

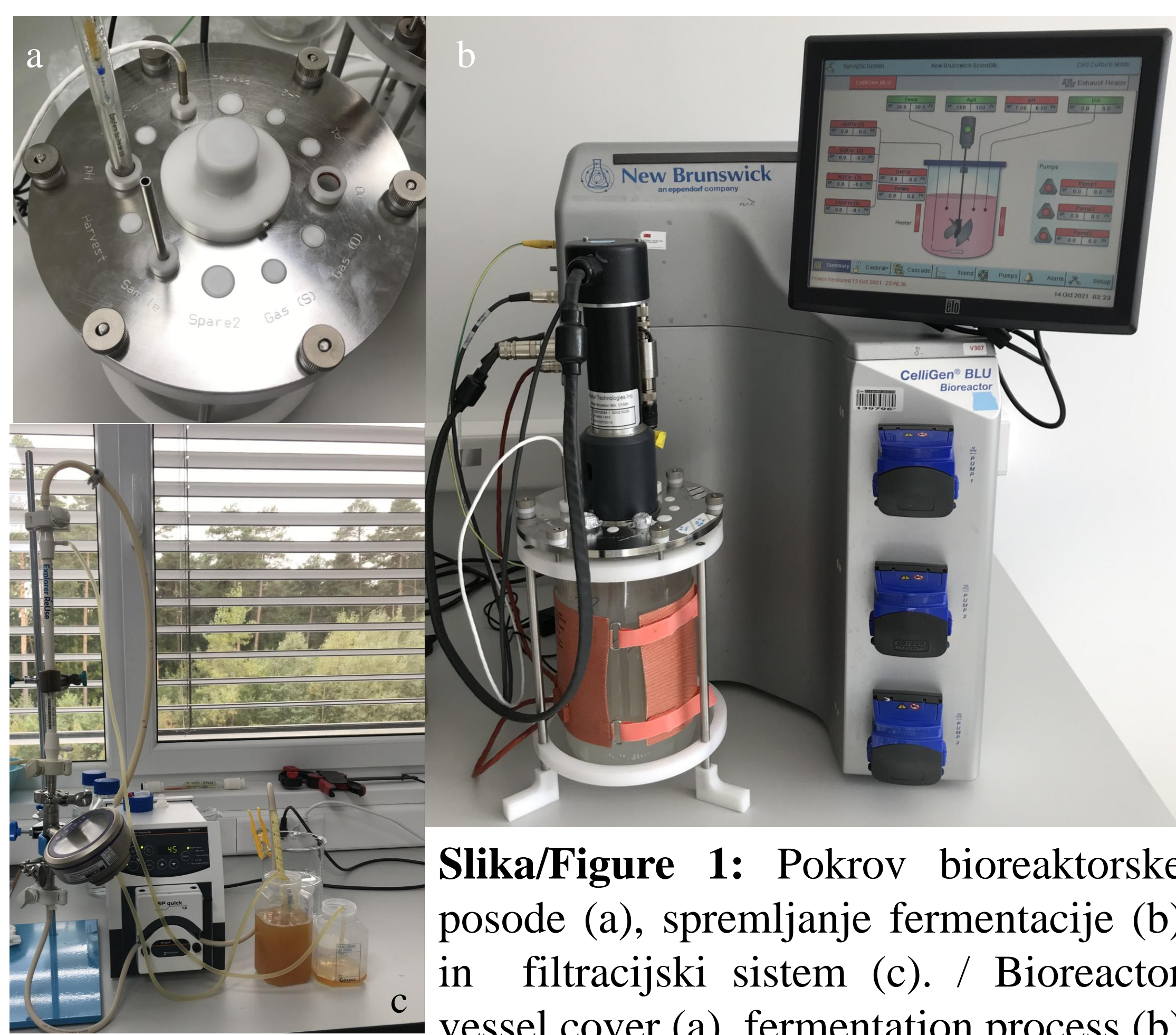
Polona Zabukovec<sup>1</sup>, Diana Paveljšek<sup>2</sup>, Tjaša Prevc<sup>1</sup>, Maja Zupančič Justin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ARHEL d.o.o., Komenda, Slovenija, tjas.precv@arhel.si  
<sup>2</sup>Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Inštitut za mlekarstvo in probiotike, Domžale, Slovenija

## UVOD / INTRODUCTION

Nevezano frakcijo sirotke po izolaciji laktoferina in laktoperoksidaze smo želeli izkoristiti kot medij za gojenje mlečnokislinskih bakterij in produkcijo nizina, ki je zanimiv zaradi svojih protimikrobnih lastnosti (Malvido s sod., 2019). V ta namen so bili izdelani stekleni bioreaktorji in prirejena bioreaktorska tehnika, ki omogoča gojenje v treh litrih gojišča. Za kultivacijo *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* smo uporabili več različnih frakcij sirotke z dodanimi hranili in permeat izrabljenega gojišča po gojenju kefirnih zrn. Med procesom fermentacije smo spremljali porabo laktoze, koncentracijo nastale mlečne kisline in bakteriocinsko aktivnost v bioreaktorski gošči. Po gojenju smo s centrifugiranjem in filtriranjem (mikrofiltracija, ultrafiltracija) poskusili z iz gošče odstraniti nastalo biomaso in pridobiti frakcijo z visoko bakteriocinsko aktivnostjo.

Flow-through fraction of whey after the isolation of lactoferrin and laktoperoxidase was used as a growth medium for the cultivation of lactic acid bacteria and the production of nisin, which is interesting because of its antimicrobial activity (Malvido et al., 2019). For this purpose, glass bioreactors were made and adapted for the fermentation conditions that enable cultivation in three liters of growth medium. For the cultivation of the *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, we used several whey fractions with added nutrients and permeate of spent growth medium after cultivation of kefir grains under different fermentation conditions. During the fermentation process, lactose consumption, lactic acid concentration, and antimicrobial activity in the bioreactor broth were monitored. After cultivation, we tried to remove the resulting biomass from the broth by centrifugation and filtration (microfiltration, ultrafiltration) and obtain a fraction with high antimicrobial activity.



**Slika/Figure 1:** Pokrov bioreaktorske posode (a), spremljanje fermentacije (b) in filtracijski sistem (c). / Bioreactor vessel cover (a), fermentation process (b) and filtration system (c).

**Preglednica/Table 1:** Poskusi gojenja laktokokov v PKFT frakcijah kisle in sladke sirotke in izrabljenega gojišča po gojenju kefirnih zrn. / Experiments of lactococcal fermentation in PCFT fractions of acid and sweet whey and spent medium after cultivating kefir grains.

GOJIŠČE	pH regulacija	ZAČETNI pH	KONČNI pH	MLEČNA KISLINA (g/100g)	LAKTOZA (g/100g)	BAKTAKT. (BA/mL)
PKFT SS	ne	6,39	5,45	0,03	2,70	0
PKFT SS + KE	ne	6,36	4,41	0,20	2,45	51200
PKFT SS + KE	ne	6,26	4,38	0,20	2,64	102400
PKFT KS + KE	ne	6,5	4,6	0,84	3,08	102400
PKFT KS + KE	ne	6,5	4,6	0,85	3,17	102400
PKFT KS + KE	da	6,5	6,5	2,33	0,33	409600
PKFT KS + KE	da	6,5	6,5	2,37	0,10	409600
PIKG (KS)	da	6,4	6,5	1,51	1,95	102400
PIKG (KS)	da	6,4	6,5	1,82	1,12	102400

## METODE DELA

Izdelani sta bili bioreaktorski posodi, ki sta kompatibilni z New Brunswick Eppendorf Celligen BLU bioreaktorji. Med fermentacijo smo spremljali pH, količino raztopljenega kisika (DO) in temperaturo. Pri nekaterih eksperimentih smo pH fermentacijske gošče med procesom regulirali s 5M raztopino NaOH. Membranske separacije so bile izvedene na laboratorijskem sistemu za tangencialno filtracijo z uporabo WaterSep modulov z velikostjo por 750 kDa in 10 kDa.

Kemijske analize gošč in analize bakteriocinske aktivnosti so bile opravljene na Inštitutu za mlekarstvo in probiotike.

## REZULTATI IN DISKUSIJA

Potek fermentacije smo spremljali z vidika doseganja čim višje bakteriocinske aktivnosti v bioproceni brozgi in čim boljše izrabe laktoze v gojišču. Dodatek kvasnega ekstrakta (KE) v koncentraciji 2,5 % bistveno vpliva na kinetiko rasti in produkcijo bakteriocina (Preglednica 1). V primeru uporabe sladke sirotke je bila koncentracija proizvedene mlečne kisline nizka (do 0,2 g/100g). Dodatek KE je bistveno spremenil bakteriocinsko aktivnost v bioproceni gošči. Pri uporabi kisle sirotke je bila koncentracija mlečne kisline po fermentaciji bistveno večja kot pri sladki sirotki, bakteriocinska aktivnost pa primerljiva.

Najboljše rezultate smo dobili pri uporabi pkft ks z dodatkom KE in regulacijo pH med procesom fermentacije, kjer je bila na koncu procesa določena najvišja BA, količina preostale laktoze je bila minimalna, koncentracija mlečne kisline pa večja kot v ostalih poskusih. Pri fermentaciji v permeatu izrabljenega gojišča po gojenju kefirnih zrn in regulacijo pH med fermentacijo, je bila bakteriocinska aktivnost primerljiva s tistimi, izmerjenimi v pkft ss in ks z dodatkom KE brez regulacije.

Za izbrane bioprocene gošče smo po končani fermentaciji skušali ločiti na več frakcij, pri čemer smo pričakovali, da bomo lahko pridobili frakcijo z izrazito povečano bakteriocinsko aktivnostjo in drugo frakcijo, kjer bi le ta bila bistveno zmanjšana. Najprej smo s centrifugiranjem iz gošče odstranili biomaso in oborjene beljakovine, kasneje pa še z mikro in ultrafiltracijo supernatanta na laboratorijski tangencialni filtraciji pridobili posamezne frakcije retentatov in permeatov. Uporabili smo 2 membranska modula proizvajalca watersep z velikostjo por 750 in 10 kda. Pri tem smo pričakovali, da nizin ne bo kvantitativno prehajal por velikih 10 kda in se bo v večji meri zadržal v retentatni frakciji po ultrafiltraciji, in da bo zato permeatna frakcija imela bistveno nižjo bakteriocinsko aktivnost, vendar je bilo razporejanje bakteriocina bistveno drugačno v primerjavi z ultrafiltracijo, narejeno z uporabo ultrafiltracijskih centrifugirk amicon na manjši skali.

## ZAKLJUČKI

Vzpostavili smo bioreaktorski proces in določili pogoje za mlečnokislinsko fermentacijo v gojišču na osnovi kisle sirotke. Najboljše rezultate smo dobili v permeatu po ultrafiltraciji kisle sirotke, ki mu je bil dodan kvasni ekstrakt, med fermentacijo s startersko kulturo *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* pa smo uravnavali vzdrževali pH. Tako smo dosegli najvišjo bakteriocinsko aktivnost, ki je posledica proizvedenega nizina. S procesi selektivnih filtracij pa še nismo uspeli pridobiti frakcije, kjer bi bil nizin skoncentriran in ločen od večine drugih sestavin gojišča.

## CONCLUSIONS

We set up the biotechnological process and determined the conditions for lactic acid fermentation in a growth medium based on acid whey. We achieved the best results with the permeate of ultrafiltration of acid whey, to which yeast extract was added, and the pH was regulated during fermentation with the starter culture *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. In this way, the maximum antimicrobial activity, resulting from the production of nisin was achieved. However, selective filtration procedures have not yet allowed us to obtain a fraction in which the nisin is concentrated and separated from the bulk of the growth medium.