Prosimy cytować jako: Inż. Ap. Chem. 2013, 52, 5, 443-444

Magdalena LECH, Anna TRUSEK-HOŁOWNIA

e-mail: magdalena.lech@pwr.wroc.pl

Zakład Procesów Chemicznych i Biochemicznych, Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska, Wrocław

Biodegradacja serwatki z wykorzystaniem szczepu *B. licheniformis*

Wprowadzenie

Zakłady mleczarskie od lat borykają się z problemem utylizacji serwatki – poprodukcyjnego płynu zawierającego znaczne ilości laktozy (ok. 45 kg·m^{-3}) i białka (ok. 11 kg·m^{-3}). Białka w niej zawarte są bardzo wartościowe z punktu widzenia przemysłu spożywczego, farmaceutycznego czy chemicznego. Za pomocą metod membranowych, chromatograficznych, wysalania i wielu innych możemy uzyskać interesujące nas frakcje, a niezdatny do dalszego odzysku strumień poddać biodegradacji. Medium to jest doskonałą pożywką dla mikroorganizmów z racji wspomnianej wcześniej dużej zawartości laktozy.

Idealnym szczepem do procesu biodegradacji serwatki jest *Bacillus licheniformis* – szczep Gram dodatni, należący do typu *Firmicutes*.

W celu opracowania procesu biodegradacji w bioreaktorze działającym okresowo i docelowo w sposób ciągły niezbędne jest wyznaczenie kinetyki wzrostu *B.licheniformis* na podłożu składającym się z serwatki przemysłowej (powstałej przy produkcji kozich serów podpuszczkowych). Było to przedmiotem niniejszej pracy. W tym celu sporządzono roztwory serwatki o różnych stężeniach i wyznaczono właściwą szybkość wzrostu oraz szybkość utylizacji substancji organicznych.

Materiały i metody

W celu pozbycia się naturalnej mętności serwatki (pozostałości skrzepu kazeinowego i tłuszczu) serwatkę wirowano przez 20 minut w wirówce z chłodzeniem (4°C) o przyspieszeniu 9508 G. Następnie dodawano $CaCl_2$ w temperaturze 2÷5°C (1,2 kg·m^{-3}) w celu pozbycia się nadmiaru tłuszczu przez strącenie go w postaci kompleksów lipidowo-fosforanowych. W kolejnym etapie doprowadzono serwatkę do *pH* 7,3, następnie podgrzano roztwor do temperatury 55°C i utrzymywano takie warunki przez 8 minut. Powstałą zawiesinę wirowano przez 20 minut w temperaturze 4°C [*Almecija i in., 2007*].

Stężenie komórek (X) oznaczano za pomocą analizy spektrofotometrycznej przy długości fali λ = 550 [nm] wykorzystując krzywą standardową o równaniu X [kg·m^{-3}] = 0,389 Abs (550).

Zawartość białka mierzono za pomocą analizy kolorymetrycznej *Lowry'ego i in.* [*1951*] z wykorzystaniem krzywej na albuminę wołową o równaniu $C_{białka}$ [kg·m^{-3}] = 0,396 Abs (750).

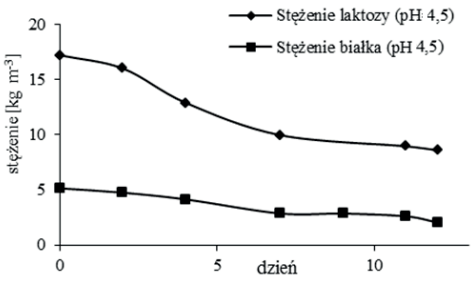
Zawartość laktozy oznaczano metodą DNS przy wykorzystaniu krzywej standardowej $C_{laktozy}$ [kg·m^{-3}] = 2,360 Abs (550) [*Miller, 1959*].

Pobierano próbki z hodowli w równych odstępach czasu i mierzono bezpośrednio stężenie mikroorganizmów. Do analizy *Lowry'ego* i DNS próbki wirowano przez 7 minut przy przyspieszeniu wirówki wynoszącym 4 226 G.

Wyniki i ich omówienie

Przed przystąpieniem do badań z wykorzystaniem *szczepu Bacillus licheniformis* sprawdzono zdolność do rozkładu laktozy i białka przez rodzime szczepy bakteryjne występujące w serwatce. Mierzono stężenie laktozy i białka w czasie, w kolbach inkubowanych w temperaturze 38°C, zawierających jedynie rozcieńczoną (sześcio- i trzykrotnie) serwatkę. Odczyn *pH* wynosił 4,5.

Jak widać na rys.1 zawarte w serwatce szczepy do swych przemian metabolicznych zużywają obecną w serwatce laktozę oraz białko, choć jego spadek jest bardzo powolny, co także może wynikać z obecności w serwatce rodzimych enzymów proteolitycznych m.in. plazminy [*Milk Facts – Milk Enzymes*].

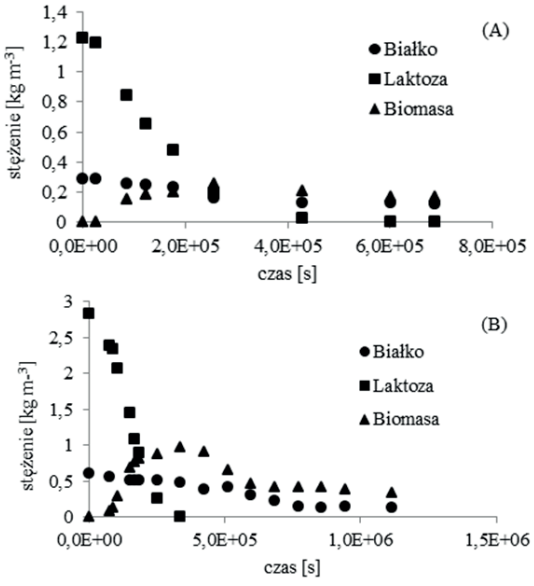


Rys. 1. Zmiana stężenia laktozy i białka w serwatce 3-krotnie rozcieńczonej, inkubowanej przez 12 dni w 38°C

Wzrost szczepu *B. licheniformis* na podłożu serwatkowym

W celu opracowania kinetyki wzrostu szczepu *B. licheniformis* sporządzono roztwory będące w różnym stopniu rozcieńczoną serwatką, w których stężenie początkowe laktozy wynosiło od 0,8 do 11,6 [kg·m^{-3}]. W przypadku serwatki bardziej zatężonej obserwowano po ok. 200 h hodowli wchodzenie hodowli w fazę zamierania pomimo obecności składników organicznych, zarówno białka, jak i laktozy. Ponieważ stężenie biomasy nie osiągało wówczas poziomu (X >10 [kg·m^{-3}]), przy którym należałoby oczekiwać utrudnionego wzrostu, nagromadzenia licznych metabolitów itp., stąd takie zjawisko przypisuje się zaistnieniu inhibicji monocukrami (lub jednym z nich) powstających jako produkt pośredni w dużej ilości przy wysokim stężeniu laktozy.

W trakcie każdej hodowli monitorowano stężenie komórek, białka i cukru. Przykładowe przebiegi przedstawiono na rys. 2.



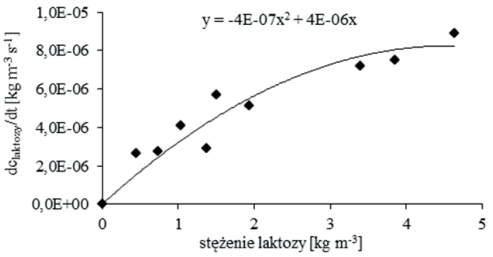
Rys.2. Zmiana stężenia substancji organicznych zawartych w serwatce oraz stężenia biomasy w czasie trwania hodowli okresowej dla serwatki rozcieńczonej 16 razy (A) i 36 razy (B)

Na podstawie uzyskanych wyników, zaobserwowano, że badany szczep bardzo szybko wchodzi w fazę wzrostu logarytmicznego (faza zastoju trwa ok. 4÷5 h) i w badanym zakresie nie zależy od stężenia substancji organicznych zawartych w serwatce.

Prosimy cytować jako: Inż. Ap. Chem. 2013, 52, 5, 443-444

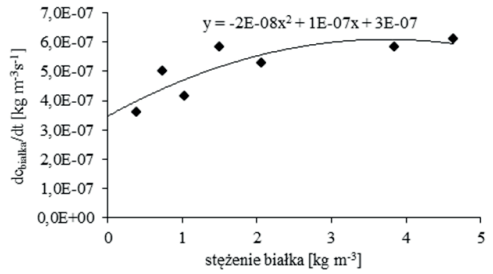
Wzrostowi stężenia biomasy towarzyszy intensywny (niemal liniowy) spadek stężenia laktozy i wolniejszy (też liniowy) stężenia białka. W momencie wyczerpania się zapasów laktozy hodowla zaczyna wchodzić w fazę zamierania. Zauważalny jest jednak wówczas, dalszy powolny spadek stężenia białka.

Szybkość biodegradacji laktozy r_L jest zależna do jej stężenia (Rys. 3). Dla stężeń mniejszych niż 2 [kg m^{-3}] szybkość ta może zostać opisana kinetyką pierwszego rzędu, a stała szybkości biodegradacji wynosi w tym wypadku k_L=3,08·10^{-6}[s^{-1}].



Rys. 3. Szybkość zużycia laktozy w funkcji stężenia

Podczas wzrostu *B. licheniformis* następuje również spadek stężenia białek serwatkowych. Szybkość biodegradowania białka jest o rząd niższa od szybkości wyznaczonej dla składnika cukrowego (Rys. 4).



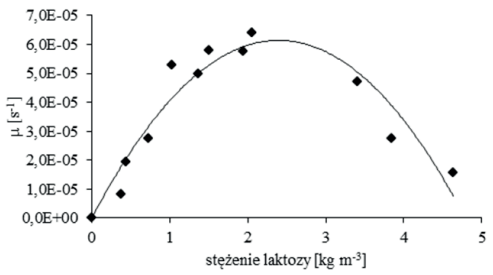
Rys. 4. Szybkość zużycia białka w funkcji stężenia

Średni współczynnik wydajności biomasy:

$$X_{X/S} = \frac{X_t - X_0}{c_{S,0} - x_{S,t}} \tag{1}$$

wynosi, w przeliczeniu na laktozę Y = 0,33 (błąd względny dla obliczeń wyniosł Δ = 14,7%). Dla białka jest on bardzo niski.

Rozpatrując właściwą szybkość wzrostu *B. licheniformis* na podłożu serwatkowym dla stężeń mniejszych niż 2 [kg·m^{-3}] można przyjąć, iż jest to reakcja 1 – szego rzędu ze względu na stężenie laktozy, a stała szybkości wzrostu wynosi k_X = 3,45·10^{-5} [m^3·kg^{-1}·s^{-1}]. Dla stężeń większych niż 2 [kg·m^{-3}] obserwuje się inhibicję substratową wynikającą z wysokiego stężenia jednego (bądź obu) substratów (Rys. 5), gdyż wysokiemu stężeniu laktozy towarzyszy stosunkowo wysokie stężenie białka (stosunek stężenia laktozy do białka w serwatce koziej jest stały i wynosi ok. 4:1).



Rys. 5. Kinetyka wzrostu *B .licheniformis* na serwatce w funkcji stężenia laktozy

Znając współczynnik wydajności biomasy można uzależnić szybkość wzrostu biomasy od szybkości biodegradacji (zużycia) laktozy:

$$r_L = \frac{1}{Y_{X/S}} r_X \tag{2}$$

Natomiast znając pozostałe parametry kinetyki wzrostu *B.licheniformis* można na ich podstawie zaprojektować proces biodegradacji w bioreaktorze okresowym, by docelowo utylizować to medium w bioreaktorze o działaniu ciągłym.

Tak więc, szybkość przyrostu biomasy w bioreaktorze wynosi:

$$r_X = X\mu = Xk_X c_L = X \cdot 3,45 \cdot 10^{-5} c_L \tag{3}$$

czyli jest ściśle zależna od aktualnego stężenia biomasy i laktozy.

Wnioski

Serwatka przemysłowa jest roztworem zawierającym znaczące ilości białek, wśród których są te (np. immunoglobuliny, laktoferyna) o właściwościach leczniczych. Jednak zawsze po odzysku cennych białek czy bezpośrednio po produkcji serów w serwatce pozostaje część białek i duża ilość laktozy.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że szczep bakteryjny *B.licheniformis* może zostać wykorzystany w procesie biodegradacji zarówno laktozy, jak i białek.

Szczep ten do skompikowanych przemian metabolicznych i wzrostu wykorzystuje obecną w serwatce laktozę i w mniejszym stopniu białko (ale należy zaznaczyć, że rzadko biodegradacji poddaje się serwatkę bez uprzedniej próby wykorzystania i odzysku białek serwatkowych i z reguły wyjściowe stężenie białka będzie niższe aniżeli poddawane badaniu). Odnotowywany spadek stężenia białka po wejściu hodowli w fazę zamierania (Rys. 2) wynika ze zdolności stosowanego szczepu do oddychania azotanowego (denitryfikacji) [*Singleton, 1999*].

Określenie kinetyki wzrostu *B.licheniformis* zostało ograniczone do stężeń laktozy poniżej 5 [kg·m^{-3}], co nie oznacza, że dla stężeń wyższych nie odnotowano spadku zawartości laktozy czy wzrostu mętności. Problem przedwczesnego wchodzenia w fazę zastoju może zostać rozwiązany w klasycznym reaktorze ciągłym lub w reaktorze membranowym.

Oznaczenia

c – stężenie, [kg m^{-3}]
k – stała szybkości reakcji, [s^{-1},·m^3·kg^{-1}·s^{-1}]
r – szybkość reakcji, [kg·m^{-3}·s^{-1}]
t – czas, [s]
X – stężenie biomasy, [kg·m^{-3}]
$Y_{x/s}$ – współczynnik wydajności biomasy
μ – właściwa szybkość wzrostu, [s^1]
λ – długość fali świetlnej, [nm]

LITERATURA:

Almecija M.C., Ibanez R., Guadix A., Guadix E.M., 2007. Effect of pH on the fractionation of whey proteins with a ceramic ultrafiltration membrane. *J. Mem. Sci.* 288, 28-35. DOI: 10.1016/j.memsci.2006.10.021

Siso M.I.G., 1996. The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Biores. Tech.,* **57,** 1-11. DOI: 10.1016/0960-8524(96)00036-3

Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*., 193, 265-270

Libudzisz Z. (red.), Kowal K., (red.), Żakowska Z. (red.), 2008. *Mikrobiologia techniczna.* PWN, Warszawa

Mafarlane G.T., Cummings J.H., Allison C., 1986. Protein degradation by human intestinal bacteria. *J. General Microbiology*, **132**, 1647-1656. DOI: 10.1099/00221287-132-6-1647

Miller C.N., 1959. Use of dinitrosalicyle acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 81, 426-428. DOI: 10.1021/ac60147a030

Singleton P., 1999. *Bacteria in biology, biotechnology and medicine*. John Wiley &Sons Ltd, England

Milk Facts – *Milk Enzymes* (02.2013): http://www.milkfacts.info/Milk%20Composition/Enzymes.htm

Publikacja była współfinansowana ze środków Uni Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego