

UNIVERZITET U BEOGRADU  
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Dragana D. Mladenović

**AGRO-INDUSTRIJSKI OTPAD KAO  
SUPSTRAT ZA PROIZVODNJU MLEČNE  
KISELINE, MIKROBNE BIOMASE I HRANE  
ZA ŽIVOTINJE**

doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Dragana D. Mladenović

**AGRO-INDUSTRIAL WASTE AS A  
SUBSTRATE FOR PRODUCTION OF  
LACTIC ACID, MICROBIAL BIOMASS AND  
ANIMAL FEED**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

**MENTOR:**

---

**Dr Ljiljana Mojović**, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

**ČLANOVI KOMISIJE:**

---

**Dr Aleksandra Đukić-Vuković**, naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

---

**Dr Maja Vukašinović-Sekulić**, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

---

**Dr Jelena Pejin**, vanredni profesor

Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet

**DATUM ODBRANE:**

---

## **\*\* ZAHVALNICA \*\***

*Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju u okviru projekta Tehnološkog razvoja TR 31017 pod nazivom „Proizvodnja mlečne kiseline i probiotika na otpadnim proizvodima prehrambene i agro-industrije“. Zahvalna sam Ministarstvu prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije koje je četiri godine stipendiralo moje učešće na projektu, iz čega je proistekla ova doktorska disertacija.*

*Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru, dr Ljiljani Mojović, redovnom profesoru Tehnološko-metalurškog fakulteta, na ukazanom poverenju i prilici da se bavim fermentacionim tehnologijama. Hvala na izuzetno odgovornom i savesnom mentorstvu, velikoj pomoći i podršci u svakom trenutku izrade i pisanja doktorske disertacije, na optimizmu, dragocenim savetima i razumevanju.*

*Neizmernu zahvalnost osećam prema dr Aleksandri Đukić-Vuković, naučnom saradniku Tehnološko-metalurškog fakulteta, pre svega na spremnosti da nesebično podeli svoje znanje i vreme, na zalaganju, savetima i brojnim diskusijama koje su bile od neprocenjivog značaja tokom eksperimentalnog rada i pisanja disertacije. Hvala na prijateljskoj podršci, motivaciji i pozitivnom duhu u teškim momentima!*

*Dr Maji Vukašinović-Sekulić, vanrednom profesoru Tehnološko-metalurškog fakulteta, sam zahvalna na izuzetno korisnim praktičnim savetima, diskusijama i druženju u laboratoriji i dr Jeleni Pejin, vanrednom profesoru Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, na sugestijama, rečima ohrabrenja i podrške tokom zajedničkih susreta.*

*Hvala svim koleginicama sa Katedre za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju za ljubaznost i smeh tokom rada u laboratoriji.*

*Mojim prijateljicama Jaci i Maji hvala na retkim, ali lepim i ispunjenim zajedničkim trenucima. Hvala što ste ostale tu!*

*Beskrajno sam zahvalna zetu Mirku na tehničkoj pomoći i sestri Bojani na podršci i brizi. Na kraju, najveće hvala mami Ljiljani i tati Draganu za ogromno požrtvovanje, pomoć i smirenost tokom svih ovih godina.*

# AGRO-INDUSTRIJSKI OTPAD KAO SUPSTRAT ZA PROIZVODNJU MLEČNE KISELINE, MIKROBNE BIOMASE I HRANE ZA ŽIVOTINJE

## SAŽETAK

Mlečna kiselina nalazi široku primenu u prehrambenoj, kozmetičkoj, farmaceutskoj i hemijskoj industriji. Poslednjih godina najvažnija primena mlečne kiseline je u proizvodnji polimera mlečne kiseline koji predstavljaju najčešće korišćene biorazgradive i biokompatibilne plastične materijale. Mlečna kiselina se dominantno proizvodi fermentacionim putem pomoću bakterija mlečne kiseline. Visoki prinosi D- ili L-mlečne kiseline u fermentaciji jeftinih izvora ugljenika su ključne odlike održivog fermentacionog postupka. Predmet istraživanja u okviru ove doktorske disertacije bio je da se ispita mogućnost proizvodnje mlečne kiseline na kombinovanom supstratu na bazi otpadne krompirove džibre iz proizvodnje bioetanola i melase šećerne repe kao sporednog proizvoda industrije šećera. Osnovni cilj je definisanje tehnološkog postupka koji će primenom jeftinih sirovina omogućiti efikasnu i ekonomski održivu proizvodnju mlečne kiseline i valorizaciju sporednih proizvoda fermentacije u ishrani preživara.

Hemijskom analizom je pokazano da kombinovani supstrat na bazi krompirove džibre i melase šećerne repe predstavlja dobar izvor azota, fermentabilnih šećera i mineralnih materija neophodnih za rast bakterija mlečne kiseline i proizvodnju mlečne kiseline. Selekcijom soja koji efikasno fermentiše šećere prisutne u kombinovanom otpadnom supstratu, za proizvodnju mlečne kiseline je odabran soj *Lactobacillus paracasei* NRRL B-4564. U cilju poboljšanja efikasnosti proizvodnje mlečne kiseline, *L. paracasei* je uspešno adaptiran na potencijalno inhibitorna jedinjenja prisutna u melasi šećerne repe. U dolivnoj fermentaciji pomoću adaptiranog *L. paracasei* A-22 koncentracija mlečne kiseline (169,9 g/L) je bila za 51% veća u odnosu na koncentraciju mlečne kiseline koja je ostvarena pomoću neadaptiranog soja (107,1 g/L). Imobilizacija *L. paracasei* na repin rezanac, pivski trop i ljusku suncokreta je omogućila efikasna proizvodnju mlečne kiseline u ponovljenoj šaržnoj fermentaciji i

istovremenu valorizaciju zaostalih fermentisanih nosača kao hraniva za životinje. Analizom osušenih fermentisanih nosača i poređenjem sa nefermentisanim materijalima, utvrđeno je da je mlečno-kiselinska fermentacija dovela do povećanja sadržaja proteina i pepela. Takođe, fermentisani nosači su imali znatno manji sadržaj svih frakcija vlakana (NDF, ADF i ADL) u odnosu na nefermentisane materijale. Mlečno-kiselinska fermentacija je imala značajan pozitivan uticaj na *in vitro* svarljivost suve materije pivskog tropa i ljuske suncokreta. Sa druge strane, fermentacija je dovela do smanjenja *in vitro* svarljivosti suve materije repinog rezanca. Poređenjem fermentisanog i nefermentisanog pivskog tropa i ljuske suncokreta, predviđene energetske vrednosti su bile značajno veće nakon fermentacije, dok su energetske parametri fermentisanog repinog rezanca bili niži u poređenju sa nefermentisanim materijalom. Analizom probiotskog potencijala, *L. paracasei* NRRL B-4564 je pokazao visoku stopu preživljavanja u simuliranim uslovima gastro-intestinalnog trakta preživara, antimikrobnu aktivnost prema Gram-pozitivnim (*Bacillus cereus* i *Staphylococcus aureus*) i Gram-negativnim (*Escherichia coli* i *Salmonella enteritidis*) patogenim bakterijama, značajnu sposobnost autoagregacije i antioksidativnu aktivnost. Na osnovu dobijenih rezultata, sporedni proizvodi mlečno-kiseinske fermentacije, probiotska biomasa i fermentisani lignocelulozni nosači mogu naći primenu u ishrani preživara.

**Ključne reči:** mlečna kiselina, agro-industrijski otpad, krompirova džibra, melasa šećerne repe, ljuska suncokreta, pivski trop, repin rezanac, mikrobnna imobilizacija, *Lactobacillus paracasei* NRRL B-4564, probiotici, hranivo za preživare.

**Naučna oblast:** Tehnološko inženjerstvo

**Uža naučna oblast:** Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija

**UDK:**

## **AGRO-INDUSTRIAL WASTE AS A SUBSTRATE FOR PRODUCTION OF LACTIC ACID, MICROBIAL BIOMASS AND ANIMAL FEED**

### **ABSTRACT**

Lactic acid has been widely used in food, cosmetics, pharmaceutical and chemical industry. In recent years, the most important application of lactic acid is in production of poly-lactic acid (PLA) polymers, which are most frequently applied biocompatible and biodegradable plastic materials. Dominant route for lactic acid production is fermentation by lactic acid bacteria. High yields of D- or L-lactic acid in fermentation on low-cost carbon and nitrogen sources are key factors for sustainable lactic acid production. The aim of this research was to evaluate the possibility of lactic acid production on a combined substrate based on potato stillage from bioethanol production and sugar beet molasses from sugar industry. The main goal was to develop a process based on utilization of low-cost feedstocks that will enable efficient and sustainable lactic acid production and valorization of by-products remained after lactic acid fermentation in animal nutrition.

Chemical composition of the stillage and molasses indicate that the combination of these substrates can provide necessary nutrients and fermentable sugars for the growth of lactic acid bacteria and efficient lactic acid production. Among three assayed strains, *Lactobacillus paracasei* NRRL B-4564 gave the highest lactic acid production and growth on cheap and complex waste substrate. In order to enhance lactic acid production, *L. paracasei* was successfully adapted to inhibitory compounds contained in sugar beet molasses. Fed-batch fermentation by adapted *L. paracasei* A-22 resulted in 51 % higher lactic acid concentration (169.9 g/L) compared to fermentation with parent strain (107.1 g/L). Immobilization of *L. paracasei* onto sugar beet pulp, brewers' spent grain and sunflower seed hull enabled efficient lactic acid production in five successive batches and valorization of fermented support materials in ruminant nutrition.

Dried lignocellulosic supports remained after repeated batch fermentation were significantly higher in the content of proteins and ash, and lower in the content of fibers (NDF, ADF and ADL). In addition, the fermentation had favorable effect on *in vitro* dry matter digestibility of sunflower seed hull and brewers' spent grain. On the contrary, *in vitro* dry matter digestibility of fermented sugar beet pulp was lower than that of unfermented material. Comparing fermented and unfermented sunflower seed hull and brewers' spent grain, predicted energy values were significantly higher after fermentation. Conversely, predicted energy parameters of fermented sugar beet pulp were lower compared to unfermented material. According to *in vitro* assessment of probiotic potential, *L. paracasei* NRRL B-4564 demonstrated favorable probiotic profile, exhibiting high resistance to simulated ruminant digestive tract, the ability to autoaggregate, significant antioxidant and antimicrobial activity against Gram-positive (*Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*) and Gram-negative (*Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis*) pathogenic bacteria. Due to favorable probiotic characteristics of *L. paracasei*, the fermented lignocellulosic materials together with immobilized biomass have a great potential for use as probiotic enriched source of nutrients in compounded ruminant feeds.

**Keywords:** lactic acid, agro-industrial waste, potato stillage, sugar beet molasses, sunflower seed hull, brewers' spent grain, sugar beet pulp, microbial immobilization, *Lactobacillus paracasei* NRRL B-4564, probiotics, ruminant feed.

**Scientific field:** Technological engineering

**Scientific discipline:** Biochemical engineering and biotechnology

**UDC:**



## SPISAK SKRAĆENICA

<b>ADF</b>	(engl. <i>Acid Detergent Fibres</i> ) Kisela deterdžentska vlakna
<b>ADIP</b>	(engl. <i>Acid Detergent Insoluble Protein</i> ) Protein nerastvorljiv u rastvoru kiselog deterdženta
<b>ADL</b>	(engl. <i>Acid Detergent Lignin</i> ) Lignin nerastvorljiv u rastvoru kiselog deterdženta
<b>BMK</b>	Bakterije mlečne kiseline
<b>CBP</b>	(engl. <i>Consolidated Bioprocessing</i> ) Konsolidovani bioproces
<b>CLSI</b>	(engl. <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> ) Institut za kliničke i laboratorijske standarde
<b>CP</b>	(engl. <i>Crude Protein</i> ) Sirovi protein
<b>DE<sub>1x</sub></b>	(engl. <i>Digestible Energy</i> ) Svarljiva energija hraniva pri konzumiranju na nivou uzdržanih potreba
<b>DE<sub>3x</sub></b>	Svarljiva energija hraniva pri konzumiranju na trećem nivou proizvodnih potreba
<b>DF</b>	(engl. <i>Discount Factor</i> ) Faktor korekcije koji se uzima u obzir prilikom izračunavanja energetske vrednosti hraniva
<b>DPPH<sup>•</sup></b>	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal
<b>EFSA</b>	(engl. <i>European Food Safety Authority</i> ) Evropska agencija za bezbednost hrane
<b>GRAS</b>	(engl. <i>Generally Recognized as Safe</i> ) Status mikroorganizama koji se smatraju bezbednim za upotrebu u ishrani
<b>HMF</b>	5-hidroksimetilfurfural
<b>ME<sub>3x</sub></b>	(engl. <i>Metabolizable Energy</i> ) Metabolička energija hraniva pri konzumiranju na trećem nivou proizvodnih potreba
<b>NDF</b>	(engl. <i>Neutral Detergent Fibres</i> ) Neutralna deterdžentska vlakna
<b>NDIP</b>	(engl. <i>Neutral Detergent Insoluble Protein</i> ) Protein nerastvorljiv u rastvoru neutralnog deterdženta
<b>NE<sub>L3x</sub></b>	Neto energija za laktaciju na trećem nivou produktivnosti

<b>NE<sub>M</sub></b>	Neto energija za održanje
<b>NE<sub>G</sub></b>	Neto energija za porast
<b>NFC</b>	(engl. <i>Non-Fibrous Carbohydrates</i> ) Nestrukturani ugljeni hidrati
<b>NRC</b>	(engl. <i>National Research Council</i> ) Nacionalni istraživački savet
<b>P</b>	Produktivnost mlečne kiseline
<b>PAF</b>	(engl. <i>Processing Adjustment Factor</i> ) Faktor koji se uzima u obzir prilikom izračunavanja svarljive frakcije nestrukturanih ugljenih hidrata, a zavisi od obrađenosti hraniva
<b>PBS</b>	(engl. <i>Phosphate-Buffered Saline</i> ) Fosfatni pufer
<b>QPS</b>	(engl. <i>Qualified Presumption of Safety</i> ) Status kvalifikovane pretpostavke bezbednosti mikroorganizama koji se smatraju bezbednim za upotrebu u proizvodnji hrane i suplemenata
<b>SLSF</b>	Simultana likvefakcija, saharifikacija i fermentacija
<b>SM</b>	Suva materija
<b>SSF</b>	Simultana saharifikacija i fermentacija
<b>TDN</b>	(engl. <i>Total Digestible Nutrients</i> ) Ukupna svarljiva hranljiva materija
<b>Y</b>	Prinos mlečne kiseline
<b>Y<sub>koef.</sub></b>	Koeficijent prinosa mlečne kiseline

## SPIŠAK NASLOVA SLIKA

- Slika 1.** L (+) i D (-) enantiomer mlečne kiseline.
- Slika 2.** Metabolički putevi proizvodnje mlečne kiseline iz različitih vrsta šećera. Enzimi: (1) 6-fosfoglukonat dehidrogenaza; (2) laktat dehidrogenaza; (3) fosfoketolaza; (4) alkohol dehidrogenaza; (5) acetat kinaza.
- Slika 3.** Primena adaptivne laboratorijske evolucije.
- Slika 4.** Šematski prikaz osnovnih faza proizvodnje mlečne kiseline na različitim supstratima. SSF – simultana saharifikacija i fermentacija; SLSF – simultana likvefakcija, saharifikacija i fermentacija; CBP – konsolidovani bioproces.
- Slika 5.** Šematski prikaz osnovnih načina imobilizacije bakterijskih ćelija.
- Slika 6.** Globalni sastav stočne hrane. Krmno bilje (leguminoze, stočna repa); ostaci useva (slama, kukuruzovina, vrhovi šećerne trske); pogače uljarica (uljane repice, pamuka, uljane palme); druga jestiva hrana (peleti tapioke, pasulj, neprerađeno sojino zrno, sojino i ulje repice); sporedni industrijski proizvodi (kukuruzni gluten i mekinje, melasa, repin rezanac, pivski trop, suva džibra); druga nejestiva hrana (riblje brašno, sintetičke aminokiseline, stočna kreda); žitarice (pšenica, ječam, proso, pirinač, kukuruz, sirak, zob, heljda).
- Slika 7.** Osnovne kategorije hraniva za preživare.
- Slika 8.** Šematski prikaz osnovnog hemijskog sastava hraniva za preživare. NDF – neutralna deterdžentska vlakna; ADF – kisela deterdžentska vlakna.
- Slika 9.** Šematski prikaz metabolizma i iskoristivosti energije kod preživara.
- Slika 10.** Reakcija redukujućih šećera i 3,5-dinitrosalicilne kiseline.
- Slika 11.** Standardna prava zavisnosti koncentracije rastvora šećera od apsorbance na talasnoj dužini od 505 nm.
- Slika 12.** Reakcija ninhidrina i  $\alpha$ -aminokiselina.
- Slika 13.** Šematski prikaz procesa adaptacije *L. paracasei* NRRL B-4564.
- Slika 14.** Reakcija DPPH' radikala i antioksidanata.

- Slika 15.** Postupak određivanja broja živih ćelija pravljenjem serije decimalnih razblaženja uzorka i zasejavanjem odgovarajućeg razblaženja na čvrstoj agarnoj podlozi.
- Slika 16.** Frakcije vlakana po Van Soest-u.
- Slika 17.** Koncentracija mlečne kiseline postignuta pomoću *L. paracasei* NRRL B-4564, *L. salivarius* ATCC 11741 i *L. rhamnosus* ATCC 7469 nakon 48 h fermentacije na modifikovanom MRS bujonu na bazi saharoze (MRS/saharoza), modifikovanom MRS bujonu na bazi melase (MRS/melasa) i krompirovoj džibri.
- Slika 18.** Broj živih ćelija *L. paracasei* NRRL B-4564, *L. salivarius* ATCC 11741 i *L. rhamnosus* ATCC 7469 nakon 48 h fermentacije na modifikovanom MRS bujonu na bazi saharoze (MRS/saharoza), modifikovanom MRS bujonu na bazi melase (MRS/melasa) i krompirovoj džibri.
- Slika 19.** Kinetika potrošnje šećera a) i proizvodnje mlečne kiseline b) tokom fermentacije kombinovanog supstrata na bazi krompirove džibre i melase šećerne repe pomoću *L. paracasei* NRRL B-4564.
- Slika 20.** Produktivnost mlečne kiseline tokom fermentacije supstrata na bazi krompirove džibre i melase šećerne repe pri različitim početnim koncentracijama šećera.
- Slika 21.** Kriva rasta *L. paracasei* NRRL B-4564 tokom fermentacije supstrata na bazi krompirove džibre i melase šećerne repe pri različitim početnim koncentracijama šećera.
- Slika 22.** Inhibicija DPPH' radikala pomoću adaptiranog i neadaptiranog *L. paracasei*.
- Slika 23.** Kinetika potrošnje šećera a) i proizvodnje mlečne kiseline b) u šaržnoj fermentaciji supstrata na bazi krompirove džibre i melase šećerne repe pomoću adaptiranog i neadaptiranog *L. paracasei*.

- Slika 24.** Kriva rasta adaptiranog i neadaptiranog *L. paracasei* tokom šaržne fermentacije na supstratu na bazi krompirove džibre i melase šećerne repe.
- Slika 25.** Kinetika dolivnog postupka proizvodnje mlečne kiseline pomoću a) neadaptiranog i b) adaptiranog *L. paracasei*.
- Slika 26.** Usporedni prikaz najvažnijih parametara dolivne fermentacije pomoću neadaptiranog i adaptiranog *L. paracasei*.
- Slika 27.** Indeks apsorpcije vode i kritična tačka vlažnosti repinog rezanca, pivskog tropa i ljuske suncokreta.
- Slika 28.** Skenirajuća elektronska mikrografija površine a) repinog rezanca, b) pivskog tropa i c) ljuske suncokreta bez i sa ćelijama *L. paracasei* imobilisanih na d) repin rezanac, e) pivski trop i f) ljusku suncokreta.
- Slika 29.** Kinetika potrošnje šećera i proizvodnje mlečne kiseline u šaržnoj fermentaciji supstrata na bazi tečne džibre i melase šećerne repe pomoću slobodnih ćelija *L. paracasei* NRRL B-4564.
- Slika 30.** Kinetika potrošnje šećera a) i proizvodnje mlečne kiseline b) u ponovljenoj šaržnoj fermentaciji supstrata na bazi tečne džibre i melase šećerne repe pomoću *L. paracasei* imobilisanog na repin rezanac, pivski trop i ljusku suncokreta.
- Slika 31.** Ukupan broj slobodnih i imobilisanih ćelija *L. paracasei* NRRL B-4564 tokom šaržne i ponovljene šaržne fermentacije na supstratu na bazi tečne džibre i melase šećerne repe.
- Slika 32.** Broj ćelija *L. paracasei* NRRL B-4564 imobilisanih na tri lignocelulozna nosača tokom pet ponovljenih šaržnih ciklusa.
- Slika 33.** Šematski prikaz tehnoloških postupaka proizvodnje mlečne kiseline ispitivanih u doktorskoj disertaciji i predložene mogućnosti valorizacije nastalih sporednih proizvoda.
- Slika 34.** Hemijski sastav fermentisanog i nefermentisanog a) repinog rezanca, b) pivskog tropa i c) ljuske suncokreta.

- Slika 35.** Ukupna svarljiva hranljiva materija (TDN) i *in vitro* svarljivost suve materije fermentisanih i nefermentisanih lignoceluloznih nosača.
- Slika 36.** Uporedni prikaz energetske parametara fermentisanih i nefermentisanih lignoceluloznih nosača predviđenih za mlečne krave.
- Slika 37.** Uporedni prikaz energetske parametara fermentisanih i nefermentisanih lignoceluloznih nosača predviđenih za tovna goveda.
- Slika 38.** Preživljavanje *L. paracasei* NRRL B-4564 u simuliranim uslovima digestivnog trakta preživara.
- Slika 39.** Antimikrobna aktivnost *L. paracasei* NRRL B-4564 prema patogenim mikroorganizmima. 1 – supernatant pH 3,8; 2 – supernatant pH 7,0; 3 – neutralisan supernatant tretiran pronazom E.
- Slika 40.** Antibiogram test *L. paracasei* NRRL B-4564. 1 – eritromicin; 2 – tetraciklin; 3 – penicilin; 4 – ampicilin; 5 – vankomicin; 6 – gentamicin; 7 – streptomycin; 8 – kanamicin; 9 – nalidiksinska kiselina.
- Slika 41.** Kinetika autoagregacije *L. paracasei* NRRL B-4564 tokom 24 h inkubacije u PBS puferu.

## **SPISAK NASLOVA TABELA**

- Tabela 1.** Supstrati agro-industrijskog porekla ispitivani za proizvodnju mlečne kiseline.
- Tabela 2.** Vrednosti najvažnijih parametara mlečno-kiselinske fermentacije sa imobilisanim ćelijama.
- Tabela 3.** Preporuke za uključivanje pojedinih sporednih industrijskih proizvoda u obroke krava.
- Tabela 4.** Sadržaj proteina, sirovih vlakana i svarljivost tipičnih hraniva za preživare.
- Tabela 5.** Ključni kriterijumi za selekciju probiotika za komercijalnu upotrebu.
- Tabela 6.** Mikroorganizmi koji nalaze primenu u ishrani preživara i njihova uloga u buragu.
- Tabela 7.** Plan dodavanja reagenasa prilikom kvantitativnog određivanja sadržaja mlečne kiseline enzimskom metodom.
- Tabela 8.** Kriterijumi za procenu osetljivosti mikroorganizma na antibiotike.
- Tabela 9.** Hemijski sastav krompirove džibre i melase šećerne repe.
- Tabela 10.** Sadržaj šećera,  $\alpha$ -amino azota i mineralnih materija u melasi, džibri i kombinovanom supstratu koji je korišćen za mlečno-kiselinsku fermentaciju.
- Tabela 11.** Parametri postignuti u mlečno-kiselinskoj fermentaciji kombinovanog supstrata na bazi krompirove džibre i melase šećerne repe pomoću *L. paracasei* NRRL B-4564 pri različitim početnim koncentracijama šećera.
- Tabela 12.** Najvažniji parametri šaržne fermentacije na kombinovanom supstratu pomoću adaptiranog i neadaptiranog *L. paracasei*.
- Tabela 13.** Poređenje najvažnijih parametara dolivne fermentacije na različitim alternativnim supstratima.
- Tabela 14.** Parametri porozne strukture lignoceluloznih nosača.

- Tabela 15.** Vrednosti najvažnijih parametara mlečno-kiselinske fermentacije na supstratu na bazi tečne džibre i melase šećerne repe pomoću slobodnih i imobilisanih ćelija *L. paracasei* NRRL B-4564.
- Tabela 16.** Prečnici zone inhibicije rasta patogenih mikroorganizama postignuti pomoću supernatanta prekonoćne kulture *L. paracasei* NRRL B-4564.
- Tabela 17.** Prečnici zona inhibicije rasta i kategorija osetljivosti *L. paracasei* NRRL B-4564 na test antibiotike.
- Tabela 18.** Antioksidativna aktivnost *L. paracasei* NRRL B-4564.



# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DEO .....</b>	<b>4</b>
2.1. Mlečna kiselina .....	4
2.2. Mikroorganizmi za proizvodnju mlečne kiseline .....	6
2.2.1. Metabolički putevi proizvodnje mlečne kiseline .....	6
2.2.2. Bakterije mlečne kiseline.....	7
2.2.3. Bakterije roda <i>Bacillus</i> .....	8
2.2.4. Plesni roda <i>Rhizopus</i> .....	9
2.2.5. Mešane mikrobne kulture .....	10
2.2.6. Genetički modifikovani i adaptirani mikroorganizmi za proizvodnju mlečne kiseline.....	11
2.3. Agro-industrijski sporedni i otpadni proizvodi kao supstrati za proizvodnju mlečne kiseline.....	13
2.4. Proizvodnja mlečne kiseline u šaržnom i dolivnom postupku.....	21
2.5. Proizvodnja mlečne kiseline pomoću imobilisanih sistema.....	21
2.6. Ekstrakcija i prečišćavanje mlečne kiseline .....	24
2.7. Upotreba sporednih proizvoda prehrambene i agro-industrije u ishrani životinja.....	24
2.7.1. Kvalitet hraniva za ishranu preživara .....	28
2.7.2. Energetska vrednost hraniva za preživare .....	32
2.7.3. Pобољшanje kvaliteta hraniva za preživare.....	34
2.7.4. Probiotici.....	37
2.7.4.1. Upotreba probiotika u ishrani preživara .....	40
<b>3. EKSPERIMENTALNI DEO .....</b>	<b>45</b>
3.1. Materijali .....	45
3.2. Metode.....	49
3.2.1. Hemijska karakterizacija krompirove džibre i melase šećerne repe.....	49
3.2.1.1. Određivanje sadržaja suve materije .....	49
3.2.1.2. Određivanje sadržaja šećera .....	50

3.2.1.3. Određivanje potencijalno inhibitornih jedinjenja u melasi šećerne repe .....	53
3.2.1.4. Određivanje sadržaja ukupnog azota .....	53
3.2.1.5. Određivanje slobodnog $\alpha$ -amino azota.....	55
3.2.1.6. Određivanje sadržaja pepela.....	57
3.2.1.7. Određivanje sadržaja metala.....	58
3.2.1.8. Određivanje sadržaja masti .....	59
3.2.2. Priprema inokuluma bakterija mlečne kiseline .....	60
3.2.3. Selekcija bakterija mlečne kiseline koje efikasno fermentišu saharozu.....	61
3.2.4. Proizvodnja mlečne kiseline na kombinovanom supstratu na bazi krompirove džibre i melase – priprema supstrata za fermentaciju.....	61
3.2.5. Optimizacija početne koncentracije šećera za proizvodnju mlečne kiseline .....	62
3.2.6. Adaptacija <i>L. paracasei</i> NRRL B-4564 – priprema supstrata za adaptaciju .....	62
3.2.6.1. Proces adaptacije <i>L. paracasei</i> .....	63
3.2.7. Šaržni postupak proizvodnje mlečne kiseline pomoću adaptiranog i neadaptiranog <i>L. paracasei</i> .....	64
3.2.8. Dolivni postupak proizvodnje mlečne kiseline pomoću adaptiranog i neadaptiranog <i>L. paracasei</i> .....	65
3.2.9. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti celih ćelija i unutarćelijskog ekstrakta adaptiranog i neadaptiranog <i>L. paracasei</i> .....	65
3.2.9.1. Priprema suspenzija celih ćelija i unutarćelijskih ekstrakata.....	65
3.2.9.2. Određivanje antioksidativne aktivnosti – sposobnosti inhibicije DPPH <sup>•</sup> radikala .....	66
3.2.10. Proizvodnja mlečne kiseline sa recirkulacijom mikrobne biomase imobilisane na lignocelulozne nosače.....	67
3.2.10.1. Priprema lignoceluloznih nosača .....	67
3.2.10.2. Fizička karakterizacija nosača za imobilizaciju.....	68
3.2.10.3. Imobilizacija <i>L. paracasei</i> NRRL B-4564 .....	69
3.2.10.4. Ponovljena šaržna fermentacija sa imobilisanom mikrobnom biomasom .....	70
3.2.11. Procena efikasnosti mlečno-kiselinske fermentacije.....	70
3.2.11.1. Određivanje sadržaja mlečne kiseline .....	71
3.2.11.2. Određivanje broja živih ćelija .....	73
3.2.11.3. Računski parametri za procenu efikasnosti mlečno-kiselinske fermentacije.....	75
3.2.12. Analiza lignoceluloznih nosača kao hraniva za životinje.....	76
3.2.12.1. Određivanje sadržaja vlakana.....	77
3.2.12.2. Određivanje sadržaja proteina nerastvorljivog u neutralnim i kiselim deterđžentima.....	82

3.2.12.3. Određivanje <i>in vitro</i> svarljivosti suve materije.....	83
3.2.12.4. Izračunavanje ostalih parametara za procenu kvaliteta hraniva .....	84
3.2.12.5. Određivanje energetske vrednosti hraniva.....	85
3.2.13. Određivanje <i>in vitro</i> probiotskih karakteristika <i>L. paracasei</i> .....	87
3.2.13.1. Preživljavanje u simuliranim uslovima gastro-intestinalnog trakta preživara .....	88
3.2.13.2. Antimikrobna aktivnost.....	89
3.2.13.3. Autoagregacija .....	90
3.2.13.4. Antibiogram test.....	90
3.2.14. Statistička obrada eksperimentalnih rezultata .....	91
<b>4. REZULTATI I DISKUSIJA .....</b>	<b>92</b>
4.1. Hemijski sastav krompirove džibre i melase šećerne repe kao supstrata za mlečno-kiselinsku fermentaciju.....	92
4.2. Selekcija soja BMK za proizvodnju mlečne kiseline na supstratu bogatom saharozom.....	95
4.3. Uticaj početne koncentracije šećera na rast <i>L. paracasei</i> NRRL B-4564 i proizvodnju mlečne kiseline.....	98
4.4. Proizvodnja mlečne kiseline pomoću adaptiranog <i>L. paracasei</i> .....	104
4.4.1. Uticaj procesa adaptacije na antioksidativnu aktivnost <i>L. paracasei</i> .....	104
4.4.2. Poređenje šaržnog postupka proizvodnje mlečne kiseline pomoću adaptiranog i neadaptiranog <i>L. paracasei</i> .....	107
4.4.3. Poređenje dolivnog postupka proizvodnje mlečne kiseline pomoću neadaptiranog i adaptiranog <i>L. paracasei</i> .....	110
4.5. Proizvodnja mlečne kiseline pomoću imobilisane mikrobne biomase.....	115
4.5.1. Fizička karakterizacija lignoceluloznih nosača i imobilizacija <i>L. paracasei</i> .....	115
4.5.2. Poređenje proizvodnje mlečne kiseline pomoću slobodne i imobilisane mikrobne biomase.....	119
4.6. Mogućnosti istovremene proizvodnje mlečne kiseline i hraniva za preživare obogaćenog probiotskom biomasom.....	127
4.6.1. Uticaj mlečno-kiselinske fermentacije na kvalitet lignoceluloznih nosača kao hraniva za životinje.....	129
4.6.2. <i>In vitro</i> probiotske karakteristike <i>L. paracasei</i> NRRL B-4564.....	135
4.6.2.1. Preživljavanje u simuliranim uslovima digestivnog trakta preživara .....	136
4.6.2.2. Antimikrobna aktivnost.....	138

4.6.2.3. Osetljivost na antibiotike.....	140
4.6.2.4. Autoagregacija .....	142
<b>5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>147</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>152</b>
<i>BIOGRAFIJA AUTORA.....</i>	<i>180</i>
<i>Radovi i saopštenja proistekli iz doktorske disertacije.....</i>	<i>182</i>
<i>Prilog 1 – Izjava o autorstvu.....</i>	<i>185</i>
<i>Prilog 2 – Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada.....</i>	<i>186</i>
<i>Prilog 3 – Izjava o korišćenju.....</i>	<i>187</i>

# 1. UVOD

Nove tehnologije u kojima se koriste sporedni i otpadni industrijski proizvodi su u fokusu naučnih istraživanja koja su prevashodno vođena potrebom za održivim razvojem društva i zaštitom životne sredine. Otpadni proizvodi prehrambene i agro-industrije su izvor fermentabilnih šećera, ali i mnogih drugih jedinjenja od velikog značaja za rast mikroorganizama, kao što su proteini, mineralne materije i vitamini i zbog toga predstavljaju potencijalnu sirovinu za proizvodnju bioetanol, organskih kiselina, enzima, mikrobne biomase i drugih vrednih biotehnoloških proizvoda.

Mlečna kiselina je organska kiselina koja nalazi široku primenu u prehrambenoj, kozmetičkoj, farmaceutskoj, hemijskoj i industriji polimera. Do nedavno, prehrambena industrija je bila najveći potrošač mlečne kiseline, međutim poslednjih godina mlečna kiselina nalazi sve veću primenu u proizvodnji biodegradabilnih i biokompatibilnih polimera – polilaktida [1]. Zbog biorazgradivosti polilaktidi se mogu koristiti kao ekološki prihvatljiva alternativa za konvencionalne plastične materijale, a zbog biokompatibilnosti nalaze primenu u medicini i farmaciji kao materijali za fiksaciju fraktura, kontrolisano oslobađanje leka itd. [2]. Procenjuje se da će do 2020. godine globalno tržište mlečne kiseline dostići preko milion tona prvenstveno usled rastućeg trenda primene polilaktida [3]. Trenutno, najveći deo proizvodnje mlečne kiseline se odvija fermentacijom ugljenih hidrata pomoću homofermentativnih mikroorganizma koji proizvode mlečnu kiselinu kao glavni proizvod. Ovaj vid proizvodnje mlečne kiseline je dominantan zato što se izborom odgovarajućeg mikroorganizma može dobiti optički čist proizvod (D- ili L-enantiomer), dok hemijska proizvodnja uvek daje racemsku smešu enantiomera mlečne kiseline. Za biotehnološku proizvodnju mlečne kiseline najčešće se koriste bakterije mlečne kiseline (BMK), predstavnici roda *Bacillus*

[4], kao i plesni roda *Rhizopus* [5]. Visoki prinosi D- ili L-mlečne kiseline u fermentaciji jeftinih izvora ugljenika i azota su ključne odlike održivog fermentacionog postupka.

Za proizvodnju mlečne kiseline se mogu koristiti sirovine koje sadrže fermentabilne šećere ili polisaharide koji se mogu razgraditi do fermentabilnih šećera, a postupak i faze proizvodnje mlečne kiseline zavise od prirode polazne sirovine. Veliki broj istraživanja do nedavno je bio fokusiran na proizvodnju mlečne kiseline iz rafiniranih šećera i jestivih useva. Međutim, ovakva proizvodnja je ekonomski nepovoljna, zato što su rafinirani šećeri skupi, a globalna potražnja za hranom je sve veća. Zbog toga, u novije vreme se intenzivnije razmatra proizvodnja mlečne kiseline iz jeftinih sirovina koje se ne koriste u ishrani ljudi i životinja, kao što je poljoprivredni otpad i sporedni industrijski proizvodi [6,7]. Imajući u vidu navedeno, predmet istraživanja u okviru ove doktorske disertacije bio je da se ispita mogućnost proizvodnje mlečne kiseline na kombinovanom supstratu na bazi otpadne krompirove džibre iz proizvodnje bioetanolu i melase šećerne repe kao sporednog proizvoda industrije šećera. Osnovni cilj je definisanje tehnološkog postupka koji će primenom jeftinih sirovina omogućiti efikasnu i ekonomski održivu proizvodnju mlečne kiseline.

Pojedini sojevi BMK imaju veliki probiotski potencijal između ostalog, zahvaljujući svojim sposobnostima da proizvode antimikrobna jedinjenja. BMK se tradicionalno koriste u proizvodnji različitih fermentiranih proizvoda, a takođe se tradicionalno koriste kao inokulanti u procesu siliranja useva. Zbog brojnih pozitivnih efekata na zdravlje ljudi i životinja, BMK su među najzastupljenijim probiotskim mikroorganizmima prisutnim u komercijalnim probiotskim preparatima [8,9]. Shodno tome, mikrobna biomasa koja zaostaje nakon mlečno-kiselinske fermentacije predstavlja sporedni proizvod visoke biološke vrednosti koji bi mogao da se koristiti kao dodatak hrani za životinje.

Problemi korišćenja sporednih industrijskih proizvoda kao supstrata u fermentacionim procesima su najčešće povezani sa visokim sadržajem jedinjenja koja deluju inhibitorno na rast mikroorganizama i aktivnost enzima, pa su adaptacije mikroorganizama jedan od načina za razvoj sojeva za različite biotehnološke namene i

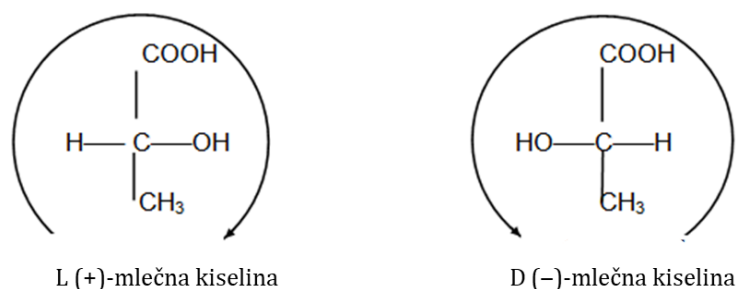
poboljšanje efikasnosti bioprocesa. Ranija istraživanja su pokazala da oksidativni stres niskog intenziteta može da izazove adaptivni odgovor kod mikroorganizama dovodeći do jačanja njihovog antioksidativnog potencijala [10,11]. Ovo ukazuje da postepeno povećanje intenziteta faktora stresa može dovesti do nastanka fenotipa sa povećanom tolerancijom na određene stresne uslove. Među različitim fiziološkim karakteristikama, poboljšanje antioksidativnog potencijala se smatra posebno efikasnim za povećanje opšte otpornost BMK protiv brojnih, a često i udruženih stresnih uslova [12]. U tom smislu, jedan od zadataka doktorske disertacije bio je uspostavljanje protokola za adaptaciju radnog mikroorganizma u cilju selekcije mutanata za efikasniju proizvodnju mlečne kiseline na kombinovanom otpadnom supstratu na bazi melase šećerne repe i destilerijske džibre.

Na efikasnost i produktivnost fermentacije, pored sastava i načina pripreme podloge, izbora i pripreme radnog mikroorganizma i utvrđivanja optimalnih uslova fermentacije, značajnu ulogu ima utvrđivanje optimalne tehnološke šeme fermentacije (šaržno, dolivno, sa imobilisanim ćelijama i recirkulacijom biomase) [13,14]. Imobilizacijom ćelija se ostvaruju veće koncentracije mikrobne biomase u sistemu, a time i efikasnija proizvodnja mlečne kiseline, dok upotreba prirodnih nosača kao što su lignocelulozni materijali agro-industrijskog porekla može doprineti razvoju ekonomski povoljnog tehnološkog postupka. Primena prirodnih nosača za imobilizaciju BMK, kao što su repin rezanac, pivski trop i ljuska suncokreta, pored proizvodnje mlečne kiseline, omogućava valorizaciju fermentisanih nosača u ishrani životinja. Nutritivni sastav, energetski parametri i svarljivost su važni pokazatelji kvaliteta hraniva za životinje pa je karakterizacija fermentisanih nosača sa aspekta primene u ishrani preživara jedan od ciljeva ove doktorske disertacije.

## 2. TEORIJSKI DEO

### 2.1. Mlečna kiselina

Mlečna kiselina ili 2-hidroksipropanska kiselina ( $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$ ) je hiralni molekul koji je prisutan u dva optički aktivna oblika, L (+) i D (-) enantiomer (slika 1). Mlečna kiselina je najrasprostranjenija hidroksikarboksilna kiselina u prirodi. Prisutna je u mnogim namirnicama bilo prirodno ili je proizvod mikrobne fermentacije, kao što su kiseli kupus, jogurt, hlebovi od kiselog testa itd. Takođe, mlečna kiselina je glavni metabolički intermedijer kod većine živih organizama, od anaerobnih prokariota do ljudi [15]. U telu čoveka L (+)-mlečna kiselina se proizvodi i lako metaboliše putem enzima L-laktat dehidrogenaza [16].



**Slika 1.** L (+) i D (-) enantiomer mlečne kiseline.

Mlečna kiselina se tradicionalno koristi u prehrambenoj industriji kao konzervans, pojačivač ukusa, fortifikator i sredstvo za zakiseljavanje [3,17]. Takođe, koristi se kao sredstvo za dekontaminaciju jer sprečava rast mnogih patogenih mikroorganizama. Nalazi primenu u kozmetičkoj, farmaceutskoj i hemijskoj industriji,



u preparatima za negu i eksfolijaciju kože, za proizvodnju estara i ekoloških rastvarača itd. Poslednjih godina najvažnija primena mlečne kiseline je u proizvodnji polimera mlečne kiseline (PLA) i kopolomera mlečne i glikolne kiseline (PLGA), najčešće korišćenih biorazgradivih i biokompatibilnih plastičnih materijala [18].

Prema procenama, očekuje se da će do 2025. godine upotreba mlečne kiseline za proizvodnju PLA dostići 50% ukupne mlečne kiseline dostupne na globalnom tržištu [19]. Materijali na bazi PLA su se prvobitno koristili isključivo u medicini za proizvodnju stentova, hirurških konaca ili graftova. Nove tehnologije polimerizacije [20] i smanjenje troškova proizvodnje mlečne kiseline iz obnovljivih sirovina, kao što su otpadni i sporedni industrijski proizvodi, omogućavaju ekonomičnu proizvodnju PLA visoke molekulske mase. PLA visoke molekulske mase imaju dobre fizičke osobine pa se mogu koristiti kao zamena za plastične materijale na bazi neobnovljivih fosilnih goriva, kao što su kese za odlaganje otpada, materijali za pakovanje hrane, čaše za jednokratnu upotrebu itd. [2]. Imajući u vidu sve veću potrebu za zaštitom životne sredine, vodeći proizvođači biorazgradivih polimera, kao što je Corbion (Holandija), ali i akademska zajednica intenzivno traže nove načine za integraciju lanaca od otpadne biomase do termostabilnih i biokompatibilnih polimera mlečne kiseline kojima se mogu zameniti konvencionalni plastični materijali.

Trenutno, više od 90% mlečne kiseline na globalnom tržištu se proizvodi fermentacionim putem pomoću mikroorganizama koji proizvode stereoselektivno L (+) ili D (-)-mlečnu kiselinu [16,21]. Preostali deo mlečne kiseline se proizvodi hemijskim putem, hidrolizom laktonitrila, bazno katalizovanom degradacijom šećera, oksidacijom propilen glikola itd., a krajnji proizvod navedenih hemijskih postupaka je racemska smeša enantiomera mlečne kiseline [22]. Biotehnološka proizvodnja mlečne kiseline je postala dominantan način proizvodnje pre svega zbog mogućnosti dobijanja optički čistog enantiomera mlečne kiseline selekcijom odgovarajućeg soja [23], koji fermentacijom na obnovljivim sirovinama ostvaruje visoke produktivnosti procesa sa značajno manjim uticajem na životnu sredinu u odnosu na hemijsku proizvodnju.

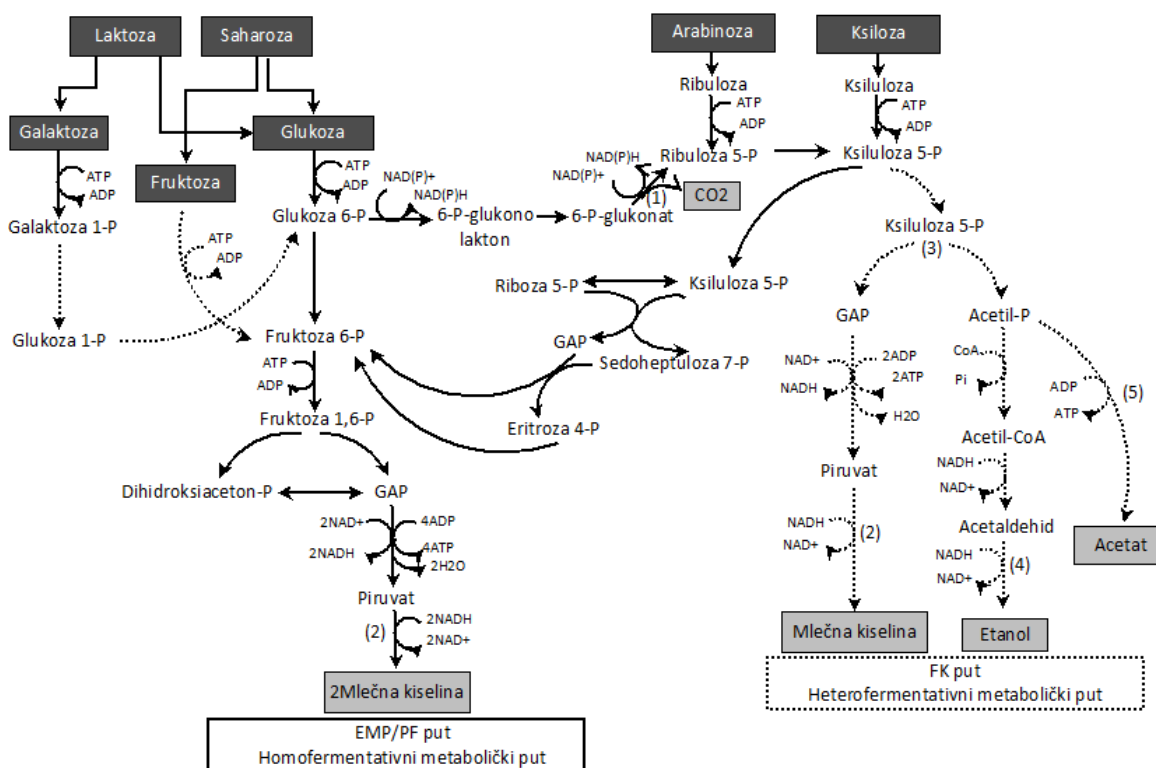
## 2.2. Mikroorganizmi za proizvodnju mlečne kiseline

Za proizvodnju mlečne kiseline najčešće se koriste BMK, predstavnici roda *Bacillus* i plesni roda *Rhizopus*. Svaka od navedenih grupa proizvođača mlečne kiseline ima određene prednosti i nedostatke usled različitih morfoloških, fizioloških i biohemijskih karakteristika koje se moraju uzeti u obzir prilikom razvoja fermentacionog postupka na specifičnom supstratu.

### 2.2.1. Metabolički putevi proizvodnje mlečne kiseline

Mikroorganizmi koji proizvode mlečnu kiselinu imaju sposobnost da fermentišu ugljene hidrate, heksoze i pentoze, različitim metaboličkim putevima i shodno tome daju različite proizvode fermentacije, na osnovu čega se dele na homofermentativne i heterofermentativne. Na slici 2 je dat šematski prikaz metaboličkih puteva proizvodnje mlečne kiseline iz različitih vrsta šećera. Proizvod fermentacije kod homofermentativnih vrsta u anaerobnim uslovima je isključivo mlečna kiselina, dok heterofermentativni predstavnici metabolišu ugljene hidrate do acetate ili etanola, CO<sub>2</sub>, mlečne kiseline i drugih metabolita. Homofermentativne vrste metabolišu heksoze Embden-Meyerhof-Parnas-ovim (EMP) putem, pri čemu od svakog mola glukoze nastaju 2 mola mlečne kiseline, sa teorijskim prinosom mlečne kiseline od 1 g/g. Budući da se mali procenat izvora ugljenika koristi za proizvodnju mikrobne biomase (0,07 g/g do 0,22 g/g) eksperimentalni prinosi su obično niži (0,74 g/g do 0,99 g/g) [24]. Mikroorganizmi koji koriste isključivo ovaj metabolički put su obligatno homofermentativni, a osim glukoze mogu da metabolišu i druge heksoze, kao što su fruktoza, manosa ili galaktoza, ali nemaju sposobnost da fermentišu pentoze. Heterofermentativne vrste koriste alternativni pentozo-fosfatni (PF) put kojim heksoze konvertuju do pentoza i CO<sub>2</sub>. Nastale pentoze dalje metabolišu fosfoketolaznim (FK) putem do laktata, etanola ili acetata. Mikroorganizmi koji metabolišu ugljene hidrate samo ovim putem su obligatno heterofermentativni. Heterofermentativne vrste iz jednog mola glukoze daju 1 mol mlečne kiseline, 1 mol CO<sub>2</sub> i 1 mol etanola ili acetata,

pri čemu postižu maksimalni teorijski prinos mlečne kiseline od 0,5 g/g [28,29]. Mnogi heterofermentativni mikroorganizmi metabolišu pentoze FK putem i pri tome postižu maksimalni prinos mlečne kiseline od 0,6 g/g [25]. Pored vrsta koje su klasifikovane kao obligatno homofermentativne, odnosno obligatno heterofermentativne, pojedine vrste roda *Lactobacillus* su označene kao fakultativno heterofermentativne. Iako ove bakterije metabolišu heksoze preko EMP puta, takođe poseduju i enzim fosfoketolazu koja se može indukovati u prisustvu pentoza [26].



**Slika 2.** Metabolički putevi proizvodnje mlečne kiseline iz različitih vrsta šećera. Enzimi: (1) 6-fosfoglukonat dehidrogenaza; (2) laktat dehidrogenaza; (3) fosfoketolaza; (4) alkohol dehidrogenaza; (5) acetat kinaza.

### 2.2.2. Bakterije mlečne kiseline

BMK predstavljaju heterogenu grupu mikroorganizama čija je glavna karakteristika sposobnost sproizvodnje mlečne kiseline kao glavnog, a ponekad i

jedinog proizvoda fermentacije šećera. Grupa BMK uključuje sledeće rodove: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* i *Weissella* [27]. BMK su Gram-pozitivne, nesporogene, acidotolerantne, anaerobne do mikroaerofilne bakterije. Generalno se opisuju kao katalaza negativne, iako pojedine vrste roda *Lactobacillus* imaju pseudokatalazu [28]. BMK mogu selektivno da proizvode jedan stereoisomer mlečne kiseline ili njihovu mešavinu u različitim proporcijama. Stereospecifičnu proizvodnju mlečne kiseline katalizuje enzim laktat dehidrogenaza (LDH) koji ima L i D formu, pa izomer mlečne kiseline zavisi od oblika enzima koji je karakterističan za određenu vrstu BMK [21]. BMK su auktotrofi i zbog ograničene sposobnosti da sintetišu faktore rasta zahtevaju podlogu bogatu aminokiselinama, peptidima i vitaminima [21]. Pojedine vrste BMK proizvode ekstracelularne amilolitičke enzime, što ih čini pogodnim za direktnu proizvodnju mlečne kiseline iz različitih skrobnih sirovina [29]. Takođe, pojedine vrste BMK proizvode inulinazu koja katalizuje hidrolizu frukto-oligosaharida, pa se mogu koristiti za direktnu proizvodnju mlečne kiseline iz sirovina bogatih inulinom, kao što su Jerusalimska artičoka [30] i cikorija [31]. Veliki izazov u proizvodnji mlečne kiseline na različitim lignoceluloznim sirovinama je mogućnost efikasne konverzije pentoza (ksiloze i arabinoze) prisutnih u hemiceluloznim frakcijama lignoceluloznih hidrolizata. Na supstratima bogatim ksilozom je ispitivana fermentacija sojevima *Enterococcus mundtii* QU 25 [32], *L. pentosus* ATCC 8041 [33], *Leuconostoc lactis* [34], *L. rhamnosus* ATCC 7469 [35]. Pored BMK, za fermentacionu proizvodnju mlečne kiseline na otpadnim supstratima su ispitivani pripadnici roda *Bacillus*, kao i plesni roda *Rhizopus*.

### 2.2.3. Bakterije roda *Bacillus*

Od pripadnika roda *Bacillus* za proizvodnju mlečne kiseline na otpadnim supstratima je najčešće ispitivana vrsta *Bacillus coagulans*. Predstavnici roda *Bacillus* su Gram-pozitivni, sporogeni, aerobni do mikroaerofilni mikroorganizmi. To su termofilne bakterije koje mogu da rastu i proizvode L-mlečnu kiselinu u

temperaturnom intervalu od 50°C do 60°C [36–39]. Visoke optimalne temperature smanjuju rizik od kontaminacije mezofilnim vrstama i pružaju mogućnost vođenja otvorenog (nesterilnog) fermentacionog postupka, što smanjuje ukupne troškove proizvodnje mlečne kiseline [38]. Sojevi *B. coagulans* fermentišu heksoze i pentoze i zbog toga su pogodni mikroorganizmi za proizvodnju mlečne kiseline na lignoceluloznim hidrolizatima [39]. U poređenju sa BMK, pripadnici roda *Bacillus* su manje zahtevni u pogledu organskih izvora azota i mogu da rastu na jednostavnom medijumu. Poređenjem efikasnosti proizvodnje mlečne kiseline pomoću *L. delbrueckii* DSM 20073 i *B. coagulans* SIM-7 na medijumu čiji je sastav prethodno optimizovan za oba soja, produktivnost ostvarena u fermentaciji pomoću *B. coagulans* (5,5 g/L h) je bila znatno veća u odnosu na *L. delbruecki* (2,2 g/L h) [40], pa se *B. coagulans* može smatrati pogodnijim za proizvodnju mlečnu kiselinu na ispitivanom supstratu uz energetski i ekonomski niže zahteve.

#### **2.2.4. Plesni roda *Rhizopus***

Plesni rodova *Mucor*, *Monilia* i *Rhizopus* takođe imaju sposobnost proizvodnje mlečne kiseline. *R. oryzae* i *R. arrhizus* proizvode amilolitičke enzime, pa se mogu koristiti za direktnu proizvodnju L-mlečne kiseline na skrobnim sirovinama bez prethodne saharifikacije [5,41]. *R. oryzae* ima sposobnost da metaboliše ksilozu, što ga čini atraktivnim za proizvodnju mlečne kiseline na lignoceluloznom supstratu [42,43]. Plesni mogu da rastu u jednostavnom, neorganskom medijumu, bez dodatka skupih izvora azota [5], što je njihova osnovna prednost u odnosu na BMK. Međutim, na osnovu dosadašnjih rezultata može se zaključiti da fermentacija pomoću plesni još uvek nije konkurentna bakterijskoj, a niži prinosi se pripisuju ograničenom prenosu mase kiseonika i hranljivih materija usled filamentoznog rasta, a delom i formiranju sporednih proizvoda kao što su etanol, CO<sub>2</sub>, fumarna, jabučna i limunska kiselina [5,43].

### 2.2.5. Mešane mikrobne kulture

U cilju povećanja efikasnosti konverzije supstrata i proizvodnje mlečne kiseline na supstratima koji sadrže različite izvore ugljenika, često se ispituju mešane mikrobne kulture. U studiji u kojoj je mešana kultura *L. casei* i *Lactococcus lactis* korišćena za proizvodnju mlečne kiseline na ekstraktu urme ostvarena je koncentracija mlečne kiseline od 60,3 g/L, dok su koncentracije dobijene u fermentaciji sa monokulturom *L. casei*, odnosno *L. lactis* iznosile 53 g/L i 46 g/L, redom [44]. Slično, mešana kultura *L. rhamnosus* i *L. brevis* je korišćena za proizvodnju mlečne kiseline na kukuruzovini tretiranoj NaOH, pri čemu je postignuta koncentracija od 20,95 g/L, dok je koncentracija mlečne kiseline sa monokulturom *L. rhamnosus*, odnosno *L. brevis*, bila manja za 15,5%, odnosno 20,2% [45]. U pomenutoj studiji, glukoza je uspešno fermentisana do mlečne kiseline pomoću homofermentativnog soja *L. rhamnosus* preko EMP puta, dok je heterofermentativni soj *L. brevis* konvertovao ksilozu i manju koncentraciju glukoze do mlečne i sirćetne kiseline FK putem [45]. Pored mešanih bakterijskih kultura, mešane kulture plesni i BMK su ispitivane za proizvodnju mlečne kiseline na sirovinama koje sadrže inulin, kao što je Jerusalimska artičoka [46]. Hidroliza inulina se odvija u prisustvu enzima inulinaze i invertaze. Sposobnost da proizvode ove enzime imaju pojedine bakterije i plesni, među kojima se često koriste vrste iz roda *Aspergillus* [68]. U postupku simultane saharifikacije i fermentacije (SSF) na Jerusalimskoj artičoki pomoću kulture *Aspergillus niger* SL-09 i *Lactobacillus* sp. G-02 postignuta je koncentracija mlečne kiseline od 120,5 g/L sa prinosom od 0,95 g/g [46]. Nedostatak mešanih kultura se ogleda u njihovoj heterogenosti, pri čemu različiti sojevi mogu imati različit temperaturni i pH optimum, kao i različite potrebe za kiseonikom i nutrijentima, što znatno otežava definisanje optimalnih i stabilnih uslova za takve kulture tokom fermentacije. Alternativno, za proizvodnju mlečne kiseline na supstratima složenog hemijskog sastava se može koristiti autohtona mikrobiota, koja je zbog sposobnosti samo-evolucije prilagođena hemijskom sastavu supstrata [47], a dobijeni rezultati otvaraju put za dalja istraživanja proizvodnje mlečne kiseline u nesterilnim uslovima (otvorena fermentacija).

### 2.2.6. Genetički modifikovani i adaptirani mikroorganizmi za proizvodnju mlečne kiseline

Različite tehnike metaboličkog inženjerstva se danas sve više primenjuju u cilju poboljšanja performansi radnog mikroorganizma i razvoja efikasnog fermentacionog procesa [48]. U nedavno objavljenim studijama aktivacija metaboličkog puta konverzije ksiloze u D-, odnosno L-mlečnu kiselinu kod dva soja *Pediococcus acidilactici* je ispitivana sa ciljem proizvodnje mlečne kiseline na hidrolizatu kukuruzovine i pšenične slame [49,50]. Osim BMK, genetički modifikovani sojevi *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Schizosaccharomyces pombe* i *Saccharomyces cerevisiae* su često ispitivani bilo za proizvodnju D- ili L-izomera mlečne kiseline. *E. coli* je heterofermentativnog karaktera i fermentacijom šećera proizvodi smešu etanola i nekoliko organskih kiselina (mlečnu, sirćetnu, mravlju i sukcinu kiselinu), pa je regulacija gena koji kodiraju enzime odgovorne za konverziju piruvata do sporednih proizvoda jedan od načina za postizanje većih prinosa i optičke čistoće mlečne kiseline [51–53].

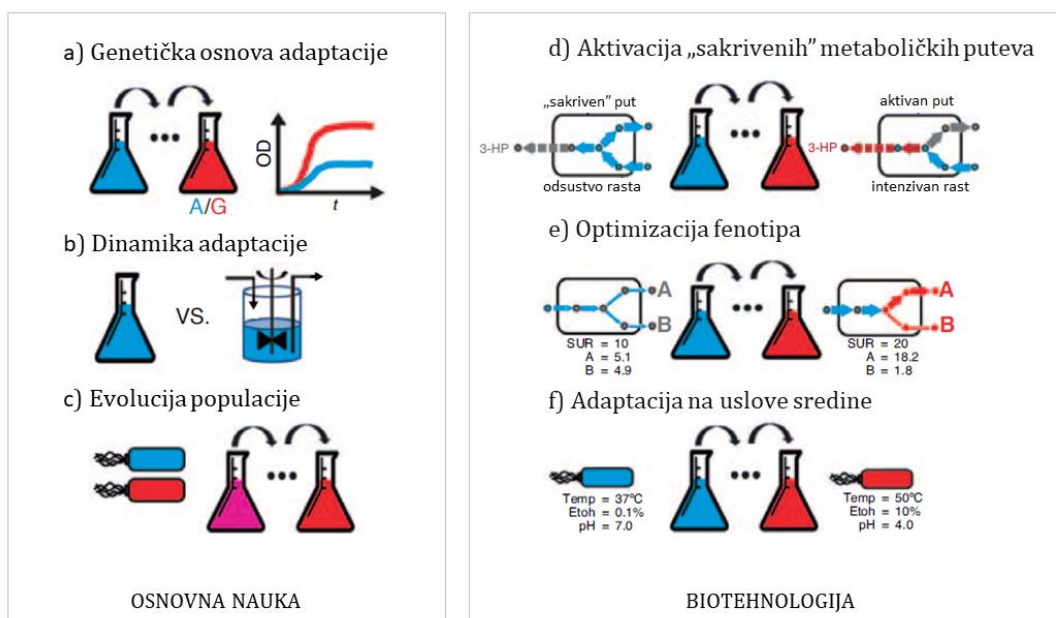
Pored metoda genetičkog inženjerstva, različite strategije za optimizaciju fenotipa ili adaptaciju na specifične uslove sredine omogućavaju razvoj sojeva za efikasniju konverziju supstrata složenog hemijskog sastava [11,54]. Mikroorganizmi imaju ograničenu sposobnost da simultano fermentišu nekoliko vrsta šećera, osetljivi su na visoke koncentracije supstrata, prisustvo inhibitornih jedinjenja i niske pH vrednosti. Kombinovane tehnike metaboličkog inženjerstva i adaptivne evolucije su se često pokazale veoma uspešnim u prevazilaženju ovih nedostataka [55–57]. Jedna od najinteresantnijih osobina mikroorganizama je sposobnost da se brzo prilagode različitim uslovima sredine. Naučni pristup adaptivne laboratorijske evolucije se zasniva na ispitivanjima populacija mikroorganizama kroz više generacija u kontrolisanom laboratorijskom okruženju. Tokom laboratorijske evolucije mikroorganizmi se kultiviraju u jasno definisanim uslovima tokom dužeg vremenskog perioda (u rasponu od nekoliko nedelja do čak godinu dana), što omogućava nastanak fenotipskih promena. Mutacije su osnova na kojoj se zasnivaju genetske promene i

selekcija poboljšanih fenotipova kako u prirodi, tako i u laboratorijskim uslovima [11]. Iako se sama replikacija DNK odvija sa visokim stepenom tačnosti i za mikroorganizme je karakteristična konstantna brzina spontanih mutacija od približno  $10^{-10}$  po replikaciji, kod velikih populacija mikroorganizama dolazi do pojave čestih mutacija u kratkom vremenskom periodu [11,58]. Za razliku od racionalnih inženjerskih strategija i ciljanih modifikacija specifičnih enzima, strategija adaptivne laboratorijske evolucije omogućava pojavu korisnih mutacija u različitim genima istovremeno. Do sada su uglavnom ispitivane adaptacije dobro okarakterisanih sojeva *S. cerevisiae* i *E. coli*, međutim, poslednjih godina primena adaptivne laboratorijske evolucije kod drugih mikroorganizama je u znatnom porastu [54]. Evolucionim biologima primena adaptivne laboratorijske evolucije omogućava otkrivanje genetičke osnove i dinamike adaptacije, kao i analizu evolutivnih pojava u populacijama mikroorganizama. Osim toga, ova strategija je postala široko korišćen alat za različite biotehnološke primene, pre svega zbog mogućnosti dobijanja boljih prinosa željenog proizvoda i smanjenja troškova proizvodnje u industrijskim uslovima [54]. Adaptivna laboratorijska evolucija je prvobitno primenjivana u metaboličkom inženjerstvu kao efikasna metoda za razvoj i optimizaciju mikrobni sojeva. Danas, neke od najvažnijih biotehnoloških primena ove strategije uključuju aktivaciju „sakrivenih” metaboličkih puteva, povećanje spektra upotrebljivih šećera i efikasnosti njihovog iskorišćavanja, poboljšanje stope rasta radnog mikroorganizma i koncentracije proizvoda, adaptaciju sojeva na različite uslove sredine, povećanje tolerancije na niske pH vrednosti, prisustvo određenih inhibitornih jedinjenja, itd. (slika 3) [54].

Vrsta supstrata ima veliki uticaj na rast mikroorganizma i efikasnost bioprocasa, pa su adaptacije na specifičnu vrstu supstrata jedan od načina za razvoj sojeva za različite biotehnološke namene [11]. Tako je u nedavno objavljenoj studiji ispitivana adaptacija rekombinovane *E. coli* za homofermentativnu proizvodnju L-mlečne kiseline na ksilozi [59]. Slično, adaptacija *S. cerevisiae* na ksilozu je prethodno proučavana u cilju efikasnije proizvodnje bioetanola [60]. Takođe, *E. coli* HBUT-D je najpre genetički modifikovana za proizvodnju L-mlečne kiseline, a zatim je adaptirana na saharozu kako



bi se omogućila efikasnija proizvodnja mlečne kiseline na melasi šećerne trske [56]. Osim adaptacije na specifičnu vrstu šećera, upotreba različitih alternativnih supstrata zahteva povećanje tolerancije radnog mikroorganizma prema inhibitornim jedinjenjima. Lignocelulozni hidrolizati i drugi otpadni supstrati često sadrže jedinjenja koja deluju inhibitorno na rast mikroorganizama i aktivnost enzima, pa je povećanje tolerancije mikroorganizama neophodno u cilju ostvarivanja boljih prinosa i produktivnosti mlečne kiseline na ovakvim supstratima [61].



Slika 3. Primena adaptivne laboratorijske evolucije [54].

### 2.3. Agro-industrijski sporedni i otpadni proizvodi kao supstrati za proizvodnju mlečne kiseline

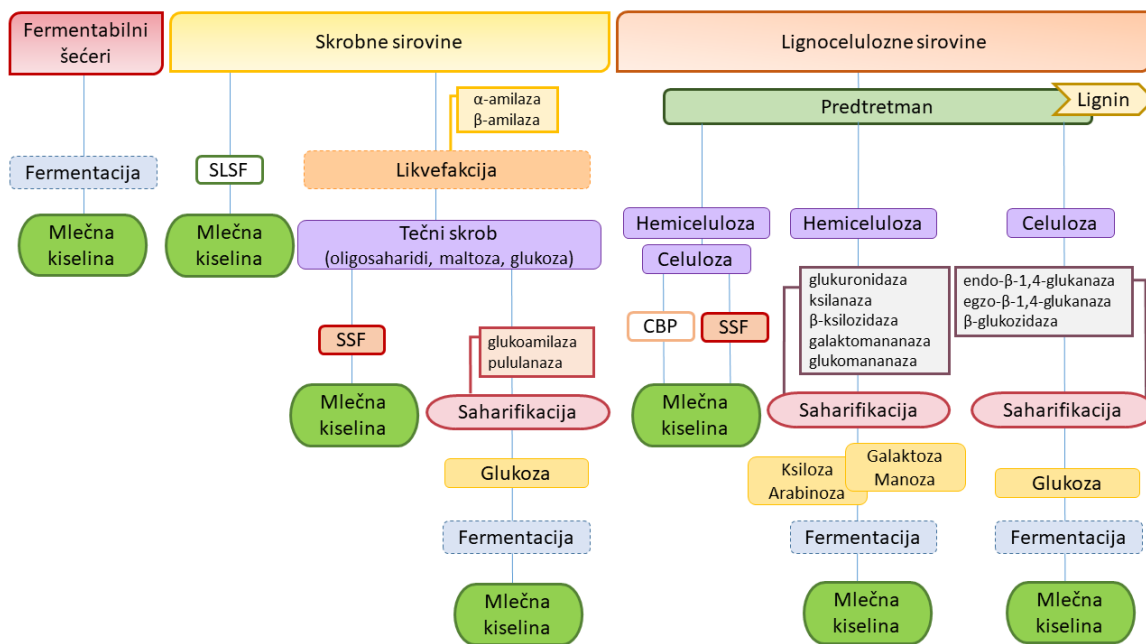
Za biotehnošku proizvodnju mlečne kiseline se mogu koristiti sirovine koje sadrže fermentabilne šećere ili polisaharide koji se mogu razgraditi do fermentabilnih šećera. Veliki broj istraživanja do nedavno je bio fokusiran na proizvodnju mlečne kiseline iz rafiniranih šećera i jestivih useva [21]. Međutim, ovakva proizvodnja je ekonomski nepovoljna, zato što su rafinirani šećeri skupi, a globalna potražnja za

hranom je sve veća. Takođe, mlečna kiselina je prilično jeftin proizvod, trenutna tržišna cena 88% mlečne kiseline iznosi manje od 1 US\$ po kilogramu [62]. Zbog toga, postoji veliki interes za razvoj postupka proizvodnje mlečne kiseline iz jeftinih alternativnih sirovina, kao što su poljoprivredni otpad i sporedni proizvodi prehrambene i agro-industrije.

Generalno, postupak proizvodnje mlečne kiseline na agro-industrijskim sporednim i otpadnim proizvodima se može podeliti u četiri osnovne faze: 1) priprema sirovine (tretman i hidroliza), 2) fermentacija, 3) separacija i prečišćavanje mlečne kiseline i 4) tretman i valorizacija otpadnih tokova. Hemijski sastav supstrata, pretežno sadržaj ugljenika i azota, njihova dostupnost, kao i prisustvo inhibitornih jedinjenja su najvažniji činioci od kojih zavisi primena supstrata u proizvodnji mlečne kiseline. Među poljoprivrednim ostacima, primarni ostaci su čvrsti, dok sekundarni sporedni proizvodi mogu biti u čvrstom ili tečnom stanju. Sadržaj vode u supstratu utiče na vreme skladištenja i kontaminaciju, ali takođe i na potrošnju vode tokom predtretmana i pripreme sirovine. Na slici 4 je dat prikaz različitih postupaka mlečno-kiselinske fermentacije u zavisnosti od vrste polazne sirovine. U tabeli 1 su prikazane vrednosti najvažnijih parametara mlečno-kiselinske fermentacije koje su postignute na različitim otpadnim supstratima.

Najjednostavnije sirovine za proizvodnju mlečne kiseline su one koje sadrže fermentabilne šećere, poput mono i disaharida. Takve sirovine su melasa šećerne repe, melasa šećerne trske, otpad iz prerade urmi, surutka itd. Znatno složenije sirovine su one koje sadrže skrob, koji se postupkom gelatinizacije, likvefakcije i saharifikacije mora razložiti do fermentabilnih šećera, odnosno glukoze. Među otpadnim skrobnim sirovinama za proizvodnju mlečne kiseline su ispitivani otpad iz prerade krompira [63] i kasave [22], otpadni pirinač [64], pšenične mekinje [65] itd. (tabela 1). Konvencionalna proizvodnja mlečne kiseline iz skrobnih sirovina je višefazni proces koji pre saharifikacije, odnosno hidrolize skroba do glukoze, uključuje likvefakciju koja se izvodi na temperaturama od 90°C do 130°C [66]. Hidroliza gradivnih jedinica skroba, amiloze i amilopektina, do fermentabilnih šećera se izvodi kiselinama ili češće

komercijalnim amilolitičkim enzimima (amilaze, glukoamilaze i pululanaze) [67]. Za hidrolizu skroba najčešće se koristi  $\alpha$ -amilaza dobijena iz *B. licheniformis* poznata pod komercijalnim nazivom Termamyl 120 L, kao i Termamyl SC, dok su najčešće korišćene glukoamilaze SAN extra L iz *A. niger* i AMG 300 L proizvedena iz genetski modifikovane *Aspergillus* vrste [67]. Najzad, mlečno-kiselinskom fermentacijom glukoza se konvertuje do mlečne kiseline (slika 4).



**Slika 4.** Šematski prikaz osnovnih faza proizvodnje mlečne kiseline na različitim supstratima. SSF – simultana saharifikacija i fermentacija; SLSF – simultana likvefakcija, saharifikacija i fermentacija; CBP – konsolidovani bioproces.

Zbog uštede u vremenu i troškovima proizvodnje, kao i sprečavanja efekta inhibicije supstratom, intenzivno se ispituje postupak simultane saharifikacije i fermentacije (SSF), kao i postupak simultane likvefakcije, saharifikacije i fermentacije (SLSF). Takođe, zbog visokih cena amilolitičkih enzima postoji veliki interes za razvoj postupka SLSF pomoću mikroorganizama koji proizvode ekstracelularne amilolitičke enzime. Među BMK koje imaju amilolitičko dejstvo ispitivane su sledeće vrste: *L.*

*manihotivorans*, *L. amylovorus*, *L. amilophilus*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. cellobiosus*, *L. amylolyticus* [29].

Najjeftinije i najdostupnije sirovine za fermentacionu industriju danas su lignocelulozne sirovine [68]. Ove sirovine se ne koriste u ishrani ljudi što ih čini posebno atraktivnim za proizvodnju mlečne kiseline ali i mnogih drugih vrednih proizvoda. Međutim, zbog složene hemijske građe postupak proizvodnje mlečne kiseline iz lignoceluloznih sirovina je znatno komplikovaniji. Prisustvo lignina smanjuje dostupnost polisaharida hidrolitičkim enzimima, a time i efikasnost iskorišćenja lignocelulozne biomase [69], pa ga je neophodno ukloniti iz lignoceluloznog materijala. Za predtretman sirovine primenjuju se određene fizičke, hemijske, fizičko-hemijske i biološke metode [69,70]. Osim uklanjanja lignina, predtretmanom se smanjuje stepen kristalne strukture celuloze [69,70] i povećava unutrašnja poroznost materijala što olakšava hidrolizu celuloze i hemiceluloze u prisustvu kiselina ili enzima. Hemiceluloza se hidrolizom razlaže do smeše šećera koju čine pentoze (ksiloza i arabinoza) i heksoze (galaktoza i manoz), dok se celuloza razlaže do glukoze. Mikroorganizmi imaju ograničenu sposobnost da fermentišu ksilozu i arabinozu pa upotreba lignocelulozne biomase u proizvodnji mlečne kiseline još uvek predstavlja veliki izazov i istovremeno otvara put za nova istraživanja i razvoj modifikovanih sojeva koji mogu da fermentišu pentoze. Čest problem koji se javlja prilikom primene lignoceluloznih hidrolizata je efekat kataboličke represije glukozom koji smanjuje efikasnost mlečno-kiselinske fermentacije [70]. Pored toga, nastanak različitih sporednih proizvoda fermentacije (uglavnom sirćetne kiseline usled aktivacije enzima fosfoketolaze u prisustvu pentoz) smanjuje prinos mlečne kiseline i povećava troškove njenog prečišćavanja. Za proizvodnju mlečne kiseline iz lignoceluloznih sirovina je posebno atraktivan tzv. konsolidovani bioproces (skraćeno CBP engl. *Consolidated Bioprocessing*) u kome se koriste genetički modifikovani mikroorganizmi koji simultano proizvode enzime  $\beta$ -glukozidaze neophodne za hidrolizu celuloze i vrše konverziju nastale glukoze do mlečne kiseline, čime se izbegava potreba za skupim hidrolitičkim enzimima [71,72].

**Tabela 1.** Supstrati agro-industrijskog porekla ispitivani za proizvodnju mlečne kiseline.

Supstrat	Tretman	Mikroorganizam	Režim rada	Mlečna kiselina		Suplementacija	Referenca
				C (g/L)	P (g/L h)		
Sok šećerne trske		<i>L. mesenteroides</i> NRRL B 512	Šaržni	60,2 <sup>D</sup>	1,25	Autolizat kvasca	[73]
Sok šećerne trske		<i>L. delbrueckii</i> NCIM-2025	Šaržni	116,3	1,62	Ekstrakt kvasca, pepton, mineralne soli	[74]
Sok urme		Mešana kultura <i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> NRRL-B445 i <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 19435	Šaržni	60,3	3,20	Ekstrakt kvasca, mineralne soli, Tween 80	[44]
Sok slatkog sirka		<i>L. salivarius</i> CGMCC7.75	Šaržni	142,5	2,97	Kukuruzni sirup, ekstrakt kvasca, mesni ekstrakt, mineralne soli	[75]
Sok slatkog sirka		Mešana kultura <i>B. coagulans</i> LA1507 i <i>L. rhamnosus</i> LA-04-1	Šaržni	118,0 <sup>L</sup>	1,84	Kukuruzni ekstrakt	[76]
Ekstrakt slame slatkog sirka	Tretman pomoću HCl	<i>Lactobacillus</i> sp. MKT-878	Šaržni	106,0	3,04	Ekstrakt kvasca, gluten tretiran proteazom	[77]
Melasa šećerne trske	Tretman pomoću aktivnog uglja	<i>L. delbrueckii</i> NCIM 2025	Šaržni	79,12	3,40	Tween 80, fenilalanin, lizin	[78]
Melasa šećerne trske		Genetički modifikovana i adaptirana <i>E. coli</i> WYZ-L	Šaržni	75,0 <sup>L</sup>	0,48	Kukuruzni ekstrakt	[56]
Melasa šećerne repe		<i>R. oryzae</i> TS-61	Šaržni	38,5 <sup>L</sup>	0,92	Proteinski hidrolizat perja	[79]
Melasa šećerne trske		<i>Lactobacillus</i> sp. B2	Šaržni	19,5 <sup>L</sup>	0,81	Otpad iz prerade rakova	[80]

Otpad iz proizvodnje ksilitola		<i>Bacillus</i> sp. XZL9	Dolivni	74,7 <sup>L</sup>	0,38	Ekstrakt kvasca	[81]
Deproteinizovana surutka		<i>L. lactis</i> ATCC 4797	Šaržni	24,3 <sup>D</sup>	0,52	Hidrolizat kazeina	[82]
Surutka	Hidroliza proteazom	<i>L. bulgaricus</i> CGMCC 1.6970	Dolivni	113,2 <sup>D</sup>	2,36	Ekstrakt kvasca	[83]
Surutka	Deproteinizacija zagrevanjem na 100°C 15 min	<i>L. rhamnosus</i> B103	Šaržni/ Dolivni	57,0 <sup>L</sup> / 143,7 <sup>L</sup>	1,18/1,49	Ekstrakt kukuruza, Tween 80, MnSO <sub>4</sub>	[84]
Autolizovan otpad iz proizvodnje etanola		<i>L. paracasei</i> KCTC 11710BP	Šaržni	50,6	1,58	Glukoza	[85]
Otpadna voda iz prerade tapioke	Kuvanje 5 min	<i>L. rhamnosus</i> B 103	Šaržni	39,0 <sup>L</sup>	1,08	Ekstrakt kukuruza, Tween 80	[86]
Otpadna kora krompira	Hidroliza α-amilazom i glukoamilazom	Nedefinisana mešana kultura	Šaržni	14,7	0,08		[47]
Otpadni pirinač	Hidroliza amilazama i proteazom	<i>L. delbrueckii</i> JCM1106	Šaržni SSF	79,0 <sup>D</sup>	3,59	Kvaščevo ekstrakt, pepton, mineralne soli	[64]
Sačma kikirikija	Hidroliza proteazom	<i>Sporolactobacillus</i> sp. CASD	Dolivni	207,0 <sup>D</sup>	3,80	Glukoza	[87]
Seme pamuka	Hidroliza proteazom	<i>Sporolactobacillus laevolacticus</i> DSM442	Dolivni	144,4 <sup>D</sup>	4,13	Glukoza	[88]
Duvanski otpad	Hidroliza celulazom i pektinazom	<i>R. oryzae</i> As 3.819	Dolivni	173,5 <sup>L</sup>	1,45		[89]
Otpadna biomasa <i>Curcuma longa</i>		<i>L. paracasei</i> LA104/ <i>L. coryniformis</i> ATCC 25600	Šaržni SSF	97,1 <sup>L</sup> / 91,6 <sup>D</sup>	2,70/2,08	Sojina sačma	[90]
Pšenične mekinje	Hidroliza proteazom, tretman kiselinama i celulazom	<i>S. inulinus</i> YBS1-5	Dolivni SSF	87,3 <sup>D</sup>	0,81	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , MgSO <sub>4</sub>	[91]

Nusproizvod prerade <i>Paspalum scrobiculatum</i>	Hidroliza pomoću HCl/ Likvefakcija i saharifikacija enzimima	<i>L. delbrueckii lactis</i> NCDC290/ <i>L. delbrueckii delbrueckii</i> NBRC3202	Šaržni	10,53 <sup>D</sup> / 25,38 <sup>D</sup>	0,44/0,53	Komponente MRS bujona	[92]
Pivski trop	Hidroliza amilazama i celulazom	<i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469	Dolivni	58,01 <sup>L</sup>	1,19	Ekstrakt ječmenog slada, glukoza	[93]
Pšenična slama	Predtretman pomoću H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> na 121°C 90 min, hidroliza celulazom	<i>B. coagulans</i> IPE22	Šaržni	54,6- 56,5	1,01-2,35	Pepton, mesni ekstrakt, ekstrakt kvasca, mineralne soli	[94]
Pšenična slama	Predtretman pomoću H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> na 175°C 5 min, detoksikacija pomoću <i>Amorphotheca resinae</i> ZN1	Genetički modifikovan i adaptiran <i>P. acidilactici</i>	Šaržni SSF	130,8 <sup>L</sup>	1,82	Pepton, ekstrakt kvasca, mineralne soli	[49]
Otpad iz proizvodnje ksilo-oligosaharida	Hidroliza celulazama	<i>R. oryzae</i> NLX-M-1	Šaržni SSF	60,3 <sup>L</sup>	1,00	Mineralne soli	[95]
Kukuruzni oklasak	Predtretman pomoću H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> na 121°C 90 min, hidroliza sa celulazom i celobiazom	<i>B. coagulans</i> IPE22	Šaržni	50,5 <sup>L</sup>	3,16		[96]
Kukuruzni oklasak	Hidroliza pomoću H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> na 121°C 60 min	Adaptirani <i>R. oryzae</i> HM11	Šaržni	77,2 <sup>L</sup>	0,99	Mineralne soli	[97]
Otpad iz proizvodnje ksilitola i furfurala	Hidroliza celulazom	<i>S. inulinus</i> YBS1-5	Dolivni	107,2 <sup>D</sup>	1,19	Seme pamuka hidrolizovano proteazom	[98]
Otpad iz prerade papira	Enzimaska hidroliza	<i>L. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> ATCC 25600	Šaržni	55,7 <sup>D</sup>	2,80		[99]
Otpad iz proizvodnje palminog ulja	Hidroliza kiselinama na 130°C 30 min	<i>B. coagulans</i> JI12	Šaržni SSF	80,6 <sup>L</sup>	3,40	Ekstrakt kvasca, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	[100]
Otpad iz prerade kafe	Predtretman pomoću H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> na 121°C 30 min, hidroliza celulazama	<i>B. coagulans</i>	Šaržni	48,0 <sup>L</sup>	1,20	Ekstrakt kvasca	[101]

Otpad iz proizvodnje kafe		<i>B. coagulans</i>	Šaržni	45,3 <sup>L</sup>	4,40	Ekstrakt kvasca	[102]
Otpad iz prerade šećerne trske	Predtretman pomoću H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> na 121°C	Genetički modifikovana i adaptirana <i>E. coli</i> JU15	Šaržni	49,0 <sup>D</sup>	0,51	Mineralne soli, betain	[51]
Otpad iz prerade šećerne trske	Predtretman pomoću H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> na 121°C 30 min	<i>L. pentosus</i>	Dolivni SSF	72,8	1,01	Mineralne soli, ekstrakt kvasca	[103]
Otpad iz prerade šećerne trske	Predtretman organskim rastvaračima, hidroliza pomoću celulaza	<i>L. casei</i> TISTR 390	Šaržni	21,3 <sup>L</sup>	0,18		[104]
Kukuruzovina tretirana bazama		Mešana kultura <i>L. brevis</i> ATCC 367 i <i>L. plantarum</i> ATCC 21028	Šaržni SSF	31,2 <sup>D/L</sup>	0,43	Komponente MRS bujona	[105]
Kukuruzovina	Predtretman pomoću NaOH na sobnoj temperaturi u trajanju od 12 h	Mešana kultura <i>L. brevis</i> ATCC 367 i <i>L. rhamnosus</i>	Šaržni SSF	20,9	0,58	Ekstrakt kvasca, mineralne soli	[45]
Kukuruzovina	Predtretman sa H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> na 130°C 8 min, enzimaska hidroliza	Genetički modifikovana <i>E. coli</i> AV03	Šaržni	58,1 <sup>D</sup>	1,21	Mineralne soli, betain	[51]
Kukuruzovina	Predtretman sa H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> na 175°C 5 min, detoksikacija pomoću <i>A. resinae</i> ZN1	Genetički modifikovan i adaptiran <i>P. acidilactici</i>	Šaržni SSF	97,3 <sup>D</sup>	1,01	Komponente MRS bujona	[50]
Kukuruzovina	Predtretman sa H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> na 121°C 90 min, hidroliza pomoću celulaze i β-glukozidaze	<i>S. inulinus</i> YBS1-5	Šaržni	70,7 <sup>D</sup>	0,65		[106]



## **2.4. Proizvodnja mlečne kiseline u šaržnom i dolivnom postupku**

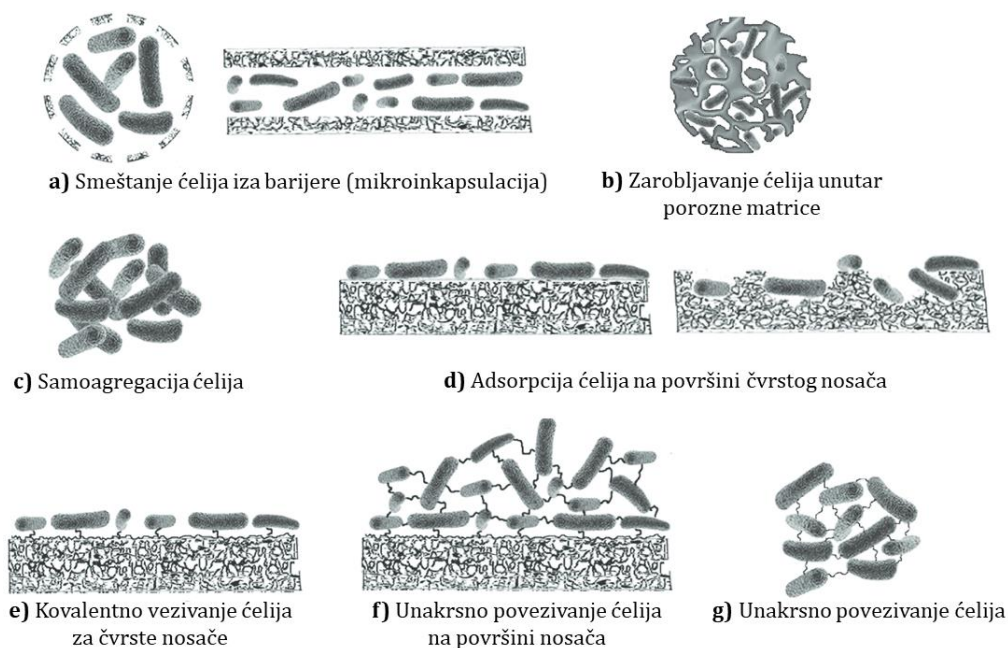
Način na koji će se voditi fermentacioni proces zavisi od vrste i prirode polazne sirovine i vrste radnog mikroorganizma. Šaržni postupak je najjednostavniji i najčešće primenjivan tip fermentacionog procesa. Prednosti ovog postupka su manji rizik od kontaminacije i jednostavno upravljanje procesom, dok su nedostaci niska produktivnost usled izraženog efekta inhibicije supstratom i/ili proizvodom. Dolivni postupak proizvodnje se može primeniti u cilju prevazilaženja efekta inhibicije supstratom ili proizvodom. U dolivnom postupku svež supstrat se dodaje kontinualno ili povremeno, čime se koncentracija supstrata održava u optimalnim granicama i time povećava produktivnost procesa. Za proizvodnju mlečne kiseline su spitivane različite metode dolivanja supstrata, najčešće kontinualni, povremeni (pulsni) i eksponencijalni metod [13,107].

## **2.5. Proizvodnja mlečne kiseline pomoću imobilisanih sistema**

Imobilisani sistemi omogućavaju veću koncentraciju mikrobne biomase u fermentorima što dovodi do povećanja produktivnosti procesa. Pored veće produktivnosti, imobilizacija omogućava ćelijsku i operativnu stabilnost, olakšava separaciju imobilisanih ćelija od fermentacionog medijuma i omogućava njihovo ponovno korišćenje. Na slici 5 je dat šematski prikaz osnovnih metoda imobilizacije bakterijskih ćelija, dok su u tabeli 2 prikazane vrednosti osnovnih parametara fermentacije postignutih primenom različitih imobilisanih sistema. Imobilizacija u polimerne matrice gela je često korišćena metoda imobilizacije BMK. Kao materijali za imobilizaciju korišćeni su prirodni polimeri, kao što su alginat [108,109], agar [110], κ-karagenan [111], a od sintetskih poliakrilamid [112] i polivinil alkohol [113]. Nedostatak imobilizacije ćelija u polimerne matrice gela je ograničena difuzija supstrata i proizvoda kroz polimernu matricu. Pored toga, osnovni nedostatak Ca-alginata za proizvodnju mlečne kiseline je gubitak mehaničke stabilnosti gela, tj. razmekšavanje čestica usled reakcije Ca sa mlečnom kiselinom. Istraživanja su pokazala

da oblaganje alginatnih čestica hitozanom doprinosi boljoj stabilnosti gela što dovodi do povećanja produktivnosti fermentacije [114].

Osim imobilizacije unutar čestica gela, ispitivana je i imobilizacija BMK adsorpcijom na površinu različitih prirodnih ili sintetskih nosača. Prednosti ove metode su jednostavnost izvođenja i primena blagih uslova čime se ne narušava vijabilnost i aktivnost BMK. Takođe, zbog adsorpcije bakterija na površinu čvrstog nosača difuziona ograničenja su manje izražena pa je prenos mase znatno bolji u odnosu na imobilizaciju ćelija unutar polimernih matrica gela. Nedostatak ove metode su relativno slabe veze ćelija i nosača, što može da dovede do njihovog spiranja sa površine nosača. Kao nosači za adsorpciju ispitivani su plastični kompozitni materijali [115], poliuretanska pena [116], zeolitni prah [117], lignocelulozni materijali [14,118] i čestice pšeničnog glutena [119].



**Slika 5.** Šematski prikaz osnovnih načina imobilizacije bakterijskih ćelija.

Takođe, povećanje produktivnosti procesa se može ostvariti primenom imobilisane biomase u kontinualnim i bioreaktorima sa fibrozim pakovanim slojem. U

kontinualnoj proizvodnji mlečne kiseline na hidrolizatu pirinčanih mekinja pomoću *L. rhamnosus* imobilisanog na čestice kukuruzovine ostvarene su prilično visoke produktivnosti od 5,73 g/Lh do 6,20 g/Lh [118]. U dolivnom postupku pomoću *L. lactis* na hidrolizatu Jerusalimske artičoke u bioreaktoru sa fibrozim pakovanim slojem postignuta je koncentracija mlečne kiseline od 142 g/L, što je za 27,92% više u odnosu na fermentaciju sa slobodnim ćelijama [120]. Takođe, u dolivnom postupku pomoću *S. inulinus* na hidrolizatu kukuruznog brašna u bioreaktoru sa fibrozim pakovanim slojem je postignuta koncentracija mlečne kiseline od 218,8 g/L, što je za 37,67% više u odnosu na fermentaciju sa slobodnim ćelijama [121].

**Tabela 2.** Vrednosti najvažnijih parametara mlečno-kiselinske fermentacije sa imobilisanim ćelijama.

Mikroorganizam	Tehnika imobilizacije i vrsta nosača/supstrat	Mlečna kiselina			Referenca
		C (g/L)	Y <sub>koef.</sub> (g/g)	P (g/L h)	
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469	Adsorpcija na zeolit/hlebna džibra	42,2	0,99	1,22	[117]
<i>L. casei</i>	Adsorpcija na čestice pšeničnog glutena/hemijski definisan medijum	42,2	-	3,51	[119]
<i>L. rhamnosus</i> LA-04-01	Adsorpcija na čestice kukuruzovine/hidrolizat pirinčanih mekinja	88,0	0,95	5,20	[118]
Kokultura <i>L. casei</i> SU No 22 i <i>L. lactis</i> WS 1042	Koimobilizacija u alginatne čestice/deproteinizovana surutka	47,0	0,72	1,96	[122]
<i>L. delbrueckii</i> IFO 3202	Imobilizacija u alginatne čestice/melasa šećerne repe	42,7	0,82	-	[108]
<i>L. casei</i> MTCC 1423	Imobilizacija u alginatne čestice obložene hitozanom/melasa šećerne trske	128,5	-	1,78	[123]
<i>R. oryzae</i> RQ4015	Imobilizacija u čestice polivinil alkohola modifikovane alginatom/hemijski definisan medijum	106,3	0,73	2,95	[113]

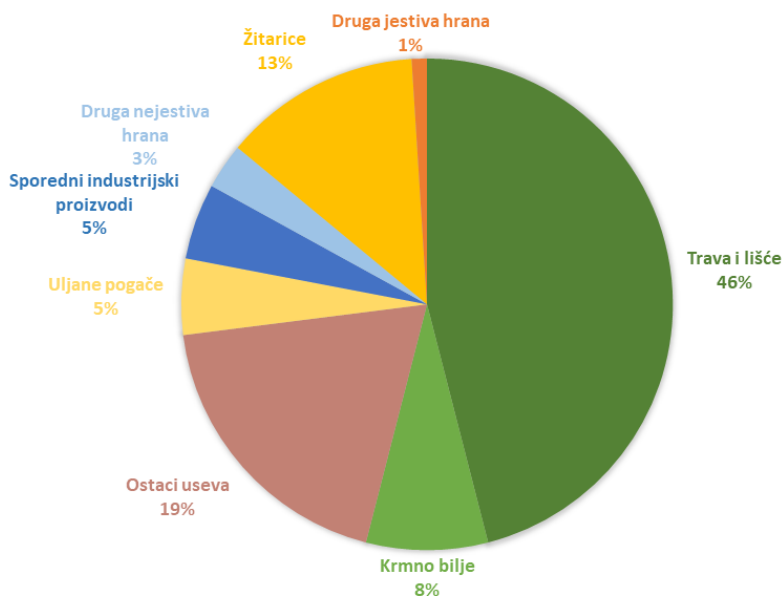
## 2.6. Ekstrakcija i prečišćavanje mlečne kiseline

Važan korak u proizvodnji mlečne kiseline je efikasna separacija i prečišćavanje dobijenog proizvoda kako bi se zadovoljili standardi kvaliteta za određene namene, a to je ujedno i najskuplja faza procesa. Prilikom upotrebe  $\text{CaCO}_3$  za neutralizaciju mlečne kiseline nastaje Ca-laktat. U konvencionalnom postupku, za ekstrakciju mlečne kiseline se koristi sumporna kiselina pri čemu nastaju velike količine gipsa ( $\text{CaSO}_4$ ) koji je veoma štetan po životnu sredinu. Ovi koraci se smatraju glavnom ekonomskom preprekom za proizvodnju mlečne kiseline, s obzirom da cena navedenog načina ekstrakcije mlečne kiseline čini 50% ukupnih troškova proizvodnje [25]. Na ovaj način se dobija tehnička mlečna kiselina, koja se dalje prečišćava hidrolizom, esterifikacijom ili destilacijom. Danas se intenzivno proučavaju procesi prečišćavanja koji stvaraju manje sporednih proizvoda i imaju manji uticaj na životnu sredinu, kao što su konvencionalna elektrodijaliza i elektrodijaliza sa bipolarnom membranom, ekstrakcija, mikrofiltracija, nanofiltracija, ultrafiltracija itd. [25,124,125].

## 2.7. Upotreba sporednih proizvoda prehrambene i agro-industrije u ishrani životinja

Trenutno se na globalnom nivou oko 70% poljoprivrednog zemljišta i 30% do 40% jestive hrane koristi za stočarsku proizvodnju [126]. Pored toga, uzgoj konvencionalnih krmnih kultura na nemarginalnim obradivim površinama zauzima zemljište raspoloživo za proizvodnju ratarskih kultura namenjenih ishrani ljudi. Sve ovo zajedno sa brojnim ekološkim problemima povezanim sa stočarskom proizvodnjom dovodi do povećanja konkurentnosti ljudske i životinjske populacije u pogledu dostupnih izvora hranljivih materija [127], što danas predstavlja jednu od najvećih pretnji globalnoj sigurnosti hrane [128]. Rezultati nedavno objavljene studije ukazuju na to da je globalni sektor stočarstva u 2010. godini utrošio 6 biliona tona hrane (suve materije). Kao tri glavne sirovine navode se trava i listovi, a zatim ostaci useva kao što su slama žitarica, kukuruzovina i ostaci šećerne trske. Hrana koja je jestiva za

ljude činila je 14% utrošene stočne hrane. Žitarice su činile 13% obroka, međutim to je predstavljalo čak 32% svetske proizvodnje žitarica u 2010. godini. Uljane pogače poreklom od različitih biljnih vrsta su činile 5% obroka (slika 6) [129].



**Slika 6.** Globalni sastav stočne hrane. Krmno bilje (leguminoze, stočna repa); ostaci useva (slama, kukuruzovina, vrhovi šećerne trske); pogače uljarica (uljane repice, pamuka, uljane palme); druga jestiva hrana (peleti tapioke, pasulj, neprerađeno sojino zrno, sojino i ulje repice); sporedni industrijski proizvodi (kukuruzni gluten i mekinje, melasa, repin rezanac, pivski trop, suva džibra); druga nejestiva hrana (riblje brašno, sintetičke aminokiseline, stočna kreda); žitarice (pšenica, ječam, proso, pirinač, kukuruz, sirak, zob, heljda) [129].

U mnogim delovima sveta potražnja za hranom animalnog porekla raste kao posledica urbanizacije, rasta prihoda i populacije. Procenjuje se da će globalna potražnja za mesom i mlekom porasti za 57%, odnosno 48% između 2005. i 2050. godine [129]. Danas se sa problemima vezanim za porast stočarske proizvodnje naročito suočavaju zemlje u razvoju koje se sve više okreću ka upotrebi nekonvencionalnih hraniva i sporednih proizvoda prehrambene i agro-industrije u

ishrani životinja. Upotrebom hraniva koja su nejestiva za ljudsku populaciju se značajno može smanjiti konkurentnost hrane i hrane za životinje i ublažiti uticaj stočarske proizvodnje na životnu sredinu. Pod pojmom nekonvencionalna hraniva se podrazumevaju sva ona hraniva koja ne nalaze tradicionalnu primenu u ishrani životinja i obično se ne koriste u komercijalno pripremljenim obrocima namenjenim ishrani stoke [130].

U ishrani životinja se mogu koristiti ostaci poljoprivrednih useva i oni predstavljaju primarnu biomasu koja ostaje na obradivom zemljištu nakon žetve, odnosno berbe poljoprivrednih kultura. Pored primarne biomase, koristi se i sekundarna biomasa koju čine sporedni proizvodi agro-industrije nastali preradom poljoprivrednih useva [131]. Količine primarne i sekundarne biomase koje nastaju u postupku pripreme i prerade žitarica i drugih ratarskih kultura za ishranu ljudi nisu zanemarljive. Primera radi, preradom 1000 kg šećerne repe nastaje 140 kg šećera, 58 kg suvog repinog rezanca, 40 kg melase i 15 kg ostataka repe (listovi i glave repe) [132]. Spaljivanje ostataka useva na obradivim površinama u cilju pripreme zemljišta za naredni proizvodni ciklus je još uvek uobičajena praksa u mnogim zemljama. Ova praksa osim što negativno utiče na biotu tla, smanjuje plodnost zemljišta i uzrokuje emisiju gasova staklene bašte, dok istovremeno troši resurs koji bi mogao da se iskoristi za ishranu životinja ili neke druge namene.

Ostaci poljoprivrednih useva i sporedni proizvodi prehrambene i agro-industrije se generalno smatraju bezbednim za ishranu životinja, a njihov kvalitet je određen brojnim faktorima, među kojima su najvažniji sadržaj proteina i njihova biološka vrednost, kvalitativni i kvantitativni sastav aminokiselina, vitamina i minerala, sadržaj masti, ugljenih hidrata i vlakana, svarljivost i energetska vrednost [130]. Pojedina istraživanja ukazuju na to da sporedni agro-industrijski proizvodi imaju bolji nutritivni profil u odnosu na ostatke useva i predstavljaju održiv izvor proteina, energije i vlakana kojima se mogu zadovoljiti prehrambene potrebe životinja [126]. Međutim, nutritivna vrednost sporednih industrijskih proizvoda znatno varira i zavisi od procesa proizvodnje primarnog proizvoda. Dodatno, visok procenat vlage i

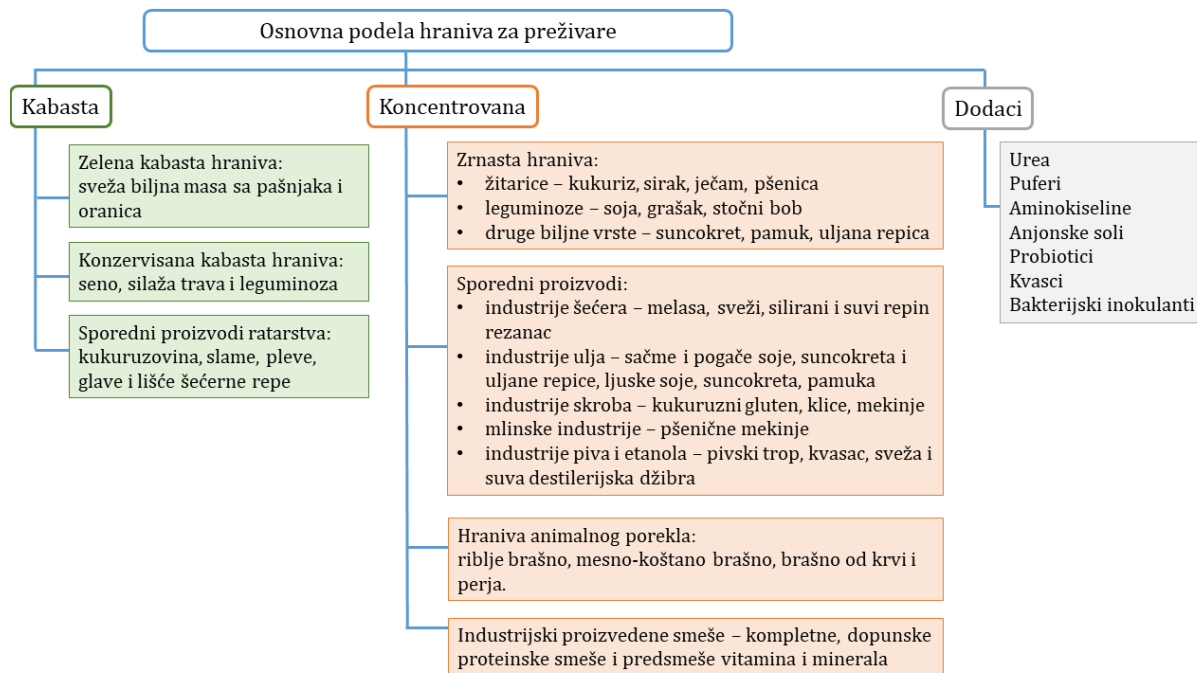
nestabilnost ovih sirovina dovodi do brzih promena hemijskog sastava i pogoršanja kvaliteta zbog čega su neophodne efikasne metode čuvanja.

Najčešći razlozi zbog kojih je upotreba agro-industrijskih sporednih proizvoda kao hraniva za životinje organska su sledeći [126,130]:

- Varijabilan sastav hranljivih materija;
- Prisustvo antinutritivnih faktora i toksičnih jedinjenja;
- Visok sadržaj sirovih vlakana i nizak sadržaj proteina što ih čini neadekvatnim za ishranu monogastričnih životinja, a u pojedinim slučajevima i za ishranu preživara;
- Potreba za suplementacijom;
- Dostupni su u pojedinim regionima i sezonski;
- Njihova cena je obično manja od troškova prikupljanja, transporta i dalje obrade;
- Sadrže visok procenat vlage i podložni su kontaminaciji;
- Zahtevaju dalju obradu u cilju poboljšanja kvaliteta i/ili produženja vremena čuvanja;
- Često nema dovoljno podataka o njihovom hemijskom sastavu i hranljivoj vrednosti.

Hraniva koja se koriste u ishrani preživara se mogu podeliti na više načina i po različitim kriterijumima, a osnovna podela je na kabasta, koncentrovana i dodatke. Međutim, treba imati u vidu da navedena podela nije savršena, s obzirom da postoje hraniva koja se po svojim karakteristikama u nju ne uklapaju u potpunosti [133]. Kabasta hraniva su biljni proizvodi koji imaju visok sadržaj sirovih vlakana, a time manju svarljivost i niži sadržaj energije po jedinici mase ili zapremine. U koncentrovana hraniva se ubrajaju biljni proizvodi koji imaju niži sadržaj vlakana u odnosu na kabasta hraniva. Koncentrovanim hranivima pripadaju i ona koja ne sadrže vlakna, kao što su proizvodi animalnog porekla i industrijski proizvedene smeše. Dodaci ishrani, kao što su urea, aminokiseline i dr., se uključuju u obroke preživara u cilju poboljšanja proizvodnih i fizioloških parametara, zdravstvenog statusa i zadovoljavanja potreba

životinja za hranljivim materijama. Dataljnija podela navedenih grupa hraniva je prikazana na slici 7.



**Slika 7.** Osnovne kategorije hraniva za preživare.

Uzgoj preživara značajno doprinosi sistemima održive poljoprivrede i ishrane, pre svega zbog sposobnosti preživara da unosom hrane koja je nejednaka za ljudsku populaciju daju visokovredne proteinske proizvode – meso i mleko [126,127]. Smatra se da troškovi ishrane preživara čine čak 70% ukupnih troškova proizvodnje u stočarskoj industriji, pa upotreba jeftinih, nekonvencionalnih hraniva, kao i poboljšanje efikasnosti njihovog iskorišćenja za proizvodnju mesa i mleka mogu imati značajan uticaj na profitabilnost stočarske proizvodnje [134,135].

### 2.7.1. Kvalitet hraniva za ishranu preživara

Zbog višekomorne građe želuca i raznovrsne populacije mikroorganizama u buragu, ishrana preživara se znatno razlikuje u odnosu na ishranu monogastričnih



životinja. Osnovne potrebe preživara za hranljivim materijama se odnose na sadržaj sirovih proteina, energije (u obliku vlakana), masti, hidrosolubilnih vitamina i minerala [134]. U većini slučajeva, nedostatak osnovnih hranljivih sastojaka u dnevnom obroku preživara dovodi do značajnog smanjenja proizvodnih performansi životinje. Zastupljenost sporednih proizvoda prehrambene i agro-industrije u dnevnim obrocima preživara zavisi od sastava i energetske vrednosti hraniva, ali i od starosti i proizvodnog ciklusa životinje. U tabeli 3 su date preporuke za zastupljenost najčešće korišćenih sporednih industrijskih proizvoda u ishrani krava.

**Tabela 3.** Preporuke za uključivanje pojedinih sporednih industrijskih proizvoda u obroke krava [133].

Hranivo	Zastupljenost u obroku
Repin rezanac	do 35% suve materije obroka
Sojina sačma	nema ograničenja
Suncokretova sačma	nema ograničenja
Sačma uljane repice	do 12% koncentrata
Lanena sačma	do 20% koncentrata
Sladne klice	do 25% suve materije obroka
Suvi pivski trop	do 4 kg ili 25% koncentrata
Svež pivski trop	do 18 kg ili 20% suve materije obroka
Kukuruzni gluten	do 2 kg

Iskorišćenje hranljivih materija kod preživara zavisi od veoma složenih fermentacionih procesa koji se odigravaju pod uticajem brojnih vrsta bakterija, protozoa i gljivica prisutnih u buragu. Fermentacijom hraniva bogatog vlaknima pod uticajem mikrobiote buraga nastaju važni proizvodi kao što su isparljive masne kiseline i visokosvarljivi mikrobn proteini. Neadekvatan nutritivni profil hraniva može imati negativan uticaj na stabilnost i funkciju mikrobiote buraga, a time i na pravilno funkcionisanje digestivnog sistema preživara [136], što dovodi do smanjenja unosa hrane, svarljivosti hranljivih materija i narušavanja proizvodnih performansi preživara. Ostaci useva i sporedni agro-industrijski proizvodi obično imaju visok sadržaj vlakana i nizak sadržaj proteina, što ograničava unos suve materije. Brzina digestije i prolaska

kroz burag su glavni faktori koji utiču na unos hraniva, odnosno njegovu zastupljenost u ukupnom dnevnom obroku. Sadržaj proteina, vlakana i svarljivost pojedinih hraniva koja se koriste u ishrani preživara su prikazani u tabeli 4.

**Tabela 4.** Sadržaj proteina, sirovih vlakana i svarljivost tipičnih hraniva za preživare [137].

Vrsta hraniva	Sadržaj proteina <sup>a</sup> (g/kg SM)	Sadržaj sirovih vlakana <sup>b</sup> (g/kg SM)	Svarljivost <sup>c</sup> (g/kg SM)
Kukuruzovina	nizak	visok	niska
Pirinčana slama	nizak	visok	niska
Vrhovi šećerne trske	nizak	visok	srednja
Bagasa (otpad iz prerade šećerne trske)	nizak	visok	niska
Listovi tapioke	visok	visok	-
Trop	visok	visok	srednja do visoka
Melasa	nizak	nizak	-
Uljane pogače	nizak	srednji do visok	visoka
Mekinje žitarica	srednji do visok	srednji do visok	visoka
Žitarice	srednji	srednji	visoka

<sup>a</sup>Sadržaj proteina: nizak<60, srednji 60 do 110, visok>110. <sup>b</sup> Sadržaj vlakana: nizak<60, srednji 60 do 120, visok>120. <sup>c</sup>Svarljivost: niska<400, srednja 400 do 600, visoka>600.

Kod preživara proteini prvenstveno imaju ulogu gradivnog materijala i od velikog su značaja za životinje koje se nalaze u fazi rasta i laktacije. Azotne materije, odnosno ukupan protein u hranivima je zastupljen u tri osnovne frakcije, a to su:

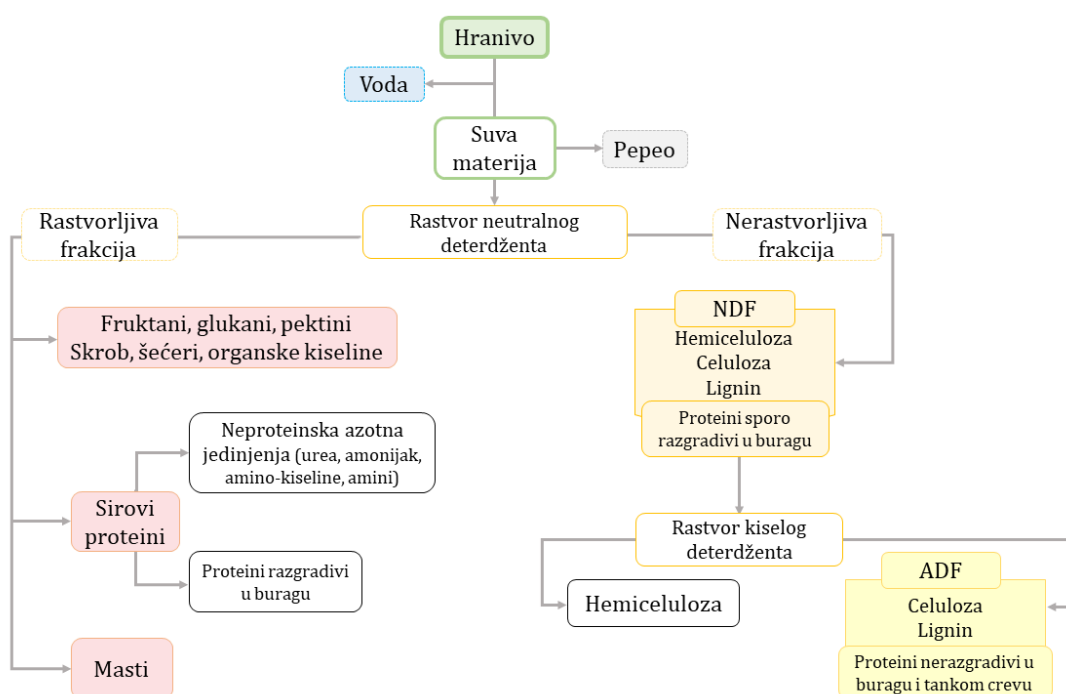
- 1) neproteinska azotna jedinjenja
- 2) protein razgradiv u buragu
- 3) vezani protein koji je nerazgradiv i kao takav nedostupan za životinje.

Najbrže razgradivu frakciju azotnih materija čine neproteinska azotna jedinjenja u koje se ubrajaju amonijak, peptidi i aminokiseline. Deo proteina koji se relativno sporo razlaže u buragu je protein koji je vezan za ćelijski zid biljnog materijala i koji se hemijskom analizom određuje kao protein nerastvorljiv u rastvoru neutralnog deterdženta (NDF). Frakciju proteina koja je nerazgradiva u digestivnom traktu preživara čini protein koji je vezan za lignin, zatim kompleksi polifenola i proteina, kao i proizvodi Mailardove reakcije. Ova frakcija proteina koju životinje ne mogu da

iskoriste se hemijski određuje kao protein nerastvorljiv u rastvoru kiselog deterdženta (ADF) (slika 8) [133].

Najveći deo hraniva za preživare čine ugljeni hidrati i oni se mogu podeliti na:

- 1) nestrukturane ugljene hidrate u koje se ubrajaju brzo razgradivi šećeri, skrob i pektini
- 2) strukturne ugljene hidrate, odnosno vlakna koja je sastoje od celuloze, hemiceluloze i lignina.



**Slika 8.** Šematski prikaz osnovnog hemijskog sastava hraniva za preživare. NDF – neutralna deterdžentska vlakna; ADF – kisela deterdžentska vlakna.

Mikroorganizmi prisutni u buragu razlažu šećer, skrob, pektine, uključujući i strukturne ugljene hidrate, celulozu i hemicelulozu. U normalnim uslovima osnovni proizvodi razlaganja ugljenih hidrata su tri niže masne kiseline – sirćetna, propionska i buterna. Osim isparljivih masnih kiselina u procesu razlaganja ugljenih hidrata u buragu nastaju i gasovi među kojima su dominantni ugljen-dioksid i metan, dok

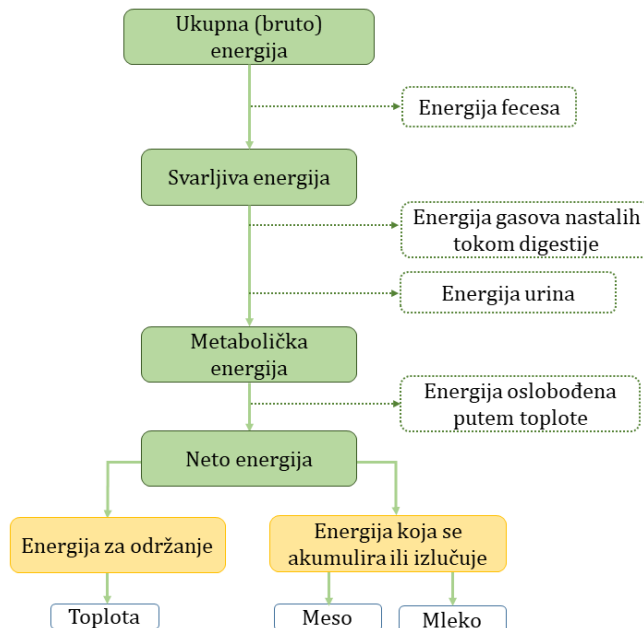
kiseonik, vodonik i azot nastaju u manjim količinama. U normalnim uslovima, prosečno 60% do 70% ukupnog sadržaja isparljivih masnih kiselina koje nastaju u buragu čini sirćetna kiselina, 15% do 20% propionska i 10% do 15% buterna kiselina, dok valerinska i druge više masne kiseline obično čine manje od 5% [133,138]. Komponente biljnog ćelijskog zida (hemiceluloza i celuloza) se u najvećoj meri fermentišu u sirćetnu, dok fermentacijom nestrukturnih ugljenih hidrata poput skroba, pretežno nastaje propionska kiselina. Ukoliko obrok sadrži veće količine lako svarljivih ugljenih hidrata, može doći i do stvaranja mlečne kiseline u većim koncentracijama i pojave acidoze buraga. Obroci za krave treba da budu formulisani tako da pogoduju stvaranju sirćetne kiseline zato što je ona prekursor za sintezu mlečne masti [133]. Sa druge strane, veće koncentracije propionske kiseline su ponekad povezane sa poremećajem poznatim pod nazivom sindrom niskog sadržaja mlečne masti [138], pa neadekvatno izbalansirani obroci mogu da nanesu velike ekonomske štete proizvođačima mleka. Osim za sintezu mlečne masti, isparljive masne kiseline se kod preživara koji se hrane u skladu sa svojim potrebama koriste kao izvori energije za održanje i rast ili bivaju deponovane u tkivima u vidu masnih rezervi [133]. Isparljive masne kiseline su osnovni izvori energije i doprinose približno 70% ukupnim energetske potrebama preživara [138]. Odnos masnih kiselina koje nastaju u buragu znatno varira u zavisnosti od zastupljenosti nestrukturnih i strukturalnih ugljenih hidrata u obroku, te oni moraju biti formulisani tako da zadovolje potrebe životinja i istovremeno obezbede ekonomsku isplativost stočarske proizvodnje.

### **2.7.2. Energetska vrednost hraniva za preživare**

Za sve životne procese, uključujući rast, rad i proizvodnju, neophodna je energija, a osnovni izvor energije je hrana. Iskoristivost energije kod preživara je prikazana na slici 9.

Ukupna, odnosno bruto energija predstavlja hemijsku energiju sadržanu u hrani i može se odrediti na osnovu toplote koja se oslobađa u procesu sagorevanja, odnosno oksidacije organske materije. S obzirom da tokom metabolizma hranljivih materija

dolazi do značajnih gubitaka u energiji, na osnovu vrednosti ukupne energije sadržane u hrani nemoguće je proceniti koliko energije je zapravo dostupno za održavanje vitalnih procesa ili za izgradnju telesnih tkiva. Najveći gubitak energije predstavlja energija sadržana u fecesu koju čine nesvarljiva frakcija hrane i produkti metabolizma preživara.



**Slika 9.** Šematski prikaz metabolizma i iskoristivosti energije kod preživara. Modifikovano prema [133].

Oduzimanjem energije fecesa od ukupne energije konzumirane hrane dobija se podatak o svarljivoj energiji. Tokom fermentacije u buragu dolazi do oslobađanja jednog dela svarljive energije u vidu metana, dok se jedan deo energije izlučuje putem urina. Preostali deo energije predstavlja metaboličku energiju, odnosno energiju hranljivih materija koja je dostupna za metaboličke funkcije životinja. Tokom metaboličkih procesa varenja hrane dolazi do oslobađanja toplotne energija, a oduzimanjem ove energije od metaboličke dobija se vrednost koja predstavlja neto energiju hrane.

Dostupna neto energija hrane značajno varira u zavisnosti od toga za koje funkcije se troši, pa se u praksi posebno izražava neto energija za održanje, laktaciju i prirast [133,139]. Sadržaj hranljivih materija i energije koji je potreban za održavanje bazalnog metabolizma predstavlja uzdržne potrebe životinje. Životinja koja se nalazi u fazi proizvodnje, pored uzdržnih potreba ima i proizvodne potrebe koje se odnose na porast mišićne mase, deponovanje masti, proizvodnju mleka itd.

### **2.7.3. Poboljšanje kvaliteta hraniva za preživare**

Osnovni izazov kada je u pitanju upotreba poljoprivrednih ostataka i sporednih industrijskih proizvoda u ishrani životinja jeste povećanje hranljive vrednosti, svarljivosti i količine konzumirane hrane, sa ciljem da se obezbedi efikasnija stočarska proizvodnja. Pre obrade i pripreme hraniva veoma je važno definisati kojoj grupaciji životinja je hranivo namenjeno, s obzirom da su ciljevi i postupci proizvodnje visokokvalitetnog hraniva za preživare i monogastrične životinje prilično različiti.

Povećanje svarljivosti i unosa suve materije lignoceluloznih hraniva se može postići fizičkim, hemijskim i biološkim metodama. Fizički postupci, kao što su seckanje i mlevenje, se primenjuju u cilju smanjenja veličine čestica, čime se povećava površina materijala koja je dostupna mikroorganizmima buraga. Tretmani hemikalijama, kao što je NaOH, dovode do raskidanja lignoceluloznih veza, smanjenja sadržaja celuloze i hemiceluloze i povećanja svarljivosti materijala. Međutim, tretmani pomoću NaOH nisu praktični i zahtevaju određene mere predostrožnosti. U poređenju sa NaOH, amonijak i urea su jednostavniji za upotrebu, a njihovom primenom osim što se može povećati svarljivosti hraniva, postiže se dodatni efekat povećanja sadržaja azota [137].

Biološkim tretmanima lignoceluloznih sirovina se postiže razgradnja hemijskih veza između lignina, celuloze i hemiceluloze. Mikrobnom fermentacijom se pored razgradnje lignoceluloznog materijala može poboljšati sadržaj proteina i drugih hranljivih materija [130,140], te ona predstavlja potencijalno rešenje problema ishrane stoke u zemljama u razvoju. Kako bi se poboljšao kvalitet lignoceluloznog materijala tokom mikrobne fermentacije se mora postići jedan od tri osnovnih ciljeva, a to su

povećanje sadržaja proteina, povećanje svarljivosti (smanjenje sadržaja celuloze i hemiceluloze) ili poboljšanje palatabilnosti lignoceluloznog materijala. Poboljšanje palatabilnosti se ne smatra primarnim ciljem, s obzirom da se ova karakteristika hraniva veoma lako može postići siliranjem ili mešanjem sa palatabilnijim hranivima. Osnovni cilj pripreme lignoceluloznog materijala za ishranu preživara jeste povećanje njegove svarljivosti [140]. Među različitim mikroorganizmima koji su poznati po razgradnji lignina, gljive bele truleži, odnosno pripadnici klase *Basidiomycetes*, se smatraju najperspektivnijim i najčešće su ispitivane za povećanje svarljivosti lignoceluloznog materijala, pre svega zbog sposobnosti da selektivno uklanjaju lignin bez većeg uticaja na ugljene hidrate koji ostaju dostupni preživarima [141]. Pored povećanja svarljivosti, fermentacija različitih ostataka biljnog porekla (repin rezanac, otpad iz prerade šećerne trske, slama pšenice i pirinča, koren tapioke i dr.) pomoću gljiva ili kvasaca je često ispitivana u cilju povećanja sadržaja proteina i efikasnije upotrebe ovih hraniva u ishrani preživara [130,142,143].

Osim mikroorganizama, za razgradnju lignocelulozne strukture poljoprivrednih ostataka se mogu koristiti i enzimi. Enzimski preparati koji sadrže celulaze i hemicelulaze se obično dodaju fibroznim hranivima radi poboljšanja njihove svarljivosti. Istraživanja ukazuju na to da upotreba enzima može imati pozitivan efekat na palatabilnost, unos hrane i sintezu mikrobnih proteina u buragu, a time i na proizvodne performanse životinja [144]. Pored enzima, često korišćeni aditivi u ishrani preživara su bakterijski inokulanti koji su naročito važni za pripremu i proizvodnju silaže. Siliranje je postupak konzervisanja sirovih krmnih kultura i drugih nekonvencionalnih materijala koji sadrže visok procenat vlage i podložni su kontaminaciji. Zasniva se na prirodnoj fermentaciji u anaerobnim uslovima tokom koje epifitne BMK fermentišu mono i disaharide do mlečne kiseline. Kao rezultat toga, dolazi do smanjenja pH vrednosti i konzervisanja hraniva. U cilju poboljšanja procesa siliranja razvijeni su brojni hemijski i biološki aditivi. Biološki aditivi su poželjniji u odnosu na hemijske, zato što su pogodniji za upotrebu, netoksični i ne predstavljaju opasnost po životnu sredinu [145]. Za pripremu silaže, danas se koriste posebno razvijeni

homofermentativni inokulanti koji sadrže odabrane sojeve BMK čija je uloga da obezbede brzu i efikasnu fermentaciju, poboljšaju hranljivu vrednost i svarljivost siliranog materijala [145,146]. Istraživanja ukazuju na to da primena siliranih poljoprivrednih ostataka povećava dnevni prirast, unos i konverziju hrane i značajno smanjuje cenu stočne hrane po jedinici prirasta preživara u fazi rasta. Takođe, pokazano je da kod krava u laktaciji obrok na bazi silirane slame povećava prinos mleka i procenat mlečne masti [144]. Za pripremu silažnog materijala često su ispitivani i kombinovani aditivi na bazi BMK i enzima [147].

Pored poboljšanja kvaliteta lignoceluloznog materijala, veliki broj istraživanja je fokusiran na poboljšanje svarljivosti i iskoristivosti skroba iz žitarica kao što su ječam, kukuruz, pšenica, tritikale, zob i sirak [148]. Žitarice su bogate energijom, a rezultati ranijih istraživanja ukazuju na to da njihovo uključivanje u obroke može imati pozitivan efekat na proizvodnju mleka i stopu rasta [149,150]. U cilju poboljšanja svarljivosti i iskoristivosti skroba kod preživara, kao i optimizacije nutritivne vrednosti, žitarice se najčešće obrađuju primenom fizičkih i hemijskih metoda, koje se primenjuju pojedinačno ili u kombinaciji. Mlevenje i drobljenje su najčešće primenjivane fizičke metode kojima se razaraju spoljašnji slojevi zrna žitarica i na taj način olakšava pristup mikroorganizmima buraga i digestivnim enzimima. Pored toga, zagrevanje u cilju postizanja gelatinizacije dodatno povećava osetljivost skroba prema delovanju mikrobiote buraga i enzima intestinalnog trakta [151]. Različiti mehanički ili termički tretmani skrobnih sirovina su najčešće primenjivani u cilju povećanja degradacije skroba u buragu, energije i efikasnosti iskorišćenja hranljivih materija. Međutim, negativni efekti ishrane bogate razgradivim skrobom, kao što su visoka incidenca bolesti buraga i poremećaji degradacije vlakana koji su uočeni u sistemima intenzivnog uzgoja preživara, su doveli do znatnih promena u tehnologiji prerade skrobnih sirovina [150]. U cilju poboljšanja iskoristivosti skrobne hrane bez izazivanja negativnih efekata na funkciju buraga, intenzivno se ispituju nove hemijske metode za preradu žitarica, kao što su tretmani kiselinama. Istraživanja su nedavno pokazala da postoji veliki interes za korišćenje mlečne kiseline kao modifikatora skroba žitarica. Mlečna kiselina



usporava enzimsko delovanje amilaze, što dovodi do smanjenja brzine degradacije skroba u gastrointestinalnom traktu (GIT) ljudi i životinja [150]. Istraživanja su pokazala da tretiranje žitarica mlečnom kiselinom utiče na degradaciju skroba u buragu krava i dovodi do bitnih promena u nastanku isparljivih masnih kiselina kratkog lanca, čime se mogu obezbediti optimalni uslovi za zdrave i produktivne životinje [150].

Pored navedenih metoda kojima se može uticati na kvalitet hraniva, pojedina istraživanja su usmerena na manipulaciju mikrobiote buraga u cilju optimizacije fermentacionih procesa u buragu, povećanja efikasnosti iskorišćenja hraniva i sinteze mikrobnih proteina [152]. Pобољшanje efikasnosti mikrobne fermentacije u buragu se može postići upotrebom različitih dodataka, kao što su biljni aditivi, fibrolitički enzimi i probiotici [130,152]. Iako manipulacija mikrobiotom buraga predstavlja prilično težak zadatak, sa porastom znanja o procesima varenja u buragu optimizacija fermentacionih procesa upotrebom različitih aditiva danas postaje sve izvodljivija.

#### **2.7.4. Probiotici**

U cilju poboljšanja proizvodnje i prevencije bolesti, upotreba antibiotika u prošlom veku je bila uobičajena praksa u stočarskoj industriji. Razlog tome je pozitivan uticaj antibiotika kao stimulatora rasta i produktivnosti životinja koji je prethodno dokumentovan brojnim studijama [153]. Međutim, otkriće rezistentnosti kod pojedinih sojeva enterobakterija među životinjskom populacijom 1994. godine izazvalo je zabrinutost u vezi sa prenosom gena rezistencije i dovelo do drastičnog pada upotrebe antibiotika [154]. Evropska Unija je 2006. godine donela odluku o zabrani korišćenja antibiotika za poboljšanje proizvodnje, pre svega zbog zabrinutosti nastanka rezistentnih patogenih mikroorganizama i prisustva rezidua antibiotika u životnoj sredini i hrani životinjskog porekla [155]. Od tada do danas, postoji veliki interes stočarske industrije za pronalaženje novih alternativnih sredstava za prevenciju bolesti kod životinja i poboljšanje stočarske proizvodnje [9,153]. Kao moguće zamene za antibiotike, najveću pažnju naučne zajednice ali i potrošača privlače probiotici i prebiotici.

Prema definiciji Svetske zdravstvene organizacije probiotici „su živi mikroorganizmi koji kada se unesu u adekvatnoj količini doprinose zdravlju domaćina” [156]. Danas se kao probiotici koriste brojni mikroorganizmi i oni se mogu klasifikovati na sledeći način [157]:

- 1) Probiotske bakterije i ostali probiotski mikroorganizmi – sa izuzetkom određenih vrsta koje pripadaju kvascima i plesnima, većina probiotskih mikroorganizama su bakterije. Danas najčešće korišćene probiotske bakterije pripadaju rodovima *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* i *Bacillus*. Među kvascima i plesnima u probiotike se ubrajaju vrste *A. oryzae*, *C. pintolopesii*, *S. boulardii* i *S. cerevisiae*.
- 2) Sporulišući i nesporulišući probiotici – iako je upotreba probiotika koji ne stvaraju spore, kao što su *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, prvobitno bila dominantna, danas se koriste i sporulišuće vrste, npr. *B. subtilis* i *B. amyloliquefaciens*.
- 3) Probiotski preparati koji sadrže više vrsta/sojeva i probiotici koji sadrže jednu vrstu/soj – primer komercijalog preparata koji sadrži više probiotskih vrsta je PoultryStar ME (sadrži *E. faecium*, *L. reuteri*, *L. salivarius* i *P. acidilactici*), dok preparat Anta Pro EF sadrži *E. faecium*.
- 4) Alohtoni i autohtoni probiotici – probiotski mikroorganizmi koji nisu uobičajeno prisutni u GIT-u životinja se navode kao alohtoni (npr. kvasci), dok mikroorganizmi koji su normalni stanovnici digestivnog trakta pripadaju autohtonim probioticima (npr. *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*).

Značaj određenih tehnoloških i fizioloških karakteristika probiotskih sojeva je prepoznat odavno. Gordon, Macrae i Wheeler su primetili da je za postizanje uspešnog ishoda terapije laktobacilima neophodno da preparat ispunjava sledeće uslove: kultura mora biti uobičajen stanovnik intestinalne mikrobiote, nepatogena, sposobna za efikasnu kolonizaciju intestinalnih površina i isporučena u visokim koncentracijama ( $10^7$  CFU/mL do  $10^9$  CFU/mL proizvoda) [158]. Iako su mnogi autori prethodno isticali

važnost porekla u specifičnim komercijalnim aplikacijama, preporuke Svetske zdravstvene organizacije ukazuju na to da specifičnost delovanja probiotika ima važniju ulogu od samog porekla probiotskog soja. Ovaj zaključak je izveden pre svega zbog nesigurnosti porekla intestinalne mikroflore budući da se novorođenčad rađaju sa praktično sterilnim intestinalnim traktom [159]. Osnovni kriterijumi za selekciju novih probiotskih sojeva su prikazani u tabeli 5.

**Tabela 5.** Ključni kriterijumi za selekciju probiotika za komercijalnu upotrebu [159].

Kriterijum	Svojstvo koje je potrebno ispitati
Bezbednosni	poreklo patogenost i infektivnost rezistentnost na antibiotike faktori virulencije-toksičnost, metabolička aktivnost
Tehnološki	genetička stabilnost vijabilnost tokom proizvodnje i čuvanja senzorna svojstva rezistentnost na bakteriofage proizvodnja u velikim koncentracijama
Funkcionalni	tolerantnost na niske pH vrednosti želuca tolerantnost na prisustvo žučnih soli adhezija za intestinalne površine efekti na zdravlje
Fiziološki	imunomodulacija antimikrobna aktivnost protiv gastrointestinalnih patogena uticaj na metabolizam holesterola uticaj na metabolizam laktoze antimutagena i antikancerogena svojstva

Iako se većina navedenih rodova i vrsta smatra bezbednom za upotrebu u ishrani, pojedini mikroorganizmi mogu biti problematični. Ovo se posebno odnosi na enterokoke (*E. faecium* i *E. faecalis*) koje se smatraju uslovnim patogenima, odnosno izazivačima oportunističkih infekcija u bolničkim uslovima, kao što su endokarditis i bakteriemija, kao i intraabdominalne, urinarne i infekcije centralnog nervnog sistema [160]. Takođe, poznato je da su pojedine vrste, npr. pripadnici roda *Enterococcus*, nosioci prenosivih gena rezistencije na određene antibiotike, dok bacili, naročito sojevi

*B. cereus* proizvode enterotoksine i emetički toksin [155,160]. Sve ovo zajedno stavlja bezbednosne kriterijume prilikom selekcije novih probiotskih sojeva u prvi plan. Ovo se naročito odnosi na neophodnost ispitivanja rezistentnosti na antibiotike budući da se geni rezistencije lokalizovani na mobilnim genetskim elementima (plazmidima i transpozonomima) mogu horizontalnim putem preneti na druge mikroorganizme [159].

U početnoj fazi, selekcija probiotskih kultura se vrši ne samo na osnovu funkcionalnih kriterijuma, već se u obzir uzimaju i dodatni tehnološki kriterijumi, uključujući mogućnost dobijanja visokih prinosa tokom kultivacije na industrijskom nivou i preživljavanja tokom koncentrisanja kulture i liofilizacije. Da bi ostvarili funkcionalna svojstva, probiotski sojevi moraju da zadrže vitalnost tokom procesa proizvodnje i čuvanja probiotskog preparata. Vitalnost i aktivnost probiotika se često navodi kao preduslov za postizanje pozitivnih zdravstvenih efekata. Međutim, rezultati pojedinih istraživanja ukazuju na to da čak i nevitalne kulture mogu imati određena funkcionalna svojstva, kao što je imunomodulacija [161].

#### **2.7.4.1. Upotreba probiotika u ishrani preživara**

Zahvaljujući anatomske adaptaciji digestivnog trakta, za preživare je karakterističan specijalizovan način varenja hrane koji im omogućava bolji pristup i iskorišćenje energije sadržane u vlaknastim hranivima u odnosu na monogastrične životinje. Najvažnije karakteristike digestivnog trakta preživara koje ih čine drugačijim u odnosu na ostale sisare su četvorokomorna građa želuca i varenje hrane koje započinje u predgastričnom delu, gde pomoću simbiotskih mikroorganizama dolazi do fermentacije biljnog materijala. Želudac preživara se sastoji iz buraga, mrežavca i listavca, odnosno predgastričnog dela, i sirišta koji predstavlja pravi želudac i po fiziologiji odgovara želucu monogastričnih životinja. Odlika svih sisara, uključujući i preživare, je odsustvo enzima celulaza neophodnih za razgradnju osnovne gradivne komponente biljnog materijala – celuloze. Međutim, tokom evolucije celulolitički mikroorganizmi su postali sastavni deo mikrobiote digestivnog trakta sisara, pri čemu

su preživari po brojnosti i aktivnosti ovih mikroorganizama u digestivnom traktu daleko superiorniji u odnosu na monogastrične životinje.

Iako je intestinalna mikrobiota preživara veoma kompleksna i značaj mnogih individualnih vrsta još uvek nije utvrđen, poslednjih godina je postignut značajan napredak u razumevanju njenog uticaja na proizvodne parametre i zdravstveni status preživara. Istraživanja su pokazala da rodovi *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* značajno doprinose zdravlju domaćina brojnim mehanizmima, kao što su prevencija kolonizacije i proliferacije patogenih mikroorganizama, čime se smanjuje rizik od pojave gastrointestinalnih infekcija [9]. Kod monogastričnih vrsta intestinalna mikrobiota se uglavnom sastoji od pripadnika rodova *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Enterobacteriaceae*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium* i *Streptococcus*. Kod preživara najvažnija i najraznovrsnija mikrobiota postoji u buragu gde se pored celulolitičkih mikroorganizama, kao što su *Butyrivibrio*, *Fibrobacter* i *Ruminococcus*, nalaze i predstavnici rodova *Lactobacillus*, *Megasphaera*, *Prevotella*, *Selenomonas* i *Streptococcus*. Pored navedenih, u buragu se u manjem broju nalaze i metanogene bakterije, protozoe i gljivice [9,162].

Ciljno mesto delovanja probiotika kod odraslih preživara je burag koji predstavlja glavno mesto varenja hrane [163]. Mikrobna fermentacija u buragu se smatra neophodnom za pravilnu digestiju i sveukupno zdravlje preživara, a naročito imajući u vidu činjenicu da su mikroorganizmi buraga odgovorni za razgradnju i fermentaciju 70% do 75% hranljivih materija obroka [163]. Pod uticajem mikrobiote buraga dolazi do fermentacije ugljenih hidrata i proteina što dovodi do stvaranja masnih kiselina kratkog lanca i mikrobnih proteina koji za preživare predstavljaju osnovni izvor energije i proteina. Zbog toga, postoji veliki interes za manipulacijom mikrobiote buraga u cilju povećanja efikasnosti fermentacije, a time i poboljšanja produktivnosti životinja i smanjenja neželjenih sporednih proizvoda fermentacije, kao što je metan. Najčešće korišćeni mikroorganizmi u ishrani preživara i njihov doprinos u pravilnom funkcionisanju buraga su prikazani u tabeli 6.

**Tabela 6.** Mikroorganizmi koji nalaze primenu u ishrani preživara i njihova uloga u buragu [160,164].

Rod	Vrsta	Način delovanja u buragu
<b>Bakterije mlečne kiseline</b>		
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proizvodnja mlečne kiseline i stabilizacija pH vrednosti</li> <li>• Stimulacija rasta bakterija koje koriste mlečnu kiselinu</li> <li>• Adaptacija mikrobiote buraga na prisustvo mlečne kiseline</li> </ul>
	<i>L. plantarum</i>	
	<i>L. casei</i>	
	<i>L. gallinarum</i>	
	<i>L. salivarius</i>	
	<i>L. reuteri</i>	
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. pseudolongum</i>	
	<i>B. thermophilum</i>	
	<i>B. longum</i>	
	<i>B. lactis</i>	
<i>Streptococcus</i>	<i>S. bovis</i>	
	<i>S. faecium</i>	
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecium</i>	
	<i>E. faecalis</i>	
<b>Bakterije koje koriste mlečnu kiselinu</b>		
<i>Megasphaera</i>	<i>M. elsdenii</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Konverzija mlečne kiseline do isparljivih masnih kiselina</li> <li>• Proizvodnja propionske kiseline</li> <li>• Povećanje efikasnosti ishrane</li> <li>• Smanjenje proizvodnje metana</li> <li>• Povećanje pH vrednosti</li> </ul>
<i>Propionibacterium</i>	<i>P. shermanii</i>	
	<i>P. freudenreichii</i>	
	<i>P. acidipropionici</i>	
	<i>P. jensenii</i>	
<b>Druge bakterije</b>		
<i>Prevotella</i>	<i>P. bryantii</i>	
<i>Bacillus</i>	<i>B. subtilis</i>	
	<i>B. licheniformis</i>	
	<i>B. coagulans</i>	
<b>Kvasci</b>		
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Smanjenje koncentracije kiseonika</li> <li>• Prevenzija viška mlečne kiseline</li> </ul>
	<i>S. boulardii</i>	
<b>Plesni</b>		
<i>Aspergillus</i>	<i>A. oryzae</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Obezbeđivanje faktora rasta (vitamina B)</li> <li>• Povećanje broja mikroorganizama i njihove aktivnosti</li> <li>• Stimulacija stvaranja proizvoda fermentacije (isparljivih masnih kiselina i mikrobnih proteina)</li> </ul>
	<i>A. niger</i>	

Istraživanja ukazuju na to da probiotici kod preživara smanjuju rizik od pojave bolesti, naročito onih koje se odnose na poremećaj pH vrednosti buraga (npr. acidoze), dijareje i infekcije izazvane *E. coli* [157]. Bakterije koje koriste mlečnu kiselinu kao izvor energije, npr. *M. elsdenii*, mogu da se koriste u cilju sprečavanja akumulacije mlečne kiseline, stabilizacije pH vrednosti buražnog sadržaja i prevencije nastanka akutne acidoze [163]. Takođe, istraživanja ukazuju na to da probiotici koji sadrže BMK, kao što su vrste roda *Enterococcus* i *Lactobacillus*, sprečavaju pojavu acidoze kod preživara čiji obroci sadrže veći udeo koncentrovanih u odnosu na kabasta hraniva [160]. Najčešći proizvodi za preživare koji se mogu naći na tržištu su preparati na bazi živih ćelija kvasca *S. cerevisiae*. Istraživanja su pokazala da primena ovih preparata kod mlečnih krava povećava unos suve materije i proizvodnju mleka [163]. Takođe, svakodnevna primena kvasca u obrocima tovnih goveda poboljšava parametre rasta (prosečan dnevni prirast, konačnu težinu, unos i konverziju hrane). Neki od navedenih efekata su povezivani sa većom ukupnom koncentracijom bakterija u buragu, stimulacijom rasta i aktivnosti celulolitičkih mikroorganizama, što dovodi do povećane svarljivosti vlakana [163]. Iako je u pojedinim studijama pokazano da probiotici, naročito *S. cerevisiae*, mogu da poboljšaju svarljivost hraniva lošijeg kvaliteta, rezultati su prilično varijabilni. Zbog toga, u cilju procene značaja upotrebe mikroorganizama u ishrani životinja neophodna su dalja istraživanja koja obuhvataju selekciju dobro okarakterisanih probiotskih mikroorganizama i analizu hemijskog sastava stočne hrane, uključujući nekonvencionalna hraniva [157].

Imajući u vidu da je burag teladi nedovoljno funkcionalno razvijen, u prvim mesecima života preživara glavno mesto delovanja probiotika je tanko crevo. Uloga probiotika kao što su BMK ili vrste roda *Bacillus* je da stabilizuju intestinalnu mikrobiotu i smanje rizik od kolonizacije patogena. Pojedina istraživanja ukazuju da upotreba živih ćelija kvasca u prvim danima života teladi pogoduje razvoju populacije mikroorganizama i uspostavljanju fermentacionog kapaciteta buraga [163].

Iako mehanizam delovanja probiotika u intestinalnom traktu nije potpuno razjašnjen, pretpostavlja se da pozitivne efekte ispoljavaju na više načina [164]:

- Proizvode antimikrobna jedinjenja (organske kiseline, bakteriocine, vodonik-peroksid) i inhibiraju rast patogenih mikroorganizama;
- Vezuju se za intestinalne površine i sprečavaju kolonizaciju patogena;
- Proizvode i/ili stimulišu aktivnost enzima;
- Moduliraju imune ćelije i stimulišu imunu funkciju.

Probiotski mikroorganizmi su efikasni u smanjenju učestalosti dijareje kod teladi tako što sprečavaju disbiozu digestivnog trakta. Rezultati studije u kojoj je ispitivan efekat oralne primene *B. pseudolongum* i *L. acidophilus* kod novorođenih teladi ukazuju na to da primena navedenih mikroorganizama dovodi do smanjenja učestalosti dijareje, povećanja telesne mase i efikasnosti ishrane [165]. Slično, navedeni efekti su postignuti kod teladi u periodu od rođenja do prelaska na čvrstu hranu pomoću *S. faecium* [166]. Takođe, probiotici smanjuju fekalno izlučivanja enterohemoragične *E. coli* O157:H7 koja produkuje citotoksin poznat pod nazivom verotoksin, koji kod ljudi izaziva akutnu dijareju, hemoragični kolitis i hemolitično-uremični sindrom [167,168]. Prethodno je pokazano da kod jagnjadi inficiranih *E. coli* O157:H7 suplementacija obroka BMK dovodi do smanjenja ukupnog broja bakterija u fecesu i poboljšanja fizioloških i proizvodnih parametara [168]. Međutim, rezultati objavljenih istraživanja ukazuju na to da su efekti probiotika na zdravlje domaćina prilično varijabilni i u velikoj meri zavise od probiotskog soja, kao i od proizvodne prakse (ishrane, uslova gajenja životinja itd.) [157].



## 3. EKSPERIMENTALNI DEO

### 3.1. Materijali

U istraživanjima obuhvaćenim doktorskom disertacijom ispitivani su sledeći materijali agro-industrijskog porekla: destilerijska džibra (fabrika etanola Reahem, Reahem d.o.o., Srbobran, Srbija), melasa šećerne repe (fabrika etanola Alpiss-SLC, Swan lake d.o.o., Beograd, Srbija), pivski trop (pivara Carlsberg Serbia d.o.o., Čelarevo, Srbija), repin rezanac (fabrika šećera Jedinstvo, Sunoko d.o.o., Novi Sad, Srbija), ljuska suncokreta (maloprodajni prehrambeni objekat, Beograd, Srbija).

Za proizvodnju mlečne kiseline ispitivani su sledeći sojevi BMK: *Lactobacillus paracasei* NRRL B-4564, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, *Lactobacillus salivarius* ATCC 11741 (Kolekcija laboratorije za mikrobiologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu). Patogeni mikroorganizmi korišćeni u radu su: *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Candida albicans* ATCC 10259, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Kolekcija laboratorije za mikrobiologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu).

Za rast mikroorganizama korišćene su sledeće komponente i mikrobiološke podloge: Agar, De Man, Rogosa, Sharpe (MRS) bujon, Tripton, Žučne soli, Hranljivi bujon, Kvašćev ekstrakt, Mesni ekstrakt, Pepton-4, Sladni bujon (Torlak, Srbija), Tween® 80 (Difco®, SAD).

Za antibiogram test korišćeni su sledeći antibiotici: Ampicilin, 10 µg; Eritromicin, 15 µg; Gentamicin, 10 µg; Kanamicin, 30 µg; Nalidiksinska kiselina, 30 µg; Penicilin G, 10 IU; Streptomycin, 10 µg; Tetraciklin, 30 µg; Vankomicin, 30 µg (Neo-Sensitabs®, Danska).

Od enzima i enzimskih preparata korišćeni su: Pepsin (Merck®, UK), Tripsin (Sigma-Aldrich, UK),  $\alpha$ -himotripsin (Sigma-Aldrich, UK), Pronaza E (Merck®, UK), celulaza „Onozuka R-10” (Merck®, UK), enzimski test za kvantitativno određivanje stereoisomera mlečne kiseline (Megazyme®, Irska).

U radu su korišćene sledeće supstance p.a čistoće:

- 3,5-dinitrosalicilna kiselina,  $C_7H_4N_2O_7$  (Acros Organics, SAD)
- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil,  $C_{18}H_{12}N_5O_6$  (Sigma-Aldrich, UK)
- 2-etoksietanol (etil celosolv),  $C_4H_{10}O_2$  (Acros Organics, SAD)
- Aceton,  $C_3H_6O$  (Lach-Ner, Češka)
- Acetonitril,  $C_2H_3N$  (Sigma-Aldrich, UK)
- Bakar-sulfat,  $CuSO_4 \times 5H_2O$  (Zorka Pharma, Srbija)
- Buterna kiselina,  $C_4H_8O_2$  (Acros Organics, SAD)
- Celobioza,  $C_{12}H_{22}O_{11}$  (Sigma, UK)
- Cetil-trimetilamonijum-bromid,  $C_{19}H_{42}BrN$  (Sigma-Aldrich, Nemačka)
- Cistein-hidrohlorid,  $C_3H_7NO_2S \times HCl \times H_2O$  (Sigma, UK)
- Cink-sulfat,  $ZnSO_4 \times 7H_2O$  (Lach-Ner, Češka)
- Dekalin,  $C_{10}H_{18}$  (Fisher scientific, SAD)
- Dinatrijum etilen diamin tetra-acetat,  $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \times 2H_2O$  (Sigma, UK)
- Dinatrijum-hidrogenfosfat,  $Na_2HPO_4 \times 12H_2O$  (Centrohema, Srbija)
- Fenolftalein,  $C_{20}H_{14}O$  (Centrohema, Srbija)
- Fruktaza,  $C_6H_{12}O_6$  (Centrohema, Srbija)
- Glicin,  $C_2H_5NO_2$  (Lach-Ner, Češka)
- Glukoza,  $C_6H_{12}O_6$  (Fluka® Analytical, UK)
- Hemin,  $C_{34}H_{32}ClFeN_4O_4$  (Sigma-Aldrich, UK)
- Hidroksimetilfurfural,  $C_6H_6O_3$  (Sigma-Aldrich, UK)
- Hlorovodonična kiselina, HCl (Zorka Pharma, Srbija)
- Hloroform,  $CHCl_3$  (Centrohema, Srbija)
- Izobuterna kiselina,  $C_4H_8O_2$  (Acros Organics, SAD)
- Izovalerinska kiselina,  $C_5H_{10}O_2$  (Fluka® Analytical, UK)

- Kalijum-hidrogenfosfat,  $K_2HPO_4$  (Superlab, Srbija)
- Kalijum-heksacijanoferat (II),  $K_4[Fe(CN)_6] \times 3H_2O$  (Merck, Nemačka)
- Kalijum-natrijum tartarat,  $KNaC_4H_4O_6 \times 4H_2O$  (Centrohchem, Srbija)
- Kalijum-jodat,  $KIO_3$  (Sigma-Aldrich, UK)
- Kalijum-sulfat,  $K_2SO_4$  (Centrohchem, Srbija)
- Magnezijum-sulfat,  $MgSO_4 \times 7H_2O$  (Merck®, Nemačka)
- Mangan-sulfat,  $MnSO_4 \times H_2O$  (Hemos, Srbija)
- Metanol,  $CH_4O$  (Merck-Alkaloid, Makedonija)
- Metiloranž,  $C_{14}H_{14}N_3NaO_3S$  (NRK® Inženjering, Srbija)
- Metilplavo,  $C_{37}H_{27}N_3Na_2O_9S_3$  (NRK® Inženjering, Srbija)
- Natrijum-acetat,  $C_2H_9NaO_5$  (Zdravlje Leskovac, Srbija)
- Natrijum-borat,  $Na_2B_4O_7 \times 10H_2O$  (Centrohchem, Srbija)
- Natrijum-dodecil-sulfat,  $NaC_{12}H_{25}SO_4$  (Fluka® Analytical, UK)
- Natrijum-hidroksid,  $NaOH$  (Centrohchem, Srbija)
- Natrijum-hlorid,  $NaCl$  (Zorka Pharma, Srbija)
- Natrijum-karbonat,  $Na_2CO_3$  (Hemos, Srbija)
- Natrijum-sulfit,  $Na_2SO_3$  (Zorka Pharma a.d., Srbija)
- Natrijum-sulfid,  $Na_2S \times 9H_2O$  (Sigma-Aldrich, UK)
- Ninhidrin,  $C_9H_6O_4 \times H_2O$  (Acros Organics, SAD)
- Propionska kiselina,  $C_3H_6O_2$  (Acros Organics, SAD)
- Rafinoza,  $C_{18}H_{32}O_{16}$  (Acros Organics, SAD)
- Resazurin,  $C_{12}H_7NO_4$  (Acros Organics, SAD)
- Saharoza,  $C_{12}H_{22}O_{11}$  (Fluka® Analytical, UK)
- Selen,  $Se$  (Acros Organics, SAD)
- Sirćetna kiselina,  $C_2H_4O_2$  (Carlo Erba, Italija)
- Sumporna kiselina,  $H_2SO_4$  (Zorka Pharma, Srbija)
- Skrob,  $(C_6H_{10}O_5)_n$  (Merck-Alkaloid, Makedonija)
- Stearinska kiselina,  $C_{18}H_{36}O_2$  (Sigma, UK)

- Triamonijum-citrat,  $C_6H_{17}N_3O_7$  (Fisher scientific, SAD)
- Vanilin,  $C_8H_8O_3$  (Sigma-Aldrich, UK)
- Valerinska kiselina,  $C_5H_{10}O_2$  (Fluka<sup>®</sup> Analytical, UK)

Od uređaja i instrumenata korišćeni su:

- Analitička vaga (Mettler AJ100, Švajcarska)
- Aparat za određivanje sadržaja vlakana (Fibertec<sup>™</sup> 2010, Foss, Švedska)
- Autoklav (Sutjeska, Beograd)
- Centrifuga (Sigma<sup>®</sup> model 2-16P, Osterode am Harz, Nemačka)
- Električna peć za žarenje (Instrumentaria, Hrvatska)
- Induktivno spregnuti plazma maseni spektrometar (NexION<sup>®</sup> 300X ICP/MS, Perkin Elmer, Inc., SAD)
- Laboratorijska sušnica (Sutjeska, Fabrika medicinskih uređaja, Beograd)
- Mikroskop (Axio Imager A1, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Nemačka)
- Orbitalna tresilica (KS 4000i control, IKAR, Werke GmbH & Co. KG, Nemačka)
- pH metar (inoLab pH 720, WTW, Nemačka)
- Skenirajući elektronski mikroskop sa emisijom polja (Mira3 XMU Field Emission Scanning Electron Microscope, TESCAN, SAD)
- Tehnička vaga (Chyo Balance Corp., MP-3000, Japan)
- Termostat za rast mikroorganizama (Memmert, Nemačka)
- UV-VIS spektrofotometar (Ultrospec 3300 pro, Biochrom Ltd., Engleska)
- Ultrazvučna sonda (Sonopuls HD 2200, Bandelin electronic, Nemačka)
- Vakuum sušnica (Binder VD 23, Binder GmbH, Nemačka)
- Visokopritisni tečni hromatograf (Dionex Ultimate 3000 Thermo Scientific, Thermo Scientific, SAD)
- Vlagomer (KERN MLS-A, KERN & SOHN GmbH, Nemačka)
- Vorteks (REAX 7000, Heidolph, Nemačka)
- Živin porozimetar (Carlo Erba 2000, Italija)

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Hemijska karakterizacija krompirove džibre i melase šećerne repe

Kao supstrat za proizvodnju mlečne kiseline korišćena su dva sporedna agro-industrijska proizvoda: destilerijska džibra iz proizvodnje bioetanol na otpadnom krompiru i melasa šećerne repe koja predstavlja sporedni proizvod industrije šećera. U cilju formulacije supstrata na bazi krompirove džibre i melase i utvrđivanja optimalnog odnosa ove dve sirovine u supstratu za mlečno-kiselinsku fermentaciju, najpre je izvršena njihova detaljna hemijska karakterizacija, koja je obuhvatila određivanje sadržaja suve materije, šećera, ukupnog azota,  $\alpha$ -amino azota, pepela, metala i masti. Dodatno, u melasi šećerne repe je analiziran sadržaj jedinjenja koja imaju potencijalno inhibitorno dejstvo na rast i metaboličke funkcije mikroorganizama.

#### 3.2.1.1. Određivanje sadržaja suve materije

Suva materija u krompirovoj džibri i melasi šećerne repe je određivana metodom sušenja u sušnici do konstantne mase [169].

##### ***Postupak***

Prazan vegeglas je sušen na 105°C u trajanju od 1 h, ohlađen u eksikatoru do sobne temperature, a zatim izmeren sa tačnošću  $\pm 0,001$  g ( $m_0$ ). U vegeglas je preneto 5 g uzorka, a zatim je ukupna masa vegeglasa sa poklopcem izmerena sa tačnošću  $\pm 0,001$  g ( $m_1$ ). Poluotvoren vegeglas sa uzorkom je sušen u sušnici na 105°C do postizanja konstantne mase ( $m_2$ ). Sadržaj suve materije (SM) izražen u % je računat primenom sledeće jednačine:

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

Gde je:

$m_0$  – masa praznog vegeglasa (g)

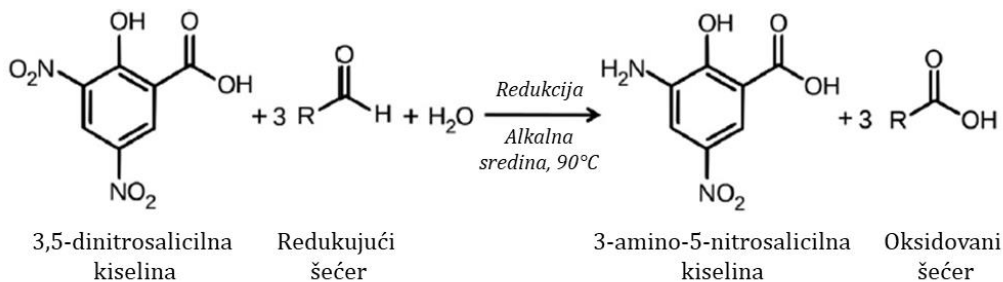
$m_1$  – masa vegeglasa sa uzorkom pre sušenja (g)

$m_2$  – masa vegeglasa sa uzorkom posle sušenja (g)

### 3.2.1.2. Određivanje sadržaja šećera

#### *Određivanje sadržaja šećera metodom sa 3,5-dinitrosalicilnom (DNS) kiselinom*

Sadržaj šećera u ispitivanim uzorcima je određivan spektrofotometrijskom metodom sa 3,5-dinitrosalicilnom kiselinom [170] nakon hidrolize rastvora u prisustvu hlorovodonične kiseline. Reakcija redukujućih šećera i 3,5-dinitrosalicilne kiseline se odvija u alkalnoj sredini uz zagrevanje, pri čemu dolazi do oksidacije aldehidne funkcionalne grupe kod glukoze, odnosno keto funkcionalne grupe kod fruktoze, do karboksilne grupe. Istovremeno 3,5-dinitrosalicilna kiselina se redukuje do 3-amino-5-nitrosalicilne kiseline uz nastanak karakterističnog crveno-braon obojenja (slika 10).



**Slika 10.** Reakcija redukujućih šećera i 3,5-dinitrosalicilne kiseline.

Šećeri koji ne poseduju redukcionu osobinu (neredujući šećeri), kao što je saharoza prisutna u melasi šećerne repe, se određuju posle hidrolize kiselinama ili enzimima. Hidrolizom saharoze (inverzijom) nastaje ekvimolekulska smeša glukoze i fruktoze, a određivanjem šećera posle hidrolize rastvora u stvari se određuje sadržaj ukupnih šećera, tj. redukujućih šećera prisutnih u uzorku pre hidrolize i redukujućih šećera nastalih hidrolizom saharoze.

#### **Reagensi**

- 1% rastvor 3,5-dinitrosalicilne kiseline:

10 g dinitrosalicilne kiseline ( $C_7H_4N_2O_7$ )

0,5 g natrijum-sulfita ( $Na_2SO_3$ )

10 g natrijum-hidroksida (NaOH)

Destilovana voda do 1 L

- 40% rastvor kalijum-natrijum tartarata ( $KNaC_4H_4O_6 \times 4H_2O$ )
- 10 M rastvor hlorovodonične kiseline (HCl)
- 10 M rastvor natrijum-hidroksida (NaOH)

### **Postupak**

U normalnom sudu odgovarajuće zapremine su napravljena razblaženja uzorka u zavisnosti od očekivane koncentracije šećera. U epruvetu je preneto 3 mL razblaženog rastvora uzorka, a zatim je dodato 50  $\mu$ L 10 M rastvora HCl. Zatvorene epruvete su zagrevane 10 minuta na 100°C, čime se postiže hidroliza saharoze do glukoze i fruktoze. Nakon toga, sadržaj u epruveti je neutralisan dodatkom 50  $\mu$ L 10 M rastvora NaOH. U neutralisan rastvor je dodato 3 mL rastvora DNS kiseline, a zatim su epruvete zagrevane u vodenom kupatilu na 90°C u trajanju od 5-15 minuta do pojave crvenobraon obojenja. Istovetno je pripremljena i slepa proba u kojoj je umesto ispitivanog razblaženog uzorka korišćena destilovana voda, a koja nakon zagrevanja zadržava žutu boju. Zatim je u topao rastvor dodat 1 mL rastvora kalijum-natrijum-tartarata i sadržaj dobro promešan. Sadržaj u epruvetama je ohlađen do sobne temperature i zatim je merena apsorbanca na spektrofotometru na 505 nm. Za dobijanje standardne prave korišćeni su rastvori saharoze poznatih koncentracija (0,05 g/L do 0,3 g/L) koji su podvrgnuti istovetnom postupku hidrolize i neutralizacije kao i ispitivani razblaženi uzorci. Koncentracija šećera je računata prema jednačini standardne prave:

$$C = (0,21269 \times A + 0,04461) \times R \quad \text{uz} \quad r^2 = 0,99993$$

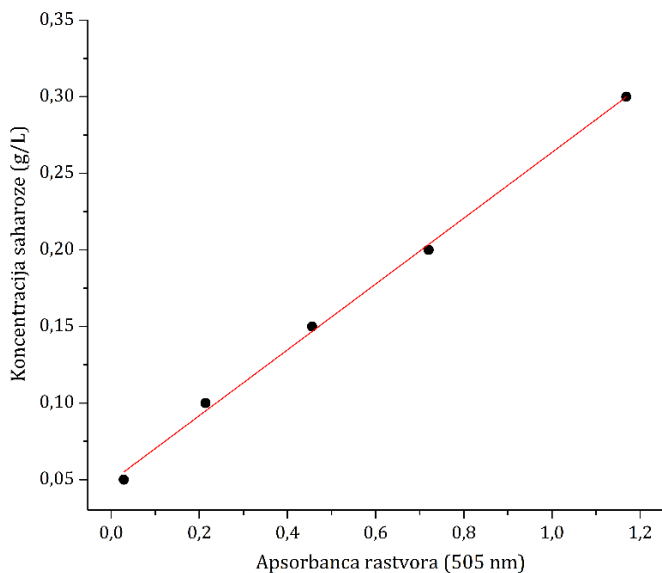
Gde je:

C – koncentracija ukupnih šećera u ispitivanom rastvoru (g/L)

A – apsorbanca ispitivanog rastvora na 505 nm

$r^2$  – kvadrat koeficijenta korelacije

R – faktor razblaženja



**Slika 11.** Standardna prava zavisnosti koncentracije rastvora šećera od apsorbance na talasnoj dužini od 505 nm.

### *Određivanje šećera hromatografijom visokih performansi (HPLC)*

Pre analize uzorci su deproteinizovani pomoću rastvora Carrez I, Carrez II i 0,1M NaOH [171]. Deproteinizacija je vršena u normalnom sudu u koji je, u zavisnosti od prisutne koncentracije šećera u uzorku i osetljivosti sistema za određivanje, preneto određena zapremina uzorka, a zatim je dodato približno 10 mL destilovane vode. Sadržaj u normalnom sudu je promešan, a nakon toga je dodato 5 mL rastvora Carrez I, 5 mL rastvora Carrez II i 10 mL 0,1 M rastvora NaOH. Normalni sud je dopunjen do oznake destilovanom vodom. Uzorci su filtrirani kroz 0,2  $\mu\text{m}$  filter i dalje analizirani HPLC metodom.

Analiza prethodno pripremljenih uzoraka je vršena na Dionex Ultimate 3000 Thermo Scientific HPLC uređaju. Za razdvajanje šećera korišćena je reverzno-fazna kolona (Hypersil gold C18, 150 mm  $\times$  4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) na 35°C. Kao mobilna faza



korišćena je smeša acetonitrila i vode u odnosu 80:20 (v/v) sa protokom od 1,2 mL/min. Detekcija šećera je vršena pomoću RI detektora (RefractoMax 520). Pri istim uslovima je određivan i sadržaj standarda poznatih koncentracija na osnovu kojih su formirane kalibracione krive za kvantifikovanje šećera u uzorcima.

### **3.2.1.3. Određivanje potencijalno inhibitornih jedinjenja u melasi šećerne repe**

Potencijalno inhibitorna jedinjenja u melasi šećerne repe su detektovana HPLC analizom prema metodologiji Barroso i saradnika [172]. Analiza prethodno pripremljenih uzoraka je vršena na Dionex Ultimate 3000 Thermo Scientific HPLC uređaju i reverzno-faznoj koloni (Hypersil gold C18, 150 mm × 4,6 mm, 5 µm) na temperaturi od 25°C. Detekcija je vršena pomoću UV detektora na 280 nm. Standardi očekivanih inhibitornih jedinjenja su podvrgnuti analizi na isti način i pod istim uslovima na osnovu čega su formirane kalibracione krive za njihovu kvantifikaciju.

### **3.2.1.4. Određivanje sadržaja ukupnog azota**

Sadržaj ukupnog azota je određivan metodom po Kjeldahl-u [169]. Princip metode se zasniva na oksidaciji organskih materija u uzorku u prisustvu koncentrovane sumporne kiseline i katalizatora, pri čemu se azot oslobađa u obliku amonijaka koji sa sumpornom kiselinom gradi amonijum-sulfat. U sledećoj fazi, dejstvom baza na nastali amonijum-sulfat oslobođeni amonijak se predestiliše u kiselinu poznatog molariteta. Sadržaj azota se posle destilacije određuje titracijom pomoću rastvora baze molariteta koji odgovara uzetoj kiselini.

#### ***Reagensi***

- Koncentrovana sumporna kiselina (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
- 33% rastvor natrijum-hidroksida (NaOH)
- 1% rastvor fenolftaleina u etanolu (C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>O)

- 0,05 M rastvor sumporne kiseline ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )
- 0,1 M rastvor natrijum-hidroksida ( $\text{NaOH}$ )
- Katalizator:
  - 62,5 g kalijum-sulfata ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ )
  - 1 g bakar-sulfata ( $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ )
  - 1 g selena ( $\text{Se}$ )
- Tashiro indikator:
  - 100 mL 0,1% vodenog rastvora metiloranža ( $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{NaO}_3\text{S}$ )
  - 4 mL 1% vodenog rastvora metilplavog ( $\text{C}_{37}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{Na}_2\text{O}_9\text{S}_3$ )

### ***Postupak***

U tikvicu za sagorevanje je odmereno 5 g do 10 g uzorka, zatim je dodato 6 g pripremljenog katalizatora i 20 mL koncentrovane sumporne kiseline. Sadržaj je dobro promešan i postepeno zagrevan do pojave bele pare, nakon čega je zagrevanje nastavljeno do tačke ključanja. Povremeno tokom zagrevanja sadržaj je promešan pokretanjem tikvice, a zaostale mrke kapi i čvrsti delići uzorka su ispirani dodatkom nekoliko mL koncentrovane sumporne kiseline. Prilikom sagorevanja melase, po početku zagrevanja smeše dodato je 0,01 g stearinske kiseline kako bi se sprečilo obilno formiranje pene usled prisustva velike koncentracije šećera. Zagrevanje traje dok sadržaj u tikvici ne postane bezbojan do plavičast, nakon čega se uzorak zagreva još 15 minuta.

Posle hlađenja, sadržaj tikvice je razblažen dodatkom 50 mL do 100 mL destilovane vode i posle ponovnog hlađenja prenet u balon destilaconog aparata po Parnas-Wagner-u, postepeno ispirajući tikvicu destilovanom vodom, tako da zapremina u balonu bude 200 mL do 250 mL. Potom je u balon dodat 33% rastvor natrijum-hidroksida u višku (obično 100 mL), pri čemu sadržaj u balonu dobija tamno plavu boju. U erlenmajer je preneto 70 mL 0,05 M rastvora sumporne kiseline i nekoliko kapi Tashiro indikatora, nakon čega je započeta destilacija vodenom parom. Tokom destilacije, prisustvo amonijaka u destilatu je povremeno proveravano puštanjem

nekoliko kapi destilata na crveni lakmus papir. Destilacija traje sve dok celokupni amonijak ne predestiliše u kiselinu, odnosno dok boja lakmus papira ne ostane nepromenjena.

Po završetku destilacije, kraj hladnjaka je ispran destilovanom vodom, a zatim je rastvor titrisan 0,1 M rastvorom natrijum-hidroksida. Sadržaj azota se određuje na osnovu količine vezane kiseline u toku destilacije, pri čemu 1 mL 0,005 M rastvora sumporne kiseline odgovara 0,0014 g azota. Sadržaj azota je određivan primenom sledeće jednačine:

$$\text{Azot (\%)} = \frac{(V_k - V_b) \times 0,0014}{m_u} \times 100$$

Gde je:

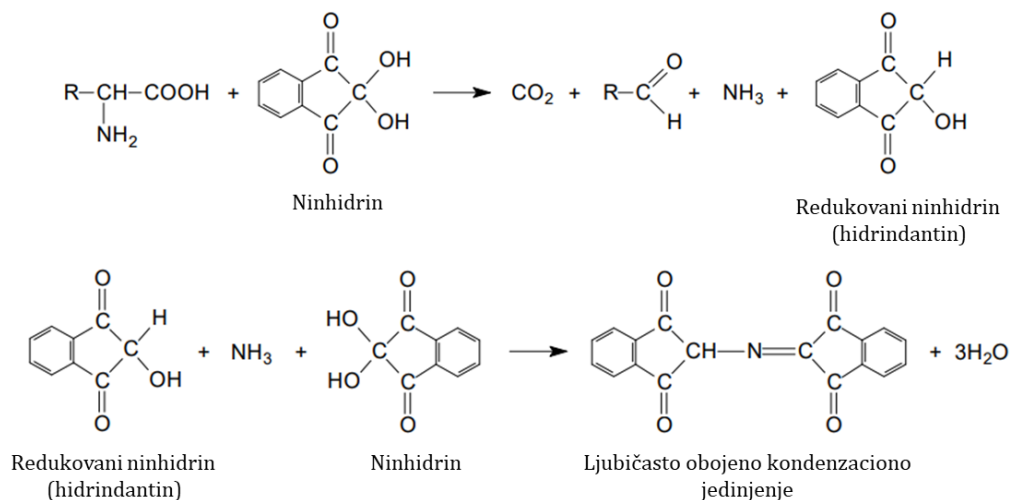
$V_k$  – zapremina 0,05 M rastvora sumporne kiseline (mL)

$V_b$  – zapremina 0,1 M rastvora natrijum-hidroksida (mL)

$m_u$  – masa uzorka (g)

### 3.2.1.5. Određivanje slobodnog $\alpha$ -amino azota

Slobodni  $\alpha$ -amino azot je određivan spektrofotometrijskom metodom sa ninhidrinom na talasnoj dužini od 570 nm [173]. Proteini, polipeptidi i sve  $\alpha$ -aminokiseline, izuzev prolina i hidroksprolina, sa ninhidrinom daju kompleks intenzivno plave ili ljubičaste boje. Vodeni rastvor ninhidrina oksidiše  $\alpha$ -aminokiseline, prevodeći ih u imino oblik, koji zatim prelazi u odgovarajuću ketokiselinu, oslobađajući amonijak. Na povišenoj temperaturi ketokiseline dekarboksilacijom prelaze u odgovarajući aldehid. Nastao redukovani oblik ninhidrina (hidrindantin) reaguje sa jednim molekulom oslobođenog amonijaka i jednim molekulom nepromenjenog ninhidrina pri čemu se formira ljubičasto obojeno kondenzaciono jedinjenje (slika 12). Intenzitet nastalog obojenja je proporcionalan koncentraciji prisutnog  $\alpha$ -amino azota i određuje se na talasnoj dužini od 570 nm.



**Slika 12.** Reakcija ninhidrina i  $\alpha$ -aminokiselina.

### Reagensi

- Reagens za bojenje:

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

0,5 g ninhidrina ( $\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ )

0,3 g fruktoze ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ )

Destilovana voda do 100 mL

pH rastvora je podešen na 6,6-6,8. Pripremljen rastvor je čuvan u tamnoj boci na temperaturi od 0°C do 4°C, najduže dve nedelje.

- Rastvor za razblaživanje:

2 g kalijum-jodata ( $\text{KIO}_3$ )

600 mL destilovane vode

400 mL 96% etanola

- Standardni rastvor glicina:

107,2 mg glicina ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$ )

Destilovana voda do 100 mL

Standardni rastvor glicina je čuvan na temperaturi od 0°C do 4°C. Za analizu je korišćen razblažen standardni rastvor glicina koji sadrži 2 mg/L  $\alpha$ -amino azota, a

koji je dobijen tako što je 1 mL standardnog rastvora glicina razblažen destilovanom vodom do 100 mL.

### **Postupak**

Uzorak je prethodno razblažen destilovanom vodom do koncentracije amino azota 1 mg/L do 3 mg/L. U epruvetu je preneto 2 mL razblaženog rastvora uzorka, a zatim je dodat 1 mL reagensa za bojenje. Zatvorene epruvete su prvo zagrevane 16 minuta u ključalom vodenom kupatilu, a zatim inkubirane 20 minuta na 20°C. Istovetno je pripremljena i slepa proba u kojoj je umesto ispitivanog razblaženog uzorka korišćena destilovana voda. Nakon hlađenja, u svaku epruvetu je dodato 5 mL rastvora za razblaživanje. U roku od 30 min od momenta dodavanja, merena je apsorbancija rastvora uzorka i razblaženog standardnog rastvora glicina na 570 nm u odnosu na slepu probu. Koncentracija  $\alpha$ -amino azota je određivana na osnovu sledeće jednačine:

$$C = \frac{A_U}{A_S} \times 2 \times R$$

Gde je:

C – koncentracija  $\alpha$ -amino azota u ispitivanom rastvoru (mg/L)

$A_U$  – apsorbancija uzorka

$A_S$  – apsorbancija razblaženog standardnog rastvora glicina

R – faktor razblaženja

#### **3.2.1.6. Određivanje sadržaja pepela**

Sadržaj pepela je određivan metodom spaljivanja uz dodatak sumporne kiseline [169]. Dodatkom sumporne kiseline, termolabilni zemnoalkalni karbonati i lako isparljivi hloridi se prevode u sulfate, koji su znatno stabilniji na višim temperaturama, čime se izbegavaju gubici tokom spaljivanja, a ovako dobijeni pepeo se naziva sulfatni pepeo.

### **Postupak**

Posuda za spaljivanje (tigel) je prethodno izžarena na temperaturi od 550°C u trajanju od najmanje 1 h, ohlađena u eksikatoru i izmerena sa tačnošću  $\pm 0,001$  g ( $m_0$ ). Nakon toga, u tigel je izmereno 10 g uzorka. S obzirom da ispitivani uzorci, a naročito destilerijska džibra sadrže znatan procenat vode, pre spaljivanja voda iz uzorka je uklonjena, najpre uparavanjem na vodenom kupatilu, a zatim sušenjem u sušnici na 105°C. Nakon uparavanja uzorka, dodato je 5 mL 10% rastvora sumporne kisline. Sagorevanje uzorka je u početku vršeno na nižoj temperaturi na plameniku (u digestoru dok ne prestanu da se izdvajaju pare sumpor-trioksida), a zatim je zagrevanje nastavljeno u električnoj peći na temperaturi od 550°C. Posle žarenja, posuda je ohlađena u eksikatoru, ponovo je dodato 3 mL sumporne kiseline i ponovljen opisani postupak sagorevanja. Po završetku spaljivanja, posuda je ohlađena u eksikatoru i zatim izmerena sa tačnošću  $\pm 0,001$  g ( $m_1$ ). Sagorevanje u peći traje do postizanja konstantne mase. Sadržaj sulfatnog pepela izražen u % je računat primenom sledeće jednačine:

$$\text{Pepeo (\%)} = \frac{m_1 - m_0}{m_u} \times 100$$

Gde je:

$m_0$  – masa praznog tigla (g)

$m_1$  – masa tigla sa pepelom posle žarenja (g)

$m_u$  – masa uzorka (g)

#### **3.2.1.7. Određivanje sadržaja metala**

Za određivanje koncentracije metala u melasi i destilerijskoj džibri korišćena je masena spektrometrija sa indukovano spregnutom plazmom (ICP-MS) [174]. ICP-MS je analitička metoda u kojoj se indukovano spregnuta plazma koristi kao izvor jonizacije, dok se razdvajanje i detekcija jona vrši masenom spektrometrijom. Metoda je pogodna za određivanje koncentracija različitih vrsta metala u hrani i sličnim uzorcima koji se

mogu ekstrahovati kiselinama primenom mikrotalasne digestije. Priprema uzorka za analizu pomoću mikrotalasno-potpomognute vlažne digestije je veoma često primenjivana zbog jednostavnosti manipulacije uzorcima, efikasnosti i kraćeg vremena neophodnog za analizu, kao i ekološke opravdanosti u smislu manje potrošnje hemikalija.

Pre analize, uzorci su mineralizovani primenom mikrotalasne digestije u zatvorenom sistemu pod visokim pritiskom uz dodatak azotne kiseline i vodonik peroksida. Nakon digestije, uzorci su razblaženi destilovanom vodom u zavisnosti od prisutne koncentracije metala u uzorku i osetljivosti sistema za određivanje. Pre analize, uzorci su filtrirani kroz membranski filter, a filtrat je dalje analiziran ICP-MS metodom. Koncentracije metala su kvantifikovane korišćenjem eksterne kalibracije [174].

#### **3.2.1.8. Određivanje sadržaja masti**

Sadržaj masti je određivan metodom kontinuirane ekstrakcije osušenog uzorka hloroformom u Soxhlet ekstraktoru [169]. Ekstrakcija masti metodom po Soxhlet-u se vrši na temperaturi ključanja rastvarača, a nakon završene ekstrakcije višak rastvarača se uklanja destilacijom. Pre početka ekstrakcije voda iz uzorka je uklonjena najpre uparavanjem na vodenom kupatilu, a zatim sušenjem u sušnici na 105°C.

U specijalno pripremljen fišek od odmašćenog filter papira je odmereno 5 g prethodno homogenizovanog uzorka, koji je potom pokriven vatom. Fišek sa uzorkom je postavljen u srednji deo ekstraktora, koji se jednim krajem spaja sa hladnjakom, a drugim sa odgovarajućom tikvicom. Tikvica je prethodno sušena najmanje 1 h na temperaturi od 105°C, ohlađena u eksikatoru do sobne temperature i izmerena sa tačnošću  $\pm 0,001$  g ( $m_0$ ). U aparat, sa gornje strane hladnjaka, je dodato toliko rastvarača da se ekstraktor napuni i prelije u tikvicu. Zagrevanje tikvice je vršeno na vodenom kupatilu, a intenzitet zagrevanja podešavan tako da se kondenzovane kapljice rastvarača ne slivaju u neprekidnom mlazu. Prilikom zagrevanja, pare rastvarača dospevaju u hladnjak gde se hlade, slivaju u ekstraktor i rastvarač u dodiru sa uzorkom

ekstrahuje masti. Nakon što se ekstraktor napuni rastvaračem, koji sadrži ekstrahovanu mast, rastvor se prelije u tikvicu, a istovetni postupak prelaska rastvarača iz ekstraktora u tikvicu je ponavljan više puta. Tokom ekstrakcije prisustvo masti u rastvaraču je povremeno proveravano puštanjem nekoliko kapi rastvarača iz ekstraktora na filter papir. Posle završene ekstrakcije, veći deo hloroforma iz tikvice je predestilisan u ekstraktor, nakon čega je aparatura sklonjena sa vodenog kupatila. Ostatak rastvarača iz tikvice je uklonjen uparavanjem, a zatim je tikvica sa ekstrahovanim mastima sušena u sušnici na 105°C do postizanja konstantne mase ( $m_1$ ). Sadržaj masti u uzorku je određivan na osnovu razlike mase tikvice pre i posle ekstrakcije:

$$\text{Masti (\%)} = \frac{m_1 - m_0}{m_u} \times 100$$

Gde je:

$m_0$  – masa prazne tikvice (g)

$m_1$  – masa tikvice sa ekstrahovanim mastima (g)

$m_u$  – masa uzorka (g)

### 3.2.2. Priprema inokuluma bakterija mlečne kiseline

Za proizvodnju mlečne kiseline na supstratu na bazi krompirove džibre i melase šećerne repe ispitivana su tri soja: *Lactobacillus paracasei* NRRL B-4564, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 i *Lactobacillus salivarius* ATCC 11741. Pre zasejavanja supstrata, inokulum ispitivanih sojeva je pripreman inkubiranjem u MRS bujonu na 37°C u trajanju od 18 h, pod anaerobnim uslovima. Za postizanje anaerobnih uslova u komori za inkubiranje korišćene su Anaerocult® C kesice (Merck, Nemačka).



### 3.2.3. Selekcija bakterija mlečne kiseline koje efikasno fermentišu saharozu

Selekcija soja BMK koji efikasno fermentišu saharozu je vršena testiranjem ispitivanih sojeva u fermentaciji dva modifikovana MRS bujona: MRS bujona koji je umesto glukoze kao izvora ugljenika sadržao saharozu (MRS/saharoza) i MRS bujona sa dodatkom melase šećerne repe kao izvora ugljenika (MRS/melasa). MRS/saharoza bujon je pripreman mešanjem sledećih sastojaka: pepton, 10 g/L; mesni ekstrakt, 10 g/L; kvašćev ekstrakt, 5 g/L;  $K_2HPO_4$ , 2 g/L;  $C_2H_9NaO_5$ , 5 g/L;  $(NH_4)_3C_6H_5O_7$ , 2 g/L;  $MgSO_4 \times 7H_2O$ , 0,2 g/L;  $MnSO_4 \times H_2O$ , 0,05 g/L; saharoza, 25 g/L; Tween® 80, 1 mL/L; destilovana voda, 1 L. MRS/melasa bujon je pripreman mešanjem sledećih sastojaka: pepton, 10 g/L; mesni ekstrakt, 10 g/L; kvašćev ekstrakt, 5 g/L;  $K_2HPO_4$ , 2 g/L;  $C_2H_9NaO_5$ , 5 g/L;  $(NH_4)_3C_6H_5O_7$ , 2 g/L;  $MgSO_4 \times 7H_2O$ , 0,2 g/L;  $MnSO_4 \times H_2O$ , 0,05 g/L; melasa šećerne repe, 50 g/L (ekvivalentno koncentraciji ukupnih šećera 25 g/L); Tween® 80, 1 mL/L; destilovana voda, 1 L.

Takođe, sposobnost ispitivanih sojeva da fermentišu glukozu je analizirana u fermentaciji krompirove džibre kao jedinog izvora azota i ugljenika. pH vrednost krompirove džibre i dva modifikovana MRS bujona pripremljena na gore opisani način je podešena na 6,5 dodatkom 30% rastvora NaOH (w/w), a zatim su supstrati sterilisani u autoklavu na 121°C u trajanju od 15 minuta i dalje korišćeni za selekciju BMK.

Pripremljeni supstrati su zasejavani 5% (v/v) inokulumom *L. paracasei* NRRL B-4564, *L. rhamnosus* ATCC 7469 i *L. salivarius* ATCC 11741. Fermentacija je vođena u mikroaerofilnim statičnim uslovima, na temperaturi od 37°C u trajanju od 48 h. Koncentracija šećera, mlečne kiseline i broj živih ćelija u fermentacionom medijumu su određivani u nultom satu i nakon 48 h fermentacije.

### 3.2.4. Proizvodnja mlečne kiseline na kombinovanom supstratu na bazi krompirove džibre i melase – priprema supstrata za fermentaciju

Za proizvodnju mlečne kiseline korišćen je kombinovani supstrat na bazi krompirove džibre i melase šećerne repe. Za pripremu kombinovanog supstrata

krompirova džibra i melasa su mešane u odgovarajućem odnosu u zavisnosti od ispitivane koncentracije šećera. Nakon toga, pH vrednost supstrata je podešena na 6,5 pomoću 30% rastvora NaOH (w/w). Supstrat je sterilisan u autoklavu na 121°C u trajanju od 15 minuta i dalje korišćen za mlečno-kiselinsku fermentaciju.

### **3.2.5. Optimizacija početne koncentracije šećera za proizvodnju mlečne kiseline**

U cilju optimizacije početne koncentracije šećera u medijumu analizirane su tri vrednosti: 55 g/L, 75 g/L i 105 g/L. Početne koncentracije šećera od 55 g/L, 75 g/L i 105 g/L su dobijene mešanjem krompirove džibre i melase u odnosu 1:6, 1:9 i 1:12, redom. Nakon podešavanja pH vrednosti na 6,5 i sterilizacije, supstrat je zasejavan 5% (v/v) inokulumom *L. paracasei* NRRL B-4564. Fermentacija je vođena pod mikroaerofilnim uslovima na orbitalnoj tresilici (100 obrt/min), na temperaturi od 41°C. Tokom fermentacije, pH vrednost medijuma je održavana u optimalnim granicama (6,2-6,5) dodatkom 30% rastvora NaOH (w/w). Tokom fermentacije praćena je promena koncentracije šećera, mlečne kiseline i broja živih ćelija.

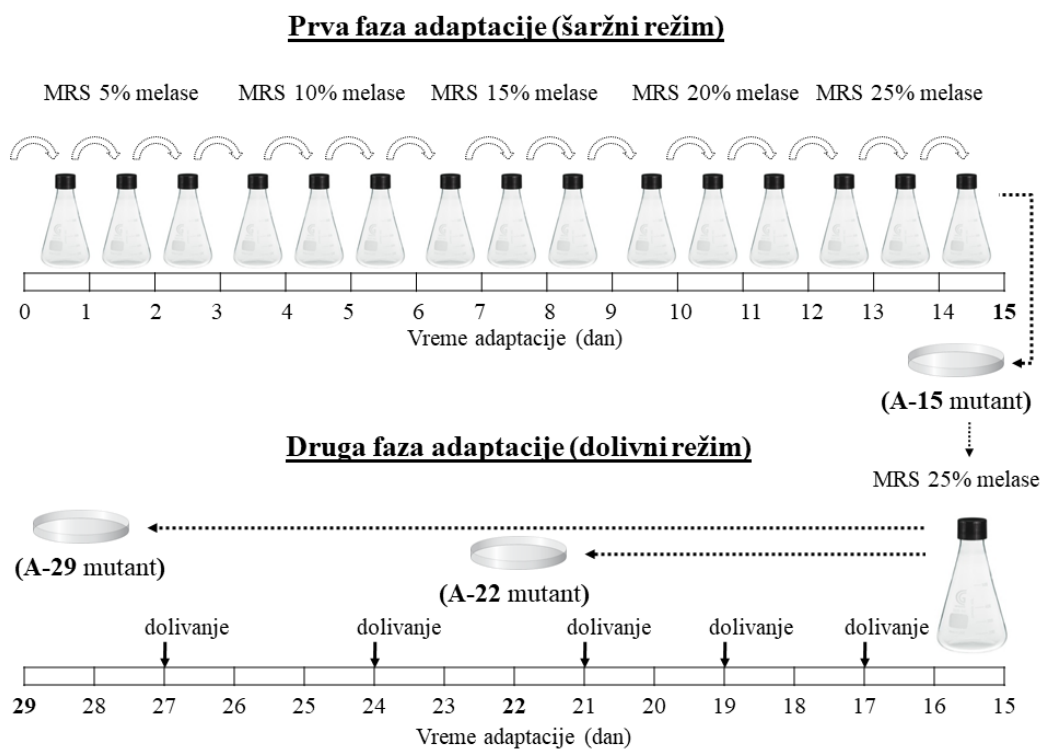
### **3.2.6. Adaptacija *L. paracasei* NRRL B-4564 – priprema supstrata za adaptaciju**

U cilju poboljšanja efikasnosti proizvodnje mlečne kiseline na kombinovanom otpadnom supstratu, *L. paracasei* NRRL B-4564 je adaptiran na potencijalno inhibitorna jedinjenja prisutna u melasi šećerne repe. Za adaptaciju *L. paracasei* NRRL B-4564 korišćen je modifikovani MRS bujon koji je umesto glukoze sadržao melasu šećerne repe. Modifikovani MRS bujon je pripreman mešanjem sledećih sastojaka: pepton, 10 g/L; mesni ekstrakt, 10 g/L; kvašćev ekstrakt, 5 g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 g/L; C<sub>2</sub>H<sub>9</sub>NaO<sub>5</sub>, 5 g/L; (NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>, 2 g/L; melasa šećerne repe, 50 g/L do 250 g/L (ekvivalentno koncentraciji ukupnih šećera 25 g/L do 125 g/L); destilovana voda, 1 L. Nakon podešavanja pH vrednosti na 6,5 dodatkom 30% rastvora NaOH (w/w), supstrat je

sterilisan u autoklavu na 121°C u trajanju od 15 minuta, a zatim je korišćen kao supstrat za adaptaciju.

### 3.2.6.1. Proces adaptacije *L. paracasei*

Šematski prikaz uspostavljenog protokola za adaptaciju *L. paracasei* NRRL B-4564 u cilju selekcije mutanata za efikasniju proizvodnju mlečne kiseline na kombinovanom otpadnom supstratu je dat na slici 13.



**Slika 13.** Šematski prikaz procesa adaptacije *L. paracasei* NRRL B-4564.

Adaptacija je trajala 29 dana, a tokom tog perioda *L. paracasei* je izlagan postepeno većoj koncentraciji melase. Prva faza adaptacije je podrazumevala uzastopno presejavanje *L. paracasei* u svež adaptacioni medijum koji je sadržao rastuću koncentraciju melase (5%, 10%, 15%, 20%, 25% w/v). Prekonoćna kultura *L. paracasei* NRRL B-4564 je zasejana u 50 mL modifikovanog MRS bujona (5% v/v), a zatim

inkubirana na 41°C u mikroaerofilnim uslovima i uz mešanje (100 obrt/min). Nakon dostizanja kasne eksponencijalne faze (20 h do 24 h), kultura je presejavana u svež adaptacioni medijum. *L. paracasei* je inkubiran tri puta u MRS medijumu istog sastava, nakon čega je presejavan u medijum sa većom koncentracijom melase.

Po završetku prve faze adaptacije, kultura je ezom zasejana na modifikovani MRS agar koji je sadržao 10% (w/v) melase. Nakon inkubacije ezom je selektovano 3 do 4 najvećih kolonija (označenih A-15), kojima je zatim inokulisan svež adaptacioni medijum (25% w/v melase), čime je započeta druga faza adaptacije.

Druga faza adaptacije je vođena u dolivnom režimu. Nakon pada koncentracije šećera u fermentacionom medijumu ispod 70 g/L, svež modifikovani MRS medijum je dolivan sa ciljem podešavanja koncentracije šećera na početnu vrednost (125 g/L). Osim koncentracije šećera, tokom druge adaptacione faze praćen je i broj živih ćelija, a pH vrednost medijuma je podešavana na 6,5 dodatkom 30% rastvora (w/w) NaOH u intervalima od 24 h. Proces adaptacije je prekinut nakon što je uočen značajan pad vijabilnosti ćelija (ispod 10<sup>5</sup> CFU/mL), sporija potrošnja šećera i proizvodnja mlečne kiseline. Tokom kultivacije u dolivnom sistemu, kultura je još dva puta ezom zasejavana na modifikovani MRS agar. Nakon inkubacije izolovane su najveće kolonije (označene A-22 i A-29), koje su zajedno sa A-15, korišćene za pripremu inokuluma, a zatim su testirane u šaržnom i dolivnom postupku proizvodnje mlečne kiseline.

### **3.2.7. Šaržni postupak proizvodnje mlečne kiseline pomoću adaptiranog i neadaptiranog *L. paracasei***

Proizvodnja mlečne kiseline pomoću adaptiranog i neadaptiranog *L. paracasei* ispitivana je u šaržnoj fermentaciji supstrata na bazi krompirove džibre i melase. Krompirova džibra i melasa su mešane u odnosu 1:12 (poglavljje 3.2.5.). Za pripremu inokuluma A-15, A-22 i A-29 je korišćen modifikovani MRS bujon sa dodatkom 5% melase (w/v), dok je za neadaptirani *L. paracasei* korišćen standardni MRS bujon. Inokulumi su pripremani po proceduri opisanoj u poglavlju 3.2.2. Nakon podešavanja pH vrednosti na 6,5 i sterilizacije, ohlađeni supstrat je inokulisan 10% (v/v)

inokulumom adaptiranog, odnosno neadaptiranog *L. paracasei*. Fermentacija je vođena mikroaerofilno na orbitalnoj tresilici (100 obrt/min), na temperaturi od 41°C. Tokom fermentacije, pH vrednost medijuma je održavana u optimalnim granicama (6,2-6,5) dodatkom 30% rastvora NaOH (w/w). Tokom fermentacije praćena je koncentracija ukupnih šećera, mlečne kiseline i broja živih ćelija.

### **3.2.8. Dolivni postupak proizvodnje mlečne kiseline pomoću adaptiranog i neadaptiranog *L. paracasei***

Dolivni postupak proizvodnje mlečne kiseline je ispitivan pomoću adaptiranog i neadaptiranog *L. paracasei*, pri početnoj koncentraciji šećera od 100 g/L. Dolivni postupak mlečno-kiselinske fermentacije je vođen u mikroaerofilnim uslovima na orbitalnoj tresilici (100 obrt/min), na temperaturi od 41°C. Početna zapremina supstrata od 200 mL je inokulisana prekonoćnom kulturom adaptiranog, odnosno neadaptiranog *L. paracasei* u koncentraciji od 10% (v/v). Supstrat za dolivanje je pripreman mešanjem melase i krompirove džibre u odnosu 1:3. Određena zapremina svežeg supstrata je dolivana u 12 h, 24 h, 36 h i 48 h u cilju podešavanja koncentracije ukupnih šećera na početnu vrednost (100 g/L), čime je koncentracija supstrata održavana u optimalnim granicama. U toku fermentacije, pH vrednost medijuma je podešavana na 6,2-6,5 dodatkom 30% rastvora NaOH (w/w) u intervalima od 4 h. Tokom fermentacije praćena je promena koncentracije šećera, mlečne kiseline i broja živih ćelija.

### **3.2.9. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti celih ćelija i unutarćelijskog ekstrakta adaptiranog i neadaptiranog *L. paracasei***

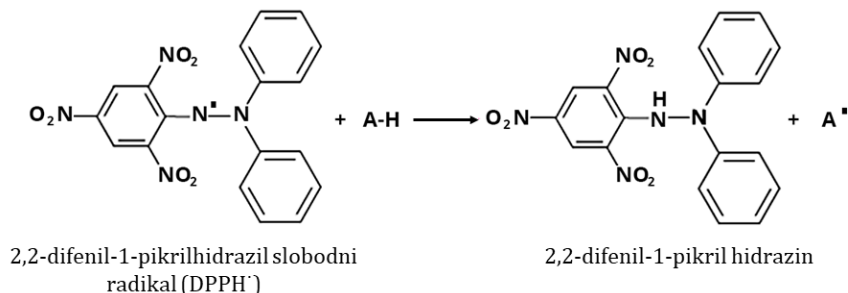
#### **3.2.9.1. Priprema suspenzija celih ćelija i unutarćelijskih ekstrakata**

Prekonoćna kultura potencijalno adaptiranih mutanata, A-15, A-22 i A-29 i neadaptiranog *L. paracasei* pripremljena po prethodno opisanoj proceduri (poglavlje 3.2.2 i poglavlje 3.2.7.) je centrifugirana (6000 × g, 10 min), supernatant dekantovan, a

ćelije isprane dva puta u dejonizovanoj vodi. Isprana biomasa je zatim resuspendovana u dejonizovanoj vodi do koncentracije ćelija  $10^9$  CFU/mL. Pripremljene suspenzije celih ćelija su zatim korišćene za pripremu unutarćelijskih ekstrakata po metodologiji Lin i Yen [175]. Razaranje ćelijskog zida je vršeno ultrazvukom visoke frekvencije (20 kHz), a kao izvor ultrazvičnih talasa korišćena je titanijumska sonotroda prečnika 6 mm (Sonopuls HD 2200, Bandelin electronic, Nemačka). Uzorci su tretirani pri maksimalnoj amplitudi talasa od 35% tokom 60 sekundi, uz konstantno hlađenje, nakon čega je usledilo mirovanje narednih 60 sekundi, a ista procedura je ponavljana pet puta. Nakon tretmana, uzorci su centrifugirani ( $8000 \times g$ , 10 min), a dobijeni supernatanti (unutarćelijski ekstrakti), kao i suspenzije celih ćelija, su korišćeni za procenu antioksidativne aktivnosti.

### 3.2.9.2. Određivanje antioksidativne aktivnosti – sposobnosti inhibicije DPPH<sup>•</sup> radikala

Antioksidativna aktivnost adaptiranog i neadaptiranog *L. paracasei* je ispitivana metodom redukcije DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-pikril hidrazil) radikala [176]. DPPH<sup>•</sup> je stabilan azotni radikal intenzivno ljubičaste boje, koji se u reakciji sa donorom vodonika odnosno antioksidantima redukuje do žuto obojenog difenilpikril hidrazina (DPPH-H) (slika 14). Stepem dekolorizacije ukazuje na potencijal ispitivanog uzorka da neutrališe DPPH<sup>•</sup> radikal, a promena apsorbance rastvora se očitava na talasnoj dužini od 517 nm.



**Slika 14.** Reakcija DPPH<sup>•</sup> radikala i antioksidanata.

Za određivanje sposobnosti inhibicije DPPH<sup>•</sup> radikala pripremljen je 0,15 mM rastvor DPPH u metanolu. U 1 mL pripremljenog DPPH rastvora je dodato 1 mL uzorka (suspenzije ćelija u dejonizovanoj vodi i dobijenih unutarćelijskih ekstrakata). Istovremeno su pripremljeni kontrolni uzorak dodatkom 1 mL metanola u 1 mL uzorka, kao i slepa proba u kojoj je 1 mL metanola dodato u 1 mL DPPH rastvora. Smeše u epruvetama su snažno mešane na vorteksu, a zatim inkubirane na sobnoj temperaturi u mraku tokom 30 minuta. Nakon centrifugiranja ( $8000 \times g$ , 10 min) očitavana je apsorbanca na 517 nm, a kao referentni rastvor je korišćen metanol. Rezultati su izraženi kao procenat inhibicije, odnosno neutralizacije DPPH<sup>•</sup> radikala, prema sledećoj jednačini:

$$\text{Inhibicija DPPH}^{\bullet} \text{ radikala (\%)} = \left(1 - \frac{A_U - A_K}{A_{SP}}\right) \times 100$$

Gde je:

$A_U$  – apsorbanca uzorka

$A_K$  – apsorbanca kontrole

$A_{SP}$  – apsorbanca slepe probe

### **3.2.10. Proizvodnja mlečne kiseline sa recirkulacijom mikrobne biomase imobilisane na lignocelulozne nosače**

#### **3.2.10.1. Priprema lignoceluloznih nosača**

Za imobilizaciju *L. paracasei* NRRL B-4564 su korišćeni lignocelulozni materijali agro-industrijskog porekla: repin rezanac, pivski trop i ljuska suncokreta. Suvi repin rezanac, pivski trop i ljuska suncokreta su prethodno usitnjeni i prosejani kroz laboratorijska sita promera otvora 200  $\mu\text{m}$  do 800  $\mu\text{m}$  u cilju odvajanja frakcija. Frakcija čestica veličine 500  $\mu\text{m}$  je sterilisana u autoklavu na 121°C u trajanju od 15 minuta i nakon toga korišćena za fizičku karakterizaciju i imobilizaciju *L. paracasei*.

### 3.2.10.2. Fizička karakterizacija nosača za imobilizaciju

#### *Određivanje porozne strukture lignoceluloznih nosača*

Parametri porozne strukture nosača, kao što su zapremina pora, specifična površina, srednji prečnik pora, prividna gustina i poroznost, analizirani su živinom porozimetrijom na uređaju CARLO ERBA, model 2000. Merni opseg porozimetra je 7,5 nm do 15000 nm, a radni pritisak je od 0,1 MPa do 200 MPa.

#### *Određivanje indeksa apsorpcije vode i kritične tačke vlažnosti*

Indeks apsorpcije vode i kritična tačka vlažnosti repinog rezanca, pivskog tropa i ljuske suncokreta su određivani prema proceduri opisanoj u studiji Castro i saradnika [177]. Za analizu indeksa apsorpcije vode, 1,25 g uzorka je suspendovano u 15 mL destilovane vode, a zatim je sadržaj mešan staklenim štapićem u trajanju od 10 minuta. Uzorci su centrifugirani ( $3000 \times g$ , 10 min), nakon čega je supernatant dekantovan, a vlažni nosači izmereni. Indeks apsorpcije vode, koji predstavlja masu (g) vode apsorbovane po masi (g) suvog nosača, je određivan na osnovu razlike mase suvog nosača i nosača sa apsorbovanim molekulima vode:

$$\text{Indeks apsorpcije vode (g/g)} = \frac{m_2 - m_1}{m_1}$$

Gde je:

$m_1$  – masa suvog uzorka (g)

$m_2$  – masa vlažnog uzorka (g)

Određivanje kritične tačke vlažnosti je vršeno na vlagomeru KERN MLS-A. Odmerena masa uzorka (1 g) je ravnomerno naneta na aluminijumski tas i postepeno sušena do postizanja zadate temperature od 120°C, a u trajanju od 60 minuta. Kritična tačka vlažnosti (%) je računata na osnovu razlike mase uzorka pre i posle sušenja:



$$\text{Kritična tačka vlažnosti (\%)} = \frac{m_2}{m_1} \times 100$$

Gde je:

$m_1$  – masa vlažnog uzorka (g)

$m_2$  – masa uzorka nakon sušenja (g)

### ***Analiza morfologije nosača***

Analiza morfologije površine nosača i nosača sa imobilisanim ćelijama rađena je skenirajućom elektronskom mikroskopijom (skraćeno SEM engl. *Scanning Electron Microscopy*). SEM je jedna od najčešće korišćenih tehnika za karakterizaciju površinskih i prostornih struktura čvrstih materijala, pri kojoj do stvaranja slike dolazi usled interakcija elektrona i površine ispitivanog uzorka. Pre analize, uzorci lignoceluloznih nosača sa imobilisanim ćelijama su isprani u sterilnom fiziološkom rastvoru, a zatim su sušeni u vakuum sušnici na temperaturi od 37°C u trajanju od 2 h. Uzorci su naneti na aluminijumski nosač, a zatim su u cilju postizanja dobre provodnosti uzorka prekriveni tankim slojem zlata i paladijuma koristeći Polaron SC502 raspršivač. Morfologija površine uzoraka analizirana je uređajem TESCAN Mira3 XMU sa naponom ubrzanja jona od 20 kV.

#### **3.2.10.3. Imobilizacija *L. paracasei* NRRL B-4564**

Prekonoćna kultura *L. paracasei* NRRL B-4564 je zasejana u 200 mL MRS bujona (10% v/v), a zatim inkubirana na 37°C pri anaerobnim uslovima u trajanju od 18 h. Nakon toga, kultura je centrifugirana (3500 × *g*, 10 min), supernatant dekantovan, a ćelije dva puta isprane u sterilnom fiziološkom rastvoru. Isprana biomasa je resuspendovana u 200 mL svežeg MRS bujona u koji je prethodno dodato 3% (w/v) lignoceluloznog nosača. Kultura je zatim inkubirana na 41°C pri mikroaerofilnim uslovima i uz mešanje (100 obrt/min). Posle 24 h, uzorci su centrifugirani (1000 × *g*, 5 min), supernatant je dekantovan, a biomasa *L. paracasei* imobilisana na lignocelulozni

nosač je isprana u sterilnom fiziološkom rastvoru i nakon toga korišćena za inokulaciju supstrata.

#### **3.2.10.4. Ponovljena šaržna fermentacija sa imobilisanom mikrobnom biomasom**

U eksperimentima sa imobilisanom biomasom je korišćena tečna destilerijska džibra. Tečna džibra je dobijena centrifugiranjem industrijske džibre ( $1800 \times g$ , 20 min), zatim odvajanjem tečnog od čvrstog dela, a nakon toga je mešana sa melasom šećerne repe u odnosu 1:12. pH vrednost supstrata je podešena na 6.5 pomoću 30% rastvora NaOH (w/w), nakon čega je supstrat sterilisan u autoklavu na  $121^{\circ}\text{C}$  u trajanju od 15 minuta.

Fermentacija sa imobilisanim ćelijama je vođena u ponovljenom šaržnom režimu sa recirkulacijom imobilisane mikrobne biomase. Baloni zapremine 500 mL su sadržali 200 mL prethodno pripremljenog supstrata koji je inokulisan biomasom *L. paracasei* imobilisanom na lignocelulozni nosač. Uzorci su inkubirani na  $41^{\circ}\text{C}$  pri mikroaerofilnim uslovima na orbitalnoj tresilici (150 obrt/min). Nakon pada koncentracije šećera ispod 20 g/L, fermentacioni medijum je centrifugiran ( $1000 \times g$ , 5 min), supernatant je odliven, a zaostala biomasa *L. paracasei* imobilisana na lignocelulozni nosač je isprana u sterilnom fiziološkom rastvoru. Ispranom imobilisanom biomasom inokulisano je 200 mL svežeg supstrata u cilju započinjanja sledećeg šaržnog ciklusa. Tokom fermentacije, pH vrednost medijuma je održavana u optimalnim granicama (6,2-6,5) dodatkom 30% rastvora NaOH (w/w) u intervalima od 4 h. Šaržni ciklusi su ponavljani do trenutka pada produktivnosti procesa ispod 1 g/L h.

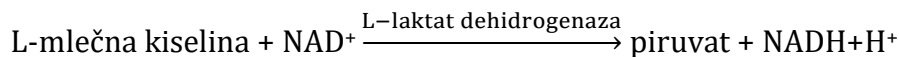
#### **3.2.11. Procena efikasnosti mlečno-kiselinske fermentacije**

Za izračunavanje parametara mlečno-kiselinske fermentacije praćena je koncentracija mlečne kiseline ( $C_{MK}$ ), broj živih ćelija i koncentracija ukupnih šećera ( $C_{\text{š}}$ )

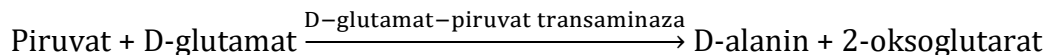
u fermentacionom medijumu. Metoda za određivanje koncentracije ukupnih šećera je prethodno opisana u poglavlju 3.2.1.2.

### 3.2.11.1. Određivanje sadržaja mlečne kiseline

Za kvantitativno određivanje sadržaja mlečne kiseline korišćena je enzimska metoda (Megazyme®, Irska). Princip određivanja mlečne kiseline se zasniva na dve enzimске reakcije. U prvoj reakciji koju katalizuje enzim L-laktat dehidrogenaza (L-LDH), odnosno D-laktat dehidrogenaza (D-LDH), odgovarajući stereoizomer mlečne kiseline (L-mlečna kiselina ili D-mlečna kiselina) se oksiduje do piruvata u prisustvu nikotinamid-adenin dinukleotida (NAD<sup>+</sup>):



Ravnoteža navedene reakcije je pomerena u smere nastanka mlečne kiseline i NAD<sup>+</sup>, pa je u narednom koraku neophodno sprečiti povratnu reakciju. To se postiže konverzijom piruvata u D-alanin i 2-oksoglutarat uz pomoć enzima D-glutamat-piruvat transaminaze (D-GPT) u prisustvu D-glutamata u suvišku:



Na ovaj način je omogućeno spektrofotometrijsko merenje nastalog NADH, koji je proporcionalan količini L-, odnosno D-mlečne kiseline u uzorku. Promena apsorbanse rastvora usled nastalog NADH je očitavana na talasnoj dužini od 340 nm.

#### **Postupak**

Pre analize uzorci su razblaženi u normalnom sudu odgovarajuće zapremine u zavisnosti od očekivane koncentracije mlečne kiseline i deproteinizovani dodatkom rastvora Carrez I i Carrez II, prema prethodno opisanoj proceduri (poglavlje 3.2.1.2.). Svi reagensi za analizu su pripremani i dalje korišćeni prema uputstvu proizvođača. Postupak određivanja mlečne kiseline je izvođen u plastičnim kivetama zapremine 3 mL, a merenje apsorbanse rastvora uzorka i slepe probe je vršeno u odnosu na

destilovanu vodu. Način pripreme uzorka i slepe probe za određivanja sadržaja mlečne kiseline je prikazan u tabeli 7.

**Tabela 7.** Plan dodavanja reagenasa prilikom kvantitativnog određivanja sadržaja mlečne kiseline enzimskom metodom.

	Kiveta 1: Slepa proba	Kiveta 2: Uzorak
Destilovana voda	1,60 mL	1,50 mL
Uzorak	-	0,10 mL
Pufer	0,50 mL	0,50 mL
NAD <sup>+</sup>	0,10 mL	0,10 mL
D-GPT	0,02 mL	0,02 mL
Kivete su zatvarane parafilmom, sadržaj promešan blagim okretanjem kivete nekoliko puta. Nakon 3 minuta očitavana je apsorbance $A_1$ .		
L-LDH ili D-LDH*	0,02 mL	0,02 mL
Kivete su zatvarane parafilmom, sadržaj promešan blagim okretanjem kivete. Nakon 10 minuta očitavana je apsorbance $A_2$ . Ukoliko reakcija nije završena u navedenom periodu, nastavljeno je sa očitavanjem apsorbance u intervalima od 5 minuta, sve dok se vrednost apsorbance rastvora ne ustali.		

\*U zavisnosti od toga koji stereoizomer mlečne kiseline se određuje

Za izračunavanje koncentracija mlečne kiseline neophodno je prvo odrediti razliku očitanih apsorbanci za slepu probu  $A_{SP} = (A_2 - A_1)$  i uzorak  $A_U = (A_2 - A_1)$ . Nakon toga, dobijena razlika apsorbanci slepe probe se oduzima od razlike apsorbanci uzorka ( $A_U - A_{SP}$ ), čime se dobija vrednost  $\Delta A_{MK}$ . Na osnovu dobijene vrednosti za  $\Delta A_{MK}$ , koncentracija mlečne kiseline je računata primenom sledeće jednačine:

$$C = \frac{V \times M}{\epsilon \times d \times v} \times \Delta A_{MK} \times F$$

Gde je:

C – koncentracija mlečne kiseline (g/L)

V – konačna zapremina u kiveti po dodavanju svih reagenasa (2,24 mL)

M – molarna masa mlečne kiseline (90,1 g/mol)

$\varepsilon$  – ekstinkcioni koeficijent NADH na 340 nm (6300 L/mol mL)

d – dužina svetlosnog puta (1 cm)

v – zapremina uzorka (0,1 mL)

F – faktor razblaženja

### 3.2.11.2. Određivanje broja živih ćelija

Broj bakterijskih ćelija je određivan indirektnom metodom brojanja živih ćelija na čvrstoj agarnoj podlozi. Za određivanje broja živih ćelija u fermentacionom medijumu pripremljena je serija decimalnih razblaženja uzorka (slika 15). Nakon toga, 1 mL odgovarajućeg razblaženja je prenet u Petri šolju, a zatim prelišan rastopljenim i ohlađenim MRS agarom. Nakon očvršćavanja podloge, nanet je još jedan sloj agara kako bi se obezbedili mikroaerofilni uslovi za rast bakterija. Petri šolje su inkubirane na 37°C u trajanju od 48 h, nakon čega su brojane izrasle kolonije. Množenjem broja kolonija izbrojanih na Petri šolji sa odgovarajućim razblaženjem dobijen je broj živih ćelija u 1 mL fermentacionog medijuma (CFU/mL).

U eksperimentima sa imobilisanom mikrobnom biomasom, broj živih ćelija je određivan nakon odvajanja imobilisanih ćelija sa površine nosača. Broj imobilisanih ćelija je računat na osnovu razlike između ukupnog broja živih ćelija u fermentacionom medijumu (imobilisane i slobodne ćelije) i broja slobodnih ćelija. Ukratko, 1 mL fermentacionog medijuma je prenet u 9 mL sterilnog fiziološkog rastvora. U cilju određivanja broja slobodnih ćelija ( $N_s$ ) uzorak je kratko promešan na vorteksu, a zatim je određivanje broja slobodnih ćelija nastavljeno po prethodno objašnjenoj proceduri. Odvajanje ćelija sa površine nosača je postignuto snažnim mešanjem istog uzorka na vorteksu u trajanju od 10 minuta. Nakon toga, napravljena je serija decimalnih razblaženja, a zatim je 1 mL odgovarajućeg razblaženja prenet u Petri šolju i prelišan rastopljenim i ohlađenim MRS agarom. Preostali nosač u epruveti je dva puta ispran u sterilnoj destilovanoj vodi, osušen na 37°C, a zatim je njegova masa izmerena. Brojanjem izraslih kolonija nakon inkubacije dobijen je ukupan broj živih ćelija ( $N_U$ ).

Konačno, broj imobilisanih ćelija ( $N_I$ ) izražen kao CFU/mL fermentacionog medijuma je računat oduzimanjem broja slobodnih ćelija od ukupnog broja ćelija:

$$N_I(\text{CFU/mL}) = N_U - N_S$$

Broj imobilisanih ćelija izražen kao CFU/g lignoceluloznog nosača je računat na sledeći način:

$$N_I(\text{CFU/g}) = \frac{N_U - N_S}{m}$$

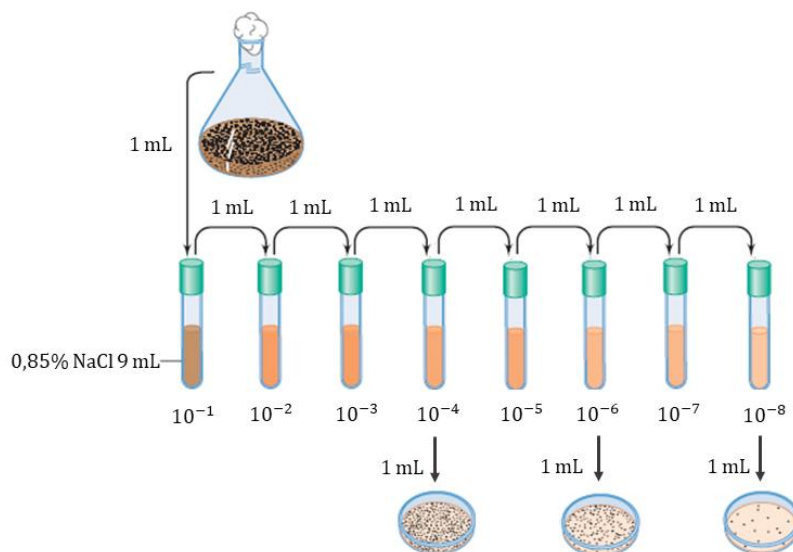
Gde je:

$N_I$  – broj imobilisanih ćelija

$N_U$  – ukupan broj ćelija

$N_S$  – broj slobodnih ćelija

$m$  – masa osušenog nosača u 1 mL fermentacionog medijuma (g)



**Slika 15.** Postupak određivanja broja živih ćelija pravljenjem serije decimalnih razblaženja uzorka i zasejavanjem odgovarajućeg razblaženja na čvrstoj agarnoj podlozi.

### 3.2.11.3. Računski parametri za procenu efikasnosti mlečno-kiselinske fermentacije

Parametri za procenu efikasnosti mlečno-kiselinske fermentacije, prinos (Y), koeficijent prinosa ( $Y_{\text{koef.}}$ ) i produktivnost (P), su određivani računskim putem.

Prinos (Y) predstavlja masu (g) mlečne kiseline proizvedene po masi (g) početnog šećera u medijumu:

$$Y = \frac{m_{\text{MK}}}{m_{\xi}}$$

Gde je:

Y – prinos mlečne kiseline (g/g)

$m_{\text{MK}}$  – masa mlečne kiseline u medijumu (g)

$m_{\xi}$  – početna masa šećera u medijumu (g)

Koeficijent prinosa ( $Y_{\text{koef.}}$ ) predstavlja masu (g) mlečne kiseline proizvedene po masi (g) utrošenog šećera:

$$Y_{\text{koef.}} = \frac{m_{\text{MK}}}{m_{\text{U}\xi}}$$

Gde je:

$Y_{\text{koef.}}$  – koeficijent prinosa (g/g)

$m_{\text{MK}}$  – masa mlečne kiseline u medijumu (g)

$m_{\xi}$  – utrošena masa šećera u toku fermentacije (g)

Produktivnost mlečno-kiselinske fermentacije (P) predstavlja masu (g) mlečne kiseline proizvedene po zapremini (L) fermentacionog medijuma u vremenu fermentacije (h):

$$P = \frac{C_{MK}}{t_F}$$

Gde je:

P – produktivnost (g/L h)

$C_{MK}$  – koncentracija mlečne kiseline u medijumu (g/L)

$t_F$  – vreme fermentacije (h)

### 3.2.12. Analiza lignoceluloznih nosača kao hraniva za životinje

Nakon mlečno-kiselinske fermentacije sa imobilisanim ćelijama, kao sporedni proizvod zaostaju fermentisani lignocelulozni nosači sa imobilisanom biomasom *L. paracasei* NRRL B-4564. U drugom delu istraživanja je ispitivan uticaj mlečno-kiselinske fermentacije na hemijski sastav lignoceluloznih materijala, njihovu nutritivnu vrednost i energetske parametre, na osnovu čega je procenjena mogućnost valorizacije nastalih sporednih proizvoda fermentacije u ishrani preživala.

Po završetku poslednje fermentacione šarže, lignocelulozni nosači sa imobilisanom mikrobnom biomasom su odvojeni od fermentacionog medijuma centrifugiranjem ( $3000 \times g$ , 5 min), a zatim su sušeni u sušnici na  $50^\circ\text{C}$  u trajanju od 24 h. Osušeni fermentisani uzorci su usitnjeni u laboratorijskom mlinu, nakon čega su ispitivani parametri kvaliteta fermentisanih uzoraka sa aspekta primene u ishrani životinja. Istovetnim analizama su podvrgnuti i nefermentisani nosači, a dobijeni rezultati su upoređeni. Svi rezultati su predstavljeni u g/kg suve materije.

Sadržaj suve materije, pepela i masti u fermentisanim i nefermentisanim nosačima je određivan po prethodno opisanim procedurama (poglavlje 3.2.1.1., 3.2.1.6., 3.2.1.8., redom). Sadržaj masti i pepela izražen u g/kg suve materije je računat primenom sledećih jednačina:

$$\text{Masti (g/kg SM)} = \frac{\text{Masti (\%)} \times 1000}{\% \text{ SM}}$$



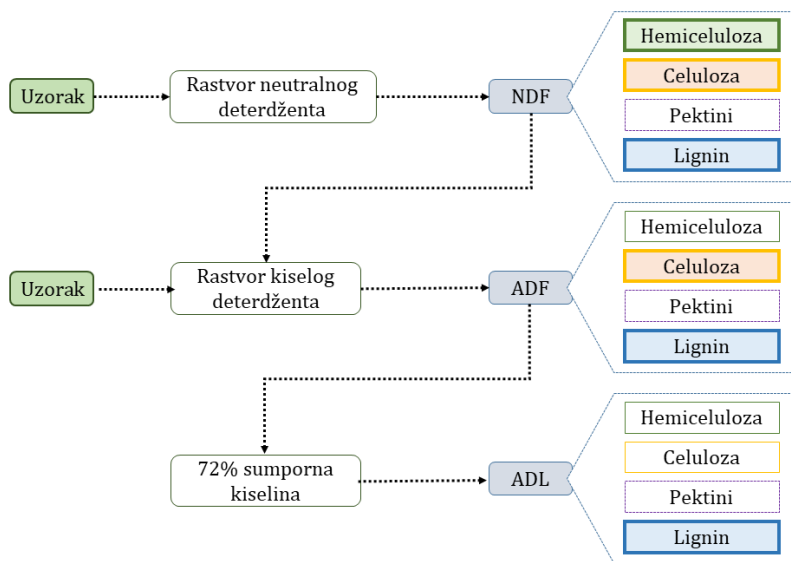
$$\text{Pepeo (g/kg SM)} = \frac{\text{Pepeo (\%)} \times 1000}{\% \text{ SM}}$$

Sadržaj azota je određivan po proceduri opisanoj u poglavlju 3.2.1.4., a množenjem sa korektivnim faktorom 6,25 dobijena je koncentracija sirovih proteina (skraćeno CP engl. *Crude Protein*). Sadržaj sirovih proteina izražen u g/kg suve materije je računat na sledeći način:

$$\text{Proteini (g/kg SM)} = \frac{\text{Proteini (\%)} \times 1000}{\% \text{ SM}}$$

### 3.2.12.1. Određivanje sadržaja vlakana

Za određivanje sadržaja vlakana korišćena je modifikovana metoda Van Soest i saradnika [178], koja je prilagođena za izvođenje na aparatu Fibertec™ 2010 (Foss, Švedska). Šematski prikaz smernica za određivanje frakcija vlakana je dat na slici 16.



**Slika 16.** Frakcije vlakana po Van Soest-u.

### ***Vlakna nerastvorljiva u neutralnim deterdžentima – neutralna deterdžentska vlakna***

Vlakna nerastvorljiva u neutralnim deterdžentima (skraćeno NDF engl. *Neutral Detergent Fibres*) čine komponente ćelijskog zida hemiceluloza, celuloza i lignin. Primenom rastvora neutralnog deterdženta dolazi do hidrolize lakorazgradivih strukturnih ugljenih hidrata (pektina), šećera, proteina i lipida, dok preostali nerazgradivi deo čine NDF, frakcija proteina koja je vezana za lignin i/ili protein oštećen pri visokim temperaturama i nerastvorne mineralne materije. Spaljivanjem uzorka određuje se sadržaj pepela, a zatim se sadržaj NDF izračunava na osnovu razlike mase uzorka pre i posle žarenja.

#### ***Reagensi***

- Rastvor neutralnog deterdženta:
  - 30 g Natrijum-dodecil-sulfata ( $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$ )
  - 18,61 g Dinatrijum etilen diamin tetra-acetata ( $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \times 2\text{H}_2\text{O}$ )
  - 6,81 g Natrijum-borata ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$ )
  - 4,56 g Dinatrijum-hidrogenfosfata ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )
  - 10 mL 2-etoksietanola (etil celosolv) ( $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2$ )
  - Destilovana voda do 1 L
- pH vrednost rastvora je podešena na 6,9-7,1.
- Dekalin ( $\text{C}_{10}\text{H}_{18}$ )
- Aceton ( $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ )
- Natrijum-sulfit ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ )

#### ***Postupak***

U filter lončić je odmereno 1 g do 1,5 g uzorka sa tačnošću  $\pm 0,001$  g ( $m_1$ ), a zatim je dodato 0,5 g natrijum-sulfita. Filter lončić je postavljen na kolonu za hidrolizu, nakon čega je dodato 100 mL rastvora neutralnog deterdženta i 2 mL dekalina. Smeša u koloni je postepeno zagrevana do tačke ključanja, a zatim je zagrevanje nastavljeno narednih

60 minuta. Nakon toga, rastvor je uklonjen vakuum filtracijom, a ostatak uzorka ispran najpre toplom destilovanom vodom, a zatim nekoliko puta acetonom. Uzorak je zatim sušen u sušnici na 105°C do postizanja konstantne mase. Nakon hlađenja u eksikatoru, izmerena je masa filter lončića sa tačnošću ±0,001 g ( $m_2$ ). Filter lončić sa osušenim uzorkom je zatim postavljen u peć za žarenje na 500°C u trajanju od najmanje 3 h. Nakon žarenja, filter lončić je ohlađen u eksikatoru, a zatim izmeren sa tačnošću ±0,001 g ( $m_3$ ). Sadržaj NDF izražen u % je računat primenom sledeće jednačine:

$$\text{NDF (\%)} = \frac{m_2 - m_3}{m_1} \times 100$$

Gde je:

$m_1$  – masa uzorka (g)

$m_2$  – masa filter lončića sa uzorkom posle sušenja (g)

$m_3$  – masa filter lončića sa uzorkom posle žarenja (g)

Sadržaj NDF izražen u g/kg suve materije je računat na sledeći način:

$$\text{NDF (g/kg SM)} = \frac{\text{NDF(\%)} \times 1000}{\% \text{ SM}}$$

### ***Vlakna nerastvorljiva u kiselim deterdžentima – kisela deterdžentska vlakna***

Vlakna nerastvorljiva u kiselim deterdžentima (skraćeno ADF engl. *Acid Detergent Fibres*) predstavljaju najteže svarljivi deo hraniva i sastoje se od celuloze i lignina. Hraniva sa većim sadržajem ADF imaju niže vrednosti svarljive energije, pa se na osnovu toga ubrajaju u hraniva lošijeg kvaliteta. Sadržaj ADF u uzorku se može odrediti direktno tretiranjem uzorka rastvorom kiselog deterdženta ili tretiranjem osušene frakcije uzorka zaostale nakon tretmana rastvorom neutralnog deterdženta.

### **Reagensi**

- Rastvor kiselog deterdženta:
  - 1 L 1 N rastvora sumporne kiseline ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )
  - 20 g Cetil-trimetilamonijum-bromida ( $\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{BrN}$ )
- Dekalin ( $\text{C}_{10}\text{H}_{18}$ )
- Aceton ( $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ )

### **Postupak**

U filter lončić je odmereno 1 g do 1,5 g uzorka sa tačnošću  $\pm 0,001$  g ( $m_1$ ). Filter lončić je postavljen na kolonu za hidrolizu, nakon čega je dodato 100 mL rastvora deterdženta i 2 mL dekalina. Smeša u koloni je zagrevana do tačke ključanja, a zatim je zagrevanje nastavljeno narednih 60 minuta. Nakon toga, rastvor je uklonjen vakuum filtracijom, a ostatak je prvo ispran toplom destilovanom vodom, a zatim acetonom. Uzorak je sušen u sušnici na  $105^\circ\text{C}$  do postizanja konstantne mase. Nakon hlađenja u eksikatoru, izmerena je masa filter lončića sa tačnošću  $\pm 0,001$  g ( $m_2$ ). Filter lončić sa osušenim uzorkom je zatim postavljen u peć za žarenje na  $500^\circ\text{C}$  u trajanju od najmanje 3 h. Nakon žarenja, filter lončić je ohlađen u eksikatoru, a zatim izmeren sa tačnošću  $\pm 0,001$  g ( $m_3$ ). Sadržaj ADF izražen u % je računat primenom sledeće jednačine:

$$\text{ADF (\%)} = \frac{m_2 - m_3}{m_1} \times 100$$

Gde je:

$m_1$  – masa uzorka (g)

$m_2$  – masa filter lončića sa uzorkom posle sušenja (g)

$m_3$  – masa filter lončića sa uzorkom posle žarenja (g)

Sadržaj ADF izražen u g/kg suve materije je računat na sledeći način:

$$\text{ADF (g/kg SM)} = \frac{\text{ADF(\%)} \times 1000}{\% \text{ SM}}$$

### ***Lignin nerastvorljiv u kiselim deterdžentima***

Da bi se odredio sadržaj lignina nerastvorljivog u kiselim deterdžentima (skraćeno ADL engl. *Acid Detergent Lignin*) neophodno je hidrolizom ukloniti svarljive proteine, masti i ugljene hidrate.

#### ***Reagensi***

- Rastvor kiselog deterdženta (pripremljen po prethodno opisanoj proceduri)
- 72% rastvor sumporne kiseline (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
- Dekalin (C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>)
- Aceton (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O)

#### ***Postupak***

U filter lončice je odmereno 1 g do 1,5 g uzorka (m<sub>1</sub>). Filter lončići su postavljeni na kolonu za hidrolizu, nakon čega je dodato 100 mL rastvora kiselog deterdženta i 2 mL dekalina. Smeša u koloni je zagrevana do tačke ključanja, a zatim je zagrevanje uz konstantno ključanje sadržaja nastavljeno narednih 60 minuta. Nakon toga, rastvor je uklonjen vakuum filtracijom, a ostatak ispran najpre toplom destilovanom vodom, a zatim acetonom. Uzorci su sušeni u sušnici na 105°C do postizanja konstantne mase, a zatim su postavljeni u peć za žarenje na 500°C u trajanju od najmanje 3 h. Nakon hlađenja u eksikatoru, u filter lončice je dodata 72% sumporna kiselina toliko da uzorak bude potopljen. Uzorci su ostavljeni na sobnoj temperaturi u trajanju od 3 h uz povremeno mešanje staklenim štapićem. Filter lončići su ispirani destilovanom vodom, preneti u Petri šolje, a zatim sušeni u sušnici na 105°C do konstantne mase. Nakon hlađenja u eksikatoru, izmerena je masa filter lončića sa tačnošću ±0,001 g (m<sub>2</sub>). Nakon toga, filter lončići su postavljeni u peć za žarenje na 500°C u trajanju od najmanje 3 h, ohlađeni u eksikatoru i izmereni sa tačnošću ±0,001 g (m<sub>3</sub>). Sadržaj ADL izražen u % je računat primenom sledeće jednačine:

$$\text{ADL (\%)} = \frac{m_2 - m_3}{m_1} \times 100$$

Gde je:

$m_1$  – masa uzorka (g)

$m_2$  – masa filter lončića sa uzorkom posle sušenja (g)

$m_3$  – masa filter lončića sa uzorkom posle žarenja (g)

Sadržaj ADF izražen u g/kg suve materije je računat na sledeći način:

$$\text{ADL (g/kg SM)} = \frac{\text{ADL (\%)} \times 1000}{\% \text{ SM}}$$

### 3.2.12.2. Određivanje sadržaja proteina nerastvorljivog u neutralnim i kiselim deterdžentima

Protein koji je nerastvorljiv u rastvoru neutralnog deterdženta (skraćeno NDIP engl. *Neutral Detergent Insoluble Protein*) predstavlja frakciju proteina koja je vezana za ćelijski zid biljnog materijala i kao takva se relativno sporo razlaže u buragu preživara. Protein nerastvorljiv u rastvoru kiselog deterdženta (skraćeno ADIP engl. *Acid Detergent Insoluble Protein*) čini protein koji je vezan za lignin, zatim kompleksi polifenola i proteina, kao i proizvodi Mailardove reakcije. Smatra se da je ova frakcija proteina nerazgradiva u digestivnom traktu preživara i kao takva nedostupna za životinje. Sadržaj NDIP i ADIP u lignoceluloznim materijalima je određivan nakon tretiranja uzorka rastvorom neutralnog, odnosno kiselog deterdženta (poglavlje 3.2.12.1.). Sadržaj azota u zaostalim nerazgradivim frakcijama je određivan metodom po Kjeldahl-u (poglavlje 3.2.1.4.), a množenjem sa korektivnim faktorom 6,25 dobijen je sadržaj NDIP i ADIP. Sadržaj NDIP i ADIP izražen u g/kg suve materije je računat primenom sledećih jednačina:

$$\text{NDIP (g/kg SM)} = \frac{\text{NDIP(\%)} \times 1000}{\% \text{ SM}}$$

$$\text{ADIP (g/kg SM)} = \frac{\text{ADIP(\%)} \times 1000}{\% \text{ SM}}$$

### 3.2.12.3. Određivanje *in vitro* svarljivosti suve materije

*In vitro* svarljivosti suve materije je određivana pepsin-celulaznom metodom koju su uspostavili Aufréré and Demarquilly [179].

#### **Reagensi**

- 0,1% rastvor pepsina:  
1 g pepsina (2000 FIP  $\mu\text{g}^{-1}$ , Merck®)  
1 L 0,1 M rastvora hlorovodonične kiseline (HCl)
- 0,1% rastvor celulaze:  
1 g celulaze „Onozuka R-10”  
1 L acetatnog pufera pH=4,8

#### **Postupak**

Pre analize, fermentisani i nefermentisani repin rezanac, pivski trop i ljuska suncokreta su usitnjeni u mlinu sa sitom promera otvora 0,8 mm do 1mm, a zatim je u njima određen sadržaj suve materije po proceduri opisanoj u poglavlju 3.2.1.1.

Filter lončići su izžareni 3 h na 500°C, ohlađeni u eksikatoru, a zatim je svaki filter lončić izmeren sa tačnošću od  $\pm 0,0001$  g ( $m_1$ ). Nakon toga, u filter lončić je odmereno 0,5 g uzorka u kome je prethodno određen sadržaj suve materije. Filter lončići su sa donje strane zatvoreni silikonskim čepom, a zatim je u svaki lončić dodato 50 mL rastvora pepsina koji je prethodno zagrejan na 40°C. Nakon zatvaranja gornje strane filter lončića silikonskim zatvaračima, uzorci su inkubirani na 40°C tokom 24 h. Sadržaj filter lončića je blago mešan nakon 1 h, 6 h i 22 h inkubacije. Po isteku 24 h, filter lončići su sušeni u sušnici na 80°C u trajanju od 30 min, da bi se hidrolizovao skrob u uzorku. Nakon toga, rastvor pepsina u uzorcima je uklonjen vakuum filtracijom, a zaostali talog ispiran destilovanom vodom, prethodno zagrejanom na 80°C, sve dok filtrat pri ispiranju ne postane bistar.

Lončići su ponovo zatvoreni sa donje strane i u svaki je dodato 50 mL sveže pripremljenog rastvora celulaze prethodno zagrejanog na 40°C. Nakon zatvaranja gornje strane filter lončića silikonskim zatvaračama, uzorci su inkubirani na 40°C tokom 24 h. Sadržaj filter lončića je blago promešan nakon 1 h, 6 h i 22 h inkubacije. Po isteku 24 h, rastvor celulaze u uzorcima je uklonjen vakuum filtracijom, a zaostali talog ispiran destilovanom vodom, prethodno zagrejanom na 80°C, sve dok filtrat pri ispiranju ne postane bistar. Filter lončići sa zaostalim talogom su sušeni u sušnici na 105°C tokom 48 h. Nakon hlađenja u eksikatoru, filter lončići su izmereni sa tačnošću od ±0,0001 g (m<sub>2</sub>). *In vitro* svarljivost suve materije (%) je računata primenom sledeće jednačine:

$$\text{Svarljivost SM (\%)} = \frac{\text{SM} - (m_2 - m_1)}{\text{SM}} \cdot 100$$

Gde je:

SM – sadržaj suve materije u uzorku (g)

m<sub>1</sub> – masa praznog filter lončića (g)

m<sub>2</sub> – masa filter lončića sa uzorkom posle sušenja (g)

#### **3.2.12.4. Izračunavanje ostalih parametara za procenu kvaliteta hraniva**

Sadržaj celuloze, hemiceluloze i nestrukturanih ugljenih hidrata (skraćeno NFC engl. *Non-Fibrous Carbohydrates*) je računat primenom sledećih jednačina [180]:

$$\text{Celuloza (\% SM)} = \text{ADF} - \text{ADL}$$

$$\text{Hemiceluloza (\% SM)} = \text{NDF} - \text{ADF}$$

$$\text{NFC (\% SM)} = 100 - ((\text{NDF} - \text{NDIP}) + \text{CP} + \text{Masti} + \text{Pepeo})$$



### 3.2.12.5. Određivanje energetske vrednosti hraniva

Energetske vrednosti lignoceluloznih nosača su računane na osnovu američkog neto energetskog standardnog proračuna za krave u laktaciji i goveda u tovu [180,181]. Za izračunavanje neto energije hraniva potrebno je prethodno izračunati sadržaj svarljive energije pri konzumiranju energije na nivou uzdržnih potreba ( $DE_{1x}$ ). Za izračunavanje sadržaja svarljive energije na nivou uzdržnih potreba i ukupne svarljive hranljive materije (skraćeno TDN engl. *Total Digestible Nutrients*) koriste se podaci o hemijskom sastavu hraniva, odnosno o sadržaju NDF, proteina, pepela, masti, ADL i NFC, zajedno sa njihovim teorijskim koeficijentima svarljivosti, kao bi se predvideo teorijski sadržaj svarljivih hranljivih materija u ispitivanom hranivu. TDN na nivou uzdržnih potreba ( $TDN_{1x}$ ) je računat primenom jednačina koje su uspostavili Weiss i saradnici [182], a koje su prihvaćene kao standardne od strane američkog Nacionalnog istraživačkog saveta (skraćeno NRC engl. *National Research Council*). Za većinu hraniva, kao što su kabasta i koncentrovana hraniva, sporedni proizvodi prehrambene i agro-industrije,  $TDN_{1x}$  se određuje na sledeći način:

$$TDN_{1x} (\% SM) = tdNFC + tdCP + (tdMasti \times 2,25) + tdNDF - 7$$

Gde su potrebni parametri računati primenom sledećih jednačina:

tdNFC (% SM) (svarljiva frakcija nestrukturnih ugljenih hidrata)

$$= 0,98 \times (100 - ((NDF - NDIP) + CP + Masti + Pepeo)) \times PAF^*$$

tdCP (% SM) (svarljivi sirovi proteini)\*\*

$$= (1 - (0,4 \times (ADIP/CP))) \times CP$$

tdMasti (% SM) (svarljive masti)

$$= (Masti - 1) \text{ (ako je sadržaj masti } < 1, \text{ onda je tdMasti} = 0)$$

\* PAF (engl. *Processing Adjustment Factor*) je korekcija koja se uzima u obzir u skladu sa obrađenošću hraniva i čija vrednost za ispitivane uzorke iznosi 1.

\*\* Data jednačina se primenjuje za izračunavanje sadržaja svarljivih proteina u koncentrovanim hranivima. U slučaju kabastih hraniva primenjuje se sledeća jednačina:  $tdCP (\%SM) = CP \times e^{(1,2 \times (ADIP/CP))}$ .

tdNDF (% SM) (svarljiva vlakna nerastvorna u neutralnom deterdžentu)

$$= 0,75 \times (\text{NDF} - \text{NDIP} - \text{ADL}) \times (1 - (\text{ADL}/(\text{NDF} - \text{NDIP}))^{0,667})$$

Svarljiva energija na nivou uzdržnih potreba ( $DE_{1x}$ ) je računata primenom sledeće jednačine:

$$DE_{1x} \text{ (Mcal/kg)} = (\text{tdNFC}/100) \times 4,2 + (\text{tdNDF}/100) \times 4,2 + (\text{tdCP}/100) \times 5,6 + (\text{tdMasti}/100) \times 9,4 - 0,3$$

Prema modelu NRC 2001 [180], svarljivost hraniva je niža ukoliko životinje konzumiraju obrok u količini većoj od uzdržnih potreba. U tom slučaju je neophodno uzeti u obzir vrednost za korekciju (skraćeno DF engl. *Discount Factor*) koja se računa za svaki nivo proizvodnih potreba iznad nivoa uzdržnih potreba. DF ne može biti  $< 0$ . Ako je TDN obroka  $< 60\%$ , onda je  $DF = 1$ . Prema NRC 2001 modelu, DF se ne odnosi na pojedinačna hraniva već na ceo obrok. Energetske vrednosti pojedinačnih hraniva se mogu predvideti pod pretpostavkom da  $TDN_{1x}$  celog obroka iznosi  $74\%$ . Shodno tome, ukoliko npr. krave konzumiraju obrok u količini tri puta većoj od uzdržnih potreba, DF se računa primenom sledeće jednačine:

$$DF = (\text{TDN}_{1x} - (0,18 \times \text{TDN}_{1x} - 10,3)) \times \text{unos}/\text{TDN}_{1x}$$

Gde je:

Unos =  $3 - 1 = 2$  (treći nivo proizvodnih potreba – uzdržne potrebe)

$TDN_{1x} = 74\%$  (prosečna vrednost za ceo obrok)

Sadržaj svarljive energije hraniva za konzumiranje na trećem nivou proizvodnih potreba ( $DE_{3x}$ ) se određuje na sledeći način:

$$DE_{3x} \text{ (Mcal/kg)} = DE_{1x} \times DF$$

Sadržaj metaboličke energije pri konzumiranju hraniva na trećem nivou produktivnosti ( $ME_{3x}$ ) se određuje na osnovu izračunatih vrednosti za  $DE_{3x}$ , a u zavisnosti od sadržaja masti u hranivu.

Ako je sadržaj masti  $< 3\%$ :

$$ME_{3x} \text{ (Mcal/kg)} = 1,01 \times DE_{3x} - 0,45$$

Ako je sadržaj masti > 3%:

$$ME_{3\times} \text{ (Mcal/kg)} = 1,01 \times DE_{3\times} - 0,45 + 0,0046 \times (\text{Masti} - 3)$$

Sadržaj neto energije za laktaciju pri konzumiranju hraniva na datom nivou produktivnosti ( $NE_{L3\times}$ ) se određuje na osnovu izračunatih vrednosti za  $ME_{3\times}$ , a u zavisnosti od sadržaja masti.

Ako je sadržaj masti < 3%:

$$NE_{L3\times} \text{ (Mcal/kg)} = (0,703 \times ME_{3\times}) - 0,19$$

Ako je sadržaj masti > 3%:

$$NE_{L3\times} \text{ (Mcal/kg)} = (0,703 \times ME_{3\times}) - 0,19 + (((0,097 \times ME_{3\times} + 0,19)/97) \times (\text{Masti} - 3))$$

Vrednosti neto energije hraniva za održanje ( $NE_M$ ) i neto energije za porast ( $NE_G$ ) su računane primenom jednačina datih u modelu NRC 1996 za tovna goveda [181], a koje su zadržane u neto energetsom sistemu NRC 2001 za krave u laktaciji.

Neto energija za održanje:

$$NE_M \text{ (Mcal/kg)} = 1,37 \times ME - 0,138 \times ME^2 + 0,0105 \times ME^3 - 1,12$$

Neto energija za porast:

$$NE_G \text{ (Mcal/kg)} = 1,42 \times ME - 0,174 \times ME^2 + 0,0122 \times ME^3 - 1,65$$

Metabolička energija u gore navedenim jednačinama je računata na sledeći način:

$$ME = 0,82 \times DE_{1\times}$$

### 3.2.13. Određivanje *in vitro* probiotskih karakteristika *L. paracasei*

U završnom delu disertacije ispitivan je probiotski potencijal *L. paracasei* NRRL B-4564 primenom sledećih *in vitro* testova:

1. Preživljavanje u simuliranim uslovima GIT-a preživara
2. Antimikrobna aktivnost
3. Sposobnost autoagregacije
4. Osetljivost na antibiotike

### 3.2.13.1. Preživljavanje u simuliranim uslovima gastro-intestinalnog trakta preživara

Preživljavanje *L. paracasei* u simuliranim uslovima GIT-a je ispitivano po metodologiji Dogi i saradnika [183], pri čemu su simulirani tipični uslovi u buragu, sirištu i tankom crevu preživara. Simulirani sok buraga je pripreman mešanjem sledećih sastojaka: glukoza, 0,5 g/L; celobioza, 0,5 g/L; rastvorljivi skrob, 0,5 g/L;  $\text{Na}_2\text{S}\times 9\text{H}_2\text{O}$ , 0,25 g/L; cistein $\times\text{HCl}\times\text{H}_2\text{O}$ , 0,25 g/L; rezaurin, 0,001 g/L;  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 4 g/L; triptikaza, 2 g/L; kvašćev ekstrakt, 0,5 g/L; hemin, 0,001 g/L; smeša isparljivih masnih kiselina (sirćetna, propionska, buterna, izobuterna, valerinska, izovalerinska), 3,1 mL/L; rastvor mineralnih soli, 37,5 mL/L i destilovana voda, 1 L [184]. Nakon rastvaranja svih sastojaka, anoksični uslovi u pripremljenom rastvoru su obezbeđeni uvođenjem 100%  $\text{CO}_2$ . pH vrednost je podešena na 6,8, a zatim je rastvor sterilisan u autoklavu na 121°C u trajanju od 15 minuta. Za simulaciju soka sirišta korišćen je fiziološki rastvor u koji je dodat pepsin u koncentraciji od 3 g/L, a pH vrednost podešena na 3,0 pomoću 1 M rastvora HCl. Za simulaciju intestinalnih uslova korišćen je fiziološki rastvor u koji je dodato 1 g/L tripsina, 1 g/L  $\alpha$ -himotripsina i 3 g/L žučnih soli, a pH vrednost podešena na 8,0 pomoću 1 M rastvora NaOH. Nakon pripreme rastvori su sterilisani filtriranjem kroz 0,2  $\mu\text{m}$  filter.

Prekonoćna kultura *L. paracasei* (5% v/v) zasejana je u 50 mL simuliranog soka buraga, a zatim inkubirana na 39°C u anaerobnim uslovima u trajanju od 24 h. Nakon 24 h, ćelije su odvojene od tečnog medijuma centrifugiranjem (10000  $\times g$ , 10 min), a zatim resuspendovane u istoj zapremini simuliranog soka sirišta. Kultura je inkubirana na temperaturi od 37°C, uz mešanje u cilju simuliranja peristaltičkih pokreta, u trajanju od 3 h. Nakon toga, ćelije su odvojene od tečnog medijuma centrifugiranjem, resuspendovane u istoj zapremini simuliranog intestinalnog soka, a zatim je kultura inkubirana 4 h na temperaturi od 37°C i uz mešanje. Za određivanje broja živih ćelija, 1 mL kulture je sterilno uzorkovan neposredno po zasejavanju simuliranog soka buraga (0 h) i u određenim vremenskim intervalima tokom inkubacije u simuliranim uslovima GIT-a. Nakon pravljenja serije decimalnih razblaženja, broj preživelih ćelija je

određivan metodom brojanja izraslih kolonija na čvrstoj agarnoj podlozi. Procenat preživljavanja je računat na osnovu broja živih ćelija nakon prolaska kroz simulirani sok buraga (24 h), sok sirišta (27 h) i intestinalni sok (31 h) u odnosu na početni broj ćelija (0 h).

### 3.2.13.2. Antimikrobna aktivnost

Prekonoćna kultura *L. paracasei* je centrifugirana ( $6000 \times g$ , 10 min), a zatim je antimikrobna aktivnost dobijenog supernatanta ispitivana difuzionom metodom sa bunarčićima [185]. U cilju ispitivanja hemijske prirode antimikrobne supstance dobijeni supernatant je tretiran na dva načina. Kako bi se utvrdilo da li je antimikrobni efekat izazvan proizvedenom mlečnom kiselinom, pH vrednost supernatanta je podešena na 7,0 dodatkom 1 M rastvora NaOH, a zatim je supernatant filtriran kroz 0,2  $\mu\text{m}$  filter. Da bi se ispitalo da li je inhibitorna aktivnost posledica prisustva antimikrobnih peptida (bakteriocina), u neutralisan supernatant je dodato 1 g/L enzima pronasa E. Po dodatku enzima, supernatant je inkubiran na 37°C u trajanju od 3 h, a zatim filtriran kroz 0,2  $\mu\text{m}$  filter.

U Petri šolje u koje je prethodno razliven sloj agara su postavljeni keramički bunarčići, prečnika 5 mm, nakon čega je nanet sloj odgovarajućeg soft agara (0,7% w/v) inokulisanog sa 1% v/v prekonoćne kulture indikatorskog soja na koji je testirana antimikrobna aktivnost *L. paracasei*. Kao indikator mikroorganizmi korišćeni su: *B. cereus* ATCC 11778, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 2592, *S. enteritidis* ATCC 13076 i *C. albicans* ATCC 10259. Nakon očvršćavanja soft agara, bunarčići su izvađeni, a u formirane otvore je dodato po 100  $\mu\text{L}$  ispitivanog supernatanta. Petri šolje su ostavljene 2 h na sobnoj temperaturi, a zatim su inkubirane 24 h na 37°C. Pojava svetle (halo) zone oko bunarčića je znak antimikrobne aktivnosti *L. paracasei* prema ispitivanom patogenom soju, a osetljivost patogenog mikroorganizma je kvantifikovana merenjem prečnika zone inhibicije rasta u mm.

### 3.2.13.3. Autoagregacija

Sposobnost autoagregacije *L. paracasei* je određivana spektrofotometrijskom metodom po proceduri Collado i saradnika [186]. Prekonoćna kultura *L. paracasei* je centrifugirana ( $6000 \times g$ , 10 min), supernatant je dekantovan, a ćelije isprane u sterilnom PBS puferu (PBS: 130 mM natrijum-hlorid, 10 mM natrijum-fosfat, pH 7,2). Isprana biomasa je zatim resuspendovana u istom puferu do apsorbance ( $A_{600 \text{ nm}}$ )  $0,25 \pm 0,25$  čime je koncentracija ćelija u suspenziji podešena na  $10^7$  CFU/mL do  $10^8$  CFU/mL. Suspenzije ćelija *L. paracasei* (4 mL) su kratko promešane na vorteksu, a zatim inkubirane na  $37^\circ\text{C}$ . Kinetika autoagregacije je praćena merenjem apsorbance suspenzija u različitim vremenskim intervalima (0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 20 h i 24 h). Procenat autoagregacije je računat na sledeći način:

$$\text{Autoagregacija (\%)} = \left(1 - \frac{A_t}{A_0}\right) \times 100$$

Gde je:

$A_t$  – apsorbanca suspenzije na 600 nm u određenom vremenu

$A_0$  – apsorbanca suspenzije na 600 nm u 0 h

### 3.2.13.4. Antibiogram test

Osetljivost *L. paracasei* na devet različitih antibiotika je ispitivana disk difuzionom metodom prema preporukama Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (skraćeno CLSI engl. *Clinical and Laboratory Standards Institute*) [187]. U Petri šolje je nanet sloj rastopljenog i ohlađenog soft agara (0,7% w/v), koji je prethodno zasejan sa 1% (v/v) prekonoćne kulture *L. paracasei*. Nakon očvršćavanja soft agara, na površinu su postavljane test tablete antibiotika prečnika 10 mm (Neo-Sensitabs®, Danska). Petri šolje su ostavljene 30 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim su inkubirane 24 h na  $37^\circ\text{C}$ . Nakon inkubacije, rezultati su očitavani merenjem prečnika

zone inhibicije rasta u mm, na osnovu čega je utvrđivana kategorija osetljivosti na ispitivani test antibiotik. *L. paracasei* je kvalitativno klasifikovan kao osetljiv (S), umereno osetljiv (I) ili rezistentan (R) prema kriterijumima Instituta za kliničke i laboratorijske standarde za Gram-pozitivne mikroorganizme (tabela 8).

**Tabela 8.** Kriterijumi za procenu osetljivosti mikroorganizma na antibiotike.

Test antibiotik	Sadržaj antibiotika u test tableti	Prečnik zone inhibicije (mm)		
		S	I	R
Eritromicin	15 µg	≥23	22–14	≤13
Tetraciklin	30 µg	≥15	14–12	≤11
Penicilin	10 IU	≥26	25–13	≤12
Ampicilin	10 µg	≥17	16–14	≤13
Vankomicin	30 µg	≥17	16–15	≤14
Gentamicin	10 µg	≥15	14–13	≤12
Streptomycin	10 µg	≥15	14–12	≤11
Kanamycin	30 µg	≥18	17–14	≤13
Nalidiksinska kiselina	30 µg	≥19	17–14	≤13

#### 3.2.14. Statistička obrada eksperimentalnih rezultata

Sva ispitivanja su vršena u triplikatu. Analiza dobijenih rezultata je rađena pomoću OriginPro® 8.5 softvera (Northampton, USA), a svi rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ± standardna devijacija. Jednostruka analiza varijanse i Tukey test su korišćeni u cilju procene statističkog značaja dobijenih rezultata. Razlike su smatrane statistički značajnim ukoliko je  $P$  vrednost bila manja od 0,05 ( $P < 0,05$ ).

## 4. REZULTATI I DISKUSIJA

### 4.1. Hemijski sastav krompirove džibre i melase šećerne repe kao supstrata za mlečno-kiselinsku fermentaciju

Prilikom formulacije supstrata na bazi otpadnih i sporednih sirovina poreklom iz drugih tehnoloških procesa jedan od najvećih izazova je zadovoljiti nutritivne potrebe proizvodnog mikroorganizma i omogućiti dobijanje visokih koncentracija i prinosa mlečne kiseline. Kao što je poznato, otpadni i sporedni industrijski proizvodi su nestandardne sirovine, njihov hemijski sastav zavisi od mnogo faktora i nikada nije postojan. Iz tog razloga veoma je važno utvrditi njihov kvalitet i ustanoviti optimalan sastav supstrata za dobijanje maksimalnih prinosa proizvoda. U cilju formulacije supstrata na bazi krompirove džibre i melase i definisanja efikasnog postupka proizvodnje mlečne kiseline kombinovanjem ova dva sporedna agro-industrijska proizvoda, najpre je izvršena njihova detaljna hemijska karakterizacija. Osnovni hemijski sastav destilerijske džibre i melase šećerne repe je prikazan u tabeli 9. Sadržaj različitih ugljenih hidrata,  $\alpha$ -amino azota i mineralnih materija u melasi, džibri i kombinovanom supstratu koji je korišćen za mlečno-kiselinsku fermentaciju je prikazan u tabeli 10.

Destilerijska džibra je otpadna voda koja zaostaje nakon izdvajanja etanola destilacijom. Pored toga što se u njenom sastavu nalaze komponente supstrata koji je inicijalno korišćen za proizvodnju etanola, džibra sadrži i inaktiviranu biomasu kvasca, uključujući i proizvode njegovog metabolizma nastalih tokom fermentacije. Destilerijska džibra koja je korišćena u ovom istraživanju je nastala u postupku proizvodnje etanola na otpadnom krompiru. Hemijskom analizom je utvrđeno da je



sadržaj azota u krompirovoj džibri iznosio 0,18%, računato na ukupnu masu džibre (tabela 9), pri čemu je izvesno da deo azota potiče od biomase kvasca, a deo od supstrata na bazi krompira koji je podvrgnut alkoholnoj fermentaciji. Poređenjem sadržaja azota krompirove džibre i standardnog medijuma za rast BMK, koji se kreće u granicama od 0,01 do 0,21% [188], može se zaključiti da je krompirova džibra adekvatan izvor azota za nutritivno zahtevne mikroorganizme kao što su BMK.

**Tabela 9.** Hemijski sastav krompirove džibre i melase šećerne repe.

Parametar	% (w/w)	
	Krompirova džibra	Melasa šećerne repe
Suva materija	5,74±0,14	83,6±0,89
Ukupan šećer	1,57±0,26	53,2±0,51
Ukupan azot	0,18±0,03	1,31±0,16
Masti	0,31±0,05	0,28±0,07
Pepeo	0,89±0,09	11,9±0,67

Sa druge strane, sadržaj ukupnog azota u melasi šećerne repe je iznosio 1,31%. U literaturi se mogu naći podaci da sadržaj azota u melasi varira u granicama od 0,8% do 2,2%, računato na ukupnu masu melase [189,190]. Veći deo azotnih materija u melasi šećerne repe čini betain, dok preostali deo azota ulazi u sastav aminokiselina, nitrata, amida, melanoidina i soli amonijaka [189–191]. Analizom uzoraka melase iz nekoliko različitih fabrika šećera tokom više sezona je pokazano da sadržaj ukupnog azota u melasi znatno varira iz godine u godinu i da postoje značajne razlike u sadržaju azota melase među fabrikama šećera. Međutim, zapaženo je da je sadržaj betaina konstantan, pri čemu azot betaina iznosi 33% do 43% od ukupnog azota melase [189,190]. Analizom melase u kojoj je sadržaj ukupnog azota iznosio 1,61% utvrđeno je da je 37,3% azota poreklom iz betaina, dok je amino azot činio 41,6% [190]. S obzirom da mikroorganizmi u svojim metaboličkim putevima ne mogu da iskoriste azot betaina, kriterijum za ocenu pogodnosti melase za fermentacionu industriju nije

ukupan sadržaj azota, već sadržaj azota koji se nalazi u sastavu aminokiselina i to slobodnih, a koji mikroorganizmi lako asimiluju [189].

Da bi se koristila kao sirovina u fermentacionoj industriji melasu je neophodno razblažiti do određenog sadržaja šećera. Kao takva, melasa nije potpuna sirovina za gajenje mikroorganizama, jer ne sadrži sva potrebna jedinjenja u dovoljnim koncentracijama. Zbog toga, u zavisnosti od nutritivnih potreba proizvodnog mikroorganizma, razblaženoj melasi je neophodno dodati mineralne soli, azotna jedinjenja organske ili neorganske prirode, a u pojedinim slučajevima i stimulatore rasta, poput vitamina B grupe, nikotinske kiseline, biotina i dr. [189]. U kombinovanom supstratu na bazi destilerijske džibre i melase (tabela 10), krompirova džibra pre svega ima ulogu dodatnog izvora  $\alpha$ -amino azota, što je od velikog značaja imajući u vidu da su BMK nutritivno zahtevni mikroorganizmi, pre svega u pogledu organskih izvora azota, kao što su slobodne amino kiseline i peptidi.

**Tabela 10.** Sadržaj šećera,  $\alpha$ -amino azota i mineralnih materija u melasi, džibri i kombinovanom supstratu koji je korišćen za mlečno-kiselinsku fermentaciju.

Parametar	Melasa	Džibra	Melasa + džibra (1:12)
Šećeri (g/L)			
Saharoza	506±2,31	-	54,8±2,58
Glukoza	201±2,39	14,7±0,67	34,2±1,99
Fruktoza	40,8±1,24	-	7,25±1,05
Rafinoza	2,69±0,88	-	0,28±0,16
$\alpha$ -amino azot (mg/L)	1739±0,54	195±0,72	359±1,45
Metali (mg/L)			
K	20803±0,97	673±0,88	2630±0,79
Na	12516±0,85	439±0,79	1675±0,94
Ca	4608±0,77	561±0,67	980±0,85
P	120±0,44	443±0,54	405±0,52
Fe	105±0,35	26,3±0,25	34,5±0,69
Mn	88,5±0,21	16,2±0,06	24,9±0,74
Mg	82,3±0,68	106±0,12	107±0,97
Zn	4,26±0,09	2,05±0,21	2,34±0,41
Ni	1,09±0,18	-	0,13±0,09
Cu	0,57±0,09	0,64±0,10	0,59±0,08

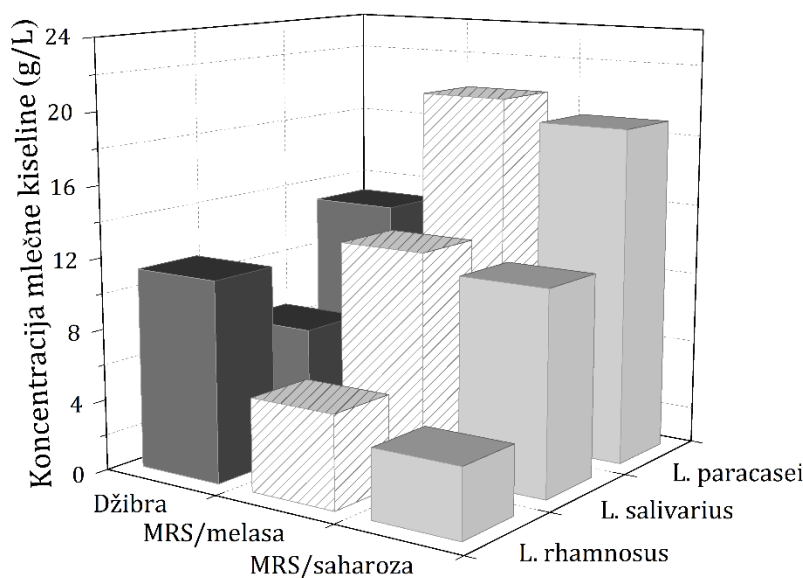
Ranija istraživanja su pokazala da pojedina lipidna jedinjenja prisutna u manjim koncentracijama deluju stimulatивно na rast mikroorganizama, uključujući BMK [192–194], pa sadržaj masti u melasi i džibri može imati povoljan uticaj na mlečno-kiselinsku fermentaciju.

Koncentracija šećera u krompirovoj džibri je očekivano niska imajući u vidu da je glukoza nastala hidrolizom skroba efikasno utrošena za proizvodnju etanola. Sa druge strane, zbog visokog sadržaja šećera, melasa se tradicionalno koristi u fermentacionoj industriji, a u najvećoj meri za proizvodnju pekarskog kvasca i etanola. Ugljeni hidrati predstavljaju glavni deo melase šećerne repe i prema literaturnim podacima njihov sadržaj u melasi se kreće u granicama od 50% do 55%, pri čemu najveći deo šećera čini saharoza, dok su invertni šećer i rafinoza prisutni u malim koncentracijama [189,190]. Kao što je prikazano u tabelama 9 i 10, analizom je utvrđeno da koncentracija ukupnih šećera u melasi iznosi 53,2%, odnosno 750 g/L, što odgovara vrednostima koje se mogu naći u literaturi (51,2%, 715 g/L) [195,196]. Osim saharoze, u melasi je detektovana značajna koncentracija invertnog šećera (glukoze i fruktoze), a koji je najverovatnije nastao hidrolizom saharoze u postupku proizvodnje šećera i/ili tokom skladištenja i čuvanja melase. U krompirovoj džibri i melasi šećerne repe je detektovano prisustvo veoma važnih mineralnih materija (tabela 10). Ranija istraživanja su pokazala da Mg, Mn, Ca, Fe, K i Na imaju esencijalnu ili stimulativnu ulogu u transportu hranljivih materija, sintezi i aktivnosti brojnih enzima i rastu BMK [197]. Na osnovu potreba BMK za mineralnim materijama [197,198] i koncentracijama najvažnijih minerala u kombinovanom supstratu na bazi džibre i melase (tabela 10), tokom fermentacije se može očekivati dobar rast mikrobne biomase i efikasna proizvodnja mlečne kiseline.

#### **4.2. Selekcija soja BMK za proizvodnju mlečne kiseline na supstratu bogatom saharozom**

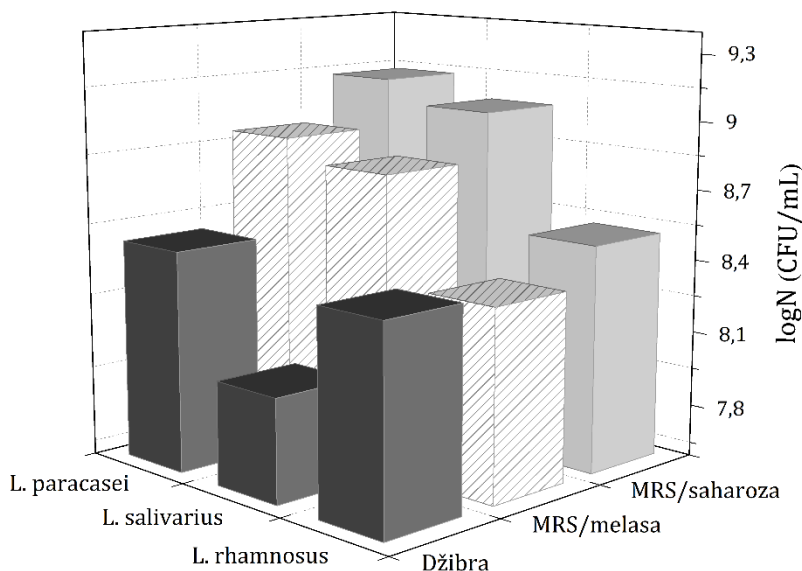
Rast i metaboličke aktivnosti BMK u velikoj meri zavise od dostupnih izvora ugljenika. Iako veliki broj BMK ima sposobnost da fermentiše glukožu, brojna

istraživanja ukazuju na to da se optimalan rast i metabolička aktivnost pojedinih vrsta BMK postiže u prisustvu nekih drugih vrsta šećera, a ne u prisustvu glukoze [197]. Imajući u vidu da približno 55% ukupnog sadržaja šećera u kombinovanom supstratu na bazi džibre i melase čini saharoza, a 35% glukoza (tabela 10), veoma je važno da radni mikroorganizam ima sposobnost da podjednako efikasno fermentiše obe vrste šećera. U cilju selekcije soja BMK koji efikasno fermentiše saharozu, *L. paracasei* NRRL B-4564, *L. salivarius* ATCC 11741 i *L. rhamnosus* ATCC 7469 su gajeni u dva modifikovana MRS bujona, od kojih je jedan kao izvor ugljenika sadržao saharozu (MRS/saharoza), a drugi melasu šećerne repe (MRS/melasa). Takođe, sposobnost ispitivanih sojeva da fermentišu glukoze je analizirana u fermentaciji krompirove džibre kao jedinog izvora azota i ugljenika. Koncentracija mlečne kiseline postignuta nakon 48 h fermentacije na tri ispitivana supstrata je prikazana na slici 17. Broj živih ćelija *L. paracasei* NRRL B-4564, *L. salivarius* ATCC 11741 i *L. rhamnosus* ATCC 7469 je prikazan na slici 18.



**Slika 17.** Koncentracija mlečne kiseline postignuta pomoću *L. paracasei* NRRL B-4564, *L. salivarius* ATCC 11741 i *L. rhamnosus* ATCC 7469 nakon 48 h fermentacije na modifikovanom MRS bujonu na bazi saharoze (MRS/saharoza), modifikovanom MRS bujonu na bazi melase (MRS/melasa) i krompirovoj džibri.

U oba modifikovana MRS supstrata, najveća koncentracija mlečne kiseline je postignuta pomoću *L. paracasei* NRRL B-4564. Koncentracija mlečne kiseline koja je postignuta nakon 48 h fermentacije na dva modifikovana MRS bujona pomoću *L. paracasei* nije bila statistički različita ( $P > 0,05$ ), pa se može smatrati da je melasa adekvatna zamena za rafinisanu saharozu u medijumu. *L. salivarius* ATCC 11741 i *L. rhamnosus* ATCC 7469 su pokazali znatno manju sposobnost da fermentišu saharozu u poređenju sa *L. paracasei* NRRL B-4564. U prethodnoj studiji u kojoj je ispitivana mlečno-kiselinska fermentacija na soku urme je pokazano da *L. casei* subsp. *rhamnosus* ne fermentiše saharozu, dok su glukoza i fruktoza bile podjednako efikasno utrošene tokom fermentacije [199].



**Slika 18.** Broj živih ćelija *L. paracasei* NRRL B-4564, *L. salivarius* ATCC 11741 i *L. rhamnosus* ATCC 7469 nakon 48 h fermentacije na modifikovanom MRS bujonu na bazi saharoze (MRS/saharozu), modifikovanom MRS bujonu na bazi melase (MRS/melasa) i krompirovoj džibri.

U fermentaciji krompirove džibre koja sadrži glukoza kao jedini izvor ugljenika, koncentracija mlečne kiseline postignuta pomoću *L. paracasei* NRRL B-4564 i *L. rhamnosus* ATCC 7469 nije bila statistički različita ( $P > 0,05$ ). Na osnovu dobijenih

rezultata može se zaključiti da oba soja podjednako efikasno proizvode mlečnu kiselinu fermentacijom glukoze, dok *L. paracasei* NRRL B-4564 pored glukoze, efikasno fermentiše i saharozu. Zbog niske koncentracije fermentabilnih šećera (tabela 10), destilerijska džibra nije kompletan supstrat za proizvodnju mlečne kiseline i za postizanje većih koncentracija je neophodna suplementacija izvorima ugljenika. Pri istim uslovima, u fermentaciji kombinovanog medijuma na bazi džibre i melase i modifikovanog MRS/saharoza medijuma, postignute koncentracije mlečne kiseline nisu bile značajno različite ( $P > 0,05$ ).

Rast ispitivanih sojeva tokom fermentacije je imao sličan trend kao i proizvodnja mlečne kiseline. Nakon 48 h fermentacije broj živih ćelija *L. paracasei* NRRL B-4564 nije bio statistički različit u dva modifikovana MRS bujona (MRS/saharoza i MRS/melasa) ( $P > 0,05$ ). Takođe, pri istim uslovima broj živih ćelija *L. paracasei* u kombinovanom otpadnom supstratu i modifikovanom MRS/saharoza medijumu nije bio značajno različit ( $P > 0,05$ ).

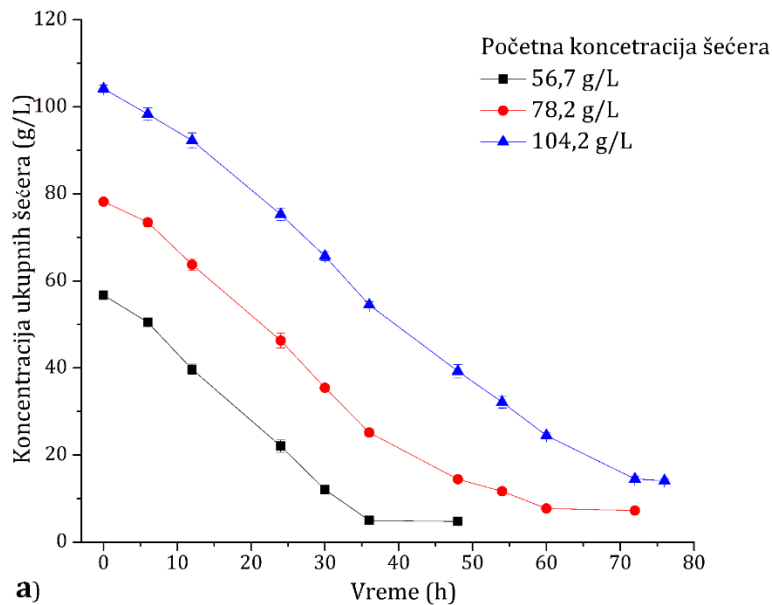
S obzirom da je jedan od glavnih ciljeva ovog istraživanja bio razvoj tehnološkog postupka proizvodnje mlečne kiseline na kombinovanom supstratu na bazi krompirove džibre kao izvora azota i melase kao izvora ugljenika, za dalja istraživanja je odabran soj *L. paracasei* NRRL B-4564.

#### **4.3. Uticaj početne koncentracije šećera na rast *L. paracasei* NRRL B-4564 i proizvodnju mlečne kiseline**

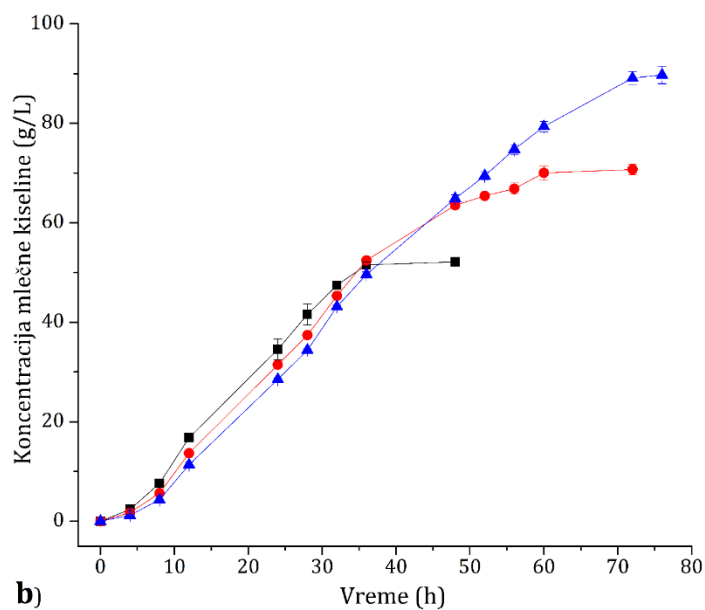
Pored dostupnih izvora ugljenika i azota, na rast i metaboličku aktivnost BMK veliki uticaj ima koncentracija šećera u medijumu. Kinetika proizvodnje mlečne kiseline je ispitivana pri različitim početnim koncentracijama šećera (56,7 g/L, 78,2 g/L i 104,2 g/L) i dobijeni rezultati su prikazani na slici 19.

Veća početna koncentracija šećera u medijumu je omogućila veću finalnu koncentraciju mlečne kiseline, te je maksimalna koncentracija mlečne kiseline (89,5 g/L) postignuta u uzorku sa početnom koncentracijom šećera od 104,2 g/L. Sa druge

strane, maksimalne vrednosti prinosa (0,91 g/g) i produktivnosti (1,42 g/L h) su postignute u uzorku sa najnižom početnom koncentracijom šećera (56,7 g/L).



a)



b)

**Slika 19.** Kinetika potrošnje šećera a) i proizvodnje mlečne kiseline b) tokom fermentacije kombinovanog supstrata na bazi krompirove džibre i melase šećerne repe pomoću *L. paracasei* NRRL B-4564.

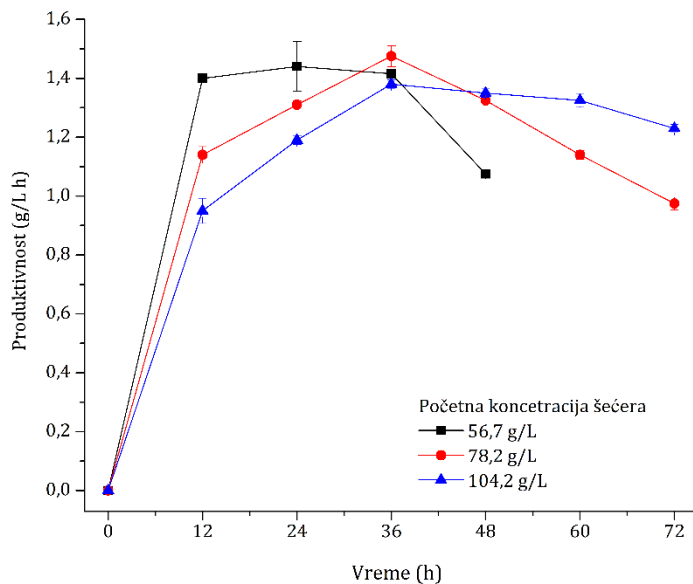
Kao što je prikazano na slici 19, kinetika potrošnje šećera i proizvodnje mlečne kiseline pri ispitivanim početnim koncentracijama šećera je imala sličan trend. Jedva primetna lag faza ukazuje da je početni sastav medijuma veoma pogodovao bakterijskom rastu. Takođe, visoka koncentracija mlečne kiseline je rezultat povoljnog hemijskog sastava supstrata na bazi krompirove džibre i melase, pre svega sadržaja ugljenika i azota, ali i prisustva značajnih minerala (tabela 10), a verovatno i vitamina [189,190] neophodnih za optimalan rast BMK.

U nekoliko prethodnih istraživanja je pokazano da odnos ugljenika i azota u medijumu značajno utiče na rast bakterija i prinos mlečne kiseline. U studiji Akao i saradnika [200] povoljan odnos ugljenika i azota za mlečno-kiselinsku fermentaciju je bio u granicama od 27 do 35. Prema studiji Bilanovic i saradnika [188] odnos ugljenika i azota u standardnom medijumu za mlečno-kiselinsku fermentaciju se može kretati u širokom opsegu od 5,71 do 680. Na osnovu navedenog može se zaključiti da optimalan odnos ugljenika i azota u medijumu značajno varira, zbog čega se on ne može smatrati ključnim parametrom za analizu pogodnosti supstrata za mlečno-kiselinsku fermentaciju. Pod pretpostavkom da šećeri prisutni u melasi sadrže prosečno 40% ugljenika, može se zaključiti da se odnos ugljenika i azota u supstratu na bazi krompirove džibre i melase kretao u granicama od 13 (u uzorku sa početnom koncentracijom šećera od 56,7 g/L) do 23 (u uzorku sa početnom koncentracijom šećera od 104,2 g/L), što odgovara prethodno objavljenim vrednostima [188,200].

Koncentracija rezidualnog šećera u medijumu se kretala u granicama od 4,72 g/L do 14,1 g/L, što ukazuje da melasa sadrži izvesnu količinu nefermentabilnih šećera koje BMK ne mogu da metabolišu. Najviša koncentracija rezidualnog šećera je uočena u uzorku sa najvećom početnom koncentracijom šećera. Poređenjem produktivnosti dobijenih u fermentaciji pri ispitivanim početnim koncentracijama šećera (slika 20), može se primetiti da je produktivnost tokom prvih 24 h bila veća u uzorku sa najnižom početnom koncentracijom šećera, što ukazuje na izvesnu inhibiciju supstratom. Uprkos blagoj inhibiciji visokom početnom koncentracijom šećera u medijumu, produktivnosti

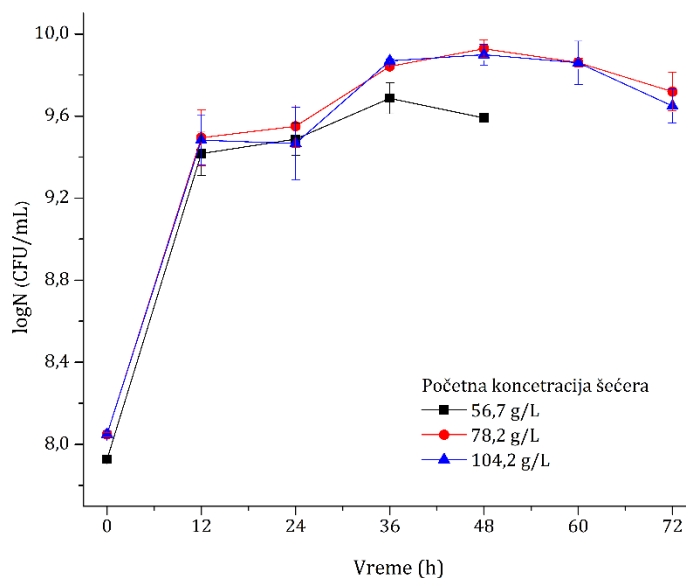


postignute u 36 h fermentacije pri ispitivanim početnim koncentracijama šećera (56,7 g/L, 78,2 g/L i 104,2 g/L) nisu bile statistički različite ( $P > 0,05$ ) (slika 20).



**Slika 20.** Produktivnost mlečne kiseline tokom fermentacije supstrata na bazi krompirove džibre i melase šećerne repe pri različitim početnim koncentracijama šećera.

Broj živih ćelija *L. paracasei* NRRL B-4564 tokom fermentacije supstrata na bazi krompirove džibre i melase pri različitim inicijalnim koncentracijama šećera je prikazan na slici 21. Najbolji rast *L. paracasei* je postignut u fermentaciji pri početnoj koncentraciji šećera od 78,2 g/L (slika 21). Može se primetiti da je u sva tri uzorka rast *L. paracasei* bio intenzivan tokom prvih 12 h fermentacije. Nakon toga je uočena stagnacija rasta koja je najverovatnije rezultat prisustva različitih izvora ugljenika u medijumu (saharoza, glukoza i fruktoza) i činjenice da bakterije prvenstveno fermentišu heksoze, a zatim složenije šećere poput disaharida.



**Slika 21.** Kriva rasta *L. paracasei* NRRL B-4564 tokom fermentacije supstrata na bazi krompirove džibre i melase šećerne repe pri različitim početnim koncentracijama šećera.

Kao što je prikazano na slici 21, kriva rasta *L. paracasei* predstavlja tipičnu krivu diauksičnog rasta, međutim to nije značajno uticalo na potrošnju šećera i proizvodnju mlečne kiseline. Takođe, rast biomase nakon 36 h fermentacije je bio intenzivniji u uzorcima sa većom inicijalnom koncentracijom šećera. Nakanishi i saradnici [201] su primetili diauksični rast *L. lactis* tokom fermentacije na sirupu ananasa pri početnoj koncentraciji šećera od 20 g/L. U toj studiji, diauksični rast *L. lactis* je znatno uticao na brzinu fermentacije, odnosno proizvodnju mlečne kiseline, zbog čega je krajnja produktivnost procesa bila izuzetno niska.

Vrednosti najvažnijih parametara fermentacije pri različitim početnim koncentracijama šećera su prikazane u tabeli 11. Koncentracija mlečne kiseline u medijumu je veoma važan parametar sa aspekta ekstrakcije i prečišćavanja mlečne kiseline. Troškovi supstrata za proizvodnju mlečne kiseline se mogu značajno smanjiti upotrebom jeftinih agro-industrijskih sirovina umesto rafiniranih šećera. Sa druge strane, složenost njihovog hemijskog sastava znatno otežava proces ekstrakcije i

prečišćavanja mlečne kiseline i tako značajno doprinosi ukupnim troškovima proizvodnje. Istraživanja su pokazala da troškovi ekstrakcije i prečišćavanja čine 50% ukupnih troškova proizvodnje mlečne kiseline [202]. U prethodnim istraživanjima je objavljeno da je iz medijuma na bazi otpada iz prerade kafe postignuta stopa ekstrakcije mlečne kiseline od 38,2% [102], dok je primenom iste metodologije gotovo sva mlečna kiselina ekstrahovana iz hemijski definisanog medijuma [203].

**Tabela 11.** Parametri postignuti u mlečno-kiselinskoj fermentaciji kombinovanog supstrata na bazi krompirove džibre i melase šećerne repe pomoću *L. paracasei* NRRL B-4564 pri različitim početnim koncentracijama šećera.

Vreme (h)	Početna koncentracija šećera (g/L)	Mlečna kiselina				Broj živih ćelija ( $10^9$ CFU/mL)
		C (g/L)	Y (g/g)	$Y_{\text{koef.}}$ (g/g)	P (g/L h)	
36	56,7±1,03	51,5±0,54	0,91±0,03	0,98±0,04	1,42±0,01	3,92±0,14 <sup>a</sup>
60	78,2±0,49	70,0±1,44	0,90±0,01	0,97±0,02	1,14±0,01	5,34±1,13 <sup>b</sup>
72	104,2±0,86	89,2±1,27	0,85±0,02	0,99±0,02	1,23±0,02	4,51±0,85 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Vrednosti dobijene u 48 h fermentacije

<sup>b</sup> Vrednosti dobijene u 72 h fermentacije

Na osnovu postignutih parametara fermentacije (koncentracije mlečne kiseline, koeficijenta prinosa i produktivnosti) pri analiziranim početnim koncentracijama šećera, za dalja istraživanja proizvodnje mlečne kiseline odabrana je početna koncentracija šećera od 100 g/L. Pri ovako visokim koncentracijama šećera poreklom iz melase, u medijumu su prisutna i druga jedinjenja koja mogu delovati inhibitory na metaboličke funkcije mikroorganizama (furanski aldehidi, fenolna i isparljiva jedinjenja, joni metala, i dr.) [204,205]. Evolutivna sposobnost mikroorganizama da se brzo prilagode različitim uslovima sredine se danas sve češće primenjuje kako bi se razvili proizvodni sojevi sa željenim karakteristikama radi upotrebe u različitim biotehnoškim procesima. Imajući u vidu navedeno, u narednom setu eksperimenata je ispitivana sposobnost proizvodnog mikroorganizma da razvije fenotip adaptiran na hemijski sastav supstrata na bazi melase sa ciljem boljeg iskorišćenja supstrata i

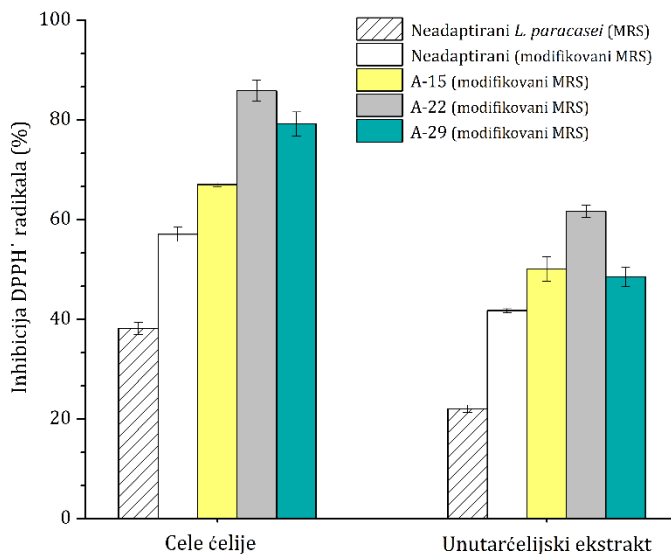
poboljšanja efikasnosti proizvodnje mlečne kiseline na kombinovanom otpadnom supstratu.

#### **4.4. Proizvodnja mlečne kiseline pomoću adaptiranog *L. paracasei***

##### **4.4.1. Uticaj procesa adaptacije na antioksidativnu aktivnost *L. paracasei***

Tokom adaptacije *L. paracasei* NRRL B-4564 na hemijski sastav supstrata na bazi melase (poglavlje 3.2.6.) izolovana su tri potencijalno adaptirana mutanta, a zatim je ispitivan njihov antioksidativni kapacitet sa ciljem da se utvrdi odgovor *L. paracasei* na uslove sredine kojima je bio izložen tokom adaptacionog procesa. Ranija istraživanja su pokazala da oksidativni stres niskog intenziteta može da izazove adaptivni odgovor kod mikroorganizama dovodeći do jačanja njihovog antioksidativnog potencijala [10,11]. Ovo ukazuje da postepeno povećanje intenziteta faktora stresa može dovesti do nastanka fenotipa sa povećanom tolerancijom na određene stresne uslove. Među različitim fiziološkim karakteristikama, poboljšanje antioksidativnog potencijala se smatra posebno efikasnim za povećanje opšte otpornost BMK protiv brojnih, a često i udruženih stresnih uslova [12].

Antioksidativna aktivnost neadaptiranog *L. paracasei* i tri potencijalno adaptirana mutanta (A-15, A-22 i A-29) je prikazana na slici 22. Antioksidativna aktivnost *L. paracasei* je određivana na osnovu sposobnosti suspenzija celih ćelija i unutarćelijskih ekstrakata da neutrališu slobodne DPPH<sup>•</sup> radikale. Dobijeni rezultati pokazuju da cele ćelije, kao i unutarćelijski ekstrakti imaju sposobnost redukcije DPPH<sup>•</sup> radikala, pri čemu izlaganje *L. paracasei* većim koncentracijama melase izaziva jači antioksidativni odgovor. Step en inhibicije DPPH<sup>•</sup> radikala neadaptiranog *L. paracasei* koji je prethodno kultivisan u podlozi sa dodatkom melase je iznosio 57,1% (suspenzija celih ćelija), odnosno 41,8% (unutarćelijski ekstrakt). Istovremeno, neadaptirani soj prethodno kultivisan u standardnom MRS bujonu je pokazao značajno manju sposobnost redukcije DPPH<sup>•</sup> radikala.



**Slika 22.** Inhibicija DPPH radikala pomoću adaptiranog i neadaptiranog *L. paracasei*.

Povećanje antioksidativnog kapaciteta ispitivanog soja nakon gajenja u prisustvu melase šećerne repe ukazuje da izvesna jedinjenja koja su prisutna u melasi indukuju sintezu antioksidativnih metabolita i enzima koji učestvuju u redukciji DPPH radikala. Prethodna istraživanja koja su rađena na BMK, *C. glutamicum* i *S. cerevisiae*, su pokazala da kod pomenutih mikroorganizama u prisustvu određenih metala, furanskih aldehida i fenolnih jedinjenja dolazi do nastanka reaktivnih vrsta kiseonika, kao što su vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ), superoksid anjon radikal ( $O_2^-$ ) i hidroksilni radikal ( $OH^\cdot$ ) [206–208]. Može se pretpostaviti da povećanje antioksidativnog kapaciteta *L. paracasei* predstavlja odgovor ispitivanog soja na prisustvo različitih pro-oksidativnih jedinjenja u melasi, kao što su furanski aldehidi (furfural, 5-hidroksimetilfurfural-HMF), fenolna jedinjenja (vanillin, vanilinska kiselina), isparljiva jedinjenja (heksanol, heptanol), joni metala, i dr. [204,205].

Pored brojnih jedinjenja koja su od velikog značaja za rast mikroorganizama, melasa sadrži i pojedina jedinjenja koja mogu da deluju inhibitorno na rast i metaboličke funkcije mikroorganizama. U nekoliko prethodnih studija je ispitivan inhibitorni efekat furfurala, HMF, sirćetne kiseline, siringaldehida i vanilina na pojedine

vrste mikroorganizama, uključujući *S. cerevisiae* [208,209], *P. acidilactici* [61] i *L. plantarum* [210]. Od navedenih jedinjenja za koje je potvrđeno da deluju inhibotorno na rast mikroorganizama i enzimsku aktivnost, u melasi šećerne repe koja je korišćena u ovom istraživanju je detektovano prisustvo HMF i vanilina. Većina inhibitornih jedinjenja koja se mogu naći u melasi nastaje tokom procesa proizvodnje šećera, pri čemu njihova koncentracija može značajno da varira i u velikoj meri zavisi od tehnološkog postupka proizvodnje šećera [189]. Koncentracije HMF (38,7 mg/kg) i vanilina (25,5 mg/kg) detektovane u melasi šećerne repe su bile nešto veće od vrednosti koje se mogu naći u literaturi (20 mg/kg i 17,4 mg/kg, redom)[211,212].

Potencijalno adaptirani mutanti (A-15, A-22, A-29) su pokazali veću sposobnost inhibicije DPPH<sup>·</sup> radikala u poređenju sa neadaptiranim *L. paracasei*, pri čemu se stepen inhibicije kretao u granicama od 67,1% do 85,9% za cele ćelije, odnosno od 48,5% do 61,7% za unutarćelijske ekstrakte. Od tri selektovana mutanta, *L. paracasei* A-22 je pokazao najveću sposobnost redukcije DPPH<sup>·</sup> radikala, a dobijene vrednosti su bile čak duplo veće u odnosu na neadaptirani *L. paracasei* (slika 22). Kao što se može videti na slici 22, *L. paracasei* A-29 koji je izolovan na kraju adaptacionog procesa je pokazao manju sposobnost inhibicije DPPH<sup>·</sup> radikala u odnosu na *L. paracasei* A-22 ( $P < 0,05$  za unutarćelijski ekstrakt i  $P > 0,05$  za cele ćelije), što ukazuje da izlaganje visokim koncentracijama melase tokom dužeg vremenskog perioda dovodi do smanjenja antioksidativnog potencijala *L. paracasei*. Uočen obrazac antioksidativnog odgovora *L. paracasei* NRRL B-4564 izazvanog stresnim faktorima odgovara klasifikaciji oksidativnog stresa zasnovanoj na njegovom intenzitetu [213]. Prema navedenoj klasifikaciji, aktivnost antioksidanata i enzima koji su deo antioksidativne zaštite u biološkim sistemima zavisi od intenziteta oksidativnog stresa. Pri oksidativnom stresu niskog intenziteta, aktivnost antioksidanata i antioksidativnih enzima može dostići određeni maksimum, a nakon toga, daljim povećanjem stresnih uslova i koncentracija reaktivnih kiseoničnih vrsta, se vraća na početni nivo [10,213].

U daljem istraživanju tri potencijalno adaptirana mutanta, *L. paracasei* A-15, A-22 i A-29, su testirana za proizvodnju mlečne kiseline na kombinovanom supstratu na

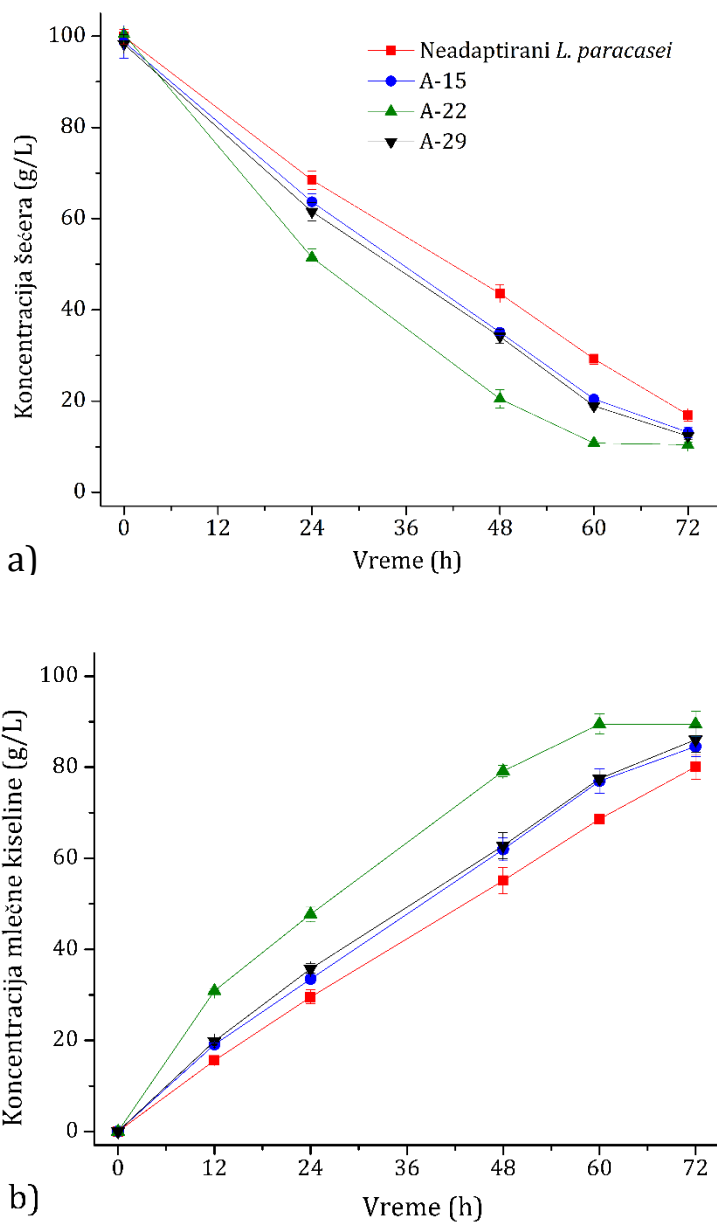
bazi melase šećerne repe i krompirove džibre. Mogućnost proizvodnje mlečne kiseline pomoću adaptiranog i neadaptiranog *L. paracasei* je ispitivana i upoređena u šaržnoj, a zatim u dolivnoj fermentaciji.

#### **4.4.2. Poređenje šaržnog postupka proizvodnje mlečne kiseline pomoću adaptiranog i neadaptiranog *L. paracasei***

Kinetika proizvodnje mlečne kiseline i potrošnje šećera tokom šaržne fermentacije pomoću adaptiranog i neadaptiranog *L. paracasei* je prikazana na slici 23. Najvažniji parametri mlečno-kiselinske fermentacije su prikazani u tabeli 12.

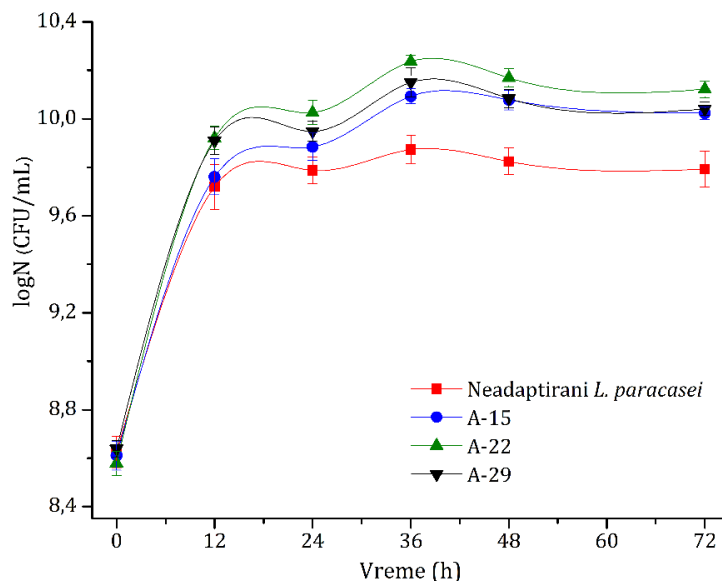
*L. paracasei* A-22 je pokazao značajno bolju sposobnost proizvodnje mlečne kiseline u odnosu na neadaptirani soj. Tokom prvih 48 h fermentacije, *L. paracasei* A-22 je utrošio 80% šećera iz medijuma, dok je za isto vreme utrošeni šećer u fermentaciji pomoću neadaptiranog soja iznosio svega 56%. Produktivnost nakon 60 h fermentacije pomoću *L. paracasei* A-22 (1,49 g/L h) je bila 31% veća u odnosu na produktivnost koja je ostvarena u fermentaciji pomoću neadaptiranog *L. paracasei* (1,14 g/L h). Sličan trend potrošnje šećera i proizvodnje mlečne kiseline je uočen u fermentaciji pomoću *L. paracasei* A-15 i A-29, a koncentracija mlečne kiseline ostvarena pomoću ova dva mutanta nije bila statistički različita ( $P > 0,05$ ).

Uočen je istri trend proizvodnje mlečne kiseline i antioksidativnog kapaciteta adaptiranog i neadaptiranog *L. paracasei*, što ukazuje da poboljšanje efikasnosti mlečno-kiselinske fermentacije može biti rezultat bolje zaštite adaptiranog soja od inhibitornih jedinjenja prisutnih u fermentacionom medijumu i efikasne prilagođenosti na date uslove sredine. Na slici 24 je prikazana kriva rasta adaptiranog i neadaptiranog *L. paracasei* tokom šaržne fermentacije. Slično proizvodnji mlečne kiseline, rast adaptiranog soja je bio bolji u odnosu na neadaptirani *L. paracasei*, a od tri selektovana mutanta, *L. paracasei* A-22 je pokazao najbolju sposobnost rasta tokom fermentacije na kombinovanom otpadnom supstratu.



**Slika 23.** Kinetika potrošnje šećera a) i proizvodnje mlečne kiseline b) u šaržnoj fermentaciji supstrata na bazi krompirove džibre i melase šećerne repe pomoću adaptiranog i neadaptiranog *L. paracasei*.





**Slika 24.** Kriva rasta adaptiranog i neadaptiranog *L. paracasei* tokom šaržne fermentacije na supstratu na bazi krompirove džibre i melase šećerne repe.

**Tabela 12.** Najvažniji parametri šaržne fermentacije na kombinovanom supstratu pomoću adaptiranog i neadaptiranog *L. paracasei*.

Soj	Vreme (h)	Mlečna kiselina				Optička čistoća <sup>L(+)</sup> (%)	P (g/L h)	Broj ćelija (10 <sup>10</sup> CFU/mL)
		C (g/L)	Y (g/g)	Y <sub>koef.</sub> (g/g)				
Neadaptirani <i>L. paracasei</i>	48	55,1±2,9	0,56±0,08	0,98±0,07		1,15±0,11	0,67±0,08	
	72	81,0±2,7	0,80±0,09	0,96±0,04	99,6	1,13±0,07	0,63±0,11	
Mutant A-15	48	61,9±2,6	0,63±0,05	0,99±0,07		1,29±0,08	1,20±0,11	
	72	84,5±2,2	0,86±0,06	0,96±0,03	99,4	1,17±0,05	1,06±0,06	
Mutant A-22	48	79,1±1,2	0,79±0,03	0,97±0,09		1,65±0,07	1,48±0,13	
	72	89,4±2,9	0,89±0,09	0,99±0,05	99,2	1,24±0,05	1,33±0,11	
Mutant A-29	48	62,7±2,9	0,64±0,07	0,98±0,06		1,31±0,03	1,22±0,10	
	72	86,0±2,7	0,88±0,05	1,01±0,08	99,3	1,20±0,06	1,10±0,07	

Yang i saradnici [55] su ispitivali proizvodnju mlečne kiseline na pekarskom otpadu pomoću *Thermoanaerobacterium* sp. koji je prvo genetički modifikovan, a zatim adaptiran na visoke koncentracije šećera u medijumu. Adaptacija *Thermoanaerobacterium* sp. u toj studiji je dovela do znatno brže potrošnje šećera, a

kao rezultat toga postignuta je krajnja koncentracija mlečne kiseline od 77,7 g/L sa produktivnošću od 1,30 g/L h [55]. Adaptacija *R. oryzae* na hidrolizat kukuruznog oklaska bogatog inhibitornim jedinjenjima i ksilozom je ispitivana sa ciljem da se poboljša tolerancije radnog mikroorganizma i efikasnost iskorišćenja ksiloze i time omogući bolja proizvodnja mlečne kiseline na pomenutom supstratu [97]. Slično, poboljšanje stepena tolerantnosti na inhibitore prisutne u medijumu na bazi tretirane kukuruzovine je postignuto adaptacijom dva genetički modifikovana soja *P. acidilactici* [61].

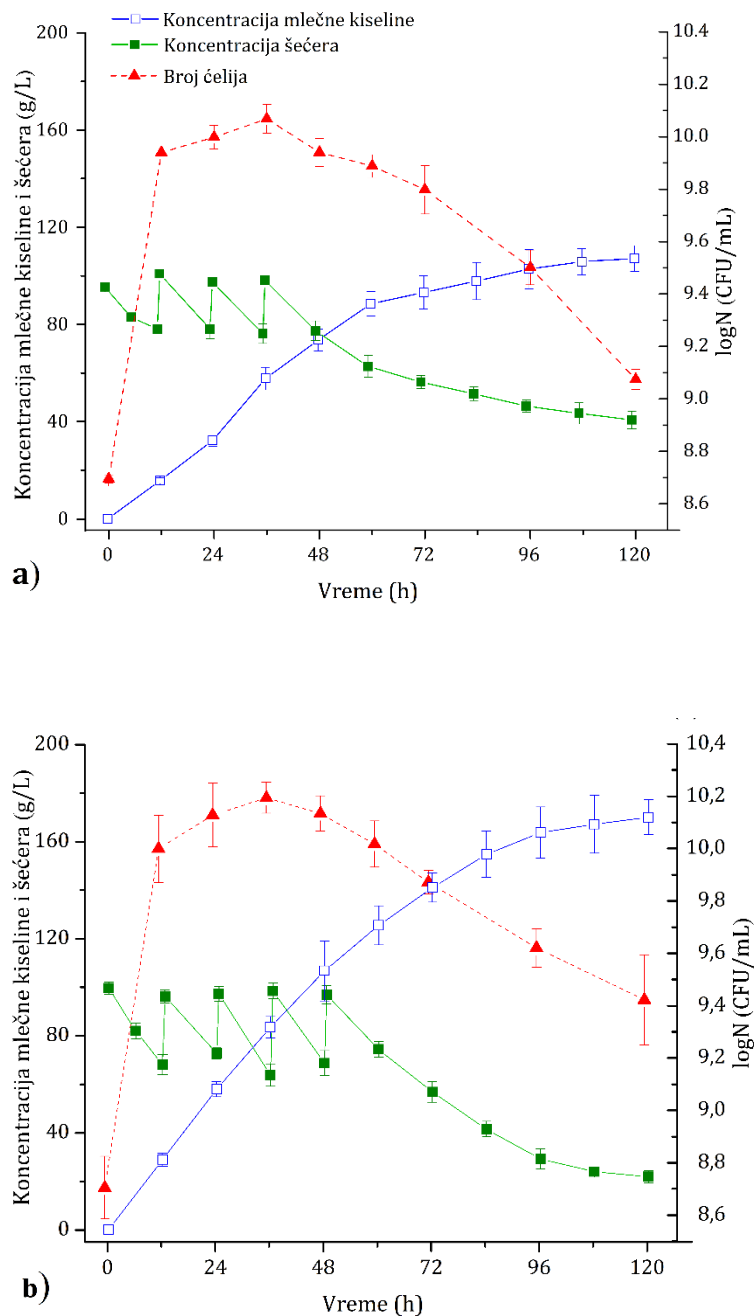
Na osnovu dobijenih rezultata, od tri selektovana mutanta *L. paracasei* A-22 je odabran za dalja ispitivanja proizvodnje mlečne kiseline u dolivnom postupku fermentacije na kombinovanom supstratu na bazi krompirove džibre i melase šećerne repe.

#### **4.4.3. Poređenje dolivnog postupka proizvodnje mlečne kiseline pomoću neadaptiranog i adaptiranog *L. paracasei***

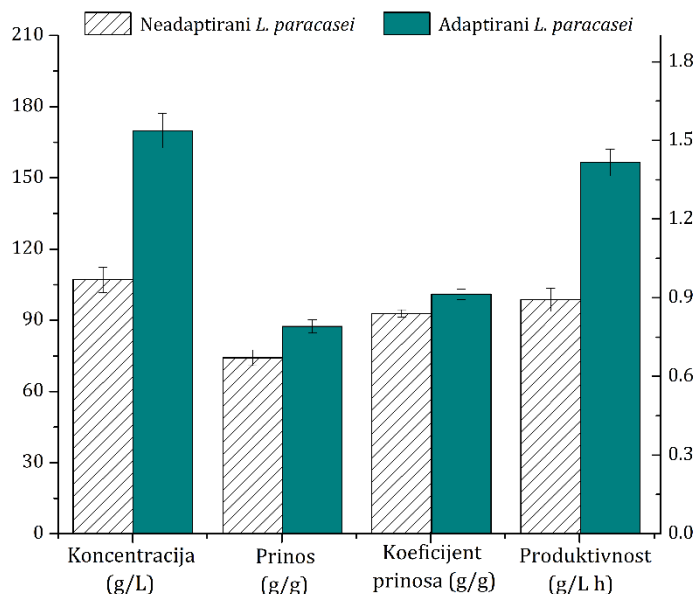
U ovom setu eksperimenata ispitivana je efikasnost proizvodnje mlečne kiseline u dolivnoj fermentaciji pomoću neadaptiranog i adaptiranog *L. paracasei* A-22. Uppedni prikaz kinetike dolivne fermentacije pomoću neadaptiranog i adaptiranog *L. paracasei* A-22 na supstratu na bazi krompirove džibre i melase šećerne repe je prikazan na slici 25, dok su najvažniji parametri fermentacije prikazani na slici 26.

Tokom prvih 60 h fermentacije pomoću adaptiranog soja, postignuta je koncentracija mlečne kiseline od 125,3 g/L i maksimalne produktivnosti veće od 2 g/L h. Takođe, tokom prvih 60 h broj živih ćelija *L. paracasei* A-22 je bio veći od  $10^{10}$  CFU/mL, nakon čega je primećen blagi pad broja živih ćelija u fermentacionom medijumu (slika 25b). Kako je proizvodnja mlečne kiseline uslovljena rastom i koncentracijom mikrobne biomase, od 60 h do 120 h je uočeno postepeno smanjenje brzina potrošnje šećera i proizvodnje mlečne kiseline i za to vreme proizvedeno je 44,6 g/L mlečne kiseline. Istovremeno, tokom prvih 60 h dolivne fermentacije pomoću neadaptiranog *L. paracasei* postignuta je koncentracija mlečne kiseline od 88,5 g/L, dok

je do kraja fermentacije usledilo povećanje koncentracije mlečne kiseline od svega 18,5 g/L.



**Slika 25.** Kinetika dolivnog postupka proizvodnje mlečne kiseline pomoću a) neadaptiranog i b) adaptiranog *L. paracasei*.



**Slika 26.** Upporedni prikaz najvažnijih parametara dolivne fermentacije pomoću neadaptiranog i adaptiranog *L. paracasei*.

Slično proizvodnji mlečne kiseline, rast neadaptiranog *L. paracasei* je bio slabiji u odnosu na adaptirani A-22, a značajan pad broja živih ćelija je usledio nakon trećeg ciklusa dolivanja supstrata (slika 25a). Zbog boljeg rasta *L. paracasei* A-22 i efikasnije proizvodnje mlečne kiseline, u dolivnoj fermentaciji pomoću adaptiranog soja je bilo moguće izvesti jedan ciklus dolivanja supstrata više u odnosu na fermentaciju pomoću neadaptiranog *L. paracasei*. Koncentracija mlečne kiseline u fermentaciji pomoću adaptiranog *L. paracasei* A-22 (169,9 g/L) je bila 51% veća u odnosu na koncentraciju mlečne kiseline ostvarene pomoću neadaptiranog *L. paracasei* (107,1 g/L). Takođe, prinos mlečne kiseline od 0,79 g/g u fermentaciji pomoću *L. paracasei* A-22 je bio znatno veći ( $P < 0,05$ ) u odnosu na prinos koji je ostvaren u fermentaciji sa neadaptiranim *L. paracasei* (0,67 g/g) (slika 26). Koncentracija rezidualnog šećera od 20,7 g/L na kraju fermentacije pomoću *L. paracasei* A-22 (slika 25b) je posledica prisustva nefermentabilnih šećera u medijumu, a verovatno i inhibicije proizvodom, odnosno mlečnom kiselinom. Međutim, koncentracija rezidualnog šećera je bila

značajno niža kod fermentacije sa adaptiranim sojem od one dobijene na kraju fermentacije pomoću neadaptiranog *L. paracasei* (41,2 g/L).

Sveobuhvatna analiza rezultata dobijenih u šaržnom i dolivnom postupku mlečno-kiselinske fermentacije ukazuje na to da produženo vreme trajanja dolivnog postupka različito utiče na parametre fermentacije. Maksimalne produktivnosti procesa i proizvodnja mikrobne biomase su postignute tokom prvih 60 h fermentacije. Nakon toga vrednosti ovih parametara postepno opadaju, dok koncentracija i prinos mlečne kiseline rastu sve do kraja fermentacije. Iako je na osnovu dobijenih rezultata superiornost dolivne fermentacije u odnosu na šaržnu očigledna, precizno definisanje optimalnog vremena trajanja dolivne fermentacije bi trebalo da bude rezultat ekonomske analize kojom bi se u obzir morali uzeti svi relevantni faktori kao što su troškovi proizvodnje, cena supstrata i proizvoda, odnosno mlečne kiseline, kao i troškovi njene ekstrakcije i prečišćavanja iz fermentacionog medijuma.

Poređenje najvažnijih parametara dolivnog postupka proizvodnje mlečne kiseline na supstratu na bazi krompirove džibre i melase i drugim alternativnim supstratima koji se mogu naći u literaturi je prikazano u tabeli 13. Koncentracija mlečne kiseline (169,9 g/L) ostvarena u fermentaciji supstrata na bazi krompirove džibre i melase pomoću adaptiranog *L. paracasei* A-22 je bila veća od vrednosti dobijenih na različitim alternativnim supstratima. Takođe, u prethodnim studijama u kojima je ispitivana dolivna fermentacija na različitim sintetičkim supstratima [1,21,214] postignute su značajno niže koncentracije mlečne kiseline i produktivnosti od vrednosti dobijenih u ovom istraživanju. Problemi korišćenja melase kao supstrata u fermentacionim procesima su najčešće povezani sa visokim sadržajem jedinjenja koja deluju inhibitorno na rast mikroorganizama i aktivost enzima. Zbog toga je za proizvodnju ornitina, sukcininske kiseline [215], lizina [216], mikrobnih polisaharidara [217,218] i mlečne kiseline [219] melasa prethodno tretirana različitim hemijskim metodama u cilju uklanjanja potencijalno inhibitornih jedinjenja. Da bi se izbegle visoke koncentracije ovih jedinjenja u medijumu i njihov negativan efekat, prethodno je za

proizvodnju mlečne kiseline pomoću *B. coagulans* H-1 ispitivano kombinovano dolivanje glukoze i melase šećerne trske [220].

**Tabela 13.** Poređenje najvažnijih parametara dolivne fermentacije na različitim alternativnim supstratima.

Supstrat	Mikroorganizam	Režim dolivanja supstrata	Mlečna kiselina			Referenca
			C (g/L)	Y/Y <sub>koef.</sub> (g/g)	P (g/L h)	
Hlebna džibra	<i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469	Pulsno	97,1	0,87 <sup>a</sup>	1,80	[221]
Otpad iz reciklaže papira	<i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469	Pulsno	108,2	0,62 <sup>b</sup>	0,90	[222]
Lignocelulozni hidrolizat	<i>Bacillus</i> sp. NL01	Pulsno	75,0	0,75 <sup>b</sup>	1,04	[4]
Otpad iz proizvodnje ksilitola	<i>Bacillus</i> sp. XZL9	Pulsno	74,7	0,50 <sup>b</sup>	0,38	[81]
Kukuruzovina tretirana NaOH	<i>B. coagulans</i> LA204	Kontinualno	97,6	0,68 <sup>a</sup>	1,63	[223]
Krtola topinambura ( <i>Helianthus tuberosus</i> )	Mešana kultura <i>A. niger</i> SL-09 i <i>Lactobacillus</i> sp. G-02	Pulsno	120,5	0,95 <sup>a</sup>	3,35	[46]
Saćma kikirikija	<i>Sporolactobacillus</i> sp. CASD	Pulsno	226,0	0,84 <sup>b</sup>	4,43	[87]
Melasa šećerne trske	<i>B. coagulans</i> H-1	Pulsno	168,3	0,88 <sup>b</sup>	2,10	[220]
Kombinovani supstrat na bazi džibre i melase šećerne repe	Adaptirani <i>L. paracasei</i> NRRL B-4564	Pulsno	169,9	0,79 <sup>a</sup> 0,91 <sup>b</sup>	1,42	Ova studija

<sup>a</sup>Prinos (Y)

<sup>b</sup>Koeficijent prinosa (Y<sub>koef.</sub>)

Adaptacija *L. paracasei* na otpadni supstrat na bazi melase šećerne repe je rezultirala u značajno boljoj potrošnji supstrata tokom fermentacije, a time i boljoj

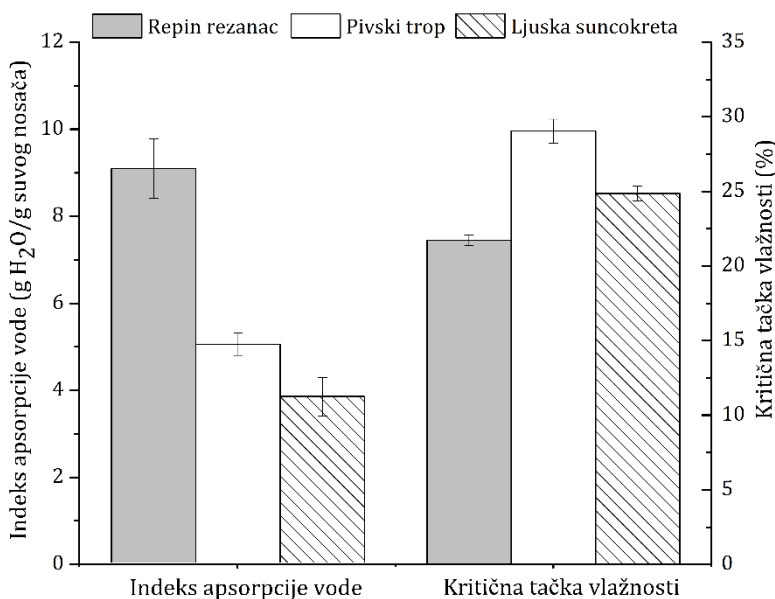
proizvodnji mlečne kiseline i mikrobne biomase. Međutim, mehanizam koji dovodi do poboljšanja tolerancije i adaptacije *L. paracasei* na date uslove sredine, kao i genetska osnova novog fenotipa za sada ostaju nepoznati. Prethodna istraživanja ukazuju na to da se adaptacija mikroorganizama može pripisati sintezi enzima i kofaktora koji učestvuju u redukciji inhibitornih jedinjenja [11]. Osim navedenog, bolje fermentacione karakteristike adaptiranog *L. paracasei* mogu biti rezultat adaptivnih promena nastalih u odgovoru na oksidativni stres, kao što je pokazano u poglavlju 4.4.1. Istraživanja pokazuju da furanski aldehidi kod mikroorganizama uglavnom dovode do inhibicije rasta usled oštećenja DNK materijala i/ili inhibicije glikolize i enzima heksokinaze odgovorne za fosforilaciju heksoza, promene metaboličkih puteva, preusmeravanja energije za „popravku” oštećenja itd. [210]. U nekoliko prethodnih studija je proučavan metabolički put furana kod pojedinih sojeva kvasca i BMK [61,209,210]. U fermentaciji hemiceluloznog hidrolizata pomoću *L. plantarum* postignuta je efikasna konverzija furana, uključujući HMF, do manje inhibitornih jedinjenja i istovremena proizvodnja mlečne kiseline [210]. Sa druge strane, pokazano je da fenolna jedinjenja, uključujući vanilin, potiskuju ekspresiju gena koji kodiraju enzim laktat-dehidrogenazu kod soja *P. acidilactici* i tako inhibiraju proizvodnju mlečne kiseline, čak i pri prilično niskim koncentracijama (0,3 g/L)[61].

#### **4.5. Proizvodnja mlečne kiseline pomoću imobilisane mikrobne biomase**

##### **4.5.1. Fizička karakterizacija lignoceluloznih nosača i imobilizacija *L. paracasei***

Lignocelulozni materijali agro-industrijskog porekla, ljuska suncokreta, repin rezanac i pivski trop, su korišćeni za imobilizaciju *L. paracasei* NRRL B-4564 i proizvodnju mlečne kiseline u postupku sa recirkulacijom imobilisane mikrobne biomase. Pogodnost primene ovih materijala kao nosača za mikrobnu imobilizaciju je ispitivana određivanjem fizičkih karakteristika materijala, kao što su parametri porozne strukture, indeks apsorpcije vode i kritična tačka vlažnosti.

Indeks apsorpcije vode i kritična tačka vlažnosti su od velikog značaja za procenu upotrebe različitih prirodnih materijala bilo kao nosača za imobilizaciju mikroorganizama [177,224] ili supstrata za površinsku fermentaciju [225]. Indeks apsorpcije vode je pokazatelj sposobnosti prirodnog materijala, odnosno njegovih hidrofilnih grupa da vezuju molekule vode [224]. Kritična tačka vlažnosti predstavlja onu količinu vode koja je vezana za strukturu samog materijala i kao takva je nedostupna mikroorganizmima [226]. Poželjne karakteristike materijala za imobilizaciju mikroorganizama su visoke vrednosti indeksa apsorpcije vode i niske vrednosti kritične tačke vlažnosti [177], s obzorom da takvi materijali stvaraju odgovarajuću sredinu za metaboličke funkcije mikroorganizama i pogoduju proliferaciji mikrobnih ćelija. Od tri ispitivana materijala agro-industrijskog porekla, rezanac šećerne repe je pokazao najveću sposobnost apsorpcije vode, a u isto vreme i najniže vrednosti kritične tačke vlažnosti (slika 27).



**Slika 27.** Indeks apsorpcije vode i kritična tačka vlažnosti repinog rezanca, pivskog tropa i ljuske suncokreta.



Vrednosti indeksa apsorpcije vode i kritične tačke vlažnosti ljuske suncokreta i pivskog tropa su bile znatno nepovoljnije u odnosu na repin rezanac. Pivski trop je pokazao veće vrednosti kritične tačke vlažnosti u odnosu na ljusku suncokreta, dok razlika između ova dva nosača u pogledu kapaciteta da apsorbiju molekule vode nije bila statistički značajna ( $P > 0,05$ ). Na osnovu utvrđenih vrednosti ova dva fizička pokazatelja, rezanac šećerne repe ima hidrofilniju strukturu, a time i bolji potencijal kao nosač za imobilizaciju ćelija, u odnosu na pivski trop i ljusku suncokreta.

Vrednosti parametara porozne strukture lignoceluloznih nosača dobijene živinom porozimetrijom su prikazane u tabeli 14. Od tri ispitivana materijala, utvrđeno je da je struktura ljuske suncokreta najporoznija sa stepenom poroznosti od 63,14%. Znatno manji stepen poroznosti je utvrđen u slučaju pivskog tropa (30,14%) i repinog rezanca (9,96%). Najveću specifičnu površinu je imao pivski trop, što ukazuje da je velika površina ovog materijala dostupna za vezivanje bakterijskih ćelija. Najmanja vrednost ovog parametra je detektovana u slučaju repinog rezanca. Takođe, pivski trop ima najveći srednji prečnik pora (3,50  $\mu\text{m}$ ), dok su vrednosti prečnika pora repinog rezanca i ljuske suncokreta iznosile 1,83  $\mu\text{m}$  i 1,01  $\mu\text{m}$ , redom (tabela 14).

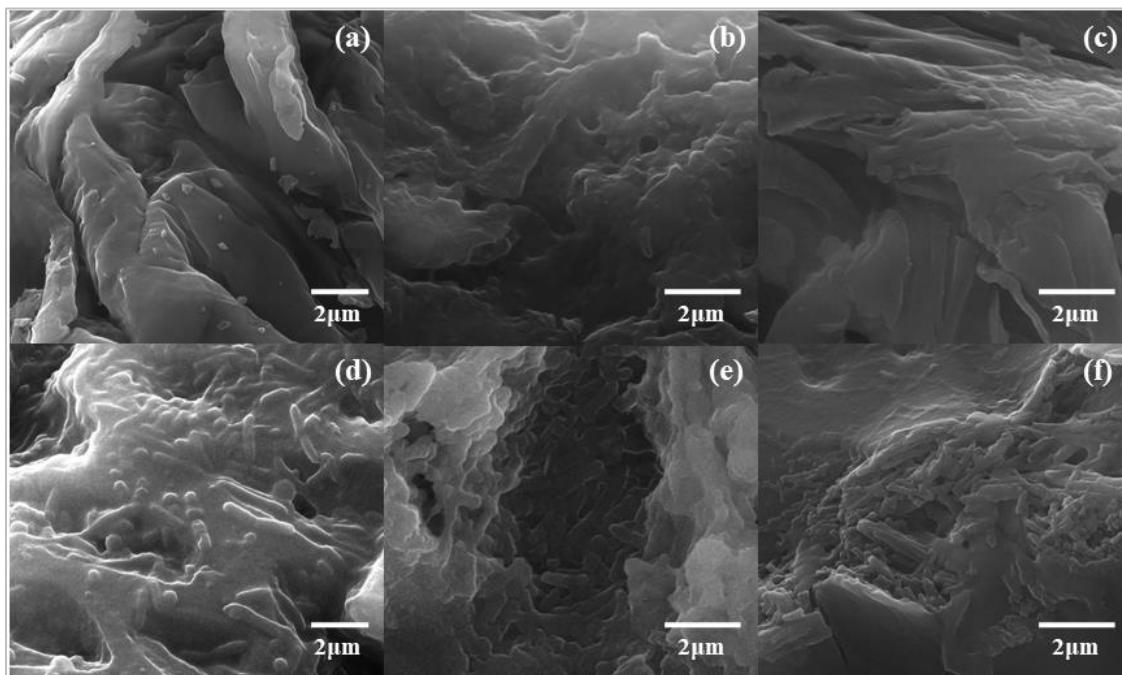
**Tabela 14.** Parametri porozne strukture lignoceluloznih nosača.

Parametar		Lignocelulozni nosač		
		Ljuska suncokreta	Pivski trop	Repin rezanac
Zapremina pora	( $\text{mm}^3/\text{g}$ )	1052,47	281,71	81,01
Specifična površina	( $\text{m}^2/\text{g}$ )	19,74	22,41	7,26
Srednji prečnik pora	( $\mu\text{m}$ )	1,01	3,50	1,83
Prividna gustina	( $\text{g}/\text{cm}^3$ )	0,60	1,07	1,23
Poroznost	(vol%)	63,14	30,14	9,96

Morfologija nosača je često isticana kao važan faktor koji utiče na adsorpciju ćelija na površinu prirodnih materijala. Prethodne studije su pokazale da hrapavost površine nosača i poroznost dovode do jačeg vezivanja ćelija za površinske strukture materijala i manjeg oslobađanja imobilisanih ćelija usled dejstva smicajnih sila [177,227]. Pored poroznosti i hrapavosti površine nosača, veličina pora je od izuzetnog

značaja i utiče na mogućnost vezivanja ćelija unutar porozne strukture materijala. Istraživanja su pokazala da se najbolji rast ćelija i formiranje biofilma unutar pora ostvaruje ukoliko je veličina pora materijala jedan do pet puta veća u odnosu na veličinu bakterijske ćelije [228]. Kao što se može primetiti, vrednosti srednjeg prečnika pora ljske suncokreta i repinog rezanca su bile iste ili nešto niže u odnosu na srednji prečnik ćelija *L. paracasei* NRRL B-4564 (1,56  $\mu\text{m}$  do 1,84  $\mu\text{m}$ ), što u velikoj meri utiče na distribuciju i vezivanje ćelija *L. paracasei* na površinu nosača.

Imobilizacija ćelija *L. paracasei* na agro-industrijskim materijalima je potvrđena skenirajućom elektronskom mikroskopijom (slika 28). Uočena je dobra kolonizacija površine sva tri nosača i formiranje gustog biofilma *L. paracasei* na površini materijala, kao i unutar međuprostornih šupljina. Obično, do vezivanja ćelija za površinu čvrstog nosača dolazi usled formiranja slabih veza, kao što su elektrostatičke interakcije [229]. Površina materijala biljnog porekla i otpadnih materijala poreklom iz prehrambene i agro-industrije je heterogena, sa mnoštvom pozitivno i negativno naelektrisanih funkcionalnih grupa, što ih čini izuzetno atraktivnim i efikasnim adsorbensima za mnoga anjonska i katjonska jedinjenja [230,231]. Ranija istraživanja su pokazala da je površina ćelija nekoliko sojeva *L. paracasei* negativno naelektrisana pri pH vrednostima 3,8 do 8,0 [229], te se može očekivati specifično vezivanje ćelija *L. paracasei* za pozitivno naelektrisana mesta na površini lignoceluloznih nosača tokom mlečno-kiselinske fermentacije. Pored toga, hidrofobno/hidrofilni karakter površine ćelija je važan faktor koji utiče na adheziju i formiranje biofilma na različitim površinama. Prethodnim istraživanjima je ustanovljeno da je površina ćelija *L. paracasei* hidrofilnog karaktera [229,232–234], pa jače vezivanje ćelija može biti očekivano upravo na hidrofilnim površinama [235]. Kao i mnoge druge BMK [236], *L. paracasei* NRRL B-4564 proizvodi egzopolisaharide koji formiraju gust, lepljiv sloj na površini ćelija. Egzopolisaharidi imaju ulogu u adheziji ćelija, formiranju biofilma i zaštiti ćelija u nepovoljnim uslovima sredine [236], pa tako mogu dodatno da doprinesu boljem vezivanju ćelija *L. paracasei* i njihovom dužem zadržavanju na površini lignoceluloznih nosača.



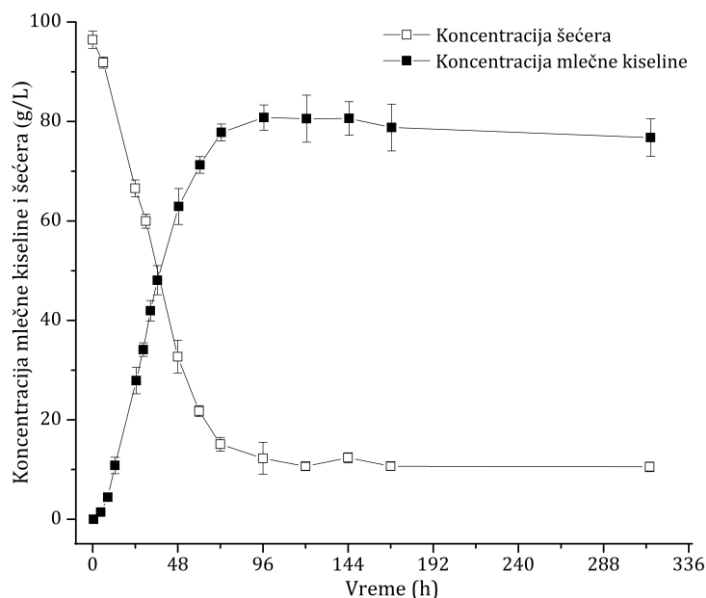
**Slika 28.** Skenirajuća elektronska mikrografija površine a) repinog rezanca, b) pivskog tropa i c) ljuske suncokreta bez i sa ćelijama *L. paracasei* imobilisanih na d) repin rezanac, e) pivski trop i f) ljusku suncokreta.

#### 4.5.2. Poređenje proizvodnje mlečne kiseline pomoću slobodne i imobilisane mikrobne biomase

U ovom delu istraživanja je upoređena mlečno-kiselinska fermentacija kombinovanog supstrata na bazi tečne krompirove džibre i melase šećerne repe pomoću slobodne i imobilisane biomase *L. paracasei* NRRL B-4564. Kinetika potrošnje šećera i proizvodnje mlečne kiseline pomoću slobodnih ćelija *L. paracasei* je prikazana na slici 29.

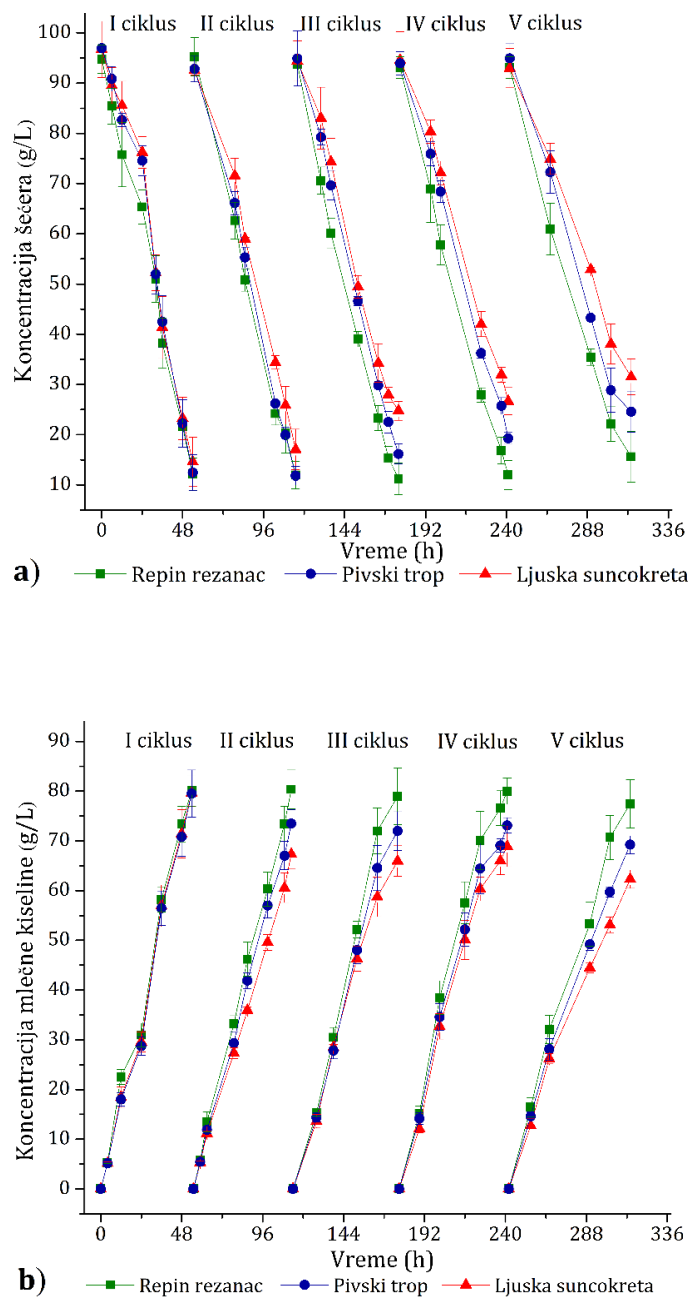
Potpuni utrošak fermentabilnih šećera u šaržnoj fermentaciji pomoću slobodnih ćelija je postignut nakon 96 h fermentacije, pri čemu je ostvarena koncentracija mlečne kiseline od 79,0 g/L i produktivnost od 0,81 g/L h. Kinetika mlečno-kiselinske fermentacije supstrata na bazi tečne džibre i melase šećerne repe pomoću *L. paracasei* imobilisanog na repin rezanac, pivski trop i ljusku suncokreta je prikazana na slici 30.

Najvažniji parametri fermentacije sa slobodnim i imobilisanim ćelijama *L. paracasei* su prikazani u tabeli 15.



**Slika 29.** Kinetika potrošnje šećera i proizvodnje mlečne kiseline u šaržnoj fermentaciji supstrata na bazi tečne džibre i melase šećerne repe pomoću slobodnih ćelija *L. paracasei* NRRL B-4564.

Sposobnost adsorpcije *L. paracasei* i formiranja biofilma na površini tri lignocelulozna nosača je omogućila recirkulaciju imobilisane biomase i efikasno ponovno korišćenje imobilisanih biokatalizatora u pet uzastopnih šaržnih ciklusa. Kinetika potrošnje šećera i proizvodnje mlečne kiseline u fermentaciji pomoću imobilisane mikrobne biomase je bila znatno brža u odnosu na fermentaciju sa slobodnim ćelijama *L. paracasei*. Tokom prve fermentacione šarže, između tri imobilisana sistema nije bilo statistički značajnih razlika u pogledu potrošnje šećera i proizvodnje mlečne kiseline ( $P > 0,05$ ), pri čemu je postignuta maksimalna koncentracija mlečne kiseline od 80,1 g/L i produktivnost od 1,48 g/L h. U svakom narednom ciklusu, operativna stabilnost imobilisanog sistema na bazi repinog rezanca je bila nešto bolja u odnosu na druga dva biokatalizatora (slika 30).



**Slika 30.** Kinetika potrošnje šećera a) i proizvodnje mlečne kiseline b) u ponovljenoj šaržnoj fermentaciji supstrata na bazi tečne džibre i melase šećerne repe pomoću *L. paracasei* imobilisanog na repin rezanac, pivski trop i ljusku suncokreta.

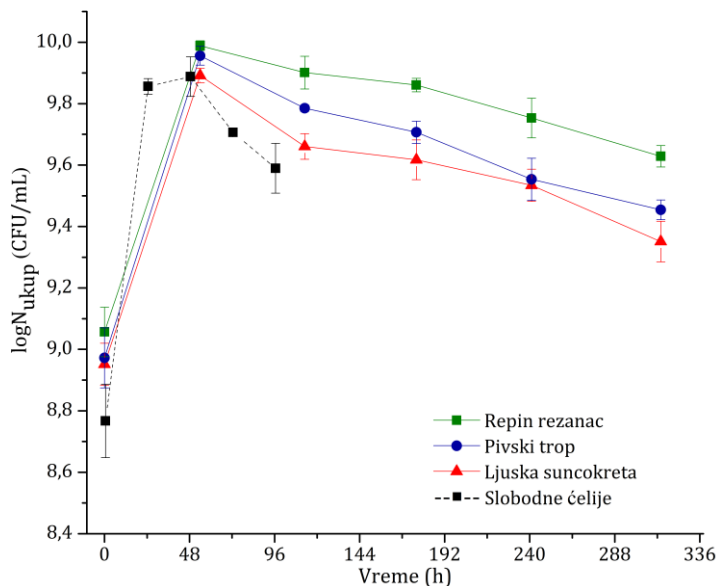
**Tabela 15.** Vrednosti najvažnijih parametara mlečno-kiselinske fermentacije na supstratu na bazi tečne džibre i melase šećerne repe pomoću slobodnih i imobilisanih ćelija *L. paracasei* NRRL B-4564.

	Trajanje ciklusa (h)	Noslač	Mlečna kiselina				
			C (g/L)	Y (g/g)	Y <sub>koef.</sub> (g/g)	P (g/L h)	
Imobilisane ćelije	I ciklus	54	Repin rezanac	80,10±3,13	0,85±0,02	0,97±0,01	1,48±0,01
		Pivski trop	79,51±4,74	0,85±0,01	0,94±0,02	1,47±0,04	
		Ljuska suncokreta	79,64±2,76	0,82±0,01	0,97±0,01	1,47±0,02	
	II ciklus	60	Repin rezanac	80,35±3,89	0,83±0,03	0,96±0,02	1,34±0,05
		Pivski trop	73,50±2,82	0,79±0,02	0,91±0,04	1,22±0,02	
		Ljuska suncokreta	67,32±2,87	0,73±0,04	0,89±0,05	1,12±0,08	
	III ciklus	60	Repin rezanac	78,96±5,73	0,84±0,01	0,96±0,02	1,32±0,03
		Pivski trop	71,99±3,89	0,76±0,02	0,91±0,02	1,20±0,06	
		Ljuska suncokreta	65,95±3,07	0,70±0,05	0,95±0,02	1,10±0,10	
	IV ciklus	64	Repin rezanac	79,98±2,62	0,86±0,03	0,99±0,03	1,25±0,09
		Pivski trop	73,11±1,56	0,77±0,01	0,97±0,01	1,14±0,07	
		Ljuska suncokreta	68,92±4,09	0,71±0,01	1,01±0,04	1,08±0,03	
	V ciklus	72	Repin rezanac	77,45±4,88	0,82±0,03	0,97±0,01	1,08±0,01
		Pivski trop	69,24±1,76	0,72±0,04	0,98±0,02	0,96±0,03	
		Ljuska suncokreta	62,30±1,84	0,67±0,01	0,95±0,03	0,86±0,02	
Slobodne ćelije	96		79,02±3,11	0,82±0,01	0,94±0,01	0,81±0,01	

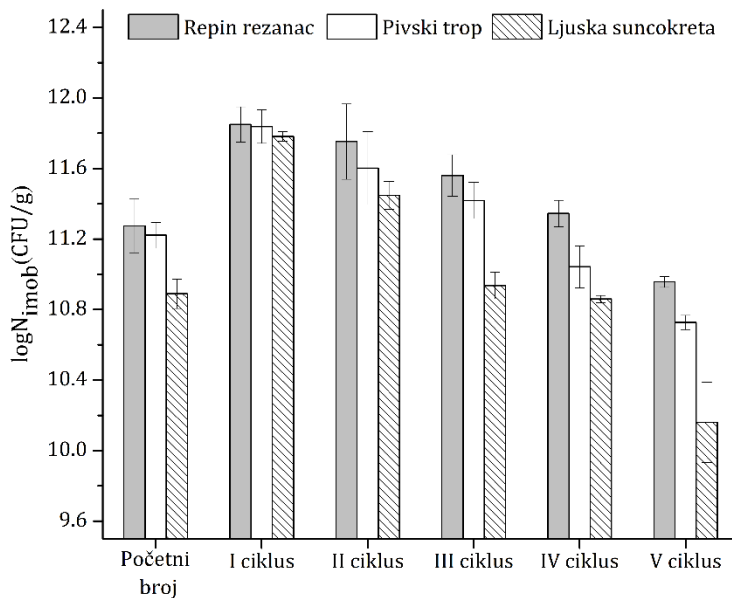
Bolja operativna stabilnost imobilisanog sistema na bazi repinog rezanca je dovela do značajno veće koncentracije mlečne kiseline na kraju pete fermentacione šarže u odnosu na koncentraciju mlečne kiseline koja je postignuta pomoću biomase imobilisane na pivski trop i ljusku suncokreta ( $P < 0,05$ ). U ponovljenoj šaržnoj

fermentaciji pomoću *L. paracasei* imobilisanog na repin rezanac, pivski trop i ljusku suncokreta postignute su ukupne produktivnosti procesa od 1,26 g/L h, 1,17 g/L h i 1,09 g/L h, redom, a dobijene vrednosti su bile značajno veće od produktivnosti (0,81 g/L h) ostvarene u fermentaciji pomoću slobodnih ćelija. Bolja proizvodnja mlečne kiseline pomoću imobilisanih sistema u odnosu na slobodne ćelije se može pripisati boljoj zaštiti ćelija unutar formiranog biofilma od štetnih i promenljivih uslova sredine, kao što su smicajne sile, inhibitorski efekat supstrata, odnosno proizvoda (mlečne kiseline) itd. Može se primetiti da se efikasnost imobilisanih sistema u svakom narednom šaržnom ciklusu može dovesti u vezu sa prethodno određenim fizičkim parametrima, indeksom apsorpcije vode i kritičnom tačkom vlažnosti (poglavlje 4.5.1.). Veći afinitet *L. paracasei* prema repinom rezancu i pivskom tropu i kompatibilnost površina ćelija i nosača, su doveli do efikasnije proizvodnje mlečne kiseline pomoću biomase imobilisane na ova dva nosača u odnosu na imobilisani sistem na bazi ljuske suncokreta.

Ukupan broj živih ćelija tokom fermentacije u sistemu sa imobilisanim i slobodnim ćelijama *L. paracasei* je prikazan na slici 31. Broj ćelija *L. paracasei* imobilisanih na tri lignocelulozna nosača tokom ponovljene šaržne fermentacije je prikazan na slici 32. Iako ukupan broj živih ćelija u 48 h u sistemu sa imobilisanim i slobodnim ćelijama nije bio statistički različit (slika 31), svi značajni parametri mlečno-kiselinske fermentacije postignuti sa imobilisanom mikrobnom biomasom su bili znatno bolji od istih parametara ostvarenih u fermentaciji sa slobodnim ćelijama. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa prethodno objavljenim [14,237] i potvrđuju bolje fermentacione sposobnosti imobilisanih ćelija, kojima se postiže efikasnija konverzija supstrata, a time i veće koncentracije i produktivnosti mlečne kiseline.



**Slika 31.** Ukupan broj slobodnih i imobilisanih ćelija *L. paracasei* NRRL B-4564 tokom šaržne i ponovljene šaržne fermentacije na supstratu na bazi tečne džibre i melase šećerne repe.



**Slika 32.** Broj ćelija *L. paracasei* NRRL B-4564 imobilisanih na tri lignocelulozna nosača tokom pet ponovljenih šaržnih ciklusa.



Slično proizvodnji mlečne kiseline, uočena je bolja kolonizacija površine repinog rezanca i prilično jaka adhezija ćelija *L. paracasei*, te je koncentracija imobilisane biomase na površini repinog rezanca bila veća u odnosu na druga dva lignocelulozna nosača (slika 32). Maksimalan broj imobilisanih ćelija u sva tri imobilisana sistema je postignut na kraju prve fermentacione šarže. Nakon prvog recirkulacionog ciklusa usledilo je blago smanjenje koncentracije imobilisane biomase, najverovatnije usled oslobađanja ćelija koje su bile slabo vezane za površinske strukture nosača, te je u sva tri imobilisana sistema uočeno postepeno smanjenje produktivnosti (tabela 15).

Međutim, bez obzira na oslobađanje ćelija sa površine nosača, visok broj živih ćelija po gramu sva tri lignocelulozna materijala na kraju pete fermentacione šarže ( $2 \times 10^{10}$  CFU/g do  $8 \times 10^{10}$  CFU/g) ukazuje na zadovoljavajuću adsorpciju ćelija *L. paracasei*. Prilično stabilna adsorpcija *L. paracasei* i konstantno visoka koncentracija imobilisanih ćelija na površini nosača tokom ponovljene šaržne fermentacije mogu biti rezultat sekrecije egzopolisaharida. Ranija istraživanja su pokazala da egzopolisaharidi pružaju zaštitu od smicajnih sila i mehaničkog oštećenja izazvanog mešanjem fermentacionog medijuma, učestvuju u formiranju biofilma i tako stabilizuju zadržavanje ćelija na površini nosača [236,238].

Kao što je prikazano u poglavlju 4.5.1., najporozniju strukturu ima ljuska suncokreta, zatim slede pivski trop i repin rezanac. Ovi rezultati su u suprotnosti sa koncentracijom imobilisanih ćelija *L. paracasei* (slika 32) koja je bila najveća na površini repinog rezanca, a najmanja na površini ljuske suncokreta. Na isti način, stepen poroznosti nosača je u suprotnosti sa ukupnim produktivnostima koje su postignute pomoću tri imobilisana sistema (tabela 15). Na osnovu navedenog se može zaključiti da se poroznost lignoceluloznih materijala ne može smatrati ključnim faktorom za imobilizaciju *L. paracasei*. Pretpostavlja se da su elektrostatičke sile između ćelija i površine nosača, hemijski sastav koji dovodi do specifičnog vezivanja, indeks adsorpcije vode i kritična tačka vlažnosti nosača imali važniju ulogu u vezivanju ćelija, dok je sekrecija egzopolisaharida doprinela formiranju biofilma i dužem zadržavanju ćelija na površini nosača.

Slično rezultatima dobijenim u ovom istraživanju, imobilizacija *Xanthomonas campestris* na površinu fibroznih nosača se pokazala nezavisnom od njihove poroznosti i hrapavosti, dok je odlučujući faktor za imobilizaciju ćelija na površinu nosača bila hidrofilnost materijala [239]. Sa druge strane, prethodne studije su pokazale da je morfologija nosača imala veliki uticaj na koncentraciju imobilisanih ćelija *Aureobasidium pullulans* i *Phanerochaete chrysosporium* i da su poroznost i hrapavost površine materijala u velikoj meri doprineli jačem vezivanju ćelija za strukture ispitivanih nosača [177,227].

Operativna stabilnost imobilisanih sistema na bazi repinog rezanca, pivskog tropa i ljske suncokreta je bila znatno bolja u odnosu na mnoge druge ispitivane za proizvodnju mlečne kiseline, uključujući ćelije imobilisane na površinu čestica glutena [119], plastičnih kompozitnih materijala [115] i celuloznih materijala [14]. Problemi koji se najčešće javljaju prilikom upotrebe imobilisanih sistema u kojima su ćelije mikroorganizama adsorbovane na površinu nosača su relativno brzo odvajanje ćelija od nosača. Slaba povezanost i brzo odvajanje ćelija sa površine nosača onemogućava ponovnu upotrebu imobilisanog biokatalizatora u dužem vremenskom periodu i tako smanjuje efikasnost bioprocesa. Kumar i saradnici su ispitivali proizvodnju mlečne kiseline u fermentaciji surutke i hemijski definisanog supstrata na bazi laktoze, pomoću ćelija imobilisanih na različite celulozne materijale [14]. U toj studiji, nakon jedne fermentacione šarže postignute su maksimalne koncentracije mlečne kiseline od 23,8 g/L i 30,2 g/L i produktivnosti od 0,25 g/L h i 0,31 g/L h [14], što su znatno niže vrednosti od istih parametara postignutih u fermentaciji supstrata na bazi krompirove džibre i melase šećerne repe. U nedavno objavljenoj studiji u kojoj je ispitivana proizvodnja mlečne kiseline na hidrolizatu pirinčanih mekinja pomoću ćelija imobilisanih na čestice kukuruzovine, prijavljeno je efikasno ponovno korišćenje imobilisanog biokatalizatora u čak 20 uzastopnih šarži [118]. U toj studiji postignuta je maksimalna koncentracija mlečne kiseline od 88 g/L, prinos od 0,95 g/g i veoma visoka produktivnost procesa od 5,20 g/L h [118]. U fermentaciji na hemijski definisanom supstratu pomoću *L. salivarius* imobilisanog na čestice lufa sundera (*Luffa cylindrica*)

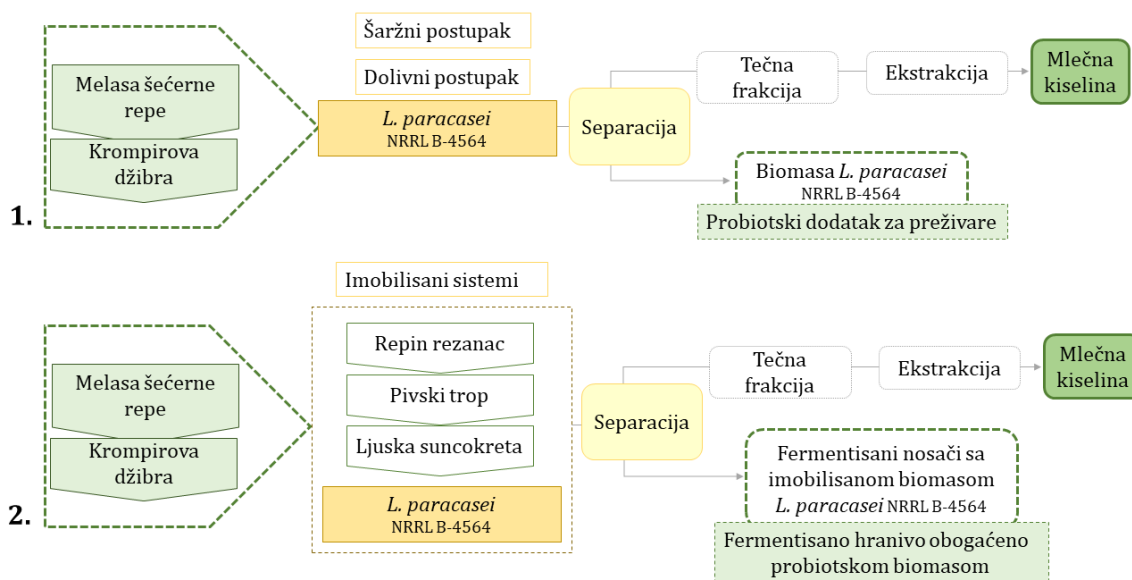
obloženih hitozanom, pokazana je mogućnost ponovnog korišćenja imobilisanog biokatalizatora u pet šaržnih ciklusa, pri čemu su ostvarene produktivnosti u opsegu 0,90 g/L h do 1,20 g/L h i koncentracije mlečne kiseline do 30 g/L [240]. Pored mogućnosti dobijanja visokih koncentracija i produktivnosti mlečne kiseline, upotreba prirodnih nosača, kao što su repin rezanac, pivski trop i ljuska suncokreta, može biti od velikog interesa, imajući u vidu da nakon fermentacije zaostaju fermentisani nosači sa imobilisanom biomasom BMK koji takođe predstavljaju vredan sporedni proizvod fermentacije.

#### **4.6. Mogućnosti istovremene proizvodnje mlečne kiseline i hraniva za preživare obogaćenog probiotskom biomasom**

U zavisnosti od tehnološkog postupka proizvodnje mlečne kiseline, nakon mlečno-kiselinske fermentacije kao sporedni proizvodi zaostaju: biomasa *L. paracasei* NRRL B-4564 – u slučaju primene šaržnog i dolivnog režima i fermentisani lignocelulozni nosači sa imobilisanom biomasom *L. paracasei* NRRL B-4564 – u slučaju primene imobilisanih sistema (slika 33). U drugom delu istraživanja je ispitivana mogućnost valorizacije nastalih sporednih proizvoda mlečno-kiselinske fermentacije u ishrani preživara.

Poslednjih godina zabrana upotrebe antibiotika kao promotera rasta dovela je do povećanog interesa za mogućost primene probiotskih mikroorganizama i organskih kiselina u ishrani životinja. BMK su klasifikovane kao bezbedne (skraćeno GRAS, engl. *Generally Recognized As Safe*) i najčešće su korišćene probiotske bakterije u dodacima ishrani. Istraživanja ukazuju na to da suplementacija probioticima kod preživara povećava efikasnost iskorišćenja hranljivih materija, dnevni prirast i ukupne performanse, kako mlečnih krava tako i tovnih goveda. Takođe, pokazano je da probiotici koji sadrže BMK smanjuju učestalost dijareje kod goveda, sprečavaju pojavu acidoze kod preživara koji se hrane visoko koncentrovanim obrocima i inhibiraju intestinalnu kolonizaciju patogenima [160]. Pored toga, inokulanti koji sadrže BMK se veoma često koriste kao silažni aditivi u cilju poboljšanja mlečno-kiselinske

fermentacije i time boljeg očuvanja siliranih useva [241] i poboljšanja svarljivosti siliranog materijala [242].



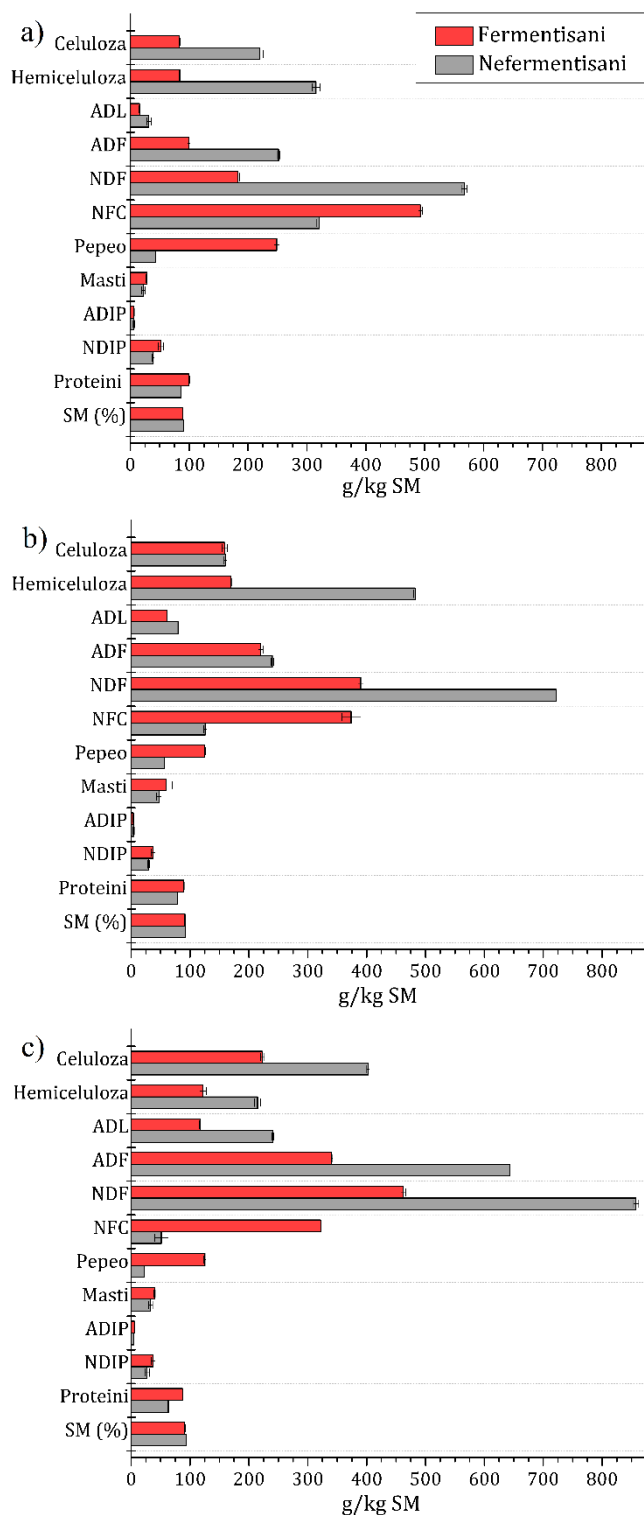
**Slika 33.** Šematski prikaz tehnoloških postupaka proizvodnje mlečne kiseline ispitivanih u doktorskoj disertaciji i predložene mogućnosti valorizacije nastalih sporednih proizvoda.

Iako je proizvodnja mlečne kiseline pomoću BMK imobilisanih na prirodne lignocelulozne nosače ispitivana u nekoliko studija, uticaj formiranog biofilma na hemijski sastav nosača, nutritivnu vrednost i parametre kvaliteta relevantne za njihovu upotrebu u ishrani životinja do sada nije proučavan. Na taj način, definisanjem hemijskog sastava i energetske vrednosti fermentisanih nosača, kao i probiotskog potencijala proizvodnog mikroorganizma se može omogućiti istovremena proizvodnja mlečne kiseline i funkcionalnog hraniva za životinje, što dovodi do poboljšanja ukupne profitabilnosti i produktivnosti procesa.

#### 4.6.1. Uticaj mlečno-kiselinske fermentacije na kvalitet lignoceluloznih nosača kao hraniva za životinje

Po završetku ponovljene šaržne fermentacije, lignocelulozni nosači sa imobilisanom biomasom *L. paracasei* NRRL B-4564 su odvojeni od fermentacionog medijuma centrifugiranjem i osušeni, nakon čega su ispitivani parametri kvaliteta fermentisanih uzoraka sa aspekta primene u ishrani životinja. Istovetnim analizama su podvrgnuti i nefermentisani nosači, a dobijeni rezultati su potom upoređeni. Hemijski sastav fermentisanog i nefermentisanog repinog rezanca, pivskog tropa i ljuske suncokreta je prikazan na slici 34.

Rezultati pokazuju da je mlečno-kiselinska fermentacija značajno uticala na hemijski sastav lignoceluloznih nosača. Nefermentisani uzorci su imali visok sadržaj strukturnih ugljenih hidrata, pri čemu je najveći sadržaj neutralnih i kiselih deterdžentskih vlakana (NDF i ADF) i lignina (ADL) detektovan u ljusci suncokreta, a najmanji u repinom rezancu. Najveće promene u sadržaju vlakana su zabeležene u ljusci suncokreta ( $P < 0,05$ ). Takođe, značajno smanjenje sadržaja vlakana je postignuto u slučaju pivskog tropa i repinog rezanca ( $P < 0,05$ ). Soj *L. paracasei* NRRL B-4564 ne pripada grupi celulolitičkih mikroorganizama, pa se smanjenje sadržaja strukturnih ugljenih hidrata u ispitivanim uzorcima ne može pripisati hidrolizi izazvanoj enzimima, ali može biti rezultat hidrolize mlečnom kiselinom tokom ponovljene šaržne fermentacije. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa prethodnom studijom u kojoj je fermentacija pomoću necelulolitičkog soja *L. acidophilus* dovela do smanjenja sadržaja vlakana u sporednim proizvodima industrije vrenja [243].



**Slika 34.** Hemijski sastav fermentisanog i nefermentisanog a) repinog rezanca, b) pivskog tropa i c) ljuske suncokreta.

BMK se samostalno ili u kombinaciji sa enzimima obično koriste za poboljšanje nutritivnog kvaliteta useva i industrijskih sporednih proizvoda, kao i za povećanje svarljivosti silažnog materijala [146,147,243,244]. Li i saradnici su ispitivali efekat BMK, enzima celulaza, celulolitičkog soja *B. pumilus* i njihovih kombinacija na hemijski sastav, *in vitro* svarljivost i populaciju mikroorganizama silaže lucerke [244]. U toj studiji, najbolje fermentacione karakteristike silaže, smanjenje sadržaja vlakana i povećanje svarljivosti su postignuti upravo tretmanom lucerke pomoću soja *L. plantarum* a214. U drugom istraživanju, kombinovani tretman pirinčane slame hemicelulazama i BMK je doveo do smanjenja sadržaja hemiceluloze i NDF, ukazujući da je razgradnja strukturnih ugljenih hidrata rezultat sinergističkog dejstva enzima, nastalih kiselina i mikrobne aktivnosti [147].

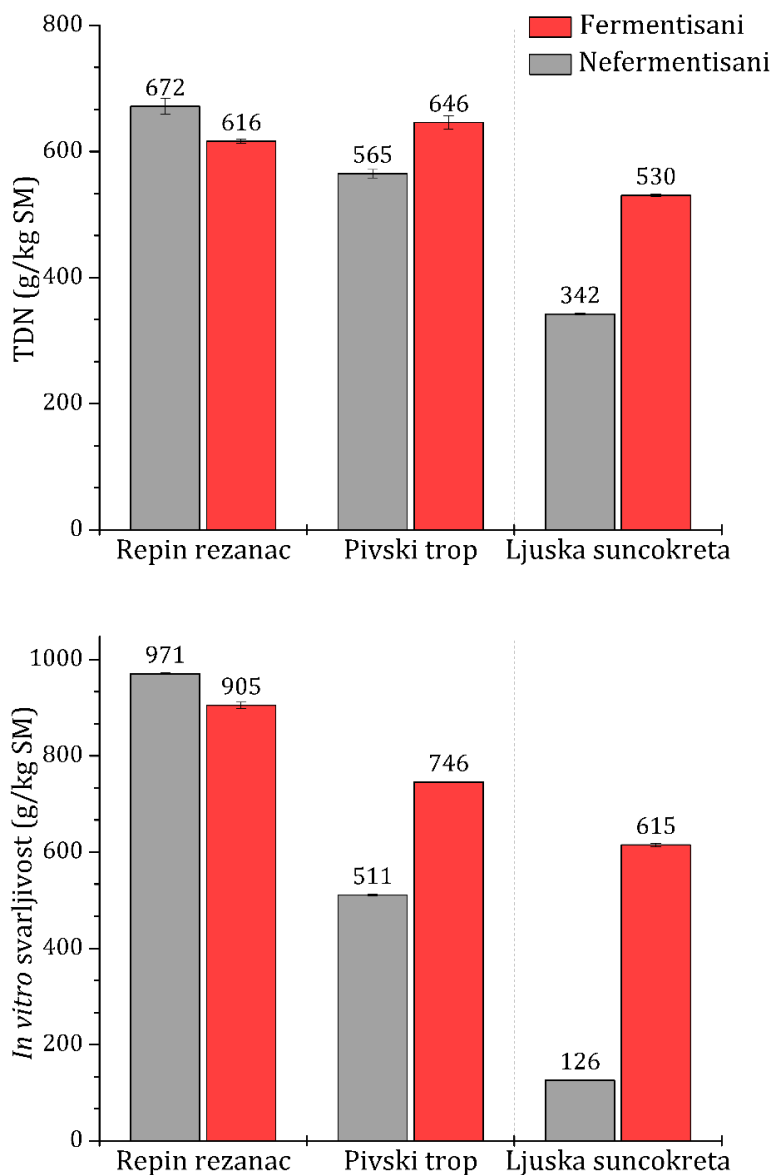
Analizom fermentisanog i nefermentisanog repinog rezanca, pivskog tropa i ljuske suncokreta je pokazano da je mlečno-kiselinska fermentacija statistički značajno uticala na sadržaj proteina te je on u sva tri fermentisana materijala bio značajno veći u odnosu na nefermentisane uzorke ( $P < 0,05$ ). Sadržaj proteina u fermentisanom repinom rezancu je iznosio 99,4 g/kg SM, a nešto niže vrednosti su detektovane u pivskom tropu (89,4 g/kg SM) i ljusci suncokreta (87,7 g/kg SM). Povećanje sadržaja proteina nakon fermentacije je u saglasnosti sa prethodnim studijama u kojima je isti efekat postignut nakon fermentacije različitog silažnog materijala pomoću BMK [243,245,246]. Izvesno je da deo proteina u fermentisanom repinom rezancu, pivskom tropu i ljusci suncokreta potiče od mikrobne biomase, ali i od zaostalog fermentacionog medijuma. Što se tiče sadržaja proteina nerastvorljivog u rastvoru neutralnog (NDIP), odnosno kiselog deterdženta (ADIP), nakon fermentacije sadržaj ovih frakcija proteina nije bio značajno drugačiji u odnosu na nefermentisane uzorke ( $P > 0,05$ ). Sadržaj ADIP u fermentisanom repinom rezancu (6,2 g/kg SM), pivskom tropu (3,8 g/kg SM) i ljusci suncokreta (5,1 g/kg SM) ukazuje da je relativno mali deo od ukupnog sadržaja proteina nedostupan životinjama, budući da se ova frakcija proteina smatra nesvarljivom [247]. Mlečno-kiselinska fermentacija nije imala statistički značajan uticaj na sadržaj masti u ispitivanim uzorcima ( $P > 0,05$ ). Kao što se može videti sa slike 34, u fermentisanim

uzorcima je detektovan značajno veći sadržaj pepela u odnosu na nefermentisane materijale ( $P < 0,05$ ). Najveći sadržaj pepela je detektovan u fermentisanom rezancu šećerne repe (228 g/kg SM), zatim u ljusci suncokreta (125 g/kg SM) i pivskom tropu (124 g/kg SM). U studiji Arasu i saradnika je detektovano povećanje sadržaja pepela u različitim vrstama žitarica fermentisanih pomoću *L. plantarum* [245]. Slično, povećanje sadržaja pepela je postignuto fermentacijom biljnog otpada pomoću *A. niger* [248]. Porast sadržaja pepela u repinom rezancu, pivskom tropu i ljusci suncokreta može biti rezultat sposobnosti ovih materijala da vežu metale iz fermentacionog medijuma na bazi džibre i melase šećerne repe. Rezultati ranijih istraživanja ukazuju na to da se, u zavisnosti od hemijskih karakteristika i prisutnih funkcionalnih grupa, otpadni materijali agro-industrijskog porekla veoma efikasno mogu koristiti za uklanjanje jona metala iz otpadnih voda [249].

Sadržaj nestrukturnih ugljenih hidrata (NFC) nakon fermentacije je bio značajno veći u odnosu na nefermentisane uzorke ( $P < 0,05$ ). Porast sadržaja lako asimilativnih ugljenih hidrata je bio najizraženiji u ljusci suncokreta, zatim repinom rezancu i pivskom tropu. Veća koncentracija lako asimilativnih ugljenih hidrata u fermentisanim materijalima je posledica razgradnje strukturnih ugljenih hidrata. Takođe, izvesno je da deo NFC u fermentisanim materijalima čine fermentabilni šećeri koji potiču iz zaostalog fermentacionog medijuma.

Na slici 35 je prikazan sadržaj ukupne svarljive hranljive materije (TDN) i *in vitro* svarljivost suve materije fermentisanih i nefermentisanih lignoceluloznih nosača. Mlečno-kiselinska fermentacija je imala značajan pozitivan uticaj na *in vitro* svarljivost suve materije pivskog tropa i ljuske suncokreta ( $P < 0,05$ ). Sa druge strane, fermentacija je dovela do statistički značajnog smanjenja *in vitro* svarljivosti suve materije repinog rezanca ( $P < 0,05$ ). Kao što se može primetiti sa slike 34, postoji dobro slaganje svarljivosti suve materije određene *in vitro* enzimskom metodom i sadržaja ukupne svarljive hranljive materije (TDN<sub>1x</sub>) koji je dobijen računskim putem.

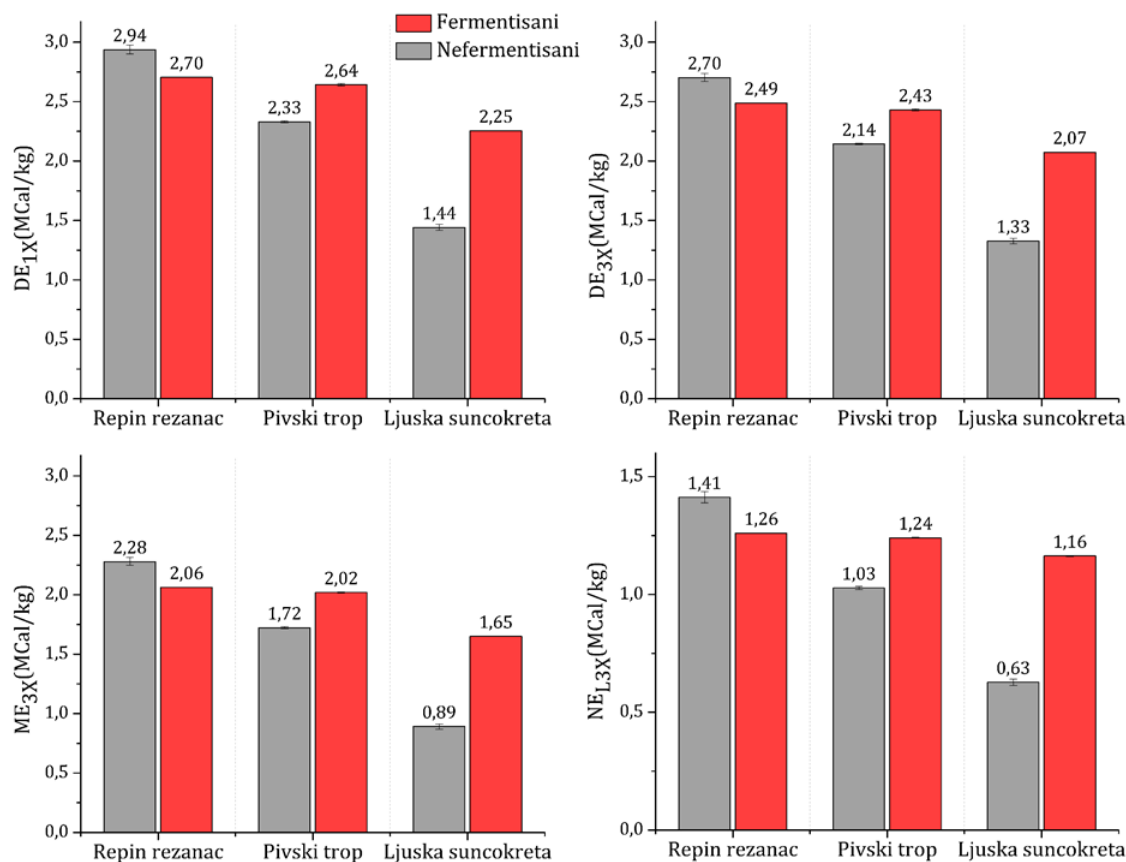




**Slika 35.** Ukupna svarljiva hranljiva materija (TDN) i *in vitro* svarljivost suve materije fermentisanih i nefermentisanih lignoceluloznih nosača.

Ostali energetske parametiri fermentisanih i nefermentisanih uzoraka su imali isti trend kao i TDN<sub>1x</sub> (slika 36 i 37). Poređenjem fermentisanog i nefermentisanog pivskog tropa i ljuske suncokreta, vrednosti svarljive energije (DE<sub>1x</sub>), metaboličke energije (ME<sub>3x</sub>), neto energije za laktaciju (NE<sub>L3x</sub>), kao i neto energije za održanje (NE<sub>M</sub>) i porast (NE<sub>G</sub>) su bile značajno veće nakon mlečno-kiselinske fermentacije ( $P < 0,05$ ).

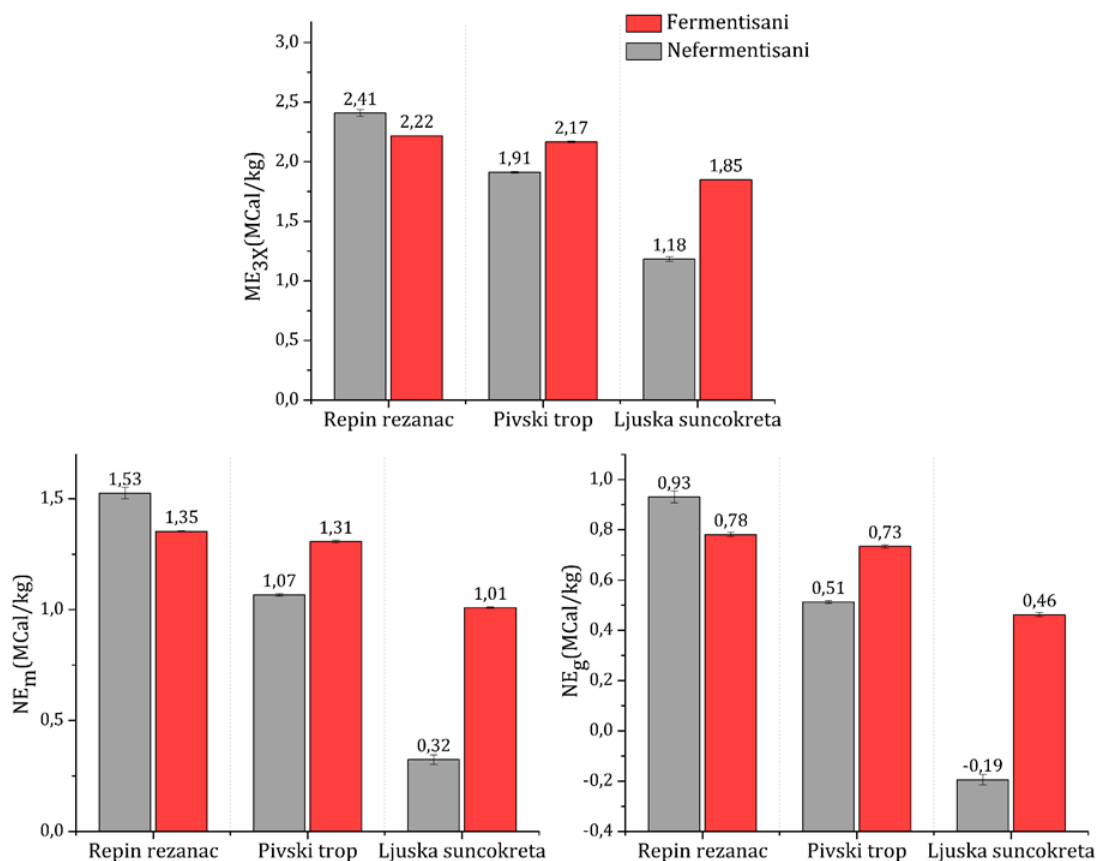
Sa druge strane, vrednosti navedenih energetskih parametara repinog rezanca su bile niže nakon fermentacije ( $P < 0,05$ ).



**Slika 36.** Uporedni prikaz energetskih parametara fermentisanih i nefermentisanih ligniceluloznih nosača predviđenih za mlečne krave.

Manja svarljivost i sadržaj energije repinog rezanca nakon mlečno-kiselinske fermentacije se jednim delom mogu dovesti u vezu sa povećanjem sadržaja pepela koji je u fermentisanim uzorcima bio pet puta veći u odnosu na nefermentisane. Prema američkom NRC sistemu [180], TDN je pokazatelj energetske vrednosti hraniva i u negativnoj je korelaciji sa sadržajem pepela. Takođe, prethodno je ustanovljena značajna negativna korelacija između sadržaja NDF i svarljivosti suve materije [250]. Smanjenje sadržaja NDF i ADL nakon fermentacije je bilo izraženije u uzorcima ljuske

suncokreta i pivskog tropa u poređenju sa repinim rezancem, što je dodatno uticalo na svarljivost i dostupnu energiju ljuske suncokreta i pivskog tropa, te su fermentisani uzorci imali znatno veće vrednosti ovih parametara u odnosu na nefermentisane uzorke.



**Slika 37.** Uporedni prikaz energetske parametara fermentisanih i nefermentisanih ligniceluloznih nosača predviđenih za tovna goveda.

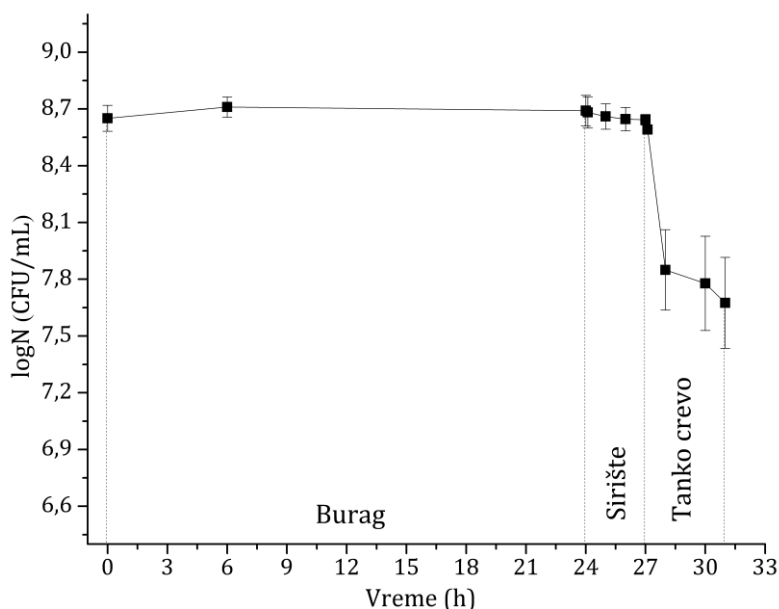
#### 4.6.2. *In vitro* probiotske karakteristike *L. paracasei* NRRL B-4564

Imajući u vidu da je u prethodnom poglavlju pokazano da mlečno-kiselinska fermentacija dovodi do poboljšanja kvaliteta lignoceluloznih materijala, kao i činjenicu da u procesu zaostaje značajna količina imobilisane biomase *L. paracasei* NRRL B-4564, u narednom setu eksperimenata su ispitana probiotska svojstva ovog soja, kako bi se

u potpunosti sagledala mogućnost primene fermentisanog ostatka kao funkcionalnog hraniva za životinje. Na osnovu preporuka organizacije Ujedinjenih nacija za hranu i poljoprivredu i Svetske zdravstvene organizacije, osnovni kriterijumi za selekciju novih probiotskih sojeva su otpornost na uslove GIT-a, sposobnost adhezije za intestinalne površine, antimikrobna aktivnost i osetljivost na antibiotike [251]. Ovi kriterijumi se moraju uzeti u obzir u cilju procene bezbednosti upotrebe probiotskog soja, kao i njegovog potencijala da ispolji određena funkcionalna svojstva u telu domaćina.

#### **4.6.2.1. Preživljavanje u simuliranim uslovima digestivnog trakta preživara**

Kao što je već spomenuto, anatomija i fiziologija digestivnog trakta preživara se značajno razlikuje od monogastričnih životinja, pri čemu se najveće razlike odnose na građu želuca, odnosno postojanje buraga u kome se pod uticajem brojnih mikroorganizama odigrava složen proces fermentacije hranljivih materija i nastanka karakterističnih produkata metabolizma. Sposobnost preživljavanja u uslovima digestivnog trakta preživara je ispitivana inkubiranjem *L. paracasei* u simuliranim uslovima buraga, sirišta i tankog creva, u vremenskom periodu koji je karakterističan za prosečno zadržavanje i varenje hrane u svakom od navedenih delova digestivnog trakta preživara. Dobijeni rezultati pokazuju da *L. paracasei* NRRL B-4564 ima visoku sposobnost preživljavanja u uslovima GIT-a preživara, pri čemu je uočena veća otpornost na uslove buraga i sirišta u odnosu na uslove tankog creva (slika 38). Tokom 24 h inkubacije u simuliranim uslovima buraga nije bilo statistički značajnih promena u broju živih ćelija *L. paracasei* ( $P > 0,05$ ). Takođe, uslovi sirišta nisu značajno uticali na broj živih ćelija *L. paracasei* ( $P > 0,05$ ). Međutim, dalje izlaganje *L. paracasei* simuliranim uslovima tankog creva je značajno uticalo na njegovu vijabilnost, te je nakon 4 h inkubacije u veštačkom soku tankog creva broj ćelija *L. paracasei* bio manji za jednu logaritamsku jedinicu u odnosu na početni broj ćelija ( $P < 0,05$ ). Stopa preživljavanja *L. paracasei* NRRL B-4564 nakon prolaska kroz simulirani digestivni trakt preživara je iznosila 88,7%.



**Slika 38.** Preživljavanje *L. paracasei* NRRL B-4564 u simuliranim uslovima digestivnog trakta preživara.

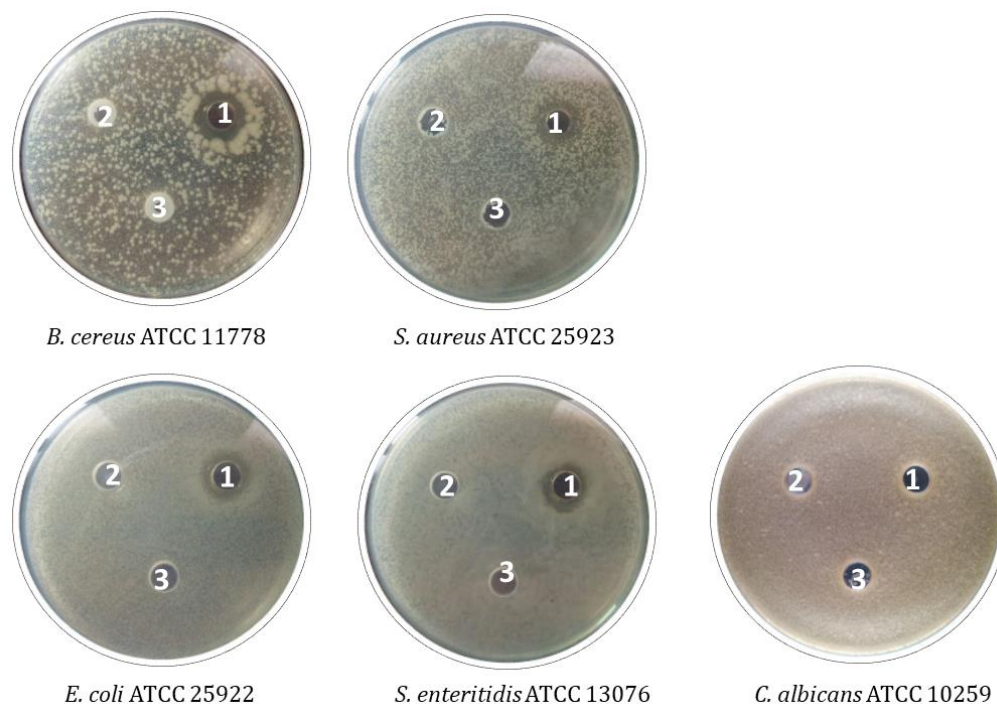
Malo je literaturnih podataka koji govore o sposobnosti preživljavanja potencijalnih probiotskih sojeva u uslovima GIT-a preživara. U studiji Dogi i saradnika, nakon prolaska kroz kompletan digestivni trakt preživara, ostvarena stopa preživljavanja *S. cerevisiae* je iznosila 87,1% [183], što odgovara sposobnosti preživljavanja *L. paracasei* NRRL B-4564.

Rezultati prethodnih istraživanja u kojima je ispitivano preživljavanje BMK u uslovima karakterističnim za GIT, ukazuju na to da je većina ispitivanih sojeva, uključujući pripadnike vrsta *L. paracasei*, *L. casei* and *L. rhamnosus*, otpornija na alkalne uslove i prisustvo žučnih soli u tankom crevu u odnosu na niske pH vrednosti želuca [252,253]. Probiotske karakteristike mikroorganizama, uključujući preživljavanje u digestivnim uslovima, su specifične za svaki soj i varijacije unutar jedne vrste mogu biti uzuzetno velike. Osim toga, nepostojanje jedinstvene standardizovane *in vitro* metode za procenu sposobnosti preživljavanja u uslovima GIT-a onemogućava poređenje tolerantnosti potencijalnih probiotskih sojeva na osnovu rezultata dostupnih u literaturi.

#### 4.6.2.2. Antimikrobna aktivnost

Primena probiotika u ishrani ljudi i životinja je od velikog interesa, naročito imajući u vidu antagonističko dejstvo probiotskih sojeva protiv brojnih patogenih mikroorganizama koji su najčešći uzročnici gastrointestinalnih infekcija. Antagonističko dejstvo protiv patogenih mikroorganizama je posledica sposobnosti BMK da proizvode jedinjenja koja imaju antimikrobni efekat. Antimikrobna aktivnost BMK je najčešće izazvana organskim kiselinama koje nastaju tokom metabolizma ugljenih hidrata, uglavnom mlečna i sirćetna kiselina i/ili jedinjenjima proteinske prirode, kao što su bakteriocini, a kod pojedinih sojeva u manjoj meri i katabolitima nastalim u procesima oksidacije, kao što je vodonik peroksid. Osim toga, drugi proizvodi heterofermentativnog metabolizma, kao što su mravlja i propionska kiselina i diacetil, takođe mogu imati izvesno antimikrobno dejstvo.

Za procenu antimikrobne aktivnosti *L. paracasei*, supernatanti prekonocne kulture su testirani difuzionom metodom pomoću bunarčića u odnosu na pet indikatorskih patogenih mikroorganizama. Rezultati su pokazali da supernatant pri pH vrednosti 3,8 inhibira rast Gram-pozitivnih (*B. cereus*, *S. aureus*) i Gram-negativnih bakterija (*S. enteritidis*, *E. coli*), dok inhibitorna aktivnost prema patogenoj vrsti kvasca *C. albicans* nije uočena (slika 39, tabela 16). Kako bi se utvrdila hemijska priroda inhibitornog jedinjenja koje proizvodi *L. paracasei*, supernatanti prekonocne kulture su neutralisani (pH 7,0) i tretirani pronazom E, a zatim su testirani u odnosu na iste patogene mikroorganizame. U oba slučaja, neutralisan supernatant, kao i neutralisan supernatant koji je dodatno tretiran pronazom E, nisu delovali inhibitorno na rast patogena, te se može zaključiti da je antimikrobno dejstvo *L. paracasei* NRRL B-4564 izazvano nedisosovanim organskim kiselinama, a ne jedinjenjima proteinske prirode.



**Slika 39.** Antimikrobna aktivnost *L. paracasei* NRRL B-4564 prema patogenim mikroorganizmima. **1** – supernatant pH 3,8; **2** – supernatant pH 7,0; **3** – neutralisan supernatant tretiran pronazom E.

*L. paracasei* NRRL B-4564 je homofermentativni soj, pa je mlečna kiselina jedini proizvod metabolizma ugljenih hidrata odgovoran za njegovu antimikrobnu aktivnost. Brojna istraživanja su pokazala da je mlečna kiselina glavni metabolit velikog broja vrsta *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* koji dovodi do smanjenja pH vrednosti i posledično do antimikrobnog efekta [254], što u velikoj meri doprinosi bezbednosti fermentisanih proizvoda, ali i stabilnosti crevne mikrobiote [185,255,256]. Mehanizam kojim mlečna kiselina ispoljava inhibitorno dejstvo se ogleda u tome što nedisosovan oblik kiseline difunduje kroz ćelijsku membranu i disosuje unutar ćelije uz oslobađanje H<sup>+</sup> jona, što stvara kiselu sredinu unutar ćelije. Pored pH efekta, nedisosovana kiselina narušava elektrohemijski gradijent protona, dovodeći do bakterioostaze i konačno smrti osetljivih bakterija [257].

Dok je inhibitorno dejstvo BMK prema patogenim bakterijama potvrđeno brojnim *in vitro* istraživanjima, u literaturi je znatno manje podataka o inhibitornom efektu na patogene vrste plesni i kvasaca [258]. Objavljeni rezultati o antimikrobnom dejstvu BMK prema patogenim vrstama roda *Candida* su prilično raznoliki [255,259]. Pored toga, rezultati ranijih istraživanja ukazuju na to da su bakteriocini i druga jedinjenja male molekulske mase najčešće odgovorni za antifungalno dejstvo BMK [258], što objašnjava odsustvo inhibitornog efekta *L. paracasei* NRRL B-4564 prema patogenoj vrsti kvasca *C. albicans*.

**Tabela 16.** Prečnici zone inhibicije rasta patogenih mikroorganizama postignuti pomoću supernatanta prekonocne kulture *L. paracasei* NRRL B-4564.

Patogen	Supernatant prekonocne kulture <i>L. paracasei</i>
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	+++
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	+++
<i>E. coli</i> ATCC 25922	++
<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	+++
<i>C. albicans</i> ATCC 10259	-

Simboli se odnose na prečnik zone inhibicije rasta: (-) nema inhibicije; (+) 1 mm do 2 mm; (++) 2,1 mm do 4 mm; (+++) > 4.

#### 4.6.2.3. Osetljivost na antibiotike

Osetljivost na antibiotike je važan kriterijum za procenu bezbednosti upotrebe potencijalnog probiotskog soja u ishrani ljudi i životinja. Osetljivosti *L. paracasei* na devet različitih antibiotika je ispitana primenom standardne disk difuzione metode. *L. paracasei* NRRL B-4564 je pokazao osetljivost na eritromicin, tetraciklin i ampicilin, umerenu osetljivost na penicilin G, dok je uočena rezistentnost *L. paracasei* na vankomicin, aminoglikozide (gentamicin, streptomycin, kanamicin) i nalidiksinsku kiselinu (slika 40, tabela 17).





**Slika 40.** Antibiogram test *L. paracasei* NRRL B-4564. **1** – eritromicin; **2** – tetraciklin; **3** – penicilin; **4** – ampicilin; **5** – vankomicin; **6** – gentamicin; **7** – streptomycin; **8** – kanamicin; **9** – nalidiksinska kiselina.

**Tabela 17.** Prečnici zona inhibicije rasta i kategorija osetljivosti *L. paracasei* NRRL B-4564 na test antibiotike.

Test antibiotik	Mehanizam dejstva	Prečnik zone inhibicije (mm)	Kategorija osetljivosti
Eritromicin	Inhibitor sinteze proteina	27	S
Tetraciklin	Inhibitor sinteze proteina	25	S
Penicilin	Inhibitor sinteze ćelijskog zida	19	I
Ampicilin	Inhibitor sinteze ćelijskog zida	21	S
Vankomicin	Inhibitor sinteze ćelijskog zida	-	R
Gentamicin	Inhibitor sinteze proteina	-	R
Streptomycin	Inhibitor sinteze proteina	-	R
Kanamycin	Inhibitor sinteze proteina	-	R
Nalidiksinska kiselina	Inhibitor sinteze ili aktivnosti nukleinskih kiselina	-	R

(S) osetljiv, (I) umereno osetljiv, (R) rezistentan.

Prenos gena rezistencije na autohtonu crevnu mikrobiotu ili patogene mikroorganizme je trenutno jedno od najvažnijih bezbednosnih pitanja u vezi sa upotrebom probiotskih mikroorganizama u ishrani ljudi i životinja. Ovo pitanje dobija na značaju naročito imajući u vidu da se lanac ishrane smatra glavnim putem prenosa

gena rezistencije između životinjske i ljudske populacije [260]. Kako bi se izbegla mogućnost horizontalnog transfera, geni odgovorni za rezistenciju kod mikroorganizama koji se koriste kao starteri ili aditivi u hrani ne smeju biti povezani sa mobilnim genetskim elementima. Prirodno visoka rezistentnost na brojne antibiotike, a posebno na vankomicin, je karakteristična za BMK [261]. Prethodna istraživanja su potvrdila prisustvo unutrašnje rezistentnosti na ovaj antibiotik kod nekoliko sojeva *L. paracasei* [262,263]. Takođe, otpornost na aminoglikozide je često primećena kod velikog broja ispitivanih sojeva BMK [261], uključujući *L. paracasei* subsp. *paracasei* [264,265].

Ispitivanjem fenotipske i genotipske rezistentnosti sojeva izolovanih iz fermentisane hrane pokazana je osetljivost velikog broja testiranih sojeva, uključujući pripadnike vrsta *L. rhamnosus* i *L. casei*, na ampicilin, bacitracin, cefsulodin, kao i prisustvo unutrašnje rezistentnosti na nalidiksinsku kiselinu, kanamicin i vankomicin [266]. Prema Evropskoj agenciji za bezbednost hrane (skraćeno EFSA, engl. *European Food Safety Authority*), bakterijski sojevi koji su nosioci gena odgovornih za unutrašnju rezistentnost predstavljaju minimalan rizik za njihov horizontalni transfer, te se ovi sojevi mogu smatrati bezbednim za upotrebu u ishrani životinja [267].

Zbog dugogodišnje bezbedne upotrebe, *L. paracasei* je nosilac statusa „kvalifikovana pretpostavka bezbednosti” (skraćeno QPS, engl. *Qualified Presumption of Safety*), koji je uveden od strane EFSA za mikroorganizme koji se smatraju bezbednim za upotrebu u proizvodnji hrane i suplemenata namenjenih ishrani ljudi i životinja [268]. Takođe, prema važećoj regulativi o upotrebi aditiva u ishrani životinja (EC) 1831/2003, *L. paracasei* je već svrstan u kategoriju tehnoloških aditiva, odnosno funkcionalnu grupu silažnih aditiva [269], pa se primena ispitivanog soja *L. paracasei* NRRL B-4564 u ishrani životinja može smatrati potpuno bezbednom.

#### 4.6.2.4. Autoagregacija

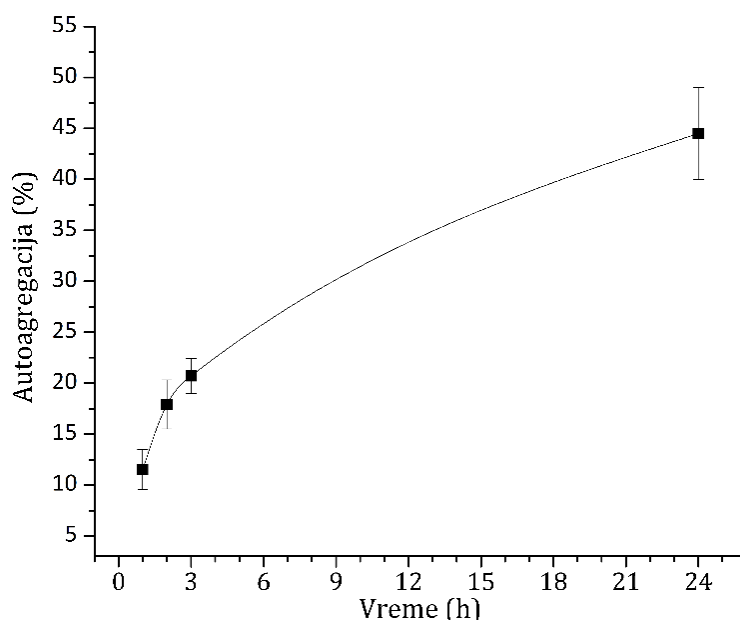
Sposobnost vezivanja, odnosno adhezije bakterijskih ćelija za intestinalnu površinu je važna karakteristika probiotskih sojeva. Do danas, brojna istraživanja su

sporovedena sa ciljem da se ispituju površinske karakteristike bakterijskih ćelija i sile interakcija koje se mogu dovesti u vezu sa adhezijom za intestinalne epitelne ćelije i mukozne površine [229,270,271]. Smatra se da je sposobnost agregacije bakterijskog soja u većini slučajeva povezana sa njegovim adhezivnim karakteristikama. Autoagregacija predstavlja sposobnost bakterijskih ćelija jednog soja da se međusobno grupišu, odnosno formiraju agregate. Korelacija između autoagregacije i sposobnosti adhezije je prethodno potvrđena za brojne pripadnike roda *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* [186,271,272]. Sposobnost probiotskih sojeva da formiraju ćelijske agregate se smatra poželjnom karakteristikom budući da takvi sojevi mogu potencijalno da inhibiraju vezivanje patogenih mikroorganizama za intestinalne površine. Ovo se može postići bilo formiranjem barijere putem autoagregacije, koagregacijom sa komensalnim mikroorganizmima na intestinalnoj mukozni ili direktnom koagregacijom sa intestinalnim patogenima, čime se olakšava njihovo ukljanjanje iz GIT-a.

Sposobnost autoagregacije *L. paracasei* NRRL B-4564 je praćena merenjem optičke gustine suspenzija ćelija u PBS puferu na talasnoj dužini od 600 nm tokom 24 h. Step en autoagregacije *L. paracasei* koji je određen u odnosu na početnu optičku gustinu suspenzija ćelija je prikazan na slici 41. Može se primetiti da step en autoagregacije ćelija *L. paracasei* raste tokom perioda inkubacije, pri čemu je veoma intenzivno formiranje autoagregata usledilo tokom prvih 3 h inkubacije. Step en autoagregacije ćelija *L. paracasei* nakon 3 h je iznosio 20,7%, dok je nakon 24 h inkubacije postignut procenat autoagregacije od 44,5%. Uočena zavisnost step ena autoagregacije *L. paracasei* od vremena inkubacije je u saglasnosti sa prethodno objavljenim rezultatima [186,273,274].

Generalno, mehanizam koji dovodi do agregacije probiotskih sojeva BMK je i dalje nepoznat, iako se čini da je fenomen agregacije rezultat složenih interakcija između jedinjenja vezanih za površinu bakterijskih ćelija, kao što su proteini, glikoproteini, teihoična ili lipoteihoična kiselina i agregacioni faktori [275]. Faktori odgovorni za agregaciju i geni koji ih kodiraju su prethodno okarakterisani za nekoliko vrsta roda *Lactobacillus* [276,277], uključujući *L. paracasei* [278]. Step en autoagregacije

*L. paracasei* NRRL B-4564 (44,1%) je blizak vrednostima prethodno objavljenim za *L. casei* Shirota (40,4%), *L. acidophilus* NCFM (33,5%), *L. rhamnosus* LC-705 (38,7%) i *L. salivarius* Ls-33 (54,5%) [186]. Međutim, treba imati u vidu da visoke vrednosti autoagregacije ne znače nužno *in vivo* adheziju u kojoj sudeluju brojni faktori domaćina, kao što su odbrambeni mehanizmi, rezidentna (stalna) mikrobiota i peristaltički pokreti, koji mogu znatno da modifikuju adheziju bakterijskih ćelija za intestinalnu površinu [279].



**Slika 41.** Kinetika autoagregacije *L. paracasei* NRRL B-4564 tokom 24 h inkubacije u PBS puferu.

Pored navedenih probiotskih karakteristika, antioksidativna aktivnost *L. paracasei* NRRL B-4564 predstavlja dodatnu vrednost koja se može postići prilikom njegove primene u ishrani životinja. Poslednjih godina uloga BMK kao antioksidanata je veoma intenzivno proučavana [280], a tome doprinose brojni potvrđeni pozitivni efekti BMK na crevnu mikrobiotu i dugogodišnja bezbedna upotreba u ishrani ljudi i životinja [8]. Kao što je objašnjeno u poglavlju 4.4.1., antioksidativna aktivnost *L. paracasei* je potvrđena na osnovu sposobnosti celih ćelija i unutarćelijskog ekstrakta da

neutrališu slobodne DPPH<sup>•</sup> radikale. Rezultati ukazuju na to da antioksidativna aktivnost *L. paracasei* NRRL B-4564 zavisi od koncentracije ćelija, pri čemu veće koncentracije dovode do većeg stepena redukcije DPPH<sup>•</sup> radikala (tabela 18). Step en inhibicije DPPH<sup>•</sup> radikala ostvaren pomoću celih ćelija *L. paracasei* NRRL B-4564 (39,1%) je bio znatno veći od prethodno prijavljenih za *L. casei* (27,5%) i *L. delbrueckii* (24,0%) pri istoj koncentraciji ćelija od 10<sup>9</sup> CFU/mL. Takođe, pokazano je da antioksidativni kapacitet *L. paracasei* NRRL B-4564 u velikoj meri zavisi od uslova sredine i da izlaganje soja izvesnim pro-oksidativnim jedinjenjima dovodi do značajnog povećanja njegovog antioksidativni kapaciteta (poglavlje 4.4.1.). Ovo ukazuje da *L. paracasei* može imati važnu ulogu u zaštiti od oksidativnog stresa i tako doprineti pravilnom funkcionisanju crevne mikrobiote, a time i zdravlju domaćina.

**Tabela 18.** Antioksidativna aktivnost *L. paracasei* NRRL B-4564.

Koncentracija ćelija	Inhibicija DPPH <sup>•</sup> radikala (%)	
	Cele ćelije	Unutarćelijski ekstrakt
10 <sup>8</sup> CFU/mL	30,1±1,03	17,5±0,82
10 <sup>9</sup> CFU/mL	39,1±0,75	22,6±1,22

Sojevi BMK koji ispoljavaju značajnu antioksidativnu aktivnost su posebno atraktivni za primenu u prehrambenoj industriji, za proizvodnju funkcionalne hrane ili prirodnih suplemenata [175]. Da bi ispoljili pozitivno dejstvo, probiotski sojevi moraju da prežive nepovoljne uslove GIT-a međutim, tokom prolaska kroz GIT dolazi do liziranja izvesnog broja ćelija i oslobađanja unutarćelijskog sadržaja u okolnu sredinu. Zbog toga, postoji veliki interes za utvrđivanje doprinosa celih ćelija i unutarćelijskog ekstrakta ukupnoj zaštiti od oksidativnog stresa.

Unutarćelijski antioksidativni odbrambeni sistem BMK čine neenzimski antioksidanti (glutacion, tioredoksin i dr.) i antioksidativni enzimi (superoksid dizmutaza, katalaza, flavin zavisna oksidaza i peroksidaza) [12]. Pored unutarćelijskih antioksidanata, antioksidativnom kapacitetu BMK doprinose jedinjenja koja su vezana za površinu ćelije, kao što su egzopolisaharidi i proteini, a čiji antioksidativni potencijal

je prethodno potvrđen u nekoliko studija [176,281,282]. Literaturni podaci ukazuju na to da je antioksidativna aktivnost celih ćelija i unutarćelijskih ekstrakata specifična karakteristika soja. Na osnovu stepena inhibicije DPPH<sup>•</sup> radikala ostvarenih pomoću *L. paracasei* može se zaključiti da cele ćelije imaju veći antioksidativni kapacitet u odnosu na unutarćelijske ekstrakte (tabela 18). Ovo ukazuje da su pojedina jedinjenja lokalizovana na površini ćelija *L. paracasei* aktivnija u neutralizaciji DPPH<sup>•</sup> radikala u odnosu na antioksidativna jedinjenja prisutna u unutarćelijskom ekstraktu.

## 5. ZAKLJUČAK

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije je valorizacija agro-industrijskih otpadnih proizvoda u mlečno-kiselinskoj fermentaciji. Na osnovu prikazanih ekperimentalnih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

Na osnovu utvrđenog hemijskog sastava, kombinovani supstrat na bazi krompirove džibre i melase šećerne repe predstavlja dobar izvor azota, fermentabilnih šećera i mineralnih materija neophodnih za rast nutritivno zahtevnih BMK. U kombinovanom supstratu krompirova džibra predstavlja izvor  $\alpha$ -amino azota, dok je melase šećerne repe dominantni izvor fermentabilnih šećera. Pored optimalnog odnosa ugljenika i azota, krompirova džibra i melasa sadrže mineralne materije neophodne za rast mikrobne biomase i efikasnu proizvodnju mlečne kiseline.

Od tri ispitivana soja BMK, utvrđeno je da *L. paracasei* NRRL B-4564 ima najbolju sposobnost da fermentiše saharozu i glukozu koje su dominantni izvori ugljenika u kombinovanom supstratu na bazi džibre i melase. Koncentracija mlečne kiseline koja je postignuta u fermentaciji dva modifikovana MRS bujona (na bazi saharoze i melase) pomoću *L. paracasei* nije bila statistički različita, pa se može zaključiti da je melasa adekvatna zamena za rafinisanu saharozu u medijumu.

Optimizacijom početne koncentracije šećera u medijumu je pokazano da se maksimalna koncentracija mlečne kiseline od 89,5 g/L ostvaruje pri najvećoj ispitivanoj početnoj koncentraciji šećera (104,2 g/L), dok su maksimalne vrednosti prinosa (0,91 g/g) i produktivnosti (1,42 g/L h) postignute u uzorku sa najnižom početnom koncentracijom šećera (56,7 g/L).

HPLC analizom je utvrđeno da melasa sadrži jedinjenja koja mogu delovati inhibitorno na rast i metaboličke funkcije BMK, od kojih je u nešto većim

koncentracijama detektovano prisustvo HMF (38,7 mg/kg) i vanilina (25,5 mg/kg). U cilju poboljšanja efikasnosti proizvodnje mlečne kiseline na kombinovanom otpadnom supstratu, *L. paracasei* NRRL B-4564 je adaptiran na potencijalno inhibitorna jedinjenja prisutna u melasi šećerne repe. Tokom procesa adaptacije izolovana su tri adaptirana mutanta, a zatim je ispitivan njihov antioksidativni kapacitet, kao i sposobnost proizvodnje mlečne kiseline u šaržnom i dolivnom postupku. Izolovani mutanti su pokazali veću sposobnost inhibicije DPPH<sup>•</sup> radikala u odnosu na neadaptirani *L. paracasei*, što predstavlja odgovor ispitivanog soja na prisustvo različitih pro-oksativnih jedinjenja u melasi. Poređenjem tri adaptirana mutanta i neadaptiranog *L. paracasei*, najveći stepen inhibicije DPPH<sup>•</sup> radikala je postignut pomoću *L. paracasei* A-22 koji je istovremeno pokazao i najbolju sposobnost proizvodnje mlečne kiseline u šaržnoj fermentaciji.

Dolivni postupak proizvodnje je ispitivan pomoću adaptiranog i neadaptiranog soja sa ciljem dodatnog povećanja efikasnosti proizvodnje mlečne kiseline na kombinovanom otpadnom supstratu. Koncentracija mlečne kiseline postignuta u fermentaciji pomoću adaptiranog *L. paracasei* A-22 (169,9 g/L) je bila za 51% veća u odnosu na koncentraciju mlečne kiseline ostvarene pomoću neadaptiranog soja (107,1 g/L). Osim efikasije proizvodnje mlečne kiseline, rast adaptiranog *L. paracasei* je bio znatno bolji u odnosu na neadaptirani. Zbog bolje prilagođenosti na hemijski sastav medijuma, u dolivnoj fermentaciji pomoću adaptiranog soja je bilo moguće izvesti jedan ciklus dolivanja supstrata više u odnosu na fermentaciju pomoću neadaptiranog *L. paracasei*.

Lignocelulozni materijali agro-industrijskog porekla: ljuska suncokreta, repin rezanac i pivski trop, su korišćeni za imobilizaciju *L. paracasei* NRRL B-4564 i proizvodnju mlečne kiseline u postupku sa recirkulacijom imobilisane mikrobne biomase. Pogodnost primene ovih materijala kao nosača za mikrobnu imobilizaciju je ispitivana određivanjem fizičkih karakteristika materijala, kao što su parametri porozne strukture, indeks apsorpcije vode i kritična tačka vlažnosti. Utvrđeno je da rezanac šećerne repe ima hidrofilniju strukturu, a time i bolji potencijal kao nosač za



imobilizaciju ćelija, u odnosu na pivski trop i ljusku suncokreta. Živinom porozimetrijom je utvrđeno je da je struktura ljuske suncokreta najporoznija, dok najveću specifičnu površinu i najveći srednji prečnik pora ima pivski trop. Na osnovu analize prečnika pora sva tri materijala i srednjeg prečnika ćelija *L. paracasei* se može zaključiti da se imobilizacija ćelija *L. paracasei* predominantno ostvaruje na površinama nosača.

Na osnovu koncentracije imobilisanih ćelija tokom ponovljene šaržne fermentacije, može se zaključiti da poroznost lignoceluloznih materijala nije bila ključni faktor za imobilizaciju *L. paracasei*, već da elektrostatičke sile između ćelija i površine nosača, hemijski sastav koji dovodi do specifičnog vezivanja, indeks apsorpcije vode i kritična tačka vlaznosti nosača imaju važniju ulogu u vezivanju ćelija.

Sposobnost adsorpcije *L. paracasei* i formiranja biofilma na površini tri lignocelulozna nosača je omogućila recirkulaciju imobilisane biomase i ponovno korišćenje imobilisanih biokatalizatora u pet uzastopnih šaržnih ciklusa. U ponovljenoj šaržnoj fermentaciji pomoću *L. paracasei* imobilisanog na repin rezanac, pivski trop i ljusku suncokreta postignute su ukupne produktivnosti procesa od 1,26 g/L h, 1,17 g/L h i 1,09 g/L h, redom, a dobijene vrednosti su bile značajno veće od produktivnosti koja je ostvarena u fermentaciji pomoću slobodnih ćelija (0,81 g/L h).

Upotreba lignoceluloznih materijala za imobilizaciju *L. paracasei* pored efikasne proizvodnje mlečne kiseline, pruža mogućnost valorizacije zaostalih fermentisanih nosača sa imobilisanom mikrobnom biomasom kao hraniva za životinje. U završnom delu istraživanja ispitivan je kvalitet fermentisanih nosača kao hraniva za preživare. Dodatno, primenom *in vitro* metoda utvrđen je probiotski potencijal *L. paracasei* NRRL B-4564. Analizom osušenih fermentisanih nosača i poređenjem sa nefermentisanim materijalima, utvrđeno je da mlečno-kiselinska fermentacija ima pozitivan efekat na sadržaj proteina i pepela. Takođe, fermentisani nosači su imali znatno manji sadržaj svih frakcija vlakana u odnosu na nefermentisane materijale. Mlečno-kiselinska fermentacija ima značajan pozitivan uticaj na *in vitro* svarljivost suve materije pivskog tropa i ljuske suncokreta. Sa druge strane, fermentacija dovodi do smanjenja *in vitro*

svarljivosti suve materije repinog rezanca. Poređenjem fermentisanog i nefermentisanog pivskog tropa i ljuske suncokreta, predviđene vrednosti  $DE_{1\times}$ ,  $ME_{3\times}$ ,  $NE_{L3\times}$ ,  $NE_M$  i  $NE_G$  su bile značajno veće nakon mlečno-kiselinske fermentacije, dok su vrednosti navedenih energetske parametara repinog rezanca bile nešto niže nakon fermentacije.

Analizom preživljavanja u uslovima GIT-a, sposobnosti autoagregacije i antimikrobne aktivnosti, *L. paracasei* NRRL B-4564 je pokazao zadovoljavajuća probiotska svojstva. Stopa preživljavanja *L. paracasei* nakon prolaska kroz simulirani digestivni trakt preživara je iznosila 88,7%. Rezultati antimikrobne aktivnosti su pokazali da *L. paracasei* deluje inhibitorno na rast Gram-pozitivnih (*B. cereus*, *S. aureus*) i Gram-negativnih bakterija (*S. enteritidis*, *E. coli*), dok inhibitorna aktivnost prema patogenoj vrsti kvasca *C. albicans* nije uočena. Analizom hemijske prirode inhibitornog jedinjenja koje proizvodi *L. paracasei*, utvrđeno je da je antimikrobno dejstvo *L. paracasei* NRRL B-4564 izazvano nedisosovanom mlečnom kiselinom, a ne jedinjenjima proteinske prirode. Na osnovu rezultata dobijenih antibiogram testom, utvrđena je osetljivost *L. paracasei* NRRL B-4564 na eritromicin, tetraciklin i ampicilin, umerena osetljivost na penicilin G, dok je uočena rezistentnost na vankomicin, aminoglikozide (gentamicin, streptomycin, kanamicin) i nalidiksinsku kiselinu. Ispitivanjem kinetike autoagregacije utvrđena je zadovoljavajuća sposobnost *L. paracasei* da formira agregate, a stepen autoagregacije ćelija nakon 24 h inkubacije je iznosio 44,5%. Ispitivanjem sposobnosti inhibicije DPPH<sup>•</sup> radikala pokazana je značajna antioksidativna aktivnost celih ćelija i unutarćelijskog ekstrakta ispitivanog soja. Rezultati ukazuju na to da antioksidativna aktivnost *L. paracasei* zavisi od koncentracije ćelija, kao i da cele ćelije imaju veći antioksidativni kapacitet u odnosu na unutarćelijske ekstrakte. Takođe, pokazano je da antioksidativni kapacitet *L. paracasei* u velikoj meri zavisi od uslova sredine i da izlaganje soja izvesnim pro-oksidativnim jedinjenjima dovodi do značajnog povećanja njegove antioksidativne aktivnosti. Ovi rezultati ukazuju da *L. paracasei* može imati važnu ulogu u zaštiti od oksidativnog stresa i tako doprineti pravilnom funkcionisanju crevne mikrobiote domaćina. Na osnovu

fenotipskih karakteristika *L. paracasei* NRRL B-4564, kao i pokazanog povoljnog uticaja na kvalitet repinog rezanca, pivskog tropa i ljuske suncokreta, može se zaključiti da se fermentisani materijali zajedno sa imobilisanom probiotskom biomasom mogu koristiti kao funkcionalno hranivo u obrocima namenjenim ishrani preživara.

Kombinovanjem dva komplementarna agro-industrijska sporedna proizvoda (destilerijske džibre i melase) u mlečno-kiselinskoj fermentaciji se pored dobijanja visokovrednih proizvoda, rešava ekološko pitanje njihovog odlaganja. Ovo je naročito važno imajući u vidu da se velika količina destilerijske džibre koja zaostaje nakon proizvodnje bioetanola u našoj zemlji ispušta u vodotokove, pa tako definisanje procesa koji koristi ovu otpadnu tečnost kao sirovinu za dalju proizvodnju ima veliki ekološki značaj.

## 6. LITERATURA

- [1] Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, Sonomoto K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnol Adv* 2013;31:877–902.
- [2] Madhavan Nampoothiri K, Nair NR, John RP. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. *Bioresour Technol* 2010;101:8493–501.
- [3] Global Industry Analysts, Inc. Lactic acid: a global strategic business report, 2014; [http://www.prweb.com/releases/lactic\\_acid/polylactic\\_acid/prweb12173291.htm](http://www.prweb.com/releases/lactic_acid/polylactic_acid/prweb12173291.htm).
- [4] Ouyang J, Ma R, Zheng Z, Cai C, Zhang M, Jiang T. Open fermentative production of L-lactic acid by *Bacillus* sp. strain NL01 using lignocellulosic hydrolyzates as low-cost raw material. *Bioresour Technol* 2013;135:475–80.
- [5] Zhang ZY, Jin B, Kelly JM. Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus* fungi. *Biochem Eng J* 2007;35:251–63.
- [6] Karp SG, Igashiyama AH, Siqueira PF, Carvalho JC, Vandenberghe LPS, Thomaz-Soccol V, et al. Application of the biorefinery concept to produce L-lactic acid from the soybean vinasse at laboratory and pilot scale. *Bioresour Technol* 2011;102:1765–72.
- [7] Lu Z, He F, Shi Y, Lu M, Yu L. Fermentative production of L(+)-lactic acid using hydrolyzed acorn starch, persimmon juice and wheat bran hydrolysate as nutrients. *Bioresour Technol* 2010;101:3642–8.
- [8] Gaggia F, Di D, Baffoni L, Biavati B. The role of protective and probiotic cultures

- in food and feed and their impact in food safety. *Trends Food Sci Technol* 2011;22:S58–66.
- [9] Gaggia F, Mattarelli P, Biavati B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *Int J Food Microbiol* 2010;141:S15–28.
- [10] Lushchak VI. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol* 2011;153:175–90.
- [11] Dragosits M, Mattanovich D. Adaptive laboratory evolution – principles and applications for biotechnology. *Microb Cell Fact* 2013;12:64.
- [12] Zhang Y, Li Y. Engineering the antioxidative properties of lactic acid bacteria for improving its robustness. *Curr Opin Biotechnol* 2013;24:142–7.
- [13] Ding S, Tan T. l-lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation using different fed-batch feeding strategies. *Process Biochem* 2006;41:1451–4.
- [14] Kumar MN, Gialleli AI, Masson JB, Kandylis P, Bekatorou A, Koutinas AA, et al. Lactic acid fermentation by cells immobilised on various porous cellulosic materials and their alginate/poly-lactic acid composites. *Bioresour Technol* 2014;165:332–5.
- [15] Datta R, Hydroxy carboxylic acids, in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 5th edn, Vol. 14, ed. by Seidel A. Wiley, Hoboken, NJ, pp. 114–134 (2005).
- [16] Carlsten A, Hallgren B, Jagenburg R, Svanborg A, Werkö L, Jagenburg M, Larsson S, Myrén I. Myocardial metabolism of glucose, lactic acid, amino acids and fatty acids in healthy human individuals at rest and at different work loads. *Scand J Clin Lab Invest* 1961;13:418–28.
- [17] Rivas B, Torrado A, Rivas S, Moldes AB, Domínguez JM. Simultaneous lactic acid and xylitol production from vine trimming wastes. *J Sci Food Agric* 2007;87:1603–12.
- [18] Shive, Anderson. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv Drug Deliv Rev* 1997;28:5–24.
- [19] Research Grand View. Lactic acid market & polylactic acid (PLA) market, industry

- report 2025, 2017; <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/lacticacid-and-poly-lactic-acid-market>.
- [20] Hu Y, Daoud WA, Cheuk KKL, Lin CSK. Newly developed techniques on polycondensation, ring-opening polymerization and polymer modification: Focus on poly(lactic acid). *Materials (Basel)* 2016;9.
- [21] Hofvendahl K, Hahn-Hägerdal B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources1. *Enzyme Microb Technol* 2000;26:87–107.
- [22] John RP, Sukumaran RK, Nampoothiri KM, Pandey A. Statistical optimization of simultaneous saccharification and L(+)-lactic acid fermentation from cassava bagasse using mixed culture of lactobacilli by response surface methodology. *Biochem Eng J* 2007;36:262–7.
- [23] Adsul MG, Varma AJ, Gokhale D V. Lactic acid production from waste sugarcane bagasse derived cellulose. *Green Chem* 2007;9:58–62.
- [24] Castillo Martinez FA, Balciunas EM, Salgado JM, Domínguez González JM, Converti A, Oliveira RP de S. Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends Food Sci Technol* 2013;30:70–83.
- [25] Wang Y, Tashiro Y, Sonomoto K. Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits. *J Biosci Bioeng* 2015;119:10–8.
- [26] Fugelsang K, Edwards C. *Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures* 2007.
- [27] Holzapfel WH, Stiles ME. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol* 1997;36:1–29.
- [28] Felis GE, Dellaglio F. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Curr Issues Intest Microbiol* 2007;8:44–61.
- [29] Reddy G, Altaf M, Naveena BJ, Venkateshwar M, Kumar EV. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation - A review. *Biotechnol Adv* 2008;26:22–34.
- [30] Choi HY, Ryu HK, Park KM, Lee EG, Lee H, Kim SW, et al. Direct lactic acid

- fermentation of Jerusalem artichoke tuber extract using *Lactobacillus paracasei* without acidic or enzymatic inulin hydrolysis. *Bioresour Technol* 2012;114:745–7.
- [31] Petrova P, Velikova P, Popova L, Petrov K. Direct conversion of chicory flour into L(+)-lactic acid by the highly effective inulinase producer *Lactobacillus paracasei* DSM 23505. *Bioresour Technol* 2015;186:329–33.
- [32] Abdel-Rahman MA, Xiao Y, Tashiro Y, Wang Y, Zendo T, Sakai K, et al. Fed-batch fermentation for enhanced lactic acid production from glucose/xylose mixture without carbon catabolite repression. *J Biosci Bioeng* 2015;119:153–8.
- [33] Zhu Y, Lee YY, Elander RT. Conversion of aqueous ammonia-treated corn stover to lactic acid by simultaneous saccharification and cofermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 137–140, 2007, p. 721–38.
- [34] Ohara H, Owaki M, Sonomoto K. Xylooligosaccharide fermentation with *Leuconostoc lactis*. *J Biosci Bioeng* 2006;101:415–20.
- [35] Marques S, Santos JAL, Gírio FM, Roseiro JC. Lactic acid production from recycled paper sludge by simultaneous saccharification and fermentation. *Biochem Eng J* 2008;41:210–6.
- [36] Wang Q, Zhao X, Chamu J, Shanmugam KT. Isolation, characterization and evolution of a new thermophilic *Bacillus licheniformis* for lactic acid production in mineral salts medium. *Bioresour Technol* 2011;102:8152–8.
- [37] Patel MA, Harbrucker R, Aldrich HC, Ou MS, Ingram LO, Buszko ML, Shanmugam KT. Isolation and Characterization of Acid-Tolerant, Thermophilic Bacteria for Effective Fermentation of Biomass-Derived Sugars to Lactic Acid. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:3228–35.
- [38] Ma K, Maeda T, You H, Shirai Y. Open fermentative production of L-lactic acid with high optical purity by thermophilic *Bacillus coagulans* using excess sludge as nutrient. *Bioresour Technol* 2014;151:28–35.
- [39] Ye L, Zhou X, Hudari MS Bin, Li Z, Wu JC. Highly efficient production of L-lactic

- acid from xylose by newly isolated *Bacillus coagulans* C106. *Bioresour Technol* 2013;132:38–44.
- [40] Michelson T, Kask K, Jõgi E, Talpsep E, Suitso I, Nurk A. L(+)-Lactic acid producer *Bacillus coagulans* SIM-7 DSM 14043 and its comparison with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* DSM 20073. *Enzyme Microb Technol* 2006;39:861–7.
- [41] Huang LP, Jin B, Lant P, Zhou J. Simultaneous saccharification and fermentation of potato starch wastewater to lactic acid by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus*. *Biochem Eng J* 2005;23:265–76.
- [42] Maas RHW, Springer J, Eggink G, Weusthuis RA. Xylose metabolism in the fungus *Rhizopus oryzae*: Effect of growth and respiration on L(+)-lactic acid production. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2008;35:569–78.
- [43] Maas RHW, Bakker RR, Eggink G, Weusthuis RA. Lactic acid production from xylose by the fungus *Rhizopus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006;72:861–8.
- [44] Nancib A, Nancib N, Boudrant J. Production of lactic acid from date juice extract with free cells of single and mixed cultures of *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis*. *World J Microbiol Biotechnol* 2009;25:1423–9.
- [45] Cui F, Li Y, Wan C. Lactic acid production from corn stover using mixed cultures of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus brevis*. *Bioresour Technol* 2011;102:1831–6.
- [46] Ge X-Y, Qian H, Zhang W-G. Improvement of L-lactic acid production from Jerusalem artichoke tubers by mixed culture of *Aspergillus niger* and *Lactobacillus* sp. *Bioresour Technol* 2009;100:1872–4.
- [47] Liang S, McDonald AG, Coats ER. Lactic acid production with undefined mixed culture fermentation of potato peel waste. *Waste Manag* 2014;34:2022–7.
- [48] Upadhyaya BP, DeVeaux LC, Christopher LP. Metabolic engineering as a tool for enhanced lactic acid production. *Trends Biotechnol* 2014;32:637–44.
- [49] Qiu Z, Gao Q, Bao J. Engineering *Pediococcus acidilactici* with xylose assimilation pathway for high titer cellulosic L-lactic acid fermentation. *Bioresour Technol* 2018;249:9–15.



- [50] Qiu Z, Gao Q, Bao J. Constructing xylose-assimilating pathways in *Pediococcus acidilactici* for high titer D-lactic acid fermentation from corn stover feedstock. *Bioresour Technol* 2017;245:1369–76.
- [51] Utrilla J, Vargas-Tah A, Trujillo-Martínez B, Gosset G, Martinez A. Production of D-lactate from sugarcane bagasse and corn stover hydrolysates using metabolic engineered *Escherichia coli* strains. *Bioresour Technol* 2016;220:208–14.
- [52] Wang Y, Tian T, Zhao J, Wang J, Yan T, Xu L, et al. Homofermentative production of D-lactic acid from sucrose by a metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett* 2012;34:2069–75.
- [53] Mazumdar S, Bang J, Oh MK. L-lactate production from seaweed hydrolysate of *Laminaria japonica* using metabolically engineered *Escherichia coli*. *Appl Biochem Biotechnol* 2014;172:1938–52.
- [54] Portnoy VA, Bezdán D, Zengler K. Adaptive laboratory evolution-harnessing the power of biology for metabolic engineering. *Curr Opin Biotechnol* 2011;22:590–4.
- [55] Yang X, Zhu M, Huang X, Lin CSK, Wang J, Li S. Valorisation of mixed bakery waste in non-sterilized fermentation for L-lactic acid production by an evolved *Thermoanaerobacterium* sp. strain. *Bioresour Technol* 2015;198:47–54.
- [56] Wang Y, Li K, Huang F, Wang J, Zhao J, Zhao X, et al. Engineering and adaptive evolution of *Escherichia coli* W for L-lactic acid fermentation from molasses and corn steep liquor without additional nutrients. *Bioresour Technol* 2013;148:394–400.
- [57] Utrilla J, Licona-Cassani C, Marcellin E, Gosset G, Nielsen LK, Martinez A. Engineering and adaptive evolution of *Escherichia coli* for D-lactate fermentation reveals GatC as a xylose transporter. *Metab Eng* 2012;14:469–76.
- [58] Drake JW. A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proc Natl Acad Sci* 2006;88:7160–4.
- [59] Zhao J, Xu L, Wang Y, Zhao X, Wang J, Garza E, Manow R, Zhou S. Homofermentative production of optically pure L-lactic acid from xylose by

- genetically engineered *Escherichia coli* B. *Microb Cell Fact* 2013;12:57.
- [60] Tomás-Pejó E, Ballesteros M, Oliva JM, Olsson L. Adaptation of the xylose fermenting yeast *Saccharomyces cerevisiae* F12 for improving ethanol production in different fed-batch SSF processes. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2010;37:1211–20.
- [61] Yi X, Zhang P, Sun J, Tu Y, Gao Q, Zhang J, Bao J. Engineering wild-type robust *Pediococcus acidilactici* strain for high titer L- and D-lactic acid production from corn stover feedstock. *J Biotechnol* 2016;217:112–21.
- [62] Find ICIS. A Chemicals commodity. 2006; <https://www.icis.com/chemicals/channel-info-finder/>
- [63] Jin B, Huang LP, Lant P. *Rhizopus arrhizus* - A producer for simultaneous saccharification and fermentation of starch waste materials to L(+)-lactic acid. *Biotechnol Lett* 2003;25:1983–7.
- [64] Nakano S, Ugwu CU, Tokiwa Y. Efficient production of D-(-)-lactic acid from broken rice by *Lactobacillus delbrueckii* using Ca(OH)<sub>2</sub> as a neutralizing agent. *Bioresour Technol* 2012;104:791–4.
- [65] Li Z, Han L, Ji Y, Wang X, Tan T. Fermentative production of L-lactic acid from hydrolysate of wheat bran by *Lactobacillus rhamnosus*. *Biochem Eng J* 2010;49:138–42.
- [66] John RP, G.S. A, Nampoothiri KM, Pandey A. Direct lactic acid fermentation: Focus on simultaneous saccharification and lactic acid production. *Biotechnol Adv* 2009;27:145–52.
- [67] Mojović L, Pejin D, Lazić M. Bioetanol kao gorivo stanje i perspektive: monografija. Leskovac: Tehnološki fakultet; 2007, pp. 65-9.
- [68] Bakker R. Availability of lignocellulosic feedstocks for lactic acid production. 2013.
- [69] Hendriks ATWM, Zeeman G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* 2009;100:10–8.
- [70] Abdel-Rahman A, Tashiro Y, Sonomoto K. Lactic acid production from

- lignocellulose derived sugars using lactic acid bacteria: overview and limits. *J Biotechnol* 2011;156:286–301.
- [71] Aso Y, Tsubaki M, Dang Long BH, Murakami R, Nagata K, Okano H, Dung NT, Ohara H. Continuous production of D-lactic acid from cellobiose in cell recycle fermentation using  $\beta$ -glucosidase-displaying *Escherichia coli*. *J Biosci Bioeng* 2019;127:441–6.
- [72] Tanaka T, Kondo A. Cell-surface display of enzymes by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* for synthetic biology. *FEMS Yeast Res* 2015;15:1–9.
- [73] Coelho LF, De Lima CJB, Bernardo MP, Contiero J. D(-)-lactic acid production by *Leuconostoc mesenteroides* B512 using different carbon and nitrogen sources. *Appl Biochem Biotechnol* 2011;164:1160–71.
- [74] Dey P, Sikder J, Roy S, Pal P. Fermentative lactic acid production from a renewable carbon source under response surface optimized conditions without alkali addition: A membrane-based green approach. *Clean Technol Environ Policy* 2012;14:827–35.
- [75] Liu Q, Wang S, Zhi JF, Ming H, Teng D. Efficient Production of Lactic Acid from Sweet Sorghum Juice by a Newly Isolated *Lactobacillus salivarius* CGMCC 7.75. *Indian J Microbiol* 2013;53:332–6.
- [76] Wang Y, Chen C, Cai D, Wang Z, Qin P, Tan T. The optimization of L-lactic acid production from sweet sorghum juice by mixed fermentation of *Bacillus coagulans* and *Lactobacillus rhamnosus* under unsterile conditions. *Bioresour Technol* 2016;218:1098–105.
- [77] Hetényi K, Gál K, Németh Á, Sevelle B. Use of sweet sorghum juice for lactic acid fermentation: Preliminary steps in a process optimization. *J Chem Technol Biotechnol* 2010;85:872–7.
- [78] Srivastava A, Poonia A, Tripathi AD, Singh RP, Srivastava SK. Optimization of nutritional supplements for enhanced lactic acid production utilizing sugar refinery by-products. *Ann Microbiol* 2014;64:1211–21.
- [79] Taskin M, Esim N, Ortucu S. Efficient production of L-lactic acid from chicken

- feather protein hydrolysate and sugar beet molasses by the newly isolated *Rhizopus oryzae* TS-61. *Food Bioprod Process* 2012;90:773–9.
- [80] Flores-Albino B, Arias L, Gómez J, Castillo A, Gimeno M, Shirai K. Chitin and L(+)-lactic acid production from crab (*Callinectes bellicosus*) wastes by fermentation of *Lactobacillus* sp. B2 using sugar cane molasses as carbon source. *Bioprocess Biosyst Eng* 2012;35:1193–200.
- [81] Wang L, Zhao B, Liu B, Yu B, Ma C, Su F, et al. Efficient production of L-lactic acid from corncob molasses, a waste by-product in xylitol production, by a newly isolated xylose utilizing *Bacillus* sp. strain. *Bioresour Technol* 2010;101:7908–15.
- [82] Prasad S, Srikanth K, Limaye AM, Sivaprakasam S. Homo-fermentative production of d-lactic acid by *Lactobacillus* sp. employing casein whey permeate as a raw feed-stock. *Biotechnol Lett* 2014;36:1303–7.
- [83] Liu P, Zheng Z, Xu Q, Qian Z, Liu J, Ouyang J. Valorization of dairy waste for enhanced D-lactic acid production at low cost. *Process Biochem* 2018;71:18–22.
- [84] Bernardo MP, Coelho LF, Sass DC, Contiero J. L-(+)-Lactic acid production by *Lactobacillus rhamnosus* B103 from dairy industry waste. *Brazilian J Microbiol* 2016;47:640–6.
- [85] Moon S-K, Lee J, Song H, Cho J-H, Choi G-W, Seung D. Characterization of ethanol fermentation waste and its application to lactic acid production by *Lactobacillus paracasei*. *Bioprocess Biosyst Eng* 2013;36:547–54.
- [86] Coelho LF, de Lima CJB, Bernardo MP, Alvarez GM, Contiero J. Improvement of L-(+)-lactic acid production from cassava wastewater by *Lactobacillus rhamnosus* B 103. *J Sci Food Agric* 2010;90:1944–50.
- [87] Wang L, Zhao B, Li F, Xu K, Ma C, Tao F, et al. Highly efficient production of D-lactate by *Sporolactobacillus* sp. CASD with simultaneous enzymatic hydrolysis of peanut meal. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011;89:1009–17.
- [88] Li Y, Wang L, Ju J, Yu B, Ma Y. Efficient production of polymer-grade D-lactate by *Sporolactobacillus laevolacticus* DSM442 with agricultural waste cottonseed as

- the sole nitrogen source. *Bioresour Technol* 2013;142:186–91.
- [89] Zheng Y, Wang Y, Zhang J, Pan J. Using tobacco waste extract in pre-culture medium to improve xylose utilization for L-lactic acid production from cellulosic waste by *Rhizopus oryzae*. *Bioresour Technol* 2016;218:344–50.
- [90] Nguyen CM, Kim JS, Nguyen TN, Kim SK, Choi GJ, Choi YH, Jang KS, Kim JC. Production of L- and D-lactic acid from waste *Curcuma longa* biomass through simultaneous saccharification and cofermentation. *Bioresour Technol* 2013;146:35–43.
- [91] Li J, Sun J, Wu B, He B. Combined utilization of nutrients and sugar derived from wheat bran for D-Lactate fermentation by *Sporolactobacillus inulinus* YBS1-5. *Bioresour Technol* 2017;229:33–8.
- [92] Balakrishnan R, Reddy Tadi SR, Sivaprakasam S, Rajaram S. Optimization of acid and enzymatic hydrolysis of kodo millet (*Paspalum scrobiculatum*) bran residue to obtain fermentable sugars for the production of optically pure D (-) lactic acid. *Ind Crops Prod* 2018;111:731–42.
- [93] Pejin J, Radosavljević M, Pribić M, Kocić-Tanackov S, Mladenović D, Djukić-Vuković A, et al. Possibility of L-(+)-lactic acid fermentation using malting, brewing, and oil production by-products. *Waste Manag* 2018;79:153–63.
- [94] Zhang Y, Chen X, Qi B, Luo J, Shen F, Su Y, Khan R, Wan Y. Improving lactic acid productivity from wheat straw hydrolysates by membrane integrated repeated batch fermentation under non-sterilized conditions. *Bioresour Technol* 2014;163:160–6.
- [95] Zhang L, Li X, Yong Q, Yang ST, Ouyang J, Yu S. Simultaneous saccharification and fermentation of xylo-oligosaccharides manufacturing waste residue for L-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. *Biochem Eng J* 2015;94:92–9.
- [96] Wang Y, Cao W, Luo J, Wan Y. Exploring the potential of lactic acid production from lignocellulosic hydrolysates with various ratios of hexose versus pentose by *Bacillus coagulans* IPE22. *Bioresour Technol* 2018;261:342–9.
- [97] Bai D-M, Li S-Z, Liu ZL, Cui Z-F, Bai D-M, Li S-Z, et al. Enhanced L-(+)-Lactic Acid

- Production by an Adapted Strain of *Rhizopus oryzae* using Corncob Hydrolysate. *Appl Biochem Biotechnol* 2008;144:79–85.
- [98] Bai Z, Gao Z, Sun J, Wu B, He B. D-Lactic acid production by *Sporolactobacillus inulinus* YBS1-5 with simultaneous utilization of cottonseed meal and corncob residue. *Bioresour Technol* 2016;207:346–52.
- [99] de Oliveira Moraes A, Ramirez NIB, Pereira N. Evaluation of the Fermentation Potential of Pulp Mill Residue to Produce D(-)-Lactic Acid by Separate Hydrolysis and Fermentation Using *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens*. *Appl Biochem Biotechnol* 2016;180:1574–85.
- [100] Ye L, Hudari MS Bin, Li Z, Wu JC. Simultaneous detoxification, saccharification and co-fermentation of oil palm empty fruit bunch hydrolysate for L-lactic acid production by *Bacillus coagulans* J112. *Biochem Eng J* 2014;83:16–21.
- [101] Pleissner D, Neu AK, Mehlmann K, Schneider R, Puerta-Quintero GI, Venus J. Fermentative lactic acid production from coffee pulp hydrolysate using *Bacillus coagulans* at laboratory and pilot scales. *Bioresour Technol* 2016;218:167–73.
- [102] Neu AK, Pleissner D, Mehlmann K, Schneider R, Puerta-Quintero GI, Venus J. Fermentative utilization of coffee mucilage using *Bacillus coagulans* and investigation of down-stream processing of fermentation broth for optically pure L(+)-lactic acid production. *Bioresour Technol* 2016;211:398–405.
- [103] Unrean P. Optimized feeding schemes of simultaneous saccharification and fermentation process for high lactic acid titer from sugarcane bagasse. *Ind Crop Prod* 2018;111:660–6.
- [104] Oonkhanond B, Jonglertjunya W, Srimarut N, Bunpachart P, Tantinukul S, Nasongkla N, Sakdaronnarong C. Lactic acid production from sugarcane bagasse by an integrated system of lignocellulose fractionation, saccharification, fermentation, and *ex-situ* nanofiltration. *J Environ Chem Eng* 2017;5:2533–41.
- [105] Zhang Y, Vadlani P V. Lactic acid production from biomass-derived sugars via co-fermentation of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus plantarum*. *J Biosci Bioeng* 2015;119:694–9.

- [106] Bai Z, Gao Z, He B, Wu B. Effect of lignocellulose-derived inhibitors on the growth and D-lactic acid production of *Sporolactobacillus inulinus* YBS1-5. *Bioprocess Biosyst Eng* 2015;38:1993–2001.
- [107] Zhang Y, Cong W, Shi S. Application of a pH feedback-controlled substrate feeding method in lactic acid production. *Appl Biochem Biotechnol* 2010;162:2149–56.
- [108] Göksungur Y, Güvenç U. Production of lactic acid from beet molasses by calcium alginate immobilized *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202. *J Chem Technol Biotechnol* 1999;74:131–6.
- [109] Idris A, Suzana W. Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, initial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochem* 2006;41:1117–23.
- [110] Mostafa NA. Production of lactic acid from whey with agar immobilized cells in a continuous packed tubular reactor. *Energy Convers Manag* 1996;37:253–60.
- [111] Roukas T, Kotzekidou P. Production of lactic acid from deproteinized whey by coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells. *Enzyme Microb Technol* 1991;13:33–8.
- [112] Petrov KK, Yankov DS, Beschkov VN. Lactic acid fermentation by cells of *Lactobacillus rhamnosus* immobilized in polyacrylamide gel. *World J Microbiol Biotechnol* 2006;22:337–45.
- [113] Wang P, Chen Z, Li J, Wang L, Gong G, Zhao G, et al. Immobilization of *Rhizopus oryzae* in a modified polyvinyl alcohol gel for L(+)-lactic acid production. *Ann Microbiol* 2013;63:957–64.
- [114] Göksungur Y, Gündüz M, Harsa Ş. Optimization of lactic acid production from whey by *Lactobacillus casei* NRRL B-441 immobilized in chitosan stabilized Ca-alginate beads. *J Chem Technol Biotechnol* 2005;80:1282–90.
- [115] Velázquez AC, Pometto AL, Ho KLG, Demirci A. Evaluation of plastic-composite supports in repeated fed-batch biofilm lactic acid fermentation by *Lactobacillus casei*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2001;55:434–41.
- [116] Rangaswamy V, Ramakrishna S V. Lactic acid production by *Lactobacillus*

- delbrueckii* in a dual reactor system using packed bed biofilm reactor. Lett Appl Microbiol 2008;46:661–6.
- [117] Djukić-Vuković AP, Mojović L V., Jokić BM, Nikolić SB, Pejin JD. Lactic acid production on liquid distillery stillage by *Lactobacillus rhamnosus* immobilized onto zeolite. Bioresour Technol 2013;135:454–8.
- [118] Li L, Cai D, Wang C, Han J, Ren W, Zheng J, Wang Z, Tan T. Continuous L-lactic acid production from defatted rice bran hydrolysate using corn stover bagasse immobilized carrier. RSC Adv 2015;5:18511–7.
- [119] Chronopoulos G, Bekatorou A, Bezirtzoglou E, Kaliafas A, Koutinas AA, Marchant R, Banat IM. Lactic acid fermentation by *Lactobacillus casei* in free cell form and immobilised on gluten pellets. Biotechnol Lett 2002;24:1233–6.
- [120] Shi Z, Wei P, Zhu X, Cai J, Huang L, Xu Z. Efficient production of L-lactic acid from hydrolysate of Jerusalem artichoke with immobilized cells of *Lactococcus lactis* in fibrous bed bioreactors. Enzyme Microb Technol 2012;51:263–8.
- [121] Zhao T, Liu D, Ren H, Shi X, Zhao N, Chen Y, Ying H. D-lactic acid production by *Sporolactobacillus inulinus* Y2-8 immobilized in fibrous bed bioreactor using corn flour hydrolyzate. J Microbiol Biotechnol 2014;24:1664–72.
- [122] Roukas T, Kotzekidou P. Lactic acid production from deproteinized whey by mixed cultures of free and coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells using fedbatch culture. Enzyme Microb Technol 1998;22:199–204.
- [123] Thakur A, Panesar PS, Saini MS. L(+)-Lactic acid production by immobilized *Lactobacillus casei* using low cost agro-industrial waste as carbon and nitrogen sources. Waste Biomass Valori 2017:1–11.
- [124] Joglekar HG, Rahman I, Babu S, Kulkarni BD, Joshi A. Comparative assessment of downstream processing options for lactic acid. Sep Purif Technol 2006;52:1–17.
- [125] Wang X, Wang Y, Zhang X, Xu T. In situ combination of fermentation and electro dialysis with bipolar membranes for the production of lactic acid: Operational compatibility and uniformity. Bioresour Technol 2012;125:165–71.
- [126] Salami SA, Luciano G, O’Grady MN, Biondi L, Newbold CJ, Kerry JP, Priolo A.



- Sustainability of feeding plant by-products: a review of the implications for ruminant meat production. *Anim Feed Sci Technol* 2019.
- [127] Oltjen JW, Beckett JL. Role of Ruminant Livestock in Sustainable Agricultural Systems. *J Anim Sci* 1996;74:1406–9.
- [128] Charles H, Godfray J, Beddington JR, Crute IR, Haddad L, Lawrence D, Muir JF, Pretty J, Robinson S, Thomas SM, Toulmin C. Food security: The challenge of feeding 9 billion people. *Science* 2010;327:812–8.
- [129] Mottet A, Haan C de, Falcucci A, Tempio G, Opio C, Gerber P. Livestock: On our plates or eating at our table? A new analysis of the feed/food debate. *Glob Food Sec* 2017;14:1–8.
- [130] Ajila CM, Brar SK, Verma M, Tyagi RD, Godbout S, Valéro JR. Bio-processing of agro-byproducts to animal feed. *Crit Rev Biotechnol* 2012;32:382–400.
- [131] Johnson, F., Linke-Hepp C. *Industrial Biotechnology and Biomass Utilisation: Prospects and Challenges for the Developing World*. Vienna: 2007.
- [132] Capper JL, Berger L, Brashears MM, Jensen H. Animal Feed vs. Human Food: Challenges and Opportunities in Sustaining Animal Agriculture Toward 2050. *Counc Agric Sci Technol* 2013;53:1–16.
- [133] Grubić Goran, Adamović Milan. *Ishrana visokoproizvodnih krava*. Beograd: 2003.
- [134] McGrath J, Duval SM, Tamassia LF, Kindermann M, Stemmler RT, de Gouvea VN, Acedo TS, Immig I, Williams SN, Celi P. Nutritional strategies in ruminants: A lifetime approach. *Res Vet Sci*. 2018;116:28-39.
- [135] Vasta V, Nudda A, Cannas A, Lanza M, Priolo A. Alternative feed resources and their effects on the quality of meat and milk from small ruminants. *Anim Feed Sci Technol* 2008;147:223–46.
- [136] Loor J, Elolimy A, McCann JC. Dietary impacts on rumen microbiota in beef and dairy production. *Anim Front* 2016;6:22–9.
- [137] Salem HB, Smith T. Feeding strategies to increase small ruminant production in dry environments. *Small Rumin Res* 2008;77:174–94.
- [138] Bergman EN. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal

- tract in various species. *Physiol Rev* 2017;70:567–90.
- [139] Dijkstra J, Forbes JM, France J E, editor. *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*. Second edi. CABI Publishing; 2004.
- [140] Villas-Bôas SG, Esposito E, Mitchell DA. Microbial conversion of lignocellulosic residues for production of animal feeds. *Anim Feed Sci Technol* 2002;98:1–12.
- [141] Shrivastava B, Jain KK, Kalra A, Kuhad RC. Bioprocessing of wheat straw into nutritionally rich and digested cattle feed. *Sci Rep* 2014;4:6360.
- [142] Iconomou D, Kandylis K, Israilides C, Nikokyris P. Protein enhancement of sugar beet pulp by fermentation and estimation of protein degradability in the rumen of sheep. *Small Rumin Res* 2002;27:55–61.
- [143] El-Bordeny NE, Khattab HM, El-Badr AM, Madkour MA. Using of bio-upgraded rice straw in growing lambs nutrition. *Asian J Anim Vet Adv* 2015;10:62–73.
- [144] Abdel-Aziz NA, Salem AZM, El-Adawy MM, Camacho LM, Kholif AE, Elghandour MMY, Borhami BE. Biological treatments as a mean to improve feed utilization in agriculture animals-An overview. *J Integr Agric* 2015;14:534–43.
- [145] Weinberg ZG, Ashbell G, Hen Y, Azrieli A. The effect of applying lactic acid bacteria at ensiling on the aerobic stability of silages. *J Appl Bacteriol* 1993;75:512–8.
- [146] Li X, Xu W, Yang J, Zhao H, Pan C, Ding X, Zhang Y. Effects of applying lactic acid bacteria to the fermentation on a mixture of corn steep liquor and air-dried rice straw. *Anim Nutr* 2016;2:229–33.
- [147] Zhao J, Dong Z, Li J, Chen L, Bai Y, Jia Y, Shao T. Ensiling as pretreatment of rice straw: The effect of hemicellulase and *Lactobacillus plantarum* on hemicellulose degradation and cellulose conversion. *Bioresour Technol*. 2018;266:158-65.
- [148] Humer E, Zebeli Q. Grains in ruminant feeding and potentials to enhance their nutritive and health value by chemical processing. *Anim Feed Sci Technol* 2017;226:133–51.
- [149] Murphy JJ, O'mara F. Nutritional modification of milk protein concentration and its impact on the dairy. *Ind Livest Prod Sci* 1993;35:117–34.
- [150] Deckardt K, Khol-Parisini A, Zebeli Q. Peculiarities of enhancing resistant starch

- in ruminants using chemical methods: Opportunities and challenges. *Nutrients* 2013;5:1970–88.
- [151] Campling RC. Processing cereal grains for cattle - a review. *Livest Prod Sci* 1991;28:223–34.
- [152] Wadhwa M, Bakshi M, Makkar HPS. Modifying gut microbiomes in large ruminants: Opportunities in non-intensive husbandry systems. *Anim Front* 2016;6:27.
- [153] Reti KL, Thomas MC, Yanke LJ, Selinger LB, Inglis GD. Effect of antimicrobial growth promoter administration on the intestinal microbiota of beef cattle. *Gut Pathog* 2013;5:8.
- [154] Wegener HC. Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Curr Opin Microbiol* 2003;6:439–45.
- [155] Anadón A, Martínez-Larrañaga MR, Martínez MA. Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment. *Regul Toxicol Pharmacol* 2006;45:91–5.
- [156] WHO, Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, Joint FAO/WHO Working Group. London, Ontario, Canada: 2002.
- [157] FAO. Probiotics in animal nutrition – Production, impact and regulation. vol. 179. 2016.
- [158] Gordon D, Macrae J, Wheater DM. A *Lactobacillus* preparation for use with antibiotics. *Lancet* 1957;269:899–901.
- [159] Vasiljevic T, Shah NP. Probiotics-From Metchnikoff to bioactives. *Int Dairy J* 2008;18:714–28.
- [160] Watson R, Preedy V. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: bioactive foods in health promotion. 2015.
- [161] Ouwehand AC, Kirjavainen P V., Shortt C, Salminen S. Probiotics: Mechanisms and established effects. *Int Dairy J* 1999;9:43–52.
- [162] Kumar S, Puniya AK, Puniya M, Dagar SS, Sirohi SK, Singh K, et al. Factors affecting rumen methanogens and methane mitigation strategies. *World J Microbiol*

- Biotechnol 2009;25:1557–66.
- [163] Chaucheyras-Durand F, Durand H. Probiotics in animal nutrition and health. *Benef Microbes* 2010;1:3–9.
- [164] Seo JK, Kim SW, Kim MH, Upadhaya SD, Kam DK, Ha JK. Direct-fed microbials for ruminant animals. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.*, vol. 23, 2010, p. 1657–67.
- [165] Abe F, Ishibashi N, Shimamura S. Effect of Administration of Bifidobacteria and Lactic Acid Bacteria to Newborn Calves and Piglets. *J Dairy Sci* 2010;78:2838–46.
- [166] Newbold CJ. Microbial feed additives for ruminants. *Biotechnol. Anim. Feed. Anim. Feed.*, Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH; 2007, p. 259–78.
- [167] Zhao T, Doyle MP, Harmon BG, Brown CA, Mueller POE, Parks AH. Reduction of carriage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cattle by inoculation with probiotic bacteria. *J Clin Microbiol* 1998;36:641–7.
- [168] Lema M, Williams L, Rao DR. Reduction of fecal shedding of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in lambs by feeding microbial feed supplement. *Small Rumin Res* 2001;39:31–9.
- [169] Trajković J, Mirić M, Baras J ŠS. Analiza životnih namirnica. Beograd: Tehnološko-metalurški fakultet; 1983.
- [170] Miller GL. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem* 1959;31:426–8.
- [171] Megazyme, D-lactic acid (D-lactate) and L-lactic acid (L-lactate) assay procedures -sample clarification; p. 14. [https://secure.megazyme.com/files/Booklet/K-DLATE\\_DATA.pdf](https://secure.megazyme.com/files/Booklet/K-DLATE_DATA.pdf).
- [172] Barroso CG, Rodríguez MC, Guillén DA, Pérez-Bustamante JA. Analysis of low molecular mass phenolic compounds, furfural and 5-hydroxymethylfurfural in Brandy de Jerez by high-performance liquid chromatography-diode array detection with direct injection. *J Chromatogr A* 1996;724:125–9.
- [173] Lie S. The EBC-ninhydrin method for determination of free alpha amino nitrogen. *J Inst Brew* 1973;79:37–41.
- [174] Gray PJ, Mindak WR CJ. Inductively coupled plasma-mass spectrometric

- determination of arsenic, cadmium, chromium, lead, mercury, and other elements in food using microwave assisted digestion version 1.1. Elem Anal Manual, US Food Drug Adm 2015.
- [175] Lin MY, Yen CL. Antioxidative ability of lactic acid bacteria. J Agric Food Chem 1999;47:1460–6.
- [176] Li S, Zhao Y, Zhang L, Zhang X, Huang L, Li D, et al. Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Chinese fermented foods. Food Chem 2012;135:1914–9.
- [177] Castro CC, Nobre C, Duprez ME, De Weireld G, Hantson AL. Screening and selection of potential carriers to immobilize *Aureobasidium pullulans* cells for fructo-oligosaccharides production. Biochem Eng J 2017;118:82–90.
- [178] Mertens DR. Critical conditions in determining detergent fibers. In: Proceedings of the Forage Analysis Workshop, September 16-17, 1992, Denver, Colorado, National Forage Testing Association, Omaha, NE (1992) pp. C1-8.
- [179] Aufréré J and Demarquilly C. Predicting organic matter digestibility of forage by two pepsin-cellulase methods. In: Proceedings of the 16th International Grassland Congress, October 4-11, 1989, Nice, France, Association Francaise pour la Production Feurragere, Versailles Cedex, France (1989) pp. 877–8.
- [180] National Research Council. Nutrient requirements of dairy cattle: 2001. 7th revised ed. Washington: National Academies Press; 2001.
- [181] National Research Council. Nutrient requirements of beef cattle: 1996. 8th revised ed. Washington: National Academies Press; 1996.
- [182] Weiss WP, Conrad HR, St. Pierre NR. A theoretically-based model for predicting total digestible nutrient values of forages and concentrates. Anim Feed Sci Technol 1992;39:95–110.
- [183] Dogi CA, Armando R, Ludueña R, De Moreno de LeBlanc A, Rosa CA, Dalcero A, Cavaglieri L. *Saccharomyces cerevisiae* strains retain their viability and aflatoxin B 1 binding ability under gastrointestinal conditions and improve ruminal fermentation. Food Addit Contam Part A 2011;28:1705–11.

- [184] Caldwell DR, Bryant MP. Medium without rumen fluid for nonselective enumeration and isolation of rumen bacteria. *Appl Microbiol* 1966;14:794–801.
- [185] Mishra V, Prasad DN. Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *Int J Food Microbiol* 2005;103:109–15.
- [186] Collado MC, Meriluoto J, Salminen S. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *Eur Food Res Technol* 2008;226:1065–73.
- [187] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 2017.
- [188] Bilanovic D, Chang FH, Isobaev P, Welle P. Lactic acid and xanthan fermentations on an alternative potato residues media–Carbon source costs. *Biomass and bioenergy*. 2011;35:2683-9.
- [189] Šušić S, Petrov S, Kukić G, Sinobad V, Perunović P, Koronovac B, Bašić Đ. *Osnovi tehnologije šećera*. Drugo izda. Beograd: Industrija šećera SR Jugoslavije “Jugošećer” d.d.; 1995.
- [190] Hubert Olbrich. *The molasses*. Berlin: Biotechnologie-Kempe GmbH; 1963.
- [191] Harland JI JC and HC. *Co-products. Sugar Beet*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd; 2006.
- [192] Williams L, Snell E, Broquist P. Oleic Acid and Related Compounds as Growth Factors for Lactic Acid Bacteria. *J Biol Chem* 1947;170:619–30.
- [193] Endo Y, Kamisada S, Fujimoto K, Saito T. Trans fatty acids promote the growth of some *Lactobacillus* strains. *J Gen Appl Microbiol* 2006;52:29–35.
- [194] Jenkins JK, Courtney PD. *Lactobacillus* growth and membrane composition in the presence of linoleic or conjugated linoleic acid. *Can J Microbiol* 2003;49:51–7.
- [195] Nakata H, Tamura M, Shintani T, Gomi K. Evaluation of baker’s yeast strains exhibiting significant growth on Japanese beet molasses and compound analysis of the molasses types. *J Biosci Bioeng* 2014;117:715–9.
- [196] Malbaša R, Lončar E, Djurić M. Comparison of the products of Kombucha fermentation on sucrose and molasses. *Food Chem* 2008;106:1039–45.
- [197] Hayek SA, Ibrahim SA. Current Limitations and Challenges with Lactic Acid

- Bacteria: A Review. *Food Nutr Sci* 2013;04:73–87.
- [198] Djukić-Vuković A, Mojović L, Vukašinović-Sekulić M, Rakin M, Nikolić S, Pejin J, Bulatović M. Effect of different fermentation parameters on L-lactic acid production from liquid distillery stillage. *Food Chem* 2012;134:1038–43.
- [199] Nancib A, Nancib N, Meziane-Cherif D, Boubendir A, Fick M, Boudrant J. Joint effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *Bioresour Technol* 2005;96:63–7.
- [200] Akao S, Nagare H, Maeda M, Kondo K, Fujiwara T. Combined use of sugars and nutrients derived from young maize plants for thermophilic L-lactic acid fermentation. *Ind Crops Prod* 2015;69:440–6.
- [201] Nakanashi K, Ueno T, Sato S, Yoshi S. L-Lactic Acid Production from Canned Pineapple Syrup by Rapid Sucrose Catabolizing *Lactobacillus paracasei* NRIC 0765. *Food Sci Technol Res* 2010;16:239–46. doi:10.3136/fstr.16.239.
- [202] Wasewar KL. Separation of Lactic Acid: Recent Advances. *Chem Biochem Eng Q* 2005;19:159–72.
- [203] Yun J-S, Zeng A-P, Lee YY, Ryu H-W, Wee Y-J. Recovery of lactic acid by repeated batch electrodialysis and lactic acid production using electrodialysis wastewater. *J Biosci Bioeng* 2005;99:104–8.
- [204] Taherzadeh MJ, Karimi K. Chapter 12 – Fermentation Inhibitors in Ethanol Processes and Different Strategies to Reduce Their Effects. *Biofuels*, 2011, p. 287–311.
- [205] Fattohi N. Investigation into the presence of volatile secondary constituents of beet molasses with inhibitory effect on yeast fermentation and baker's yeast quality. *Zuckerindustrie*. 1990;115(5).
- [206] Solioz M, Mermoud M, Abicht HK, Mancini S. Responses of Lactic Acid Bacteria to Heavy Metal Stress. *Stress Responses Lact. Acid Bact.*, Boston, MA: Springer US; 2011, p. 163–95.
- [207] Park H-S, Um Y, Sim SJ, Lee SY, Woo HM. Transcriptomic analysis of

- Corynebacterium glutamicum* in the response to the toxicity of furfural present in lignocellulosic hydrolysates. *Process Biochem* 2015;50:347–56.
- [208] Allen SA, Clark W, McCaffery JM, Cai Z, Lanctot A, Slininger PJ, Liu ZL, Gorsich SW. Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels* 2010;3:2.
- [209] Almeida JR, Modig T, Petersson A, Hähn-Hägerdal B, Lidén G, Gorwa-Grauslund MF. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Chem Technol Biotechnol* 2007;82:340–9.
- [210] Alves de Oliveira R, Vaz Rossell CE, Venus J, Cândida Rabelo S, Maciel Filho R. Detoxification of sugarcane-derived hemicellulosic hydrolysate using a lactic acid producing strain. *J Biotechnol* 2018;278:56–63.
- [211] Filipčev B, Mišan A, Šarić B, Šimurina O. Sugar beet molasses as an ingredient to enhance the nutritional and functional properties of gluten-free cookies. *Int J Food Sci Nutr* 2016;67:249–56.
- [212] Valli V, Gómez-Caravaca AM, Di Nunzio M, Danesi F, Caboni MF, Bordoni A. Sugar Cane and Sugar Beet Molasses, Antioxidant-rich Alternatives to Refined Sugar. *J Agric Food Chem* 2012;60:12508–15.
- [213] Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact* 2014;224:164–75.
- [214] Zhang Y, Vadlani P V. D-lactic acid biosynthesis from biomass-derived sugars via *Lactobacillus delbrueckii* fermentation. *Bioprocess Biosyst Eng* 2013;36:1897–904.
- [215] Xu S, Hao N, Xu L, Liu Z, Yan M, Li Y, Ouyang P. Series fermentation production of ornithine and succinic acid from cane molasses by *Corynebacterium glutamicum*. *Biochem Eng J* 2015;99:177–82.
- [216] He X, Chen K, Li Y, Wang Z, Zhang H, Qian J, Ouyang P. Enhanced L-lysine production from pretreated beet molasses by engineered *Escherichia coli* in fed-batch fermentation. *Bioprocess Biosyst Eng* 2015;38:1615–22.



- [217] Küçükaşık F, Kazak H, Güney D, Finore I, Poli A, Yenigün O, Nicolaus B, Öner ET. Molasses as fermentation substrate for levan production by *Halomonas* sp. Appl Microbiol Biotechnol 2011;89:1729–40.
- [218] Roukas T. Pretreatment of beet molasses to increase pullulan production. Process Biochem 1998;33:805–10.
- [219] Kotzamanidis C, Roukas T, Skaracis G. Optimization of lactic acid production from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130. World J Microbiol Biotechnol 2002;18:441–8.
- [220] Xu K, Xu P. Efficient production of l-lactic acid using co-feeding strategy based on cane molasses/glucose carbon sources. Bioresour Technol 2014;153:23–9.
- [221] Djukić-Vuković AP, Mojović L V., Vukašinović-Sekulić MS, Nikolić SB, Pejin JD. Integrated production of lactic acid and biomass on distillery stillage. Bioprocess Biosyst Eng 2013;36:1157–64.
- [222] Marques S, Gírio FM, Santos JAL, Roseiro JC. Pulsed fed-batch strategy towards intensified process for lactic acid production using recycled paper sludge. Biomass Convers Biorefinery 2016:1–11.
- [223] Hu J, Zhang Z, Lin Y, Zhao S, Mei Y, Liang Y, et al. High-titer lactic acid production from NaOH-pretreated corn stover by *Bacillus coagulans* LA204 using fed-batch simultaneous saccharification and fermentation under non-sterile condition. Bioresour Technol 2015;182:251–7.
- [224] Mussatto SI, Aguilar CN, Rodrigues LR, Teixeira JA. Fructooligosaccharides and  $\beta$ -fructofuranosidase production by *Aspergillus japonicus* immobilized on lignocellulosic materials. J Mol Catal B Enzym 2009;59:76–81.
- [225] Orzua MC, Mussatto SI, Contreras-Esquivel JC, Rodriguez R, de la Garza H, Teixeira JA, Aguilar CN. Exploitation of agro industrial wastes as immobilization carrier for solid-state fermentation. Ind Crops Prod 2009;30:24–7.
- [226] Robledo A, Aguilera-Carbó A, Rodriguez R, Martinez JL, Garza Y, Aguilar CN. Ellagic acid production by *Aspergillus niger* in solid state fermentation of pomegranate residues. J Ind Microbiol Biotechnol 2008;35:507–13.

- [227] Guimarães C, Matos C, Azeredo J, Mota M, Oliveira R. The importance of the morphology and hydrophobicity of different carriers on the immobilization and sugar refinery effluent degradation activity of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol Lett* 2002;24:795–800.
- [228] Santos JC, Mussatto SI, Dragone G, Converti A, Silva SS. Evaluation of porous glass and zeolite as cells carriers for xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate. *Biochem Eng J* 2005;23:1–9.
- [229] Pelletier C, Bouley C, Cayuela C, Bouttier S, Bourlioux P, Bellon-Fontaine MN. Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:1725–31.
- [230] Vučurović VM, Razmovski RN, Tekić MN. Methylene blue (cationic dye) adsorption onto sugar beet pulp: Equilibrium isotherm and kinetic studies. *J Taiwan Inst Chem Eng* 2012;43:108–11.
- [231] Witek-Krowiak A. Analysis of temperature-dependent biosorption of Cu<sup>2+</sup> ions on sunflower hulls: Kinetics, equilibrium and mechanism of the process. *Chem Eng J* 2012;192:13–20.
- [232] Samot J, Lebreton J, Badet C. Adherence capacities of oral lactobacilli for potential probiotic purposes. *Anaerobe* 2011;17:69–72.
- [233] Schillinger U, Guigas C, Holzapfel WH. In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. *Int Dairy J* 2005;15:1289–97.
- [234] Xu H, Jeong HS, Lee HY, Ahn J. Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains. *Lett Appl Microbiol* 2009;49:434–42.
- [235] Krasowska A, Sigler K. How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? *Front Cell Infect Microbiol* 2014;4:112.
- [236] Ruas-Madiedo P, Hugenholtz J, Zoon P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int Dairy J* 2002;12:163–71.
- [237] Genisheva Z, Mussatto SI, Oliveira JM, Teixeira JA. Evaluating the potential of wine-making residues and corn cobs as support materials for cell immobilization

- for ethanol production. *Ind Crops Prod* 2011;34:979–85.
- [238] Tuson HH, Weibel DB. Bacteria-surface interactions. *Soft Matter* 2013;9:4368–80.
- [239] Hsu CH, Chu YF, Argin-Soysal S, Hahm TS, Lo YM. Effects of Surface Characteristics and Xanthan Polymers on the Immobilization of *Xanthomonas campestris* to Fibrous Matrices. *J Food Sci* 2003;69.
- [240] Chantawongvuti R, Veerajetbodithat J, Jaturapiree P, Muangnapoh C. Immobilization of *Lactobacillus salivarius* ATCC 11741 on loofa sponge coated with chitosan for lactic acid fermentation. *J Microbiol Biotechnol* 2010;20:110–6.
- [241] Chen Y, Muck RE, Weimer PJ, Gamburg M, Weinberg ZG. Lactic Acid Bacteria Used in Inoculants for Silage as Probiotics for Ruminants. *Appl Biochem Biotechnol* 2004;118:001–10.
- [242] Weinberg ZG, Shatz O, Chen Y, Yosef E, Nikbahat M, Ben-Ghedalia D, Miron J. Effect of Lactic Acid Bacteria Inoculants on In Vitro Digestibility of Wheat and Corn Silages. *J Dairy Sci* 2007;90:4754–62.
- [243] Abasiekong SF. Effects of fermentation on crude protein content of brewers dried grains and spent sorghum grains. *Bioresour Technol* 1991;35:99–102.
- [244] Li DX, Ni KK, Zhang YC, Lin YL, Yang FY. Influence of lactic acid bacteria, cellulase, cellulase-producing *Bacillus pumilus* and their combinations on alfalfa silage quality. *J Integr Agric* 2018;17:2768–82.
- [245] Arasu MV, Jung MW, Kim DH, Ilavenil S, Jane M, Park HS, Al-Dhabi NA, Jeon BT, Choi KC. Enhancing Nutritional Quality of Silage by Fermentation with *Lactobacillus plantarum*. *Indian J Microbiol* 2014;54:396–402.
- [246] Koo B, Kim JW, Nyachoti CM. Nutrient and energy digestibility, and microbial metabolites in weaned pigs fed diets containing *Lactobacillus*-fermented wheat. *Anim Feed Sci Technol* 2018;241:27–37.
- [247] Licitra G, Hernandez TM, Van Soest PJ. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Anim Feed Sci Technol* 1996;57:347–58.
- [248] Rajesh N, Imelda-Joseph, Paul Raj R. Value addition of vegetable wastes by solid-

- state fermentation using *Aspergillus niger* for use in aquafeed industry. *Waste Manag* 2010;30:2223–7.
- [249] Nguyen TA, Ngo HH, Guo WS, Zhang J, Liang S, Yue QY, Li Q, Nguyen TV. Applicability of agricultural waste and by-products for adsorptive removal of heavy metals from wastewater. *Bioresour Technol* 2013;148:574–85.
- [250] Terzić D, Radosavljević M, Žilić S, Milašinović M, Semenčenko V. Quality parameters of ZP hybrids biomass. In XII International Symposium on Forage Crops of Republic of Serbia “Forage Crops basis of the Sustainable Animal Husbandry Development”, Kruševac (2010) pp. 26-8.
- [251] de Melo Pereira GV, de Oliveira Coelho B, Magalhães Júnior AI, Thomaz-Soccol V, Soccol CR. How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnol Adv* 2018;36:2060–76.
- [252] Jacobsen CN, Nielsen VR, Hayford AE, Møller PL, Michaelsen KF, Paerregaard A, Sandström B, Tvede M, Jakobsen M. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65:4949-56.
- [253] Tuo Y, Zhang W, Zhang L, Ai L, Zhang Y, Han X YH. Study of probiotic potential of four wild *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Anaerobe* 2013;21:22–7.
- [254] Tejero-Sariñena S, Barlow J, Costabile A, Gibson GR, Rowland I. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: Evidence for the effects of organic acids. *Anaerobe* 2012;18:530–8.
- [255] Cizeikiene D, Juodeikiene G, Paskevicius A, Bartkiene E. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. *Food Control* 2013;31:539–45.
- [256] Bendali F, Madi N, Sadoun D. Beneficial effects of a strain of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* in *Staphylococcus aureus*-induced intestinal and colonic injury. *Int J Infect Dis* 2011;15:e787–94.
- [257] Magnusson J, Schnurer J. Antifungal lactic acid bacteria as bio-preservations.

- Trends Food Sci Technol 2005;16:70–8.
- [258] Magnusson J, Ström K, Roos S, Sjögren J, Schnürer J. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Lett 2003;219:129–35.
- [259] Bulgasem BY, Lani MN, Hassan Z, Wan Yusoff WM, Fnaish SG. Antifungal activity of lactic acid bacteria strains isolated from natural honey against Pathogenic *Candida* species. Mycobiology 2016;44:302–9.
- [260] Mathur S, Singh R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - A review. Int J Food Microbiol 2005;105:281–95.
- [261] Tomar SK, Goswami P, Sangwan V, Singh R, Sharma P. Antibiotic resistance among commercially available probiotics. Food Res Int 2014;57:176–95.
- [262] Blandino G, Milazzo I, Fazio D. Antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products available in Italy. Microb Ecol Health Dis 2008;20:199–203.
- [263] Plessas S, Nouska C, Karapetsas A, Kazakos S, Alexopoulos A, Mantzourani I, Chondrou P, Fournomiti M, Galanis A, Bezirtzoglou E. Isolation, characterization and evaluation of the probiotic potential of a novel *Lactobacillus* strain isolated from Feta-type cheese. Food Chem 2017;226:102–8.
- [264] Ripamonti B, Agazzi A, Bersani C, De Dea P, Pecorini C, Pirani S, Rebutti R, Savoini G, Stella S, Stenico A, Tirloni E. Screening of species-specific lactic acid bacteria for veal calves multi-strain probiotic adjuncts. Anaerobe 2011;17:97–105.
- [265] Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK. Antibiotic Susceptibility of Potentially Probiotic *Lactobacillus* Species. J Food Prot 1998;61:1636–43.
- [266] Nawaz M, Wang J, Zhou A, Ma C, Wu X, Moore JE, Millar BC, Xu J. Characterization and Transfer of Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria from Fermented Food Products. Curr Microbiol 2011;62:1081–9.
- [267] FEEDAP. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. EFSA J 2012;10:1–10.
- [268] EFSA. Introduction of a Qualified Presumption of Safety ( QPS ) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. Opinion of the

- Scientific Committee. EFSA J 2007;587:1–16.
- [269] Commission implementing regulation (EU) 2015/ 1060 - of 2 July 2015 - concerning the authorisation of betaine anhydrous and betaine hydrochloride as feed additives for all animal species 2015.
- [270] Hernández M, Collado MC, Sanz Y, Salminen S, Gueimonde M. Adhesion of Selected Bifidobacterium Strains to Human Intestinal Mucus and the Role of Adhesion in Enteropathogen Exclusion. J Food Prot 2016;68:2672–8.
- [271] Del Re B, Sgorbati B, Miglioli M, Palenzona D. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. Lett Appl Microbiol 2000;31:438–42.
- [272] Pérez PF, Minnaard Y, Disalvo EA, De Antoni GL. Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. Appl Environ Microbiol 1998;64:21–6.
- [273] Angmo K, Kumari A, Savitri, Bhalla TC. Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. LWT - Food Sci Technol 2016;66:428–35.
- [274] Pithva S, Shekh S, Dave J, Vyas BRM. Probiotic attributes of autochthonous *Lactobacillus rhamnosus* strains of human origin. Appl Biochem Biotechnol 2014;173:259–77.
- [275] Goh YJ, Klaenhammer TR. Functional roles of aggregation-promoting-like factor in stress tolerance and adherence of *Lactobacillus acidophilus* NCFM. Appl Environ Microbiol 2010;76:5005–12.
- [276] Ventura M, Jankovic I, Walker DC, Pridmore RD, Zink R. Identification and characterization of novel surface proteins in *Lactobacillus johnsonii* and *Lactobacillus gasseri*. Appl Environ Microbiol 2002;68:6172–81.
- [277] Turner MS, Hafner LM, Walsh T, Giffard PM. Identification and characterization of the novel LysM domain-containing surface protein Sep from *Lactobacillus fermentum* BR11 and its use as a peptide fusion partner in *Lactobacillus* and *Lactococcus*. Appl Environ Microbiol 2004;70:3673–80.
- [278] Lozo J, Jovcic B, Kojic M, Dalgalarrrondo M, Chobert JM, Haertlé T, Topisirovic L.

- Molecular Characterization of a Novel Bacteriocin and an Unusually Large Aggregation Factor of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8, a Natural Isolate from Homemade Cheese. *Curr Microbiol* 2007;55:266–71.
- [279] Verón HE, Di Risio HD, Isla MI, Torres S. Isolation and selection of potential probiotic lactic acid bacteria from *Opuntia ficus-indica* fruits that grow in Northwest Argentina. *LWT - Food Sci Technol* 2017;84:231–40.
- [280] Prajapati J, Shah C, Mishra V, Yadav H, Chavan R, Mokalhe N. Probiotics as Potential Antioxidants: A Systematic Review. *J Agric Food Chem* 2015;63:3615–26.
- [281] Liu CF, Tseng KC, Chiang SS, Lee BH, Hsu WH, Pan TM. Immunomodulatory and antioxidant potential of *Lactobacillus* exopolysaccharides. *J Sci Food Agric* 2011;91:2284-91.
- [282] Rui X, Li W, Jiang M, Dong M, Ji J, Chen X. Structural elucidation and antioxidant activities of exopolysaccharides from *Lactobacillus helveticus* MB2-1. *Carbohydr Polym* 2013;102:351–9.

## BIOGRAFIJA AUTORA

Dragana Mladenović je rođena 3.5.1985. godine u Pančevu. Osnovnu školu završila je u Kačarevu, a srednju medicinsku školu, smer farmaceutski tehničar, u Beogradu. Osnovne akademske studije na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Kragujevcu upisala je školske 2004/2005. godine, studijski program Biologija. Diplomirala je 5.11.2009. godine na Katedri za biologiju i ekologiju sa ocenom na diplomskom radu 10 i prosečnom ocenom u toku studija 9,50. U periodu od januara 2010. do septembra 2012. godine radila je u Osnovnoj školi „Filip Filipović” u Beogradu, na mestu nastavnika biologije. U oktobru 2014. godine položila je stručni ispit i time stekla licencu za rad nastavnika biologije u osnovnom i srednjem obrazovanju. Doktorske akademske studije, na studijskom programu Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, upisala je školske 2012/2013. godine pod mentorstvom prof. dr Ljiljane Mojović. U okviru doktorskih studija položila je sve ispite predviđene studijskim programom, sa prosečnom ocenom 9,73.

Od aprila 2013. do februara 2017. godine kao stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja bila je angažovana na projektu iz programa Tehnološkog razvoja, pod nazivom „Proizvodnja mlečne kiseline i probiotika na otpadnim proizvodima prehrambene i agro-industrije” (evidencioni broj TR 31017). Od februara 2017. godine kao istraživač saradnik zaposlena je u Inovacionom centru Tehnološko-metalurškog fakulteta, u okviru istog projekta. U periodu od 2017. do 2018. godine bila je učesnik projekta bilateralne saradnje Tehnološko-metalurškog fakulteta i Karlsruhe tehnološkog instituta pod nazivom „Integrirana ekstrakcija pulsniim električnim poljem i mlečno-kiselinska fermentacija za proizvodnju ekstrakata mikroalgi obogaćenih probioticima (PEF4AlgBiotics)”, u okviru kog je 2017. godine realizovala jednomesečni naučni boravak na Institutu za pulsnu snagu i mikrotalasne tehnologije (Karlsruhe, Nemačka). Pored nacionalnog projekta, Dragana Mladenović trenutno učestvuje i u realizaciji dva međunarodna projekta: projekta bilateralne saradnje Srbije i Slovenije



(2018-2019) pod nazivom „Elektroporacija mlečno-kiselinskih bakterija – efekti na *in vitro* probiotske karakteristike” i zajedničkog istraživačko razvojnog projekta Srbije i Narodne Republike Kine (2018-2020) pod nazivom „Razvoj novih bioloških postupaka za dobijanje proizvoda sa dodatnom vrednošću na agro-industrijskom otpadu”.

Bila je polaznik nekoliko radionica i seminara namenjenih istraživačima: „Food waste recovery workshop” održane u organizaciji ISEKI Food Association u okviru 4th International ISEKI Food konferencije (Beč, jul 2016.), „WIPO IP Toolkit” organizovane od strane Svetske organizacije za intelektualnu svojinu (WIPO) u saradnji sa Zavodom za intelektualnu svojinu Republike Srbije i centrom za transfer tehnologije Univerziteta u Beogradu (Beograd, novembar 2018.), „Prezentacione veštine i tehnike” – YOURS 2019 održane u okviru YOUng ResearcherS konferencije (Beograd, mart 2019). Autor je 8 naučnih radova (od toga 1 kategorije M21a, 2 kategorije M21, 1 kategorije M22 i 1 kategorije M23). Pored navedenih publikacija, rezultate svog istraživanja predstavila je na nacionalnim i međunarodnim konferencijama. U zvanje istraživač saradnik izabrana je 1.11.2018. godine, odlukom Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta.

**Radovi i saopštenja proistekli iz doktorske disertacije****Rad u međunarodnom časopisu izuzetnih vrednosti (M21a)**

1. **Mladenović D.**, Pejin J., Kocić-Tanackov S., Radovanović Ž., Đukić-Vuković A., Mojović L., (2018). Lactic acid production on molasses enriched potato stillage by *Lactobacillus paracasei* immobilized onto agro-industrial waste supports. *Industrial crops and products*, 124, 142-148. doi:10.1016/j.indcrop.2018.07.081, (ISSN 0923-6690) IF(2017)=3,849 (Agronomy: 6/87).

**Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21)**

1. **Mladenović D.**, Đukić-Vuković A., Kocić-Tanackov S., Pejin J., Mojović L., (2016). Lactic acid production on a combined distillery stillage and sugar beet molasses substrate. *Journal of chemical technology and biotechnology*, 91(9), 2474-2479. doi:10.1002/jctb.4838, IF(2016)=3,135 (ISSN 0268-2575) (Engineering, Chemical: 25/135).
2. **Mladenović D.**, Đukić-Vuković A., Stanković M., Milašinović-Šeremešić M., Pejin J., Radosavljević M., Mojović L., (2019). Bioprocessing of agro-industrial residues into lactic acid and probiotic enriched livestock feed. *Journal of the science of food and agriculture*, prihvaćen za publikaciju. doi:10.1002/jsfa.9759, IF(2017)=2,379 (ISSN 0022-5142) (Agriculture, Multidisciplinary: 8/57).

**Rad u istaknutom međunarodnom časopisu (M22)**

1. **Mladenović D.**, Pejin J., Kocić-Tanackov S., Đukić-Vuković A., Mojović L., (2019). Enhanced lactic acid production by adaptive evolution of *Lactobacillus paracasei* on agro-industrial substrate. *Applied biochemistry and biotechnology*, 187(3), 753-769. doi:10.1007/s12010-018-2852-x, (ISSN 0273-2289) IF(2016)=1,751 (Biotechnology & Applied Microbiology: 96/160).

**Rad u međunarodnom časopisu (M23)**

1. **Mladenović D.**, Đukić-Vuković A., Pejin J., Kocić-Tanackov S., Mojović L., (2016). Mogućnosti, perspektive i ograničenja u proizvodnji mlečne kiseline na sporednim i otpadnim sirovinama. *Hemijska industrija*, 70(4).

doi:10.2298/HEMIND150403050M, (ISSN 0367-598X) IF(2016)=0,459  
(Engineering, Chemical: 125/135).

### **Predavanje po pozivu na međunarodnom skupu štampano u izvodu (M32)**

1. **Mladenović D.**, Đukić-Vuković A., Milašinović-Šeremešić M., Radosavljević M., Pejin J., Kocić-Tanackov S., Mojović L., (2019). Valorisation of sunflower seed hull in lactic acid fermentation, Proceedings of Sixth International Conference Sustainable Postharvest and Food Technologies INOPTTEP 2019 and XXXI National Conference Processing and Energy In Agriculture PTEP 2019, Kladovo, Serbia, April 07–12, 2019, pp. 123-124, Nacionalno društvo za procesnu tehniku i energetiku u poljoprivredi. (ISBN 978-86-7520-367-4).

### **Saopštenje na međunarodnom skupu štampano u izvodu (M34)**

1. **Mladenović D.**, Đukić-Vuković A., Pejin J., Kocić-Tanackov S., Mojović L., (2016). Fed-batch fermentation for enhanced lactic acid production on potato stillage, 4th International ISEKI Food Conference, Vienna, Austria, 6-8. July, 2016, Book of abstracts, p. 215. (ISBN 978-3-900932-34-3).
2. Mojović L., Đukić-Vuković A., **Mladenović D.**, Pejin J., (2016). Lactic acid fermentation of a combined agro-food waste substrate, 4th International Conference on Sustainable Solid Waste Management, Limassol, Cyprus, 23-25. June, 2016, e-Book of Abstracts.
3. Mojović L., **Mladenović D.**, Đukić-Vuković A., Kocić-Tanackov S., Pejin J., (2016). Lactic acid fermentation of a combined distillery stillage and sugar beet molasses substrate, 4th International ISEKI Food Conference, Vienna, Austria, 6-8. July, 2016, Book of abstracts, p. 159. (ISBN 978-3-900932-34-3).
4. Mojović L., **Mladenović D.**, Đukić-Vuković A., Pejin J., Kocić-Tanackov S., (2017). Lactic acid fermentation of agro-industrial waste by immobilized *Lactobacillus paracasei*, JRC-EC – CEI – ICGEB European Workshop “Smart Specialization Strategy in the Field of Biotechnologies in Europe: A Challenge for CEE Region (Central and East European Countries)”, Book of Abstracts, Edited by Daniela Chmelová, Miroslav Ondrejovic, Trnava, Slovak Republic, 2017., p 81. (ISBN 978-80-8105-864-6).

**Rad u vrhunskom časopisu nacionalnog značaja (M51)**

1. **Mladenović D.**, Pejin J., Kocić-Tanackov S., Stefanović A., Đukić-Vuković A., Mojović L., (2016). Potato stillage and sugar beet molasses as a substrate for production of lactic acid and probiotic biomass. *Journal on processing and energy in agriculture*, 20(1), 17-20. (ISSN 1821-4487).
2. **Mladenović D.**, Đukić-Vuković A., Radosavljević M., Pejin J., Kocić-Tanackov S., Mojović L., (2017). Sugar beet pulp as a carrier for *Lactobacillus paracasei* in lactic acid fermentation of agro-industrial waste. *Journal on processing and energy in agriculture*, 21(1), 41-45. (ISSN 1821-4487).

**Saopštenje na skupu nacionalnog značaja štampano u izvodu (M64)**

1. **Mladenović D.**, Đukić-Vuković A., Milašinović-Šeremešić M., Pejin J., Kocić-Tanackov S., Radosavljević M., Mojović L., (2018). Agro-industrial waste for production of lactic acid and animal feed, UNIFood Conference, Belgrade, Serbia, 5-6. October, 2018, e-Book of Abstracts.
2. Mojović L., **Mladenović D.**, Đukić-Vuković A., Kocić-Tanackov S., Pejin J., (2018). Proizvodnja mlečne kiseline na agro-industrijskom otpadnom supstratu pomoću adaptiranog *Lactobacillus paracasei*, Zbornik izvoda XXX Nacionalne konferencije sa međunarodnim učešćem „Procesna tehnika i energetika u poljoprivredi - PTEP 2018“, 15-20. april, Brzeće, Srbija, str. 77-78, Nacionalno društvo za procesnu tehniku i energetiku u poljoprivredi, Novi Sad, Srbija. (ISBN 978-86-7520-367-4).

**Prilog 1.****Izjava o autorstvu**Ime i prezime autora Dragana MladenovićBroj indeksa 4039/2012**Izjavljujem**

Da je doktorska disertacija pod naslovom

**Agro-industrijski otpad kao supstrat za proizvodnju mlečne kiseline, mikrobne biomase i hrane za životinje**

---

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis autora**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Prilog 2.****Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije  
doktorskog rada**Ime i prezime autora Dragana MladenovićBroj indeksa 4039/2012Studijski program Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologijaNaslov rada **Agro-industrijski otpad kao supstrat za proizvodnju mlečne kiseline, mikrobne biomase i hrane za životinje**Mentor Dr Ljiljana Mojović, redovni profesor Tehnološko-metalurškog fakulteta

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la radi pohranjena u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis autora**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Prilog 3.****Izjava o korišćenju**

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

**Agro-industrijski otpad kao supstrat za proizvodnju mlečne kiseline, mikrobn  
biomase i hrane za životinje**

---

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci.  
Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

**Potpis autora**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

1. **Autorstvo.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. **Autorstvo – nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. **Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. **Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. **Autorstvo – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. **Autorstvo – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.