

UNIVERZITET U BEOGRADU  
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Aleksandra P. Djukić-Vuković

**PROIZVODNJA MLEČNE KISELINE I  
PROBIOTSKE BIOMASE NA  
DESTILERIJSKOJ DŽIBRI**

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Aleksandra P. Djukić-Vuković

**PRODUCTION OF LACTIC ACID AND  
PROBIOTIC BIOMASS ON DISTILLERY  
STILLAGE**

doctoral dissertation

Belgrade, 2013

MENTOR:

---

Dr Ljiljana Mojović  
Redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu  
Tehnološko-metalurški fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

---

Dr Maja Vukašinović-Sekulić  
Docent  
Univerzitet u Beogradu  
Tehnološko-metalurški fakultet

---

Dr Marica Rakin  
Vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu  
Tehnološko-metalurški fakultet

---

Dr Jelena Pejin  
Docent  
Univerzitet u Novom Sadu  
Tehnološki fakultet

DATUM ODBRANE: \_\_\_\_\_

## ZAHVALNICA

*U toku izrade ove doktorske disertacije ogromnu podršku, razumevanje i pomoć pružila mi je moja mentorka Dr Ljiljana Mojović, redovni profesor Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Svojim sugestijama i stručnim razgovorima proširila je moja znanja i značajno mi olakšala savlađivanje potpuno nove oblasti za mene. Svojim iskustvom i znanjem uz izuzetno poštovanje i razumevanje moje individualnosti vodila me je kroz istraživačko putovanje u toku poslednjih par godina i ja sam joj neizmerno zahvalna na njenoj posvećenosti, stručnosti i poverenju koje mi je ukazala u toku rada na disertaciji.*

*Doc. Dr Maji Vukašinović-Sekulić, Van. Prof. Dr Marici Rakin i Doc. Dr Jeleni Pejin se zahvaljujem na pomoći u eksperimentalnom radu, korisnim sugestijama i korekcijama kojima su uticale na konačni izgled ove doktorske disertacije. Zahvaljujem se i Prof. Dr Dušanki Pejin koja mi je obezbedila industrijsku džibru i time mi značajno olakšala rad i uticala na praktičnu primenljivost rezultata ove disertacije.*

*Koleginicama i kolegama sa Katedre za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju se zahvaljujem na razumevanju, pomoći, druženju i lepoj saradnji u toku eksperimentalnog rada na ovoj disertaciji, čime su mi u velikoj meri olakšali i pomogli u radu. Takođe, želim da se zahvalim koleginicama Valentini Semenčenko, Mr Vesni Vujačić i kolegi Dr Bojanu Jokić za pomoć i saradnju u toku rada.*

*Osećam veliku zahvalnost i prema svojim predavačima sa osnovnih studija na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, jer sam zahvaljujući znanjima i veštinama stečenim u toku mojih prethodnih studija lako savladala zadatke koje je pred mene stavio istraživački rad u okviru disertacije. Posebno želim da se zahvalim Prof. Dr Branislavi Lakušić i Doc. Dr Violeti Slavkovski što su me iskreno podržale u mom profesionalnom izboru po završetku osnovnih studija.*

*Od srca se zahvaljujem svojim prijateljima za razmevanje za sva odložena i pomerena druženja i podršku u toku svih ovih godina, a posebno mojoj Jeleni.*

*Ogromnu zahvalnost dugujem svojoj porodici. Majci za veru, podršku i snagu koju uvek unosi u moj rad i život. Ocu za konkretnu tehničku i logističku podršku u izradi ove disertacije i agilnost u prevazilaženju svih tehničkih nedostataka koje sa sobom nosi istraživački rad u Srbiji na početku 21. veka. Svojoj sestri za ljubav, podršku, entuzijazam i boje koje unosi u moj život.*

*Posebno se zahvaljujem svojoj novoj porodici. Suprugu Miroslavu za smirenost i ljubav kao i za konkretnu pomoć u radu i grafičkom oblikovanju pojedinih delova ove disertacije. Za iskreno razumevanje i podršku i u teškim i u lepim trenucima rada na disertaciji, na čemu ću mu uvek biti zahvalna.*

## PROIZVODNJA MLEČNE KISELINE I PROBIOTSKE BIOMASE NA DESTILERIJSKOJ DŽIBRI

### REZIME

Mlečna kiselina je važna supstanca za prehrambenu, farmaceutsku i hemijsku industriju. Srbija trenutno uvozi mlečnu kiselinu pa bi korišćenje destilerijske džibre, otpadne vode iz procesa proizvodnje bioetanola, kao jeftinog supstrata u proizvodnji mlečne kiseline moglo biti efikasna i ekološki povoljna strategija. Osnovni cilj ove disertacije je bio da se ispita mogućnost integrisane proizvodnje mlečne kiseline i stočne hrane na industrijskoj destilerijskoj džibri iz proizvodnje bioetanola na skrobnim sirovinama.

Hemijskom karakterizacijom džibre je pokazano da je džibra bogata proteinima i da sadrži odgovarajući sastav jona metala za rast bakterija mlečne kiseline. U toku selekcije mikroorganizama odabran je soj *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, kao odgovarajući soj za paralelnu proizvodnju mlečne kiseline i biomase pogodne za stočnu ishranu. U šaržnom sistemu je ispitan uticaj temperature, koncentracije inokuluma, mešanja i kontrole pH. Nakon optimizacije, odabrana je temperature od 41 °C, mešanje od 90 obrt/min, koncentracija inokuluma 5 % (v/v). Ispitana je mogućnost korišćenja CaCO<sub>3</sub> i 30% NaOH kao sredstava za neutralizaciju i kontrolu pH vrednosti i odabran je dodatak 30% NaOH u četvorosatnim intervalima kao najpovoljniji za integrisani postupak proizvodnje mlečne kiseline i stočne hrane. Primenom NaOH je ostvarena visoka produktivnost i intenzivan rast *Lb. rhamnosus* ATCC 7469.

Značajno unapređenje procesa je postignuto primenom dolivnog postupka gde je konačna koncentracija mlečne kiseline u medijumu povećana za 47,6% a zapreminska produktivnost za 21% u odnosu na šaržni postupak. Maksimalna postignuta produktivnost mlečne kiseline je iznosila 1,80 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, sa prinosom mlečne kiseline od 0,87 g g<sup>-1</sup> i koncentracijom mlečne kiseline od 97,1 g L<sup>-1</sup>. Broj vijabilnih ćelija po završetku fermentacije je bio 10<sup>9</sup> CFU ml<sup>-1</sup>.

Recirkulacioni šaržni postupak sa imobilisanim *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 na zeolitu je takođe isptivan. Snažna adsorpcija ćelija na površinu zeolita je omogućila lako odvajanje imobilizata od fermentisanog medijuma, gust rast ćelija u

biofilmu i visoku stabilnost imobilisanih ćelija za recirkulaciju. Na kraju četvrtog ciklusa broj vijabilnih imobilisanih ćelija iznosio je više od  $10^{10}$  CFU  $g^{-1}$  zeolitnog nosača. U šaržnom procesu sa recirkulacijom na tečnoj džibri bez dodatka izvora azota i minerala najviša postignuta produktivnost je iznosila  $1,69 g L^{-1} h^{-1}$ , uz maksimalnu koncentraciju mlečne kiseline  $42,19 g L^{-1}$  i prosečni koeficijent prinosa od  $0,96 g g^{-1}$ . Ipak, u skladu sa potrebama *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 i mineralnim sastavom džibre izvršena je i modifikacija zeolita, izmenom jona  $Na^{+}$  jonima  $Mg^{2+}$ , što je rezultovalo povećanom adsorpcijom bakterija na površinu modifikovanog zeolita, kao i povećanjem proizvodnje mlečne kiseline za oko 10%.

Ostaci nakon mlečno-kiselinske fermentacije i odvajanja tečne frakcije sa mlečnom kiselinom su analizirani sa aspekta primene u ishrani životinja nakon hemijske analize i izračunavanja važnih energetske parametara. Svarljivost ostataka nakon fermentacije je bila 96,63 % SM, sa više od 38,65% SM proteina, uz veoma visoke vrednosti svarljive i metaboličke energije od preko 4000 kcal  $kg^{-1}$  SM. Pokazano je da u *in vitro* uslovima 88% ćelija *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 preživljava četvorosatnu izloženost pH=2,5 i 85,7% ćelija preživljava četvorosatnu izloženost žučnim solima u koncentraciji 0,3%, uz ispoljenu antimikrobnu aktivnost i sposobnost proizvodnje egzopolisaharida. Zbog visokog preživljavanja *Lb. rhamnosus* ATCC 7469, može se očekivati da soj preživi prolazak kroz gastrointestinalni trakt i pozitivno deluje na zdravlje životinja. Na osnovu svojih karakteristika ostaci džibre nakon mlečno-kiselinske fermentacije predstavljaju kvalitetnu hranu prvenstveno za monogastrične životinje.

Zaključuje se da se destilerijska džibra može koristiti bez azotnih i mineralnih dodataka kao jeftin supstrat za proizvodnju mlečne kiseline sa visokom produktivnošću ( $1,80 g L^{-1} h^{-1}$ ) uz paralelnu proizvodnju kvalitetne stočne hrane za monogastrične životinje obogaćene probiotskim bakterijama.

**Ključne reči:** mlečna kiselina, mlečno-kiselinska fermentacija, džibra, bakterije mlečne kiseline, dolivni postupak, šaržni postupak, imobilizacija, zeolit, stočna hrana, probiotici.

**Naučna oblast:** Tehnološko inženjerstvo;

**Uža naučna oblast:** Biotehnologija.

**UDK broj:** 547.472.3 : 663.48

## **PRODUCTION OF LACTIC ACID AND PROBIOTIC BIOMASS ON DISTILLERY STILLAGE**

### **SUMMARY**

Lactic acid is a significant chemical for food, cosmetic, pharmaceutical and chemical industry. Currently, Serbia imports lactic acid and utilization of distillery stillage, a waste water from bioethanol production, as a cheap substrate for lactic acid fermentation could be an efficient and environmentally friendly approach. The main goal of this work was to investigate the possibilities of integrated production of lactic acid and animal feed on an industrial distillery stillage from bioethanol production on starch feedstock.

Chemical analysis of the stillage has shown high content of proteins and valuable composition of minerals for the growth of LAB. In the selection process, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 was chosen as the most promising strain for integrated production of lactic acid and biomass suitable for animal feed. The kinetics of lactic acid and biomass production in the batch fermentation and the impact of temperature, inoculum concentration, shaking and pH control were evaluated. The temperature of 41°C, shaking (90 rpm) and inoculum concentration of 5% (v/v) were selected for the fermentation. Among two different neutralizing agents (powdered CaCO<sub>3</sub> and 30% solution of NaOH) a solution of 30% NaOH was selected for pH adjustment in four hour intervals during the fermentation. This system enabled the most optimal pH control and resulted in high lactic acid productivity and extensive growth of *Lb. rhamnosus* ATCC 7469.

Significant improvements of the process were achieved in fed-batch fermentation where the final concentration of lactic acid was increased for 47.6 % and volumetric productivity for 21 % over the batch process. Maximal lactic acid productivity in fed-batch fermentation was 1.80 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, with lactic acid yield of 0.87 g g<sup>-1</sup> and lactic acid concentration of 97.1 g L<sup>-1</sup>. The number of viable cells at the end of fermentation was 10<sup>9</sup> CFU ml<sup>-1</sup>.

The fermentation with a recirculation of immobilized *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 onto zeolite was studied as a fermentation strategy. The strong adsorption of



*Lb. rhamnosus* ATCC 7469 cells onto the zeolite surface allowed easy cell separation from the fermentation media, dense growth and high stability of immobilized cells for reuse in repeated batch cycles. A number of viable cells of over  $10^{10}$  CFU per g of zeolite was achieved at the end of fourth fermentation cycle. A maximal process productivity of  $1.69 \text{ g L}^{-1}$ , maximal lactic acid concentration of  $42.19 \text{ g L}^{-1}$  and average yield coefficient of  $0.96 \text{ g g}^{-1}$  were reached in the fermentation of stillage without mineral or nitrogen supplementation. However, in accordance to mineral requirements of *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 and chemical content of minerals in stillage, exchange of  $\text{Na}^+$  ions in zeolite structure with selected Mg was performed. Exchange of  $\text{Na}^+$  with  $\text{Mg}^{2+}$  ions had improved immobilization of bacterial cells and increased lactic acid production for approximately 10%.

Suitability of the fermentation residuals after lactic acid separation for animal nutrition was assessed after determination of chemical composition and calculation of energy parameters. The digestibility of the stillage remained after lactic acid production was 96.63 % DM with the high protein content of 38.65 % DM and values of digestible and methabolisable energy above  $4000 \text{ kcal kg}^{-1}$  DM. The *in vitro* survival test has shown survival of 88% of bacteria after 4h incubation under  $\text{pH}=2.5$  and 85.7% after 4h incubation in the presence of 0.3% of bile. These values are high so it could be expected for *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 to survive passage through stomach and exhibit beneficial effect on animal health. The strain has shown antimicrobial effect and capability to produce exopolysaccharides. These findings qualify residuals from lactic acid fermentation on stillage as a high-quality feed predominantly for monogastric animals.

The results have shown that the stillage from bioethanol production could be used as an inexpensive substrate for integral production of lactic acid and monogastric animal feed with probiotics.

**Keywords:** lactic acid, lactic acid fermentation, stillage, lactic acid bacteria, batch fermentation, fed-batch fermentation, immobilization, zeolite, animal food, probiotics.

**Scientific field:** Technological engineering;

**Scientific discipline:** Biotechnology

**UDC number:** 547.472.3 : 663.48

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DEO.....	5
2. 1. Mlečna kiselina.....	5
2. 1.1. Istorijat proizvodnje mlečne kiseline.....	5
2. 1.2. Mlečna kiselina – fizičko-hemijska svojstva.....	6
2. 2. Sirovine za proizvodnju mlečne kiseline .....	8
2. 2.1. Različiti izvori ugljenika .....	8
2.2.2. Različiti izvori azota.....	18
2. 3. Mikroorganizmi mlečno-kiselinske fermentacije.....	19
2.3.1. Opšte karakteristike.....	19
2.3.2. Mikroorganizmi producenti mlečne kiseline .....	20
2.4. Tehnološki postupci za fermentaciono dobijanje mlečne kiseline .....	27
2.4.1. Primena novih tehnologija za dobijanje mlečne kiseline .....	32
2.4.2. Imobilizacija u procesima mlečno-kiselinske fermentacije.....	33
2.4.2.1. Zeolit kao nosač za imobilizaciju bakterija mlečne-kiseline .....	35
2.5. Separacione tehnike za izdvajanje mlečne kiseline nakon fermentacije.....	40
2.6. Probiotici .....	42
2.7. Stočna hrana.....	50
2.7.1. Fermentisana stočna hrana.....	54
3. EKSPERIMENTALNI DEO.....	57
3.1. Materijali .....	57
3.2. Metode.....	61
3.2.1. Priprema destilerijske džibre.....	61
3.2.2. Određivanje sadržaja redukujućih šećera u džibri i fermentacionom medijumu [163].....	61
3.2.3. Određivanje sadržaja mlečne-kiseline enzimskim testom [165] .....	63

3.2.4. Određivanje sadržaja metala .....	67
3.2.5. Određivanje sadržaja ukupnih proteina [111] .....	67
3.2.6. Određivanje sadržaja masti po Soxhlet-u [164] .....	71
3.2.7. Određivanje sadržaja pepela – metoda spaljivanja uz ekstrakciju vodom [164] .....	73
3.2.8. Određivanje suve materije [164] .....	75
3.2.9. Određivanje slobodnog $\alpha$ - amino azota [166] .....	75
3.2.10. Skenirajuća elektronska mikroskopija.....	77
3.2.11. Selekcija mikroorganizama za proizvodnju mlečne kiseline na džibri .	77
3.2.12. Mlečno-kiselinska fermentacija .....	78
3.2.12.1. Šaržni postupak.....	79
3.2.12.2. Dolivni postupak.....	80
3.2.12.3. Određivanje broja živih bakterijskih ćelija.....	81
3.2.12.4. Priprema zeolitnih molekulskih sita za imobilizaciju bakterija.....	82
3.2.12.6. Imobilizacija ćelija <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 7469 na zeolitne čestice..	83
3.2.13. Karakterizacija džibre pre i nakon mlečno-kiselinske fermentacije sa aspekta primene u ishrani životinja .....	83
3.2.13.1. Određivanje sadržaja vlakana rastvorljivih u neutralnim deterdžentima (NDF) .....	84
3.2.13.2. Određivanje sadržaja vlakana nerastvorljivih u kiselim deterdžentima (ADF) .....	86
3.2.13.3. Određivanje sadržaja lignina nerastvornog u kiselim deterdžentima (ADL) .....	88
3.2.13.4. Izračunavanje ostalih parametara za procenu kvaliteta stočne hrane [150] .....	91
3.2.13.5. Određivanje svarljivosti suve i organske materije pepsin-celulaznom metodom [172] .....	93
3.2.14. Ispitivanje probiotskih karakteristika <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 7469 <i>in vitro</i> .....	95
3.2.14.1. Preživljavanje <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 7469 pri niskoj pH vrednosti medijuma i u prisustvu goveđe žuči .....	95

3.2.14.2. Antimikrobna aktivnost <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 7469 .....	96
3.2.14.3. Proizvodnja egzopolisaharida <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 7469 na različitim izvorima ugljenika .....	97
3.2.14.4. Antibiogram test <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 7469.....	98
3.3. Statistička obrada eksperimentalnih rezultata .....	99
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	100
4.1. Hemijska karakterizacija džibre kao sirovine za proizvodnju mlečne kiseline i bakterijske biomase .....	100
4.2. Selekcija <i>Lactobacillus</i> sp. za proizvodnju mlečne kiseline i bakterijske biomase na tečnoj destilerijskoj džibri .....	102
4.3. Ispitivanje uticaja različitih faktora na mlečno-kiselinsku fermentaciju tečne hlebne destilerijske džibre .....	104
4.3.1. Uticaj temperature na proizvodnju mlečne kiseline i bakterijske biomase na tečnoj destilerijskoj džibri.....	104
4.3.2. Uticaj koncentracije inokuluma na proizvodnju mlečne kiseline i bakterijske biomase na tečnoj destilerijskoj džibri.....	106
4.3.3. Uticaj pH kontrole i mešanja na proizvodnju mlečne kiseline i bakterijske biomase na na tečnoj destilerijskoj džibri.....	108
4.3.4. Pregled važnih parametara mlečno-kiselinske fermentacije na tečnoj destilerijskoj džibri nakon selekcije optimalnih uslova temperature, koncentracije inokuluma, mešanja i kontrole pH.....	111
4.3.5. Uticaj koncentracije dodatog CaCO <sub>3</sub> kao sredstva za neutralizaciju na proizvodnju mlečne kiseline i bakterijske biomase na tečnoj destilerijskoj džibri.....	113
4.3.6. Uticaj dodatka rastvora NaOH kao sredstva za neutralizaciju na proizvodnju mlečne kiseline i bakterijske biomase na tečnoj destilerijskoj džibri .....	115
4.4. Proizvodnja mlečne kiseline i bakterijske biomase na destilerijskoj džibri.....	119
4.4.1. Ispitivanje uticaja početne koncentracije šećera na proizvodnju mlečne kiseline na destilerijskoj džibri.....	119
4.4.2. Proizvodnja mlečne kiseline i bakterijske biomase na destilerijskoj džibri dolivnim postupkom.....	123

4.4.3. Proizvodnja mlečne kiseline i bakterijske biomase na destilerijskoj džibri dolivnim postupkom.....	126
4.4.3.1. Imobilizacija <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 7469 na zeolit.....	126
4.4.3.2. Proizvodnja mlečne kiseline i bakterijske biomase na tečnoj destilerijskoj džibri imobilizacijom <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 7469 na zeolit....	129
4.4.3.3. Uporedni prikaz mlečno-kiselinske fermentacije sa slobodnim i imobilisanim <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 7469 .....	133
4.4.3.4 Proizvodnja mlečne kiseline pomoću <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 7469 imobilisanog na magnezijumom modifikovani zeolit.....	135
4.5. Mogućnosti proizvodnje stočne hrane iz ostatka nakon mlečno-kiselinske fermentacije.....	143
4.5.1. Hemijski sastav i nutritivna vrednost fermentisanog medijuma za primenu u ishrani životinja.....	144
4.5.2. Probiotska svojstva <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 7469.....	150
4.5.2.1. Preživljavanje <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 7469 pri niskom pH i u prisustvu žučnih soli .....	150
4.5.2.2. Ispitivanje antimikrobnog delovanja <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 7469....	153
4.5.2.3. Proizvodnja egzopolisaharida <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 7469 u prisustvu različitih šećera .....	155
4.5.2.4. Antibiogram test <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 7469 .....	157
5. ZAKLJUČAK.....	160
6. LITERATURA.....	164
PRILOG.....	193

## 1. UVOD

Savremeni trendovi na polju proizvodnje sirovina za industriju zasnivaju se na principima održivosti, energetske i ekološke povoljnosti i što nižih troškova proizvodnje. Mlečna kiselina je 2- hidroksi propanska kiselina koja se javlja u dva izomerna oblika, kao L- i D- mlečna kiselina. Široko se koristi u farmaceutskoj, hemijskoj, prehrambenoj, tekstilnoj i kožnoj industriji. Poslednjih godina raste potreba za proizvodnjom mlečne kiseline zbog porasta potrošnje polilaktida, polimera mlečne kiseline. Polilaktidi se koriste u proizvodnji implanta, hirurških konaca i drugih medicinskih sredstava zbog povoljnih karakteristika biodegradabilnosti, biokompatibilnosti, elastičnosti, termostabilnosti i drugih pogodnih fizičko-hemijskih svojstava. Fizičko-hemijske karakteristike polilaktida su određene udelom L-, odnosno D- izomera mlečne kiseline, pa je cilj savremenih tehnoloških postupaka stereoselektivna proizvodnja odgovarajućeg izomera mlečne kiseline, a ne racemata. Zbog svojstva bakterija mlečne kiseline (BMK) da proizvode selektivno L- ili D- izomer mlečne kiseline danas se 90% mlečne kiseline proizvodi fermentacionim postupkom, dok se preostalih 10% proizvodi sintezom iz laktonitrila [1]. Sintetskim postupkom se dobija racemat koji zahteva dalju stereospecifičnu separaciju enantiomera, što je skup postupak. Procenjeno je da se godišnje proizvede preko 120000 tona mlečne kiseline [2]. Najveći proizvođač polimera na bazi mlečne kiseline u svetu, Nature Works LLC, koristi fermentacionu tehnologiju za dobijanje mlečne kiseline i ima preko 100 US patenata iz oblasti dobijanja i prečišćavanja mlečne kiseline, dilaktida i drugih polimera mlečne kiseline [1].

Kao sirovine u mlečno-kiselinskoj fermentaciji (MKF) koriste se obnovljivi izvori šećera koje bakterije mogu da koriste. Upotrebom sporednih i otpadnih proizvoda poljoprivredne industrije kao sirovina za proizvodnju mlečne kiseline

ne povećava se koncentracija ugljen dioksida u atmosferi, a istovremeno se rešava i problem odlaganja i uništavanja sporednih proizvoda štetnih po okolinu (džibra zaostala nakon alkoholne fermentacije, otpad iz procesa prerade školjki, ostaci iz prerade ananasa itd.). Deo prinosa žitarica slabijeg kvaliteta kao i otpadni proizvodi drugih industrija (drvena industrija, industrija prerade mleka) mogu odgovarajućim postupcima hidrolize da se prevedu u slobodne šećere koje koriste BMK. Korišćenjem otpadnih proizvoda drugih industrija dobija se i znatno jeftiniji proizvod. Osnovni nedostatak tehnoloških procesa zasnovanih na otpadnim sirovinama je promenljivost u hemijskom sastavu što značajno otežava kontrolu i podešavanje parametara procesa. Takođe, žitarice koje se mogu koristiti za MKF bogate su šećerima, ali su često vrlo siromašne proteinima, mineralima i vitaminima potrebnim bakterijama i plesnima za fermentaciju. Medijumi siromašni azotom se najčešće obogaćuju ekstraktom kvasca i peptonom što povećava cenu procesa. Zbog toga se ispituju jeftinijih izvora azota u cilju intenziviranja rasta BMK i proizvodnje mlečne kiseline.

Bakterije mlečne kiseline koje se koriste za fermentaciono dobijanje mlečne kiseline obuhvataju više različitih rodova koji proizvode mlečnu kiselinu. *Lactobacillus* sp. su najčešći predstavnici BMK koji deluju blagotvorno na zdravstveno stanje ljudi i životinja pa se ubrajaju u probiotike. Prema definiciji Svetske zdravstvene organizacije, probiotici su živi mikroorganizmi koji ispoljavaju pozitivno dejstvo na zdravlje ljudi, ali i životinja. Rodovi *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* pored mlečne kiseline proizvode i druge antimikrobna jedinjenja (vodonik peroksid, bakteriocine), deluju imunostimulativno u gastrointestinalnom traktu (GIT) domaćina i potrošnjom nutrijenata suzbijaju patogene vrste mikroorganizama u GIT-u. Zbog blagotvornog delovanja na zdravlje u poslednjih deset godina su uključeni u standardnu terapiju dijareja izazvanih rotavirusima i sličnim patogenim vrstama kod dece i odraslih. Probiotici su veoma značajni i za ishranu životinja, pokazano je da upotreba BMK sa probiotskim karakteristikama poboljšava digestabilnost hrane, a imaju i dokazano pozitivno dejstvo u supresiji enteropatogena [3].



Pored ispitivanja različitih mikroorganizama i jeftinih i obnovljivih sirovina za proizvodnju mlečne kiseline, ispituju se i novi fermentacioni postupci kao što su imobilizacija biomase, dolivanje svežeg supstrata ili njegova recirkulacija itd. čime bi se uz optimizaciju povećali produktivnost, prinosi i isplativost čitavog procesa. Poslednjih godina se u svetu intenzivno ispituje imobilizacija proizvodnih mikroorganizama. Imobilizacijom se omogućava jednostavnija separacija skupih biokatalizatora, ponovno vraćanje biokatalizatora u proces, projektovanje kontinuiranih procesa koji daju veću zapreminsku produktivnost u odnosu na do sada primarno zastupljenu šaržnu proizvodnju. U ovom istraživanju cilj je da se pored proizvodnje mlečne kiseline ispita i mogućnost iskorišćenja bakterijske biomase po završetku fermentativnog dobijanja mlečne kiseline za dobijanje probiotskog dodatka ishrani životinja.

Prvo će biti izvršena hemijska karakterizacija industrijske destilerijske džibre dobijene nakon proizvodnje bioetanola na otpadnom hlebu. Sastav džibre će biti upoređen sa potrebama BMK i optimalnim sastavom medijuma za rast BMK, kako bi se procenio potencijal džibre kao supstrata za MKF.

Ispitaće se različiti mikroorganizmi iz roda *Lactobacillus* kako bi se odabrao soj najpogodniji po kriterijumima proizvodnje mlečne kiseline, biomase BMK i potencijalnih probiotskih svojstava. Sa odabranim sojem će biti izvršena optimizacija uslova šaržne MKF: temperature, koncentracije inokuluma, mešanja i dodatka sredstva za neutralizaciju. Takođe, ispitaće se efikasnost postupaka sa destilerijskom džibrom i samo sa tečnom frakcijom džibre. U cilju povećanja efikasnosti procesa, razmatraće se uticaj početne koncentracije šećera i odabrati najpovoljnija koncentracija za efikasnu paralelnu proizvodnju mlečne kiseline i biomase.

Pored šaržnog, ispitaće se dolivni postupak MKF na džibri i recirkulacioni šaržni postupak na tečnoj džibri sa imobilisanom biomasom BMK. U imobilisanom sistemu će se kao nosač BMK koristiti sprašena zeolitna molekulska sita, u nativnoj Na<sup>+</sup>-formi. Takođe, biće izvršena modifikacija zeolita u skladu sa nutritivnim potrebama BMK jonskom izmenom Na<sup>+</sup> sa Mg<sup>2+</sup> jonom i proceniće se efekat i

značaj ovako izmenjenog nosača na sve parametre MKF i proizvodnju biomase BMK..

Zbog predviđene upotrebe zaostalog fermentacionog medijuma u ishrani životinja, ostatak nakon MKF će biti hemijski okarakterisan i upoređen sa kriterijumima za stočnu hranu definisanim pravilnicima u Republici Srbiji i međunarodnim pravilnicima. Ispitaće se sadržaj proteina, masti, pepela, lako asimilativnih šećera, celuloze, hemiceluloze i vlakana u fermentisanom medijumu. Takođe, biće izračunati energetske parametri stočne hrane, metabolička i svarljiva energija, i svarljivost fermentisanog medijuma. Dobijeni rezultati će biti upoređeni sa referentnim vrednostima i karakteristikama drugih vrsta stočne hrane.

Da bi se procenio probiotski potencijal odabranog soja BMK kao i njegova bezbednost za primenu u stočnoj hrani, ispitaće se antimikrobno delovanje, preživljavanja u uslovima niskog pH i u prisustvu žučnih soli, proizvodnja egzopolisaharida i osetljivost na dejstvo različitih antibiotika.

Na osnovu dobijenih rezultata i kritičke analize literature biće doneti zaključci o mogućnosti integrisane biotehnološke proizvodnje mlečne kiseline i stočne hrane bogate probioticima na destilerijskoj džibri.

## 2. TEORIJSKI DEO

### 2. 1. Mlečna kiselina

#### 2. 1.1. Istorijat proizvodnje mlečne kiseline

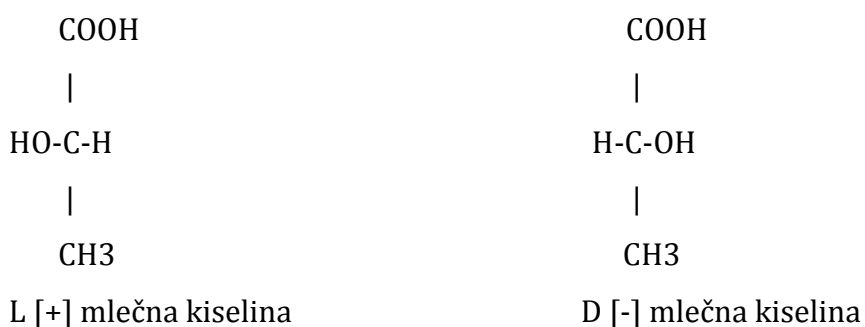
Mlečna kiselina je 2-hidroksipropanska kiselina. Koristi se širom sveta u farmaceutskoj, tekstilnoj, hemijskoj, industriji hrane, kože i tekstila. Prvi dokazi o korišćenju mlečne kiseline kao konzervansa u hrani datiraju iz 2300 godine p.n.e. U Egiptu su u kontejnerima sa hranom pronađeni ostaci sira iako se veruje da se fermentacija mleka i mesa koristila za povećanje trajnosti još u četvrtom i petom milenijumu p.n.e. [4]. U osamnaestom veku, 1780. godine, Karl Vilhem Šele (Carl Wilhelm Scheele) je prvi put identifikovao mlečnu kiselinu u surutki. Saznanje o postojanju određene organske kiseline u surutki nije još uvek bilo povezano sa njenim producentom, bakterijama mlečne kiseline. Tek 1857. godine, Luj Paster (Louis Pasteur) je doveo u vezu „sivkastu materiju“ koju je nazvao „mlečni kvasac“ sa fermentacijom mleka, da bi 1877. god. hirurg Lister (Joseph Lister) utvrdio da je dovoljna samo jedna bakterija „Bacterium lactis“ za izazivanje fermentacije kravljeg mleka [5]. Dalji razvoj proizvodnje mlečne kiseline tekao je uporedo sa celokupnim zamahom industrijske revolucije. Počeci industrijske proizvodnje mlečne kiseline fermentacijom su se zasnivali na selekciji i izolaciji pogodnih sojeva i podešavanju uslova tako da se podstakne rast odabranog soja u odabranom medijumu, a inhibira rast nepoželjnih mikroorganizama. Prvi uspešan industrijski postupak za fermentacionu proizvodnju većih količina mlečne kiseline tehničkog kvaliteta uspostavio je u svojoj fabrici u Ingelhajmu u Nemačkoj Albert Beringer (Albert Boehringer) devedesetih godina devetnaestog veka. Početkom dvadesetog veka uspostavljena je fermentaciona proizvodnja mlečne kiseline i u SAD čime je stvoreno svetsko tržište. Do Prvog svetskog rata najveći proizvođači mlečne kiseline su bili sa teritorije Nemačke (fabrike Boehringer i Merck) zahvaljujući boljem kvalitetu i jeftinijem proizvodu usled stalnog unapređenja proizvodnog postupka i primene naučnih dostignuća. Nakon Prvog svetskog rata

nemački proizvođači su uspjeli da povrate staru tržišnu poziciju i tokom Drugog svetskog rata ukupna proizvodnja mlečne kiseline je iznosila između 3300 i 4100 t godišnje. Natrijum-laktat i kalijum-laktat su korišćeni kao tečnosti za hlađenje oklopnih vozila, pa je dodatno rasla potražnja u ratnim godinama [5].

Značajniji zaokret u industrijskoj proizvodnji mlečne kiseline dogodio se 1963. godine kada je prvi put sintetski proizvedena mlečna kiselina u industrijskim uslovima. I danas se koristi u osnovi isti postupak dobijanja mlečne kiseline sintezom iz laktonitrila. Laktonitril nastaje bazno katalizovanom adicijom cijanovodonika na acetaldehid [6]. Dalje, hidrolizom laktonitrila jakom kiselinom nastaje mlečna kiselina. Postoje i drugi postupci sintetskog dobijanja mlečne kiseline, kao što su: bazno katalizovana degradacija šećera, oksidacija propilenglikola, reakcija acetaldehida sa ugljen monoksidom i vodom pri povišenoj temperaturi i pritisku, hidroliza hloropropanske kiseline i oksidacija propilena azotnom kiselinom, ali nijedan od njih se nije pokazao ekonomski prihvatljivim [1].

## 2. 1.2. Mlečna kiselina – fizičko-hemijska svojstva

Mlečna kiselina je 2-hidroksipropanska kiselina koja se javlja u dva optička izomera, kao L (+) desnogira i D (-) levogira:



Sintetskim postupcima dobijanja mlečne kiseline nastaje racemska smeša. Procesom fermentacije, u zavisnosti od mikroorganizma koji se koristi, nastaje L- ili D- oblik mlečne kiseline. Visoke koncentracije D (-) mlečne kiseline deluju štetno na organizam sisara zbog primarne ekskrecije putem urina, budući da je D-laktat

dehidrogenasa veoma slabo eksprimirana u organizmu sisara [114]. Zato se u hrani i farmaceutskoj industriji uglavnom teži upotrebi L (+) mlečne kiseline koju organizam sisara može efikasno da metaboliše.

Mlečna kiselina je slabo isparljiva, bezbojna ili bledo žuta, higroskopna, viskozna supstanca, bez ukusa i mirisa, koja u koncentrovanijim rastvorima (>20%) spontano polimerizuje gradeći linearne dimerne laktoil laktate, ciklične dimerne DD, LL ili DL laktide, ali i složenije polimere [5]. Mlečna kiselina je od strane Američke agencije za hranu i lekove (FDA) označena kao GRAS (Generally Recognized As Safe) i kao takva odobrena za upotrebu u ishrani [7].

Kao bezbedna supstanca za humanu upotrebu danas se najviše koristi u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. U prehrambenoj industriji se koristi kao blagi konzervans i acidulant, čime povećava trajnost proizvoda. Koristi se u konditorskoj industriji, industriji hleba i peciva, majoneza itd. Takođe je prisutna u svim fermentisanim mlečnim proizvodima, naročito jogurtu i drugim probiotskim preparatima mlečno-kiselinske fermentacije. U farmaceutskoj tehnologiji se koristi kao slobodna kiselina koja poseduje humektantna, antimikrobna i blago ekfolijantna dejstva. Mlečna kiselina je hemijski  $\alpha$ -hidroksi kiselina male molekulske mase pa lako prodire u kožu. Ulazi u sastav kozmetičkih preparata za ekfolijaciju i tretman „voćnim“ kiselinama. Komercijalno je zastupljena i u preparatima za tretman kože sa aknama gde deluje istim mehanizmom.

Primena mlečne kiseline u obliku polimera raste iz godine u godinu. Polimeri mlečne kiseline su bezbedni, biodegradabilni, biokompatibilni jer kao proizvod razgradnje nastaje mlečna kiselina koja je prirodan metabolit. Polilaktidi i kopolimeri mlečne i glikolne kiseline se ispituju u novim tehnologijama kao punioci za izgradnju graftova i implanta, a zbog povoljnih fizičkih karakteristika koriste se i za proizvodnju hirurških konaca i stentova [115]. Polilaktidi zauzimaju i značajno mesto u industriji pakovanja hrane. Zbog termostabilnosti, čvrstine i kratkog vremena razgradnje u prirodi koriste se za proizvodnju posuda za hranu, za jednokratnu upotrebu [2]. Takođe, intenzivno se koriste u sistemima za

kontrolisano oslobađanje leka iz različitih farmaceutskih oblika (za peroralnu, bukalnu, primenu na sluznice i kožu).

U hemijskoj industriji se mlečna kiselina koristi kao polazna sirovina za sinteze drugih supstanci. Reaktivnost mlečne kiseline potiče od slobodne karboksilne i hidroksi grupe pa se mlečna kiselina u reakcijama ponaša i kao kiselina i kao alkohola. Različitim reakcijama daje akrilnu kiselinu, propilenglikol, acetaldehid, polimere i druge supstance [10].

## **2. 2. Sirovine za proizvodnju mlečne kiseline**

### **2. 2.1. Različiti izvori ugljenika**

U postupcima dobijanja mlečne kiseline fermentacijom, tradicionalni izvori ugljenika su bili skupi prečišćeni redukujući šećeri: glukoza, saharoza... Jeftinije sirovine su obično složenijeg sastava npr. poljoprivredne kulture slabijeg kvaliteta, otpaci prerade poljoprivrednih kultura, otpadci industrije hrane, industrije papira itd. To su sporedni proizvodi bogati složenim ugljenim hidratima, a značajno manji procenat čine proteini, lipidi ili mineralne komponente. Pregled jeftinijih sirovina koje su ispitivane za dobijanje mlečne kiseline, prinosi i mikroorganizmi korišćeni za fermentaciju dati su u tabeli 2.1. i 2.2. Sirovina za mlečno-kiselinsku fermentaciju mora da sadrži šećere koje mikroorganizmi mogu da asimiliraju, uz dovoljnu količinu azotnih komponenti i faktora rasta iz same sirovine ili dodataka medijumu.

Tabela 2.1. Mikroorganizami i prinosi mlečne kiseline na skrobnim sirovinama

Sirovina	Mikroorganizam	Prinos mlečne kiseline (g g <sup>-1</sup> supstrata)	Referenca
Pšenični skrob	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> ATCC 19435	0,77-1	[11]
Cela pšenica	<i>Lactobacillus lactis</i> and <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0,93-0,95	[12]
Ječam	<i>Lactobacillus casei</i> NRRL B-441	0,87-0,98	[13]
Pšenične mekinje	<i>Lactobacillus amylophilus</i> GV 6	> 0,90	[14,15,16,17]
Kukuruzni skrob	<i>Lactobacillus amylovorus</i> NRRL B-4542	0,94	[18,19]
Krompirov skrob	<i>Rhizopus oryzae</i> , <i>R. arrhizus</i>	0,87 - 0,97	[20]

Tabela 2.2. Mikroorganizami i prinosi mlečne kiseline na celuloznim sirovinama

Sirovina	Mikroorganizam	Prinos mlečne kiseline (g g <sup>-1</sup> supstrata)	Referenca
Celuloza	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> NRRL B-548	~ 0,6	[21]
	<i>Lactobacillus coryniformis</i> ssp. <i>torquens</i> ATCC 25600	0,89	[22,23]
Hidrolizat pirinčane slame	<i>Lactobacillus brevis</i>	~ 0,52	[24]
Ceo kukuruzni klip	<i>Rhizopus sp.</i> MK-96-1196	0,82	[25]
Drvo	<i>R. oryzae</i> NRRL 395	> 0,85	[26]
Otpadni papir	<i>R. oryzae</i>	>0,8	[27]
Hidrolizat drveta	<i>Enterococcus faecalis</i> RKY1	~ 0,9	[28]

Godišnje se u svetu proizvede 3,5 milijardi otpadnih proizvoda poljoprivredne industrije [1]. Ukoliko se za dobijanje mlečne kiseline pomoću *Lb.*

*bulgaricus* koristi pšenično brašno i kvašćev ekstrakt, 68% troškova proizvodnje odlazi upravo na sirovinu [13]. Jeftinim izvorima ugljenika smatraju se obnovljive sirovine iz prirode (lignocelulozni materijali: drvo, hidrolizati drveta), obnovljive ratarske kulture bogate skrobom (pšenica, ječam, krompir, kukuruz, tapioka, šargarepa [12]), sporedni proizvodi iz industrije mleka (surutka) [29] i otpadni proizvodi poljoprivredne prerade i industrije (pirinčana slama [24], melasa, voda od močenja kukuruza, ostaci prerade šećerne trske, kasave [30]). Tehnološki postupci koji koriste sporedne ili otpadne proizvode drugih industrija su jeftiniji i značajno smanjuju troškove uklanjanja ili obrade u cilju prečišćavanja ovakvog otpada. Zato je danas svetski trend implementacija tehnologija koje koriste otpadne i obnovljive sirovine i time smanjuju emisiju ugljen-dioksida i drugih polutanata.

Zahtevi koji se stavljaju pred dobru sirovinu za dobijanje mlečne kiseline su:

- 1) niska cena,
- 2) minimalna onečišćenost i zagađenost,
- 3) brza fermentacija,
- 4) visok prinos mlečne kiseline,
- 5) minimalno stvaranje sporednih proizvoda u toku fermentacije,
- 6) mogućnost korišćenja bez predtretmana ili minimalni predtretman
- 7) dostupnost u toku cele godine (mogućnost dugotrajnog čuvanja, dugačak vegetacioni periodi, višestruki vegetacioni periodi u toku godine)
- 8) blizina proizvodnog pogona za mlečnu kiselinu
- 9) mogućnost jednostavnog izdvajanja mlečne kiseline iz fermentacionog medijuma.

U poljoprivrednim ostacima prisutni su uglavnom polimerni ugljeni hidrati skrob, celuloza i hemiceluloza, pa je neophodno da se prosti šećeri iz ovih sirovina oslobode [30]. Tako je za sirovine bogate skrobom potrebno prvo molekule skroba razložiti na proste šećere delovanjem enzima (faza saharifikacije), a potom fermentacijom nastaje mlečna kiselina. Upotrebom BMK koje imaju i



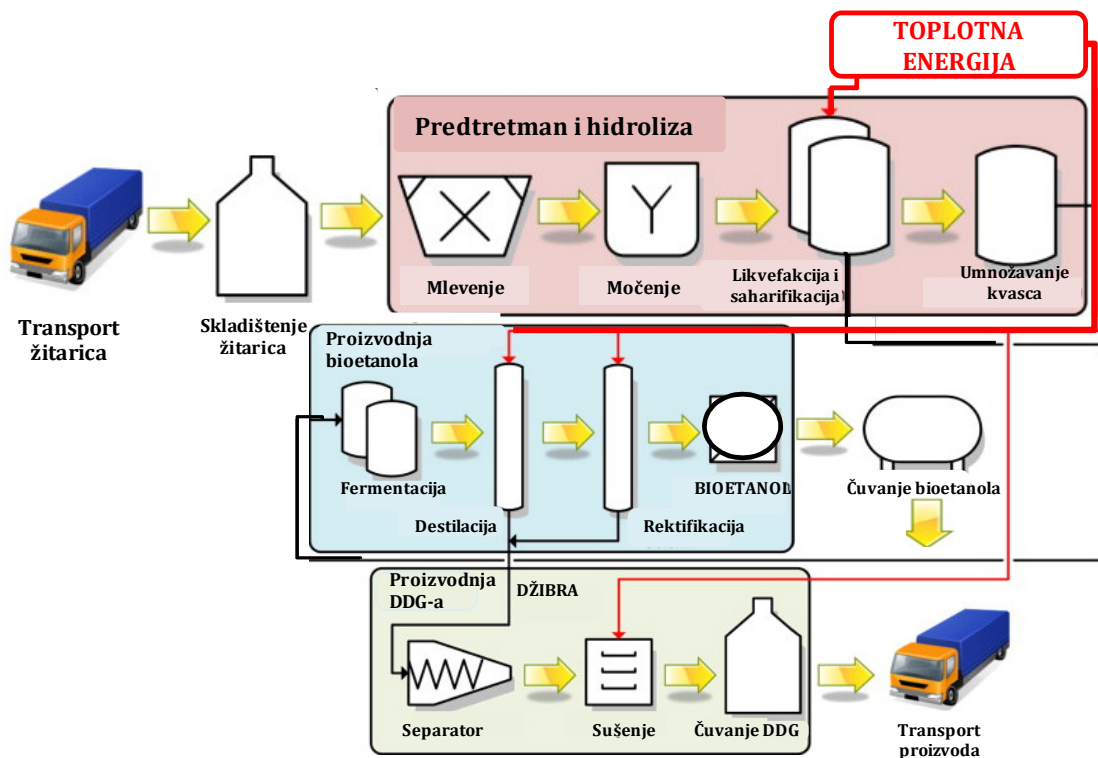
ekstracelularne amilolitičke enzime omogućava se direktni postupak fermentacije na ovim složenim sirovinama jer enzimi bakterija razgrađuju skrob do prostih šećera. Ovakav postupak je ekonomičniji, jer se odvija u jednom stupnju, ostvaruje se ušteda u energiji i vremenu (nije potrebno formiranje i održavanje dva procesa, pranje reaktora između faza), nije potreban skup predtretman amilazama. U zavisnosti od mikroorganizma koji je korišćen ispitivane su brojne skrobne sirovine kao što su kukuruzni skrob [19,31], skrob korena kasave [32], raženo brašno [33], ječmeno brašno [13], krompirov skrob [32, 34] i krompirova kaša [35]. Krompirova kaša je u postupku direktne fermentacije sa amilolitičkim sojem *Lactobacillus cellobiosus* D-39 u prisustvu  $\text{CaCO}_3$  dala prinos mlečne kiseline od 50% u odnosu na totalne ugljene hidrate [35]. Dobijanje mlečne kiseline na skrobnim sirovinama je do sada najviše ispitivano i u različito projektovanim procesima mogu se dobiti prinosi od  $4,8 \text{ g L}^{-1}$  na azotom siromašnim sirovinama kao što je kasava [36], do  $0,98 \text{ g}$  mlečne kiseline po  $\text{g}$  substrata na ječmenom skrobu obogaćenom peptonom i kvašćevim ekstraktom [13]. Iako je skrob povoljnija sirovina u odnosu na rafinisane šećere (glukoza, saharoza), dodatna ušteda se može ostvariti upotrebom otpadnih poljoprivrednih proizvoda koji se obnavljaju svake godine, a ne koriste se u drugim industrijama (ljuske semena pamuka, stabljike kukuruza, Jerusalimska artičoka, celi klipovi kukuruza [37], pšenične mekinje [38], hidrolizat kukuruznih vlakana [39], kineska šećerna trska [40], pirinčana slama [24], otpad iz procesa obrade šargarepe [1]). Pogodnost i cenu određene sirovine za fermentaciju diktiraju brojni već pomenuti parametri, uključujući i genotip, lokaciju i kvalitet zemljišta na kojem određena vrsta uspeva [41]. Kasava i Jerusalimska artičoka su vrste koje opstaju na oskudnim marginalnim staništima, pa spadaju u veoma jeftine i lako dostupne sirovine. Sa druge strane, prinosi mlečne kiseline na korenu kasave su dosta niski i iznose oko  $4,8 \text{ g L}^{-1}$  bez obogaćivanja izvorima azota. Upravo zbog siromašnih zemljišta na kojima raste, kasava je poznata kao biljka sa veoma malim sadržajem azota, pa je u tehnoekonomsku analizu korišćenja ovakvih sirovina potrebno uključiti i cenu dodatnih izvora azota, minerala, vitamina itd. [36, 42- 44].

Melasa je veoma kvalitetan i nutritivno vredan sporedni proizvod dobijanja šećera. Melasa je sirup koji nastaje nakon poslednje kristalizacije u postupku dobijanja šećera iz šećernih sirovina (šećerna repa i šećerna trska). Sadrži od 48-56% ukupnih šećera (postoje male razlike u sastavu melase dobijene iz šećerne trske i šećerne repe), 30 % nesaharoznih materija, ali i vitamine i minerale (biotin, folnu kiselinu, piridoksin, Ca-pantotemat, riboflavin, Mg, Ca, P, Si, K, Al, Fe...) [45]. Pogodna je za izvođenje fermentacija jer veliki broj mikroorganizama može koristiti šećere melase. Jeftinija je od rafinisanih šećera, a zbog visoke koncentracije šećera smanjena je mogućnost kontaminacije. Kao nedostaci mogu se izdvojiti povećana potražnja jer zbog dobrih osobina postaje interesantna u biotehnologiji. Sa druge strane osavremenjivanjem procesa proizvodnje šećera, smanjuje se količina melase kao sporednog proizvoda za dobijanje mlečne i drugih organskih kiselina [46]. Ranije, prilikom korišćenja melase šećerne repe za dobijanje mlečne kiseline, da bi se dobio zadovoljavajući kvalitet, bilo je neophodno uvođenje dodatnog stepena ekstrakcije za uklanjanje hemikalija dodatih u toku procesa što značajno smanjuje isplativost procesa. Sa druge strane, prinosi mlečne kiseline na melasi šećerne repe mogu biti i preko 90% što je čini izuzetno atraktivnom sirovinom. Ispitivana je sposobnost proizvodnje mlečne kiseline pomoću soja *Lb. delbrueckii ssp. delbrueckii* IFO 3202 na melasi šećerne repe i ostvareni su prinosi od 95,4% u šaržnom reaktoru [47]. Ipak, kako je savladana tehnologija njene primene i korišćenja u drugim industrijama, melasa je danas dosta skupa sirovina za dobijanje jeftine mlečne kiseline.

Poslednjih godina intenzivno se ispituju otpadni proizvodi drvne industrije, prvenstveno zbog svoje rasprostranjenosti i niske cene. Procenjeno je da je godišnja proizvodnja lignoceluloznog otpada samo u SAD oko 200 miliona tona [48]. Izazove pri korišćenju celuloznih materijala za fermentacije predstavlja nemogućnost većine bakterijskih vrsta da razgrade molekule celuloze da prostih šećera, pa je potreban predtretman kiselinama ili i enzimima, celulazama i celobiozama, što poskupljuje kompletan tehnološki postupak. Celuloza je složeni homopolimer  $\beta$ -D glukoze, a hemiceluloza heteropolimer sastavljen od glukoze, manoze, galaktoze, ksiloze, arabinoze i malih količina ramnoze, glukuronske,

metilglukuronske i galaktouronske kiseline. Zato u medijumu nakon faze saharifikacije postoji smeša pentoza i heksoza [49]. Efekat kataboličke represije izvora ugljenika je osobina uočena kod velikog broja mikroorganizama da sekvencijalno koriste heksoze i pentoze iz smeše. U medijumu koji sadrži i heksoze i pentoze, bakterije prvo koriste heksoze, a tek kada iscrpe zalihe heksoze počinju da asimiliraju pentoze što smanjuje efikasnost iskorišćenja slobodnih šećera. Ukupni sadržaj šećera u lignoceluloznim sirovinama je visok, ali zbog nemogućnosti iskorišćenja svih vrsta šećera prinosi su dosta mali u odnosu na ukupni sadržaj šećera. Povećanje iskorišćenja može se postići simultanom saharifikacijom i fermentacijom (SSF), uz korišćenje proizvodnog mikroorganizma kod koga nije prisutan efekat kataboličke represije izvorima ugljenika. Pored skraćivanja vremena samog tehnološkog postupka, SSF postupkom se smanjuje i inhibicija proizvodnog organizma supstratom jer se istovremeno sa oslobađanjem šećera iz sirovine vrši i fermentacija. U postupku dobijanja mlečne kiseline iz hidrolizata pirinčane slame mikroorganizam *Lactobacillus brevis* je pokazao bolje rezultate u SSF procesu u odnosu na sekvencijalni dvofazni postupak saharifikacije i fermentacije. Oslobađanje šećera ksiloze, glukoze i arabinoze enzimima celulazom i celobiozom nije izazvalo inhibiciju *Lb. brevis*, a nije uočen ni efekat kataboličke represije izvora ugljenika, pa je *Lb. brevis* istovremeno koristio i glukozu i pentoze iz medijuma, što ukazuje na potencijal ovog soja za dobijanje mlečne kiseline na lignoceluloznim i hemicelulozni hidrolizatima [24, 50].

Džibra je sporedni proizvod koji nastaje u postupku dobijanja bioetanola alkoholnim vrenjem pomoću kvasaca *Saccharomyces* sp. na kukuruznom brašnu i drugim sirovinama. U ovom radu će se prvi put razmatrati potencijal džibre, kao izvora ugljenih hidrata i proteina, za dobijanje mlečne kiseline i fermentisane stočne hrane. Šema postupka proizvodnje bioetanola i džibre sa istaknutim energetski skupim procesima u postupku proizvodnje je predstavljena na slici 2.1.



Slika 2.1. Šema proizvodnje kompletnog procesa proizvodnje bioetanol a i nastajanja džibre i suvog ostatka džibre (SODŽ, DDG (engl.) - dried distillers' grains). Modifikovano prema Bösch i sar. (2012) [51]

Džibra koja zaostaje nakon izdvajanja etanola je otpadna sirovina, a budući da sadrži inaktivirane ćelije kvasca bogate azotom i vitaminima B grupe može se očekivati dobra produktivnost bakterija mlečne kiseline na njoj kao i male potrebe za obogaćivanjem podloge [52,53]. Zbog efikasne alkoholne fermentacije očekuje se niska koncentracija šećera u džibri. Nakon uklanjanja etanola destilacijom i centrifugiranja, zaostaje tečna frakcija, žućkastog obojenja, lako mešljiva sa vodom. Hemijski sastav džibre varira od serije do serije, što predstavlja jedan od osnovnih nedostataka za primenu u industrijskim uslovima, gde je potrebno ostvariti dobru kontrolu procesa, naročito ulazne sirovine. Pregled osnovnih grupa jedinjenja prisutnih u tečnoj džibri i njihove procentualne zastupljenosti dat je u tabeli 2.3.

Tabela 2.3. Sadržaj osnovnih grupa jedinjenja u tečnoj džibri

Osnovne grupe jedinjenja (% izraženo na suvu materiju)	Vrednosti	Reference
Suva materija	3,7- 7,5	[52,53]
Proteini	1,3- 2,3	[52,53]
Masti	~1,3	[52,53]
Ugljeni-hidrati	0,5- 2,8	[52,53]
Skrob	0,5-0,56	[52,53]
Sirova vlakna	0,1- 1,81	[52,53]
Pepeo	0,8- 2,1	[52,53]

Sastav džibre varira u zavisnosti od upotrebljene sirovine za alkoholnu fermentaciju. Sadržaj proteina, vitamina i minerala je veoma značajan za ispitivanje pogodnosti tečne džibre kao podloge za mlečno-kiselinsku fermentaciju. BMK zahtevaju složene medijume, bogate vitaminima i azotom zbog svojih ograničenih kataboličkih sposobnosti. Pregled sadržaja aminokiselina, minerala i vitamina B grupe u tečnoj džibri različitog porekla dat je u tabelama 2.4 i 2.5.

Tabela 2.4. Sadržaj aminokiselina u kukuruznoj tečnoj džibri [53]

Aminokiseline	Sadržaj (% SM)	Aminokiseline	Sadržaj (% SM)	Aminokiseline	Sadržaj (% SM)
Arginin	0,1	Alanin	0,1	Metionin	0,0
Histidin	0,0	Asparaginska kiselina	0,1	Fenilalanin	0,1
Izoleucin	0,1	Glutaminska kiselina	0,1	Valin	0,1
Leucin	0,1	Glicin	0,1	Serin	0,1
Lizin	0,1	Prolin	0,1	Treonin	0,1

Tabela 2.5. Sadržaj minerala i B vitamina u tečnoj džibri različitog porekla

Minerali (kukuruzna džibra)	Sadržaj (% SM)	Reference	Vitamini (smeša ražene i krompirove džibre)	Sadržaj (g kg <sup>-1</sup> )	Reference
Kalcijum (ppm)	31,0	[53]	Tiamin (B1)	0,0114	[54]
Fosfor	0,1	[53]	Riboflavin (B2)	0,0165	[54]
Kalijum	0,2	[53]	Piridoksin (B6)	0,0114	[54]
Magnezijum	0,1	[53]	Vitamin B12	0,00006	[54]
Sumpor	0,1	[53]	Biotin	0,00029	[54]
Natrijum	0,1	[53]	Niacin, (B3)	0,13345	[54]
Gvožđe (ppm)	8,0	[53]	Pantotenska kiselina (B5)	0,0656	[54]
Mangan (ppm)	2,0	[53]	Folna kiselina (B9)	0,00159	[54]

Jedan od najzahtevnijih mikroorganizama iz grupe BMK roda *Lactobacillus* je *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis*. U tabeli 2.6. su date nutritivne potrebe u hemijski definisanom medijumu za uspešan rast i fermentaciju pomoću ovog mikroorganizma.

Tabela 2.6. Nutritivne potrebe *Lb. delbrueckii ssp. lactis* u medijumu za gajenje [55]

Šećeri i aminokiseline	Koncentracija (g L <sup>-1</sup> )	Minerali, nukleinske kiseline i vitamini	Koncentracija (g L <sup>-1</sup> )
<b>ŠEĆERI</b>		<b>MINERALNE MATERIJE</b>	
Glukoza	10	CH <sub>3</sub> COONa	5
<b>AMINOKISELINE</b>		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3
L-Ala	0,1	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3
L-Arg	0,1	MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,2
L-Asn	0,20	MnSO <sub>4</sub> ×4H <sub>2</sub> O	0,05
L-Asp	0,20	FeSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,02
L-Cys	0,20	<b>NUKLEINSKE KISELINE</b>	
L-Gln	0,20	Adenin	0,01
L-Glu	0,20	Guanin	0,01
Gly	0,10	Timin	0,01
L-His	0,10	Uracil	0,01
L-Ile	0,10	2,6-dioksipurin (ksantin)	0,01
L-Leu	0,10	<b>VITAMINI</b>	
L-Cys	0,10	Tiamin (B <sub>1</sub> )	0,001
L-Met	0,10	Riboflavin (B <sub>2</sub> )	0,001
L-Phe	0,10	Piridoksal (B <sub>6</sub> )	0,002
L-Pro	0,10	Cijanokobalamin (B <sub>12</sub> )	0,001
L-Ser	0,10	D-Biotin (H, B <sub>7</sub> )	0,01
L-Thr	0,10	Nikotinska kiselina (B <sub>3</sub> )	0,001
L-Trp	0,10	Pantotenska kiselina (B <sub>5</sub> )	0,001
L-Tyr	0,10	Folna kiselina (B <sub>9</sub> )	0,001
L-Val	0,10	p-aminobenzoeva kiselina	0,01

Upoređivanjem podataka iz tabele 2.6. sa literaturnim podacima o sastavu džibre datim u tabelama 2.4 i 2.5. može se zaključiti koliki je potencijal tečne džibre kao podloge za dobijanje mlečne kiseline. Danas se u velikoj meri ispituju i jeftiniji izvori azota kako bi se obogatila podloga i dobili viši prinosi mlečne kiseline uz minimalnu cenu i utrošak energije.

Pored korišćenja sporednih proizvoda biljnog porekla moguće je koristiti kao sirovine za MKF i ostatke od prerade sirovina animalnog porekla. Surutka je tečna frakcija koja nastaje u proizvodnji sira i kazeina. Nakon koagulacije proteina iz mleka enzimima, kiselinama ili toplotom, odvaja se gruša, a tečnost koja zaostaje

je surutka. Sastav surutke varira u zavisnosti od postupka kojim se izaziva koagulacija, mleka koje se koristi za dobijanje i tehnološkog postupka. Prosečno nakon dobijanja jednog kilograma sira nastaje 10 litara surutke [46]. Sadržaj suve materije je oko 6,4% i najzastupljeniji su: laktoza (70-80%), azotne materije i minerali, a u manjem procentu i lipidi i kiseline. U tabeli 2.7. je dat uobičajeni sastav suve materije surutke. Korišćenje surutke za proizvodnju mlečne kiseline uslovljeno je sposobnošću proizvodnog mikroorganizma da metaboliše laktozu i postoji značajan broj mikroorganizama za fermentaciju surutke (detaljnije u poglavlju 2.3.2., vidi Tabelu 2.8.) [56, 57].

Tabela 2.7. Sastav suve materije surutke [58]

Komponenta	Sadržaj u % SM
Laktoza	70-80
Azotne materije	10-14
Mineralne materije	7-12
Kiseline	1,5-4
Lipidi (izvorna surutka)	4-6
Lipidi (obrana surutka)	0,7-0,8

### 2.2.2. Različiti izvori azota

Ratarske culture slabijeg kvaliteta i otpadni proizvodi drugih industrija koji se koriste kao sirovine za dobijanje mlečne kiseline uglavnom su bogate ugljenim hidratima, ali su siromašne proteinima i drugim faktorima rasta bitnim za BMK, pa je neohodno dodavati medijumu ili skupe suplemente, kao što je kvašćev ekstrakt koji pored azota sadrži i B-vitamine potrebne za rast bakterija, ili pronaći jeftinije izvore azota. Jedna sudija je pokazala da od ukupnih troškova proizvodnje mlečne kiseline 38% otpada na kvašćev ekstrakt kao izvor azota [58]. Tradicionalni izvori azota za povećanje nutritivne vrednosti medijuma su pepton i kvašćev ekstrakt.

Kao mogući jeftiniji izvori azota ispitivani su crveno sočivo, pekarski kvasac, brašno „golubijeg“ graška, crni, bengalski i zeleni grašak, soja, [15-17,58], voda od močenja kukuruza [59] itd. Najbolji prinosi mlečne kiseline su dobijeni sa brašnom crvenog sočiva, pekarskim kvascem i vodom od močenja kukuruza. Brašno crvenog



sočiva sadrži 25% proteina, riboflavin i niacin, a nedostaju mu pantotenska kiselina, piridoksin i folna kiselina, pa iako u fermentaciji sa *Lb. amylophilus* GV6 samo na brašnu crvenog sočiva bez obogaćivanja medijuma daje dobar prinos mlečne kiseline, medijum se može delimično obogatiti dodavanjem kvašćevog ekstrakta, čime se povećava prinos, a zamenom peptona sa crvenim sočivom se pojeftinjuje proces. Isti autori su ispitivali pekarski kvasac kao zamenu za kvašćev ekstrakt. Usled prethodne sterilizacije razaraju se ćelije kvasca i oslobađaju se aminokiseline, vitamini i nukleotidi veoma značajni za rast *Lactobacillus* sp. koje proizvode mlečnu kiselinu (Tabela 3.5) [60]. Kombinacijom brašna crvenog sočiva sa pekarskim kvascem i dodatkom 1% rastvornog skroba u fermentaciji sa *Lb. amylophilus* GV6 postiže se prinos od 92% na utrošenu masu skroba, što ukazuje na mogućnosti postizanja visokih prinosa i na alternativnim sirovinama [61]. Pokazano je, takođe, da se prinosi mlečne kiseline mogu i povećati u odnosu na rezultate postignute sa dodatkom kvašćevog ekstrakta dodatkom larvi svilene bube, autolizata kvasca ili korišćenjem otpada od prerade škampa, ali su broj ćelija i suva masa ćelija bili veći u uzorcima sa kvašćevim ekstraktom [61].

## **2. 3. Mikroorganizmi mlečno-kiselinske fermentacije**

### **2.3.1. Opšte karakteristike**

Osnova za razvoj biotehnološkog postupka dobijanja mlečne kiseline bila je izolovanje bakterijske vrste „*Bacterium lactis*“ 1877. godine, odgovorne za fermentaciju kravljeg mleka. Težnja da se proces komercijalizuje i učini efikasnim zahtevala je što bolje definisanje parametara koji učestvuju u procesu. Vremenom je uočeno da postoji više bakterijskih sojeva, uglavnom iz rodova *Lactobacillus*, *Lactococcus* koji su sposobni da izazovu fermentaciju. Sa povećanjem broja bakterijskih vrsta koje su mogle ući u proces, započeta su istraživanja u cilju selekcije najboljih za industrijske razmere. Važni parametri za rast bakterija su sastav podloge, radna temperatura, pH vrednost, osetljivost na inhibiciju supstratom ili proizvodom, brzina rasta, posedovanje specifičnih enzima... Ukupni prinos mlečne kiseline, predstavlja rezultat sadejstva svih navedenih parametara,

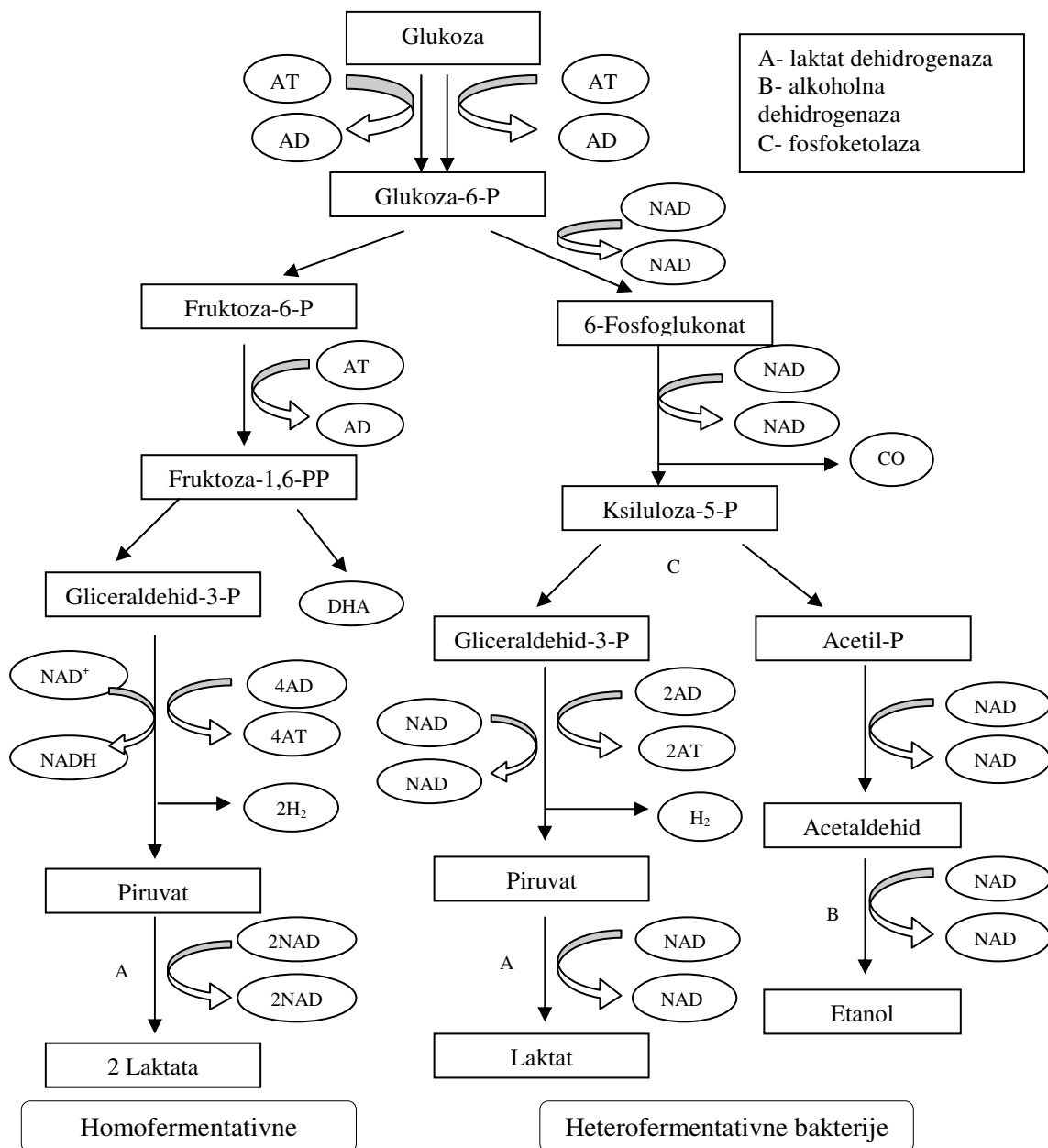
pa je u skladu sa tim veliki izbor mogućnosti i za formiranje različitih proizvodnih sistema. Biomasa, zaostala nakon fermentacije, može se uz odgovarajući tretman upotrebiti za probiotske preparate. Sa druge strane tehnološki postupci diktiraju željena svojstva bakterije. Za direktno dobijanje mlečne kiseline iz skrobnih sirovina neophodno je da bakterije poseduju enzime za hidrolizu skroba. Bakterije se nakon završene fermentacije mogu koristiti kao probiotici, nakon odgovarajućeg sušenja odnosno stabilizacije. Pokušano je i da se dodatno poveća efikasnost tehnoloških postupaka imobilizacijom BMK na nosače. Postupci i uslovi pod kojima se vrši imobilizacija zahtevaju odgovarajuću otpornost odabrane vrste BMK. Zahteva se sposobnost vezivanja za nosač, zadržavanje aktivnosti nakon vezivanja i visoka stopa preživljavanja, budući da je cilj ponovno vraćanje bakterija u proces [62]. Konačno, mikroorganizam mora biti označen kao GRAS (generaly recognized as safe) od strane FDA US ili drugih regulatornih agencija da bi mogao biti odobren za primenu u humanoj i životinjskoj ishrani. Veoma su strogi propisi za probiotike koje postavlja Svetska Zdravstvena organizacija i detaljnije su izneti u poglavlju o probioticima.

### **2.3.2. Mikroorganizmi producenti mlečne kiseline**

BMK smatraju se sve bakterijske vrste koje kao glavni metabolički proizvod daju mlečnu kiselinu. One proizvode mlečnu kiselinu fermentacijom sirovina bogatih ugljenim hidratima. BMK pripadaju razdelu *Firmicutes*, obuhvataju bakterije 12 rodova, ali se kao rodovi sa najvećim brojem predstavnika koji se intenzivnije koriste izdvajaju: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* i *Pediococcus*. *Lactobacillus* je rod sa najvećim brojem predstavnika ispitivanih po pitanju probiotičke aktivnosti i proizvodnje mlečne kiseline fermentacijom i smatra se da ima oko 80 vrsta.

BMK iako su heterogene, sve zahtevaju za svoj rast dosta složene medijume, bogate azotom i vitaminima. Zbog nedostatka metaboličkih puteva kojima bi same stvarale potrebne nutrijente, uglavnom naseljavaju prirodne niše bogate aminokiselinama, peptidima, nukleotidima, masnim kiselinama, vitaminima B

grupe, mineralima i drugim faktorima rasta. Iako se pod BMK podrazumeva ne samo mnoštvo vrsta, već više rodova, mogu se istaći još neke zajedničke osobine. To su gram pozitivne, nesporogene bakterije, anaerobne (mada postoje aerotolerantne koke i bacili iz ove grupe), katalaza negativne, acidotolerantne bakterije koje mogu da proizvode mlečnu kiselinu kao glavni proizvod metabolizma ugljenih hidrata iz različitih sirovina. Zbog nemogućnosti da sintetišu porfirinsko jezgro, ne koriste kiseonik i ne formiraju respiratorni lanac, pa su većinom anaerobni ili mikroaerofilni mikroorganizmi. Vrste koje mogu da žive u prisustvu kiseonika imaju peroksidaze, enzime koji štite bakteriju od kiseonika i kiseoničnih radikala gradeći peroksid, pa kod aerotolerantnih vrsta deo antimikrobnog delovanja koje ispoljavaju potiče i od ovako nastalog  $H_2O_2$  [63]. Komercijalno, najznačajnija je njihova sposobnost da proizvode mlečnu kiselinu i to uglavnom stereospecifično, pa je i jedna od klasifikacija izvršena na osnovu fermentativnih osobina. BMK su podeljene na homofermentativne i heterofermentativne, u zavisnosti od toga da li je dominantan proizvod njihove aktivnosti mlečna kiselina ili proizvode i druga jedinjenja, npr.  $CO_2$ , etanol, sirćetnu kiselinu... Šema metaboličkih puteva kod homofermentativnih i heterofermentativnih mlečno-kiselinskih bakterija data je na slici 2.2.



Slika 2.2. Prikaz metaboličkih puteva homofermentativnih i heterofermentativnih BMK [64,5]

Homofermentativne bakterije proizvode više od 85% mlečne kiseline iz glukoze, tj. iz 1 mola glukoze nastaju 2 mola mlečne kiseline, dok heterofermentativne daju iz 1 mola glukoze 1 mol mlečne kiseline, 1 mol etanola i 1 mol CO<sub>2</sub>, odnosno prinos mlečne kiseline je 50 % [63].

Pored osnovne podele na obligatne homofermentativne i obligatne heterofermentativne bakterije, može se uočiti i postojanje homofermentativnih

bakterija kod kojih je moguće indukovati heterofermentativni metabolizam. Pregled nekih od mikroorganizama koji su fakultativno (indukovano) heterofermentativni dat je u tabeli 2.8. U uslovima niskih koncentracija glukoze (i

Tabela 2.8. Podela mlečno-kiselinskih bakterija prema fermentacionom putu [5]

Bakterija	Fermentacioni put	Enantiomer mlečne kiseline	Izvor ugljenika
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (pre <i>Lb. bulgaricus</i> )	Obligatni homofermentativni	D [-]	Laktoza, surutka,
<i>Lb. rhamnosus</i> (pre <i>Lb. delbrueckii</i> )	Fakultativno heterofermentativni	L[+]	Glukoza, saharoza i krompir
<i>Lb. helveticus</i>	Obligatni homofermentativni	L[+], D [-]	Surutka i laktoza
<i>Lb. amylophilus</i>	Obligatni homofermentativni	L[+]	Skrob
<i>Lb. amylovorus</i>	Obligatni homofermentativni	L[+], D[-]	Skrob
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i> , <i>Lb. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>	Fakultativno heterofermentativni	L[+]	Laktoza, surutka
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> i subsp. <i>cremoris</i> (pre <i>Streptococcus lactis</i> )	Obligatni homofermentativni	L[+]	Laktoza i surutka
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Obligatni homofermentativni	L[+]	Laktoza

drugih heksoza) dodatkom pentoza indukuje se enzim fosfoketolaza koji prevodi ksilulozu u gliceraldehid-3-fosfat, koji se dalje uključuje u Embden-Meyerhof-ov put do nastanka piruvata koji dejstvom laktat-dehidrogenaze daje laktat i acetilfosfat. U sledećoj reakciji redukcije nastaje acetat, odnosno etanoLb. Pentoza fosfatni put je sporedni metabolički put kojim se bakterija prilagođava na siromašniji izvor ugljenika. Pentoza fosfatni put se aktivira pri niskim koncentracijama heksoza, a u prisustvu pentoza, obrazujući energetske manje povoljan proces, ali dovoljan za opstanak. Uzrok „efekta kataboličke represije izvora ugljenika“ upravo leži u energetske povoljnosti procesa, Embden-Meyerhof

metabolički put je energetski povoljniji, nastaju 4 mola ATP-a, dok u pentoza fosfatnom putu nastaju 2 mola ATP-a. Postoje i BMK koje koriste samo pentoza fosfatni put, ali one nemaju industrijsku primenu.

Optička aktivnost mlečne kiseline kao proizvoda fermentacije diktirana je enzimom, L-laktat dehidrogenazom ili D-laktat dehidrogenazom, u poslednjem koraku prevođenja piruvata u laktat. Istovremeno postoje i vrste bakterija koje imaju oba enzima, takvi su npr. *Lb. plantarum* i *Lb. helveticus*, pa mogu da sintetišu racemat L- i D- mlečne kiseline.

Izučavanjem na polju korišćenja novih otpadnih poljoprivrednih sirovina, izdvojila se posebna grupa bakterija iz grupe BMK koja poseduju enzime ekstracelularne amilaze i označene su kao amilolitičke BMK. Amilolitičke bakterije omogućavaju upotrebu sirovina bogatih skrobom i sporednih proizvoda prerade skrobnih sirovina u jednostavnijim i jeftinijim tehnološkim postupcima. Nakamura i Crowell su 1979. godine potvrdili sposobnost soja *Lb. amylolyticus* B 4437 da hidrolizuje molekule skroba, a 1981. godine izolovan je još jedan amilolitički soj, *Lb. amylovorus* [65,66]. Pregled najviše ispitivanih amilolitičkih bakterija i sirovina na kojima je potvrđena aktivnost amilaza dat je u tabeli 2.9.

Tabela 2.9. Amilolitičke bakterije korišćene za fermentisanje skrobnih sirovina

Bakterija	Soj	Sirovina	Referenca
<i>Lb. amylolyticus</i>	B 4437	Otpadne sirovine prerade kukuruza	[65]
<i>Lb. amylovorus</i>	NRRL B-4542	Različite skrobne sirovine	[18]
<i>Lb. amylophilus</i>	GV6	Skrob, pšenične mekinje	[15]
<i>Lactococcus lactis</i>		Pšenični skrob	[11]
<i>Lb. manihotivorans</i>	OND32T	Kasava	[67]
<i>Lb. fermentum</i>	Ogi E1	Skrob	[68]
<i>Lb. plantarum</i>	LMG18053	Različite skrobne sirovine	[69]
<i>Lb. cellobiosus</i>		Različite skrobne sirovine	[70]

Danas je potvrđeno postojanje mnogo sojeva bakterija koje mogu da razlažu molekule skroba i uglavnom su izolovane sa sirovina bogatih skrobom, kao što su koren kasave, fermentisani napici na bazi kasave, pirinča, kukuruza i žitarica.

Složeni nutritivni zahtevi *Lactobacillus* spp. u industrijskim uslovima predstavljaju značajan ograničavajući faktor. Svojstvo bakterija da sinergistički proizvode mlečnu kiselinu u medijumu, može imati značajne povoljnosti u formulaciji tehnološkog postupka (bolji prinosi, smanjenje kontaminacije, brža proizvodnja). Mešana kultura pet sojeva *Lactobacillus* spp. daje više prinose mlečne kiseline u odnosu na svaki od pojedinačnih sojeva, uz smanjenu potrošnju izvora azota. Takođe, povećan je rast mikroorganizama, pa se dobija i veća količina biomase za probiotsku primenu [71].

Plesni su takođe sposobne za stereospecifičnu proizvodnju mlečne kiseline. Rodovi plesni koji mogu da proizvode mlečnu kiselinu u visokom prinosu su *Mucor*, *Monilia* i *Rhizopus*, ali daleko najveću primenu ima vrsta *Rhizopus oryzae* [72]. Najbolje su dokumentovane fermentacije sa *R. arrhizus* i *R. oryzae*, a prinosi mlečne kiseline su u prvim pokušajima primene bili niži u odnosu na bakterijske sojeve [72, 26, 27]. Manji prinosi su rezultat metaboličkih puteva koji stvaraju sporedne proizvode (etanol, mravlja kiselina). Takođe, plesni su osetljive na inhibiciju proizvodom čime se smanjuje njihova efikasnost u odnosu na homofermentativne bakterije. Istovremeno, osobina plesni da u toku rasta grade filamentozne strukture koje otežavaju transfer mase proizvoda i supstrata u bioreaktorima, onemogućava potpuno iskorišćenje supstrata, pa su očekivani niži prinosi, posebno u klasičnim bioreaktorskim sistemima. Savremenije tehnologije stvaranja peleta plesni debljine do jednog mm i korišćenje  $\text{CaCO}_3$  kao sredstva za neutralizaciju mlečne kiseline omogućile su povećanje prinosa mlečne kiseline u fermentacijama sa *R. oryzae* na 85 do 90 g g<sup>-1</sup> sustrata [73, 20]. Iako su prinosi koje daju *Rhizopus* spp. nešto manji od prinosa bakterija mlečne kiseline, velika prednost je njihova sposobnost da rastu u jednostavnom, neorganskom medijumu. Umesto skupih izvora azota kao što je kvašćev ekstrakt, *Rhizopus* spp. mogu koristiti amonijak ili nitrata [5]. Sa napretkom tehnologija, razvojem novih tipova reaktora i težnjom da se iskoriste nove sirovine, *Rhizopus* spp. zauzimaju sve značajnije mesto kao proizvodni mikrororganizmi, naročito na celuloznim sirovinama [25, 20]. *R. arrhizus* daje prinose od 0,94-0,97 g mlečne kiseline po gramu skroba ili glukoze, uz mogućnost da u jednom stepenu fermentiše složene

medijume: krompir, kukuruz, pšenicu i otpad iz procesa prerade ananasa [74]. Prednost plesni je i mogućnost lakog odvajanja mikroorganizma od medijuma i proizvoda zbog filamentoznog rasta, što olakšava proces separacije.

Imajući u vidu sve karakteristike BMK i plesni, mogu se uobličiti generalni zahtevi koje bi idealni proizvodni mikroorganizam trebao da zadovolji. Savremene tehnike genetičkog inženjerstva pružaju nadu da će se tehnikama transfera gena omogućiti stvaranje modifikovanih mikroorganizama koji će davati znatno veće prinose uz manja ulaganja. Zahtevi savremene industrijske proizvodnje mlečne kiseline podrazumevaju izbor mikroorganizama koji:

- brzo fermentišu jeftine izvore ugljenika sa malim sadržajem azota,
- daju selektivno visoke prinose jednog izomera mlečne kiseline i malo sporednih proizvoda,
- tolerantni su na nizak pH ( $\text{pH} < 5$ ) i visoke temperature (oko  $45^\circ \text{C}$  i više ako se vrši sušenje biomase za dobijanje probiotika),
- fakultativni su anaerobi (finansijski je značajno povoljnije za industrijske uslove ukoliko proizvodni mikroorganizam toleriše kiseonik),
- visoko su tolerantni na proizvode,
- teško su podložni virusnim infekcijama (mala osetljivost na bakteriofage),
- ne zahtevaju obogaćivanje medijuma organskim izvorima azota i faktorima rasta,
- minimalno su podložni mutacijama, uz mogućnost korišćenja biomase nakon fermentacije.

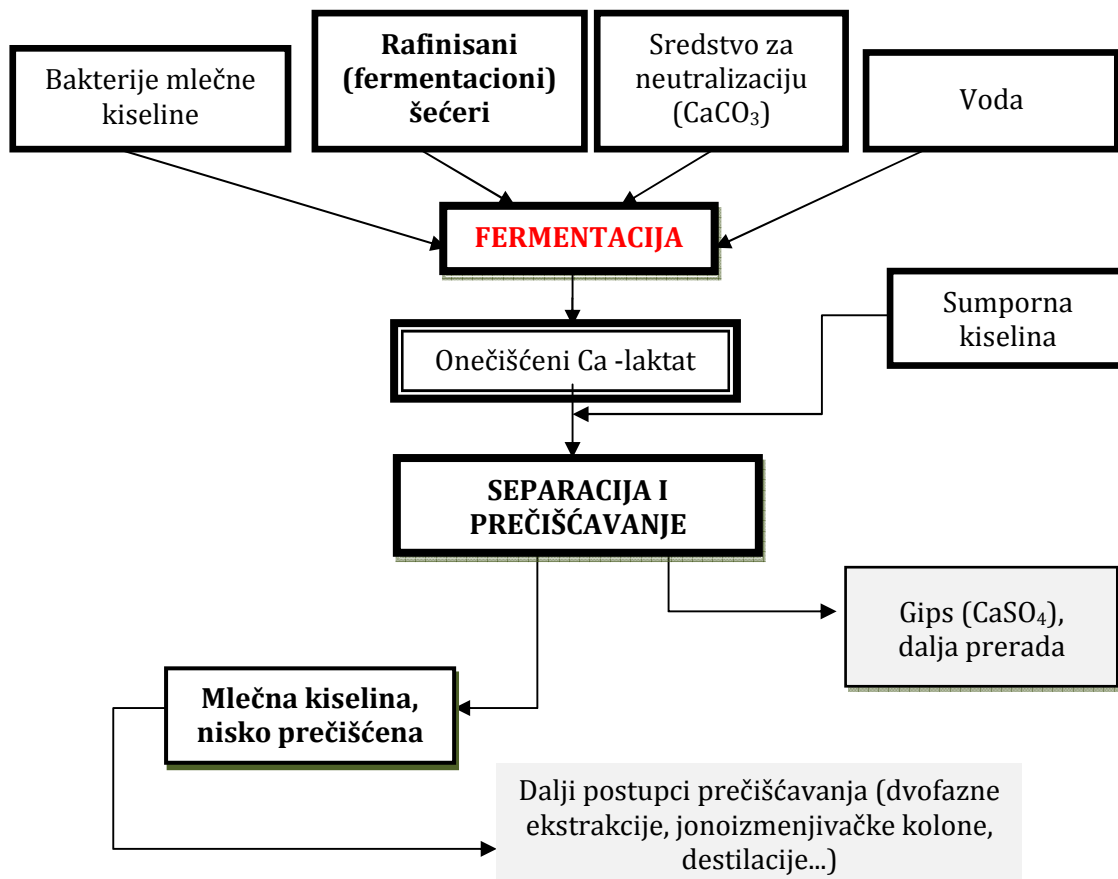
Nisu još uvek pronađeni, niti genetičkim inženjerstvom dobijeni sojevi koji bi zadovoljili sve navedene kriterijume. Upotrebom separacionih i proizvodnih membranskih kontinualnih bioreaktora moguće je smanjiti negativni inhibitorni uticaj mlečne kiseline kao proizvoda, čime raste i produktivnost. Još krajem prošlog veka korišćene su indukovane nespecifične mutacije kojima su dobijeni sojevi sa dvostruko većom produktivnošću mlečne kiseline [75]. Zbog težnje da se podstiče dobijanje ekološki što čistijih proizvoda, opravdano se može očekivati da fermentaciona proizvodnja mlečne kiseline ostane dominantan način dobijanja, pa



su genetičke modifikacije metabolizma bakterija logičan pristup. Pored indukcije nespecifičnih mutacija, ispitivani su i ciljani transferi gena radi promene određenog svojstva proizvodnog mikroorganizma. Tako je iz *Lb. sake* LTH677 unet gen za enzim katalazu u *Lb. casei*, da bi se omogućio rast u aerobnim uslovima [76]. Teži se pronalaženju postupaka za unošenje u BMK gena za enzime (celulaze, celobioze, amilaze) koji mogu da hidrolizuju složene sporedne poljoprivredne sirovine uz minimalni predtretman. Kao pogodna tehnika pokazala se elektroporacija, iako je potrebno potvrditi uspešnosti na svakom pojedinačnom mikroorganizmu [77]. Smatra se da će u budućnosti za povećanje efikasnosti fermentacionog dobijanja mlečne kiseline osnovno sredstvo predstavljati upravo genetičko inženjerstvo proizvodnih mikroorganizama, uz usavršavanje bioreaktora i tehnologija. Sa druge strane, upotreba biomase proizvodnih mikroorganizama u probiotskim preparatima ograničava primenu genetičkih modifikacija, zbog strogih zahteva za primenu u ishrani životinja i ljudi. Ipak ne bi trebalo da se smanji isplativost čitavog postupka, budući da se iskorišćenjem biomase, značajno povećava profit, jer se zaradi od dobijanja mlečne kiseline dodaje i zarada od biomase probiotika. Krajnji izbor postupka bi najverovatnije bio izvršen na osnovu detaljne ekonomske analize.

#### **2.4. Tehnološki postupci za fermentaciono dobijanje mlečne kiseline**

Za fermentaciono dobijanje mlečne kiseline mogu se koristiti prosti šećeri ili hidrolizati šećera. Klasičan i industrijski najzastupljeniji je šaržni bioreaktorski proces sa fermentacionim šećerima kao izvorom ugljenika (glukoza, laktoza, ksiloza, arabinoza, saharoza...) [5]. Na slici 2.3. data je opšta šema klasičnog postupka fermentacionog dobijanja mlečne kiseline iz rafiniranih šećera.



Slika 2.3. Opšta šema fermentacionog postupka dobijanja mlečne kiseline iz redukujućih šećera

Ovaj postupak nije dovoljno finansijski konkurentan, pa su istraživanja usmerena na razvoj tehnologija za iskorišćenje jeftinijih sirovina. Jeftinije sirovine (otpadni i sporedni proizvodi različitih industrija) detaljno su razmatrane u poglavlju 3. U slučaju korišćenja jeftinijih sirovina obično je potreban predtretman sirovina i kompletan postupak dobijanja mlečne kiseline je tada dvostepeni. Dvostepenim postupkom se iz sporednih proizvoda uglavnom poljoprivredne i drvene industrije dobijaju hidrolizati šećera koji se koriste za dobijanje mlečne kiseline u fermentaciji. Prva faza obuhvata likvefakciju i saharifikaciju i u njoj se oslobađaju fermentabilni mono- i disaharidi. Nakon završene saharifikacije zasejavaju se bakterije mlečne kiseline i izvodi se faza fermentacije.

Likvefakcija (“utečnjavanje”) je postupak kojim se polisaharidi (uglavnom celulozni i skrobni materijali) razlažu na dekstrine pri povišenim temperaturama i optimalnom pH. Likvefakcija skroba  $\alpha$ -amilazom pri pH=6, na 100°C, traje 15 min

do 2 h [78, 79]. Faza likvefakcije omogućava pristup glukoamilazama u fazi saharifikacije, koje hidrolizuju oligosaharide do fermentabilnih šećera - mono i disaharida. Saharifikacija se odvija na nižim temperaturama (55-60°C) i pri nižim pH vrednostima (oko 5), ali obično traje duže, oko 4h.

Pored enzima, mogu se koristiti i kiseline kao sredstva za hidrolizu polisaharida (uglavnom skroba iz kasave, krompira, kukuruza, pšenice i celuloze iz lignoceluloznih sirovina). U uporednoj analizi kiselina i enzima za hidrolizu na skrobnim sirovinama, pokazana je približno jednaka efikasnost. Kao jedan od nedostataka postupka kiselinske hidrolize ističe se neophodnost naknadne neutralizacije dodate kiseline, pa povećana koncentracija mineralnih soli inhibira rast mikroorganizama. U enzimskom procesu faza saharifikacije je duža i zahteva povišenu temperaturu, a samim tim i dodatnu energiju, što uz cenu enzima poskupljuje proces [80]. Za hidrolizu lignoceluloznih sirovina koriste se takođe kiseline (sumporna kiselina) i enzimi (celulaze, pektinaze) [24,81]. Vršeni su još neki pokušaji da se poveća efikasnost predtretmana sirovina. Prilikom ispitivanja fermentacije pomoću *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 na brašnu celog zrna pšenice uočena su nutritivna ograničenja rasta [11]. Zato su u fazu saharifikacije uključene i proteaze čime je povećan dostupan udeo azotnih jedinjenja osobođenih iz proteina sirovine, a samim tim i prinosi mlečne kiseline [82,11]. Pored dvostepenih, na laboratorijskom nivou se ispituju i jednostepeni postupci fermentacionog dobijanja mlečne kiseline. Postoji direktni fermentacioni postupak sa mlečno-kiselinskim plesnima, direktna fermentacija sa BMK i simultana saharifikacija i fermentacija. Šema najvažnijih do sada ispitivanih postupaka za fermentaciono dobijanje mlečne kiseline iz skrobnih sirovina data je na slici 2.3. Istražuju se i mogućnost istovremenog odvijanja sve tri faze, likvefakcije, saharifikacije i fermentacije i neki modifikovani procesi sa međufaznom filtracijom i izbistravanjem medijuma, ali su ovakvi procesi još uvek nedovoljno ekonomični [13]. Prednost jednostepenih postupaka leži u kraćem vremenu proizvodnje, smanjenju inhibicije visokim koncentracijama supstrata i smanjenju broja operacija u uslovima proizvodnje, što doprinosi ukupnom smanjenju troškova.



Slika 2.3. Šema postupaka za dobijanje mlečne kiseline iz skrobnih sirovina [13, 80, 36, 83]

Direktni postupci fermentacije podrazumevaju upotrebu mikroorganizama koji poseduju enzime potrebne za razgradnju složenih ugljenih hidrata do fermentabilnih šećera. Do sada su razvijeni direktni postupci samo na skrobnim sirovinama. Za hidrolizu skrobnih sirovina već su ispitivani sojevi *Lb. amylophilus* GV6, *Lb. fermentum* OGi E1, *Lb. casei*, *Lb. cellobiosus*, *Lb. amylovorus*. Procena količine i aktivnosti ekstracelularnih amilaza je izvršena za soj *Lb. amylovorus* GV6 [84]. Prinosi mlečne kiseline bili su manji u odnosu na druge postupke, tako je sa *Lb. amylovorus* prinos mlečne kiseline na ječmenom brašnu iznosio oko 61% [85], a na kukuruznom i pšeničnom, 10,1 g L<sup>-1</sup> i 7,8 g L<sup>-1</sup>, redom. Na skrobu kasave i krompira su postignute produktivnosti od 4,8 g L<sup>-1</sup> i 4,2 g L<sup>-1</sup>, redom [36]. Ovakvi prinosi su dobijeni bez obogaćivanja medijuma, a uz dodatak 1% peptona produktivnost na skrobu kasave je porasla za 27% [36]. Zato je moguće je da su niži prinosi rezultat nedostatka izvora azota, zbog slabe proteazne aktivnosti *Lb. amylovorus*. Soj *Lb. cellobiosus* na krompirovoj kaši je dao prinos mlečne kiseline od oko 50%, bez ikakvog predtretmana i obogaćivanja medijuma [70]. Zahvaljujući tehnikama genetičkog inženjerstva, postojeći mikroorganizmi su poboljšani tako da mogu da rastu i vrše fermentaciju sporednih proizvoda poljoprivredne i drugih industrija. Integracijom gena za  $\alpha$ -amilazu iz *Streptococcus bovis* 148 u genom *Lb. casei* uz ekspresiju AmyAF peptida značajno je povećana hidrolitička aktivnost.

Preko peptida AmyAF su imobilisane bakterije i ponovno vraćane u proces, što je takođe doprinelo povećanju produktivnosti [86]. Tehnike genetičkog inženjerstva su veoma značajne i za korišćenje lignoceluloznih sirovina. Do sada nisu izolovani mikroorganizmi koji mogu da razgrađuju direktno lignocelulozne sirovine i proizvode mlečnu kiselinu, nego se uglavnom oni modifikuju u tom pravcu. Tako je gen za  $\alpha$ -amilazu *Bacillus stercophilus* i gen za celulazu *Clostridium thermocellum* integrisan u hromozom soja *Lb. plantarum* [5]. Međutim, direktni postupci fermentacije sa genetički modifikovanim bakterijama još uvek ne daju visoke prinose mlečne kiseline, ali se dosta ispituju i očekuje se povećanje njihove efikasnosti u budućnosti.

Znatno produktivniji su jednostepeni procesi simultane saharifikacije i fermentacije (SSF). Enzimi koji vrše saharifikaciju dodaju se istovremeno sa BMK u reaktor, pa se procesi saharifikacije i fermentacije odvijaju simultano, u jednom koraku. U procesu SSF kraće je vreme dobijanja proizvoda. Vršeno je uporedno ispitivanje efikasnosti različitih tehnoloških postupaka fermentacionog dobijanja mlečne kiseline sa *Lb. rhamnosus* i SSF postupak je dao značajno veće prinose mlečne kiseline uz potpuni utrošak glukoze u odnosu na dvostepenu fermentaciju i postupak simultane likvefakcije, saharifikacije i fermentacije (SLSF) [83, 13]. Rastvori skrobnih sirovina prilikom sterilizacije daju viskozne rastvore što otežava mešanje i prenos mase, pa je očekivan niži prinos u SLSF postupcima. Kontinualno oslobađanje fermentacionih šećera iz skrobnih sirovina pomoću glukoamilaza u SSF postupku, onemogućava stvaranje prevelike koncentracije supstrata koji bi izazvao smanjenje brzine reakcije. Uslovi temperature i pH pod kojima su aktivni amilolitički enzimi moraju biti optimalni i za sam proizvodni mikroorganizam, da bi se ostvarili što veći prinosi, ali nije neophodno da proizvodni mikroorganizam ima amilolitičko delovanje. Da bi se koncipirao što povoljniji proces, izoluju se enzimi iz drugih mikroorganizama ili se koriste mešane kulture. Mešana kultura *Lb. casei* i *Lb. delbrueckii* je korišćena za fermentaciju pšeničnog brašna prethodno tretiranog proteazama. Desetostruko je smanjena potreba za obogaćivanjem medijuma izvorima azota, a ostvaren je prinos od 0.95 g mlečne kiseline po gramu utrošenog skroba za 54 h [44]. Česte su i kombinacije plesni i bakterija, pa je tako

ispitivana koimobilizacija amilolitičke plesni *Aspergillus awamori* sa vrstom BMK *Streptococcus lactis* u SSF [87].

Za dobijanje mlečne kiseline SSF postupkom iz lignoceluloznih sirovina koriste se enzimi celulaze i celobiaze. Najčešće korišćeni mikroorganizmi koji proizvode celulaze su plesni iz rodova *Trichoderma*, *Humicola*, *Penicillium*, *Aspergillus* i bakterije iz rodova *Pseudomonas* i *Cellulomonas* [88]. Tako je u kinetičkom modelu za praćenje uticaja pH u postupku SSF sa *Lactobacillus bulgaricus* na celulozi, korišćena celulaza izolovana iz plesni *Trichoderma resei* i dobijen je prinos od 50 g L<sup>-1</sup> mlečne kiseline [21]. Celuloza, otpadni papir, ostaci iz prerade drveta i druge lignocelulozne materije su široko rasprostranjene i samim tim jeftine. Danas se usavršavaju tehnologije koje će omogućiti što efikasnije iskorišćenje ovakve sirovine, a za sada je najpovoljniji SSF postupak [87].

#### **2.4.1. Primena novih tehnologija za dobijanje mlečne kiseline**

U industrijskim uslovima najzastupljeniji su šaržni i dolivni postupak fermentacionog dobijanja mlečne kiseline. Ekonomičnost i ekološka povoljnost su važan kriterijum za formulaciju nekog procesa pa je ispitivana i mogućnost kontinualnog postupka dobijanja mlečne kiseline. Za kontinualne postupke proizvodnje mlečne kiseline membranski reaktori sa šupljim vlaknima su dali najpovoljnije rezultate. Kontinualni membranski bioreaktor čini reaktorski sud sa mešanjem u kome se nalazi permeabilna membrana u obliku šupljeg vlakna (može biti i u obliku ravnih ploča, keramičkih tubusa, cevčica itd.). BMK se smeštaju u šuplje vlakno, a permeabilnost membrane omogućava dotok supstrata do ćelija i izlazak mlečne kiseline iz vlakana, čime se olakšava separacija i smanjuje inhibicija proizvodima. Ovakvi sistemi se negde u literaturi označavaju i kao imobilisani, budući da je kretanje bakterijskih ćelija ograničeno unutar vlakna [62]. U membranskom bioreaktoru sa šupljim vlaknima ostvaren je prinos od 0,9 g mlečne kiseline po g glukoze pomoću *Lb. amylovorus* na skrobu bez prethodne likvefakcije i saharifikacije skroba [90]. Povećanje prinosa u odnosu na klasične šaržne reaktore može se objasniti ostvarenom većom koncentracijom ćelija, budući da se

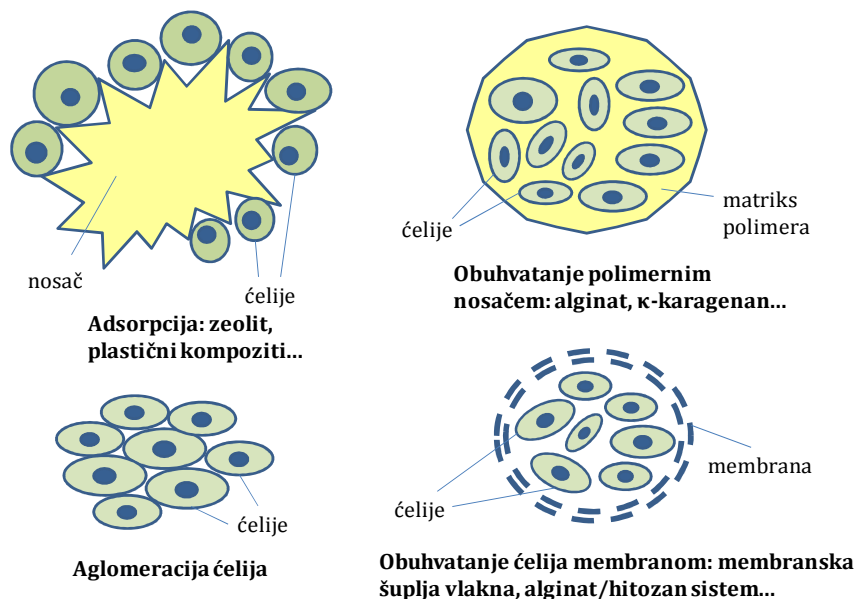
ćelije vraćaju u proces, a separacijom mlečne kiseline kroz membranu smanjuje se i inhibicija proizvodom. Usavršavanjem reaktora moguće je očekivati još veće prinose, budući da se ovom metodom postižu visoke koncentracije ćelija koje zadržavaju svoju produktivnost, pa se dobijaju zapreminski veće količine proizvoda u odnosu na klasičan šaržni postupak.

Dolivni postupak je takođe ispitivan kao moguće tehnološko rešenje za prevazilaženje problema inhibicije supstratom ili proizvodom reakcije kako u šaržnim, tako i u ponovljenim šaržnim postupcima. Dolivnim postupkom se omogućava dotok svežeg supstrata u odgovarajućim vremenskim intervalima i održavanje koncentracije supstrata u optimalnim granicama što omogućava povećanje produktivnosti procesa. Različite strategije dolivanja se koriste, ali je najčešće kao kriterijum korišćena ili optimalna koncentracija supstrata u medijumu [91, 92] ili kritična vrednost pH u procesima proizvodnje kiseline [93]. Upravo je najviša koncentracija mlečne kiseline od  $210 \text{ g L}^{-1}$  u medijumu postignuta u sistemu dolivanja svežeg supstrata nakon pada koncentracije šećera na oko  $5\text{-}10 \text{ g L}^{-1}$ . Ipak ovako visoke vrednosti mlečne kiseline nisu prijavljene u literaturi za fermentacije na otpadnim supstratima, već samo na sintetskim, hemijski definisanim podlogama sa dodatkom značajne količine izvora azota.

Još jedan od načina za povećanje efikasnosti procesa je korišćenje imobilisanih ćelija mikroorganizama.

#### **2.4.2. Imobilizacija u procesima mlečno-kiselinske fermentacije**

Imobilizacija ima za cilj da se poveća koncentracija produktivnih mikroorganizama i da se omogući lakša separacija proizvoda od imobilisanih ćelija i njihovo vraćanje u proces. Takođe, daje mogućnost uvođenja kontinualnog načina rada. U velikoj meri karakteristike imobilisanog sistema zavise od nosača koji se koristi za imobilizaciju. Odabir pogodnog nosača zavisi od njegovih fizičko-hemijskih karakteristika, a posebno toksičnosti i stabilnosti, uslova pod kojima se izvodi imobilizacija, osetljivosti biokatalizatora, njegove sposobnosti da se stabilno veže za nosač. Na slici 2.4. su predstavljeni najčešći načini imobilizacije ćelija.



Slika 2.4. Šematski prikaz različitih načina imobilizacije bakterijskih ćelija i sistema u kojima su primenjeni

Do sada su za imobilizaciju BMK uglavnom ispitivani alginatni gelovi. Nedostatke postupka imobilizacije u alginat predstavlja uočeno razmekšavanje čestica, curenje BMK iz matrica gela i spora difuzija mlečne kiseline, što je dovelo do inhibicije BMK proizvodom, pa su i prinosi bili znatno niži. Alginatni gelovi su osetljivi na prisustvo laktatnih jona koji vezuju dvovalentne katjone ( $\text{Ca}^{2+}$ ) iz trodimenzionalne strukture gela, tako da je nepovoljno koristiti alginat za imobilizaciju u sistemima sa mlečnom kiselinom. Nešto veći prinosi i efikasnija imobilizacija postignuta je sa inertnim nosačima, kao što su polietilenimid i plastični kompoziti [94]. Ipak prinosi mlečne kiseline za sada su značajno niži u sistemima sa imobilisanim ćelijama u odnosu na klasične šaržne postupke sa slobodnim ćelijama i membranske procese [4].

U ovom istraživanju je planirano iskorišćenje biomase BMK nakon fermentacije, pa imobilizacija ima značajnu prednost. Imobilizacijom bi se omogućilo lakše izdvajane ćelija koje bi se koristile kao probiotski suplement bilo u ishrani, bilo u određenim preparatima za poboljšanje zdravlja. Zbog specifičnosti primene, u ishrani ljudi i životinja, potrebno je da nosač, pored zahteva tehnologije dobijanja mlečne kiseline, zadovolji i kriterijume vezane za bezbednost i efikasnost primene za probiotike. Alginat je prihvaćen kao bezbedan za medicinsku primenu



kod ljudi, ali je u uslovima visokih koncentracija mlečne kiseline u medijumu potrebno izvršiti određene modifikacije, kao što je dodatno oblaganje hitozanom itd. [95]. Zato je za integrisanu proizvodnju mlečne kiseline i bakterijske biomase za primenu u ishrani životinja u ovoj disertaciji ispitana imobilizacija bakterija mlečne kiseline na zeolit kao mineralni nosač tehnikom adsorpcije.

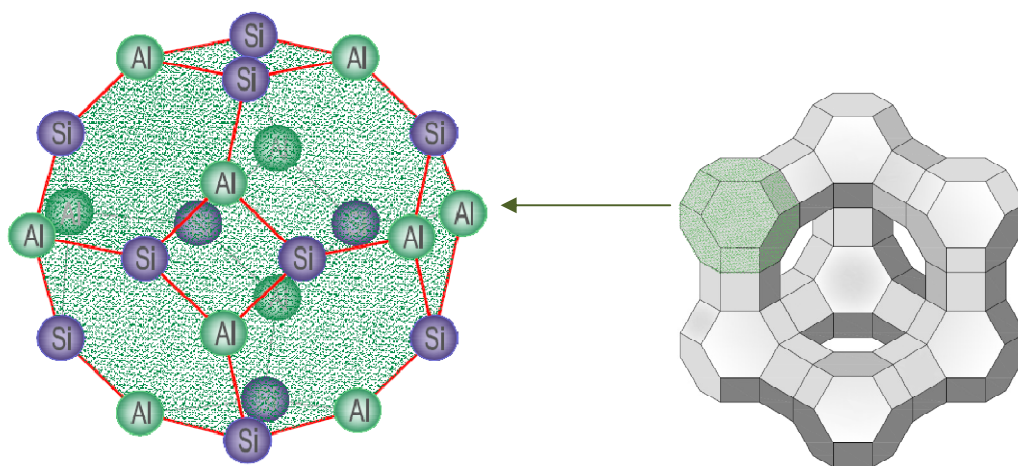
#### **2.4.2.1. Zeolit kao nosač za imobilizaciju bakterija mlečne-kiseline**

Prirodni zeolit je otkrio još davne 1756. godine, u Švedskoj, Baron Kronstedt (Cronstedt) i to u formi minerala stilbita, ali se zeoliti željenih karakteristika danas i sintetišu [96]. U prirodi je zeolit prisutan u više od 63 forme, ali su najzastupljeniji: analcim, kabazit, klinoptilolit, erionit, mordenit, filipsit i ferierit [97]. Opseg primene zeolita je širok što se može objasniti njegovom mehaničkom stabilnošću, inertnošću, poroznošću, velikom površinom i sposobnošću izmene jona i adsorpcije. Koristi se za dehidrataciju u procesima prerade nafte, u pripremi plastičnih kompozita za presovanje i izlivanje, pri izradi boja osetljivih na prisustvo vode, za uklanjanje gasova kao što su H<sub>2</sub>S, CO<sub>2</sub>, HCl, HF, teških metala (Hg) i desulfurovanje, kao i za adsorpciju radioaktivnog cezijuma u tretmanu radioaktivnog otpada [97, 98]. Za industrijsku primenu se uglavnom zeoliti sintetišu da bi imali kontrolisana svojstva u pogledu veličine pora, adsorpcione moći, izmenjivosti jona i kapaciteta adsorpcije. Zeolit se u najvećoj količini koristi u naftnoj industriji u cilju uklanjanja vode u "hidrokreking" procesu i to u formi molekulskih sita. Pregled svojstava najvažnijih tipova zeolitnih molekulskih sita je predstavljen u tabeli 2.10.

Tabela 2.10. Različiti tipovi sintetskih zeolitnih molekularnih sita proizvođača Sigma Aldrich® [99]

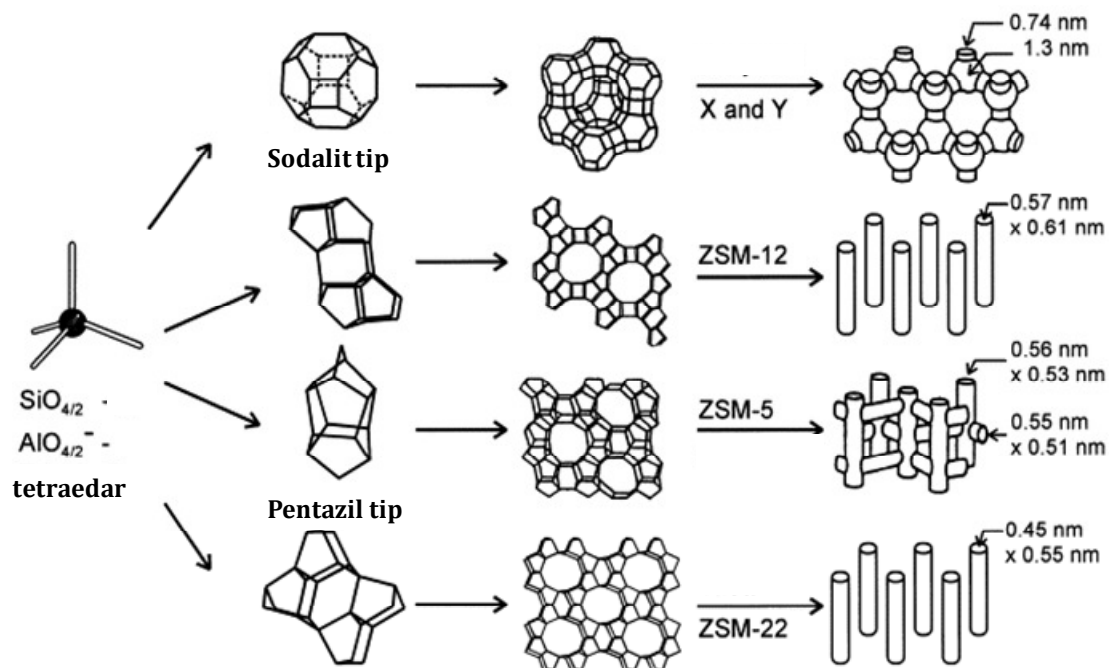
Tip zeolita	Prečnik pora (Å)	Gustina (g/cm <sup>3</sup> )	Sadržaj vlage (%)	Adsorptivni kapacitet za H <sub>2</sub> O (teorijski)	pH (5% suzpenzija)	Temperatura regeneracije (°C)
3A	3	45-46	1.5	21	10.5	175-260
4A	4	45	1.5	23	10.5	200-315
5A	5	44	1.5	21.7	10.5	200-315
13X	10	43	1.5	29.5	10.3	200-315

Zeoliti se ubrajaju u grupu aluminosilikata prema definiciji Svadlea (Swaddle). Aluminosilikati su jedinjenja kod kojih je neki od jona Si<sup>4+</sup> izmenjen jonom Al<sup>3+</sup> [100]. Struktura zeolita nastaje od tetraedara SiO<sub>4/2</sub><sup>-</sup>, odnosno AlO<sub>4/2</sub><sup>-</sup> koji se kombinuju formirajući različite rešetke zeolita čime su određena svojstva poroznosti nastalih tipova zeolita. Tako je sodalit osnovna trodimenzionalna gradivna jedinica više tipova zeolita, sastavljena od 8 šestouglova i 6 četvorouglova sa naizmenično postavljenim Si<sup>4+</sup> i Al<sup>3+</sup> u uglovima. Na slici 2.5. je prikazan A i X tip zeolita, sa izdvojenim sodalitim kavezom i rasporedom Si i Al u strukturi.



Slika 2.5. Rešetka zeolita tipa X i Y. Krupno je predstavljena osnovna gradivna jedinica - sodaliti kavez gde crvene linije u rešetki predstavljaju kiseonične mostove. Modifikovano prema [100-102].

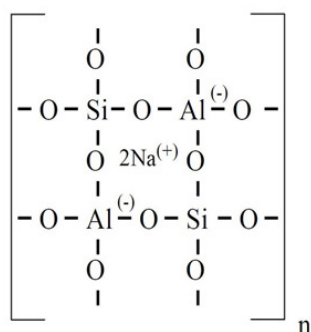
Na slici 2.6. je predstavljena struktura različitih tipova zeolita i principi formiranja zeolitnih struktura različitih poroznosti i fizičko-hemijskih karakteristika. Zbog velikog broja kombinacija povezivanja tetraedarske osnovne



Slika 2.6. Različiti tipovi zeolita i formiranje pora različitih prečnika [103]

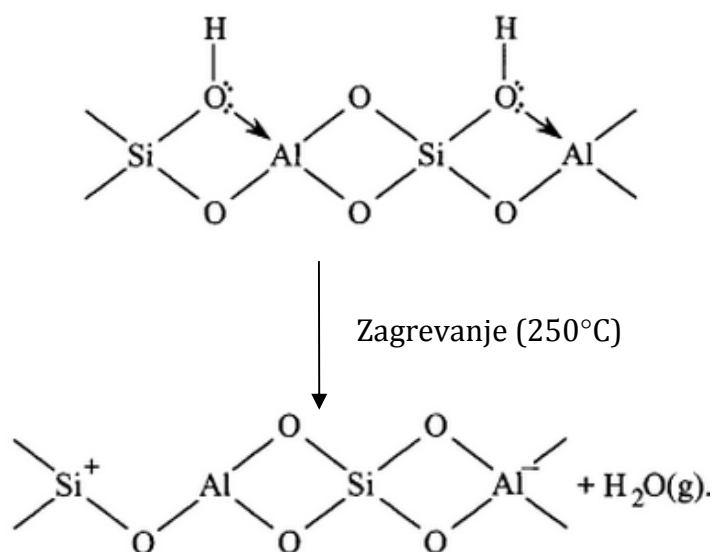
gradivne jedinice zeolita mogu se ostvariti pore i širokog opsega dijametara što je najviše iskorišćeno u proizvodnji zeolitnih molekulskih sita.

Pored sposobnosti da ekskluzivno adsorbuje molekule odgovarajuće veličine unutar svojih pora, zeolit ima i druga veoma važna svojstva. Čvrstina i inertnost zeolita potiče od jakih O-Si-O veza. Ukoliko je jon  $\text{Si}^{4+}$  zamenjen  $\text{Al}^{3+}$  jonom u osnovnoj gradivnoj tetraedarskoj jedinici zeolita menja se odnos naelektrisanja u rešetki i potrebno je da se struktura neutrališe pozitivnim jonima [100]. Upravo zbog ovog svojstva zeolit u svojoj strukturi privlači katjone  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  itd. koji su lako izmenjivi sa drugim katjonima iz rastvora, pa bi se opšta formula zeolita A mogla predstaviti:



Takođe zeolit privlači protone  $\text{H}^+$  izazivajući disocijaciju vode i dajući baznu reakciju u rastvorima.

Prilikom aktivacije visokom temperaturom iz strukture zeolita se uklanja voda čime se kidaju eventualno prisutne veze sa vodonikom i ostaje pozitivno naelektrisana rešetka koju čine koordinativno nezasićeni joni Si koji se ponašaju kao elektron akceptori odnosno Luisove kiseline [100] što je i šematski prikazano:



Takođe, zbog pozitivnog neto naelektrisanja rešetke zeolita i izmenjivih katjona metala [104] očekivano je da se ostvari interakcija i adsorpcija negativno naelektrisane površine bakterija [105] za površinu zeolita što čini zeolit pogodnim nosačem u procesima MKF.

U literaturi je dokumentovano korišćenje zeolita kao nosača fosfoakumulirajućih bakterija u tretmanu otpadnih voda [106], a takođe je

korišćen i kao nosač za anaerobne bakterije u proizvodnji metana [107]. Zbog integralnog pristupa u ovoj disertaciji da se paralelno proizvodi i mlečna kiselina i stočna hrana obogaćena biomasom BMK, važno je istaći i značaj zeolita u ishrani životinja. Zbog sposobnosti izmene jona i adsorptivne moći uz baznu strukturu, zeolit se već duže vreme primenjuje u ishrani životinja. I prirodni i sintetski zeoliti imaju važnu ulogu u prevenciji bolesti životinja i koriste se u hranivima. Uočeno je da zeoliti mogu povećati efikasnost unesenog hraniva kod tovljenika [108, 109], poboljšati prinos mleka kod krava [110, 111], a takođe je povoljno uticao i na kvalitet jaja i nosivost živine [112, 113, 114]. Zeoliti sprečavaju trovanje amonijakom i teškim metalima zbog sposobnosti izmene katjona sa uobičajenim jonima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{K}^+$  prisutnim u strukturi zeolita [115]. Takođe, ispitivana je i mogućnost zeolita da adsorbuju mikotoksine i time umanje negativne efekte na zdravlje životinja. U istraživanju Grce i Pavelić (2005) [116] je pokazano da klinoptilolit inhibira razmnožavanje herpes simpleks virusa 1, koksaki virusa B5 i eho virusa 7, što takođe predstavlja veoma povoljnu i važnu karakteristiku zeolita za primenu u ishrani životinja, ali i ljudi. Iako su predloženi različiti mehanizmi kojim zeoliti deluju pozitivno na zdravlje životinja i dalje nije tačno utvrđeno koje karakteristike zeolita najznačajnije utiču na pozitivne efekte ispoljene *in vivo*. Verovatno je to rezultat kombinovanog delovanja više svojstava zeolita.

Budući da je cilj ovog rada integrisana proizvodnja mlečne kiseline i stočne hrane sa probiotskim bakterijama, potrebno je sagledati efekte imobilizacije BMK na eventualno probiotisko delovanje BMK. U literaturi je dokumentovana sposobnost određenih vrsta zeolita bogatih  $\text{Ca}^{2+}$  da intenzivnije adsorbuju žučne kiseline [117]. Ovaj efekat bi mogao uticati na preživljavanje bakterija kroz gastrointestinalni trakt, što bi moglo poboljšati probiotsku aktivnost *in vivo*.

Sa druge strane, koncept imobilizacije probiotskih bakterija nije nov, iako je uglavnom ispitivana inkapsulacija u polimere. Poslednjih godina veliki broj istraživača ukazuje na prednosti formulisanja mikrokapsuliranih probiotika i najviše je ispitivana inkapsulacija u alginate [118,119] i  $\kappa$ -karagenan [120] kao polimere bezbedne za humanu i animalnu ishranu. Inkapsulacija značajno

povećava stabilnost u toku perioda čuvanja i povećava se preživljavanje, koje je neophodno za punu aktivnost probiotika [121, 122]. Mogućnost odabira nosača specifičnih karakteristika omogućava značajnu zaštitu tokom pasaža kroz gornje partije i ciljno oslobađanje i delovanje u donjim partijama gastrointestinalnog trakta [123]. Inkapsulacijom i mikroinkapsulacijom su bakterije kompletno obuhvaćene permeabilnom membranom odgovarajućeg polimera, dok u slučaju imobilizacije drugim tehnikama određeni broj bakterija može biti zarobljen na površini čestice ili membrane. Iako postoje ove razlike, imobilisane probiotske bakterije su značajno zaštićenije od slobodnih probiotika, pa je očekivano da imobilisane bolje preživljavaju [122].

Takođe, aktivno se ispituju i efekti primene probiotika adsorbovanih na biljni material, što je rezultovalo boljim preživljavanjem kako u toku čuvanja, tako i prilikom prolaska kroz gastrointestinalni trakt [124]. Zaključeno je da probiotske bakterije primenjene u formi biofilma na odgovarajućem nosaču pokazuju bolju otpornost na uslove spoljašnje sredine.

## **2.5. Separacione tehnike za izdvajanje mlečne kiseline nakon fermentacije**

Najskuplja faza u proizvodnji mlečne kiseline u industrijskim uslovima, je izdvajanje i prečišćavanje dobijene mlečne kiseline iz fermentacionog medijuma [8]. U zavisnosti od stepena prečišćenosti nakon izdvajanja postoji: tehnička mlečna kiselina, mlečna kiselina za prehrambenu namenu, mlečna kiselina farmaceutske čistoće i najčistija mlečna kiselina tzv. "termo stabilna" koja ne menja boju ni nakon višerasovnog grejanja na 200 °C. U zavisnosti od potrebne čistoće mlečne kiseline postoji više postupaka ekstrakcije i prečišćavanja:

- kristalizacija kalcijum-laktata (mlečna kiselina tehničke čistoće),
- filtracija, tretman ugljendioksidom, uparavanje (mlečna kiselina za primenu u ishrani),
- stvaranje laktatnih estara i njihovo frakcionisanje (mlečna kiselina farmaceutske čistoće),
- destilacija estara mlečne kiseline ("toplotno stabilna" mlečna kiselina).

U klasičnom procesu proizvodnje mlečne kiseline dobijaju se značajne količine gipsa (Slika 2.3.) koji je veoma štetan za okolinu i procenjuje se da za svaku dobijenu tonu mlečne kiseline nastane tona gipsa [2,5]. Za neutralizaciju se pored  $\text{CaCO}_3$  može koristiti i amonijak, ali je i u tako dizajniranom procesu značajan tehnološki problem izdvajanje čiste mlečne kiseline. Teži se korišćenju savremenijih postupaka koji stvaraju manje sporednih proizvoda, pa su i ekološki znatno povoljniji, kao što su tečno-tečna ekstrakcija, mikrofiltracija, ultrafiltracija, elektrodijaliza, dvostruka elektrodijaliza i dr.

Elektrodijaliza je našla značajno mesto među tehnikama za prečišćavanje mlečne kiseline. Bipolarne membrane koje se koriste za elektrodijalizu sastoje se od membranske katode i anode između kojih se provodi voda. Molekuli vode disosuju na vodonik katjon i hidroksilni anjon pod dejstvom elektrostatičkog polja u kome se nalaze i difunduju kroz membransku katodu, odnosno anodu. Upravo zbog slobodnih hidroksilnih jona koji nastaju, rad je otežan u prisustvu dvovalentnih katjona  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ . Prilikom prelaska fermentacionog medijuma bogatog dvovalentnim katjonima (oko 1000 ppm) preko membrana formiraju se nerastvorni hidroksidi dvovalentnih metala. Neophodno je uvesti prethodne postupke kojima će se količina dvovalentnih katjona smanjiti ispod 1ppm da bi proces izdvajanja mlečne kiseline tekao uspešno. Dvostepeni postupak elektrodijalize je efikasan i ekonomski povoljan postupak. U prvom stepenu se uklanjaju dvovalentni katjoni i anjoni i koncentrišu prečišćene amonijačne soli mlečne kiseline. U drugom stepenu se vrši izdvajanje čiste mlečne kiseline pomoću bipolarnih membrana [2].

Metode ekstrakcije takođe se razmatraju kao moguće rešenje za separaciju i prečišćavanje mlečne kiseline. Ispitivana je mogućnost korišćenja tercijarnog amina i  $\text{CO}_2$  pod pritiskom za ekstrakciju. U fermentacionom medijumu sa Na-laktatom nastaje laktat amina i natrijum hidrogenkarbonat. Dobijeni laktat amina se ekstrahuje pomoću vrele vode i visokog pritiska (oko 800 kPa), a natrijum hidrogenkarbonat se zagreva do nastanka Na-karbonata, dok se oslobođeni  $\text{CO}_2$  vraća u proces. Ovaj postupak ekstrakcije je u industrijskim razmerama prvi put

primenjen u fabrici Cragill Dow koja je jedan od najvećih svetskih proizvođača mlečne kiseline [2, 5].

Metode prečišćavanja su diktirane namenom dobijene mlečne kiseline. Velike količine mlečne kiseline se danas koriste za dobijanje polimera. Prekursori za dobijanje polimera su estri mlečne kiseline i često se već u postupku prečišćavanja amonijum laktat prevodi u etil laktat, a onda se serijom separacionih membrana propusnih za vodu i amonijum jone, a nepropusnih za etanol i estre vrši odvajanje. Dobijeni amonijačni rastvor se može recirkulisati kao sredstvo za neutralizaciju u fermentaciji, a etil laktat se dalje prečišćava destilacijom i evaporacijom i nastaje visoko prečišćena mlečna kiselina [5].

## **2.6. Probiotici**

Mikroorganizmi su uključeni u ishranu ljudi i životinja kroz sve fermentisane proizvode. Dve hiljade godina pre naše ere korišćeni su fermentisani mlečni proizvodi u ishrani, jer je uočeno da se procesom fermentacije produžava trajnost hrane. Ruski mikrobiolog i nobelovac Mečnikov (Metchnikoff) je prvi istakao vezu između primene fermentisanih mlečnih proizvoda i poboljšanja zdravlja ljudi još 1907. godine. Uočio je da bugarski zemljoradnici koji koriste veće količine fermentisanog mleka u svojoj ishrani u odnosu na opštu populaciju prosečno žive značajno duže od prosečne starosti na početku dvadesetog veka, čak 87 godina [125]. Početkom dvadesetog veka, kada je postavljena teorija Mečnikova, još uvek se nisu koristili u terapiji antibiotici i primena bakterija za poboljšanje zdravlja predstavljala je revolucionarno nov koncept. Prvo su fermentativne bakterije upotrebljavane u mlečnim proizvodima za ishranu, a tek kasnije su uvedene kao sredstva za prevenciju i tretman bolesti. Značajnija istraživanja na polju korišćenja bakterija u prevenciji bolesti pokreću se sedamdesetih godina dvadesetog veka, kao odgovor na probleme prouzrokovane ekspanzijom primene antibiotika tokom pedesetih i šezdesetih godina. U kliničkoj praksi je uočeno da se javljaju dijareje i poremećaji varenja uzrokovani



preteranom ili neadekvatnom primenom antibiotika. Primenom probiotskih bakterija, odnosno fermentisanih mlečnih proizvoda, simptomi su se ublažavali ili nestajali.

Termin probiotik, u današnjem značenju prvi put je upotrebio Vergin 1954. godine [126], kao bakterijski dodatak ishrani uspešan u lečenju pacijenata čija je mikroflora narušena upotrebom antibiotika. Kao odgovor na brojne primene probiotika i njihova pozitivna terapijska delovanja Svetska zdravstvena organizacija (SZO) ih je definisala kao „žive mikroorganizme koji kada se koriste u adekvatnim količinama deluju pozitivno na zdravstveno stanje organizma domaćina“ [127]. Istraživanja pojedinih autora su pokazala i da neživi mikroorganizmi pojedinih sojeva ispoljavaju pozitivno delovanje na domaćina, pa se nekada i takvi preparati koriste i nazivaju probioticima, iako su to u stvari funkcionalni proizvodi [128]. Pozitivno delovanje neživih probiotika je vezano za pojačavanje imunskog odgovora i manju sklonost ka obolenjima povezanim sa poremećajima imunskog sistema. Modulacija imunskog odgovora pod dejstvom neživih probiotika (ćelijskih ekstrakata ili frakcija) nastaje zbog interakcije antigena iz ovih ekstrakata sa imunskim sistemom domaćina. Probiotici se primenjuju u hrani, u preparatima za tretman obolenja gastrointestinalnog trakta ili samo za poboljšanje varenja, u preparatima za tretman vaginalne sluzokože, a postoje i istraživanja vezana za korišćenje probiotskih bakterija na kožu.

Probiotici pokazuju brojne pozitivne efekte na zdravlje ljudi i životinja. Postoji veliki broj studija koje su pokazale blagotvorno delovanje na nivo holesterola u krvi, zapaljensku bolest creva, alergije, gastrične infekcije *Helicobacter pylori*, smanjenje pojave vaginalnih i urinarnih infekcija primenom na sluznicu, antikancerogeno i antimutageno delovanje, posredni uticaj na motilitet creva i čak psihičko stanje ljudi [129-132]. Klinički je potvrđeno delovanje probiotika u oblasti regulisanja putnih dijareja izazvanih prvenstveno rotavirusima i tretman poremećaja prirodne mikroflora gastrointestinalnog trakta usled dugotrajnog korišćenja antibiotika širokog spektra. Procenjuje se da je mikrobiom, odnosno kompletna populacija mikroorganizama koja živi u

organizmu čoveka najveći organ računajući masu. Bakterije su prisutne u gastrointestinalnom traktu (GIT), na koži, na sluznicama i čine simbiozu sa čovekom. Zbog složenosti i raznolikosti vrsta unutar mikrobioma, veoma je teško vršiti ispitivanja vezana za uticaj pojedinačnih vrsta. Poznato je da su *Lactobacillus* sp. prisutne u gastrointestinalnom traktu i vaginalnoj sluznici žena, pored mnogo drugih rodova i vrsta. Kod dojenih beba *Lactobacillus* sp. kolonizuju gastrointestinalni trakt novorođenčeta u toku prve nedelje po rođenju [133]. Zato je nemoguće ispitati kako bi se razvijao intestinalni trakt i mukozni imunitet bez prisustva bakterija. Najčešće se u ispitivanjima upoređuju grupe zdravih pojedinaca sa grupom u kojoj je prisutan određeni poremećaj. Ipak, veliki problem je nemogućnost da se upoređuju rezultati različitih studija. Ne postoji jedinstven model za ispitivanje delovanja probiotika ni u jednoj od dijagnostičkih oblasti. Dodatno, složeni uslovi koji postoje u gastrointestinalnom traktu onemogućavaju postavljanje adekvatnog *in vitro* modela koji bi na zadovoljavajući način imitirao *in vivo* uslove za probiotike koji ispoljavaju delovanje u GIT-u. Takođe, u uslovima izmenjene fiziologije digestivnog trakta pacijenata koji već pate od pojedinih bolesti izvođenje zaključka bez velikog uzorka je nepouzđano. Cilj je da se u budućnosti postavi veći broj multicentričnih randomiziranih dvostruko slepih studija sa velikim uzorkom, prema preporukama SZO, čime bi se omogućio pouzdaniji zaključak.

Mehanizmi kojima pozitivno deluju probiotici još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni. Veliki broj korisnih efekata za domaćina se ostvaruje kroz simbiozu. Probiotici luče antimikrobna jedinjenja kojima sprečavaju rast drugih mikroorganizama u svom staništu. U svetlu istraživanja vezanih za BMK najznačajnije antimikrobne supstance su bakteriocni (proteinske supstance), mlečna kiselina i vodonik peroksid, ali pojedini mikroorganizmi luče i druge organske kiseline i ugljen dioksid. Proizvodnjom mlečne i drugih organskih kiselina BMK snižavaju pH u gastrointestinalnom traktu i otežavaju preživljavanje drugih mikroorganizama, a same su acidotolerantne. Probiotske bakterije koriste hranu i time ograničavaju izvore energije drugim mikroorganizmima.

Takođe, najveći broj vrsta koje deluju pozitivno imaju sposobnost adhezije na zidove creva, čim se smanjuje raspoloživa površina za druge mikroorganizme i formira se zaštitna barijera na površini epitela. Nije moguće pouzdano potvrditi ni jedan od pomenutih mehanizama, ali je jasno da probiotici mogu da kompetitivno suzbijaju druge mikroorganizme [134]. Probiotici deluju i na permeabilnost zidova creva utičući na tesne veze između ćelija trepljastog epitela, čime se objašnjava pozitivan efekat u tretmanu zapaljenske bolesti creva gde je narušena barijerna funkcija epitela [135].

Mikroorganizmi prisutni u crevima proizvode vitamin K, fermentišu nedigestibilnu hranu, proizvode kratkolančane masne kiseline i neophodne su za maturaciju imuniteta. Ispitivan je i antimutageni i antikancerogeni efekat probiotika, iako nije utvrđen mehanizam dejstva, postoje posredni dokazi o pozitivnom delovanju fermentisanih proizvoda kod pacijenata sa kolorektalnim kancerom [136].

Poslednjih godina su uočena nova delovanja probiotika, kao što je smanjenje nivoa holesterola u krvi i antihipertenzivno delovanje fermentisanih proizvoda sa probioticima. Ovakvi efekti su posredni i rezultat su metaboličke aktivnosti pojedinih BMK. Neke vrste roda *Lactobacillus* proizvode ekstracelularne hidrolaze kojima razlažu žučne soli, omogućavajući preživljavanje kroz želudac i tanko crevo. Razgradnjom žučnih soli, one u organizmu domaćina smanjuju resorpciju masti iz digestivnog trakta, pa se povećava uklanjanje masnoća iz krvi. Predlažu se i drugi mehanizmi obaranja holesterola, ali su potrebna detaljnija ispitivanja.

U fermentisanim mlečnim proizvodima BMK mogu da razlažu kazeine mleka do tzv. kazomorfina koji se vezuju za morfinske receptore i utiču na motilitet, a za njihovo delovanje se vezuju i pozitivni efekti probiotika na psihičko stanje pacijenata, mada je potreban veliki broj kontrolisanih studija koje bi potvrdile psihotropno delovanje. Takođe, razgradnjom kazeina kozjeg mleka nastaju proteini manje molekulske mase koji deluju inhibitorno na angiotenzin konvertujući enzim (ACE). Ovaj enzim je odgovoran za povišene nivoe renina u

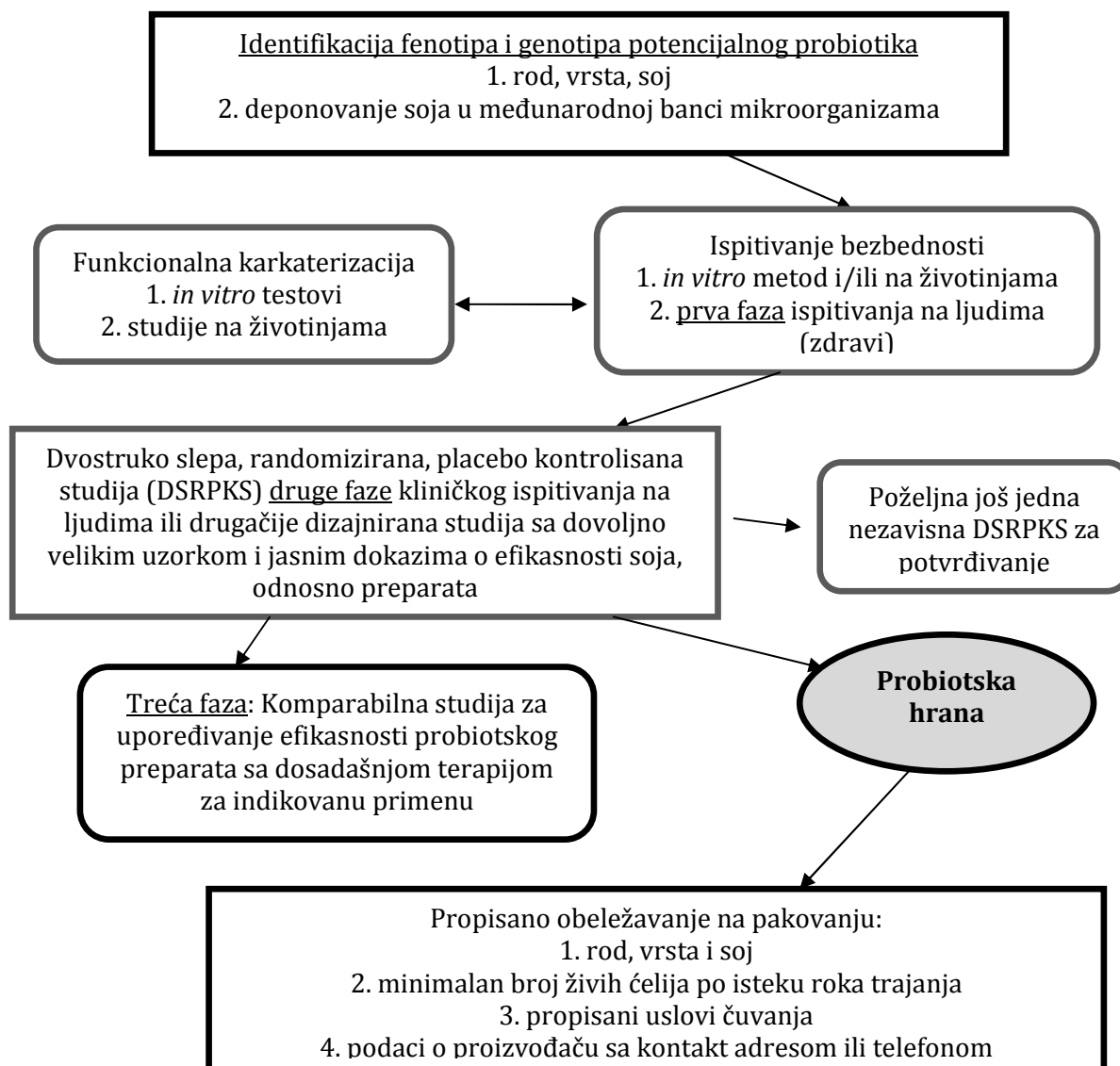
krvi i njegova aktivacija dovodi do povećanja krvnog pritiska. Frakcionisani kazeinski molekuli inhibiraju ACE i dovode do smanjenja krvnog pritiska, pa ovim posrednim mehanizmom probiotici deluju antihipertenzivno.

Najveći broj savremenih istraživanja blagotvornog delovanja probiotika vezan je za njihovo modulatorno delovanje na imunski sistem domaćina. Još od postavljanja higijenske hipoteze, koja ukazuje na neophodnost kontakta sa antigenima bakterija i parazita, raste interesovanje za ulogu i značaj ogromne količine mikroorganizama koje nosimo u sebi [137]. Veća stopa alergijskih oboljenja u razvijenijim zemljama ne može se opravdati samo zagađenjem, već se smatra da je rezultat smanjenog kontakta sa parazitima, bakterijama i drugim izvorima antigena sposobnim da provociraju naš imunski sistem i omoguće razvoj kompletnog imunskog odgovora. Povoljno delovanje probiotika na imunitet se objašnjava razvojem tolerancije domaćina na prisustvo antigena probiotika. Nastaje dovoljno sposobnih ćelija imunskog sistema koje će u buduće moći da brzo i kompletno eliminišu izvor infekcije. Probiotici se najviše ispituju za primenu u tretmanu inflamatorne bolesti creva (Kronova bolest i ulcerozni kolitis) iako je patofiziologija ovih obolenja nedovoljno poznata, pa još uvek nema ni adekvatnog tretmana.

Efekti koje probiotici izazivaju složeni su i još uvek je u velikoj meri nepoznat citokinski profil kojim odgovara imunski sistem. Najčešće se probiotici analiziraju kao imunomodulatori koji izazivaju lučenje antiinflamatornih citokina kakav je IL10. On aktivira regulatorne T limfocite i modeluje odgovor dendritičnih ćelija. Pojedini sojevi indukuju proinflamatorne citokine odgovorne za pojačanje imunskog odgovora, kao što je TNF $\alpha$  koji se naziva i modulatornim citokinom, jer u zavisnosti od koncentracije drugih citokina može menjati pravac imunskog odgovora [128]. Takođe, probiotske bakterije mogu da izazovu sintezu i oslobađanje IL12 koji je odgovoran za razvoj Th 1 imunskog odgovora i sazrevanje citotoksičnih limfocita koji su normalno uključeni u odbranu od bakterija. Povećana sposobnost organizma za odbranu u pravcu Th1 odgovora, smanjuje aktivnost Th2 limfocita odgovornih za razvoj i posredno za simptome alergijske

reakcije. Veliki broj istraživanja ukazuje na značaj ravnoteže između odgovora Th1 i Th2 limfocita za razvoj adekvatnog imunskog odgovora. Pojedine vrste, kao što je *Lb. rhamnosus* smanjuju proizvodnju proinflamatornih citokina (TNF- $\alpha$ ) i interleukina (IL-12 i IL-6), pa ublažavaju simptome inflamacije. Probiotici se zbog svog mehanizma delovanja na imunitet najčešće i nazivaju imunomodulatorima [137, 138].

Veliki broj rodova bakterija i manji broj vrsta kvasaca se danas koristi u probiotskim preparatima, a najčešće BMK. Vrste rodova *Lactobacillus* sp. i *Bifidobacterium* spp. su najzastupljenije u komercijalnim preparatima, naročito kao dodaci ishrani [139], a od kvasaca se dosta koristi *Saccharomyces boulardii*. Dosadašnja istraživanja su uglavnom pokazala da su efekti vezani za pojedinačne sojeve i da nije moguće rezultate proširivati na vrstu. Izuzetak su vrste *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* i *S. thermophilus*, kod kojih svi sojevi povećavaju apsorpciju laktoze kod osoba sa intolerancijom na laktozu [127]. Odabir mikroorganizma i njegovih željenih karakteristika zavisi od buduće primene, kod životinja ili kod ljudi. Za humanu primenu zahteve za probiotske mikroorganizme propisuje Svetska Zdravstvena Organizacija (SZO). Odnose se na bezbednost, dokazanu efikasnost, definisanost sastava i odgovarajuće obeležavanje gotovog proizvoda kako bi se izbegle greške i zloupotrebe. Pregled smernica SZO za odabir i primenu sojeva mikroorganizama kao probiotika dat je na slici 2.7.



Slika 2.7. Smernice SZO za odabir i primenu probiotskih sojeva mikroorganizama [127]

Probiotski soj mora zadovoljiti tehnološke, funkcionalne i terapeuske kriterijume uz dokazanu neškodljivost i ekonomsku isplativost. Pregled najvažnijih zahteva za probiotske bakterije dat je u tabeli 2.11.

Da bi se određeni probiotik očuvao u dužem roku trajanja, najčešće se vrši liofilizacija. Nedostaci smrzavanja i liofilizacije su znatno veći troškovi transporta i rukovanja, a često dolazi i do značajnog smanjenja vijabilnosti u toku procesa odmrzavanja i kristali unutar ćelije deluju štetno [140].

Tabela 2.11. Zahtevi za komercijalne probiotike [132]

1. Neškodljivost	Poznato poreklo, patogenost i infektivnost
	Nevirulentnost
	Odsustvo rezistencije na antibiotike
	Netoksičnost
2. Tehnološka svojstva	Genetička stabilnost
	Dobro preživljavanje u toku procesa proizvodnje i čuvanja
	Pogodnost za rukovanje
	Rezistentnost na bakteriofage
	Pogodnost za proizvodnju u industrijskim razmerama
3. Funkcionalna svojstva	Otpornost na niski pH i enzime za varenje
	Tolerancija na žučne soli
	Sposobnost adhezije za zidove creva
	Sposobnost sinteze egzopolisaharida
4. Terapijska efikasnost	Imunomodulatorno delovanje
	Antagonističko delovanje prema patogenima prisutnim u digestivnom traktu
	Uticaj na metabolizam holesterola
	Ublažavanje intolerancije na laktozu
	Antimutageno i antikancerogeno

Zbog poskupljenja troškova prevoza i opšte težnje ka uštedi energije, uvode se nove tehnologije, kao što je sprej-sušenje. Tehnikom sprej sušenja bakterije se izlažu u kraćem vremenskom periodu povišenoj temperaturi od oko 80°C, a sa sojem *Lb. rhamnosus* GG na ovaj način je ostvareno preživljavanje oko 60% [141]. U toku sušenja sprej tehnikom najčešće dolazi do oštećenja ćelijske membrane usled čega ćelija umire, a nastala oštećenja su direktno proporcionalna primenjenoj temperaturi. Povoljniji ishodi se dobijaju ukoliko se sprej sušenje koristi uz primenu odgovarajućih polimera pogodnih za inkapsulaciju. Oko bakterije se formira tanka, permeabilna membrana koja veštački štiti ćeliju od dehidratacije. *Lactobacillus* sp. luče egzopolisaharide kojima se prirodno štite od spoljašnjih uslova, ali je ta membrana diskontinualna. Tehnikom sprej sušenja postiže se adekvatan odnos zaštite i potrebnog prenosa mase kroz membranu [123].

## 2.7. Stočna hrana

Stočna hrana i njen kvalitet su veoma značajni za pravilan rast i uzgoj stoke što se odražava značajno i na kvalitet proizvoda koji se koriste za ishranu ljudi. Upravo zbog potrebe da se kvalitet stočne hrane očuva i održi, pored tradicionalne upotrebe žitarica, kasnije su uvedeni i posebni oblici stočne hrane koji imaju pojačane karakteristike ili su prilagođeni za primenu u pojedinim fazama ili tipovima odgoja životinja. Tako se npr. razlikuje stočna hrana za primenu u početnim fazama odgoja živine, pre početka perioda nosivosti jaja i po pronošavanju, ali isto tako postoje različite formule stočne hrane za živinu pripremanu za produkciju jaja i tov u cilju korišćenja mesa. Upravo zbog ovoga postoji potreba da se uspostave jasne veze o značaju pojedinih komponenata stočne hrane na prinos mleka, jaja, mišićnog tkiva ili masnog tkiva i da se u skladu sa tim izvrši optimizacija stočne hrane. Istovremeno, u skladu sa fiziološkim i anatomskim karakteristikama životinja (preživari, monogastrične životinje...) potrebno je kreirati odgovarajuće preparate i formule.

Da bi sastav stočne hrane bio što bolje izbalansiran, počelo se sa pripremom smeša koje su se prvobitno sastojale iz dve, ili svega nekoliko, sirovina, ali se danas na tržištu prema važećem Pravilniku o kvalitetu hrane za životinje mogu naći hraniva, premiksi i smeše, a takođe se mogu naknadno u hranu dodavati dodaci [142]. U smislu ovog pravilnika hrana za životinje se definiše kao svaka supstanca ili proizvod, prerađena, delimično prerađena ili neprerađena, a namenjena za ishranu životinja koje služe za proizvodnju hrane.

Premiksi predstavljaju proizvode koji se dobijaju kombinacijom jednog ili više mikroingredijenata (vitamina, minerala i drugih dozvoljenih dodataka) s nosačem, a koriste se za proizvodnju potpunih i dopunskih smeša. Nosač ne sme da bude higroskopan, da sadrži supstance koje će izazvati hemijsku nestabilnost i ometati dejstvo mikroingredijenata.

Potpune ili kompletne smeše su proizvodi koji sadrže sve potrebne hranljive sastojke. Njima je potrebno pre upotrebe dodati samo vodu. Pripremaju



se u fabrikama stočne hrane, koje imaju uređaje koji omogućavaju tačno odmeravanje komponenata, njihovo usitnjavanje i optimalnu izmešanost.

Dopunske smeše su proizvodi koji se sastoje od mineralnih materija, vitamina i hrane bogate proteinima. Pre upotrebe mešaju se sa osnovnom hranom (žitaricama).

Prema nameni potpune i dopunske smeše su podeljene na:

- smeše za ishranu svinja;
- smeše za ishranu goveda;
- smeše za ishranu živine;
- smeše za ishranu ovaca.

Smeše, koje se stavljaju u promet, mora da ispunjavaju odgovarajuće standarde i uslove kvaliteta:

- da im boja odgovara boji upotrebljene hrane, hranljivih dodataka i aditiva;
- da imaju miris i ukus svojstven mirisu i ukusu upotrebljene hrane, hranljivih i ostalih dozvoljenih dodataka;
- da ne sadrže više od 1% stranih primesa (pesak, prašina i dr.), dok predsmeše uopšte ne smeju da sadrže strane primese;
- da ispunjavaju uslov u pogledu izmešanosti, homogenosti

Sa aspekta korišćenja fermentisane džibre nakon MKF u ishrani stoke, što je jedan od ciljeva ove doktorske disertacije važno je napomenuti šta je dozvoljeno za primenu u stočnoj ishrani prema važećim pravnim aktima u Srbiji. Kao hraniva su dozvoljena [142]:

- 1) zrnasta hraniva;
- 2) mlinski proizvodi od žita;
- 3) proizvodi industrije skroba;
- 4) proizvodi industrije alkohola i vrenja;
- 5) proizvodi industrije šećera i sporedni proizvodi industrije šećera i proizvodnje askorbinske kiseline;

- 6) proizvodi industrije ulja;
- 7) sušeni biljni proizvodi;
- 8) ostali biljni proizvodi;
- 9) hraniva životinjskog porekla;
- 10) hraniva sa dodatkom neproteinskih azotnih jedinjenja;
- 11) mineralna hraniva.

Džibra zaostala nakon proizvodnje bioetanola je u svetu široko u upotrebi kao stočna hrana ili u tečnoj formi (WDG- wet distillers grains) ili osušena (DDG- dried distillers grain i DDGS- dried distillers grains with solubles) [143-146], ali je u važećem Pravilniku o kvalitetu hrane za životinje Republike Srbije definisana izdvojeno samo melasna džibra (vinasa) kao podvrsta proizvoda industrije alkohola i vrenja namenjena za ishranu životinja [142].

Ukoliko se pogledaju kriterijumi za kvalitet stočne hrane u literaturi, kao najvažniji se izdvajaju i u domaćim i u stranim izvorima sadržaj proteina, masti i vlakana, što u najvišem stepenu određuje energetska vrednost hrane i svarljivost takođe [142, 147, 148].

Stočna hrana u prvom redu predstavlja izvor energije za rast i razvoj životinja. Ukoliko se osnovnim energetskim komponentama stočne hrane ne obezbedi dovoljno energije (a to su ugljeni hidrati i masti), deo proteina će se trošiti na energetske potrebe, što je osnovna odlika loše izbalansirane stočne hrane [149]. Takođe ovakva ishrana je skupa i neproduktivna. Izvori ugljenih hidrata u stočnoj hrani za monogastrične životinje mogu se podeliti na proste šećere (glukoza, fruktoza, galaktoza...), disaharide (saharoza, maltoza...) i polisaharide (celuloza, hemiceluloza, skrob itd.). Kod preživara je zbog sposobnosti da delimično razgrađuju lignocelulozne sirovine izvršena drugačija podela ugljenih hidrata na: nevlaknaste, odnosno bezazotni ekstrakt (NFE-nitrogen free extract) i vlaknaste ugljene hidrate, odnosno sirova vlakna (CWC - cell wall carbohydrates ili CF- crude fibres) [149]. Vrednost nevlaknastih ugljenih hidrata određuje ukupni unos određene stočne hrane, dok sadržaj sirovih vlakana utiče značajno na digestibilnost.

U nevlaknaste ugljene hidrate se ubrajaju monosaharidi, disaharidi i škrob, dok vlaknasti ugljeni hidrati obuhvataju manje rastvorna jedinjenja poput celuloze, hemiceluloze, pektina i lignina, iako lignin nije ugljenohidratna komponenta, ali pošto uvek prati prethodno nabrojane slabo rastvorne i svarljive šećere uključuje se u ovu grupu vlaknastih ugljenih hidrata. Ne postoji način da se sadržaj nevlaknastih ugljenih hidrata eksperimentalno odredi već se oni izračunavaju prema odgovarajućim formulama [147]. Nevlaknasti ugljeni hidrati predstavljaju najvažniji izvor energije naročito kod tovne stoke predviđene za klanje.

Vlaknasti ugljeni hidrati odnosno sirova vlakna nisu značajan izvor energije u ishrani stoke ali bitno utiču na svarljivost hrane i njihov udeo u ishrani takođe mora biti izbalansiran. Sirova vlakna predstavljaju nerastvornu, nemineralnu frakciju stočne hrane koja nije rastvorna ni u slabim kiselinama ni u slabim bazama. Danas je najšire prihvaćena Van Soest-ova (1970) metoda za analizu sirovih vlakana koja u toku pripreme uzorka simulira uslove gastrointestinalnog trakta, a potom se uz upotrebu kiselih i neutralnih deterdženata određuju posebne frakcije i tipovi vlakana prisutnih u uzorku, uz naknadno uvedene modifikacije [150,151]. Nakon izlaganja slaboj kiselini (1,25% sumporna kiselina, 30 min) i slaboj bazi (1,25% natrijum hidroksid, 30 min) iz uzorka se rastvaraju proteini, škrob, rastvorni ugljeni hidrati, a zaostaje nerastvorna celuloza, lignin, drugi složeni šećeri i minerali [149]. Dalje se u nerastvornom zaostatku određuju različite frakcije: deterdžent neutralna vlakna (NDF-neutral detergent fibers), zaostatak nakon kuvanja u neutralnom deterdžentu), deterdžent kisela vlakna (ADF-acid detergent fibres), zaostatak nakon kuvanja u kiselom deterdžentu) i deterdžent kiseli lignin (ADL- acid detergent lignin), zaostatak lignina nakon kuvanja u kiselom deterdžentu) [150,151]. Svi ovi parametri se koriste dalje u analizi kvaliteta stočne hrane i izračunavanju specifičnih parametara. Tako se na osnovu vrednosti deterdžent neutralnih vlakana (NDF) određuje i limitira unos u ishrani preživara.

Masti predstavljaju energetska rezervu organizma i u stočnoj hrani u masti spadaju masnoće, ali i druga u mastima i organskim rastvaračima rastvorljiva

jedinjenja kao što su voskovi, masne kiseline, lecitin, vitamini itd. [149]. Upravo zbog ovog je veoma važna zastupljenost masti u dijeti, jer su u mastima rastvoreni liposolubilni vitamin A, D, E i K koji su veoma značajni za pravilan razvoj stoke, pored evidentne energetske vrednosti masnoća (2,25 veći energetski sadržaj u odnosu na ugljene hidrate). Ukupno masti bi trebale da budu zastupljene u opsegu od 3-5% ukupnog unosa suve materije hraniva [149], iako sadržaj varira u različitim tipovima stočne hrane.

Zbog gradivne uloge proteini se smatraju osnovom dijete životinja. Aminokiseline su neophodne u sintezi hormona i enzima i zato je sadržaj proteina u ishrani životinja veoma značajan. Asimilacija proteina se razlikuje kod monogastričnih životinja i preživara. U buragu se pod dejstvom mikroorganizama značajan deo proteina razlaže na aminokiseline i peptide koji delimično prelaze u početne delove creva gde se resorbuju ili se pod uticajem mikroflore vrši deaminacija do amonijaka [149]. Značaj flore digestivnog trakta životinja je veliki jer omogućavaju razgradnju proteina i iskorišćenje azota sa jedne strane, ali i proizvodnju vitamina K i esencijalnih aminokiselina proizvedenih od strane mikrobne flore. 80-90% ukupno unetih proteina (uključujući i aminokiseline i peptide koje sintetiše crevna mikroflora) se apsorbuje, iako na svarljivost i apsorpciju može da utiče negativno agresivna prerada stočne hrane (previsoke temperature itd.) [149, 152].

### **2.7.1. Fermentisana stočna hrana**

Primena fermentacije i to upravo mlečno-kiselinske fermentacije u cilju povećanja kvaliteta i trajnosti stočne hrane je ispitivana još tokom devedesetih godina prošlog veka. Jensen i Mikkelsen (1998) su primetili da se unosom fermentisane stočne hrane smanjuje broj enteropatogenih vrsta u gastrointestinalnom traktu životinja uz porast prinosa životinja [153]. Takođe, u toku fermentacije zbog smanjenja pH vrednosti u medijumu otežana je kontaminacija čime se produžava trajanje hrane. Koncept konzervisanja fermentacijom je star nekoliko hiljada godina, ali je na polju primene u ishrani

stoke intenzivnije istraživani u toku poslednjih desetak godina [154]. Fermentisana tečna stočna hrana pronalazi sve značajnije mesto na tržištu iz više razloga. Uvođenje regulativa koje zabranjuju primenu antibiotika u ishrani stoke i varijacije u ceni stočne hrane stimulatивно deluju na iznalaženje novih izvora nutrijenata prihvatljive cene i kvaliteta za ishranu životinja. Sa druge strane intenzivna proizvodnja biogoriva, u prvom redu bioetanol na škrobnim i drugim sirovinama, rezultuje značajnom količinom džibre kao jeftinog otpadnog proizvoda pogodnog za primenu u ishrani životinja bez ikakvog tretmana [146]. Ipak zbog značajnog sadržaja vlage i velike količine organskih komponenata, džibra je podložna kontaminaciji. Sušenje džibre je energetski skup proces koji se u Evropi ne primenjuje, tako da bi delimično konzerviranje džibre uz obogaćivanje BMK i eventualno poboljšanje kvaliteta usled MKF bilo nova strategija koja bi doprinela održivosti i efikasnosti čitavog procesa proizvodnje etanola. Takođe, iskorišćenje otpadnog supstrata za proizvodnju vredne stočne hrane je veoma povoljno i sa ekološkog i sa ekonomskog aspekta.

Postupak pripreme tečne fermentisane stočne hrane veoma značajno utiče na brojne aspekte mikrobiološkog i nutritivnog kvaliteta fermentisanog medijuma. Najčešće se fermentisana tečna stočna hrana priprema mešanjem sirovine sa određenom količinom vode, čime se fermentacija izaziva spontano prisutnom mikroflorom. U početnim satima fermentacije dok koncentracija mlečne kiseline ne dostigne više vrednosti usled slabijeg početnog razmnožavanja BMK i kvasaca, *Enterobacteriaceae* sp. brže rastu [154]. Nakon približno 8h spontane fermentacije u uslovima prisustva oko 50% čvrstog dela i pri temperaturi od oko 20°C, postiže se dominacija BMK i značajna proizvodnja mlečne kiseline što rezultuje smanjenjem pH vrednosti medijuma ispod 4,5 i inhibicijom rasta *Enterobacteriaceae* sp. [155]. Takođe je uočeno da je pri višim temperaturama fermentacije podstaknut rast *Lactobacillus* sp. u odnosu na *Enterobacteriaceae* sp. pa na temperaturi od 35°C broj *Enterobacteriaceae* sp. ne prelazi vrednost od  $10^4$  CFU ml<sup>-1</sup> [154]. Fermentacija utiče povoljno i na sadržaj lako fermentativnih šećera i blago smanjuje sadržaj proteina iako ne statistički značajno [156]. Takođe, sve veći broj studija ukazuje na

smanjenu pojavu *Salmonella* sp. u fecesu svinja hranjenih fermentisanim tečnim hranivom [157-159].

U postupku ispitivanom u ovoj disertaciji ne može se očekivati prisustvo mešane kulture BMK i kvasaca, kao ni prisustvo patogena, budući da se džibra sterilise pre MKF, pa je očekivano da se u mikrobiološkim svojstvima fermentisani medijum značajno razlikuje u odnosu na fermentisana tečna hraniva. Ipak, kroz procese optimizacije MKF očekivano je da se ostvari intenzivan rast BMK, pa samim tim i maksimalno iskorišćenje izvora azota i ugljenika u medijumu, što bi trebalo da utiče na nutritivna svojstva džibre kao fermentisanog hraniva za stočnu ishranu. Takođe, zbog mlečno-kiselinske fermentacije očekivane su niske pH vrednosti u medijumu, čime se fermentisani medijum može dodatno zaštititi od naknadne kontaminacije po završetku procesa proizvodnje mlečne kiseline.

U fermentisanoj džibri zaostaloj nakon MKF očekuje se značajan broj BMK koje imaju probiotički potencijal. Koncept primene probiotika u stočnoj ishrani je značajno noviji u odnosu na primenu u ishrani ljudi. Ipak, osnovni principi su isti i zasnivaju se na neophodnosti da unesena biomasa bude živa i ima sposobnost da ispolji pozitivno dejstvo na zdravlje životinja primarno u gastrointestinalnom traktu [160]. Prema važećim regulativama u Evropskoj Uniji, pripadnici više rodova se ubrajaju u probiotike i odobreni su za primenu u stočnoj hrani [161]. Uglavnom se koriste gram pozitivne bakterije *Bacillus* (*B. cereus* var. *toyoi*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*), *Enterococcus* (*E. faecium*), *Lactobacillus* (*Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. farciminis*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus*), *Pediococcus* (*P. acidilactici*), *Streptococcus* (*S. infantarius*), ali i kvasci kao što je *Saccharomyces cerevisiae* vrste [161]. Trenutno je na snazi Pravilnik o dodacima stočnoj hrani (EC) No. 1831/2003 koji se dopunjuje svakog meseca, i uključuje sve preparate odobrene za upotrebu u stočnoj ishrani na teritoriji Evropske Unije [162].

### 3. EKSPERIMENTALNI DEO

#### 3.1. Materijali

##### *Mikroorganizmi:*

*Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* NRRL B 4564 (Kolekcija: Laboratorija za mikrobiologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerzitet u Beogradu)

*Lactobacillus casei* ssp. *casei* NRRL B 441 (Kolekcija: Laboratorija za mikrobiologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerzitet u Beogradu)

*Lactobacillus pentosus* NRRL 227 (Kolekcija: Laboratorija za mikrobiologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerzitet u Beogradu)

*Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 (Kolekcija: Laboratorija za mikrobiologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerzitet u Beogradu)

*Salmonella enteritidis* ATCC 13076 (Kolekcija: Laboratorija za mikrobiologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerzitet u Beogradu)

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Kolekcija: Laboratorija za mikrobiologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerzitet u Beogradu)

*Shiegella sonnei* (Kolekcija: Laboratorija za mikrobiologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerzitet u Beogradu)

*Listeria innocua* (Kolekcija: Laboratorija za mikrobiologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerzitet u Beogradu)

##### *Materijali:*

Anaerocult® C bags, Merck® KGaA, Nemačka

Parafilm® M, BRAND GmbH & Co KG, Nemačka

Pesak, ispran i izaren

Zeolitna molekulska sita (13X, beads, 8-12 mesh, Sigma-Aldrich®, Nemačka)

Antibiogram test tablet (Torlak, Srbija):

Tetraciklin, Ampicilin, Streptomycin, Kanamicin, Hloramfenikol, Penicilin, Eritromicin, Gentamicin, Vankomicin, Nalidiksična kiselina

Pepton-4, Torlak, Beograd, Srbija  
Mesni ekstrakt, Torlak, Beograd, Srbija  
Ekstrakt kvasca, Torlak, Beograd, Srbija  
De Man, Rogosa, Sharpe (MRS) bujon, Torlak, Beograd, Srbija  
Goveđa žuč, Torlak, Beograd, Srbija  
Hranljivi bujon, Torlak, Beograd, Srbija  
Polisorbat 80, Tween 80®, DIFCO®, BD, SAD  
Agar, Torlak, Beograd, Srbija

*Supstance p.a. čistoće:*

3, 5 - dinitrosalicilna kiselina (C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), Acros Organics, New Jersey, SAD  
Natrijum-sulfit (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>), Zorka, Šabac, Srbija  
Natrijum hlorid (NaCl), Centrohem, Beograd, Srbija  
Natrijum-hidroksid (NaOH), Centrohem, Beograd, Srbija  
Kalijum-natrijum tartarat (KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>×4H<sub>2</sub>O), Centrohem, Beograd, Srbija  
Kalijum heksacijanoferat (II) (K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]×3H<sub>2</sub>O), Merck, Darmstadt, Nemačka  
Cink sulfat (ZnSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O), Lach-Ner, Neratovice, Republika Češka  
Magnezijum sulfat (MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O), Merck-Alkaloid, Skoplje, Makedonija  
Hlorovodonična kiselina (HCl), Zorka Pharma a.d., Šabac, Srbija  
Glukoza (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>), Centrohem, Beograd, Srbija  
Dekstroza (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>), Torlak, Beograd, Srbija  
Laktoza (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>), Torlak, Beograd, Srbija  
Maltoza (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>), Torlak, Beograd, Srbija  
Galaktoza (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>), Torlak, Beograd, Srbija  
Fruktoza (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>), Torlak, Beograd, Srbija  
Saharoza (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>), Torlak, Beograd, Srbija  
Triamonijum citrate (C<sub>6</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>), Sigma-Aldrich, Gilligham, UK  
Kalijum hidrogenfosfat (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), Kemika, Zagreb, Hrvatska  
Natrijum acetat (CH<sub>3</sub>COONa×3H<sub>2</sub>O), EuroHemija, Beograd, Srbija  
Mangan sulfat (MnSO<sub>4</sub>), Hemos, Beograd, Srbija



Diamonijum hidrogen citrate ( $\text{HOC}(\text{CO}_2\text{H})(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{NH}_4)_2$ ), Lach-Ner, Neratovice, Republika Češka

Ninhidrin ( $\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ), Alfa Aesar GmbH&CoKG, Karlsruhe, Nemačka

Glicin ( $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ ), Biochemica, Sigma-Aldrich Chemi GmbH, China

Kalijum jodat ( $\text{KIO}_3$ ) Sigma-Aldrich, Gilligham, UK

Sumporna kiselina ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), 96%, Lach-Ner, Neratovice, Republika Češka

Fenolftalein, Merck-Alkaloid, Skopje, Makedonija

Kalijum sulfat ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ ), Kemika, Zagreb, Hrvatska

Bakar sulfat ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), Zorka Pharma a.d., Šabac, Srbija

Selen (Se), The British Drug-Houses Ltd., Pool, Engleska

Metiloranž, Hemos, Beograd, Srbija

Metilplavo, Hemos, Beograd, Srbija

Dietiletar ( $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ ), Merck, Darmstadt, Nemačka

Etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ), Reahem, Novi Sad, Srbija

Srebro nitrat ( $\text{AgNO}_3$ ), Centrohem, Beograd, Srbija

Magnezijum-hlorid ( $\text{MgCl}_2$ ), Acros Organics, New Jersey, SAD

Natrijumdodecil sulfat ( $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$ ), Centrohem, Beograd, Srbija

Dinatrijum etilendiamintetraacetat (EDTA), Centrohem, Beograd, Srbija

Natrijum tetraborat ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$ ), Lach-Ner, Neratovice, Republika Češka

Dinatrijumhidrogen fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ ), Centrohem, Beograd, Srbija

Metil celosol ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_2$ ), Centrohem, Beograd, Srbija

Dekalin ( $\text{C}_{10}\text{H}_{18}$ ), Centrohem, Beograd, Srbija

Aceton ( $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ ), Lachema, Češka republika

Natrijum sulfat ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), Zorka, Šabac, Srbija

Cetil trimetilamonijum bromid ( $\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Br}$ ), Centrohem, Beograd, Srbija

#### *Enzimski preparati:*

Pepsin, Merck® 2000 FIP  $\mu\text{g}^{-1}$  Art 7190

Celulaza Onozuka R10 iz *Trichoderma viridae*, Merck KGaA, Darmstadt, Nemačka

Pronaza E, kristali, Calbiochem-Behring Corp., La Jolla, SAD

Enzimski kit za određivanje sadržaja stereoizomera mlečne kiseline L-/ D-Lactic acid assay, Megazyme®, Wicklow, Irska

*Uređaji:*

Atomski apsorpcioni spektrometar (Perkin Elmer® AAnalyst 200, Waltham, SAD)

UV-VIS spektrofotometar (Ultrospec 3300 pro, Biochrom Ltd., Cambridge, Engleska)

Mikroskop (Axio Imager A1, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Nemačka)

Skenirajući elektronski mikroskop (Mira3 XMU Field Emission Scanning Electron Microscope, TESCAN, SAD)

Centrifuga (Sigma® model 2-16, Shropshire, Engleska)

Vorteks (REAX 7000, Heidolph, Schwabach, Nemačka)

Autoklav (Sutjeska, Beograd)

Električni rešo Bauer GH-525 (JTD Ltd., Severna Koreja)

Termostat za rast mikroorganizama (Mettler, Nemačka)

Orbitalna tresilica (KS 4000i control, IKA®, Werke GmbH & Co. KG, Nemačka)

Aparat za određivanje sadržaja vlakana (Fibertec system Hot Extractor 2010, Foss Tecator, Švedska)

Vakuurni sušnica (Binder VD 23, Binder GmbH, Nemačka)

pH metar (inoLab pH 720, Nemačka)

Tehnička vaga (Chyo Balance Corp., MP-3000)

Analitička vaga (Mettler AJ100, Švajcarska)

Laboratorijska sušnica (Sutjeska (60-200°C), Fabrika medicinskih uređaja, Beograd)

Električna peć za žarenje (Instrumentaria (50-1200 °C), Hrvatska)

Ultrazvučno kupatilo, tip USK 28, radna frekvencija 40 kHz (EI, Niš, Niš)

Vodeno kupatilo sa mešanjem, model WB/OB 7-45 (Mettler, Nemačka)

Magnetna mešalica (ARE Heating Magnetic Stirrer, Velp Scientifica srl, Italija)

## **3.2. Metode**

### **3.2.1. Priprema destilerijske džibre**

Za fermentacionu proizvodnju mlečne kiseline je korišćena destilerijska džibra nastala u proizvodnji bioetanolu na otpadnom hlebu u fabrici Reahem (Srbobran, Srbija). Džibra korišćena u ispitivanjima je sporedni proizvod alkoholne fermentacije.

Odmah po preuzimanju iz fabrike, džibra je podeljena u plastične kontejnere zapremine do 2 l, odmah smrznuta i čuvana na -20°C. Kao supstrat za mlečno-kiselinsku fermentaciju je ispitivana ukupna džibra i njena tečna frakcija džibre.

Tečna frakcija džibre je dobijena nakon centrifugiranja destilerijske džibre na 4500 obrt/min u trajanju od 20 minuta (Sigma® model 2-16, Shropshire, Engleska). Tečna frakcija je korišćena u daljoj proceduri pripreme fermentacionog medija ili za hemijsku karakterizaciju.

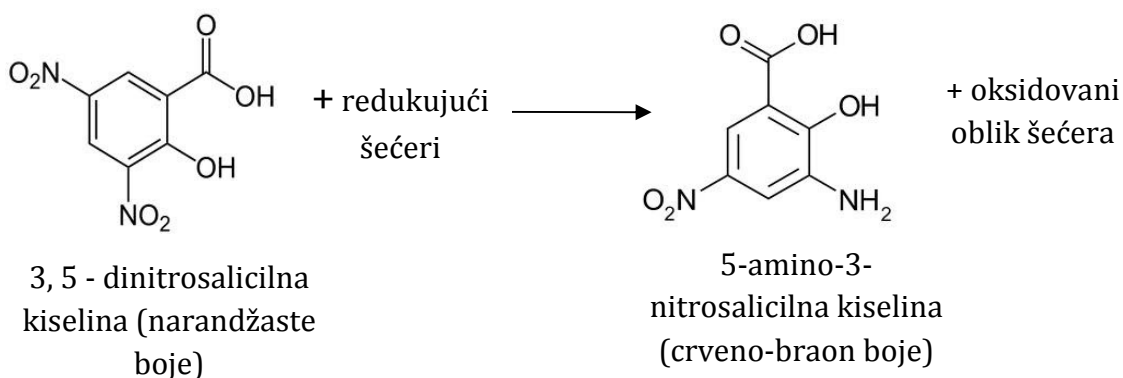
Da bi se ispitala pogodnost sastava džibre za rast BMK određeni su sadržaj redukujućih šećera [163], sadržaj ukupnih proteina, sadržaj masti, sadržaj pepela i sadržaj suve materije [164].

### **3.2.2. Određivanje sadržaja redukujućih šećera u džibri i fermentacionom medijumu [163]**

Spektrofotometrijska metoda sa 3,5-dinitrosalicilnom kiselinom je korišćena za određivanje sadržaja redukujućih šećera u džibri i u fermentacionom medijumu u cilju praćenja koncentracije redukujućih šećera izraženih na glukozu.

U toku reakcije slobodna karbonilna grupa redukujućih šećera se oksiduje do karboksilne, dok se 3, 5 - dinitrosalicilna kiselina redukuje do 3-amino-5-nitrosalicilne kiseline u baznoj sredini uz zagrevanje. Absorbancija rastvora se

meri na talasnoj dužini od 505 nm. Na slici 3.1. je prikazana reakcija oksidacije redukujućih šećera sa 3, 5 - dinitrosalicilnom kiselinom.



Slika 3.1. Reakcija 3, 5 – dinitrosalicilne kiseline sa redukujućim šećerima

Reagensi:

1% rastvor 3,5-dinitrosalicilne kiseline (DNS):

10 g dinitrosalicilne kiseline

0,5 g natrijum-sulfita Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>

10 g natrijum-hidroksida NaOH

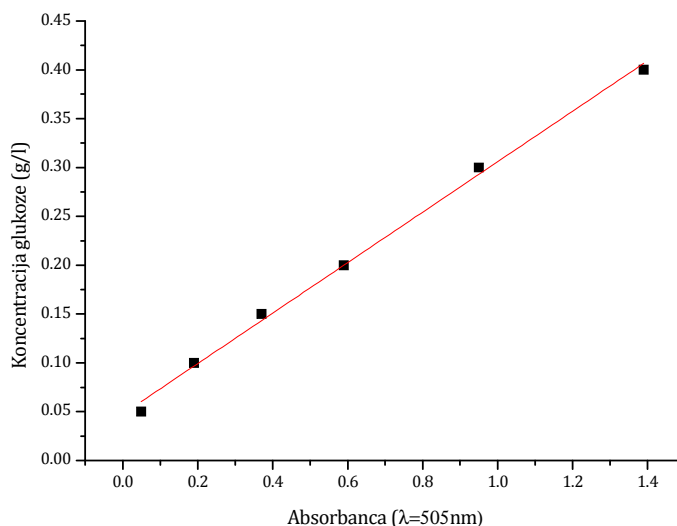
dodati vodu do 1 L.

40% rastvor kalijum-natrijum tartarata

*Postupak*

1 ml filtrata džibre ili fermentacionog medijuma se pipetom prenese u normalni sud od 100 ili 250 ml u zavisnosti od očekivane koncentracije šećera, koji se zatim postepeno dopuni destilovanom vodom. Iz normalnog suda se prenese 3 ml razblaženog rastvora šećera u epruvetu, a zatim se doda 3 ml rastvora DNS. Istovetno se pripremi slepa proba u kojoj se koristi 3 ml destilovane vode umesto ispitivanog razblaženog filtrata. Epruvete se zatvore i zagrevaju u vodenom kupatilu na 90 °C u trajanju od 5-15 minuta do nastanka crveno-braon obojenja. Slepa proba zadržava žutu boju. Zatim se u topao rastvor dodaje 1 ml rastvora kalijum-natrijum-tartarata i promeša. Sadržaj u epruvetama se ohladi do sobne temperature i zatim se meri absorbanca na spektrofotometru na 505 nm.

Koncentracija redukujućih šećera, izraženih kao glukoza, se određuje iz standardne krive. Za dobijanje standardne krive merena je apsorbanca rastvora glukoze poznatih koncentracija na 505 nm. Na slici 3.2. je prikazana standardna kriva zavisnosti koncentracije glukoze od absorbance na 505 nm.



Slika 3.2. Standardna kriva zavisnosti koncentracije rastvora šećera od apsorbanacije, merene na talasnoj dužini od 505nm u reakciji sa 3,5 - dinitrosalicilnom kiselinom.

Dobijena standardna kriva ima jednačinu:

$$c_{\text{glu}} (\text{g L}^{-1}) = (0,2583 \times A + 0,0476) \times R, \quad \text{uz } r^2 = 0,99628$$

gde je:

$c_{\text{glu}}$  – koncentracija šećera, izraženo na glukozi, u ispitivanom rastvoru

A – apsorbanca ispitivanog rastvora na talasnoj dužini od 505 nm

$r^2$  - kvadrat koeficijenta korelacije

R – razblaženje

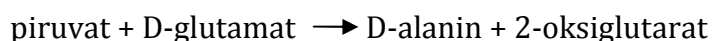
### 3.2.3. Određivanje sadržaja mlečne-kiseline enzimskim testom [165]

Koncentracija proizvedene mlečne kiseline je određivana pomoću enzimskog kita (Megazyme®, Wicklow, Ireland). Metoda se sastoji u prevođenju L

(+) ili D (-) mlečne kiseline, u zavisnosti od toga koji oblik mlečne kiseline proizvodi mikroorganizam, u piruvat njenom oksidacijom pomoću L-laktat dehidrogenaze (L-LDH), odnosno D-laktat dehidrogenaze (D-LDH) u prisustvu nikotinamid-adenin dinukleotida (NAD<sup>+</sup>).



Zbog blago pomerene ravnoteže reakcije u korist piruvata i NADH, da bi se sprečila povratna reakcija potrebno je odmah piruvat vezati u narednoj reakciji i omogućiti spektrofotometrijsko merenje koncentracije NADH koja odgovara koncentraciji mlečne kiseline. Stoga, u sledećoj reakciji dolazi do konverzije piruvata do D-alanina i 2-oksiglutarata pomoću enzima D-glutamat-piruvat transaminaze (D-GPT) u prisustvu D-glutamata u višku.



Dobijena količina NADH u prvoj reakciji odgovara količini L (+), odnosno D (-) mlečne kiseline, pa se spektrofotometrijski meri koncentracija NADH, odnosno apsorbanca rastvora na talasnoj dužini od 340 nm.

Reagensi za deproteinizaciju uzorka prilikom pripreme:

Carrez I rastvor:

3,6 g K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]

100ml d. H<sub>2</sub>O

Carrez II rastvor:

7,2g ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O

100ml d. H<sub>2</sub>O

0,1M NaOH

#### *Postupak deproteinizacije*

Uzorke za određivanje mlečne kiseline je potrebno prethodno deproteinizovati. Za deproteinizaciju se koriste rastvori Carrez I, Carrez II i 0,1M NaOH. Postupak deproteinizacije se sastoji u prebacivanju odgovarajuće zapremine uzorka (prema Tabeli 3.1.) u sud od 100 ml koji sadrži približno 60 ml

destilovane vode (d.H<sub>2</sub>O), a nakon toga se pažljivo doda 5 ml rastvora Carrez I, 5 ml rastvora Carrez II i 10 ml 0,1 M NaOH. Po dodavanju svakog od reagenasa dobijeni rastvor se dobro promeša i normalni sud se dopuni do crte destilovanom vodom. Nakon taloženja proteina, uzorak se filtrira, a filtrat se koristi za određivanje koncentracije mlečne kiseline.

Tabela 3.1. Tabela za razblaživanje uzorka prema očekivanoj koncentraciji mlečne kiseline

Očekivana koncentracija mlečne kiseline u uzorku (g/L)	Razblaženje	Faktor razblaženja (F)
< 0,30	bez razblaživanja	1
0,30-3,00	1 ml uzorka +9 ml d.H <sub>2</sub> O	10
3,00-30,00	1 ml uzorka +99 ml d.H <sub>2</sub> O	100
> 30,00	1 ml uzorka +999 ml d.H <sub>2</sub> O	1000

Reagensi za određivanje mlečne kiseline:

Rastvor 1 (pripremljen od strane proizvođača):

Glicil-glicin pufer (25 ml, 0,5M, pH 10)

D-glutamat (0,5M)

Natrijum azid (0,02% (w/v))

Rastvor 2 (priprema se neposredno pre upotrebe):

380 mg NAD<sup>+</sup>

5,5 ml d. H<sub>2</sub>O

Čuva se na -20°C, a u toku određivanja mlečne kiseline se čuva na hladnom

Suspenzija 3 (pripremljen od strane proizvođača):

D-Glutamat-piruvat transaminaza (1300 U ml<sup>-1</sup>)

Suspenzija 4 (pripremljen od strane proizvođača):

L-laktat dehidrogenaza (2000 U ml<sup>-1</sup>)

Suspenzija 5 (pripremljen od strane proizvođača):

D-laktat dehidrogenaza (2000 U ml<sup>-1</sup>)

### Postupak određivanja mlečne kiseline

Postupak za određivanje koncentracije mlečne kiseline u deproteinizovanim uzorcima se izvodi u kivetama (minimum 3 ml zapremine) tako da je put svetlosti kroz rastvor 1 cm. Reakcija se izvodi na temperature od oko 25°C i merenje je vršeno na spektrofotometru na talasnoj dužini 340 nm. Sva merenja apsorbance rastvora uzorka i slepe probe se vrše u odnosu na destilovanu vodu. Plan dodavanja reagenasa u prethodno deproteinizovai uzorak i slepu probu prikazan je u Tabeli 3.2.

Tabela 3.2. Plan dodavanja reagenasa prilikom određivanja koncentracije mlečne kiseline enzimskom metodom

Redosled dodavanja	Slepa proba	Uzorak
Destilovana voda (~25°C)	1,60 ml	1,50 ml
Uzorak	-	0,10 ml
Rastvor 1	0,50 ml	0,50 ml
Rastvor 2	0,10 ml	0,10 ml
Suspenzija 3	0,02 ml	0,02 ml
Promešati sadržaj kivete tako što se kiveta zatvori parafilmom i par puta okrene, očitati apsorbancu ( $A_1$ ) nakon približno 3 min i nakon toga nastaviti sa dodavanjem reagenasa:		
Suspenzija 4 ili 5*	0,02 ml	0,02 ml
Promešati sadržaj kivete tako što se kiveta zatvori parafilmom i par puta okrene. Po završetku reakcije (približno 10 min) očitati apsorbancu ( $A_2$ ). Ukoliko se reakcija nije završila nakon 10 min, treba nastaviti očitavanje u intervalima od 2 min, dok porast u apsorbanci ne bude konstantan tokom 2 min.		

\*U zavisnosti od toga da li se ispituje prisustvo L- ili D- mlečne kiseline.

Neophodno je prvo izačunati razliku apsorbanci  $A_2 - A_1$  za slepu probu ( $A_2 - A_1$ )<sub>s</sub> i za uzorke ( $A_2 - A_1$ )<sub>u</sub>. Potom se od razlike apsorbanci za uzorak ( $A_2 - A_1$ )<sub>u</sub> oduzima razlika apsorbanci za slepu probu ( $A_2 - A_1$ )<sub>s</sub> čime se dobija razlika apsorbanci  $\Delta A_{mk}$ . Koncentracija mlečne kiseline u rastvoru se računa prema sledećoj formuli:

$$c_{mk} = \frac{V \times M}{\epsilon \times d \times v} \times \Delta A_{mk} \times F,$$

gde je:



$C_{mk}$  – koncentracija mlečne kiseline u uzorku ( $\text{g L}^{-1}$ )

$V$  – konačna zapremina uzorka u kiveti po dodavanju reagenasa (ml)

$M$  – molarna masa mlečne kiseline ( $90,1 \text{ g mol}^{-1}$ )

$\epsilon$  – ekstinkcioni koeficijent NADH na 340 nm ( $6300 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

$d$  – dužina svetlosnog puta (cm)

$v$  – zapremina uzorka (ml)

$\Delta A_{mk}$  – razlika apsorbanci  $[(A_2 - A_1)_u - (A_2 - A_1)_s]$

$F$  – faktor razblaženja

### 3.2.4. Određivanje sadržaja metala

Za određivanje sadržaja različitih metala u džibri korišćena je atomska apsorpciona spektrometrija (AAS). Nakon centrifugiranja uzoraka na 4500 obrt/min u trajanju od 20 minuta, izvršena je filtracija.

Ispitivan je sadržaj Ca, Co, Mg, Cr, Mn, Zn, Na i Fe plamenom atomskom apsorpcionom spektrometrijom (Perkin Elmer® AAnalyst 200, Waltham, SAD). Detekcioni nivoi za svaki od određenih metala su dati u Tabli 3.3.

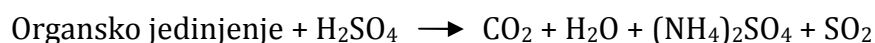
Tabela 3.3. Detekcioni nivoi za ispitivane metale

Ispitivani metal	Detekcioni nivo (ppm)	Ispitivani metal	Detekcioni nivo (ppm)
Ca	0,062	Zn	0,006
Co	0,053	Mg	0,004
Cr	0,078	Na	0,007
Mn	0,016	Fe	0,06

### 3.2.5. Određivanje sadržaja ukupnih proteina [111]

Sadržaj proteina ( $S_{\text{proteina}}$ ) u džibri je određivan metodom po Kjeldalu, semikvantitativnim postupkom. Određivanje sadržaja proteina metodom po Kjeldalu zasniva se na određivanju sadržaja azota i naknadnom preračunavanju pomoću odgovarajućeg koeficijenta na ukupne proteine.

Destilerijska džibra i njena tečna frakcija su tretirane koncentrovanom sumpornom kiselinom uz zagrevanje, čime se organska jedinjenja prisutna u džibri oksiduju, a azot koji se pritom oslobađa u obliku amonijaka sa sumpornom kiselinom gradi amonijum-sulfat. Dejstvom baze na stvoreni amonijum-sulfat, oslobođeni amonijak se predestiliše u kiselinu poznatog molalитета. Na osnovu utrošene zapremnine baze pri retitraciji neizreagovane kiseline poznatog molalитета, određuje se količina amonijaka, odnosno kolilčina azota u džibri.



Množenjem sadržaja azota sa faktorom 6,25 dobija se ukupni sadržaj proteina u džibri.

Reagensi:

Sumporna kiselina (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), conc.

Natrijum hidroksid (NaOH), 33% rastvor

Fenolftalein, 1%-ni rastvor u etanolu

Sumporna kiselina (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 0,05M

Natrijum hidroksid (NaOH), 0,1M

Katalizator „b“, sprášena smeša:

62,5g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,

1g CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O

1 g Se

Tashiro indikator, smeša:

100 ml 0,1%-tnog vodenog rastvora metiloranža

4 ml 1%-tnog vodenog rastvora metilplavog

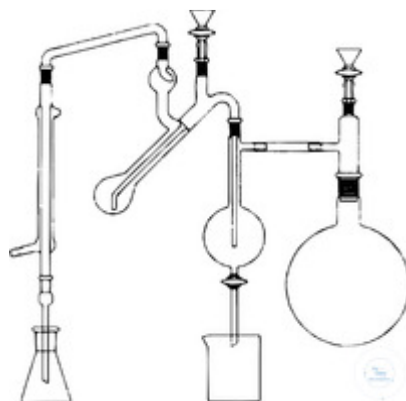
*Postupak*

Postupak određivanja ukupnih proteina po Kjeldahl-u se sastoji od 3 faze: spaljivanje, destilacija i titracija. Odmerena masa ispitivane džibre (m) je prenetu u Kjeldahl-ovu tikvicu za spaljivanje.

Spaljivanje. Za brže i potpunije spaljivanje uzorka u Kjeldahl-ovu tikvicu je dodat katalizator „b“ i pažljivo niz zid 10-20ml conc.  $H_2SO_4$ . Nakon intenzivnog i opreznog mešanja tikvica se postavi na azbestnu mrežicu pod uglom od  $45^\circ$  i započinje se postepeno zagrevanje. Na početku se sadržaj u tikvici greje na slabijem plamenu dok ne počnu da se izdvajaju bele pare. Kod namirnica koje intenzivno pene u toku zagrevanja zbog velike količine šećera može se dodati 5-10mg stearinske kiseline. Nakon toga se grejanje intenzivira do ključanja uz stalno kretanje plamena. Zagrevanje se nastavlja, uz povremeno mešanje i spiranje zaostalih čestica po zidovima tikvice dok sadržina ne postane prozirna ili svetlo plavičasta, bez zaostalih čestica, nakon čega se greje još 15 min.

Destilacija (semimikro postupak). Nakon sagorevanja, sadržaj u tikvici se razblaži pažljivo sa 20ml destilovane vode i posle hlađenja se kvantitativno prenese u normalni sud od 100 ml, uz višestruko ispiranje Kjeldahl-ove tikvice u kojoj je vršeno spaljivanje i dopuni se do crte. Uzima se 10-50 ml ovog rastvora i prenese se u balon destilacionog aparata po Parnas-Wagner-u (Slika 3.3.). U erlenmajer (prijemnik) ispod hladnjaka sipa se odgovarajuća zapremina 0,05M  $H_2SO_4$  (A, obično 25 ml) uz par kapi Tashiro indikatora i započinje se destilacija. Indikator se dodaje već pri destilaciji da bi se još u toku rada ustanovilo da nije možda uzeta manja količina kiseline nego što je potrebno za vezivanje amonijaka. Kraj hladnjaka se mora uroniti u kiselinu. Tada se balon, u kome se nalazi preneti sadržaj iz Kjeldahl-ove tikvice, doda 33%-tni NaOH u višku, obično 100ml, a zatim se vrši destilacija vodenom parom. Da je dodat višak baze poznaje se po tome što se neposredno posle mešanja pojavi tamno plava boja (u katalizatoru je  $CuSO_4$ ) od tetraminskog kompleksa sa bakrom  $/Cu(NH_4)_4^{2+}$ . Za vreme destilacije plava boja tečnosti se menja u svetlo smeđu. Kompleks se razlaže, nastaje  $Cu(OH)_2$ , koji se dalje zagrevanjem prevodi u  $CuO$ , te tečnost na kraju postaje mrko obojena.

Kada predestiliše oko 100 ml, pusti se kap destilata na crveni lakmus. Ako lakmus promeni boju u destilatu ima još amonijaka i destilacija se nastavlja do negativne reakcije destilata sa lakmus papirom.



Slika 3.3. Aparatura po Parnas-Wagner-u

Titracija. Kada je završena destilacija, izvadi se prijemnik, a cev hladnjaka koja je bila uronjena ispere se vodom sa spoljne i unutrašnje strane, tako ta voda ode u prijemnik. Preostala zapremina kiseline se retitriše 0,1 M NaOH (B) do promene boje.

Na osnovu količine neutralisane kiseline u toku destilacije izračuna se sadržaj azota, a množenjem sa odgovarajućim faktorom 6,25 izračunava se ukupan sadržaj proteina u ispitivanom uzorku prema sledećoj formuli:

$$S_{\text{proteina}} = \frac{(A-B) \times f \times 100 \times 6,25}{m} \%$$

gde je:

$S_{\text{proteina}}$  – sadržaj proteina izražen u %

A - odmerena zapremina 0,05M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (ml)

B – utrošena zapremina 0,1M NaOH (ml)

m – odmerena masa ispitivanog uzorka (g)

F – 0,0014 g/ml, 0,0014g azota odgovara 1 ml neutralisane (A-B) 0,05M  $\text{H}_2\text{SO}_4$

Ukoliko se  $S_{\text{proteina}}$  izražava u % suve materije (% SM) uzorka, izračunava se prema sledećoj formuli:

$$S_{\text{proteina}} (\% \text{ SM}) = \frac{S_{\text{proteina}} (\%) \times 100}{\% \text{ SM}},$$

gde je:

$S_{\text{proteina}} (\% \text{ SM})$  – sadržaj proteina izražen u % suve materije

$S_{\text{proteina}} (\%)$  – sadržaj proteina izražen u %

% SM – udeo suve materije u uzorku izražen u %

Ukoliko se sadržaj proteina ( $S_{\text{proteina}}$ ) izražava u  $\text{g kg}^{-1}$  SM, vrednost se preračunava po formuli:

$$S_{\text{proteina}} (\text{g kg}^{-1} \text{ SM}) = S_{\text{proteina}} (\% \text{ SM}) \times 10$$

### 3.2.6. Određivanje sadržaja masti po Soxhlet-u [164]

Određivanje sadržaja masti ( $S_{\text{masti}}$ ) po Soxhlet-u se zasniva na ekstrakciji masti određenom količinom svežeg organskog rastvarača.

*Reagensi:*

Etar, bezvodni ili petroletar (temp. ključanja do  $60^{\circ}\text{C}$ ) ili hloroform

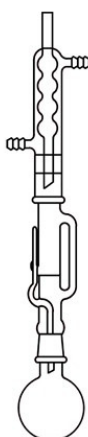
Natrijum-sulfat, bezvodni (žareni)

Pesak, ispran i izaren

*Postupak*

Uparena i osušena džibra, između 5-10g (m), homogenizuje se u tarioniku sa oko 10 g isparenog peska. Masa iz tarionika se prenese u čauru za ekstrakciju i eventualno prisutni ostaci se sakupe vatom natopljenom rastvaračem i ubace sa vatom u čauru. Čaura sa uzorkom se postavi u srednji deo aparature po Soxhlet-u (Slika 3.4.) koji se zatim spoji sa hladnjakom i tikvicom. Tikvica je prethodno sušena sa nekoliko staklenih kuglica 1 h na  $105^{\circ}\text{C}$  i izmerena (B). Sa gornje strane hladnjaka, preko malog levka, ulije se u aparat toliko rastvarača da se ekstraktor napuni i prelije u tikvicu. Zatim se doda još malo rastvarača, tako da ukupna količina rastvarača ne zauzima više od  $3/4$  zapremine tikvice. Zagrevanje tikvice vrši se ili direktno na električnoj zatvorenoj grejalici ili na električnom vodenom kupatilu. Jačina zagrevanja se podešava tako da kapljice kondenzata padaju brzo da se jedva mogu brojati, a da ne padaju u mlazu. Pri zagrevanju pare rastvarača

dolaze u hladnjak, slivaju se u ekstraktor i rastvarač u dodiru sa uzorkom ekstrahuje masti. Kada se ekstraktor napuni rastvaračem, koji u sebi sadrži ekstrahovanu mast, do gornjeg nivoa sifonske cevi, rastvor se prelije u tikvicu. Na taj način se postiže konstantna ekstrakcija masti uz malu potrošnju rastvarača. Ekstrakcija traje 3-6h, u zavisnosti od uzorka. Završetak ekstrakcije se određuje probom. Kap-dve rastvarača iz ekstraktora se prenese na filter papir i ukoliko ne ostaje masan trag ekstrakcija je završena.



Slika 3.4. Aparatura po Soxhlet-u

Po završetku ekstrakcije, prekida se sa destilacijom u momentu kada se rastvarač prelije u tikvicu. Aparat se skine sa grejalice, izvadi iz njega čaura, zatim se aparat sklopi ponovo, a rastvarač predestiliše u ekstraktor i pre nego što se rastvarač prelije u tikvicu, izlije se iz ekstraktora. Ukoliko postoji potreba postupak se ponavlja. Zaostale male količine rastvarača u tikvici se ispare potpuno na vodenom kupatilu, a zatim se tikvica sa mašću suši do konstantne mase (A) na 105°C, najčešće je dovoljno 1h.

Sadržaj masti ( $S_{masti}$ ) u uzorku se izračunava na osnovu razlike mase tikvice pre i nakon ekstrakcije:

$$S_{masti} = \frac{(A-B) \times 100}{m} \%,$$

gde je:

$S_{masti}$  – sadržaj masti u ispitivanom uzorku, izražen u %

A – masa tikvice sa ekstrahovanim mastima (g)

B – masa prazne tikvice (g)

m – odmerena masa ispitivanog uzorka (g)

Ukoliko se  $S_{masti}$  izražava u % suve materije (% SM) uzorka, izračunava se prema sledećoj formuli:

$$S_{masti} (\% SM) = \frac{S_{masti} (\%) \times 100}{\% SM},$$

gde je:

$S_{masti} (\% SM)$  – sadržaj masti izražen u % suve materije

$S_{masti} (\%)$  – sadržaj masti izražen u %

% SM – udeo suve materije u uzorku izražen u %

Ukoliko se sadržaj masti ( $S_{masti}$ ) izražava u g kg<sup>-1</sup> SM, vrednost se preračunava po formuli:

$$S_{masti} (\text{g kg}^{-1} \text{ SM}) = S_{masti} (\% SM) \times 10$$

### **3.2.7. Određivanje sadržaja pepela – metoda spaljivanja uz ekstrakciju vodom [164]**

Sadržaj ukupnog pepela ( $S_{pepela}$ ) se određuje žarenjem uz ekstrakciju vodom, da bi se sprečio gubitak alkalnih hlorida i drugih supstanci.

#### *Postupak*

Izmerena masa džibre (m) se u prethodno izarenom i izmerenom tigli (B) postepeno spaljuje na plamenu u dogostoru na niskoj temperaturi, dok sva masa ne pougljeniše i dok ne prestane izdvajanje dima. Ugljenisana masa se isitni staklenim štapićem (oprezno) i ohladi. U tigl se doda 20 ml vruće destilovane vode i uz povremeno mešanje se ostavi na vodenom kupatilu 15-30 minuta, da bi se ekstrahovale rastvorljive soli. Posle ekstrakcije, filtrira se u čašu, kroz kvantitativni filter papir i filtrat se sačuva. Tigl i ostatak na filteru isperu se nekoliko puta

toplom vodom. Filter papir sa ostatkom se vrati u isti tigl osuši u sušnici (1-2h, 120°C), zatim se oprezno spaljuje prvo na plameniku, a zatim u električnoj peći (650°C). Posle potpunog spaljivanja, u ohlađeni tigl sa pepelom se sipa nekoliko kapi destilovane vode. Kada se sav pepeo nakvasi, doda se odjednom sav prethodno odvojen filtrat. Čaša se nekoliko puta ispere destilovanom vodom i dolije filtratu u tignu. Tigl se prvo zagreva na vodenom kupatilu dok sva voda ne ispari, a potom se suši 30 min u sušnici na 120-130°C. Nakon sušenja, tigl se oprezno izžari (525°C), ohladi u eksikatoru i meri (A). Sadržaj pepela se izračunava po formuli:

$$S_{\text{pepela}} = \frac{(A-B) \times 100}{m} \%,$$

gde je:

$S_{\text{pepela}}$  – sadržaj ukupnog pepela, izražen u %

A – masa tigla sa pepelom (g)

B – masa praznog, izarenog tigla (g)

m – odmerena masa ispitivanog uzorka (g)

Ukoliko se  $S_{\text{pepela}}$  izražava u % suve materije (% SM) uzorka, izračunava se prema sledećoj formuli:

$$S_{\text{pepela}} (\% \text{ SM}) = \frac{S_{\text{pepela}} (\%) \times 100}{\% \text{ SM}},$$

gde je:

$S_{\text{pepela}} (\% \text{ SM})$  – sadržaj pepela izražen u % suve materije

$S_{\text{pepela}} (\%)$  – sadržaj pepela izražen u %

% SM – udeo suve materije u uzorku izražen u %

Ukoliko se sadržaj pepela ( $S_{\text{pepela}}$ ) izražava u g kg<sup>-1</sup> SM, vrednost se preračunava po formuli:

$$S_{\text{pepela}} (\text{g kg}^{-1} \text{ SM}) = S_{\text{pepela}} (\% \text{ SM}) \times 10$$



### 3.2.8. Određivanje suve materije [164]

Za određivanje suve materije (SM) korišćena je metoda sušenja do konstantne mase u sušnici.

#### *Postupak*

Prazan vegeglas u kom će se sušiti uzorak prvo se suši najmanje 1 h na 100-105°C, ohladi u eksikatoru na sobnu temperaturu i izmeri sa tačnošću  $\pm 0,001g$  ( $m_v$ ). U vegeglas se brzo prenese određena količina uzorka, oko 10g, pokrije se sa poklopcem i izmeri se ukupna masa ( $m$ ). Poluotvoren vegeglas sa uzorkom se suši na 105°C u sušnici do postizanja konstantne mase i potom izmeri ( $m_u$ ).

Sadržaj suve materije (SM) izražen u % se izračunava po sledećem obrazcu:

$$SM (\%) = \frac{(m_u - m_v) \times 100}{m - m_v},$$

gde je:

SM – sadržaj suve materije (%)

$m_u$  – masa vegeglasa sa osušenim uzorkom (g)

$m_v$  – masa praznog vegeglasa (g)

$m$  – masa vegeglasa sa odmerenim uzorkom (g)

### 3.2.9. Određivanje slobodnog $\alpha$ - amino azota [166]

Slobodni  $\alpha$ -aminoazot se određuje spektrofotometrijskom metodom sa ninhidrinom na 570 nm. Proteini, polipeptidi i velika većina  $\alpha$ -aminokiselina sa ninhidrinom daju kompleks intenzivno plave ili ljubičaste boje. Vodeni rastvor ninhidrina oksidiše  $\alpha$ -aminokiseline, prevodeći ih u iminooblik, a sam prelazi u vodenom rastvoru u odgovarajuću ketokiselinu, osobađajući amonijak. Na povišenoj temperaturi keto-kiseline dekarboksilacijom prelaze u odgovarajući aldehyd.

Redukovani oblik ninhidrina 1,3-diketohidrindol reaguje sa jednim molekulom amonijaka i prelazi u 1,3-diketohidrindamin. On reaguje sa jednim molekulom nepromenjenog ninhidrina i daje bezbojan kompleks diketohidrindiliden-diketohidrindamin. Kompleks zatim keto-enolnom tautomerijom prelazi u kompleks ljubičaste boje. Intenzitet obojenja je proporcionalan koncentraciji prisutnog aminoazota i određuje se na talasnoj dužini od 570 nm.

Reagensi:

Reagens za bojenje (R<sub>1</sub>):

10 g dinatrijum-hidrogenfosfata ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ ),

0,5 g ninhidrina,

0,3 g fruktoze

do 100 ml d.  $\text{H}_2\text{O}$

Ovako pripremljen rastvor se može čuvati 2 nedelje u frižideru u tamnoj boci. pH rastvora mora da biti između 6,6 i 6,8.

Rastvor za razblaživanje (R<sub>2</sub>):

2 g  $\text{KJO}_3$

600 ml d.  $\text{H}_2\text{O}$

400 ml 96% etanola

Standarni rastvor glicina (R<sub>st</sub>):

107,2 mg glicina

100 ml d.  $\text{H}_2\text{O}$

Rastvor se čuva u frižideru na 0°C. Za analizu se koristi razblažen standardni rastvor glicina koji sadrži 2 mg  $\alpha$ -aminoazota u litri (1 ml standardnog rastvora glicina se razblaži destilovanom vodom do 100ml).

Postupak

Uzorak se razblaži destilovanom vodom do koncentracije od 1 do 3 mg/l aminoazota. U epruvetu se prenese 2 ml razblaženog rastvora, doda 1 ml reagensa

za bojenje (R<sub>1</sub>) i epruveta zatvori čepom da bi se izbegli gubici usled isparavanja. Epruveta se zagreva tačno 16 minuta u vodenom kupatilu koje ravnomerno ključa a zatim hladi 20 min u vodenom kupatilu na 20°C. U svaku epruvetu se doda 5 ml rastvora za razblaživanje (R<sub>2</sub>). U roku od 30 min od momenta dodavanja, meri se apsorbanca rastvora uzorka i razblaženog standardnog rastvora glicina na 570 nm u odnosu na slepu probu.

$$\alpha\text{-amino azot} = \frac{A_{\text{uzorka}}}{A_{\text{standarda}}} \times 2 \times R,$$

gde je:

$\alpha$ -amino azot – sadržaj  $\alpha$ -amino azota izražen u mg L<sup>-1</sup>,

A<sub>uzorka</sub> – apsorbanca uzorka

A<sub>standarda</sub> – apsorbanca uzorka

R - razblaženje uzorka

### 3.2.10. Skenirajuća elektronska mikroskopija

Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) je korišćena u cilju vizuelizacije morfologije površine zeolitnog nosača i zeolitnog nosača sa imobilisanim bakterijama *Lb. rhamnosus*. Isprani uzorci imobilizata su 3 sata sušeni u vakuum sušnici, na temperaturi 25°C u tankom sloju. Nakon sušenja uzorci su presvućeni Au-Pd smešom pomoću raspršivača. Za mikroskopiranje je korišćen uređaj TESCAN Mira3 XMU na 20 kV.

### 3.2.11. Selekcija mikroorganizama za proizvodnju mlečne kiseline na džibri

Za proizvodnju mlečne kiseline na džibri ispitivano je više vrsta BMK: *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* NRRL B- 4564, *Lactobacillus casei* ssp. *casei* NRRL B-441, *Lactobacillus pentosus* NRRL- 227 i *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. Vrste *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* NRRL B- 4564, *Lb. casei* ssp. *casei* NRRL B- 441 i *Lb. pentosus* NRRL- 227 su gajene u MRS bujonu na 30°C. Vrsta *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 je gajena na temperaturi 37°C, takođe u MRS bujonu. Pre zasejavanja

tečne kulture ispitivane BMK su dva puta uzastopno presejane u MRS bujonu i gajene prekoći (18 h) na odgovarajućim temperaturama.

Prilikom selekcije BMK mlečno-kiselinska fermentacija je vođena u toku 72h na sterilisanoj tečnoj hleбноj džibri, optimalne pH vrednosti podešene na 6,5 pomoću 30% NaOH. Za ispitivanje u ovom radu korišćena je tečna hleбna džibra iz industrijske proizvodnje bioetanola na otpadnom hleбу (Reahem, Srbobran) sa sadržajem šećera 16 – 25 g L<sup>-1</sup>, računato na glukozu. Za fermentaciju je zasejavano 2 % (v/v) tečne prekoćne bakterijske kulture. Mlečno kiselinska fermentacija je izvodjena u erlenmajerima od 300 ml sa 100 ml tečne sterilne džibre kao podloge u toku 72 časa. U toku fermentacije u određenim vremenskim intervalima praćen je sadržaj mlečne kiseline i broj živih ćelija i određeni su važni procesni parametri na osnovu kojih su upoređivani ispitivani sojevi. Ukupan broj živih ćelija je određivan metodom razblaženja.

### 3.2.12. Mlečno-kiselinska fermentacija

Za procenu MKF korišćene su koncentracija mlečne kiseline ( $c_{mk}$ ), koncentracija redukujućih šećera ( $c_{\text{š}}$ ) i ukupan broja bakterijskih ćelija koji su određivani eksperimentalno i vrednosti prinosa ( $Y_{mk/s}$ ), koeficijenta prinosa ( $Y_{mk/us}$ ) i produktivnosti ( $Q_f$ ) MKF koje su dobijene računski.

Prinos mlečne kiseline ( $Y_{mk/s}$ ) predstavlja prinos mlečne kiseline po g ukupno prisutnog supstrata tj. početne mase redukujućih šećera u medijumu. Može se izražavati u jedinicama g g<sup>-1</sup> ili u %. Prinos mlečne kiseline je računat kao odnos mase proizvedene mlečne kiseline u medijumu i mase redukujućih šećera u medijumu na početku fermentacije. Računat je prema formuli:

$$Y_{mk/s} = \frac{m_{mk}}{m_{\text{š}}},$$

gde je:

$m_{mk}$  - masa mlečne kiseline u medijumu

$m_{\text{š}}$  - masa redukujućih šećera u medijumu.

Ukoliko se izražava u procentima, dobijena vrednost  $Y_{mk/š}$  se množi sa 100% i dobija se vrednost prinosa izražena u %.

Koeficijent prinosa mlečne kiseline ( $Y_{mk/uš}$ ) predstavlja prinos mlečne kiseline po gramu utrošenog supstrata, odnosno gramu redukujućeg šećera. Izražava se u  $g\ g^{-1}$ . Koeficijent prinosa mlečne kiseline ( $Y_{mk/uš}$ ) je računat kao odnos mase proizvedene mlečne kiseline u medijumu i mase utrošenog redukujućeg šećera iz fermentacionog medijuma u toku MKF. Računat je prema formuli:

$$Y_{p/uš} = \frac{m_{mk}}{m_{uš}},$$

gde je:

$m_{mk}$  - masa mlečne kiseline u medijumu

$m_{uš}$  - masa utrošenog redukujućeg šećera iz medijuma u toku fermentacije, dobija se na osnovu razlike početne mase redukujućih šećera u rastvoru i mase šećera u rastvoru nakon fermentacije

Produktivnost MKF ( $Q_f$ ) predstavlja koncentraciju proizvedene mlečne kiseline u toku odgovarajućeg vremena i izražava se u  $g\ L^{-1}\ h^{-1}$ . Produktivnost ( $Q$ ) je računata kao odnos koncentracije proizvedene mlečne kiseline i vremena fermentacije. Računata je prema formuli:

$$Q_f = \frac{c_{mk}}{t_f},$$

gde je:

$c_{mk}$  - koncentracija mlečne kiseline u medijumu

$t_f$  - vreme fermentacije

### 3.2.12.1. Šaržni postupak

Mlečno-kiselinska fermentacija je izvođena šaržno u toku odabira najpovoljnijih uslova za proizvodnju mlečne kiseline na džibri. Mlečno-kiselinska fermentacija je vođena u toku 72h na sterilisanoj hlebnoj džibri (tečnoj ili ukupnoj, u zavisnosti od eksperimenta), optimalne pH vrednosti podešene na 6,5 pomoću 30% NaOH. Fermentacije su izvođene šaržno u erlenmajerima zapremine 500ml sa

ukupnom zapreminom fermentacionog medijuma od 250 mL. Kao fermentacioni medijum je korišćena sterilna džibra (ili samo tečna frakcija džibre, u zavisnosti od eksperimenta) u kojoj je početna koncentracija redukujućih šećera iznosila od 7-12 g L<sup>-1</sup>. Podešavanje početne koncentracije šećera u fermentacionom medijumu je vršeno dodatkom sterilnog 70% (w/v) rastvora glukoze. U eksperimentima u kojima je ispitivan uticaj početne koncentracije šećera ispitane su tri vrednosti: 55 g L<sup>-1</sup>, 75 g L<sup>-1</sup> i 85 g L<sup>-1</sup>. U zavisnosti od dizajna eksperimenta (2%, 5%, 10% (v/v)) korišćene su različite koncentracije inokuluma. Inokulum je pripreman u skladu sa postupkom pripreme soja *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 opisanim u odeljku 3.2.2.

U eksperimentima u kojima je ispitivan uticaj dodatka sredstva za neutralizaciju, odgovarajuća koncentracija CaCO<sub>3</sub> (1%, 2%, 5% i 10% (w/v)) je dodavana na početku fermentacije, dok je u fermentacijama sa kontrolom pH dodatkom rastvora NaOH, 30% rastvor NaOH dodavan u intervalima od 4h.

U toku fermentacije je praćena koncentracija šećera, mlečne kiseline, ukupnog broja živih ćelija i pH vrednosti u cilju karakterisanja mlečno-kiselinske fermentacije.

### **3.2.12.2. Dolivni postupak**

U eksperimentima u kojima je ispitivana proizvodnja mlečne kiseline na hleboj destilerijskoj džibri dolivnim postupkom korišćeni su erlenmajeri zapremine 1000 mLb. Hlebna džibra je sterilisana u Kohovom loncu nakon podešavanja pH vrednosti na 6,5 dodatkom 30% NaOH. Početna koncentracija šećera je podešena na oko 50 g L<sup>-1</sup> dodatkom sterilnog 70% (w/v) rastvora glukoze. U toku dolivnog procesa, kao svež medijum je dodavana sterilna hlebna džibra koncentracije šećera od oko 140 g L<sup>-1</sup>. U toku fermentacije je praćena koncentracija šećera u fermentacionom medijumu i nova količina svežeg medijuma je dodavana kada koncentracija šećera u medijumu padne ispod 20 g L<sup>-1</sup>, a do maksimalno 700ml zapremine fermentacionog medijuma.

U toku fermentacije je praćena koncentracija šećera, mlećne kiseline, ukupnog broja živih ćelija i pH vrednosti u cilju karakterisanja mlećno-kiselinske fermentacije.

### **3.2.12.3. Određivanje broja živih bakterijskih ćelija**

Ukoliko je fermentacija vršena sa slobodnim ćelijama bakterija, 1 ml fermentacionog medijuma se aseptićno pomeša sa 9 ml sterilnog 0,85 % rastvora NaCl, što predstvalja razblaženje  $10^{-1}$ . Prenošenjem po 1 ml ovog razblaženja u novih 9 ml sterilnog 0,85 % rastvora NaCl dobija se serija razblaženja pri ćemu je svako sledeće deset puta veće, a ukupno se postupak ponavlja 8 puta. U zavisnosti od pretpostavljene koncentracije bakterija u fermentacionom medijumu odabiraju se tri razblaženja iz kojih se prenosi po 1 ml u Petri šolje. Uzorci se u Petri kutijama prelivaju hranljivom podlogom MRS agar. Po oćvršćavanju prvog sloja MRS agara, Petri kutije se prelivaju jos jednim slojem MRS agara, kako bi se obezbedili mikroaerofilni uslovi za rast bakterija. Nakon obeležavanja, Petri šolje se inkubiraju u termostatu na odgovarajućoj temperaturi u trajanju od 48 h na  $37^{\circ}\text{C}$ , odnosno  $30^{\circ}\text{C}$  u zavisnosti od ispitivane bakterije. Broj izraslih kolonija je određivan Kohovom metodom. Ukupan broj živih ćelija u 1 ml hidrolizata dobija se množenjem ukupnog broja kolonija izraslih na Petri šolji sa odgovarajućim razblaženjem. U slućaju da postoje prisutne ćelije na više Petri kutija uzima se srednja vrednost broja ćelija.

Za određivanje broja imobisanih ćelija, korišćena je delimićno modifikovana metoda Hrenović i sar. [120]. Fermentacioni medijum je promešan i aseptićno je prenet 1 ml u 9 ml sterilnog 0,85 % rastvora NaCl. Nakon intenzivnog mešanja (10 min, 50Hz) urađena je serija razblaženja kao u uzorcima sa slobodnim ćelijama. Tako dobijena vrednost predstavlja ukupan broj ćelija po ml fermentacionog medijuma (vrednost A, CFU/ml). Takođe, zaostala kolićina nosaća je osušena i izmerena na vagi (vrednost B).

Uporedo je, nakon kratkog mešanja, 1 ml fermentacionog medijuma sa imobilizatom aseptićno prenet u 9 ml sterilnog 0,85 % rastvora NaCl, kratko

promešan (10s, 50Hz) i urađen je dalji postupak opisan za određivanje broja slobodnih bakterija. Tako dobijena vrednost predstavlja broj slobodnih, neadsorbovanih bakterija po ml fermentacionog medijuma (vrednost C, CFU/ml).

Broj imobilisanih ćelija se dobija izračunavanjem na osnovu sledeće formule:

$$N_{\text{imob.1}} (\text{CFU/g}) = (A - C)/B$$

$$N_{\text{imob.2}} (\text{CFU/ml fermentacionog medijuma}) = A - C$$

gde je:

A - vrednost ukupnog broja ćelija po ml fermentacionog medijuma (CFU/ml)

B - masa osušenog nosača u ml fermentacionog medijuma (g)

C - vrednost broja neimobilisanih, slobodnih ćelija po ml fermentacionog medijuma (CFU/ml)

$N_{\text{imob.1}}$  - broj imobilisanih ćelija po g zeolitnog nosača

$N_{\text{imob.2}}$  - broj imobilisanih ćelija po ml fermentacionog medijuma

#### **3.2.12.4. Priprema zeolitnih molekulskih sita za imobilizaciju bakterija**

Zeolitna molekulska sita (tip 13X, sferične čestice, 8-12 mesh, Sigma Aldrich, Darmstadt, Nemačka) hemijske formule  $1 \text{ Na}_2\text{O} : 1 \text{ Al}_2\text{O}_3 : 2.8 \pm 0.2 \text{ SiO}_2 : x\text{H}_2\text{O}$  su korišćena za imobilizaciju *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 [99]. Odgovarajuća količina zeolitnih čestica je sprášena tako da je prosečna veličina 4-7 $\mu\text{m}$  (90%) sa normalnom raspodelom veličine čestica. Zeolitni prah je dva puta ispran demineralizovanom vodom i osušen. Zagrevanjem u peći na temperaturi od 250°C u trajanju od 2h, zeolitni prah je aktiviran. U toku hlađenja i do upotrebe, osušeni prah je čuvan u sterilnim Petri kutijama, u eksikatoru [167].

#### **3.2.12.5. Priprema modifikovanih zeolitnih molekulskih sita za imobilizaciju bakterija**

Zeolitna molekulska sita (tip 13X, sferične čestice, 8-12 mesh, Sigma Aldrich, Darmstadt, Nemačka) [99] su korišćena za modifikaciju i potom



imobilizaciju *Lb. rhamnosus* ATCC 7469. Odgovarajuća količina zeolitnih čestica je sprašena tako da je prosečna veličina 4-7 $\mu$ m (90%) sa normalnom raspodelom veličine čestica. Nakon ispiranja demineralizovanom vodom 10 g zeolitnog praha je prenešeno u erlenmajer sa 250 ml 1 M rastvora MgCl<sub>2</sub> u cilju izmene Na<sup>+</sup> jona u strukturi zeolita sa jonima Mg<sup>2+</sup>. Rastvori sa zeolitom su inkubirani na 30°C u toku 24 h uz mešanje (200 obrt/min). Nakon dekantovanja vodenog rastvora, zaostali modifikovani zeolitni prah je ispran demineralizovanom vodom do negativne reakcije na hloridni jon (pomoću 1% rastvora AgNO<sub>3</sub>) i osušen u sušnici na 50°C preko noći. Ovako pripremljen zeolitni prah je aktiviran u peći za žarenje na 250°C u trajanju od 2h i čuvan u eksikatoru nakon hlađenja.

### **3.2.12.6. Imobilizacija ćelija *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 na zeolitne čestice**

*Lb. rhamnosus* ATCC 7469 bakterijska kultura je gajena na 37 °C u zapremini od 200 ml MRS bujana sa koncentracijom inokuluma 10% (v/v) pod anaerobnim, statičnim uslovima uz korišćenje Anaerocult ® C kesica (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) u gas-pak sistemu. Posle 18 sati kultura je centrifugirana (10000 rpm, 5 min) i zaostala biomasa je isprana sterilnim fiziološkim rastvorom (0.85% (w/v) NaCl rastvor) i ponovo centrifugirana. Zaostala biomasa je resuspendovana u 200 ml sterilnog MRS bujona uz dodatak 2% (w/v) prethodno pripremljenog i aktiviranog zeolitnog praha. Ovako pripremljena kultura je inkubirana na 41°C, mikroaerofilno uz mešanje (90 obrt/min). Posle 16 h, kultura je centrifugirana (1000 rpm, 5 min), supernatant sa slobodnim ćelijama je odbačen, a zaostali talog *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 ćelija adsorbovanih na zeolit je ispran sa sterilnim fiziološkim rastvorom i korišćen kao inokulum za fermentaciju.

### **3.2.13. Karakterizacija džibre pre i nakon mlečno-kiselinske fermentacije sa aspekta primene u ishrani životinja**

Za karakterisanje ostataka fermentisanog medijuma nakon MKF, fermentisani medijum je centrifugiran (1000 obrt/min, 5 min) i čvrst deo je sušen u sušnici na 40°C, 24h. U ovako pripremljenim uzorcima je određen sadržaj suve

materije (Poglavlje 3.2.1.6., [164]), sadržaj proteina (Poglavlje 3.2.1.3., [164]), sadržaj masti (Poglavlje 3.2.1.4., [164]) i pepela (Poglavlje 3.2.1.5., [164]). Specifična karakterizacija sa aspekta primene u ishrani životinja je takođe izvršena. Određen je sadržaj vlakana rastvorljivih u neutralnim deterdžentima (NDF), vlakana rastvorljivih u kiselom deterdžentu (ADF) i sadržaj lignina rastvornog u kiselim deterdžentima (ADL). Na osnovu ovih parametara je izračunat sadržaj hemiceluloze i celuloze. Takođe, ispitana je i svarljivost suvog ostatka fermentacionog medijuma *in vitro* metodom sa celulazom i pepsinom.

### **3.2.13.1. Određivanje sadržaja vlakana rastvorljivih u neutralnim deterdžentima (NDF)**

U eksperimentalnom radu je korišćena metoda za određivanje sadržaja NDF vlakana u silaži i hrani za životinje Van Soest i sar. (1991) [150], modifikovana po Maters (1992) [168], a prilagođena za izvođenje aparatu za određivanje vlakana (Fibertec system Hot Extractor 2010, unit: 1010, 1021, Foss Tecator, Švedska). Rastvor neutralnog deterdženta se koristi da bi se rastvorili lakorazgradivi pektini i jedinjenja ćelijskog zida (proteini, šećeri i lipidi) tokom hidrolize, a nerazgrađeni deo predstavlja vlaknasti ostatak (NDF) koji se sastoji od komponenata ćelijskog zida uzorka biljnog porekla (celuloze, hemiceluloze i lignina). EDTA omogućava heliranje kalcijuma i uklanjanje pektina na temperaturi ključanja.

Reagensi:

Reagens 1 (R1) (pH 6,9-7,1):

30,00 g Natrijumdodecil sulfat

18,61 g Dinatrijum etilendiamintetraacetat

6,81 g Natrijum tetraborat

7,77 g Dinatrijumhidrogen fosfat

10,00 ml Metil celosol

do 1000 ml d. H<sub>2</sub>O

*Postupak pripreme reagensa R1* - Sve reagensne rastvoriti u manjoj količini destilovane vode u normalnom sudu od 1000 ml uz povremeno zagrevanje na rešou. Nakon toga normalni sud dopuniti do 1000 mLb.

Proveriti pH vrednost rastvora. Ako se pH vrednost rastvora kreće u opsegu od 6,9 do 7,1 rastvor se može koristiti, a u suprotnom pH vrednost se koriguje dodavanjem nekoliko kapi 1M hlorovodonične kiseline ili 10M natrijum hidroksida.

Dekalin

Aceton

Natrijum sulfat

*Postupak*

Masa od 1-1,5g uzorka ( $m_0$ ) se odmeri u filter lončice i potom u svaki filter lončić treba dodati 0,5g natrijum sulfata. Lončići se postave u stalak koji je pričvršćen za aparat, nivelišu se, a zatim se pažljivo prenose i postavljaju se na aparat. Nakon instaliranja na kolone za hidrolizu, dodaje se po 100ml predhodno zagrejanog rastvora (rastvor deterdženta za reagens 1 pH 6,9-7,1) i 2 ml dekalina. Pritiskom na dugme za grejač smeša u kolonama se zagreva do ključanja. Vreme ključanja treba da iznosi 60 min. Potom se pomoću vakuuma filtrira rastvor i ostatak ispere toplom vodom koja se nalazi u rezervoaru za destilovanu vodu. Viljuškom se prihvate filter lončići i oslobađaju sa kolona, postavljaju se na stalak za filter lončice, iznivelišu i pažljivo prenesu na deo aparata za hladnu filtraciju.

Lončići se isperu tri puta sa acetonom, prenesu se u Petri šolju i u sušnici prethodno zagrejanom na 105°C suše do konstantne mase, odnosno 12 časova. Osušene uzorke treba ohladiti u eksikatoru tokom 60 minuta i izmeriti na analitičkoj vagi ( $m_1$ ).

Dalje, filter lončići sa uzorkom se prenesu u peć za žarenje (na ulazni deo peći) da se zagreju, a zatim ih mašicama pomeriti u unutrašnjost peći i žariti na 500°C najmanje tri časa, da pepeo pobeli. Posle žarenja lončići se mašicama premeste ka unutrašnje delu peći za žarenje da se malo ohlade i potom se prenesu u eksikator. Nakon 60 min, ohlađeni filter lončići se izmere na analitičkoj vagi ( $m_2$ ).

Sadržaj NDF se izračunava u % polaznog uzorka prema sledećoj formuli:

$$\text{NDF (\%)} = \frac{m_2 - m_1}{m_0} \times 100,$$

gde je:

NDF (%) – sadržaj vlakana nerastvornih u neutralnom deterdžentu izražen kao udeo u uzorku, u %

$m_1$ - masa filter lončića sa uzorkom

$m_2$ - masa filter lončića sa uzorkom posle sušenja

$m_3$ - masa filter lončića sa uzorkom posle žarenja

Ukoliko se NDF izražava u % suve materije (% SM) uzorka, izračunava se prema sledećoj formuli:

$$\text{NDF (\% SM)} = \frac{\text{NDF (\%)} \times 100}{\text{SM (\%)}}$$

gde je:

NDF (%) - sadržaj vlakana nerastvorljivih u neutralnim deterdžentima izražen kao udeo u uzorku, u %

NDF (% SM) - sadržaj vlakana nerastvorljivih u neutralnim deterdžentima izražen u % suve materije

SM (%) – procenat suve materije u uzorku

Ukoliko se rezultat NDF izražava u g kg<sup>-1</sup> SM, vrednost se preračunava po formuli:

$$\text{NDF (g kg}^{-1}\text{ SM)} = \text{NDF (\% SM)} \times 10$$

### **3.2.13.2. Određivanje sadržaja vlakana nerastvorljivih u kiselim deterdžentima (ADF)**

Preduslov za određivanje sadržaja nerastvornih vlakana u kiselim deterdžentima (ADF) je prethodno uklanjanje proteina, skroba, masti i svarljivih ugljenih hidrata. U ovoj disertaciji je korišćena metoda Van Soest i sar. (1970) modifikovana prema Mertens (1992) prilagođena za izvođenje na aparatu za određivanje vlakana (Fibertec system Hot Extractor 2010, unit: 1010, 1021, Foss Tecator, Švedska)[151, 169, 168].

Reagensi:

Dekalin

Aceton

Reagens 2 (R2):

55,72 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, conc.

200,00 ml Cetil trimetilamonijum bromid

do 2000,00 ml d. H<sub>2</sub>O

### *Postupak*

Masa od 1-1,5g uzorka se odmeri u filter lončice ( $m_0$ ) koji se potom postave u stalak koji je pričvršćen za aparat, nivelišu se, a zatim se pažljivo prenose i postavljaju u aparat. Lončići se instaliraju u kolonu za hidrolizu i nakon preliivanja sa 100ml prethodno zagrejanog rastvora detergenta (reagens R<sub>2</sub>) i dodatka 2 ml dekalina uzorci se zagrevaju do ključanja u aparatu. Uzorci se izlažu temperaturi ključanja u trajanju od 60 min. Nakon Potom se pomoću vakuuma filtrira rastvor i ostatak ispere toplom vodom koja se nalazi u rezervoaru za destilovanu vodu. Viljuškom se prihvate filter lončići i oslobađaju sa kolona, postavljaju se na stalak za filter lončice, iznivelišu i pažljivo prenesu na deo aparata za hladnu filtraciju.

Nakon toga, lončići se isperu tri puta sa acetonom, prenesu se u Petri šolju i u sušnici prethodno zagrejanom na 105°C suše do konstantne mase, odnosno 8 sati. Osušene uzorke treba ohladiti u eksikatoru tokom 60 minuta i izmeriti na analitičkoj vagi ( $m_1$ ).

Dalje, filter lončići sa uzorkom se prenesu u peć za žarenje (na ulazni deo peći) da se zagreju, a zatim ih mašicama pomeriti u unutrašnjost peći i žariti na 500°C najmanje tri časa, da pepeo pobeli. Posle žarenja lončići se mašicama premeste ka unutrašnje delu peći za žarenje da se malo ohlade i potom se prenesu u eksikator. Nakon 60 min, ohlađeni filter lončići se izmere na analitičkoj vagi ( $m_2$ ). Analiza se radi u dve paralelne probe, a dozvoljena razlika između dve paralelne probe je 1%.

Sadržaj ADF-a na 100 g polaznog uzorka se izračunava po sledećoj formuli;

$$\text{ADF (\%)} = \frac{(m_1 - m_2) \times 100}{m_0},$$

gde je:

ADF (%) - sadržaj vlakana nerastvorljivih u kiselim deterdžentima izražen u %

$m_1$  - masa filter lončića sa osušenim talogom (g)

$m_2$  - masa filter lončića sa izarenim talogom (g)

$m_0$  - masa odmerenog uzorka (g)

Ukoliko se ADF izražava u % suve materije (% SM) uzorka, izračunava se prema sledećoj formuli:

$$\text{ADF (\% SM)} = \frac{\text{ADF (\%)} \times 100}{\% \text{ SM}},$$

gde je:

ADF (% SM) - sadržaj vlakana nerastvorljivih u kiselim deterdžentima izražen u % suve materije

ADF (%) - sadržaj vlakana nerastvorljivih u kiselim deterdžentima izražen kao udeo u uzorku, u %

SM (%) - procenat suve materije u uzorku

Ukoliko se sadržaj ADF izražava u g kg<sup>-1</sup> SM, vrednost se preračunava po formuli:

$$\text{ADF (g kg}^{-1}\text{ SM)} = \text{ADF (\% SM)} \times 10$$

### **3.2.13.3. Određivanje sadržaja lignina nerastvornog u kiselim deterdžentima (ADL)**

Da bi se odredio sadržaj ADL-a u uzorku neophodno je prvo, putem hidrolize, odstraniti prisutne proteine, skrob, masti i svarljive ugljene hidrate. U ovoj disertaciji je korišćena metoda Van Soest i sar. (1963) modifikovana prema AOAC metodologiji (1990) i prilagođena za izvođenje na aparatu za određivanje sadržaja vlakana (Fibertec system Hot Extractor 2010, unit: 1010, 1021, Foss Tecator, Švedska) [170, 171].

Reagensi:

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, conc.

Cetil trimetilamonijum bromid

Aceton

Dekalin

Aceton

Reagens 2 (R2):

55,72 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, conc.

200,00 ml Cetil trimetilamonijum bromid

do 2000,00 ml d. H<sub>2</sub>O

### *Postupak*

Masa od 1-1,5g uzorka ( $m_0$ ) se odmeri u filter lončice koji se potom postave u stalak koji je pričvršćen za aparat, nivelišu se, a zatim se pažljivo prenose i postavljaju u aparat. Lončići se instaliraju u kolonu za hidrolizu i nakon preliivanja sa 100ml prethodno zagrejanog rastvora detergenta (reagens R<sub>2</sub>) i dodatka 2 ml dekalina uzorci se zagrevaju do ključanja u aparatu. Uzorci se izlažu temperaturi ključanja u trajanju od 60 min. Potom se vrši vakuum filtracija i ostatak ispere toplom vodom koja se nalazi u rezervoaru za destilovanu vodu. Viljuškom se prihvate filter lončići i oslobađaju sa kolona, postavljaju se na stalak za filter lončice, iznivelišu i pažljivo prenesu na deo aparata za hladnu filtraciju.

Nakon toga, lončići se isperu tri puta sa acetonom, prenesu se u Petri šolju i u sušnici prethodno zagrejanog na 105°C suše do konstantne mase, odnosno 8 sati. Osušene uzorke treba ohladiti u eksikatoru tokom 60 minuta.

Dalje, filter lončići sa uzorkom se prenesu u peć za žarenje (na ulazni deo peći) da se zagreju, a zatim ih mašicama pomeriti u unutrašnjost peći i žariti na 500°C najmanje tri časa, da pepeo pobeli. Posle žarenja lončići se mašicama premeste ka unutrašnje delu peći za žarenje da se malo ohlade i potom se prenesu u eksikator.

Nakon 60 min, u ohlađene filter lončići se sipa 72% sumporna kiselina (potopi se uzorak) i ostave se tri sata da stoje uz povremeno mešanje staklenim štapićem. Filter lončice treba ispirati najmanje tri puta hladnom destilovanom

vodom uz mešanje staklenim štapićem. Špric bocom se ispere ostatak uzorka sa zidova filter lončića i staklenog štapića. Lončići se prenesu u Petri šolju i suše u sušnici na 105°C do konstantne mase (8 časova). Osušeni uzorci se prenesu u eksikator i hlade 60 minuta, pa se potom izmere na analitičkoj vagi ( $m_1$ ).

Dalje, filter lončići sa uzorkom se prenesu u peć za žarenje (na ulazni deo peći) da se zagreju, a zatim ih mašicama pomeriti u unutrašnjost peći i žariti na 500°C najmanje tri časa, da pepeo pobeli. Posle žarenja lončići se mašicama premeste ka unutrašnje delu peći za žarenje da se malo ohlade i potom se prenesu u eksikator. Nakon 60 min, ohlađeni filter lončići se izmere na analitičkoj vagi ( $m_2$ ). Analiza se radi u dve paralelne probe, a dozvoljena razlika između dve paralelne probe je 1%.

Sadržaj ADL (%) računa se po sledećoj formuli:

$$ADL (\%) = \frac{(m_1 - m_2) \times 100}{m_0}$$

gde je:

ADL – sadržaj lignina nerastvornog u kiselinama (%)

$m_1$  - masa filter lončića sa uzorkom posle sušenja (g)

$m_2$  - masa filter lončića sa uzorkom posle žarenja (g)

$m_0$  - masa odmerenog uzorka (g)

Ukoliko se ADL izražava u % suve materije (% SM) uzorka, izračunava se prema sledećoj formuli:

$$ADL (\% SM) = \frac{ADL (\%) \times 100}{\% SM},$$

gde je:

ADL (%) - sadržaj lignina nerastvorljiv u kiselim deterdžentima izražen kao udeo u uzorku, u %

ADL (% SM) - sadržaj lignina nerastvorljiv u kiselim deterdžentima izražen u % suve materije

SM (%) – procenat suve materije u uzorku (%)

Ukoliko se rezultat NDF izražava u g kg<sup>-1</sup> SM, vrednost se preračunava po formuli:



$$\text{ADL (g kg}^{-1}\text{ SM)} = \text{ADL (\% SM)} \times 10$$

#### **3.2.13.4. Izračunavanje ostalih parametara za procenu kvaliteta stočne hrane [150]**

##### *Sadržaj celuloze, hemiceluloze i sirovih vlakana*

Sadržaj celuloze ( $S_{\text{celuloze}}$ ) i hemiceluloze ( $S_{\text{hemiceluloze}}$ ) se procenjuje na osnovu prethodno određenih vrednosti ADL (Poglavlje 3.2.9.3.), ADF (Poglavlje 3.2.9.2.) i NDF (Poglavlje 3.2.9.1.), a koristeći sledeće formule:

$$S_{\text{celuloze}} (\%) = \text{ADF} (\%) - \text{ADL} (\%),$$

$$S_{\text{hemiceluloze}} (\%) = \text{NDF} (\%) - \text{ADF} (\%),$$

gde su:

ADF – sadržaj vlakana nerastvornih u kiselim deterdžentima izražen kao udeo u uzorku, u %

NDF – sadržaj vlakana nerastvornih u neutralnim deterdžentima izražen kao udeo u uzorku, u %

ADL - sadržaj lignina nerastvornog u kiselim deterdžentima izražen kao udeo u uzorku, u %

$S_{\text{celuloze}}$  - sadržaj celuloze izražen kao udeo u uzorku, u %

$S_{\text{hemiceluloze}}$  - sadržaj hemiceluloze izražen kao udeo u uzorku, u %

Kako 97% sadržaja sirovih vlakana čine celuloza i lignin [248, 249], za procenu sadržaja sirovih vlakana može koristiti sledeći obrazac:

$$S_{\text{sir.vlakana}} (\%) = (S_{\text{celuloze}} (\%) + \text{ADL} (\%)) \times 1,031,$$

gde je:

$S_{\text{celuloze}}$  - sadržaj celuloze izražen kao udeo u uzorku, u %

ADL - sadržaj lignina nerastvornog u kiselim deterdžentima izražen kao udeo u uzorku, u %

$S_{\text{sir.vlakana}}$  – sadržaj sirovih vlakana izražen kao udeo u uzorku, u %

Ukoliko se  $S_{\text{sir.vlakana}}$  izražava u % suve materije (% SM) uzorka, izračunava se prema sledećoj formuli:

$$S_{\text{sir.vlakana}} (\% \text{ SM}) = \frac{S_{\text{sir.vlakana}}(\%) \times 100}{\% \text{ SM}},$$

gde je:

$S_{\text{sir.vlakana}} (\%)$  - sadržaj sirovih vlakana izražen kao udeo u uzorku, u %

$S_{\text{sir.vlakana}} (\% \text{ SM})$  - sadržaj sirovih vlakana izražen u % suve materije

SM (%) – procenat suve materije u uzorku

Ukoliko se rezultat  $S_{\text{sir.vlakana}}$  izražava u  $\text{g kg}^{-1}$  SM, vrednost se preračunava po formuli:

$$S_{\text{sir.vlakana}} (\text{g kg}^{-1} \text{ SM}) = S_{\text{sir.vlakana}} (\% \text{ SM}) \times 10.$$

#### *Sadržaj bezazotnog ekstrakta (NFE)*

Bezazotni ekstrakt (NFE) predstavlja lako asimilativnu frakciju ugljenih hidrata iz stočne hrane i izračunava se na osnovu određenog sadržaja proteina, masti, pepela i sirovih vlakana. NFE predstavlja preostali deo suve materije stočne hrane prema formuli:

$$\text{NFE (g kg}^{-1} \text{ SM)} = 1000 - (S_{\text{pepela}}(\text{g kg}^{-1} \text{ SM}) + S_{\text{proteina}}(\text{g kg}^{-1} \text{ SM}) + S_{\text{masti}}(\text{g kg}^{-1} \text{ SM}) + S_{\text{sir.vlakana}}(\text{g kg}^{-1} \text{ SM})),$$

#### *Sadržaj svarljive energije (DE)*

Sadržaj svarljive energije (DE) se takođe računa na osnovu prethodno određenih sadržaja pepela, proteina, masti i procenjenog sadržaja sirovih vlakana, prema formuli:

$$\text{DE (kcal kg}^{-1}) = 4151 - (122 \times S_{\text{pepela}}(\%)) + (23 \times S_{\text{proteina}}(\%)) + (38 \times S_{\text{masti}}(\%)) - (64 \times S_{\text{sir.vlakana}}(\%))$$

### *Sadržaj metaboličke energije (ME)*

Sadržaj metaboličke energije (DE) se takođe računa na osnovu prethodno određenog sadržaja proteina, prema formuli:

$$ME(\text{kcal kg}^{-1}) = DE \times \{1,003 - [0,0021 \times S_{\text{proteina}} (\%)]\}$$

### **3.2.13.5. Određivanje svarljivosti suve i organske materije pepsin-celulaznom metodom [172]**

#### *Reagensi:*

Hlorovodonična kiselina (0,1 M HCl)

0,1 % rastvor pepsina:

2 g pepsina (Merck® 2000 FIP  $\mu\text{g}^{-1}$ )

1000 ml 0,1 M HCl

Acetatni pufer pH=4,8 :

6,8 g Natrijum acetat ( $\text{NaCH}_3\text{COO} \times 3\text{H}_2\text{O}$ )

do 1000 ml d.  $\text{H}_2\text{O}$

*Postupak pripreme.* U odmerenu masu 6,8 g natrijum acetat dodati destilovanu vodu i podesiti pH=4,8 dodatkom koncentrovane sirćetne kiseline. Dopuniti destilovanom vodom do 1000 mLb.

Rastvor celulaze:

1 g celulaze "ONOUKA R 10" (Merck®)

1000 ml acetatnog pufera pH=4,8

#### *Postupak*

Nakon mlevenja uzorka u mlinu sa sitom promera otvora 0,8-1mm, odredjen je sadržaj suve materije (Poglavlje ). Nakon žarenja filter lončića 3h na 500°C i hlađenja u eksikatoru, svaki filter lončić se izmeri na analitičkoj vagi, sa tačnošću na četiri decimale ( $m_0$ ) i u svaki se doda 0,5 g uzorka. Nakon zatvaranja

dna lončića silikonskim čepom, u svaki lončić je dodato 50 ml rastvora pepsina koji je prethodno zagrejan u vodenom kupatilu na  $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Nakon zatvaranja gornje strane filter lončića silikonskim zatvoričama, uzorci se inkubiraju na  $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  tokom 24 h. Lončići se promućkaju nakon 1h, 6h i 22h inkubacije. Po isteku 24h, filter lončiće treba staviti 30min u sušnicu koja je zagrejana na  $80^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , da bi se hidrolizovao skrob iz uzorka. Nakon sušenja i skidanja gornjih zapušača, pažljivo se skidaju donji čepovi i uzroci se stavljaju na vakuum filtriranje. Zaostali talog se ispita tri puta sa po 80 ml destilovane vode zagrejane na  $80^{\circ}\text{C}$  (neophodno je da filtrat pri ispiranju bude bistar).

Potom se lončići ponovo zatvore sa donje strane i u svaki se ulije 50 ml sveže pripremljenog rastvora celulaze zagrejanog u vodenom kupatilu na  $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Nakon zatvaranja gornje strane filter lončića silikonskim zatvoričama, uzorci se inkubiraju na  $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  tokom 24 h. Lončići se promućkaju nakon 1h, 6h i 22h inkubacije. Po isteku 24h inkubacije i skidanja gornjih zapušača, pažljivo se skidaju donji čepovi i uzroci se stavljaju na vakuum filtriranje. Zaostali talog se ispira tri puta sa po 80 ml destilovane vode zagrejane na  $80^{\circ}\text{C}$  (neophodno je da filtrat pri ispiranju bude bistar). Filter lončići sa zaostalim talogom se prenose u sušnicu prethodno zagrejanu na  $103^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  i suše se 48 h. Nakon hlađenja u eksikatoru, filter lončići se izmere na analitičkoj vagi, sa tačnošću na 4 decimale ( $m_1$ ). Dozvoljeno je odstupanje između dve paralelene probe je  $\pm 1\%$ . U slučaju većeg odstupanja, analizu treba ponoviti.

$$S_{SM} = \frac{SM - (m_1 - m_0)}{SM} \times 100,$$

gde je:

$m_0$  – masa praznog filter lončića (g)

$m_1$  – masa praznog filter lončića + talog (suva materija) (g)

SM – sadržaj suve materije u uzorku (g)

$S_{SM}$  – svarljivost suve materije određena pomoću celulaze (%)

### **3.2.14. Ispitivanje probiotskih karakteristika *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 in vitro**

Funkcionalna probiotska svojstva *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 su ispitana kroz seriju testova:

- 1) Preživljavanje u uslovima pH vrednosti 2,5 i u prisustvu 0,3% žučnih soli.
- 2) Antimikrobno dejstvo na odabrane enteropatogene
- 3) Ispitivanje proizvodnje egzopolisaharida
- 4) Ispitivanje rezistencije na različite antibiotike

#### **3.2.14.1. Preživljavanje *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 pri niskoj pH vrednosti medijuma i u prisustvu goveđe žuči**

U ispitivanju preživljavanja probiotskih bakterija u simuliranim uslovima u želucu korišćena je delimično modifikovana metoda Prasad i sar. (1998) [173]. U uzorku u kome je ispitivan uticaj kisele sredine na preživljavanje bakterija, u MRS bujonu je pH korigovan sa vrednosti 5,7-6,6 na 2,5. Korekcija pH MRS bujona vršena je dodavanjem 2M rastvora HCl i nakon provere pH metrom je ovako preipremljena podloga sterilisana u autoklavu. U uzorku u kome je ispitivan uticaj prisustva žučnih soli na preživljavanje bakterija, u prethodno sterilisan MRS bujon je dodat sterilni 10% (w/v) rastvor goveđe žuči, tako da konačna koncentracija goveđe žuči u medijumu bude 0,3% (w/v). pH vrednost u ovim uzorcima je bila u opsegu 5,6 do 6,2. Kao kontrolni uzorak je korišćen sterilni rastvor MRS bujona pH vrednosti od 5,7-6,5. Za zasejavanje je korišćeno 2% (v/v) prekonoćne kulture *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 u MRS bujonu, što je odgovaralo početnom broju bakterija u kontrolnom uzorku od oko  $10^7$  CFU ml<sup>-1</sup>.

Promena broja bakterija u svim uzorcima je praćena nakon 1h, 2h, 3h i 4h, što odgovara maksimalnom zadržavanju hrane u želucu. Broj ćelija u svakom od uzoraka je određivan nakon serije razblaženja u fiziološkom rastvoru Kohovom metodom na agarnim pločama (postupak opisan u Poglavlju 3.2.6.). Petri šolje su inkubirane 48h u termostatu na 37°C, nakon čega su brojane izrasle kolonije.

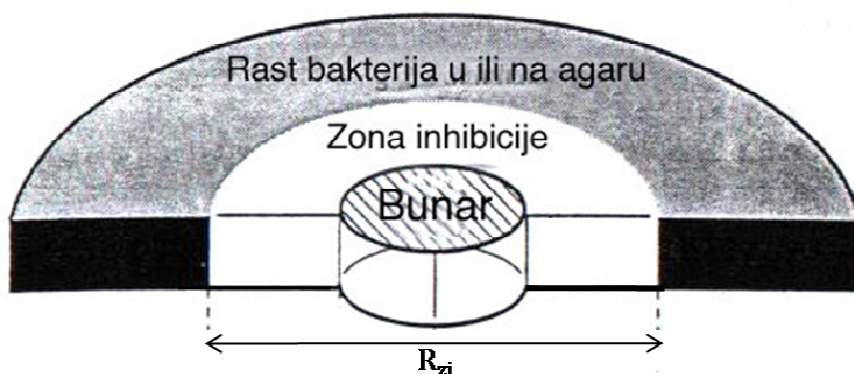
### 3.2.14.2. Antimikrobna aktivnost *Lb. rhamnosus* ATCC 7469

Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 korišćena je agar difuziona metoda. Na Petri šolje sa MRS agarom postavljani su plastični bunarići, prečnika 5mm, nakon čega je nanet rastopljen sloj odgovarajućeg hranljivog top agara koji sadrži patogeni test mikroorganizam na koji se ispituje antimikrobna aktivnost (Tabela 3.4.).

Tabela 3.4. Test mikroorganizmi korišćeni za ispitivanje antimikrobnog dejstva *Lb. rhamnosus* ATCC 7469

Test mikroorganizmi	Kolekcija
<i>Staphilococcus aureus</i> ATCC-25923	American Type Culture Collection, (Laboratorija za mikrobiologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerzitet u Beogradu)
<i>Sallmonela enteroides</i> ATCC-13076	American Type Culture Collection, (Laboratorija za mikrobiologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerzitet u Beogradu)
<i>Shiegella sonnei</i>	Laboratorija za mikrobiologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerzitet u Beogradu
<i>Listeria innocua</i>	Laboratorija za mikrobiologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerzitet u Beogradu

Nakon očvršćavanja top agara plastični bunarići su izvađeni i u formirane otvore dodato je po 100 µl prekonocne kulture *Lb. rhamnosus* ATCC 7469. U cilju ispitivanja hemijske prirode prisutne antimikrobne supstance na rub svakog bunarića stavljan je kristal pronaze E (Calbiochem-Behring Corp.). Ukoliko je proizvedena supstanca proteinske prirode (bakteriocini) na zoni inhibicije će se uočiti polumesečasta zona usled razgradnje antimikrobnih supstanci proteinske prirode pod dejstvom proteinaze. Petri šolje su inkubirane preko noći na 37° C. Pojava svetle zone (halo) oko bunarića pokazuje da odgovarajuća bakterija ima antimikrobnu aktivnost prema test mikroorganizmu. Grafički prikaz agar difuzione metode je dat na Slici 3.5.



Slika 3.5. Šematski prikaz agar difuzione metode

Merenjem prečnika zone inhibicije se kvantifikuje osetljivost različitih test mikroorganizama na prisustvo *Lb. rhamnosus* ATCC 7469.

### 3.2.14.3. Proizvodnja egzopolisaharida *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 na različitim izvorima ugljenika

Za evaluaciju sposobnosti *Lb. rhamnosus* da proizvode egzopolisaharide na različitim izvorima ugljenika pripremljeno je po 20 ml MRS agara od komponenata (pepton-4 10 g L<sup>-1</sup>; mesni ekstrakt 4 g L<sup>-1</sup>; ekstrakt kvasca 4 g L<sup>-1</sup>, kalijum hidrogenfosfat 2 g L<sup>-1</sup>; natrijum acetat 5 g L<sup>-1</sup>; magnezijum sulfat 0,2 g L<sup>-1</sup> i mangan sulfat 0,04 g L<sup>-1</sup>, di-amonijum hidrogen citrat 2,0 g L<sup>-1</sup>, Tween 80 1,0 g L<sup>-1</sup>, agar 18,0 g L<sup>-1</sup>) uz dodatak odgovarajućeg šećera u koncentraciji od 2% (w/v). Ispitano je šest različitih šećera: glukoza, fruktoza, laktoza, galaktoza, saharoza i maltoza.

Po 20ml MRS agara sa svakim šećerom je razliveno u posebnu Petri kutiju. Nakon očvršavanja agara, Petri kutije su inkubirane 24h na 30°C da bi se prosušila površina agara. Potom je bakteriološko ezom tehnikom iscrpljivanja (strikovanjem) nanešena prekonoćna kultura *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 na svaku agarnu ploču. Tako pripremljen uzorak je ostavljen 48h u termostatu na 37°C i dobijene Petri kutije sa izraslim bakterijama i produkovanim egzopolisaharidima u formi bele, sluzave, tegljive mase na površini agarne ploče su fotografisani. Vizuelno je upoređen intenzitet proizvodnje egzopolisaharida na različitim šećerima.

### 3.2.14.4. Antibiogram test *Lb. rhamnosus* ATCC 7469

Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 korišćena je modifikovana agar difuziona metoda. Na Petri šolje je nanet sloj rastečnjelog top MRS top agara (0,7% agara) i zasejan sa 2% prekonoćne kulture *Lb. rhamnosus* ATCC. Nakon očvršćavanja top agara u Petri kutijama, na površinu su postavljene test tablete antibiotika za antibiogram test (Torlak, Beograd), prečnika 5mm. Ovako pripremljeni uzorci su inkubirani 24h na 37°C, nakon čega je meren prečnik zone inhibicije rasta oko svake od tableta test antibiotika. Prisustvo zone inhbicije rasta označava osetljivost *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 na odgovarajući antibiotik. Za kvantifikaciju osetljivosti korišćena je vrednost prečnika zone inhibicije rasta i u Tabeli 3.5. su dati kriterijumi za procenu osetljivosti.

Tabela 3.5. Kriterijumi za procenu osetljivosti mikroorganizma na različite antibiotike

Test antibiotik	Sadržaj antibiotika u test tableti	Prečnik zone inhibicije, R <sub>zi</sub> (mm)		
		S	I	R
Tetraciklin	30 µg	≥ 26	23 - 25	≤ 22
Ampicilin	30 µg	≥ 26	23 - 25	≤ 22
Streptomycin	30 µg	≥ 26	23 - 25	≤ 22
Kanamycin	30 µg	≥ 26	23 - 25	≤ 22
Hloramfenikol	30 µg	≥ 26	23 - 25	≤ 22
Penicilin	10 IU	≥ 26	23 - 25	≤ 22
Eritromicin	15 µg	≥ 26	23 - 25	≤ 22
Gentamicin	15 µg	≥ 26	23 - 25	≤ 22
Vankomicin	30 µg	≥ 12	10 - 11	≤ 9
Nalidiksična kiselina	30 µg	≥ 26	23 - 25	≤ 22

Merenjem prečnika zone inhibicije i upoređivanjem sa vrednostima datim u tabeli 3.5. utvrđeni su antibiotici koji deluju na *Lb. rhamnosus* ATCC 7469, kao i oni na koje je odabrani soj rezistentan.



### **3.3. Statistička obrada eksperimentalnih rezultata**

Sva ispitivanja su vršena u triplikatu. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti  $\pm$  standardan devijacija svakog merenja. Analiza varijanse je korišćena prikom analize rezultata u cilju procene statističkog značaja rezultata. U zavisnosti od broja parametara čiji je uticaj ispitivan za poređenje aritmetičkih sredina je korišćena jednostruka ili dvostruka analiza varijanse sa naknadnim Tukey testom. Razlike su smatrate značajnim ukoliko je p vrednost bila manja od 0,05.

## 4. REZULTATI I DISKUSIJA

### 4.1. Hemijska karakterizacija džibre kao sirovine za proizvodnju mlečne kiseline i bakterijske biomase

Za fermentacione procese sa BMK veoma je bitan hemijski sastav podloge, zbog izrazitih nutritivnih potreba BMK prvenstveno u pogledu izvora azota. Džibra kao otpadna sirovina ima promenljiv hemijski sastav što se može odraziti značajno na procesne parametre kao što su prinos i produktivnost. U tabeli 4.1. je prikazan hemijski sastav destilerijske džibre iz industrijske proizvodnje bioetanol na otpadnom hlebu, a u tabeli 4.2. sastav tečnog dela džibre.

Tabela 4.1. Hemijski sastav destilerijske džibre

Hemijski sastav džibre	Sadržaj
Ukupni redukujući šećeri (% sm)	9,74 ± 0,04
Proteini (% sm)	58,50 ± 0,12
Masti (% sm)	8,49 ± 0,12
Pepeo (% sm)	21,47 ± 0,20
Suva materija (%)	11,55 ± 0,30

Nizak sadržaj redukujućih šećera u džibri je očekivan zbog efikasne prethodne alkoholne fermentacije u proizvodnji bioetanol. Zato je neophodno obogatiti medijum glukozom kao izvorom ugljenika za mlečno-kiselinsku fermentaciju.

Tabela 4.2. Hemijski sastav tečne destilerijske džibre

Hemijski sastav tečne džibre	Sadržaj
Ukupni redukujući šećeri (% sm)	24,30 ± 0,05
Proteini (% sm)	43,75 ± 0,10
Masti (% sm)	11,42 ± 0,09
Pepeo (% sm)	14,49 ± 0,08
Suva materija (%)	4,80 ± 0,04

Visok sadržaj proteina, računato na suhu materiju je prisutan i u tečnoj frakciji (43,75% sm) i u ukupnoj džibri (58,50% sm). Ukoliko se upoređi sadržaj

proteina u džibri iz proizvodnje bioetanol na otpadnom hlebu sa sadržajem proteina u komercijalnoj podlozi za gajenje *Lactobacillus* sp. (MRS bujon, Torlak, Srbija), gde je sadržaj proteina oko 44,8 % sm [174], zaključuje se da je džibra veoma bogata azotnim materijama i da bi mogla biti veoma dobar supstrat za mlečno-kiselinsku fermentaciju. Iako se sastav džibre menja u zavisnosti od upotrebljene sirovine i tipa procesa proizvodnje bioetanol, sadržaj najvažnijih grupa jedinjenja (proteina, masti, šećera...) je uglavnom sličan [52,53] (Tabela 2.3.). Takođe, zbog prethodne alkoholne fermentacije pomoću kvasca, može se očekivati da u ukupnom sadržaju proteina prisutnih u džibri učestvuju značajno ostaci ćelija kvasca koji ima pozitivno dejstvo na rast BMK. Industrijski se u mlečno-kiselinskim fermentacijama najčešće dodaje upravo ekstrakt kvasca kao izvor azota i vitamina B grupe, ali se zbog njegove visoke cene danas istražuju alternativni izvori azota [58]. Zbog značaja mineralnih materija za rast i produktivnost BMK, u tabeli 4.3. je predstavljen sadržaj različitih metala rastvorenih u tečnoj džibri i uticaj ispitanih metala na rast BMK.

Tabela 4.3. Sadržaj metala u tečnoj džibri i optimalne vrednosti za rast BMK

Metali u tečnoj džibri	Koncentracija metala u tečnoj džibri (mg L <sup>-1</sup> )	Optimalna koncentracija metala za rast BMK (mg L <sup>-1</sup> ) <sup>a,b</sup>	Efekat metala na proizvodnju mlečne kiseline i rast BMK <sup>a</sup>
Mg	155,00 ± 0,01	480-972	stimulativno
Mn	1,34 ± 0,01	≤ 110	stimulativno
Ca	210,55 ± 0,03	≤ 8000	stimulativno
Fe	3,02 ± 0,04	≤ 4	stimulativno
Zn	3,78 ± 0,01	< 20	stimulativno
Na	398,02 ± 0,01	≤ 4000	bez efekta
Cu	0,22 ± 0,05	< 19	bez efekta
Co	0,06 ± 0,03		bez efekta

<sup>a</sup> [175]; <sup>b</sup> [176]

Važni metali su u ispitivanoj džibri prisutni u optimalnim koncentracijama, izuzev Mg, čija je koncentracija manja od optimalne. Kao supstrat za mlečno-kiselinsku fermentaciju ispitivane su destilerijska džibra i njena tečna frakcija. Pošto se čvrsta frakcija džibre koristi kao stočna hrana, ispitivana je mogućnost

iskorišćenja zaostale tečne frakcije kao supstrata za mlečno-kiselinsku fermentaciju. Sa druge strane, ukupna džibra ima veći sadržaj suve materije i veći udeo azotnih materija u odnosu na samo tečnu frakciju, pa se očekuje da bude pogodnija kao supstrat za fermentaciju. Nakon fermentacije zaostali čvrsti deo fermentisane džibre bi se takođe mogao koristiti kao vredna stočna hrana obogaćena bakterijama mlečne kiseline.

#### 4.2. Selekcija *Lactobacillus* sp. za proizvodnju mlečne kiseline i bakterijske biomase na tečnoj destilerijskoj džibri

Za proizvodnju mlečne kiseline i biomase BMK ispitivane su četiri *Lactobacillus* vrste: *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* NRRL B-4564, *Lb. casei* ssp. *casei* NRRL B-441, *Lb. pentosus* NRRL-227 i *Lb. rhamnosus* ATCC 7469. Pri mikroaerofilnim, statičnim uslovima i na preporučenim temperaturama navedeni sojevi su korišćeni za mlečno-kiselinsku fermentaciju na tečnoj frakciji hlebne džibre, sa početnom koncentracijom glukoze podešenom na 25-30 g L<sup>-1</sup> u toku 72h. Važni procesni parametri: koncentracija mlečne kiseline (c<sub>mk</sub>), prinos mlečne kiseline (Y<sub>mk</sub>), zapreminska produktivnost (Q<sub>v</sub>) i ukupan broj ćelija (N) postignuti na tečnoj frakciji džibre su prikazani u tabeli 4.4.

Table 4.4. Parametri mlečno-kiselinske fermentacije na tečnoj destilerijskoj hleboj džibri sa različitim *Lactobacillus* sp. Uslovi eksperimenta: anaerobno, statično, šaržna fermentacija (72h), početna koncentracija šećera oko 25 g L<sup>-1</sup>, temperatura T=30°C (za *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 je T=37°C)

	c <sub>mk</sub> (g L <sup>-1</sup> )	N (CFU ml <sup>-1</sup> )	Y <sub>mk</sub> (g g <sup>-1</sup> )	Q <sub>v</sub> (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 7469	20,2	8,2×10 <sup>8</sup>	0,81	0,28
<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> NRRL B- 4564	16,6	7,0×10 <sup>7</sup>	0,66	0,23
<i>Lb. casei</i> ssp. <i>casei</i> NRRL B-441	13,7	1,0×10 <sup>8</sup>	0,55	0,19
<i>Lb. pentosus</i> NRRL- 227	10,1	2,1×10 <sup>8</sup>	0,40	0,14

Iz tabele 4.4. se uočava da su najbolji prinosi postignuti u fermentaciji sa *Lb. rhamnosus* i *Lb. paracasei* ssp. *paracasei*. Takođe, prinosi mlečne kiseline su najviši

sa ova dva soja, što je važan parametar sa aspekta ekonomike procesa. Vrednosti zapreminske produktivnosti su male, budući da ostali procesni parametri nisu optimizovani (temperatura, mešanje, koncentracija inokuluma itd.). Takođe, dugo vreme fermentacije (72h) značajno utiče na krajnju vrednost produktivnosti (Poglavlje 3.2.12.). Razlike u produktivnostima postignutim u procesima sa različitim vrstama *Lactobacillus* sp. su takođe male, što je takođe rezultat dugog vremena fermentacije i neoptimizovanih uslova.

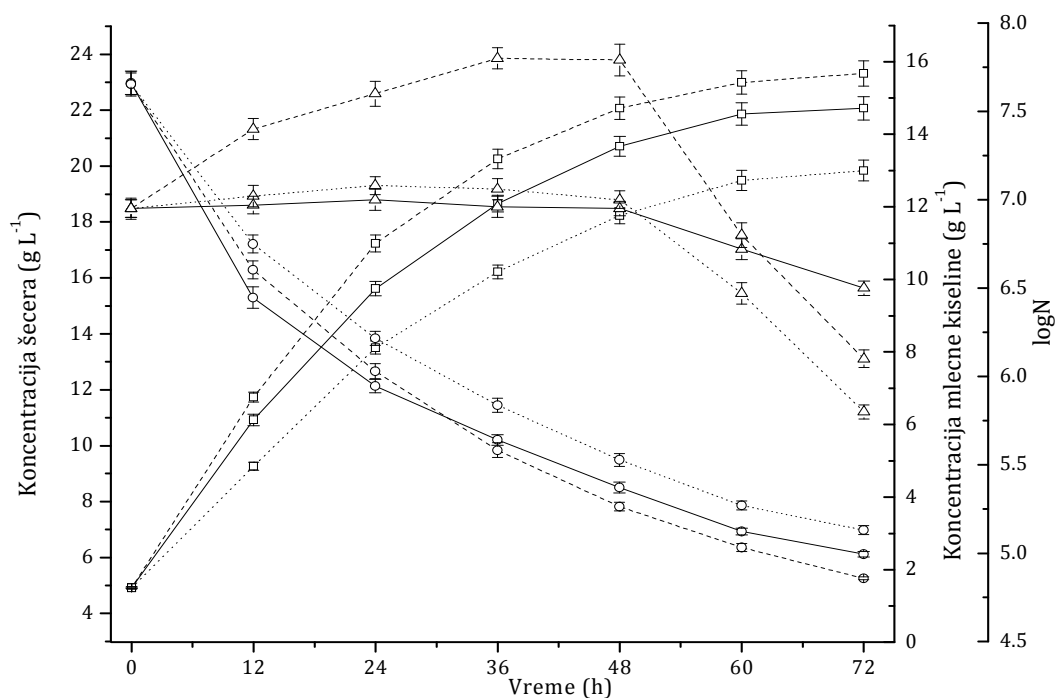
*Lb. paracasei* ssp. *paracasei* B-4564 i *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 su fakultativno heterofermentativne BMK [177]. U fermentaciji na hlebnoj džibri pomoću *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 potvrđeno je enzimskim testom (L(+)/D(-) lactate enzymatic assay, Megazyme®, Ireland) da je 99,7% proizvedene mlečne kiseline L(+) oblika. U fermentaciji na hlebnoj džibri pomoću *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* B-4564 manji procenat, 72,15%, proizvedene mlečne kiseline je L(+) oblika. L(+) oblik mlečne kiseline je pogodan stereoizomer za najzastupljenije područje primene mlečne kiseline, za farmaceutsku i prehrambenu industriju. L-laktat-dehidrogenaza je dominantan enzim u metabolizmu mlečne kiseline kod ljudi, pa je poželjno koristiti selektivne producente L(+) mlečne kiseline [178]. Takođe, stereoselektivnost je jedna od osnovnih prednosti fermentacione proizvodnje, tako da je sa aspekta industrijske primene povoljnije odabrati soj *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 kao proizvodni mikroorganizam. Kako je jedan od ciljeva rada zaostalu biomasu BMK koristiti nakon fermentacije u ishrani životinja važna su potencijalna probiotska svojstva proizvodnog mikroorganizma. Tuomola i Salminen (1998) su potvrdili *in vitro* sposobnost adhezije *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 za mukozni epitel intestinalnog trakta, što je jedna od važnih karakteristika potencijalnih probiotika, budući da adhezivnost omogućava zadržavanje i razmnožavanje u crevima [179].

Stoga je za dalji eksperimentalni rad izabran soj *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 kao proizvodni mikroorganizam.

### **4.3. Ispitivanje uticaja različitih faktora na mlečno-kiselinsku fermentaciju tečne hlebne destilerijske džibre**

#### **4.3.1. Uticaj temperature na proizvodnju mlečne kiseline i bakterijske biomase na tečnoj destilerijskoj džibri**

Na slici 4.1. je prikazana promena broja živih ćelija, koncentracije šećera i mlečne kiseline u statičnim, mikroaerofilnim uslovima na različitim temperaturama: 37°C, 41°C i 45°C. Ispitivanjem međusobnog uticaja temperature i koncentracije inokuluma utvrđeno je da interakcija između ova dva parametra nije statistički značajna ( $p=0,79507>0,05$ ). Nakon 72h fermentacije na temperaturama 37°C i 41°C su postignute približno iste vrednosti koncentracije mlečne kiseline i broja ćelija. Kinetika proizvodnje mlečne kiseline i utroška šećera je približno ista za sve tri ispitivane temperature. Uočava se da na temperaturi 41°C, *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 brže raste i stvara mlečnu kiselinu. Najveća koncentracija mlečne kiseline od 15,68 g L<sup>-1</sup> je postignuta u fermentaciji na 41°C, pa je ista temperature odabrana za dalje eksperimente kao najpovoljnija. Može se uočiti sa grafika da na kraju fermentacije zaostaje određena količina šećera, od 5,23 g L<sup>-1</sup> (na 41 °C) do 6,98 g L<sup>-1</sup> (na 45°C). *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 ne može da iskoristi ovaj residualni nefermentabilni šećer u džibri, koji u fermentacijama sa malom početnom koncentracijom šećera značajno utiče na ukupan stepen konverzije supstrata.



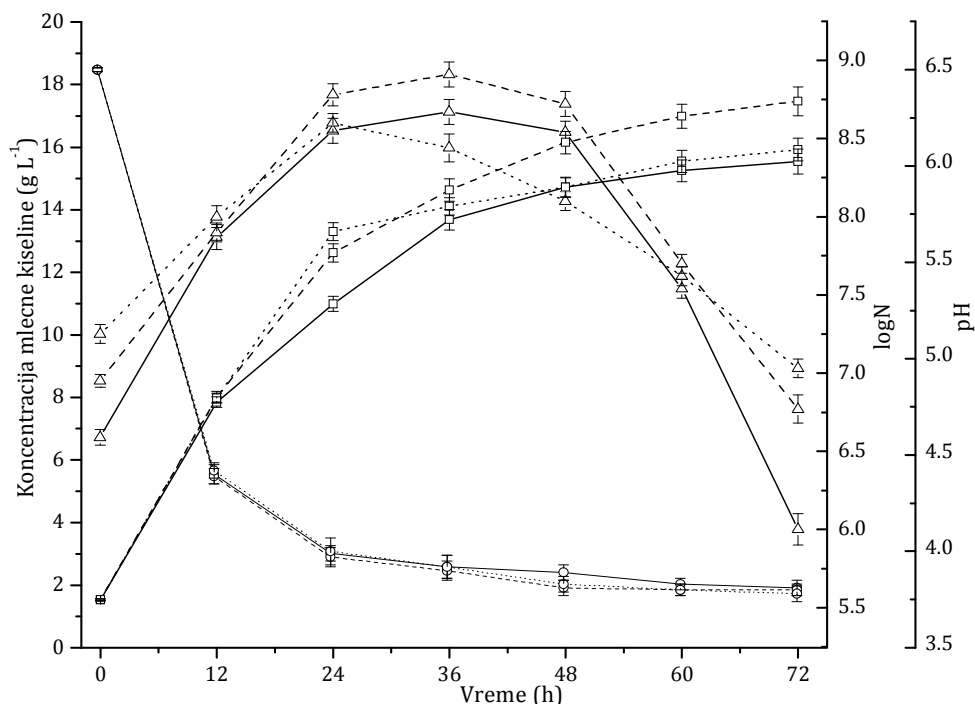
Slika 4.1. Promena broja ćelija i koncentracije šećera i mlečne kiseline u mlečno-kiselinskoj fermentaciji sa *Lb. rhamnosus* ATCC 7469. Eksperimentalni uslovi: koncentracija inokuluma 2 % (v/v), anaerobno, statično, početna koncentracija šećera 22,94 g L<sup>-1</sup>, pH medijuma podešen na 6,5. Legenda: (□) – proizvodnja mlečne kiseline, (o) – potrošnja šećera, (Δ) – proizvodnja bakterijske biomase; puna linija - 37 °C; isprekidana linija - 41 °C; tačkasta linija - 45 °C.

Najveći broj živih ćelija u toku fermentacije je takođe postignut na temperaturi od 41°C nakon 48 h fermentacije. Nakon 48 sati broj ćelija počinje da opada na svim temperaturama, što je verovatno uslovljeno značajnim smanjenjem koncentracije šećera u podlozi i mogućom inhibicijom mlečnom kiselinom pri pH vrednostima nižim od 3,7, koliko je izmereno u medijumu nakon 48 h fermentacije. Temperatura od 41 °C koja je izabrana kao najpovoljnija za istovremenu proizvodnju mlečne kiseline i rast *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 je u okviru opsega temperatura (35-47 °C) koje su najčešće birane za ovaj soj [1,180]. Opseg optimalnih temperatura za *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 koji se javlja u različitim studijama varira usled korišćenja različitih supstrata, izvora azota i ugljenika, kao i sveukupnim razlikama u dizajnu eksperimenata. Budući da mlečno-kiselinska fermentacija do sada nije izvođena na hleбноj džibri kao osnovi fermentacionog medijuma, teško je praviti poređenja među značajno različitim studijama. U

ispitivanju proizvodnje mlečne kiseline na kukuruznoj tečnoj džibri pomoću *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* NRRL B- 4564, Mojović i sar. (2011) su pokazali da je optimalna temperatura za proizvodnju mlečne kiseline takođe 41°C dok je najbolja proizvodnja biomase ostvarena na 37 °C [181].

#### 4.3.2. Uticaj koncentracije inokuluma na proizvodnju mlečne kiseline i bakterijske biomase na tečnoj destilerijskoj džibri

U ovom setu eksperimenata je praćen uticaj različitih koncentracija inokuluma *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 na proizvodnju mlečne kiseline i bakterijske biomase u fermentaciji na prethodno odabranoj temperaturi 41 °C. Ispitivane su tri početne koncentracije inokuluma: 2%, 5% i 10% (v/v). Koncentracija mlečne kiseline, broj živih ćelija i promena pH vrednosti u toku fermentacije na tečnoj džibri su prikazani na Slici 4.2.



Slika 4.2. Promena koncentracije mlečne kiseline, broja ćelija i pH vrednosti u fermentaciji sa *Lb. rhamnosus* ATCC 7469. Eksperimentalni uslovi: T=41°C, anaerobno, statično, početna koncentracija šećera 25,3 g L<sup>-1</sup>, pH medijuma podešen na 6,5. Legenda: (□) – proizvodnja mlečne kiseline, (o) – profil pH vrednosti u medijumu, (Δ) – proizvodnja bakterijske biomase; puna linija – koncentracija



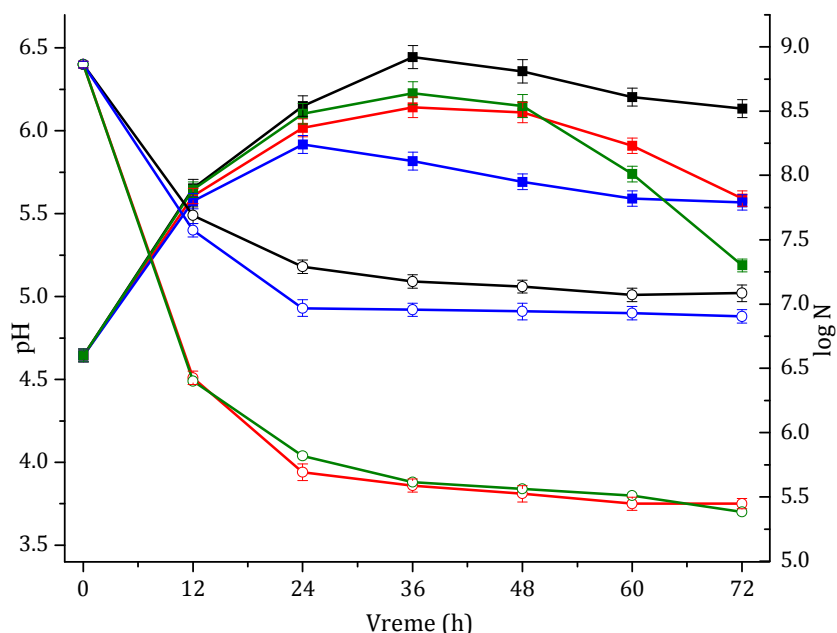
inokuluma 2% (v/v); isprekidana linija – koncentracija inokuluma 5% (v/v); tačkasta linija – koncentracija inokuluma 10% (v/v).

Najveća koncentracija mlečne kiseline od 17,59 g L<sup>-1</sup> je postignuta u fermentaciji sa 5% (v/v) inokuluma nakon 72h. Razlika u prinosu mlečne kiseline sa najvišom koncentracijom inokuluma od 10% (v/v) i najnižom koncentracijom inokuluma od 2% (v/v) nije bila statistički značajna ( $p=0.97561>0.05$ ). U dosadašnjim ispitivanjima mlečno-kiselinske fermentacije najčešće su korišćene koncentracije inokuluma u opsegu od 1-10% (v/v) [182, 83]. U fermentaciji na permeatu surutke pokazano je da koncentracije inokuluma veće od 5% (v/v) ne utiču značajno na koncentraciju mlečne kiseline i broj ćelija, iako veća koncentracija inokuluma može da skрати vreme fermentacije [182, 183]. Najveći broj živih ćelija je postignut sa 5% (v/v) inokuluma u 36 satu fermentacije (slika 4.2.). U uzorcima sa 10% (v/v) inokuluma broj ćelija je počeo značajno da opada već posle 36 h, dok se u uzorcima sa 2% (v/v) i 5% (v/v) inokuluma broj ćelija smanjivao tek nakon 48 sati od početka fermentacije. Sličan obrazac se može uočiti i na slici 4.1. Opadanje vijabilnosti može biti rezultat smanjenja koncentracije šećera prisutnih u podlozi ili inhibicije nedisosovanom mlečnom kiselinom prisutnom pri nižim pH vrednostima. Gonçalves i saradnici (1997) su potvrdili da u mlečno-kiselinskoj fermentaciji najznačajniji inhibitorski efekat na rast i produktivnost ima nedisosovana forma mlečne kiseline koja je dominantna pri pH vrednostima medijuma nižim od 5 [184]. Iako su koncentracije mlečne kiseline postignute u ovoj studiji relativno male (14-17 g L<sup>-1</sup>) zbog pH vrednosti medijuma koja je bila niža od 4 nakon 24 h fermentacije (slika 4.2.), moguće je da se ispolji inhibitorski efekat mlečne kiseline na rast bakterija.

U cilju eliminacije negativnog uticaja niske pH vrednosti i inhibicije nedisosovanom mlečnom kiselinom u daljem radu je ispitana mogućnost pH kontrole dodatkom CaCO<sub>3</sub> kao sredstva za neutralizaciju i mešanjem.

### 4.3.3. Uticaj pH kontrole i mešanja na proizvodnju mlečne kiseline i bakterijske biomase na na tečnoj destilerijskoj džibri

Na slici 4.3. prikazana je vijabilnost bakterija i pH profil mlečno-kiselinske fermentacije uz dodatak  $\text{CaCO}_3$  i mešanje. U uzorcima sa dodatkom  $\text{CaCO}_3$  i mešanjem pH medijuma je održavan iznad vrednosti 5, što je uslovilo bolje preživljavanje bakterija u odnosu na ostale uzorke. U uzorcima bez pH kontrole i mešanja uočava se nagli pad vijabilnosti nakon 48 sati fermentacije (Slika 4.1. i Slika 4.2.).

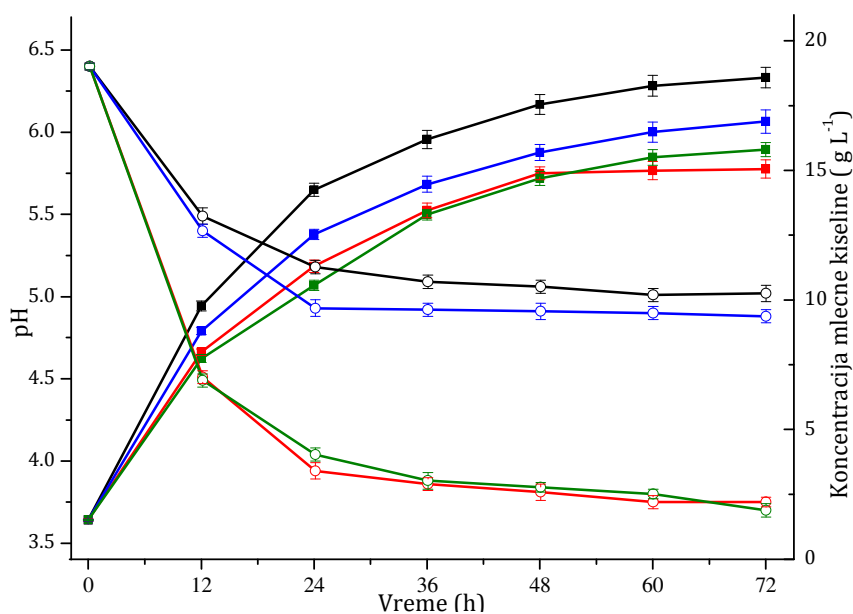


Slika 4.3. Uticaj mešanja i dodatka  $\text{CaCO}_3$  na broj živih ćelija *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 i pH vrednosti u toku mlečno-kiselinske fermentacije na tečnoj destilerijskoj džibri; Eksperimentalni uslovi:  $T=41^\circ\text{C}$ , koncentracija inokuluma 5% (v/v), anaerobno, početna koncentracija šećera  $25.9 \text{ g L}^{-1}$ , početni pH medijuma podešen na 6.5. Legenda: (■) – proizvodnja bakterijske biomase, (o) – profil pH vrednosti u medijumu; crna linija – 1%  $\text{CaCO}_3$  (w/v), sa mešanjem (90 orbt/min); crvena linija – bez dodatka  $\text{CaCO}_3$ , sa mešanjem (90 orbt/min); zelena linija - bez dodatka  $\text{CaCO}_3$ , statično; plava linija - 1%  $\text{CaCO}_3$  (w/v), statično.

I samo mešanje, bez dodatka sredstva za neutralizaciju je pozitivno uticalo na vijabilnost, verovatno zbog ravnomernije raspodele šećera i proizvedene mlečne kiseline u medijumu. Najviši broj živih bakterija je postignut u uzorcima sa

mešanjem i dodatkom  $\text{CaCO}_3$  usled sinergističke pozitivne interakcije oba faktora ( $p=0.02721<0.05$ ) i najefikasnije kontrole pH vrednosti u medijumu (pH profil na slici 4.3.). Po završetku fermentacije broj živih ćelija *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 je bio iznad  $10^8$  CFU  $\text{ml}^{-1}$ , što je važna karakteristika zaostalog fermentacionog medijuma sa aspekta upotrebe za stočnu hranu. Literaturno preporučeni broj živih bakterija u probiotiskoj stočnoj hrani je u opsegu od  $10^6$  do  $10^9$  CFU  $\text{ml}^{-1}$  [185], što ukazuje da je fermentisani medijum odgovara ovom kriterijumu.

Uticaj mešanja i dodatka  $\text{CaCO}_3$  na proizvodnju mlečne kiseline i pH vrednost u toku mlečno-kiselinske fermentacije na tečnoj destilerijskoj džibri je prikazan na slici 4.4.



Slika 4.4. Uticaj mešanja i dodatka 1%  $\text{CaCO}_3$  (w/v) na proizvodnju mlečne kiseline i profil pH vrednosti u medijumu u toku fermentacije. Eksperimentalni uslovi kao na slici 4.3. Legenda: (□) – proizvodnja mlečne kiseline, (o) - pH vrednosti u medijumu; crna linija – 1%  $\text{CaCO}_3$  (w/v), sa mešanjem (90 orbt/min); crvena linija – bez dodatka  $\text{CaCO}_3$ , sa mešanjem (90 orbt/min); zelena linija - bez dodatka  $\text{CaCO}_3$ , statično; plava linija - 1%  $\text{CaCO}_3$  (w/v), statično.

Najviša koncentracija mlečne kiseline od  $18.58 \text{ g L}^{-1}$  je postignuta u fermentaciji uz dodatak 1% (w/v)  $\text{CaCO}_3$  kao sredstva za neutralizaciju uz mešanje. U ovom uzorku je postignut prinos mlečne kiseline od 73.4%. Ukoliko se pogleda pH profil u toku fermentacije uočava se nagli pad pH vrednosti u toku

prvih 24 sata fermentacije u svim uzorcima usled najvećeg intenziteta proizvodnje mlečne kiseline. Mešanje kao pojedinačan faktor nije značajno uticalo na povećanje proizvodnje mlečne kiseline ( $p=0.05996 >0.05$ ), ali je sinergistički sa dodatkom  $\text{CaCO}_3$  omogućilo najintenzivniju proizvodnju mlečne kiseline ( $p=4.76488 \times 10^{-4} < 0.05$ ). Takođe, kombinacijom faktora mešanja i dodatka  $\text{CaCO}_3$  ostvaren je i značajno veća proizvodnja mlečne kiseline u odnosu na uzorak sa dodatkom  $\text{CaCO}_3$ , ali statično. Sinergističko dejstvo mešanja i dodatka  $\text{CaCO}_3$  može se objasniti boljim transferom mase i efikasnijom neutralizacijom čvrstim česticama  $\text{CaCO}_3$  uz mešanje nego u statičnim uslovima. Na ovaj način se smanjuje destruktivno dejstvo visoke koncentracije mlečne kiseline u neposrednoj blizini ćelijske površine i izbegava se formiranje gradijenta koncentracija mlečne kiseline u fermentacionom medijumu. Takođe, u statičnim uslovima je zapaženo stvaranje čvrstog taloga  $\text{CaCO}_3$  što onemogućava ravnomernu raspodelu u medijumu i otežava ponovljivost i uniformnost u toku procesa.

Rezultati drugih autora se dosta razlikuju u pogledu efekta mešanja na proizvodnju mlečne kiseline, pa se može zaključiti da je ovo svojstvo vezano za brojne faktore: vrstu mikroorganizma, uslove eksperimenta, sastav i gustinu fermentacionog medijuma itd. Panesar i sar. (2010) [182] nisu uočili značajne razlike u prinosima između uzoraka sa i bez mešanja, dok Makarova i sar. (2006) [186] ističu da su za gajenje *Lactobacillus sp.* povoljniji statični uslovi zbog mikroaerofilnih uslova rasta ovog roda i negativnog efekta aeracije medijuma do koje dolazi mešanjem. Pozitivni efekat mešanja koji je uočen u ovom istraživanju je verovatno uzrokovan interakcijom mešanja i dodatka  $\text{CaCO}_3$ , budući da efekat mešanja samostalno nije dao značajne efekte na povećanje prinosa mlečne kiseline. Dodatno, soj *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 proizvodi egzopolisaharide u formi kapsule [187]. Uloga egzopolisaharida nije pouzdano poznata. Sugerise se da bi egzopolisaharidni film na površini ćelije mogao da ima ulogu u zaštiti ćelije od niske pH vrednosti i smicajnog napona koji izaziva mešanje, što može prouzrokovati drugačije ponašanje ćelija u odnosu na sojeve koji ne proizvode egzopolisaharide. U studiji Mojović i sar. (2011) soj *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* NRRLB 4654 koji ne proizvodi egzopolisaharide je pokazao najintenzivniju

proizvodnju mlečne-kiseline na kukuruznoj džibri u anaerobnom statičnom postupku [181]. Prethodne studije su pokazale da je optimalna pH vrednost za proizvodnju mlečne kiseline u opsegu od 5 do 7 [1, 184]. Na osnovu rezultata ovog istraživanja sa *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 na tečnoj destilerijskoj džibri, najviši prinos mlečne kiseline od 73.4% postignut je na temperature 41 °C, sa 5% (v/v) inokuluma, uz dodatak 1% (w/v) CaCO<sub>3</sub> i mešanje (90 obrt/min).

#### **4.3.4. Pregled važnih parametara mlečno-kiselinske fermentacije na tečnoj destilerijskoj džibri nakon selekcije optimalnih uslova temperature, koncentracije inokuluma, mešanja i kontrole pH**

U tabeli 4.5. je predstavljen pregled najvažnijih parametara fermentacije dobijenih u fermentaciji sa prethodno izabranim uslovima. Optimizacijom uslova temperature, koncentracije inokuluma, mešanja i pH kontrole omogućeno je značajno povećanje koncentracije mlečne kiseline i biomase bez dodatka izvora azota ili minerala. Maksimalna koncentracija mlečne kiseline je uvećana sa 15.68 g L<sup>-1</sup> (Slika 4.1.) do vrednosti od 18.58 g L<sup>-1</sup> (Slika 4.4.) u fermentaciji sa odabranim vrednostima važnih parametara. Takođe, prinos mlečne kiseline koji je pre optimizacije iznosio 61.74% je uvećan na 73.4% (Tabela 4.5.). Efektivni prinos računat na osnovu utrošenog šećera iz podloge iznosi 0.90 g g<sup>-1</sup> (Tabela 4.5.). Optimizacijom uslova za proizvodnju mlečne kiseline takođe je postignuto uvećanje vijabilnosti i intenzivniji rast *Lb. rhamnosus* ATC 7469. Po završetku fermentacije sa odabranim uslovima (Slika 4.3.) broj živih ćelija je iznosio 3×10<sup>8</sup> CFU mL<sup>-1</sup>, dok je pre optimizacije maksimalni postignut broj ćelija iznosio 3×10<sup>6</sup> CFU mL<sup>-1</sup> (Slika 4.1.). U ispitivanju proizvodnje mlečne kiseline na destilerijskoj otpadnoj vodi uz dodatak kvašćevog ekstrakta, peptona, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> i MgSO<sub>4</sub> pomoću *Enterococcus hawaiiensis* kao proizvodnog mikroorganizma postignuta je koncentracija mlečne kiseline od 56 g L<sup>-1</sup> i prinos 70% [188]. Prinos mlečne kiseline od 73.4% postignut na tečnoj džibri je viši od koncentracije mlečne kiseline postignute u fermentaciji na destilerijskoj otpadnoj vodi, iako džibra nije obogaćena mineralima i izvorima azota. Prinos mlečne kiseline na tečnoj džibri je niži nego prinosi postignuti na nekim drugim supstratima kao što su surutka,

ječmeni skrob, melasa, šećerna trska [1, 189, 40, 190], ali su značajni sa aspekta mogućnosti prevođenja agroindustrijskog otpadnog proizvoda u organsku kiselinu sa širokim poljem primene. Takođe, visoka vijabilnost ćelija na kraju fermentacije ukazuje na potencijal iskorišćenja žive biomase MKB. Kao što se može videti iz tabele 4.5. krajnja koncentracija mlečne kiseline u medijumu je relativno mala, a vreme fermentacije je dugo (72h).

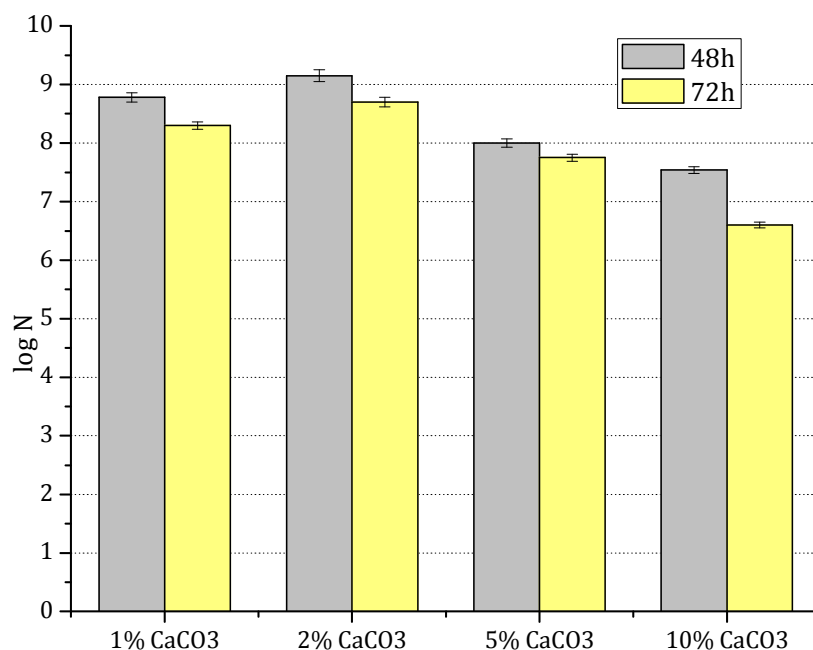
Tabela 4.5. Pregled najvažnijih procesnih parametara nakon optimizacije (početna koncentracija šećera oko 25 g L<sup>-1</sup>, trajanje fermentacije 72h)

Optimalni uslovi	Koncentracija mlečne kiseline (g L <sup>-1</sup> )	Prinos mlečne kiseline (% teorijskog prinosa)	Koeficijent prinosa mlečne kiseline (%)	Broj ćelija (10 <sup>8</sup> CFU mL <sup>-1</sup> )
T (41 °C) Koncentracija inokuluma (5%) CaCO <sub>3</sub> (1%) mešanje (90 obrt/min)	18,58±0,19	73,4±1,8	90,11±3,15	5,0±0,9

Sa slike 4.4. se uočava da brzina proizvodnje mlečne kiseline drastično opada posle 48-og sata fermentacije i produktivnost tokom poslednjih 24 sata fermentacije iznosi samo 0.06 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Takođe, maksimalni broj ćelija se postiže do 48-og sata fermentacije posle čega dolazi do opadanja vijabilnosti. U daljim eksperimentima je bio cilj povećati produktivnost procesa i maksimalnu koncentraciju mlečne kiseline u medijumu. Budući da je ekstrakcija jedna od najskupljih faza u fermentacionoj proizvodnji mlečne kiseline, ostvarivanjem visoke produktivnosti u toku procesa smanjuju se gubici i povećava isplativost procesa.

#### 4.3.5. Uticaj koncentracije dodatog CaCO<sub>3</sub> kao sredstva za neutralizaciju na proizvodnju mlečne kiseline i bakterijske biomase na tečnoj destilerijskoj džibri

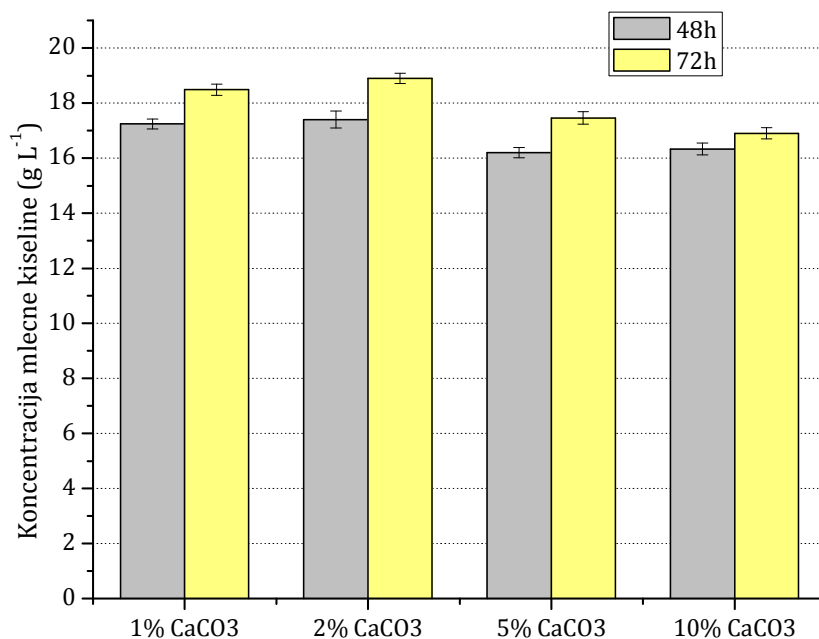
Pod prethodno optimizovanim uslovima temperature (41°C), koncentracije inokuluma (5% (v/v)) i mešanja (90 obrt/min) ispitivan je uticaj različitih koncentracija dodatog CaCO<sub>3</sub>. Promena broja ćelija nakon 48 i 72 sata fermentacije pri različitim koncentracijama CaCO<sub>3</sub> prikazana je na slici 4.5. Na slici 4.6. je prikazana promena koncentracije mlečne kiseline pod uticajem različitih koncentracija CaCO<sub>3</sub> nakon 48 i 72 sata fermentacije. Najveći broj živih bakterija od 1,4×10<sup>9</sup> CFU ml<sup>-1</sup> je postignut nakon 48 sati fermentacije pri koncentraciji 2% CaCO<sub>3</sub> (w/v) (Slika 4.5.), dok je sadržaj proizvedene mlečne kiseline približno isti pri koncentraciji CaCO<sub>3</sub> 1%, 2% i 5% (w/v) (Slika 4.6.).



Slika 4.5. Uticaj različitih koncentracija CaCO<sub>3</sub> (w/v) na preživljavanje ćelija *Lb. rhamnosus* ATCC 7469. Eksperimentalni uslovi: T=41°C, koncentracije inokuluma 5% (v/v), mikroaerofilno sa mešanjem (90 obrt/min), početna koncentracija šećera oko 25 g L<sup>-1</sup>.

Sa ekonomske tačke gledišta povoljnije je za neutralizaciju fermentacionog medijuma koristiti niže koncentracije CaCO<sub>3</sub> (2% CaCO<sub>3</sub> (w/v)) pri čemu je

postignut visok prinos mlečne kiseline od  $0,83 \text{ g g}^{-1}$ . Može se primetiti da sa povećanjem koncentracije dodatog  $\text{CaCO}_3$  iznad 2% (w/v) značajno opada broj živih ćelija (Slika 4.5.), uz manji uticaj na prinos mlečne kiseline (Slika 4.6.).



Slika 4.6. Uticaj koncentracije  $\text{CaCO}_3$  na proizvodnju mlečne kiseline. Eksperimentalni uslovi kao na slici 4.5.

U ispitivanjima dobijanja mlečne kiseline na melasi šećerne repe pomoću *Lb. delbrueckii* uočen je sličan trend značajnog smanjenja vijabilnosti sa porastom koncentracije  $\text{CaCO}_3$  preko 7%, uz blago smanjenje prinosa mlečne kiseline [191]. Produktivnost od  $0,26 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , prinos od  $0,83 \text{ g g}^{-1}$  i koncentracija mlečne kiseline od  $18,49 \text{ g L}^{-1}$  nakon 72h fermentacije uz 2% (w/v)  $\text{CaCO}_3$  je najviša postignuta na tečnoj džibri u ovom setu eksperimenata. Ipak treba istaći da ukoliko se koncentracija mlečne kiseline u uzorcima sa 2% (w/v)  $\text{CaCO}_3$  uporedi sa vrednostima dobijenim u fermentaciji sa 1% (w/v)  $\text{CaCO}_3$  razlika nije statistički značajna.

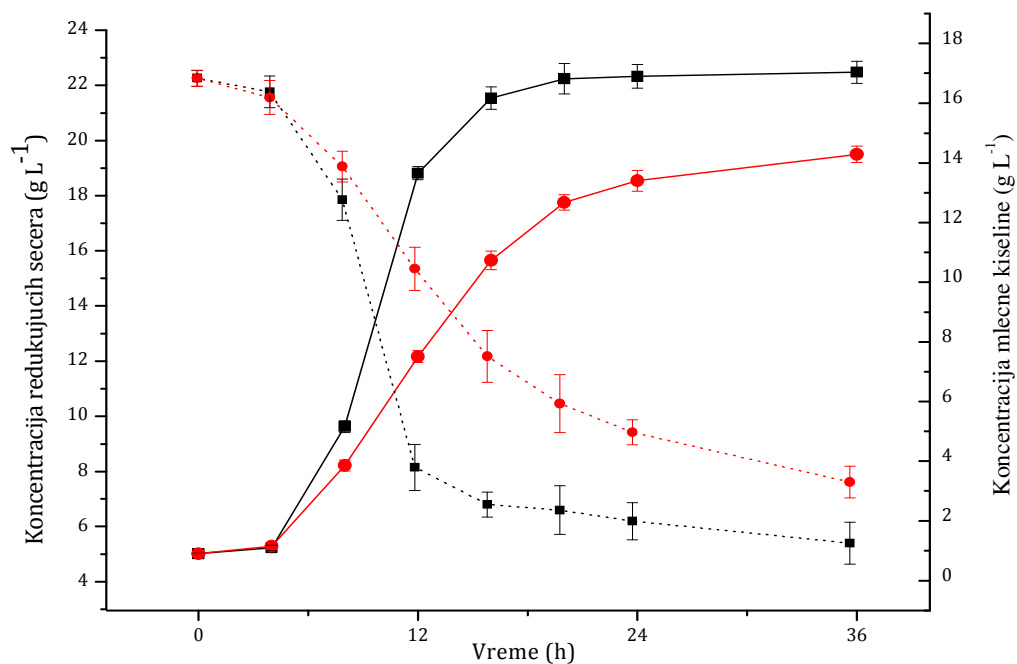
Upotreba  $\text{CaCO}_3$  kao sredstva za neutralizaciju je česta u fermentacionoj proizvodnji mlečne kiseline. Nakon fermentacije u medijumu zaostaje značajna količina čvrstog  $\text{CaCO}_3$  (nešto manje od 2%) koji bi se unosio u organizam životinja prilikom korišćenja fermentisanog medijuma kao stočne hrane.  $\text{CaCO}_3$  je važan



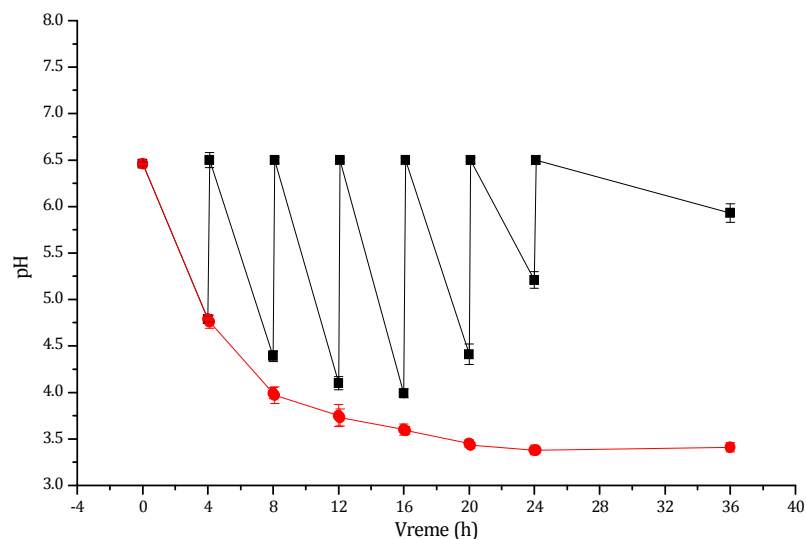
aditiv u stočnoj hrani, naročito u periodima intenzivnog rasta ili laktacije [192]. U fazi rasta goveda preporučena doza iznosi oko 0,31% suve materije ukupnog dnevnog unosa hrane [193]. Iako maksimalna dozvoljena doza nije određena [193] i generalno se smatra upotreba  $\text{CaCO}_3$  bezbednom bez rizika za zdravlje i ljudi i životinja [194], učešće  $\text{CaCO}_3$  sa 5,9% suve materije ukupnog dnevnog unosa hrane u ukupnoj suvoj materiji dnevnog unosa hrane se smatra izuzetno visokim [195]. Ukoliko bi se u ishrani životinja koristio fermentisani medijum iz MKF na tečnoj džibri sa 2% (w/v)  $\text{CaCO}_3$ , dnevni unos  $\text{CaCO}_3$  bi iznosio oko 40% suve materije ukupnog dnevnog unosa hrane što značajno prevazilazi optimalne doze. Ipak, fermentisani medijum bi se mogao koristiti kao suplement u ishrani stoke uz ograničavanje dnevnih unosa i uz korišćenje 1% (w/v)  $\text{CaCO}_3$  u fermentaciji. Ovako bi se medijum bolje prilagodio životinjskom dijetetskom režimu, bez smanjenja prinosa mlečne kiseline i uz očuvanje vijabilnosti bakterijske biomase.

#### **4.3.6. Uticaj dodatka rastvora NaOH kao sredstva za neutralizaciju na proizvodnju mlečne kiseline i bakterijske biomase na tečnoj destilerijskoj džibri**

Iako se  $\text{CaCO}_3$  često koristi u proizvodnji mlečne kiseline kao sredstvo za neutralizaciju, u konkretnom slučaju proizvodnje mlečne kiseline i biomase na džibri ispoljava izvesne nedostatke. Primena fermentisanog medijuma u ishrani životinja je otežana zbog velike zaostale količine  $\text{CaCO}_3$ . Sa druge strane, u toku rada je uočeno da je teško ostvariti uniformnost mešanja čestica  $\text{CaCO}_3$  zbog njihove težnje ka aglomeraciji i stvaranju agregata sa čvrstim česticama džibre. Primena većih brzina mešanja je izazvala smanjenje vijabilnosti verovatno zbog intenzivnije aeracije podloge i kao posledicu toga smanjenu proizvodnju mlečne kiseline. Zato je ispitana mogućnost korišćenja rastvora NaOH kao sredstva za neutralizaciju. NaOH je dodavan u obliku 30% rastvora da bi se smanjio uticaj promene zapremine na koncentraciju nutrienata u medijumu. Na slici 4.7. je prikazana potrošnja šećera i proizvodnja mlečne kiseline u uzorcima sa i bez kontrole pH dodatkom rastvora NaOH, dok je na slici 4.8. prikazan profil pH vrednosti u istim uzorcima.

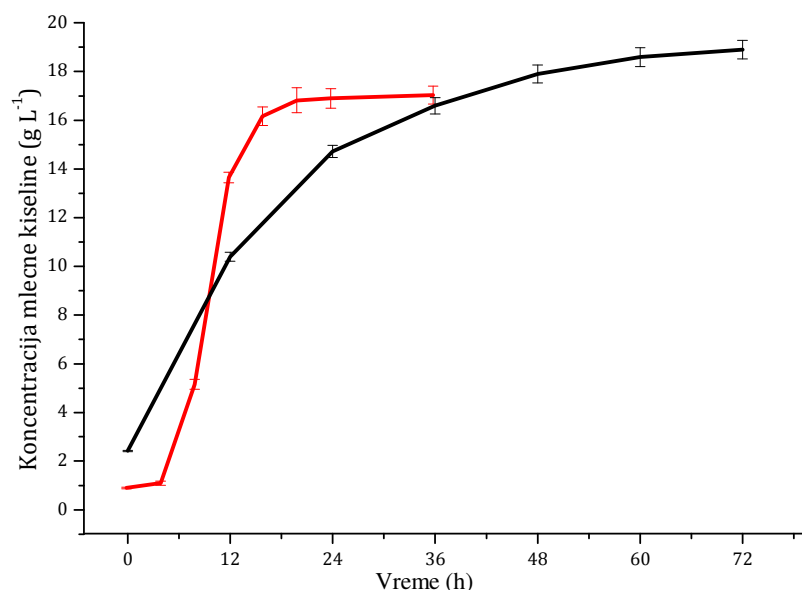


Slika 4.7. Profil potrošnje šećera i proizvodnje mlečne kiseline u uzorcima sa i bez kontrole pH dodatkom rastvora NaOH. Eksperimentalni uslovi:  $T=41^{\circ}\text{C}$ , koncentracija inokuluma 5% (v/v), sa mešanjem (90 obrt/min), mikoraerofilno, početna koncentracija šećera  $22.5\text{ g L}^{-1}$ , početni pH medijuma podešen na 6.5.; Legenda: crvena linija – bez kontrole pH dodatkom 30% NaOH, crna linija – sa kontrolom pH dodatkom 30% NaOH, isprekidane linije - koncentracija šećera u fermentacionom medijumu, pune linije – koncentracija mlečne kiseline u medijumu.



Slika 4.8. Profil pH vrednosti u fermentacionom medijumu sa i bez dodatka rastvora NaOH. Eksperimentalni uslovi kao na slici 4.7.; Legenda: Crna linija-uzorak sa kontrolom pH dodatkom 30% NaOH u četvorosatnim intervalima; crvena linija-uzorak bez kontrole pH.

Kontrola pH vrednosti u medijumu utiče značajno na bržu asimilaciju šećera i efikasniju proizvodnju mlečne kiseline. Sa slike 4.7. se može uočiti da se maksimalna koncentracija mlečne kiseline u uzorku sa kontrolom pH vrednosti postiže već posle 24 h što je značajno kraći vremenski period u poređenju sa uzorkom bez kontrole pH. Postignuta koncentracija mlečne kiseline nakon 24 sata fermentacije je  $16,90 \text{ g L}^{-1}$ , uz prinos mlečne kiseline od  $0,76 \text{ g g}^{-1}$  i produktivnost  $0,70 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Prinos postignut u ovoj fermentaciji je niži u odnosu na prinose postignute sa  $\text{CaCO}_3$ . Ipak, treba uzeti u obzir da je početna koncentracija šećera u ovom eksperimentu bila nešto niža, pa je na vrednost prinosa značajniji uticaj imala relativno konstantna vrednost zaostalog šećera (oko  $6 \text{ g L}^{-1}$ ). Najvažniju razliku predstavlja značajno veća produktivnost postignuta u fermentaciji uz kontrolu pH dodatkom rastvora NaOH. U fermentaciji sa  $\text{CaCO}_3$  produktivnost je iznosila  $0,26 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Poglavlje 4.3.5.), dok je u fermentaciji sa NaOH, zbog skraćenja vremena fermentacije, vrednost produktivnost gotovo trostruko uvećana ( $0,70 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). Na slici 4.9. je prikazan uporedni kinetički profil MKF u uzorcima sa dodatkom NaOH i dodatkom  $\text{CaCO}_3$  u cilju kontrole pH.



Slika 4.9. Uporedni kinetički profil MKF u uzorcima sa dodatkom NaOH i dodatkom CaCO<sub>3</sub>. Eksperimentalni uslovi kao na slici 4.7.; Legenda: crvena linija – fermentacija uz pH kontrolu rastvorom NaOH, crna linija - fermentacija uz pH kontrolu dodatkom 1% (w/v) CaCO<sub>3</sub>.

Intervalnim (na 4 sata) dodavanjem rastvora NaOH bakterije su duže izložene optimalnim pH vrednostima (oko 6,5), čime se ostvaruje najefikasnija konverzija šećera u mlečnu kiselinu. U slučaju korišćenja CaCO<sub>3</sub> pH vrednost medijuma je oko 5 što je značajno niže od optimalnih vrednosti za *Lb. rhamnosus*. Skraćenje vremena fermentacije uz korišćenje NaOH je značajno sa aspekta ekonomike procesa i jedan je od najvažnijih parametara. Ukoliko se uporede dosada objavljeni podaci za produktivnost u fermentacijama na drugim supstratima, ovde postignuta vrednost produktivnosti od 0,70 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> je značajno manja. U laboratorijskim uslovima, u fermentaciji na različitim vrstama otpadnog hidrolizovanog papira maksimalna produktivnost procesa je bila 1,0 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> [89]. Tako, u zavisnosti od upotrebljenog soja *Lactobacillus sp.* i sirovine, objavljene produktivnosti u mlečno-kiselinskim fermentacijama variraju od 0,1 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> u fermentaciji sa *Lb. amylovorus* ATCC 33620 na krompiru kao izvoru ugljenika do 4,8 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> pomoću soja *Lb. casei* NRRL B-441 na surutki [196]. Najviše vrednosti produktivnosti su postignute u kontinualnim membranskim reaktorima povezanim u serije, sa recirkulacijom ćelija uz maksimalne vrednosti

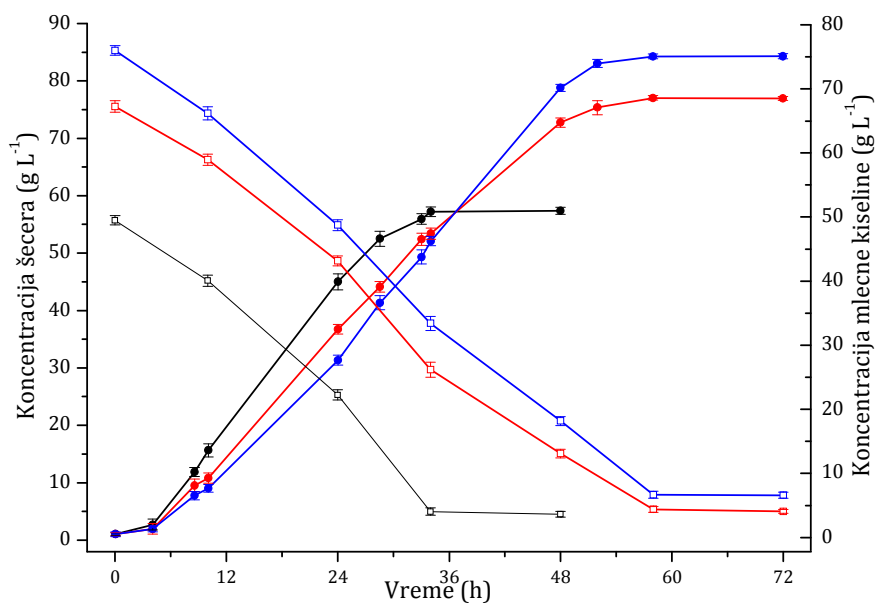
produktivnosti od  $57 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , dok je sa istim sojem *Lb. rhamnosus* ATCC 10863 u šaržnom postupku postignuta maksimalna produktivnost od  $2,1 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  [197]. Visoke produktivnosti su uglavnom postignute obogaćivanjem medijuma dodatkom izvora azota, minerala uz značajno više početne koncentracije šećera u supstratu i primenu različitih tehnoloških fermentacionih strategija.

#### **4.4. Proizvodnja mlečne kiseline i bakterijske biomase na destilerijskoj džibri**

Kao alternativni postupak iskorišćenja džibre za proizvodnju mlečne kiseline, u cilju povećanja produktivnosti procesa ispitana je mogućnost korišćenja džibre, bez prethodnog odvajanja tečnog dela. U Poglavlju 4.1. (Tabela 4.1.) predstavljen je sastav destilerijske džibre, sa sadržajem glavnih grupa jedinjenja i sadržajem važnih metala. Na osnovu visokog sadržaja prisutnih proteina i povoljnog odnosa koncentracija prisutnih metala, očekivano je da se tokom MKF u džibri postignu bolji prinosi u odnosu na tečnu frakciju koja je siromašnijeg sastava.

##### **4.4.1. Ispitivanje uticaja početne koncentracije šećera na proizvodnju mlečne kiseline na destilerijskoj džibri**

Efekat početne koncentracije šećera na proizvodnju mlečne kiseline i biomase *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 je ispitivan u šaržnom postupku na destilerijskoj džibri. U dosadašnjim ispitivanjima je početna koncentracija šećera u medijumu bila u opsegu  $20\text{-}30 \text{ g L}^{-1}$ , a u ovom setu eksperimenata su ispitivane više početne koncentracije šećera. Na slici 4.10. je predstavljen kinetički profil utroška šećera i proizvodnje mlečne kiseline u toku fermentacije.



Slika 4.10. Uticaj početne koncentracije šećera na proizvodnju mlečne kiseline i utrošak šećera u fermentaciji na ukupnoj džibri. Eksperimentalni uslovi:  $T=41^{\circ}\text{C}$ , koncentracija inokuluma 5% (v/v), sa mešanjem (90 obrt/min), mikoraerofilno, početni pH medijuma 6.5, uz kontrolu pH dodatkom 30% NaOH u intervalima od 4h. Legenda: crna linija – početna koncentracija šećera oko 55 g L<sup>-1</sup>, crvena linija - početna koncentracija šećera oko 75 g L<sup>-1</sup>, plava linija – početna koncentracija šećera oko 85 g L<sup>-1</sup>.

Kinetika potrošnje šećera i proizvodnje mlečne kiseline pri različitim početnim koncentracijama šećera (55,72 g L<sup>-1</sup>, 75,58 g L<sup>-1</sup> i 85,31 g L<sup>-1</sup>) je slična (Slika 4.10.). Najviša vrednost koncentracije mlečne kiseline (75,06 g L<sup>-1</sup>) je postignuta u fermentaciji sa najvišom početnom koncentracijom šećera od 85,31 g L<sup>-1</sup>. U ovom uzorku nije postignut najbolji prinos niti najviša produktivnost verovatno zbog inhibicije supstratom. U uzorcima sa višom početnom koncentracijom šećera (75,58 g L<sup>-1</sup> i 85,31 g L<sup>-1</sup>) sporije se vrši konverzija šećera u mlečnu kiselinu u odnosu na uzorak sa inicijalnom koncentracijom šećera od 55,72 g L<sup>-1</sup>. U tabeli 4.6. je dat pregled najvažnijih parametara za ispitivane fermentacije. Najviši prinos je postignut u fermentaciji sa najmanjom početnom koncentracijom šećera od 55,72 g L<sup>-1</sup>.

Tabela 4.6. Uticaj početne koncentracije šećera na vrednosti najvažnijih parametara u mlečno-kiselinskoj fermentaciji na hleбној džibri. Eksperimentalni uslovi: T=41°C, mikroaerofilno, mešanje (90 obrt/min), kontrola pH dodatkom 30% NaOH na 4h do pH 6,5.

	Početna koncentracija šećera (g L <sup>-1</sup> )	Koncentracija mlečne kiseline (g L <sup>-1</sup> )	Broj ćelija (10 <sup>8</sup> CFU ml <sup>-1</sup> )	Prinos mlečne kiseline (%)	Produktivnost (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
F1 <sup>a</sup>	55,72±0,82	50,83±0,73	10,0±3,2	92,3±2,0	1,49±0,02
F2 <sup>b</sup>	75,58±1,02	68,6±0,35	7,2±0,8	90,6±1,4	1,18±0,01
F3 <sup>b</sup>	85,31±0,84	75,06±0,38	10,0±2,4	88,0±1,1	1,29±0,01

<sup>a</sup> U fermentaciji F1 parametri su izračunati za 34 h fermentacije;

<sup>b</sup> U fermentacijama F2 i F3 parametri su izračunati za 58 h fermentacije kada su utrošeni svi fermentativni šećeri iz medijuma.

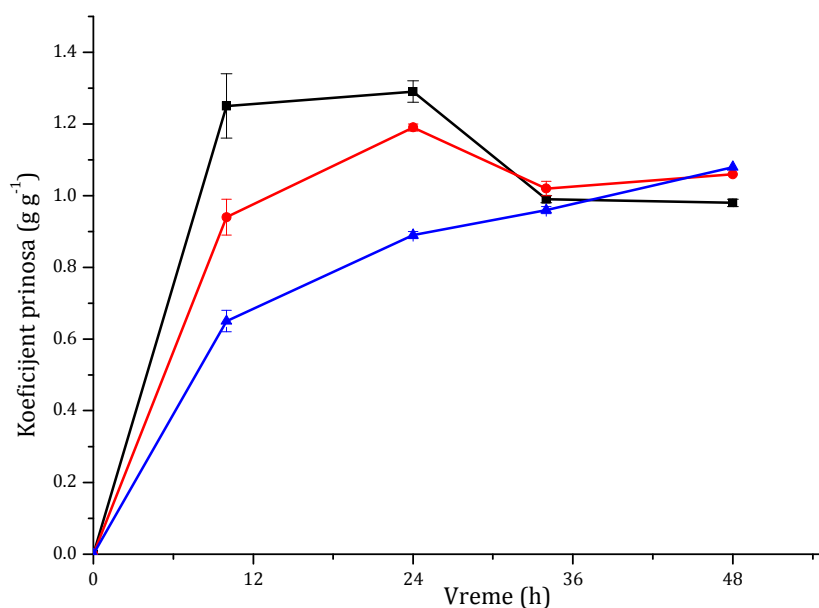
Efekat inhibicije supstratom i posledično smanjenje prinosa pri višim početnim koncentracijama šećera uočili su i drugi istraživači. Hujanen i sar. (2001) [198] su objavili da je sa povećanjem početne koncentracije šećera sa 80 g L<sup>-1</sup> na 120 g L<sup>-1</sup> uočen sličan porast koncentracije mlečne kiseline uz smanjenje prinosa. U šaržnoj fermentaciji je kao supstrat korišćen polusintetski medijum obogaćen slalom ječmenih klica [198]. Takođe, u studiji Liu i sar. (2005) [199] prinos mlečne kiseline se smanjivao sa povećanjem početne koncentracije šećera u fermentaciji sa *Rhizopus* sp.. Najviša produktivnost u fermentaciji sa *Lb. lactis* na sintetskom medijumu je postignuta pri početnoj koncentraciji šećera od 30 g L<sup>-1</sup>, uz smanjenje produktivnosti sa porastom početne koncentracije šećera do 90 g L<sup>-1</sup> [91].

Sa slike 4.10. se može uočiti da se nakon 36 sata od početka fermentacije blago smanjuje brzina utroška šećera u uzorcima sa višom početnom koncentracijom šećera i posredno višom koncentracijom mlečne kiseline. Koncentracija mlečne kiseline u ovim uzorcima posle 36 sati premašuje 50 g L<sup>-1</sup>. Negativno dejstvo viših koncentracija mlečne kiseline na produktivnost *Lactobacillus* sp. je naročito izraženo ukoliko se pH ne održava konstantnim tokom čitave fermentacije [184].

Za proizvodnju mlečne kiseline ispitivana je otpadna kaša iz prerade jabuke uz obogaćivanje medijuma azotom i postignut je prinos od 92,6% i produktivnost

od  $1,71 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  [200]. Produktivnost postignuta na džibri je niža u odnosu na kašu jabuke, ali je prinos isti. Važno je naglasiti da džibra nije obogaćivana izvorima azota. Ukoliko se uporedi najviši postignut prinos (sa početnom koncentracijom šećera od  $55.72 \text{ g L}^{-1}$ ) od oko  $0,92 \text{ g g}^{-1}$  (Tabela 4.6.) sa prinosima postignutim na tečnoj džibri tritikalea, kukuruza i otpadnog hleba,  $0.50 \text{ g g}^{-1}$ ,  $0.76 \text{ g g}^{-1}$  and  $0.80 \text{ g g}^{-1}$  [201], jasno je da se povećanjem početne koncentracije šećera i korišćenjem ukupne hlebne džibre povećava profitabilnost procesa uz skraćenje vremena fermentacije. Takođe, koncentracije mlečne kiseline postignute na drugim otpadnim sirovinama su takođe niže. Maksimalna koncentracija mlečne kiseline od  $41,65 \text{ g L}^{-1}$  na otpadnoj vodi iz prerade kasave je postignuta nakon 48 sati uz početnu koncentraciju šećera od  $50 \text{ g L}^{-1}$  u medijumu [201].

Za ocenu efikasnosti konverzije šećera iz supstrata u mlečnu kiselinu korišćen je koeficijent prinosa mlečne kiseline po g utrošenog šećera iz džibre koji je prikazan na slici 4.11..



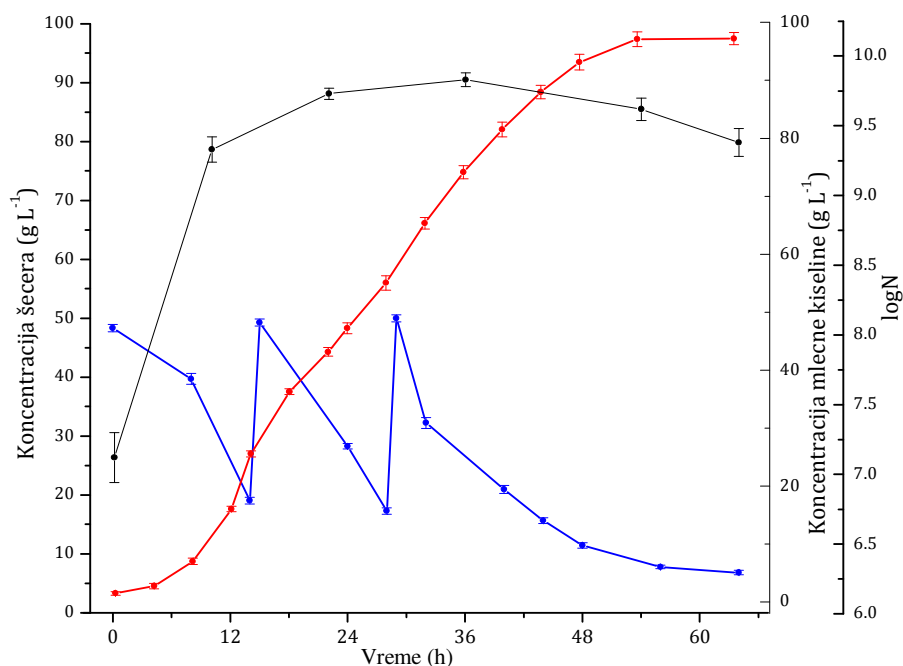
Slika 4.11. Koeficijent prinosa mlečne kiseline po g utrošenog šećera u fermentacijama sa različitim početnim koncentracijama šećera. Eksperimentalni uslovi kao na slici 4.10. Legenda: crna linija – početna koncentracija šećera oko  $55 \text{ g L}^{-1}$ , crvena linija - početna koncentracija šećera oko  $75 \text{ g L}^{-1}$ , plava linija – početna koncentracija šećera oko  $85 \text{ g L}^{-1}$ .



Najviši koeficijent prinosa ( $1,31 \text{ g g}^{-1}$ ) je postignut nakon 24 sata od početka fermentacije sa početnom koncentracijom šećera  $55.72 \text{ g L}^{-1}$ . Na osnovu toga se može zaključiti da je ova koncentracija najpodesnija za brzo započinjanje proizvodnje mlečne kiseline na džibri kao medijumu i ova vrednost koncentracije šećera je korišćena kao optimalna u daljim eksperimentima.

#### **4.4.2. Proizvodnja mlečne kiseline i bakterijske biomase na destilerijskoj džibri dolivnim postupkom**

Značajna poboljšanja u produktivnosti i povećanju proizvodnje mlečne kiseline mogu se postići primenom strategije dolivanja svežeg supstrata u toku fermentacije čime se može ostvariti kontrola koncentracije šećera u opsegu optimalnih. Dolivanjem svežeg supstrata u odgovarajućim intervalima određenim na osnovu važnih procesnih parametara smanjuje se negativni uticaj proizvoda reakcije, u ovom slučaju mlečne kiseline, razređivanjem fermentacionog medijuma. U prethodnom setu eksperimenata je pokazano da se najefikasnija konverzija šećera u mlečnu kiselinu postiže pri koncentraciji šećera od oko  $50 \text{ g L}^{-1}$  (slika 4.10.). Zato je za dolivni postupak mlečno-kiselinske fermentacije na džibri početna koncentracija šećera iznosila  $50 \text{ g L}^{-1}$ . Kao kontrolni parameter korišćena je vrednost šećera u medijumu. Kada je koncentracija šećera u toku fermentacije opadala ispod  $20 \text{ g L}^{-1}$ , novi sveži medijum je dodavan tako da koncentracija šećera bude ponovo  $50 \text{ g L}^{-1}$ . Koncentracija šećera u medijumu za dolivanje je iznosila  $140 \text{ g L}^{-1}$ . Na slici 4.12. prikazana je kinetička kriva proizvodnje mlečne kiseline, biomase *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 i potrošnje šećera u fermentaciji na hleбноj džibri.



Slika 4.12. Kinetička kriva proizvodnje mlečne kiseline, biomase *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 i potrošnje šećera u fermentaciji na hleboj džibri. Eksperimentalni uslovi: T=41°C, koncentracija inokuluma 5% (v/v), sa mešanjem (90 obrt/min), mikoraerofilno, početna koncentracija šećera oko 50 g L<sup>-1</sup>, početni pH medijuma podešen na 6.5, uz kontrolu pH dodatkom 30% NaOH u intervalima 4h, dolivanje svežeg medijuma nakon opadanja koncentracije šećera ispod 20 g L<sup>-1</sup>. Simboli: crna linija – broj ćelija N (CFU ml<sup>-1</sup>) izražen kao logN; crvena linija – koncentracija mlečne kiseline; plava linija - koncentracija šećera.

U dolivnom postupku je postignuta maksimalna koncentracija mlečne kiseline od 97.1 g L<sup>-1</sup>, uz prinos 0.87 g g<sup>-1</sup> i produktivnost od 1.80 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, nakon 54 sata fermentacije. Ukoliko se uporedi ova vrednost sa vrednošću postignutom u šaržnom fermentacionom postupku sa istom početnom koncentracijom šećera (odeljak 4.4.1.), primenom dolivnog postupka je za 47,6% povećana koncentracija mlečne kiseline. Produktivnost dolivnog postupka je 21% veća od produktivnosti šaržnog postupka (Poglavlje 4.4.1., Tabela 4.6.). Postignuta vrednost prinosa u dolivnom postupku, 0.87 g g<sup>-1</sup>, je slična vrednosti postignutoj u šaržnom procesu sa početnom koncentracijom šećera oko 85 g L<sup>-1</sup> (Poglavlje 4.4.1., Tabela 4.6.), ali je postignuta koncentracija mlečne kiseline značajno manja. U dolivnom postupku je postignuta 39% viša vrednost produktivnosti u odnosu na šaržni postupak sa početnom koncentracijom šećera od oko 85 g L<sup>-1</sup> (Poglavlje 4.4.1., Tabela 4.6.). Na

osnovu svega izloženog zaključuje se da su i vrednost produktivnosti i koncentracije mlečne kiseline značajno povećane primenom dolivnog postupka.

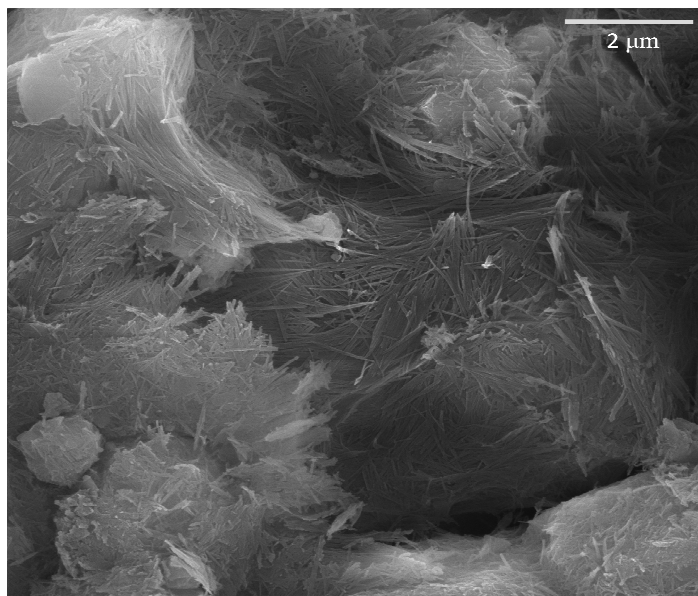
Dolivni postupak je do sad već ispitvan u mlečno-kiselinskim fermentacijama na različitim supstratima [202]. Većinom su korišćeni sintetski supstrati uz obogaćivanje izvorima azota (kvašćev ekstrakt najčešće) i minerala, pa nije moguće izvršiti direktno poređenje sa rezultatima postignutim na džibri. Upravo na takvom supstratu su Ding i Tan postigli koncentraciju mlečne kiseline od  $180 \text{ g L}^{-1}$  nakon 84 sata fermentacije uz dolivanje supstrata obogaćenog kvašćevim ekstratom i glukozom [92]. U navedenoj studiji je korišćena koncentracija šećera u medijumu kao indikator dolivanja svežeg supstrata i postignuta je veoma visoka koncentracija mlečne kiseline bez uočavanja efekta inhibicije mikroorganizma *Lb. casei*. U drugoj studiji je kontrola dolivanja vršena merenjem pH vrednosti medijuma kao indikatora konvertovanog šećera u mlečnu kiselinu [93]. Na hemijski definisanom medijumu obogaćenom peptonom, kvašćevim ekstratom i mineralima postignuta je maksimalna koncentracija mlečne kiseline od  $96,3 \text{ g L}^{-1}$ , što je niže nego vrednost postignuta na džibiri [93]. U dolivnom postupku fermentacije na deproteinizovanoj surutki pomoću mešane kulture *Lb. casei* i *Lc. lactis* postignute su još niže vrednosti mlečne kiseline ( $46 \text{ g L}^{-1}$ ) i prinosa ( $0,77 \text{ g g}^{-1}$ ) [203].

Pored značajnog uvećanja produktivnosti procesa i povećanja koncentracije mlečne kiseline, u medijumu (džibri) je u dolivnom postupku postignut i veliki broj živih ćelija *Lb. rhamnosus*. Već nakon prvih 12 sati fermentacije postignut je broj ćelija od  $10^9 \text{ CFU ml}^{-1}$  (Slika 4.12.). Nakon 54 sata fermentacije i dostizanja maksimalne koncentracije mlečne kiseline u medijumu, nije zapaženo opadanje bakterijske biomase ispod  $10^9 \text{ CFU ml}^{-1}$ , iako je u ranijim fazama fermentacije broj živih ćelija iznosio i preko  $5 \times 10^9 \text{ CFU ml}^{-1}$ . Stabilna vrednost biomase u toku 40 sati mlečno-kiselinske fermentacije ukazuje da su dolivnim postupkom ostvareni pogodni uslovi za rast *Lb. rhamnosus* i proizvodnju mlečne kiseline što je veoma važno sa aspekta potencijalne integrisane proizvodnje mlečne kiseline i stočne hrane.

### 4.4.3. Proizvodnja mlečne kiseline i bakterijske biomase na destilerijskoj džibri dolivnim postupkom

#### 4.4.3.1. Imobilizacija *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 na zeolit

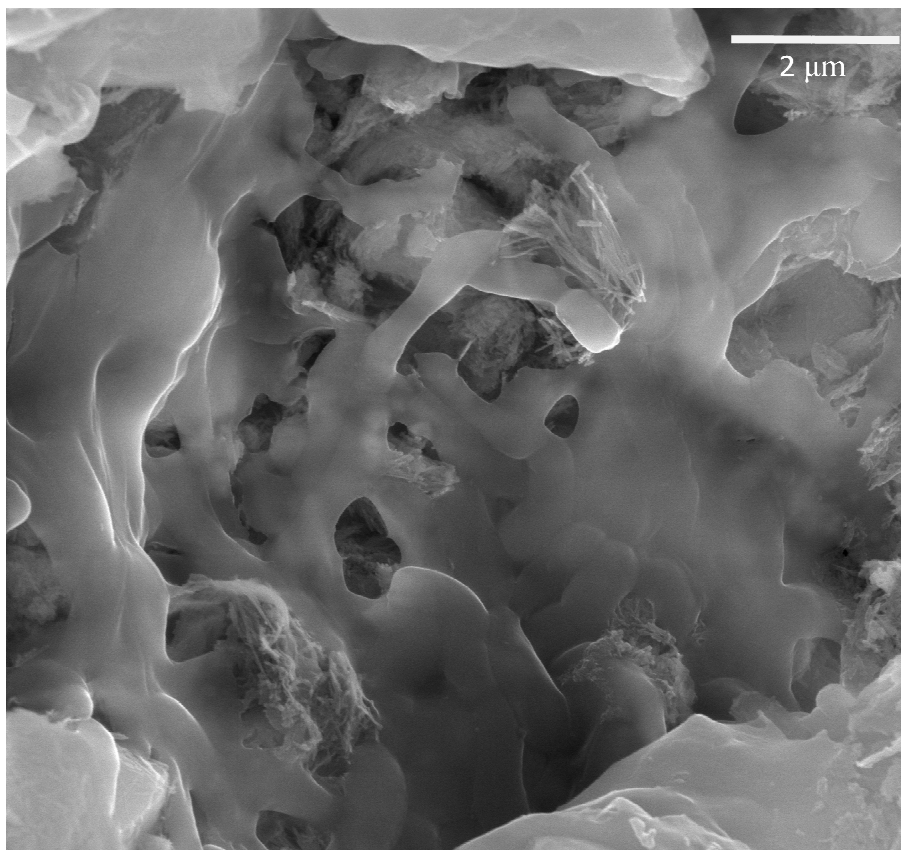
Za imobilizaciju *Lb. rhamnosus* korišćena su sprášena zeolitna molekulska sita. Bakterijske ćelije su imobilisane adsorpcijom u MRS bujonu i nakon ispiranja korišćene kao inokulum za fermentaciju na tečnoj džibri. Na slici 4.13. je prikazana skenirajuća elektronska mikrografija površine zeolita bez immobilisanih bakterija. Na slici 4.14. i 4.15. su prikazane skenirajuće elektronske mikrografije proizvodnog mikroorganizma *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 imobilisanog na zeolitni prah.



Slika 4.13. Skenirajuća elektronska mikrografija slobodne površine 13X zeolita. Eksperimentalni uslovi: uzorci zeolita su 3 h sušeni u vakuumu na temperaturi 25°C u tankom sloju, presvućeni Au-Pd smešom, mikroskopiranje: Mikroskop TESCAN Mira3 XMU na 20 kV.

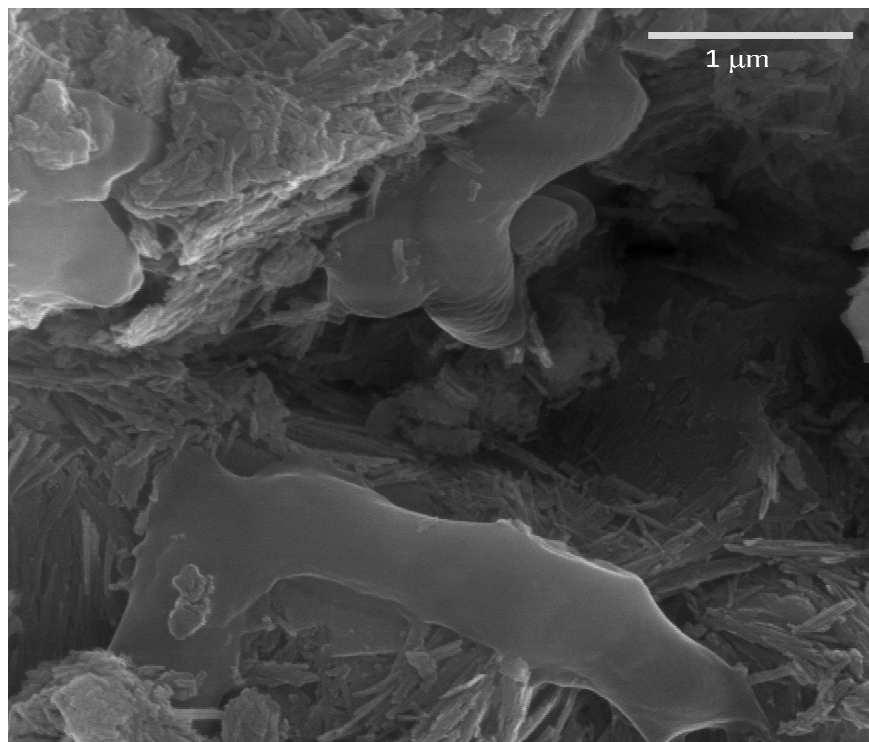
Sa slike 4.14. se uočava da su bakterije adsorbovane po površini u gustom rasporedu. Bakterijske ćelije na nekim mestima nisu jasno odvojene već formiraju strukturu biofilma i međusobno su slepljene, što može biti posledica intenzivne proizvodnje egzopolisaharida koja je uočena na glukozi kao izvoru azota (Poglavlje 4.5.2.3.). Na slici 4.15. se može primetiti da je adsorpcija bakterija ostvorena direktno za zeolitnu površinu. Soj *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 ima sposobnost da

sintetiše egzopolisaharide, polisaharidne supstance koje formiraju lepljivi sloj (omotač) oko bakterijske ćelije. Adsorpciju bakterija na zeolit za anaerobne fermentacije i proizvodnju biogasa je ispitivao Weiss sa saradnicima (2011) [107]. Ova grupa autora je uočila strukture koje podsećaju na pile, kako između bakterija i površine zeolita tako i međusobno, između bakterija. Iako slične strukture nisu uočenu u slučaju imobilizacije *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 na zeolit, moguće je, iako nije eksperimentalno potvrđeno, da egzopolisaharidni omotač igra važnu ulogu u adsorpciji *Lb. rhamnosus* za zeolitnu površinu. U studiji Kubote i saradnika (2008) [204] je pokazano da zeolit adsorbuje biomolekule poput proteina i nukleinskih kiselina, pa je moguće da postoji afinitet i prema egzopolisaharidima zbog razvijene površine i pozitivnog naelektrisanja. Prilikom ispitivanja vremena potrebnog za desorpciju bakterija sa zeolitnog nosača, pokazano je da je minimalno potrebno vreme mešanja 10 minuta što je značajno duže u odnosu na studiju Hrenović i saradnika (2009) [106], kod kojih je kompletna desorpcija *Acinetobacter junii* bakterija postignuta nakon 3 minuta mešanja pri 40 Hz. Snažna adsorpcija bakterija na zeolitnu površinu može takođe biti i rezultat elektrostatičkih interakcija. Površina *Lb. rhamnosus* ATCC7469 je negativno naelektrisana dok je površina zeolita pozitivno naelektrisana. U širokom opsegu pH vrednosti površina *Lb. rhamnosus* ATCC7469 je negativno naelektrisana i ponaša se kao Luisova baza [105]. Sa druge strane, zbog izmenjivog natrijumovog jona površina zeolita se ponaša kao Luisova kiselina [104], što doprinosi afinitetu bakterija za zeolit.



Slika 4.14. Skenirajuća elektronska mikrografija površine Na-Y zeolita sa adsorbovanim *Lb. rhamnosus* ATCC 7469. Uslovi pri mikroskopiranju kao na slici 4.13.

Zeolit je pogodan za upotrebu u životinjskoj ishrani zbog mogućnosti apsorpcije supstanci (razvijena površina) i sposobnosti izmene jona  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$  i  $K^+$  koji su bitni minerali za rast bakterija [205]. Pozitivna svojstva zeolita uz mogućnost adsorpcije *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 kvalifikuju ovaj imobilisani sistem za potencijalnu primenu kao dodatak ishrani životinja nakon mlečno-kiselinske fermentacije džibre.



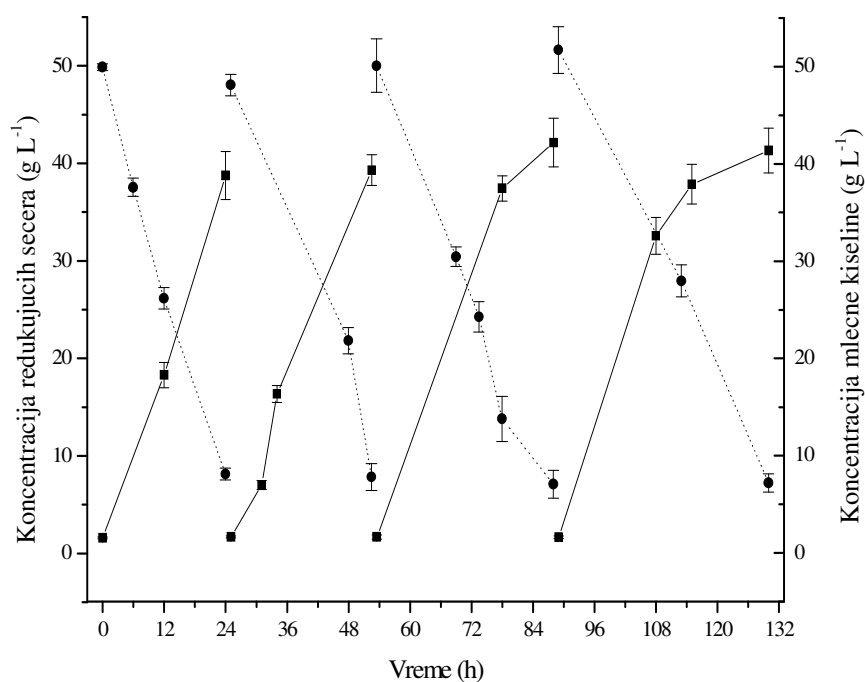
Slika 4.15. Skenirajuća elektronska mikrografija površine Na-Y zeolita sa adsorbovanim *Lb. rhamnosus* ATCC 7469-detaljniji prikaz. Uslovi pri mikroskopiranju kao na slici 4.13.

#### **4.4.3.2. Proizvodnja mlečne kiseline i bakterijske biomase na tečnoj destilerijskoj džibri imobilizacijom *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 na zeolit**

Proizvodnja mlečne kiseline i bakterijske biomase na tečnoj destilerijskoj džibri pomoću soja *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 imobilisanog na zeolitni prah je ispitivana uz recirkulaciju imobilizata tokom 4 ciklusa do opadanja produktivnosti procesa na vrednost  $1,0 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Kao fermentacioni medijum je korišćen tečni deo džibre jer zbog manjeg procenta čvrstih čestica omogućava efikasnu recirkulaciju imobilisane mase bez ugušćavanja medijuma u svakom sledećem ciklusu. Primena većih čestica zeolita kao nosača nije efikasna jer je zbog baznih karakteristika maksimalna koncentracija zeolita u medijumu za MKF ograničena na 2-3% (w/v) (da pH vrednost medijuma ne bi prelazila 6,5 što je optimalni pH za BMK). Slobodna površina većih čestica zeolita (koje bi omogućile lako odvajanje zeolitnog imobilizata od čvrstih čestica džibre), a u koncentraciji do 3% (w/v) u medijumu, nije dovoljna za vezivanje dovoljnog broja bakterijskih ćelija za brzu i efikasnu

fermentaciju što drastično utiče na produktivnost (ispod  $0,9 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  već u prvom ciklusu). Zato je za rad sa imobilisanim ćelijama odabrana tečna frakcija džibre.

Fermentacioni medijum je izmenjivan nakon opadanja koncentracije šećera ispod  $10 \text{ g L}^{-1}$ . Na slici 4.16. je predstavljena proizvodnja mlečne kiseline i potrošnja šećera tokom četiri fermentaciona ciklusa. U toku prvog fermentacionog ciklusa postignuta je najviša produktivnost od  $1,62 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , uz prinos od  $0,78 \text{ g g}^{-1}$  i koncentraciju mlečne kiseline od  $38,80 \text{ g L}^{-1}$ . U svakom sledećem ciklusu uočava se produžavanje vremena potrebnog za potrošnju šećera iz medijuma, odnosno usporavanje fermentacije. U tabeli 4.7. dat je pregled najvažnijih procesnih parametara u imobilisanom sistemu.



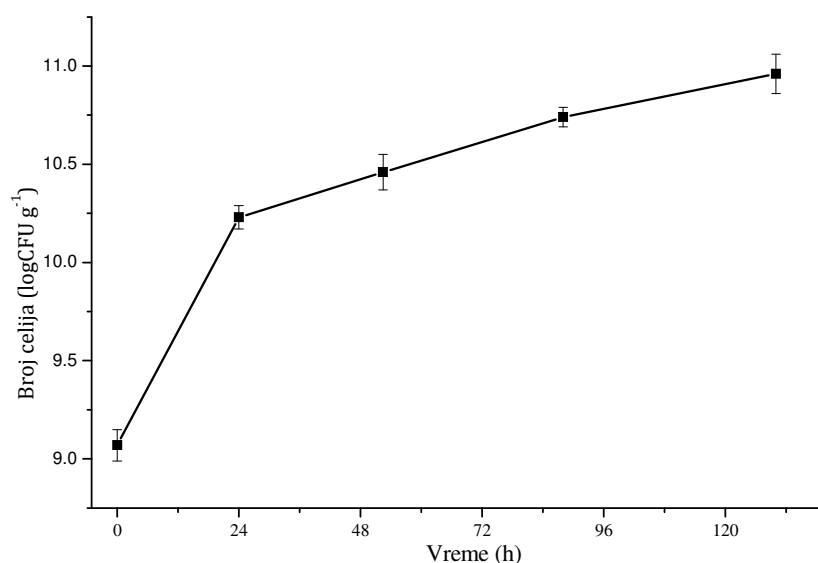
Slika 4.16. Promena koncentracije šećera i mlečne kiseline u toku četiri uzastopna ciklusa mlečno-kiselinske fermentacije na tečnoj destilerijskoj džibri sa *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 imobilisanim na Na-Y zeolit. Eksperimentalni uslovi: početna koncentracija šećera oko  $50 \text{ g L}^{-1}$ , koncentracija imobilizata 2% (w/v), mikroaerofilno, mešanje (90 obrt/min), kontrola pH dodatkom 30% NaOH u 4h intervalima, recirkulacija nakon smanjenja koncentracije šećera u medijumu ispod  $10 \text{ g L}^{-1}$ .



Tabela 4.7. Važni parametri procesa mlečno-kiselinske fermentacije na tečnoj destilerijskoj džibri sa recirkulacijom *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 imobilisanog na zeolit. Ekseperimentalni uslovi kao na slici 4.16.

	Koncentracija mlečne kiseline (g L <sup>-1</sup> )	Prinos mlečne kiseline (g g <sup>-1</sup> )	Koeficijent prinosa (g g <sup>-1</sup> )	Zapreminska produktivnost (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
I ciklus	38,80±2,48	0,78±0,04	0,93±0,05	1,62±0,10
II ciklus	39,36±1,59	0,82±0,01	0,98±0,03	1,43±0,06
III ciklus	42,19±2,48	0,84±0,01	0,99±0,04	1,22±0,07
IV ciklus	41,37±2,31	0,80±0,01	0,93±0,05	1,01±0,05

Zbog produženja vremena fermentacije u svakom sledećem ciklusu produktivnost procesa opada budući da je koncentracija šećera bila približno 55 g L<sup>-1</sup> na početku svakog ciklusa. Prosečna produktivnost za ceo process iznosi 1,32 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Najnovija istraživanja Nguyen i sar. (2012) su pokazala da se mikroalge mogu koristiti kao novi supstrat za proizvodnju mlečne kiseline uz maksimalnu produktivnost od 1,06 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> [206]. Ova vrednost je niža od produktivnosti ostvarene u procesu sa recirkulacijom imobilisanog *Lb. rhamnosus* u tečnoj džibri opisanom u ovoj disertaciji. Takođe, u ovom procesu je postignuta koncentracija mlečne kiseline od 42,19 g L<sup>-1</sup> i prinos od 0,99 g g<sup>-1</sup> što je značajno više od koncentracije mlečne kiseline (28,73 g L<sup>-1</sup>) i prinosa (91,7%) postignutog u fermentaciji na otpadu ananasa sa Ca-alginatnim imobilizatom *Lb. delbrueckii* [207]. Na slici 4.17. je predstavljena promena broja imobilisanih bakterija *Lb. rhamnosus* u toku fermentacije, izraženo po g zeolita kao nosača.



Slika 4.17. Promena broja imobilisanih bakterija *Lb. rhamnosus* u toku fermentacije. Eksperimentalni uslovi kao na slici 4.16. Legenda: linija - broj imobilisanih živih ćelija *Lb. rhamnosus* (N, CFU g<sup>-1</sup>) izdruženih kao logN.

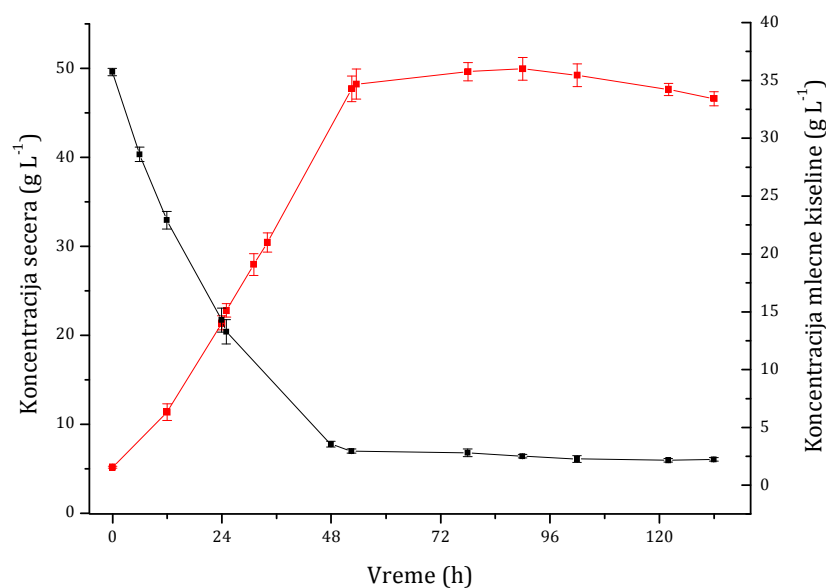
Na početku svakog sledećeg fermentacionog ciklusa zabeležen je porast broja *Lb. rhamnosus* imobilisanog na površinu zeolita. Najintenzivnija kolonizacija površine je zabeležena u toku prva 24 časa fermentacije. Intenzivno formiranje biofilma je verovatno rezultat združenog povoljnog efekta zeolita na održavanje pH vrednosti iznad 4,5 u toku fermentacije i afiniteta bakterija za razvijenu površinu zeolita. Zbog imobilizacije *Lb. rhamnosus* adsorpcijom na površinu zeolita, u biofilmu se ostvaruje bolji prenos mase i smanjena su difuziona ograničenja u odnosu na imobilizaciju u alginatni gel, gde su ćelije obuhvaćene nosačem. Time se mogu objasniti viši prinosi i produktivnosti u odnosu na studije drugih autora sa bakterijama zarobljenim u alginatnom gelu [206, 207].

Ukoliko se pogleda tabela 4.7. može se uočiti da su nešto više koncentracije mlečne kiseline postignute u trećem i četvrtom ciklusu. Iako je uočeno povećanje vijabilnosti u toku ukupnog vremena fermentacije (Slika 4.17), povećanje koncentracije mlečne kiseline u trećem i četvrtom ciklusu je verovatno rezultat nešto više početne koncentracije šećera u ovim ciklusima, budući da razlike između prinosa i koeficijenta prinosa trećeg i četvrtog ciklusa nisu statistički značajne.

#### **4.4.3.3. Uporedni prikaz mlečno-kiselinske fermentacije sa slobodnim i imobilisanim *Lb. rhamnosus* ATCC 7469**

U cilju procene efikasnosti procesa fermentacije sa recirkulacijom imobilisane biomase na zeolitu u odnosu na šaržni postupak sa slobodnim ćelijama, na slici 4.18. je prikazana kinetika šaržnog postupka. U tabeli 4.8. su uporedno prikazani najvažniji parametri šaržnog procesa sa slobodnim *Lb. rhamnosus* i prosečne vrednosti parametara recirkulacionog postupka sa imobilisanim *Lb. rhamnosus*.

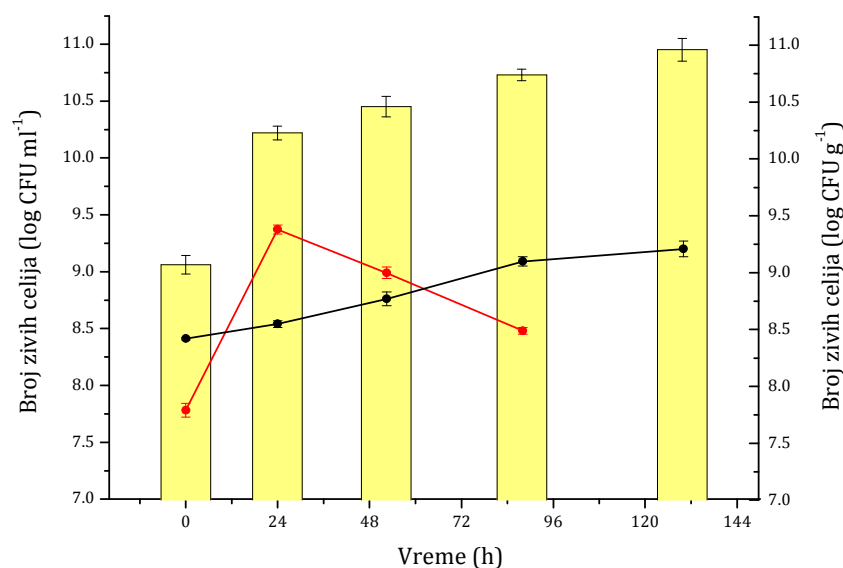
U procesu sa imobilisanim ćelijama proizvedena je viša koncentracija mlečne kiseline. Uzrok može biti razlika u početnom broju bakterija u šaržnom procesu i procesu sa recirkulacijom imobilisane biomase predstavljenim na slici 4.19. Zbog izrazite adhezije ćelija *Lb. rhamnosus* na površinu zeolita i dalje efikasne kolonizacije površine ovog nosača početna koncentracija bakterija izražena po ml fermentacionog medijuma je bila viša nego u šaržnom postupku (Slika 4.19.). Intenzivan rast i kolonizacija površine zeolita je naročito bila izražena u toku prvih 24h fermentacije. U toku prvog cikusa recirkulacionog procesa postignuta je gotovo trostruko viša produktivnost ( $1,62 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , Tabela 4.7.) u odnosu na sistem sa slobodnim ćelijama ( $0,66 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , Tabela 4.8.). Potrošnja šećera i proizvodnja mlečne kiseline (Slika 4.16.) su bili brži u odnosu na šaržni postupak (Slika 4.18.). Ipak, nakon 24 časa fermentacije, broj slobodnih ćelija u šaržnom procesu je prevazišao broj imobilisanih ćelija, ali su i prinos mlečne kiseline i koeficijent prinosa i produktivnost ostali veći u uzorku sa imobilisanim bakterijama (Tabela 4.7.). Ovo ukazuje da se više vrednosti procesnih parametara ostvaruju sa imobilisanim ćelijama iako je ukupan broj prisutnih ćelija u medijumu manji. Ovako povoljan efekat biofilma na proizvodnju mlečne kiseline zapazili su i drugi autori, pa su ispitivani različiti imobilisani sistemi BMK [208, 95, 209].



4.18. Kinetika šaržnog postupka proizvodnje mlečne kiseline na tečnoj destilerijskoj hleбноj džibri pomoću slobodnih *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 ćelija. Uslovi eksperimenta: koncentracija inokuluma 10%, kontrola pH dodatkom 30% NaOH u četvorosatnim intervalima, početna koncentracija šećera oko 50 g L<sup>-1</sup>. Legenda: crvena linija – koncentracija mlečne kiseline; crna linija – koncentracija šećera.

Tabela 4.8. Najvažniji parametri fermentacije sa slobodnim i imobilisanim ćelijama *Lb. rhamnosus* ATCC 7469. Eksperimentalni uslovi (za fermentaciju sa slobodnim ćelijama kao na slici 4.18., a za imobilisan sistem kao na slici 4.16.)

	Koncentracija mlečne kiseline (g L <sup>-1</sup> )	Prinos mlečne kiseline (g g <sup>-1</sup> )	Koeficijent prinosa (g g <sup>-1</sup> )	Zapreminska produktivnost (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
Fermentacija- slobodna biomasa	34,69±1,29	0,69±0,03	0,81±0,03	0,66±0,02
Fermentacija - imobilisana biomasa	40,43±2,21	0,81±0,02	0,96±0,04	1,32±0,03



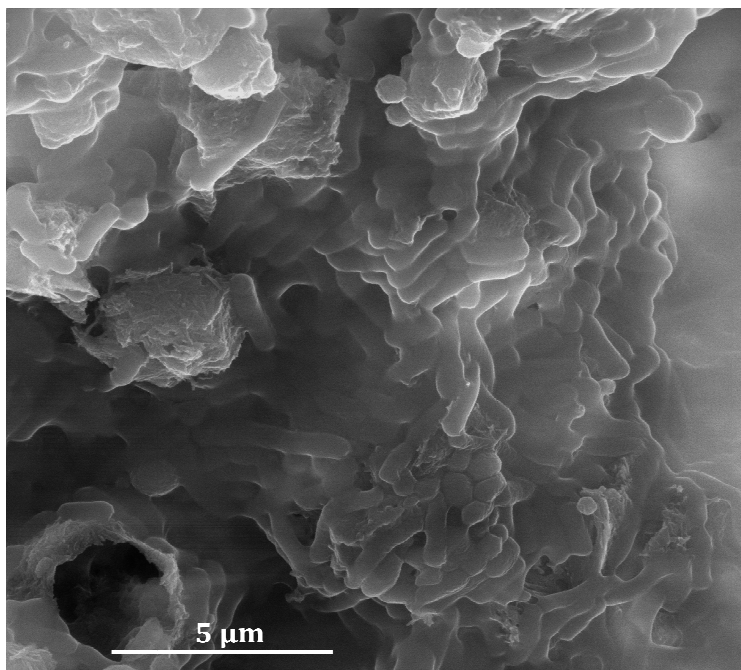
Slika 4.19. Uporedni prikaz broja živih ćelija u šaržnom procesu sa slobodnim *Lb. rhamnosus* i recirkulacionog postupka sa *Lb. rhamnosus* imobilisanim na zeolit. Legenda: crvena linija - broj slobodnih *Lb. rhamnosus* po ml fermentacionog medijuma, crna linija - broj imobilisanih *Lb. rhamnosus* po ml fermentacionog medijuma, stubići - broj imobilisanih bakterija po g zeolita. Eksperimentalni uslovi kao u tabeli 4.8.

Maksimalna produktivnost postignuta u šaržnom postupku je značajno manja u odnosu na prosečnu produktivnost postupka sa imobilisanim ćelijama. Produktivnost u imobilisanom sistemu je viša i u odnosu na rezultate postignute na ukupnoj džibri ( $1.49 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , Poglavlje 4.4.1., Tabela 4.6.) pri istoj početnoj koncentraciji šećera.

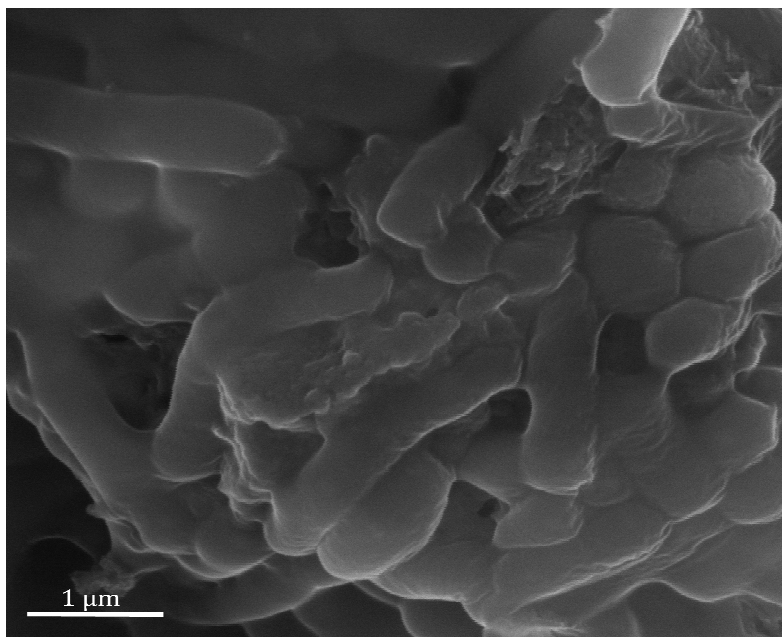
#### 4.4.3.4 Proizvodnja mlečne kiseline pomoću *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 imobilisanog na magnezijumom modifikovani zeolit

Modifikacija zeolita jonskom izmenom  $\text{Na}^+$  u zeolitnim molekulskim sitima sa  $\text{Mg}^{2+}$  je izvršena u skladu sa nutritivnim potrebama *Lb. rhamnosus* ATCC 7469. Kao izuzetno zahtevni mikroorganizmi u pogledu potreba za mineralima i izvorima azota, BMK koriste dosta složene i skupe medijume za rast. Hemijskom analizom sastava tečne džibre koja je data u Poglavlju 4.1. i uporednom analizom sa nutritivnim potrebama BMK [175, 176] pokazano je da džibra ima niži sadržaj Mg

u odnosu na potrebe BMK. Stoga je u ovom setu eksperimenata ispitan uticaj prisustva jona Mg u strukturi zeolita na stepen imobilizacije *Lb. rhamnosus* i proizvodnju mlečne kiseline u Mg-zeolit imobilisanom sistemu na tečnoj destilerijskoj džirbi. Elektronska mikrografija površine magnezijumom modifikovanog zeolita sa adsorbovanim bakterijama *Lb. rhamnosus* je predstavljena na slikama 4.20. i 4.21.



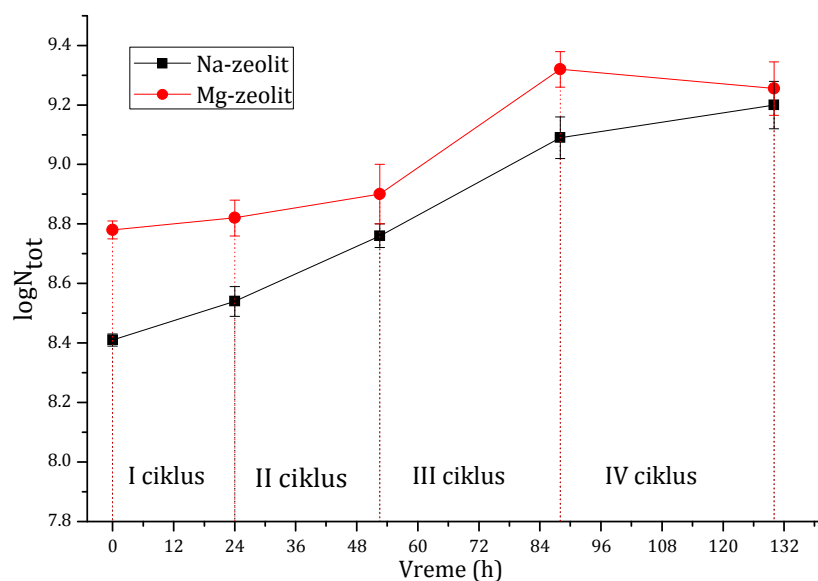
Slika 4.20. Elektronska mikrografija kolonizacije površine magnezijumom modifikovanog zeolita bakterijama *Lb. rhamnosus* ATCC 7469. Uslovi pri mikroskopiranju kao na slici 4.13.



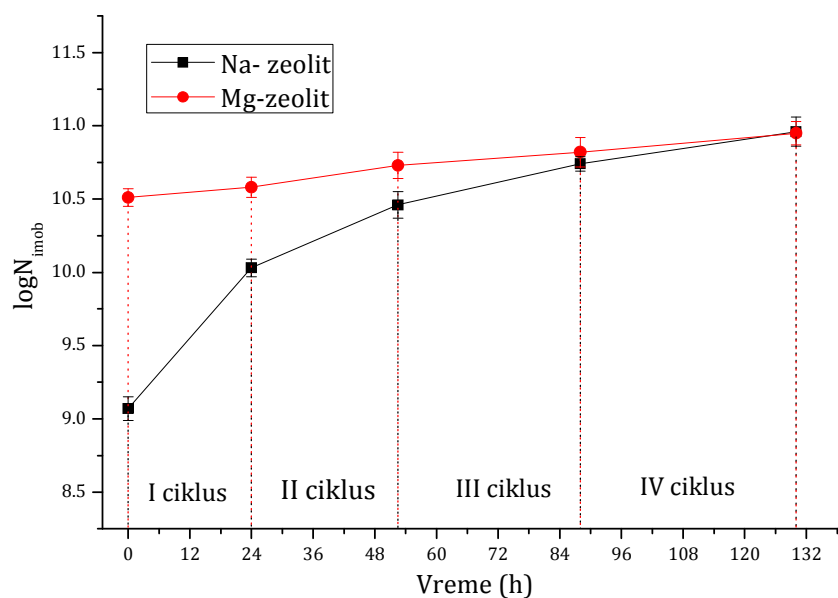
Slika 4.21. Elektronska mikrografija kolonizacije površine magnezijumom modifikovanog zeolita bakterijama *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 – detaljniji prikaz. Uslovi pri mikroskopiranju kao na slici 4.13.

Sa slika 4.20. i 4.21. se uočava da su bakterije adsorbovane za gotovo čitavu površinu modifikovanog zeolitnog nosača (Mg-zeolit). Grafički i tabelarni prikaz broja živih ćelija *Lb. rhamnosus* adsorbovanih na Mg-zeolit i Na-zeolit dat je na slikama 4.22. i 4.23. i u tabeli 4.9.

Na oba nosača je uočen efekat povećanja ukupnog broja bakterija i kolonizacije u toku ponovljenih ciklusa, ali je broj ćelija adsorbovanih na Mg-zeolit značajno veći u odnosu na Na-zeolit u toku prva tri ciklusa (Slika 4.23.). Intenzivnije vezivanje *Lb. rhamnosus* na površinu Mg-zeolit je rezultat prisustva Mg jona. Sa slike 4.22. se uočava da je ukupni početni broja ćelija u uzorku sa Mg-zeolitom viši za oko pola logaritamske jedinice u odnosu na Na-zeolit. Početan broj imobilisanih bakterija na Mg-zeolitu viši je za jednu i po logaritamsku jedinicu (Slika 4.23.) pa se može zaključiti da Mg vezan u strukturi zeolita ima veoma važnu ulogu u adsorpciji bakterija i da pozitivan efekat na rast bakterija nije samo rezultat prisustva  $Mg^{2+}$  koji je oslobođen u medijum iz zeolita jonskom izmenom sa  $Na^+$  u toku fermentacije.



Slika 4.22. Ukupan broj bakterija u medijumu u toku fermentacije sa imobilisanim *Lb. rhamnosus* na Mg-zeolit i Na-zeolit. Eksperimentalni uslovi: početna koncentracija šećera oko 50 g L<sup>-1</sup>, koncentracija Mg-imobilizata, odnosno Na-imobilizata 2% (w/v), mikroaerofilno, mešanje (90 obrt/min), kontrola pH dodatkom 30% NaOH u 4h intervalima, recirkulacija nakon smanjenja koncentracije šećera u medijumu ispod 10 g L<sup>-1</sup>.



Slika 4.23. Ukupan broj imobilisanih bakterija u medijumu u toku fermentacije sa imobilisanim *Lb. rhamnosus* na Mg-zeolit i Na-zeolit. Eksperimentalni uslovi kao na slici 4.22.



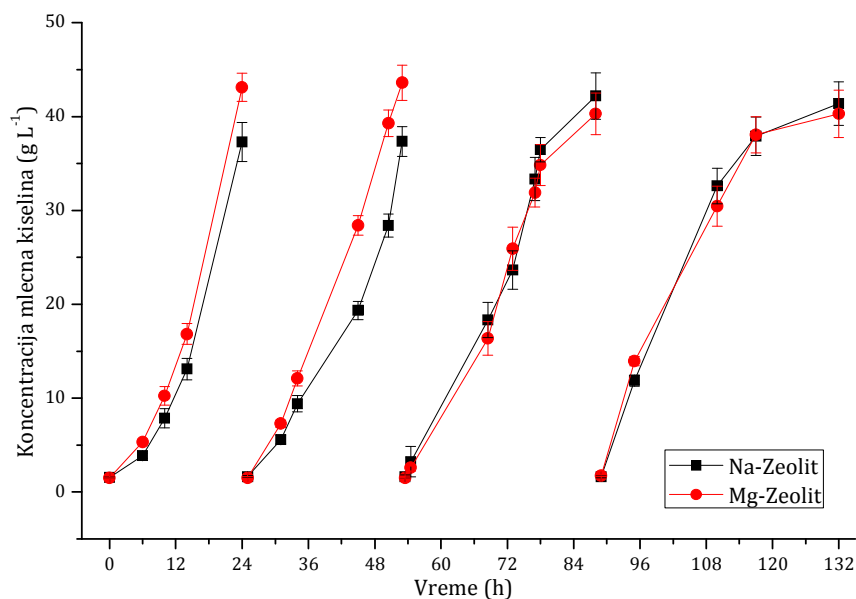
Tabela 4.9. Broj bakterija na početku svakog fermentacionog ciklusa sa imobilisanim *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 na Mg-zeolit i Na-zeolit. Eksperimentalni uslovi kao na slici 4.22.

		I ciklus	II ciklus	III ciklus	IV ciklus
logN <sub>tot</sub> *	Na-zeolit	8,41±0,02	8,54±0,05	8,76±0,04	9,09±0,07
	Mg-zeolit	8,78±0,03	8,82±0,06	8,90±0,10	9,32±0,06
logN <sub>imob</sub> **	Na-zeolit	9,07±0,08	10,03±0,06	10,46±0,09	10,74±0,05
	Mg-zeolit	10,51±0,06	10,58±0,07	10,73±0,09	10,82±0,10

\*N<sub>tot</sub> predstavlja ukupan broj živih ćelija *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 u ml fermentacionog medijuma (CFU ml<sup>-1</sup>)

\*\*N<sub>imob</sub> predstavlja broj imobilisanih živih ćelija *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 po g nosača (CFU g<sup>-1</sup>)

Analizom proizvodnje mlečne kiseline u toku četiri fermentaciona ciklusa koji su prikazani na slici 4.24. uočava se da se u toku prva dva ciklusa ostvaruje viša produktivnost i veća koncentracija mlečne kiseline u uzorcima sa Mg-zeolitom. Najvažniji parametri fermentacije sa imobilisanim *Lb. rhamnosus* ćelijama na Mg-zeolit i Na-zeolit su predstavljeni u tabeli 4.10. Najviša produktivnost od 1,80±0,05 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> i koncentracija mlečne kiseline od 43,13±1,49 g L<sup>-1</sup> je postignuta u toku prvog ciklusa u uzorku sa Mg-zeolitom. Nakon prve dve recirkulacije dolazi do izjednačavanja vrednosti važnih parametara fermentacije na različitim nosačima i nakon drugog ciklusa ne postoji statistički značajna razlika u proizvodnji mlečne kiseline u sistemu sa Mg-zeolitom i Na-zeolitom (Tabela 4.10.). U uzorku sa Mg-zeolitom je zbog prisustva Mg<sup>2+</sup> u nosaču početni broj bakterija u medijumu bio značajno viši pa je u ovim uzorcima postignut viši prinos i efikasnija konverzija šećera u mlečnu kiselinu (Tabele 4.9. i 4.10.).



Slika 4.24. Uporedni prikaz proizvodnje mlečne kiseline u imobilisanom sistemu sa nemodifikovanim (Na-zeolitom) i magnezijumom modifikovanim zeolitom (Mg-zeolitom). Eksperimentalni uslovi kao na slici 4.22.

Tabela 4.10. Važni parametri mlečno-kiselinske fermentacije sa *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 imobilisanim na Na-zeolit i Mg-zeolit. Eksperimentalni uslovi kao na slici 4.22.

		Koncentracija mlečne kiseline (g L <sup>-1</sup> )	Prinos mlečne kiseline (g g <sup>-1</sup> )	Koeficijent prinosa (g g <sup>-1</sup> )	Zapreminska produktivnost (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
I ciklus	Na-zeolit	37,31±2,08	0,75±0,02	0,94±0,02	1,55±0,07
	Mg-zeolit	43,13±1,49	0,86±0,04	0,99±0,01	1,80±0,05
II ciklus	Na-zeolit	37,36±1,59	0,74±0,03	0,93±0,01	1,33±0,06
	Mg-zeolit	43,61±1,89	0,86±0,01	0,99±0,01	1,56±0,02
III ciklus	Na-zeolit	42,19±2,48	0,84±0,03	0,98±0,02	1,21±0,04
	Mg-zeolit	40,29±2,21	0,81±0,02	0,98±0,02	1,17±0,03
IV ciklus	Na-zeolit	41,38±2,31	0,81±0,01	0,96±0,03	0,96±0,02
	Mg-zeolit	40,30±2,54	0,79±0,02	0,95±0,03	0,94±0,03

Pored povoljnog uticaja Mg<sup>2+</sup> na rast i kolonizaciju površine zeolita bakterijama *Lb. rhamnosus*, povećano prisutvo Mg<sup>2+</sup> u medijumu pogoduje metaboličkim procesima BMK i stimulatивно deluje na proizvodnju mlečne kiseline [175, 176]. Mg je veoma značajan kofaktor mnogih enzima [210]. Prisustvo Mg<sup>2+</sup>

neophodno je za aktivaciju ATP u reakcijama fosforilacije koje se odvijaju u toku glikolize i sinteze mlečne kiseline [211] (Poglavlje 2.3.2.).  $Mg^{2+}$  jon se ponaša kao Luisova kiselina i  $Mg^{2+}$  podstiče jonizaciju (npr. vode do hidroksilnog jona) [211] čime povoljno utiče na pH vrednost medijuma za rast BMK. Sa druge strane,  $Mg^{2+}$  prisutan u strukturi zeolita, kao Luisova kiselina podstiče adsorpciju BMK čija površina ima karakter Luisove baze, što dodatno objašnjava snažnu adsorpciju *Lb. rhamnosus* na površinu Mg-modifikovanog zeolita.

Koeficijent prinosa od  $0,99 \pm 0,01$  g  $g^{-1}$  ostvaren u toku prvog ciklusa u uzorku sa Mg-zeolitom ukazuje na visoku efikasnost konverzije šećera prisutnih u podlozi (Tabela 4.10.). Ipak, u svakom sledećem ciklusu se smanjuje i ukupna koncentracija jona  $Mg^{2+}$  prisutnih u medijumu čime se izjednačuju uzorci sa Mg-zeolitom i Na-zeolitom. U toku prva dva ciklusa fermentacije u uzorku sa Mg-zeolitom je postignuta oko 16% viša koncentracija mlečne kiseline i ako se uzmu u razmatranje sva četiri izvedena ciklusa u uzorcima sa Mg-zeolitom je postignuta oko 7% viša koncentracija i oko 8% viša produktivnost mlečne kiseline u odnosu na uzorak sa Na-zeolitom. U oba uzorka je uočen trend produženja vremena fermentacije u svakom narednom ciklusu, pa je značajno viša produktivnost u sistemu sa Mg-zeolitom u toku prva dva ciklusa uticala značajno na ukupnu vrednost produktivnosti u toku cele fermentacije.

Iako imobilizacija bakterija mlečne kiseline na zeolit nije do sada ispitivana, u nekim studijama je ispitivan uticaj prisustva metala i sastava nosača na stepen formiranja biofilma. Hrenović i sar. (2009) su ispitivali stvaranje biofilma fosforakumulirajuće bakterije *Acinetobacter junii* na prirodnim klinoptilolitima i efekat jonske izmene sa Mg [106]. Utvrdili su da je Mg modifikovan klinoptilolit bolji nosač za *A. junii* i da je statistički značajno viši broj bakterija imobilisan na površinu nosača bogatog magnezijumom. Zaključci Hrenović i sar. (2009) [106] su u potpunosti u skladu sa rezultatima ove disertacije iako je maksimalan broj imobilisanih ćelija postignut u okviru eksperimenta predstavljenog u disertaciji bio značajno veći. Broj imobilisanih ćelija *A. junii* na Mg-klinoptilolitu je iznosio  $9,5 \times 10^9$  CFU  $g^{-1}$  [106], dok je na Mg-zeolitu u ovoj disertaciji maksimalan postignut broj imobilisanih *Lb. rhamnosus* ćelija bio oko  $6,6 \times 10^{10}$  CFU  $g^{-1}$ . Biofilm *Lb.*

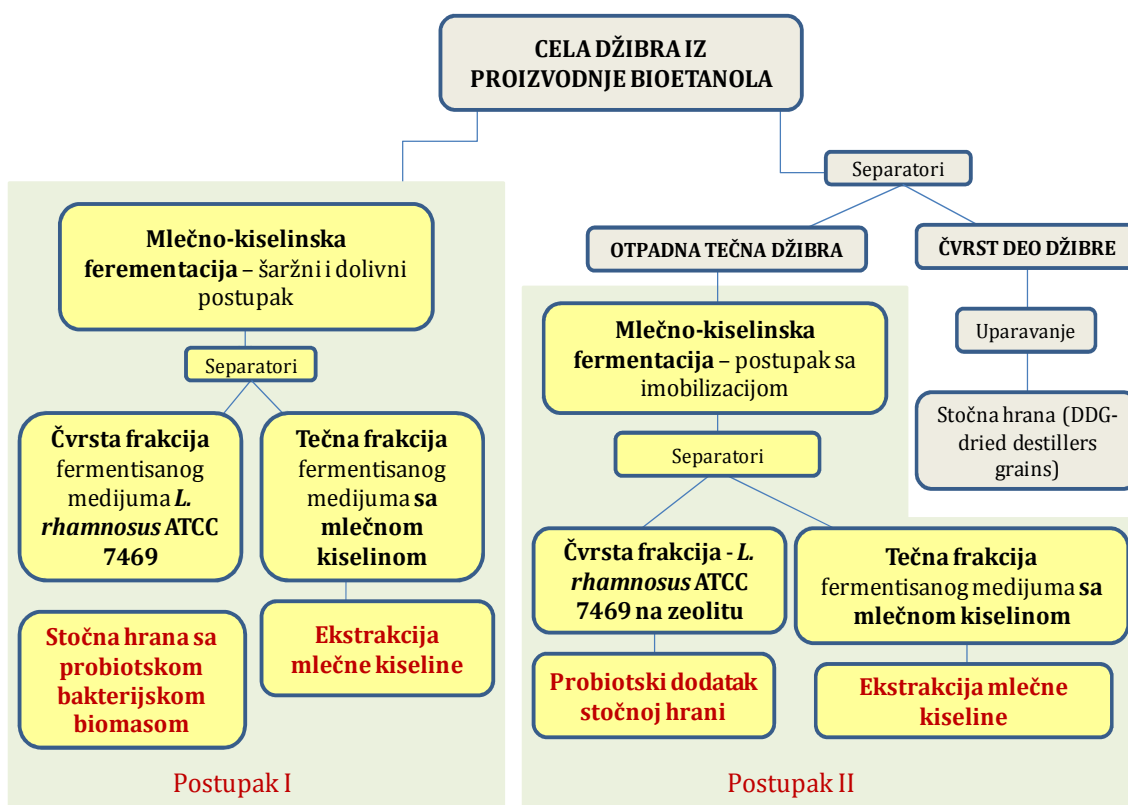
*rhamnosus* ATCC 7469 formiran na površini zeolita omogućio je značajno višu produktivnost, uz stalni porast broja ćelija u odnosu na sistem sa slobodnim ćelijama. Pozitivni efekti rasta u formi biofilma su uočeni i kod drugih bakterijskih vrsta, što je korišćeno u tretmanu otpadnih voda, kao i u prehrambenoj industriji [212].

U odnosu na eksperimente mlečno-kiselinske fermentacije sa slobodnim *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 (Poglavlje 4.4.3.3.), imobilizacijom na Mg-zeolit kao nosač postiže se gotovo četvororostruko viša produktivnost u toku prvih 24h ( $1,80 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) i dva i po puta viša prosečna produktivnost od  $1,29 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  u toku ukupnog vremena fermentacije (130h). Ovako visoke vrednosti produktivnosti postignute su sa tečnom frakcijom džibre koja je sirovina lošijeg kvaliteta za MKF u odnosu na ukupnu džibru (Poglavlje 4.1.). U dolivnom postupku na celoj džibri koji se pokazao najproduktivniji u prethodnim eksperimentima, maksimalna postignuta produktivnost je iznosila  $1,81 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  u toku 54h fermentacije.

U uslovima industrijske prerade džibre nakon proizvodnje etanola najčešće se upotrebljavaju separatori koji fermentisani medijum razdvajaju na otpadnu tečnu džibru i čvrst deo koji se dalje uparava i koristi se za stočnu hranu (DDG-dried distillers grains) (Slika 2.1.) [144, 51]. Tečna frakcija džibra je bogata organskim materijama i bez odogovarajućeg tretmana može predstavljati ekološki problem, a njeno sušenje je energetski veoma nepovoljan process. Ispitan postupak korišćenja imobilisanih bakterija *Lb. rhamnosus* na Mg-zeolit omogućava da se otpadna tečna frakcija džibre nakon odvajanja u separatorima potpuno iskoristi za visoko efikasan postupak proizvodnje mlečne kiseline. Imobilizacijom na Mg-zeolit je omogućeno da se nakon proizvodnje mlečne kiseline vredna biomasa *Lb. rhamnosus* odvoji od fermentisanog medijuma i koristi kao probiotski dodatak stočnoj hrani (eksperimentalni rezultati vezani za probiotska svojstva *Lb. rhamnosus* data su u poglavlju 4.5.2.) uz zeolit koji takođe ima povoljan efekat na zdravlje životinja [115].

#### 4.5. Mogućnosti proizvodnje stočne hrane iz ostatka nakon mlečno-kiselinske fermentacije

Na osnovu prethodno predstavljenih rezultata mogućnosti proizvodnje mlečne kiseline na džibri iz proizvodnje bioetanolu sastavljena je šema data na slici 4.25. Pored tradicionalnog korišćenja džibre nakon separacije za proizvodnju DDG i DDGS [144] predstavljeni su postupci iskorišćenja džibre za proizvodnju mlečne kiseline uz mogućnosti iskorišćenja zaostalog dela fermentisanog medijuma za primenu u ishrani životinja. Nakon završene fermentacije, u zavisnosti od strategije fermentativnog postupka, kao dodatna vrednost procesa zaostaje fermentisana džibra obogaćena biomasom *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 u postupku I, odnosno biomasa *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 imobilisana na zeolitu u postupku II.



Slika 4.25. Postupci za iskorišćenje sporednih proizvoda proizvodnje bioetanolu za proizvodnju mlečne kiseline i dodatka stočnoj hrani. Sivom bojom je predstavljen tradicionalni postupak korišćenja džibre, dok su žutom bojom predstavljeni novi postupci isptani u okviru ove disertacije.

U daljim eksperimentima je ispitan uticaj mlečno-kiselinske fermentacije na sastav džibre i nutritivna vrednost suvog čvrstog dela fermentisane džibre, kao i sposobnost preživljavanja *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta (niske pH vrednosti i prisustvo žučnih soli) za probiotsku primenu.

#### **4.5.1. Hemijski sastav i nutritivna vrednost fermentisanog medijuma za primenu u ishrani životinja**

U Srbiji se džibra iz proizvodnje etanola koristi u tečnom obliku za ishranu domaćih životinja zbog visokih energetske troškova njenog sušenja. U cilju ispitivanja kvaliteta i hemijskog sastava zaostalog medijuma nakon mlečno-kiselinske fermentacije za ishranu životinja, čvrsta frakcija zaostalog medijuma nakon MKF na hlebnoj džibri je osušena do uobičajene vlažnosti za suhu destilerijsku džibru sa rastvornim materijama (SDDŽRM) od oko 10% [147]. Usled mlečno-kiselinske fermentacije krajnja pH vrednost fermentisanog medijuma iznosi oko 4, što dodatno smanjuje podložnost kontaminaciji i olakšava čuvanje.

U tabeli 4.11. je prikazan sadržaj najvažnijih komponenata bitnih za procenu kvaliteta stočne hrane. Predstavljene su vrednosti za nefermentisanu džibru i sadržaj istih komponenata nakon MKF iste džibre.

Tabela 4.11. Sadžaj vlakana i njihov relativni udeo (sve izraženo u g po kg suve materije medijuma, odnosno, hlebne džibre)

Sastav	Suvi ostatak nefermentisane džibre (g kg <sup>-1</sup> SM)	Suvi ostatak fermentisane džibre (g kg <sup>-1</sup> SM)
Suva materija	89,17±0,18*	89,45±0,22*
Proteini	402,40±1,27	386,52±2,97
Masti	49,20±0,71	61,15±1,58
Pepeo	3,50±0,62	6,04±1,13
NFE**	493,50 ±3,11	469,00±2,85
NDF**	60,55±6,58	62,20±6,55
ADF**	20,40±2,10	23,10±1,90
ADL**	3,40±0,30	4,62±0,71
Hemiceluloza	40,15±4,45	38,90±4,92
Celuloza	17,00±2,40	18,46±2,88
Sirova vlakna	20,40±2,12	23,10±1,86

\* Suva materija je izražena u %

\*\*NFE –nitrogen free extract; NDF-neutral detergent fibres; ADF- acid detergent fibres; ADL- acid detergent lignin

Za upotrebu DDGS u ishrani svinja sadržaj vlage bi trebao da bude ispod 13,5% [213], dok Američki sekretariat za žitarice (American Grains Council) preporučuje da sadržaj suve materije u suvim ostacima kukuruzne džibre bude oko 89% [214]. Sadžaj vlage u ispitivanim uzorcima nefermentisane i fermentisane hlebne džibre iznosi oko 10,5% što odgovara kriterijuma oba stručna tela. Razlike u sadržaju suve materije usled MKF nisu statistički značajne. Zbog fine strukture suspendovanih čestica u hleboj džibri vlaga se veoma lako uklanja iz čvrstog ostatka, ali se istovremeno stvara kompaktan ostatak sušenjem u sloju, što zahteva mlevenje. Sa druge strane, ovakava svojstva fermentisane džibre omogućavaju primenu niže temperature i brže sušenje što smanjuje mogućnost kontaminacije.

Sadržaj proteina u nefermentisanoj džibri je iznosio 402,40±1,27 g kg<sup>-1</sup> SM i nešto je viši od maksimalnog propisanog sadržaja proteina u stočnoj hrani koji iznosi 400 g kg<sup>-1</sup> SM [142]. Sadržaj proteina u fermentisanoj džibri (386,52±2,97 g kg<sup>-1</sup> SM) je značajno niži u odnosu na nefermentisanu džibru (p=0,0023<0,05) i odgovara Pravilniku o kvalitetu hrane za životinje [142]. Određivanjem koncentracije α-amino azota u tečnom delu hlebne džibre pre i nakon fermentacije

pokazano je da nakon fermentacije dolazi do povećanja koncentracije  $\alpha$ -amino azota od oko 16%. U nefermentisanoj tečnoj džibri je određeno da je koncentracija  $\alpha$ -amino azota bila 236.8 mg L<sup>-1</sup> dok je nakon fermentacije koncentracija bila 274.3 mg L<sup>-1</sup>. Ovaj efekat je verovatno rezultat proteolitičke sposobnosti *Lb. rhamnosus* ATCC 7469. Za više sojeva *Lb. rhamnosus* je već objavljeno da poseduju proteolitičku aktivnost čime omogućavaju asimilaciju azota prisutnog u medijumu u formi proteina [214, 215].

Analizom vrednosti ostalih komponenti sirovine, kao što su masti, pepeo i sirova vlakna, uočava se statistički značajno uvećanje sadržaja masti ( $p=0,02563<0,05$ ) i pepela ( $p=1,34\times 10^{-6}<0,05$ ), dok porast sadržaja sirovih vlakana nije značajan. Sadržaj masti nakon fermentacije je iznosio  $61,15\pm 1,58$  g kg<sup>-1</sup> SM, što je oko 24% više u odnosu na nefermentisani uzorak. Efekat uvećanja sadržaja masti se može objasniti sposobnošću BMK da proizvode konjugovane masne kiseline (KMK) [217]. Za soj *Lb. rhamnosus* AKU 1124 je potvrđeno da proizvodi značajnu koncentraciju cis-9,trans-11-18:2 konjugovanih masnih kiselina (oko 1,5mg ml<sup>-1</sup> medijuma) koje su važne za ishranu životinja [218, 219]. U ispitivanjima proizvodnje konjugovanih masnih kiselina na mleku ili povrću pomoću BMK najčešće je korišćen egzogeni izvor polinezasićenih masnih kiselina (najčešće linolne kiseline, all-cis-9,12-oktadekadienska kiselina) kao prekursor, u koncentraciji od oko 0,25% (v/v) [220]. Sadržaj pojedinačnih masnih kiselina u nefermentisanoj i fermentisanoj hleбноj džibri u ovom radu nije bio eksperimentalno određen. Na osnovu literaturnih podataka za uobičajeni sastav masnih kiselina prisutnih u džibri može se očekivati da je prisutna koncentracija u prvom redu linolne kiseline dovoljna za proizvodnja KMK [143]. U tabeli 4.12. data je literaturna vrednost prosečnog sadržaja masnih kiselina u dva tipa suvih ostataka džibre pšeničnog porekla koja po sastavu i poreklu najviše odgovara hleбноj džibri korišćenoj u okviru disertacije. Uočava se da su dominantne komponente upravo polinezasićene masne kiseline, najviše linolna i linoleinska koje čine oko 60% svih prisutnih masnih kiselina.



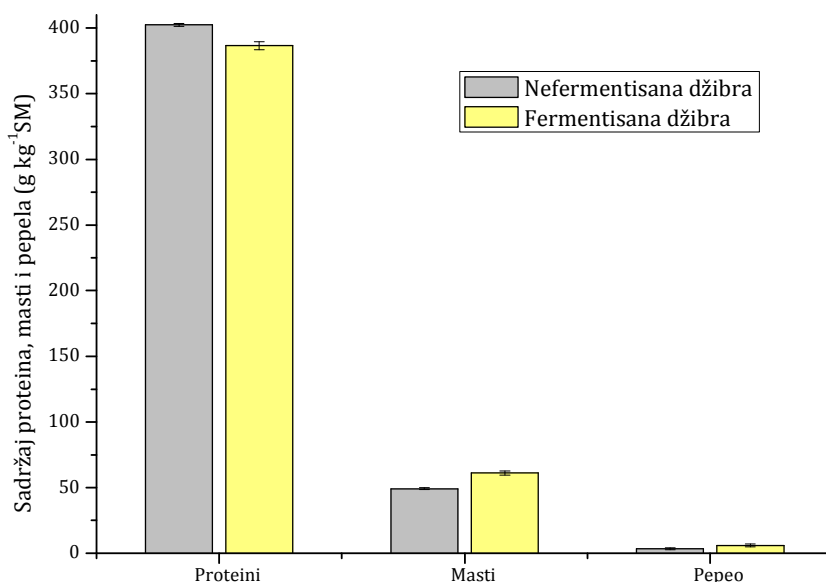
Tabela 4.12. Sadržaj masnih kiselina u suvim ostacima dve vrste pšenične džibre [178]

	Suvi ostaci pšenične džibre (Kanadska Prairie Spring vrsta) (% prisutnih KMK)	Suvi ostaci pšenične džibre (durum pšenica) (% prisutnih KMK)
C 14:0	0,3	0,2
C 16:0	19,1±0,3	18,9±0,1
C 16:1	0,3	0,2
C 18:0	1,6	1,9
C 18:1	15,1±0,8	17,1±0,9
C 18:2	56,9±1,4	54,4±0,9
C 18:3	4,2±0,3	4,1±0,2
C 20:0	0,4	0,3
C 20:1	0,8	0,9
C 20:2	0,2	0,2
C 22:0	0,4	0,4
C 22:1	0,5	0,8
C 24:0	0,4	1,0

Postupkom ekstrakcije masti Soxlet metodom koja je korišćena u ovoj disertaciji ekstrakuju se i konjugovane masne kiseline tako da je moguće da do povećanja sadržaja masti nakon fermentacije dolazi upravo zbog potencijalne sposobnosti korišćenog soja da proizvodi konjugovane masne kiseline. U literaturi nisu pronađene studije drugih autora vezane za uticaj MKF na kvalitet fermentisane džibre iz proizvodnje bioetanola kao stočne hrane. Dobijene karakteristike se mogu porediti sa literaturnim podacima za suvi ostatak džibre različitog porekla (SODž, SODžRM) koji se intenzivno koristi u ishrani stoke. Vrednosti sadržaja masti u ispitanim uzorcima fermentisane džibre su niže u odnosu SODžRM dobijen nakon proizvodnje bioetanola na različitim hibridima kukuruza iz Srbije [143]. Ovakvi rezultati su očekivani budući da je ovde ispitivana džibra hlebnog porekla, odnosno, očekivano je da njen sastav bliže korelira sa sastavom džibre pšeničnog porekla. Sadržaj masti u čvrstom delu džibre pšeničnog porekla je u opsegu od 4,9-5,9% suve materije [220], što odgovara vrednostima u suvom ostatku nefermentisane hlebne džibre ( $49,20 \pm 0,71 \text{ g kg}^{-1}$  suve materije, oko 4,9%), a niže je od sadržaja masti u uzorku nakon fermentacije ( $61,15 \pm 1,58 \text{ g kg}^{-1}$

SM, oko 6,1% suve materije). MKF povoljno utiče na sadržaj masti i rezultuje porastom njihovog sadržaja.

Sadržaj pepela je gotovo udvostručen nakon MKF (Tabela 4.11.), pa je na dijagramu na slici 4.26. dat pregled statistički značajno promenjenih vrednosti usled MKF.



Slika 4.26. Komponente suvog ostatka hlebne džibre statistički značajno promenjene pod uticajem MKF.

Ukupan sadržaj ugljenohidratnih komponenti stočne hrane bitnih za procenu njenog kvaliteta obuhvata određivanje sadržaja sirovih vlakana (NDF- neutral detergent fibre, ADF- Acid detergent fibre i ADL- Acid detergent lignin) i bezazotnog ekstrakta (NFE) [149]. Mlečno-kiselinska fermentacija ne utiče statistički značajno na sadržaj sirovih vlakana prisutnih u ispitivanoj sirovini dok je sadržaj bezazotnog ekstrakta (NFE) značajno snižen ( $p=0,0082<0,05$ ) kao rezultat MKF (Tabela 4.11.). Vrednosti vlakana, NDF, ADF i ADL su značajno niže u odnosu na suvi ostatak kukuruzne džibre (Tabela 4.11., [147]). Sadržaj NFE predstavlja udeo relativno lako asimilativnih supstanci koje ne sadrže azot u ukupnoj suvoj materiji ispitivane stočne hrane [149]. Ovaj parametar nije moguće odrediti eksperimentalno već se određuje računski na osnovu eksperimentalnih vrednosti ostalih parametara (proteina, masti, sirovih vlakana i pepela). NFE vrednost je značajnija za procenu pogodnosti hrane za ishranu monogastričnih

životinja dok vrednosti vlakana imaju veći značaj u ishrani preživara koji mogu da razgrađuju celulozu, hemicelulozu i ostala teže asimilativna jedinjenja koja nisu nužno ugljenohidratna (pr. lignin) [149]. Smanjenje NFE vrednosti medijuma je rezultat dominantnog uticaja vrednosti proteina na NFE vrednost, ali i verovatnog utroška dela lakše asimilativnih ugljenih hidrata u toku MKF (Poglavlje 3.2.13.4.). Ipak, NFE vrednost u suvom ostatku fermentisane hlebne džibre od  $469,00 \pm 2,85 \text{ g kg}^{-1} \text{ SM}$  je viša od najviše vrednosti ( $423,3 \text{ g kg}^{-1} \text{ SM}$ ) određene u studiji Semenčenko i sar. (2012) u suvom ostatku kukuruzne džibre [147]. Na osnovu analize ugljenohidratnog sastava može se zaključiti da je suvi ostatak fermentisane hlebne džibre pogodan za ishranu monogastričnih životinja zbog niskog sadržaja vlakana i visokog sadržaja ne-azotne ugljenohidratne komponente (NFE).

U tabeli 4.13. su predstavljene vrednosti energetske parametara i svarljivosti suvog ostatka hlebne džibre, pre i nakon MKF. Svarljivost suvog ostatka fermentisane džibre je nešto viša u odnosu na nefermentisani uzorak iako razlika nije statistički značajna. Vrednost svarljivost od preko 96% je izuzetno povoljna i ukazuje da se može gotovo potpuno razgraditi i preuzeti u organizmu. Ovakav rezultat je posledica niskog sadržaja sirovih vlakana i visokog sadržaja ne-azotne komponente, koja se ne mogu u potpunosti razgraditi i kao takva otežavaju asimilaciju unete hrane. Semenčenko i sar. (2012) su prijavili najvišu svarljivost suvog ostatka kukuruzne džibre od  $818,8 \pm 2,3 \text{ g kg}^{-1} \text{ SM}$  [147].

4.13. Tabela energetske parametara i svarljivosti

	ME, kcal kg <sup>-1</sup>	DE, kcal kg <sup>-1</sup>	Svarljivost, g kg <sup>-1</sup> SM
Nefermentisana džibra	4183,56±1,1	4206,49±0,99	964,45±1,34
Fermentisana džibra	4153,31±2,4	4175,18±0,79	966,95±0,51

Usled MKF vrednosti metaboličke i svarljive energije suvog ostatka fermentisane džibre su se statistički značajno smanjile u odnosu na nefermentisanu hlebu džibru, iako su značajno više u odnosu na vrednosti dobijene za suvi ostatak kukuruzne džibre [147]. U studiji Cozanet i sar. (2010) koji su ispitivali energetske parametre suvog ostatka džibre iz proizvodnje bioetanol na pšenici je pokazano da je svarljiva energija suvog ostatka pšenične

džibre oko 3568 kcal kg<sup>-1</sup>, dok je prosečna metabolička energija oko 3336 kcal kg<sup>-1</sup> [221], što je značajno niže od vrednosti postignutih u ovoj disertaciji.

Može se zaključiti da suvi ostatak fermentisane hlebne džibre bakterijama mlečne kiseline odgovara po svom sastavu nutritivnim potrebama stoke, u prvom redu svinja i drugih monogastričnih životinja. Kao posledica MKF smanjen je sadržaj proteina i povećan sadržaj masti i pepela. Visoke vrednosti bezazotnog ekstrakta, masti, svarljivosti, metaboličke i svarljive energije kvalifikuju suvi fermentisani ostatak nakon postupka proizvodnje mlečne kiseline na hlebnj džibri kao visoko kvalitetnu stočnu hranu. Scheuermann (1993) [3] je pokazao da prisustvo probiotskih bakterija povećava digestibilnost azotnih materija u stočnoj hrani što je potvrđeno i u ovoj disertaciji (Tabela 4.13.). Da bi se omogućila primena suvog fermentisanog ostatka i imobilisanih *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 kao probiotskog dodatka ishrani stoke, u narednom poglavlju su predstavljeni rezultati ispitivanja funkcionalnih probiotskih svojstava soja *Lb. rhamnosus* ATCC 7469.

#### **4.5.2. Probiotska svojstva *Lb. rhamnosus* ATCC 7469**

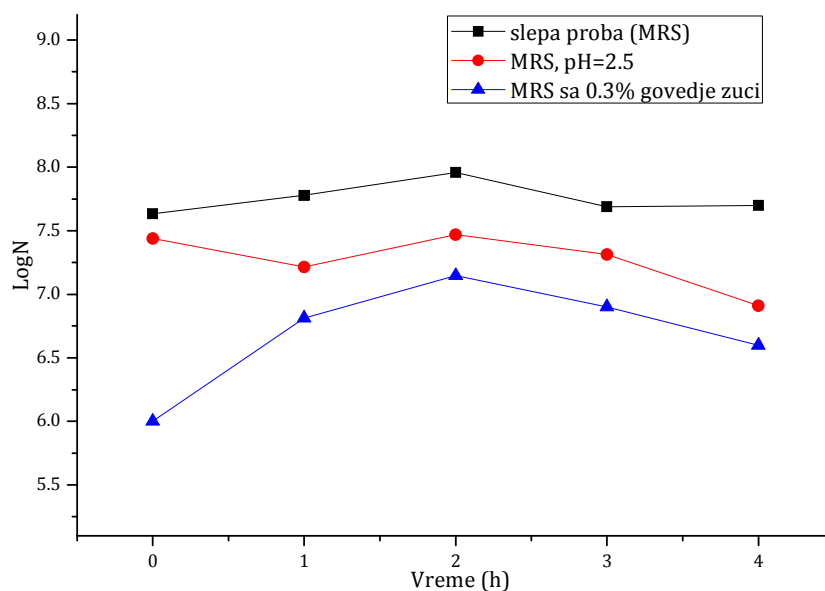
##### **4.5.2.1. Preživljavanje *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 pri niskom pH i u prisustvu žučnih soli**

Probiotske karakteristike variraju među sojevima iste vrste i neophodno je da se pojedinačno potvrde za svaki soj [222, 223]. Pozitivni zdravstveni efekti potencijanih probiotskih bakterija zavise od njihove sposobnosti preživljavanja pri niskom pH u želucu tokom prolaska kroz gastrointestinalni trakt (GIT). U ispitivanju je korišćenja metodologija Prasad i sar. (1998) [173], iako protokoli za ispitivanje probiotskih karakteristika nisu jasno definisani. Ispitivanje i karakterizacija probiotskih sojeva za animalnu, ali i humanu upotrebu nije standardizovana, u prvom redu zbog složenosti ekosistema GIT i multifaktorijalne varijabilnosti koja vlada u digestivnom traktu. Na slici 4.27. je prikazano preživljavanje *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 nakon četvorosatnog izlaganja pH vrednosti od 2.5 i koncentraciji od 0,3% žučnih soli, u cilju imitacije uslova koji vladaju u želucu. U uzorku sa žučnim solima ukupan broj živih ćelija je bio  $4 \times 10^6$

CFU ml<sup>-1</sup> nakon četiri sata, odnosno procenat preživljavanja je 85,7% u odnosu na kontrolni uzorak. Najveći pad broja ćelija je ostvaren u trenutku dodavanja žučnih soli, 0h i iznosio je 1×10<sup>6</sup> CFU ml<sup>-1</sup> (Slika 4.27.). Potom je broj ćelija rastao do kraja 2h i nakon toga je postepeno opadao. Ipak, krajnji broj ćelija nakon 4h je bio viši u odnosu na početnu vrednost u 0h. Kao što je već navedeno, eksperimentalni dizajn za ispitivanje važnih probiotskih svojstava u *in vitro* uslovima nije jednoznačno definisan i preporuke Svetske Zdravstvene Organizacije (SZO) ne daju precizna uputstva za utvrđivanje karakteristika [127], tako da se razlikuju strategije korišćene u različitim studijama. U studiji Yavuzdurmaz (2007), gde je korišćena ista metodologija kao i u ovoj disertaciji, nije uočen značajan pad broja ćelija u 0h i krajnji broj ćelija je bio 1×10<sup>6</sup> – 2,5×10<sup>6</sup> CFU ml<sup>-1</sup> u zavisnosti od soja (*Lactobacillus oris*, *Lactobacillus fermentum*) [184,173].

U uzorku sa pH vrednošću 2,5 u toku prva dva sata broj ćelija se neznatno smanjio u odnosu na kontrolni uzorak. Nakon prva dva časa procenat preživljavanja u uzorku sa pH 2,5 je bio oko 93,8% u odnosu na kontrolni uzorak. Nakon 4h je broj ćelija iznosio 8,1×10<sup>6</sup> CFU ml<sup>-1</sup>, dok je procenat preživljavanja bio oko 88%. Na pH vrednost u digestivnom traktu značajno utiče prisustvo hrane [223], naročito proteini mogu da utiču na pH svojim puferskim kapacitetom. U ispitivanju preživljavanja *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus johnsonii* B-2178, *Lactobacillus gasserii* B-14168 i *Lactobacillus salivarius* B-1950 najveći broj ćelija *Lactobacillus johnsonii* B-2178 je preživeo 3 sata pri pH vrednosti 2 u MRS medijumu (oko 10<sup>5</sup> CFU ml<sup>-1</sup>) bez dodataka, dok se u prisustvu kazeina i skroba povećava približno za jednu logaritamsku jedinicu [225]. Soj *Lb. rhamnosus* korišćen u ovoj disertaciji je pokazao bolje preživljavanje iako nisu korišćeni dodaci medijumu. Na osnovu zapažanja Kathwer i sar. (2010) i Sánchez i sar. (2010), dodatak proteina u vidu kazeina ili mleka značajno je popravio stepen preživljavanja bakterija [225, 226]. Na osnovu ovoga se može očekivati da prilikom primene biomase *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 prisutne u ostatku nakon MKF hlebne džibre za koji je pokazano da sadrži visoku koncentraciju proteina (Poglavlje 4.5.1.) bude ostvaren visok stepen preživljavanja i u *in vivo* uslovima prilikom primene u ishrani životinja. Takođe, uočeno je da adaptacija BMK na niske pH

vrednosti utiče na preživljavanje prilikom prolaska kroz gornje delove intestinalnog trakta zbog povišene ekspresije gena za stres-proteine [222]. Moguće je da kontrola pH vrednosti u toku mlečno-kiselinske fermentacije u intervalima od 4 sata može da utiče na adaptabilnost *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 na snižene pH vrednosti u gastrointestinalnom traktu.

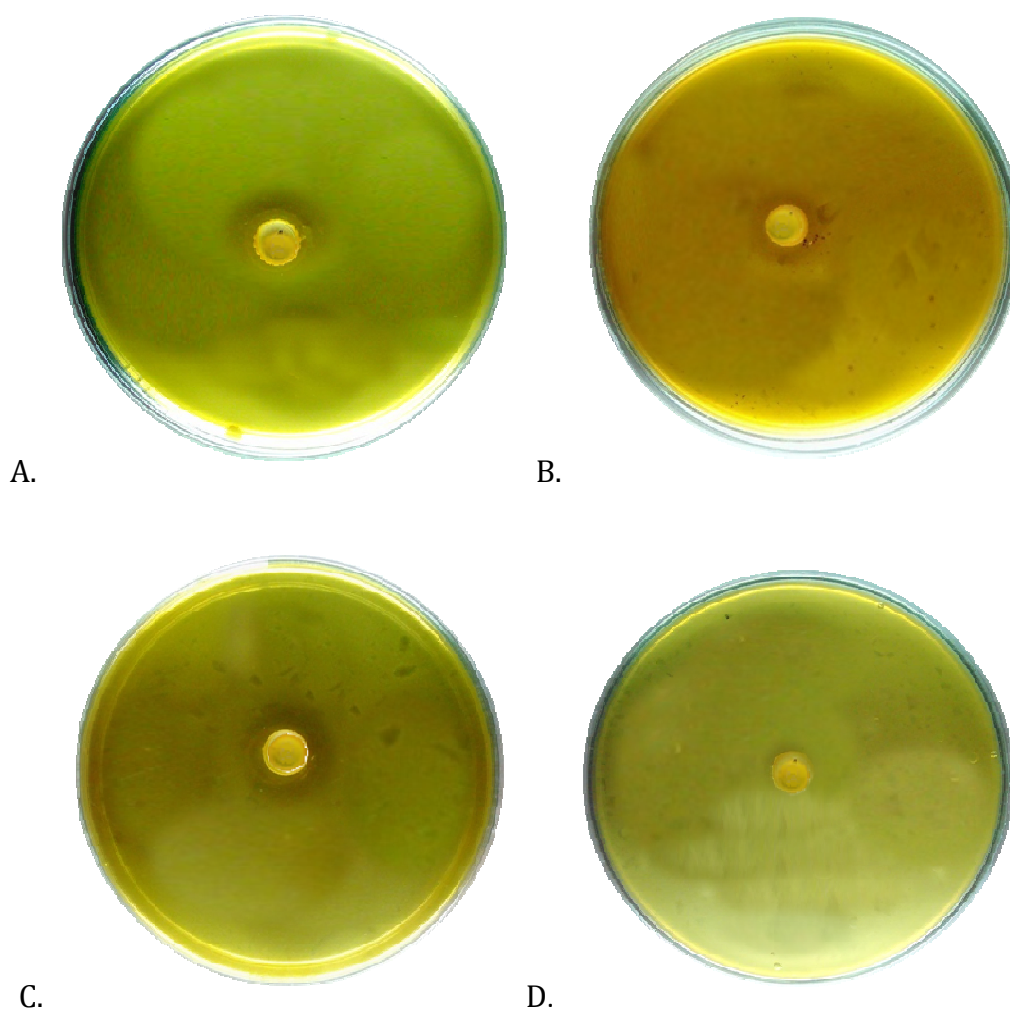


Slika 4.27. Uticaj niske pH vrednosti i prisustva žučnih soli na broj ćelija *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 u toku četiri sata. Uslovi eksperimenta: početni broj ćelija  $6 \times 10^7$ , inkubirano na  $37^\circ\text{C}$  tokom 4 h, anaerobno, statično, u 80 ml odgovarajućeg medijuma.

Prema Evropskoj regulativi [227], minimalni sadržaj živih bakterija u ukupnoj masi stočne hrane predstavlja jednu od najvažnijih karakteristika hrane obogaćene probiotskom biomasom. Ukupan broj bakterija rodova *Lactobacillus* sp. and *Enterococcus* sp. u intestinalnom traktu životinja iznosi  $10^5 - 10^8$  CFU g<sup>-1</sup> i preporuka je da njihov broj bude od  $10^6 - 10^9$  CFU kg<sup>-1</sup> u ukupnoj masi stočne hrane [161,228]. Nakon dolivnog procesa na džibri ostvaren je broj ćelija od preko  $10^9$  CFU ml<sup>-1</sup>, dok je u postupku sa imobilisanim *Lb. rhamnosus* nakon fermentacije na tačnoj džibri ostvaren broj bakterija od  $2,1 \times 10^9$  CFU ml<sup>-1</sup>, dok je u biofilmu na zeolitu broj imobilisanih ćelija *Lb. rhamnosus* bio  $6 \times 10^{10}$  CFU g<sup>-1</sup> (Tabela 4.9.).

#### 4.5.2.2. Ispitivanje antimikrobnog delovanja *Lb. rhamnosus* ATCC 7469

Džibra nakon mlečno-kiselinske fermentacije ima više prednosti u odnosu na nefermentisanu džibru, iz ugla primene u stočnoj ishrani. Generalno, nefermentisana džibra se koristi za stočnu hranu u dve forme: kao vlažna džibra (nakon delimičnog uparavanja) i kao suva džibra (nakon uparavanja). Zbog visokih energetske troškova procesa uparavanja, u Evropi se dominantno koristi tečna džibra, dok se u Americi, u ishrani životinja koristi uparena džibra [229 - 231]. Sa druge strane, nedostatak tečne džibre je podložnost kontaminaciji zbog visokog sadržaja vlage. U fermentisanoj džibri smanjenjem pH usled proizvodnje mlečne kiseline otežan je rast patogenih mikroorganizama. Mlečna kiselina deluje inhibitorno na rast patogena u gastrointestinalnom traktu, što je važno sa aspekta probiotske primene, pa je u *in vitro* uslovima ispitana osetljivost najvažnijih patogenih bakterija gastro-intestinalnog trakta na *Lb. rhamnosus* ATCC 7469. Na slici 4.28. je predstavljena antimikrobna aktivnost *Lb. rhamnosus* ATCC 7469.



Slika 4.28. Antimikrobna aktivnost *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 na različite mikroorganizme. Legenda: A. *Listeria innocua* B. *Shigella sonnei* C. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 D. *Salmonella enteritidis* ATCC 13076

Sa slike 4.28. se uočava da soj *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 deluje inhibitorno na rast ispitivanih mikroorganizama: *Listeria innocua*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Najuža zona inhibicije je uočena prema *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 i može se označiti kao delimično osetljiv. U cilju provere hemijske prirode antimikrobnog jedinjenja koje proizvodi *Lb. rhamnosus* ATCC 7469, na ivicu bunara u koji je dodat uzorak stavljeno je znace pronaze E. Pronaza E se dodaje sa ciljem da se ispita hemijska priroda antimikrobnog jedinjenja. Ukoliko soj proizvodi antimikrobno jedinjenje proteinske prirode, odnosno bakteriocine, na mestu dodatka pronaze se formira zona oblika polumeseca usled razgradnje proteinske delujuće supstance. Na slici 4.28. se vidi

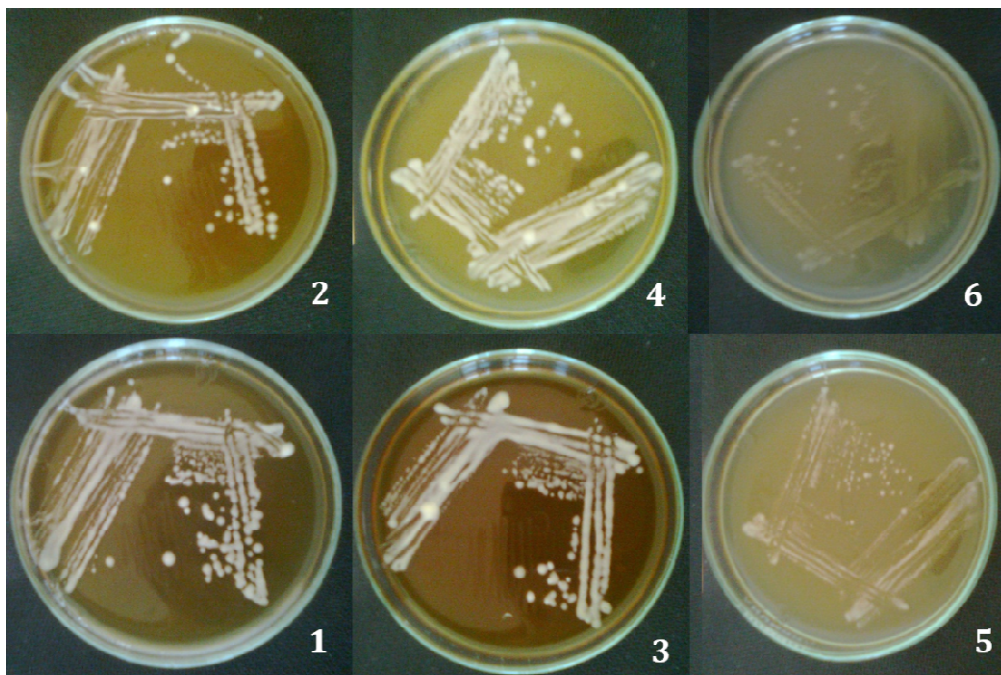


da ni u jednom od uzoraka ne nastaje antimikrobno jedinjenje proteinske prirode. Može se pretpostaviti da antimikrobno dejstvo *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 potiče od intenzivne sposobnosti proizvodnje mlečne kiseline, budući da su brojne studije pokazale osetljivost vrsta *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Staphylococcus aureus* itd. Na dejstvo mlečne kiseline [232-234].

#### **4.5.2.3. Proizvodnja egzopolisaharida *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 u prisustvu različitih šećera**

U važna funkcionalna svojstva probiotika se ubraja sposobnost proizvodnje egzopolisaharida [125]. Još uvek se tačno ne zna uloga egzopolisaharida, ali je uočeno da mogu povoljno da utiču na preživljavanje u surovim uslovima gastrointestinalnog trakta, da doprinesu adheziji za epitel zidova creva i ispolje imunomodulatorno i antikancerogeno delovanje [235, 236]. Takođe pojedine vrste egzopolisaharida BMK imaju svojstvo prebiotika [237], iako ova svojstva zavise dosta od hemijskog sastava egzopolisaharida. Na slici 4.29. je dat prikaz rasta *Lb. rhamnosus* i proizvodnje egzopolisaharida na MRS agarnim pločama sa različitim izvorima ugljenika. Može se uočiti da je proizvodnja egzopolisaharida, koji se uočavaju kao beličasta, sluzava, tegljiva masa na površini podloge, najviša na glukozu, fruktozu, galaktozu i laktozu, dok je na saharozu i maltozu uočena slabija produkcija egzopolisaharida.

Looijesteijn i sar. (2001) su pokazali u *in vivo* studiji da se egzopolisaharidi soja *Lactococcus lactis* izlučuju gotovo potpuno ne izmenjeni nakon oralne primene kod laboratorijskih miševa [238]. Isti autori su u *in vitro* uslovima utvrdili da prisustvo egzopolisaharida ne utiče značajno na preživljavanje *Lactococcus lactis* u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta [238]. Budući da je u okviru ove disertacije ispitivana mogućnost primene biomase *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 kao dodatka ishrani životinja razmotrena je sposobnost ovog soja da proizvodi egzopolisaharide na različitim šećerima koji se mogu naći u gastrointestinalnom traktu životinja.



Slika 4.29. Proizvodnja egzopolisaharida *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 na različitim šećerima. Legenda: 1-glukoza, 2- fruktoza, 3-galaktoza, 4-laktoza, 5- maltoza, 6-saharoza

Svojstvo *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 da proizvodi egzopolisaharide je pokazalo povoljne efekte u pravcu imobilizacije na površinu zeolita i time omogućilo visoku stabilnost biofilma. Takođe, moguće je da prisustvo egzopolisaharida štiti dodatno ćelije utičući na viskozitet medijuma i smanjujući direktan kontakt ćelija sa slobodnim H<sup>+</sup> jonima prilikom ispitivanja preživljavanja u *in vitro* simuliranoj želudačnoj sredini.

Za potencijalne probiotske sojeve potrebno je ispitati sposobnost adhezije za epitel digestivnog trakta. Tuomola i sar. (1998) su pokazali za *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 da ima sposobnost adhezije u *in vitro* ispitivanju na CaCo-2 ćelijskoj liniji [179]. Adhezije je važna za ispoljavanje probiotskog efekta jer omogućava zadržavanje u intestinalnom traktu i razmnožavanje koje je neophodno za ispoljavanje antimikrobnog dejstva na patogene i drugih korisnih svojstava probiotika. Treba istaći i da je soj *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 ispoljio izuzetnu sposobnost adhezije na zeolit u imobilisanom sistemu za integrisanu proizvodnju

mlečne kiseline i biomase [239], što je važno i sa tehnološkog aspekta, ali i sa aspekta ispoljavanja povoljnih efekata na zdravlje životinja.

#### 4.5.2.4. Antibiogram test *Lb. rhamnosus* ATCC 7469

Svetska zdravstvena odrganizacija je u okviru svojih preporuka za ispitivanje i procenu probiotskih sojeva uključila i ispitivanje prisustva rezistencije na antibiotike [125] (Tabela 2.11.). Za upotrebu bakterijske biomase u ishrani životinja potrebno je ispitati rezistenciju na antibiotike. Uključivanjem bakterija rezistentnih na određene antibiotike u ishranu stoke potencijalno bi se omogućilo širenje rezistencije kroz lanac ishrane, prenosom gena do patogenih bakterija intestinalnog trakta čoveka. Na slici 4.30. su predstavljene zone inhibicije i osetljivost soja *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 na prisustvo antibiotika. U tabeli 4.14. su dati prečnici zone inhibicije u slučaju deset ispitivanih test antibiotika.



Slika 4.30. Osetljivost *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 na prisustvo razičitih antibiotika. Legenda: 1-eritromicin; 2-tetraciklin; 3- penicilin; 4-ampicilin; 5- hloramfenikol; 6-vankomicin; 7-nalidiksična kiselina; 8-gentamicin; 9-streptomycin; 10-kanamicin;

Tabela 4.14. Prečnici zona inhibicije i osetljivost *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 na prisustvo različitih test antibiotika doze antibiotika

	Antibiotik	Prečnik zone inhibicije (mm)	Osetljivost soja na antibiotik
1.	Eritromicin	30	S
2.	Tetraciklin	30	S
3.	Penicilin	28	S
4.	Ampicilin	23	I
5.	Hloramfenikol	22	R
6.	Vankomicin	0	R
7.	Nalidiksična kiselina	0	R
8.	Gentamicin	0	R
9.	Streptomycin	0	R
10.	Kanamycin	0	R

Na osnovu predstavljenih rezultata se može zaključiti da je korišćeni soj *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 pokazao osetljivost na prisustvo eritromicina (15 µg), tetraciklina (30µg) i penicilina (10 IU). Na prisutvo ampicilina (30 µg) ispitivani soj je pokazao delimičnu osetljivost, dok je na antibiotike iz grupe aminoglikozida (gentamicin, streptomycin, kanamicin), vankomicin i nalidiksičnu kiselinu rezistentan. U prisustvu hloramfenikola je uočena uža zona inhibicije, pa se može zaključiti da je ispitivani soj delimično osetljiv. Uočava se da je *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 rezistentan na sve ispitane antibiotike iz grupe aminoglikozida. Coppola i sar. (2005) [240] su ispitali 63 soja *Lb. rhamnosus* izolovanih iz različitih parmezana sireva i utvrdili osetljivost 95% svih ispitanih izolata na penicilin G i rezistenciju svih izolata na vankomicin i gotovo sve antibiotike iz grupe aminoglikozida. Naime, samo 2% izolata je pokazalo osetljivost na gentamicin [240]. Ovi rezultati u potpunosti koreliraju sa svojstvima soja *Lb. rhamnosus* ATCC 7469. Dalje, isti autori su pokazali da su svi izolati pokazali osetljivost na tetraciklin i eritromicin, što odgovara takođe karakteristikama ovde ispitivanog soja, ali je *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 razvio delimičnu rezistenciju na hloramfenikol, dok je najveći broj izolata iz studije Coppole i sar. (2005) pokazao izuzetnu osetljivost na hloramfenikol [240]. Budući da je rezistencija bakterija na antibiotike danas široko rasprostranjena, veoma je čest slučaj da se za probiotske sojeve utvrdi prisustvo

gena odgovornih za rezistenciju na više antibiotika [241, 242]. Među bakterijama *Lactobacillus* sp. veoma je česta rezistencija na penicilin i tetraciklin, dok su mnoge vrste BMK prirodno otporne na vankomicin i aminoglikozide [243]. Generalno je prenos prirodnih plazmida redak kod *Lactobacillus* sp. [244]. Geni odgovorni za rezistenciju na klindamicin, streptomycin, eritromicin i tetraciklin vrste *Lc. lactis* uglavnom su bili locirani na bakterijskom hromozom, a ne na prenosnom plazmidu [243] čime je otežan prenos rezistencije između vrsta. Ovakvi rezultati delimično opravdavaju upotrebu probiotskih sojeva sa dokazanom rezistencijom ukoliko se pokaže da ne dolazi do prenosa ovih gena između vrsta. U slučaju ispitivanog soja *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 bilo bi neophodno izvršiti detaljna genetička ispitivanja u cilju utvrđivanja potencijala za širenje konkretnih gena odgovornih za rezistenciju na antibiotike.

## 5. ZAKLJUČAK

Nakon eksperimentalnih rezultata ispitivanja mogućnosti integrirane biotehnoške proizvodnje mlečne kiseline i stočne hrane bogate probioticima na destilerijskoj džibri iz proizvodnje bioetanol na otpadnom hlebu zaključuje se da je destilerijska džibra supstrat veoma adekvatnog sastava za rast bakterija mlečne kiseline nakon optimizacije uslova. Takođe, nakon mlečno-kiselinske fermentacije zaostali fermentacioni medijum odgovara kriterijumima za kvalitetnu hranu za monogastrične životinje, uz mogućnost korišćenja zaostale biomase *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 u formi probiotskog dodatka stočnoj hrani.

Hemijskom karakterizacijom hlebne destilerijske džibre je pokazano da predstavlja sirovinu bogatu proteinima i siromašnu fermentabilnim šećerima, pa je neophodno dodati šećere da bi se omogućila efikasnija MKF. Džibra ima viši sadržaj suve materije (11,55%) i proteina (58,50% SM) u odnosu na tečnu frakciju (suva materija 4,80%, sadržaj proteina 43,75% SM), pa je ukupna džibra bolji supstrat za MKF. Sastav i sadržaj jona metala u obe džibre je veoma povoljan i adekvatan za rast BMK.

Ispitane su četiri vrste iz roda *Lactobacillus* (*Lb. paracasei* ssp. *paracasei* NRRL B-4564, *Lb. casei* ssp. *casei* NRRL B-441, *Lb. pentosus* NRRL-227 i *Lb. rhamnosus* ATCC 7469) kao proizvodni mikroorganizmi za MKF na tečnoj džibri i najbolja koncentracija mlečne kiseline ( $20,2 \text{ g L}^{-1}$ ), prinos ( $0,81 \text{ g g}^{-1}$ ) produktivnost ( $0,28 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) i broj vijabilnih ćelija ( $8,2 \times 10^8 \text{ CFU ml}^{-1}$ ) su postignuti u fermentaciji sa *Lb. rhamnosus* ATCC 7469. Takođe, 99,7% proizvedene mlečne kiseline je L (+) oblik koji je poželjan stereoizomer za upotrebu u ishrani ljudi i životinja. Na osnovu svega prethodno navedenog *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 je odabran kao proizvodni mikroorganizam u daljim eksperimentima.

U šaržnom postupku na tečnoj džibri izvršena je optimizacija uslova temperature, koncentracije inokuluma, mešanja i dodatka  $\text{CaCO}_3$  kao sredstva za

neutralizaciju. Utvrđeno je da postoji statistički značajna interakcija između parametra mešanja i dodatka  $\text{CaCO}_3$ , dok interakcija između ostalih parametara nije statistički značajna. Najviše vrednosti koncentracija mlečne kiseline ( $18,58 \text{ g L}^{-1}$ ), prinosa ( $73,4 \%$ ) koeficijenta prinosa ( $90,11 \%$ ), produktivnosti ( $0,26 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) i broja vijabilnih ćelija ( $5,0 \times 10^8 \text{ CFU ml}^{-1}$ ) su postignute na temperaturi od  $41^\circ\text{C}$ , sa koncentracijom inokuluma  $5\%$  (v/v), uz mešanje ( $90 \text{ obrt/min}$ ) i sa dodatkom  $1\%$   $\text{CaCO}_3$  (w/v) dok je vreme fermentacije bilo  $72\text{h}$ . Primenom  $30\%$  NaOH u intervalima od  $4 \text{ h}$  kao sredstva za neutralizaciju umesto  $\text{CaCO}_3$  (w/v) postignuto je značajno skraćanje vremena fermentacije na  $24\text{h}$ , uz povećanu produktivnost procesa ( $0,70 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) i slične vrednosti prinosa ( $76\%$ ). Za dalji rad je korišćen dodatak  $30\%$  NaOH u  $4\text{h}$  intervalima za kontrolu pH vrednosti u medijumu, temperatura  $41^\circ\text{C}$ , koncentracija inokuluma  $5\%$  (v/v) i mešanje ( $90 \text{ obrt/min}$ ) u MKF.

U šaržnom postupku na džibri pod optimizovanim uslovima ispitane su različite početne koncentracije šećera ( $55 \text{ g L}^{-1}$ ,  $75 \text{ g L}^{-1}$ ,  $85 \text{ g L}^{-1}$ ). Najefikasnija fermentacija je zabeležena u uzorku sa početnom koncentracijom šećera od  $55 \text{ g L}^{-1}$  uz najviši koeficijent prinosa od  $1,31 \text{ g g}^{-1}$  nakon  $24\text{h}$  fermentacije. U istom uzorku je postignut najviši prinos mlečne kiseline ( $92,3 \%$ ) i produktivnost ( $1,49 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) uz visok krajnji broj ćelija  $10^9 \text{ CFU ml}^{-1}$ , pa je ova početna koncentracija šećera odabrana kao optimalna za dalje eksperimente.

U dolivnom postupku na džibri ostvarena su dva ciklusa dolivanja i postignuta je maksimalna produktivnost od  $1,80 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , prinos od  $0,87 \text{ g g}^{-1}$  uz maksimalnu koncentraciju mlečne kiseline od  $97,1 \text{ g L}^{-1}$  za  $54\text{h}$  koliko je trajala fermentacija. U odnosu na šaržni postupak, dolivnim se postiže  $21\%$  veća produktivnost i  $47,6\%$  viša koncentracija mlečne kiseline. Takođe, broj živih ćelija u medijumu po završetku fermentacije je bio preko  $10^9 \text{ CFU ml}^{-1}$ . Od svih ispitanih postupaka u ovoj disertaciji, dolivni postupak na ukupnoj džibri pod optimalnim uslovima se pokazao kao najpovoljniji za integrisanu proizvodnju mlečne kiseline i bakterijske biomase.

U ispitivanju mogućnosti imobilizacije biomase na nativni Na-zeolit 13X, *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 je pokazao snažan afinitet za površinu zeolita i visoku stabilnost biofilma, uz dalju kolonizaciju slobodne površine zeolita tokom fermentacije, što je omogućilo četiri recirkulacije imobilizata, uz povećanje broja imobilisanih ćelija. Naročito intenzivna kolonizacija površine zeolita bakterijama je ostvarena u toku prva 24h fermentacije (prvi ciklus) i nastavila se do završetka fermentacije. Broj imobilisanih ćelija pozavršetku MKF je iznosio oko  $10^{11}$  CFU g<sup>-1</sup> nosača, što je izuzetno visok broj ćelija, pa se Na-zeolit 13X može oceniti kao izuzetno pogodan nosač za *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 u MKF na džibri. Nakon četiri ciklusa šaržne MKF na tečnoj džibri sa recirkulacijom imobilisanog *Lb. rhamnosus* ATCC 7469, ostvarena je prosečna produktivnost od 1,32 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, koncentracija mlečne kiseline 40,43 g L<sup>-1</sup>, prinos od 0,81 g g<sup>-1</sup> i koeficijent prinosa od 0,96 g g<sup>-1</sup>. U odnosu na šaržni sistem pod istim uslovima, postignuta je 16% viša koncentracija mlečne kiseline, 17% viši prinos, 18,5% viši koeficijent prinosa, a produktivnost je povećana 100%, pa je primena Na-zeolita i recirkulacionog šaržnog postupka ocenjena kao izuzetno efikasna. Na osnovu snažne adsorpcije bakterija na površini zeolita i daljeg rasta biofilma u toku fermentacije, Na-zeolit imobilisani sistem se može oceniti kao izuzetno povoljan za manipulaciju i eventualnu primenu u industriji.

Na Mg-zeolitu je ostvarena još intenzivnija adsorpcija *Lb. rhamnosus* ATCC uz početni broj ćelija  $5 \times 10^{10}$  CFU ml<sup>-1</sup> i uz dalju kolonizaciju površine zeolita u toku fermentacije. Nakon četiri ciklusa u recirkulacionoj šaržnoj MKF na tečnoj džibri sa imobilisanim bakterijama na Mg-zeolit, prosečno je ostvarena 8% viša produktivnost u odnosu na Na-zeolit sistem, uz najviše vrednosti produktivnosti (1,80 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), prinosa (0,86 g g<sup>-1</sup>) i koeficijenta prinosa (0,99 g g<sup>-1</sup>) u toku prvog ciklusa. Razlike između Na-zeolit sistema i Mg-zeolit sistema nisu bile statistički značajne nakon drugog ciklusa, što je verovatno rezultat izmene Mg<sup>2+</sup> jona sa Na<sup>+</sup> prisutnim u medijumu.

Hemijskom analizom osušene džibre nakon MKF ispitana je pogodnost za primenu u stočnoj ishrani. Utvrđeno je da je osušena džibra nakon fermentacije



bogata proteinima (386 g kg<sup>-1</sup> SM) i bezazotnim ekstraktom (469,00 g kg<sup>-1</sup> SM) dok je sadržaj vlakana: NDF (62,20 g kg<sup>-1</sup> SM), ADF (23,10 g kg<sup>-1</sup> SM), ADL (4,62 g kg<sup>-1</sup> SM), celuloze (18,46 g kg<sup>-1</sup> SM) i hemiceluloze (38,90 g kg<sup>-1</sup> SM) veoma nizak. Usled MKF statistički je značajno smanjen sadržaj proteina i bezazotnog ekstrakta, dok je značajno povećan sadržaj masti i pepela. Na osnovu sastava (mali sadržaj vlakana), visoke vrednosti svarljivosti (preko 96%) i energetske parametara svarljive energije (4175,18 kcal kg<sup>-1</sup> SM) i metaboličke energije (4153,31 kcal kg<sup>-1</sup> SM), suvi ostatak džibre nakon MKF se može oceniti kao visoko kvalitetna hrana za monogastrične životinje.

Ispitivanjem probiotskih osobina pokazano je da soj *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 ima visoku sposobnost preživljavanja nakon 4h *in vitro* na pH vrednosti 2,5 (88%) i u prisustvu 0,3% žučnih soli (85,7%). Inhibira rast *Shigella sonnei* i *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, dok slabije inhibira rast *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 i *Listeria innocua*. Ispitana je i sposobnost *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 da produkuje egzopolisaharide na različitim šećerima i pokazano je da je najintenzivnija proizvodnja egzopolisaharida ostvarena na glukozi, fruktozi, galaktozi i laktozi. U cilju procene bezbednosti primene *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 u ishrani životinja ispitana je osetljivost soja na različite antibiotike i pokazano je da je *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 osetljiv na eritromicin, tetraciklin, penicilin i delimično na ampicilin, dok je rezistentan na aminoglikozidne antibiotike i delimično na hloramfenikol. Rezistencija na aminoglikozide je prirodna kod *Lactobacillus* sp. i ne predstavlja ozbiljan rizik, ali bi ipak bilo potrebno izvesti dodatna genetička ispitivanja vezana za horizontalni prenos rezistencije u cilju procene bezbednosti primene u ishrani.

## 6. LITERATURA

- [1] K. Hofvendahl, B. Hahn-Hägerdal, Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources, *Enzyme and Microbial Technology*, 26 (2000) 87–107.
- [2] R. Datta, M. Henry, Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies – a review, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81 (2006) 1119–1129.
- [3] S. E. Scheuermann, Effect of the probiotic Paciflor® (CIP 5832) on energy and protein metabolism in growing pigs, *Animal Feed Science and Technology*, 41 (1993) 181-189.
- [4] H. McGee, *On Food and Cooking: The Science and Lore of the Kitchen*. Scribner's. New York, (1984) pp. 8-12.
- [5] P. Rogers, S.J. Chen, J.M. Zidwick, Organic Acid and Solvent Production Part I: Acetic. Lactic. Gluconic. Succinic and Polyhydroxyalkanoic Acids. in: Dvorkin M [Eds.], *The Prokaryotes: Handbook on the Biology of Bacteria. Volume 1: Symbiotic Associations. Biotechnology Applied Microbiology*. 3rd ed., Springer Science Business Media, (2006) pp. 511–755.
- [6] C. M. Holten, A. Muller, D. Rehbinder [Eds.], *Lactic Acid*, Weinheim, Germany, (1971) pp. 23-28.
- [7] J. B. Ewaschuk, J. M. Naylor, G. A. Zello, D-Lactate in Human and Ruminant Metabolism, *Journal of Nutrition*, 135 (2005) 1619-1625.
- [8] R. Datta, S.-P. Tsai, P. Bonsignore, S.-H. Moon, J. R. Frank, Technological and economic potential of poly (lactic acid) and lactic acid derivatives, *FEMS Microbiology Reviews*, 16 (1995) 221–231.

- [9] Bastiol, C. (1997). Biodegradable materials. In A.L. Brody & K.S. Marsh, Wiley encyclopedia of packaging technology (2nd ed), Wiley, New York, (p.77).
- [10] S. Varadarajan, D. J. Miller, Catalytic upgrading of fermentation-derived organic acids, *Biotechnology Progress* 15 (1999) 845-854.
- [11] K. Hofvendahl, C. Akerberg, G. Zacchi, B. Hahn-Hägerdal, Simultaneous enzymatic wheat starch saccharification and fermentation to lactic acid by *Lactococcus lactis*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52 (1999) 163–169.
- [12] K. Hofvendahl, B. Hahn-Hägerdal, L-Lactic acid production from whole wheat flour hydrolyzate using strains of *Lactobacilli* and *Lactococci*, *Enzyme and Microbial Technology*, 20 (1997) 301–307.
- [13] Y.-Y. Linko, P. Javanainen, Simultaneous liquefaction, saccharification, and lactic acid fermentation on barley starch, *Enzyme and Microbial Technology*, 19 (1996) 118–123.
- [14] C. Vishnu, G. Seenayya, G. Reddy, Direct fermentation of various pure and crude starchy substrates to L(+) lactic acid using *Lactobacillus amylophilus* GV6, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18 (2002) 429–433.
- [15] M. Altaf, B. J. Naveena, M. Venkateshwar, E. V. Kumar, G. Reddy, Single step fermentation of starch to L(+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using inexpensive nitrogen sources to replace peptone and yeast extract-optimization by RSM, *Process Biochemistry*, 41 (2006) 465–472.
- [16] M. Altaf, B. J. Naveena, G. Reddy, Use of inexpensive nitrogen sources and starch for L(+) lactic acid production in anaerobic submerged fermentation, *Bioresource Technology*, 98 (2007) 498–503.
- [17] M. Altaf, M. Venkateshwar, M. Srijana, G. Reddy, An economic approach for L-[+] lactic acid fermentation by *Lactobacillus amylophilus* GV6 using inexpensive carbon and nitrogen sources, *Journal of Applied Microbiology*, 103 (2007) 372–380.

- [18] P. A. Nagarjun, R. S. Rao, S. Rajesham, L. V. Rao, Optimization of lactic acid production in SSF by *Lactobacillus amylovorus* NRRL B-4542 using Taguchi methodology, *Journal of Microbiology*, 43 (2005) 38–43.
- [19] P. Cheng, R. E. Muller, S. Jaeger, R. Bajpai, E. L. Jannotti, Lactic acid production from enzyme thinned cornstarch using *Lactobacillus amylovorus*, *Journal of Industrial Microbiology*, 7 (1991) 27–34.
- [20] L. P. Huang, B. Jin, P. Lant, J. Zhou, Simultaneous saccharification and fermentation of potato starch wastewater to lactic acid by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus*, *Biochemical Engineering Journal*, 23 (2005) 265–276.
- [21] K. V. Venkatesh, Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to lactic acid, *Bioresource Technology*, 62 (1997) 91–98.
- [22] R. Yanez, A.B. Molfes, J. L. Alonso, J. C. Parajo, Production of D(–) lactic acid from cellulose by simultaneous saccharification and fermentation using *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens*, *Biotechnology Letters*, 25 (2003) 1161–1164.
- [23] R. Yanez, J. L. Alonso, J. C. Parajo, D-lactic acid production from waste cardboard, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80 (2005) 76–84.
- [24] J.-H. Kim, D. E. Block, S. P. Shoemaker, D. A. Mills, Conversion of rice straw to bio-based chemicals: an integrated process using *Lactobacillus brevis*, *Applied Microbiology Biotechnology*, 86 (2010) 1375–1385.
- [25] S. Miura, T. Arimura, N. Itoda, L. Dwiarti, J. B. Feng, C. H. Bin, M. Okabe, Production of L-lactic acid from corncob, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97 (2004) 153–157.
- [26] A. L. Woiciechowski, C. R. Soccol, L. P. Ramos, A. Pandey, Experimental design to enhance the production of L-(+)-lactic acid from steam-exploded wood hydrolysate using *Rhizopus oryzae* in a mixed-acid fermentation, *Process Biochemistry*, 34 (1999) 949–955.

- [27] E. Y. Park, Y. Kosakai, M. Okabe, Efficient production of L(+)-lactic acid using mycelia cotton-like flocs of *Rhizopus oryzae* in an air-lift bioreactor, *Biotechnology Progress*, 14 (1998) 699–704.
- [28] Y. J. Wee, J. S. Yun, D. H. Park, H. W. Ryu, Biotechnological production of L[+]-lactic acid from wood hydrolyzate by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*, *Biotechnology Letters*, 26 (2004) 71–74.
- [29] S. Tejayadi, M. Cheryan, Lactic acid from cheese whey permeate. Productivity and economics of a continuous membrane bioreactor, *Applied Microbiology Biotechnology*, 43 (1995) 242–248.
- [30] A. Pandey, C. R. Soccol, J. A. Rodriguez –Leon, P. Nigam, Solid state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications. Asatech Publishers, New Delhi (2001).
- [31] Y. D. Hang, Direct fermentation of cornstarch to L(+) lactic acid by *Rhizopus oryzae*. US Patent 4963486, (1990).
- [32] I. Yumoto, K. Ikeda, Direct fermentation of starch to L(+)-lactic acid using *Lactobacillus amylophilus*, *Biotechnology Letters*, 17 (1995) 543–546.
- [33] M. Raccach, T. Bamiro, The effect of temperature on the lactic acid fermentation of rye flour, *Food Microbiology*, 14 (1997) 213–220.
- [34] R. Anuradha, A. K. Suresh, K. V. Venkatesh, Simultaneous saccharification and fermentation of starch to lactic acid, *Process Biochemistry*, 35 (1999) 367–375.
- [35] R. P. John, G.S. Anisha, K. M. Nampoothiri, A. Pandey, Direct lactic acid fermentation: Focus on simultaneous saccharification and lactic acid production, *Biotechnology Advances*, 27 (2009) 145–152.
- [36] W. Xiaodong, G. Xuan, S. K. Rakshit, Direct fermentation of lactic acid from cassava or other starch substrates, *Biotechnology Letters*, 9 (1997) 841–843.
- [37] T. B. Vickroy, Lactic acid, in: A. Moo-Young [Eds.], *Comprehensive biotechnology*, vol. 3., Dic Pergamon Press, Toronto, (1985) pp.761–776.

- [38] B. J. Naveena, C. Vishnu, M. Altaf, G. Reddy, Wheat bran an inexpensive substrate for production of lactic acid in solid state fermentation by *Lactobacillus amylophilus* GV6-optimization of fermentation conditions, *Journal of Scientific and Industrial Research*, 62 (2003) 453–456.
- [39] B. C. Saha, L. K. Nakamura, Production of mannitol and lactic acid by fermentation with *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693, *Biotechnology and Bioengineering*, 82 (2003) 865–871.
- [40] K. Richter, A. Trager, L(+) Lactic acid from sweet sorghum by submerged and solid state fermentations, *Acta Biotechnologica*, 14 (1994) 367–378.
- [41] X. Zhan, D. Wang, M. R. Tuinstra, S. Bean, P. A. Seib, X. S. Sun, Ethanol and lactic acid production as affected by sorghum genotype and location, *Industrial Crops and Products*, 18 (2003) 245-255.
- [42] P. J. Rojan, K. M. Nampoothiri, A. S. Nair, A. Pandey, L(+)-Lactic acid production using *Lactobacillus casei* in solid-state fermentation, *Biotechnology Letters*, 27 (2005) 1685–1688.
- [43] J. P. Rojan, K. M. Nampoothiri, A. Pandey, Solid-state fermentation for lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*, *Process Biochemistry* 41 (2006) 759–763.
- [44] J. P. Rojan, K. M. Nampoothiri, A. Pandey, Simultaneous saccharification and L-(+)-lactic acid fermentation of protease treated wheat bran using mixed culture of *lactobacilli*, *Biotechnology Letters*, 28 (2006) 1823–1826.
- [45] B. P. Baker, Problems with Molasses in the Yeast industry, in: E. Sinda, Parkkinen E. Parkkinen [Eds.], *Symposium*, Aug 31-Sept 1, Helsinki, Finland, (1979) p.126.
- [46] L. Mojović, D. Pejin, M. Lazić, Bioetanol kao gorivo-stanje i perspektive, monografija, Tehnološki fakultet, Leskovac, (2007) pp. 33-62.

- [47] Y. Göksungur, U. Güvenç, Batch and continuous production of lactic acid from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 69 (1997) 399–404.
- [48] S. Bashir, S. Lee, Fuel ethanol production from agricultural lignocellulosic feedstocks—a review, *Fuel Science and Technology International*, 12 (1994) 1427–1473.
- [49] E. Sjöström, *Wood chemistry, fundamentals and applications*, 2nd edition, Academic press, San Diego, (1993).
- [50] M. Karel, V. Jaroslav, H. Vera, R. Mojmir, Lactic acid production in a cell retention continuous culture using lignocellulosic hydrolysate as a substrate, *Journal of Biotechnology*, 56 (1997) 25–31.
- [51] P. Bösch, A. Modarresi, A. Friedl, Comparison of combined ethanol and biogas polygeneration facilities using exergy analysis, *Applied thermal engineering*, 37 (2012) 19-29.
- [52] M. Krzywonos, E. Cibis, T. Miśkiewicz, A. Ryznar-Luty, Utilization and biodegradation of starch stillage (distillery wastewater), *Electronic Journal of Biotechnology* (online), 12 (2009).
- [53] Y. Kim, N. Mosier, R. Hendrickson, T. Ezeji, H. Blaschek, B. Dien, M. Cotta, B. Dale, M. Ladisch, Composition of corn dry-grind ethanol by-products: DDGS, wet cake, and thin stillage, *Bioresource Technology*, 99 (2008) 5165–5176.
- [54] M. Becker, K. Nehging, *Handbuch der Futtermittel*. 3rd ed., Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin, (1967), p 419.
- [55] E. M. Hebert, R. R. Raya, G. Savoy de Giori, Nutritional Requirements of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* in a Chemically Defined Medium, *Current Microbiology*, 49 (2004) 341–345.

- [56] T. Pauli, J. J. Fitzpatrick, Malt combining nuts as a nutrient supplement to whey permeate for producing lactic by fermentation with *Lactobacillus casei*, *Process Biochemistry*, 38 (2002) 1–6.
- [57] A. O. Büyükkileci, S. Harsa, Batch production of L(+) lactic acid from whey by *Lactobacillus casei* NRRL B-441, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79 (2004) 1036–1040.
- [58] M. Altaf, B. J. Naveena, G. Reddy, Screening of Inexpensive Nitrogen Sources for Production of L(+) Lactic Acid from Starch by Amylolytic *Lactobacillus amylophilus* GV6 in Single Step Fermentation, *Food Technology and Biotechnology*, 43 (2005) 235–239.
- [59] H. Oh, Y.-J. Wee, J.-S. Yun, S. H. Han, S. Jung, H.-W. Ryu, Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw material, *Bioresource Technology*, 96 (2005) 1492–1498.
- [60] N. Nancib, D. Meziane-Cherif, A. Boubendir, M. Fick, J. Boudrant, Joint effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. *rahamnosus*, *Bioresource Technology*, 96 (2005) 63–67.
- [61] W. Timbuntam, K. Sriroth, Y. Tokiwa, Lactic acid production from sugar-cane juice by a newly isolated *Lactobacillus* sp., *Biotechnology Letters*, 28 (2006) 811–814.
- [62] Z. Knežević-Jugović, *Enzimsko inženjerstvo, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd*, (2008), pp. 100-120.
- [63] L. Axelsson, Lactic acid bacteria: classification and physiology, in: S. Salminen, A. von Wright, A. Ouwehand [Eds.], *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 3rd rev. and exp. ed., Marcel Dekker Inc., New York, (2004), p. 1-66.
- [64] A. C. Kimberley, C. Taylor, A simple calorimetric assay for muramic acid and lactic acid, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 56 (1996) 49–58.



- [65] L. K. Nakamura, C. D. Crowell, *Lactobacillus amylolyticus*, a new starch hydrolyzing species from swine waste corn fermentation, *Developments in Industrial Microbiology*, 20 (1979) 531–540.
- [66] L. K. Nakamura, *Lactobacillus amylovorus*, a new starch-hydrolyzing species from cattle waste-corn fermentations, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 31 (1981) 56–63.
- [67] J. P. Guyot, J. Morlon-Guyot, Effect of different cultivation conditions on *Lactobacillus manihotivorans* OND32T, an amylolytic *Lactobacillus* isolated from sour starch cassava fermentation, *International Journal of Food Microbiology*, 67 (2001) 217–225.
- [68] M. S. Calderon, G. Loiseau, R. R. Sanoja, J. P. Guyot, Study of starch fermentation at low pH by *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 reveals uncoupling between growth and  $\alpha$ -amylase production at pH 4, *International Journal of Food Microbiology*, 80 (2003) 77–87.
- [69] E. Giraud, A. Champailier, M. Raimbault, Degradation of raw starch by a wild amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (1994) 4319–4323.
- [70] M. Chatterjee, S.L. Chakrabarty, B.D. Chattopadhyay, R.K. Mandal, Production of lactic acid by direct fermentation of starchy wastes by an amylase-producing *Lactobacillus*. *Biotechnology Letters*, 19 (1997) 873–874.
- [71] K. B. Lee, Comparison of fermentative capacities of *Lactobacilli* in single and mixed culture in industrial media, *Process Biochemistry*, 40 (2005) 1559–1564.
- [72] P. J. Rojan, M. K. Napoothiri, A. Pandey, Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74 (2007) 524–534.
- [73] R. U. Yu, Y. D. Hang, Kinetics of direct fermentation of agricultural commodities to L(+) lactic acid by *Rhizopus oryzae*. *Biotechnology Letters*, 11 (1989) 597–600.

- [74] B. Jin, P. Yin, Y. Ma, L. Zhao, Production of lactic acid and fungal biomass by *Rhizopus* fungi from food processing waste streams. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32 (2005) 678–686.
- [75] A. Demirci, A. L. Pometto 3rd., Enhanced production of D(-) lactic acid by mutants of *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 9649, *Journal of Industrial Microbiology*, 11 (1992) 23–28.
- [76] H. J. Knauf, R. F. Vogel, W. P. Hammes. Cloning, sequence, and phenotypic expression of KatA which encodes the catalase of *Lactobacillus sake* LTH677, *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (1992) 832–839.
- [77] W. M. DeVos, G. F. M. Simons, Gene cloning and expression systems in *Lactococci*, in: M. J. Gasson, W. M. DeVos [Eds.], *Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*, Blackie Academic and Professional Publishers, London, New York, (1994), pp. 52–105.
- [78] R. Anuradha, A. K. Suresh, K. V. Venkatesh, Simultaneous saccharification and fermentation of starch to lactic acid, *Process Biochemistry*, 35 (1999) 367–375.
- [79] P. Cheng, R. E. Mueller, S. Jaeger, R. Bajpai, E. L. Iannotti, Lactic acid production from enzyme-thinned corn starch using *Lactobacillus amylovorus*, *Journal of Industrial Microbiology*, 7 (1991) 27–34.
- [80] A. L. Woiciechowski, S. Nitsche, A. Pandey, C.R. Socool, Acid and enzymatic hydrolysis to recover reducing sugars from cassava bagasse: an economic study, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 45 (2002) 393–400.
- [81] K. H. Sreenath, B. A. Moldes, G. R. Koegel, J. R. Straub, Lactic acid production by simultaneous saccharification and fermentation of alfalfa fiber, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92 (2001) 518–523.
- [82] K. Hofvendahl, B. Hahn– Hägerdal, L-lactic acid production from whole wheat flour hydrolysate using strains of *Lactobacilli* and *Lactococci*. *Enzyme and Microbial Technology*, 20 (1997) 301–307.

- [83] L. Wang, B. Zhao, B. Liu, C. Yang, B. Yu, Q. Li, C. Ma, P. Xu, Y. Ma, Efficient production of L-lactic acid from cassava powder by *Lactobacillus rhamnosus*, *Bioresource Technology*, 101 (2010) 7895–7901.
- [84] G. Reddy, M. Altaf, B.J. Naveena, M. Venkateshwar, E. Vijay Kumar, Amylolytic bacterial lactic acid fermentation — A review, *Biotechnology Advances*, 26 (2008) 22–34.
- [85] Y. Y. Linko, F. Strejcek, P. Javanainen, Direct production of lactic acid from barley starch by *Lactobacillus amylovorus*. Abstracts of Ninth International Biotechnology Symposium, (1992), p. 486.
- [83] J. Narita, K. Okano, T. Kitao, S. Ishida, T. Sewaki, M.-H. Sung, H. Fukuda, A. Kondo, Display of  $\alpha$ -amylase on the surface of *Lactobacillus casei* cells by use of the PgsA anchor protein, and production of lactic acid from starch, *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (2006) 269–275.
- [87] H. Kurusava, H. Ishikawa, H. Tanaka, L-lactic acid production from starch by coimmobilized mixed culture system of *Aspergillus awamori* and *Streptococcus lactis*, *Biotechnology and Bioengineering*, 31 (1988) 183–187.
- [88] R. K. Sukumaran, R. R. Singhanian, Microbial cellulases-Production, applications and challenges, *Journal of Scientific and Industrial Research*, 64 (2005) 832-844.
- [89] S. Schmidt, N. Padukone, Production of lactic acid from wastepaper as a cellulosic feedstock, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 18 (1997) 10–14.
- [90] D. X. Zhang, M. Cheryan, Starch to lactic acid in a continuous membrane reactor, *Process Biochemistry*, 29 (1994) 145–150.
- [91] 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, *Biotechnology Letters*, 25 (2003) 1833–1835.

- [92] S. Ding, T. Tan, L-lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation using different fed-batch feeding strategies, *Process Biochemistry*, 41 (2006) 1451–1454.
- [93] Y. Zhang, W. Cong, S.-Y. Shi, Application of a pH feedback-controlled substrate feeding method in lactic acid production, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162 (2010) 2149–2156.
- [94] A. C. Velázquez, A. L. Pometto III, K.-L. G. Ho, A. Demirci, Evaluation of plastic-composite supports in repeated fed-batch biofilm lactic acid fermentation by *Lactobacillus casei*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55 (2001) 434–441.
- [95] 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, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80 (2005) 1282–1290.
- [96] D. W. Breck, *Zeolite Molecular Sieves, Structure, Chemistry and Use*, Wiley, New York, (1974).
- [97] J. D. Sherman, Synthetic zeolites and other microporous oxide molecular sieves, *Proc. NatL. Acad. Sci. USA*, 96 (1999) 3471–3478.
- [98] UOP Honeywell company, UOP Adsorbents, Comprehensive portfolio to remove contaminants from a variety of sources, <http://www.uop.com/wp-content/uploads/2011/06/UOP-Adsorbents-Solutions-brochure.pdf> (Poslednji put pristupljeno 17.02.2013. )
- [99] Sigma-Aldrich, Technical bulletin, AL-143 Mineral Adsorbents, Filter Agents and Drying Agents - molecular sieves. <http://www.sigmaaldrich.com/chemistry/chemical-synthesis/learning-center/technical-bulletins/al-1430/molecular-sieves.html> (Poslednji put pristupljeno 17.02.2013.)
- [100] T. W. Swaddle, *Inorganic Chemistry: An Industrial and Environmental Perspective*, Academic press, San Diego, (1997), pp 129-142.

- [101] H. W. Langmi, A. Walton, M. M. Al-Mamouri, S. R. Johnson, D. Book, J. D. Speight, P. P. Edwards, I. Gameson, P. A. Anderson, I. R. Harris, Hydrogen adsorption in zeolites A, X, Y and RHO, *Journal of Alloys and Compounds*, 356-357 (2003) 710-715.
- [102] Sodalite Cage Al/Si, Wikipedia <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Sodalite-CageAlSi.png> (Poslednji put pristupljeno 22.02.2013. godine)
- [103] J. Weitkamp, Zeolites and catalysis, *Solid State Ionics*, 131 (2000) 175-188.
- [104] A. Miura, R. Okabe, K. Izumo, M. Fukushima, Influence of the physicochemical properties of clay minerals on the degree of darkening via polycondensation reactions between catechol and glycine, *Applied Clay Science*, 46 (2009) 277-282.
- [105] C. Pelletier, C. Bouley, C. Cayuela, S. Bouttier, P. Bourlioux, M. Bellon-Fontaine, Cell Surface Characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* Strains, *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (1997) 1725-1731.
- [106] Hrenović, J., Ivanković, T., Tibljas, D., 2009. The effect of mineral carrier composition on phosphate-accumulating bacteria immobilization. *J. Hazard. Mater.* 166, 1377-1382.
- [107] S. Weiss, A. Zankel, M. Lebuhn, S. Petrak, W. Somitsch, G.M. Guebitz, Investigation of microorganisms colonizing activated zeolites during anaerobic biogas production from grass silage, *Bioresource Technology*, 102 (2011) 4353-4359.
- [108] A. Filippidis, A. Godelitsas, D. Charistos, P. Misaelides, A. Kassoli-Fournaraki, The chemical behavior of natural zeolites in aqueous environments: Interactions between low-silica zeolites and 1 M NaCl solutions of different initial pH-values, *Applied Clay Science*, 11 (1996) 199-209.
- [109] N. Nestorov, in: W.G. Pond, F.A. Mumpton (Eds.), *Zeo-agriculture: Use of Natural Zeolites in Agriculture and Aquaculture*, Westview Press Inc., Boulder, Colorado, (1984) p. 167.

- [110] G. Lopez, R. A. Elias, M. A. Menchaca, The utilization of zeolite by dairy cows. 2. Effect on milk yield. Cuban Journal of Agricultural Sciences, 26 (1992) 131.
- [111] P. D. Katsoulos, N. Panousis, N. Roubies, E. Christaki, G. Arsenos, H. Karatzias, Effects of long-term feeding dairy cows on a diet supplemented with clinoptilolite on the incidence of ketosis, milk yield and liver function, Veterinary Record, 159 (2006) 415-418.
- [112] E. V. Christaki, P. C. Florou- Paneri, P. D. Fortomaris, A. S. Tserveni- Gousi, A. L. Yannakopoulos, Effects of dietary inclusion of natural zeolite and flaxseed on broiler chickens' body fat deposition in an extended fattening period, Archiv fur Geflugelkunde, 70 (2006) 106-111.
- [113] A. S. Tserveni- Gousi, A. L. Yannakopoulos, N. K. Katsaounis, A. Filippidis, A. Kassoli-Fournaraki, Some interior egg characteristics as influenced by addition of Greek clinoptilolitic rock material in the hen diet. Archiv fur Geflugelkunde, 61 (1997) 291-296.
- [114] M. D. Oliver, Effect of feeding clinoptilolite (zeolite) on the performance of three strains of laying hens, British Poultry Science, 38 (1997) 220-222.
- [115] D. Papaioannou, P. D. Katsoulos, N. Panousis, H. Karatzias, The role of natural and synthetic zeolites as feed additives on the prevention and/or the treatment of certain farm animal diseases: A review, Microporous and Mesoporous Materials, 84 (2005) 161-170.
- [116] M. Grce, K. Pavelić, Antiviral properties of clinoptilolite, Microporous and Mesoporous Materials, 79 (2005) 165-169.
- [117] G. Rodriguez-Fuentes, M.A. Barrios, A. Iraizoz, I. Perdomo, B. Cedre, Enterex: Anti-diarrheic drug based on purified natural clinoptilolite, Zeolites, 19 (1997) 441-448.
- [118] M. S. Tapia, M. A. Rojas-Graü, F. J. Rodríguez, J. Ramírez, A. Carmona, O. Martin-Belloso, Alginate- and gellan- based edible films for probiotic coatings on fresh-cut fruits, Journal of Food Science, 72 (2007) E190-E196.

- [119] J.-H. Tsen, Y.-P. Lin, V. A.-E. King, Banana purée fermentation by *Lactobacillus acidophilus* immobilized in Ca-alginate, *Journal of General and Applied Microbiology*, 49 (2003) 357-361.
- [120] J.-H. Tsen, Y.-P. Lin, H.-Y. Huang, V. A.-E. King, Studies on the fermentation of tomato juice by using k-carrageenan immobilized *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Food Processing and Preservation*, 32 (2008) 178-189.
- [121] A. K. Anal, H. Singh, Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery, *Trends in Food Science and Technology*, 18 (2007) 240-251.
- [122] W. K. Ding, N. P. Shah, Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in orange and apple juices, *International Food Research Journal*, 15 (2008) 219-232.
- [123] R. Vidhyalakshmi, R. Bhagyaraj, R. S. Subhasree, Encapsulation “The Future of Probiotics”-A Review, *Advances in Biological Research*, 3 (2009) 96-103.
- [124] C. M. Peres, C. Peres, A. Hernández-Mendoza, F. X. Malcata, Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria - with an emphasis on table olives, *Trends in Food Science & Technology*, 26 (2012) 31-42.
- [125] I. I. Metchnikoff, *The prolongation of life: Optimistic studies* (reprinted edition 1907). Springer, New York, (2004).
- [126] F. Vergin, Anti- und Probiotika, *Hippokrates*, 25 (1954) 116–119.
- [127] WHO, *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*, Joint FAO/WHO Working Group, London, Ontario, Canada, 2002.
- [128] K. Takeda, T. Suzuki, S.I. Shimada, K. Shida, M. Nanno, K. Okumura, Interleukin-12 is involved in the enhancement of human natural killer cell activity by *Lactobacillus casei* Shirota, *Clinical and Experimental Immunology*, 146 (2006) 109-115.

- [129] T. Iannitti, B. Palmieri, Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice, *Clinical Nutrition*, 29 (2010) 701-725.
- [130] M. H. Hsieh, J. Versalovic, The Human Microbiome and Probiotics: Implications for Pediatrics, *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, 38 (2008) 309-327.
- [131] G. Giraffa, N. Chanishvili, Y. Widyastuti, Importance of *Lactobacilli* in food and feed biotechnology, *Research in Microbiology*, 161 (2010) 480-487.
- [132] T. Vasiljevic, N.P. Shah, Probiotics—From Metchnikoff to bioactives, *International Dairy Journal*, 18 (2008) 714– 728.
- [133] L. Morelli, C. Cesena, C. De Haën, L. Gozzini, Taxonomic *Lactobacillus* Composition of Feces from Human Newborns during the First Few Days, *Microbial Ecology*, 35 (1998) 205-212.
- [134] M. L. Cross, Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic *Lactobacilli* and their role in protection against microbial pathogens, *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 34 (2002) 245-253.
- [135] N.R. Bullock, J. C. L. Boothand, G. R. Gibson, Comparative composition of bacteria in human intestinal microflora during remission and active ulcerative colitis, *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 5 (2004) 59-64.
- [136] J. Rafter, Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective, *British Journal of Nutrition*, 88 (2002) S89–S94.
- [137] S. Bengmark, Bacteria for Optimal Health, *Nutrition*, 16 (2000) 611-615.
- [138] A. Mercenier, S. Pavan, B. Pot, Probiotics as Biotherapeutic Agents: Present Knowledge and Future Prospects, *Current Pharmaceutical Design*, 9 (2003) 175-191.
- [139] N.P. Shah, Probiotics and prebiotics, *Agro-Food Industry Hi-tech*, 15 (2004) 13–16.



- [140] G. E. Gardiner, E. O'Sullivan, J. Kelly, M. A. E. Auty, G. F. Fitzgerald, J. K. Collins, R. P. Ross, C. Stanton, Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying, *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (2000) 2605–2612.
- [141] E. Ananta, M. Volkert, D. Knorr, Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG, *International Dairy Journal*, 15 (2005) 399–409.
- [142] Vlada Republike Srbije. Pravilnik o kvalitetu hrane za životinje. Službeni glasnik RS 41/09, 2010. Dostupno na: [www.mpt.gov.rs/postavljen/125/4827010.0062.4-1.pdf](http://www.mpt.gov.rs/postavljen/125/4827010.0062.4-1.pdf) (Poslednji put pristupljeno 22.02.2013.).
- [143] W. J. Lee, F. W. Sosulski, S. Sokhansanj, Yield and composition of soluble and insoluble fractions from corn and wheat stillages, *Cereal chemistry*, 68 (1991) 559-562.
- [144] FLOTTWEG centrifuges for high efficient stillage separation in bioethanol production, Information bulletin, [http://www.flottweg.de/cms/upload/downloads/English/Bioethanol\\_English.pdf](http://www.flottweg.de/cms/upload/downloads/English/Bioethanol_English.pdf), (Poslednji put pristupljeno 22.02.2013.)
- [145] Iowa State University, Fact Sheets for Feeding Distillers, <http://www.ksgains.com/ethanol/DDGSFacts.pdf> (Poslednji put pristupljeno: 21.02.2013. godine)
- [146] L. Mojović, D. Pejin, M. Rakin, J. Pejin, S. Nikolić, A. Djukić-Vuković, How to improve the economy of bioethanol production in Serbia, *Renewable and sustainable energy reviews*, 16 (2012) 6040-6047.
- [147] V.V. Semenčenko, L.V. Mojović, A.P. Đukić-Vuković, M.M. Radosavljević, D.R. Terzić, M.S. Milašinović Šeremešić, Suitability of some selected maize hybrids from Serbia for the production of bioethanol and dried distillers' grains with soluble,

Journal of the science of food and agriculture, in press (2012), DOI 10.1002/jsfa.5801

[148] D.I. Givens, E. Owen, R.F.E. Axford, H.M. Ohmed, Forage evaluation in ruminant nutrition. CABI Publishing, Wallingford, (2000).

[149] T. W. Petty, M. J. Cecava, Beef Cattle Feeding and Nutrition, 2<sup>nd</sup> edition, Elsevier Inc., (1995).

[150] P. J. Van Soest, J. B. Robertson, B. A. Lewis, Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition, Journal of Dairy Science, 74 (1991) 3583-3597.

[151] H. K., Goering, P. J., Van Soest, Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications). ARS/USDA Handbook No. 379, Superintendent of Documents, US Government Printing Office, Washington, D.C. (1970).

[152] C. J. Sniffen, J. D. O'Connor, P. J. Van Soest, D. G. Fox, J. B. Russell A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability, Journal of Animal Science, 70 (1992) 3562-3577.

[153] B. B. Jensen, L. L. Mikkelsen, Feeding liquid diets to pigs. In: Recent Advances in Animal Nutrition. P. C. Garnsworthy and J. Wiseman, ed. Nottingham Univ. Press, Nottingham, (1998), pp. 107–126.

[154] N. Canibe, B.B. Jensen, Fermented liquid feed—Microbial and nutritional aspects and impact on enteric diseases in pigs, Animal Feed Science and Technology, 173 (2012) 17– 40.

[155] N. Canibe, O. Højberg, J. H. Badsberg, B. B. Jensen, Effect of feeding fermented liquid feed and fermented grain on gastrointestinal ecology and growth performance in piglets, Journal of Animal Science, 85 (2007) 2959–2971.

- [156] N. Canibe, B.B. Jensen, Fermented and nonfermented liquid feed to growing pigs: effect on aspects of gastrointestinal ecology and growth performance, *Journal of Animal Science*, 81 (2003) 2019–2031.
- [157] P. J. Van der Wolf, J. H. Bongers, A. R. W. Elbers, F. M. M. C. Franssen, W.A. Hunneman, A. C. A. Van Exsel, M. J. M. Tielen, *Salmonella* infections in finishing pigs in The Netherlands: bacteriological herd pre-valence, serogroup and antibiotic resistance of isolates and risk factors for infection, *Veterinary Microbiology*, 67 (1999) 263–275.
- [158] P.B. Bahnson, P.J. Fedorka-Cray, S.R. Ladely, N.E. Mateus-Pinilla, Herd-level risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* in U.S. market pigs, *Preventive Veterinary Medicine*, 76 (2006) 249–262.
- [159] Z. Poljak, C.E. Dewey, R.M. Friendship, S.W. Martin, J. Christensen, Multilevel analysis of risk factors for *Salmonella* shedding in Ontario finishing pigs, *Epidemiology and Infection*, 136 (2008) 1388–1400.
- [160] J. F. Guillot, Probiotic feed additives, *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 26(S1) (2003) 52–55.
- [161] A. Anadón, M.R. Martínez-Larrañaga, M. A. Martínez, Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 45 (2006) 91–95.
- [162] European Union, Register of Feed Additives pursuant to Regulation (EC) No 1831/2003, 154<sup>th</sup> Edition, [http://ec.europa.eu/food/food/animalnutrition/feedadditives/comm\\_register\\_feed\\_additives\\_1831-03.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/animalnutrition/feedadditives/comm_register_feed_additives_1831-03.pdf) (Poslednji put pristupljeno 17.02.2013. godine).
- [163] G. L. Miller, Use of dinitrosalicylic acid for determining reducing sugars. *Analytical Chemistry*, 31 (1959) 426–428.
- [164] J. Trajković, M. Mirić, J. Baras, S. Šiler, *Analize životnih namirnica*, Tehnološko-Metalurški fakultet, Beograd, (1983).

[165] Megazyme, L/D lactic acid (L/D lactate) rapid assay, booklet: [http://secure.megazyme.com/files/BOOKLET/K-DLATE\\_1212\\_DATA.pdf](http://secure.megazyme.com/files/BOOKLET/K-DLATE_1212_DATA.pdf)

(Poslednji put pristupljeno 22.02.2013.)

[166] The Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommision e.V., Brautechnische Analysemethoden, 4th Ed., Method 2.8.4.1.1, II (2002) p. 62, [http://www.wtw.com/downloads/manuals/ba75922e01\\_Brewery-](http://www.wtw.com/downloads/manuals/ba75922e01_Brewery-Application_Analysis_Instructions.pdf)

[Application\\_Analysis\\_Instructions.pdf](http://www.wtw.com/downloads/manuals/ba75922e01_Brewery-Application_Analysis_Instructions.pdf) (Poslednji put pristupljeno 10.03.2013.)

[167] D. Bezbradica, Sinteza estara katalizovana slobodnim lipazama i lipazama imobilisanim na polimernim nosačima, Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, (2007).

[168] D. R. Mertens, Critical conditions in determining detergent fiber. Proceedings of NFTA Forage Analysis Workshop. Denver, (1992), pp. C1-C8.

[169] P. J. Van Soest, R.H. Wine, Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell wall constituents. Journal of Association of Official Analytical Chemists, 50 (1967) 50-55.

[170] P. J. Van Soest, Uses of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method of fiber and lignin, Journal of the Association of Official Agricultural Chemists, 46 (1963) 829-835.

[171] Association of Official Analytical Chemists, Fiber (Acid Detergent) and Lignin in Animal Feed. (973.18) Official Methods of Analysis. 15th Edition, (1990).

[172] J. Aufréré, C. Demarquilly, Predicting organic matter digestibility of forage by two pepsin-cellulase methods, in Proceedings of the 16<sup>th</sup> International Grassland Congress, 4–11 October, Nice, France, Association Francaise pour la Production Feurragere, Versailles, (1989), pp. 877–878.

[173] J. Prasad, H. Gill, J. Smart, P.K. Gopal, Selection and Characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotic, International Dairy Journal, 8 (1998) 993-1002.

- [174] Institut za virusologiju, vakcije i serume, Torlak, Beograd, Katalog proizvoda: suve podloge, (2010).
- [175] P. Boyaval, Lactic acid bacteria and metal ions, Dairy Science and Technology, 69 (1989) 87-113.
- [176] A. Majkowska, M. Bielecka, E. Biedrzycka, Selection of the probiotic strains of lactic acid bacteria stimulated by fructans in the presence of calcium, Polish journal of food and nutrition sciences, 53(2S) (2003) 64-68.
- [177] S. Rapposch, F. Eliskases-Lechner, W. Ginzinger, Growth of Facultatively Heterofermentative *Lactobacilli* on Starter Cell Suspensions, Applied and Environmental Microbiology, 65 (1999) 5597-5599.
- [178] K. Kylä-Nikkilä, M. Hujanen, M. Leisola, A. Palva, Metabolic engineering of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 for production of pure L-(+)-lactic acid, Applied and Environmental microbiology, 66 (2000) 3835-3841.
- [179] E. M. Tuomola (nee Lehto), S. J. Salminen, Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures, International Journal of Food Microbiology, 41 (1998) 45-51.
- [180] Z. Li, L. Hana, Y. Ji, X. Wang, T. Tan, Fermentative production of l-lactic acid from hydrolysate of wheat bran by *Lactobacillus rhamnosus*, Biochemical Engineering Journal, 49 (2010) 138-142.
- [181] L. Mojović, M. Vukašinović Sekulić, A. Đukić, D. Pejin, M. Rakin, J. Pejin, S. Nikolić, Production of lactic acid on liquid distillery stillage, Journal on Processing and Energy in Agriculture (former PTEP), 15 (2011) 1-5.
- [182] P.S. Panesar, J.F. Kennedy, C.J. Knill, M. Kosseva, Production of L(+) lactic acid using *Lactobacillus casei* from whey, Brazilian Archives of Biology and Technology, 53 (2010) 219-226.

- [183] F. Cui, C. Wan, Y. Li, Z. Liu, G., Rajashekara, Co-production of Lactic Acid and *Lactobacillus rhamnosus* cells from whey permeate with nutrient supplements, *Food and Bioprocess Technology*, 5 (2012) 1278-1286.
- [184] L. M. D. Gonçalves, A. Ramos, J. S. Almeida, A. M. R. B. Xavier, M. J. T. Carrondo, Elucidation of the mechanism of lactic acid growth inhibition and production in batch cultures of *Lactobacillus rhamnosus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48 (1997). 346-350.
- [185] N. Agarwal, D.N. Kamra, L.C. Chaudhary, I. Agarwal, A. Sahoo, N.N. Pathak, Microbial status and rumen enzyme profile of crossbred calves fed on different microbial feed additives, *Letters in Applied Microbiology*, 34 (2002) 329-336.
- [186] Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D.M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J.-H., Diaz- Muñiz, I., Dosti, B., Smeianov, V., Wechter, W., Barabote, R., Lorca, G., Altermann, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins, R., O'Sullivan, D., teele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyaykin, S., Weimer, B., Mills, D., Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (2006) 15611-15616.
- [187] G. Lorca, M.I. Torino, G. Font de Valdez, Å. Ljungh, *Lactobacilli* express cell surface proteins which mediate binding of immobilized collagen and fibronectin, *FEMS Microbiology Letters*, 206 (2002) 31-37.
- [188] L. Zhang, K. Shi, G. Shi, Production of L-lactic acid with very high gravity distillery wastewater from ethanol fermentation by a newly isolated *Enterococcus hawaiiensis*, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 86 (2011) 213-216.

- [189] A. Đukić Vuković, L. Mojović, D. Pejin, M. Vukašinović-Sekulić, M. Rakin, S. Nikolić, J. Pejin, Novi pravci i izazovi u proizvodnji mlečne kiseline na obnovljivim sirovinama, *Hemijska industrija*, 65 (2011), 411–422.
- [190] M. Hujanen, Y. Y. Linko, Effect of temperature and various nitrogen sources on L(+) lactic acid production by *Lactobacillus casei*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45 (1996) 307–313.
- [191] C. Kotzamanidis, T. Roukas, G. Skaracis, Optimization of lactic acid production from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18 (2002) 441-448.
- [192] Chad. Hale, K.C. Olson, Mineral Supplements for Beef Cattle, (University of Missouri: <http://extension.missouri.edu/p/G2081>) (Poslednji put pristupljeno: 18. 10.2012.)
- [193] National Research Council. Nutrient Requirements of Beef Cattle, seventh revised edition. National Academy Press, Washington, D.C., (1996).
- [194] EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), Scientific Opinion on re-evaluation of calcium carbonate (E170) as a food additive, *EFSA Journal*. 9 (2011) 2318-2391.
- [195] J. Kamphues, Acidification of the stomach contents of weaned piglets-effect of feed quantity and composition, *Tierärztliche Praxis*, 18 (1990) 359-63.
- [196] Y.-J. Wee, J.-N. Kim, H.-W. Ryu, Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications, *Food Technology and biotechnology*, 44 (2006) 163-172.
- [197] S. Kwon, I. K. Yoo, W. G. Lee, H. N. Chang, Y. K. Chang, High-rate continuous production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* in a two-stage membrane cell-recycle bioreactor, *Biotechnology and Bioengineering*, 73 (2001) 25–34.

- [198] M. Hujanen S. Linko, Y.-Y. Linko, M. Leisola, Optimisation of media and cultivation conditions for L(+)(S)-lactic acid production by *Lactobacillus casei* NRRL B-441, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56 (2001) 126–130.
- [199] T. Liu, S. Miura, T. Arimura, M.-Y. Tei, E.Y. Park, Evaluation of L-lactic acid production in batch, fed-batch and continuous cultures of *Rhizopus* sp. MK-96-1196 using an airlift bioreactor, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 10 (2005) 522-527.
- [200] M. S. Silveira, C. P. M. L. Fontes, A. A. Guilherme F. A. N. Fernandes, S. Rodrigues, Cashew apple juice as substrate for lactic acid production, *Food and Bioprocess Technology*, 5 (2012) 947-953.
- [201] A. Djukić-Vuković, S. Nikolić, L. Mojović, D. Pejin, M. Rakin, J. Pejin, M. Bulatović, The possibilities of utilization of stillage from the production of bioethanol on starch feedstocks. In: Online Proceeding of XIX International Symposium on Alcohol Fuels – ISAF/ 2nd Lignocellulosic Bioethanol Conference, 10-14 October 2011, Verona, Italy, (2011).
- [202] A. Djukić-Vuković, L. Mojović, M. Vukašinović-Sekulić, S. Nikolić, J. Pejin, Integrated production of lactic acid and biomass on distillery stillage, *Bioprocess and biosystems engineering*, (2012), in press, DOI: 10.1007/s00449-012-0842-x
- [203] T. Roukas, P. Kotzekidou, Lactic acid production from deproteinized whey by mixed cultures of free and coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells using fedbatch culture, *Enzyme and Microbial Technology*, 22 (1998) 199-204.
- [204] M. Kubota, T. Nakabayashi, Y. Matsumoto, T. Shiomi, Y. Yamada, K. Ino, H. Yamanokuchi, M. Matsui, T. Tsunoda, F. Mizukami, K. Sakaguchi, Selective adsorption of bacterial cells onto zeolites, *Colloid and Surfaces B: Biointerfaces*, 64 (2008) 88–97.



- [205] J. Galindo, A. Elies, M. R. Gonzales, The effect of zeolite on ruminal bacteria population and its activity in heifers fed sunflower: sorghum silage, *Studies in Surface Science and Catalysis*, 28 (1986) 1055-1059.
- [206] C. M. Nguyen, J-S. Kim, H. J. Hwang, M. S. Park, G. J. Choi, Y. H. Choi, K. S. Jang, J-C. Kim, Production of L-lactic acid from a green microalga *Hydrodictyon reticulum*, by *Lactobacillus paracasei* LA104 isolated from traditional Korean food, makgeolli, *Bioresource Technology*, 110 (2012) 552-559.
- [207] 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 Biochemistry*, 41 (2006) 1117–1123.
- [208] C. S. Rao, R. S. Prakasham, A. B. Rao, J. S. Yadav, Functionalized Alginate as Immobilization Matrix in Enantioselective L (+) Lactic Acid Production by *Lactobacillus delbrueckii*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 149 (2008) 219–228.
- [209] Y. Kourkoutas, V. Xolias, M. Kallis, E. Bezirtzoglou, M. Kanellaki, *Lactobacillus casei* cell immobilization on fruit pieces for probiotic additive, fermented milk and lactic acid production, *Process biochemistry*, 40 (2005) 411–416.
- [210] J. E. Burgess, J. Quarmby, T. Stephenson, Role of micronutrients in activated sludge-based biotreatment of industrial effluents, *Biotechnology advances*. 17 (1999) 49–70.
- [211] J. A. Cowan, Structural and catalytic chemistry of magnesium-dependent enzymes, *BioMetals*, 15 (2002) 225–235.
- [212] S. F. Dagher, A. L. Ragout, F. Siñeriz, J. M. Bruno-Bárcena, Cell immobilization for production of lactic acid biofilms do it naturally, *Advances in Applied Microbiology*, 71 (2010) 113-48.
- [213] National Research Council, Nutrient Requirements of Swine, 10th revised edition. [Online]. NRC, National Academy Press, Washington, DC (1998),

www.nap.edu/openbook.php?record id=6016&page=3 (Poslednji put pristupljeno 18.05.2012.)

[214] US Grains Council, DDGS User Handbook. [Online]. Available: [www.grains.org/index.php/buying-selling/ddgs-userhandbook](http://www.grains.org/index.php/buying-selling/ddgs-userhandbook) (Poslednji put pristupljeno 18.05.2012.)

[215] K. Savijoki, H. Ingmer, P. Varmanen, Proteolytic systems of lactic acid bacteria, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71 (2006) 394–406.

[216] J. Lozo, I. Strahinić, M. Dalgalarrrondo, J-M. Chobert, T. Haertlé, L. Topisirović, Comparative analysis of b-casein proteolysis by PrtP proteinase from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGHN14, PrtR proteinase from *Lactobacillus rhamnosus* BGT10 and PrtH proteinase from *Lactobacillus helveticus* BGRA43, *International Dairy Journal*, 21 (2011) 863-868.

[217] J., Ogawa, S. Kishino, A. Ando, S. Sugimoto, K. Mihara, S. Shimizu, Production of Conjugated Fatty Acids by Lactic Acid Bacteria, *Journal of bioscience and bioengineering*, 100 (2005) 355–364.

[218] S. Kishino, J. Ogawa, Y. Omura, K. Matsumura, S. Shimizu, Conjugated Linoleic Acid Production from Linoleic Acid by Lactic Acid Bacteria, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79 (2002) 159-163.

[219] M. A. Belury, Inhibition of carcinogenesis by conjugated linoleic acid: Potential mechanisms of action, *Journal of Nutrition*, 132 (2002) 2995–2998.

[220] Z. Zeng, J. Lin, D. Gong, Identification of Lactic Acid Bacterial Strains with High Conjugated Linoleic Acid-Producing Ability from Natural Sauerkraut Fermentations, *Journal of food science*, 74 (2009) 154-158.

[221] P. Cozannet, Y. Primot, C. Gady, J.P. Métayer, M. Lessire, F. Skiba, J. Noblet, Energy value of wheat distillers grains with solubles for growing pigs and adult sows, *Journal of animal science*, 88 (2010) 2382-2392.

- [222] N. P. Shah, Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods, *Journal of Dairy Science*, 83 (2000) 894-907.
- [223] F. Gaggia, P. Mattarelli, B. Biavati, Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production, *International Journal of Food Microbiology*, 141 (2010) S15–S28.
- [224] H. Yavuzdurmaz, Isolation, characterization, determination of probiotic properties of lactic acid bacteria from human milk, Master thesis, Graduate School of Engineering and Sciences of Izmir Institute of Technology, Izmir, Turkey, (2007).
- [225] E.-S. Kawther, N. F. Tawfik, Nadia, M. A. Dabiza, O. M. Sharaf, B. A. Effat, In vitro assessment of gastrointestinal viability of potentially probiotic *Lactobacilli*, *Journal of American Science*, 6 (2010) 357-367.
- [226] B. Sánchez, M. Fernández-García, A. Margolles, C.G. de los Reyes-Gavilán, P. Ruas-Madiedo, Technological and probiotic selection criteria of a bile-adapted *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strain, *International Dairy Journal* 20 (2010) 800-805.
- [227] European Commission, Commission Regulation (EC) No 429/2008 of 25 April 2008 on detailed rules for the implementation of Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council as regards the preparation and the presentation of applications and the assessment and the authorisation of feed additives. *Official Journal of European Union* L 133 (2008) - 65.
- [228] A. Busch, H.-H. Herrmann, I. Kühn, O. Simon, J. Struck, E. Süphke, Probiotics in animal nutrition, *Arbeitsgemeinschaft für Wirkstoffe in der Tierernährung e.V*, Agrimedia, Bonn, (2004).
- [229] A. C. Wilkie, K. J. Riedesel, J. M. Owens, Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstock, *Biomass and Bioenergy*, 19 (2000) 63-102.

- [230] A. Djukić-Vuković, L. Mojović, M. Vukašinović-Sekulić, M. Rakin, S. Nikolić, J. Pejin, M. Bulatović, Effect of different fermentation parameters on L- lactic acid production from liquid distillery stillage, *Food Chemistry*, 134 (2012) 1038-1043.
- [231] Pravilnici za Tehnologiju hrane za životinje, Tehnologija hrane, <http://www.tehnologijahrane.com/pravilnici/pravilnici-za-tehnologiju-stocne-hrane> (Poslednji put pristupljeno: 15.04.2013.)
- [232] S. C. J. De Keersmaecker, T. L. A. Verhoeven, J. Desair, K. Marchal, J. Vanderleyden, I. Nagy, Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella typhimurium* is due to accumulation of lactic acid, *FEMS microbiology letters*, 259 (2006) 89-96.
- [233] S. A. Ibrahim, H. Yang, C.W. Seo, Antimicrobial activity of lactic acid and copper on growth of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 in laboratory medium and carrot juice, *Food Chemistry*, 109 (2008) 137-143.
- [234] G. Garrote, A. Abraham, G. De Antoni, Inhibitory power of kefir: The Role of organic acids, *Journal of food protection*, 63 (2000) 364-369.
- [235] P. Ruas-Madiedo, J. Hugenholtz, P. Zoon, An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria, *International Dairy Journal*, 12 (2002) 163-171.
- [236] A. D. Welman, I. S. Maddox, Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges, *Trends in biotechnology*, 21 (2003) 269-274.
- [237] L. De Vuyst, B. Degeest, Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria, *FEMS Microbiology Reviews*, 23 (1999) 153-177.
- [238] P. J. Looijesteijn, L. Trapet, E. de Vries, T. Abee, J. Hugenholtz, Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. *International Journal of Food Microbiology*, 64 (2001) 71-80.
- [239] A. Djukić-Vuković, L. Mojović, B. Jokić, S. Nikolić, J. Pejin, Lactic acid production on liquid distillery stillage by *Lactobacillus rhamnosus* immobilized

onto zeolite, Bioresource technology, (2012), in press, DOI: 10.1016/j.biortech.2012.10.066

[240] R. Coppola, M. Succi, P. Tremonte, A. Reale, G. Salzano, Elena Sorrentino, Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese, Lait, 85 (2005) 193-204.

[241] A. A. Salyers, A. Gupta, Y. Wang, Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes, Trends in Microbiology, 12 (2004) 412-6.

[242] S. Mathur, R. Singh, Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review, International Journal of Food Microbiology, 105 (2005) 281-95.

[243] D. R. Snyderman, The Safety of probiotics, Clinical Infectious Diseases, 46 (S2) (2008) S104-S111.

[244] P. L. Hibberd, L. E. Davidson, Safety of probiotics, Agro food industry hi-tech, 19 (2008) 30-33.

## Biografija

Aleksandra Đukić-Vuković je rođena 30.07.1984. godine u Smederevu. Gimnaziju „Branko Radičević“ u Kovinu je završila sa odličnim uspehom 2002. godine. Diplomirala je na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu 05. maja 2008. godine sa ocenom 10 i prosečnom ocenom u toku studija 8,84. Završila je pripravnički staž za farmaceute u junu 2009. godine i stekla licencu za obavljanje farmaceutske zdravstvene delatnosti. Govori, čita i piše engleski jezik, a služi se nemačkim jezikom. Doktorske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu je upisala školske 2008/2009. godine, na smeru Biohemijско inženjerstvo i biotehnologija. U toku doktorskih studija je položila sve ispite sa prosečnom ocenom 10.

Od juna 2009. godine do januara 2011. godine bila je stipendista Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. U zvanje istraživač pripravnik je izabrana 23.09.2010., a u zvanje istraživač saradnik 12.07.2011. godine. Od 2009. godine je bila angažovana na projektu TR20064 *Razvoj tehnoloških postupaka za proizvodnju aditiva i novih formulacija za prehrambenu industriju* Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj. Od januara 2010. godine, bila je angažovana na projektu TR18002 Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj *Povećanje efikasnosti proizvodnje bioetanola na obnovljivim sirovinama potpunim iskorišćenjem sporednih proizvoda*. Od 01.02.2011. godine zaposlena je na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu, Katedra za biohemijско inženjerstvo i biotehnologiju, pri projektu Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj TR31017 *Proizvodnja mlečne kiseline i probiotika na otpadnim proizvodima prehrambene i agro-industrije*. U periodu 2011-2012. godine učestvovala je u međunarodnom projektu u okviru bilateralne saradnje između Republike Srbije i Narodne republike Kine pod nazivom *Unapređenje proizvodnje hemikalija na obnovljivoj biomasi*.

Angažovana je na izvođenju vežbi iz predmeta Farmaceutska biotehnologija na osnovnim studijama i Farmaceutska biotehnologija i Analitika životnih namirnica na master studijama.

## PRILOG

Lista skraćenica korišćenih u disertaciji (po abecednom redu)

ADF (engL.) – acid detergent fibre

ADL (engL.) – acid detergent lignin

BMK – bakterije mlečne-kiseline

DDG (engL.) – dried distillers' grains

DDGS (engL.) - dried distillers' grains with soluble

GIT – gastro-intestinalni trakt

KMK – konjugovane masne kiseline

MKF – mlečno-kiselinska fermentacija

NDF (engL.) – neutral detergent fibre

NFE (engL.) – nitrogen free extract

SM – suva materija

SEM – skenirajuća elektronska mikroskopija

SSF – simultana saharifikacija i fermentacije

SZO – svetska zdravstvena organizacija

SDDŽRM – suvi ostatak džibre sa rastvorenim materijama

SODŽ – suvi ostatak džibre

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а АЛЕКСАНДРА Ђукић - Вуковић

број индекса 4005/08

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

ПРОИЗВОДЊА МЛЕЧНЕ КИСЕЛИНЕ И ПРОБИОТСКЕ БИОМАСЕ НА  
РЕСТАКЛЕРИЈСКОЈ ЦИБРИ

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 14.05.2013.

A. Đukić-Vuković



Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора АЛЕКСАНДРА ЂУКИЋ-ВУКОВИЋ

Број индекса 4005/08

Студијски програм БИОХЕМИЈСКО ИНЖЕЊЕРСТВО И БИОТЕХНОЛОГИЈА

Наслов рада ПРОИЗВОДЊА МАЧИНЕ КИСЕЛИНЕ И ПРОБИОТСКЕ БИОМАСЕ НА ДИСТИЛЕРИЈСКОЈ ЦИБРИ

Ментор Проф. Др Љиљана Мојовић, ред. проф. Технолошко-металуршког факултета  
Универзитета у Београду

Потписани/а АЛЕКСАНДРА ЂУКИЋ-ВУКОВИЋ

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 14.05.2013.

Ђукић-Вуковић

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

ПРОИЗВОДЊА МЛЕЧНЕ КИСелиНЕ И ПРОБИОТСКЕ БИОМАСЕ НА  
ДЕСТИЛЕРИЈСКОЈ ФИБРИ

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 15.05.2013.

Abdica Velovic