

Celem pracy pt. „Wielostopniowa separacja membranowa wybranych białek sprzężona z procesami bioreaktorowymi” było opracowanie zintegrowanego procesu zagospodarowania serwatki przemysłowej. Obiektem badań był bogaty w białko i laktozę odciek z produkcji serów kozich o dużej mętności, zawartości tłuszczu oraz zawierający pozostałości skrzepu kazeinowego.

Pierwszym etapem badań było opracowanie skutecznej techniki separacyjnej dla białek serwatkowych. Niektóre z tych białek (laktoferyna, albumina serum) charakteryzują się cennymi właściwościami i są wykorzystywane głównie w medycynie.

Proces ten okazał się bardzo trudny w wykonaniu, ponieważ wyniki przeprowadzonych badań nie pokrywały się z założeniami bazującymi na teorii ciśnieniowych technik separacyjnych, głównie sitowego mechanizmu separacji. Współczynnik odcięcia w przypadku membran ultrafiltracyjnych oraz nominalna średnica porów dla membran mikrofiltracyjnych wskazuje jakiej wielkości cząstki powinny swobodnie przechodzić przez pory membrany. Transmisja cząstek mniejszych niż współczynnik odcięcia powinna być swobodna, a ich współczynnik zatrzymania powinien być bliski zeru. Licznie przeprowadzone eksperymenty ujawniły, że separacja białek serwatkowych nie stosuje się do tej teorii. Białka zdecydowanie mniejsze niż wskazywała wielkość porów lub współczynnik odcięcia były w dużym stopniu zatrzymywane przez membranę. Nie możliwym jest więc, wyizolowanie technikami membranowymi jednej frakcji białek serwatkowych oraz przewidzenia, bez wykonania serii eksperymentów, zawartości jakościowej permeatu.

Zbyt wysoką retencję ogólną białka wg doniesień literaturowych może niwelować zwiększaniem siły jonowej oraz modyfikacją pH roztworu. Dlatego też sprawdzono wpływ obecności NaCl w różnym stężeniu oraz zmiany odczynu serwatki na jakość i efektywność separacji mikro-, i ultrafiltracyjnej. Określono również wpływ stężenia białek serwatkowych na stopień retencji.

Podczas eksperymentów odnotowano znacznie wyższą retencję aniżeli oczekiwaną z wartości (podanej przez producenta) wielkości porów lub współczynnika odcięcia, co wynika prawdopodobnie z wysokiego ich zróżnicowania, silnego oddziaływania międzycząsteczkowego, na który wpływ mogą mieć również inne składniki serwatki (duże ilości glikomakropeptydów, laktozy, soli mineralnych).

Drugim etapem badań było opracowanie hydrolizy wybranego białka serwatkowego – albuminy serum, w celu pozyskiwania peptydów aktywnych.

By stworzyć odpowiedni opis matematyczny reakcji proteolizy z wykorzystaniem enzymu – termolizyny, przeprowadzono reakcje hydrolizy albuminy serum w systemie okresowym. Na podstawie uzyskanych wyników zauważono, że reakcja bardzo szybko ulega spowolnieniu, co było następstwem powstawania inhibitora/-ów będącego/-ych produktem/-ami hydrolizy. W wyniku symulacji graficznej określono rodzaj występującej inhibicji jako produktową – niekompetycyjną a reakcję proteolizy albuminy serum termolizyną opisano modelem Michaelisa – Menten z nałożoną inhibicją niekompetycyjną. W zakresie stosowanych stężeń substratu (do 25 [g l⁻¹]) model uproszczono do reakcji pierwszego rzędu. Stałe kinetyczne wyniosły $K_i = 250.0$ [g produktu g_{enzymu}⁻¹] i $k/K_m = 13.3$ [l g⁻¹ min⁻¹].

Bazując na stałych uzyskanych podczas analizy kinetyki reakcji katalizy w reaktorach okresowych sprawdzono stosowalność mechanizmu reakcji z inhibicją niekompetycyjną – pierwszego rzędu w reaktorach działających w trybie ciągłym. Analiza błędu dopasowania równania kinetycznego na podstawie eksperymentów była zadowalająca, a opracowany model może z powodzeniem opisywać proces prowadzony przy różnych stężeniach substratu oraz enzymu.

W celu odzysku peptydów aktywnych (w tym też frakcji inhibitora/ów) z reakcji proteolizy dokonano selekcji membrany z pogranicza nano- i ultrafiltracji. Przetestowano trzy typy membran o współczynniku odcięcia z zakresu 1-15 [kDa] i zbadano wpływ siły jonowej oraz pH na współczynnik retencji oraz strumień permeatu. Największy wpływ na selektywność separacji miał współczynnik odcięcia membrany. Wpływ dodatku chlorku sodu i zmiana pH na jakość separacji peptydów był pomijalny.

Do reaktora membranowego zostały wybrane dwie, spośród badanych, membrany: płaską membranę polieterosulfonową o współczynniku odcięcia 1-3 [kDa] i rurkową ceramiczną o współczynniku odcięcia 15 [kDa]. Obie membrany zapewniały całkowite zatrzymanie enzymu w strefie reakcji, a odbiór krótkich peptydów, wśród których znajdują się peptydy będące inhibitorem niekompetycyjnym termolizyny skutkuje wzrostem stopnia hydrolizy substratu.

Ostatnim etapem badań było opracowanie procesu biodegradacji strumieni powstających po separacji membranowej, czyli o obniżonej zawartości białka.

Badania rozpoczęto sprawdzeniem aktywności mikrobiologicznej rodzimych szczepów serwatki, która była bardzo niska. Następnie dokonano wyboru szczepu do biodegradacji serwatki i spośród trzech wyselekcjonowanych na podstawie literatury i przebadanych szczepów, wybrano bakteryjny – *Bacillus licheniformis*, który poza efektywnym metabolizowaniem laktozy obecnej w serwatce, posiadał zdolności do oddychania azotanowego, co skutkowało ubytkiem pozostałości białkowych.

Opracowano równanie kinetyczne opisujące szybkość wzrostu *B.licheniformis* na podłożu serwatkowym. Powyżej stężenia laktozy 5.4 [g l⁻¹] obserwowano bardzo długi czas trwania lag-fazy. Kinetykę wzrostu w hodowlach okresowych opisano równaniem Loung'a uwzględniającym inhibicję substratową. Uzyskane stałe wyniosły: $K_I=6.03$ [g l⁻¹], $n=1.10$, $K_M=4.79$ [g l⁻¹], $\mu_{\max} = 2.29 \cdot 10^{-4}$ [s⁻¹].

Ustalając parametry procesowe biodegradacji ciągłej bazowano na wynikach uzyskanych z hodowli okresowych na podłożu serwatkowym. Prowadząc proces ciągły, zgodnie z oczekiwaniami uzyskano punkty jedynie na ramieniu wznoszącym, stąd do opisu kinetycznego procesu zastosowano równanie Monoda, uzyskując wartości stałych $K_M=0.45$ [g l⁻¹] i $\mu_{\max}= 8.52 \cdot 10^{-5}$ [s⁻¹]. Równanie to ma zastosowanie do stężeń laktozy mniejszych od 2.25 [g l⁻¹].

Na podstawie parametrów równania kinetycznego opracowano zależność opisującą szybkość przekształcania laktozy i białek w odniesieniu do ich stężenia oraz stężenia biomasy.

W badaniach prowadzonych w systemie ciągłym potwierdzono zdolność szczepu *B.licheniformis* do skutecznego obniżania stężenia laktozy oraz powolnego wykorzystania źródła azotu organicznego. Stosowanie czasów przebywania powyżej 37 [h] skutkowało obniżeniem indeksu ChZT do wartości wymaganej przez Ministra Środowiska. Obliczona na podstawie stężenia materii organicznej wartość tego indeksu w medium opuszczającym bioreaktor wynosiła przy tym czasie przebywania 7.6 [mgO₂ l⁻¹].