



## Wykorzystanie chromatografii membranowej do odzyskiwania białek aktywnych biologicznie z odpadów przemysłu skrobiowego

*Marta Markiewicz<sup>\*</sup>, Agnieszka Przewodowska<sup>\*\*</sup>,  
Włodzimierz Przewodowski<sup>\*\*</sup>, Wioleta Stochła<sup>\*\*</sup>*

*<sup>\*</sup>Uniwersytet, Brema, Niemcy,  
Centrum Badan nad Środowiskiem  
i Zrównoważonych Technologii*

*<sup>\*\*</sup>IHAR – PIB, Zakład Nasiennictwa  
i Ochrony Ziemiaka, Bonin*

### 1. Wstęp

Skrobiowe odpady przetwórcze, produkowane obecnie w dużych ilościach, zawierają wiele substancji wysokowartościowych nadających się do dalszego użytku [15]. Jak podaje Bennett, zakład przetwórstwa ziemniaka na skrobię „Emskland – Stärke” w pobliżu Weitzendorfu (Niemcy) w ciągu półrocznej kampanii produkcyjnej generuje około 600 000 m<sup>3</sup> płynnych odpadów [6]. W krajach Unii Europejskiej każdego roku wytwarzanych jest około 2 milionów ton wód sokowych zawierających białka, aminokwasy i cukry [46]. Ponieważ odpady przemysłu skrobiowego charakteryzują się bardzo wysokim wskaźnikiem biologicznego i chemicznego zapotrzebowania na tlen (odpowiednio do 26 g O<sub>2</sub>/dm<sup>3</sup> i do 77 g O<sub>2</sub>/dm<sup>3</sup>), przy jednocześnie wysokim uwodnieniu, ich utylizacja stanowi poważny problem technologiczny [20]. Przy zastosowaniu odpowiedniej technologii, materiał odpadowy może służyć jako półprodukt, składnik innego produktu lub surowiec w kolejnym procesie produkcyjnym. Wiele wartościowych substancji w przetwórstwie żywności może być oddzielonych i odzyskanych na końcu procesu produkcyj-

nego, chociaż obecnie stosowane procesy separacji i recyklingu nie zawsze są wystarczająco korzystne ekonomicznie [21].

Podczas produkcji skrobi ziemniaczanej powstają trzy rodzaje odpadów organicznych: sok ziemniaczany, woda sokowa i wycierka. Sok ziemniaczany zawiera około 2% związków azotowych, z czego jak podaje Shoenbeck i in. (2013) 50% stanowią inhibitory proteaz, 40% patatyna i 10% białka takie jak lektyny, kinazy i fosforylasy [2, 32, 35, 36]. Woda sokowa jest dziesięciokrotnie rozcieńczonym sokiem ziemniaczanym powstającym podczas rafinacji mlecza skrobiowego. Wycierka z kolei zawiera głównie skrobię związaną, czyli znajdującą się we wnętrzu nieuszkodzonych komórek oraz nie krochmalowe substancje nierozpuszczalne, głównie fragmenty ścian komórkowych. Ponadto w procesie produkcyjnym powstają wody brudne pochodzące z procesów mycia i transportu ziemniaków. Stanowią około 96% wszystkich zanieczyszczeń i zawierają niewielkie ilości materii organicznej. Wody te poddaje się sedymentacji. Uzyskany osad wykorzystywany jest w rolnictwie, natomiast woda jest poddawana klarowaniu i wykorzystywana ponownie [29].

### **1.1. Strategie utylizacji wody sokowej**

Przez wzgląd na niską zawartość suchej masy, woda sokowa tradycyjnie wykorzystywana była do użyźniających zalewów upraw rolniczych lub łąk [29]. Z powodu znikomej aktywności biologicznej gleby w niskich temperaturach, poza sezonem wegetacyjnym, wody sokowe nie mogły być wylewane na pola przez znaczną część czasu trwania kampanii produkcyjnej. Z tego względu oraz z uwagi na coraz ostrzejsze wymagania dotyczące ochrony środowiska w Unii Europejskiej ta metoda ma obecnie ograniczone zastosowanie [46]. Wody sokowe wykorzystywane są również, jako źródło paszy białkowej. Odzyskiwanie białek poprzez termiczną koagulację lub strącanie w punkcie izoelektrycznym pozwala na uzyskanie preparatu zawierającego do 85% białek. Pozyskanie takiego preparatu wymaga wieloetapowego procesu obróbki odpadów pokrochmalniczych, którego przeprowadzanie w celu uzyskania produktu o stosunkowo niskiej wartości ekonomicznej, nie jest w pełni uzasadnione. Ponadto zawartość w odpadzie toksycznych glikoalkaloidów [31, 39], jest kluczowym parametrem decydującym o możliwości zastosowania takiego preparatu w żywieniu zwierząt. Zastosowanie techniki koagulacji kwasowo-termicznej pozwala na uzyskanie produktu o zmniejszonej za-

wartości glikoalkaloidów ale otrzymany w ten sposób produkt cechuje się niską jakością [30, 38]. Wydajność paszowa wynosi około 600 kg białka z 1000 t ziemniaków [7, 28]. W celu uzyskania białek o lepszej rozpuszczalności niż przy koagulacji termicznej próbowano stosować precypitację z wykorzystaniem bentonitu i karboksymetylocelulozy. Jednakże problemem okazało się usuwanie sorbentu z preparatu po zakończonym procesie [38]. Odpad krochmalniczy może zostać wykorzystany do produkcji pożywek dla mikroorganizmów konwertujących zawartą w niej skrobię do użytecznych produktów. Hodowla *Aureobasidium pullulans* poprzedzona enzymatyczną i termiczną obróbką odpadu krochmalniczego umożliwia uzyskanie pullulanu. Proces przygotowania pożywki wymaga upłynnienia odpadu w wysokiej temperaturze i w obecności  $\alpha$ -amylazy, a następnie dodatku dwóch kolejnych enzymów (pullulanazy i aminoglukozydazy lub pullulanazy i  $\beta$ -amylazy). Ze względu na wieloetapowość i konieczność stosowania kosztownych preparatów enzymatycznych strategia ta nie wydaje się być wystarczająco korzystną ekonomicznie [5]. Jeżeli wytwarzany z odpadów produkt jest wysokowartościowy w sensie ekonomicznym, wielostopniową obróbkę bądź izolację można uznać za uzasadnioną. W przeciwnym wypadku preferowane są nieskomplikowane metody przetwarzania. Huang i in. (2005) wyprodukowali kwas mlekowy przy zastosowaniu szczepów grzybów *Rhizopus oryzae* i *Rhizopus arrhizus* wykorzystując zdolność tych organizmów do jednoczesnej sacharyfikacji skrobi i fermentacji powstałych cukrów używając pożywki, której głównym składnikiem była woda sokowa [14]. Produkcja kwasu mlekowego z odpadów skrobiowych charakteryzowała się jednak niższą wydajnością, niż produkcja ze sztucznie spreparowanej pożywki zawierającej skrobię rozpuszczalną. Ponadto efektywność procesu była zależna w znacznym stopniu od zawartości skrobi w wodzie sokowej. Niska zawartość, do której dążą zakłady przetwórstwa skrobiowego, powoduje uzyskiwanie niskiego stężenia kwasu mlekowego i sprawia, że jego izolacja staje się niskoopłacalna. Z kolei wysoka zawartość skrobi powoduje, że w medium hodowlanym gromadzi się duża ilość cukrów prostych, głównie glukozy, które wpływają hamująco na proces fermentacji [26]. Wytworzony kwas mlekowy może być stosowany, jako monomer w przemyśle spożywczym i tekstylnym lub polimeryzowany do kwasu polimlekowego wykorzystywanego obecnie, jako tzw. biopolimer do produkcji opakowań biodegradowalnych.

Kwas mlekowy podobnie jak pullulan, nie należy do produktów wysokowartościowych, jednakże na korzyść tej strategii przemawia stosunkowo prosta metoda jego pozyskiwania [9, 14, 23]. Odpady z przemysłu skrobiowego mogą także stanowić substrat do produkcji alkoholu. W celu przeprowadzenia fermentacji należy najpierw dokonać hydrolizy – kwasowej lub enzymatycznej – skrobi do cukrów prostych. Konieczność przeprowadzenia hydrolizy komplikuje proces i podnosi jego koszty [26]. Istnieje możliwość połączenia obu etapów poprzez zastosowanie enzymatycznej hydrolizy oraz fermentacji z udziałem żywych mikroorganizmów. Abouzied i Reddy (1986) przeprowadzili kokultywację produkującego enzymy amylolityczne *Aspergillus niger* oraz przeprowadzających fermentację alkoholową *Saccharomyces cerevisiae* uzyskując etanol w stężeniu powyżej 96% teoretycznego maksimum [1]. Udowodniono również wysoką efektywność jednoczesnej produkcji acetonu, butanolu i etanolu w procesie fermentacji sztucznego ścieku krochmalniczego przez *Clostridium acetobutyricum*. Jednakże problematyczną okazała się izolacja tych substancji z medium hodowlanego. Badań nad zastosowaniem tej strategii w utylizacji odpadów rzeczywistych nigdy nie przeprowadzono [11]. W procesie fermentacji płynnych odpadów poskrobiowych można otrzymywać również enzymy, które po oczyszczeniu mogłyby stanowić produkt handlowy. Wykorzystując *Aspergillus oryzae* wzrastający na pożywce, której głównym składnikiem była woda sokowa z krochmalni przetwarzających kukurydzę i pszenicę, uzyskano enzymy amylolityczne oraz biomasę grzybową. Ilość otrzymanych  $\alpha$ -amylaz wynosi 55 EU/ml po zaledwie 12 godzinnej fermentacji [15]. W podobny sposób, z wykorzystaniem *Rhizopus oligosporus*, uzyskano glukoamylazę oraz biomasę [16]. Z uwagi na fakt, iż enzymy należą do produktów o wysokiej wartości, ich produkcja jest zdecydowanie korzystną strategią utylizacji odpadów przemysłowych. Ponadto pozyskiwana, jako produkt drugorzędowy biomasa grzybowa, jest bogata w białko o wysokiej wartości odżywczej i może być dalej przetwarzana na paszę lub dodatek do żywności dla ludzi [15–17]. Możliwe jest również pozyskiwanie wodoru ze skrobi na drodze fermentacji beztlenowej. Zhang i in. (2003) wykorzystali skrobię ziemniaczaną zawieszoną w medium mineralnym, które następnie inokulowano mikroorganizmami pochodzącymi ze zbiorników oczyszczających ściek bogaty w sacharozę. Uzyskany biogaz był wolny od metanu i zawierał do 60% wodoru oraz

dwutlenek węgla. Maksymalna wydajność produkcji wynosiła  $92 \text{ cm}^3 \text{ H}_2/\text{g}$  skrobi ( $\sim 17\%$  teoretycznego maksimum), przy zastosowaniu fermentacji w temperaturze  $55^\circ\text{C}$  [44]. Lay (2000) uzyskał aż  $270 \text{ cm}^3 \text{ H}_2/\text{g}$  skrobi stosując o 30% wyższą zawartość skrobi w medium hodowlanym, niższą temperaturę ( $37^\circ\text{C}$ ) oraz inokulację mikroorganizmami przystosowanymi do produkcji wodoru z materiału o wysokiej zawartości organicznych odpadów stałych [23]. Oba te procesy zostały jednak wykonane z wykorzystaniem czystej chemicznie skrobi, jako substratu. Nie przeprowadzono, jak dotąd, podobnego procesu z wykorzystaniem wody sokowej powstającej w krochmalniach. Dostępne są natomiast dane na temat wytwarzania wodoru z wód sokowych o zbliżonym składzie powstających przy cięciu ziemniaków. Efektywność pozyskiwania wodoru wynosiła  $100 \text{ cm}^3 \text{ H}_2/\text{g}$  skrobi, przy parametrach uzyskanego gazu zbliżonych do poprzednich [10].

## **1.2. Podstawowe metody utylizacji wycierki ziemniaczanej**

Rozważano możliwość spalania stałych odpadów krochmalniczych osobno lub łącznie z węglem kamiennym, jednakże strategia taka nie została przyjęta w praktyce ze względu na niską wartość kaloryczną takiej mieszanki, dużą zawartość wody i powstawanie odorów przy spalaniu. Doprowadziło to do prób stworzenia alternatywnych strategii wykorzystania odpadów krochmalniczych jak np. użycie jako materiał budowlany lub do produkcji biogazu [44]. Wysuszona pulpa ziemniaczana zawiera do 30% pektyn i może być dobrym ich źródłem wykorzystywanym w przemyśle spożywczym. Żelujące właściwości pektyn są obecnie wykorzystywane w produkcji galaretek, dżemów, produktów mleczarskich, napojów, ciast i słodczy. Ponadto z odpadów ziemniaczanych na drodze fermentacji można wytwarzać substancje aromatyczne wykorzystywane do produkcji piwa, w piekarnictwie oraz w przemyśle tekstylnym. Na drodze fermentacji można z odpadów ziemniaczanych wytworzyć również butanol lub aceton [22]. Prowadzone są również próby hydrolizy enzymatycznej wycierki ziemniaczanej w celu pozyskania preparatów białkowych [18].

Jedną z technik mogących znaleźć swoje zastosowanie w procesie utylizacji odpadów przemysłu skrobiowego jest technika oparta na wykorzystaniu chromatografii membranowej. Chromatografia membranowa w porównaniu z tradycyjnie stosowanymi złożami chromatograficznymi

cechuje się wieloma zaletami. Pierwszą z nich jest możliwość prowadzenia procesu przy dużych prędkościach przepływu, gdyż zdolność wiązania membrany nie ulega zmianie przy prędkości 10–100 ml/min. Nie obserwuje się również niekorzystnych zjawisk takich jak ciśnienie wsteczne i zbijanie się złoża podczas procesu. Samo przygotowanie membrany do pracy trwa kilka minut, a jej praca charakteryzuje się wysoką powtarzalnością i możliwością przeprowadzenia wielu następujących po sobie cykli. Główną zaletą tego typu chromatografii jest też wysoka efektywność wiązania dużych biomolekuł, takich jak cząsteczki białek. Duża porowatość membran pozwala cząsteczkom w roztworze swobodnie dyfundować do wnętrza membrany i wiązać się z określonymi grupami funkcyjnymi.

Celem badań było dokonanie oceny możliwości zastosowania membranowych jednostek filtracyjnych do odzyskiwania aktywnych biologicznie białek z produktu odpadowego, jakim jest wycierka ziemniaczana.

## **2. Materiały i metody**

Materiałem użytym do badań była wycierka ziemniaczana – półpłynna masa składająca się głównie z fragmentów ścian komórkowych. Wycierka pochodziła z Przedsiębiorstwa Przemysłu Ziemniaczanego „Nowamyl” w Łobzie. Świeżą wycierkę pobierano z linii produkcyjnej, odwirowywano z prędkością 2500–3000 obr/min i przechowywano zamrożoną w 1 kg porcjach w workach z tworzywa sztucznego.

### **2.1. Izolacja białek z wycierki**

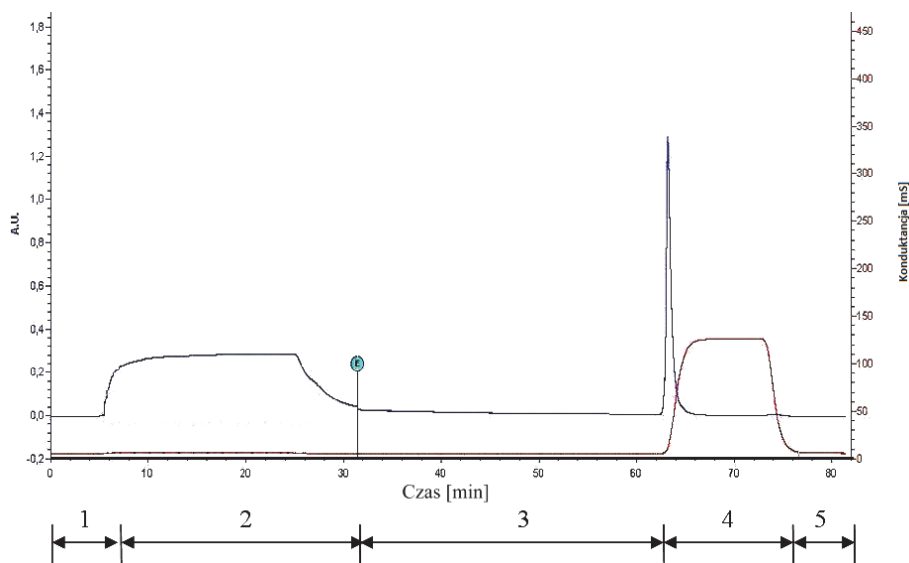
Rozmrożoną w temperaturze pokojowej wycierkę odciskano, wazono, dzielono na 1kg porcje i ekstrahowano przez noc buforem ekstrakcyjnym (1,5 M octan wapnia + 0,1% 2-Merkaptoetanol) stosując 500 ml buforu na każdy kilogram odcisniętej wycierki. Po ekstrakcji mieszaninę wirowano z prędkością 3000 obr/min, uzyskując średnio 750 ml cieczy z kilograma ekstrahowanego materiału. W przypadku ekstrakcji większych partii materiału uzyskane ekstrakty łączono i dializowano przez 24 godziny w 8°C wobec 50-krotnej objętości 20 mM buforu fosforanowego pH = 7,5 zmieniając bufor dializacyjny co 8 godzin. Dializę prowadzono w workach dializacyjnych o punkcie odcięcia 3000 MWCO.

## **2.2. Rozdział chromatograficzny ekstraktu białkowego**

Do izolacji białek wykorzystano membrany jonowymienne z firmy Sartorius AG. Zastosowano moduł z kationowymieniaczem wypełnionym membraną Q oraz moduł z anionowymieniaczem zawierający membranę S. Białka izolowano poprzez wielokrotne przepuszczanie preparatu białkowego przez moduły z użyciem chromatografu niskociśnieniowego FPLC, Bio-Rad. Każdy cykl izolacji białek z ekstraktu na membranach jonowymiennych składał się z pięciu etapów. W celu zapewnienia optymalnych warunków do wiązania białek moduł zawierający membranę jonowymienną równoważono przepuszczając 50 ml buforu wiążącego (20mM bufor fosforanowy pH = 7,5) z prędkością 3 ml/minutę. W drugim etapie przebiegającym z prędkością 1 ml/min następowało wiązanie białek do jonowymiennej membrany oraz wypływ niezwiązanych białek (rysunek 1 etap 2). Etap wiązania jest kluczowy dla rozdziału białek i efektywności procesu oczyszczania, dlatego prowadzono go z mniejszą prędkością by zapewnić jak najlepsze warunki i możliwość kontaktu białek z matrycą membrany. W trzecim etapie następowało oczyszczanie membrany z niezwiązanych białek, buforem wiążącym z prędkością 3 ml/minutę (rysunek 1 etap 3). Elucja związanych do membrany białek następowała w obecności soli (1 M NaCl) w buforze wiążącym, przy prędkości przepływu 3 ml/min. W etapie tym odzyskiwano białka związane do kolumny w postaci skoncentrowanego preparatu. Ostatni etap zwany regeneracją jonowymieniacza miał na celu wymycie pozostałości soli z poprzedniego etapu oraz zrównoważenie membrany i przygotowanie jej do kolejnego cyklu. Badania przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

## **3. Wyniki i dyskusja**

Ekstrakt białkowy uzyskany z wycierki ziemniaczanej rozdzielano na modułach membranowych Sartorius S15 i Q15. W trakcie rozdzielania do dodatnio naładowanej membrany Q15 wiązały się białka o charakterze kwaśnym, a do ujemnie naładowanej membrany S15 – białka zasadowe. Frakcja białek zasadowych związanych z membraną S eluowała się przy 0,4 M NaCl (rysunek 2). Z membrany Q związane białka wypływały przy takim samym stężeniu soli.



**Rys. 1.** Rozdział chromatograficzny ekstraktu białkowego uzyskanego z wycierki ziemniaczanej na membranie S15: 1 – równoważenie kolumny; 2 – adsorpcja białek na jonowymieniaczu i elucja białek nie wiążących się; 3 – odmywanie białek niezwiązanych; 4 – desorpcja białek związanych na jonowymieniaczu; 5 – regeneracja jonowymieniacza

**Fig. 1.** Chromatographic separation of protein extract obtained from potato pulp in the membrane S15: 1 – equilibration of the column; 2 – adsorption of proteins on the resin charged and elution of unbound proteins; 3 – washing of unbound proteins; 4 – desorption of proteins bound to the ion-exchanger; 5 – regeneration of ion-exchanger

W wyniku rozdziału chromatograficznego z każdej membrany zbierano 10 ml frakcje zawierające białka związane do membrany, wymyte podczas elucji z jonowymieniacza buforem z 1 M solą NaCl. Aktywność peroksydazową w uzyskanych frakcjach identyfikowano przy użyciu odczynnika TMB (tetrametylobenzydyna) oraz p-ADPA (p-aminodiphenylamine). Zawartość białka w każdej zebranej próbie oznaczono metodą Bradforda, następnie trzy uzyskane próby (wyjściowy ekstrakt z wycierki, eluat z membrany Q i eluat z membrany S) doprowadzono do jednakowego stężenia białka i mierzono w trzech powtórzeniach aktywność peroksydazy w każdej próbie (rysunek 2).





**Rys. 2.** Aktywność peroksydazową oznaczana w badanych próbach białek z wycierki ziemniaczanej

**Fig. 2.** Peroxidase activity measured in tested samples of proteins from potato pulp

Aktywność peroksydazową stwierdzono w wyjściowym ekstrakcie z wycierki ziemniaczanej oraz we frakcji białek zasadowych wiążących się do membrany kationowymiennej S. Przyjmując aktywność peroksydacyjną w ekstrakcie z wycierki za 100% obliczono, że 68% tej aktywności wykazują białka o charakterze zasadowym, 6,7% kwaśne białka związane z membrana Q, pozostała aktywność przypadła na białka niezwiązane do żadnej z membran. Prezentowane wyniki mają charakter jakościowy ich celem było jedynie wykazanie aktywności enzymatycznej w badanych frakcjach uzyskanych z membran jonowymiennych.

Prowadzono wiele prób opracowania strategii efektywnego odzyskiwania białek posiadających aktywność biologiczną z materiałów odpadowych, pochodzących z przemysłu skrobiowego. W poszukiwaniu optymalnej metody testowano i porównywano różne sposoby odzyskiwania białek [41]. Termiczna koagulacja i strącanie w środowisku kwaśnym, jest wydajne, ale otrzymane tym sposobem białka są pozbawione swojej aktywności [8,27]. Ekstrakcja z użyciem soli [3], etanolu [4], siarczanu amonu [40] oraz karboksymetylocelulozy [42] również nie dała zadowalających efektów.

**Tabela 1.** Względna aktywność peroksydacyjna białek izolowanych z wycierki ziemniaczanej i frakcjonowanych za pomocą chromatografii jonowymiennej

**Table. 1.** Relative peroxidase activity of proteins isolated from potato pulp and fractionated by ion exchange chromatography

Lp.	Badana próba białka	Wynik reakcji enzymatycznej z substratem dla peroksydazy P-ADPA	Względna aktywność peroksydazy
		405 nm	[%]
1.	Białka z wycierki ziemniaczanej	1,256±0,023	100,0
2.	Białka z wycierki izolowane na membranie Q	0,143±0,012	6,7
3.	Białka z wycierki izolowane na membranie S	0,874±0,026	68,0
7.	KN (bufor 1xPBS pH 7,4)	0,063±0,007	0,0

W Pracowni Diagnostyki Molekularnej i Biochemii IHAR-PIB w Boninie opracowano i opatentowano sposób otrzymywania peroksydaz z wycierki ziemniaczanej. W ramach opatentowanej procedury peroksydazy związane na powierzchni ścian komórkowych odzyskuje się używając kwaśnych roztworów soli w stężeniu od 0,1 do 2M [24].

Wykorzystanie chromatografii membranowej do izolacji białek z odpadów przemysłu skrobiowego prezentowano przez Menzel i in. (2005). W pracy wykazano, że membrana anionowymienna umożliwia izolację dobrej jakości patatyny, natomiast membrana kationowymienna jest szczególnie przydatna do izolacji niskocząsteczkowych frakcji białkowych [25, 40].

Pozyskiwanie białek natywnych, wykazujących aktywność biologiczną jest opłacalne ekonomicznie. Jak podaje Schoenbeck i in. (2013) cena za kilogram takiego preparatu wynosi 100 Euro, a jej wartość rynkowa jest 100-krotnie wyższa. W roku 2007 opracowano technologie pozyskiwania białek ziemniaka w formie natywnej. Proces ten obejmował kolejno: prefiltrację, izolację na membranach, ultrafiltrację i suszenie

preparatu [13, 35]. Ze względu na użycie kapsuł zawierających porowaty materiał ułożony w formie cylindrycznej z przepływem poprzecznym (od wewnątrz kapsuły na zewnątrz), filtrowany płyn musiał być pozbawiony wszelkich zanieczyszczeń by zapobiec zapychaniu filtrów. Dodatkowa prefiltracja wydłużała czas procesu i czyniła go mało opłacalnym ekonomicznie [33, 34].

Kolejna próba opracowania technologii odzyskiwania natywnych białek z użyciem membran jonowymiennych została podjęta w 2013, przez zespół z Uniwersytetu w Hannoverze, członków koncernu Südzucker AG oraz Sartorius Stedim Biotech GmbH. W badaniach zastosowano prototypową kapsułę nazwaną „Direct Capture Modules” (Sartorius Stedim Biotech GmbH), wypełniona membranami o różnym stopniu porowatości oddzielonych przekładkami z włókien polimerowych. W odróżnieniu od poprzednio stosowanej kapsuły zastosowano tu przepływ równoległy do membrany. Takie rozwiązanie umożliwiło filtrowanie cieczy zawierającej zanieczyszczenia mechaniczne z jedynie nieznacznym blokowaniem powierzchni membrany. Tak prowadzony proces nie wymagał stosowania filtracji wstępnej i mógł być prowadzony z większą prędkością bez obawy o uszkodzenie jednostki filtracyjnej [12, 13, 43]. Dodatkowo wykazano, że zastosowanie nowej konstrukcji kapsuły z membranami jonowymiennymi pozwala izolować natywne frakcje białkowe z większą efektywnością, a sam proces może być realizowany bez konieczności czyszczenia jednostki membranowej przez ponad dwadzieścia cykli.

#### **4. Podsumowanie**

Białka zawarte w bulwie ziemniaczanej, które w procesie ekstrakcji skrobi traktowane są, jako odpad, swoją wartością dorównują białku jaja kurzego, a zdecydowanie przewyższają większość białek roślinnych. Ponadto wykazują aktywność enzymatyczną, co umożliwia ich wykorzystanie w procesach biokatalizy. Dlatego działania ukierunkowane na pozyskiwanie białek, zwłaszcza w ich formie natywnej, wydają się być jednymi z bardziej korzystnych strategii utylizacji odpadów krochmalniczych.

Z przedstawionych wstępnych badań wynika, że chromatografia membranowa może również stanowić metodę pozwalającą na izolację białek funkcyjnych, aktywnych biologicznie z materiału odpadowego.

Zastosowanie membran filtracyjnych o zmodyfikowanej powierzchni pozwala na szybką i łatwą izolację oraz zagęszczanie uzyskanych preparatów białkowych. Prezentowana w poniższej pracy technika chromatografii membranowej może być szczególnie przydatna do odzyskiwania białek z wód pokrochmalnianych bogatych w cenne i aktywne enzymatycznie białka. Płynna postać odpadu upraszcza procedurę izolacji na membranach filtracyjnych, gdyż nie wymaga etapu ekstrakcji białek ze ścian komórkowych przy użyciu wysokich stężeń soli, jak to ma miejsce w przypadku wycierki. Z powyższych względów zasadne jest, podjęcie kolejnych badań mających na celu opracowanie procesu odzyskiwania białek z wód pokrochmalnianych oraz optymalizację procesu oczyszczania poszczególnych grup funkcyjnych białek.

Dostępność jednostek membranowych w kapsułach filtracyjnych o dużym przepływie może stanowić dodatkową zaletą takiej metody izolacji, pozwalającą w prosty sposób zaadaptować opracowane rozwiązanie na skalę przemysłową.

## Literatura

1. **Abouzieed M.M., Reddy C.A.:** *Direct fermentation of potato starch to ethanol by cocultures of Aspergillus niger and Saccharomyces cerevisiae.* Applied and Environmental Microbiology 52(5), 1055–1059 (1986).
2. **Allen A.K., Bolwell G.P., Brown D.S., Sidebottom C., Slabas A.R.:** *Potato lectin: a three-domain glycoprotein with novel hydroxyproline-containing sequences and sequence similarities to wheat-germ agglutinin.* International Journal of Biochemistry & Cell Biology 28, 1285–1291 (1996).
3. **Bárta J., Heřmanová V., Diviš J.:** *Effect of low-molecular additives on precipitation of potato fruit juice proteins under different temperature regimes.* Journal of Food Process Engineering 31, 533–547 (2007).
4. **Bártová V., Bárta J.:** *Chemical composition and nutritional value of protein concentrates isolated from potato (Solanum Tuberosum L.) fruit juice by precipitation with ethanol or ferric chloride.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57, 9026–9034 (2009).
5. **Barnett C., Smith A., Scanlon B., Israilides C. J.:** *Pullulan production by Aureobasidium pullulans growing on hydrolysed potato starch waste.* Carbohydrate Polymers 38, 203–209 (1999).
6. **Bennett A.:** *Membranes in industry: facilitating reuse of wastewater.* Filtration & Separation. 42(8), 28–30 (2005).
7. **Bergthaller W.:** *Chemical and functional properties of food saccharides.* Krakow, CRC Press. (2003).

8. **Cheng Y., Xiong Y., Chen J.:** *Antioxidant and emulsifying properties of potato protein hydrolysate in soybean oil-in-water emulsions.* Food Chemistry, 120, 101–108 (2010).
9. **Drumright R. E., Gruber P. R., Henton D. E.:** *Poly(lactic Acid) Technology.* Advanced Materials 12(23), 1841–1846 (2000).
10. **Ginkel S. W. V., Oh S.-E., Logan B. E.:** *Biohydrogen gas production from food processing and domestic wastewaters.* International Journal of Hydrogen Energy 30(15), 1535–1542 (2005).
11. **Grobben N. G., Eggink G., Cuperus F. P., Huizing H. J.:** *Production of acetone, butanol and ethanol (ABE) from potato wastes: fermentation with integrated membrane extraction.* Applied Microbiology and Biotechnology 39(4–5), 494–498, (1993).
12. **Graf A.M.:** *Entwicklung und Anwendung prozesstechnischer und analytischer Systeme zur Wertschöpfung bioaktiver Inhaltsstoffe aus Kartoffeln.* Dissertation Universität Hannover 2010.
13. **Graf A.M., Steinhof R., Lotz M., Tippkötter N., Kasper C., Beutel S., Ulber R.:** *Downstream-Processing mit Membranadsorbern zur Isolierung nativer Proteinfractionen aus Kartoffelfruchtwasser.* Chemie Ingenieur Technik 81, 267–274 (2009).
14. **Huang L. P., Jina B., Lant P., Zhou J.:** *Simultaneous saccharification and fermentation of potato starch wastewater to lactic acid by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus*.* Biochemical Engineering Journal 23, 265–276 (2005).
15. **Jin B., Leeuwen H. J. v., Patel B., Yu Q.:** *Utilisation of starch processing wastewater for production of microbial biomass protein and fungal  $\alpha$ -amylase by *Aspergillus oryzae*.* Bioresource Technology 66(3), 201–206 (1998).
16. **Jin B., Leeuwen H. J. v., Patel B., Doelle H. W., Yu Q.:** *Production of fungal protein and glucoamylase by *Rhizopus oligosporus* from starch processing wastewater.* Process Biochemistry. 34, 59–65 (1999).
17. **Jin B., Yan X. Q., Yu Q., Leeuwen J. H.:** *A comprehensive pilot plant system for fungal biomass protein production and wastewater reclamation.* Advances in Environmental Research. 6, 179–189 (2002).
18. **Kammerdetch C., Weiss M., Kasper C., Scheper T.:** *An improvement of potato pulp protein hydrolyzation process by the combination of protease enzyme systems.* Enzyme and Microbial Technology 40, 508–514 (2007).
19. **Koningsveld G.A.v., Gruppen H., Jongh H.H.J.d., Wijngaards G., Boekel M.A.J.S.v., Walstra P., Voragen A.G.J.:** *The solubility of potato proteins from industrial potato fruit juice as influenced by pH and various additives.* Journal of Science of Food and Agriculture 82, 134–142 (2001).

20. **Lasik M., Nowak J., Kent C.A., Czarnecki Z.:** *Assessment of Metabolic Activity of Single and Mixed Microorganism Population Assigned for Potato Wastewater Biodegradation.* Polish Journal of Environmental Studies 11(6), 719–725 (2002).
21. **Laufenberg G., Grüß O., Kunz B.:** *New concepts for the utilisation of residual products from food industry – Prospects for the potato starch industry.* Starch-Stärke 48, 315–321 (1996).
22. **Laufenberg G., Kunz B., Nystroem M.:** *Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations.* Bioresource Technology 87, 167–198 (2003).
23. **Lay J.-J.:** *Modeling and Optimization of Anaerobic Digested Sludge Converting Starch to Hydrogen.* Biotechnology and Bioengineering 68(3), 269–278 (2000).
24. **Lewosz J.:** Opis patentowy, 195200, PL.. Zgłosz. P. 357963 Opubl. 28.06.2004. *Sposób otrzymywania peroksydazy z wycierki ziemniaczanej.* Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Radzików 2002.
25. **Menze, F., Kasper C., Scheper T., Zeidler R.:** *Abtrennung wertvoller Kartoffelproteine mit Hilfe von Membranadsorbent.* Bio spektrum 1, (2005).
26. **Markiewicz M.:** *Analiza instalacji do uzyskiwania frakcji białek z odpadowych wód sokowych pokrochmalniczych.* Praca Magisterska. Politechnika Koszalińska 2007.
27. **Miedzianka J., Pęksa A., Aniolowska M.:** *Properties of acetylated potato protein preparations.* Food Chemistry, 133, 1283–1291 (2012).
28. **Mioduszevska H., Bielińska-Czarnecka M., Klocek J.:** *Zmiany aktywności peroksydaz w roślinach ziemniaka hodowanych w kulturach in vitro.* [W:] Botanika polska u progu XXI wieku. Mater. symp. i obrad sekcji 51 Zjazdu PTB Gdańsk, 15–19.09.1998. PTB Gdańsk: 334, (1998).
29. **Pałasiński M.:** *Przemysł skrobiowy.* Kraków, Wydawnictwo Naukowe Akapit. (1999).
30. **Pastuszewska B., Taciak M., Tuśnio A.:** *Koncentrat białka ziemniaczanego w żywieniu zwierząt monogastrycznych.* Postępy Nauk Rolniczych 5, 91–106 (2007).
31. **Pęksa A., Golubowska G., Rytel E., Lisińska G., Aniolowski K.:** *Influence of harvest date on the glycoalkaloid contents of three potato varieties.* Food Chem. 78, 313–317 (2002).
32. **Pots A.M.:** *Physico-chemical properties and thermal aggregation of patatin, the major potato tuber protein.* Dissertation Universität Wageningen 1999.
33. **Sartorius Stedim Biotech:** *Sartobind Membrane Adsorbers for Rapid Purification of Proteins.* (2009).

34. **Schoenbeck I., Graf A.M., Leuthold M., Pastor A., Beutel S., Scheper T.:** *Purification of high value proteins from particle containing potato fruit juice via direct capture membrane adsorption chromatography.* J Biotechnol. 168, 693–700 (2013).
35. **Steinhof R.:** *Aufbau eines Downstream-Prozesses zur Proteingewinnung mittels Membrantechnologie am Beispiel von Kartoffelfruchtwasser.* Dissertation Universität Hannover 2007.
36. **Suck K., Walter J., Menzel F., Tappe A., Kasper C., Naumann C., Zeidler R., Scheper T.:** *Fast and efficient protein purification using membrane adsorber systems.* Journal of Biotechnology 121, 361–367 (2006).
37. **Tsai S. P., Moon S. H.:** *An Integrated Bioconversion Process for Production of L-Lactic Acid from Starchy Potato Feedstocks.* Applied Biochemistry and Biotechnology 70–72, 417–428 (1998).
38. **Tuśnio A. Pastuszewska B. Swiech E. Taciak M.:** *Response of young pigs to feeding potato protein and potato fibre — nutritional, physiological and biochemical parameters.* J. Anim. Feed Sci. 20 (3), 361–378 (2011).
39. **Ulber R.:** *Biotechnologische Methoden zur effizienteren Rohstoffnutzung.* Habilitationsschrift Universität Hannover. (2002).
40. **van Koningsveld G.A.:** *Physico-chemical and functional properties of potato proteins.* In: Dissertation Universität Wageningen 2001.
41. **Waglay A., Salwa K., Alli I.:** *Potato protein isolates: Recovery and characterization of their properties.* Food chemistry. 142, 373– 382 (2014).
42. **Vikelouda M., Kiosseoglou V.:** *The use of carboxymethylcellulose to recover potato proteins and control their functional properties.* Food Hydrocolloids 18, 21–27 (2004).
43. **Zgórska K., Czerko Z., Grudzińska M.:** *Wpływ wybranych czynników na zawartość glikoalkaloidów w bulwach ziemniaka.* Żyw. Nauk. Technol. Ja. 1 (46) Supl.: 229– 234 (2006).
44. **Zhang H., Zhou X., Dong J., Zhang G., Wang C.:** *A novel family of green ionic liquids with surface activities.* Science in China Series B: Chemistry 50, 238–242 (2007).
45. **Zhang T., Liu H., Fang H. H. P.:** *Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic condition.* Journal of Environmental Management 69, 149–156 (2003).
46. **Zwijnenberg H.J., Kemperman A.J.B., Boerrigter M.E., Lotz M., Dijksterhuis J.F., Paulsen P.E., Koops G.-H.:** *Native protein recovery from potato fruit juice by ultrafiltration.* Desalination 144, 331–334 (2002).

## Use of Membrane Chromatography for Recovery of Biologically Active Protein from Starch Industry Waste

### Abstract

Starch industry generates enormous amount of wastes which contains several valuable components such as minerals, proteins and amino acids. In the past those wastes were released to the environment in unchanged form or used as fertilizers or animal feed. However, economical and ecological functionality of those applications was minor and rather a result of lack of better options than real needs. Currently, due to the urgent necessity of environment pollution prevention as well as for economic reasons, research concerning development of new methods of recovery, bioconversion and utilization of valuable substances present in wastes is being undertaken. This publication aims to describe strategies of starch industry wastes conversion, mainly potato soap, into useful products. Historical, presently used and advanced biotechnological methods were described. In addition, an economical and ecological evaluation of methods was performed. Ion-Exchange chromatography can be an economically profitable technology for the isolation and purification of different native potato proteins. Using membrane adsorption instead of classical chromatography has many advantages. Further availability of filter modules with different shapes and capacities enables the efficient isolation of proteins on an industrial scale. The application of ion-exchange modules for active recovery of proteins from potato juice is confirmed by research. In recent years, Sartorius Stedim Biotech company has designed new modules with polymer spacers and different channel sizes (MA-IEX-modules) enabling processing of crude, particle-containing solutions using a tangential flowthrough the membranes. The great advantage of this solution is the possibility of omitting the first steps of the purification, what saves time and money. The usefulness of such units was confirmed by isolation of valuable potato proteins: patatin and low molecular weight from potato fruit juice from starch factory.

In this study a preliminary researches of the possibility of using the membrane ion exchange chromatography as a technique for recovery of biologically active protein from waste material which is potato pulp is also presented.

### Słowa kluczowe:

odpady przemysłu skrobiowego, utylizacja odpadów, woda sokowa, wycierka ziemniaczana

### Keywords:

starch industry wastes, wastes utilization, potato fruit juice, potato pulp