



Napredni načini izrabe potenciala sirotke: prehod iz okoljskega problema v dragocen naravni vir



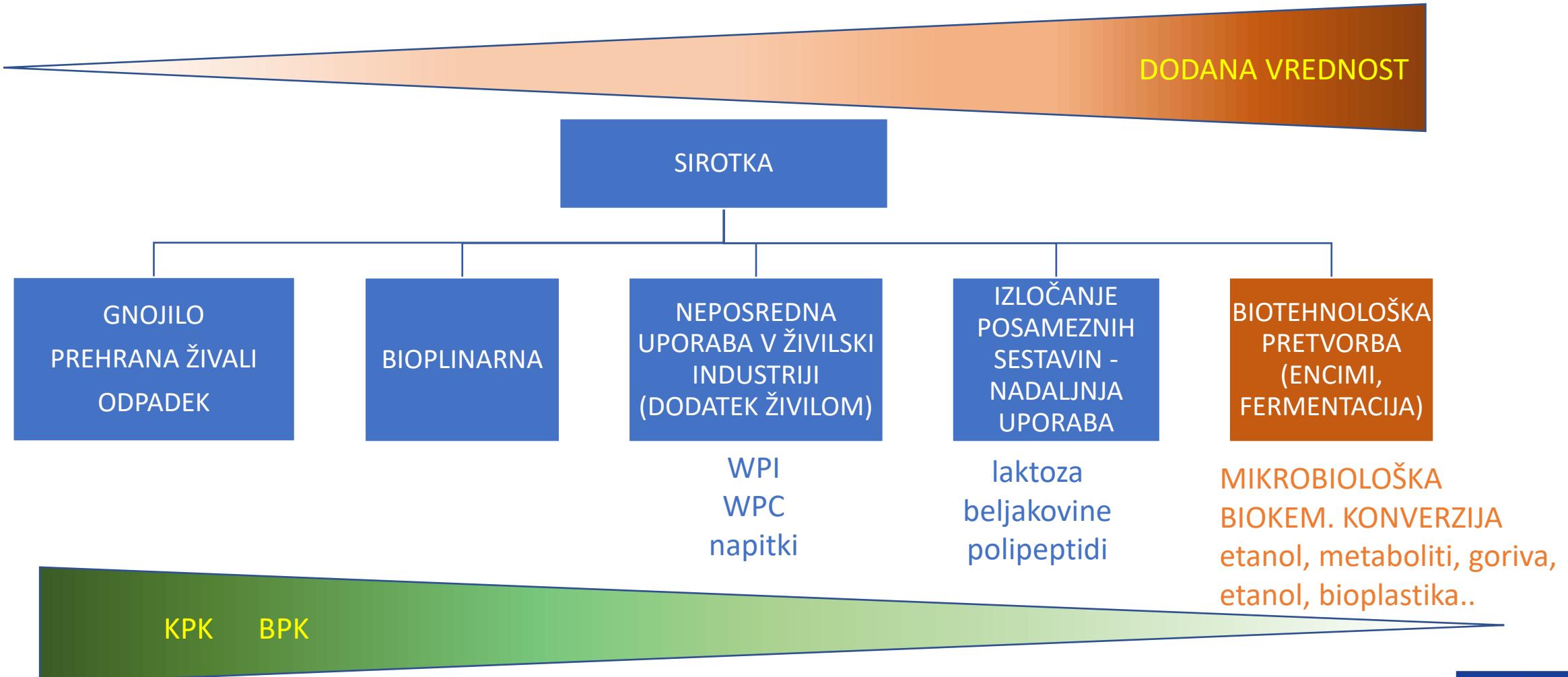
BIOTEHNOLOŠKA UPORABA SIROTKE

Bojana Bogovič Matijašić, Diana Paveljšek, Jernej Oberčkal

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Inštitut za mlekarstvo
in probiotike, Domžale, Slovenija



Poti uporabe sirotke



Komercialno zanimivi izdelki, pridobljeni z mikrobiološko pretvorbo sirotke

Produkt	Producijski organizem	Uporaba
bioetanol	<i>Kluyveromyces, Saccharomyces</i>	napitki, biogoriva
polihidroksialcanoati (PHA)	<i>Hydrogenophaga pseudoflava</i> <i>Cupriavidus necator</i> rekombinantne <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas hydrogenovora</i>	bioplastika
organske kisline (mlečna, ocetna, propionska, citronska, jantarna, laktobionska, glukonska...)	laktobacili, ocetnokislinske bakterije, <i>Propionibacterium</i> , <i>Candida</i> , <i>Aspergillus niger</i> ...	živilska in kemična industrija
celični proteini	<i>Kluyveromyces</i> sp., kefirna zrna	hrana za živali, živilska industrija
celično olje	<i>Fusarium</i> , <i>Mucor</i> ...	živilska in farmacevtska industrija
encimi (β -galaktozidaza, α -amilaza, proteaze...)	mlečnokislinske bakterije, <i>Bacillus</i> , <i>Kluyveromyces</i> , <i>Aspergillus</i> ...	živilska in kemična industrija
glicerol	<i>Kluyveromyces</i> , <i>Aspergillus</i>	biogorivo, kemična industrija
celuloza	ocetnokislinske bakterije	biocompositni materijali
biosurfaktanti	laktobacili, <i>Pseudomonas</i> ...	živilska in farmacevtska industrija, kozmetika
probiotiki	mlečnokislinske bakterije, bifidobakterije...	funkcionalna hrana, prehranska dopolnila
postbiotiki (bakteriocini, eps, cla...)	mlečnokislinske bakterije, bifidobakterije, <i>Bacillus</i>	prehranska dopolnila
vitamini (B6, B12...)	propionibakterije	živilska in farmacevtska industrija

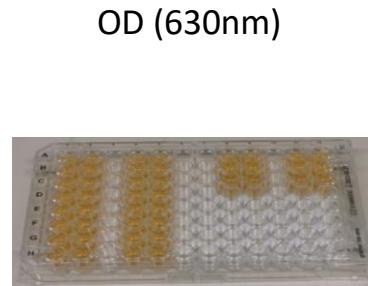
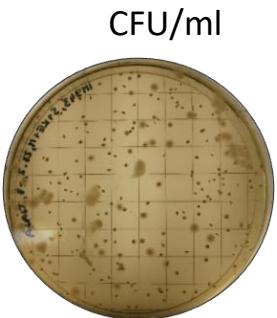
Pridobivanje probiotikov oz. LBP („live bioterapeutic products“)



- Konvencionalna gojišča so draga
- Sirotka vsebuje veliko hraničnih količin, ki jih potrebujejo mikroorganizmi za rast
- ŽOHAR, Tjaša. *Izraba odpadne kisle sirotke za gojenje laktobacilov s probiotičnim potencialom*, 2021, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Ljubljana, Magistrsko delo magistrskega študija - 2. stopnja Prehrana [COBISS.SI-ID [67500291](#)]

Izraba odpadne kisle sirotke za gojenje laktobacilov s probiotičnim potencialom

Vrsta	Oznaka
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	IM1163
	IM1164
	IM943
	IM930
	IM527
<i>Lactobacillus paragasseri K7</i>	IM105
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus GG</i>	IM239

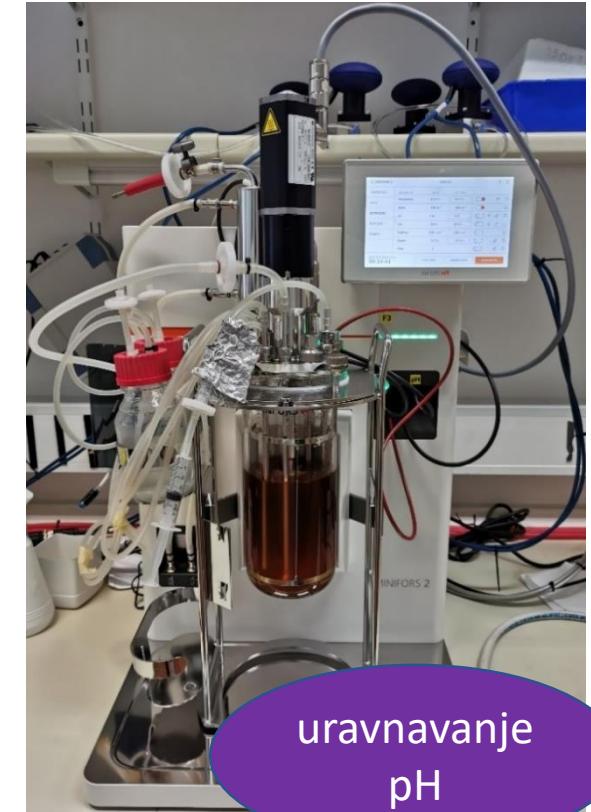


Sestava
gojišča

MRS

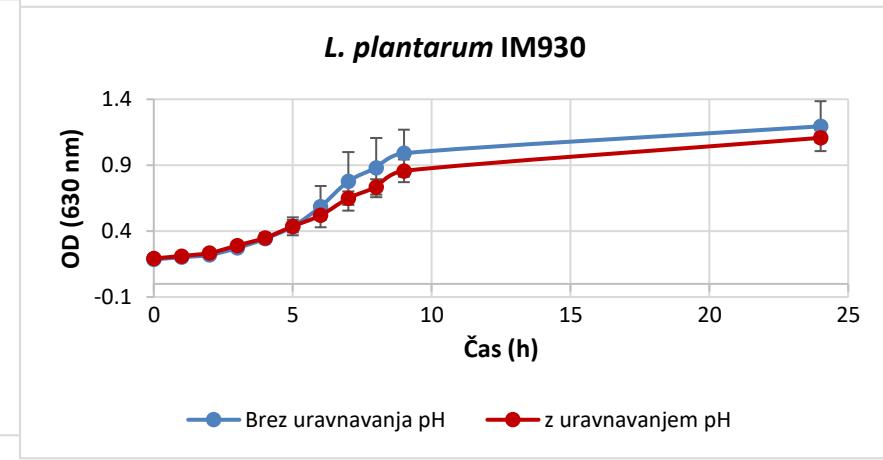
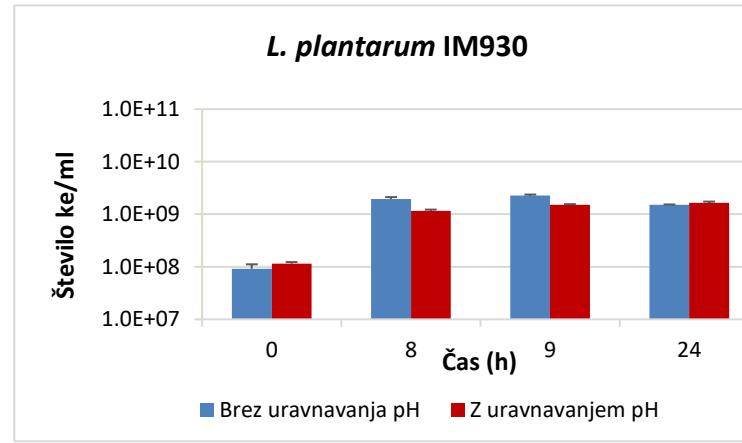
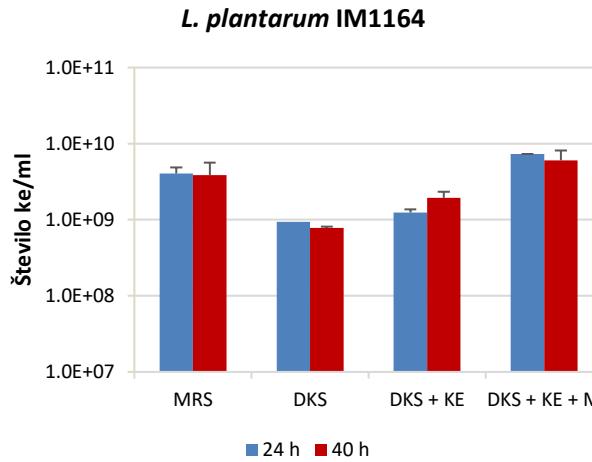
Deproteinizirana kisla
sirotka (DKS)

DKS + kvasni ekstrakt
(KE)



DKS + KE + zmes ($MgSO_4$, $MnSO_4$, K_2HPO_4 , CH_3COONa in $C_6H_8O_7 \times 2NH_3$)

Izraba odpadne kisle sirotke za gojenje laktobacilov s probiotičnim potencialom



- Kisla sirotka, ki nastane pri industrijski izdelavi skute, omogoča rast izbranih sevov bakterij s probiotičnim potencialom.
- Obogatitev sirotke s kvasnim ekstraktom in/ali z mešanico mineralov je izboljšala rast sevov *L. plantarum* in seva *L. rhamnosus* IM239
- Uravnavanje pH ni prispevalo k boljšemu izplenu živih bakterij po gojenju v bioreaktorju.

Pridobivanje postbiotikov

- “preparation of inanimate microorganisms and/or their components that confers a health benefit on the host”. – pripravki z **neživimi (inaktiviranimi) MO in/ali celičnimi komponentami**, ki izkazujejo učinke na zdravje gostitelja
- Postbiotiki lahko vsebujejo tudi **metabolite**, ki izkazujejo pozitivne učinke na zdravje.

Salminen, S., et al. (2021). "The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics." Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology **18**(9): 649-667.

Condition	New
Availability	<input type="checkbox"/> Include Out of Stock
	Complete Gut Health+ by MaryRuth's 3-in-1 Prebiotic + Probiotic + Postbiotic Corebiome® Vegan... 60 Count (Pack of 1) ★★★★★ ~ 648
	Jung's Laboratory of Immunology-Billion-CFUs Vita Postbiotics for Woman-Support Immune and... 30 Count (Pack of 1) ★★★★☆ ~ 131
	Postbiotics Immune Square 2,500mg x 30 Sticks, Next-Generation lactobacillus 30 Count (Pack of 1) ★★★★★ ~ 6
	Restore for Gut Health by Primal Harvest, Primal Gut Restore w/ POSTbiotics, PREbiotics and... 60 Count (Pack of 1) ★★★★★ ~ 98
	Viscera 3 POSTbiotics TRI Butyrate - Sodium Butyrate Supplement - Butyric Acid 45 Count (Pack of 1) ★★★★☆ ~ 1,861
	Gut Health Supplement 100 Caps - Butyrate + Calcium + Magnesium The Ultimate Postbiotic No Bloating 100 Count (Pack of 1) ★★★★☆ ~ 1,820
	Healus Complete Biotic Butyrate Supplement, Tributyrin Based Butyric Acid, Advanced Absorption... 60 Count (Pack of 1) ★★★★★ ~ 440
	Dr. Ohhira's Probiotics Original Formula with 3 Year Fermented Prebiotics, Live Active Probiotics and... 100 Count (Pack of 1) ★★★★★ ~ 2,440
	Jung's Laboratory of Immunology-Vita Postbiotics S with Probiotics, Prebiotics, Vitamins & Postbiotics F... 30 Count (Pack of 1) ★★★★★ ~ 51
	Dr. Emil Nutrition Total Gut Complex - Pre + Pro + Postbiotic Gut Health Nutritional Supplement for Women... 60 Count (Pack of 1) ★★★★★ ~ 42
	Designs for Health Tri-Butyryl Supreme - Groundbreaking 'Postbiotic' Butyrate Supplement for... 60 Count (Pack of 1) ★★★★★ ~ 102
	Postbiotics Proline Breast Milk Lactobacillus 60 Bags (1 Box, PostBiotics) 60 Count (Pack of 1) ★★★★☆ ~ 2 \$39.90 (\$39.90/Count) Ships to Slovenia More Buying Choices \$37.90 (2 new offers)

Proizvodnja postbiotikov

18-24 h kultura bakterij v sirotki (probiotik)

Centrifugiranje – ločimo celice od gojišča

Pelet s celicami

Resuspendiranje peleta v pufru PBS

toplota obdelava (121°/20 min)

Lahko tudi sonikacija, obsevanje (gama, UV), kemikalije

Suspenzija neživih celic probiotika

Nacepljanje na gojišče – preverimo živost

HPLC
GC-MS
LC-MS
identifikacija biomolekul

Supernatant

mikrofiltriranje

Brezcelični supernatant

liofilizacija

Bioaktivni metaboliti

liofilizacija

Postbiotik v prahu

Nataraj, B. H., et al. (2020). "Postbiotics-parabiotics: the new horizons in microbial biotherapy and functional foods." *Microbial Cell Factories* **19**(1).

Pridobivanje za zdravje koristnih metabolitov MO

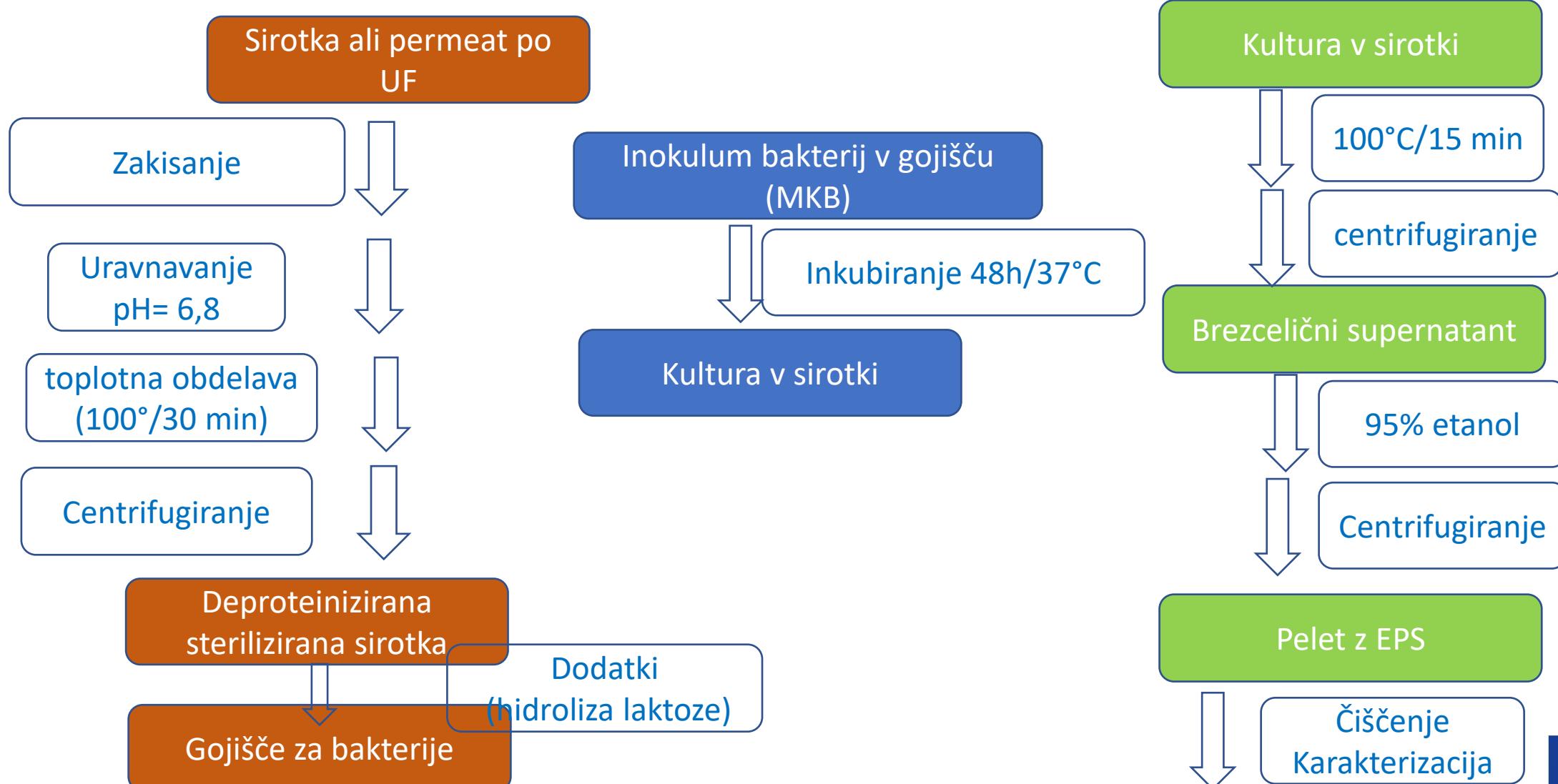
- vitmini: B6, B12
- Bakteriocini, reuterin
- Kefiran /kefirna zrna
- SCFA (butirat, propionat, acetat) in druge organske kislino
- EPS
- CLA (konjugirana linolejska kislina)
- Biosurfaktanti

Paveljšek D. in sod.: Pridobivanje nizina in vitamina B12 z biokonverzijo kisle sirotke (plakat)

Paveljšek D. in sod.: Izkoriščanje kisle sirotke za gojenje mlečnokislinskih bakterij in pridobivanje koristnih metabolitov (predavanje)

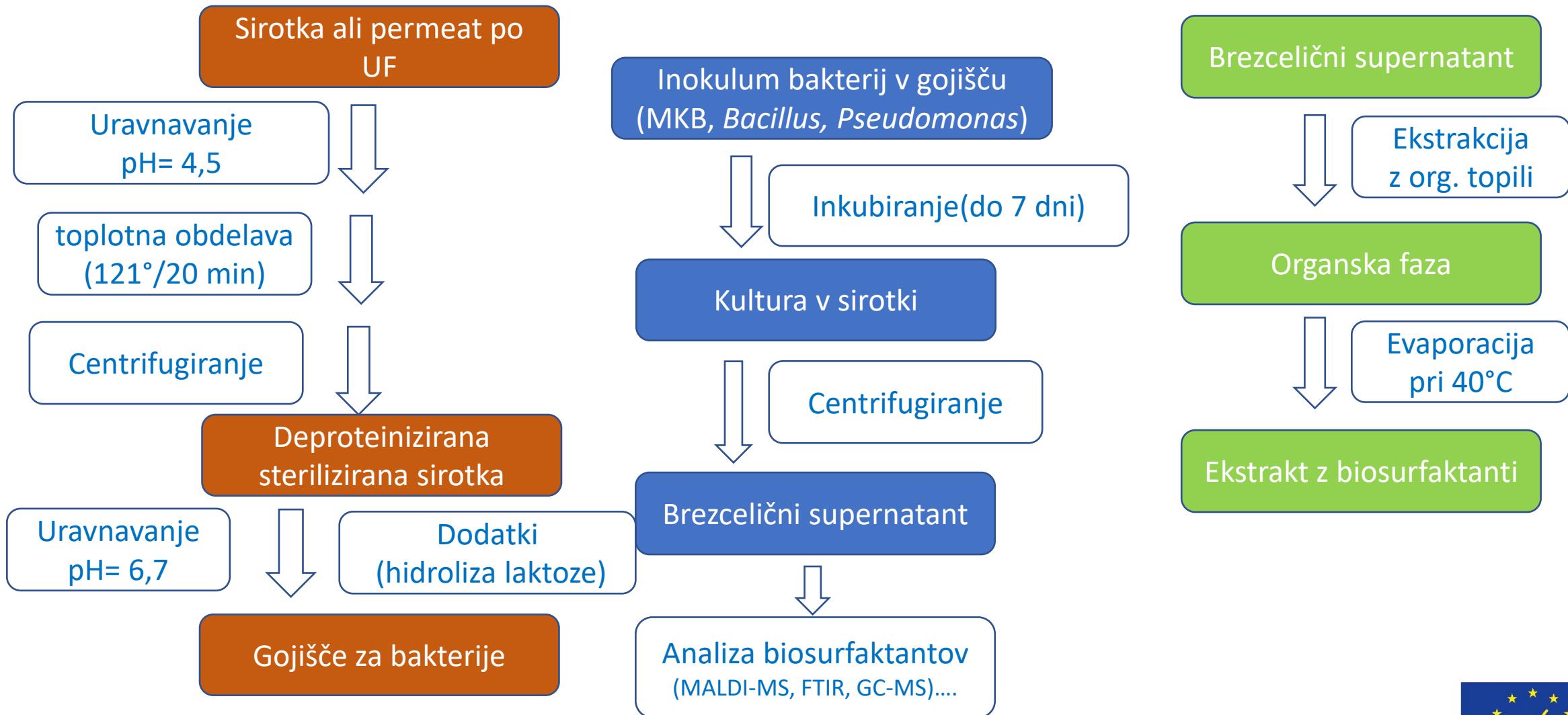
Čič M. in sod.: Optimizacija gojenja kefirnih zrn v sirotki (plakat)

Proizvodnja eksopolisaharidov: priprava sirotke, gojenje, ekstrakcija

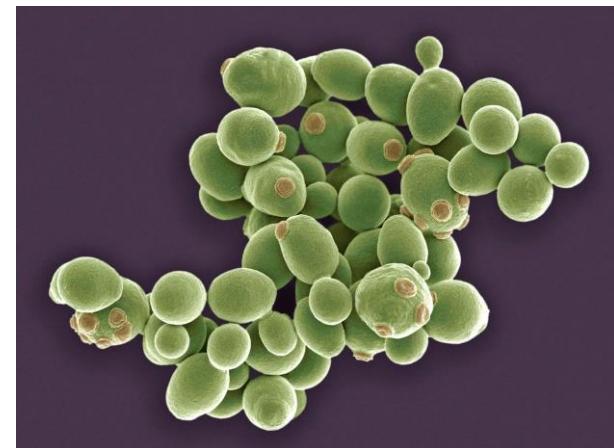


Napredni nacini izrabe potenciala sirotke: prehod iz okoljskega problema v dragocen naravni vir, Ljubljana, 15.2.2022
Zaključna konferenca projekta LIFE for Acid Whey - LIFE16 ENV/SI/000335 <http://lifeforacidwhey.arhel.si>

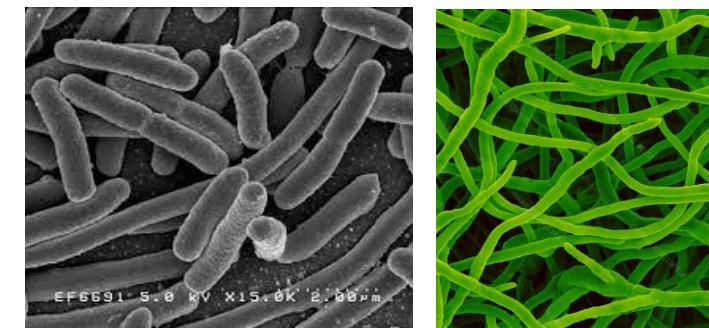
Proizvodnja biosurfaktantov: priprava sirotke, gojenje, ekstrakcija



Pridobivanje „single cell protein“

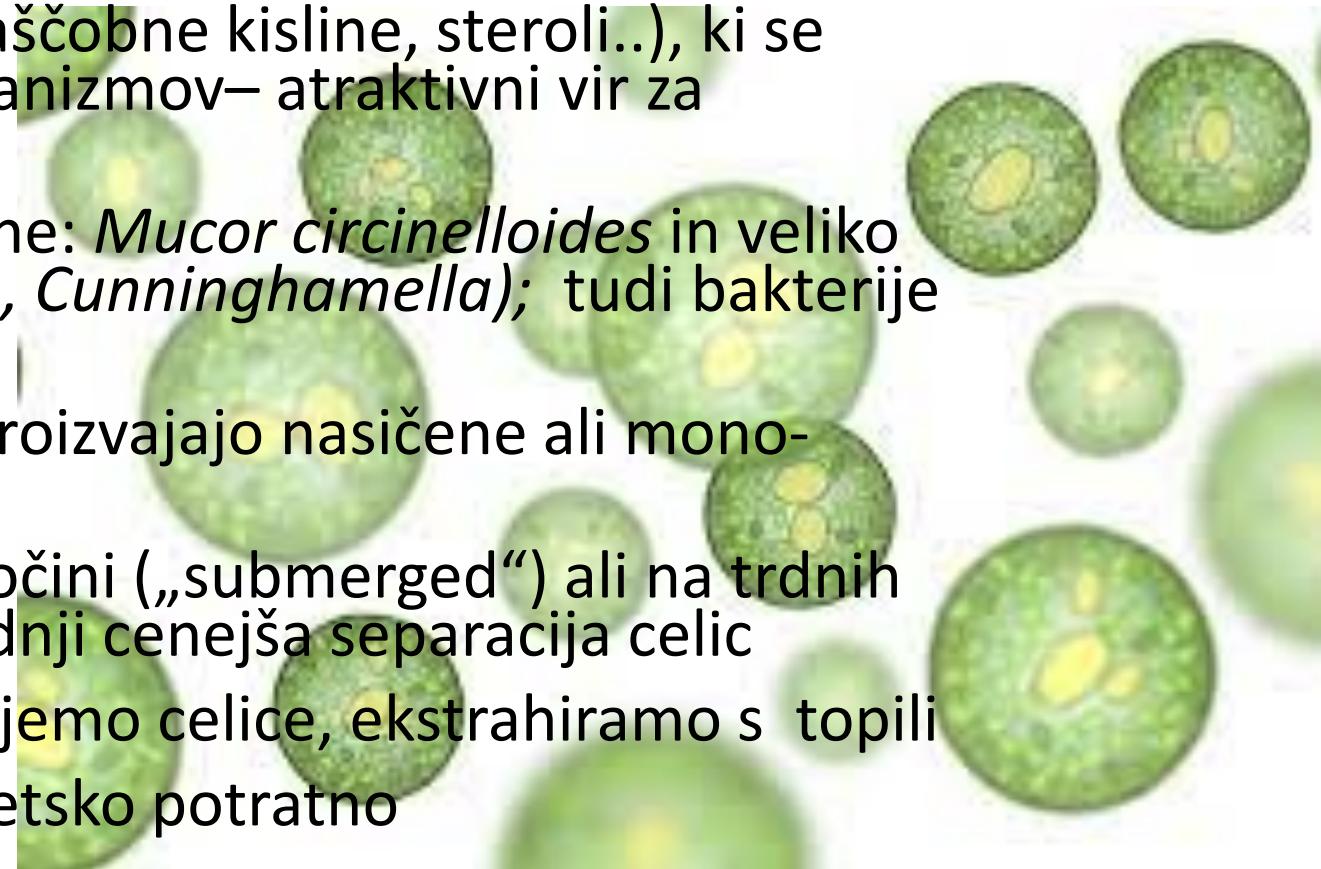


- SCP - se nanaša na vir mešanih beljakovin, ki jih ekstrahirajo iz čistih ali mešanih kultur alg, kvasovk, gliv ali bakterij, ki smo jih nagojili v sirotki ali posameznih frakcijah sirotke (permeat) – hrana za živali, ljudi
- Uporabljam predvsem kvasovke (*Kluyveromyces marxianus*, *K. fragilis*) – GRAS in dober izplen



Pridobivanje „single cell oil“ za proizvodnjo bio-goriv

- Lipidi (triacilgliceroli, proste maščobne kisline, steroli..), ki se akumulirajo v celicah mikroorganizmov – atraktivni vir za proizvodnjo biodizla
- Filamentozne glive zelo primerne: *Mucor circinelloides* in veliko drugih (*Aspergillus*, *Mortierella*, *Cunninghamella*); tudi bakterije in kvasovke
- Zanimivi so predvsem sevi, ki proizvajajo nasičene ali mononasičene maščobne kisline;
- Proizvodnja lahko poteka v tekočini („submerged“) ali na trdnih gojiščih („solid-state“) – pri slednji cenejša separacija celic
- Ekstrakcija lipidov iz celic; razbijemo celice, ekstrahiramo s topili
- Zaenkrat še visoka cena, energetsko potratno

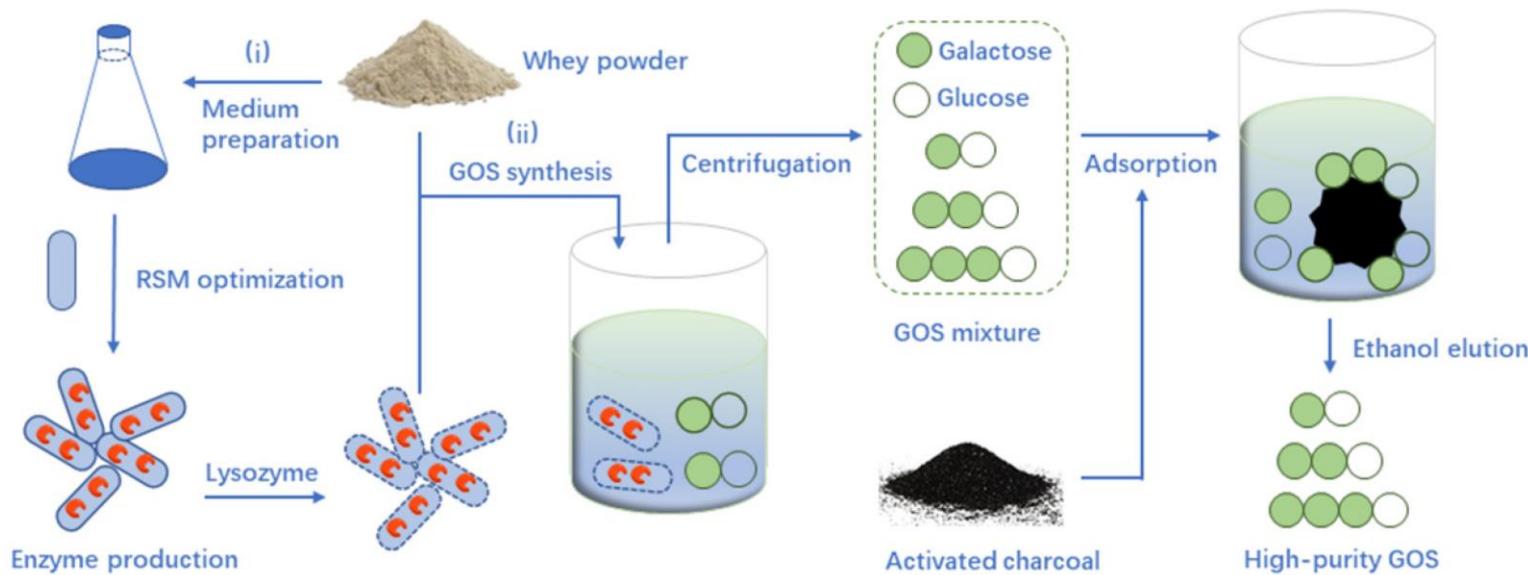


Slika: Wageningen Food & Biobased Research

Pridobivanje prebiotikov (galakto-oligosaharidi)

- Iz laktoze, iz sirotke, s pomočjo β -galaktozidaze (transgalaktozilacija)

L. bulgaricus
v sirotki proizvede
 β -galaktozidazo



Duan, F. Y., et al. (2021). "Integrated Utilization of Dairy Whey in Probiotic beta-Galactosidase Production and Enzymatic Synthesis of Galacto-Oligosaccharides." Catalysts **11**(6).

Pridobivanje bioetanola (prehrana, gorivo)

Sirotkin permeat

fermentacija „fed-batch“
(šaržna, z dohranjevanjem)
Kluyveromyces marxianus

+

kontinuirna destilacija

95 % etanol

Proizvodnja konzumnega alkohola

- 1978 na Irskem prvi obrat, v lasti mlekarne „Carbery“;
Irska: 11.000 ton/leto
Nova Zelandija: 18 mil. litrov (Anchor Ethanol, lastnik Fonterra – mlekarska industrija)
 - bolj trajnostno (manj CO₂ izpusta in porabe vode kot pri proizvodnji iz žit)
 - v nasprotju s strategijami za zagotavljanje zdravja prebivalstva

Pridobivanje bioetanola (prehrana, gorivo)

Sirotkin permeat (UF, RO),
ostanek po kristalizaciji lakoze

Fermentacija lakoze
Kluyveromyces,
Saccharomyces

Etanol za gorivo

Proizvodnja biogoriva

- Začetki na Irskem (Carbery) – od leta 2005 dalje s proizvedenim alkoholom oskrbujejo industrijo avtomobilskih goriv
- ZDA: kvasovke, ki jih reciklirajo in večkrat uporabijo, prvi patent v ZDA 1939

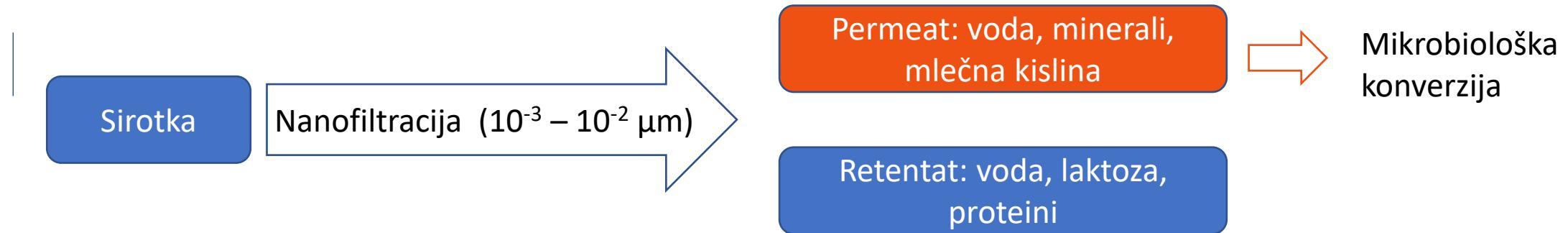


Dairy Farmers of America's ethanol-from-whey plant in Corona, California. (Photograph courtesy of Dairy Farmers of America)

Pridobivanje bioplastike

- Izolacija mlečne kisline iz sirotke

Cellulac od leta 2014:
proizvodnja mlečne
kisline, z laktobacili



- Kondenzacija mlečne kisline v polylactic acid ali polylactid PLA
– dobimo biorazgradljivi termoplastični poliester (za kozarčke)

Pridobivanje bioplastike iz sirotke

- mikrobiološka sinteza polihidroksialcanoatov (PHA)

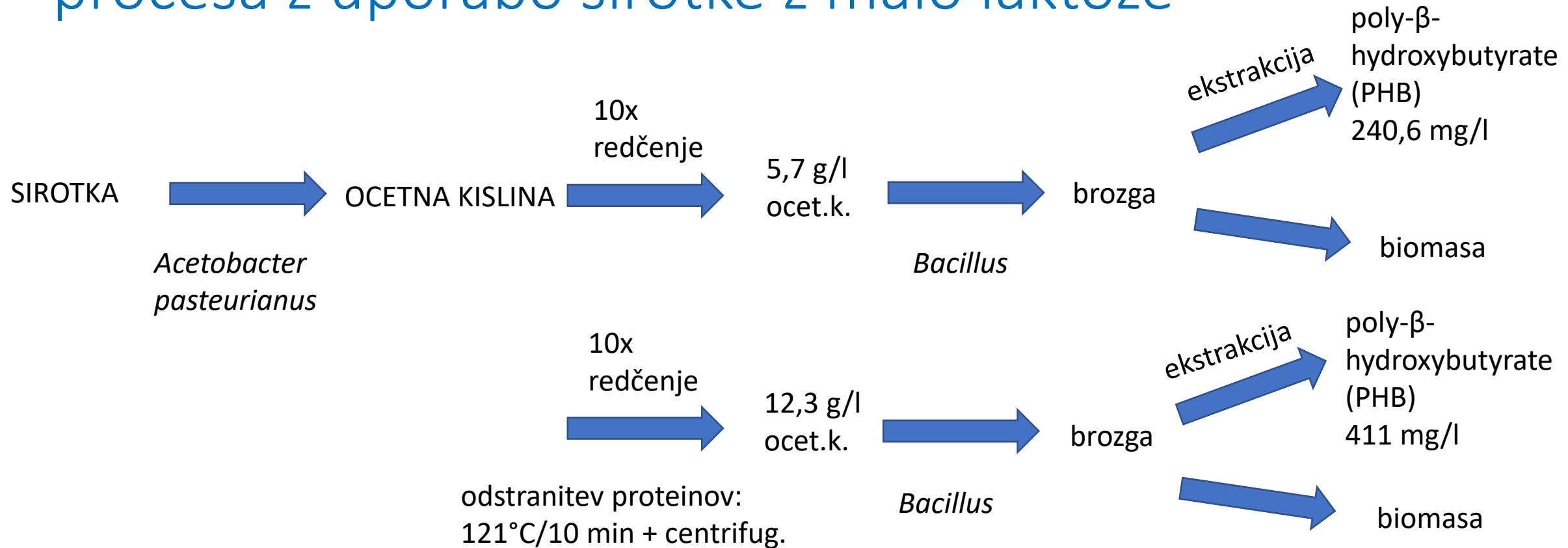
laktoza maščobne kisline

- *Kluyveromyces marxianus*
- *Hydorgenophaga pseudoflava*
- *Haloferax mediterranei*
- *Cupriavidus necator*
- *Bacillus megaterium*
- *Azohydromonas lata*
- *Pseudomonas hydrogenovora*
- *Methylobacterium*
- rekombinantne *Escherichia coli*

- Če sevi nimajo β -galaktozidazne aktivnosti, je potrebno **laktozo** prej razgraditi v monomere (encimska ali kemijska hidroliza)



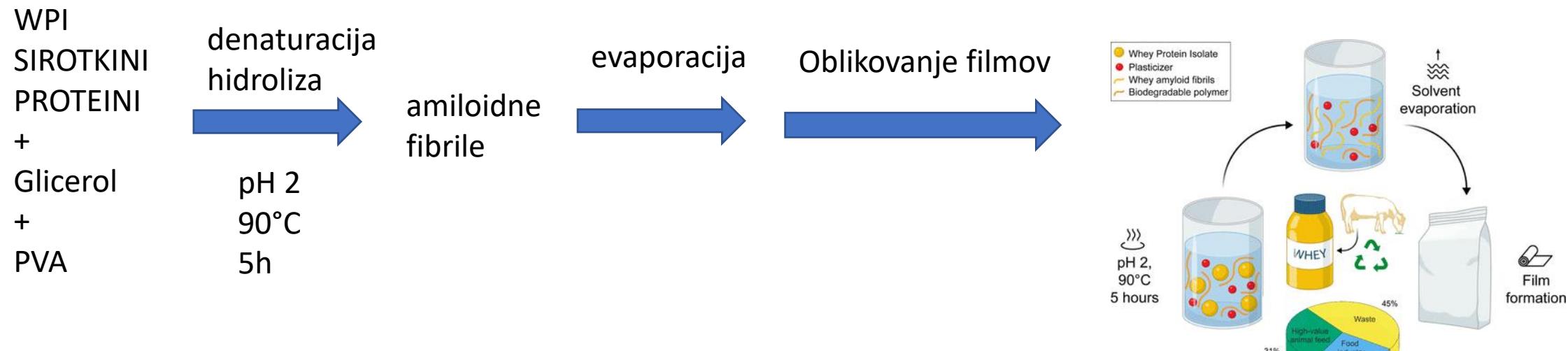
Pridobivanje bioplastike – primer dvostopenjskega procesa z uporabo sirotke z malo lakoze



Chang, Y. C., et al. (2021). "Two-Stage Polyhydroxyalkanoates (PHA) Production from Cheese Whey Using *Acetobacter pasteurianus* C1 and *Bacillus* sp. CYR1." Bioengineering-Basel 8(11).

Pridobivanje bioplastike iz amiloidnih fibril, kombiniranih z biorazgradljivimi polimeri

β -lactoglobulin je globularni protein, ki se zlahka sestavi v amiloidne fibrile (vlakna)

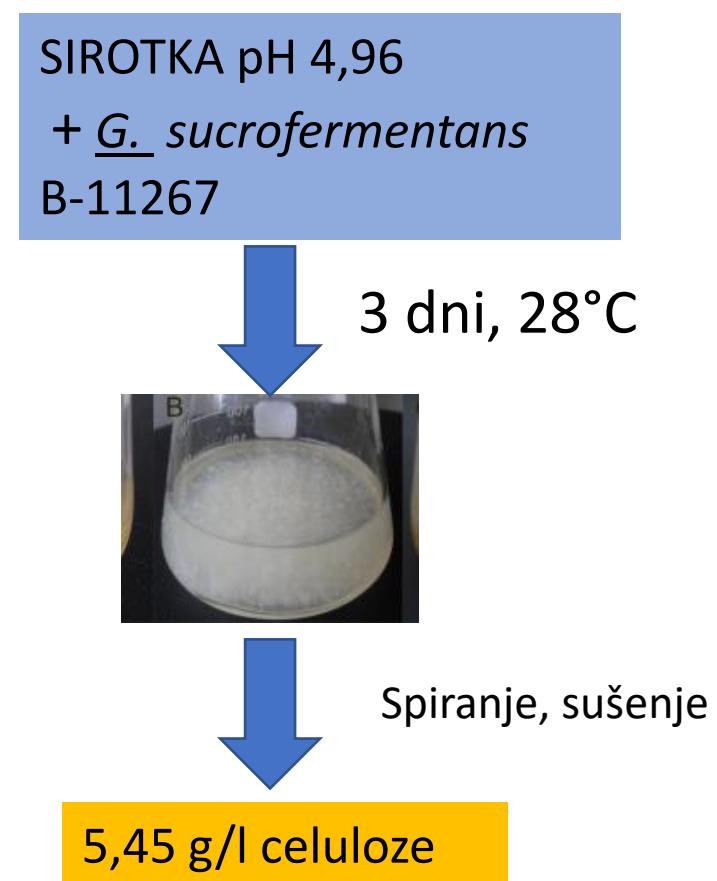


biorazgradljivi polimeri: PVA – polivinil alkohol, celuloza...
glicerol je mehčalec

Peydayesh, M., et al. (2021). "Sustainable Bioplastics from Amyloid Fibril-Biodegradable Polymer Blends." *Acs Sustainable Chemistry & Engineering* 9(35): 11916-11926.

Pridobivanje bakterijske celuloze

- Okoljsko prijazen polimer, številne možnosti uporabe v živilski, papirni, tekstilni industriji, v kozmetičnih izdelkih in medicini
- Živilska industrija: podaljšana obstojnost - Aktivno pakiranje (vključevanje protimikrobnih snovi v embalažo)
- *Gluconacetobacter sucrofermentans*, 5.45 g/L BC (kristalna struktura malo drugačna, posledično slabše mehanske lastnosti – trdnost)
- *Gluconacetobacter xylinus*, *Komagataeibacter sucrofermentans*.. (slabše izkoriščajo laktozo - encimska hidroliza sirotke izboljša izplen)
- rekombinantni sevi *Acetobacter xylinum*z vstavljenim *lacZ* (β -galaktozidaza)



Kolesovs, S. and P. Semjonovs (2020). "Production of bacterial cellulose from whey-current state and prospects." *Applied Microbiology and Biotechnology* **104**(18): 7723-7730.

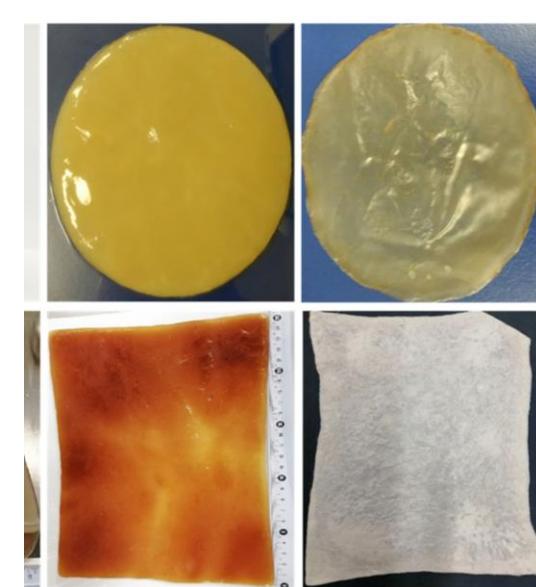
Revin, V., et al. (2018). "Cost-effective production of bacterial cellulose using acidic food industry by-products." *Brazilian Journal of Microbiology* **49**: 151-159.

Pridobivanje bakterijske celuloze

KISLA
SIROTKA

*Komagatacibacter
xylinus*

Kombuča
+
celulozna membrana,
usnju podoben materijal



Nguyen, H. T., et al. (2022). "Development of novel biocomposites based on the clean production of microbial cellulose from dairy waste (sour whey)." *Journal of Applied Polymer Science* **139**(1).

Ovire pri predelavi sirotke

- Prevoz
- nizke koncentracije nekaterih sestavin
- stranski proizvodi
- Regulativa: živilo/prehransko dopolnilo, medicinski pripomoček, kozmetični izdelek



Zaključki

- Sirotka je najpomembnejši stranski produkt mlekarske industrije, zato je pomembno iskati nove poti za njen ponovno uporabo v izdelkih
- Biotehnološki pristopi h konverziji sirotke omogočajo pridobivanje inovativnih izdelkov z visoko dodano vrednostjo (živila, prehranska dopolnila, biogoriva, bioplastika...)
- Razen ekonomskega učinka je pomemben tudi vpliv v smislu zmanjšanja obremenitve za okolje in krožnega gospodarstva
- Nove tehnologije in znanje odpirajo biotehnološkim podjetjem številne nove možnosti za izrabo odpadne sirotke



Raziskava je bila sofinancirana z evropskim finančnim instrumentom LIFE projekta LIFE16 ENV/SI/000335 Ponovna uporaba odpadne sirotke za ekstrakcijo bioaktivnih beljakovin z visoko dodano vrednostjo, <http://lifeforacidwhey.arhel.si> in z Operativnim programom za izvajanje evropske kohezijske politike v obdobju 2014 – 2020, Spodbujanje izvajanja raziskovalno-razvojnih projektov (TRL 3-6), S4 - Mreže za prehod v krožno gospodarstvo, Biomasa in alternativne surovine, v okviru projekta LAKTIKA (OP20.03521), Frakcioniranje in oplemenitenje sirotkinih proteinov ter izraba preostanka za oblikovanje novih funkcionalnih živil in prehranskih dopolnil, <http://laktika.arhel.si>.

