

تولید کاروتنوئید از آب پنیر توسط مخمر قرمز رنگ ردوترولا آکنیوروم، جداسازی شده از شیرۀ درختان توس طالقان

ایرج نحوی، محسن واعظ و گیتی امتیازی^۱

چکیده

کاروتنوئیدها از مهم ترین و رایج ترین رنگیزه های طبیعی هستند، که وظایف بیولوژیک مهمی را در موجودات زنده برعهده دارند، و هم چنین، رنگ مشخص و جذابی را به بسیاری از حیوانات پرورشی می بخشند. در دهه اخیر استفاده از کاروتنوئیدهای با منشأ میکروبی، به علت دارا بودن مزایایی چون طبیعی و مقرون به صرفه بودن آنها، مورد توجه پژوهشگران واقع شده است. در این بین، مخمرهای تولید کننده کاروتنوئید با توانایی مصرف لاکتوز به ندرت جداسازی شده اند، و اطلاعات کمی در زمینه تولید کاروتنوئیدهای مخمری با استفاده از سویستراهای حاوی لاکتوز، از جمله آب پنیر گزارش شده است. در این تحقیق یک سویه از مخمر قرمز رنگ مولد کاروتنوئید به نام ردوترولا آکنیوروم از شیرۀ درختان توس منطقه ماسه چال طالقان جداسازی گردید و توسط آزمون های میکروسکوپی، ماکروسکوپی و بیوشیمیایی شناسایی شد.

نتایج نشان داد که مخمر جداسازی شده توانایی مصرف لاکتوز و تولید کاروتنوئید را تماماً دارا می باشد. ارزیابی شرایط مطلوب کشت مقادیر ماکزیم بیوماس و کاروتنوئید را به ترتیب معادل ۹/۹g/lit و ۲۹۰µg/g برآورد نمود. ضمناً آنالیز شیمیایی عصاره کاروتنوئیدی استخراج شده از این مخمر، مؤید حضور بتاکاروتن، ترولین و ترولورودین، به عنوان کاروتنوئیدهای اصلی تولید شده بود. با توجه به این که آب پنیر یکی از فراورده های جانبی صنایع پنیر سازی کشور است، و متأسفانه در حال حاضر اکثراً به هدر می رود و باعث آلودگی محیط زیست می شود، استفاده از این ماده در تولید مواد با ارزشی چون کاروتنوئیدها می تواند از اهمیت شایانی برخوردار باشد.

واژه های کلیدی: کاروتنوئید، ردوترولا آکنیوروم، آب پنیر

مقدمه

ترولین^۴ و ترولورودین^۵ اجزای اصلی این رنگیزه ها در این گروه از مخمرها می باشند (۷)، که به عنوان پیش ماده ویتامین A و نیز یک رنگ خوراکی طبیعی در صنایع غذایی و دارویی اهمیت

تشکیل رنگیزه های کاروتنوئیدی یکی از خصوصیات جنس ردوترولا^۲ است (۳ و ۱۴). بتاکاروتن^۳ همراه با دو کاروتنوئید

۱. به ترتیب استادیار، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

2. *Rhodotorula* 3. Beta carotene 4. Torulene 5. Torularhodin

دارند (۳، ۶ و ۱۳).

مواد و روش‌ها

جداسازی مخمرها

شیره درختان توس منطقه ماسه چال از روستای دهر طالقان، واقع در شهرستان ساوجبلاغ، از نظر حضور سویه‌های برتر از مخمرهای کاروتنویدی مورد مطالعه قرار گرفت. درختان در منطقه‌ای سردسیر، در خاکی سطحی با شیب تند، در کنار چشمه‌های دائمی به نام چهل چشمه، به شکل دو توده نزدیک به هم رویش نموده‌اند. شیره درختان توسط سرنگ‌ها و سواب‌های استریل نمونه برداری شد، و میکروفلور مخمری کاروتنویدی آنها با استفاده از محیط‌های کشت مناسب جداسازی و خالص سازی گردید.

شناسایی مخمرها

مخمرهای جداسازی شده (با کلتی صورتی تا قرمز) بعد از تهیه کشت خالص، با استفاده از کلید شناسایی شماره ۹ مورد شناسایی قرار گرفتند (۵). شناسایی بر پایه آزمون‌های ماکروسکوپی، میکروسکوپی و بیوشیمیایی صورت پذیرفت (۱۲).

آماده سازی محیط کشت تلقیحی و آب پنیر

مخمر ردوترولا آکتیوروم^۴، که به عنوان سویه برتر در این جداسازی شناخته شده بود، در ۱۰ میلی لیتر محیط کشت پیتون-یست اکسترکت مالت-لاکتوز برات (P. Y. M. L.) (۳) درون ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری تلقیح و در ۲۰°C و با سرعت هوادهی ۲۵۰ دور در دقیقه، برای مدت ۲۴ ساعت کشت گردید. محیط کشت آب پنیر با روش‌های مختلفی تهیه شد، و در نهایت محیط کشت ویلتز^۵ و آگالد^۶ انتخاب گردید. این محیط کشت حاوی یک لیتر آب پنیر تازه است که به آن دو گرم $(NH_4)_2SO_4$ ، دو گرم Na_2HPO_4 ، دو گرم $MgSO_4$ ، ۰/۱ گرم $NaCl$ ، ۰/۱ گرم $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ ، ۰/۰۲۵ گرم $FeSO_4$

در دو دهه اخیر، استفاده از سویستراهای ارزان قیمت به منظور رشد و تولید کاروتنوید توسط مخمرها مورد توجه پژوهشگران بوده است (۱۰، ۱۱، ۱۴، ۱۵ و ۱۷). با این وجود، سویه‌های مخمری کاروتنویدی با توانایی مصرف سویستراهای طبیعی حاوی قند لاکتوز (مثل آب پنیر)، به ندرت در طبیعت یافت شده‌اند، و گزارش‌های کمی در این زمینه منتشر گردیده است. در سال ۱۹۹۰، زالاشکو (۲۰)، از مخمر لاکتوز مثبت رودترولا لاکتوزا^۱، و در سال ۱۹۹۴ و ۱۹۹۷، فرنگوا و همکاران (۷ و ۸) با استفاده از کشت مخلوط مخمر لاکتوز منفی ردوترولا گلو تینیس^۲ و باکتری هموفرمانتیتوی لاکتوباسیلوس هلوتیکوس^۳ تولید کاروتنوید در محیط آب پنیر نمودند.

آب پنیر یک فرآورده جنبی مهم صنایع پنیر سازی است. از تولید ۰/۴۵ کیلوگرم پنیر مقدار ۲/۷ - ۴/۵ کیلوگرم آب پنیر حاصل می‌شود، که با BOD و COD بالا، آلوده کننده شدید محیط زیست محسوب می‌شود (۱). با استفاده از فرایندهای میکروبی می‌توان علاوه بر رفع این مشکل، فرآورده‌های باارزشی تولید نمود (۳)، که این مهم نیز منوط به جداسازی سویه‌های برتر با تولید بالا می‌باشد. در فصل بهار درختان برگ‌ریز، از جمله درختان توس، در محل زخم‌های خود شیره‌ای ترشح می‌کنند که توسط بسیاری از میکروارگانیسم‌ها، از جمله مخمرها آلوده می‌گردد (۳ و ۹). شیره درختان توس به سبب دارا بودن ترکیباتی خاص، در مجاورت نور تولید اکسیژن نوزاد می‌کنند. این ماده یک اکسیدکننده قوی مواد داخل سلولی مانند آنزیم‌ها است، و سبب از بین بردن عوامل مهاجم و پارازیت‌ها در محل زخم‌های درخت می‌گردد. با این وجود، مخمرهای تولید کننده کاروتنوید به سبب دارا بودن رنگیزه‌ها قادرند از سمیت اکسیژن نوزاد بکاهند، و به صورت فلور غالب مخمری در محل، رشد و تکثیر نمایند، که گاه به عنوان زیستگاه منحصر به فردی که مخمر خاصی از آن جدا شده است، ذکر گردیده‌اند (۳ و ۱۶).

1. *Rhodotorula lactosa*2. *Rhodotorula glutinis*3. *Lactobacillus helveticus*4. *Rhodotorula acheniorum*

5. Willetts

6. Ugald

داخل سلولی بودند، برای بهینه‌سازی میزان تولید، اقدام به بهینه نمودن بیوماس تولیدی توسط مخمر مورد استفاده گردید، و اثر عوامل مختلف، شامل غلظت قند لاکتوز و سولفات آمونیوم محیط کشت آب پنیر، دما، pH، سرعت هوادهی و زمان کشت در سه تکرار انجام پذیرفت.

نتایج

جداسازی و شناسایی میکروفلور مخمری تولید کننده کاروتنوئید شیرۀ درختان توس در این تحقیق دو گونه مخمر کاروتنوئیدی شامل ردوترولا آکنیوروم و اسپوریادیوبولوس رویینتی^۳ با ظاهر کلنی کاملاً متفاوت جداسازی گردید (جدول ۱)، که با استفاده از کلید شناسایی موجود و چند تست تکمیلی، گونه‌های مذکور شناخته شد (جدول ۲). در نهایت، گونه اول به لحاظ دارا بودن خصوصیت دیگر، یعنی توانایی مصرف قند لاکتوز، به عنوان سویه برتر انتخاب و در مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

تجزیه شیمیایی کاروتنوئیدهای استخراجی

طیف جذبی عصاره سلولی استخراج شده از مخمر ردوترولا آکنیوروم (شکل ۱) نشان‌دهنده حضور رنگیزه‌های کاروتنوئیدی در این گونه جداسازی شده بود، و تجزیه شیمیایی TLC، حضور سه ترکیب اصلی بتا کاروتن، ترولین و ترولورودین را با توجه به گزارش‌های قبلی در این جنس تأیید می‌نمود (جدول ۳).

بررسی اثر غلظت قند لاکتوز و سولفات آمونیوم

با بررسی چهار غلظت از قند لاکتوز در محیط کشت آب پنیر، میزان ۷۵ g/l آن، تولید بیوماس مخمری بالاتر و به تبع آن کاروتنوئید بیشتر، به ازای هر لیتر محیط کشت می‌نمود (شکل ۲).

هم‌چنین، غلظت دو گرم در لیتر از سولفات آمونیوم، به عنوان تأمین کننده منبع نیتروژن، مناسب‌تر دیده شد (شکل ۳).

$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، H_3BO_3 ، $2\text{H}_2\text{O}$ گرم ۰/۰۰۷۵، ۰/۰۰۰۱، ۰/۰۰۰۱ و H_3BO_3 ، $2\text{H}_2\text{O}$ گرم ۰/۰۰۰۵ و آماده سازی، محیط فوق به میزان ۵۰ ml در ارلن‌های ۲۵۰ میلی لیتری تقسیم و استریل گردید (۱۹).

شکست سلول‌های مخمری و استخراج کاروتنوئیدها

از آن‌جا که کاروتنوئیدهای تولید شده توسط مخمر ترکیبات داخل سلولی می‌باشند، برای استخراج آنها روش‌های مختلفی از شکست سلولی، شامل استفاده از هم‌زن برقی و ذرات شیشه به قطر ۰/۵ mm (۳ و ۴)، استفاده از دستگاه هموژنیزه کننده ساخت شرکت IKA (۳)، استفاده از دستگاه اولتراسونیک و استفاده از حلال دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) به شکل داغ (۳ و ۱۸) مورد مطالعه قرار گرفت، که روش اخیر به سبب کارایی بالا، سرعت عمل و سادگی برای آزمون‌های بعدی آنالیز انتخاب شد. بعد از شکست سلول‌های مخمری، کاروتنوئیدهای تولید شده توسط حلال پترولیوم اتر استخراج و مقدار آن محاسبه گردید (۳، ۴، ۷ و ۱۰).

آنالیز شیمیایی ترکیبات کاروتنوئیدی تولیدی

کاروتنوئیدهای استخراج شده توسط پترولیوم اتر، از نظر طیف جذبی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر پیشرفته^۱ در دامنه طول موج ۴۰۰-۶۰۰ نانومتر مورد آنالیز قرار گرفت. به منظور شناسایی کامل تر اجزای تشکیل دهنده عصاره کاروتنوئیدی استخراج شده، از تکنیک کروماتوگرافی نازک لایه^۲ روی صفحاتی از جنس سیلیکاژل خنثی و منیزیم اکسید و حلال پترولیوم اتر و استن به نسبت (۱:۱۰) استفاده و با تفکیک باندهای به دست آمده از هر یک، نوع کاروتنوئیدهای تولید شده شناسایی اولیه گردید.

بررسی اثر پارامترهای محیط کشت بر تولید کاروتنوئید

از آن‌جا که کاروتنوئیدهای تولید شده توسط مخمرها ترکیبات

1. Specord S

2. Thin Layer Chromatography

3. *Sporidiobolus ruinenii*

جدول ۱. مورفولوژی مخمرهای جداسازی و شناسایی شده

نام مخمر	رنگ کلنی	اندازه کلنی* (mm)	سطح کلنی	اطراف کلنی
ردوترولا آکتیوروم	قرمز رنگ	۱-۳	محدب	صاف
اسپوریدیوبولوس روییننی	قرمز کم رنگ	۱-۴	آتش فشانی	دنداندار

*: بعد از ۵ روز در ۲۲°C روی محیط YM آگار

جدول ۲. نتایج تست‌های شناسایی مخمرهای جداسازی شده

نام تست	نام مخمر	ردوترولا آکتیوروم	اسپوریدیوبولوس روییننی
مصرف هوازی قند د-گزیلوز		+	+
مصرف هوازی قند مالتوز		+	+
مصرف هوازی قند لاکتوز		+	-
مصرف هوازی قند د-مانیتول		+	+
مصرف نیترات		+	+
مصرف اتیل آمین		-	-
رشد در غیاب ویتامین بیوتین		+	+
رشد در غیاب ویتامین PABA		+	+
رشد در دمای ۲۵°C		+	+
رشد در دمای ۳۰°C		-	-
رشد در دمای ۳۷°C		-	-
رشد در حضور ۱/۰٪ سیکلو هگزامید		-	W ^۱
تشکیل نشاسته خارج سلولی		+	-
تولید رشته یا فیلامنت		-	+
تولید هیف کاذب		-	+
تولید بالیستوسپور		-	+

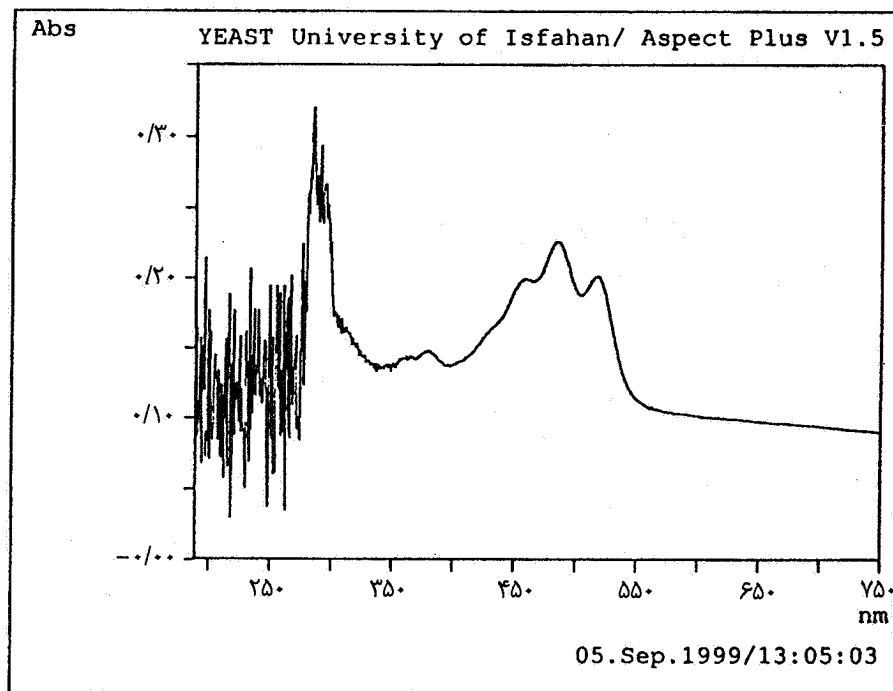
۱. ضعیف

بررسی اثر pH، دما و سرعت هوادهی

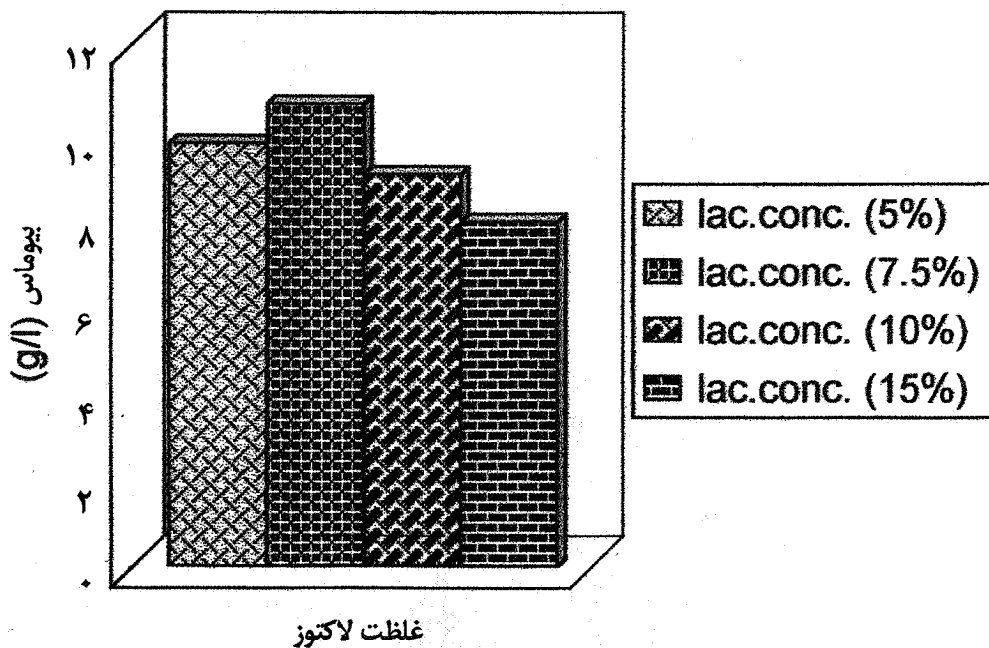
بالاترین بیوماس تولیدی توسط مخمر در pH=۵/۵ حاصل گردید (شکل ۴). هر چند که مخمر در حد وسیعی از pH قادر به رشد بود، اما در pH کمتر از سه رشد محسوسی قابل مشاهده

نبود.

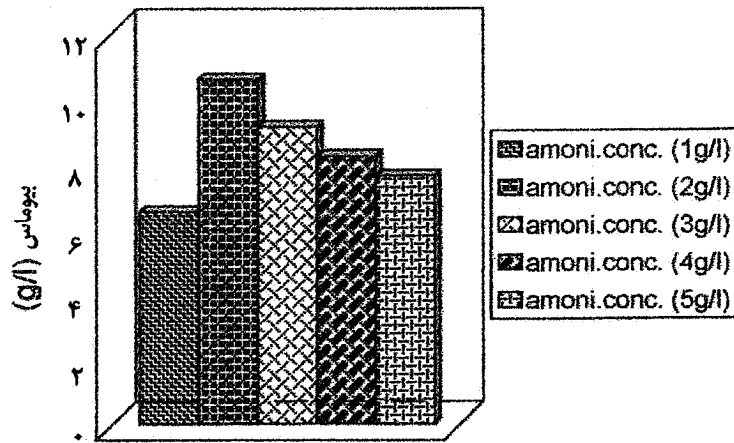
مناسب‌ترین دمای رشد مخمر جداسازی شده در ۲۲°C تعیین گردید (شکل ۵)، و مشخص شد که رشد مخمر فوق در دمای بالاتر از ۲۸°C به طور چشم‌گیری کاهش می‌یابد.



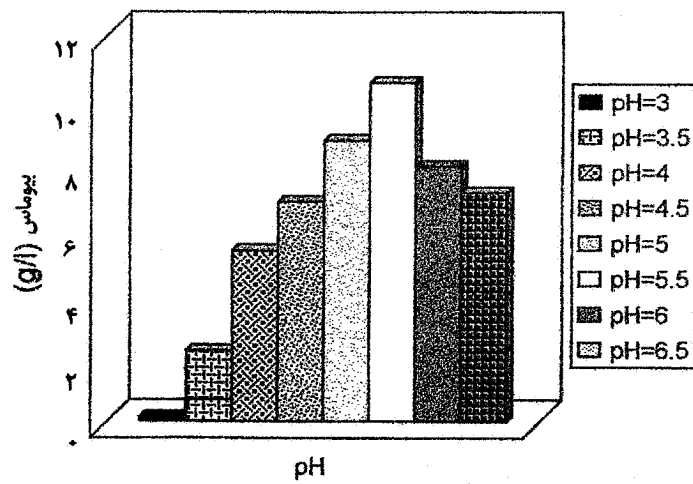
شکل ۱. طیف جذبی عصاره کاروتنوئیدی استخراج شده از ردوترولا آکنیوروم در حلال پترولیوم اتر



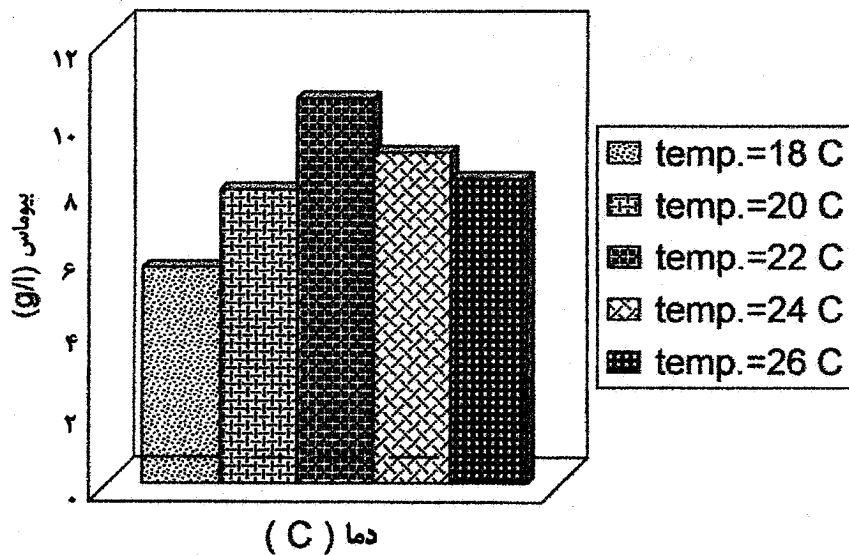
شکل ۲. اثر غلظت قند لاکتوز آب پنیر بر بیوماس تولید شده توسط مخمر



شکل ۳. اثر غلظت سولفات آمونیوم بر بیوماس تولید شده توسط مخمر
غلظت سولفات آمونیوم



شکل ۴. اثر pH بر بیوماس تولید شده توسط مخمر



شکل ۵. اثر دما بر بیوماس تولید شده توسط مخمر

جدول ۳. ترکیبات کاروتنوئیدی شناسایی شده در عصاره استخراج شده از سلول‌های مخمری، توسط حلال پترولیوم اتر با استفاده از تکنیک TLC

نام کاروتنوئید	λ_{max}
بتا - کاروتن	۴۵۲
ترولین	۴۸۵
ترولورودین	۵۱۵

جدول ۴. مقایسه میزان تولید کاروتنوئید توسط مخمرهای لاکتوز مثبت با سویه برتر جداسازی شده

مطالعه انجام شده	منبع ۷ و ۸	منبع ۲۰	تحقیق حاضر
کاروتنوئید کل تولیدی	۲۶۸ $\mu\text{g/g}$	۸۶/۸ $\mu\text{g/g}$	۲۹۰ $\mu\text{g/g}$
مخمر مورد استفاده	<i>R. glutinis</i>	<i>R. lactosa</i>	<i>R. acheniorum</i>

آکنیوروم، جدا شده از شیرۀ درختان توس منطقه طالقان، علاوه بر توانایی تولید نسبتاً زیاد کاروتنوئید، قادر است قند لاکتوز را نیز مصرف کند. این در حالی است که گزارش‌های کمی در زمینه مخمرهای کاروتنوئیدی لاکتوز مثبت و کاربرد صنعتی آنها وجود دارد.

سویه جداسازی شده اخیر، در مقایسه با سویه‌های مخمری به کار گرفته شده توسط سایر پژوهشگران، از تولید کاروتنوئید نسبتاً بیشتری برخوردار است (جدول ۴).

در نهایت، بعد از بهینه سازی شرایط محیط کشت آب پنیر (غلظت لاکتوز ۷۵ و سولفات آمونیوم دو گرم در لیتر، pH=۵/۵، دمای ۲۲°C و سرعت هوا دهی ۲۵۰ دور در دقیقه)، میزان تولید کاروتنوئید ۲۸۷۱ میکروگرم در لیتر (شکل ۸ج)، معادل ۲۹۰ میکروگرم در گرم (شکل ۸ب) و بیوماس ۹/۹ گرم در لیتر (شکل ۸الف) در مدت ۵ روز به دست آمد، و بازده تولید بیوماس بر مبنای مصرف قند لاکتوز به حداکثر ۶۳/۱۲٪ رسید.

سعی بر آن است که در پژوهش‌های آینده میکروفلور مخمری درختان توس سایر مناطق کشور از نظر حضور سویه‌های دیگری چون قافیا ردوزیما^۱، تولید کننده کاروتنوئید

از آن جا که مخمر ردوترولا آکنیوروم یک مخمر غیر تخمیری است، هوادهی اثر مهمی بر رشد و تولید کاروتنوئید آن دارد. از طرفی، چون مقدار هوادهی محیط کشت با سرعت تکان خوردن آن بر حسب دور در دقیقه رابطه مستقیم دارد، اقدام به تعیین میزان آن گردید، و برای ۵۰ ml محیط کشت در ظروف ۲۵۰ میلی لیتری مقدار ۲۵۰ دور در دقیقه مناسب به نظر رسید (شکل ۶). هم چنین، مشخص گردید که در سرعت‌های فراتر از این مقدار، به علت ایجاد نیروی تنش بر میکروارگانیسم، میزان رشد کاهش می‌یابد.

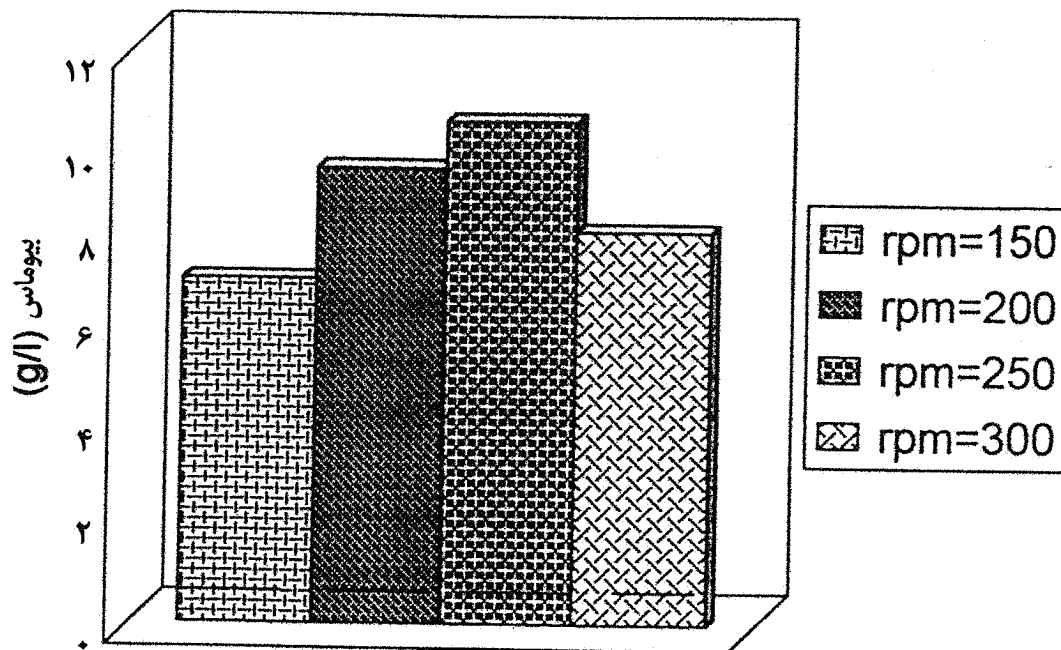
بررسی اثر مدت زمان کشت

آزمایش‌ها نشان داد که حداکثر بیوماس تولیدی توسط این مخمر در روز چهارم به دست می‌آید (شکل ۷)، و به دنبال آن کاهش جزئی در مقدار بیوماس (شکل ۸الف) و افزایش تدریجی در کاروتنوئید سلول، باعث می‌شود که کاروتنوئید تولید شده در محیط کشت در روز پنجم حداکثر مقدار خود را دارا باشد (شکل ۸ب و ۸ج).

بحث و نتیجه گیری

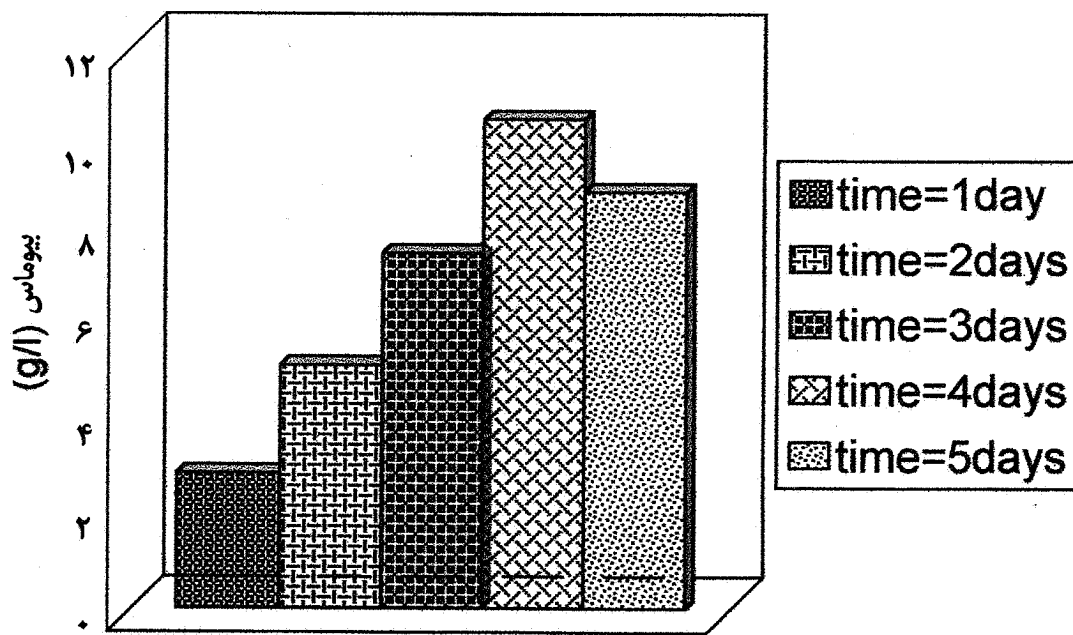
در تحقیق حاضر مشخص شد که مخمر قرمز رنگ ردوترولا

1. *Phaffia rhodozyma*



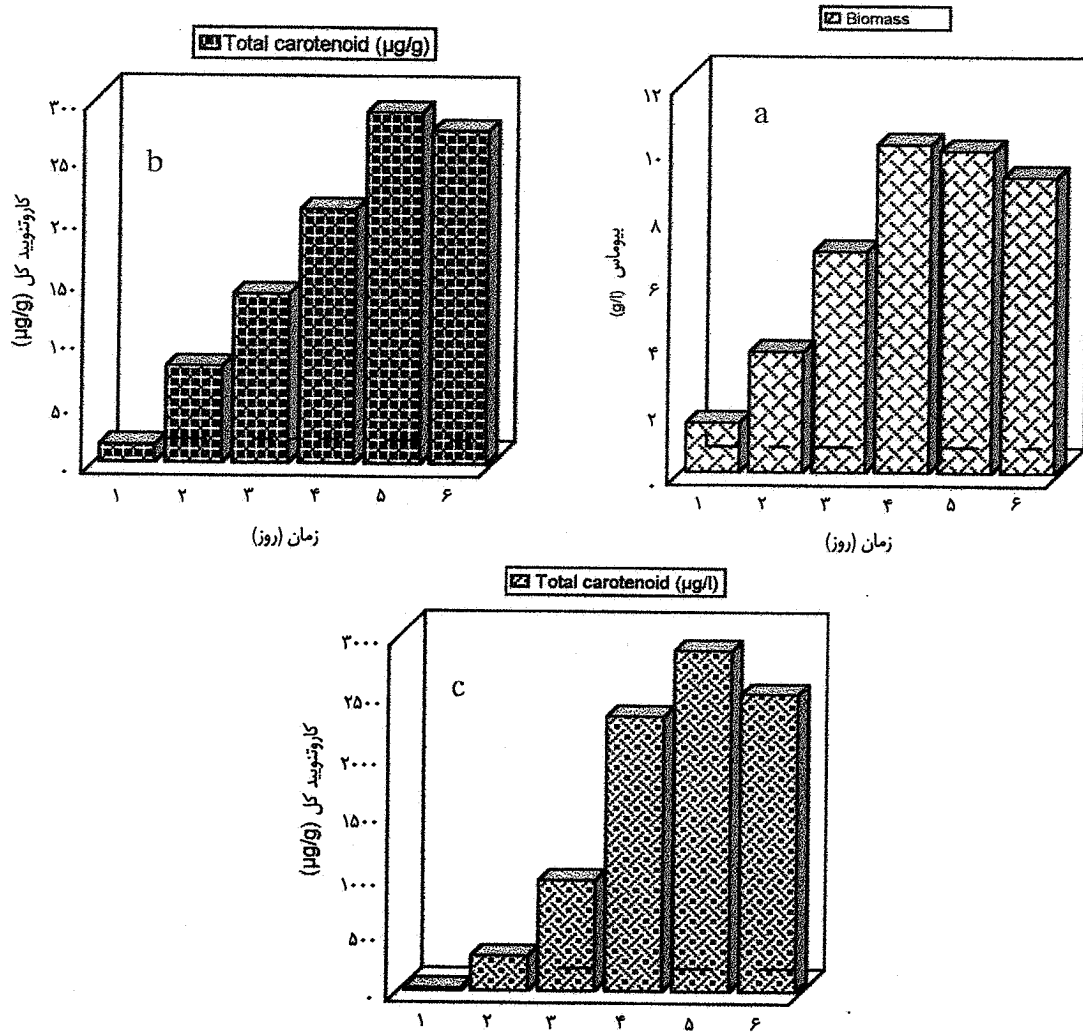
دور در دقیقه

شکل ۶. اثر سرعت هوادهی بر بیوماس تولید شده توسط مخمر



زمان

شکل ۷. اثر مدت زمان کشت بر بیوماس تولید شده توسط مخمر



شکل ۸. نتیجه نهایی بعد از بهینه‌سازی پارامترهای محیط کشت مخمر در مدت شش روز

الف) نمودار بیوماس تولیدی (g/l) ب) نمودار کاروتنوئید تولیدی (µg/g) ج) نمودار کاروتنوئید تولیدی (µg/l)

آستاگزانتین، که از مناطق دیگری از دنیا گزارش شده است (۲) و (۹)، مورد بررسی قرار گیرد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از آقایان مهندس سید علی خانی و مهندس
گرشاسبی از اداره آبخیزی جهاد سازندگی شهرستان ساوجبلاغ و

منابع مورد استفاده

۱. نحوی، ا. و ز. صهبائی. ۱۳۷۷. بررسی تولید پروتئین تک یاخته (SCP) از آب پنیر. مجله پژوهشی دانشگاه اصفهان ۱ و ۲: ۲۹-۴۴.
۲. نحوی، ا. و م. واعظ. ۱۳۷۸. تولید آستاگزانتین از منابع میکروبی و کاربرد آن در پرورش ماهی. مجله آبی پروری ۲۶: ۵۷-۶۱.
۳. واعظ، م. ۱۳۷۸. جداسازی و شناسایی مخمرهای تولید کننده کاروتنوئید و کاربرد آنها در صنعت. پایان نامه کارشناسی ارشد زیست شناسی، دانشگاه اصفهان.
4. An, G. H., D. B. Schuman and E. A. Johnson. 1989. Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Appl. and Environ. Microbiol.* 55: 116-124.
5. Barnett, J. A., R. W. Payne and D. Yarrow. 1983. *Yeasts: Characteristics and Identification*. Frist edittion, Cambrige Univ. Press, Cambrige.
6. Ershova, Y. A., A. Dmitrovsky, O. Polulyakh, O. Podoprigova and V. Bykhovky. 1992. Enzymatic conversion of torulene and torularhodin to retinal. *Prikladnaya Biokhimiya Mikrobiologia* 28: 680-684.
7. Frengova, G., E. Simova, K. Paulova, D. Beshkova and D. Grigorova. 1994. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate. *Biotech. and Bioeng.* 44: 888-894.
8. Frengova, G., E. Simova and D. Beshkova. 1997. Caroteno-protein and exopolysaccharide production by co-cultures of *Rhodotorula glutinis* and *Lactobacillus helveticus*. *J. Indust. Microbiol. and Biotech.* 18: 272-277.
9. Golubev, W. I. 1995. Perfect state of *Rhodomycetes dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Yeast* 11: 101-110.
10. Haard, N. F. 1988. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma* on molasses. *Biotech. Letters* 10: 609-614.
11. Hayman, G. T., B. M. Mannarelli and T. D. Leathers. 1995. Production of carotenoids by *Phaffia rhodozyma* grown on media composed od corn wet-milling co-products. *J. Indust. Microbiol.* 14: 389-395.
12. Kurtzman, C. P. and J. W. Fell. 1998. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Fourth edition, Elsevier, Amsterdam.
13. Margalith, P. Z. 1992. The carotenoid pigments. *In: Pigment Microbiology*. First edition, pp. 32-76, Chapman and Hall, London.
14. Matelli, I., N. O. da Silva and D. Pomeroy. 1990. Production of β -carotene by a *Rhodotorula* strain grown on sugar-cane juice. *Biotech. Letters* 12: 207-208.
15. Meyer, P. S. and J. C. Du Preez. 1994. Astaxanthin production by a *Phaffia rhodozyma* mutant on grape juice. *World J. Microbiol. and Biotech.* 10: 178-183.
16. Miller, M. W., M. Yoneyama and M. Soneda. 1976. *Phaffia* a new yeast genus in the *Deuteromycotina* (*Blastomycetes*). *Internat. J. Systematic Bacteriol.* 26: 286-291.
17. Okagbue, R. N. and M. J. Lewis. 1984. Use of alfalfa residual juice as a substrate for propagation of the red yeast *Phaffia rhodozyma*. *Appl. Microbiol. and Biotech.* 20: 33-39.
18. Sedmak, J. J., D. K. Weerasinghe and S. O. Jolly. 1990. Extraction and quantitation of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. *Biotech. Techniques* 4: 107-112.
19. Willetts, A. and U. Ugald. 1987. The production of single cell protein from whey. *Biotech. Letters* 9: 795-800.
20. Zalashko, M. V. 1990. *Biotechnology of Milk Whey Processing*. Science Press, Moscow.