

Novi pravci i izazovi u proizvodnji mlečne kiseline na obnovljivim sirovinama

Aleksandra J. Đukić Vuković¹, Ljiljana V. Mojović¹, Dušanka Pejin², Maja Vukašinović-Sekulić¹, Marica Rakin¹, Svetlana Nikolić¹, Jelena Pejin²

¹Tehnološko–metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

²Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, Srbija

Izvod

Potražnja za mlečnom kiselinom beleži snažan rast u poslednjoj deceniji, prvenstveno zbog razvoja biodegradabilnih polimera na bazi mlečne kiseline i njene primene u prehrambenoj, farmaceutskoj i drugim industrijama. Savremena proizvodnja mlečne kiseline se zasniva na principima održivosti, ekonomske i ekološke povoljnosti u biotehnoškim postupcima na obnovljivim i otpadnim poljoprivrednim sirovinama. U ovom radu su razmatrane mogućnosti fermentativne proizvodnje mlečne kiseline na različitim obnovljivim sirovinama, sa detaljnijom analizom mogućnosti korišćenja tečne džibre kao sirovine. Poseban izazov je povećati produktivnost proizvodnje na obnovljivim sirovinama korišćenjem novih tipova bioreaktora, bakterija mlečne kiseline (BMK) sa amilolitičkom aktivnošću, mešovitim kultura BMK ili pak genetički modifikovanih mikroorganizama. Primena novih tehnoloških rešenja koja uključuju integraciju određenih tehnoloških faza ili procesa, primenu imobilisanih sistema kao i uporednu proizvodnju mlečne kiseline i probiotske biomase je razmatrana u ovom radu.

Ključne reči: mlečna kiselina; obnovljiva biomasa; tečna džibra; fermentacija.

Dostupno na Internetu sa adrese časopisa: <http://www.ache.org.rs/HI/>

Savremeni trendovi na polju proizvodnje industrijskih sirovina zasnivaju se na principima održivosti, energetske i ekološke povoljnosti i što nižih troškova proizvodnje. Mlečna kiselina se široko koristi u farmaceutskoj, hemijskoj, prehrambenoj, tekstilnoj i kožarskoj industriji. Poslednjih godina se uočava snažan rast potražnje za mlečnom kiselinom, prvenstveno zbog razvoja biodegradabilnih laktidnih polimera koji se koriste za kontrolisano oslobađanje lekovitih supstanci. Procenjeno je da će godišnja potražnja za mlečnom kiselinom do kraja 2011. godine biti 200000 tona [1]. Najveći proizvođači mlečne kiseline i polilaktidnih polimera u svetu: Cargill Dow (SAD), Purac (Holandija), Galactica (Belgija), Musa-shino Chemical Laboratory Ltd. (Japan), uglavnom koriste mlečnu kiselinu dobijenu fermentacijom [2–4]. U ukupnoj svetskoj proizvodnji mlečne kiseline, procenjuje se da fermentacioni postupak učestvuje sa 90%, a samo 10% mlečne kiseline se proizvodi sintezom iz laktonitrila [5]. Velike kompanije koje proizvode i polimere na bazi mlečne kiseline koriste fermentacioni postupak jer selektivno nastaje L(+) ili D(–) izomer, dok hemijskom sintezom nastaje racemat. Za sintezu polimera je potrebno koristiti kao bazu visoko prečišćene enantiomere mlečne kiseline dobijene nakon skupih procesa mikrofiltracije, ultrafiltracije ili bipolarne elektrodijalize jer su termostabilnost, mehanička

otpornosti i druga fizikohemijska svojstva polimera diktirana zastupljenošću L(+) ili D(–) mlečne kiseline [6].

Prvobitno, mlečna kiselina se dobijala iz skupih rafiniranih šećera (glukoze, saharoze) klasičnim fermentacionim postupkom pomoću bakterija mlečne kiseline [7], dok danas postoje industrijski procesi u kojima se fermentacija izvodi na kukuruzu, šećernoj repi i pirinču [8]. Danas je posebno aktuelno ispitivanje obnovljivih sirovina iz prirode (lignocelulozni materijali: drvo, hidrolizati drveta), obnovljivih ratarskih kultura bogatih skrobom (pšenica, ječam, krompir, kukuruz, tapioka, šargarepa) [9], otpadnih sirovina iz industrije mleka (sirutka) [10] i otpadnih proizvoda poljoprivredne prerade i industrije (pirinčana slama, melasa, voda od močenja kukuruza, ostatci prerade šećerne trske, kasave) [11,12] za dobijanje mlečne kiseline u laboratorijskim uslovima. Primena sporednih i otpadnih proizvoda drugih industrija kao i obnovljivih poljoprivrednih sirovina je značajno ekonomičnija, doprinosi smanjenju ekoloških problema odlaganja otpada kao i smanjenju koncentracije ugljen-dioksida u atmosferi. Ipak, mali broj tehnologija na obnovljivim sirovinama je našao industrijsku primenu, prvenstveno zbog nedovoljne produktivnosti, budući da je mlečna kiselina relativno jeftina supstanca. Ispituju se mogućnosti da se poveća efikasnost procesa korišćenjem imobilisanih proizvodnih mikroorganizama i njihovom recirkulacijom, projektovanjem dolivnih, kontinualnih i semikontinualnih procesa i drugim tehnološkim rešenjima [13].

U ovom radu će biti dat kratak pregled dosadašnjih istraživanja vezanih za proizvodnju mlečne kiseline, a

PREGLEDNI RAD

UDK 661.746.2:66:60

Hem. Ind. 65 (4) 411–422 (2011)

doi: 10.2298/HEMIND110114022D

Prepiska: Lj. Mojović, Tehnološko–metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Karnegijeva 4, 11120 Beograd, Srbija.

E-pošta: lmojovic@tmf.bg.ac.rs

Rad primljen: 14. januar, 2011

Rad prihvaćen: 23. mart, 2011

poseban akcenat biće na sagledavanju i analizi savremenih trendova u fermentacionim procesima za dobijanje mlečne kiseline na obnovljivim sirovinama. Posebno će se razmotriti mogućnosti primene tečne džibre, kao nove potencijalne sirovine.

MLEČNA KISELINA

Mlečna kiselina je 2-hidroksipropionska kiselina i postoji u dva izomerna oblika, kao L(+) desnogira i D(–) levogira. Sintetskim postupcima dobijanja mlečne kiseline nastaje racemska smeša. Procesom fermentacije, u zavisnosti od mikroorganizma koji se koristi, nastaje stereoselektivno L ili D oblik mlečne kiseline. U humanom organizmu je dominantan enzim L-laktat dehidrogenaza, pa se za primenu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji uglavnom proizvodi L(+) mlečna kiselina. Visoke koncentracije D(–) mlečne kiseline mogu da deluju štetno na ljudski organizam zato što humana mitohondrijalna D-laktat dehidrogenaza pet puta sporije prevodi D(–) mlečnu kiselinu u piruvat [14–16]. Američka agencija za hranu i lekove (FDA) označila je mlečnu kiselinu kao bezbednu supstancu za humanu upotrebu (GRAS – eng. *generaly recognized as safe*), pa se ona u značajnim količinama proizvodi i koristi za prehrambene svrhe. Zbog svoje kiselosti (pK_a 3,86) i antimikrobnog delovanja koristi se kao acidulant i konzervans u prehrambenoj i konditorskoj industriji [17,18]. Osim toga, danas je u prehrambenoj industriji posebno zastupljen trend proizvodnje mlečno-kiselinskih fermentisanih proizvoda, na primer sokova na bazi voća ili povrća koji predstavljaju izuzetno zdrave proizvode, tzv. „funkcionalne“ prehrambene proizvode [19–21].

Mlečna kiselina je slabo isparljiva, bezbojna ili bledo žuta, higroskopna, viskozna supstanca, bez mirisa, koja u koncentrovanijim rastvorima (>20%) spontano polimerizuje gradeći linearne dimerne laktoil laktate, ciklične dimerne DD, LL ili DL laktide, ali i složenije polimere [7]. U farmaceutskoj tehnologiji se koristi kao slobodna kiselina koja poseduje humektantna, antimikrobna i blago ekfolijantna dejstva i u obliku polimera. Polimeri su bezbedni, biodegradabilni i omogućavaju kontrolisano oslobađanje leka iz farmaceutskog oblika. Mlečna kiselina je hemijski α -hidroksi kiselina male molekulske mase pa lako prodire u kožu. Ulazi u sastav kozmetičkih preparata za ekfolijaciju, tretman akni i tretman „voćnim“ kiselinama. Reaktivnost mlečne kiseline potiče od slobodne karboksilne i hidroksi grupe što omogućava da se u reakcijama ponaša i kao kiselina i kao alkohol. U različitim reakcijama daje akrilnu kiselinu, propilenglikol, acetaldehid, polimere i druge supstance i kao takva predstavlja značajnu sirovinu za hemijsku industriju [18].

Bakterije mlečne kiseline

Industrijski postupak za dobijanje mlečne kiseline pomoću bakterija mlečno-kiselinskog vrenja je prvi put uspešno uspostavio Albert Beringer (*Albert Boehringer*) 1895. godine [22]. U grupu bakterija mlečne kiseline (BMK) ubrajaju se predstavnici više rodova: *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* i *Weissella* [13]. Kao industrijski proizvodni mikroorganizmi najviše se koriste vrste roda *Lactobacillus* sposobne za stereospecifičnu proizvodnju mlečne kiseline, a koriste se i kao probiotici zbog svog povoljnog dejstva na zdravlje ljudi i životinja.

BMK su gram-pozitivne, nesporigene, anaerobne (mada postoje aerotolerantne koke i bacili među BMK), katalaza negativne, acidotolerantne bakterije koje mogu da proizvode mlečnu kiselinu kao glavni proizvod metabolizma ugljenih hidrata iz različitih sirovina [23]. Ove bakterije uglavnom koriste dosta složene medijume za rast jer ne mogu same da sintetišu sve potrebne nutrijente. U prirodi naseljavaju staništa bogata aminokiselinama, peptidima, nukleotidima, masnim kiselinama, vitaminima B grupe, mineralima i drugim neophodnim faktorima rasta, kao što je na primer digestivni trakt ljudi i životinja. U industrijskim uslovima je najčešće neophodno obogaćivanje medijuma izvorima azota i vitaminima za postizanje visokih prinosa, što se odražava na ukupne troškove proizvodnje. BMK su podeljene na homofermentativne i heterofermentativne, u zavisnosti od toga da li je dominantan proizvod njihove aktivnosti mlečna kiselina ili proizvode i CO₂, etanol, acetatnu kiselinu i druge metabolite [24]. Kod određenih homofermentativnih vrsta pod odgovarajućim uslovima može se indukovati heterofermentativni metabolizam.

Bakterije mlečne kiseline pogodne za proizvodnju mlečne kiseline na obnovljivim sirovinama

Za korišćenje otpadnih poljoprivrednih sirovina pogodne su BMK koje sintetišu ekstracelularne enzime. BMK koje proizvode ekstracelularne amilaze se nazivaju amilolitičke bakterije mlečne kiseline. Za izvođenje mlečno-kiselinske fermentacije na sirovinama bogatim skrobom sa većinom BMK neophodno je prvo molekule skroba razložiti na proste šećere delovanjem enzima amilaza (faza likvefakcije i saharifikacije), a potom fermentacijom nastaje mlečna kiselina. Amilolitičke BMK omogućavaju korišćenje sirovina bogatih skrobom i sporednih proizvoda prerade skrobnih sirovina u jednostavnijim i jeftinijim tehnološkim postupcima. Nakamura i Crowell su 1979. godine potvrdili sposobnost soja *Lactobacillus amylolyticus* B 4437 da hidrolizuje molekule skroba, a 1981. godine izolovan je još jedan amilolitički soj, *L. amylovorus* [25,26]. Primena amilolitičkih sojeva omogućava primenu direktnog postupka

koji je ekonomičniji, jer se odvija u jednom stupnju, čime se ostvaruje ušteda u energiji i vremenu (nije potrebno formiranje i održavanje dva procesa, pranje reaktora između faza saharifikacije i fermentacije).

Tehnike genetičkog inženjerstva omogućavaju manipulacije na visoko produktivnim sojevima koji nemaju amilaznu aktivnost, integracijom gena za α -amilazu. Integracijom gena za α -amilazu iz *Streptococcus bovis* 148 u genom *Lactobacillus casei* uz ekspresiju AmyAF peptida značajno je povećana hidrolitička aktivnost. Preko peptida AmyAF su imobilisane bakterije i ponovno vraćane u proces, što je takođe doprinelo povećanju produktivnosti [27]. Direktni postupci fermentacije genetički modifikovanim bakterijama još uvek ne daju visoke prinose mlečne kiseline, ali se dosta ispituju i očekuje se povećanje njihove efikasnosti u budućnosti. Radi povećanja produktivnosti, u laboratorijskim uslovima se ispituje i sposobnost BMK da sinergistički proizvode mlečnu kiselinu. Utvrđeno je da mešana kultura pet sojeva *Lactobacillus spp.* daje više prinose mlečne kiseline u odnosu na svaki od pojedinačnih sojeva, uz smanjenu potrošnju izvora azota. Takođe, povećan je rast mikroorganizama, pa se dobija i veća količina biomase za eventualnu probiotsku primenu [28].

Obnovljive sirovine za dobijanje mlečne kiseline

Jeftinije sirovine, koje su danas od posebnog interesa i koje se sve više koriste i u industrijskim procesima su obično složenog sastava, na primer poljoprivredne kulture slabijeg kvaliteta, otpaci iz prerade poljoprivrednih kultura, industrije hrane, industrije papira itd. Godišnje se u svetu proizvede 3,5 milijardi otpadnih produkata iz poljoprivredne industrije [29]. Ukoliko se za dobijanje mlečne kiseline pomoću *Lactobacillus bul-*

garicus koristi pšenično brašno i kvasni ekstrakt, 68% troškova proizvodnje odlazi upravo na sirovinu [30]. Danas je svetski trend primena tehnologija koje koriste otpadne i obnovljive sirovine i time smanjuju emisiju ugljen-dioksida i drugih polutanata uz istovremenu uštedu u samom postupku proizvodnje. Pregled nekih sirovina koje su ispitivane za dobijanje mlečne kiseline, prinosi i mikroorganizmi korišćeni za fermentaciju dati su u tabeli 1.

Odgovarajuća sirovina za dobijanje mlečne kiseline treba da ima sledeće osobine:

- niska cena,
- odsustvo kontaminirajućih supstanci,
- brza fermentacija,
- visok prinos mlečne kiseline,
- minimalna sinteza sporednih proizvoda u toku fermentacije,
- mogućnost korišćenja bez ili minimalnog predtretmana,
- dostupnost u toku cele godine (mogućnost dugotrajnog čuvanja, dugačak vegetacioni period ili više vegetacionih perioda u toku godine),
- niski transportni troškovi do proizvodnog pogona i
- mogućnost jednostavnog izdvajanja mlečne kiseline iz fermentacionog medijuma.

Skrobne sirovine

Za proizvodnju mlečne kiseline ispitivane su brojne skrobne sirovine kao što su: kukuruzni skrob [37,46], skrob korena kasave [47], raženo brašno [48], ječmeno brašno [30], krompirov skrob [47,49] i krompirova kaša [50]. Pri tome su, u zavisnosti od primenjene sirovine, korišćene različite vrste ili sojevi BMK. Dobijanje mlečne kiseline na skrobnim sirovinama je do sada najviše ispitivano, i u različito projektovanim procesima mogu

Tabela 1. Pregled nekih sirovina, proizvodnih mikroorganizama i prinosa mlečne kiseline
Table 1. An overview of some raw materials, production microorganisms and lactic acid yields

Tip sirovine	Sirovina	Mikroorganizam	Prinos mlečne kiseline (g mlečne kiseline /g supstrata)	Referenca
Skrobne sirovine	Pšenični skrob	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> ATCC 19435	0,77–1	[31]
	Cela pšenica	<i>Lactobacillus lactis</i> i <i>L. delbrueckii</i>	0,93–0,95	[9]
	Ječam	<i>L. casei</i> NRRL B-441	0,87–0,98	[30]
	Pšenične mekinje	<i>L. amylophilus</i> GV6	> 0,90	[32–35]
	Kukuruzni skrob	<i>L. amylovorus</i> NRRL B-4542	0,94	[36,37]
	Krompirov skrob	<i>Rhizopus oryzae</i> , <i>R. arrhizus</i>	0,87–0,97	[38]
Celulozne sirovine	Celuloza	<i>L. bulgaricus</i> NRRL B-548 <i>L. coryniformis</i> ssp. <i>torquens</i> ATCC 25600	~0,6 0,89	[39] [40,41]
	Hidrolizat pirinčane slame	<i>L. brevis</i>	~ 0,52	[11]
	Ceo kukuruzni klip	<i>Rhizopus sp.</i> MK-96-1196	0,82	[42]
	Drvo	<i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395	> 0,85	[43]
	Otpadni papir	<i>Rhizopus oryzae</i>	>0,8	[44]
	Hidrolizat drveta	<i>Enterococcus faecalis</i> RKY1	~0,9	[45]

se dobiti prinosi od 4,8 g/l na azotom siromašnim sirovinama kao što je kasava [51], do 0,98 g mlečne kiseline po gramu supstrata na ječmenom skrobu obogaćenom peptonom i kvašćevim ekstraktom [30]. Na izbor sirovine utiču brojni faktori, među kojima su najznačajniji cena sirovine, potreban kvalitet zemljišta za gajenje i kvalitet same sirovine, jer od njega zavisi da li je potrebno vršiti obogaćivanje izvorima azota, vitaminima, faktorima rasta i mineralima neophodnim za fermentaciju [52]. Kasava i Jerusalimska artičoka su vrste koje opstaju na oskudnim staništima, pa spadaju u veoma jeftine i lako dostupne sirovine. Ispitivanja su pokazala da se Jerusalimska artičoka može gajiti u našoj zemlji na marginalnom zemljištu [53]. Međutim, prinosi mlečne kiseline dobijeni na ovim sirovinama bez obogaćivanja izvorima azota su dosta niski, pa je u tehnoukonomie analizu potrebno uključiti i cenu dodatnih izvora azota, minerala, vitamina itd. [51, 54–56].

Melasa

Melasa je veoma kvalitetan i nutritivno vredan sporedni proizvod industrije šećera. Sadrži 48–56% ukupnih šećera (postoje male razlike u sastavu melase dobijene iz šećerne trske i šećerne repe), ali i vitamine i minerale (biotin, folnu kiselinu, piridoksin, Ca-pantotenoat, riboflavin, Mg, Ca, P, Si, K, Al i Fe) [57]. Jeftinija je od rafiniranih šećera, a zbog visoke koncentracije šećera smanjena je mogućnost kontaminacije. U mnogim biotehnoškim postupcima se danas razmatra njena primena, pa raste i potražnja. Sa druge strane, osavremenjivanjem procesa proizvodnje šećera, smanjuje se količina raspoložive melase za dobijanje mlečne i drugih organskih kiselina [58]. Na melasi šećerne repe je pomoću soja *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* IFO 3202 u šaržnom reaktoru ostvaren prinos od 95,4% mlečne kiseline [59].

Lignocelulozne sirovine

Ove sirovine se zbog svoje dostupnosti i niske cene poslednjih godina intenzivno razmatraju za primenu u fermentacionim tehnologijama. Procenjeno je da je godišnja proizvodnja lignoceluloznog otpada samo u SAD oko 200 miliona tona [60]. Poteškoća pri korišćenju celuloznih materijala za fermentaciju predstavlja nemogućnost bakterijskih enzima da razgrade molekule celuloze do prostih šećera, pa je potreban predtretman kiselinom i enzimima, celulazama, što poskupljuje kompletan tehnološki postupak. Nakon faze saharifikacije u podlozi se nalazi smeša pentozna i heksoza, pa se može javiti efekat kataboličke represije izvora ugljenika, što najviše zavisi od proizvodnog mikroorganizma [61]. U postupku simultane saharifikacije i fermentacije smeše otpadnog papira postignut je prinos od 31 g/l mlečne kiseline pomoću *L. delbrueckii* B445 što predstavlja 84% od teorijskog prinosa [62]. Pored otpadnog papira, za

dobijanje mlečne kiseline su ispitivane i druge lignocelulozne sirovine navedene u tabeli 1.

Surutka

Nakon koagulacije proteina iz mleka enzimima, kiselinama, toplotom ili drugim supstancama, odvaja se gruša, a tečnost koja zaostaje je surutka. Tradicionalno se dosta koristi u biotehnoškim procesima kao sirovina bogata laktozom i proteinima animalnog porekla. U fermentaciji na surutki u šaržnom bioreaktoru sa *L. casei* NRRL B-441 postignuta je produktivnost od 3,97 g l⁻¹ h⁻¹ [63], dok se u membranskom bioreaktoru sa recirkulacijom pomoću *L. bulgaricus* može proizvesti 22,5 g l⁻¹ h⁻¹ mlečne kiseline [10].

Poljoprivredne obnovljive sirovine

Iako su skrob i melasa ekonomski povoljnije sirovine u odnosu na rafinirane šećere (glukoza, saharoza), najbolji ekonomski efekti bi se mogli ostvariti upotrebom otpadnih poljoprivrednih proizvoda koje ne koriste druge industrije kao što su: ljuske semena pamuka, stabljike kukuruza, klipovi kukuruza [64], pšenične mekinje [65], hidrolizat kukuruznih vlakana [66], pirinčana slama [11], otpad iz procesa obrade šargarepe [29] itd. Ovakve sirovine su uglavnom vrlo složene sastava i sadrže veliki udeo celuloze i hemiceluloze pa nakon hidrolize nastaje složena smeša heksoza i pentozna koju je potrebno odgovarajućim mikroorganizmima fermentirati do mlečne kiseline. Ispitivanja sa pojedinim sojevima BMK dala su obećavajuće rezultate, pa je nakon tretmana hidrolizata klipova kukuruza enzimima celulazom i celobiazom, *L. brevis* bio mogućnosti da fermentiše oslobođene šećere: ksilozu, glukozu i arabinozu bez ispoljavanja efekata kataboličke represije izvora ugljenika i proizvede 34,2 g/l mlečne kiseline [11,67].

Tečna džibra

Tečna džibra je sporedni proizvod koji nastaje u postupku dobijanja bioetanola alkoholnim vrenjem [68,69]. Nakon centrifugiranja i uklanjanja etanola destilacijom zaostaje tečna frakcija, žućkastog obojenja, lako mešljiva sa vodom. Prilikom proizvodnje 1 hl bioetanola nastaje oko 13 hl bistre džibre [70]. Sa globalnom ekspanzijom proizvodnje bioetanola radi korišćenja za biogorivo problem velikih količina nastale džibre postaje sve izraženiji. Džibra se uglavnom koristi za ishranu stoke ili nakon uparavanja kao dodatak stočnoj hrani, ali se često javlja problem skladištenja i uklanjanja neiskorišćene džibre [71–73]. Vrlo malo podataka je objavljeno vezano za korišćenje tečne džibre za proizvodnju mlečne kiseline, a ovim istraživanjima se trenutno intenzivno bave istraživači u Srbiji, autori ovog rada.

U džibri su prisutni slobodni fermentabilni šećeri, glukoza, manoza i rafinoza [74,75], pa uglavnom nije potreban enzimski predtretman kao kod skrobnih i lignoceluloznih sirovina. Džibra sadrži ostatke inaktivira-

nih ćelija kvasca bogatih azotom i vitaminima B grupe, pa se može očekivati dobra produktivnost bakterija mlečne kiseline [76,77]. Kao i kod drugih agroindustrijskih sirovina, hemijski sastav varira u različitim serijama, što otežava kontrolu procesa. Pregled osnovnih grupa jedinjenja prisutnih u tečnoj kukuruznoj džibri i njihove procentualne zastupljenosti dat je u tabeli 2 [76,77].

Tabela 2. Hemijski sastav tečne kukuruzne džibre [76,77]
Table 2. Chemical composition of thin stillage [76,77]

Osnovna grupa jedinjenja	Sadržaj, % suve materije
Suva materija	3,7–7,5
Proteini	1,3–2,3
Masti	≈1,3
Ugljeni hidrati	0,5–2,8
Skrob	0,5–0,56
Sirova vlakna	0,1–1,81
Pepeo	0,8–2,1

Autori ovog rada su ispitali uticaj temperature, mešanja i prisustva kiseonika na mlečno-kiselinsku fermentaciju na kukuruznoj džibri [78]. Najviši prinosi mlečne kiseline, 17,37 g/l medijuma, ostvareni su na džibri bez obogaćivanja pomoću soja *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* NRRL B-4564 [74], dok je sa *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 ostvaren prinos od 12,56 g/l medijuma [79]. Danas se dosta ispituju mogućnosti dobijanja bioetanolu i na drugim poljoprivrednim kulturama, kao što su ječam, raž, pirinač, pšenica, krompir i tritikale. U ovim procesima takođe zaostaje značajna količina džibre koja bi mogla potencijalno da se koristi za dobijanje mlečne kiseline. Pored kukuruzne džibre, do sada je ispitivana i mogućnost proizvodnje mlečne kiseline na džibri tritikalea [75,80]. Kod primene otpadnih sirovina za proizvodnju mlečne kiseline, često

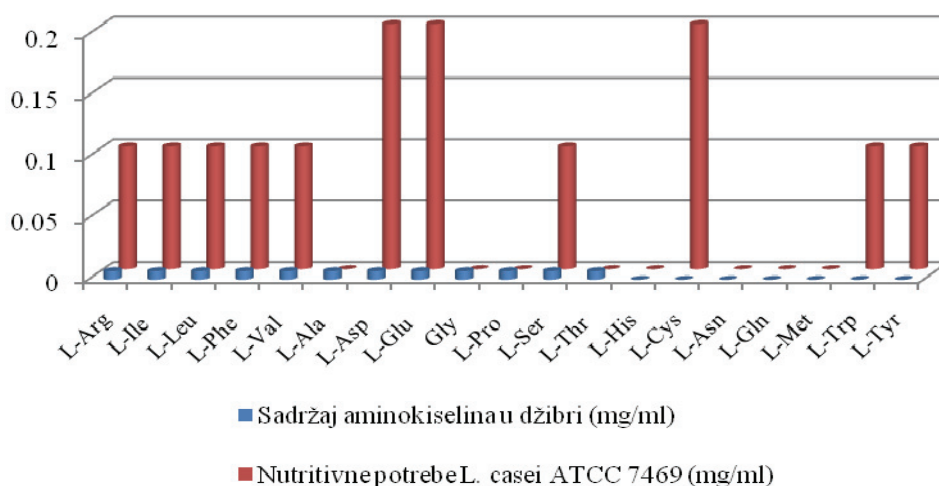
se javlja ograničenje izvorima azota i potreba za dodavanjem peptona i/ili kvašćevog ekstrakta da bi se povećali prinosi fermentacije. Slika 1 prikazuje aminokiselinski sastav kukuruzne džibre u poređenju sa nutritivnim potrebama *L. casei* ATCC 7469 [77,81].

U brojnim istraživanjima je pokazan značaj ekstrakcelularne proteolitičke aktivnosti *Lactobacillus spp.* za bolje iskorišćenje proteina prisutnih u podlozi [51,82]. Pored aminokiselina kao izvora azota, BMK za svoj rast zahtevaju i prisustvo vitamina u podlozi. Sadržaj najznačajnijih vitamina u smeši ražene i krompirove džibre u poređenju sa nutritivnim potrebama *L. casei* ATCC 7469 dat je na slici 2 [83,81].

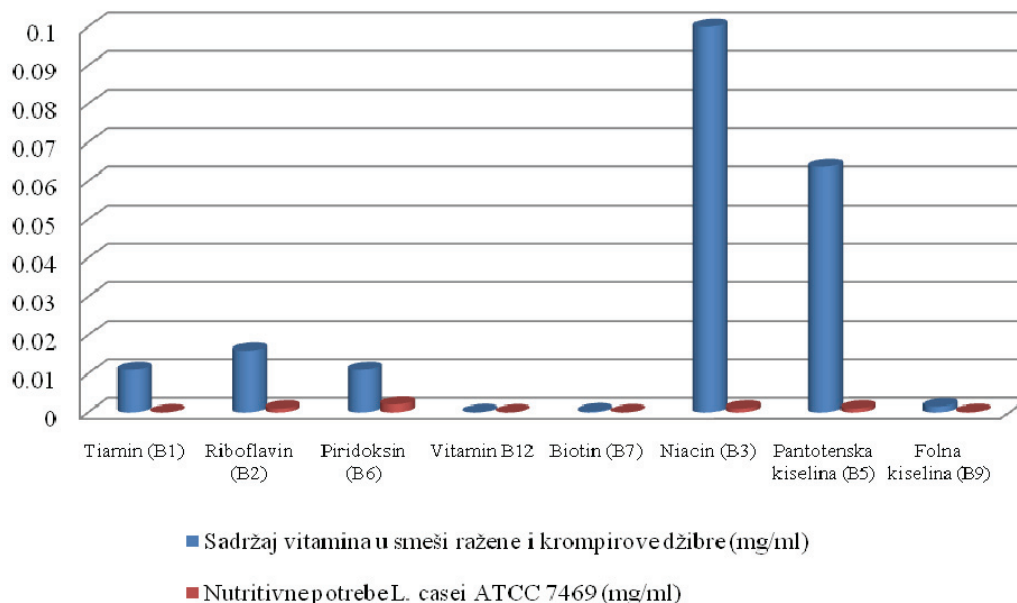
Može se očekivati da obogaćivanjem podloge izvorima azota i dodatkom pojedinih vitamina u zavisnosti od konkretno upotrebene sirovine i proizvodnog mikroorganizma budu povećani prinosi mlečne kiseline na džibri.

Tehnološka unapređenja u proizvodnji mlečne kiseline

Klasičan i industrijski najzastupljeniji proces za proizvodnju mlečne kiseline je šaržni proces na fermentabilnim šećerima (glukoza, laktoza, ksiloza, arabinoza, saharoza...) kao izvorom ugljenika [7]. Ovaj postupak nije dovoljno ekonomičan pre svega zbog cene sirovina. U slučaju korišćenja jeftinijih sirovina uglavnom je potrebno primeniti odgovarajući predtretman i kompletan postupak dobijanja mlečne kiseline je tada dvofazni. Prva faza obično obuhvata likvefakciju i saharifikaciju u kojoj se oslobađaju fermentabilni mono- i disaharidi. Nakon završene saharifikacije inokulišu se bakterije mlečne kiseline i izvodi se faza fermentacije. Za hidrolitičku fazu se mogu koristiti kiseline ili enzimi. U postupku kiselinske hidrolize neophodno je izvršiti naknadnu neutralizaciju dodate kiseline, pa se povećava koncentracija mineralnih soli koje inhibiraju rast mikroorganizama. U enzimskom procesu faza saharifikacije je duža i zahteva



Slika 1. Poređenje potrebnih količina aminokiselina za rast *L. casei* ATCC 7469 sa sadržajem aminokiselina u tečnoj kukuruznoj džibri.
Figure 1. Comparison of amino acid requirements of *L. casei* ATCC 7469 and amino acid content in corn thin stillage.

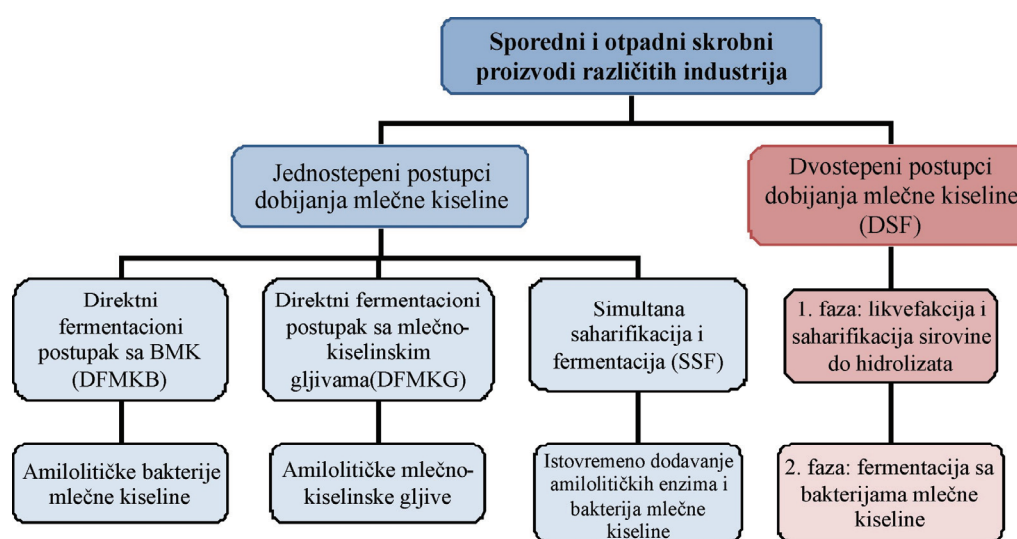


Slika 2. Poređenje potrebnih količina vitamina za rast *L. casei* ATCC 7469 i sadržaja istih vitamina u smeši ražene i krompirove džibre. Figure 2. Comparison of vitamin requirements for the growth of *L. casei* ATCC 7469 and vitamin content in the mixture of rye and potato thin stillage.

povišenu temperaturu, samim tim i dodatnu energiju, što uz cenu enzima poskupljuje proces [84]. Zbog navedenih nedostataka, na laboratorijskom nivou se ispituju postupci u kojima se saharifikacija i fermentacija objedinjuju u jednoj fazi (jednostepeni postupci), a istražuje se i mogućnost istovremenog odvijanja sve tri faze: likvefakcije, saharifikacije i fermentacije [30]. Takođe se ispituju i određeni modifikovani procesi sa međufaznom filtracijom i izbistravanjem medijuma, ali su oni još uvek nedovoljno ekonomični [30]. Šema najvažnijih do sada ispitivanih postupaka za fermentaciono

dobijanje mlečne kiseline iz skrobnih sirovina data je na slici 3.

Prednost jednostepenih postupaka leži u kraćem vremenu proizvodnje, smanjenju inhibicije visokim koncentracijama supstrata i smanjenju broja operacija u proizvodnji, što doprinosi ukupnom smanjenju troškova. U direktnom postupku fermentacije sa amilolitičkim gljivama mlečne kiseline (*Rhizopus spp.*) (DFGMK) postižu se prinosi 0,57–0,93 g/g supstrata, u zavisnosti od vrste mikroorganizma i supstrata [85,86], dok su u fermentaciji sa amilolitičkom bakterijom mlečne kiseline



Slika 3. Različiti postupci fermentacionog dobijanja mlečne kiseline. Figure 3. Various processes of fermentative lactic acid production.

(DFBMK), *L. amylophilus* GV6, ostvareni prinosi 0,92–0,96 g/g skroba [32].

U literaturi je vršeno poređenje efikasnosti različitih fermentativnih postupaka dobijanja mlečne kiseline sa *L. rhamnosus* [87]. Najveća produktivnost od $1,7 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ je ostvarena u postupku simultane saharifikacije i fermentacije (SSF). U dvostepenom postupku saharifikacije i fermentacije (DSF) postignuta je produktivnost od $1,0 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ uz nepotpuno iskorišćenje glukoze, a u postupku simultane likvefakcije, saharifikacije i fermentacije (SLSF) je ostvarena produktivnost od $1,6 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ [87].

Pored visoke produktivnosti, prednost SSF postupka je što se nakon fermentacije dobija medijum pogodnijeg viskoziteta i drugih fiziko-hemijskih svojstva značajnih za izdvajanje i prečišćavanje mlečne kiseline. Zbog toga se danas najviše ispituje mogućnost uvođenja SSF industrijskih postupaka. Uslovi temperature i pH pod kojima su aktivni amilolitički enzimi moraju biti optimalni i za sam mikroorganizam, da bi se ostvarili što veći prinosi, ali nije neophodno da fermentacioni mikroorganizam ima hidrolitičko delovanje. Da bi se koncipirao što povoljniji proces, izoluju se enzimi iz drugih mikroorganizama ili se koriste mešane kulture. Mešana kultura *L. casei* i *L. delbrueckii* je korišćena za fermentaciju pšeničnog brašna prethodno tretiranog proteazama. Na taj način je desetostruko smanjena potreba za obogaćivanjem medijuma izvorima azota, a ostvaren je prinos od 0,95g mlečne kiseline po gramu utrošenog skroba za 54 h [56]. Za postupke SSF je moguće koristiti i kombinacije plesni i bakterija. Koimobilizacijom amilolitičke plesni *Aspergillus awamori* sa mlečno-kiselinskom bakterijom *Streptococcus lactis* u SSF ostvaren je koeficijent prinosa 0,66 [88].

Poslednjih godina intenzivirana su istraživanja mogućnosti upotrebe novih tipova bioreaktora u cilju povećanja produktivnosti [89]. Imobilisani sistemi i kontinualni bioreaktori omogućavaju izvesna poboljšanja na polju ekonomičnosti i ekološke povoljnosti uz smanjenje troškova separacije koji spadaju u najviše u postupku. Tako je u seriji kontinualnih membranskih bioreaktora sa šupljim vlaknima postignuta produktivnost od $57 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ na hemijski definisanom medijumu sa *L. rhamnosus* ATCC 10863 [90]. Produktivnost kontinualnog fermentacionog postupka u membranskom bioreaktoru sa *L. paracasei* na hemijski definisanom medijumu je iznosila $31,5 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ i desetostruko je bila veća u odnosu na dolivni postupak [91].

U direktnim postupcima fermentacije na složenim prirodnim sirovinama postižu se niži prinosi. Tako je sa *L. amylovorus* u membranskom kontinualnom bioreaktoru, na skrobnom supstratu ostvarena produktivnost od $25 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ [92], dok je na surutki sa *L. bulgaricus* u membranskom bioreaktoru sa recirkulacijom ostvarena produktivnost od $22,5 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ [10]. Generalno se u kontinualnim membranskim bioreaktorima može ostvariti

veća koncentracija biomase i smanjiti inhibicija supstratom i proizvodima čime se povećava produktivnost u odnosu na šaržne i dolivne postupke. Ipak, ovi kontinualni procesi se još uvek ne koriste u industrijskim uslovima zbog veće mogućnosti kontaminacije, nestabilnosti proizvodnih mikroorganizama i visokih troškova kontrole procesa, naročito na složenim poljoprivrednim sirovinama.

Imobilizacija BMK je za sada dala skromnije rezultate u odnosu na smeštanje BMK u šuplja vlakna membranskih bioreaktora i uopšte kontinualne tehnološke procese. Imobilizacija ima za cilj da se poveća koncentracija proizvodnih mikroorganizama, njihovo ponovno vraćanje u proces i da se omogući lakša separacija proizvoda. Do sada su za imobilizaciju BMK uglavnom ispitivani alginatni gelovi i uočeno je razmekšavanje čestica, curenje BMK iz matrica gela i spora difuzija mlečne kiseline, što je dovelo do inhibicije BMK proizvodom. Oblaganjem alginatnih čestica hitozanom u cilju povećanja stabilnosti nešto je povećana produktivnost fermentacije. Imobilizacijom *L. casei* u Ca-alginatne čestice postignuta je produktivnost od $2,78 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$, a nakon oblaganja čestica sa hitozanom, povećana je proizvodnja mlečne kiseline na $3,46 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ [93]. Imobilizacijom na inertnije nosače (poliamidi i plastični kompoziti) postižu se nešto povoljniji rezultati koji se razlikuju u zavisnosti od proizvodnog mikroorganizma [94]. U procesu kontinualne proizvodnje mlečne kiseline sa *L. helveticus* imobilisanim u κ -karagenanu na surutki obogaćenju kvasnim ekstraktom ostvarena je visoka produktivnost $19\text{--}22 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ [95]. Pored imobilizacije za proizvodnju mlečne kiseline, poslednjih godina se značajno razmatra koncept enkapsulacije BMK u prehrambenoj industriji i proizvodnji probiotika za humanu upotrebu [96,97]. Ukoliko bi se postigao prihvatljiv stepen imobilizacije i zadovoljavajuće preživljavanje, korišćenje biomase zaostale nakon fermentacije za proizvodnju probiotskih preparata bi značajno povećalo isplativost čitavog postupka i omogućilo integrisanu proizvodnju mlečne kiseline i probiotika. Može se očekivati da će se usavršavanjem bioreaktora i nosača pogodnih za imobilizaciju BMK u skoroj budućnosti omogućiti industrijska primena ovih postupaka.

Najskuplja faza u proizvodnji mlečne kiseline u industrijskim uslovima, je izdvajanje i prečišćavanje dobijene mlečne kiseline iz fermentacionog medijuma. U zavisnosti od stepena prečišćenosti nakon izdvajanja postoji: tehnička mlečna kiselina, mlečna kiselina za prehrambenu namenu, mlečna kiselina farmaceutske čistoće i najčistija termo stabilna mlečna kiselina. U klasičnom procesu proizvodnje mlečne kiseline nastaju značajne količine gipsa, veoma štetanog za okolinu i procenjuje se da za svaku dobijenu tonu mlečne kiseline nastane tona gipsa [5]. Danas se teži korišćenju savremenijih postupaka koji stvaraju manje sporednih

produkata, pa su i ekološki znatno povoljniji, kao što su tečno-tečna ekstrakcija, mikrofiltracija, ultrafiltracija, elektrodijaliza, dvostruka elektrodijaliza itd. Veoma efikasan i ekonomičan postupak je dvostepena elektrodijaliza sa bipolarnim membranama i danas se već koristi industrijski [5]. Za separaciju i prečišćavanje se može koristiti i ekstrakcija dobijenih laktata vrelom vodom pod visokim pritiskom. U zavisnosti od primene dobijene mlečne kiseline mogu se formulirati i specifični integrisani postupci prečišćavanja. Tako se danas velike količine mlečne kiseline koriste za dobijanje polimera. Prekursori za dobijanje polimera su estri mlečne kiseline i moguće je u postupku prečišćavanja amonijum laktat prevesti u etil laktat, a onda se serijom separacionih membrana propusnih za vodu i amonijum jone, a nepropusnih za etanol i estre vrši odvajanje. Dobijeni amonijačni rastvor se može recirkulisati kao sredstvo za neutralizaciju u fermentaciji, a etil laktat se dalje prečišćava destilacijom i evaporacijom i nastaje visoko prečišćena mlečna kiselina [98].

ZAKLJUČAK

Potražnja za mlečnom kiselinom se značajno povećava u poslednjoj deceniji. Da bi se zadovoljile rastuće potrebe za ovim proizvodom razvijaju se jednostavni integrisani procesi, sa što manje sporednih proizvoda na obnovljivim ili otpadnim sirovinama koje ne koriste druge industrije. U industrijskim uslovima se već koriste složenije obnovljive poljoprivredne sirovine (kukuruz, šećerna repa i pirinač), a i procesi fermentacije i separacije su delimično integrisani. Na laboratorijskom nivou se ispituje korišćenje mnogih otpadnih sirovina. Nedostaci u pogledu promenljivosti sastava ovakvih sirovina u različitim serijama otežavaju upravljanje procesima, pa se intenzivno ispituju i kritični faktori za proizvodnju mlečne kiseline na svakoj od sirovina. Tečna džibra, kao jedna od najnovijih sirovina za dobijanje mlečne kiseline, daje obećavajuće rezultate i biće neophodna dodatna ispitivanja za karakterisanje fermentacije i ciljano povećanje produktivnosti. Jedan od novih pravaca u proizvodnom procesu za dobijanje mlečne kiseline mogao bi biti i iskorišćenje zaostale biomase BMK za formulisanje probiotskih preparata.

Zahvalnica

Ovaj rad je rezultat projekta TR31017 finansiranog od strane Ministarstva za prosvetu i nauku Republike Srbije.

LITERATURA

- [1] G. Reddy, M. Altaf, B.J. Naveena, M. Venkateshwar, E. V. Kumar, Amylolytic bacterial lactic acid fermentation - A review, *Biotechnol. Adv.* **26** (2008) 22–34.
- [2] Purac Corporate, www.purac.com.
- [3] Galactic Corporate, www.lactic.com.
- [4] F. Mirasol, Lactic acid prices falter as competition toughen, *Chem. Market Reporter* **255** (1999) 16.
- [5] R. Datta, M. Henry, Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies – a review, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **81** (2006) 1119–1129.
- [6] R. Datta, S.-P. Tsai, P. Bonsignore, S.-H. Moon, J.R. Frank, Technological and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives, *FEMS Microbiol. Rev.* **16** (1995) 221–231.
- [7] P. Rogers, S.J. Chen, J.M. Zidwick, Organic Acid and Solvent Production Part I: Acetic. Lactic. Gluconic. Succinic and Polyhydroxyalkanoic Acids., in: *The Prokaryotes: Handbook on the Biology of Bacteria. Volume 1: Symbiotic Associations. Biotechnology Applied Microbiology*, 3rd ed., M. Dworkin (Ed.), Springer Science Business Media, 2006, pp. 511–755.
- [8] E.T.H. Vink, K.R. Rábago, D.A. Glassner, P.R. Gruber, Applications of life cycle assessment to NatureWorks™ polylactide (PLA) production, *Polym. Degrad. Stabil.* **80** (2003) 403–419.
- [9] K. Hofvendahl, B. Hahn-Hägerdal, L-lactic acid production from whole wheat flour hydrolysate using strains of *Lactobacilli* and *Lactococci*, *Enzyme Microb. Technol.* **20** (1997) 301–307.
- [10] S. Tejayadi, M. Cheryan, Lactic acid from cheese whey permeate. Productivity and economics of a continuous membrane bioreactor, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43** (1995) 242–248.
- [11] J.-H. Kim, D.E. Block, S.P. Shoemaker, D.A. Mills, Conversion of rice straw to bio-based chemicals: an integrated process using *Lactobacillus brevis*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86** (2010) 1375–1385.
- [12] A. Pandey, C.R. Soccol, J.A. Rodriguez –Leon, P. Nigam, Solid state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications, Asatech Publishers, New Delhi, 2001.
- [13] K. Hofvendahl, B. Hahn-Hägerdal, Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources, *Enzyme Microb. Technol.* **26** (2000) 87–107.
- [14] P. Tubbs, The metabolism of D-alpha-hydroxy acids in animal tissues, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **119** (1965) 920–926.
- [15] L. Bari, A. Atlante, N. Guaragnella, G. Principato, S. Passarella, D-Lactate transport and metabolism in rat liver mitochondria, *Biochem. J.* **365** (2002) 391–403.
- [16] M. de Vrese, B. Koppenhoefer, C.A. Barth, D-Lactic acid metabolism after an oral load of DL-lactate, *Clin. Nutr.* **9** (1990) 23–28.
- [17] J.B. Ewaschuk, J.M. Naylor, G.A. Zello, D-Lactate in Human and Ruminant Metabolism, *J. Nutr.* **135** (2005) 1619–1625.
- [18] S. Varadarajan, D.J. Miller, Catalytic upgrading of fermentation-derived organic acids, *Biotechnol. Prog.* **15** (1999) 845–854.
- [19] M. Rakin, M. Vukašinić, S. Šiler-Marinković, M. Maksimović, Contribution of lactic acid fermentation to improved nutritive quality vegetable juices enriched with brewer's yeast autolysate, *Food Chem.* **100** (2007) 599–602.
- [20] M. Rakin, J. Baras., M. Vukasinović, The influence of brewers yeast autolysate and lactic acid bacteria on the

- production of a functional food additive based on beetroot fermentation, *Food Technol. Biotech.* **42** (2004) 105–109.
- [21] G. Campbell-Platt, Fermented foods - a world perspective, *Food Res. Int.* **27** (1994) 253–257.
- [22] H. Benninga, *A History of Lactic Acid Making: A Chapter in the History of Biotechnology*, Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, 1990, p. 144.
- [23] L. Axelsson, Lactic acid bacteria: classification and physiology, in: S. Salminen, A. von Wright, A. Ouwehand (Eds.), *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 3rd rev. and exp. ed., Marcel Dekker Inc., New York, 2004, pp. 1–66.
- [24] O. Kandler, Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria, *Anton. Leeuw. Int. J. G.* **49** (1983) 209–224.
- [25] L.K. Nakamura, C.D. Crowell, *Lactobacillus amylolyticus*. A new starch hydrolyzing species from swine waste corn fermentation, *Dev. Ind. Microbiol.* **20** (1979) 531–540.
- [26] L.K. Nakamura, *Lactobacillus amylovorus* a new starch-hydrolyzing species from cattle waste-corn fermentations, *Int. J. Syst. Bacteriol.* **31** (1981) 56–63.
- [27] J. Narita, K. Okano, T. Kitao, S. Ishida, T. Sewaki, M.-H. Sung, H. Fukuda, A. Kondo, Display of α -amylase on the surface of *Lactobacillus casei* cells by use of the PgsA anchor protein, and production of lactic acid from starch, *Appl. Environ. Microbiol.* **72** (2006) 269–275.
- [28] K.B. Lee, Comparison of fermentative capacities of *lactobacilli* in single and mixed culture in industrial media, *Process Biochem.* **40** (2005) 1559–1564.
- [29] P.J. Rojan, M.K. Nampoothiri, A. Pandey, Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74** (2007) 524–534.
- [30] Y.-Y. Linko, P. Javanainen, Simultaneous liquefaction, saccharification, and lactic acid fermentation on barley starch, *Enzyme Microb Technol.* **19** (1996) 118–123.
- [31] K. Hofvendahl, C. Akerberg, G. Zacchi, B. Hahn-Hägerdal, Simultaneous enzymatic wheat starch saccharification and fermentation to lactic acid by *Lactococcus lactis*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52** (1999) 163–169.
- [32] C. Vishnu, G. Seenayya, G. Reddy, Direct fermentation of various pure and crude starchy substrates to L(+) lactic acid using *Lactobacillus amylophilus* GV6, *W. J. Microbiol. Biotechnol.* **18** (2002) 429–433.
- [33] M. Altaf, B.J. Naveena, M. Venkateshwar, E.V. Kumar, G. Reddy, Single step fermentation of starch to L(+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using inexpensive nitrogen sources to replace peptone and yeast extract-optimization by RSM, *Process Biochem.* **41** (2006) 465–472.
- [34] M. Altaf, B.J. Naveena, G. Reddy, Use of inexpensive nitrogen sources and starch for L(+) lactic acid production in anaerobic submerged fermentation, *Biores. Technol.* **98** (2007) 498–503.
- [35] M. Altaf, M. Venkateshwar, M. Srijana, G. Reddy, An economic approach for L(+) lactic acid fermentation by *Lactobacillus amylophilus* GV6 using inexpensive carbon and nitrogen sources, *J. Appl. Microbiol.* **103** (2007) 372–380.
- [36] P.A. Nagarjun, R.S. Rao, S. Rajesham, L.V. Rao, Optimization of lactic acid production in SSF by *Lactobacillus amylovorus* NRRL B-4542 using Taguchi methodology, *J. Microbiol.* **43** (2005) 38–43.
- [37] P. Cheng, R.E. Muller, S. Jaeger, R. Bajpai, E.L. Jannotti, Lactic acid production from enzyme thinned cornstarch using *Lactobacillus amylovorus*, *J. Ind. Microbiol.* **7** (1991) 27–34.
- [38] L.P. Huang, B. Jin, P. Lant, J. Zhou, Simultaneous saccharification and fermentation of potato starch wastewater to lactic acid by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus*, *Biochem. Eng. J.* **23** (2005) 265–276.
- [39] K.V. Venkatesh, Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to lactic acid, *Bioresour. Technol.* **62** (1997) 91–98.
- [40] R. Yáñez, A.B. Moldes, J.L. Alonso, J.C. Parajó, Production of D(-)-lactic acid from cellulose by simultaneous saccharification and fermentation using *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens*, *Biotechnol. Lett.* **25** (2003) 1161–1164.
- [41] R. Yáñez, J.L. Alonso, J.C. Parajó, D-Lactic acid production from waste cardboard, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **80** (2005) 76–84.
- [42] S. Miura, T. Arimura, N. Itoda, L. Dwiarti, J.B. Feng, C.H. Bin, M. Okabe, Production of L-lactic acid from corncob, *J. Biosci. Bioeng.* **97** (2004) 153–157.
- [43] A.L. Woiciechowski, C.R. Soccol, L.P. Ramos, A. Pandey, Experimental design to enhance the production of L-(+)-lactic acid from steam-exploded wood hydrolysate using *Rhizopus oryzae* in a mixed-acid fermentation, *Process Biochem.* **34** (1999) 949–955.
- [44] E.Y. Park, Y. Kosakai, M. Okabe, Efficient production of L-(+)-lactic acid using mycelial cotton-like flocs of *Rhizopus oryzae* in an air-lift bioreactor, *Biotechnol. Prog.* **14** (1998) 699–704.
- [45] Y.J. Wee, J.S. Yun, D.H. Park, H.W. Ryu, Biotechnological production of L-(+)-lactic acid from wood hydrolyzate by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*, *Biotechnol. Lett.* **26** (2004) 71–74.
- [46] Y.D. Hang, Direct fermentation of cornstarch to L(+) lactic acid by *Rhizopus oryzae*. US Patent 4963486, 1990.
- [47] I. Yumoto, K. Ikeda, Direct fermentation of starch to L-(+)-lactic acid using *Lactobacillus amylophilus*, *Biotechnol. Lett.* **17** (1995) 543–546.
- [48] M. Raccach, T. Bamiro, The effect of temperature on the lactic acid fermentation of rye flour, *Food Microbiol.* **14** (1997) 213–220.
- [49] R. Anuradha, A.K. Suresh, K.V. Venkatesh, Simultaneous saccharification and fermentation of starch to lactic acid, *Process Biochem.* **35** (1999) 367–375.
- [50] R.P. John, G.S. Anisha, K.M. Nampoothiri, A. Pandey, Direct lactic acid fermentation: Focus on simultaneous saccharification and lactic acid production, *Biotechnol. Adv.* **27** (2009) 145–152.
- [51] W. Xiaodong, G. Xuan, S.K. Rakshit, Direct fermentative production of lactic acid on cassava and other starch substrates, *Biotechnol. Lett.* **9** (1997) 841–843.
- [52] X. Zhan, D. Wang, M.R. Tuinstra, S. Bean, P.A. Seib, X.S. Sun, Ethanol and lactic acid production as affected by

- sorghum genotype and location, *Ind. Crops Prod.* **18** (2003) 245–255.
- [53] D. Pejin, J. Jakovljević, R. Razmovski, J. Berenji, Experience in cultivation, processing and application of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.), In: A. Fuch, (Eds.), *Studies in Plant science*, 3, inulin and inulin-containing Crops, Elsevier, Amsterdam, 1993, pp. 51–57.
- [54] P.J. Rojan, K.M. Nampoothiri, A.S. Nair, A. Pandey, L(+)-Lactic acid production using *Lactobacillus casei* in solid-state fermentation, *Biotechnol. Lett.* **27** (2005) 1685–1688.
- [55] J.P. Rojan, K.M. Nampoothiri, A. Pandey, Solid-state fermentation for lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*, *Process Biochem.* **41** (2006) 759–763.
- [56] J.P. Rojan, K.M. Nampoothiri, A. Pandey, Simultaneous saccharification and L(+)-lactic acid fermentation of protease treated wheat bran using mixed culture of *lactobacilli*, *Biotechnol. Lett.* **28** (2006) 1823–1826.
- [57] B.P. Baker, Problems with Molasses in the Yeast industry, in: E. Sinda, E. Parkkinen (Eds.), *Symposium*, Helsinki, Finland, 1979, p.126.
- [58] L. Mojović, D. Pejin, M. Lazić, Bioetanol kao gorivostanje i perspektive, Tehnološki fakultet, Leskovac, 2007, pp. 33–62.
- [59] Y. Göksungur, U. Güvenç, Batch and continuous production of lactic acid from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **69** (1997) 399–404.
- [60] S. Bashir, S. Lee, Fuel ethanol production from agricultural lignocellulosic feedstocks—a review, *Fuel Sci. Technol. Int.* **12** (1994) 1427–1473.
- [61] E. Sjöström, *Wood chemistry, fundamentals and applications*, 2nd ed., Academic press, San Diego, 1993.
- [62] S. Schmidt, N. Padukone, Production of lactic acid from wastepaper as a cellulonic feedstock, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **18** (1997) 10–14.
- [63] A.O. Büyükkileci, S. Harsa, Batch production of L(+) lactic acid from whey by *Lactobacillus casei* NRRL B-441, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **79** (2004) 1036–1040.
- [64] T.B. Vickroy, Lactic acid, in: A. Moo-Young (Eds.), *Comprehensive biotechnology*, vol. 3., Dic Pergamon Press, Toronto, 1985, pp. 761–776.
- [65] B.J. Naveena, C. Vishnu, M. Altaf, G. Reddy, Wheat bran an inexpensive substrate for production of lactic acid in solid state fermentation by *Lactobacillus amylophilus* GV6-optimization of fermentation conditions, *J. Sci. Ind. Res.* **62** (2003) 453–456.
- [66] B.C. Saha, L.K. Nakamura, Production of mannitol and lactic acid by fermentation with *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693, *Biotechnol. Bioeng.* **82** (2003) 865–871.
- [67] M. Karel, V. Jaroslav, H. Vera, R. Mojmir, Lactic acid production in a cell retention continuous culture using lignocellulosic hydrolysate as a substrate, *J. Biotechnol.* **56** (1997) 25–31.
- [68] M.B. Tasić, V.B. Veljković, I.B. Banković-Ilić, M.L. Lazić, L.V. Mojović, Bioetanol – Stanje i perspektive, *Hem. ind.* **60** (2006) 1–10.
- [69] V.V. Semenčenko, L.V. Mojović, S.D. Petrović, O. Očić, Recent trends in bioethanol production, *Hem. Ind.* **65** (2011) 103–114.
- [70] L. Mojović, D. Pejin, M. Rakin, M. Vukašinić, J. Pejin, O. Grujić, S. Nikolić, M. Radosavljević, Ispitivanje mogućnosti korišćenja džibre iz proizvodnje bioetanol iz kukuruza, *PTEP*, **14** (2010) 54–57.
- [71] M. Rakin, L. Mojović, S. Nikolić, M. Vukašinić-Sekulić, D. Pejin, Poboljšanje kvaliteta džibre kao stočne hrane nakon proizvodnje bioetanol, *Ecologica*, **16** (2009) 151–154.
- [72] D. Pejin, L. Mojović, O. Grujić, J. Pejin, M. Rakin, The bioethanol production with the thin stillage recirculation, *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* **15** (2009) 49–52.
- [73] L. Mojović, D. Pejin, O. Grujić, S. Markov, J. Pejin, M. Rakin, M. Vukašinić, S. Nikolić, D. Savić, Progress in the production of bioethanol on starch-based feedstocks, *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* **15** (2009) 221–226.
- [74] M. Vukašinić-Sekulić, Lj. Mojović, M. Rakin, S. Nikolić, A. Đukić, M. Marković, S. Markov, Selekcija vrsta roda *Lactobacillus* za mlečnu fermentaciju tečne kukuruzne džibre, *Knjiga celih radova sa Konferencije Biotehnologija za održivi razvoj*, CD-izdanje, Tehnološko-metalurški fakultet Beograd, 2010.
- [75] M. Marković, S. Markov, D. Pejin, L. Mojović, M. Vukašinić, J. Pejin., N. Joković, The possibility of lactic acid fermentation in the triticale stillage *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* **17** (2011) 153–162.
- [76] M. Krzywonos, E. Cibis, T. Miškiewicz, A. Ryznar-Luty, Utilization and biodegradation of starch stillage (distillery wastewater), *Electron. J. Biotechn.* **12** (2009). <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol12/issue1/full/5/index.html>
- [77] Y. Kim, N. Mosier, R. Hendrickson, T. Ezeji, H. Blaschek, B. Dien, M. Cotta, B. Dale, M. Ladisch, Composition of corn dry-grind ethanol by-products: DDGS, wet cake, and thin stillage, *Bioresour. Technol.* **99** (2008) 5165–5176.
- [78] A. Đukić, Lj. Mojović, M. Rakin, M. Vukašinić-Sekulić, S. Nikolić, Uticaj temperature i prisustva kiseonika na mlečno-kiselinsku fermentaciju pomoću *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* NRRLB 4564 na tečnoj destilerijskoj džibri, *Knjiga celih radova sa Konferencije Biotehnologija za održivi razvoj*, CD-izdanje, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 2010.
- [79] S. Nikolić, M. Vukašinić-Sekulić, D. Pejin, Lj. Mojović, M. Rakin, J. Pejin, A. Đukić, Proizvodnja mlečne kiseline iz kukuruzne tečne džibre pomoću *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, *Knjiga celih radova sa Konferencije Biotehnologija za održivi razvoj*, CD-izdanje, Tehnološko-metalurški fakultet Beograd, 2010.
- [80] M. Marković, S. Markov, D. Pejin, Lj. Mojović, M. Vukašinić, J. Pejin, N. Joković, Primena džibre tritikalea za proizvodnju mlečne kiseline, *Knjiga celih radova sa Konferencije Biotehnologija za održivi razvoj*, CD-izdanje, Tehnološko-metalurški fakultet Beograd, 2010.
- [81] T. Morishita, Y. Deguchi, M. Yajima, T. Sakurai, T. Yura, Multiple nutritional requirements of *Lactobacilli*: genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways, *J. Bacteriol.* **148** (1981) 64–71.

- [82] C.I. Pereira, M.T. Barreto Crespo, M.V. San Romao, Evidence for proteolytic activity and biogenic amines production in *Lactobacillus curvatus* and *L. homohiochii*, Int. J. Food Microbiol. **68** (2001) 211–216.
- [83] M. Becker, K. Nehring, Handbuch der Futtermittel. 3rd ed., Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin, 1967.
- [84] A.L. Woiciechowski, S. Nitsche, A. Pandey, C.R. Soccol, Acid and enzymatic hydrolysis to recover reducing sugars from cassava bagasse: an economic study, Braz. Arch. Biol. Technol. **45** (2002) 393–400.
- [85] B. Jin, P. Yin, Y. Ma, L. Zhao, Production of lactic acid and fungal biomass by *Rhizopus* fungi from food processing waste streams, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **32** (2005) 678–686.
- [86] R.U. Yu, Y.D. Hang, Kinetics of direct fermentation of agricultural commodities to L(+) lactic acid by *Rhizopus oryzae*, Biotechnol. Lett. **11** (1989) 597–600.
- [87] L. Wang, B. Zhao, B. Liu, C. Yang, B. Yu, Q. Li, C. Ma, P. Xu, Y. Ma, Efficient production of L-lactic acid from cassava powder by *Lactobacillus rhamnosus*, Bioresour. Technol. **101** (2010) 7895–7901.
- [88] H. Kurusava, H. Ishikawa, H. Tanaka, L-lactic acid production from starch by coimmobilized mixed culture system of *Aspergillus awamori* and *Streptococcus lactis*, Biotechnol. Bioeng. **31** (1988) 183–187.
- [89] Z. Knežević-Jugović, Enzimsko inženjerstvo, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 2008.
- [90] S. Kwon, I.-K. Yoo, W.G. Lee, H.N. Chang, Y.K. Chang, High-rate continuous production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* in a two-stage membrane cell-recycle bioreactor, Biotechnol. Bioeng. **73** (2001) 25–34.
- [91] G.-Q. Xu, J. Chu, Y.-H. Wang, Y.-P. Zhuang, S.-L. Zhang, H.-Q. Peng, Development of a continuous cell-recycle fermentation system for production of lactic acid by *Lactobacillus paracasei*, Process Biochem. **41** (2006) 2458–2463.
- [92] D.X. Zhang, M. Cheryan, Starch to lactic acid in a continuous membrane bioreactor, Process Biochem. **29** (1994) 145–150.
- [93] Y. Göksungur, M. Gündüz, Ş. Harsa, Optimization of lactic acid production from whey by *L. casei* NRRL B-441 immobilized in chitosan stabilized Ca-alginate beads, J. Chem. Technol. Biotechnol. **80** (2005) 1282–1290.
- [94] A.L. Pometto III, A. Demirci, K.E. Johnson, Immobilization of microorganisms on a support made of synthetic polymer and plant material, US patent, 5595893, 1997.
- [95] A. W. Schepers, J. Thibault, C. Lacroix, Continuous lactic acid production in whey permeate/yeast extract medium with immobilized *Lactobacillus helveticus* in a two-stage process: Model and experiments, Enzyme Microb. Technol. **38** (2006) 324–337.
- [96] A.K. Anal, H. Singh, Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery, Trends Food Sci. Technol. **18** (2007) 240–251.
- [97] R. Vidhyalakshmi, R. Bhakayaraj, R.S. Subhasree, Encapsulation “The Future of Probiotics” – A Review, Adv. Biol. Res. **3** (2009) 96–103.
- [98] R. Datta, S.P. Tsai, Esterification of fermentation-derived acids via pervaporation, US Patent 5,723,639, 1998.

SUMMARY

NEW TRENDS AND CHALLENGES IN LACTIC ACID PRODUCTION ON RENEWABLE BIOMASS

Aleksandra J. Đukić Vuković¹, Ljiljana V. Mojović¹, Dušanka Pejin², Maja Vukašinović-Sekulić¹, Marica Rakin¹, Svetlana Nikolić¹ i Jelena Pejin²

¹*Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia*

²*Faculty of Technology, University of Novi Sad, Novi Sad, Serbia*

(Review paper)

Lactic acid is a relatively cheap chemical with a wide range of applications: as a preservative and acidifying agent in food and dairy industry, a monomer for biodegradable poly-lactide polymers (PLA) in pharmaceutical industry, precursor and chemical feedstock for chemical, textile and leather industries. Traditional raw materials for fermentative production of lactic acid, refined sugars, are now being replaced with starch from corn, rice and other crops for industrial production, with a tendency for utilization of agro-industrial wastes. Processes based on renewable waste sources have ecological (zero CO₂ emission, eco-friendly by-products) and economical (cheap raw materials, reduction of storage costs) advantages. An intensive research interest has been recently devoted to develop and improve the lactic acid production on more complex industrial by-products, like thin stillage from bioethanol production, corncoobs, paper waste, straw etc. Complex and variable chemical composition and purity of these raw materials and high nutritional requirements of lactic acid bacteria (LAB) are the main obstacles in these production processes. Media supplementation to improve the fermentation is an important factor, especially from an economic point of view. Today, a particular challenge is to increase the productivity of lactic acid production on complex renewable biomass. Several strategies are currently being explored for this purpose such as process integration, use of LAB with amylolytic activity, employment of mixed cultures of LAB and/or utilization of genetically engineered microorganisms. Modern techniques of genetic engineering enable construction of microorganisms with desired characteristics and implementation of single step processes without or with minimal pre-treatment. In addition, new bioreactor constructions (such as membrane bioreactors), utilization of immobilized systems are also being explored. Electrodialysis, bipolar membrane separation process, enhanced filtration techniques etc., can provide some progress in purification technologies, although it is still remaining the most expensive phase in the lactic acid production. A new approach of parallel production of lactic bacteria biomass with probiotic activity and lactic acid could provide additional benefit and profit rise in the production process.

Keywords: Lactic acid • Renewable biomass • Thin stillage • Fermentation