

# Mogućnosti, perspektive i ograničenja u proizvodnji mlečne kiseline na sporednim i otpadnim sirovinama

Dragana D. Mladenović<sup>1</sup>, Aleksandra P. Djukić-Vuković<sup>1</sup>, Jelena D. Pejin<sup>2</sup>, Sunčica D. Kocić-Tanackov<sup>2</sup>, Ljiljana V. Mojović<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Tehnološko–metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

<sup>2</sup>Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, Srbija

## Izvod

U skladu sa ciljevima održivog razvoja i potrebama zaštite životne sredine danas se velika pažnja usmerava ka razvoju novih tehnologija u kojima se koriste sporedni i otpadni industrijski proizvodi. Otpadni proizvodi predstavljaju potencijalnu sirovinu za biotehnošku proizvodnju bioetanol, biogasa, biodizela, organskih kiselina, enzima, mikrobne biomase itd. Od prve industrijske proizvodnje do danas, mlečna kiselina (MK) je našla široku primenu u prehrambenoj, kozmetičkoj, farmaceutskoj i hemijskoj industriji, a poslednjih godina potražnja za MK je znatno povećana zbog njene uloge u proizvodnji biodegradabilnih laktidnih polimera. Ispitivanja mogućnosti fermentacione proizvodnje MK na otpadnim sirovinama su danas intenzivna kako zbog smanjenja ukupnih troškova proizvodnje MK, tako i zbog ekološkog problema odlaganja otpadnih materijala. U cilju unapređenja procesa, poboljšanja produktivnosti i dobijanja proizvoda visoke čistoće ispituju se novi proizvodni mikroorganizmi i fermentacioni postupci. U ovom radu je dat pregled nedavnih istraživanja proizvodnje MK na sporednim i otpadnim industrijskim sirovinama, kao i mogućnosti pojedinih tehnoloških postupaka u proizvodnji MK.

**Ključne reči:** mlečna kiselina, bakterije mlečne kiseline, otpadne sirovine, sporedne sirovine, fermentacija.

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

Biorafinerijski koncept pored održive prerade biomase predviđa korišćenje sporednih i otpadnih proizvoda iz jednog proizvodnog procesa kao polaznih sirovina za dobijanje energije, goriva ili hemikalija. Trenutno se u svetu više od 80% energije i oko 90% organskih hemikalija proizvodi iz fosilnih izvora [1]. Zbog naglog porasta svetske populacije i poboljšanja životnog standarda potrošnja energije i hemikalija neprekidno raste (približno 7% godišnje) [1], što dovodi do sve veće zabrinutosti u pogledu snabdevanja kako energijom tako i sirovinama u budućnosti. Evropska komisija je 2012. godine usvojila strategiju pod nazivom „Inovativnost za održivi rast – bioekonomija za Evropu“ čiji je cilj razvoj novih tehnologija i proizvodnja uz smanjenje štetne emisije, pretvaranje otpadnih proizvoda u bio-proizvode, bioenergiju i biogorivo, kao i veća upotreba obnovljivih i održivih izvora [2]. U tom svetlu su ispitivani različiti supstrati za primenu u biotehnoškoj proizvodnji MK kao izuzetno tražene i široko primenjene supstance u hemijskoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj, prehrambenoj i tekstilnoj industriji.

U novije vreme MK se intenzivno koristi za proizvodnju polimera-polilaktida. Zbog biorazgradivosti poli-

Prepiska: Lj. Mojović, Tehnološko–metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Karnegijeva 4, 11000 Beograd, Srbija.

E-pošta: lmojovic@tmf.bg.ac.rs

Rad primljen: 3. aprik, 2015

Rad prihvaćen: 2. septembar, 2015

PREGLEDNI RAD

UDK 502/504:638.4.04:579.864

Hem. Ind. 70 (4) 435–449 (2016)

doi: 10.2298/HEMIND150403050M

laktidi se mogu koristiti kao ekološki prihvatljiva alternativa za konvencionalne plastične materijale, a zbog biokompatibilnosti nalaze primenu u medicini i farmaciji kao materijali za fiksaciju fraktura, kontrolisano oslobađanje leka i sl. [3]. Prema procenama Global Industry Analyst Inc. očekuje se da će globalno tržište za MK dostići 367 300 tona do 2017. godine [4], a preko milion tona do 2020. godine [5]. Godišnji porast potražnje za MK od približno 20% se očekuje prvenstveno usled rastućeg trenda primene polilaktida [6]. Trenutno, 90% svetske proizvodnje MK se odvija mikrobnom fermentacijom ugljenih hidrata pomoću homofermentativnih mikroorganizama koji sintetišu MK kao glavni proizvod [7]. Izborom odgovarajućeg mikroorganizma koji proizvodi samo jedan od izomera (D- ili L-MK) se može dobiti optički čist proizvod, dok hemijska proizvodnja uvek daje racemsku smešu izomera MK [7]. Kao proizvodni mikroorganizmi najčešće se koriste bakterije mlečne kiseline (BMK), ali i predstavnici roda *Bacillus* i plesni roda *Rhizopus*. Svaka od navedenih grupa producenata MK ima određene prednosti i nedostatke usled različitih morfoloških, fizioloških i biohemijskih karakteristika, a najbolji uslovi za fermentaciju i postizanje visokih prinosa proizvoda nisu uvek najpovoljniji sa ekonomske tačke gledišta. Izbor mikroorganizma za proizvodnju MK prvenstveno zavisi od sposobnosti fermentacije ugljenih hidrata. Poželjna karakteristika proizvodnih mikroorganizama je sposobnost da

daju visoke prinose D- ili L-MK fermentacijom jeftinih izvora ugljenika, sa minimalnom potrebom za obogaćivanjem medijuma izvorima azota i faktorima rasta.

Ovaj rad daje uvid u dosadašnja istraživanja vezana za fermentacionu proizvodnju MK na sporednim i otpadnim industrijskim sirovinama. Analizirani su izazovi u mlečno-kiselinskoj fermentaciji, kao i do sada ispitivane tehnologije na polju proizvodnje MK. U cilju postizanja boljih prinosa analizirana je upotreba mešanih kultura, različitih strategija dolivnog fermentacionog postupka, imobilisanih i bioreaktorskih sistema. Razmatrana je i mogućnost vođenja otvorenog (nesterilnog) fermentacionog postupka, kao jednog od načina za ekonomski održivu proizvodnju MK.

## MIKROORGANIZMI PRODUCENTI MLEČNE KISELINE

### Bakterije mlečne kiseline

BMK predstavljaju heterogenu grupu mikroorganizama čija je glavna karakteristika sposobnost sinteze MK kao glavnog, a ponekad i jedinog proizvoda fermentacije šećera. Grupa BMK uključuje sledeće rodove: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* i *Weissella* [8]. BMK su Gram-pozitivne, nesporogene, acidotolerantne, anaerobne do mikroaerofilne bakterije. Generalno se opisuju kao katalaza negativne, iako pojedine vrste roda *Lactobacillus* imaju pseudokatalazu [9]. BMK mogu selektivno da proizvode jedan specifičan stereoisomer MK ili njihovu mešavinu u različitim proporcijama. Glavni enzim odgovoran za stereospecifičnu proizvodnju MK je laktat dehidrogenaza (LDH) koji ima L i D formu, pa izomer proizvedene MK zavisi od toga koji je oblik enzima prisutan kod BMK [7]. BMK su aukso-trofi i zbog ograničene sposobnosti da sintetišu faktore rasta zahtevaju podlogu bogatu aminokiselinama i vitaminima [7]. Pojedine vrste BMK imaju sposobnost produkcije ekstracelularnih amilolitičkih enzima, što ih čini pogodnim za direktnu proizvodnju MK iz različitih skrobnih sirovina [10]. Takođe, pojedine vrste BMK proizvode inulinazu i imaju sposobnost da fermentišu frukto-oligosaharide, pa se mogu koristiti za direktnu fermentacionu proizvodnju MK iz sirovina koje sadrže inulin [11,12]. U direktnoj fermentaciji na Jerusalimskoj artičoki sa *Lactobacillus paracasei* KCTC 13169 je postignuta koncentracija MK od 92,5 g L<sup>-1</sup> [11], dok je pomoću *Lb. paracasei* DSM 23505 na brašnu cikorije postignuta koncentracija MK od 127,3 g L<sup>-1</sup> [12]. Poslednjih godina istraživanje mogućnosti korišćenja lignoceluloznog materijala za proizvodnju MK zahtevalo je pronalaženje mikroorganizama sposobnih za efikasnu konverziju pentozna (ksiloze i arabinoze) prisutnih u hemiceluloznim frakcijama lignoceluloznih sirovina. Na supstratima bogatim ksilozom su ispitivane sledeće

vrste BMK: *Enterococcus mundtii* QU 25 [13], *Lb. pentosus* ATCC 8041 [14], *Leuconostoc lactis* [15] i *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 [16].

Pored navedenih vrsta BMK od značaja za primenu u proizvodnji MK na otpadnim supstratima su i bakterije roda *Bacillus*, kao i plesni iz roda *Rhizopus*.

### Bakterije roda *Bacillus*

Vrste iz roda *Bacillus* takođe imaju sposobnost proizvodnje MK, a na otpadnim supstratima je najviše ispitivana vrsta *Bacillus coagulans*. To su Gram-pozitivne, sporogene, aerobne do mikroaerofilne, termofilne bakterije koje mogu da rastu i proizvode optički čistu L-MK u temperaturnom intervalu od 50 do 60 °C [17–20]. Visoke optimalne temperature smanjuju rizik od kontaminacije mezofilnim vrstama mikroorganizama i omogućavaju otvorenu (nesterilnu) fermentaciju, što smanjuje ukupne troškove proizvodnje [19]. Sojevi *B. coagulans* fermentišu heksoze i pentoze i zbog toga su pogodni mikroorganizmi za proizvodnju MK na lignoceluloznim sirovinama [20]. Za razliku od BMK ove bakterije mogu da rastu u jednostavnom medijumu, ne zahtevajući složene izvore azota. Michelson i sar. [21] su izvršili poređenje dva proizvodna mikroorganizma, *Lb. delbrueckii* DSM 20073 i *B. coagulans* SIM-7 u optimizovanom fermentacionom medijumu za oba soja. Koncentracija MK i produktivnost koju je postigao *B. coagulans* tokom 10 h fermentacije su bili 56 g L<sup>-1</sup> i 5,5 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, dok su postignute vrednosti istih parametara fermentacije za *Lb. delbrueckii* tokom 24 h fermentacije bile 52 g L<sup>-1</sup> i 2,2 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> [21]. Na osnovu postignute produktivnosti *B. coagulans* je pokazao sposobnost efikasnije konverzije supstrata pa se može smatrati pogodnijim za primenu u ispitivanom sistemu uz energetski i ekonomski niže zahteve.

### Plesni roda *Rhizopus*

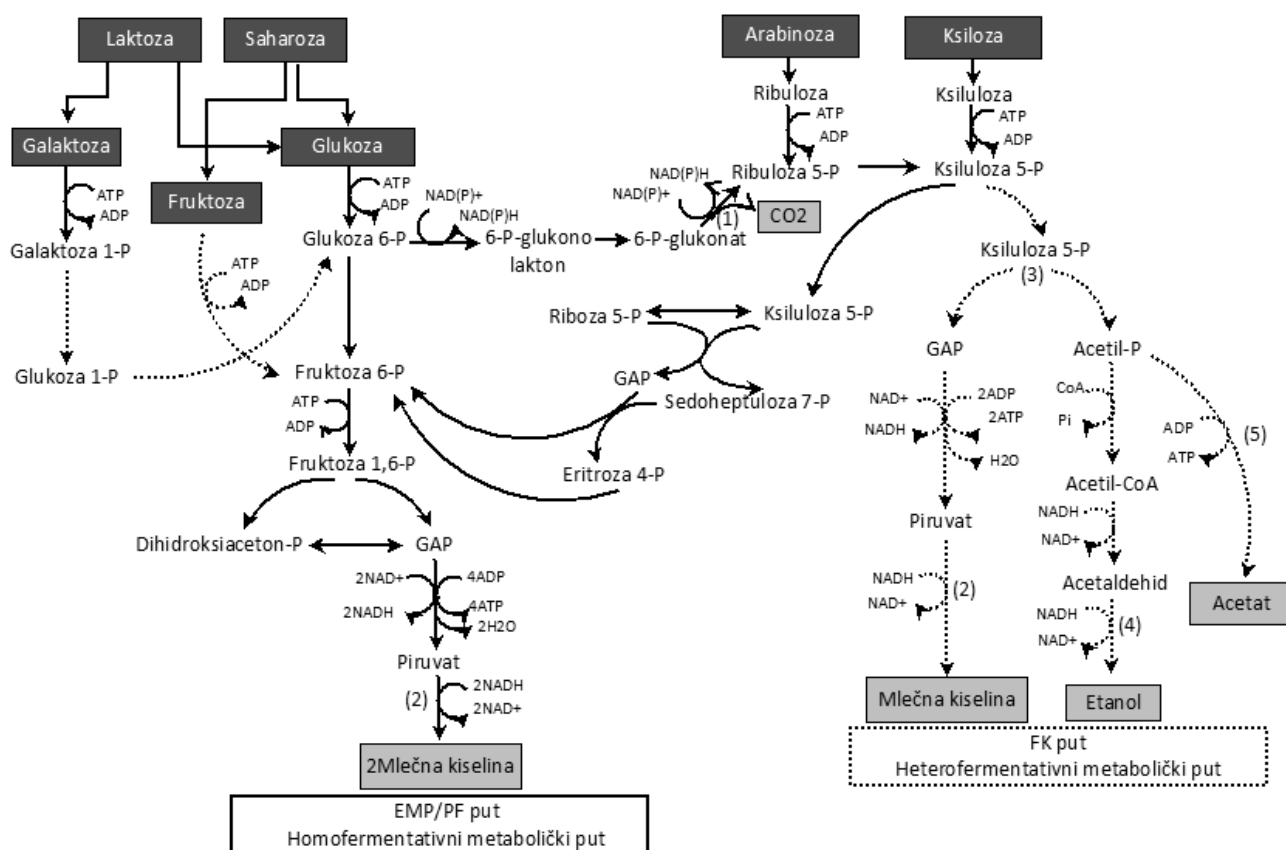
Pojedine vrste plesni koje pripadaju rodovima *Mucor*, *Monilia* i *Rhizopus* takođe proizvode MK, a *Rhizopus oryzae* je prva vrsta ispitivana za industrijsku proizvodnju MK [22]. *R. oryzae* i *R. arrhizus* proizvode amilolitičke enzime, pa mogu da fermentišu skrob do glukoze i dalje direktno do L-MK, bez prethodne saharifikacije [23,24]. *R. oryzae* ima sposobnost da metaboliše ksilozu, što ga čini atraktivnim za proizvodnju MK iz lignoceluloznog materijala [25–27]. Filamentozni rast plesni olakšava njihovo odvajanje iz fermentacionog medijuma, a zaostala mikroba biomasa predstavlja vredan sporedni proizvod fermentacije koji se može koristiti u ishrani životinja kao izvor proteina, za prečišćavanje otpadnih voda ili proizvodnju hitozana [23,27]. Plesni mogu da rastu u jednostavnom, neorganskom medijumu, bez dodatka skupih izvora azota [23], što je njihova osnovna prednost u odnosu na BMK. Međutim, na osnovu dosadašnjih rezultata može se zaključiti da fermentacija pomoću plesni još uvek

nije konkurentna bakterijskoj, a niži prinosi se pripisuju ograničenom prenosu mase kiseonika i hranljivih materija usled filamentoznog rasta, a delom i formiranju sporednih proizvoda kao što su etanol, CO<sub>2</sub>, fumarna, jabučna i limunska kiselina [23,25].

### METABOLIČKI PUTEVI BAKTERIJA MLEČNE KISELINE

BMK imaju sposobnost da fermentišu ugljene hidrate, heksoze i pentoze, različitim metaboličkim putevima i shodno tome daju različite produkte fermentacije, na osnovu čega se dele na homofermentativne i heterofermentativne. Na slici 1 su šematski prikazani različiti metabolički putevi proizvodnje MK. Glavni krajnji proizvod fermentacije kod homofermentativnih vrsta u anaerobnim uslovima je isključivo MK, dok heterofermentativni predstavnici metabolišu ugljene hidrate do acetate ili etanola, CO<sub>2</sub>, MK i drugih metabolita. Homofermentativne BMK metabolišu heksoze Embden–Meyerhof–Parnas (EMP) putem, pri čemu nastaju 2 mola MK od svakog mola glukoze, sa teorijskim prinosom MK od 1 g g<sup>-1</sup>. Budući da se mali procenat izvora ugljenika koristi za proizvodnju mikrobne biomase (0,07–0,22 g g<sup>-1</sup>) eksperimentalni prinosi su obično niži

(0,74–0,99 g g<sup>-1</sup>) [28]. BMK koje koriste isključivo ovaj metabolički put su obligatno homofermentativne, a osim glukoze mogu da metabolišu i druge heksoze kao što su fruktoza, manozna ili galaktoza, ali nemaju sposobnost da fermentišu pentoze. Heterofermentativne BMK koriste alternativni pentozo-fosfatni (PF) put kojim heksoze konvertuju do pentozna i CO<sub>2</sub>. Nastale pentoze dalje metabolišu fosfoketolaznim (FK) putem do laktata, etanola ili acetata. BMK koje metabolišu ugljene hidrate samo ovim putem su obligatno heterofermentativne. Heterofermentativne BMK iz jednog mola glukoze daju 1 mol MK, 1 mol CO<sub>2</sub> i 1 mol etanola ili acetata, pri čemu postižu maksimalni teorijski prinos MK od 0,5 g g<sup>-1</sup> [28,29]. Mnoge heterofermentativne BMK metabolišu pentoze FK putem i pri tome postižu maksimalni prinos MK od 0,6 g g<sup>-1</sup> [29]. Pored BMK koje su klasifikovane kao obligatno homofermentativne, odnosno obligatno heterofermentativne, pojedine vrste roda *Lactobacillus* su označene kao fakultativno heterofermentativne. Iako ove bakterije metabolišu heksoze preko EMP puta, takođe poseduju i enzim fosfoketolazu koja se može indukovati u prisustvu pentozna [30].



Slika 1. Metabolički putevi bakterija mlečne kiseline. Enzimi: (1) 6-fosfogluconat dehidrogenaza; (2) laktat dehidrogenaza; (3) fosfoketolaza; (4) alkohol dehidrogenaza; (5) acetat kinaza.

Figure 1. Metabolic pathways in lactic acid bacteria. Enzymes: (1) 6-phosphogluconate dehydrogenase; (2) lactate dehydrogenase; (3) phosphoketolase; (4) alcohol dehydrogenase; (5) acetate kinase.

## SPOREDNE I OTPADNE SIROVINE ZA PROIZVODNJU MLEČNE KISELINE

Za proizvodnju MK fermentacionim putem se mogu koristiti sirovine koje sadrže fermentabilne šećere ili polisaharide koji se mogu razgraditi do fermentabilnih šećera. Veliki broj istraživanja do nedavno je bio fokusiran na proizvodnju MK iz rafiniranih šećera i jestivih useva [7]. Međutim, ovakva proizvodnja je ekonomski nepovoljna, zato što su rafinirani šećeri skupi, a globalna potražnja za hranom je sve veća. Takođe, MK je prilično jeftin proizvod, trenutna tržišna cena MK za prehrambenu upotrebu iznosi 1400–1600 US\$ po toni [31]. Zbog toga, u novije vreme se intenzivnije razmatra proizvodnja MK iz jeftinih sirovina, kao što su otpadne sirovine iz poljoprivrede, šumarstva i industrije.

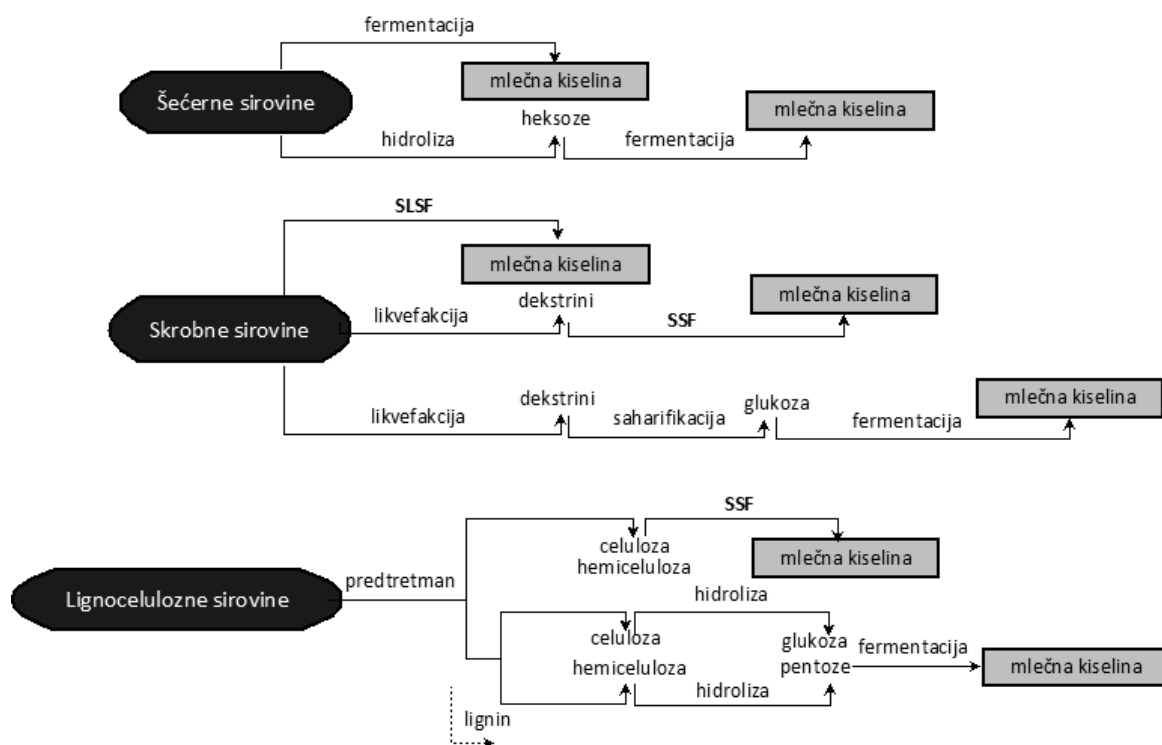
Na slici 2 šematski su prikazani različiti postupci mlečno-kiselinske fermentacije u zavisnosti od korišćenog supstrata, dok su u tabeli 1 prikazane postignute vrednosti najvažnijih parametara mlečno-kiselinske fermentacije na različitim otpadnim supstratima.

Otpadne sirovine mogu imati veliki potencijal kao izvori fermentabilnih šećera, ali i mnogih drugih jedinjenja od značaja za rast mikroorganizama, kao što su proteini, mineralne materije i vitamini. Zbog složenosti njihovog sastava i varijacija u hemijskim i fizičkim karakteristikama potrebna su detaljna ispitivanja i optimizacija procesnih parametara za svaku od otpadnih siro-

vina kako bi se omogućila njihova upotreba u biotehnoškim procesima.

### Surutka

Surutka je zeleno-žučkasta tečnost koja nastaje kao sporedni proizvod u procesu proizvodnje sira i kazeina. Žučkasta boja surutke je rezultat prisustva riboflavina (vitamina B<sub>2</sub>) [32]. Iako surutku karakteriše nutritivno vredan sastav, a time i mogućnost njenog iskorišćavanja u različitim biotehnoškim procesima, čak 50% surutke se bez prethodne obrade ispušta u vodotokove [33]. Surutka ima visoko organsko opterećenje sa vrednostima hemijske i biološke potrošnje kiseonika u opsegu od 27–60 i 50–102 g L<sup>-1</sup>, redom [32]. Takođe, proizvodnjom 1 kg sira nastaje 9 kg surutke [32], pa je jasno da surutka koja se ispušta u vodotokove predstavlja veliki ekološki problem. Prema prosečnom sastavu, surutka sadrži oko 93–94% vode i hranljive materije iz mleka, kao što su laktoza, rastvorljivi proteini, mineralne materije, MK i masti [32,34]. Međutim, i pored nutritivne vrednosti surutke BMK zahtevaju dodatno obogaćivanje aminokiselinama i peptidima [34]. U proizvodnji MK surutka se najčešće dopunjuje ekstraktom kvasca i proteinskim lizatima (peptonima) [34,35]. Obogaćivanje surutke se može izbeći ukoliko se supstrat prethodno tretira proteolitičkim enzimima ili proteolitičkim mikroorganizmima [34], kao što su vrste rodova *Pseudomonas* i *Bacillus*. Vasala i sar. [34] su



Slika 2. Shematski prikaz osnovnih faza proizvodnje mlečne kiseline na različitim supstratima. SSF – simultana saharifikacija i fermentacija; SLSF – simultana likvefakcija, saharifikacija i fermentacija.

Figure 2. Schematic overview of basic phases of lactic acid production on various materials. SSF – simultaneous saccharification and fermentation; SLSF – simultaneous liquefaction, saccharification and fermentation.

Tabela 1. Vrednosti najvažnijih parametara mlečno-kiselinske fermentacije na različitim otpadnim sirovinama;  $c$  – koncentracija MK,  $Y_{p/s}$  – prinos (g MK/g početnog šećera),  $Y_{p/uš}$  – koeficijent prinosa po supstratu (g MK/g utrošenog šećera),  $P$  – produktivnost  
 Table 1. Values of the most important parameters of lactic acid fermentation on different waste materials

Mikroorganizam	Soj	Tip otpadnog supstrata	Mlečna kiselina				Referenca
			$c / g L^{-1}$	$Y_{p/s} / g g^{-1}$	$Y_{p/uš} / g g^{-1}$	$P / g L^{-1} h^{-1}$	
<i>Lactobacillus</i> sp.	RKY2	Surutka	116,92	–	0,99	0,93	[99]
<i>Lb. delbrueckii</i>	NRRL B-445	Surutka	12–24,5	0,67–0,82	0,87–0,94	0,27–0,57	[100]
<i>Lb. casei</i>	NRRL B-441	Surutka	–	–	0,92–0,94	1,36–1,87	[101]
<i>Lb. casei</i>	LC1	Otpad iz proizvodnje rikota sira	14,4–30,6	–	0,86–0,92	0,72–1,53	[102]
<i>Lb. delbrueckii</i>	NCIMB 8130	Melasa šećerne repe	90,0	–	0,97	3,8	[42]
<i>E. faecalis</i>	RKY1	Melasa šećerne repe	65,1	–	0,98	4,3	[103]
<i>Lb. delbrueckii</i>	IFO 3202	Melasa šećerne repe	60,3	–	0,95	3,4	[104]
<i>Lb. delbrueckii</i>	C.E.C.T 286	Melasa šećerne repe	45,1	–	0,88	2,7	[105]
<i>R. oryzae</i>	NRRL 395	Melasa šećerne repe	37,0–49,0	–	–	–	[106]
<i>Lb. delbrueckii</i>	NCIM 2025	Melasa šećerne trske	64,86	–	–	2,7	[107]
<i>Lb. delbrueckii</i>	JCM 1148	Melasa šećerne trske	107	0,90	0,91	1,48	[108]
<i>B. coagulans</i>	H-1	Melasa šećerne trske	34,5	–	0,97	1,4	[109]
<i>Lb. pentosus</i>	NRRL B227	Sojina melasa	29,38	–	–	1,22	[49]
<i>Lb. agilis</i>	LPB 56	Sojina džibra	22,29	–	–	0,46	[49]
<i>Lb. rhamnosus</i>	ATCC 7469	Hlebna džibra	18,58	0,73	0,90	–	[46]
<i>E. hawaiiensis</i>	CICIM-CU B0114	Kukuruzna džibra	56,0	0,70	–	1,17	[110]
<i>Lb. rhamnosus</i>	LA-04-1	Hidrolizat pšeničnih mekinja	74,0–80,0	–	0,98–0,99	2,35–3,75	[111]
<i>R. arrhizus</i>	DAR 36017	Otpadni skrobni materijali	8,2–44,3	–	0,6–0,96	–	[112]
<i>R. arrhizus</i>	36017	Otpadna voda iz proizvodnje skroba	19,74	0,91	–	0,41	[24]
<i>Lb. delbrueckii</i>	JCM1106	Otpadni pirinač	63,3–79,0	0,65–0,81	–	1,40–3,59	[53]
<i>Lb. rhamnosus</i>	ATCC 7469	Otpad iz reciklaže papira	29,8–72,9	–	0,70–0,91	0,29–2,19	[16]
<i>Lb. delbrueckii</i>	UFV H2B20	Pivski trop	5,4	–	0,73	0,11	[113]
<i>Bacillus</i> sp.	XZL9	Otpad iz proizvodnje ksilitola	26,4	0,42	–	0,55	[114]

pokazali da tretiranje surutke pomoću *B. megaterium* može biti podjednako efikasno kao i tretiranje komercijalnim proteazama. Surutka koja je tretirana membranskim procesima kao što su ultrafiltracija i diafiltracija u cilju dobijanja koncentrata proteina je takođe ispitivana za proizvodnju MK [36].

### Melasa

Melasa se zbog visokog sadržaja ugljenih hidrata, azotnih jedinjenja i slatkog ukusa, tradicionalno koristi za dobijanje vrednih proizvoda prehrambene i fermentacione industrije. U našoj zemlji veći deo melase se koristi za proizvodnju kvasca i etanola [37]. Danas se melasa više ne smatra otpadnim proizvodom već sekundarnom sirovinom, a na raspolaganju su ograničene količine koje su uslovljene proizvodnjom šećera zbog čega njena cena drastično raste. U industriji šećera pod melasom se smatra sirup dobijen na poslednjem stepenu kristalizacije u postupku proizvodnje rafinisanog šećera iz šećernih sirovina (šećerna repa i šećerna trska) [37]. Prinos melase zavisi od više faktora i razlikuje se od šarže do šarže, dok se hemijski sastav melase menja iz godine u godinu kako zbog promene

kvaliteta osnovne sirovine, tako i zbog promena koje nastaju u toku njenog skladištenja i čuvanja. Smatra se da prinos melase šećerne repe iznosi oko 4% na repu, odnosno 25% na proizvedeni šećer [38].

Glavni deo melase šećerne repe čine ugljeni hidrati, pre svega saharoza, čiji je sadržaj u melasi oko 50%. Osim saharoze, melasa šećerne repe sadrži glukozu, fruktozu i rafinozu [37,38]. Najveći deo azotnih materija u melasi čini betain, a ostalo su aminokiseline, amidi i soli amonijaka [37,38]. Smatra se da je melasa koja ne sadrži dovoljnu količinu azotnih materija nekompletna sirovina za fermentacionu industriju. Jedan od kriterijuma za ocenu pogodnosti melase je sadržaj azota koji mikroorganizmi lako asimiluju, a od suštinske važnosti su aminokiseline, peptidi, amonijak, nitrati i nitriti [39]. Karakteristična tamnobraon boja melase najvećim delom potiče od melanoidina (proizvoda Majlardove reakcije), ali i od proizvoda karamelizacije i alkalne degradacije heksoza [37].

U pojedinim studijama je razmatrana prethodna obrada melase u cilju poboljšanja efikasnosti procesa (katjonske izmenjivačke smole, tretman sumpornom kiselinom, trikalcijum fosfatom, kalijum ferocijanidom,

aktivnim ugljem ili tretman etilen diamin tertasirćetnom kiselinom) jer bojene materije, 5-hidroksimetilfurfural i metali (Fe, Zn, Cu, Mn, Mg i Ca) koji se nalaze u melasi mogu da inhibiraju rast mikroorganizama [40–42] i inaktiviraju enzime biosintetičkog puta željenog proizvoda. Poređenjem pomenutih postupaka predtretmana melase pokazano je da fermentacija na netretiranoj melasi daje najviše koncentracije MK [42], pa se može zaključiti da se ispitivanim predtretmanima neselektivno uklanjaju komponente melase koje su važne za efikasnu proizvodnju MK [42].

### Destilerijska džibra

U postupku dobijanja bioetanola iz šećernih, skrobnih ili lignoceluloznih sirovina kao sporedni proizvod nastaje velika količina džibre. U proseku 8–15 L džibre nastaje proizvodnjom 1 L etanola [43]. Džibru karakterišu visoke vrednosti hemijske i biološke potrošnje kiseonika, niska pH vrednost, visok sadržaj organskih materija i zbog toga se ne sme ispuštati u okolinu bez prethodnog tretmana [43]. Visoki troškovi obrade džibre pre ispuštanja u vodotokove ozbiljno utiču na održivost i profitabilnost proizvodnje bioetanola, a njeno odlaganje predstavlja ozbiljan ekološki problem. Procesi koji koriste ovu otpadnu tečnost kao sirovinu za dalju proizvodnju imaju značajnu ulogu u kontroli i smanjenju zagađenja životne sredine, a takođe i povećavaju konkurentnost bioetanola kao alternativnog goriva. Neki od pravaca primene i iskorišćavanja džibre su recirkulacija u cilju ukomljavaanja sirovine za proizvodnju etanola, njena upotreba kao visoko kvalitetne hrane za životinje, za fertigaciju biljaka i upotreba džibre kao supstrata u različitim fermentacionim tehnologijama [43,44]. Karakteristike džibre se razlikuju i zavise od načina izvođenja procesa proizvodnje etanola, kao i od karakteristika i obrade polazne sirovine. Nakon uklanjanja etanola destilacijom u džibri ostaju inaktivirane ćelija kvasca bogate vitaminima (naročito B kompleksa) zbog čega džibra može biti potencijalno dobar supstrat za dobijanje vrednih proizvoda. Takođe, u džibri se mogu naći zaostali fermentabilni šećeri koji su lako dostupni mikroorganizmima. Džibra je korišćena kao supstrat za proizvodnju kalijum acetata [45], MK [46], ali i drugih proizvoda kao što su hitozan, astaksantin, alternan, pululan [44].

Kao supstrat za mlečno-kiselinsku fermentaciju je ispitivana džibra iz proizvodnje bioetanola na otpadnom hlebu [46], kukuruzu [47], tritikaleu [48] i sojinoj melasi [49]. Ispitivanjem mogućnosti proizvodnje MK na džibri zaostaloj nakon proizvodnje bioetanola iz smeše otpadnog hleba i vode iz proizvodnje glutena postignuta je koncentracija MK od 50,18 g L<sup>-1</sup> i produktivnost od 1,48 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> [50]. Osim proizvodnje MK gde je ostvarena visoka produktivnost, ostaci nakon fermentacije i odvajanja tečne frakcije sa MK su analizirani sa aspekta primene u ishrani životinja čime je

dokazana mogućnost paralelne proizvodnje kvalitetne stočne hrane zajedno sa MK [50]. Sojina melasa je sporedni proizvod koji zaostaje u proizvodnji proteinskog koncentrata sojine sačme, čijom daljom primenom u proizvodnji bioetanola zaostaje sojina džibra [49]. U studiji u kojoj je razmatrana mogućnost upotrebe sojine džibre i melase kao supstrata postignuta je koncentracija MK od 90,35 g L<sup>-1</sup> sa produktivnošću od 1,88 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> tokom 48 h fermentacije pomoću *Lb. agilis* LPB 56 koji je pokazao zadovoljavajuću sposobnost konverzije kompleksnih oligosaharida (stahioze i rafinoze) koji se nalaze u sojinoj melasi i džibri [49].

### Skrobne otpadne sirovine

Među otpadnim skrobnim sirovinama za proizvodnju MK su ispitivani otpad iz prerade krompira [51] i kasave [52], otpadni pirinač [53], pšenične mekinje [54,55]. Ukoliko se ne koriste amilolitički proizvodni mikroorganizmi, ove sirovine zahtevaju izvesnu pripremu kojom se skrob i komponente skroba, amiloza i amilopektin, hidrolizuju do fermentabilnih šećera. Hidroliza skroba se izvodi kiselinama ili češće komercijalnim amilolitičkim enzimima (amilaze i glukoamilaze) [56]. Za hidrolizu skroba najviše se primenjuje  $\alpha$ -amilaza dobijena iz *B. licheniformis* poznata pod komercijalnim nazivom Termamyl 120 L, kao i Termamyl SC, dok su najčešće korišćene glukoamilaze SAN extra L iz *Aspergillus niger* i AMG 300 L proizvedena iz genetski modifikovane *Aspergillus* vrste [56]. Konvencionalna fermentaciona proizvodnja MK iz skrobnih sirovina je višefazni proces koji uključuje likvefakciju (na temperaturi od 90–130 °C tokom 15 min), a zatim sledi saharifikacija kojim se skrob potpuno hidrolizuje do glukoze [57]. Najzad, mlečno-kiselinskom fermentacijom glukoza se konvertuje do MK (slika 2). Zbog uštede u vremenu i troškovima proizvodnje, kao i sprečavanja efekta inhibicije supstratom intenzivno se ispituje postupak simultane saharifikacije i fermentacije (SSF) kao i postupak simultane likvefakcije, saharifikacije i fermentacije (SLSF). Wang i sar. [58] su izvršili poređenje tri različita postupka fermentacije na brašnu kasave koristeći komercijalne amilolitičke enzime. U postupku SLSF pomoću *Lb. rhamnosus* je postignuta najveća koncentracija MK (187,2 g L<sup>-1</sup>) sa produktivnošću od 1,6 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, dok je najmanja koncentracija MK zabeležena u postupku odvojene likvefakcije, saharifikacije i fermentacije (145,1 g L<sup>-1</sup>) i produktivnost od svega 1 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> [58]. Međutim, zbog visokih cena amilolitičkih enzima i složenosti postupka, sve veća pažnja se usmerava na proučavanje direktne fermentacije skrobnih sirovina pomoću mikroorganizama koji proizvode ekstracelularne amilolitičke enzime. Među BMK koje imaju amilolitičko dejstvo ispitivane su sledeće vrste: *Lb. manihotivorans*, *Lb. amylovorus*, *Lb. amilophilus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. fermentum*, *Lb. plantarum*, *Lb. cellobiosus*, *Lb. amylolyticus* [10]. U direktnom postupku fermentacije po-

moću *Lb. amylophilus* GV6 na brašnu kasave i brašnu pirinča postignuta je koncentracija MK od 33,6 i 30,9 g L<sup>-1</sup> sa produktivnošću od 0,36 i 0,32 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, redom [59], što je i dalje značajno manje od vrednosti postignutih u postupku SSF sa komercijalnim enzimima na istim supstratima [53,58].

### Lignocelulozne otpadne sirovine

Lignocelulozni materijali su sastavljeni iz celuloze, hemiceluloze i lignina koji čine 90% suve materije, a ostatak su mineralne materije, ulja i druge komponente [60]. Procesom hidrolize, hemiceluloza i celuloza se moraju razložiti do monosaharida, odnosno fermentabilnih šećera. Hemiceluloza se razlaže do smeše šećera koju čine pentoze (ksiloza i arabinoza) i heksoze (galaktoza i manoz), dok se celuloza razlaže do glukoze. Različiti postupci mlečno-kiselinske fermentacije na lignoceluloznim sirovinama su prikazani na slici 2. Upotreba lignocelulozne biomase u proizvodnji MK je ograničena zbog malog broja vrsta BMK sposobnih da fermentišu ksilozu i arabinozu i izraženog efekta kataboličke represije glukozom [60]. Pored toga, formiranje različitih sporednih proizvoda fermentacije (uglavnom sirćetne kiseline usled aktivacije enzima fosfoketolaze u prisustvu pentoz) smanjuje prinos MK i povećava troškove njenog prečišćavanja. Takođe, prisustvo lignina smanjuje dostupnost polisaharida hidrolitičkim enzimima, a time i efikasnost iskorišćenja lignocelulozne biomase [61], pa ga je neophodno ukloniti iz lignoceluloznog materijala. Predtretman lignoceluloznog materijala, osim uklanjanja lignina, ima za cilj i smanjenje stepena kristalne strukture celuloze [60,61]. Time se povećava unutrašnja poroznost materijala što dovodi do povećanja prinosa fermentabilnih šećera iz celuloze i hemiceluloze u fazi hidrolize, u prisustvu kiselina ili enzima. Kao postupci predtretmana primenjuju se određene fizičke, hemijske, fizičko-hemijske i biološke metode [60,61].

Među lignoceluloznim otpadnim materijalima, za proizvodnju MK je ispitivan pivski trop, sporedni proizvod koji nastaje u procesu proizvodnje piva. Proizvodnjom 100 L piva nastaje oko 20 kg tropa, zbog čega je ova sirovina lako dostupna i jeftina [62]. Mussatto i sar. [63] su ispitivali proizvodnju MK iz hidrolizata pivskog tropa pomoću *Lb. delbrueckii*. Pivski trop je prvobitno podvrgnut hemijskom predtretmanu, a dobijena celulozna pulpa je potom tretirana komercijalnim celulaznim kompleksom u cilju saharifikacije [63]. U studiji u kojoj je tako dobijen hidrolizat korišćen u mlečno-kiselinskoj fermentaciji, uz kontrolu pH vrednosti i dodatak komponenata MRS bujona, postignuta je koncentracija MK od 35,54 g L<sup>-1</sup> i produktivnost od 0,59 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Pomoću *Lb. rhamnosus* na hidrolizatu pivskog tropa uz kontrolu pH vrednosti i dodatak kvašćevog ekstrakta postignuta je koncentracija MK od 12,48 g L<sup>-1</sup> sa produktivnošću od 0,52 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> [64].

## IZAZOVI U FERMENTACIONOJ PROIZVODNJI MLEČNE KISELINE

### Upotreba mešanih kultura

Osnovni cilj u proizvodnji MK na složenim, prirodnim supstratima je povećati efikasnost konverzije supstrata, zbog čega je u nekoliko studija proučavano korišćenje mešanih kultura. Upotrebom mešanih kultura se na osnovu sinergističkog delovanja različitih mikroorganizama može ostvariti bolja proizvodnja MK. Pomoću mešane kulture *Lb. casei* i *Lactococcus lactis* na ekstraktu urme je postignuta koncentracija MK od 60,3 g L<sup>-1</sup>, dok su postignute koncentracije MK sa monokulturom *Lb. casei*, odnosno *Lc. lactis* bile 53 i 46 g L<sup>-1</sup> [65]. Osim veće koncentracije MK, upotrebom mešane kulture je postignuta i efikasnija konverzija šećera (glukoze i fruktoze) u MK. Lee [66] je izvršio poređenje mono- i mešane kulture BMK na sintetskoj podlozi sa dodatkom koncentrovanog kukuruznog ekstrakta kao jedinog izvora azota. U fermentaciji sa mešanom kulturom pet sojeva roda *Lactobacillus* osim većeg prinosa MK, uočen je bolji rast ćelija i manja potrošnja proteina [66]. To ukazuje da mešane kulture zahvaljujući sinergističkom delovanju mogu lakše da prevaziđu nutritivna ograničenja i ostvare bolju produktivnost MK na siromašnijim supstratima. Mešana kultura *Lb. rhamnosus* i *Lb. brevis* je korišćena za SSF na kukuruznoj stočnoj hrani tretiranoj NaOH, pri čemu je postignuta koncentracija MK od 20,95 g L<sup>-1</sup>, dok je postignuta koncentracija MK sa monokulturom *Lb. rhamnosus*, odnosno *Lb. brevis* bila manja za 15,5%, odnosno 20,2% [67]. Mešane kulture plesni i BMK su ispitivane za proizvodnju MK na sirovinama koje sadrže inulin, kao što je Jerusalimska artičoka [68]. Hidroliza inulina se odvija u prisustvu enzima inulinaze i invertaze. Sposobnost da proizvode ove enzime imaju pojedine bakterije i plesni, među kojima se često koriste vrste iz roda *Aspergillus* [68]. U SSF na Jerusalimskoj artičoki pomoću kulture *Aspergillus niger* SL-09 i *Lactobacillus* sp. G-02 je postignuta koncentracija MK od 120,5 g L<sup>-1</sup> i prinos od 0,95 g g<sup>-1</sup> [68]. Nedostatak kompleksnih mešanih kultura se ogleda u njihovoj heterogenosti, pri čemu različiti sojevi mogu imati različit temperaturni i pH optimum, kao i različite potrebe za kiseonikom i nutrijentima, što otežava definisanje optimalnih i stabilnih uslova za takve kulture tokom fermentacije.

### Otvorena (nesterilna) fermentacija

Za efikasnu proizvodnju MK neophodno je obezbediti sterilnost medijuma pre inokulisanja BMK, odnosno obezbediti uslove u kojima je proizvodnja MK dominantan proces u medijumu. Sa aspekta energetske efikasnosti kao i ekonomske pogodnosti i konkurentnosti fermentacione proizvodnje MK, otvorena (nesterilna) fermentacija ima sve veći značaj i u fokusu je

istraživanja poslednjih godina [19,69–71]. Otvorena fermentacija, pored toga što smanjuje potrošnju energije i pojednostavljuje postupak proizvodnje, sprečava Majlardovu reakciju, kao i formiranje furfurala tokom sterilizacije. U otvorenoj fermentaciji su uglavnom korišćene termofilne vrste roda *Bacillus*. U otvorenoj šaržnoj fermentaciji na lignoceluloznom hidrolizatu pomoću *Bacillus* sp. NL01 postignuta je koncentracija MK od  $75 \text{ g L}^{-1}$  i produktivnost  $1,04 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  [69]. Takođe, pomoću *B. coagulans* NBRC 12583 na skrobnom hidrolizatu kasave sa dodatkom otpadnog mulja kao nutrijenta je postignuta koncentracija MK od  $98,1 \text{ g L}^{-1}$  i produktivnost od  $3,63 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  [70]. Otvorena fermentacija je ispitivana i pomoću *E. mundtii* QU 25 na sintetskom supstratu [71]. Ponovljenim šaržnim postupkom sa recirkulacijom ćelija u toku petog ciklusa je postignuta koncentracija MK od  $81,4 \text{ g L}^{-1}$  i produktivnost od  $12,3 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  [71]. Očekivano je da se dalje razvijaju sistemi pogodni za otvorene fermentacije, što podrazumeva pronalaženje novih termofilnih mikroorganizama sposobnih za efikasnu proizvodnju MK na otpadnim sirovinama.

#### Uticaj izvora azota i značaj kontrole pH vrednosti

Zbog ograničene sposobnosti da sintetišu faktore rasta, BMK zahtevaju podlogu bogatu aminokiselinama, vitaminima, masnim kiselinama, purinima i pirimidinima [72]. U brojnim studijama u kojima je ispitivan sastav podloge za mlečno-kiselinsku fermentaciju zaključeno je da dodatak nutrijenata obezbeđuje bolju produktivnost procesa, kao i da među različitim izvorima azota kvašćev ekstrakt ima najveći uticaj na proizvodnju MK [7]. Tako je obogaćivanjem melase šećerne repe kvašćevim ekstraktom u fermentaciji sa *Lb. delbrueckii* postignuta značajno veća koncentracija MK u poređenju sa drugim izvorima azota (suvi pivski kvasac, proteini ekstrahovani iz pivskog kvasca, proteini surutke) [42]. Kako dodatak različitih izvora azota poput kvašćevog ekstrakta čini oko 38% ukupnih troškova proizvodnje [70], mnoga istraživanja se bave pronalaženjem jeftinih hranljivih materija koje bi mogle delimično ili potpuno da zamene kvašćev ekstrakt i ostale skupe nutrijente. Yu i sar. [73] su ispitivali pogodnost primene koncentrovanog kukuruznog ekstrakta kao alternative kvašćevom ekstraktu. Pomoću *Lb. rhamnosus* CGMCC 1466 na podlozi kojoj je dodat koncentrovani kukuruzni ekstrakt, glukoza, melasa, Tween 80 i Mn proizvedeno je  $115,12 \text{ g L}^{-1}$  MK [73]. U poređenju sa vrednostima dobijenim na supstratu sa kvašćevim ekstraktom, proizvodnja MK je bila veća za 30,4% [73]. Kao jeftini, alternativni izvori azota ispitivani su hidrolizat perja [74], otpadni mulj [70], sok japanske jabuke, hidrolizat pšeničnih mekinja [75] i hidrolizat soje [76].

Pored izvora azota, pH vrednost je još jedan faktor koji utiče na efikasnost procesa. S obzirom da optimalna pH za rast većine vrsta BMK i proizvodnju MK

varira između 5–7, kiselost podloge povezana sa proizvodnjom MK inhibira dalju fermentaciju [16]. Upotrebom  $\text{CaCO}_3$  i  $\text{Ca(OH)}_2$  kao sredstva za neutralizaciju nakon izdvajanja i prečišćavanja MK zaostaje značajna količina gipsa ( $\text{CaSO}_4$ ) koji je veoma štetan po životnu sredinu. U studiji u kojoj je testirano pet različitih jedinjenja za regulaciju pH vrednosti ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ,  $\text{NaOH}$ , dime-tilamin, trimetilamin i  $\text{CaCO}_3$ ), trimetilamin se pokazao najboljim neutrališućim agensom [77]. Zamena  $\text{CaCO}_3$  drugim sredstvom za regulaciju pH vrednosti pored toga što sprečava nastanak velike količine gipsa, olakšava i izdvajanje MK. Upotreba genetski modifikovanih sojeva sposobnih da rastu pri niskoj pH vrednosti može biti alternativna strategija u prevazilaženju efekta inhibicije proizvodom. Stopa preživljavanja *Lb. delbrueckii* koji je podvrgnut mutagenesi indukovanom azotnom kiselinom je pri pH vrednosti 3.5 bila veća 1,3 puta u odnosu na roditeljski soj u istim uslovima [78]. Ye i sar. [79] su postupkom slučajne amplifikacije gena modifikovali *Lb. pentosus* koji je pri pH vrednosti 3.8 postigao prinos MK od  $0,95 \text{ g g}^{-1}$ , dok rast roditeljskog soja i proizvodnja MK pri istim uslovima nije uočena.

#### POSTUPCI IZVOĐENJA MLEČNO-KISELINSKE FERMENTACIJE

##### Šaržni i dolivni postupak u proizvodnji mlečne kiseline

Način na koji će se voditi fermentacioni proces zavisi od vrste i prirode polazne sirovine, vrste proizvodnog mikroorganizma, kao i karakteristika fermentacionog medijuma. Šaržni postupak je najjednostavniji i najčešće primenjivan tip fermentacionog procesa. Prednosti ovog postupka su manji rizik od kontaminacije i jednostavno upravljanje procesom, dok su nedostaci niska produktivnost usled izraženog efekta inhibicije supstratom i/ili proizvodom. U cilju prevazilaženja efekta inhibicije supstratom ili proizvodom kao moguća strategija je ispitivan dolivni postupak. U tabeli 2 je dato poređenje vrednosti osnovnih parametara fermentacije postignutih u šaržnom i dolivnom postupku na različitim supstratima. U dolivnom postupku svež supstrat se dodaje kontinualno ili povremeno, čime se koncentracija supstrata održava u optimalnim granicama i time povećava produktivnost procesa. Ispitivane su različite metode dolivanja supstrata, najčešće kontinualni, povremeni i eksponencijalni metod [80,81]. Kontinualnim dodavanjem glukoze hemijski definisanom medijumu pomoću *Lb. lactis* postignuta je koncentracija MK od  $210 \text{ g L}^{-1}$  i produktivnost od  $2,2 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , a zaostala koncentracija glukoze u medijumu je bila manja od  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  [82]. Ding i Tan [80] su ispitivali više metoda dolivanja supstrata, pri čemu se najefikasnijim pokazao eksponencijalni metod. U fermentaciji sa *Lb. casei* na hemijski definisanom medijumu obogaćenom glukozom i kvašćevim ekstraktom, postignuta je kon-



Tabela 2. Vrednosti najvažnijih parametara mlečno-kiselinske fermentacije u šaržnom i dolivnom postupku;  $c$  – koncentracija MK,  $Y_{p/uš}$  – koeficijent prinosa po supstratu (g MK/g utrošenog šećera),  $P$  – produktivnost  
 Table 2. Values of the most important parameters of lactic acid fermentation in batch and fed-batch mode of lactic acid production

Mikroorganizam	Supstrat	Fermentacioni postupak	Mlečna kiselina			Referenca
			$c / g L^{-1}$	$Y_{p/uš} / g g^{-1}$	$P / g L^{-1} h^{-1}$	
<i>Lb. lactis</i>	Glukoza	Šaržni	150,2	–	1,34	[115]
BME5-18M		Kontinualni dolivni	161,2	–	2,02	
<i>B. coagulans</i> 36D1	Glukoza	Šaržni	103,6	0,93	0,72	[116]
		Dolivni, dodatak šećera u 48 i 96 h	182,2	0,92	0,84	
<i>B. coagulans</i> 36D1	Ksiloza	Šaržni	102,3	0,86	0,71	[116]
		Dolivni, dodatak šećera u 48 i 96 h	163,0	0,87	0,75	
<i>Lb. lactis</i> -11	Glukoza	Šaržni	82,7	0,92	1,7	[81]
		Dolivni, održavanje koncentracije šećera na 4–5 g L <sup>-1</sup> u periodu od 18,5 do 49 h	96,3	0,99	1,9	
<i>Lb. casei</i> SU No 22	Surutka	Šaržni	22,5	0,48	0,93	[117]
<i>Lc. lactis</i> WS 1042		Kontinualni dolivni	46,0	0,77	1,91	
<i>B. coagulans</i> SIM-7	Glukoza	Šaržni	91,5	0,97	9,7 <sup>a</sup>	[21]
		Dolivni, dodatak šećera 5 h nakon početka fermentacije	91,6	0,97	11,12 <sup>a</sup>	

<sup>a</sup>Maksimalna produktivnost

centracija MK od 180 g L<sup>-1</sup> i produktivnost od 2,14 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> nakon 84 h fermentacije [80]. U dolivnom postupku koncentracija MK je bila za 56,5% veća od vrednosti dobijenih u šaržnoj fermentaciji, dok je produktivnost bila veća za 59,7% [80]. Istraživanja dolivnog postupka su uglavnom zasnovana na primeni hemijski definisanih supstrata, kojima su dodati faktori rasta poput kvaščevog ekstrakta, kao i mineralne materije, što dodatno utiče na efikasnost procesa. Može se primetiti da je znatno manje istraživanja u kojima je dolivni postupak ispitivan na otpadnim supstratima, pa ih je zbog toga teško porediti. U dolivnom postupku na hleboj džibri pomoću *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 postignuta je maksimalna koncentracija MK od 97,1 g L<sup>-1</sup> i produktivnost 1,80 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> nakon 54 h fermentacije [82]. U poređenju sa šaržnim postupkom, primenom dolivnog postupka u ovom istraživanju koncentracija MK je povećana za 47,6%, a produktivnost za 17,2% [83].

### Proizvodnja mlečne kiseline sa sistemima imobilisanih ćelija

Metode imobilizacije ćelija se, u novije vreme, sve više koriste u cilju povećanja koncentracije biomase u fermentorima što dovodi do povećanja produktivnosti procesa. Pored veće produktivnosti, imobilizacija omogućava ćelijsku i operativnu stabilnost, olakšava separaciju imobilisanih ćelija od fermentacionog medijuma i omogućava njihovo ponovno korišćenje. U tabeli 3 je dato poređenje vrednosti osnovnih parametara fermentacije postignutih u sistemima sa slobodnim i imobilisanim ćelijama. Imobilizacija u polimerne matrice gela je često korišćena tehnika imobilizacije BMK. Kao

materijali za imobilizaciju korišćeni su prirodni polimeri, kao što su Ca-alginat [84,85], agar [86],  $\kappa$ -karagenan [87], a od sintetskih poliakrilamid [87,88] i polivinil alkohol [89]. Za imobilizaciju u polimerne matrice gela je karakteristična ograničena difuzija supstrata i proizvoda kroz polimernu matricu što smanjuje prinos MK. Osnovni nedostatak Ca-alginata za proizvodnju MK je gubitak mehaničke stabilnosti gela, tj. razmekšavanje čestica usled reakcije Ca sa MK. Pokazano je da oblaganje alginatnih čestica hitozanom u cilju povećanja stabilnosti može povećati produktivnost fermentacije [90].

Osim imobilizacije unutar čestica gela, ispitivana je i imobilizacija BMK adsorpcijom na površinu nosača, pri čemu se bakterije u vidu filma vezuju za različite prirodne ili sintetske nosače. Prednosti ove metode se ogledaju u njenom jednostavnom izvođenju, pri čemu je vijabilnost i aktivnost BMK očuvana. Takođe, zbog adsorpcije bakterija na površinu čvrstog nosača difuziona ograničenja su manje izražena i ostvaruje se bolji prenos mase. Nedostatak ove metode su relativno slabe veze ćelija i nosača, što može da dovede do njihovog spiranja sa površine nosača. Kao nosači za adsorpciju ispitivani su plastični kompozitni materijali [91], poliuretanska pena [92], zeolitni prah [93], lignocelulozni materijali [94,96] i čestice pšeničnog glutena [95].

U cilju povećanja produktivnosti procesa vršena su istraživanja proizvodnje MK pomoću imobilisane biomase u kontinualnim i bioreaktorima sa fibrozim pakovanim slojem. U kontinualnoj proizvodnji MK na hidrolizatu pirinčanih mekinja pomoću *Lb. rhamnosus*

Tabela 3. Vrednosti najvažnijih parametara mlečno-kiselinske fermentacije sa slobodnim i imobilisanim ćelijama;  $c$  – koncentracija MK,  $Y_{p/uš}$  – koeficijent prinosa po supstratu (g MK/g utrošenog šećera),  $P$  – produktivnost

Table 3. Values of the most important parameters of lactic acid fermentation with free and immobilized cells

Mikroorganizam	Tehnika imobilizacije i vrsta nosača/supstrat	Fermentacioni postupak	Mlečna kiselina			Referenca
			$c / g L^{-1}$	$Y_{p/uš} / g g^{-1}$	$P / g L^{-1} h^{-1}$	
<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 7469	Adsorpcija na zeolit/hlebna džibra	Šaržni sa slobodnim ćelijama	34,7	0,81	0,66	[93]
		Ponovljeni šaržni sa imobilisanim ćelijama, 3. ciklus	42,2	0,99	1,22	
<i>Lb. casei</i>	Adsorpcija na čestice pšeničnog glutena/glukoza	Šaržni sa slobodnim ćelijama, fermentaciono vreme 18 h	41,4	–	2,3	[95]
		Šaržni sa imobilisanim ćelijama, fermentaciono vreme 12 h	42,2	–	3,51	
<i>Lb. casei</i> SU No 22	Koimobilizacija u čestice Ca	Kontinualni dolivni sa slobodnim ćelijama	46	0,77	1,91	[117]
<i>Lc. lactis</i> WS 1042	alginata/deproteinizovana surutka	Kontinualni dolivni sa imobilisanim ćelijama	47	0,72	1,96	
<i>Lb. delbrueckii</i> IFO 3202	Zarobljavanje u čestice Ca-alginata/melasa šećerne repe	Šaržni sa slobodnim ćelijama	42,4	0,81	–	[118]
		Šaržni sa imobilisanim ćelijama	42,7	0,82	–	

koji je bio imobilisan na čestice kukuruzne stabljike ostvarena je produktivnost od 5,73–6,20 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> [96]. Takođe, u šaržnoj fermentaciji surutke pomoću *Lb. bulgaricus* imobilisanog na porozne celulozne nosače postignuta je produktivnost od 6,78 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> [94]. U dolivnom postupku sa *Lc. lactis* na hidrolizatu Jerusalimske artičoke u bioreaktoru sa fibrozim pakovanim slojem postignuta je koncentracija MK od 142 g L<sup>-1</sup>, što je za 27,92% više u odnosu na fermentaciju sa slobodnim ćelijama [97]. Takođe, u dolivnom postupku pomoću *Sporolactobacillus inulinus* na hidrolizatu kukuruznog brašna u bioreaktoru sa fibrozim pakovanim slojem je postignuta koncentracija MK od 218,8 g L<sup>-1</sup>, što je za 37,67% više u odnosu na fermentaciju sa slobodnim ćelijama [98]. Iako se u pomenutim bioreaktorima i imobilisanim sistemima na hemijski definisanim supstratima postiže daleko veća produktivnost, upotreba jeftinih i otpadnih materijala obezbeđuje ekonomsku i ekološku povoljnost procesa, dok dobijeni rezultati predstavljaju osnov za dalja istraživanja.

## ZAKLJUČAK

Biorafinerijski procesi su u poslednjoj deceniji sve popularniji u proizvodnji energije, goriva, organskih hemikalija i polimera. S obzirom na trend stalnog porasta potrošnje MK biorafinerijski koncept bi mogao da doprinese smanjenju ukupnih troškova proizvodnje MK. Korišćenje sporednih i otpadnih sirovina u proizvodnji MK pored ekonomske održivosti procesa, nudi rešenje problema njihovog odlaganja. Otpadni industrijski proizvodi kao što su surutka, melasa, destilerijska džibra, različiti skrobni i lignocelulozni materijali mogu biti dobar izvor fermentabilnih šećera, ali i mnogih drugih jedinjenja od značaja za rast mikroorganizama, kao što

su proteini, mineralne materije i vitamini. Zbog kompleksnog sastava, kao i varijacija u hemijskim i fizičkim karakteristikama otpadnih proizvoda potrebna su detaljna ispitivanja koja uključuju optimizaciju procesnih parametara kako bi se omogućila njihova upotreba u biotehnoškim procesima. Ekonomski održiva proizvodnja MK pored upotrebe otpadnih sirovina, uključuje i smanjenu potrošnju energije, zbog čega su ispitivanja otvorenih fermentacionih postupaka pomoću termofilnih mikroorganizama jedna od vodećih na polju proizvodnje MK. Razvojem novih tehnika genetičkog inženjerstva sve češće su modifikacije mikroorganizama u cilju poboljšanja produktivnosti procesa, čistoće proizvoda, sposobnosti iskorišćavanja različitih vrsta šećera ili otpornosti na niske pH vrednosti sredine. Dosadašnja ispitivanja mogućnosti proizvodnje MK na džibri zaostaloj iz proizvodnje etanola su dala zapažene rezultate, a očekivani porast potrošnje MK u narednim godinama navodi na pronalaženje novih sirovina i tehnoloških rešenja koja omogućavaju efikasnu i održivu proizvodnju.

## Zahvalnica

Ovaj rad je deo projekta Tehnološkog razvoja (TR 31017) finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

## LITERATURA

- [1] S.K. Maity, Opportunities, recent trends and challenges of integrated biorefinery: Part I, *Renew. Sust. Energ. Rev.* **43** (2015) 1427–1445.
- [2] MEMO/12/97, Strategy for a sustainable bioeconomy to ensure smart green growth in Europe, 2012 (<http://>

- //europa.eu/rapid/press-release\_MEMO-12-97\_en.htm?locale=en).
- [3] K.M. Nampoothiri, N.R. Nair, R.P. John, An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research, *Bioresour. Technol.* **101** (2010) 8493–8501.
  - [4] Global Industry Analysts, Inc., Lactic Acid: A Global Strategic Business Report, 2012 ([http://www.prweb.com/releases/lactic\\_acid/polylactic\\_acid/prweb9369473.htm](http://www.prweb.com/releases/lactic_acid/polylactic_acid/prweb9369473.htm)).
  - [5] Global Industry Analysts, Inc., Lactic Acid: A Global Strategic Business Report, 2014, ([http://www.prweb.com/releases/lactic\\_acid/polylactic\\_acid/prweb12173291.htm](http://www.prweb.com/releases/lactic_acid/polylactic_acid/prweb12173291.htm)).
  - [6] L.T. Sin, A.R. Rahmat, W.A.W.A. Rahman, *Polylactic acid: PLA biopolymer technology and applications*, Elsevier, Amsterdam, 2012, pp. 301–327.
  - [7] K. Hofvendahl, B. Hahn-Hägerdal, Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources, *Enzyme Microb. Technol.* **26** (2000) 87–107.
  - [8] M. Stiles, W. Holzapfel, Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy, *Int. J. Food Microbiol.* **36** (1997) 1–29.
  - [9] G. Felis, F. Dellaglio, Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria, *Curr. Issues Intest. Microbiol.* **8** (2007) 44–61.
  - [10] 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.
  - [11] H-Y. Choi, H-K. Ryu, K-M. Park, E. G. Lee, H. Lee, S-W. Kim, E-S. Choi, Direct lactic acid fermentation of Jerusalem artichoke tuber extract using *Lactobacillus paracasei* without acidic or enzymatic inulin hydrolysis, *Bioresour. Technol.* **114** (2012) 745–747.
  - [12] P. Petrova, P. Velikova, L. Popova, K. Petrov, Direct conversion of chicory flour into L(+)-lactic acid by the highly effective inulinase producer *Lactobacillus paracasei* DSM 23505, *Bioresour. Technol.* **186** (2015) 329–333.
  - [13] M.A. Abdel-Rahman, Y. Xiao, Y. Tashiro, Y. Wang, T. Zendo, K. Sakai, K. Sonomoto, Fed-batch fermentation for enhanced lactic acid production from glucose/xylose, mixture without carbon catabolite repression, *J. Biosci. Bioeng.* **119** (2015) 153–158.
  - [14] Z.M. Zhu, Z.Z. Lee, R.T. Elander, Conversion of aqueous ammonia-treated corn stover to lactic acid by simultaneous saccharification and cofermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **136–140** (2007) 721–738.
  - [15] H. Ohara, M. Owaki, K. Sonomoto, Xylooligosaccharide fermentation with *Leuconostoc lactis*. *J. Biosci. Bioeng.* **101** (2006) 415–420.
  - [16] S. Marques, J.A.L. Santos, F.M. Gírio, J.C. Roseiro, Lactic acid production from recycled paper sludge by simultaneous saccharification and fermentation, *Biochem. Eng. J.* **41** (2008) 210–216.
  - [17] Q. Wang, X. Zhao, J. Chamu, K.T. Shanmugam, Isolation, characterization and evolution of a new thermophilic *Bacillus licheniformis* for lactic acid production in mineral salts medium, *Bioresour. Technol.* **102** (2011) 8152–8158.
  - [18] M.A. Patel, M.S. Ou, R. Harbrucker, H.C. Aldrich, M.L. Buszko, L.O. Ingram, K.T. Shanmugam, Isolation and Characterization of Acid-Tolerant, Thermophilic Bacteria for Effective Fermentation of Biomass-Derived Sugars to Lactic Acid, *Appl. Environ. Microbiol.* **72** (2006) 3228–3235.
  - [19] K. Ma, T. Maeda, H. You, Y. Shirai, Open fermentative production of L-lactic acid with high optical purity by thermophilic *Bacillus coagulans* using excess sludge as nutrient, *Bioresour. Technol.* **151** (2014) 28–35.
  - [20] L. Ye, X. Zhou, M.S.B. Hudari, Z. Li, J.Ch. Wu, Highly efficient production of L-lactic acid from xylose by newly isolated *Bacillus coagulans* C106, *Bioresour. Technol.* **132** (2013) 38–44.
  - [21] T. Michelson, K. Kask, E. Jögi, E. Talpsep, I. Suitso, A. Nurka, L(+)-Lactic acid producer *Bacillus coagulans* SIM-7 DSM 14043 and its comparison with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* DSM 20073, *Enzyme Microb. Technol.* **39** (2006) 861–867.
  - [22] L.B. Lockwood, G.E. Ward, O.E. May, The physiology of *Rhizopus oryzae*, *J. Agric. Res.* **53** (1936) 849–857.
  - [23] Z.Y. Zhang, B. Jin, J.M. Kelly, Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus* fungi, *Biochem. Eng. J.* **35** (2007) 251–263.
  - [24] L.P. Huang, B. Jin, P. Lanta, 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.
  - [25] R.H.W. Maas, R.R. Bakker, G. Eggink, R.A. Weusthuis, Lactic acid production from xylose by the fungus *Rhizopus oryzae*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72** (2006) 861–868.
  - [26] R.H.W. Maas, J. Springer, G. Eggink, R.A. Weusthuis, Xylose metabolism in the fungus *Rhizopus oryzae*: effect of growth and respiration on L(+)-lactic acid production, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **35** (2008) 569–578.
  - [27] L. Zhang, X. Li, Q. Yong, S.T. Yang, J. Ouyang, S. Yu, Simultaneous saccharification and fermentation of xylo-oligosaccharides manufacturing waste residue for L-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*, *Biochem. Eng. J.* **94** (2015) 92–99.
  - [28] F.A.C. Martinez, E.M. Balciunas, J.M. Salgado, J.M.D. González, A. Converti, R.P.S. Oliveira, Lactic acid properties, applications and production: A review, *Trends Food Sci. Technol.* **30** (2013) 70–83.
  - [29] Y. Wang, Y. Tashiro, K. Sonomoto, Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits, *J. Biosci. Bioeng.* **119** (2015) 10–18.
  - [30] K.C. Fugelsang, C.G. Edwards, *Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures*, Springer Science & Business Media, Berlin, 2007, pp. 29–39.
  - [31] B. Upadhyaya, L. DeVeaux, L. Christopher, Metabolic engineering as a tool for enhanced lactic acid production, *Trends Biotechnol.* **32** (2014) 637–644.
  - [32] A. Prazeres, F. Carvalho, J. Rivas, Cheese whey management: A review, *J. Environ. Manage.* **110** (2012) 48–68.
  - [33] M. Bulatović, M. Rakin, L. Mojović, S. Nikolić, M. Vukašinović Sekulić, A. Đukić Vuković, Surutka kao sirovina za

- proizvodnju funkcionalnih napitaka, Hem. Ind. **66** (2012) 567–579.
- [34] A. Vasala, J. Panula, P. Neubauer, Efficient lactic acid production from high salt containing dairy by-products by *Lactobacillus salivarius* ssp. *salicinius* with pre-treatment by proteolytic microorganisms, J. Biotechnol. **117** (2005) 421–431.
- [35] P.S. Panesar, J.F. Kennedy, D.N. Gandhi, K. Bunko, Bio-utilisation of whey for lactic acid production, Food Chem. **105** (2007) 1–14.
- [36] M.I. González, S. Álvarez, F. Riera, R. Álvarez, Economic evaluation of an integrated process for lactic acid production from ultrafiltered whey, J. Food Eng. **80** (2007) 553–561.
- [37] S. Šušić, S. Petrov, G. Kukić, V. Sinobad, P. Perunović, B. Koronovac, Đ. Bašić, Osnovi tehnologije šećera, Beograd, 1995, pp. 193–212.
- [38] H. Olbrich, The Molasses, Fermentation Technologist, Institut für Zuckerindustrie, Berlin, 1963.
- [39] E. Stoppok, K. Buchholz, Sugar-Based Raw materials for fermentation-Applications, in Biotechnology Set, 2<sup>nd</sup> ed., H.-J. Rehm, G. Reed (Eds.), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2001, pp. 4–29.
- [40] T. Roukas, Pretreatment of beet molasses to increase pullulan production, Process Biochem. **33** (1998) 805–810.
- [41] F. Küçüktaşık, H. Kazak, D. Güney, I. Finore, A. Poli, O. Yenigün, B. Nicolaus, E.T. Öner, Molasses as fermentation substrate for levan production by *Halomonas* sp. Appl. Microbiol. Biotechnol. **89** (2011) 1729–1740.
- [42] Ch. Kotzamanidis, T. Roukas, G. Skaracis, Optimization of lactic acid production from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130, World J. Microbiol. Biotechnol. **18** (2002) 441–448.
- [43] L.T. Fuess, M.L. Garcia, Implications of stillage land disposal: A critical review on the impacts of fertigation, J. Environ. Manage. **145** (2014) 210–229.
- [44] A. Wilkie, K. Riedesel, J. Owens, Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstock, Biomass Bioenerg. **19** (2000) 63–102.
- [45] M.M. Shan, F. Akanbi, M. Cheryan, Potassium Acetate by Fermentation with *Clostridium thermoaceticum*, Appl. Biochem. Biotechnol. **63–65** (1997) 423–433.
- [46] A. Djukić-Vuković, L. Mojović, M. Vukašinić-Sekulić, M. Rakin, S. Nikolić, J. Pejin, M. Bulatović, Effect of different fermentation parameters on L-lactic acid production from liquid distillery stillage, Food Chem. **134** (2012) 1038–1043.
- [47] L. Mojović, M. Vukašinić-Sekulić, A. Djukić, D. Pejin, M. Rakin, J. Pejin, S. Nikolić, Proizvodnja mlečne kiseline na tačnoj destilerijskoj džibri, PTEP **15** (2011) 1–5.
- [48] M. Marković, S. Markov, O. Grujić, L. Mojović, S. Kocić-Tanackov, M. Vukašinić Sekulić, J. Pejin, Microwave as a pre-treatment of triticale for bioethanol fermentation and utilization of the stillage for lactic acid fermentation, Biochem. Eng. J. **85** (2014) 132–138.
- [49] S. Karp, A. Igashiyama, P. Siqueira, J. Carvalho, L. van den Berghe, V. Thomaz-Soccol, J. Coral, J.L. Tholozan, A. Pandey, C. Soccol, Application of the biorefinery concept to produce L-lactic acid from the soybean vinasse at laboratory and pilot scale, Bioresour. Technol. **102** (2011) 1765–1772.
- [50] A. Djukić-Vuković, L. Mojović, V. Semenčenko, M. Radosavljević, J. Pejin, S. Kocić-Tanackov, Effective valorisation of distillery stillage by integrated production of lactic acid and high quality feed, Food Res. Int. **73** (2015) 75–80.
- [51] B. Jin, L.P. Huang, P. Lant, *Rhizopus arrhizus* - a producer for simultaneous saccharification and fermentation of starch waste materials to L-(+)-lactic acid, Biotechnol. Lett. **25** (2003) 1983–1987.
- [52] R. John, R. Sukumaran, K. Nampoothiri, A. Pandey, Statistical optimization of simultaneous saccharification and L-(+)-lactic acid fermentation from cassava bagasse using mixed culture of lactobacilli by response surface methodology, Biochem. Eng. J. **36** (2007) 262–267.
- [53] S. Nakano, C. Ugwu, Y. Tokiwa, Efficient production of D-(–)-lactic acid from broken rice by *Lactobacillus delbrueckii* using Ca(OH)<sub>2</sub> as a neutralizing agent, Bioresour. Technol. **104** (2012) 791–794.
- [54] R. John, 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.
- [55] Z. Li, L. Han, Y. Ji, X. Wang, T. Tan, Fermentative production of l-lactic acid from hydrolysate of wheat bran by *Lactobacillus rhamnosus*, Biochem. Eng. J. **49** (2010) 138–142.
- [56] L. Mojović, D. Pejin, M. Lazić, Bioetanol kao gorivo stanje i perspektive, Tehnološki fakultet, Leskovac, 2007, pp. 65–69.
- [57] 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.
- [58] L. Wang, B. Zhao, B. Liu, Ch. Yang, B. Yu, Q. Li, C. M, P. Xu, Y. Ma, Efficient production of L-lactic acid from cassava powder by *Lactobacillus rhamnosus*, Bioresour. Technol. **101** (2010) 7895–7901.
- [59] C. Vishnu, G. Seenayya, G. Reddy, Direct fermentation of various pure and crude starchy substrates to L-(+)-lactic acid using *Lactobacillus amylophilus* GV6, World J. Microbiol. Biotechnol. **18** (2002) 429–433.
- [60] M.A. Abdel-Rahman, Y. Tashiro, K. Sonomoto, Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: overview and limits, J. Biotechnol. **156** (2011) 286–301.
- [61] A.T.W.M. Hendriks, G. Zeeman, Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass, Bioresour. Technol. **100** (2009) 10–18.
- [62] J. Pejin, M. Radosavljević, O. Grujić, L. Mojović, S. Kocić-Tanackov, S. Nikolić, A. Djukić-Vuković, Mogućnosti primene pivskog tropa u biotehnologiji, Hem. Ind. **67** (2013) 277–291.
- [63] S. Mussatto, M. Fernandes, I. Mancilha, I. Roberto, Effect of medium supplementation and pH control on

- lactic acid production from brewer's spent grain, *Biochem. Eng. J.* **40** (2008) 437–444.
- [64] J. Pejin, M. Radosavljević, L. Mojović, S. Kocić-Tanackov, A. Djukić-Vuković, The influence of calcium-carbonate and yeast extract addition on lactic acid fermentation of brewer's spent grain hydrolysate, *Food Res. Int.* **73** (2015) 31–37.
- [65] A. Nancib, N. Nancib, J. Boudrant, Production of lactic acid from date juice extract with free cells of single and mixed cultures of *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis*, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **25** (2009) 1423–1429.
- [66] K.B. Lee, Comparison of fermentative capacities of lactobacilli in single and mixed culture in industrial media, *Process Biochem.* **40** (2005) 1559–1564.
- [67] F. Cui, Y. Li, C. Wan, Lactic acid production from corn stover using mixed cultures of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus brevis*, *Bioresour. Technol.* **102** (2011) 1831–1836.
- [68] X.-Y. Ge, H. Qian, W.-G. Zhang, Improvement of L-lactic acid production from Jerusalem artichoke tubers by mixed culture of *Aspergillus niger* and *Lactobacillus* sp., *Bioresour. Technol.* **100** (2009) 1872–1874.
- [69] J. Ouyang, R. Ma, Z. Zheng, C. Cai, M. Zhang, T. Jiang, Open fermentative production of L-lactic acid by *Bacillus* sp. strain NL01 using lignocellulosic hydrolyzates as low-cost raw material, *Bioresour. Technol.* **135** (2013) 475–480.
- [70] K. Ma, T. Maeda, H. You, Y. Shirai, Open fermentative production of L-lactic acid with high optical purity by thermophilic *Bacillus coagulans* using excess sludge as nutrient, *Bioresour. Technol.* **151** (2014) 28–35.
- [71] M.A. Abdel-Rahman, Y. Tashiro, T. Zendo, K. Sonomoto, Improved lactic acid productivity by an open repeated batch fermentation system using *Enterococcus mundtii* QU 25, *RSC Adv.* **3** (2013) 8437–8445.
- [72] M.A. Abdel-Rahman, Y. Tashiro, K. Sonomoto, Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes, *Biotechnol. Adv.* **31** (2013) 877–902.
- [73] L. Yu, T. Lei, X. Ren, X. Pei, Y. Feng, Response surface optimization of L-(+)-lactic acid production using corn steep liquor as an alternative nitrogen source by *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466, *Biochem. Eng. J.* **39** (2008) 496–502.
- [74] M. Taskin, N. Esim, S. Ortucu, Efficient production of L-lactic acid from chicken feather protein hydrolysate and sugar beet molasses by the newly isolated *Rhizopus oryzae* TS-61, *Food Bioprod. Process.* **90** (2012) 773–779.
- [75] Z. Lu, F. He, Y. Shi, M. Lu, L. Yu, Fermentative production of L-(+)-lactic acid using hydrolyzed acorn starch, persimmon juice and wheat bran hydrolysate as nutrients, *Bioresour. Technol.* **101** (2010) 3642–3648.
- [76] S. Kwon, P.C. Lee, E.G. Lee, Y.K. Chang, N. Chang, Production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* with vitamin-supplemented soybean hydrolysate, *Enzyme Microb. Technol.* **26** (2000) 209–215.
- [77] K. Hetényi, Á. Németh, B. Sevilla, Role of pH-regulation in lactic acid fermentation: Second steps in a process improvement, *Chem. Eng. Process.* **50** (2011) 293–299.
- [78] R.P. John, K.M. Nampoothiri, Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* using nitrous acid mutation for L-lactic acid production, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **24** (2008) 3105–3109.
- [79] L. Ye, H. Zhao, Zh. Li, J.Ch. Wu, Improved acid tolerance of *Lactobacillus pentosus* by error-prone whole genome amplification, *Bioresour. Technol.* **135** (2013) 459–463.
- [80] S. Ding, T. Tan, L-lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation using different fed-batch feeding strategies, *Process Biochem.* **41** (2006) 1451–1454.
- [81] Y. Zhang, W. Cong, S.Y. Shi, Application of a pH Feedback-Controlled Substrate Feeding Method in Lactic Acid Production, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **162** (2010) 2149–2156.
- [82] D.M. Bai, Q. Wei, Z.H. Yan, X.M. Zhao, X.G. Li, S.M. Xu, Fed-batch fermentation of *Lactobacillus lactis* for hyper-production of L-lactic acid, *Biotechnol. Lett.* **25** (2003) 1833–1835.
- [83] A. Djukić-Vuković, L. Mojović, M. Vukašinić-Sekulić, S. Nikolić, J. Pejin, Integrated production of lactic acid and biomass on distillery stillage, *Bioprocess Biosyst. Eng.* **36** (2013) 1157–1164.
- [84] Y. Göksungur, U. Güvenç, Production of lactic acid from beet molasses by calcium alginate immobilized *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **74** (1999) 131–136.
- [85] A. Idris, W. Suzana, Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, initial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *Lactobacillus delbrueckii*, *Process Biochem.* **41** (2006) 1117–1123.
- [86] N.A. Mostafa, Production of lactic acid from whey with agar immobilized cells in a continuous packed tubular reactor, *Energ. Convers. Manage.* **37** (1996) 253–260.
- [87] T. Roukas, P. Kotzekidou, Production of lactic acid from deproteinized whey by coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells, *Enzyme Microb. Technol.* **13** (1991) 33–38.
- [88] K. Petrov, D. Yankov, V. Beschkov, Lactic acid fermentation by cells of *Lactobacillus rhamnosus* immobilized in polyacrylamide gel, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **22** (2006) 337–345.
- [89] P. Wang, Z. Chen, J. Li, L. Wang, G. Gong, G. Zhao, H. Liu, Z. Zheng, Immobilization of *Rhizopus oryzae* in a modified polyvinyl alcohol gel for L-(+)-lactic acid production, *Ann. Microbiol.* **63** (2013) 957–964.
- [90] 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.
- [91] A.C. Velázquez, A.L. Pometto III, K.L. Ho, A. Demirci, Evaluation of plastic-composite supports in repeated fed-batch biofilm lactic acid fermentation by *Lactobacillus casei*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55** (2001) 434–441.
- [92] V. Rangaswamy, S.V. Ramakrishna, Lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* in a dual reactor system using packed bed biofilm reactor, *Letts. Appl. Microbiol.* **46** (2008) 661–666.

- [93] A. Djukić-Vuković, L. Mojović, B. Jokić, S. Nikolić, J. Pejin, Lactic acid production on liquid distillery stillage by *Lactobacillus rhamnosus* immobilized onto zeolite, *Bioresour. Technol.* **135** (2013) 454–458.
- [94] M.N. Kumar, A.I. Gialleli, J.B. Masson, P. Kandyli, A. Bekatorou, A.A. Koutinas, M. Kanellaki, Lactic acid fermentation by cells immobilised on various porous cellulosic materials and their alginate/poly-lactic acid composites, *Bioresour. Technol.* **165** (2014) 332–335.
- [95] G. Chronopoulos, A. Bekatorou, E. Bezirtzoglou, A. Kalifas, A.A. Koutinas, R. Marchant, I.M. Banat, Lactic acid fermentation by *Lactobacillus casei* in free cell form and immobilised on gluten pellets, *Biotechnol. Lett.* **24** (2002) 1233–1236.
- [96] L. Li, D. Cai, C. Wang, J. Han, W. Ren, J. Zheng, Z. Wang, T. Tan, Continuous L-lactic acid production from defatted rice bran hydrolysate using corn stover bagasse immobilized carrier, *RSC Adv.* **5** (2015) 18511–18517.
- [97] Z. Shi, P. Wei, X. Zhu, J. Cai, L. Huang, Z. Xu, Efficient production of L-lactic acid from hydrolysate of Jerusalem artichoke with immobilized cells of *Lactococcus lactis* in fibrous bed bioreactors, *Enzyme Microb. Technol.* **51** (2012) 263–268.
- [98] T. Zhao, D. Liu, H. Ren, X. Shi, N. Zhao, Y. Chen, H. Ying, D-Lactic Acid Production by *Sporolactobacillus inulinus* Y2-8 Immobilized in Fibrous Bed Bioreactor Using Corn Flour Hydrolyzate, *J. Microbiol. Biotechnol.* **24**(12) (2014) 1664–1672.
- [99] H.O. Kim, Y.J. Wee, J.N. Kim, J.S. Yun, H.W. Ryu, Production of Lactic Acid From Cheese Whey by Batch and Repeated Batch Cultures of *Lactobacillus* sp. RKY2, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **131** (2006) 694–704.
- [100] V. Arasaratnam, A. Senthuran, K. Balasubramaniam, Supplementation of whey with glucose and different nitrogen sources for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*, *Enzyme Microb. Technol.* **19** (1996) 482–486.
- [101] 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.
- [102] N. Secchi, D. Giunta, L. Pretti, M. R. García, T. Roggio, I. Mannazzu, P. Catzeddu, Bioconversion of ovine *scotta* into lactic acid with pure and mixed cultures of lactic acid bacteria, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **39** (2012) 175–181.
- [103] Y.J. Wee, J.N. Kim, J.S. Yun, H.W. Ryu, Utilisation of sugar molasses for economical L(+)-lactic acid production by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*, *Enzyme Microb. Technol.* **35** (2004) 568–573.
- [104] 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.
- [105] J. Monteagudo, L. Rodríguez, J. Rincón, J. Fuertes, Optimization of the conditions of the fermentation of beet molasses to lactic acid by *Lactobacillus delbrueckii*, *Acta Biotechnol.* **14** (1994) 251–260.
- [106] S. Bulut, M. Elibol, D. Ozer, Effect of different carbon sources on l(+) -lactic acid production by *Rhizopus oryzae*, *Biochem. Eng. J.* **21** (2004) 33–37.
- [107] A. Srivastava, A. Poonia, A.D. Tripathi, R.P. Singh, S.K. Srivastava, Optimization of nutritional supplements for enhanced lactic acid production utilizing sugar refinery by-products, *Ann. Microbiol.* **64** (2014) 1211–1221.
- [108] B.P. Calabia, Y. Tokiwa, Production of D-lactic acid from sugarcane molasses, sugarcane juice and sugar beet juice by *Lactobacillus delbrueckii*, *Biotechnol. Lett.* **29** (2007) 1329–1332.
- [109] K. Xu, P. Xu, Efficient production of L-lactic acid using co-feeding strategy based on cane molasses/glucose carbon sources, *Bioresour. Technol.* **153** (2014) 23–29.
- [110] L. Zhang, K.Q. Shia, G.Y. Shib, Production of L-lactic acid with very high gravity distillery wastewater from ethanol fermentation by a newly isolated *Enterococcus hawaiiensis*, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **86** (2011) 213–216.
- [111] Z. Li, L. Han, Y. Ji, X. Wang, T. Tan, Fermentative production of L-lactic acid from hydrolysate of wheat bran by *Lactobacillus rhamnosus*, *Biochem. Eng. J.* **49** (2010) 138–142.
- [112] B. Jin, L.P. Huang, P. Lant, *Rhizopus arrhizus*-a producer for simultaneous saccharification and fermentation of starch waste materials to L(+)-lactic acid, *Biotechnol. Lett.* **25** (2003) 1983–1987.
- [113] S. Mussatto, M. Fernandes, G. Dragone, I. Mancilha, I. Roberto, Brewer's spent grain as raw material for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*, *Biotechnol. Lett.* **29** (2007) 1973–1976.
- [114] L. Wang, B. Zhao, B. Liu, B. Yu, C. Ma, F. Su, D. Hu, Q. Li, Y. Ma, P. Xu, Efficient production of L-lactic acid from corncob molasses, a waste by-product in xylitol production, by a newly isolated xylose utilizing *Bacillus* sp. strain, *Bioresour. Technol.* **101** (2010) 7908–7915.
- [115] D.M. Bai, Z.H. Yan, Q. Wei, X.M. Zhao, X.G. Li, S.M. Xu, Ammonium lactate production by *Lactobacillus lactis* BME5-18M in pH-controlled fed-batch fermentations, *Biochem. Eng. J.* **19** (2004) 47–51.
- [116] M. Ou, L. Ingram, K. Shanmugam, L(+)-Lactic acid production from non-food carbohydrates by thermotolerant *Bacillus coagulans*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **38** (2011) 599–605.
- [117] T. Roukas, P. Kotzekidou, Lactic acid production from deproteinized whey by mixed cultures of free and co-immobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells using fedbatch culture, *Enzyme Microb. Technol.* **22** (1998) 199–204.
- [118] Y. Göksungur, U. Güvenç, Production of lactic acid from beet molasses by calcium alginate immobilized *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **74** (1999) 131–136.

## SUMMARY

### OPPORTUNITIES, PERSPECTIVES AND LIMITS IN LACTIC ACID PRODUCTION FROM WASTE AND INDUSTRIAL BY-PRODUCTS

Dragana D. Mladenović<sup>1</sup>, Aleksandra P. Djukić-Vuković<sup>1</sup>, Jelena D. Pejin<sup>2</sup>, Sunčica D. Kocić-Tanackov<sup>2</sup>, Ljiljana V. Mojović<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia*

<sup>2</sup>*Faculty of Technology, University of Novi Sad, Novi Sad, Serbia*

(Review paper)

In line with the goals of sustainable development and environmental protection today great attention is directed towards new technologies for waste and industrial by-products utilization. Waste products represent potentially good raw material for production other valuable products, such as bioethanol, biogas, biodiesel, organic acids, enzymes, microbial biomass, etc. Since the first industrial production to the present, lactic acid has found wide application in food, cosmetic, pharmaceutical and chemical industries. In recent years, the demand for lactic acid has been increasing considerably owing to its potential use as a monomer for the production of poly-lactic acid (PLA) polymers which are biodegradable and biocompatible with wide applications. Waste and industrial by-products such as whey, molasses, stillage, waste starch and lignocellulosic materials are a good source of fermentable sugars and many other substances of great importance for the growth of microorganisms, such as proteins, minerals and vitamins. Utilization of waste products for production of lactic acid could help to reduce the total cost of lactic acid production and except the economic viability of the process offers a solution of their disposal. Fermentation process depends on chemical and physical nature of feedstocks and the lactic acid producer. This review describes the characteristics, abilities and limits of microorganisms involved in lactic acid production, as well as the characteristics and types of waste products for lactic acid production. The fermentation methods that have been recently reported to improve lactic acid production are summarized and compared. In order to improve processes and productivity, fed-batch fermentation, fermentation with immobilized cell systems and mixed cultures and opportunities of open (non-sterilized) fermentation have been investigated.

*Keywords:* Lactic acid • Lactic acid bacteria • Waste products • Industrial by-products • Fermentation