

.6137 617 30.



University Free State



34300000108534

Universiteit Vrystaat

HIERDIE EKSEMPLAAR MAG ONDER  
GEEN OMSTANDIGHED E UIT DIE  
BIBLIOTEK VERWYDER WORD NIE

**DIE BELANG VAN GISTE TYDENS WEIFERMENTASIE**

deur

**Albertha Lamprecht (van der Merwe)**  
**(BSc. Agric. (hons))**

Voorgelê ter vervulling van die vereistes vir die Graad

**MAGISTER SCIENTIAE AGRICULTURAE**

in die Departement VOEDSELWETENSKAP  
UNIVERSITEIT VAN DIE ORANJE VRYSTAAT, BLOEMFONTEIN.

MEI 1997

Promotor: Prof. B.C. Viljoen  
Mede-Promotor: Prof. J.C. du Preez

*We live in a world today where the state of nutrition in each country is relevant and important to each other country, and where the state of nutrition in the wealthy industrialized countries like the United States has profound significance for the role that such countries can play in eliminating famine and providing for adequate nutrition throughout the world. In a world in which each half knows what the other half does, we cannot live with hunger and malnutrition in one part of the world while people in another part are not only well nourished, but over-nourished. Any talk of one world, of brotherhood, rings hollow to those who have come face to face on the television screen with the emaciation of starving children and to the people whose children are starving as the poor over month-old issues of glossy American and European magazines, where full color prints show people glowing with health, their plates piled high with food that glistens to match the shining textures of their clothes. People who have resolutely tightened their belts and put up with going to bed hungry, people who have seen their children die because they did not have the strength to resist disease and called it fate or the will of God, can no longer do so in the vivid visual realization of the amount and quality of food eaten - and wasted - by others.*

- MARGARET MEAD -

Hierdie verhandeling word opgedra aan my eggenoot, Hennie en my ouers

Universiteit van die  
Oranje-Vrystaat  
BLOEMFONTEIN

1 1 MAY 2000

UOVS SASOL BIBLIOTEEK

# INHOUD

## DANKBETUIGINGS

## HOOFSTUK 1

| INLEIDING EN LITERATUUROORSIG |  | Bladsy |
|-------------------------------|--|--------|
| 1.1                           | Inleiding  | 2      |
| 1.2                           | Doel van studie  | 2      |
| 1.3                           | Literatuuroorsig   | 4      |
| 1.3.1                         | Probleme ten opsigte van voeding wêreldwyd                               | 4      |
| 1.3.2                         | Proteïentekorte in die Republiek van Suid-Afrika                         | 5      |
| 1.3.3                         | Enkelselproteïen-produkte  | 6      |
| 1.3.4                         | Wei  | 8      |
| 1.3.4.1                       | Wei - Definisie  | 8      |
| 1.3.4.2                       | Wei - Bron van proteïen  | 8      |
| 1.3.5                         | Wei-produksie en -benutting  | 8      |
| 1.3.6                         | Wei-fermentasie prosesse vir die produksie van enkelselproteïen-produkte | 11     |
| 1.3.6.1                       | Fermentasie- Definisie en karakterisering                                | 11     |
| 1.3.6.2                       | Mikroorganismes gebruik tydens wei-fermentasie prosesse                  | 11     |
| 1.3.7                         | Voorkoms en ekologie van <i>Kluyveromyces</i>                            | 12     |
| 1.3.8                         | Die samestelling van enkelselproteïen produkte                           | 13     |
| 1.3.9                         | Motivering vir projek  | 13     |
| 1.4                           | Verwysings   | 15     |

## HOOFSTUK 2

### DIE SAMESTELLING VAN WEI

|     |            |    |
|-----|------------|----|
| 2.1 | Uittreksel | 22 |
| 2.2 | Inleiding  | 22 |
| 2.3 | Metodiek   | 23 |

|        |                         |                              |    |
|--------|-------------------------|------------------------------|----|
| 2.3.1. | Monsternemingspunte     | 23                           |    |
| 2.3.2. | Monsternemingprosedure  | 23                           |    |
| 2.3.3  | Weimonster ontledings   | 27                           |    |
|        | 2.3.3.1                 | Mikrobiologiese samestelling | 27 |
|        | 2.3.3.2                 | pH                           | 27 |
|        | 2.3.3.3                 | Proteïen                     | 27 |
|        | 2.3.3.4                 | Laktose                      | 27 |
|        | 2.3.3.5                 | Vet                          | 28 |
|        | 2.3.3.6                 | Totale vastestofinhoud       | 28 |
|        | 2.3.3.7                 | Minerale                     | 28 |
|        | 2.3.3.8                 | Aminosuurinhoud              | 28 |
| 2.4.   | Resultate en Bespreking | 28                           |    |
| 2.5.   | Verwysings              | 42                           |    |

### HOOFSTUK 3

#### ISOLASIE EN KARAKTERISERING VAN GISTE GEASSOSIEER MET WEI, DIE KAASFABRIEK EN -OMGEWING

|      |                         |                                       |    |
|------|-------------------------|---------------------------------------|----|
| 3.1. | Uittreksel              | 47                                    |    |
| 3.2. | Inleiding               | 47                                    |    |
| 3.3  | Metodiek                | 49                                    |    |
|      | 3.3.1.                  | Monsterneming en seleksie van isolate | 49 |
|      | 3.3.2.                  | Identifisering van gis isolate        | 50 |
|      | 3.3.3.                  | Langkettingvetsuuranalise             | 50 |
| 3.4  | Resultate en Bespreking | 51                                    |    |
| 3.5. | Verwysings              | 59                                    |    |

## HOOFSTUK 4

## EVALUERING VAN LAKTOSE FERMENTERENDE GISTE VIR ENKELSELPROTEÏEN PRODUKSIE VANAF WEI

|           |                           |    |
|-----------|---------------------------|----|
| 4.1       | Uittreksel                | 65 |
| 4.2       | Inleiding                 | 65 |
| 4.3       | Metodiek                  | 67 |
| 4.3.1     | Toetsorganismes           | 67 |
| 4.3.2     | Evaluasie prosedure       | 67 |
| 4.3.2.1   | Primere evaluasie         | 67 |
| 4.3.2.2   | Finale evaluasie          | 67 |
| 4.3.2.2.1 | Media voorbereiding       | 68 |
| 4.3.2.2.2 | Vorbereiding van inokulum | 68 |
| 4.3.3     | Analitiese prosedure      | 68 |
| 4.3.3.1   | Proteienbepaling          | 68 |
| 4.3.3.2   | Alkoholbepaling           | 69 |
| 4.3.3.3   | Groeikinetika             | 69 |
| 4.4       | Resultate en Bespreking   | 69 |
| 4.5       | Verwysings                | 80 |

## HOOFSTUK 5

## ENKELSELPROTEÏEN PRODUKSIE DEUR LAKTOSE FERMENTERENDE GISTE IN WEIPERMEAAT

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 5.1     | Uittreksel  | 84 |
| 5.2     | Inleiding   | 84 |
| 5.3     | Metodiek  | 85 |
| 5.3.1   | Primêre evaluasie   | 85 |
| 5.3.1.1 | Vergelykende groeistudie van <i>K. marxianus</i> en <i>C. utilis</i> om die groeitempo te bepaal in twee verskillende media | 85 |
| 5.3.1.2 | Vermoë van <i>K. marxianus</i> en <i>C. utilis</i> (CBS 890) om by verskillende   | 86 |



|         |   |     |
|---------|---|-----|
|         | temperature te groei                          |     |
| 5.3.2   | Sekondêre evaluasie                           | 86  |
| 5.3.2.1 | Kweekmedium -wei                              | 86  |
| 5.3.2.2 | Toetsorganisme                                | 86  |
| 5.3.2.3 | Kweekmedium en inokulum<br>voorbereiding      | 87  |
| 5.3.2.4 | Fermentasie - apparaat                        | 87  |
| 5.3.2.5 | Eksperimentele prosedure                      | 87  |
| 5.3.3   | Analitiese metodes                            | 88  |
| 5.3.3.1 | Bepaling van die groei van<br>proeforganismes | 88  |
| 5.3.3.2 | Droëgewigopbrengs                             | 88  |
| 5.3.3.3 | Proteïenbepalings                             | 88  |
| 5.3.3.4 | Laktosebepalings                              | 89  |
| 5.3.3.5 | Alkoholbepaling                               | 89  |
| 5.4     | Resultate en bespreking                       | 89  |
| 5.5     | Verwysings                                    | 105 |

## HOOFSTUK 6

|                                       |     |
|---------------------------------------|-----|
| ALGEMENE BESPREKING EN GEVOLGTREKKING | 109 |
| Verwysings                            | 115 |

## HOOFSTUK 7

|           |     |
|-----------|-----|
| OPSOMMING | 119 |
| SUMMARY   | 120 |

## DANKBETUIGINGS

Die skrywer betuig hiermee graag haar opregte dank en waardering aan:

Die Almagtige Drie-Enige God, deur Wie alles moontlik is en aan Wie alle eer toekom.

Dr. B.C. Viljoen as studieleier vir sy onderhou akademiese leiding, aanmoediging en hulp met die beplanning en uitvoering van die projek.

Prof. J.C du Preez vir leiding en uiters waardevolle advies.

Mnre. Dairy Belle Aliwal-Noord vir die gereelde verskaffing van wei vir eksperimentele doeleindes.

My ouers en familie vir gebede, inspirasie en ondersteuning

Vriende en kollegas vir hulle volgehoue belangstelling en aanmoediging

My eggenote, Hennie vir sy liefde, geduld, ondersteuning en aanmoediging.

# HOOFSTUK 1

## INLEIDING EN LITERATUUROORSIG

## 1.1 INLEIDING

As byproduk van kaasvervaardiging is wei reeds sedert die Middeleeue bekend, en is onder andere deur Hippokrates beskryf as die serumgedeelte van melk (Holzapfel, 1966). Wei beslaan ongeveer 80% van die oorspronklike volume van melk en bestaan uit 5% laktose, 0.8% proteïene en klein hoeveelhede vitamïene en minerale (Zertuche & Zall, 1985). Die progressiewe meganisering van kaasproduksie het, veral sedert die begin van die twintigste eeu gepaard gegaan met 'n negatiewe benadering ten opsigte van wei wat tans nog grotendeels as minderwaardige afvalstof beskou en behandel word (Holzapfel, 1966).

Die verhoging in kaasvervaardiging die afgelope paar jaar, het direk aanleiding gegee tot die toename in weiproduksie wêreldwyd. Wei is vir baie jare as afvalproduk beskou en is hoofsaaklik in afvoertype of op land gestort (Hayes, 1985). Die storting van wei het egter 'n ernstige probleem begin word soos die produksie van kaas toegeneem het en omgewingsbewustes bekommerd begin raak het oor die besoedeling wat dit veroorsaak (Hayes, 1985). Aangesien wei besonder ryk is aan voedingstowwe het dit 'n hoë biologiese suurstof vereiste van 32 000 of hoër (Singh et al., 1983). Tans word die pomp van onbehandelde wei in riviere of damme deur natuurbewaringsdepartemente verbied (Potgieter, 1988).

Dit is dus geen oorskatting van die probleem om te beweer dat wei die grootste probleem in die hedendaagse suiwelbedryf is nie (Kosikowski, 1979). Die waardevolle voedingstowwe van wei moet dus op een of ander manier benut word. Wei is 'n baie geskikte fermentasiemedium, want afgesien van die laktose teenwoordig as die hoof energiebron, bevat wei ook die nodige voedingstowwe om die groei van 'n verskeidenheid mikroörganismes te ondersteun (De Haast, 1985).

## 1.2 DOEL VAN STUDIE

Tydens hierdie studie is die voedingswaarde van wei soos dit huidiglik as varkvoeding aangewend word ondersoek. Alle biochemiese en mikrobiologiese implikasies vanaf weiprosessering tot varkvoeding is gemonitor, en die moontlikheid van die groei van giste as bron van enkelselproteïene op weipermeaat ondersoek. Ten einde die doel te bereik is sewe kritiese evalueringpunte geïdentifiseer en verteenwoordigende mikrobiologiese en biochemiese toetse uitgevoer om die verandering in weisamestelling te bepaal. Verder is daarop gebou om 'n gis te isoleer en te identifiseer wat onder die besonderse toestande van lae pH, hoë temperatuur en hoë getalle kontaminerende bakterieë die vermoë besit om

laktose te fermenteer vir die aanwending van dié produksie van enkelselproteïene. Alle geïsoleerde giste uit die ekologiese suiwelfabriek omgewing, is onderwerp aan identifikasie en die isolate gekarakteriseer volgens hulle vermoë om aan die vereistes van laktose fermentasie by hoë temperatuur te voldoen. Isolate wat laktose-fermentasie-positief vertoon het, is geselekteer en onderwerp aan primêre laktose fermentasie toetse waarna die tempo van groei, proteïenproduksie en aanpasbaarheid by hoë temperature ondersoek is. Bogenoemde gispresteerders op grond van die kriteria soos hierbo uiteengesit is geselekteer en gebruik vir fermentasie proewe in 'n konvensionele aërobiese fermenteerder. Biomassa-, proteïen- en alkoholproduksie asook die benutting van laktose is deurentyd gemonitor.

Die hoofdoel van die studie is om 'n proteïen verrykte voedingsproduk met goeie voedingswaarde, verkry vanaf gedeproteïeniseerde wei as afvalproduk, te voorsien vir dierevoeding. Deur die eindproduk te verkry, is die weisamestelling bepaal soos huidiglik beskikbaar in die suiwelfabriek. Die voedingswaarde van die wei, soos huidiglik voorsien aan die varke moet bepaal word om as verwysingsraamwerk gebruik te word vir die opgradering van die gedeproteïeniseerde wei. Vir die opgradering van gedeproteïeniseerde wei moet fermenterende giste gebruik word om die beskikbare laktose in die wei te benut as energie en koolstofbron om sodoende hoë graad enkelselproteïene te produseer. Vir dié doel, moet daar giste geïsoleer word wat laktose kan benut en fermenteer. Giste geassosieer met die kaasmaakproses wat reeds aangepas is by hierdie spesifieke toestande is geïsoleer en geïdentifiseer uit verskillende kaasfabrieke en verder geselekteer op grond van hulle vermoë om laktose te fermenteer. Geselekteerde giste moet onderwerp word aan fermentasie toetse om te selekteer vir die giste met die beste vermoë om laktose te fermenteer. Die geselekteerde giste word dan onderwerp aan konvensionele aërobiese fermentasie prosesse om toestande te simuleer soos verkry in 'n suiwelfabriek. Tydens al die toetse moet giste geëvalueer word op grond van hul vermoë om vinnig biomassa, enkelselproteïen te produseer. Die finale gis seleksie behels die gis wat die beste by die omstandighede aanpas gebaseer op groei by hoë temperatuur, hoë selkonsentrasie en kompeterende faktore teenoor bakterieë.

Die geselekteerde gisstam, op grond van die eienskappe soos hierbo uiteengesit, sal gebruik word in die fermentasieprosesse om gedeproteïeniseerde wei te fermenteer met die uiteindelige doel om 'n hoë kwaliteit, met goeie voedingswaarde, dierevoeding te voorsien wat aangewend sal word vir varkvoeding. Die uiteindelige dierevoeding soos geproduseer deur die gebruik van die giste, sal geëvalueer word aan die hand van die noodsaaklikste voedingsvereistes teenwoordig in die weiproduk soos dit tans gelewer word aan die varke.

### 1.3 LITERATUUROORSIG

#### 1.3.1 Probleme ten opsigte van voeding wêreldwyd.

Die ontploffing in die wêreldbevolking oor die afgelope paar dekades het 'n sorgwekkende toestand geskep wat nie net die aandag van voedselwetenskaplikes verg nie, maar ook die van politici. Voedselwetenskaplikes, omdat daar na hulle opgesien word om die probleem die hoof te bied, deur na vore te kom met oplossings wat op navorsing gebaseer is en politici, omdat hongersnood nie bevorderlik is vir staatkundige bestendigheid nie (Fourie, 1967; Smith, 1988). Die wêreldtekort aan voedsel is veral ernstig ten opsigte van proteïenryke voedselsoorte (Ledward et al., 1983) wat kan voorsien aan aminosure wat essensieel is vir die normale groei, ontwikkeling en instandhouding van die menslike liggaam (Galesloot & Tinbergen, 1985).

Volgens Pimentel (Ledward, et al., 1983) is 'n benaderde waarde van vyfhonderd-miljoen mense van die wêreldbevolking ondervoed, terwyl ongeveer 50% van die wêreldbevolking 'n dieet ontvang wat ongebalanseerd is veral ten opsigte van die proteïeninhoud en gehalte daarvan (Robinson, 1981). Hierdie tekort aan voedsel raak kommerwekkend soos die wêreldpopulasie daagliks toeneem met ongeveer 2% (180 tot 200 duisend persone daagliks), sodat daar van die huidige syfer van ongeveer 5 biljoen mense tot ongeveer 12 to 16 biljoen mense teen die jaar 2150 kan wees (Ledward et al., 1983; Robinson, 1986). Om genoeg voedsel vir hierdie styging in populasie te kan voorsien moet die voedselproduksie nagenoeg verdubbel (Ledward et al., 1983). Die huidige voedselproduksietempo neem jaarliks met ongeveer 2,5% toe (Robinson, 1986), maar hierdie hoër voedselproduksie in vergelyking met 'n 2% toename in populasie jaarliks, vind plaas in die ontwikkelde lande en nie in die onder ontwikkelde lande waar die grootste behoefte heers nie (Galesloot & Tinbergen, 1985). Dit is bereken dat teen die einde van die 20ste eeu 60 miljoen ton proteïene jaarliks benodig sal word om die verwagte 6.5 biljoen mense behoorlik te voed en dat die intensiewe landboukundige verbouing van al die beskikbare grond van die aarde, voedsel vir ongeveer 10 biljoen mense sal kan produseer. Bogenoemde sal egter groot kapitale uitgawes sowel as streng politieke en maatskaplike dissipline vereis. Hierdie vereistes maak dit hoogs onwaarskynlik dat die intensiewer bewerking van alle beskikbare grond sal kan voorsien in die heersende en groeiende tekort aan proteïene (Fourie, 1967).

Bewustheid van die bogemelde gegewens omtrent 'n wêreldtekort aan proteïene sou rederlikerwys daartoe lei dat alle moontlike beskikbare bronne of potensiële bronne van proteïenryke voedsels in die wêreld ten volle benut word. Dit is tans nie die geval nie.

Daar is verskeie redes hiervoor maar die belangrikste is skynbaar, dat in die meeste ontwikkelde lande voldoende voedsel geproduseer of ingevoer word sodat hul bevolkings van 'n gebalanseerde dieet verseker is. In die onder ontwikkelde lande is daar 'n tekort aan die nodige wetenskaplike kennis om optimale ontginning van potensiële voedselbronne moontlik te maak (Fourie, 1967).

Om bogenoemde redes gee wetenskaplikes reeds intensiewe aandag aan die moontlikheid om die proteïentekort aan te vul uit ongewone bronne en deur van ongewone produksie metodes en middels gebruik te maak (Johnson, 1977; Mateles & Tannenbaum, 1971). Voorts is daar groeiende belangstelling in verskeie mikroörganismes as potensiële bronne van proteïene (Goldberg, 1985; Hudson, 1983). Mikroörganismes het voedsel nodig vir groei en kompeteer dus gedeeltelik met mens en dier vir voedselbronne. Dit kan in baie gevalle voorkom deur oortollige organiese afvalstowwe te gebruik as koolstofbron vir mikrobiese groei. Mikroörganismes het verskeie spesifieke voordele bo plante en diere, onder meer die vermoë om proteïen vanaf anorganiese stikstof te vervaardig. Die proteïeninhoud van mikroörganismes is hoog en kan bykans in enige deel van die wêreld geproduseer word (Goldberg, 1985).

### 1.3.2 Proteïen tekorte in die Republiek

In die Republiek is daar voldoende koolhidraatryke voedsels beskikbaar teen redelike pryse, maar daar is 'n tekort aan proteïenryke voedsels. Tans ondergaan Suid-Afrika ook 'n stygende tekort aan proteïen vir dierevoeding as gevolg van die stygende vraag na diereproteïen. Volgens Cloete (Horn, 1990), sal daar teen die jaar 2000 'n jaarlikse tekort van 135 000 ton diereproteïen wees as die menslike populasie teen dieselfde tempo toeneem. Die tekort aan dierevoedingsproteïen word op 440 000 ton per jaar beraam waarvan 268 000 ton deur die optimale benutting van dier en plant proteïenprodukte voorsien kan word. Die oorblywende 172 000 ton moet verskaf word deur alternatiewe proteïen bronne (Horn, 1990).

### 1.3.3 Enkelselproteïen-produkte

Enkelselproteïen is 'n algemene term wat gebruik word vir droë selle van mikroorganismes soos bakterieë, giste, alge en swamme, aktinomisete en hoër fungi wat op grootskaal gekweek word as bron van proteïen vir mens en dier. (Goldberg, 1985; Hudson, 1983). Die gebruik van enkelselproteïen as bron van voedsel is 'n twintigste eeuse konsep en belangstelling in die produksie van proteïen vanaf giste het reeds vroeg in die 1960's ontstaan (Hudson, 1983). Proteïenkwaliteit en -kwantiteit is die hoofdoel tydens enkelselproteïen produksie. Mikrobies kan egter ook koolhidrate, vette, vitamienes en minerale bevat en dit ook produseer vanaf lae kwaliteit afvalmateriaal. Enkelselproteïen kan as 'n proteïen supplement vir mens of dier gebruik word (Smith, 1988). Die veiligheid van enkelselproteïen is al deur talle studies bestudeer (Goldberg, 1985; Horn, 1990; Smith, 1988).

Die eienskappe waaraan mikroorganismes moet voldoen om as inisieerder vir enkelselproteïen produksie gebruik te word, sluit die volgende in (Goldberg, 1985):

a) *Fisiologiese eienskappe*

1. Hoë groeitempo
2. Groei op 'n eenvoudige media
3. Hoë opbrengs koëffisient op koolstofbron
4. Hoë affiniteit vir die betrokke koolstofbron
5. Die vermoë om komplekse substraat te benut en/of 'n kombinasie van koolstofbronne indien nodig
6. Die vermoë om by hoë seldigheid te groei
7. Weerstand teen substraat en/of produk toksisiteit
8. Stabiele groei in 'n kontinue kultuur
9. 'n Hoë optimum groei temperatuur
10. Vermoë tot genetiese modifikasie
11. Vermoë om ammonia as stikstofbron te gebruik.
12. pH tolerant

b) *Ander vereistes waaraan die finale enkelselproteïen-produk moet voldoen om aanvaarbaar te wees:*

1. Proteïen, vet en koolhidraat inhoud moet van goeie gehalte wees
2. Lae nukleiensuur inhoud



3. Hoë voedingswaarde
4. Hoë verteerbaarheid
5. Nie-toksies
6. Goeie smaak
7. Moet verdere prosesserings stappe kan weerstaan (bv. droging sonder verandering in kleur, tekstuur en reuk)

*Van die vele voordele van enkelselproteïene is die volgende van belang:*

- i) Mikroörganismes het 'n kort generasie tyd en kan dus baie vinnig vermeerder.
- ii) Die proteïeninhoud is hoog.
- iii) Die produksie van enkelselproteïen kan op groot hoeveelhede roumateriale toegepas word.

Die groter effektiwiteit, ekonomiese voordeel en tempo van mikrobiëse proteïenproduksie teenoor plant en dierlike bronne van proteïen kan duidelik gesien word uit die volgende syfers: 'n 1000lb os kan 1lb nuwe proteïen per dag produseer; sojabone produseer ongeveer 80lb teenoor giste wat 50ton per dag kan produseer (Jay, 1992; Smith, 1988).

Proteïenryke voedsels is essensieël vir groeiende sowel as volwasse mense en diere, maar ongelukkig ook duurder as koolhidraat of vetryke voedsels. Volgens Demmler (Holzapfel, 1966) was daar gedurende die afgelope twee wêreldoorloë so 'n groot behoefte aan proteïenryke voedsels dat giste en ander mikroörganismes as bron van proteïen gekweek is op goedkoop koolhidraatryke media soos sulfietafval (Holzapfel, 1966). Volgens Fabel (Holzapfel, 1966) is wei vanweë die relatief hoë laktose inhoud daarvan reeds gedurende die Eerste Wêreldoorlog in Duitsland gebruik as kweekbodem vir *Oidium lactis*. 'n Proses bekend as die Waldhofproses vir sulfietafval, is gedurende die Tweede Wêreldoorlog ontwikkel vir die kweek van 'n aangepaste stam van *Candida utilis*, in wei (Holzapfel, 1966).

Die keuse van substraat vir enkelselproteïen is baie belangrik, aangesien dit bekostigbaar moet wees, en maklik bekombaar. Die voordele van die gebruik van afvalmateriaal tydens enkelselproteïen produksie is tweërlei naamlik: verlaging in besoedeling en die produksie van 'n eetbare proteïenprodukt (Smith, 1988).

### 1.3.4 Wei

#### 1.3.4.1 Wei - Definisie

Wei is die groen-geel waterige gedeelte van melk, wat verkry word deur die suur, hitte of rennienkoagulasie van melk tydens kaasvervaardiging (Kurmann et al., 1992) en is glad nie 'n uniforme produk nie (Zadow, 1993). Soet wei word verkry tydens rennienkoagulasie van melk by 'n pH van 5.6. Suur wei word gevorm as die koagulum gevorm word as gevolg van suur behandeling by 'n pH van 5.1 of laer (Zadow, 1993). Wei is 'n verdunde vloeistof bevattende laktose, proteïene, minerale en spore van vet en bevat ongeveer 6% vastestowwe waarvan meer as 70% uit laktose bestaan en ongeveer 0.8% uit weiproteïene (Sanderson, 1973).

#### 1.3.4.2 Wei - bron van proteïene

'n Potensiële bron van proteïene met hoë biologiese waarde wat wêreldwyd (Charalambous, 1993; Kosikowski, 1979; Ledward et al., 1983; Mann, 1975; Marwaha & Kennedy, 1988) en ook in Suid-Afrika (De Haast et al., 1987) nie doeltreffend benut word nie, is kaaswei. Op sigself bevat wei min proteïene (0.8-0.9%) (Willems & Ugalde, 1987) maar dit bevat 4.8 tot 5.2% laktose wat kan dien as bron van koolstof tydens die kweek van giste of ander mikroörganismes (Sandhu & Waraich, 1983). Verder bevat wei 'n verskeidenheid van minerale en ander bestanddele soos vitamïene wat bevorderlik is vir die groei van mikroörganismes (Mahmoud, 1990). Wei is in die verlede as 'n afvalproduk beskou en in riviere en damme gestort (Hayes, 1985), wat nie net veroorsaak dat waardevolle voedingstowwe verlore gaan nie (Sandhu & Waraich, 1983) maar ook ernstige besoedelings probleme skep as gevolg van die hoë biologiese suurstof vereiste van wei (Capoor & Singh, 1985; Singh et al., 1983).

### 1.3.5 Weiproduksie en -benutting

Die produksie van wei wêreldwyd is ongeveer 130 miljoen ton, terwyl daar in Suid-Afrika gedurende die tydperk Februarie 1991 tot Januarie 1992, 3 946 000 kilolters wei geproduseer (Sadler, 1992) is. Bogenoemde statistieke tesame met die feit dat kaasproduksie teen 'n tempo van 3% per jaar toeneem sorg vir 'n kommerwekkende toestand. Oor die jare is daar na baie maniere gekyk om groot hoeveelhede wei te hanteer, maar dit blyk dat kaasproduksie vinniger toeneem as wat daar na oplossings gekyk kan word om van die wei ontslae te raak.

Ten spyte van al die insette gelewer deur die industrie sowel as die akademie moet daar na nuwe oplossings gesoek word ten einde al die volumes wei te kan benut wat vir die volgende dekade voorspel word. In die meeste dele van die wêreld is die benutting van wei 'n ernstige probleem. 'n Bydraende faktor tot hierdie probleem is die groot hoeveelheid permeaat wat geproduseer word as gevolg van die toenemende toepassing van ultra-filtrasië proses vir die produksie van weiproteïen-konsentraat (Zadow, 1993). Weiproteïen-konsentraat is die hoof produk wat tans ontwikkel word en kan gedefinieer word as die produk wat gevorm word vanaf wei bevattende 50, 65 of 80% gedenatureerde of ongedenatureerde proteïene (Coton, 1987; Zadow, 1993).

Vir baie jare is 'n hitte gedenatureerde vorm van weiproteïen naamlik laktalbumien vervaardig (Robinson, 1981), maar die resulterende produk is 'n onoplosbare poeier met swak funksionele eienskappe (Zall & El-Samragy, 1988). Dit is baie belangrik om daarop te let dat daar baie toepassings vir wei bestaan maar dat weinig van hulle, uiteindelik bruikbare produkte is. Indien wei nie in bruikbare produkte vir mens of dier omgesit kan word nie, moet die laaste uitweg gevolg word, naamlik die storting daarvan in riviere. Dit is noodsaaklik dat weiprosessering ekonomies geregverdig moet wees voordat enige kapitale uitgawes gedoen word. Weiprosessering as sulks is relatief nog aan die ontwikkeling, want ongeveer 20 jaar gelede is meer as twee derdes van wei in riviere gestort omdat wei grotendeels as minderwaardige afvalstof beskou en behandel is (Hayes, 1985). Die situasie het in die laaste paar jaar egter begin verander as gevolg van wetgewing en erkenning van die waarde van wei, dus word na nuwe gebruike vir laktose en proteïene gekyk. Volgens die ADPI (American Dairy Products Institute) se verslag uitgegee in 1988, het die produksie van wei en wei gemodifiseerde produkte asook die verkoop van wei vir menslike gebruik toegeneem gedurende 1987 (Zadow, 1993) en kan ons aflei vanaf hierdie data dat 'n verdere verhoging in gebruik verwag kan word.

*Metodes van weiprosessering kan in drie hoofgroepe verdeel word (Kirkpatrick, 1971):*

- 1) Weiprodukte vervaardig deur slegs die water in wei teenwoordig te verwyder. Voorbeelde is weiproteïen-konsentrate vir dierevoeding, weikaas en weipoeier.
- 2) Weiprodukte vervaardig deur verdere verwerkingstappe om sodoende die waarde daarvan te verhoog en ook die toepassings- en bemarkbaarheidsmoontlikhede te verbreed. Voorbeelde hiervan is nie-higroskopiese weipoeier en gedemineraliseerde weipoeier wat vir babavoeding aangewend kan word.

- 3) Weiprodukte vervaardig deur veranderinge in die samestelling van die hoofkomponente in wei, deur middel van die skeiding van komponente deur fraksionering, of deur fermentasie om nuwe produkte te lewer. Voorbeelde hiervan is weiproteïene, laktose, alkohol en ander fermentasie produkte.

Omdat laktose ongeveer 83% tot die sowat 6% vastestofinhoud van wei bydra, is metodes van weibenutting hoofsaaklik gebaseer, of op die omsetting, of op die suiwering van laktose (Marwaha & Kennedy, 1988). Dit sluit onder andere in die bereiding van melksuur (Zadow, 1988), laktose (Sanderson, 1973; Zadow, 1988), etanol (Janssens et al., 1983; Mahmoud, 1990; Mann, 1975), gom (Zadow, 1988), ander fermentasieprodukte soos sitroensuur (Zadow, 1988), asetoon, butanol en weidranke (Holsinger et al., 1974; Morr & Mellachouris, 1984), riboflaviene, vitamien B12 (Hayes, 1985) en penisillien (Mahmoud, 1990). Genoemde produkte word o.m. gebruik in aptekerswese, roomysbereiding, bakkerye (Lee et al., 1974), en as koeldranke (Morr & Melachouris, 1984).

Bogemelde metodes hou weinig voordeel vir die voeding van mens of dier in (Holzapfel, 1966) en bykans geen van die metodes word op kommersiële skaal toegepas nie (Potgieter, 1988; Sadler, 1992). Nagenoeg 70% van alle wei in Suid-Afrika word verpoeier en 'n groot gedeelte hiervan word teen verliese uitgevoer as gevolg van die swak mark en hoë energiekoste wat aan hierdie produk gekoppel word (Charalambous, 1993; Ghaly & Singh, 1989; Potgieter, 1988).

Die suiwelindustrie staan baie skepties teenoor weiprosesserings-skemas, alhoewel sommige hiervan soos ultra-filtrasiereeds vir 20 jaar hoofsaaklik oorsee toegepas word. Alhoewel die produksie van weiproteïene-konsentraat meer ekonomies geregverdig is as weipoeier, veroorsaak die produksie van laktose permeaat as byproduk van hierdie proses, probleme soortgelyk as wei self omdat laktose teen dieselfde konsentrasies teenwoordig is (Zadow, 1993). Daar moet dus na oplossings gesoek word om bogenoemde probleem die hoof te bied.

### 1.3.6 Weifermentasie prosesse vir die produksie van enkelselproteïen-produkte

#### 1.3.6.1 Fermentasie - Definisie en karakterisering

Fermentasie is die metaboliese proses waartydens koolhidrate en verwante verbindings geoksideer word in die afwesigheid van eksterne elektron akseptors met die gepaardgaande vrystelling van energie. Volgens Prescott en Dunn (Jay, 1992) kan daar na die term van fermentasie verwys word as "die proses waarin chemiese veranderinge teweeggebring word in 'n organiese substraat deur die aksie en werking van ensieme wat deur mikroorganismes daargestel word".

#### 1.3.6.2 Mikroorganismes gebruik tydens weifermentasie prosesse

Die behoefte aan 'n proses waardeur die koolhidraatinhoud van wei verlaag kan word, terwyl die proteïeninhoud daarvan verhoog kan word, is wesenlik (Holzapfel, 1966). Dit is bekend dat wei gebruik kan word vir die produksie van enkelselproteïen (Capoor & Singh, 1985; Kuhn & Pretorius, 1988; Sandhu & Waraich, 1983; Willets & Ugalde, 1987). Daarom bestaan die moontlikheid om wei of permeaat se voedingswaarde te verhoog deur die koolhidrate daarin nl. laktose te verbruik as energiebron vir die groei van mikroorganismes wat aanleiding kan gee tot die verhoging in enkelselproteïen. Twee tipes van mikroorganismes kan aangewend word naamlik giste of fungi tydens die fermentasie van wei om aanleiding te gee tot die produksie van enkelselproteïen. Gis- en swamspesies wat goed op wei kan groei volgens literatuur sluit in: *Kluyveromyces marxianus*, *Trichosporon cutaneum*, *Morchella crassipes*, *M. esculenta* en *M. hortensis* asook verskillende *Candida* stamme (Ghaly & Singh, 1989). Tot op hede is die mees aanvaarbare sisteem die gebruik van *Kluyveromyces marxianus* op soet of suur wei in 'n deurlugte tenk (Bernstein et al., 1977; Willets & Ugalde, 1987).

Deur laktose benuttende giste in wei te kweek, kan die hoë laktose inhoud van wei verlaag word en die totale proteïeninhoud terselfdertyd verhoog word deur die produksie van enkelselproteïen (Sandhu & Waraich, 1983).

### 1.3.7 Voorkoms en ekologie van *Kluyveromyces*

Giste kan beskryf word as eensellige fungi in vergelyking met skimmels wat meersellig is, en hul verskil morfologies van bakterieë deur hul groter selgrootte en ovaal, verlengde, sferiese of elliptiese selvorms. Die giste geassosieer met voedsel reproduseer ongeslagtelik deur botselvorming of fusie (Jay, 1992), en geslagtelik deur askospor of basidiospor vorming (Kreger-van Rij, 1984).

*Kluyveromyces* spesies is een van die dominante gis genera teenwoordig in suiwelprodukte, 'n karakteristieke laktose fermenterende gis wat die vermoë het om laktose in suiwelprodukte as energiebron te benut (Fleet & Mian, 1987; Jay, 1992). *K. marxianus* en sekere laktose assimilerende spesies van *Candida* word algemeen in bederfde suiwelprodukte aangetref (Fleet & Mian, 1987; Phaff et al., 1978). *K. marxianus* veroorsaak kaasbederf en word ook gevind in joghurt, roumelk en karringmelk. Aangesien die giste nie deur lae pH waardes beïnvloed word nie, goeie fermenterende eienskappe besit, groei by lae temperature en alkohol produseer word hierdie organismes ook geassosieer met die vervaardiging van Kefir en Kumiss (Jay, 1992; Robinson, 1981). Koolhidrate teenwoordig in die suiwelprodukte word deur *Kluyveromyces* spesies benut (Jay, 1992) wat aanleiding gee tot die produksie van koolstofdiksied en selmassa terwyl lae vlakke van alkohol tydens aërobiese toestande gevind word (Robinson, 1981). Tydens anaërobiese toestande word hoër vlakke van alkohol geproduseer deur middel van fermentasie (Gianetto et al., 1986; Tu et al., 1985; Zakrzewski & Zmarlicki, 1988).

Hierdie askosporvormende giste, gewoonlik een tot vier sferiese askospor per askus (Barnett et al., 1990; Kreger-van Rij, 1984; Lodder, 1970) reproduseer ongeslagtelik deur multilaterale botselvorming terwyl pseudomiselium vorming ook waargeneem word (Jay 1992).

*Kluyveromyces marxianus* is deur Jörgensen in 1909 vir die eerste keer uit Kefir geïsoleer, en hy het dit *Saccharomyces fragilis* genoem. Later is hierdie gis hernoem na *Fabospora fragilis*. Van der Walt het in 1971 die naam *F. fragilis* na *Kluyveromyces fragilis* verander (Phaff, 1985). Phaff (1985) het gevind dat daar 'n 90 tot 100% ooreenkoms tussen *K. fragilis* en *K. marxianus* se DNA samestelling bestaan en verder gevind dat hierdie ooreenkoms ook geld tussen *K. marxianus* en *Kluyveromyces bulgaricus*, *Kluyveromyces cicerisporus* en *Kluyveromyces wikenii*, met *K. marxianus* as verwysingstam. Aangesien *K. marxianus* die oudste naam bekend is, word hoogste prioriteit daaraan verleen, en staan alle bogenoemde stamme nou bekend as *K. marxianus* (Phaff, 1985). *K. marxianus* sluit dus nou ook in *K. fragilis*, *K. lactis*, *K. bulgaricus*, *Saccharomyces lactis*, en *S. fragilis* (Jay, 1992). Dit moet egter in gedagte gehou word dat stamme van *K. fragilis* goeie fermenteerders van laktose is, anders as *K. marxianus* wat laktose baie swak fermenteer (Phaff, 1985). *K. marxianus* is egter volgens die

"Botanical Code" die korrekte naam (Phaff, 1985) en sal tydens hierdie studie gebruik word.

*Kluyveromyces* spesies word gekenmerk deur die vermoë om die ensiem  $\beta$ -galaktosidase te produseer wat 'n rol speel tydens die afbraak van laktose (Jay, 1992). *K. marxianus* word ook gebruik vir laktase produksie vanaf wei en is die organisme van keuse tydens die produksie van biomassa vanaf wei (El-Samragy et al., 1988; Jay, 1992; Moulin et al., 1983; Ozilgen et al., 1988; Sandhu & Waraich, 1983; Willets & Ugalde, 1987).

### 1.3.8 Samestelling van enkelselproteïen produkte

Die doeltreffende produksie van enkelselproteïen in wei is belangrik alhoewel die voedingswaarde daarvan 'n groter rol speel (Fourie, 1967). Volgens Wasserman (1960) is die aminosuursamestelling en vitamieninhoud van *Kluyveromyces fragilis* (nou bekend as *K. marxianus*) behalwe vir 'n hoër lisieninhoud soortgelyk aan die van ander giste. Volgens Wasserman (1961) en Singh & Neelakantan (1989) is daar minder swawelbevattende aminosure in gisproteïene as in bakterieproteïen. Die voordeel van gisproteïen is egter die hoër proteïeninhoud wat hulle 'n natuurlike proteïenkonsentraat maak (Singh en Neelakantan, 1989).

### 1.3.9 Motivering vir projek

Dit is wel die geval dat diere melkpermeaat op plase drink en ons kan hieruit aanneem dat hulle ook weipermeaat kan benut. Volgens Zall & El-Samragy (1988) is daar egter 'n opsie om die voedingswaarde van hierdie weipermeaat te verhoog deur die laktose teenwoordig in permeaat te benut deur fermentasie met selektiewe mikroörganismes en sodoende die enkelselproteïen waarde te verhoog, en dus kan die diere weipermeaat voordeliger benut (Zadow, 1993). Terselfdertyd kan die besoedelingsprobleem wat deur permeaat geskep word as gevolg van 'n hoë laktose inhoud, ook opgelos word.

Die grootste waarde van gisbiomassa is die proteïeninhoud, maar dit besit ook koolhidrate en vette, sowel as vitamien en minerale wat 'n bydrae lewer tot die voedingswaarde van die produk (Zall & El-Samragy, 1988). Weiproteïen, tesame met beskikbare laktose in wei verleen 'n uitstekende veld vir navorsing, wat regoor die wêreld aangegryp word. Die brandstof tekort van die sewentigs en die dreiging van nog so 'n tekort in die 90's noodsaak die gebruik van wei of permeaat tydens fermentasie prosesse vir produksie van alkohole, metaan, organiese sure, enkelselproteïen biomassa en ander

bruikbare produkte. Verskeie giste is reeds aanvaar as voedselprodukt vir die mens en dier en tesame met die feit dat giste eenvoudige voedingsbehoefte het (Marx, 1989), hulle vinnige vermeerdering in vergelyking met skimmels (Holzapfel, 1966) en bowenal dat die aminosuursamestelling van sekere giste goed vergelyk met die van die belangrikste proteienryke voedsels (Sandhu & Waraich, 1983) dui alles daarop dat die gebruik van giste as bron van enkelsel-proteien 'n baie sterk oorweging behoort te geniet vir die produksie van proteien.

Uit voorafgaande gegewens blyk dit duidelik dat die voedingswaarde van die giste wat in wei gekweek is, goed vergelyk met die van ander proteienbevattende voedsels en dat mens en dier die gis-enkelselproteïene doeltreffend kan benut. Die aanname skyn dus geregverdig te wees, dat gisproteïene voordelig benut kan word.



#### 1.4 VERWYSINGS

- BARNETT, J.A., PAYNE, R.W. & YARROW, D. (1990) Yeasts: Characteristics and identification, 2nd edition. Cambridge University Press, Cambridge.
- BERNSTEIN, S., TZENG, C.H. & SISSON D. (1977) The commercial fermentation of cheese whey for the production of protein and/or alcohol. *Biotech. Bioengin. Symp.*, 7: 1-9.
- CAPOOR, A.K. & SINGH, K (1985) Fermentation of whey by lactose utilizing yeast for SCP production and BOD reduction. *Indian J. Dairy Sci.*, 38, 1: 15-16
- CHARALAMBOUS, G. (1993) Food flavors, ingredients and composition. Elseviers Science Publishers.
- COTON, G. (1987) Trends in utilization of whey and whey derivatives. *Bulltetin of the IDF* 233: 3.
- DE HAAST, J. (1985) Fixed film anaerobic digestion of cheese whey. PhD - thesis. University of the Orange Free State, Bloemfontein.
- DE HAAST, J., LAUBSCHER, J.M. & VAN RENSBURG, J.J. (1987) Die benutting van wei onder Suid-Afrikaanse toestande. *S. Afr. J. Dairy Sci.* 19, 2: 57-61.
- EL-SAMRAGY, Y.A., CHEN, J.H. & ZALL, R.R. (1988) Amino acid and mineral profile of yeast biomass produced from fermentation of cheddar whey permeate. *Process Biochem.*, February: 1135-1140.
- FLEET, G.H. & MIAN, M.A. (1987) The occurrence and growth of yeasts in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.*, 4: 145-155.
- FOURIE, K.H. (1967) Die invloed van verskeie faktore op die groei van *Kluyveromyces fragilis* en *K. lactis* in kaaswei. Ter vervulling van die vereistes vir die Graad Magister Scientiae Agriculturae in die Departement Suiwelwetenskap, Universiteit van die Oranje Vrystaat, Bloemfontein.

- GALESLOOT, T.E. & TINBERGEN B.J. (1985) Milk proteins '84. Proceedings of the international congress on milk proteins. Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen.
- GHALY, A.E. & SINGH, R.K. (1989) Pollution potential reduction of cheese whey through yeast fermentation. *Appl. Biochem. and Biotech.*, 22: 181-203.
- GIANETTO, A., BERRUTI, F., GLICK, B.R. & KEMPTON, A.G. (1986) The production of ethanol from lactose in a tubular reactor by immobilized cells of *Kluyveromyces fragilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24: 277-281.
- GOLDBERG, I. (1985) Single Cell Protein. Biotechnology Monographs Volume 1. Springer-Verlag, Berlin.
- HAYES, S. (1985) New ways with whey. *Nutr. Food Sci.*, November: 5-7.
- HOLSINGER, V.H., POSATI, L.P. & DeVILBISS E.D (1974) Whey beverages: A Review. *J. Dairy Sci.*, 57, 8: 849-859.
- HOLZAPFEL, W.H. (1966) Die verryking van kaaswei met behulp van *Saccharomyces fragilis* en ander gisisolate. Ter vervulling van die vereistes vir die Graad Magister Scientiae Agriculturae in die Departement Suiwelwetenskap, Universiteit van die Oranje Vrystaat, Bloemfontein.
- HORN, C.H. (1990) Characterization of an amylolytic *occidentalis* mutant in relation to ethanol and protein production from grain sorghum. Submitted in fulfilment of the degree Philosophiae Doctor in the Department of Microbiology and Biochemistry, Faculty of Science, University of the Orange Free State, Bloemfontein.
- HUDSON, B.J.F. (1983) Developments in food proteins, vol. II. Applied Science Publishers, London.
- JANSSENS, J.H. BERNARD, A. & BAILEY, R.B. (1983) Ethanol from whey: continuous fermentation with cell recycle. *Biotech. and Bioengin.*, 26: 001-005.
- JAY, J.M. (1992) Modern Food Microbiology. Fourth Edition. Van Nostrand Reinhold, New York.

- JOHNSON, J.C. (1977) Yeasts for food and other purposes. *Food Technology Review* no. 45. Noyes Data Corporation New Jersey.
- KIRKPATRICK, K.J. (1971) Marketable products from whey. *New Zealand J. Dairy Sci. and Technol.*, 6: 89-90.
- KOSIKOWSKI, F.V. (1979) Whey utilization and whey products. *J. Dairy Sci.* 62: 1149-1160.
- KREGER-VAN RIJ, N.J.W. (ed.) (1984) *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 3rd ed. Elsevier, Amsterdam.
- KÜHN A.L. & PRETORIUS, W.A. (1988) Use of crossflow-microscreen technique for SCP production from dilute substrates. *Appl. Microbiol. Biotech.*, 27: 593-600.
- KURMANN, J.A., RASIC, J.L. & KROGER, M. (1992) *Encyclopedia of fermented fresh milk products*, 1st ed. Van Nostrand Reinhold Publishers, New York.
- LEDWARD, D.A., TAYLOR, A.J. & LAWRIE, R.A. (1983) *Upgrading waste for feeds and foods*. Butterworths London.
- LEE, D.A., BOXER, S., AND PALLANSCH, M. (1974) Whey recovery: New ways to profits. *Food Engin.*, May: 96-99.
- LODDER, J. (1970) *The Yeasts*. North-Holland Publishing Company, London.
- MAHMOUD, M. (1990) Recombination of milk and milk products. *Subject 3.15*: 346-350.
- MANN, E.J. (1975) Whey utilization. *Dairy Indust.*, December: 487-488.
- MARWAHA, S.S. & KENNEDY, J.F. (1988) Whey pollution problem and potential utilization. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 23: 323-336.
- MARX, J.L., (1989) *A revolution in biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge.

- MATELES, R.I. & TANNENBAUM, R.S. (1971) *Single-Cell Protein*. The M.I.T. Press, Massachusetts Institute of Technology. Cambridge, Massachusetts and London, England.
- MORR, C.C. & MELACHOURIS, N. (1984) Symposium: Production and utilization of whey and whey components. *J. Dairy Science*. 67, (11).
- MOULIN, G., LEGRAND, M. & GALZY, P. (1983) The importance of residual aerobic fermentation in aerated medium for the production of yeast from glucidic substrates. *Process Biochem.*, October: 5-8.
- OZILGEN, M., OLLIS, D.F. & OGRYDZIAK, D. (1988) Kinetics of batch fermentations with *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 10, March: 165-172.
- PHAFF, H.J., MILLER, M.W. & MRAK, E.M. (1978) *The life of yeasts*. 2nd edition. Harvard University Press.
- PHAFF, H.J. (1985) Biology of yeasts other than *Saccharomyces*. In "Biology of Industrial Microorganisms" (A.L. Demain & N.A. Sollomon eds.) The Benjamin Publishing Company, Inc., London. pp. 537-563.
- POTGIETER, A.P. (1988) A study of factors influencing the performance of the ammonium bicarbonate process for the demineralization of cheese whey. Submitted in fulfilment of the requirements of the degree of Magister Scientiae Agriculturae in the Department of Food Science, University of the Orange Free State, Bloemfontein.
- ROBINSON, R.K. (1981) *The microbiology of milk*. vol. 1. Applied Science Publishers London.
- ROBINSON, C.H. (1986) *Fundamentals of Normal Nutrition*. 3rd edition. Macmillan Publishing Co., Inc., New York.

- SADLER, R. (1992) The benefits of dietary whey protein concentrate on the immune response and health. *S. Afr. J. Dairy Sci.*, 24, 2: 53-59.
- SANDERSON, W.B. (1973) Research into whey utilization. Proceedings of the Pollution Research Conference.
- SANDHU, D.K. & WARAICH, M.K. (1983) Conversion of cheese whey to single-cell protein. *Biotech. and Bioengin.*, XXV: 797-808.
- SINGH, V., HSU, C.C. & TZENG, C.H. (1983) Fermentation processes for dilute food and dairy wastes. *Proc. Biochem.*, March/April: 13-25.
- SINGH, K & NEELAKANTAN S. (1989) Amino acid composition of yeast single cell protein grown on paneer whey. *J. Dairy Res.*, 56: 813-815 .
- SMITH, J.E. (1988) *Biotechnology*. 2nd edition. Edward Arnold, London.
- TU, C.W. , JAYANATA, Y. & BAJPAI, R. (1985) Factors affecting ethanol production from cheese whey. *Biotech. and Bioengin. Symp.*, no. 15: 295-305.
- WASSERMAN, A.E. (1960) Whey utilization IV. Availability of whey for the growth of *Saccharomyces fragilis*. *J. Dairy Sci.*, 43: 1231-1234.
- WASSERMAN, A.E. (1961) Amino acid and vitamin composition of *Saccharomyces fragilis* grown in whey. *J. Dairy Sci.*, 44: 387-392.
- WILLETS, A. & UGALDE, U (1987) The production of single-cell protein from whey. *Biotech. Letters.*, 9, 11: 795-800.
- ZADOW, J.G. (1988) Fermentation of whey and permeate. *Bulletin of the IDF*, 233: 53-60.
- ZADOW, J.G. (1993) *Whey and lactose processing*. Applied Science Publishers, London.
- ZAKRZEWSKI E. & ZMARLICKI, S. (1988) Ethanolic fermentation in whey and whey-molasses mixtures. *Milchwissenschaft*, 43, 7: 435-437..

ZALL, R.R. & EL-SAMRAGY, Y.Y. (1988) Utilization of salt whey for the production of yeast protein. *Cult. Dairy Prod. J.*, 23: 28-31.

ZERTUCHE, L. & ZALL, R.R. (1985) Optimizing alcohol production from whey using computer technology. *Biotech. and Bioengin.*, 27: 547-554.

## HOOFSTUK 2

### SAMESTELLING VAN WEI

## 2.1 UITTREKSEL

Tydens hierdie studie is sewe kritiese monsternemingspunte geïdentifiseer om die verandering in weisamestelling vanaf kaasprosessering tot die voeding van varke te monitor. Mikrobiologiese en chemiese analyses is uitgevoer oor 'n periode van 12 ure. Hiervolgens kon die kwaliteit van die wei bepaal word wat daaglik aan die varke as voeding voorsien word. Die mikrobiologiese analyses het getoon dat hoewel suurselbakterieë en ander kontaminerende bakterieë oorwegend in hoër getalle voorgekom het, giste ook 'n rol gespeel het tot die bydrae van metaboliet benutting en proteïenkwaliteit. Data verkry het verder getoon dat wei 'n variërende media is wat wel aan alle voedingstofbehoefes vir die groei van mikroorganismes voldoen.

## 2.2 INLEIDING

Voedsel verskaf beide die energie vir die liggaam se funksies sowel as die boustene vir groei en onderhoud. Selfs vir die volwasse soogdier soos die vark, is daar 'n behoefte vir energie om die liggaam te onderhou deur die voorsiening van belangrike komponente wat daaglik vervang moet word. Die voedselwetenskaplike moet dus altyd die voedingswaarde van enige voedselproduk in twee aspekte beskou: a) watter voedingseienskappe besit die voedsel en wat is die behoefte vir die eienskappe vir liggaamlike gebruik en b) die stabiliteit van die voedingseienskappe en hoe word dit geaffekteer deur voedselprosessering, opbergingtydperk en voorbereiding (Jay, 1992).

Die wetenskap van voeding, geassosieer met die wye areas, sluit egter ook die fisiologiese en biochemiese fenomene van voedselverbruiking in ten opsigte van gesondheid (Potter & Hotchkiss, 1995). Die voedingswaarde van voedsel, soos benodig in gebalanseerde hoeveelhede om te voorsien in liggaamlike gesondheid, hang af van die hoeveelheid koolhidrate, proteïene, vette, vitamienes en minerale teenwoordig (Ronsivalli & Vieira, 1992). Dus was dit vir ons belangrik om tydens hierdie studie die verandering in weisamestelling te monitor om die voedingswaarde te bepaal wat uiteindelik deur die vark verbruik word. Ten einde die kwaliteit en higiëne te monitor, moet die mikrobiologiese samestelling van die verskillende monsters ook geëvalueer word.



## 2.3 METODIEK

### 2.3.1 Monsternemingspunte:

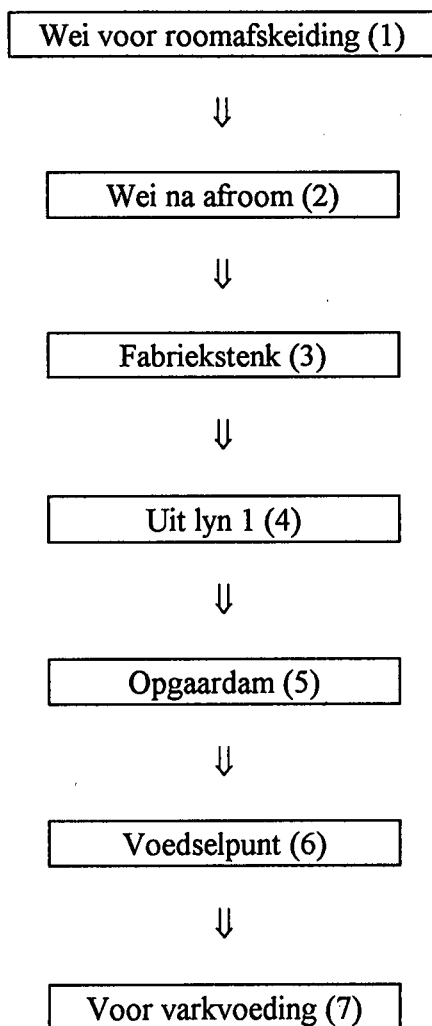
Sewe monsternemingspunte is geïdentifiseer volgens 'n kritiese plan soos skematies aangedui in Diagram 2.1. Punt 1 word geïdentifiseer as die punt net voordat wei afgeroom word. Punt 2 is nadat alle room vanuit die wei verwyder is deur 'n roomafskeier en Punt 3 is die fabriekstenk waar alle afgeroomde wei vir die dag opgevang word alvorens dit in die middag na die boer se plaas gepomp word. Punt 4 bestaan uit 'n pyplyn ongeveer 5-6km lank ondergronds, vanaf die fabriekstenk tot by die boer. Hierdie pyplyn word nooit skoongemaak nie. Punt 5 is een van die twee opgaardamme op die plaas waaruit varke gevoed word. Punt 6 is die voedselpunt waar wei in krippe getap word net voor dit na punt 7, dit is in die vark se bak gaan. Honderd- -en-vyftig ml monster is in duplikaat in steriele Schott-bottels geneem by elk van die monsternemingspunte. Monsters is geseël en bewaar in 'n koelhouer gevul met ys en so spoedig moontlik na die laboratorium vervoer vir verdere mikrobiologiese ontledings (Tabel 2.1).

### 2.3.2 Monsternemingprosedure:

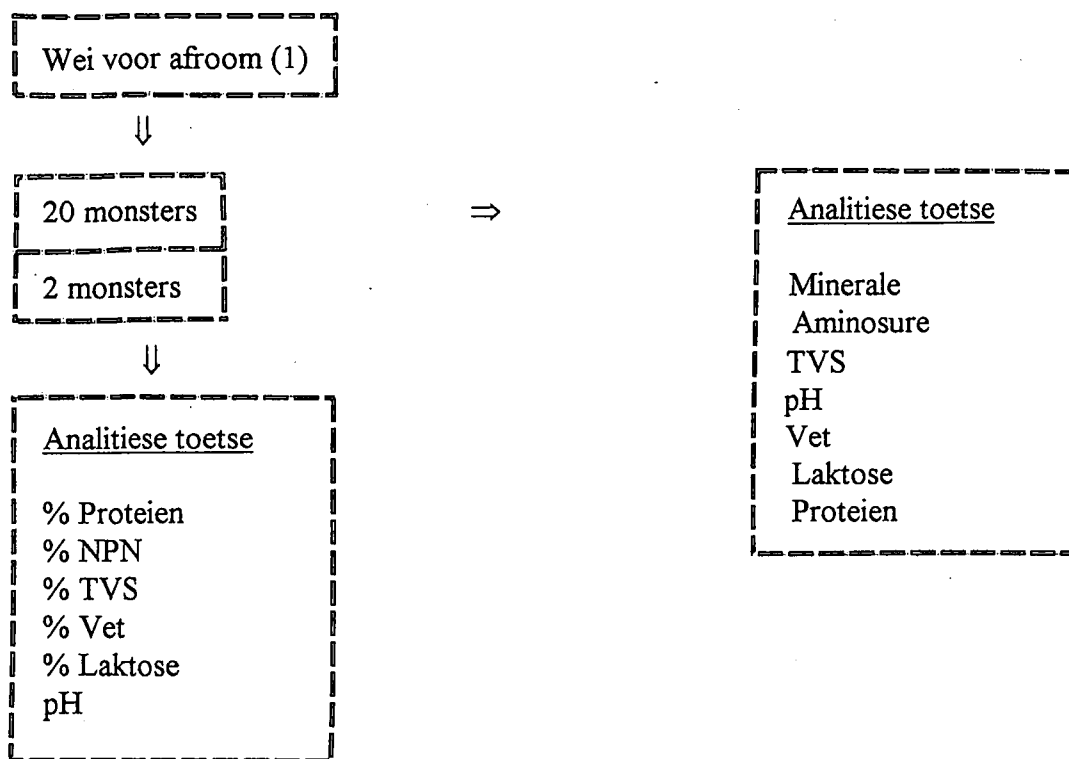
Die verandering in chemiesesamestelling van die wei net voor wei afroming (punt 1 volgens skematiese voorstelling Diagram 2.2) is oor 'n tydperk van 600 min uitgevoer. Twintig verteenwoordigende monsters is elke 30 min in steriele McCartney bottels uit die pyplyn na roomafskeier geneem en gevries tot verdere ontleding (Tabel 2.2). Die verandering in weisamestelling is herhaal deur 10ml weimonsters in duplikaat elke 30 min asepties te onttrek vir 'n periode van 12 uur. Die weimonsters geneem tydens die 12 uur periode is gegooi in 'n 11 steriele Schott-bottel en die gemiddelde biochemiese waardes oor die tydperk bepaal (Tabel 2.3). Tydens beide ondersoeke is pH, laktose%, proteïen%, vet%, totale vastestowwe, asook mineraal en aminosuursamestelling ontledings op die verskillende monsters uitgevoer (Diagram 2.2).

**Diagram 2.1:**

Diagrammatiese voorstelling van die sewe weimonsternemings punte direk na weiprossering tot voor varkvoeding.



**Diagram 2.2:** Diagramatiese voorstelling van die verandering in chemiesamestelling van wei net voor weiafrooming.



**Tabel 2.1:** Kultuurmedia, temperatuur en tyd van inkubasie vir die mikrobiologiese analise van weimonsters.

| ISOLASIE             | INKUBASIE |         | GROEIMEDIA                        |
|----------------------|-----------|---------|-----------------------------------|
|                      | Tyd (ure) | Temp °C |                                   |
| 1) giste             | 120       | 25 °C   | YGC (Merck, FIL-IDF)              |
| 2) giste en skimmels | 120       | 25 °C   | PDA (Oxoid, Basingstoke, England) |
| 3) laktobacillus     | 48        | 25 °C   | MRS (Merck, FIL-IDF)              |
| 4) laktococci        | 48        | 25 °C   | M17 (Oxoid, Basingstoke)          |
| 5) totale telling    | 72        | 25 °C   | PCA (Oxoid, Basingstoke)          |

### 2.3.3 Weimonster ontledings

#### 2.3.3.1 Mikrobiologiese samestelling

Twintig ml verteenwoordigende weimonster is geneem by elke kritiese monsternemingspunt (Diagram 2.1) en bygevoeg by 180ml steriele peptonwater. Tienvoudige verdunnings is uitgevoer in peptonwater en in duplikaat uitgeplaat volgens die spreiplaat metode op vyf verskillende media (Tabel 2.1). Alle plate is aërobies geïnkubeer, behalwe MRS en M17 plate wat in 'n anaërobiese fles geïnkubeer is wat ontgas is met Anaerocult A (Oxoid).

Monster analise: Plate bevattende mikrobiologiese kolonies tussen 30 tot 300 KVE (of die hoogste telling indien laer as 30) is getel en die gemiddelde telling bepaal vanaf duplikaat plate (Figuur 2.1)

#### 2.3.3.2 pH

Die pH van die verskillende monsters is bepaal deur middel van 'n elektroniese pH-elektrode met 'n akkuraatheid van 0.01 oor die reeks van 0 tot 14 (HI 9321, Microprocessor) (Fig 2.1).

#### 2.3.3.3 Proteïen

Proteïeninhoud is bepaal deur die Kjeldahlmetode volgens die AOAC (1990). 'n Omskakelingsfaktor van 6.38 is gebruik om totale stikstof na proteïeninhoud om te skakel (Fig 2.2).

#### 2.3.3.4 Laktose

Om laktose te bepaal is wei in Eppendorfbuise vir 5 min by 5000 g gesentrifugeer. Daarna is die bovloeistof onttrek en deur 'n 0.20 µm filter gespuit. Laktose is bepaal met behulp van 'n hoëdrukvlloeistofchromatograaf toegerus met 'n refraksie indeks detektor (Water Associates) deur gebruik te maak van 'n Bio-Rad Aminex HPX-87c kolom by 85 °C met dubbel gedistilleerde, gedeïoniseerde, ontgasde, gefiltreerde water as loopvlloeistof. Die water in die opgaartenk is konstant gehou by 80 °C. 'n 2% m/v laktose-oplossing is as interne standaard gebruik tydens die kalibrering (Fig 2.2) (Vanderzant & Splittstoesser, 1992).

### 2.3.3.5 Vetinhoud

Vetinhoud is bepaal deur middel van die gravimetriese metode (IDF, 22A:1983) en is uitgedruk as 'n persentasie van die droë massa (Tabel 2.2 en 2.3).

### 2.3.3.6 Totale vastestofinhoud

Die totale vastestofinhoud in wei is bepaal volgens die IDF (21A:1982) se verwysingsmetode. Weimonsters is vooraf verhit vanaf 20 °C tot 40 °C en daarna weer afgekoel tot 20 °C. 3g monster is in voorafgedroogde porselein bakkies gepipeteer en op 'n waterbad vir 30 min geplaas. Daarna is bakkies in 'n droogoond by 102 °C oornag geplaas en geweeg tot 'n konstante massa verkry is (Tabel 2.2 en 2.3).

### 2.3.3.7 Minerale

Minerale is bepaal op 'n Varian Spectr AA-300 Atoomabsorpsie spektrometer. Monsters en standaarde is voorberei soos in literatuur aangegee (Firman, 1965; Halls & Townshend, 1966; Ramakrishna et al., 1968) (Tabel 2.4 en 2.5).

### 2.3.3.8 Aminosuur inhoud

Die standaard aminosuur metode is gebruik vir aminosuurontledings (Martini & Martini, 1976) (Tabel 2.6).

## 2.4 RESULTATE EN BESPREKING

Die verandering in weisamestelling direk na prosessering tot en met varkvoeding is gemonitor om verandering wat daar in weisamestelling in 'n kaasfabriek voorkom oor 'n gegewe tydperk aan te toon, sowel as die uiteindelijke mikrobiologiese en chemiese samestelling van die wei te bepaal soos dit toegedien word vir varkvoeding.

Sewe monsternemingspunte is geïdentifiseer soos geïllustreer in die skematiese voorstelling direk na die prosessering van wei (Diagram 2.1). Op grond van die data verkry uit die ontleding van monsters geneem by hierdie monsternemingspunte was dit

moontlik om aan te toon die verandering van weisamestelling direk na weiprosessering tot en met voeding. Die eerste monsternemingspunt is geïdentifiseer as die punt na kaasprosessering en afskeiding van wei, maar voor afroming. By hierdie monsternemingspunt is die volgende data versamel:

Monsters is geneem elke 30 min om die verandering in weisamestelling te bepaal voor afroming. Die verandering in weisamestelling sou verwag word, aangesien verskillende tipes en lotte kaas in die periode van 600 min vervaardig word. Volgens die data (Tabel 2.2) is dit duidelik dat die pH waardes min varieer in die 600 min monsternemingstydperk. Die hoogste pH waarde was 6.60 terwyl die pH tot die laagste vlak van 6.34 gedaal het na 600 min. 'n Groot variasie in laktoseinhoud met die hoogste waarde 4.9% en die laagste waarde 0.1%, is opmerklik volgens die data in Tabel 2.2. Die variasie kan toegeskryf word aan die verskil in melkkwaliteit oorspronklik gebruik vir elke produksie van kaas. Verder sal die laktoseinhoud ook varieer a.g.v. verskillende tipes kase wat gemaak is in dieselfde dag, wat kan lei tot veranderende laktose benutting deur die verskillende suurselkulture gebruik. Die tyd van stremming, sal ook 'n verandering in laktoseinhoud teweegbring. Dit is veral die kwaliteit van melk en die aktiwiteit van die suurselkulture wat 'n invloed sal hê op die tyd van stremming.

Die laktoseinhoud gemiddelde is bereken as 3.0095% wat laer is as die gemiddeld van 4.7% volgens literatuur voedingstabelle (Scherz & Senser, 1989). Die gemiddelde laktose inhoud van die monsters wat saamgevoeg is oor 'n periode van 12 uur, het 'n waarde gelewer van 3.32% en 3.54% (Tabel 2.3).

Die proteïen, vet en totale vastestowwe se waarde is ook bepaal om die aanvanklike samestelling van die wei te ondersoek. Die gemiddelde proteïeninhoud van die weimonsters geneem oor 600 min is bereken as 0.5515% wat laer is as die 0.6-0.8% gemiddelde proteïeninhoud deur literatuur aangegee (Hayes, 1985; Kosikowski, 1979; Scherz & Senser, 1989). 'n Maksimum van 0.85% en minimum van 0.29% proteïen is verkry (Tabel 2.2). Die proteïeninhoud het gevarieer as gevolg van die verskil in tyd wanneer die kaasbaddens se wei uitgepomp is en die weiproteïen samestellings kan ook varieer as gevolg van die verskillende lotte roumelk wat ontvang is. Wanneer al die monsters bymekaar gevoeg is oor 'n periode van 12 uur is gemiddelde proteïenwaardes van 0.3742 en 0.4124% verkry (Tabel 2.3).

Die gemiddelde vetinhoud van die wei tydens die monsterneming oor 600 min is 0.0372% (Tabel 2.2) volgens hierdie bepaling wat laer is as die 0.06 tot 0.8%, met 'n gemiddelde waarde van 0.24% volgens literatuur (Hayes, 1985; Holsinger, 1983; Scherz & Senser, 1989; Zadow, 1993).

**Tabel 2.2:** Die verandering in weisamestelling oor 'n periode van 600 min direk na kaasprosessering.

| Monster    | Tyd (min) | pH           | Laktose<br>%  | Proteien<br>% | Vet<br>%      | Totale<br>vastestowwe |
|------------|-----------|--------------|---------------|---------------|---------------|-----------------------|
| 0          | 0         | 6.55         | 4.6           | 0.85          | 0.1580        | 4.0979                |
| 1          | 30        | 6.54         | 4.2           | 0.84          | 0.0430        | 3.9573                |
| 3          | 60        | 6.56         | 3.9           | 0.64          | 0.0350        | 3.3343                |
| 4          | 90        | 6.57         | 3.2           | 0.48          | 0.0250        | 2.5781                |
| 5          | 120       | 6.48         | 3.1           | 0.50          | 0.0215        | 2.7045                |
| 6          | 150       | 6.49         | 3.0           | 0.47          | 0.0195        | 2.8137                |
| 7          | 180       | 6.51         | 3.0           | 0.51          | 0.0265        | 2.6132                |
| 8          | 210       | 6.55         | 3.5           | 0.51          | 0.0345        | 2.9195                |
| 9          | 240       | 6.46         | 1.4           | 0.34          | 0.0210        | 1.0441                |
| 10         | 300       | 6.49         | 1.1           | 0.34          | 0.0190        | 1.1088                |
| 11         | 330       | 6.60         | 0.1           | 0.29          | 0.0110        | 8.1661                |
| 12         | 360       | 6.42         | 4.9           | 0.83          | 0.0460        | 4.6901                |
| 13         | 390       | 6.50         | 2.9           | 0.55          | 0.0570        | 3.0174                |
| 14         | 420       | 6.47         | 4.6           | 0.74          | 0.0610        | 5.0016                |
| 15         | 450       | 6.48         | 4.7           | 0.76          | 0.0720        | 5.0089                |
| 16         | 480       | 6.44         | 2.7           | 0.47          | 0.0280        | 2.6589                |
| 17         | 510       | 6.41         | 2.7           | 0.37          | 0.500         | 2.7679                |
| 18         | 540       | 6.45         | 3.3           | 0.47          | 0.275         | 2.9548                |
| 19         | 570       | 6.49         | 2.7           | 0.47          | 0.400         | 3.5285                |
| 20         | 600       | 6.34         | 3.6           | 0.60          | 0.0485        | 3.4126                |
| <b>Gem</b> |           | <b>6.49</b>  | <b>3.16</b>   | <b>0.5515</b> | <b>0.0372</b> | <b>3.4189</b>         |
| <b>SD</b>  |           | <b>0.062</b> | <b>1.2348</b> | <b>0.1728</b> | <b>0.0167</b> | <b>1.5354</b>         |

(Monster 0 - 20 is die verteenwoordigende monsters wat elke 30 min uit die pyplyn geneem is)



**Tabel 2.3:** Die gemiddelde weisamestelling van monsters geneem oor 'n periode van 12 uur direk na kaasprosessering.

|                        | Monster 1 | Monster 2 |
|------------------------|-----------|-----------|
| pH                     | 4.75      | 4.68      |
| vet (%)                | 0.069     | 0.0725    |
| laktose (%)            | 3.32      | 3.54      |
| totale N (%)           | 0.6299    | 0.6569    |
| proteien (%)           | 0.3742    | 0.4124    |
| NPN (%)                | 0.0407    | 0.03833   |
| totale vastestowwe (%) | 4.9759    | 5.2484    |

(Monster 1 en 2 is op twee verskillende dae geneem)

Die totale vastestofinhoud is ook laer as die gemiddelde wat in literatuur aangegee word. Die gemiddelde waarde wat verkry is, is 3.4189% teenoor die 6% wat in literatuur aangegee word (Hayes, 1985; Holsinger, 1983; Kosikowski, 1979). Waardes het gewissel van maksimum 8.1661% tot 'n minimum van 1.0441%.

Atoom absorpsie spektrometrie is die metode wat die algemeenste toegepas word vir die bepaling van minerale (Harper, 1975), en was die metode van keuse tydens hierdie studie. Giste benodig sekere minerale verbindings wat as funksionele komponente van proteïene dien, as aktiveerders vir ensieme of as stabiliseerders vir proteïene. Sommige minerale kan die groei van giste stimuleer, terwyl ander teenwoordig teen hoë konsentrasies groei kan inhibeer (Morris, 1958). Die data word aangedui in Tabel 2.4.

Volgens Olson & Johnson (Suomalainen & Oura, 1971) is koper in lae konsentrasies nodig vir die groei van giste. 'n Gemiddelde waarde van 0.015 mg koper/100ml is tydens die studie verkry in die verskillende weimonsters. Geen konsentrasie waarde vir koper in wei word in die voedingswaarde tabelle aangegee nie, en ons kan dus aanvaar dat die konsentrasie koper in wei baie laag is, en dus geen noemenswaardige rol tydens die groei en fermentasie van giste in wei sal speel nie. Klein hoeveelhede van yster is ook noodsaaklik vir die groei van giste (Suomalainen & Oura, 1971). 'n Gemiddelde waarde van 0.01mg yster/100ml is in die weimonsters gevind. 'n Gemiddelde waarde van 0.1mg/100ml monster word in die voedingstabelle aangegee (Scherz & Senser, 1989). Die waarde verkry tydens die studie is dus laer as die gemiddeldes aangegee in literatuur. Volgens McHargue & Calfee (Suomalainen & Oura, 1971), kan die byvoeging van sink tot 'n medium fermentasie aanhelp. Verder word die opname van sink deur temperatuur en konsentrasie van koper beïnvloed (Suomalainen & Oura, 1971). 'n Gemiddelde waarde van 0.265 mg sink/100ml is in die verskillende weimonsters gevind. Volgens die voedingswaarde tabelle kan sink konsentrasies in weimonsters van 0.05 tot 0.2 mg/100g monster varieer (Scherz & Senser, 1989). Resultate verkry stem dus ooreen met literatuur. Mangaan kan die groei van giste stimuleer teen lae konsentrasies maar kan toksies wees in groter hoeveelhede (Rose & Harrison, 1971). In teenstelling hiermee het Olson & Johnson (Suomalainen & Oura, 1971) bevind dat mangaan geen invloed op die groei van giste het nie. Tydens hierdie studie is geen mangaan in enige van die monsters gevind nie. Geen waardes vir mangaan in wei kon in literatuur gevind word nie, en kan ons dus aanneem dat daar baie lae of selfs geen vlakke van mangaan in wei voorkom nie.

**Tabel 2.4:** Die mineralesamestelling van wei oor 'n periode van 600 min direk na kaasprosessering

| Monster | Cu    | Fe   | Zn    | Mn  | Ca    | K      | Mg    | Na     | Cr    | Ni   | Cd  | Pb    |
|---------|-------|------|-------|-----|-------|--------|-------|--------|-------|------|-----|-------|
| 0       | 0.0   | 0.0  | 0.2   | 0.0 | 36.8  | 140.0  | 5.9   | 46.0   | 0.2   | 0.1  | 0.1 | 0.5   |
| 1       | 0.0   | 0.0  | 0.3   | 0.0 | 36.2  | 136.7  | 5.6   | 44.7   | 0.1   | 0.0  | 0.1 | 0.5   |
| 3       | 0.0   | 0.0  | 0.2   | 0.0 | 34.5  | 106.8  | 5.5   | 39.0   | 0.4   | 0.0  | 0.1 | 0.5   |
| 4       | 0.0   | 0.0  | 0.3   | 0.0 | 33.0  | 78.1   | 4.2   | 28.2   | 0.4   | 0.1  | 0.1 | 0.7   |
| 5       | 0.1   | 0.0  | 0.3   | 0.0 | 32.1  | 86.0   | 4.4   | 29.8   | 0.7   | 0.1  | 0.1 | 0.7   |
| 6       | 0.0   | 1.0  | 0.3   | 0.0 | 32.4  | 83.2   | 4.4   | 29.9   | 0.3   | 0.0  | 0.1 | 0.7   |
| 7       | 0.0   | 0.0  | 0.3   | 0.0 | 32.3  | 81.5   | 4.3   | 29.8   | 0.4   | 0.0  | 0.1 | 0.7   |
| 8       | 0.0   | 1.0  | 0.3   | 0.0 | 30.7  | 91.9   | 4.2   | 30.7   | 0.1   | 0.1  | 0.1 | 0.6   |
| 9       | 0.0   | 0.0  | 0.3   | 0.0 | 28.0  | 59.5   | 3.5   | 20.9   | 0.0   | 0.1  | 0.1 | 0.6   |
| 10      | 0.0   | 0.0  | 0.2   | 0.0 | 28.9  | 57.9   | 3.9   | 22.4   | 0.6   | 0.1  | 0.1 | 0.6   |
| 11      | 0.0   | 0.0  | 0.2   | 0.0 | 27.7  | 54.2   | 3.3   | 18.5   | 0.8   | 0.1  | 0.1 | 0.7   |
| 12      | 0.0   | 0.0  | 0.3   | 0.0 | 37.3  | 139.3  | 5.5   | 41.4   | 0.2   | 0.1  | 0.1 | 0.6   |
| 13      | 0.1   | 0.0  | 0.3   | 0.0 | 34.4  | 90.7   | 4.4   | 30.1   | 0.3   | 0.2  | 0.1 | 0.5   |
| 14      | 0.0   | 0.0  | 0.2   | 0.0 | 33.7  | 119.5  | 4.8   | 41.3   | 0.4   | 0.1  | 0.1 | 0.4   |
| 15      | 0.0   | 0.0  | 0.2   | 0.0 | 35.6  | 128.3  | 5.5   | 41.7   | 0.0   | 0.1  | 0.1 | 0.3   |
| 16      | 0.0   | 0.0  | 0.3   | 0.0 | 32.0  | 88.8   | 4.2   | 29.6   | 0.2   | 0.1  | 0.1 | 0.3   |
| 17      | 0.0   | 0.0  | 0.3   | 0.0 | 30.6  | 78.4   | 4.1   | 29.4   | 0.4   | 0.2  | 0.1 | 0.2   |
| 18      | 0.0   | 0.0  | 0.2   | 0.0 | 41.5  | 76.4   | 4.4   | 30.3   | 0.5   | 0.1  | 0.1 | 0.2   |
| 19      | 0.1   | 0.0  | 0.3   | 0.0 | 38.4  | 92.7   | 4.5   | 32.4   | 0.0   | 0.0  | 0.1 | 0.2   |
| 20      | 0.0   | 0.0  | 0.3   | 0.0 | 34.1  | 97.4   | 4.7   | 35.0   | 0.4   | 0.2  | 0.1 | 0.4   |
| Gem     | 0.015 | 0.01 | 0.265 | 0.0 | 33.52 | 94.365 | 4.565 | 32.555 | 0.32  | 0.09 | 0.1 | 0.495 |
| SD      | 0.037 | 0.03 | 0.049 | 0.0 | 3.514 | 26.413 | 0.708 | 7.6951 | 0.226 | 0.06 | 0.0 | 0.179 |

(Monster 0 - 20 is die verteenwoordigende monsters wat elke 30 min uit die pyplyn geneem is.)

Alhoewel kalsium nie essensieel vir die groei van gisselle is nie, stimuleer dit wel groei en fermentasie (Morris, 1958). Atkin en Gray (Suomalainen & Oura, 1971) het bevind dat in die afwesigheid van magnesium, kalsium nie die fermentasie tempo beïnvloed het nie, hulle het verder ook 'n mate van interverwantskap tussen kalsium en magnesium gevind. Volgens Thorne (Suomalainen & Oura, 1971), oefen kalsium 'n klein depressante effek op die tempo van fermentasie uit. 'n Gemiddelde waarde van 33.52mg kalsium/100ml is in die weimonsters gevind, terwyl 'n gemiddeld van 67.9mg/100g monster wei met 'n variasie van 51 tot 99mg/100g in literatuur aangegee word (Scherz & Sencer, 1989). Kalium is nodig vir die groei van giste en vir fermentasie. Fermenterende giste absorbeer twee keer soveel kalium as respirerende giste (Rose & Harrison, 1971). Hoë vlakke van kalium is in die weimonsters gevind met 'n variasie van 54.2 tot 140 mg/100ml monster, en 'n gemiddelde waarde van 94.365mg/100ml monster. Volgens literatuur kan 'n gemiddelde waarde van 129 mg/100g monster met 'n variasie van 110 tot 147 mg/100g monster verwag word. Lood oefen geen invloed op giste tydens fermentasie nie, selfs teen groot konsentrasies teenwoordig (Rose & Harrison, 1971). 'n Gemiddelde waarde van 0.4952 mg lood/100ml is in die onderskeie monsters gevind. Geen konsentrasie waardes vir lood word in literatuur aangegee nie, en kan ons dus aanneem dat lood teen lae vlakke in wei voorkom, en dus geen noemenswaardige rol tydens fermentasie sal speel nie. Natrium is nodig vir die groei van giste en het geen toksiese effekte nie (Rose & Harrison, 1971). 'n Gemiddelde waarde van 32,555mg/100ml monster is tydens hierdie bepaling verkry.

Minerale wat toksies is en groei totaal inhibeer indien dit teen konsentrasies tussen 0.4-10 d.p.m aangetref word, sluit in: kadmium, koper, silwer, osmium, yster en palladium (Suomalainen & Oura, 1971). Baie lae vlakke van kadmium naamlik 0.01 mg/100ml monster is in weimonsters gevind, koper teen 0.015mg/100ml en yster teen 0.01mg/100ml monster. Hierdie konsentrasies kan geen toksiese gevare vir die groei van giste inhou nie. Ons kan dus die afleiding maak dat mineraal benodigdhede vir die groei van giste wel deur wei voorsien word. Hierdie resultate stem ook ooreen met die data vergelyk in literatuur (Rose & Harrison, 1971; Zadow, 1993).

Die verandering in mineralesamestelling vanaf na die prosessering van wei tot voor varkvoeding is ook ondersoek (Tabel 2.5). Resultate het getoon dat daar geen of geringe veranderinge in die mineralesamestelling voorgekom het by die sewe verskillende monsternemingspunte. Ons kan hieruit aflei dat die voedingswaarde samestelling van wei ten opsigte van minerale, gelewer aan varke geen noemenswaardige verandering ondergaan het tydens die verskillende prosesse nie.

**Tabel 2.5:** Die mineralesamestelling van wei vanaf direk na kaasprosessering tot varkvoeding.

|            | %P   | %K     | %Na  | %Mg    | %Zn     | %Cu  | %Fe     | %Mn  |
|------------|------|--------|------|--------|---------|------|---------|------|
| 1          | 0.03 | 0.01   | 0.01 | 0.006  | 0.00033 | 0.00 | 0.00003 | 0.00 |
| 2          | 0.03 | 0.01   | 0.01 | 0.006  | 0.00035 | 0.00 | 0.00004 | 0.00 |
| 3          | 0.03 | 0.01   | 0.01 | 0.007  | 0.00034 | 0.00 | 0.00004 | 0.00 |
| 4          | 0.03 | 0.02   | 0.01 | 0.007  | 0.00050 | 0.00 | 0.00005 | 0.00 |
| 5          | 0.03 | 0.01   | 0.01 | 0.005  | 0.00046 | 0.00 | 0.00004 | 0.00 |
| 6          | 0.03 | 0.01   | 0.01 | 0.007  | 0.00054 | 0.00 | 0.00006 | 0.00 |
| 7          | 0.03 | 0.01   | 0.01 | 0.007  | 0.00066 | 0.00 | 0.00006 | 0.00 |
| <b>GEM</b> | 0.03 | 0.0114 | 0.01 | 0.0064 | 0.00045 | 0.00 | 0.00005 | 0.00 |
| <b>SD</b>  | 0.00 | 0.0037 | 0.01 | 0.0008 | 0.00012 | 0.00 | 0.00001 | 0.00 |

(Punte 1 - 7 is die sewe monsternemingspunte geïdentifiseer volgens die kritiese plan aangedui in Diagram 2.1)

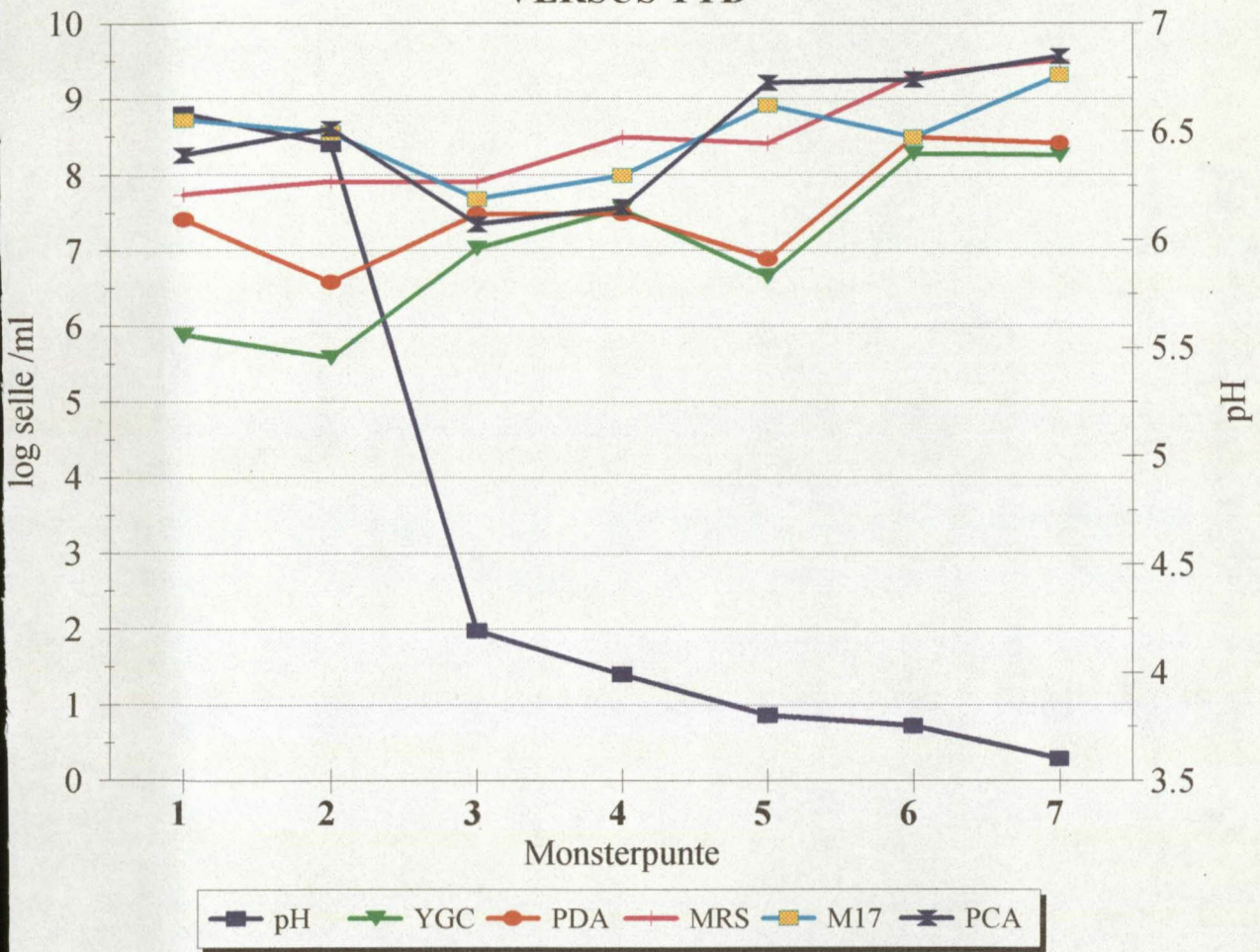
'n Volledige proteïen bevat al die essensiële aminosure in 'n verhouding wat groei en onderhoud sal verseker indien dit as die enigste bron van proteïen gebruik sou word. So 'n proteïen beskik oor 'n hoë biologiese waarde. 'n Onvolledige proteïen kan aangevul word deur sintetiese komponente of as 'n mengsel van plant en dierlike produkte (Potter & Hotchkiss, 1995). Die aminosuurdata voorgestel in Tabel 2.6, dui konsentrasies van die essensiële en nie-essensiële aminosure teenwoordig in die wei voor afroming. Die essensiële aminosure, treonien, valien, iso-leusien en leusien se konsentrasies is merkbaar hoër as die konsentrasies van die ander essensiële aminosure. Hoë konsentrasies van glutamiensuur, alanien en prolien is ook gevind as deel van die nie-essensiële aminosure. Bykans alle giste besit die vermoë om die vrye aminosure as stikstofbron te gebruik (Large, 1986), dit is veral alanien wat by voorkeur eerste deur al die giste afgebreek word. Ander stikstofbronne wat ook deur die giste en teenwoordigende mikroörganismes benut word sluit onder meer in die hoë konsentrasies urea en ammonia teenwoordig (Berry, 1989; Bui & Galzy, 1990; Castillo, 1990; El-Samragy et al. 1988). Dit is a.g.v. die afbraak van stikstof-bevattende komponente wat as enigste stikstofbron benut word deur mikroörganismes wat aanleiding gee tot die opbou van ammonia en L-glutamiensuur (Large, 1986). Die stikstofbronne kan dan algemeen deur die meeste mikroörganismes benut word. Opmerklik is die verlaging in urea vanaf punt 1 na punt 7 (Tabel 2.6). Die verlaging is a.g.v. die moontlike benutting van die urea deur die verskillende mikroörganismes tydens die groeiperiode. Verder het ons ook gevind dat 'n verhoging in ammonia en glutamiensuur voorkom vanaf punt 1 na 7. Die verhoging kan toegeskryf word aan die afbraak van stikstof bevattende komponente (aminosure ingesluit) wat akkumuleer as die komponente (Large, 1986). Die afbraak geskied hoofsaaklik deur die ensiematiese werking van NADP-afhanklike glutamaat dehidrogenase, NAD-afhanklike glutamaat dehidrogenase en glutamien sintetase glutamaat sintase (Johnson en Brown, 1974).

In Fig 2.1 word die verandering in pH en mikrobiologiese groei by verskillende monsternemingspunte aangetoon. Die onderskeie krommes toon dat daar 'n groot afname in pH voorkom tussen punte 2 (direk na afroming) en 3 (fabriekstenk) d.i. vanaf pH 6.44 tot 4.19 en daarna neem pH geleidelik af tot by 3.6. Hierdie daling in pH kan toegeskryf word aan toenemende mate van kontaminasie wat in wei voorkom soos dit deur die sisteem beweeg en die groei van kultuurorganismes wat tydens kaasvervaardiging gebruik word en melksuurvormende bakterieë soos lactobacillus en lactococci wat die beskikbare koolhidrate (hoofsaaklik laktose) omsit na sure (melksuur) (Jay, 1992, Holzapfel, 1966). Ten opsigte van mikrobiologiese groei kan ons sien dat die totale tellings ook afgeneem het tussen punte 2 en 3, daarna het 'n sloerfase gevolg met 'n toename tussen punte 5 en 7. Giste en skimmel tellings op PDA en op YGC-agar het dieselfde patroon gevolg, naamlik

**Tabel 2.6:** Die aminosuursamestelling van wei voor afroning asook voor varkvoeding

|              | Konsentrasie (g/ml)<br>Wei voor afroning | Konsentrasie (g/ml)<br>Voor varkvoeding |
|--------------|--|---|
| fosfoserien  | $2.8635 \times 10^{-5}$                  | $3.7908 \times 10^{-5}$                 |
| taurien      | $5.5544 \times 10^{-6}$                  | $7.1430 \times 10^{-6}$                 |
| fosfoetamien | -  | -                                       |
| urea         | $1.2300 \times 10^{-4}$                  | -                                       |
| aspartienuur | $2.2933 \times 10^{-5}$                  | $4.2538 \times 10^{-5}$                 |
| treonien     | $6.5767 \times 10^{-4}$                  | $2.1187 \times 10^{-5}$                 |
| serien       | $2.1546 \times 10^{-5}$                  | $1.2759 \times 10^{-5}$                 |
| asparagien   | $9.5314 \times 10^{-6}$                  | $1.2308 \times 10^{-5}$                 |
| glutamienuur | $1.4111 \times 10^{-4}$                  | $1.6338 \times 10^{-4}$                 |
| prolien      | $4.8687 \times 10^{-5}$                  | $2.6760 \times 10^{-5}$                 |
| glisien      | $1.7604 \times 10^{-5}$                  | $1.8977 \times 10^{-5}$                 |
| alanien      | $4.5685 \times 10^{-5}$                  | $1.9172 \times 10^{-5}$                 |
| sitrullien   | $3.3638 \times 10^{-6}$                  | $3.6610 \times 10^{-6}$                 |
| valien       | $3.9310 \times 10^{-5}$                  | $3.0434 \times 10^{-5}$                 |
| metionien    | $2.4320 \times 10^{-6}$                  | $3.4610 \times 10^{-6}$                 |
| iso-leusien  | $3.8297 \times 10^{-5}$                  | $3.5922 \times 10^{-5}$                 |
| leusien      | $2.8956 \times 10^{-5}$                  | $3.3311 \times 10^{-5}$                 |
| tirosien     | $2.4462 \times 10^{-6}$                  | $6.5770 \times 10^{-6}$                 |
| feniëalanien | $1.0837 \times 10^{-5}$                  | $1.1134 \times 10^{-5}$                 |
| homosistien  | $1.1537 \times 10^{-6}$                  | $5.3600 \times 10^{-7}$                 |
| etanolamien  | $7.2013 \times 10^{-6}$                  | $6.9870 \times 10^{-6}$                 |
| ammonia      | $8.6430 \times 10^{-5}$                  | $2.3533 \times 10^{-4}$                 |
| sistienuur   | -  | -                                       |
| ornitien     | $6.9126 \times 10^{-6}$                  | $8.8510 \times 10^{-6}$                 |
| lisien       | $7.7778 \times 10^{-6}$                  | $1.4079 \times 10^{-5}$                 |
| histidien    | -  | -                                       |
| arginien     | $3.5014 \times 10^{-6}$                  | $6.358 \times 10^{-6}$                  |

### MIKROBIOLOGIESE TELLINGS EN pH VERSUS TYD



**Fig 2.1:** Die verandering in pH en mikrobiologiese groei by verskillende monsternemingspunte.



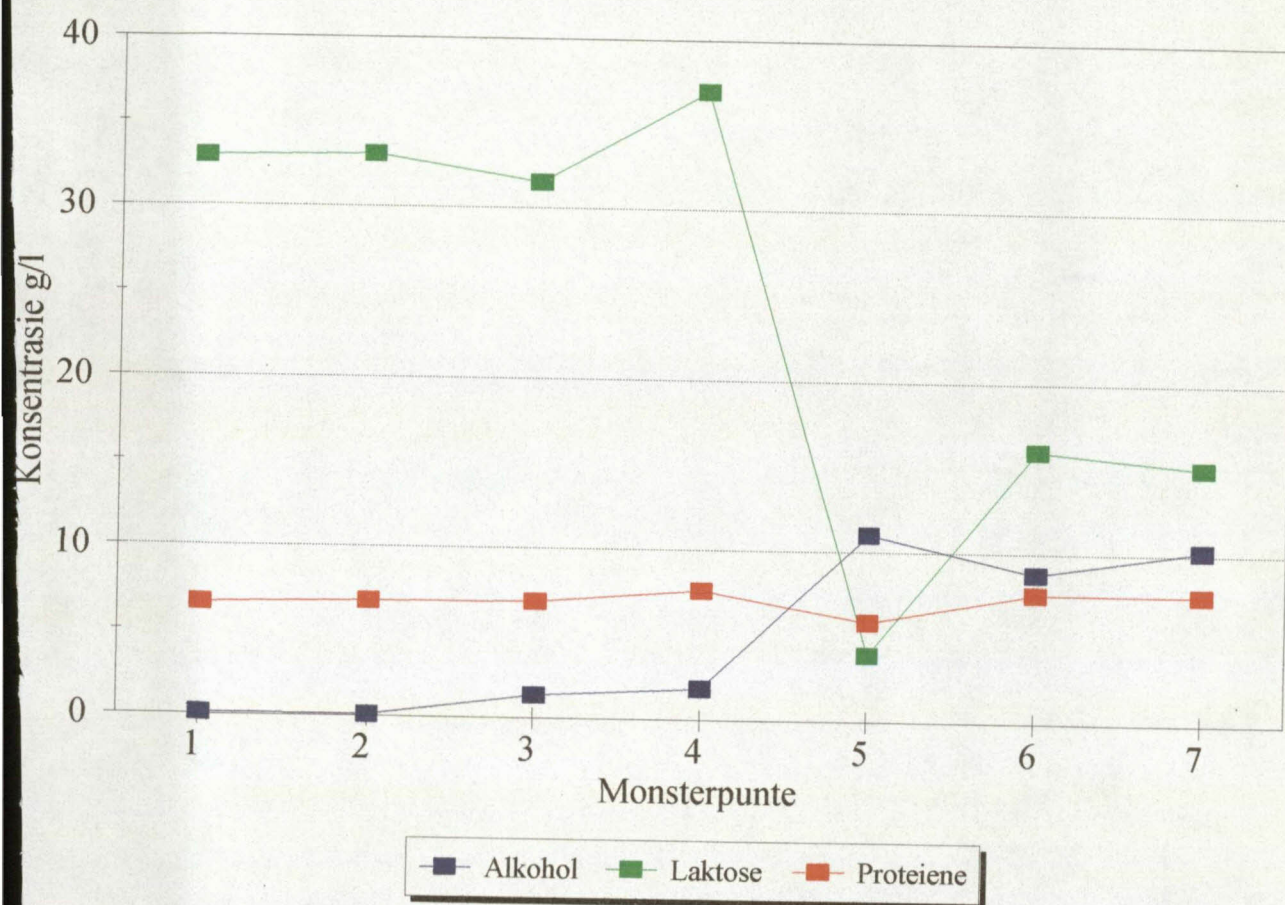
'n effense verlaging in selle net na afroming en daarna 'n styging in aantal selle met 'n gepaardgaande verlaging in pH en 'n verlaging in bakterie getalle tot by punt 4. Hieruit lei ons af dat die skielike verlaging in pH, bakterie getalle op daardie tydstip kon verlaag het en ons het dus 'n verhoging in die aantal dooie bakterie selle gekry. Giste en skimmels wat oor 'n laer optimum pH beskik met 'n pH groeireeks tussen pH 1.5 - 8.5 en tussen 0 - 11 (Jay, 1992) onderskeidelik, is dus instaat om by die toestande van laer pH waardes te kan groei en het toegeneem as gevolg van die afname in bakterie getalle en die gevolglike beskikbaarheid van voedingstowwe. Melksuurbakterieë se pH groeireeks is tussen pH 3.2 tot 10.4 (Jay, 1992). 'n Kort sloerfase het gevolg tussen punte 3 en 4 waartydens bakterieselle aangepas het by die spesifieke omstandighede en die pH omgewing en waartydens die aantal dooie en lewende bakterie selle dieselfde was en die resulterende effek geen groei getoon het nie; tussen punte 4 en 5 het totale tellings toegeneem asook lactobacilli terwyl lactococci getalle 'n sloerfase bereik, gis getalle het afgeneem as gevolg van kompetering met bakterieë, maar neem weer toe tussen punte 5 en 6, terwyl lactococci getalle effens verlaag.

Dit is veral gram positiewe bakterieë wat suurvoedsel (pH kleiner as 4.5) bederf, waarvan lactobacilli die algemeenste organisme betrokke is (Deak & Beuchat, 1996; ICMSF, 1982; Jay, 1992). Lactobacillus is weerstandbiedend teen melksuur en kan dus by pH laer as 4.5 aangetref word (ICMSF, 1982). Hieruit kan die hoë getalle van lactobacilli wat by wei se lae pH voorkom verklaar word.

Giste en skimmels is gewoonlik suur tolerant en groei goed onder pH 4.0 en sluit van die mees suur tolerante mikroorganismes aangetref in voedsel in (Deak & Beuchat, 1996). Die teenwoordigheid van giste en skimmels in wei tydens hierdie eksperiment stem ooreen met bogenoemde en kan dus hieruit verklaar word (ICMSF, 1982).

In Figuur 2.2 word die verandering in laktose, alkohol en proteïen konsentrasies tussen die verskillende monsternemingspunte aangetoon. Volgens die krommes kan ons 'n definitiewe verhoging in alkoholkonsentrasies waarneem, vanaf 0.14 g/l (0.01%) by punt 1 tot 'n maksimum van 11.02 g/l (1.1%) in die opgaardam (punt 5). Hierdie hoër alkoholkonsentrasie waargeneem in die opgaardam, asook laer proteïen en laktosekonsentrasies in vergelyking met ander monsternemingspunte, kan toegeskryf word daaraan dat die sisteem in die opgaardam suurstofbeperkend kon geraak het en dit aanleiding gegee het tot die verhoging van alkoholkonsentrasie vanaf 0.19 uit lyn 1 tot 1.1% in die opgaardam. Hierdie verhoging in alkoholkonsentrasies het veroorsaak dat proteïenkonsentrasies afgeneem het omdat 'n anaërobiese toestand voorgekom het wat etanolproduksie bevoordeel het, terwyl proteïenproduksie geïnhibeer word. Die verlaging in laktosekonsentrasie kan toegeskryf word aan die teenwoordigheid van melksuurbakterieë, giste en kontaminante wat laktose in die wei benut en dus afbreek.

### VERANDERING IN LAKTOSE, ALKOHOL EN PROTEIENE IN g/l BY VERSKILLENDE PUNTE



**Fig 2.2:** Die verandering in laktose, alkohol en proteïeninhoud tussen verskillende monsternemingspunte.

Verhoging in die aantal log gisselle vanaf punte 2 tot 4 het 'n verhoging in proteïene vanaf 6.78 tot 7.62 g/l veroorsaak, wat 'n aanduiding kan wees dat gisselle aanleiding gee tot 'n verhoging in enkelselproteïen. Tydens die verlaging in aantal log gisselle tussen punte 4 tot 5 kry ons 'n gepaardgaande verlaging in proteïenkonsentrasie, wat weer verhoog tussen punte 5 tot 6 sodra die gisgetalle toeneem. Hieruit kan ons aflei dat giste wel 'n rol moet speel t.o.v. die totale proteïeninhoud teenwoordig. Die verhoging in die laktosekonsentrasie tussen punte 5 en 6 kan toegeskryf word aan die feit dat die vorige dag se weivoorraad ook by hierdie punt opgegaan word. Die monsters word geneem op afsonderlike stadia tydens die siklus van varkvoeding.

Uit die resultate verkry in hierdie eksperiment kan ons duidelik sien dat wei geheel en al nie 'n uniforme produk is nie. Wei verskil nie alleen tussen verskillende kaassoorte vervaardig nie, maar verskil ook as gevolg van verskille in melksamestelling tussen beesrasse en as gevolg van seisoensverskille (Zadow, 1993), maar groot verskille in samestelling kom ook voor tydens die vervaardiging van dieselfde kaassoort, in dieselfde fabriek, onder dieselfde toestande. Hierdie veranderinge kan hoofsaaklik toegeskryf word aan die verandering in melksamestelling wat afkomstig is van verskillende beesrasse (Zadow, 1993).

Die samestelling van wei dui egter daarop dat dit 'n goeie kweekbodem behoort te wees vir giste en ander mikroorganismes. Benewens die stikstof-, koolhidraat- en minerale bestanddele daarvan bevat dit ook al die nodige groeifaktore in die vorm van vitamienes (Deak & Beuchat, 1996; Phaff et al., 1978; Zadow, 1993).

## 2.5 VERWYSINGS

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (1990) Method 920.105. Nitrogen (Total) in Milk - Final action. In Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C..
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (1990) Official Methods of Analysis, 15th ed. Washington, D.C.:AOAC.
- BERRY, D.R. (1989) Growth of Yeast. In "Fermentation process development of industrial organisms" (J.O. Neway, ed.) Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 299-356.
- BUI, K. & GALZY, P. (1990) Food Yeast. In "Yeast Technology" (Spencer J.F.T & Spencer D.M., eds.) Springer-Verlag Berlin. pp. 241-265.
- CASTILLO, F.J. (1990) Lactose Metabolism by Yeasts. In "Yeast Biotechnology and Biocatalysis" (Verachtert & de Mot, ed.) Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 297-320.
- DEAK, T. & BEUCHAT, L.R. (1996) Handbook of food spoilage yeasts. CRC Press, Boca Raton.
- EL-SAMRAGY, Y.A., CHEN, J.H. & ZALL, R.R. (1988) Amino acid and mineral profile of yeast biomass produced from fermentation of cheddar whey permeate. *Proc. Biochem.*, 23,1: 28-30.
- FIRMAN, R.J. (1965) Interference by iron and alkali (metals) on the determination of magnesium by atomic-absorption spectrophotometry. *Spectrochim. Acta* 21, 2: 341-343.
- HALLS, D.J. & TOWSHEND, A. (1966) Study of some interferences in the atomic-absorption spectrophotometry of magnesium. *Anal. Chim. Acta*, 36, 3: 278-281.
- HARPER, W.J. (1975) Analytical procedures for whey and whey products. *New Zealand J. Dairy Sci. Tech.* Review: 156-170.

- HAYES, S. (1985) New ways with whey. *Nutr. Food Sci.*, November/December: 5-7.
- HOLSINGER, V.H. (1983) Underutilized proteins for beverages. In "Upgrading waste for feeds and food" (D.A. Ledward, A.J. Taylor, R.A. Lawrie, eds.) Butterworths, London. pp. 211-229.
- HOLZAPFEL, W.H. (1966) Die verryking van kaaswei met behulp van *Saccharomyces fragilis* en ander gisolate. Ter vervulling van die vereistes vir die Graad Magister Scientiae Agriculturae in die Departement Suiwelwetenskap, Universiteit van die Oranje Vrystaat, Bloemfontein.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (1982) Milk, cream and evaporated milk. Determination of the total solids content (Reference Method). *International IDF Standard 21A:1982*. International Dairy Federation, Brussels.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (1983) Skimmed milk, whey and buttermilk. Determination of fat content - gravimetric method (Reference Method). *International IDF Standard 22A:1983*. International Dairy Federation, Brussels.
- JAY, J.M. (1992) *Modern Food Microbiology*. Fourth Edition. Van Nostrand Reinhold, New York.
- JOHNSON, B & BROWN, C.M. (1974) The enzymes of ammonia assimilation in *Schizosaccharomyces spp.* and in *Saccharomyces ludwigii*. *J. Gen. Microbiol.* 85: 169-175.
- KOSIKOWSKI, F.V. (1979) Whey utilization and whey products. *J. Dairy Sci.*, 62: 1149-1160.
- LARGE, P.J. (1986) Degradation of organic nitrogen compounds by yeasts. *Yeast*. 2: 1-34.
- MARTH, E.H. (1978) *Standard Methods for the examination of Dairy Products*. 14th ed. Washington, D.C.: American Public Health Association.

- MARTINI, A. & MARTINI, A.E.V. (1976) Taxonomic implications of the quantitative amino acid composition of the whole yeast cell. *Ann. Microbiol.* 26: 119-226.
- MICROORGANISMS IN FOODS (1982) Vol. 1. Their significance and methods of enumeration, 2d ed. *ICMSF*. Toronto: University of Toronto Press.
- MORRIS, E.O. (1958) Yeast Growth. In "The Chemistry and Biology of Yeasts" (A.H. Cook, ed.), Academic Press, New York. pp. 252-321.
- PHAFF, H.J., MILLER, M.W. & MRAK, E.M. (1978) The life of Yeasts. 2nd edition. Harvard University Press, Cambridge.
- POTTER, N.N & HOTCHKISS, J.H. (1995) Food Science. 5th edition. Chapman & Hall, New York.
- RAMAKRISHNA, T.V., WEST, P.W. & ROBINSON, J.W. (1968) Determination of copper, cadmium and zinc by atomic-absorption spectroscopy. *Anal. Chim. Acta.*, 40: 347.
- RONSIVALLI, L.J. & VIEIRA, L.J. (1992) Elementary Food Science. 3rd edition. Van Nostrand Reinhold, New York.
- ROSE, A.H. & HARRISON, J.S. (1971) The Yeasts. Vol. 2 Physiology and Biochemistry of Yeasts, Academic Press, London.
- SANDERSON, W.B. (1973) Research into whey utilization. Proceedings of the Pollution Research Conference.
- SCHERZ, H. & SENSER, F. (1989) Food Composition and Nutrition Tables 1989/90. 4th ed. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart.
- SUOMALAINEN, H. & OURA, E (1971) Yeast nutrition and solute uptake. In "The Yeasts" Vol. 2. (A.H. Rose & Harrison, J.S. eds), Academic Press London. pp. 3-60.
- VANDERZANT, C. & SPLITTSTOESSER, D.F. (1992) Compendium of methods for the Microbiological Examination of Foods. 3rd edition. American Public Health Association.

ZADOW, J.G. (1993) Whey and lactose processing. Applied Science Publishers, London.

## HOOFSTUK 3

ISOLASIE EN KARAKTERISERING VAN GISTE GEASSOSIEER  
MET WEI, DIE KAASFABRIEK EN -OMGEWING



### 3.1 UITTREKSEL

Bronne van giskontaminasie wat kan lei tot die kontaminasie van die wrongel tydens Cheddar en Gouda vervaardiging is in 'n kaasfabriek ondersoek.

'n Totaal van 187 verteenwoordigende gis isolate teenwoordig in die fabrieksomgewing, op werksoppervlakte, pekelwater en op werkers se hande en voorskote is geïdentifiseer deur die konvensionele metode en langkettingvetsuuranalise. Monsters is by kritieke kontrole punte geneem tydens die vervaardigingsproses en geanaliseer na inkubasie by 25°C vir 96 uur.

Die isolate wat die algemeenste voorgekom het, het behoort tot die genera *Debaryomyces* en *Candida*. Ander genera het ingesluit *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Yarrowia*, *Pichia*, *Trichosporon*, *Torulaspota*, *Issatchenkia*, *Saccharomyces* en *Zygosaccharomyces*. Die karakterisering van die dominante gis isolate het aangetoon dat die pekelwater bygedra het tot die grootste verskeidenheid en aantal gis isolate. 'n Totaal van 64 gisstamme wat aan 9 verskillende genera behoort het, is uit die pekelwater afkomstig.

Met behulp van 'n gekoördineerde program kon al die laktose-fermenterende giste geïdentifiseer word. Al die laktose-fermenterende gisstamme het behoort aan die genus *Kluyveromyces*.

### 3.2 INLEIDING

Bakterieë is van groot belang tydens die kaasmaakproses, omdat die meeste van hulle fermentasie van melk kan veroorsaak (Cousin, 1982). Giste is in staat om onder omstandighede te groei en te oorleef wat ongunstig is vir die meeste bakterieë, en hulle speel dus 'n uiters belangrike rol in die bederf van suiwelprodukte, asook in die rypwordingsproses van sekere kaasvariëteite (Fleet & Mian, 1987; Seiler & Busse, 1990).

Daar is baie verwysings in literatuur van gisspesies wat gisagtige- of vrugtegeure, gasvorming, slymvorming en verkleuring van produkte veroorsaak en so die bederf van suiwelprodukte veroorsaak (Ingram, 1958; Lenoir, 1984; Pitt & Hocking, 1985; Seiler & Busse, 1990; Walker & Ayres, 1970). Giste kan egter ook gewenste biochemiese

veranderinge in suiwelprodukte veroorsaak (Fleet and Mian, 1987). Daar is talle bewyse<sup>48</sup> in onlangse literatuur dat sommige gisspesies tot geur en tekstuur ontwikkeling tydens die rypwordingsproses van kaas kan bydra (Fernandez Del Pozo et al., 1988; Lubert & Frazier, 1955; Machota et al., 1987; Nunez, 1978; Seiler & Busse 1990; Szumski & Cone, 1962). Giste se bydrae tot die geur en aroma van sekere kase word direk toegeskryf aan die vermoë van sommige spesies om laktose te fermenteer en tot die produksie van etanol, asetaldehyd, etielasetaat en etielbuturaat te lei (Horwood et al., 1987; Lenoir, 1984). Giste speel ook indirek 'n rol deur die vorming van voorlopers van aroma soos aminosure, vetsure en esters as gevolg van hul proteolitiese en lipolitiese aktiwiteit en deur die ekskresie van groeifaktore soos B-vitamiene, pantoteensuur, niasien, riboflavin en biotien, stimuleer giste die groei van ander mikroörganismes (Lenoir, 1984; Purko et al., 1951). Giste speel ook 'n sinergistiese rol deur die melksuur teenwoordig in die wrongel te metaboliseer en so verskuiwing van die pH van die medium na neutraal te veroorsaak, wat weer die groei van bakterieë bevoordeel (Fernandez Del Pozo et al., 1988; Purko et al., 1951; Szumski & Cone, 1962).

Ten spyte van die herhaalde voorkoms van gisspesies in kaas en hul rol op die uiteindelijke eindproduk, is relatief min pogings aangewend om die bronne van giste betrokke by kontaminasie in 'n kaasfabriek vas te stel of die spesies betrokke te identifiseer. Sommige vervaardigers van suurselkulture sluit egter *Kluyveromyces marxianus* of *Debaryomyces hansenii* as suurselkulture in om uniformiteit in kaas aroma te verkry (Seiler & Busse, 1990), maar dit wil voorkom of elke kaasfabriek oor 'n eie populasie van giste beskik wat 'n bydrae lewer tot die sensoriese verskille in verskillende kase.

Tydens hierdie studie word daar gepoog om die verskillende bronne van gis kontaminasie in kaasfabrieke te identifiseer en ook om die voorkoms en tipe giste geassosieer met Cheddar en Gouda vervaardiging vas te stel, met die uiteindelijke doel om alle laktose fermenterende giste wat reeds aangepas is in hulle onmiddellike omgewing te isoleer.

### 3.3 METODIEK

#### 3.3.4 Monsterneming en seleksie van isolate

Verteenwoordigende isolate is geselekteer om mikrobiese ladings geassosieer met Cheddar en Gouda vervaardiging te bepaal vanaf aartappel dekstrose agar (Oxoid, pH 3.5) en gis-moutekstrak agar plate (YM, pH 3.5) (Wickerham, 1951) en geïnkubeer vir 96 ure by 25°C. Die fabrieksomgewing, produk- en werksoppervlaktes, is by verskeie punte volgens die "Hazard Analysis Critical Control Points (HACCP)" prosedure (Bigalke & Busta, 1982) ondersoek.

Kaasmonsters, vloeibare monsters en deppers is geneem by verskillende kaasfabrieke, oor 'n periode van twee dae. Monsters is geneem van die fabriek se watervoorsiening, die soutoplossing wat gebruik word om kaas te sout, van die lug by die verpakkingstafels, asook van die persvorms, kaasbaddens en cheddarrollies waar die cheddarproses plaasvind. Produkmonsters is ook geneem en dit sluit die kaaswringel voor en na souting en die wei wat dreineer word in. Deppermonsters van werksoppervlaktes sluit in monsters van die vlekvrystaalverpakkingstafels, cheddarrollies, weidreinerings-baddens asook die werkers se hande en oorjasse.

Vloeibare (water en soutoplossing) monsters is verdun in steriele kwart-sterkte Ringers oplossing en uitgeplaat. 20 g-porsies van alle soliede monsters (wringel) is in 180 ml steriele kwart-sterkte Ringers oplossing geplaas, gehomogeniseer in 'n Colworth 400 stomacher vir 2 min, en daarna is die vloeistof verdun en uitgeplaat. Lugmonsters is geneem deur Petriplate vir 5 min oop te laat op voorafgeïdentifiseerde distansies van 0, 5 en 10 m vanaf die kaasbaddens, terwyl monsters van alle oppervlaktes geneem is deur RODAC (Favero et al., 1968) plate.

Die verteenwoordigende gis isolate is oorgedra na gis-moutekstrak agar (YM) (Wickerham, 1951) en geïnkubeer vir 72 h by 25°C op YM-skuinstes gehou tydens die verloop van die studie.

### 3.3.2 Identifisering van gis isolate

Suiwer giskulture is geklassifiseer volgens die identifikasiesleutels soos voorgestel deur Kreger-van Rij (1984) en Barnett et al. (1990).

Elke isolaat is geïnkuleer in 6 fermentasie media, 33 koolstofbron assimilasië media, vitamien vrye medium, 0,01% en 0,1% sikloheksamied. Assimilasië van stikstof komponente is deur middel van die auxanogram metode uitgevoer (Lodder & Kreger-van Rij, 1952). Addisionele toetse uitgevoer sluit in groei by 37°C, in 50% D-glukose medium, uream hidrolise, arbutiensplyting, styselvorming en die kleur van 4 week-oue kulture met Disonium blou B reagens (Van der Walt & Hopsu-Havu, 1976).

Askospoor vorming is ondersoek op McClary's asetaat agar, aartappel dekstrose agar (PDA), Gorodkova agar, mieliemeel agar (Cornmeal agar) en moutekstrak agar (Kreger-van Rij, 1984). Die geïnkuleerde media is geïnkubeer by 18°C vir 4 weke en met 4 dae intervalle ondersoek. Selmorfologie en vegetatiewe ongeslagtelike voortplanting is waargeneem op YM agar en Dalmau plate (Kreger-van Rij, 1984). Die vorming van pseudomiselium en ware miselium is waargeneem op mieliemeel agar volgens Dalmau plaattegniek (Wickerham, 1951).

Alle resultate met die uitsondering van morfologiese data word in Figuur 1 aangetoon. Positiewe reaksies, sowel as swak positiewe reaksies, word deur swart blokke aangedui, terwyl negatiewe reaksies deur oop spasies aangedui word. Die verskillende gis stamme geïsoleer in hierdie studie word in Fig. 1 aangetoon volgens resultate verkry wat op die horisontale en vertikale skale aangetoon word. Getalle is toegeken aan elke stam wat aangedui word op die verskillende skale ter wille van vereenvoudiging.

### 3.3.3 Langkettingvetsuuranalise

Die kweek van verskillende stamme, ekstraksië van vetsure, en die voorbereiding van metiel esters en hul chromatografie, is uitgevoer soos beskryf deur Viljoen et al. (1986).

Die relatiewe persentasies word in Fig. 1 aangetoon deur middel van 'n histogram. Elke stam se langkettingvetsuursamestelling is vergelyk met ooreenstemmende verwysingsstamme soos beskryf in literatuur, om sodoende die identifisering van die

geïsoleerde giste te bevestig (Oosthuizen et al., 1987; Viljoen et al., 1986; Viljoen et al., 1988a,b; Viljoen et al., 1989a,b).

### 3.4 RESULTATE EN BESPREKING

'n Totaal van 187 gisstamme is geïsoleer vanaf 'n kaasfabriek tydens Gouda en Cheddar vervaardiging, by vier verskillende geleenthede. Die verskillende gisstamme geïsoleer vanaf verskillende bronne word in Fig. 1 getoon. Die aantal gisstamme van elke spesie geïsoleer vanaf verskillende bronne word in hakies langs elke spesienaam in Fig. 1 aangetoon. Bronne van kontaminasie sluit in die lug wat die cheddarrollies en die kaasbaddens omring, asook werksoppervlaktes, wei, wrongel en die soutoplossing in die pekelbaddens. Die pekeloplossing wat gebruik word om die Goudakaas te sout, was verantwoordelik vir die hoogste kontaminasievlakke en 64 verskillende gisstamme is hieruit geïsoleer. Hierna het die werksoppervlaktes gevolg (50), wei (37), wrongel (15), lug (13), terwyl die laagste vlakke gevind is op die werkers se hande en voorskote.

Die giste geïsoleer sluit beide gepigmenteerde en nie-gepigmenteerde stamme. Negentien verskillende spesies wat behoort aan die genera *Candida*, *Yarrowia*, *Torulaspora*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Issatchenkia* en *Debaryomyces* was teenwoordig. Met die uitsondering van *Rhodotorula*, *Cryptococcus* en *Trichosporon* is die oorgrote meerderheid van die spesies askomisete verwant.

Al die stamme is vir 54 eienskappe getoets soos aangetoon in Fig. 1. Positiewe reaksies is verkry vir al die stamme vir die assimilasië van D-glukose, gliserol en etanol, terwyl geeneen van die stamme metanol kon benut nie. Kulture is geïdentifiseer met behulp van die identifikasie sleutel voorgestel deur Van der Walt en Yarrow (1984) en Barnett et al. (1990). Morfologiese studies is ook uitgevoer vir al die stamme, aangesien dit as identifikasie kriteria dien, in die geval van nouerwante spesies met 'n hoë vlak van ooreenkoms. Met die uitsondering van *Debaryomyces vanrijiae* en *Debaryomyces*

148 811 23









**Fig 3.1:** Giste geïsoleer uit die wei, kaasfabriek en omgewing gerangskik volgens langketting vetsuuranalises en bronne van kontaminasie.

**Bronne van kontaminasie:**

- A - Pekelwater
- B - Wei
- C- Toerusting
- D- Lug
- E - Hande en voorskote
- F - Wrongel

**Lang-kettingvetsuur analises:**

|   |         |
|---|---------|
|  | = C16:0 |
|  | = C16:1 |
|  | = C18:0 |
|  | = C18:1 |
|  | = C18:2 |
|  | = C18:3 |

CARBON SOURCE UTILIZATION

LONG-CHAIN FATTY ACIDS

FERMENTATION

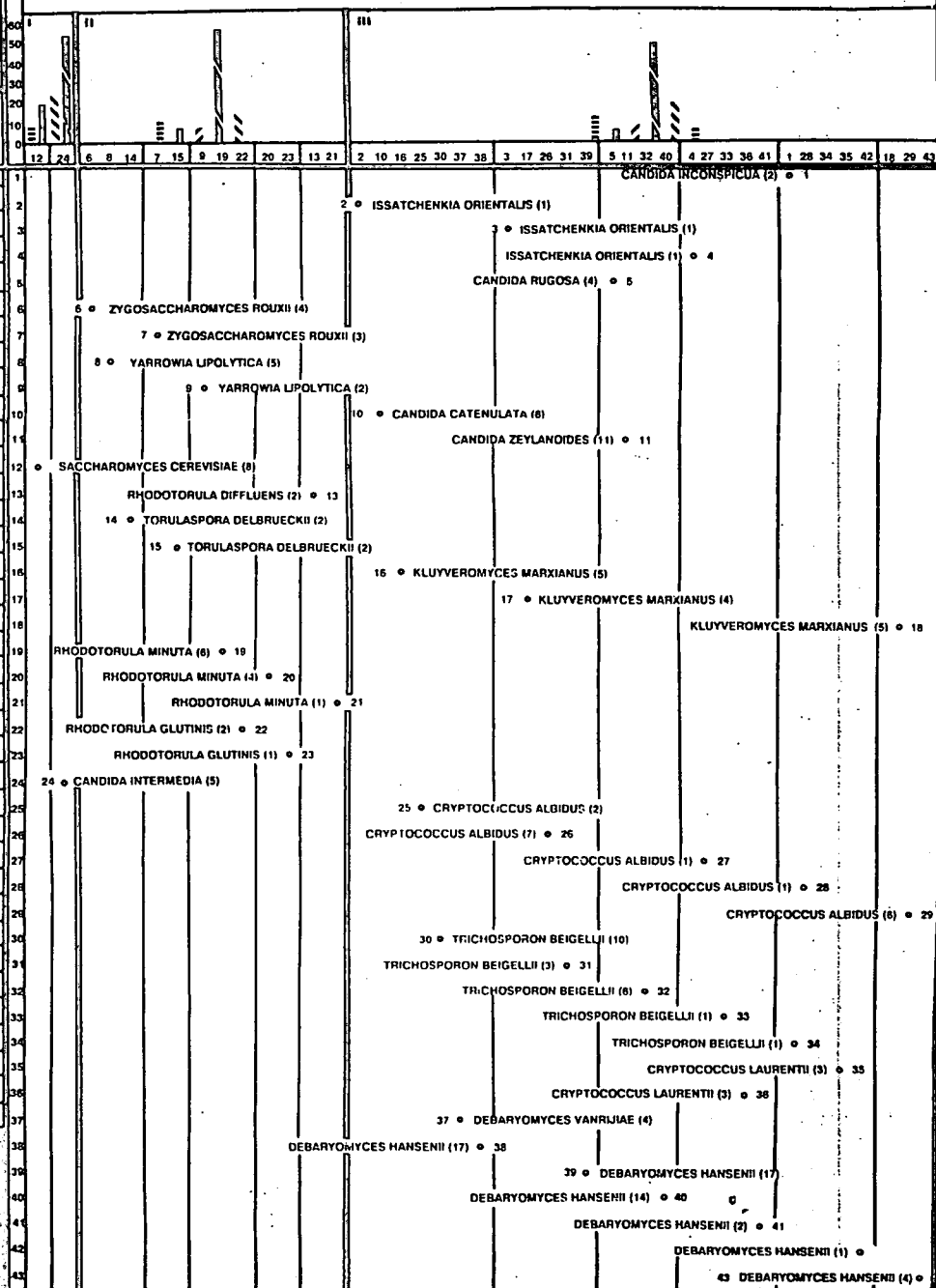
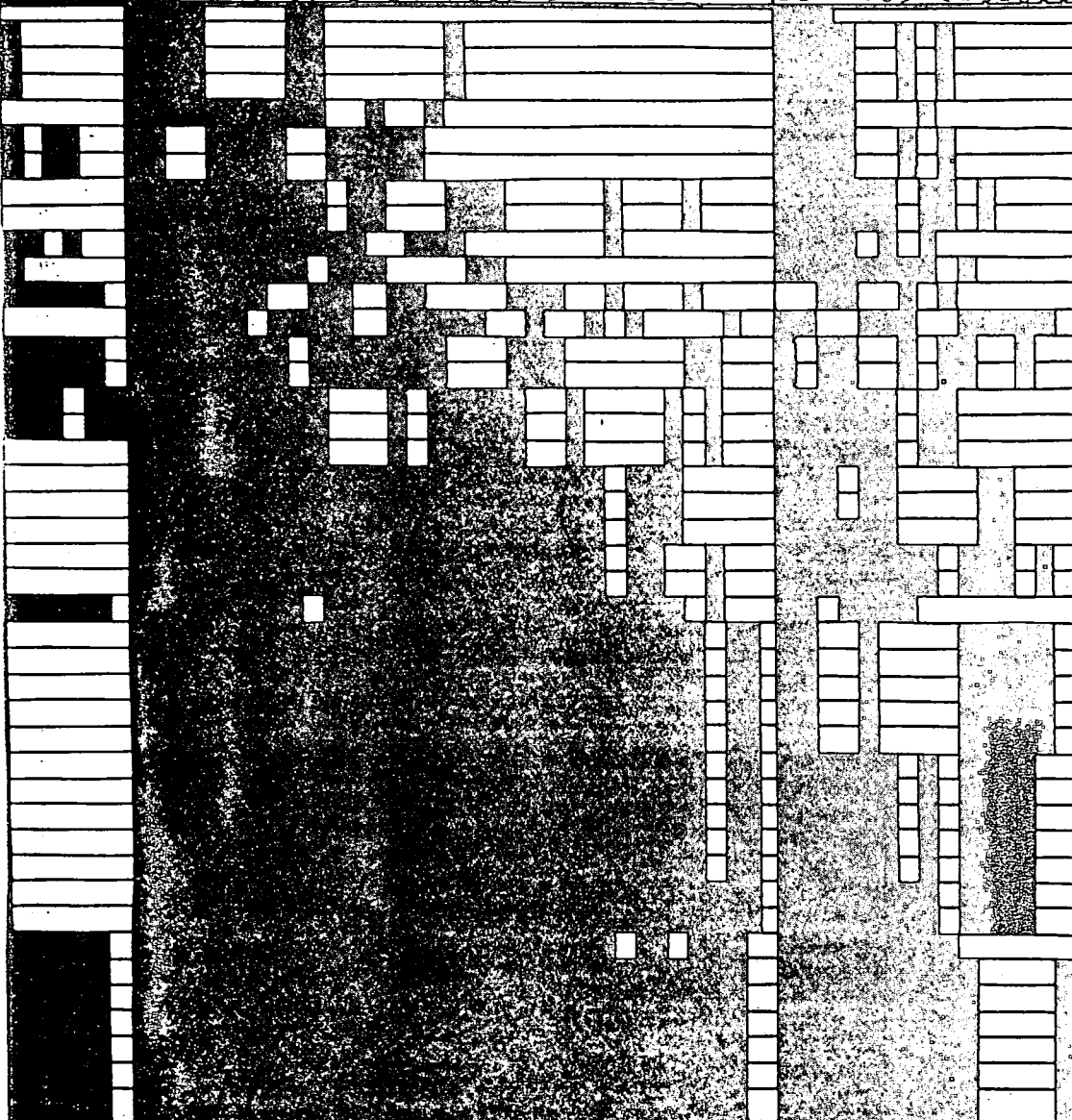
ASSIMILATION

ADDITIONAL

RELATIVE PERCENTAGES

53

- D-GLUCOSE
- D-LACTOSE
- SUCROSE
- MALTOSE
- TRAFFINOSE
- LACTULOSE
- D-GLUCOSE
- ETHANOL
- GLYCEROL
- SUCCINATE
- D-GLUCITOL
- D-MANNITOL
- GALACTULOSE
- RIBITOL
- CITRATE
- D-LACTATE
- TREHALULOSE
- D-GLUCONATE
- L-SORBOSE
- SUCROSE
- MALTOSE
- D-XYULOSE
- D-RIBULOSE
- SALICIN
- CELLULOULOSE
- TRIAFFINOSE
- HELEZTOULOSE
- ME-D-GLUCOSIDE
- L-ARABINOULOSE
- GALACTITOL
- STARCH
- D-ARABINOULOSE
- L-RHAMNOULOSE
- LACTULOSE
- MELIBIOULOSE
- INULIN
- ERYTHRITOL
- RIBITOL
- METHANOL
- ETHYLAMINE
- CADAVERINE
- 37°C
- 50% D-GLUCULOSE
- ARBITIN
- 0.01% CYCLOHEXAMIDE W/O VITAMINS
- 0.1% CYCLOHEXAMIDE
- ASCOPHORES
- HITRITE
- UREA HYDROLYSIS
- DBB
- CREATININE
- UREATE
- CREATINE



*hansenii* kon al die stamme duidelik gekarakteriseer word, alhoewel geringe afwykings van Barnett's se data wel voorgekom het. Die oorgrote meerderheid stamme het geen, of een of twee afwykings getoon.

Op grond van langkettingvetsuursamestelling, is stamme in drie hoofgroepe opgedeel. Groep I het uit 13 stamme bestaan en word onderskei deur die afwesigheid van linoleïensuur (C18:2) en linoleensuur (C18:3). Groep II het bestaan uit 'n heterogene groep met 16 gisstamme wat basidiomisetse lewenswyse toon en 18 stamme wat askomisetse is, en word gekenmerk deur die teenwoordigheid van linoleïensuur (C18:2) en die afwesigheid van linoleensuur (C18:3). Groep III is verteenwoordig deur 140 stamme wat linoleïensuur (C18:2) en linoleensuur (C18:3) bevat en in staat is om 'n groot verskeidenheid van koolstofbronne te benut. Ses en negentig stamme het askomisetse lewenswyse getoon, terwyl 44 stamme basidiomisetse lewenswyse getoon het.

*Debaryomyces hansenii*, *Cryptococcus albidus* en *Trichosporon beigelii* is die organismes wat die meeste voorgekom en geïsoleer is uit die verskillende bronne af (Fig. 1). Hierdie hoë voorkoms van bogenoemde stamme geassosieer met suiwelprodukte word toegeskryf aan hul vermoë om by lae temperature te groei (Davenport, 1980), asook hul vermoë om laktose (belangrikste suiker in melk), melksuur en sitroensuur (hooforganiese sure in suiwelprodukte) te assimileer (Cousin, 1982; Robinson, 1981). Op grond van hierdie studies is *Cryptococcus albidus* stamme veral in room monsters (Fleet & Mian, 1987; Garrison, 1959) en mastitismelk (Machota et al., 1987) gevind. *Trichosporon beigelii*, ook bekend as die sinoniem van *Trichosporon cutaneum* (Barnett et al., 1990), is geïsoleer vanaf pekel (Seiler & Busse, 1990), rou melk monsters (Engel, 1986a; Machota et al., 1987), "Trappist type" kaas (Szumski & Cone, 1962), asook room en botter (Walker & Ayres, 1970). *Debaryomyces hansenii* domineer egter in die meeste studies van giste geassosieer met suiwelprodukte. As gevolg van hul hoë sout toleransie, is *Debaryomyces* spesies al herhaaldelik gevind in pekelwater (Mrak & Bonnar, 1939; Seiler & Busse, 1990; Walker & Ayres, 1970), maar daar is ook volgens literatuur 'n hoë voorkoms in yoghurt (Suriyarachchi & Fleet, 1981), kaas (Gilmour & Rowe, 1981; Lenoir, 1984; Szumski & Cone, 1962) en rou melk (Fleet & Mian, 1987).



Die proteolitiese giste geïsoleer en gekarakteriseer in hierdie studie, naamlik *Candida diffluens* (nou bekend as *Rhodotorula diffluens*), *Rhodotorula glutinis*, *Kluyveromyces marxianus* en *Saccharomyces lipolytica* (nou bekend as *Yarrowia lipolytica*) is reeds in melk, room, botter en kaas monsters gevind (Fleet & Mian, 1987). Hierdie navorsers (Fleet & Mian, 1987) het ook *Cryptococcus laurentii* in room en botter monsters gevind. Seiler en Busse (1990) het die teenwoordigheid van *Candida rugosa*, *Candida intermedia*, *Yarrowia lipolytica*, *Torulaspora delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Issatchenkia orientalis* en *Candida zeylanoides* in pekelwater aangetoon nadat dit hieruit geïsoleer is. Engel (1986a,b) het die teenwoordigheid van *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae* en *Candida lipolytica* in maaskaas aangetoon. *Rhodotorula glutinis* en *Torula cremoris* (nou bekend as *Kluyveromyces marxianus*) is ook uit botter geïsoleer waar hulle aanleiding gegee het tot 'n gisagtige geur (Ingram, 1958), veral in gevalle waar die room genoeg suur gevorm het om laktose-fermenteerbare bakterieë te inhibeer. Horwood et al. (1987) het ook hierdie defek in Cheddar gevind, as gevolg van lae suursel aktiwiteit en ook hoë vogtigheid in kaas. Dit stel *Candida* spesies in staat om hoë vlakke van etanol, etielasetaat en etielbutiraat te produseer, wat algemeen geassosieer word met 'n vrugte geur in kaas. Lenoir (1984) het meer as 10 gisspesies in Camembert kaas gevind, afkomstig vanaf verskillende plekke en hy het gevind dat *Kluyveromyces*, *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae* en *Zygosaccharomyces rouxii* die grootste gedeelte van hierdie gis flora uitgemaak het. Die oorblywende spesies naamlik *Candida catenulata* en *Rhodotorula minuta* geïsoleer in hierdie studie, is voorheen geïsoleer uit kaas (Barnett et al. 1990), terwyl die gis spesies *Candida inconspicua* en *Debaryomyces vanrijae* wat in lae getalle voorgekom het in hierdie studie, nie voorheen in suiwelprodukte gevind is nie.

Die meerderheid van die stamme geïsoleer in hierdie studie, is in staat om laktose of melksuur en sitroensuur te assimileer, behalwe *Zygosaccharomyces rouxii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida zeylanoides* en *Torulaspora delbrueckii* soos in Fig. 1 aangetoon. Die besonderse goeie groei van *Candida zeylanoides* stamme in suiwelprodukte, word toegeskryf aan die stamme se vermoë om by lae temperature te groei (Davenport, 1980), maar veral aan hul lipolitiese aktiwiteit wat hul in staat stel om

vet te hidroliseer. *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces* en *Torulaspota* stamme produseer egter nie lipase of proteïenase nie (Fleet & Mian, 1987) en is sterk fermentatiewe giste, en tolerant tot hoë sout en suiker konsentrasies by 'n lae pH en wateraktiwiteit (Pitt & Hocking, 1985). Die teenwoordigheid van hierdie genera in kaas is moeilik om te verklaar, aangesien hoë konsentrasies van koolhidrate in suiwelprodukte baie beperk is (Walker, 1988), met die uitsondering van joghurts en versoete gekondenseerde melk. Volgens Fleet en Mian (1987) word verbindings soos vry aminosure en vetsure vermoedelik benut.

Groep I in hierdie studie bestaan uit 8 *Saccharomyces cerevisiae* stamme en 5 stamme van *Candida intermedia* wat onderskeidelik geïsoleer is uit pekel en werksoppervlaktes. Beide spesies kon duidelik onderskei word op grond van verskille in benutting van koolstofbronne en ook die feit dat dit die enigste spesies was wat nie in staat is om linoleïensuur (C18:2) en linoleensuur (C18:3) te produseer nie. Alhoewel *Saccharomyces cerevisiae* 'n belangrike rol speel in die vervaardiging van brood en alkoholiese drankes, kan die teenwoordigheid van hierdie spesies in verskillende voedselsoorte soos suiwelprodukte, bederf veroorsaak in die vorm van gasproduksie en gisagtige- of vrugtegeure (Walker, 1988).

Groep II bestaan uit 7 *Zygosaccharomyces* isolate, 7 *Yarrowia* isolate, 16 *Rhodotorula* isolate en 4 *Torulaspota* isolate. Die gepigmenteerde genus *Rhodotorula* is verteenwoordig deur *Rhodotorula diffluens*, *Rhodotorula glutinis* en *Rhodotorula minuta*, waarvan laasgenoemde meestal voorgekom het. *Rhodotorula* spesies word dikwels aan die bederf van suiwelprodukte gekoppel en veroorsaak pienk kolonies op die oppervlak van botter, room en kaas (Skinner et al. 1961; Walker & Ayres, 1970). Hierdie spesies is in staat om sub-zero temperature by lae pH waardes so laag as 2.4 te groei (Pitt & Hocking, 1985) en is tipiese koue-tolerante basidiomisetes giste (Davenport, 1980; Schmidt-Lorenz & Gutschmidt, 1968). Die *Rhodotorula* spesies is in staat om kaseïen te peptiseer en bottervet aan te val (Ingram, 1958; Fleet & Mian, 1987) en word daarom as betreklik skadelik vir melk en melkprodukte beskou. Alhoewel dit bekend is dat *Rhodotorula diffluens* stamme volop in kaasmonsters voorkom (Fleet & Mian, 1987; Nakase et al. 1977), is slegs twee isolate in hierdie studie gevind (Fig. 1). Die oorgrote

meerderheid *Rhodotorula* isolate is vanaf lug en werksoppervlaktes geïsoleer en hierdie resultate verkry, vergelyk goed met dié soos beskryf deur Connell en Skinner (1953) wat hierdie spesies as algemene lug kontaminante beskryf. *Yarrowia lipolytica* stamme word deur sterk lipolitiese aktiwiteite by temperature onder 0°C gekenmerk (Alford & Pierce, 1961). Hierdie kenmerk mag belangrik wees by die bederf van kaas. *Yarrowia* isolate is gevind in die pekelwater en op werksoppervlaktes. Die genera *Zygosaccharomyces* en *Torulasporea* is in pekelwater en kaaswei in hierdie studie gevind (Fig. 1), wat ooreenstem met Seiler en Busse (1990) se studies.

Groep III bestaan uit 3 *Issatchenkia* isolate, 11 *Kluyveromyces* isolate, 21 *Trichosporon* isolate, 23 *Cryptococcus* isolate, 23 *Candida* isolate en 59 *Debaryomyces* isolate. Laasgenoemde genus was oorheers deur die spesies *Debaryomyces hansenii*. *Debaryomyces hansenii* spesies is geïsoleer vanaf 'n wye verskeidenheid van bronne in die kaasfabriek insluitende die pekelwater, wei, wrongel, lug, werksoppervlaktes en die werkers se hande en voorskote. *Debaryomyces hansenii* spesies, het domineer in hierdie studie en dit stem ooreen met vorige resultate verkry (Fleet & Mian, 1987; Lenoir, 1984; Seiler & Busse, 1990; Suriyarachchi & Fleet, 1981). Die mees uitstaande kenmerk van *Debaryomyces hansenii* is hul vermoë om by uiterste hoë sout konsentrasies (Mrak & Bonar, 1939) en lae wateraktiwiteits waardes (Tilbury, 1980) te groei. Bogenoemde se toleransie tot lae temperature (Davenport, 1980) en hul vermoë om ekstrasellulêre proteases en lipases te produseer (Fleet & Mian, 1987; Szumski & Cone, 1962), kan ook hul dominansie in suiwelprodukte verklaar.

*Trichosporon beigeli* isolate verteenwoordig die tweede grootste groep van spesies wat uit pekelwater, wei, lug, werksoppervlaktes en die werkers se hande en voorskote geïsoleer is. Hierdie hoë voorkoms van *Trichosporon beigeli* in pekelwater (Fig. 1) stem ooreen met resultate verkry deur Seiler en Busse (1990). *Trichosporon beigeli* spesies speel ook 'n belangrike rol in die bederf van suiwelprodukte as gevolg van hul vermoë om melkproteïene en vet te metaboliseer (Szumski & Cone, 1962; Vorbeck & Cone, 1963) by lae temperature (Davenport, 1980). *Kluyveromyces marxianus*, die enigste laktose fermenterende gis geïsoleer tydens hierdie studie vanuit pekel, wei en wrongel, is ook by hierdie groep ingesluit (Fig. 1). Die proteolitiese en lipolitiese

aktiwiteit van hierdie spesies asook hul vermoë om te fermenteer, speel 'n belangrike rol in die aroma van kaas as gevolg van die vorming van asetaldehyd en etanol. Die tekstuur van kaas word ook deur *Kluyveromyces* stamme se fermenterende vermoë beïnvloed (Lenoir, 1984; Lubert & Frazier, 1955). Daar is baie verwysings oor *Torula cremoris* (nou bekend as *Kluyveromyces marxianus*) wat 'n gisagtige of soms 'n bitter smaak (Ingram, 1958; Walker & Ayres, 1970) in melk en melkprodukte veroorsaak. Dit is bekend dat die oormatige produksie van koolstofdoksied as gevolg van die fermentasie van laktose, skuimerigheid en laat blaas in kaas veroorsaak (Lenoir, 1984; Walker & Ayres, 1970). *Cryptococcus albidus* isolate is ook dikwels in pekel, wei, lug, wrongel en op werkers se hande en voorskote gevind. Die voorkoms van hierdie spesies in groot getalle word toegeskryf aan hul lipolitiese aktiwiteit en hul vermoë om goed by lae temperature te groei (Davenport, 1980; Fleet & Mian, 1987).

Die herhaalde voorkoms van giste geassosieer met Cheddar en Gouda vervaardiging is duidelik aangetoon deur resultate verkry in hierdie studie. Die spesies geïsoleer vanaf die verskillende bronne is nagenoeg dieselfde as dié wat normaalweg uit rou melk geïsoleer word. Dit stem ook ooreen met resultate verkry deur Walker en Ayres (1970). Laasgenoemde werkers het gevind dat die mate van geur defekte wat ontwikkel in kaas, baie nouverwant is aan die teenwoordigheid van giste in melk tydens die stollingstyd. *Debaryomyces hansenii*, *Trichosporon beigeli* en *Cryptococcus albidus* spesies het die meeste voorgekom tydens hierdie studie, wat toegeskryf kan word aan hul vermoë om ekstrasellulêre proteases of lipases of beide te produseer, asook hul toleransie tot lae temperature en hoë soutkonsentrasies. Ses-en-sewentig gisstamme het positiewe resultate getoon op die assimilasië van laktose. Hierdie gisstamme sal dan verder geselekteer word op grond van hulle vermoë om laktose te benut.

### 3.5 VERWYSINGS

- ALFORD, J.A. AND PEARCE, D.A. (1961) Lipolytic activity of microorganisms at low and intermediate temperatures. III. Activity of microbial lipases at temperatures below 0 °C. *J. Food. Sci.*, 26: 518-524.
- BARNETT, J.A., PAYNE, R.W. AND YARROW, D. (1990). *Yeasts: Characteristics and identification*, second edition. Cambridge University Press, Cambridge.
- BIGALKE, D.L., AND BUSTA, F.F. (1982) Quality management systems for the food industry HACCP approach to increased profits. *Food Technol. Aust.* 34: 515-517.
- CONNELL, G.A. AND SKINNER, C.E. (1953) The eternal surface of the human body for nonfermenting nonpigmented yeasts. *J. Bacteriol.*, 66: 627-633.
- COUSIN, M.A. (1982) Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. *J. Food Protect*, 45: 172-207.
- DAVENPORT, R.R. (1980) Cold-tolerant yeasts and yeast-like organisms. In: "Biology and activities of yeasts" (F.A. Skinner; S.M. Passmore, and R.R. Davenport eds.). Academic Press, London. pp. 215-228.
- ENGEL, V.G. (1986a) Hefen in silagen und rokmilch. *Milchwissenschaft*, 41: 633-635.
- ENGEL, V.G. (1986b) Vorkommen von hefen in frischkäse-organoleptische beeinflussung. *Milchwissenschaft*, 41: 692-694.
- FAVERO, M.S., McDONE, J.J., ROBERTSON, J.A., HOFFMAN, R.F. AND EDWARDS, R.W. (1968) Microbiological sampling of surfaces. *J. Appl. Bacteriol.*, 31: 366-373.

- FERNANDEZ DEL POZO, B., GAYA, P., MEDINA, M., RODRIGUES-MARIN, M.A., AND NUNEZ, M. (1988) Changes in chemical and rheological characteristics of La Serena ewes' milk cheese during ripening. *J. Dairy Res.*, 55: 457-465.
- FLEET, G.H. AND MIAN, M.A. (1987) The occurrence and growth of yeasts in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.*, 4: 145-155.
- GARRISON, E.R. (1959) Lipolytic yeasts in cream from dairy farms. *J. Dairy Sci.*, 42: 905-911.
- GILMOUR, A. AND ROW, M.T. (1981) Micro-organisms associated with milk. In: "Dairy Microbiology", volume 1 (R.K. Robinson, ed.). Applied Science Publishers, London. pp. 35-75.
- HORWOOD, J.F., STARK, W. AND HULL, R.R. (1987) A "fermented, yeasty" flavour defect in Cheddar cheese. *Aust. J. Dairy Technol.*: 25-26.
- INGRAM, M. (1958) Yeasts in food spoilage. In: A.H. Cook (ed), The chemistry and biology of yeasts, Academic Press, New York. pp. 603-633.
- KREGER-VAN RIJ, N.J.W. (ed.) (1984) The yeasts, a taxonomic study. 3rd ed. Elsevier, Amsterdam.
- LENOIR, J. (1984) The surface flora and its role in the ripening of cheese. *Bull. Int. Dairy Fed.*, 171: 3-20.
- LODDER, J. AND KREGER-VAN RIJ, N.J.W. (1952) The yeasts, a taxonomic study. North Holland Publishing Co., Amsterdam, Netherlands.
- LUBERT, D.J. AND FRAZIER, W.C. (1955) Microbiology of the surface ripening of brick cheese. *J. Dairy Sci.*, 38: 981-990.

MACHOTA, S.V., VICENS, M.J.P., DE SIMON, M.T.C. AND FERNANDEZ, G.S.

(1987) Raw milk mycoflora. *Milchwissenschaft*, 42: 20-22.

MRAK, E.M. AND BONAR, L. (1939) Film yeasts from pickle brines. *Zentbl. Ba*

*ktl ParasitKde*, Abt. II: 289-294.

NAKASE, T., GOTO, S., KOYAMA, Y., KOMAGATA, K. AND IZUKA, H. (1977)

Microbiological studies on cheese II. Determination of yeast found in cheese imported from Europe and North America. *J. Food Hygienic Soc. Japan*, 18: 353-361.

NUNEZ, M. (1978) Microflora of Cabrales cheese: changes during maturation. *J. Dairy*

*Res.*, 45: 501-508.

OOSTHUIZEN, A., KOCK, J.L.F., VILJOEN, B.C., MULLER, H.B. AND LATEGAN,

P.M. (1987) The value of long-chain fatty acid composition in the identification of some brewery yeasts. *J. Inst. Brew.*, 93: 174-176.

PITT, J.I. AND HOCKING, A.D. (1985) Fungi and food spoilage. Academic Press, New

York, pp. 335-360.

PURKO, M., NELSON, W.O. AND WOOD. (1951) The associative action between

certain yeasts and *Bacterium linens*. *J. Dairy Sci.*, 34: 699-705.

ROBINSON, R.K. (1981) Dairy microbiology, volume 1. Applied Science Publishers,

London.

SCHMIDT-LORENZ, W. AND GUTSCHMIDT, J. (1968) Mikrobielle und sensorische

veränderungen gefrorener Lebensmittel bei Lagerung im Temperatur bereich von -2.5°C bis -10°C. *Lebensmittel-Wissenschaft Technologie*, 1: 26-43.

- SEILER, H. AND BUSSE, M. (1990) The yeasts of cheese brines. *Int. J. Food Microbiol.*, 11: 289-304.
- SKINNER, C.E., EMMONS, C.W. AND TSUSCHIYA, H.M. (1961) *Henrici's molds, yeasts and actinomycetes*. John Wiley & sons, Inc., New York.
- SURIYARACHCHI, V.R. AND FLEET, G.H. (1981) Occurrence and growth of yeasts in yogurts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 42: 574-579.
- SZUMSKI, S.A. AND CONE, J.F. (1962) Possible role of yeasts endoproteinases in ripening surface-ripened cheeses. *J. Dairy Sci.*, 45: 349/353.
- TILBURY, R.H. (1980) Xerotolerant (osmophilic) yeasts. In: F.A. Skinner; S.M. Passmore, and R.R. Davenport (Eds.), *Biology and activities of yeasts*. Academic Press, London. pp. 153-176.
- VAN DER WALT, J.P. AND HOPUSU-HAVU, V.K. (1976) A colour reaction for the differentiation of ascomycetous and hemibasidiomycetous yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, 42: 157-163.
- VILJOEN, B.C., KOCK, J.L.F. AND LATEGAN, P.M. (1986) Fatty acid composition as a guide to the classification of selected genera of yeasts belonging to the Endomycetales. *J. Gen. Microbiol.*, 132: 2397-2400.
- VILJOEN, B.C., KOCK, J.L.F. AND BRITZ, T.J. (1988a) The significance of long-chain fatty acid composition and other phenotypic characteristics in determining relationships among some *Pichia* and *Candida* species. *J. Gen. Microbiol.*, 134: 1893-1899.
- VILJOEN, B.C., KOCK, J.L.F. AND BRITZ, T.J. (1988b) The significance of long-chain fatty acid composition and other phenotypic characteristics in determining



relationships among some *Candida*, *Kluyveromyces* and *Saccharomyces* species. *System. Appl. Microbiol.*, 10: 116-120.

VILJOEN, B.C., KOCK, J.L.F. AND THOUPOU, K. (1989a) The significance of cellular long-chain fatty acid compositions and other criteria in the study of the relationship between sporogenous ascomycete species and asporogenous *Candida* species. *System. Appl. Microbiol.*, 12: 80-90.

VILJOEN, B.C. AND KOCK, J.L.F. (1989b) A taxonomic study of the yeast genus *Candida* Berkhout. *System. Appl. Microbiol.*, 12: 91-102.

VORBECK, M.L. AND CONE, J.F. (1963) Characteristics of an intracellular protease system of a *Trichosporon* species isolated from trappist-type cheese. *Appl. Microbiol.*, 11:23-27.

WALKER, S.J. (1988) Major spoilage micro-organisms in milk and dairy products. *J. Soc. Dairy Technol.*, 41: 91-92.

WALKER, H.W. AND AYRES, J.C. (1970) Yeasts as spoilage organisms. In: A.H. Rose and Harrison, J.S. (Eds.), *The Yeasts*, Vol. 3, Yeast Technology. Academic Press, London, p. 463-527.

WICKERHAM, L.J. (1951) Taxonomy of yeasts. *U.S. Dept. Agr. Tech. Bull.*, 1029.

## HOOFSTUK 4

EVALUERING VAN LAKTOSE FERMENTERENDE GISTE VIR  
ENKELSELPROTEÏEN PRODUKSIE VANAF WEI

#### 4.1 UITTREKSEL

Tydens die evaluering van laktose fermenterende giste vir enkelselproteïen produksie is 76 gisstamme van die 187 gisstamme wat in die voorafgaande hoofstuk (Hoofstuk 3) geïsoleer is, verder geselekteer op grond van hul vermoë om laktose te benut en te fermenteer. Veertien gisstamme van dieselfde spesie het met primêre seleksie die beste vermoë getoon om die beskikbare laktose in die wei te kan fermenteer. Die gisspesies *Candida utilis*, wat bekend is vir die produksie van enkelselproteïen vanaf verskeie bronne is ook in hierdie studie ingesluit. Die 15 gisstamme se vermoë om enkelselproteïen te produseer in wei as enigste voedingsbron is in skudflesse uitgevoer onder standaardtoestande oor 'n periode van 24 uur by 'n aanvangs pH waarde van 5.0 en temperatuur van 25 °C. Resultate het getoon dat meeste stamme van *K. marxianus* beter laktose fermenterende vermoë besit onder die spesifieke omgewingstoestande terwyl enkele stamme 'n stadiger tempo van groei getoon het. *C. utilis* het swakker laktose fermenterende eienskappe getoon as stamme van *K. marxianus* var. *lactis*. Een stam van *K. marxianus* geïsoleer uit kaaaswringel is geselekteer vir verdere weifermentasie studies op grond van die stam se vermoë om laktose te fermenteer, enkelselproteïen te produseer en sy aanpasbaarheid by hoë temperatuur, soos gevind in die fabrieksopset.

#### 4.2 INLEIDING

Rou en geprosesseerde suiwelprodukte word deur mikroörganismes vanuit die omgewing gekontamineer. Slegs 'n gedeelte van hierdie mikroflora sal oorleef as gevolg van eksterne en interne faktore teenwoordig in suiwelprodukte (Deak, 1991; Deak & Beuchat, 1996). Giste wat wel in staat is om te oorleef beskik oor sekere fisiologiese eienskappe om hierdie faktore die hoof te bied. Van hierdie faktore sluit in die fermentasie en assimilasië van laktose as enigste koolstofbron, proteolitiese aktiwiteit, lipolitiese aktiwiteit, assimilasië van melksuur en sitroensuur, groei by lae temperature en souttoleransië (Deak & Beuchat, 1996). Interaksië tussen giste onderling en ander mikroörganismes sal ook die ontwikkeling van 'n mikrobiese populasie beïnvloed. Uiteindelik sal 'n spesifieke gispopulasie in so 'n omgewing ontstaan (Deak, 1991; Deak & Beuchat, 1996; Phaff et al., 1978); in hierdie geval ekosisteme in 'n kaasfabriek.

Elke voedselproduk bied 'n besondere habitat selektief vir 'n sekere populasie van mikroörganismes. Die belangrikste voedingstof vir giste is koolhidrate wat beide as 'n groei en energiebron dien (Deak, 1991; Rose, 1987). Alle giste kan glukose benut as 'n enkel koolstofbron, alhoewel sekere gisspesies op ander koolstofbronne beter groei sal toon. Die primêre bron van suiker teenwoordig in wei is laktose en word deur 'n klein

groep giste benut (Macrae et al., 1993). Die groei en teenwoordigheid van die meeste giste in suiwelprodukte is ook afhanklik van die assimilasië van melksuur, sitroensuur asook ander organiese sure (Deak, 1991).

Alhoewel giste tradisioneel met fermentasië geassosieer word, is ongeveer slegs die helfte van alle bekende giste in staat om suikers te kan fementeer. Verder word slegs 'n klein hoeveelheid suikers, meestal heksose en oligosakkariede deur giste gefementeer. Aangesien suiwelprodukte en ook wei, hoofsaaklik uit laktose bestaan as 'n moontlike fermenteerbare suiker, is fermentasië beperk tot spesies van die genus *Kluyveromyces* en sekere *Candida* stamme. *Kluyveromyces marxianus* (vroeër bekend as *K. fragilis*) is ongetwyfeld die organisme van keuse vir die produksie van enkelselproteïene in wei-substraat (Capoor & Singh, 1985; Gomez & Castillo, 1983; Murad et al., 1992; Peppler, 1978; Willets & Ugalde, 1987; Zadow, 1993). Ander giste wat ook positiewe resultate opgelewer het tydens groei in wei sluit die spesies *Candida utilis* (Demmler, 1950), *C. kefyr*, *C. pseudotropicalis* en *C. krusei* (Beuchat, 1978) in.

Die teenwoordigheid van bogenoemde spesies in suiwelprodukte kan toegeskryf word aan die vermoë van hierdie giste om laktose te fermenteer en te assimileer, asook om die hoof organiese sure in suiwelprodukte, naamlik melksuur en sitroensuur te assimileer en hul vermoë om lipase en proteases te produseer wat kaseïene en vet kan hidroliseer (Deak, 1991; Fleet & Mian, 1987). Die ander hoof voedingsbron nodig vir giste om te kan groei is stikstof. Die beste stikstofbron is 'n kombinasie van aminosure, wat gewoonlik nie in natuurlike substrate teenwoordig is nie. Bykans alle giste kan aminosure, uream en anorganiese ammonium soute benut. Al hierdie verskillende vermoëns in die benutting en assimilasië van verskillende koolstof- en stikstofbronne, dra ongetwyfeld by tot die daarstelling van 'n spesifieke gispopulasië in 'n habitat (Deak, 1991).

Die spesifieke doel van hierdie studie is om vanuit die gispopulasië wat in die voorafgaande hoofstuk (Hoofstuk 3) geïsoleer is, deur middel van primêre en finale evaluasië prosedures 'n geskikte gisstam te selekteer wat in staat sal wees om onder die intrinsieke en ekstrinsieke faktore teenwoordig in kaaswei te kan groei. Verder moet die gisstam ook in staat wees om die hoofkoolstofbron teenwoordig in kaaswei, naamlik laktose te kan benut en fermenteer. Die belangrikste intrinsieke faktore sluit in die voedingstowwe teenwoordig in wei, wateraktiwiteit en pH, terwyl die ekstrinsieke faktore temperatuur en suurstofkonsentrasies insluit (Deak & Beuchat, 1996).

### 4.3 METODIEK

#### 4.3.1 Toetsorganismes

Tydens die primêre evaluasie prosedure is die 187 gisolate wat uit verskillende kaasfabrieke verkry is tydens die studie beskryf in Hoofstuk 3, gebruik. Tydens die sekondêre evaluasie prosedure is van die gisolate wat positiewe resultate getoon het tydens die primêre evaluasie prosedure gebruik. Die gisolate word numeries beskou as isolate 1 tot 14. *C utilis* (CBS 890) is ingesluit as verwysingstam, verkry uit die kultuurversameling van die Departement Mikrobiologie en Biochemie, UOVS, en word as isolaat 15 beskou. Voorraadkulture is op YM-agarskuinstes in McCartney bottels gehou bestaande uit 10% glukose, 3% gisekstrak, 3% moutekstrak, 5% pepton en 2% agar (Wickerham, 1951) en ses-maandeliks oorgeënt op YM skuinstes en by 4 °C opgeberg.

#### 4.3.2 Evaluasie prosedure

##### 4.3.2.1 Primêre evaluasie

As kontrole is gisolate se vermoë om op laktose plate te groei ondersoek. Alle isolate is op laktose plate uitgestreep (bestaande uit 10% laktose, 3% gisekstrak, 3% moutekstrak, 5% pepton en 2% agar) en geïnkubeer by 25 °C vir 96 uur. Daarna is die giste wat positiewe groei getoon het op laktose plate, uitgestreep op weimedium. Weimedium-plate is voorberei deur wei verkry vanaf 'n plaaslike Cheddar-kaasfabriek, te pasteuriseer by 72 °C vir 10s en gesteriliseerde agar (Oxoid, Basingstoke)(2%) hierby te voeg. Etileenoksied (Oxoid, Basingstoke, England) is gebruik om agarpoeier te steriliseer. Plate is geïnkubeer by 25 °C vir 96 uur. Gisolate wat groei op die weiplate getoon het, is verder ondersoek met behulp van fermentasie toetse soos voorgestel deur Lodder (1970). Laktose fermentasie stelle (bevattende 2.5g gisekstrak, 487.5 H<sub>2</sub>O, 10g laktose in 1 l H<sub>2</sub>O) is geïnkuleer en by 25 °C geïnkubeer vir 1 tot 3 dae. Durhambuise wat duidelike gasvorming getoon het, is as 'n positiewe resultaat aangeteken.

##### 4.3.2.2 Finale evaluasie

Die gisolate wat positiewe resultate getoon het tydens die primêre evaluasie prosedure is verder geëvalueer in 500ml Erlenmeyer skudflesse, bevattende weimedium. Elke fles is opgemaak om 200ml voorbereide wei (4.3.2.2.1) te bevat. Die eksperiment is uitgevoer by 25 °C en pH 5.0 op 'n skudmasjien (160 opm; asafstand van 50mm) oor 'n periode van 24 uur. Elke fles is met 4% inokulum van die verskillende kulture geïnkuleer (4.3.2.2.2).

#### 4.3.2.2.1 Media voorbereiding

Die wei se pH is aanvanklik op 5.0 ingestel en gepasteuriseer by 72 °C vir 15 sekondes. Die wei is gelaat om af te koel en gesentrifugeer by 5000 g vir 1min (Beckman, J2-21) om die gedepteïeniseerde proteïene en wrongeldeeltes af te swaai. Die bovloeistof is gedekanteer in 200ml hoeveelhede in 500ml steriele Erlenmeyer flesse.

#### 4.3.2.2.2 Voorbereiding van inokulum

Giste geselekteer tydens die primêre evaluasie is gebruik vir inokulasie van die weimedium soos beskryf vir die finale evaluasie. Agt-en-veertig-uur-oue giskulture (voorraadkulture) is gebruik vir die inokulasie van 200ml YM-boeljon in 500ml Erlenmeyerflesse en by 25 °C vir 48 uur op 'n skudmasjien (160 opm; asafstand 50mm) geskud. Die gisselle is geoes deur die selsuspensie te sentrifugeer by 10000 g vir 1 min. (Beckman J2-21) by 4 °C en 3 x gewas met steriele water. Die bovloeistof is afgegooi en die selle gesuspendeer in steriele water en 'n 4 % inokulum grootte vir inokulasie voorberei, wat as volg bereken is;

Die vergelyking  $y = (x * 100)/4$  is gebruik waar:

$x$  = g selle afgeweg

$y$  = hoeveelheid gesteriliseerde water bygevoeg

Selle is hersuspendeer deur te vorteks en 50ml van die selsuspensie is as inokulum by voorbereide wei (4.3.2.2.1) gevoeg.

Gefermenteerde weimonsters is elke 3 uur onttrek vir proteïene en alkohol bepaling vir 'n periode van 24 uur. Standaardtoestande (konstante pH, inokulum en inkubasietemperaatuur) is deurgaans tydens die periode van fermentasie in die skudflesse toegepas.

### 4.3.3 Analitiese prosedure

#### 4.3.3.1 Proteïene bepaling

Proteïenebepaling is gedoen volgens die Biuret-metode waartydens bees serum albumien fraksie V (Sigma Chemical Co., St Louis) as standaard gebruik is (Herbert et al., 1971; Stewart, 1975). 'n Standaardkromme van absorpsie versus standaard proteïenkonsentrasie is bepaal (Fig 4.1) en die proteïeninhoud van die monsters is daarna afgelees vanaf die reguitlyn verkry deur lineêre regressie. Alle monsters is gesentrifugeer en selmassas is 2 x met 'n 5mM NaOH oplossing gewas. Selle is in hierdie oplossing hersuspendeer en

gevries. Die Biuret-reagens is na ontvriesing tot die monster gevoeg en die absorpsie van die bovloeistof teen 'n reagensblanko spektrofotometries (LKB Biochrom Ultrospec II) by 555nm gelees. Resultate word in Fig 4.2, 4.3 en 4.4 getoon.

#### 4.3.3.2 Alkoholbepaling

Twee ml-hoeveelhede monster is geneem uit die fermenterende weimedia en afgeswaai in Eppendorfbuise (4000 g). Een-en-'n half ml-hoeveelhede is onttrek uit die bovloeistof en geplaas in GC-botteltjies. Die alkohol- monsters is ontleed m.b.v. 'n Hewlett-Packard 5710A gaschromatograaf toegerus met 'n vlamioniseerder detektor en Hewlett-Packard 3390A integreerder. 'n Glaskolom (15m x 1.5mm interne deursnit) gepak met 80 - 100 mesh Porapak N (Water Associates) is gebruik met 50ml/min stikstof as draergas met 'n oond temperatuur van 165 °C. 2% etielalkohol is as interne standaard gebruik. Resultate word in Fig. 4.5 en 4.6 getoon.

#### 4.3.3.3. Groeikinetika

Die finale evaluasie is uitgevoer op grond van groeitempo ( $\mu\text{.h}^{-1}$ ) gebaseer op die groeikrommes soos verkry tydens proteïenbepalings (4.3.3.1) uitgevoer op die verskillende skudfleskulture. Resultate word in Tabel 4.1 getoon.

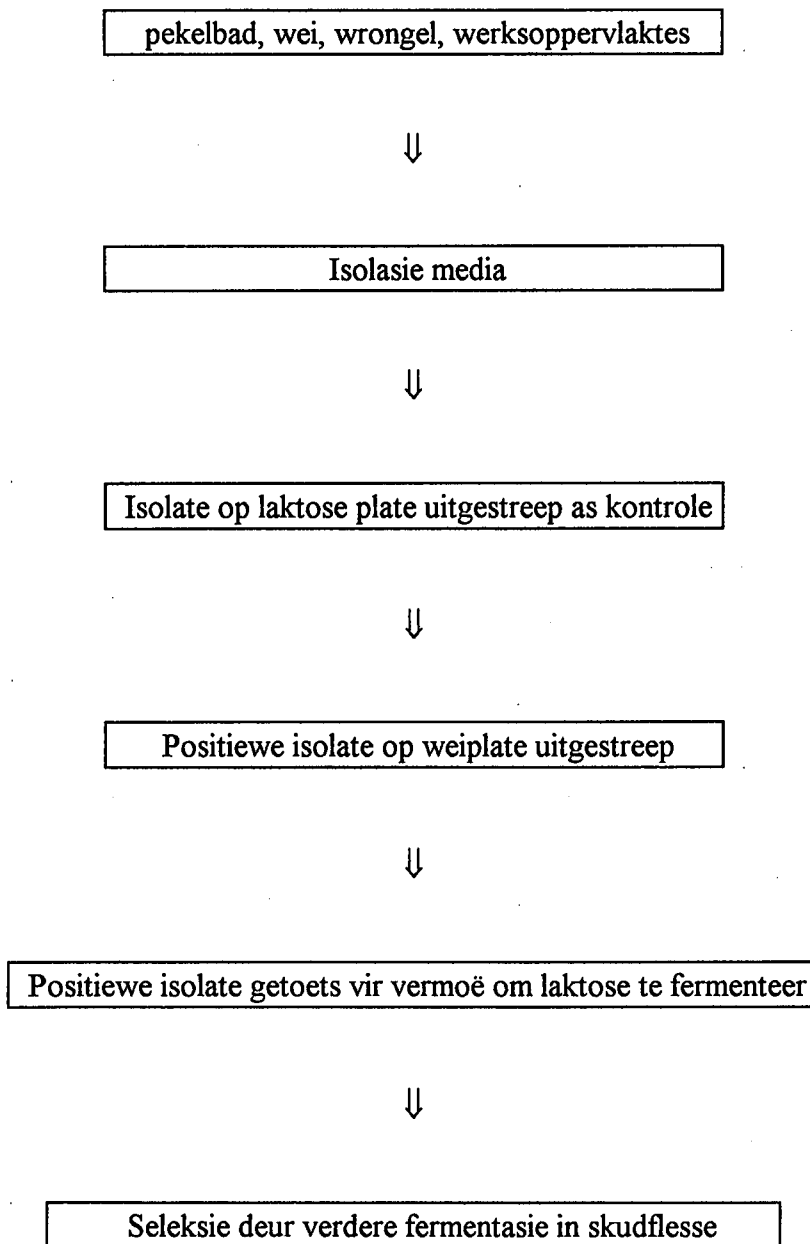
### 4.4 RESULTATE EN BESPREKING

Die kommersiële produksie van proteïen-verrykte voedsels deur die fermentasie van suur of soet wei word reeds wyd aanvaar (Jay, 1992). Twee van die mees algemene fermentasie sisteme waartydens wei in enkelselproteïenprodukte omgeskakel kan word is die gebruik van giste of fungi (Meyrath & Bayer, 1979). Tot op hede is die meeste navorsing gedoen op *K. fragilis* (nou bekend as *K. marxianus*), wat oor 'n baie goeie verteenwoordigende aminosuur samestelling beskik (Meyrath & Bayer, 1979; Moulin et al., 1983).

In Diagram 4.1 word 'n diagrammatiese voorstelling vir die aanvanklike isolering en selektering van gisolate vir verdere weifermentasie studies aangetoon. Uit die gispopulasie wat uit die verskillende kaasfabrieke geïsoleer is, het 'n totaal van 76 gisstamme positief op laktose plate gegroei, wat daarop dui dat hulle in staat is om laktose as koolstofbron te benut. Een-en-twintig van die gisolate het ook positiewe resultate op

**Diagram 4.1:**

Diagrammatiese voorstelling vir die aanvanklike isolering en selektering van organismes vir verdere ondersoek.





die weiplate getoon, wat 'n aanduiding is dat hierdie isolate wel in wei kan groei. Veertien gisisolate het positiewe resultate getoon tydens fermentasietoetse uitgevoer met laktose as enigste bron van koolhidraat wat uitgevoer is in proefbuis met die aanduiding van gasproduksie in Durhambuis. Die gasproduksie was dus 'n aanduiding dat hierdie isolate wel in staat is om te kan fermenteer met laktose as enigste koolstofbron (Kreger-van Rij, 1984).

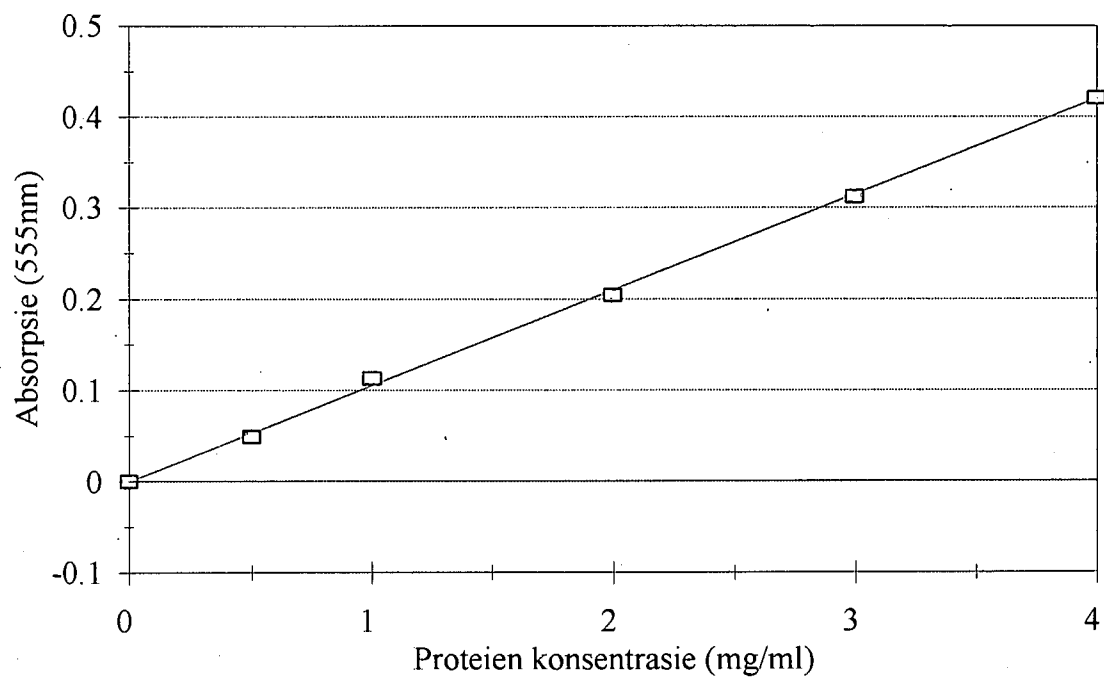
Al 14 gisisolate wat positiewe laktose fermentatiewe eienskappe getoon het behoort aan die spesies *Kluyveromyces*. Dit stem ooreen met resultate verkry in literatuur (Badr-Eldin et al., 1984; Fleet, 1990; Fleet & Mian, 1987; Jakobsen & Rossi, 1994; Marison & von Stockar, 1986; Ozilgen et al., 1988; Roostita & Fleet, 1996). Aangesien *C. utilis* dikwels gebruik word vir biomassa-produksie vanaf koolhidraatbronne as gevolg van sy vermoë om 'n verskeidenheid koolhidraatbronne te benut met 'n hoë proteïen opbrengs (Pasari et al., 1989), is 'n stam van *C. utilis* (CBS 890) in die studie ingesluit en as verwysingstam gebruik. Die finale evaluasie behels die seleksie van 'n geskikte stam van die laktose-benuttende giste met 'n beter potensiaal om biomassa te produseer as *C. utilis* (CBS 890).

Tydens finale evaluasie prosedures is die verskillende *Kluyveromyces* stamme asook *C. utilis* onderwerp aan fermentasie van gepasteuriseerde wei (4.3.2.2.1) in skudflesse onder standaard toestande. Alle skudflesse is geïnokuleer met die verskillende gisisolate met gelyke inokulum groottes. Aangesien die fisiese toestand waarin die gisselle hulle bevind tydens inokulasie die sloerfase sowel as die logaritmiëse fase kan beïnvloed, is die onderskeie gisisolate drie maal uitgestreep op YM-media en elke keer geïnkubeer vir 'n periode van 48 uur (Ghaly & El-Taweel, 1995). Fermentasie het geskied vir 'n periode van 24 uur, waartydens proteïen en alkohol monsters met gereelde tydsintervalle van 3 ure geneem is. Die standaardkromme van absorpsie teenoor proteïenkonsentrasie word in Fig 4.1 aangetoon. Die proteïeninhoud van die monsters is afgelees vanaf die reguitlyn verkry deur liniêre regressie. Die grafieke van die verandering in proteïenproduksie teenoor die fermentasietyd word voorgestel in Fig. 4.2, 4.3 en 4.4, terwyl die produksie van alkohol tydens dieselfde tydperiode oor fermentasietyd voorgestel word in Fig. 4.5 en 4.6.

Die Biuret-metode is gebruik tydens proteïenbepalings wat gekarakteriseer word deur die produksie van 'n pers-blou kleur wanneer  $\text{Cu}^{2+}$  ione deur peptied bindings verander word by 'n alkaliese pH. Die kleur verkry varieer met die tipe proteïen verkry en die intensiteit van die kleur is direk verwant aan die hoeveelheid proteïen teenwoordig. Die biuret metode is baie akkuraat en vinnig en is dus as die mees geskikte metode gesien om die ware proteïeninhoud te bepaal (King, 1978).

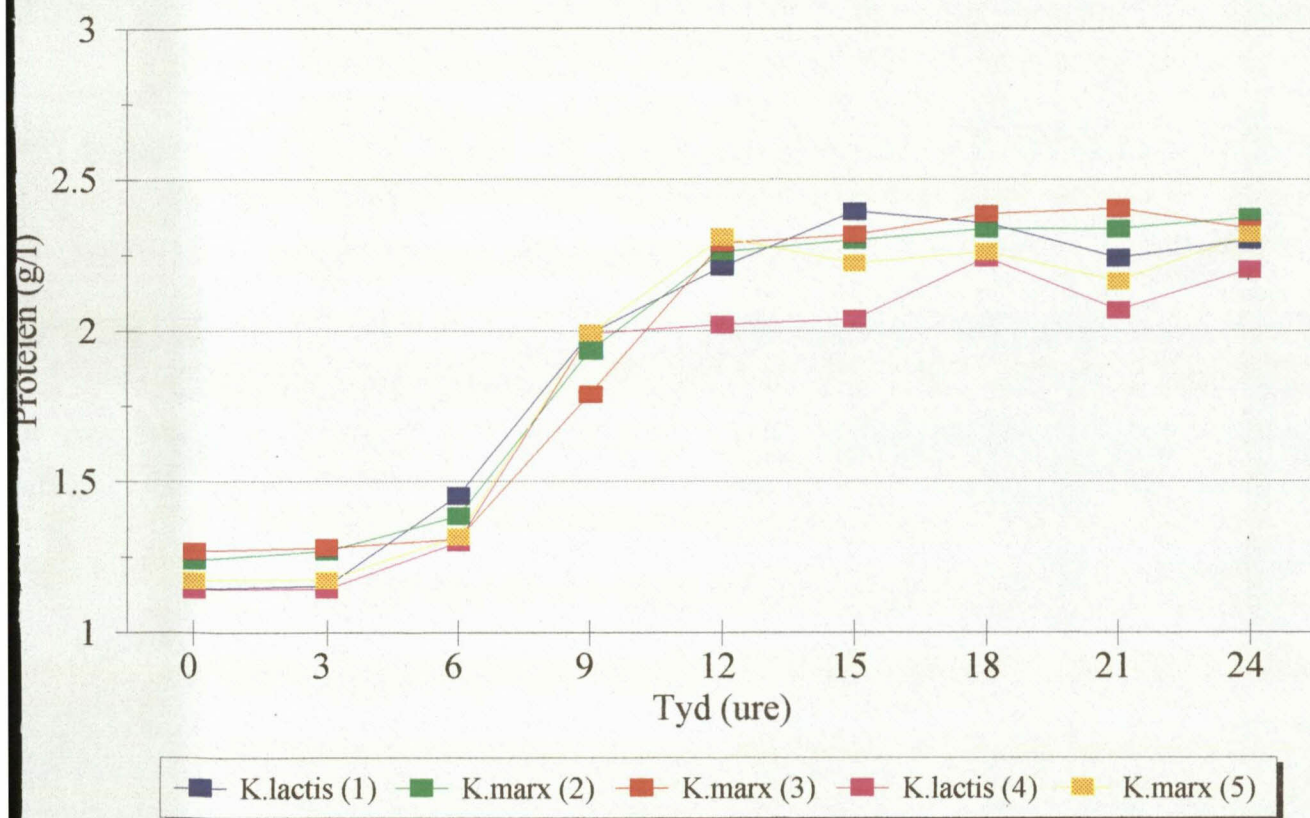
Die aanvanklike proteïenkonsentrasies het gevarieer tussen 0.952 en 1.269g/l. Hierdie variasie kan verklaar word aangesien bekend is dat wei geheel en al nie 'n uniforme produk is nie (Zadow, 1993). Die sloerfase in proteïenproduksie het plaasgevind tydens

STANDAARDKROMME  
Proteïen bepaling



**Fig 4.1:** Standaardkromme van proteïenbepaling ( $r^2 = 0,99868$ ) voorberei volgens Herbert et al. (1971).

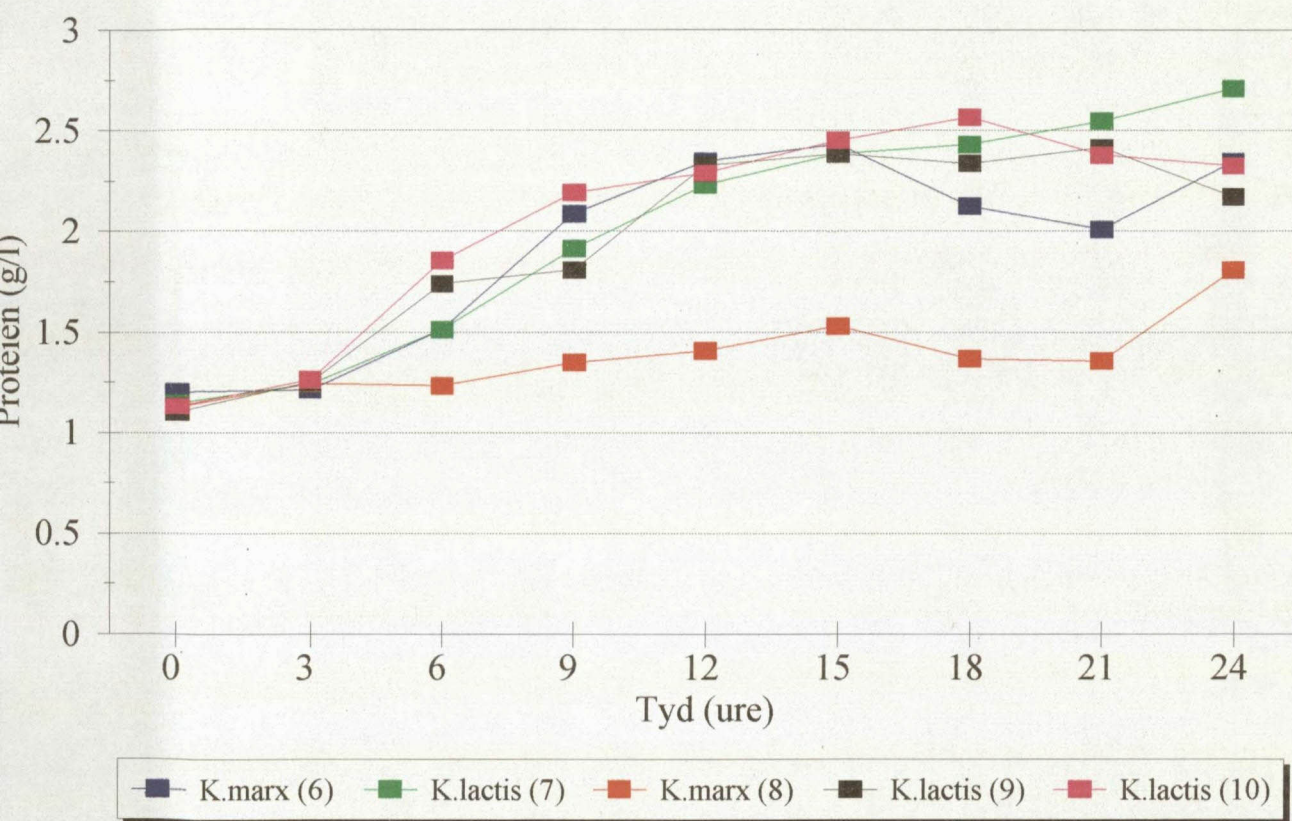
### VERANDERING IN PROTEIENKONSENTRASIE TYDENS WEIFERMENTASIE IN SKUDFLESSE



**Fig 4.2:**

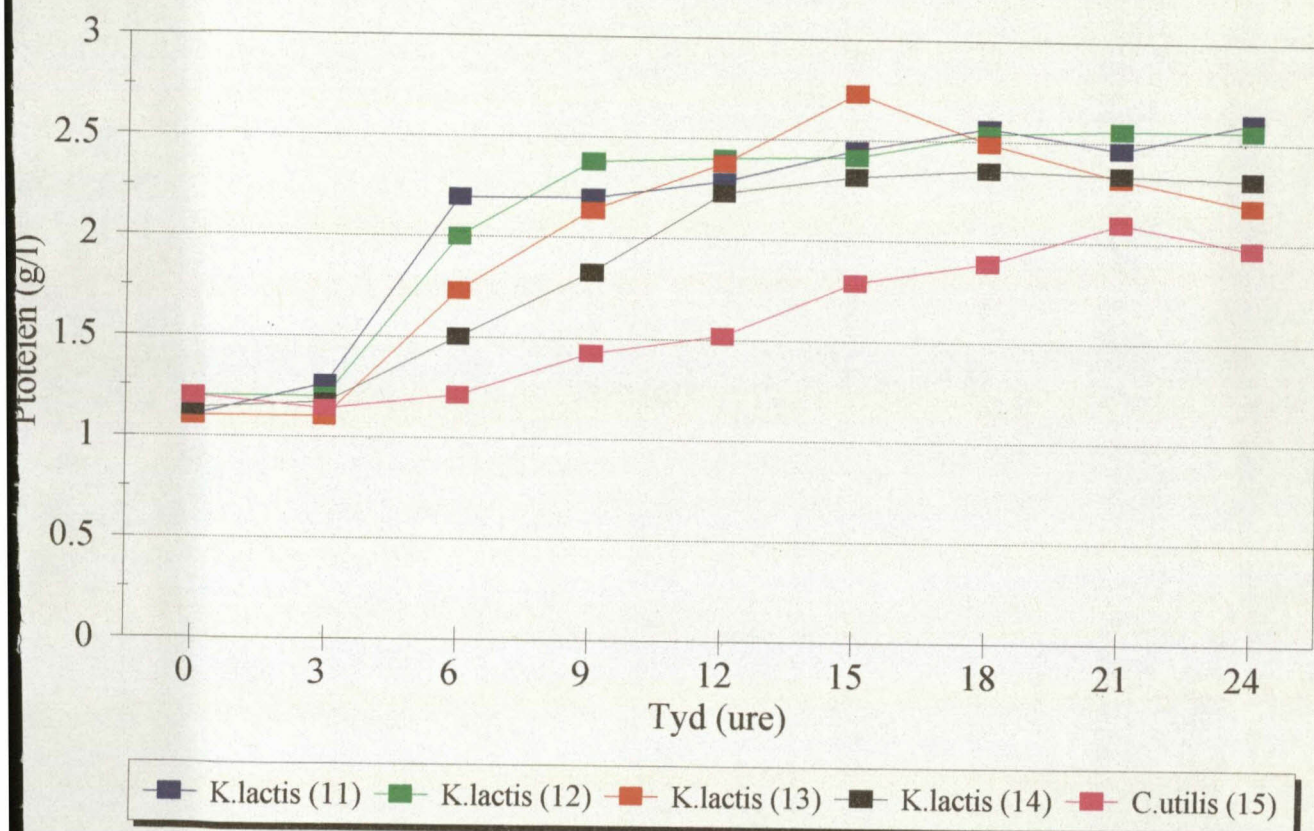
Kromme van die verandering in proteienkonsentrasie oor tyd tydens weifermentasie. (*K. lactis* 1 en 4 en *K. marxianus* 2,3 en 5).

### VERANDERING IN PROTEIENKONSENTRASIE TYDENS WEIFERMENTASIE IN SKUDFLESSE



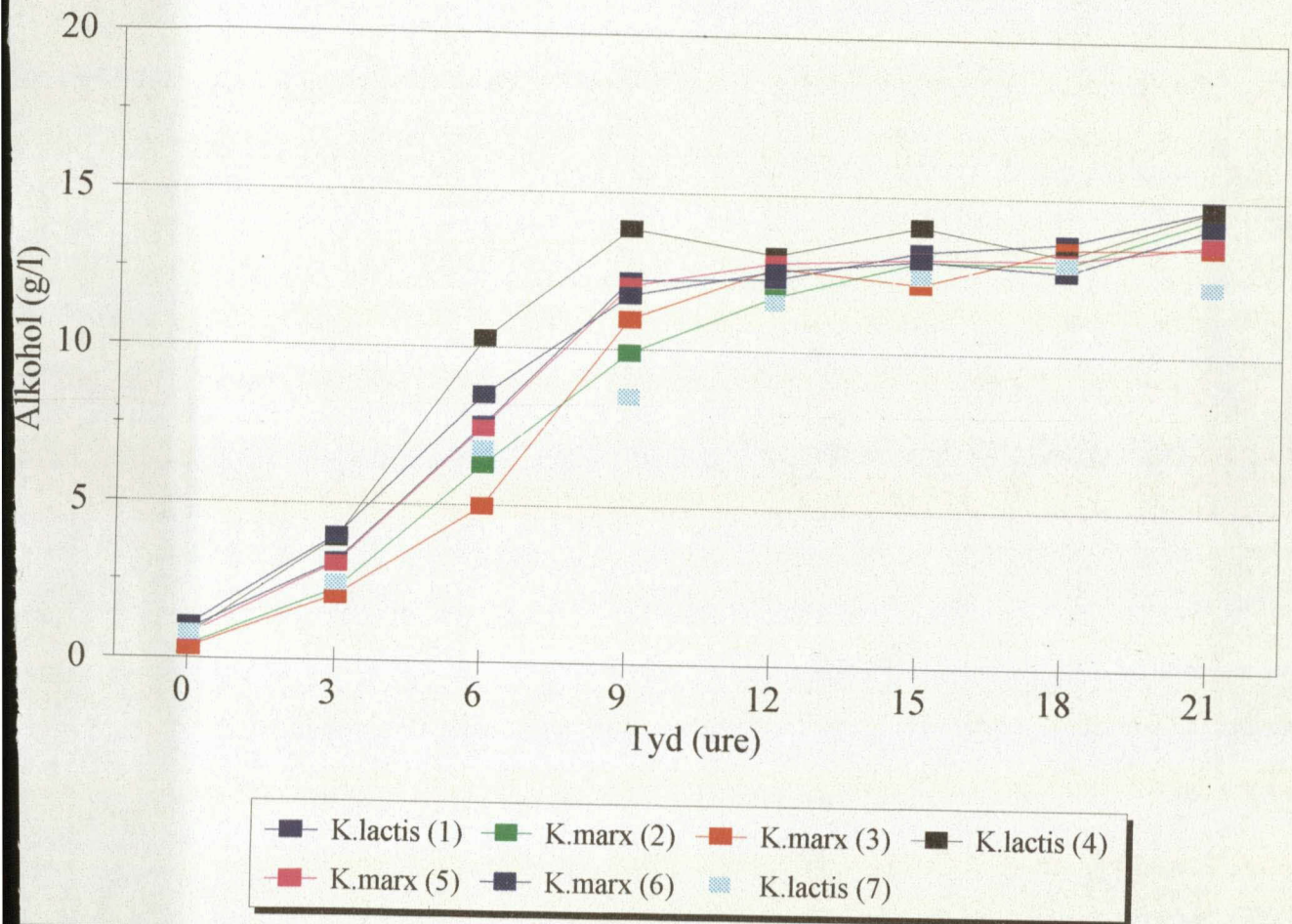
**Fig 4.3:** Kromme van die verandering in proteienkonsentrasie oor tyd tydens weifermentasie (*K. marxianus* 6 en 8 en *K. lactis* 7, 9 en 10).

### VERANDERING IN PROTEIENKONSENTRASIE TYDENS WEIFERMENTASIE IN SKUDFLESSE



**Fig 4.4:** Kromme van die verandering in proteienkonsentrasie oor tyd tydens weifermentasie (*K. lactis* 11 tot 14 en *C. utilis* 15)

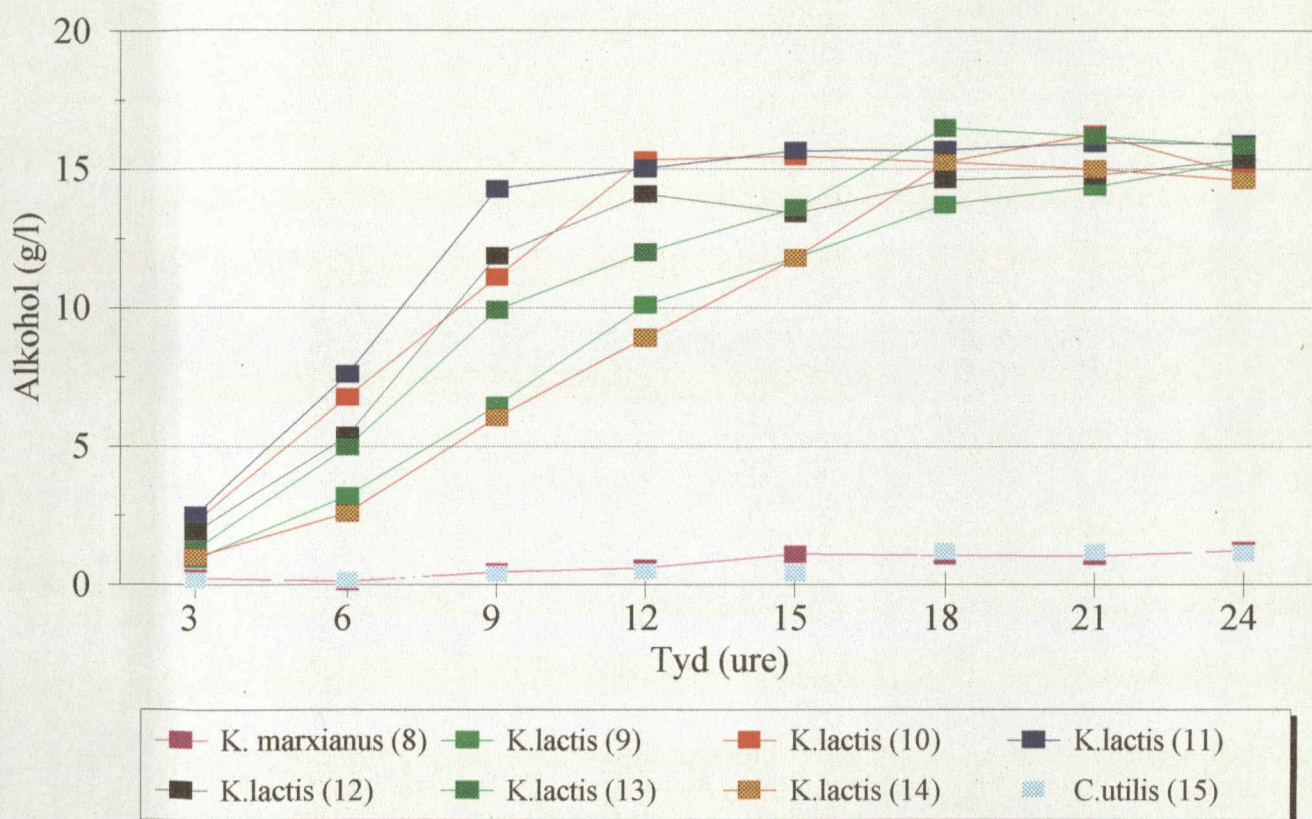
### VERANDERING IN ALKOHOLKONSENTRASIE TYDENS WEIFERMENTASIE IN SKUDFLESSE



**Fig 4.5:**

Kromme van die verandering in alkoholkonsentrasies oor tyd tydens weifermantasie (*K. lactis* 1 en 7 en *K. marxianus* 2, 3, 5 en 6).

### VERANDERING IN ALKOHOLKONSENTRASIE TYDENS WEIFERMENTASIE IN SKUDFLESSE



**Fig 4.6:** Kromme van die verandering in alkoholkonsentrasie oor tyd tydens weifermantasie (*K. marxianus* 8 en *K. lactis* 9 tot 14 en *C. utilis* 15).

die eerste drie uur van fermentasie, daarna het die logaritmiëse fase gevolg wat plaasgevind het oor die tydperk drie tot 12 ure. Die stasionêre fase van proteïenproduksie het gevolg na 12 ure van fermentasie. Die finale proteïenkonsentrasies wat verkry is na 24 uur het gewissel vanaf maksimum 2.712 mg/ml tot 'n minimum van 1.808 g/l.

Die hoogste proteïenkonsentrasie na 24 uur is deur *K. marxianus* stam 7 geproduseer naamlik, 2.712 g/l. Die laagste vlakke van proteïenkonsentrasie is deur *K. marxianus* stam 8 en *C. utilis* (15) geproduseer, onderskeidelik 1.808 en 1.971 g/l.

Deur gebruik te maak van die produksie van proteïen oor fermentasietyd is die  $\mu.h^{-1}$  (groeitempo) waarde bepaal waarvolgens ons die gisolate kan evalueer volgens hulle tempo van proteïenproduksie (Tabel 4.1). Hiervolgens kon ons bepaal watter gisolaat die hoogste proteïenkonsentrasie in die kortste tyd, naamlik 12 ure kon produseer. Resultate het getoon dat stamme 1 tot 6 van *K. marxianus* goeie groei getoon het met groeitempo's van 0.1041 tot 0.1419  $\mu.h^{-1}$ . *Kluyveromyces* stamme 7 tot 14 sowel as *C. utilis* het almal groeitempo's van laer as 0.08  $\mu.h^{-1}$  getoon. Die gisstam wat die beste vertoon het op grond van tempo van proteïenproduksie was *K. marxianus var. lactis* (4). Op grond van hierdie data is *K. marxianus var. lactis* stam 4 geselekteer vir verdere fermentasiestudies in 'n aërobiese bioreaktor, met gekontroleerde deurlugting, roerspoed en temperatuur.

Die produksie van alkohol en koolstofdoksied as finale produkte kom algemeen onder giste voor tydens anaërobiese toestande (Sols et al., 1971). Indien geen of min suurstof teenwoordig is, lei die fermentasie van 'n suiker molekule tot die vorming van alkohol (Suomalainen & Oura, 1971). 'n Sterk toename in alkoholproduksie het tydens die periode drie tot 15 ure van fermentasie voorgekom vir *K. marxianus* stamme 1 tot 7 en 9 tot 14. Dit kan verklaar word as gevolg van die ontstaan van anaërobiese toestande tydens die eksponensiële fase van groei, wat in die skudflesse voorgekom het. Na 15 ure van fermentasie is 'n stasionêre fase bereik en alkoholvlakke het konstant gebly. *K. marxianus* stam 8 asook *C. utilis* het deurgaans baie lae vlakke van alkohol geproduseer. Die finale vlakke van alkohol het na 24 ure gevarieer tussen die verskillende organismes vanaf minimum 1.144 tot 'n maksimum waarde van 15.933 g/l. *C. utilis* het die laagste vlak van alkohol geproduseer naamlik 1.144 g/l, gevolg deur *K. marxianus* stam 8 wat 1.227 g/l gevorm het. Die hoogste vlakke van alkohol is geproduseer deur *K. marxianus* stamme 1 tot 7 en 9-14 met 'n gemiddeld van 14.551 g/l en variasie 12.210 tot 15.933 g/l.



Tabel 4.1: Die groeisnelheid bepaal volgens die proteïenproduksie (mg/ml) teenoor tyd (ure) soos verkry in Fig 4.2 en 4.3.

| Organisme                           | Groeisnelheid ( $\mu h^{-1}$ ) |
|-------------------------------------|--------------------------------|
| 1. <i>K. marxianus var. lactis</i>  | 0.1055                         |
| 2. <i>K. marxianus</i>              | 0.1180                         |
| 3. <i>K. marxianus</i>              | 0.1041                         |
| 4. <i>K. marxianus</i>              | 0.1419                         |
| 5. <i>K. marxianus</i>              | 0.1369                         |
| 6. <i>K. marxianus</i>              | 0.1079                         |
| 7. <i>K. marxianus var. lactis</i>  | 0.0783                         |
| 8. <i>K. marxianus</i>              | 0.0286                         |
| 9. <i>K. marxianus var. lactis</i>  | 0.0131                         |
| 10. <i>K. marxianus var. lactis</i> | 0.0545                         |
| 11. <i>K. marxianus var. lactis</i> | 0.0015                         |
| 12. <i>K. marxianus var. lactis</i> | 0.0613                         |
| 13. <i>K. marxianus var. lactis</i> | 0.0693                         |
| 14. <i>K. marxianus var. lactis</i> | 0.0663                         |
| 15. <i>C. utilis</i>                | 0.0534                         |

## 4.5 VERWYSINGS

- BADR-ELDIN, S.M., EL-NIMR, A.A., YOUSEF, A. & YOUSEF, Y.B. (1984) Salted whey utilization. V. Chemical composition of some yeasts grown on salted whey. *Egypt. J. Microbiol.*, 19, 2: 261-264.
- BEUCHAT, L.R. (1978) Food and beverage mycology. Avi Publishing Company, Westport.
- CAPOOR, A.K. & SINGH, K. (1985) Fermentation of whey by lactose utilizing yeast for S.C.P production and B.O.D. reduction. *Indian J. Dairy Sci.*, 38, 1: 15-17.
- DEAK, T. (1991) Foodborne Yeasts. *Advances in Applied Microbiology*, 36: 179-195.
- DEAK, T. & BEUCHAT, L.R. (1996) Handbook of food spoilage yeasts. CRC Press, Boca Raton.
- DEMMLER, G. (1950) Production of yeast from whey using the Waldof method. *Milchwissenschaft*, 5: 11-17.
- FLEET, G.H. (1990) Yeasts in dairy products. *J. Appl. Bacteriology*, 68: 199-211
- FLEET, G.H. & MIAN, M.A. (1987) The occurrence and growth of yeasts in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.*, 4: 145-155.
- GHALY, A.E & EL-TAWEEL, A.A. (1995) Effect of lactose concentration on batch production of ethanol from cheese whey using *Candida pseudotropicalis*. *American Society of Agricultural Engineers*, 38, 4: 1113-1120.
- GOMEZ, A. & CASTILLO, F.J. (1983) Production of biomass and B-o-galactosidase by *Candida pseudotropicalis* grown in continuous culture on whey. *Biotechnol. Bioengin.*, 25: 1341-1357.
- HERBERT, PHIPPS & STRANGE (1971) Chemical Analysis of Microbial Cells. In "Methods in Microbiology 5B" (Norris and Ribbons eds.). Academic Press, New York. pp. 209-344.

- JAKOBSEN, M. & ROSSI, J. (1994) Yeasts. *International Dairy Federation Annual Sessions in Adelaide, September*. F-Doc 245: 1-25.
- JAY, J.M. (1992) *Modern Food Microbiology*. Fourth Edition. Van Nostrand Reinhold, New York.
- KING, R.D. (1978) *Developments in food analysis techniques-1*, 1st ed.. Applied Science Publishers Ltd., London.
- KREGER-VAN RIJ, N.J.W. (ed.) (1984) *Encyclopedia of fermented fresh milk products*. 1st ed. Van Nostrand Reinhold Publishers, New York.
- LODDER, J. (1970) *The Yeasts*. North-Holland Publishing Company, London.
- MACRAE, R., ROBINSON, R.K. & SADLER, M.J. (1993) Fermentation of whey. In: *Encyclopedia of food science, food technology and nutrition*. Volumes 3 and 7. Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich Publishers, London.
- MARISON, I & VON STOCKAR, U. (1987) A colorimetric investigation of the aerobic cultivation of *Kluyveromyces fragilis* on various substrates. *Enzyme Microb. Technol.*, 9: 33-42.
- MEYRATH, J. & BAYER, K. (1979) Biomass from whey. In "Microbial Biomass" (A.H. Rose ed.) Academic Press, London. pp.207-269.
- MOULIN, G., LEGRAND, M. & GALZY, P. (1983) The importance of residual aerobic fermentation in aerated medium for the production of yeast from glucidic substrates. *Proc. Biochem.*, 18,5: 5-8.
- MURAD, H.A., ABD-EL-GHANI S. & EL-SHENAWY, K. (1992) Bioconversion of whey permeate into *Kluyveromyces lactis* biomass. *Egyptian J. Dairy Sci.* 20: 261-271.
- OZILGEN, M., OLLIS, D.F. & OGRYDZIAK, D. (1988) Kinetics of batch fermentations with *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme Microb. Technol.*, 10: 165-172.

- PASARI, A.B., KORUS, R.A. & HEIMSCH, R.C. (1989) A model for continuous fermentations with amylolytic yeasts. *Biotechnol. Bioeng.*, 33: 338-343.
- PHAFF, H.J., MILLER, M.W. & MRAK, E.M. (1978) The life of yeasts. 2nd ed.. Harvard University Press, London.
- PEPPLER, H.J. (1978) Yeasts. Annual Reports on Fermentation Processes, Vol. 2, Academic Press, Inc.
- ROOSTITA, R. & FLEET, G.H. (1996) The occurrence and growth of yeasts in Camembert and Blue-veined cheeses. *Int. J. Food Microbiol.*, 28: 393-404.
- ROSE, A.H. (1987) Responses to the chemical environment. In "The Yeasts, Yeasts and the Environment" Vol. 2 (A.H. Rose & J.S. Harrison, eds.). 2nd edition, Academic Press, London. pp. 5-40.
- SOLS, A., GANCEDO C. & DELAFUENTE, G. (1971) Energy-yielding metabolism in yeasts. In "The Yeasts " (A.H. Rose & J.S. Harrison, eds.) Academic Press, London. pp. 271-307.
- STEWART (1975) Methods in Cell Biology. In Prescott (ed.) 12, p114.
- SUOMALAINEN, H. & OURA, E (1971) Yeast nutrition and solute uptake. In "The Yeasts" Vol. 2. (A.H. Rose & J.S. Harrison, eds), Academic Press London. pp. 3-60.
- WICKERHAM, L.J. (1951) Taxonomy of yeasts. U.S. Dept. Agr. Tech. Bull. 1029.
- WILLETS, A. & UGALDE, U. (1987) The production of single-cell protein from whey. *Biotech. Letters*, 9, 11: 795-800.
- ZADOW, J.G. (1993) Whey and lactose processing. Applied Science Publishers, London.

## HOOFSUK 5

ENKELSELPROTEÏEN PRODUKSIE DEUR LAKTOSE  
FERMENTERENDE GISTE IN WEIPERMEAT

## 5.1 UITTREKSEL

Die benutting van weipermeaat as fermentasiemedium vir die produksie van enkelselproteïen geskik vir diervoeding is ondersoek. Tydens hierdie ondersoek is 'n 2 l Multigen aërobiese bioreaktor met 'n volume van 1.5 l weipermeaat-substraat gebruik om 'n geïsoleerde *K. marxianus* stam te evalueer vir die vermoë om die laktose te benut vir die produksie van enkelselproteïen. Die kweking van *K. marxianus* in weipermeaat is oor 'n periode van 22 uur uitgevoer waartydens die aanvangs pH 6.00 was en die temperatuur konstant gehou is by 40 °C. 'n Gemiddeld van 44% proteïene in selle op droë massa basis is tydens die studie verkry, met 'n selopbrengskoeffisiënt van 0.4 g biomassa/g laktose verbruik. Hierdie data is gebruik om die geskiktheid van die isolaat as 'n potensiële enkelselproteïen produseerder te ondersoek.

## 5.2 INLEIDING

Giste speel 'n baie belangrike rol in voedsel tydens die bederf sowel as die fermentasie daarvan (Rossi, 1994) en is die belangrikste mikroorganismes gesien vanaf 'n ekonomiese en tradisionele oogpunt (Jakobsen, 1994). Die gebruik van giste strek vanaf die historiese en huidige produksie van brood, bier, wyn en ander alkoholiese drankes, tot 'n wye verskeidenheid van ander produkte soos etanol, gisekstrakte, pigmente, probiotika en ander spesifieke bestanddele van voedsel vir mens en dier, sowel as biochemiese middels vir die farmaseutiese bedryf (Jakobsen, 1994).

Die hoeveelheid wei wat wêreldwyd geproduseer word neem jaarliks toe teen 'n tempo van 3% gekorreleerd aan die verhoging in kaasproduksie. Die toename in toepassing van ultra-filtrasië proses in kaasfabrieke waartydens die proteïen uit wei gefiltreer word vir die produksie van weiproteïen-kontraat, lei tot die produksie van permeaat, 'n substraat wat geskik is vir die toepassing van biofermentasie (Murad et al., 1992). Die fermentasie van permeaat bied 'n addisionele oplossing gesien uit 'n finansiële oogpunt en sodoende word daar terselfdertyd ontslae geraak van 'n besoedelings probleem wat deur permeaat geskep word, aangesien 'n groot gedeelte hiervan nie benut word nie (Johnson, 1977; Zadow, 1992).

Weipermeaat kan gebruik word as afvalsubstraat tydens fermentasie vir die produksie van enkelselproteïen produkte deur giste vir menslike of diervoeding (Ben-Hassan & Ghaly, 1995; Bernstein et al., 1977; Deepen et al., 1994; Meyrath & Bayer, 1979; Wasserman, et al., 1961b). Hierdie produkte kan hoog in voedingswaarde wees en is nie-toksiese bronne van proteïene en vitamienes (Marth, 1978; Ben-Hassan & Ghaly, 1995). Wêreldwye proteïen tekorte maak die produksie van enkelselproteïen produkte 'n

baie goeie oorweging (Beuchat, 1978; Goldberg, 1985; Robinson, 1978; Stare & McWilliams, 1973).

Die kommersiële produksie van proteïene verrykte wei produkte deur die fermentasie van soet of suur wei is reeds aanvaar deur die suiwelbedryf as 'n erkende metode vir die produksie van enkelselproteïene-produkte (Jay, 1992). Twee algemene fermentasie sisteme vir die produksie van enkelselproteïene, sluit die gebruik van giste of fungi kulture in. Die mees algemene sisteem wat wel toegepas word, is die gebruik van *Kluyveromyces fragilis* (nou bekend as *K. marxianus*) (Ben-Hassan & Ghaly, 1995; Beuchat, 1978; Vananuvat & Kinsella, 1975) wat reeds deur die "FDA" goedgekeur is as 'n "GRAS" organisme (Bonekamp & Oosterom, 1994). Die "FDA" beskou *K. lactis* as 'n normale en selfs noodsaaklike komponent van baie gefermenteerde suiwelprodukte, en geen toksisiteit of patogenisiteit is al ooit geassosieer tydens die teenwoordigheid van *K. lactis* in voedsel nie (Bonekamp & Oosterom, 1994).

Die fermentasieproses behels die innokulasie van gedeproteïeniseerde-wei met 'n geskikte giskultuur as aanvangskultuur met deurlugting deurentyd om aërobiese toestande te skep (Marth, 1978) en die voorsiening van suurstof in geskikte hoeveelhede om die maksimum groei van die giskultuur te verseker (Johnson, 1977). Deur gebruik te maak van 'n groot inokulum kan die probleem van bakteriese- of giskontaminasie oorkom word en is spesiale aseptiese tegnieke onnodig. Omdat wei geen toksiese bestanddele bevat nie, is die medium baie geskik om mee te werk. (Singh & Neelakantan, 1989).

Die belangstelling in wei word gemotiveer deur die potensiaal om die winsgewendheid van die suiwelbedryf te verhoog en indirek kan die melkprodusent ook hierby baat (Conroy, 1993). Produksiekoste is egter die grootste beperkende faktor, aangesien operasionele koste 'n groot finansiële las kan bewerkstellig. Optimisering van die fermentasieproses kan lei tot die verlaging van kapitale en operasionele koste (Ben-Hassan & Ghaly, 1995).

## 5.3 METODIEK

### 5.3.1 Primêre evaluasie

#### 5.3.1.1 Vergelykende groeistudie van *K. marxianus* en *C. utilis* (CBS 890) om die groeitempo te bepaal in twee verskillende media.

'n Groeistudie onder standaardtoestande op 'n skudmasjien (160 opm en asafstand van 50mm) by 25 °C is oor 'n periode van 48 uur uitgevoer om te bepaal wat die groeitempo van *K. marxianus* en *C. utilis* (CBS 890) in onderskeidelik gesteriliseerde wei- en YM-media bevattende 10% glukose, 3% gisekstrak, 3% moutekstrak en 5% pepton

(Wickerham, 1951) is (Tabel 5.1). Hierdie studie is uitgevoer om te bepaal a) watter gisspesie die beste groei in wei sonder enige byvoegings of optimumtoestande en b) op watter tydstip die betrokke gisspesie die logfase sou bereik om sodoende te bepaal op watter tydstip inokulasie in voorbereide media maksimum groei sou verseker. 'n Klett kolorimeter (filter 64. golflengte 640 nm) is gebruik om die groei van organismes te volg soos bespreek onder die punt 5.3.3.1.

### 5.3.1.2. Vermoë van *K. marxianus* en *C. utilis* (CBS 890) om by verskillende temperature te groei.

*K. marxianus* en *C. utilis* (CBS 890) is op YM-medium uitgestreep en by vier verskillende temperature naamlik 25 °C, 30 °C, 37 °C, 40 °C vir 24 uur geïnkubeer, om die invloed van temperatuur op die oorlewing en groeitempo van die organismes te ondersoek. Resultate word in Tabel 5.2 aangetoon.

## 5.3.2 Sekondêre evaluasie

### 5.3.2.1 Kweekmedium - wei

Tydens hierdie studie is van 6% weipoelier, opgelos in gedistilleerde water gebruik gemaak. Die oplossing is gesteriliseer by 121 °C vir 15 min (stoomdruk 100kPa) en oornag by 4 °C opgeberg tot gebruik. Die weioplossing is daarna by 12 000 g vir 1 min. (Beckman, J2-21) uitgeswaai om van bakterieë en soliede partikels ontslae te raak. 1.5 l gesteriliseerde wei is hierna asepties na die fermenteerder oorgegooi. 'n Monster van die voorbereide wei het as blanko gedien tydens die bepaling van groei. Die pH van wei het voor gebruik gewissel tussen 5.4 en 6.78 en is voor inokulasie gestandaardiseer na 'n pH 6.00 met behulp van 0.1 N NaOH en HCl.

### 5.3.2.2 Toetsorganisme

'n *K. marxianus* stam, geïsoleer in 'n voorafgaande studie (Hoofstuk 3) en geselekteer vir die beste fermentasie vermoë in Hoofstuk 4 is deurgaans gebruik.

'n 10 % giskultuur inokulum is gebruik vir die inokulasie van die weimedium. Fermentasietoetse is in duplikaat gedoen. Monsters is elke 3 uur onttrek totdat die betrokke gis die stasionêre fase van groei bereik het, daarna is monsters 4 tot 5 uurliks onttrek vir analitiese ontledings (5.3.3).



### 5.3.2.3 Kweekmedium en inokulum voorbereiding

YM-medium is deurgaans gebruik vir die onderhoud van kulture van die proeforganismes. Voorraadkulture is drie-maandeliks in McCartney bottels oorgeënt op YM-skuinstes en by 4 °C opgeberg. Vanaf skuinstes is kulture uitgestreep op gesteriliseerde YM-agarplate en by 25 °C vir 48 uur geïnkubeer. 'n Ogievol van die vars moederkultuur is 48 uur voor inokulasie vanaf agarmedium oorgedra na 200ml gesteriliseerde YM-medium in 500ml Erlenmeyer skudflesse en by 25 °C op 'n skudmasjien geplaas by 160 opm (asafstand 50mm) vir 24 uur of totdat 'n Klett-waarde van  $\pm 1000$  bereik is. 'n 10% gis inokulum is asepties voorberei vanaf die opgegroeide selle deur die byvoeging van steriele water.

### 5.3.2.4 Fermentasie - apparaat

'n New Brunswick Multigen F-2000 bioreaktor is gebruik vir lot fermentasie by 'n temperatuur van 40 °C. Die 2.0 l glashouer wat gekoppel is aan 'n terugvloei koeler om verdamping te verhoed, is gevul met 1.5 l voorbereide weimedium (5.3.2.1). Deurlugting van een volume lug per volume medium per minuut is gebruik. Die opgeloste suurstofspanning (OSP) is by 'n 20% lug versadiging gehou deur gebruik te maak van 'n polarografiese elektrode (WTW, Weilheim, Federal Republic of Germany) wat aan 'n opgeloste suurstof kontroleerder gekoppel is (Du Preez & Hugo 1989). Saamgeperste lug is deur 'n vloeimeter verskaf wat daarna deur 'n mikrofilter (Hepa vent L\*3599) gestuur is, om lug te steriliseer. Die pH is gemeet deur 'n pH elektrode wat gekoppel is aan 'n pH meter (TC 1003).

### 5.3.2.5 Eksperimentele prosedure

Die bioreaktor en alle toebehore is gesteriliseer by 121 °C vir 30 min en gevul met 1.5 l voorbereide wei (5.3.2.4) en onmiddelik geïnokuleer met 'n 10%v/v inokulum sodra die wei se temperatuur gestandaardiseer is op 40 °C en aanvangs pH ingestel is op 6.00. Twee honderd  $\mu$ l antiskuumingsmiddel (Dow Corning 1520) is asepties na die weimedium in bioreaktor oorgedra om skuimvorming te beperk. Die opgeloste suurstofkonsentrasie is voortdurend gemonitor. Die aanvanklike roerspoed was 300 opm, maar is tydens die verloop van die studie verander soos die suurstofbehoefte verander het.

### 5.3.3 Analitiese metodes

#### 5.3.3.1 Bepaling van die groei van proeforganismes

Die Klett-Summerson foto-elektriese kolorimeter (filter no. 64, golflengte 640nm) is volgens standaard-voorskrifte gebruik. 'n Monster van die betrokke voorraad voorbereide wei in 'n Klettbuis het as blanko gedien en is gebruik om die nulpunt vir elke reeks lesings in te stel. Tydens die kweekproses is lesings geneem deur nagenoeg 5ml van die monster in Klettbuise te plaas. Die verandering met tyd, in Klettlesing het gedien as maatstaf van die groei van die proeforganisme en word aangedui in Fig 5.3. 'n Lineêre verwantskap bestaan slegs tussen 30 en 160 Klett eenhede en slegs waardes tussen hierdie twee betrokke waardes is gebruik vir die berekening van die maksimum spesifieke groeitempo ( $\mu_{\max}$ ) deur die vergelyking:

$$\mu_{\max} = \frac{\ln (x_2 / x_1)}{t_2 - t_1}$$

waar  $\mu_{\max}$  'n konstante naamlik die maksimum spesifieke groeisnelheid verteenwoordig  
 $x_2$  en  $x_1$  die verandering in Klett tussen twee punte verteenwoordig  
 $t_2$  en  $t_1$  die verandering in tyd

Resultate word in Tabel 5.3 weergegee.

#### 5.3.3.2 Droëmassaopbrengs

10 ml van die monster is uitgemeet en vir 5 min. uitgeswaai teen 4 000 g. Na dekantering van die bovloeistof is die buise bevattende die sediment in 'n droogoond by 105 °C geplaas vir 24 uur en daarna in 'n dessikator bevattende silika gel geplaas voordat die toetsbuise geweeg is (Tabel 5.3).

#### 5.3.3.3 Proteïenbepalings

Proteïenbepalings is uitgevoer volgens die Biuret-metode soos reeds in Hoofstuk 4 onder punt 4.3.3.1 bespreek. 'n Standaardkromme van absorpsie versus standaard proteïenkonsentrasie is bepaal (Fig 5.4) en die proteïeninhoud van die monsters is daarna afgelees vanaf die reguitlyn verkry deur lineêre regressie. Resultate word in Fig 5.5 aangetoon.

#### 5.3.3.4 Laktosebepalings

Ongeveer 2ml monster is afgemeet in Eppendorfbuise en vir laktose bepalings gebruik. Laktose monsters is vir 5min by 5000 g gesentrifugeer waarna die bovloeistof onttrek en deur 'n 0.20  $\mu\text{m}$  filter gespuit. Laktose is bepaal met behulp van 'n hoëdrukvlloeistofchromatograaf toegerus met 'n refraksie indeks detektor (Water Associates) deur gebruik te maak van 'n Bio-Rad Aminex HPX-87c kolom by 85 °C met dubbel gedistilleerde, gedeioniseerde, ontgasde, gefiltreerde water as loopvlloeistof. Die water in die opgaartenk is konstant gehou by 80 °C. 'n 2% m/v laktose-oplossings is as interne standaard gebruik tydens die kalibrering. Fig 5.6 toon hierdie resultate.

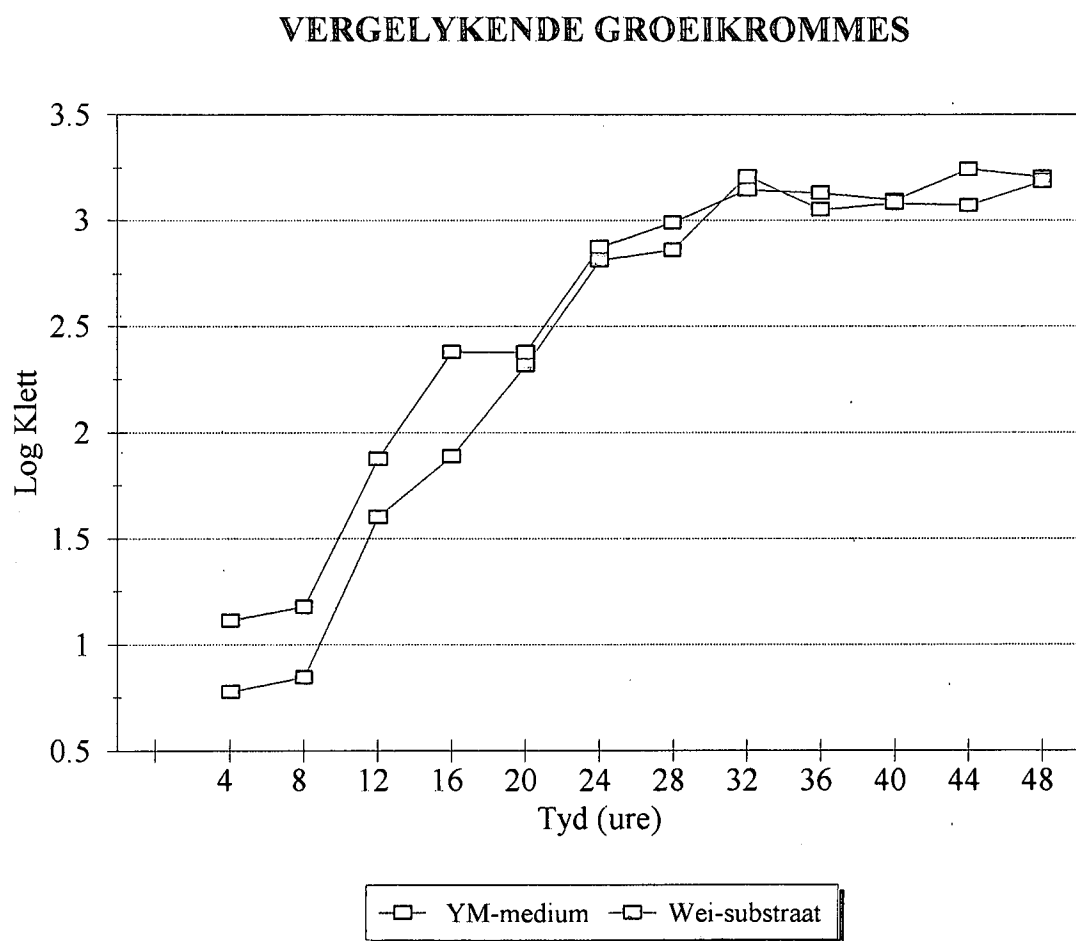
#### 5.3.3.5 Alkoholbepaling

Alkoholbepalings is gedoen soos reeds bespreek in Hoofstuk 4 onder punt 4.3.3.2.

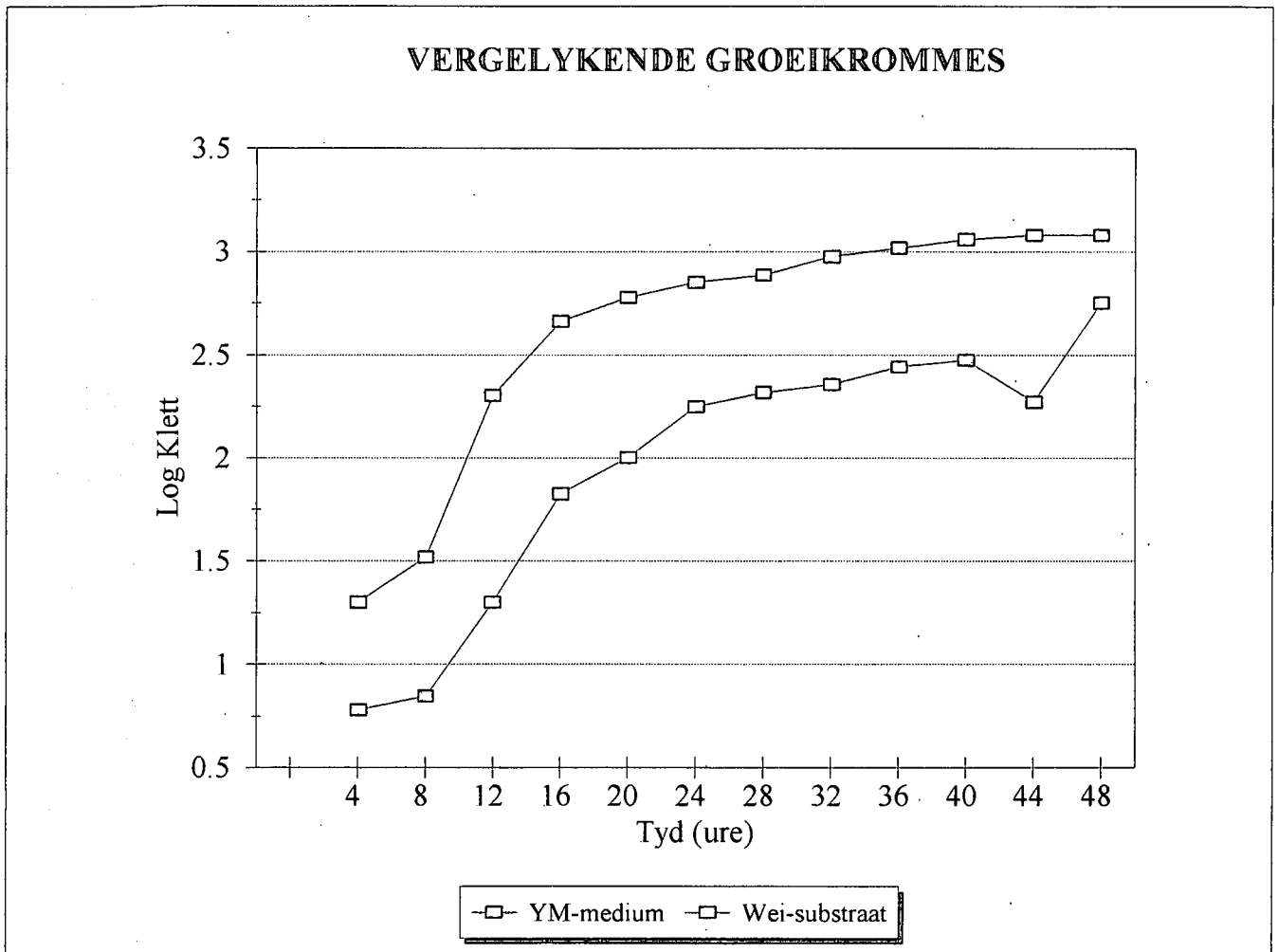
### 5.4 RESULTATE EN BESPREKING

In Fig 5.1 en 5.2 word die vergelykende groeistudies tussen *K. marxianus* en *C. utilis* (CBS 890) in onderskeidelik YM-medium en wei-substraat aangetoon. Die groeisnelheid bepaal vir die twee organismes word in Tabel 5.1 aangetoon. Volgens resultate verkry kan ons aflei dat *K. marxianus* (Fig 5.1) beter groei getoon het as *C. utilis* (CBS 890) (Fig 5.2) in beide YM en wei-substraat met  $\mu_{\text{max}} = 0.38 \text{ h}^{-1}$  in YM-medium en  $0.3 \text{ h}^{-1}$  in wei-substraat. *K. marxianus* het goeie groei in YM-medium en wei-substraat getoon, wat 'n aanduiding is dat *K. marxianus* in staat is om die hoofkoolstofbron in YM-medium naamlik glukose en die hoofkoolstofbron in wei-substraat naamlik laktose te kan benut. Volgens resultate verkry het *K. marxianus* egter 'n beter vermoë getoon om glukose te benut as laktose. *C. utilis* (CBS 890) het goeie groei getoon in YM-medium met  $\mu_{\text{max}} = 0.35 \text{ h}^{-1}$ , maar 'n laer vermoë getoon om in wei-substraat te groei naamlik  $0.28 \text{ h}^{-1}$ . Hieruit kan ons dus aflei dat *C. utilis* (CBS 890) wel instaat is om laktose te benut, maar teen 'n laer groeitempo. Op grond van hierdie resultate is besluit om die gisselle te oes na 24 uur vir die voorbereiding van die inokulum vir fermentasie doeleindes aangesien *K. marxianus* steeds in die logfase van groei is.

Tydens die inkubasie van *K. marxianus* en *C. utilis* (CBS 890) by vier verskillende temperature is resultate verkry soos aangedui in Tabel 5.2. Hierdie resultate toon aan dat *K. marxianus* in staat is om by hoër temperature tot 40 °C te groei. Inteenstelling met die



**Figuur 5.1:** Vergelykende groeikurwes van *K.marxianus* opgegroeï in YM-medium en wei-substraat



**Figuur 5.2:** Vergelykende groeikurwes van *C. utilis* opgegroeï in YM-medium en wei-substraat.

**Tabel 5.1:** Die groeisnelheid bepaal volgens die log Klettwaarde teenoor tyd (ure) soos verkry in Fig 5.1 en 5.2.

| Organisme                               | Maksimum spesifieke groeisnelheid<br>( $\mu_{max} h^{-1}$ ) |
|---|---|
| 1. <i>K. marxianus</i> in YM-medium     | 0.38  |
| 2. <i>K. marxianus</i> in wei-substraat | 0.30  |
| 3. <i>C. utilis</i> in YM-medium        | 0.35  |
| 4. <i>C. utilis</i> in wei-substraat    | 0.28  |

**Tabel 5.2:** Die vermoë van *K. marxianus* en *C. utilis* (CBS 890) om by verskillende temperature te kan groei.

| Organisme                  | Temperatuur | Resultate |
|----------------------------|-------------|-----------|
| <i>K. marxianus</i>        | 25 °C       | +++       |
|                            | 30°C        | +++       |
|                            | 37°C        | +++       |
|                            | 40°C        | +++       |
| <i>C. utilis</i> (CBS 890) | 25°C        | +++       |
|                            | 30°C        | +++       |
|                            | 37°C        | +         |
|                            | 40°C        | -         |

groeï van *K. marxianus* by hoë temperature was die groeï van *C. utilis* (CBS 890) beperk tot goeie groeï by 30 °C en baie stadige groeï by 37 °C.

Uit hierdie resultate verkry is besluit om *C. utilis* (CBS 890) nie verder in fermentasietoetse in te sluit nie, aangesien fermentasie van weipermeaat by 40 °C uitgevoer sal word, aangesien dit die gegewe temperatuur is van die wei wat uitgestort word na afroming.

Tydens verdere fermentasietoetse is van weipoëieroplossing gebruik gemaak aangesien dit ons instaat gestel het om met 'n baie meer uniforme substraat te werk as wat die geval met verskillende lotte wei sou wees. Die weiplossing is gesteriliseer om a) alle ongewenste mikroörganismes te verwyder en gunstiger toestande te skep vir die proeforganisme en b) om weiproteïene te denatureer om sodoende gedeproteïeniseerde wei te verkry en c) om die hoeveelheid proteïenstikstof in wei teenwoordig te verhoog en nie-proteïen stikstof te verlaag wat aanleiding gee tot meer toeganklike stikstof vir organismes (Zadow, 1992). Deproteïenisasie het ons ook instaat gestel om met 'n helder medium te werk waarop Klett lesings geneem kan word nadat alle proteïene en oorblywende wrongeldeeltjies deur filtrasie verwyder is.

## INOKULUM

Die volume inokulum wat voorgestel word deur literatuurverwysings is 10% (Murad et al., 1992). Volgens Murad et al. (1992) toon die persentasie proteïen 'n negatiewe verwantskap met die toename in inokulum persentasie bokant 10%. Hierdie bevinding stem ook ooreen met resultate verkry deur Garg en Neelakantan (1981). Die inokulum konsentrasie wat gebruik word, het 'n belangrike invloed op die duur van die kweektyd voordat maksimum groeï bereik kan word. Uit praktiese en finansiële oorwegings vir die Suiwelbedryf is dit noodsaaklik dat die fermentasie proses binne 'n tydsbestek van 24 uur afgehandel moet word. Om die rede is die grootste moontlike inokulum (10%) gebruik om te verseker dat maksimum groeï vinnig bereik kan word.

## pH

Die meeste giste kan oor 'n wye pH reeks groeï en kan by waardes tussen 3 en 8 groeï. Oor die algemeen verkies giste 'n effens suur medium met 'n optimum pH tussen 4.5 en 6.5 (Deak, 1991). Die optimum pH vir maksimum enkelselproteïen produksie word aangedui

as tussen 5.0 tot 5.7 (Marth, 1978). Die optimum pH waardes vir *K. marxianus* word in literatuur aangegee as tussen 3.8 en 5.7 (Ghaly & Singh, 1989).

Die aanvanklike pH van die voorbereide weipermeaat het gevarieer tussen 5.4 en 6.78 wat gevolglik gestandaardiseer is na 'n konstante pH van 6.00, aangesien die biomassa en proteïen opbrengs volgens literatuur verhoog deur die aanvangs pH van die groeimedium te verhoog na 6.00 (Murad et al., 1992). Die wei se pH het geleidelik gedaal oor tyd tydens die fermentasie proses met onderskeie finale waardes van 4.75 en 4.65 en 'n gemiddeld van 4.7 (Fig 5.6). Die waargenome pH waardes is binne die optimum pH waardes van 3.8-5.7 wat in literatuur aangegee word as die optimum waardes van groei vir *K. marxianus* (Ghaly & Singh, 1989). Die verlaging in pH kan toegeskryf word aan die produksie van organiese sure soos melksuur wat gevorm word tydens die afbraak van laktose (Zadow, 1992)

## TEMPERATUUR

Verhitting van wei maak dit meer geskik vir die groei van giste (Wasserman et al., 1961a). Indien 'n kort fermentasiesiklus gebruik word is steriele omstandighede nie noodsaaklik nie aangesien die geïnokuleerde giste kontaminerende giste in hierdie geval sal oorgroei (Wasserman et al., 1961a). Die optimum temperatuur vir groei vir *K. marxianus* is 30 tot 36 °C (Ghaly & Singh, 1989) en vir groei in wei wissel dit tussen 31 tot 33 °C, alhoewel goeie selopbrengste ook by temperature tot 43 °C gekry is (Marth, 1978). Hierdie wye temperatuur reeks waarby *K. marxianus* kan groei, verminder die noodsaaklikheid van verkoeling, aangesien die meeste giste geïnhibeer word tydens hoë temperature. Die gebruik van 'n gis met 'n hoë optimum temperatuur, soos in hierdie geval *K. marxianus*, is wenslik aangesien dit die koste verbonde aan afkoeling in die fabrieksopset aansienlik verminder (Marth, 1978).

Die temperatuur tydens fermentasie is konstant gehou op 40 °C, die temperatuur waarby wei in 'n kaasfabriek uitgepomp word na die silo's. Die fermentasieproses waartydens laktose benut word as die fermenterende koolstofbron en *K. marxianus* as die groeikultuur is 'n eksotermiese reaksie waartydens hitte geproduseer word. Daarom is 'n terugvloei koeler tydens die duur van die eksperiment gebruik om substraat af te koel en ook verliese aan verdamping te voorkom.



## ROERSPOED

Die roerspoed is tydens die verloop van die studie tydens die sterk logaritmiëse groeifase d.i. na 6 ure aangepas vanaf 300 opm na 350 opm om te kompenseer vir die veranderende suurstofbehoefte in die medium. Aangesien skuiming van die medium voorgekom het, kon die roerspoed nie vinniger as na 350 opm verstel word nie, waarna heftige skuiming voorgekom het.

## GROEITEMPO EN BIOMASSA GEPRODUSEER

In Tabel 5.3 word die groeisnelheid van *K. marxianus* getoon, asook die selopbrengskoëffisiënt wat die hoeveelheid produk geproduseer per eenheidmassa substraat wat verbruik is aantoon.

Die groeitempo van giste is afhanklik van die voedings en omgewingsfaktore van die groeiomgewing (Sinskey, 1978). 'n Vinnig groeiende organisme is nie absoluut noodsaaklik tydens die produksie van enkelselproteïen produksie nie. Wat wel krities is is die opbrengsfaktor, of die hoeveelheid selbiomassa geproduseer per g gewig vanaf die koolstofbron in die substraat (Sinskey, 1978). Volgens resultate verkry aangetoon in Fig. 5.3 is die groeisnelheid van *K. marxianus* bereken as  $0.32 \text{ h}^{-1}$  en  $0.16 \text{ h}^{-1}$  met 'n gemiddelde groeisnelheid van  $0.24 \text{ h}^{-1}$ . Die lae groeisnelheid van *K. marxianus* tydens die tweede herhaling van die groeistudie nl.  $0.16 \text{ h}^{-1}$  kan nie verklaar word nie. Die teenwoordigheid van 'n inhibitor of temperatuurbeheer kon moontlik 'n rol gespeel het. Wat wel belangrik is, is dat die opbrengskoëffisiënt en selbiomassa geproduseer per g laktose verbruik na 22 uur van fermentasie baie goed ooreenstem.

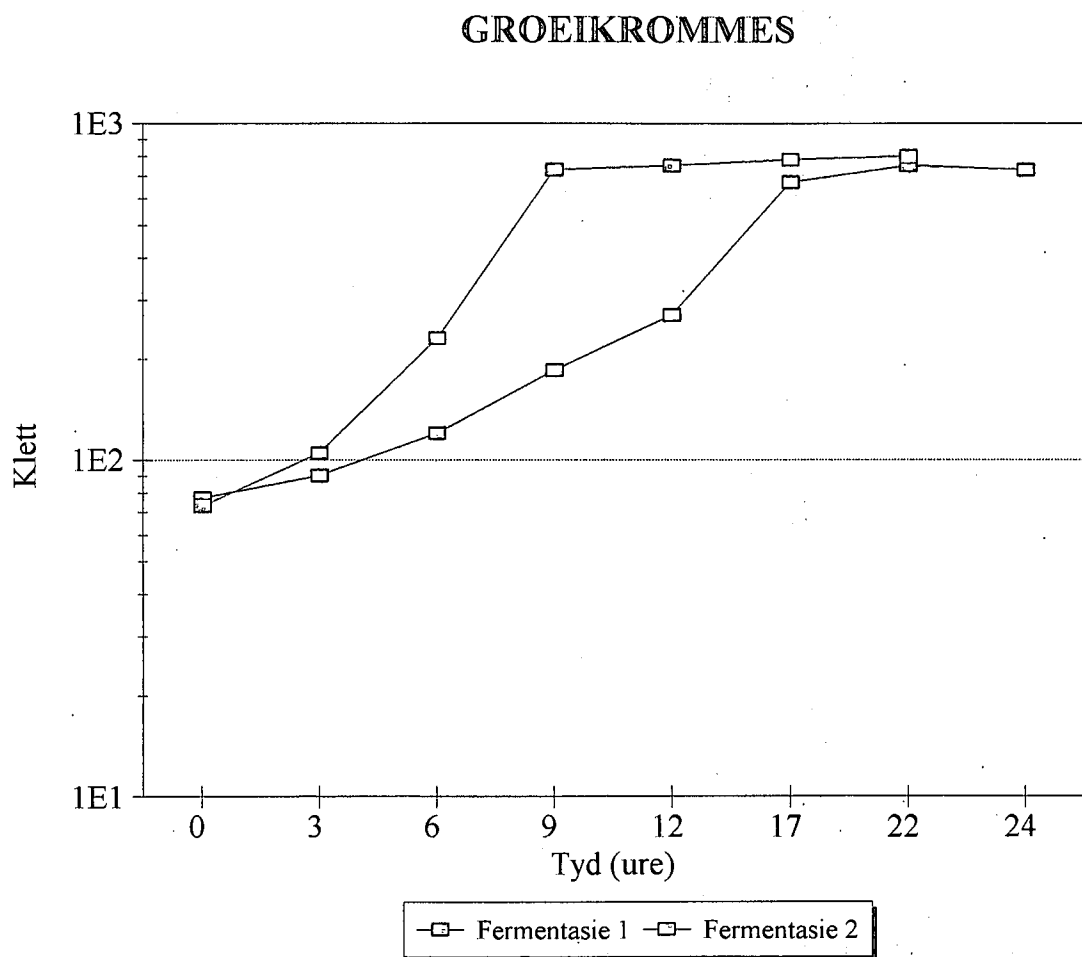
Tydens die finale bepaling van droë massa is 2.3 en 2.8 mg/ml biomassa met 'n gemiddeld van 2.6 mg/ml verkry. Die data stem goed ooreen met die resultate verkry deur Mahmoud & Kosikowski (1982) wat 'n opbrengs van 2.8g droë massa per liter enkelselproteïen verkry het.

Tydens die bepaling van biomassa geproduseer per g laktose verbruik is 0.42 en 0.37 verkry met 'n gemiddeld van 0.4 g biomassa/g laktose verbruik. Walker en O'Neil (1990) het 'n biomassa opbrengskoëffisiënt van 0.44 tot 0.51 biomassa /g laktose verbruik verkry, terwyl Alvarez & Ricano (1979) 'n gemiddeld van 0.33g biomassa/g laktose verbruik by 'n temperatuur van  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  en pH 4.5 verkry het (Tabel 5.3).

Volgens data verkry in hierdie studie is gevind dat die groeitempo van *K. marxianus* in die bioreaktor laer was in vergelyking met kulture opgegroeï in skudfleskulture (Hoofstuk 4). Die verskil in groeitempo kan toegeskryf word aan die

**Tabel 5.3:** Die spesifieke groeitempo ( $\mu_{\max}$ ,  $h^{-1}$ ), selopbrengs ( $Y_{x/s}$ ), finale droë massa (mg/ml) en proteïen inhoud (%proteïen op 'n droë massa basis) tydens die kweking van *K. marxianus* in wei-substraat.

| Organisme                              | $\mu_{\max}$ | $Y_{x/s}$ | Droë massa | %proteïen |
|--|--------------|-----------|------------|-----------|
| <i>K. marxianus</i><br>(fermentasie 1) | 0.32         | 0.42      | 2.3        | 42        |
| <i>K. marxianus</i><br>(fermentasie 2) | 0.16         | 0.37      | 2.8        | 47        |
| GEMIDDELD                              | 0.24         | 0.40      | 2.6        | 45        |



**Figuur 5.3:** Groeikrommes verkry tydens die kweking van *K. marxianus* in weipermeaat-substraat by 40 °C.

verskillende inkubasie temperature. 'n Beter groeitempo van  $0.38 \text{ h}^{-1}$  is ondervind by temperature van  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  as by  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  met 'n gemiddelde groeitempo van  $0.24 \text{ h}^{-1}$ .

## ENKELSELPORTEÏEN PRODUKSIE

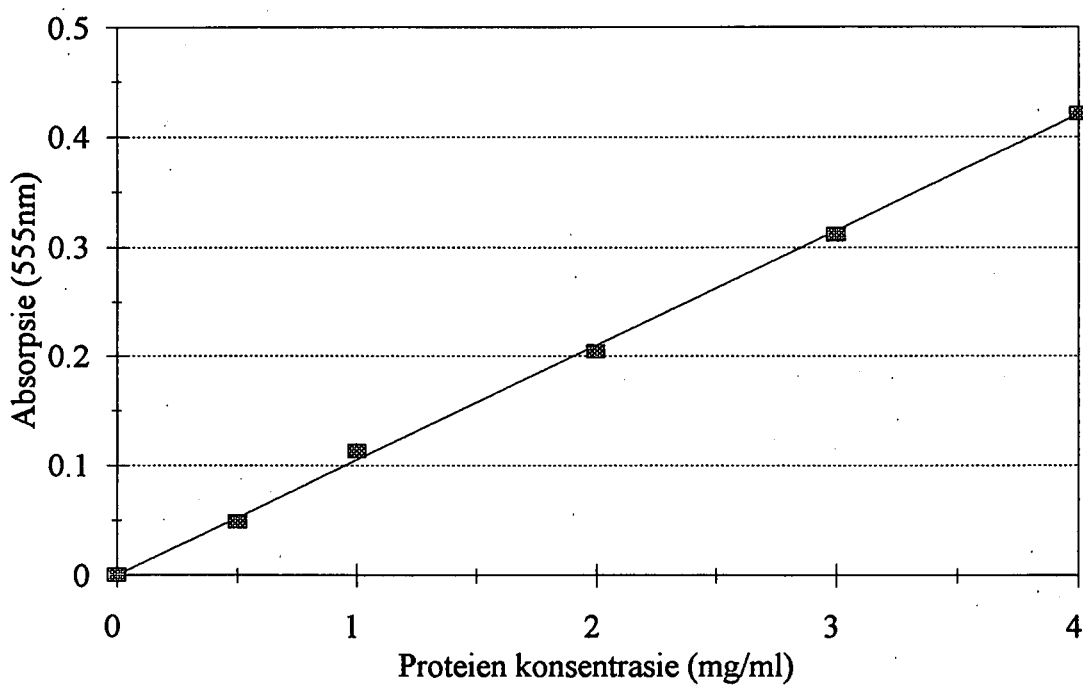
Daar is relatief min studies gedoen op die verwantskap tussen proteïensintese en groeitempo. Dit is wel bekend dat die tempo van proteïensintese in giste afhanklik is van hul groeitempo (Tuite, 1989). Volgens Waldron & Lacroute (Tuite, 1989), word die tempo van proteïensintese in giste verlaag met 'n verlaging in groeitempo en dit is nie as gevolg van te min ribosome of tRNA molekules nie, maar eerder 'n gemiddelde ribosoom tekort (d.i. tempo van proteïensintese per ribosoom). Dit staan in teenstelling met bakterieë waar ribosome gebruik word oor 'n groot reeks van groeitempo's (Tuite, 1989).

Proteïenkonsentrasie verkry tydens die kweking van *K. marxianus* in gedeproteïeniseerde weipermeaat word in Fig 5.5 getoon. Proteïensintese vind eksponensieël plaas gedurende die giste groeisiklus wat lei tot die akkumulasie van gesintetiseerde proteïene en het plaasgevind tussen drie en 12 ure na inokulasie van weipermeaat met *K. marxianus*. Giste se groeitempo raak stasionêr (waar geen groei plaasvind nie), indien essensiële voedingstowwe ontbreek (Boucherie, 1985) en is tydens hierdie studie na 9 en 15 ure (Fig 5.3) van fermentasie bereik. Sodra die stasionêre fase bereik is lei dit tot 'n afname in proteïensintese, tot minder as 10% as wat tydens die logaritmiëse groeifase waargeneem is. Residuele proteïensintese wat wel tydens die stasionêre fase in selle waargeneem word, vind plaas as gevolg van die sinteses van 'n klein groepie van proteïene veral die glikolitiese ensieme (b.v. enolase, gliseraldehyd-3-fosfaat dehidrogenase) asook hitte beskadigde proteïene, en nie a.g.v. 'n lae vlak van sintese deur alle proteïene nie (Boucherie, 1985).

'n Maksimum proteïenopbrengs van 1.184 en 1.179 mg/ml is verkry tydens die groei van *K. marxianus* stam 4 in weipermeaat, met 'n gemiddelde opbrengs van 1.182 mg/ml (Fig 5.5). Dit vergelyk goed met studies van Murad et al. (1992) wat 'n proteïen opbrengs van 1.76 mg/ml na 'n inkubasieperiode van 24 uur verkry het deur *K. marxianus var. lactis* te kweek in permeaat wat met 0.5% gisekstrak verryk is. Goeie resultate is dus tydens hierdie studie verkry as ons in ag neem dat geen verryking gebruik is nie.

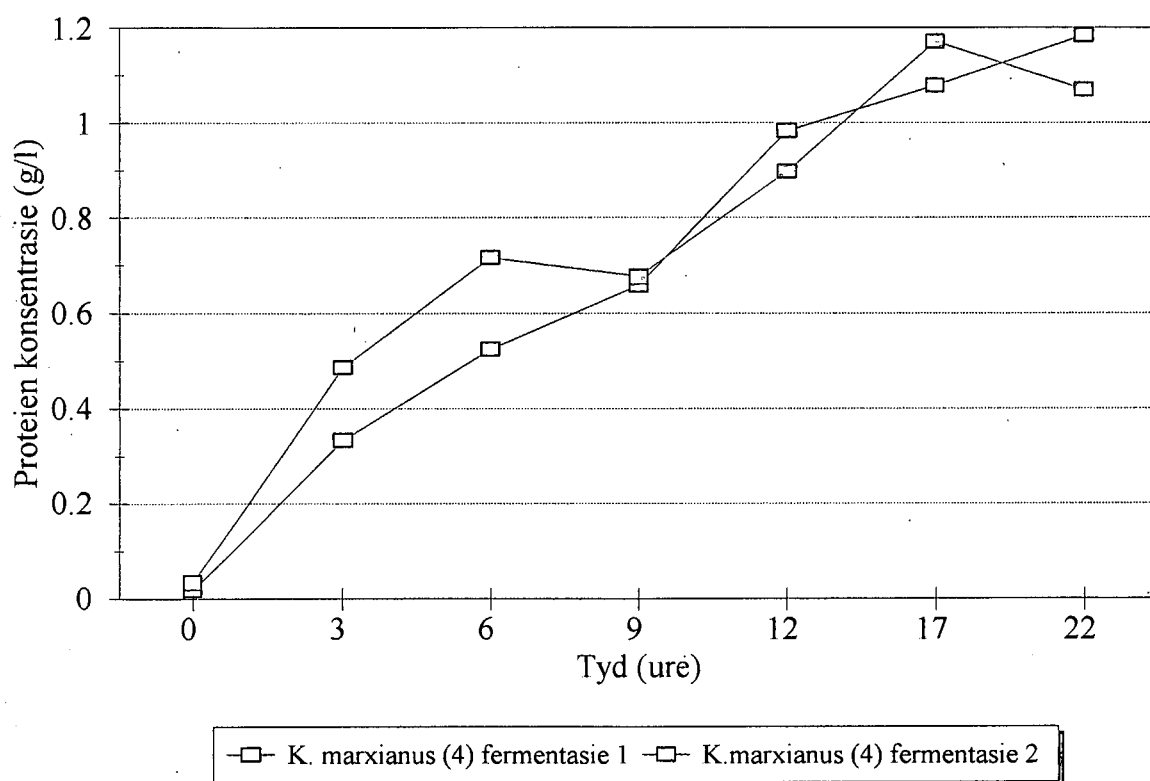
Tydens die bepaling van die persentasie proteïene in gisselle op 'n droë massa basis, het resultate getoon dat na 22 uur van fermentasie 42 % en 47 % proteïen opgelewer is, met 'n gemiddeld van 44.5 % (Tabel 5.3). Dit stem ooreen met resultate verkry deur vorige studies waartydens biomassa met 'n proteïeninhoud van 49.5% op 'n droë massa basis verkry is tydens die fermentasie van permeaat verryk met anorganiese stikstof (Delaney et al., 1975). 'n Gemiddeld van 44.3 % proteïen is verkry na 'n

STANDAARDKROMME  
Proteïen bepaling



**Fig 5.4:** Standaardkromme van proteïenbepaling ( $r^2 = 0,999681$ ) voorberei volgens Herbert et al. (1971).

VERANDERING IN PROTEÏEN KONSENTRASIE  
TYDENS KWEKING VAN *K. marxianus*



**Fig 5.5:**

Die verandering in proteïen konsentrasie tydens die kweking van *K. marxianus* in weipermeaat-substraat by 40 °C.

inkubasiëperiode van 24 uur deur Murad et al. (1992) deur *K. marxianus var. lactis* in permeaat verryk met gisekstrak te kweek. Resultate verkry tydens hierdie studie vergelyk dus baie goed met bogenoemde as ons in ag neem dat geen stikstofbyvoeging tydens hierdie studie gedoen is nie. Volgens Ben-Hassan & Ghaly (1995) kan die proteïeninhoud van giste varieer tussen 40 tot 80 % op 'n droë massa basis tydens enkelselproteïen produksie, terwyl Zadow (1988) tydens fermentasie van permeaat onder aërobiese toestande met 'n geskikte giskultuur 'n inhoud van 45% proteïen in 'n produk geskik vir dierevoeding kon oplewer.

## LAKTOSE BENUTTING

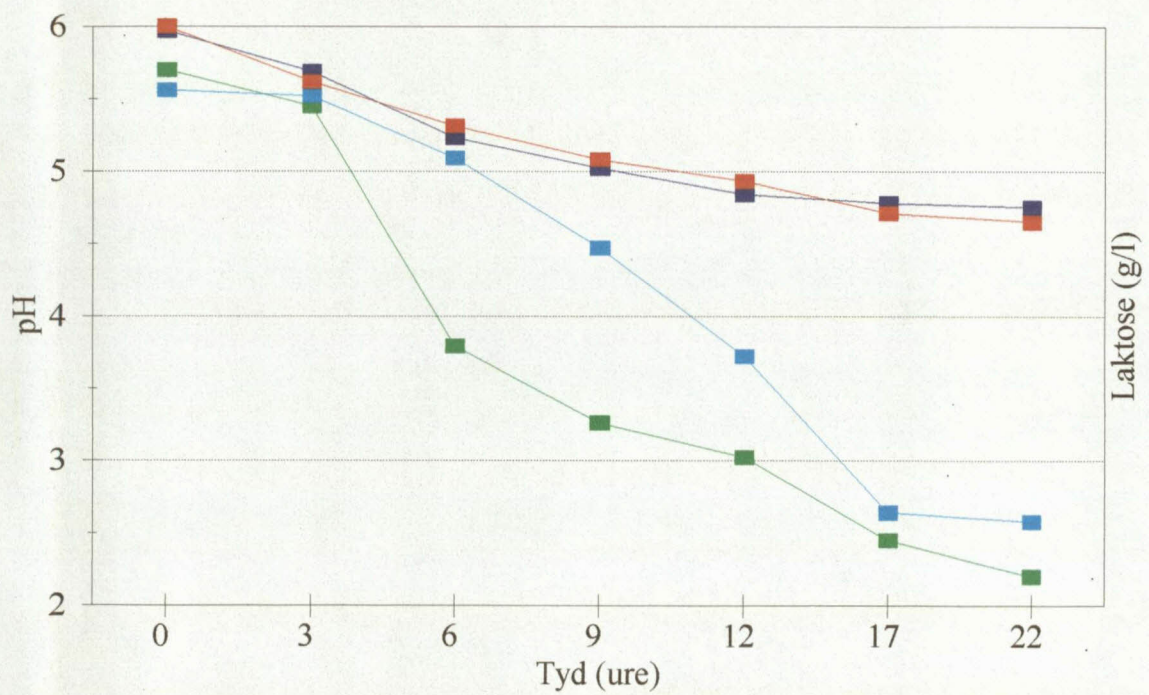
Die laktosekonsentrasie in wei het afgeneem oor tyd tydens fermentasie in die bioreaktor wat 'n aanduiding is dat laktose wel benut is deur *K. marxianus* (Fig 5.6). Die benutting van laktose deur *K. marxianus* met 'n 10% inokulum was 61 % en 54 % met 'n gemiddeld van 57.5 %. Capoor & Singh (1985) het gevind dat daar 'n afname in die benutting van laktose voorkom met 'n laer inokulumgrootte as 10%. Tydens hierdie studies is daar nie van verskillende inokulumgroottes gebruik gemaak nie. Vir die algehele benutting van laktose moet die groeimedium verryk word met addisionele voedingstowwe soos ammoniumsulfaat, ammoniumchloried, kopersulfaat, sinksulfaat en vitamien soos byvoorbeeld biotien en tiamien (Kilara & Patel, 1992). Tydens hierdie studie is geen byvoegings tot weipermeaat gedoen nie.

Die plasmamembraan van die gissel is ondeurlaatbaar vir suikers. Suikers word deur of 'n passiewe transport sisteem waar geen energie benodig word nie, of 'n aktiewe meganisme waar energie benodig word afkomstig vanaf metabolisme, in die sel in vervoer. Laktose word deur middel van 'n spesifieke sisteem vervoer en gehidroliseer in die gissel deur glikosidase produksie wat geïnduseer word (Cartwright et al., 1989). Baie min inligting bestaan tans oor die bestaan van 'n transport sisteem vir disakkariëde in giste behalwe vir *S.cerevisiae*. Wat wel bekend is, is dat *K.marxianus* oor 'n laktose transport sisteem beskik wat geïnduseer word (Cartwright et al., 1989).

## ALKOHOLPRODUKSIE

Vir die produksie van enkelselproteïen is die hoofdoel om te verhoed dat laktose na alkohol omgeskakel word. Laktose moet deur laktose benuttende giste gemetaboliseer word na koolstofdiksied en water vir die produksie van enkelselproteïen (Kilara & Patel; 1992). Tydens die bepaling van alkoholvlakke in die gefermenteerde produk, is geen

### VERANDERING IN pH EN LAKTOSE KONSENTRASIE



■ pH fermentasie 1   
 ■ Laktose fermentasie 1   
 ■ pH fermentasie 2   
 ■ Laktose fermentasie 2

**Fig 5.6:** Die verandering in pH en laktose konsentrasie tydens kweking van *K. marxianus* in weipermeaat-substraat by 40 °C.



konsentrasie alkohol gevind nie, inteenstelling met fermentasiestudies wat in skudflesse in Hoofstuk 4 uitgevoer is waar alkoholvlakke van 'n minimum van tussen 1.144 g/l tot 'n maksimum van 15.933 g/l verkry is. Hieruit kan ons aflei dat suurstof beperkend geraak het in die skudflesse wat gelei het tot anaërobiese toestande en die gevolglike produksie van alkohol (Gianetto, et al., 1986; Janssens et al., 1984; Mann, 1980; Marwaha & Kennedy, 1984).

Die feit dat geen alkoholproduksie verkry is tydens duplikaat fermentasiestudies nie, stem ooreen met literatuurverwysings aangesien die moontlikheid dat *K. marxianus* 'n "Crabtree" positiewe gis is, wat 'n alkoholiese fermentasie kan uitvoer ten spyte van die teenwoordigheid van suurstof wanneer daar hoë vlakke van metaboliseerbare koolhidrate teenwoordig is, is hoogs onwaarskynlik. Vorige studies het getoon dat die "Crabtree" effek nie voorkom in *Kluyveromyces* spesies nie, maar wel die Pasteur-effek (Moulin et al., 1983; Willets & Ugalde, 1987); die proses word dus gekenmerk deur 'n dominante oksidatiewe metabolisme. Genoegsame suurstof moet voorsien word om giste in staat te stel om ongeveer 35% van die laktose in wei na koolstofdioksied en water om te skakel. Die oorblywende laktose kan gebruik word om selmateriaal of nie-oksideerbare metaboliese produkte te vorm (Beuchat, 1978). Die suurstof behoefte in die fermentasiemedium verhoog tydens die logaritmiëse fase, en aangesien anaërobiese toestande baie gou kan ontstaan moet daar genoegsame suurstof verskaf word. Die belangrikheid van genoegsame deurlugting tydens fermentasie word deur Stuber se studie beklemtoon (Beuchat, 1978). Die opname van suurstof deur die medium is afhanklik van: a) hoeveelheid lug wat deur die fermenteerder beweeg; b) tipe roerder gebruik tydens roering en c) spoed van die roerder (Beuchat, 1978). Volgens Ghaly en Singh (1989) word suurstof beter oorgedra na weimedium deur die verhoging in roerspoed, en word die opbrengs, laktose verbruik en spesifieke groeispoed beïnvloed deur die verhoging in roerspoed. Tydens die logaritmiëse fase van groei, is die roerspoed na 6 ure verhoog tot 350 opm om sodoende beter oordrag van suurstof na die weimedium te verkry.

Die resultate verkry tydens hierdie studie dui daarop dat die fermentasie van weipermeaat met die geïsoleerde gisspesie, *K. marxianus*, kan lei tot 'n voedsame bruikbare produk vir dierevoeding. Deur die fermentasie word 'n potensiële afvalproduk, wat reeds in oormaat geproduseer word omgesit na 'n bruikbare hoë proteïen produk, wat huidiglik reeds in aanvraag is en in die toekoms sal vergroot. Wat die voordele van weipermeaat fermentasie nog aanlokliker maak is die feit dat hoë energie laktose steeds in die substraat bly na deproteïenisasie wat dien as genoegsame koolstofenergiebron vir enkelselproteïen produksie. Die huidige proses sluit geen byvoegings in nie; om die potensiële

enkelselproteien produksie nog verder te verhoog, kan optimum fermentasie toestande verkry word deur die byvoeging van stikstofbronne.

## 5.5 VERWYSINGS

- ALVAREZ, J & RICANO, J. (1979) Modeling and optimal control of an SCP fermentation process. *Proc. Biotech. and Bioengin. Symp.*, 9, 1: 149-154.
- BEN-HASSAN, R.M. & GHALY, A.E. (1995) Continuous production of single cell protein from whey lactose using *Kluyveromyces fragilis*. *Am. Soc. of Agric. Eng.*, 38, 4: 1121-1127.
- BERNSTEIN, S. TZENG, C.H. & SISSON, D. (1977) The commercial fermentation of cheese whey for the production of protein and/ or alcohol. *Proc. Biotech. Bioengin. Symp.*, 7, 1: 1-9.
- BEUCHAT, L.R. (1978) Food and Beverage Mycology. Avi Publishing Company, Westport.
- BONEKAMP, F.J. & OOSTEROM, J. (1994) On the safety of *Kluyveromyces lactis* - a review. *Appl. Microbiol. Biotech.*, 41: 1-3.
- BOUCHERIE, H. (1985) Protein synthesis during transition and stationary phases under glucose limitation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 161, 1: 85-392.
- CAPOOR, A.K. & SINGH, K. (1985) Fermentation of whey by lactose utilizing yeast for S.C.P. production and B.O.D. reduction. *Indian J. Dairy Sci*, 38, 1: 15-17.
- CARTWRIGHT, C.P., ROSE, A.H., CALDERBANK, J. & KEENAN, M.H. (1989) Solute Transport. In "The Yeasts" Vol. 3. 2nd edition (A.H. Rose & J.S. Harrison, eds.). Academic Press, London. pp. 5-49.
- CONROY, F. (1993) Opening the whey. *Rural Research*, 161: 20-22.
- DEAK, T. (1991) Foodborne Yeasts. *Advances in Applied Microbiology*, 36: 179-195.
- DEEPEN, P., GUHA, A.K. & CHATTERJEE, B.P. (1994) Effect of plant growth hormones on *Kluyveromyces fragilis* grown on deproteinized whey. *Biochem. Archiv.*, 10: 277-283.

- DELANEY, R.A.M., KENNEDY, R. W. & WALLEY, B.D. (1975) Composition of *Saccharomyces fragilis* biomass grown on lactose permeate. *J. Sci. Food Agric.*, 26: 1177-1186.
- DU PREEZ, J.C. & HUGO, A. (1989) An electronic controller for maintaining low dissolved oxygen levels in a bench-top fermentor. *Biotechnol. Techniques*, 3, 5: 289-294
- GARG, S.K. & NEELAKANTAN, S. (1981) Fermentation of waste mechanical fibers from a newsprint mill by the rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Biotech. Bioeng.*, 17: 327.
- GHALY, A.E. & SINGH, R.K. (1989) Pollution potential reduction of cheese whey through yeast fermentation. *Appl. Biochem. Biotech.*, 22: 181-203
- GIANETTO, A., BERRUTI, F., GLICK, B.R. & KEMPTON, A.G. (1986) The production of ethanol from lactose in a tubular reactor by immobilized cells of *Kluyveromyces fragilis*. *Appl. Microbiol. Biotech.*, 24: 277-281.
- GOLDBERG, I. (1985) Single cell protein. *Biotechnology Monographs*. Springer-Verlag, Berlin.
- HERBERT, PHIPPS & STRANGE (1971) Chemical Analysis of Microbial Cells. In "Methods in Microbiology 5B" (Norris and Ribbons eds.). Academic Press, New York. pp. 209-344.
- JAKOBSEN, M. (1994) Yeasts, Subject F47. IDF, F-Doc 245: 1-15.
- JANSSENS, J.H., BERNARD, A. & BAILEY, R.B. (1984) Ethanol from whey. Continuous fermentation with cell recycle. *Biotech. Bioengin.*, XXVI: 001-005.
- JAY, J.M. (1992) *Modern Food Microbiology*. Fourth Edition. Van Nostrand Reinhold, New York.
- JOHNSON, J.C. (1977) Yeasts for food and other purposes. *Food Technology Review*, 45. Noyes Data Corporation, New Jersey.

- KILARA, A. & PATEL, M.T. (1992) Whey and lactose fermentation. In "Whey and lactose processing" (J.G. Zadow, ed.). Elsevier Science Publishers, London. pp. 409-448.
- MAHMOUD, M.M. & KOSIKOWSKI, F.V. (1982) Alcohol and single cell protein production by *Kluyveromyces* in concentrate whey permeate with reduced ash. *J. Dairy Sci.*, 65: 2082-2087.
- MANN, E.J. (1980) Alcohols from whey. *Dairy Indus. Internat.*, 45, 3: 47-48.
- MARTH, E.H. (1978) Dairy products. In "Food and Beverage Mycology" (L.R. Beuchat ed.). Avi Publishing Company, Westport. pp. 145-172.
- MARWAHA, S.S. & KENNEDY, J.F. (1984) Alcohol production from whey permeate by immobilized and free cells of *Kluyveromyces marxianus* NCYC 179. *Proc. Biochem.*, April: 79-80.
- MEYRATH, J. & BAYER, K. (1979) Biomass from whey. In "Microbial Biomass" (A.H. Rose ed.). Academic Press, London. pp. 207-269.
- MOULIN, G., MALIGE, B. & GALZY, P. (1983) Balanced flora of an industrial fermenter: Production of yeast from whey. *J. Dairy Sci.*, 66: 21-28.
- MURAD, H.A., ABD-EL-GHANI, S. & EL-SHENAWY, K. (1992) Bioconversion of whey permeate into *Kluyveromyces lactis* biomass. *Egyptian J. Dairy Sci.*, 20: 261-271.
- ROBINSON, C.H. (1978) Fundamentals of Normal Nutrition. 3rd edition. Macmillan Publishing Co., Inc., New York.
- ROSSI, J. (1994) Yeasts. IDF, F-Doc 245: 16-25.
- SINGH K. & NEELAKANTAN, S. (1989) Amino acid composition of yeast single cell protein grown on whey. *J. Dairy Research*, 56: 813-815.
- SINSKEY, J. (1978) Fungi as source of protein. In "Food and Beverage Mycology" (L.R. Beuchat ed.). Avi Publishing Company, Westport. pp. 334-367.

- STARE, F.J. & McWILLIAMS, M. (1973) *Living Nutrition*. 2nd edition. John Wiley & Sons. New York.
- TUITE, M.F. (1989) Protein Synthesis. In "The Yeasts Metabolism and Physiology of Yeasts" Vol. 3, 2nd edition. Academic Press, London. pp. 161-198.
- VANANUVAT, P. & KINSELLA, J.E. (1975) Production of yeast protein from crude lactose by *Saccharomyces fragilis*. Batch culture and continuous culture studies. *J. of Food Sci.*, 40, 2: 336-341.
- WALKER, G.M. & O'NEIL, J.D. (1990) Morphological and metabolic changes in the yeast *Kluyveromyces marxianus var. marxianus* NRRLy 2415 during fermentation of lactose. *J. Chemi. Technol. and Biotechnol.*, 49,1: 75-89.
- WASSERMAN, A.E., HAMPSON, J.W., ALVARE, N.F. & ALVARE, N.J. (1961a) Whey utilization. Growth of *Saccharomyces fragilis*. *Sewage Ind. Wastes*, 30: 913-920.
- WASSERMAN, A.E., HAMPSON, J.W. & ALVARE, N.F. (1961b) Large scale production of yeast to whey. *J. Water Pollution Control Fed.*, 33, 10: 1090-1094.
- WICKERHAM, L.J. (1951) Taxonomy of yeasts. *U.S. Dept. Agr. Tech. Bull.*, 1029.
- WILLETS, A. & UGALDE, U. (1987) The production of single cell protein from whey. *Biotech. Letters*, 9, 11: 795-800.
- ZADOW, J.G. (1988) Fermentation of whey and permeate. *Bulletin of the IDF*, 233: 53-60.
- ZADOW, J.G. (1992) Lactose Hydrolysis. In "Whey and lactose processing" (J.G. Zadow ed.) Elsevier Applied Science, London. pp. 361-408.

## HOOFSTUK 6

### ALGEMENE BESPREKING EN GEVOLGTREKKING

Daar is reeds in hierdie studie verwys na die heersende en groeiende voedsel- en veral proteïentekort in die wêreld. Ongewone metodes sal gevind moet word om voedsel in die algemeen, maar veral proteïenryke voedsels te produseer om sodoende 'n ramspoedige toestand van ondervoeding en hongersnood af te wend. Aandag sal verleen moet word aan die benutting van bestaande produksiegeriewe en om die by- of afvalprodukte van bestaande voedselbereidingprosesse doeltreffend te benut.

Wei, 'n afvalproduk van die kaasindustrie word in groot hoeveelhede geproduseer en veroorsaak groot besoedelingsprobleme (Deepen et al., 1994). Dit is tans 'n baie groot uitdaging om na nuwe tegnologie te soek vir die benutting van wei om sodoende ontslae te raak van die surplus wei wat tans bestaan. Talle studies het getoon dat 'n potensiële oplossing vir die probleem die produksie van enkelselproteïen is (Ben-Hassan & Ghaly, 1995; Bernstein et al, 1977; Capoor & Singh, 1985; Goldberg, 1985). Fermentasie van wei en permeaat vir die produksie van enkelselproteïen vir voedseldoeleindes bied 'n goeie opsie vir talle vervaardigers. Verder word die produksie van biomassa as 'n effektiewe metode beskou in die verlaging van die biologiese suurstof vereiste van wei (Willems & Ugalde, 1987; Zadow, 1988). Deur van laktose fermenterende giste gebruik te maak om die hoë laktose inhoud van wei as bron van koolstof te benut kan waardevolle enkelselproteïene geproduseer word. Die groter doeltreffendheid in die benutting van wei as byproduk van die kaasbedryf kan onder beheerde toestande van temperatuur, inokulum grootte en kweekmedium lei tot die vinnige produksie van enkelselproteïene, inteenstelling met die konvensionele prosesse wat maande kan neem. Die benutting van laktose deur giste, gee oorsprong aan die verlaging van die laktose inhoud, gepaardgaande met 'n toename in proteïeninhoud. Die verlaging in laktose inhoud tesame met die produksie van proteïen het hierdie produk meer aanvaarbaar gemaak vir mens en dier.

Die toenemende toepassing van ultrafiltrasieprosesse vir die produksie van weiproteïen konsentraat lei tot die ophoping van weipermeaat as afvalvloeistof wat hedendaags as die "nuwe wei probleem" beskou word (Horton, 1994). Huidiglik word wei deur sommige suiwelindustrieë aan varkboere voorsien om ontslae te raak van die groot hoeveelhede onverwerkte wei. Aangesien die proteïene uit die wei nou verwyder word deur ultrafiltrasie, wek dit kommer by varkboere dat varke nie genoegsame proteïen uit permeaat sal kry nie en die hoë laktose inhoud is ook nie wenslik nie. Op grond van hierdie probleem van 'n tekort aan proteïen is besluit om die projek uit te voer om die proteïeninhoud in weipermeaat te verhoog deur die gebruik van laktose fermenterende giste, om sodoende 'n produk te lewer wat meer aanvaarbaar is vir die varkboer.



Aangesien die weisamestelling soos dit huidiglik aan die varkboer voorsien word, as uiteindelijke mikpunt beskou word vir die heropgradering van die weipermeaat, is 'n volledige studie gedoen oor die mikrobiologiese sowel as chemiese samestelling van die wei. Sewe weimonsternemingspunte is volgens 'n kritiese evalueringsplan geselekteer en monsters op 'n gereelde basis onttrek. Mikrobiologiese ontledings is uitgevoer om die mikroflora teenwoordig in wei te ondersoek, asook analitiese ontledings soos die bepaling van % proteïen, % NPN, % TVS, % vet en % laktose. Analitiese ontledings is ook gedoen om die aminosuur en mineraalinhoud in wei te bepaal net voor varkvoeding. Die samestelling van wei het getoon dat wei 'n goeie kweekmedium is vir die opgroei van giste en ander mikroörganismes, wat voorsien in genoegsame koolhidrate (laktose) as energiebron (4.7%), en die nodige vitamien, aminosure en minerale.

Vervolgens is die verskillende bronne van giskontaminasie in kaasfabrieke geïdentifiseer om die voorkoms en tipe giste geassosieer met die kaasmaakproses te identifiseer en alle giste wat instaat is om laktose te benut en te fermenteer in hul onmiddellike omgewing te isoleer. As gevolg van die spesifieke ekologiese beheer van 'n omgewing sal daar 'n spesifieke gispopulasie in so omgewing ontstaan (Deak, 1991; Deak & Beuchat, 1996; Phaff, et al., 1978). Daarom is besluit om giste uit 'n kaasfabriek te isoleer wat reeds aangepas is by spesifieke interne en eksterne faktore, aangesien elke voedselprodukt 'n besondere habitat bied vir 'n populasie mikroörganismes. Alle laktose fermenterende giste is geïsoleer uit die omgewing. Tydens hierdie ondersoek is 187 verteenwoordigende gisolate geïsoleer uit die kaasfabriekomgewing. Die spesies wat die mees verteenwoordigste voorgekom het, was afkomstig vanaf die genera *Debaryomyces* en kan toegeskryf word aan hul vermoë om ekstrasellulêre proteases of lipases of beide te produseer, asook hul toleransie tot hoë soutkonsentrasies en lae temperature. Ander genera wat geïsoleer is sluit in *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Yarrowia*, *Pichia*, *Trichosporon*, *Torulaspora*, *Issatchenkia*, *Saccharomyces* en *Zygosaccharomyces*. Tydens die studie is aangetoon dat pekelwater tot die grootste verskeidenheid en aantal gis isolate bygedra het. Giste is geselekteer om mikrobiese ladings, geassosieer met kaasvervaardiging te bepaal vanaf aartappel dekstroze agar (Oxoid, pH 3,5) en gismoutekstrak agar (YM, pH 3,5). Die giskulture is volgens die identifikasiesleutels soos voorgestel deur Kreger-Van Rij (1984) en Barnett et al. (1990) gekarakteriseer. Langkettingvetsuuranalises is ook op alle isolate uitgevoer soos beskryf deur Viljoen et al. (1986), waartydens elke stam se langkettingvetsuursamestelling vergelyk is met ooreenstemmende verwysingstamme soos in literatuur beskryf. Sodoende kon die geïsoleerde giste se identifisering bevestig word (Oosthuizen et al., 1987; Viljoen et al., 1986; Viljoen et al., 1988a,b).

Tydens die evaluering van giste wat laktose kan benut en fermenteer in Hoofstuk 4, is die 187 gisstamme geïsoleer in Hoofstuk 3 uitgestreep op laktose plate as kontrole vir die benutting van laktose en alle positiewe kulture geselekteer. Ses-en-sewentig isolate het positiewe resultate gelever en is daarna op weiplate uitgestreep om hul vermoë om in wei te kan groei ondersoek. Een-en-twintig gisstamme het die vermoë getoon om in wei te groei terwyl 14 van die gisstamme fermenterende eienskappe getoon het tydens fermentasietoetse. Al 14 van hierdie gisstamme het aan die spesies *Kluyveromyces marxianus* behoort. Die vermoë van hierdie 14 gisstamme asook *C. utilis* (CBS 890) wat bekend is as 'n goeie enkelselproteïen produseerder wat as verwysingstam in hierdie studie ingesluit is, is verder ondersoek in skudflesse bevattende gepasteuriseerde weimedium. *C. utilis* (CBS 890) het swakker fermenterende eienskappe getoon op grond van enkelselproteïenproduksie as stamme van *K. marxianus*. Die finale proteïenkonsentrasies wat verkry is na 24 uur het gewissel vanaf maksimum 2.712 mg/ml tot 'n minimum van 1.808 mg/ml. Op grond van die tempo van proteïenproduksie is *K. marxianus* stam (4), geïsoleer uit pekelwater, geselekteer vir verdere weifermentasiestudies onder optimumtoestande. Alkoholproduksie tydens die verloop van die fermentasie is ook ondersoek. Vlakke het gewissel vanaf 'n maksimum van 15.933 tot 'n minimum van 1.144 g/l. Uit ons resultate en literatuurverwysings kon ons aflei dat *K. marxianus* ongetwyfeld die organisme van keuse is vir die produksie van enkelselproteïen in 'n weisubstraat.

'n Vergelykende groeistudie tussen *K. marxianus* en *C. utilis* wat uitgevoer is in onderskeidelik YM-medium en weisubstraat het getoon dat *K. marxianus* 'n beter vermoë getoon het om in weisubstraat te groei as *C. utilis* met 'n groeitempo van  $0.38 \text{ h}^{-1}$  teenoor  $0.28 \text{ h}^{-1}$ . Tydens die inkubasie van die twee organismes by vier verskillende temperature naamlik 25 °C, 30 °C, 37 °C en 40 °C is getoon dat *K. marxianus* instaat is om by temperature tot 40 °C te groei, terwyl *C. utilis* geen groei by hierdie temperatuur getoon het nie. Op grond van hierdie resultate is *K. marxianus* geselekteer vir verdere fermentasiestudies.

Die benutting van weipermeaat vir die produksie van enkelselproteïen geskik vir diervoeding is in 'n Multigen aërobiese bioreaktor ondersoek. Hierdie data is gebruik om die geskiktheid van die isolaat geselekteer te ondersoek as 'n potensiële enkelselproteïen produseerder. Die fermentasiestudie is oor 'n periode van 22 uur uitgevoer by 'n aanvangs pH van 6.00 en konstante temperatuur van 40 °C. 'n Gemiddelde maksimum proteïenopbrengs van 1.18 mg/ml is verkry tydens die studie met 'n gemiddeld van 44.5 %

proteïene in die gisselle op 'n droë massa basis. Hierdie resultate vergelyk goed met vorige studies tesame met die feit dat geen byvoegings tot permeaat gedoen is nie. In vorige studies is bykans deurgaans van verryking gebruik. Ons kan dus die afleiding maak dat so 'n sisteem wel in die suiwelbedryf geïmplementeer kan word.

### TOEKOMSTIGE NAVORSING

Om tot 'n beslissing te kom oor die doeltreffendheid van die geselekteerde isolaat onder kommersiële verbouingstoestande vereis egter verdere studies op groter skaal as wat in die huidige studie bepaal is. Optimum toestande van groei, pH, lug, suurstof, stikstof, temperatuur en duur van inkubasie kan verder ondersoek word vir beter resultate.

Verdere studies kan ook op varke uitgevoer word om die verskil in massa toename te kontroleer as gevolg van die toediening van die enkelselproteïen-produk.

Kostoorweging is ook 'n baie belangrike aspek. Die koste van produksie hang hoofsaaklik af van twee faktore, naamlik die koste van wei en die kapitale investering. Die ligging van so 'n opset moet noodgedwonge naby 'n groot kaasproduserende fabriek wees waar wei in oormaat teenwoordig is teen die minimum of geen koste. Die kapitale investering is groot, maar dit is nodig om sodoende 'n produk daar te stel wat markwaardig is. Die ontwikkeling van 'n sisteem wat ook ekonomies geregverdig sou wees vir 'n kleinskaalse kaasvervaardiger bied 'n goeie navorsingsveld vir die nabye toekoms (Reed, 1982; Zadow, 1988).

Uit 'n praktiese oogpunt is daar sekere faktore wat die doelmatige benutting van wei bemoeilik. Eerstens bestaan wei uit meer as 90% water, sodat vervoer of opberging van die onverwerkte produk onprakties en onekonomies is. 'n Oplossing vir hierdie probleem sal dan wees om die produk hetsy wei of permeaat aan naburige varkboere te verkoop (Hansen, 1993). Tweedens is daar nie alleen aansienlike seisoenskommeling in die kaasproduserende streke t.o.v. die hoeveelheid beskikbare wei nie, maar ook tussen fabriek binne streke. Om die proses ekonomies te regverdig, is die beskikbaarheid van 'n gereelde en voldoende hoeveelheid wei feitlik deurslaggewend. In geval van kleiner fabriek sal so 'n onderneming dus nie lonend wees nie. Vanweë die mate van amalgamasie van kaasfabriek wat reeds in die Republiek plaasgevind het, is die toestand in sekere gevalle reeds bereik waar voldoende wei beskikbaar is om die lonendheid van gisproduksie of ander vorms van weibenutting te verseker (Holzapfel, 1966).

Die hoof objektief waarna egter gekyk moet word tydens enkelselproteïen produksie is om 'n bruikbare voedingsryke produk so goedkoop as moontlik te lewer. Wei is 'n produk wat beskik oor genoegsame voedingswaarde, word in oormaat

geproduseer en kan deur die proses van fermentasie in 'n bruikbare proteïenprodukt omgesit word waarna daar tans 'n groot vraag bestaan, wat kan verder toeneem in die toekoms (Bernstein, et al., 1977).

Daar moet steeds gestreef word na die gebruik van giste as enkelselproteïene vir menslike en dierlike gebruik om te vergoed vir die proteïen tekorte wat daar tans wêreldwyd heers. Daar moet nog egter baie aandag verleen word aan aspekte soos koste, aanvaarbaarheid en smaaklikheid van hierdie produkte. Die belangrikheid en rol van enkelselproteïen-produkte vir die toekoms is grootliks afhanklik van die gewilligheid en toeganklikheid van die industrie en owerheid om toegepaste navorsing te ondersteun en die onus berus ook op navorsers om die uitdagings te aanvaar om nuwe voedselprodukte vir die dag van môre te ontwikkel (Beuchat, 1978).

## VERWYSINGS

- BARNETT, J.A., PAYNE, R.W. AND YARROW, D. (1990). Yeasts: Characteristics and identification, 2nd edition. Cambridge University Press, Cambridge.
- BEN-HASSAN, R.M. & GHALY, A.E. (1995) Continuous production of single cell protein from whey lactose using *Kluyveromyces fragilis*. *Am. Soc. of Agric. Eng.*, 38, 4: 1121-1127.
- BERNSTEIN, S., TZENG, C.H. & SISSON D. (1977) The commercial fermentation of cheese whey for the production of protein and/or alcohol. *Biotech. and Bioengineering Symposium*: 1-9.
- BEUCHAT, L.R. (1978) Food and beverage mycology. Avi Publishing Company, Inc. Westport, Connecticut.
- CAPOOR, A.K. & SINGH, K. (1985) Fermentation of whey by lactose utilizing yeast for S.C.P production and B.O.D. reduction. *Indian J. Dairy Sci.*, 38, 1: 15-17.
- DEAK, T. (1991) Foodborne Yeasts. *Advances in Applied Microbiology*, 36: 179-195.
- DEAK, T. & BEUCHAT, L.R. (1996) Handbook of food spoilage yeasts. CRC Press, Boca Raton.
- DEEPEN, P., GUHA, A.K. & CHATTERJEE, B.P. (1994) Effect of plant growth hormones on *Kluyveromyces fragilis* grown on deproteinized whey. *Biochem. Archiv.*, 10: 277-283.
- GOLDBERG, I. (1985) Single cell protein. Biotechnology Monographs. Vol 1. Springer-Verlag, Berlin.
- HANSEN, R. (1993) Is whey and permeate worth bothering with? *North European Food and Dairy Journal*, 3, 88: 95-96.
- HOLZAPFEL, W.H. (1966) Die verryking van kaaswei met behulp van *Saccharomyces fragilis* en ander gisisolate. Ter vervulling van die vereistes vir die Graad Magister

Scientiae Agriculturae in die Departement Suiwelwetenskap, Universiteit van die Oranje Vrystaat, Bloemfontein.

HORTON, B.S. (1994) Whey processing and utilization. Subject B31. *Bulletin of the IDF*, 279: 46-49.

KREGER-Van RIJ, N.J.W. (ed.) (1984) The yeasts, a taxonomic study. 3rd ed. Elsevier, Amsterdam.

OOSTHUIZEN, A., KOCK, J.L.F., VILJOEN, B.C., MULLER, H.B. & LATEGAN, P.M. (1987) The value of long-chain fatty acid composition in the identification of some brewery yeasts. *J. Inst. Brew.*, 93: 174-176.

PHAFF, H.J., MILLER, M.W. & MRAK, E.M. (1978) The life of yeasts. 2nd edition. Harvard University Press, London.

REED, G. (1982) Prescott & Dunn's Industrial Microbiology. 4th edition. Avi Publishing Company, Westport.

VILJOEN, B.C., KOCK, J.L.F. AND LATEGAN, P.M. (1986) Fatty acid composition as a guide to the classification of selected genera of yeasts belonging to the Endomycetales. *J. Gen. Microbiol.*, 132: 2397-2400.

VILJOEN, B.C., KOCK, J.L.F. AND BRITZ, T.J. (1988a) The significance of long-chain fatty acid composition and other phenotypic characteristics in determining relationships among some *Pichia* and *Candida* species. *J. Gen. Microbiol.*, 134: 1893-1899.

VILJOEN, B.C., KOCK, J.L.F. AND BRITZ, T.J. (1988b) The significance of long-chain fatty acid composition and other phenotypic characteristics in determining relationships among some *Candida*, *Kluyveromyces* and *Saccharomyces* species. *System. Appl. Microbiol.*, 10: 116-120.

WILLETS, A. & UGALDE, U. (1987) The production of single cell protein from whey. *Biotech. Letters*, 9, 11: 795-800.

ZADOW, J.G., (1988) Fermentation of whey and permeate. *Bulletin of the IDF*, 233: 53-59.

## HOOFSTUK 7

OPSOMMING

SUMMARY



Kaas geprosesseer deur tradisionele en moderne metodes produseer 'n groot hoeveelheid wei, nagenoeg 84% van die volume van melk gebruik tydens kaasprosessering. Die storting van wei verskaf tans besoedelings probleme van groot omvang. Bewuswording van die voedingswaarde van wei vir beide menslike en dierlike gebruik het gelei tot talle nuwe navorsingprojekte.

In die lig van die huidige voedseltekorte veral proteïen, bied die omskakeling van wei na bruikbare produkte soos enkelselproteïen-produkte 'n baie goeie alternatief. Die hoë soutkonsentrasie, lae energieverhouding en lae soetheid van laktose, plaas 'n demper op die ontwikkeling van nuwe weiprodukte. Die gebruik van gedeproteïeniseerde weipermeaat verskaf goeie finansiële vooruitsigte aan die suiwelbedryf deur die verskaffing van hoë kwaliteit weiproteïen aan die een kant en die benutting van gedeproteïeniseerde wei of permeaat aan die ander kant. Dit kan lei tot nog groter ekonomiese voordele indien 'n geskikte gisstam gevind kan word om sodoende die proteïen inhoud daarvan te verhoog. Hierdie proteïen verrykte weipermeaat kan aangewend word as veevoer met die oog op die ontwikkeling van 'n voedselprodukt vir menslike gebruik in die toekoms.

Veertien verskillende laktose benuttende gisstamme, wat in staat is om proteïen te produseer vanaf wei, is geïsoleer vanaf 'n kaasfabriek en -fabrieksomgewing. 'n Seleksieprosedure is uitgevoer waartydens elke stam in gepasteuriseerde wei verkry tydens Cheddar kaasvervaardiging, geïnkuleer is en hul fermenterende eienskappe asook proteïen produksie en uitputting van laktose gemonitor is. Gebaseer op hierdie resultate is 'n gisspesie naamlik *Kluyveromyces marxianus var. lactis* geselekteer vir verdere fermentasie studies. Hierdie gisspesie is gebruik om 'n gefermenteerde weiprodukt met 'n hoë enkelselproteïen konsentrasie te produseer. 'n Hoë konsentrasie van proteïen naamlik 1.18 mg/ml is verkry tydens 'n fermentasieperiode van 22 uur sonder enige byvoegings tot permeaat, wat 'n aanduiding is dat so 'n sisteem wel in die suiwelbedryf geïmplementeer kan word.

Cheese processed by traditional or modern methods inevitably produces large quantities of whey (approximately 84% of the volume of milk used). The disposal of whey is becoming a major industrial and environmental health problem and is difficult to separate from cheese technology. However, since a greater appreciation of the inherent nutritional value of whey constituents for both humans and livestock has become apparent, various new research projects have been initiated.

In the light of growing global food shortages, the most logical use of whey would be to return it, in a palatable form, to the human food chain. The high salt content, low energy ratio and sweetening power of lactose, however, place constraints in the way of developing whey-derived food products. Single-cell protein, using deproteinized whey offer attractive new possibilities, not only from the standpoint of the current exhaustion of protein sources, but also because such food products have great potential for acceptance. The use of deproteinized whey offers attractive financial opportunities for the dairy industry by providing good quality whey protein on the one hand and by further processing of the deproteinized whey on the other. This can lead to even greater economic advantages if the deproteinized whey is enriched by means of suitable yeast strains to enhance the single-cell protein content. This protein enriched whey can primarily be applied for stockfeed with the envisaged development of a whey based food product for human consumption later.

Fourteen lactose utilizing yeast strains, capable of fermenting lactose and producing high protein contents when grown on whey, were isolated from whey and its immediate environment. Priority selection studies were performed by growing each strain on whey, obtained during the processing of Cheddar cheeses, while monitoring their fermentative abilities, protein production capacity and the depletion of lactose. Based on these results, a yeast species namely *Kluyveromyces marxianus var. lactis* were selected for detailed fermentation studies. The yeast species were used for producing a whey-fermented product with high single-cell protein but low alcohol content. High levels of protein 1.18 mg/ml were obtained in a 22 h fermentation period without any enrichment which reflects well on the possibility of implementing the system in the dairy industry.

