

PROIZVODNJA MLEČNE KISELINE NA TEČNOJ DESTILERIJSKOJ DŽIBRI POMOĆU *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469*

Aleksandra Đukić-Vuković¹, Ljiljana Mojović¹, Dušanka Pejin²,
Maja Vukašinić-Sekulić¹, Marica Rakin¹, Svetlana Nikolić¹, Jelena Pejin²

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

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

U radu je ispitivana proizvodnja mlečne kiseline na tečnoj destilerijskoj džibri nastaloj nakon proizvodnje bioetanola iz smeše otpadnog hleba i otpadne vode iz proizvodnje glutena. Mlečno-kiselinska fermentacija je vršena pomoću probiotički aktivne bakterije *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. U toku fermentacije praćen je sadržaj mlečne kiseline (po metodi Taylor-a), sadržaj redukujućih šećera (spektrofotometrijski metodom po Miller-u), pH, kao i rast bakterije (brojanjem ćelija Koh-ovom metodom na agarnim pločama). Utvrđeni su optimalni uslovi za proizvodnju mlečne kiseline: temperatura, koncentracija inokuluma, koncentracija dodatog CaCO₃ kao sredstva za neutralizaciju i intenzitet mešanja. Pri utvrđenim optimalnim uslovima ostvareni su prinosi od preko 80% od teorijskog prinosa mlečne kiseline u mikroaerofilnoj fermentaciji sa mešanjem. Najveći intenzitet fermentacije ostvaren je u toku prvih 24 časa, a fermentacija je završena nakon 72 časa. Pri optimalnim uslovima mlečno-kiselinske fermentacije uočen je intenzivan rast bakterije *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 što ukazuje na mogućnost paralelne proizvodnje mlečne kiseline i probiotičke biomase, čime bi se mogli postići bolji ekonomski efekti. Ispitivana džibra se pokazala kao pogodan medijum za mlečno kiselinsku fermentaciju

Ključne reči: proizvodnja mlečne kiseline, optimizacija, *L. rhamnosus* ATCC 7469, probiotici, tečna džibra

* Rad saopšten na IX Simpozijumu "Savremene tehnologije i privredni razvoj", Leskovac, 21. i 22. oktobar 2011. godine

Adresa autora: Ljiljana Mojović, Tehnološko-metalurški fakultet, Karnegijeva 4, 11000 Beograd, Srbija

E-mail: lmojovic@tmf.bg.ac.rs

UVOD

Mlečna kiselina je 2-hidroksi propionska kiselina koja se koristi kao rastvarač i prekursor u hemijskoj industriji, kao acidulant, konzervans i sredstvo za poboljšanje ukusa hrane u prehrambenoj industriji, monomer za proizvodnju biodegradabilne plastike i polilaktidnih polimera za farmaceutsku industriju. Potražnja za mlečnom kiselinom intenzivno raste poslednjih godina prvenstveno usled razvoja industrije polilaktidnih polimera i procenjeno je da će godišnja potražnja za mlečnom kiselinom do kraja 2011. godine biti 200 000 tona [1]. U ukupnoj svetskoj proizvodnji mlečne kiseline, fermentacioni postupak učestvuje sa 90%, a samo 10% mlečne kiseline se proizvodi sintezom iz laktonitrila [2]. Uobičajenim fermentacionim postupkom se mlečna kiselina dobija iz rafiniranih šećera (glukoze, saharoze) pomoću bakterija mlečne kiseline [3]. Troškovi proizvodnje mlečne kiseline, u zavisnosti od postupka, se kreću između 0,1-2,0 američka dolara po kg [4], a u februaru 2010. godine je cena mlečne kiseline bila 0,15 eura po kg [5]. Zbog visokih proizvodnih troškova i relativno niske cene mlečne kiseline ispituju se mogućnosti zamene skupih rafiniranih šećera kao izvora ugljenika sporednim i otpadnim proizvodima drugih industrija. Otpadni proizvodi su jeftina, lako dostupna, obnovljiva i ekološki povoljna sirovina za mlečno-kiselinsku fermentaciju, čijom upotrebom se značajno smanjuju negativni ekološki i ekonomski uticaji njihovog odlaganja. U velikoj meri se razvijaju industrijski postupci za proizvodnju mlečne kiseline prvenstveno na škrobnim, ali i drugim agro-industrijskim sirovinama od strane najvećih svetskih proizvođača mlečne kiseline i polilaktidnih polimera [6,7]. Tečna džibra je relativno nova sirovina koja se ispituje za dobijanje mlečne kiseline. Dosada je ispitivana proizvodnja na tečnoj džibri zaostaloj nakon proizvodnje bioetanola na kukuruznom brašnu i brašnu tritikalea [8-10]. Na tečnoj džibri nastaloj nakon proizvodnje bioetanola iz smeše otpadnog hleba i otpadne vode iz proizvodnje glutena do sada nije ispitivana mogućnost proizvodnje mlečne kiseline. Za sintezu mlečne kiseline na obnovljivim sirovinama najviše se ispituju *Lactobacillus sp.* kao proizvodni mikroorganizmi. U ovom istraživanju je korišćena homofermentativna, mikroaerofilna vrsta *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, koja osim sposobnosti proizvodnje mlečne kiseline poseduje i probiotska svojstva. Cilj ovog rada je da se ispituju mogućnosti i uslovi proizvodnje mlečne kiseline i biomase pomoću mikroorganizma *L. rhamnosus* ATCC 7469 na džibri iz proizvodnje bioetanola na smeši otpadnog hleba i otpadne vode iz proizvodnje glutena. Biomasa proizvodnog mikroorganizma bi se nakon izdvajanja mlečne kiseline iz fermentacionog medijuma mogla koristiti kao probiotski preparat u ishrani stoke. U radu su optimizovani uslovi temperature, koncentracije inokuluma, uslova mešanja i koncentracije sredstva za neutralizaciju u cilju efikasne proizvodnje mlečne kiseline i biomase.

EKSPERIMENTALNI DEO

Mlečno-kiselinska fermentacija je vođena u toku 72h na sterilisanoj tečnoj džibri, pomoću *L. rhamnosus* ATCC 7469. pH vrednosti džibre je pre početka fermentacije

podešena na vrednost 6,5, pomoću 0,1 M NaOH. Za ispitivanje je korišćena tečna hlebna džibra dobijena iz fabrike alkohola Reahem, Srbobran, Srbija. Koncentracija šećera u dobijenoj džibri je bila 12g/l i korigovana je dodatkom D-glukoze (Sigma-Aldrich) na 20 g/l. Mlečno-kiselinska fermentacija je izvođena u mikroaerofilnim uslovima, u erlenmajerima od 300 ml sa 100 ml tečne džibre kao podloge, prethodno sterilisane u autoklavu na 121°C u toku 20 min. Pre zasejavanja u tečnu džibru, kultura *L. rhamnosus* ATCC 7469 je gajena 18h u MRS bujonu, na 37°C. Mlečno-kiselinska fermentacija je vođena na različitim temperaturama: 37°C, 41°C, 45°C. Ispitana je fermentacija sa 2%, 5% i 10% (v/v) inokuluma i uz dodatak 1%, 2%, 5% i 10% CaCO₃ (w/v), statično i uz mešanje (90 obr/min). Za ispitivanje uticaja mešanja na tok fermentacije, korišćena je orbitalna tresilica (IKA, KS 4000i control, D_r= 2 cm). U toku fermentacije u određenim vremenskim intervalima praćen je pH, sadržaj mlečne kiseline, šećera i broj živih ćelija. Sadržaj mlečne kiseline je određivan spektrofotometrijskom metodom po Taylor-u [11]. Sadržaj redukujućih šećera je određivan spektrofotometrijskom metodom po Miller-u sa 3,5-dinitrosalicilnom kiselinom i izražen u g/l, računato na glukozu [12]. Broj živih ćelija je određivan Koh-ovom metodom brojanja na agranim pločama. Svi eksperimenti su rađeni u triplicatu i dobijene vrednosti su računate kao srednje vrednosti.

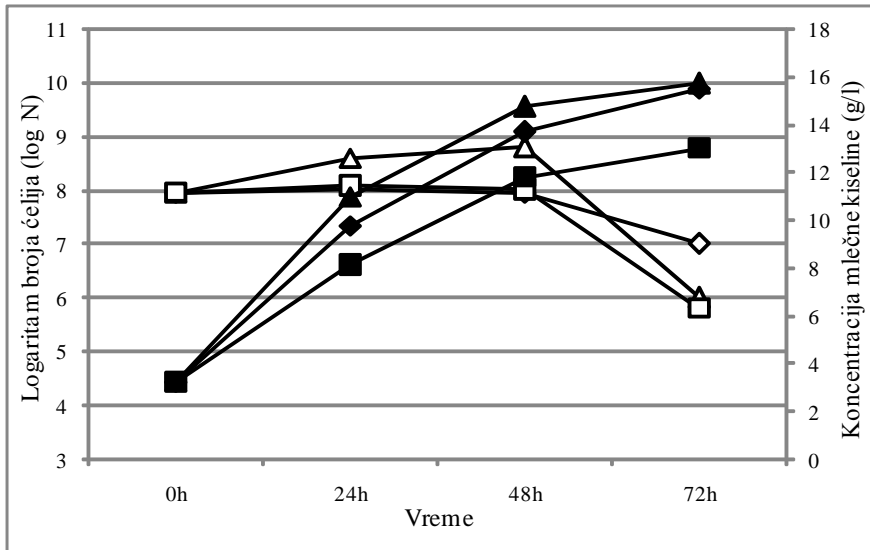
REZULTATI I DISKUSIJA

Uticaj temperature

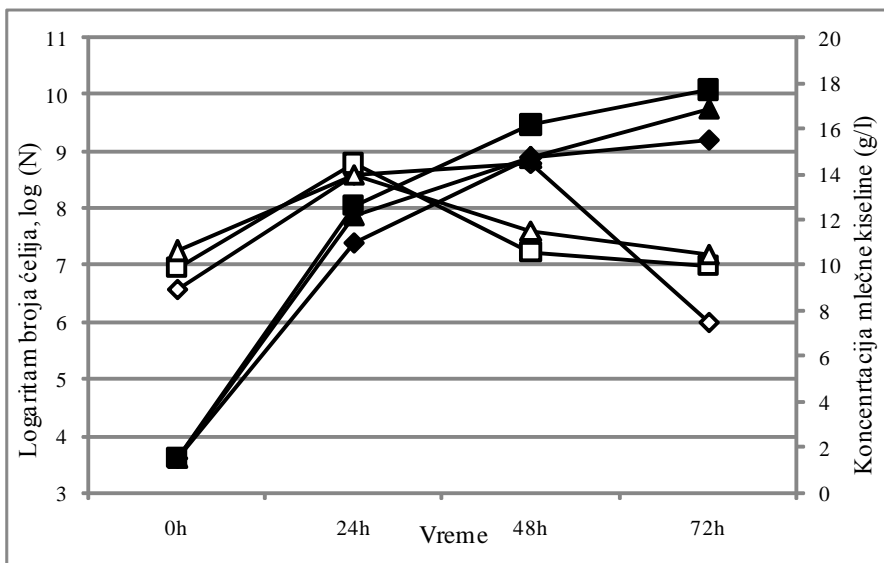
Na slici 1. je prikazana promena broja živih ćelija i koncentracije mlečne kiseline u statičnim, mikroaerofilnim uslovima na različitim temperaturama: 37°C, 41°C i 45°C. Nakon 72h fermentacije na temperaturama 37°C i 41°C su postignute približno iste vrednosti koncentracije mlečne kiseline i broja ćelija. Uočava se da na temperaturi 41°C, *L. rhamnosus* ATCC 7469 brže raste i stvara mlečnu kiselinu. Sa aspekta efikasnosti proizvodnje važno je ostvariti što višu produktivnost procesa, pa je zbog intenzivnije fermentacije u toku prvih 48 h kao optimalna odabrana temperatura 41°C koja je korišćena u daljim eksperimentima. U ispitivanju na kukuruznoj tečnoj džibri sa istim sojem, kao optimalna za proizvodnju mlečne kiseline je takođe odabrana temperatura od 41°C [9], dok je u ispitivanjima mlečno-kiselinske fermentacije sa *L. paracasei* ssp. *paracasei* NRRL B-4564 utvrđeno da se optimalna temperatura za rast (30°C) i temperatura za proizvodnju mlečne kiseline (41°C) značajno razlikuju [8].

Uticaj koncentracije inokuluma

Uticaj koncentracije inokuluma na prinos mlečne kiseline i rast *L. rhamnosus* ATCC 7469 u statičnoj, mikroaerofilnoj fermentaciji prikazan je na slici 2. Najviša koncentracija mlečne kiseline nakon 72 h fermentacije, 17,7 g/l, ostvarena je sa 5% inokuluma, uz prinos od 0,80 g_{mk}/g_s (g mlečne kiseline po g šećera). Na kukuruznoj tečnoj džibri je postignuta koncentracija od 18,4 g/l mlečne kiseline i prinos od 0,80 g_{mk}/g_s pomoću *L. paracasei* ssp. *paracasei* NRRL B-4564 [13], a sa *L. rhamnosus* ATCC 7469 prinos od 0,70 g_{mk}/g_s [9].



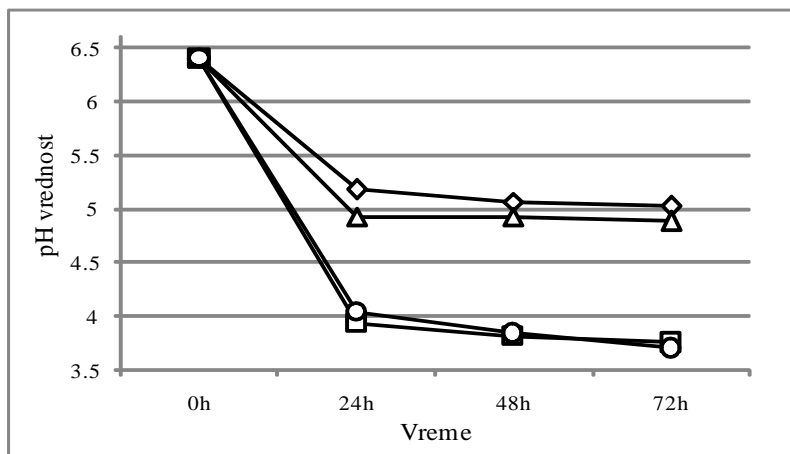
Slika 1. Promena koncentracije mlečne kiseline (tamni simboli) i broja ćelija (svetli simboli) u toku fermentacije džibre pomoću bakterije *L. rhamnosus* ATCC 7469. Eksperimentalni uslovi: statična, mikroaerofilna fermentacija, 2% (v/v) koncentracija inokuluma, početni pH=6,5, početna koncentracija šećera 20,92 g/l, temperatura: 37°C (◇), 41°C (Δ) i 45°C (□).



Slika 2. Promena koncentracije mlečne kiseline (tamni simboli) i broja ćelija (svetli simboli) *L. rhamnosus* ATCC 7469 pri različitim koncentracijama inokuluma. Eksperimentalni uslovi: statična, mikroaerofilna fermentacija, početni pH=6,5, početna koncentracija šećera 20,2 g/l, temperatura 41°C, 2% (◇), 5% (□) i 10% (Δ) koncentracija inokuluma (v/v).

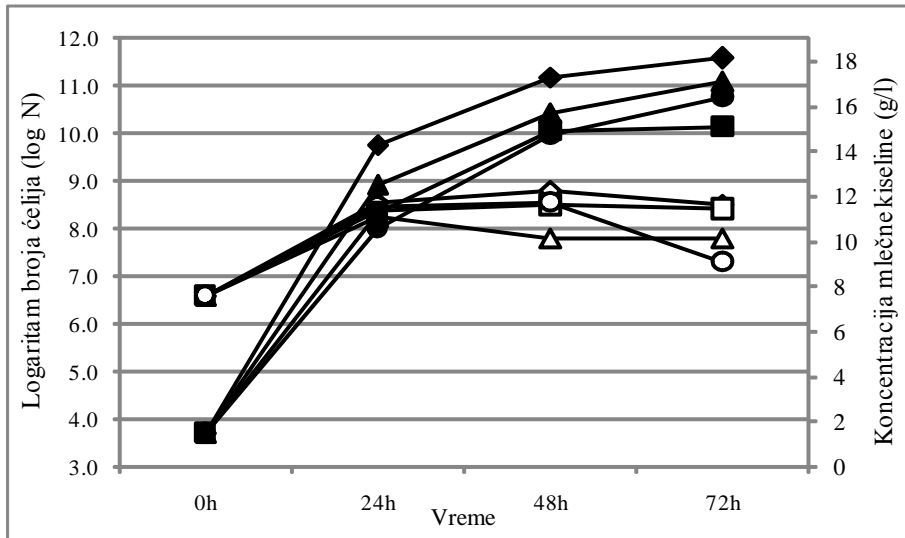
Uticaj mešanja i dodatka CaCO₃ kao sredstva za neutralizaciju

U ovim ispitivanjima na početku fermentacije dodavano je 1 % CaCO₃ (w/v) kao sredstva za neutralizaciju, statično ili sa mešanjem i praćena je promena pH vrednosti (slika 3.). Za rast *L. rhamnosus* ATCC 7469 i proizvodnju mlečne kiseline je optimalan pH = 6-6,5 [14]. U toku prvih 24h časa fermentacije, uočava se najdrastičniji pad pH vrednosti u fermentacionom medijumu sa i bez dodatka CaCO₃ (Slika 3), iako se dodatkom CaCO₃ omogućava održavanje pH vrednosti iznad 4,75.



Slika 3. Promena pH vrednosti u toku fermentacije sa *L. rhamnosus* ATCC 7469. Eksperimentalni uslovi: mikroaerofilna fermentacija, 5% koncentracija inokuluma, početni pH=6,4, početna koncentracija šećera 20,5 g/l, temperatura 41°C, sa 1% CaCO₃ sa mešanjem (90 obrt/min) (◇), sa 1% CaCO₃ statično (Δ), bez dodatka CaCO₃ sa mešanjem (90 obrt/min) (□), bez CaCO₃ statično (○).

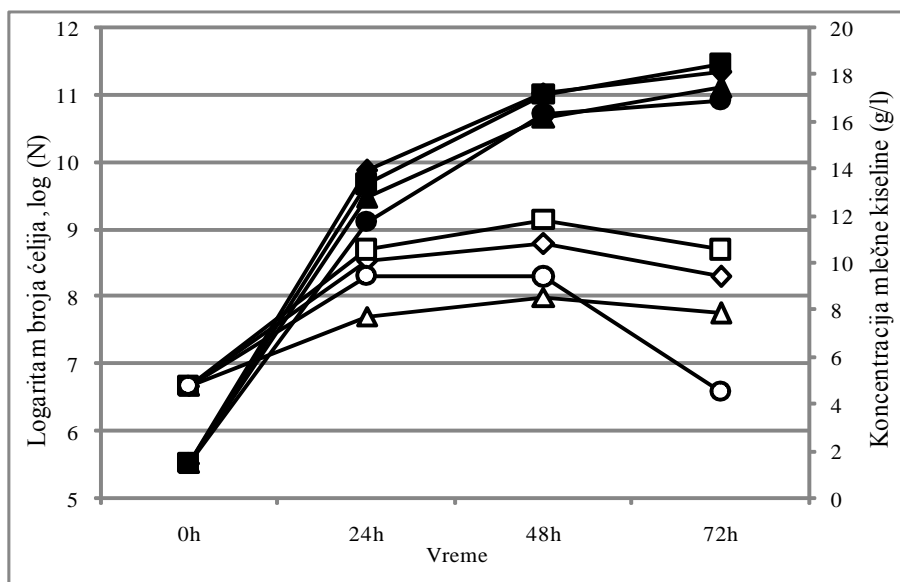
Na slici 4. je prikazan uticaj dodatka CaCO₃ kao sredstva za neutralizaciju na prinos mlečne kiseline i rast proizvodnog mikroorganizma u mikroaerofilnim uslovima. Najveća koncentracija mlečne kiseline, 18,1 g/l, se postiže uz dodatak CaCO₃ i mešanje, sa prinosom 0,81 g/g i produktivnošću 0,23 gl⁻¹h⁻¹. Mešanjem se postiže bolja kontrola pH (slika 3.), što se može objasniti boljim prenosom mase između čestica CaCO₃ i fermentacionog medijuma što dalje utiče na efikasniju neutralizaciju nastale mlečne kiseline. Takođe, u medijumu sa CaCO₃ i mešanjem, ostvaren je intenzivan rast i visok broj bakterija (3,5*10⁸ CFU/ml) nakon 72h fermentacije.



Slika 4. Promena koncentracije mlečne kiseline (tamni simboli) i broja ćelija (svetli simboli) *L. rhamnosus* ATCC 7469 uz kontrolu pH i mešanje. Eksperimentalni uslovi i simboli kao na slici 3.

Uticaj koncentracije dodatog CaCO_3

Slika 5. prikazuje promenu broja ćelija i proizvodnju mlečne kiseline pri različitim koncentracijama CaCO_3 , pri brzini mešanja 90 obrt/min, u mikroaerofilnim uslovima. Uočava se najbolji rast bakterija pri koncentraciji 2% CaCO_3 (w/v), dok je sadržaj proizvedene mlečne kiseline približno isti pri koncentraciji 2% i 5% CaCO_3 . Sa ekonomske tačke gledišta povoljnije je za neutralizaciju fermentacionog medijuma koristiti niže koncentracije (2% CaCO_3) pri čemu je postiže visok prinos mlečne kiseline od 0,83 g/g. Uočava se da sa povećanjem koncentracije dodatog CaCO_3 iznad 2% značajno opada broj živih ćelija, uz manji uticaj na sam prinos mlečne kiseline. U ispitivanjima dobijanja mlečne kiseline na melasi šećerne repe pomoću *L. delbrueckii* je uočen sličan trend značajnog smanjenja viabilnosti sa porastom koncentracije CaCO_3 preko 7%, uz smanjenje prinosa mlečne kiseline [16]. Najviša koncentracija mlečne kiseline proizvedene na tečnoj džibri iznosila je 18,49 g/l uz dodatak 2% CaCO_3 . Pri ovim uslovima je nakon 72 h postignuta produktivnost od 0,26 $\text{gl}^{-1}\text{h}^{-1}$ (Slika 5.). U procesu simultane saharifikacije i fermentacije na brašnu kasave pomoću *L. rhamnosus* postignuta je koncentracija mlečne kiseline od 175,4 g/l, ali je i početna koncentracija šećera bila značajno viša, 222,5g/l [17].



Slika 5. Promena koncentracije mlečne kiseline (tamni simboli) i promena broja ćelija (svetli simboli) *L. rhamnosus* ATCC 7469 pri različitim koncentracijama CaCO₃. Eksperimentalni uslovi: mikroaerofilna fermentacija, uz mešanje (90 obrt/min), 5% (v/v) koncentracija inokuluma, početni pH=6,5, početna koncentracija šećera 20,60 g/l, temperatura 41°C, sa dodatkom 1% (◇), 2% (□), 5% (Δ) i 10% (○) CaCO₃ (w/v).

ZAKLJUČAK

Najefikasnija proizvodnja mlečne kiseline na tečnoj hleбноj džibri je postignuta na temperaturi od 41°C, sa 5% inokuluma i uz dodatak 2% CaCO₃, pri brzini mešanja od 90 obrt/min. Prinos mlečne kiseline od preko 80% na hleбноj džibri ukazuje na značajan potencijal ove džibre za proizvodnju mlečne kiseline. Zbog intenzivnog rasta u toku fermentacije i visoke vrednosti broja *L. rhamnosus* ATCC 7469 po završetku fermentacije, moguće je zaostalu biomasu iskoristiti kao vredan probiotski aktivan dodatak stočnoj ishrani. Korišćenje zaostale biomase u ishrani stoke bi moglo imati pozitivan efekat na ukupnu isplativost procesa.

Zahvalnica

Ovaj rad je deo projekta TR 31017 finansiranog od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

Literatura

- [1] G. Reddy, M. Altaf, B.J. Naveena, M. Venkateshwar and E. V. Kumar, *Biotechnol. Adv.* 26 (2008) 22-34
- [2] R. Datta and M. Henry, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81 (2006) 1119–1129
- [3] P. Rogers, S.J. Chen and J.M. Zidwick, in: *The Prokaryotes: Handbook on the Biology of Bacteria*, E. M. Dvorkin 3rd ed., Springer Science Business Media, (2006), pp. 511–755
- [4] L. Wang, B. Zhao, B. Liu, C. Yang, B. Yu, Q. Li, C. Ma, P. Xu and Y. Ma, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 7895–7901
- [5] <http://www.foodnavigator.com/Financial-Industry/Purac-raises-lactic-acid-prices-as-raw-materials-rocket>
- [6] K. Hofvendahl and B. Hahn-Hägerdal, *Enzyme Microb. Technol.* 26 (2000) 87–107
- [7] A. Djukić Vuković, Lj. Mojović, D. Pejin, M. Vukašinović-Sekulić, M. Rakin, S. Nikolić i J. Pejin, *Hemijska industrija*, (2011) in press
DOI:10.2298/HEMIND110114022D
- [8] A. Djukić, Lj. Mojović, M. Rakin, M. Vukašinović-Sekulić, S. Nikolić, *Knjiga celih radova sa Konferencije Biotehnologija za održivi razvoj*, CD-izdanje, Tehnološko-metalurški fakultet Beograd, 2010.
- [9] S. Nikolić, M. Vukašinović-Sekulić, D. Pejin, Lj. Mojović, M. Rakin, J. Pejin, A. Đukić, *Knjiga celih radova sa Konferencije Biotehnologija za održivi razvoj*, CD-izdanje, Tehnološko-metalurški fakultet Beograd, 2010.
- [10] M. Marković, S. Markov, D. Pejin, L. Mojović, M. Vukašinović, J. Pejin and N. Joković, *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* 17 (2011) in press.
DOI:10.2298/CICEQ100916065M
- [11] K. A. C. C. Taylor, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 56 (1996) 49–58
- [12] G.L. Miller, *Anal. Chem.* 31 (1959) 426–428
- [13] L. Mojović, M. Vukašinović Sekulić, A. Đukić, D. Pejin, M. Rakin, J. Pejin and S. Nikolić, *Journal on Processing and Energy in Agriculture*, 15 (2011) 1-5
- [14] D. Guoqiang, R. Kaul and B. Mattiasson, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36 (1991) 309–14
- [15] R. Data and M. Henry, *Chem Technol Biotechnol* 8 (2006) 1119–1129
- [16] C. Kotzamanidis, T. Roukas and G. Skaracis, *World J Microbiol Biotechnol* 18 (2002) 441-448
- [17] L. Wang, B. Zhao, B. Liu, C. Yang, B. Yu, Q. Li, C. Ma, P. Xu and Y. Ma, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 7895–7901

SUMMARY

THE PRODUCTION OF LACTIC ACID ON LIQUID DISTILLERY STILLAGE BY *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469

(Original scientific paper)

**Aleksandra Djukić-Vuković¹, Ljiljana Mojović¹, Dušanka Pejin²,
Maja Vukašinović-Sekulić¹, Marica Rakin¹, Svetlana Nikolić¹, Jelena Pejin²**

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

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

The production of lactic acid on a liquid distillery stillage remaining after the bioethanol production on a mixture of waste bread and waste water from the production of wheat gluten was studied in this work. The lactic acid fermentation was performed with a probiotic lactic acid bacteria *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. During the fermentation, parameters such as the concentration of lactic acid (according to Taylor method), the concentration of reducing sugars (spectrophotometric method according to Miller), pH, and the bacterial growth (counting method on agar plates) were followed. The optimal conditions for the production of lactic acid such as: temperature, inoculum concentration, concentration of added CaCO₃ for neutralization and shaking intensity were determined. Under these conditions, a yield of over 80% of the theoretical yield was achieved. The highest intensity of the lactic acid production was noticed during the first 24 hours of fermentation, while the fermentation completely ended after 72 hours. An intensive growth of the *L. rhamnosus* ATCC 7469 was detected under the optimal conditions, indicating a possibility of the parallel production of lactic acid and probiotic biomass. This approach could be economically more favourable. The liquid stillage used in this study was shown as a good substrate for lactic acid fermentation.

Key words: lactic acid production, optimization, *L. rhamnosus* ATCC 7469, probiotics, liquid stillage

Primljen / Received: 18. maj 2011. godine

Prihvaćen / Accepted: 03. jun 2011. godine