

Proizvodnja mliječne kiseline iz hidrolizata lignoceluloznih sirovina i utjecaj furfurala na rast i aktivnost bakterija mliječne kiseline

Kostić, Alen

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:668655>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO – BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2016. godine

Alen Kostić

680/BPI

**Proizvodnja mliječne kiseline iz
hidrolizata lignoceluloznih sirovina i
utjecaj furfurala na rast i aktivnost
bakterija mliječne kiseline**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju, tehnologiju slada i piva na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom dr. sc. Božidara Šanteka, redovitog profesora u trajnom zvanju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć dr. sc. Antonije Trontel, više asistentice.

Diplomski rad je izrađen u okviru HRZZ projekta "Održiva proizvodnja bioetanola i biokemikalija iz otpadnih poljoprivrednih lignoceluloznih sirovina" (SPECH-LRM; šifra projekta 9158).

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Proizvodnja mliječne kiseline iz hidrolizata lignoceluloznih sirovina i utjecaj furfurala na rast i aktivnost bakterija mliječne kiseline

Alen Kostić, 680/BPI

Sažetak: Mliječna kiselina može se proizvesti fermentacijom jednostavnih ugljikohidrata (mono- i disaharida), polimernih ugljikohidrata (škrob, celuloza) ili sirovina koje sadrže navedene ugljikohidrate (npr. šećerna repa, kukuruzna krupica, pšenična krupica, kukuruzovina, pšenična slama). U ovom radu provedeni su uzgoji bakterija mliječne kiseline *L. amylovorus* DSM 20531^T i *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T u modificiranoj MRS podlozi koja kao glavni izvor ugljika sadrži tri jednostavna ugljikohidrata: glukozu, ksilozu i arabinozu. Provedeni su i uzgoji ovih bakterija na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina (kukuruzovine, kukuruznih oklasaka i pšenične slame) dobivenih nakon predobrade s 1,0 %-tnom i 0,5 %-tnom sumpornom kiselinom u visokotlačnom reaktoru (vrijeme zadržavanja 5 min). Mliječna kiselina proizvedena je tijekom uzgoja ovih bakterija iz hidrolizata kukuruzovine i pšenične slame dobivenih nakon predobrade s 0,5 % sumpornom kiselinom u visokotlačnom reaktoru. Bioprocesi su provedeni pri temperaturi od 40 °C, brzini okretaja miješala od 150 u minuti i bez regulacije pH vrijednosti. Bakterija *L. amylovorus* DSM 20531^T odabrana je za provođenje bioprocasa u horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreaktoru na hidrolizatima pšenične slame i kukuruzovine zbog većeg prinosa mliječne kiseline u odnosu na *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T. Zbog prisutnosti različitih toksičnih spojeva u hidrolizatima lignoceluloznih sirovina određen je i utjecaj različitih koncentracija furfurala (100–5000 mg L⁻¹) na rast i aktivnost bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T u MRS podlozi.

Ključne riječi: bakterije mliječne kiseline, lignocelulozne sirovine, fermentacija, mliječna kiselina, inhibitori

Rad sadrži: 65 stranica, 34 slike, 15 tablica, 42 literaturne reference, 2 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: prof. dr. sc. Božidar Šantek

Pomoć pri izradi: dr. sc. Antonija Trontel

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Prof.dr.sc. Srđan Novak
2. Prof.dr.sc. Božidar Šantek
3. Prof.dr.sc. Blaženka Kos
4. Izv.prof.dr.sc. Jasna Novak (zamjena)

Datum obrane: 28. rujan 2016. godine

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

Laboratory of Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Malting and Brewing Technology

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Biotechnology

Lactic acid production from lignocellulosic hydrolysates and influence of furfural on growth and activity of lactic acid bacteria

Alen Kostić, 680/BPI

Abstract: Lactic acid can be produced by fermentation of simpler carbohydrates (mono- and disaccharides), polymeric carbohydrates (starch, cellulose) or raw materials that contain these carbohydrates (e.g. sugar beet, corn grits, wheat grits, corn stover, wheat straw). In this work, fermentations in modified MRS medium that has three carbohydrates (glucose, xylose and arabinose) as main carbon source, were conducted by lactic acid bacteria *L. amylovorus* DSM 20531^T and *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T. The bacteria were also used for fermentations of hydrolysates of lignocellulosic raw materials (corn stover, corn cob and wheat straw). The hydrolysates were obtained after pretreatment with 1.0% and 0.5% sulfuric acid in high pressure reactor with residence time of 5 minutes. Lactic acid was produced from hydrolysates that were obtained after pretreatment with 0.5% sulfuric acid. Bioprocesses were performed at 40°C, stirrer speed of 150 min⁻¹, and without pH regulation. Bacterium *L. amylovorus* DSM 20531^T was chosen for conducting fermentations in horizontal rotating tubular bioreactor on corn stover and wheat straw hydrolysates due to higher lactic acid yield than *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T. Lignocellulosic hydrolysates have different toxic compounds present in the medium. Therefore, influence of different concentrations of furfural (100–5000 mg L⁻¹) on growth and activity of *L. amylovorus* DSM 20531^T in MRS medium was determined.

Keywords: lactic acid bacteria, lignocellulose raw material, fermentation, lactic acid, inhibitors

Thesis contains: 65 pages, 34 figures, 15 tables, 42 references, 2 supplements

Original in: Croatian

Graduate thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: PhD Božidar Šantek, Full professor

Technical support and assistance: PhD Antonija Trontel

Reviewers:

1. PhD Srđan Novak, Full professor
2. PhD Božidar Šantek, Full professor
3. PhD Blaženka Kos, Full professor
4. PhD Jasna Novak, Associate professor (substitute)

Paper defended: September 28th 2016

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Lignocelulozne sirovine.....	2
2.2. Predobrada lignoceluloznih sirovina.....	5
2.3. Nastajanje inhibitora tijekom procesa predobrade lignoceluloznih sirovina	6
2.3.1. Alifatske kiseline	7
2.3.2. Alhidi furana	7
2.3.3. Fenolni spojevi	8
2.4. Uklanjanje inhibitora iz lignoceluloznih hidrolizata.....	8
2.5. Proizvodnja mliječne kiseline iz lignoceluloznih sirovina.....	9
2.5.1. Bakterije mliječne kiseline	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	13
3.1. MATERIJALI.....	13
3.1.1. Mikroorganizam	13
3.1.2. Kemikalije i hranjive podloge	13
3.1.2.1. Hranjive podloge za održavanje, čuvanje i uzgoj bakterijskih kultura.....	14
3.1.3. Aparatura i pribor	14
3.1.3.1. Horizontalni rotirajući cijevni bioreaktor (HRCB)	14
3.1.3.2. Sustav za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (eng. High Pressure Liquid Chromatography, HPLC).....	15
3.1.3.3. Ostala oprema	16
3.2. METODE RADA	17
3.2.1. Analiza sastava lignoceluloznih sirovina.....	17
3.2.2. Predobrada lignoceluloznih sirovina u visokotlačnom reaktoru.....	17
3.2.3. Priprava hranjivih podloga	18
3.2.4. Uzgoj bakterija <i>L. amylovorus</i> DSM 20531 ^T i <i>L. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> DSM 20004 ^T i proizvodnja mliječne kiseline u hranjivoj MRS-glc ₅ -ksi ₅ -arab ₁ podlozi.....	21
3.2.5. Uzgoj bakterija <i>L. amylovorus</i> DSM 20531 ^T i <i>L. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> DSM 20004 ^T i proizvodnja mliječne kiseline na hidrolizatima kukuruzovine, kukuruznih oklasaka i pšenične slame u Erlenmeyer tikvicama.....	21
3.2.6. Uzgoj bakterije <i>L. amylovorus</i> DSM 20531 ^T i proizvodnja mliječne kiseline na hidrolizatima kukuruzovine i pšenične slame dobivenih nakon predobrade u visokotlačnom reaktoru s 0,5 % sumpornom kiselinom u HRCB-u	22
3.2.7. Uzgoj bakterije <i>L. amylovorus</i> DSM 20531 ^T i proizvodnja mliječne kiseline u hranjivim MRS podlogama sa furfuralom.....	23
3.2.8. Analitičke metode.....	23
3.2.8.1. Određivanje optičke gustoće uzoraka hranjive podloge.....	24
3.2.8.2. Određivanje koncentracije suhe tvari biomase gravimetrijskom metodom	24
3.2.8.3. Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)	24

3.2.8.3.1. Taloženje proteina iz uzoraka cinkovim sulfatom	25
3.2.8.3.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)	25
3.2.8.4. Izračunavanje pokazatelja uspješnosti rasta i proizvodnje mliječne kiseline	26
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	29
4.1. Uzgoj bakterija <i>L. amylovorus</i> DSM 20531 ^T i <i>L. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> DSM 20004 ^T i proizvodnja mliječne kiseline u hranjivoj MRS-glc ₅ -ksi ₅ -arab ₁ podlozi	30
4.2. Uzgoj bakterija <i>L. amylovorus</i> DSM 20531 ^T i <i>L. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> DSM 20004 ^T i proizvodnja mliječne kiseline na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina u Erlenmeyer tikvicama	34
4.2.1. Uzgoj bakterija <i>L. amylovorus</i> DSM 20531 ^T i <i>L. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> DSM 20004 ^T i proizvodnja mliječne kiseline na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina dobivenih nakon predobrade u visokotlačnom reaktoru s 0,5 % sumpornom kiselinom kao katalizatorom	34
4.2.2. Uzgoj bakterije <i>L. amylovorus</i> DSM 20531 ^T i proizvodnja mliječne kiseline na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina dobivenih nakon predobrade u visokotlačnom reaktoru s 1,0 % sumpornom kiselinom kao katalizatorom	41
4.3. Uzgoj bakterije <i>Lactobacillus amylovorus</i> DSM 20531 ^T i proizvodnja mliječne kiseline na lignoceluloznim hidrolizatima u horizontalnom rotirajućem bioreaktoru (HRCB) šaržnim postupkom	43
4.3.1. Uzgoj bakterije <i>Lactobacillus amylovorus</i> DSM 20531 ^T i proizvodnja mliječne kiseline na hidrolizatu pšenične slame dobivenom nakon predobrade u visokotlačnom reaktoru s 0,5 % sumpornom kiselinom kao katalizatorom.....	44
4.3.2. Uzgoj bakterije <i>Lactobacillus amylovorus</i> DSM 20531 ^T i proizvodnja mliječne kiseline na hidrolizatu kukuruzovine dobivenom nakon predobrade u visokotlačnom reaktoru s 0,5 % sumpornom kiselinom kao katalizatorom.....	46
4.4. Određivanje utjecaja furfurala na rast i aktivnost bakterije <i>Lactobacillus amylovorus</i> DSM 20531 ^T i na proizvodnju mliječne kiseline u hranjivoj MRS podlozi bez regulacije pH vrijednosti u Erlenmeyer tikvicama	48
5. ZAKLJUČCI.....	56
6. LITERATURA.....	58
7. PRILOZI.....	62
7.1. Popis kratica	62
7.2. Baždarni dijagrami za određivanje koncentracije supstrata i proizvoda tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti.....	63

1. UVOD

Mikroorganizmi koji se istražuju za upotrebu u industrijskoj proizvodnji mliječne kiseline trebali bi “brzo” proizvoditi mliječnu kiselinu iz “jeftinih” sirovina, imati visoke prinose željenog stereoizomera mliječne kiseline pri niskoj pH vrijednosti i visokoj temperaturi fermentacije, proizvoditi male količine biomase i drugih proizvoda fermentacije kao što su octena kiselina, mravlja kiselina i etanol. Mliječna kiselina se uglavnom proizvodi s pomoću različitih plijesni (npr. *Rhizopus oryzae*, *R. arrhizus*) i s pomoću bakterija mliječne kiseline (BMK; Ghaffar i sur., 2014). Mliječna kiselina može se proizvesti fermentacijom jednostavnih ugljikohidrata (glukoza, saharoza), hidrolizata škroba i škrobnih sirovina (npr. kukuruzna krupica, pšenična krupica, ljuske krumpira) ili hidrolizata lignoceluloznih sirovina (npr. kukuruzovina, kukuruzni oklasci i pšenična slama; Abdel-Rahman i sur., 2011).

Cijena mliječne kiseline proizvedene biotehnoškim postupkom u industrijskom mjerilu uglavnom ovisi o cijeni sirovine koje se koriste kao glavni izvor ugljika. Stoga sirovina koja se odabire za proizvodnju mliječne kiseline treba imati slijedeće karakteristike: dostupnost tijekom cijele godine, nisku cijenu, malu koncentraciju kontaminanata, visok prinos mliječne kiseline i da ne nastaju drugi proizvodi fermentacije (Ghaffar i sur., 2014).

Cilj ovog rada bio je okarakterizirati rast BMK *L. amylovorus* DSM 20531^T i *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T u modificiranoj MRS podlozi u kojoj su kao glavni izvor ugljika korištene glukoza, ksiloza i arabinoza, ugljikohidrati koji nastaju hidrolizom lignoceluloze. Istražena je proizvodnja mliječne kiseline iz hidrolizata različitih lignoceluloznih sirovina s pomoću ovih dviju BMK. Lignocelulozne sirovine, kukuruzovina, kukuruzni oklasci i pšenična slama podvrgnuti su predobradi u visokotlačnom reaktoru s 1,0 %-tnom i 0,5 %-tnom sumpornom kiselinom uz vrijeme zadržavanja od 5 minuta, temperature pare od 210 °C i tlak pare od 20 bara. Bioprocesi proizvodnje mliječne kiseline provedeni su pri temperaturi od 40 °C, brzini okretaja miješala od 150 min⁻¹ i bez regulacije pH vrijednosti. Veći prinos mliječne kiseline postignut je s pomoću bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T te je stoga ova BMK odabrana za provođene bioprocasa u horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreaktoru (HRCB) na hidrolizatima slame i kukuruzovine. Tijekom procesa predobrade lignoceluloznih sirovina nastaju različiti toksični spojevi, te je određen je i utjecaj različitih koncentracija furfurala (100–5000 mg L⁻¹) na rast i aktivnost bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T u MRS podlozi.

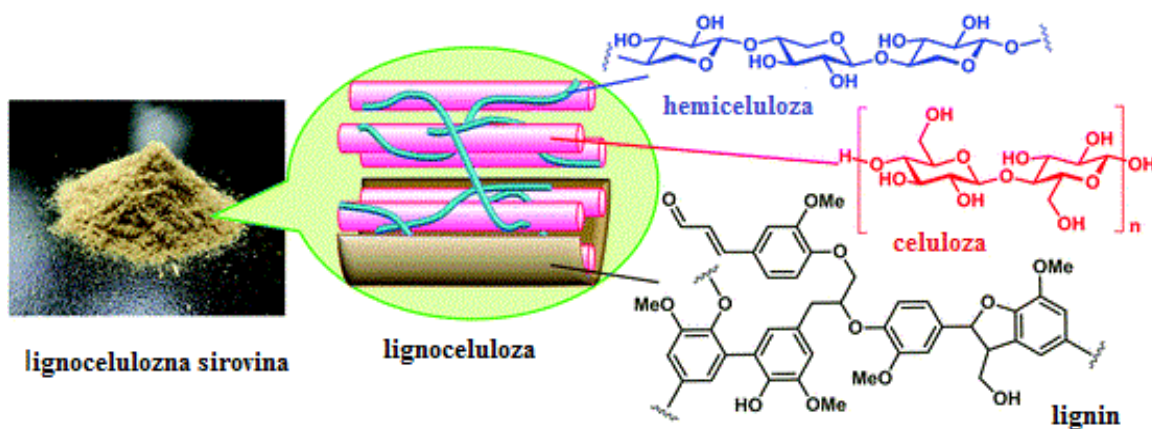
Tablica 1. Sastav najzastupljenijih lignoceluloznih sirovina.

Lignocelulozna sirovina	Celuloza [%]	Hemiceluloza [%]	Lignin [%]	Proteini [%]	Pepel [%]	Referenca
pšenična slama	46,40 ± 0,57	31,00 ± 0,81	18,39 ± 0,24	0,72 ± 0,02	7,20 ± 0,20	Nigam, 2001.
kukuruzovina	39 – 47	26 – 31	3 – 5	-	12 – 16	Demirbas, 2005.
kukuruzni oklasci	38,8 ± 2,5	44,4 ± 5,20	11,9 ± 2,3	4,26 ± 0,96	2,88 ± 0,11	Pointner i sur., 2014.
trava	25 – 40	25 – 50	10 – 30	-	n.d.	Demirbas, 2005.
bagasa šećerne trske	50	25	25	-	-	Pandey i sur., 2000.
alge	20 – 40	20 – 50	-	-	n.d.	Demirbas, 2005.
pamuk	80 – 95	5 – 20	-	-	n.d.	Demirbas, 2005.
novine	40 – 55	25 – 40	18 – 30	-	n.d.	Demirbas, 2005.

(n.d.) – nije dostupno; (-) – ne sadrži; ± SD (standardna devijacija)

Hemiceluloza je amorfni polimer koji se sastoji od linearnih i razgranatih lanaca različitih monosaharida, L-arabinoze, D-galaktoze, D-glukoze, D-manoze i D-ksiloze (Demirbas, 2008). Na hemiceluloze vezane su metilne ili acetilne skupine. Hemiceluloza se najvećim dijelom sastoji od ksilana, polimera jedinica ksiloze vezanih β -1,4-glikozidnom vezom. Sastav hemiceluloze ovisi o vrsti lignocelulozne biomase iz koje potječe. Hemiceluloza nema kristalnu strukturu, topiva je u lužinama, te se stoga lakše hidrolizira od celuloze (Olsson i Hahn-Hägerdal, 1996; Demirbas, 2008).

Lignin je amorfni aromatski polimer koji se sastoji od alkilfenola i ima kompleksnu trodimenzionalnu strukturu i uz celulozu najzastupljeniji je materijal u prirodi. Građevne jedinice lignina su prekursori fenilpropana (siringil, guacil i *p*-hidroksifenil) i vezani su zajedno različitim vrstama veza u vrlo kompleksni matriks (Demirbas, 2008). Lignin se izdvaja u operacijama obrade pulpe i izrade papira te upotrebljava kao gorivo (Lora i Glasser, 2002). Na osnovnu strukturu lignina vezane su različite funkcionalne grupe kao što su hidroksi, metoksi i karbonilne grupe, koje doprinose visokoj polarnosti molekule lignina (Demirbas, 2008).



Slika 2. Kemijski sastav lignocelulozne sirovine (preuzeto Kobayashi i Fukuoka, 2013)

2.2. Predobrada lignoceluloznih sirovina

Kristalična struktura celuloze u lignoceluloznim sirovinama glavna je prepreka uspješnoj proizvodnji fermentabilnih ugljikohidrata. Od fizikalnih metoda predobrade lignoceluloznih sirovina najčešće se upotrebljavaju usitnjavanje (eng. chipping) i mljevenje (eng. grinding, milling). Ovi tretmani uzrokuju smanjenje čestice lignoceluloznih sirovina povećavajući pritom dodirnu površinu i lakšu dostupnost enzimima za enzimsku hidrolizu. Za provođenje ovih operacija koriste se različite vrste mlinova (kuglični mlin, mlin čekičar i dr.) (Kumar i sur., 2008; Balat, 2011).

Kemijska predobrada lignoceluloznih sirovina obuhvaća: obradu natrijevim hidroksidom (NaOH), perkloratnom kiselinom (HClO_4), peroctenom kiselinom ($\text{CH}_3\text{CO}_3\text{H}$), kiselinsku hidrolizu sumpornom (H_2SO_4) i mravljom (HCOOH) kiselinom, eksploziju u tekućem amonijaku (AFEX, od eng. Ammonia Fiber Explosion), obradu ozonom (ozonoliza), alkalnim otopinama – alkalna hidroliza (NaOH, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, NH_4OH) i organskim otapalima – organsolv proces, npr. *n*-propilamin, etilendiamin, *n*-butilamin; Weil i sur., 1994; Martinez i sur., 2005; Balat, 2011).

Piroliza se često koristi za predobradu lignoceluloznih sirovina pri čemu se djelovanjem topline pri visokoj temperaturi celuloza i hemiceluloza prevode u fermentabilne ugljikohidrate sa visokom produktivnosti. Predobrada vodenom parom najčešći je korišteni tretman za predobradu lignoceluloznih sirovina. U usporedbi sa drugim procesima predobrade, ona zahtjeva niski investicijski kapital, mali utjecaj na okoliš, visoka energetska učinkovitost i manje opasnih kemikalija i uvjeta rada. Nedostatak ovog postupka je proizvodnja inhibitora enzima celulaza tijekom procesa što onemogućava enzimsku hidrolizu dobivene podloge nakon predobrade (Kumar i sur., 2008; Balat, 2011).

Dobivanje fermentabilnih ugljikohidrata iz lignoceluloznih sirovina može se provesti enzimskom hidrolizom celuloze pomoću celulaza. Celulaze koje se koriste za hidrolizu celuloze su: (1) endoglukanaze – nasumično hidroliziraju amorfne dijelove celuloze do oligosaharida; (2) celobiohidrolaze – razgrađuju kristaličnu strukturu celuloze do celobioze sa kraja celuloznog lanca; (3) β -glukozidaze – razgrađuju kratke lance oligosaharida i celobiozu do glukoze (Hansen i sur., 2011; Kobayashi i Fukuoka, 2013).

Korištenjem mikroorganizama može se provesti biološka delignifikacija kojom se uklanja lignin i oslobađa celuloza iz lignocelulozne sirovine. Mikroorganizmi korišteni za biološku delignifikaciju rižine slame, kukuruza i bagase šećerne repe su gljive: *Cyathus* sp.,

Streptomyces viridosporus, *Phelebia tremellosus*, *Pleurotus xorida* i *Peurotus cornucopiae* (Kumar i sur., 2008; Balat, 2011).

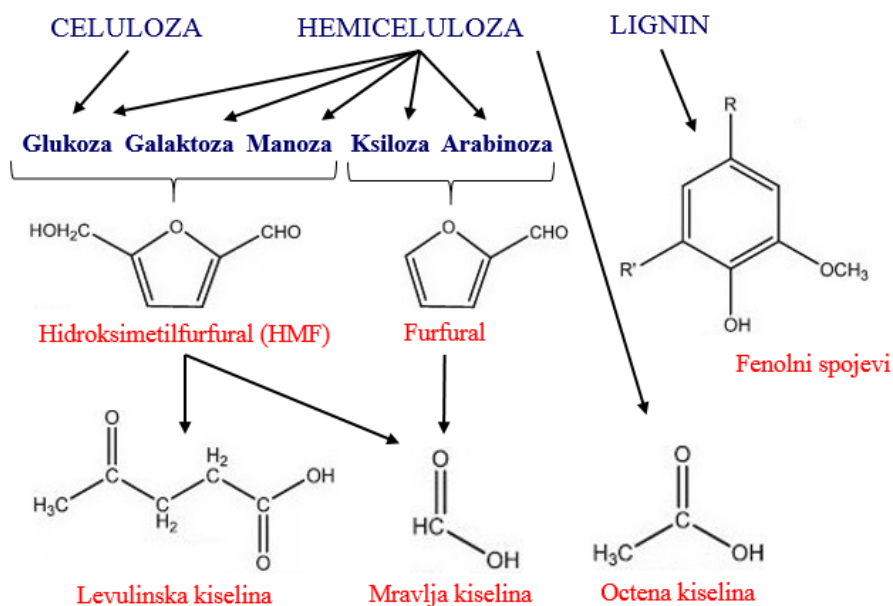
Predobrada je vrlo važan korak u razgradnji lignocelulozne sirovine. Ukoliko postupak preodbrade nije dovoljno učinkovit, celulozu, zaostalu u lignoceluloznoj sirovini, teško je prevesti u fermentabilne ugljikohidrate enzimskom hidrolizom. Ako se predobrada lignoceluloznih sirovina provodi pri visokim temperaturama i tlaku uz korištenje kiseline ili lužine sa relativno visokim koncentracijama, mogu nastati različiti toksični spojevi. Ti spojevi mogu inhibirati celulolitičke enzime, kao i rast i aktivnost radnog mikroorganizma. Također, predobrada utječe na produktivnost bioprocasa, troškove izdvajanja i pročišćavanja proizvoda (Abdel–Rahman i sur., 2011).

2.3. Nastajanje inhibitora tijekom procesa predobrade lignoceluloznih sirovina

Tijekom predobrade lignoceluloznih sirovina razgradnjom hemiceluloze nastaju velike koncentracije ugljikohidrata (uglavnom pentoza) i octene kiseline (Palmqvist i Hahn–Hägerdal, 2000a; Jonsson i sur., 2013). Osim jednostavnih ugljikohidrata nastaje i veliki broj različitih spojeva koji mogu inhibirati radni mikroorganizam (Olsson i Hahn–Hägerdal, 1996). Koncentracija i karakteristike nastalih spojeva ovise o sirovini, postupku predobrade i hidrolize. Toksični spojevi nastaju zbog „ekstremnih“ uvjeta u kojima se odvija predobrada sirovina. Prisutnost inhibitora u hidrolizatu dobivenom nakon predobrade smanjuje aktivnost enzima ili radnog mikroorganizma (Jiang i sur., 2016), te je stoga produktivnost biotehnoloških procesa na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina smanjena u odnosu na bioprocese koji se provode na hidrolizatima škroba ili na jednostavnim ugljikohidratima (Palmqvist i Hahn–Hägerdal, 2000a).

Odabir lignocelulozne sirovine kao i metode kojom se provodi predobrada sirovine značajno utječe na sastav i koncentraciju toksičnih spojeva prisutnih u hidrolizatima. Spojevi koji imaju inhibitorni učinak na rast i aktivnost radnog mikroorganizma mogu se podijeliti na:

- (i) alifatske (slabe) kiseline (octena, mravlja i levulinska kiselina),
- (ii) furane (furfural i hidroksimetilfurfural; HMF),
- (iii) fenolne spojeve (Jiang i sur., 2016),
- (iv) anorganske ione (Jonsson i sur., 2013).



Slika 3. Shematski prikaz nastajanja različitih inhibitora tijekom razgradnje lignoceluloznih sirovina (preuzeto Jonsson i sur., 2013).

2.3.1. Alifatske kiseline

Razgradnjom lignoceluloznih sirovina dobivaju se octena ($pK_a = 3.75$), mravlja ($pK_a = 4.76$) i levulinska kiselina ($pK_a = 4.64$). Octena kiselina nastaje hidrolizom acetilnih grupa iz hemiceluloze, a mravlja i levulinska kiselina nastaju tijekom hidrolize polisaharida s jakim kiselinama (Jonsson i sur., 2013). Mravlja kiselina nastaje razgradnjom furfurala i HMF-a, a levulinska kiselina samo razgradnjom HMF-a. Nedisocirane slabe kiseline mogu slobodno difundirati kroz membranu u citoplazmu. Citoplazma ima pH vrijednost oko 7 jedinica te dolazi do disocijacije kiseline što uzrokuje smanjenje pH vrijednosti citoplazme (Palmqvist i Hahn-Hägerdal, 2000b).

2.3.2. Aldehidi furana

Aldehidi furana dobiveni predobradom lignoceluloznih sirovina su furfural i 5-hidroksimetilfural (HMF). Furfural nastaje razgradnjom pentoza, a HMF razgradnjom heksoza pri visokoj temperaturi i tlaku (Palmqvist i Hahn-Hägerdal, 2000b; Jonsson i sur., 2013). Molekularni mehanizmi i utjecaj ovih toksičnih spojeva na rast bakterija mliječne kiseline nisu dovoljno istraženi.

2.3.3. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi s niskom molekulskom masom imaju veći inhibitorski učinak na radni mikroorganizam od furfurala i HMF-a, ali zbog vrlo niske koncentracije ovih spojeva u hidrolizatu, vrlo je teško ispravno odrediti utjecaj ovih spojeva na radni mikroorganizam. Utječu na stanicu tako što narušavaju strukturu stanične membrane i njenu funkciju selektivne barijere. Pretpostavlja se da fenolni spojevi interferiraju sa membranom mijenjajući omjer lipida i proteina stanične membrane narušavajući pritom njenu funkcionalnost, no taj mehanizam inhibicije još nije razjašnjen (Jonsson i sur., 2013). Inhibitorski utjecaj fenolnih i aromatskih spojeva je vrlo različit i ovisi o funkcionalnim grupama fenolnih spojeva. Nisko molekularni fenolni spojevi imaju najtoksičniji učinak. Topivost fenolnih spojeva je ograničena i može ovisiti o sastavu lignoceluloznog hidrolizata ili definirane podloge (Palmqvist i Hahn–Hägerdal, 2000b). Većina fenolnih spojeva koji nastaju tijekom kiselinske hidrolize lignoceluloznih sirovina je formirano iz lignina (Jiang i sur., 2016).

2.4. Uklanjanje inhibitora iz lignoceluloznih hidrolizata

Kako bi se riješio problem toksičnosti spojeva na rast i aktivnost mikroorganizama razvijen je veliki broj fizikalnih, kemijskih i bioloških metoda uklanjanja inhibitora iz hidrolizata lignoceluloznih sirovina (Jiang i sur., 2016). Navedene metode povećavaju cijenu i kompleksnost te smanjuju ekonomsku isplativost samog bioprocasa.

Metode uklanjanja inhibitora iz lignoceluloznih hidrolizata su:

- (1) dodatak aktivnog ugljena
- (2) ekstrakcija toksičnih spojeva organskim otapalima (npr. etil acetat, trialkilamin, superkritična otopina CO₂)
- (3) ion izmjenjivačka kromatografija
- (4) „ion exclusion“ kromatografija
- (5) uklanjanje toksičnih spojeva pomoću molekularnih sita
- (6) dodavanje lužina (npr. kalcijev hidroksid, natrijev hidroksid)
- (7) korištenje filamentoznih gljiva (npr. *Trichoderma reesei*)
- (8) enzimski predtretman (lakaze, peroksidaze; Jonsson i sur., 2013).

Uklanjanje inhibitora iz hidrolizata lignoceluloznih sirovina (detoksifikacija) povećava cijenu procesa. Dodavanje kalcijevog hidroksida u suvišku je najčešće korištena metoda detoksifikacije. Kalcijev hidroksid (ili neki drugi hidroksid) se dodaje u hidrolizat dok se ne postigne pH vrijednost hidrolizata od 10-10,5 jedinica. Nastali talog, koji sadrži uglavnom kalcijeve soli niske topljivosti od kojih je najviše prisutna sol kalcijevog sulfata, izdvaja se nakon miješanja. Proces detoksifikacije se može kombinirati sa zagrijavanjem hidrolizata jer se povećanjem temperature topivost kalcijeva sulfata smanjuje i mogu se izdvojiti hlapljivi spojevi (npr. furfural). Sulfit se često dodaje u određenoj fazi detoksifikacije, prije ili poslije dodavanja kalcijevog hidroksida (Olsson i Hahn–Hägerdal, 1996). Različite metode detoksifikacije djelomično uklanjaju inhibitore iz podloge i ne mogu se direktno uspoređivati jer ovise o vrsti hidrolizata i odabiru mikroorganizma koji će se koristiti za fermentaciju. Neki mikroorganizmi mogu rasti na podlogama u kojima se nalazi određeni toksični spoj ili kombinacija različitih toksičnih spojeva. Ako je koncentracija ovih spojeva u podlozi relativno visoka, može rezultirati inaktivacijom stanice (Palmqvist i Hahn–Hägerdal, 2000a).

2.5. Proizvodnja mliječne kiseline iz lignoceluloznih sirovina

Mliječna kiselina (2–hidroksipropanska kiselina, $\text{CH}_3\text{--CH(OH)--COOH}$) je organska kiselina koja se koristi u prehrambenoj (začin i konzervans), farmaceutskoj, kozmetičkoj i tekstilnoj industriji i kao ishodišni spoj za proizvodnju različitih kemikalija (Hofvendahl i Hahn–Hägerdal, 2000; Laopaiboon i sur., 2009; Abdel–Rahman i sur., 2011). Koristi se također za proizvodnju biopolimera polilaktata (PLA, eng. polylactic acid). Polilaktati se koriste za proizvodnju ekološki prihvatljive biorazgradive plastike, te su dobra alternativa za plastiku proizvedenu iz petrokemikalija. PLA se koristiti i u medicinske svrhe za konce kojima se šivaju rane i ortopedska pomagala (Abdel–Rahman i sur., 2011).

Mliječna kiselina se može proizvesti kemijskom sintezom ili mikrobnom fermentacijom. Mikrobnom fermentacijom dobivaju se L-(+)-mliječna kiselina, D-(-)-mliječna kiselina i smjesa L-(+)/ D-(-)-mliječne kiseline u različitim omjerima (John i sur., 2007) ,dok se kemijskom sintezom iz petrokemijskih izvora dobiva racemična smjesa D-(-)- i L-(+)-mliječne kiseline (Hofvendahl i Hahn–Hägerdal, 2000). Danas se skoro sva mliječna kiselina proizvodni mikrobnom fermentacijom iz obnovljivih sirovina. Bioproces se provodi pri relativno niskim temperaturama i uz mali utrošak energije. Mikroorganizmi koji se koriste za

proizvodnju mliječne kiseline su uglavnom bakterije iz roda *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* i *Enterococcus* (Tablica 2). Za proizvodnju mliječne kiseline mogu se koristiti sojevi plijesni *Mucor*, *Monilia* i *Rhizopus* od kojih je najpoznatiji *Rhizopus oryzae* (John i sur., 2007). U industrijskom mjerilu mliječna kiselina uglavnom se proizvodi se iz glukoze, saharoze, laktoze i hidrolizatima škroba dobivenih iz šećerne repe, melase, sirutke i ječmenog slada (Ghaffar i sur., 2014). Kako se navedene sirovine koriste u prehrani životinja i ljudi potrebno je pronaći jeftine i široko dostupne sirovine za proizvodnju mliječne kiseline po relativno niskoj cijeni. Lignocelulozni materijali koji se dobivaju kao nusproizvod ili otpadni proizvod iz prehrambene industrije, poljoprivredne proizvodnje različitih usjeva i šumarske industrije predstavljaju jeftin i obnovljiv izvor sirovine za biotehnošku proizvodnju mliječne kiseline u industrijskom mjerilu. Potreba za predobradom lignocelulozne sirovine kako bi se iz njene kompleksne strukture dobili jednostavni fermentabilni ugljikohidrati (glukoza, ksiloza, arabinoza, manoz) koje BMK mogu fermentirati do mliječne kiseline još uvijek predstavlja veliku prepreku u učinkovitom korištenju ovih sirovina u industrijskom mjerilu. Glavni problemi koji sprečavaju uspješnu proizvodnju mliječne kiseline iz lignoceluloznih sirovina su otpornost sirovine i problemi s odabirom predobrade; visoka cijena enzima za hidrolizu i njihova inhibicija toksičnim spojevima; nastajanje nusproizvoda heterofermentacijom; katabolička represija izvorom ugljika uzrokovana heterogenim sastavom ugljikohidrata u hidrolizatu lignocelulozne sirovine (Abdel-Rahman i sur., 2011). Biotehnoška proizvodnja mliječne kiseline iz lignoceluloznih sirovina podjeljena je na četiri opće faze : (1) predobrada – razgradnja lignocelulozne strukture; (2) enzimska hidroliza – prevođenje celuloze i hemiceluloze u fermentabilne ugljikohidrate (npr. glukozu, ksilozu, arabinozu); (3) fermentacija – biokonverzija dobivenih ugljikohidrata u mliječnu kiselinu pomoću BMK; (4) izdvajanje i pročišćavanje – dobivanje mliječne kiseline za komercijalne svrhe. Glavni izazov u biotehnoškoj proizvodnji mliječne kiseline na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina je pronalazak mikroorganizma koji može fermentirati ksilozu i tolerirati toksične spojeve (Olsson i Hahn-Hägerdal, 1996; Jiang i sur., 2016).

Tablica 2. Mikroorganizmi koji proizvode mliječnu kiselinu iz lignoceluloznih sirovina.

Mikroorganizam	Sirovina / γ (g L ⁻¹)	γ_{MK} (g L ⁻¹)	Referenca
<i>Rhizopus</i> sp. MK-96-1196	kuk. oklasci / 100	24,0	Miura i sur., 2004
<i>Bacillus coagulans</i> DSM 2314	pšenična slama / 230	40,7	Maas i sur., 2008
<i>Enterococcus faecalis</i> RKY1	drvo hrasta / 100	93,0	Wee i sur., 2004
<i>Lactobacillus brevis</i>	kuk. oklasci / 56,9	39,1	Guo i sur., 2010
<i>Lactobacillus intermedius</i> NRRL B-3693	kukuruzna vlakna / 50,6	21,3	Saha i Nakamura, 2002

2.5.1. Bakterije mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline (BMK) su gram pozitivne, nesporogene bakterije oblika štapića ili koka iz rodova *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* i *Pediococcus* i roda *Carnobacterium*, koje proizvode kao primarni proizvod mliječnu kiselinu fermentacijom ugljikohidrata (Rattanachaikunsopon i Phumkhachorn, 2010). Bakterije mliječne kiseline dijele se u dvije osnovne grupe prema konačnom proizvodu fermentacije glukoze. Kod homofermentativnih bakterija *Pediococcus*, *Lactococcus* i *Streptococcus* i nekih bakterija iz roda *Lactobacillus* kao krajnji produkt razgradnje glukoze nastaje samo mliječna kiselina. Ove bakterije koriste Embden-Meyerhof-Parnas metabolički put za proizvodnju dva mola laktata po molu glukoze i proizvode duplo više energije nego heterofermentativne bakterije. Heterofermentativne bakterije iz rodova *Weissella* i *Leuconostoc*, kao i neke bakterije iz roda *Lactobacillus*, kao krajnji produkt razgradnje glukoze osim mliječne kiseline proizvode CO₂, etanol ili octenu kiselinu 6-fosfoglukonatnim putem (Rattanachaikunsopon i Phumkhachorn, 2010; Slavica i sur., 2015). Fakultativno heterofermentativne bakterije posjeduju oba navedena puta i fermentiraju glikolizom glukozu do laktata, a u uvjetima limitacije glukoze 6-fosfoglukonatnim putem do navedenih produkata (Slavica i sur., 2015).

Danas se u industriji proizvodnje mliječne kiseline najviše koriste homofermentativne bakterije mliječne kiseline iz roda *Lactobacillus* (Trontel i sur., 2010). Fermentacijom ugljikohidrata nastaju dva izomera D-(-)- i L-(+)- mliječne kiseline, od kojih je poznato da bakterije iz rodova *Pediococcus*, *Lactococcus* and *Lactobacillus* mogu proizvoditi samo L-

(+)- mliječnu kiselinu, dok D-(-)- mliječnu kiselinu mogu proizvoditi samo bakterije iz roda *Lactobacillus*. Smjesu D-(-)- i L-(+)- mliječne kiseline najčešće proizvode homofermentativne bakterije iz rodova *Pediococcus* i *Lactobacillus* (Trontel i sur., 2010).

Bakterije mliječne kiseline mogu rasti pri temperaturama 5–45 °C i pri optimalnoj pH vrijednosti 5,5–6,5 jedinica (Özcelik i sur., 2016) i mogu se postići visoke brzine rasta, visoki prinos i specifičnost produkta (Trontel i sur., 2010). Jedne su od najvažnijih grupa industrijskih mikroorganizama koje se koriste kao starter kulture i u proizvodnji fermentirane hrane (npr. povrće, dijetetski dodaci, probiotici, kozmetički sastojci i dr.) i imaju GRAS status (Kormin i sur., 2001; Özcelik i sur., 2016). Bakterije mliječne kiseline proizvode različite spojeve kao što su organske kiseline (mliječna, octena, propionska), diacetil, vodikov peroksid i bakteriocine ili bakteriocidalne proteine tijekom mliječne fermentacije, koje uzrokuju antimikrobni učinak u konzerviranju hrane i pića (Rattanachaikunsopon i Phumkhachorn, 2010). U konzerviranju hrane i pića danas se najviše koristi bakteriocin nisin kojeg proizvodi bakterija *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* koji uspješno sprječava razvoj spora bakterija *Clostridium* kao i druge bakterijske patogene i jedini je bakteriocin koji ima GRAS status. Poznat je i bakteriocin plantaricin koji se proizvodi bakterijom *Lactobacillus plantarum* (Kormin i sur., 2001), a bakterija *Lactobacillus reuteri* kao proizvod sekundarnog metabolizma proizvodi antibiotik reuterociklin i kemijski spoj reuterin koji ima širok spektar aktivnosti i inhibicije na funge, protozoe i širok spektar djelovanja na gram pozitivne i negativne bakterije (Rattanachaikunsopon i Phumkhachorn, 2010).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Mikroorganizam

U ovom radu, kao radni mikroorganizam, korištene su bakterije mliječne kiseline *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T i *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T iz zbirke mikroorganizama Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Njemačka).

3.1.2. Kemikalije i hranjive podloge

Tablica 3. Čistoća i podrijetlo kemikalija za pripravu hranjivih podloga i otopina.

Kemikalija	Čistoća	Proizvođač
amonijev citrat	p.a.	Merck, Njemačka
D-(+)-ksiloza	≥99 %, za biokemiju	Roth, Njemačka
L-(+)-arabinoza	za mikrobiologiju	Kemika, Hrvatska
D-(+)-glukoza	p.a.	Kemika, Hrvatska
manganov sulfat monohidrat	p.a.	Merck, Njemačka
dikalijev hidrogenfosfat	p.a.	Merck, Njemačka
kvašćev ekstrakt	za upotrebu u biotehnologiji	Merck, Njemačka
magnezijev sulfat	p.a.	Merck, Njemačka
mesni ekstrakt	za upotrebu u biotehnologiji	Merck, Njemačka
natrijev acetat trihidrat	p.a.	Merck, Njemačka
pepton	za upotrebu u biotehnologiji	Merck, Njemačka
Tween 80®	p.a.	Merck, Njemačka
furfural	p.a.	Sigma-Aldrich, Njemačka
sumporna kiselina	min. 96%, p.a.	Kemika, Hrvatska
celobioza	p.a.	Molekula, UK
cinkov sulfat heptahidrat	p.a.	Merck, Njemačka
etanol	p.a.	Carlo Erba Reagents, Italija

Tablica 3. Čistoća i podrijetlo kemikalija za pripremu hranjivih podloga i otopina (nastavak).

Kemikalija	Čistoća	Proizvođač
demineralizirana voda	p.a.	Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Hrvatska
fosfatna kiselina	p.a.	Fluka, Njemačka
kalcijev hidroksid	p.a.	Kemika, Hrvatska

3.1.2.1. Hranjive podloge za održavanje, čuvanje i uzgoj bakterijskih kultura

Kultura BMK *L. amylovorus* DSM 20531^T i *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T čuvana je i održavana na čvrstoj i u tekućoj De Man, Rogosa i Sharpe (MRS) hranjivoj podlozi (Biolife, Milano, Italija; De Man i sur., 1960). Ova hranjiva podloga korištena je i za pripremu inokuluma za uzgoj BMK u Erlenmeyer-ovim tikvicama i horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreaktoru (HRCB). Za razliku od tekuće MRS podloge, čvrsta MRS podloga, osim već navedenih sastojaka, sadrži i agar.

Sastav čvrste MRS podloge (g L⁻¹): agar, 15; diamonijev citrat, 2; dikalijev hidrogenfosfat, 2; glukoza, 20; kvašćev ekstrakt, 5; magnezijev sulfat, 0,05; manganov sulfat, 0,2; mesni ekstrakt, 10; natrijev acetat, 5; pepton, 10 i Tween 80® 1 mL L⁻¹. Početne pH vrijednosti priređenih tekućih hranjivih MRS podloga bila su 6,2 ± 0,2 jedinica.

3.1.3. Aparatura i pribor

3.1.3.1. Horizontalni rotirajući cijevni bioreaktor (HRCB)

Ovaj bioreaktorski sustav sastoji se od nosača, bioreaktora izrađenog od nehrđajućeg čelika, elektromotora i kontrolne jedinice. Nosač bioreaktora podupire posudu bioreaktora čime omogućava njenu rotaciju preko osovine koju pokreće elektromotor. Kontrolna jedinica omogućuje regulaciju broja okretaja bioreaktora (*n*) i intervalno uključivanje/ isključivanje rotacije. Bioreaktor se rotira pomoću elektromotora snage 0,9 kW. Maksimalni broj okretaja reaktora (*n*) iznosi 60 min⁻¹. Ovaj bioreaktor nema regulaciju temperature i pH vrijednosti, a

ukupni volumen iznosi 30 L. Bioreaktor ima ugrađena dva lopatasta mješala duljine 0,6 m i širine 0,04 m učvršćena na unutrašnju stijenku HRCB-a.

Sterilizacija bioreaktora provodi se direktnom parom. Bioreaktor ima dva mjesta za izuzimanje uzoraka: (1) za izuzimanje tekuće faze i (2) za izuzimanje čvrste faze.



Slika 4. Horizontalni rotirajući cijevni bioreaktor (Rosing d.o.o., Hrvatska)

3.1.3.2. Sustav za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti

(eng. High Pressure Liquid Chromatography, HPLC)

Kromatograf Shimadzu CLASS-VP LC10AVP (Shimadzu, Kyoto, Japan) sastoji se od pumpe (LC-10ADVP), otplinjača (DGU-14A), injektora (SIL-10 ADVP), uređaja za grijanje kolone (CTO-10AVP), ionsko-izmjenjivačke analitičke kolone (SupelcogelTM C-610H; 30 cm x 7,8 mm ID, 9 μm) s predkolonom (SupelcogelTM H; 5 cm x 4,6 mm ID, 9 μm), detektora indeksa loma (RID-10A), modula za kontrolu sustava (SCL-19AVP) i računalnog programa za kromatografiju (CLASS-VP v6.10).

3.1.3.3. Ostala oprema

- analitička vaga Shimadzu (Kyoto, Japan);
- tehnička vaga Tehtnica (Železniki, Slovenija);
- autoklav Sutjeska;
- mikser EV-100, Tehtnica (Železniki, Slovenija);
- pH metar 744, Metrohm (Herisau, Švicarska);
- sušionik Instrumetarija ST-50 (Zagreb, Hrvatska);
- magnetna miješalica MM-510, Tehtnica (Železniki, Slovenija);
- magnetna miješalica Cimarec iTM Poly15 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)
- oprema za filtraciju otopina [najlonski filter (0,20 µm, 47 mm; Sartorius Stedim Biotech GMBH, Goettingen, Njemačka) pomoću boce za filtriranje (Nalgene, Rochester, SAD)]
- ultrazvučna kupelj USC300T (VWR International, Leuven, Belgija)
- UV/Vis spektrofotometar Cary 13E Varian (Mulgrave, Australija)
- staklene kivete promjera 10 mm (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka),
- centrifuga Harrier 18/10 (Sanyo, Watford, Velika Britanija)
- centrifuga Beckman J-21B (Beckman Coulter, Krefeld, Njemačka)
- polipropilenske kivete volumena 10 mL i odgovarajući adapteri (Nalgene, Nalge Nunc International, Rochester, USA).

3.2. METODE RADA

3.2.1. Analiza sastava lignoceluloznih sirovina

Tablica 4. Udio strukturnih ugljikohidrata i lignina u lignoceluloznim sirovinama.

sirovina	w_{glukan}	w_{ksilan}	w_{arabitan}	w_{LTK}	$w_{\text{NTLK+pepel}}$	referenca
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	
kukuruzovina	40,32	16,38	3,49	0,20	22,63	Lauder, 2016
kuk. oklasci	35,26	26,31	3,63	0,22	22,73	Govedarica, 2016
pšenična slama	43,70	28,83	3,37	0,27	16,48	Ivančić, 2016

LTK - lignin topiv u kiselini; LNTK - lignin netopiv u kiselini

3.2.2. Predobrada lignoceluloznih sirovina u visokotlačnom reaktoru

Predobrada lignoceluloznih sirovina provedena je u visokotlačnom reaktoru pri uvjetima navedenim u Tablici 5 (Lauder, 2016; Govedarica, 2016; Ivančić, 2016). Ukratko, odvagano je 500 grama (m_{LC}) suhe tvari usitnjene lignocelulozne sirovine i stavljeno u reaktor za predobradu lignoceluloznih sirovina. U reaktor je dodano 10 L (V_0) otopine sumporne kiseline. Za procese su korištene dvije otopine sumporne kiseline ($w_{\text{H}_2\text{SO}_4} = 0,5 \%$ i $1,0 \%$; Tablica 5). Nakon određenog vremena zadržavanja (t_z) i ispuštanja tlaka pare na atmosferski tlak dobivene su dvije faze, tekuća i čvrsta faza hidrolizata lignocelulozne sirovine.

Tablica 5. Uvjeti u visokotlačnom reaktoru pri kojima je provedena predobrada lignoceluloznih sirovina.

Sirovina	m_{LC} (g)	t_{pare} (°C)	p_{pare} (bar)	t_z (min)	V_0 (L)	$w_{\text{H}_2\text{SO}_4}$ (%)	Oznaka
kukuruzovina	500	210	20	5	10	1,0	KUK/210 °C/1 % H ₂ SO ₄ /5 min
						0,5	KUK/210 °C/0,5 % H ₂ SO ₄ /5 min
kuk. oklasci	500	210	20	5	10	1,0	K.O./210 °C/1 % H ₂ SO ₄ /5 min
						0,5	K.O./210 °C/0,5 % H ₂ SO ₄ /5 min
pšenična slama	500	210	20	5	10	1,0	P.S./210 °C/1 % H ₂ SO ₄ /5 min
						0,5	P.S./210 °C/0,5 % H ₂ SO ₄ /5 min

Za provođenje fermentacije korištena je tekuća faza, odnosno hidrolizat lignoceluloznih sirovina. Hidrolizat je neutraliziran sa 50 %-tnim kalcijevim hidroksidom. Dobivene suspenzije su odcentrifugirane (Beckman, 5000 min⁻¹, 15 min) ili odekantirane. Sastav i koncentracija ugljikohidrata i toksičnih spojeva u tekućoj fazi prikazan je u Tablici 6.

Tablica 6. Sastav hidrolizata lignoceluloznih sirovina (tekuće faze) dobivenih nakon predobrade u visokotlačnom reaktoru.

Oznaka	γ_{glukoza}	γ_{ksiloza}	$\gamma_{\text{arabinoza}}$	γ_{HAc}	γ_{formijat}	$\gamma_{\text{evulinska kis.}}$	γ_{furali}
	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)
KUK/210 °C/ 1 % H₂SO₄/5 min	3,92	5,81	1,13	2,32	4,68	7,23	1,38
KUK/210 °C/ 0,5 % H₂SO₄/5 min	4,58	4,53	1,45	1,62	3,05	0,55	2,99
K.O./210 °C/ 1 % H₂SO₄/5 min	3,71	6,00	1,01	2,19	4,15	6,24	1,03
K.O./210 °C/0,5 % H₂SO₄/5 min	4,13	5,95	1,05	2,39	3,37	2,06	3,99
P.S./210 °C/ 1 % H₂SO₄/5 min	6,18	2,51	0,86	1,26	3,40	2,69	1,78
P.S./210 °C/ 0,5 % H₂SO₄/5 min	8,49	6,40	1,32	0,78	1,18	0,26	1,72

KUK - kukuruzovina; K.O. - kukuruzni oklasci; P.S. - pšenična slama

3.2.3. Priprava hranjivih podloga

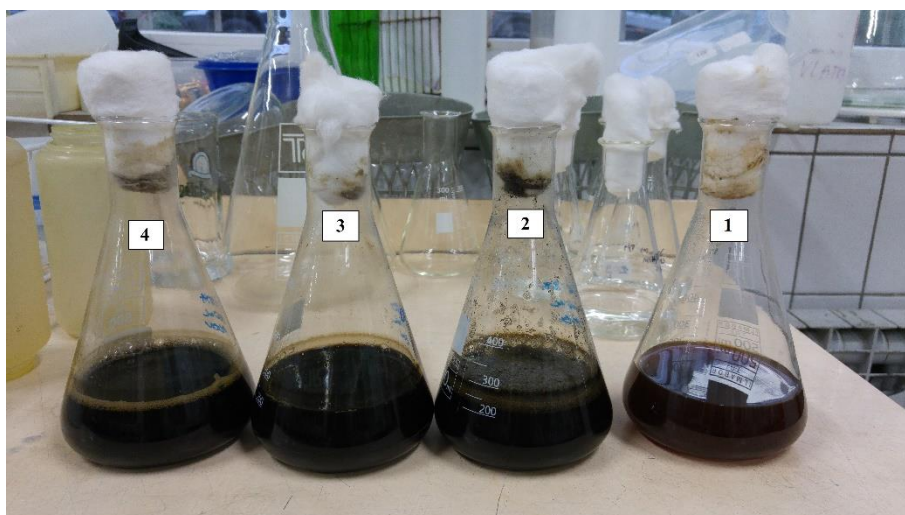
Bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T i *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T uzgajane su u dvije MRS podloge: (1) MRS podloga (MRS-glc₂₀) i (2) modificirana MRS podloga (MRS-glc₅-ksi₅-arab₁). MRS-glc₂₀ podloga pripravljena je otapanjem praškaste MRS podloge (Biolife, Milano, Italija) u demineraliziranoj vodi prema uputama proizvođača, a modificirana MRS podloga pripravljena je vaganjem i otapanjem pojedinačnih sastojaka MRS podloge u demineraliziranoj vodi. U modificiranu MRS podlogu su dodani svi sastojci,

osim ugljikohidrata, u koncentracijama navedenim u Poglavlju 3.1.2.1. Ugljikohidrati, glukoza, ksiloza i arabinoza dodani su u podlogu u koncentracijama od 5, 5 i 1 g L⁻¹.

Za uzgoj inokuluma za provođenje fermentacija korištena je MRS-glc₂₀ podloga. Za određivanje utjecaja različitih koncentracija furfurala na rast i aktivnost bakterije mliječne kiseline *L. amylovorus* DSM 20531^T pripremljena je jedna MRS-glc₂₀ podloga ($V = 150$ mL) koja je služila kao kontrola i sedam MRS-glc₂₀ podloga ($V = 150$ mL) u koje je dodan furfural u različitim koncentracijama (100, 500, 1000, 2000, 3000, 4000 i 5000 mg L⁻¹; Tablica 7)

Bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T i *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T uzgajane su i u podlogama koje se sastoje od: (1) neutraliziranog hidrolizata kukuruzovine, (2) neutraliziranog hidrolizata kukuruznih oklasaka i (3) neutraliziranog hidrolizata pšenične slame (Tablica 7). U sve tri podloge dodan je kvašćev ekstrakt (5 g L⁻¹) i pepton (5 g L⁻¹). Neutralizirani hidrolizati lignoceluloznih sirovina pripremljeni su kako je to opisano u Poglavlju 3.2.2. Sve navedene podloge pipremljene su u Erlenmeyer tikvicama od 500 mL. MRS pologe su sterilizirane u autoklavu pri 121 °C tijekom 20 minuta, a podloge sa hidrolizatima kukuruzovine, oklasaka i slame nisu sterilizirane.

Podloge za uzgoj bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T u HRCB-u sastoje se od neutraliziranog hidrolizata kukuruzovine ili neutraliziranog hidrolizata pšenične slame u koje je dodan kvašćev ekstrakt (5 g L⁻¹) i pepton (5 g L⁻¹). Hidrolizat kukuruzovine i hidrolizat pšenične slame dobiveni su nakon predobrade u visokotlačnom reaktoru pri uvjetima 210 °C/20 bar/5 min/0,5 % H₂SO₄. Podloge nisu sterilizirane.



Slika 5 Prikaz hranjivih podloga: (1) MRS-glc₅-ksi₅-arab₁, (2) hidrolizat kuk. oklasaka (K.O./210 °C/0,5 % H₂SO₄/5 min), (3) hidrolizat kukuruzovine (KUK/210 °C/0,5 % H₂SO₄/5 min) i (4) hidrolizat pšenične slame (P.S./210 °C/0,5 % H₂SO₄/5 min)

Tablica 7. Podloge i uvjeti pri kojima je proveden uzgoj bakterija mliječne kiseline u Erlemeyer tikvicama.

BMK	Podloga	V_{podloga} (mL)	T (°C)	γ_{furfural} (mg L ⁻¹)	γ_{UH_0} (g L ⁻¹)		
					glukoza	ksiloza	arabinoza
<i>L. amylovorus</i> DSM 20531 ^T	MRS-glc ₂₀	150	40	0	20	0	0
				100	20	0	0
				500	20	0	0
				1000	20	0	0
				2000	20	0	0
				3000	20	0	0
				4000	20	0	0
				5000	20	0	0
	MRS-glc ₅ -ksi ₅ -arab ₁	300	40	0	5	5	1
	KUK/210 °C/1 % H ₂ SO ₄ /5 min	300	40	1300	5	5	1
	KUK/210 °C/0,5 % H ₂ SO ₄ /5 min	300	40	2990	5	5	1
	K.O./210 °C/1 % H ₂ SO ₄ /5 min	300	40	1030	5	5	1
	K.O./210 °C/0,5 % H ₂ SO ₄ /5 min	300	40	3990	5	5	1
P.S./210 °C/1 % H ₂ SO ₄ /5 min	300	40	1780	5	5	1	
P.S./210 °C/0,5 % H ₂ SO ₄ /5 min	300	40	1720	5	5	1	
<i>L. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> DSM 20004 ^T	MRS-glc ₅ -ksi ₅ -arab ₁	300	40	0	5	5	1
	KUK/210 °C/0,5 % H ₂ SO ₄ /5 min	300	40	2990	5	5	1
	K.O./210 °C/0,5 % H ₂ SO ₄ /5 min	300	40	3990	5	5	1
	P.S./210 °C/0,5 % H ₂ SO ₄ /5 min	300	40	1720	5	5	1

KUK - kukuruzovina; K.O. - kukuruzni oklasci; P.S. - pšenična slama

3.2.4. Uzgoj bakterija *L. amylovorus* DSM 20531^T i *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T i proizvodnja mliječne kiseline u hranjivoj MRS-glc₅-ksi₅-arab₁ podlozi

Suspenzija kulture *L. amylovorus* DSM 20531^T (0,1 mL) precijepljena je iz tekuće hranjive MRS podloge u staklene epruvete sa sterilnom hranjivom MRS podlogom ($V_K = 10$ mL) koje su inkubirane kroz 18 sati pri temperaturi od 40 °C. Ovako porasla kultura (7,5 mL; 2,5 % ^{vol/vol}) korištena je kao inokulum za provođenje uzgoja u MRS-glc₅-ksi₅-arab₁ podlozi ($V_K = 300$ mL).

Priprema inokuluma bakterije *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T za uzgoj ove bakterije u MRS-glc₅-ksi₅-arab₁ podlozi ($V_K = 300$ mL) provedena je na isti način kao i za *L. amylovorus* DSM 20531^T.

Uzgoji su provedeni pri 40 °C na magnetnoj mješalici ($n = 150 \text{ min}^{-1}$) bez podešavanja pH vrijednosti. Tijekom ovih uzgoja uzorci su izuzimani u aseptičnim uvjetima u pravilnim vremenskim intervalima kako bi se odredila kinetika rasta bakterije i fermentacija ugljikohidrata do mliječne kiseline.

3.2.5. Uzgoj bakterija *L. amylovorus* DSM 20531^T i *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T i proizvodnja mliječne kiseline na hidrolizatima kukuruzovine, kukuruznih oklasaka i pšenične slame u Erlenmeyer tikvicama

Bakterijska kultura *L. amylovorus* DSM 20531^T uzgojena je u podlogama koje se sastoje od hidrolizata kukuruzovine (KUK/210 °C/1 % H₂SO₄/5 min; KUK/ 210 °C/0,5 % H₂SO₄/5 min), kukuruznih oklasaka (K.O./210 °C/1 % H₂SO₄/5 min; K.O./210 °C/0,5 % H₂SO₄/5 min) i pšenične slame (P.S./210 °C/1 % H₂SO₄/5 min; P.S./210 °C/0,5 % H₂SO₄/5 min) u koje je dodan kvašćev ekstrakt i pepton (5 g L⁻¹; Tablica 7).

Bakterijska kultura *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T uzgojena je u podlogama koje se sastoje od hidrolizata kukuruzovine (KUK/210 °C/0,5 % H₂SO₄/5 min), kukuruznih oklasaka (K.O./210 °C/0,5 % H₂SO₄/5 min) i pšenične slame (P.S./210 °C/0,5 % H₂SO₄/5 min) u koje je dodan kvašćev ekstrakt i pepton (5 g L⁻¹; Tablica 7).

Podloge nisu sterilizirane, a korisni volumen podloge iznosio je 300 mL. Uzgoj ovih bakterija je proveden pri 40 °C na magnetnoj mješalici ($n = 150 \text{ min}^{-1}$) bez podešavanja pH vrijednosti. Sve podloge, nacijeppljene su svježom, preko noći, poraslom kulturom *L. amylovorus* DSM 20531^T (7,5 mL) ili *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T (7,5 mL)

u hranjivoj MRS podlozi (16 h/40 °C). Tijekom ovog uzgoja u aseptičnim uvjetima izuzimani su uzorci u pravilnim vremenskim intervalima kako bi se odredila kinetika rasta bakterije i fermentacija glukoze, ksiloze i arabinoze, dobivenih obradom sirovine, do mliječne kiseline uz prisutnost inhibitora fermentacije furfurala, formijata i dr., koji su nastali predobradom sirovine.

3.2.6. Uzgoj bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T i proizvodnja mliječne kiseline na hidrolizatima kukuruzovine i pšenične slame dobivenih nakon predobrade u visokotlačnom reaktoru s 0,5 % sumpornom kiselinom u HRCB-u

Svježe uzgojenom suspenzijom kulture *L. amylovorus* DSM 20531^T (30 °C/12 h, $V_K = 10$ mL) nacijepljeno je 400 mL tekuće hranjive MRS-glc podloge u Erlenmeyer tikvici (500 mL), nakon čega je ova podloga inkubirana 16 sati pri 30 °C u statičnim uvjetima (bez stresa). Ovako porasla suspenzija (400 mL; 5 % ^{vol/vol}) iz Erlenmeyer tikvice je u aseptičnim uvjetima dodana u HRCB (Rosing d.o.o., Hrvatska) u kojem je prethodno sterilizirana podloga i ohlađena do 30 °C. Hranjiva podloga je sastavljena od tekuće faze hidrolizata dobivene predobradom lignoceluloznih sirovina u visokotlačnom reaktoru za predobradu lignoceluloznih sirovina (KUK/210 °C/20 bar/5 min/0,5 % H₂SO₄; P.S./210 °C/20 bar/5 min/0,5 % H₂SO₄) i kvašćevog ekstrakta i peptona. Volumen podloge sa hidrolizatom kukuruzovine iznosio je 2,6 L, a volumen pologe s hidrolizatom pšenične slame iznosio je 2,76 L. Tijekom uzgoja u ovom bioreaktoru podloga nije aerirana, a intervalnom rotacijom [$n = 10 \text{ min}^{-1}$; (12 minuta rotacija/ 48 minuta mirovanje HRCB-a)] održavana je homogenost suspenzije. Temperatura podloge nije održavana, a pH vrijednost nije podešavana tijekom ovog šaržnog bioprocesa. Nakon svakog izuzimanja uzorka određena je njegova optička gustoća pri valnoj duljini svjetlosti od 600 nm (A_{600}). Uzorci su izuzimani tijekom uzgoja BMK u pravilnim razmacima.

3.2.7. Uzgoj bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T i proizvodnja mliječne kiseline u hranjivim MRS podlogama sa furfuralom

Suspenzija kulture *L. amylovorus* DSM 20531^T (0,1 mL) precijepljena je iz tekuće hranjive MRS podloge u staklene epruvete sa sterilnom hranjivom MRS podlogom ($V_K = 10$ mL) koje su inkubirane kroz 18 sati pri 40 °C. Nakon inkubacije porasla kultura (3,75 mL) korištena je za nacjepljivanje sterilne MRS podloge u Erlenmeyer tikvici ($V_K = 150$ mL). Tikvica je inkubirana kroz 18 sati pri 40 °C u statičnim uvjetima (bez stresanja). Ovako porasla kultura korištena je kao inokulum za provođenje uzgoja. Inokulum je dodan u koncentraciji od 2,5 % ($\frac{vol}{vol}$).

BMK *L. amylovorus* DSM 20531^T uzgojena je u MRS-glc₂₀ podlozi ($V_K = 150$ mL) i MRS-glc₂₀ podlozi ($V_K = 150$ mL) u koje je dodan furfural u koncentracijama koje su prikazane u Tablici 7. Uzgoj je proveden pri 40 °C na magnetnoj mješalici ($n = 150 \text{ min}^{-1}$) bez podešavanja pH vrijednosti.

Tijekom uzgoja u aseptičnim uvjetima izuzimani su uzorci u pravilnim vremenskim intervalima kako bi se odredila kinetika rasta bakterije i fermentacija glukoze do mliječne kiseline uz prisutnost furfurala kao inhibitora.

3.2.8. Analitičke metode

Tijekom uzgoja u Erlenmeyer tikvicama (Poglavlje 3.2.5.) i uzgoja u HRCB-u (Poglavlje 3.2.6.) bakterija *L. amylovorus* DSM 20531^T i *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T praćena je optička gustoća izuzetih uzoraka (OD_{600}) (Poglavlje 3.2.8.1.). Nakon izdvajanja biomase centrifugiranjem određena je koncentracija suhe tvari biomase gravimetrijskom metodom (γ_X) samo tijekom uzgoja u MRS-glc₂₀ i modificiranoj MRS-glc₅-ksi₅-arab₁ podlozi (Poglavlje 3.2.4.), a u supernatantima MRS podloga određena je koncentracija: glukoze (γ_{glc}), ksiloze (γ_{ksi}), arabinoze (γ_{arab}), mliječne kiseline (γ_{MK}) i octene kiseline (γ_{OK}). U supernatantima podloga koje se sastoje od hidrolizata lignoceluloznih sirovina (Tablica 8) određene su i koncentracije levulinske (γ_{LK}) i mravlje kiseline ($\gamma_{formijat}$) HPLC metodom, postupkom opisanim u Poglavlju 3.2.8.3. Osim toga koncentracija ukupnih furana određena je spektrofotometrijski (Martinez i sur., 2000; Ivančić, 2016).

3.2.8.1. Određivanje optičke gustoće uzoraka hranjive podloge

Izuzeti uzorci imali su visoku optičku gustoću ($A_{600} > 1,5$ AU), pa je bilo potrebno prirediti odgovarajuća razrijeđenja ovih uzoraka. Određeni volumen svakog razrijeđenja ($V \approx 4$ mL) prenesen je u kivete promjera 10 mm (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka) i pomoću UV/Vis spektrofotometra Cary 13E Varian (Mulgrave, Australija) određena je optička gustoća pri valnoj duljini (λ) od 600 nm (A_{600}).

3.2.8.2. Određivanje koncentracije suhe tvari biomase gravimetrijskom metodom

U prethodno osušene i izvagane kivete od 10 mL (Nalgene, Nalge Nunc International, New York, SAD) pipetom je preneseno 5 mL izuzete suspenzije. Uzorak je centrifugiran (4500 g, 10 min, 4 °C, Harrier 18/10 Sanyo, Watford, Velika Britanija) i nakon toga je supernatant otpipetiran iz kivete. Izdvojena biomasa je sušena pri 105 °C do konstantne mase. Nakon sušenja i vaganja kiveta s osušenom biomasom na analitičkoj vagi Shimadzu (Kyoto, Japan), izračunata je koncentracija suhe tvari biomase (γ_x) prema slijedećem izrazu:

$$\gamma_x = \frac{m - m_K}{V_{UZ}} \text{ [g L}^{-1}\text{]} \quad [3-1]$$

m - masa kivete s biomasom nakon sušenja [g],

m_K - masa prazne kivete nakon sušenja [g],

V_{UZ} - volumen uzorka [L].

3.2.8.3. Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)

Iz uzoraka izuzetih tijekom uzgoja bakterija *L. amylovorus* DSM 20531^T i *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T centrifugiranjem (4500 g, 10 min, 4 °C, Harrier 18/10 Sanyo, Watford, Velika Britanija) je izdvojena biomasa. Iz dobivenih supernatanata taloženjem su izdvojeni proteini sa cinkovim sulfatom heptahidratom (Poglavlje 3.2.8.3.1.). Dobivena otopina je profiltrirana pomoću šprica kroz najlonski filter sa porama veličine 0,20 µm. Filtrat je analiziran pomoću kromatografskog sustava.

3.2.8.3.1. Taloženje proteina iz uzoraka cinkovim sulfatom

U supernatant uzorka volumena 700 μL dodana je otopina cinkovog sulfata heptahidrata ($\gamma = 100 \text{ g L}^{-1}$) u omjeru volumena 1:1 ($V = 700 \mu\text{L}$). Dobivena otopina intenzivno je izmješana tijekom 20-ak sekundi (mikser EV-100, Tehnica, Železniki, Slovenija) i ostavljena minimalno 20 minuta pri sobnoj temperaturi da se proteini istalože. Centrifugiranjem (10000 g, 5 min, 4 °C; Harrier 18/10 Sanyo, Watford, Velika Britanija) izdvojeni su istaloženi proteini, a dobiveni supernatant profiltriran je pomoću šprice na koje je, kao nastavak, dodan najlonski filter s porama veličine 0,20 μm (Sartorius Stedim Biotech GMBH, Goettingen, Njemačka). Ovako pripremljeni uzorci analizirani su pomoću Shimadzu CLASS-VP LC-10A_{VP} sustava (Poglavlje 3.2.8.3.2.).

3.2.8.3.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Kromatografski sustav Shimadzu CLASS-VP LC-10A_{VP} (Shimadzu, Kyoto, Japan) korišten je za određivanje koncentracije ugljikohidrata (glukoze, ksiloze, arabinoze), mliječne, octene, levulinske i mravlje kiseline u uzorcima. Za analizu priređenih uzoraka korištena je kromatografska metoda opisana u radovima Trontel i sur. (2010, 2011a). Kao mobilna faza korištena je 0,1 % otopina fosforne kiseline. Injektirano je 20 μL uzorka u sustav. Protok mobilne faze je 0,5 mL min⁻¹, a temperatura ionsko – izmjenjivačke analitičke kolone (SupelcogelTM C-610H; 30 cm x 7,8 mm ID, 9 μm) s predkolonom (SupelcogelTM H; 5 cm x 4,6 mm ID, 9 μm) 55 °C. Za detekciju je korišten detektor indeksa loma.

Obrada rezultata dobivenih kromatografskom analizom napravljena je pomoću računalnog programa za kromatografiju (CLASS-VP v6.10). Pripadajuće vrijednosti očitane su iz baždarnih pravaca (Tablica 8).

Tablica 8. Retencijska vremena i baždarni pravci.

spoj	t_{R^*} (min)	jednandžba baždarnog pravca	R^2 (-)
celobioza	11,885 ± 0,035	$A = 221943 \cdot \gamma_{\text{celobioza}} + 838,98$	0,9999
glukoza	14,045 ± 0,040	$A = 226208,50 \gamma_{\text{glukoza}} - 1433,13$	1,0000
ksiloza	14,834 ± 0,037	$A = 223510 \gamma_{\text{ksiloza}} + 1070,5$	1,0000
arabinoza	16,061 ± 0,034	$A = 225152 \gamma_{\text{arabinoza}} + 562,39$	0,9999
mliječna kiselina	18,520 ± 0,028	$A = 119006 \gamma_{\text{mliječna kiselina}} + 1369,5$	0,9999
mravlja kiselina	18,520 ± 0,018	$A = 82201 \gamma_{\text{mravlja kiselina}} - 125,4$	0,9983
octena kiselina	19,825 ± 0,026	$A = 112445 \cdot \gamma_{\text{octena kiselina}} + 1276,1$	0,9989
levulinska kiselina	21,388 ± 0,051	$A = 207915 \gamma_{\text{levulinska kiselina}} + 3222,5$	0,9998
etanol	25,406 ± 0,014	$A = 819297 \varphi_{\text{etanol}} - 1766,9$	0,9992

* t_R izraženo kao srednja vrijednost ± standardna devijacija; A, površina

3.2.8.4. Izračunavanje pokazatelja uspješnosti rasta i proizvodnje mliječne kiseline

Prinos biomase (Y_X)

$$Y_X = X - X_0 \text{ [g L}^{-1}\text{]} \quad [3-2]$$

X_0 - početna koncentracija biomase [g L⁻¹]

X - konačna koncentracija biomase [g L⁻¹]

Prinos produkta (Y_P)

$$Y_P = P - P_0 \text{ [g L}^{-1}\text{]} \quad [3-3]$$

P_0 - početna koncentracija produkta [g L⁻¹]

P - konačna koncentracija produkta [g L⁻¹]

Koeficijent pretvorbe supstrata u biomasu ($Y_{X/S}$)

$$Y_{X/S} = \frac{(X-X_0)}{(S_0-S)} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{Y_X}{\Delta S} \quad [\text{g g}^{-1}] \quad [3-4]$$

S_0, X_0 - početne koncentracije supstrata, odnosno biomase [g L^{-1}],
 S, X - konačne koncentracije supstrata, odnosno biomase [g L^{-1}],
 (Marić i Šantek, 2009).

Koeficijent pretvorbe supstrata u produkt ($Y_{P/S}$)

$$Y_{P/S} = \frac{(P-P_0)}{(S_0-S)} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{Y_P}{\Delta S} \quad [\text{g g}^{-1}] \quad [3-5]$$

S_0, P_0 - početna koncentracija supstrata, odnosno produkta [g L^{-1}],
 S, P - konačna koncentracija supstrata, odnosno produkta [g L^{-1}],
 (Marić i Šantek, 2009).

Koeficijent nastajanja produkta po biomasu ($Y_{P/X}$)

$$Y_{P/X} = \frac{(P-P_0)}{(X_0-X)} = \frac{\Delta P}{\Delta X} = \frac{Y_P}{Y_X} \quad [\text{g g}^{-1}] \quad [3-6]$$

X_0, P_0 - početna koncentracija biomase, odnosno produkta [g L^{-1}],
 X, P - konačna koncentracija biomase, odnosno produkta [g L^{-1}],
 (Marić i Šantek, 2009).

Brzina potrošnje supstrata (r_S)

$$\ln(S) = r_S \cdot t + b \quad [3-7]$$

Brzina nastajanja produkta (r_p)

$$\ln (P) = r_p \cdot t + b \quad [3-8]$$

Maksimalna specifična brzina rasta biomase (μ_m)

$$\ln (X) = \mu_m \cdot t + b \quad [3-9]$$

Produktivnost (Pr)

$$Pr = \frac{Y_X \text{ ili } Y_P}{t_U} \quad [\text{kg m}^{-3} \text{ h}^{-1}] \quad [3-10]$$

Y_X - prinos biomase [g L^{-1}]

Y_P - prinos produkta [g L^{-1}]

t_U - ukupno vrijeme bioprocesa [h]

4. REZULTATI I RASPRAVA

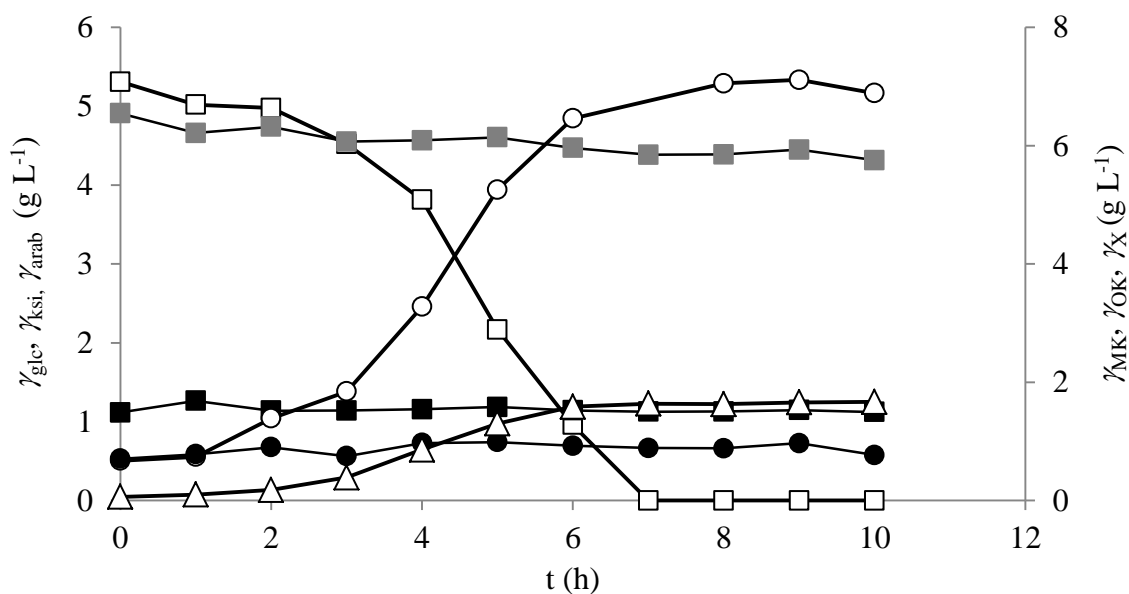
U ovom su radu kao radni mikroorganizam korištene BMK *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T i *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T. Pomoću ovih bakterija, provedene su fermentacije u modificiranoj MRS podlozi (MRS-glc₅-ksi₅-arab₁) koje kao glavni izvor ugljika imaju glukozu ($\gamma \approx 5,0 \text{ g L}^{-1}$), ksilozu ($\gamma \approx 5,0 \text{ g L}^{-1}$) i arabinozu ($\gamma \approx 1,0 \text{ g L}^{-1}$). Osim u modificiranim MRS podlogama, proizvodnja mliječne kiseline s pomoću ove dvije bakterije provedena je i na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina (kukuruzovine, kukuruznih oklasaka i pšenične slame). Hidrolizati lignoceluloznih sirovina koji su korišteni u fermentacijama dobiveni su predobradom lignoceluloznih sirovina u visokotlačnom reaktoru za predobradu lignoceluloznih sirovina, kako je to opisano u Poglavlju 3.2.2. BMK *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T korištena je i za proizvodnju mliječne kiseline na hidrolizatima pšenične slame i kukuruzovine u HRCB-u. Kako tijekom predobrade lignoceluloznih sirovina nastaju različiti toksični spojevi (furfural, HMF, levulinska kiselina, mravlja kiselina) određen je i utjecaj različitih koncentracija furfurala na rast i aktivnost bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T te na proizvodnju mliječne kiseline.

Rezultati provedenih istraživanja podijeljeni su u sljedeća poglavlja:

- a) Uzgoj bakterija *L. amylovorus* DSM 20531^T i *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T i proizvodnja mliječne kiseline u hranjivoj MRS-glc₅-ksi₅-arab₁ podlozi (Poglavlje 4.1.);
- b) Uzgoj bakterija *L. amylovorus* DSM 20531^T i *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T i proizvodnja mliječne kiseline na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina u Erlenmeyer tikvicama (Poglavlje 4.2.);
- c) Uzgoj bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T i proizvodnja mliječne kiseline na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina u HRCB-u (Poglavlje 4.3.);
- d) Uzgoj bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T u hranjivim MRS-glc₂₀ podlogama s različitim koncentracijama furfurala ($\gamma_{\text{furfural}} = 100\text{-}5000 \text{ mg L}^{-1}$) bez regulacije pH vrijednosti (Poglavlje 4.4.).

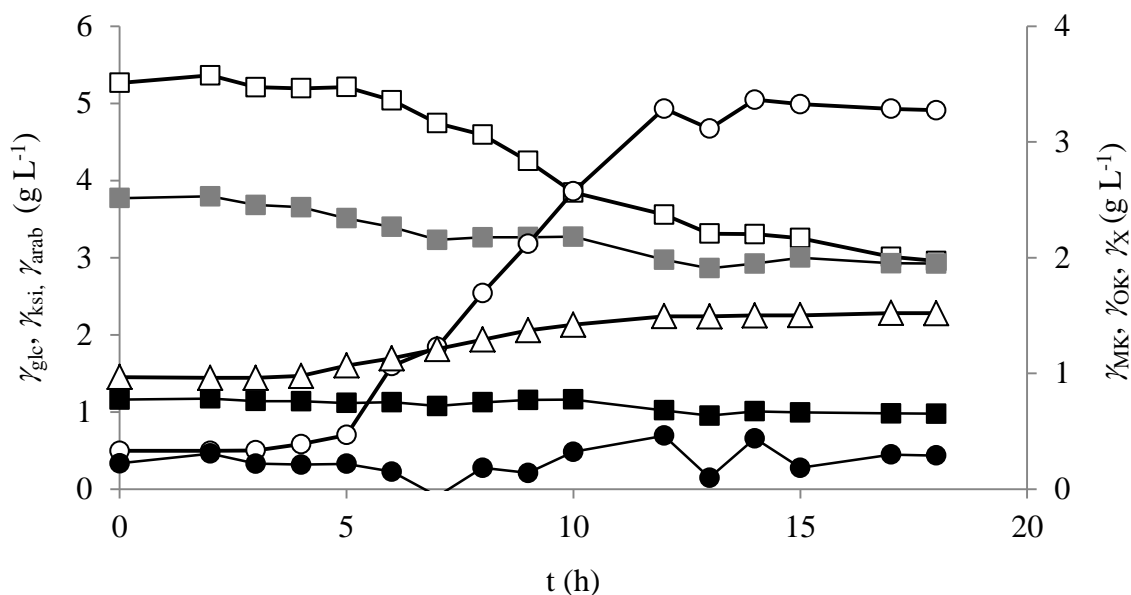
4.1. Uzgoj bakterija *L. amylovorus* DSM 20531^T i *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T i proizvodnja mliječne kiseline u hranjivoj MRS-glc₅-ksi₅-arab₁ podlozi

U ovom su poglavlju prikazani rezultati dobiveni tijekom uzgoja bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T i *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T u modificiranim MRS-glc₅-ksi₅-arab₁ hranjivim podlogama. Fermentacije su provedene pri 40 °C i bez regulacije pH vrijednosti podloge na magnetnoj mješalici ($n = 150 \text{ min}^{-1}$, Cimarec iTM Poly15, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Ove dvije bakterije mliječne kiseline odabrane su za provođenje bioprocasa proizvodnje mliječne kiseline u modificiranim MRS podlogama u kojima su kao glavni izvor ugljika korišteni ugljikohidrati koji se nalaze u lignoceluloznim sirovinama. Rezultati analize izuzetih uzoraka tijekom uzgoja prikazani su Slikama 6 i 7. Kinetički parametri potrošnje supstrata, rasta biomase i proizvodnje mliječne kiseline prikazani su Tablicama 9 i 10.



Slika 6. Promjene koncentracije glukoze (γ_{glc} , \square), ksiloze (γ_{ksi} , \blacksquare), arabinoze (γ_{arab} , \blacksquare), suhe tvari bakterijske biomase (γ_{X} , \triangle), mliječne (γ_{MK} , \circ) i octene kiseline (γ_{OK} , \bullet) u uzorcima izuzetim tijekom uzgoja bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T u hranjivoj MRS-glc₅-ksi₅-arab₁ podlozi.

Prozvodnja mliječne kiseline s pomoću bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T u MRS podlozi u kojoj su, osim glavnog izvora ugljika glukoze ($\gamma_{\text{glc}} \approx 5 \text{ g L}^{-1}$), dodane pentoze, ksiloza ($\gamma_{\text{ksi}} \approx 5 \text{ g L}^{-1}$) i arabinoza ($\gamma_{\text{arab}} \approx 1 \text{ g L}^{-1}$), provedeno je kako bi se utvrdilo može li bakterija *L. amylovorus* DSM 20531^T fermentirati uz glukozu i ove dvije pentoze. Ksiloza i pentoza su ugljikohidrati koji se nalaze u hidrolizatima lignoceluloznih sirovina (Boguta i sur., 2014). Šaržni uzgoj proveden u Erlenmeyer tikvici u trajanju od 10 sati pri temperaturi od 40 °C. Ova amilolitička homofermentativna bakterija može fermentirati veliki broj mono- i di- saharida, ali ne može fermentirati pentoze do mliječne kiseline (Trontel i sur., 2011). Prema podacima dobivenim HPLC analizom tijekom rasta bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T zabilježena je mala promjena u koncentraciji ksiloze ($\Delta\gamma_{\text{ksi}} = 0,59 \text{ g L}^{-1}$), a koncentracija arabinoze bila je konstantna ($\Delta\gamma_{\text{arab}} = 0,00 \text{ g L}^{-1}$; Slika 6). Nakon relativno kratke lag faze koja je trajala 2 sata, bakterija je ušla u eksponencijalnu fazu rasta koja je trajala 4 sata i u toj fazi je postignut najveći prinos mliječne kiseline ($\gamma_{\text{MK}} = 5,07 \text{ g L}^{-1}$). U šestom satu uzgoja bakterija je ušla u stacionarnu fazu pri koncentraciji glukoze ($\gamma_{\text{glc}} = 0,96 \text{ g L}^{-1}$) i koncentraciji biomase ($\gamma_{\text{X}} = 1,58 \text{ g L}^{-1}$). Maksimalna koncentracija mliječne kiseline i biomase postignuta je u devetom satu uzgoja ($\gamma_{\text{MKm}} = 7,11 \text{ g L}^{-1}$, $\gamma_{\text{X}} = 1,66 \text{ g L}^{-1}$). Osim koncentracije mliječne kiseline, praćena je i promjena koncentracija octene kiseline. Acetat je u podlogu dodan kao sol natrijevog acetata koji je sastojak MRS podloge sa početnom koncentracijom acetata od 4,15 g L⁻¹. Tijekom fermentacije nije došlo do promjene koncentracije octene kiseline što ukazuje da bakterija *L. amylovorus* DSM 20531^T homofermentativnim putem fermentira glukozu do mliječne kiseline. Drugi proizvodi fermentacije (octena i mravlja kiselina, odnosno etanol) nisu zabilježeni HPLC metodom u ovom eksperimentu. Maksimalna specifična brzina rasta (μ_{m}) ove bakterije iznosila je 0,13 h⁻¹ uz produktivnost mliječne kiseline (Pr_{MK}) od 0,62 g L⁻¹ h⁻¹ (Tablica 10). Znatno veća μ_{m} (0,41-0,67 h⁻¹) i Pr_{MK} (1,05-1,69 g L⁻¹ h⁻¹) dobiveni su uzgojem bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T u MRS podlozi i modificiranim MRS podlogama sa saharozom i škrobom uz regulaciju pH vrijednosti ($5,5 \pm 0,2$) pri 40 °C (Trontel i sur., 2011).



Slika 7. Promjene koncentracije glukoze (γ_{glc} , □), ksiloze (γ_{ksi} , ■), arabinoze (γ_{arab} , ■), suhe tvari bakterijske biomase (γ_{X} , Δ), mliječne (γ_{MK} , ○) i octene kiseline (γ_{OK} , ●) u uzorcima izuzetim tijekom uzgoja bakterije *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T u hranjivoj MRS-glc₅-ksi₅- arab₁ podlozi.

Provedena je i proizvodnja mliječne kiseline s pomoću bakterije *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T u MRS-glc₅-ksi₅-arab₁. Ova bakterija pripada skupini fakultativno heterofermentativnih bakterija mliječne kiseline i proizvodi isključivo D(-)- stereoizomer mliječne kiseline (Slavica i sur., 2015). Za razliku od bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T, tijekom uzgoja bakterije *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T nije utrošena sva glukoza iz podloge ($t = 18$ h; $\gamma_{\text{glc}} = 2,96$ g L⁻¹), dok je koncentracija ksiloze smanjena za 0,85 g L⁻¹ ($t = 18$ h; $\gamma_{\text{ksi}} = 2,92$ g L⁻¹). Koncentracija arabinoze iznosila je oko 1 g L⁻¹ tijekom cijelog uzgoja (Slika 7). Nakon lag faze koja je trajala 5 sati, bakterija je ušla u eksponencijalnu fazu rasta koja je trajala sedam sati i u toj fazi je postignut prinos mliječne kiseline od 3,29 g L⁻¹. Nakon 12 sati uzgoja postignuta je maksimalna koncentracija biomase ($\gamma_{\text{X}} = 1,58$ g L⁻¹), a maksimalna koncentracija mliječne kiseline postignuta je u 14. satu uzgoja ($\gamma_{\text{MK}} = 3,37$ g L⁻¹). Tijekom fermentacije nije došlo do proizvodnje octene kiseline ni drugih proizvoda fermentacije (mravlja kiselina i etanol). Maksimalna specifična brzina rasta (μ_{m}) ove bakterije iznosila je 0,06 h⁻¹ uz produktivnost mliječne kiseline (Pr_{MK}) od 0,16 g L⁻¹ h⁻¹ (Tablica 10). Bakterija *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T u istim uvjetima ima

duplo manju specifičnu brzinu rasta od bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T (Tablica 9). Tijekom bioprocesa provedenog s pomoću bakterije *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T proizvedeno je i duplo manje mliječne kiseline, dok je produktivnost bioprocesa (Pr_{MK}) bila gotovo četiri puta manja u odnosu na vrijednosti dobivene *L. amylovorus* DSM 20531^T (Tablica 10).

Tablica 9. Pokazatelji uspješnosti rasta biomase dobiveni tijekom uzgoja bakterija *L. amylovorus* DSM 20531^T i *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T u hranjivim MRS glc₅-ksi₅-arab₁ podlogama pri 40 °C i bez regulacije pH vrijednosti.

BMK	t _{FAZE RASTA} (h)		r_{glc}	μ_m	γ_{Xm}	$Y_{X/S}$	Pr_X
	lag	eksp	(h ⁻¹)	(h ⁻¹)	(g L ⁻¹)	(g g ⁻¹)	(g L ⁻¹ h ⁻¹)
<i>L. amylovorus</i> DSM 20531 ^T	2	4	0,69	0,13	0,88	0,17	0,09
<i>L. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> DSM 20004 ^T	4	7	0,06	0,06	0,69	0,30	0,04

Tablica 10. Pokazatelji uspješnosti proizvodnje mliječne kiseline dobiveni tijekom uzgoja bakterija *L. amylovorus* DSM 20531^T i *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T u hranjivim MRS glc₅-ksi₅-arab₁ podlogama pri 40 °C i bez regulacije pH vrijednosti.

BMK	r_{MK}	γ_{MK_m}	$Y_{P/S}$	$Y_{P/X}$	Pr_{MK}
	(h ⁻¹)	(g L ⁻¹)	(g g ⁻¹)	(g g ⁻¹)	(g L ⁻¹ h ⁻¹)
<i>L. amylovorus</i> DSM 20531 ^T	0,52	7,11	1,00	3,80	0,62
<i>L. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> DSM 20004 ^T	0,20	3,37	0,93	4,20	0,16

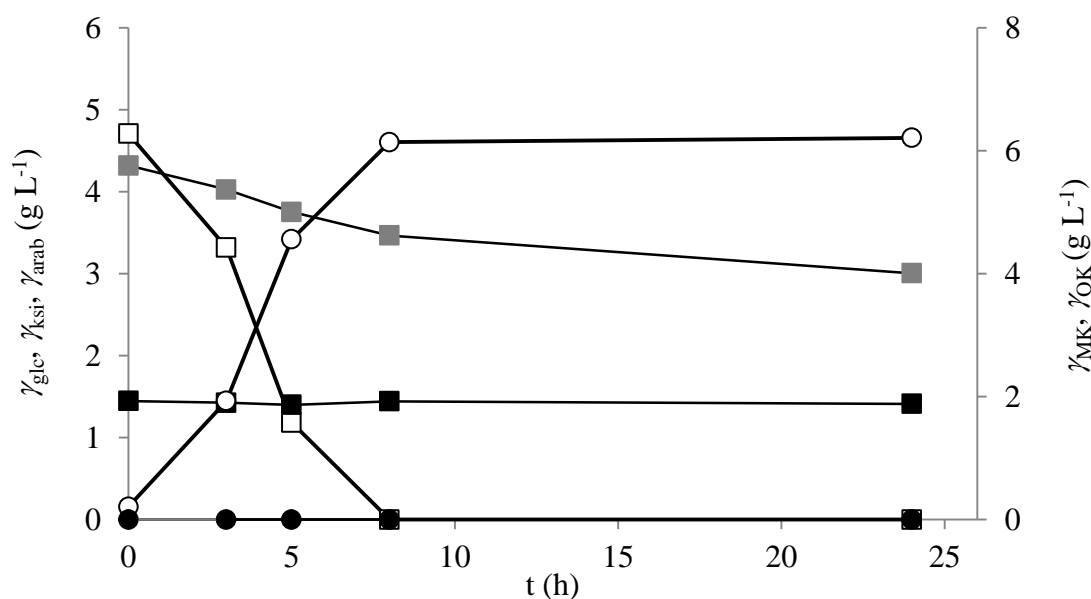
4.2. Uzgoj bakterija *L. amylovorus* DSM 20531^T i *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T i proizvodnja mliječne kiseline na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina u Erlenmeyer tikvicama

U ovom su poglavlju prikazani rezultati dobiveni tijekom uzgoja bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T i *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T u podlogama pripremljenim od hidrolizata kukuruzovine, kukuruznih oklasaka i pšenične slame koji su dobiveni predobradom u visokotlačnom reaktoru (Poglavljje 3.2.2.). Fermentacije su provedene pri 40 °C i bez regulacije pH vrijednosti podloge na magnetnoj mješalici ($n = 150 \text{ min}^{-1}$, Cimarec iTM Poly15, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) u Erlenmeyer tikvicama. U Poglavljima 4.2.1. prikazani su rezultati uzgoja bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T i *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina (kukuruzovina, kukuruzni oklasci i pšenična slama) dobivenih nakon predobrade u visokotlačnom reaktoru uz 0,5 % sumpornu kiselinu kao katalizator, a u Poglavlju 4.2.2. su prikazani rezultati uzgoja bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina kukuruzovina, kukuruznih oklasaka i pšenične slame dobivenih nakon predobrade u visokotlačnom reaktoru uz 1,0 % sumpornu kiselinu kao katalizator.

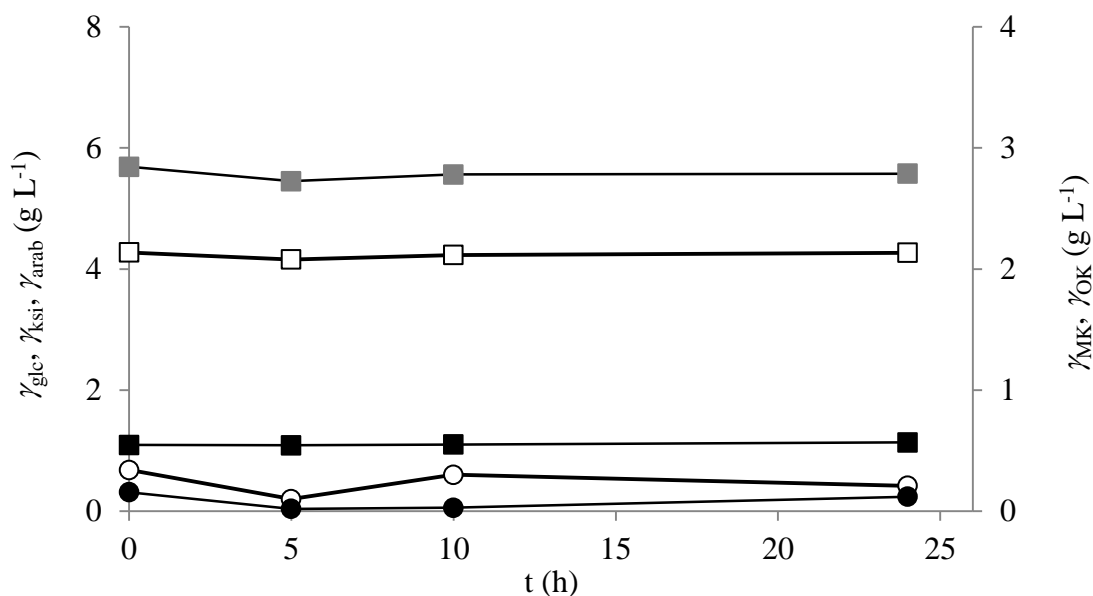
4.2.1. Uzgoj bakterija *L. amylovorus* DSM 20531^T i *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T i proizvodnja mliječne kiseline na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina dobivenih nakon predobrade u visokotlačnom reaktoru s 0,5 % sumpornom kiselinom kao katalizatorom

U ovom poglavlju su prikazani rezultati dobiveni tijekom uzgoja bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T i *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T u podlogama pripremljenim od hidrolizata kukuruzovine, kukuruznih oklasaka i pšenične slame dobivenih predobradom u visokotlačnom reaktoru s 0,5 % sumpornom kiselinom kao katalizatorom (Tablica 7, Poglavlje 3.2.3.). Rezultati analize uzoraka izuzetih tijekom uzgoja prikazani su na Slikama 8-13, a kinetički parametri potrošnje supstrata i proizvodnje mliječne kiseline prikazani su u Tablici 11.

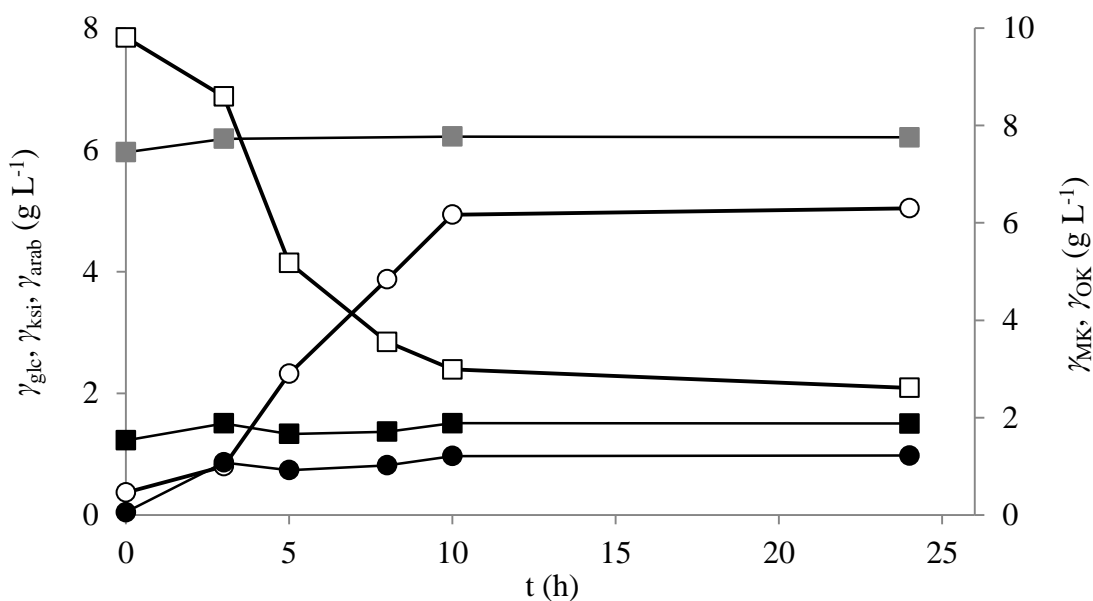
Bakterija *L. amylovorus* DSM 20531^T može rasti na hidrolizatu kukuruzovine (Slika 8) i hidrolizatu pšenične slame (Slika 10), ali ne raste na hidrolizatu kukuruznih oklasaka (Slika 9). Tijekom uzgoja bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T na hidrolizatu kukuruzovine, glukoza je potpuno utrošena iz podloge već u osmom satu uzgoja uz brzinu potrošnje glukoze (r_{glc}) od $0,26 \text{ h}^{-1}$. Od početka uzgoja zabilježen je i pad koncentracije ksiloze ($\Delta\gamma_{\text{ksi}} = 1,31 \text{ g L}^{-1}$). Ova bakterija nije utrošila svu glukožu tijekom rasta na hidrolizatu slame ($t = 24 \text{ h}$; $\gamma_{\text{glc}} = 2,09 \text{ g L}^{-1}$) uz brzinu potrošnje glukoze od $0,17 \text{ h}^{-1}$, dok je koncentracija ksiloze ostala konstantna tijekom uzgoja. Promjena koncentracije arabinoze nije vidljiva ni u jednom uzgoju. Uzgojem bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T na hidrolizatu kukuruzovine i pšenične slame, dobivena je slična koncentracija mliječne kiseline ($\gamma_{\text{MKm}} = 6,30\text{-}6,38 \text{ g L}^{-1}$; Tablica 11), ali uz četiri puta veću brzinu proizvodnje mliječne kiseline u uzgoju na hidrolizatu kukuruzovine ($r_{\text{MK}} = 0,63 \text{ h}^{-1}$) u odnosu na uzgoj na hidrolizatu slame ($r_{\text{MK}} = 0,15 \text{ h}^{-1}$).



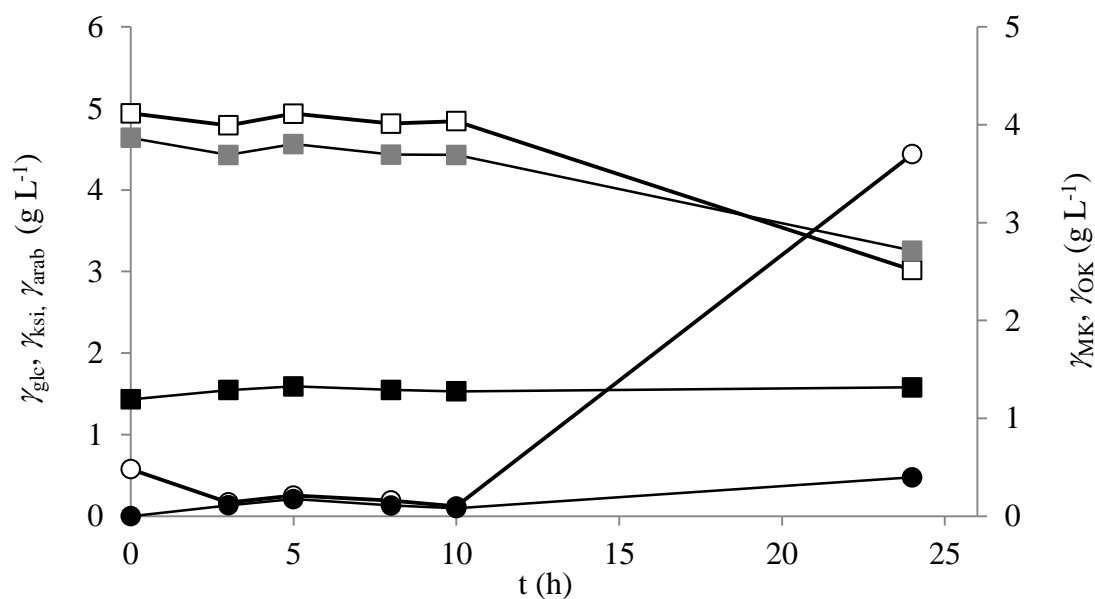
Slika 8. Promjene koncentracije glukoze (γ_{glc} , \square), ksiloze (γ_{ksi} , \blacksquare), arabinoze (γ_{arab} , \blacksquare), mliječne (γ_{MK} , \circ) i octene kiseline (γ_{OK} , \bullet) tijekom uzgoja bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T na hidrolizatu kukuruzovine.



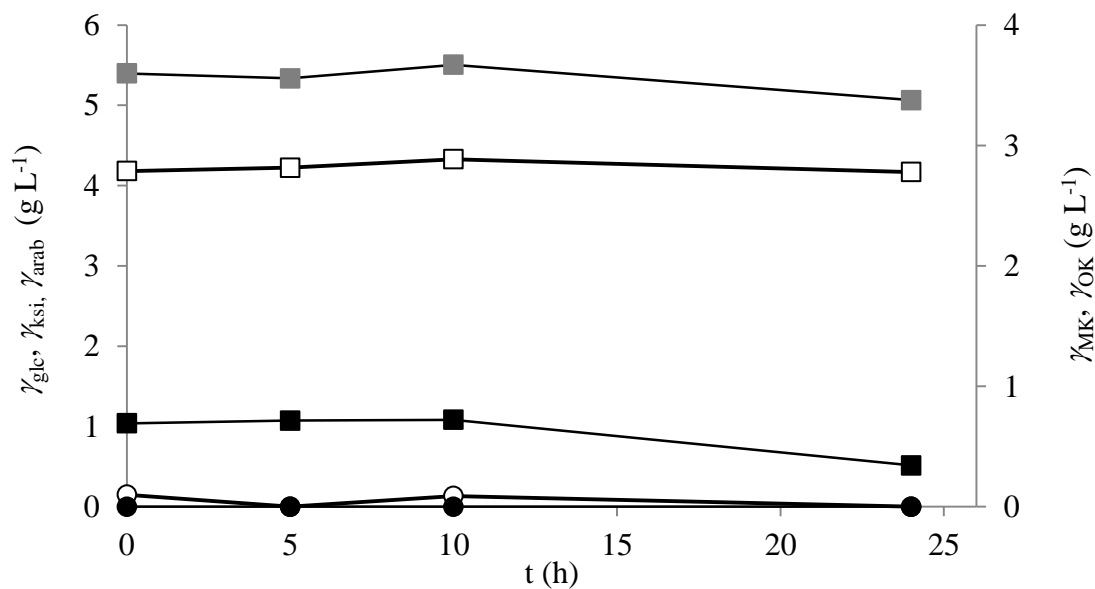
Slika 9. Promjene koncentracije glukoze (γ_{glc} , □), ksiloze (γ_{ksi} , ■), arabinoze (γ_{arab} , ■), mliječne (γ_{MK} , ○) i octene kiseline (γ_{OK} , ●) tijekom uzgoja bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T na hidrolizatu kukuruznih oklasaka.



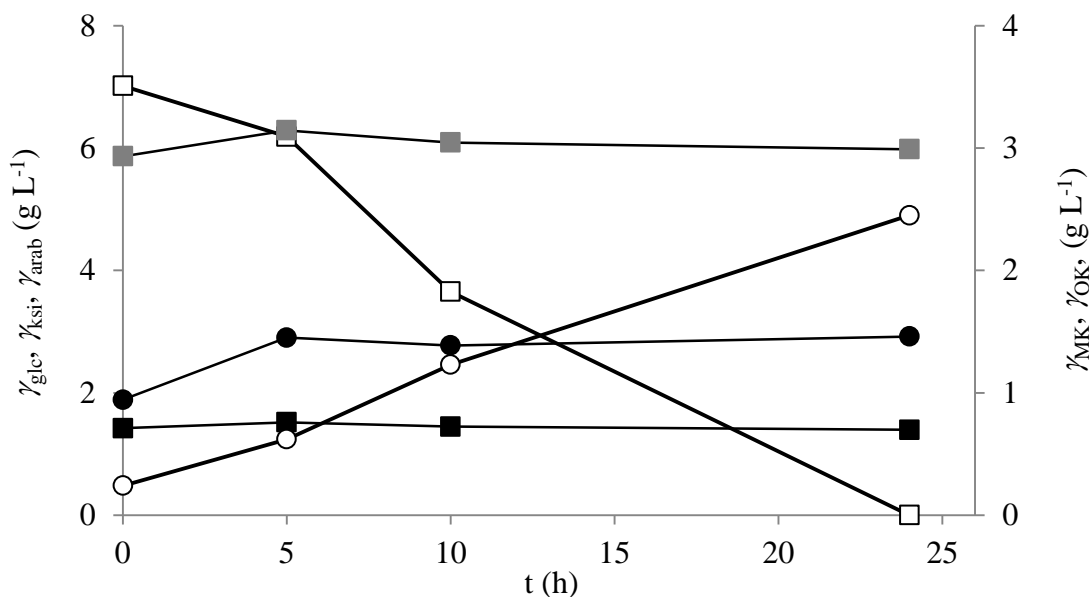
Slika 10. Promjene koncentracije glukoze (γ_{glc} , □), ksiloze (γ_{ksi} , ■), arabinoze (γ_{arab} , ■), mliječne (γ_{MK} , ○) i octene kiseline (γ_{OK} , ●) tijekom uzgoja bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T na hidrolizatu pšenične slame.



Slika 11. Promjene koncentracije glukoze (γ_{glc} , \square), ksiloze (γ_{ksi} , \blacksquare), arabinoze (γ_{arab} , \blacksquare), mliječne (γ_{MK} , \circ) i octene kiseline (γ_{OK} , \bullet) tijekom uzgoja bakterije *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T na hidrolizatu kukuruzovine.



Slika 12. Promjene koncentracije glukoze (γ_{glc} , \square), ksiloze (γ_{ksi} , \blacksquare), arabinoze (γ_{arab} , \blacksquare), mliječne (γ_{MK} , \circ) i octene kiseline (γ_{OK} , \bullet) tijekom uzgoja bakterije *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T na hidrolizatu kukuruznih oklasaka.



Slika 13. Promjene koncentracije glukoze (γ_{glc} , \square), ksiloze (γ_{ksi} , \blacksquare), arabinoze (γ_{arab} , \blacksquare), mliječne (γ_{MK} , \circ) i octene kiseline (γ_{OK} , \bullet) tijekom uzgoja bakterije *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T na hidrolizatu pšenične slame.

Eksperimentalni podaci dobiveni tijekom uzgoja bakterije *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T na hidrolizatima pokazuju da ova bakterija raste i proizvodi mliječnu kiselinu na hidrolizatu kukuruzovine i pšenične slame (Slika 11 i Slika 13), dok na hidrolizatu kukuruznih oklasaka ova bakterija ne raste (Slika 12), kao ni bakterija *L. amylovorus* DSM 20531^T. Iz podataka dobivenih tijekom uzgoja ove bakterije na hidrolizatima kukuruzovine i pšenične slame, nije bilo moguće odrediti brzinu potrošnje supstrata i proizvodnje mliječne kiseline, ali je zabilježena maksimalna koncentracija mliječne kiseline (γ_{MKm}). Na hidrolizatu kukuruzovine je postignuta γ_{MKm} u 24. satu uzgoja ($\gamma_{\text{MKm}} = 3,70 \text{ g L}^{-1}$), uz produktivnost proizvodnje mliječne kiseline (Pr_{MK}) od $0,16 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, dok je na hidrolizatu pšenične slame u istom vremenskom roku ova bakterija proizvela 29 % manje mliječne kiseline ($\gamma_{\text{MKm}} = 2,64 \text{ g L}^{-1}$, $Pr_{\text{MK}} = 0,10 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$; Tablica 11). Bakterija *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T tijekom uzgoja na hidrolizatu kukuruzovine, nije utrošila svu glukoza iz podloge ($t = 24 \text{ h}$; $\gamma_{\text{glc}} = 3,02 \text{ g L}^{-1}$), dok je na hidrolizatu pšenične slame nakon 24 sata uzgoja glukoza bila potpuno iscrpljena iz podloge. Pad u koncentraciji ksiloze određen je jedino tijekom uzgoja ove bakterije na hidrolizatu kukuruzovine ($\Delta\gamma_{\text{ksi}} = 1,38 \text{ g L}^{-1}$; Slika 11).

Zbog prevelike koncentracije toksičnih spojeva nastalih predobradom u visokotlačnom reaktoru sa 0,5 % sumpornom kiselinom kao katalizatorom (Poglavlje 3.2.2.) koji se nalaze u hidrolizatu kukuruznih oklasaka ($\gamma_{\text{furani}} = 3,99 \text{ g L}^{-1}$; $\gamma_{\text{levulinska kis}} = 2,06 \text{ g L}^{-1}$; $\gamma_{\text{HAc}} = 2,39 \text{ g L}^{-1}$; $\gamma_{\text{formijat}} = 3,37 \text{ g L}^{-1}$), bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T i *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T ne mogu rasti i proizvoditi mliječnu kiselinu u podlozi koja se sastoji od hidrolizata kukuruznih oklasaka (Slika 9 i Slika 12).

Dobiveni rezultati pokazuju da je uzgojem bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T na hidrolizatu kukuruzovine i pšenične slame proizvedeno 40 % odnosno 60 % više mliječne kiseline ($\gamma_{\text{MK-KUK}} = 6,21 \text{ g L}^{-1}$; $\gamma_{\text{MK-SLAMA}} = 6,30 \text{ g L}^{-1}$) nego uzgojem bakterije *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T na hidrolizatu kukuruzovine ($\gamma_{\text{MK-KUK}} = 3,70 \text{ g L}^{-1}$) i hidrolizatu pšenične slame ($\gamma_{\text{MK-SLAMA}} = 2,45 \text{ g L}^{-1}$). Na temelju ovih rezultata bakterija *L. amylovorus* DSM 20531^T se pokazala uspješnijom od bakterije *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T i odabrana je za daljnja istraživanja proizvodnje mliječne kiseline na lignoceluloznim hidrolizatima (Poglavlje 4.3.).

Tablica 11. Pokazatelji uspješnosti bioprocesa tijekom uzgoja bakterija *L. amylovorus* DSM 20531^T i *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T na podlogama pripremljenim od hidrolizata kukuruzovine, kukuruznih oklasaka i pšenične slame pri 40 °C i bez regulacije pH vrijednosti.

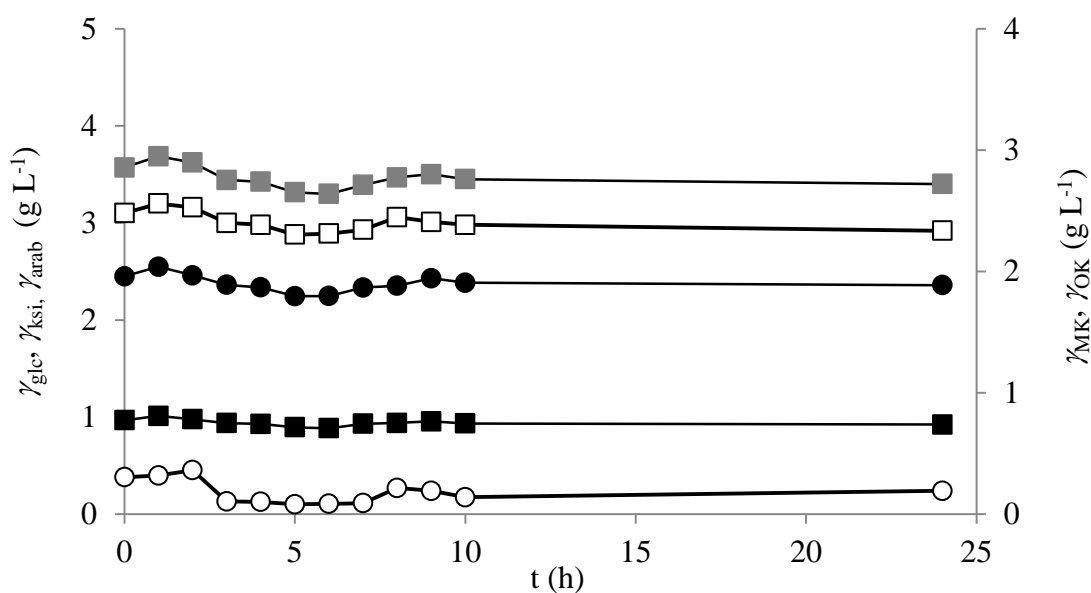
BMK	podloga	t_{UZ}	r_{glc}	r_{ksi}	r_{arab}	r_{MK}	γ_{MK_m}	$Y_{P/S}$	Pr_{MK}
		(h ⁻¹)	(h ⁻¹)	(h ⁻¹)	(h ⁻¹)	(h ⁻¹)	(g L ⁻¹)	(g g ⁻¹)	(g L ⁻¹ h ⁻¹)
<i>L. amylovorus</i> DSM 20531 ^T	kukuruzovina	24	0,26	0,03	0,00	0,63	6,21	0,99	0,26
	kuk. oklasci	24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	pšenična slama	24	0,17	0,00	0,00	0,15	6,30	0,98	0,26
<i>L. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> DSM 20004 ^T	kukuruzovina	24	-	-	-	-	3,70	0,98	0,16
	kuk. oklasci	24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	pšenična slama	24	-	0,00	-	-	2,45	0,34	0,10

(-) – nije određeno

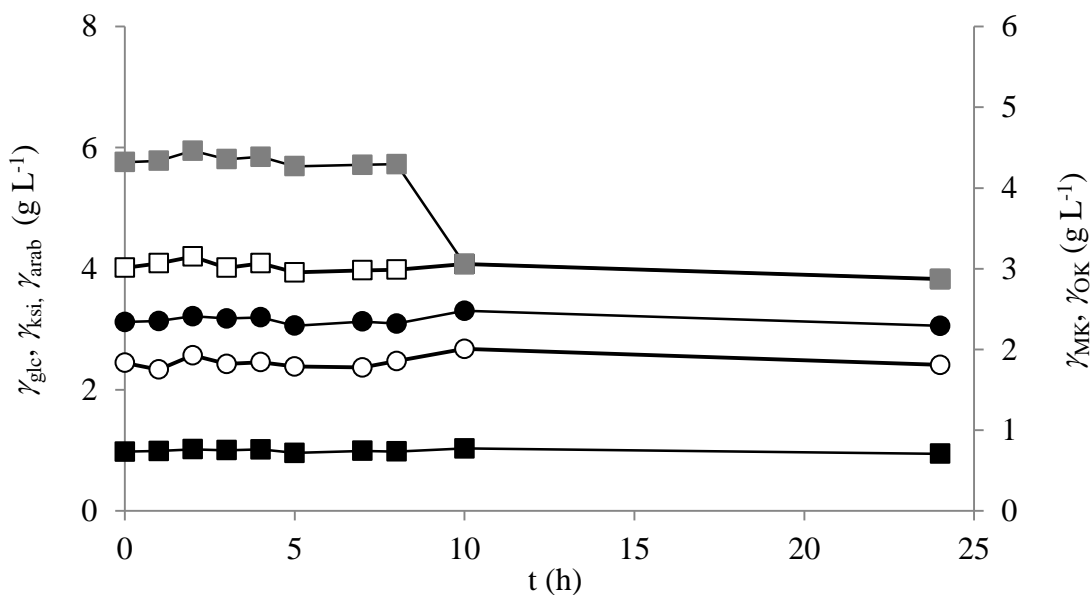
4.2.2. Uzgoj bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T i proizvodnja mliječne kiseline na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina dobivenih nakon predobrade u visokotlačnom reaktoru s 1,0 % sumpornom kiselinom kao katalizatorom

U ovom poglavlju prikazani su rezultati dobiveni tijekom uzgoja bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T u podlogama pripremljenim od hidrolizata kukuruzovine, kukuruznih oklasaka i pšenične slame koji su dobiveni predobradom u visokotlačnom reaktoru s 1,0 %-tnom sumpornom kiselinom kao katalizatorom. Za provođenje fermentacija odabrana je bakterija *L. amylovorus* DSM 20531^T zbog većeg prinosa mliječne kiseline u odnosu na bakteriju *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T tijekom uzgoja na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina dobivenih nakon predobrade u visokotlačnom reaktoru s 0,5 % sumpornom kiselinom (Poglavlje 4.2.1.). Rezultati analize izuzetih uzoraka tijekom uzgoja prikazani su na Slikama 14-16.

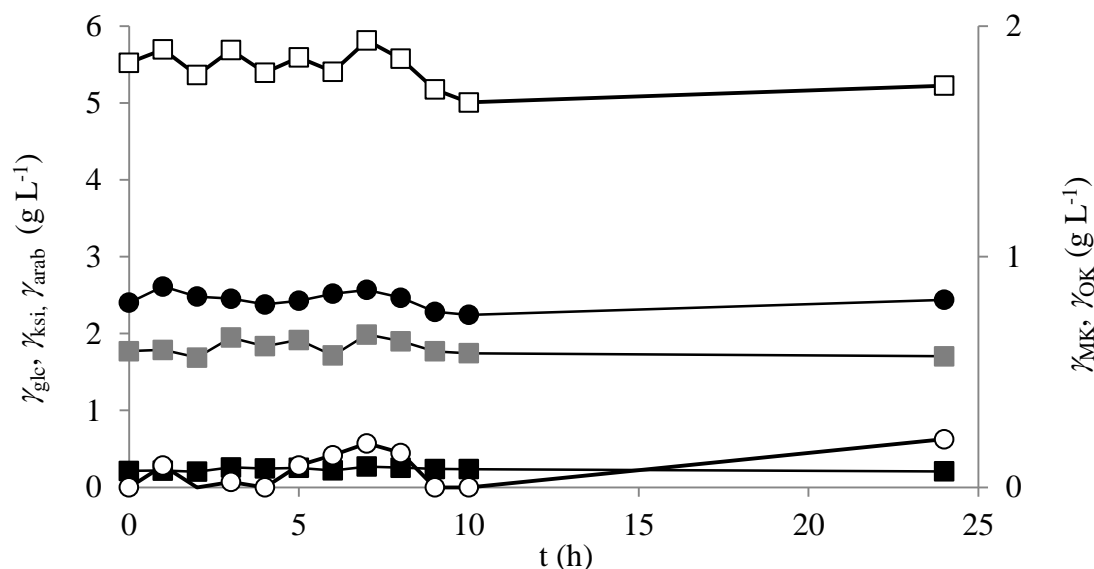
Iz dobivenih rezultata, koji su prikazni na Slikama 14-16, vidljivo je da bakterija *L. amylovorus* DSM 20531^T ne raste ni na jednoj od navedenih podloga. Analizom uzoraka HPLC metodom iz sva tri procesa nije detektirana mliječna kiselina, a koncentracije glukoze, ksiloze i arabinoze su ostale na istoj razini kao na početku procesa. U Poglavlju 3.2.2. i Tablici 6 prikazano je da predobradom lignoceluloznih sirovina u visokotlačnom reaktoru s 1,0 %-tnom sumpornom kiselinom kao katalizatorom nastaje više toksičnih spojeva nego što nastaje istim postupkom s 0,5 % sumpornom kiselinom koji zajedno izazivaju inhibitorni učinak na rast bakterija što je detaljnije objašnjeno u Poglavlju 2.3. Zbog prevelike koncentracije toksičnih spojeva nastalih predobradom lignoceluloznih sirovina u visokotlačnom reaktoru s 1,0 %-tnom sumpornom kiselinom kao katalizatorom koji se nalaze u hidrolizatu kukuruzovine ($\gamma_{\text{furan}} = 1,38 \text{ g L}^{-1}$; $\gamma_{\text{evulinska kis}} = 7,23 \text{ g L}^{-1}$; $\gamma_{\text{HAc}} = 2,32 \text{ g L}^{-1}$; $\gamma_{\text{formijat}} = 4,68 \text{ g L}^{-1}$), hidrolizatu kukuruznih oklasaka ($\gamma_{\text{furan}} = 1,03 \text{ g L}^{-1}$; $\gamma_{\text{evulinska kis}} = 6,24 \text{ g L}^{-1}$; $\gamma_{\text{HAc}} = 2,19 \text{ g L}^{-1}$; $\gamma_{\text{formijat}} = 4,15 \text{ g L}^{-1}$) i hidrolizatu pšenične slame ($\gamma_{\text{furan}} = 1,78 \text{ g L}^{-1}$; $\gamma_{\text{evulinska kis}} = 2,69 \text{ g L}^{-1}$; $\gamma_{\text{HAc}} = 1,26 \text{ g L}^{-1}$; $\gamma_{\text{formijat}} = 3,40 \text{ g L}^{-1}$), bakterija *L. amylovorus* DSM 20531^T ne može rasti ni na jednom od navedenih hidrolizata lignoceluloznih sirovina.



Slika 14. Promjene koncentracije glukoze (γ_{glc} , □), ksiloze (γ_{ksi} , ■), arabinoze (γ_{arab} , ■), mliječne (γ_{MK} , ○) i octene kiseline (γ_{OK} , ●) tijekom uzgoja bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T na hidrolizatu kukuruzovine.



Slika 15. Promjene koncentracije glukoze (γ_{glc} , □), ksiloze (γ_{ksi} , ■), arabinoze (γ_{arab} , ■), mliječne (γ_{MK} , ○) i octene kiseline (γ_{OK} , ●) tijekom uzgoja bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T na hidrolizatu kukuruznih oklasaka.



Slika 16. Promjene koncentracije glukoze (γ_{glc} , \square), ksiloze (γ_{ksi} , \blacksquare), arabinoze (γ_{arab} , \blacksquare), mliječne (γ_{MK} , \circ) i octene kiseline (γ_{OK} , \bullet) tijekom uzgoja bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T na hidrolizatu pšenične slame.

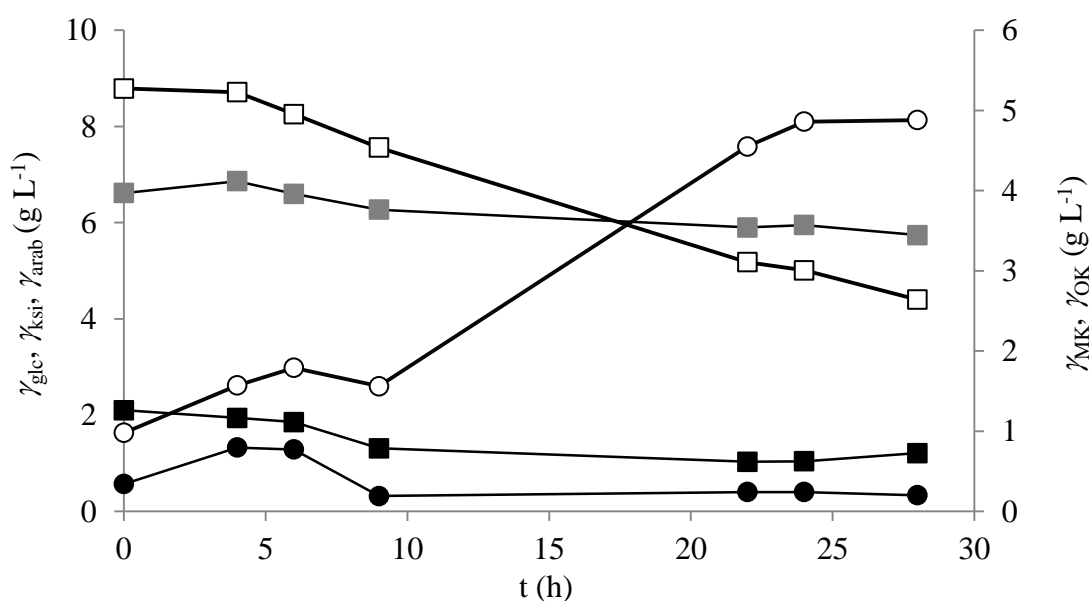
4.3. Uzgoj bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T i proizvodnja mliječne kiseline na lignoceluloznim hidrolizatima u horizontalnom rotirajućem bioreaktoru (HRCB) šaržnim postupkom

U ovom poglavlju su prikazani rezultati dobiveni tijekom uzgoja bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T i proizvodnje mliječne kiseline u podlogama pripremljenim od hidrolizata kukuruzovine i hidrolizata pšenične slame koji su dobiveni predobradom u visokotlačnom reaktoru s 0,5 % sumpornom kiselinom kao katalizatorom.

Nakon provedenog uzgoja bakterija *L. amylovorus* DSM 20531^T i *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T i proizvodnje mliječne kiseline na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina dobivenih predobradom u visokotlačnom reaktoru s 0,5% sumpornom kiselinom kao katalizatorom u Erlenmeyer tikvicama, za daljnje istraživanje odabrani su hidrolizati kukuruzovine i pšenične slame i bakterija *L. amylovorus* DSM 20531^T na kojima je postignut najveći prinos mliječne kiseline pomoću ove bakterije (Tablica 11; Poglavlje 4.2.1.). Fermentacije su provedene na sobnoj temperaturi i bez regulacije pH vrijednosti podloge u HRCB-u šaržnim postupkom uz intervalno miješanje ($t_{\text{ROTACIJE}} = 12 \text{ min}$ ($n = 10 \text{ min}^{-1}$); $t_{\text{MIROVANJA}} = 48 \text{ min}$). U Poglavljima 4.3.1. i 4.3.2. su prikazani rezultati uzgoja bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T na pšeničnoj slami i kukuruzovini.

4.3.1. Uzgoj bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T i proizvodnja mliječne kiseline na hidrolizatu pšenične slame dobivenom nakon predobrade u visokotlačnom reaktoru s 0,5 % sumpornom kiselinom kao katalizatorom

U ovom poglavlju su prikazani su rezultati dobiveni tijekom uzgoja bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T na hidrolizatu pšenične slame (Slika 17), a kinetički parametri potrošnje supstrata i proizvodnje mliječne kiseline prikazani su u Tablici 12.



Slika 17. Promjene koncentracije glukoze (γ_{glc} , \square), ksiloze (γ_{ksi} , \blacksquare), arabinoze (γ_{arab} , \blacksquare), mliječne (γ_{MK} , \circ) i octene kiseline (γ_{OK} , \bullet) tijekom uzgoja bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T na hidrolizatu pšenične slame u HRCB-u šaržnim postupkom pri sobnoj temperaturi i bez regulacije pH vrijednosti.

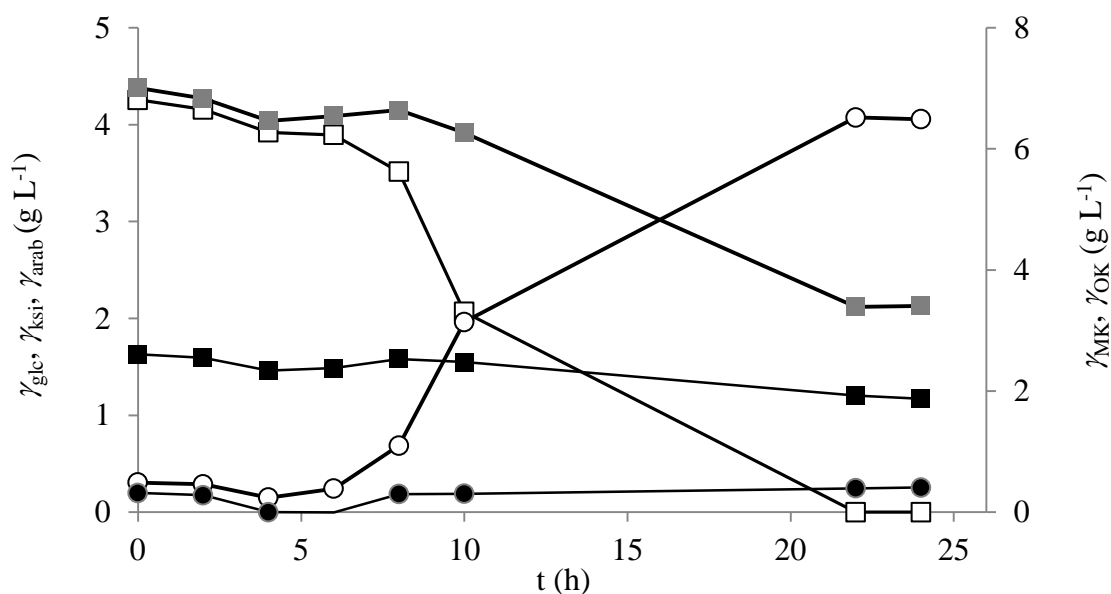
Tablica 12. Pokazatelji uspješnosti bioprocesa dobiveni tijekom uzgoja bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T na hidrolizatu pšenične slame u HRCB-u šaržnim postupkom na sobnoj temperaturi i bez regulacije pH vrijednosti.

t_{UZ}	r_{glc}	r_{ksi}	r_{arab}	r_{MK}	γ_{MKm}	$Y_{P/S}$	Pr_{MK}
(h)	(h ⁻¹)	(h ⁻¹)	(h ⁻¹)	(h ⁻¹)	(g L ⁻¹)	(g g ⁻¹)	(g L ⁻¹ h ⁻¹)
28	0,03	0,01	0,03	0,06	4,88	0,63	0,10

Bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T raste na hidrolizatu slame i u HRCB-u. Uzgoj je proveden tijekom 28 sati na sobnoj temperaturi bez regulacije pH vrijednosti. Nakon duge lag faze koja je trajala oko 10 sati, bakterija je ušla u usporenu fazu rasta koja je trajala oko 15 sati i na kraju koje je postignuta maksimalna koncentracija mliječne kiseline ($t = 24$ sata, $\gamma_{MKm} = 4,88$ g L⁻¹; Tablica 12). Brzina potrošnje glukoze je bila gotovo linearna ($r_{glc} = 0,03$ h⁻¹) tijekom uzgoja, ali nije potpuno utrošena ($t = 28$ sata, $\gamma_{glc} = 4,40$ g L⁻¹). Tijekom uzgoja zabilježene su male promjene koncentracija ksiloze i arabinoze ($\Delta\gamma_{ksi} = 0,88$ g L⁻¹, $\Delta\gamma_{arab} = 0,89$ g L⁻¹) tijekom bioprocesa (Slika 17). Osim mliječne kiseline praćena je i koncentracija octene kiseline (γ_{OK}) za koju je zabilježen porast koncentracije do četvrtog sata ($\gamma_{OK} = 0,80$ g L⁻¹), koja se do sedmog sata zadržala na istoj koncentraciji. Nakon sedmog sata koncentracija octene kiseline je pala na 0,19 g L⁻¹ i na toj koncentraciji ostala do kraja procesa. Osim mliječne i octene kiseline, HPLC metodom je praćena promjena levulinske kiseline, koja se nije mijenjala tijekom uzgoja (rezultati nisu prikazani), dok drugi proizvodi nisu zabilježeni. Uzgojem bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T na hidrolizatu slame u HRCB-u proizvedeno je 23 % manje mliječne kiseline ($\gamma_{MK-HRCB} = 4,88$ g L⁻¹) u odnosu na uzgoj ove bakterije u Erlenmeyer tikvici na hidrolizatu pšenične slame dobivenom pri istim uvjetima ($\gamma_{MK-Erlenmeyer\ tikvica} = 6,30$ g L⁻¹; Tablica 11).

4.3.2. Uzgoj bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T i proizvodnja mliječne kiseline na hidrolizatu kukuruzovine dobivenom nakon predobrade u visokotlačnom reaktoru s 0,5 % sumpornom kiselinom kao katalizatorom

Provedena je i proizvodnja mliječne kiseline sa bakterijom *L. amylovorus* DSM 20531^T na hidrolizatu kukuruzovine u HRCB-u. Rezultati uzgoja prikazani su Slikom 18, a kinetički parametri uzgoja Tablicom 13. Uzgoj je proveden pri istim uvjetima koji su prethodno opisani u Poglavlju 4.3.



Slika 18. Promjene koncentracije glukoze (γ_{glc} , □), ksiloze (γ_{ksi} , ■), arabinoze (γ_{arab} , ■), mliječne (γ_{MK} , ○) i octene kiseline (γ_{OK} , ●) tijekom uzgoja bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T na hidrolizatu kukuruzovine u HRCB-u šaržnim postupkom pri sobnoj temperaturi i bez regulacije pH vrijednosti.

Tablica 13. Pokazatelji uspješnosti bioprocasa dobiveni tijekom uzgoja bakterija *L. amylovorus* DSM 20531^T na hidrolizatu kukuruzovine u HRCB-u šaržnim postupkom pri sobnoj temperaturi i bez regulacije pH vrijednosti.

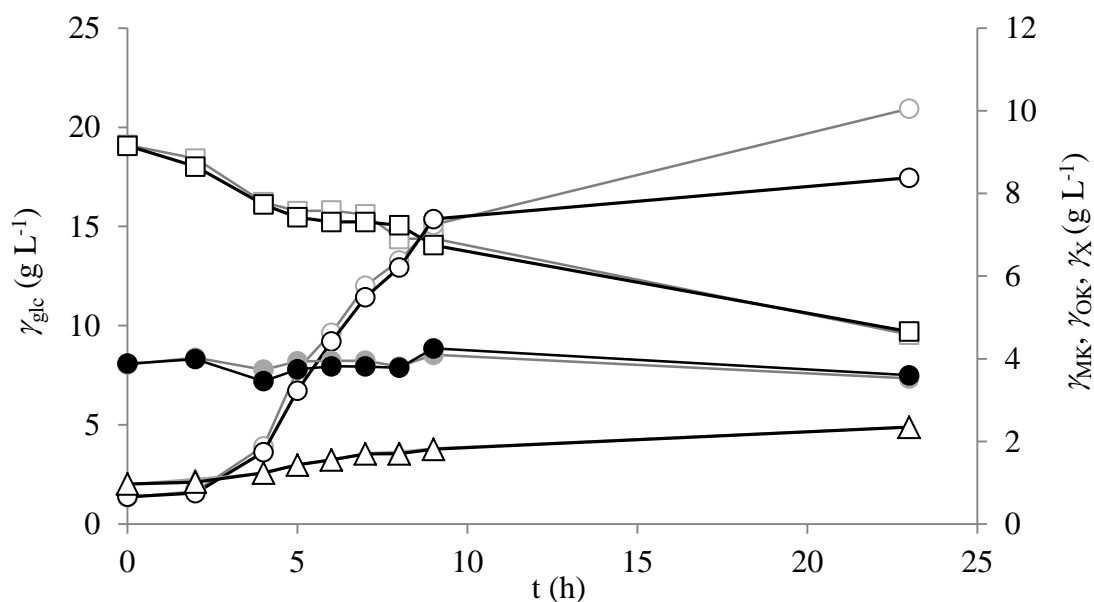
t_{UZ}	r_{glc}	r_{ksi}	r_{arab}	r_{MK}	γ_{MKm}	$Y_{P/S}$	Pr_{MK}
(h)	(h ⁻¹)	(h ⁻¹)	(h ⁻¹)	(h ⁻¹)	(g L ⁻¹)	(g g ⁻¹)	(g L ⁻¹ h ⁻¹)
24	0,16	0,05	0,00	0,44	6,52	1,41	0,27

Uzgoj bakterije i proizvodnja mliječne kiseline *L. amylovorus* DSM 20531^T na hidrolizatu kukuruzovine u HRCB-u trajao je 24 sata. Nakon lag faze koja je trajala oko šest sati bakterija je ušla u eksponencijalnu fazu rasta na kraju koje je postignuta maksimalna koncentracija mliječne kiseline ($\gamma_{MKm} = 6,52 \text{ g L}^{-1}$) uz brzinu proizvodnje mliječne kiseline od $0,44 \text{ h}^{-1}$. Tijekom procesa zabilježena je brzina potrošnje glukoze (r_{glc}) od $0,16 \text{ h}^{-1}$ koja je potpuno utrošena u 22. satu, za razliku od uzgoja bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T na hidrolizatu pšenične slame u HRCB-u u kojem glukoza nije potpuno utrošena tijekom bioprocasa ($t = 28$ sati, $\gamma_{glc} = 4,40 \text{ g L}^{-1}$; Slika 17). Praćene su promjene koncentracija ksiloze i arabinoze, od kojih je zabilježen značajni utrošak ksiloze ($\Delta\gamma_{ksi} = 2,25 \text{ g L}^{-1}$, $r_{ksi} = 0,05 \text{ h}^{-1}$) u odnosu na uzgoj ove bakterije na hidrolizatu pšenične slame u HRCB-u ($\Delta\gamma_{ksi} = 0,88 \text{ g L}^{-1}$, $r_{ksi} = 0,01 \text{ h}^{-1}$; Poglavlje 4.3.1.), a zabilježena je i mala promjena koncentracije arabinoze ($\Delta\gamma_{arab} = 0,46 \text{ g L}^{-1}$) tijekom cijelog uzgoja. Osim mliječne kiseline praćena je i promjena koncentracije octene kiseline (γ_{OK}) za koja se nije mijenjala tijekom cijelog procesa. Osim mliječne i octene kiseline, praćena je i promjena levulinske kiseline, koja se nije mijenjala kao ni u uzgoju bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T na hidrolizatu pšenične slame, dok drugi proizvodi nisu zabilježeni. U usporedbi s rezultatima dobivenim uzgojem bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T na hidrolizatu kukuruzovine u Erlenmeyer tikvici (Poglavlje 4.2.1) vidljivo da je uzgojem u HRCB-u postignuta 5 % veća koncentracija mliječne kiseline ($\gamma_{MK-HRCB} = 6,52 \text{ g L}^{-1}$; $\gamma_{MK-Erlenmeyer tikvica} = 6,17 \text{ g L}^{-1}$), dok su vrijednosti Pr_{MK} bile gotovo identične ($0,26-0,27 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). U odnosu na uzgoj *L. amylovorus* DSM 20531^T na hidrolizatu pšenične slame u HRCB-u (Poglavlje 4.3.1.), ovim je uzgojem proizvedeno 25 % više mliječne kiseline uz gotovo tri puta veću produktivnost proizvodnje mliječne kiseline nego tijekom uzgoja na hidrolizatu pšenične slame (Tablica 12).

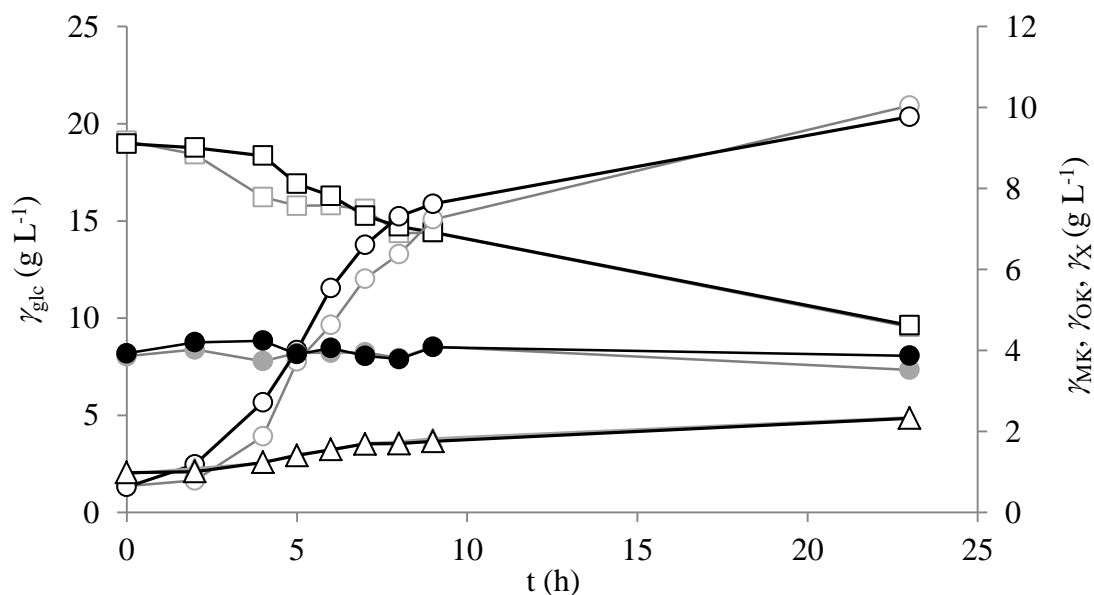
4.4. Određivanje utjecaja furfurala na rast i aktivnost bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T i na proizvodnju mliječne kiseline u hranjivoj MRS podlozi bez regulacije pH vrijednosti u Erlenmeyer tikvicama

Tijekom postupka predobrade lignoceluloznih sirovina, osim fermentabilnih ugljikohidrata nastaju i spojevi koji imaju inhibitorski učinak na rast i aktivnost mikroorganizama. Toksični spojevi koji nastaju su furani, fenolni spojevi i slabe organske kiseline (Boguta i sur., 2014). Određivanje utjecaja furana (furfurala i hidroksimetilfurfurala) na rast i aktivnost mikroorganizama može se koristiti kao indikator za predviđanje inhibicije drugih spojeva. Stoga su u ovom poglavlju prikazani rezultati dobiveni tijekom uzgoja bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T u hranjivoj MRS-glc₂₀ podlozi u koje je dodan furfural u različitim koncentracijama.

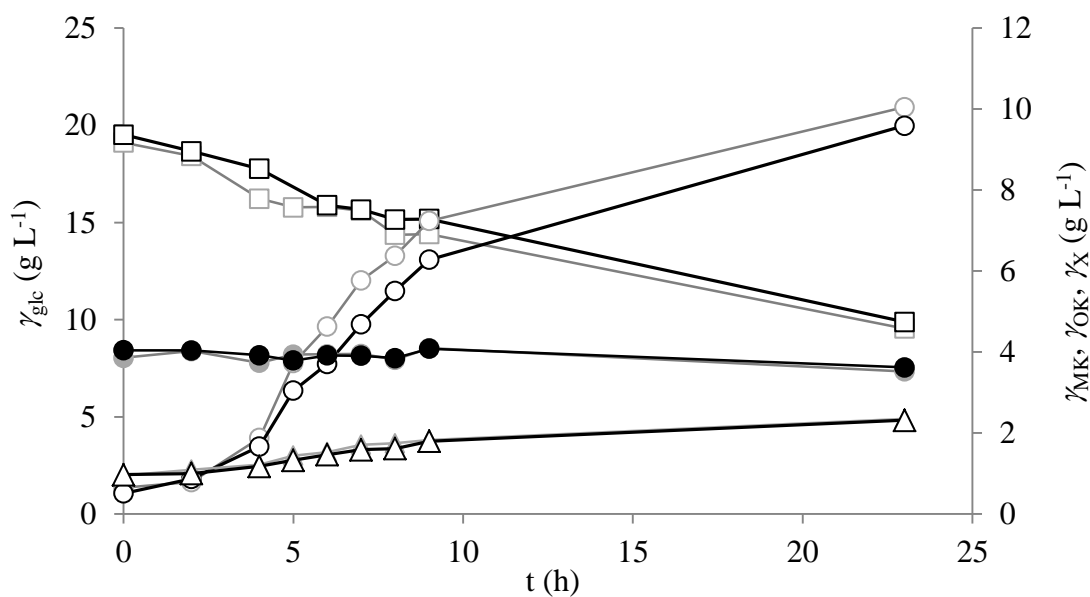
Rezultati uzgoja u hranjivoj MRS podlozi bez dodatka furfurala i u hranjivim MRS podlogama u koje su dodane različite koncentracije furfurala ($\gamma_{\text{furfural}} = 100, 500, 1000, 2000, 3000, 4000$ i 5000 mg L^{-1}), prikazani su Slikama 19-25. Na Slikama 19-25 sivo su odgovarajućim simbolima označene vrijednosti za uzgoj bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T u MRS podlozi (bez dodatka furfurala) koja je služila kao kontrola. Sve fermentacije su provedene pri 40 °C i bez regulacije pH vrijednosti podloge na magnetnoj mješalici ($n = 150 \text{ min}^{-1}$, Cimarec iTM Poly15, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). U Tablicama 14 i 15 prikazani su kinetički parametri potrošnje supstrata, brzine rasta biomase i proizvodnje mliječne kiseline.



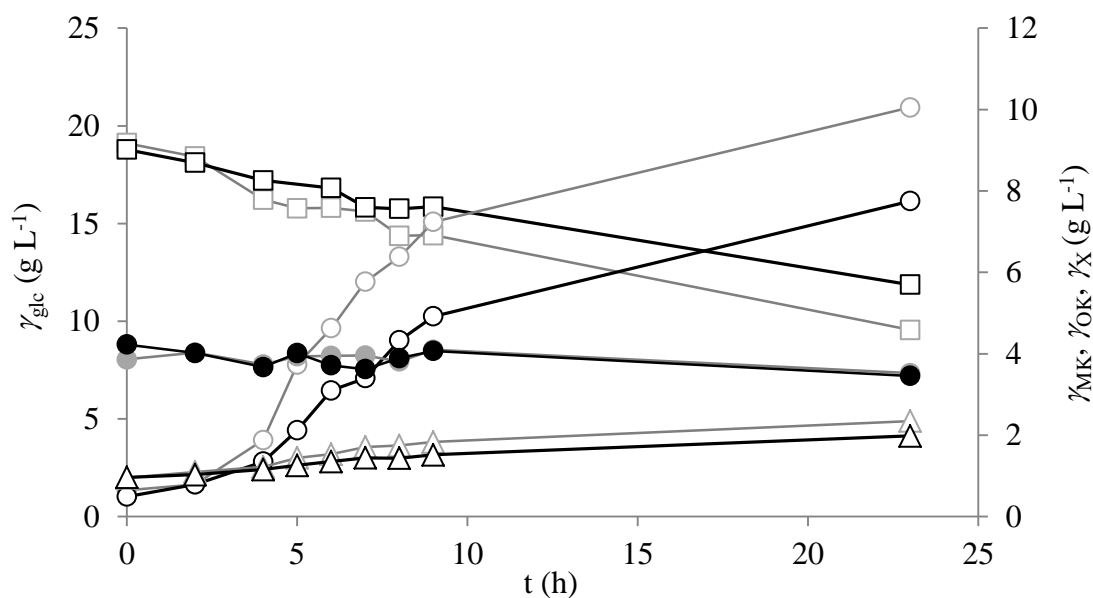
Slika 19. Promjene koncentracije glukoze (γ_{glc} , \square), suhe tvari bakterijske biomase (γ_{x} , \triangle), mliječne kiseline (γ_{MK} , \circ) i octene kiseline (γ_{OK} , \bullet) tijekom uzgoja bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T u hranjivoj MRS podlozi uz dodatak furfurala ($\gamma_{\text{furfural}} = 100 \text{ mg L}^{-1}$).



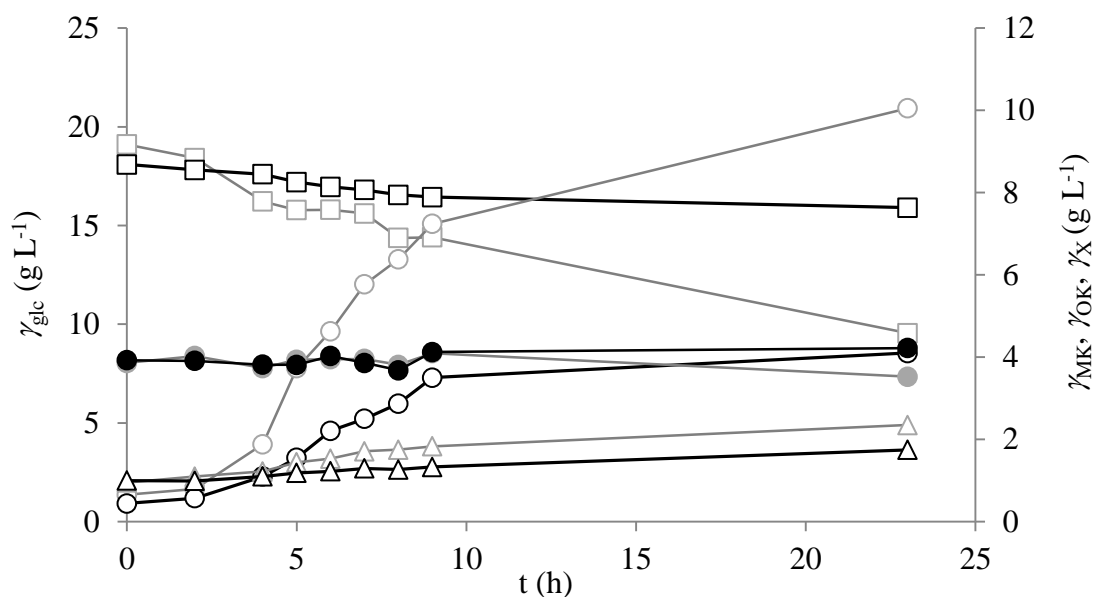
Slika 20. Promjene koncentracije glukoze (γ_{glc} , \square), suhe tvari bakterijske biomase (γ_{x} , \triangle), mliječne kiseline (γ_{MK} , \circ) i octene kiseline (γ_{OK} , \bullet) tijekom uzgoja bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T u hranjivoj MRS podlozi uz dodatak furfurala ($\gamma_{\text{furfural}} = 500 \text{ mg L}^{-1}$).



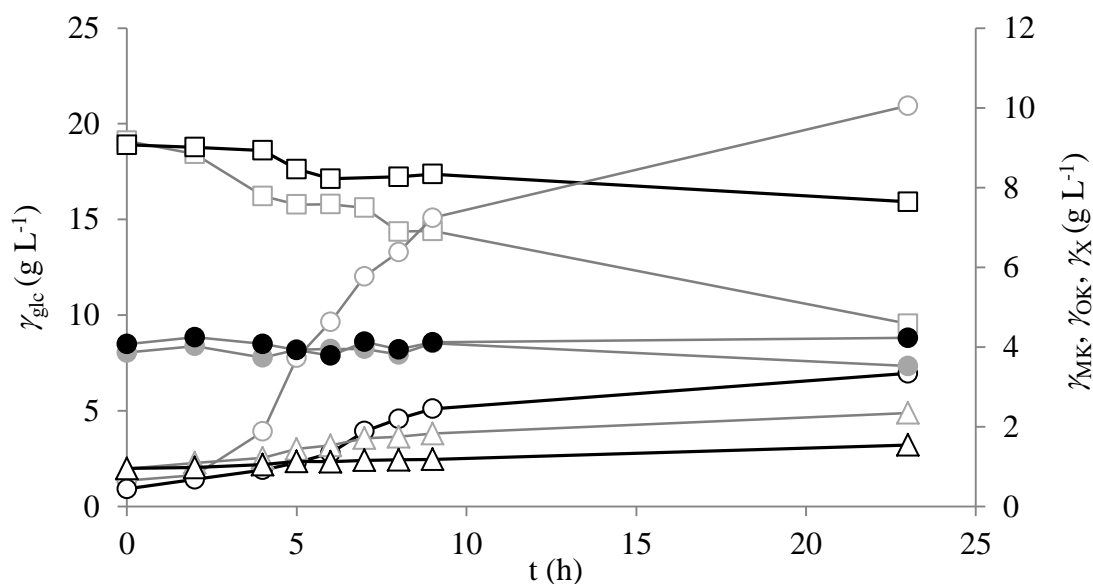
Slika 21. Promjene koncentracije glukoze (γ_{glc} , \square), suhe tvari bakterijske biomase (γ_{X} , \triangle), mliječne kiseline (γ_{MK} , \circ) i octene kiseline (γ_{OK} , \bullet) tijekom uzgoja bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T u hranjivoj MRS podlozi uz dodatak furfurala ($\gamma_{\text{furfural}} = 1000 \text{ mg L}^{-1}$).



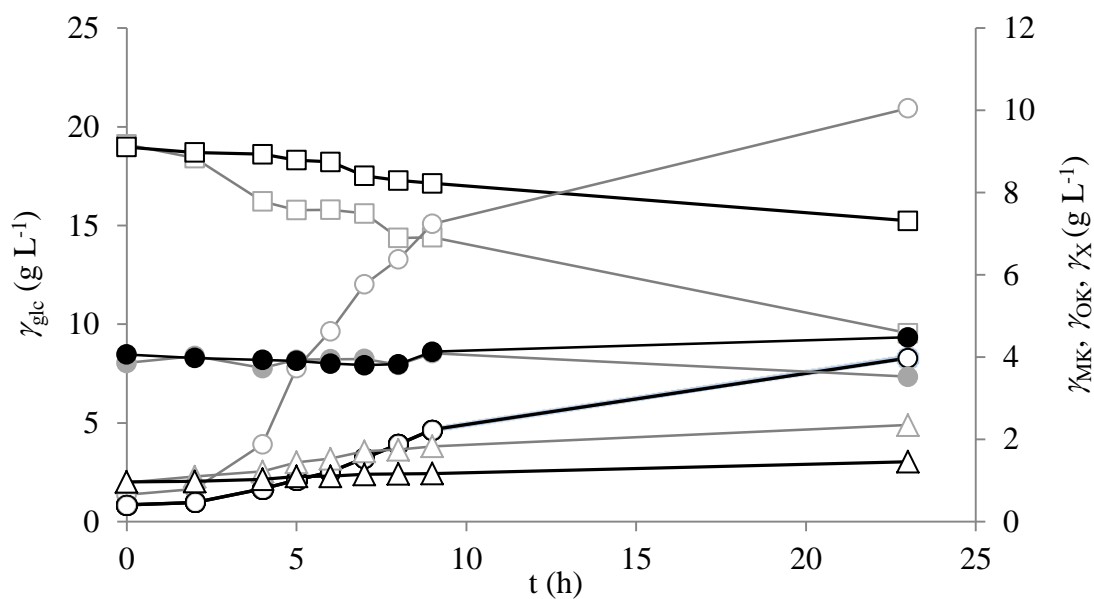
Slika 22. Promjene koncentracije glukoze (γ_{glc} , \square), suhe tvari bakterijske biomase (γ_{X} , \triangle), mliječne kiseline (γ_{MK} , \circ) i octene kiseline (γ_{OK} , \bullet) tijekom uzgoja bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T u hranjivoj MRS podlozi uz dodatak furfurala ($\gamma_{\text{furfural}} = 2000 \text{ mg L}^{-1}$).



Slika 23. Promjene koncentracije glukoze (γ_{glc} , \square), suhe tvari bakterijske biomase (γ_X , \triangle), mliječne kiseline (γ_{MK} , \circ) i octene kiseline (γ_{OK} , \bullet) tijekom uzgoja bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T u hranjivoj MRS podlozi uz dodatak furfurala ($\gamma_{\text{furfural}} = 3000 \text{ mg L}^{-1}$).



Slika 24. Promjene koncentracije glukoze (γ_{glc} , \square), suhe tvari bakterijske biomase (γ_X , \triangle), mliječne kiseline (γ_{MK} , \circ) i octene kiseline (γ_{OK} , \bullet) tijekom uzgoja bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T u hranjivoj MRS podlozi uz dodatak furfurala ($\gamma_{\text{furfural}} = 4000 \text{ mg L}^{-1}$).



Slika 25. Promjene koncentracije glukoze (γ_{glc} , \square), suhe tvari bakterijske biomase (γ_X , \triangle), mliječne kiseline (γ_{MK} , \circ) i octene kiseline (γ_{OK} , \bullet) tijekom uzgoja bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T u hranjivoj MRS podlozi uz dodatak furfurala ($\gamma_{furfural} = 5000 \text{ mg L}^{-1}$).

Tablica 14. Pokazatelji uspješnosti rasta biomase dobiveni tijekom uzgoja bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T u hranjivim MRS podlogama sa i bez dodatka furfurala pri 40 °C i bez regulacije pH vrijednosti.

γ_{furfural} (mg L ⁻¹)	Rast bakterije <i>L. amylovorus</i> DSM 20531 ^T						
	$t_{\text{FAZE RASTA}}$ (h)		r_{glc}	μ_{m}	γ_{Xm}	$Y_{\text{X/S}}$	Pr_{X}
	lag	eksp	(h ⁻¹)	(g L ⁻¹)	(h ⁻¹)	(g g ⁻¹)	(g L ⁻¹ h ⁻¹)
0	2	5	0,03	0,11	2,35	0,15	0,06
100	2	5	0,03	0,11	2,35	0,15	0,06
500	2	5	0,03	0,11	2,33	0,13	0,06
1000	2	5	0,03	0,10	2,32	0,14	0,06
2000	2	5	0,02	0,07	1,98	0,13	0,04
3000	3	4	0,01	0,05	1,75	0,17	0,03
4000	3	4	0,01	0,03	1,54	0,20	0,03
5000	3	4	0,01	0,03	1,46	0,13	0,02

Tablica 15. Pokazatelji uspješnosti proizvodnje mliječne kiseline dobiveni tijekom uzgoja bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T u hranjivim MRS podlogama sa i bez dodatka furfurala pri 40 °C i bez podešavanja pH vrijednosti.

Proizvodnja mliječne kiseline					
γ_{furfural} (mg L ⁻¹)	r_{MK} (h ⁻¹)	γ_{MK_m} (g L ⁻¹)	$Y_{\text{P/S}}$ (g g ⁻¹)	$Y_{\text{P/X}}$ (g g ⁻¹)	Pr_{MK} (g L ⁻¹ h ⁻¹)
0	0,46	10,05	0,98	6,71	0,40
100	0,33	9,38	0,93	6,36	0,37
500	0,28	9,77	0,88	6,82	0,38
1000	0,25	9,59	0,93	6,64	0,37
2000	0,25	7,74	0,92	7,11	0,29
3000	0,22	4,10	0,85	4,88	0,13
4000	0,20	3,34	0,98	4,97	0,10
5000	0,20	3,98	0,95	7,08	0,13

Boguta i sur. (2014) istraživali su utjecaj furfurala ($\gamma_{\text{furfural}} = 3500\text{-}15000$ mg L⁻¹) i hidroksimetilfurfurala (HMF; $\gamma_{\text{HMF}} = 5900\text{-}10000$ mg L⁻¹) na različite vrste bakterija iz roda *Lactobacillus*. Utjecaj furfurala na rast bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T nije istraživani. Sojevi *Lactobacillus pentosus* LMG 19215 i *Lactobacillus brevis* LMG 17673 mogu rasti pri koncentraciji furfurala od 15000 mg L⁻¹, dok većina drugih ispitivanih sojeva nije tolerirala koncentraciju furfurala veću od 7000 mg L⁻¹. Također, određen je i utjecaj HMF-a koji ima potpuni inhibitory učinak pri koncentraciji od 5900 mg L⁻¹ na većinu ispitivanih sojeva iz roda *Lactobacillus*, osim na *Lactobacillus pentosus* LMG 19215, *L. brevis* LMG 17673 i *L. plantarum* KOG 8 koji mogu rasti i pri koncentraciji HMF-a od 7300 mg L⁻¹ (Boguta i sur., 2014).

Bakterija *L. amylovorus* DSM 20531^T raste u MRS podlozi u koje je dodan furfural u rasponu koncentracija od 0-5000 mg L⁻¹. Maksimalna koncentracija biomase (γ_{Xm}) određena nakon 24 sata uzgoja u podlogama u kojima je furfural dodan u koncentraciji od 0 do 1000 mg L⁻¹ iznosila je od 2,32 do 2,35 g L⁻¹. Porastom koncentracije furfurala iznad 1000 mg L⁻¹ opada i koncentracija biomase ($\gamma_{Xm,2000} = 1,98$ g L⁻¹, $\gamma_{Xm,5000} = 1,46$ g L⁻¹). Slično tome, tijekom uzgoja bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T u modificiranim MRS podlogama u kojima je furfural dodan u podlogu u koncentracijama od 100 do 1000 mg L⁻¹ gotovo da i nema utjecaja furfurala na specifičnu brzinu rasta ($\mu_m = 0,10-0,11$ h⁻¹), u odnosu na μ_m koja je zabilježena u uzgoju ove bakterije na MRS podlozi bez dodatka furfurala i iznosila je 0,11 h⁻¹.

Brzina potrošnje supstrata (r_{glc}) i produktivnost rasta bakterijske biomase (Pr_X) tijekom uzgoja u prethodno navedenim podlogama je bila vrlo slična ($r_{glc} = 0,3$ h⁻¹, $Pr_X = 0,06$ g L⁻¹ h⁻¹; Tablica 14). Pri koncentracijama furfurala većim od 1000 mg L⁻¹ dolazi do značajnog smanjenja maksimalne specifične brzine rasta koja je već pri koncentraciji furfurala od 2000 mg L⁻¹ iznosila 0,07 h⁻¹ i nastavlja se smanjivati sve do koncentracije furfurala od 5000 mg L⁻¹ ($\mu_m = 0,03$ h⁻¹). Zabilježeno je i smanjenje r_{glc} i Pr_X pri koncentraciji furfurala od 2000 mg L⁻¹ ($r_{glc} = 0,02$ h⁻¹, $Pr_X = 0,16$ g L⁻¹ h⁻¹). Tijekom uzgoja ove bakterije u modificiranim MRS podlogama pri koncentracijama furfurala od 3000 do 5000 mg L⁻¹ zabilježena je minimalna brzina potrošnje glukoze ($r_{glc} = 0,01$ h⁻¹). Brzina proizvodnje mliječne kiseline (r_{MK}) pomoću bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T u MRS podlozi iznosila je 0,46 h⁻¹. Inhibicijski utjecaj furfurala na brzinu proizvodnje mliječne kiseline uočen je već pri koncentraciji furfurala od 100 mg L⁻¹ i pri ovoj koncentraciji r_{MK} je smanjena za oko 28 % u odnosu na r_{MK} određenu tijekom uzgoja bakterije u MRS podlozi bez dodatka furfurala ($r_{MK} = 0,33$ h⁻¹). Pri koncentraciji furfurala od 5000 mg L⁻¹, r_{MK} je smanjena za 56 % i iznosila je 0,20 h⁻¹. Produktivnost proizvodnje mliječne kiseline (Pr_{MK}) pri koncentracijama furfurala od 0 do 1000 mg L⁻¹ kreće se u rasponu od 0,37 do 0,40 h⁻¹. Tako pri koncentraciji furfurala od 2000 mg L⁻¹ iznosi 0,29 g L⁻¹ h⁻¹, a pri koncentraciji furfurala od 5000 mg L⁻¹ dvostruko se smanjila (0,13 g L⁻¹ h⁻¹; Tablica 15).

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata opisanih u ovom radu može se zaključiti slijedeće:

1. Bakterija *L. amylovorus* DSM 20531^T i bakterija *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T rastu u modificiranoj MRS-glc₅-ksi₅-arab₁ podlozi. Bakterija *L. amylovorus* DSM 20531^T, uz brzinu proizvodnje mliječne kiseline (r_{MK}) od 0,52 h⁻¹, postigla je duplo veći prinos mliječne kiseline (γ_{MK}) i četiri puta veću produktivnost proizvodnje mliječne kiseline ($\gamma_{MK} = 7,11 \text{ g L}^{-1}$, $Pr_{MK} = 0,62 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) tijekom 10 sati uzgoja u odnosu na bakteriju *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T ($t_{UZ} = 18 \text{ h}$; $\gamma_{MK} = 3,37 \text{ g L}^{-1}$, $Pr_{MK} = 0,16 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$).
2. Bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T i *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T rastu na hidrolizatima kukuruzovine i pšenične slame dobivenih predobradom u visokotlačnom reaktoru s 0,5 % sumpornom kiselinom, a ne rastu na hidrolizatu kukuruznih oklasaka dobivenom istom predobradom. Maksimalni prinos mliječne kiseline (γ_{MKm}) bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T postignut je na hidrolizatu pšenične slame ($\gamma_{MKm} = 6,63 \text{ g L}^{-1}$, $Pr_{MK} = 0,28 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), a nešto manji prinos postignut je na hidrolizatu kukuruzovine ($\gamma_{MKm} = 6,17 \text{ g L}^{-1}$, $Pr_{MK} = 0,26 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Maksimalni prinos mliječne kiseline bakterije *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T postignut je na hidrolizatu kukuruzovine ($\gamma_{MKm} = 3,91 \text{ g L}^{-1}$, $Pr_{MK} = 0,16 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), a nešto manji prinos postignut je na hidrolizatu pšenične slame ($\gamma_{MKm} = 2,40 \text{ g L}^{-1}$, $Pr_{MK} = 0,10 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) tijekom istog vremena uzgoja.
3. Tijekom uzgoja bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T na podlogama koje su sadržavale hidrolizat kukuruzovine, kukuruznih oklasaka i pšenične slame, dobivenih predobradom u visokotlačnom reaktoru s 1,0 % sumpornom kiselinom nije zabilježen rast biomase odnosno proizvodnja mliječne kiseline.
4. Bakterija *L. amylovorus* DSM 20531^T raste u HRCB-u pri sobnoj temperaturi i bez regulacije pH vrijednosti na podlogama pripremljenim od hidrolizata kukuruzovine i pšenične slame dobivenih predobradom u visokotlačnom reaktoru s 0,5 % sumpornom kiselinom. Produktivnost proizvodnje mliječne kiseline (Pr_{MK}) na hidrolizatu

kukuruzovine i pšenične slame u HRCB-u iznosi $0,25 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ i $0,10 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, a maksimalni prinos mliječne kiseline $6,00 \text{ g L}^{-1}$, odnosno $4,88 \text{ g L}^{-1}$.

5. Bakterija *L. amylovorus* DSM 20531^T raste i proizvodi mliječnu kiselinu u modificiranoj MRS podlozi u koje je dodan furfural u rasponu koncentracija od 0-5000 mg L⁻¹. Pri koncentracijama furfurala višim od 1000 mg L⁻¹, u hranjivoj MRS podlozi dolazi do značajnije inhibicije rasta i smanjenja specifične brzine rasta bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T, dok je brzina proizvodnje mliječne kiseline smanjena već pri koncentraciji furfurala od 100 mg L⁻¹ za 28 % u odnosu na podlogu bez dodatka furfurala.

6. LITERATURA

Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., Sonomoto, K. (2011) Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits. *J. Biotechnol.* **156**, 286-301.

De Man, J. D., Rogosa, M., Sharpe, M. E. (1960) A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bact.* **23**, 130-135.

Demirbas, A. (2005) Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass. *Energ. Source.* **27**, 327-337.

Demirbas, A. (2008) Heavy metal adsorption onto agro-based waste materials: a review. *J. Hazard. Mater.* **157**, 220-229.

Funaoka, M. (1998) A new type of phenolic lignin-based network polymer with the structure-variable function composed of 1,1-Diarylpropane Units. *Poly. Int.* **47**, 277-290.

Govedarica, D. (2016) Predobrada kukuruznih oklasaka za proizvodnju bioetanol, Završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.

Guo, W., Jia, W., Li, Y., Chen, S. (2010) Performances of *Lactobacillus brevis* for producing lactic acid from hydrolysate od lignocellulosics. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **161**, 124-136.

Hansen, M. A. T., Kristensen, J. B., Felby, C., Jorgensen, H. (2011) Pretreatment and enzymatic hydrolysis of wheat straw (*Triticum aestivum* L.) – The impact of lignin relocation and plant tissues on enzymatic accessibility. *Biores. Technol.* **102**, 2804-2811.

Hofvendahl, K., Hahn-Hägerdal, B. (2000) Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme Microb. Technol.* **26**, 87-107.

Holladay, J. E., White, J. F., Bozell, J. J., Johnson, D. (2007) Top Value-Added Chemicals from Biomass–Volume II–Results of Screening for Potential Candidates from Biorefinery Lignin (No. PNNL-16983). Pacific Northwest National Laboratory (PNNL), Richland, Washington.

- Ivančić, I. (2016) Predobrada pšenične slame za proizvodnju bioetanol, Završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.
- Iyer, P. V., Thomas, S., Lee, Y. Y. (2000) High-yield fermentation of pentoses into lactic acid. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **84-86**, 665-677.
- Jiang, T., Qiao, H., Zheng, Z., Chu, Q., Li, X., Yong, Q., Ouyang, J. (2016) Lactic acid production from pretreated hydrolysates of corn stover by a newly developed *Bacillus coagulans* Strain. *PLoS ONE*, **11**(2), 1-13.
- John, R. P., Nampoothiri, K. M., Pandey, A. (2007) Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**, 524-534.
- Jonsson, J. L., Alriksson, B., Nilvebrant, N. (2013) Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnol. Biofuels*, **6**, 1-16.
- Kamide, K. (2005) Cellulose and cellulose derivatives molecular characterization and its applications, Elsevier, B.V., Amsterdam, str. 2.
- Kobayashi, H., Fukuoka, A. (2013) Synthesis and utilisation of sugar compounds derived from lignocellulosic biomass. *Green Chem.* **12**(9), 1481-1676.
- Kormin, S., Rusul, G., Radu, S., Hooi Ling, F. (2001) Bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from traditional fermented food. *Malays. J. Med. Sci.* **8**(1), 63-68.
- Kumar, R., Singh, S., Singh, O. V. (2008) Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 377-391.
- Lauder, A. (2016) Predobrada kukuruzovine za proizvodnju bioetanol, Završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.
- Lora, J. H., Glasser, W. G. (2002) Recent industrial applications of lignin: a sustainable alternative to nonrenewable materials. *J. Polym. Environ.* **10**, 39-48.

- Maas, R. H. W., Bakker, R. R., Jansen, M. L. A., Visser, D., de Jong, E., Eggink, G., Weusthuis R. A. (2008) Lactic acid production from lime-treated wheat straw by *Bacillus coagulans*: neutralization of acid by fed-batch addition of alkaline substrate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **78**(5), 751-758.
- Mäki-Arvela, P., Salmi, T., Holmbom, B., Willför, S., Murzin, D. Y. (2011) Synthesis of Sugars by Hydrolysis of Hemicelluloses—A Review. *Chem. Rev.* **111**(9), 5638-5666.
- Martinez, A., Rodriguez, M. E., York, S. W., Preston, J. F., Ingram, L. O. (2000) Use of UV Absorbance To Monitor Furans in Dilute Acid Hydrolysates of Biomass. *Biotechnol. Prog.* **16**, 637-641.
- Martinez, A. T., Speranza, M., Ruiz-Duenas, F. J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillen, F., Martinez, M. J., Gutierrez, A., del Rio, J. C. (2005) Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int. Microbiol.* **8**, 195-204.
- Miura, S., Dwiarti, L., Arimura, T., Hoshino, M., Tiejun, L., Okabe, M. (2004) Enhanced production of L-lactic acid by ammonia-tolerant mutant strain *Rhizopus* sp. MK-96-1196. *J. Biosci. Bioeng.* **97**(1), 19-23.
- Mussatto, S. I., Texeira, J. A. (2010) Lignocellulose as raw material in fermentation processes U: Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, 2 izd. (Mendez-Vilas, A., ured.), Formatex, Badajoz, Spain, str. 897-907.
- Nigam, J. N. (2001) Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *J. Biotechnol.* **87**, 17-27.
- Özcelik, S., Kuley, E., Özogul, F. (2016) Formation of lactic, acetic, succinic, propionic, formic and butyric acid by lactic acid bacteria. *LWT - Food Sci. Technol.* **73**, 536-542.
- Palmqvist, E., Hahn-Hagerdal, B. (2000a) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I : inhibition and detoxification. *Biores. Technol.* **74**, 17-24.
- Palmqvist, E., Hahn-Hagerdal, B. (2000b) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II : inhibition and detoxification. *Biores. Technol.* **74**, 25-33.

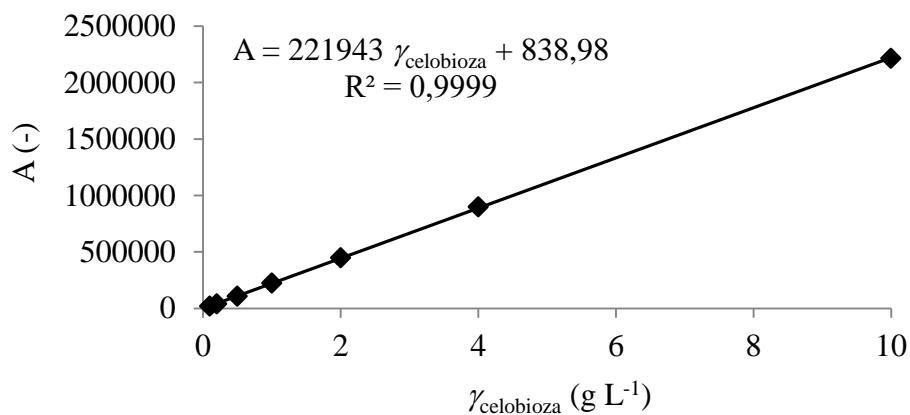
- Pandey, A., Soccol, R. C., Nigam, P., Soccol, T. V. (2000) Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Biores.Technol.* **74**, 69-80.
- Pointner, M., Kuttner, P., Obrlik, T., Jäger, A., Kahr, H. (2014) Composition of corncobs as a substrate for fermentation of biofuels. *Agron. Res.* **12**(2), 391–396.
- Rattanachaikunsopon, P. i Phumkhachorn, P. (2010) Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. *Annals Biol. Res.* **1**, 218-228.
- Saha, B. C., Nakamura, L. K. (2002) Production of mannitol and lactic acid by fermentation with *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693. *Biotechnol. Bioeng.* **82**(7), 864-871.
- Saini, K. J., Saini, R., Tewari, L. (2014) Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *3 Biotech.* **4**, 337-353.
- Slavica, A., Trontel, A., Jelovac, N., Kosovec, Ž. (2015) Production of lactate and acetate by *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T in comparison with *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T. *J. Biotechnol.* **202**, 50-59.
- Trontel, A., Baršić, V., Slavica, A., Šantek, B., Novak, S. (2010) Modelling the effect of different substrates and temperature on the growth and lactic acid production by *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T in batch process. *Food Technol. Biotechnol.* **48**(3), 352-361.
- Trontel, A., Batušić, A., Gusić, I., Slavica, A., Šantek, B., Novak, S. (2011a) Production of D- and L-lactic acid by mono- and mixed cultures of *Lactobacillus* sp. *Food Technol. Biotechnol.* **49**(1), 75-82.
- Wee, Y. J., Yun, J. S., Park, D. H., Ryu, H. W. (2004) Biotechnological production of L(+) lactic acid from wood hydrolyzate by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*. *Biotechnol. Lett.* **26**, 71-74.
- Weil, J., Westgate, P., Kohlman, K., Ladish, M. R. (1994) Cellulose pretreatment of lignocellulosic substrate. *Enzyme Microb. Technol.* **16**, 1002-1004.
- Zhang, Z. Y., Jin, B., & Kelly, J. M. (2007) Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus fungi*. *Biochem. Eng. J.* **35**(3), 251-263.

7. PRILOZI

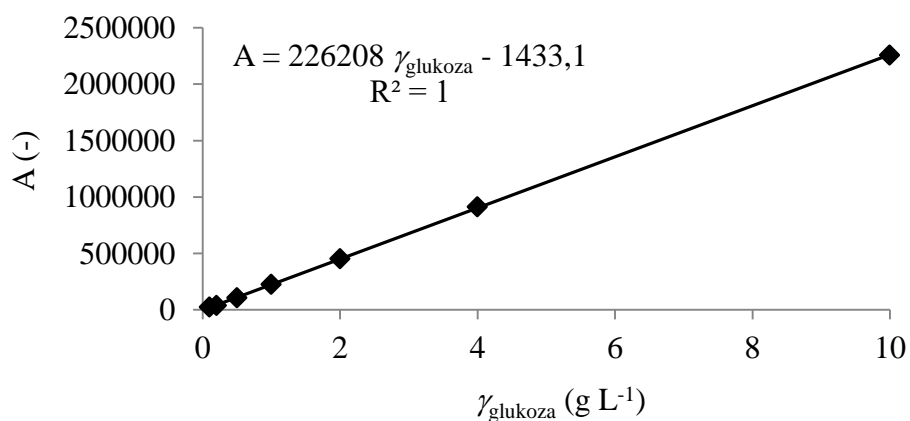
7.1. Popis kratica

Oznaka veličine	Veličina	Jedinica
$t_{\text{FAZA RASTA}}$	faze rasta tijekom uzgoja	[h]
lag	lag faza rasta	[h]
$eksp$	eksponencijalna faza rasta	[h]
t_{UZ}	ukupno vrijeme uzgoja	[h]
r_{gle}	brzina potrošnje glukoze	[h ⁻¹]
r_{ksi}	brzina potrošnje ksiloze	[h ⁻¹]
r_{arab}	brzina potrošnje arabinoze	[h ⁻¹]
μ_m	maksimalna specifična brzina rasta biomase	[h ⁻¹]
γ_{Xm}	maksimalna koncentracija biomase	[g L ⁻¹]
$Y_{\text{X/S}}$	koeficijent konverzije supstrata u biomasu	[g g ⁻¹]
Pr_{X}	produktivnost proizvodnje biomase	[g L ⁻¹ h ⁻¹]
r_{MK}	brzina proizvodnje mliječne kiseline	[h ⁻¹]
γ_{MKm}	maksimalna koncentracija mliječne kiseline	[g L ⁻¹]
$Y_{\text{P/S}}$	koeficijent konverzije glukoze u mliječnu kiselinu	[g g ⁻¹]
$Y_{\text{P/X}}$	odnos mase proizvedene mliječne kiseline i mase prirasle biomase	[g g ⁻¹]
Pr_{MK}	produktivnost proizvodnje mliječne kiseline	[g L ⁻¹ h ⁻¹]

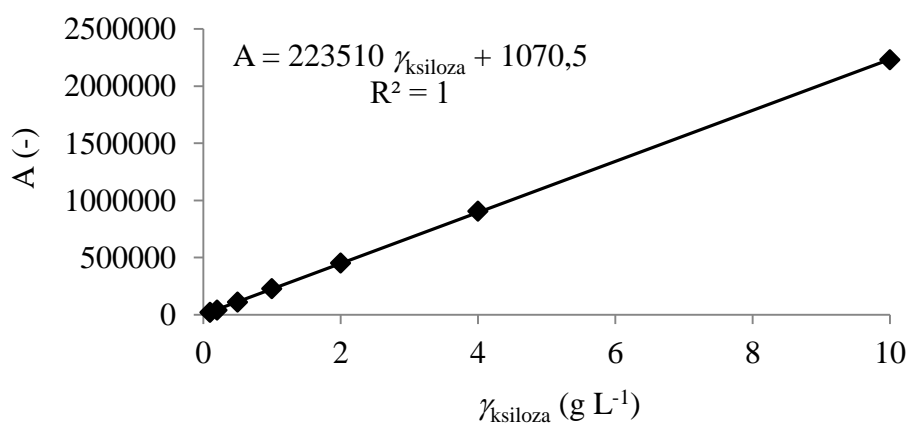
7.2. Baždarni dijagrami za određivanje koncentracije supstrata i proizvoda tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)



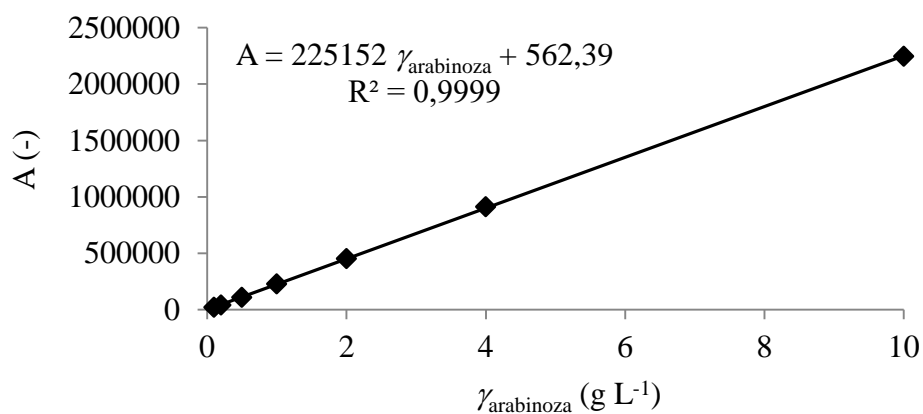
Slika 26. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije celobioze.



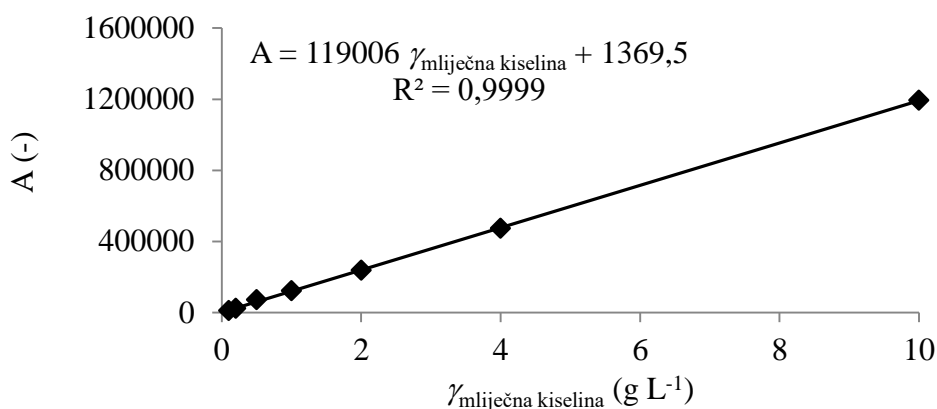
Slika 27. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije glukoze.



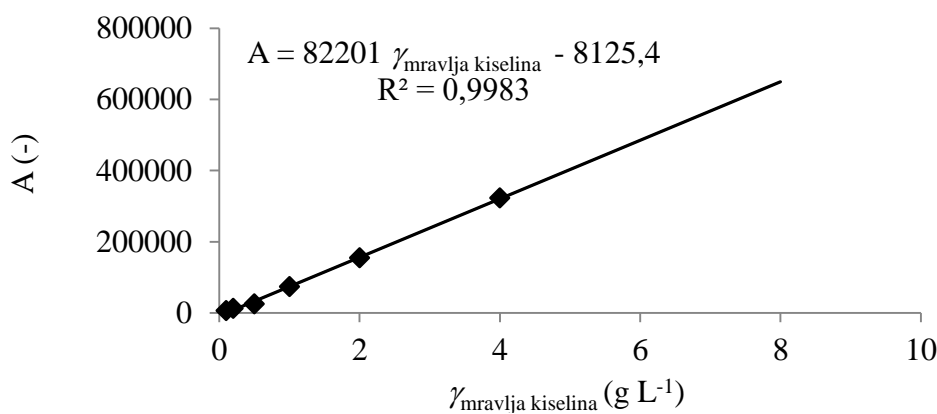
Slika 28. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije ksiloze.



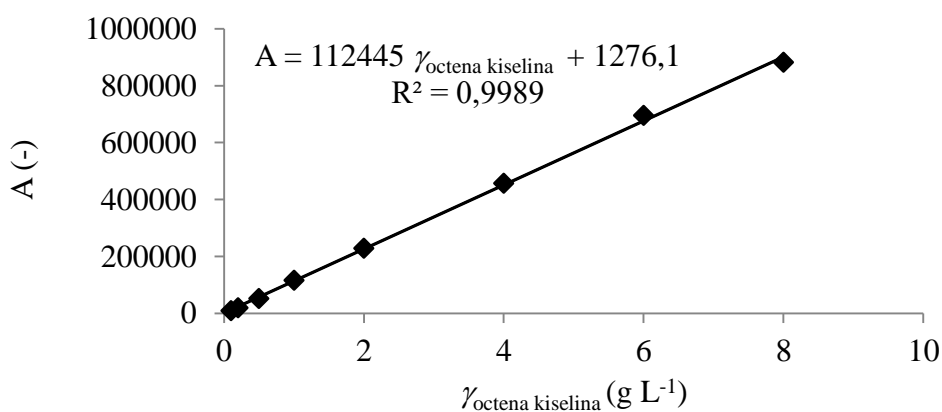
Slika 29. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije arabinoze.



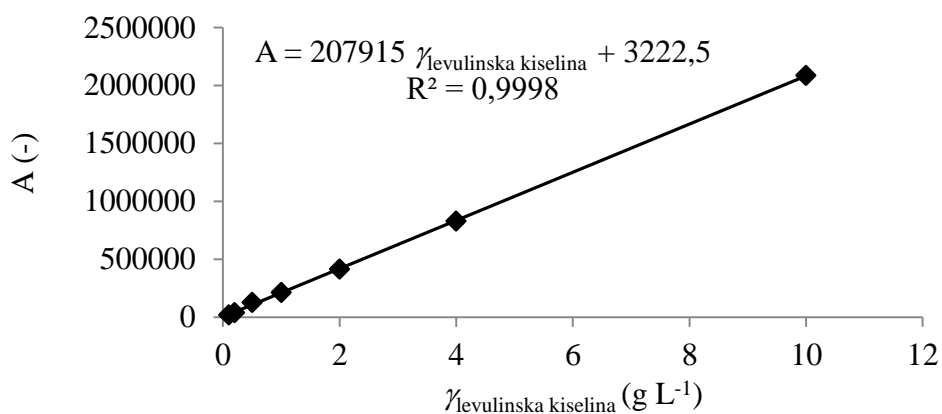
Slika 30. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije mliječne kiseline.



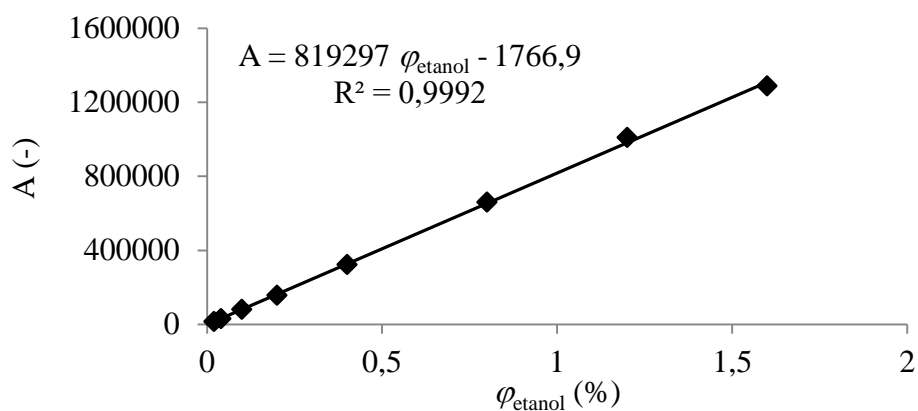
Slika 31. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije mravlje kiseline.



Slika 32. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije octene kiseline.



Slika 33. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije levulinske kiseline.



Slika 34. Baždarni dijagram za određivanje volumnog udjela etanola.