

PROIZVODNJA JEDNOSTANIČNIH PROTEINA S POMOĆU KVASCA *KLUYVEROMYCES FRAGILIS* NA SIRUTCI

Dr Slobodan GRBA, mr Vesna STEHLIK-TOMAS,
Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb

Sažetak

Studirana je mogućnost kultivacije kvasca *Kluyveromyces fragilis* za proizvodnju mikrobnih proteina na sirutci u šaržnom i kontinuiranom postupku pri pH 5,0 — 5,5 i temperaturi od 40 °C.

Ustanovljeno je eksperimentima na tresilici i laboratorijskom fermentoru da se kvasac dobro razmnožava pri odabranim uvjetima okoline, na 2%-tnoj deproteiniziranoj sirutci s dodatkom diamonijevog sulfata i kalijevog hidrogen fosfata. Pri optimalnim uvjetima okoline postiže se stupanj konverzije laktoze u kvašćevu biomasu od 0,45—0,55 g s. tv. kvasca/g laktoze, specifična brzina rasta do 0,25 sat⁻¹ i produktivnost procesa do 1,3 g/L/sat.

Kada se osnovnom supstratu doda 0,1% kvašćevog ekstrakta kvasac se razmnožava brže, specifična brzina rasta poraste na 0,35 — 0,38 sat⁻¹, a produktivnost procesa dostiže 1,8 g/L/sat.

Ukoliko se voda, potrebna za razrjeđenje sirutke, zamijeni melasnom džibrom, postiže se također povećanje brzine rasta kvasca *K. fragilis*. Specifična brzina rasta bila je do 0,40 sat⁻¹, a produktivnost procesa od 2,0 — 2,4 g/L/sat.

Uvod

Sirutka u mljekarama predstavlja otpadni ostatak koji se kod nas još često ispušta u sistem gradske kanalizacije ili prirodne vodotoke. Zbog toga se smatra teško opterećenom otpadnom vodom s oko 50.000 mg O₂/L BPK₅. S obzirom na vrijedne organske supstance koje sirutka sadrži, kao što su laktoza i proteini, može se koristiti kao sekundarna sirovina za proizvodnju mnogih vrijednih produkata. Porastom količine sirutke u proizvodnim pogonima sirana, razvijali su se i tehnološki postupci za preradu sirutke. Najčešće se sirutka sušila, a osušeni prah koristio kao krmivo ili kao dodatak nekim prehrambenim proizvodima. Kako osušena sirutka zbog velike količine laktoze ima ograničenu primjenu u ishrani stoke, istraživači su nastojali konvertirati laktozu pomoću mikrobnih procesa u visokovrijedne proteine (Vanauvat i Kinsella, 1975.; Bechtle i Claydon, 1971.).

Dominantan mikroorganizam u većini radova bio je *Kluyveromyces fragilis* (Castillo, 1978.; Moresi, 1980.; Sandku, 1983.; Maiorella, 1984.). Osušena biomasa toga kvasca može se koristiti kao krmivo, ali i u ljudskoj ishrani. Isti mikroorganizam može se koristiti i za proizvodnju etilnog alkohola (Maiorella i Castillo, 1984.). Uzgojem kvasca na sirutci eliminira se većina organskih tvari koje opterećuju otpadne vode, pa je to zasigurno interesantan postupak za obradu otpadne sirutke, jer se proizvodi visokovrijedan produkt.

Međutim, sirutka sadrži do 1% visokokvalitetnih proteina, pa je u novije vrijeme prvi stupanj obrade deproteinizacija sirutke ultrafiltracijom ili termičkom obradom. Zato smo u ovom radu istražili uzgoj kvasca *K. fragilis* na deproteiniziranoj sirutci sa različitim dodacima, da bi se pronašao postupak koji omogućuje jeftinu proizvodnju vrijednih mikrobnih proteina.

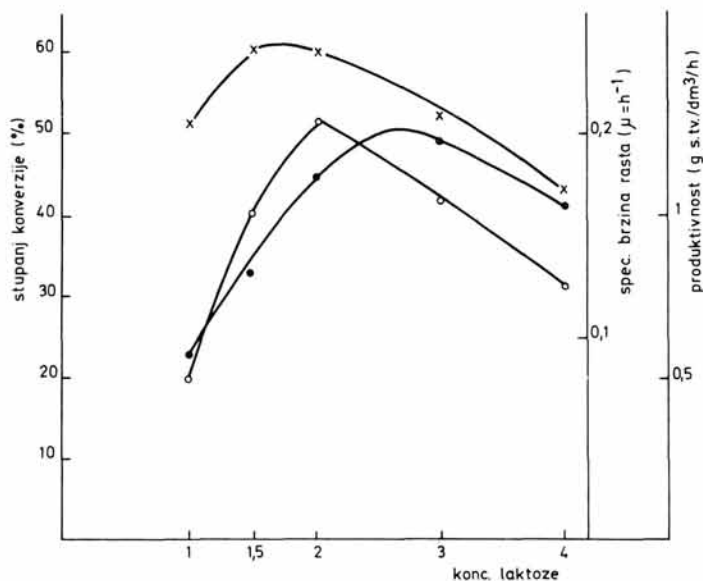
Materijal i metode

Mikroorganizam

Za pokuse je odabran soj kvasca *Kluyveromyces fragilis* 89 dobiven iz Zbirke mikroorganizama tvrtke Vogelbusch (Austrija). Kultura kvasca održavana je na kosom sladnom agaru u hladnjaku pri 2–4 °C.

Priprema inokuluma

S kosog agara kvasac je precijepljen u epruvete koje su sadržavale po 10 ml tekuće sterilne podloge ovog sastava (u g/L): glukoza — 20, Bacto pepton —

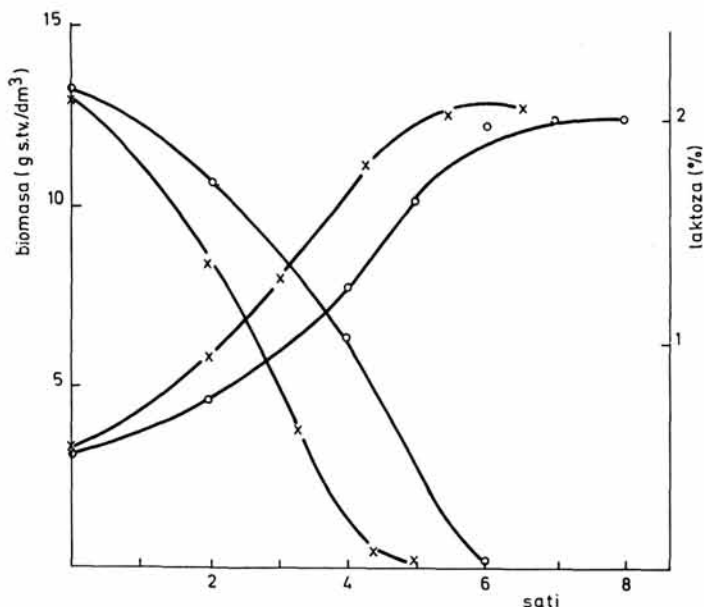


Slika 1. Ovisnost stupnja konverzije laktoze u biomasu, specifične brzine rasta kvasca *K. fragilis* 89 i produktivnost procesa o koncentraciji laktoze u podlozi

- ○ — ○ — stupanj konverzije
- × — × — specifična brzina rasta
- ○ — ○ — produktivnost procesa

Fig. 1. Effect of lactose concentration on biomass yield, specific growth rate of *K. fragilis* 89 and the productivity of the process

- ○ — ○ — yield
- × — × — specific growth rate
- ○ — ○ — productivity



Slika 2. Promjene koncentracije biomase i laktoze u toku kultivacije kvasca *K. fragilis* 89 u podlozi br. 1 i podlozi br. 2

— × — × — koncentracija biomase i laktoze u podlozi br. 1
 — ○ — ○ — koncentracija biomase i laktoze u podlozi br. 2

Fig. 2. Changes of biomass and lactose concentrations during the cultivation of *K. fragilis* 89 in medium 1 and 2

— × — × — biomass and lactose concentration in medium 1
 — ○ — ○ — biomass and lactose concentration in medium 2

10, kvašćev ekstrakt — 5. Nakon inkubacije u termostatu pri 28 °C tokom 48 sati, cjepivo je prebačeno u tikvice od 500 ml koje su sadržavale po 100 ml sterilne razrijeđene sirutke slijedećeg sastava (u g/L): laktoza — 20, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 2, kvašćev ekstrakt — 1, mlječna kiselina — 5. Tikvice su trešene na rotacionoj tresilici 24 sata pri 30 °C i 150 o/min. Tako pripremljena kultura kvasca poslužila je kao inokulum za pokuse uzgoja kvasca u fermentoru.

Uzgoj u fermentoru

Šaržni i kontinuirani uzgoj biomase kvasca obavljen je u laboratorijskom fermentoru Vogelbusch (Austrija) od 5 litara (3 litre korisnog volumena). Temperatura je regulirana pomoću ultra termostata, a pH i pjena su korigirani ručno. Za mjerenje otopljenog kisika u komini korištena je kisikova elektroda priključena na instrument OXI 39 WTW (Zapadna Njemačka).

Osnovni supstrat bila je deproteinizirana razrijeđena sirutka, a kao dodatni izvor dušika i fosfora korištene su soli diamonsulfat i kalijev dihidrogenfosfat.

Uzgoj je obavljen na slijedećim podlogama ovog sastava:

1. Osnovna: Sirutka razrijeđena vodom u omjeru 1:1, diamonijev sulfat 2 g/L, kalijev hidrogen fosfat 1 g/L

2. Sirutka istog razrjeđenja, 2 g/L diamonijev sulfat, 1 g/L kalijev hidrogenfosfat i 0,1% kvašćev ekstrakt
3. Sirutka razrijeđena melasnom džibrom u omjeru 1:1, amonijev sulfat 2 g/L i kalijev hidrogenfosfat 1 g/L.

Podloga je sterilizirana direktno u fermentoru ili u staklenim posudama od 5 litara u autoklavu 20 minuta pri 120 °C. Podloga za prtok crpljena je peristaltičkim crpkama u fermentor. Sterilnost je kontrolirana mikroskopski.

Analitičke metode

Sastav native sirutke (Zagrebačke mljekare) i deproteinizirane sirutke određen je analitičkim metodama prilagođenim za sirutku (Vajić, 1960.).

Laktoza je određivana i antron reagensom.

Čisti proteini određivani su BIORAD metodom.

KPK je analiziran metodom oksidacije s $K_2Cr_2O_7$ (APHA STANDARD, 1971).

Za praćenje prirasta biomase kvasca uzimani su dvostruki uzorci od 5 ml komine u određenim vremenskim razmacima i centrifugirani 5 minuta pri 4000 o/min, jedamput oprani vodom i sušeni pri 105 °C do konstantne težine.

Rezultati i diskusija

Sastav deproteinizirane sirutke

Za sve pokuse korištena je deproteinizirana kisela sirutka iz Zagrebačke mljekare. Sirutka je deproteinizirana termički pri 100 °C u toku 30 minuta. Nakon mladenja ofiltrirani su koagulirani proteini na filter papiru Whatman No 1, a tekući dio je korišten za daljnje pokuse. Prosječan kemijski sastav tako deproteinizirane sirutke prikazan je u tablici 1.

Tablica 1. Sastav deproteinizirane sirutke
Table 1. Composition of deproteinized whey

Komponenta Component	g/L
Suha tvar Dry matter	50,7 — 52,8
Organska tvar Organic matter	45,5 — 46,5
Anorganska tvar Anorganic matter	5,2 — 6,3
Laktoza Lactose	38,2 — 44,0
Čisti proteini Pure proteins	0,3 — 0,50
Ukupni fosfati (P_2O_5) Total phosphate	0,11 — 0,17
KPK COD	50,8 — 55,2
pH	4,3 — 4,8

Utjecaj koncentracije laktoze na kinetiku procesa

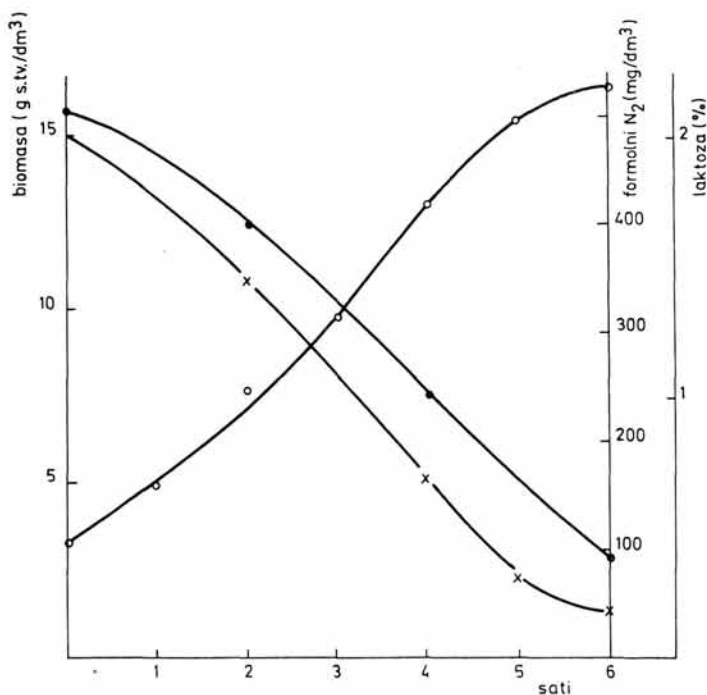
Utjecaj količine laktoze u podlozi na kinetiku procesa prikazan je na slici 1. Sirutci su dodane samo soli: diamonijev sulfat 2 g/L i kalijev hidrogenfosfat 1 g/L.

Iz slike se vidi da su najveće brzine rasta od $0,22 \text{ sat}^{-1}$ i stupanj konverzije laktoze u biomasu kvasca od 0,50 g s.tv. kvasca/g laktoze postignuti u podlozi s 1,5—2,0% laktoze, dok je najveća produktivnost procesa od 1,2 g/L/sat postignuta u podlozi s 2,5—3,0% laktoze u podlozi.

Ovi rezultati su u suglasnosti s nalazima Morresi-a i sur. (1980.) i Blackbrough-a i sur. (1981.) koji su utvrdili da je za uzgoj kvasca *K. fragilis* optimalna koncentracija laktoze u komini cko 2%.

Ako se osnovnoj podlozi doda 0,1% kvašćevog ekstrakta povećava se brzina umnažanja kvašćevih stanica, što je prikazano na slici 2.

Iz slike proizlazi da se dodatkom kvašćevog ekstrakta povećava specifična brzina rasta za 35%, produktivnost procesa za 23% i prinos kvašćeve biomase za 5%. Ovi nalazi su u skladu s rezultatima Wasserman-a i sur. (1961.)



Slika 3. Promjene koncentracije biomase, laktoze, formolnog dušika i ukupne organske tvari tokom kultivacije kvasca *K. fragilis* 89 u podlozi br. 3

— ○ — ○ — koncentracija biomase
 — × — × — koncentracija laktoze
 — □ — □ — koncentracija formolnog dušika

Fig. 3. Changes of biomass, lactose and formol-N₂ concentrations during the cultivation of *K. fragilis* 89 in medium 3

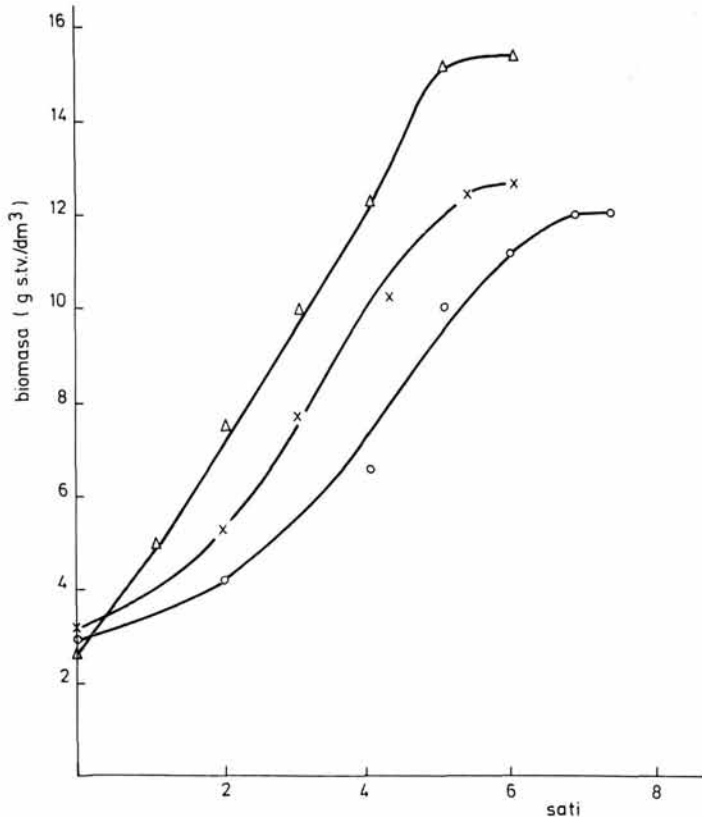
— ○ — ○ — biomass
 — × — × — lactose
 — □ — □ — formol-N₂

i Castillo i sur. (1978.), koji su ustanovili da se dodatkom kvašćevog ekstrakta u podlogu, koja sadrži samo amonijev sulfat i amonijev fosfat, povećea brzina potrošnje laktoze i brzina umnožavanja kvašćevih stanica.

Utjecaj melasne džibre na kinetiku rasta kvasca *K. fragilis* prikazan je na slici 3. Umjesto vodom, sirutka je razrijeđena melasnom džibrom. Takvoj podlozi dodane su samo amonijeve soli.

Iz slike je vidljivo da se prinos biomase povećao za 3 do 3,5 g s.tv. kvasca (33—38%) u odnosu na prethodna dva uzgoja, te da se kvašćeve stanice razmnožavaju brzo ($\mu = 0,4 \text{ sat}^{-1}$). To se može objasniti pozitivnim utjecajem mineralnih tvari i biosa (koje melasna džibra iz proizvodnje etanola sadrži u svom sastavu) na rast kvašćevih stanica te količinom organske tvari koja se potroši iz džibre za prirast kvasca.

Usporedni prikaz prirasta kvasca *K. fragilis* na sve tri korištene podloge dat je na slici 4.



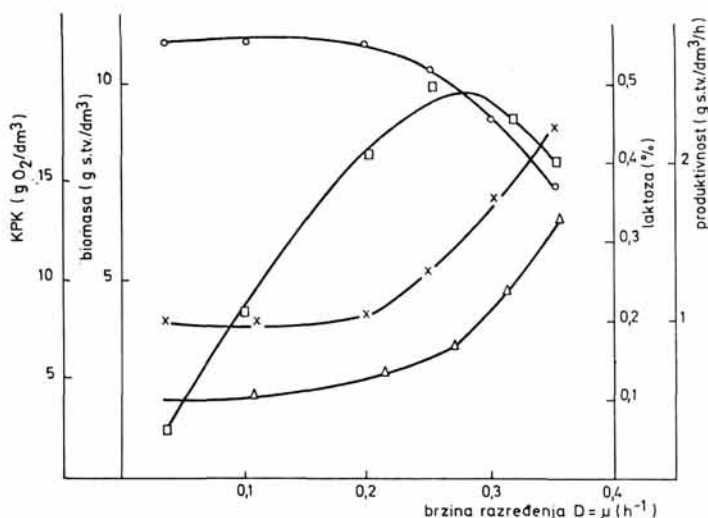
Slika 4. Kultivacija kvasca *K. fragilis* u različitim podlogama

- ○ — ○ — kultivacija u podlozi br. 1
- × — × — kultivacija u podlozi br. 2
- △ — △ — kultivacija u podlozi br. 3

Fig. 4. Cultivation of *K. fragilis* 89 in different substrates

- ○ — ○ — substrate 1
- × — × — substrate 2
- △ — △ — substrate 3

Za kontinuirani uzgoj kvasca *K. fragilis* u osnovnoj podlozi istražen je utjecaj brzine razrjeđenja na količine laktoze i biomase kvasca u komini te na produktivnost procesa i KPK vrijednost (slika 5). Povećanjem brzine razrjeđenja do $0,2 \text{ sat}^{-1}$ održavale su se konstantne vrijednosti i to: količina kvasca 11 g s.tv./L , koncentracija laktoze do $0,3\%$, KPK do $3 \text{ g O}_2/\text{L}$. Daljnjim povećanjem brzine razrjeđenja dolazi do smanjenja prinosa biomase te povećanja koncentracije laktoze i KPK vrijednosti. Međutim, povećanjem brzine razrjeđenja raste i produktivnost procesa sve do $0,25 \text{ sat}^{-1}$, kada postiže vrijednost od $2,3 \text{ g s.tv./L/sat}$.



Slika 5. Utjecaj brzine razrjeđenja (D) na promjenu koncentracije biomase, laktoze i produktivnosti procesa tokom kontinuiranog uzgoja kvasca *K. fragilis* 89, u podlozi br. 1

- ○ — ○ — koncentracija biomase
- × — × — koncentracija laktoze
- □ — □ — produktivnost procesa
- △ — △ — KPK vrijednost

Fig. 5. The influence of dilution rate (D) on the biomass and lactose concentration and the productivity of the continuous cultivation of *K. fragilis* 89 in medium 1

- ○ — ○ — biomass
- × — × — lactose
- □ — □ — productivity
- △ — △ — COD

Zaključak

Na bazi prikazanih rezultata može se zaključiti da se kvasac *K. fragilis* može uspješno uzgajati u kiseloj deproteiniziranoj sirutci koja se razrijedi vodom na $2\text{--}2,5\%$ laktoze. Najpovoljnija koncentracija laktoze u podlozi bila je $2\text{--}2,5\%$, a sirutci je neophodno dodati izvore dušika, kalija i fosfora za rast kvašćevih stanica. U takvoj podlozi kvasci se mogu uzgajati čaržno i kontinuirano. Međutim, ako se osnovnoj podlozi doda $0,1\%$ kvašćevog ekstrakta

ili ako se sirutka razrijedi melasnom džibrom umjesto vodom, znatno se poboljša kinetika rasta kvašćevih stanica te prinos biomase i produktivnost procesa.

Summary

The possibility of cultivation of the yeast Kluyveromyces fragilis for the production of single-cell protein on deproteinated whey was studied. The batch and the continuous cultivations were performed at pH 5.0—5.5 and the temperature of 40 °C.

By experiments on the shaker and in laboratory fermenter it was established that the yeast cells grow well on 2% deproteinated whey with the addition of ammonium sulphate and potassium hydrogen phosphate. At optimal conditions the biomass yield was 0.45—0.55 g DM/g lactose with the specific growth rate up to 0.25 h⁻¹ and productivity of 1.3 g/L/h.

When 0.1% of the yeast extract was added to the basic medium the yeast cells were multiplying faster ($\mu = 0.35 - 0.38 \text{ h}^{-1}$) and productivity was up to 1.8 g/L/h. If the water necessary for the dilution of whey was exchanged with molasses slop a very good effect attained in the cultivation of yeast cells. The specific growth rate was 0.4 h⁻¹ and productivity up to 2.4 g/L/h.

Literatura

1. American Public Health Association, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 13th ed., Amer. Public Health Assoc., New York, 1971.
2. BECHTLE, R. M. and CLAYDON, T. J. (1971.); **J. Dairy Sci.** **54**, 1595.
3. BLAKEBROUGH, N. and MORESI, M. (1981.); Second European Congress of Biotechnology, (5—10), Abstracts of Communications.
4. MAIORELLA, E. L. and CASTILLO, F. J. (1984.); **Proc. Biochem.** **8**, 157.
5. MORESI, M., COLICCHIO, A. and SALISOUINI, F. (1980.); **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, **9**, 173.
6. SANDHU, D. K. and WARAICH, M. K. (1983.); **Biotechnology and Bioengineering**, (797—808), 25.
7. VANANUVAT, P. and KINSELLA, J. E. (1975.); **J. Food Sci.** **40**, 336.
8. VAJIĆ, B. (1960); Živežne namirnice — Određivanje osnovnih sastojaka (skripta), Zagreb.
9. WASSERMAN, A. E. (1961.); **J. Dairy Sci.** **44**, 379.