

Sirutka -alternativna sirovina za proizvodnju prehrambenog kvasca

Damir Stanzer, Vesna Stehlik-Tomas, Vlatka Gulan Zetić, Jelena Manenica

Izvorni znanstveni rad - Original scientific paper

UDK: 637.344.8

Sažetak

*U ovom radu ispitivani su utjecaji koncentracije laktoze u podlozi i aerobnosti procesa na prirast biomase kvasca **Kluyveromyces marxianus** na sirutki. U tu svrhu provedeni su šaržni procesi uzgoja u laboratorijskom bioreaktoru od 2L kvascem **Kluyveromyces marxianus** ZIM75 s različitim koncentracijama laktoze u podlozi i s različitim protocima zraka. Najbolji prirast biomase ostvaren je u procesu s najvećim protokom zraka od 1,5 L/L min i u podlozi s 10% laktoze, a iznosio je 5,90 g s.tv./L. S povećanjem protoka zraka rasla je i specifična brzina rasta, te je najveća vrijednost od 0,1060 h⁻¹ postignuta pri najvećem protoku zraka i u podlozi s 5% laktoze. Iskorištenje supstrata ipak je bilo bolje u podlozi s 5% laktoze (0,104 g/g).*

*Ključne riječi: **Kluyveromyces marxianus**, sirutka, laktoza, prehrambeni kvasac*

Uvod

Prehrambeni kvasac se tradicionalno proizvodi iz ugljikohidratnih sirovina kao što su melasa, sirutka, sulfitna lužina i hidrolizati škroba (Halasz i Lasztity, 1991). Zbog smanjenja ponude i znatnog povećanja cijene melase - osnovne sirovine u proizvodnji prehrambenog kvasca i alkohola - u posljednje je vrijeme aktualizirana potreba korištenja sirutke kao primarne sirovine. Sirutka je glavni nusprodukt industrije mlijeka a dobiva se u tehnološkom procesu proizvodnje sira ili kazeina, pri čemu se samo 10-20% mlijeka iskoristi za proizvod, a 80-90% odlazi u sirutku (Popović-Vranješ i Vujičić, 1997.). Velika količina industrijski proizvedene sirutke je primarni razlog za utvrđivanje načina iskorištenja sirutke. Najjednostavniji i najlošiji način rješavanja sirutke je ispuštanje u vodotokove. Još i danas se od 115 milijuna tona sirutke, koliko se svake godine proizvede u svijetu, 47% ispušta

izravno u vodotokove, postrojenja za obradu otpadnih voda ili se prospe po zemlji (Cristiani-Urbina i sur., 2000.). Zbog ekoloških posljedica (biološko zagađenje uzrokovano BPK vrijednošću od 40000 – 60000 ppm) već se duže vrijeme istražuju i razvijaju tehnološki i biotehnološki procesi iskorištavanja sirutke. Sirutka se danas uglavnom prerađuje za domaći sirutkin sir, sirutkine proteine, sirutku u prahu, stočnu hranu, laktozu i dječju hranu. Osnovni razlozi nedovoljne uporabe sirutke u prehrambene svrhe su velika količina vode, te velik udio mineralnih tvari u suhoj tvari što uzrokuje tehnološke probleme u preradi (Tratnik, 1998.). S druge strane, sirutka je upravo zbog svoga kemijskog sastava (70% laktoze u suhoj tvari, mineralne tvari i vitamini) vrlo dobar supstrat za uzgoj mikroorganizama, pa se velika pažnja posvećuje mogućnosti biotehnološkog iskorištenja sirutke u proizvodnji raznih vrijednih produkata: proteinske biomase, alkohola, mliječne kiseline, β -D-galaktozidaze, vitamina. Od puštanja u pogon prvog postrojenja za proizvodnju kvasčeve biomase na sirutki kao sirovini (u Njemačkoj 1937. godine), pa sve do ranih šezdesetih godina prošloga stoljeća, prirast biomase nije bio zadovoljavajući. Više saznanja o respiratornom i fermentativnom metabolizmu kvasaca koji koriste laktozu, selekcija sojeva i razvoj bioreaktora s boljom aeracijom rezultirali su u međuvremenu efikasnijim tehnologijama uzgoja kvasca na sirutki (Halasz i Lasztity, 1991.). Najčešće korišteni mikroorganizam u fermentaciji sirutke je kvasac *Kluyveromyces marxianus*. Više autora istraživalo je uvjete kultivacije toga kvasca koji posjeduje enzim β -D-galaktozidazu te zbog toga može koristiti laktozu iz sirutke bez prethodne hidrolize enzimskim preparatima (Stehlik-Tomas, 1983., Maiorella i Castillo, 1984., Parrondo i sur., 2000.). Istraživanje uzgoja kvasca *Saccharomyces cerevisiae* na sirutki obuhvatilo je nekoliko pristupa: uzgoj na sirutki u kojoj je prethodno izvršena enzimska hidroliza laktoze (Spencer & Spencer, 1997., Santos i sur., 1998.), korištenje genetički izmijenjenih sojeva kvasca *S.cerevisiae* koji su transformirani tako da posjeduju gen za proizvodnju β -D-galaktozidaze (Compagno i sur., 1993., Ramakrishnan i Hartley, 1993.) te koimobilizacija β -D-galaktozidaze s kvascem *S.cerevisiae* (Axelsson i sur., 1991.). Osim toga, istraživanja proizvodnje mikrobne biomase i etanola provedena su i u smjeru mješovitih kultura mikroorganizama *Torulopsis cremoris* i *Candida utilis*, odnosno *Saccharomyces cerevisiae* i *Kluyveromyces fragilis* (Cristiani-Urbina i sur. 2000., Kallel-Mhiri i sur., 1994.).

Za razliku od "standardnog" kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, kvasac *Kluyveromyces marxianus* pripada skupini tzv. Crabtree-negativnih kvasaca (Von Stockar i Auberson, 1992.) koji ne pokazuju svojstvo represije respiracije glukozom i kod kojih, u aerobnim uvjetima, respiracija prevladava nad fermentacijom. Proizvodnja etanola se u tom slučaju odvija u ovisnosti o aerobnosti procesa (u uvjetima limitacije kisikom).

Svrha ovoga rada bila je utvrditi optimalne uvjete uzgoja (protoka zraka i koncentracije supstrata) kvasca *Kluyveromyces marxianus* na deproteiniziranoj sirutki u kojima se postižu najbolji prirasti biomase i najbolje iskorištenje supstrata.

Materijali i metode

Za provođenje šaržnog procesa proizvodnje biomase na sirutki korišten je soj kvasca *Kluyveromyces marxianus* ZIM75 dobiven od Biotehniške fakultete, odjel Prehrambena tehnologija i biotehnologija, Ljubljana. Radni mikroorganizam je čuvan na kosom agaru u hladnjaku na +4°C. Podloga za uzgoj kvasca (YM) sadržavala je (u g/L): laktozu - 20; bakto pepton - 10; kvašćev ekstrakt - 5; agar - 20. Radi umnažanja inokuluma kultura je s kosog agara (YM) precijepljena u epruvete s 10 mL tekuće podloge (YS) i inkubirana u termostatu na 30°C tijekom 24 sata.

Za pripremu podloga u svim procesima korištena je suha deproteinizirana sirutka koja je sadržavala 84% (w/w) laktoze, dobivena iz mljekare "Lura" d.d. iz Bjelovara. Masa sirutke proračunata je tako da odgovara potrebnoj koncentraciji laktoze u podlozi (50, odnosno 100 g/L). Podloge, u kojima su provedeni šaržni procesi proizvodnje biomase, imale su sastav prikazan u tablici 1.

Šaržni procesi su provedeni u laboratorijskom bioreктору Multigen New Brunswick volumena 2 L (korisni volumen 1,5 L) sa sustavom za kontrolu temperature i protoka zraka. Procesu su vođeni 10 sati na 34°C i pH=5, s protocima zraka 0,5 L/L min, 1 L/L min i 1,5 L/L min uz miješanje 400°/min, te bez protoka zraka uz miješanje 200°/min.

Biomasa kvasca određivana je centrifugiranjem alikvota od 10 mL (10 min, 4000°/min) i vaganjem nakon sušenja do konstantne mase. Količina alkohola i količina laktoze određivana je enzimskim metodama (Boehringer Mannheim).

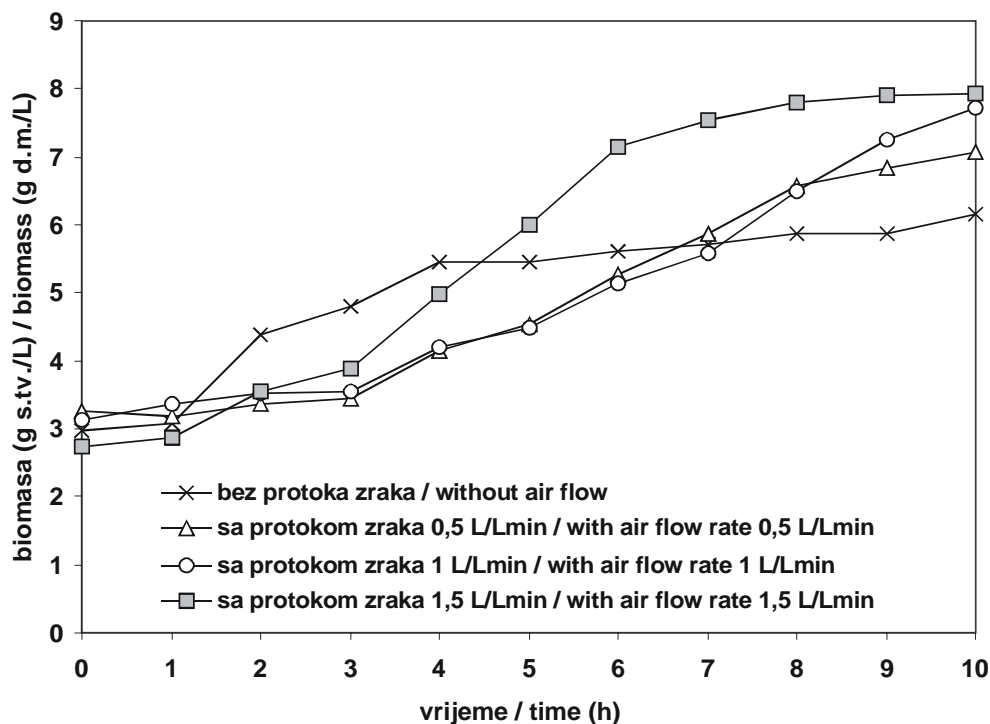
Tablica 1: Podloge za šaržni proces proizvodnje biomase s kvascem *Kluyveromyces marxianus* ZIM75

Table 1: Media for batch process of yeast biomass production with yeast *Kluyveromyces marxianus* ZIM75

Podloga Medium	Sastojci Composition	Masena koncentracija Mass concentration (g/L)
Podloga 1 Medium 1	Laktoza/Lactose	50
	(NH ₄) ₂ SO ₄	2
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	1
	MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,5
Podloga 2 Medium 2	Laktoza/Lactose	100
	(NH ₄) ₂ SO ₄	2
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	1
	MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,5

Rezultati i rasprava

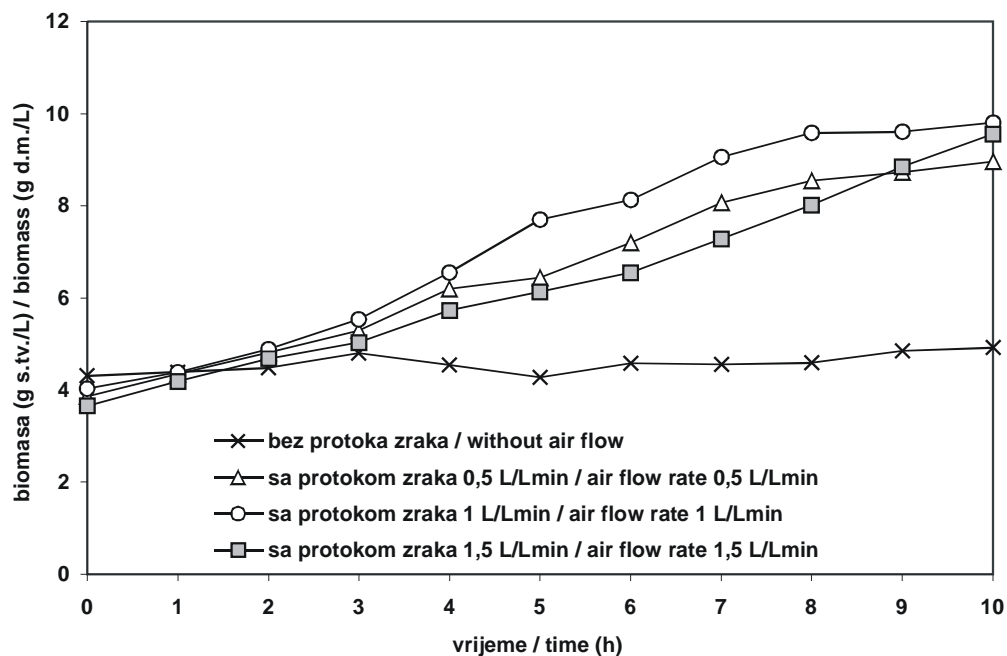
Šaržni uzgoj biomase kvasca *Kluyveromyces marxianus* proveden je uz različite protoke zraka na podlogama koje su sadržavale 5 i 10% laktoze. Kinetike proizvodnje kvašćeve biomase na sirutki s 5% laktoze uz različite protoke zraka prikazuje Slika 1. Protok zraka u bioreaktoru uvelike utječe na rast biomase. Inicijalna koncentracija biomase bila je oko 3 g s.tv./L. U procesu bez protoka zraka ostvaren je najmanji prinos biomase (3,19 g s.tv./L). U procesima s većim protocima zraka veće su i krajnje koncentracije biomase, pa je najveći prinos (5,19 g s.tv./L) postignut u procesu s najvećim protokom zraka (1,5 L/L min). Na slici je vidljiva relativno duga lag faza i manja brzina rasta u slučaju protoka zraka 0,5 i 1 L/L min ($\mu_{\max} = 0,18 \text{ h}^{-1}$ odnosno $\mu_{\max} = 0,16 \text{ h}^{-1}$), dok je u slučaju najvećeg protoka zraka (1,5 L/L min) u exp. fazi rasta postignuta znatno veća - specifična brzina rasta ($\mu_{\max} = 0,25 \text{ h}^{-1}$), što zadovoljava tehnološke karakteristike proizvodnih sojeva.



Slika 1: Kinetika proizvodnje kvašćeve biomase šaržnim procesom na sirutki (5% laktoze) s različitim protocima zraka

Figure 1: Kinetics of yeast biomass production on whey (5% of lactose) at different air flow rates in batch process

Na Slici 2. prikazane su kinetike procesa proizvodnje kvašćeve biomase na sirutki koja je sadržavala 10% laktoze. Istraživanja su provedena u svrhu ispitivanja mogućnosti dobivanja većih prinosa biomase. Iz slike je vidljivo da kvasac uspješno konvertira laktozu iz podloge. U procesu bez protoka zraka, samo s miješanjem komine, postignut je tek neznatan prinos biomase, dok su u procesima s većim protocima zraka postignuti i veći prinosi biomase. Slika 2. pokazuje nešto ujednačenije kinetike rasta kvašćeve biomase uz sva tri protoka zraka u usporedbi s podlogom koja je sadržavala 5% laktoze, pri čemu je brži rast ostvaren uz pritok zraka od 1 L/L min.

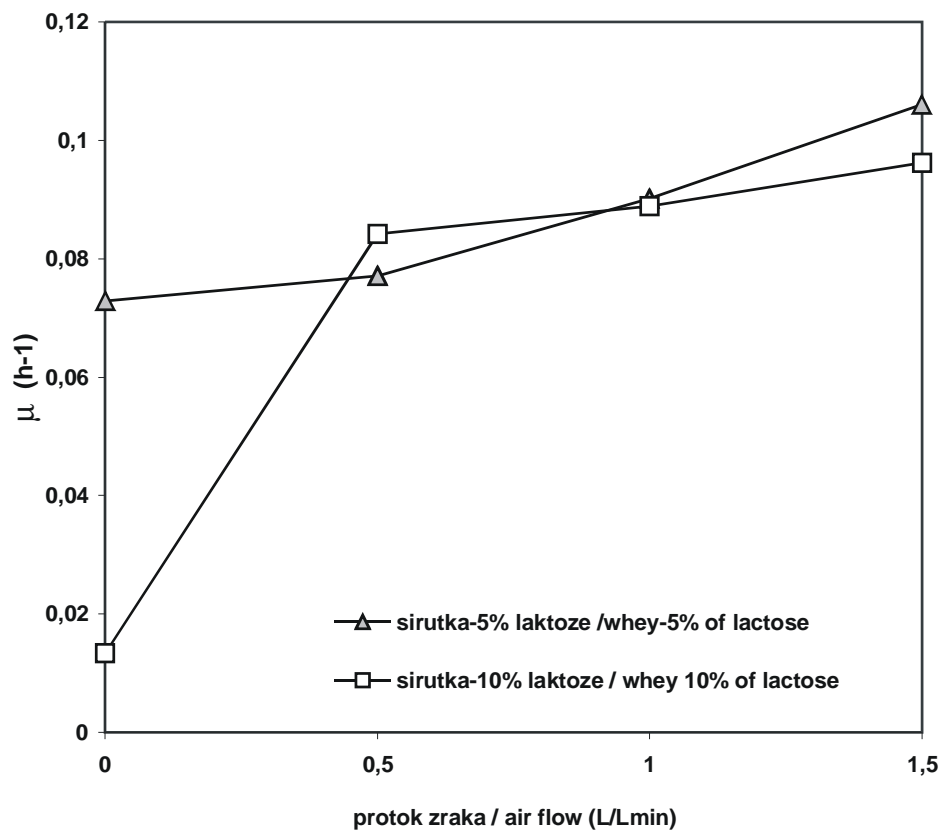


Slika 2: Kinetika proizvodnje kvašćeve biomase šaržnim procesom na sirutki (10% laktoze) s različitim protocima zraka

Figure 2: Kinetics of yeast biomass production on whey (10% of lactose) at different air flow rates in batch process

Iz dijagrama rasta kvašćeve biomase izračunate su specifične brzine rasta, a dobivene vrijednosti prikazane su na Slici 3.

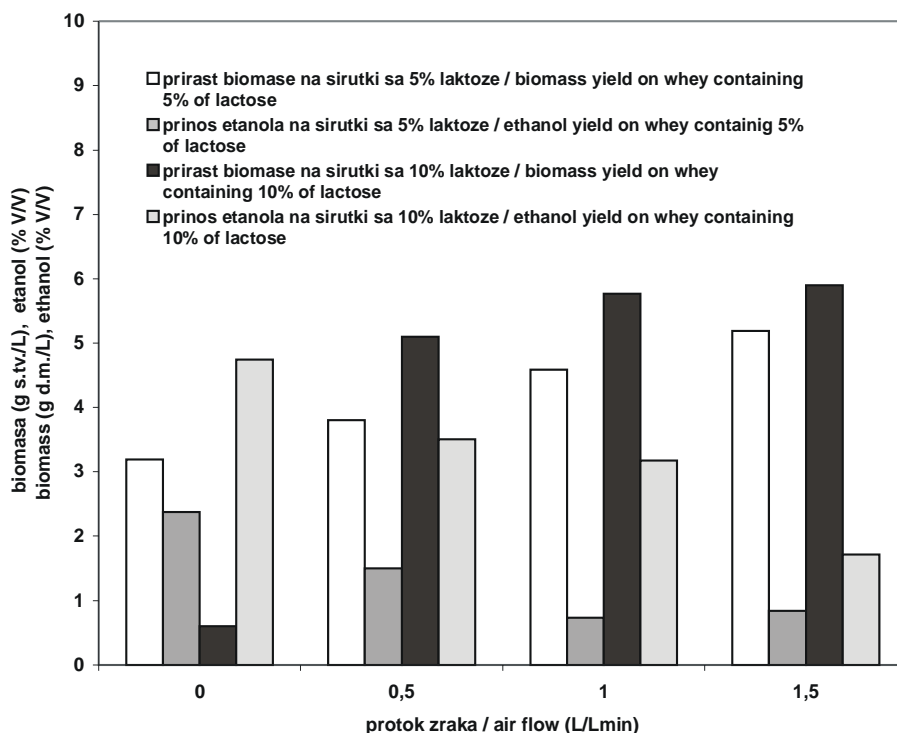
Specifična brzina rasta povećavala se s protokom zraka pri uzgoju na obje podloge. Najmanja je u procesu bez protoka zraka i u podlozi sa 5% laktoze ($0,0730 \text{ h}^{-1}$), dok je u podlozi s 10% laktoze iznosila $0,0134 \text{ h}^{-1}$. Najveća specifična brzina rasta ostvarena je u procesu s protokom zraka od 1,5 L/L min i u podlozi s 5% laktoze ($0,1060 \text{ h}^{-1}$), dok je u podlozi s 10% laktoze bila nešto manja ($0,0960 \text{ h}^{-1}$). Iz rezultata proizlazi da kvasac brže raste u sirutki s 5% laktoze. Belem i Lee (1999.) su proveli proces s pritokom supstrata, a cilj je ekstrakcija oligonukleotida kvasca. Ostvarili su maksimalni prinos biomase od 28,13 g/L, prinos od 0,58 g/g uz produktivnost 2,42 g/L h, pri čemu je početna koncentracija laktoze u podlozi iznosila 5%, a pritok (180 mL/h) podloge koja je sadržavala 15% laktoze vršen je uz pritok zraka od 2 L/L min.



Slika 3: *Specifične brzine rasta kvasca **Kluyveromyces marxianus** ZIM75 na sirutki s 5% i s 10% laktoze pri različitim protocima zraka*

Figure 3: *Specific growth rates of yeast strain **Kluyveromyces marxianus** ZIM75 on whey containing 5 and 10 % of lactose at different air flow rates*

Na Slici 4. prikazani su prirasti kvaščeve biomase i prinosi etanola na podlogama s 5 i 10 % laktoze pri različitim protocima zraka.



Slika 4: Utjecaj uvjeta uzgoja kvasca *Kluyveromyces marxianus* (različiti protoci zraka i količine laktoze u podlozi) na prirast biomase i prinos etanola.

Figure 4: Influence of yeast *Kluyveromyces marxianus* production conditions (different air flow rates and lactose contents in medium) on biomass and ethanol yield

Slika 4. pokazuje da uvjeti uzgoja, kao što su različiti protoci zraka i koncentracija supstrata (laktoze) u podlozi, značajno utječu na prirast biomase i prinos etanola. Prirast biomase je u obje podloge rastao proporcionalno s protokom zraka. Najbolji su rezultati postignuti u procesu s protokom zraka od 1,5 L/Lmin, pa je tako u podlozi koja je sadržavala 5% laktoze ostvaren prirast od 5,10 g s.tv./L, a u podlozi koja je sadržavala 10% laktoze 5,90 g s.tv./L. To se objašnjava činjenicom da je s većom koncentracijom otopljenog kisika u podlozi veća aktivnost kvasca. Alkohol se sintetizirao u svim procesima, ali je

njegov prinos opadao s većim protokom zraka pa ga je najviše nastalo u procesu bez protoka zraka u obje podloge; u podlozi koja je sadržavala 5% laktoze sintetiziralo se 2,37%, a u podlozi koja je sadržavala 10% laktoze 4,74% alkohola. Uspoređujući rezultate na podlogama koje su sadržavale 5% i 10% laktoze, vidi se da su prirasti biomase i prinosi etanola nešto veći na podlozi koja je sadržavala 10% laktoze. Međutim, stupanj konverzije laktoze u kvašćevu biomasu bio je gotovo dvostruko veći na podlozi koja je sadržavala 5% laktoze i pri protoku zraka od 1,5 L/L min iznosio je 0,104 g/g, dok je na podlozi koja je sadržavala 10% laktoze ostvareno 0,059 g/g.

Usporedba prirasta biomase i prinosa etanola na podlozi koja je sadržavala 10% laktoze u anaerobnim uvjetima i u uvjetima protoka zraka od 0,5 L/L min pokazuje najjasnije da je limitacija kisikom osnovni razlog proizvodnje etanola. Naime, pri višoj koncentraciji šećera u podlozi i višim koncentracijama biomase, manja količina otopljenog kisika (Von Stockar i Auberson, 1992.) je ograničavajući faktor za rast biomase kvasca *Kluyveromyces marxianus* i uzrok proizvodnje znatnijih količina alkohola. Prinos biomase u anaerobnim uvjetima (3,19 g/L na podlozi koja je sadržavala 5% laktoze) pokazuje da kvasac *Kluyveromyces marxianus* može rasti i u odsustvu kisika, odnosno da ga karakterizira koegzistencija fermentacije i respiracije. Gonzales-Siso i sur. (1996.) došli su do analognih rezultata s kvascem *Kluyveromyces lactis*. Proizvodnja etanola je u svim pokusima bila znatna što upućuje na zaključak da primijenjeni uvjeti nisu osigurali rast biomase koji nije limitiran kisikom. U uvjetima najvećeg primijenjenog protoka zraka (1,5 L/L min) nije izbjegnuta znatnija konverzija laktoze u etanol ($Y_{P/S} = 0,12$ na 5%-tnoj podlozi, odnosno 0,14 na 10%-tnoj podlozi). Inchauro i sur. (1994.) izvještavaju da male količine etanola nastaju čak i u dobro aeriranim sistemima u slučaju nedostatka nekih elemenata u tragovima i vitamina u podlozi. Međutim, u ovom slučaju, velike koncentracije etanola upućuju na zaključak da je limitacija kisikom presudni faktor izraženog fermentativnog metabolizma. Belem i Lee (1999.) su utvrdili da na podlogama s većim koncentracijama laktoze (5, 10, 15%) protok zraka od 1 L/L min pri 350 °/min nije dovoljan i da tek protok od 2 L/L min na 5%-tnoj podlozi osigurava rast biomase kvasca *Kluyveromyces marxianus* nelimitiran kisikom.

Zaključci

Ostvareni rezultati pokazuju da je limitacija kisikom izazvana velikom koncentracijom laktoze u podlozi (5 odnosno 10%) ograničavajući faktor u proizvodnji biomase kvasca *Kluyveromyces marxianus* u šaržnom procesu na sirutki. Najveći primijenjeni protok zraka (1,5 L/L min) nije omogućio dovoljnu opskrbu stanica kvasca kisikom, zbog čega je vrlo niska konverzija laktoze u biomasi i, za aerobni proces, proizvodnju značajnih količina etanola. U cilju postizanja boljeg iskorištenja potrebno je povećati aerobnost procesa: a) većim protokom zraka; b) vođenjem procesa s protokom supstrata; c) izborom pogodnog soja *K.marxianus* koji sintetizira manje etanola.

WHEY – AN OPTIONAL RAW MATERIAL FOR FOOD YEAST PRODUCTION

Summary

*The influence of the lactose content in the medium and of the air flow rate on the biomass yield of the yeast **Kluyveromyces marxianus** on whey substrate was investigated. For this purpose, batch processes were conducted in a laboratory bioreactor (2L) with the yeast **Kluyveromyces marxianus** ZIM75 in media with different contents of lactose and at different air flow rates. The highest biomass yield (5,9 g d.m./L) was achieved at the highest air flow rate (1,5 L/L min) in the medium with 10% of lactose. The specific growth rate increased with increased air flow rate, and the highest specific growth rate of 0,1060 h⁻¹ was achieved at the highest air flow rate in the medium with 5% of lactose. However, the best conversion of lactose carbon to biomass (0,104 g/g) was achieved in the medium with 5% of lactose.*

Keywords: ***Kluyveromyces marxianus**, whey, lactose, food yeast*

Literatura

- AXELLSON, A., NILSSON, M., ZACCHI, G., HAHN-HÄGERDAL, B. (1991.) Performance of Batch and Continuous Reactors with Coimmobilized Yeast and β -Galactosidase. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **52**, 227-241.
- BELEM, M.A.F., LEE, B.H. (1999.) Fed-batch fermentation to produce oligonucleotides from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey, *Proc. Biochem* **34** 501-509
- COMPAGNO, C., TURA, A., RANZI, B. M., MARTEGANI, E. (1993.) Bioconversion of lactose/whey to fructose diphosphate with recombinant *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biotechnol. and Bioengin.* **42**, 398-400.
- CRISTIANI-URBINA, E., NETZAHUATL-MUNOZ, A.R., MANRIQUEZ-ROJAS, F.J., JUAREZ-RAMIREZ, C., RUIZ-ORDAZ, N., GALINDEZ-MAYER, J. (2000.) Batch and fed-batch cultures for the treatment of whey with mixed yeast cultures. *Process Biochemistry* **35**(7), 649-657
- GONZALEZ SISO, M.I., RAMIL, E., CERDAN, M.E., FREIRE-PICOS, M.A. (1996.) Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: Ethanol production and the Crabtree effect, *Enzyme. Microb. Technol.* **18** (8) 585-591
- HALASZ, A., LASZTITY, R. (1991.) Use of Yeast Biomass in Food Production, CRC Press, Florida
- INCHAURRONDO, V.A., OKOS, M.R., VOGET, C.E. (1994.) Yeast Growth and β -galactosidase Production During Aerobic Batch Cultures in Lactose-Limited Syntetic Medium. *Process Biochemistry*, **29**, 47-54.
- KALLEL-MHIRI, H., VALANCE, C., ENGASSER, J.M., MICLO, A. (1994.) Yeast Continuous Mixed Cultures on Whey Permeate and Hydrolysed Starch. *Proc. Biochem.*, **29**, 381-386.
- MAIORELLA, B.L., CASTILLO, F.J. (1984.) Ethanol, Biomass and Enzyme Production for Whey Waste Abatement. *Proc. Biochem* **19** (2) 157-161.
- PARRONDO, J. GARCIA, L.A., DIAZ, M. (2000.) Production of Alcoholic Beverage by Fermentation of Whey Permeate with *Kluyveromyces fragilis* I: Primary Metabolism. *Journal of The Institute of Brewing* **106** (6), 367-375
- POPOVIĆ-VRANJEŠ, A., VUJIČIĆ, I.F. (1997.) *Tehnologija sirutke*, Univerzitet, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad
- RAMAKRISHNAN, S., HARTLEY, B.S. (1993.) Fermentation of Lactose by Yeast Cells Secreting Recombinant Fungal Lactase, *Appl. and Envir. Microbiol.* **59**, 4230-4235.
- SANTOS, A., LADERO, M., GARCÍA-OCHOA, F. (1998.) Kinetic Modeling of Lactose Hydrolysis by a β -Galactosidase from *Kluyveromyces Fragilis*, *Enzyme. Microb. Technol.* **22** (7) 558-567
- SPENCER, J. F.T., SPENCER, D. M. (1997.) *Yeast in natural and artificial habitats*, Springer, Verlag Berlin Heidelberg, Germany.

STEHLIK-TOMAS, V. (1983.) Magistarski rad. PBF, Zagreb.

TRATNIK, LJ. (1998.) *Mlijeko-tehnologija, biokemija i mikrobiologija*, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb

VON STOCKAR, U., AUBERSON, L.C.M. (1992.) Chemostat cultures of yeasts, continuous culture fundamentals and simple unstructured mathematical models. *J.Biotechnology* **22** 69-88

Adrese autora - Author's addresses:

Damir Stanzer, dipl. ing.
Dr. sc. Vesna Stehlik – Tomas, izv. prof.
Mr. sc. Vlatka Gulan – Zetić
Jelena Menenica, dipl. ing.
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišta u Zagrebu

Prispjelo – Received:

20. 05. 2002.

Prihvaćeno – Accepted:

28. 06. 2002.