

## ODPADY PRZEMYSŁU ZIEMNIACZANEGO JAKO PODŁOŻE DO HODOWLI BAKTERII MLEKOWYCH

Anna Sip<sup>1</sup>, Joanna Le Thanh-Blicharz<sup>2</sup>, Katarzyna Siergiej<sup>1</sup>, Mariusz Lesiecki<sup>1</sup>,  
Grażyna Lewandowicz<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności  
ul. Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań

<sup>2</sup> Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego  
Zakład Koncentratów Spożywczych i Produktów Skrobiowych w Poznaniu  
ul. Starołęcka 40, 61-361 Poznań  
lethanh@man.poznan.pl

### Streszczenie

Wycierka ziemniaczana oraz woda sokowa są produktami odpadowymi przemysłu skrobiowego, aktualnie zagospodarowywanymi głównie na cele paszowe. W odniesieniu do wycierki, dane literaturowe wskazują również na możliwość jej zastosowania do produkcji bioetanolu. Niestety część tego surowca nie nadaje się do przerobu tą metodą, ponieważ jest zbudowana z monomerów niepodatnych na fermentację etanolową. Dlatego też w niniejszej pracy podjęto próbę wykorzystania odpadów przemysłu ziemniaczanego, tj. wycierki ziemniaczanej oraz wody sokowej, jako podłoży do hodowli probiotycznych bakterii fermentacji mlekowej *Lactobacillus plantarum* KBiMŻ LAB15. Szczególny nacisk położono na możliwość zagospodarowania nieprzydatnych do wytwarzania bioetanolu produktów hydrolizy wycierki, tj. frakcji ciekłej powstałej w wyniku działania pektynaz na wycierkę oraz frakcji stałej powstałej po działaniu kompleksem enzymów (pektynaz, amylaz i celulaz). Stwierdzono, że zarówno świeża wycierka ziemniaczana, jak i produkty jej hydrolizy mogą być komponentami podłoży do hodowli probiotycznych bakterii *L. plantarum*. Szczególnie efektywnie badane mikroorganizmy rosły w wycierce wzbogacanej sokiem z ziemniaka lub jego hydrolizatem. Maksymalna liczebność ich komórek w podłożach na bazie tych składników była porównywalna do uzyskiwanej w podłożu MRS rekomendowanym do hodowli bakterii mlekowych. Ustalono jednocześnie, że frakcja ciekła powstała w wyniku hydrolizy wycierki pektynazą gwarantowała lepszy wzrost *L. plantarum* niż świeża wycierka. Mimo wysokiej efektywności wzrostu aktywność metaboliczna *L. plantarum* w podłożach

zawierających wycierkę ziemniaczaną oraz produkty jej przetwarzania była znacznie niższa niż w podłożu MRS.

**Słowa kluczowe:** wycierka, sok z ziemniaka, hydroliza enzymatyczna, bakterie mlekowe

## **POTATO STARCH INDUSTRY WASTES AS MEDIA FOR THE CULTIVATION OF LACTIC ACID BACTERIA**

### **Summary**

Potato pulp and juice are the waste products of the potato starch industry usually used as fertilizers. With respect to potato pulp, there are literature recommendations for its use as a raw material for bioethanol production. However, a part of potato fibre is not appropriate for that purpose, because it is formed with not fermentable monomers. The aim of the study was to examine the usefulness of potato pulp and juice for the cultivation of probiotic bacteria *Lactobacillus plantarum*. Special attention was paid to the possibility of use of products of enzymatic hydrolysis of potato pulp which are unsuitable for ethanol fermentation. It was found that both fresh potato pulp, as well as products of its enzymatic hydrolysis are useful as cultivation medium for probiotic *L. plantarum* bacteria. Especially effective was potato pulp enriched with fresh or hydrolysed juice. Their number was even higher than in the MRS medium recommended for the cultivation of lactic acid bacteria. Liquid fraction resulting from pectinolysis of the pulp was more effective as cultivation medium than the fresh pulp. Despite the high efficiency of the growth, the metabolic activity of *L. plantarum* cultivated in media containing potato pulp and its processing products is significantly lower than in the MRS medium.

**Key words:** potato pulp, potato juice, enzymatic hydrolysis, lactic acid bacteria

### **WSTĘP**

Wycierka ziemniaczana oraz woda sokowa są produktami odpadowymi przemysłu skrobiowego. W samej Europie roczna produkcja wycierki przekracza 1 mln ton [Mayer, Hillebrandt 1997]. W północnej Japonii produkuje się jej natomiast około 100 tys. ton rocznie [Yunoki i in. 2004]. Jak dotąd wycierkę wykorzystuje się głównie jako paszę lub nawóz, a wodę sokową jako źródło białek paszowych [Oda i in. 2002; Saito i in. 2006; Rytel i in. 2010; Tuśnio i in. 2011]. Nie są to jednak ekonomiczne metody zagospodarowania tych produktów. Co więcej, duże ilości wycierki ziemniaczanej oraz wody sokowej pozostają nadal niezagospodarowane, a to z kolei zwiększa ładunek biologiczny ścieków oraz obciąża

zakłady produkcyjne dodatkowymi kosztami związanymi z ich utylizacją [Pastuszewska i in. 2007; Miedzianka i in. 2010].

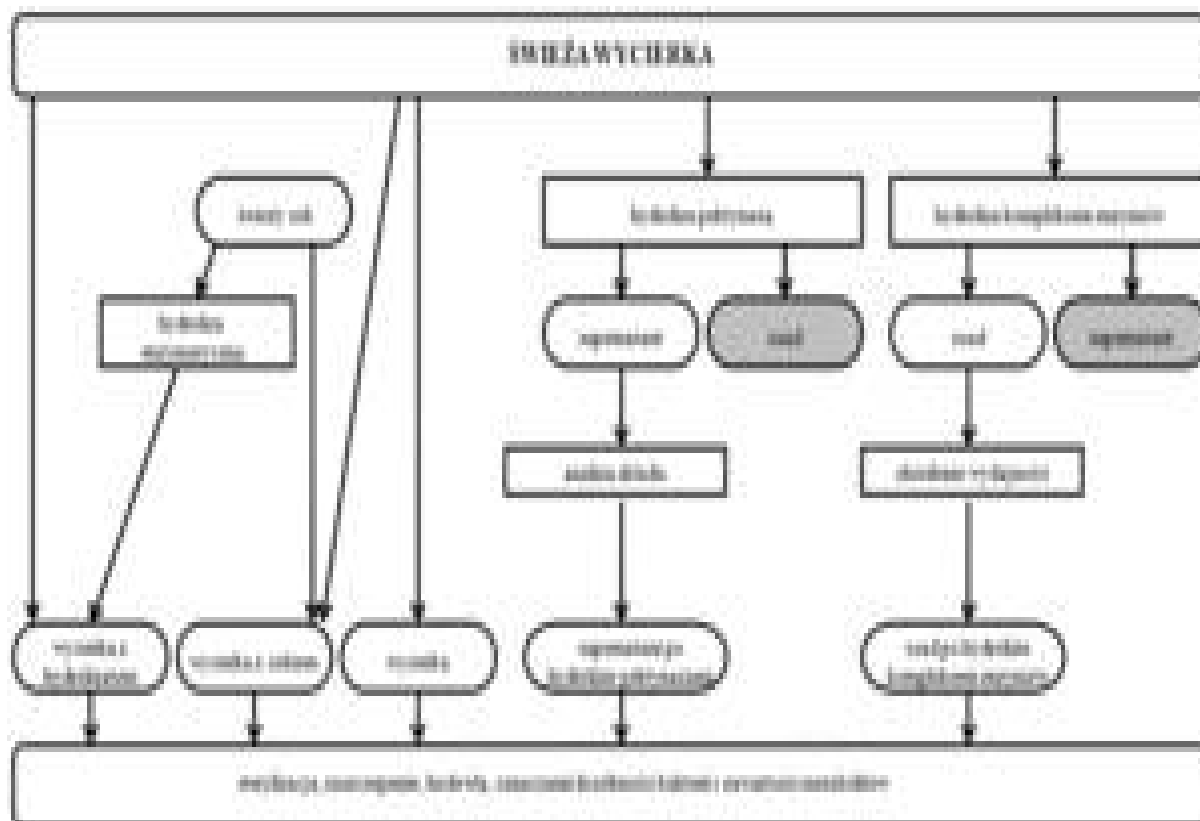
Wycierka ziemniaczana, ze względu na podatność na hydrolizę bez konieczności przeprowadzania obróbki wstępnej, jest potencjalnie doskonałym surowcem do produkcji bioetanolu II generacji [Białas i in. 2010; Szymanowska i in. 2011; Lesiecki i in. 2012]. Niestety pektyny zawarte w wycierce nie nadają się do przerobu na etanol, ponieważ są zbudowane z niefermentowanych przez drożdże *Saccharomyces cerevisiae* (najczęściej wykorzystywane do produkcji bioetanolu) kwasów uronowych [Szymanowska i in. 2011]. Zmniejsza to opłacalność produkcji bioetanolu i nadal pozostawia otwartym problem zagospodarowania części wycierki.

Wycierka ziemniaczana jest natomiast doskonałym środowiskiem dla rozwoju szerokiego spektrum mikroorganizmów, w tym grzybów jak również bakterii fermentacji mlekowej [Mayer, Hillebrandt 1997; Sip i in. 2010]. Te drugie, z uwagi na swe właściwości metaboliczne oraz status GRAS (Generally Recognised As Safe) [Bardowski 2006], coraz częściej są wykorzystywane jako kultury starterowe lub ochronne do produkcji żywności fermentowanej bezpiecznej z mikrobiologicznego punktu widzenia [Libudzisz i in. 2008]. Są one również podstawą do otrzymywania wielu preparatów probiotycznych [Gomes, Maltaca 1999; Sip, Grajek 2010].

W niniejszej pracy podjęto więc próbę wykorzystania odpadów przemysłu ziemniaczanego, tj. wycierki ziemniaczanej oraz wody sokowej, jako podłoży do hodowli probiotycznych bakterii fermentacji mlekowej *Lactobacillus plantarum* KBiMŻ LAB15. Szczególny nacisk położono na możliwość zagospodarowania nieprzydatnych do wytwarzania bioetanolu produktów jej hydrolizy, tj. frakcji ciekłej powstałej w wyniku działania pektynaz na wycierkę oraz frakcji stałej powstałej po działaniu kompleksem enzymów (pektynaz, amylaz i celulaz).

## **MATERIAŁY I METODY BADAŃ**

Materiał badawczy stanowiła wycierka i sok ziemniaczany pozyskane, w toku kampanii krochmalniczej, z zakładu produkcyjnego w Stawie, wchodzącego w skład Wielkopolskiego Przedsiębiorstwa Przemysłu Ziemniaczanego S.A. w Luboniu. Badane surowce w postaci natywnej bądź po hydrolizie enzymatycznej zaszczepiano probiotycznymi bakteriami *L. plantarum*, a następnie badano przebieg ich hodowli. Schemat badań przedstawiono na rysunku 1.



**Rysunek 1.** Schemat badań  
*Flow sheet of experiments*

### ***Hydroliza enzymatyczna surowców***

Surowcem do otrzymywania hydrolizatu był sok pięciokrotnie zatężony w procesie kriokoncentracji, otrzymany zgodnie z metodyką opisaną w pracy Lewandowicz i in. [2012]. Do hydrolizy soku z ziemniaka, wykorzystywano endoproteazy z *Bacillus licheniformis* (Alcalase 2.4L FG, Novozymes). Hydrolizę prowadzono w pH = 8, w sposób ciągły, w reaktorze membranowym wyposażonym w ultrafiltracyjny moduł separacyjny. Stosowano membranę ceramiczną firmy Tami o punkcie odcięcia 5 kDa i powierzchni filtracyjnej 0,06 m<sup>2</sup>. Ze względu na ciągły charakter procesu hydrolizy temperatura procesu została ustalona na poziomie 30°C, w celu uniknięcia szybkiej dezaktywacji enzymu zachodzącej w temperaturach zbliżonych do optimum jego aktywności [Celka 2011; Tardioli i in 2003].

Do pektynolizy świeżej wycierki ziemniaczanej stosowano pektynazę z *Aspergillus niger* (Pectinex® 3XL, Sigma Aldrich). Naważkę wycierki (30 g), zagęszczoną uprzednio poprzez proces wirowania (3869 x g, 30 min), zawierającą 10% s.s. i niepoddawaną wstępnej obróbce hydrotermicznej, umieszczano w kolbie Erlenmeyera o pojemności 250 ml, a następnie dodawano enzym (pektynazę) w ilości 1 ml/10 g s.s. substratu. Całość inkubowano w temp. 45°C przez 24 h w łaźni wodnej z wytrząsaniem (250 rpm). Po

hydrolizie próby wirowano (3869 x g, 30 min), a uzyskany supernatant analizowano pod kątem zawartości cukrów (glukozy, galaktozy, arabinozy i ramnozy) oraz kwasów uronowych i następnie kierowano do dalszych badań.

Jako składniki kompleksu enzymów hydrolitycznych do hydrolizy wycierki wykorzystano: wybitnie termostabilną  $\alpha$ -amylazę Thermamyl 120L (Novozymes), pektynazę z *Aspergillus niger* (Pectinex® 3XL, Sigma Aldrich) oraz celulazę z *Trichoderma reesei* ATCC 26921 (Sigma Aldrich). Proces hydrolizy kompleksem enzymów prowadzono w celu usunięcia z wycierki całości materiału, jaki można przeprowadzić do roztworu w toku hydrolizy enzymatycznej, oraz uzyskania osadu wykorzystanego w toku dalszych etapów badań jako podłoże do hodowli *L. plantarum*. Przed procesem surowiec zagęszczano poprzez wirowanie (3869 x g, 30 min) do ok. 10% s.s, zgodnie z procedurą opisaną przez Lesieckiego i in. [2012]. W tym celu naważkę wycierki (30 g) umieszczano w kolbie Erlenmeyera o pojemności 250 ml, dodawano preparat Thermamyl 120L (0,3 ml/10 g s.s. substratu) i całość inkubowano w autoklawie w temp. 117°C, w czasie 10 min. W wyniku tego procesu do roztworu przechodziły oligoglukany, będące produktami hydrolizy resztek skrobi obecnych w wycierce. Następnie wycierkę schładzano i dodawano preparaty pektynazy oraz celulazy (dla obu preparatów w dawce 0,3 ml /10 g s.s. substratu). Całość inkubowano w temp. 45°C przez 24 h w łaźni wodnej z wytrząsaniem (250 rpm). Po zakończonym procesie próby wirowano (3869 x g, 30 min), a otrzymany osad wykorzystywano do dalszych badań (rysunek 1). Skład otrzymanych hydrolizatów oraz ich przydatność w procesie fermentacji etanolowej opisano w poprzednich pracach naszego zespołu [Lesiecki i in. 2012; Szymanowska i in. 2011].

Na podstawie oznaczeń: ilość wyekstrahowanej suchej substancji ( $m_e$ ) oraz ilość suchej substancji pozostałej w osadzie ( $m_o$ ) wyliczano wydajność procesu hydrolizy enzymatycznej (E) zgodnie ze wzorem:

$$E = \frac{m_e}{m_e + m_o} * 100\%$$

### **Mikroorganizmy i warunki hodowli**

W badaniach wykorzystywano probiotyczny szczep bakterii fermentacji mlekowej *Lactobacillus plantarum* z Kolekcji Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Szczep ten hodowano w warunkach względnie beztlenowych w temp. 30°C przez 48 h, bez regulacji pH. Jako podłoża doświadczalne stosowano:

- świeżą wycierkę,
- świeżą wycierkę z dodatkiem świeżego soku z ziemniaka w proporcji 1:1,
- świeżą wycierkę z dodatkiem hydrolizatu soku z ziemniaka w proporcji 1:1,
- frakcję ciekłą (supernatant) wycierki po hydrolizie pektynazą,
- frakcję stałą (osad) wycierki po hydrolizie kompleksem enzymów (pektynazą, amylazą i celulazą), zawieszoną w wodzie destylowanej w proporcji objętościowo-objętościowej 1:4.

Próba kontrolną były hodowle prowadzone w podłożu MRS (Biocorp), przeznaczone do hodowli bakterii kwasu mlekowego. Skład podłoża MRS przedstawiono w tabeli 1.

**Tabela 1.** Skład podłoża MRS  
*Composition of MRS medium*

Składnik	Stężenie [g/l]
Glukoza	20,00
Enzymatyczny hydrolizat kazeiny	10,00
Ekstrakt wołowy	8,00
Octan sodu	5,00
Ekstrakt drożdżowy	4,00
Fosforan dwupotasowy	2,00
Cytrynian amonowy	2,00
Tween-80	1,00
Siarczan magnezu	0,20
Siarczan manganu	0,05

Wszystkie podłoża przed zaszczepieniem  $10^4$  jtk/ml bakterii *L. plantarum* sterylizowano w temp.  $121^\circ\text{C}$  przez 20 min. W trakcie hodowli badano kinetykę wzrostu bakterii *L. plantarum* poprzez wykonywanie posiewów ilościowych metodą zalewową. Do oznaczeń liczebności badanych bakterii wykorzystywano podłoże MRS z 2% (v/v) agaru. Bakterie namnażano w temp.  $30^\circ\text{C}$  przez 72 h. Po inkubacji liczono otrzymane kolonie za pomocą automatycznego licznika kolonii (Easy Count 2) i na podstawie tych oznaczeń obliczano liczebność populacji badanych bakterii, którą wyrażano w jtk w przeliczeniu na 1ml podłoża.

### **Metody analityczne**

Stężenie cukrów (glukozy, galaktozy, arabinozy i ramnozy), kwasu galakturonowego oraz kwasu mlekowego oznaczano techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) na chromatografie cieczowym MERCK-HITACHI (zestaw: automatyczny podajnik prób MERCK-HITACHI L-7250, pompa MERCK-HITACHI L-7100 z detektorem RI

(MERCK-HITACHI L-7490). Do oznaczeń wykorzystywano kolumnę Aminex HPX-87H 300x7,8 mm (BIO-RAD). Jako eluent stosowano 0,001N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:acetonitryl (98,25:1,75) przy przepływie 0,5 ml/min, izokratycznie. Oznaczenia prowadzono w temperaturze 65°C. Próby nanoszono na kolumnę w ilości 30 µl. Identyfikacji jakościowej i ilościowej dokonano metodą standardu zewnętrznego z wykorzystaniem powierzchni pików (pomiar i integracja komputerowa z zastosowaniem Chromatography Data Station Software, MERCK-HITACHI).

## WYNIKI I DYSKUSJA

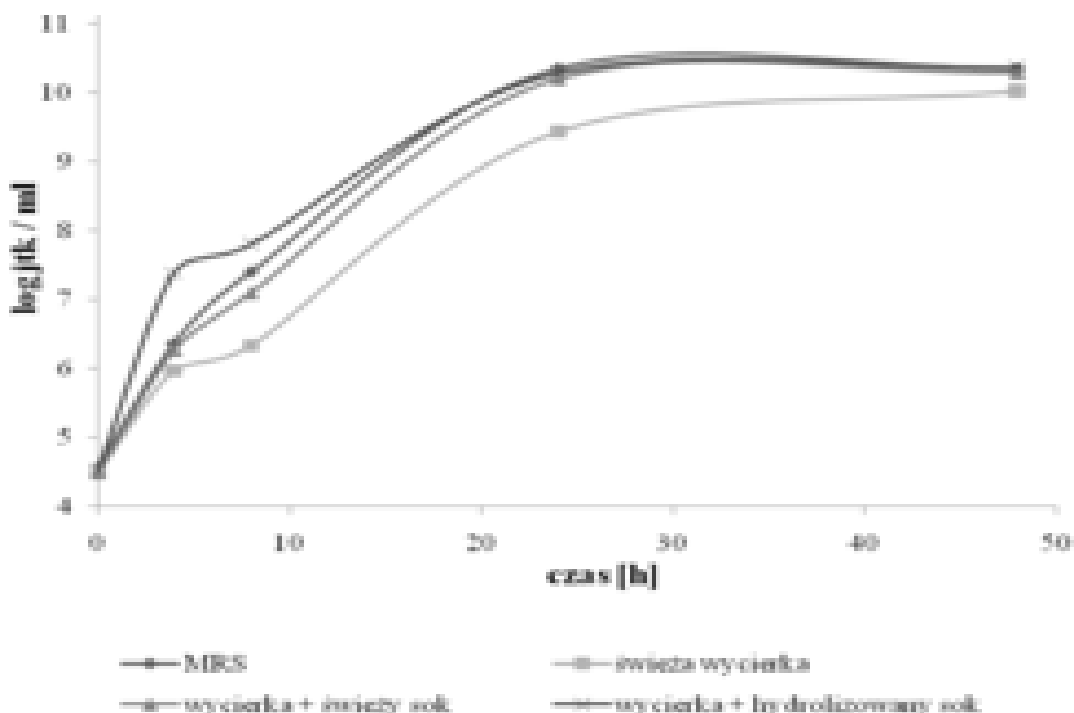
### *Hodowle w pożywkach na bazie świeżej wycierki*

Wycierka ziemniaczana dzięki luźnej strukturze i zawartości łatwo fermentowalnych heksoz jest dobrym środowiskiem dla rozwoju wielu grup mikroorganizmów, zwłaszcza bakterii beztlenowych i względnie beztlenowych [Mayer i Hillebrandt 1997]. W związku z tym jest ona produktem nietrwałym, szybko kolonizowanym m.in. przez bakterie fermentacji mlekowej. Pozwala to na wykorzystywanie jej jako surowca do otrzymywania kiszonek dla zwierząt [Sip i in. 2010]. Naturalnym zatem kierunkiem zagospodarowania wycierki i/lub produktów jej hydrolizy wydaje się wykorzystanie ich jako podłoży do hodowli bakterii fermentacji mlekowej, np. bakterii probiotycznych, tj. *L. plantarum* KBiMŻ LAB15. W pracy podjęto próbę zbadania ww. możliwości aplikacyjnych tych produktów odpadowych. W tym celu założono hodowle probiotycznego szczepu bakterii *L. plantarum* w pożywkach na bazie świeżej wycierki oraz wycierki, której skład uzupełniono dodatkowym źródłem azotu.

Przeprowadzone badania, których wyniki zamieszczono na rysunku 2, wykazały, że bakterie *L. plantarum* były zdolne do wzrostu w czystej świeżej wycierce. W ciągu 48 h hodowli liczebność ich populacji zwiększała się z 10<sup>4</sup> do 3,3\*10<sup>9</sup> jtk/ml. Maksymalne stężenie komórek tych bakterii było jednak o ok. 0,5 cykla logarytmicznego niższe od uzyskiwanego w komercyjnym podłożu MRS (rysunek 2).

W związku z tym, że bakterie fermentacji mlekowej mają duże wymagania pokarmowe, jednym z czynników ograniczających efektywność ich wzrostu może być niedobór związków mineralnych oraz przyswajalnych źródeł azotu. Z taką sytuacją mamy do czynienia w przypadku wykorzystywania surowca, jakim jest surowa wycierka ziemniaczana. Dlatego też skład wycierki uzupełniono limitującymi go związkami. Jako ich źródło wykorzystano sok z ziemniaka. Sok ten jest wysokobiałkowym produktem odpadowym powstającym, podobnie jak wycierka, przy produkcji skrobi. Przeprowadzone badania wykazały, że suplementacja

wycieki świeżym sokiem z ziemniaka wpłynęła korzystnie na efektywność wzrostu bakterii *L. plantarum*. Dzięki niej w trakcie prowadzonych hodowli uzyskiwano średnio aż  $6,3 \cdot 10^9$  jtk/ml badanych bakterii, czyli o ok. 0,4 cykla log więcej niż w hodowlach prowadzonych w samej wycierce. Ustalono jednocześnie, że maksymalne stężenie komórek *L. plantarum* w podłożu na bazie wycierki z dodatkiem soku z ziemniaka było porównywalne do otrzymywanego w hodowlach w standardowym podłożu MRS (rysunek 2).

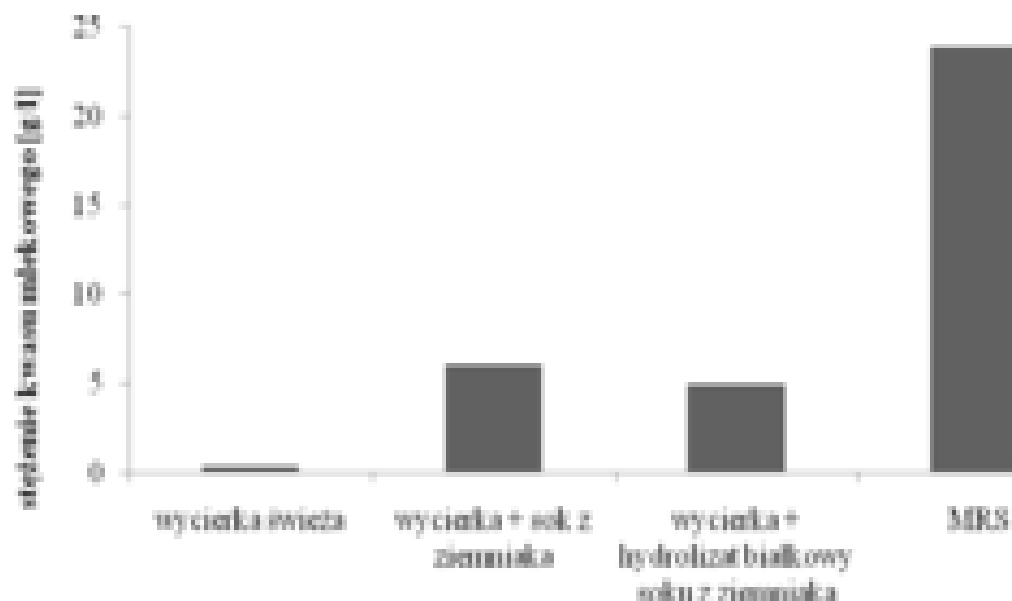


**Rysunek 2.** Kinetyka wzrostu *L. plantarum* na podłożach na bazie wycierki ziemniaczanej suplementowanej sokiem z ziemniaka  
*Kinetic of the growth of *L. plantarum* on potato pulp media supplemented with potato juice*

W celu poprawienia efektywności wzrostu bakterii *L. plantarum* do świeżej wycierki wprowadzono także enzymatyczny hydrolizat soku ziemniaczanego. Dodatek ten zawierał dobrze zhydrolizowaną frakcję białkową. Zwiększenie przyswajalności tej frakcji nie zwiększyło jednak finalnej koncentracji komórek badanych bakterii, zaobserwowano natomiast, że miało pozytywny wpływ na szybkość ich wzrostu (rysunek 2). Przyczyny tego zjawiska są aktualnie badane przez autorów.

Pomimo iż bakterie *L. plantarum* namnażały się w podłożach na bazie wycierki do wysokiej koncentracji, to produkowały one w nich znacznie mniej kwasu mlekowego niż w pożywce MRS (rysunek 3).





**Rysunek 3.** Synteza kwasu mlekowego przez bakterie *L. plantarum* wzrastające w różnych podłożach na bazie wycierki ziemniaczanej suplementowanej sokiem z ziemniaka  
*Lactic acid synthesis by *L. plantarum* cultivated on potato pulp media supplemented with potato juice*

Stężenie kwasu mlekowego w podłożach zawierających wycierkę suplementowaną dodatkowymi źródłami azotu po zakończeniu hodowli mieściło się w przedziale od 5,1 do 6,2 g/l, podczas gdy w pożywce MRS wynosiło aż 24,8 g/l. W przypadku hodowli prowadzonych w podłożu zawierającym wyłącznie wycierkę, ilość produkowanego kwasu mlekowego była jeszcze niższa i wynosiła 0,1 g/l. Inne oznaczone w pracy metabolity *L. plantarum* występowały w płynach pochodzących w stężeniu nieprzekraczającym 0,2 g/l.

### ***Hodowle w pożywkach na bazie produktów enzymatycznej hydrolizy wycierki***

#### Hydrolizat pektynazowy

Wycierka ziemniaczana ze względu na swój skład, właściwości fizykochemiczne i strukturę jest atrakcyjnym substratem do produkcji bioetanolu. Zgodnie z danymi literaturowymi polimery tworzące wycierkę są zbudowane z: glukozy – 51,4%, galaktozy – 14,6%, arabinozy – 3,7%, ramnozy – 0,8% oraz kwas galakturonowego – 15% [Turquois i in. 1999]. Przeprowadzenie wybiórczej hydrolizy frakcji pektynowej stanowi potencjalnie najefektywniejszy sposób obróbki wstępnej kompleksu wycierki ziemniaczanej. Usunięcie tworzących ją łańcuchowych polimerów kwasu galakturonowego – całkowicie nieprzydatnych w fermentacji etanolowej – pozwala na rozluźnienie struktury surowca i prawie całkowite technologiczne wykorzystanie cukrów, a co za tym idzie – zwiększa

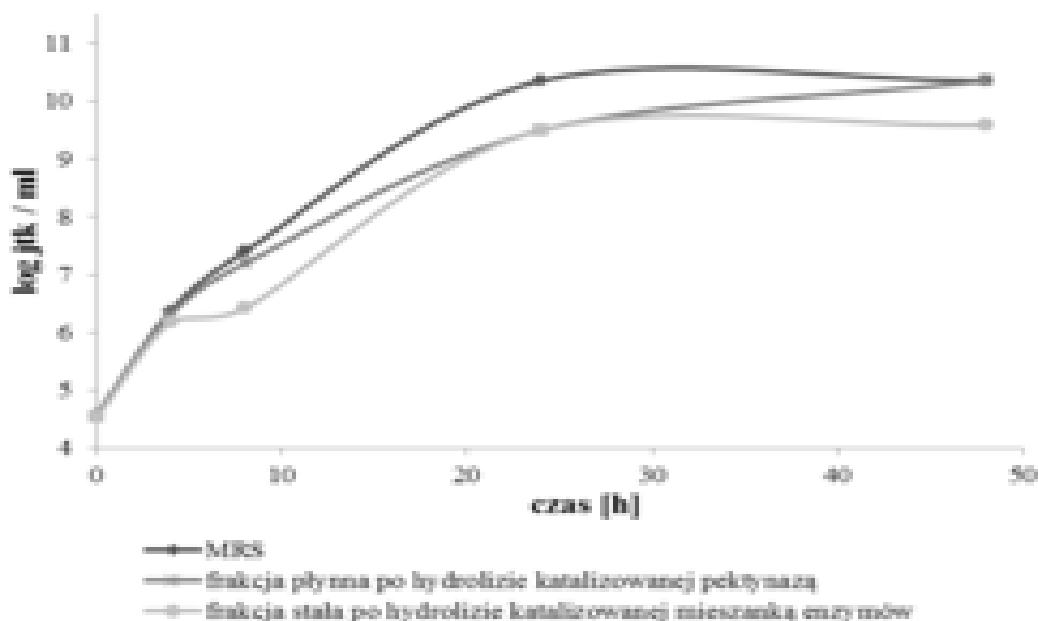
opłacalność produkcji bioetanolu. W wyniku przeprowadzenia w ramach niniejszej pracy selektywnej hydrolizy frakcji pektynowej wycierki ziemniaczanej, po 24h do frakcji rozpuszczalnej przeprowadzone zostało aż 33% s.s. surowca.

**Tabela 2.** Udział poszczególnych monomerów cukrowych w s.s. frakcji płynnej po procesie hydrolizy pektynazą  
*Content of sugar monomers in liquid phase after pectinolysis process*

<b>Składnik</b>	<b>Udział</b>
Galaktoza	36%
Kwas galakturonowy	27%
Glukoza	23%
Arabioza	6%
Ramnoza	5%
Inne	3%

W składzie otrzymanej frakcji ciekłej (tabela 2) dominowały galaktoza, kwas galakturonowy i glukoza. Występowały tam też niewielkie ilości arabinozy i ramnozy. Wykorzystanie takiego surowca do produkcji etanolu może nie być efektywne ekonomicznie, ponieważ łatwo fermentowalne heksozy stanowią w nim niespełna 60%, a prawie 30% to całkowicie nieprzydatne kwasy uronowe. Z drugiej strony usunięcie z wycierki tak dużej części heksoz obniża efektywność produkcji bioetanolu z tego surowca. Niemniej jednak zmiany strukturalne, zachodzące w wycierce w toku pektynolizy, należy uznać za bardzo korzystne. Dzięki usunięciu frakcji pektynowej nastąpiło bowiem znaczne zmniejszenie objętości wycierki, a to z kolei umożliwia uzyskanie wyższego stężenia cukrów fermentujących w dalszych etapach hydrolizy.

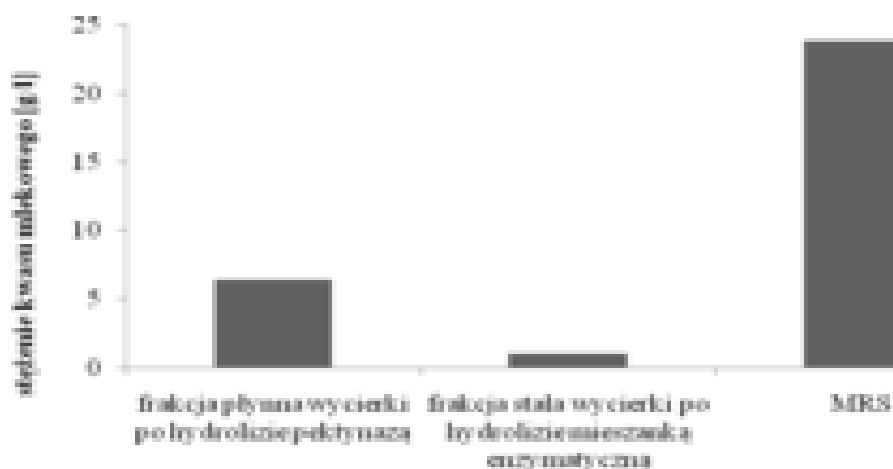
Za pomocą opisanego powyżej hydrolizatu badane bakterie namnażały się do poziomu  $7,1 \cdot 10^9$  jtk/ml (rysunek 4).



**Rysunek 4.** Kinetyka wzrostu *L. plantarum* na podłożach na bazie hydrolizatów wycierki ziemniaczanej  
*Kinetic of the growth of *L. plantarum* on potato pulp hydrolysates*

Poziom ten był porównywalny do otrzymywanego w podłożu MRS, czyli podłożu rekomendowanym do hodowli bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. Podłoże będące frakcją płynną wycierki poddanej hydrolizie pektynazą zawierało mniej składników odżywczych w stosunku do świeżej niesuplementowanej wycierki, mimo to pozwalało ono na namnożenie się bakterii *L. plantarum* do 4-krotnie wyższego poziomu (rysunek 4). Spowodowane to było prawdopodobnie różnicami jakościowymi w składzie substratów (źródeł węgla), które w przypadku hydrolizatu pektynazowego stanowiły łatwo przyswajalne monomery (tabela 2). W przypadku wycierki źródłem węgla dla *L. plantarum* były substancje wysokocząsteczkowe, do których przyswojenia bakterie musiały uruchomić odpowiedni aparat enzymatyczny, co przekładało się na zużycie przez nie dodatkowej energii. Ponadto działanie enzymów pektynazowych sprowadzać się mogło do degradacji kompleksu protopektyn, to jest frakcji pektyn związanych z innymi substancjami, np. białkami [Tajner-Czopek i in. 2003]. Stanowią one w ziemniaku znaczący udział [Gołubowska, Lisińska 2005], dlatego też proces hydrolizy dostarczył bakteriom dodatkowych składników odżywczych. Miało to najprawdopodobniej bezpośredni wpływ na wzrost ich liczebności mimo ograniczonego dostępu do źródła węgla w pożywce. W przypadku hydrolizatu pektynazowego niska zawartość składników pokarmowych przełożyła się na niską wydajność syntezy pozakomórkowych metabolitów *L. plantarum*. Stwierdzono, że w mieszaninie

pohodowlanej jedynym produktem biosyntezy badanych bakterii, który występował w stężeniu powyżej 0,2 g/l, był kwas mlekowy (rysunek 5).



**Rysunek 5.** Synteza kwasu mlekowego przez bakterie *L. plantarum* wzrastające w różnych podłożach na bazie hydrolizatów wycierki ziemniaczanej  
*Lactic acid synthesis by L. plantarum cultivated on potato pulp hydrolysates*

#### Osad po hydrolizie kompleksem enzymatycznym

Kompleksowe zagospodarowanie wycierki, mające na celu głównie produkcję bioetanolu, wymaga przeprowadzenia degradacji biopolimerów tworzących ten surowiec. Pomimo luźnej i uwodnionej struktury wycierka nie jest jednak w pełni hydrolizowana do cukrów prostych i kwasów organicznych, nawet z zastosowaniem kompleksu enzymów hydrolitycznych o różnych aktywnościach [Lesiecki i in. 2010; Szymanowska i in. 2011]. Celowe było więc ustalenie, czy wycierka pozbawiona substancji podatnych na hydrolizę enzymatyczną mogłaby być efektywnie wykorzystana, np. do namnażania bakterii fermentacji mlekowej. Substrat taki powstaje w wyniku kolejno przeprowadzonych etapów wstępnej obróbki hydrotermicznej, a następnie hydrolizy mieszaniną enzymów amylolytycznych, pektynolitycznych oraz celulozytycznych [Białas i in. 2010; Lesiecki i in. 2010]. W wyniku przeprowadzenia wstępnej obróbki hydrotermicznej, a następnie hydrolizy wycierki ziemniaczanej z wykorzystaniem kompleksu enzymów amylolytycznych, pektynolitycznych oraz celulozytycznych, po 24 h doszło do uwolnienia ok. 90% s.s. surowca. Otrzymana w ten sposób frakcja osadu wycierki okazała się atrakcyjnym podłożem do hodowli bakterii *L. plantarum*, które namnażały się w nim w sposób zbliżony jak w przypadku świeżej wycierki, tj. do poziomu ok.  $1,2 \cdot 10^9$  jtk/ml (rysunek 4). Działo się tak nawet pomimo usunięcia z surowca wszystkich składników odżywczych podatnych na hydrolizę kompleksem przemysłowych preparatów enzymatycznych. Związane jest to

najprawdopodobniej z tym, że w warunkach ograniczonego dostępu do substancji odżywczych bakterie *L. plantarum* konwertują obecne w środowisku, nierozpuszczalne biopolimery do łatwo przyswajalnych monomerów, bardziej efektywnie niż komercyjne preparaty enzymatyczne. Potwierdza to również fakt, iż gatunek *Lactobacillus plantarum* zdolny jest do wzrostu również na innych odpadach roślinnych, np. otrębach pochodzących z przerobu ziarna pszenicy, stanowiących kompleks ksylanu, skrobi i białka [Dallagnol i in. 2013]. Szczególnie ważna wydaje się zdolność tych bakterii do syntezy i sekrecji enzymów degradujących właśnie białka, tj. proteaz [Khalid i Marth, 1990]. Molekuły te związane są bowiem nie tylko z macierzą pektyn [Tajner-Czopek i in. 2003], lecz także z hemicelulozą, tworząc wraz z nią barierę utrudniającą dostęp enzymów hydrolitycznych do celulozy i degradację tej frakcji do cząsteczek glukozy. Ich usunięcie zwiększa zatem efektywność hydrolizy biopolimeru [Pei i in. 2010]. Ponadto ustalono, że w płynach otrzymanywanych po hodowlach prowadzonych w osadzie wycierki poddanej obróbce kompleksem enzymów stężenie kwasu mlekowego było wyższe niż w surowej wycierce. Wynosiło ono 0,9 g/l, podczas gdy w surowej wycierce zaledwie 0,1 g/l (rysunek 5). Wzrost produkcji tego metabolitu był prawdopodobnie skutkiem usunięcia z wycierki, w toku zastosowanej obróbki, szeregu substancji o potencjalnym działaniu inhibującym.

## WNIOSKI

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że odpady przemysłu ziemniaczanego, tj. wycierka i sok z ziemniaka, mogą być wykorzystywane jako składniki podłoża do hodowli probiotycznych bakterii *L. plantarum*, przy czym:

- maksymalne stężenie komórek tych bakterii, wzrastających na świeżej niewzbogaconej wycierce, było o ok. 0,5 cykła logarytmicznego niższe od uzyskiwanego w komercyjnym podłożu MRS rekomendowanym do hodowli bakterii z rodzaju *Lactobacillus*;
- zastosowanie jako podłoża świeżej wycierki wzbogaconej sokiem z ziemniaka lub jego hydrolizatem pozwoliło na uzyskanie liczebności bakterii *L. plantarum* na poziomie uzyskiwanym na podłożu MRS;
- frakcja ciekła powstała w wyniku hydrolizy wycierki pektynazą umożliwiała szczególnie efektywne namnażanie bakterii *L. plantarum*;
- frakcja stała pozostająca po hydrolizie kompleksem enzymów okazała się podobnie atrakcyjnym podłożem do hodowli tych mikroorganizmów jak świeża wycierka;

- mimo wysokiej efektywności wzrostu aktywność metaboliczna *L. plantarum* w podłożach zawierających wycierkę ziemniaczaną oraz produkty jej przetwarzania była znacznie niższa niż w podłożu MRS.

## PIŚMIENNICTWO

1. Bardowski J. (2006). Żywią i bronią. *Academia*, 4 (8), 34-35
2. Białas W., Lesiecki M., Leja K., Lewandowicz G. (2010). Produkcja bioetanolu z wycierki ziemniaczanej. Ocena przydatności obróbki hydrotermicznej do wstępnego przetwórstwa. *Zesz. Nauk. Post. Nauk Rol.*, 557, 467-477
3. Celka K. (2011). Hydroliza enzymatyczna soku ziemniaczanego w recyrkulacyjnym reaktorze membranowym wyposażonym w ceramiczną jednostkę separacyjną. Praca magisterska, UP w Poznaniu
4. Dallagnol A. M., Pescuma M., De Valdez G. F., Rollán G. (2013). Fermentation of quinoa and wheat slurries by *Lactobacillus plantarum* CRL 778: proteolytic activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97(7), 3129-3140
5. Gołubowska, Lisińska. (2005). Zmiany tekstury i zawartości związków pektynowych w ziemniakach podczas produkcji frytek. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 1 (42), 63-70
6. Gomes A. M. P., Malcata F. X. (1999). *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends Food Sci. Tech.*, 10, 139-157
7. Hansen M. A. T., Hidayat B. J., Mogensen K. K., Jeppesen M. D., Jørgensen B., Johansen K. S., Thygesen L. G. (2013). Enzyme affinity to cell types in wheat straw (*Triticum aestivum* L.) before and after hydrothermal pretreatment. *Biotechnol. Biofuels.*, 6, 54
8. Khalid N. M., Marth E. H. (1990). Proteolytic Activity by Strains of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei*. *J. Dairy Sci.*, 73 (11), 3068-3076
9. Lesiecki M., Białas W., Lewandowicz G. (2012). Enzymatic hydrolysis of potato pulp. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.*, 11 (1), 53-59

10. Lewandowicz G., Kowalczewski P., Białas W., Olejnik A., Rychlik J. (2012). Rozdział frakcji soku ziemniaczanego różniących się masą cząsteczkową i charakterystyka ich aktywności biologicznej. *Biuletyn IHAR*, 266, 331-344
11. Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z. (2008). *Mikrobiologia techniczna*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
12. Mayer F., Hillebrandt J. O. (1997). Potato pulp: microbiological characterization, physical modification and application of this agriculture waste product. *Appl. Microbiol. Biot.*, 48, 435-440
13. Miedzianka J., Pęksa A., Smolarczyk E. (2010). Zastosowanie przemysłowego soku ziemniaczanego do otrzymywania preparatów białka arylowanego. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, 557, 261-273
14. Oda Y., Saito K., Yamauchi H., Mori M. (2002). Lactic Acid Fermentation of Potato Pulp by the Fungus *Rhizopus oryzae*. *Curr. Microbiol.*, 45, 1-4
15. Pastuszewska B., Taciak M., Tuśnio A. (2007). Koncentrat białka ziemniaczanego w żywieniu zwierząt monogastrycznych. *Post. Nauk Rol.*, 5, 91-106
16. Pei H. Y., Hu W. R., Liu Q. H. (2010). Effect of protease and cellulase on the characteristic of activated sludge. *J. Hazard. Mater.*, 178 (1-3), 397-403
17. PN-75/A-04018:1975/Az3:2002. Produkty rolniczo-żywniowe. Oznaczanie azotu metodą Kjeldahla i przeliczenie na białko
18. Rytel E. (2010). Wybrane substancje odżywcze i antyżywniowe ziemniaka i zmiany ich zawartości podczas przetwarzania na produkty spożywcze. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, 557, 43-61
19. Saito K., Noda T., Tsuda S., Mori M., Hasa Y., Kito H., Oda Y. (2006). Effect of the dates of extraction on the quality of potato pulp. *Bioresource Technol.*, 97, 2470-2473
20. Sip A., Olejnik-Schmidt A., Sawicka E., Kubiak M., Lewandowicz G. (2010). Charakterystyka autochtonicznej mikroflory wycierki ziemniaczanej. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, 557, 455-466
21. Sip A., Grajek W. (2010). Probiotics and Prebiotics. W: *Functional food product development*. Red. Smith J., Charter E., Wiley-Blackwell Ltd., Publication, United Kingdom, 8, 146-177

22. Szymanowska D., Drożdżyńska A., Lewandowicz G. (2011). Wycierka ziemniaczana jako surowiec do produkcji bioetanolu. *Zesz. Nauk. UE w Poznaniu*, 206, 234-242
23. Tajner-Czopek A., Kita A., Rytel E., Gołubowska G. (2003). Zawartość polisacharydów nieskrobiowych i ligniny w bulwach ziemniaka o różnej długości okresu wegetacyjnego. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, 489, 291-299
24. Tardioli P. W., Pedroche J., Raquel L. C., Giordano R. L. C., Fernández-Lafuente R., Guisán J. M. (2003). Hydrolysis of Proteins by Immobilized-Stabilized Alcalase-Glyoxyl Agarose. *Biotechnol Progr*, 19, 352-360
25. Turquois T., Rinaudo M., Taravel F. R., Heyraud A. (1999). Extraction of highly gelling pectic substances from sugar beet pulp and potato pulp: influence of extrinsic parameters on their gelling properties. *Food Hydrocolloid.*, 13, 255-262
26. Tuśnio A., Pastuszewska B., Swiech E., Taciak M. (2011). Response of young pigs to feeding potato protein and potato fibre – nutritional, physiological and biochemical parameters. *J. Anim. Feed Sci.*, 20 (3), 361-378
27. Yunoki K., Musa R., Kinoshita M., Tazaki H., Oda Y., Ohnishi M. (2004). Presence of higher alcohols as ferulates in potato pulp and its radical-scavenging activity. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 68 (12), 2619-2622