



UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET
BIOTEHNOLOGIJA

PIVSKI TROP – SIROVINA U MLEČNO-KISELOJ FERMENTACIJI

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor: Prof. dr Jelena D. Pejin

Kandidat: Miloš S. Radosavljević

Novi Sad, mart 2017. godine

Uz dužno poštovanje najtoplije se zahvaljujem svom mentoru prof. dr Jeleni Pejin na dragocenim savetima i pomoći prilikom postavljanja problematike i izrade ovog rada, kao i na bezrezervnoj podršci i razumevanju koju mi je pružila tokom izrade ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se prof. dr Ljiljani Mojović, prof. dr Marini Šćiban, prof. dr Gordani Dimić i dr Aleksandri Đukić-Vuković na izuzetnoj časti koju su mi ukazale svojim učešćem u komisiji, kao i na korisnim sugestijama i dobronamernim savetima tokom čitavog procesa rada i izrade doktorske disertacije.

Dr Sunčici Kocić-Tanackov najtoplije se zahvaljujem na nesebičnoj pomoći u eksperimentalnom radu.

Za tehničku pomoć u toku izrade ovog rada zahvaljujem se prof. dr Jasni Čanadanović-Brunet, prof. dr Gordani Četković, prof. dr Spaseniji Milanović, asistentu dr Mireli Iličić, doc. dr Vesni Tumbas-Šaponjac, asistentu dr Jeleni Vulić, Branislavu Bastaji i Marku Cvetiću.

Srdačno se zahvaljujem tehničkom saradniku Biljani Todorović na pomoći i zalaganju u eksperimentalnom radu.

Hvala svim kolegama i prijateljima na savetima i podršci.

Hvala mojim roditeljima i porodici na bezgraničnoj ljubavi, strpljenju i podršci.

Mojoj Jasmini i Anđeli hvala za svu ljubav, razumevanje, strpljenje i podršku.

Rezultati ovog rada su deo projekta Projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije: „Proizvodnja mlečne kiseline i probiotika na otpadnim proizvodima prehrambene i agro-industrije“ TR-31017, a čiji je nosilac prof. dr Ljiljana Mojović.

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET**

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Miloš Radosavljević
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Jelena Pejin
Naslov rada: NR	Pivski trop – sirovina u mlečno-kiseloj fermentaciji
Jezik publikacije: JP	Srpski
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Autonomna pokrajina Vojvodina
Godina: GO	2017
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1

Fizički opis rada: FO	(broj poglavlja/stranica/slika/tabela/referenci/priloga) 6 / 138 / 38 / 40 / 284 / 0
Naučna oblast: NO	Tehnološko inženjerstvo
Naučna disciplina: ND	Biotehnologija

Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Pivski trop, mlečno-kisela fermentacija, mlečna kiselina, pivski kvasac, <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. fermentum</i>
UDK	663.48:663.142/.143+547.472.2(043.3)
Čuva se: ČU	U biblioteci Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, 21000 Novi Sad, Srbija, Bulevar cara Lazara 1
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	<p>Pivski trop čini približno 85% od ukupnih sporednih proizvoda proizvodnje piva, i dostupan je po veoma niskim cenama tokom čitave godine. Pivski trop ima veliku perspektivu za primenu u biotehnologiji i proizvodnji visoko vrednih proizvoda. Jedna od veoma ekološki i ekonomski isplativih alternativa je upotreba pivskog tropa u proizvodnji mlečne kiseline, jer se poslednjih par decenija uočava intenzivan rast potražnje za mlečnom kiselinom. Mlečna kiselina je najvažnija hidroksikarbonska kiselina široko rasprostranjena u prirodi, sa velikom primenom u prehrambenoj, farmaceutskoj, tekstilnoj i hemijskoj industriji i industriji prerade kože.</p> <p>Cilj istraživanja ove doktorske disertacije je ispitivanje primene pivskog tropa u proizvodnji mlečne kiseline. Prvo je izvršena optimizacija enzimske hidrolize pivskog tropa u cilju dobijanja što je moguće veće koncentracije redukujućih šećera neophodne za mlečno-kiselu fermentaciju. Hidrolizat pivskog tropa je dobijen enzimskom hidrolizom dodatkom komercijalnih enzima za razgradnju skroba i celuloze. Parametri čiji je uticaj na efikasnost enzimske hidrolize ispitanu su: pH vrednost, temperatura hidrolize i količina dodatih enzima. Nakon što su određeni najbolji uslovi razgranje pivskog tropa, dobijeni postupak hidrolize je primenjen u proizvodnji hidrolizata pivskog tropa koji je korišćen u mlečno-kiselim fermentacijama.</p> <p>Nakon toga je ispitana mlečno-kisela fermentacija sa dva proizvodna mikroorganizma. Kao proizvodni mikroorganizmi u mlečno-kiselim fermentacijama primenjena su dva soja bakterija mlečne kiseline: <i>Lactobacillus fermentum</i> PL-1 i <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469. Ispitan je uticaj dodatka različitih koncentracija ekstrakta kvasca (0,5-5,0%) uz korekciju pH vrednosti tokom fermentacije sa dodatkom kalcijum-karbonata. U zavisnosti od udela L-(+)- i D-(-)-mlečne kiseline koje nastaju tokom fermentacije izabran je proizvodni mikroorganizam koji proizvodi više L-(+)-mlečne kiseline.</p> <p>U daljim ispitivanjima je ispitan uticaj korekcije pH pomoću natrijum-hidroksida kao i dodatak različitih koncentracija ekstrakta kvasca (0,5-5,0%) i redukujućih šećera (2,7; 5,4 i 8,1%) u hidrolizatu pivskog tropa na mlečno-kiselu fermentaciju pomoću odabranog soja bakterija mlečne kiseline. Na osnovu dobijenih rezultata izabrana je</p>

najbolja koncentracija redukujućih šećera i ekstrakta kvasca koji će se koristiti u daljim istraživanjima.

Takođe je ispitana i mogućnost zamene skupog ekstrakta kvasca i glukoze sa obnovljivim sirovinama, kao što su pivski kvasac, džibra i bistra džibra.

Ispitan je uticaj dodatka različitih koncentracija pivskog kvasca (0,5-5,0%), džibre (5-20%) i bistre džibre (5-50%) pre fermentacije kao i dodatak bistre džibre u dolivnoj fermentaciji, na mlečno-kiselu fermentaciju hidrolizata pivskog tropa.

Ispitan je i dolivni postupak fermentacije hidrolizata pivskog tropa dodatkom glukoze, glukoze i ekstrakta kvasca i sladovine. Takođe je ispitana mogućnost izvođenja više uzastopnih fermentacija sa imobilisanim ćelijama odabranog soja bakterija mlečne kiseline u kalcijum-alginatu.

Na osnovu eksperimentalnih rezultata zaključeno je da je dodatak kalcijum-karbonata imao pozitivan uticaj na proizvodnju mlečne kiseline sa *L. fermentum* i *L. rhamnosus*. Sa dodatkom kalcijum-karbonata povećali su se utrošak redukujućih šećera, koncentracija i prinos mlečne kiseline i vijabilnost ćelija *L. fermentum* i *L. rhamnosus*. Ekstrakt kvasca i kalcijum-karbonat su imali značajan uticaj na proizvodnju mlečne kiseline sa *L. fermentum* i *L. rhamnosus*. U fermentacijama sa *L. fermentum* najveći prinos ukupne mlečne kiseline (44%) je postignut sa dodatkom 5,0% ekstrakta kvasca i 2,0% kalcijum-karbonata. U fermentacijama sa *L. rhamnosus* najveći prinos ukupne mlečne kiseline (98%) i L-(+)-mlečne kiseline (96%) je ostvaren u fermentaciji sa dodatkom 2,0% ekstrakta kvasca i 2,0% kalcijum-karbonata. Na osnovu rezultata odlučeno je da se u daljim ispitivanjima mlečno-kisele fermentacije hidrolizata pivskog tropa kao proizvodni mikroorganizam koristi *L. rhamnosus*.

Primenom natrijum-hidroksida za korekciju pH je skratila fermentaciju za 48 sati a ostvareno je i značajno povećanje zapreminske produktivnosti L-(+)-mlečne kiseline (za 200%, povećanje sa 0,21 na 0,63 g/l·h⁻¹). Korekcija pH u svim daljim istraživanjima je vršena sa dodatkom natrijum-hidroksida.

U mlečno-kiselim fermentacijama sa različitim početnim koncentracijama redukujućih šećera (2,7; 5,4 i 8,1%) i sa dodatkom različitih koncentracija ekstrakta kvasca (0,5-5,0%), najveći prinos L-(+)-mlečne kiseline i zapreminska produktivnost od 91,29% i 1,69 g/l·h⁻¹, kao i vijabilnost ćelija *L. rhamnosus* od 9,7·10⁹ CFU/ml ostvareni su u fermentaciji sa početnom koncentracijom redukujućih šećera od 5,4% i dodatkom 5,0% ekstrakta kvasca.

Na osnovu ostvarenih rezultata u istraživanjima sa dodatkom džibre i dodacima tokom fermentacije kao i u fermentacijama sa imobilisanim ćelijama je korišćen

	<p>hidrolizat pivskog tropa sa početnom koncentracijom redukujućih šećera od 5,4%.</p> <p>U mlečno kiseloj fermentaciji sa dodatkom pivskog kvasca najveći prinos L-(+)-mlečne kiseline (89,01%) i zapreminska produktivnost (0,89 g/l·h⁻¹) L-(+)-mlečne kiseline su ostvareni u fermentaciji sa dodatkom 5,0% pivskog kvasca i korekcijom početne koncentracije redukujućih šećera na 5,0%. Na osnovu rezultata utvrđeno je da se može izvršiti delimična ili potpuna zamena ekstrakta kvasca pivskim kvascem uz značajno smanjenje cene podloge za mlečno-kiselu fermentaciju, bez značajnog smanjenja efikasnosti mlečno-kisele fermentacije.</p> <p>U mlečno-kiseloj fermentaciji sa dodatkom džibre i bistre džibre najveć koncentracija, prinos i zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline od 31,03 g/l, 86,15% i 0,93 g/l·h⁻¹, ostvareni su u fermentaciji sa dodatkom 50% bistre džibre. Najviša koncentracija, prinos i zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline ostvareni u dolivnoj fermentaciji sa dodatkom glukoze i bistre džibre tokom mlečno-kisele fermentacije su iznosili su 48,02 g/l, 87,82% i 0,96 g/l·h⁻¹.</p> <p>U fermentacijama sa dodatkom nutritijenata tokom mlečno-kisele fermentacije najveća vrednost koncentracije, prinosa i zapreminske produktivnosti L-(+)-mlečne kiseline od 116,08 g/l, 93,32% i 2,04 g/L·h⁻¹, su ostvarene u fermentaciji sa dodatkom glukoze i ekstrakta kvasca tokom fermentacije. Na osnovu rezultata utvrđeno je da se dolivni postupak fermentacije može koristiti u cilju povećanja efikasnosti mlečno-kisele fermentacije.</p> <p>Izvršena je imobilizacija ćelija <i>L. rhamnosus</i> u kalcijum-alginatu uz izuzetno visoku vijabilnost (10¹⁰ CFU/ml). Imobilisane ćelije <i>L. rhamnosus</i> su uspešno korišćene u tri mlečno-kisele fermentacije. Prinos L-(+)-mlečne kiseline i zapreminska produktivnost su u sve tri fermentacije bili izuzetno visoki, pri čemu su najveći prinos L-(+)-mlečne kiseline i zapreminska produktivnost od 95,2% i 1,76 g/l·h⁻¹, ostvareni u drugoj fermentaciji. Upotrebom imobilisanih ćelija <i>L. rhamnosus</i> je osim povećanja prinosa i zapreminske produktivnosti L-(+)-mlečne kiseline skraćena fermentacija za 12 sati u poređenju sa šaržnim fermentacijama.</p>
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	21.11.2016 godine
Datum odbrane: DO	

<p>Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO</p>	<p>predsednik: dr Marina Šćiban, redovni profesor, Tehnološki fakultet u Novom Sadu mentor: dr Jelena Pejin, vanredni profesor, Tehnološki fakultet u Novom Sadu član: dr Gordana Dimić, redovni profesor, Tehnološki fakultet u Novom Sadu član: dr Ljiljana Mojović, redovni profesor, Tehnološko-metalurški fakultet u Beogradu, član: dr Aleksandra Đukić-Vuković, naučni saradnik, Tehnološko-metalurški fakultet u Beogradu</p>
---	---

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF TECHNOLOGY**

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	Doctoral thesis (PhD thesis)
Author: AU	Miloš Radosavljević
Mentor: MN	Associate Professor Jelena Pejin, Ph.D.
Title: TI	Brewer's spent grain – raw material in lactic acid fermentation
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2017
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	21 000 Novi Sad, Serbia, Bulevar cara Lazara 1

Physical description: PD	(No of volumes/ pages/ ref./ tables/ figures/ app.) 6 / 138 / 284 / 40 / 38 / 0
Scientific field SF	Technological engineering
Scientific discipline SD	Biotechnology
Subject, Key words SKW	Brewer's spent grain, lactic acid fermentation, lactic acid, brewer's spent yeast, <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. fermentum</i>

UC	663.48:663.142/.143+547.472.2(043.3)
Holding data: HD	Library of Faculty of Technology, 21 000 Novi Sad, Serbia, Bulevar cara Lazara 1
Note: N	
Abstract: AB	<p>Brewers spent grain represents (BSG) about 85% of the total by-products from brewing process and is available at low price during the whole year. Due to its chemical composition BSG has great potential use in biotechnology and production of high-value products. One of very eco-friendly and economical alternative uses of BSG is in production of lactic acid (LA), since in the last few decades the demand for the LA has significantly risen, mostly because of development of biodegradable lactic polymers, which are eco-friendly and nontoxic.</p> <p>Lactic acid is the most important hydrocarboxylic acid with an asymmetrical carbon atom, widely distributed in nature, and it has shown great potential in fields of food, pharmaceutical, textile, leather and chemical industries.</p> <p>The aim of this doctoral thesis was to investigate the application of BSG in lactic acid production. First, the optimization of enzymatic hydrolysis of BSG was conducted, with the goal to achieve high reducing sugar concentrations, as much as possible, that are necessary on LA fermentation. BSG hydrolysis was conducted by usage of commercial enzymes for degradation of starch and cellulose. Effect of pH value, temperature and enzyme dosage on BSG hydrolysis efficiency was investigated. After the best conditions for BSG hydrolysis were determined, the optimized procedure for BSG hydrolysis was used for the production of BSG hydrolysate that will be used in LA fermentations.</p> <p>After optimization of BSG hydrolysis, LA fermentation by two LA producing microorganisms was investigated. The strains investigated were two LA bacteria strains: <i>Lactobacillus fermentum</i> PL-1 and <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469. The effect of yeast extract (0.5; 1.0; 2.0; 3.0; 4.0, and 5.0%) addition in BSG hydrolysate, with the correction of pH value during LA fermentation by the addition of calcium-carbonate, on LA fermentation was investigated. Based on the results achieved for L-(+)- and D-(-)-LA ratio the LAB strains that produced more L-(+)-LA was chosen for further research.</p> <p>In further research the effect of pH correction (with addition of NaOH), yeast extract (0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, and 5.0%) addition and reducing sugar concentration (2.7; 5.4 and 8.1%) in BSG hydrolysate on LA fermentation was investigated. Based on the results achieved the best yeast extract and reducing sugars concentrations was determined and used in further analysis or research. Also the possible replacement of expensive yeast extract and glucose with cheap alternatives, like brewer's spent grain and stillage was</p>

investigated. The effect of brewer's spent grain (0.5; 1.0; 2.0; 3.0; 4.0, and 5.0%), whole stillage (5, 10, 15 i 20%) and thin stillage (5, 10, 15, 20, 30, 40, 50%) addition before fermentation as well as thin stillage addition in fed-batch fermentation in BSG hydrolysate on LA fermentation were investigated.

Also fed-batch fermentation procedure (addition of glucose, glucose and yeast extract and wort during fermentation) was investigated. The possible application of cells immobilized in Ca-alginate for LA fermentation of BSG hydrolysate was also investigated.

Based on the results it was concluded that BSG can be successfully utilized as a raw material in production of LA, after optimization of hydrolysis and addition of nitrogen source.

According to the results of chemical composition before and after optimized hydrolysis 78.6% of total cellulose was hydrolyzed.

Addition of calcium-carbonate had positive effect on LA production by *L. fermentum* i *L. rhamnosus*. With the addition of calcium-carbonate reducing sugar utilization, LA yield and concentration and cell viability (both *L. fermentum* i *L. rhamnosus*) increased. Addition of calcium-carbonate and yeast extract had a positive effect on LA fermentation by *L. fermentum* and *L. rhamnosus*. In LA fermentation by *L. fermentum* the highest LA yield (44%) was achieved with addition of 5.0% of yeast extract and 2.0% of calcium-carbonate. In *L. rhamnosus* fermentations the highest total LA yield (98%) and L-(+)-LA yield (96%) was reached when 2.0% of yeast extract and 2.0% of calcium-carbonate were added.

Based on the results achieved it was concluded that BSG hydrolysate, with the addition of yeast extract, is a good fermentation media for LA fermentation with *L. rhamnosus*, and it was decided that *L. rhamnosus* will be used in further research of LA fermentation on BSG hydrolysate.

Addition of NaOH instead of calcium-carbonate for the pH correction shortened the fermentation time by 48 h and increased the L-(+)-LA volumetric productivity (by 200%, from 0.21 to 0.63 g/L·h⁻¹). Based on this results pH correction in further experiments was done by addition of NaOH.

In LA fermentation with different reducing sugar (2.7, 5.4 and 8.1%) and yeast extract concentrations (0.5-5.0%), the highest L-(+)-LA yield and volumetric productivity of 91.29%, and 1.69 g/L·h⁻¹, respectively, as well as *L. rhamnosus* cell viability (9.67 log CFU/mL), were achieved with the reducing sugar content of 5.4% and yeast extract content of 5.0%.

Based on this results in further experiment with the addition of stillage, in fed-batch fermentation and

	<p>fermentation with immobilized cell BSG hydrolysate with 5.4% of reducing sugars and 5.0% yeast extract was used.</p> <p>In fermentation with the addition of brewer's spent yeast the highest L-(+)-LA yield (89.01%) and volumetric productivity (0.89 g/L·h⁻¹) were achieved in the fermentation of BSG hydrolysate with 5.0% of reducing sugar and 5.0% of brewer's yeast. Based on the results achieved it was concluded that yeast extract can be partial or complete replaced by brewer's spent yeast with significant decrease of media cost, without the decrease in LA fermentation efficiency.</p> <p>In fermentation with the addition of thin stillage the highest L-(+)-LA concentration, yield, and volumetric productivity of 31.03 g/L, 86.15%, and 0.93 g/L·h⁻¹, respectively, was obtained in fermentation with the addition of 50% of thin stillage. The highest L-(+)-LA concentration, yield, and volumetric productivity achieved in fed-batch fermentation with the addition of glucose and thin stillage during fermentation, were 48,02 g/L, 87,82% i 0,96 g/L·h⁻¹.</p> <p>In fed-batch fermentation the highest L-(+)-LA concentration, yield, and volumetric productivity of 116.08 g/L, 93.32%, and, 2.04 g/L h⁻¹, respectively, were achieved in fermentation with glucose and yeast extract addition during fermentation. The results showed that fed-batch fermentation could be used to increase L-(+)-LA fermentation efficiency</p> <p>Immobilization of <i>L. rhamnosus</i> cells with high viability (10¹⁰ CFU/mL) in Ca-alginate was conducted. Immobilized cells we successfully utilized in three repeated batch fermentation. L-(+)-LA yield and volumetric productivity were very high in all three batch fermentation, with the highest results achieved (95.20% and 1.76 g/L·h⁻¹, respectively) in second fermentation. Application of immobilized <i>L. rhamnosus</i> cells increased L-(+)-LA yield and volumetric productivity and shortened the fermentation time for 12 h in comparison with batch fermentation.</p>
Accepted on Senate on: AS	November 21 st , 2016
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>president: Ph.D. Marina Šćiban, Full Professor, Faculty of Technology, Novi Sad</p> <p>menthor: Ph.D. Jelena Pejin, Associate Professor, Faculty of Technology, Novi Sad</p> <p>member: Ph.D. Gordana Dimić, Full Professor, Faculty of Technology, Novi Sad</p> <p>member: Ph.D. Ljiljana Mojović, Full Professor, redovni profesor, Faculty of Technology and Metallurgy, Belgrade</p> <p>member: Ph.D. Aleksandra Đukić-Vuković, Research Fellow, Faculty of Technology and Metallurgy, Belgrade</p>

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI UVOD.....	6
2.1. Dobijanje pivskog tropa	6
2.1.1 Razgradnja skroba	6
2.1.2. Razgradnja proteina.....	6
2.1.3. Razgradnja β -glukana.....	7
2.1.4. Razgradnja lipida i polifenola	7
2.1.5. Komljenje	7
2.1.6. Ceđenje komine.....	9
2.2. Pivski trop	14
2.3. Tehnike čuvanja pivskog tropa.....	17
2.4. Potencijalne primene pivskog tropa u biotehnologiji.....	18
2.4.1. Pivski trop kao dodatak ili nosač za imobilizaciju kvasca u fermentaciji.....	18
2.4.2. Pivski trop kao sirovina za proizvodnju bioetanolu	20
2.4.3. Pivski trop kao podloga za kultivaciju mikroorganizama, gljiva i proizvodnju enzima	21
2.4.4. Pivski trop kao sirovina za proizvodnju ksilitola	23
2.4.5. Pivski trop kao sirovina za proizvodnju pululana	24
2.4.6. Pivski trop kao sirovina za proizvodnju fenolnih kiselina	24
2.4.7. Pivski trop kao sirovina za proizvodnju biogasa.....	25
2.4.8. Pivski trop kao sirovina za proizvodnju mlečne kiseline	26
2.5. Mogućnosti pripreme pivskog tropa za primenu u biotehnologiji	27
2.5.1 Mehanički predtretman	27
2.5.2. Enzimaska hidroliza	28
2.6. Mlečna kiselina	28
2.6.1 Sirovine za proizvodnju mlečne kiseline	30
2.6.2. Proizvodni mikroorganizmi mlečne kiseline	35
2.6.3. Mlečno-kisela fermentacija	39
2.6.4. Primena novih tehnologija za dobijanje mlečne kiseline	42
2.6.5. Mlečno-kisela fermentacija sa imobilisanim ćelijama	43
2.6.6. Izdvajanje mlečne kiseline nakon fermentacije.....	46
3. EKSPERIMENTALNI DEO	48
3.1. Materijal	48
3.1.1. Mikroorganizmi	48
3.1.2. Materijal	48
3.1.3. Hemikalije p.a. čistoće	48

3.1.4. Enzimi i enzimski preparati.....	49
3.2. Metode i priprema uzoraka.....	50
3.2.1. Mehanička priprema pivskog tropa.....	50
3.2.2. Određivanje sadržaja vlage	50
3.2.3. Određivanje sadržaja rastvorljivog ekstrakta	50
3.2.4. Određivanje sadržaja ekstrakta koji se može razgraditi enzimima (ukupnog ekstrakta)	51
3.2.5. Optimizacija termičko-enzimske priprema pivskog tropa za mlečno-kiselu fermentaciju.....	52
3.2.6. Određivanje sadržaja skroba	53
3.2.7. Određivanje sadržaja celuloze – metoda po Kürschner-Hoffer-u	54
3.2.8. Određivanje koncentracije redukujućih šećera	55
3.2.9. Određivanje koncentracije mlečne kiseline enzimskim testom	56
3.2.10. Određivanje pH vrednosti	59
3.2.11. Određivanje sadržaja metala.....	59
3.2.12. Određivanje sadržaja ukupnih proteina.....	59
3.2.13. Određivanje sadržaja pepela.....	60
3.2.14. Određivanje koncentracije slobodnog amino azota	61
3.3. Mlečno-kisela fermentacija	62
3.3.1. Statistička obrada podataka	63
3.3.2. Šaržni postupak sa <i>L. fermentum</i> i <i>L. rhamnosus</i>	63
3.3.3. Dolivni postupak sa <i>L. rhamnosus</i>	64
3.3.4. Imobilizacija ćelija <i>Lactobacillus rhamnosus</i> u Ca-alginatu i njihova primena u mlečno-kiseloj fermentaciji.....	65
3.3.5. Priprema inokuluma za mlečno-kiselu fermentacija.....	65
3.3.6. Određivanje vijabilnosti (ukupnog broja živih ćelija) <i>L. fermentum</i> i <i>L. rhamnosus</i>	65
4. REZULTATI I DISKUSIJA	67
4.1. Rezltati analize pivskog tropa	67
4.2. Optimizacija enzimske hidrolize	67
4.2.1 Optimizacija hidrolize skroba pivskog tropa.....	67
4.2.2 Optimizacija hidrolize celuloze pivskog tropa.....	71
4.2.3 Optimizacija enzimske hidrolize pivskog tropa	72
4.3. Rezultati analize pivskog tropa posle enzimske hidrolize	73
4.4. Mlečno-kisela fermentacija hidrolizata pivskog tropa	74
4.4.1. Sastav hidrolizata pivskog tropa kao sirovina za proizvodnju mlečne kiseline	74
4.4.2. Rezultati mlečno-kisele fermentacije uz dodatak kalcijum-karbonata.....	75
4.4.3. Rezultati mlečno-kisele fermentacije hidrolizata pivskog tropa sa dodatkom	

ekstrakta kvasca (0,5-5,0%) i kalcijum-karbonata	79
4.4.4. Rezultati mlečno-kisele fermentacije hidrolizata pivskog tropa sa korekcijom pH i različitim početnim koncentracijama redukujućih šećera	84
4.4.5 Rezultati mlečno-kisele fermentacije MRS bujona i hidrolizata pivskog tropa sa dodatkom MRS bujona.....	87
4.4.6. Rezultati mlečno-kisele fermentacije hidrolizata pivskog tropa sa različitim početnim koncentracijama redukujućih šećera i sa dodatkom ekstrakta kvasca (0,5-5,0%)	90
4.4.7. Rezultati mlečno-kisele fermentacije hidrolizata pivskog tropa sa dodatkom pivskog kvasca (0,5-5,0%)	98
4.2.8. Rezultati mlečno-kisele fermentacije hidrolizata pivskog tropa sa dodatkom džibre (5–20%) i bistre džibre (5–50%)	104
4.2.9. Dolivni postupak mlečno-kisele fermentacija uz dodatak šećera, ekstrakta kvasca i sladovine.....	112
4.2.10. Mlečno-kisela fermentacija hidrolizata pivskog tropa sa imobilisanim ćelijama <i>L. rhamnosus</i> u Ca-alginatu.....	117
5. ZAKLJUČAK	121
6. LITERATURA	123

1. UVOD

Pivo je jedno od najčešće konzumiranih alkoholnih pića u svetu. Pivo je osvežavajuće piće nastalo alkoholnom fermentacijom vodenog ekstrakta sladovanog ječma sa hmeljom, a sama proizvodnja piva predstavlja višestepeni proces, koji obuhvata konverziju sirovina u finalni proizvod. Bogato je hranljivim sastojcima, ugljenim hidratima, aminokiselinama, mineralima, vitaminima i fenolnim jedinjenjima (Gerhäuser, 2005). Za proizvodnju piva potrebne su četiri sirovine: ječam, odnosno slad, hmelj, voda i kvasac, a pored njih često se primenjuju skrobne i šećerne sirovine, kojima se zamenjuje deo slada. Kvalitet svih sirovina ima odlučujući uticaj, čak često i presudan, na kvalitet gotovog piva (Pejin i sar., 2013).

Proizvodnja piva se sastoji iz tri faze. Šema proizvodnje piva prikazana je na slici 1. Prva faza obuhvata proizvodnju sladovine iz ječmenog slada, nesladovanih sirovina, vode i hmelja. Postupak proizvodnje sladovine odvija se u pogonu pivare, koji se naziva varionica i obuhvata nekoliko operacija i postupaka:

- drobljenje (usitnjavanje) slada i nesladovanih sirovina (surogata);
- komljenje;
- ceđenje komine, tj. odvajanje sladovine od tropa;
- kuvanje sladovine sa hmeljom i
- hlađenje i bistrenje ohmeljene sladovine.

Usitnjavanjem se olakšava ekstrakcija sastojaka slada i nesladovanih sirovina tokom postupka komljenja. Postupak komljenja zavisi od vrste piva koje se proizvodi. Komljenje je postupak u kome se usitnjeni slad i nesladovane sirovine (ako se koriste), mešaju sa određenom količinom vode zadate temperature. Dobijena komina se zagreva po tačno definisanom temperaturnom režimu (enzimska razgradnje ugljenih hidrata i proteina) u cilju dobijanja sladovine željenog kvaliteta. Po završetku komljenja vrši se razdvajanje sladovine i pivskog tropa. Dobijena sladovina se kuva uz dodatak hmelja ili proizvoda od hmelja (Eaton, 2006). Tokom kuvanja sladovine sa hmeljom odigrava se niz promena: rastvaranje i transformacija jedinjenja hmelja, koagulacija proteina sladovine, nastajanje kompleksa proteina i polifenola i njihovo taloženje, isparavanje viška vode i usled toga promena koncentracije sladovine, sterilizacija sladovine, inaktivacija enzima sladovine, nastajanje nosioca arome i boje piva, povećanje boje sladovine, smanjenje pH vrednosti sladovine, nastajanje antioksidativnih (redukujućih) jedinjenja za koje se smatra da štite sladovinu od oksidacije u daljem procesu proizvodnje i isparavanje jedinjenja sladovine poreklom iz slada (dimetilsulfida) i hmelja (Denk i sar., 2000).

Po završetku kuvanja sladovine sa hmeljom vrši se bistrenje ohmeljene sladovine uklanjanjem toplog taloga. Bistrenjem sladovine uklanjaju se jedinjenja koja mogu izazvati mutnoću piva i negativno uticati na proces fermentacije i formiranje arome piva. Ohmeljena sladovina se zatim hladi, u zavisnosti od postupka fermentacije, do temperature 6-8°C za proizvodnju piva „donjeg vrenja“, odnosno do temperature 15-18°C za proizvodnju piva „gornjeg vrenja“. Hladna ohmeljena sladovina se inokuliše pivskim kvascem i time započinje druga faza u proizvodnji piva (Eßlinger, 2009; Pavsler i Buiatti, 2009).

Druga faza proizvodnje piva obuhvata glavnu i naknadnu fermentaciju, kao i dozrevanje piva. Fermentacijom hladne ohmeljene sladovine ćelijama pivskog kvasca dobija se pivo. Konverzija šećera u etanol i ugljen-dioksid se odvija pod dejstvom enzima kvasca i čini osnovu procesa fermentacije. Pri tome nastaju i sporedni proizvodi koji bitno utiču na ukus, miris i druge osobine piva, a čije je nastajanje, i delom razgradnja, usko povezano sa

metabolizmom ćelija kvasca. Hladna ohmeljena sladovina se inokuliše tačno definisanom količinom i sojem pivskog kvasca. Jedna od osnovnih podela piva je na piva donjeg i piva gornjeg vrenja. Pivo donjeg vrenja je najzastupljeniji tip u skoro svim zemljama i čini 90% od ukupne svetske proizvodnje piva (Bamforth, 2003). U proizvodnji piva „donjeg vrenja“ se koristi soj kvasca *Saccharomyces pastorianus*, pri čemu fermentacija traje 5-12 dana na temperaturama u ospegu 5–12°C. Na kraju fermentacije kvasac se izdvaja na dno fermentora (Carey i Grossman, 2006). U proizvodnji piva „gornjeg vrenja“ se koristi soj kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, pri čemu fermentacija traje značajno kraće (3-5 dana) u poređenju sa pivima donjeg vrenja ali se fermentacija vrši na višim temperaturama (15-22°C). Tokom fermentacije kvasac se polako podiže ka površini mladog piva i na kraju fermentacije se izdvaja u peni. U toku faze glavne fermentacije dolazi do utroška najvećeg dela fermentabilnog ekstrakta iz sladovine (preko 90%) uz nastajanje etanola, ugljen-dioksida, organskih kiselina, estara, viših alkohola i dr. Po završetku glavne fermentacije, dobijeno mlado pivo se hladi na 0-2°C nakon čega počinje naknadna fermentacija i dozrevanje piva (pri čemu dolazi do utroška preostalog ekstrakta delovanjem ćelija kvasca ostalih u suspenziji) u istim ili u posebnim fermentorima (Carey i Grossman, 2006; Eßlinger, 2009).

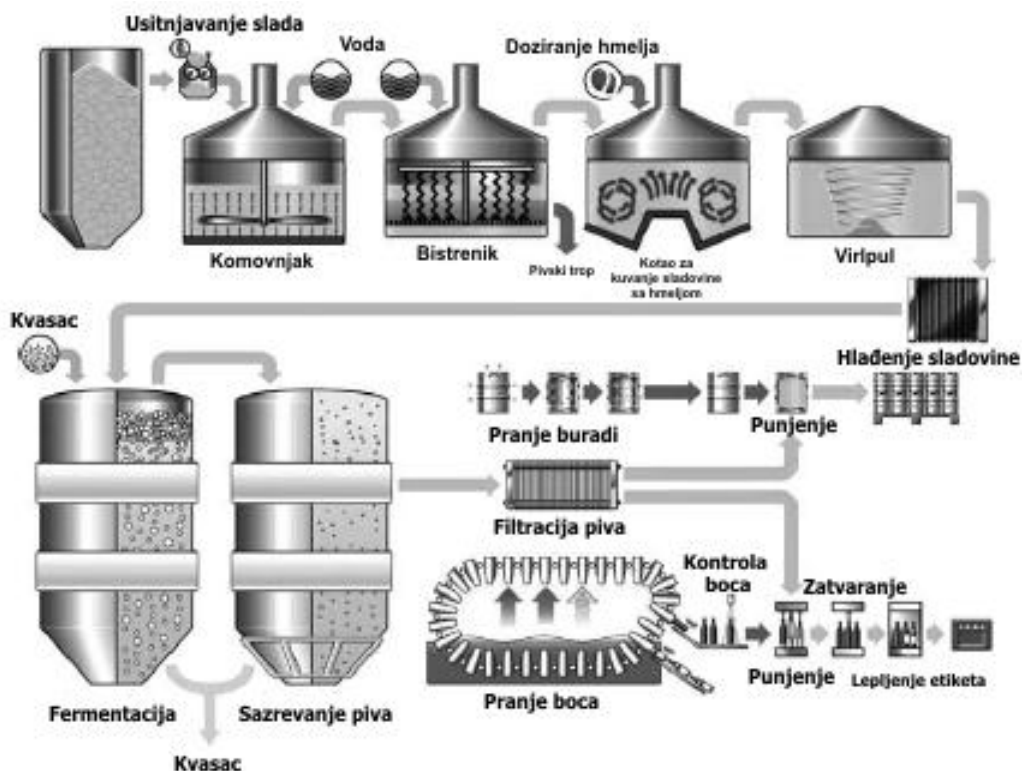
Bistrenje piva započinje sniženjem temperature pri kraju glavne fermentacije usled čega dolazi do taloženja najvećeg dela suspendovanih ćelija kvasca. Deo kvasca ostaje suspendovan u mladom pivu. Po završetku dozrevanja pivo se filtrira čime započinje treća faza u proizvodnji piva (Eaton, 2006).

Treća faza obuhvata filtraciju i stabilizaciju piva u koloidnom i biološkom pogledu i punjenje piva u ambalažu. Filtracija je postupak razdvajanja kojim se iz piva uklanjaju ćelije kvasca i jedinjenja koja mogu uzrokovati mutnoću piva. Cilj filtracije je da se dobije stabilno pivo u kome neće biti vidljivih promena najmanje do datuma minimalnog roka upotrebe (Bamforth, 2006). Filtracija se sastoji u razdvajanju mutnog piva, pomoću sredstava za filtraciju (kiselgur), na bistro pivo i ostatak na filteru. Pri tome je pogonska sila razlika pritiska na ulazu u filter i izlazu iz filtera. Tokom filtracije se deo čestica zbog svoje veličine zadržavaju na površini filtracionog materijala dok se čestice manjih dimenzija zadržavaju unutar pora filtracionog materijala putem mehaničkog vezivanja ili adsorpcije (Briggs i sar., 2004). U daljem postupku vrši se biološka i koloidna stabilizacija piva.

Biološka stabilizacija podrazumeva uklanjanje mikroorganizama koji mogu izazvati kvarenje piva. Za biološku stabilizaciju se koristi pasterizacija ili hladna sterilizacija putem posebnih filtera (Munroe, 2006). Koloidnom stabilizacijom piva se uklanjaju proteini i polifenoli. Proteini i polifenoli mogu da izazovu mutnoću gotovog piva. Za koloidnu stabilizaciju se koriste sredstva za stabilizaciju polivinilpirolidon (PVPP – uklanja polifenole adsorpcijom), silikagel (uklanja proteine adsorpcijom) i enzimi (uklanjaju proteine) (Lindemann, 2006).

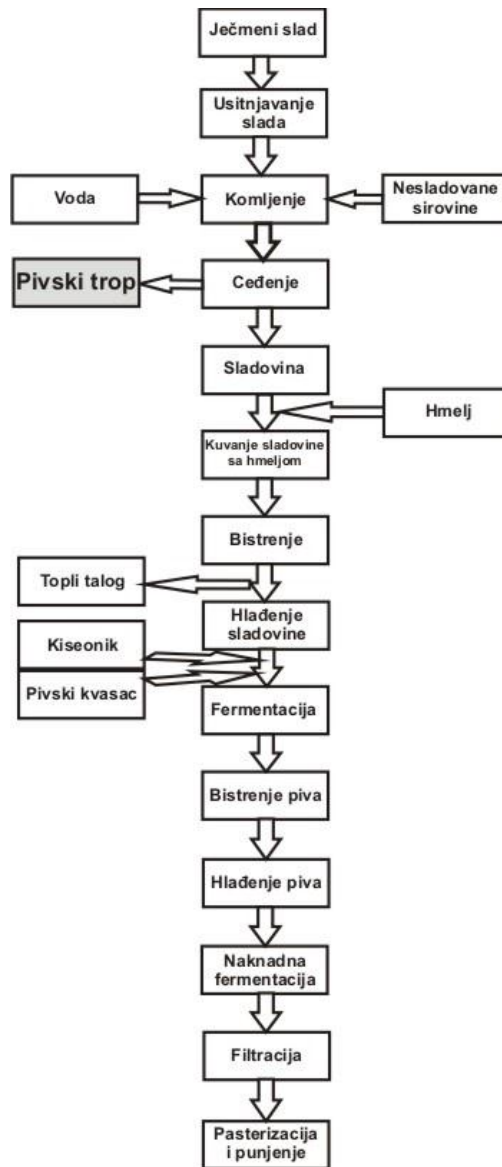
Nakon filtracije i stabilizacije, pivo se puni u ambalažu (Bamforth, 2003). Ceo proces se vodi pod nadpritiskom kako bi se zadržao željeni sadržaj ugljen-dioksida (Eaton, 2006). Na slikama 1 i 2 je data šema procesa proizvodnje piva.

Tokom proizvodnje piva nastaju velike količine sporednih proizvoda, od kojih 85% čini pivski trop. Pivski trop nastaje u velikim količinama tokom čitave godine i dostupan je po veoma niskim cenama. Pivski trop se najčešće koristi kao jeftina stočna hrana ili se odlaže na deponije. Zbog hemijskog sastava pivski trop ima veliku perspektivu za primenu u biotehnologiji i proizvodnji visoko vrednih proizvoda. Jedna od veoma ekološki i ekonomski isplativih alternativa je upotreba pivskog tropa u proizvodnji mlečne kiseline, jer se poslednjih par decenija uočava intenzivan rast potražnje za mlečnom kiselinom, prvenstveno zbog razvoja biorazgradivih laktidnih polimera, koji su ekološki prihvatljiviji i netoksični.



Slika 1. Proces proizvodnje piva (Wunderlich i Back, 2009)

Mlečna kiselina je najvažnija hidroksikarbonska kiselina široko rasprostranjena u prirodi, sa velikom primenom u prehrambenoj, farmaceutskoj, tekstilnoj i hemijskoj industriji i industriji prerade kože (Wang i sar., 2016). Sve više raste potražnja za mlečnom kiselinom kao prekursorom za proizvodnju biorazgradivih i zdravstveno i ekološki prihvatljivih polimera koji sve više zamenjuju plastiku proizvedenu od derivata nafte (Marques i sar. 2017). Mlečna kiselina se može proizvoditi putem hemijske sinteze (iz derivata nafte) ili fermentacijom (Karamanlioglu i sar., 2017; Marques i sar., 2017;). Fermentacijom se u zavisnosti od proizvodnog mikroorganizma može dobiti optički čista L-(+)- ili D-(-)-mlečna kiselina. Glukoza (iz skroba) se najčešće koristi u industriji za dobijanje mlečne kiseline pri čemu kao proizvodni mikroorganizmi koriste bakterije mlečne kiseline (BMK). Primena čistih monosaharida kao što je glukoza, nije ekonomski isplativa, zbog čega je efikasna razgradnja (pri blagim uslovima) biomase i upotreba dobijenih šećera od ključnog značaja za ekonomski isplativu i održivu mikrobiološku proizvodnju mlečne kiseline (Wang i sar., 2016).



Slika 2. Blok šema proizvodnje piva (Pejin i sar., 2013)

Cilj istraživanja ove doktorske disertacije je ispitivanje primene pivskog tropa u proizvodnji mlečne kiseline. Prvo će biti izvršena optimizacija enzimske hidrolize pivskog tropa u cilju dobijanja što je moguće većih koncentracija redukujućih šećera neophodnih za mlečno-kiselu fermentaciju. Hidrolizat pivskog tropa će se proizvoditi pomoću komercijalnih enzima za razgradnju skroba – termostabilne α -amilaze – Termamyl SC i glukoamilaze – SAN Super 240 L i enzima za razgradnju celuloze – Celluclast 1.5 L. Parametri čiji će uticaj biti ispitan su: pH vrednost, temperatura hidrolize i količina dodatog enzima. Nakon utvrđivanja najboljih uslova i potrebne količine enzima, dobijeni postupak hidrolize će biti primenjen za proizvodnju hidrolizata koji će biti u korišćen u mlečno-kiseljoj fermentaciji. Za mlečno-kiselu fermentaciju će se koristiti tečna faza hidrolizata.

Nakon utvrđivanja najboljih uslova hidrolize pivskog tropa izvršiće se optimizacija mlečno-kisele fermentacije. Kao proizvodni mikroorganizam u mlečno-kiseljoj fermentaciji će se koristiti dva soja bakterija mlečne kiseline, *Lactobacillus fermentum* PL-1 i *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. Tokom optimizacije sastava hidrolizata ispitivaće se uticaji dodatka različitih koncentracija ekstrakta kvasca (0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 i 5,0%) uz korekciju pH vrednosti tokom fermentacije sa dodatkom kalcijum-karbonata, pri čemu će se na osnovu ostvarenih parametara fermentacije (ostvarene koncentracije, prinosa i zapreminske

produktivnosti mlečne kiseline) izabrati bolji proizvodni mikroorganizam. Ekstrakt kvasca je izvor azota, vitamina i drugih faktora rasta neophodnih za efikasan rast mikroorganizma i efikasnu mlečno-kiselu fermentaciju, dok su redukujući šećeri izvor energije i ugljenika. U daljim ispitivanjima u cilju poboljšanja efikasnosti fermentacije i povećanja parametara fermentacije izabrani soj proizvodnog mikroorganizma će se koristiti u fermentacijama sa različitim koncentracijama ekstrakta kvasca (0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 i 5,0%) i redukujućih šećera (2,7; 5,4 i 8,1%) uz korekciju pH vrednosti tokom fermentacije sa dodatkom natrijum-hidroksida. Na osnovu dobijenih rezultata izabraće se najbolja koncentracija redukujućih šećera i ekstrakta kvasca koja će se koristiti u daljim istraživanjima. Potom će se u cilju daljeg poboljšanja efikasnosti fermentacije izvršiti ispitivanja sa izabranim sojem i sastavom podloge u fermentacijama sa korekcijom koncentracije redukujućih šećera tokom mlečno-kisele fermentacije. Takođe će se ispitati i mogućnost zamene skupog ekstrakta kvasca i glukoze sa jeftinijim sirovinama, kao što su koncentrovana sladovina, pivski kvasac i džibra u podlozi za mlečno-kiselu fermentaciju. Pivski kvasac i džibra će se dodavati kao jeftini izvori azota i mineralnih materija dok će koncentrovana sladovina biti izvor redukujućih šećera, azota i mineralnih materija. Ispitaće se uticaj različitih koncentracija pivskog kvasca (0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 i 5,0%) sa optimalnom koncentracijom redukujućih šećera na mlečno-kiselu fermentaciju. Takođe ispitaće i se uticaj različitih koncentracija džibre (5; 10; 15 i 20%) i tečne džibre (5; 10; 15; 20; 30; 40 i 50%) sa optimalnom koncentracijom redukujućih šećera na mlečno-kiselu fermentaciju. Ispitaće se dodatak koncentrovane sladovine tokom fermentacije na paramere mlečno-kisele fermentacije. Takođe će se ispitati mogućnost upotrebe imobilisanih ćelija izabranog mikroorganizma u kalcijum-alginatu pri optimalnom sastavu podloge sa ciljem uspešne upotrebe proizvodnog mikroorganizma u više uzastopnih fermentacija.

2. TEORIJSKI UVOD

2.1. Dobijanje pivskog tropa

Komljenje je postupak u kome se usitnjeni slad meša sa određenom količinom vode zadate temperature (ukomljava), u cilju dobijanja sladovine željenog kvaliteta. Primenom tačno definisanih temperaturnih režima tokom komljenja se dobija komina iz koje se ceđenjem dobijaju sladovina i pivski trop. Komljenje je složen proces tokom koga se dešava niz fizičkih, hemijskih i biohemijskih promena. Svrha komljenja je što ekonomičnija proizvodnja sladovine definisanog sastava, arome i boje uz ostvarivanje najvišeg mogućeg ekstrakta za što je moguće kraće vreme (Briggs i sar., 2004).

Sladovina se najčešće karakteriše sadržajem ekstrakta ili količinom materija koje se razgrade i ekstrahuju tokom komljenja (Briggs i sar., 2004). Najveći deo ekstrakta nastaje delovanjem enzima. Aktivnost enzima zavisi od niza faktora (temperature, pH vrednosti, gustine komine i vremena zadržavanja na određenim temperaturama). Tokom komljenja istovremeno dolazi do razgradnje skroba, proteina i hemiceluloza i gumastih materija, kao i lipida i polifenola (Wunderlich i Back, 2009).

2.1.1 Razgradnja skroba

U toku komljenja, nepohodno je da se skrob razgradi do šećera i dekstrina, kako iz ekonomskih razloga, tako i zbog toga što eventualno prisutni ostaci nerazgrađenog skroba izazivaju pojavu tzv. klajsterizacije mutnoće piva (Stewart, 2013).

Razgradnja skroba se odvija u 3 faze:

1. klajsterizacija;
2. likvefakcija (otečnjavanje) i
3. saharifikacija (ošećerenje).

Tokom klajsterizacije granule skroba vezuju vodu, pri čemu prvo bubre nakon čega dolazi do pucanja granula. Skrob slada klajsterizuje na 60°C u prisustvu amilaza. Klajsterizovani skrob se najvećim delom razgrađuje delovanjem α -amilaze tokom likvefakcije (otečnjavanja). α -Amilaza razgrađuje α -(1,4)-veze amiloze i amilopektina. α -Amilaza razgrađuje duge lance amiloze i amilopektina do dekstrina manjih molekulskih masa. α -Amilaza deluje optimalno na 72–75°C i pri pH 5,6–5,8, a inaktivira se na 80°C. α -Amilaza slada je smeša izoenzima, koji imaju različite osobine i nastaju tokom sladovanja.

β -Amilaza optimalno deluje na 60–65°C i na pH 5,4–5,5, a inaktivira se na 70°C. β -Amilaza se u ječmu nalazi u rastvorljivom i nerastvorljivom obliku, s tim da se tokom sladovanja udeo rastvorljivog oblika povećava. Dekstrini se delovanjem β -amilaze razlažu do maltoze (i delom do glukoze i maltotrioze) tokom saharifikacije (Stewart, 2013).

2.1.2. Razgradnja proteina

U komini se nalaze i proteini velikih molekulskih masa i aminokiseline. Enzimi koji razgrađuju proteine su: endo- i egzo-peptidaze. Endo-peptidaze razgrađuju molekule proteina iznutra povećavajući sadržaj rastvorljivog azota. Egzo-peptidaze razgrađuju krajeve lanca

proteina i oslobađaju aminokiseline. Razgradnja proteina je brža 10–14 puta tokom komljenja nego u toku sladovanja. Najintenzivnija razgradnja proteina se dešava na 50°C, dok je sa povišenjem temperature komine razgradnja slabija. Proizvodi razgradnje proteina, srednjih i velikih molekulskih masa nastaju između 60 i 70°C. Ovi proizvodi su važni za punoću ukusa i nastajanje pene (Wunderlich i Back, 2009). Nedovoljna razgradnja proteina ima za posledicu nastajanje azota u količinama koje nisu dovoljne za uspešnu umnožavanje kvasca i efikasnu fermentaciju, usled čega mogu nastati nepoželjni sporedni proizvodi fermentacije (Kreisz, 2009).

2.1.3. Razgradnja β-glukana

Čelijski zidovi endosperma ječma se sastoje od hemiceluloza: β-glukana i male količine pentozana. Proizvodi razgradnje hemiceluloze se rastvaraju i povećavaju viskoznost komine. Najintenzivnija razgradnja je na temperaturi od 50°C. Dalja razgradnja drastično opada sa povišenjem temperature komine. Razgradnja β-glukana prestaje na temperaturama višim od 60°C. Pod uticajem sila koje se javljaju u toku komljenja, molekuli β-glukana se povezuju pomoću vodoničnih mostova, stvarajući gelove i povećavaju viskoznost komine. Povećanje viskoznosti dovodi do problema tokom filtracije. Vodonične veze β-glukana se raskidaju tokom zagrevanja i ključanja (Wunderlich i Back, 2009).

2.1.4. Razgradnja lipida i polifenola

Veći deo lipida je nerastvorljiv u vodi i ostaje u pivskom tropu. Lipaze razgrađuju manji deo lipida na glicerin i masne kiseline. Delovanjem kiseonika i enzima nastaju nezasićene masne kiseline, koje čak i pri niskim koncentracijama utiču na stabilnost arome. Smanjenje ovih procesa se vrši komljenjem na temperaturama višim od 60°C i pri pH vrednostima nižim od 5,2.

Ekstrakcija polifenola (delovanjem peroksidaze i polifenoloksidaze) iz plevice i endosperma se povećava sa produženjem komljenja i povećanjem temperature. Takođe može doći i do neželjene oksidacije. Polimerizacija polifenola smanjuje antioksidativni potencijal piva, uz smanjenje stabilnosti arome piva (Wunderlich i Back, 2009).

2.1.5. Komljenje

Ukomljavanje predstavlja postupak mešanja usipka (usitnjenog slada) sa vodom (3–4 hl vode po 100 kg slada). Odnos vode i usipka i temperatura nastale komine moraju biti odgovarajući pri čemu komina mora biti homogena, jer može doći do smanjene ekstrakcije i otežane razgradnje (Briggs i sar., 2004).

Komljenje se izvodi u uređajima koji se nazivaju komovnjaci. Samo komljenje se sastoji od zagrevanja komine u cilju postizanja temperatura optimalnih za aktivnost enzima, a potom i držanje pauza na zadatoj temperaturi. Temperature pauza su ujedno optimalne temperature delovanja odgovarajućih enzima:

- 50°C – pauza za razgradnju proteina;
- 62-65°C – pauza za nastajanje maltoze;
- 70-75°C – pauza za ošecerenje;
- 78°C – temperatura završetka komljenja.

Prema načinu povišavanja temperature, razlikuju se dve grupe postupaka komljenja:

1. infuzioni postupci;
2. dekokcioni postupci.

Infuzioni postupci – komina se, uz držanje odgovarajućih pauza, zagreva do temperature završetka komljenja i pri tome nema kuvanja pojedinih delova komine (odvaraka).

Dekokcioni postupci – temperatura se povišava tako, da se jedan deo komine (odvarak) odvaja iz komine i kuva. Vraćanjem odvarka, nakon kuvanja, u ostatak komine, povišava se temperatura celokupne mase komine do temperature naredne pauze. Zavisno od broja odvaraka, razlikuju se dekokcija sa jednim, dva, ili tri odvarka (Bamforth, 2003, Briggs i sar., 2004).

Varionica

Savremena “dvostruka” varionica sadrži:

1. komovnjak,
2. kotao za kuvanje komine,
3. bistenik ili filter za ceđenje komine i
4. kotao za kuvanje sladovine.

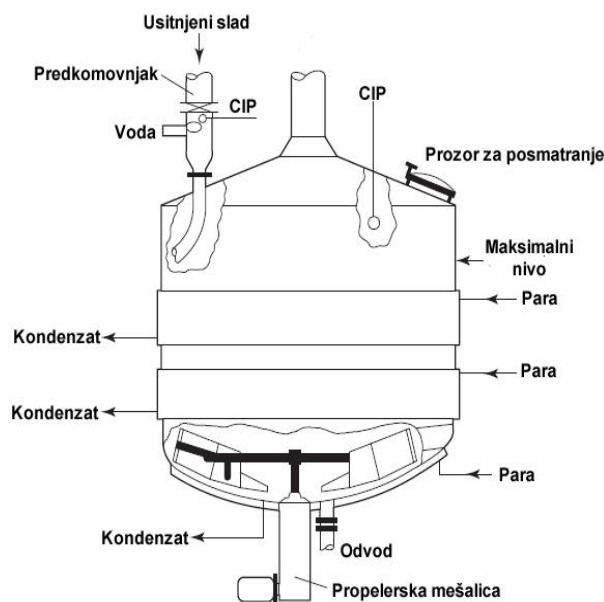
Zbog povećanja proizvodnje varionica danas sadrži i:

- “peti sud” i
- virlpul.

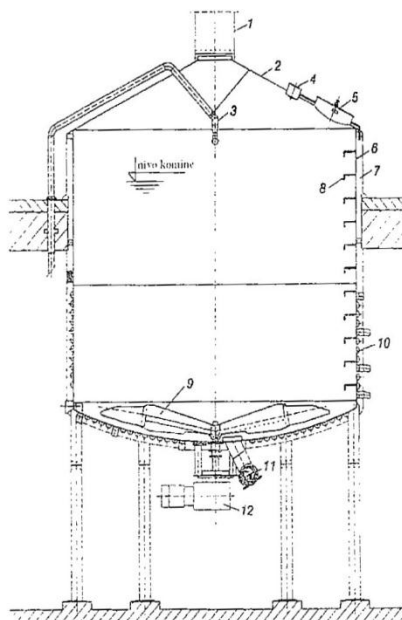
Za komljenje su potrebna jedan ili dva uređaja u zavisnosti kojim postupkom se radi. Za proizvodnju sladovine dekokcijom potrebna su dva uređaja: komovnjak i kotao za kuvanje komine. U savremenim varionicama se oba uređaja mogu zagrevati i istih su dimenzija. Ako se sladovina proizvodi postupkom infuzije, za komljenje je potreban samo jedan uređaj – kotao za kuvanje komine (Bamforth, 2006).

KOMOVNJAK – čelični ili bakarni cilindar sa ravnim ili sfernim dnom, na čijem vrhu se nalazi cev za odvod pare. Visina komovnjaka je najčešće između 2 i 2,5 m. Zagrevanje se odvija vodenom parom kroz plašt (sa 2 ili 3 zone), pri čemu se deo pare može odvoditi na vrhu komovnjaka. Pritisak pare je ograničen na 3 bara kako bi se izbeglo pregravanje komine. Na dnu komovnjaka se nalazi odvod. Kako bi mešanje bilo intenzivnije, koristi se propelerska mešalica velikog prečnika, koja je konstruisana tako da radi pri malim obrtajima. Na poklopcu komovnjaka se nalazi predkomovnjak, kroz koji se u komovnjak uvodi usitnjeni slad. U komovnjaku se takođe nalazi sistem za automatsko pranje (CIP – „cleaning in place“). Na slici 3 dat je komovnjak novije konstrukcije (Briggs i sar., 2004, Andrews, 2006).

KOTAO ZA KUVANJE KOMINE – služi za zagrevanje i kuvanje pojedinih delova komine. Najpogodniji su oni cilindričnog oblika i sa sfernim dnom (prikazan na slici 4). Grejna površina u kotlu je oblika polucevi, koje se postavljaju na dno i bočne zidove kotla. Para nadpritiska od 2 do 3 bara se uvodi u više zona kotla. U centru sfernog dna je otvor za odvođenje komine. Pri dnu kotla se na vertikalnoj osovini nalazi propelerska mešalica sa pogonom. Na vrhu sfernog poklopca je otvor za odvod pare (Kunze, 1998).



Slika 3. Komovnjak novije konstrukcije (Briggs i sar., 2004)



Slika 4. Kotao za komljenje i kuvanje komine: 1-odvod pare; 2-prihvat pare; 3-CIP-pranje; 4-osvetljenje unutrašnjosti kotla; 5-otvor za manipulaciju; 6-bočno ojačanje; 7-izolacija; 8-stepenice za ulaz u kotao; 9-mešalica; 10-cevi za zagrevanje; 11-dovod i odvod komine; 12-motor (Kunze, 1998)

Po završetku komljenja, komina se prebacuje u uređaje za ceđenje, jer se u proizvodnji piva koristi samo tečna faza (sladovina) dok se čvrsta faza (trop) uklanja iz procesa. Prebacivanje komine iz komovnjaka u uređaje za ceđenje se vrši pomoću pumpi. Cevovod je dimenzionisan tako da transport teče polako pri čemu brzina ne prelazi 1,5 m/s (Andrews, 2006).

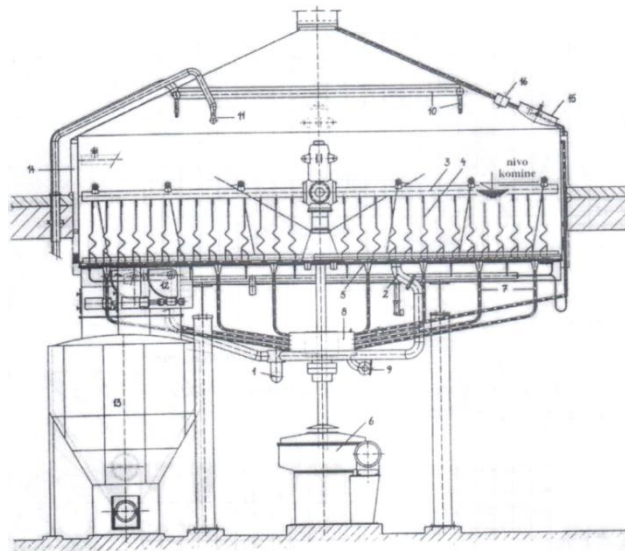
2.1.6. Ceđenje komine

Komina koja se dobija na kraju procesa komljenja predstavlja mešavinu nerastvorenih i rastvorenih sastojaka slada u vodi. Vodeni rastvor ekstrahovanih sastojaka je *sladovina*, a

nerastvorni sastojci čine trop. Postupak razdvajanja nerastvornih sastojaka od ekstrakta naziva se ceđenje. Proces ceđenja komine se danas najčešće obavlja pomoću bistrenika, filtera za kominu i membranskih filter presa (Krottenthaler i sar., 2009).

Pivski trop služi kao filtracioni sloj tokom ceđenja u bistreniku. Tokom ceđenja se prvo izdvaja prvenac (glavni naliv) nakon čega se vrši ispiranje tropa toplom vodom, nekoliko puta (naliv), do koncentracije ekstrakta u tropu od 0,5 do 1,0%. Zapremina vode kojom se vrši ispiranje tropa zavisi od propisane koncentracije sladovine koja se koristi u proizvodnji piva jer se ispiranjem tropa razblažuje prvenac. Povećanjem temperature tokom ceđenja smanjuje se viskoznost i ceđenje se ubrzava. Međutim, temperature preko 80°C inaktiviraju α -amilazu usled čega se zaostali skrob slada ne može razgraditi (Kunze, 1999, Briggi sar., 2004). Uređaji koji se najčešće koriste za ceđenje su bistrenik i filter za kominu.

BISTRENİK je stariji i najrasprostranjeniji tip uređaja za ceđenje. Bistrenik je cilindričan sud sa perforiranim dvostrukim dnom na kome se zadržava trop i kroz koji se filtrira sladovina (slika 5). Kao i svi drugi uređaji u varionici, danas se i bistrenik pravi od hrom-nikl čelika i sa izolacijom za sprečavanje hlađenja. Komina se uvodu u bistrenik od dole kako bi se rastvaranje kiseonika svelo na najmanju moguću meru. Sa donje strane bistrenika se postavljaju ventili za dovod komine koji moraju da omoguće prebacivanje komine na ceđenje za 10 minuta. Perforirano dno se pravi od hrom-nikl čelika i nalazi se na 2 cm iznad dna bistrenika čime je omogućeno postavljanje mlaznica za pranje (Leiper i Meidl, 2006).



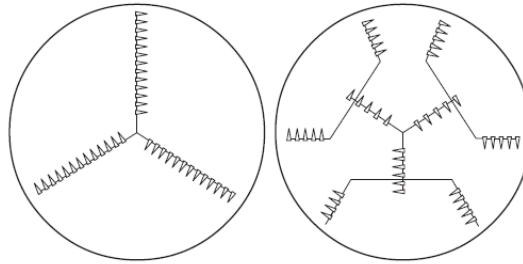
Slika 5. Bistrenik: 1. Dovod komine, 2. Ventil za uvođenje sladovine, 3. Uređaj za rastresanje tropa, 4. Noževi za rastresanje tropa, 5. Uređaj za izbacivanje tropa, 6. Pogon uređaja za rastresanje tropa, 7. Cevi za ceđenje sladovine, 8. Sabirni sud, 9. Izvod sladovine ka pumpi za sladovinu, 10. Voda za ispiranje tropa, 11. Raspršivač tečnosti u sastavu CIP pranja, 12. Otvor za pražnjenje tropa, 13. Prihvat tropa, 14. Izolacija, 15. Otvor za manipulaciju i 16. Osvetljenje (Kunze, 1998)

Na svakom m² dna bistrenika se postavlja konus za izvod sladovine (slika 6). Sve cevi za ceđenje se spajaju u centralni sud za prihvat sladovine pri čemu nema kontakta sladovine i vazduha.



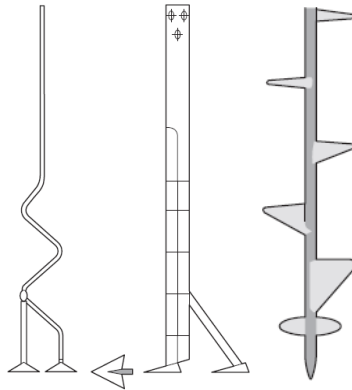
Slika 6. Konus za izvod sladovine (Briggs i sar., 2004)

Zavisno od veličine bistrenika uređaj za rastresanje tropa ima 2, 3, 4 ili 6 poluga (slika 7). Brzina obrtanja ovog uređaja može se regulisati kontinualno.



Slika 7. Uređaj za rastresanje tropa (Briggs i sar., 2004)

Osnovni elementi za rastresanje tropa su noževi posebne konstrukcije, koji su postavljeni tako da se svaki nož kreće po posebnoj putanji. Oblik noževa i njihov raspored na nosećim polugama obezbeđuje ravnomerno rastresanje tropa (slika 8). Na slici 9 data je unutrašnjost bistrenika.



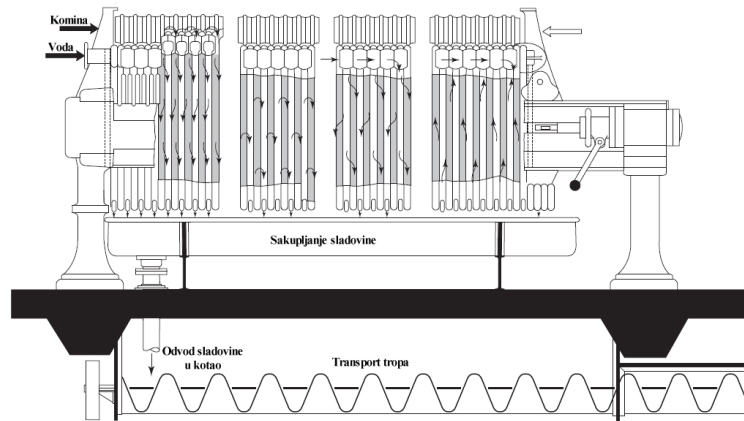
Slika 8. Oblici noževa za rastresanje tropa (Briggs i sar., 2004)



Slika 9. Unutrašnjost bistrenika

STANDARDNI TIP FILTERA ZA KOMINU je alternativa za bistrenik, ali je mnogo manje rasprostranjen. Debljina sloja tropa je samo 4–6 cm, pa se sama filtracija najviše obavlja preko filtracionih marama na kojima su otvori za prolaz tečnosti veoma mali. Na taj način se bolje može izdvojiti ekstrakt zaostao u tropu. Filter za kominu se sastoji od postolja sa nosačima ramova i ploča. Ramovi i ploče su ograničeni stacionarnom i pokretnom čeonom pločom (slika 10). Ramovi služe za prihvat tropa i kvadratnog su oblika a najčešće su dimenzija oko 1,2×1,2 m i debljine 6 cm tako da je ukupna zapremina koja je na raspolaganju za trop 0,8×1,0 hl. Broj ramova zavisno od veličine filtera, može biti između 10 i 60. Ploče

služe za odvod prvenca i vode od ispiranja tropa. Istih su dimenzija kao i ramovi i na njima se sa obe strane postavljaju filtracione marame sa međuprostorima kroz koje sladovina može da ističe. Sladovina se izvodi preko ploča, pa se na svakoj ploči nalazi slavina (Briggs i sar., 2004).

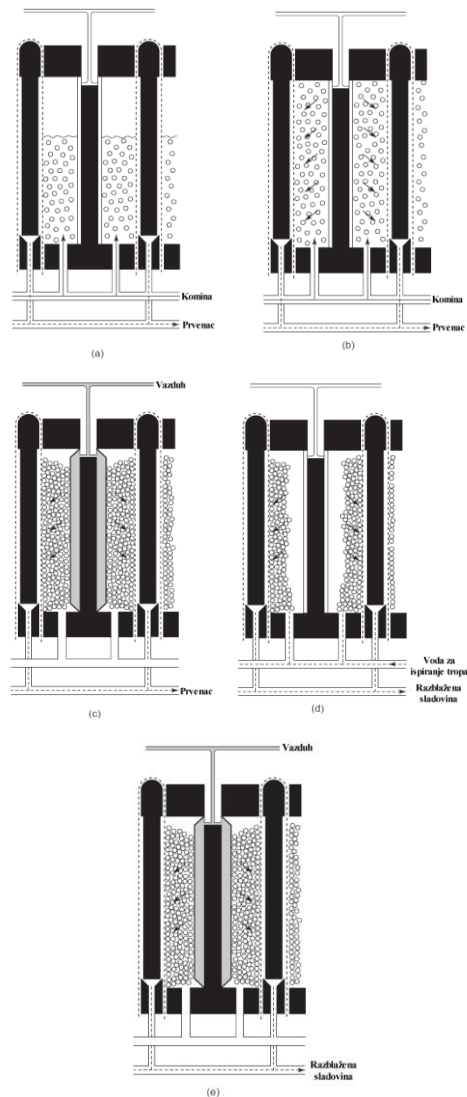


Slika 10. Filter za kominu (Briggs i sar., 2004)

FILTER ZA KOMINU 2001 (Meura, Belgija) sastoji se od naizmenično postavljenih membranskih komornih modula i rešetkastih ploča od polipropilena (sa praznim prostorom između elemenata debljine oko 4 cm) (slika 11). Sklopljen filter se sastoji od stacionarne i pokretne čeonu ploče, između kojih se nalaze pokretne ploče i moduli. Na stacionarnu čeonu ploču su ugrađeni dovod za kominu i odvod sladovine. U filter se stavlja do 60 ploča pri čemu se može filtrirati najviše 10,5 t kominne. Komorni membranski moduli imaju ugrađenu tanku ploču, koja je sa obe strane obavijena elastičnom membranom od plastične mase kojom se vrši pritisak na trop pomoću komprimovanog vazduha. U određenom trenutku se vazduh pod pritiskom potiskuje u prostor između ploča i membrana od plastične mase. Pošto su membrane elastične, istežu se i na taj način ostvaruju pritisak na trop koji se nalazi u ramovima, s obe strane ograničenim membranama. Postupak ceđenja je prikazan na slici 12. S druge strane tropa se nalaze rešetkaste ploče napravljene od polipropilena i s obe strane presvučene sa po jednom filtracionom maramom od polipropilena, kroz koju može da protiče sladovina i voda od ispiranja tropa. Na donjem delu, kroz sve module i rešetkaste ploče i s prednje i zadnje strane prolazi po jedan kanal. Jedan od ovih kanala služi za dovod kominne i kasnije za dovod vode za ispiranje tropa: on je sa obe strane povezan sa komorama membranskih modula. U kanal sa druge strane se prihvataju sladovina i razblažena sladovina od ispiranja tropa i izvode se iz filtera (Briggs i sar., 2004; Leiper i Meidl, 2006).

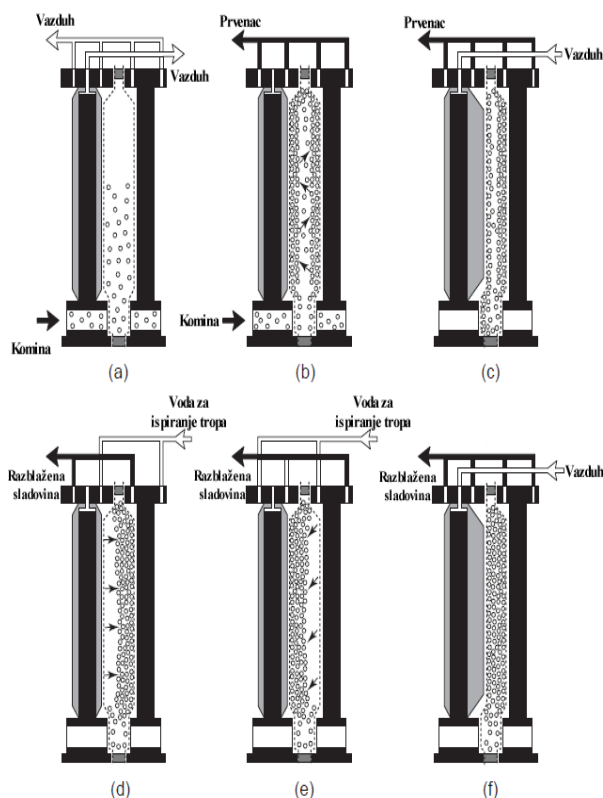


Slika 11. Filter za kominu 2001 (proizvođač Meura, Belgija)



Slika 12. Postupak cedjenja koline filterom za kolinu 2001: a) Punjenje filtera, b) filtracija, c) prvo komprimovanje, d) ispiranje tropa i e) završno komprimovanje (Briggs i sar., 2004)

MEMBRANSKA FILTER PRESA – u okviru konstrukcije je masivan nosač uz koji se proteže čitav filter i o koji su obešene sve ploče. U samom filteru su naizmenično obešene membranske i kompaktne komorne ploče (slika 13). Komorne konstrukcije su napravljane od polipropilena a membranske ploče imaju ugrađen zaštitni nosač s čije se obe strane nalaze fleksibilne polipropilenske ploče. Svaka komorna i membranska ploča je sa obe strane presvučena filtracionom maramom. Kolina puni prostor između ploča, a sladovina se cedi kroz polipropilensku maramu. Nakon punjenja filtera, prvenac može da ističe kroz gornji bočni kanal, ulaz sladovine u ovaj kanal je omogućen preko malih otvora na ploči (Huije, 2006).



Slika 13. Postupak rada membranske filter prese MK 15/20: a) dovod kominе; b) punjenje komora kominom i cedenje prvenca; c) prethodno presovanje tropa i cedenje prvenca; d) dovod vode za ispiranje tropa i odvođenje razblažene sladovine od ispiranja tropa; e) dovod vode za ispiranje tropa s druge strane u cilju boljeg ispiranja i f) cedenje tropa presovanjem (Briggs i sar., 2004)

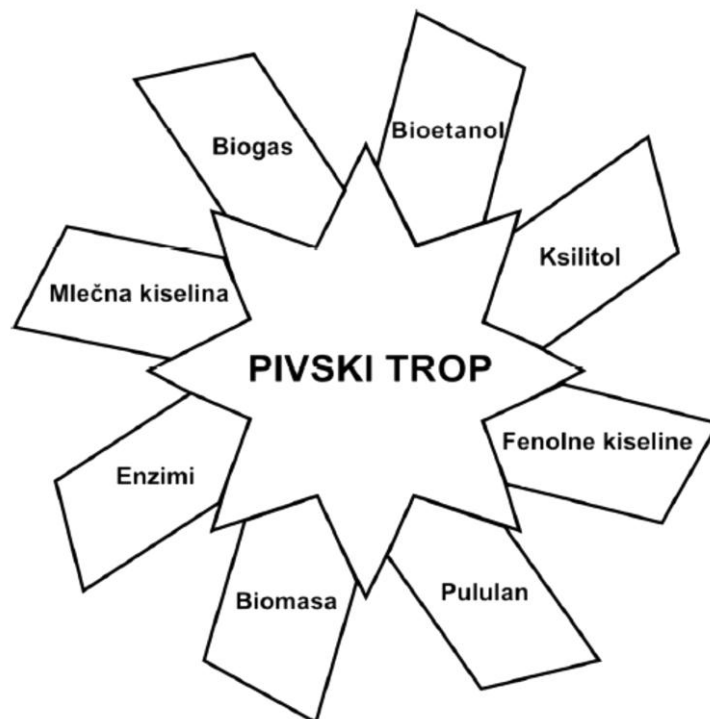
2.2. Pivski trop

Pivski trop čini oko 85% ukupnih sporednih proizvoda koji nastaju u proizvodnji piva. Na 100 l proizvedenog piva, dobija se oko 20 kg tropa. Pivski trop je lignocelulozni materijal, bogat proteinima i vlaknima koji čine 20%, odnosno 70% sastava pivskog tropa. Hemijski sastav pivskog tropa može značajno da varira u zavisnosti od sorte ječma koja se koristi za sladovanje, vremena žetve i uslova pod kojima je vršena setva, uslovi pod kojima su vođeni sladovanje i komljenje i količine i tipa nesladovanih sirovina (surogata) koji je korišćen u proizvodnji sladovine (Mussatto i sar., 2006a).

Sve više prisutna svest o zaštiti okoline i smanjenju zagađenja dovodi do razvoja novih tehnologija za iskorišćenje sporednih proizvoda. Pivski trop se danas koristi kao stočna hrana (Gallo i sar., 2001; Firkins i sar., 2002; Dhiman, 2003; Kaur i Saxena, 2004) i dodatak proizvodima namenjenim za ljudsku ishranu (Öztürk i sar., 2002; Plessas i sar., 2007). Postoji veliki broj istraživanja vezanih za primenu pivskog tropa: kao sirovine u biotehnologiji (Roukas, 1999; Brányik i sar., 2001; Leathers, 2003; Mussatto i sar., 2005, 2007a, 2007b, 2008; Carvalheiro i sar., 2007; White i sar., 2008; Xiros i sar., 2008a,b; 2009a,b; Hashemi i sar., 2011), sirovine za proizvodnju građevinskog materijala (Russ i sar., 2005), za proizvodnju uglja (Sato i sar., 2001), papira (Ishiwaki i sar., 2000) i energije (Rieker i sar., 1992; Ezeonu i Okaka, 1996; Okamoto i sar., 1999; Zanker i Kepplinger, 2002) i kao adsorbensa (Chiang i sar., 1992; Low i sar., 2000, 2001; Silva i sar., 2004a, 2004b). Trop nastaje u velikim količinama tokom cele godine, jeftin je ili besplatan i zbog visokog sadržaja proteina i ugljenih hidrata može se upotrebljavati kao sirovina u biotehnologiji. Na slici 14 dat je pregled primene tropa u biotehnologiji.

Istraživanja Agencija za zaštitu okoline pokazuju da pivare u Velikoj Britaniji proizvode

godišnje više od pola miliona tona tropa, dok u celoj Evropi količina tropa iznosi negde oko 3,5 miliona tona (Jay i sar., 2008). Kina je najveći proizvođač piva u svetu sa 51,2 milijardom litara godišnje, za njom slede Sjedinjene Američke Države (22,4 milijardi), Brazil (13,6 milijardi) i Ruska Federacija (8,9 milijardi) (FAOSTAT, 2013). U Srbiji se godišnje proizvede oko 5 miliona hl piva. Prema Republičkom zavodu za statistiku proizvodnja piva za 2015. godinu iznosila je 5.444.191 hl (Privredna Komora Srbije, 2015). Na osnovu toga se može zaključiti da se u Srbiji godišnje proizvede oko 100 000 tona pivskog tropa.



Slika 14. Mogućnost primene pivskog tropa u biotehnologiji (Pejin i sar., 2013)

Pivski trop se sastoji od slojeva omotača ječmenog zrna. Zrno ječma se sastoji iz: klice (embrio), endosperma (aleuronski sloj i skrob) i opni zrna. Opne zrna se sastoje od sedam različitih slojeva od kojih su tri najznačajnija: unutrašnja opna (semenjača) – smeštena neposredno iznad aleuronskog sloja i deluje kao polupropustljiva membrana; oplodnjača – obavija semenjaču i srasla je sa njom, a plevica obavija oplodnjaču. Plevica predstavlja spoljašnji zaštitni sloj zrna i sastoji se od lignoceluloze i malih količina polifenola i proteina (Schuster i sar., 1999).

U zavisnosti od tipa piva koje se proizvodi, trop može da sadrži ostatake klice, delimično razgrađene delove endosperma, proteine i ostatke plevice, oplodnjače i semenjače (Jay i sar., 2008). Hemijski sastav ječma, slada i pivskog tropa je dat u tabeli 1.

Tabela 1. Hemijski sastav ječma, slada i pivskog tropa (Celus, 2008)

Komponenta (% suve materije)	Ječam	Slad	Pivski trop
Proteini	10,1	10,4	24,2
Arabinoksilani	6,5	7,0	23,4
Necelulozni glukoзни polimeri	69,2	64,5	9,2
Ukupni skrob	55,2	46,5	Nije određeno
β-(1,3;1,4)-Glukan	4,2	0,1	Nije određeno
Celuloza i lignin	10,9	13,6	32,2
Lipidi	2,1	2,5	6,8
Mineralne materije	2,2	2,0	4,2

Pregled sastava pivskog tropa dat je u tabeli 2. Na osnovu podataka prikazanih u tabeli 2 može se zaključiti da sadržaj celuloze, lignina i proteina značajno varira što se može objasniti primenom različitih metoda određivanja i različitog sastava ispitivanih uzoraka tropa. Glavne komponente vlakana tropa su hemiceluloza (linearni i razgranati heteropolisaharid), lignin (trodimenzionalni polifenolni makromolekul) i celuloza (linearni homopolimer glukoze) (Santos i sar., 2003). Ugljeni hidrati tropa se sastoje od arabinoksilana, celuloze, β -glukana i skroba (Forssell i sar., 2008). Celuloza i hemiceluloza su okružene ligninom. Lignin je odgovoran za strukturnu čvrstinu lignoceluloznog materijala. Hemiceluloza okružuje vlakna celuloze i štiti ih od enzimskog delovanja (Taherzadeh i Karimi, 2008). Celuloza je homopolisaharid velike molekulske mase sastavljen od velikog broja jedinica celobioze (dve glukopiranoze povezane β -(1,4)-vezom) (Taherzadeh i Karimi, 2008; Mussatto i Teixeira, 2010).

Tabela 2. Hemijski sastav pivskog tropa prema različitim autorima

Komponenta suve materije (%)	Serena i Knudsen (2007)	Mussatto i sar. (2008a)	Dehnavi (2009)	Carvalho i sar. (2004)	Treimo i sar. (2009)
Celuloza	15	16,8	15,1	21,9	-
Hemicelulza	-	28,4	32,5	-	-
Ksilan	-	-	-	20,6	-
Arabinan	-	-	-	9,0	-
Lignin	-	27,8	13,4 \pm 1,9	-	-
Klason lignin*	13	-	-	21,7	12,6
Lignin rastvorljiv u kiselinama	-	-	-	-	9,0
Proteini	22	15,3	-	24,6	23,4
Mineralne materije	5	4,6	3,4 \pm 0,1	1,2	-
Jedinjenja koja se mogu ekstrahovati	-	5,8	12,9 \pm 0,7	-	-
Ugljeni hidrati	53	-	-	-	45,9
Sirova vlakana	-	-	-	-	-
Lipidi	-	-	-	-	-
Skrob	6	-	12,5	-	7,8

* Klason lignin – lignin nerastvorljiv u kiselinama

Hemiceluloza je linearni i razgranati heteropolisaharid sastavljen najčešće od pet različitih monosaharida L-arabinoze, D-galaktoze, D-manoze, D-glukoze i D-ksiloze, ali i drugih komponenti kao što su sirćetna, glukuronska i ferulna kiselina. Hemiceluloza tropa je sastavljena najvećim delom od ksiloze (70%) i arabinoze (30%) (Mussatto i sar., 2005; 2010). Lignin je složeni molekul sastavljen od jedinica fenilpropana povezanih u veliku trodimenzionalnu strukturu. Trifenilpropil alkoholi su monomerne jedinice lignina: *p*-kumaril alkohol, konferil alkohol i sinapil alkohol. Zbog svoje molekulske konfiguracije lignin je veoma otporan na hemijsku i enzimsku razgradnju. Najzastupljeniji monosaharidi u tropu su ksiloza, arabinoza i glukoza (Robertson i sar., 2010). Trop sadrži proteine velike biološke vrednosti (Santos i sar., 2003).

Proteini tropa su poreklom iz aleuronskog sloja slada odnosno ječma i čine ih: albumin, globulin, glutelin i prolamin. Albumin i globulin se ekstrahuju vodom i razblaženim rastvorima soli i čine 2,8 i 18,1% ukupnih proteina ječma. Prolamin ječma je hordein. Glutelinsku frakciju čine proteini koji se ne mogu ekstrahovati vodom, razblaženim

rastvorima soli i etanolom. Aminokiselinski sastav glutelina je sličan aminokiselinskom sastavu albumina i globulina (Celus, 2008).

Minerali, vitamini i aminokiseline se takođe nalaze u pivskom tropu. U tropu se u visokim koncentracijama nalaze: kalcijum (103,8 mg/kg), magnezijum (687,5 mg/kg), silicijum (242 mg/kg) i fosfor (1977 mg/kg) dok se u nižim koncentracijama nalaze i drugi minerali: bakar, kobalt, gvožđe, mangan, kalijum, selen, natrijum i sumpor (Aliyu i Bala, 2011). Od vitamina su zastupljeni (mg/kg): biotin (0,1), holin (1800), folna kiselina (0,2), niacin (44), pantotenska kiselina (8,59), riboflavin (1,5), tiamin (0,7) i piridoksin (0,7). Aminokiseline tropa obuhvataju: leucin, prolin, alanin, serin, glicin, vanilin, fenilalanin, arginin, glutaminsku i asparaginsku kiselinu u višim koncentracijama, i tirozin, izoleucin, treonin i lizin u nižim koncentracijama. Cistein, histidin, metionin, hidroksiprolin i triptofan takođe mogu biti prisutni u tropu (Mussatto i Roberto, 2006; Serena i Knudsen, 2007; Celus, 2008; Robertson i sar., 2010). Prosečan sastav aminokiselina u pivskom tropu dat je u tabeli 3.

Tabela 3. Prosečan sastav aminokiselina pivskog tropa (Celus, 2008)

Aminokiselina	Pivski trop (mol%)
Hidrofobne aminokiseline	
Glicin	7,4
Alanine	7,3
Valin	6,2
Leucin	8,0
Izoleucin	4,1
Prolin	11,4
Fenilalanin	4,6
Triptofan	0,7
Metionin	1,9
Hidrofilne aminokiseline	
Serin	5,2
Treonin	4,3
Cistein	1,1
Tirozin	2,3
Asparagin + asparaginska kiselina	7,2
Glutamin + glutaminska kiselina	18,5
Osnovne aminokiseline	
Lizin	3,8
Arginin	4,0
Histidin	1,9

2.3. Tehnike čuvanja pivskog tropa

Zbog visoke koncentracije vlage i fermentabilnih šećera, pivski trop je veoma nestabilan i pogodan je za razvoj mikroorganizama. Predloženo je nekoliko metoda, za produženje stabilnosti i vremena čuvanja pivskog tropa. Dodatkom mlečne, sirćetne, mravlje i benzojeve kiseline i kalijum-sorbata može se efikasno sačuvati kvalitet i nutritivna vrednost pivskog tropa u trajanju od 3 meseca (Al-Hadithi i sar., 1985; Kuntzel i Sonnenberg, 1997). Drugi način čuvanja pivskog tropa je sušenje. Sušenjem se osim produženja stabilnosti smanjuje i zapremina tropa, čime se smanjenju troškovi transporta i skladištenja. Proces sušenja sastoji se iz: presovanja (do postizanja sadržaja vlage manjeg od 65%) i sušenja (do postizanja

sadržaja vlage manjeg od 10%) (Santos i sar., 2003; Aliyu i Bala, 2011). Santos i saradnici (2003) su ispitivali tri postupka čuvanja kvaliteta pivskog tropa: sušenje u statičnim sušnicama, sušenje zamrzavanjem i zamrzavanje. Istraživanje je pokazalo da zamrzavanje nije zadovoljavajući postupak: zapremina tropa je velika i može doći do promena u sadržaju arabinoze. Sušenjem u statičnim sušnicama i sušenjem zamrzavanjem se smanjuje zapremina tropa pri čemu sastav ostaje nepromenjen. Sušenje zamrzavanjem je blaži način čuvanja, ali je ekonomski neprihvatljiv, zbog čega se u praksi najviše koristi sušenje u statičnim sušnicama (Santos i sar., 2003). Sušenje pivskog tropa u statičnim sušnicama mora se voditi na temperaturama nižim od 60°C, jer na višim temperaturama dolazi do formiranja neprijatnih mirisa. Pri sušenju u statičnim sušnicama postoji rizik od pregrevanja i karamelizacije tropa zbog povećanja temperature (Mussatto i sar., 2006a). Alternativni postupak sušenja koji bi mogao da uštedi energiju je sušenje u tankom sloju pomoću pregrejane vodene pare (Tang i sar., 2005). Prednosti ovog postupka sušenja u poređenju sa tradicionalnim sušenjem toplim vazduhom su: manja potrošnja energije, manja emisija štetnih gasova, poboljšanje efikasnosti sušenja, eliminacija rizika od eksplozije i požara i zaštita vrednih isparljivih organskih jedinjenja. Sušenje pregrejanom vodenom parom ima mali uticaj na promene sastava pivskog tropa (Tang i sar., 2005). Takođe se za smanjenje sadržaja vlage koriste i membranske filter prese. Tokom ovog procesa se pivski trop meša s vodom i filtrira pri pritisku 3–5 bar-a, nakon čega se ispira s toplom vodom (65°C), filtrira pomoću membranskog filtera i suši u vakuumu, u cilju snižavanja vlage na 20–30%. Ovako osušeni trop je čuvan na otvorenom 6 meseci, pri čemu nije primećena nikakva mikrobiološka aktivnost (El-Shafey i sar., 2004).

2.4. Potencijalne primene pivskog tropa u biotehnologiji

2.4.1. Pivski trop kao dodatak ili nosač za imobilizaciju kvasca u fermentaciji

Ekstrakt tropa dobijen pod visokim pritiskom, pokazao se kao dobar antipenušavac u fermentaciji piva. Dodatak ekstrakta pivskog tropa nije uticao negativno na karakteristike piva. Čestice pivskog tropa su nepravilnog oblika i nehomogenog hemijskog sastava, sadrže aktivne centre za vezivanje i imobilizaciju kvasca (Mussatto i sar., 2006a). U fermentacijama se sve više koriste imobilisane ćelije zbog niza prednosti u poređenju sa fermentacijama sa slobodnim ćelijama. Ovi sistemi su ekološki prihvatljivi i imobilisane ćelije u potpunosti zadržavaju biološke funkcije uz povećanje stabilnosti i produktivnosti. Visoke koncentracije ćelija u podlozi za fermentaciju, poboljšavaju efikasnost i produktivnost procesa. Imobilisane ćelije se lako izdvajaju iz podloge i mogu se ponovo koristiti u sledećoj fermentaciji. Ipak, izbor pogodnog nosača za imobilizaciju ćelija je od suštinske važnosti za efikasnu proizvodnju. Veliki broj neorganskih i organskih materijala se može koristiti u imobilizaciji ćelija mikroorganizama. Međutim, nosači prirodnog porekla se češće koriste, jer su obnovljivi, biorazgradivi, netoksični, jeftini i svakodnevno dostupni (Mussatto, 2014).

Pivski trop je ispitivan kao nosač za ćelije pivskog kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*) u kontinualnoj fermentaciji piva (Brányk i sar., 2001). Rezultati su pokazali da je pivski trop dobra alternativa za komercijalne nosače koji se koriste u kontinualnoj fermentaciji piva, zbog sledećih prednosti: velika mogućnost vezivanja ćelija kvasca za pivski trop (430 mg/g suve materije tropa u poređenju sa 100 mg/g suve materije za nemodifikovanu DEAE celulozu), jednostavna primena bez potrebe za hemijskom modifikacijom, regeneracija ispiranjem u

rastvoru baze, nema negativnih uticaja na proces fermentacije, nije toksičan i za njegovu primenu nisu potrebne dodatne investicije (Brányik i sar., 2001).

U daljim istraživanjima Brányik i saradnici (2002) su utvrdili da je optimalno vreme zadržavanja u fermentoru 18-25 sati (brzina razblaživanja 0,04-0,055 1/h). Pri ovim uslovima je postignuta visoka fermentabilnost od 70 do 80% i koncentracija etanola od 4,2% u mladom pivu.

Primenu imobilisanih ćelija kvasca (na pivskom tropu) i uticaj aeracije i temperature glavne fermentacije na produktivnost i senzorne osobine mladog piva su ispitivali Brányik i saradnici (2004a). Produktivnost ostvarena u kontinualnoj fermentaciji bila 5 puta veća od produktivnosti diskontinualne fermentacije. Utvrđeno je da je pri ovim uslovima fermentacije optimalna količina rastvorenog kiseonika bila 2 mg/l dok je optimalna temperatura bila 13-16°C. Brányik i saradnici (2004b) su takođe ispitivali moguće mehanizme vezivanja ćelija kvasca za čestice pivskog tropa: adhezija ćelija kvasca na pivski trop, međusobno vezivanje ćelija kvasca na tropu i adsorpcija ćelija unutar prirodnih pora na površini tropa i dokazali da se ćelije putem adhezije vezuju za pivski trop kao i da se adsorbuju unutar pora tropa.

Mogućnost upotrebe ćelija pivskog kvasca imobilisanih na pivskom tropu u kontinualnoj fermentaciji sladovine sa visokim sadržajem ekstrakta (13,4; 15,3; 16,6 i 18,5%) su ispitivali Dragone i saradnici (2007). Fermentacija je izvođena na 15°C, uz vreme zadržavanja u fermentoru od 25 sati (brzina razblaživanja od 0,04 1/h) i kontinualnom protoku CO₂ (200 ml/min) i vazduha (50 ml/min). Ostvarene su koncentracije etanola od 5,8 (13,4%) – 7,5% (18,5%) u mladom pivu, dok je fermentabilnost iznosila od 67,3% (18,5%) – 78,9% (13,4%). Pri koncentracijama ekstrakta od 13,4 i 15,3% postignut je odgovarajući odnos viših alkohola i estara tj. 2,5–3:1, dok je ovaj odnos bio nezadovoljavajući za mlada piva dobijena iz sladovine sa koncentracijama ekstrakta od 16,6 i 18,5%. Dobijeno mlado pivo je imalo visok sadržaj etil-acetata i neprihvatljivu aromu. Zaključeno je da se pivski trop može uspešno koristiti u kontinualnoj proizvodnji piva uz postizanje veće produktivnosti.

U daljim ogleđima Dragone i saradnici (2008) su ispitivali mogućnost upotrebe imobilisanih ćelija pivskog kvasca na tropu u kontinualnoj fermentaciji sladovine sa visokom koncentracijom ekstrakta (15%) na tri različite temperature fermentacije (7, 10 i 15°C). Istraživanja su vođena uz brzinu razblaživanja od 0,05 1/h i protok CO₂ od 240 ml/min i vazduha od 10 ml/min. Na 15°C ostvarene su najveće vrednosti prividne (72,2%) i prave fermentabilnosti (60,4%), zapreminske produktivnosti etanola (2,24 g/l·h⁻¹) i koncentracija etanola od 6% uz postizanje odgovarajućeg odnosa viših alkohola i estara od 2,2–2,4:1. Zaključeno je da se pivski kvasac imobilisan na tropu, na temperaturi fermentacije od 15°C, može uspešno koristiti u proizvodnji piva (Dragone i sar., 2008).

Pivski trop, iz kog je izdvojen lignin, je korišćen kao nosača za *S. cerevisiae* AXAZ-1 nakon sušenja na 30 i 35°C, u proizvodnji vina u uzastopnim fermentacijama na 5, 10 i 15°C (Tsaousi i sar., 2010). Imobilizacija ćelija kvasca na pivskom tropu (sa i bez uklanjanja lignina) može poboljšati kvalitet proizvoda, naročito na nižim temperaturama. Visoka produktivnost etanola, povećanje koncentracije estara i smanjenje koncentracije viših alkohola postignuti tokom fermentacije na nižim temperaturama ukazuju na potencijalno poboljšanje kvaliteta vina. Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da trop iz koga je uklonjen lignin pogodan materijal za imobilizaciju ćelije kvasca i da može zaštititi ćelije tokom sušenja i poboljšati njihovu fermentativnu aktivnost (Tsaousi i sar., 2011).

Kopsahelis i saradnici (2007) su ispitivali mogućnost upotrebe tropa (bez i sa dodatkom nutritijenata (soli i ekstrakta kvasca) tokom imobilizacije) i odmrznutog pivskog tropa (bez dodatka nutritijenata tokom imobilizacije) i pivskog tropa iz kog je uklonjen lignin (bez i sa dodatkom nutritijenata tokom imobilizacije), kao nosača za ćelije *S. cerevisiae* AXAZ-1 u uzastopnim alkoholnim fermentacijama (6 uzastopnih fermentacija za svaki nosač) na melasi (sa početnih 109, 156 i 187 g šećera/l) bez dodatka nutrijenata na 20 i 30°C. Prilikom upotrebe

pivskog tropa (bez dodatka nutritijenata prilikom imobilizacije) postignuti su najveći prinosi i produktivnosti etanola i najniže krajnje koncentracije šećera na sve tri početne podloge. Zaključeno je da se pivski trop može uspešno koristiti bez prethodnog hemijskog tretmana kao nosač za imobilizaciju, što znači lakše rukovanje, nižu cenu sirovine i niže troškove proizvodnog procesa (Kopsahelis i sar., 2007).

Pivski trop je takođe uspešno korišćen kao nosač i u proizvodnji polisaharida i enzima. Almeida i saradnici (2003) su ispitivali mogućnost upotrebe celulozne frakcije pivskog tropa kao nosača za *Kluyveromyces marxianus* CCT 3172 u proizvodnji pektinaze (endopoligalakturonaze) na glukozi kao izvoru ugljenika i energije u kontinualnoj fermentaciji sa konstantim mešanjem (FKM) i u birektoru sa fluidizovanim slojem uz recirkulaciju (FFS). Svi ogleđi su vođeni na temperaturi od 25°C, brzina razblaživanja za FKM je bila u opsegu od 0,05 do 0,45 1/h, uz mešanje u opsegu 80–200 o/min, a za FFS brzina razblaživanja je bila u opsegu od 0,05 do 0,4 1/h. Najveća zapreminska produktivnost pektinaze od 0,98 U/ml·h⁻¹ je ostvarena u FFS pri brzini razblaženja od 0,4 1/h, uz početnu koncentraciju glukoze od 20 g/l i koncentraciji biomase na nosaču od 0,255 g/g.

Mussatto i saradnici (2009a) su ispitivali mogućnost proizvodnje fruktooligosaharida i β-fruktofuranozidaze na saharozi (200 g/l) sa *Aspergillus japonicus* ATCC 20236 imobilisane na pivskom tropu na 28°C i 160 o/min u trajanju od 48 sati. Nakon 48 sati fermentacije ostvarena je koncentracija fruktooligosaharida i aktivnost β-fruktofuranozidaze od 129,28 g/l i 38,05 U/ml.

2.4.2. Pivski trop kao sirovina za proizvodnju bioetanola

White i saradnici (2008) su ispitivali proizvodnju bioetanola na pivskom tropu sa *Pichia stipitis* (metaboliše ksilozu) i *Kluyveromyces marxianus* (odlično metaboliše glukozu i ksilozu). Pivski trop je pre inokulacije hidrolizovan. Hidroliza pivskog tropa se sastojala iz: kiselinske hidrolize pomoću sumporne, hlorovodonične ili azotne kiseline na 121°C u autoklavu u trajanju od 15 minuta. Nakon toga hidrolizovanom tropu su dodati enzimi (celulaza, β-glukozidaza, hemicelulaza i ksilanaza) na pH 5–6 na 50°C i brzini mešanja od 130 obrtaja/minuti. Enzimska hidroliza je izvođena u toku 18 sati. Prinos bioetanola u fermentaciji izvođenoj sa *Pichia stipitis* je iznosio 8,3 g/l a za *Kluyveromyces marxianus* 5,9 g/l hidrolizata pivskog tropa.

Mezofilna plesan *Neurospora crassa* DSM 1129 je korišćena u proizvodnji bioetanol iz pivskog tropa (Xiros i sar., 2008a). Osušen pivski trop (na 65°C u trajanju od 48 sati) samleven je i pomešan sa natrijum-hidroksidom u odnosu 1:8 i termički tretiran u autoklavu na 121°C u trajanju od 30 minuta u cilju rastvaranja lignina. Nakon toga je pivski trop neutralisan dodatkom sumporne kiseline. Fermentacija je izvođena submerzno na 30°C i pH 5 uz mikroaerofilne uslove. Pri ovim uslovima je ostvaren prinos bioetanola od 74 g/kg suve materije tropa.

Xiros i Christakopoulos (2009a) su sa mezofilnom plesni *Fusarium oxysporum* proizvodili bioetanol na pivskom tropu na 30°C uz mikroaerofilne uslove. Pivski trop je prethodno hidrolizovan pomoću natrijum-hidroksida i koncentracija pivskog tropa u podlozi je iznosila 75 g/l. Ostvaren je prinos bioetanola od 110 g/kg suve materije tropa, što je odgovaralo teorijskom prinosu od 60%, zasnovanom na koncentraciji glukoze i ksiloze u pivskom tropu.

Ksiloza dobijena nakon hidrolize pivskog tropa razblaženom kiselinom je korišćena u proizvodnji bioetanola sa *Pichia stipitis*. Prinos bioetanola je bio 86,3% (Mussatto 2014).

Birkmire i saradnici (2010) su razvili metodu za proizvodnju bioetanola iz pivskog tropa. Metoda se sastoji iz sledećih faza: (1) tremičkog predtretmana pivskog tropa ili predtretmana kiselinom u cilju razgradnje hemiceluloze; (2) enzimske razgradnje predtretiranog pivskog

tropa u cilju dobijanja monosaharida; (3) fermentacije dobijenih šećera do etanola sa odgovarajućim mikroorganizmima (*Zymomonas mobilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* ili *Pichia pastoris*); (4) višestepene destilacije nastalog bioetanola; (5) i dehidratacije dobijenog bioetanola.

2.4.3. Pivski trop kao podloga za kultivaciju mikroorganizama, gljiva i proizvodnju enzima

Visok sadržaj vlage i hemijski sastav pivskog tropa čine ga idealnim za rast i metabolizam mikroorganizama. Novik i saradnici (2007) su ispitivali mogućnost primene frakcija (proteina i ugljenih hidrata) pivskog tropa kao podloge za rast probiotskih bakterija. Pored frakcija pivskog tropa podloge za rast su sadržale laktozu, askorbinsku kiselinu, ekstrakt kvasca i mineralne materije. Ostvareni su visoki prinosi biomase, vijabilnost ćelija (*Bifidobacterium adolescentis* 94 BIM i *Lactobacillus* sp.), sirćetne i mlečne kiseline (Novik i sar., 2007).

Pivski trop je takođe korišćen za kultivaciju rodova *Pleurotus*, *Agrocybe* i *Lentinous* (Mussatto i sar., 2006a). Pivski trop poseduje biološku i nutritivnu vrednost, kao podloga za *Pleurotus ostreatus* (Gregori i sar., 2008). Smatra se da podstiče rast ovih pečuraka, ne samo zbog visoke koncentracije proteina, već i zbog visoke koncentracije vlage i fizičkih osobina poput veličine čestica, specifične gustine, poroznosti i kapaciteta zadržavanja vode (Wang i sar., 2001). Wang i saradnici (2001) su ispitivali rast *Pleurotus ostreatus* na pivskom tropu koji nije prethodno pripremljen. Ispitivan je uticaj vrste tropa (u zavisnosti od vrste slada i nesladovanih sirovina), dodatka (pšenične, kukuruzne i pirinčane mekinje) i sadržaja vlage tropa na prinos rasta ove pečurke. Zaključeno je da se trop može direktno koristiti kao supstrat za rast ovih pečurki. Prinos pečurki je bio veći kada su pivskom tropu dodate mekinje žitarica (pšenice, pirinča i kukuruza).

Proteinska frakcija pivskog tropa je ispitana kao podloga za kultivaciju i izolaciju aktinomiceta roda *Streptomyces* (Szponar i sar., 2003). Istraživanja su pokazala da je proteinska frakcija pivskog tropa odlična podloga za izolovanje i ispitivanje nepoznatih sojeva, proizvodnju biološki aktivnih supstanci sa aktinomicetama i brzu proizvodnju spora.

Godinama se sporedni proizvodi poljoprivrede i prehrambene industrije, sličnog hemijskog sastava i strukture kao pivski trop, koriste kao podloga za proizvodnju komercijalnih enzima pomoću „solid-state“ fermentacije (Aikat i Bhattacharyya, 2000; Sangeethai sar., 2004). Tokom poslednjih godina su započela ispitivanja primene pivskog tropa u proizvodnji enzima. Hemijski sastav podloge i upotrebljeni soj mikroorganizma određuju tip enzima i njegovu aktivnost. Pivski trop (kao izvor ugljenika) pomešan sa vodom od namakanja kukuruza (kao izvor azota) je pogodna podloga za proizvodnju celulolitičkih enzima (karboskimetilcelulaza) sa *Streptomyces malaysiensis* (Nascimento i sar., 2009). Kompleks celulolitičkih enzima može se proizvoditi sa *Trichoderma reesei* na pivskom tropu kao podlozi, bez prethodne pripreme (Sim i Oh, 1999).

Francis i saradnici (2002, 2003) su ispitivali proizvodnju α -amilaze na pivskom tropu sa *Aspergillus oryzae* NRRL 6270. Maksimalno proizvedena količina α -amilaze (6870 jedinica/g suve materije podloges) postignuta je „solid-state“ fermentacijom na 30°C u trajanju od 96 sati na pivskom tropu, koji je imao početni sadržaj vlage od 70% i inokulisan je suspenzijom spora koncentracije 1×10^7 spora/ml. Dodavanje mono-, di- i polisaharida u pivski trop izazvalo je inhibiciju sitneze enzima. Optimizovanjem parametara „solid-state“ fermentacije (temperature, početni sadržaj vlage tropa i količina inokuluma) postignut je za 20% više prinos enzima (Francis i sar., 2003).

Pivski trop se kao podloga pokazao bolji od kukuruznih vlakana u proizvodnji α -amilaze „solid-state“ fermentacijom sa *Aspergillus oryzae* (Bogar i sar., 2002). Sa dodatkom skroba,

vode od namakanja kukuruza, sojine sačme i amonijum-nitrata i pri sadržaju vlage od 67% na 25°C, nakon 3 dana fermentacije ostvarena je najveća koncentracija α -amilaze od 4519 U/g suve materije podloge. Predloženo je da se celokupna podloga nakon „solid-state“ fermentacije može koristiti kao probiotski dodatak stočnoj hrani ili za proizvodnju bioetanola iz skrobnih sirovina.

Patel i saradnici (2005) su koristili pivski trop (sa dodatkom kalijum-dihidrogenfosfata, amonijum-nitrata, natrijum-hlorida i magnezijum-sulfata) za proizvodnju α -amilaze u „solid-state“ fermentaciji sa *Aspergillus oryzae* i ostvarili su najvišu aktivnost α -amilaze od 11296 U/g suve materije tropa nakon 48 sati fermentacije.

Pivski trop je ispitivan kao dodatak podlozi za submerznu fermentaciju u proizvodnji α -amilaze sa *Bacillus* sp. KR-8104 (Hashemi i sar., 2011). U istraživanjima su u podlogu koja je sadržala dekstrin, ekstrakt kvasca i mesni ekstrakt dodati rastvorljivi ekstrakt pivskog tropa, nerastvorljivi ekstrakt pivskog tropa kao i kompletan pivski trop. Najveći prinos α -amilaze (15985 U/l) ostvaren je dodatkom kompletnog pivskog tropa (5 puta veći prinos α -amilaze u poređenju sa podlogom bez dodatka pivskog tropa).

Ispitan je uticaj dodatka nutritijenata u pivski trop za proizvodnju α -amilaze „solid-state“ fermentacijom sa *Aspergillus oryzae* As 3951. Ostvareno je povećanje prinosa α -amilaze od 17,5% (6186 U/g suve materije tropa) uz dodatak vode od namakanja kukuruza, kalcijum-hlorida i magnezijum-sulfata nakon 96 sati na 30°C (Xu i sar., 2008).

Adeniran i saradnici (2010) su primenom „solid-state“ fermentacije na pivskom tropu proizveli α -amilazu i amiloglukozidazu sa izolatom plesni iz pivskog tropa: *Helminthosporium oxysporium*, *Penicillium frequestans*, *Aspergillus fumigatus* i *Aspergillus niger*.

Pivski trop je ispitivan za proizvodnju kompleksa enzima za razgradnju arabinoksilana (feruloil esteraze, ksilanaze i α -L-arabinofuranozidaze) sa plesni *Penicillium brasilianum* „solid-state“ fermentacijom (Panagiotou i sar., 2006). U radu je optimizovan početni sadržaj vlage, pH vrednost, temperatura i sadržaj izvora azota da bi se postigla maksimalna proizvodnja navedenih enzima. Optimalni uslovi za rast su bili: sadržaj vlage 80%, pH 6, temperatura 26,5°C i dodatak 5 g/l izvora azota. Maksimalna količina feruloil esteraze dobijena je nakon 196 sati, dok se maksimalne količine ksilanaze i α -L-arabinofuranozidaze dobijene nakon 108 odnosno 96 sati.

Sastav podloge, kao i pH vrednost i temperatura su se pokazali kao važni parametri tokom proizvodnje navedenih enzima. Osim proizvodnog mikroorganizma i količine inokuluma i izvora ugljenika, parametri koji najviše utiču na proizvodnju celulolitičkih i hemicelulolitičkih enzima na pivskom tropu su sadržaj vlage (u „solid-state“ fermentaciji), pH vrednost, izvor azota i temperatura. Organski izvori azota kao što je voda od namakanja kukuruza su u većini slučajeva imali pozitivan efekat na proizvodnju enzima, dok optimalan sadržaj vlage varira u zavisnosti od proizvodnog mikroorganizma ili veličine čestica pivskog tropa u „solid-state“ fermentaciji (Panagiotou i sar., 2006; Xiros i sar., 2008a, 2009a).

Pivski trop je upotrebljen i kao izvor ugljenika za proizvodnju enzima feruloil esteraze i ksilanaze sa *Talaromyces stipitatus* i *Humicola grisea* var. *thermoidea*. Maksimalna aktivnost ksilanaze je ostvarena nakon 8 dana kada je kao proizvodni mikroorganizam korišćen *Humicola grisea* var. *Thermoidea* (16,9 U/ml) odnosno 9 dana kada je korišćen *Talaromyces stipitatus* (2,33 U/ml). Primenom *Humicola grisea* var. *thermoidea* za proizvodnju feruloil esteraze maksimalna aktivnost ostvarena je nakon 8 dana fermentacije (0,47 U/ml) (Mandalari i sar., 2008). Sposobnost da proizvede ove enzime na pivskom tropu pokazao je i *Streptomyces avermitilis* CECT 3339 (Bartolomé i sar., 2003). Szwajgier i saradnici (2011) su proizveli enzim feruloil esterazu (2,64 U/ml) na pivskom tropu sa *Lactobacillus acidophilus* K1 nakon 51 sata fermentacije.

Terrasan i saradnici (2010) su ispitivali mogućnost upotrebe pivskog tropa u submerznoj

fermentaciji sa mezofilnim sojem *Penicillium janczewskii* u proizvodnji ksilanaze, β -ksilozidaze i α -L-arabinofuranozidaze. Pri dodatku pivskog tropa u koncentraciji od 2% (m/v), na pH 6 i na 25°C ostvareni su aktivnost ksilanaze od 15,19 U/ml, aktivnost β -ksilozidaze od 0,16 U/ml i aktivnost α -L-arabinofuranozidaze od 0,67 U/ml.

Celulozna frakcija pivskog tropa je sa uspehom korišćena i za imobilizaciju *Kluyveromyces marxianus* CCT 3172 u kontinualnoj proizvodnji endopoligalkturone (Almeida i sar., 2003; 2005). Pivski trop je korišćen kao nosač za ćelije *Kluyveromyces marxianus* CCT 3172 a trop je pripremljen pod uslovima koje su opisali Brányik i saradnici (2001; 2002).

Pivski trop je korišćen kao izvor ugljenika za proizvodnju lignoceluloznih enzima (ksilanaza i endoglukanaze) sa *Fusarium oxysporum*. Ispitivane su različite koncentracije tropa (1–6% m/v) na aktivnost lignoceluloznih enzima. Rezultati submerzne fermentacije su pokazali da se najveća aktivnost ovih enzima dobija pri koncentraciji tropa od 4% m/v (Xiros i sar., 2009b).

Sandhya i saradnici (2005) su ispitivali mogućnost proizvodnje neutralne proteaze sa *Aspergillus oryzae* (NRRL 1808) u „solid-state“ i submerznoj fermentaciji na pivskom tropu. U submerznoj fermentaciji proizvodnja proteaze je bila značajna (4,8 U/g suve materije tropa) dok se „solid-state“ fermentacija pokazala kao manje efikasna.

2.4.4. Pivski trop kao sirovina za proizvodnju ksilitola

Ksilitol je veštački zaslađivač koji se može proizvesti biotehnološkim putem i ima ekonomsku prednost (zbog manjeg utroška energije) u odnosu na hemijski proces proizvodnje.

Duarte i saradnici (2004) su ispitivali proizvodnju ksilitola na hidrolizatu pivskog tropa. Pivski trop je pomešan sa vodom u odnosu 1:8 (m/m) i prvo tretiran u autoklavu na 100°C u trajanju od 1 sata (u cilju odvajanja skroba) a zatim na 190°C u trajanju od 2,5 min u cilju dobijanja rastvora oligosaharida. Nakon hlađenja rastvor oligosaharida je odvojena filtracijom i hidrolizovan enzimski (pH 5,5, na 35°C, 150 o/min, 96 sati) ili kiselinski (na 121°C u 15 ili 60 minuta, dodatkom sumporne kiseline). Primenom kiselinske hidrolize (na 121°C, 15 minuta, 2% m/m sumporna kiselina) ostvaren je viši prinos pentozna. Dobijeni hidrolizat je primenjen za fermentaciju sa *Debaryomyces hansenii* CCMI 941 za proizvodnju ksilitola i arabitola. Dodatkom aminokiselina u podlogu za fermentaciju ostvaren je najbolji prinos ksilitola od 0,29 g/g tropa.

Carvalho i saradnici (2006) su pivski trop hidrolizovali (kisela hidroliza) kako su opisali Duarte i saradnici (2004). Ispitivan je uticaj dodatka nutritijenata u hidrolizat pivskog tropa (vitamina, minerala, azota, fosfora i magnezijuma, peptona, ekstrakt kvasca, ekstrakt slada, vode od namakanja kukuruza) na prinos ksilitola fermentacijom sa *Debaryomyces hansenii* CCMI 941. Najveći prinos ksilitola od 0,55 g/g dobijen je dodatkom ekstrakta kvasca (ostarena produktivnost je bila 0,36 g/l·h⁻¹). U daljim istraživanjima Carvalho i saradnici (2007) su ispitivali uticaj dodatka ekstrakta kvasca (3,0; 4,5 i 6,0 g/l), aminokiselina, vode od namakanja kukuruza, smeše vitamina i minerala ili smeše ekstrakta kvasca (3 g/l) i vode od namakanja kukuruza (5 g/l) u hidrolizat pivskog tropa na prinos ksilitola dobijenog fermentacijom sa *Debaryomyces hansenii* CCMI 941. Najveći prinos ksilitola od 0,58 g/g ostvaren je kombinovanjem ekstrakta kvasca i vode od namakanja kukuruza.

Proizvodnju ksilitola iz pivskog tropa sa *Candida guilliermondii* su ispitivali Mussatto i Roberto (2005). Ispitivani su uslovi kiselinske hidrolize tj. odnos kiseline i tropa (8–12 g/g), vreme trajanja hidrolize (17–37 minuta) kao i koncentracija sumporne kiseline (100–140 mg/g suve materije tropa). Pri optimalnim uslovima kiselinske hidrolize (odnos tropa i kiseline 8

g/g, 100 mg H₂SO₄/g suve materije tropa i trajanje hidrolize od 17 minuta) ostvaren je prinos ksilitola od 0,70 g/g i produktivnost od 0,45 g/l·h⁻¹.

Mussatto i Roberto (2008) su ispitivale uticaj različitih početnih koncentracija ksiloze (55, 75 i 95 g/l) u hidrolizatu pivskog tropa sa i bez dodatka nutritijenata (diamonijum-sulfata, kalcijum-hlorida dihidrata i ekstrakta pšeničnih mekinja) u proizvodnji ksilitola sa *C. guilliermondi* pri pH 6,5 i 200 o/min na 30°C. Najveći prinos ksilitola i zapreminska produktivnost od 0,78 g/g i 0,58 g/l·h⁻¹ su ostvareni u hidrolizatu sa početnom koncentracijom ksiloze od 70 g/l bez dodatka soli i ekstrakta.

2.4.5. Pivski trop kao sirovina za proizvodnju pululana

Pululan je homopolisaharid glukoze. Pululan i njegovi derivati se koriste u prehrambenoj, farmaceutskoj i elektro industriji (Roukas, 1999; Leathers, 2003). Roukas (1999) je ispitivao uticaj dodatka nutritijenata i početne vrednosti pH na sintezu pululana sa *Auerbasidium pullulans*. Pivski trop je bio obogaćen sa dikalijumhidrogenfosfatom, *L*-glutaminskom kiselinom, ili rastvorom maslinovog ulja i Tween 80. Pored toga pivski trop je bio obogaćen i smešom svih ovih nutritijenata. Najveći prinos pululana (11 g/l tj. 48,2%) je postignut dodatkom smeše navedenih nutritijenata. Uticaj početne pH vrednosti je ispitivan podešavanjem na 4,5; 5,5; 6,5; 7,5 ili 8,5. Najbolji rezultati prinosa pululana su ostvareni na pH vrednostima 6,5 i 7,5 (11,0 g/l tj. 48,2%). Iskorišćenje šećera kod dodatka smeše nutritijenata i primenom optimalne pH vrednosti je bilo 99%.

2.4.6. Pivski trop kao sirovina za proizvodnju fenolnih kiselina

Od fenolnih kiselina u ječmu i sladu se u najvećim količinama nalaze ferulna i *p*-kumarinska (Briggs i sar., 2004; Pejin i sar., 2009). Fenolne kiseline se uglavnom nalaze u spoljašnjem omotaču zrna ječma koji sadrži 77,7–82,3% i 79,2–86,8% od ukupnih količina ferulne i *p*-kumarinske kiseline u zrnu ječma (Hernanz i sar., 2001). Vanbeneden i saradnici (2007) su ispitivali sadržaje ferulne i *p*-kumarinske u devet sorti slada poreklom iz dve sladare i u proizvedenim sladovinama. Dobijeni rezultati su pokazali da je samo mali deo ispitivanih kiselina ekstrahovan sladovinu tokom komljenja (udeo *p*-kumarinske kiseline u sladovinama iznosio je 2,3–5,3%, a ferulne kiseline 7,1–12,5%), a najveći deo je zaostao u tropu, što je u svojim eksperimentima pokazala i Pejin (2009). Ferulna kiselina se smatra jednom od najvažnijih fenolnih kiselina zbog toga što ima fiziološke funkcije kao što su antioksidativna, antimikrobna i antiinflamatorna aktivnost (Mussatto i sar., 2007a). Prosečna koncentracija ferulne kiseline nakon alkalne ekstrakcije je oko 2mg/g suve materije pivskog tropa (Hernanz i sar., 2001). *p*-Kumarinska kiselina takođe poseduje značajnu antioksidativnu aktivnost. Bartolomé i saradnici (2002) su u pivskom tropu nakon alkalne hidrolize i ekstrakcije sa etil-acetatom, u ekstraktu odredili ferulnu (0,17–0,24% suve materije) i *p*-kumarinsku kiselinu (0,068–0,121% suve materije).

Bartolomé i saradnici (2003) su uspeli da izdvoje 43% od ukupne ferulne kiseline (koja se može izdvojiti alkalnom ekstrakcijom) pomoću enzimskog kompleksa feruloil esteraze i ksilanaze dobijenog iz soja *Streptomyces avermitilis* CECT 3339 koji je rastao na pivskom tropu (sa 0,6% m/v ekstrakta kvasca). Iako su korišćene jednake količine feruloil esteraza u svim ispitivanjima, razlika u prinosu oslobođene ferulne kiseline zavisila je od aktivnosti ksilanaze kao i izvora ugljenika i sinteze esteraze specifične za dati izvor ugljenika (Bartolomé i sar., 2003).

Ispitana je primena sirovog enzimskog ekstrakta iz *Fusarium oxysporum* za razgradnju

pivskog tropa u cilju dobijanja ferulne kiseline (Xiros i sar., 2009b). Dobijen je skoro 2,5 puta veća koncentracija ferulne kiseline (1 mg/g suve materije pivskog tropa) u poređenju sa primenom kombinacije feruloil esteraze (FoFaeC-12213) i ksilanaze (*Trichoderma longibrachiatum* M3) (0,37 mg/g suve materije pivskog tropa).

Mussatto i saradnici (2007a) su ispitivali različite uslove alkalne hidrolize pivskog tropa: različite koncentracije natrijum-hidroksida (1,0; 1,5 i 2,0% m/v), temperature (80, 100 i 120°C) i trajanje hidrolize (30, 60 i 90 minuta). U ovim eksperimentima je odnos pivskog tropa i vode bio 1:20 m/m. Pivski trop je prethodno bio podvrgnut hidrolizi putem kiseline po postupku koji su opisali Mussatto i Roberto (2005). Najbolji uslovi alkalne hidrolize pivskog tropa u cilju dobijanja ferulne i *p*-kumarinske kiseline su bili 2% NaOH na 120°C u trajanju od 90 minuta. Pod ovim uslovima hidrolize dobijeno je u hidrolizatu 145,3 mg/l ferulne kiseline i 138,8 mg/l *p*-kumarinske kiseline.

Pivski trop je korišćen za ispitivanje aktivnost feruloil esteraze termofilne plesni *Humicola insolens* (Faulds i sar., 2004). Delovanjem ovog enzima (1 U/g pivskog tropa) na pivski trop nakon 24 sata inkubacije na 37°C uz mešanje utvrđene su koncentracije ferulne i *p*-kumarinske kiseline od 2,55 i 1,40 µg/mg tropa.

Ispitana je primena mikrotalasa u ekstrakciji polifenolnih jedinjenja iz pivskog tropa. Utvrđeni su optimalni uslovi za ekstrakciju: vreme ekstrakcije 15 minuta, temperatura ekstrakcije 100°C, odnos natrijuma-hidroksida i suvog pivskog tropa 20:1 i maksimalna brzina mešanja, kojom je ostvaren prinos ferulne kiseline 1,31% (m/m). Ostvareni prinos ferulne kiseline je bio 5 puta veći od prinosa dobijenog konvencionalnim postupkom alkalne ekstrakcije (Moreira i sar., 2012).

Fenolna jedinjenja se mogu dobiti iz pivskog tropa ekstrakcijom upotrebom različitih rastvarača. Ovi rastvarači su: metanol, etanol, aceton, heksan, etil-acetat, voda i smeša metanola i vode, etanola i vode i acetona i vode. Pored ovoga, smeše acetona i vode, naročito 60% (v/v) aceton, se mogu efikasno koristiti za ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz pivskog tropa. Antioksidativna fenolna jedinjenja ekstrahovana iz pivskog tropa se mogu koristiti kao prirodna i jeftina zamena za sintetske antioksidante (Meneses i sar., 2013).

2.4.7. Pivski trop kao sirovina za proizvodnju biogasa

Pivski trop se može koristiti za proizvodnju biogasa. Biogas je mešavina 60–70% metana, ugljen-dioksida, vodonika, azota i ugljen-monoksida (Ezeonu i sar., 1996; Okamoto i sar., 1999). Proizvodnja biogase obuhvata dve faze: hidrolizu tropa i metanogenezu. Hidroliza vlakana tropa je ograničavajući korak za kompletnu razgradnju tropa. Međutim, postoji nekoliko mogućih predtretmana u cilju povećanja brzine fermentacije. Jedna od mogućnosti je hemijsko-termički (na 70°C) predtretman fino samlevenog tropa. Druga mogućnost je enzimski tretman celulazama (Rieker i sar., 1992).

U fazi metanogeneze, mikroorganizmi u prvom koraku razgrađuju makromolekule ugljenih hidrata, proteina i lipida do masnih kiselina, acetata, butirata i propionata, od kojih tokom dalje metanogeneze, bakterije proizvode metan (Ezeonu i sar., 1996). Hidroliza lignoceluloze i konverzija u biogas se vrši sa združenom kulturom mikroorganizama. Prednost u upotrebi združene kulture je u tome što se skoro svi proizvodi, kao što su pentoze, heksoze, isparljiva jedinjenja kao i neki inhibitori, furfural i rastvorljiva jedinjenja lignina mogu razgraditi do metana nakon perioda adaptacije mikroorganizama (Xiros i sar., 2012).

Optimizovana je hidroliza tropa u cilju unapređenja isplativosti proizvodnje biogasa. Alkalnom hidrolizom tropa i anaerobnom fermentacijom dobijenog hidrolizata ostvarena je konverzija 86% organske materije tropa za 8 dana (Mussatto i sar., 2006a). Ezeonu i Okaka (1996) su ispitivali kinetiku procesa i efikasnost dobijanja biogasa anaerobnom

diskontinualnom fermentacijom pivskog tropa. Ostvarena je razgradnja celuloze i lignina od 60 i 40%, uz prinos od 3476 cm³/100g tropa nakon 15 dana fermentacije. Ostatak nakon fermentacije može se koristiti kao đubrivo zbog visokog sadržaja azota (Carvalho i sar., 2006). Teorijski prinos metana po toni pivskog tropa se procenjuje na 98 Nm³ metana (Sežun i sar., 2010). Bochmann i saradnici (2007) su primenili dvostepenu anaerobnu fermentaciju na pivskom tropu. Na osnovu koncentracije organskih kiselina u fermentoru, proizvedenog biogasa i njegovog kvaliteta zaključeno je da je pivski trop veoma pogodan za enzimsku hidrolizu i kao izvor ugljenika za anaerobnu fermentaciju. Ochs i Kastner (2010) su koristili pivski trop u postupku kombinovane proizvodnje vodonika i metana i zaključili da se dvostepenom fermentacijom dobija manje biogasa ali veća koncentracija metana u biogasu. Ukupni prinos biogasa je iznosio 204,7–210,6 l biogasa/kg organskih kiselina.

Biogas se može koristiti i u pivari kao izvor toplote. Međutim, Acacio i saradnici (2011) su utvrdili da je proizvodnja biogasa iz pivskog tropa isplativa samo u pivarama koje proizvode više od 20 miliona litara piva godišnje.

2.4.8. Pivski trop kao sirovina za proizvodnju mlečne kiseline

Mlečna kiselina (2-hidroksipropionska kiselina) ima široku primenu u farmaceutskoj, hemijskoj, prehrambenoj, tekstilnoj i kožarskoj industriji (Djukić-Vuković i sar., 2011).

Mussato i saradnici (2007) su ispitivali mogućnostna proizvodnje mlečne kiseline na pivskom tropa sa *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20. pH hidrolizata pivskog tropa je podešena na 6 dodatkom natrijum-hidroksida i hidrolizat je sterilisan na 112°C u trajanju od 15 minuta. Koncentracija glukoze u hidrolizatu pivskog tropa je podešena na 50 g/l. Najveći prinos mlečne kiseline iznosio je 0,73 g/g, dok prisustvo sporednih proizvoda (uključujući etanol, sirćetnu i mravlju kiselinu) nije utvrđeno.

Mussatto i saradnici (2008a) su u daljim istraživanjima ispitivali proizvodnju mlečne kiseline iz: 1) hidrolizata pivskog tropa, 2) hidrolizata pivskog tropa s dodatkom ekstrakta kvasca, 3) hidrolizata pivskog tropa s dodatkom komponente MRS (de Man Rogosa Sharpe) bujona osim izvora ugljenika i 4) MRS bujona u kojem je koncentracija glukoze bila približno ista kao i u hidrolizatu pivskog tropa (50 g/l). Frakcija celuloze dobijena hemijskim predtretmanom pivskog tropa je razgrađena komercijalnim preparatom celulaze pri čemu je dobijen hidrolizat sadržao 50 g/l glukoze. Mlečna kiselina je proizvedena iz dobijenog hidrolizata sa *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20. Dodatak ekstrakta kvasca u koncentraciji od 5 g/l je povećao zapreminsku produktivnost mlečne kiseline za 18% (0,53 g/l·h⁻¹). Kao kontrolni eksperiment izvođena je mlečno-kisela fermentacija MRS bujona, s istom početnom koncentracijom glukoze, kao u hidrolizatu pivskog tropa. Dodatkom komponenti MRS bujona (izuzev izvora ugljenika) u hidrolizat pivskog tropa ostvarena je najveća zapreminska produktivnost 0,79 g/l·h⁻¹. U svim slučajevima, prinos mlečne kiseline je iznosio 0,7 g/g utrošene glukoze, ali se fermentacija zaustavila nakon 24 sata usled pada pH vrednosti sa 6,0 na 4,2 što je prouzrokovalo velike količine zaostale glukoze: 38–41 g/l.

Takođe, ispitivan je uticaj korekcije pH vrednosti hidrolizata tropa i MRS bujona tokom fermentacije. Fermentacioni proces koji se odvijao na korigovanoj pH vrednosti (6,0) dao je bolje rezultate u poređenju sa fermentacijama u kojima nije korigovana pH vrednost. Najbolji rezultat, gde je koncentracija mlečne kiseline iznosila 35,54 g/l, je postignut fermentacijom hidrolizovanog tropa obogaćenog komponentama MRS bujona. Zapreminska produktivnost na kraju fermentacije je iznosila 0,59 g/l·h⁻¹, sa maksimumom od 0,82 g/l·h⁻¹ tokom prvih 12 sati fermentacije (Mussatto i sar., 2008a). Do proizvodnje mlečne kiseline došlo je i pri korišćenju hidrolizata bez dodatka, što ukazuje na činjenicu da su neki neophodni nutritijenti za BMK prisutni u hidrolizatu pivskog tropa.

Što je u podlogu dodato više nutritijenata, postignut je viši prinos mlečne kiseline. Usvajanje glukoze i prinos mlečne kiseline su bili bolji tokom fermentacije hidrolizata pivskog tropa s dodatkom komponenata MRS bujona, u odnosu na rezultate dobijene kada je izvođena fermentacija MRS bujona.

Ovo ukazuje na to da hidrolizat pivskog tropa poseduje neke, do sada neidentifikovane komponente u svom sastavu, koje deluju sinergistički sa komponentama MRS bujona i podstiču proizvodnju mlečne kiseline. Drugo objašnjenje za visok prinos mlečne kiseline dobijene iz hidrolizata pivskog tropa u odnosu na MRS bujon, je potencijalni puferski kapacitet hidrolizata (koji direktno utiče na fermentaciju), budući da je hidrolizat dobijen enzimskom razgradnjom pivskog tropa uz dodatak natrijum-citratnog pufera (pH 4,8), koji nije prisutan u sastavu MRS bujona (Mussatto i sar., 2008a).

2.5. Mogućnosti pripreme pivskog tropa za primenu u biotehnologiji

Predtretman sirovina je važan korak u biotehnologiji. Primenom predtretmana se menja struktura lignoceluloznih materijala i time se postiže razgradnja celuloze i ona postaje više dostupna enzimima. Tokom predtretmana lignoceluloznih materijala nastaju jedinjenja koja mogu delovati inhibitory na enzime i rast ćelija mikroorganizama. Takođe predtretman je jedan od najskupljih koraka u proizvodnji u kojoj se lignocelulozni materijali koriste kao sirovine. Svaki predtretman ima svoje prednosti i mane. Zbog toga je važan izbor predtretmana koji odgovara određenoj sirovini. Osim toga optimalni parametri različitih predtretmana (temperatura, trajanje procesa i pritisak) su specifični za svaku sirovinu i zbog toga je važna optimizacija predtretmana za svaku pojedinačnu sirovinu (Dehnavi, 2009).

2.5.1 Mehanički predtretman

Predtretman pivskog tropa se zasniva na mehaničkom usitnjavanju tropa nakon čega sledi hidroliza celuloze. Mehanička obrada lignoceluloznih materijala uključuje usitnjavanje, drobljenje i mlevenje. Veličina čestica tropa nakon usitnjavanja je obično 10–30 mm dok je nakon mlevenja i drobljenja 0,2-2 mm (Macheiner i sar., 2003).

Predtretmani pivskog tropa koji uključuju visoke temperature i visok sadržaj vlage su se pokazali kao najefikasniji u razgradnju pivskog tropa. Upotreba mikrotalasa za predtretman pivskog tropa je novija metoda. Macheiner i saradnici (2003) su ispitivali uticaj predtretmana sa mikrotalasa sa i bez dodatka hlorovodonične kiseline, natrijum-hidroksida i sirćetne kiseline u različitim koncentracijama u trajanju od 10 do 60 minuta na 160°C i 200°C, na razgradnju suspenzije pivskog tropa (5% m/v). Skoro 35% pivskog tropa, predtretiranog upotrebom mikrotalasa (160°C u trajanju od 10 minuta) sa dodatkom hlorovodonične kiseline, je moguće razgraditi na redukujuće šećere, dok se upotrebom natrijum-hidroksida može razgraditi 49% polisaharida na oligomerne proizvode. Dodatak sirćetne kiseline (160°C u trajanju od 10 minuta) u pivski trop predtretiran upotrebom mikrotalasa dobijen je hidrolizat sa 17,4% rastvornih ugljenih hidrata, dok je produženje tretmana povećalo sadržaj rastvornih ugljenih hidrata. Na 200°C količina ukupnih rastvornih šećera je smanjena za 25,8% usled nastajanja inhibitora (Macheiner i sar. 2003).

2.5.2. Enzimaska hidroliza

Enzimaska hidroliza se koristi najčešće za razgradnju celuloze. Mussatto i saradnici (2008b) su ispitivali uticaj različitih brzina mešanja (100, 150 i 200 o/min), koncentracija suspenzije pivskog tropa (2, 5 i 8% m/v) i količina dodatog enzima Celluclast 1.5 L (5, 25 i 45 FPU („Filter paper unit“)/g) na hidrolizu celuloze pivskog tropa. Hidroliza hemiceluloze je vođena po postupku koji su opisali Mussatto i Roberto (2005), dok je hidroliza lignina vođena po postupku koji su opisali Mussatto i saradnici (2006b). Enzimaska hidroliza je vođena sa različitim koncentracijama enzima na 45°C u trajanju od 96 sati pri različitim brzinama mešanja. Iz dobijenih rezultata definisani su optimalni uslovi za hidrolizu celuloze: brzina mešanja od 100 o/min, količina enzima od 45 FPU/g celuloze i koncentracija celuloze 2% m/v. Pri optimalnim uslovima ostvareni su prinos glukoze i razgradnja celuloze od 93,1 i 99,4% (Mussatto i sar., 2008b). Takođe, potpuno uklanjanje hemiceluloze i lignina nije bilo potrebno za postizanje maksimalne razgradnje celuloze tokom enzimske hidrolize (Mussatto i sar., 2008c).

Treimo i saradnici (2008) su ispitivali enzimsku hidrolizu proteina pivskog tropa. Za enzimsku hidrolizu su korišćeni: pepsin, bakterijske peptidaze (Alcalase 2,4L, Neutrase 0,8L i Protamex), biljni proteolitički enzimi (Papain, Bromelain, i Actinidin,). Takođe, za razgradnju ugljenih hidrata je korišćena mešavina komercijalnih enzima (Celluclast 1,5L, Pectinex Ultra SP-L, Ultraflo L i Viscozyme L i Depol 740). Enzimaska hidroliza suspenzije pivskog tropa preparatima pepsina i Actinidina je vođena 18 sati na 30°C na 150 o/min na pH 5. Enzimaska hidroliza pomoću Alcalase, Neutrase, Prolamex, Papain i Bromelain je vođena na 50 i 60°C, pH 6,8. Neki uzorci su bili predtretirani enzimima za razgradnju ugljenih hidrata, na 50°C, 6 sati na 150 o/min. Enzim Alcalase se pokazao kao najefikasniji razgradivši 77% ukupnih proteina (proteini su činili 23,4% suve materije tropa). Preparati peptidaza su razgradili samo 30% suve materije. Razgradnja je poboljšana na 43% uz predtretman sa enzimima za hidrolizu ugljenih hidrata (Treimo i sar., 2008). Ispitana je i enzimaska hidroliza pivskog tropa pomoću karbohidraza (Depol 740 L, Depol 686 L, Depol 670 L i Econase CE) i peptidaza (Alcalase 2,4 L i Promod 439). Hidroliza je vođena na 50 ili 60°C, 4 sata (za jednostepeni proces) i 2 x 4 sata (za dvostepeni proces) na 150 o/min. Kod dvostepenih ogleđa supernatant dobijen nakon prvih 4 sata je dekantovan i dodate su nove količine pufera i enzima nakon čega je sledila inkubacija u trajanju od 4 sata. Ispitivanja vođena u opsegu pH od 5,5 do 9. Najviše je razgrađeno 42% suve materije u dvostepenom procesu pomoću Depol 740 – Alcalase pri čemu su količine rastvorene glukoze, ksiloze i arabionze bile 41, 34, 41% (Treimo i sar., 2009).

2.6. Mlečna kiselina

Mlečna kiselina je jedna od najrasprostranjenijih i najvažnijih organskih kiselina koju proizvode BMK. Otkrio ju je švedski naučnik Carl Wilhelm Scheele 1780. godine u kiselom mleku (Reddy i sar., 2008). Prvi put izolovana mlečna kiselina je bila u obliku smeđeg sirupa, kojoj je Scheele na osnovu porekla dao naziv „Mjölksyra“. 1789. godine francuski hemičar Antoine Laurent de Lavoisier je ovoj komponenti mleka dao naziv „acid lactique“ (mlečna kiselina), što je postalo izvorno ime u sadašnjoj terminologiji mlečne kiseline. Sve do 1857. godine smatralo se da je mlečna kiselina deo mleka, kada je francuski hemičar Louis Pasteur otkrio da mlečna kiselina nastaje fermentacijom sa određenim mikroorganizmima. Francuski naučnik Edmond Frémy je proizveo mlečnu kiselinu fermentacijom što je omogućilo 1881. godine prvu industrijsku proizvodnju mlečne kiseline fermentacijom u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) (Ghaffar i sar., 2014). Od tada je mlečna kiselina ima široku

primenu u farmaceutskoj, hemijskoj, prehrambenoj, tekstilnoj i kožarskoj industriji. Poslednjih godina se uočava rast potražnje za mlečnom kiselinom, prvenstveno zbog razvoja biorazgradivih laktidnih polimera koji se koriste za kontrolisano oslobađanje lekovitih supstanci (Djukić-Vuković i sar., 2011). Procenjeno je da će godišnja potražnja za mlečnom kiselinom u 2017. godini biti oko 367.300 tona uz godišnji porast potražnje od 5-8%, a pretpostavlja se da će do 2020. godine samo proizvodnja polimera mlečne kiseline iznositi 830 000 tona (Komesu i sar., 2015; Dreschke i sar., 2015). Najveći proizvođači mlečne kiseline fermentacijom su: Natural Works LLC (u Vlasništvu Cargill Incorporated, SAD), Purac (Holandija), Galactic (Belgija) i nekoliko Kineskih kompanija (Abdel-Rahman i sar., 2013). Trenutno, NaturalWorks LLC je lider u tehnologiji polimera na bazi mlečne kiseline i ima kapacitet od preko 95% trenutne svetske proizvodnje polimera. Drugi proizvođači polimera na bazi mlečne kiseline (koji upotpunjavaju preostalu proizvodnju) su Toyobo, Dai Nippon Printing Co., Ltd, Mitsui Chemicals, Inc., Shimadzu Corporation, NEC Corporation, Toyota Motor Corporation (Japan), Purac Biomaterials, Hycail (Holandija), Futerro i Galactic (Belgija), Cereplast Inc. (SAD), FkuR Plastic Corporation, Biomer Technology Ltd, Stanelco RF Technologies, Uhde Inventa-Fischer (Nemačka) i Hisun Industries Co. Ltd i Snamprogetti (Kina) (Jamshidian i sar., 2010; Abdel-Rahman i sar., 2013).

Mlečna kiselina je α -hidroksikarboksilna kiselina sa hiralinim centrom na drugom ugljenikovom atomu. Zbog prisustva dve funkcionalne grupe na molekulu sa tri ugljenikova atoma, poseduje značajnu hemijsku reaktivnost. Hemijske i fizičke osobine mlečne kiseline su date u tabeli 4. Karboksilna grupa je umereno kisela i stereochemija sekundarnog ugljenikovog atoma je od najvećeg značaja za polilaktidnu industriju (Dusselier i sar., 2013). Mlečna kiselina se u prodaji nalazi kao 20 do 90% vodeni rastvor.

Tabela 4. Hemijske i fizičke osobine mlečne kiseline (Dusselier i sar., 2013)

Osobina	Jedinica	Izomer ili koncentracija	Opseg
Tačka topljenja	°C	L ili D oblik	52,7–53,0
		Racemska smeša	16,4–18,0
Tačka ključanja	°C (pri 1,86 kPa)	L ili D oblik	103
		Racemska smeša	122
Gustina u čvrstom stanju	g/ml (pri 20°C)		1,33
Gustina vodenog rastvora	g/ml (pri 25°C)	20	1,057
		88,6	1,201
pK _a	-	L ili D oblik	3,79–3,86
		Racemska smeša	3,73

Mlečna kiselina se koristi kao konzervans i za korekciju pH u industriji hrane i napitaka već nekoliko decenija. Pored toga, mlečna kiselina se koristi za korekciju arome ili kao pufar, kao i inhibitor rasta nepoželjnih bakterija u prehrambenim proizvodima, kao što su slatkši, peciva, bezalkoholnih pića, supe, mlečnih proizvodi, džem, žele i majonez, često i u kombinacij sa drugim konzervansima (John i sar., 2009). Kalcijum-laktat se koristi za poboljšanje teksture testa, dok se natrijum-laktat koristi kao emulgator.

Estri natrijum i kalcijum-laktata sa masnim kiselinama dugog lanca se koriste za poboljšanje teksture testa i kao dobri emulgatori. Sposobnost mlečne kiseline da zadržava vodu čini je pogodnom za upotrebu u kozmetici za hidratantne kreme (Djukić-Vuković, 2013). Sposobnost mlečne kiseline da sprečava sintezu tirozinaze odgovorna je za efekat podmlađivanja i posvetljavanja kože (John i sar., 2009). Etil-laktat je aktivni sastojak u mnogim preparatima protiv akni. Mlečna kiselina se već dugo koristi u proizvodnji masti, losiona i oralnih preparata. Takođe se koristi u proizvodnji polimera u medicinske svrhe, kao što su hirurški konci i proteze i za kontrolisano otpuštanje lekova u organizmu (Wee i sar.,

2006). Mlečna kiselina tehničkog kvaliteta se intenzivno koristi u tekstilnoj industriji kao sredstvo za zakišeljavanje tokom štavljenje kože. Mlečna kiselina se takođe koristi za uklanjanje kamenca i čišćenje, kao rastvarač i kao sredstvo za postepeno sniženje pH u nizu tehnoloških procesa. Mlečna kiselina se može koristiti za proizvodnju niza supstanci kao što su propilen glikol, propilen oksid, akrilna kiselina i akrilni estri, kao i laktatni estri koji se koriste kao plastifikatori (Datta i Henry, 2006). Sve više se u proizvodnji polimera na bazi mlečne kiseline koristi kompleks polimera L-(+)- i D-(-)-mlečne kiseline zbog visoke tačke topljenja (230°C) koja je za oko 50°C viša od tačke topljenja poli-L-(+)-laktida (177°C) (Okano i sar., 2010).

Mlečna kiselina je javlja u dva stereo izomera: L-(+)-mlečna kiselina i D-(-)-mlečna kiselina. Oba izomera se mogu polimerizovati i polimeri različitih osobina se mogu proizvoditi u zavisnosti od sastava smeše izomera. D-(-)-mlečna kiselina je štetna po ljudski organizam, zbog čega se u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji koristi isključivo L-(+)-mlečna kiselina. Hemijska sinteza se uglavnom zasniva na hidrolizi laktonitrila upotrebom jakih kiseline, usled čega uvek nastaje racemska smeša D-(-)- i L-(+)-mlečne kiseline (John i sar., 2007; Madhavan Nampoothiri i sar., 2010). Drugi putevi hemijske sinteze uključuju: razgradnju šećera upotrebom baza kao katalizatora; oksidaciju propilen glikola; reakciju acetaldehida, ugljen-monoksida i vode na povišenim temperaturama i pritiscima i hidrolizu hloropropionske kiseline i oksidaciju propilena u prisustvu azotne kiseline (Madhavan Nampoothiri i sar., 2010).

Sa druge strane, optički čista L-(+)- ili D-(-)-mlečna kiselina se može dobiti mlečno-kiselom fermentacijom. Fermentacioni postupci se zasnivaju na konverziji rastvora šećera (glukoze, fruktoze, saharoze i laktoze) sa BMK (Mussatto i sar., 2008a). Trenutno se oko 90% ukupno proizvedene mlečne kiseline dobija putem mlečno-kisele fermentacije. Sa razvojem biotehnologije, mlečno-kisela fermentacija je primenom odgovarajućeg proizvodnog mikroorganizma postala vodeći postupak u proizvodnji mlečne kiseline, zbog niske temperature procesa, male potrošnje energije i visoke optičke čistoće (Madhavan Nampoothiri i sar., 2010). Velike kompanije koje proizvode i polimere na bazi mlečne kiseline koriste mlečno-kiselu fermentaciju u cilju dobijanja L-(+)- ili D-(-)- izomera (Oh i sar., 2005; Djukić-Vuković i sar., 2011).

2.6.1 Sirovine za proizvodnju mlečne kiseline

Za proizvodnju mlečne kiseline fermentacijom se tradicionalno kao podloga koriste šećeri ili jestive biljke. Troškovi predtretmana i izdvajanja su u tom slučaju niski. Međutim, cena sirovina se ne može smanjiti povećanje proizvodnih kapaciteta, zbog čega se sve više ispituju nove, jeftinije i obnovljive sirovine za mlečno-kiselu fermentaciju (Abdel-Rahman i sar., 2013). Upotreba jeftinijih sirovina je neophodna za ekonomski isplativu proizvodnju mlečne kiseline, jer su za proizvodnju polimera i drugih proizvoda potrebne velike količine mlečne kiseline po niskoj ceni. Sirovine za proizvodnju mlečne kiseline bi trebale ne samo da su jeftine već i da sadrže male količine inhibitora i toksičnih jedinjenja, da su dostupne tokom čitave godine, da se mogu koristiti u fermentaciji bez ili sa jednostavnim predtretmanom i da je prinos mlečne kiseline visok a količinama sporednih proizvoda mala (Wee i sar., 2006; John i sar., 2009). Godišnje se u svetu proizvede oko 3,5 milijardi tona sporednih proizvoda poljoprivrede. Upotreba sirovina zavisi od njihove cene, dostupnosti i čistoće (John i sar., 2007). Danas je posebno aktuelno ispitivanje obnovljivih sirovina iz poljoprivrede, drvne i prehrambene industrije (drvo (Moldes i sar., 2000; Wee i sar., 2004), hidrolizati drveta (Wee i sar., 2006), pirinčana slama (Kim i sar., 2010), melasa (Göksungur i Güvenç, 1999; Bulut i sar., 2004; Bolner de Lima i sar., 2009), pivski trop (Mussatto i sar., 2008a), pšenične mekinje (Neveena i sar., 2004; John i sar., 2006b), voda od namakanja kukuruza (Rivas i sar.,

2004a,b), ostaci prerade šećerne trske (Adsul i sar., 2007), manioka (John i sar. 2006a; Wang i sar., 2010), krtole krompira, kukuruzni klipovi (Cui i sar., 2011)), ratarske kulture bogate skrobom (pšenica (Thomsen i sar., 2007), ječam (Oh i sar., 2005), krompir, kukuruz (Altaf i sar., 2005), topioka, šargarepa, cvekla (Rakin i sar., 2004), žir (Lu i sar., 2010)) i sporednih proizvoda iz industrije mleka (surutka (Kim i sar., 2006; Shahbazi i sar., 2005) za dobijanje mlečne kiseline u laboratorijskim uslovima. Pregled jeftinih sirovina koje su ispitivane za dobijanje mlečne kiseline, prinosi i proizvodni mikroorganizmi korišćeni za fermentaciju su dati u tabeli 5. Iako su lignocelulozni materijali, hidrolizati drveta i ostaci poljoprivrede bogati ugljenim hidratima, njihova primena je ograničena zbog niskog sadržaja proteina i visokog sadržaja celuloze i lignina. Skrobne i lignocelulozne sirovine su bogate složenim ugljenim hidratima pa se pre fermentacije ovi ugljeni hidrati moraju hidrolizovati do šećera koje proizvodni mikroorganizmi mogu da asimiluju i metabolišu. U zavisnosti od proizvodnog procesa hidroliza sirovina i fermentacija se mogu voditi u dva odvojena koraka ili istovremeno pri čemu se enzimi za razgradnju sirovine i inokulum dodaju zajedno. Takođe se mogu koristiti proizvodni mikroorganizmi koji imaju sposobnost sinteze ekstracelularnih enzima (amilolitičkih ili celulolitičkih) pri čemu se vodi direktan postupak fermentacije bez faze hidrolize i samim tim se ostvaruje ušteda u energiji, vremenu, hemikalijama i celokupnoj ceni proizvodnje (John i sar., 2009; Abdel-Rahman i sar., 2011).

Za proizvodnju mlečne kiseline ispitivane su brojne skrobne sirovine kao što su: kukuruzni skrob (Altaf i sar., 2005, Wang i sar., 2010), skrob manioke (John i sar. 2006a; Wang i sar., 2010), pšenične mekinje (Neveena i sar., 2004; 2005; Givry i sar., 2008), pirinač (Lu i sar., 2009), brašno indijskih mahunarki (Altaf i sar., 2006; 2007a,b), ječmeno brašno (Oh i sar., 2005; Altaf i sar., 2006), pšenično brašno (Altaf i sar., 2007b; Oh i sar., 2005), pšenični skrob (Thomsen i sar., 2007), skrob žira (Lu i sar., 2010), skrob krompira (Altaf i sar., 2007b) i kaša krompira (Oda i sar., 2002). U zavisnosti od proizvodnog mikroorganizma za proizvodnju mlečne kiseline pored izvora ugljenika neophodan je dodatak izvora azota i mineralnih materija. Neke skrobne sirovine svojim sastavom zadovoljavaju nutritivne zahteve proizvodnog mikroorganizma ili se ovo ispunjava kombinovanjem nekoliko sirovina (Altaf i sar., 2006; 2007a,b). Takođe u cilju smanjenja troškova proizvodnje mlečne kiseline, komercijalno dostupni izvori azota kao što su ekstrakt kvasca i pepton se mogu zameniti jeftinim sirovinama koje su često sporedni proizvodi prehrambene ili poljoprivredne industrije (autolizat pekarskog i pivskog kvasca i voda od namakanja kukuruza) (Rivas i sar., 2004a,b; Altaf i sar., 2006; 2007a,b; Lu i sar., 2010). U cilju daljeg pojeftinjenja proizvodnog procesa skrobne sirovine se mogu zameniti sporednim proizvodima poljoprivredne i prehrambene industrije kao što su: otpadna voda iz proizvodnje čipsa (Afifi i sar., 2011), rezanci šećerne trske (Adsul i sar., 2007, Laopaiboon i sar., 2010), kukuruzni klipovi (Miura i sar., 2004; Rivas i sar., 2004a,b; Ali i sar., 2009; Cui i sar., 2011), pirinčana slama (Qi i Yao, 2007; Kim i sar., 2010), vinova loza (Bustos i sar., 2004, 2007), pivski trop (Mussatto i sar., 2007b), otpadna voda iz obrade krompira (Huang i sar., 2005) i ostaci hrane iz kantine (Ohkouchi i Inoue (2006) (slika 15).

Tabela 5. Lignocelulozne sirovine i sporedni proizvodi prehrambene industrije i poljoprivrede koji se koriste u proizvodnji mlečne kiseline (Abdel-Rahman i sar., 2013)*

Sirovina	Soj	Vrsta fermentacije	Mlečna kiselina		
			Koncentracija (g/l)	Prinos (g/g)	Zapremnska produktivnost (g/l·h ⁻¹)
Alfalfa vlakna	<i>L. delbreuckii</i>	Diskontinualna, ISF	35,4	0,35	0,75
Alfalfa vlakna	<i>L. plantarum</i>	Diskontinualna, ISF	46,4	0,46	0,64
Kljuk od jabuke	<i>L. rhamnosus</i> ATCC 9595 (CECT 288)	Diskontinualna	32,5	0,88	5,41
Kora banane	<i>L. casei</i>	Diskontinualna	-	0,10	0,13
Rezanci manioke	<i>L. delbrueckii</i> NCIM 2025	Diskontinualna, ISF	81,9	0,94	1,36
Celuloza	<i>B. coagulans</i> 36D1	Dolivna, ISF	80,0	0,80	0,30
Otpaci celuloze	<i>L. rhamnosus</i> CECT-288	Dolivna, ISF	42,0	0,38	0,87
Sok urme	<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> NRRL-B445 i <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC19435	Diskontinualna	60,3	-	3,20
Odmašćene pirinčane mekinje	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> IFO 3202	Diskontinualna, ISF	28,0	0,28	0,78
Ostaci hrane	<i>L. manihotivorans</i> LMG18011	Diskontinualna, ISF	48,7	0,10	0,76
Ostaci hrane	<i>B. licheniformis</i> TY7	Diskontinualna	40,0	-	2,50
Ostaci hrane	BMK i <i>Clostridium</i> sp.	Diskontinualna	64,0	0,62	-
Ljuska manga	Prirodno prisutni mikroorganizmi	Diskontinualna	17,4	-	-
Ostaci iz prerade dagnji	<i>L. plantarum</i> A6	Diskontinualna	8,4	0,98	-
Rezanci šećerne trske	<i>L. lactis</i> IO-1	Diskontinualna	10,9	0,36	0,17
Vinova loza	<i>L. pentosus</i> ATCC 8041	Diskontinualna	21,8	0,77	0,84
Ostaci kartona	<i>L. coryniformis</i> ssp. <i>torquens</i> ATCC 25600	Diskontinualna, ISF	23,4	0,51	0,49
Ostaci iz prerade šećerne trske	<i>L. delbrueckii</i> mutant Uc-3	Diskontinualna, ISF	67,0	0,83	0,93
Mulj iz obrade vode	<i>L. paracasei</i> LA1	Diskontinualna, ISF	23,4	0,72	0,23
Pšenična slama	<i>L. brevis</i> CHCC 2097 i <i>L. pentosus</i> CHCC 2355	Diskontinualna	7,1	0,95	-

*ISF-istovremena saharifikacija i fermentacija

Danas se sve više ispituje upotreba lignoceluloznih materijala iz poljoprivredne i drvne industrije kao jeftine i obnovljive ugljeno hidratne sirovine u industrijskoj proizvodnji mlečne kiseline zbog niske cene, dostupnosti, obnovljivosti i visokog sadržaja ugljenih hidrata (Abdel-Rahman i sar., 2011). Godišnja svetska proizvodnja biomase, od koje je 90% lignocelulozna biomasa, iznosi oko $2 \cdot 10^{11}$ t, od kojih $8-20 \cdot 10^9$ t ostaje neiskorišćeno (Lin i Tanaka, 2006). Neophodno je primeniti nekoliko koraka u cilju razgradnje lignoceluloznog materijala do šećera koje proizvodni mikroorganizam može iskoristiti za fermentaciju. Postupak dobijanja mlečne kiseline upotrebom lignoceluloznog materijala može se podeliti u tri faze: 1. Enzimaska hidroliza (razgradnja lignoceluloznog materijala do fermentabilnih

šećera, kao što su glukoza ili ksiloza, upotrebom enzima); 2. Fermentacija (dobijanje mlečne kiseline upotrebom određenog proizvodnog mikroorganizma); 3. Izdvajanje i prečišćavanje (u cilju ispunjavanja komercijanih zahteva).



Slika 15. Sporedni proizvodi poljoprivredne i prehrambene industrije (Graffar i sar., 2014)

U zavisnosti od proizvodnog mikroorganizma može se izostaviti ili smanjiti upotreba enzima, jer se kiselinama razlaže hemiceluloza na ksilozu i arabinozu. Takođe u cilju poboljšanja efikasnosti mlečno-kisele fermentacije faze hidrolize i fermentacije se mogu objediniti u jednu pri čemu se koristi jedan fermentor, skraćuje vreme procesa, smanjuje količina upotrebljenih enzima, umanjuje inhibicija proizvodima hidrolize i povećava produktivnost. Pored ovoga u cilju što boljeg iskorišćenja svih nastalih šećera mogu se koristiti mešane kulture proizvodnih mikroorganizama (Abdel-Rahman i sar., 2013).

Melasa je veoma kvalitetan i nutritivno vredan sporedni proizvod industrije šećera. Sadrži šećer (48–56% ukupne mase; postoje male razlike u sastavu melase dobijene iz šećerne trske i šećerne repe), azotna jedinjenja, organske kiseline, aminokiseline, ali i vitamine i minerale (biotin, folnu kiselinu, piridoksin, kalcijum-pantotenoat, riboflavin, magnezijum, kalcijum, fosfor, silicijum, kalijum, aluminijum, gvožđe). Jeftinija je od rafinisanih šećera, a zbog visoke koncentracije šećera smanjena je mogućnost kontaminacije (Kotzamanidis i sar., 2002; Djukić-Vuković i sar., 2011). Dodatni predtretmani melase dodatkom sumporne kiseline, trikalcijum-fosfata, kalijum-ferocijanida i etilendiamin tetrasirćetne kiseline (EDTA) mogu biti neophodni kako bi se ostvarila efikasnija fermentacija jer, melasa sadrži teške metale (gvožđe, bakar, mangan) koji mogu inhibirati rast ćelija, uticati na pH podloge i inaktivirati enzime potrebne za sintezu mlečne kiseline. Takođe neophodana je dodatna faza ekstrakcije za uklanjanje hemikalija dodatih tokom procesa fermentacije što sa dodatnim predtretmanom poskupljuje celokupan proces. Međutim, ostvareni prinos mlečne kiseline na melasi šećerne repe u diskontinualnom postupku može biti preko 90%. Göksungur i Güvenç (1997) su sa *L. delbruecki* IFO 3220 ostvarili prinos mlečne kiseline na melasi šećerne repe od 95,4% dok su

Kotzamanidis i saradnici (2002) su sa *L. delbrueckii* NCIMB 8130 ostvarili prinos mlečne kiseline od 97,9%.

Sporedni proizvodi undustrije mleka se takođe mogu koristiti u proizvodnji mlečne kiseline. Surutka je tečna frakcija mleka koja nastaje nakon koagulacije proteina mleka upotrebom kiselina, toplote ili enzima. Nastaje u velikim količinama tokom cele godine i njeno nenamensko i nesavesno uklanjanje predstavlja ozbiljan problem za okolinu. Sastav i tip surutke zavisi od postupka za izdvajanje proteina iz mleka i sadrži oko 55% ukupnih sastojaka mleka (Panesar i sar., 2007). U proseku surutku čine voda (93%), laktoza (5%), azotne materije (0,9%), mineralne materije i vitamini (0,6%), lipidi (0,3%) i mlečna kiselina (0,2%) (Tango i Ghaly, 1999). Upotreba surutke u proizvodnje mlečne kiseline je uslovljena upotrebom mikroorganizama koji mogu da fermentišu laktozu (Panesar i sar., 2007).

Izvori azota

Sporedni proizvodi poljoprivredne i prehrambene industrije kao i lignocelulozna biomasa koji se mogu koristiti za dobijanje mlečne kiseline su bogati ugljenim-hidratima, ali su siromašni azotnim materijama, vitaminima i faktorima rasta koji su važni za rast i efikasnu fermentaciju sa BMK (Altaf i sar., 2005). U cilju efikasne mlečno-kisele fermentacije, BMK pored izvora ugljenika i drugih nutritijenata zahtevaju i izvor azota (aminokiselina, peptida, itd.), zbog čega je u podlogu za fermentaciju potrebno dodati složene proteinske hidrolizate (ekstrakt kvasca, pepton, itd.). Međutim, hidrolizati proteina su veoma skupi i neophodna je njihova zamena jeftinim izvorima azota prilikom projektovanja industrijske proizvodnje mlečne kiseline (Venus, 2006). Ekonomskom analizom mlečno-kisele fermentacije je utvrđeno da udeo ekstrakta kvasca u ceni podloge za fermentaciju iznosi 38%, zbog čega je neophodno istraživanje i zamena svih skupih ekstrakata proteina jeftinijim izvorima azota kao što su sporedni proizvodi poljoprivredne i prehrambene industrije (Altaf i sar., 2005).

Kao jeftinija zamena za skupe komercijalne izvore azota ispitivani su pekarski kvasac, brašno crvenog sočiva, „golubijeg“ graška, crnog, bengalskog i zelenog graška i soje (Altaf i sar., 2005, 2006, 2007a,b), voda od namakanja kukuruza (Rivas i sar., 2004a,b, Oh i sar., 2005), pivski kvasac (Rakin i sar., 2004; 2007) i sladna klica (Hujanen i sar., 2001). Najbolji prinosi mlečne kiseline su dobijeni sa dodatkom brašna crvenog sočiva, pekarskog kvasca, vodom od namakanja kukuruza i sladne klice. Sa dodatkom sladne klice (53,8 g suve materije sladne klice/l podloge) ostvaren je prinos mlečne kiseline od 98% i zaključeno je da se za efikasnu mlečno-kiselu fermentaciju ekstrakt kvasca većim delom (sa 22 na 4 g/l) može zameniti sladnim klicama (Hujanen i sar., 2001).

Altaf i saradnici (2005) su ispitivali mogućnost zamene ekstrakta kvasca i peptona sa različitim vrstama mahunarki i pekarskim kvascem u MRS bujonu za mlečno-kiselu fermentaciju sa *Lactobacillus amylophilus* GV6. Od svih mahunarki dodatih u MRS bujon (sa 1% rastvorljivog skroba), brašno crvenog sočiva se pokazalo kao najpogodnije za efikasnu mlečno-kiselu fermentaciju. Pored toga, utvrđeno je da se brašno crvenog sočiva može koristiti kao zamena za pepton. Ispitana je i primena pekarskog kvasca kao zamene za ekstrakt kvasca. Sterilizacijom pekarskog kvasca dolazi do razgradnje ćelija pri čemu se oslobađaju aminokiseline, vitamini, purinske i pirimidinske baze i peptidi prisutni u ćelijama pekarskog kvasca a koji su esencijalni za rast *Lactobacillus* sp. i sintezu mlečne kiseline. Na izmenjenom MRS bujonu koji je sadržao 2% brašna i 1% pekarskog kvasca (zamena za pepton i ekstrakt kvasca) i 1% rastvorljivog skroba (zamena za glukozu), ostvaren je prinos mlečne kiseline od 92% (g mlečne kiseline/g utrošenog skroba), čime je utvrđeno da se visoki prinosi mlečne kiseline mogu ostvariti i upotrebom jeftinijih izvora azota (Altaf i sar., 2005).

Ekonomska isplativost fermentacije je ograničena cenom fermentacione podloge, koja može dostići i skoro 30% ukupne cene proizvodnje (Rivas i sar., 2004a). Upotrebom vode od

namakanja kukuruza i ćelija *Debaryomyces hansenii* (iz proizvodnje ksilitola) kao izvora azota (i faktora rasta) u mlečnoj-kiseloj fermentaciji sa *L. rhamnosus* CECT-228 na hidrolizatu kukuruznih klipova, ostvaren je visok prinos mlečne kiseline (90%) (Rivas i sar., 2004a). Utvrđeno je da se u mlečno-kiseloj fermentaciji sa *Lactobacillus* sp. FCP2 na soku šećerne trske može povećati prinos mlečne kiseline dodatkom larvi svilene bube, autolizata kvasca ili ostataka iz prerade škampa u poređenju sa dodatkom ekstrakta kvasca. Međutim, najveći broj živih ćelija je dobijen u fermentaciji soka šećerne trske sa dodatkom ekstrakta kvasca (Timbuntam i sar., 2006).

Tokom proizvodnje piva pored pivskog tropa nastaju i značajne količine pivskog kvasca koji se koristi u proizvodnji ekstrakta koji se koristi u prehrambenoj industriji (Tanguler i sar., 2008). Ćelije kvasca sadrže velike količine proteina, lipida, RNK, vitamina i minerala. Pivski kvasac predstavlja jeftin izvor azota koji je bezbedan za upotrebu u prehrambenoj industriji (Chae i sar., 2001). Takođe otpadni tokovi prehrambene industrije i fermentacija sadrže ogromne količine organskih materija (Fuess i Garcia, 2015; Djukić-Vuković i sar., 2015). Džibra iz proizvodnje bioetanola na skrobnim sirovinama sadrži ćelije kvasca i organske materije kao što su proteini, aminokiseline i ugljeni hidrati različitih molekulskih masa. Zbog visoke nutritivne i energetske vrednosti džibra se često koristi kao stočna hrana (Kim i sar., 2008; Wilkie i sar., 2000). Bistra džibra predstavlja tečnu fazu dobijenu nakon centrifugiranja džibre nakon destilacije. Sadrži velike količine rastvorenih organskih materija, kao što su šećeri i aminokiseline, kao i ćelije kvasca, koje doprinose visokom sadržaju azota (Moestedt i sar., 2014).

2.6.2. Proizvodni mikroorganizmi mlečne kiseline

Mlečnu kiselinu proizvodi nekoliko klasa mikroorganizama klasifikovanih u bakterije, plesni, kvasce, cianobakterije i alge. Svaki od ovih mikroorganizama ima svoje prednosti u poređenju sa drugima, kao što su opseg mogućih podloga, bolji prinos i produktivnost, zahtevi u pogledu sastava podloge i optička čistoća nastale mlečne kiseline. Upotreba mešane kulture sojeva omogućava dobijanje kombinacije metaboličkih puteva u cilju što potpunijeg iskorišćenja složenih podloga i poboljšanja proizvodnje mlečne kiseline (Taniguchi i sar., 2004; Kleerebezem i van Loosdrecht, 2007; Nancib i sar., 2009; Cui i sar., 2011).

Bakterije mlečne kiseline čini raznovrsna grupa Gram-pozitivnih mikroorganizama koja se može naći na biljkama, mesu i mlečnim proizvodima i proizvodi mlečnu kiselinu kao anaerobni proizvod glikolize sa visokim prinosom i produktivnošću. Najveći deo (90%) istraživanja o proizvodnji mlečne kiseline putem fermentacije čine istraživanja sa BMK. BMK su štapići i koke, pripadaju razdelu *Firmicutes* i obuhvataju 20 rodova. Rodovi *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weisella*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* i *Enterococcus* su glavni predstavnici BMK. *Lactobacillus* je rod sa 80 priznatih vrsta (Reddy i sar., 2008). BMK su nesporogeni, nepokretni, katalaza negativni, fakultativno anaerobni ili mikroaerofilni mikroorganizmi koji rastu na 5–45°C i pH vrednosti 3,2–9,6 i za rast i proizvodnju mlečne kiseline neophodni su im složene podloge sa izvorima azota, vitamina i minerala (Caplice i Fitzgerald, 1999; Ross i sar., 2002). Nemaju sposobnost da sintetišu porfirinsko jezgro (hem) zbog čega ne poseduju katalazu i citohrome i usled odstustva respiratornog lanca moraju da stvaraju energiju putem fermentacije. Postoje i aerotolerantne vrste koje kiseonik i kiseonične radikale prevode u vodonik-peroksid delovanjem peroksidaze. Zbog slabijeg energetskog metabolizma, BMK često rastu sporije nego mikroorganizmi koji poseduju respiratorni lanac. Njihove kolonije su prečnika od 2 do 3mm (Reddy i sar., 2008).

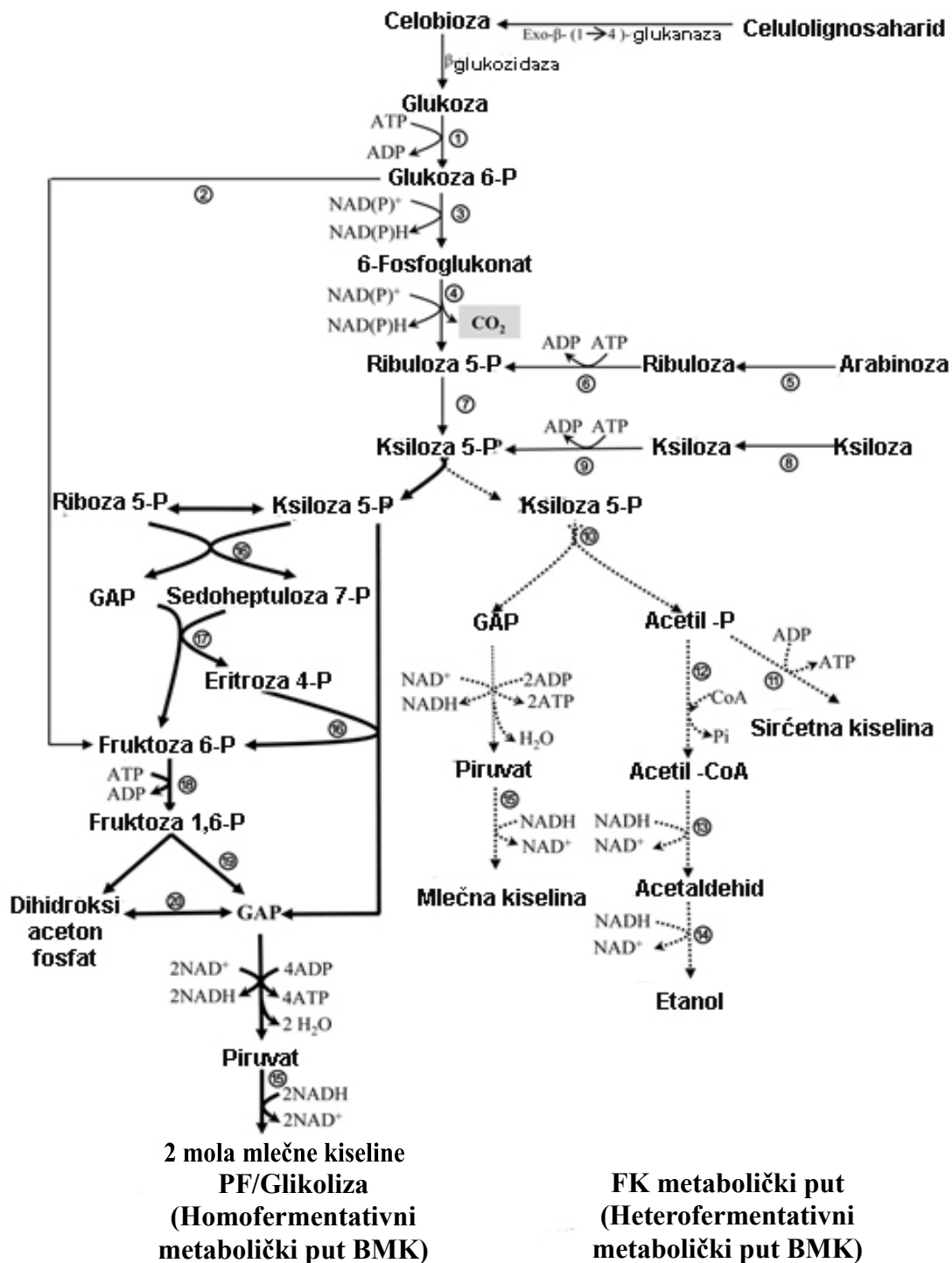
Sojevi BMK izolovani iz različitih podloga su uvek najbolji izvor za dobijanje genetski stabilnih sojeva sposobnih za proizvodnju mlečne kiseline (Wang i sar., 2015). Pored BMK

neki sojevi *Bacillus* sp., *Escherichia coli* i *Corynebacterium glutamicum* takođe mogu efikasno da proizvode mlečnu kiselinu (Abdel-Rahman i sar., 2013). Sa metaboličke tačke gledišta BMK se dele na homofermentativne i heterofermentativne bakterije. Homofermentativne bakterije ostvaruju teorijski prinos od 2 mola mlečne kiseline po 1 molu glukoze uz teorijski prinos od 1 g mlečne kiseline po g šećera, ali eksperimentalni prinos je manji (0,74–0,99 g/g) zbog utroška dela izvora ugljenika na rast proizvodnog mikroorganizma (0,07–0,22 g/g) (Martinez i sar. 2013). Heterofermentativne bakterije mogu da ostvare teorijski prinos od najviše 1 mola mlečne kiseline po molu glukoze uz nastajanje 1 mola etanola i 1 mola ugljen-dioksida (Abdel-Rahman i sar., 2011; Martinez i sar., 2013). Homofermentativne bakterije su od velikog značaja za industrijsku proizvodnju mlečne kiseline putem fermentacije iz ekonomskih razloga (Litchfield i sar., 2009). Pod nepovoljnim uslovima kao što su nizak sadržaj izvora ugljenika, prisustvo drugih izvora ugljenika osim glukoze, visoka vrednost pH ili niska temperatura fermentacije, neke homofermentativne bakterije mogu proizvoditi i mravlju kiselinu (Martinez i sar., 2013).

BMK metabolišu heksoze i pentoze putem različitih metaboličkih puteva koji vode do homofermentativnog ili heterofermentativnog metabolizma. Homofermentativni metabolizam proizvodi teorijski samo mlečnu kiselinu kao krajnji proizvod Embden-Meyerhof-Parnas-ovog (EMP) metaboličkog puta (metabolizam heksoza) i pentozafosfatnog (PF)/glikolitičkog metaboličkog puta (metabolizam pentoza). Na slici 16 su prikazani EMP i PF/glikolitički metabolički putevi. Teorijski prinos mlečne kiseline iz glukoze je 1 g/g (2mol/mol) preko EMP puta dok teorijski prinos mlečne kiseline iz pentoza iznosi 1 g/g (1,67 mol/mol) putem pentozafosfatnog/glikolitičkog puta (Wang i sar., 2015). Sa druge strane heterofermentativnim metabolizmom glukoze nastaju ekvimolarne količine mlečne kiseline, ugljen-dioksida i etanola (ili acetata) u fosfoketolaznom metaboličkom putu. Zbog ovog teorijski prinos mlečne kiseline, heterofermentativnog metabolizma glukoze je samo 0,5 g/g (1,0 mol/mol). Teorijskim prinos mlečne kiseline prema pentozama iznosi 0,6 g/g (1,0 mol/mol). Zbog ovoga su EMP i PF metabolički putevi efikasniji u proizvodnji mlečne kiseline i iskorišćenju šećera (Wang i sar., 2015). Glukoza je šećer koji većina sojeva BMK prvi fermentiše, zbog čega prisustvo glukoze u podlogama sa više različitih izvora ugljenika izaziva „efekat kataboličke represije izvora ugljenika“. „Efekat kataboličke represije izvora ugljenika“ se ogleda u tome da izvor ugljenika koji se lakše usvaja sprečava ekspresiju kataboličkog sistema koji omogućava iskorišćenje drugog izvora ugljenika. Zbog toga proizvodni mikroorganizmi prvo koriste heksoze (i to prvo glukozu) pa zatim pentoze uz smanjenje efikasnosti iskorišćenja izvora ugljenika. Galaktoza, maltoza, laktoza, manoza i saharoza (bez obzira na koncentracije 30–120 mmol) nisu ispoljile represioni efekat kao glukoza (Yun i Ryu, 2001; Linares i sar., 2013; Wang i sar., 2015).

BMK imaju složene nutritivne zahteve zbog njihove ograničene mogućnosti da sintetišu elemente neophodne za rast. Dok se izvori ugljenika koriste za dobijanje energije, za rast i građu ćelija BMK neophodni su i izvori azota, vitamini i minerali. Odnos izvora ugljenika i azota je važan faktor koji utiče na sintezu mlečne kiseline. Hetényi i saradnici (2008) su u ispitivanjima uticaja odnosa ugljenika i azota utvrdili da odnos od 19:1 do 37:1 ima pozitivan efekat na produktivnost mlečne kiseline u fermentacijama sa *Lactobacillus* sp. MKT-LC878, dok odnos ugljenika i azota manji od 12:1 nema pozitivan uticaj na mlečno-kiselu fermentaciju.

Osim izvora ugljenika i azota, vitamini i minerali imaju značajan uticaj na mlečno-kiselu fermentaciju. Chauhan i saradnici (2007) su utvrdili da dodatak natrijum-sulfata, natrijum-acetata, dikalijum-hidrogenfosfata, mangan-sulfata i gvožđe(II)-sulfata ima pozitivan uticaj na proizvodnju mlečne kiseline sa *Lactobacillus* sp. KCP01.



Slika 16. Homofermentativni i heterofermentativni metabolički put BMK. Metabolički putevi proizvodnje mlečne kiseline iz glukoze, ksiloze i arabinoze dobijenih hidrolizom lignoceluloznih materijala sa BMK. Enzimi: (1) Heksokinaza; (2) Glukoza-6-fosfat izomeraza; (3) Glukoza-6-fosfat dehidrogenaza; (4) 6-fosfoglukonat dehidrogenaza; (5) Arabinoza izomeraza; (6) Ribulokinaza; (7) Ribuloza-5-fosfat 3-izomeraza; (8) Ksiluloza izomeraza; (9) Ksilulokinaza; (10) Fosfoketolaza; (11) Acetat kinaza; (12) Fosfotransacetilaza; (13) Aldehid dehidrogenaza; (14) Alkohol dehidrogenaza; (15) laktat dehidrogenaza; (16) Transketolaza; (17) Transaldolaza; (18) 6-fosfofruktokinaza; (19) Fruktoza-difosfat aldolaza; (20) triozafosfat izomeraza. PF - pentoza fosfatni put/glikoliza homofermentativni metabolizam BMK; FK - fosfoketolazni put heterofermentativni metabolizam BMK (Abdel-Rahman i sar., 2011)

Upotrebom mešane kulture pet sojeva *Lactobacillus* sp. (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 12315, *Lactobacillus casei* NRRL-B1445, *Lactobacillus delbrueckii* NRRL-B445, *Lactobacillus helveticus* NRRL-B1937 i *Lactobacillus casei* NRRL-B1922) postignut je viši prinos mlečne kiseline u poređenju sa pojedinačnim sojevima. Takođe upotreba mešanih kultura i njihovo sinergističko delovanje povećavaju produktivnost uz smanjenu potrošnju izvora azota i smanjenjuju mogućnost kontaminacije (Lee, 2005).

Proizvodnja mlečne kiseline je ispitivana i upotrebom nekih sojeva *Bacillus* sp., kao što su *Bacillus coagulans*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus licheniformis* i *Bacillus subtilis*. (Abdel-Rahman i sar., 2013). Sojevi *Bacillus* sp. mogu da rastu na podlogama sa malim sadržajem izvora azota, na 45°C a neki sojevi mogu efikasno da proizvode mlečnu kiselinu na povišenim vrednostima pH (oko 9) (Wang i sar., 2011, Meng i sar., 2012). Fermentacijom na višim temperaturama može se izvoditi simultana saharifikacija i fermentacija. Patel i saradnici (2006) su u ispitivanju rasta i proizvodnje mlečne kiseline sa *Bacillus coagulans* 171C5, 36D1 i P4-102B na heksozama i pentozama iz lignocelulozne biomase (na 50°C i pH 5) ostvarili potpunu koverziju ksiloze, arabinoze, zajedno sa glukozom u optički čistu L-(+)-mlečnu kiselinu. Pored sojeva *Bacillus* sp. vršena su ispitivanja i sa sojevima *Escherichia coli*, zbog brzog metabolizma ovih sojeva, njihove sposobnosti da fermentišu heksoze i pentoze uz skromne nutritivne zahteve i mogućnosti jednostavne genske manipulacije. Neki sojevi *E. coli* proizvode etanol i nekoliko organskih kiselina tokom EMP metaboličkog puta, zbog čega su u cilju poboljšanja proizvodnje mlečne kiseline izvršene genetske manipulacije metabolizma (Zhou i sar., 2003). Upotrebom sojeva *E. coli* ostvareni su niža produktivnost i koncentracija mlečne kiseline. Pored toga, sojevi *E. coli* imaju manju toleranciju na mlečnu kiselinu od sojeva BMK i *Bacillus* sp. (Zhou i sar., 2003; Portnoy i sar., 2008).

Corynebacterium glutamicum je Gram pozitivna, aerobna, nesporogena, nepokrtena, saprofitna bakterija koja proizvodi nekoliko organskih kiselina pod mikroaerofilnim uslovima i može se kao i *E. coli* putem genskog inženjerstva orjentisati na proizvodnju mlečne kiseline (Yukawa i sar., 2007). Upotrebom genskog inženjerstva mogu se zameniti L/D-LDH geni željenim genima iz *Lactobacillus* sp. u cilju postizanja viših koncentracija mlečne kiseline visoke optičke čistoće, u poređenju sa *Lactobacillus* sp. sojem iz kojeg je uzet gen (Jia i sar., 2011). Okino i saradnici (2005) su ostvarili zapreminsku produktivnost L-(+)-mlečne kiseline od 42,9 g/l·h⁻¹ nakon 360 sati kontinualne fermentacije sa recirkulacijom ćelija sa *C. glutamicum* R.

Plesni takođe imaju sposobnost za proizvodnju mlečne kiseline. Rodovi plesni koji mogu da proizvode mlečnu kiselinu su *Mucor*, *Monilia* i *Rhizopus*, ali se vrsta *Rhizopus oryzae* najviše koristi u ispitivanjima vezanim za proizvodnju mlečne kiseline (John i sar., 2007). Upotreba plesni u mlečno-kiseloj fermentaciji ima nekoliko prednosti koje se ogledaju u njihovoj sposobnosti da sintetišu amilolitičke enzime, imaju male nutritivne zahteve, formiraju filamentozne strukture koje olakšavaju njihovo uklanjanje iz procesa a biomasa plesni predstavlja značajan sporedni proizvod (Bulut i sar., 2004; Zhang i sar. 2007; Oda i sar., 2002). Različiti morfološki oblici rasta plesni imaju značajan uticaj na reološke karakteristike podloge, količinu prisutnog kiseonika i prinos mlečne kiseline. Zbog ovoga su u industriji poželjne plesni koje formiraju pelete malih dimenzija pri čemu se poboljšava prinos mase u podlozi i plesni se mogu koristiti duži vremenski period u uzastopnim diskontinualnim fermentacijama (Maneeboon i sar., 2010). Takođe, *Rhizopus* sp. mogu da rastu na sintetskim podlogama koje sadrže neorganske izvore azota kao što su amonijumove soli ili nitrati i mineralne soli što ima olakšava izdvajanje i prečišćavanje mlečne kiseline. Međutim, *Rhizopus* sp. daje manje prinose mlečne kiseline u poređenju sa BMK zbog formiranja sporednih proizvoda kao što su etanol, fumarna kiselina i glicerol tokom fermentacije (Litchfield, 2009).

Huang i saradnici (2005) su sa *Rhizopus oryzae* i *Rhizopus arrhizus* 36017 ostvarili prinose mlečne kiseline 0,85–0,92 g/g (36–48 sati fermentacije) na otpadnoj vodi iz obrade krompira u fermentaciji sa istovremenom saharifikacijom. Takođe, Jin i saradnici (2005) su ostvarili visoke prinose mlečne kiseline 0,94–0,97 g/g šećera sa *Rhizopus arrhizus* 36017 na otpadnim tokovima prerade krompira, kukuruza, pšenice i ananasa u toku 36–48 sati fermentacije.

Zbog dobre tolerancije na niske pH vrednosti (čak do 1,5) a samim tim i mogućnosti za eliminisanjem korekcije pH tokom fermentacije a samim tim jednostavnijim procesom izdvajanja i prečišćavanja mlečne kiseline (i smanjenje zagađenja) kvasci su takođe ispitivani u proizvodnji mlečne kiseline. Iako većina sojeva kvasca proizvodi male količine mlečne kiseline, uloženi su veliki naponi u genskoj modifikaciji određenih sojeva kvasca. Moguće je ostvariti visoke prinose mlečne kiseline delimičnom ili potpunom zaustavljanjem proizvodnje etanola putem eliminisanja aktivnosti piruvat dekarboksilaze i piruvat dehidrogenaze (Bianchi i sar., 2001).

Sojevi *Kluyveromyces lactis* i *Kluyveromyces marxianus* su najviše genski modifikovani za proizvodnju mlečne kiseline (Litchfield, 2009). Genski modifikovan *K. Lactis* bez gena za aktivnost piruvat dekarboksilaze i piruvat dehidrogenaze, daje visok prinos mlečne kiseline od 0,85 g/g glukoze (Bianchi i sar., 2001).

Tokuhiro i saradnici (2009) su ostvarili prinos mlečne kiseline od 0,75 g/g glukoze uz umereno mešanje (200 o/min) sa genski modifikovanim sojem *Saccharomyces cerevisiae* u kom je inaktiviran gen za aktivnost piruvat dekarboksilaze i alkohol dehidrogenaze.

Sve više se vrše istraživanja u cilju dobijanja genski izmenjenih mikroorganizama čime bi se povećala optička čistoća dobijene mlečne kiseline, smanjili nutritivni zahtevi, povećao prinos i zapreminska produktivnost i proširio broj mogućih podloga. Početni pokušaji genske manipulacije su bili uglavnom orjentisani na poboljšanje BMK na tradicionalne načine, koji su uključivali izlaganje bakterija mutagenima kao što su etil-metil-sulfonat, *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin i ultravioletno zračenje (UV zračenje). S druge strane, u poslednjih nekoliko decenija razvijene su efikasnije genske metode za nekoliko mikroorganizama. Izmena metaboličkih puteva je važna metoda za industrijsku biotehnologiju. Manipulacijom funkcija enzima, menja se metabolizam, izmenom „*in vivo*“ ćelijskih proteina i reguliše ekspresija gena u nekoliko domaćina kao što su *Saccharomyces cerevisiae*, *E. coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *R. oryzae*, i *Lactococcus lactis* (Bron i sar., 2011, Shinkawa i sar., 2011; Wang i sar., 2015).

2.6.3. Mlečno-kisela fermentacija

Mlečna kiselina može nastati fermentacijom šećera, hidrolizata koji sadrže šećere ili fermentacijom u kojoj su u jednom koraku objedinjeni i hidroliza skrobnih ili lignoceluloznih sirovina i fermentacija, pri čemu hidrolizu mogu da vrše sami mikroorganizmi koji proizvode mlečnu kiselinu ili se pre fermentacije sa inokulumom dodaju potrebni enzimi (John i sar., 2009). Uopšteno, hidrolizati šećera se češće koriste od čistih šećera jer su jeftiniji i to u submerznim ili „solid-state“ fermentacijama (John i sar., 2006a,b,c). Izbor procesa fermentacije zavisi od tipa i prirode podloge, rasta mikroorganizma i reoloških osobina podloge za fermentaciju.

Fermentacijom šećera koje proizvodni mikroorganizmi mogu direktno da asimiluju ekonomski neisplative sve više se vrše istraživanja vezana za upotrebu jeftinijih alternativa. Najčešće jeftinije sirovine koje su sporedni proizvodi različitih industrija većina proizvodnih mikroorganizama ne može direktno da metaboliše do mlečne kiseline i zbog toga je neophodan određen predtretman. Postoji više načina kojima se može voditi diskontinualni postupak proizvodnje mlečne kiseline i njih čine odvojena hidroliza i fermentacija, hidroliza i fermentacija objedinjene u jednom koraku, fermentacija sa upotrebom mešanih kultura

mikoorganizama i fermentacija nesterilne podloge. U fermentaciji sa mešanim kulturama i fermentaciji nesterilne podloge su hidroliza i fermentacija objedinjene u jednom koraku. U diskontinualnom postupku u kome se pre fermentacije vrši hidroliza podloge u cilju dobijanja šećera, sam postupak hidrolize se može vršiti upotrebom enzima i/ili kiselina. Prednost procesa u kome su hidroliza i fermentacija odvojeni koraci je u činjenici da se svaki faza vodi pod optimalnim uslovima. Međutim, osnovni nedostatak je inhibicija enzima nastalim proizvodima hidrolize (glukoza, ksiloza, celobioza i drugi oligosaharidi) zbog čega se moraju koristiti manje količine sirovine za hidrolizu i velike koncentracije enzima da bi se ostvarile visoke koncentracije šećera (Abdel-Rahman i sar., 2011).

U istraživanju u kome je razgradnja skroba vršena hidrolizom kiselinama i enzimima, obe hidrolize su bile veoma efikasne, uzimajući u obzir stepen hidrolize, vreme i cenu utrošenih hemikalija i energije. Iako je hidroliza kiselinama jeftinija i traje kraće, potreban je dodatan korak neutralizacije nakon hidrolize pri čemu dolazi do nepotrebnog povećanja sadržaja soli u podlozi što može uticati negativno na rast proizvodnog mikroorganizma i proizvodnju mlečne kiseline. Enzimskom hidrolizom se ostvaruje viši prinos redukujućih šećera ali cena enzima i energije potrebne za duži proces saharifikacije povećavaju troškove (Woiciechowski i sar., 2002). Takođe predtretman skrobnih sirovina uključuje klajsterizaciju i likvefakciju skroba (temperature postupaka zavise od vrste sirovine) nakon čega sledi enzimska hidroliza (saharifikacija) u cilju dobijanja glukoze (John i sar., 2009).

Hidroliza lignoceluloznih materijala takođe može da se vrši dodatkom kiselina ili enzima, pri čemu treba imati u vidu da se dodatkom kiselina hidrolizuje većim delom hemicelulozna frakcija sastavljena iz ksiloze i arabinoze dok se manjim delom hidrolizuje celuloza. Hemicelulozni hidrolizat dobijen delovanjem kiseline se izdvaja i koristi u proizvodnji ksilitola i mlečne kiseline, dok se lignocelulozni ostatak podvrgava delovanju baze pri čemu dolazi do izdvajanja celuloze od ligninskog ostatka (koji se koristi za dobijanje visoko vrednih proizvoda (fenolnih jedinjenja) i aktivnog uglja). Celuloza se na kraju razgrađuje celulolitičkim enzimima u cilju dobijanja celobioze i glukoze za mlečno-kiselu fermentaciju (Mussatto i Roberto, 2005; Mussatto i sar., 2005, 2006a,b, 2013).

Postupkom sa istovremenom saharifikacijom i fermentacijom (ISF) smanjenja se energija potrebna za likvefakciju i saharifikaciju i samim tim se pojeftinjuje proces i štedi energija tokom proizvodnje mlečne kiseline (Woiciechowski i sar., 2002). Postupak sa istovremenom saharifikacijom i fermentacijom se može podeliti na tri metoda a to su: 1. Upotreba sojeva plesni kao što su *Rhizopus oryzae* i *Rhizopus arrhizus* koje mogu direktno da metaoblišu skrob u mlečnu kiselinu pomoću sopstvenog amilolitičkog kompleksa; 2. Upotreba amilolitičkih sojeva BMK (kao što su *L. manihotivorans*, *L. amylovorans*, *L. amylophilus*, *L. fermentum* Ogi E1 i drugi) koje mogu direktno da metaoblišu skrob u mlečnu kiselinu pomoću sopstvenog amilolitičkog kompleksa; 3. Istovremeni tretman supstrata (skrobne i lignocelulozne sirovine) enzimima (amilolitičkim i celulolitičkim) i inokulacija željenim proizvodnim mikroorganizmom (John i sar., 2009). U ISF se u podlogu zajedno sa inokulumom umesto enzima mogu dodati bakterije i plesni koje će metabolisati supstrat. Kombinacija amilolitičke plesni kao što je *Aspergillus awamori* i BMK *Streptococcus lactis* se može koristiti za proizvodnju mlečne kiseline u ISF (Kurusava i sar., 1988).

Nedostatak ISF je u činjenici da se optimalni opseg temperature i pH vrednosti za saharifikaciju i fermentaciju razlikuju i da dolazi do delimične inhibicije enzima nastalom mlečnom kiselinom (Huang i sar., 2005). Optimalni opseg temperature i pH vrednosti za hidrolizu (enzimsku likvefakciju i saharifikaciju) je 40–90°C (zavisno od enzima, 80–90°C α -amilaza, glukoamilaza 50–60°C, celulaza 40–50°C) i pH 4–5,5, dok je optimalni opseg temperature i pH vrednosti fermentacije 37–43°C i pH 5,5–7,0 (Hofvendahl i Nahn-Hägerdal, 2000).

Upotrebom termotolerantnog soja *Bacillus coagulans* Ou i saradnici (2009, 2011) su postigli visoke koncentracije mlečne kiseline na kristalnoj celulozi u ISF. Iyer i Lee (1999) su uspitivali uticaj nastale mlečne kiseline na enzimsku hidrolizu celuloze u ISF i utvrdili da se razgradnja celuloze smanjila sa 79% na 56% sa povećanjem koncentracije mlečne kiseline sa 0 na 90 g/l, dok je na koncentracijama višim od 90 g/l došlo do razgradnje celuloze od 50%. Međutim, inhibicija enzimske hidrolize mlečnom kiselinom je mnogo manja nego inhibicija nastalom glukozom (Iyer i Lee, 1999). Linko i Javanainen (1996) su na podlozi sa skrobom sa *L. casei* ostvarili najveće prinose mlečne kiseline 69, 71 i 69% (100, 150 i 170 g/l skroba) nakon 24 sata fermentacije na 60°C.

Na rezancima manioke u ISF nakon 60 sati fermentacije sa *L. casei* NCIMB 3254 ostvarena je koncentracija mlečne kiseline od 83,8 g/l sa zapreminskom produktivnošću od 1,40 g/l·h⁻¹, dok je sa *L. delbrueckii* NCIM 2025 ostvarena koncentracija mlečne kiseline 81,9 g/l sa zapreminskom produktivnošću od 1,36 g/l·h⁻¹ (John i sar., 2006a).

U ISF u kojima se koriste lignocelulozni materijali kao sirovina, koriste se enzimi celulaza i celobioza koji se sastoje iz nekoliko enzima. Za saharifikaciju se mogu koristiti enzimski ekstrakti dobijeni kultivacijom plesni iz rodova *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Melanocarpus*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, bakterija iz rodova *Acidothermus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Rhodothermis*, *Cellulomonas*, *Streptomyces* i *Thermonospora* (Sukumaran i sar., 2005). Saharifikaciju se može izvesti kiselinama, dok se lignin može ukloniti bazama. Neke od lignoceluloznih sirovina ispitivane kao podloga za proizvodnju mlečne kiseline su pšenične mekinje, pirinčana slama, kukuruzni klipovi bez zrna, drvo, rezanci šećerne trske, otpadni papir i karton.

Adsul i saradnici (2007) su ispitivali mogućnost upotrebe rezanaca šećerne trske u proizvodnji mlečne kiseline sa *L. delbrueckii* mutant Uc-3 (fermentacija na 42°C, 150 o/min i pH 6,5 u trajanju od 72). U sterilisane rezance šećerne trske dodat je sirovi preparat enzima celulaze (dobijen iz mikroorganizma *Penicillium janthinellum* mutant EU1 u količini od 10 FPU/g podloge) nakon čega je podloga inokulisana (5% v/v). Ostvareni su koncentracija, zapreminska produktivnost i prinos mlečne kiseline od 67 g/l, 0,93 g/l·h⁻¹ i 0,83 g/g.

Rivas i saradnici (2004a) su ispitivali mogućnost primene kukuruznih klipova i vode od namakanja kukuruza i ćelija kvasca (*D. hansenii*) u proizvodnji mlečne kiseline sa *L. rhamnosus* CECT-288. Kukuruzni klipovi su pre fermentacije usitnjeni i termički tretirani na 202°C. Za razgranju je korišćen enzimski preparat celulaze, Celluclast (Novo Nordisk Bioindustrial, Madrid, Španija). Optimalni uslovi za gotovo kompletnu konverziju celuloze u mlečnu kiselinu su bili: temperatura: 45°C; vreme reakcije: 122 sati; koncentracija ćelija *D. hansenii*: 5–20 g/l; koncentracija vode od namakanja kukuruza 10 g/l; količina enzima: 35-55 FPU/g; odnos tečne preme čvrstoj fazi: 8,4–10 g/g.

Takođe je za povećanje prinosa i zapreminske produktivnosti i samim tim i bolje iskorišćenje podloge ispitivana upotreba mešanih kultura. Cui i saradnici (2011) su sa mešanom kulturom *L. rhamnosus* i *L. brevis* na kukuruznim klipovima u ISF (dodatkom celulaze 25 FPU/g glukana) ostvarili iskorišćenje heksoza i pentoza i dobili prinos mlečne kiseline od 70% uz povećanje prinosa od 18,6 odnosno 29,6% u poređenju sa fermentacijom pojedinačnih kultura, *L. rhamnosus* i *L. brevis*.

John i saradnici (2006b) su ispitivali mogućnost objedinjavanja saharifikacije i fermentacije pšeničnih mekinja i primene u proizvodnji mlečne kiseline sa mešanom kulturom *L. casei* i *L. delbrueckii* (1:1). Pored toga, u radu je ispitana mogućnost zamene ili smanjenje količine skupog ekstrakta kvasca jeftinijom sirovinom. Pre dodatka amilolitičkih enzima pšenične mekinje su hidrolizovane neutralnom peptidazom. Nakon optimizacije procesa ostvarena je koncentracija mlečne kiseline od 123 g/l uz zapreminsku produktivnost od 2,3 g/l·h⁻¹ i prinos od 0,95 g mlečne kiseline/g skroba nakon 54 sata fermentacije pri 37°C (John i sar., 2006b).

Danas veliki izazov predstavlja izdvajanje i selekcija sojeva BMK koji imaju sposobnost da fermentišu šećere (pentoza i heksoza) i koji su otporni na inhibiciju mlečnom kiselinom i jedinjenjima nastalim tokom hidrolize, predtretmana i sterilizacije (Okano i sar., 2010).

2.6.4. Primena novih tehnologija za dobijanje mlečne kiseline

Utvrđeno je da je za isplativu proizvodnju mlečne kiseline potrebno ostvariti minimalan prinos mlečne kiseline od 90% (Litchfield, 2009). Izvori ugljenika (koncentracija preko 70 g/l) i manjim delom nastala mlečne kiseline mogu imati inhibitoran efekat na proizvodni mikroorganizam, čime se produženje lag faze ili čak autolizu ćelija (Djukić-Vuković i sar., 2013a). Kako bi se smanjio ili izbegao inhibitoran efekat sastava podloge i mlečne kiseline i povećala proizvodnja i zapreminska produktivnost mlečne kiseline mogu se primeniti drugi postupci fermentacije kao što su dolivni postupak fermentacije, uzastopne šaržne fermentacije i kontinualna fermentacija bez i sa recirkulacijom ćelija.

Dolivnim postupkom fermentacije se koncentracija nutritijenata održava u optimalnom opsegu stalnim ili periodičnim dodatkom sveže podloge bez izdvajanja dela podloge. Međutim, u cilju maksimalnog iskorišćenja procesa treba uzeti u obzir vreme i način doziranja sveže podloge, broj dolivanja i koncentraciju nutritijenata u podlozi. Takođe, povećanje koncentracije mlečne kiseline može imati inhibitoran efekat na proizvodni mikroorganizam, jer se deo podloge ne izdvaja iz fermentora (Ding i Tan, 2006). Optimizaciju procesa otežava veliki broj faktora koji imaju značajan uticaj na efikasnost procesa. Uobičajeni načini dolivanja podloge su periodično, kontinualno i eksponencijalno, pri čemu se koncentracija određenog nutritijenata (najčešće izvora ugljenika) i/ili pH vrednost mogu održavati u određenom uskom opsegu ili se dodatak vrši kada vrednosti opadnu do određene granice (Abdel-Rahman i sar., 2013).

Ding i Tan (2006) su primenili nekoliko načina za dodatak svežih nutritijenata u dolivnom postupku proizvodnje mlečne kiseline sa *Lb. casei* LA-04-1, pri čemu je upotrebom eksponencijalnog dodatka nutritijenata (glukoze (850 g/l) i ekstrakta kvasca (1%)) ostvarena koncentracija mlečne kiseline od 180 g/l sa zapreminskom produktivnošću od $2,14 \text{ g/l}\cdot\text{h}^{-1}$, što je predstavljalo povećanje od 56,5 i 59,7%, u poređenju sa šaržnim postupkom.

Li i saradnici (2010) su u postupku kontrole koncentracije glukoze u dolivnoj fermentaciji sa *Lb. rhamnosus* LA-04-1 ostvarili koncentraciju mlečne kiseline od 170 g/l uz zapreminsku produktivnost od $2,70 \text{ g/l}\cdot\text{h}^{-1}$, što je bilo značajno povećanje u odnosu na šaržnu fermentaciju (90 g/l) i periodično (130 g/l) i kontinualno dodavanje (135 g/l) rastvora glukoze.

Romaní i saradnici (2008) su postigli koncentraciju mlečne kiseline od 37,8 g po 100g celulozne pulpe (*Eucalyptus globulus*) uz zapreminsku produktivnost od $0,87 \text{ g/l}\cdot\text{h}^{-1}$ sa *Lb. rhamnosus* CECT-288 u dolivnom postupku fermentacije sa istovremenom saharifikacijom (upotrebom celulaze (12,5 FPU/g čvste materije) i celobiazе (13 IU („International units“) β -glukozidaze/FPU)).

Takođe upotrebom mešane kulture soja *Aspergillus niger* SL-09 (kao proizvođača inulinaze i invertaze) i soja *Lactobacillus* sp. G-02 (proizvođača mlečne kiseline) u dolivnom postupku fermentacije sa istovremenom saharifikacijom i fermentacijom na brašnu Jerusalimske artičoke, Ge i saradnici (2009) su ostvarili prinos L-(+)-mlečne kiseline od 94,5% uz koncentraciju mlečne kiseline i zapreminsku produktivnost od $120,5 \text{ g/l}$ i $3,6 \text{ g/l}\cdot\text{h}^{-1}$. Upotrebom mešane kulture povećana je i sinteza enzima za oko 5 puta.

Kim i saradnici (2010) su za mlečno-kiselu fermentaciju sa *L. brevis* u ISF koristili MRS bujon sa dodatkom predtretirane pirinčane slame (100 g suve materije/l predtretirane pirinčane slame), celulaze (10 FPU/g podloge) i celobiazе (10 CBU („Cellobiose units“)/g podloge). Fermentacija i saharifikacija su vođene na 37°C na početnoj vrednosti pH od 6.

Tokom 34 sata fermentacije dobijene koncentracije mlečne i sirćetne kiseline i etanola su iznosile 12,6 g/l, 4,8 g/l i 4,0 g/l.

Uzastopne šaržne fermentacije uključuju upotrebu dela ili celukupne količine proizvodnog mikroorganizma iz prethodne fermentacije u novoj fermentaciji (Zhao i sar., 2010). Za izdvajanje proizvodnog mikroorganizma se koriste različite metode. Za bakterije to su centrifugiranje, membranska filtracija ili odlivanje dela profermentisane podloge dok se za plesni koriste filtracija ili taloženje micelijuma. U poređenju sa šaržnim i dolivnim postupkom fermentacije uzastopne šaržne fermentacije imaju prednosti u pogledu povećanja prinosa, uštede vremena i izostavljanje umnožavanja proizvodnog mikroorganizma, postizanje visoke koncentracije ćelija i zapreminske produktivnostie i skraćenje trajanja fermentacije zbog visoke koncentracije ćelija na početku fermentacije (Naritomi i sar., 2002).

Zhao i saradnici (2010) su u postuku sa uzastopnim šaržnim fermentacijama (9) sa *Bacillus* sp. soj 2-6 na nesterilnoj podlozi (130 g/l glukoze i različite koncentracije ekstrakta kvasca) ostvarili maksimalnu koncentraciju L-(+)-mlečne kiseline od 107 g/l (8. fermentacija, 20 g/l ekstrakta kvasca) i optičku čistoću od 99,8%.

Kim i saradnici (2006) su sa *Lactobacillus* sp. RKY2 u uzastopnim šaržnim fermentacijama ostvarili zapreminsku produktivnost od 6,34 g/l·h⁻¹ na surutki što je iznosilo povećanje od 6,2 puta u poređenju sa šaržnom fermentacijom.

Ispitivana je upotreba upotreba hidrolizata drveta (hrasta) i vode od namakanja kukuruza u šaržnim i uzastopnim šaržnim fermentacijama sa *Enterococcus faecalis* RKY1 (Wee i sar., 2006). Komadići drveta su predtretirani sa sumpornom kiselinom i parom na 215°C u trajanju od 5 minuta, nakon čega je izvršena enzimaska hidroliza (Celluclast 1.5L (20 IU/g) i Novozym 188 (30 IU/g) čvrstog ostataka na 50°C u trajanju od 2 dana. Podloge za fermentaciju su sadržale hidrolizat drveta (u količini koja je sadržala 50 g glukoze/l), ekstrakt kvasca (1,5 g/l) i vodu od namakanja kukuruza (15 g/l). Tokom fermentacija ostvarena je najveća zapreminska produktivnost od 4 g/l·h⁻¹ dok je prinos mlečne kiseline u svim fermentacijama bio preko 92%.

2.6.5. Mlečno-kisela fermentacija sa imobilisanim ćelijama

Imobilizacija ćelija se pokazala kao jedna od najboljih metoda za povećanje koncentracije ćelija proizvodnog mikroorganizma i postizanje visokih zapreminskih produktivnosti mlečne kiseline. Imobilizacijom se povećava stabilnost procesa a smanjuje potreba za izvorom azota, ali i pojednostavljuje postupak nakon fermentacije i izdvajanje mlečne kiseline i smanjuje rizik od kontaminacije (Krasaekoopt i sar., 2003; Panesar i sar., 2007). Imobilisane ćelije se mogu koristiti u više uzastopnih šaržnih fermentacija ili u kontinualnoj fermentaciji, čime se postiže smanjenje troškova proizvodnje mlečne kiseline. Upotrebom imobilisanih ćelija mogu se koristiti brzine razblaživanja veće od brzine rasta ćelija a da se pri tome izbegne ispiranje ćelija iz fermentora .

Tehnike imobilizacije ćelija uključuju: fizičko vezivanje unutar poroznih matriksa, enkapsulaciju, adsorpciju ili vezivanje za prethodno formirane nosače i unakrsno vezivanje (isprepletano vezivanje) (Rashid, 2008).

Sintetički polimeri koji se koriste u imobilizaciji su: poliakrilamid, polivinilhlorid, fotoaktivne čestice i poliuretani. Od prirodnih polimera najčešće se koriste polisaharidi kao što su: kalcijum-alginat, κ-karagenan i agar (Smidsrød i Skjåk-Bræk, 1990).

Imobilisane ćelije se mogu primeniti u čitavom nizu višestepenih enzimskih reakcija. Danas se sa imobilisanim ćelijama proizvode alkoholi (etanol, butanol, izopropanol i drugi), organske kiseline, aminokiseline, antibiotici, steroidi i enzimi (Rashid, 2008).

Djukić-Vuković i saradnici (2013b) su ispitali mogućnost upotrebe ćelija *L. rhamnosus* ATCC 7469 imobilisanih na zeolitu u više uzastopnih mlečno-kiselih fermentacija na bistroj džibri. Imobilisane ćelije su korišćene u četiri uzastopne šaržne mlečno-kisele fermentacije pri čemu su ostvareni koncentracija, prinos i zapreminska produktivnost mlečne kiseline od 42,19 g/l, 96% i 1,69 g/l·h⁻¹. Djukić-Vuković i saradnici (2015) su ispitali mogućnost upotrebe ćelija *L. rhamnosus* ATCC 7469 imobilisanih na modifikovanom zeolitu (magnezijum-zeolitu) u više uzastopnih mlečno-kiselih fermentacija na bistroj džibri. Imobilisane ćelije su korišćene u četiri uzastopne šaržne mlečno-kisele fermentacije pri čemu su ostvareni koncentracija, prinos i zapreminska produktivnos mlečne kiseline od 43,13 g/l, 99% i 1,80 g/l·h⁻¹. Zamena jona natrijuma jonima magnezijuma u strukturi zeolita je imala pozitivan efekat na mlečno-kiselu fermentaciju.

Ispitivana je mogućnost upotrebe nekoliko vrsta nosača za imobilizaciju ćelija *Lactobacillus casei* subsp. *casei*. u proizvodnji mlečne kiseline na semi-sintetskoj podlozi (glukoza, surutka, voda od namakanja kukuruza i soli) (Mirdamadi i sar., 2008). Kao nosači su korišćeni barijum-alginat, agar i kocke od poliuretanske pene. Prilikom upotrebe poliuretanske pene nisu postignuti bolji prinos i zapreminska produktivnost mlečne kiseline u poređenju sa mlečno-kiselom fermentacijom sa slobodnim ćelijama. Zapreminska produktivnost ostvarena sa barijum-alginatom (0,625 g/l·h⁻¹) je bila za 68% veća od zapreminske produktivnosti ostvarene sa slobodnim ćelijama, dok je zapreminska produktivnost ostvarena sa agarom (0,425 g/l·h⁻¹) bila za 13% veća od zapreminske produktivnosti ostvarene sa slobodnim ćelijama (0,375 g/l·h⁻¹). Najveća koncentracija mlečne kiseline od 60 g/l je ostvarena sa ćelijama imobilisanim u barijum-alginatu.

Kazemi i saradnici (2001) su ispitivali mogućnost proizvodnje mlečne kiseline sa imobilisanim ćelijama *Lactobacillus casei* na surutki iz koje su uklonjeni proteini (sa 12 g/l laktoze i sa dodatkom ekstrakta kvasca i mangan-sulfata) u šaržnoj i kontinualnoj mlečno-kiseloj fermentaciji. Kao nosači ispitivani su komadići drveta, komadići cigle, porozno staklo i ljske jaja. Nakon inicijalnog ispitivanja količina adsorbovanih ćelija na pojedinačne nosače, utvrđeno je da su komadići drveta najpogodniji za dalja istraživanja. Tokom kontinualne fermentacije ostvaren je prosečan prinos mlečne kiseline od 73% (nakon 5 dana), dok je kod šaržne fermentacije Najveći prinos mlečne kiseline iznosio 77% (nakon 5 dana).

Spora *Bacillus coagulans* imobilisane u gelu polivinilalkohola (PVA) poznatom kao „LentiKats“ su ispitivane u mlečno-kiseloj fermentaciji podloge koja nije sterilisana (pre inokulacije je zagrejana na 60°C) i koja je sadržala glukoza (80 g/l) i nutritijente (ekstrakt kvasca, diamonijum-fosfat, magnezijum-sulfat heptahidrat, mangan-sulfat tetrahidrat, gvožđe(II)-sulfat heptahidrat) (Rosenberg i sar., 2005). Sa imobilisanim ćelijama ostvarena je zapreminska produktivnost mlečne kiseline od 7,4 g/l·h⁻¹, što je bilo povećanje od 100% u poređenju sa fermentacijom sa slobodnim ćelijama.

Imobilizacija u kalcijum-alginatu

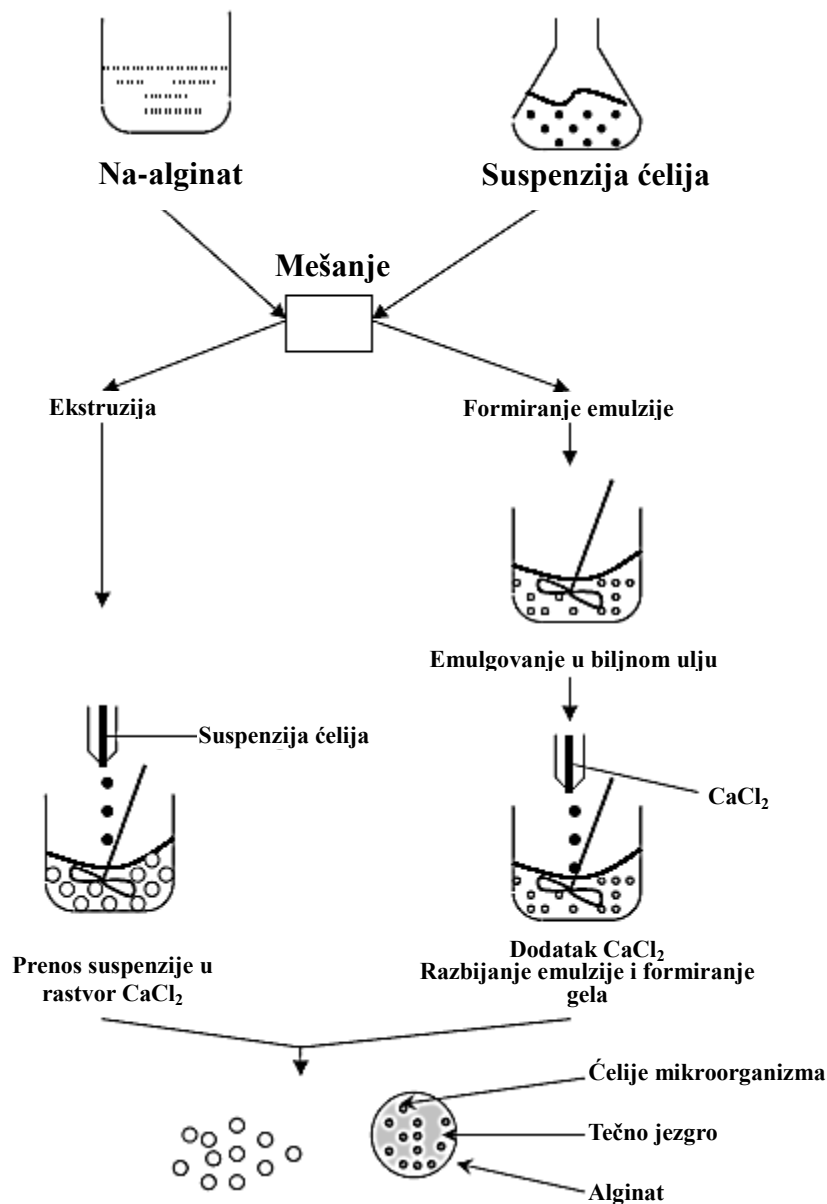
Alginat je polisahard dobijen iz morske trave i sastoji se iz (1,4)-linearno povezanih kopolimera α-D-manuronske kiseline (M bloka) i β-L-guluronske kiseline (G bloka). Može formirati termostabilne i biokompatibilne hidrokolojne gelove u obliku perli u prisustvu jona kalcijuma. Kalcijum-alginat ima široku primenu u imobilizaciji ćelija mikroorganizama, enzima, hormona, lekova, ulja, biljnih ekstrakata i aroma. Veliki broj istraživanja pokazao je da uspešna upotreba perli kalcijum-alginata zavisi od karakteristika perli kao što su veličina, distribucija veličine i oblik perli, maseni transport kroz perle, sposobnost bubrenja, rastvorljivost, morfologija površine perli i mehanička i hemijska stabilnost (Lee i sar, 2013).

Veličina perli kontroliše brzinu difuzije podloge i proizvoda tako da se sa perlama manjih dimenzija postižu visoki prinosi i produktivnosti jer se otežana difuzija javlja kod perli većih

dimenzija (prečnika preko 3mm). Sferičnost perli kalcijum-alginata ima veoma značajan uticaj na mehaničku i hemijsku stabilnost. Perle nepravilnog oblika (oblik suze i jajeta) imaju slabije mehaničke karakteristike od perli pravilnog sfernog oblika. Perle sa jasno definisanom veličinom i oblikom omogućavaju jednostavno ponavljanje procesa i kontrolu oslobađanja sadržaja. Tehnike koje se najčešće koriste u imobilizaciji mikroorganizama u hidrokolooidnim perlama su ekstruzija kroz uzanu cev i formiranje emulzija. Obe tehnike omogućavaju preživljavanje ćelija od 80-95% (Krasaekoopt i sar., 2003).

Tehike za imobilizaciju u kalcijum-alginatu su prikazane na slici 17. Ekstruzija se najčešće koristi u proizvodnji perli i sastoji se od pripreme hidrokolooidnog rastvora natrijum-alginata u koji se dodaje suspenzija ćelija nakon čega se dobijena suspenzija ćelija i gela alginata istiskuje kroz iglu malog prečnika i putem slobodnog pada prebacuje u rastvor za formiranje perli (najčešće kalcijum-hlorid). Veličina i oblik perli zavisi od unutrašnjeg prečnika igle ekstrudera, rastojanja vrha igle i rastvora za očvršćavanje, tj. dužine slobodnog pada, koncentracije suspenzije natrijum-alginata i ćelija i koncentracije rastvora kalcijum-hlorida. Ova metoda je jednostavna, jeftina i blaga prema ćelijama mikroorganizma, ali treba naglasiti da aseptični uslovi čine proces složenijim. Divalentni joni kalcijuma su najbolji za polimerizaciju L-guluronske kiseline, dok od dužine polimera D-manuronske kiseline zavisi struktura nastale perle (Krasaekoopt i sar., 2003). Pri kontaktu kapi suspenzije i kalcijum-hlorida dolazi do momentalnog formiranja perli, usled izraženog afiniteta lanaca alginata ka jonima kalcijuma i zadržavanja ćelija mikroorganizma unutar trodimenzionalne sfere, isprepletanih lanaca kalcijum-alginata (Smidsrød i Skjåk-Bræk, 1990).

U proizvodnji mlečne kiseline za postizanje najvećih prinosa i zapreminskih produktivnosti mlečne kiseline korišćene su perle kalcijum-alginata prečnika od 2 do 3 mm uz upotrebu 2% rastvora natrijum-alginata. Vreme očvršćavanja u rastvoru kalcijum-hlorida je od 30 minuta do 2 sata na sobnoj temperaturi uz upotrebu rastvora kalcijum-hlorida koncentracije od 0,05 do 0,5 M (Göksungur i Güvenç, 1999; Shen i Xia, 2006; Mirdamadi i sar. 2008). Upotreba gela natrijum-alginata koncentracije niže od 2% ima za posledicu nastajanje perli slabe strukture i nesimetričnog oblika, dok koncentracije iznad 2% otežavaju difuziju materije kroz nastale perle.



Slika 17. Tehnike za imobilizaciju u alginatu (Krasaekoopt i sar., 2003)

Stvaranje perli kalcijum-alginata pomoću emulzija predstavlja postupak dodatka malih zapremina suspenzije ćelija i polimera (diskontinualna faza) u velike zapremine biljnog ulja (kontinualna faza) kao što su sojino, suncokretovo ili kukuruzno ulje i ulje uljane repice. Smeša se homogenizuje kako bi se stvorila emulzija vode u ulju, nakon čega se u cilju formiranja perli dodaje so, najčešće kalcijum-hlorid u obliku kapi usled čega dolazi do stvaranja sitnih perli unutar ulja. Što su manje čestice suspenzije to su manje nastale perle gela. Veličina perli se kontroliše brzinom mešanja smeše i može se biti između 25 μ m do 2mm (Krasaekoopt i sar., 2003).

2.6.6. Izdvajanje mlečne kiseline nakon fermentacije

Faze izdvajanja i prečišćavanja nastale mlečne kiseline čine najskuplju fazu proizvodnje, jer se u ovim fazama troše skupe hemikalije i troškovi čine 50% ukupnih troškova

proizvodnje uz nastajanje velikih količina gipsa u klasičnom postupku izdvajanja i prečišćavanja (Abdel-Rahman i sar., 2013).

U zavisnosti od stepena čistoće nakon izdvajanja postoji: tehnička mlečna kiselina, mlečna kiselina za proizvodnju hrane, mlečna kiselina farmaceutske čistoće i najčistija termostabilna mlečna kiselina. U klasičnom procesu proizvodnje mlečne kiseline nastaju značajne količine gipsa, veoma štetnog za okolinu. Procenjuje se da za svaku dobijenu tonu mlečne kiseline nastane tona gipsa (Djukić-Vuković i sar., 2011). Tokom procesa fermentacije nastaju soli laktata, kao posledica korekcije pH vrednosti (dodatkom različitih baza), koje se moraju istaložiti dodatkom neorganskih kiselina, najčešće sumpornom kiselinom. Sadržaj fermentora se zakišeljava sumpornom kiselinom (78%) i izdvaja se kalcijum-sulfat, a mlečna kiselina se izdvaja kao slobodna. Proces se mora voditi pažljivo, jer će sumporna kiselina u višku razgraditi mlečnu kiselinu. Nakon toga sledi filtracija, jer se u filtratu nalazi sva mlečna kiselina. Filtrat se pod slabim vakuumom uparava. Uparavanjem se uklone sirćetna, propionska i druge kiseline, tako da u filtratu zaostaje samo mlečna kiselina. Obojene materije (jedinjenja gvožđa i bakra koje ostaju u podlozi nakon pripreme) se adsorbuju na aktivnom uglju i uklanjaju filtracijom. Preostale soli se uklanjaju propuštanjem kroz jonoizmenjivače, tako da se na kraju dobija relativno koncentrovan rastvor (80%) dobro prečišćene mlečne kiseline. Ako se želi nastaviti dalje sa prečišćavanjem, mlečna kiselina se može tretirati sa permanganatom ili vodonik-peroksidom (kako bi se uklonili strani mirisi i ukusi). Danas se izdvajanje mlečne kiseline može vršiti i dodatkom etanola, pri čemu nastaje estar mlečne kiseline etil-laktat koji se izdvaja iz podloge destilacijom i nakon toga hidrolizuje (Pejin, 2003).

U novije vreme se za izdvajanje mlečne kiseline koristi natrijum-hidroksid, umesto kalcijum-hidroksida, jer se u određenim fermentacija koristi za kontrolu pH, pa se već nalazi u podlozi. Dodatkom natrijum-hidroksida nastaje natrijum-laktat. Dodatkom koncentrovane sumporne kiseline izdvaja se natrijum-sulfat, a nastala mlečna kiselina se nalazi u podlozi (Mussatto i sar., 2013). Postoji nekoliko metoda koje se primenjuju u izdvajanju mlečne kiseline bez taloženja i čine ih difuziona dijaliza, ekstrakcija rastvaračima, direktna destilacija, adsorpcija, upotreba hromatografskih metoda, ultrafiltracija, mikorfiltracija, nanofiltracija, reverzna osmoza, sušenje i elektrodijaliza upotrebom bipolarnih membrana (Abdel-Rahman i sar., 2013; Ghaffar i sar., 2014).

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Materijal

3.1.1. Mikoorganizmi

Lactobacillus fermentum PL-1 i *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 (Kolekcija Katedre za biohemijско inženjerstvo i biotehnologiju Tehnološko-metarulškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu).

3.1.2. Materijal

Pivski trop korišćen u radu je dobijen proizvodnjom sladovine za svetlo pivo. Trop je sušen u trajanju od 12 sati na temperaturi od 40°C.

Na-alginat (Sigma-Aldrich[®], Nemačka)

Parafilm[®] M, BRAND GmbH & Co KG, Nemačka

Pivski kvasac (Hemijski sastav pivskog kvasca korišćenog u analizama je prikazan u tabeli 6), BIP, Beograd, Srbija

Koncentrovana sladovina, dobijena u laboratorijskim uslovima standardnom „Kongresnom“ metodom po MEBAK-u (MEBAK, 2013) pri čemu je umesto 50 g slada korišćeno 100 g.

Džibra iz proizvodnje bioetanola, Reahem, Srbobran, Srbija

Ekstrakt Kvasca, Hi-Media, Mumbaj, Indija

De Man, Rogosa, Sharp (MRS) bujon (pepton 10 g/l, ekstrakt govedine 10 g/l, ekstrakt kvasca 5 g/l, glukoza 20 g/l, Polisorbat 80, 1 g/l; amonijum-citrat, 2 g/l, natrijum-acetat 5 g/l, magnezijum-sulfat 0,1 g/l, mangan-sulfat 0,05 g/l i dikalijum-hidrogenfosfat 2 g/l) Hi-Media, Mumbaj, Indija

Agar, Torlak, Beograd, Srbija

Tabela 6. Hemijski sastav pivskog kvasca

Parametri	Saržaj
Proteini	minimum 45 g/100g
Ugljeni hidrati	27,56 g/100g
Minerali	maximum 11 g/100g
Lipidi	3,0 g/100g
Vitamin B1	7,0 mg/100g
Vitamin B2	1,1 mg/100g
Vitamin B6	1,1 mg/100g
Vitamin B3	41 mg/100g
Fosfor	1610 mg/100g
Magnezijum	300 mg/100g

3.1.3. Hemikalije p.a. čistoće

3,5-dinitrosalicilna kiselina (C₇H₄N₂O₇), Lach-Ner, Neratovice, Češka Republika

Natrijum-sulfit (Na₂SO₃), Lach-Ner, Neratovice, Češka Republika

Natrijum-hlorid (NaCl), Centrohem, Beograd, Republika Srbija
 Kalcijum-hlorid (CaCl₂), Centrohem, Beograd, Republika Srbija
 Kalijum-natrijum tartarat (KNaC₄H₄O₆·x4H₂O), Lach-Ner, Neratovice, Češka Republika
 Kalijum-heksacijanoferat(II) (K₄[Fe(CN)₆]·x3H₂O), Centrohem, Beograd, Republika Srbija
 Sirćetna kiselina (CH₃COOH), Centrohem, Beograd, Republika Srbija
 Azotna kiselina (HNO₃), Centrohem, Beograd, Republika Srbija
 Pentan-1-ol (C₅H₁₁OH), Centrohem, Beograd, Republika Srbija
 Natrijum-hidroksida (NaOH), Centrohem, Beograd, Republika Srbija
 Cink-sulfat heptahidrat (ZnSO₄·7H₂O), Lach-Ner, Neratovice, Češka Republika
 Magnezijum-sulfat (MgSO₄), Lach-Ner, Neratovice, Češka Republika
 Natrijum-acetat (CH₃COONa·3H₂O), Eurohemija, Beograd, Srbija,
 Sumporna kiselina (H₂SO₄), Centrohem, Beograd, Republika Srbija
 Natrijum-hidroksid (NaOH), Centrohem, Beograd, Republika Srbija
 Granule cinka, Centrohem, Beograd, Republika Srbija
 Borna kiselina (H₃BO₃), Centrohem, Beograd, Republika Srbija
 Sumporna kiselina (H₂SO₄), Centrohem, Beograd, Republika Srbija
 Kalijum-sulfat (K₂SO₄), Centrohem, Beograd, Republika Srbija
 Kalijum-hidrogenfosfat (K₂HPO₄), Lach-Ner, Neratovice, Češka Republika
 Bakar-sulfat (CuSO₄·5H₂O), Centrohem, Beograd, Republika Srbija
 Selen (Se), The British Drug-Houses Ltd., Pool, Engleska
 Metil crveno, Hemos, Beograd, Srbija
 Metilenskog plavo, Hemos, Beograd, Srbija
 Acetanilid (C₈H₉NO), Lach-Ner, Neratovice, Češka Republika
 Saharoza, (C₁₂H₂₂O₁₁), Torlak, Beograd, Srbija
 Glukoza (C₆H₁₂O₆), Centrohem, Beograd, Republika Srbija
 Dinatrijum-hidrogenfosfata (Na₂HPO₄·12H₂O),
 Ninhidrina (C₉H₆O₄·H₂O), Alfa Aesar GmbH&CoKG, Karlsruhe, Nemačka
 Fruktaza (C₆H₁₂O₆), Torlak, Beograd, Srbija,
 Kalijum-jodat (KJO₃), Sigma-Aldrich, Gilligham, Engleska,
 Etanol (C₂H₅OH), Reahem, Srbobran, Srbija,
 Glicin (NH₂CH₂COOH), Alfa Aesar GmbH&CoKG, Karlsruhe, Nemačka
 Fosforvolframova kiselina (H₃PW₁₂O₄₀), Alfa Aesar GmbH&CoKG, Karlsruhe, Nemačka
 Hlorovodonična kiselina (HCl), Centrohem, Beograd, Republika Srbija

3.1.4. Enzimi i enzimski preparati

Za određivanje koncentracije L(+)- i D(-)-mlčene kiselije je korišćen enzimski kit (L/D-lactic acid assay kit, Megazyme[®], Wicklow, Irska)

Za hidrolizu skroba pivskog tropa su upotrebljavana tri komercijalna enzimski preparata:

- **Termamyl SC** (proizvođač Novozymes, Danska), predstavlja tečni koncentrat α-amilaze. Stabilan je do 95°C,
- **Termamyl 120L**, (proizvođač Novozymes, Danska), predstavlja tečni koncentrat α-amilaze. Stabilan je do 95°C
- **SAN Super 240 L** (proizvođač Novozymes, Danska), predstavlja tečni koncentrat glukoamilaze. Razgrađuje dekstrine do redukujućih šećera. Optimalna temperatura delovanja ovog enzima je 55-60°C.

Za hidrolizu celuloze pivskog tropa je upotrebljen enzimski preparat:

- **Celluclast 1.5 L** (proizvođač Novozymes, Danska), predstavlja tečni koncentrat celuloze. Proizveden je submerznom fermentacijom soja *Trichoderma reesei*. Optimalna temperatura za delovanje ovog enzima je 40-50°C.

3.2. Metode i priprema uzoraka

3.2.1. Mehanička priprema pivskog tropa

Osušeni pivski trop je samleven u laboratorijskom mlinu sa diskovima DLFU (*Bühler GmbH, Braunschweig, Nemačka*), tako da je dobijena granulacija pivskog tropa koja odgovara finoj meljavi (čestice manje od 0,25 mm).

U osušenom tropu su određeni vlaga, sadržaj rastvorljivog ekstrakta, sadržaj ekstrakta koji se može razraditi enzimima, sadržaj ukupnog ekstrakta, sadržaj proteina (MEBAK, 2013), sadržaj skroba (International Standard, ISO 10520, 1997), sadržaj celuloze (metoda po Kürschner-Hoffer-u, 1931).

3.2.2. Određivanje sadržaja vlage

Pribor i uređaji:

Posudice za sušenje
Eksikator sa sredstvom za sušenje vazduha
Sušnica, 105–107°C
Analitička vaga

Postupak

Vlaga osušenog pivskog tropa je određivana standardnom metodom sušenja na 105°C u trajanju od 3 sata (MEBAK, 2013).

3.2.3. Određivanje sadržaja rastvorljivog ekstrakta

Pribor i uređaji:

Piknometri za određivanje gustine
Naborani papir za filtraciju
Kupatilo za ukomljavanje sa čašama za ukomljavanje
Analitička vaga

Postupak

Odmereno je 25 g suvog fino samlevenog tropa u čašu za ukomljavanje i pomešano sa 250 ml destilovane vode. Ukomljavanje uzorka tropa izvođeno je 1 sat na 70°C. Nakon toga, uzorak je ohlađen na 20°C i dopunjen vodom do početne mase, filtriran i u filtratu je gustina određena piknometrijski. Na osnovu gustine iz tablica je očitana sadržaj ekstrakta (e, % m/m) u filtratu (MEBAK, 2013).

Izračunavanje:

$$RE (\%) = \frac{(275 + 0,25 \cdot W) \cdot e}{100 - e} \cdot 4$$

Rastvorljivi ekstrakt u suvoj materiji tropa:

$$RE_{SMT}(\%) = \frac{RE \cdot 100}{100 - w}$$

gde je:

e = g ekstrakta u 100 g filtrata ili % m/m

W = vlaga tropa, %

3.2.4. Određivanje sadržaja ekstrakta koji se može razgraditi enzimima (ukupnog ekstrakta)

Pribor i uređaji:

Piknometri za određivanje gustine

Naborani papir za filtraciju

Kupatilo za ukomljavaje sa čašama za ukomljavaenje

Analitička vaga

Reagensi:

Termamyl 120 L i SAN Super 240 L

Rastvor kalcijum-hlorida (dobijen rastvaranjem 22,0 g kalcijum-hlorida dihidrata u 1000 ml destilovane vode).

Postupak

Nakon što je 25 g samlevenog suvog pivskog tropa ukomljeno u čaši za ukomljavaenje sa 350 ml destilovane vode dodato je 0,1 ml enzima Termamyl 120 L i 10 ml rastvora kalcijum-hlorida. Nakon toga je smeša zagrevana do ključanja, uz mešanje i držana na temperaturi ključanja u trajanju od 15 minuta. Nakon ključanja, smeša je ohlađena na 45°C. Dodato je 0,1 ml Termamyl 120 L i 0,3 ml SAN Super 240 L nakon čega je sledilo komljenje. Komljenje je vršeno na 45°C pola sata i na 70°C 1 sat. Nakon hlađenja na 20°C i dopune do početne mase, uzorak je filtriran i u filtratu je određena gustina piknometrijski. Na osnovu gustine iz tablica je očitana sadržaj ekstrakta (e, % m/m).

Slepa proba

Za korekciju prilikom izračunavanja, radi se slepa proba, dodatkom 0,2 ml Termamyl 120L, 0,3 ml SAN Super 240 L i 10 ml rastvora kalcijum-hlorida. Dobijena smeša se dopuni do 400,0 g i u njoj se odredi sadržaj ekstrakta (MEBAK, 2013).

Izračunavanje:

$$UE (\%) = \left[\frac{(400 - 25 + 0,25 \cdot W - e_1) \cdot e}{100 - e} - e_1 \right] \cdot 4$$

gde je:

UE = ukupni ekstrakt u tropu, %

e = sadržaj ekstrakta u filtratu tropa, % m/m

e₁ = sadržaj ekstrakta u slepoj probi, % m/m

W= vlaga suvog tropa, %

Ekstrakt koji se može razgraditi enzimima = Ukupni ekstrakt (%) – rastvorljivi ekstrakt (%)

3.2.5. Optimizacija termičko-enzimske priprema pivskog tropa za mlečno-kiselu fermentaciju

Hidroliza je obuhvatala usitnjavanje, mešanje usitnjenog pivskog tropa sa vodom i termičko-enzimsku razgradnju. U svim oglecima optimizacije enzimske hidrolize, 50 g pivskog tropa je pomešano sa 300 ml destilovane vode i hidroliza je vršena u kupatilu za komljenje uz mešanje od 200 o/min (Glasbläserei, Institut für Gärungs Gewerbe, Berlin). Kao parametar ocene efikasnosti hidrolize i izbora optimalnih uslova hidrolize korišćena je koncentracija redukujućih šećera.

Prvo je izvršena optimizacija enzimske hidrolize skroba pa celuloze, jer je hidroliza skroba vršena na višim temperaturama. Za hidrolizu skroba su korišćeni enzimski preparati Termamyl SC (α -amilaza) i SAN Super 240L (glukoamilaza). Izbor zapremine enzimskih preparata Termamyl SC i SAN Super 240L je izvršen na osnovu analize metoda sa određivanjem sadržaja rastvorljivog ekstrakta i ekstrakta koji se može razgraditi enzimima (MEBAK, 2013). U zvaničnim MEBAK metodama se koristi 0,2 ml enzimskog preparata Termamyl SC i 0,4 ml enzimskog preparata SAN Super 240L na 25 g suvog pivskog tropa, shodno čemu su uzete odgovarajuće zapremine datih enzimskih preparata za hidrolizu. Proces razgradnje skroba prema metodama je trajao 2 sata na osnovu čega je bilo definisano vreme hidrolize u oglecima optimizacije.

Prvo je izvršen izbor optimalnih vrednosti pH i temperature za enzimsku hidrolizu skroba dodatkom 0,3ml enzimskog preparata Termamyl SC u trajanju od 2 sata. Ispitivane vrednosti pH su iznosile 5 i 5,5 dok su vrednosti temperature bile 85 i 90°C. Zatim je u cilju smanjenja potrebne zapremine enzima izvršena hidroliza, u trajanju od 2 sata, sa 0,1 i 0,2 ml enzimskog preparata Termamyl SC pri izabranim optimalnim vrednostima pH i odabranoj temperaturi. Nakon toga je izvršen izbor optimalnih vrednosti pH i temperature za enzimsku hidrolizu skroba upotrebom 0,3ml enzimskog preparata SAN Super 240L u trajanju od 2 sata. Ispitivane vrednosti pH su iznosile 5 i 5,5 dok su ispitivane temperature bile 50, 55 i 60°C. Zatim je u cilju smanjenja potrebne zapremine enzima izvršena hidroliza, u trajanju od 2 sata, sa 0,1 i 0,2 ml enzimskog preparata SAN Super 240L pri izabranoj optimalnoj pH vrednosti i temperaturi.

U cilju postizanja maksimalne hidrolize skroba izvršen je izbor optimalnih vrednosti pH (5 ili 5,5) i zapremine enzima (0,2 ili 0,3 ml) na optimalnoj temperaturi za enzimsku hidrolizu skroba upotrebom prvo enzimskog preparata Termamyl SC u trajanju hidrolize od jednog sata nakon čega je dodat enzimski preparat SAN Super 240L (prvo je smeša ohlađena na optimalnu temperaturu za SAN Super 240L) u trajanju hidrolize od jednog sata. Nakon utvrđivanja optimalnih vrednosti pH, temperature i zapremine enzima za hidrolizu skroba zajedničkim delovanjem enzimskih preparata Termamyl SC i SAN Super 240L izvršena je optimizacija enzimske hidrolize celuloze.

Za optimizaciju enzimske hidrolize celuloze prvo je izvršen izbor optimalnih vrednosti pH i temperature upotrebom 3 ml enzimskog preparata Celluclast 1.5L u trajanju od 12 sati.

Ispitivane vrednosti pH su iznosile 4; 4,5; 5 i 5,5 dok su temperature bile 40, 45 i 50°C. Zatim je u cilju optimizacije zapremine enzima izvršena hidroliza, u trajanju od 12 sati, sa 2, 4, 5 i 6 ml enzimskog preparata Termamyl SC na odabranoj pH vrednosti i temperaturi. Na osnovu optimalnih vrednosti pH, temperature i zapremine enzima izvršena je finalna optimizacija hidrolize pivskog tropa upotrebom enzimskih preparata Termamyl SC, SAN Super 240L i Celluclast 1.5L. Hidroliza pivskog tropa je započeta dodatkom enzimskog preparata Termamyl SC (na optimalnoj temperaturi u trajanju od jednog sata) nakon čega je dodat enzimski preparat SAN Super 240L (prvo je smeša ohlađena na optimalnu temperaturu uz zadržavanje na datoj temperaturi od jednog sata) i na kraju je dodat enzimski preparat Celluclast 1.5L (prvo je smeša ohlađena na optimalnu temperaturu uz trajanje ukupne hidrolize od 10 sati). U optimizaciji hidrolize pivskog tropa izvršen je izbor optimalne vrednosti pH na optimalnim temperaturama za ispitivane enzime, pri čemu je ispitana mogućnost vođenja čitave hidrolize na istoj vrednosti pH i sa korekcijom pH. Na osnovu ostvarenih rezultata pri dodatku različitih količina enzima Celluclast 1.5L izvršen je i konačan izbor količine enzimskog preparata Celluclast 1.5L koji će se koristiti za hidrolizu pivskog tropa. Vrednosti pH koji su ispitivane u optimizaciji hidrolize pivskog tropa su bile 5 i 5,5, dok su ispitivane količine enzimskog preparata Celluclast 1.5L iznosile 3, 4, 5 i 6 ml. Na osnovu finalnih vrednosti hidrolize pivskog tropa izvršen je izbor optimalnih uslova (pH vrednosti, temperature i količine enzima) za hidrolizu pivskog tropa.

3.2.6. Određivanje sadržaja skroba

Pribor i uređaji:

Odmerni sud, 100 ml

Levak

Filter papir

Polarimetar

Ključalo vodeno kupatilo

Analitička vaga

Reagensi:

Fosforvolframova kiselina, $H_3PW_{12}O_{40}$, 4% rastvor

Hlorovodonična kiselina, HCl, 1,124% rastvor

Postupak

Za određivanje sadržaja skroba u uzorcima pivskog tropa korištena je polarimetrijska metoda po Ewers-u (International Standard, ISO 10520, 1997).

Odmeri se 5 g uzorka i prenese u odmerni sud od 100 ml. Doda se 25 ml hlorovodonične kiseline i dobro promućka. Zatim se sa još 25 ml hlorovodonične kiseline speru zidovi odmernog suda i odmerni sud se prebacuje u ključalo vodeno kupatilo, gde se drži 15 minuta, s tim da se prva 3 minuta obavezno meša uzorak. Po isteku 15 minuta odmerni sud se dopuni hladnom destilovanom vodom do oko 90 ml i ohladi se do 20°C. U cilju taloženja proteina dodaje se 5 ml fosforvolframove kiseline, dopuni destilovanom vodom do oznake, promeša i uzorak se filtrira kroz filter papir. Bistrim rastvorom se napuni cev polarimetra pri čemu se vodi računa da nema zaostalog vazduha. Očita se ugao skretanja ravni polarizovane svetlosti pri svetlosti talasne dužine 589 nm (natrijumova lampa).

Izračunavanje:

$$S = \frac{10000 \cdot \alpha}{L \cdot c \cdot [\alpha]_D^E}$$

gde je:

S–procenat skroba u uzorku (%)

α –uzao skretanja ravni polarizovane svetlosti

L–dužina polarimetrijske cevi (dm)

c–koncentracija rastvora (%)

$[\alpha]_D^E$ –koeficijent Ewers-a za skrob (182,7)

3.2.7. Određivanje sadržaja celuloze – metoda po Kürschner-Hoffer-u

Ova metoda se zasniva na tretiranju uzorka vrućim rastvorom kiselina (azotne i sirćetne), pri čemu dolazi do oksidacije, hidrolize i nitrovanja svih supstanci koje se nalaze u uzorku. Ovakvo dejstvo ima azotna kiselina, a sirćetna se koristi kao rastvarač jedinjenja koja pri tome nastaju.

Pribor i uređaji:

Erlenmajer sa šlifom, 250 ml

Aparatura za destilaciju

Aparatura za vakum filtraciju

Guč

Sušnica, 105°C

Eksikator

Analitička vaga

Reagensi:

Sirćetna kiselina, CH₃COOH, 80% rastvor

Koncentrovana azotna kiselina, HNO₃

Pentan-1-ol, C₅H₁₂O

Postupak

Odmeri se 0,5-1,5 g uzorka zavisno od količine celuloze i prenese u erlenmajer sa šlifovanim čepom od 250 ml. U Erlenmajer se doda 45 ml sirćetne kiseline i 4,5 ml koncentrovane azotne kiseline i zagreva se na plameniku uz azbestnu mrežicu, uz povratni hladnjak, prvo slabijim plamenom do ključanja a onda se plamen reguliše tako da sadržaj ključa 20–25 minuta. Ako se pojavi pena, doda se oko 0,5 ml pentan-1-ola. U toku ključanja se sadržaj povremeno meša. Još vreo uzorak se filtrira kroz osušen i izmeren guč, koji se pre filtracije natopi sa par kapi koncentrovane sirćetne kiseline. Talog sa guča se ispira sa 7 do 10 ml smeše 80% sirćetne kiseline i koncentrovane azotne kiseline u odnosu 10:1, sa 20 ml tople destilovane vode, malo etanola i etra i konačno vrelom destilovanom vodom do nestanka mirisa na sirćetnu kiselinu. Filter sa talogom se suši u sušnici na 105°C oko 1 sat do konstantne mase, a potom se hladi u eksikatoru i meri.

Izračunavanje:

Sadržaj sirove celuloze (X) se izračunava putem formule:

$$X = \frac{(m_2 - m_1)}{m} \cdot 100, \%$$

gde je:

X-sadržaj sirove celuloze (%),

m-masa uzorka (g),

m₁-masa osušenog praznog lončića (g),

m₂-masa lončića sa suvim talogom (g).

3.2.8. Određivanje koncentracije redukujućih šećera

U proizvedenim hidrolizatima pivskog tropa kao i na početku i tokom mlečno-kisele fermentacije određivan je koncentracija redukujućih šećera (Miller, 1959). Koncentracija redukujućih šećera je određivan spektrofotometrijskom metodom sa 3,5-dinitrosalicilnom kiselinom (DNS). Ovom metodom se određuje prisustvo slobodne karbonilne grupe (C=O) kod redukujućih šećera. To podrazumeva oksidaciju aldehidne funkcionalne grupe (kod glukoze), odnosno keto funkcionalne grupe (kod fruktoze) do karboksilne grupe. Oksidacija se odvija u prisustvu 3,5-dinitrosalicilne kiseline koja se redukuje do 3-amino,5-nitrosalicilne kiseline u alkalnoj sredini sa karakterističnim crveno-braon obojenjem.

Pribor i uređaji:

Odmerni sud, 100ml

Epruvete

Vodeno kupatilo zagrejano na 90°C

Spektrofotometar

Reagensi:

1% rastvor 3,5-dinitrosalicilne kiseline:

- 10g dinitrosalicilne kiseline, C₇H₄N₂O₇

- 0,5g natrijum-sulfita, Na₂SO₃

- 10g natrijum-hidroksida, NaOH

- dodati destilovanu vodu do 1000 ml.

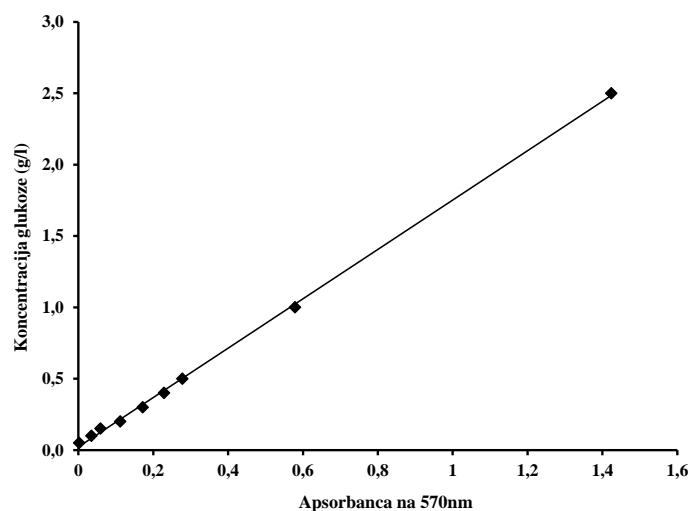
40% rastvor kalijum-natrijum tartarata, KNaC₄H₄O₆·4H₂O

Postupak

1 ml uzorka se pipetom prenese u odmerni sud od 100 ml, koji se zatim dopuni destilovanom vodom. Iz odmernog suda se uzme 3 ml rastvora uzorka (ili rastvora šećera poznate koncentracije kada se radi kalibracija) i prenese u epruvetu, a zatim doda 3 ml rastvora 3,5-dinitrosalicilne kiseline. Takođe, pravi se kontrolni uzorak za kalibrisanje spektrofotometra kod koga se umesto 3 ml razblaženog uzorka dodaje 3 ml destilovane vode. Dalji postupak je identičan. Epruvete se zatvore i kuvaju u vodenom kupatilu na 90°C u trajanju od 5 do 15 minuta do nastanka crveno-smeđeg obojenja. Kontrolni uzorak zadržava žutu boju. Zatim se u topao rastvor dodaje 1 ml rastvora kalijum-natrijum tartarata kako bi se stabilizovala boja. Sadržaj u epruvetama se ohladi do 20°C i zatim se meri apsorbance na spektrofotometru na 570 nm. Koncentracija redukujućih šećera, izražen kao glukoza, se određuje iz standardne krive koja se dobija merenjem apsorbance rastvora glukoze poznatih koncentracija na 570 nm. U tabeli 7 su prikazane dobijene vrednosti apsorbance za rastvore glukoze poznatih koncentracija, a na slici 18 je prikazana standardna kriva zavisnosti koncentracije glukoze od apsorbance na 570 nm.

Tabela 7. Zavisnost apsorbance na 570 nm od koncentracije standardnih rastvora glukoze

Koncentracija glukoze (g/l)	Apsorbanca na 570 nm
0,05	0,003
0,10	0,018
0,15	0,063
0,20	0,079
0,30	0,146
0,50	0,257
1,00	0,556
2,50	1,376



Slika 18. Standardna kriva zavisnosti koncentracije rastvora glukoze od apsorbance na 570 nm

Dobijena standardna kriva ima jednačinu:

$$S_{\text{glu}} (\text{g L}^{-1}) = (1,7289 \cdot A + 0,0226) \cdot R \text{ uz } r^2 = 0,9993$$

gde je:

S_{glu} – koncentracija redukujućih šećera, izraženo kao glukoza, u ispitivanom uzorku (g/l),

A – apsorbanca ispitivanog rastvora na talasnoj dužini od 570 nm,

R – razblaženje rastvora šećera (100) i

r^2 – kvadrat koeficijenta korelacije.

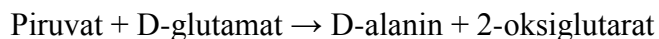
3.2.9. Određivanje koncentracije mlečne kiseline enzimskim testom

Koncentracija proizvedene mlečne kiseline je određivan pomoću enzimskog kita (Megazyme®, Wicklow, Ireland). Metoda se sastoji u prevođenju L-(+)-mlečne kiseline, u zavisnosti od toga koji oblik mlečne kiseline proizvodi mikroorganizam, u piruvat njenom oksidacijom pomoću L-laktatdehidrogenaze (L-LDH) u prisustvu nikotinamid-adenin dinukleotida (NAD^+).



Zbog blago pomerene ravnoteže reakcije u korist piruvata i NADH, da bi se sprečila

povratna reakcija potrebno je odmah piruvat vezati u narednoj reakciji i omogućiti spektrofotometrijsko merenje koncentraciji NADH koji odgovara koncentraciji mlečne kiseline. Zbog toga, u sledećoj reakciji dolazi do konverzije piruvata do D-alanina i 2-oksiglutarata pomoću enzima D-glutamat-piruvat transaminaze (D-GPT) u prisustvu D-glutamata u višku.



Dobijeni koncentracija NADH u prvoj reakciji odgovara koncentracija L-(+)-mlečne kiseline, pa se spektrofotometrijski meri koncentracija NADH, odnosno apsorbancu rastvora na talasnoj dužini od 340 nm.

Deproteinizacija uzorka za određivanje L-(+)-mlečne kiseline

Uzorke za određivanje mlečne kiseline je potrebno prethodno deproteinizovati. Za deproteinizaciju se koriste rastvori Carrez I, Carrez II i 0,1M rastvor NaOH.

Reagensi za deproteinizaciju uzorka prilikom pripreme:

Carrez I rastvor:

- 3,6 g Kalijum-heksacijanoferat(II), $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$
- 100 ml destilovane vode

Carrez II rastvor:

- 7,2 g cink-sulfata heptahidrata, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 - 100 ml destilovane vode
- 0,1M rastvor natrijum-hidroksida, NaOH

Postupak deproteinizacije

Postupak deproteinizacije se sastoji u prebacivanju odgovarajuće zapremine uzorka (prema tabeli 8) u odmerni sud od 100 ml koji sadrži 60 ml destilovane vode, a nakon toga se pažljivo doda 5 ml rastvora Carrez I, 5 ml rastvora Carrez II i 10 ml 0,1M rastvora NaOH. Nakon dodavanja ovih reagenasa dobijeni rastvor se dobro promeša i odmerni sud se dopuni do crte destilovanom vodom. Nakon taloženja proteina, uzorak se filtrira (Whatman No. 1), a filtrat se koristi za određivanje koncentracije mlečne kiseline.

Tabela 8. Faktor razblaženja u zavisnosti od koncentracije mlečne kiseline

Očekivana koncentracija mlečne kiseline u uzorku (g/l)	Razblaženje	Faktor razblaženja (F)
<0,30	Bez razblaženja	1
0,30-3,00	1ml uzorka + 9 ml destilovane vode	10
3,00-30,00	1ml uzorka + 99 ml destilovane vode	100
>30,00	1ml uzorka + 999 ml destilovane vode	1000

Reagensi za određivanje mlečne kiseline:

Rastvor 1 (pripremljen od strane proizvođača):

- Glicil-glicin pufer (25 ml, 0,5M, pH 10)
- D-glutamat, 0,5M
- Natrijum-azid, 0,02% (m/v) rastvor,

Rastvor 2 (priprema se neposredno pre upotrebe)

- 380 mg NAD⁺

- 5,5 ml destilovane vode

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

Rastvor 3 (pripremljen od strane proizvođača):

- D-glutamat-piruvat transaminaza (1300U/ml)

Rastvor 4 (pripremljen od strane proizvođača):

- L-laktat dehidrogenaza (2000U/ml)

Postupak

Postupak za određivanje koncentracije L-(+)-mlečne kiseline u deproteinizovanim uzorcima (prema tabeli 9) je izvođen u kivetama (minimum 3 ml zapremine) tako da je put svetlosti kroz rastvor bio 1cm. Određivanje je vršeno na spektrofotometru UV-1800 (Shimadzu, Japan) na talasnoj dužini od 340 nm. Plan dodavanja reagenasa u prethodno deproteinizovani uzorak i slepu probu prikazan je u tabeli 9

Izračunavanje:

Izračunata je razlika apsorbanci A_2-A_1 za slepu probu $(A_2-A_1)_s$ i za uzorke $(A_2-A_1)_u$. Nakon toga je od razlike apsorbanci za uzorak $(A_2-A_1)_u$ bila oduzeta razlika apsorbanci za slepu probu $(A_2-A_1)_s$ čime je dobijena razlika apsorbanci ΔA_{mk} . Koncentracija mlečne kiseline u rastvoru je izračunat prema sledećoj formuli:

$$S_{mk} = \frac{V \cdot M}{\varepsilon \cdot d \cdot v} \cdot \Delta A_{mk} \cdot F$$

gde je:

S_{mk} – koncentracija mlečne kiseline u uzorku (g/l)

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

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

ε – koeficijent apsorbance koeficijent NADH na 340 nm (6300 L/(mol·cm))

d – dužina svetlosnog puta (cm)

v – zapremina uzorka (ml)

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

F – faktor razblaženja

Tabela 9. Plan dodavanja reagenasa prilikom određivanja koncentracije L-(+)-mlečne kiseline enzimskom metodom

Redosled dodavanja	Slepa proba	Uzorak
Destilovana voda (~25°C)	1,60 ml	1,50 ml
Uzorak	-	0,10 ml
Rastvor 1	0,5 ml	0,5 ml
Rastvor 2	0,1 ml	0,1 ml
Rastvor 3	0,02 ml	0,02 ml
Promešati sadržaj kivete, očitati apsorbancu (A_1) nakon približno 3 minuta i nakon toga nastaviti sa dodavanjem reagenasa:		
Rastvor 4	0,02 ml	0,02 ml
Promešati sadržaj kivete. Po završetku reakcije (10 minuta za L-(+)-mlečnu kiselinu) očitati apsorbancu (A_2). Ukoliko se reakcija nije završila nakon 10 minuta, treba nastaviti očitavanje u intervalima od 5 minuta, dok porast u apsorbanci ne bude konstantan tokom 5 minuta.		

3.2.10. Određivanje pH vrednosti

U proizvedenim hidrolizatima pivskog tropa i tokom mlečno-kisele fermentacije određivana je pH vrednost uzoraka je određivana na pH-metru HI 9321 (HANNA Instruments).

3.2.11. Određivanje sadržaja metala

Za određivanje sadržaja različitih metala u hidrolizatu pivskog tropa i džibri korišćena je ICP-masena spektrometrija (BS EN 13805:2014). Ispitivanje sadržaja Zn, Cu, Fe, Mn, Co, Ca, Mg i Na je izvršeno sa ICP-masenim spektrometrom (Indukovano kuplovana plazma sa masenim spektrometrom, NexION 300X, PerkinElmeris[®], Massachusetts, SAD). Nivo detekcije nivo za metale je bio 0,001 mg/l.

3.2.12. Određivanje sadržaja ukupnih proteina

Pribor i uređaji:

Tikvice po Kjeldahl-u, 500ml
Tikvice po Erlenmayer-u, 250 ml
Aparatura za spaljivanje po Kjeldahl-u
Aparatura za destilaciju po Kjeldahl-u
Analitička vaga

Reagensi:

Koncentrovana sumporna kiselina, H₂SO₄
Natrijum-hidroksid, NaOH, 33% rastvor
Granule cinka
Borna kiselina, H₃BO₃, 2% rastvor,
Sumporna kiselina, H₂SO₄, 0,1M,
Selenski katalizator, sprášena smeša:
-100g kalijum-sulfata, K₂SO₄
-3g bakar-sulfat pentahidrat, CuSO₄·5H₂O
-3g selena
Mešani indikator:
0,01 g metil crvenog + 0,05 g metilenskog plavog u 100 ml 96% etanola.
Acetanilid, C₆H₉NO, osušen u vakumu na 80°C,
Saharoza, C₁₂H₂₂O₁₁

Postupak

Određivanje sadržaja proteina u uzocima pivskog tropa, hidrolizata pivskog tropa, džibre i bistro džibre je vršeno prema standardnoj metodi po Kjeldahl-u (MEBAK, 2013).

Odmeri se oko 1,5 g sa tačnošću 0,001 g i prebace u tikvice po Kjeldahl-u (za tečne uzorke se odmerava 20 ml uzorka i dodaje se 2–3 ml koncentrovane sumporne kiseline, nakon čega se uzorak uparava dok je dalji postupak je isti kao za čvrsti uzorak). Zatim se dodaje 10 g selenskog katalizatora i sadržaj se dobro izmeša, nakon čega se dodaje 20 ml koncentrovane sumporne kiseline uz mešanje. Tikvice po Kjeldahl-u se postavljaju u aparaturu za spaljivanje, pri čemu se prvo vrši blago zagrevanje dok uzorak ne prestane da peni nakon čega se uzorci

intenzivno spaljuju sve dok boja uzoraka ne pređe iz smeđe u svetlozelenu i zatim se uzorci zagrevaju još 10 minuta. Uzorci se zatim hlade, razblažuju sa postepenim dodatkom 150 ml destilovane vode uz stalno mešanje i na kraju se pre destilacije u uzorke dodaje 70 ml natrijum-hidroksida i nekoliko granula cinka (za bolje ključanje). Tikvica se uzorkom se spaja sa aparaturom za destilaciju, odmah zagreje do ključanja i amonijak se sakuplja u tikvici po Erlenmajeru u koju je prethodno dodato 25 ml borne kiseline i 0,5 ml mešanog indikatora. Po sakupljanju oko 180 ml destilata destilacija se prekida i dobijeni destilat se titriše sa sumpornom kiselinom (a) do prelaza boje indikatora. Paralelno sa analizom uzoraka radi se i slepa proba (b) po istoj metodi.

Izračunavanje:

$$N_{sm} = \frac{(a - b) \cdot 14 \cdot f}{G \cdot (100 - w)} \%$$

gde je:

N_{sm} -sadržaj azota izražen u % na suhu materiju

a- utrošak sumporne kiseline za glavnu probu (ml)

b- utrošak sumporne kiseline za slepu probu (ml)

f- faktor sumporne kiseline

G-masa uzorka (g)

w- vlaga uzorka (%)

Sadržaj proteina se izračunava množenjem sadržaja azota sa 6,25.

Sadržaj azota u tečnim uzorcima (rastvorljivi azot) se računa po formuli:

$$N = (a - b) \cdot 1,4 \cdot f \cdot 50$$

gde je:

N-sadržaj rastvorljivog azota (mg/l)

a- utrošak 0,1M sumporne kiseline za glavnu probu (ml)

b- utrošak 0,1M sumporne kiseline za slepu probu (ml)

f- faktor 0,1M sumporne kiseline

3.2.13. Određivanje sadržaja pepela

Pribor i uređaji:

Platinska šolja,

Električna peć, 550°C

Reagensi:

Sumporna kiselina, H₂SO₄, 10% rastvor.

Postupak

Određivanje pepela kod uzoraka pivskog tropa, hidrolizata pivskog tropa, džibre i bistre džibre su vršena prema standardnoj metodi za određivanje sadržaja pepela (AOAC, Method 923.03, 2007). U oko 5 g uzorka izmerenog u platinskoj šolji (prethodno izmerenoj) se doda 5 ml sumporne kiseline i pažljivo upari i sagori, prvo na plameniku (u digestoru do nestanka para SO₃), a zatim potpuno izžari u električnoj peći na 550°C. Posle hlađenja ponovo se doda 2–3 ml sumporne kiseline i ponovi u potpunosti proces uparavanja i sagorevanja. Dvostruko

tretiranje sumpornom kiselinom je neophodno da bi se ukupni pepeo preveo u sulfate.
Sagorevanje u peći je završeno kada se postigne konstantna masa.

Izračunavanje:

$$S_{\text{pepela}} = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 100}{m_0} \%$$

gde je:

S_{pepela} -sadržaj ukupnog pepela (%)

m_2 -masa šolje sa pepelom (g)

m_1 -masa prazne šolje (g)

m_0 -odmerena masa uzorka (g)

Sadržaj ukupnog pepela izražen u % na suhu materiju (%SM) se izračunava prema sledećoj formuli:

$$S_{\text{pepela}}(\%SM) = \frac{S_{\text{pepela}} \cdot 100}{(100 - w)}$$

gde je:

$S_{\text{pepela}}(\%SM)$ -sadržaj ukupnog pepela izražen u % na suhu materiju

w-vlaga uzorka (%)

3.2.14. Određivanje koncentracije slobodnog amino azota

Pribor i uređaji:

Epruvete sa čepom

Spektrofotometar

Vodeno kupatilo

Analitička vaga

Reagensi:

Reagens za bojenje (R_1):

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

-0,5g ninhidrina, $\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

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

Dopuna do 100ml dodatkom destilovane H_2O .

Rastvor se može čuvati 2 nedelje u frižideru u tamnoj boci. pH rastvora mora biti između 6,6 i 6,8.

Rastvor za razblaživanje (R_2):

-2g kalijum-jodata, KJO_3 ,

-600ml dest. H_2O

-400ml 96% etanola, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$

Standardni rastvor glicina (R_{st}):

-107,2mg glicina, $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$

-100ml destilovane vode

Rastvor se čuva u frižideru na 0°C.

Postupak

Određivanje koncentracij slobodnog amino azota u uzorcima uzoraka pivskog tropa, hidrolizata pivskog tropa, džibre i bistre džibre su vršena prema standardnoj metodi za određivanje koncentracije slobodnog amino azota (MEBAK, 2013).

Uzorak se razblaži destilovanom vodom do koncentracije 1-3 mg/l amino azota. U epruvete se prenese 2ml razblaženog rastvora uzorka, odnosno standardnog rastvora glicina, odnosno destilovane vode (slepa proba); doda se 1 ml reagensa za bojenje (R₁) i epruvete se zatvore čepom kako bi se izbegli gubici usled isparavanja. Epruvete sa uzorcima se zagrevaju 16 minuta u vodenom kupatilu koje ravnomerno ključa a zatim se hlade 20 minuta u vodenom kupatilu na 20°C. Nakon hlađenja u svaku epruvetu se doda po 5 ml rastvora za razblaživanje (R₂). U roku od 30 minuta od momenta dodavanja rastvora za razblaživanje, meri se apsorbancu na 570 nm razblaženog rastvora uzorka, razblaženog standardnog rastvora glicina i slepe probe, u odnosu na destilovanu vodu.

Izračunavanje:

$$\text{Slobodni amino azot} = \frac{(A_u - A_{sp})}{A_{st}} \cdot 2 \cdot F$$

gde je:

Slobodni amino azot izražen u mg/l

A_u–apsorbancu uzorka

A_{sp}–apsorbancu slepe probe

A_{st}–apsorbancu standardnog rastvora glicina

F–faktor razblaženja

2–koncentracija glicina u standardnom rastvoru (mg/l)

3.3. Mlečno-kisela fermentacija

Tokom mlečno-kisele fermentacije sterilnog tečnog hidrolizata pivskog tropa određivani su: koncentracija redukujućih šećera, D-(-)- i/ili samo L-(+)-mlečne kiseline, vijabilnost i pH vrednost.

Prinos mlečne kiseline (Y_{mk/uš}) predstavlja prinos g mlečne kiseline po g utrošenog šećera tokom mlečno-kisele fermentacije. Može se izraziti u % ili g/100g. Količina utrošenih redukujućih šećera u fermentaciji se računa kao razlika koncentracije redukujućih šećera u podlozi na početku fermentacije i koncentracije redukujućih šećera tokom fermentacije. Prinos mlečne kiseline je izračunat kao odnos nastale mlečne kiseline u podlozi i količine utrošenih redukujućih šećera u podlozi. Računat je prema:

$$Y_{mk/\%} = \frac{c_{mk}}{c_{uš}} \cdot 100$$

gde je:

c_{mk} – koncentracija mlečne kiseline u podlozi,

c_{uš} – koncentracija utrošenih redukujućih šećera.

Zapreminska produktivnost mlečne kiseline (Q_f) je koncentracija nastale mlečne kiseline po satu fermentacije i izražava se u $g/l \cdot h^{-1}$. Računa se kao:

$$Q_f = c_{mk} / t_f$$

gde je:

c_{mk} – koncentracija mlečne kiseline u podlozi,

t_f – vreme fermentacije.

3.3.1. Statistička obrada podataka

Svi ogledi su vršeni u tri probe. Sve vrednosti su predstavljene kao aritmetične sredine \pm standardna devijacija. Aritmetičke sredine koncentracije i prinosa ukupne, L-(+)- i D-(-)-mlečne kiseline, zapreminske produktivnosti ukupne i L-(+)-mlečne kiseline, utroška šećera kao i vijabilnosti *L. fermentum* i *L. rhamnosus* su upoređene u testu varijansi („one-way“ ANOVA) praćeno Duncan-ovim testom za testiranje razlika u vrednostima aritmetičkih sredina (SPSS Statistica 20, IBM Corporation, Armonk, New York, U.S.). Razlike su se smatrale statistički značajnim pri $p < 0,05$. U tabelama aritmetičke sredine označene različitim malim slovima u koloni su statistički značajno različite ($p < 0,05$). Pearson-ov koeficijent korelacije je određivan u cilju utvrđivanja korelacije između koncentracije slobodnog amino azota i koncentracije L-(+)-mlečne kiseline za $p < 0,01$ (SPSS Statistica 20, IBM Corporation, Armonk, New York, U.S.).

3.3.2. Šaržni postupak sa *L. fermentum* i *L. rhamnosus*

Hidrolizat pivskog tropa je pre inokulacije sterilisan u autoklavu na 121°C u trajanju od 15 minuta. Mlečno-kisela fermentacija je izvođena u šaržnom (diskontinualnom) postupku na 30°C (*L. fermentum*) i 37°C (*L. rhamnosus*) pri 150 o/min. U ogledima je održavanje pH vrednosti vršeno dodatkom kalcijum-karbonata u podlogu na početku fermentacije u količini od 2% (m/v) ili dodatkom sterilnog 30% natrijum-hidroksida tokom fermentacije. Podešavanje koncentracije redukujućih šećera je u svim ogledima vršeno sa dodatkom sterilne 70% (m/m) glukoze pre inokulacije. Inokulum je u svim ogledima dodavan u koncentraciji od 5% (v/v).

Ogledi sa dodatkom kalcijum-karbonata su izvođeni u Erlenmajerima zapremine 100ml sa 60ml inokulisane podloge za fermentaciju postavljenim tako da su za svaki pojedinačni eksperiment postojala po 3 Erlenmajera i na svaka 24 sata je uziman jedan za analizu.

Ogledi sa korekcijom pH dodatkom rastvora natrijum-hidroksida tokom fermentacije su izvođeni u Erlenmajerima zapremine 300 ml sa 200 ml inokulisane podloge za fermentaciju, uz korekciju pH i uzimanje uzorka (10 ml) svakih 4 sata.

Uzorci (uzeti tokom ili na kraju fermentacije) su pre analize bili centrifugirani na 4000 o/min u trajanju od 20 minuta, u cilju odvajanja ćelija BMK.

U ogledima sa kalcijum-karbonatom je fermentacija vođena 72 sata sa proizvodnim mikroorganizmima *L. fermentum* i *L. rhamnosus* bez i sa dodatkom kalcijum-karbonata i dodatkom ekstrakta kvasca u različitim koncentracijama (0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 i 5,0% (m/v)) pri 150 o/min, na temperaturi fermentacije od 30°C za *L. fermentum* i 37°C za *L. rhamnosus*. Dodatak ekstrakta kvasca je izvršen pre sterilizacije, dok je kalcijum-karbonat dodat neposredno pre dodatka inokuluma pod aseptičnim uslovima.

U cilju povećanja prinosa i zapreminske produktivnosti odabrani soj proizvodnog mikroorganizma je korišćen u mlečno-kiselim fermentacijama hidrolizata pivskog tropa uz korekciju pH sa dodatkom rastvora natrijum-hidroksida tokom fermentacije. Ispitana je efikasnost mlečno-kisele fermentacije sa *L. rhamnosus* na MRS bujonu bez i sa korekcijom pH, kao i na hidrolizatu pivskog tropa sa dodatkom različitih koncentracija MRS bujona (2,75; 5,5 i 11,0%). MRS bujon je dodat u hidrolizat pivskog tropa pre sterilizacije.

Ispitani su uticaji različitih koncentracija redukujućih šećera (2,7; 5,4 i 8,1%) i ekstrakta kvasca (0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 i 5,0% (m/v)) na mlečno-kiselu fermentaciju. Takođe je ispitana mogućnost zamene ekstrakta kvasca jeftinijim alternativama kao što su pivski kvasac i džibra.

Pivski kvasac je dodat u različitim koncentracijama (0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 i 5,0% (m/v)) u hidrolizat pivskog tropa bez i sa korekcijom koncentracije redukujućih šećera na 5,0%. Pivski kvasac je dodat u zadatim koncentracijama u hidrolizat pivskog tropa pre sterilizacije.

Džibra je dodata kao celokupna i bistra džibra (nakon centrifugiranja 10 min na 4000 o/min). U ogleđima sa dodatkom džibre (5, 10, 15 i 20% (v/v)) i bistre džibre (5, 10, 15, 20, 30, 40 i 50% v/v) hidrolizat pivskog tropa je sadržao 5,4% redukujućih šećera. Džibra i bistra džibra su sterilisane odvojeno od hidrolizata pivskog tropa i dodate su nakon sterilizacije, pre inokulacije.

3.3.3. Dolivni postupak sa *L. rhamnosus*

Dolivni postupci fermentacije su vođeni sa dodatkom šećera, ekstrakta kvasca, sladovine ili bistre džibre tokom mlečno-kisele fermentacije. U svim dolivnim postupcima vršena je korekcija koncentracije šećera u hidrolizatu pivskog tropa na početnu vrednost. Korekcija pH je vršena sa dodatkom rastvora natrijum-hidroksida, pri čemu su brzina mešanja i temperatura fermentacije bile ista kao i u ranijim ogleđima (150 o/min i 37°C). Ogleđi su vršeni u Erlenmajerima zapremine 300 ml sa 200 ml hidrolizata pivskog tropa. Korekcija pH je vršena svaka 4 sata uz uzimanje dela uzorka (10 ml) za analizu. Korekcija koncentracije redukujućih šećera tokom mlečno-kisele fermentacije je vršena svakih 12 sati, dodatkom rastvora glukoze dok je korekcija koncentracija ekstrakta kvasca vršena dodatkom 1% ekstrakta kvasca (m/v) (preračunato na trenutnu zapreminu podloge, pri čemu je data masa ekstrakta kvasca bila rastvorena u 2 ml sterilnog hidrolizata pivskog tropa) u trenutku kada je vršena i korekcija koncentracije redukujućih šećera.

U ogleđima sa korekcijom koncentracije redukujućih šećera, bez i sa korekcijom koncentracije ekstrakta kvasca tokom mlečno-kisele fermentacije i ogleđu sa dodatkom sladovine tokom fermentacije, koncentracija redukujućih šećera je podešena na 5,4% a koncentracija ekstrakta kvasca na 5,0%. Korekcija koncentracije redukujućih šećera i ekstrakta kvasca je vršena u trenutku kada je koncentracija redukujućih šećera u hidrolizatu pivskog tropa opala na oko 3,0%, dok je sladovina dodavana na svakih 12 sati.

U ogleđu sa korekcijom koncentracije redukujućih šećera tokom fermentacije sa dodatkom glukoze i bistre džibre, u hidrolizat pivskog tropa je dodata bistra džibra (50% (v/v)) a koncentracija redukujućih šećera je podešena na 5,4%. Korekcija koncentracije redukujućih šećera i džibre je vršena u trenutku kada je koncentracija redukujućih šećera u hidrolizatu pivskog tropa opala na oko 3,0% i to dodatkom rastvora glukoze i džibre pri čemu je ukupna dodata zapremina iznosila 10ml.

3.3.4. Imobilizacija ćelija *Lactobacillus rhamnosus* u Ca-alginatu i njihova primena u mlečno-kiseloj fermentaciji

Za imobilizaciju je korišćen 4% natrijum-alginat koji je pre upotrebe sterilisan u autoklavu na 121°C u trajanju od 15 minuta. Postupak imobilizacije je vođen pod aseptičnim uslovima. Suspenzija ćelija *Lactobacillus rhamnosus* i 4% natrijum-alginat su pomešani u odnosu 1:1 i homogenizovani u tresilici 10 minuta. Dobijena suspenzija 2% natrijum-alginata sa ćelijama je prebačena u sterilnu brizgalicu iz koje je rastvor kap po kap (1 kap svake 2 sekunde) putem slobodnog pada ispuštan, kroz iglu malog unutrašnjeg prečnika, u rastvor 0,5M kalcijum-hlorida. Nakon što je suspenzija prebačena u rastvor kalcijum-hlorida, dobijene kuglice su ostavljene u rastvoru kalcijum-hlorida u trajanju od 30 minuta u cilju njihovog formiranja i očvršćivanja. Formirane kuglice 2,0% kalcijum-alginata sa ćelijama *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 su izdvojene iz rastvora kalcijum-hlorida filtracijom i prebačene u 300 ml MRS bujona i inkubirane 20 sati na 37°C. Prečnik nastalih perli je iznosio $2,06 \pm 0,04$ mm. Potom su kuglice izdvojene iz MRS bujona filtracijom i prebačene u hidrolizat pivskog tropa za fermentaciju u količini od 5% (inokulum). Fermentacija inokulisanog hidrolizata je izvedena aerobno na 37°C, uz mešanje na 150 o/min. Po isteku 24 i 48 sati fermentacije, pod aseptičnim uslovima, hidrolizat pivskog tropa je odliven i dodat je svež hidrolizat pivskog tropa (5,4% redukjućih šećera i 5,0% ekstrakta kvasca) za nastavak mlečno-kisele fermentacije.

3.3.5. Priprema inokuluma za mlečno-kiselu fermentacija

Inokulacija sterilnog tečnog hidrolizata pivskog tropa je izvedena sa *L. fermentum* i *L. rhamnosus*. *L. fermentum* i *L. rhamnosus* su čuvani na -18°C u vijalu koji je sadržao 3 ml MRS bujona i 50% (v/v) glicerola.

Čista kultura *L. fermentum* i *L. rhamnosus* je preneti (0,2ml) u 7ml MRS bujona i inkubirana 48 sati na 30°C za *L. fermentum* i na 37°C za *L. rhamnosus*. Nakon toga je 0,2 ml preneto u 7 ml MRS bujona i inkubirano još 48 sata na 30°C za *L. fermentum* i na 37°C za *L. rhamnosus*. Od dobijenog inokuluma je prenešeno 3 ml u 60 ml MRS bujona i inkubirano 24 sata na 30°C za *L. fermentum* i na 37°C za *L. rhamnosus*. Dobijeni inokulum je korišćen za inokulaciju hidrolizata u količini od 5% (v/v). Veličina inokuluma je bila oko 10^9 CFU/ml.

Ćelije *L. rhamnosus* za imobilizaciju su dobijene postupkom za dobijanje inokuluma za fermentacije sa slobodnim ćelijama, uz dodatno inkubiranje 3 ml inokuluma u novih 60 ml MRS bujona 24 sata na 37°C.

Dobijeni inokulum je korišćen u imobilizaciji ćelija *L. rhamnosus* u kalcijum-alginatu. Veličina inokuluma je bila oko 10^{10} CFU/ml.

Inokulum (slobodne ćelije i imobilisane ćelije) je dodat u sterilni tečni hidrolizat pivskog tropa do postizanja koncentracija od 5%.

3.3.6. Određivanje vijabilnosti (ukupnog broja živih ćelija) *L. fermentum* i *L. rhamnosus*

Određivanje vijabilnosti (ukupnog broja živih ćelija) *L. fermentum* i *L. rhamnosus* na početku i tokom fermentacije izvedeno je Koch-ovom metodom na MRS agaru aerobnim inkubiranjem tokom 48 sati na 37°C.

U oglecima sa dodatkom kalcijum-karbonata i različitih koncentracija ekstrakta kvasca

vijabilnost ćelija *L. fermentum* i *L. rhamnosus* je praćena nakon 24, 48 i 72 sata mlećno-kisele fermentacije.

U oglecima sa dodatkom MRS bujona, razlićitih koncentracija glukoze, ekstrakta kvasca, pivskog kvasca i bistre dźibre, vijabilnost *L. rhamnosus* je praćena nakon 12, 24 i 36 sati mlećno-kisele fermentacije.

U oglecu sa dodatkom dźibre vijabilnost *L. rhamnosus* je praćena nakon 12, 24, 36 i 48 sati mlećno-kisele fermentacije.

U oglecu sa dodatkom bistre dźibre, sladovine i korekcijom koncentracije redukujućih šećera i bez i sa korekcijom koncentracije ekstrakta kvasca vijabilnost *L. rhamnosus* je praćena nakon 12, 24, 36, 48, 60 i 72 sata mlećno-kisele fermentacije.

U oglecu sa imobilisanim ćelijama *L. rhamnosus* vijabilnost je praćena nakon 12, 24, 36, 48, 60 i 72 sata mlećno-kisele fermentacije.

Kuglice kalcijum-alginata sa imobilisanim ćelijama *L. rhamnosus* su prvo rastvorene u 2% natrijum-citratu, pa je zatim vijabilnost ćelija *L. rhamnosus* vršena Koch-ovom metodom na MRS agaru aerobnim inkubiranjem tokom 48 sati na 37°C. Na početku samog ogleda vijabilnost je odrećena iz 1g kuglica dok je tokom ogleda po završetku jedne fermentacije vijabilnost odrećivana iz 5 kuglica (mase 0,03 g) i izraćunata na 1 g kuglica.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Rezltati analize pivskog tropa

Sastav pivskog tropa pre enzimske hidrolize je prikazan u tabeli 10. Pivski trop je sadržao 10,31% ukupnog ekstrakta, 26,48% proteina, 4,10% skroba i 15,15% celuloze.

Tabela 10. Sastav pivskog tropa pre hidrolize

Parametri	Pre enzimske hidrolize
Rastvorljivi ekstrakt, % na suhu materiju uzorka	5,84 ± 0,27
Ekstrakt koji se može razgraditi enzimima, % na suhu materiju uzorka	4,47 ± 0,33
Ukupni ekstrakt, % na suhu materiju uzorka	10,31 ± 0,37
Ukupni proteini, % na suhu materiju uzorka	26,48 ± 0,35
Skrob, % na suhu materiju uzorka	4,10±0,27
Celuloza, % na suhu materiju uzorka	15,15 ± 0,38

4.2. Optimizacija enzimske hidrolize

Enzimska hidroliza se pokazala kao ekološki prihvatljiva uz daleko manji utrošak energije i hemikalija u poređenju sa fizičkim i hemijskim postupcima hidrolize. Postupak enzimske hidrolize se vodi na niskim temperaturama tako da ne dolazi do nastanka inhibitornih jedinjenja koja nastaju tokom hemijskih tretmana na visokim temperaturama (tretmani kiselinama). Optimizacija enzimske hidrolize je vršena sa komercijalnim enzimskim preparatima za razgradnju celuloze i zaostalog skroba. Kao parametar uspešnosti hidrolize je uzeta ostvarena koncentracija redukujućih šećera.

4.2.1 Optimizacija hidrolize skroba pivskog tropa

Za optimizaciju hidrolize skroba pivskog tropa ispitivane su različite vrednosti pH i temperature kao i količine enzimskih preparata Termamyl SC i SAN Super 240L. Prvo je ispitan uticaj dodatka 0,3ml enzimskog preparata Termamyl SC na različitim vrednostima pH (5 i 5,5) i temperaturama (85 i 90°C) na hidrolizu skroba pri ukupnom trajanju hidrolize od 2 sata. Ostvareni rezultati su prikazani u tabeli 11. Utvrđeno je da je najveća koncentracija redukujućih šećera (od 5,77 g/l) ostvarena na pH 5,5 i na 90°C. U cilju mogućeg smanjenja zapremine enzima ispitan je uticaj dodatka 0,1 i 0,2 ml Termamyl SC na pH 5 i 5,5 i temperaturi hidrolize 90°C i dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 12.

Tabela 11. Uticaj različitih temperatura i pH vrednosti pri dodatku 0,3 ml enzimskog preparata Termamyl SC na hidrolizu pivskog tropa

Zapremina enzima Termamyl SC (ml)	Temperatura (°C)	pH vrednost	Vreme (sati)	Koncentracija redukujućih šećera (g/l)
0,3	85	5,0	0	0,00 ± 0,00
			1	4,80 ± 0,08
			2	5,33 ± 0,08
		5,5	0	0,00 ± 0,00
			1	4,80 ± 0,08
			2	5,68 ± 0,10
	90	5,0	0	0,00 ± 0,00
			1	4,89 ± 0,08
			2	5,51 ± 0,10
		5,5	0	0,00 ± 0,00
			1	5,33 ± 0,10
			2	5,77 ± 0,10

Tabela 12. Uticaj dodatka 0,1 i 0,2 ml enzimskog preparata Termamyl SC na hidrolizu pivskog tropa

Zapremina enzima Termamyl SC (ml)	Temperatura (°C)	pH vrednost	Vreme (sati)	Koncentracija redukujućih šećera (g/l)
0,1	90	5,0	0	0,00 ± 0,00
			1	5,15 ± 0,10
			2	5,33 ± 0,10
		5,5	0	0,00 ± 0,00
			1	5,33 ± 0,10
			2	5,51 ± 0,10
0,2	90	5,0	0	0,00 ± 0,00
			1	5,24 ± 0,10
			2	5,51 ± 0,11
		5,5	0	0,00 ± 0,00
			1	5,33 ± 0,10
			2	5,77 ± 0,11

Zatim je izvršeno ispitvanje uticaja dodata 0,3ml enzimskog preparata SAN Super 240L na različitim vrednostima pH (5 i 5,5) i temperaturama (50, 55 i 60°C) na hidrolizu skroba, pri ukupnom trajanju hidrolize od 2 sata. Dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 13.

Tabela 13. Uticaj različitih temperatura i pH vrednosti pri dodatku 0,3ml enzimskog preparata SAN Super 240L na hidrolizu pivskog tropa

Zapremina enzima SAN Super 240L (ml)	Temperatura (°C)	pH vrednost	Vreme (sati)	Koncentracija redukujućih šećera (g/l)
0,3	50	5,0	0	0,00 ± 0,00
			1	5,15 ± 0,08
			2	5,24 ± 0,10
		5,5	0	0,00 ± 0,00
			1	5,42 ± 0,08
			2	5,42 ± 0,10
	55	5,0	0	0,00 ± 0,00
			1	5,33 ± 0,10
			2	5,42 ± 0,10
		5,5	0	0,00 ± 0,00
			1	5,42 ± 0,10
			2	5,68 ± 0,10
	60	5,0	0	0,00 ± 0,00
			1	5,33 ± 0,10
			2	5,42 ± 0,10
		5,5	0	0,00 ± 0,00
			1	5,42 ± 0,10
			2	5,68 ± 0,10

Iz ostvarenih rezultata se vidi da su iste koncentracije redukujućih šećera (5,68 g/l) dobijene na temperaturi hidrolize 55 i 60°C na pH 5,5, pa je zbog uštede energije kao optimalna temperatura izabrana temperatura 55°C. Potom je u cilju mogućeg smanjenja zapremine enzima, na pH 5 i 5,5 i temperaturama 55 i 60°C ispitan uticaj dodatka 0,1 i 0,2 ml SAN Super 240L. Dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 14. Na osnovu dobijenih rezultata za enzimski preparat Termamyl SC utvrđeno je da su pri dodatku 0,2 i 0,3 ml enzima i pH 5,5 i 90°C dobijene iste vrednosti koncentracije redukujućih šećera od 5,77 g/l. Takođe je utvrđeno da su pri dodatku 0,2 i 0,3 ml enzimskog preparata SAN Super 240L, na 55 i 60°C i na pH 5,5 dobijene iste koncentracije redukujućih šećera od 5,68 g/l.

Nakon toga ispitan je uticaj oba enzimska preparata na hidrolizu skroba. Pošto je razlika u ostvarenim koncentracijama redukujućih šećera za oba enzimska preparata između prvog i drugog sata hidrolize bila mala, odlučeno je da se dalje ispitivanje hidrolize pivskog tropa pri dodatku oba enzimska preparata vodi tako što su prvo bile dodate različite količine enzimskog preparata Termamyl SC (0,2 i 0,3 ml) na pH 5 i 5,5 i temperaturi 90°C uz vreme hidrolize od jednog sata, nakon čega je temperatura hidrolize snižena na 55°C i dodate su različite količine enzimskog preparata SAN Super 240L (0,2 i 0,3 ml) takođe na pH 5 i 5,5 uz trajanje hidrolize od jednog sata, pri čemu je ukupno vreme hidrolize skroba pivskog tropa bilo 2 sata. Dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 15.

Tabela 14. Uticaj dodatka 0,1 i 0,2 ml enzimskog preparata SAN Super 240L na hidrolizu pivskog tropa

Zapremina enzima SAN Super 240L (ml)	Temperatura (°C)	pH vrednost	Vreme (sati)	Koncentracija redukujućih šećera (g/l)
0,1	55	5,0	0	0,00 ± 0,00
			1	5,15 ± 0,10
			2	5,24 ± 0,10
		5,5	0	0,00 ± 0,00
			1	5,33 ± 0,10
			2	5,51 ± 0,10
	60	5,0	0	0,00 ± 0,00
			1	5,24 ± 0,10
			2	5,33 ± 0,10
		5,5	0	0,00 ± 0,00
			1	5,42 ± 0,10
			2	5,60 ± 0,10
0,2	55	5,0	0	0,00 ± 0,00
			1	5,24 ± 0,10
			2	5,42 ± 0,11
		5,5	0	0,00 ± 0,00
			1	5,51 ± 0,10
			2	5,68 ± 0,11
	60	5,0	0	0,00 ± 0,00
			1	5,33 ± 0,10
			2	5,42 ± 0,11
		5,5	0	0,00 ± 0,00
			1	5,51 ± 0,10
			2	5,68 ± 0,11

Tabela 15. Uticaj dodatka različitih koncentracija enzima Termamyl SC i SAN Super 240L na optimalnim temperaturama i pH vrednostima od 5 i 5,5

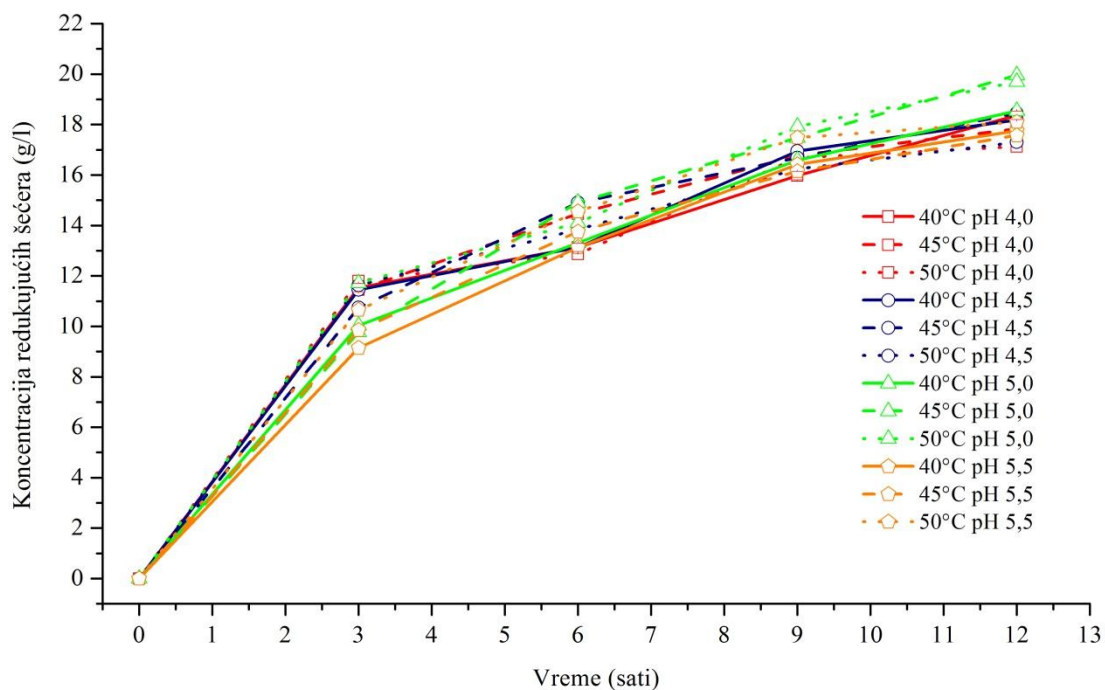
Zapremina enzima Termamyl SC i SAN Super 240L (ml)	pH vrednost	Vreme (sati)	Koncentracija redukujućih šećera (g/l)
0,2	5,0	0	0,00 ± 0,00
		2	5,95 ± 0,11
	5,5	0	0,00 ± 0,00
		2	7,46 ± 0,14
0,3	5,0	0	0,00 ± 0,00
		2	6,13 ± 0,11
	5,5	0	0,00 ± 0,00
		2	7,64 ± 1,14

Pri dodatku 0,3 ml enzima Termamyl SC i SAN Super 240L i na pH 5,5 na optimalnim temperaturama hidrolize za date enzime ostvarena je najveća koncentracija redukujućih šećera od 7,64 g/l. Na osnovu dobijenih rezultata odlučeno je da se za hidroliza skroba pivskog tropa koriste po 0,3 ml enzimskih preparata Termamyl SC i SAN Super 240L i na temperaturama hidrolize od 90°C za Termamyl SC i 55°C za SAN Super 240L uz ukupno trajanje hidrolize

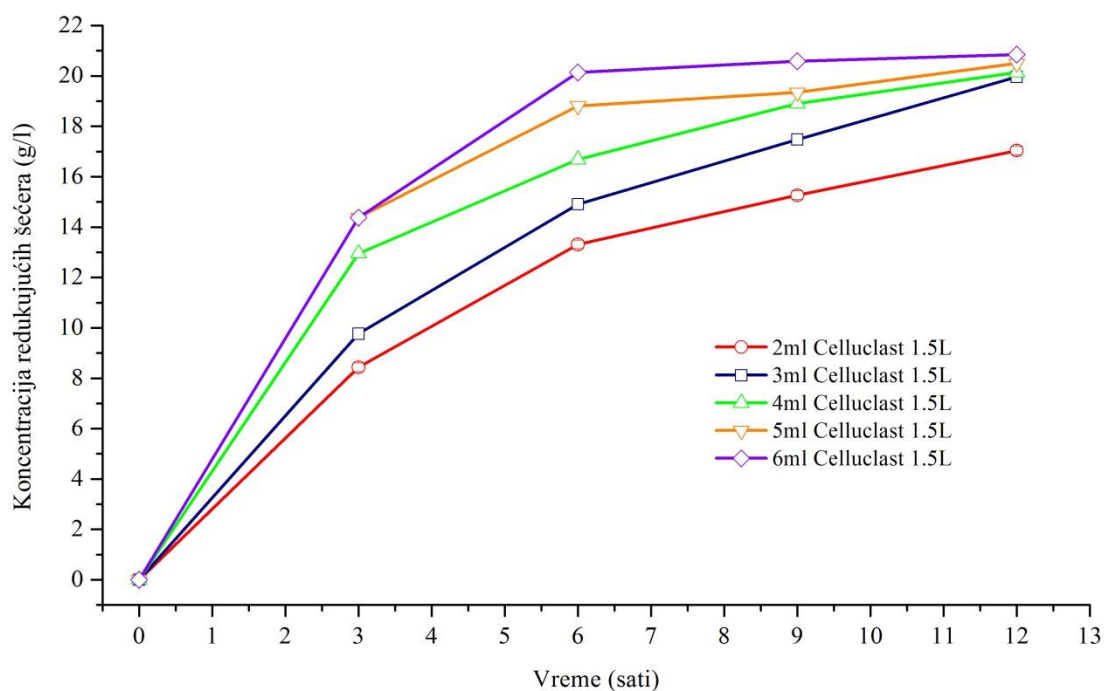
od 2 sata.

4.2.2 Optimizacija hidrolize celuloze pivskog tropa

U cilju optimizacije hidrolize celuloze ispitivane su različite pH vrednosti (pH 4; 4,5; 5 i 5,5) i temperature (40, 45 i 50°C) koje su se nalazile u opsegu optimalnih vrednosti za enzimski preparat Celluclast 1.5L, koje je propisao proizvođač, kao i različite količine enzimskog preparata (2, 3, 4, 5 i 6ml) u ukupnom trajanju hidrolize od 10 sati. Prvo je ispitivan uticaj različitih vrednosti pH (pH 4; 4,5; 5 i 5,5) i temperature (40, 45 i 50°C) pri dodatku 3ml enzimskog preparata za razgradnju celuloze Celluclast 1.5L (slika 19). Uslovi hidrolize, pH vrednost 5 i temperatura 45°C, pri kojima je ostvarena najveća koncentracija redukujućih šećera (19,96 g/l) su usvojeni kao optimalni. Potom je ispitan uticaj različitih količina enzimskog preparata Celluclast 1.5L na hidrolizu (slika 20). Na osnovu ostvarenih rezultata, utvrđeno je da je koncentracija redukujućih šećera preko 20 g/l ostvarena pri dodatku 4 (20,14 g/l), 5 (20,49 g/l) i 6 ml (20,85 g/l) enzimskog preparata Celluclast 1.5L, pa je zbog toga konačan izbor zapremine enzimskog preparata bio izvršen nakon optimizacije konačne hidrolize pivskog tropa delovanjem sva tri enzimska preparata.



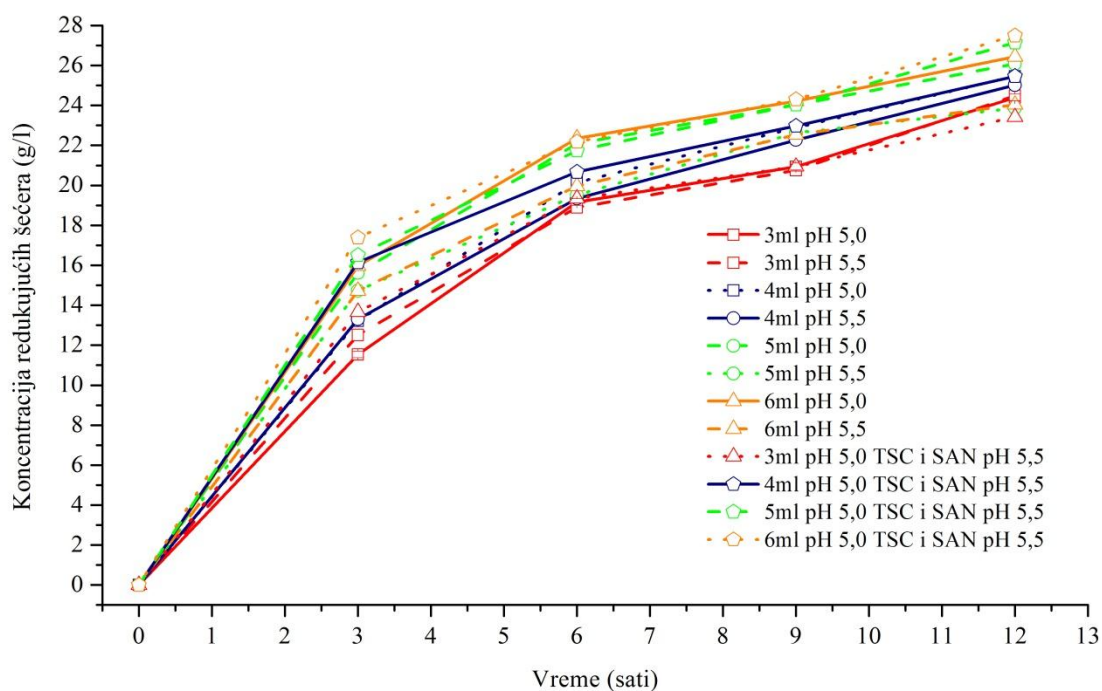
Slika 19. Hidroliza pivskog tropa uz dodatak 3ml Celluclast 1.5L na različitim vrednostima pH i temperature



Slika 20. Hidroliza pivskog tropa uz dodatak 2, 3, 4, 5 i 6ml enzimskog preparata Celluclast 1.5L na pH 5 i temperaturi 45°C

4.2.3 Optimizacija enzimske hidrolize pivskog tropa

Enzimski preparat Celluclast 1.5L je dodavan u pivski trop nakon dodatka enzimskih preparata Termamyl SC i SAN Super 240L kako bi hidroliza bila započeta na 90°C (Termamyl SC) pa je nastavljena na 55°C (SAN Super 240L) i završena na 45°C (optimalni opseg za Celluclast 1.5L). Takođe je uzet u obzir i opseg optimalnih vrednosti pH za date enzimske preparate. Ako bi kao optimalna pH vrednost za Termamyl SC i SAN Super 240L bila uzeta vrednost od 5,5 bilo bi potrebno da se pre dodatka enzimskog preparata Celluclast 1.5L izvrši smanjenje pH na 5 po isteku 2. sata razgradnje skroba, pa je zbog toga u cilju mogućeg smanjenja utroška hemikalija za korekciju pH izvršeno ispitivanje hidrolize pivskog tropa na pH vrednostima od 5 i 5,5 tokom čitave hidrolize i na početnoj vrednosti pH od 5,5 uz smanjenje pH vrednosti na 5 pre dodatka enzimskog preparata Celluclast 1.5L uz optimalne temperature hidrolize za svaki enzimski preparat i dodatak optimalnih količina enzima Termamyl SC i SAN Super 240L, dok je ispitana optimalna količina enzima Celluclast 1.5L. U optimizaciji je ispitan uticaj dodatka 3, 4, 5 i 6 ml enzimskog preparata Celluclast 1.5L na razgranju celuloze pivskog tropa. Dobijeni rezultati hidrolize pivskog tropa sa dodatkom sva tri enzimska preparata (Termamyl SC (0,3ml), SAN Super 240L (0,3ml) i Celluclast 1.5L (3, 4, 5 i 6 ml) na različitim vrednostima pH (5,0 i 5,5) i na optimalnim temperaturama (90, 55 i 45°C) prikazani na slici 21.



Slika 21. Uticaj različitih količina enzima Celluclast 1.5L na različitim vrednostima pH; sa dodatkom optimalnih količina enzima Termamyl SC (TSC) i SAN Super 240L (SAN) i na optimalnim temperaturama hidrolize za sva tri enzimska preparata

Na osnovu dobijenih rezultata utvrđeno je da se najviše koncentracije redukujućih šećera od 27,15 i 27,50 g/l, dobijaju pri dodatku 5 i 6 ml enzimskog preparata Celluclast 1.5L na pH 5 i na temperaturi od 45°C uz prethodni dodatak enzimskih preparata Termamyl SC (0,3 ml i 90°C) i SAN Super 240L (0,3 ml i 55°C) na pH 5,5. Uzimajući u obzir cene enzimskih preparata i malu razliku u ostvarenim koncentracijama redukujućih šećera pri dodatku 5 i 6 ml enzimskog preparata Celluclast 1.5L, odlučeno je da se za hidrolizu celuloze pivskog tropa dalje koristi 5 ml enzimskog preparata Celluclast 1.5L. Na osnovu svih ostvarenih rezultata, utvrđeni su i usvojeni optimalni uslovi hidrolize pivskog tropa nakon čega je definisan čitav postupak hidrolize pivskog tropa.

Hidroliza pivskog tropa je započeta podešavanjem pH vrednosti suspenzije pivskog tropa na 5,5 (uz dodatak 10% fosforne kiseline), zagrevanjem na 90°C i daodavanjem 0,3 ml enzimskog preparata Termamyl SC uz zadržavanje na 90°C u trajanju od 1 sata nakon čega je suspenzija ohlađena na 55°C i dodato je 0,3 ml enzimskog preparata SAN Super 240L. Na ovoj temperaturi je vršena hidroliza 1 sat, nakon čega je pH vrednost suspenzije snižena na 5. Suspenzija je ohlađena na 45°C i dodato je 5ml enzimskog preparata Celluclast 1.5L uz trajanje ostatka hidrolize od 10 sati. Dobijeni hidrolizat je centrifugiran na 4000 o/min u trajanju od 20 minuta i dobijeni tečni deo je korišćen kao podloga u mlečno-kiseloj fermentaciji.

4.3. Rezultati analize pivskog tropa posle enzimske hidrolize

Sastav pivskog tropa posle enzimske hidrolize je prikazan u tabeli 16. Nakon enzimske hidrolize pivskog tropa značajno se smanjio sadržaj rastvorljivog ekstrakta (za 2439%),

ekstrakta koji se može razgraditi enzimima (za 174%) i celuloze (za 366%) dok je skrob u potpunosti razgrađen koji razgrađeni tokom hidrolize. Sadržaj ukupnih proteina se neznatno smanjio, jer za enzimsku hidrolizu nisu korišćeni proteolitički enzimi.

Tabela 16. Sastav pivskog tropa posle hidrolize

Parametri	Posle enzimske hidrolize
Rastvorljivi ekstrakt, % na suhu materiju uzorka	0,23 ± 0,11
Ekstrakt koji se može razgraditi enzimima, % na suhu materiju uzorka	1,63 ± 0,14
Ukupni ekstrakt, % na suhu materiju uzorka	1,86 ± 0,16
Ukupni proteini, % na suhu materiju uzorka	26,23 ± 0,34
Skrob, % na suhu materiju uzorka	Nije detektovan
Celuloza, % na suhu materiju uzorka	3,25 ± 0,09

Na osnovu rezultata dobijenih analizom pivskog tropa pre i nakon hidrolize može se videti da je 78,6% celuloze hidrolizovano.

4.4. Mlečno-kisela fermentacija hidrolizata pivskog tropa

4.4.1. Sastav hidrolizata pivskog tropa kao sirovina za proizvodnju mlečne kiseline

Za efikasnu mlečno-kiselu fermentaciju sa BMK pored optimalnih uslova veoma je bitan sastav podloge za fermentaciju. Sastav podloge je od velikog značaja kako za rast i razvoj BMK, tako i za sintezu mlečne kiseline. Pored izvora ugljenika neophodno je da podloga za mlečno-kiselu fermentaciju sadrži izvore azota. Sastav hidrolizata pivskog tropa korišćenog u mlečno-kiseloj fermentaciji je prikazan u tabeli 17. Sadržaj jona metala u hidrolizatu pivskog tropa je prikazan u tabeli 18.

Tabela 17. Sastav hidrolizata pivskog tropa

Parametri	Hidrolizat pivskog tropa
Sadržaj suve materije, %	4,81 ± 0,03
Koncentracija redukujućih šećera, g/l	25,34 ± 0,18
Sadržaj proteina, g/l	0,81 ± 0,01
Slobodni amino azot, mg/l	54,98 ± 0,13
Mineralne materije, % na suhu materiju	1,99 ± 0,01

Tabela 18. Sadržaj jona metala u hidrolizatu pivskog tropa

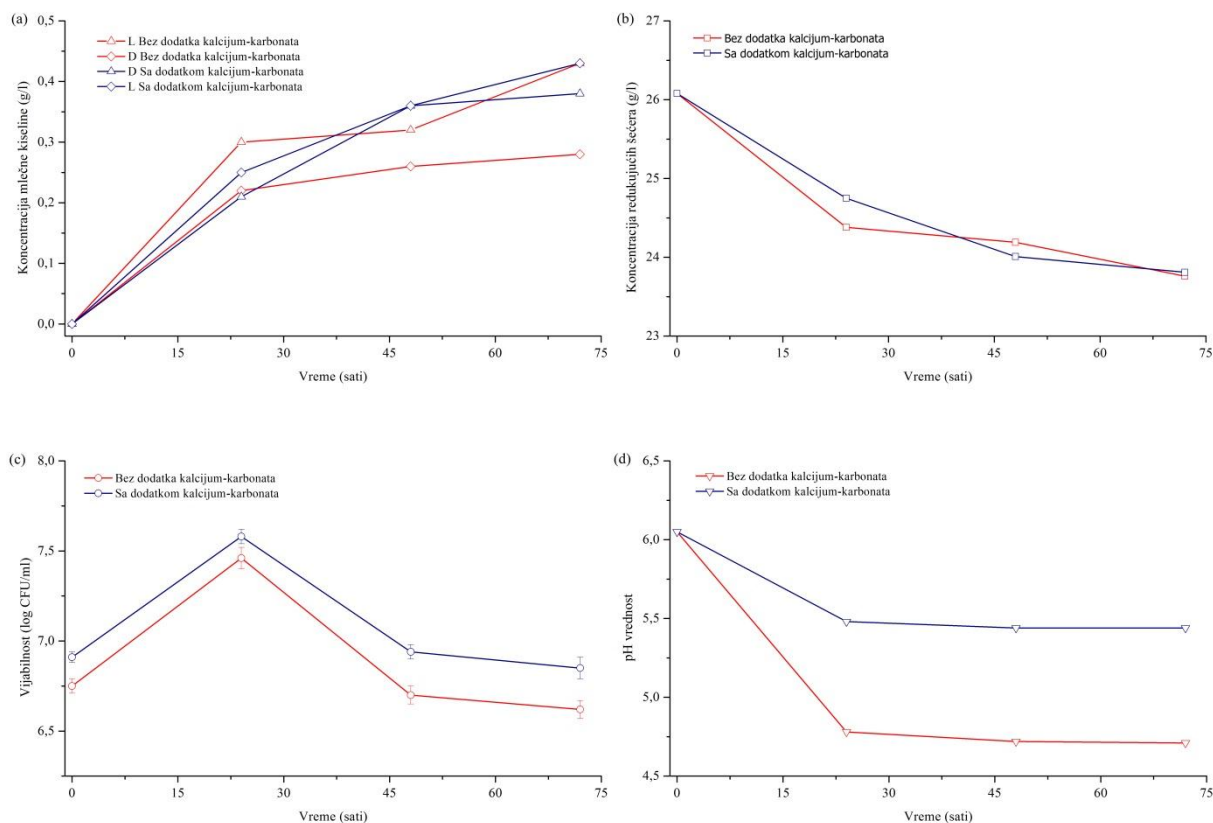
Sadržaj metala (mg/kg)	Hidrolizat pivskog tropa	Optimalna koncentracija metala za rast BMK (mg/l) ^a
Zn	0,266 ± 0,002	<20
Cu	1,778 ± 0,008	<19
Fe	0,609 ± 0,021	≤4
Mn	1,31 ± 0,050	≤110
Co	0,011 ± 0,001	-
Ca	535,8 ± 1,820	≤8000
Mg	236,3 ± 1,410	480–972
Na	761,8 ± 0,172	≤4000

^a-Djukić-Vuković i sar., 2012

Iz rezultata prikazanih u tabelama 17 i 18 može se videti da je hidrolizat pivskog tropa siromašan izvorima azota i da je potreban dodatak izvora azota kao što je ekstrakt kvasca, koji se pokazao kao jedan od najboljih komercijalnih dodataka podlogama za mlečno-kiselu fermentaciju, jer pored izvora azota sadrži vitamine, purinske i pirimidinske baze (Liu i sar., 2010). Međutim sve više se posvećuje pažnja zameni skupih izvora azota i vitamina (pre svega vitamina B grupe) kao što su ekstrakt kvasca i pepton jeftinijim obnovljivim sirovinama poput pivskog i pekarskog kvasca, džibre iz proizvodnje bioetanola koja je bogata ćelijama kvasca itd. Joni metala (magnezijum, mangan i gvožđe) koji su u komercijalnoj podlozi (za rast BMK) dostupni u obliku soli (magnezijum-sulfat, mangan-sulfat i gvožđe-sulfat) i vitamini (najviše vitamini B grupe) su esencijalni elementi koji deluju kao kofaktori u mnogim enzimskim reakcijama u metabolizmu BMK (Martinez i sar, 2013). Utvrđeno je da natrijum, kalijum, mangan i gvožđe, koji se u komercijalnoj podlozi (za rast BMK) nalaze u obliku soli (natrijum-sulfat, natrijum-acetat, kalijum-hidrogenfosfata, mangan-sulfata tetrahidrata i gvožđe(II)-sulfata heptahidrata) imaju značajan uticaj na efikasnu proizvodnju mlečne kiseline (Wang i sar., 2015). Dodatak malih količina cinka (vrednosti niže od 20 mg/l, 0,002%) ima pozitivan efekat na mlečno-kiselu fermentaciju (Boyaval, 1989).

4.4.2. Rezultati mlečno-kisele fermentacije uz dodatak kalcijum-karbonata

Korekcija pH vrednosti u optimalnom opsegu je ključna za uspešnu mlečno-kiselu fermentaciju, jer nastala mlečna kiselina inhibira ne samo rast ćelija proizvodnog mikroorganizma već i sintezu mlečne kiseline i to već pri niskim koncentracijama (Hetényi i sar. 2011). Kalcijum-karbonat je dodat kao sredstvo za neutralizaciju nastale mlečne kiseline u cilju održavanja pH vrednosti tokom fermentacije u optimalnom opsegu za metabolizam BMK (5,5–6,5) (Reddy i sar., 2008). Na slici 22 prikazane su koncentracije L-(+)- i D-(-)-mlečne kiseline, redukujućih šećera i vijabilnost ćelija *L. fermentum* i promena pH vrednosti tokom fermentacije hidrolizata pivskog tropa bez i sa dodatkom 2,0% kalcijum-karbonata.



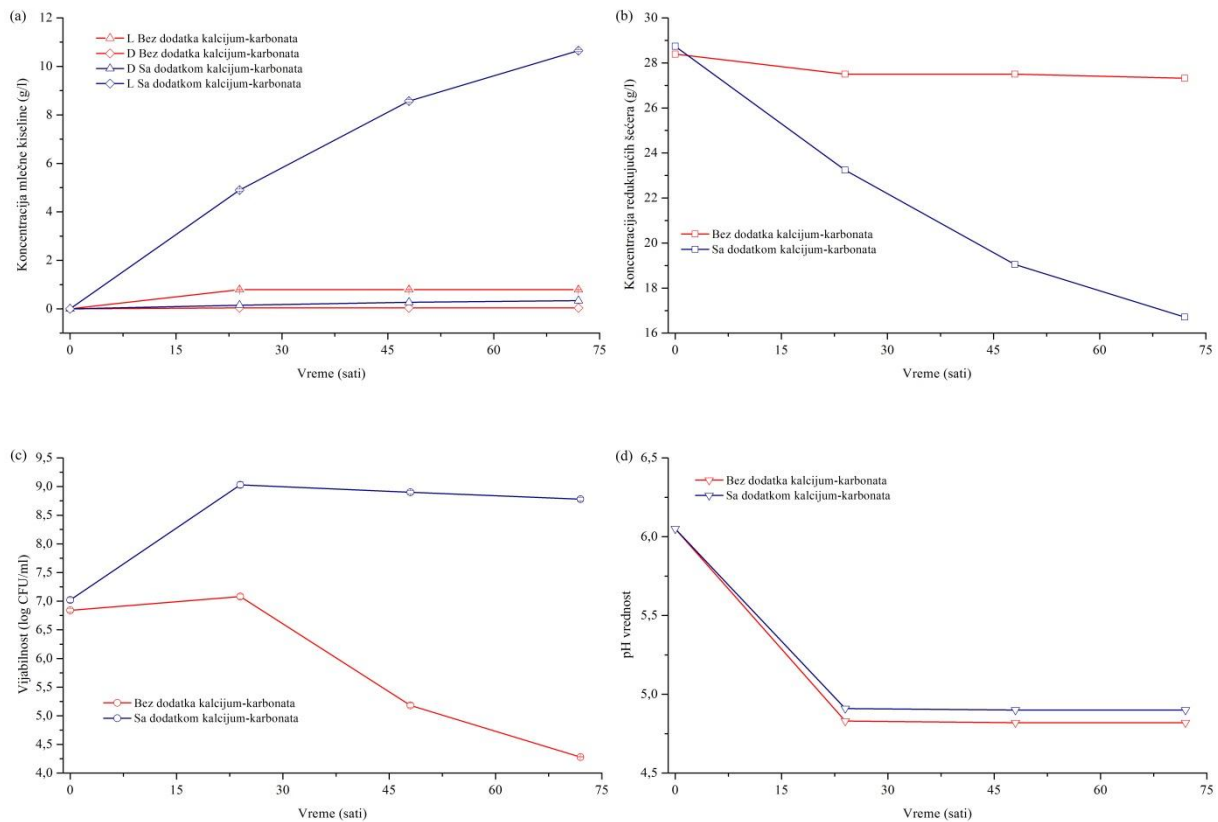
Slika 22. Mlečno-kisela fermentacija hidrolizata pivskog tropa sa *L. fermentum*: (a) koncentracija mlečne kiseline; (b) koncentracija redukujućih šećera; (c) vijabilnost ćelija; (d) pH

Konzentracija ukupne mlečne kiseline se povećala sa dodatkom kalcijum-karbonata za 11%. Dodatak kalcijum-karbonata je povećao koncentraciju ukupne mlečne kiseline (za oko 30%) u mlečno-kiseloj fermentaciji džibre tritikalea nakon proizvodnje bioetanola sa *L. fermentum* PL-1 (Marković i sar., 2014). Dodatkom kalcijum-karbonata se utrošak redukujućih šećera povećao za 3,72%. Vijabilnost ćelija *L. fermentum* je na kraju fermentacije sa dodatkom kalcijum-karbonata bila za 3% veća od vijabilnosti ćelija *L. fermentum* u fermentaciji bez dodatka kalcijum-karbonata. Marković i saradnici (2014) su postigli veću vijabilnost ćelija *L. fermentum* dodatkom kalcijum-karbonata u mlečno-kiseloj fermentaciji džibre tritikalea (iz proizvodnje bioetanola). Dodatak kalcijum-karbonata je imao pozitivan uticaj na vijabilnost ćelija *L. fermentum*.

Na slici 23 prikazane su koncentracije L-(+)- i D-(-)-mlečne kiseline, redukujućih šećera i vijabilnost ćelija *L. rhamnosus* i promene pH vrednosti tokom fermentacije hidrolizata pivskog tropa bez i sa dodatkom 2,0% kalcijum-karbonata.

Ćelije *L. rhamnosus* su tokom fermentacije proizvodile skoro samo L-(+)-mlečnu kiselinu (95–98%). Konzentracija L-(+)-mlečne kiseline se povećala 13 puta sa dodatkom kalcijum-karbonata. Dodatak kalcijum-karbonata je uticao na povećanje koncentracije L-(+)-mlečne kiseline (za oko 20%) u mlečno-kiseloj fermentaciji bistre džibre (iz proizvodnje bioetanola na ostacima hleba i otpadne vode iz proizvodnje glutena) sa *L. rhamnosus* ATCC 7469. Dodatak kalcijum-karbonata je povećao utrošak redukujućih šećera za 10 puta. Tokom fermentacije bez dodatka kalcijum-karbonata vijabilnost ćelija *L. rhamnosus* se smanjila za 37% dok se tokom fermentacije sa dodatkom kalcijum-karbonata vijabilnost povećala za 25%. Vijabilnost ćelija *L. rhamnosus* je na kraju fermentacije sa dodatkom kalcijum-karbonata bila za 105% veća od vijabilnosti ostvarene u fermentaciji bez dodatka kalcijum-karbonata. Djukić-Vuković i saradnici (2012) su takođe ostvarili povećanje vijabilnosti ćelija

L. rhamnosus u mlečno-kiseloj fermentaciji bistre džibre sa dodatkom kalcijum-karbonata. U mlečno-kiseloj fermentaciji bez dodatka kalcijum-karbonata su Djukić-Vuković i saradnici (2012) utvrdili smanjenje vijabilnosti ćelija *L. rhamnosus* tokom fermentacije.



Slika 23. Mlečno-kisela fermentacija hidrolizata pivskog tropa sa *L. rhamnosus*: (a) koncentracija mlečne kiseline (L-(+)-mlečna kiselina; D(-)-mlečna kiselina); (b) koncentracija redukujućih šećera; (c) vijabilnost ćelija; (d) pH

U fermentacijama najveće koncentracije ukupne, L-(+)- i D(-)- mlečne kiseline su proizvedena tokom 48 sati fermentacije. U svim fermentacijama se vijabilnost ćelija *L. fermentum* i *L. rhamnosus* povećala prvih 24 sata fermentacije nakon čega se smanjivala.

U fermentacijama sa dodatkom kalcijum-karbonata vrednosti pH su bile više od vrednosti u fermentacijama bez dodatka kalcijum-karbonata, posebno u fermentaciji sa *L. fermentum*. Marković i saradnici (2014) su utvrdili sličnu kinetiku smanjenja pH u mlečno-kiseloj fermentaciji džibre tritikalea, bez i sa dodatkom kalcijum-karbonata, sa *L. fermentum*. Dodatkom kalcijum-karbonata je postignuto održanje pH vrednosti iznad 5 u fermentaciji bistre džibre sa *L. rhamnosus* (Djukić-Vuković i sar., 2012).

U tabelama 19 i 20 prikazani su prinos L-(+)-, D(-)- i ukupne mlečne kiseline i zapreminska produktivnost dobijeni u fermentaciji hidrolizata pivskog tropa sa *L. fermentum* i *L. rhamnosus*, bez i sa dodatkom kalcijum-karbonata.

Tabela 19. Prinos L-(+)-, D-(-)- i ukupne mlečne kiseline i zapreminska produktivnost ukupne mlečne kiseline ostvareni u fermentacijama hidolizata pivskog tropa sa *L. fermentum* bez i sa dodatkom kalcijum-karbonata*

Uzorak	Sati	Prinos D-(+)-mlečne kiseline (%)	Prinos L-(+)-mlečne kiseline (%)	Prinos ukupne mlečne kiseline (%)	Zapreminska produktivnost ukupne mlečne kiseline (g/l·h ⁻¹)
Bez dodatka kalcijum-karbonata	24	11,33 ± 0,39	75,71±1,06	28,07 ± 0,52	0,02 ± 0,00^a
	48	12,10 ± 0,74	75,71±1,06	29,88 ± 0,98	0,01 ± 0,00
	72	12,11 ± 0,45^a	18,57 ± 0,68^a	30,68 ± 0,95^a	0,01 ± 0,00
Sa dodatkom kalcijum-karbonata	24	14,16 ± 0,43	16,49 ± 0,50	30,65 ± 0,93	0,02 ± 0,00^a
	48	16,26 ± 0,55	16,25 ± 0,55	32,51 ± 1,10	0,02 ± 0,00
	72	16,34 ± 0,58^b	18,54 ± 0,66^a	34,88 ± 1,11^b	0,01 ± 0,00

*Aritmetičke sredine označene različitim malim slovima u koloni su statistički značajno različite ($p < 0,05$).

Tabela 20. Prinos L-(+)-, D-(-)- i ukupne mlečne kiseline i zapreminska produktivnost ukupne mlečne kiseline ostvareni u fermentacijama hidolizata pivskog tropa sa *L. rhamnosus* bez i sa dodatkom kalcijum-karbonata*

Uzorak	Sati	Prinos D-(+)-mlečne kiseline (%)	Prinos L-(+)-mlečne kiseline (%)	Prinos ukupne mlečne kiseline (%)	Zapreminska produktivnost ukupne mlečne kiseline (g/l·h ⁻¹)
Bez dodatka kalcijum-karbonata	24	3,03 ± 0,03	73,13 ± 0,96	76,20 ± 0,98	0,03 ± 0,00^a
	48	3,49 ± 0,05	73,02 ± 0,89	76,51 ± 0,93	0,02 ± 0,00
	72	3,74 ± 0,03^a	74,27 ± 0,56^a	78,01 ± 0,57^a	0,01 ± 0,00
Sa dodatkom kalcijum-karbonata	24	2,63 ± 0,02	84,13 ± 0,52	86,77 ± 0,51	0,21 ± 0,01^a
	48	2,74 ± 0,02	86,42 ± 0,67	89,16 ± 0,69	0,18 ± 0,00
	72	2,81 ± 0,03^b	88,52 ± 0,41^b	91,33 ± 0,42^b	0,15 ± 0,00

*Aritmetičke sredine označene različitim malim slovima u koloni su statistički značajno različite ($p < 0,05$).

Dodatak kalcijum-karbonata je povećao prinos ukupne mlečne kiseline za 13% u fermentaciji sa *L. fermentum* i za 17% u fermentaciji sa *L. rhamnosus*. Najviša zapreminska produktivnosti je postignuta u 24. satu fermentacije nakon čega se smanjivala u svim fermentacijama. U fermentaciji sa *L. fermentum* dodatak kalcijum-karbonata nije uticao na povećanje zapreminske produktivnosti ukupne mlečne kiseline. U fermentaciji sa *L. rhamnosus* sa dodatkom kalcijum-karbonata je postignuta veća zapreminska produktivnost u poređenju sa fermentacijom bez dodatka kalcijum-karbonata (0,21 naprema 0,03 g/l·h⁻¹, povećanje od 600%). Marković i saradnici (2014) su utvrdili da dodatak kalcijum-karbonata ima pozitivan uticaj na mlečno-kiselu fermentaciju i efikasnost proizvodnje mlečne kiseline sa *L. fermentum* na džibri tritikalea, ostvarivši prinos L-(+)- i D-(-)-mlečne kiseline od 28,0% i 18,5% koji je sličan prinosu ostvarenom u mlečno-kiseloj fermentaciji hidolizata pivskog tropa sa dodatkom kalcijum-karbonata. Djukić-Vuković i saradnici (2012) su u mlečno-kiseloj fermentaciji bistre džibre, sa dodatkom kalcijum-karbonata, sa *L. rhamnosus* ostvarili prinos L-(+)-mlečne kiseline (oko 80%) sličan prinosu L-(+)-mlečne kiseline ostvarenom u fermentaciji hidrolizata pivskog tropa, sa dodatkom kalcijum-karbonata i sa *L. rhamnosus*.

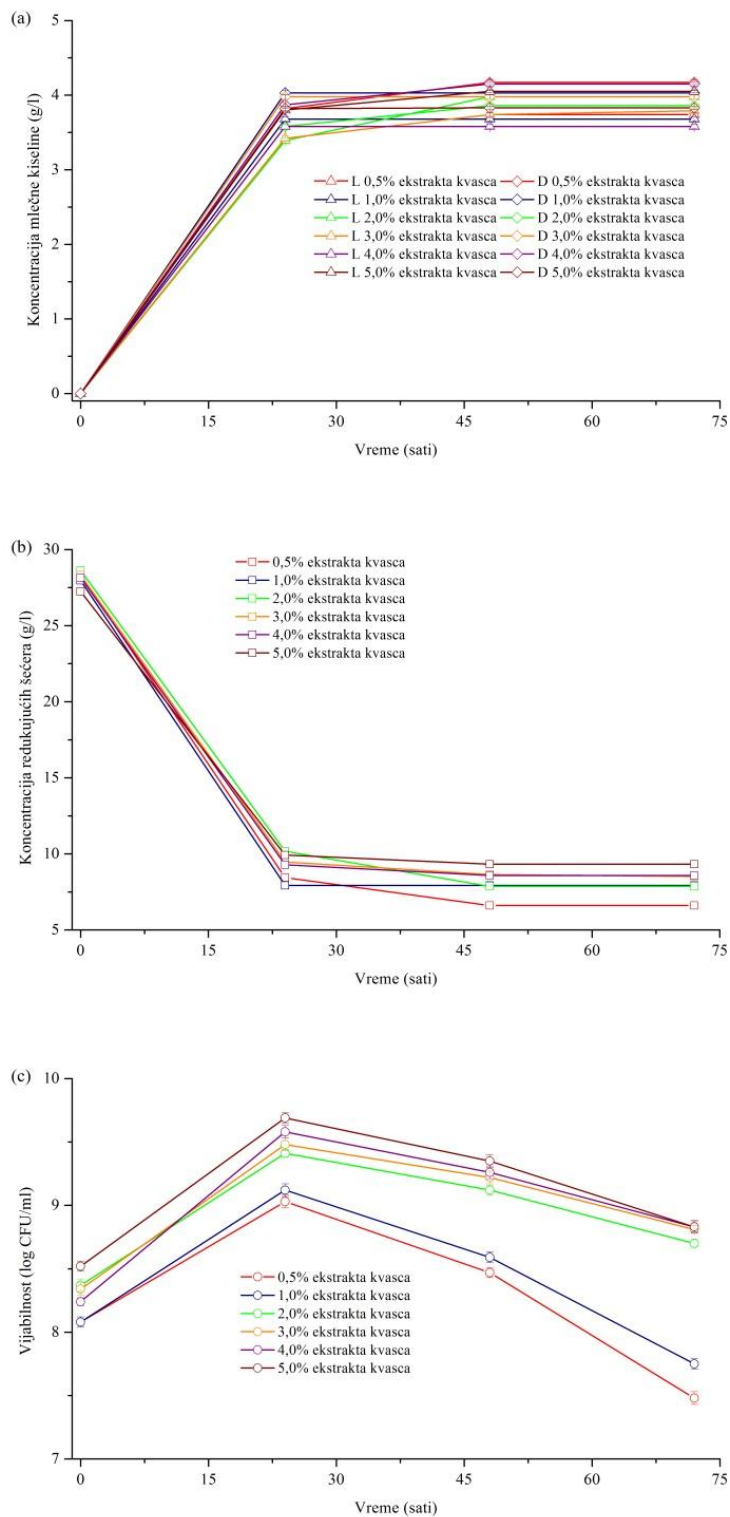
Dodatak kalcijum-karbonata je imao pozitivan uticaj na proizvodnju mlečne kiseline sa *L. fermentum* i *L. rhamnosus*. Sa dodatkom kalcijum-karbonata su se povećali utrošak redukujućih šećera, prinos i koncentracija mlečne kiseline i vijabilnost ćelija *L. fermentum* i *L. rhamnosus*. Dodatak kalcijum-karbonata je povećao zapreminsku produktivnost mlečne kiseline u mlečno-kiseloj fermentaciji sa *L. rhamnosus*.

4.4.3. Rezultati mlečno-kisele fermentacije hidrolizata pivskog tropa sa dodatkom ekstrakta kvasca (0,5-5,0%) i kalcijum-karbonata

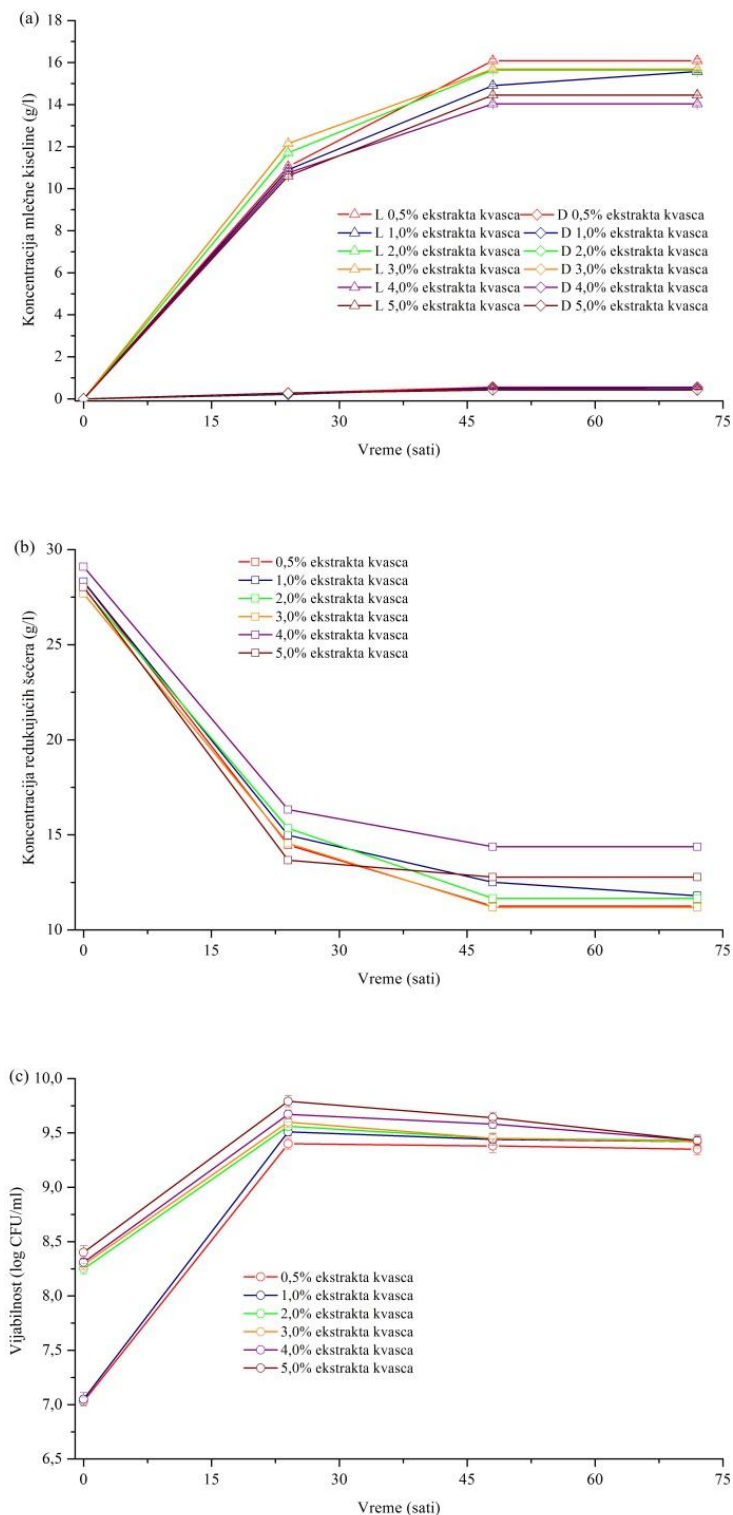
U svim fermentacijama je dodato 2,0% kalcijum-karbonata u cilju održavanja pH vrednosti u optimalnom opsegu. Za rast ćelija kod većine sojeva *Lactobacilli* spp. potreban je dodatak izvora azota, aminokiselina ili peptida (Manca de Nadra, 2007). Za efikasan rast i sintezu mlečne kiseline sa *L. rhamnosus* potrebne su podloge složenog nutritivnog sastava jer BMK ne poseduju enzime za sintezu vitamina B i aminokiseline (Cui i sar., 2012). Ekstrakt kvasca je dodan kao izvor azota, vitamina i minerala.

Na slici 24 prikazane su koncentracije L-(+)- i D-(-)-mlečne kiseline, redukujućih šećera i vijabilnost ćelija *L. fermentum* tokom fermentacije hidrolizata pivskog tropa bez i sa dodatkom ekstrakta kvasca (0,5-5,0%). Dodatkom ekstrakta kvasca koncentracija ukupne mlečne kiseline se povećala za 10 puta. Dodatak ekstrakta kvasca je povećao utrošak redukujućih šećera 8 puta. Vijabilnost ćelija *L. fermentum* je bila veća u fermentacijama sa dodatkom ekstrakta kvasca za 9% (0,5% ekstrakta kvasca) – 29% (5,0% ekstrakta kvasca) u poređenju sa vijabilnošću u fermentaciji bez dodatka ekstrakta kvasca. Bolja vijabilnosti ćelija *L. fermentum* se mogu objasniti dodatkom ekstrakta kvasca, jer ekstrakt kvasca sadrži vitamine, minerale, proteine, aminokiseline i druge nutritijente neophodne u metabolizmu BMK (Hofvendahl i Hahn-Hägerdal, 2000). Calderon i saradnici (2001) su postigli mnogo bolji rast ćelija *L. fermentum* Ogi E1 dodatkom ekstrakta kvasca u mlečno-kiselej fermentaciji skroba sa dodatkom mineralnih soli (magnezijum-sulfat, mangan-sulfat, fosfatni pufer i diamonijum-sulfat).

Na slici 25 prikazane su koncentracije L-(+)- i D-(-)-mlečne kiseline, redukujućih šećera i vijabilnost ćelija *L. rhamnosus* tokom fermentacije hidrolizata pivskog tropa bez i sa dodatkom ekstrakta kvasca. Koncentracija L-(+)-mlečne kiseline se povećala sa dodatkom ekstrakta kvasca za 31,83 (4% ekstrakta kvasca) – 51,05% (0,5% ekstrakta kvasca). Dodatak ekstrakta kvasca je povećao utrošak redukujućih šećera za 22,36% (4,0% ekstrakta kvasca) – 41,65% (0,5% ekstrakta kvasca) u poređenju sa fermentacijom bez dodatka ekstrakta kvasca i sa dodatkom kalcijum-karbonata. Vijabilnost ćelija *L. rhamnosus* u fermentacijama sa dodatkom ekstrakta kvasca je bila veća za 6% (0,5% ekstrakta kvasca) – 7% (5,0% ekstrakta kvasca) od vijabilnosti u fermentaciji bez dodatka ekstrakta kvasca. Liew i saradnici (2005) su ostvarili visoku vijabilnost ćelija *L. rhamnosus* ($\log_{10} 9,35$; $2,2 \cdot 10^9$ CFU/ml) u mlečno-kiselej fermentaciji na glukozi uz dodatak ekstrakta kvasca i vitamina. U svim fermentacijama sa *L. fermentum* i *L. rhamnosus* sa dodatkom ekstrakta kvasca (0,5–5,0%) najveća koncentracija mlečne kiseline je proizvedena tokom 48 sati fermentacije. U svim fermentacijama vijabilnost ćelija *L. fermentum* i *L. rhamnosus* je rasla prvih 24 sata fermentacije nakon čega se smanjivala. Mussatto i saradnici (2008a) su uočili da je ćelijski rast *L. delbrueckii* UFV H2B20 na hidrolizatu pivskog tropa sa dodatkom ekstrakta kvasca ili komponenti MRS bujona bio intenzivan i brz, ali je stao nakon 12 sati fermentacije.



Slika 24. Mlečno-kisela fermentacija hidrolizata pivskog tropa sa dodatkom različitih koncentracija ekstrakta kvasca (0,5-5,0%) sa *L. fermentum*: (a) koncentracija mlečne kiseline (L–L-(+)-mlečna kiselina; D–D(-)-mlečna kiselina); (b) koncentracija redukujućih šećera; (c) vijabilnost ćelija



Slika 25. Mlečno-kisela fermentacija hidrolizata pivskog tropa sa dodatkom različitih koncentracija ekstrakta kvasca (0,5-5,0%) sa *L. rhamnosus*: (a) koncentracija mlečne kiseline (L-(+)-mlečna kiselina; D-(-)mlečna kiselina); (b) koncentracija redukujućih šećera; (c) vijabilnost ćelija

U tabelama 21 i 22 prikazani su prinos L-(+)-, D-(-)- i ukupne mlečne kiseline i zapreminska produktivnost ostvareni u fermentaciji hidrolizata pivskog tropa sa *L. fermentum* i *L. rhamnosus* uz dodatak ekstrakta kvasca (0,5-5,0%). Dodatak ekstrakta kvasca je povećao prinos ukupne mlečne kiseline za 4% (0,5% ekstrakta kvasca) – 26% (5,0% ekstrakta kvasca)

u fermentacijama sa *L. fermentum*. U fermentacijama sa *L. fermentum* najveći prinos ukupne mlečne kiseline (44%) je postignut dodatkom 5,0% ekstrakta kvasca. Dodatak ekstrakta kvasca je povećao prinos ukupne mlečne kiseline za 7% (0,5% ekstrakta kvasca) – 8% (2,0% ekstrakta kvasca) u fermentacijama sa *L. rhamnosus*. U fermentacijama sa *L. rhamnosus* najveći prinos ukupne mlečne kiseline (98%) i L-(+)-mlečne kiseline (96%) je ostvaren u fermentaciji sa dodatkom 2,0% ekstrakta kvasca. Na osnovu rezultata zapaža se da je dodatak od 2,0% ekstrakta kvasca dovoljan za postizanje visokih prinosa u fermentaciji sa *L. rhamnosus*.

Mussatto i saradnici (2008a) su postigli visok prinos L-(+)-mlečne kiseline (99%) u fermentaciji hidrolizata pivskog tropa sa *L. delbrueckii* UFV H2B20 sa dodatkom komponenti MRS bujona uz korekciju pH. Djukić-Vuković i saradnici (2012, 2013a,b, 2015) su takođe postigli visoke prinose L-(+)-mlečne kiseline (preko 90%) u fermentacijama sa *L. rhamnosus* ATCC 7469 na džibri. Na kukuruzovini tretiranoj sa natrijum-hidroksidom u mlečno-kiseloj fermentaciji sa *L. rhamnosus* uz korekciju pH dodatkom kalcijum-karbonata, Cui i saradnici (2011) su postigli prinos mlečne kiseline od 70%. U mlečno-kiseloj fermentaciji sa *L. rhamnosus* LA-04-1 na glukozu (100 g/l) sa dodatkom 1,5% ekstrakta kvasca i kalcijum-karbonata, Li i saradnici (2010) su postigli prinos mlečne kiseline od 95%.

Tabela 21. Prinos L-(+)-, D-(-)- i ukupne mlečne kiseline i zapreminska produktivnost ukupne mlečne kiseline ostvareni u fermentaciji hidrolizata pivskog tropa sa *L. fermentum* uz dodatak ekstrakta kvasca*

% dodatka ekstrakta kvasca	Sati	Prinos D-(+)-mlečne kiseline (%)	Prinos L-(+)-mlečne kiseline (%)	Prinos ukupne mlečne kiseline (%)	Zapreminska produktivnost ukupne mlečne kiseline (g/l·h ⁻¹)
0,0	24	14,16 ± 0,43	16,49 ± 0,50	30,65 ± 0,93	0,02 ± 0,00^a
	48	16,26 ± 0,55	16,25 ± 0,55	32,51 ± 1,10	0,02 ± 0,00
	72	16,34 ± 0,58^a	18,54 ± 0,66^{bc}	34,88 ± 1,11^a	0,01 ± 0,00
0,5	24	19,12 ± 0,11	17,12 ± 0,16	36,24 ± 0,05	0,30 ± 0,02^b
	48	19,20 ± 0,14	17,23 ± 0,11	36,42 ± 0,05	0,16 ± 0,01
	72	19,20 ± 0,14^c	17,23 ± 0,11^a	36,42 ± 0,05^b	0,11 ± 0,01
1,0	24	20,01 ± 0,18	18,29 ± 0,13	38,30 ± 0,30	0,32 ± 0,02^c
	48	20,10 ± 0,18	18,38 ± 0,13	38,49 ± 0,31	0,16 ± 0,01
	72	20,10 ± 0,18^d	18,38 ± 0,13^b	38,49 ± 0,31^d	0,11 ± 0,01
2,0	24	19,29 ± 0,17	18,29 ± 0,12	37,58 ± 0,14	0,29 ± 0,02^d
	48	18,61 ± 0,07	19,17 ± 0,13	37,78 ± 0,15	0,16 ± 0,01
	72	18,61 ± 0,07^b	19,17 ± 1,13^c	37,78 ± 0,15^c	0,11 ± 0,01
3,0	24	20,98 ± 0,08	18,04 ± 0,08	39,02 ± 0,15	0,31 ± 0,02^e
	48	20,21 ± 0,14	19,02 ± 0,12	39,22 ± 0,17	0,16 ± 0,01
	72	20,08 ± 0,16^d	19,14 ± 0,16^c	39,22 ± 0,32^e	0,11 ± 0,01
4,0	24	20,42 ± 0,07	18,87 ± 0,07	39,29 ± 0,15	0,31 ± 0,02^f
	48	21,21 ± 0,08	18,28 ± 0,10	39,50 ± 0,17	0,16 ± 0,01
	72	21,21 ± 0,08^e	18,28 ± 0,10^b	39,50 ± 0,17^e	0,11 ± 0,01
5,0	24	21,92 ± 0,14	21,82 ± 0,10	43,75 ± 0,06	0,32 ± 0,02^g
	48	21,39 ± 0,11	22,62 ± 0,09	44,00 ± 0,20	0,16 ± 0,01
	72	21,39 ± 0,11^e	22,62 ± 0,09^d	44,00 ± 0,20^f	0,11 ± 0,01

*Aritmetičke sredine označene različitim malim slovima u koloni su statistički značajno različite ($p < 0,05$).

U svim fermentacijama sa *L. fermentum* i *L. rhamnosus* sa dodatkom ekstrakta kvasca (0,5–5,0%) su najviše vrednost zapreminske produktivnosti postignute u 24. satu fermentacije. Veoma niska zapreminska produktivnost je dobijena u fermentaciji sa *L. fermentum* bez dodatka ekstrakta kvasca. Vrednosti zapreminske produktivnosti su bile veoma slične u svim fermentacijama sa dodatkom ekstrakta kvasca. Dodatak ekstrakta kvasca je povećao zapreminsku produktivnost ukupne mlečne kiseline za 13,5 (2% ekstrakta kvasca) –

15 (1% ekstrakta kvasca) puta. U fermentacijama hidrolizata pivskog tropa sa *L. rhamnosus*, dodatak ekstrakta kvasca je povećao zapreminsku produktivnost ukupne mlečne kiseline za 115,89% (5,0% ekstrakta kvasca) – 146,65% (3,0% ekstrakta kvasca). Zapreminska produktivnost je bila veća u fermentacijama sa *L. rhamnosus* u poređenju sa fermentacijama sa *L. fermentum*. U fermentaciji sa *L. rhamnosus* sa dodatkom 3,0% ekstrakta kvasca postignuta je najveća zapreminska produktivnost (0,52 g/l·h⁻¹). Cui i saradnici (2012) su utvrdili da ekstrakt kvasca ima veoma dobar uticaj na mlečno-kiselu fermentaciju i efikasnost proizvodnje mlečne kiseline sa *L. rhamnosus* na surutki. Cui i saradnici (2011) su u fermentaciji sa *L. rhamnosus* na kukuruzovini tretiranoj sa natrijum-hidroksidom, postigli zapreminsku produktivnost od 0,49 g/l·h⁻¹, koja je bila slična sa zapreminskom produktivnošću ostvarenoj na hidrolizatu pivskog tropa sa dodatkom 2,0% ekstrakta kvasca.

Tabela 22. Prinos L-(+)-, D-(-)- i ukupne mlečne kiseline i zapreminska produktivnost ukupne mlečne kiseline ostvareni u fermentaciji hidrolizata pivskog tropa sa *L. rhamnosus* uz dodatak ekstrakta kvasca*

% dodatka ekstrakta kvasca	Sati	Prinos D-(+)-mlečne kiseline (%)	Prinos L-(+)-mlečne kiseline (%)	Prinos ukupne mlečne kiseline (%)	Zapreminska produktivnost ukupne mlečne kiseline (g/l·h ⁻¹)
0,0	24	2,63 ± 0,02	84,13 ± 0,52	86,77 ± 0,51	0,21 ± 0,01^a
	48	2,74 ± 0,02	86,42 ± 0,67	89,16 ± 0,69	0,18 ± 0,00
	72	2,81 ± 0,03^b	88,52 ± 0,41^a	91,33 ± 0,42^a	0,15 ± 0,00
0,5	24	1,93 ± 0,02	79,86 ± 0,49	81,79 ± 0,47	0,47 ± 0,01^c
	48	3,29 ± 0,06	94,41 ± 0,41	97,69 ± 0,36	0,35 ± 0,01
	72	3,29 ± 0,06^d	94,41 ± 0,41^b	97,69 ± 0,36^b	0,23 ± 0,01
1,0	24	1,68 ± 0,01	81,84 ± 0,70	83,52 ± 0,71	0,46 ± 0,01^{bc}
	48	3,27 ± 0,04	94,35 ± 0,25	97,62 ± 0,19	0,32 ± 0,01
	72	3,27 ± 0,06^d	94,35 ± 0,25^b	97,62 ± 0,31^b	0,22 ± 0,01
2,0	24	2,06 ± 0,06	92,81 ± 0,53	94,87 ± 0,53	0,50 ± 0,01^d
	48	2,74 ± 0,06	95,97 ± 0,46	98,71 ± 0,46	0,34 ± 0,01
	72	2,74 ± 0,06^{ab}	95,97 ± 0,46^d	98,71 ± 0,46^c	0,22 ± 0,01
3,0	24	2,14 ± 0,01	92,51 ± 0,57	94,65 ± 0,58	0,52 ± 0,01^e
	48	2,71 ± 0,04	95,03 ± 0,40	97,74 ± 0,37	0,34 ± 0,01
	72	2,71 ± 0,04^a	95,03 ± 0,40^{bc}	97,74 ± 0,37^b	0,22 ± 0,01
4,0	24	2,17 ± 0,01	84,13 ± 0,73	86,30 ± 0,72	0,46 ± 0,01^{bc}
	48	3,15 ± 0,03	95,38 ± 0,41	98,53 ± 0,38	0,30 ± 0,01
	72	3,15 ± 0,03^c	95,38 ± 0,41^{cd}	98,53 ± 0,38^c	0,20 ± 0,01
5,0	24	2,07 ± 0,01	81,40 ± 0,65	83,47 ± 0,65	0,45 ± 0,01^b
	48	2,80 ± 0,04	94,72 ± 0,23	97,52 ± 0,20	0,31 ± 0,01
	72	2,80 ± 0,04^b	94,72 ± 0,23^{bc}	97,52 ± 0,20^b	0,21 ± 0,01

*Aritmetičke sredine označene različitim malim slovima u koloni su statistički značajno različite ($p < 0,05$).

Dodatak kalcijum-karbonata i ekstrakta kvasca su imali značajan uticaj na proizvodnju mlečne kiseline sa *L. fermentum* i *L. rhamnosus* na hidrolizatu pivskog tropa. U fermentacijama sa *L. fermentum* postignuti su niski prinosi mlečne kiseline (30–44%) kao i niska zapreminska produktivnost. Zbog toga se može zaključiti da soj *L. fermentum* nije odgovarajući soj za mlečno-kiselu fermentaciju hidrolizata pivskog tropa, čak i u uslovima dodatka izuzeno visokih koncentracija ekstrakta kvasca. Hidrolizat pivskog tropa sa dodatkom ekstrakta kvasca se pokazao kao dobra podloga za mlečno-kiselu fermentaciju sa *L. rhamnosus*. Na osnovu rezultata odlučeno je da će se u daljim ispitivanjima mlečno-kisele fermentacije hidrolizata pivskog tropa kao proizvodni mikroorganizam koristiti *L. rhamnosus*.

4.4.4. Rezultati mlečno-kisele fermentacije hidrolizata pivskog tropa sa korekcijom pH i različitim početnim koncentracijama redukujućih šećera

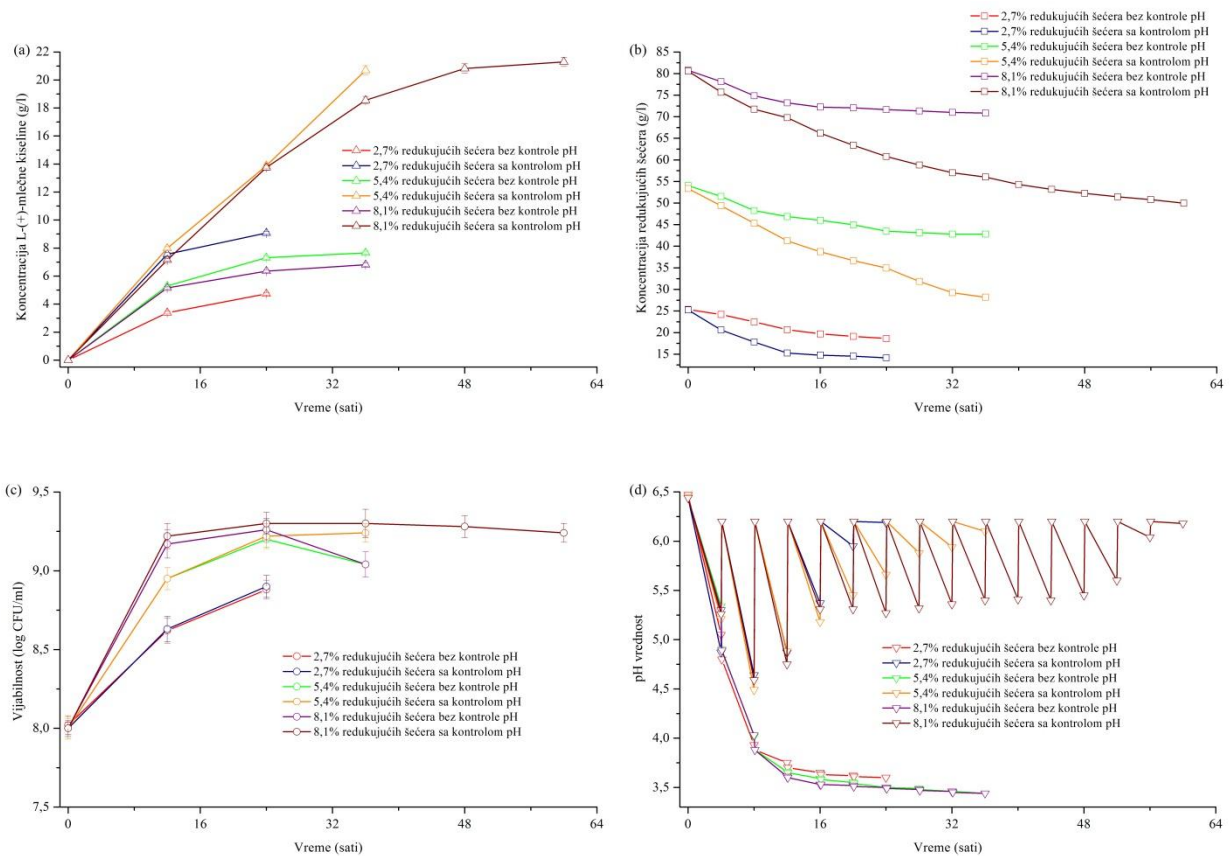
Upotreba kalcijum-karbonata tokom mlečno-kisele fermentacije ima nekoliko nedostataka. Zaostali kalcijum-karbonat pravi probleme tokom izdvajanje mlečne kiseline. Takođe izdvajanje mlečne kiseline nakon fermentacije zahteva dodatan korak pri čemu nastaju velike količine gipsa koji je štetan za okolinu. Tokom fermentacije kalcijum-karbonat otežava uniformno mešanje zbog težnje čestica kalcijum-karbonata ka aglomeraciji (Djukić-Vuković, 2013).

U cilju zamene kalcijum-karbonata i povećanja efikasnosti mlečno-kisele fermentacije ispitana je upotreba natrijum-hidroksida kao sredstva za neutralizaciju. Upotrebom natrijum-hidroksida se mlečna kiseline jednostavnije izdvaja nakon fermentacije. Natrijum-hidroksid je dodavan u obliku 30% rastvora kako bi se smanjio uticaj promene zapremine na koncentraciju nutritijenata u podlozi za mlečno-kiselu fermentaciju. Početna koncentracija redukujućih šećera u podlozi za fermentaciju utiče na proizvodni mikroorganizam, pre svega na dužinu lag faze i više koncentracije redukujućih šećera u podlozi mogu imati inhibitoran efekat na mlečno-kiselu fermentaciju. Koncentracija redukujućih šećera koja deluje inhibitoryno je različita za svaki proizvodni mikroorganizam, zbog čega se tokom optimizacije parametara fermentacije mora uzeti u obzir i početna koncentracije redukujućih šećera u podlozi (Djukić-Vuković i sar., 2013a).

Ispitivan je uticaj korekcije pH dodatkom natrijum-hidroksida na efikasnost mlečno-kisele fermentacije. Takođe je ispitan uticaj različitih početnih koncentracija redukujućih šećera (2,7; 5,4 i 8,1), bez i sa korekcijom pH (dodatkom natrijum-hidroksida), na efikasnost mlečno-kisele fermentacije.

Koncentracije L-(+)-mlečne kiseline i redukujućih šećera, vijabilnost ćelija *L. rhamnosus* i promena pH vrednosti tokom fermentacije hidrolizata pivskog tropa sa početnom koncentracijom redukujućih šećera od 2,7; 5,4 i 8,1%, bez i sa dodatkom natrijum-hidroksida je prikazana na slici 26.

U fermentacijama bez korekcijom pH na sve tri početne koncentracije redukujućih šećera ostvarene su niske koncentracije L-(+)-mlečne kiseline, 4,73 g/l (2,7%), 7,66 g/l (5,4%) i 6,81 g/l (8,1%). Korekcija pH je povećala koncentraciju L-(+)-mlečne kiseline u fermentacijama na sve tri početne koncentracije redukujućih šećera i to za 91,97% (2,7%), 170,10% (5,4%) i 212,63% (8,1%). U poređenju sa rezultatima bez korekcije pH, Mussatto i saradnici (2008a) su ostvarili sličnu koncentraciju mlečne kiseline od 7,87 g/l u fermentaciji hidrolizata pivskog tropa sa početnom koncentracijom glukoze od 5,0% bez korekcije pH sa *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20. U fermentaciji bez dodatka nutritijenata sa korekcijom pH Mussatto i saradnici (2008a) su postigli nižu koncentraciju mlečne kiseline (12,76 g/l) u poređenju sa ostvarenim koncentracijama u fermentaciji sa korekcijom pH (20,69 g/l).



Slika 26. Mlečno-kisela fermentacija hidrolizata pivskog tropa sa *L. rhamnosus* bez i sa korekcijom pH i sa različitim početnim koncentracijama redukujućih šećera u hidrolizatu pivskog tropa (2,7; 5,4 i 8,1%): (a) koncentracija L-(+)-mlečne kiseline; (b) koncentracija redukujućih šećera; (c) vijabilnost ćelija; (d) pH

Korekcija pH je uticala na kinetiku utroška redukujućih šećera, pri čemu su utrošak redukujućih šećera i konverzija u L-(+)-mlečnu kiselinu u fermentacijama bez korekcije pH bili mnogo sporiji nego kod fermentacija sa korekcijom pH na sve tri koncentracije redukujućih šećera. Korekcija pH je povećala utrošak redukujućih šećera tokom fermentacija u poređenju sa fermentacijama bez korekcije pH i to za 68,22% (2,7%), 123,88% (5,4%) i 209,09% (8,1%).

U fermentacijama sa korekcijom pH sa početnim koncentracijama redukujućih šećera od 5,4 i 8,1% vijabilnost ćelija *L. rhamnosus* je bila veća u poređenju sa fermentacijama bez korekcije pH. U fermentacijama bez korekcije pH, vrednost pH se brzo smanjila (nakon 8 sati fermentacije) što je značajno uticalo na fermentaciju.

Prinos L-(+)-mlečne kiseline i zapreminska produktivnost mlečno-kisele fermentacije hidrolizata pivskog tropa sa 2,7; 5,4 i 8,1%, redukujućih šećera, bez i sa korekcijom pH su prikazani u tabeli 23.

Tabela 23. Prinos i zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline u mlečno-kiseloj fermentaciji hidrolizata pivskog tropa sa *L. rhamnosus* i različitim početnim koncentracijama redukujućih šećera u hidrolizatu pivskog tropa (2,7; 5,4 i 8,1%)*

Hidrolizat pivskog tropa		Sati	Prinos L-(+)-mlečne kiseline (%)	Zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline (g/l·h ⁻¹)
Sa 2,7% redukujućih šećera	Bez korekcije pH	12	72,45 ± 1,76	0,28 ± 0,01^a
		24	70,47 ± 1,61^b	0,20 ± 0,01
	Sa korekcijom pH	12	75,71 ± 1,06	0,63 ± 0,01^d
		24	81,80 ± 0,85^c	0,38 ± 0,01
Sa 5,4% redukujućih šećera	Bez korekcije pH	12	73,73 ± 1,30	0,44 ± 0,01^b
		24	69,31 ± 1,04	0,30 ± 0,01
		36	68,16 ± 0,98^a	0,21 ± 0,01
	Sa korekcijom pH	12	65,94 ± 0,88	0,67 ± 0,01^e
		24	75,38 ± 1,29	0,58 ± 0,01
		36	82,25 ± 1,17^c	0,57 ± 0,01
Sa 8,1% redukujućih šećera	Bez korekcije pH	12	68,39 ± 1,46	0,43 ± 0,01^b
		24	69,89 ± 1,07	0,26 ± 0,01
		36	68,76 ± 1,01^{ab}	0,19 ± 0,01
	Sa korekcijom pH	12	66,19 ± 0,96	0,60 ± 0,01^c
		24	69,42 ± 0,87	0,57 ± 0,01
		36	75,55 ± 0,94	0,52 ± 0,01
		48	73,52 ± 1,02	0,43 ± 0,01
		60	69,55 ± 0,95^{ab}	0,35 ± 0,01

*Aritmetičke sredine označene različitim malim slovima u koloni su statistički značajno različite ($p < 0,05$).

Korekcija pH je povećala prinos L-(+)-mlečne kiseline u fermentacijama sa početnom koncentracijom redukujućih šećera od 2,7 i 5,4% (za 16,07% i 20,66%) u hidrolizatu pivskog tropa u poređenju sa fermentacijom bez korekcije pH. Najveći prinos L-(+)-mlečne kiseline je bio ostvaren sa 5,4% redukujućih šećera. Značajno niže zapreminske produktivnosti su ostvarene u fermentacijama bez korekcije pH na sve tri početne koncentracije redukujućih šećera. Najviše zapreminske produktivnosti mlečne kiseline u svim fermentacijama su postignute u 12. satu fermentacije. Korekcija pH je povećala utrošak redukujućih šećera na sve tri početne koncentracije redukujućih šećera i to za 65,85 (2,7%), 126,77 (5,4%) i 209,72% (8,1%). Najviša zapreminska produktivnost i utrošak šećera su ostvarene sa 5,4% redukujućih šećera (0,67 g/l h⁻¹ i 47,15%).

Vrednost pH je jedna od ključnih faktora koji utiču na proizvodnju mlečne kiseline, jer katalitička aktivnost enzima i metabolička aktivnost proizvodnog mikroorganizma zavisi od pH vrednosti podloge (Mussatto i sar., 2008a). Bez korekcije pH, pH vrednost podloge se smanjuje sa povećanjem koncentracije mlečne kiseline, usled čega dolazi do inhibicije rasta ćelija i proizvodnje mlečne kiseline (Wang i sar., 2015). Mehanizam inhibicije rasta i metabolizma soja *L. rhamnosus* usled nastanka mlečne kiseline je složen proces i ne može se reći da zavisi samo od jednog oblika ravnoteže mlečne kiseline i nastalog laktata, niti se može uopštiti za širok opseg pH vrednosti podloge (Gonçalves i sar., 1997). Neutralizacija nastale mlečne kiseline korekcijom pH samo delimično otklanja probleme tokom fermentacije jer i vezana mlečna kiselina može delovati kao inhibitor (Hetényi i sar., 2011).

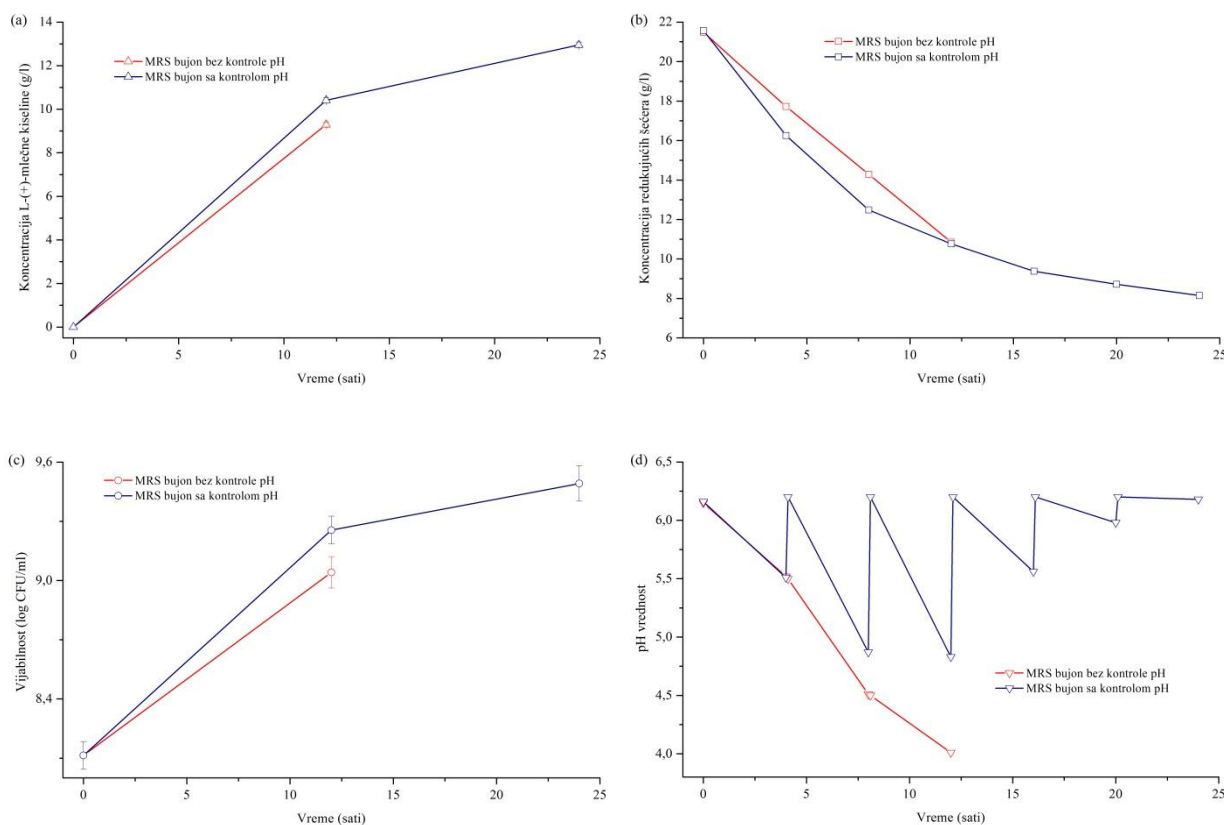
Idris i Suzane (2006) su ispitali uticaj početne vrednosti pH 4,5–8,5 na proizvodnju mlečne kiseline sa *L. delbrueckii* ATCC 9646. Početna vrednost pH od 6,5 najpovoljnije je delovala na proizvodni mikroorganizam pri čemu je postignut najveći procenat utroška šećera i najveća koncentracija mlečne kiseline. Korekcija pH je uticala na kinetiku utroška

redukujućih šećera, pri čemu su utrošak redukujućih šećera i konverzija u L-(+)-mlečnu kiselinu u fermentacijama bez korekcije pH bili mnogo sporiji nego kod fermentacija sa korekcijom pH na sve tri koncentracije redukujućih šećera na početku fermentacije.

Korekcija pH je značajno uticala na efikasnost mlečno-kisele fermentacije. Prinos i zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline, kao i vijabilnost ćelija *L. rhamnosus* i utrošak redukujućih šećera tokom fermentacije su se značajno povećali sa korekcijom pH. Zamena kalcijum-karbonata sa natrijum-hidroksidom kao sredstva za korekciju pH je uticala na skraćanje trajanja fermentacije bez smanjenja efikasnosti mlečno-kisele fermentacije i ostvareno je značajno povećanje zapreminske produktivnosti L-(+)-mlečne kiseline.

4.4.5 Rezultati mlečno-kisele fermentacije MRS bujona i hidrolizata pivskog tropa sa dodatkom MRS bujona

U cilju određivanja maksimalnih vrednosti prinosa i zapreminske produktivnosti L-(+)-mlečne kiseline, u mlečno-kiselom fermentaciji sa *L. rhamnosus*, korišćen je MRS bujon koji je komercijalna podloga optimizovana za rast BMK. Koncentracije L-(+)-mlečne kiseline i redukujućih šećera, vijabilnost ćelija *L. rhamnosus* i promena pH vrednosti tokom fermentacije MRS bujona bez i sa korekcijom pH je prikazana na slici 27.



Slika 27. Mlečno-kisela fermentacija MRS bujona sa *L. rhamnosus*: (a) koncentracija L-(+)-mlečne kiseline; (b) koncentracija redukujućih šećera; (c) vijabilnost ćelija; (d) pH

Korekcija pH u fermentaciji MRS bujona je povećala koncentraciju L-(+)-mlečne kiseline za 39,4% (12,95 g/l) (slika 27a). Utrošak redukujućih šećera tokom fermentacija bez korekcije pH je bio niži od utroška redukujućih šećera u fermentacija sa korekcijom pH, pri čemu se fermentacija MRS bujona bez korekcije pH završila u 12. satu fermentacije. Utrošak

redukujućih šećera se sa korekcijom pH u fermentacijama MRS bujona povećao za 26,13%. Tokom fermentacije MRS bujona sa korekcijom pH vrednosti vijabilnost ćelija *L. rhamnosus* se povećala (za 5%) u poređenju sa vijabilnošću ostvarenom u fermentaciji MRS bujona bez korekcije pH.

Prinos L-(+)-mlečne kiseline i zapreminska produktivnost u fermentacijama MRS bujona bez i sa korekcijom pH su prikazane u tabeli 24.

Tabela 24. Prinos i zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline u mlečno-kiseloj fermentaciji MRS bujona bez i sa korekcijom pH*

MRS bujon	Vreme (sati)	Prinos L-(+)-mlečne kiseline (%)	Zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline (g/l·h ⁻¹)
Bez korekcije pH	12	87,31 ± 1,03^a	0,77 ± 0,01^a
Sa korekcijom pH	12	96,39 ± 1,33	0,87 ± 0,01^b
	24	96,50 ± 0,97^b	0,54 ± 0,01

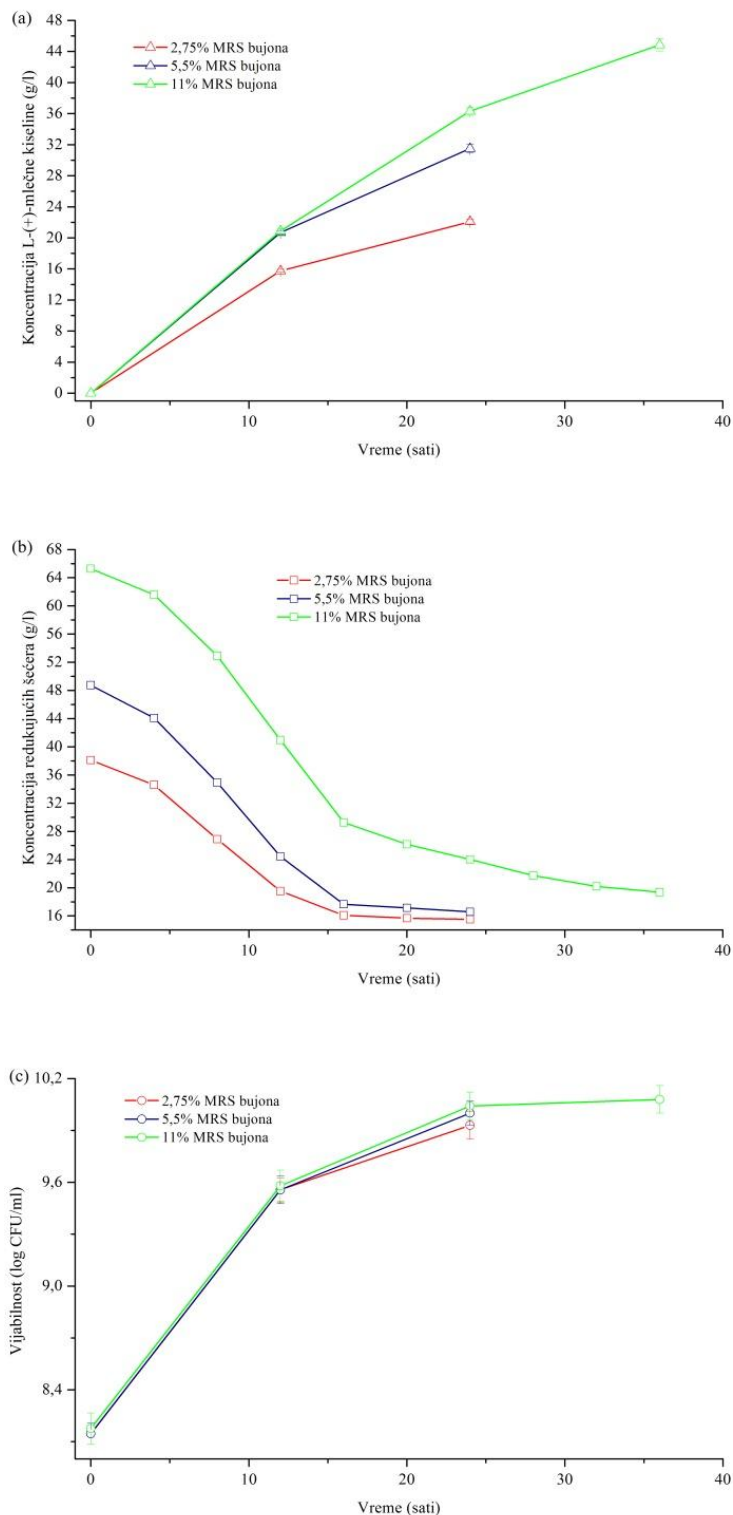
*Aritmetičke sredine označene različitim malim slovima u koloni su statistički značajno različite ($p < 0,05$).

Korekcija pH je povećala prinos i zapreminsku produktivnost L-(+)-mlečne kiseline za 10,52 i 12,99%.

U cilju ispitivanja mogućnosti povećanja prinosa i zapreminske produktivnosti L-(+)-mlečne kiseline u hidrolizat pivskog tropa su dodate različite količine MRS bujona (2,75; 5,5 i 11%). pH je tokom fermentacije korigovana dodatkom natrijum-hidroksida. Koncentracije L-(+)-mlečne kiseline i redukujućih šećera i vijabilnost ćelija *L. rhamnosus* tokom fermentacije hidrolizata pivskog tropa sa dodatkom MRS bujona (2,75; 5,5 i 11%) sa *L. rhamnosus* je prikazana na slici 28.

Koncentracija MRS bujona od 5,5% sadrži istu koncentraciju nutritijenata (osim glukoze) kao i standardni rastvor MRS bujona koji se koristi u mikrobiološkim ispitivanjima. Dodatak MRS bujona je povećao koncentraciju redukujućih šećera u hidrolizatu pivskog tropa (kod koga je početna koncentracija redukujućih šećera bila 2,7% i to za 3,8% (2,75% MRS bujona), 4,9% (5,5% MRS bujona) i 6,5% (11,0% MRS bujona).

Dodatak MRS bujona u hidrolizat pivskog tropa je povećao koncentraciju L-(+)-mlečne kiseline za 143,28% (2,75% MRS bujona), 246,92% (5,5% MRS bujona) i 393,94% (11,0% MRS bujona) u poređenju sa koncentracijom dobijenom u fermentaciji hidrolizata pivskog tropa bez dodatka MRS bujona (slika 28a). Značajno je povećao i utrošak redukujućih šećera za 103,57% (2,75% MRS bujona), 190,18% (5,5% MRS bujona) i 313,82%, (11,0% MRS bujona) u poređenju sa fermentacijom bez dodatka MRS bujona (slika 28b). Vijabilnost ćelija *L. rhamnosus* je povećana za 11,50% (2,75% MRS bujona), 12,31%, (5,5% MRS bujona) i 12,76%, (11,0% MRS bujona) (slika 28c).



Slika 28. Mlečno-kisela fermentacija hidrolizata pivskog tropa sa dodatkom različitih koncentracija MRS bujona (2,7; 5,5 i 11,0%) sa *L. rhamnosus*: (a) koncentracija L-(+)-mlečne kiseline; (b) koncentracija redukujućih šećera; (c) vijabilnost ćelija

Prinos L-(+)-mlečne kiseline i zapreminska produktivnost ostvareni u mlečno-kiseljoj fermentaciji sa *L. rhamnosus* na hidrolizatu pivskog tropa sa dodatkom različitih koncentracija MRS bujona (2,75; 5,5 i 11,0%) prikazani su u tabeli 25.

Tabela 25. Prinos i zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline ostvareni u fermentaciji hidrolizata pivskog tropa sa dodatkom različitih koncentracija MRS bujona (2,75; 5,5 i 11%)*

	Vreme (sati)	Prinos L-(+)-mlečne kiseline (%)	Zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline (g/l·h)
Hidrolizat pivskog tropa	12	75,71 ± 1,06	0,63 ± 0,01^a
	24	81,80 ± 0,85^a	0,38 ± 0,01
Hidrolizat pivskog tropa sa 2,75% MRS bujona	12	84,77 ± 1,08	1,31 ± 0,02^b
	24	97,79 ± 1,46^b	0,92 ± 0,01
Hidrolizat pivskog tropa sa 5,5% MRS bujona	12	85,01 ± 1,11	1,72 ± 0,02^c
	24	97,83 ± 1,65^b	1,31 ± 0,02
Hidrolizat pivskog tropa sa 11,0% MRS bujona	12	85,93 ± 1,02	1,74 ± 0,02^c
	24	88,02 ± 1,28	1,52 ± 0,02
	36	97,67 ± 1,74^b	1,25 ± 0,02

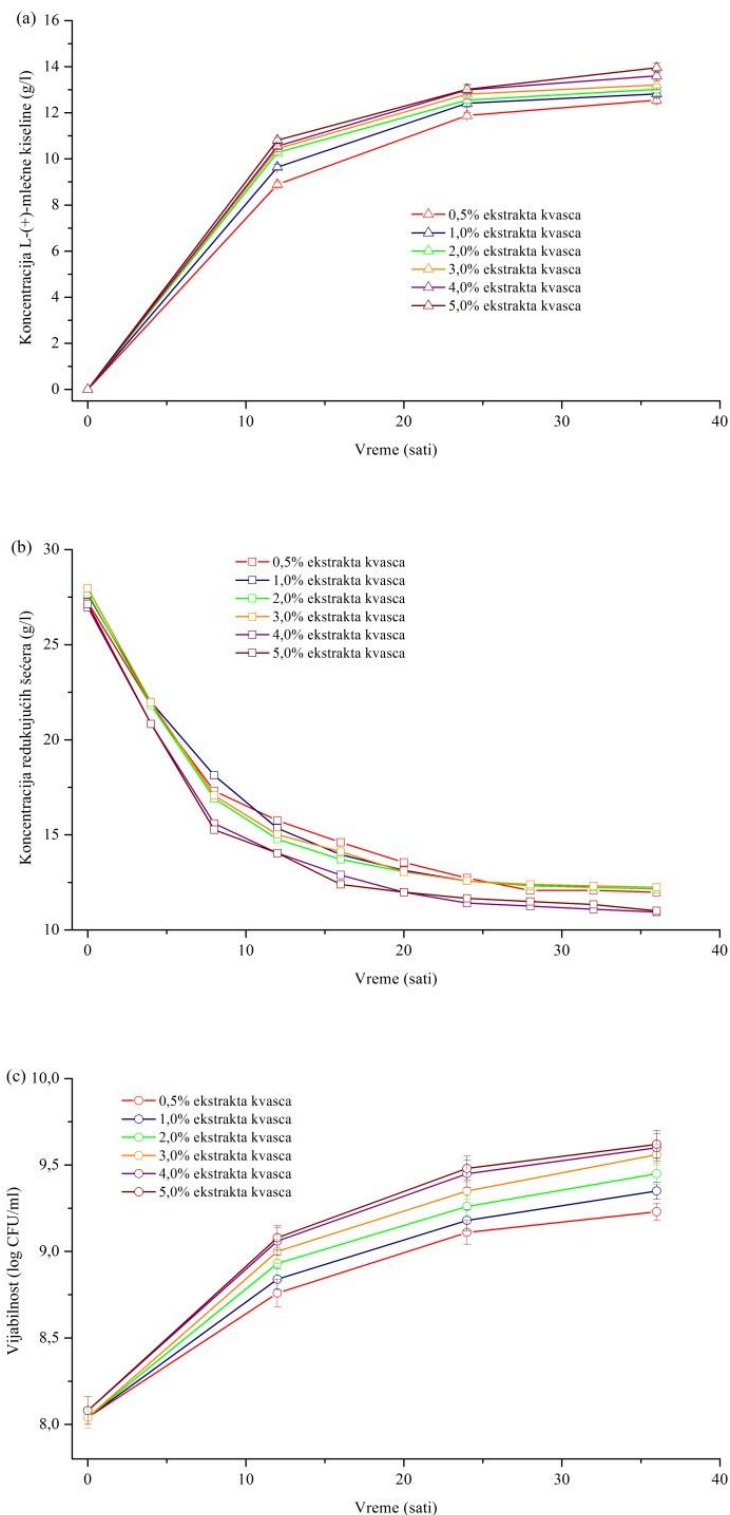
*Aritmetičke sredine označene različitim malim slovima u koloni su statistički značajno različite ($p < 0,05$).

Prinosi L-(+)-mlečne kiseline su bili visoki u svim fermentacijama sa dodatkom MRS bujona (97,79% (2,75% MRS bujona), 97,83% (5,5% MRS bujona) i 97,67%, (11,0% MRS bujona)) (tabela 22). Dodatak MRS bujona je povećao prinos L-(+)-mlečne kiseline za 19,50% (2,75% MRS bujona), 19,55% (5,5% MRS bujona) i 19,36%, (11,0% MRS bujona) u poređenju sa prinosom ostvarenim u fermentaciji bez dodatka MRS bujona i sa korekcijom pH (tabela 25). U fermentaciji sa dodatkom nutritijenata iz MRS bujona (0,5% ekstrakta kvasca, 5,0% glukoze na početku fermentacije) sa korekcijom pH Mussatto i saradnici (2008a) su ostvarili sličnu koncentraciju i prinos mlečne kiseline od 35,54 g/l i 99%.

Dodatak MRS bujona u hidrolizat pivskog tropa je značajno povećao zapreminsku produktivnost za 108,33 (2,75% MRS bujona), 173,68 (5,5% MRS bujona) i 176,32%, (11% MRS bujona) u poređenju sa fermentacijom bez dodatka MRS bujona i sa korekcijom pH (tabela 25). Najviša zapreminska produktivnost je ostvarena u 12. satu svih fermentacija. U fermentaciji sa dodatkom 11,0% MRS bujona je ostvarena najveća zapreminska produktivnost od 1,74 g/l·h⁻¹.

4.4.6. Rezultati mlečno-kisele fermentacije hidrolizata pivskog tropa sa različitim početnim koncentracijama redukujućih šećera i sa dodatkom ekstrakta kvasca (0,5-5,0%)

Koncentracije L-(+)-mlečne kiseline i redukujućih šećera i vijabilnost ćelija *L. rhamnosus* tokom fermentacije hidrolizata pivskog tropa sa 2,7% redukujućih šećera na početku mlečno-kisele fermentacije i sa dodatkom različitih koncentracija ekstrakta kvasca (0,5-5,0%) prikazani su na slici 29. Koncentracija L-(+)-mlečne kiseline je bila veća u fermentacijama sa dodatkom ekstrakta kvasca u poređenju sa fermentacijom bez dodatka ekstrakta kvasca i to za 38,22% (12,55 g/l, 0,5% ekstrakta kvasca) – 56,39% (13,95 g/l, 5,0% ekstrakta kvasca) (slika 29a). Sa dodatkom ekstrakta kvasca utrošak redukujućih šećera se takođe povećao (za 37,19 (0,5% ekstrakta kvasca) – 45,30% (5,0% ekstrakta kvasca)) (slika 29b). Vijabilnost ćelija *L. rhamnosus* je bila veća u fermentacijama sa dodatkom ekstrakta kvasca (3,7% (0,5% ekstrakta kvasca) – 8,1% (5,0% ekstrakta kvasca) na kraju fermentacije) u poređenju sa fermentacijom bez dodatka ekstrakta kvasca (slika 29c).



Slika 29. Mlečno-kisela fermentacija hidrolizata pivskog tropa sa 2,7% redukujućih šećera i sa dodatkom različitih koncentracija ekstrakta kvasca (0,5-5,0%) sa *L. rhamnosus*: (a) koncentracija L-(+)-mlečne kiseline; (b) koncentracija redukujućih šećera; (c) vijabilnost ćelija

Prinos L-(+)-mlečne kiseline i zapreminska produktivnost u mlečno-kiseloj fermentaciji hidrolizata pivskog tropa sa početnom koncentracijom redukujućih šećera od 2,7% bez i sa dodatkom ekstrakta kvasca (0,5-5,0%) su dati u tabeli 26. Prinosi L-(+)-mlečne kiseline su bili visoki u svim fermentacijama sa dodatkom ekstrakta kvasca ((82,44% (0,5% ekstrakta

kvasca) – 86,52% (5,0% ekstrakta kvasca)). Dodatak 4,0 i 5,0% ekstrakta kvasca povećao je prinos L-(+)-mlečne kiseline za 3,78 i 5,77%, u poređenju sa fermentacijom bez dodatka ekstrakta kvasca. Cui i saradnici (2011) su ispitivali mogućnost upotrebe sintetske podloge sa glukozom i ksilozom (odnos glukoze i ksiloze je bio 3:1, ukupna koncentracija šećera je bila 20 g/l) i hidrolizata kukuruznih klipova (prethodno tretiranih sa natrijum-hidroksidom) uz dodatak 5 g/l ekstrakta kvasca i različitih soli (dikalijum-hidrogenfosfata, mangan-sulfata i magnezijum-sulfat heptahidrata) u mlečno-kiseloj fermentaciji sa *L. rhamnosus*. Ovi autori su postigli prinos i zapreminsku produktivnost L-(+)-mlečne kiseline od 79% i 0,78 g/l·h⁻¹ (nakon 12 sati fermentacije) na sintetskoj podlozi i 59% i 0,49 g/l·h⁻¹ (nakon 12 sati fermentacije) na hidrolizatu kukuruznih klipova, pri čemu su ove vrednosti bile niže od vrednosti ostvarenih u mlečno-kiseloj fermentaciji hidrolizata pivskog tropa sa početnom koncentracijom redukujućih šećera od 2,7% i sa dodatkom 0,5% ekstrakta kvasca.

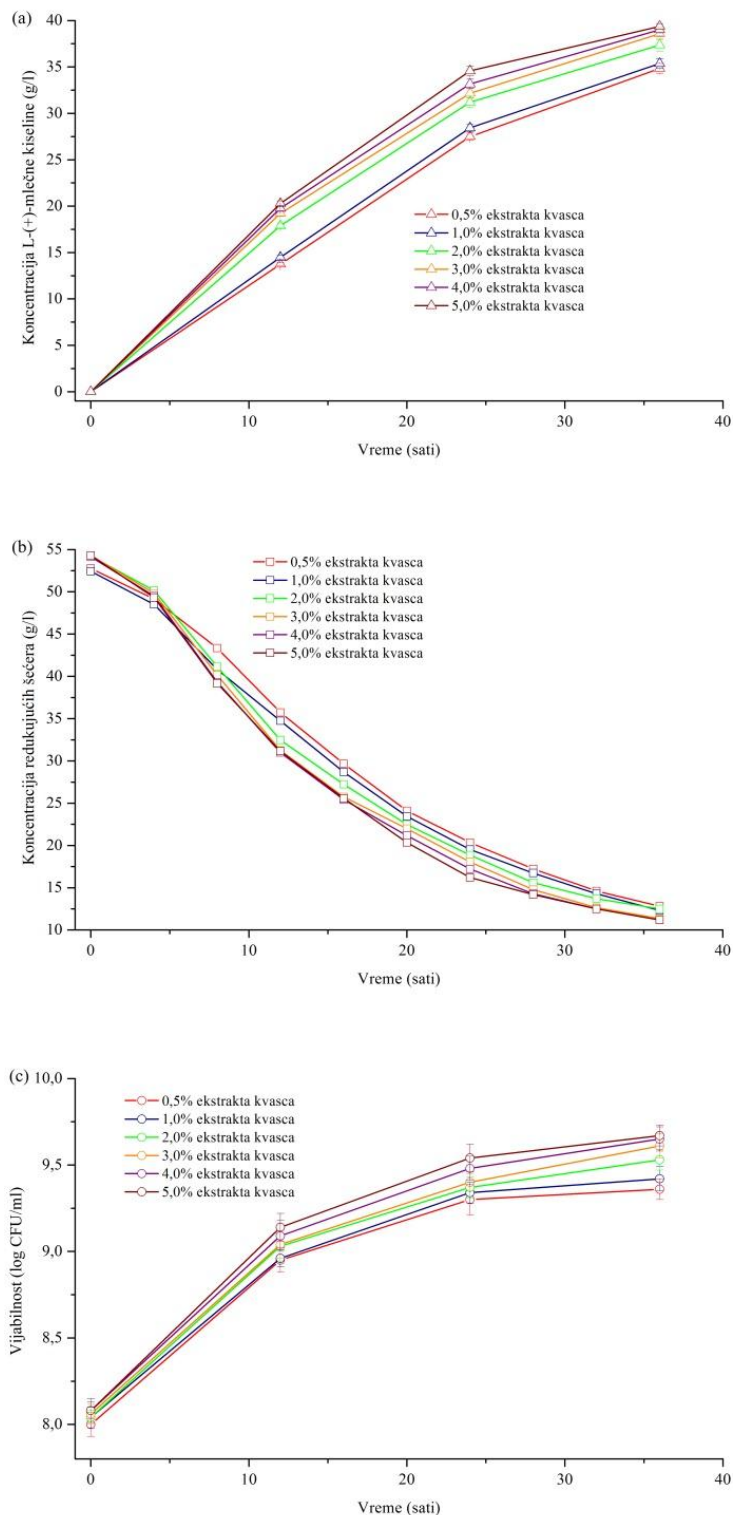
Najviša zapreminska produktivnost je postignuta u 12. satu fermentacije. Sa dodatkom ekstrakta kvasca i porastom koncentracije ekstrakta kvasca povećavala se i zapreminska produktivnost, pri čemu je najveća zapreminska produktivnost od 0,9 g/l·h⁻¹ ostvarena sa dodatkom 5,0% ekstrakta kvasca. Dodatkom ekstrakta kvasca zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline se povećala za 17,59 (0,5% ekstrakta kvasca) – 42,99% (5,0% ekstrakta kvasca) u poređenju sa mlečno-kiselom fermentacijom bez dodatka ekstrakta kvasca.

Tabela 26. Prinos i zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline u mlečno-kiseloj fermentaciji hidrolizata pivskog tropa sa 2,7% redukujućih šećera i sa dodatkom različitih koncentracija ekstrakta kvasca (0,5-5,0%)*

% dodatka ekstrakta kvasca	Sati	Prinos L-(+)-mlečne kiseline (%)	Zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline (g/l·h ⁻¹)
0,0	12	75,71 ± 1,06	0,63 ± 0,01^a
	24	81,80 ± 0,85^a	0,38 ± 0,01
0,5	12	77,58 ± 0,96	0,74 ± 0,01^b
	24	82,00 ± 0,90	0,50 ± 0,01
	36	82,44 ± 1,14^a	0,35 ± 0,01
1,0	12	78,50 ± 0,90	0,80 ± 0,02^c
	24	82,40 ± 1,40	0,52 ± 0,01
	36	82,86 ± 1,80^{ab}	0,35 ± 0,01
2,0	12	79,48 ± 0,85	0,86 ± 0,01^d
	24	82,88 ± 1,12	0,53 ± 0,01
	36	83,71b ± 1,09^b	0,36 ± 0,01
3,0	12	80,73 ± 1,13	0,87 ± 0,01^{de}
	24	83,25 ± 1,56	0,53 ± 0,01
	36	84,06b ± 1,53^b	0,37 ± 0,01
4,0	12	81,58 ± 1,19	0,88 ± 0,01^e
	24	83,53 ± 1,55	0,54 ± 0,01
	36	84,89 ± 1,56^{bc}	0,38 ± 0,01
5,0	12	82,54 ± 0,84	0,90 ± 0,02^f
	24	84,16 ± 1,56	0,54 ± 0,01
	36	86,52 ± 1,53^c	0,39 ± 0,01

*Aritmetičke sredine označene različitim malim slovima u koloni su statistički značajno različite ($p < 0,05$).

Koncentracije L-(+)-mlečne kiseline i redukujućih šećera i vijabilnost ćelija *L. rhamnosus* tokom fermentacije hidrolizata pivskog tropa sa 5,4% redukujućih šećera na početku mlečno-kisele fermentacije i sa dodatkom različitih koncentracija ekstrakta kvasca (0,5-5,0%) su prikazani na slici 30.



Slika 30. Mlečno-kisela fermentacija hidrolizata pivskog tropa sa 5,4% redukujućih šećera i sa dodatkom različitih koncentracija ekstrakta kvasca (0,5-5%) sa *L. rhamnosus*: (a) koncentracija L-(+)-mlečne kiseline; (b) koncentracija redukujućih šećera; (c) vijabilnost ćelija

Koncentracija L-(+)-mlečne kiseline se povećala sa dodatkom ekstrakta kvasca za 68,39% (34,84 g/l, 0,5% ekstrakta kvasca) – 90,33% (39,38 g/l, 5,0% ekstrakta kvasca) u poređenju sa fermentacijom bez dodatka ekstrakta kvasca (slika 30a). U fermentaciji hidrolizata pivskog tropa sa 5,0% glukoze (na početku fermentacije) sa dodatkom svih nutritijenata iz MRS

bujona, uključujući ekstrakt kvasca, pepton i mesni bujon (koji zajedno čine ukupno 2,5% izvora azota) sa korekcijom pH, Mussatto i saradnici (2008a) su ostvarili koncentraciju mlečne kiseline od 35,54 g/l koja je bila niža od koncentracije L-(+)-mlečne kiseline u fermentaciji pivskog tropa sa 2,0% ekstrakta kvasca (37,37 g/l). Sa dodatkom ekstrakta kvasca utrošak redukujućih šećera se takođe povećao za 58,78 (0,5% ekstrakta kvasca) – 71,46% (5,0% ekstrakta kvasca) (slika 30b). Vijabilnost ćelija *L. rhamnosus* se povećala sa dodatkom ekstrakta kvasca za 1,3% (0,5% ekstrakta kvasca) – 4,6% (5,0% ekstrakta kvasca), u poređenju sa fermentacijom bez dodatka ekstrakta kvasca (slika 30c).

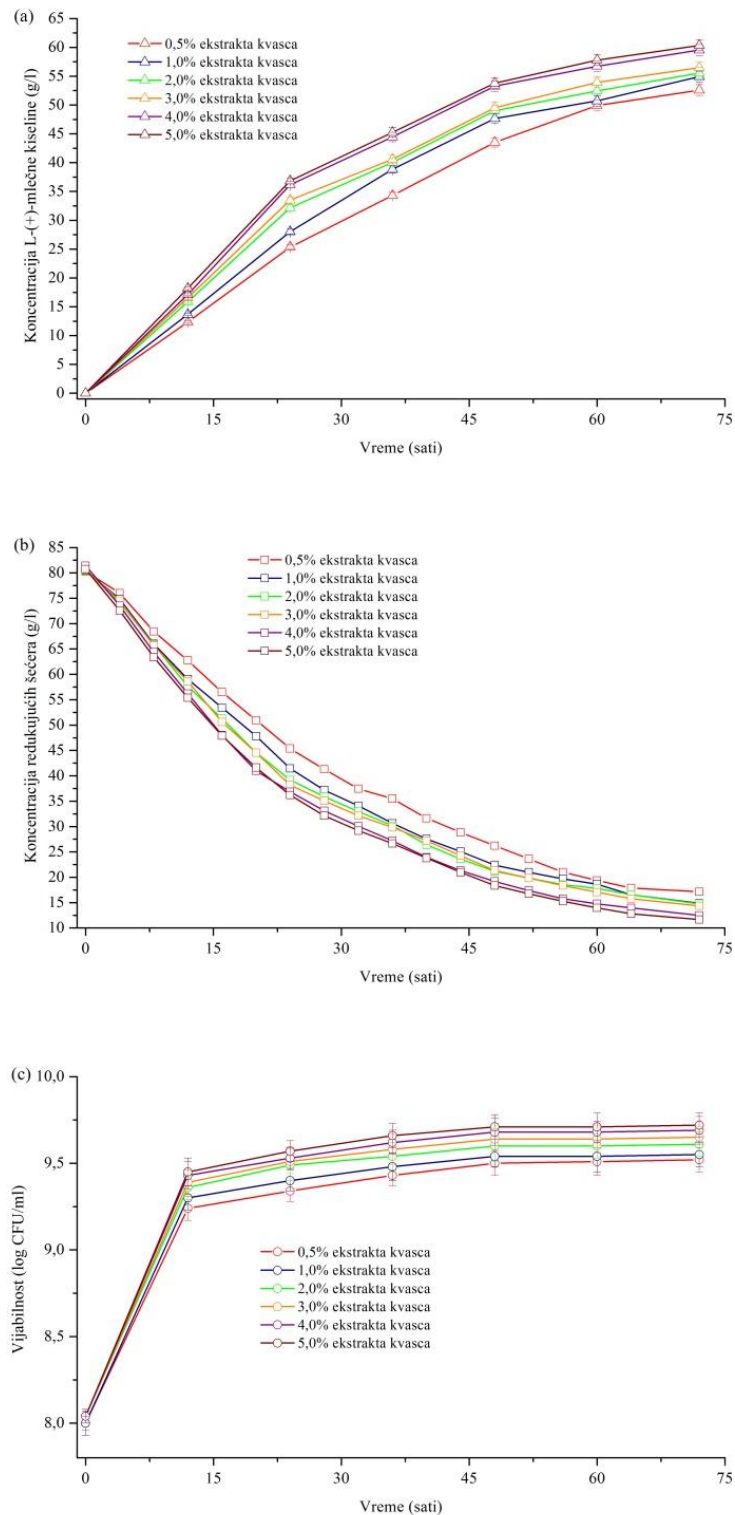
Prinos L-(+)-mlečne kiseline i zapreminska produktivnost u mlečno-kiseloj fermentaciji hidrolizata pivskog tropa sa početnom koncentracijom redukujućih šećera od 5,4% bez i sa dodatkom ekstrakta kvasca (0,5-5,0%) su dati u tabeli 27. Prinosi L-(+)-mlečne kiseline su bili visoki u svim fermentacijama sa dodatkom ekstrakta kvasca (87,22% (0,5% ekstrakta kvasca) – 91,29% (5,0% ekstrakta kvasca)). Dodatak ekstrakta kvasca je povećao prinos L-(+)-mlečne kiseline za 6,05% (0,5% ekstrakta kvasca) – 11,00% (5,0% ekstrakta kvasca) u poređenju sa prinosom dobijenim u fermentaciji bez dodatka ekstrakta kvasca. Najviša zapreminska produktivnost je ostvarena u 12. satu fermentacije. Dodatkom ekstrakta kvasca zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline se povećala za 72,31% (0,5% ekstrakta kvasca) – 154,22% (5,0% ekstrakta kvasca) u poređenju sa mlečno-kiselom fermentacijom bez dodatka ekstrakta kvasca. Sa dodatkom ekstrakta kvasca i porastom koncentracije ekstrakta kvasca u podlozi povećavala se i zapreminska produktivnost, pri čemu je najveća zapreminska produktivnost od 1,69 g/l·h⁻¹ ostvarena sa dodatkom 5,0% ekstrakta kvasca.

Tabela 27. Prinos i zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline u mlečno-kiseloj fermentaciji hidrolizata pivskog tropa sa 5,4% redukujućih šećera i sa dodatkom različitih koncentracija ekstrakta kvasca (0,5-5,0%)*

% dodatka ekstrakta kvasca	Sati	Prinos L-(+)-mlečne kiseline (%)	Zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline (g/l·h ⁻¹)
0,0	12	65,94 ± 0,88	0,67 ± 0,01^a
	24	75,38 ± 1,29	0,58 ± 0,01
	36	82,25 ± 1,17^a	0,57 ± 0,01
0,5	12	80,77 ± 1,42	1,15 ± 0,02^b
	24	84,84 ± 1,11	1,15 ± 0,01
	36	87,22 ± 1,34^b	0,97 ± 0,01
1,0	12	81,90 ± 1,13	1,21 ± 0,02^c
	24	86,40 ± 1,23	1,18 ± 0,02
	36	88,19 ± 1,32^{bc}	0,98 ± 0,01
2,0	12	82,17 ± 1,24	1,49 ± 0,02^d
	24	88,21 ± 1,50	1,30 ± 0,02
	36	89,53 ± 1,59^{bcd}	1,04 ± 0,02
3,0	12	83,27 ± 1,17	1,60 ± 0,02^e
	24	88,72 ± 1,57	1,34 ± 0,02
	36	89,78 ± 1,65^{bcd}	1,07 ± 0,02
4,0	12	85,35 ± 1,36	1,65 ± 0,02^f
	24	89,86 ± 1,56	1,38 ± 0,02
	36	90,76 ± 1,65^{cd}	1,08 ± 0,02
5,0	12	87,59 ± 1,33	1,69 ± 0,02^g
	24	90,75 ± 1,46	1,44 ± 0,02
	36	91,29 ± 1,65^d	1,09 ± 0,02

*Aritmetičke sredine označene različitim malim slovima u koloni su statistički značajno različite ($p < 0,05$).

Koncentracije L-(+)-mlečne kiseline i redukujućih šećera i vijabilnost ćelija *L. rhamnosus* tokom fermentacije hidrolizata pivskog tropa sa početnom koncentracijom redukujućih šećera od 8,1% i sa dodatkom različitih koncentracija ekstrakta kvasca (0,5-5,0%) je prikazana na slici 31.



Slika 31. Mlečno-kisela fermentacija hidrolizata pivskog tropa sa 8,1% redukujućih šećera i sa dodatkom različitih koncentracija ekstrakta kvasca (0,5-5,0%) sa *L. rhamnosus*: (a) koncentracija L-(+)-mlečne kiseline; (b) koncentracija redukujućih šećera; (c) vijabilnost ćelija

Koncentracija L-(+)-mlečne kiseline se povećala sa dodatkom ekstrakta kvasca za 147,02% (52,59 g/l, 0,5% ekstrakta kvasca) – 183,37% (60,33 g/l, 5,0% ekstrakta kvasca) u poređenju sa fermentacijom bez dodatka ekstrakta kvasca (slika 31a). Sa dodatkom ekstrakta kvasca utrošak redukujućih šećera se povećao za 106,44 (0,5% ekstrakta kvasca) – 125,68% (5,0% ekstrakta kvasca) u poređenju sa fermentacijom bez dodatka ekstrakta kvasca (slika 31b). Vijabilnost ćelija *L. rhamnosus* je bila veća u fermentacijama sa dodatkom ekstrakta kvasca (za 3,0% (0,5% ekstrakta kvasca) – 5,2% (5,0% ekstrakta kvasca) na kraju fermentacije) nego u fermentaciji bez dodatka ekstrakta kvasca (slika 31c).

Prinos L-(+)-mlečne kiseline i zapreminska produktivnost u mlečno-kiseloj fermentaciji hidrolizata pivskog tropa sa početnom koncentracijom redukujućih šećera od 8,1%, bez i sa dodatkom ekstrakta kvasca (0,5-5,0%) su dati u tabeli 28. Prinosi L-(+)-mlečne kiseline su bili visoki u svim fermentacijama sa dodatkom ekstrakta kvasca (83,23% (0,5% ekstrakta kvasca) – 87,33% (5,0% ekstrakta kvasca)) ali niži od vrednosti ostvarenih tokom fermentacije hidrolizatu sa početnom koncentracijom redukujućih šećera od 5,4%. Dodatak ekstrakta kvasca je povećao prinos L-(+)-mlečne kiseline za 19,67% (0,5% ekstrakta kvasca) – 25,57% (5,0% ekstrakta kvasca) u poređenju sa vrednosti ostvarenoj u fermentaciji bez dodatka ekstrakta kvasca. Li i saradnici (2012) su koristili rastvor glukoze (10%) uz dodatak različitih soli i 1,5% ekstrakta kvasca kao podlogu u mlečno-kiseloj fermentaciji sa *L. rhamnosus* LA-04-1. Prinos L-(+)-mlečne kiseline od 85%, koji su ostvarili Li i saradnici (2012) je sličan prinosu L-(+)-mlečne kiseline ostvarenom u fermentaciji hidrolizata pivskog tropa sa početnom koncentracijom redukujućih šećera od 8,1% i sa dodatkom 2,0% ekstrakta kvasca (84,53%).

U fermentacijama bez dodatka ekstrakta kvasca najviša zapreminska produktivnost je ostvarena u 12. satu, dok je u fermentacijama sa dodatkom ekstrakta kvasca najviša zapreminska produktivnost ostvarena u 24. satu mlečno-kisele fermentacije. Dodatkom ekstrakta kvasca zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline se povećala za 77,34 (0,5% ekstrakta kvasca) – 157,62% (5,0% ekstrakta kvasca) u poređenju sa mlečno-kiselom fermentacijom bez dodatka ekstrakta kvasca. Sa dodatkom ekstrakta kvasca i porastom koncentracije ekstrakta kvasca u hidrolizatu povećavala se i zapreminska produktivnost, pri čemu je najveća zapreminska produktivnost od $1,54 \text{ g/l}\cdot\text{h}^{-1}$ ostvarena sa dodatkom 5,0% ekstrakta kvasca.

U mlečno-kiselim fermentacijama hidrolizata pivskog tropa sa različitim početnim koncentracijama redukujućih šećera (2,7; 5,4 i 8,1%) i sa dodatkom ekstrakta kvasca (0,5-5,0%), najveća koncentracija L-(+)-mlečne kiseline od 60,33 g/l je ostvarena u fermentaciji sa najvišom početnom koncentracijom redukujućih šećera od 8,1% uz dodatak 5,0% ekstrakta kvasca. Na svim početnim koncentracijama redukujućih šećera najveći prinosi L-(+)-mlečne kiseline su postignuti sa dodatkom 5,0% ekstrakta kvasca. Najveći prinos i zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline su postignuti u fermentaciji sa početnom koncentracijom redukujućih šećera od 5,4% i 5,0% ekstrakta kvasca (tabela 31). Hujanen i saradnici (2001) su takođe utvrdili da se sa povećanjem početne koncentracije redukujućih šećera u podlozi (sa 8,0 na 12,0%) smanjuje prinos mlečne kiseline. Šaržna fermentacija je vođena na semi-sintetskoj podlozi koja je sadržala različite soli, glukozu, ekstrakt kvasca i/ili ekstrakt sladnih korenčića sa *Lactobacillus casei* NRRL B-441. Bai i saradnici (2003) su ostvarili najvišu zapreminsku produktivnost sa početnom koncentracijom redukujućih šećera od 3% u šaržnom postupku na sintetskoj podlozi (glukoza sa dodatkom soli i Tween 80) sa *L. lactis* BME5-18M uz progresivno opadanje zapreminske produktivnosti i povećanje prinosa mlečne kiseline sa povećanjem koncentracije redukujućih šećera na početku mlečno-kisele fermentacije.

Tabela 28. Prinos i zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline u mlečno-kiseloj fermentaciji hidrolizata pivskog tropa sa 8,1% redukujućih šećera i sa dodatkom različitih koncentracija ekstrakta kvasca (0,5-5,0%)*

% dodatka ekstrakta kvasca	Sati	Prinos L-(+)-mlečne kiseline (%)	Zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline (g/l·h ⁻¹)
0,0	12	66,19 ± 0,96	0,60 ± 0,01^a
	24	69,42 ± 0,87	0,57 ± 0,01
	36	75,55 ± 0,94	0,52 ± 0,01
	48	73,52 ± 1,02	0,43 ± 0,01
	60	69,55 ± 0,95^a	0,35 ± 0,01
0,5	12	70,19 ± 1,29	1,03 ± 0,02
	24	72,56 ± 1,18	1,06 ± 0,02^b
	36	76,47 ± 1,12	0,95 ± 0,01
	48	80,42 ± 1,51	0,91 ± 0,02
	60	81,87 ± 1,55	0,83 ± 0,02
	72	83,23 ± 1,51^b	0,73 ± 0,01
1,0	12	64,04 ± 0,61	1,14 ± 0,02
	24	71,94 ± 0,92	1,17 ± 0,02^c
	36	78,05 ± 1,21	1,08 ± 0,02
	48	82,11 ± 1,23	0,99 ± 0,02
	60	82,07 ± 1,27	0,85 ± 0,02
	72	83,78 ± 1,34^b	0,76 ± 0,01
2,0	12	69,40 ± 1,35	1,32 ± 0,02
	24	77,83 ± 1,37	1,34 ± 0,02^d
	36	79,55 ± 1,40	1,11 ± 0,02
	48	82,56 ± 1,64	1,02 ± 0,02
	60	83,68 ± 1,50	0,87 ± 0,02
	72	84,53 ± 1,48^{bc}	0,77 ± 0,01
3,0	12	75,45 ± 1,21	1,38 ± 0,02
	24	79,01 ± 1,24	1,40 ± 0,02^e
	36	79,97 ± 1,14	1,13 ± 0,02
	48	83,56 ± 1,58	1,03 ± 0,02
	60	84,91 ± 1,47	0,90 ± 0,02
	72	85,27 ± 1,36^{bcd}	0,78 ± 0,01
4,0	12	68,03 ± 1,07	1,43 ± 0,02
	24	81,23 ± 1,18	1,51 ± 0,02^f
	36	82,03 ± 1,49	1,23 ± 0,02
	48	85,62 ± 1,50	1,11 ± 0,02
	60	85,15 ± 1,40	0,95 ± 0,02
	72	86,39 ± 1,36^{cd}	0,83 ± 0,01
5,0	12	71,81 ± 0,93	1,52 ± 0,02
	24	82,74 ± 1,08	1,54 ± 0,02^f
	36	83,64 ± 1,31	1,26 ± 0,02
	48	86,24 ± 1,41	1,12 ± 0,02
	60	86,54 ± 1,31	0,96 ± 0,02
	72	87,33 ± 1,27^d	0,84 ± 0,02

*Aritmetičke sredine označene različitim malim slovima u koloni su statistički značajno različite ($p < 0,05$).

Zhang i saradnici (2010) su u mlečno-kiseloj fermentaciji sa *L. lactis*-11 na podlozi koja je sadržala glukozu, faktore rasta (ekstrakt kvasca, pepton i goveđi ekstrakt) i soli (natrijum-hlorid, natrijum-acetata, triamonijum-citrat, magnezijum-sulfat, mangan-sulfat) utvrdili da je optimalan opseg za koncentraciju glukoze u podlozi za fermentaciju između 38 i 64 g/l, dok su koncentracije preko 80 g/l (89, 106 i 120 g/l) imale inhibitoran efekat. Djukić-Vuković i saradnici (2013a) su utvrdili isti efekat početne koncentracije redukujućih šećera pri čemu su ostvarili najveći prinos L-(+)-mlečne kiseline u fermentaciji džibre sa *L. rhamnosus* ATCC 7469 i sa početnom koncentracijom redukujućih šećera od 5,6% uz opadanje prinosa sa povećanjem početne koncentracije redukujućih šećera na 8,6%. Djukić-Vuković i saradnici (2013a) su zaključili da slabija konverzija redukujućih šećera (nakon 36 sati fermentacije) u fermentacijama sa višim početnim koncentracijama redukujućih šećera može nastati usled inhibitornog delovanja nastale L-(+)-mlečne kiseline.

Zapreminska produktivnost je bila veća kada je dodat ekstrakt kvasca, u poređenju sa fermentacijama bez dodatka ekstrakta kvasca na sve tri početne koncentracije redukujućih šećera sa korekcijom pH. Najviše zapreminske produktivnosti u fermentacijama sa početnim koncentracijama redukujućih šećera od 2,7 i 5,4% su postignute nakon 12 sati fermentacije. U fermentacijama sa početnom koncentracijom redukujućih šećera od 8,1% na svim koncentracijama ekstrakta kvasca najviše zapreminske produktivnosti su ostvarene nakon 24 sata fermentacije (tabele 26-28). Zapreminska produktivnost se povećala sa povećanjem koncentracije ekstrakta kvasca na sve tri koncentracije redukujućih šećera (2,7, 5,4 i 8,1%) sa korekcijom pH. Sa dodatkom 5,0% ekstrakta kvasca i početnom koncentracijom redukujućih šećera od 5,4% postignuta je najveća zapreminska produktivnost od 1,69 g/l·h⁻¹.

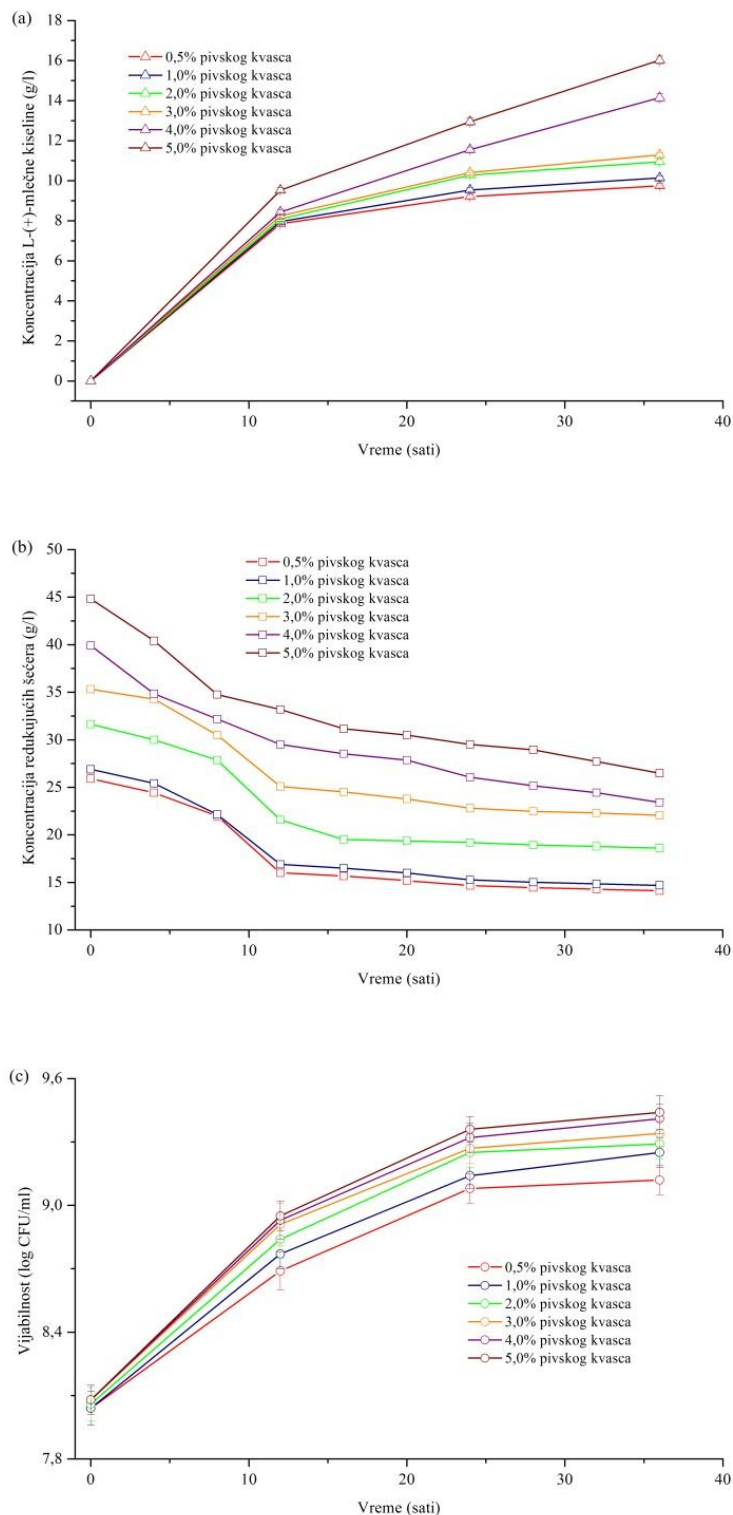
Najveća koncentracija L-(+)-mlečne kiseline od 60,33 g/l je ostvarena u fermentaciji sa početnom koncentracijom redukujućih šećera od 8,1% i dodatkom 5,0% ekstrakta kvasca. Najveća vrednost prinosa L-(+)-mlečne kiseline i zapreminske produktivnosti od 91,29% i 1,69 g/l·h⁻¹ ostvarene su u fermentaciji sa početnom koncentracijom redukujućih šećera od 5,4% i dodatkom 5,0% ekstrakta kvasca.

Na osnovu ostvarenih rezultata u daljim ispitivanjima je korišćen hidrolizat pivskog tropa sa početnom koncentracijom redukujućih šećera od 5,4%. Takođe u fermentacijama gde nije vršen dodatak jeftinih izvora azota ili nije drugačije naglašeno, u hidrolizat pivskog tropa je dodato 5,0% ekstrakta kvasca.

4.4.7. Rezultati mlečno-kisele fermentacije hidrolizata pivskog tropa sa dodatkom pivskog kvasca (0,5-5,0%)

Pivski kvasac je korišćen kao zamena skupog ekstrakta kvasca u hidrolizatu pivskog tropa za mlečno-kiselu fermentaciju. Sa dodatkom suvog pivskog kvasca u hidrolizat pivskog tropa povećala se koncentracija redukujućih šećera, jer pivski kvasac sadržao ugljene-hidrate (27,56 g/100g). Sa povećanjem koncentracije pivskog kvasca u hidrolizatu pivskog tropa povećana je i koncentracija redukujućih šećera i prilikom dodatka najveće koncentracije pivskog kvasca od 5,0% postignuta je početna koncentracija redukujućih šećera od 4,4%. U cilju ocene uticaja dodatka različitih koncentracija pivskog kvasca (0,5-5,0%), u drugoj seriji ispitivanja je početna koncentracija redukujućih šećera podešena na 5,0%.

Koncentracije L-(+)-mlečne kiseline i redukujućih šećera i vijabilnost ćelija *L. rhamnosus* tokom fermentacije hidrolizata pivskog tropa sa dodatkom različitih koncentracija pivskog kvasca (0,5-5,0%) prikazani su na slici 32.



Slika 32. Mlečno-kisela fermentacija hidrolizata pivskog tropa sa dodatkom različitih koncentracija pivskog kvasca (0,5-5,0%) sa *L. rhamnosus*: (a) koncentracija L-(+)-mlečne kiseline; (b) koncentracija redukujućih šećera; (c) vijabilnost ćelija

Koncentracija L-(+)-mlečne kiseline je bila veća u fermentacijama sa dodatkom pivskog kvasca za 7,27% (9,08 g/l, 0,5% pivskog kvasca) – 76,43% (16,02 g/l, 5,0% pivskog kvasca) u poređenju sa fermentacijom bez dodatka pivskog kvasca (slika 32a). Dodatak pivskog kvasca je povećao utrošak redukujućih šećera za 6,25% (0,5% pivskog kvasca) – 65,27%

(5,0% pivskog kvasca) u poređenju sa fermentacijom bez dodatka pivskog kvasca (slika 32b). Rakin i saradnici (2004) su utvrdili da je dodatak pivskog kvasca pozitivno uticao na utrošak redukujućih šećera tokom mlečno-kisele fermentacije soka od povrća sa *L. plantarum* i *L. acidophilus*. Vijabilnost ćelija *L. rhamnosus* je bila veća u fermentacijama sa dodatkom pivskog kvasca (2,41% (0,5% pivskog kvasca) – 6,09% (5,0% pivskog kvasca) na kraju fermentacije) nego u fermentaciji bez dodatka pivskog kvasca (slika 32c). Rakin i saradnici (2007) su takođe ispitivali dodatak pivskog kvasca u sok od povrća za mlečno-kiselu fermentaciju sa *L. acidophilus* NCDO1748. Autori su utvrdili da je dodatak pivskog kvasca povećao broj vijabilnih ćelija (CFU/ml) *L. acidophilus* za 16,90 – 27,80%.

Prinos i zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline u mlečno-kiseloj fermentaciji hidrolizata pivskog tropa bez i sa dodatkom pivskog kvasca (0,5-5,0%) su dati u tabeli 29.

Tabela 29. Prinos i zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline u mlečno-kiselim fermentacijama hidrolizata pivskog sa dodatkom različitih koncentracija pivskog kvasca (0,5-5,0%)*

% dodatka pivskog kvasca	Sati	Prinos L-(+)-mlečne kiseline (%)	Zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline (g/l·h ⁻¹)
0,0	12	75,71 ± 1,06	0,63 ± 0,01^a
	24	81,80 ± 0,85^a	0,38 ± 0,01
0,5	12	79,21 ± 1,11	0,65 ± 0,01^b
	24	81,94 ± 0,98	0,38 ± 0,01
	36	82,64 ± 0,93^{ab}	0,27 ± 0,01
1,0	12	79,73 ± 1,10	0,66 ± 0,01^{bc}
	24	82,10 ± 0,95	0,40 ± 0,01
	36	83,18 ± 0,90^{ab}	0,28 ± 0,01
2,0	12	80,34 ± 1,09	0,67 ± 0,01^c
	24	82,64 ± 0,88	0,43 ± 0,01
	36	84,10 ± 1,00^{bc}	0,30 ± 0,01
3,0	12	80,65 ± 1,08	0,69 ± 0,01^d
	24	83,15 ± 0,88	0,43 ± 0,01
	36	85,16 ± 0,83^c	0,31 ± 0,01
4,0	12	81,15 ± 1,06	0,70 ± 0,01^d
	24	83,45 ± 0,94	0,48 ± 0,01
	36	85,81 ± 1,21^{cd}	0,39 ± 0,01
5,0	12	81,94 ± 0,95	0,79 ± 0,01^e
	24	84,59 ± 1,31	0,54 ± 0,01
	36	87,35 ± 1,09^d	0,45 ± 0,01

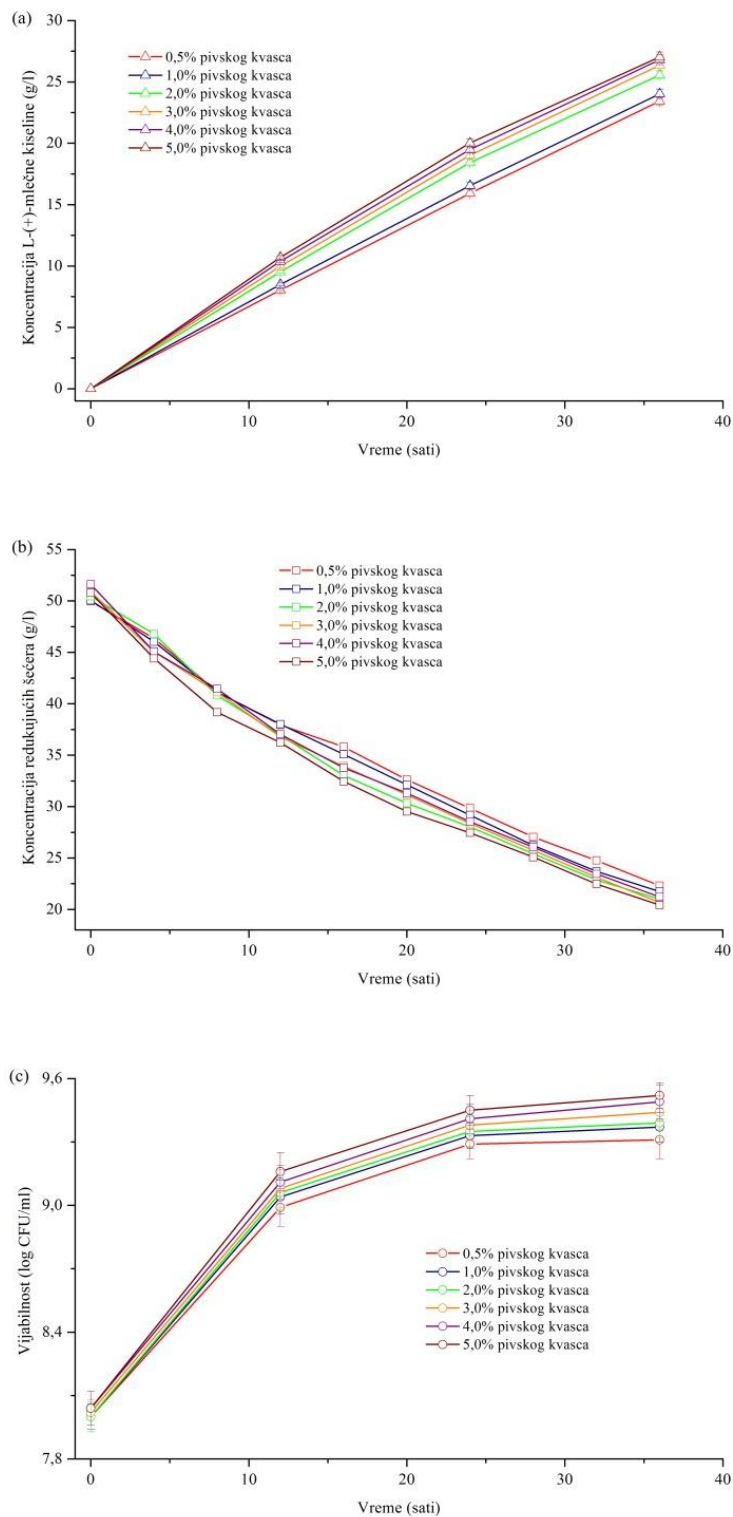
*Aritmetičke sredine označene različitim malim slovima u koloni su statistički značajno različite ($p < 0,05$).

Prinos L-(+)-mlečne kiseline je bio visok u svim fermentacijama sa dodatkom pivskog kvasca (82,61% (0,5% pivskog kvasca) – 87,35% (5,0% pivskog kvasca)). Dodatak 2,0–5,0% pivskog kvasca je povećao prinos L-(+)-mlečne kiseline za 2,78% (2% pivskog kvasca) – 6,75% (5,0% pivskog kvasca), u poređenju sa prinosom ostvarenim u fermentaciji bez dodatka pivskog kvasca. Najviša zapreminska produktivnost je postignuta nakon 12 sati u svim fermentacijama (tabela 34). Zapreminska produktivnost se povećala sa porastom koncentracije pivskog kvasca u hidrolizatu pivskog tropa. Zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline se u fermentacijama povećala sa dodatkom pivskog kvasca za 3,84% (0,5% pivskog kvasca) – 26,06% (5,0% pivskog kvasca).

Koncentracije L-(+)-mlečne kiseline i redukujućih šećera i vijabilnost ćelija *L. rhamnosus*

tokom fermentacije hidrolizata pivskog sa 5,0% redukujućih šećera i sa dodatkom različitih koncentracija pivskog kvasca (0,5-5,0%) prikazani su na slici 33. Koncentracija L-(+)-mlečne kiseline je bila veća u fermentacijama sa dodatkom pivskog kvasca za 15,08% (23,43 g/l, 0,5% pivskog kvasca) – 32,76% (27,03 g/l, 5,0% pivskog kvasca) u poređenju sa fermentacijom bez dodatka pivskog kvasca (slika 33a). Sa dodatkom pivskog kvasca utrošak redukujućih šećera se takođe povećao za 11,52 (0,5% pivskog kvasca) – 22,44% (5,0% pivskog kvasca) u poređenju sa fermentacijom bez dodatka pivskog kvasca (slika 33b). Vijabilnost ćelija *L. rhamnosus* je takođe bila veća u fermentacijama sa dodatkom 1,0–5,0% pivskog kvasca (1,37% (1,0% pivskog kvasca) – 2,98% (5,0% pivskog kvasca) na kraju fermentacije) nego u fermentaciji bez dodatka pivskog kvasca (slika 33c).

Prinos i zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline u mlečno-kiseloj fermentaciji hidrolizata pivskog tropa sa 5,0% redukujućih šećera i sa dodatkom pivskog kvasca (0,5-5,0%) su dati u tabeli 30. Prinos L-(+)-mlečne kiseline je bio visok u svim fermentacijama sa dodatkom pivskog kvasca (84,71% (0,5% pivskog kvasca) – 89,01% (5,0% pivskog kvasca)). Dodatak pivskog kvasca je povećao prinos L-(+)-mlečne kiseline za 3,19% (0,5% pivskog kvasca) – 8,42% (5,0% pivskog kvasca), u poređenju sa prinosom ostvarenim u fermentaciji bez dodatka pivskog kvasca. Gao i saradnici (2006) su koristili ćelije kvasca (iz različitih fermentacija, 6 g/l) u mlečno-kiseloj fermentaciji rastvora glukoze (100 g/l) bez i sa dodatkom različitih soli (natrijum-hlorida, dikalijum-hidrogenfosfata i magnezijum-sulfata) sa *L. rhamnosus* NBRC 3863. Postignut je prinos L-(+)-mlečne kiseline od 46,9% što je niže od prinosa dobijenog u fermentaciji hidrolizata pivskog tropa sa dodatkom 0,5% pivskog kvasca. Rivas i saradnici (2004b) su ispitivali mogućnost upotrebe ćelija *Debaryomyces hansenii* iz proizvodnje ksilitola u mlečno-kiseloj fermentaciji rastvora glukoze (100-120 g/l) sa *L. rhamnosus* CECT-28. U ispitivanjima sa dodatkom 1% ćelija kvasca Rivas i saradnici (2004b) su postigli prinos mlečne kiseline od 75%, što je bilo niže od prinosa ostvarenog u fermentaciji hidrolizata pivskog tropa sa dodatkom 1,0% pivskog kvasca. Zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline se takođe povećala sa dodatkom pivskog kvasca za 11,51% (0,5% pivskog kvasca) – 48,54% (5,0% pivskog kvasca).



Slika 33. Mlečno-kisela fermentacija hidrolizata pivskog tropa sa 5,0% redukujućih šećera i sa dodatkom različitom koncentracijom pivskog kvasca (0,5-5,0%) sa *L. rhamnosus*: (a) koncentracija L-(+)-mlečne kiseline; (b) koncentracija redukujućih šećera; (c) vijabilnost ćelija

Tabela 30. Prinos L-(+)-mlečne kiseline i zapreminska produktivnost u mlečno-kiselim fermentacijama hidrolizata pivskog tropa 5,0% redukujućih šećera i sa dodatkom različitih koncentracija pivskog kvasca (0,5-5,0%)*

% dodatka pivskog kvasca	Sati	Prinos L-(+)-mlečne kiseline (%)	Zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline (g/l·h ⁻¹)
0,0	12	61,19 ± 1,25	0,60 ± 0,01^a
	24	75,28 ± 1,31	0,57 ± 0,01
	36	82,09 ± 1,51^a	0,57 ± 0,01
0,5	12	66,83 ± 0,91	0,67 ± 0,01^b
	24	79,09 ± 1,34	0,66 ± 0,01
	36	84,71 ± 1,19^b	0,65 ± 0,01
1,0	12	70,53 ± 0,93	0,71 ± 0,01^c
	24	79,13 ± 1,23	0,69 ± 0,01
	36	84,85 ± 1,17^b	0,67 ± 0,01
2,0	12	70,59 ± 0,71	0,79 ± 0,01^d
	24	82,16 ± 1,20	0,77 ± 0,01
	36	86,76 ± 1,12^c	0,71 ± 0,01
3,0	12	70,88 ± 0,78	0,83 ± 0,01^e
	24	84,50 ± 1,20	0,79 ± 0,01
	36	87,33 ± 1,33^{cd}	0,73 ± 0,01
4,0	12	71,24 ± 0,87	0,87 ± 0,01^f
	24	84,45 ± 1,17	0,81 ± 0,01
	36	88,18 ± 1,33^{cd}	0,74 ± 0,01
5,0	12	73,51 ± 0,89	0,89 ± 0,01^g
	24	85,81 ± 1,41	0,83 ± 0,01
	36	89,01 ± 1,32^d	0,75 ± 0,01

*Aritmetičke sredine označene različitim malim slovima u koloni su statistički značajno različite ($p < 0,05$).

Koncentracije slobodnog amino azota u hidrolizatu pivskog tropa sa početnom koncentracijom redukujućih šećera od 5,0% i bez i sa dodatkom pivskog kvasca (0,5-5,0%) prikazane su u tabeli 31.

Tabela 31. Koncentracija slobodnog amino azota u hidrolizatu pivskog tropa sa koncentracijom redukujućih šećera od 5,0% i sa dodatkom različitih količina pivskog kvasca (0,5-5,0%)

% dodatka pivskog kvasca	Koncentracija slobodnog amino azota (mg/l)
0,0	54,98 ± 0,13
0,5	68,86 ± 0,23
1,0	147,54 ± 1,04
2,0	249,22 ± 1,21
3,0	296,45 ± 2,01
4,0	376,91 ± 2,10
5,0	393,61 ± 2,14

Dodatak pivskog kvasca je povećao koncentraciju slobodnog amino azota u hidrolizatu pivskog tropa za 25,24% (0,5% pivskog kvasca) – 615,91% (5,0% pivskog kvasca) u poređenju sa hidrolizatom pivskog tropa bez dodatka pivskog kvasca. Statističkom analizom je utvrđena pozitivna korelacija između koncentracije slobodnog amino azota i koncentracije

L-(+)-mlečne kiseline (faktor korelacije 0,913). Djukić-Vuković i saradnici (2016) su takođe utvrdili pozitivnu korelaciju između koncentracije slobodnog amino azota i koncentracije L-(+)-mlečne kiseline u fermentaciji sa *L. rhamnosus* ATCC 7469 na džibri.

Najveći prinos L-(+)-mlečne kiseline (89,01%) je postignut u fermentaciji hidrolizata pivskog tropa sa početnom koncentracijom redukujućih šećera od 5,0% i sa dodatkom 5,0% pivskog kvasca. Najviša zapreminska produktivnost je postignuta nakon 12 sati svih fermentacija (tabele 34 i 35). Zapreminska produktivnost se povećala sa porastom koncentracije pivskog kvasca u hidrolizatu pivskog tropa. Najveća zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline je ostvarena u fermentaciji sa dodatkom 5,0% pivskog kvasca i korekcijom početne koncentracije redukujućih šećera na 5,0% ($0,89 \text{ g/l}\cdot\text{h}^{-1}$).

Sa korekcijom početne koncentracije redukujućih šećera koncentracija L-(+)-mlečne kiseline se povećala za 124%, odnosno 198% kada je dodato i 5,0% pivskog kvasca u poređenju sa koncentracijom dobijenom u fermentaciji bez dodatka pivskog kvasca i bez korekcije početne koncentracije redukujućih šećera. Hidrolizati pivskog tropa (Mussatto i sar., 2008a) kao i od drugih lignoceluloznih materijala kao što su pšenična slama (Garde i sar., 2002), kukuruzni klipovi (Ali i sar., 2009), drvo (Parajó i sar., 1996), prah manioke, prah šećerne trske (John i sar., 2006; Laopaiboon i sar., 2010) i kukuruzna stabljika (Cui i sar., 2011) zahtevaju dodatne izvore nutritijenata (ekstrakt kvasca, MRS bujon, voda od namakanja kukuruza, pepton, soli i dr.) u cilju efikasne proizvodnje mlečne kiseline sa sojevima *Lactobacillus*. Na osnovu rezultata može se zaključiti da je dodatak pivskog kvasca značajno uticao na povećanje koncentracije i prinos L-(+)-mlečne kiseline i vijabilnost ćelija *L. rhamnosus*.

Sridee i saradnici (2011) su ispitivali uticaj dodatka pivskog kvasca (8 i 16 g/l) na proizvodnju bioetanola iz soka šećerne trske sa *S. cerevisiae* NP 01. Dodatak pivskog kvasca (8 i 16 g/l) je povećao prinos bioetanola za 2%. Slično povećanje prinosa bioetanola (od 3%) je postignuto i u ispitivanjima Suwanapong i saradnika (2013) u proizvodnji bioetanola iz soka šećerne trske sa dodatkom pivskog kvasca (21 g/l) sa *S. cerevisiae* NP 01.

Altaf i saradnici (2005) su ispitivali mogućnost upotrebe brašna crvenog pasulja (BCP) i ćelija pekarskog kvasca (ČPK) kao zamene za pepton i ekstrakt kvasca u modifikovanom MRS bujonu u mlečno-kiseloj fermentaciji sa *L. amylophilus* GV6. U fermentaciji sa dodatkom 2% BCP i 1% ČPK postignut je prinos L-(+)-mlečne kiseline od 92%, što je bilo više od prinosa ostvarenog na hidrolizatu pivskog tropa sa dodatkom 5% pivskog kvasca. Altaf i saradnici (2005) su najverovatnije postigli viši prinos L-(+)-mlečne kiseline jer su pored zamene za pepton i ekstrakt kvasca u podlogu dodali sve nutritijente koji se nalaze u MRS bujonu. Međutim, dodatak komponenti MRS bujona može se smatrati kao skup izbor. Iz ostvarenih rezultata zaključeno je da upotrebljeni jeftini izvori azota mogu uspešno u potpunosti zameniti pepton i ekstrakt kvasca u mlečno-kiseloj fermentaciji.

Prosečna cena ekstrakta kvasca iznosi 227 \$/kg (<http://www.sigmaaldrich.com>) dok je prosečna cena suvog pivskog kvasca iznosi 25\$/kg. Pošto je cena pivskog kvasca 10 puta niža od cene ekstrakta kvasca, delimična ili potpuna zamena ekstrakta kvasca pivskim kvascem bi značajno smanjila cenu podloge za mlečno-kiselu fermentaciju, bez značajnog smanjenja efikasnosti mlečno-kisele fermentacije. Visoke koncentracije slobodnog amino azota, postignute dodatkom pivskog kvasca, su značajno uticale na postizanje visokih koncentracija L-(+)-mlečne kiseline, prinosa i zapreminske produktivnosti L-(+)-mlečne kiseline.

4.2.8. Rezultati mlečno-kisele fermentacije hidrolizata pivskog tropa sa dodatkom džibre (5–20%) i bistre džibre (5–50%)

Danas je širom sveta, jedan od najvećih problema u industriji, pre svega prerambenoj

industriji, odlaganje sporednih proizvoda. Tečni spredni proizvodi prehrambene industrije, nastaju u mnogo većim količinama od čvrstih sporednih proizvoda, imaju visoke vrednosti biološke potrošnje kiseonika (BPK) i zahtevaju ogromne površine za odlaganje, zbog čega je njegova upotreba u drugim granama industrije alternativa kojoj treba posvetiti najviše pažnje. Džibra je sporedni proizvod tehnologije bioetanola. Bistra džibra je tečnu frakcija (supernatant) dobijena nakon centrifugiranja džibre. Sastav džibre i bistre džibre korišćenih u mlečno-kiseloj fermentaciji je prikazan u tabeli 32. Džibra i bistra džibra su imale veći sadržaj proteina (za 186,4% (džibra) i 64,2% (bitra džibra)), slobodnog amino azota (za 645,9% (džibra) i 517,1% (bitra džibra)) i mineralnih materija (za 188,4% (džibra) i 151,8% (bitra džibra)) od hidrolizata pivskog tropa. Sadržaj suve materije džibre je bio viši (za 72,8%) od sadržaja suve materije hidrolizata pivskog tropa, dok je sadržaj suve materije bistre džibre je bio niži (za 71,2%) od sadržaja suve materije hidrolizata pivskog tropa. Koncentracija redukujućih šećera džibre i bistre džibre je bila niža (za 60,6% (džibra) i 103,1% (bitra džibra)) nego kod hidrolizata pivskog tropa. Koncentracija jona metala u bistroj džibri je prikazan u tabeli 33. Bistra džibra je sadržala veće koncentracije jona Zn (za 1575%), Fe (5187%), Mn (425%), Ca (1,5%) i Mg (10%) od hidrolizata pivskog tropa. Hidrolizat pivskog tropa je sadržao više koncentracije jona Cu (za 608%), Co (1000%) i Na (1234%) od bistre džibre.

Tabela 32. Sastav džibre i bistre džibre

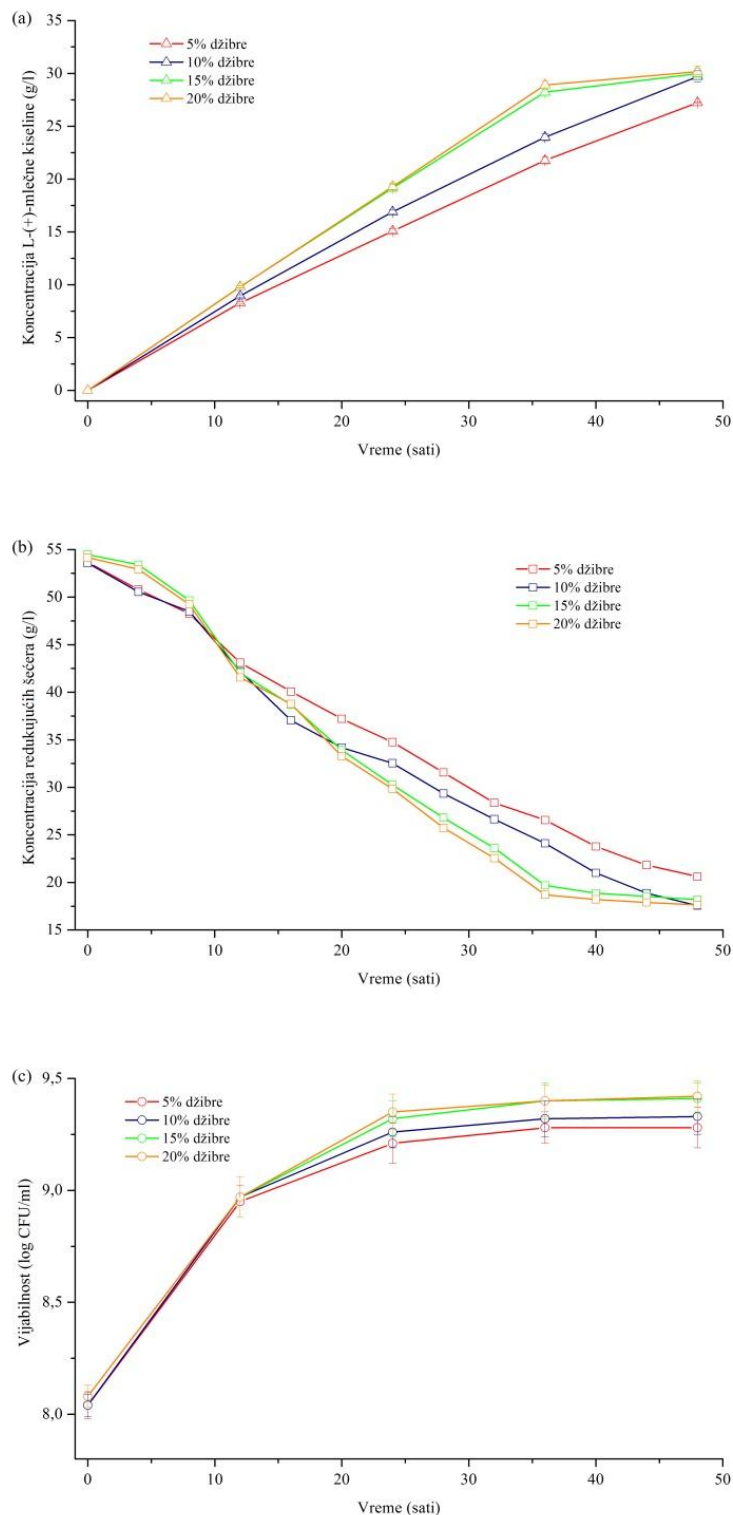
Parametri	Džibra	Bistra džibra
Sadržaj suve materije, %	8,31 ± 0,03	2,81 ± 0,02
Koncentracija redukujućih šećera, g/l	15,68 ± 0,18	12,48 ± 0,16
Sadržaj proteina, g/l	2,32 ± 0,01	1,33 ± 0,01
Slobodni amino azot, mg/l	410,12 ± 2,10	339,30 ± 2,10
Mineralne materije, % na suhu materiju	5,74 ± 0,02	5,01 ± 0,01

Tabela 33. Koncentracija jona metala u bistroj džibri

Koncentracija jona metala (mg/kg)	Bistra džibra
Zn	4,456 ± 0,010
Cu	0,251 ± 0,003
Fe	32,2 ± 0,023
Mn	6,878 ± 0,050
Co	<0,001 ± 0,001
Ca	543,9 ± 1,781
Mg	260,7 ± 1,480
Na	57,09 ± 0,155

Koncentracije L-(+)-mlečne kiseline i redukujućih šećera i vijabilnost ćelija *L. rhamnosus* tokom fermentacije hidrolizata pivskog tropa sa 5,4% redukujućih šećera i sa dodatkom različitih koncentracija džibre (5, 10, 15 i 20%) prikazani su na slici 34.

Koncentracija L-(+)-mlečne kiseline se povećala sa dodatkom džibre za 31,61% (27,23 g/l, 5% džibre) – 45,82% (30,17 g/l, 20% džibre) u poređenju sa fermentacijom bez dodatka džibre (slika 34a). Sa dodatkom džibre kinetika utroška redukujućih šećera se povećala u poređenju sa fermentacijom bez dodatka džibre. Dodatak džibre je povećao utrošak redukujućih šećera za 31,35% (5% džibre) – 45,09% (20% džibre) (slika 34b). Vijabilnost ćelija *L. rhamnosus* je bila veća kod fermentacije sa dodatkom 20% džibre (za 2,0%) u poređenju sa fermentacijom bez dodatka džibre (slika 34c).



Slika 34. Mlečno-kiselna fermentacija hidrolizata pivskog troja sa 5,4% redukujućih šećera i različitim koncentracijama džibre (5–20%) sa *L. rhamnosus*: (a) koncentracija L-(+)-mlečne kiseline; (b) koncentracija redukujućih šećera; (c) vijabilnost ćelija

Prinos i zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline ostvarene u mlečno-kiseljoj fermentaciji hidrolizata pivskog troja sa 5,4% redukujućih šećera i sa dodatkom različitim koncentracijama džibre (5-20%) su prikazani u tabeli 34. Dodatak džibre je povećao prinos L-(+)-mlečne kiseline za 0,2% (5% džibre) – 0,5% (20% džibre) u poređenju sa fermentacijom

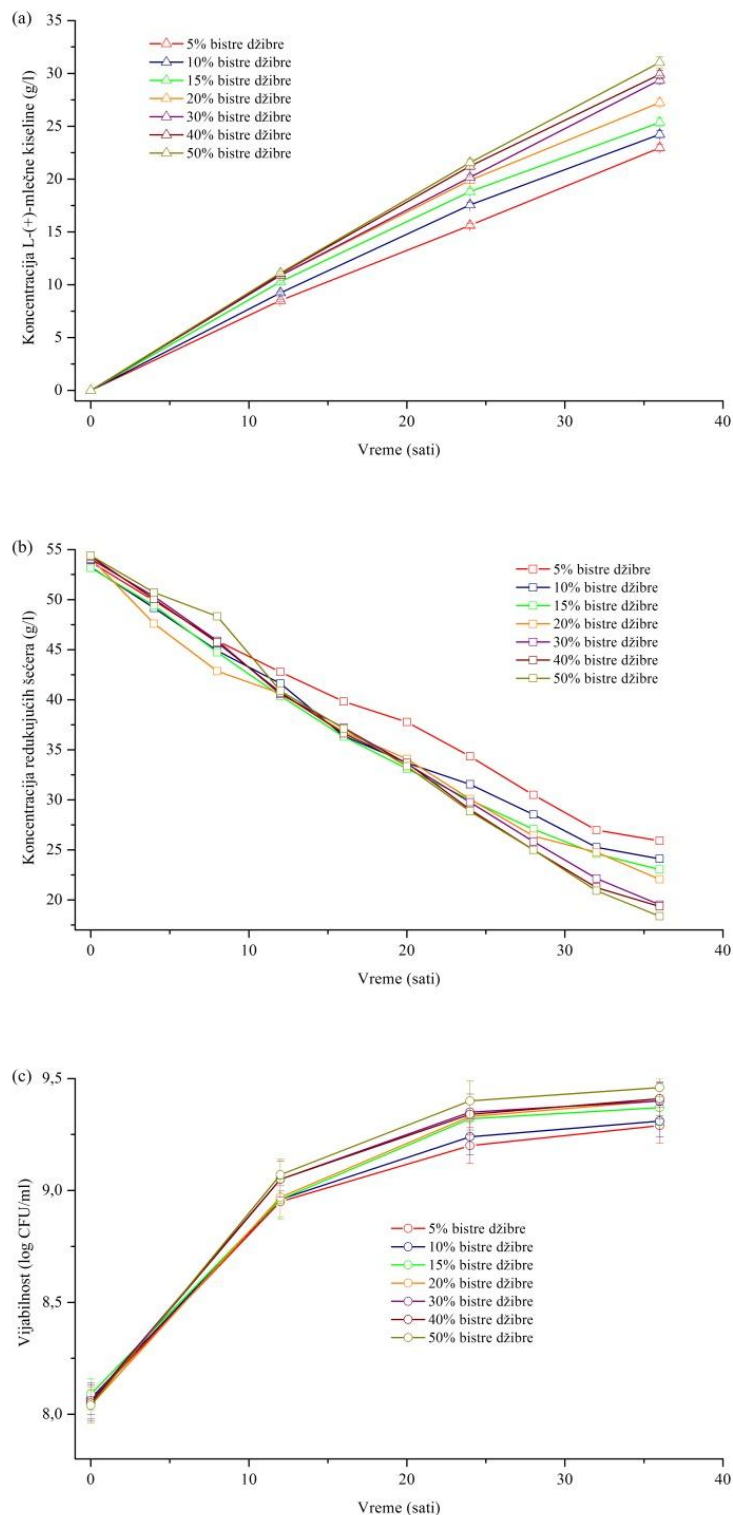
bez dodatka džibre, pri čemu je utvrđeno da dodatak džibre nije imao uticaj na povećanje prinosa L-(+)-mlečne kiseline. Zapreminska produktivnost se povećala sa porastom koncentracije džibre u hidrolizatu pivskog tropa. Sa dodatkom džibre zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline se povećala za 3,76 (5% džibre) – 22,81% (20% džibre) u poređenju sa fermentacijom bez dodatka džibre. Pošto nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji L-(+)-mlečne kiseline, prinosa i zapreminske produktivnosti između fermentacija sa dodatkom 15 i 20% džibre, nije ispitan dodatak većih koncentracija džibre u hidrolizat pivskog tropa.

Tabela 34. Prinos i zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline u mlečno-kiselim fermentacijama hidrolizata pivskog tropa sa 5,4% redukujućih šećera i bez i sa dodatkom različitih koncentracija džibre (5-20%)*

% dodatka džibre	Sati	Prinos L-(+)-mlečne kiseline (%)	Zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline (g/l·h ⁻¹)
0	12	65,94 ± 0,88	0,67 ± 0,01^a
	24	75,38 ± 1,29	0,58 ± 0,01
	36	82,25 ± 1,17^a	0,57 ± 0,01
5	12	78,42 ± 0,82	0,69 ± 0,01^b
	24	79,75 ± 1,1	0,63 ± 0,01
	36	80,32 ± 1,46	0,60 ± 0,01
	48	82,41 ± 1,61^a	0,57 ± 0,01
10	12	78,58 ± 0,42	0,75 ± 0,01^c
	24	80,31 ± 0,60	0,70 ± 0,01
	36	81,31 ± 0,68	0,67 ± 0,01
	48	82,47 ± 1,11^a	0,62 ± 0,01
15	12	78,94 ± 0,88	0,82 ± 0,01^d
	24	79,05 ± 0,82	0,80 ± 0,01
	36	81,15 ± 0,96	0,78 ± 0,01
	48	82,54 ± 1,28^a	0,62 ± 0,01
20	12	79,03 ± 0,71	0,82 ± 0,01^d
	24	79,35 ± 1,10	0,80 ± 0,01
	36	81,54 ± 0,94	0,80 ± 0,01
	48	82,66 ± 1,27^a	0,63 ± 0,01

*Aritmetičke sredine označene različitim malim slovima u koloni su statistički značajno različite ($p < 0,05$).

Koncentracije L-(+)-mlečne kiseline i redukujućih šećera i vijabilnost ćelija *L. rhamnosus* tokom šaržnog postupka fermentacije hidrolizata pivskog tropa sa 5,4% redukujućih šećera i sa dodatkom različitih koncentracija bistre džibre (5-50%) prikazani su na slici 35. Dodatak bistre džibre je povećao koncentraciju L-(+)-mlečne kiseline za 10,97% (22,96 g/l, 5% džibre) – 49,98% (31,03 g/l, 50% džibre) u poređenju sa fermentacijom bez dodatka bistre džibre (slika 35a). Najveća koncentracija L-(+)-mlečne kiseline od 31,03 g/l je ostvarena pri dodatku 50% bistre džibre. Sa dodatkom bistre džibre kinetika utroška šećera se povećala u poređenju sa fermentacijom bez dodatka džibre (slika 35b). Dodatak džibre je povećao utrošak redukujućih šećera za 10,61 (5% bistre džibre) – 43,17% (50% bistre džibre). Vijabilnost ćelija *L. rhamnosus* se povećala u fermentaciji sa dodatkom 50% bistre džibre (za 2,4%) u poređenju sa fermentacijom bez dodatka bistre džibre (slika 35c).



Slika 35. Mlečno-kisela fermentacija hidrolizata pivskog tropa sa 5,4% redukujućih šećera i različitim koncentracijama bistro džibre, sa *L. rhamnosus*: (a) koncentracija L-(+)-mlečne kiseline; (b) koncentracija redukujućih šećera; (c) vijabilnost ćelija

Prinos i zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline u šaržnom postupku mlečno-kisela fermentacije hidrolizata pivskog tropa sa 5,4% redukujućih šećera i sa dodatkom različitih koncentracija bistro džibre (5-50%) su prikazani u tabeli 35.

Tabela 35. Prinos i zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline u mlečno-kiselim fermentacijama hidrolizata pivskog tropa sa 5,4% redukujućih šećera i bez i sa dodatkom različitih koncentracija bistre džibre (5–50%)*

% dodatka džibre	Sati	Prinos L-(+)-mlečne kiseline (%)	Zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline (g/l·h ⁻¹)
0	12	65,94 ± 0,88	0,67 ± 0,01^a
	24	75,38 ± 1,29	0,58 ± 0,01
	36	82,25 ± 1,17^a	0,57 ± 0,01
5	12	77,69 ± 0,97	0,71 ± 0,01^b
	24	80,53 ± 0,68	0,65 ± 0,01
	36	82,51 ± 1,17^{ab}	0,64 ± 0,01
10	12	79,50 ± 0,95	0,77 ± 0,02^c
	24	80,91 ± 0,95	0,73 ± 0,01
	36	83,15 ± 1,13^{abc}	0,67 ± 0,01
15	12	80,52 ± 0,86	0,86 ± 0,01^d
	24	81,26 ± 1,26	0,78 ± 0,01
	36	84,20 ± 0,93^{abcd}	0,70 ± 0,01
20	12	80,14 ± 1,29	0,91 ± 0,01^e
	24	82,65 ± 1,14	0,83 ± 0,01
	36	84,86 ± 1,25^{bcd}	0,76 ± 0,01
30	12	80,62 ± 0,46	0,91 ± 0,01^e
	24	82,93 ± 0,84	0,88 ± 0,01
	36	85,02 ± 1,1^{bcd}	0,83 ± 0,01
40	12	81,26 ± 0,99	0,92 ± 0,01^{ef}
	24	83,91 ± 1,38	0,88 ± 0,01
	36	85,55 ± 1,34^{cd}	0,83 ± 0,01
50	12	82,27 ± 0,45	0,93 ± 0,01^f
	24	84,43 ± 1,29	0,90 ± 0,01
	36	86,15 ± 1,11^d	0,86 ± 0,01

*Aritmetičke sredine označene različitim malim slovima u koloni su statistički značajno različite ($p < 0,05$).

Prinos L-(+)-mlečne kiseline je bio visok u svim fermentacijama sa dodatkom bistre džibre (82,51% (5% bistre džibre) – 86,15% (50% bistre džibre)). Dodatak 20 – 50% bistre džibre je povećao prinos L-(+)-mlečne kiseline (za 3,17 (20% bistre džibre) – 4,75% (50% bistre džibre) u poređenju sa fermentacijom bez dodatka bistre džibre. Rivas i saradnici (2004b) su ispitali mogućnost primene ćelija *Debaromyces hanseni* iz proizvodnje ksilitola i vode od namakanja kukuruza u proizvodnji mlečne kiseline sa *L. rhamnosus* CECT-288 na podlozi koja je sadržala glukozu (100–120 g/l) i soli. Sa dodatkom 1,0% vode od namakanja kukuruza i 1% ćelija kvasca ostvaren je prinos L-(+)-mlečne kiseline od 82% koji je sličan prinosu dobijenim u fermentaciji hidrolizata pivskog tropa sa 5,0% bistre džibre (82,51%). Zapreminska produktivnost se povećala sa dodatkom bistre džibre u poređenju sa fermentacijom bez dodatka džibre. Najviša zapreminska produktivnost je ostvarena u 12 satu svih fermentacija. Zapreminska produktivnost se povećala sa porastom koncentracije bistre džibre u hidrolizatu pivskog tropa. Dodatak bistre džibre je takođe povećao zapreminsku produktivnost L-(+)-mlečne kiseline za 6,77 (5% bistre džibre) – 39,22% (50% bistre džibre) u poređenju sa mlečno-kiselom fermentacijom bez dodatka bister džibre.

Najveća zapreminska produktivnosti L-(+)-mlečne kiseline od 0,93 g/l·h⁻¹ je postignuta sa dodatkom 50% bistre džibre. Poređenjem prinosa i zapreminske produktivnosti L-(+)-mlečne kiseline u fermentacijama sa istom koncentracijom džibre i bistre džibre (do 20%) utvrđeno je da se bolji rezultati dobijaju sa dodatkom bistre džibre. Dodatkom bistre džibre je skraćeno

vreme fermentacije za 12 sati.

Koncentracije slobodnog amino azota u hidrolizatu pivskog tropa sa početnom koncentracijom redukujućih šećera od 5,4% i bez i sa dodatkom bistre džibre (5–50%) prikazane su u tabeli 36.

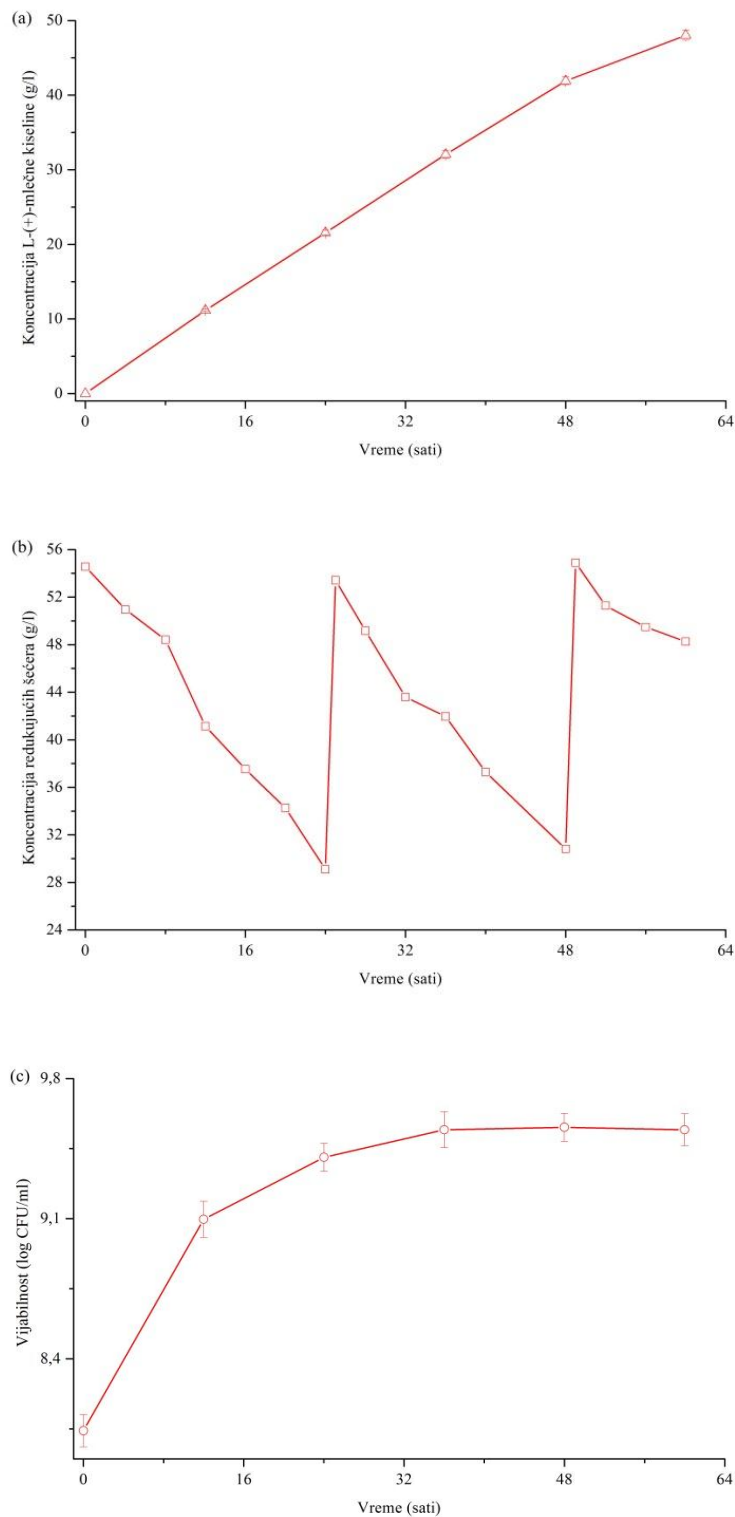
Tabela 36. Koncentracija slobodnog amino azota u hidrolizatu pivskog tropa sa dodatkom različitih koncentracija bistre džibre (5–50%)

% dodatka bistre džibre	Koncentracija slobodnog amino azota (mg/l)
0	54,98 ± 0,13
5	56,81 ± 0,14
10	58,52 ± 0,14
15	74,96 ± 0,38
20	103,32 ± 1,04
30	137,59 ± 1,15
40	148,76 ± 1,15
50	169,83 ± 1,17

Dodatak džibre je povećao koncentraciju slobodnog amino azota u hidrolizatu pivskog tropa za 3,33% (5% bistre džibre) – 208,89% (50% bistre džibre) u poređenju sa hidrolizatom pivskog tropa bez dodatka bistre džibre. Statističkom analizom je utvrđena pozitivna korelacija između koncentracije slobodnog amino azota i koncentracije L-(+)-mlečne kiseline (faktor korelacije 0,954).

Najviša koncentracija, prinos i zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline od 31,03 g/l, 86,15% i 0,93 g/l·h⁻¹, ostvareni su u fermentaciji sa dodatkom 50% bistre džibre. Na osnovu rezultata može se zaključiti da je dodatak bistre džibre povećao prinos i zapreminsku produktivnost L-(+)-mlečne kiseline. Yu i saradnici (2008) su ispitivali uticaj vode od namakanja kukuruza uz dodatak glukoze, melase, Tween 80 i mangan-sulfata na mlečno-kiselu fermentaciju sa *L. rhamnosus* CGMCC 1466. Voda od namakanja kukuruza je korišćena kao jedini izvor azota u kombinaciji sa drugim komponentama kao zamena za skupi ekstrakt kvasca u proizvodnji mlečne kiseline. Yu i saradnici (2008) su ostvarili prinos L-(+)-mlečne kiseline od 82% koji je sličan prinosu L-(+)-mlečne kiseline ostvarenim u fermentaciji hidrolizata pivskog tropa sa 5,0% džibre (82,41%) i 5,0% bistre džibre (82,51%). Li i saradnici (2012) su u mlečno-kiseloj fermentaciji rastvora glukoze (100 g/l) i soli (natrijum-hlorida, natrijum-acetata, triamonijum-citrata, kalijum-dihidrogenfosfata, magnezijum-sulfata heptahidrata, mangan-sulfat heptahidrata) sa dodatkom 6,0% vode od namakanja kukuruza sa *L. rhamnosus* LA-04-1 ostvarili prinos L-(+)-mlečne kiseline od 80% koji je sličan prinosu ostvarenom u fermentaciji hidrolizata pivskog tropa sa dodatkom 10% džibre (82,47%) i 10% bistre džibre (83,15%).

Koncentracije L-(+)-mlečne kiseline i redukujućih šećera i vijabilnost ćelija *L. rhamnosus* tokom dolivnog postupka fermentacije hidrolizata pivskog tropa (sa 5,4% redukujućih šećera i sa 50% bistre džibre) uz dodatak glukoze i bistre džibre tokom fermentacije su prikazani na slici 36.



Slika 36. Mlečno-kisela fermentacija hidrolizata pivskog tropa sa *L. rhamnosus* i sa dodatkom glukoze i bistrre džibre tokom fermentacije: (a) koncentracija L-(+)-mlečne kiseline; (b) koncentracija redukujućih šećera; (c) vijabilnost ćelija

Prinos i zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline u dolivnom postupku mlečno-kisele fermentacije hidrolizata pivskog tropa (sa 5,4% redukujućih šećera i sa 50% bistrre džibre) sa dodatkom glukoze i bistrre džibre tokom fermentacije su prikazani u tabeli 37. Nakon 60 sati fermentacije ostvareni su najveći prinos (87,82%) i koncentracija L-(+)-mlečne

kiseline (48,02 g/l). Najveća zapreminska produktivnosti od 0,96 g/l·h⁻¹ ostvarena je u 12. satu fermentacije.

Tabela 37. Prinos i zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline u mlečno-kiselej fermentacija hidrolizata pivskog tropa (sa 5,4% redukujućih šećera i 50% bistre džibre 50%) uz dodatak glukoze i bistre džibre tokom fermentacije

Sati	Prinos L-(+)-mlečne kiseline (%)	Zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline (g/l·h ⁻¹)
12	84,70 ± 0,82	0,96 ± 0,01
24	85,72 ± 1,30	0,92 ± 0,01
36	86,80 ± 1,44	0,89 ± 0,01
48	87,22 ± 1,10	0,87 ± 0,01
60	87,82 ± 1,23	0,80 ± 0,01

U poređenju sa rezultatima dobijenim šaržnim postupkom fermentacije (hidrolizat pivskog tropa sa 5,4% redukujućih šećera i sa 50% bistre džibre), u dolivnom postuku sa dodatkom glukoze i džibre tokom fermentacije ostvareno je povećanje koncentracije (za 54,75%), prinosa (za 1,93%) i zapreminske produktivnosti L-(+)-mlečne kiseline (za 4,05%). Tokom dolivnog postuka se ukupan utrošak redukujućih šećera povećao za 47,73% u poređenju sa utroškom ostvarenim u šaržnom postuku. Dodatak glukoze i bistre džibre tokom fermentacije je takođe povećao vijabilnost ćelija *L. rhamnosus* za 0,9%.

Prosečna cena ekstrakta kvasca iznosi 227\$/kg dok su džibra i bistra džibra praktično besplatne. Delimična ili potpuna zamena ekstrakta kvasca u proizvodnji mlečne kiseline bi mogla značajno da smanji troškove proizvodnje mlečne kiseline uz dobijanje visokih prinosa.

4.2.9. Dolivni postupak mlečno-kisele fermentacija uz dodatak šećera, ekstrakta kvasca i sladovine

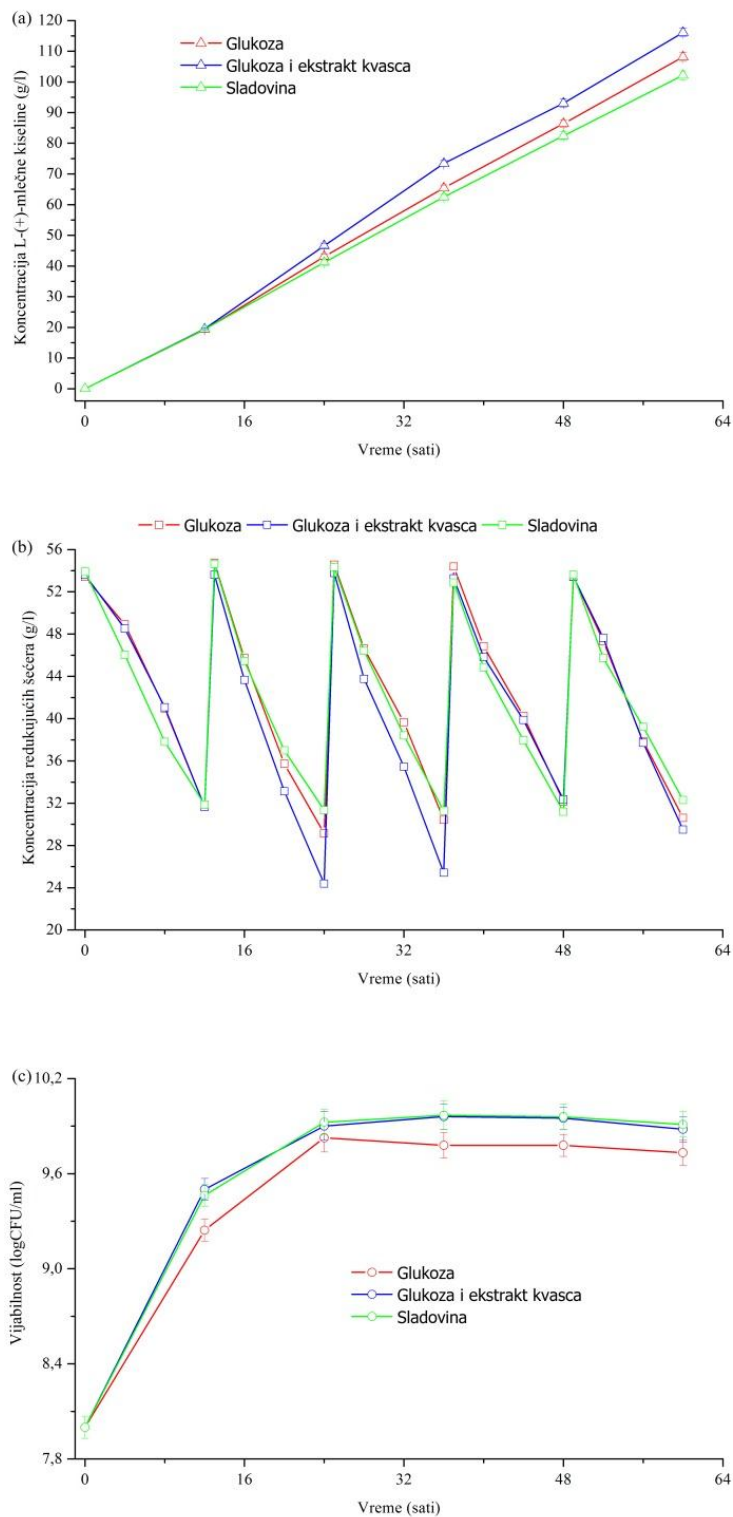
Dolivnim postupcima fermentacije, u kojima se vrši dodatak nutritijenata tokom fermentacije postižu se više koncentracije i prinos L-(+)-mlečne kiseline kao i zapreminska produktivnost. Dolivnim postupkom fermentacije se koncentracija nutritijenata održava u optimalnom opsegu stalnim ili periodičnim dodatkom sveže podloge bez izdvajanja dela podloge. Međutim, povećanje koncentracije mlečne kiseline i nutritijenata u podlozi, kao i vreme i način doziranja, mogu imati inhibitoran efekat na proizvodni mikroorganizam, jer se deo podloge ne izdvaja iz fermentora (Ding i Tan, 2006). U cilju povećanja efikanosti mlečno-kisele fermentacije ispitan je dodatak glukoze, glukoze i ekstrakta kvasca i sladovine tokom mlečno-kisele fermentacije.

Koncentracije L-(+)-mlečne kiseline i redukujućih šećera i vijabilnost ćelija *L. rhamnosus* tokom fermentacije hidrolizata pivskog tropa (sa 5,4% redukujućih šećera i 5,0% ekstrakta kvasca) sa dodatkom glukoze, glukoze i ekstrakta kvasca i sladovine tokom fermentacije su prikazani na slici 37. Vijabilnost ćelija *L. rhamnosus* nakon 60 sati fermentacije (9,7 log CFU/ml) je bila jednaka sa vijabilnošću ostvarenom tokom šaržne fermentacije hidrolizata pivskog tropa (sa 5,4% redukujućih šećera i 5,0% ekstrakta kvasca). S obzirom da su vrednosti vijabilnosti za dolivni i šaržni postupak bile jednake, dodatak glukoze je poboljšao sposobnost BMK da sintetišu L-(+)-mlečnu kiselinu, pri čemu je ostvarena veća koncentracija L-(+)-mlečne kiseline (108,12 g/l) uz povećanje koncentracije L-(+)-mlečne kiseline (za 174,56%) u poređenju sa šaržnim postupkom fermentacije hidrolizata pivskog tropa (sa 5,4% redukujućih šećera i 5,0% ekstrakta kvasca). Najveći utrošak redukujućih šećera je ostvaren između 12. i 24. sata fermentacije i iznosio je 25,59 g/l. Dodatak glukoze je povećao utrošak

redukujućih šećera između 12. i 24. sata u poređenju sa šaržnom fermentacije hidrolizata pivskog tropa (sa 5,4% redukujućih šećera i 5,0% ekstrakta kvasca) za 71,38%. Tokom mlečno-kisele fermentacije sa dodatkom glukoze tokom fermentacije se ukupan utrošak redukujućih šećera povećao za 170,22% u poređenju sa utroškom ostvarenim u šaržnoj fermentaciji hidrolizata pivskog tropa (sa 5,4% redukujućih šećera i 5,0% ekstrakta kvasca).

U dolivnom postuku sa dodatkom glukoze i ekstrakta kvasca tokom mlečno-kisele fermentacije ostvarena je visoka koncentracija L-(+)-mlečne kiseline (116,08 g/l), koje je u poređenju sa šaržnom postupkom fermentacije hidrolizata pivskog tropa (sa 5,4% redukujućih šećera i 5,0% ekstrakta kvasca) i dolivnim postupkom sa dodatkom glukoze tokom fermentacije bila veća za 197,77% i 7,36%. Ostvarena je visoka vijabilnost ćelija *L. rhamnosus* (9,9 log CFU/ml), koja je bila veća u poređenju sa šaržnom fermentacijom hidrolizata pivskog tropa (sa 5,4% redukujućih šećera i 5,0% ekstrakta kvasca) i dolivnim postupkom sa dodatkom glukoze tokom fermentacije za 1,02%. Najveći utrošak redukujućih šećera je ostvaren između 12. i 24. sata fermentacije i iznosio je 29,22 g/l. Dodatak glukoze i ekstrakta kvasca je povećao utrošak redukujućih šećera između 12. i 24. sata u poređenju sa šaržnom fermentacijom hidrolizata pivskog tropa (sa 5,4% redukujućih šećera i 5,0% ekstrakta kvasca) za 95,70%. Tokom mlečno-kisele fermentacije sa dodatkom glukoze i ekstrakta kvasca tokom fermentacije se ukupan utrošak redukujućih šećera povećao za 188,42% u poređenju sa utroškom ostvarenim u šaržnoj fermentaciji hidrolizata pivskog tropa (sa 5,4% redukujućih šećera i 5,0% ekstrakta kvasca). Utrošak redukujućih šećera je bio viši (za 16,92%) nego kod dolivnog postupka sa dodatkom glukoze tokom fermentacije.

Dodatak sladovine, kao izvora ugljenika i azota, je vršen u cilju zamene skupog ekstrakta kvasca. Sastav sladovine je prikazan u tabeli 38. Sladovina je bogata šećerima, dekstrinima, β -glukanom, pentozanima, fosfatima, rastvorenim neorganiskim jonima, proteinima, peptidima, aminokiselinama, lipidima, vitaminima, organiskim kiselinama, bazama, fenolnim jedinjenjima i jedinjenjima nastalim razgradnjim nukleinskih kiselina (Briggs i sar., 2004). Sladovina je sadržala značajno viši sadržaj suve materije (za 424%), proteina (za 72%), slobodnog amino azota (866%) i redukujućih šećera (za 635%) u poređenju sa hidrolizatom pivskog tropa. U dolivnom postupku sa dodatkom sladovine ostvarena koncentracija L-(+)-mlečne kiseline je bila veća za 159,40% od koncentracije dobijene tokom šaržne fermentacije hidrolizata pivskog tropa (sa 5,4% redukujućih šećera i 5,0% ekstrakta kvasca). Vijabilnost ćelija *L. rhamnosus* (10,0 log CFU/ml) je bila jednaka sa vijabilnošću ostvarenom u dolivnom postupku sa dodatkom glukoze i ekstrakta kvasca tokom fermentacije. Najveći utrošak redukujućih šećera je ostvaren između 12. i 24. sata fermentacije i iznosio 23,29 g/l. Dodatak sladovine je povećao utrošak redukujućih šećera između 12. i 24. sata u poređenju sa šaržnom fermentacije hidrolizata pivskog tropa (sa 5,4% redukujućih šećera i 5,0% ekstrakta kvasca) za 55,98%. Tokom mlečno-kisele fermentacije sa dodatkom glukoze i ekstrakta kvasca se ukupan utrošak redukujućih šećera povećao za 158,22% u poređenju sa utroškom ostvarenim u šaržnoj fermentaciji hidrolizata pivskog tropa (sa 5,4% redukujućih šećera i 5,0% ekstrakta kvasca). U poređenju sa šaržnom postupkom fermentacije hidrolizata pivskog tropa (sa 5,0% ekstrakta kvasca) sa većom koncentracijom redukujućih šećera (8,1%), u sva tri dolivna postuka ostvareno je povećanje koncentracije L-(+)-mlečne kiseline (od 79,21% (glukoza); 92,41% (glukoza i ekstrakt kvasca) i 69,32% (sladovina)) i vijabilnosti ćelija *L. rhamnosus* (od 1,09 (glukoza); 2,46 (glukoza i ekstrakt kvasca) i 2,56% (sladovina)).



Slika 37. Mlečno-kisela fermentacija hidrolizata pivskog tropa sa *L. rhamnosus* i sa dodatkom glukoze, glukoze i ekstrakta kvasca i sladovine tokom fermentacije: (a) koncentracija L-(+)-mlečne kiseline; (b) koncentracija redukujućih šećera; (c) vijabilnost ćelija

Tabela 38. Sastav sladovine

Parametri	Sladovina
Sadržaj suve materije, %	25,25 ± 0,04
Koncentracija redukujućih šećera, g/l	186,17 ± 0,17
Sadržaj proteina, g/l	1,37 ± 0,01
Slobodni amino azot, mg/l	531,58 ± 2,10
Mineralne materije, % na suhu materiju	0,38 ± 0,01

Prinos i zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline ostvareni tokom mlečno-kisele fermentacije hidrolizata pivskog tropa sa dodatkom glukoze, glukoze i ekstrakta kvasca i sladovine tokom fermentacije su dati u tabeli 39.

Tabela 39. Prinos i zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline ostvareni u mlečno-kiselim fermentacijama hidrolizata pivskog tropa sa *L. rhamnosus* sa dodatkom glukoze, glukoze i ekstrakta kvasca ili sladovine*

Hidrolizat pivskog tropa sa 5,4% redukujućih šećera i 5,0% ekstrakta kvasca	Sati	Prinos L-(+)-mlečne kiseline (%)	Zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline (g/l·h ⁻¹)
Bez dodataka tokom fermentacije	12	87,59 ± 1,33	1,69 ± 0,02^c
	24	90,75 ± 1,46	1,44 ± 0,02
	36	91,29 ± 1,65^a	1,09 ± 0,02
Sa dodatkom glukoze tokom fermentacije	12	88,65 ± 1,22	1,61 ± 0,02
	24	90,94 ± 1,35	1,79 ± 0,03
	36	91,48 ± 1,30	1,82 ± 0,03^d
	48	92,17 ± 1,15	1,80 ± 0,02
	60	92,77 ± 1,14^b	1,80 ± 0,02
Sa dodatkom glukoze i ekstrakta kvasca tokom fermentacije	12	88,81 ± 1,15	1,63 ± 0,02
	24	91,04 ± 1,22	1,94 ± 0,03
	36	92,31 ± 1,17	2,04 ± 0,03^e
	48	92,63 ± 1,06	1,94 ± 0,02
	60	93,32 ± 1,07^b	1,93 ± 0,02
Sa dodatkom sladovine tokom fermentacije	12	88,11 ± 0,94	1,62 ± 0,02
	24	90,83 ± 1,29	1,72 ± 0,02
	36	91,35 ± 1,35	1,74 ± 0,02^b
	48	91,54 ± 1,25	1,72 ± 0,02
	60	91,72 ± 1,10^a	1,70 ± 0,02

*Aritmetičke sredine označene različitim malim slovima u koloni su statistički značajno različite ($p < 0,05$).

Nakon 60 sati fermentacije ostvareni su najveći prinosi (91,72 – 93,32%) i koncentracija L-(+)-mlečne kiseline (102,15 – 116,08 g/l) u svim fermentacijama. Najviše vrednosti zapreminske produktivnosti L-(+)-mlečne kiseline su u svim fermentacijama ostvareni u 36. satu fermentacije (1,74 – 2,04 g/L·h⁻¹). Najveća koncentracija, prinos i zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline od 116,08 g/l, 93,32% i 2,04 g/L·h⁻¹, su ostvarene u fermentaciji sa dodatkom glukoze i ekstrakta kvasca tokom fermentacije. U poređenju sa rezultatima ostvarenim u šaržnom postupku, u dolivnim postupku sa dodatkom sladovine i glukoze tokom fermentacije ostvareno je povećanje prinosa (za 0,34 i 1,62%) i zapreminske produktivnosti L-(+)-mlečne kiseline (od 2,86 i 7,51%). Dodatak glukoze i ekstrakta kvasca tokom fermentacije je još više povećao prinos i zapreminsku produktivnost L-(+)-mlečne kiseline (za 2,21 i 20,66%). U poređenju sa šaržnom postupkom fermentacije hidrolizata

pivskog tropa (sa 5,0% ekstrakta kvasca) sa većom koncentracijom redukujućih šećera (8,1%), u sva tri dolivna postuka ostvareno je povećanje prinosa (od 6,23% (glukoza); 6,85% (glukoza i ekstrakt kvasca) i 5,03% (sladovina)) i zapreminke produktivnosti L-(+)-mlečne kiseline (od 17,98% (glukoza); 32,41% (glukoza i ekstrakt kvasca), i 12,70% (sladovina)).

Zhang i saradnici (2010) su ispitivali mogućnost primene dolivnog postupka fermentacije, sa dodatkom glukoze tokom mlečno-kisele fermentacije sa *L. lactis*-11, na podlozi koja je sadržala glukozu (38 g/l) i nutritijente (ekstrakta kvasca, pepton, goveđi ekstrakt, natrijum-hlorid, natrijum-acetata, triamonijum-citrata, magnezijum-sulfat, mangan-sulfat). Pri ovim uslovima Zhang i saradnici (2010) su ostvarili koncentraciju mlečne kiseline i zapreminsku produktivnost od 96,3 g/l i 1,9 g/l·h⁻¹, koje su bile niže od koncentraciju mlečne kiseline i zapreminske produktivnosti dobijenih u mlečno-kiseloj fermentaciji hidrolizata pivskog tropa sa dodatkom glukoze i ekstrakta kvasca tokom fermentacije.

Mogućnost primene dolivnog postupka fermentacije (dodatak rastvora glukoze (1000 g/L) tokom fermentacije) u mlečno-kiseloj fermentaciji sa *L. lactis* BME5-18M na sintetskoj podlozi (magnezijum-sulfat, mangan-sulfat, gvožđe-sulfat, natrijum-hlorid, natrijum-acetat, triamonijum-citrata, dikalijum-hidrogenfosfata, kalijum-dihidrogenfosfat, Tween 80 i kalcijum-karbonat) sa 50 g/l šećera (glukoza, laktoza i ksiloza) su ispitivali Bai i saradnici (2003). Najveća zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline od 2,2 g/l·h⁻¹ ostvarena na podlozi sa 50 g/l glukoze, je slična sa rezultatima ostvarenim u mlečno-kiseloj fermentaciji hidrolizata pivskog tropa (sa 5,4% redukujućih šećera i 5,0% ekstrakta kvasca) sa dodatkom glukoze i ekstrakta kvasca (2,04 g/l·h⁻¹) tokom fermentacije.

Bai i saradnici (2004) su u daljem istraživanju ispitivali mogućnost primene dolivnog postupka fermentacije (dodatak rastvora glukoze (600 g/l) tokom fermentacije) u mlečno-kiseloj fermentaciji sa *L. lactis* BME5-18M na istoj sintetskoj podlozi sa 50 g/l glukoze. Najveća zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline od 1,34 g/l·h⁻¹ je bila niža od vrednosti ostvarenih u mlečno-kiselim fermentacijama hidrolizata pivskog tropa (sa 5,4% redukujućih šećera i 5,0% ekstrakta kvasca) sa dodatkom glukoze (1,82 g/l·h⁻¹), glukoze i ekstrakta kvasca (2,04 g/l·h⁻¹) i sladovine (1,74 g/l·h⁻¹) tokom fermentacije.

U mlečno-kiseloj fermentaciji sa *L. casei* LA-04-01 su Ding i Tan (2006) ispitivali različite posupke dodatka glukoze i ekstrakta kvasca tokom fermentacije na podlozi koja je sadržala glukozu (90 g/l), faktore rasta i soli (ekstrakt kvasca, pepton iz sojine sačme, natrijum-acetat, triamonijum-citrat, magnezijum-sulfat heptahidrat, mangan-sulfat heptahidrat, vodu od namakanja kukuruza). Ostvareni prinosi L-(+)-mlečne kiseline su bili od 89,2 do 92,8% i slični sa rezultatima ostvarenim u mlečno-kiseloj fermentacijama hidrolizata pivskog tropa (sa 5,4% redukujućih šećera i 5% ekstrakta kvasca) sa dodatkom glukoze, glukoze i ekstrakta kvasca, sladovine i džibre. Najviši prinos je ostvaren u fermentaciji sa konstantnim dodatkom glukoze tokom fermentacije (koncentracija rastvora glukoze 850 g/l), dok su najviše zapreminske produktivnosti L-(+)-mlečne kiseline od 1,88 i 2,14 g/l·h⁻¹ ostvarene u fermentacijama sa eksponencijalnim dodatkom glukoze i ekstrakta kvasca (1,0%) tokom fermentacije. Zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline koju su postigli Ding i Tan (2006) je slična sa rezultatima ostvarenim u mlečno-kiselim fermentacijama hidrolizata pivskog tropa (sa 5,4% redukujućih šećera i 5% ekstrakta kvasca) sa dodatkom glukoze (1,82 g/l·h⁻¹) i glukoze i ekstrakta kvasca (2,04 g/l·h⁻¹) tokom fermentacije.

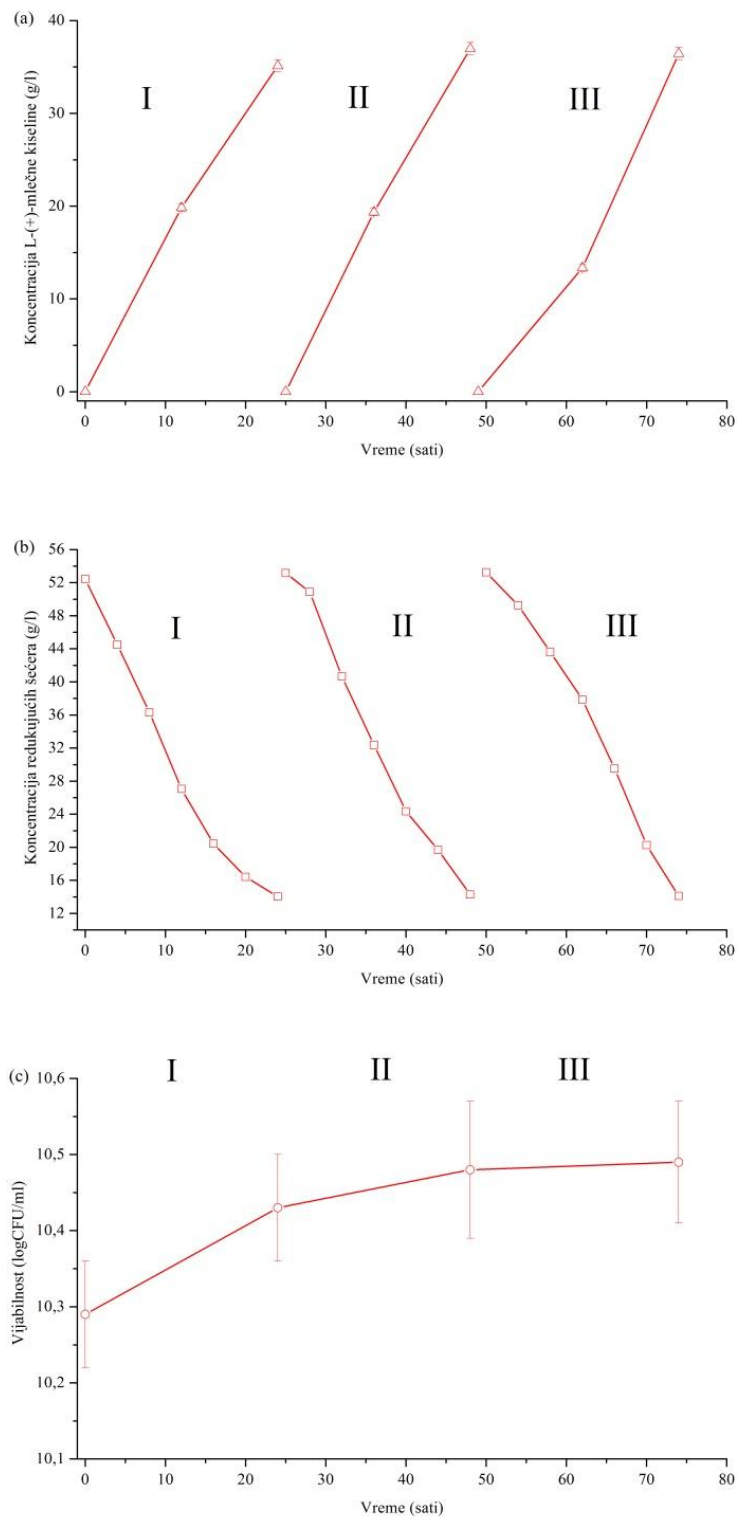
Na osnovu rezultata zaključeno je da je sa dodatkom glukoze, glukoze i ekstrakta kvasca, sladovine i džibre tokom mlečno-kisele fermentacije postignuto povećanje koncentracije, prinosa i zapreminske produktivnosti L-(+)-mlečne kiseline i vijabilnosti ćelija *L. rhamnosus* u poređenju sa šaržnim fermentacijama hidrolizata pivskog tropa sa 5,4% (i 5,0% ekstrakta kvasca) i 8,1% redukujućih šećera (i 5,0% ekstrakta kvasca).

4.2.10. Mlečno-kisela fermentacija hidrolizata pivskog tropa sa imobilisanim ćelijama *L. rhamnosus* u Ca-alginatu

Kalcijum-alginat ima široku primenu u imobilizaciji ćelija mikroorganizama. Perle kalcijum-alginata korišćene u fermentacijama su sfernog oblika, jer im je mehanička i hemijska stabilnost mnogo bolja u poređenju sa drugim oblicima perli kalcijum-alginata (Lee i saradnici, 2013). Prečnik perli oko 2mm se pokazao kao najbolji za efikasnu mlečno-kiselu fermentaciju (Göksungur i Güvenç, 1999). Perle kalcijum-alginata dobijene upotrebom 2,0% (m/v) natrijum-alginata imaju najbolju mehaničku stabilnost, kao i difuzione osobine, zbog čega je ova koncentracija natrijum-alginata korišćena u ispitivanjima (Göksungur i Güven, 1999; Idris i Suzane, 2006).

Koncentracije L-(+)-mlečne kiseline i redukujućih šećera i vijabilnost imobilisanih ćelija *L. rhamnosus* tokom fermentacije hidrolizata pivskog tropa sa imobilisanim ćelijama *L. rhamnosus* su prikazani na slici 38. Iz ostvarenih rezultata se vidi da su perle kalcijum-alginata sa ćelijama *L. rhamnosus* bile uspešno upotrebljene u tri uzastopne mlečno-kisele fermentacije. Sve tri mlečno-kisele fermentacije su završene u 24. satu fermentacije. Tokom sve tri fermentacije vijabilnost ćelija imobilisanih u perlama kalcijum-alginata je bila izuzetno visoka (10,4-10,5 logCFU/ml). Vijabilnost imobilisanih ćelija *L. rhamnosus* je bila za 7,76 (I fermentacija), 8,30 (II fermentacija) i 8,39% (III fermentacija), veća od vijabilnosti u šaržnoj fermentaciji sa slobodnim ćelijama *L. rhamnosus*. Göksungur i Güvenç (1999) su u uzastopnim šaržnim mlečno-kiselim fermentacijama sa *L. delbrueckii* IFO 3202 imobilisanim u kalcijum-alginatu na melasi postigli vijabilnost ćelija od 9,9 logCFU/ml, što je niže od vijabilnosti ostvarenih u uzastopnim šaržnim mlečno-kiselim fermentacijama na hidrolizatu pivskog tropa. Koncentracija L-(+)-mlečne kiseline se takođe povećala u II i III fermentaciji sa imobilisanim za 7,04% (36,96 g/l, II fermentacija,) i 5,41% (36,44 g/l, III fermentacija) u poređenju sa šaržnom fermentacijom sa slobodnim ćelijama *L. rhamnosus*, ako se porede vrednosti ostvarene u 24. satu fermentacije. Tokom uzastopnih šaržnih fermentacija sa imobilisanim ćelijama *L. rhamnosus* utrošak redukujući šećera se povećao za 0,78% (I fermentacija) do 2,50% (III fermentacija) u poređenju sa šaržnoj fermentaciji sa slobodnim ćelijama *L. rhamnosus*.

Prinos L-(+)-mlečne kiseline i zapreminska produktivnost ostvareni tokom mlečno-kisele fermentacije hidrolizata pivskog tropa sa imobilisanim ćelijama *L. rhamnosus* su dati u tabeli 40. Prinos L-(+)-mlečne kiseline je u sve tri fermentacije bio izuzetno visok, pri čemu je najveći prinos L-(+)-mlečne kiseline od 95,20% ostvaren u drugoj fermentaciji. Najviše zapreminske produktivnosti od 1,65 i 1,76 g/l·h⁻¹, su ostvarene u 12. satu za prve dve fermentacije, dok je najveća zapreminska produktivnost za treću fermentaciju od 1,52 g/l·h⁻¹ ostvarena u 24. satu fermentacije. Prinosi L-(+)-mlečne kiseline su u sve tri fermentacije bili viši nego u fermentaciji sa slobodnim ćelijama *L. rhamnosus* (tabela 40) i to za 0,18% (I fermentacija), 4,28% (II fermentacija) i 1,99% (III fermentacija). Zapreminska produktivnost u prvoj fermentaciji je bila približna vrednosti ostvarenoj u fermentaciji sa slobodnim ćelijama, dok je u drugoj fermentaciji postignuto povećanje od 4,09% u poređenju sa fermentacijom sa slobodnim ćelijama. Upotrebom imobilisanih ćelija *L. rhamnosus* postignuto je osim povećanja prinosa i zapreminske produktivnosti L-(+)-mlečne kiseline i skraćenje fermentacije za 12 sati i omogućena je upotreba istih ćelija u više fermentacija.



Slika 38. Uzastopne mlečno-kisele fermentacije hidrolizata pivskog troja sa imobilisanim ćelijama *L. rhamnosus*: (a) koncentracija L-(+)-mlečne kiseline; (b) koncentracija redukujućih šećera; (c) vijabilnost ćelija

Tabela 40. Prinos L-(+)-mlečne kiseline i zapreminska produktivnost u tri uzastopne fermentacije hidrolizata pivskog tropa sa 5,4% redukujućih šećera i 5,0% ekstrakta kvasca sa imobilisanim ćelijama *L. rhamnosus**

Fermentacija	Vreme (sati)	Prinos L-(+)-mlečne kiseline (g/l)	Zapreminska produktivnost (g/l·h ⁻¹)
Sa slobodnim ćelijama	12	87,59 ± 1,33	1,69 ± 0,02^b
	24	90,75 ± 1,46	1,44 ± 0,02
	36	91,29 ± 1,65^a	1,09 ± 0,02
I ciklus sa imobilisanim ćelijama	12	78,09 ± 1,06	1,65 ± 0,02^b
	24	91,46 ± 1,38^a	1,46 ± 0,02
II ciklus sa imobilisanim ćelijama	12	93,07 ± 1,30	1,76 ± 0,02^c
	24	95,20 ± 1,49^b	1,61 ± 0,02
III ciklus sa imobilisanim ćelijama	12	86,74 ± 1,10	1,11 ± 0,01
	24	93,11 ± 1,35^{ab}	1,52 ± 0,02^a

*Aritmetičke sredine označene različitim malim slovima u koloni su statistički značajno različite ($p < 0,05$).

Idris i Suzana (2006) su ispitivali različite koncentracije Na-alginata, prečnika perli, početne vrednosti pH i temperature na mlečno-kiselu fermentaciju sa imobilisanim ćelijama *L. delbrueckii* ATCC 9649 na ostacima ananasa (31,3 g/l glukoze). U svim fermentacijama maksimalni prinosi mlečne kiseline ostvareni su u 56. satu mlečno-kisele fermentacije. Pri optimalnim uslovima (pH 6,5, 37°C, prečnik perli od 1 mm, inokulum od 5,0% (m/v) i 2,0% (m/v) Na-alginata) ostvareni su prinosi mlečne kiseline od 92,7% koji je bio sličan sa vrednostima prinosa L-(+)-mlečne kiseline ostvarenim u uzastopnim šaržnim fermentacijama hidrolizata pivskog tropa u II (95,20%) i III fermentaciji (93,33%).

Shen i Xia (2006) su ispitivali mogućnost upotrebe hidrolizata celuloze iz ostataka kukuruznih klipova bez zrna (iz proizvodnje ksiloze) u mlečno-kiseloj fermentaciji sa ćelijama *L. delbrueckii* ZU-S2 imobilisanim u kalcijum-alginatu, bez i sa dodatkom hidrolizata pšeničnih mekinja u šaržnom, uzastopnom šaržnom i kontinualnom postupku fermentacije. U podlogu za fermentaciju su uz hidrolizat mekinja dodati i ekstrakt kvasca, magnezijum-sulfat, natrijum-hlorid i kalijum-dihidrogenfosfat. Prečnik perli je bio od 2,5–3mm, dok je koncentracija redukujućih šećera i glukoze u hidrolizatu iznosila 58,6 odnosno 52,4 g/l. Autori su u uzastopnim šaržnim fermentacijama (48 sati, pH 4,8 i 50°C) ostvarili prosečne vrednosti prinosa mlečne kiseline od 95,0% koji je bio sličan sa vrednostima prinosa L-(+)-mlečne kiseline ostvarenim u uzastopnim šaržnim fermentacijama hidrolizata pivskog tropa u II (95,20%) i III fermentaciji (93,33%).

Göksungur i Güvenç (1999) su ispitivali mogućnost proizvodnje mlečne kiseline sa ćelijama *L. delbrueckii* IFO 3202 imobilisanim u perlama kalcijum-alginata na melasi (u koju je dodat ekstrakt kvasca, kalijum-dihidrogenfosfata, dikalijum-hidrogenfosfata, natrijum-acetat i različite koncentracije kalcijum-karbonata). Prilikom ispitivanja optimizacija je vršena sa različitim prečnicima perli kalcijum-alginata (1,3–1,7mm, 2,0–2,4mm i 2,8–3,2mm); različitim koncentracijama natrijum-alginata (1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 i 3,5%) i početnim koncentracijama saharoze (28,2; 52,1; 78,2 i 107,2 g/l). Tokom optimizacije uslova mlečno-kisele fermentacije autori su utvrdili da se najbolji rezultati dobijaju sa perlama prečnika 2,0–2,4mm, pri čemu je za formiranje perli bio upotrebljen 2% natrijum-alginat. Perle kalcijum-alginata korišćene u mlečno-kiseloj fermentaciji hidrolizata pivskog tropa su takođe bile sličnih dimenzija i korišćen je 2,0% natrijum-alginat. Tokom šaržne fermentacije sa početnom koncentracijom saharoze u podlozi od 52,1 g/l ostvaren je najveći prinos mlečne kiseline od 82%, dok je sa početnom koncentracijom saharoze od 78,2 g/l ostvarena najveća konverzija šećera i zapreminska produktivnost mlečne kiseline. Koncentracija saharoze viši od 78,2 g/l je imao inhibitoran efekat na ćelije *L. delbrueckii* pri čemu je došlo do smanjenja prinosa. U

uzastopnim šaržnim fermentacijama korišćena je podloga sa početnom koncentracijom saharoze od 78,2 g/l. Najveća koncentracija (63 g/l) i prinos mlečne kiseline (94%) su ostvareni u trećoj mlečno-kiseloj fermentaciji. Rezultati prinosa mlečne kiseline koje su ovi autori ostvarili u uzastopnim šaržnim mlečno-kiselim fermentacijama su bili slični sa prinosom L-(+)-mlečne kiseline ostvarenim u uzastopnim šaržnim fermentacijama hidrolizata pivskog tropa u II (95,20%) i III fermentaciji (93,33%).

Fermentacije sa perlama Ca-alginata su pokazale da se ćelije *L. rhamnosus* mogu uspešno koristiti u više uzastopnih mlečno-kiselih fermentacije pri čemu se postižu izuzetno visok prinos L-(+)-mlečne kiseline uz skraćenje trajanja fermentacije.

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti:

Dodatak kalcijum-karbonata je imao pozitivan uticaj na proizvodnju mlečne kiseline sa *L. fermentum* i *L. rhamnosus*. Sa dodatkom kalcijum-karbonata povećali su se utrošak redukujućih šećera, prinos i koncentracija mlečne kiseline i vijabilnost *L. fermentum* i *L. rhamnosus*. Koncentracija ukupne mlečne kiseline, utrošak redukujućih šećera, vijabilnost ćelija *L. fermentum* i prinos ukupne mlečne kiseline su se povećali sa dodatkom kalcijum-karbonata za 11; 3,72; 3 i 13%. Koncentracija ukupne mlečne kiseline i utrošak redukujućih šećera su se povećali 13 i 10 puta, sa dodatkom kalcijum-karbonata, dok su se vijabilnost ćelija *L. rhamnosus* i prinos ukupne mlečne kiseline povećali za 105% i 17%. Dodatak kalcijum-karbonata je povećao zapreminsku produktivnost mlečne kiseline za 600% u mlečno-kiseloj fermentaciji sa *L. rhamnosus*.

Ekstrakt kvasca i kalcijum-karbonata su imali značajan uticaj na proizvodnju mlečne kiseline sa *L. fermentum* i *L. rhamnosus*. U fermentacijama sa *L. fermentum* najveći prinos ukupne mlečne kiseline (44%) je postignut sa dodatkom 5,0% ekstrakta kvasca i 2,0% kalcijum-karbonata. U fermentacijama sa *L. rhamnosus* najveći prinos ukupne mlečne kiseline (98%) i L-(+)-mlečne kiseline (96%) je ostvaren u fermentaciji sa dodatkom 2,0% ekstrakta kvasca i 2,0% kalcijum-karbonata.

Hidrolizat pivskog tropa sa dodatkom ekstrakta kvasca se pokazao kao dobra podloga za mlečno-kiselu fermentaciju sa *L. rhamnosus*. Na osnovu rezultata odlučeno je da se u daljim ispitivanjima mlečno-kisele fermentacije hidrolizata pivskog tropa kao proizvodni mikroorganizam koristi *L. rhamnosus*.

U cilju zamene kalcijum-karbonata i povećanja efikasnosti mlečno-kisele fermentacije ispitana je upotreba natrijum-hidroksida kao sredstva za neutralizaciju mlečne kiseline tokom fermentacije i korekciju pH. Korekcija pH pomoću natrijum-hidroksida je skratila fermentaciju za 48 sati, a ostvareno je i značajno povećanje zapreminske produktivnosti L-(+)-mlečne kiseline (za 200%, povećanje sa 0,21 na 0,63 g/l·h⁻¹). Iz ovog razloga, korekcija pH u daljim istraživanjima je vršena sa dodatkom natrijum-hidroksida.

U mlečno-kiselim fermentacijama sa različitim početnim koncentracijama redukujućih šećera (2,7; 5,4 i 8,1%) i sa dodatkom različitih koncentracija ekstrakta kvasca (0,5-5,0%), najveća koncentracija L-(+)-mlečne kiseline od 60,33 g/l je ostvarena u fermentaciji sa početnom koncentracijom redukujućih šećera od 8,1% i dodatkom 5,0% ekstrakta kvasca. Najveći prinos L-(+)-mlečne kiseline i zapreminska produktivnost od 91,29% i 1,69 g/l·h⁻¹, kao i vijabilnost ćelija *L. rhamnosus* od 9,7·10⁹ CFU/ml ostvareni su u fermentaciji sa početnom koncentracijom redukujućih šećera od 5,4% u hidrolizatu pivskog tropa i dodatkom 5,0% ekstrakta kvasca.

Na osnovu ostvarenih rezultata u istraživanjima sa dodatkom džibre i dodacima tokom fermentacije kao i u fermentacijama sa imobilisanim ćelijama je korišćen hidrolizat pivskog tropa sa početnom koncentracijom redukujućih šećera od 5,4%.

Pivski kvasac je dodat u cilju zamene ekstrakta kvasca u hidrolizatu pivskog tropa za mlečno-kiselu fermentaciju. Najveći prinos L-(+)-mlečne kiseline (89,01%) i zapreminska produktivnost (0,89 g/l·h⁻¹) L-(+)-mlečne kiseline su ostvareni u fermentaciji sa dodatkom 5,0% pivskog kvasca i korekcijom početne koncentracije redukujućih šećera na 5,0%. Dodatak 2,0–5,0% pivskog kvasca je povećao prinos L-(+)-mlečne kiseline za 2,78% (2,0% pivskog kvasca) – 6,75% (5,0% pivskog kvasca) u poređenju sa prinosom ostvarenim u fermentaciji bez dodatka pivskog kvasca. Zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline se u fermentacijama povećala sa dodatkom pivskog kvasca za 3,84% (0,5% pivskog kvasca) –

26,06% (5,0% pivskog kvasca)). Pivski kvasac i korekcija početne koncentracije redukujućih šećera na 5,0% su povećali prinos L-(+)-mlečne kiseline za 3,19% (0,5% pivskog kvasca) – 8,42% (5,0% pivskog kvasca), u poređenju sa prinosom ostvarenim u fermentaciji bez dodatka pivskog kvasca i sa 5,0% redukujućih šećera. Zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline se takođe povećala sa dodatkom pivskog kvasca za 11,51% (0,5% pivskog kvasca) – 48,54% (5,0% pivskog kvasca), u poređenju sa prinosom ostvarenim u fermentaciji bez dodatka pivskog kvasca i sa 5,0% redukujućih šećera. Na osnovu rezultata utvrđeno je da se može izvršiti delimična ili potpuna zamena ekstrakta kvasca pivskim kvascem uz značajno smanjenje cene podloge za mlečno-kiselu fermentaciju.

Najviša koncentracije, prinos i zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline od 31,03 g/l, 86,15% i $0,93 \text{ g/l}\cdot\text{h}^{-1}$ ostvareni su u fermentaciji sa dodatkom 50% bistre džibre. Dodatak 20–50% bistre džibre je povećao prinos L-(+)-mlečne kiseline za 3,17 (20% bistre džibre) – 4,75% (50% bistre džibre) u poređenju sa fermentacijom bez dodatka džibre. Džibra je povećala koncentraciju L-(+)-mlečne kiseline za 31,61% (5,0% džibre) – 45,82% (20% džibre), dok je bistra džibra povećala koncentraciju L-(+)-mlečne kiseline za 10,97% (5,0% džibre) – 49,98% (50% bistre džibre) u poređenju sa fermentacijom bez dodatka džibre, odnosno bistre džibre. Sa dodatkom džibre zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline se povećala za 3,76 (5,0% džibre) – 22,81% (20% džibre). Dodatak bistre džibre je takođe povećao zapreminsku produktivnost L-(+)-mlečne kiseline za 6,77 (5,0% bistre džibre) – 39,22% (50% bistre džibre). Dodatkom bistre džibre je skraćeno vreme fermentacije za 12 sati.

Najviša koncentracija, prinos i zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline su ostvareni u dolivnoj fermentaciji sa dodatkom glukoze i bistre džibre tokom mlečno-kisele fermentacije i iznosili su 48,02 g/l, 87,82% i $0,96 \text{ g/l}\cdot\text{h}^{-1}$. U poređenju sa rezultatima ostvarenim šaržnim postupkom fermentacije (hidrolizat pivskog tropa sa 5,4% redukujućih šećera i sa 50% bistre džibre), u dolivnom postupku sa dodatkom glukoze i bistre džibre tokom fermentacije ostvareno je povećanje koncentracije (za 54,75%), prinosa (za 1,93%) i zapreminske produktivnosti L-(+)-mlečne kiseline (za 4,05%). Tokom dolivnog postupka se ukupan utrošak redukujućih šećera povećao za 47,73% u poređenju sa utroškom ostvarenim u šaržnom postupku. Dodatak glukoze i bistre džibre tokom fermentacije je povećao i vijabilnost ćelija *L. rhamnosus* za 0,9%.

U dolivnim fermentacijama sa dodatkom glukoze, glukoze i ekstrakta kvasca iili sladovine najveća koncentracija, prinos i zapreminska produktivnost L-(+)-mlečne kiseline od 116,08 g/l, 93,32% i $2,04 \text{ g/l}\cdot\text{h}^{-1}$ su ostvareni u fermentaciji sa dodatkom glukoze i ekstrakta kvasca. U poređenju sa rezultatima ostvarenim u šaržnom postupku (sa istom početnom koncentracijom redukujućih šećera (5,4%) i ekstrakta kvasca (5,0%)), u dolivnim postupku sa dodatkom sladovine i glukoze ostvareno je povećanje prinosa (za 0,34% i 1,62%) i zapreminske produktivnosti L-(+)-mlečne kiseline (od 2,86 do 7,51%). Dodatak glukoze i ekstrakta kvasca je još više povećao prinos i zapreminsku produktivnost L-(+)-mlečne kiseline (za 2,21% i 20,66%).

Izvršena je imobilizacija ćelija *L. rhamnosus* u kalcijum-alginatu uz izuzetno visoku vijabilnost (10^{10} CFU/ml). Imobilisane ćelije *L. rhamnosus* su uspešno korišćene u tri uzastopne mlečno-kisele fermentacije. Prinos L-(+)-mlečne kiseline i zapreminska produktivnost su u sve tri fermentacije bili izuzetno visoki, pri čemu su najveći prinos L-(+)-mlečne kiseline i zapreminska produktivnost od 95,20% i $1,76 \text{ g/l}\cdot\text{h}^{-1}$, ostvareni u drugoj fermentaciji. Upotrebom imobilisanih ćelija *L. rhamnosus* postignuto je osim povećanja prinosa i zapreminske produktivnosti L-(+)-mlečne kiseline i skraćanje fermentacije za 12 sati u poređenju sa šaržnim fermentacijama.

6. LITERATURA

1. Abdel-Rahman, M.A., Toshiro, Y., Sonomoto, K., Lactic acid production from lignocellulose derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits, *J. Biotechnol.* **156** (2011) 286–301.
2. Abdel-Rahman, M.A., Toshiro, Y., Sonomoto, K., Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes, *Biotechnol. Adv.* **31** (2013) 877–902.
3. Acacio, K., Kapaldo, J., Orekoya, M., Sahni, S., Apyan, A., Kim, P., Prusak, M., Zahir, S., Chiem, E., Mares Araiza, R., Smith, A., Tomlin, S., IPRO 340: Business study of alternative uses for brewer's spent grain, Final Project Report, Faculty advisors: Dushay M., and Lewis P., Illinois Institute of Technology, 2011 (<http://share.iit.edu/>).
4. Adeniran, H.A., Abiose, S., Ogunsua, A., Production of fungal β -amylase and amyloglucosidase on some Nigerian agricultural residues, *Food Bioprocess Technol.* **3** (2010) 693–698.
5. Adsul, M.G., Varma, A.J., Gokhale, D.V., Lactic acid production from waste sugarcane bagasse derived cellulose, *Green Chem.* **9** (2007) 58–62.
6. Afifi, M.M., Enhancement of lactic acid production by utilizing liquid potato wastes, *Int. J. Biol. Chem.* **5** (2011) 91–102.
7. Aikat, K., Bhattacharyya, B., Optimization of some parameters of solid state fermentation of wheat bran for protease production by a local strain of *Rhizopus oryzae*, *Acta Biotechnol.* **20** (2000) 149–159.
8. Al-Hadithi, A.N., Muhsen, A.A., Yaser, A.A., Study of the possibility of using some organic acids as preservatives for brewery by-products, *J. Agric. Water Resour. Res.* **4** (1985) 229–242.
9. Ali, Z., Anjum, F.M., Zahoor, T., Production of lactic acid from corn cobs hydrolysate through fermentation by *Lactobacillus delbrukii*, *African J. Biotechnol.* **8** (2009) 4174–4178.
10. Aliyu, S., Bala, M., Brewer's spent grain: A review of its potentials and applications, *Afr. J. Biotechnol.* **10** (2011) 324–331.
11. Almeida, C., Brányik, T., Moradas-Ferreira, P., Teixeira, J., Continuous production of pectinase by immobilized yeast cells on spent grains, *J. Biosci. Bioeng.* **96** (2003) 513–518.
12. Almeida, C., Brányik, T., Moradas-Ferreira, P., Teixeira, J., Use of two different carriers in a packed bed reactor for endopolygalacturonase production by a yeast strain, *Process Biochem.* **40** (2005) 1937–1942.
13. Altaf, M., Naveena, B.J., Reddy, G., Use of inexpensive nitrogen sources and starch for L(+) lactic acid production in anaerobic submerged fermentation, *Biores. Technol.* **98** (2007a) 498–503.
14. Altaf, M., Naveena, B.J., Venkateshwar, M., Kumar, E.V., Reddy, G., Single step fermentation of starch to L(+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using inexpensive nitrogen sources to replace peptone and yeast extract-optimization by RSM, *Process Biochem.* **41** (2006) 465–472.
15. Altaf, M., Naveenam, B.J., Reddy, G., Screening of Inexpensive Nitrogen Sources for Production of L(+) Lactic Acid from Starch by Amyolytic *Lactobacillus amylophilus* GV6 in Single Step Fermentation, *Food Technol. Biottechnol.* **43** (2005) 235–239.
16. Altaf, M., Venkateshwar, M., Srijana, M., Reddy, G., An economic approach for L(+) lactic acid fermentation by *Lactobacillus amylophilus* GV6 using inexpensive carbon and nitrogen sources, *J. Appl. Microbiol.* **103** (2007b) 372–380.

17. Andrews, J.M.H., The brewhouse, in: C. Bamforth (Eds.), *Brewing New technologies*, 1st ed., Woodhead publishing limited, Cambridge, 2006.
18. AOAC, Official methods of analysis of AOAC international. Methods 923.03, AOAC international, 18th edn. Gaithersburg, MD, USA. (2007).
19. Bai, D.-M., Wei, Q., Yan, Z.-H., Zhao, X.-M., Li, X.-G., Xu, S.-M., Fed-batch fermentation of *Lactobacillus lactis* for hyper-production of L-lactic acid, *Biotechnol. Lett.* **25** (2003) 1833–1835.
20. Bai, D.-M., Yan, Z.-H., Wei, Q., Zhao, X.-M., Li, X.-G., Xu, S.-M., Ammonium lactate production by *Lactobacillus lactis* BME5-18M in pH-controlled fed-batch fermentations, *Biochem. Eng. J.* **19** (2004) 47-51.
21. Bamforth, C.W., *New brewing technologies: setting the scene*, in: *Brewing New technologies*, 1st ed., Woodhead publishing limited, Cambridge, 2006.
22. Bamforth, C.W. (2003). *Beer: Tap into the Art and Science of Brewing*, 2nd edn. Oxford University Press, New York.
23. Bamforth, C.W. (2004). *Beer: Health and Nutrition*. Blackwell Science, Oxford.
24. Bartolomé, B., Gómez-Cordovés, C., Sancho, A., Díez, N., Ferreira, P., Soliveri, J., Copa-Patiño, J., Growth and release of hydroxycinnamic acids from brewer's spent grain by *Streptomyces avermitilis* CECT 3339, *Enzyme Microb. Tech.* **32** (2003) 140–144.
25. Bartolomé, B., Santos, M., Jiménez, J., del Nozal, M., Gómez-Cordovés, C., Pentoses and hydroxycinnamic acids in brewer's spent Grain, *J. Cereal Sci.* **36** (2002) 51–58.
26. Bianchi, M.M., Brambilla, L., Protani, F., Liu, C.-L., Lievens, J., Porro, D., Efficient Homolactic Fermentation by *Kluyveromyces lactis* Strains Defective in Pyruvate Utilization and Transformed with the Heterologous *LDH* Gene, *Appl. Environ. Microbiol.* **67** (2001) 5621–5625.
27. Birkmire, S., Duff, B., Lindeman, C., Spooner, J., Yancey, M., Converting spent brewers grain into ethanol includes hydrolyzing pretreated spent brewers grain with enzyme to convert starch and cellulosic material to simple sugars, and fermenting simple sugars into ethanol with ethanol-producing microbe. US Patent 2010196979- A1 (2010).
28. Bochmann, G., Herfellner, H., Susano, F., Kreuter, F., Pesta, G., Application of enzymes in anaerobic digestion. *Water Sci. Technol.* **56** (2007) 29-35.
29. Bogar, B., Szakacs, G., Tengerdy, R., Linden, J., Pandey, A., Production of α -amylase with *Aspergillus oryzae* on spent brewing grain by solid substrate fermentation, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **102–103** (2002) 453–461.
30. Bolner de Lima, C.J., Coelho, L.F., Blanco, K.C., Contiero, J., Response surface optimization of D(-)-lactic acid production by *Lactobacillus* SMI8 using corn steep liquor and yeast autolysate as an alternative nitrogen source, *African J. Biotechnol.* **8** (2009) 5842–5846.
31. Boyaval, P., Lactic acid bacteria and metal ions. *Dairy Sci. Technol.* **69** (1989) 87–113.
32. Brányik, T., Vincente, A., Cruz, J., Teixeira, J., Continuous primary beer fermentation with brewing yeast immobilized on spent grains, *J. Inst. Brew.* **108** (2002) 410–415.
33. Brányik, T., Vincente, A., Cruz, J., Teixeira, J., Spent grains – a new support for brewing yeast immobilisation, *Biotechnol. Lett.* **23** (2001) 1073–1078.
34. Brányik, T., Vincente, A., Kuncová, G., Podrazký, O., Dostálek, P., Teixeira, J., Growth model and metabolic activity of brewing yeast biofilm on the surface of spent grains: a biocatalyst for continuous beer fermentation, *Biotechnol. Progr.* **20** (2004a) 1733–1740.
35. Brányik, T., Vincente, A., Rosario, O., Teixeira, J., Physicochemical surface properties of brewing yeast influencing their immobilization onto spent grains in a continuous reactor, *Biotechnol. Bioeng.* **88** (2004b) 84–93.

36. Briggs, D., Boulton, C., Brookes, P., Stevens, R., *Brewing- Science and practice*, CRC Press, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, 2004.
37. Bron, P.A., i Kleerebezem, M., *Engineering lactic acid bacteria for increased industrial functionality*, *Bioeng. Bugs*, **2** (2011) 80-87.
38. Bulut, S., Elibol, M., Ozer, D., *Effect of different carbon sources on L-(+) -lactic acid production by *Rhizopus oryzae**, *Biochem. Eng. J.* **21** (2004) 33–37.
39. Bustos, G., de la Torre, N., Moldes, A.B., Cruz, J.M., Dominguez, J.M., *Revalorization of hemicellulosic trimming vine shoots hydrolyzates trough continuous production of lactic acid and biosurfactants by *L. pentosus**, *J. Food Eng.* **78** (2007) 405–412.
40. Bustos, G., Moldes, A.B., Cruz, J.M., Domínguez, J.M., *Production of fermentable media from vine-trimming wastes and bioconversion into lactic acid by *Lactobacillus pentosus**, *J. Sci. Food Agric.* **84** (2004) 2105–2112.
41. Calderon, M., Loiseau, G., Guyot, J.P., *Nutritional requirements and simplified cultivation medium to study growth and energetics of a sourdough lactic acid bacterium *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 during heterolactic fermentation of starch*, *J. Appl. Microbiol.* **90** (2001) 508–516.
42. Caplice, E., Fitzgerald, G.F., *Food fermentations: role of microorganisms in food production and Preservation*, *Int. J. Food Microbiol.* **50** (1999) 131–149.
43. Carey, D. i Grossman, K., *Fermentation and Cellar Operations*, in *Fermentation, Cellinging, and Packaging Operations* (ed. Ocker K.), *MBAA Practical Handbook of the Speciality Brewer Vol. 2*, The Master Brewers Association of the America, St. Paul, Minnesota, USA (2006) str. 1-2.
44. Carvalheiro, F., Duarte, L., Lopes, S., Parajò, J., Pereira, H., Gírio, F., *Supplementation requirements of brewery's spent grain hydrolysate for biomass and xylitol production by *Debaryomyces hansenii* CCM1 941*, *J. Ind. Microbiol. Biot.* **33** (2006) 646–654.
45. Carvalheiro, F., Duarte, L., Medeiros, R., Gírio, F., *Xylitol production by *Debaryomyces hansenii* in brewery spent grain dilute-acid hydrolysate: effect of supplementation*, *Biotechnol. Lett.* **29** (2007) 1887–1891.
46. Carvalheiro, F., Esteves, M.P., Parajó, J.C., Pereira, H., Gírio, F.M., *Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewer's spent gain*, *Bioresource Technol.* **91** (2004) 93-100.
47. Celus, A., *Characterisation and fractionality of brewer'sspent grain proteins and their enzymatic hydrolysates*, PhD thesis, Laboratory of Food Chemistry and Biochemistry, Katholieke Universiteit Leuven, Leuven, 2008.
48. Chae, H.J., Joo, H., In, M.-J., *Utilization of brewer's yeast cells for the production of food-grade yeast extract. Part 1: effects of different enzymatic treatments on solid and protein recovery and flavor characteristics*, *Bioresource Technol.* **76** (2001) 253–258.
49. Chauhan, K., Trivedi, U., Patel, K.C., *Statistical screening of medium components by Plackett Burman design for lactic acid production by *Lactobacillus* sp. KCP01 using date juice*, *Bioresource Technol.* **98** (2007) 98–103.
50. Chiang, P., Chang, P., You, J., *Innovative technology for controlling VOC emissions*, *J. Hazard. Mater.* **31** (1992) 19–28.
51. Cui, F., Li, Y., Wan, C., *Lactic acid production from corn stover using mixed cultures of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus brevis**, *Bioresource Technol.* **102** (2011) 1831–1836.
52. Cui, F., Wan, C., Li, Y., Liu, Z., Rajashekhara, G., *Co-production of Lactic Acid and *Lactobacillus rhamnosus* Cells from Whey Permeate with Nutrient Supplements*, *Food Bioprocess Technol.* **5** (2012) 1278–1286.
53. Datta, R., Henry, M., *Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies – a review*, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **81** (2006) 1119–1129.

54. Dehnavi, G., Fractionation of the main components of barley spent grains from a microbrewery, Master thesis in Resource Recovery - Sustainable Technology, Department of Chemical Engineering, School of Engineering, University of Borås, 2009.
55. Denk, V., Felgentraeger H. G. W., Flad D, W., Leneol, M., Michel, R., Miedaner, H., Stippler, K., Hensel, H., Narziss, L. and O'rourke, T. European Brewery Convention - Manual of Good Practice, Wort Boiling and Clarification, Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, 2000.
56. Dhiman, T., Bingham, H., Radloff, H., Production response of lactating cows fed dried versus wet brewers' grain in diets with similar dry matter content, *J. Dairy Sci.* **86** (2003) 2914–2921.
57. Ding, S., i Tin, T., L-lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation using different fed-batch feeding strategies, *Process Biochem.* **41** (2006) 1451–1454.
58. 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.* **134** (2012) 1038–1043.
59. Djukić-Vuković, A., Mojović, L., Pejin, D., Vukašinović-Sekulić, M., Rakin, M., Nikolić, S., Pejin, J., Novi pravci i izazovi u proizvodnji mlečne kiseline na obnovljivim sirovinama, *Hem. Ind.* **65** (2011) 411–422.
60. Djukić-Vuković, A.P., Mojović, L.V., Vukašinović-Sekulić, M.S., Nikolić, S.B., Pejin, J.D., Integrated production of lactic acid and biomass on distillery stillage, *Pioproces. Biosyst. Eng.* **36** (2013) 1157–1164.
61. Djukić-Vuković, A.P., Mojović, L.V., Jokić, B.M., Nikolić, S.B., Pejin, J.D., Lactic acid production on liquid distillery stillage by *Lactobacillus rhamnosus* immobilized onto zeolite. *Bioresource Technol.* **135** (2013) 454–458.
62. Djukić-Vuković, A.P., Mojović, L.V., Semenčenko, V.V., Radosavljević, M.M., Pejin, J.D., Kocić-Tanackov, S.D., Effective valorisation of distillery stillage by integrated production of lactic acid and high quality feed, *Food Res. Int.* **73** (2015) 75–80.
63. Djukić-Vuković, A., Mladenović, D., Radosavljević, M., Kocić-Tanackov, S., Pejin, J., Mojović, L., Wastes from bioethanol and beer productions as substrates for L(+) lactic acid production – A comparative study, *Waste Manage.* **48** (2016) 478–482.
64. Djukić-Vuković, A., Proizvodnja mlečne kiseline i probiotske biomase na destilerijskoj džibri, Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet, 2013.
65. Dragone, G., Mussatto, S.I., Almeida de Silva, J.B., High gravity brewing by continuous process using immobilised yeast: effect of wort original gravity on fermentation performance, *J. Inst. Brew.* **113** (4) (2007) 391–398.
66. Dragone, G., Mussatto, S.I., Almeida de Silva, J.B., Influence of temperature on continuous high gravity brewing with yeasts immobilized on spent grains, *Eur. Food Res. Technol.* **228** (2008) 257–264.
67. Dreschke, G., Probst, M., Walter, A., Pümpel, T., Walde, J., Insam H., Lactic acid and methane: Improved exploitation of biowaste potential. *Bioresource Technol.* **175** (2015) 47–55.
68. Duarte, L., Carvalheiro, F., Lopes, S., Marques, S., Parajó, J., Girio, F., Comparison of two posthydrolysis processes of brewer's spent grain autohydrolysis liquor to produce a pentose-containing culture medium, *Appl. Biochem. Biotech.* **115** (2004) 1041–1058.
69. Dusselier, M., Van Wouwe, P., Dewaele, A., Makshina, E., Sels, B.F., Lactic acid as a platform chemical in the biobased economy: the role of chemocatalysis, *Energy Environ. Sci.* **6** (2013) 1415–1442.

70. Eaton, B., An overview of Brewing, in: Handbook of Brewing (eds Priest, F.G., and Stewart, G.G.), CRC Press, Tazlor and Francis Group, Boca Raton, Florida, USA (2006).
71. El-Shafey, E., Gameiro, M., Correia, P., de Carvalho, J., Dewatering of brewers' spent grain using a membrane filter press: a pilot plant study, *Separ. Sci. Technol.* **39** (2004) 3237–3261.
72. EN 13805:2014, Foodstuffs. Determination of trace elements. Pressure digestion. ICP/MS.
73. Eßlinger, H. M., Fermentation, Maturation and Storage, in: Hans Michael Eßlinger (Eds.), Handbook of Brewing, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2009.
74. Ezeonu, F., Okaka, A., Process kinetics and digestion efficiency of anaerobic batch fermentation of brewer's spent grains (BSG), *Process Biochem.* **31** (1996) 7–12.
75. Faulds, C., Mandalari, G., LoCurto, R., Bisignano, G., Waldron, K., Arabinoxylan and mono- and dimeric ferulic acid release from brewers' grain and wheat bran by feruloyl esterases and glycosyl hydrolases from *Humicola insolens*, *Appl. Microbiol. Biot.* **64** (2004) 644–650.
76. Firkins, J., Harvatine, D., Sylvester, J., Eastridge, M., Lactation performance by dairy cows fed wet brewers grains or whole cottonseed to replace forage, *J. Dairy Sci.* **85** (2002) 2662–2668.
77. Forssell, P., Kontkanen, H., Schols, H., Hinz, S., Eijsink, V., Treimo, J., Robertson, J., Waldron, K., Faulds, C., Buchert, J., Hydrolysis of brewers' spent grain by carbohydrate degrading enzymes, *J. Inst. Brew.* **114** (2008) 306–314.
78. Francis, F., Sabu, A., Madhavan Nampoothiri, K., Ramachandran, S., Ghosh, S., Szakacs, G., Pandey, A., Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of α -amylase by *Aspergillus oryzae*, *Biochem. Eng. J.* **15** (2003) 107–115.
79. Francis, F., Sabu, A., Madhavan Nampoothiri, K., Szakacs, G., Pandey, A., Synthesis of α -amylase by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation, *J. Basic Microb.* **42** (2002) 320–326.
80. Fuess, L.T., i Garcia, M.L., Bioenergy from stillage anaerobic digestion to enhance the energy balance ratio of ethanol production, *J. Environ. Manage.* **162** (2015) 102–114.
81. Gallo, M., Sommer A., Mlynar R., Rajcakova, L., Effect of dietary supplementation with brewery draff on rumen fermentation and milk production in grazing dairy cows, *J. Farm. Animal Sci.* **34** (2001) 107–113.
82. Gao, M.-T., Kaneko, M., Hirata, Toorisaka, E., Hano, T., Study on acid-hydrolysis of spent cells for lactic acid fermentation, *Biochem. Eng. J.* **28** (2006) 87–91.
83. Garde, A., Jonsson, G., Schmidt, A.S., Ahring, B.K., Lactic acid production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus brevis*, *Bioresource Technol.* **81** (2002) 217–223.
84. 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. *Bioresource Technol.* **100** (2009) 1872–1874.
85. Gerhäuser, C., Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents, *Eur. J. Cancer.* **41** (2005) 1941–1954.
86. Ghaffar, T., Irshad, M., Anwar, Z., Aqil, T., Zulifqar, Z., Tariq, A., Kamran, M., Ehsan, N., Mehmood, S., Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on production to purification, *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* **7** (2014) 222–229.

87. Givry, S., Prevot, V., Duchiron, F., Lactic acid production from hemicellulosic hydrolyzate by cells of *Lactobacillus bif fermentans* immobilized in Ca-alginate using response surface methodology, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **24** (2008) 745–752.
88. Göksungur, Y., Güvenç, U., Production of lactic acid from beet molasses by calcium alginate immobilized *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **74** (1999) 131–136.
89. Göksungur, Y., i Güvenç, U., Batch and Continuous Production of Lactic Acid from Beet Molasses by *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202, *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **69** (1997) 399–404.
90. Gonçalves, L.M.D., Ramos, A., Almeida, J.S., Xavier, A.M.R.B., Carrondo, M.J.T., Elucidation of the mechanism of lactic acid growth inhibition and production in batch cultures of *Lactobacillus rhamnosus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48** (1997) 346–350.
91. Gregori, A., Svagelj, M., Pahor, B., Berovic, M., Pohleven, F., The use of spent brewery grains for *Pleurotus ostreatus* cultivation and enzyme production, *New Biotechnol.* **25** (2008) 157–161.
92. Hashemi ,M., Razavi, S., Shojaosadati, S., Mousavi, S., The potential of brewer’s spent grain to improve the production of α -amylase by *Bacillus* sp. KR-8104 in submerged fermentation system, *New Biotechnol.* **28** (2011) 165–172.
93. Hernanz, D., Nuñez, V., Sancho, A., Faulds, G., Williamson, G., Bartolomé, B., Gómez-Cordovés, C., Hydroxycinnamic acids and ferulic acid dehydrodimers in barley and processed barley, *J. Agr. Food Chem.* **49** (2001) 4884–4888.
94. Hetényi, K., Németh, Á., Sevela, B., Examination of medium supplementation for lactic acid fermentation, *Hungar. J. Ind. Chem.* **36** (2008) 49–53.
95. Hetényi, K., Németh, Á., Sevela, B., Role of pH-regulation in lactic acid fermentation: Second steps in a process improvement, *Chem. Eng. Process.* **50** (2011) 293–299.
96. Hofvendahl, K., Hahn-Hägerdal, B., Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources, *Enzyme Microb. Tech.* **26** (2000) 87–107.
97. <http://www.sigmaaldrich.com>
98. Huang, L.P., 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.* **23** (2005) 265–276.
99. Huige, N. J., Brewery By-products and effluents, in: *Handbook of Brewing* (eds Priest, F.G., and Stewart, G.G.), CRC Press, Tazlor and Francis Group, Boca Raton, Florida, USA (2006).
100. Hujanen, M., Linko, S., Linko, Y.-Y., Leisola, M., Optimisation of media and cultivation conditions for L(+)(S)-lactic acid production by *Lactobacillus casei* NRRL B-441, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56** (2001) 126–130.
101. Idris, A., i 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.* **41** (2006) 1117–1123.
102. International Standard: ISO 10520, Native starch - Determination of starch content - Ewers polarimetric method, International Organization for Standardization (1997).
103. Ishiwaki, N., Murayama, H., Awayama, H., Kanauchi, O., Sato, T., Development of high value uses of spent grain by fractionation technology, *MBAA TQ* **37** (2000) 261–265.
104. Iyer, P.V., i Lee, Y.Y., Product inhibition in simultaneous saccharification and fermentation of cellulose into lactic acid. *Biotechnol. Lett.* **21** (1999) 371–373.
105. Jamshidian, M., Tehrany, E.A., Imran, M., Jacquot, M., Desobry, S., Poly-lactic acid: production, application, nanocomposites, and releas studies, *Compr. Rev. Food Sci. F.* **9** (2010) 552-571.

106. Jay, A., Parker, M., Faulks, R., Husband, F., Wilde, P., Smith, A., Faulds, C., Waldron, K., A systematic micro-dissection of brewers' spent grain, *J. Cereal Sci.* **47** (2008) 357–364.
107. Jia, X., Liu P., Li, S., Li, S., Wen, J., D-Lactic acid production by a genetically engineered strain *Corynebacterium glutamicum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **27** (2011) 2117–2124.
108. Jin, B., Yin, P., Ma, Y., Zhao, L., Production of lactic acid and fungal biomass by *Rhizopus* fungi from food processing waste streams, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **32** (2005) 678–686.
109. John, R.P., Anisha, G.S., Madhavan Nampoothiri, K., Pandey, A., Direct lactic acid fermentation: Focus on simultaneous saccharification and lactic acid production *Biotechnol. Adv.* **27** (2009) 145–152.
110. John, R.P., Madhavan Nampoothiri, K., Pandey, A., Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74** (2007) 524–534.
111. John, R.P., Madhavan Nampoothiri, K., Pandey, A., Simultaneous Saccharification and Fermentation of Cassava Bagasse for L-(+)-Lactic Acid Production Using *Lactobacilli*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **134** (2006a) 263–272.
112. John, R.P., Madhavan Nampoothiri, K., Pandey, A., Simultaneous saccharification and L-(+)-lactic acid fermentation of protease-treated wheat bran using mixed culture of lactobacilli, *Biotechnol. Lett.* **28** (2006b) 1823–1826.
113. John, R.P., Madhavan Nampoothiri, K., Pandey, A., Solid-state fermentation for L-lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*, *Process Biochem.* **41** (2006c) 759–763.
114. Karamanlioglu, M., Preziosi, R., Robson, G.D., Abiotic, and biotic environmental degradation of the bioplastic polymer poly(lactic acid): A review. *Polym. Degrad. Stab.* **137** (2017) 122-130.
115. Kaur, V., Saxena, P., Incorporation of brewery waste in supplementary feed and its impact on growth in some carps, *Bioresource Technol.* **91** (2004) 101–104.
116. Kazemi, A., Baniardalan, P., Production of lactic acid from whey by immobilized cells. *Sci. Iran.* **8** (2001) 218-222.
117. Kim, H.-O., Wee, Y.-J., Kim, J.-N., Yun, J.-S., Ryu, H.-W., Production of Lactic Acid From Cheese Whey by Batch and Repeated Batch Cultures of *Lactobacillus* sp. RKY2, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **129–132** (2006) 694–704.
118. Kim, Y., Mosier, N.S., Hendrickson, R., Ezeji, T., Blaschek, H., Dien, B, Cotta, M., Dale, B., Ladisch, M.R., Composition of corn dry-grind ethanol by-products: DDGS, wet cake, and thin stillage. *Bioresource Technol.* **99**, (2008) 5165–5176.
119. Kim, J.-H., Block, D.E., Shoemaker, S.P., Mills, D.A., Conversion of rice straw to bio-based chemicals: an integrated process using *Lactobacillus brevis*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86** (2010) 1375–1385.
120. Kleerebezem, R., i van Loosdrecht, M.C.M., Mixed culture biotechnology for bioenergy production. *Curr. Opin. Biotechnol.* **18** (2007) 207–212.
121. Komesu, A., Martinez, P.F.M., Lunelli, B.H., Filho, R.M., Maciel, M.R.W., Lactic acid purification by reactive distillation system using design of experiments, *Chem. Eng. Process* **95** (2015) 26-30.
122. Kopsahelis, N., Agouridis, N., A. Bekatoru, M. Kanellaki, Comparative study of spent grains and delignified spent grains as yeast supports for alcohol production from molasses, *Bioresource Technol.* **98** (2007) 1440-1447.

123. Kotzamanidis, Ch., Roukas, T., Skaracis, G., Optimization of lactic acid production from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130, World J. Microbiol. Biotechnol. **18** (2002) 441–448.
124. Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H., Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt, Int. Dairy J. **13** (2003) 3–13.
125. Kreis, S., Malting, in: Hans Michael Eßlinger (Eds.), Handbook of Brewing, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, (2009) 160.
126. Krottenthaler, M., Back, W., Zarnkow, M., Wort Production, in: Hans Michael Eßlinger (Eds.), Handbook of Brewing, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2009.
127. Kuntzel, U., Sonnenberg, H., Preservation of pressed brewers' spent grains with potassium sorbate, Monatsschr. Brauwiss. **50** (1997) 175–181.
128. Kunze, W., Technologie Brauer und Mälzer, 8. Auflage, VLB Berlin, 1998.
129. Kürschner, K., and Hoffer, A., A new quantitative cellulose determination. Chem. Zeit., **55** (1931) 161, 1811.
130. Kurusava, H., Ishikawa, H., Tanaka, H., L-lactic acid production from starch by coimmobilized mixed culture system of *Aspergillus awamori* and *Streptococcus lactis*, Biotechnol. Bioeng. **31** (1988) 183–187.
131. Laopaiboon, P., Thani, A., Leelavatcharamas, V., Laopaiboon, L., Acid hydrolysis of sugarcane bagasse for lactic acid production, Bioresource Technol. **101** (2010) 1036–1043.
132. Leathers, T., Biotechnological production and applications of pullulan, Appl. Microbiol. Biot. **62** (2003) 468–473.
133. Lee, B.-B., Ravindra, P., Chan, E.-S., Size and Shape of Calcium Alginate Beads Produced by Extrusion Dripping, Chem. Eng. Technol. **36** (2013) 1627–1642.
134. Lee, K., Comparison of fermentative capacities of lactobacilli in single and mixed culture in industrial media, Process Biochem. **40** (2005) 1559–1564.
135. Leiper, K.A., Meidl, M., Brewhouse Technology, in: Handbook of Brewing (eds Priest, F.G., and Stewart, G.G.), CRC Press, Tazlor and Francis Group, Boca Raton, Florida, USA (2006).
136. Li, Z., Han, L., Wang, X., Tan, T., Fermentative production of l-lactic acid from hydrolysate of wheat bran by *Lactobacillus rhamnosus*, Biochem. Eng. J. **49** (2010) 138–142.
137. Li, Z., Lu, J., Yan, Z., Han, L., Tan, T., Utilization of white rice bran for production of L-lactic acid, Biomass Bioenerg. **39** (2012) 53–58.
138. Liew, S.L., Ariff, A.B., Raha, A.R., Ho, Y.W., Optimization of medium composition for the production of a probiotic microorganism, *Lactobacillus rhamnosus*, using response surface methodology, Int. J. Food Microbiol. **102** (2005) 137–142.
139. Lin, Y., i Tanaka, S., Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects, Appl. Microbiol. Biotechnol. **69** (2006) 627–642.
140. Linares, D.M., del Río, B., Ladero, V., Redruello, B., Martín, M.C., Fernández, M., Alvarez, M.A., The putrescine biosynthesis pathway in *Lactococcus lactis* is transcriptionally regulated by carbon catabolic repression, mediated by CcpA, Int. J. Food Microbiol. **165** (2013) 43–50.
141. Lindemann, B., Filtration and Stabilization, in: Hans Michael Eßlinger (Eds.), Handbook of Brewing, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2009.
142. Linko, Y., i Javanainen, P., Simultaneous liquefaction saccharification and lactic acid fermentation on barley starch, Enz. Microb. Technol. **19** (1996) 118–123.

143. Litchfield, J.H., Lactic Acid, Microbially Produced, Battelle Memorial Institute, Columbus, OH, USA, (2009) pp. 362–372.
144. Liu, B., Yanga, M., Qia, B., Chena, X., Sua, Z., Wana, Y., Optimizing l-(+)-lactic acid production by thermophile *Lactobacillus plantarum* As.1.3 using alternative nitrogen sources with response surface method, *Biochem. Eng. J.*, **52** (2010) 212-219.
145. Low, K., Lee, C., Liew, S., Sorption of cadmium and lead from aqueous solutions by spent grain, *Process Biochem.* **36** (2000) 59–64.
146. Low, K., Lee, C., Low, C., Sorption of chromium (VI) by spent grain under batch conditions, *J. Appl. Polym. Sci.* **82** (2001) 2128–2134.
147. 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, *Bioresource Technol.* **101** (2010) 3642–3648.
148. Lu, Z., Lu, M., He, F., Yu, L., An economical approach for D-lactic acid production utilizing unpolished rice from aging paddy as major nutrient source, *Bioresource Technol.* **100** (2009) 2026–2031.
149. Macheiner, D., Adamitsch, B.F., Karner, F., Hampel, W.A., Pretreatment and Hydrolysis of Brewer’s Spent Grain, *Eng. Life Sci.* **3** (2003) 401–405.
150. Madhavan Nampoothiri, K., Nair, N.R., John, R.P., An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research, *Bioresource Technol.* **101** (2010) 8493–8501.
151. Manca de Nadra, M.C., Nitrogen metabolism in lactic acid bacteria from fruits: A review, in *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology*. (Méndez-Vilas, A. Ed.), Formatex Reseach Center, Badajoz (2007) str. 500–510.
152. Mandalari, G., Bisignano, G., Lo Curto, R., Waldron, K., Faulds C., Production of feruloyl esterases and xylanases by *Talaromyces stipitatus* and *Humicola grisea* var. *Thermoidea* on industrial food processing by-products, *Bioresource Technol.* **99** (2008) 5130–5133.
153. Maneeboon, T., Vanichsriratana, W., Pomchaitaward, C., Kitpreechavanich, V., Optimization of lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* in 3-L lirlift bioreactor using response surface methodology. *Appl. Biochem, Biotechnol.* **161** (2010) 137–146.
154. Marques, S., Matos, C.T., Gírio, F.M., Roseiro, J.C., Santos, J.A.L., Lactic acid production from recycled papir sludge: Process intensification by running fed-batch into a membrane-recycle bioreactor. *Biochem. Eng. J.* **120** (2017) 63-72.
155. Marković, M., Markov, S., Grujić, O., Mojović, L., Kocić-Tanackov, S., Vukašinović, M., Pejin, D., Microwave as a pre-treatment of triticale for bioethanol fermentation and utilization of the stillage for lactic acid fermentation. *Biochem. Eng. J.* **85** (2014) 132–138.
156. Martinez, F.A.C., Balciunas, E.M., Salgado, J.M., Gonzáles, J.M.D., Converti, A., Oliveira, R.P.S., Lactic acid properties, applications and production: A review, *Trends Food. Sci. Tech.* **30** (2013) 70-83.
157. MEBAK - *Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommission*. Method 1.4.2. Moisture content (EBC); Method 1.4.4.1 Available residual extract; Method 1.4.3.2 Soluble extract in wet and dry spent grains obtained by rinsing; Method 2.6.1.1. Protein content by Kjeldahl method; Method 2.6.4.1.1 Free Amino Nitrogen (FAN) Ninhydrin Method. 85350 Freising-Weihenstephan, Germany, (2013).
158. Meneses, N.G.T., Martine, S., Teixeira, J.A., Mussatto, S.I., Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer’s spent grains, *Sep. Purif. Technol.* **108** (2013) 152–158.

159. Meng, Y., Xue, Y., Yu, B., Gao, C., Ma, Y., Efficient production of L-lactic acid with high optical purity by alkaliphilic *Bacillus* sp. WL-S20. *Bioresource Technol.* **116** (2012) 334–339.
160. Miller, G.L., Use of dinitrosalicylic acid for determining reducing sugars, *Anal. Chem.* **31** (1959) 426–428.
161. Mirdamadi, S., Atashgahi, S., Rajani, A., Aziz-Mohseni, F., Roayaei, M., Hamadi, J., Cell entrapment of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 39392 for lactic acid production, *Iranian J. Biotechnol.* **6** (2008) 16–21.
162. Miura, S., Arimura, T., Itoda, N., Dwiarti, L., Feng, J.B., Bin, C.H., Okabe, M., Production of L-Lactic Acid from Corncob, *J. Biosci. Bioeng.* **97** (2004) 153–157.
163. Moldes, A.B., Alonso, J.L., Parajó, J.C., Multi-step feeding systems for lactic acid production by simultaneous saccharification and fermentation of processed wood, *Bioprocess Eng.* **22** (2000) 175–180.
164. Moestedt, J., Nordell, E., Schürer, A., Comparison of operating strategies for increased biogas production from thin stillage. *J. Biotechnol.* **175** (2014) 22–30.
165. Moreira, M.M., Morais, S., Barros, A.A., Delerue-Matos, C., Guido, L.F., A novel application of microwave-assisted extraction of polyphenols from brewer's spent grain with HPLC-DAD-MS analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* **403** (2012) 1019–1029.
166. Munroe, J.H., Fermentation, in: *Handbook of Brewing* (eds Priest, F.G., and Stewart, G.G.), CRC Press, Tazlor and Francis Group, Boca Raton, Florida, USA (2006).
167. Mussatto, S.I., Dragone, G., Roberto, I.C., Ferulic and *p*-coumaric acids extraction by alkaline hydrolysis of brewer's spent grain, *Ind. Crop. Prod.* **25** (2007a) 231–237.
168. Mussatto, S.I., Dragone, G., Roberto, I.C., Brewer's spent grain: generation, characteristics and potential applications, *J. Cereal Sci.* **4** (2006a) 1–14.
169. Mussatto, S.I., Dragone, G., Rocha, G.J.M., Roberto, I.C., Optimal operating conditions for brewer's spent grain soda pulping, *Carbohydr. Polym.* **64** (2006b) 22–28.
170. Mussatto, S.I., Fernandes, M., Dragone, G., Mancilha, I., Roberto, I.C., Brewer's spent grain as raw material for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*, *Biotechnol. Lett.* **29** (2007b) 1973–1976.
171. Mussatto, S.I., Fernandes, M., Mancilha, I., Roberto, I.C., Effect of medium supplementation and pH control on lactic acid production from brewer's spent grain, *Biochem. Eng. J.* **40** (2008a) 437–444.
172. Mussatto, S.I., Fernandes, M., Rocha, G., Órfão, J., Teixeira, J.A., Roberto, I.C., Production, characterization and application of activated carbon from brewer's spent grain lignin, *Bioresource Technol.* **101** (2010) 2450–2457.
173. Mussatto, S.I., Roberto, I.C., Acid hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain to produce xylitol, *J. Sci. Food Agric.* **85** (2005) 2453–2460.
174. Mussatto, S.I., Teixeira, J.A., in: A. Méndez-Vilas (Eds.), *Communicating Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, Formatex, Badajoz (2010).
175. Mussatto, S.I., Aguilar, C.N., Rodrigues, L.R., Teixeira, J.A., Fructooligosaccharides and β -fructofuranosidase production by *Aspergillus japonicus* immobilized on lignocellulosic materials, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **59** (2009) 76–81.
176. Mussatto, S.I., Dragone, G., Fernandes, M., Milagres, A.M.F., Roberto, I.C., The effect of agitation speed, enzyme loading and substrate concentration on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain, *Cellulose* **15** (2008b) 711–721;
177. Mussatto, S.I., Dragone, G., Roberto, I.C., Influence of the toxic compounds present in brewer's spent grain hemicellulosic hydrolysate on xylose-to-xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*, *Process Biochem.* **40** (2005) 3801–3806.

178. Mussatto, S.I., Fernandes, M., Milagres, A.M.F., Roberto, I.C., Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain, *Enzyme Microb. Tech.* **43** (2008c) 124-129.
179. Mussatto, S.I., Roberto, I.C., Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **81** (2006) 268-274.
180. Mussatto, S.I., Roberto, I.C., Establishment of the optimum initial xylose concentration and nutritional supplementation of brewer's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*, *Process Biochem.* **43** (2008) 540-546.
181. Mussatto, S.I., Mancada, J., Roberto, I.C., Cardona, C.A., Techno-economic analysis for brewer's spent grains use on a biorefinery concept: The Brazilian case, *Bioresource Technol.* **148** (2013) 302-310.
182. Mussatto, S.I., Brewer's spent grain: a valuable feedstock for industrial applications. *J. Sci. Food Agric.* **94** (2014) 1264-1275.
183. 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.* **25** (2009) 1423-1429.
184. Naritomi, T., Kouda, T., Yano, H., Yoshinaga, F., Shigematsu, T., Morimura, S., Kida, K., Influence of broth exchange ratio on bacterial cellulose production by repeated-batch culture. *Process Biochem.* **38** (2002) 41-47.
185. Nascimento, R., Junior, N., Pereira, N.Jr., Bon, E., Coelho, R., Brewer's spent grain and corn steep liquor as substrate for cellulolytic enzymes production by *Streptomyces malaysiensis*, *Lett. Appl. Microbiol.* **48** (2009) 529-535.
186. Neveena, B.J., Altaf, M., Bhadrappa, K., Reddy, G., Production of L(+) Lactic Acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in Semi-Solid State Fermentation Using Wheat Bran, *Food Technol. Biotechnol.* **42** (2004) 147-152.
187. Neveena, B.J., Altaf, Md., Bhadrappa, K., Reddy, G., Selection of medium components by Plackett-Burman design for production of L(+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using wheat bran, *Bioresource Technol.* **96** (2005) 485-490.
188. Novik, G., Wawrzynczyk, J., Norrlov, O., Szwajcer-Dey, E., Fractions of barley spent grain as media for growth of probiotic bacteria, *Microbiology* **76** (2007) 804-808.
189. Ochs, D., i Kastner, V., Combined methane and hydrogen production for the application in a stationary motor, *Chem. Eng. Trans.* **21** (2010) 1261-1266.
190. Oda, Y., Saito, K., Yamauchi, H., Mori, M., Lactic Acid Fermentation of Potato Pulp by the Fungus *Rhizopus oryzae*, *Curr. Microbiol.* **45** (2002) 1-4.
191. Oh, H., Wee, Y., Yun, J., Han, S., Jung, S., Ryu, H., Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials, *Bioresource Technol.* **96** (2005) 1492-1498.
192. Ohkouchi, Y., Inoue, Y., Direct production of L(+)-lactic acid from starch and food wastes using *Lactobacillus manihotivorans* LMG18011, *Bioresource Technol.* **97** (2006) 1554-1562;
193. Okamoto, H., Kitagawa, Y., Minowa, T., Ogi, T., Thermalcatalytic conversion of high moisture spent grains to a gaseous fuel, *MBAA TQ* **36** (1999) 239-241.
194. Okano, K., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., Kondo, A., Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: recent achievements, perspectives, and limits, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85** (2010) 413-423.
195. Okino, S., Inui, M., Yukawa, H., Production of organic acids by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68** (2005) 475-480.

196. Ou, M.S., Ingram, L.O., Shanmugam, K.T., L(+)-Lactic acid production from non-food carbohydrates by thermotolerant *Bacillus coagulans*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **38** (2011) 599–605.
197. Ou, M.S., Mohammed, N., Ingram, L.O., Shanmugam, K.T., Thermophilic *Bacillus coagulans* Requires Less Cellulases for Simultaneous Saccharification and Fermentation of Cellulose to Products than Mesophilic Microbial Biocatalysts, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **155** (2009) 379–385.
198. Öztürk, S., Özboy, Ö., Cavidoglu, I., Köksel, H., Effects of brewers' spent grain on the quality and dietary fibre content of cookies, *J. Inst. Brew.* **108** (2002) 23–27.
199. Panagiotou, G., Granouillet, P., Olsson, L., Production and partial characterization of arabinoxylan-degrading enzymes by *Penicillium brasilianum* under solid-state fermentation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72** (2006) 1117–1124.
200. Panesar, P.S., Kennedy, J.F., Knill, C.J., Kosseva, M.R., Applicability of pectate-entrapped *Lactobacillus casei* cells for L-(+)-lactic acid production from whey, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74** (2007) 35–42.
201. Parajó, J.C., Alonso, J.L., Santos, V., Lactic acid from wood, *Process Biochem.* **31** (1996) 271–280.
202. Patel, A.K., Madhavan Nampoothiri, K., Ramachandran, S., Production of fructosyl transferase by *Aspergillus oryzae* CFR 202 in solid-state fermentation using agricultural by-products, *Indian J Biotechnol.* **4** (2005) 336–341.
203. Patel, M.A., Ou, M.S., Harbrucker, R., Aldrich, H.C., Buszko, M.L., Ingram, L.O., Shanmugam, K.T., Isolation and Characterization of Acid-Tolerant, Thermophilic Bacteria for Effective Fermentation of Biomass-Derived Sugars to Lactic Acid. *Appl. Environ. Microb.* **72** (2006) 3228–3235.
204. Pavslar, A., Buiatti, S., in: Preedy, V. (Eds.), *Beer in Health and Disease Prevention* Academic Press, Elsevier, 2009.
205. Pejcin, J.D., Radosavljević, M.S., Grujić, O.S., Mojović, L.V., Kocić-Tanackov, S.D., Nikolić, S.B. Djukić-Vuković, A.P., Mogućnost primene pivskog tropa u biotehnologiji. *Hem. Ind.* **67** (2013) 277–291.
206. Pejcin D., *Industrijska mikrobiologija*, Tehnološki fakultet, Novi Sad, (2003) str. 126–136.
207. Pejcin, J., Grujić, O., Čanadanović-Brunet, J., Vujić, Đ., Tumbas, V., Investigation of phenolic acids content and antioxidant activity in malt production, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **67** (2009) 81–88.
208. Pejcin, J., Ispitivanje sadržaja i antioksidativne aktivnosti fenolnih kiselina u toku proizvodnje slada i piva, *Doktorska disertacija*, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, 2009.
209. Plessas, S., Trantallidi, M., Bekatoru, A., Kanellaki, M., Nigam, P., Koutinas, A., Immobilization of *kefir* and *Lactobacillus casei* on brewery spent grains for use in sourdough wheat bread making, *Food Chem.* **105** (2007) 187–194.
210. Portnoy, V.A., Herrgård, M.J., Palsson, B.Ø., Aerobic Fermentation of D-Glucose by an Evolved Cytochrome Oxidase-Deficient *Escherichia coli* Strain, *Appl. Environ. Microbiol.* **74** (2008) 7561–7569.
211. Privredna Komora Srbije (<http://www.pks.rs/>).
212. Qi, B., Yao, R., L-lactic acid production from *Lactobacillus casei* by solid state fermentation using rice straw, *Bioresource* **2** (2007) 419–429.
213. Rakin, M., Baras, J., Vukašinović, M., Maksimović, M., The examination of parameters for lactic acid fermentation and nutritive value of fermented juice of beetroot, carrot and brewer's yeast autolysate, *J. Serb. Chem. Soc.* **69** (2004) 625–634.

214. Rakin, M., Vukašinović, M., Šiler-Marinković, S., Maksimović, M., Contribution of lactic acid fermentation to improved nutritive quality vegetable juices enriched with brewer's yeast autolysate, *Food Chem.* **100** (2007) 599–602.
215. Rashid, R. Optimization and modeling of lactic acid production from pineapple waste, PhD thesis, University Teknologi Malaysia, Faculty of Chemical and Natural Resource Engineering, 2008.
216. Reddy, G., Altaf, M., Naveena, B., Venkateshwar, M., Vijay Kumar, E., Amylolytic bacterial lactic acid fermentation – A review, *Biotechnol. Adv.* **26** (2008) 22–34.
217. Rieker, C., Moeller, M., Sommer, K., Anaerobic degradation of beer spent grains for biogas production, *Brauwelt* **132** (1992) 716–721.
218. Rivas, B., Moldes, A.B., Domínguez, J.M., Parajó, J.C., Lactic acid production from corn cobs by simultaneous saccharification and fermentation: a mathematical interpretation, *Enzyme Microb. Technol.* **34** (2004) 627–634.
219. Rivas, B., Moldes, A.B., Domínguez, J.M., Parajó, J.C., Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep liquor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*, *Int. J. Food Microbiol.* **97** (2004b) 93–98.
220. Robertson, J., I'Anson, K., Treimo, J., Faulds, C., Brocklehurst, T., Eijsink, V., Waldron, K., Profiling brewers' spent grain for composition and microbial ecology at the site of production, *LWT – Food Sci. Technol.* **43** (2010) 890–896.
221. Romani, A., Yáñez, R., Garrote, G., Alonso, J.L., SSF production of lactic acid from cellulosic biosludges, *Bioresource Technol.* **99** (2008) 4247–4254.
222. Ross, R.P., Morgan, S., Hill, C., Preservation and fermentation: past, present and future, *Int. J. Food Microbiol.* **79** (2002) 3–16.
223. Rosenberg, M., Rebroš, M., Krištofiková, Malátová, K., High temperature lactic acid production by *Bacillus coagulans* immobilized in LentiKats. *Biotechnol. Lett.* **27** (2005) 1943–1947.
224. Roukas, T., Pullulan production from brewery wastes by *Aureobasidium pullulans*, *World J. Microb. Biot.* **15** (1999) 447–450.
225. Russ, W., Mörtel, H., Meyer-Pittroff, R., Application of spent grain to increase porosity in bricks, *Constr. Build. Mater.* **19** (2005) 117–126.
226. Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G., Pandey, A., Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochem.* **40** (2005) 2689–2694.
227. Sangeetha, P., Ramesh, M., Prapulla, S., Production of fructosyl transferase by *Aspergillus oryzae* CFR 202 in solid-state fermentation using agricultural by-products, *Appl. Microbiol. Biot.* **65** (2004) 530–537.
228. Santos, M., Jimenez, J., Bartolomé, B., Gomez-Cordoves, C., del Nozal, J., Variability of brewer's spent grain within a brewery, *Food Chem.* **80** (2003) 17–21.
229. Sato, K., Yagi, N., Okamoto, H., Inoue, M., Ajiri, T., Shibata J., Physical property and burning property of spent grain charcoal, *J. Min. Mater Proc. Inst. J.* **117** (2001) 587–590.
230. Schuster, K., Weinfurter, F., Narziss, L., Die Bierbrauerei: Band I: Die Technologie der Malzbereitung, 7., Neu bearbeitete Auflage, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 1999.
231. Serena, A., Bach Knudsen, K., Chemical and physicochemical characterisation of co-products from the vegetable food and agro industries, *Anim. Feed Sci. Technol.* **139** (2007) 109–124.
232. Sežun, M., Grilc, V., Logar, R.M., Anaerobic digestion of mechanically and chemically pretreated lignocellulosic substrate. *CISA, Environmental Sanitary Engineering Center, Third Int. Symp. on Energy from Biomass and Waste, Venice* (2010).

233. Shahbazi, A., Mims, M.R., Li, Y., Shirley, V., Ibrahim, S.A., Morris, A., Lactic Acid Production from Cheese Whey by Immobilized Bacteria, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **122** (2005) 529–540.
234. Shen, X., i Xia, L., Lactic Acid Production From Cellulosic Material by Synergetic Hydrolysis and Fermentation, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **133** (2006) 251–262.
235. Shinkawa, S., Okano, K., Yoshida, S., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., Kondo, A., Improved homo L-lactic acid fermentation from xylose by abolishment of the phosphoketolase pathway and enhancement of the pentose phosphate pathway in genetically modified xylose-assimilating *Lactococcus lactis*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **91** (2011) 1537–1544.
236. Silva, J., Sousa, S., Goncalves, I., Porter, J., Ferreira-Dias, S., Modeling adsorption of acid orange 7 dye in aqueous solutions to spent brewery grains, *Sep. Purif. Technol.* **40** (2004a) 163–170.
237. Silva, J., Sousa, S., Rodrigues, J., Antunes, H., Porter, J., Goncalves, I., Ferreira-Dias, S., Adsorption of acid orange 7 dye in aqueous solutions by spent brewery grains, *Sep. Purif. Technol.* **40** (2004b) 309–315.
238. Sim, T., Oh, J., Spent brewery grains as substrate for the production of cellulases by *Trichoderma reesei* QM9414, *J. Ind. Microbiol. Biot.* **5** (1999) 153–158.
239. Smidsrød, O., i Skjåk-Bræk, G., Alginate as immobilization matrix for cells, *Trends Biotechnol.* **8** (1990) 71–78.
240. Sridee, W., Laopaiboon, L., Jaisil, P., Laopaiboon, P., The use of dried spent yeast as a low-cost nitrogen supplement in ethanol fermentation from sweet sorghum juice under very high gravity conditions, *Electron. J. Biotechnol.* **14** (2011) 1–15. www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-34582011000600003&lng=es.
241. Stewart, G.G., *Biochemistry of Brewing*, in *Biochemistry of Food*, 3rd ed. (editors N.M: Eskin and Cogan U.), Academic press, Elsevier Inc, USA (2013) str. 297–299.
242. Sukumara, R.K., Singhanian, R.R., Pandey, A., Microbial cellulases-Production, applications and challenges, *J. Sci. Ind. Res.* **64** (2005) 832–844.
243. Suwanapong, S., Khongsay, N., Laopaiboon, L., Jaisil, P., Laopaiboon, P., Dried Spent Yeast and Its Hydrolysate as Nitrogen Supplements for Single Batch and Repeated-Batch Ethanol Fermentation from Sweet Sorghum Juice, *Energies* **6** (2013) 1618–1631.
244. Szponar, A., Pawlik, K., Gamian, A., Dey, E., Protein fraction of barley spent grain as a new simple medium for growth and sporulation of soil actinobacteria, *Biotechnol. Lett.* **25** (2003) 1717–1721.
245. Szwajgier, D., Jakubczyk, A., Production of extracellular ferulic acid esterases by *Lactobacillus* strains using natural and synthetic carbon sources, *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* **10** (2011) 287–302.
246. Taherzadeh, M.J., i Karimi, K., Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A Review, *Int. J. Mol. Sci.* **9** (2008) 1621–1651.
247. grains in superheated steam, *J. Food Eng.* **67** (2005) 457–465.
248. Tango, M.S.A., Ghaly, A.E., Effect of temperature on lactic acid production from cheese whey using *Lactobacillus helveticus* under batch conditions, *Biomass Bioenergy* **16** (1999) 61–78.
249. Tanguler, H., i Erten, H., Utilisation of spent brewer's yeast for yeast extract production by autolysis: The effect of temperature, *Food Bioprod. Process.* **86** (2008) 317–321.
250. Taniguchi, M., Tokunaga, T., Horiuchi, K., Hoshino, K., Sakai, K., Tanaka, T., Production of L lactic acid from a mixture of xylose and glucose by co-cultivation of lactic acid bacteria, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66** (2004) 160–165.
251. Terrasan, C.R.F., Temer, B., Duarte, M.C.T., Carmona, E.C., Production of xylanolytic enzymes by *Penicillium janczewskii*, *Bioresour. Technol.* **101** (2010) 4139–4143.

252. Thomsen, M.H., Guyot, J.P., Kiel, P., Batch fermentations on synthetic mixed sugar and starch medium with amylolytic lactic acid bacteria, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74** (2007) 540–546.
253. Timbuntam, W., Sriroth, K., Tokiwa, Y., Lactic acid production from sugar-cane juice by a newly isolated *Lactobacillus* sp. *Biotechnol. Lett.* **28** (2006) 811–814.
254. Tokuhira, K., Ishida, N., Nagamori, E., Saitoh, S., Onishi, T., Kondo, A., Takahashi, H., Double mutation of the PDC1 and ADH1 genes improves lactate production in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* expressing the bovine lactate dehydrogenase gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **82** (2009) 883–890.
255. Treimo, J., Aspino, S.I., Eijssink, V.G.H., Horn, S.J., Enzymatic Solubilization of Proteins in Brewer's Spent Grain, *J. Agr. Food Chem.* **56** (2008) 5359-5365;
256. Treimo, J., Westereng, B., Horn, S.J., Forssell, P., Robertson, J.A., Faulds, C.B., Waldron, K.W., Buchert, J., Eijssink, V.G.H., Enzymatic Solubilization of Brewer's Spent Grain by Combined Action of Carbohydrases and Peptidases, *J. Agr. Food Chem.* **57** (2009) 3316-3324;
257. Tsaousi, K., Velli, A., Akarepis, F., Bosnae, L., Drouza, C., Koutinas, A.A., Bekatorou, A., Low temperature winemaking by thermally dried immobilized yeast on delignified brewer's spent grains, *Food Technol. Biotechnol.* **49** (3) (2011) 379-384.
258. Vanbeneden, N., Gills, F., Delvaux, F., Delvaux, F.R., Variability in the release of free and bound hydroxycinnamic acids from diverse malted barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars during wort production, *J. Agr. Food Chem.* **55** (2007) 11002–11010.
259. Venus, J., Utilization of renewables for lactic acid fermentation, *Biotechnol. J.* **1** (2006) 1428–1432.
260. Wang, D., Sakoda, A., Suzuki, M., Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain, *Bioresource Technol.* **78** (2001) 293–300.
261. Wang, L., Zhao, B., Liu, B., Yang, C., Yu, B., Li, Q., Ma, C., Xu, P., Ma, Y., Efficient production of L-lactic acid from cassava powder by *Lactobacillus rhamnosus*, *Bioresource Technol.* **101** (2010) 7895–7901.
262. Wang, Q., Zhao, X., Chamu, J., Shanmugam, K.T., Isolation, characterization and evolution of a new thermophilic *Bacillus licheniformis* for lactic acid production in mineral salts medium. *Bioresource Technol.* **102** (2011) 8152–8158.
263. Wang, Y., Tashiro, Y., Sonomoto, K., Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits, *J. Biosci. Bioeng.* **119** (2015) 10–18.
264. 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, *Bioresource Technol.* **218** (2016) 1098–1105.
265. Wee, Y.-J., Kim, J.-N., Yun, J.-S., Ryu, H.-W., Utilization of sugar molasses for economical l(+) lactic acid production by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*, *Enzyme Microb. Tech.* **35** (2004) 568–573.
266. Wee, Y.-J., Yun, J.-S., Kim, D., Ryu, H.-W., Batch and repeated batch production of L(+)-lactic acid by *Enterococcus faecalis* RKY1 using wood hydrolyzate and corn steep liquor. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **33** (2006) 431–435.
267. White, J., Yohannan, B., Walker, G., Bioconversion of brewer's spent grains to bioethanol, *FEMS Yeast Res.* **8** (2008) 1175–1184.
268. Wilkie, A.C., Riedesel, K.J., Owens, J.M., Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstock. *Biomass Bioenerg.* **19** (2000) 63–102.

269. Woiciechowski, A.L., Nitsche, S., Pandey, A., Soccol, C.R., Acid and enzyme hydrolysis to recover reducing sugars from cassava bagasse: an economic study, *Brazilian Archives of Biology and Technology* **45** (2002) 393–400.
270. Wunderlich, S., Back W., Overview of Manufacturing Beer: Ingredients, Processes, and Quality criteria, in: Preedy, V. (Eds.), *Beer in Health and Disease Prevention* Academic Press, Elsevier, 2009.
271. Xiros, C., Christakopoulos, P., Enhanced ethanol production from brewer's spent grain by a *Fusarium oxysporum* consolidated system, *Biotechnology for Biofuels* **2** (2009a) 4–15.
272. Xiros, C., i Christakopoulos, P., Biorechnological potential of brewers spent grain and its recent applications, *Wast Biomass Valor.* **3** (2012) 213-232.
273. Xiros, C., Moukouli, M., Topakas, E., Christakopoulos, P., Factors affecting ferulic acid release from brewer's spent grain by *Fusarium oxysporum* enzymatic system, *Bioresource Technol.* **100** (2009b) 5917–5921.
274. Xiros, C., Topakas, E., Katapodis, P., Christakopoulos, P., Evaluation of *Fusarium oxysporum* as an enzyme factory for the hydrolysis of brewer's spent grain with improved biodegradability for ethanol production, *Ind. Crop Prod.* **28** (2008b) 213–224.
275. Xiros, C., Topakas, E., Katapodis, P., Christakopoulos, P., Hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain by *Neurospora crassa*, *Bioresource Technol.* **99** (2008a) 5427–5435.
276. Xu, H., Sun, L., Zhao, D., Zhang B., Shi, Y., Wu, Y., Production of α -amylases by *Aspergillus oryzae* As 3951 in solid state fermentation using spent brewing grains as substrate, *sJ. Sci. Food Agr.* **88** (2008) 529–535.
277. Yu, L., Lei, T., Ren, X., Pei, X., Feng, Y., Response surface optimization of l-(+)-lactic acid production using corn steep liquor as an alternative nitrogen source by *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466, *Biochem. Eng. J.* **39** (2008) 496–502.
278. Yukawa, H., Omumasaba, C.A., Nonaka, H., Kos, P., Okai, N., Suzuki, N., Suda, M., Tsuge, Y., Watanabe, J., Ikeda, Y., Vertès, A.A., Inui, M., Comparative analysis of the *Corynebacterium glutamicum* group and complete genome sequence of strain R. *Microbiology* **153** (2007) 1042–1058.
279. Yun, J.-S., i Ryu, H.-W., Lactic acid production and carbon catabolite repression from single and mixed sugars using *Enterococcus faecalis* RKY1, *Process Biochem.* **37** (2001) 235–240.
280. Zanker, G., Kepplinger, W., The utilization of spent grains in the brewery integrated system, *Brauwelt* **142** (2002) 1742–1747.
281. Zhang, Y., Cong, W., Shi, S.Y., Application of a pH Feedback-Controlled Substrate Feeding Method in Lactic Acid Production, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **162** (2010) 2149–2156.
282. Zhang, Z.Y., Jin, B., Kelly, J.M., Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus fungi*, *Biochem. Eng. J.* **35** (2007) 251–263.
283. Zhao, B., Wang, L., Ma, C., Yang, C., Xu, P., Ma, Y., Repeated open fermentative production of optically pure L-lactic acid using a thermophilic *Bacillus* sp. strain. *Bioresource Technol.* **101** (2010) 6494–6498.
284. Zhou, S., Causey, T.B., Hasona, A., Shanmugam, K.T., Ingram, L.O., Production of optically pure D-lactic acid in mineral salts medium by metabolically engineered *Escherichia coli* W3110. *Appl. Environ. Microbiol.* **69** (2003) 399–407.