LabM) szelektív táptalajon történt, mely 5 g élesztő kivonatot, 20 g dextrózt, 0,001 g biotint és 12 g agart, valamint oxytetracycline nevű kiegészítő antibiotikumot tartalmaz. A tápközeget 115 °C-on 10 percig sterilizáltuk, majd lehűtöttük 47 °C-ra és hozzáadtunk egy fioła antibiotikumot. A táptalaj elkészítése után lemezeket öntöttünk és élesztővel beoltottuk. Az elkészített lemezeket 25 °C-on 5 napig inkubáltuk.

Szénforrás asszimilációjának vizsgálata

A vizsgálat annak megállapítására irányult, hogy szénforrásként egyetlen vegyületet tartalmazó táptalajon szaporodik-e a vizsgált élesztő, azaz rendelkezik-e annak asszimilációjához szükséges enzimmrendszerrel. A vizsgált három szénforrás monoszacharidok közül a

D-glükóz, ill. melasz, diszacharidok közül a laktóz volt. A vizsgálat kivitelezése auxanográfias ill. agardiffúziós módszerrel történt. A használt táptalaj szintetikus szénforrásmentes agar volt, mely 5 g ammónium-szulfátot, 1 g kálium-dihidrogén-foszfátot, 0,5 g magnézium-szulfátot, 20 g agart, valamint 1000 ml vizet tartalmazott. A táptalajt 115 °C-on 10 percig sterilizáltuk és pH-ját 4,5-re állítottuk. A 45 °C-ra lehűtött táptalajba a *Saccharomyces cerevisiae* 24 órás tenyésztéséből készített vizes szuszpenzióját adagoltunk és Petri-csészékbe öntöttük, majd az agar megszilárdulása után egy 10 mm átmérőjű steril célszerszámmal lyukat fűrtünk az agarba. Az agarba kialakított lyukakba, a vizsgálandó szénforrás 150 µl-nyi vizes szuszpenzióját pipettáztuk. A Petri-csészénket 25 °C-os inkubátorba helyeztük és 5 nap múlva értékeltük. A lyukakba helyezett szénforrás bediffundált a táptalajba és kifejtette hatását az élesztő szaporodására. A serkentő hatás mértékét a lyukak körül kialakult „szaporodási zóna” nagyságából következtettük.

A laktóz enzim hidrolízise

Számtalan technológia létezik a laktóz enzimatisz hidrolízisére. A Gekas és Lopez-Leiva (1985) által használt szakaszos (batch) eljárást alkalmaztuk. A kívánt mennyiségű laktóz hidrolízisét 30 °C-on, 36 órán keresztül végeztük 80 mg *Aspergillus oryzae* gomba által termelt laktáz enzimmal, mely után a reakciót melegeitessel megállítottuk, melynek következtében az enzim denaturációja – és ebből eredően az enzim-aktivitás elvesztése – áll fenn. Ezen kívül az enzim a termék alkotójává válik az eljárás után.

A *Saccharomyces cerevisiae* szaporodási sebességének meghatározása különböző szénforrást tartalmazó táptalajokon

A kísérlet során laktózt, hidrolizált laktózt, tejsavót, enzimatisz hidrolizált tejsavót és kontrollként glükózt tartalmazó táptalajokat állítottunk be, melyek 1000 µl élesztő szuszpenziót tartalmaztak. Fermentációs alaptáptalajként szintetikus szénforrásmentes folyékony táptalajt alkalmaztunk, kiegészítve az adott szénhidrát 5 g-nyi mennyiségével. A fermentálást 5 napig végeztük 30 °C-on, rázógépen (180 rpm) aerob körülmények között. A fermentáció beállításakor a kezdeti élesztősejt-szám 1×10^6 sejt/ml volt, melynek változását naponta háromszor mértük Bürker-kamra segítségével, annak érdekében, hogy az élesztő szaporodás-kinetikáját nyomon kövessük, eközben folyamatosan mértük a táptalaj szénhidrát-tartalmának csökkenését refraktométerrel.

EREDMÉNYEK

A kísérletek értékelése során a vizsgált tényezők (pl. sejt-szám növekedés) időbeni változásának szemléltetéséhez a Excel táblázatkezelő programot alkalmaztuk. Az auxanográfias, ill. agardiffúziós vizsgálatokból kiténik, hogy a *Saccharomyces cerevisiae* a glükózt tartalmazó lyuk körül tudott elszaporodni a leginkább, míg a laktózt tartalmazó Petri-csészében semmilyen fejlődést nem mutatott. Viszont az enzimatisz úton hidrolizált laktózon az élesztő szaporodása jól kivehető (2. ábra).

2. ábra: Az agardiffúziós vizsgálat eredményei

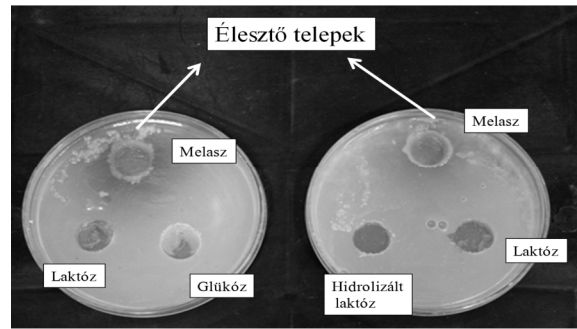


Figure 2: The agar diffusion test results Lactose(1), Galactose(2),

A sejt-számlálással kapott eredmények értékelése céljából az lg szaporodási görbék felvételéhez az élesztő sejt-számának 10-es alapú logaritmusát ábrázoltuk az idő függvényében. A tejsavón fermentált élesztő szaporodási görbéje alapján megállapíthatjuk, hogy az egységnyi idő alatt mérhető sejt-szám viszonylag kis mértékben növekedett, ami valószínűleg a tejsavóban található kis mennyiségű monoszacharidoknak köszönhető. A *Saccharomyces cerevisiae* sejt-számának alakulását tejsavó táptalajon a 3. ábra szemlélteti.

3. ábra: A *Saccharomyces cerevisiae* sejt-számának és szénhidrát-tartalmának változása tejsavóban

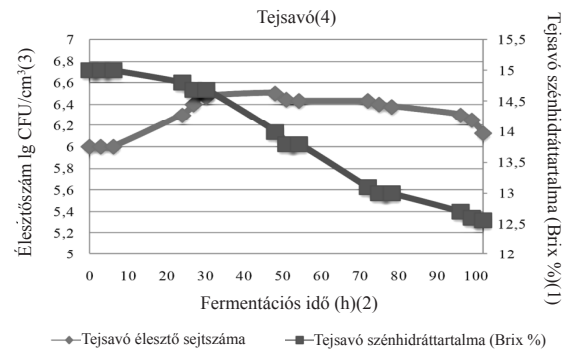


Figure 3: The *Saccharomyces cerevisiae* cells and the number of changes of carbohydrate content

Whey carbohydrate content (% Brix)(1), Fermentation time (h)(2), Number lg yeast CFU cm⁻³(3), Whey(4)

A hidrolizált tejsavóban mért élesztő sejt-szám változásában jelentős növekedés volt tapasztalható. Az első és második nap, azonos időpontokban vett mintákban nem mértünk jelentős növekedést. A 6. órától a 24. óráig a sejt-szám nem változott. Az 30. órától kezdődően a szaporodás szemmel is látható, a szaporodási sebesség hirtelen felgyorsult, majd a 72. óránál érte el a maximumot, ami megfelel a normál élesztőgyártási gyakorlatnak. A grafikonokon együttesen ábrázoltuk a szénhidrát tartalom alakulását, mely összhangban van azzal az élesztőszám növekedés mérési eredményeivel, miszerint az élesztőszám a szénhidrát-tartalom folyamatos felhasználását követően jelentősen emelkedik, majd annak felhasználást követően csökkenni kezd. A szénhidrát-tartalom csökkenés tehát az élesztők folyamatos szaporodására, energiaigényére utalnak (4. ábra).

4. ábra: A *Saccharomyces cerevisiae* sejtszámának és szénhidrát tartalmának változása hidrolizált tejsavóban

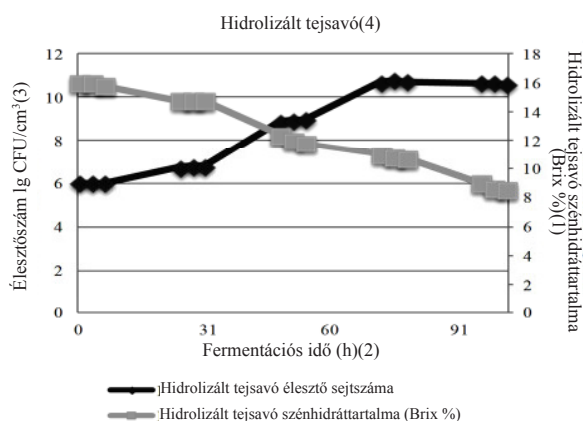


Figure 4: The *Saccharomyces cerevisiae* cells and the number of changes of carbohydrate content of hydrolysed

Hydrolysed whey carbohydrate content (% Brix)(1), Fermentation time (h)(2), Number Ig yeast CFU cm⁻³(3), Hydrolysed whey(4)

A vizsgálat során fermentációs alapanyagként használt tejipari melléktermékről elmondható, hogy felhasználhatóságához nélkülözhetetlen az előkezelés, mely többek között enzim hidrolízissel történhet. Ennek hiányában az élesztő számára nincs hozzáférhető energiaforrás, vagyis szaporodás nem következik be. Viszont az alkalmazott hidrolízis jól használható, alternatívaként szolgál a tejsavó gazdaságos felhasználását illetően.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A publikáció elkészítését a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 számú projekt támogatta.

A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

IRODALOM

- Barrett, E.–Stanton, C.–Zelder, O.–Fitzgerald, G.–Ross, R. P. (2004): Heterologous expression of lactose- and galactose-utilizing pathways from lactic acid bacteria in *Corynebacterium glutamicum* for production of lysine in whey. *Applied and Environmental Microbiology*. 70. 5: 2861–2866.
- Belem, M. A. F.–Lee, B. H. (1998): Production of bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: an alternative. *Cit. Rev. Food Sci. Nutr.* 38: 598–656.
- Bodánszky H. (2000): Tejcukorérzékenység. [In: Barna M. (szerk.) A táplálékallergiáról mindenkinek.] Magyar Táplálékallergia és Táplálékintolerancia Adatbank Kiadványa. Budapest. 177–184.
- Castillo, F. J. (1990): Lactose metabolism by yeasts. *Yeast biotechnology and biocatalysis*. 297–320.
- Csapó J.–Csapóné Kiss Zs. (2002): Tej és tejtermékek a táplálkozásban. Budapest. Mezőgazda Kiadó. 464.
- Deák T. (2006): Élelmiszer-mikrobiológia. Mezőgazda Kiadó. Budapest. 37–53.
- Elshafei, A. M.–Abdel-Fatah, O. M. (2001): Evidence for a non-phosphorylated route of galactose breakdown in cell-free extracts of *Aspergillus niger*. *Enzyme Microb. Technol.* 29: 76–83.
- Gancedo, J. M. (1998): Yeast carbon catabolite repression. *Microb. Mol. Biol. Rev.* 62: 334–361.
- Gekas, V.–Leiva, L. (1985): Hydrolysis of lactose: A literature Review. *Process Biochemistry*. Ricknansworks. 20: 2–12.
- Kevei F.–Kucsera J.–Manczinger L.–Vágvolgyi Cs. (1999): Mikrobiológia II. Jate Press. Szeged.
- Manczinger L.–Pócsi I.–Vetter J. (2003): Gombaélettan. [In: Jakucs E.–Vajna L. (szerk.) Mikológia.] Agroiinform Kiadó és Nyomda. Budapest. 139–195.
- Peters, M. (2007): Raw materials. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 105: 1–30
- Sienkiewicz, T.–Riedel, C. L. (1990): Whey and whey utilization: Possibilities for utilization in agriculture and foodstuffs production. Gelsenkirchen-Buer. Berlin. Verlag Th. Mann. 379.
- Szép I. (1979): Az élesztő- és szeszgyártás mikrobiológiája. [In: Gyimesi J.–Sólyom L. (szerk.) Élesztő- és szeszipari kézikönyv.] Mezőgazdasági Könyvkiadó. Budapest. 21–59.
- Thomsen, H. (2005) Complex media from processing of agricultural crops for microbial fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 68: 598–606.
- Trumbly, J. R. (1992): Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 6: 5–21.