

SZENT ISTVÁN EGYETEM

**SAVÓ PERMEÁTUM ENZIMES ÉS MIKROBIOLÓGIAI
KONVERZIÓJA HOZZÁADOTT ÉRTÉKET
KÉPVISELŐ TERMÉKEK ELŐÁLLÍTÁSA CÉLJÁBÓL**

DOI: 10.54598/000350

PÁZMÁNDI MELINDA

Budapest

2020

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: **Simonné Dr. Sarkadi Livia**
Egyetemi tanár, DSc
SZIE, Élelmiszertudományi Kar
Élelmiszerkémia és Táplálkozástudomány Tanszék

Témavezetők: **Dr. Maráz Anna**
Professzor emeritus, CSc
SZIE, Élelmiszertudományi Kar
Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszék

Dr. Kovács Zoltán
Egyetemi tanár, PhD
SZIE, Élelmiszertudományi Kar
Élelmiszeripari Műveletek és Gépek Tanszék

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	1
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	5
3.1. A TEJSAVÓ	5
3.1.1. A tejsavó keletkezésének és felhasználásának történelmi háttere	5
3.1.2. A tejsavó összetétele	6
3.1.3. Tejsavó kezelésének lehetőségei	8
3.1.3.1. Natív savó felhasználása	8
3.1.3.2. Savó szeparációja és a komponensek elkülönített felhasználása	9
3.2. GOS SZINTÉZIS.....	12
3.2.1. Az enzimes GOS szintézis jellemzői.....	12
3.2.2. Az enzimes GOS szintézis műveletei.....	15
3.2.3. Savó permeátum, mint GOS prekursor	16
3.2.4. GOS szintézis downstream műveletei	18
3.2.4.1. Mono- és diszacharidok szelektív fermentációja	20
3.2.4.2. GOS fermentáció élesztőkkel: előnyök és hátrányok.....	22
3.2.4.3. GOS fermentáció tejsavbaktériumokkal: lehetséges új csoport	22
3.3. TEJSAVBAKTÉRIUMOK	22
3.3.1. Tejsavbaktériumok élelmiszeripari jelentősége	22
3.3.2. Tejsavbaktériumok anyagcserefolyamatai: tejsavas fermentáció	23
3.3.2.1. Tejsavizomerek élettani hatásai.....	24
3.3.2.2. A tejsavbaktériumok alternatív metabolikus útvonalai	25
3.3.3. Tejsavbaktériumok sajátosságai: metabolikus flexibilitás	26
3.3.4. Anyagcsere útvonalak szabályozása: karbon katabolit represszió	27
3.3.5. Szénhidrát felvétel és hasznosítás	28
3.3.5.1. Monoszacharidok: glükóz és galaktóz-felvétele és hasznosítása	28
3.3.5.2. Di- és oligoszacharidok - laktóz és GOS - felvétele és hasznosítása	29
3.3.6. Fehérjék, peptidek felvétele és hasznosítása	30
3.3.7. Tejsavó alapú, tejsavas erjesztett italok.....	32
3.3.7.1. Előnyök, fogyasztói hozzáállás	32
3.3.7.2. A savó fermentált ital-célú feldolgozása	33
3.3.7.3. Savó és savó permeátum tejsavas fermentációja: mikrobiológiai szempontok.....	34

3.3.7.4. Savó permeátum, mint fermentációs közeg: lehetőségek és korlátok	35
.....	35
4. ANYAG ÉS MÓDSZER	36
4.1. FELHASZNÁLT ANYAGOK	36
4.1.1. Demineralizált (sómentes) tejsavó	36
4.1.2. β -galaktozidáz	36
4.1.3. Alkalmazott tejsavbaktérium törzsek	36
4.1.4. Alkalmazott <i>Kluyveromyces</i> törzsek	37
4.1.5. Tápközegek és pufferek.....	37
4.1.5.1. Tejsavbaktérium törzsek tápanyagigényének meghatározása	37
4.1.5.2. Savó permeátum tejsavas fermentációjának vizsgálata.....	38
4.1.5.3. Szerves nitrogénforrások tejsavas fermentációra gyakorolt hatásának vizsgálata	39
4.1.5.4. GOS szirup tejsavas fermentációjának vizsgálata.....	39
4.1.5.5. Nyers GOS szirup <i>Kluyveromyces</i> törzsekkel végzett szelektív fermentációjának vizsgálata	41
4.2. MÓDSZEREK.....	41
4.2.1. Tejsavó membrános frakcionálása	41
4.2.1.1. Membránszűrő berendezés	41
4.2.1.2. Ultra- és diaszűrés	42
4.2.1.3. Nanoszűrés	43
4.2.2. Enzimes GOS szintézis	43
4.2.3. Savó permeátum tejsavas fermentációjához szükséges mikrobiológiai alapok kidolgozása	44
4.2.3.1. Tejsavbaktérium törzsek tápanyag igényének meghatározása	44
4.2.3.2. Savó permeátum tejsavas fermentációjának vizsgálata.....	44
4.2.3.3. Szerves nitrogénforrások tejsavas fermentációra gyakorolt hatásának vizsgálata	44
4.2.4. Nyers GOS szirup tejsavas fermentációjának kidolgozása	45
4.2.4.1. Tejsavbaktérium törzsek mono-, diszacharid és GOS fermentációs képességének screenelése.....	45
4.2.4.2. Szelektált tejsavbaktérium törzsek GOS fermentációjának vizsgálata	45
.....	45

4.2.5. Nyers GOS szirup Kluyveromyces törzsekkel végzett fermentációjának vizsgálata	45
4.3. ANALITIKAI MÓDSZEREK.....	45
4.3.1. Membránszeparáció nyomon követése: törésmutató, pH, vezetőképesség, fehérjetartalom.....	45
4.3.2. Biolacta N5 aktivitásának meghatározása	46
4.3.3. HPLC analízis.....	46
4.3.3.1. Szénhidrát-analízis	46
4.3.3.2. Szerves savak analízise	47
4.3.4. Tejsavbaktériumok szaporodásának vizsgálata.....	47
4.3.4.1. Sejtszám meghatározása optikai denzitás alapján	47
4.3.4.2. Élősejtszám meghatározása szélesztéssel.....	48
4.3.5. pH mérése.....	48
4.3.6. Aminosav-összetétel meghatározása	48
4.3.7. Teljes aminosavmennyiség meghatározása.....	48
4.3.8. Aminosav-felhasználás mértékének meghatározása	49
4.3.9. A fermentációs felülúszó β -galaktozidáz aktivitásának meghatározása ..	49
4.3.10. D-tejsav mérése	50
4.3.11. Tejsavbaktériumok szelektív mono- és diszacharid fermentációs képességének screenelése.....	51
4.3.12. Tejsavbaktérium és Kluyveromyces törzsek szelektív mono- és diszacharid fermentációs teljesítményének értékelése által	51
4.4. STATISZTIKAI ELEMZÉS.....	52
4.4.1. A GOS szintézis kísérleti beállítás robusztusságának vizsgálata	52
4.4.2. A pH GOS szintézisre gyakorolt hatása	52
4.4.3. Tejsavbaktériumok fermentációs jellemzőinek statisztikai értékelése.....	53
4.4.4. Adat vizualizáció	53
5. EREDMÉNYEK.....	54
5.1. SAVÓ FRAKCIONÁLÁSA MEMBRÁNSZŰRÉSSEL	54
5.1.1. Savó oldat ultra- és diaszűrése	55
5.1.2. Nanoszűrés	57
5.2. ENZIMES GOS SZINTÉZIS BIOLACTA N5 ENZIMMEL.....	58
5.2.1. Savó permeátum, mint GOS szubsztrát: a kísérleti beállítás robusztusságának ellenőrzése.....	59

5.2.2. Membránszűrés és GOS szintézis: optimális szubsztrát koncentráció.....	60
5.2.3. pH állítás GOS szintézisre gyakorolt hatása	63
5.3. MIKROBIOLÓGIAI ALAPOK KIDOLGOZÁSA SAVÓ PERMEÁTUM TEJSAVAS FERMENTÁCIÓJÁHOZ.....	64
5.3.1. A vizsgált tejsavbaktérium törzsek aminosav és vitamin szükségletei	64
5.3.2. Savó permeátum tejsavas fermentációjának vizsgálata.....	64
5.3.3. Különböző szerves nitrogénforrások hatása a savó permeátum tejsavas fermentációjára	67
5.3.4. Szerves nitrogénforrások típusának hatása a tejsavbaktériumok szénhidrát és nitrogén metabolizmusára	70
5.3.4.1. Szelektált törzsek fermentációs profilja savófehérjét tartalmazó tápközegben.....	71
5.3.4.2. Szelektált törzsek fermentációs profilja kazein és szója peptont tartalmazó tápközegekben	73
5.4. TEJSAVBAKTÉRIUM TÖRZSEK SZELEKTÍV GOS FERMENTÁCIÓJA, FERMENTÁLT ITAL ELŐÁLLÍTÁSÁNAK CÉLJÁBÓL	78
5.4.1. Tejsavbaktérium törzsek GOS szirupból történő szelektív mono- és diszacharid felhasználásának screenelése	78
5.4.2. A fermentációs közeg pufferelésének hatása a szelektált tejsavbaktérium törzsek szaporodására és metabolikus sajátosságaira.....	82
5.4.2.1. Szelektált tejsavbaktérium törzsek szaporodása.....	82
5.4.2.2. β -galaktozidáz aktivitás a fermentációs felülúszóban	85
5.4.2.3. Szénhidrát profilok alakulása a GOS szelektív fermentációja során	86
5.4.2.4. Szerves sav termelés.....	91
5.4.2.5. A szelektív fermentáció végterméke, mint funkcionális ital alapja ..	93
5.5. MONO- ÉS DISZACHARIDOK SZELEKTÍV ELTÁVOLÍTÁSA KLUYVEROMYCES TÖRZSEK ALKALMAZÁSÁVAL NAGY TISZTASÁGÚ GOS ELŐÁLLÍTÁSA CÉLJÁBÓL	94
5.5.1. <i>Kluyveromyces</i> törzsek szaporodása minimál sókkal és élesztőkivonattal kiegészített GOS szirup fermentációja során	95
5.5.2. <i>Kluyveromyces</i> törzsek szénhidrát felhasználása minimál sókkal és élesztőkivonattal kiegészített GOS szirup fermentációja során	96
7. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	100
6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	102

8. ÖSSZEFOGLALÁS	104
9. SUMMARY	108
MELLÉKLET	112
M1 IRODALOMJEGYZÉK.....	112
KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS.....	144

1. BEVEZETÉS

A sajtgyártás elsődleges mellékterméke a nagy mennyiségben keletkező tejsavó. A globálisan termelt savómennyiség éves szinten meghaladja a 100 millió tonnát, mely a tejipar bővülése következtében további 1-2%-os növekedést mutat.

A tejsavó fő összetételét tekintve kisebb mennyiségű ásványi só és zsírtartalma mellett kb. 5% laktózból és 0.7% savófehérjéből áll. Szervesanyag tartalma miatt biológia és kémiai oxigénigénye rendkívül magas, ezért a szennyvízrendszerekbe történő bocsátása előtt kezelése elengedhetetlen. A savókezelés lényeges gazdasági terhet ró a tejipar szereplőire, azonban komponensei potenciálisan alkalmazhatók számos élelmiszeripari és biotechnológiai folyamatban. Ezért az elmúlt években a savókezelési technológiák értéknövelő alternatíváinak kiaknázása tudományos, és ipari érdeklődés tárgyává vált.

A korszerű savókezelési technológiák általában a savó frakcionálásán alapulnak. A két fő komponens (laktóz és savófehérje) szétválasztását azok további konverziója vagy értékesítése követi. A savófehérjék számos előnyös techno-funkcionális és élettani jellemzővel rendelkeznek: jó habképzők, valamint fogyasztásuk bizonyítottan pozitív élettani hatással bír. Ennek következtében leggyakrabban magas piaci értékű étrendkiegészítőként kerülnek forgalomba.

A laktóz hasznosítása azonban korlátozott. Lehetséges az élelmiszeriparban történő felhasználása, azonban nagyobb koncentrációban alkalmazva könnyen kristályosodáshoz vezet, illetve a laktóz-érzékeny fogyasztók növekvő aránya miatt alkalmazása fogyasztási cikkekben korlátozott. További lehetőség a fermentációs iparban szénhidrát forrásként történő hasznosítása. Ilyen jellegű alkalmazás során azonban általában előzetes hidrolízis szükséges a laktóz-hasznosító mikrobák alacsony száma, illetve az egyéb szénforrásokkal (glükóz, maltóz, szacharóz) összehasonlított alacsony sejthozamok miatt.

Az utóbbi időben a prebiotikus oligoszacharidok fokozott tudományos érdeklődésben részesültek, mivel fogyasztásuk szelektíven serkenti a humán bél-mikrobióta hasznos baktériumainak szaporodását, ezzel pozitív hatást gyakorolva az emberi egészségre. A savó-eredetű laktóz szubsztrátját képezheti prebiotikus hatású galakto-oligoszacharidok (GOS) előállításának. A GOS szintézis β -galaktozidáz enzimmel, magas szubsztrát koncentráció (>200 g/L laktóz) mellett zajlik, ezért az ilyen felhasználás esetében a savó laktóztartalmának koncentrációja szükséges. Az enzimes reakció eredményeként a prebiotikus GOS frakciók és a nem-reagáló laktóz mellett

galaktóz és glükóz keletkezik, melyek eltávolítása szükséges magas-tisztaságú termékek előállításánál.

A tejsavó hasznosításának további, tradicionális módja annak tejsavas erjesztése, mellyel értéknövelt fermentált italok előállítására nyílik lehetőség. A fermentált termékek évszázadok óta az emberi táplálkozás részét képezik, kedvező érzékszervi jellemzőik mellett fogyasztásuk bizonyítottan pozitívan hat az emberi egészségre.

Doktori munkám célja a tejsavó-feldolgozás értéknövelő lehetőségeinek elemzése és bemutatása. Munkám során elsősorban a savó laktóztartalmának felhasználását vizsgáltam, tekintettel a savófehérje-hasznosítás és az ezt övező ipar kiaknázottságára. Céлом volt a fehérjementes savó GOS szintézisben, illetve tejsavas fermentációban való alkalmazása. További célom volt a két eljárás kombinációja a GOS szintézis során keletkezett melléktermékek eltávolítására, ezzel egy prebiotikus, fermentált ital kifejlesztéséhez szükséges alapok kidolgozása. Végül célom volt a tejsavas GOS-fermentáció összehasonlítása az erre a célra gyakran alkalmazott, élesztő törzsekkel végzett szelektív GOS fermentációs folyamatokkal.

2. CÉLKITŰZÉSEK

1. Fehérjementes tejsavó előállítására membránszűréssel és felhasználása galakto-oligoszacharidok (GOS) enzimikus szintézisére

Az első munkapont célja egy többlépcsős művelet sor kidolgozása, mely magába foglalja a tejsavó membrános műveletekkel történő frakcionálását és a GOS enzimikus szintézisét. A munka során a következő lépéseket terveztem elvégezni:

- (i) Savófehérje és laktóz frakcionálása ultraszűréssel (UF).
- (ii) A fehérjementes savó (UF permeátum) laktóztartalmának koncentrációja nanoszűréssel (NF).
- (iii) Az NF során gyűjtött, különböző laktóz-koncentrációjú savó permeátum minták felhasználása kereskedelmi forgalomban kapható β -galaktozidáz enzimmel végzett GOS szintézis szubsztrátjaként.

A folyamat során a fő cél a GOS szintézishez alkalmazható szubsztrátum előállítása, és az ehhez szükséges membránszeparációs műveletek összehangolása volt.

2. A fehérjementes savó (savó permeátum) tejsavas fermentációjához szükséges mikrobiológiai alapok kidolgozása

Munkám során célom volt a fehérjementes savó tejsavas fermentációjának vizsgálata különböző kiegészítő tápanyagforrások mellett. Az eredmények alapján célom volt a megfelelő savó permeátum alapú tápközeg összetételének meghatározása. A célok eléréséhez kitűzött részfeladatok az alábbiak voltak:

- (i) Megfelelő tejsavbaktérium törzsek szelektálása törzsgyűjteményekből és izolálása tejipari starterkultúrákból.
- (ii) A szelektált törzsek aminosav- és vitaminigényének meghatározása.
- (iii) A tejsavbaktérium törzsek szerves- és szervetlen nitrogénforrás-szükségleteinek meghatározása fehérjementes savó tejsavas fermentációjában.
- (iv) Különböző szerves nitrogénforrások hatásának vizsgálata a törzsek fermentációs aktivitására és jellemzőire.

3. Nyers GOS-keverék mono- és diszacharid tartalmának szelektív fermentációja tejsavbaktériumokkal

Az előző pontban megszerzett ismeretek alapján célom volt tejsavbaktérium törzsek nyers GOS tisztításban való alkalmazhatóságának vizsgálata, optimált tápközegben. A következő részfeladatokat határoztam meg:

- (i) A tejsavbaktérium törzsek screenelése szelektív fermentációs képességük alapján.
- (ii) A szelektált törzsek GOS fermentációs profiljának vizsgálata és a termelt metabolitok meghatározása.

4. Nyers GOS-keverék mono- és diszacharid tartalmának szelektív fermentációja élesztőgombákkal

Ezen célkitűzés megvalósítása során laktóz hasznosító *Kluyveromyces* fajok alkalmazhatóságát vizsgáltam nyers GOS keverék szelektív fermentációjában. A munkapont részfeladatai a következők voltak:

- (i) Laktóz erjesztő és nem-erjesztő *Kluyveromyces* fajok törzseinek kiválasztása.
- (ii) A szelektált törzsek szaporodásának és szelektív GOS fermentációban való alkalmazhatóságának vizsgálata nagy tisztaságú (metabolit-mentes) GOS előállítása céljából

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. A tejsavó

A tejsavó a sajtgyártás során, nagy mennyiségben keletkező melléktermék. Két típusát: édes- és savanyú savót különböztetjük meg. Az édes savó a sajtgyártás során, a tej rennin/kimozion proteáz enzimmel való kezelését követően áll elő. Az enzimes kezelés következtében a tej kazein micellái aggregálódnak és térhálósodnak (megalvadnak). Az alvadási folyamat eredményeként kivált folyékony halmazállapotú anyag az édes savó. A savanyú savó a túró és különböző joghurtok gyártása során keletkezik. Ebben az esetben oltóenzim nem kerül alkalmazásra, a tej fehérjéinek alvadását a pH ~4,5 alá csökkenése eredményezi. Mind az édes, mind a savanyú savó keletkezése esetén a sajt, túró vagy joghurt elválasztásra kerül és a termék jellegétől függően további feldolgozási lépéseken esik át (SZAKÁLY, 2001; SCHMIDT *ET AL.*, 2003).

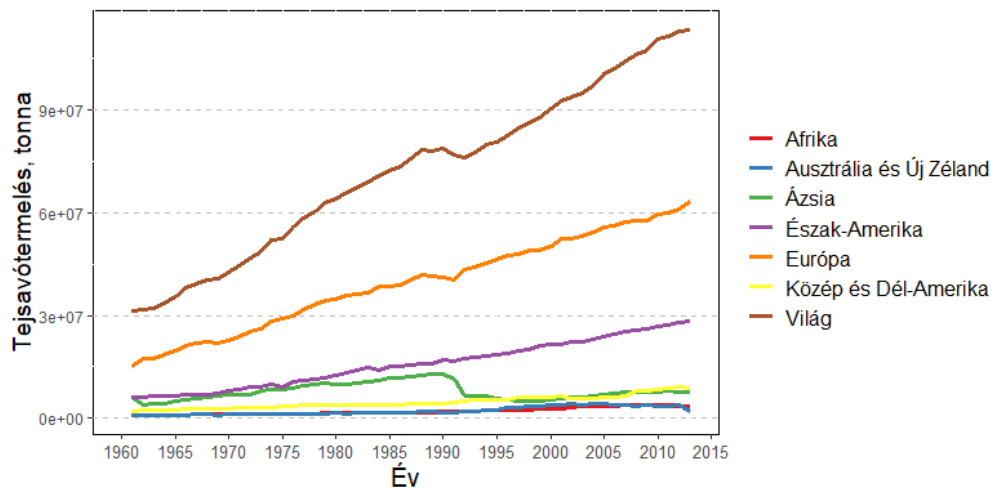
3.1.1. A tejsavó keletkezésének és felhasználásának történelmi háttere

A tejsavó az egyik legnagyobb mennyiségben keletkező tejipari melléktermék, mely évezredek óta összefonódik az emberi sajt- és egyéb tejtermék-fogyasztással. Az ember hozzáállása a savóhoz az évszázadok során számos változáson ment keresztül. A savó 17. és 18. században népszerű italnak számított, sebek és bélpanaszok enyhítésével kapcsolatos gyógyító hatását feltételezték.

A 20. században azonban a tejipar termelékenységé, ezzel együtt a keletkezett savó mennyisége drasztikus növekedésnek indult. Napjainkban az éves savótermelés volumene meghaladja a 100 millió tonnát, mely nagy része Európához köthető (1. Ábra).

A 20. században ezért a savó, termelésének nagymértékű növekedése következtében nemkívánatos melléktermékké vált, a tejipar szereplői ezért a lehető leggazdaságosabb módon próbáltak tőle megszabadulni. Ez a savó natív formájában történő felhasználását jelentette állati takarmányként vagy termőföld-trágyaként, leggyakrabban azonban a savót kezelés nélkül a folyókba, állóvizekbe, illetve szennyvízrendszerbe engedték. A tejsavó magas szervesanyag tartalma miatt azonban ezek a gyakorlatok a talaj eróziójához és a felszíni vizek eutrofizációjához vezettek (SMITHERS, 2008, 2015; PRAZERES *ET AL.*, 2012).

A fenti okokból kifolyólag a 70-es években világszerte törvényi szabályozások léptek érvénybe, melyek szabályozták vagy tiltották a kezeletlen savó környezetbe ürítését. A szigorítások következtében a tejipar szereplőire nagy gazdasági teher nehezedett, ami sarkallta a savókezelés gazdaságos vagy értéknövelő alternatíváinak kiaknázását.



1. Ábra: Globális édes savótermelés 1960 és 2013 között (Forrás: *FaoStat* <http://www.fao.org/faostat/en/#data/BL>)

A tejsavó összetételének részletesebb vizsgálata után nyilvánvalóvá vált komponensei értékes mivolta, mely tovább serkentette a savó biológiai és fiziko-kémiai értéknövelő feldolgozásával kapcsolatos kutatásokat (MAWSON, 1994; SISO, 1996).

3.1.2. A tejsavó összetétele

A tejsavó a tej vízdoldható komponenseinek nagy részét, és víztartalmának egészét tartalmazza. Összetétele az előállítás módjától (édes vagy savanyú savó), az alkalmazott technológia sajátosságaitól és a tej kiindulási összetételétől függ. Fő összetevői a laktóz, savófehérjék, savanyú savó esetén a tejsav, illetve kisebb mennyiségben zsír és hamu, mely nagyrészt ásványi sókból áll. A tehéntej és tejsavó általános százalékos összetétele az **1. Táblázatban** látható.

A savó fő komponensei a laktóz és a savófehérjék. Magas szervesanyag tartalma miatt a savó natív formájában rendkívül környezetterhelő, biológiai oxigigénigénye (BOI, anaerob körülmények közötti biológiai bontáshoz szükséges oxigénmennyiség) átlagosan 175-szöröse az átlagos szennyvizeknek (PRAZERES *ET AL.*, 2012; SMITHERS, 2015).

A savófehérje összetételét tekintve 50% β -laktoglobulin, 20% laktalbumin, 15% glikomakropeptid, és 15% egyéb fehérje vagy peptid, melyek közé az immunoglobulin, laktoferrin, laktoperoxidáz, szérum albumin, lizozim és különböző növekedési faktorok tartoznak (SMITHERS, 2008).

A savófehérjék az utóbbi években rendkívüli módon felértékelődtek, mivel kedvező technofunkcionális tulajdonságokkal (jó hab és gélképzés) illetve magas tápértékkel rendelkeznek. A különböző savófehérje frakciók változatos bioaktív hatását mutatták

ki, melyek közé antimikrobás, rák-megelőző, vérnyomáscsökkentő, immunrendszer-stimuláló, kelátképző és izomzat-összetétel javító hatások is sorolhatók. Ebből kifolyólag a savófehérjéket a leggyakrabban szeparáció, tisztítás és esetleges hidrolízis után étrend kiegészítőként és funkcionális élelmiszerként alkalmazzák (KRISSENS, 2007; MADUREIRA ET AL., 2007; SMITHERS, 2008; NATH ET AL., 2015; TAVARES ÉS MALCATA, 2016).

1. Táblázat: *Tehéntej és tejsavó általános összetétele (SMITHERS 2015 és MAWSON 1994 nyomán)*

Összetevő	Tej, %	Mennyiség, w/v%	
		Édes savó, %	Savanyú savó, %
Szárazanyag	12,8	6,3	6,6
Laktóz	4,9	4,9	3,8-4,9
Fehérje	3,5	0,75	0,75
Kazein	2,8	<0,05	<0,05
Savófehérje	0,7	0,7	0,7
Hamu	0,7	0,5	0,9
Zsír	3,7	0,1	0,1
Tejsav	0	0,02	0,6-0,7
pH	6,5-6,8	5,6	<4,5
BOI¹, mg O₂/L	>140000	>30000	>35000
KOI², mg O₂/L	~1710	~11000	~11000

¹BOI (biológiai oxigénigény): anaerob körülmények közötti biológiai bontáshoz szükséges oxigénmennyiség

²KOI (kémiai oxigénigény): kémiai úton, katalizátorokkal történő bontáshoz szükséges oxigénmennyiség

A tejsavó legnagyobb koncentrációjú komponense a laktóz. A laktóz diszacharid, melyben egy glükóz és egy galaktóz molekula $\beta(1-4)$ kötéssel kapcsolódik össze. A laktóz a természetben kizárólag az emlősállatok és emberek tejében jelenik meg. Ez nagy valószínűséggel a molekula kiegyensúlyozott glükóz-galaktóz arányához köthető, ugyanis míg a glükóz energiaforrásként szolgál, a galaktóz elengedhetetlen az agy megfelelő fejlődéséhez. Az emlősállatok esetében a laktóz kizárólag a szoptatási időszakban képi a táplálkozás részét, azonban az emberi étrendben a tejtermékek fogyasztásával későbbi életszakaszokban is jelentős mennyiségben jelenik meg (ADAM ET AL., 2004; SCHAAFSMA, 2008).

A laktóz felhasználható az élelmiszeriparban, mint édesítő, tápszer-összetevő, illetve a sütőiparban barnulást elősegítő adalékanyag. Azonban fontos kiemelni, hogy a világ népességének 75%-a laktóz intoleráns. A laktózérzékeny fogyasztók aránya továbbá az utóbbi időben növekvő tendenciát mutatott, amivel párhuzamosan megnőtt a laktóz-

mentes termékek keresettség (SCHAAFSMA, 2008; HARJU *ET AL.*, 2012). Az utóbbi időben ennek megfelelően a laktóz, mint élelmiszer-adalék egyre inkább teret vesztett az új, biotechnológiai alapanyagként történő felhasználásához képest (ADAM *ET AL.*, 2004; GÄNZLE *ET AL.*, 2008; PATERSON ÉS KELLAM, 2009). Ezen lehetőségek tárgyalása a dolgozat 3.1.3.2.3. szakaszának részét képezi.

3.1.3. Tejsavó kezelésének lehetőségei

A huszadik század második felében bevezetett környezetvédelmi szabályozások következtében a tejipar rákényszerült a nagy mennyiségben keletkező savó kezelésére. Ez kezdetben a savó natív formájában történő felhasználását jelentette. Később, a különböző szeparációs eljárások fejlődésével a komponensek elválasztása és azok elkülönített felhasználása vált hangsúlyosabbá.

3.1.3.1. Natív savó felhasználása

Az 1970-es évekig a savót natív formájában, trágyaként és állati takarmányként használták fel. Ez az alkalmazásmód a legjobb esetben is csak rendkívül kismértékű anyagi haszonnal járt (SMITHERS, 2008).

A későbbiekben nagyobb figyelmet kapott a savó ital-célú feldolgozása. Az 1970-es években nagy érdeklődés övezte az egyszerű, tejsavó-alapú italok kifejlesztését. Azonban a savó magas laktóz- és ásványi só tartalma miatt ízkaraktere egyszerre édeskés, savanyú és sós, ami nem tette népszerűvé az ilyen jellegű termékeket (HOLSINGER *ET AL.*, 1974; FRANKOWSKI *ET AL.*, 2014; SMITH *ET AL.*, 2016; ZOTTA *ET AL.*, 2020).

Az 1980-as évektől kezdve a savókezelés legelterjedtebb módja annak biológiai lebontása volt, aerob és anaerob emésztéssel. Az eljárás célja a BOI és KOI értékek csökkentése volt, melyet követően a kezelt savót a szennyvízkezelő rendszerbe engedték. A folyamat melléktermékeként előállt biomasszát trágyaként alkalmazták. A haszon ebben az esetben is csak kismértékű volt, de a keletkezett melléktermékek hasznosítása jelentette a savó teljeskörű feldolgozásának kezdetét (PRAZERES *ET AL.*, 2012).

Ezt követően a tudományos figyelem a savó értéknövelő feldolgozása felé fordult. Ez a natív savó acidogén és metanogén mikrobák konzorciumával való anaerob emésztését jelentette. Az eljárás során a biomassza mellett keletkező metánt energetikai célokra használták fel. Ez a folyamat jövedelmező volt, valamint a metán, mint energiaforrás használata az üvegház-hatású gázok kibocsátását is csökkentette. A

savó anaerob emésztését napjainkban is sok helyen alkalmazzák, mivel az eljárás alacsony telepítési és operációs költsége miatt a kisebb tejipari szereplők számára is kivitelezhető (HASSAN ÉS NELSON, 2012; PRAZERES *ET AL.*, 2012; MUSCOLO *ET AL.*, 2017).

A 2000-es években nagy figyelem fordult a natív savó fermentációjára laktóz-pozitív mikrobák alkalmazásával. A különböző fermentációk által előállított fő termékek az etanol (*Candida* sp., *Kluyveromyces* sp.), a hidrogén (*Clostridium* sp., *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp., *E. coli*) és a tejsav (*Lactobacillus* sp.) voltak. Az fermentációs eljárások gazdaságosságát csökkentette, hogy a végterméknek minden esetben tisztítási lépéseken kellett átesnie felhasználás előtt, valamint sok esetben a fermentációs felülúszó csatornarendszerbe engedése előtt is további tisztítási lépések voltak szükségesek (MATTSSON ÉS SONESSON, 2003; PRAZERES *ET AL.*, 2012). Azonban a savó-alapú fermentációk hatékonysága alulmarad az egyéb szénforrásokon (glükóz, maltóz) végzett eljárásokkal szemben, ezért az eredményesebb fermentáció és nagyobb hozatal érdekében a laktózt monomerjeire (glükóz és galaktóz) szükséges bontani. A laktóz bontása az iparban általában enzimes hidrolízissel, β -galaktozidáz enzimmal történik. A kereskedelmi enzimpreparátumok nagy része gomba (*Aspergillus* sp. vagy *Kluyveromyces* sp.) eredetű, de léteznek bakteriális (pl. *Bacillus circulans*) β -galaktozidáz enzimek is. A kereskedelmi enzimek hőmérséklet optimumai hasonlóak (50-60 °C), azonban pH optimumuk különböző, ami befolyásolja felhasználási területüket is. A bakteriális és élesztő eredetű enzimek semleges (6-7) pH értékeken működnek a legjobban, míg a penész β -galaktozidázok pH optimuma savas (4-4,5). Ennek megfelelően a bakteriális és élesztő eredetű enzimek elsősorban az édes, a penészekből származó preparátumok pedig savanyú savóban kerülnek felhasználásra (MLICHOVÁ ÉS ROSENBERG, 2006; GUERRERO *ET AL.*, 2015).

3.1.3.2. Savó szeparációja és a komponensek elkülönített felhasználása

Az utóbbi 20 évben a savófehérjék nagy mértékben felértékelődtek magas biológiai értékük és kedvező élettani hatásaik miatt. Ennek következtében a hangsúly a natív savó hasznosításáról a komponensek szeparációjára és elkülönített alkalmazására helyeződött át (NATH *ET AL.*, 2015; YADAV *ET AL.*, 2015).

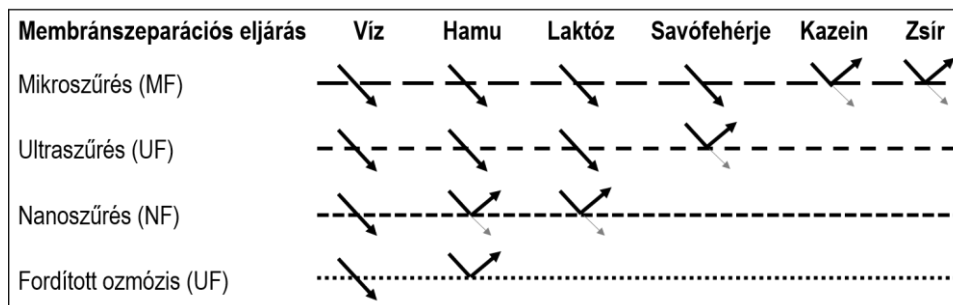
A savófehérjék elválasztása fiziko-kémiai eljárásokkal történik, melyek közé sorolható a hő- vagy izoelektromos pont szerinti kicsapás, illetve különböző koaguláló és flokkuláló anyagok használata. Ezen módszerek ipari felhasználása azonban a

hőkezelés okozta fehérje-denaturáció, illetve az adalékanyagok eltávolításának szükségessége miatt nem terjedt el (PRAZERES *ET AL.*, 2012).

A savót napjainkban leginkább komplex, többlépcsős műveletekkel szeparálják melyek különböző műveleti eljárások: bepárlás, kristályosítás, ioncsere, centrifugálás és membránszűrés változatos kombinációit foglalják magukba. Az utóbbi évek kiemelt kutatási területe volt a membránszeparáció fejlesztése, mely eredményeként rendkívül szofisztikált eljárások váltak elérhetővé. Különböző membránszűrési eljárásokkal lehetővé vált a magas tisztaságú savófehérjék és laktóz előállítása, illetve a savó víztartalmának elválasztása is (ARGENTA ÉS SCHEER, 2020).

3.1.3.2.1. Tejsavó frakcionálása membránszűréssel

A membránszűréssel végzett elválasztás során a tejsavó szemi-permeábilis hártván (membránon) halad át. Az alkalmazott membrán pórusai és savóalkotók méretének függvényében a komponensek áthaladnak az alkalmazott membránon (ekkor a permeátumba kerülnek), vagy visszatartásra kerülnek (ebben az esetben a retentátum részét képezik) (ARGENTA ÉS SCHEER, 2020). A savó membránszeparációjának vázlatos folyamata a **2. Ábrán** látható.



2. Ábra: Tejsavó komponenseinek szeparációja membránszűrési eljárásokkal (ARGENTA ÉS SCHEER, 2020 nyomán)

A savó membránszűréssel való frakcionálásának első lépése rendszerint a mikroszűrés (MF=Microfiltration), mellyel a sajtgyártás után hátramaradt kazein- és zsírrészecskék kerülnek elválasztásra. A következő műveleti lépés az ultraszűrés (UF=Ultrafiltration), mely során a savófehérjék a retentátumban maradnak, a laktóz, aminosavak, ásványi anyagok és vitaminok pedig a permeátumba kerülnek. Az elválasztott savófehérje tisztasága tovább növelhető az ultraszűrés diaszűrés módban való alkalmazásával, mely során a maradék laktóz víz bevezetésével “kimosható” (ROMÁN *ET AL.*, 2012; NATH *ET AL.*, 2015; DAS *ET AL.*, 2016).

A fehérje és laktóz szétválasztását követően a laktóz oldat víztartalma csökkenthető nanoszűrés (Nanofiltration=NF) segítségével, valamint ezzel az eljárással elválasztható az ásványi anyagok egy része is. Reverz ozmózis (RO-Reverse Osmosis) alkalmazása során a membránon csak a víz képes áthaladni, így ezzel a lépéssel magas koncentrációjú laktóz nyerhető ki. Megemlítendő, hogy a savóban található ásványi sók, melyek a hamutartalom nagy részét adják, nem választhatók el maradéktalanul membránszűrési eljárásokkal, ezt a lépést az iparban rendszerint ioncserével végzik (CUARTAS-URIBE *ET AL.*, 2006; CHOLLANGI ÉS HOSSAIN, 2007; DAS *ET AL.*, 2016).

A fent röviden bemutatott membrántechnikák kombinációja lehetővé teszi a magas tisztaságú savófehérjék és laktóz előállítását (POULIOT, 2008).

3.1.3.2.2. Savófehérje hasznosítás lehetőségei

A membránszeparáció által elválasztott savófehérje felhasználása sokoldalú. Forgalomba kerülhet különböző tisztaságú savófehérje-koncentrátumként (Whey Protein Concentrate=WPC), a savófehérje komponensek további frakcionálását követően savófehérje izolátumként (WPI=Whey Protein Isolate), vagy enzimes bontás után bioaktív peptid-készítményként (SMITHERS, 2008; NATH *ET AL.*, 2015; YADAV *ET AL.*, 2015; TAVARES ÉS MALCATA, 2016).

3.1.3.2.3. Savó permeátum/laktóz hasznosítás lehetőségei

A fehérjementesítést során létrejött laktóz oldat (savó-permeátum) felhasználása több módon lehetséges. Az élelmiszeriparban leginkább csokoládék édesítésében, és sütőipari termékekben barnulást elősegítő anyagként használják, de alkalmazása a korábban leírt technológiai és emésztési nehézségek miatt korlátozott. A gyógyszeriparban, mint tömegnövelő használatos, ebben az esetben kromatográfias lépések szükségesek a megfelelő tisztaság eléréséhez. A fermentációs iparban, mint szénhidrát-forrás kerülhet felhasználásra, azonban a tejsavó fermentációjával kapcsolatos problémák (más szénhidrátforrásokkal összehasonlítva mérsékelt szaporodás, alacsony kihozatal, hidrolízis szükségessége) miatt alkalmazása nehézkes (AUDIC *ET AL.*, 2003; GÄNZLE *ET AL.*, 2008).

Az utóbbi években kiemelt tudományos figyelmet kaptak a gyógyhatású laktóz-származékok, mint a hetero-oligoszacharid laktitol, laktulóz, laktoszukróz és a galakto-oligoszacharidok (GOS). A hetero-oligoszacharidok és a GOS szintézise egyaránt laktóz szubsztrátból, β -galaktozidáz katalizált enzimes reakcióval történik. Azonban míg a hetero-oligoszacharidok előállításához a reakcióban egyéb komponensek

(fruktóz, N-acetilglükózamin, kitozán, szacharóz, szukralóz, szialsav, fukóz stb.) is szükségesek, a GOS kizárólagos szubsztrátuma a laktóz (PATERSON ÉS KELLAM, 2009; TORRES *ET AL.*, 2010; CHEN ÉS GÄNZLE, 2017).

A bemutatott doktori munka egyik célja a savó-permeátum, mint potenciális GOS szubsztrátum vizsgálata, valamint egy olyan többlépcsős művelet sor kidolgozása, mely magába foglalja a tejsavó membrános műveletekkel történő frakcionálását és a GOS enzimes szintézisét.

3.2. GOS szintézis

A galakto-oligoszacharidok (GOS) prebiotikus hatású molekulák. Ellenállóak az emberi emésztőrendszer enzimjeivel szemben és a vastagbélbe jutva szelektíven serkentik a probiotikus baktériumok szaporodását (GIBSON *ET AL.*, 2017; WILSON ÉS WHELAN, 2017). A probiotikus baktériumok a definíció szerint olyan élő mikroorganizmusok, melyek megfelelő mennyiségben történő fogyasztása előnyös hatással van a gazdaszervezet egészségére (HILL *ET AL.*, 2014).

A GOS molekulák polimerizációs foka (Degree of polymerization=DP) 2-9 alegység, szerkezetüket tekintve több galaktóz és egy terminális glükóz molekulából állnak (SANGWAN *ET AL.*, 2011; GRAS NOTICE 000489, 2013). A GOS édesítő hatása 0,3-0,6-szorosa a szacharóznak, viszkozitása hasonló a magas fruktóztartalmú kukoricasziruphoz. Stabilitását tekintve pH=7-es értéken 160 °C-ig 10 percig, pH=2 értéken 100 °C-ig 10 percig, illetve pH=2-es értéken 37 °C-ig több hónapon keresztül változatlan szerkezetet mutat (TORRES *ET AL.*, 2010).

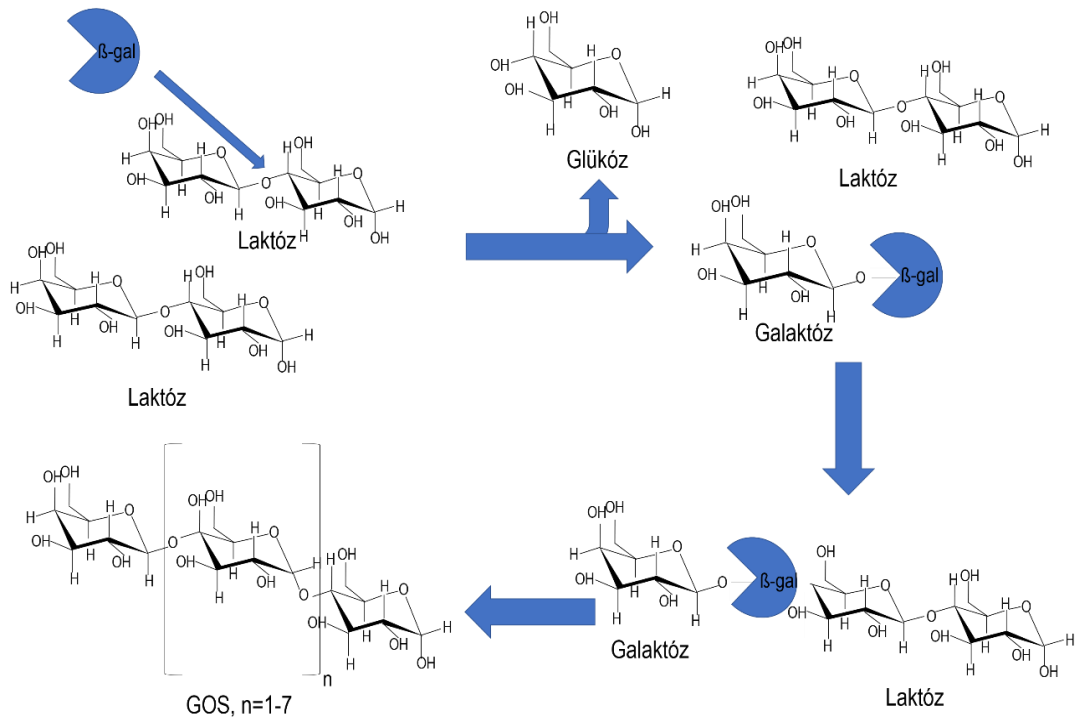
Bár a GOS előállítását történhet kémiai úton is, az iparban az enyhe reakció körülmények és magas specifikusság miatt a β -galaktozidáz katalizált, laktóz szubsztrátból történő enzimes GOS szintézis dominál (SANGWAN *ET AL.*, 2011).

3.2.1. Az enzimes GOS szintézis jellemzői

A β -galaktozidáz kettős aktivitású enzim. Alacsony laktóz koncentráció mellett hidrolitikus aktivitása dominál, ekkor a laktóz glükózra és galaktózra bomlik. Magasabb (>200 g/L) laktóz koncentráció mellett az enzim transzglykolitikus aktivitása nagyobb, ennek eredményeként GOS molekulák képződésének irányába tolódik el a reakció (SANGWAN *ET AL.*, 2011). A GOS enzimes szintézisének folyamata a **3. Ábrán** látható.

A reakció kinetikailag kontrollált, mely során a β -galaktozidáz által végzett hidrolízis és transzgalaktolízis egyszerre játszódik le. A GOS szintézis első lépésében az enzim

bontja a laktóz $\beta(1-4)$ kötését, mely következtében a glükóz molekula felszabadul, és egy galaktozil-enzim közttermék alakul ki. A második lépésben a galaktozilált enzim a víz helyett egy másik nukleofil csoporttal, az oldatban lévő laktózzal kapcsolódik össze. Ennek következtében egy GOS frakció: galaktóz-galaktóz-glükóz szerkezetű triszacharid (DP=3) keletkezik (TORRES *ET AL.*, 2010; VERA *ET AL.*, 2016).



3. Ábra: GOS molekulák keletkezésének folyamata, β -galaktozidáz által katalizált enzim szintézis során (VERA *ET AL.*, 2016 nyomán)

A GOS enzim szintézisének fő korlátja, hogy ilyen módon nem lehetséges a teljes laktózmennyiség oligoszacharidokká történő konverziója (KOVÁCS *ET AL.*, 2013). Ennek egyik oka, hogy a keletkezett melléktermékek (glükóz és galaktóz) a folyamat kompetitív inhibitorai, valamint, hogy a reakciókörülmények (enzimforrás, hőmérséklet, szubsztrát koncentráció) által meghatározott maximális GOS arány elérése után az enzim transzgalaktolitikus és hidrolitikus aktivitása kiegyenlítődik. Ezt követően a hidrolízis válik meghatározóvá, mely a GOS frakciók bomlásához vezet (BALLESTEROS *ET AL.*, 2006; PARK ÉS OH, 2010).

Az enzim szintézis végterméke tehát egy olyan szacharid-keverék, melyben a prebiotikus GOS frakciók mellett nagyobb mennyiségben megtalálható a nem-reagált laktóz, felszabadult glükóz, valamint kisebb koncentrációban galaktóz is.

A GOS molekulák mérete és szerkezete nagyban függ az eljárás során alkalmazott enzimektől. Az ipari GOS szintézishez használt β -galaktozidáz enzimek rendszerint biztonságos, az Egyesült Államok szerint GRAS (Generally Recognized As Safe), illetve az európai sztenderdek alapján QPS (Qualified Presumption of Safety) minősítésű mikrobákból származnak. A leggyakrabban használt enzimek *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces lactis* és *B. circulans* eredetűek. Az enzimek optimális reakcióparaméterei és az általuk szintetizált GOS tipikus összetétele a **2. Táblázatban** látható.

2. Táblázat: GOS szintézishez leggyakrabban alkalmazott mikrobák β -galaktozidázainak pH és hőmérséklet optimuma és a reakciótermék tipikus összetétele (forrás: (COULIER ET AL., 2009; RODRIGUEZ-COLINAS ET AL., 2011; URRUTIA ET AL., 2013; FRENZEL ET AL., 2015))

Reakció paraméter	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Bacillus circulans</i>
pH optimum	5,0	6,5-7,0	6,0
T optimum, °C	50-55	30-35	65
Glükóz, w/w %	16-30	26-34	15-21
Galaktóz, w/w %	4-10	14-16	1-2
Laktóz, w/w %	30-59	7-49	10-43
GOS, w/w %	21-30	9-42	41-65
DP2, w/w %	0,3-13	3-17	0,4-27
DP3, w/w %	17-19	5-15	22-23
DP4, w/w %	0-1	0,3-14	11-12
DP5, w/w %	-	-	2-5
Domináns galaktozid kötés	β (1-4) β (1-3) β (1-6)	β (1-3) β (1-6)	β (1-4)

Az enzim eredete nagyban befolyásolja a reakció operációs paramétereit, a GOS frakciók arányát és polimerizációs fokát, és a keletkezett glikozidos kötések típusát is (MLICHOVÁ ÉS ROSENBERG, 2006; CHEN ÉS GÄNZLE, 2017). Az *Aspergillus* eredetű β -galaktozidázok általában extracelluláris enzimek, pH optimumuk alacsonyabb (pH=5 körüli). Az általuk katalizált GOS szintézis során legnagyobb mennyiségben triszacharidok keletkeznek, melyekben β (1-4), β (1-3) és β (1-6) kötési formák egyaránt megtalálhatók. A bakteriális és élesztő eredetű β -galaktozidázok pH optimuma 6,5-7 körüli. A *Kluyveromyces lactis* készítmények használata során nagyrészt di- és tetraszacharidok keletkeznek, β (1-3) és β (1-6) kötésekkel. A *Bacillus circulans* katalizált reakciókra magasabb polimerizációs fokú GOS frakciók (DP3-4)

és $\beta(1-4)$ kötések jellemzők (MLICHOVÁ ÉS ROSENBERG, 2006; RODRIGUEZ-COLINAS *ET AL.*, 2011; URRUTIA *ET AL.*, 2013; FRENZEL *ET AL.*, 2015; CHEN ÉS GÄNZLE, 2017).

A *Bacillus circulans* eredetű enzimkészítmények általában kedveltebbek az iparban, mert kevésbé gátoltak galaktóz által, és az élesztőkkel összehasonlítva termostabilabbak, ami magasabb laktóz koncentrációk használatát teszi lehetővé (PARK ÉS OH, 2010; WARMERDAM *ET AL.*, 2014; CHEN ÉS GÄNZLE, 2017).

3.2.2. Az enzimes GOS szintézis műveletei

Az ipari gyakorlatban az enzimes GOS szintézis hagyományosan szakaszos rendszerben, kevert tartályreaktorban történik. A reakciót oldott β -galaktozidáz katalizálja, mely a szintézis végét követően inaktiválásra és eltávolításra kerül. Ez a gyakorlat a nagy volumenű enzimfelhasználás következtében magas operációs költségekkel jár. Mivel az alkalmazott biokatalizátor ára adja a GOS szintézis költségének tetemes részét, számos, az enzim újra-hasznosítását lehetővé tévő eljárási mód került kifejlesztésre (MARTINS *ET AL.*, 2019; SU *ET AL.*, 2020).

Az enzim-élettartam megnövelésének egyik módja az oldott enzimek rögzítése. Az immobilizálás történhet porózus anyagokba zárással (pl. Na-alginát, polivinyl alkohol), vagy a biokatalizátorok különböző hordozóanyagokhoz (pl. kitozán, üveg, különböző membránok stb.) való rögzítésével. Az enzim-hordozó közti kölcsönhatás lehet adszorpció vagy kovalens kötés, illetve lehetséges az enzim-enzim közti kereszt-kötések kialakítása glutár-aldehid felhasználásával. Az immobilizált enzimek rendszerint töltött-oszlop vagy rögzített enzimes membrán-reaktorokban kerülnek alkalmazásra, de lehetséges a rögzített biokatalizátorok szuszpendálása kevert-tartályos berendezésekben is. Az immobilizáció során az aktivitás rendszerint csökken az oldott enzimekhez képest, ezt azonban a megnövekedett élettartam és hosszútávú alkalmazhatóság ellensúlyozhatja. Ennek ellenére a GOS ipari szintézisében nem terjedt el az immobilizált rendszerek alkalmazása, elsősorban a β -galaktozidáz multimer szerkezete miatt, amely rögzítés során gyakran jelentős aktivitásvesztéshez vezet (KOVÁCS *ET AL.*, 2013; ILLANES *ET AL.*, 2016).

A klasszikus szakaszos reakciók további alternatívája a kevert enzimes reaktorok ultaszűréssel való kombinálása (UF-EMR). Ebben az esetben folyamatos GOS szintézis zajlik egy kevert tartályreaktorban, melyhez egy membrán modul csatlakozik. A membrán visszatartja a nagy méretű enzimet, azonban átengedi a kisebb molekulásúlyú GOS frakciókat, di- és monoszacharidokat. Az UF-EMR eljárások fő

nehézsége elsősorban a membrán-eltömődés és az enzimaktivitás csökkenése hosszútávú működtetés során. Ez a két probléma a folyamat optimalizálásával és friss enzim adagolásával kezelhető. Nagy előnye azonban az UF-EMR rendszereknek az egyéb eljárásokkal szemben az egyszerű kivitelezés és üzemeltetés, melyek fontos paraméterek a GOS gyártók számára (KOVÁCS *ET AL.*, 2013; SATYAWALI *ET AL.*, 2017; SU *ET AL.*, 2020).

3.2.3. Savó permeátum, mint GOS prekursor

A tejsavó, valamint a savó membrános frakcionálása során keletkezett savó permeátum GOS szintézis szubsztrátját képezheti (LAPPA *ET AL.*, 2019). A savóeredetű laktóz, mint GOS prekursor az utóbbi időben komoly tudományos figyelmet kapott. A témával kapcsolatos munkák összegzett eredményei a **3. Táblázatban** tekinthetők meg.

3. Táblázat: Savó és savó permeátum GOS szintézis szubsztrátjaként való alkalmazásával kapcsolatos munkák összefoglalása

β-galaktoszidáz forrás*	Szubsztrát**	Laktóz cc., g/L	Operációs mód***	GOS kihozatal****	Forrás
<i>A. A. oryzae</i> <i>B. K. lactis</i> <i>C. K. fragilis</i>	SP	230	Batch	A. 17,9% B. 22,2% C. 23,5%	(RUSTOM <i>ET AL.</i> , 1998)
<i>K. lactis</i>	SP	230	UF-EMR	31%	(FODA ÉS LOPEZ-LEIVA, 2000)
<i>Lactobacillus sp.</i>	SP	200	Batch	25%	(SPLECHTNA, NGUYEN, ZEHETNER, <i>ET AL.</i> , 2007)
<i>K. lactis</i>	ÉS SP	200	Batch UF-EMR	ÉS+Batch 15,5% ÉS+UF-EMR 10,5% SP+Batch 16,4% SP+UF-EMR 8,4%	(POCEDIČOVÁ <i>ET AL.</i> , 2010)
<i>B. circulans</i>	SP	50	Batch, NF-EMR	Batch: 20% NF-EMR: 56%	(DAS <i>ET AL.</i> , 2011)
<i>A. oryzae</i>	SP	400	PB	15%	(JOVANOVIĆ-MALINOVSKA <i>ET AL.</i> , 2012)
<i>K. lactis</i>	ÉS	400	Batch	29,9%	(LISBOA <i>ET AL.</i> , 2012)
<i>L. paracasei</i>	ÉS	240	Batch	19,4%	(SONG <i>ET AL.</i> , 2013)
<i>B. circulans</i>	SP	200	Batch, PB	Batch: 40% PB: 23%	(SEN <i>ET AL.</i> , 2014)

3. Táblázat folyt					
<i>L. plantarum</i> - ban kifejezett <i>S. thermophilus</i> gén	SP	205	Batch	50%	(GEIGER ET AL., 2015)
<i>A. K. lactis</i> <i>B. A. oryzae</i>	ÉS SS	200	Batch	A. ÉS 32,6% A. SS 33,5% B. ÉS 25% B. SS 24,5%	(FISCHER ÉS KLEINSCHMIDT, 2015)
<i>B. circulans</i>	SP	200	PB	25%	(SEN ET AL., 2016)
<i>K. lactis</i>	ÉS	154	Batch	18%	(VÉNICA ET AL., 2017)
<i>A. oryzae</i>	SP	50	PB	25%	(ESKANDARLOO ÉS ABBASPOURRAD , 2018)
<i>E. coli</i>	ÉS SP	90	Batch	ÉS 19,3% SP 21,6%	(MUELLER ET AL., 2018)
<i>A. oryzae</i>	ÉS	260	Batch IE Batch	Batch: 23% IE Batch 23%	(SIMOVIĆ ET AL., 2019)
<i>A. K. lactis</i> <i>B. A. oryzae</i> <i>C. E. coli</i>	SP	240	Batch	A. 25% B. 15% C. 4%	(MANO ET AL., 2019)

*A.=*Aspergillus*, K.= *Kluyveromyces*; E.=*Escherichia*, S.= *Streptococcus*; L.= *Lactobacillus*,

**SP: Savó permeátum, ÉS: Édes savó, SS: Savanyú savó

***STR: Stirred Tank Reactor/szakaszos kevert tartályreaktor, PB: Packed Bed/Töltött ágyas reaktor, UF-EMR: Ultrafiltration assisted Enzyme Membrane Reactor/Ultraszűréssel kombinált membránreaktor

****GOS kihozatal= A reakció során képződött GOS és a kiindulási szénhidrát tartalom aránya

Néhány kivételtől eltekintve (SPLECHTNA ET AL., 2007; SONG ET AL., 2013; GEIGER ET AL., 2015), ahol laboratóriumban előállított enzimek kivonat képezte a vizsgálat tárgyát, a munkák nagy része *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces lactis* és *Bacillus circulans* eredetű kereskedelmi enzim készítményeket alkalmazott. GOS kihozatal szempontjából az eredmények azonos nagyságrendben mozogtak, azonban az enzim eredetétől függően kisebb eltérések voltak megfigyelhetők.

Összességben elmondható, hogy az *A. oryzae* β -galaktozidázok GOS kihozatala 15-25 %, a *K. lactis* enzimeké 8-31 %, míg a *B. circulans* enzimekkel végzett reakcióké a legmagasabb, 20-40 % volt. Geiger és munkatársai (2015) kiemelkedő GOS kihozatalokat figyeltek meg kísérleti rendszerükben, azonban ezt géntechnológia alkalmazásával érték el (*S. thermophilus* β -galaktozidázt fejeztek ki *L. plantarum* törzsben), ami nem alkalmazható élelmiszer-célú oligoszacharidok előállítására. Das és kollégái (2011) ugyan magas GOS kihozatalról számoltak be, de ezt a reakciót követő, számottevő veszteséggel járó nanoszűréssel érték el, nem az enzimes szintézis optimalizálásával.

A vizsgált szubsztrátok közül - édes és savanyú savó, valamint savó-permeátum - az utóbbi bizonyult a legalkalmasabbnak GOS kihozatal szempontjából. Ennek oka feltehetően a permeátum teljes savóval összehasonlított alacsony fehérje tartalma, mely kevésbé gátolta a β -galaktozidáz enzimek aktivitását (POCEDIČOVÁ *ET AL.*, 2010; FISCHER ÉS KLEINSCHMIDT, 2015; MUELLER *ET AL.*, 2018).

A különböző operációs beállításokat tekintve a tradicionális, kevert tartályos reakció volt a legkedvezőbb a keletkezett GOS arány tekintetében (POCEDIČOVÁ *ET AL.*, 2010; SEN *ET AL.*, 2014; FISCHER ÉS KLEINSCHMIDT, 2015). MANO és munkatársai (2019) szakaszos eljárásban alkalmazott szabad és rögzített enzimmel végzett GOS szintézis során azonos kihozatalokat figyeltek meg, azonban a körülményes rögzítés előnytelenné teszi az immobilizációt.

A tejsavó - valamint elsősorban a savó permeátum - tehát optimális prekursora a GOS szintézisnek. A korábbi munkák során laktózzal összehasonlítva az esetek nagy részében elhanyagolható, vagy csak kis kihozatal-beli különbség volt megfigyelhető (SPLECHTNA *ET AL.*, 2007; POCEDIČOVÁ *ET AL.*, 2010; MUELLER *ET AL.*, 2018; SIMOVIĆ *ET AL.*, 2019). Bár több csoport alkalmazott különböző laktóz koncentrációkat a GOS szintézis során (LÓPEZ LEIVA ÉS GUZMAN, 1995; RUSTOM *ET AL.*, 1998; FODA ÉS LOPEZ-LEIVA, 2000; LISBOA *ET AL.*, 2012; SEN *ET AL.*, 2014, 2016; FISCHER ÉS KLEINSCHMIDT, 2015; GEIGER *ET AL.*, 2015; VÉNICA *ET AL.*, 2017; SIMOVIĆ *ET AL.*, 2019), a reakcióhoz szükséges magas laktózkoncentráció elérésének lehetőségeit nem vizsgálták.

A bemutatott doktori munka célja ezért, a korábbi eredmények alapján egy integrált eljárás kidolgozása, melyben a savó membránszeparációját *Bacillus circulans* eredetű, β -galaktozidáz katalizálta GOS szintézis követi.

3.2.4. GOS szintézis downstream műveletei

A GOS ipari előállításának downstream műveletei közé tartozik a szintézishez használt enzim eltávolítása (általában ioncserélő oszlopokkal) és a reakciótermék szín- és szagtalanítása aktívszenes szűréssel. Az így előállított nyers GOS termékek szénhidrát-összetétel szempontjából rendkívül heterogének.

A prebiotikus oligoszacharid molekulák mellett jelen van a nem-reagált laktóz, felszabadult glükóz, valamint kis mennyiségben galaktóz is. A pontos összetétel az alkalmazott enzimtől és a reakciókörülményektől függ. A keverék tipikus összetétele 25-60% GOS, 20-50% laktóz, 10-20% glükóz és 0,5-10% galaktóz a teljes

szénhidrátmennyiségre vonatkoztatva (TORRES *ET AL.*, 2010; VERA *ET AL.*, 2016; MANO *ET AL.*, 2019).

Mivel a laktóz, glükóz és galaktóz nem rendelkeznek prebiotikus hatással, jelenlétük magas-tisztaságú GOS termékekben nem kívánatos. A glükóz eltávolítása elsősorban a GOS készítmények tápszer-célú felhasználásánál fontos, a laktóz-mentes termékek pedig a tejcukor-érzékeny fogyasztók miatt előnyösek (KOLETZKO *ET AL.*, 2005; KOVÁCS *ET AL.*, 2013).

Ipari körülmények között a GOS frakcionálása kromatográfias technológiával, szintetikus kation-cserélő vagy zeolit oszlopokkal történik. Az elválasztás elsősorban az alkalmazott rezin pórusmérete, a GOS frakciók molekulásúlya, valamint a GOS és a töltet felszínén rögzített kationok kölcsönhatásán alapul. A módszer előnye a nagyfokú specifikusság, hátránya a magas operációs költségek. Az eljárás alapvetően szakaszos, az iparban a „folytonos” működést SMB (simulated moving bed/ szimulált mozgóágyas) technológiával, több oszlop szimultán alkalmazásával érik el (KRUSCHITZ ÉS NIDETZKY, 2020).

A GOS frakciók elválasztása történhet nanoszűrés alkalmazásával is. Az eljárás során a nanoszűrő membrán molekulaméret alapján visszatartja, vagy a permeátumba engedi a kérdéses molekulát. Ez a módszer azon alapul, hogy a mono- és diszacharidok visszatartása alacsonyabb, mint a nagyobb molekulaméretű (DP>3) frakcióké. A módszer előnye az egyszerű kivitelezés és üzemeltetés. Hátránya, hogy egy szeparációs lépésben nem lehetséges egy több komponensű mátrix szétválasztása. Ehhez kaszkád-rendszerek használata szükséges, azonban az azonos molekulaméretű monoszacharidok (glükóz és galaktóz) szeparációja ezzel a módszerrel nem lehetséges (CÓRDOVA *ET AL.*, 2017, 2018; KRUSCHITZ ÉS NIDETZKY, 2020).

Az utóbbi években a mono- és diszacharidok szelektív fermentációja, mint GOS-tisztítási lehetőség, nagyobb tudományos figyelemre tett szert. Az eljárás előnye az egyszerű kivitelezés mellett a könnyű méretnövelés, hátránya elsősorban a mikrobiális anyagcseretermékek eltávolításának szüksége. Azonban a kis mennyiségben keletkezett anyagcseretermékek eltávolítása könnyen kombinálható az aktív-szénnel végzett szín- és szagtalanítási lépéssel, így a szelektív fermentáció ígéretes eljárásnak mondható (KOVÁCS *ET AL.*, 2013; ILLANES *ET AL.*, 2016; KRUSCHITZ ÉS NIDETZKY, 2020).

3.2.4.1. Mono- és diszacharidok szelektív fermentációja

A laktózt, glükózt és galaktózt tartalmazó GOS keverék mono- és diszacharid mentesítése lehetséges mikrobás fermentációval. Az szelektív fermentációval történő GOS tisztítás lépései a következők: (i) a GOS-keverék hígítása az alkalmazott mikroba által tolerálható szintre (ii) GOS-keverék kiegészítése az alkalmazott mikroba tápanyagigény-szükségleteitől függően (iii) inkubáció (iv) fermentáció során keletkezett anyagcseretermékek eltávolítása (v) a magas-tisztaságú GOS koncentrációja.

A szelektív fermentáció versenyképessége a fenti lépések mértékétől függ, ugyanis minden eljárás (hígítás, tápanyag-kiegészítés, tisztítási eljárások, vízelvonás) az operációs költség növekedéséhez vezet (SCOTT *ET AL.*, 2016). Számos GRAS és QPS minősítésű mikroba képes a monoszacharidok (glükóz és galaktóz) felhasználására, azonban a laktóz hasznosítására csak β -galaktozidázzal rendelkező mikroorganizmusok alkalmasak, melyek száma korlátozott. Továbbá előnyös magas ozmotikus toleranciájú fajok és törzsek alkalmazása, ami lehetővé teszi a magas GOS koncentrációk és alacsony hígítási fok alkalmazását. A témával kapcsolatos munkák eredményei a **4. Táblázatban** kerültek összefoglalásra.

4. Táblázat: Nyers GOS keverékek mono- és diszacharid tartalmának szelektív fermentációjával foglalkozó munkák eredményeik bemutatása.

Mikroba*	GOS cc. g/L	Tápközeg kiegészítés* *	Ferm. idő óra	GOS tisztaság %***	Forrás
<i>K. marxianus</i>	200	0,5% YE	30	97-98%	(CHENG <i>ET AL.</i> , 2006)
<i>S. cerevisiae</i>	450	-	32	57	(GOULAS <i>ET AL.</i> , 2007)
<i>S. cerevisiae</i>	200	-	4	37	(LI <i>ET AL.</i> , 2008)
<i>K. lactis</i>	200	-	18	97	(LI <i>ET AL.</i> , 2008)
<i>S. cerevisiae</i>	167	-	10	49	(HERNÁNDEZ <i>ET AL.</i> , 2009)
<i>K. marxianus</i>	500	E	48	95	(GUERRERO <i>ET AL.</i> , 2014)
<i>S. cerevisiae</i> + <i>S. singularis</i>	300	-	24	90	(AVALAKKI <i>ET AL.</i> , 2015)
<i>S. cerevisiae</i> + <i>S. thermophilus</i>	100	-	70	>95	(GIACOMELLI <i>ET AL.</i> , 2015)
<i>S. cerevisiae</i>	400	-	24	40	(ABURTO <i>ET AL.</i> , 2016)

4. Táblázat folyt.

<i>K. lactis</i>	100	-	15	>95	(SUN ET AL., 2016)
<i>K. marxianus</i>	300	-	26	100	(TOKOŠOVÁ ET AL., 2016)
<i>K. lactis</i>	200	-	19	96	(SANTIBÁÑEZ ET AL., 2017)
<i>S. cerevisiae</i> + <i>S. singularis</i>	250	-	60	>85	(SARAVANA N ET AL., 2017)
<i>S. cerevisiae</i>	400	-	8	25.7	(ABURTO ET AL., 2018)
<i>S. cerevisiae</i> + <i>K. lactis</i>	200	-	32	65%	(SRIVASTAVA ÉS MISHRA, 2019)

**K. marxianus*: *Kluyveromyces marxianus*, *S. cerevisiae*: *Saccharomyces cerevisiae*, *K. lactis*: *Kluyveromyces lactis*, *S. singularis*: *Sporobolomyces singularis*, *S. thermophilus*: *Streptococcus thermophilus*

**YE: Yeast Extract/Élesztőkivonat, E: a szintézishez használt enzim nem került elválasztásra

***GOS tisztaság= A reakció során képződött GOS és a kiindulási szénhidrát tartalom aránya

Több kutatócsoport állított elő monoszacharid-mentes GOS termékeket *Saccharomyces cerevisiae* felhasználásával (GOULAS ET AL., 2007; LI ET AL., 2008; HERNÁNDEZ ET AL., 2009; ABURTO ET AL., 2016, 2018). Laktóz-mentes GOS termékek előállítását többen kevert-kultúras fermentációval érték el, melyek során a *Saccharomyces cerevisiae* törzseket laktóz pozitív mikrobákkal, mint a *Sporobolomyces singularis* (AVALAKKI ET AL., 2015; SARAVANAN ET AL., 2017), *Streptococcus thermophilus* (GIACOMELLI ET AL., 2015) vagy *Kluyveromyces lactis* (SRIVASTAVA ÉS MISHRA, 2019) kombinálták. A kevert-kultúrák alkalmazása ugyan megnövelte a GOS végső tisztaságát, azonban az különböző fajok eltérő fermentációs igényei (pl. hőmérséklet, tápanyag-szükséglet) a laktóz nem teljes felhasználásához (AVALAKKI ET AL., 2015; SARAVANAN ET AL., 2017), vagy a műveleti lépések számának növekedéséhez vezetett (GIACOMELLI ET AL., 2015).

A témával foglalkozó kutatócsoportok eredményei alapján a leghatékonyabb módja a mono- és diszacharidok GOS keverékből történő eltávolításához a laktóz-pozitív *Kluyveromyces lactis* (LI ET AL., 2008; SUN ET AL., 2016; SANTIBÁÑEZ ET AL., 2017) vagy *K. marxianus* (CHENG ET AL., 2006; GUERRERO ET AL., 2014; TOKOŠOVÁ ET AL., 2016) törzsek alkalmazása. Ez a nem-tradicionális élesztőfaj rendelkezik β -galaktozidáz enzimmal, és élettevékenysége során elsőként jellemzően a glükózt, majd ezt követően a laktózt és galaktózt is felhasználja.

3.2.4.2. GOS fermentáció élesztőkkel: előnyök és hátrányok

A munkák közös jellemzője, hogy részben vagy egészben élesztő fajokat alkalmaznak, melyek nagy mennyiségben etanolt termelnek. Ezen melléktermék eltávolítása fontos a magas tisztaságú GOS előállítása során, mely az operációs költségek emelkedéséhez vezet. A bemutatott munkák továbbá sok esetben magas kezdeti sejtkoncentrációkat ($0.15-0.7 \text{ g}_{\text{sejt}}/\text{g}_{\text{szénhidrát}}$) alkalmaznak. Az törzsek a tápanyagok hiányában jellemzően nem szaporodnak, így a folyamat biokonverzióként, nem pedig fermentációként jellemezhető. Ugyan ebben az esetben nem szükséges tápanyagforrások adagolása az alacsony tisztaságú GOS-hoz, azonban az eljáráshoz szükséges magas sejtkoncentrációjú inokulum előállítása további műveleti lépéseket, energia- és nyersanyagigényt realizál.

3.2.4.3. GOS fermentáció tejsavbaktériumokkal: lehetséges új csoport

Egy másik, GRAS és QPS minősítésű, laktóz-pozitív mikroba-osztály a tejsavbaktériumok csoportja, azonban eddig GOS fermentációban önállóan nem kerültek alkalmazásra. A továbbiakban ezen mikrobacsoport GOS szelektív fermentációjában való alkalmazásának lehetőségét járrom körül.

3.3. Tejsavbaktériumok

3.3.1. Tejsavbaktériumok élelmiszeripari jelentősége

A tejsavbaktériumok élettani jellemzők és anyagcserefolyamatok szempontjából azonosak: Gram pozitívok, kataláz és peroxidáz negatívok és anaerob fermentációval tejsavat termelnek. Tagjai a *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus*, *Oenococcus* és *Weisella* nemzetségek (MORISHITA ET AL., 1981; RUIZ-BARBA ÉS JIMÉNEZ-DÍAZ, 1993).

Aerotoleráns anaerobok, azaz képesek oxigén jelenlétében is szaporodni, azonban nem rendelkeznek teljes citromsav körrel. Elsődleges anyagcsereútvonaluk a homo- vagy heterofermentatív tejsavas erjedés, fő anyagcseretermékük pedig a tejsav. A tejsavbaktériumok a természetben és az emberi tevékenység nyomán általában tápanyag-gazdag közegekben (tejtermékek, humán béltraktus stb.) lelhetőek fel, mely következtében metabolizmusuk adaptálódott az aminosavak és egyéb komponensek (biotin, pantoténsav, nikotinsav) elérhetőségéhez. Ennek következtében nagy részükre jellemzők a különböző aminosav-auxotrófiák. Ugyan az emberi szempontból releváns tejsavbaktériumok nagy része élelmiszer-fermentációkhoz köthető, néhány opportunista patogén fajuk is létezik, melyek a *Streptococcus* és *Enterococcus*

nemzetséghez sorolhatók (MORISHITA ÉS YAJIMA, 1995; TEUSINK ÉS MOLENAAR, 2017; ISKANDAR *ET AL.*, 2019).

Az erjesztett élelmiszerekhez köthető tejsavbaktériumok évezredek óta az emberi táplálkozás részét képezik: a tradicionális fermentált termékek (joghurt, érlelt sajtok, kefir, savanyított hús- és zöldségtermékek) fogyasztása gyakorlatilag minden kultúra hagyományos diétájának része. Ennek oka, hogy a tejsavbaktériumok által termelt tejsav a közeg pH-csökkenéséhez vezet. A kialakult savas pH antimikrobás hatású, így a tejsavas erjesztés a modern tartósító eljárások elterjedése előtt is alkalmas volt az élelmiszerek élettartamának meghosszabbítására (TURPIN *ET AL.*, 2010; PAPADIMITRIOU *ET AL.*, 2016; GAUCHER *ET AL.*, 2019).

A tejsavbaktériumok a savtermelés és ezzel „biztonságos élelmiszerek” kialakítása mellett hozzájárulnak az egyes élelmiszer-összetevők megnövekedett emészthetőségéhez (pl. allergén tejfehérjék bontása, laktóz felhasználása), részt vesznek kellemes ízanyagok kialakításában (aminosavak és zsírok átalakítása nyomán), továbbá exo-poliszacharidok termelésével textúra kialakító hatással is rendelkeznek (GURR, 1984; SMIT *ET AL.*, 2005; ARDÖ, 2006; ZANNINI *ET AL.*, 2016; MARCO *ET AL.*, 2017).

A tejsavbaktériumok fontos jellemzője, hogy számos törzsük probiotikus tulajdonságokkal bír. A probiotikumok elsősorban a *Bifidobacterium* és *Lactobacillus* genushoz sorolhatók, de léteznek egyéb (*Lactococcus*, *Streptococcus*) nemzetséghez köthető probiotikus törzsek is (KERRY *ET AL.*, 2018; REID *ET AL.*, 2019). Pozitív élettani hatásaik rendkívül széleskörűek, közéjük tartozik a bélfal patogén mikrobákkal szembeni védelmének növelése, az immunrendszer stimulálása, agyi funkciók szabályozása a termelt metabolitok által, továbbá rák- és elhízás ellenes aktivitásukat is megfigyelték (GUARNER ÉS MALAGELADA, 2003; FIJAN, 2014; VULEVIC *ET AL.*, 2015; KERRY *ET AL.*, 2018; WAN *ET AL.*, 2019).

3.3.2. Tejsavbaktériumok anyagcserefolyamatai: tejsavas fermentáció

A tejsavas fermentáció két típusa a homo- és heterofermentatív erjedés, melyeket a glükóz lebontásának útja, és a keletkezett anyagcseretermékek alapján különítünk el. A folyamat mindkét esetben anaerob, elektron donorként és akceptorként egyaránt szerves vegyületek szolgálnak (GÄNZLE, 2015).

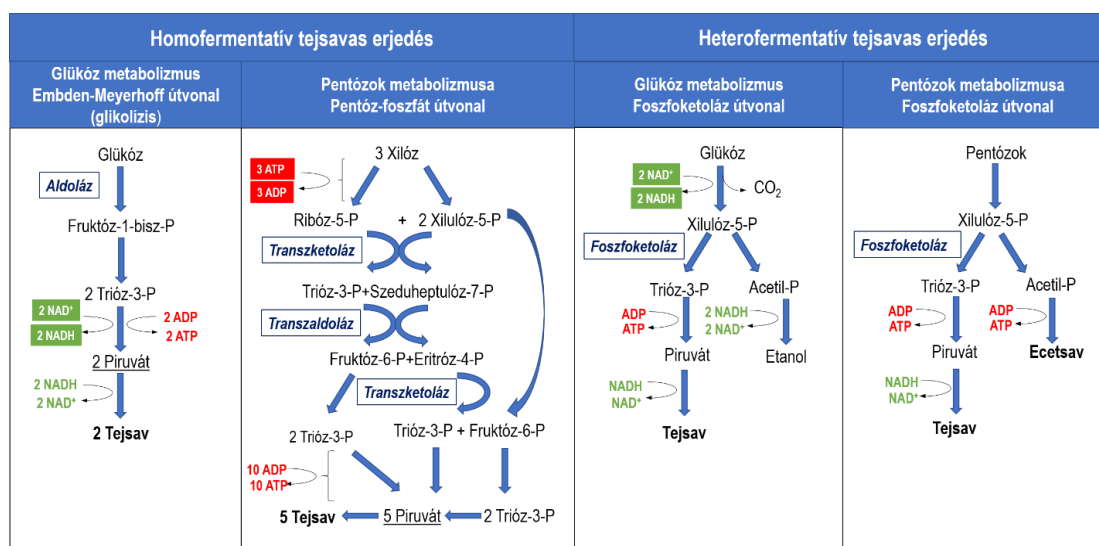
A homofermentatív tejsavbaktériumok a glükózt a glikolízis (Embden-Meyerhof-Parnas út) útvonalon végzik. A folyamat fő végterméke a tejsav, mely a tejsav-dehidrogenáz segítségével, NADH koenzim oxidálásával jön létre. A

homofermentatív törzsek nagy része képes a pentózok metabolizmusára a pentóz-foszfát anyagcsereúton keresztül, mely folyamat végterméke ugyancsak a tejsav (GÄNZLE, 2015; KOWALCZYK *ET AL.*, 2015).

Az obligát heterofermetatív törzsek ezzel szemben a glükózt (és pentózokat) a foszfoketoláz úton hasznosítják, és ebben az esetben több fő végtermék: tejsav, etanol, acetát és CO₂-keletkezik a NAD⁺/NADH arány függvényében (GÄNZLE, 2015; ISKANDAR *ET AL.*, 2019).

A fakultatív-heterofermentatív tejsavbaktériumok mindkét erjedéstípus folyamatait alkalmazzák. A glükózt, elérhetősége függvényében a glikolízis vagy foszfoketoláz úton, a pentózokat minden esetben a foszfoketoláz anyagcsereúton keresztül hasznosítják (HOFVENDAHL ÉS HAHN-HÄGERDAL, 2000; ZAUNMÜLLER ÉS UNDEN, 2009).

A glükóz és pentózok lebontásának anyagcsere útvonalai a **4. Ábrán** szerepelnek.



4. Ábra: Homo- és heterofermentatív tejsavbaktériumok glükóz és pentóz metabolizmusának anyagcsere folyamatai. Az főbb enzimek keretben, az elsődleges anyagcsere termékek vastagon szedve, az anyagcsere folyamatok elágazási pontjai aláhúzva szerepelnek (GÄNZLE, 2015).

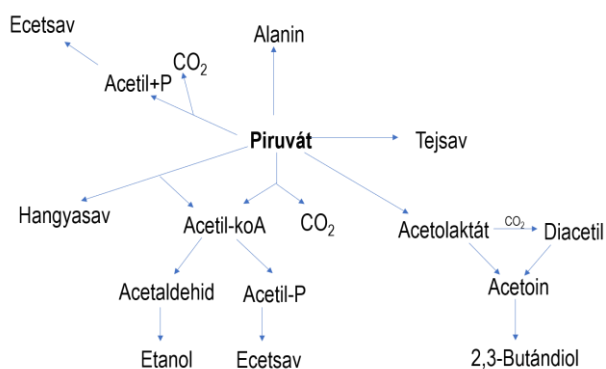
3.3.2.1. Tejsavizomerek élettani hatásai

A tejsavbaktériumok a tejsav két sztereo-izomerjét, L (+) és D (-) tejsavat képesek előállítani. A két vegyület aránya az adott faj és a környezeti paraméterek (inokulum-méret, hőmérséklet, pH) függvénye (ILINO *ET AL.*, 2003; LIU, 2003; TRONTEL *ET AL.*, 2011; ELDELEKLIOĞLU *ET AL.*, 2013).

Az L laktát az emberi emésztőrendszer számára könnyen metabolizálható, a D izomer lebontása azonban rendkívül lassú (ADEVA-ANDANY *ET AL.*, 2014; MONROE *ET AL.*, 2019). Szélsőséges esetekben (rövid-bélszindrómás, és felszívódási rendellenességekkel küzdő betegek esetén) a nagyobb mennyiségben fogyasztott, vagy a bél-mikrobióta által termelt D-laktát, felhalmozódhat a vérsérumban. A vérsérumban magas D-laktát koncentrációja neurotoxikus hatású, és az úgynevezett D-acidózis tünetegyütteshez vezet, mely tünetei jellemzően a delírium, ataxia és akadozó beszéd. A tünetek rendszerint a D-laktátot tartalmazó, illetve magas-szénhidrát-tartalmú élelmiszerek kerülésével, szélsőséges esetben pedig bélmikrobióta-transzplantációval kezelhetők (EWASCHUK *ET AL.*, 2005; TRONTEL *ET AL.*, 2011; KOWLGI ÉS CHHABRA, 2015; DAVIDOVICS *ET AL.*, 2017; FABIAN *ET AL.*, 2017).

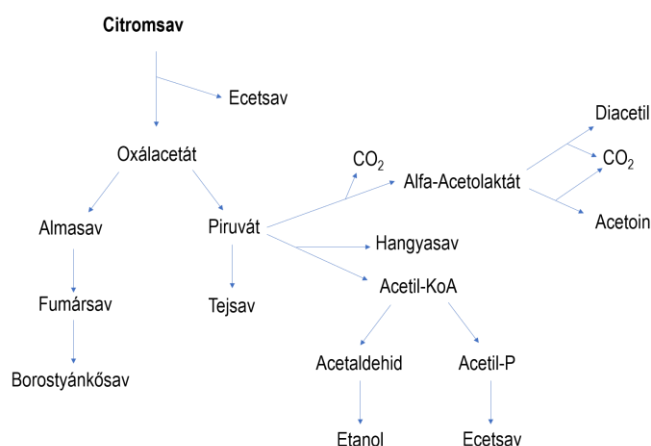
3.3.2.2. A tejsavbaktériumok alternatív metabolikus útvonalai

A homo- és heterofermentatív tejsavbaktériumok alacsony glükózszint esetén képesek alternatív útvonalakon, etanol, acetát, formiát, acetoin, diacetil, alfa-acetolaktát szintézisére is (**5. Ábra**). Az alternatív útvonalak közös pontja a piruvát, a keletkezett anyagcsere-termékek aránya és mennyisége az elérhető tápanyag és oxigén függvénye (LIU, 2003; GÄNZLE, 2015).



5. Ábra: Tejsavbaktériumok alternatív metabolikus útvonalain potenciálisan keletkező anyagcsere-termékek. (LIU, 2003; GÄNZLE, 2015)

Egyes tejsavbaktérium törzsek (pl. *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, néhány *Leuconostoc* és *Weissella* faj törzsei) képesek a citromsav hasznosítására, melyből különböző szerves savakat (almasav, borostyánkősav, tejsav, ecetsav), alkoholt, vagy aromaanyagokat (acetoin, diacetil butándiol) képeznek (**6. Ábra**). A citrát-hasznosító, aroma-képző törzsek kiemelten fontosak a kedvező érzékszervi tulajdonságú tejipari termékek kialakítása során (PEDERSEN *ET AL.*, 2012; RICCIARDI *ET AL.*, 2019).



6. Ábra: Tejsavbaktérium citromsav-hasznosítása során potenciálisan keletkező anyagcseretermékek (GÄNZLE, 2015).

3.3.3. Tejsavbaktériumok sajátosságai: metabolikus flexibilitás

A tejsavbaktériumok jellemzően könnyen alkalmazkodnak a változó környezethez. Képesek az elérhető környezeti paraméterek (elérhető tápanyagforrások, oxigén jelenléte, pH) függvényében anyagcsere-útvonalaik megváltoztatására (PLUMED-FERRER *ET AL.*, 2008; MATARAGAS, 2020).

A környezethez való adaptációs képességük másik jellemzője, hogy a tejsavbaktériumok a különböző stressz-hatásokra változatos fiziológiai válaszokat adnak (pl.: hidegsokk és hősokk fehérjék és ozmolitok termelése, intracelluláris pH növelése aminosavak-dezaminálásával) (PAPADIMITRIOU *ET AL.*, 2016; WANG *ET AL.*, 2016; GAUCHER *ET AL.*, 2019).

A pH csökkenésre adott stresszválaszok kiemelt jelentőséggel bírnak, mivel a sejtek által termelt és fermentációban felhalmozódó tejsav a pH gyors csökkenéséhez, a sejtek metabolikus aktivitásának csökkenéséhez, majd sejthalálhoz vezet (PAPADIMITRIOU *ET AL.*, 2016; WANG *ET AL.*, 2018). *Lactobacillus plantarum* törzsek esetén a 4,8-as pH egyfajta transzkripciós kapcsolóként működik, ezen érték alá csökkenés esetén a vizsgált törzsek egy sav-tolerancia választ adtak, mely hatással van a szénhidrát, nitrogén és nukleotid metabolizmust, valamint a pH homeosztázist és membrán fluiditást szabályozó gének kifejeződésére (FILANNINO *ET AL.*, 2018). Ipari tejsavas fermentációk során ezért a legtöbb esetben szükséges a pH kézben tartása a megfelelő kihazatalok eléréséhez (ASUNIS *ET AL.*, 2019).

A csoport további jellemzője a nagyfokú genetikai variabilitás. A különböző anyagcsere útvonalak megléte, és szénhidrát-hasznosítás képessége az egyes fajokon belül rendkívül változó. Egyes törzsek rendelkeznek a homo- és heterofermentatív

erjesztéshez szükséges génekkel is, és bizonyos körülmények között képesek váltani a két út között (BURON-MOLES *ET AL.*, 2019; HARLÉ *ET AL.*, 2020; KIM *ET AL.*, 2020; MATARAGAS, 2020).

A csoport metabolikus flexibilitását jó demonstrálja az utóbbi időben nagyobb figyelemhez jutott aerob légzés képessége. A tejsavbaktériumokat alapvetően aerotoleráns anaerob szervezetekként tartjuk számon, ahol a tejsavas fermentáció oxigén közreműködése nélkül játszódik le. Azonban a megszekvenált genomok nagy részében megtalálhatók az aerob légzéshez szükséges genetikai elemek. Az utóbbi években nyilvánvalóvá vált, hogy a tejsavbaktérium fajok nagy része megfelelő körülmények között képes az aerob fermentációról légzésre váltani (GÄNZLE, 2015; ZOTTA *ET AL.*, 2017, 2018). A tejsavbaktériumok légzéséhez oxigén, hem és bizonyos fajok esetében menaquinone jelenléte szükséges. A folyamatot egy egyszerűbb, sejtmembránhoz kötött elektron-transzport lánc bonyolítja le. A szénhidrát-katabolizmus során keletkezett NADH-t egy membránhoz kötött NADH-dehidrogenáz megfosztja elektronjától, majd a menaquinone a szabad elektront a citokróm-oxidázhoz szállítja, mely oxigén és heme jelenlétében azt a membránon kívüli térbe juttatja. Ezt követően a kipumpált elektronokat az F₀F₁ ATP szintáz ATP szintézishez használja fel. Az aerob légzés megléte vélhetően az oxigén jelenlétére adott stressz válasz, azonban bizonyos technológiai szempontból előnyös folyamat: légzés esetén megnő a sejthozam és a baktériumok életképessége, illetve néhány aromaanyag (acetoin és diacetil) termelése is (PEDERSEN *ET AL.*, 2012; RICCIARDI *ET AL.*, 2019).

3.3.4. Anyagcsere útvonalak szabályozása: karbon katabolit represszió

A tejsavbaktériumok különböző anyagcsere útvonalakon keresztül számos cukor hasznosítására képesek. A szénhidrát-felhasználás, és az ehhez szükséges katabolikus folyamatok hierarchikus szabályzás alatt állnak. Az tejsavbaktériumok esetében az elsődleges szénforrás a glükóz, egyéb cukrok (pl. laktóz) felvétele és hasznosítása csak glükóz hiányában következik be (TITGEMEYER ÉS HILLEN, 2002; KOWALCZYK *ET AL.*, 2015; ZÚÑIGA *ET AL.*, 2019).

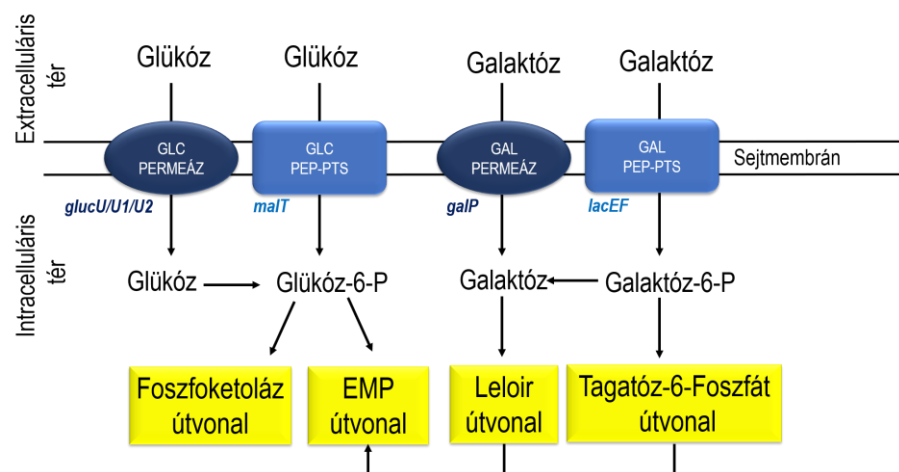
A hierarchikus szénhidrát-felhasználás szabályozásának módja a karbon katabolit represszió (KKR), mely magába foglalja az „alternatív” cukrok hasznosításához szükséges enzimek transzkripciójának szabályzását és az indukáló vegyületek (maguk a szénhidrátok) sejtbe jutásának megakadályozását. A tejsavbaktériumok KKR folyamataiban két fehérje: a HPr foszfortranszferáz, és a KkpA (Katabolit kontrol

protein A) játszik kulcsszerepet. A szabályozás mechanizmusa a HPr foszforilezési helyzetén múlik. Glükóz jelenlétében a HPr szerin pozícióban foszforilezett (HPs-Ser-P), mely gátolja a glükóztól eltérő cukrok sejtbe jutását, valamint indukálja a KkpA által végzett KKR folyamatot. Glükóz hiányában a HPr hisztidin pozícióban foszforilezett (HPr-his-P), mely aktiválja az „alternatív” cukrok (pl. laktóz, maltóz) transzportját a sejtbe, illetve egyéb szubsztrát-specifikus regulátorok működését, melyek indukálják az adott szénhidrát katabolizmusához szükséges enzimek szintézisét (POOLMAN, 1993; DE VOS ÉS VAUGHAN, 1994; ISKANDAR *ET AL.*, 2019).

3.3.5. Szénhidrát felvétel és hasznosítás

3.3.5.1. Monoszacharidok: glükóz és galaktóz-felvétele és hasznosítása

A tejsavbaktériumok számos szénhidrátforrás (hexózok, pentózok, diszacharidok) hasznosítására képesek. Az élelmiszeripari alkalmazásuk során legjelentősebb monoszacharidok (glükóz és galaktóz) felvétele és főbb lebontási útvonalai a **7. Ábrán** kerültek bemutatásra.



7. Ábra: Glükóz és galaktóz felvétel és lebontás tejsavbaktériumokban. Kék színű, dőlt betűkkel az adott transzportrendszert kódoló gén, sárga keretben az egyes anyagcsereútvonalak neve szerepel. (DE VOS ÉS VAUGHAN, 1994; POOLMAN, 2002; ISKANDAR *ET AL.*, 2019)

A baktériumokban alapvetően három különböző típusú transzportrendszer működik: (i) ATP-függő kazetták (ABC transzporterek), (ii) másodlagos permeázok, melyeket a sejtmembrán H^+ vagy Na^+ gradiense vezérel, és a vegyületek uni- anti- vagy szimportját végzik, (iii) foszfortranszferáz-rendszerek (PTS), melyek foszfo-enol-piruvát (PEP) felhasználásával végzik a különböző vegyületek transzlokációját.

A tejsavbaktériumok esetében a cukor-transzportot elsődlegesen az utóbbi két csoport: másodlagos permeázok, és PEP-PTS rendszerek végzik. A két rendszer jelentősége

azonban fajonként eltérő. A mezofil homofermentatív tejsavbaktériumok zöme a PEP/PTS rendszert használja, míg a permeáz rendszer a termofil homofermentatív és a heterofermentatív fajokra jellemző (ZAUNMÜLLER ÉS UNDEN, 2009; GÄNZLE, 2015; ZHAO ÉS GÄNZLE, 2018).

A két rendszer közti fő különbség, hogy míg a permeázokkal felvett cukrok a sejten belülré eredeti formájukba jutnak, a PEP-PTS által bevitt cukrok a transzport során foszforileződnek. A sejten belül a glükóz homofermentatív erjedés esetén a glikolízis (EMP útvonal), heterofermentatív erjedés során pedig a foszfoketoláz útvonalon át alakul energiává és fermentációs termékekké.

A galaktóz a Leloir vagy Tagatóz-6-foszfát anyagcsereúton keresztül glükóz-6-foszfáttá és trióz-foszfátokká alakul, és belép a glikolízisbe (EMP útvonal). Bizonyos tejsavbaktériumok nem rendelkeznek a galaktóz-metabolizmus enzimjeivel, ilyen pl. számos *Streptococcus thermophilus* és *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* törzs. Ebben az esetben a laktóz hidrolízisét követően a galaktóz a sejten kívüli térbe változatlan formában kiválasztódik (KOWALCZYK ET AL., 2015; ISKANDAR ET AL., 2019).

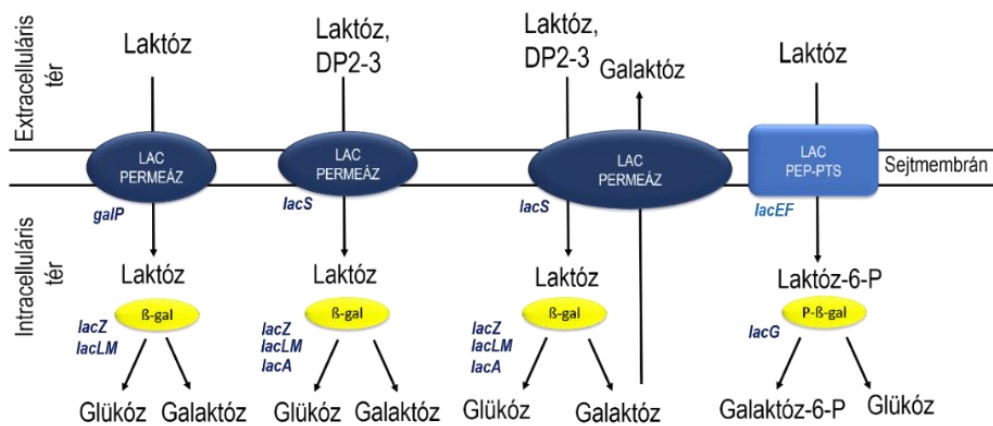
3.3.5.2. Di- és oligoszacharidok - laktóz és GOS - felvétele és hasznosítása

A glükózhoz és galaktózhoz hasonlóan a laktóz is a PEP-PTS vagy permeáz rendszeren keresztül juthat az intracelluláris térbe. Az di- és triszacharidokat (DP2-3) ezzel szemben a tejsavbaktériumok csak permeáz rendszereken keresztül veszik fel (**8. Ábra**).

A sejten belül a laktóz monomerjeire: glükózra és galaktózra bomlik, melyek belépnek az előző pontban bemutatott anyagcsere útvonalakba. A laktózbontást végző enzim alapvetően a β -galaktozidáz, pontos típusa az alkalmazott transzport mechanizmustól és tejsavbaktérium fajtától is függ (POOLMAN, 1993; DE VOS ÉS VAUGHAN, 1994; ISKANDAR ET AL., 2019).

A PEP-PTS rendszerek működése esetén a felvett laktóz foszforileződik, és a laktóz-6-foszfátot egy *lacG* kódolta foszfo- β -galaktozidáz enzim bontja galaktóz-6-foszfátra és glükózra.

A *lacS* és *galP* permeáz rendszerek esetén a laktóz eredeti formájában kerül be az intracelluláris térbe, majd egy, a *lacZ* vagy *lacLM* gének által kódolt β -galaktozidáz bontja glükózra és galaktózra. A *lacS* által kódolt permeáz két módon: proton szimporterként és galaktóz-antiporterként működhet. Az antiport funkciót elsősorban a galaktóz metabolizmusra nem képes tejsavbaktérium fajok alkalmazzák.



8. Ábra: Laktóz és DP2-DP3 GOS felvétel, és lebontás tejsavbaktériumokban. Kék színű, dőlt betűkkel az adott transzportrendszert vagy enzimet kódoló gén neve szerepel (KOWALCZYK ET AL., 2015; ZHAO ÉS GÄNZLE, 2018; ISKANDAR ET AL., 2019)

A lacS permeáz rendszer a tejsavbaktériumokban kiemelt szereppel bír. Egyrészt ezen keresztül zajlik a laktóz-transzport zöme, valamint kizárólagosan itt lehetséges a DP 2-3 galakto-oligoszacharid frakciók felvétele sejtbe (ANDERSEN ET AL., 2011, 2012; ZÚÑIGA ET AL., 2019). Di- tri- és tetraszacharidok transzportját már megfigyelték több tejsavbaktérium törzs esetében is, azonban nagyobb (>DP4) GOS frakciók felvétele nem lehetséges (SCHWAB ÉS GÄNZLE, 2011; GÄNZLE ÉS FOLLADOR, 2012; ZHAO ÉS GÄNZLE, 2018).

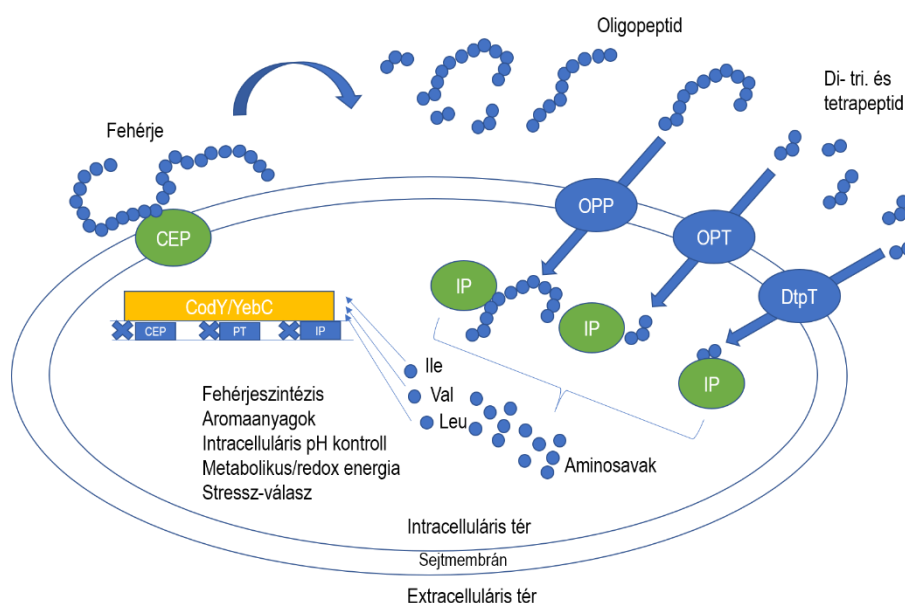
A DP2-DP3 GOS molekulák bontásának pontos mechanizmusa nem teljesen ismert, jelenleg több kutatócsoport dolgozik a folyamat feltérképezésén. Jelenlegi ismereteink szerint a sejtben belül két β-galaktozidáz típus szükséges a GOS molekulák teljes bontásához: a lacZ és lacLM típusú enzimek a laktózban is megtalálható galaktóz-glükóz β(1-4) kötést bontják, míg a lacA kódolt β-galaktozidáz képes az egyéb, gal-gal és gal-glü kötések bontását elvégezni. Nem minden tejsavbaktérium rendelkezik lacA β-galaktozidázzal, azonban a probiotikus, GOS-t hasznosítani képes törzsekben rendszerint megtalálható ez az enzim (THONGARAM ET AL., 2017; RATTANAPRASERT ET AL., 2019).

3.3.6. Fehérjék, peptidek felvétele és hasznosítása

A tejsavbaktériumok jelentős része aminosav-auxotrófiákkal rendelkezik, ezért a szaporodásukhoz szükséges aminosavakat környezetükből veszik fel. Az aminosavak természetben fehérjékben találhatóak meg. Ezek bontásához, és a keletkezett peptidek

felvételéhez és további emésztéséhez alkalmazott proteolitikus rendszer a **9. Ábrán** látható.

A tejsavbaktériumok proteolitikus folyamatai három részre oszthatók: (i) protein degradáció (ii) peptid transzport (iii) peptid degradáció (iv) aminosav katabolizmus. A sejten kívüli, nagy méretű fehérjét első lépésben egy sejtfalhoz kötött proteináz (CEP) peptidekre bontja. Ezt követően az oligopeptidek, és a kisebb di- tri- és tetrapeptidek különböző transzportereken keresztül (OPP, OPT, DtpT) bejutnak a sejtbe, ahol intracelluláris endopeptidázok (IP) tovább hasítják őket aminosavakká (SAVIJOKI *ET AL.*, 2006; LIU *ET AL.*, 2010; KOWALCZYK *ET AL.*, 2015).



9. Ábra: Tejsavbaktériumok proteolitikus rendszere. CEP: sejtfalhoz kötött proteináz; OPP: ATP függő oligopeptid permeáz (ABC transzporter); OPT: ATP függő peptid ABC transzporter; DtpT: ion-függő di-és tripeptid permeáz; IP: Intracelluláris peptidázok; Ile, Val, Leu: izoleucin, leucin és valin; CodY: transzkripciós regulátor *Lactococcus* és *Streptococcus* fajokban; YebC: transzkripciós regulátor *Lactobacillus* fajokban. (FERNÁNDEZ ÉS ZÚÑIGA, 2006; SAVIJOKI *ET AL.*, 2006; KOWALCZYK *ET AL.*, 2015).

A szabad, elágazó szénláncú aminosavak intracelluláris koncentrációja negatív visszacsatolást ad a CodY vagy YebC transzkripciós regulátoroknak. Az izoleucin, leucin és valin magas koncentrációja represszálja a proteolitikus rendszer több tagjának (CEP, oligopeptid transzporter és egyes intracelluláris peptidázok) transzkripcióját, ezzel meggátolva az energiaigényes fehérjeszintézist. A gyakorlatban ez azt jelenti, hogy magas szabad aminosav- vagy di- tri és tetrapeptid tartalmú közegben a proteolitikus rendszer aktivitása alacsony, azonban ezek hiányában a fehérjék bontása, így a proteolitikus rendszer összetevőinek szintézise szükséges, ezért

a proteolitikus aktivitás megemelkedik (GUÉDON *ET AL.*, 2005; BROWN *ET AL.*, 2017).

A szabad aminosavak különböző anabolikus folyamatokon keresztül a sejt saját fehérjéibe épülnek be (enzimek, sejtkomponensek stb.), valamint anyagcseretermékké (aromaanyagok, biogén aminok) alakulnak. Az aminosavak lebontása szolgáltat metabolikus energiát, illetve részt vehetnek koenzimek redukálásában és stressz válaszokban is (pl. intracelluláris pH stabilizálásában dekarboxilezés vagy dezaminálás által) (LIU *ET AL.*, 2003; ARDÖ, 2006; FERNÁNDEZ ÉS ZÚÑIGA, 2006; SAVIJOKI *ET AL.*, 2006).

3.3.7. Tejsavó alapú, tejsavasan erjesztett italok

3.3.7.1. Előnyök, fogyasztói hozzáállás

Az édes tejsavó értéknövelő kezelésének egy, az élelmiszeripar számára csábító lehetősége az ital célú feldolgozása. Az ilyen jellegű kezelés fő előnye, hogy nem szükséges a savó víztartalmának eltávolítása, így elkerülhető több, energiaigényes szeparációs lépés. Az előnytelen ízprofilú nyers savó-alapú italok relatív sikertelenségét követően az utóbbi időben az érdeklődés a fermentált savó-alapú italok felé fordult. Az erjesztett savó-alapú italok előnye, hogy a végtermék magában hordozza fermentált termékek pozitív élettani hatásait (pl. csökkent laktóztartalom, a tejsav kedvező élettani és antimikrobás hatás), illetve a mikrobák által termelt aromaanyagok karakteres ízt eredményeznek (KAR ÉS MISRA, 1999; MARSH *ET AL.*, 2014; PESCUA *ET AL.*, 2015).

A jelenleg a kereskedelmi forgalomban kapható fermentált savó-alapú italok száma alacsony. A kategória legsikeresebb terméke a svájci Rivella, mely egy savó permeátum alapú, tejsavasan fermentált, ízesített és széndioxiddal telített ital. A termék az 1950-es években került piacra, azonban Svájcban kívül nem ért el nagyobb népszerűséget (CHAVAN *ET AL.*, 2015).

Az elmúlt években az egészségtudatos táplálkozás térnyerésével a fermentált élelmiszerek fogyasztói elfogadottsága lényegesen növekedett. A savó-alapú fermentált italok ismert egészségügyi hatását kiemelve értéknövelt, funkcionális termékként pozícionálhatók (FRANKOWSKI *ET AL.*, 2014; MARSH *ET AL.*, 2014; BIMBO *ET AL.*, 2017; ZOTTA *ET AL.*, 2020).

3.3.7.2. A savó fermentált ital-célú feldolgozása

A savó-alapú italok kifejlesztésével foglalkozó munkák két csoportba sorolhatók: (i) munkák, melyek a fermentált savó egészségügyi hatását bizonyítják (ii) termékfejlesztés-orientált munkák, melyekben konkrét ital-formulálás és érzékszervi minősítés is lezajlik. A tejsavasan erjesztett savó-alapú italok fejlesztése során sok esetben joghurt kultúrák, vagy probiotikus törzsek kerültek alkalmazásra. A témával kapcsolatos publikációkat az **5. Táblázatban** foglaltam össze.

Több kutatócsoport bizonyította a fermentál savó fogyasztásával járó pozitív élettani hatásokat, melyek között szerepel az antimikrobás (SUGIHARTO *ET AL.*, 2015; LUZ *ET AL.*, 2018; CORDEIRO *ET AL.*, 2019), vérnyomás-csökkentő (LUZ *ET AL.*, 2018), antioxidáns (VIRTANEN *ET AL.*, 2007; ZHAO *ET AL.*, 2014), immunrendszer-stimuláló aktivitás (GARCÍA *ET AL.*, 2020), valamint a tejsavas fermentáció folytán az allergén fehérjék bontása is bekövetkezik (WRÓBLEWSKA *ET AL.*, 2019).

5. Táblázat: Savó-alapú italok kifejlesztésével foglalkozó publikációk összefoglalása

Alap*	Kiegészítés	Tejsavbaktérium**	Forrás
SS	Ferm. után: 10% szacharóz, narancs aroma	<i>L. delbr. ssp. bulg.</i> , <i>S. thermophilus</i>	(KAR ÉS MISRA, 1999)
ÉS	hidrokolloidok:	<i>L. delbr. ssp. bulg.</i> <i>S. thermophilus</i>	(GALLARDO- ESCAMILLA <i>ET AL.</i> , 2007)
ÉS	7% szacharóz,+0.4 % pektin	<i>L. reuteri</i> , <i>B. bifidum</i>	(HERNANDEZ- MENDOZA <i>ET AL.</i> , 2007)
WPC	2% sovány tejpör, 10.3% szacharóz	<i>L. plantarum</i> , <i>L. lactis</i>	(CHO <i>ET AL.</i> , 2015)
ÉS	25/50% Pasztörözött tej	<i>S. thermophilus</i> & <i>L. delbr. ssp. bulg.</i>	(LEGAROVÁ ÉS KOUŘIMSKÁ, 2010)
WPC	Ferm. után: 75% baracklé	<i>L. acidophilus</i> <i>L. delbr. ssp. bulg.</i> <i>S. thermophilus</i>	(PESCUMA <i>ET AL.</i> , 2010)
SS	-	<i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i>	(SAEED <i>ET AL.</i> , 2013)
WPC/SP	Ferm. előtt: 10% mango gyümölcsrost, 5% szacharóz, mangó aroma	<i>L. acidophilus</i> & <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i>	(PEREIRA <i>ET AL.</i> , 2015)
ÉS/SS	Szacharózzal kiegészített narancs koncentrátum	<i>S. thermophilus</i> , <i>L. acidophilus</i> , és <i>B. sp.</i>	(POGON <i>ET AL.</i> , 2015)
S	-	<i>S. thermophilus</i> , <i>L. delbr. ssp. bulg.</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. casei</i> <i>L. johnsonii</i> <i>L. rhamnosus</i>	(MARAGKOUDAKI S <i>ET AL.</i> , 2016)

5. Táblázat folyt.

ÉS	0-15%, mangólé, 5% szacharóz	<i>L. casei</i>	(DESNILASARI ÉS KUMALASARI, 2017)
ÉS	0-15% paradicsomlé, 10% szacharóz, 0.7% pektin	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i>	(NURSIWI ET AL., 2017)

*ÉS=Édes savó; SS= Savanyú savó; WPC=Savófehérje koncentrátum; SP=Savó permeátum; Scotta:ricottak-savó, alacsony fehérjetartalommal

***L.* = *Lactobacillus*; *S.* = *Streptococcus*; *B.* = *Bifidobacterium*

A savó-alapú italkészítés a legtöbb esetben a tejsavas fermentáció előtt vagy után valamilyen gyümölcs ízestés és esetlegesen cukor hozzáadását jelenti. Az így elkészített italok közepesen elfogadottak: a termékek érzékszervi bírálatokon 5/7; 6,5/10 és 7,4/10-es pontszámokat értek el (CHO ET AL., 2015; KARÉSMISRA 1999; SAEED ET AL., 2013), Desnilasari és munkatársai (2017) pedig enyhén elutasító-enyhén kedvelő reakciókat rögzítettek kóstoltatás során.

A fermentált savóitalok elfogadottsága potenciálisan tovább növelhető további funkcionális komponensek (prebiotikumok, vitaminok stb.) hozzáadásával, mivel fogyasztói elfogadás mértéke alapvetően nagyobb olyan termékek esetén, melyhez pozitív élettani hatások társíthatók (BIMBO ET AL., 2017).

3.3.7.3. Savó és savó permeátum tejsavas fermentációja: mikrobiológiai szempontok

A savó, és savó permeátum tejsavas erjesztésének fő kérdése, hogy a tejsavbaktériumok összetett tápanyag- és szerves nitrogénforrás igénye összeegyeztethető-e ezekkel a közegekkel (PANESAR ET AL., 2007; LAVARI ET AL., 2014; ZOTTA ET AL., 2020).

Az 5. táblázatban bemutatott munkák a savó-alapú fermentált italok előállítása során elsősorban érzékszervi, nem pedig mikrobiológiai és fermentáció-kinetikai szempontokra koncentráltak. Azonban savóval, és savó permeátummal, mint ipari tejsav és tejsavbaktérium-biomassza előállítás prekursora több kutatócsoport is foglalkozott.

Tápanyag-forrás szempontjából az édes savóban megtalálható a savófehérje, mint szerves nitrogénforrás, amit a tejsavbaktériumok nagy része proteolitikus rendszerük segítségével hasznosítani tud (GUERRA ET AL., 2001; MONKOONDEE ET AL., 2016; FAWOLE ÉS UNUOFIN, 2019). A különböző tejsavbaktérium törzsek fehérjebontó képessége azonban nagymértékben eltér, valamint a komplex

proteolitikus rendszerük szintézise rendkívül energiaigényes, ezért a fehérjebontást igénylő fermentációk lassú lefolyásúak (PESCUMA *ET AL.*, 2008; VUKOTIĆ *ET AL.*, 2016). Az ipari erjesztések intenzifikálásához ezért a teljes savót is rendszerint könnyen elérhető nitrogénforrásokkal, elsősorban élesztőkivonattal (PANESAR *ET AL.*, 2007; BERNÁRDEZ *ET AL.*, 2008; TALEGHANI *ET AL.*, 2016; BARTKIENE *ET AL.*, 2018) egészítik ki.

A témával kapcsolatos publikációk alapján elmondható, hogy a megfelelő szaporodás és tejsav-termelés eléréséhez a savó permeátum nitrogénforrással való kiegészítése szükséges, ami általában élesztőkivonat (TERPSTRA *ET AL.*, 2001; GONZÁLEZ *ET AL.*, 2007; ELDELEKLIÖĞLU *ET AL.*, 2013; MAWGOUD *ET AL.*, 2016), pepton vagy hidrolizált kazein-, illetve savófehérje (TULI *ET AL.*, 1985; FITZPATRICK ÉS O'KEEFFE, 2001; PRASAD *ET AL.*, 2014; MAWGOUD *ET AL.*, 2016), esetleg egyéb, szerves nitrogénben gazdag élelmiszeripari hulladék (PAULI ÉS FITZPATRICK, 2002).

3.3.7.4. Savó permeátum, mint fermentációs közeg: lehetőségek és korlátok

Az 5. Táblázatban bemutatott munkák közös jellemzője, hogy a fermentációk alapját az édes- vagy savanyú savó, illetve különböző savófehérje koncentrátumok adják. Az iparban azonban a savófehérjék felértékelődése következtében a tejsavó nagyrészt frakcionálásra kerül, hogy a savófehérjék magas piaci értéken tápanyag kiegészítőként, koncentrátum vagy fehérje-izolátum formájában kerüljenek forgalomba. Ennek következtében nagy mennyiségben keletkezik fehérje-mentes savó permeátum. Alacsony fehérjetartalmú savó keletkezik továbbá a görög-típusú joghurtok, és ricotta sajtok előállításánál is, mely termékek gyártása az utóbbi időben rendkívüli módon megemelkedett. Így a savófehérjék szeparálása és új, alacsony fehérjetartalmú savókat eredményező gyártástechnológiák következtében a fehérjementes savó és savó-permeátum hasznosítása fontos kérdéssé vált (SMITHERS, 2008; NATH *ET AL.*, 2015; TAVARES ÉS MALCATA, 2016; RAMA *ET AL.*, 2019).

A fehérjementes-savó (permeátum) ital-célú feldolgozásával az 5. táblázatban bemutatott munkák nem foglalkoztak részletesen. Pereira és munkatársai (2015) ugyan vizsgálták a savó-permeátum, mint ital-alap használhatóságát, azonban ezt főként érzékszervi vonatkozásban tették. Mivel a savó permeátum tejsavas fermentációjával kapcsolatosan rendkívül kevés mikrobiológiai és fermentáció-kinetikai ismerettel rendelkezünk, ezért doktori munkám célja ezen téma részletes vizsgálata.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. Felhasznált anyagok

4.1.1. Demineralizált (sómentes) tejsavó

A savó membránszeparációjának vizsgálata kereskedelmi forgalomban kapható, Deminal90 (FrieslandCampina DOMO, Beilen, Hollandia), demineralizált (sómentes) savópor felhasználásával történt, melyből az eredeti savó ásványi anyag tartalmának 90%-a eltávolításra került. A savóport ionmentes vízben oldottam, ezzel egy 7,4 g/L fehérjét és 46,9 g/L laktóztartalmú modell savó-oldatot létrehozva. Az így előállított modell oldatra a dolgozat további részeiben, mint tejsavó hivatkozom.

4.1.2. β -galaktozidáz

A GOS szintézist kereskedelmi forgalomban kapható, *Bacillus circulans* eredetű β -galaktozidáz enzimmal (Biolacta N5, Daiwa Kasei K. K., Japán) végeztem. A pH állításhoz használt NaOH és az enzim aktivitásának méréséhez alkalmazott laktóz-monohidrát a Biolab Kft. (Budapest, Magyarország) terméke volt.

4.1.3. Alkalmazott tejsavbaktérium törzsek

A munka során összesen kilenc tejsavbaktérium törzset vizsgáltam (**6. Táblázat**). A *Lactobacillus* törzsek probiotikus termékekből és különböző törzsgyűjteményekből származtak.

6. Táblázat. Az alkalmazott tejsavbaktérium törzsek listája, forrása, és a törzsek rövidített elnevezése

Tejsavbaktérium törzs	Forrás	Rövidítés
<i>Lactobacillus acidophilus</i> N2	Institute of Dairy Microbiology, Agricultural Faculty, University of Perugia	L.a. N2
<i>Lactobacillus casei</i> PB8	Probiotikus termék (FÜSTÖS ET AL., 2010)	L.c. PB8
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> B397	Institute of Dairy Microbiology, Agricultural Faculty, University of Perugia	L.d. B397
<i>Lactobacillus paracasei</i> PB9	Probiotikus termék (FÜSTÖS ET AL., 2010)	L.pc. PB9
<i>Lactobacillus plantarum</i> 2108	Institute of Dairy Microbiology, Agricultural Faculty, University of Perugia	L.pl. 2108
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> PB10	Probiotikus termék (FÜSTÖS ET AL., 2010)	L.r.PB10
<i>Lactobacillus sakei</i> DSM 20017	DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)	L.s.DSM
<i>Lactococcus cremoris</i> B1	CHN-22 DVS Sajt starter	L.c. B1
<i>Lactococcus lactis</i> A1	CHN-22 DVS Sajt starter	L.l. A1

A *Lactococcus* törzseket egy CHN-22 DVS tejipari sajt starter-kultúrából izoláltam Füstös és munkatársai módszere alapján (FÜSTÖS ET AL., 2010).

A törzsek tárolása -80 °C-on, 20%-os glicerín oldatban történt. A kísérleteket megelőzően a *Lactobacillus* törzseket MRS, a *Lactococcus* törzseket M17 táplevesben, 30 °C-on, 2,5 L Oxoid AnaeroJars (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US) anaerob jarban inkubáltam. A fermentációs kísérletek indítása előtt a tenyészeteket kétszer, fiziológiai sóoldatban mostam.

4.1.4. Alkalmazott *Kluyveromyces* törzsek

A munkám során három, *Kluyveromyces* nemzetséghez tartozó törzssel dolgoztam, melyek különböző törzsgyűjteményekből származtak (7. Táblázat).

7. Táblázat: Az alkalmazott *Kluyveromyces* törzsek listája, forrása és a törzsek rövidített elnevezése

Élesztő törzs	Forrás	Rövidítés
<i>Kluyveromyces lactis</i> DMB K1-RK	SZIE-ÉTK Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszék Törzsgyűjteménye	K.l. K1-RK
<i>Kluyveromyces marxianus</i> DMB Km-RK	SZIE-ÉTK Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszék Törzsgyűjteménye	K.m. Km-RK
<i>Kluyveromyces nonfermentans</i> NCAIM Y.01443	Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye	K.n. 1443

Tárolásuk -80 °C-on, 20%-os glicerín oldatban történt. A kísérleteket megelőzően a fagyasztott törzseket felolvasztottam, majd YEPD táplevesben, 30 °C-on 200 rpm-es kevertetés mellett inkubáltam. A kísérleteket megelőzően a tenyészeteket kétszer, fiziológiai sóoldatban mostam.

4.1.5. Tápközegek és pufferek

4.1.5.1. Tejsavbaktérium törzsek tápanyagigényének meghatározása

A tejsavbaktérium törzsek aminosav-auxotrófiájának és vitaminigényének vizsgálata agardiffúziós és lyukdiffúziós módszerekkel történt. Mindkét esetben Ledesma és munkatársai (1977) által leírt, tejsavbaktériumok tápanyagigény-vizsgálatára kifejlesztett minimál-tápagart alkalmaztam. A tápagar összetétele 10 g/L glükóz; 10 g/L kálium-acetát; 2 g/L dikálium-foszfát; 0,5 g/L nátrium-tioglikolát; 0,2 g/L nátrium-citrát; 0,15 g/L magnézium-szulfát*7H₂O; 0,01 g/L vas-szulfát; 0,02 g/L mangán-szulfát; 1,1 g/L Tween és 15 g/L agar volt (LEDESMA ET AL., 1977). Az

aminosav-auxotrófiák vizsgálata során a hús esszenciális aminosavat egyenként, és csoportokban is vizsgáltam. A kialakított csoportok a **8. Táblázatban** szerepelnek.

8. táblázat: Aminosavak hatásának vizsgálata során kialakított csoportok

I.	II.	III.	IV.
glutamin	arginin	lizin	valin
glutaminsav	szerin	leucin	cisztein
aszparagin	fenilalanin	izoleucin	treonin
aszparaginsav	triptofán	alanin	prolin

A vitaminigény meghatározásához alkalmazott vitamin oldat összetétele a következő volt: 0,002 g/L folsav (B9 vitamin); 0,002 g/L biotin (H vitamin); 0,4 g/L kalcium-pantotenát (B5 vitamin); 2 g/L inozitol (B8 vitamin); 0,4 g/L niacin (B3 vitamin); 0,2g/L para-aminobenzoesav (B10 vitamin); 0,4 g/L piridoxin-hidroklorid (B6 vitamin); 0,4 g/L tiamin-hidroklorid (B1 vitamin); 0,2 g/L riboflavin (B2 vitamin).

4.1.5.2. Savó permeátum tejsavas fermentációjának vizsgálata

A tejsavas fermentáció alapját a 4.2.1. pontban leírt módon előállított sűrített savó-permeátum adta. Az tejsavbaktériumokkal végzett erjesztési kísérletekhez a koncentrált savó permeátumot ioncserélt vízzel hígítottam 20 g/L laktóztartalom eléréséig. Az így előállított oldatot fermentációs közegként használtam hozzáadott tápanyagok nélkül (SP), valamint minimál sókkal (SP+MM), szervetlen (inorganikus) nitrogénnel (SP+IN), és szerves (organikus) nitrogénnel (SP+ON) kiegészítve. Az egyes tápközégek összetétele a **9. Táblázatban** látható.

9. Táblázat: Savó permeátum tejsavas fermentációja során alkalmazott tápközégek: Savó permeátum hozzáadott tápanyagok nélkül (SP), minimál sókkal (SP+MM), szervetlen (inorganikus) nitrogénnel (SP+IN), szerves (organikus) nitrogénnel (SP+ON), savófehérjével (SP+SF), kazein peptonnal (SP+KP) és szója peptonnal (SP+SZP) kiegészítve.

Tápközeg komponens	Laktóz g/L*	∑MM** sók g/L	(NH ₄) ₂ SO ₄ g/L	Savófehérje, g/L	Kazein pepton, g/L	Szója pepton, g/L
SP	20	-	-	-	-	-
SP+MM	20	5,73	-	-	-	-
SP+IN	20	-	5,0	-	-	-
SP+ON	20	-	-	5,0	-	-
SP+SF	10	-	-	2,5	-	-
SP+KP	10	-	-	-	2,5	-
SP+SZP	10	-	-	-	-	2,5

*A tápközégek laktóztartalma a hígított savó permeátumból ered

**MM összetétele: 0,5 g/L NaCl; 5 g/L (NH₄)₂SO₄; 0.2 g/L MgSO₄*7H₂O; 0.02 g/L MnSO₄*4H₂O, 0.01 g/L FeSO₄*7H₂O

A kapott eredmények alapján egy további kísérletsorozatban különböző szerves nitrogénforrások hatását vizsgáltam, mely során a savó permeátumot (SP) savófehérjével (SP+SF), kazein peptonnal (SP+KP) és szója peptonnal (SP+SZP) egészítettem ki (**9. Táblázat**).

4.1.5.3. Szerves nitrogénforrások tejsavas fermentációra gyakorolt hatásának vizsgálata

Méréseim során vizsgáltam a különböző szerves nitrogénforrások laktóz és nitrogénfelhasználására gyakorolt hatását tejsavas fermentáció során. Ehhez az 1%-os laktóz oldathoz savófehérjét (L+SF), illetve kazein peptont (L+KP) és szója peptont (L+SZP) adtam. A tápközegek összetétele a **10. Táblázatban** szerepel.

***10. Táblázat:** Szerves nitrogénforrások hatásának vizsgálatához használt tápközegek: Laktóz savófehérjével (L+SF), kazein peptonnal (L+KP) és szója peptonnal (L+SZP) kiegészítve.*

Tápközeg	Laktóz-monohidrát g/L	Savófehérje g/L	Kazein pepton g/L	Szója pepton g/L
L+SF	10	2,5	-	-
L+KP	10	-	2,5	-
L+SZP	10	-	-	2,5

4.1.5.4. GOS szirup tejsavas fermentációjának vizsgálata

A fermentációs vizsgálatok során alkalmazott, magas mono- és diszacharid tartalmú Vivinal GOS Syrup – a továbbiakban nyers GOS - a FrieslandCampina DOMO (Beilen, The Netherlands) terméke volt. Összetétele HPLC-RI analízis alapján 40 w/w % DP3-DP6 (24 w/w % DP3, 12 w/w % DP4, 4 w/w % DP5-6), 39 w/w % DP2 (mely a laktóz és nem-laktóz DP2 frakciók összege), 19 w/w % glükóz és 2 w/w % galaktóz. A gyártói specifikáció alapján a DP2 frakció teljes szénhidrát tartalomra vetítve 21 w/w% laktózból és 18 w/w% nem-laktóz diszacharidból állt.

A tejsavbaktérium törzsekkel végzett fermentációs kísérletek során a VivinalGOS szirupot 15 g/L-re hígítottam. A hígítás mértékének meghatározása a 3.1.5.2. pontban leírt kísérletek alapján, a vizsgált tejsavbaktérium szénhidrát-hasznosítási képességei ismeretében történt. A hígított VivinalGOS szirupot különböző koncentrációkban kazein peptonnal (KP) illetve szója peptonnal (SZP) egészítettem ki. A tápközegek pontos összetétele a **11. Táblázatban** látható.

11. Táblázat: Tejsavbaktériumok szelektív mono- és diszacharid fermentációs képességének szűrése során alkalmazott tápközegek. 15 g/L-esre hígított VivinalGOS szirup (GOS), 0,25-10 g/L kazein peptonnal (KP) és szója peptonnal (SZP) kiegészítve.

Tápközeg	DP3-6 g/L	DP2 g/L	Glükóz g/L	Galaktóz g/L	Kazein pepton g/L	Szója pepton g/L
GOS+0,25 KP	6,0	6,0	2,5	0,5	0,25	-
GOS+2,5 KP	6,0	6,0	2,5	0,5	2,5	-
GOS+10 KP	6,0	6,0	2,5	0,5	10	-
GOS+0,25 SZP	6,0	6,0	2,5	0,5	-	0,25
GOS+2,5 SZP	6,0	6,0	2,5	0,5	-	2,5
GOS+10 SZP	6,0	6,0	2,5	0,5	-	10

A szelektált tejsavbaktérium törzsek esetén vizsgáltam a puffereles GOS fermentációra gyakorolt hatását is. Ehhez az 15 g/L-esre hígított Vivinal GOS szirupot 2,5 g/L szója (GOS+SZP) vagy kazein peptonnal (GOS+KP) egészítettem ki, és a közeget pH=7,0-re pufferelem foszfát (KH_2PO_4 - K_2HPO_4) pufferral, különböző koncentrációkban (**12. Táblázat**).

12. Táblázat: Tejsavbaktérium törzsek szelektív GOS fermentációs képességének puffereles mellett történő vizsgálata során alkalmazott tápközegek. 15 g/L-esre hígított VivinalGOS szirup (GOS), 2,5 g/L kazein peptonnal (KP) és szója peptonnal (SZP), és 0,05-0,15 M kálium-foszfát pufferral kiegészítve.

Tápközeg	DP3-6 g/L	DP2 g/L	Glükóz g/L	Galaktóz g/L	Kazein pepton g/L	Szója pepton g/L	pH=7 foszfát puffer M
GOS+KP Puffer nélkül	6,0	6,0	2,5	0,5	2,5	-	0
GOS+KP 0,05 M	6,0	6,0	2,5	0,5	2,5	-	0,05
GOS+KP 0,10 M	6,0	6,0	2,5	0,5	2,5	-	0,10
GOS+KP 0,15 M	6,0	6,0	2,5	0,5	2,5	-	0,15
GOS+SZP Puffer nélkül	6,0	6,0	2,5	0,5	-	2,5	0
GOS+ SZP 0,05 M	6,0	6,0	2,5	0,5	-	2,5	0,05
GOS+ SZP 0,10 M	6,0	6,0	2,5	0,5	-	2,5	0,10
GOS+ SZP 0,15 M	6,0	6,0	2,5	0,5	-	2,5	0,15

4.1.5.5. Nyers GOS szirup *Kluyveromyces* törzsekkel végzett szelektív fermentációjának vizsgálata

Az élesztőkkel végzett GOS fermentációs kísérletekhez a 4.1.5.4-es szekcióban bemutatott Vivinal GOS szirupot 100 g/L koncentrációra hígítottam. A hígítás mértéke előzetes, szénhidrát-felhasználással kapcsolatos laboratóriumi kísérlet-sorozat alapján került meghatározásra (PÁZMÁNDI *ET AL.*, 2020). A méréseim során a hígított Vivinal GOS szirupot élesztőkivonattal (YE), vagy minimál sókkal (MM) egészítettem ki. A tápközegek összetétele a **13. Táblázatban** szerepel.

13. Táblázat: *Kluyveromyces* törzsek szelektív GOS fermentációs képességének vizsgálata során alkalmazott tápközegek

Tápközeg	DP3-6 g/L	DP2 g/L	Glükóz g/L	Galaktóz g/L	ΣMM sók* (MM)	Élesztő- kivonat g/L
10% GOS+YE	40	40	16,7	3,3	-	5
10% GOS+MM	40	40	16,7	3,3	6,5	-

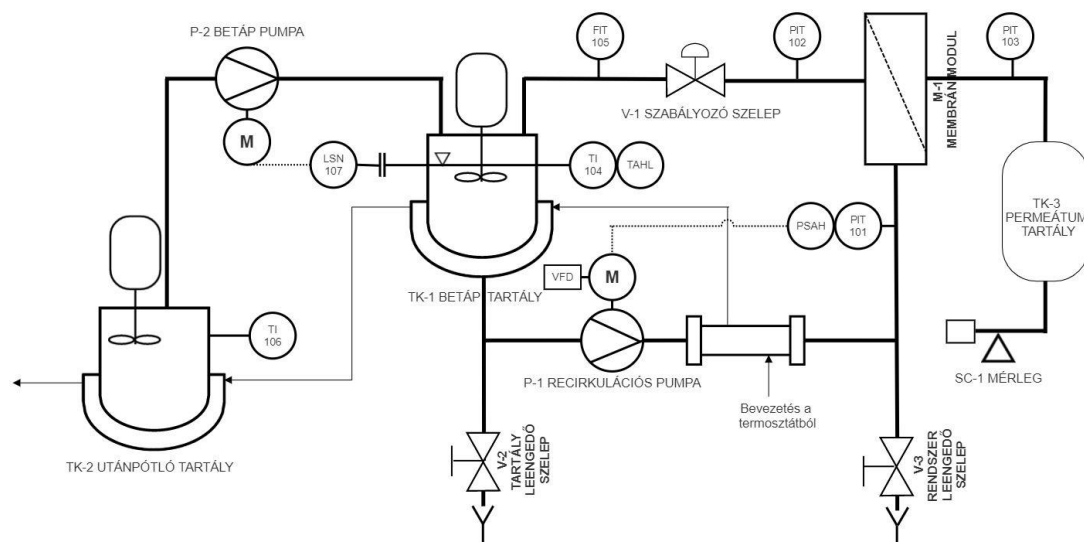
*MM összetétele: 5 g/L (NH₄)₂SO₄, 1 g/L KH₂PO₄, 0,5 g/L MgSO₄*7H₂O

4.2. Módszerek

4.2.1. Tejsavó membrános frakcionálása

4.2.1.1. Membránszűrő berendezés

A tejsavó membránseparációja (ultra-, dia- és nanoszűrés) során alkalmazott berendezés vázlatos rajza a **10. ábrán** látható.



10. Ábra: Savó membránseparációjához alkalmazott berendezés vázlatos rajza.

A berendezés fő eleme a 4 liter űrtartalmú betáp tartály (TK-1) és a membrán modul (M1) volt. A savó 0,16 m³/óra térfogatáramú áramlását egy recirkulációs szivattyú (P-1) biztosította. Az áramlási sebesség szabályozását a szivattyú változtatható frekvenciájú meghajtója (VFD), monitorozását egy indukciós áramlásmérő (FIT-105) tette lehetővé. A membrán modulon keresztül történő áthaladást követően a retentátum a betáp tartályba (TK-1) került visszavezetésre, a permeátum pedig egy külön tartályban (TK-3) gyűlt össze. Az elválasztás hajtóerejét szolgáltató transzmembrán nyomás beállítása a V-1 szeleppel történt. A transzmembrán nyomást két: egy magas (PIT-102; 0-60 bar) és egy alacsony (PIT-103; 0-5 bar) nyomás detektálására kialakított érzékelő végezte. Túlnyomás esetén a recirkulációs szivattyú működését egy nyomásérzékelővel társított magasnyomású kapcsoló (PIT-101-PSAH) szakította meg.

4.2.1.2. Ultra- és diaszűrés

A savó ultra- (UF) és diaszűrésével (DF) célom a savó frakcionálása és egy laktózmentes savófehérje sűrítmény, valamint egy nagy tisztaságú laktóz oldat előállítása volt. Az UF és DF egy 20 kDa-s vágási értékű, 0,32 m² felületű poliéter-szulfon SM spiráltekercs membránnal (Synder Filtration Inc., Vacaville, USA) történt. A szűrés 3 bar transzmembrán nyomáskülönbséggel, 27 °C-on zajlott. A folyamat két lépésből állt: egy rátáplálásos üzemvitelű ultraszűrésből és az azt követő, állandó-térfogaton végzett diaszűrésből.

Az UF-et megelőzően az összesen 20 L térfogatú savóból 4 L a betáp tartályba (TK-1), 16 L az utánpótlás tartályba (TK-2) került. Az UF során a permeátum elválasztása folyamatos volt, a betáp tartály szintjének nyomon követését konduktív szintérzékelő végezte (LSN-107). Kellő szintcsökkenés esetén a friss savó az utánpótló tartályból (TK-2) egy pumpa (P-2) segítségével betáp tartályba jutott. A folyamat végét az utánpótló tartály teljes mennyiségének (16 L) kimerülése jelentette. Ekkor a betáp tartály űrtartalma 4 L volt, azaz az ultraszűrés 5-szörös besűrítési faktorial volt jellemezhető.

A második lépésben végrehajtott diaszűrés az UF-el megegyező paraméterek mellett zajlott. Ebben az esetben az utánpótló tartályt 16 L ioncserélt vízzel töltöttem fel, az UF során keletkezett 4 L savófehérje sűrítményt ezzel mostam át. A folyamat így 4-szeres diaszűrés faktorral üzemelt. A művelet során a víz adagolásával a betáp tartályban lévő savó koncentrátumból maradék laktózt, és egyéb mikrokomponenseket távolítottam el.

4.2.1.3. Nanoszűrés

Az UF/DF műveletet követő nanoszűrés (NF) során az UF permeátum laktóz tartalmának besűrítésére került sor. A NFegy 150–300 Da vágási értékű, 0,38 m² felületű DK-típusú polimer spiráltekeres membrán (SUEZ, Párizs, Franciaország) segítségével valósult meg. Az eljárás 50°C-on 30 bar transzmembrán nyomás mellett, rátáplálásos (fed-batch) módon zajlott.

Az NF során összesen 32 L savó permeátum koncentrációja valósult meg, két lépésben. Az eljárás operációs módja megegyezett az UF/DF folyamattal. A betáp tartályba 4 L, az utánpótló tartályba 28 L savó permeátum került. A folyamat végét az utánpótló tartály teljes mennyiségének (28 L) kimerülése jelentette. Ekkor a betáp tartály úrtartalma 4 L volt, azaz a folyamat 8-szoros koncentrációs faktorról jellemezhető. Az NF második lépésében a savó permeátumot tovább sűrítettem 2,2 L úrtartalomra, ami 1,8-as koncentrációs faktornak felel meg.

Az NF során a permeátum törésmutatója, fluxusa, illetve a keletkezett permeátum teljes tömege mérésre került. A membránszűrés (UF/DF és NF) során gyűjtött, eltérő laktóz koncentrációjú minták képezték a GOS szintézis szubsztrátját.

4.2.2. Enzimes GOS szintézis

A GOS szintézis szubsztrátjai a membránszeparációs eljárás során gyűjtött, különböző laktózkoncentrációjú savó permeátum frakciók voltak. A frakciók rendre az UF, DF lépések permeátumai, és a kettő keveréke, valamint az NF folyamat végén előállított koncentrált permeátum voltak. Ezen felül a NF során előállított koncentrált savó permeátum, és az eljárás során elvont víz különböző arányú vegyítésével további, eltérő laktózkoncentrációjú szubsztrátokat állítottam elő.

A GOS szintézis szakaszos (batch) módban, 200 g szubsztrátum-oldat felhasználásával 50 °C-on, 60 rpm-es keverés mellett 0,5 w/w% Biolacta N5 enzimkoncentrációval 24 órán keresztül zajlott. A kísérlet hőmérséklet-szabályozását és homogenitását egy C-MAG HS7, elektromos kontakthőmérővel ellátott fűtött felületű mágneses keverő (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Németország) biztosította. A reakció során vett minták enzimaktivitása 10 perces 95 °C-os hőkezeléssel került inaktiválásra. A minták szénhidrát-összetételének nyomon követése HPLC analízissel valósult meg. Az enzimes szintézis egy esetben három párhuzamosban zajlott, és mivel a folyamat elhanyagolható szórás mellett reprodukálhatónak bizonyult, a további kísérletek esetén nem történt ismétlés.

4.2.3. Savó permeátum tejsavas fermentációjához szükséges mikrobiológiai alapok kidolgozása

4.2.3.1. Tejsavbaktérium törzsek tápanyag igényének meghatározása

A törzsek aminosav-auxotrófiájának és a vitaminigényének vizsgálata agardiffúziós és lyukdiffúziós módszerekkel történt. Mindkét esetben egy, a tejsavbaktériumok tápanyagigény-vizsgálatára kifejlesztett minimál-tápagart használtam (lásd 4.1.5.1 pont). Az agar felületére 1 mL, 10^6 sejt/mL koncentrációjú sejtszuszpenziót mértem, majd azt a felületen egy üvegbottal egyenletesen eloszlattam. Az agardiffúziós mérésekhez 0,9 cm átmérőjű papírkorongokra a húsz esszenciális aminosav 25 w/v%-os vizes oldatából 5 μ L-t cseppentettem, majd a korongokat az agarra helyeztem. A lyukdiffúziós mérések során az agarba 0,9 cm átmérőjű lyukakat fúrtam, és ezekbe 150 μ L vitamin oldatot mértem. A lemezeket ezt követően 30 °C-on, anaerob körülmények között 72 órán keresztül inkubáltam, és naponta megfigyeltem a törzsek szaporodását a korongok és a lyuk körül. Szaporodás stimulálása esetén megmértem a zónák átmérőjét.

4.2.3.2. Savó permeátum tejsavas fermentációjának vizsgálata

A kísérletek 15-mL Falcon centrifuga csövekben, 13 mL-es térfogatban, 10^7 sejt/mL kezdő sejtkoncentrációval zajlottak. Az tenyészeteket anaerob körülmények között, 2,5 L-es Oxoid AnaeroJars (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US) anaerob jarban, 30 °C-on inkubáltam. A fermentáció időtartama 48 óra volt, mintavétel 24 óránként történt. A mérés során a pH-t, a laktózkoncentrációt és a sejtek szaporodást követtem nyomon. A szaporodásmérés savófehérje hozzáadása esetén a közeg opálössága miatt tenyésztési módszerrel, minden egyéb tápközeg esetén az OD₆₀₀ értékek mérésével történt.

4.2.3.3. Szerves nitrogénforrások tejsavas fermentációra gyakorolt hatásának vizsgálata

A tejsavbaktériumok szimultán laktóz és szerves fehérjeforrás felhasználásának részletes vizsgálata 50 mL-es Falcon centrifugacsövekben 30 mL-es térfogatban, 10^7 sejt/mL kezdő sejtkoncentrációval zajlott. Az tenyésztés inkubációja anaerob körülmények között, 2,5 L-es Oxoid AnaeroJars (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US) anaerob jarban, 30 °C-on történt. A folyamat nyomon követése érdekében a fermentáció 24 órán keresztül, 4 óránkénti mintavétel mellett zajlott. A kísérlet során mértem a fermentációs közeg pH-ját, laktóz- és teljes aminosav-tartalmát, valamint a tejsavbaktérium törzsek szaporodását.

4.2.4. Nyers GOS szirup tejsavas fermentációjának kidolgozása

4.2.4.1. Tejsavbaktérium törzsek mono-, diszacharid és GOS fermentációs képességének screenelése

A tejsavbaktérium törzsek GOS fermentációs képességének screenelése során a kísérletek 15-mL Falcon centrifuga csövekben, 13 mL-es térfogatban, 10^7 sejt/mL kezdő sejtkoncentráció alkalmazásával zajlottak. Az inkubáció anaerob körülmények között, 30 °C-on történt. A fermentációk időtartama 72 óra volt, mintavétel 24 óránként történt. A mérések során nyomon követtem a tejsavbaktériumok szaporodását az OD_{600} értékek meghatározásával, valamint mértem a tápközeg pH-értékének változását szénhidrát összetételét.

4.2.4.2. Szelektált tejsavbaktérium törzsek GOS fermentációjának vizsgálata

A screenelés alapján szelektált tejsavbaktérium törzsek részletes mono- és diszacharid fermentációs képességének vizsgálata 50 mL-es Falcon centrifugacsövekben 30 mL-es térfogatban, 10^7 sejt/mL kezdeti sejtkoncentrációval zajlott. A tenyészeteket anaerob körülmények között, 30 °C-on inkubáltam. A fermentáció időtartama 72 óra volt, mintát 24 óránként vettem. A kísérlet során meghatároztam a tejsavbaktérium törzsek szaporodását tenyésztéses módszerrel, a fermentációs közeg pH-ját, szénhidrát-összetételét HPLC-vel, a törzsek szerves-sav és D-laktát termelését, valamint a felülúszó β -galaktozidáz aktivitását.

4.2.5. Nyers GOS szirup *Kluyveromyces* törzsekkel végzett fermentációjának vizsgálata

A kísérletek 500 mL-es Erlenmeyer lombikokban, 100 mL fermentációs közegben, $5 \cdot 10^6$ sejt/mL induló sejtkoncentrációval zajlottak. A tenyészetek inkubációja 30 °C-on, 220 rpm-es rázatás mellett, 72 órán keresztül tartott. A folyamat során 24 óránként vettem mintát. A mérések során meghatároztam az élesztőtörzsek szaporodását az OD_{600} értékek mérésével, valamint a közeg pH értékét és szénhidrát-összetételét.

4.3. Analitikai módszerek

4.3.1. Membránszeparáció nyomon követése: törésmutató, pH, vezetőképesség, fehérjetartalom

A savó permeátum törésmutatójának (Brix°) meghatározása egy PAL-refraktométerrel (ATAGO Co., Ltd., Tokyo, Japán), vezetőképesség-mérése egy sensION156 multi-paraméter mérővel (Hach Company. Loveland, CO), a pH érték nyomon követése pedig egy pHenomenal 1100 digitális pH mérővel (VWR International LLC, Radnor,

PA) történt. A savó és savó-permeátum fehérjetartalma Bradford reagenssel (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) került meghatározásra.

4.3.2. Biolacta N5 aktivitásának meghatározása

A Biolacta N5 aktivitás mérése 300 g/L, pH=6 laktózoldatban, 0,3 g/L enzimkoncentráció mellett zajlott. A reakció 50 °C-on, 15 percen keresztül zajlott, mely elteltével az enzim 10 perces, 95 °C-os hőkezeléssel inaktiválásra került. Az oldat laktóz koncentrációja ezt követően HPLC eljárással került meghatározásra. Egy unit (U) enzimaktivitás azt az enzimmennyiség jelenti, mely fenti körülmények között 1 µM laktóz konverzióját 1 perc alatt katalizálja. Az enzim aktivitása laktóz szubsztráton 27808 ± 125 U/g volt.

4.3.3. HPLC analízis

A mérések során alkalmazott HPLC rendszer egy SCM1000 gáztalanító egységből, egy P200 gradiens pumpából, és egy AS100 fűtött automata mintaevőből (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA), és egy R-101 refrakciós index detektorból (Showa Denko Europe GmbH (Munich, Germany) állt. A mérési adatok rögzítése és a csúcs alatti területek integrációja az N2000 Chromatography Data System és N2000 Photographic Data Workstation programokkal (Science Technology, Inc., Hangzhou, Kína) történt.

4.3.3.1. Szénhidrát-analízis

A kísérletek során a glükóz, galaktóz, laktóz és GOS frakciók (DP2-6) meghatározása egy Rezex RNM 8% Na⁺ szénhidrát oszloppal (Phenomenex, Torrance, CA), és hozzá kapcsolt védőoszloppal történt. Az eluens ioncserélt víz, az áramlási sebesség 0,2 ml/perc, az oszlop hőmérséklete 60 °C volt. A detektálás refrakciós index (RI) detektorral, 50 °C-on valósult meg.

Csúcsidentifikáláshoz sztenderdként glükóz, galaktóz, laktóz (SigmaAldrich Kft, Hungary), és egy kereskedelmi forgalomban kapható galakto-oligoszacharid készítmény, Vivinal GOS Powder (FrieslandCampina Domo B. V., Hollandia) került felhasználásra. A GOS készítményben lévő mono- és diszacharidok a sztenderd cukorok (glükóz, galaktóz, laktóz) retenciós ideje, a nagyobb (DP3-6) oligoszacharidok az oszlop méretválasztása és a csúcsok relatív területe alapján váltak azonosíthatóvá.

4.3.3.2. Szerves savak analízise

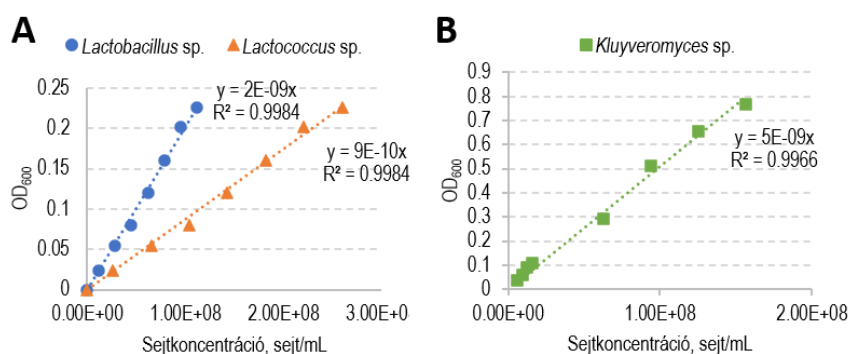
Szerves savak vizsgálata egy védőoszloppal párosított Rezex ROA Organic Acid 8% H+ 300x7,8mm oszloppal (Phenomenex, Torrance, CA) történt. A mérés 60 °C-on, 0,4 mL/min áramlási sebességű 0.005 N kénsav mobil fázissal zajlott. A detekció refrakciós index (RI) detektorral, 50 °C-on valósult meg. A csúcsok azonosításához használt sztenderdek az ecet-, citrom-, hangya-, tej-, alma-, oxál-, propion-, borostyánkő- és borkősavak voltak.

4.3.4. Tejsavbaktériumok szaporodásának vizsgálata

A tejsavbaktériumok szaporodásának meghatározásához a kísérleti körülmények és célok függvényében két módszert alkalmaztam: turbiditás alapján, az OD₆₀₀ értékek nyomon követése és az élősejtszám tenyésztéssel történő meghatározása. A két módszer 48 órás fermentáció esetén összehasonlítható eredményeket adott, ennél hosszabb fermentációs időtartam esetén a sejtek pusztulása következtében a tenyésztéses módszer alacsonyabb sejtszám értékeket mutatott.

4.3.4.1. Sejtszám meghatározása optikai denzitás alapján

Az optikai denzitás alapján történő szaporodásvizsgálat 600nm-en, Specord 200 Plus (Analytik Jena AG, Jena, Germany) spektrofotométerrel történt. A sejtszámok meghatározása egy Bürker kamrával mért sejtkoncentráció-OD₆₀₀ kalibráció segítségével történt. A *Lactobacillus*, *Lactococcus* és *Kluyveromyces* törzsek kalibrációs görbéje a **11. ábrán** látható.



11. Ábra: **A/** Tejsavbaktériumok és **B/** *Kluyveromyces* fajok szaporodásvizsgálatához felhasznált OD₆₀₀-sejtkoncentráció kalibrációk

4.3.4.2. Élősejtszám meghatározása szélesztéssel

A mintákból fiziológiás sóoldattal decimális hígítási sort készítettem, majd a sorozat három tagját TS agar lemezekre (2,5 g/L glükóz, 17 g/L kazein pepton, 3 g/L szója pepton, 5 g/L NaCl, 2,5 g/L dikálium-foszfát) szélesztettem. A lemezeket 30 °C-on, anaerob jarban inkubáltam. A kinőtt telepeket 48 óra elteltével számoltam le.

4.3.5. pH mérése

A tejsavas fermentációk során a pH változását egy OrionStar A111 típusú, ROSS pH/ATC elektróddal kiegészített pH mérővel (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US) követtem nyomon.

4.3.6. Aminosav-összetétel meghatározása

A fermentációs kísérletek során vizsgált savófehérje, kazein és szója pepton pontos aminosav összetételének meghatározása kromatográfias módszerrel történt. Az analízis első lépése a minták hidrolízise volt, mely 6 M HCl oldattal, 100 °C-on, egy éjszakán keresztül zajlott. Ezt a minták NaOH oldattal történő semlegesítése, majd mérése követte. Az analízis egy 200 x 3,7 mm, IONEX OSTON LCP5020 kationcserélő oszloppal működő (Ingos Ltd., Czech Republic) automata aminosav-analizátorral történt. Az aminosavak elválasztása 0,3 mL/perc áramlási sebességű Li⁺ citrát pufferrendszerrel, 55-65 °C-on zajlott. Az aminosavak reakciója 0,25 mL/perc áramlási sebességű ninhidrinnel, 110 °C-on zajlott. A detektálás fotometriásan, 570 és 440 nm-en zajlott.

4.3.7. Teljes aminosavmennyiség meghatározása

A savófehérjét és peptonokat tartalmazó fermentációs felülúszók teljes aminosav mennyiségének meghatározása a következőképp zajlott: a kísérletek során gyűjtött 2 mL-es minták pH-ját 7-es értékre állítottam 0,1 vagy 1 N NaOH oldattal. Ezt követően a sejteket centrifugálással (8000 rpm, 4 perc) eltávolítottam, majd a sejtmentes felülúszót 95 °C-on, 10 percig hőkezelttem az esetlegesen kiszabadult enzimek inaktiválása céljából.

Az aminosavak peptonokból és fehérjékből való felszabadítása érdekében a mintákat *Streptomyces griseus* eredetű pronáz enzimmel (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US) hidrolizáltam a következő módon: 20 µL, 2 mg/mL koncentrációjú enzimoldatot 180 µL hőkezelt mintához adtam, majd 37,5 °C-on 20 percig inkubáltam. A minták hidrolízisét követően a teljes szabad aminosavmennyiséget Church és munkatársai (1985) módszerével detektáltam. Ehhez 500 µL hidrolizált mintához 500

uL OPA reagenst (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US) adtam, majd szobahőmérsékleten 2 percig inkubáltam. Ezt követően a minták abszorbanciáját 340 nm-en, spektrofotométerrel (Specord 200 Plus, Analytik Jena AG, Jena, Germany) mértem. Az így kapott A_{340} értékeket az enzim jelenlétével korrigáltam, és egy kalibrációs görbe segítségével szerin ekvivalens értékre konvertáltam, az (1) egyenlet alkalmazásával:

$$AA \left[\text{Szerin ekvivalens}, \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right] = h \frac{(A_{340m} - A_{340e})}{0.0226} \quad (1)$$

Ahol a h a minták hígítási faktora, az A_{340m} a pronázzal hidrolizált minták, az A_{340e} pedig a mintákéval azonos koncentrációjú pronáz oldat abszorbanciája 340 nm-en.

4.3.8. Aminosav-felhasználás mértékének meghatározása

A tejsavbaktérium törzsek aminosav-felhasználás mértékeként (AFM) azt az aminosav-mennyiséget definiáltam, amennyivel az adott törzs az exponenciális szaporodási fázisa alatt 1 mL fermentációs közeg aminosav tartalmát 1 óra alatt csökkentette. Az értékek kiszámítása a (2) képlettel történt:

$$\text{AFM} \left[\text{mg szerin ekv.} \frac{\text{mg}}{\text{óra} \cdot \text{mL}} \right] = \frac{AA_x - AA_{x+4}}{4} \quad (2)$$

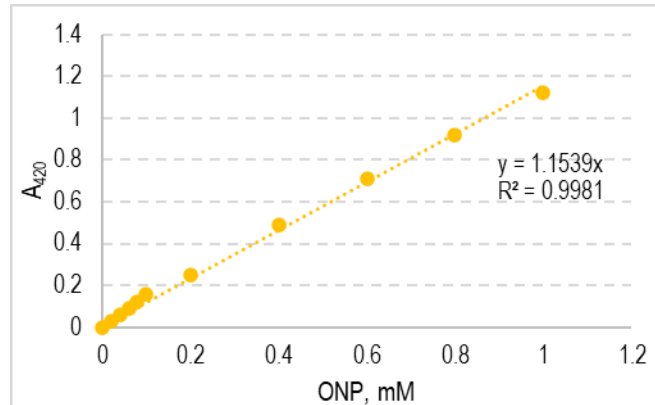
Ahol a AA_x a fermentációs közeg aminosav tartalma x óra, AA_{x+4} pedig $x+4$ óra fermentáció után, mg/mL szerin ekvivalensben kifejezve.

4.3.9. A fermentációs felülúszó β -galaktozidáz aktivitásának meghatározása

A szelektált tejsavbaktérium törzsekkel végzett GOS fermentációs kísérletek során vizsgáltam a fermentlé β -galaktozidáz aktivitást. Az β -galaktozidáz enzim tejsavbaktériumok esetén alapvetően intracelluláris, a fermentlébe sejtlízis útján juthat. A vizsgálatokhoz a laktóz kromogén analógját, orto-nitrofenil- β -D-galaktopiranozidot (ONPG)-alkalmaztam szubsztrátként. Aktív β -galaktozidáz jelenlétében az enzim az ONPG-t orto-nitrofenolra (ONP) és galaktózra bontja. Az ONP jellegzetes sárga színt ad, mely spektrofotometriásan mérhető.

A méréshez a fermentációból vett mintákból a sejteket centrifugálással eltávolítottam (10 000 rpm, 2 perc), majd 0,5 mL sejtmentes felülúszóhoz 0,5 mL Z puffert (10,67 g/l; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 6,2 g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,75 g/L KCl; 0,246 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) és 0,16 mL Z-pufferben oldott 4 mg/mL ONPG-t adtam. A reakció 30°C-on, a sárga szín megjelenéséig, vagy maximum 20 percig zajlott, melyet követően az enzimet 0,34 mL 1M NaCO_3 oldat hozzáadásával inaktíváltam. A sárga szín intenzitását ezt követően 420 nm-en Specord 200 Plus spektrofotométerrel

mértem. A kapott A_{340} értékeket orto-nitrofenollal (ONP) végzett kalibráció alapján mM/mL ONP-re számítottam át (**12. Ábra**). Egy unit (U) β -galaktozidáz aktivitásnak azt az enzimmennyiséget tekintetem, mely 1 perc alatt 1mM ONP felszabadítására volt képes. Az aktivitás értékeit a (3) egyenletem számítottam ki.

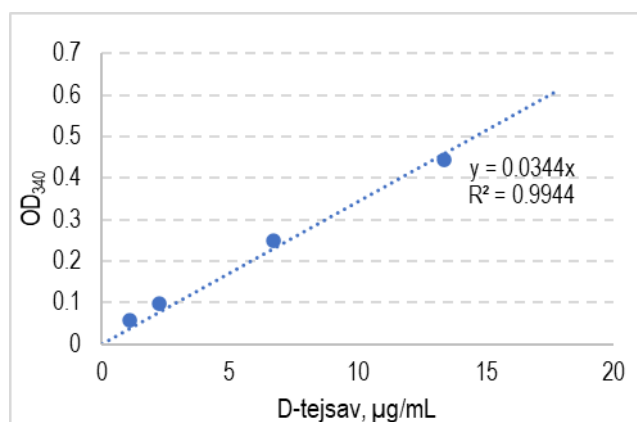


12. Ábra: Fermentációs felülúszók β -galaktozidáz aktivitás meghatározásához használt ONP- A_{420} kalibráció

$$\beta - \text{galaktozidáz} \left[\frac{U}{mL} \right] = \frac{OD_{420} * 1000 * 2}{1,1539 * \text{reakcióidő,perc}} \quad (3)$$

4.3.10. D-tejsav mérése

A tejsavas fermentáció során termelt D-tejsavat a Megazyme (Bray, Írország) enzimes D-lactic Acid Kit-jével detektáltam. Az enzimes reakció végtermékét spektrofotometriásan, 340 nm-en, MultiScan Ascent (Agilent Technologies Inc, Santa Clara, CA, US) plate olvasóval mértem. A kapott eredményeket az enzimes kit D-laktát sztenderdjével készített kalibráció alapján számítottam g/L-es koncentrációra (**13. Ábra**).



13. Ábra: Tejsavbaktérium törzsek D-laktát termelésének vizsgálata során alkalmazott D-laktát- OD_{340} kalibráció

4.3.11. Tejsavbaktériumok szelektív mono- és diszacharid fermentációs képességének screenelése

A tejsavbaktérium törzsek szelektív mono- és diszacharid (DP2) fermentációs teljesítményének értékelése fermentációs értékek kiszámításával történt. A fermentációs érték a felhasznált szénhidrát-frakciók (glükóz, galaktóz, DP2 és DP3-6) súlyozott értékeinek lineáris kombinációjából állt össze. A mono- és diszacharidok felhasználása a folyamat szempontjából előnyös volt, ezért ezek az értékek összeadódtak. A prebiotikus oligoszacharidok (DP3-6) fogyása azonban nem kívánt, így a felhasználás mértéke levonódott a fermentációs értékből. A DP3-6 felhasználás a fermentációs érték 50%-át adta, míg a glükóz, galaktóz és diszacharidok egyenként az érték 16,7%-át tették ki. A fermentációs érték kiszámításához a bemutatott munka során kidolgozott, (4) képletet használtam.

$$\text{Fermentációs érték} = (-1)0,5U_{DP3-6} + 0,167U_{GLÜ} + 0,5U_{GAL} + 0,5U_{DP2} \quad (4)$$

Ahol az U_{DP3-6} az oligoszacharidok, az $U_{GLÜ}$ a glükóz, az U_{GAL} a galaktóz és az U_{DP2} a diszacharidok felhasználásának mértéke 72 óra fermentációt követően, g/L mértékegységben.

4.3.12. Tejsavbaktérium és *Kluyveromyces* törzsek szelektív mono- és diszacharid fermentációs teljesítményének értékelése által

Az egyes tejsavbaktérium és élesztő törzsek szelektív fermentációs teljesítményét a GOS szirup kezdeti és végső tisztasága (T_k és T_v), és a fermentáció kihozatala (Y) alapján értékeltem, Guerrero és munkatásai (2014) módszere alapján, az (5), (6) és (7) képletek segítségével.

$$T_k[\%] = \frac{C_{DP3-6,k}}{C_{teljes,k}} * 100 \quad (5)$$

$$T_v[\%] = \frac{C_{DP3-6,v}}{C_{teljes,v}} * 100 \quad (6)$$

$$Y[\%] = \frac{C_{DP3-6,v}}{C_{DP3-6,k}} * 100 \quad (7)$$

Ahol a $C_{DP3-6,k}$ és $C_{DP3-6,i}$ a DP3-6 frakciók a kezdeti (fermentáció előtti) és végső (fermentáció utáni), a $C_{teljes,k}$ és $C_{teljes,v}$ a teljes szénhidrát tartalom kezdeti és végső koncentrációja g/L értékben.

4.4. Statisztikai elemzés

4.4.1. A GOS szintézis kísérleti beállítás robusztusságának vizsgálata

A mérések reprodukálhatóságának ellenőrzéséhez a NF-R-1 szubsztrátummal végzett kísérletet három ismétléssel hajtottam végre a 4.2.2. pontban leírt paraméterek mellett. Az adott mérési pontokban kapott eredményeket a három mérés szórásának kiszámításával értékeltem, a reakciógörbék lefutásának egyezését pedig Pearson-korreláció alkalmazásával elemeztem.

4.4.2. A pH GOS szintézisre gyakorolt hatása

A savó permeátum pH-jának GOS szintézisre gyakorolt hatását Motulsky és Christopholus munkája alapján vizsgáltam (MOTULSKY ÉS CHRISTOPOULOS, 2004). A módszer a (8) egyenletben leírt szaturációs modellt alkalmazza, mely az egyes szacharid frakciók koncentrációjának alakulását írja le az idő függvényében, ahol a t a reakcióidőt, $p_1 \times p_2$ pedig a koncentrációgörbe meredekségét jelenti $t=0$ időpontban.

$$f(t) = p_1(1 - e^{-p_2 t}) \quad (8)$$

A modellt a kísérletek során mért szénhidrát-koncentrációk w/w%-ban kifejezett adatpontjaira illesztettem. A pH hatásának vizsgálatához két GOS szintézis lefolyását hasonlítottam össze. Az első szintézis a savó natív pH-ján zajlott, míg a második kísérlet során a pH-t 1M NaOH oldattal a Biolacta N5 pH optimumára (pH=6) állítottam. Az adatgyűjtést követően a (8) egyenletben bemutatott modellt a két kísérletre külön-külön (önálló modellek), illetve a két szintézis kombinált adatpontjaira (globális modell) illesztettem. Az önálló és globális modellek csoporton belüli varianciáját (residual sum of squares) ezt követően F-teszt használatával, 95%-os konfidencia intervallum mellett hasonlítottam össze. Amennyiben a két kísérlet lefolyása azonos, az önálló és kombinált modell csoporton belüli varianciája nem különbözik, amennyiben a két folyamat eltér, a globális modell csoporton belüli varianciája lényegesen nagyobb az önálló modellekénél. A folyamat átfogó értékelését követően a pH állítás mentes és pH kontrollált szintézisek p_1 és p_2 értékeit is összevetettem Student féle t-teszt alkalmazásával. A leírt elemzés a IBMSPPSS v23 statisztikai szoftver alkalmazásával történt (Armonk, NY).

4.4.3. Tejsavbaktériumok fermentációs jellemzőinek statisztikai értékelése

A fermentációs adatok három párhuzamos mérések átlagaiként, szórással kiegészítve szerepelnek a dolgozatban. Az eredmények összehasonlításához az RStudio Version 1.2.5042 (RStudio Inc., Boston, MA, US) statisztikai szoftvert alkalmaztam.

Az adatok normalitását Shapiro-Wilk, szórás-homogenitását és Levene's tesztel vizsgáltam. A kapott eredmények függvényében az eredmények elemzéséhez Tukey post-hoc tesztel társított ANOVA, Games-Howell tesztel párosított Welch vagy Dunn post-hoc tesztel társított Kruskal próbákat alkalmaztam. A vizsgálatok 95%-os konfidencia intervallum mellett zajlottak, $p < 0,05$ értékeket tekintettem szignifikánsnak.

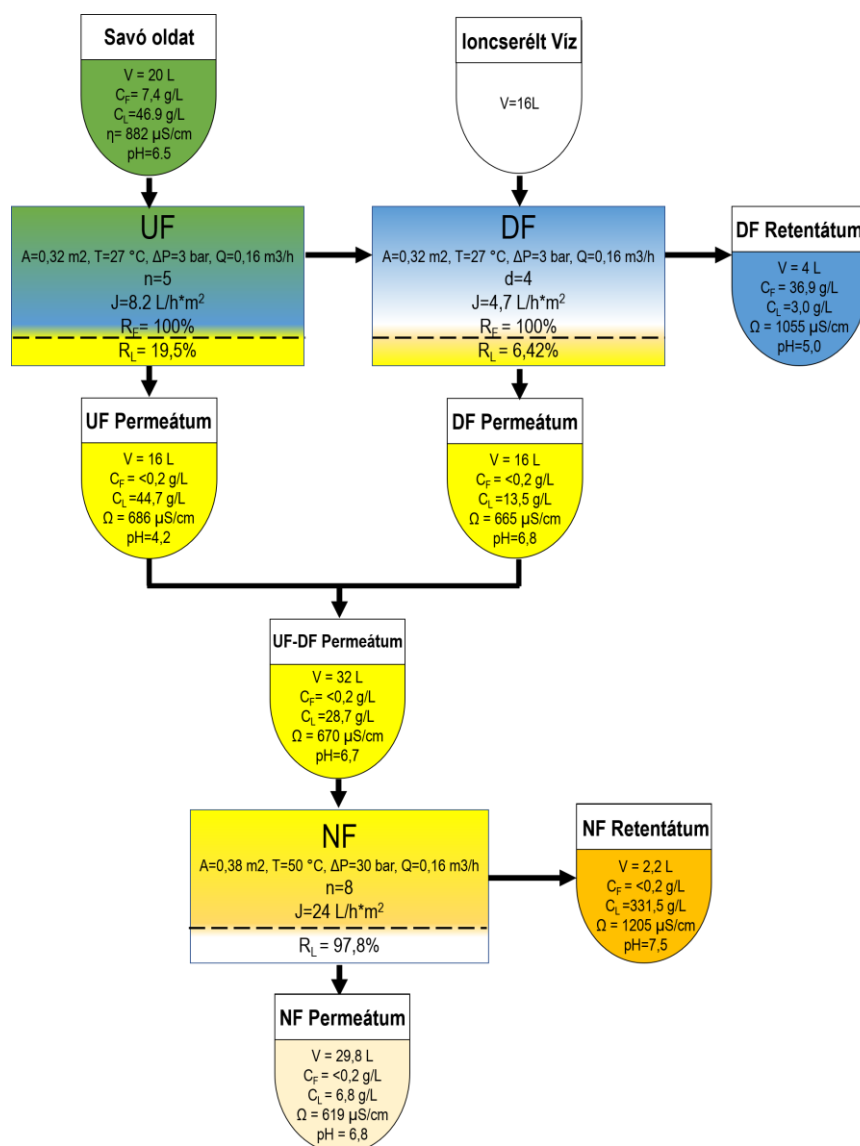
4.4.4. Adat vizualizáció

A dolgozatban szereplő diagrammok, és az adatok hierarchikus klaszterezése heatmap-ekkel az RStudio Version 1.2.5042 (RStudio Inc., Boston, MA, US) statisztikai szoftverrel készült.

5. EREDMÉNYEK

5.1. Savó frakcionálása membránszűréssel

Első lépésként az 3.2.1 pontban leírt módon előállított savó oldatot a jelenleg általánosan alkalmazott savó-feldolgozási elvek alapján frakcionáltam. Az membránszeparációs eljárás vázlatos folyamatábrája a szűrés anyagmérlegeivel együtt a 14. Ábrán látható.



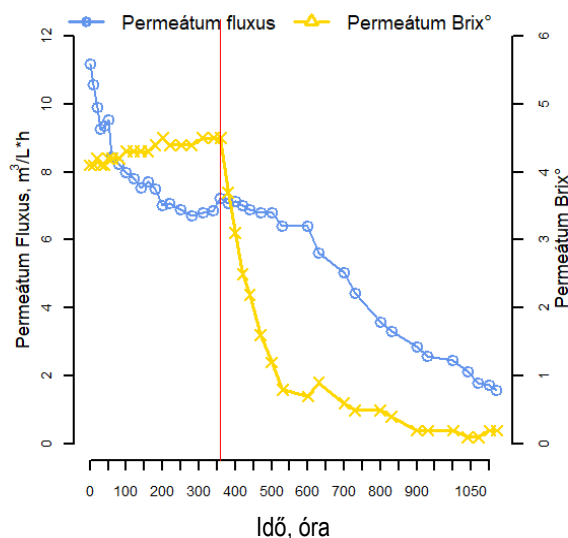
14. Ábra: Savó frakcionálása és savó permeátum besűrítése ultra-, dia- és nanoszűréssel. Jelmagyarázat: V = térfogat, C = koncentráció, A = membrán felület, m^2 ; L ; J = átlagos permeátum fluxus, $\text{L/h}\cdot\text{m}^2$; n = koncentrációs faktor; d = diaszűrési faktor; Q = recirkulációs térfogatáram m^3/h ; T = hőmérséklet, $^\circ\text{C}$; ΔP = transzmembrán nyomás, bar; Ω = vezetőképesség $\mu\text{S/cm}$; R = átlagos visszatartás %; Alsó indexek: p = permeátum; r = retentátum; L = laktóz; F = fehérje

A munkám fókuszusa egy többlépcsős műveletsor kidolgozása volt, mely során első lépésben a tejsavó savófehérje tartalmát ultraszűréssel (UF) szeparáltam és koncentráltam. Az savófehérje-sűrítmény laktózkoncentrációja az UF során nem változott, ezért azt a következő lépésben azt diaszűréssel (DF) csökkentettem. Az UF/DF eljárás eredményeként létrejött nagy tisztaságú savófehérje koncentrátum magas haszonnal értékesíthető különböző étrend kiegészítők (különböző tisztaságú WPC-k) formájában.

Az eljárás során előállított fehérjementes laktóz oldat (savó permeátum) képezte a bemutatott doktori munka fókuszát a továbbiakban, ezt használtam mind GOS szintézis, mind a tejsavas fermentáció alapjaként. Mivel az enzimes GOS szintézis csak magas szubsztrát (laktóz) koncentráció mellett játszódik le, szükséges volt a laktóz oldat víztartalmának csökkentése. A vízelvonást nanoszűrés (NF) segítségével valósítottam meg.

5.1.1. Savó oldat ultra- és diaszűrése

A savó többlépcsős membránszűrésének első szakasza az ultraszűrés (UF) volt, mely során a nagy molekulású savófehérjéket a membrán visszatartotta, így ezek a retentátumban gyűltek össze. A laktóz molekulák képesek voltak áthaladni a membránon, így ezek megjelentek a permeátumban, azonban fontos megjegyezni, hogy a laktóz (és egyéb mikrokomponensek) koncentrációja a retentátumban nem változott. A magas fehérjetartalmú UF retentátumban visszamaradt laktózt diaszűréssel (DF) távolítottam el. A **15. Ábra** az UF/DF folyamat során a permeátumban mért fluxus és Brix^o értékeket mutatja be.



15. Ábra: Savó UF-DF frakcionálása során a permeátumban mért fluxus és Brix^o értékek, a szűrés idő függvényében A piros vonal az UF és DF operációs módok közti váltást jelzi.

Az ábrán jól megfigyelhető, hogy a permeátum fluxusa a szűrés alatt folyamatosan csökkent. Az UF során ez a reakciótartály fehérjemennyiségének növekedésével, a membrán felületén megnövekedett savófehérje-koncentrációval (koncentráció-polarizáció) illetve a membrán eltömődésével (fouling) magyarázható. A művelet rátáplálásos (fed-batch) módon üzemelt, a membrán visszatartotta a savófehérjéket, így a tartály fehérje-koncentrációja az idő előrehaladtával növekedett. Továbbá az szűrés folyamat során a koncentráció-polarizációs réteg megvastagodása a szűrés teljesítmény csökkenéséhez vezetett, melyet tovább fokozott a membrán részleges eltömődése. A fouling ebben az esetben reverzibilisnek bizonyult, mivel a membrán permeabilitását vegyszeres tisztítással eredeti szintjére állítottam vissza, azaz a membrán regenerálható volt.

A DF alatt ugyan a reakciótartály fehérjemennyisége nem növekedett tovább, a fluxus tovább csökkent. Ez feltehetően az UF során kialakult szűrőlepeny morfológiájának átalakulására vezethető vissza. Steinhauer és munkatársai (STEINHAUER *ET AL.*, 2015) a savó membránszűrése során megfigyelték, hogy a diaszűrés előrehaladtával egyes mikrokomponensek (pl. ionok) kimosása savó-aggregátumok kialakulásához vezet, melyek megváltoztatják a szűrőlepeny felületi morfológiáját és előnytelenül befolyásolják a szűrés teljesítményt.

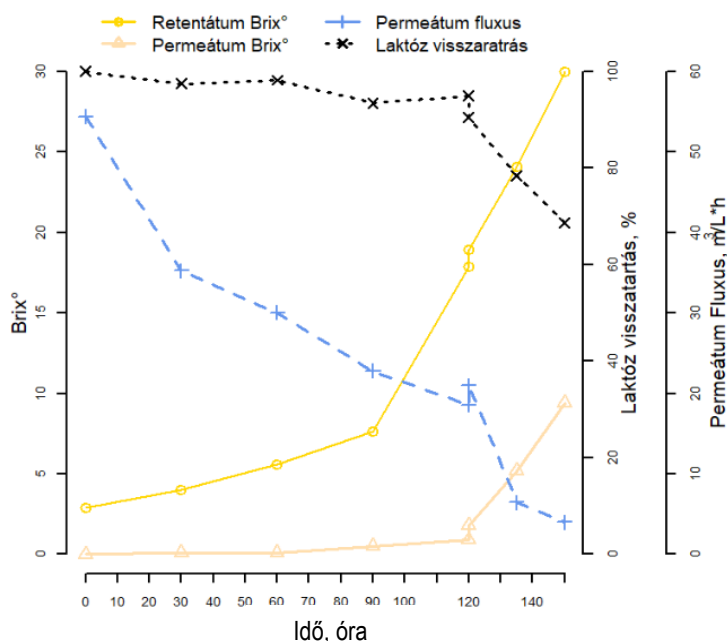
A permeátum Brix^o értékeit alapján az UF során a permeátum laktóz koncentrációja kis mértékben növekedett. Ez a jelenség azt feltételezi, hogy a folyamat során laktóz-retenció lép fel, ami alkalmazott membrán 20 kDa-s vágási értékét, és a laktóz megközelítőleg 360 Da-s méretét tekintve meglepő. Más csoportok (DE SOUZA *ET AL.*, 2010; MACEDO *ET AL.*, 2011; WEN-QIONG *ET AL.*, 2017) is hasonló laktóz-retenciót figyeltek meg savó membránszűrése során, melyet a főként savófehérjékből álló szűrőlepeny és/vagy polarizációs réteg jelenlétének tulajdonítottak. A szűrőlepeny feltehetően másodlagos membránként funkcionál, és megakadályozza a laktóz maradéktalan átjutását. A laktóz-retenció további magyarázata lehet a makro- és mikrokomponensek aggregációja is, ami ebben az esetben a laktóz savófehérjéhez való kötődéseként jelentkezhethet (WEN-QIONG *ET AL.*, 2017).

Összegzésként elmondható, hogy az UF-DF folyamat rendkívül kismértékű veszteséggel járt, a kiindulási savóoldat fehérjetartalmának 99,7%-a került a retentátumba, míg a kezdeti laktózmennyiség 99,3%-a jutott át a permeátumba. A két műveleti lépés (UF-DF) kombinálásával magas tisztaságú savófehérje-koncentrátumot (retentátum) és laktózt oldatot (permeátum) állítottam elő.

5.1.2. Nanoszűrés

Az UF-DF folyamat során keletkezett permeátum víztartalmát két lépésben, nanoszűréssel csökkentettem. Az első lépés során a betáplált, összesen 32 L UF-DF permeátumot 8-szoros sűrítési aránnyal, a reakciótartály 4 L-es térfogatára koncentráltam. Ezt követően a sűrített oldatot további nanoszűrésnek vettem alá, 1,8-szoros sűrítési arányt alkalmazva. Az eljárás a laktóz kristályosodási hajlama miatt az UF-DF folyamathoz képest magasabb hőmérsékleten, 50 °C-on zajlott.

A nanoszűrés során a permeátum fluxusa nagymértékben csökkent (**16. Ábra**). Ez a jelenség a retentátum emelkedő laktóz koncentrációjának, és az ez okozta növekvő ozmotikus nyomásának tudható be. A mérés során alkalmazott 30 bar nyomás a folyamat végén csak kis mértékben volt képes ellensúlyozni a retentátum ozmotikus nyomását. A fenti megfigyelésből következik az is, hogy a savó-permeátum ilyen mértékű koncentrállását feltétlenül sómentesítési lépés - mint az általam használt diaszűrés – kell, hogy megelőzze. Amennyiben a savóban megjelenő ásványi sók nem kerülnek eltávolításra, azok hozzájárulnak a sűrítendő permeátum ozmotikus nyomásához, így tovább nehezítve az oldat víztartalmának elvonását.



16. Ábra: Savó UF-DF folyamat során keletkezett savó permeátum nanoszűrése (NF) során mért fluxus és Brix° értékek, és a membrán laktóz visszatartása a szűrés idő függvényében

A **16. Ábrán** látható továbbá az is, hogy a nanoszűrés második lépése során a membrán laktóz-visszatartása csökkent, és nagyobb mennyiségű cukor került a permeátumba. A membrán laktóz-visszatartása kb. 200 g/L laktóz koncentráció eléréséig közel teljes volt, e fölött azonban a laktóz visszatartás lényegesen csökkent, ami a komponens

veszteségéhez vezetett. A nanoszűrés laktóz-kihozatala így 79,4% volt, a veszteség nagy része pedig a szűrés második szakaszához volt köthető, ahol a retentátum laktóz koncentrációja meghaladta a 200 g/L-t. Összességében tehát a nanoszűrés megfelelő 200 g/L laktóz töménységű savó-permeátum előállításához, azonban e fölött alkalmasabb lenne tömörebb felépítésű, fordított-oszmózis (RO) membránok használata. Az RO membránok üzemeltetése ugyan energetikai szempontból kedvezőtlenebb (magasabb transzmembrán nyomás szükséges), azonban alkalmazásukkal feltehetően elkerülhető nanoszűrés második szakaszában jelentkezett nagymértékű laktózveszteség.

5.2. Enzimes GOS szintézis Biolacta N5 enzimmel

A többlépcsős membránszűrés során gyűjtött, GOS szintézis szubsztrátjaként felhasznált permeátum és retentátum frakciók a **14. Táblázatban** szerepelnek.

14. Táblázat: Savó ultra-, (UF) dia- (DF) és nanoszűrése (NF) során gyűjtött, GOS szintézis szubsztrátjaként felhasznált permeátumok és retentátumok Brix°, laktóz koncentráció, pH és vezetőképesség értékei

Szubsztrátum*	Brix Bx°	Laktóz koncentráció g/L	pH	Vezetőképesség $\mu\text{S/cm}$
UF-P	1,4	14,0	6,8	722
UF+DF-P	2,9	28,7	6,7	690
DF-P	4,2	44,8	6,7	688
NF-R-1	10,4	105,7	6,9	1371
NF-R-2	17,9	180,4	7,3	1411
NF-R-3	25,1	246,0	7,3	1459
NF-R-4	34,0	331,5	7,5	1404
NF-R-4, puffereelt	34,0	331,5	6,0	1404

*UF=Ultraszűrés; DF=Diaszűrés; NF=Nanoszűrés; P=permeátum; R=retentátum

A fenti frakciókat natív formájukban (pH állítás nélkül) Biolacta N5 β -galaktozidáz által katalizált GOS szintézis szubsztrátjaként alkalmaztam. A kísérletek célja az alkalmazott enzim hidrolitikus és transzgalaktolitikus aktivitásának vizsgálata volt különböző laktóz koncentrációk mellett. Céлом volt az GOS szintézis szempontjából optimális szubsztrát-koncentráció megállapítása és ennek függvényében a membránszűrési eljárás értékelése.

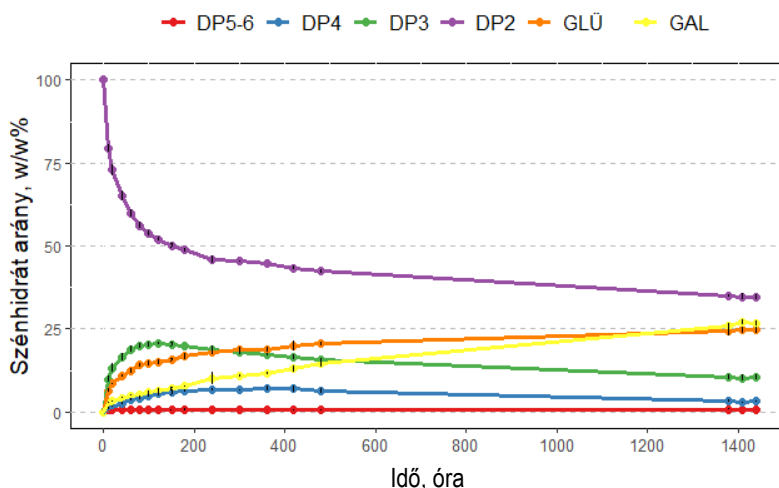
Mivel az alkalmazott szubsztrátok pH-ja (6,8-7,5) eltért a Biolacta N5 pH optimumától (5,5-6,5; SONG *ET AL.*, 2011) külön kísérletben vizsgáltam a pH állítás GOS

szintézisre gyakorolt hatását. Ehhez GOS szintézist végeztem el az NF-R-4 szubsztráttal az oldat natív pH-ján, és az alkalmazott enzim pH optimumán is, majd a reakciók lefutását összehasonítottam a 4.4.1 szakaszban leírtak alapján.

5.2.1. Savó permeátum, mint GOS szubsztrát: a kísérleti beállítás robusztusságának ellenőrzése

A mérések reprodukálhatóságának ellenőrzéséhez a NF-R-1 szubsztrátummal végzett kísérletet három ismétléssel hajtottam végre a következő paraméterek mellett: 200 g szubsztrátum, 50 °C reakcióhőmérséklet, 60 rpm-es keverés, 0,5 w/w% Biolacta N5 enzim, 24 órás reakció.

A kapott eredmények szórása elhanyagolhatónak bizonyult (DP5-6 0,02-0,28 w/w% DP4: 0,1-1 w/w%; DP3: 0,1-1,5 w/w %; DP2: 0,1-1,5 w/w %; GAL 0,1-1,7 w/w % GLU 0,2-1,6 w/w%) (**17. ábra**), valamint az egyes mérések során a szénhidrát frakciók lefutása erős pozitív korrelációt mutatott [$r > 0,97$, $n = 18$, $p < 0,001$]. A korreláció a DP5-6 frakció esetén kevésbé volt erőteljes [$r > 0,61$, $n = 18$, $p < 0,001$], ami a rendkívül alacsony koncentráció, és az ehhez képest magas relatív szórásnak tudható be. Az eredmények alapján a mérési rendszert a fenti körülmények között robusztusnak ítéltam és a további kísérleteket egy ismétléssel hajtottam végre.



17. Ábra: Az NF-R-1 szubsztráttal, végzett GOS szintézis során mért szénhidrát frakciók tömegarányának alakulása a reakcióidő függvényében. Az adat pontok a három mérés eredményeinek átlag értékei, azok szórásával kiegészítve.

Megemlítendő, hogy a tradicionálisan oligoszacharidnak nevezett, minimum három egységből álló GOS frakciók (DP3-6) mellett keletkeznek nem-laktóz diszacharidok is, melyeket prebiotikus hatásuk miatt a GOS molekulák közé sorolunk (COULIER ET AL., 2009; WARMERDAM ET AL., 2013b). Az általam, és számos GOS szintézissel foglalkozó csoport által alkalmazott mérési módszer nem teszi lehetővé a

laktóz és nem-laktóz DP2 frakciók elkülönítését, így a szövegben használt DP2 kifejezés a rendszerben mérhető összes diszacharidot, míg a GOS a DP3-6 frakciókat jelenti.

5.2.2. Membránszűrés és GOS szintézis: optimális szubsztrát koncentráció

A **18. Ábra** a különböző szénhidrát frakciók arányának alakulását mutatja a különböző laktózkoncentrációjú szubsztrátokon, a reakcióidő függvényében. A kísérletek során a Biolacta N5 a laktózt minden esetben hidrolizálta, és a szubsztrát koncentráció függvényében szabad glükózt, galaktózt vagy különböző polimerizációs fokú prebiotikus oligoszacharidokat képzett. Az enzim által katalizált hidrolízis és transzgalaktolízis egymással kinetikailag kontrollált kompetícióban áll. Alacsonyabb szubsztrát koncentráció esetén a hidrolízis dominált, magas laktózmennyiségek jelenlétében pedig a GOS szintézis vált erőteljesebbé. Az enzim két aktivitásának versengő természete miatt a GOS szintézis mértéke maximált, és nem tekinthető állandónak. Az szakaszos tartályreaktorokban kivitelezett szintézisek esetén a GOS frakciók a szubsztrát koncentráció és enzimmennyiség függvényében idővel lebomlanak. Ez jól megfigyelhető az általunk alkalmazott kísérleti beállításban (24 órás reakcióidő, 0,5 w/w% enzim koncentráció). A DP3-6 GOS frakciók összegzett kihozatala egy esetben sem emelkedett 36 w/w% fölé és idővel jól megfigyelhető volt bomlásuk. Alacsony laktózkoncentráció mellett a DP3-6 GOS frakciók gyorsan hidrolizáltak, a bomlás sebessége magasabb kezdeti laktóz koncentrációk esetén pedig lecsökkent.

Összességében elmondható, hogy a savó-permeátum alkalmas szubsztrátja a Biolacta N5 katalizálta GOS szintézisnek.

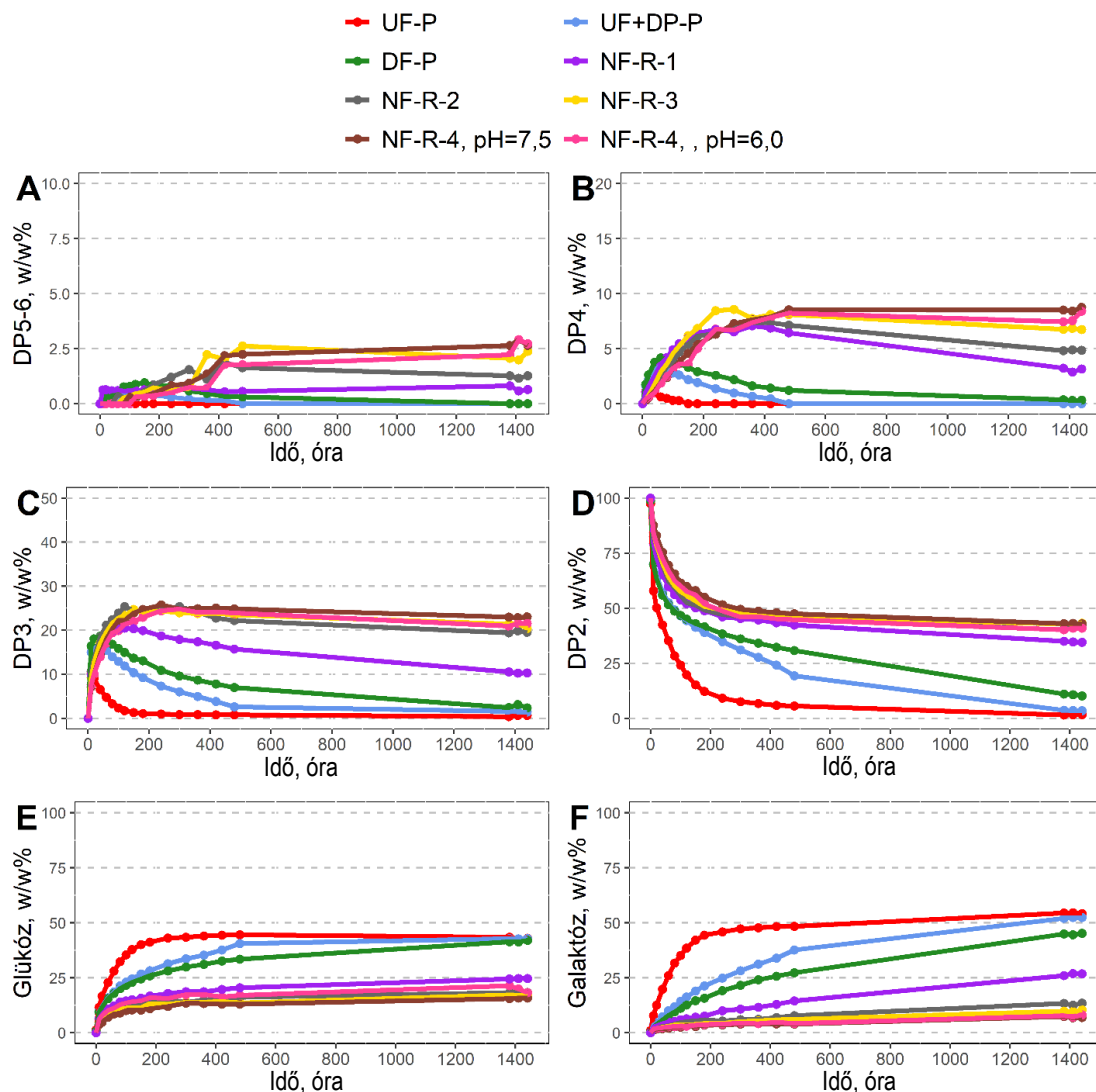
Az UF-DF folyamat során gyűjtött, alacsony kezdeti laktóz koncentrációjú (<50 g/L) szubsztrátok- UF-P, UF+DF-P és DF-P-esetén a Biolacta N5 hidrolitikus aktivitása dominált. A reakció végére a laktóz nagy mértékben, vagy teljesen elbomlott (**18D Ábra**), és a reakcióelegyben szabad glükóz és galaktóz jelent meg (**18E, 18F Ábrák**). Ugyan a reakció kezdeti szakaszában megfigyelhetők voltak kisebb mennyiségű, alacsony polimerizációs fokú GOS frakciók (10-20 w/w % DP3) (**18/C Ábra**), ezeket az enzim hamar alkotóelemeire bontotta.

Az NF első szakaszában gyűjtött, „közepes” laktóz koncentrációjú (50-200 g/L) szubsztrátok- NF-R-1 és NF-R-2-esetén a Biolacta N5 transz-galaktolitikus aktivitása megemelkedett, a keletkezett DP3-6 GOS frakció össz-aránya 27-34 w/w% volt (**19. Ábra**). A GOS frakciókon belül az oligomerek eloszlása 5% DP5, 21% DP4 és 74%

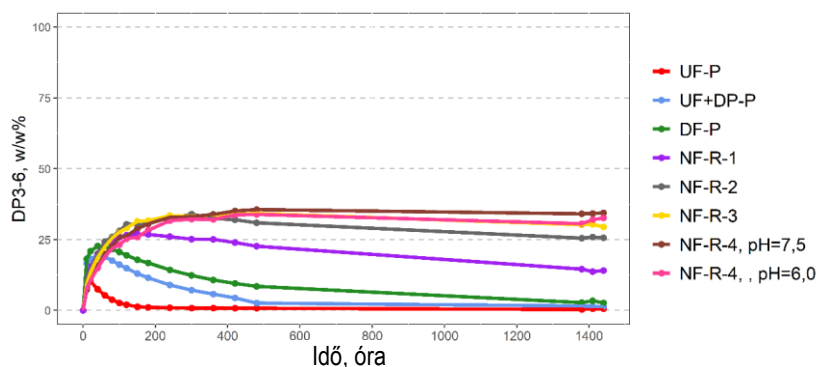
DP3 volt (**18/A, 18/B, 18/C Ábrák**). A DP3-6 GOS frakciók a reakcióidő előrehaladtával a korábbiakhoz hasonlóan bomlásnak indultak, azonban ennek sebessége elhanyagolható volt a korábbiakban bemutatottakkal összevetve (**19. Ábra**). Az NF második részében gyűjtött, „magas” laktóz koncentrációjú (>200 g/L) szubsztrátok bizonyultak a legelőnyösebbnek GOS szintézis szempontjából. Az összes GOS (DP3-6) frakció kihozatala ebben az esetben volt a legmagasabb (34-36%), melyből 5-8% DP5, 22-25% DP4 és 70-73% DP3 frakciók voltak (**18/A, 18/B, 18/C Ábrák**). Továbbá a keletkezett GOS mennyiség nem indult bomlásnak a kísérlet ideje alatt (**19. Ábra**).

Az össz-GOS (DP3-6) kihozatal szempontjából tehát a magas szubsztrát koncentráció (>200 g/L; 34-36 w/w% GOS) volt a legkedvezőbb. Megemlítendő azonban, hogy némileg alacsonyabb, 180 g/L kezdeti laktózkoncentráció mellett is 34 w/w% kihozatal volt elérhető. Az ilyen „moderált” laktózkoncentrációjú savó permeátum előnye, hogy nanoszűrés alkalmazásával, lényeges laktóz veszteség nélkül előállítható. Ugyan össz-GOS (DP3-6) kihozatal szempontjából összehasonlítható a magas laktóz koncentrációjú permeátumokkal, de hátránya, hogy a DP3-6 frakciók ebben az esetben korábban bomlásnak indulnak. A **19 Ábrán** látható, hogy míg 200 g/L laktóz fölött a GOS frakciók kihozatala a kísérlet ideje alatt konstans, 180 g/L esetén a keletkezett GOS a reakcióidő vége felé kis mértékben bomlásnak indul. Ez ipari körülmények között fontosabbá teszi a reakció pontos kézbe tartását és megfelelő időben történő leállítását.

Összességében az általam, savó-alapú szubsztrátum használatával kapott GOS kihozatalok (34-36 w/w%) összehasonlíthatóak más munkákkal (25-35 w/w% GOS), melyekben pufferelt laktóz oldat képezte a Biolacta N5 enzimmel végzett GOS szintézis szubsztrátját (PALAI *ET AL.*, 2012; WARMERDAM *ET AL.*, 2013a, 2014), azonban némileg elmarad Sen és munkatársai (2016) által jelentett 40 w/w%-os kihozataltól.



18. Ábra: Különböző szubsztrátokon végzett GOS szintézis során mért **A/ DP5-6, B/ DP4, C/ DP3, D/ DP2, E/ Glükóz és F/ Galaktóz** frakciók tömegaránya a reakcióidő függvényében. Az alkalmazott szubsztrátok, és azok fiziko-kémiai paraméterei a 14. Táblázatban láthatók.



19. Ábra: Különböző szubsztrátokon végzett GOS szintézis során mért **DP3-6** frakciók tömegaránya a reakcióidő függvényében. Az alkalmazott szubsztrátok, és azok fiziko-kémiai paraméterei a 14. Táblázatban láthatók.

5.2.3. pH állítás GOS szintézisre gyakorolt hatása

A GOS szintézis lefolyását és kihozatalát nagyban befolyásolja az alkalmazott enzim, a szubsztrát koncentrációja és a reakció körülményei (pH, hőmérséklet stb.) (SPLECHTNA, NGUYEN ÉS HALTRICH, 2007; POČEDIČOVÁ *ET AL.*, 2010; FISCHER ÉS KLEINSCHMIDT, 2015). Az eddigiekben elsősorban a savó permeátum laktóz koncentrációjának enzimes GOS szintézisre kifejtett hatását vizsgáltam. Fontos azonban megjegyezni, hogy a membránszűrési lépések következtében a vizsgált savó frakciók pH-ja a natív savó 6,8-as pH értékétől 7,5-re emelkedett (**14. Táblázat**). A Biolacta N5 pH optimuma 5,5-6,5 közé tehető (SONG *ET AL.*, 2011), mely jelentősen alacsonyabb, mint a membránszűrés végső termékének 7,5-ös pH értéke. Az eredmények alapján látható, hogy a magasabb kiindulási szubsztrát koncentráció kedvez a GOS szintézis kiszámíthatóságának (a keletkezett DP3-6 frakciók aránya konstans marad a maximum elérése után is), azonban kérdéses, hogy a megemelkedett pH nem befolyásolta-e negatívan a folyamat GOS kihozatalát. Kiemelendő, hogy Song és munkatársai (2011) a Biolacta N5 pH optimumának meghatározásához pufferelt laktóz és ONPG szubsztrátokat alkalmaztak. Ahogy korábban is megjegyzésre került, a szubsztrát típusa és a reakciókörülmények nagyban befolyásolják az enzimek aktivitását, így a mesterséges szubsztrátokkal kapott értékek nem feltétlenül tükrözik az ipari alkalmazás során (savó permeátumban) elérhető eredményeket.

Annak megállapításához, hogy a Biolacta N5 optimumánál magasabb pH érték befolyásolja-e a GOS szintézis DP3-5 kihozatalát, a szintézist elvégeztem az NF-R-4 szubsztráttal annak natív, 7,5-ös pH-ján, illetve pH=6-ra történt állítását követően is. A statisztikai vizsgálat alapján a két pH-n elvégzett GOS szintézis során nem volt különbség a DP2, DP4 és galaktóz frakciók mennyiségében (2,32; $F < 2,74$; $p > 0,05$). Ezzel szemben a DP5 (2,32; $F = 59,59$; $p < 0,001$) és DP3 (2,32; $F = 54,54$; $p < 0,05$) frakciók mennyisége szignifikánsan csökkent, a glükóz mennyisége pedig emelkedett (2,32; $F = 520,70$; $p > 0,001$) pH=6-ra állítást követően. Tehát a GOS frakciók magasabb mennyisége és a monoszacharidok alacsonyabb koncentrációja miatt statisztikailag kedvezőbb a magasabb (pH=7,5) alkalmazása, de a megfigyelt különbségek nem jelentették a GOS szintézis merőben különböző lefolyását, vagy a reakciósebesség megváltozását. Összefoglalva, a savó permeátum a GOS szintézis megfelelő szubsztrátja kiegészítő pH állítás nélkül is.

5.3. Mikrobiológiai alapok kidolgozása savó permeátum tejsavas fermentációjához

Az 5.1 szakaszban leírtak szerint előállított savó permeátum (gyakorlatilag fehérjementes laktóz oldat), az eredmények alapján optimális közege az enzimes GOS szintézisnek. A doktori munkám további célja a savó permeátum tejsavas fermentáció alapanyagaként való felhasználása volt.

A savó permeátum tejsavas erjesztésének fő kérdése, hogy a tejsavbaktériumok összetett tápanyagigénye összeegyeztethető-e az alacsony szerves nitrogéntartalmú fehérjementes tejsavóval, mint fermentációs tápközeggel (PANESAR *ET AL.*, 2007; LAVARI *ET AL.*, 2014; ZOTTA *ET AL.*, 2020). Ezért munkám során részletesen vizsgáltam azt, hogy milyen szerves- és szervesetlen nitrogénforrás-kiegészítés szükséges a savó permeátum tejsavas fermentációjához.

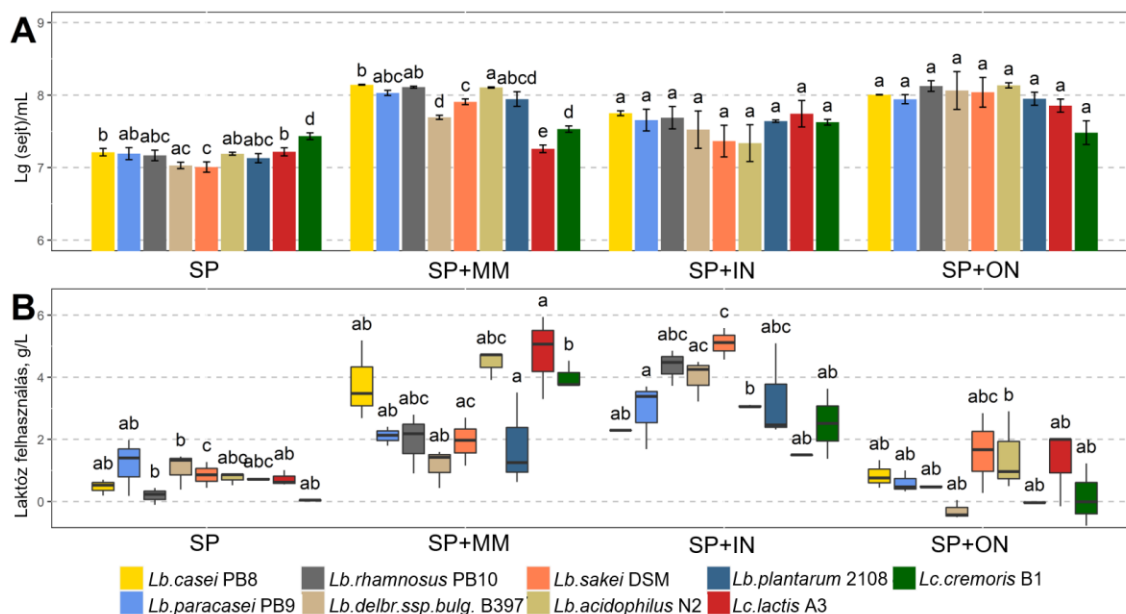
5.3.1. A vizsgált tejsavbaktérium törzsek aminosav és vitamin szükségletei

A munkám során összesen kilenc, a **6. Táblázatban** bemutatott tejsavbaktérium törzset használtam fel. Első lépésként a törzsek aminosav- és vitaminigényét vizsgáltam a 4.2.3.1. szakaszban leírt módon. A mérési eredmények alapján egyik törzs sem hordozott aminosav-auxotrófiát, valamint a vitamin-keverék minimál táptalajhoz adása sem stimulálta jelentősen szaporodásukat. Ez a megfigyelés némileg szokatlan a tejsavbaktériumok esetén, mivel a tejipari környezetből izolált törzsekben rendszerint nagy arányban figyelhetők meg különböző aminosav-auxotrófiák (SAVIJOKI *ET AL.*, 2006; LIU *ET AL.*, 2010). A méréseim során megfigyelt prototrófia magyarázata lehet, hogy a szóban forgó törzsek probiotikus termékek izolátumai és egyéb tejipart starterek voltak. Feltehetően a kultúrák fejlesztése során a törzsszelekció egyik aspektusa a robusztusság volt, így a tápanyag-összetételre érzékeny, auxotróf törzsek kizárásra kerültek.

5.3.2. Savó permeátum tejsavas fermentációjának vizsgálata

A következő lépésben a savó permeátumot fermentációs közegként alkalmaztam natív formájában, kiegészítés nélkül (SP), valamint minimál-sók keverékével (SP+MM), szervesetlen N-forrásként ammónium szulfáttal (SP+IN), és szerves nitrogénforrásként savófehérjével (SP+ON) kiegészítve.

Az eredmények alapján a savó permeátum (SP) önmagában nem bizonyult megfelelő fermentációs közegnek, mivel a törzsek csak kis mértékben szaporodtak benne. A fermentáció során a sejtkoncentráció a kezdeti $1 \cdot 10^7$ sejt/mL-ről maximum $2,7 \cdot 10^7$ sejt/mL-re emelkedett (**20/A Ábra**). A gyenge szaporodással párhuzamosan a laktóz felhasználás mértéke is alacsony volt: a törzsek a 20 g/L-es kezdeti koncentrációjuk csak töredékét (0,03-1,2 g/L) hasznosították (**20/B Ábra**). A kismértékű szaporodás és az elhanyagolható laktóz felhasználás a savó permeátum alacsony fehérje (szerves nitrogén) tartalmával magyarázható. A közeg alacsony fehérjemennyisége nem elégítette ki a tejsavbaktériumok magas tápanyag (elsősorban nitrogén) szükségleteit (SAVIJOKI ET AL., 2006; LIU ET AL., 2010). Ezt az is alátámasztja, hogy amennyiben a savó permeátumot szervesen sók keverékével, ammónium szulfáttal vagy savófehérjével egészítettem ki, a tejsavbaktérium törzsek szaporodása jelentős mértékben megnőtt. A fermentáció végén a három közegben (SP+MM, SP+IN és SP+ON elért sejtkoncentrációk rendre $5,4 \cdot 10^7$ - $1,4 \cdot 10^8$; $2,2$ - $5,6 \cdot 10^7$ és $3 \cdot 10^7$ - $1,3 \cdot 10^8$ sejt/mL voltak (**20/A Ábra**).



20. Ábra: Tejsavbaktériumok **A/** sejtkoncentrációja és **B/** laktózt felhasználása SP, SP+MM, SP+IN és SP+ON tápközegekben, 48 óra fermentációt követően. A betűk az egyes törzsek közti különbségeket jelzik, az adott fermentációs közegben

A *Lactobacillus* törzsek esetén minimál sókkal történő kiegészítés (SP+MM) illetve a savófehérjék mellett (SP+ON) keletkezett a legnagyobb sejttömeg. A *Lactococcus* törzsek szaporodását ezzel szemben a szervesen sók (SP+MM) és ammónium szulfát (SP+IN)

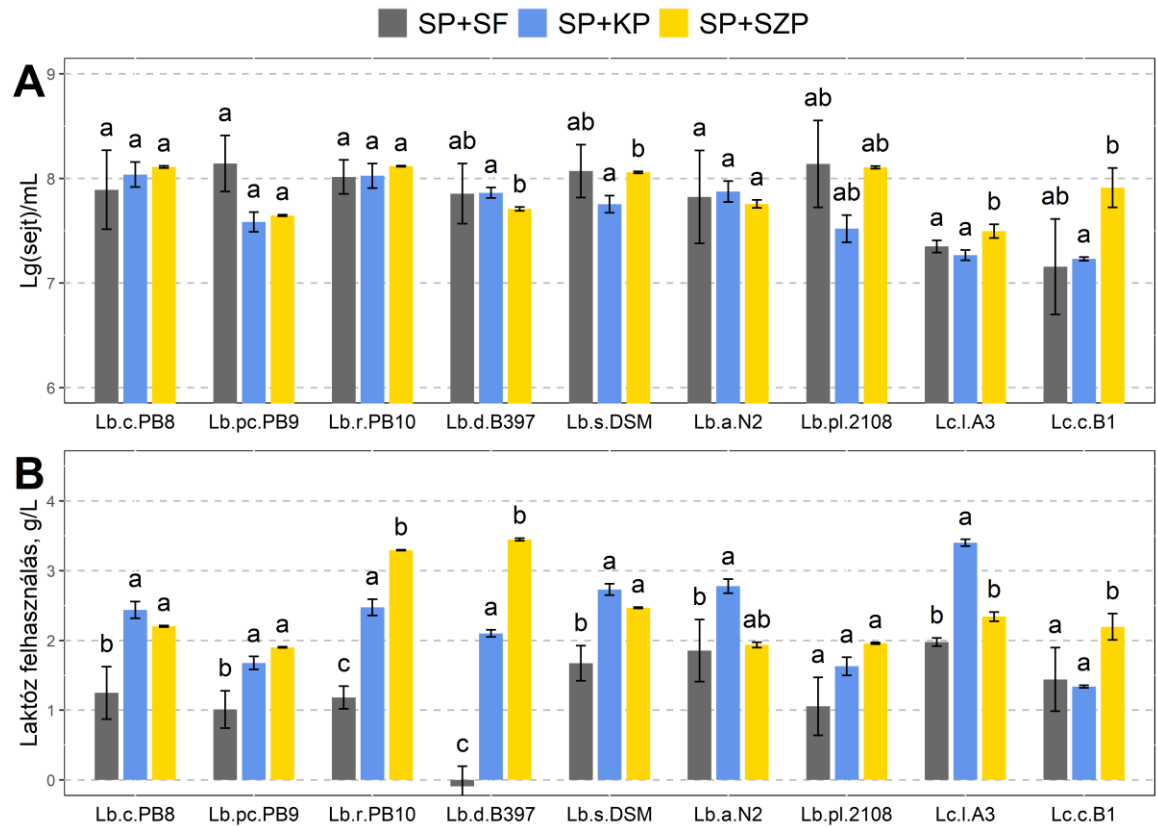
serkentette a leginkább. Az eredmények alapján elmondható, hogy a savó permeátum megfelelő erjesztéséhez a vizsgált tejsavbaktérium törzsek mindegyikének szüksége volt szerves vagy szervetlen nitrogénforrás hozzáadására.

A törzsek laktóz metabolizmusa a minimál sók (SP+MM) illetve ammónium szulfát (SP+IN) jelenlétében volt a legmagasabb, a felhasznált mennyiség rendre 1,8-4,5 g/L, illetve 1,5-5,1 g/L voltak. Ezzel összehasonlítva a savófehérjék hozzáadása esetén (SP+ON) a laktóz a felülúszóban csak elhanyagolható mértékben csökkent (0-1,6 g/L). Ez összehasonlítható volt a natív (SP) savó permeátumban megfigyelttel. Azonban kiemelendő, hogy az alacsony laktózfelhasználás ellenére az SP+ON közegben a *Lactobacillus* törzsek nagymértékű szaporodása volt megfigyelhető.

A magas elért sejtkoncentráció és alacsony laktózfelhasználás arra enged következtetni, hogy a tejsavbaktériumok szaporodásukhoz szükséges szénforrást nem a laktózból biztosították. Az alkalmazott tápközeg (SP+ON) fő komponensei a savó-permeátum eredetű laktóz, illetve a hozzáadott savófehérje voltak. Ezen felül csak elhanyagolható mennyiségben voltak savó eredetű makro- és mikrokomponensek (vitaminok stb.). Ezért a megfigyeléseim arra utalnak, hogy a törzsek a savófehérjéket használják szénforrásként. Ahhoz, hogy a savófehérje aminosavai hozzáférhetővé váljanak, szükséges annak lebontása, melyet a tejsavbaktériumok két lépcsőben végeznek. Elsőként a nagy molekulatömegű fehérjéket extracelluláris proteáz enzimekkel oligopeptidekké hidrolizálják, majd a keletkezett peptideket különböző transzportereken keresztül a sejten belüli térbe szállítják. Az intracelluláris térben számos, különböző aktivitású peptidáz enzim segítségével a peptideket aminosavakká hidrolizálják (FERNÁNDEZ ÉS ZÚÑIGA, 2006; SAVIJOKI ET AL., 2006; KOWALCZYK ET AL., 2015). Az aminosavak hasznosítása ezt követően számos anyagcsereúton át lehetséges. Azt, hogy mely anyagcsereút válik dominánssá nagyban befolyásolják a környezeti paraméterek (FILANNINO ET AL., 2018; BURON-MOLES ET AL., 2019; LIU ET AL., 2019). Bizonyított útvonalak az aminosavak dezaminálása, mely során ammónia szabadul fel, valamint a transzaminálás (LIU, 2003; ARDÖ, 2006). Feltételezhető, hogy ezekben az esetekben az aminosavak bontás során keletkezett széntartalmú vegyületek szolgálták a tejsavbaktérium törzsek szénhidrát forrásaként a táptalaj laktóztartalma helyett.

5.3.3. Különböző szerves nitrogénforrások hatása a savó permeátum tejsavas fermentációjára

Annak vizsgálatához, hogy a megfigyelt jelenség egyéb fehérjeforrások esetén is bekövetkezik-e, a savó permeátumot a savófehérje (SP+SF) mellett kazein peptonnal (SP+KP) és szója peptonnal (SP+SZP) egészítettem ki. A három savó-permeátum alapú közegben (SP+SF, SP+KP, SP+SZP) elért sejtkoncentrációk a **21/A Ábrán** láthatók.



21. Ábra: Tejsavbaktérium törzsek **A/** sejtkoncentrációja és **B/** laktóz felhasználása SP+SF, SP+KP és SP+SZP tápközegekben, 48 óra fermentációt követően. A betűk az egyes fermentációs közegekben megfigyelt különbségeket jelzi, az adott tejsavbaktérium törzs esetén. A tejsavbaktérium törzsek rövidített elnevezései a **6. Táblázatban** láthatók.

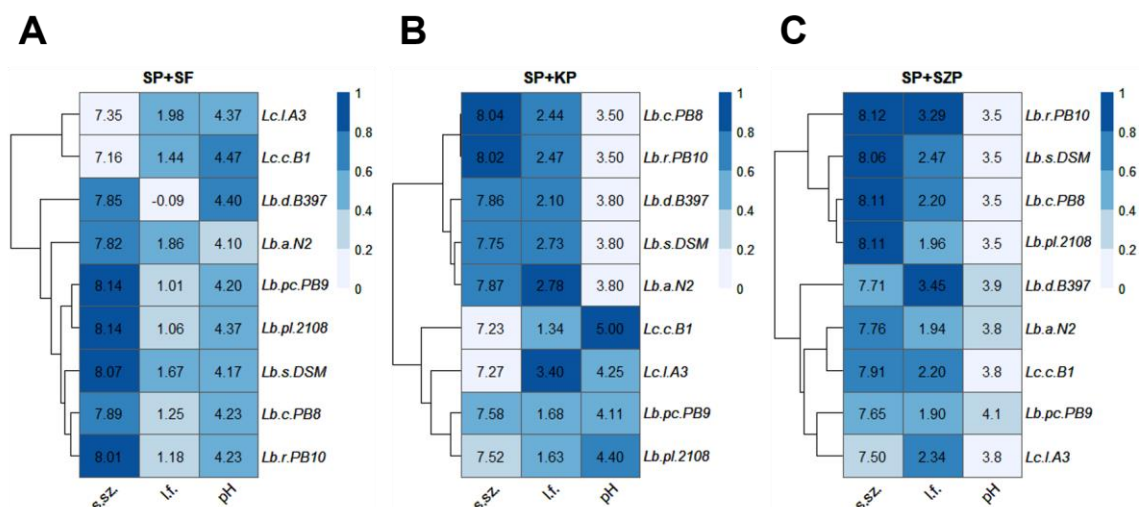
A kísérletek során négy törzs (*L. casei* PB8, *L. paracasei* PB9, *L. rhamnosus* PB10 és *L. acidophilus* N2) szaporodásának mértéke azonos volt mindhárom vizsgált közegben.

L. sakei DSM 20017 és *L. plantarum* 2108 szója pepton hozzáadása esetén (SP+SZP) szaporodott jobban, míg az *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B397 törzs kazein pepton jelenlétében (SP+KP) képzett a nagyobb sejttömeget. A két *Lactococcus* törzs (*L. lactis*

A3 és *L. cremoris* B1) szaporodása a szója peptonnal kiegészített savó permeátumban (SP+SZP) volt a legjobb.

Ugyan a kisebb sejtkoncentráció-beli eltérések ellenére a három közegben megfigyelt szaporodás alapvetően hasonló volt, a törzsek laktóz felhasználása nagy mértékben különbözött. Az *L. plantarum* 2108 törzs kivételével a laktóz felhasználás mértéke szignifikánsan nagyobb volt a peptonnal kiegészített tápközegekben (SP+KP, SP+SZP), az SP+SF közeggel összehasonlítva (**21/B Ábra**).

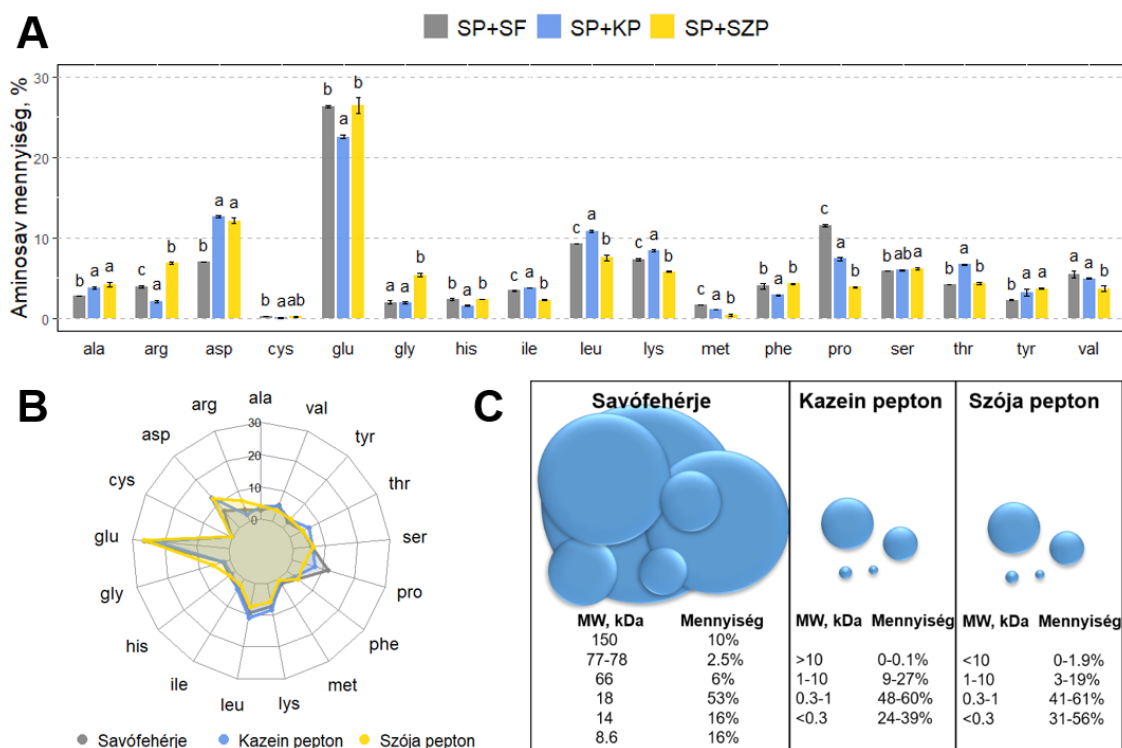
A három közeg különbségei jól megfigyelhetők a fermentációs jellemzők (szaporodás, laktózfelhasználás, és pH) hierarchikus klaszterezését követően (**22. Ábra**).



22. Ábra. Tejsavbaktérium törzsek fermentációs jellemzőinek hierarchikus klaszterezése és vizualizációja hőtérkép formában, **A/** SP+SF, **B/** SP+KP, és **C/** SP+SZP tápközegekben, 48 óra fermentációt követően. A hőtérkép sorai egyes tejsavbaktérium törzseknek felelnek meg, az oszlopok jelentése pedig a következő: s.sz.: sejtszám, l.f.: laktóz felhasználás, g/L, pH.: pH érték.

Jól látható, hogy savófehérje hozzáadása esetén (SP+SF), a magas sejtszámokat elérő törzsek (*L.pc. PB9*, *L.pl. 2108*, *L.s.DSM*, *L.r.PB10*) ugyan metabolikus aktivitásuk nyomán nagyobb mértékben csökkentették a közeg pH-ját, azonban a laktóz felhasználásuk alacsony maradt (**22/A Ábra**). A nagymértékű szaporodás alapvetően nagyobb metabolikus aktivitással, így szénhidrát-felhasználással jár, azonban ebben az esetben ez nem volt megfigyelhető. Mivel a tápközeg csak laktózból és savófehérjéből állt, feltehető, hogy a tejsavbaktérium törzsek szénhidrát szükségleteiket a fehérjében megtalálható aminosavakból fedezték.

Az SP+KP és SP+SZP közegekben nem jelentkezett az SP+SF-ben megfigyelt magas sejtszám - alacsony laktózhasznosítás ellentéte. Peptonok hozzáadása esetén a magas sejtszámok rendre alacsony pH-val és nagymértékű laktóz felhasználással társultak. A savófehérjék és peptonok hozzáadása során megfigyelt eltérő fermentációs viselkedés az alkalmazott fehérjeforrások eltérő szerkezetére vezethető vissza. A savófehérje, kazein és szója pepton aminosav-összetétele némileg különböző, azonban mindegyikben ugyanaz a 17 esszenciális aminosav található meg (**23/A Ábra**).



23. Ábra: A doktori munka során alkalmazott savófehérje, kazein- és szója pepton **A/** Aminosav összetétele és **B/** Aminosav-profilja. A feltüntetett betűk az a különböző szerves nitrogénforrások különbségeit jelzik adott aminosav mennyiségek terén. **C/** a három szerves nitrogénforrás molekulatömeg- eloszlása. (DAVAMI ET AL., 2014; GUO ÉS WANG, 2016)

Az aminosav-összetételt tekintve a három szerves nitrogénforrás hasonló, mindegyikben a glutaminsav dominál. A savófehérje és kazein pepton azonos mennyiséget tartalmaz glicin, szerin és valin aminosavakból, míg a savófehérje és szója pepton cisztein, glutaminsav, hisztidin, fenilalanin és treonin mennyisége egyezik meg. A két pepton összehasonlítva látható, hogy azok alanin, aszparaginsav, szerin és tirozin mennyiség

szempontjából azonosak. Összességében elmondható, hogy a három szerves nitrogénforrás ugyan nem teljesen egyezik aminosav-összetétel szempontjából, de profiljuk hasonló (**23/B Ábra**).

Molekulatömeg terén azonban a nagyméretű savófehérje és a kisméretű peptonok rendkívül eltérőek (**23/C Ábra**). Ennek megfelelően a két szerves nitrogénforrás-típus (fehérjék és peptonok) hasznosítása is eltérő módon zajlik.

A tejsavbaktériumok rendelkeznek di- tri- és oligopeptid transzporterekkel, ezért ezek felvétele és hasznosítása könnyen lezajlik. Azonban nem képesek savófehérjék felvételére, azok méreténél fogva. Hasznosításukhoz a sejtfalhoz kötött proteáz enzim szintézise szükséges. Ez a fehérjéket extracellulárisan kisebb peptidekre bontja, melyek felvétele az említett transzportereken keresztül lehetségessé válik. A sejtfalhoz kötött proteáz szintézise nem folyamatos, termelését az elágazó szénláncú aminosavak alacsony sejten belüli mennyisége, és az adott tápközeg alacsony elérhető peptidmennyisége indukálja (HEBERT *ET AL.*, 2000; SAVIJOKI *ET AL.*, 2006; KOWALCZYK *ET AL.*, 2015).

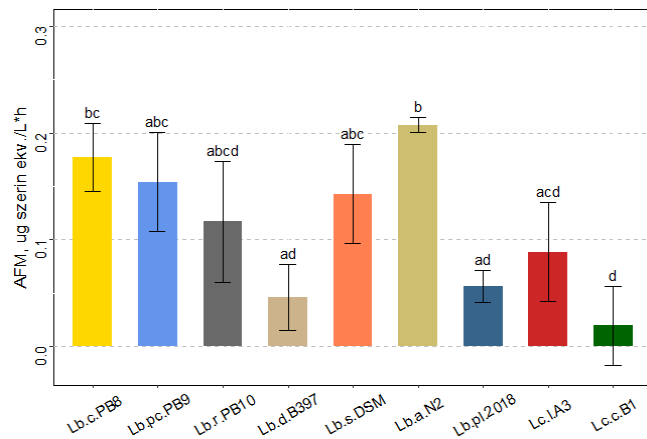
Az eredmények alapján az aminosavak, mint szénhidrátforrás preferenciája a laktózzal szemben kizárólag savófehérjék jelenlétében figyelhető meg. A tejsavbaktériumok flexibilis metabolizmusára jellemző, hogy képesek anyagcsere-útvonalaik átalakítására a környezeti paraméterekhez történő adaptáció során (PLUMED-FERRER *ET AL.*, 2008; FILANNINO *ET AL.*, 2018; BURON-MOLES *ET AL.*, 2019). Ezek alapján feltételezhető, hogy a szerves nitrogénforrások mérete befolyásolja a fermentáció során érvényesülő anyagcsere-útvonalakat, és ezzel a szénhidrát- és nitrogén felhasználás menetét. Savófehérje jelenlétében indukálódó proteáz szintézis a vizsgált tejsavbaktériumok anyagcserefolyamatait úgy módosítja, hogy a vizsgált törzsek szénhidrát forrás szempontjából az aminosavakat részesítik előnyben a tápközegben található laktózzal szemben.

5.3.4. Szerves nitrogénforrások típusának hatása a tejsavbaktériumok szénhidrát és nitrogén metabolizmusára

Annak érdekében, hogy igazoljam a savófehérjében található aminosavak, mint kizárólagos szén- és energiaforrás használatát, további kísérleteket végeztem a vizsgált tejsavbaktérium törzsek szaporodásának exponenciális fázisában, az új sejtek keletkezése során. A kísérletek során a törzsek szénhidrát- és nitrogén felhasználását követtem

nyomon. A savóból származó, kis mennyiségű makro- és mikrokomponensek (vitaminok, maradék savófehérje stb.) lehetséges hatásának kizárásához a vizsgálatok során alkalmazott tápközegeket tiszta laktóz-monohidrát és savófehérje (L+SF), kazein pepton (L+KP) vagy szója pepton (L+SZP) elegyítésével állítottam elő.

Első lépésben fermentációs kísérletet végeztem az összes vizsgált tejsavbaktérium törzssel az L+SZP közegben, a 4.2.3.3. szekcióban leírtak alapján. Az eredmények alapján, az (2) egyenlet felhasználásával megállapítottam a törzsek aminosav-felhasználásának mértékét (AFM), melyek a **24. Ábrán** szerepelnek.



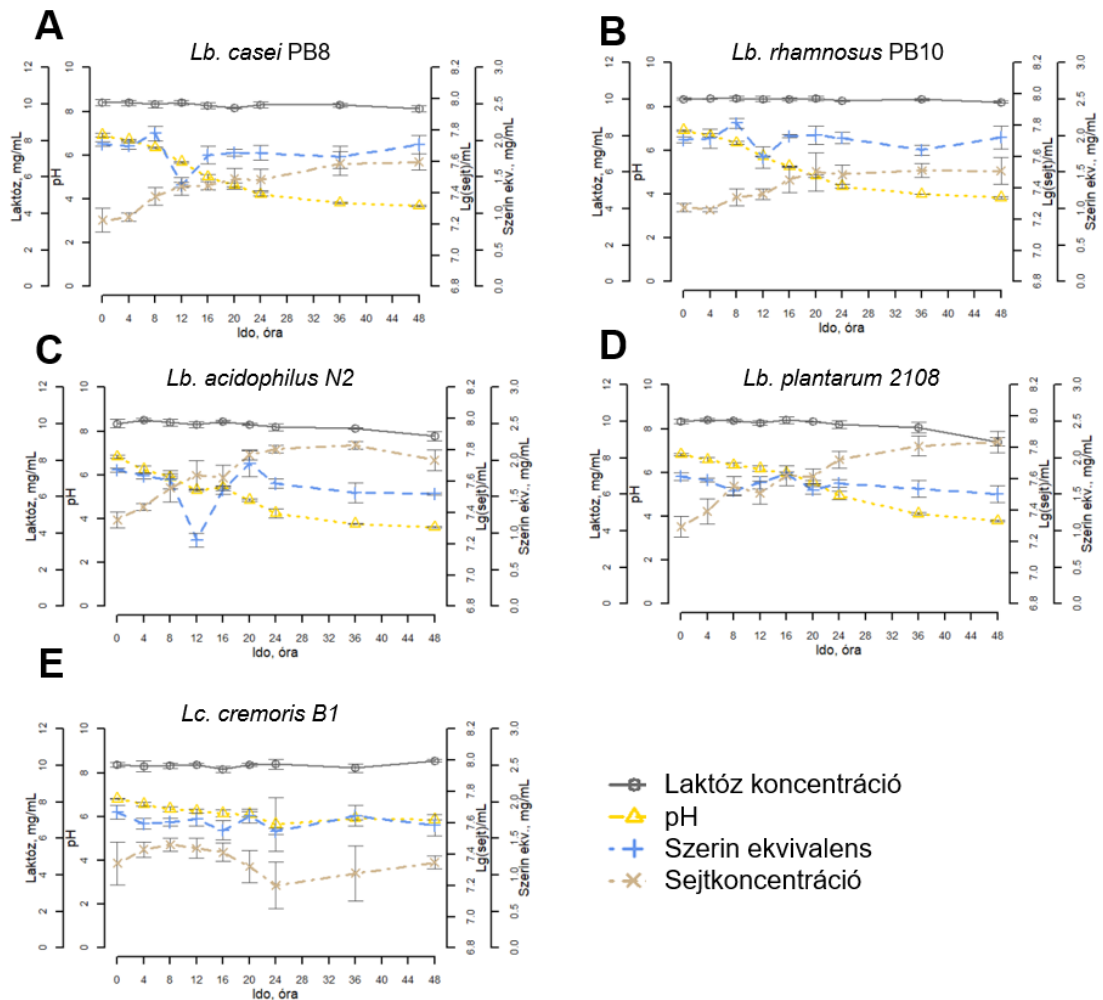
24. Ábra: Tejsavbaktérium törzsek aminosav-felhasználás mértéke (AFM) L+SF tápközegben. A betűk az egyes törzsek közti különbséget jelzik.

A további vizsgálatokhoz az AFM értékek alapján öt törzset szelektáltam. Ezek két magas (*L. acidophilus* N2 és *L. casei* PB8), egy közepes (*L. rhamnosus* PB10), és egy alacsony (*L. plantarum* 2108) AFM értékű *Lactobacillus* törzsek, és az alacsony AFM-el rendelkező *Lactococcus cremoris* B1 voltak. A szelektált törzseket további vizsgálatokba vontam be, melyek során részletesen vizsgáltam fermentációs profiljukat L+SF, L+KP és L+SZP közegekben, a 4.2.3.3 szekcióban leírt módon.

5.3.4.1. Szelektált törzsek fermentációs profilja savófehérjét tartalmazó tápközegben

A vizsgálat során az L+SF közeg alkalmas tápközegnek bizonyult a *Lactobacillus* törzsek számára, a kezdeti $1 \cdot 10^7$ sejtkoncentráció a fermentáció végére $5-8 \cdot 10^7$ sejt/mL-re emelkedett (**25/A-D Ábra**). Ezzel szemben a *Lactococcus cremoris* B1 szaporodása elhanyagolható volt (**25/E Ábra**).

A megfigyelt szaporodás ellenére a laktóz koncentráció csak kismértékben csökkent, a kezdeti mennyiség szignifikánsan csak az *L. casei* PB8, *L. acidophilus* N2 és *L. plantarum* 2108 esetében csökkent [p<0,0225]. A csökkenés csak a fermentáció végén, 48 óra elteltével volt megfigyelhető, ekkor a három törzs a laktózmennyiség 3,5%, 6,7% és 11%-át használta fel (15. Táblázat).



25. Ábra: L+SF tápközeg 48 órás tejsavas erjesztése az A/ *Lb. casei* PB8, B/ *Lb. rhamnosus* PB10, C/ *Lb. acidophilus* N2, D/ *Lb. plantarum* 2108 és E/ *Lc. cremoris* B1 törzsek által. A fermentáció során a közegben mért pH értékek, sejt-, laktóz- és szerin-ekvivalensben kifejezett teljes aminosav-koncentrációk a fermentációs idő függvényében.

Az aminosav felhasználás (szerin egyenértékben kifejezve) az exponenciális fázisban volt megfigyelhető. A fermentációs közeg aminosav mennyisége a vizsgált törzsek metabolikus aktivitása nyomán minden esetben szignifikánsan csökkent a kiindulási mennyiséghez képest [p<0,002]. Az *L. casei* PB8, *L. rhamnosus* PB10 és *L. acidophilus*

N2 a felülúszó aminosav tartalmának nagy részét, annak 28,8-51,4%-át használta fel. Az *L. plantarum* 2108 és *L. cremoris* B1 aminosav hasznosítása kisebb mértékű volt, ezek a törzsek a közeg aminosav mennyiségének 11,1% és 7,3%-át használták fel.

15. Táblázat: Az L+SF tápközegben elért minimum laktóz és szerin ekvivalens aminosav koncentrációk, 48 órás fermentáció során. A csillagok a kezdeti értékhez mért különbségek szignifikanciáját jelzik *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$.

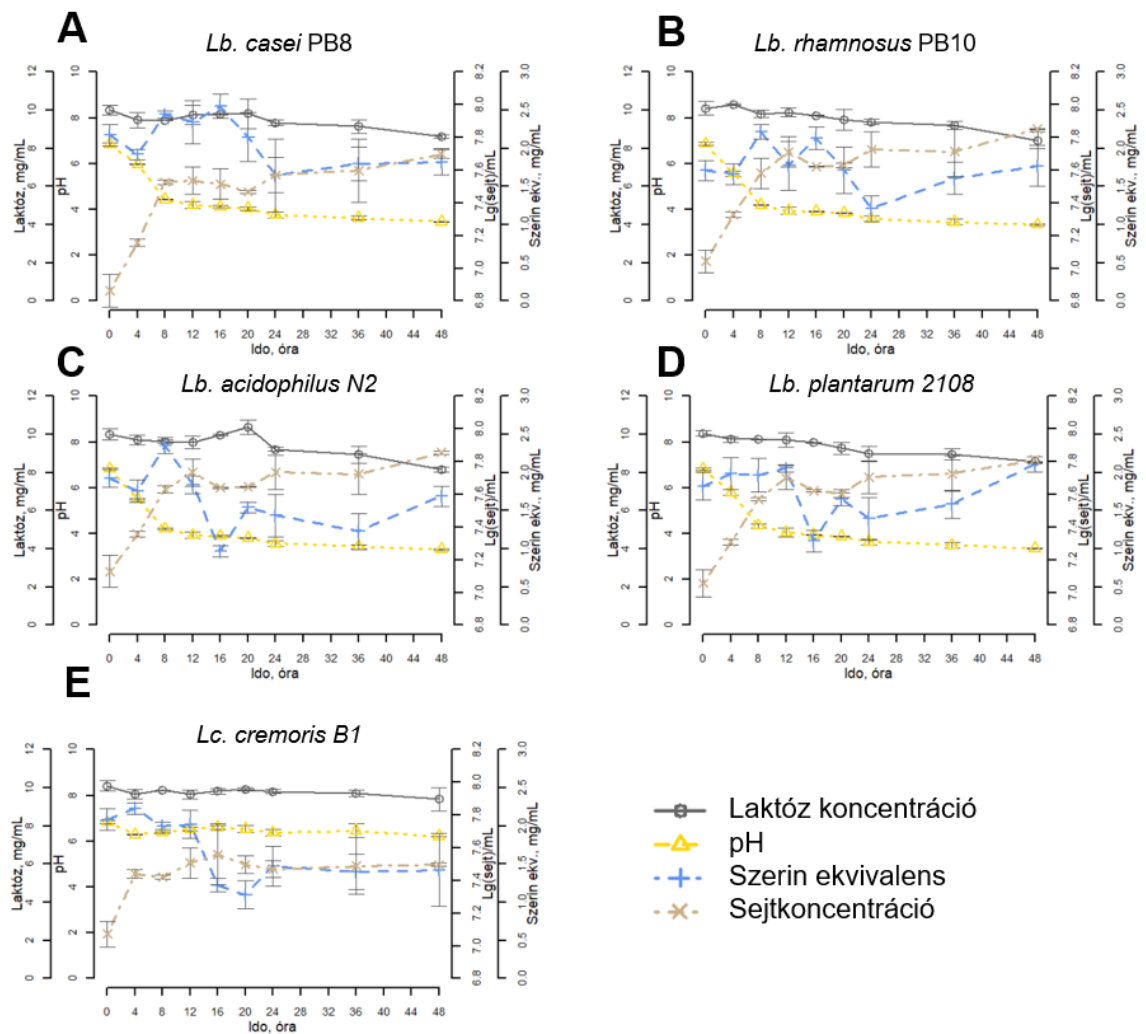
Törzs	Laktóz, g/L		Szerin ekvivalens aminosav, g/L	
	Detekciós idő	Minimum érték	Detekciós idő	Minimum érték
Kezdeti érték	0	10,08±0,22	0	1,90±0,090
Lb.c. PB8	48	9,74±0,17*	12	1,39±0,04***
Lb.r.PB10	48	9,85±0,05	12	1,70±0,15***
Lb.a. N2	48	9,34±0,25***	12	0,91±0,09***
Lb.p. 2108	48	8,89±0,22***	8	1,51±0,12***
Lc.c. B1	48	9,78±0,16	24	1,60±0,04**

Az exponenciális fázisban megfigyelt gyors csökkenést követően a fermentációs közeg aminosav mennyisége megnövekedett. Ekkor a tápközeg pH-ja tejsavbaktériumok savtermelése nyomán lecsökkent, mely feltehetően a sejtek líziséhez vezetett. A lízis nyomán feltehetően a sejtek fehérje természetű intracelluláris anyagai (enzimek, stb.) növelték meg a közeg össz-aminosav tartalmát.

Összegezve elmondható, hogy az L+SF közegben a *Lactobacillus* törzsek képesek voltak szaporodni, és az új sejtek létrehozásához szénhidrát és nitrogénforrást igényeltek. Az alkalmazott fermentációs közeg kizárólag laktóz-monohidrátból, és savófehérjékből állt. A törzsek szaporodásuk exponenciális szakaszában nem használták fel a közegben található laktózt, azonban a felülúszó aminosav tartalmát ugyanekkor jelentősen csökkentették. Ebből következik, hogy a *Lactobacillus* törzsek a savófehérjék aminosavait használták kizárólagos tápanyagforrásként.

5.3.4.2. Szelektált törzsek fermentációs profilja kazein és szója peptont tartalmazó tápközegekben

Minden vizsgált tejsavbaktérium törzs képes volt az L+KP tápközegben szaporodni. A sejtszám növekedése rendkívül gyors volt, a törzsek a stacioner fázist 8-12 óra elteltével érték el. A *Lactobacillus* törzsek sejtkoncentrációja a fermentáció végén megközelítőleg $1 \cdot 10^8$ sejt/mL, a *Lactococcus cremoris* B1 törzse $5 \cdot 10^7$ sejt/mL volt (26. Ábra).



26. Ábra: L+KP tápközeg 48 órás tejsavas erjesztése az **A/** *Lb. casei* PB8, **B/** *Lb. rhamnosus* PB10, **C/** *Lb. acidophilus* N2, **D/** *Lb. plantarum* 2108 és **E/** *Lc. cremoris* B1 törzsek által. A fermentáció során a közegben mért pH értékek, sejt-, laktóz- és szerin-ekvivalensben kifejezett teljes aminosav-koncentrációk a fermentációs idő függvényében.

A törzsek laktóz felhasználása az L+SF tápközeggel összehasonlítva jelentősen megemelkedett. A *Lactobacillus* törzsek a laktóz 14-18%-át használták fel. A felülülő laktózmennyisége az exponenciális szaporodási fázistól kezdve folyamatosan csökkent, 24 óra elteltével szignifikáns különbség volt megfigyelhető a kiindulási koncentrációhoz képest. A *Lactococcus cremoris* laktóz felhasználása mérsékeltebb volt (6,8%), de a fermentáció végére a kezdeti koncentrációhoz képest szignifikáns változás volt megfigyelhető [$p < 0,001$] (16. Táblázat).

16. Táblázat.: Az L+KP tápközegben elért minimum laktóz és szerin ekvivalens aminosav koncentrációk, 48 órás fermentáció során. A csillagok a kezdeti értékhez mért különbségek szignifikanciáját jelzik. *= $p<0,05$, **= $p<0,01$, ***= $p<0,001$.

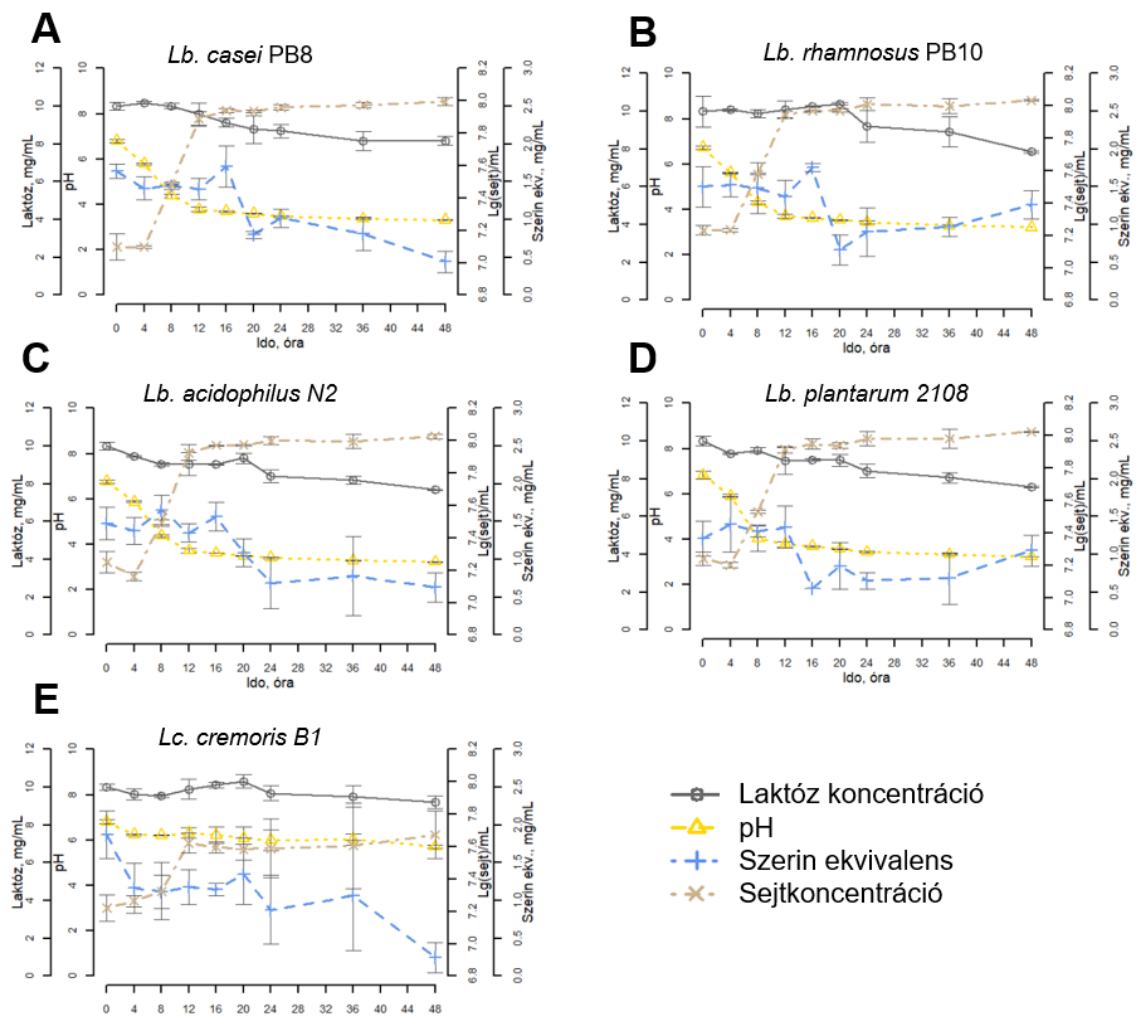
Törzs	Laktóz, g/L		Szerin ekvivalens, g/L	
	Detekciós idő	Minimum érték	Detekciós idő	Minimum érték
Kezdeti érték	0	10,00±0,38	0	1,56±0,31
Lb.c. PB8	36	8,16±0,49***	48	0,44±0,14***
Lb.r.PB10	48	7,85±0,07***	20	0,67±0,20***
Lb.a. N2	48	7,69±0,02***	48	0,63±0,19***
Lb.p. 2108	48	7,55±0,04***	16	0,55±0,00***
Lc.c. B1	48	9,22±0,33**	48	0,25±0,20*

Minden tejsavbaktérium törzs szignifikánsan csökkentette a fermentációs közeg kiindulási pepton mennyiségét [$p<0,001$]. A benne található aminosavak felhasználása minden esetben a stacioner szaporodási fázisban volt a legjelentősebb, a kezdeti aminosav mennyiség 29,1-49,4%-a került hasznosításra.

Kiemelendő, hogy minden vizsgált tejsavbaktérium törzs esetében a laktóz és pepton hasznosítás egyidejűleg zajlott (**26. Ábra**). Ez arra utal, hogy kazein pepton jelenlétében nem érvényesül a savófehérjével történő kiegészítés során megfigyelt aminosav, mint kizárólagos energiaforrás hasznosításának jelensége.

Az L+SZP közegben megfigyelt eredmények hasonlóak voltak az L+KP közegben elértekkel (**27. Ábra**). Minden tejsavbaktérium törzs képes volt szaporodni a szója peptont tartalmazó közegben, az elért sejtkoncentrációk a *Lactobacillus* törzseknél $8 \cdot 10^7$ sejt/mL, a *Lactococcus cremoris* B1 esetén $5 \cdot 10^7$ sejt/mL voltak.

A *Lactobacillus* törzsek a tápközeg laktóztartalmának 18,4-24,5%-át használták fel, és a laktóz mennyiség már 24 óra elteltével szignifikáns csökkenést mutatott a kiindulási értékhez képest [$p<0,001$] (**17. Táblázat**). A *Lactococcus cremoris* B1 ebben az esetben is kevesebb laktózt (7,8%) használt fel, a *Lactobacillus* törzsekkel összehasonlítva, és fogyás mértéke csak 48 óra elteltével vált szignifikánssá [$p=0,025$].



27. Ábra: L+SYP tápközeg 48 órás tejsavas erjesztése az **A/ *Lb. casei* PB8, B/ *Lb. rhamnosus* PB10, C/ *Lb. acidophilus* N2, D/ *Lb. plantarum* 2108 és E/ *Lc. cremoris* B1** törzsek által. A fermentáció során a közegben mért pH értékek, sejt-, laktóz- és szerin-ekvivalensben kifejezett teljes aminosav-koncentrációk a fermentációs idő függvényében.

A pepton aminosavainak hasznosítása a *Lactobacillus* törzsek esetén a stacioner fázisra volt tehető, ekkor a kezdeti mennyiség 54,5-73,1%-a került felhasználásra. A *Lactococcus cremoris* B1 szaporodásának exponenciális, és késő stacioner fázisában vett fel peptideket a táplevesből, és a fermentáció végére a kezdeti mennyiség nagy részét (87%) elfogyasztotta. Az L+KP tápközeghez hasonlóan a laktóz és pepton felhasználás egyidejűleg zajlott.

17. Táblázat: Az L+SZP tápközegben elért minimum laktóz és szerin ekvivalens koncentrációk, 48 órás fermentáció során. A csillagok a kezdeti értékhez mért különbségek szignifikanciáját jelzik.. *= $p<0,05$, **= $p<0,01$, ***= $p<0,001$.

Törzs	Laktóz, g/L		Szerin ekvivalens, g/L	
	Detekciós idő	Minimum érték	Detekciós idő	Minimum érték
Kezdeti érték	0	10,05± 0,26	0	1,94±0,22
Lb.c. PB8	48	8,62±0,10***	24	1,65±0,48***
Lb.r.PB10	48	8,42±0,44***	24	1,21±0,16***
Lb.a. N2	48	8,16±0,12***	16	0,97±0,07***
Lb.p. 2108	48	8,57±0,02***	16	1,10±0,14***
Lc.c. B1	48	9,40±0,60***	20	1,10±0,18***

A tejsavbaktériumok három közegben (L+SF, L+KP és L+SZP) folytatott fermentációja alapján elmondható, hogy a törzsek fehérje (L+SF) és peptonok (L+KP, L+SZP) jelenlétében merőben más viselkedést mutatnak.

Savófehérjék jelenlétében a *Lactobacillus* törzsek a fehérje aminosavait alkalmazzák kizárólagos szén- és energiaforrásként az új sejtek képzéséhez. A laktóz felhasználása csak a stacioner fázis elérése után kezdődik meg, és nem haladja meg a 10%-ot. A *Lactococcus cremoris* B1 nem képes hasznosítani a savófehérjét, mint nitrogénforrást, ami a törzs alacsony proteolitikus aktivitására utal.

Ezzel szemben a kisméretű peptonokat mind a *Lactobacillus* törzsek és *Lactococcus cremoris* B1 is képes felhasználni. Az L+KP és L+SZP tápközegekben a törzsek gyorsan elérték a stacioner fázist, mivel a peptonok könnyen felvehetőek és hasznosíthatók voltak. Továbbá a peptont tartalmazó fermentációs közegekben az aminosavak és laktóz felhasználása szimultán történt, azaz a törzsek nem alkalmazták kizárólagos szén- és energiaforrásként a peptonok aminosavtartalmát.

5.4. Tejsavbaktérium törzsek szelektív GOS fermentációja, fermentált ital előállításának céljából

Az előzőekben bebizonyosodott, hogy a fehérjementes savót a tejsavbaktériumok szaporodásának támogatásához szerves nitrogénforrással szükséges kiegészíteni. Savófehérje adagolása esetén *Lactobacillus* törzsek a közeg laktóz tartalma helyett a fehérje aminosavait használták kizárólagos energiaforrásként. Mivel a GOS szelektív fermentációja során céлом az egyes szénhidrát frakciók eltávolítása, a vizsgálatok során kazein és szója peptont alkalmaztam szerves nitrogénforrásként, a cukrok felhasználásának elősegítése érdekében.

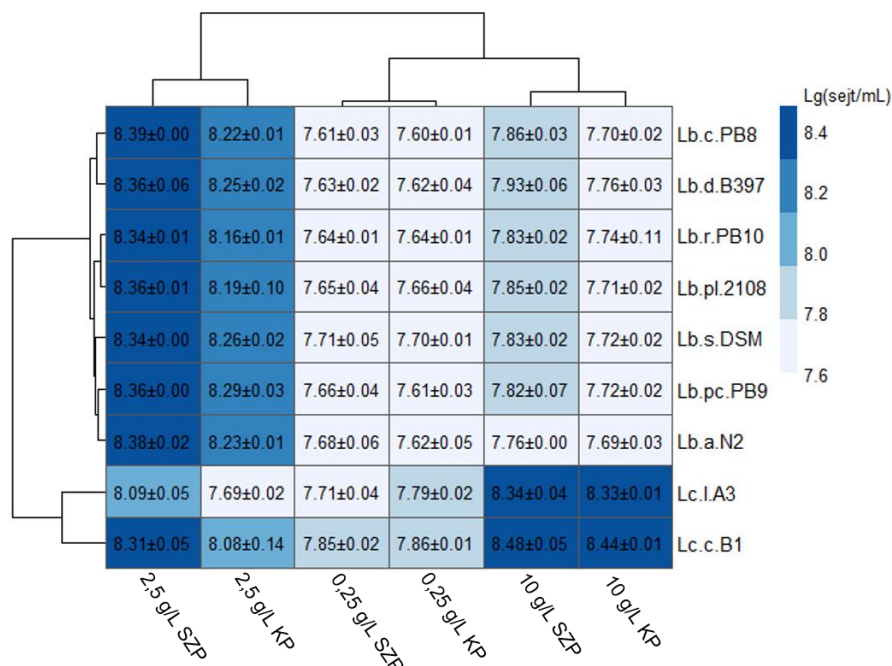
5.4.1. Tejsavbaktérium törzsek GOS szirupból történő szelektív mono- és diszacharid felhasználásának screenelése

A screenelés során a **6. Táblázatban** szereplő tejsavbaktérium törzsek szelektív fermentációs képességét vizsgáltam. A vizsgálatokhoz a 4.1.5.4. szekcióban leírt GOS szirupot 15 g/L össz-szénhidrát koncentrációra hígítottam, majd kiegészítettem 0,25; 2,5 és 10 g/ kazein, illetve szója peptonnal. Az így létrehozott tápközegekben nyomon követtem a törzsek szaporodását és szénhidrát-felhasználását.

A **28. Ábra** a 72 órás fermentáció végén elért sejtkoncentrációk hierarchikusan klaszterezett adatait mutatja be, hőterkép formájában. Jól látható, hogy a két vizsgált nemzetség-*Lactobacillus* és *Lactococcus*- törzsei másképp reagáltak a különböző pepton-koncentrációkra. A *Lactococcus* törzsek (*Lc. lactis* A1, *Lc. cremoris* B1) előnyben részesítették a magasabb pepton-koncentrációkat, míg a *Lactobacillus* nemzetség törzsei alacsonyabb szerves nitrogénszükséglettel rendelkeztek.

A *Lactococcus* törzsek szaporodását a pepton-koncentráció növelése nagymértékben serkentette, a legnagyobb sejttömeg 10 g/L kazein és szója pepton hozzáadásával keletkezett. A *Lactobacillus* törzsek szaporodása ezzel szemben 2,5 g/L kazein vagy szója peptonnal való kiegészítés esetén volt a legjelentősebb, 0,25 és 10 g/L szerves nitrogénforrás jelenlétében az elért sejtkoncentrációk lényegesen alacsonyabbak voltak. Míg a szója pepton némileg előnyösebb volt a *Lactobacillus* törzsek szaporodása szempontjából, addig a *Lactococcus* törzsek esetén nem volt különbség a pepton típusok hatásában.

Mivel a 0,25 g/L hozzáadott kazein vagy szója pepton mennyiség esetén minden törzs csak kis mértékben szaporodott, ennek hatását a továbbiakban nem vizsgáltam.



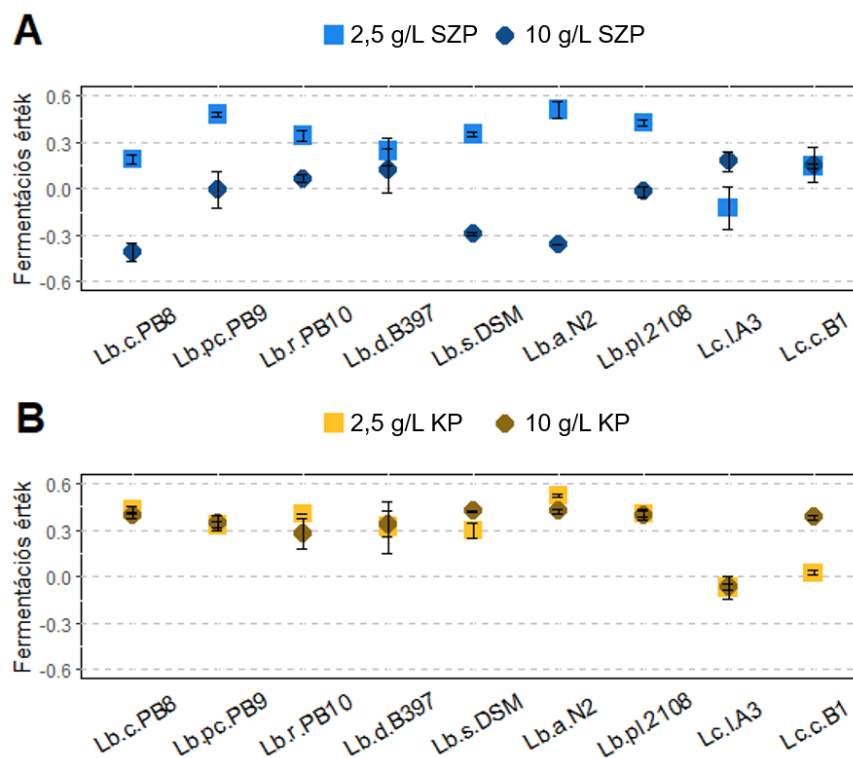
28. Ábra: 15 g/L össz-szénhidrátra hígított és kazein (KP) valamint szója peptonnal (SZP) kiegészített GOS szirup fermentációja során elért maximális sejtkoncentrációk hierarchikusan klaszterezett adatainak hő térképe. A kezdő sejtkoncentráció minden esetben megközelítőleg 10^7 sejt/mL volt. A tejsavbaktérium törzsek rövidített elnevezései a 6. Táblázatban láthatók.

A tejsavbaktérium törzsek alkalmazását arra, hogy mono- és diszacharidokat szelektíven, a magasabb polimerizációs fokú (DP3-6) frakciók csökkentése nélkül felhasználják, fermentációs érték (FÉ) kiszámolásával állapítottam meg. Ennek menete 4.3.11. pontban került bemutatásra. A **29. Ábra** alapján látható, hogy a legmagasabb fermentációs értékek 2,5 g/L szója pepton mellett, - egy kivétellel – a *Lactobacillus* törzsekkel végzett fermentációk során keletkeztek. Az *Lc. lactis* A3 törzs jobb eredményt ért el 10 g/L szója pepton jelenlétében, míg az *Lc. cremoris* B1 törzs teljesítményét nem befolyásolta a pepton-koncentráció.

Kazein peptonnal történő kiegészítés esetén a *Lactobacillus* és *Lc. lactis* törzsek hasonló fermentációs értékeket értek el 2,5 és 10 g/L pepton jelenlétében, míg az *Lc. cremoris* B1 jobban szerepelt 10 g/L kazein pepton mellett.

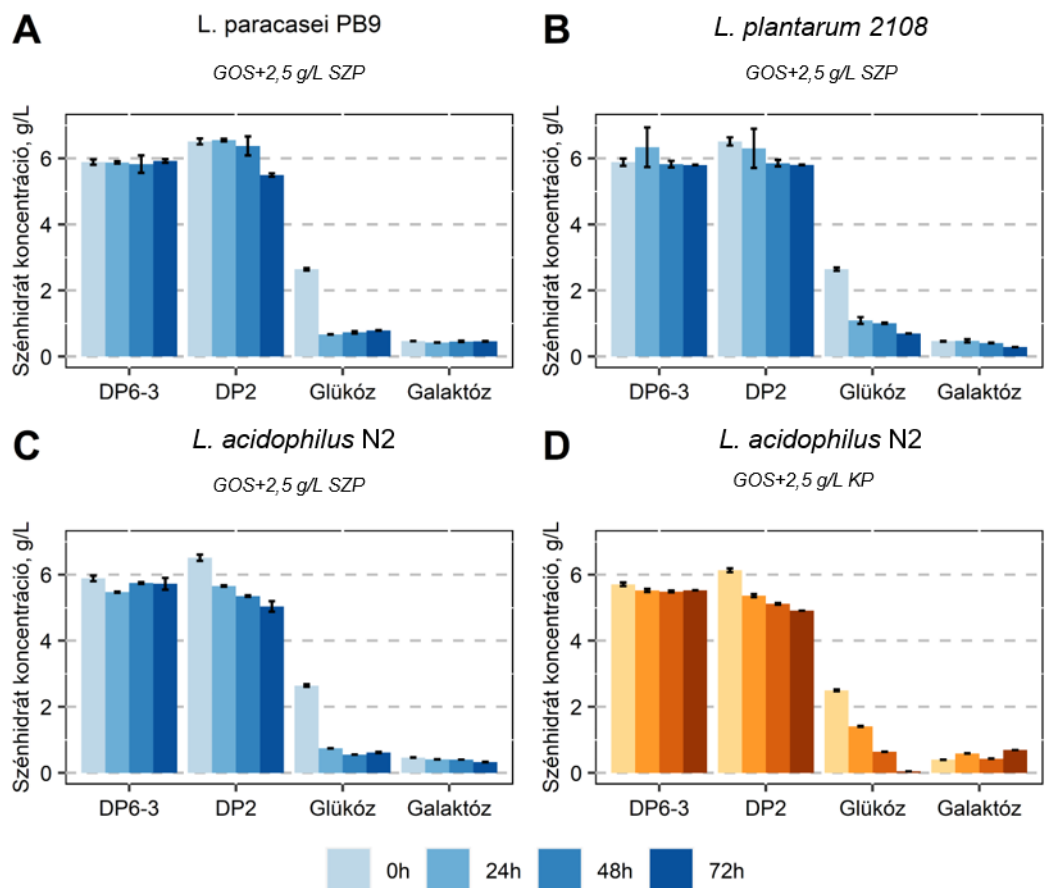
Az eredményeket összefoglalva látható, hogy a *Lactobacillus* törzsek összességében jobban teljesítettek, mint a *Lactococcus* törzsek. A legmagasabb fermentációs értékeket az *L. paracasei* PB9 és *L. plantarum* 2108 törzsek érték el 2,5 g/L szója pepton mellett,

valamint az *L. acidophilus* N2 a pepton típusától függetlenül. Ennek megfelelően a felsorolt három törzset választottam ki a további vizsgálatokhoz.



29. Ábra: 15 g/L össz-szénhidrát koncentrációra hígított GOS szirup fermentációja során a felhasznált szénhidrát frakciók mennyiségéből kalkulált fermentációs értékek. A hígított GOS sziruphoz A/ szója pepton (SZP) és B/ kazein pepton (KP) került hozzáadásra, 2,5 és 10 g/L mennyiségben. A tejsavbaktérium törzsek rövidített elnevezései a **6. Táblázatban** láthatók.

A szelektált *Lactobacillus* törzsek szénhidrát profilja a fermentáció során a **30. Ábrán** látható. Az oligoszacharid frakciók (DP3-6) koncentrációja minden esetben változatlan maradt. A közeg glükóz tartalmát a GOS+2,5 g/L SZP közegben mindhárom törzs nagymértékben csökkentette, illetve a GOS+2,5 g/L KP tápközegben az *L. acidophilus* N2 teljes mértékben felhasználta. Ezzel szemben a DP2 frakció felhasználásának mértéke alacsony volt, egyik esetben sem haladta meg a 20%-ot, és a közeg galaktóz koncentrációja sem csökkent lényegesen. A fermentáció intenzitását tekintve mindhárom törzs az első 24 órában volt a legaktívabb, ezt követően csak kis mértékű, vagy elhanyagolható szénhidrát felhasználás volt megfigyelhető. Ez alól csak az *L. acidophilus* N2 képzett kivételt a GOS+2,5 g/L KP közegben, ekkor a glükóz felhasználása a 72 órás fermentáció alatt folyamatos volt (**30/D Ábra**).



30. Ábra: 15 g/L össz-szénhidrát koncentrációra hígított GOS szirup szelektált törzsekkel végzett 72 órás tejsavas fermentációja során kapott szénhidrát profilok

Ugyan a szelektált törzsek ígéretes eredményeket mutattak a glükóz felhasználás terén, de a mono- és diszacharidok teljes eltávolítása egyik esetben sem valósult meg. A DP2 frakció felhasználásának alacsony intenzitása valószínűleg a glükóz represszió és a fermentációs közeg gyors savasodásának következménye volt (TITGEMEYER ÉS HILLEN, 2002; HAYEK ÉS IBRAHIM, 2013; KOWALCZYK *ET AL.*, 2015). A tejsavbaktérium törzsek által termelt szerves savak felhalmozódtak a közegben, és a pH 24 óra elteltével lényegesen lecsökkent (**18. Táblázat**). Az alacsony pH a sejtek halálához, majd az ezt követő szétesésükhöz vezet. Az előbbi a metabolikus folyamatok leállítását, utóbbi pedig az intracelluláris állomány -köztük a β -galaktozidáz-felülűszóba jutását eredményezi.

18. Táblázat: Kazein peptonnal (KP) és szója peptonnal (SZP) kiegészített, 15 g/L összszenhidrát koncentrációra hígított GOS szirup tejsavas fermentációja során, a felülúszóban mért pH értékek.

Törzs	Fermentációs közeg	pH értékek			
		0 h	24 h	48 h	72 h
<i>L. paracasei</i> PB9	GOS+2,5 g/L SZP	7±0,10	3,60±0,14	3,49±0,09	3,43±0,12
<i>L. plantarum</i> 2108	GOS+2,5 g/L SZP	7±0,10	3,57±0,06	3,50±0,00	3,43±0,12
<i>L. acidophilus</i> N2	GOS+2,5 g/L SZP	7±0,10	3,50±0,05	3,37±0,12	3,37±0,12
	GOS+2,5 g/L CP	7±0,10	3,70±0,15	3,50±0,00	3,50±0,00

A sejtekből kiszabadult β -galaktozidáz katalizálhatja a fermentlében lévő GOS molekulák hidrolízisét. A tejsavbaktériumok alapvetően nem képesek a nagyobb méretű (>DP4) oligoszacharidok felvételére, mivel a sejtbe történő transzport a molekulaméret szempontjából korlátolt (SCHWAB ÉS GÄNZLE, 2011; GÄNZLE ÉS FOLLADOR, 2012; ZHAO ÉS GÄNZLE, 2018).

Azonban abban az esetben, ha az intracelluláris β -galaktozidáz a sejtlízis útján a fermentlébe kerül, és ott a nagyobb GOS frakciók bontásába kezd, az így keletkezett kisebb molekulák felvehetővé válnak. Ennek fényében a sejtlízis megakadályozása vagy késleltetése megnövelheti a szaporodás intenzitását és a folyamat szelektivitását is. A továbbiakban a savas környezet okozta szaporodás-gátlás, és sejtlízis elkerülése érdekében a fermentációs közeg pH-ját 0,05, 0,10 és 0,15 M foszfát puffer hozzáadásával állítottam be pH=7-re.

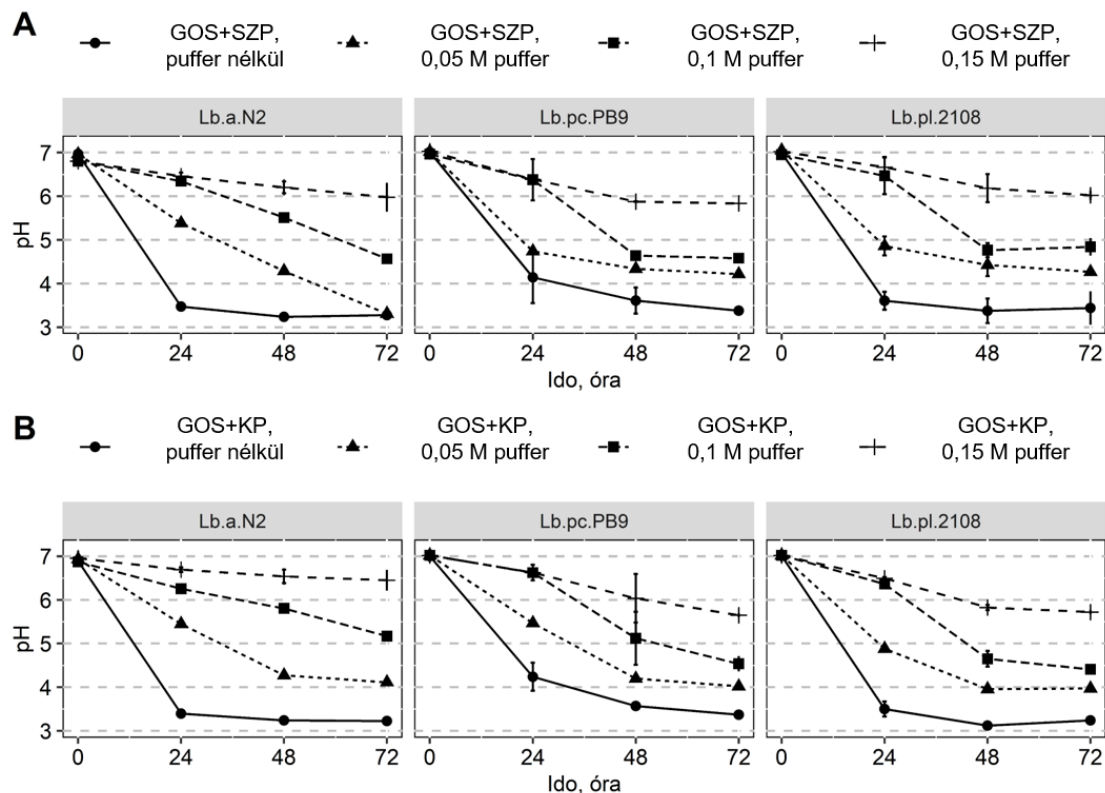
5.4.2. A fermentációs közeg pufferelésének hatása a szelektált tejsavbaktérium törzsek szaporodására és metabolikus sajátosságaira

A *L. paracasei* PB9, *L. plantarum* 2108, *L. acidophilus* N2 törzsekkel a 4.2.4.2. szekcióban leírtak alapján fermentációs kísérleteket végeztem, melynek során vizsgáltam a különböző mennyiségben (0-0,15 M) adagolt foszfát puffer fermentációra gyakorolt hatását

5.4.2.1. Szelektált tejsavbaktérium törzsek szaporodása

A három napos fermentáció során elért pH értékek a különböző tejsavbaktérium törzsek, és tápközegek esetén a **31. Ábrán** láthatók. A foszfát puffer csökkentette a fermentációs közeg savasodását, de az alkalmazott pufferkoncentrációk egyike sem volt képes a kezdeti, 7-es érték megtartására. A 72 órás fermentáció végére az elért értékek rendre

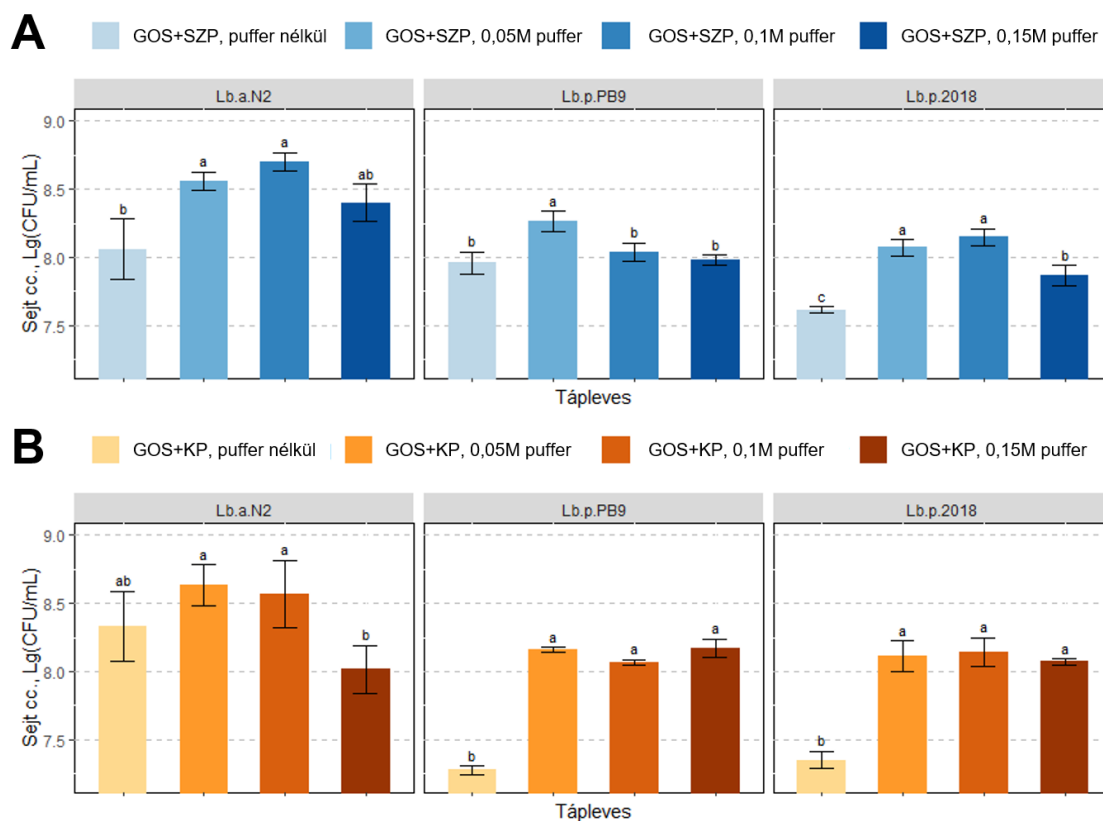
pH=3; pH=3-4; pH=4-5 és pH=6 voltak pufferelés nélkül, és 0,05-0,15 M foszfát puffer alkalmazásával. A pH=4,5-ös és az alatti pH élelmiszerbiztonsági szempontból ideálisnak mondható.



31. Ábra: Hígított GOS szirup 72 órás fermentációja során elért pH értékek **A/** 2,5 g/L szója pepton (SZP) és **B/** 2,5 g/L kazein pepton (KP) hozzáadásával, pufferelés nélkül vagy pH=7 értéken pufferelve 0,05; 0,10; és 0,15 M foszfát pufferrel. A tejsavbaktérium törzsek rövidített elnevezései a **6. Táblázatban** láthatók.

A kísérlet során meghatároztam a törzsek élősejtszámát (CFU/mL), a **32. Ábra** a maximálisan elért sejtkoncentrációkat mutatja. A pufferelés serkentette a tejsavbaktérium törzsek szaporodását a hígított GOS szirupban, kazein pepton (KP) és szója pepton (SZP) kiegészítés mellett is. A nem pufferelt közeggel összehasonlítva az elért sejtkoncentrációk szignifikánsan magasabbak voltak 0,05 és 0,1 M foszfát puffer hozzáadása esetén ($p < 0,03$). A 0,15 M-os puffer koncentráció azonban a legtöbb esetben az elért sejtkoncentrációk csökkenéséhez vezetett. Ezt feltehetőleg a fermentálé foszfát mennyiségének optimális fölötti értéke okozta. A foszfát fontos szerepet játszik a

tejsavbaktériumok glükóz felvételének és glikolitikus folyamatainak szabályozásában, ezért feltehetően nemcsak a puffereles, hatása érvényesült. A glükóz felvétel és lebontás szabályozása alapvetően a HPr fehérje különböző helyzetben történő foszforilezésével köthető össze (TITGEMEYER ÉS HILLEN, 2002; LEVERING *ET AL.*, 2012).



32. Ábra: Hígított GOS szirup 72 órás fermentációja során elért maximális sejtkoncentrációk **A/** 2,5 g/L szója pepton (SZP) és **B/** 2,5 g/L kazein pepton (KP) hozzáadásával, puffereles nélkül vagy pH=7 értéken puffereles 0,05; 0,10; és 0,15 M foszfát puffereles. A tejsavbaktérium törzsek rövidített elnevezései a **6. Táblázatban** láthatók.

Feltételezhető, hogy amennyiben a tápközeg foszfát koncentrációja magas, az negatív visszacsatolást ad a glükóz transzport és glikolízis irányába (LIU *ET AL.*, 2019), ami a tejsavbaktérium törzsek szaporodásának csökkenéséhez vezethetett.

5.4.2.2. β -galaktozidáz aktivitás a fermentációs felülúszóban

A β -galaktozidáz enzim, mely a laktóz és GOS molekulák hidrolízisét egyaránt katalizálja, a tejsavbaktériumokban intracelluláris. Abban az esetben, ha sejtlízis útján a fermentáléba kerül, jelenléte a GOS molekulák hidrolíziséhez, és az értékes prebiotikus komponensek csökkenéséhez vezethet. Ezért a pufferelt fermentációs kísérletek során vizsgáltam a felülúszó specifikus (sejttömegre vonatkoztatott) β -galaktozidáz aktivitását is. A mérés eredményei a **19. Táblázatban** láthatók.

19. Táblázat: Hígított GOS szirup fermentációja során a felülúszóban mért maximális β -galaktozidáz aktivitás (U_{max}), mintavételi időpontok és pH értékek. A hígított GOS szirup 2,5 g/L szója (GOS+SZP) vagy kazein peptonnal (GOS+KP) volt kiegészítve, pufferelése pH=7-es értéken, különböző mennyiségű foszfát pufferrel történt. A betűk az U_{max} értékek különbségeit jelzik, egyes tejsavbaktérium törzsek esetén.

Törzs	Fermentációs közeg	Puffer, M	Mintavétel ideje, óra	pH	β -galaktozidáz aktivitás U_{max} , pU/sejt
Lb.a.N2	GOS+SZP	-	24	3,5±0,0 ^c	49,22±4,68 ^b
		0,05	24	5,4±0,1 ^a	15,17±3,65 ^a
		0,10	72	5,5±0,0 ^a	21,00±5,23 ^a
		0,15	72	6,0±0,3 ^b	37,45±11,9 ^{ab}
	GOS+KP	no	24	3,4±0,0 ^c	20,21±10,05 ^{ab}
		0,05	24	5,5±0,1 ^a	43,75±11,85 ^{ab}
		0,10	24	6,3±0,0 ^{bd}	48,79±0,95 ^b
		0,15	48	6,5±0,2 ^d	104,82±22,0 ^{ab}
Lb.pc.PB9	GOS+SZP	-	24	4,1±0,6 ^{ab}	3,21±0,70 ^d
		0,05	24	4,7±0,1 ^{ab}	11,52±1,23 ^a
		0,1	48	4,6±0,0 ^c	19,76±8,41 ^{bc}
		0,15	72	5,8±0,0 ^a	37,61±2,05 ^{ad}
	GOS+KP	-	24	4,2±0,3 ^{ab}	26,35±8,00 ^{abcd}
		0,05	72	4,0±0,0 ^{ab}	11,05±2,57 ^{abd}
		0,1	48	5,1±0,6 ^{bc}	54,25±14,57 ^{abcd}
		0,15	48	6,0±0,6 ^c	55,17±6,89 ^c
Lb.pl.2108	GOS+SZP	-	48	3,4±0,3 ^c	8,46±3,98 ^{ab}
		0,05	48	4,4±0,3 ^a	11,14±4,25 ^a
		0,1	72	4,8±0,2 ^a	53,93±20,59 ^{ab}
		0,15	72	6,0±0,1 ^b	29,63±11,35 ^b
	GOS+KP	-	24	3,5±0,2 ^c	10,03±5,98 ^{ab}
		0,05	24	4,9±0,1 ^a	6,92±3,11 ^{ab}
		0,1	72	4,4±0,0 ^a	15,95±2,32 ^{ab}
		0,15	72	5,7±0,1 ^b	26,00±4,68 ^{ab}

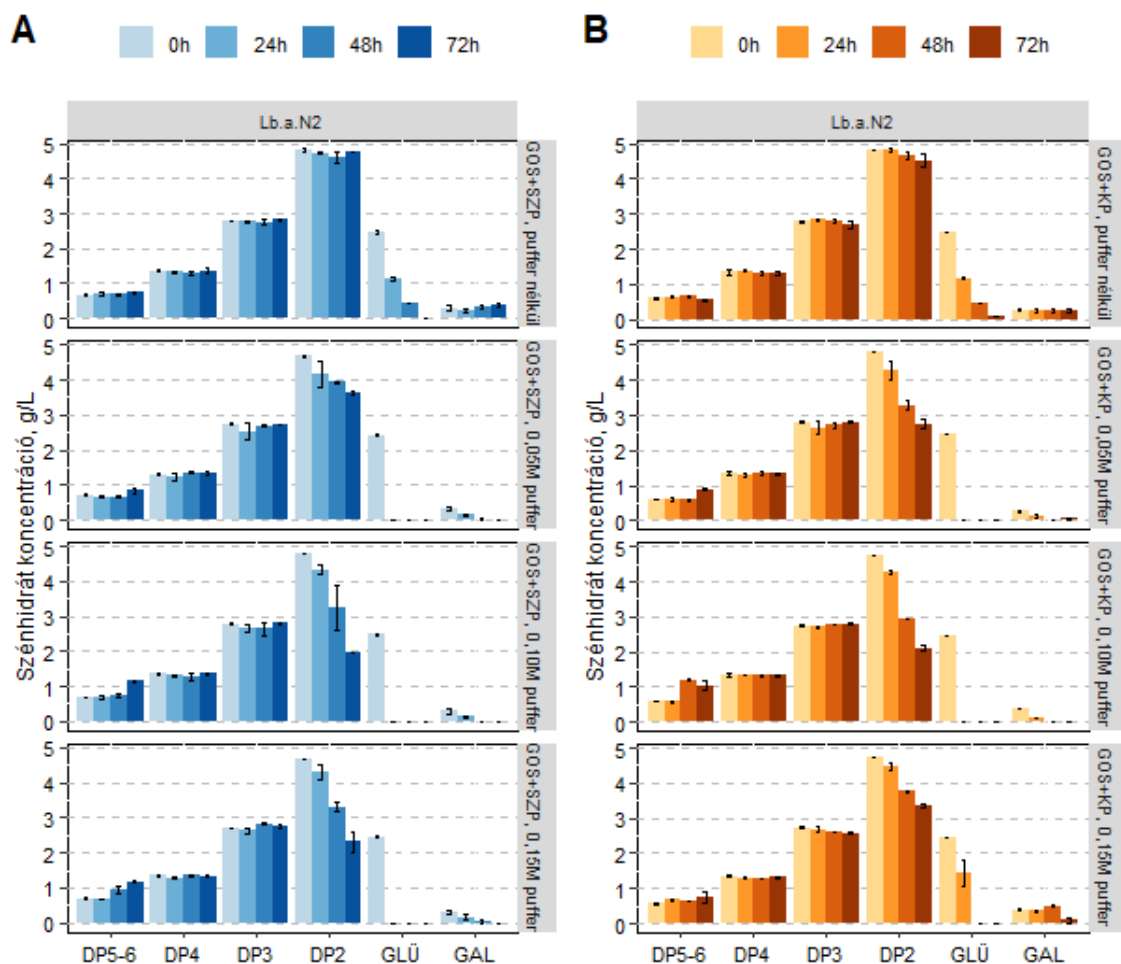
Mindkét fermentációs közegben (GOS+SZP és GOS+KP) a puffer koncentráció növelésével párhuzamosan növekedett a felülúszó specifikus β -galaktozidáz aktivitása. A

legmagasabb értékek 0,15 M pufferkoncentrációnál voltak mérhetőek. Azonban fontos megjegyezni, hogy a nem, vagy csak kis mértékben pufferelt közegekben mért alacsonyabb enzimaktivitáshoz az adott fermentlé alacsonyabb pH-ja miatt bekövetkező inaktiválódás is hozzájárulhatott. Azaz lehetséges, hogy az enzim az az alacsony (3,5-4) pH, vagy az extracelluláris proteáz aktivitás miatt inaktiválódott, így nem volt mérhető. A puffer koncentrációja nagyban befolyásolta az enzimaktivitás maximumának időpontját. Pufferelés nélkül vagy kismértékű pufferelés mellett (0,05 M) az enzimaktivitás csúcsát a fermentáció korai szakaszában érte el, jellemzően 24-48 óra alatt. Ezzel szemben a pufferkoncentráció emelése után (0,10-0,15 M) az enzimaktivitás maximuma később, 48-72 óra elteltével volt megfigyelhető. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a pufferelés késlelteti a sejtek lízisének mértékét, és a vele járó β -galaktozidáz felszabadulást. A sejtek késleltetett szétesése lehetőséget teremt arra, hogy tovább maradjanak metabolikusan aktívak, mely kedvez a mono- és diszacharidok felhasználásának.

5.4.2.3. Szénhidrát profilok alakulása a GOS szelektív fermentációja során

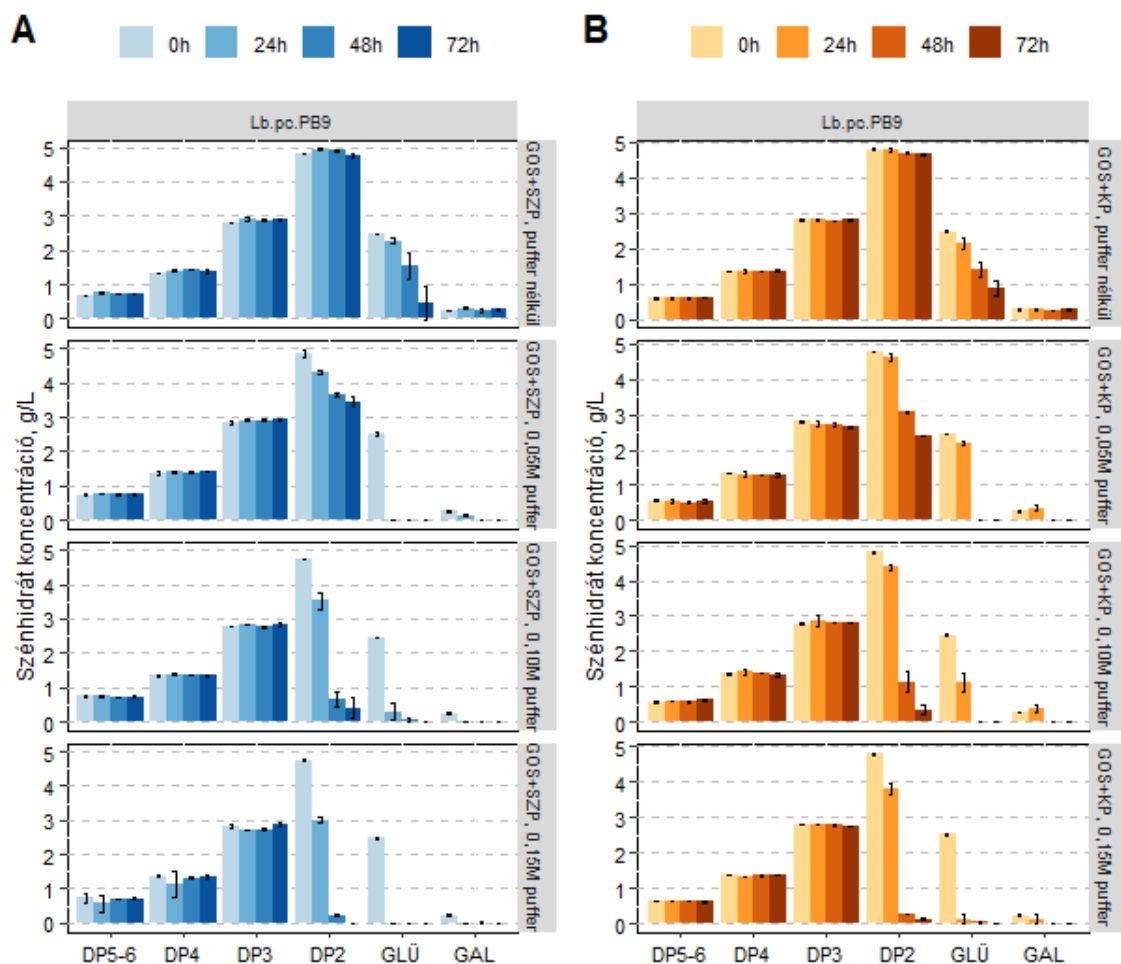
A három szelektált tejsavbaktérium törzssel végzett fermentációk szénhidrát-profiljának alakulása a **33-35. Ábrákon** láthatók. Pufferelés nélkül, a korábbiakhoz hasonlóan a glükóz és galaktóz felhasználása csak részleges volt, míg a DP2 frakció mennyisége változatlan maradt mindhárom törzs esetén. A mono- és diszacharidok felhasználásának mértéke megnőtt a pufferkoncentráció emelésével. Ez alól csak az *L. acidophilus* N2 törzs képezett kivételt, ugyanis esetében 0,15 M foszfát puffer csökkentette a cukorfelhasználás mértékét is az előzőekben megfigyelt szaporodás gátlása mellett.

A **33. Ábrán** látható, hogy *L. acidophilus* N2 törzssel végzett fermentáció esetén a pufferkoncentráció 0,05 M fölé emelésével a teljes glükóz mennyiség felhasználásra került 24 óra alatt. Ezt követte a DP2, és ugyan lényegesen lassabban, de a galaktóz hasznosítása. A 72 órás fermentáció végén glükóz és galaktóz már nem volt kimutatható egyetlen pufferkoncentráció esetében sem. A törzs a DP2 frakciót nem teljes mértékben használta fel. A legjobb eredmény 0,1 M puffer alkalmazásával volt elérhető, ekkor a DP2 frakció 50%-a került felhasználásra.



33. **Ábra:** hígított GOS szirup *L. acidophilus* N2 törzs által végzett fermentációja során kapott szénhidrát profilok, **A/** 2,5 g/L szója (SZP) és **B/** 2,5 g/L kazein peptonnal (KP) való kiegészítéssel, puffereles nélkül vagy pH=7 értéken, foszfát pufferrel végzett puffereles mellett

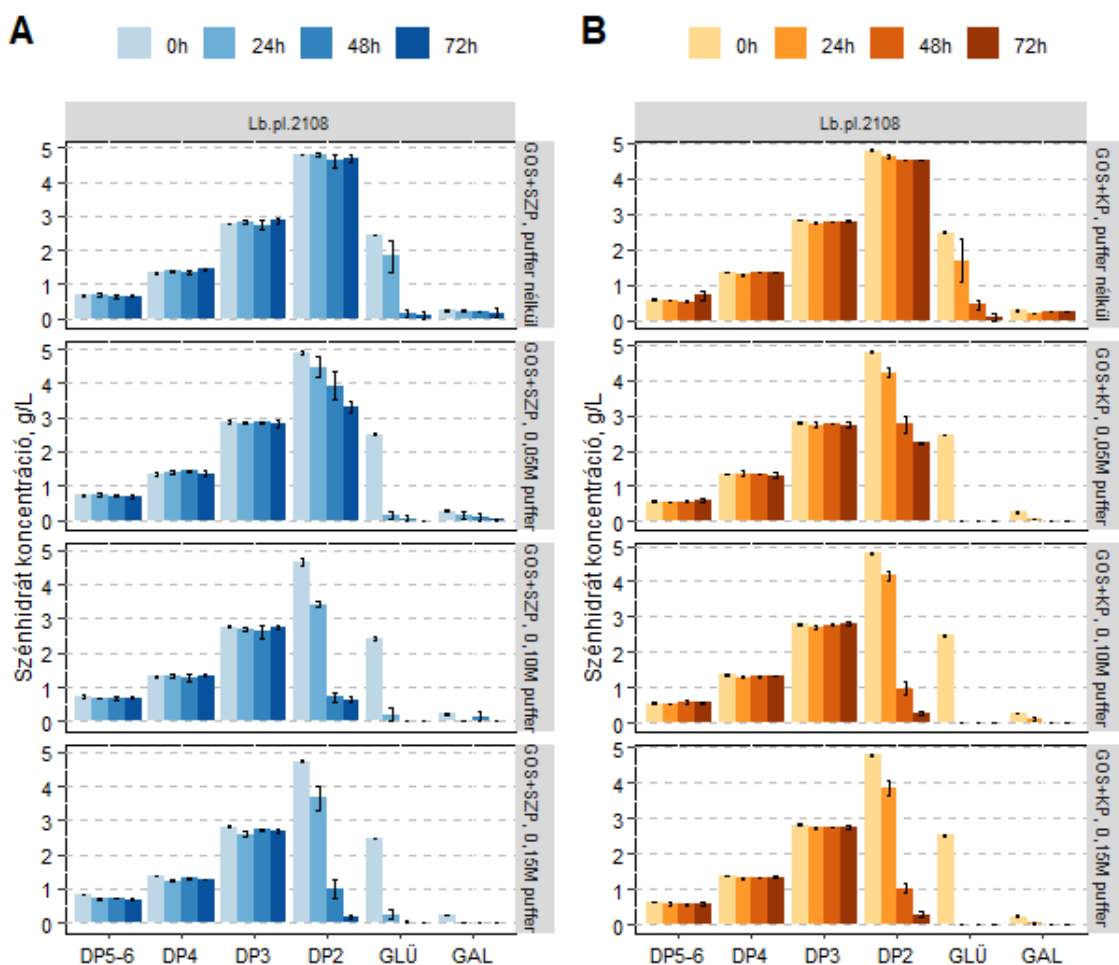
Az *L. paracasei* PB9 és *L. plantarum* 2108 törzsekkel végzett fermentáció során a szénhidrát profilok hasonlóak voltak (34. és 35. **Ábra**). A szénhidrát felhasználás hatékonyabb volt magasabb pufferkoncentrációk (0,1-0,15 M) mellett. Mindkét törzs képes volt a monoszacharidokat 24-48 óra alatt teljes mértékben felhasználni, és a DP2 frakció felhasználása is közel teljes volt. Az *L. plantarum* 2108 valamivel gyorsabban metabolizálta a cukrokat kazein pepton kiegészítés mellett (GOS+KP), míg az *L. paracasei* PB9 a szója peptonnal dúsított közegben (GOS+SZP) volt hatékonyabb.



34. *Ábra*: hígított GOS szirup *L. paracasei* PB9 törzs által végzett fermentációja során megfigyelt szénhidrát profilok, *A*/ 2,5 g/L szója (SZP) és *B*/ 2,5 g/L kazein peptonnal (KP) való kiegészítéssel, pufferelés nélkül, vagy pH=7 értéken, foszfát pufferrel végzett pufferelés mellett

Kiemelendő, hogy a 0,1-0,15 M puffer koncentrációjú felúszók magas β -galaktozidáz aktivitásának ellenére a GOS frakciók mennyisége semmilyen esetben sem csökkent. A jelenség magyarázata lehet, hogy a vizsgált tejsavbaktérium törzsek által termelt β -galaktozidázok specifikusak a laktóz, és egyéb DP2 komponensek hidrolízisére, de nem képesek egyéb, magasabb polimerizációs fokú GOS molekula lebontására. Az eredmények alapján az is láthatóvá vált, hogy míg az *L. paracasei* PB9 és *L. plantarum* 2108 törzsek képesek voltak minden DP2 komponens hidrolízisére, az *L. acidophilus* N2 csak a diszacharidok 50%-át bontotta le. A kísérletek során használt Vivinal GOS szirup specifikációja szerint a DP2 frakció laktóz, és egyéb nem-laktóz diszacharidok 1:1 arányú

keverékből áll. Ebből következtethető, hogy az *L. paracasei* PB9 és *L. plantarum* 2108 törzsek képesek minden, a DP2 frakcióban található glikozidos kötés bontására, így egyaránt képesek a laktóz, és egyéb prebiotikus diszacharidok hasznosítására.



35. Ábra: hígított GOS szirup *L. plantarum* 2108 törzs által végzett fermentációja során megfigyelt szénhidrát profilok, **A/** 2,5 g/L szója (SZP) és **B/** 2,5 g/L kazein peptonnal (KP) való kiegészítéssel, pufferelés nélkül, vagy pH=7 értéken, foszfát pufferrel rendszerrel végzett pufferelés mellett

A **20. Táblázatban** összefoglaltam a három szelektált törzs teljesítményét kihozatal (Y) és végső tisztaság (T_v) tekintetében. Az eredmények alapján minden fermentációs beállítást közel 100%-os kihozatal jellemzett, mivel egyik esetben sem csökkent a DP3-6 frakciók mennyisége. Az egyes fermentációkkal elért GOS tisztaságot (T_v) azonban nagyban befolyásolta a pufferelés mértéke a GOS+SZP ($p < 0,014$) és GOS+KP ($p < 0,001$). közegekben egyaránt. A T_v értékek a pufferkoncentráció növelésével emelkedtek. A

legjobb eredmények 0,1-0,15 M foszfát puffer mellett voltak megfigyelhetők. Az *L. acidophilus* N2 eredményezte a legalacsonyabb T_v értékeket (73%), míg az *L. plantarum* 2108 és *L. paracasei* PB9 alkalmazásával rendre 96 és 100% T_v volt elérhető.

Ugyan a fermentációk kezdeti szakaszában megfigyelhetők voltak kisebb különbségek a szója és kazein pepton adagolása esetén, ez az eltérés nem volt kimutatható a végső T_v értékeknél.

20. Táblázat: Tejsavbaktérium törzsek szelektív fermentációs teljesítményének elemzése kihozatal (Y) és végső tisztaság (T_v) szempontjából. A fermentációk 15 g/L össz-szénhidrát tartalomra hígított, szója (SZP) vagy kazein peptonnal (KP) kiegészített közegben zajlottak, puffereles nélkül vagy pH=7 értékre, foszfát pufferrel végzett puffereles mellett. A betűk az T_v különbségeit jelzik, egyes tejsavbaktérium törzsek esetén.

Törzs	Fermentációs közeg	Puffer	Kihozatal (Y %)	Kezdeti tisztaság (T_k %)	Végső tisztaság (T_v %)
<i>L. acidophilus</i> N2	GOS+SZP	no	100±1,17	38,82±0,25	49,02±0,33 ^{ab}
		0,05M	100±3,71	39,02±0,14	57,45±0,8 ^{abc}
		0,10M	100±2,08	39,01±0,21	72,92±0,33^c
		0,15M	100±0,85	39,06±0,13	69,43±2,78 ^{ac}
	GOS+KP	no	96,17±4,23	38,53±0,05	48,49±0,26 ^c
		0,05M	100±1,32	38,53±0,05	64,31±0,87 ^{abc}
		0,10M	100±2,41	38,16±0,11	70,94±0,99^{ac}
		0,15M	99,34±3,92	38,01±0,07	57,46±0 ^{dabc}
<i>L. paracasei</i> PB9	GOS+SZP	-	100±0,68	38,91±0,19	47,71±2,57 ^a
		0,05M	100±3,41	39,41±0,02	59,74±0,68 ^{ab}
		0,10M	100±1,02	39,55±0,13	92,58±4,71 ^{ab}
		0,15M	100±3,34	39,83±1,01	100±0,00^b
	GOS+KP	-	100±0,48	38,72±0,05	45,19±1,09 ^a
		0,05M	95,01±0,87	38,62±0,23	65,16±0,23 ^{ab}
		0,10M	100±1,4	38,47±0,09	93,34±2,18 ^{ab}
		0,15M	98,05±0,49	39,01±0,2	97,34±0,22^b
<i>L. plantarum</i> 2018	GOS+SZP	-	100±2,64	38,94±0,16	50,03±1 ^d
		0,05M	98,53±2,44	39,17±0,41	59,46±0,59 ^a
		0,10M	100±1,29	39,62±0,17	88,57±1,53 ^b
		0,15M	92,86±2,28	40,28±0,27	95,97±1,1^c
	GOS+KP	-	100±3,26	38,69±0,03	50,13±1,26 ^d
		0,05M	97,9±4,93	38,62±0,23	67,43±0,77 ^e
		0,10M	100±1,65	38,47±0,09	94,63±0,66 ^c
		0,15M	96,99±1,42	39,01±0,2	94,14±1,3^c

A három törzs legmagasabb T_v értékeit (a **20. Táblázatban** vastagon szedve) összehasonlítva elmondható, hogy azok szignifikánsan különböztek ($p < 0.001$), a legjobb eredmény pedig az *L. paracasei* PB9 törzsszel volt elérhető. Az ezzel a törzsszel elért eredmények összehasonlíthatók a *Kluyveromyces* fajokkal elért publikációk

eredményeivel (LI *ET AL.*, 2008; SUN *ET AL.*, 2016; TOKOŠOVÁ *ET AL.*, 2016; SANTIBÁÑEZ *ET AL.*, 2017; PÁZMÁNDI *ET AL.*, 2020).

5.4.2.4. Szerves sav termelés

Mivel a doktori munkában bemutatott eljárás célja értéknövelt, fermentált italok előállítására, vizsgáltam a szerves savak termelését is (**21. Táblázat**).

21. Táblázat. *Szelektált tejsavbaktérium törzsek szerves sav termelése 72 óra fermentációt követően.. A fermentációk hígított, 2,5 g/L szója (SZP) vagy 2,5 g/L kazein peptonnal (KP) kiegészített GOS szirupban zajlottak, puffereles nélkül vagy pH=7 értéken, KH₂PO₄-K₂HPO₄ rendszerrel végzett puffereles mellett.*

Törzs	Közeg	Puffer	Szerves sav, g/L					
			L-Tejsav	D-tejsav	Citrom-sav	Borkő-sav	Propion-sav	
<i>L. acidophilus</i> N2	GOS+SZP	-	2,48±0,05	0,03±0,05	nd	nd	0,16±0,03	
		0,05M	3,60±0,13	0,03±0,05	0,33±0,13	0,34±0,03	0,18±0	
		0,10M	4,66±0,10	0,34±0,09	1,5±0,17	0,77±0,01	0,2±0,02	
		0,15M	4,40±0,49	0,51±0,08	1,34±1,44	0,79±0,05	0,18±0,03	
	GOS+KP	-	2,24±0,03	0,12±0,01	nd	nd	0,14±0	
		0,05M	4,42±0,12	0,13±0,04	0,37±0,13	0,19±0,01	0,17±0,02	
		0,10M	4,71±0,16	0,27±0,08	1,88±0,18	0,4±0,07	0,03±0,05	
		0,15M	3,44±0,17	0,18±0,17	2,46±0,05	0,5±0,01	0,14±0	
	<i>L. paracasei</i> PB9	GOS+SZP	-	1,98±0,43	0,10±0,04	nd	nd	nd
			0,05M	3,88±0,06	0,22±0,02	0,37±0,05	0,22±0,02	nd
			0,10M	5,77±0,13	0,42±0,11	2,52±0,35	0,54±0,11	0,1±0
			0,15M	5,58±0,16	0,58±0,14	1,5±0,14	0,69±0	nd
GOS+KP		-	1,77±0,23	Nd	nd	nd	0,11±0	
		0,05M	4,51±0,12	0,15±0,04	nd	0,21±0,05	0,13±0	
		0,10M	6,17±0,37	0,17±0,07	1,56±0,88	0,43±0,05	0,14±0,02	
		0,15M	6,47±0,16	0,31±0,17	2,08±0,01	0,52±0,03	0,22±0	
<i>L. plantarum</i> 2108		GOS+SZP	-	2,55±0,15	0,03±0,05	nd	nd	0,17±0
			0,05M	3,76±0,08	0,19±0,05	0,08±0,13	0,21±0,02	0,18±0,01
			0,10M	5,55±0,14	0,39±0,22	2,66±0,21	0,51±0,04	0,19±0
			0,15M	5,50±0,18	0,55±0,12	1,74±0,15	0,95±0,08	0,19±0
	GOS+KP	-	2,57±0,09	0,03±0,05	nd	nd	0,18±0,02	
		0,05M	4,49±0,23	0,29±0,19	nd	0,2±0,01	0,16±0,01	
		0,10M	6,46±0,18	0,25±0,02	1,63±0,42	0,27±0,14	0,21±0,02	
		0,15M	6,18±0,36	0,50±0,28	2,31±0,05	0,47±0,01	0,17±0,01	

nd: nem detektált

A pufferelés nagyban befolyásolta a savtermelés össz-mennyiségét, és a keletkezett savprofilokat is. A nem-pufferelt fermentációs közegekben csak nagyobb mennyiségű tejsav, és kis koncentrációjú propionsav volt mérhető. A pufferkoncentráció növelésével alapvetően megnövekedett a savtermelés, valamint a tej- és propionsav mellett nagyobb mennyiségben a citrom- és borkósav is detektálható volt. Ezen felül kisebb mennyiségben ecet- és almasav ($\geq 0,1$ g/L) is megjelent az *L. acidophilus* N2 és *L. plantarum* 2108 törzsekkel végzett fermentáció során.

Az homofermentatív tejsavbaktériumok alma- és ecetsavtermelése széles körben ismert, mivel ezek tápanyaghiány esetén képesek a kevertsavas erjedés anyagcsere útvonalra váltani (GÄNZLE, 2015).

A tejsavbaktériumok nem rendelkeznek teljes citromsav körrel, ezért citromsav termelésük meglepő lehet. Azonban Morishita és Yayima (1995) kimutatták a citrát szintáz enzim működését *L. plantarum*, *L. casei*, *L. helveticus* és *L. acidophilus* törzsekben. Továbbá több kutatócsoport publikálta citromsav termelését *L. plantarum* és *L. conyformis* (NURYANA ET AL., 2019), *L. acidophilus* (COSTA ET AL., 2016) és *L. plantarum*, *L. paracasei* és *L. rhamnosus* (ZALÁN ET AL., 2010) esetén.

Ugyan a tejsavbaktériumok citromsav termelésének metabolikus útvonala nem ismert, a megfigyelések alapján képesek ezen szerves sav előállítására. A termelt citromsav mennyisége jelentősen magasabb volt 0,1-0,15 M puffer koncentráció esetében, mennyisége elérte a tejsav 30 %-át. A citromsav termelés a fermentáció későbbi szakaszában (48-72 óra) vált intenzívebbé, mely egybeesett a tejsav mennyiségének csökkenésével, és a hasznosítható tápanyagforrások kimerülésével. A fenti megfigyeléseket figyelembe véve, a citrát szintézis egy lehetséges útvonala a tejsav konverziója lehet. A tejsav egyéb szerves savakká (ecetsav, borostyánkősav, hangyasav, vajsav) történő konverzióját több kutatócsoport, számos tejsavbaktérium törzs esetén megfigyelte (LINDGREN ET AL., 1990; ELFERINK ET AL., 2001; LIU, 2003; ASUNIS ET AL., 2019), azonban a citromsav keletkezését csak ritkán követik nyomon tejsavas fermentációk esetében.

Összefoglalva, a hígított GOS szirup fermentációja során szerves savak széles spektruma keletkezett. Legnagyobb mennyiségben a tej- és citromsav volt mérhető minden törzs esetén. Mivel a citromsav „gyengébb” sav a tejsavval összehasonlítva, jelenléte

organoleptikus szempontból kedvező, így a két sav kombinációja kedvező lehet fermentált italt előállítására esetén.

Méréseim során meghatároztam a tejsav két sztereo-izomerjének (D- és L+) mennyiségét is. Minden esetben főként L-izomer keletkezett (2,1-6,7 g/L), a D-laktát csak kis koncentrációban (0,0-0,7 g/L) volt mérhető. Az eredmények alapján az is látható, hogy a D-tejsav aránya némileg növekedett magasabb, 0,1-0,15 M pufferkoncentráció esetén. Más szerzők megfigyelései bizonyították, hogy számos környezeti faktor, mint a hőmérséklet és a fermentációs közeg összetétele (CHRAMOSTOVÁ ET AL., 2014), valamint a pufferelő komponensek, pl. nátrium-acetát (DE VRESE ÉS BARTH, 1991) befolyásolták egyes *L. acidophilus* és *L. sakei* törzsek L és D-tejsav termelésének arányát. Ezek a megfigyelések megegyeznek más kutatócsoportok eredményeivel, ahol *L. acidophilus*, *L. casei* és *L. plantarum* törzsek is hasonló arányban termelték a tejsav L és D izomereit (MIRDAMADI ET AL., 2002; HORÁČKOVÁ ET AL., 2014). Neal-Mckinney és munkatársai (2012) által vizsgált *L. acidophilus* törzs azonban a tejsav két sztereo-izomerjét azonos mennyiségben állította elő MRS táplevesben, mikroaerob körülmények között.

5.4.2.5. A szelektív fermentáció végterméke, mint funkcionális ital alapja

Klinikai kísérletek alapján a GOS pozitív élettani hatása napi 2,5-10 g fogyasztásával érhető el. Azonban a magasabb koncentrációk kerülése célszerű, mivel nagyobb mennyiségű GOS elfogyasztása ozmotikus hasmenést okozhat. Ezeket a szempontokat figyelembe véve a kereskedelemben kapható prebiotikus termékek általában 1,5-5 gramm GOS-t tartalmaznak (SVENSSON ÉS HÅKANSSON, 2014; EUROPEAN COMMISSION, 2017). A munkám során előállított, szelektíven fermentált GOS termékek GOS tartalma megközelítőleg 5 g/L. Ennek megfelelően kb. 500 mL fogyasztása szükséges a GOS egészségjavító hatásának érvényesüléséhez.

Az elfogyasztott GOS mennyiség mellett a termék KH_2PO_4 és K_2HPO_4 tartalmát is figyelembe kell venni. Mindkét komponens engedélyezett élelmiszeradalék az Európai Unió és az Amerikai Egyesült Államok területén. Az élelmiszerekben történő felhasználásuk terén az EFSA 40 mg foszfát/testtömeg kg-ban definiálja a napi elfogadható fogyasztási mennyiséget (ADI) (EFSA PANEL ON FOOD ADDITIVES AND FLAVOURINGS (FAF), 2019), míg a WHO 70 mg foszfor/testtömeg kg-ot fogad el maximum tolerálható napi fogyasztásként (MTDI) (FAO/WHO, 1982). Amennyiben a

0,10 és 0,15 M pufferkoncentrációjú végtermékből 470 mL kerül fogyasztásra, az rendre az EFSA alapján meghatározott ADI érték 52 és 78%-át, illetve FAO/WHO által megengedett MTDI mennyiség 30 és 45%-át teszi ki. Ugyan a fermentált termékkel bevitt foszfát mennyiség egyik esetben sem haladja meg az ajánlások mértékét, de az egyéb élelmiszerekkel bevitt foszfátot figyelembe véve előnyösebb az alacsonyabb (0,1 M) pufferkoncentráció alkalmazása. Ugyanakkor feltételezhetően a végtermék foszfát tartalma kisebb, mint a kezdeti koncentráció, mivel egy részét a tejsavbaktériumok felhasználják anyagcseréjük során.

A fermentált termékkel bevitt D-tejsav mennyiség megbecsülése is szükséges. A D-tejsav élelmiszerekben alkalmazható mennyiége csak a csecsemő tápszerekben korlátozott (max. 2000 mg/mk, (CODEX ALIMENTARIUS, 2019). ADI vagy MTDI értékkel nem rendelkezik, mivel természetes összetevője számos fermentált élelmiszernek, és fogyasztása nem okoz problémát az egészséges emberek számára. A kifejlesztett, tejsavasán fermentált termék 500 mL-ének elfogyasztásakor kazein peptonnal történő kiegészítés esetén 0,1-0,2 g, szója peptonos dúsítással 0,2-0,3 g D-laktát kerülne be a szervezetbe. Ilyen mennyiség elfogyasztása nem emeli meg jelentősen a vészsérum D-laktát koncentrációját, azaz biztonságosan fogyasztható olyan személyek esetén is, akikre nézve a D-tejsav acidózis magas kockázatú (DE VRESE ÉS BARTH, 1991; SEHEULT ET AL., 2017).

5.5. Mono- és diszacharidok szelektív eltávolítása *Kluyveromyces* törzsek alkalmazásával nagy tisztaságú GOS előállítása céljából

Az előző pontokban bemutatott munka célja a tejsavbaktériumok GOS keverékek szelektív fermentációjára való alkalmazása, illetve az ehhez szükséges mikrobiológiai alapok kidolgozása volt. Az eredmények alapján látható, hogy egyes szelektált tejsavbaktérium törzsekkel, megfelelő körülmények között lehetséges mono- és diszacharidok eltávolítása nyers GOS szirupból. A kifejlesztett eljárással előállított termék ideális alapja prebiotikus hatású, fermentált italok formulálásához.

Azonban a bemutatott eljárás a tejsavbaktérium törzsek fiziológiai és metabolikus sajátosságai miatt nem alkalmas magas koncentrációjú, nagy tisztaságú tisztított GOS készítmények előállításához. Egyrészt a törzsek alacsony ozmotikus toleranciája, és kis határfokú szénhidrát fermentációja miatt a nyers GOS közeget rendkívül nagy mértékben szükséges hígítani, illetve a keletkezett szerves savak eltávolítása is szükséges lenne.

Az iparban, a mono- és diszacharidok (laktóz) szelektív fermentációja a szakirodalmi adatok alapján magas ozmotikus toleranciájú, robosztus élesztőkkel, ezen belül is *Kluyveromyces* törzsek felhasználásával elérhető. A szakirodalom alapján legjobb eredményeket *Kluyveromyces lactis* és *Kluyveromyces marxianus* törzsekkel érték el (LI ET AL., 2008; GUERRERO ET AL., 2014; SUN ET AL., 2016; TOKOŠOVÁ ET AL., 2016; SANTIBÁÑEZ ET AL., 2017). Ezen fermentációk közös jellemzője a folyamat során alkalmazott rendkívül magas kezdeti sejt koncentráció ($0,15-0,7 \text{ g}_{\text{sejt szá.}}/\text{g}_{\text{Szénhidrát}}$), illetve az élesztősejtek által termelt nagy mennyiségű etanol felhalmozódása a fermentációs termékben. A magas kiinduló sejt koncentráció eléréséhez szükséges sejttömeg előállítása rendkívül költséges, valamint a keletkezett etanol eltávolítása is tovább növeli a műveleti költségeket.

A doktori munkám során ezért céлом volt ennek a két tényezőnek (magas kezdeti sejt koncentráció és nagy mennyiségben keletkezett etanol) a kiküszöbölése nagy tisztaságú GOS termékek előállítása során.

A kísérleteim során három *Kluyveromyces* törzs, a *K. lactis* DMB K1-RK, *K. marxianus* DMB Km-RK, és egy, kevésbé ismert faj, a *K. nonfermentans* NCAIM Y.01443 törzsének szelektív mono- és diszacharid fermentációs képességét vizsgáltam (7. Táblázat). A doktori munkámban alkalmazott törzsek kiválasztása egy szakirodalmi screenelés, illetve szénhidrát-felhasználással kapcsolatos laboratóriumi kísérlet-sorozat alapján történt (PÁZMÁNDI ET AL., 2020). A *K. nonfermentans* faj fontos jellemzője, hogy a *K. lactis* és *K. marxianus* fajokkal szemben nem képes a glükóz és laktóz erjesztésére, ezért a vele végzett fermentáció során nem keletkezik etanol.

5.5.1. *Kluyveromyces* törzsek szaporodása minimál sókkal és élesztőkivonattal kiegészített GOS szirup fermentációja során

A kísérleteim során a 4.2.5. szakaszban leírtak alapján, 100 g/L-re hígított Vivinal GOS szirupot minimál sók keverékével (MM), vagy élesztőkivonattal (YE) egészítettem ki, valamint alacsony kezdő sejt koncentrációt ($5 \cdot 10^6$ sejt/mL) alkalmaztam. A fermentáció során 24 óránként vettem mintákat, amelyekben meghatároztam az élesztőtörzsek szaporodását, valamint a közeg pH értékét és szénhidrát-összetételét.

A kísérletek során megfigyelt szaporodás értékek a 22. Táblázatban kerültek összefoglalásra. Az eredmények szerint mindhárom *Kluyveromyces* törzs képes volt

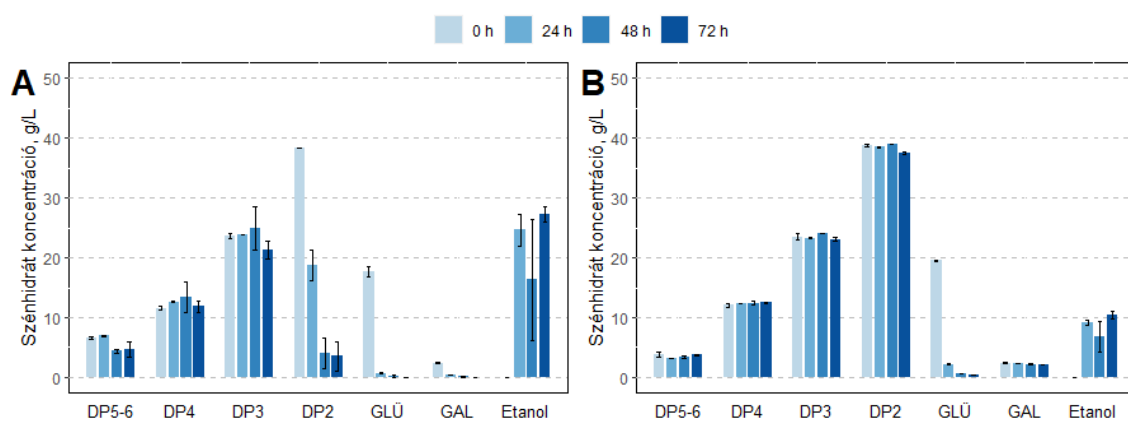
szaporodni a minimál sókkal (GOS+MM), és az élesztőkivonattal kiegészített (GOS+YE) fermentációs közegben is, azonban a GOS+YE esetén a törzsek kissé magasabb sejtkoncentrációkat értek el. A *K. lactis* DMB KI-RK és *K. marxianus* DMB Km-RK törzsek sejtkoncentrációi hasonlóak voltak mindkét közegben, a *K. nonfermentans* NCAIM Y.1443 hozzájuk képest csak kisebb mértékben szaporodott.

22. Táblázat: *Kluyveromyces* törzsek sejtkoncentrációja 100 g/L-es, minimál sók keverékével (MM) és élesztőkivonattal (YE) kiegészített GOS szirup 72 órás fermentációja során

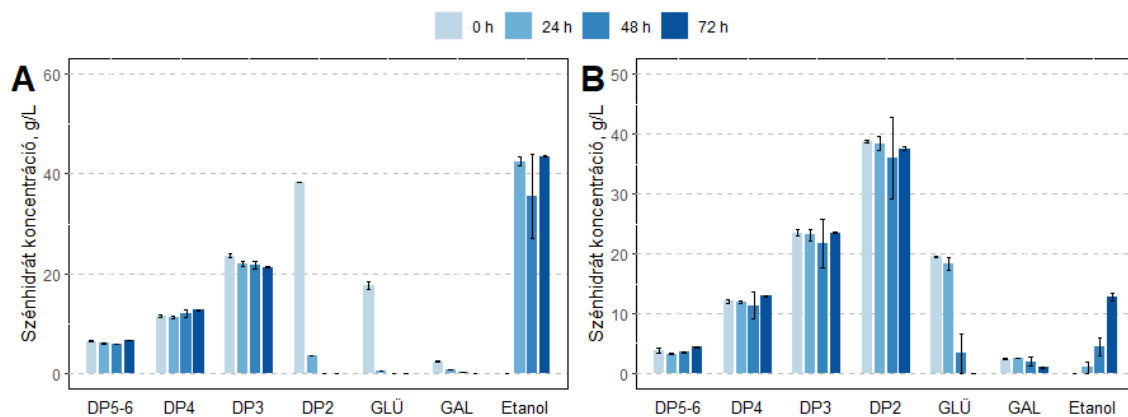
Élesztő törzs	Sejtkoncentráció, sejt/mL*10 ⁸					
	100 g/L GOS+MM			100 g/L GOS+YE		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
<i>K. lactis</i> DMB KI-RK	2,01±0,1	2,13±0,03	2,17±0,1	2,82±0,2	3,11±0,1	3,03±0,2
<i>K. marxianus</i> DMB Km-RK	1,34±0,2	2,07±0,03	2,47±0,5	2,47±0,1	3,18±0,2	3,36±0,2
<i>K. nonfermentans</i> NCAIM Y.01443	0,72±0,0	1,56±0,00	1,50±0,0	1,29±0,0	1,51±0,0	1,66±0,1

5.5.2. *Kluyveromyces* törzsek szénhidrát felhasználása minimál sókkal és élesztőkivonattal kiegészített GOS szirup fermentációja során

A GOS szirup fermentációja során megfigyelt szénhidrát felhasználást a **36-38. Ábra** mutatja.



36. Ábra: Szénhidrát koncentrációk alakulása 100 g/L-es GOS szirup *Kluyveromyces lactis* DMB KI-RK törzsszel végzett fermentációja során **A/** élesztőkivonattal és **B/** minimál sókkal való kiegészítés mellett.



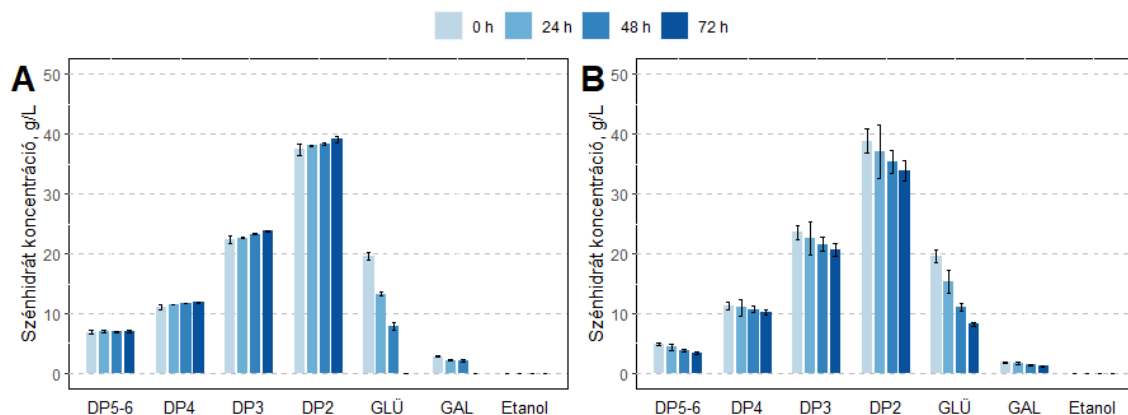
37. Ábra: Szénhidrát koncentrációk alakulása 100 g/L-es GOS szirup *Kluyveromyces marxianus* DMB Km-RK törzssel végzett fermentációja során **A/** élesztőkivonat és **B/** minimál sókkal való kiegészítés mellett.

A *K. lactis* DMB KI-RK és *K. marxianus* DMB Km-RK törzsek a higított GOS közeg kiegészítésétől függetlenül gyorsan, és teljes mértékben felhasználták annak glükóztartalmát, de a *K. marxianus* DMB Km-RK törzs némileg intenzívebb glükóz fermentációt végzett (**36. és 37. Ábra**).

A két törzs a GOS+YE közeg teljes galaktóz mennyiségét eltávolította, míg a galaktózhasonosítás a GOS+MM közegben csak részleges volt.

A DP2 frakció csökkenése a GOS+MM közegben elhanyagolható volt, azonban a GOS+YE fermentációja során a *K. lactis* DMB KI-RK a frakció nagy részét, a *K. marxianus* DMB Km-RK pedig annak egészét felhasználta. Mivel a DP2 frakció a gyártói specifikáció alapján laktóz és nem-laktóz komponensek 1:1 arányú keverékéből áll, elmondható, hogy a két törzs képes a laktózon kívüli egyéb diszacharid GOS komponens felhasználására is.

A *K. lactis* DMB KI-RK és *K. marxianus* DMB Km-RK törzsek etanolt (10-40 g/L) is termeltek, mely felhalmozódott a fermentációs közegben, ennek eltávolítása a továbbiakban szükséges nagytisztaságú GOS termékek előállításához.



38. Ábra: Szénhidrát koncentrációk alakulása 100 g/L-es GOS szirup *Kluyveromyces nonfermentans* NCAIM Y.01443 törzssel végzett fermentációja során A/ élesztőkivonat és B/ minimál sókkal való kiegészítés mellett.

A *K. nonfermentans* NCAIM Y.01443 törzs szénhidrát felhasználása kevésbé volt intenzív a *K. lactis* és *K. marxianus* törzsekkel összehasonlítva (**38. Ábra**). A GOS+YE közegben a glükóz és galaktóz teljes eltávolítása 72 óra alatt zajlott le. Ez idő alatt az egyéb szénhidrát frakciók (DP2 és DP3-6) koncentrációja nem változott. A GOS+MM fermentációs közegben a szénhidrát felhasználás mértéke még alacsonyabb volt. Ebben az esetben kizárólag a glükóz fele került hasznosításra, az egyéb szénhidrát frakciók mennyiége változatlan maradt.

Mivel a *K. nonfermentans* NCAIM Y.01443 nem termelt etanolt, a GOS+YE közeg fermentációja egy glükóz, galaktóz és etanol mentes, az eredetivel megegyező GOS és laktóz tartalmú terméket eredményezett. Az etanol hiánya a fermentációs végtermékben rendkívül előnyös, mert így idő- és energiaigényes tisztítási lépések kerülhetnek ki. Ugyan a vizsgált törzs metabolikus aktivitása alacsony volt, így a tisztítási folyamat hosszú időt (72 órát) vett igénybe, de a szelektív fermentációban demonstrált képessége a fajt rendkívül ígéretessé tette. A továbbiakban, széleskörű törzsszelekcióval felderíthetők egyéb, a laktózt intenzívebben metabolizáló *K. nonfermentans* törzsek is, esetleg törzsjavítással is fokozható a cukor metabolizáló képesség. A **23. Táblázatban** került összefoglalásra a vizsgált törzsek szelektív fermentációs teljesítménye, kihozatal (Y) és végső tisztaság (T_v) szempontjából.

23. Táblázat: *Kluyveromyces* törzsek szelektív fermentációs teljesítményének elemzése kihozatal (Y) és végső tisztaság (T_v) szempontjából. A fermentációk hígított, élesztő kivonattal (YE) vagy minimál sókkal (MM) kiegészített közegben zajlottak.

Fermentációs közeg	Törzs	Kihozatal (Y %)	Kezdeti tisztaság (T _k %)	Végso tisztaság (T _v %)
10 % GOS+MM	<i>K. lactis</i> RK	100,0±0,42	39,3±0,29	49,57±0,21
	<i>K. marxianus</i> RK	100,0±1,00	39,3±0,29	51,44±0,51
	<i>K. nonfermentans</i> Y.01443	86,37±0,41	39,6±0,00	44,16±0,21
10 % GOS+YE	<i>K. lactis</i> RK	90,94±0,86	41,6±0,88	91,49±0,87
	<i>K. marxianus</i> RK	97,43±2,51	41,6±0,88	100,0±2,58
	<i>K. nonfermentans</i> Y.01443	100,0±3,24	39,7±0,11	52,18±1,46

Összességében elmondható, hogy a GOS+YE közeg előnyösebb volt a mono- és diszacharidok fermentációja során mindhárom vizsgált *Kluyveromyces* törzs esetén.

Az adatok alapján látható, hogy GOS+MM közegben a *K. lactis* KI-RK és *K. marxianus* Km-RK törzsek nem csökkentették a DP3-6 mennyiséget, a GOS kihozatal 100 %-os volt, azonban a végso tisztaság értékei viszonylag alacsonyok (50%) voltak.

Ez a két törzs jobb eredményeket adott a GOS+YE közegben, ahol ugyan a GOS kihozatala némileg csökkent, az elért végso tisztaság nagy mértékben megemelkedett, és a *K. marxianus* Km-RK esetén elérte a 100%-os értéket. Ezek az értékek elérik vagy meghaladják a korábban legsikeresebb munkákban publikált, *K. lactis* (LI ET AL., 2008; SUN ET AL., 2016; SANTIBÁÑEZ ET AL., 2017) és *K. marxianus* (CHENG ET AL., 2006; GUERRERO ET AL., 2014; TOKOŠOVÁ ET AL., 2016) törzsekkel elért eredményeket. Santibáñez és munkatársai (2017), Sun és csoportja (2016) valamint Li és munkatársai (2008) eljárásával szemben az itt bemutatott eljárás előnye, hogy az általuk használt kezdeti sejt koncentrációkhoz képest (rendre 0,375; 0,08 és 2,5 g_{sejt}/g_{szénhidrát}), az itt alkalmazott. 5*10⁶ sejt/mL (kb. 0,0005–0,0007 g_{sejt}/g_{szénhidrát}) minimum két nagyságrenddel kisebb. Az alacsony sejt koncentrációk alkalmazása csökkenti az eljárás költségét, így növeli a szelektív fermentáció versenyképességét a tradicionálisan alkalmazott, kromatográfias eljárásokkal szemben (SCOTT ET AL., 2016).

7. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

11) A savó GOS szintézis céljából történő feldolgoása elérhető a kidolgozott UF/NF eljárással, mellyel jelentős laktóz-veszteségek nélkül, 200 g/L laktóz koncentrációjú, koncentrált savó permeátum állítható elő. Az így előállított savó permeátum pH állítás nélkül felhasználható Biolacta N5 β -galaktozidázzal végzett GOS szintézishez.

2) A vizsgált tejsavbaktérium törzsek szaporodásának és szénhidrát felhasználásának elősegítéséhez szükséges a savó permeátum szerves nitrogénnel való kiegészítése szója vagy kazein pepton formájában. Nagy molekulaméretű savófehérje adagolása nem javasolt, mivel a *Lactococcus* törzsek ezt nem képesek hasznosítani, a *Lactobacillus* törzsek pedig a savófehérje aminosavait kizárólagos tápanyag- és energiaforrásként hasznosítják, a laktóz helyett.

3) Nyers GOS szirup mono- és diszacharid tartalmának szelektív eltávolítása lehetséges az *L. paracasei* PB9 és *L. plantarum* 2108 törzsekkel, 15 g/L-es kezdő szénhidrátkoncentráció, 2,5 g/L szója vagy kazein pepton, és 0,1-15 M, pH=7-en foszfát pufferrel történő puffereelés mellett. A leírt körülmények között mono- és diszacharid mentes, kedvező savprofilú, pH \leq 5, biztonságosnak tekinthető, főként tej- és citromsavat tartalmazó termék jön létre.

4) Az *L. paracasei* PB9 és *L. plantarum* 2108 által végzett szelektív fermentáció eredménye felhasználható funkcionális (tejsavasan fermentált prebiotikus) italok alapjaként. Az így előállított termék a prebiotikus GOS frakciókon kívül tartalmazza a törzsek által termelt, pozitív élettani és organoleptikus hatású L-tejsavat- és citromsavat. A GOS terápiás dózist tekintve az előállított termék ajánlott fogyasztási mennyisége 500 mL körüli. A közeg foszfát-koncentrációját, és a foszfát-bevitel engedélyezett mennyiségét figyelembe véve célszerű a 0,1 M pufferkoncentráció alkalmazása, esetleg más, engedélyezett pufferkomponens kipróbálása. Funkcionális ital kifejlesztéséhez további vizsgálatok szükségesek (pl. érzékszervi analízis), valamint a fermentált ital-alapnak különböző ízesítő anyagokkal (gyümölcs aromák, vagy koncentrátumok), és édesítőszerekkel történő kiegészítése is javasolt.

6) Amennyiben a GOS szelektív fermentációjának célja nagy-tisztaságú, metabolitmentes GOS termékek előállítása, erre a vizsgált élesztőtörzsek közül a *Kluyveromyces marxianus* DMB Km-RK a legalkalmasabb. Nyers GOS szirup 100 g/L-re történő hígítása, és 5 g/L élesztőkivonat hozzáadása mellett mono- és diszacharid mentes GOS termék érhető el. A fermentációs lépést követően a közeg etanol tartalmának eltávolítása, valamint a GOS bekonzentrálása szükséges.

6) Glükóz, galaktóz és etanol mentes GOS termék állítható elő a *Kluyveromyces nonfermentans* NCAIM Y.01443 törzs alkalmazásával, 100 g/L-es, 5 g/L élesztőkivonattal kiegészített GOS szirup fermentációja során. Az így előállított termék bekonzentrálás után fontos szerepet játszhat laktóz tartalmú prebiotikus termékek összevetőjeként, különös tekintettel a csecsemő-tápszerekre.

6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1) A koncentrált savó-permeátum-alapú GOS szintézissel kapcsolatos munkám eredményeként a következő megállapításokat teszem: (i) az UF permeátum nanoszűrési besűrítése során 200 g/L laktózkoncentráció elérése szükséges a nem-kívánatos hidrolízis visszaszorítása érdekében; (ii) a koncentrált savó permeátum-alapú GOS szintézis kihozatala eléri az irodalomban közölt, puffertelt, nagy tisztaságú laktózzal kapott kihozatalok szintjét; (iii) a membrános műveletsorral kapott szubsztrátum natív pH-ja (7,5) előnyös az enzimes katalízis GOS kihozatalának szempontjából.

2) A vizsgált tejsavbaktérium törzsek szerves nitrogénforrás kiegészítést igényelnek savó permeátum fermentációjához. Az alkalmazott szerves fehérjeforrások közül a savófehérje nem volt megfelelő, míg a kis molekulatömegű peptideket tartalmazó peptonok (szója és kazein) a szaporodást és a laktóz felhasználást lényegesen fokozták. A *Lactobacillus* törzsek savófehérje és laktóz tartalmú táptalajon kizárólagosan a savófehérje aminosav tartalmát használták fel szén- és nitrogénforrásként. Ez a jelenség peptonok adagolása mellett nem volt megfigyelhető. Eredményeim alapján a savófehérjék által kiváltott proteolitikus rendszer indukálása olyan módon befolyásolja a vizsgált *Lactobacillus* törzsek anyagcsere útvonalait, hogy azok az aminosavak oldalláncait részesítik előnyben szénforrásként a laktózzal szemben.

3) A vizsgált *L. acidophilus* N2, *L. paracasei* PB9 és *L. plantarum* 2108 tejsavbaktérium törzsek β -galaktozidáz enzimeik specifikusak a nyers GOS DP2 diszacharidjainak lebontására, mivel a fermentlébe jutott aktív β -galaktozidáz nem csökkentette a DP3-6 komponensek mennyiségét.

4) Az *L. paracasei* PB9 és *L. plantarum* 2108 törzsek alkalmasak 15 g/L teljes szénhidrát koncentrációra hígított GOS szirupból a mono- és diszacharidok szelektív fermentációjára, 2,5 g/L szója vagy kazein peptonnal való kiegészítése mellett. A megfelelő szénhidrát felhasználás eléréséhez a kezdeti pH 7-es értékre való beállítása szükséges, 0,1-0,15 M foszfát puffer alkalmazásával.

5) A puffereles lényegesen befolyásolja az *L. acidophilus* N2, *L. paracasei* PB9 és *L. plantarum* 2108 által termelt szerves savak mennyiségét és spektrumát. Míg puffereles nélkül csak tejsav keletkezik kimutatható mennyiségben, puffereles hatására a tejsavon kívül nagyobb mennyiségben citromsav, kisebb mennyiségben pedig borkősav és propionsav is keletkezik jelenleg nem feltérképezett anyagcsere útvonalakon keresztül.

6) A vizsgált *Kluyveromyces marxianus* DMB Km-RK törzs alkalmas mono- és diszacharid mentes GOS termékek előállítására, 100 g/L-es GOS szirupban, élesztőkivonattal történő kiegészítés mellett. Az eljárás a nyers GOS szirup mérsékelt hígítása, és az alkalmazott alacsony kezdeti sejtkoncentrációk miatt alkalmas lehet mono- és diszacharid mentes tisztaságú GOS előállítására ipari körülmények között is.

7) A *Kluyveromyces nonfermentans* NCAIM Y.01443 törzs képes a 100 g/L-re hígított, élesztő kivonattal kiegészített GOS szirup glükóz és galaktóz tartalmát eltávolítani etanol termelése nélkül.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A sajtgyártás melléktermékeként keletkező tejsavó értéknövelő feldolgozása az 1970-es évektől kiemelt tudományos és ipari figyelem tárgyává vált. A napjainkban leggyakrabban alkalmazott eljárások a savó frakcionálásán alapulnak, mely során a savó fő komponenseit (a laktózt és savófehérjéket) szeparálják és külön hasznosítják. A savófehérjék magas tápértéke, techno-funkcionális jellemzői és pozitív élettani hatása miatt általában magas haszonnal, étrendkiegészítőként kerülnek forgalomba. A laktóz hasznosításának lehetőségei ezzel szemben erősen korlátozottak.

Az utóbbi években a savó eredetű laktóz, mint prebiotikus hatású galakto-oligoszacharidok (GOS) prekuzora kiemelt figyelemhez jutott. A GOS enzimes szintézisét a β -galaktozidáz katalizálja, laktóz szubsztrátból, annak magas koncentrációja mellett. Ezért az ilyen célú felhasználás esetében a savó laktóztartalmának besűritése szükséges. Az enzimes szintézis végterméke egy prebiotikus GOS frakciókat, nem-reagált laktózt, illetve melléktermékként glükózt és galaktózt tartalmazó keverék. A laktóz és a monoszacharidok a GOS készítmények nemkívánatos komponensei, eltávolításuk általában SMB (simulated moving bed/szimulált mozgóágyas) kromatográfiával történik. A költséges SMB kromatográfia alternatívája lehet a mono- és diszacharidok eltávolítása mikroorganizmusok szelektív fermentációja által.

A tejsavó hasznosításának további, tradicionális módja annak tejsavas erjesztése, mellyel értéknövelt fermentált italok állíthatók elő. A fermentált termékek fogyasztása évezredek óta az emberi táplálkozás része, mivel kedvező érzékszervi jellemzőik mellett fogyasztásuk pozitívan hat az emberi egészségre.

A doktori munkám célja egy integrált, értéknövelő tejsavó-kezelési eljárás kidolgozása volt, mely első fázisa a savó membránszeparációja, majd az így a keletkezett savó permeátummal végzett GOS szintézis volt. Ezt követően célul tűztem ki a savó permeátum tejsavas fermentációjához szükséges mikrobiológiai alapok kidolgozását. Ennek eredményei alapján céltom volt a két eljárás kombinációja a nyers GOS mono- és diszacharid tartalmának szelektív fermentációjával, prebiotikus ital-alap kifejlesztése céljából. Végül céltom volt a nagy-tisztaságú GOS termékek élesztők általi szelektív fermentációja során legjelentősebb költség-növelő faktorok (nagy kezdő sejtkoncentráció és nagy mennyiségben termelt etanol) alternatíváinak vizsgálata *Kluyveromyces* törzsekkel végzett kísérletek során.

A kutatási tervem megvalósítása során a sómentes savó UF/NF (ultraszűrés/nanoszűrés) frakcionálásával GOS-szintézisre alkalmas szubsztrátot állítottam elő. Míg az UF során gyűjtött permeátum frakciókban a laktóz hidrolízise dominált, addig az NF-el előállított, 200 g/L-es laktóz koncentrációjú savó permeátum sűrítvényben a reakció az alkalmazott Biolacta N5 β -galaktozidáz enzim transzgalaktolitikus aktivitásának irányába tolódott el. Az így végzett GOS szintézis során az oligoszacharid frakciók kihozatala (34 w/w%) az Biolacta N5-re jellemző maximum értékhez (36 w/w %) közeli volt, és a GOS frakciók bomlása is csak lassan következett be. A 200 g/L-nél magasabb laktózkoncentráció elérése NF-fel csak nagyobb laktóz veszteségek árán volt kivitelezhető. Ebben az esetben az NF helyett kompaktabb, fordított ozmózis (RO) membránok használata javasolt. Az eredményeim alapján az is elmondható, hogy a koncentrált savó permeátum natív pH-ja (pH=7,5) megfelelő GOS szintézis szempontjából. Ezért nem szükséges a közeg pH-jának a Biolacta N5 optimumára (pH=6) való állítása, így a bemutatott eljárás leegyszerűsíti a GOS szintézis kivitelezését.

A savó permeátum tejsavas fermentációjához szükséges mikrobiológiai alapok kidolgozása során kimutattam, hogy a vizsgált tejsavbaktérium törzsek szaporodásának és szénhidrát-felhasználásának elősegítéséhez a közeget szerves nitrogénforrással szükséges kiegészíteni. A *Lactococcus* törzsek alacsony proteolitikus aktivitásuk következtében nem voltak képesek a nagy molekulatömegű savófehérjék hasznosítására. A *Lactobacillus* törzsek szaporodtak ugyan savófehérje jelenlétében, de a savó permeátum laktóztartalmát nem csökkentették. Ebből levonható az a következtetés, hogy a vizsgált törzsek a savófehérje aminosav tartalmát használták kizárólagos és tápanyag forrásként, mind szén, mind pedig nitrogén szükségleteik fedezése céljából. Ez a jelenség a kisebb molekulaméretű peptonok esetében nem volt megfigyelhető. A savó permeátum szója és kazein peptonnal történő kiegészítése mellett a törzsek szaporodása, aminosav és laktóz felhasználása egyaránt intenzív volt. A fermentációnál megfigyelt különbségek feltehetően a savófehérjék bontásához szükséges proteáz enzim aktivitásával köthetők össze.

A mikrobiológia alapok kidolgozását követően a tejsavbaktériumok szelektív mono- és diszacharid fermentációs képességét vizsgáltam 15 g/L össz-szénhidrát-tartalmú, szója és kazein peptonnal kiegészített nyers GOS szirupban. A vizsgált törzsek közül a *Lactobacillus acidophilus* N2, *Lactobacillus paracasei* PB9 és *Lactobacillus plantarum*

2108 ígéretes eredményeket mutattak a glükóz szelektív eltávolításában, de mono- és diszacharid-mentes GOS egyik esetben sem keletkezett. Az eredmények alapján a megfigyelt alacsony szénhidrát felhasználás a fermentációs közeg gyors savasodásával állt összefüggésben. Ezért vizsgáltam a pH kontroll folyamatra gyakorolt hatását. A három szelektált törzssel fermentációs kísérleteket végeztem pH=7-es 0,05-0,15 M koncentrációjú foszfát puffer alkalmazásával.

Az eredmények alapján a pufferelés serkentette a törzsek mono- és diszacharid felhasználását. A pufferelés a szénhidrát-hasznosítás mellett megnövelte a törzsek sejtömeg képzését, a termelt szerves savak mennyiségét, a keletkezett savak diverzitását, valamint a a sejtízissel a fermentáléba kiszabaduló β -galaktozidáz aktivitást. Ugyan a fermentációs közegben jelentős β -galaktozidáz aktivitás volt mérhető, ez nem vezetett a GOS frakciók hidrolíziséhez, ami a törzsek által termelt enzimek DP2 frakcióra vonatkozó specificitását jelezte. Az *L. paracasei* PB9 és *L. plantarum* 2108 törzsek képesek voltak a DP2 frakció nem-laktóz komponenseinek felhasználására is, ami a két törzs probiotikus jellegével hozható összefüggésbe. A *L. paracasei* PB9 és *L. plantarum* 2108 törzsekkel végzett fermentáció nagytisztaságú GOS termékeket eredményezett (100% kihozatal, 94-97% tisztaság). Ehhez szükséges volt a közeg 2,5 g/L szója vagy kazein peptonnal történő kiegészítése, valamint 0,1 mólos pH=7 foszfát puffer alkalmazása. A folyamat eredménye egy pH \leq 5, biztonságosnak tekinthető fermentált termék volt, mely az 5,3 g/L prebiotikus GOS frakció mellett tartalmazta a tejsavbaktérium törzsek által termelt L-tejsavat (6,2-6,5 g/L) és citromsavat (kb. 1,6 g/L) is.

A GOS terápiás hatásának eléréséhez a keletkezett termék kb. 500 mL-ének elfogyasztása szükséges. Ilyen mennyiség elfogyasztása nem haladja meg a foszfát- és D-tejsav bevitelével kapcsolatos nemzetközi ajánlásokat, így az előállított fermentált GOS alkalmazható prebiotikus italok alapjaként. A fermentált ital-alap a továbbiakban kiegészíthető különböző ízesítő anyagokkal (gyümölcs aromák, vagy koncentrátumok), illetve édesítőszerrel.

A *Kluyveromyces* törzsekkel végzett szelektív GOS fermentációs kísérletek alapján a *K. marxianus* DMB Km-RK törzssel végzett, alacsony ($5 \cdot 10^6$ sejt/mL) kezdő sejt koncentrációjú szelektív fermentáció alkalmas volt nagy tisztaságú, mono- és diszacharid-mentes GOS előállítására (97% kihozatal, 100% tisztaság). Ehhez szükséges volt a nyers GOS szirup hígítása 100 g/L össz-szénhidrát koncentrációra és kiegészítése 5

g/L élesztőkivonattal. A fermentáció során a *K. marxianus* Km-RK jelentős mennyiségű etanolt termelt, mely eltávolításához további tisztítási lépések szükségesek. A *K. nonfermentans* Y.01443 törzs ugyan nem volt képes a nyers GOS DP2 frakcióját eltávolítani, azonban 100 g/L össz-szénhidrát koncentráció és 5 g/L élesztőkivonat hozzáadása esetén felhasználta a fermentációs közeg teljes glükóz és galaktóz tartalmát. Mivel a *K. nonfermentans* Y.01443 törzs nem termelt etanolt, így ezen törzs alkalmazásával monoszacharid és etanol-mentes GOS keletkezett, ami csecsemő-tápszerekben való felhasználás esetén rendkívül előnyös.

Összegzésként elmondható, hogy munkám eredményei új ismereteket szolgáltatnak a savó-eredetű GOS szintézis, a fehérjementes tejsavó tejsavas fermentációja, illetve a tejsavbaktériumokkal és *Kluyveromyces* törzsekkel végzett szelektív fermentációs folyamatokkal kapcsolatban. Továbbá eredményeim megfelelő alapot képezhetnek egy értéknövelt, savó- alapú, tejsavasan fermentált prebiotikus ital kifejlesztésének.

9. SUMMARY

The valorization of whey- a by-product of cheese manufacturing - has received increased scientific and industrial interest from the 1970's. The methods used most often today are based on the fractionation of whey, during which the main components of whey (lactose and whey protein) are separated and utilized individually. Due the high nutritional value, techno-functional properties and positive physiological effect of whey proteins, they are most often sold as dietary supplements at high market values. The possibilities of lactose utilization, however, are limited.

In recent years, the use of whey-derived lactose as a precursor for prebiotic galacto-oligosaccharides (GOS) has gained substantial interest. The enzymatic synthesis of GOS is catalyzed by β -galactosidase, from lactose as a substrate at high concentrations. Therefore, the lactose content of whey needs to be concentrated, when used for this purpose. The result of the enzymatic synthesis is a mixture of prebiotic GOS fractions, non-reacted lactose, glucose and galactose as by-products. Lactose and monosaccharides are unwanted components in GOS products, their removal is usually achieved by simulated moving bed (SMB) chromatography. Removal of mono- and disaccharides by selective fermentation of various microorganisms could be an alternative to the costly SMB chromatography.

Another, traditional method of whey valorization is lactic acid fermentation, by which value-added fermented beverages can be produced. The consumption of fermented products has been a part of the human diet for millennia, as beside their favorable organoleptic properties their ingestion is known to have health-promoting effects.

The goal my doctoral work was to develop an integrated process for the valorization of whey, the first phase of which consists of the membrane separation, and the use of the produced whey permeate as a substrate for GOS synthesis. My next goal was the elaboration of the microbiological foundations for the lactic acid fermentation of whey permeate. Based on the results of the previous steps, my goal was to combine the two processes by using selective lactic acid fermentation to remove mono- and disaccharides from the crude GOS mixture, in order to create a prebiotic fermented beverage-base. Finally, I aimed to investigate alternatives to the most relevant cost-increasing factors (use of high initial cell concentrations and ethanol produced in large amounts) of yeast-

mediated selective fermentation processes, by conducting fermentation experiments with *Kluyveromyces* strains.

During the realization of my research-objectives, I produced a substrate suitable for GOS synthesis by the UF/NF (ultrafiltration/nanofiltration) mediated fractionation of demineralized whey. While hydrolysis dominated in whey permeates collected during UF, the reaction in the concentrated 200 g/L lactose whey permeate, collected during NF, shifted toward the trans-galactolytic activity of the applied Biolacta N5 β -galactosidase. During GOS synthesis, the yield of oligosaccharide fractions (34 w/w%) was close to the maximum values characteristic to Biolacta N5 (36 w/w%), and the degradation of GOS fractions only occurred slowly. Lactose concentrations above 200 g/L could only be achieved by NF with considerable lactose loss, therefore the application of tighter-packed reverse osmosis (RO) membranes would be more suitable for this task. Based on my results, it can also be concluded that the native pH of the concentrated whey permeate (pH=7,5) is appropriate for GOS synthesis. Therefore, modification of the pH to fit the optimum values of Biolacta N5 (pH=6) is unnecessary, thus the proposed process simplifies GOS synthesis.

During the elaboration of the microbiological foundations of whey-permeate fermentation it was revealed that the investigated LAB strains required the addition of organic nitrogen to stimulate their growth and carbohydrate utilization. *Lactococcus* strains were unable to utilize large molecular weight whey protein, due to their low proteolytic activities. Although *Lactobacillus* strains were able to grow in the presence of whey protein, they did not decrease lactose levels of the whey permeate. Therefore, it can be concluded that the investigated strains used amino acids in whey protein as a sole nutrient source to satisfy their nitrogen and carbohydrate requirements alike.

This phenomenon could not be observed in the presence of small molecular weight peptones. When adding soy and casein peptones to deproteinized whey, growth, amino acid and lactose utilization alike was pronounced. The observed difference in fermentation characteristics is most likely connected to the induction of the protease enzyme required for the hydrolysis of whey proteins.

Following the elaboration of the microbiological foundations, I investigated the selective fermentation of mono- and disaccharides by the LAB strains, in crude GOS syrup diluted to 15 g/L total carbohydrates and supplemented with soy and casein peptones. Out of the

investigated strains *Lactobacillus acidophilus* N2, *Lactobacillus paracasei* PB9 and *Lactobacillus plantarum* 2108 showed promising results in terms of selective glucose removal, but mono- and disaccharide-free GOS was not achieved in either case. Based on the results, the low levels of carbohydrate utilization were connected to the rapid acidification of the fermentation media. Therefore, I examined the effect of pH control on the process. I carried out fermentation experiments with the three selected strains, by using a pH=7 phosphate buffer in 0.05-0.15 M concentrations.

Results showed, that buffering stimulated mono- and disaccharide consumption of the LAB strains. Along with the saccharide consumption, buffering increased the cell-mass generation, overall acid production, diversity of produced organic acids, and the release of β -galactosidase enzyme into the fermentation broth through cell lysis as well. Although high β -galactosidase activities were measured in the fermentation broth, GOS fractions were not hydrolyzed at all, which indicated the selectivity of the harbored β -galactosidases for the DP2-sized fractions. *L. paracasei* PB9 and *L. plantarum* 2108 were able to remove the non-lactose disaccharides of the DP2 fraction, most likely due to the probiotic characteristics of these two strains. Fermentation by *L. paracasei* PB9 and *L. plantarum* 2108 resulted in high purity GOS products (Yield: 100%, Final Purity: 94-97%). This required 2.5 g/L soy or casein peptone supplementation and the application of 0.10 M, pH=7 phosphate buffer. The result of the process was a pH \leq 5 fermented product, considered safe, that contained approximately 5.3 g/L of prebiotic GOS fractions along with L-lactate (6.2-6.5 g/L) and citrate (approx. 1.6 g/L) produced by the LAB strains.

In order to achieve the therapeutic effects of GOS consumption, approximately 500 mL of the fermentation product needs to be ingested. Consumption of such amounts does not surpass international recommendations for phosphate and D-lactate intake, hence the fermented GOS produced here is appropriate as a base for prebiotic beverages. Hereinafter, the fermented beverage-base can be supplemented with various flavorings (fruit aromas or concentrates), and sweetening agents.

Based on selective GOS fermentation experiments conducted with *Kluyveromyces* strains, the selective fermentation process carried out by *K. marxianus* DMB Km-RK with low ($5 \cdot 10^6$ cell/mL) initial cell concentrations is applicable for the production of high-purity, mono- and disaccharide free GOS products (97% yield, 100% purity). For this, the dilution of crude GOS to 100 g/L and its supplementation with 5 g/L yeast extract was necessary.

During fermentation, *K. marxianus* Km-RK produced considerable amounts of ethanol, removal of which requires further purification steps. Although *Kluyveromyces nonfermentans* Y.01443 was unable to remove the DP2 fraction of crude GOS it removed the complete glucose and galactose content of the fermentation media, in the case of 100 g/L total carbohydrate concentration 5 g/L yeast extract supplementation. As *Kluyveromyces nonfermentans* Y.01443 did not produce ethanol, monosaccharide and ethanol free GOS could be achieved with the application of this strain, which is highly favorable for application in baby formulas.

As a conclusion it can be stated that the results of my work present new insights in the fields of whey-based GOS synthesis, the lactic acid fermentation of deproteinized whey, and the selective fermentation processes of LAB and *Kluyveromyces* strains. Moreover, my results can be a basis for the development of a value-added, whey-based, lactic acid fermented prebiotic beverages.

MELLÉKLET

M1 IRODALOMJEGYZÉK

ABURTO, C., GUERRERO, C., VERA, C., WILSON, L. ÉS ILLANES, A. (2016): Simultaneous synthesis and purification (SSP) of galacto-oligosaccharides in batch operation. In: *LWT - Food Science and Technology*, 72, pp. 81–89. doi: 10.1016/j.lwt.2016.04.029.

ABURTO, C., GUERRERO, C., VERA, C., WILSON, L. ÉS ILLANES, A. (2018): Co-immobilized β -galactosidase and *Saccharomyces cerevisiae* cells for the simultaneous synthesis and purification of galacto-oligosaccharides. In: *Enzyme and Microbial Technology*, 118, pp. 102–108. doi: 10.1016/j.enzmictec.2018.08.003.

ADAM, A. C., RUBIO-TEXEIRA, M. ÉS POLAINA, J. (2004): Lactose: The milk sugar from a biotechnological perspective. In: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(7–8), pp. 553–557. doi: 10.1080/10408690490931411.

ADEVA-ANDANY, M., LÓPEZ-OJÉN, M., FUNCASTA-CALDERÓN, R., AMENEIROS-RODRÍGUEZ, E., DONAPETRY-GARCÍA, C., VILA-ALTESOR, M. ÉS RODRÍGUEZ-SEIJAS, J. (2014): Comprehensive review on lactate metabolism in human health. In: *Mitochondrion*, 17, pp. 76–100. doi: 10.1016/j.mito.2014.05.007.

ANDERSEN, J. M., BARRANGOU, R., HACHEM, M. A., LAHTINEN, S., GOH, Y. J., SVENSSON, B. ÉS KLAENHAMMER, T. R. (2011): Transcriptional and functional analysis of galactooligosaccharide uptake by lacS in *Lactobacillus acidophilus*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(43), pp. 17785–17790. doi: 10.1073/pnas.1114152108.

ANDERSEN, J. M., BARRANGOU, R., HACHEM, M. A., LAHTINEN, S. J., GOH, Y. J., SVENSSON, B. ÉS KLAENHAMMER, T. R. (2012): Transcriptional Analysis of Prebiotic Uptake and Catabolism by *Lactobacillus acidophilus* NCFM. In: *PLoS ONE*, 7(9), p. [e44409]. doi: 10.1371/journal.pone.0044409.

ARDÖ, Y. (2006): Flavour formation by amino acid catabolism. In: *Biotechnology Advances*, 24(2), pp. 238–242. doi: 10.1016/j.biotechadv.2005.11.005.

ARGENTA, A. B. ÉS SCHEER, A. D. P. (2020): Membrane Separation Processes Applied to Whey: A Review. In: *Food Reviews International*, 36(5), pp. 499–528. doi: 10.1080/87559129.2019.1649694.

ASUNIS, F., DE GIOANNIS, G., ISIPATO, M., MUNTONI, A., POLETTINI, A., POMI, R., ROSSI, A. ÉS SPIGA, D. (2019): Control of fermentation duration and pH to orient biochemicals and biofuels production from cheese whey. In: *Bioresource Technology*, 289, p. Article 121722. doi: 10.1016/j.biortech.2019.121722.

AUDIC, J. L., CHAUFER, B. ÉS DAUFIN, G. (2003): Non-food applications of milk components and dairy co-products: A review. In: *Lait*, 83(6), pp. 417–438. doi: 10.1051/lait:2003027.

AVALAKKI, U. K., MAHESWARAN, P. ÉS SARAVANAN, R. (2015): US Patent 9,139,856 B2.

BALLESTEROS, A., PLOU, F. J., ALCALDE, M., FERRER, M., GARCÍA-ARELLANO, H., REYES-DUARTE, D. ÉS GHAZI, I. (2006): Enzymatic synthesis of sugar esters and oligosaccharides from renewable resources. In: Patel, R. N. (ed.) *Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industries*. CRC Press, pp. 463–488.

BARTKIENE, E., ZAVISTANAVICIUTE, P., LELE, V., RUZAUSKAS, M., BARTKEVICS, V., BERNATONIENE, J., GALLO, P., TENORE, G. C. ÉS SANTINI, A. (2018): *Lactobacillus plantarum* LUHS135 and *paracasei* LUHS244 as functional starter cultures for the food fermentation industry: Characterisation, mycotoxin-reducing properties, optimisation of biomass growth and sustainable encapsulation by using dairy by-product. In: *LWT - Food Science and Technology*, 93, pp. 649–658. doi: 10.1016/j.lwt.2018.04.017.

BERNÁRDEZ, P. F., AMADO, I. R., CASTRO, L. P. ÉS GUERRA, N. P. (2008) : Production of a potentially probiotic culture of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CECT 4043 in whey. In: *International Dairy Journal*, 18(10–11), pp. 1057–1065. doi: 10.1016/j.idairyj.2008.05.004.

BIMBO, F., BONANNO, A., NOCELLA, G., VISCECCHIA, R., NARDONE, G., DE DEVITIIS, B. ÉS CARLUCCI, D. (2017): Consumers' acceptance and preferences for nutrition-modified and functional dairy products: A systematic review. In: *Appetite*, 113, pp. 141–154. doi: 10.1016/j.appet.2017.02.031.

BROWN, L., VILLEGAS, J. M., ELEAN, M., FADDA, S., MOZZI, F., SAAVEDRA, L. ÉS HEBERT, E. M. (2017): YebC, a putative transcriptional factor involved in the regulation of the proteolytic system of *Lactobacillus*. In: *Scientific Reports*, 7(1), pp. 1–11. doi: 10.1038/s41598-017-09124-1.

BURON-MOLES, G., CHAILYAN, A., DOLEJS, I., FORSTER, J. ÉS MIKŠ, M. H. (2019): Uncovering carbohydrate metabolism through a genotype-phenotype association study of 56 lactic acid bacteria genomes. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(7), pp. 3135–3152. doi: 10.1007/s00253-019-09701-6.

CHAVAN, R.S., SHRADDHA R. C., KUMAR, A. ÉS NALAWADE, T. (2015): Whey Based Beverage: Its Functionality, Formulations, Health Benefits and Applications. In: *Journal of Food Processing & Technology*, 6(10), p. 1000495. doi: 10.4172/2157-7110.1000495.

CHEN, X. Y. ÉS GÄNZLE, M. G. (2017): Lactose and lactose-derived oligosaccharides: More than prebiotics?. In: *International Dairy Journal*, 67, pp. 61–72. doi: 10.1016/j.idairyj.2016.10.001.

CHENG, C. C., YU, M. C., CHENG, T. C., SHEU, D. C., DUAN, K. J. ÉS TAI, W. L. (2006): Production of high-content galacto-oligosaccharide by enzyme catalysis and fermentation with *Kluyveromyces marxianus*. In: *Biotechnology Letters*, 28(11), pp. 793–797. doi: 10.1007/s10529-006-9002-1.

CHO, Y., SHIN, I., HONG, S. ÉS KIM, C. (2015): Production of Functional High-protein Beverage Fermented with Lactic Acid Bacteria Isolated from Korean Traditional Fermented Food. In: *Korean journal for food science of animal resources*, 35(2), pp. 189–196. doi: 10.5851/kosfa.2015.35.2.189.

CHOLLANGI, A. ÉS HOSSAIN, M. M. (2007): Separation of proteins and lactose from dairy wastewater. In: *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 46(5), pp. 398–404. doi: 10.1016/j.cep.2006.05.022.

CHRAMOSTOVÁ, J., MOŠNOVÁ, R., LIŠOVÁ, I., PEŠEK, E., DRBOHLAV, J. ÉS NĚMEČKOVÁ, I. (2014): Influence of cultivation conditions on the growth of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* sp., and *Streptococcus thermophilus*, and on the production of organic acids in fermented milks. In: *Czech Journal of Food Sciences*, 32(5), pp. 422–429. doi: 10.17221/616/2013-cjfs.

CHURCH, F. C., PORTER, D. H., CATIGNANI, G. L. ÉS SWAISGOOD, H. E. (1985): An o-phthalaldehyde spectrophotometric assay for proteinases. In: *Analytical Biochemistry*, 146(2), pp. 343–348. doi: 10.1016/0003-2697(85)90549-4.

CODEX ALIMENTARIUS (2019): Codex Standard 192/1995 General Standard for Food Additives, Revision 2019. pp. 1–480.

CORDEIRO, M. A., SOUZA E. L. S., ARANTES, R. M. E., BALTHAZAR, C. F., GIUMARAES, J. T., SCUDINO, H., SILVA, H. L. A., ROCHA, R. S., FREITAS, M. Q., ESMERINO, E. A., SILVA, M. C., PIMENTEI, T. C., GRANATO, D., COSTA, R. G. B., CRUZ, A. G. ÉS MARTINS, F. S. (2019): Fermented whey dairy beverage offers protection against *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Typhimurium infection in mice. In: *Journal of Dairy Science*, 102(8), pp. 6756–6765. doi: 10.3168/jds.2019-16340.

CÓRDOVA, A., ASTUDILLO, C. ÉS ILLANES, A. (2018): Membrane technology for the purification of enzymatically produced oligosaccharides. In: Galanakis, C. (ed.) *Separation of Functional Molecules in Food by Membrane Technology*. 1st edition. Elsevier, pp. 113–153. doi: 10.1016/B978-0-12-815056-6.00004-8.

CÓRDOVA, A., ASTUDILLO, C., SANTIBAÑEZ, L., CASSANO, A., RUBY-FIGUEROA, R. ÉS ILLANES, A. (2017): Purification of galacto-oligosaccharides (GOS) by three-stage serial nanofiltration units under critical transmembrane pressure conditions. In: *Chemical Engineering Research and Design*, 117, pp. 488–499. doi: 10.1016/j.cherd.2016.11.006.

COSTA, M. P. DA, FRASAO, B. D. S., LIMA, B. R. C. D. C., RODRIGUES, B. L. ÉS JUNIOR, C. A. C. (2016): Simultaneous analysis of carbohydrates and organic acids by HPLC-DAD-RI for monitoring goat's milk yogurts fermentation. In: *Talanta*, 152, pp. 162–170. doi: 10.1016/j.talanta.2016.01.061.

COULIER, L., TIMMERMANS, J., RICHARD, B., VAN DEN DOOL, R., HAAKSMAN, I., KLARENBECK, B., SLAGHEK, T. ÉS VAN DONGEN, W. (2009): In-depth characterization of prebiotic galactooligosaccharides by a combination of analytical techniques. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(18), pp. 8488–8495. doi: 10.1021/jf902549e.

CUARTAS-URIBE, B., ALCAINA-MIRANDA, M. I., SORIANO-COSTA, E. ÉS BESPÍÁ, A. (2006): Comparison of two nanofiltration membranes NF200 and Ds-5 DL to demineralize whey. In: *Desalination*, 199(1–3), pp. 43–45. doi: 10.1016/j.desal.2006.03.016.

DAS, B., SARKAR, S., SARKAR, A., BHATTACHARJEE, S. ÉS BHATTACHARJEE, C. (2016): Recovery of whey proteins and lactose from dairy waste: A step towards green waste management. In: *Process Safety and Environmental Protection*, 101, pp. 27–33. doi: 10.1016/j.psep.2015.05.006.

DAS, R., SEN, D., SARKAR, A., BHATTACHARYYA, S. ÉS BHATTACHARJEE, C. (2011): A comparative study on the production of galacto-oligosaccharide from whey permeate in recycle membrane reactor and in enzymatic batch reactor. In: *Industrial and Engineering Chemistry Research*, pp. 806–816. doi: 10.1021/ie1016333.

DAVAMI, F., BALDI, L., RAJENDRA, Y. ÉS M WURM, F. (2014): Peptone Supplementation of Culture Medium Has Variable Effects on the Productivity of CHO Cells. In: *International journal of molecular and cellular medicine*, 3(3), pp. 146–56. doi: 10.7508/ibj.2015.04.002.

DAVIDOVICS, Z. H., VANCE, K., ETIENNE, N. ÉS HYAMS, J. S. (2017) “Fecal Transplantation Successfully Treats Recurrent D-Lactic Acidosis in a Child with Short Bowel Syndrome. In: *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 41(5), pp. 896–897. doi: 10.1177/0148607115619931.

DESNILASARI, D. ÉS KUMALASARI, R. (2017): Characteristic of Fermented Drink from Whey Cheese with Addition of Mango (*Mangifera xodorata*) Juice. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. Institute of Physics Publishing. doi: 10.1088/1755-1315/101/1/012024.

EFSA PANEL ON FOOD ADDITIVES ÉS FLAVOURINGS (FAF) (2019): Re-evaluation of phosphoric acid–phosphates – di-, tri- and polyphosphates (E 338–341, E 343, E 450–452) as food additives and the safety of proposed extension of use. In: *EFSA Journal*, 17(6). doi: 10.2903/j.efsa.2019.5674.

ELDELEKLIOĞLU, B., BAYRAKTAR, E. ÉS MEHMETOĞLU, Ü. (2013): The effects of nutrient supplements on the production of lactic acid from cheese whey. In: *Turkish Journal of Biochemistry*, 38(1), pp. 81–91. doi: 10.5505/tjb.2013.46036.

ELFERINK, S. J. W. H. O., KROONEMAN, J., JAN, C., SPOELSTRA, S. F., FABER, F., ELFERINK, S. O., KROONEMAN, J. ÉS SPOELSTRA, S. F. (2001): Anaerobic Conversion of Lactic Acid to Acetic Acid and 1, 2-Propanediol by Anaerobic Conversion of Lactic Acid to Acetic Acid and. In: *Applied and environmental microbiology*, 67(1), pp. 125–132. doi: 10.1128/AEM.67.1.125.

ESKANDARLOO, H. ÉS ABBASPOURRAD, A. (2018): Production of galacto-oligosaccharides from whey permeate using β -galactosidase immobilized on functionalized glass beads. In: *Food Chemistry*, 251, pp. 115–124. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.01.068.

EUROPEAN COMMISSION (2017): Commission Implementing Regulation (EU) 2017/2470. In: *Official Journal of the European Union*, 351, pp. 72–201.

EWASCHUK, J. B., NAYLOR, J. M. ÉS ZELLO, G. A. (2005): D-Lactate in Human and Ruminant Metabolism. In: *The Journal of Nutrition*, 135(7), pp. 1619–1625. doi: 10.1093/jn/135.7.1619.

FABIAN, E., KRAMER, L., SIEBERT, F., HÖGENAUER, C., RAGGAM, R. B., WENZL, H. ÉS KREJS, G. J. (2017): D-lactic acidosis - Case report and review of the

literature. In: *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 55(1), pp. 75–82. doi: 10.1055/s-0042-117647.

FAO/WHO (1982) *Evaluation of certain food additives and contaminants (Twenty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)*. WHO Technical Report Series, No. 683.

FAWOLE, O. S. ÉS UNUOFIN, J. O. (2019): Effect of different milk based media on lactic acid production and growth characteristics of bacteria isolates from vended soft cheese. *Indian Journal of Experimental Biology*, 57(6), pp. 455–459.

FERNÁNDEZ, M. ÉS ZÚÑIGA, M. (2006): Amino acid catabolic pathways of lactic acid bacteria. In: *Critical Reviews in Microbiology*, 32(3), pp. 155–183. doi: 10.1080/10408410600880643.

FIJAN, S. (2014): Microorganisms with claimed probiotic properties: An overview of recent literature. In: *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(5), pp. 4745–4767. doi: 10.3390/ijerph110504745.

FILANNINO, P., DE ANGELIS, M., DI CAGNO, R., GOZZI, G., RICIPUTI, Y. ÉS GOBBETTI, M. (2018): How *Lactobacillus plantarum* shapes its transcriptome in response to contrasting habitats. In: *Environmental Microbiology*, 20(10), pp. 3700–3716. doi: 10.1111/1462-2920.14372.

FISCHER, C. ÉS KLEINSCHMIDT, T. (2015): Synthesis of galactooligosaccharides using sweet and acid whey as a substrate. In: *International Dairy Journal*, 48, pp. 15–22. doi: 10.1016/j.idairyj.2015.01.003.

FITZPATRICK, J. J. ÉS O’KEEFFE, U. (2001): Influence of whey protein hydrolysate addition to whey permeate batch fermentations for producing lactic acid. In: *Process Biochemistry*, 37(2), pp. 183–186. doi: 10.1016/S0032-9592(01)00203-5.

FODA, M. I. ÉS LOPEZ-LEIVA, M. (2000): Continuous production of oligosaccharides from whey using a membrane reactor. In: *Process Biochemistry*, 35(6), pp. 581–587. doi: 10.1016/S0032-9592(99)00108-9.

FRANKOWSKI, K. M., MIRACLE, R. E. ÉS DRAKE, M. A. (2014): The role of sodium in the salty taste of permeate. In: *Journal of Dairy Science*, 97(9), pp. 5356–5370. doi: 10.3168/jds.2014-8057.

FRENZEL, M., ZERGE, K., CLAWIN-RÄDECKER, I. ÉS LORENZEN, P. C. (2015): Comparison of the galacto-oligosaccharide forming activity of different β -galactosidases. In: *LWT - Food Science and Technology*, 60(2), pp. 1068–1071. doi: 10.1016/j.lwt.2014.10.064.

FÜSTÖS, Z., BELÁK, Á., FERDES, M. ÉS MARÁZ, A. (2010): Isolation and Identification of Probiotic Lactic Acid Bacteria and Examination of Their Tolerance Against Stress Factors. In: *Studia Ubb Chemia*, pp. 32–43.

GALLARDO-ESCAMILLA, F. J., KELLY, A. L. ÉS DELAHUNTY, C. M. (2007): Mouthfeel and flavour of fermented whey with added hydrocolloids. In: *International Dairy Journal*, 17(4), pp. 308–315. doi: 10.1016/j.idairyj.2006.04.009.

GÄNZLE, M. G. (2015): Lactic metabolism revisited: Metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. In: *Current Opinion in Food Science*, 2, pp. 106–117. doi: 10.1016/j.cofs.2015.03.001.

GÄNZLE, M. G. ÉS FOLLADOR, R. (2012): Metabolism of oligosaccharides and starch in lactobacilli: A review. In: *Frontiers in Microbiology*, 3, p. 340. doi: 10.3389/fmicb.2012.00340.

GÄNZLE, M. G., HAASE, G. ÉS JELEN, P. (2008): Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. In: *International Dairy Journal*, 18(7), pp. 685–694. doi: 10.1016/j.idairyj.2008.03.003.

GARCÍA, G., AGOSTO, M. E., CAVAGLIERI, L. ÉS DOGI, C. (2020): Effect of fermented whey with a probiotic bacterium on gut immune system. In: *Journal of Dairy Research*, 87(1), pp. 134–137. doi: 10.1017/S0022029919000980.

GAUCHER, F., BONNASSIE, S., RABAH, H., MARCHAND, P., BLANC, P., JEANTET, R. ÉS JAN, G. (2019): Review: Adaptation of beneficial propionibacteria,

lactobacilli, and bifidobacteria improves tolerance toward technological and digestive stresses. In: *Frontiers in Microbiology*, 10, p. 841. doi: 10.3389/fmicb.2019.00841.

GEIGER, B., NGUYEN, H. M., WENIG, S., NGUYEN, H. A., LORENZ, C., KITTL, R., MATHIESEN, G., EIJSINK, V. G. H., HALTRICH, D., NGUYEN, T. H. (2015): From by-product to valuable components: Efficient enzymatic conversion of lactose in whey using β -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. In: *Biochemical Engineering Journal*, 116, pp. 45–53. doi: 10.1016/j.bej.2016.04.003.

GIACOMELLI, S., MANONI, M., CIPOLETTI, G., BIAGIOLINI, S., VAGNOLI, L. ÉS CHINI, J. (2015): United States Patent US 9,200,303 B2.”

GIBSON, G. R., HUTKINS, R., SANDERS, M. E., PRESCOTT, S. L., REIMER, R. A., SALMINEN, S. J., SCOTT, K., STANTON, C., SWANSON, K. S., CANI, P. D., VERBEKE ÉS K. ÉS REID, G. (2017): Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. In: *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 14(8), pp. 491–502. doi: 10.1038/nrgastro.2017.75.

GONZÁLEZ, M. I., ÁLVAREZ, S., RIERA, F. ÉS ÁLVAREZ, R. (2007): Economic evaluation of an integrated process for lactic acid production from ultrafiltered whey. In: *Journal of Food Engineering*, 80(2), pp. 553–561. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2006.06.021.

GOULAS, A., TZORTZIS, G. ÉS GIBSON, G. R. (2007): Development of a process for the production and purification of α - and β -galactooligosaccharides from *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. In: *International Dairy Journal*, 17(6), pp. 648–656. doi: 10.1016/j.idairyj.2006.08.010.

GRAS NOTICE 000489 (2013): GRAS Notice 000489: Galacto-oligosaccharides.” Available at: <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/default.htm>.

GUARNER, F. ÉS MALAGELADA, J. R. (2003): Gut flora in health and disease. In: *Lancet*, 361, pp. 512–519. doi: 10.1016/S0140-6736(03)12489-0.

GUÉDON, E., SPERANDIO, B., PONS, N., EHRLICH, S. D. ÉS RENAULT, P. (2005): Overall control of nitrogen metabolism in *Lactococcus lactis* by CodY, and possible models for CodY regulation in Firmicutes. In: *Microbiology*, 151(12), pp. 3895–3909. doi: 10.1099/mic.0.28186-0.

GUERRA, N. P., RUA, M. L. ÉS PASTRANA, L. (2001): Nutritional factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria on whey. In: *International Journal of Food Microbiology*, 70(3), pp. 267–281. doi: 10.1016/S0168-1605(01)00551-7.

GUERRERO, C., VERA, C., CONEJEROS, R. ÉS ILLANES, A. (2015): Transgalactosylation and hydrolytic activities of commercial preparations of β -galactosidase for the synthesis of prebiotic carbohydrates. In: *Enzyme and Microbial Technology*, 70, pp. 9–17. doi: 10.1016/j.enzmictec.2014.12.006.

GUERRERO, C., VERA, C., NOVOA, C., DUMONT, J., ACEVEDO, F. ÉS ILLANES, A. (2014): Purification of highly concentrated galacto-oligosaccharide preparations by selective fermentation with yeasts. In: *International Dairy Journal*, 39(1), pp. 78–88. doi: 10.1016/j.idairyj.2014.05.011.

GUO, M. ÉS WANG, G. (2016): Whey protein polymerisation and its applications in environmentally safe adhesives. In: *International Journal of Dairy Technology*, 69(4), pp. 481–488. doi: 10.1111/1471-0307.12303.

GURR, M. I. (1984): The Nutritional Role of Cultured Dairy Products. In: *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 17(2), pp. 57–64. doi: 10.1016/S0315-5463(84)72357-1.

HARJU, M., KALLIOINEN, H. ÉS TOSSAVAINEN, O. (2012): Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects. In: *International Dairy Journal*, 22(2), pp. 104–109. doi: 10.1016/j.idairyj.2011.09.011.

HARLÉ, O. HARLÉ, O., FALENTIN, H., NIAY, J., VALENCE, F., COURSELAUD, C., CHUAT, V., MAILLARD, M. B., GUÉDON, É., DEUTSCH, S. M. ÉS THIERRY, A.

(2020): Diversity of the metabolic profiles of a broad range of lactic acid bacteria in soy juice fermentation. In: *Food Microbiology*, 89, p. 103410. doi: 10.1016/j.fm.2019.103410.

HASSAN, A. N. ÉS NELSON, B. K. (2012): Invited review: anaerobic fermentation of dairy food wastewater.. In: *Journal of dairy science*, 95(11), pp. 6188–6203. doi: 10.3168/jds.2012-5732.

HAYEK, S. A. ÉS IBRAHIM, S. A. (2013): Current limitations and challenges with lactic acid bacteria: a review. In: *Food and Nutrition Sciences*, 4, pp. 73–87. doi: 10.4236/fns.2013.411A010.

HEBERT, E. M., RAYA, R. R. ÉS DE GIORI, G. S. (2000): Nutritional requirements and nitrogen-dependent regulation of proteinase activity of *Lactobacillus helveticus* CRL 1062. In: *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12), pp. 5316–5321. doi: 10.1128/AEM.66.12.5316-5321.2000.

HERNÁNDEZ, O., RUIZ-MATUTE, A. I., OLANO, A., MORENO, F. J. ÉS SANZ, M. L. (2009): Comparison of fractionation techniques to obtain prebiotic galactooligosaccharides. In: *International Dairy Journal*, 19(9), pp. 531–536. doi: 10.1016/j.idairyj.2009.03.002.

HERNANDEZ-MENDOZA, A., ROBLES, V. J., ANGULO, J. O., DE LA CRUZ, J. ÉS GARCIA, H. S. (2007): Preparation of a whey-based probiotic product with *Lactobacillus reuteri* and *Bifidobacterium bifidum*. In: *Food Technology and Biotechnology*, 45(1), pp. 27–31.

HILL, C. GUARNER, F., REID, G., GIBSON, G. R., MERENSTEIN, D. J., POT, B., MORELLI, L., CANANI, R. B., FLINT, H. J., SALMINEN, S., CALDER, P.C., SANDERS ÉS M. E. (2014): Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. In: *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 11(8), pp. 506–514. doi: 10.1038/nrgastro.2014.66.

HOFVENDAHL, K. ÉS HAHN-HÄGERDAL, B. (2000): Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. In: *Enzyme and Microbial Technology*, 26(2–4), pp. 87–107. doi: 10.1016/S0141-0229(99)00155-6.

HOLSINGER, V. H., POSATI, L. P. ÉS DEVILBISS, E. D. (1974): Whey Beverages: A Review. In: *Journal of Dairy Science*, 57(8), pp. 849–859. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(74)84976-3.

HORÁČKOVÁ, Š., SEDLÁČKOVÁ, P., SLUKOVÁ, M. ÉS PLOCKOVÁ, M. (2014): Influence of whey, whey component and malt on the growth and acids production of lactobacilli in milk. In: *Czech Journal of Food Sciences*, 32(6), pp. 526–531. doi: 10.17221/214/2014-cjfs.

ILINO, T., UCHIMURA, T. ÉS KOMAGATA, K. (2003): Characterization of *Lactobacillus sakei* by the type of stereoisomers of lactic acid produced. In: *J. Gen. Appl. Microbiol*, 49, pp. 111–121.

ILLANES, A., VERA, C. ÉS WILSON, L. (2016): Enzymatic production of galacto-oligosaccharides. In: *Lactose-Derived Prebiotics: A Process Perspective*, pp. 111–189. doi: 10.1016/B978-0-12-802724-0.00004-4.

ISKANDAR, C. F., CAILLIEZ-GRIMAL, C., BORGES, F. ÉS REVOL-JUNELLES, A. M. (2019): Review of lactose and galactose metabolism in Lactic Acid Bacteria dedicated to expert genomic annotation. In: *Trends in Food Science and Technology*, 88, pp. 121–132. doi: 10.1016/j.tifs.2019.03.020.

JOVANOVIĆ-MALINOVSKA, R., FERNANDES, P., WINKELHAUSEN, E. ÉS FONSECA, L. (2012): Galacto-oligosaccharides synthesis from lactose and whey by β -galactosidase immobilized in PVA. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168(5), pp. 1197–1211. doi: 10.1007/s12010-012-9850-1.

KAR, T. ÉS MISRA, A. (1999): Therapeutic properties of whey used as fermented drink. In: *Revista de microbiologia*, pp. 163–169. doi: 10.1590/S0001-37141999000200015.

KERRY, R. G., PARTA, J. K., GOUDA, S., PARK, Y., SHIN, H. ÉS DAS, G. (2018): Benefaction of probiotics for human health: A review. In: *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(3), pp. 927–939. doi: 10.1016/j.jfda.2018.01.002.

KIM, K. H., CHUN, B. H., BAEK, J. H., ROH, S. W., LEE, S. H. ÉS JEON, C. O. (2020): Genomic and metabolic features of *Lactobacillus sakei* as revealed by its pan-genome and the metatranscriptome of kimchi fermentation. In: *Food Microbiology*, 86, p. 103341. doi: 10.1016/j.fm.2019.103341.

KOLETZKO, B. HERNELL, O., HOCK, Q. S., JIRAPINYO, P., LONNERDAL, B., PENCHARZ, P., PZYREMBEL, H., RAMIREZ-MAYANS, J., SHAMIR, R., TURCK, D., YAMASHIRO, Y. ÉS ZONG-YI, D. (2005): Global standard for the composition of infant formula: Recommendations of an ESPGHAN coordinated international expert group. In: *Japanese Pharmacology and Therapeutics*, 38(8), pp. 689–710. Available at: <http://journals.lww.com/jpgn>.

KOVÁCS, Z., BENJAMINS, E., GRAU, K., UR REHMAN, A., EBRAHIMI, M. ÉS CZERMAK, P. (2013): Recent developments in manufacturing oligosaccharides with prebiotic functions. In: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 143, pp. 257–295. doi: 10.1007/10_2013_237.

KOWALCZYK, M., MAYO, B., FERNÁNDEZ, M. ÉS ALEKSANDRZAK-PIEKARCZYK, T. (2015): Updates on Metabolism in Lactic Acid Bacteria in Light of ‘Omic’ Technologies. In: in Mozzi, F., Raya, R. R., and Vignolo, G. M. (eds) *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications: Second Edition*. 2nd edn. Wiley-Blackwell, pp. 1–24. doi: 10.1002/9781118868386.ch1.

KOWLGI, N. G. ÉS CHHABRA, L. (2015): D-lactic acidosis: An underrecognized complication of short bowel syndrome. In: *Gastroenterology Research and Practice*, 2015, p. Article 476215. doi: 10.1155/2015/476215.

KRISSANSEN, G. W. (2007): Emerging Health Properties of Whey Proteins and Their Clinical Implications. In: *Journal of the American College of Nutrition*, 26(6), pp. 713S–723S. doi: 10.1080/07315724.2007.10719652.

KRUSCHITZ, A. ÉS NIDETZKY, B. (2020): Downstream processing technologies in the biocatalytic production of oligosaccharides. In: *Biotechnology Advances*, 43, p. 107568. doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107568.

LAPPA, I. K., PAPADAKI, A., KACHRIMANIDOU, V., TERPOU, A., KOULOUGLIOTIS, D., ERIOTOU, E. ÉS KOPSAHELIS, N. (2019): Cheese whey processing: Integrated biorefinery concepts and emerging food applications. In: *Foods*, 8, p. 347. doi: 10.3390/foods8080347.

LAVARI, L., PÁEZ, R., CUATRIN, A., REINHEIMER, J. ÉS VINDEROLA, G. (2014): Use of cheese whey for biomass production and spray drying of probiotic lactobacilli. In: *Journal of Dairy Research*, 81(3), pp. 267–274. doi: 10.1017/S0022029914000156.

LEDESMA, O. V., DE RUIZ HOLGADO, A. P., OLIVER, G., DE GIORI, G. S., RAIBAUD, P. ÉS GALPIN, J. V. (1977): A Synthetic Medium for Comparative Nutritional Studies of Lactobacilli. In: *Journal of Applied Bacteriology*, 42(1), pp. 123–133. doi: 10.1111/j.1365-2672.1977.tb00676.x.

VAN LEEUWEN, S. S., KUIPERS, B. J. H., DIJKHUIZEN, L. ÉS KAMERLING, J. P. (2016): Comparative structural characterization of 7 commercial galacto-oligosaccharide (GOS) products. In: *Carbohydrate Research*, 425, pp. 48–58. doi: 10.1016/j.carres.2016.03.006.

LEGAROVÁ, V. ÉS KOUŘIMSKÁ, L. (2010): Sensory quality evaluation of whey-based beverages. In: *Mljekarstvo*, 60(4), pp. 280–287.

LEVERING, J. MUSTERS, M. W.J.M., BEKKER, M., BELLOMO, D., FIEDLER, T., DE VOS, W. M., HUGENHOLTZ, J., KREIKEMEYER, B., KUMMER, U. ÉS TEUSINK, B. (2012): Role of phosphate in the central metabolism of two lactic acid bacteria - A comparative systems biology approach. In: *FEBS Journal*, 279(7), pp. 1274–1290. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08523.x.

LI, Z., XIAO, M., LU, L. ÉS LI, Y. (2008): Production of non-monosaccharide and high-purity galactooligosaccharides by immobilized enzyme catalysis and fermentation with

immobilized yeast cells. In: *Process Biochemistry*, 43(8), pp. 896–899. doi: 10.1016/j.procbio.2008.04.016.

LINDGREN, S. E., AXELSSON, L. T. ÉS MCFEETERS, R. F. (1990): Anaerobic l-lactate degradation by *Lactobacillus plantarum*. In: *FEMS Microbiology Letters*, 66(1–3), pp. 209–213. doi: 10.1016/0378-1097(90)90284-W.

LISBOA, C. R., DE SIMONI MARTINEZ, L., TRINDADE, R. A., DE ALMEIDA COSTA, F. A., DE MEDEIROS BURKERT, J. F. ÉS BURKERT, C. A. V. (2012): Response surface methodology applied to the enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides from cheese whey. In: *Food Science and Biotechnology*, 21(6), pp. 1519–1524. doi: 10.1007/s10068-012-0202-2.

LIU, J., CHAN, S. H. J., CHEN, J., SOLEM, C. ÉS JENSEN, P. R. (2019): Systems biology - A guide for understanding and developing improved strains of lactic acid bacteria. In: *Frontiers in Microbiology*, 10, p. 876. doi: 10.3389/fmicb.2019.00876.

LIU, M., BAYJANOV, J. R., RENCKENS, B., NAUTA, A. ÉS SIEZEN, R. J. (2010): The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: A genomic comparison. In: *BMC Genomics*, 11, p. 36. doi: 10.1186/1471-2164-11-36.

LIU, S. Q. (2003): Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. In: *International Journal of Food Microbiology*, 83(2), pp. 115–131. doi: 10.1016/S0168-1605(02)00366-5.

LIU, S. Q., HOLLAND, R. ÉS CROW, V. L. (2003): The potential of dairy lactic acid bacteria to metabolise amino acids via non-transaminating reactions and endogenous transamination. In: *International Journal of Food Microbiology*, 86(3), pp. 257–269. doi: 10.1016/S0168-1605(03)00040-0.

LÓPEZ LEIVA, M. H. ÉS GUZMAN, M. (1995): Formation of oligosaccharides during enzymic hydrolysis of milk whey permeates. In: *Process Biochemistry*, 30(8), pp. 757–762. doi: 10.1016/0032-9592(95)00006-2.

LUZ, C., IZZO, L., GRAZIANI, G., GASPARI, A., RITIENI, A., MAÑES, J. ÉS MECA, G. (2018): Evaluation of biological and antimicrobial properties of freeze-dried whey

fermented by different strains of *Lactobacillus plantarum*. In: *Food and Function*, 9(7), pp. 3688–3697. doi: 10.1039/c8fo00535d.

MACEDO, A., DUARTE, E. ÉS PINHO, M. (2011): The role of concentration polarization in ultrafiltration of ovine cheese whey. In: *Journal of Membrane Science*, 381, pp. 34–40. doi: 10.1016/j.memsci.2011.07.012.

MADUREIRA, A. R., PEREIRA, C. I., GOMES, A. M. P., PINTADO, M. E. ÉS XAVIER MALCATA, F. (2007): Bovine whey proteins - Overview on their main biological properties. In: *Food Research International*, 40, pp. 1197–1211. doi: 10.1016/j.foodres.2007.07.005.

MANO, M. C. R., PAULINO, B. N. ÉS PASTORE, G. M. (2019): Whey permeate as the raw material in galacto-oligosaccharide synthesis using commercial enzymes. In: *Food Research International*, 124, pp. 78–85. doi: 10.1016/j.foodres.2018.09.019.

MARAGKOUidakis, P., VENDRAMIN, V., BOVO, B., TREU, L., CORICH, V. ÉS GIACOMINI, A. (2016): Potential use of scotta, the by-product of the ricotta cheese manufacturing process, for the production of fermented drinks. In: *Journal of Dairy Research*, 83, pp. 104–108. doi: 10.1017/S002202991500059X.

MARCO, M. L. HEENEY, D., BINDA, S., CIFELLI, C. J., COTTER, P. D., FOLIGNÉ, B., GÄNZLE, M., KORT, R., PASIN, G., PIHLANTO, A., SMID, E. J. ÉS HUTKINS, R. (2017): Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. In: *Current Opinion in Biotechnology*, 44, pp. 94–102. doi: 10.1016/j.copbio.2016.11.010.

MARSH, A. J., HILL, C., ROSS, R. P. ÉS COTTER, P. D. (2014): Fermented beverages with health-promoting potential: Past and future perspectives. In: *Trends in Food Science & Technology*, 38(2), pp. 113–124. doi: 10.1016/j.tifs.2014.05.002.

MARTINS, G. N., URETA, M. M., TYMCZYSZYN, E. E., CASTILHO, P. C. ÉS GOMEZ-ZAVAGLIA, A. (2019): Technological aspects of the production of fructo and galacto-oligosaccharides. Enzymatic synthesis and hydrolysis. In: *Frontiers in Nutrition*, 6, p. 78. doi: 10.3389/fnut.2019.00078.

MATARAGAS, M. (2020): Investigation of genomic characteristics and carbohydrates' metabolic activity of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* during ripening of a Swiss-type cheese. In: *Food Microbiology*, 87, p. 103392. doi: 10.1016/j.fm.2019.103392.

MATTSSON, B. ÉS SONESSON, U. (2003): Waste management and co-product recovery in dairy processing. In: Waldron, K. (ed.) *Handbook of waste management and co-product recovery in food processing*. Woodhead Publishing Limited, pp. 332–387.

MAWGOUD, Y. A., IBRAHIM, G. A. ÉS EL-SSAYAD, M. F. (2016): Studying the influence of nitrogen source on lactic acid production from whey permeate by immobilized *Lactobacillus bulgaricus* Lb-12. In: *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 7(1), pp. 693–705.

MAWSON, A. J. (1994): Bioconversions for whey utilization and waste abatement. In: *Bioresource Technology*, 47(3), pp. 195–203. doi: 10.1016/0960-8524(94)90180-5.

MIRDAMADI, S., SADEGHI, H., SHARAFI, N., FALLAHPOUR, M., MOHSENI, F. A. ÉS BAKHTIARI, M. R. (2002): Comparison of lactic acid isomers produced by fungal and bacterial strains. In: *Iranian Biomedical Journal*, 6(2–3), pp. 69–75.

MLICHOVÁ, Z. ÉS ROSENBERG, M. (2006): Current trends of β -galactosidase application in food technology. In: *Journal of Food and Nutrition Research*, 45(2), pp. 47–54.

MONKOONDEE, S., KUNTIYA, A., CHAIYASO, T., LEKSAWASDI, N., TECHAPUN, C., KAWEE-AI, A. ÉS SEESURIYACHAN, P. (2016): Treatability of cheese whey for single-cell protein production in nonsterile systems: Part I. Optimal condition for lactic acid fermentation using a microaerobic sequencing batch reactor (microaerobic SBR) with immobilized *Lactobacillus plantarum* TISTR 22. In: *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 46(4), pp. 392–398. doi: 10.1080/10826068.2015.1045613.

MONROE, G. R. VAN EERDE, A. M., TESSADORI, F., DURAN, K. J., SAVELBERG, S. M.C., VAN ALFEN, J. C., TERHAL, P. A., VAN DER CRABBEN, S. N., LICHTENBELT, K. D., FUCHS, S. A., GERRITS, J., VAN ROOSMALEN, M. J., VAN

GASSEN, K. L., VAN AALDEREN, M., KOOT, B. G., OOSTENDORP, M., DURAN, M., VISSER, G., DE KONING, T. J., CALÌ, F., BOSCO, P., GELEIJNS, K., DE SAIN-VAN DER VELDEN, M. G.M., KNOERS, N. V., BAKKERS, J., VERHOEVEN-DUIF, N. M., VAN HAAFTEN, G., JANS, J. J. (2019): Identification of human D lactate dehydrogenase deficiency. In: *Nature Communications*, 10(1), pp. 1–8. doi: 10.1038/s41467-019-09458-6.

MORENO, F. J., MONTILLA, A., VILLAMIEL, M., CORZO, N. ÉS OLANO, A. (2014): Analysis, structural characterization, and bioactivity of oligosaccharides derived from lactose. In: *Electrophoresis*, pp. 1519–1534. doi: 10.1002/elps.201300567.

MORISHITA, T., DEGUCHI, Y., YAJIMA, M., SAKURAI, T. ÉS YURA, T. (1981): Multiple nutritional requirements of lactobacilli: Genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways. In: *Journal of Bacteriology*, 148(1), pp. 64–71. doi: 10.1128/jb.148.1.64-71.1981.

MORISHITA, T. ÉS YAJIMA, M. (1995): Incomplete Operation of Biosynthetic and Bioenergetic Functions of the Citric Acid Cycle in Multiple Auxotrophic Lactobacilli. In: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59(2), pp. 251–255. doi: 10.1271/bbb.59.251.

MOTULSKY, H. ÉS CHRISTOPOULOS, A. (2004): Using global fitting to test a treatment effect in one experiment. In: in *Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression*, pp. 160–165. doi: 10.1002/pst.167.

MUELLER, I., KIEDORF, G., RUNNE, E., POTTRATZ, I., SEIDEL-MORGENSTERN, A. ÉS HAMEL, C. (2018): Process Control and Yield Enhancement of the Galacto-Oligosaccharide Formation. In: *Chemie-Ingenieur-Technik*, 90(5), pp. 725–730. doi: 10.1002/cite.201700152.

MUSCOLO, A., SETTINERI, G., PAPALIA, T., ATTINÀ, E., BASILE, C. ÉS PANUCCIO, M. R. (2017): Anaerobic co-digestion of recalcitrant agricultural wastes: Characterizing of biochemical parameters of digestate and its impacts on soil ecosystem. In: *Science of the Total Environment*, 586, pp. 746–752. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.02.051.

NATH, A., MONDAL, S., KANJILAL, T., CHAKRABORTY, S., CURCIO, S. ÉS BHATTACHARJEE, C. (2015): Synthesis and functionality of proteinacious nutraceuticals from casein whey—A clean and safe route of valorization of dairy waste. In: *Chemical Engineering Research and Design*, 97, pp. 192–207. doi: 10.1016/j.cherd.2015.03.017.

NEAL-MCKINNEY, J. M., LU, X., DUONG, T., LARSON, C. L., CALL, D. R., SHAH, D. H. ÉS KONKEL, M. E. (2012): Production of Organic Acids by Probiotic Lactobacilli Can Be Used to Reduce Pathogen Load in Poultry. In: *PLoS ONE*, 7(9), p. e43928. doi: 10.1371/journal.pone.0043928.

NURSIWI, A., NURHARTADI, E., UTAMI, R., SARI, A. M., LAKSONO, P. W. ÉS APRILIA, E. N. (2017): Characteristic of Fermented Whey Beverage with Addition of Tomato Juice (*Lycopersicum esculentum*). In: *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. IOP Publishing. doi: 10.1088/1757-899X/193/1/012009.

NURYANA, I., ANDRIANI, A., LISDIYANTI, P. ÉS YOPI (2019): Analysis of organic acids produced by lactic acid bacteria. In: *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, p. 012054. doi: 10.1088/1755-1315/251/1/012054.

PALAI, T., MITRA, S. ÉS BHATTACHARYA, P. K. (2012): Kinetics and design relation for enzymatic conversion of lactose into galacto-oligosaccharides using commercial grade β -galactosidase. In: *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114(4), pp. 418–423. doi: 10.1016/j.jbiosc.2012.05.012.

PANESAR, P. S., KENNEDY, J. F., GANDHI, D. N. ÉS BUNKO, K. (2007): Bioutilisation of whey for lactic acid production. In: *Food Chemistry*, 105(1), pp. 1–14. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.03.035.

PAPADIMITRIOU, K., ALEGRÍA, Á., BRON, P.A., DE ANGELIS, M., GOBBETTI, M., KLEEREBEZEM, M., LEMOS, J. A., LINARES, D. M., ROSS, P., STANTON, C., TURRONI, F., VAN SINDEREN, D., VARMANEN, P., VENTURA, M., ZÚÑIGA, M., TSAKALIDOU, E., ÉS KOK, JAN (2016): Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), pp. 837–890. doi: 10.1128/mnbr.00076-15.

PARK, A. R. ÉS OH, D. K. (2010): Galacto-oligosaccharide production using microbial β -galactosidase: Current state and perspectives. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(5), pp. 1279–1286. doi: 10.1007/s00253-009-2356-2.

PATERSON, A. H. J. ÉS KELLAM, S. J. (2009): Transformation of lactose for value-added ingredients. In: in Corredig, M. (ed.) *Dairy-Derived Ingredients: Food and Nutraceutical Uses*. 1st edn. Woodhead Publishing, pp. 625–643. doi: 10.1533/9781845697198.3.625.

PAULI, T. ÉS FITZPATRICK, J. J. (2002): Malt combining nuts as a nutrient supplement to whey permeate for producing lactic by fermentation with *Lactobacillus casei*. In: *Process Biochemistry*, 38(1), pp. 1–6. doi: 10.1016/S0032-9592(02)00038-9.

PÁZMÁNDI, M., KOVÁCS, Z., BALGA, E., KOVÁCS, M. ÉS MARÁZ, A. (2020): Production of high-purity galacto-oligosaccharides by depleting glucose and lactose from galacto-oligosaccharide syrup with yeasts” *Yeast*, pp. 1–16. doi: 10.1002/yea.3507.

PEDERSEN, M. B., GAUDU, P., LECHARDEUR, D., PETIT, M.-A. ÉS GRUSS, A. (2012): Aerobic Respiration Metabolism in Lactic Acid Bacteria and Uses in Biotechnology. In: *Annual Review of Food Science and Technology*, 3(1), pp. 37–58. doi: 10.1146/annurev-food-022811-101255.

PEREIRA, C., HENRIQUES, M., GOMES, D., GOMEZ-ZAVAGLIA, A. ÉS DE ANTONI, G. (2015): Novel functional whey-based drinks with great potential in the dairy industry. In: *Food Technology and Biotechnology*, 53(3), pp. 307–314. doi: 10.17113/ftb.53.03.15.4043.

PESCUMA, M., HÉBERT, E. M., MOZZI, F. ÉS FONT DE VALDEZ, G. (2008): Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: Evolution of carbohydrates and protein content. In: *Food Microbiology*, 25(3), pp. 442–451. doi: 10.1016/j.fm.2008.01.007.

PESCUMA, M., HÉBERT, E. M., MOZZI, F. ÉS FONT DE VALDEZ, G. (2010): Functional fermented whey-based beverage using lactic acid bacteria. In: *International Journal of Food Microbiology*, 141(1–2), pp. 73–81. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.011.

- PESCUMA, M., DE VALDEZ, G. F. ÉS MOZZI, F. (2015): Whey-derived valuable products obtained by microbial fermentation. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(15), pp. 6183–6196. doi: 10.1007/s00253-015-6766-z.
- PLUMED-FERRER, C., KOISTINEN, K. M., TOLONEN, T. L., LEHESRANTA, S. J., KÄRENLAMPI, S. O., MÄKIMATTILA, E., JOUTSJOKI, V., VIRTANEN, V. ÉS VON WRIGHT, A. (2008): Comparative study of sugar fermentation and protein expression patterns of two *Lactobacillus plantarum* strains grown in three different media. In: *Applied and Environmental Microbiology*, 74(17), pp. 5349–5358. doi: 10.1128/AEM.00324-08.
- POCEDIČOVÁ, K., ČURDA, L., MIŠÚN, D., DRYÁKOVÁ, A. ÉS DIBLÍKOVÁ, L. (2010): Preparation of galacto-oligosaccharides using membrane reactor. In: *Journal of Food Engineering*, 99(4), pp. 479–484. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2010.02.001.
- POGON, K., SADY, M., JAWORSKA, G. ÉS GREGA, T. (2015): Characteristics of orange-whey fermented beverages. In: *Acta Alimentaria*, 44(2), pp. 170–177. doi: 10.1556/AAlim.2014.0001.
- POOLMAN, B. (1993): Metabolim-Regulation Biochemistry and molecular biology oi galactoside transport and metabolism in lactic acid bacteria. In: *Lait*, 73, pp. 87–96.
- POOLMAN, B. (2002): Transporters and their roles in LAB cell physiology. In: *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 82(1–4), pp. 147–164. doi: 10.1023/A:1020658831293.
- POULIOT, Y. (2008): Membrane processes in dairy technology-From a simple idea to worldwide panacea. In: *International Dairy Journal*, 18(7), pp. 735–740. doi: 10.1016/j.idairyj.2008.03.005.
- PRASAD, S., SRIKANTH, K., LIMAYE, A. M. ÉS SIVAPRAKASAM, S. (2014): Homo-fermentative production of d-lactic acid by *Lactobacillus* sp. employing casein whey permeate as a raw feed-stock. In: *Biotechnology Letters*, 36(6), pp. 1303–1307. doi: 10.1007/s10529-014-1482-9.

PRAZERES, A. R., CARVALHO, F. ÉS RIVAS, J. (2012): Cheese whey management: A review. In: *Journal of Environmental Management*, 110, pp. 48–68. doi: 10.1016/j.jenvman.2012.05.018.

RAMA, G. R., KUHN, D., BEUX, S., MACIEL, M. J. ÉS VOLKEN DE SOUZA, C. F. (2019): Potential applications of dairy whey for the production of lactic acid bacteria cultures. In: *International Dairy Journal*, 98, pp. 25–37. doi: 10.1016/j.idairyj.2019.06.012.

RATTANAPRASERT, M., VAN PIJKEREN, J. P., RAMER-TAIT, A. E., QUINTERO, M., KOK, C. R., WALTER, J. ÉS HUTKINS, R. W. (2019): Genes involved in galactooligosaccharide metabolism in *Lactobacillus reuteri* and their ecological role in the gastrointestinal tract. In: *Applied and Environmental Microbiology*, 85(22), pp. 1–15. doi: 10.1128/AEM.01788-19.

REID, G., GADIR, A. A. ÉS DHIR, R. (2019): Probiotics: Reiterating what they are and what they are not. In: *Frontiers in Microbiology*, 10, p. 424. doi: 10.3389/fmicb.2019.00424.

RICCIARDI, A., ZOTTA, T., IANNIELLO, R. G., BOSCAINO, F., MATERA, A. ÉS PARENTE, E. (2019): Effect of respiratory growth on the metabolite production and stress robustness of *Lactobacillus casei* N87 cultivated in cheese whey permeate medium. In: *Frontiers in Microbiology*, 10, p. 851. doi: 10.3389/fmicb.2019.00851.

RODRIGUEZ-COLINAS, B. DE ABREU, M. A., FERNANDEZ-ARROJO, L., DE BEER, R., POVEDA, A., JIMENEZ-BARBERO, J., HALTRICH, D., BALLESTEROS OLMO, A. O., FERNANDEZ-LOBATO, M. ÉS PLOU, F. J. (2011): Production of galacto-oligosaccharides by the β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: Comparative analysis of permeabilized cells versus soluble enzyme. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(19), pp. 10477–10484. doi: 10.1021/jf2022012.

ROMÁN, A., VATAI, G., ITTZÉS, A., KOVÁCS, Z. ÉS CZERMAK, P. (2012): Modeling of diafiltration processes for demineralization of acid whey: An empirical approach. In: *Journal of Food Process Engineering*, 35(5), pp. 708–714. doi: 10.1111/j.1745-4530.2010.00619.x.

- RUIZ-BARBA, J. L. ÉS JIMÉNEZ-DÍAZ, R. (1993): Vitamin and amino acid requirements of *Lactococcus plantarum* strains isolated from green olive fermentations. In: *Journal of Applied Bacteriology*, pp. 350–355. doi: 10.1111/j.1365-2672.1994.tb01639.x.
- RUSTOM, I. Y. S., FODA, M. I. ÉS LÓPEZ-LEIVA, M. H. (1998): Formation of oligosaccharides from whey UF-permeate by enzymatic hydrolysis - Analysis of factors. In: *Food Chemistry*, 62(2), pp. 141–147. doi: 10.1016/S0308-8146(97)00203-3.
- SAEED, M., ANJUM, F. M., KHAN, M. R., KHAN, M. I. ÉS NADEEM, M. (2013): Isolation, characterization and utilization of starter cultures for the development of wheyghurt drink. In: *British Food Journal*, 115(8), pp. 1169–1186. doi: 10.1108/BFJ-10-2011-0274.
- SANGWAN, V., TOMAR, S. K., SINGH, R. R. B., SINGH, A. K. ÉS ALI, B. (2011): Galactooligosaccharides: Novel Components of Designer Foods. In: *Journal of Food Science*, 76(4), pp. R103–R111. doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02131.x.
- SANTIBÁÑEZ, L., GUERRERO, C. ÉS ILLANES, A. (2017): Raw galactooligosaccharide purification by consecutive lactose hydrolysis and selective bioconversion. In: *International Dairy Journal*, 75, pp. 91–100. doi: 10.1016/j.idairyj.2017.07.008.
- SARAVANAN, R., SHUBETHAR, S., NARAYANAN, S., JAIN, M., LADE, S., JADHAV, D., MAHESWARAN, P., AVALAKKI, U. K. ÉS DUBEY, A. K. (2017): A novel process for the production of high-purity galactooligosaccharides (GOS) using consortium of microbes. In: *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 47(3), pp. 245–253. doi: 10.1080/10826068.2016.1207082.
- SATYAWALI, Y., VANBROEKHOVEN, K. ÉS DEJONGHE, W. (2017): Process intensification: The future for enzymatic processes?. In: *Biochemical Engineering Journal*, 121, pp. 196–223. doi: 10.1016/j.bej.2017.01.016.

SAVIJOKI, K., INGMER, H. ÉS VARMANEN, P. (2006): Proteolytic systems of lactic acid bacteria. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(4), pp. 394–406. doi: 10.1007/s00253-006-0427-1.

SCHAAFSMA, G. (2008): Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. In: *International Dairy Journal*, 18(5), pp. 458–465. doi: 10.1016/j.idairyj.2007.11.013.

SCHMIDT, J. BOKORI, J., GUNDEL, J., HEROLD, I., KAKUK, T., KOVÁCS, G., MÉZES, M., SZIGETI, G., ÉS VINCZE, L. (2003): Élelmiszer-ipari melléktermékek. In: Schmidt, J. (ed.) *A takarmányozás alapjai*. Mezőgazda Kiadó, pp. 207–214.

SCHWAB, C. ÉS GÄNZLE, M. (2011): Lactic acid bacteria fermentation of human milk oligosaccharide components, human milk oligosaccharides and galactooligosaccharides. In: *FEMS Microbiology Letters*, 315(2), pp. 141–148. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.02185.x.

SCOTT, F., VERA, C. ÉS CONEJEROS, R. (2016): Technical and economic analysis of industrial production of lactose-derived prebiotics with focus on galacto-oligosaccharides. In: Illanes, A., Guerrero, C., Vera, C., Wilson, L., Conejeros, R., and Scott, F (eds) *Lactose-Derived Prebiotics: A Process Perspective*. Academic Press, pp. 261–284. doi: 10.1016/B978-0-12-802724-0.00007-X.

SEHEULT, J., FITZPATRICK, G. ÉS BORAN, G. (2017): Lactic acidosis: An update. In: *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 55(3), pp. 322–333. doi: 10.1515/cclm-2016-0438.

SEN, P., BHATTACHARJEE, C. ÉS BHATTACHARYA, P. (2016): Experimental studies and two-dimensional modelling of a packed bed bioreactor used for production of galacto-oligosaccharides (GOS) from milk whey. In: *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39(3), pp. 361–380. doi: 10.1007/s00449-015-1516-2.

SEN, P., NATH, A., BHATTACHARJEE, C., CHOWDHURY, R. ÉS BHATTACHARYA, P. (2014): Process engineering studies of free and micro-encapsulated β -galactosidase in batch and packed bed bioreactors for production of

galactooligosaccharides. In: *Biochemical Engineering Journal*, 90, pp. 59–72. doi: 10.1016/j.bej.2014.05.006.

SIMOVIĆ, M., MILIVOJEVIĆ, A., ČOROVIĆ, M., BANJANAC, K. ÉS BEZBRADICA, D. (2019): Whey valorization using transgalactosylation activity of immobilized β -galactosidase. In: *International Journal of Food Science and Technology*, 54(11), pp. 3074–3082. doi: 10.1111/ijfs.14222.

SISO, M. I. G. (1996): The biotechnological utilization of cheese whey: A review. In: *Bioresource Technology*, 57(1), pp. 1–11. doi: 10.1016/0960-8524(96)00036-3.

SMIT, G., SMIT, B. A. ÉS ENGELS, W. J. M. (2005): Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. In: *FEMS Microbiology Reviews*, 29(3 SPEC. ISS.), pp. 591–610. doi: 10.1016/j.femsre.2005.04.002.

SMITH, S., SMITH, T. J. ÉS DRAKE, M. A. (2016): Short communication: Flavor and flavor stability of cheese, rennet, and acid wheys. In: *Journal of Dairy Science*, 99(5), pp. 3434–3444. doi: 10.3168/jds.2015-10482.

SMITHERS, G. W. (2008): Whey and whey proteins—From ‘gutter-to-gold,’” *International Dairy Journal*, 18(7), pp. 695–704. doi: 10.1016/j.idairyj.2008.03.008.

SMITHERS, G. W. (2015): Whey-ing up the options - Yesterday, today and tomorrow. In: *International Dairy Journal*, 48, pp. 2–14. doi: 10.1016/j.idairyj.2015.01.011.

SONG, J., ABE, K., IMANAKA, H., IMAMURA, K., MINODA, M., YAMAGUCHI, S. ÉS NAKANISHI, K. (2011): Causes of the production of multiple forms of β -galactosidase by *Bacillus circulans*. In: *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 75(2), pp. 268–278. doi: 10.1271/bbb.100574.

SONG, T. S., LEE, K. S., KANG, S. B., YOO, S. H., LEE, J. I. ÉS YOON, S. S. (2013): Synthesis of galactooligosaccharides in the cheese whey-based medium by a lactase from *Lactobacillus paracasei* YSM0308. In: *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 33(5), pp. 565–571. doi: 10.5851/kosfa.2013.33.5.565.

DE SOUZA, R. R., BERGAMASCO, R., DA COSTA, S. C., FENG, X., FARIA, S. H. B. ÉS GIMENES, M. L. (2010): Recovery and purification of lactose from whey. In: *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 49(11), pp. 1137–1143. doi: 10.1016/j.cep.2010.08.015.

SPLECHTNA, B., NGUYEN, T. H. ÉS HALTRICH, D. (2007): Comparison between discontinuous and continuous lactose conversion processes for the production of prebiotic galacto-oligosaccharides using β -galactosidase from *Lactobacillus reuteri*. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16), pp. 6772–6777. doi: 10.1021/jf070643z.

SPLECHTNA, B., NGUYEN, T. H., ZEHETNER, R., LETTNER, H. P., LORENZ, W. ÉS HALTRICH, D. (2007): Process development for the production of prebiotic galacto-oligosaccharides from lactose using β -galactosidase from *Lactobacillus* sp.. In: *Biotechnology Journal*, 2(4), pp. 480–485. doi: 10.1002/biot.200600230.

SRIVASTAVA, A. ÉS MISHRA, S. (2019): Enrichment and evaluation of galacto-oligosaccharides produced by whole cell treatment of sugar reaction mixture. In: *Molecular Biology Reports*, 46(1), pp. 1181–1188. doi: 10.1007/s11033-019-04585-1.

STEINHAUER, T., MARX, M., BOGENDÖRFER, K. ÉS KULOZIK, U. (2015): Membrane fouling during ultra- and microfiltration of whey and whey proteins at different environmental conditions: The role of aggregated whey proteins as fouling initiators. In: *Journal of Membrane Science*, 489, pp. 20–27. doi: 10.1016/j.memsci.2015.04.002.

SU, Z., LUO, J., LI, X. ÉS PINELO, M. (2020): Enzyme membrane reactors for production of oligosaccharides: A review on the interdependence between enzyme reaction and membrane separation. In: *Separation and Purification Technology*, 243, p. 116840. doi: 10.1016/j.seppur.2020.116840.

SUGIHARTO, S., LAURIDSEN, C. ÉS JENSEN, B. B. (2015): Gastrointestinal ecosystem and immunological responses in *E. coli* challenged pigs after weaning fed liquid diets containing whey permeate fermented with different lactic acid bacteria. In: *Animal Feed Science and Technology*, 207, pp. 278–282. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2015.06.019.

SUN, H., YOU, S., WANG, M., QI, W., SU, R. ÉS HE, Z. (2016): Recyclable Strategy for the Production of High-Purity Galacto-oligosaccharides by *Kluyveromyces lactis*. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(28), pp. 5679–5685. doi: 10.1021/acs.jafc.6b01531.

SVENSSON, U. K. ÉS HÅKANSSON, J. (2014): Safety of Food and Beverages: Safety of Probiotics and Prebiotics. In: *Encyclopedia of Food Safety*, 3, pp. 441–446. doi: 10.1016/B978-0-12-378612-8.00439-X.

SZAKÁLY, S. (2001) *Tejgazdaságtan*. Edited by S. Szakály. Dinasztia Kiadó.

TALEGHANI, H. G., NAJAFPOUR, G. D. ÉS GHOREYSHI, A. A. (2016): A study on the effect of parameters on lactic acid production from whey. In: *Polish Journal of Chemical Technology*, 18(1), pp. 58–63. doi: 10.1515/pjct-2016-0010.

TAVARES, T. ÉS MALCATA, F. X. (2016): Whey and Whey Powders: Protein Concentrates and Fractions T. In: *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier, pp. 506–513. doi: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00748-0.

TERPSTRA, M., AHRENS, M. ÉS SMITH, S. (2001): Effect of manganese on *Lactobacillus casei* fermentation to produce lactic acid from whey permeate. In: *Process Biochemistry*, 36(7), pp. 671–675. doi: 10.1016/S0032-9592(00)00265-X.

TEUSINK, B. ÉS MOLENAAR, D. (2017): Systems biology of lactic acid bacteria: For food and thought. In: *Current Opinion in Systems Biology*, 6, pp. 7–13. doi: 10.1016/j.coisb.2017.07.005.

THONGARAM, T., HOEFLINGER, J. L., CHOW, J. ÉS MILLER, M. J. (2017): Prebiotic Galactooligosaccharide Metabolism by Probiotic Lactobacilli and Bifidobacteria. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(20), pp. 4184–4192. doi: 10.1021/acs.jafc.7b00851.

TITGEMEYER, F. ÉS HILLEN, W. (2002): Global control of sugar metabolism: A Gram-positive solution. In: *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 82(1–4), pp. 59–71. doi: 10.1023/A:1020628909429.

TOKOŠOVÁ, S., HRONSKÁ, H. ÉS ROSENBERG, M. (2016): Production of high-content galacto-oligosaccharides mixture using β -galactosidase and *Kluyveromyces marxianus* entrapped in polyvinylalcohol gel. In: *Chemical Papers*, 70(11), pp. 1445–1451. doi: 10.1515/chempap-2016-0081.

TORRES, D. P. M., GONCALVES, M. DO P. F., TEIXEIRA, J. A. ÉS RODRIGUES, L. R. (2010): Galacto-Oligosaccharides: Production, properties, applications, and significance as prebiotics. In: *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, pp. 438–454. doi: 10.1111/j.1541-4337.2010.00119.x.

TRONTEL, A., BATUŠIĆ, A., GUSIĆ, I., SLAVICA, A., ŠANTEK, B. ÉS NOVAK, S. (2011): Production of D- and L-lactic acid by mono- and mixed cultures of *Lactobacillus* sp. In: *Food Technology and Biotechnology*, 49(1), pp. 75–82.

TULI, A., SETHI, R. P., KHANNA, P. K., MARWAHA, S. S. ÉS KENNEDY, J. F. (1985): Lactic acid production from whey permeate by immobilized *Lactobacillus casei*. In: *Enzyme and Microbial Technology*, 7(4), pp. 164–168. doi: 10.1016/0141-0229(85)90058-4.

TURPIN, W., HUMBLLOT, C., THOMAS, M. ÉS GUYOT, J. P. (2010): Lactobacilli as multifaceted probiotics with poorly disclosed molecular mechanisms. In: *International Journal of Food Microbiology*, 143(3), pp. 87–102. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.032.

URRUTIA, P., RODRIGUEZ-COLINAS, B., FERNANDEZ-ARROJO, L., BALLESTEROS, A. O., WILSON, L., ILLANES, A. ÉS PLOU, F. J. (2013): Detailed analysis of galactooligosaccharides synthesis with β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(5), pp. 1081–1087. doi: 10.1021/jf304354u.

VÉNICA, C. I., BERGAMINI, C. V. ÉS PEROTTI, M. C. (2017): Response surface methodology as a tool for modelling galacto-oligosaccharide production. In: *Journal of Dairy Research*, 84(4), pp. 464–470. doi: 10.1017/S0022029917000541.

VERA, C., CÓRDOVA, A., ABURTO, C., GUERRERO, C., SUÁREZ, S. ÉS ILLANES, A. (2016): Synthesis and purification of galacto-oligosaccharides: state of the art. In: *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32, p. 197. doi: 10.1007/s11274-016-2159-4.

VIRTANEN, T., PIHLANTO, A., AKKANEN, S. ÉS KORHONEN, H. (2007): Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. In: *Journal of Applied Microbiology*, 102(1), pp. 106–115. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03072.x.

DE VOS, W. M. ÉS VAUGHAN, E. E. (1994): Genetics of lactose utilization in lactic acid bacteria. In: *FEMS Microbiology Reviews*, 16(1), pp. 77–77. doi: 10.1111/j.1574-6976.1995.tb00156.x.

DE VRESE, M. ÉS BARTH, C. A. (1991): Postprandial plasma D-lactate concentrations after yogurt ingestion. In: *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*, 30(2), pp. 131–137. doi: 10.1007/BF01610068.

VUKOTIĆ, G., STRAHINIĆ, I., BEGOVIĆ, J., LUKIĆ, J., KOJIĆ, M. ÉS FIRA, D. (2016): Survey on proteolytic activity and diversity of proteinase genes in mesophilic lactobacilli. In: *Microbiology (Russian Federation)*, 85(1), pp. 33–41. doi: 10.1134/S002626171601015X.

VULEVIC, J., JURIC, A., WALTON, G. E., CLAUS, S. P., TZORTZIS, G., TOWARD, R. E. ÉS GIBSON, G. R. (2015): Influence of galacto-oligosaccharide mixture (B-GOS) on gut microbiota, immune parameters and metabonomics in elderly persons. In: *British Journal of Nutrition*, 114(4), pp. 586–595. doi: 10.1017/S0007114515001889.

WAN, M. L. Y., FORSYTHE, S. J. ÉS EL-NEZAMI, H. (2019): Probiotics interaction with foodborne pathogens: a potential alternative to antibiotics and future challenges. In: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(20), pp. 3320–3333. doi: 10.1080/10408398.2018.1490885.

WANG, C., CUI, Y. ÉS QU, X. (2018): Mechanisms and improvement of acid resistance in lactic acid bacteria. In: *Archives of Microbiology*, 200(2), pp. 195–201. doi: 10.1007/s00203-017-1446-2.

WANG, P., WU, Z., WU, J., PAN, D., ZENG, X. ÉS CHENG, K. (2016): Effects of Salt Stress on Carbohydrate Metabolism of *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917. In: *Current Microbiology*, 73(4), pp. 491–497. doi: 10.1007/s00284-016-1087-8.

WARMERDAM, A., BOOM, R. M. ÉS JANSSEN, A. E. M. (2013a): β -galactosidase stability at high substrate concentrations. In: *SpringerPlus*, 2(1), pp. 1–8. doi: 10.1186/2193-1801-2-402.

WARMERDAM, A., PAUDEL, E., JIA, W., BOOM, R. M. AND JANSSEN, A. E. M. (2013b): Characterization of β -Galactosidase Isoforms from *Bacillus circulans* and Their Contribution to GOS Production. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170(2), pp. 340–358. doi: 10.1007/s12010-013-0181-7.

WARMERDAM, A., ZISOPOULOS, F. K., BOOM, R. M. ÉS JANSSEN, A. E. M. (2014): Kinetic characterization of galacto-oligosaccharide (GOS) synthesis by three commercially important β -galactosidases. In: *Biotechnology Progress*, 30(1), pp. 38–47. doi: 10.1002/btpr.1828.

WEN-QIONG, W., LAN-WEI, Z., XUE, H. ÉS YI, L. (2017): Cheese whey protein recovery by ultrafiltration through transglutaminase (TG) catalysis whey protein cross-linking. In: *Food Chemistry*, 215, pp. 31–40. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.07.057.

WILSON, B. ÉS WHELAN, K. (2017): Prebiotic inulin-type fructans and galacto-oligosaccharides: definition, specificity, function, and application in gastrointestinal disorders. In: *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 32, pp. 64–68. doi: 10.1111/jgh.13700.

WRÓBLEWSKA, B., KALISZEWSKA-SUCHODOŁA, A., MARKIEWICZ, L. H., SZYC, A. ÉS WASILEWSKA, E. (2019): Whey prefermented with beneficial microbes modulates immune response and lowers responsiveness to milk allergens in mouse model. In: *Journal of Functional Foods*, 54, pp. 41–52. doi: 10.1016/j.jff.2018.12.032.

- YADAV, J. S. S., YAN, S., PILLI, S., KUMAR, L., TYAGI, R. D. ÉS SURAMPALLI, R. Y. (2015): Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. In: *Biotechnology Advances*, 33(6), pp. 756–774. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.07.002.
- ZALÁN, Z., HUDÁČEK, J., ŠTĚTINA, J., CHUMCHALOVÁ, J. ÉS HALÁSZ, A. (2010): Production of organic acids by *Lactobacillus* strains in three different media. In: *European Food Research and Technology*, 230(3), pp. 395–404. doi: 10.1007/s00217-009-1179-9.
- ZANNINI, E., WATERS, D. M., COFFEY, A. ÉS ARENDT, E. K. (2016): Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(3), pp. 1121–1135. doi: 10.1007/s00253-015-7172-2.
- ZAUNMÜLLER, T. ÉS UNDEN, G. (2009): Transport of sugars and sugar alcohols by lactic acid bacteria. In: in König, H., Uden, G, and Frölich, J. (eds) *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. 2nd edn. Springer International Publishing, pp. 149–163. doi: 10.1007/978-3-540-85463-0_8.
- ZHAO, X. ÉS GÄNZLE, M. G. (2018): Genetic and phenotypic analysis of carbohydrate metabolism and transport in *Lactobacillus reuteri*. In: *International Journal of Food Microbiology*, 272, pp. 12–21. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.02.021.
- ZHAO, Z. W., PAN, D. D., WU, Z., SUN, Y. Y., GUO, Y. X. ÉS ZENG, X. Q. (2014): Antialcoholic liver activity of whey fermented by *Lactobacillus casei* isolated from koumiss. In: *Journal of Dairy Science*, 97(7), pp. 4062–4071. doi: 10.3168/jds.2014-7954.
- ZOTTA, T., PARENTE, E. ÉS RICCIARDI, A. (2017): Aerobic metabolism in the genus *Lactobacillus*: impact on stress response and potential applications in the food industry. In: *Journal of Applied Microbiology*, 122(4), pp. 857–869. doi: 10.1111/jam.13399.
- ZOTTA, T., RICCIARDI, A., IANNIELLO, R. G., STORTI, L. V, GLIBOTA, N. A. ÉS PARENTE, E. (2018): Aerobic and respirative growth of heterofermentative lactic acid

bacteria: A screening study. In: *Food Microbiology*, 76, pp. 117–127. doi: 10.1016/j.fm.2018.02.017.

ZOTTA, T., SOLIERI, L., IACUMIN, L., PICOZZI, C. ÉS GULLO, M. (2020): Valorization of cheese whey using microbial fermentations. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(7), pp. 2749–2764. doi: 10.1007/s00253-020-10408-2.

ZÚÑIGA, M., YEBRA, M. J. ÉS MONEDERO, V. (2019): Complex Oligosaccharide Utilization Pathways in *Lactobacillus*. In: in Ruzal, S. M. (ed.) *Lactobacillus Genomics and Metabolic Engineering*. Caister Academic Press, pp. 30–60. doi: 10.21775/9781910190890.03.

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni elsősorban témavezetőimnek, **Dr. Maráz Annának** és **Dr. Kovács Zoltánnak** a munkám során adott útmutatást, segítséget és bátorítást mind szakmai, mind emberi szempontból.

Szeretném továbbá megköszönni a **Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszék**, valamint az **Élelmiszeripari Műveletek és Gépek Tanszék** minden munkatársának és PhD hallgatójának is a tanácsaikat, és támogató szavaikat.

További köszönettel tartozom a **Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye** (NCAIM, Budapest) munkatársainak, akik a munkám során alkalmazott *Kluyveromyces nonfermentans* NCAIM Y.01443 törzset biztosították.

Végül szeretném **Szüleimnek, Testvéreimnek** és **Férjemnek** is megköszönni, hogy a munkám elkészítéséhez biztos bázist adtak.