

Proizvodnja optički čiste mliječne kiseline s pomoću bakterije *Lactobacillus gasseri* JCM 1131T

Prah, Juliana Lana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:159:533816>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO–BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, veljača 2019.

Juliana Lana Prah
892/MB

**Proizvodnja optički čiste mliječne
kiseline s pomoću bakterije
Lactobacillus gasser JCM 1131^T**

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 doc. dr. sc. Antonije Trontel te uz pomoć asistenta Nenada Marđetka, mag. ing. bioproc.

Diplomski rad je izrađen u okviru HRZZ projekta "Održiva proizvodnja bioetanola i biokemikalija iz otpadnih poljoprivrednih lignoceluloznih sirovina" (SPECH-LRM; šifra projekta 9158) i HRZZ projekta „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“ (OPB-SLS; šifra projekta 9717).

ZAHVALA:

Ovom prilikom željela bih se najviše zahvaliti svojoj mentorici, doc. dr. sc. Antoniji Trontel bez koje ovo ne bi bilo moguće. Hvala joj na strpljenju, velikom razumijevanju, svoj pomoći i svim odgovorima na brojna pitanja kojima mi je omogućila pomicanje mog znanja i mogućnosti.

Veliko hvala i mag. ing. bioproc. Nenadu Marđetku koji je uvijek bio tu spreman za pomoć i podršku u trenucima kada mi je ona bila najpotrebnija.

Hvala i dr. sc. Bojanu Žunaru koji je konstruirao sojeve korištene u ovom radu i uvijek bio na raspolaganju za svu pomoć.

Hvala i tehničaru gospodinu Igoru Livadi na svom strpljenju, kojeg je ponekad stvarno trebalo imati. Hvala i svim ostalim djelatnicima Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva na uvijek dobrom raspoloženju i spremnosti na šalu te što su time uvelike uljepšali moje vrijeme provedeno u laboratoriju.

Hvala mojim kolegama iz Ljetne tvornice znanosti koji su proveli sa mnom velik dio mog studiranja i pokazali mi kako se trud i rad uvijek isplate i pružili mi mogućnost da svoje znanje iskoristim na malo drugačiji način.

Veliko hvala i mojim prijateljima za sve lijepe trenutke i stvaranje nezaboravnih uspomena za vrijeme studiranja. Naravno, hvala im i za svu pomoć i podršku koje su mi pružili tijekom svih ovih godina.

Najveće hvala mojoj majci na svom nesebičnom pružanju ljubavi, razumijevanja i podrške bez kojih ništa od ovog ne bi bilo moguće.

I na kraju, #samoljubav

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 OPTIČKI ČISTE MLIJEČNE KISELINE S POMOĆU BAKTERIJE

Lactobacillus gasserii JCM 1131^T

Juliana Lana Prah, 892/MB

Sažetak:

U ovom radu proveden je uzgoj divljeg tipa bakterije *Lactobacillus gasserii* JCM 1131^T koji proizvodi oba stereoizomera mliječne kiseline, L-(+)- i D-(-)-mliječnu kiselinu, u MRS podlozi s relativno niskom (20 g L^{-1}) i visokom početnom koncentracijom glukoze (80 g L^{-1}) kako bi se utvrdilo postoji li značajna inhibicija supstratom tijekom uzgoja šaržnim postupkom u bioreaktoru s miješalom. Zatim su provedeni uzgoji dva genetski modificirana soja ove bakterije koji mogu proizvoditi samo jedan stereoizomer mliječne kiseline, L-(+)-mliječnu kiselinu (*L. gasserii* Hi 41/3/2) i D-(-)-mliječnu kiselinu (*L. gasserii* Hi 26/13/10) u MRS podlozi (20 g L^{-1}). Izračunati osnovni biokinetički i procesni parametri korišteni su za određivanje uspješnosti provedenih bioprocesa te su dobivene vrijednosti uspoređene s vrijednostima dobivenim za divlji tip bakterije *L. gasserii* JCM 1131^T ($Pr_{P, \text{JCM 1131}^T} = 0,66 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$; $Pr_{P, \text{Hi 26/13/10}} = 0,66 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$; $Pr_{P, \text{Hi 41/3/2}} = 0,63 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Zatim su provedeni bioprocеси odvojene hidrolize alkalno predobrađene pšenične slame s celulazama i fermentacije dobivenih ugljikohidrata u modificiranoj MRS podlozi do mliječne kiseline s pomoću dva genetski modificirana soja bakterije *L. gasserii*, te je određena uspješnost procesa proizvodnje oba stereoizomera mliječne kiseline na hidrolizatu lignoceluloznih sirovina ($Pr_{P, \text{Hi 41/3/2}} = 0,83 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$; $Pr_{P, \text{Hi 26/13/10}} = 0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Ključne riječi: optički čista mliječna kiselina, *Lactobacillus gasserii*, predobrađena pšenična slama, enzimska hidroliza

Rad sadrži: 53 stranice, 24 slike, 13 tablica, 30 literaturnih referenci, 2 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc. dr. sc. Antonija Trontel

Pomoć pri izradi: Nenad Marđetko, mag. ing. bioproc.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Doc. dr. sc. Mario Novak
2. Doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc
3. Doc. dr. sc. Antonija Trontel
4. Izv. prof. dr. sc. Jasna Novak (zamjena)

Datum obrane: 28. veljače 2019. 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

PRODUCTION OF OPTICALLY PURE LACTIC ACID BY BACTERIUM *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T Juliana Lana Prah, 892/MB

Abstract:

Bacterium *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T that produces both lactic acid stereoisomers, L-(+)- and D-(-)-lactic acid, in MRS substrate with relatively low (20 g L^{-1}) and high initial glucose concentration (80 g L^{-1}) was used to determine whether there is significant substrate inhibition during batch processing in a stirred tank bioreactor. Afterwards, two genetically engineered strains of this bacterium that can produce only one lactic acid stereoisomer, L-(+)-lactic acid (*L. gasseri* Hi 41/3/2) and D-(-)-lactic acid (*L. gasseri* Hi 26/13/10) in MRS medium (20 g L^{-1}) were used for fermentation. Certain biokinetic and process parameters were calculated from obtained data and used to determine the efficiency of these bioprocesses and compared to the values obtained for the wild type *L. gasseri* bacterium ($Pr_{P, \text{JCM 1131}^T} = 0,66 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$; $Pr_{P, \text{Hi 26/13/10}} = 0,66 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$; $Pr_{P, \text{Hi 41/3/2}} = 0,63 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Separate hydrolysis processes of alkali-pretreated wheat straw with cellulases and fermentation of the obtained carbohydrates in modified MRS medium to lactic acid, using two genetically modified strains of *L. gasseri* bacterium were also performed. Efficiency of the separate hydrolysis and fermentation to specific lactic acid stereoisomer on lignocellulosic raw materials were determined ($Pr_{P, \text{Hi 41/3/2}} = 0,83 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$; $Pr_{P, \text{Hi 26/13/10}} = 0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Keywords: optically pure lactic acid, *Lactobacillus gasseri*, pretreated wheat straw, enzymatic hydrolysis

Thesis contains: 53 pages, 24 figures, 13 tables, 30 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 Antonija Trontel, Assistant professor

Technical support and assistance: Nenad Marđetko, mag. ing. bioproc.

Reviewers:

1. PhD Mario Novak, Assistant professor
2. PhD Andreja Leboš Pavunc, Assistant professor
3. PhD Antonija Trontel, Assistant professor
4. PhD Jasna Novak, Associate professor (substitute)

Paper defended: 28th February 2019

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Sirovine za proizvodnju mliječne kiseline.....	2
2.1.1. Šećerne sirovine	2
2.1.2. Škrobne sirovine.....	2
2.1.3. Lignocelulozne sirovine	3
2.2. Proizvodnja mliječne kiseline.....	6
2.3. Primjena mliječne kiseline	8
2.3.1. Polimeri mliječne kiseline (PLA)	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	10
3.1. Materijali	10
3.1.1. Mikroorganizam	10
3.1.2. Kemikalije i hranjive podloge	10
3.1.3. Aparatura i pribor	13
3.2. Metode rada.....	15
3.2.1. Priprava hranjivih podloga	15
3.2.2. Uzgoj bakterija <i>L. gasseri</i> i proizvodnja mliječne kiseline u različitim MRS podlogama.....	16
3.2.3. Enzimska hidroliza predobrađene pšenične slame	17
3.3. Analitičke metode.....	19
3.3.1. Određivanje optičke gustoće uzoraka hranjive podloge	19
3.3.3. Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC).....	21
3.3.4. Određivanje L-(+)- i D-(-)- stereoizomera mliječne kiseline enzimskom metodom.....	22
3.4. Izračunavanje pokazatelja uspješnosti rasta i proizvodnje mliječne kiseline.....	23
3.4.1. Prinos biomase (Y_X).....	23
3.4.2. Prinos produkta (Y_P)	23
3.4.3. Koeficijent pretvorbe supstrata u biomasu ($Y_{X/S}$)	24
3.4.4. Koeficijent pretvorbe supstrata u produkt ($Y_{P/S}$).....	24
3.4.5. Brzina potrošnje supstrata (r_s).....	24
3.4.6. Brzina nastajanja produkta (r_P).....	24
3.4.7. Maksimalna specifična brzina rasta biomase (μ_m).....	24
3.4.8. Produktivnost (Pr).....	24
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	25
4.1. Uzgoj divljeg tipa bakterije <i>Lactobacillus gasseri</i> JCM 1131^T u hranjivoj MRS podlozi	26
4.1.1. Uzgoj divljeg tipa bakterije <i>Lactobacillus gasseri</i> JCM 1131 ^T u hranjivoj MRS podlozi ($\gamma_{glc} = 20 \text{ g L}^{-1}$)	26
4.1.2. Uzgoj divljeg tipa bakterije <i>Lactobacillus gasseri</i> JCM 1131 ^T u modificiranoj hranjivoj MRS podlozi ($\gamma_{glc} \approx 80 \text{ g L}^{-1}$).....	28
4.2.1. Uzgoj bakterije <i>Lactobacillus gasseri</i> Hi 41/3/2 u hranjivoj MRS podlozi	32
4.2.2. Uzgoj bakterije <i>Lactobacillus gasseri</i> Hi 26/13/10 u hranjivoj MRS podlozi	33
4.3. Uzgoj genetički modificiranih sojeva bakterija <i>Lactobacillus gasseri</i> JCM 1131^T u modificiranoj MRS podlozi	36
4.3.1 Uzgoj bakterije <i>Lactobacillus gasseri</i> Hi 26/13/10 u modificiranoj MRS podlozi.....	36
4.3.2 Uzgoj bakterije <i>Lactobacillus gasseri</i> Hi 41/3/2 u modificiranoj MRS podlozi.....	38
4.4. Određivanje D-(-)- i L-(+)- stereoizomera mliječne kiseline	41

5. ZAKLJUČCI.....	43
6. LITERATURA.....	45
7. PRILOZI.....	49
7.1. Popis kratica	49
7.2. Baždarni dijagrami za određivanje koncentracije supstrata i proizvoda tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC).....	50

1. UVOD

Jedna od najznačajnijih baznih kemikalija - mliječna kiselina u industrijskom se mjerilu najčešće proizvodi iz rafiniranih šećera (trska) ili škroba (kukuruz) kao glavnih sirovina s pomoću bakterija mliječne kiseline (Yuan i sur., 2018; Turner i sur., 2016). Rast potražnje za mliječnom kiselinom utječe na povećanu potražnju za sirovinama koje se koriste za njezinu proizvodnju, što ima negativan utjecaj na lanac opskrbe stočnom hranom i hranom koja se koristi za prehranu ljudi te povećava cijenu same sirovine (Turner i sur., 2016; Yuturu i Wu, 2016). Korištenjem obnovljivih sirovina, kao što su otpad iz šumarske industrije, nusproizvodi poljoprivredne proizvodnje i sirovine koje se ne koriste u prehrani ljudi, može se smanjiti potražnja za škrobnim sirovinama te tako smanjiti njihovu cijenu. Oko $8 - 20 \times 10^9$ tona biljne biomase, od ukupne godišnje proizvodnje koja iznosi 200×10^9 tona, može se iskoristiti za proizvodnju biogoriva i osnovnih baznih kemikalija (Yuan i sur., 2018; Turner i sur., 2016). Mliječna kiselina može se proizvesti biotehnološkim postupkom s pomoću različitih vrsta bakterija i plijesni, kao i kemijskim postupkom (Yuan i sur., 2018; Yuturu i Wu, 2016). Kemijskim postupkom proizvodi se racemična smjesa D-(-)- i L-(+)-mliječne kiseline, dok je biotehnološkim postupkom moguće proizvesti kiralno čistu L-(+) ili D-(-)-mliječnu kiselinu. Glavni uzrok porasta proizvodnje mliječne kiseline je korištenje stereoizomera mliječne kiseline u proizvodnji polilaktata koji se koriste za proizvodnju biorazgradljive plastike i biokompatibilnih polimera. Za proizvodnju polilaktata potrebno je proizvesti mliječnu kiselinu vrlo visokog stupnja čistoće kao i optičke čistoće. Mliječna kiselina L-orijentacije se češće koristi od mliječne kiseline D-orijentacije zbog visoke kristalne strukture i visoke čvrstoće PLA (eng. Polylactic acid) polimera (Yuan i sur., 2018; Yun i sur., 2003).

Cilj ovog rada bio je provesti uzgoj divljeg tipa bakterije *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T koji proizvodi oba stereoizomera mliječne kiseline, L-(+)- i D-(-)-mliječnu kiselinu, kao i provesti uzgoje dva genetski modificirana soja ove bakterije koji mogu proizvoditi L-(+)-mliječnu kiselinu (*L. gasseri* Hi 41/3/2) i D-(-)-mliječnu kiselinu (*L. gasseri* Hi 26/13/10) u MRS podlozi te ispitati uspješnost procesa proizvodnje oba stereoizomera mliječne kiseline na lignoceluloznim sirovinama. Potom izračunati sve osnovne biokinetičke i procesne parametre bioprocasa proizvodnje L-(+)- i D-(-)-mliječne kiseline s pomoću genetski modificiranih sojeva te izračunate vrijednosti usporediti s vrijednostima dobivenim za divlji tip bakterije *L. gasseri*.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Sirovine za proizvodnju mliječne kiseline

Mliječna kiselina je jedna od najzastupljenijih kemikalija koja se koristi u prehrambenoj, farmaceutskoj i tekstilnoj industriji. S obzirom na zastupljenost, proizvodi se u velikim količinama te ima relativno malu cijenu proizvodnje, 0,5 \$/kg (Yuan i sur., 2018). Na cijenu proizvodnje sirovine uvelike utječe cijena medija u kojem se ona proizvodi, iz tog razloga je za proizvodnju mliječne kiseline u industrijskom mjerilu kao glavni izvor ugljika potrebno imati relativno jeftinu sirovinu (Taskila i Ojamo, 2013). Sirovine koje se najčešće koriste za proizvodnju mliječne kiseline u industrijskom mjerilu su: šećerne sirovine (melasa, sirutka i dr.), škrobne sirovine te sve više i lignocelulozne otpadne sirovine iz poljoprivredne proizvodnje i šumarske industrije (Jiang i sur., 2016; Taskila i Ojamo, 2013).

2.1.1. Šećerne sirovine

Melasa je nusproizvod iz proizvodnje šećera te sadrži oko 50 % (w/w) ukupnih šećera. Godišnja proizvodnja melase iznosi oko 160 milijuna tona. Melasa se uglavnom koristi za proizvodnju etanola, biomase kvasca te kao dodatka stočnoj hrani (Vidra i sur., 2017).

Sirutka je nusproizvod iz proizvodnje sira te sadrži oko 5-6 % laktoze, 0.8-1 % proteina, 0.06 % masti (Swathi i sur., 2015) te oko 0,2 % mliječne kiseline (Taleghani i sur., 2016). Godišnja proizvodnja sirutke iznosi oko 108 tona godišnje. Sirutka se, zbog relativno visoke koncentracije laktoze, može koristiti za proizvodnju različitih biokemikalija i drugih proizvoda (Swathi i sur., 2015).

2.1.2. Škrobne sirovine

Pšenica, krumpir, manioka, riža i kukuruz su sirovine koje se koriste za proizvodnju škroba i glukoze ili glukoznog sirupa. Navedeni proizvodi mogu se koristiti u različitim biotehnološkim procesima. Prednost ovih sirovina u odnosu na melasu je smanjenje troškova obrade otpadnih voda dobivenih nakon provedenog biotehnološkog procesa proizvodnje

određenih kemikalija, kao i smanjenje cijene izdvajanja i pročišćavanja određenog proizvoda (Röper, 2005).

2.1.3. Lignocelulozne sirovine

U bioprocima proizvodnje mliječne kiseline fokus istraživanja usmjeren je uglavnom prema upotrebi lignoceluloznih sirovina (Taskila i Ojamo, 2013). Tako se sirovine koje sadrže lignocelulozu mogu podijeliti u nekoliko osnovnih grupa:

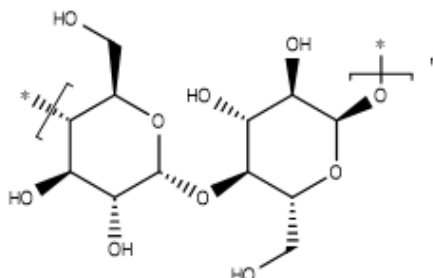
- (1) nusproizvodi poljoprivredne proizvodnje (bagaza šećerne trske i slatkog sirka, kukuruzovina, slama, rižine ljuskice, koštice maslina i komina maslina);
- (2) tvrdo drvo ili drvo listača (eng. hardwood) – npr. topola, bukva, jasen;
- (3) meko drvo ili drvo četinjača (eng. softwood) – npr. bor, smreka;
- (4) celulozni otpad (otpadni papir, otpad iz proizvodnje recikliranog papira);
- (5) trave i sjeno (djetelina, divlje proso i dr.);
- (6) komunalni kruti otpad; (Bušić i sur., 2018).

Lignoceluloza se sastoji od celuloze, hemiceluloze i lignina (Ghaffar i sur., 2014). Udjeli celuloze, hemiceluloze i lignina ovise o vrsti lignocelulozne sirovine (Tablica 1.), te se udio celuloze u lignoceluloznoj sirovini kreće u rasponu od 30 do 55 %, udio hemiceluloze od 24 do 50 %, a udio lignina 10 do 35 % (Abdel–Rahman i sur., 2011; Bajpai, 2016).

Tablica 1. Udjeli celuloze, hemiceluloze i lignina u nekim lignoceluloznim sirovinama (Bajpai, 2016).

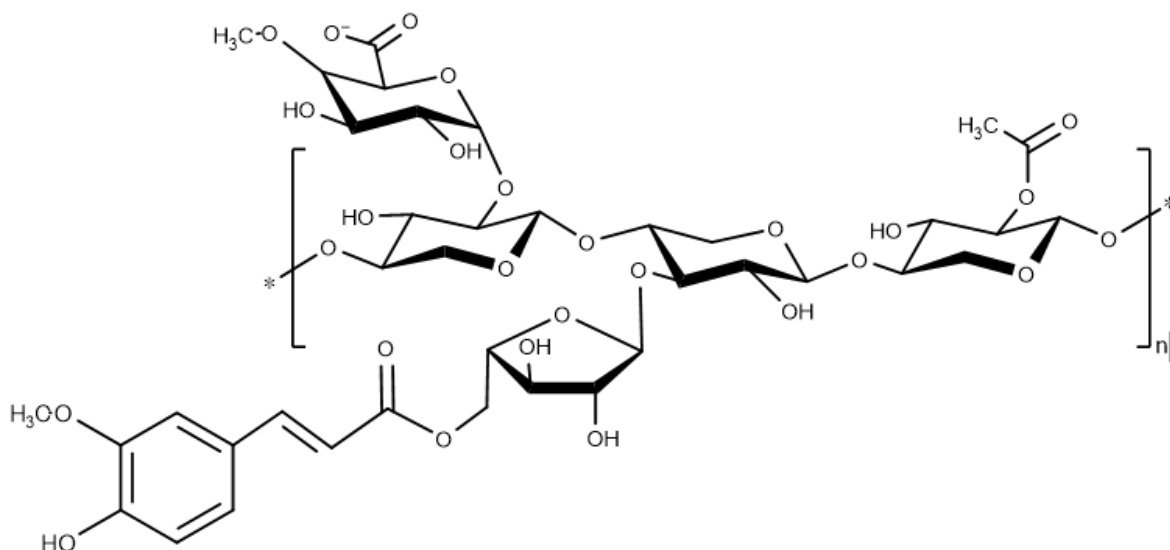
Lignocelulozna sirovina	Celuloza	Hemiceluloza	Lignin
tvrd drvo	40-55	24-50	18-25
meko drvo	45-50	25-35	25-35
pšenična slama	30	50	15
kukuruzni oklasci	45	35	15
trava	25-40	35-50	10-30
divlje proso	45	31	12

Celuloza (Slika 1.) je polimer koji se sastoji od linearno povezanih glukoznih podjedinica međusobno povezanih β -1,4-glikozidnom vezom, dok je hemiceluloza (Slika 2.) razgranati polimer koji se sastoji od različitih monosaharida (L-arabinoze, D-galaktoze, D-glukoze, D-manoze i D-ksiloze).



Slika 1. Struktura celuloze.

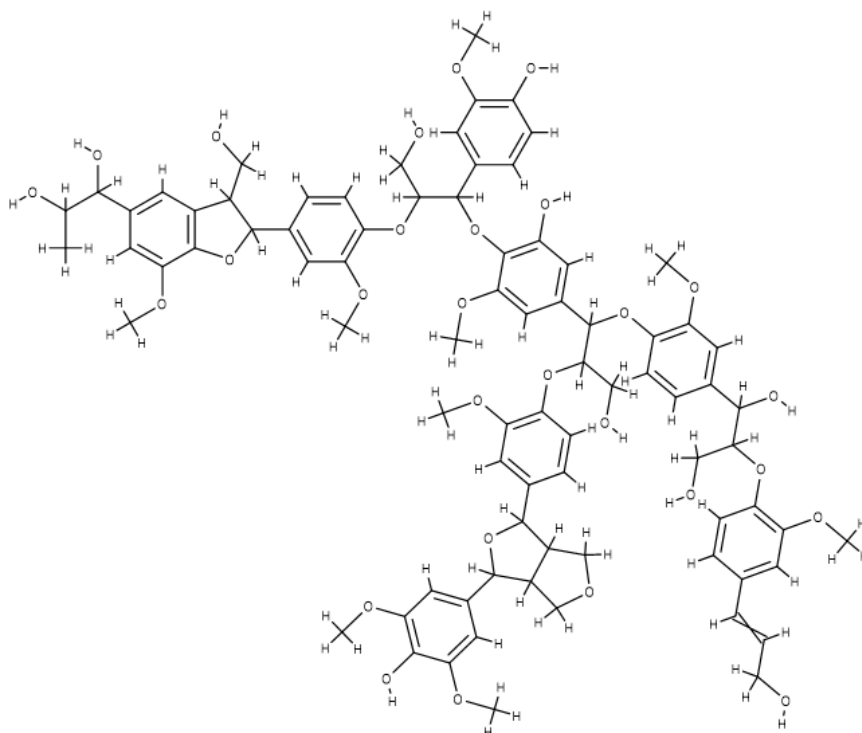
Dodatno, na lance hemiceluloze mogu biti vezane metilne ili acetilne skupine. Sastav monosaharida u hemicelulozi ovisi o vrsti lignocelulozne sirovine (Demirbas, 2008).



Slika 2. Struktura hemiceluloze.

Osim ugljikohidratnih polimera u lignocelulozi se nalazi i amorfni aromatski polimer lignin (Slika 3.). Građevne jedinice lignina su tri fenilpropil alkohola, a to su: koniferil alkohol (guacil propanol), kumaril alkohol (*p*-hidroksifenil propanol) i sinapil alkohol (siringil alkohol) koji su međusobno povezani alkil-aril, alkil-alkil i aril-aril eterskim vezama (Bajpai, 2016; Demirbas, 2008). Različite funkcionalne grupe, kao što su hidroksi, metoksi i karbonilne grupe,

moгу biti vezane na građevne jedinice lignina i doprinosti visokoj polarnosti molekule (Demirbas, 2008).



Slika 3. Struktura lignina.

Kako bi se navedene sirovine mogle koristiti kao izvor fermentabilnih ugljikohidrata, potrebno je provesti mehaničku i/ili kemijsku predobradu lignoceluloznih sirovina. Mehaničkom predobradom smanjuje se veličina čestica i povećava dodirna površina za lakše provođenje kemijske ili enzimске hidrolize. Kemijskim postupkom moguće je provesti solubilizaciju lignina i/ili hemiceluloze, promijeniti strukturu polimera i smanjiti stupanj polimerizacije kako bi se omogućila lakša enzimska hidroliza ugljikohidratnih polimera (Bajpai, 2016; Ghaffar i sur., 2014).

2.2. Proizvodnja mliječne kiseline

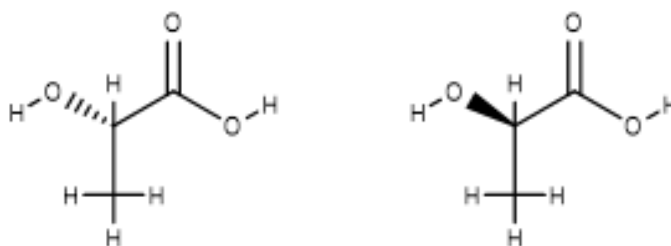
Mliječna kiselina može se proizvesti na dva načina:

- (1) kemijskom sintezom kojom se proizvodi racemična smjesa D-(-)- i L-(+)- mliječne kiseline;
- (2) biotehnološkim postupkom s pomoću odgovarajućih mikroorganizma kojima se može proizvesti optički čista D-(-)- ili L-(+)- mliječna kiselina (Yuan i sur., 2018).

Trenutačno se u svijetu oko 90 % mliječne kiseline proizvodi biotehnološkim postupkom (Wang i sur., 2015).

Sirovine koje se mogu koristiti za proizvodnju mliječne kiseline navedene su u Poglavlju 2.1. Na efikasnost procesa proizvodnje mliječne kiseline može utjecati neučinkovita predobrada, visoka cijena enzima i inhibicija produktom, nastajanje neželjenih proizvoda metabolizma radnog mikroorganizma, kao i represija izvorom ugljika zbog prisutnosti različitih ugljikohidrata u sirovini. Ostatci iz proizvodnje papira i recikliranog papira predstavljaju jedno od mogućih rješenja za proizvodnju mliječne kiseline (Taskila i Ojamo, 2013).

Kao radni mikroorganizmi za proizvodnju mliječne kiseline mogu se koristiti bakterije iz roda *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* i *Enterococcus*, sojevi plijesni *Mucor*, *Monilia* i *Rhizopus* (John i sur., 2007), te genetički modificirane bakterije i kvasci (Yamada i sur., 2017). Ovisno o soju i vrsti mikroorganizma koji se koristi u biotehnološkom postupku moguće je proizvesti optički čistu D-(-) (Slika 4. desno) i L-(+)-mliječnu kiselinu (Slika 4. lijevo), kao i smjesu ova dva stereoizomera (Tablica 2.), te se za proizvodnju mliječne kiseline odabiru mikroorganizmi koji proizvode isključivo jedan stereoizomer mliječne kiseline.



Slika 4. L-(+)-mliječna kiselina (lijevo) i D-(-)-mliječna kiselina (desno).

Tablica 2. Proizvodnja mliječne kiseline s pomoću različitih mikroorganizama (prilagođeno iz Yuan i sur., 2018 i Zhang i sur., 2017).

Mikroorganizam	Sirovina/ supstrat	Tip bioprocesa i parametri bioprocesa	γ_{MK} (g L ⁻¹)	Pr_{MK} (g L ⁻¹ h ⁻¹)	$Y_{MK/S}$ (g g ⁻¹)	Stereoizomer mliječne kiseline	Referenca
<i>Bacillus coagulans</i> DSM 2314	Pšenična slama tretirana vapnom	SSF, šaržno, 50°C	40,7	0,74	0,43	L-(+)-MK; 99,4 %	Mass i sur., 2008
<i>Pediococcus</i> <i>acidilactici</i> DQ2	Kiseliski predobrađena kukuruzovina, 27 % (w/w)	SSF, šaržno, 48°C	101,9	1,06	0,77	L-(+)-MK; 63,4 % D-(+)-MK; 34,6 %	Zhao i sur., 2013
<i>Enterococcus faecalis</i> SI	Predobrađena usitnjena šperploča, 20 % (w/v)	SHF šaržno, 42°C,	59,61	1,07	0,95	L-(+)-MK,	Yuan i sur., 2017
<i>B. coagulans</i> D- DSM1	Glukoza 50 gL ⁻¹	Šaržno, 50°C	48,65	2,03	0,97	D-(-)-MK, 99,0	Zhang i sur., 2017
<i>B. coagulans</i> D- DSM1	Glukoza 120 gL ⁻¹	Šaržno, 50°C	117,96	1,97	0,98	D-(-)-MK, 99,6	Zhang i sur., 2017
<i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>	Glukoza 100 gL ⁻¹	Polukontinuirani proces, 30°C	60,00	2,80	0,65	D-(-)-MK, 99,9	Yamada i sur., 2017

SSF, simultana saharifikacija i fermentacija; SHF – odvojena hidroliza i fermentacija

2.3. Primjena mliječne kiseline

L-(+)-mliječna kiselina koristi se u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji zbog toga što se ovaj oblik mliječne kiseline može asimilirati i razgraditi u ljudskom tijelu (Wang i sur., 2015). Osim toga, ova kiselina se koristi i u kozmetičkoj i tekstilnoj industriji (Abdel–Rahman i sur., 2011). Oba stereoizomera mliječne kiseline koriste se za sintezu polilaktata. Kopolimerizacija D-(-) i L-(+)-mliječne kiseline rezultira u amorfnim materijalima dok homopolimeri stvaraju kristalinične i pravilne strukture. Stoga su čisti izomeri mliječne kiseline puno vrijedniji od smjesa D-(-) i L-(+)-mliječne kiseline (Wang i sur., 2015). Nadalje, optička čistoća mliječne kiseline presudan je faktor koji utječe na svojstva polilaktata. L-(+)-mliječna kiselina se većinom koristi za proizvodnju polimera mliječne kiseline koji imaju visoki stupanj kristaliničnosti i visoku vlačnu čvrstoću. Ovi polimeri mogu se koristiti za proizvodnju vlakana i različitih tankih prevlaka (eng. films) (Yuan i sur., 2018). Različite forme polilaktata mogu se sintetizirati mijenjanjem udjela D-(-) i L-(+)-izomera mliječne kiseline (Yamada i sur., 2017).

2.3.1. Polimeri mliječne kiseline (PLA)

Tehnologija za proizvodnju goriva i plastike iz obnovljivih izvora se trenutno razvija kako bi se preveniralo onečišćenje okoliša i globalno zatopljenje. Polilaktati (eng. Polylactic acid; PLA) se smatraju važnom bioplastikom radi izražene termalne stabilnosti, mehaničkih svojstava, otpornosti na hidrolizu i izvrsne biorazgradivosti (Zhang i sur., 2017).

Polilaktati su jedni od najistraživanijih alifatskih poliestera koji imaju mogućnost da u potpunosti zamijene polimere iz petrokemijske industrije. Američka agencija za hranu i lijekove (FDA) klasificirala je PLA kao GRAS (eng. Generally Recognized as Safe) proizvod za sva pakiranja hrane. PLA kao i osnovna građevna jedinica ovog polimera – mliječna kiselina, ima stereoizomere poli-L-laktide (PLLA), poli-D-laktid (PDLA) i poli-DL-laktid (PDLLA) (Yamada i sur, 2017; Farah i sur., 2016). Polimeri mliječne kiseline, poli-L-laktati (PLLA) i poli-D-laktati (PDLA) imaju točku tališta oko 180°C (Yamada i sur., 2017).

PLA se može sintetizirati različitim polimerizacijskim procesima (polikondenzacija, polimerizacija s otvaranjem prstena, i direktnim metodama kao azeotropnom dehidracijom i enzimskom polimerizacijom; Farah i sur., 2016), ali direktna polikondenzacija mliječne kiseline kao i polimerizacija laktida (ciklički diester mliječne kiseline) su dva glavna postupka

proizvodnje polilaktata (Masutani i Kimura, 2018). Postupak koji se najčešće koristi u industrijskom mjerilu je polimerizacija laktida s otvaranjem prstena.

Optički čista L-(+)-mliječna kiselina ($\geq 99\%$) je glavni prekursor sinteze PLA, a dodatak optički čiste D-(-)-mliječne kiseline dovodi do više točke tališta i boljeg izgleda polimera (Zhang i sur., 2017).

S obzirom na pojačanu svijest o važnosti ekoloških proizvoda, smanjenje emisije CO₂, te važnosti recikliranja, PLA se ističe kao odlična potencijalna zamjena za polimere iz petrokemijske industrije. Pregled glavnih prednosti i nedostataka PLA dan je u Tablici 3.

Tablica 3. Prednosti i nedostaci PLA (Farah i sur., 2016).

Prednosti	Nedostaci
Ekološki proizvod (biorazgradljiv, može se reciklirati, kompostirati) Proizvodnja PLA smanjuje emisiju CO ₂	Krhak materijal, sklon pucanju
25-55 % ušteda energije prilikom proizvodnje PLA u odnosu na proizvodnju polimera iz petrokemijske industrije	Vlačna čvrstoća i elastičnost slična polietilentetraftalatu (PET), ali manja tvrdoća materijala
Biomedicinska primjena zbog netoksičnosti	Kemijska inertnost
Ima bolja toplinska svojstva od drugih polimera kao što su PHA, PEG i PCL	Hidrofobnost
Biokompatibilnost - nema toksični ili kancerogeni učinak na lokalno tkivo. Produkti razgradnje ne utječu na zacjeljivanje tkiva. U živim organizmima se razgrađuje do α -hidroksikiseline te se metabolizira TCA ciklusom i izlučuje iz organizma	Spora razgradnja, PLA se razgrađuje kroz hidrolizu esterskih grupa i brzina razgradnje ovisi o postotku kristalne strukture, molekulskoj masi, udjelu stereoizomera, difuziji vode u polimer i dr.
Može se obrađivati različitim standardnim postupcima za oblikovanje plastike	-

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Mikroorganizam

U ovom radu, kao radni mikroorganizam, korištena je bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T iz zbirke mikroorganizama Japan Collection of Microorganisms (JCM, Tsukuba, Japan) i dva soja dobivena metodama genetičkog inženjerstva (sojevi su konstruirani u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama te njihova konstrukcija nije dio ovog rada). Sojevi dobiveni genetičkim inženjerstvom su: producent L-(+)-mliječne kiseline *Lactobacillus gasseri* Hi 41/3/2, koji ima inaktiviran gen za *D-ldh* i producent D-(-)-mliječne kiseline *Lactobacillus gasseri* Hi 26/13/10 s inaktiviranim genom za *L-ldh1*. Genetski modificiranim sojevima dodan je i plazmid na kojem se nalazi gen za rezistenciju na antibiotik eritromicin.

3.1.2. Kemikalije i hranjive podloge

Popis, čistoća i podrijetlo kemikalija korištenih u ovom radu za pripremu hranjivih podloga i otopina naveden je u Tablici 4.

Tablica 4. Čistoća i podrijetlo kemikalija za pripremu hranjivih podloga i otopina.

Kemikalija	Čistoća	Proizvođač
natrijeva lužina	p.a.	Kemika, Hrvatska
amonijev citrat	p.a.	Merck, Njemačka
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
ledena octena kiselina	p.a.	Kemika, Hrvatska
ZnSO₄	p.a.	Kemika, Hrvatska

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

Čista kultura BMK *L. gasseri* JCM 1131^T čuvana je i održavana na čvrstoj i u tekućoj De Man, Rogosa i Sharpe (MRS) hranjivoj podlozi. De Man, Rogosa i Sharpe (MRS) hranjiva podloga sastoji se od: dikalijevog fosfata ($\gamma = 2 \text{ g L}^{-1}$), glukoze ($\gamma = 20 \text{ g L}^{-1}$), goveđeg ekstrakta ($\gamma = 10 \text{ g L}^{-1}$), kvašćevog ekstrakta ($\gamma = 5 \text{ g L}^{-1}$), magnezijevog sulfata ($\gamma = 0,2 \text{ g L}^{-1}$), manganova sulfata ($\gamma = 0,05 \text{ g L}^{-1}$), natrijevog acetata ($\gamma = 5 \text{ g L}^{-1}$), peptona ($\gamma = 10 \text{ g L}^{-1}$), triamonijevog acetata ($\gamma = 2 \text{ g L}^{-1}$) i Tween 80[®] koji se dodaje u omjeru 1 mL/L (Biolife, Milano, Italija; De Man i sur., 1960).

Čista kultura BMK *L. gasseri* Hi 41/3/2 i *L. gasseri* Hi 26/13/10 čuvana je i održavana na čvrstoj i u tekućoj De Man, Rogosa i Sharpe (MRS) hranjivoj podlozi u koju je dodan antibiotik eritromicin u koncentraciji 10 ppm.

Ova hranjiva podloga korištena je i za pripremu inokuluma za uzgoj bakterija (čista kultura BMK *L. gasseri* DSM 1311^T, *L. gasseri* Hi 41/3/2 i *L. gasseri* Hi 26/13/10) u bioreaktoru s miješalom.

Osim u navedenoj podlozi uzgoj bakterije *L. gasseri* JCM 1131^T proveden je i u modificiranoj MRS podlozi u kojoj je koncentracija glukoze iznosila 80 g L⁻¹.

Uzgoj genetski modificirane bakterije *L. gasseri* Hi 41/3/2 i *L. gasseri* Hi 26/13/10 proveden je i na hidrolizatu pšenične slame. Podloga korištena za uzgoj na hidrolizatu pšenične slame jednakog je kemijskog sastava kao i MRS tekuća podloga, s razlikom da je umjesto glukoze u podlogu dodan razrijeđeni hidrolizat pšenične slame koji se sastoji od glukoze (20 g L⁻¹), ksiloze (3,2 g L⁻¹) i celobioze (3,8 g L⁻¹).

Početne pH vrijednosti priređenih tekućih hranjivih MRS podloga s glukozom (20 i 80 g L⁻¹) iznosile su $6,2 \pm 0,2$ jedinica, a početna pH vrijednost modificirane MRS podloge s hidrolizatom pšenične slame bila je nešto manja, i iznosila je $5,2 \pm 0,1$ zbog acetatnog pufera u kojem je provedena hidroliza predobrađene pšenične slame (vidi poglavlje 3.2.3.).

3.1.2.2. Predobrađena pšenična slama

Predobrađena pšenična slama korištena u ovom radu dobivena je alkalnom predobradom ($W_{NaOH} = 2\%$) u visokotlačnom reaktoru pri 180°C tijekom 20 minuta (podaci nisu prikazani). Sastav predobrađene pšenične slame korištene u ovom radu bio je: glukan 61,72 %; ksilan 33,01 %; arabinan 1,62 % i lignin 1,58 % (Vidović, 2016).

3.1.2.3. Enzimi

U ovom radu korišteni su sljedeći enzimi za hidrolizu predobrađene pšenične slame:

- (1) Viscozyme® L (kat. br. V2010) koji se sastoji od različitih enzima za hidrolizu ugljikohidrata kao što su arabanaze, celulaze, β -glukanaze, hemicelulaze i ksilanaze (Anonymus 1, 2019);
- (2) Celulaze, enzimski kompleks (kat. br. SAE0020; sinonimi Cellulase blend, Cellic CTec2) koji se sastoji od različitih celulaza, β -glukozidaza i hemicelulaza, a koristi se uglavnom za razgradnju predobrađenog lignoceluloznih materijala do jednostavnih ugljikohidrata (Anonymus 2, 2019).

3.1.2.4. Enzimski kit za određivanje D-(-)- i L-(+)- izomera mliječne kiseline

Kako bi se odredio omjer D-(-)- i L-(+)- mliječne kiseline korišten je D-/L-Lactic Acid (D-/L-Lactate) (Rapid) Assay Kit proizvođača Megazyme. Ovaj enzimski kit se uobičajeno koristi za određivanje D-(-)-mliječne kiseline (D-laktat) i L-(+)-mliječne kiseline (L- laktat) u pićima, mlijeku, mesu i ostalim prehrambenim i drugim proizvodima (Anonymus 3, 2018).

3.1.3. Aparatura i pribor

3.1.3.1. Bioreaktor s miješalom

U ovom radu korišten je bioreaktor s miješalom (B. Braun Biotech International, Berlin, Njemačka) korisnog volumena 2 L (Slika 5.). Bioreaktor je opremljen pH elektrodom, sustavom za izuzimanje uzoraka, sustavom za regulaciju pH, sustavom za upumpavanje podloge i inokulaciju i temperaturnom sandom. Grijanje i hlađenje podloge u reaktoru provodi se cirkuliranjem vode kroz plašt.



Slika 5. Bioreaktor s miješalom (B. Braun Biotech International, Berlin, Njemačka) koji je u ovom radu korišten za proizvodnju mliječne kiseline.

3.1.3.2. Sustav za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti

(eng. High Pressure Liquid Chromatography, HPLC)

Kromatograf Shimadzu CLASS-VP LC10A_{VP} (Shimadzu, Kyoto, Japan) sastoji se od pumpe (LC-10A_{VP}), otplinjača (DGU-14A), automatskog uzorkivača i injektora (SIL-10A_{VP}), uređaja za grijanje kolone (CTO-10A_{VP}), 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-19A_{VP}) 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 (Beograd, Jugoslavija);
- mikser EV-100, Tehtnica (Železniki, Slovenija);
- pH metar 744, Metrohm (Herisau, Švicarska);
- sušionik Instrumetaria ST-50 (Zagreb, Hrvatska);
- magnetna mješalica Cimarec iTM Poly15 (Thermo Scientific, Waltham, MA, SAD)
- oprema za filtraciju otopina [najlonski filter (0,20µm, 47 mm; Sartorius Stedim Biotech GMBH, Goettingen, Njemačka) pomoću boce za filtriranje (Nalgene, Rochester, SAD)]
- UV/Vis spektrofotometar Cary 100 UV-Vis (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)
- plastične kivete promjera 10 mm (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka)
- termostat ST-50 Instrumentarija (Zagreb, Hrvatska)
- centrifuga Tehtnica (Železniki, Slovenija)
- centrifuga SL 8R ThermoScientific (Waltham, Massachusetts, SAD)
- univerzalna sjeckalica SwitchON 400 W (Neckarsulm, Njemačka)

3.2. Metode rada

3.2.1. Priprava hranjivih podloga

Bakterije *L. gasseri* JCM 1131^T, *L. gasseri* Hi 41/3/2 i *L. gasseri* Hi 26/13/10 uzgajane su i čuvane u MRS podlozi (Biolife, Milano, Italija) koja se priprema prema uputama proizvođača. Sastav podloge naveden je u poglavlju 3.1.2.1. MRS podloga korištena je i za uzgoj inokuluma za provođenje fermentacija.

Hranjive podloge koje su korištene za fermentacije navedene su u Tablici 5.

Tablica 5. Hranjive podloge korištene za bioprocese proizvodnje mliječne kiseline.

Podloga	<i>L. gasseri</i> JCM 1131 ^T	<i>L. gasseri</i> Hi 41/3/2	<i>L.gasseri</i> Hi 26/13/10
MRS podloga ($\gamma_{\text{glc}} = 20 \text{ g L}^{-1}$)	+	***	***
MRS podloga s visokom početnom koncentracijom glukoze ($\gamma_{\text{glc}} = 80 \text{ g L}^{-1}$)	+	-	-
Modificirana MRS podloga s dodanim hidrolizatom pšenične slame kao glavnim izvorom ugljikohidrata*	-	***	***

*Sastav – vidi poglavlje 3.1.2.1.

** u podlogu je dodan antibiotik eritromicin u koncentraciji od 10 ppm.

Prije početka fermentacije u bioreaktoru podloge su sterilizirane u autoklavu pri 121°C tijekom 20 minuta, prepumpane u reaktor i ohlađene na temperaturu fermentacije.

3.3.2. Uzgoj bakterija *L. gasseri* i proizvodnja mliječne kiseline u različitim MRS podlogama

U ovom radu su uzgoj bakterija i proizvodnja mliječne kiseline provedeni u:

- (1) u MRS hranjivoj podlozi ($\approx 20 \text{ g L}^{-1}$; *L. gasseri* JCM 1131^T, *L. gasseri* Hi 41/3/2 i *L.gasseri* Hi 26/13/10)
- (2) u MRS hranjivoj podlozi s povećanom koncentracijom glukoze ($\approx 80 \text{ g L}^{-1}$; *L. gasseri* JCM 1131^T)
- (3) u modificiranoj MRS hranjivoj podlozi u kojoj je glukoza zamijenjena hidrolizatom predobrađene pšenične slame (*L. gasseri* Hi 41/3/2 i *L. gasseri* Hi 26/13/10; Tablica 5.).

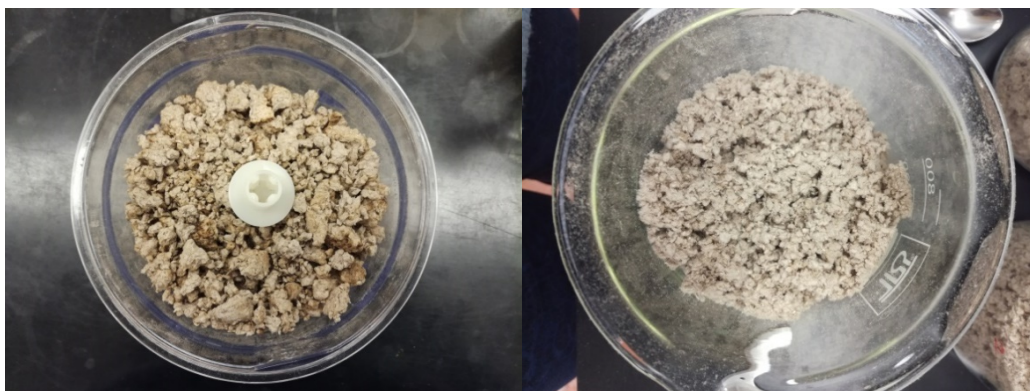
Korisni volumen podloge iznosio je 1,5 L. Uzgoj je proveden pri 37°C i pH vrijednosti od $5,5 \pm 0,05$ jedinica u bioreaktoru s miješalom ($n_i = 300 \text{ min}^{-1}$). Za regulacija pH vrijednosti korištena je 5M otopina natrijevog hidroksida.

Sve podloge naciepljene su svježom, preko noći poraslom kulturom *L. gasseri* (5 % vol/vol; V = 75 mL) u hranjivoj MRS podlozi (18 h / 37°C). Tijekom uzgoja genetički modificiranih sojeva *L. gasseri* u podlogu je dodan antibiotik eritromicin u koncentraciji 10 ppm.

Tijekom svih uzgoja u aseptičnim uvjetima izuzimani su uzorci u pravilnim vremenskim intervalima kako bi se odredila kinetika rasta bakterije i fermentacija jednostavnih ugljikohidrata, dobivenih enzimskom hidrolizom, do mliječne kiseline.

3.2.3. Enzimska hidroliza predobrađene pšenične slame

Odvagano je 2 g prethodno usitnjene predobrađene pšenične slame (Slika 6.) u 50 mL natrij-acetatnog pufera ($c = 60 \text{ mM}$, $\text{pH } 4,78$) u Erlenmeyer tikvici. Natrij-acetatni pufer ($c = 60 \text{ mM}$, $\text{pH } 4,78$) pripremljen je tako da se 200 mL 0,2 M otopina octene kiseline pomiješalo s 300 mL 0,2 M otopine natrijevog acetata te se odmjerna tikvica od 1 L dopunila destiliranom vodom do oznake.



Slika 6. Predobrađena pšenična slama prije usitnjavanja u sjekaču (lijevo) i nakon usitnjavanja u sjeckalici (desno).

Suspenzija usitnjene pšenične slame i natrij-acetatnog pufera ($c = 60 \text{ mM}$, $\text{pH } 4,78$) stavljena je na magnetsku miješalicu na termostat pri 50°C . Nakon što se suspenzija zagrijala na temperaturu od 50°C , dodan je po 1 mL enzimskog kompleksa ($\gamma_{\text{protein, Viscozyme L}} = 57 \text{ mg mL}^{-1}$; $\gamma_{\text{protein, Cellulase blend}} = 60 \text{ mg mL}^{-1}$;) kako bi se provela hidroliza ugljikohidratnih polimera do jednostavnih ugljikohidrata. Nakon 24 sata izuzet je uzorak te je određen postotak hidrolize glukana, ksilana i arabinana do glukoze, ksiloze i arabinoze (Tablica 6.).

Tablica 6. Usporedba uspješnosti hidrolize predobrađene pšenične slame s komercijalno dostupnim enzimskim kompleksima za hidrolizu celuloze.

Enzimski kompleks	Whidrolize glukana u glukozu (%)	Whidrolize ksilana u ksiložu (%)	Whidrolize arabinana u arabinozu (%)	Whidrolize ukupnih ugljikohidrata (%)
Viscozyme L	32,7	43,9	11,3	40,1
Cellulase blend	100,0	37,6	0	76,8

Učinkovitost enzimskog kompleksa Cellulase blenda s obzirom na hidrolizu glukana do glukoze iznosio je 100 % te je ovaj enzimski kompleks izabran za hidrolizu predobrađene pšenične slame za pripremu modificirane MRS podloge za uzgoj genetski modificiranih bakterija *L. gasseri* u bioreaktoru s miješalom.

Kako bi se pripremio hidrolizat pšenične slame koji je korišten za pripremu modificirane MRS podloge za uzgoj genetski modificiranih bakterija *L. gasseri* u bioreaktoru s miješalom, odvagano je 50 g prethodno usitnjene predobrađene pšenične slame. Predobrađena pšenična slama dodana je u 1 L natrij-acetatnog pufera ($c = 60 \text{ mM}$, $\text{pH } 4,78$), koncentracija predobrađene pšenične slame iznosila je 50 gL^{-1} ; (Slika 7. lijevo). Hidroliza je provedena u dvije paralele. Nakon zagrijavanja na 50°C u tikvicu je dodano 10 mL suspenzije enzimskog kompleksa Cellulase blend ($\gamma_{\text{protein, Cellulase blend}} = 60 \text{ mg mL}^{-1}$). Nakon 24 sata dodano je još 5 mL enzima te je tikvica ponovo stavljena na magnetsku miješalicu na 24 sata. Nakon 48 sati sadržaj tikvice (Slika 7. sredina) profiltriran je kroz Büchnerov lijevak te je filtrat bio zamrznut do upotrebe (Slika 7. desno). U filtratu je određena koncentracija ugljikohidrata HPLC metodom.



Slika 7. Usitnjena predobrađena pšenična slama u 60 mM natrij-acetatnom puferu s dodanim enzimom: (lijevo) prije stavljanja na odgovarajuću temperaturu reakcije; (sredina) nakon 48 sati hidrolize; (desno) filtrat dobiven nakon filtracije sadržaja tikvice kroz Büchenrov lijevak.

3.3. Analitičke metode

Tijekom bioprocesa proizvodnje mliječne kiseline s pomoću svih sojeva bakterije *L. gasseri* uzorci su izuzimani ($V_{\text{izuzeti uzorak}} \approx 20 \text{ mL}$) u pravilnim vremenskim razmacima kako bi se pratio tijek bioprocesa. Izuzetim uzorcima praćena je optička gustoća (OD_{600}) (poglavljje 3.3.1.). Izuzeti uzorci su stavljeni na centrifugu 10 minuta pri 7000 okretaja/min te je nakon izdvajanja biomase centrifugiranjem odvojen supernatant i spremljen pri -20°C za analizu. Odcentrifugirana biomasa korištena je za određivanje suhe tvari biomase (poglavljje 3.3.2.). U supernatantu je HPLC metodom određena koncentracija: glukoze (γ_{glc}), mliječne kiseline (γ_{MK}), octene kiseline (γ_{OK}) i etanola (γ_{EtOH}), te sastav ugljikohidrata tijekom enzimske hidrolize predobrađene pšenične slame (poglavljje 3.3.3.). Pomoću enzimskog kita određeni su udjeli D(-)- i L-(+)-mliječne kiseline (poglavljje 3.3.4.).

3.3.1. Određivanje optičke gustoće uzoraka hranjive podloge

Izuzetim uzorcima određena je optička gustoća pomoću UV/Vis spektrofotometra Cary 100 UV-Vis (Agilent Technologies, USA) pri valnoj duljini (λ) od 600 nm (OD_{600}). Optička gustoća određena je na način se određeni volumen uzorka ($V \approx 4 \text{ mL}$) prenio u kivetu

Eksperimentalni dio

promjera 10 mm Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka) te je pomoću UV/VIS spektrofotometra određena apsorbanacija pri 600 nm (OD_{600}). Mjerena je optička gustoća izuzetog uzorka i prvog decimalnog razrjeđenja uzorka. Prvo decimalno razrjeđenje pripremalo se tako da se 1 mL originalnog uzorka prenio u 9 mL destilirane vode te je mjerenje optičke gustoće decimalnog razrjeđenja provedeno na jednak način kao i mjerenje optičke gustoće originala.

3.3.2. Određivanje suhe tvari biomase

Nakon izuzimanja uzorka, 5 mL uzoraka preneseno je u prethodno izvaganu plastičnu kivetu s čepom te je stavljeno na centrifugiranje 10 minuta pri 7000 okretaja/min. Za svaki uzorak rađene su dvije paralele. Nakon centrifugiranja supernatant je izdvojen, a talog je stavljen na sušenje u sušionik Instrumetaria ST-50 (Zagreb, Hrvatska) pri 100°C do konstantne mase. Nakon toga kivete su ohlađene u eksikatoru te im je izvagana masa. Razlika u masi kivete nakon sušenja (m_k) i masi kivete prije sušenja (m_p) odgovara masi biomase (m_b).

$$m_b = m_k - m_p \text{ [g]} \quad [3-1]$$

m_p - početna koncentracija biomase [g]

m_k - konačna koncentracija biomase [g]

Dijeljenjem dobivene mase biomase (m_b) s volumenom uzorka (V) dobivena je koncentracija biomase (γ_X).

$$\gamma_X = m_b / V \text{ [g L}^{-1}\text{]} \quad [3-2]$$

m_b – masa biomase [g]

V - volumen uzorka [mL]

3.3.3. Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)

Kromatografski sustav Shimadzu CLASS-VP LC-10A_{VP} (Shimadzu, Kyoto, Japan) korišten je za određivanje koncentracije glukoze, mliječne kiseline, octene kiseline, mravlje kiseline i etanola u izuzetim uzorcima te za određivanje koncentracije ugljikohidrata (celobioze, glukoze, ksiloze, arabinoze) u hidrolizatu predobrađene pšenične slame.

Uzorak izuzet nakon enzimske hidrolize ili supernatant uzorka izuzetog tijekom bioprocasa proizvodnje mliječne kiseline prije analiziranja na HPLC-u razrijeđen je pomoću otopine cinkova sulfata heptahidrata i destilirane vode.

U 700 μL uzorka dodana je otopina cinkovog sulfata heptahidrata ($\gamma = 100 \text{ g L}^{-1}$) u omjeru volumena 1:1 ($V = 700 \mu\text{L}$). Dobivena otopina potom je intenzivno izmiješana na mikseru (EV-100, Tehnica, Železniki, Slovenija) tijekom 20-ak sekundi i ostavljen na sobnoj temperaturi tijekom 20 minuta. Uzorci su potom centrifugirani tijekom 10 minuta pri 10000 o/min (Tehnica, Železniki, Slovenija). Centrifugiranjem su istaloženi proteini. Potom je uzeto 200 μL te pomiješano s 800 μL destilirane vode. Dobivene otopine profiltrirane su pomoću šprica na koje je kao nastavak dodan najlonski filter s porama veličine 0,20 μm (Cromafil®Xtra PA(NY)-20 μm /25mm; Machery-Nagel CoKG, Düren, Njemačka). Ovako pripremljeni uzorci analizirani su pomoću Shimadzu CLASS-VP LC-10A_{VP} sustava.

Za analizu uzoraka i određivanje koncentracije glukoze, mliječne kiseline, octene kiseline, mravlje kiseline i etanola u uzorcima i ugljikohidrata (glukoze, ksiloze i arabinoze) kao mobilna faza korištena je 0,1 % otopina fosforne kiseline. Injektirano je 20 μL uzorka u sustav. Protok mobilne faze bio je 0,5 mL min⁻¹, a temperatura ionsko – izmjenjivačke analitičke kolone (Supelcogel™ C-610H; 30 cm x 7,8 mm ID, 9 μm) s predkolonom (Supelcogel™ H; 5 cm x 4,6 mm ID, 9 μm) 55°C. Za detekciju je korišten detektor indeksa loma (RID, eng. Refractive Indeks Detector).

Obrada rezultata dobivenih kromatografskom analizom napravljena je pomoću računalnog programa za kromatografiju (CLASS-VP v6.10). Pripadajuće vrijednosti očitane su iz baždarnih pravaca (Tablica 7.).

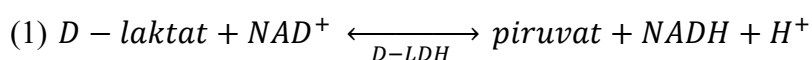
Tablica 7. Retencijska vremena i baždarni pravci za određivanje koncentracije ugljikohidrata, alkohola i kiselina.

spoj	t_R (min)	jednadžba baždarnog pravca	$R^2(-)$
glukoza	13,012	$A = 362057,08 \gamma_{\text{glukoza}} + 5598,61$	1,0000
mliječna kiselina	17,473	$A = 243473,97 \gamma_{\text{mliječna kiselina}} + 2856,08$	0,9999
mravlja kiselina	18,465	$A = 112024,49 \gamma_{\text{mravlja kiselina}} + 4968,11$	0,9998
octena kiselina	19,936	$A = 164952,58 \gamma_{\text{octena kiselina}} + 2260,95$	0,9999
etanol	27,464	$A = 1163351,69 \varphi_{\text{etanol}} - 953,28$	0,9998
celobioza	10,760	$A = 378874,59 \gamma_{\text{celobioza}} - 797,70$	1,000
ksiloza	13,813	$A = 362057,08 \gamma_{\text{ksiloza}} + 55598,61$	1,0000
arabinoza	14,952	$A = 366483,61 \gamma_{\text{arabinoza}} + 9888,80$	0,9999

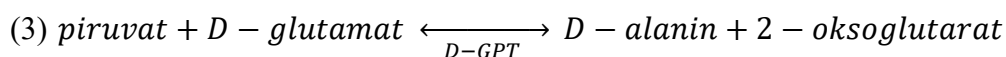
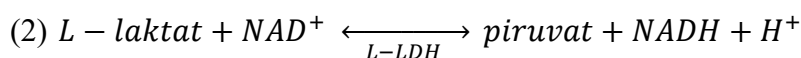
A = površina

3.3.4. Određivanje L-(+)- i D-(-)- stereoizomera mliječne kiseline enzimskom metodom

Pomoću enzimskog seta proizvođača Megazime određeni su L-(+)- i D-(-)- stereoizomeri mliječne kiseline. Određivanje koncentracije D-(-)- mliječne kiseline i L-(+)-mliječne kiseline zasniva se na odvijanju karakterističnih reakcija koje kataliziraju stereospecifični enzimi.



ili



U prvoj reakciji se, kataliziranoj D-laktat dehidrogenazom (D-LDH) (1) ili L-laktat dehidrogenazom (L-LDH) (2) u prisutnosti oksidiranog oblika kofaktora nikotinamid-adenin dinukleotida (NAD^+), oksidira D- ili L-laktat do piruvata, pri čemu se kofaktor reducira u $NADH + H^+$. U ovoj je reakciji ravnoteža na strani reaktanata D- mliječne kiseline, odnosno L-mliječne kiseline i oksidiranog oblika kofaktora (NAD^+) te je potrebno smanjiti koncentraciju proizvoda reakcije odnosno piruvata. Smanjenje koncentracije piruvata postiže se pomoću druge reakcije,

reakcije transaminacije koju katalizira D-glutamat-piruvat transaminaza (D-GTP). U ovoj reakciji se amino skupina D-glutamata prenosi na piruvat, pri čemu iz piruvata nastaje D-alanin, a iz D-glutamata 2-ketoglutarat, reakcija se odvija pri relativno visokim koncentracijama D-glutamata. Koncentracija NADH koji nastaje u prvoj reakciji, koju kataliziraju D-LDH ili L-LDH, u stehiometrijskom je odnosu s koncentracijom D-MK odnosno L-MK. Apsorbancija priređene reakcijske smjese određuje se pri valnoj duljini pri kojoj NADH ima maksimum apsorbanije ($\lambda = 340 \text{ nm}$).

Prije određivanja D- odnosno L- mliječne kiseline uzorci su najprije razrijeđeni 100 puta, odnosno 1000 puta za uzgoj pri povišenoj koncentraciji glukoze ($\gamma_{\text{glc}}=80 \text{ g L}^{-1}$). Koncentracija D- i L- mliječne kiseline određena je prema uputama proizvođača za uzastopno određivanje D- i L- mliječne kiseline (Megazyme, 2018.).

Uspoređena je suma koncentracije D-(-)- i L-(+)- mliječne kiseline koja je izračunata iz vrijednosti dobivenih enzimskom metodom i koncentracije MK (γ_{MK}) određena HPLC metodom.

3.4. Izračunavanje pokazatelja uspješnosti rasta i proizvodnje mliječne kiseline

3.4.1. Prinos biomase (Y_X)

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

X_0 - početna koncentracija biomase [g L⁻¹]

X - konačna koncentracija biomase [g L⁻¹]

3.4.2. Prinos produkta (Y_P)

$$Y_P = P - P_0 \text{ [g L}^{-1}\text{]} \quad [3-4]$$

P_0 - početna koncentracija produkta [g L⁻¹]

P - konačna koncentracija produkta [g L⁻¹]

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

$$Y_{X/S} = \frac{(X-X_0)}{(S_0-S)} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{Y_X}{\Delta S} \quad [\text{g} / \text{g}] \quad [3-5]$$

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).

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

$$Y_{P/S} = \frac{(P-P_0)}{(S_0-S)} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{Y_P}{\Delta S} \quad [\text{g} / \text{g}] \quad [3-6]$$

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).

3.4.5. Brzina potrošnje supstrata (r_S)

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

3.4.6. Brzina nastajanja produkta (r_P)

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

3.4.7. Maksimalna specifična brzina rasta biomase (μ_m)

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

3.4.8. Produktivnost (Pr)

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

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 je radu proveden uzgoj bakterije *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T u MRS podlozi i MRS podlozi u kojoj je koncentracije glukoze iznosila 80 g L⁻¹. Proveden je i uzgoj genetički modificiranih sojeva bakterije *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T koji mogu proizvoditi čistu D-(-) (*Lactobacillus gasseri* Hi 26/13/10) i L-(+)-mliječnu kiselinu (*Lactobacillus gasseri* Hi 41/3/2) u MRS podlozi, kako bi se utvrdilo jesu li se promijenili osnovni biokinetički parametri kao posljedica genetičke manipulacije sojeva. Zatim je proveden uzgoj tih genetički modificiranih sojeva u modificiranoj MRS podlozi u kojoj je umjesto glukoze kao glavni izvor ugljika dodan hidrolizat predobrađene pšenične slame kako bi se utvrdilo mogu li navedeni sojevi rasti na sirovinama druge generacije, tj. otpadnim lignoceluloznim sirovinama kao što je pšenična slama.

Svi uzgoji provedeni su u bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom pri 37°C, broju okretaja miješala od 300 u minuti i pH vrijednosti od 5,5 jedinica.

Rezultati provedenih istraživanja podijeljeni su u sljedeća poglavlja:

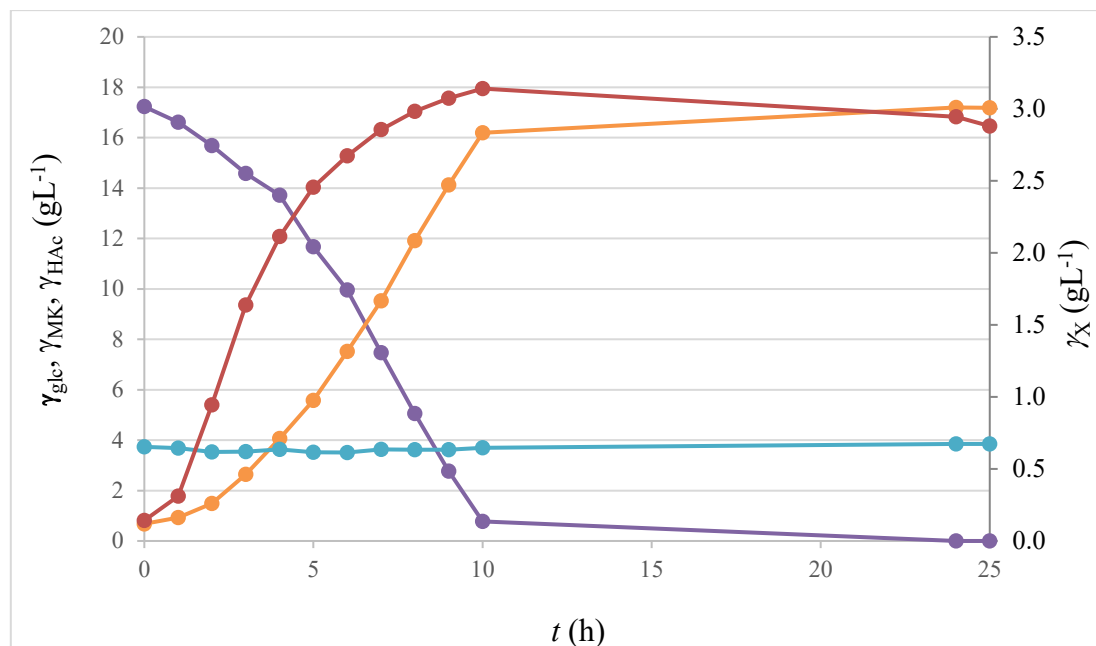
- a) Uzgoj divljeg tipa bakterije *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T i proizvodnja mliječne kiseline u standardnoj hranjivoj MRS podlozi s koncentracijom glukoze od 20 g L⁻¹ i modificiranoj MRS hranjivoj podlozi s relativno visokom koncentracijom glukoze (80 g L⁻¹; poglavlje 4.1.);
- b) Uzgoj genetički modificiranih sojeva bakterije *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T i proizvodnja mliječne kiseline u hranjivoj MRS podlozi (20 g L⁻¹; poglavlje 4.2.);
- c) Uzgoj genetički modificiranih sojeva bakterije *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T i proizvodnja mliječne kiseline na hidrolizatu predobrađene pšenične slame (poglavlje 4.3.);
- d) Određivanje L-(+)- i D-(-)- stereoizomera mliječne kiseline (poglavlje 4.4.)

4.1. Uzgoj divljeg tipa bakterije *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T u hranjivoj MRS podlozi

Uzgoj bakterije *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T proveden je u MRS podlozi u kojoj je koncentracija glukoze iznosila 20 g L⁻¹ (poglavlje 4.1.1.) i u modificiranoj MRS podlozi u kojoj je koncentracija glukoze iznosila 80 g L⁻¹ (poglavlje 4.1.2.).

4.1.1. Uzgoj divljeg tipa bakterije *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T u hranjivoj MRS podlozi ($\gamma_{\text{glc}} = 20 \text{ g L}^{-1}$)

Uzgoj bakterije *L. gasseri* JCM 1131^T proveden je u hranjivoj MRS podlozi šaržnim postupkom u reaktoru s miješalom tijekom 25 sati pri pH vrijednosti 5,5, korigiranim 5 M otopinom NaOH, brzini okretaja miješala od 300 okretaja/min te temperaturi uzgoja od 37°C. Ovaj uzgoj je proveden kako bi se utvrdili osnovni kinetički parametri (specifična brzina rasta, brzina potrošnje supstrata i brzina proizvodnje mliječne kiseline) te parametri uspješnosti procesa (Tablica 8.). Osim navedenog određen je omjer L-(+)- i D-(-)- stereoizomera mliječne kiseline koje proizvodi ova bakterija (poglavlje 4.4.). Rezultati analize uzoraka izuzetih tijekom uzgoja prikazani su na Slici 8.



Slika 8. Promjena koncentracije glukoze (●), biomase (●), mliječne (●) i octene kiseline (●) tijekom šaržnog uzgoja bakterije *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T u hranjivoj MRS podlozi ($\gamma_{glc} \approx 20 \text{ g L}^{-1}$) pri 37°C i pH vrijednosti 5,5.

Proces proizvodnje mliječne kiseline s pomoću bakterije *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T u kojem je početna koncentracija glukoze iznosila $17,23 \text{ g L}^{-1}$ proveden je kako bi se utvrdili osnovni kinetički parametri poput specifične brzine rasta, brzine potrošnje supstrata i brzine proizvodnje mliječne kiseline. Šaržni uzgoj proveden je u trajanju od 25 sati u bioreaktoru s miješalom i pri temperaturi od 37°C i pH vrijednosti od 5,5 korigiranoj 5 M otopinom NaOH.

Nakon lag faze koja je trajala 2 sata, bakterija je ušla u eksponencijalnu fazu rasta koja je trajala 4 sata. Tijekom eksponencijalne faze rasta bakterija je postigla maksimalnu specifičnu brzinu rasta koja je iznosila $0,84 \text{ h}^{-1}$. Maksimalna koncentracija mliječne kiseline postignuta je nakon 24 sata uzgoja i iznosila je $17,2 \text{ g L}^{-1}$. Acetat je u podlogu dodan kao sastojak MRS hranjive podloge u obliku soli natrijeva acetata i njegova se koncentracija tijekom uzgoja nije značajnije mijenjala. Tijekom HPLC analize uzoraka nisu detektirani ni drugi produkti fermentacije što ukazuje da je bakterija *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T homofermentativna bakterija, odnosno da pri fermentaciji glukoze u mliječnu kiselinu ne nastaju drugi produkti fermentacije poput octene kiseline, mravlje kiseline i etanola.

Usporedimo li koeficijent pretvorbe supstrata u produkt između bakterije *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T ($Y_{P/S} = 0,96 \text{ g g}^{-1}$) s koeficijentom konverzije supstrata u produkt bakterije

Rezultati

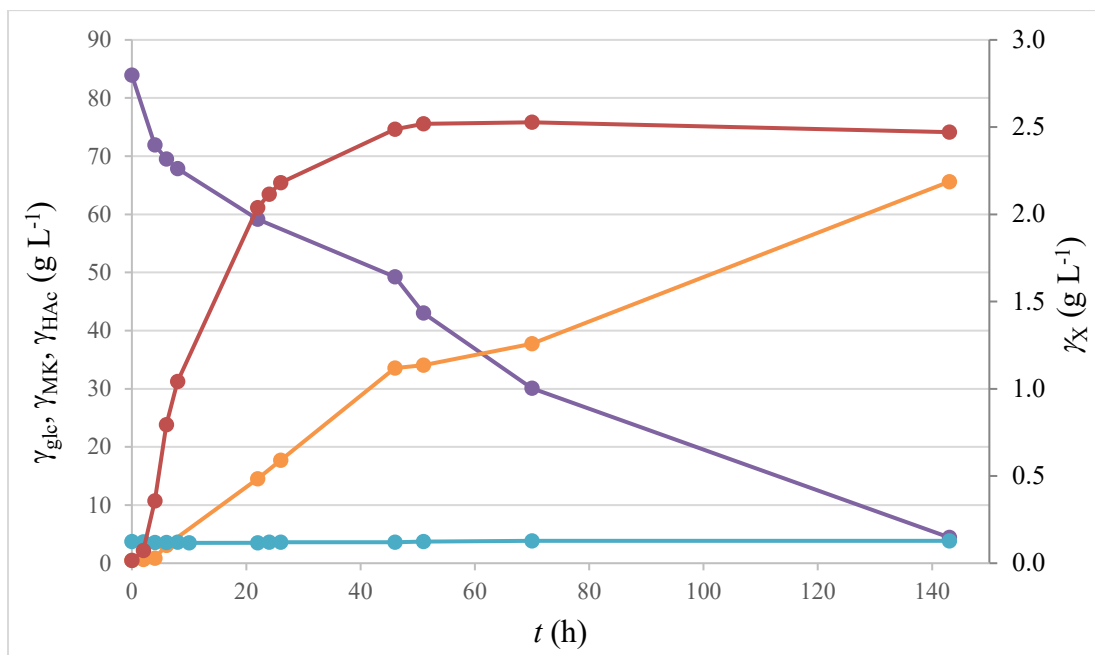
Pediococcus acidilactici DQ2 ($Y_{P/S} = 0,90 \text{ g g}^{-1}$) uzgojene u MRS podlozi koja također proizvodi oba stereoizomera mliječne kiseline (Zhao i sur., 2019), vidljiv je nešto veći $Y_{P/S}$ za *L. gasseri*. Bakterija *L. gasseri* JCM 1131^T ima efikasnost procesa proizvodnje mliječne kiseline veću od 95 % računato u odnosu na teorijski koeficijent konverzije supstrata u mliječnu kiselinu koji iznosi $Y_{P/S(\text{teor})} = 1 \text{ g g}^{-1}$. Ostali pokazatelji uspješnosti procesa poput koeficijenta konverzije supstrata u biomasu, maksimalne specifične brzine rasta, brzine potrošnje supstrata (r_s) i brzine proizvodnje mliječne kiseline (r_p) navedeni su u Tablici 8.

Tablica 8. Pokazatelji uspješnosti rasta bakterije *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T i proizvodnje mliječne kiseline u MRS podlozi ($\gamma_{\text{glc}} = 20 \text{ g L}^{-1}$) pri 37°C i pH vrijednosti od 5,5.

t_{lag}	2 h
t_{eksp}	8 h
$Y_{X/S}$	0,17 g/g
$Y_{P/S}$	0,96 g/g
$Pr_{X/s}$	0,12 g L ⁻¹ h ⁻¹
$Pr_{p/s}$	0,66 g L ⁻¹ h ⁻¹
r_p	0,44 h ⁻¹
r_s	0,74 h ⁻¹
μ_{max}	0,84 h ⁻¹

4.1.2. Uzgoj divljeg tipa bakterije *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T u modificiranoj hranjivoj MRS podlozi ($\gamma_{\text{glc}} \approx 80 \text{ g L}^{-1}$)

Kako bi se utvrdilo može li ova bakterija rasti u podlozi s industrijsko relevantnim koncentracijama supstrata proveden je uzgoj u modificiranoj MRS podlozi s visokom početnom koncentracijom glukoze ($\approx 80 \text{ g L}^{-1}$). Uzgoj bakterije *L. gasseri* JCM 1131^T proveden je pri pH 5,5 korigiranim 5 M otopinom NaOH i temperaturi od 37°C. Proces je praćen tijekom 143 sata. Promjena koncentracije glukoze, biomase, mliječne i octene kiseline prikazani su na Slici 9.



Slika 9. Promjena koncentracije glukoze (●), biomase (●), mliječne (●) i octene kiseline (●) tijekom šaržnog uzgoja bakterije *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T u hranjivoj MRS podlozi ($\gamma_{\text{glc}} \approx 80 \text{ g L}^{-1}$) pri 37°C i pH vrijednosti 5,5.

Tijekom uzgoja bakterije *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T glukoza se trošila brzinom od $r_s = 0,02 \text{ h}^{-1}$, te nakon 143 h uzgoja glukoza nije bila u potpunosti iscrpljena iz podloge ($\gamma_{\text{glc}} = 4,43 \text{ g L}^{-1}$). Dobivene vrijednosti za brzinu potrošnje supstrata u podlozi s povišenom koncentracijom glukoze značajno su manje od istih vrijednosti dobivenih za uzgoj ove bakterije u MRS podlozi s niskom početnom koncentracijom glukoze ($r_s = 0,74 \text{ h}^{-1}$; $\gamma_{\text{glc}} \approx 20 \text{ g L}^{-1}$). Specifična brzina rasta ove bakterije u podlozi s visokom početnom koncentracijom glukoze iznosi $0,35 \text{ h}^{-1}$ i oko 2,1 puta je manja od specifične brzine rasta u podlozi s niskom početnom koncentracijom glukoze ($\mu_{\text{max}} = 0,74 \text{ h}^{-1}$; $\gamma_{\text{glc}} \approx 20 \text{ g L}^{-1}$). Brzina proizvodnje mliječne kiseline za ovaj bioproces je 25 % manja od vrijednosti dobivene u podlozi s niskom početnom koncentracijom glukoze i iznosi $0,33 \text{ h}^{-1}$. Maksimalna koncentracija mliječne kiseline od $65,62 \text{ g L}^{-1}$ postignuta je u 143. satu uzgoja. Koeficijent konverzije glukoze u mliječnu kiselinu bio je oko 15 % manji u odnosu na istu vrijednost u podlozi s niskom početnom koncentracijom glukoze (Tablica 8.) i iznosio je $0,82 \text{ g g}^{-1}$, a produktivnost procesa proizvodnje mliječne kiseline manja je za 30 % i iznosila je $0,46 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. HPLC analizom uzoraka također nisu uočeni drugi produkti fermentacije poput mravlje kiseline ili etanola, niti je tijekom fermentacije došlo do promjene koncentracije acetata, što ukazuje da i pri povišenim

Rezultati

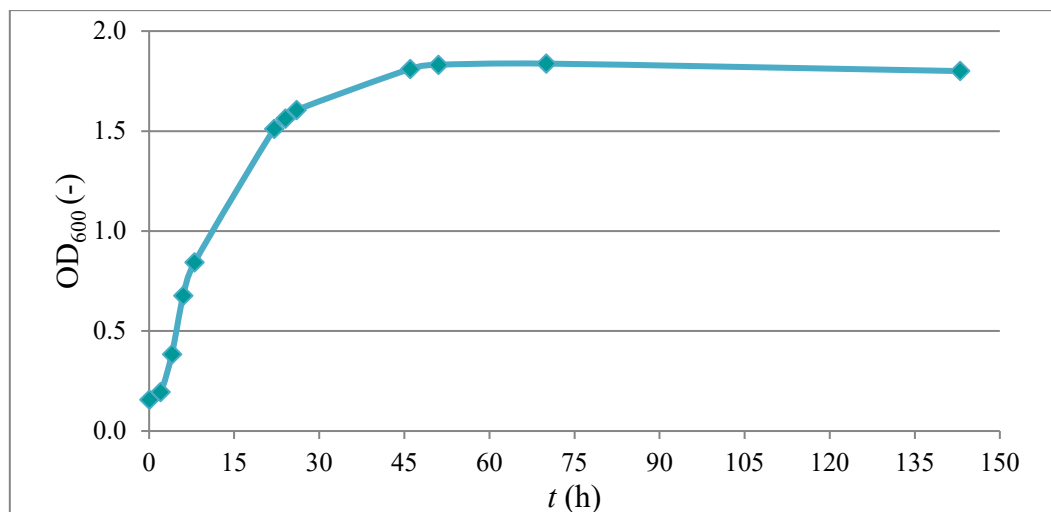
koncentracijama glukoze bakterija *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T proizvodi mliječnu kiselinu homofermentativnim putem.

Usporedbom pokazatelja uspješnosti procesa između uzgoja bakterije *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T, poput koeficijenta konverzije supstrata u biomasu i produktivnosti procesa proizvodnje mliječne kiseline vidljivo je da je kod uzgoja pri povišenoj koncentraciji supstrata u podlozi ($\gamma_{\text{glc}} \approx 80 \text{ g L}^{-1}$) dolazi do smanjenja navedenih vrijednosti (Tablice 8. i 9.).

Tablica 9. Pokazatelji uspješnosti procesa rasta mikroorganizma i proizvodnje mliječne kiseline u modificiranoj MRS podlozi s povišenom koncentracijom glukoze *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T ($\gamma_{\text{glc}} \approx 80 \text{ g L}^{-1}$).

t_{lag}	2 h
t_{eksp}	24 h
$Y_{\text{X/S}}$	0,03 g g ⁻¹
$Y_{\text{P/S}}$	0,82 g g ⁻¹
$Pr_{\text{X/S}}$	0,02 g L ⁻¹ h ⁻¹
$Pr_{\text{P/S}}$	0,46 g L ⁻¹ h ⁻¹
r_{p}	0,33 h ⁻¹
r_{s}	0,02 h ⁻¹
μ_{max}	0,35 h ⁻¹

Na Slici 10. prikazana je promjena optičke gustoće tijekom uzgoja *L. gasseri* JCM 1131^T u modificiranoj MRS podlozi. Tijekom rasta *L. gasseri* u modificiranoj MRS podlozi najveća brzina rasta bila je tijekom prvih 24 sata. Tijekom iduća 24 sata došlo je do značajnog usporavanja rasta stanica te nakon 48 sati možemo reći da je rast stanica gotovo prestao te je *L. gasseri* ušao u stacionarnu fazu.



Slika 10. Promjena optičke gustoće (●) tijekom uzgoja bakterije *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T u modificiranoj MRS hranjivoj podlozi s povišenom koncentracijom glukoze ($\gamma_{\text{glc}} \approx 80 \text{ g L}^{-1}$).

4.2. Uzgoj genetski modificiranih sojeva bakterije *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T u hranjivoj MRS podlozi

Nakon što je utvrđena pogodnost bakterije *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T za proizvodnju mliječne kiseline, provedene su genetske modifikacije kojima su konstruirani sojevi koji mogu proizvoditi isključivo jedan stereoizomer mliječne kiseline (L-(+)- ili D-(-)-mliječnu kiselinu; genetski modificirani sojevi *L. gasseri* konstruirani su u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama PBF-a; te konstrukcija ovih sojeva nije dio ovoga rada) što je od iznimne važnosti za proizvodnju mliječne kiseline u industrijskom mjerilu jer se time izbjegava vrlo skup postupak razdvajanja dvaju stereoizomera mliječne kiseline na kiralnim kolonama.

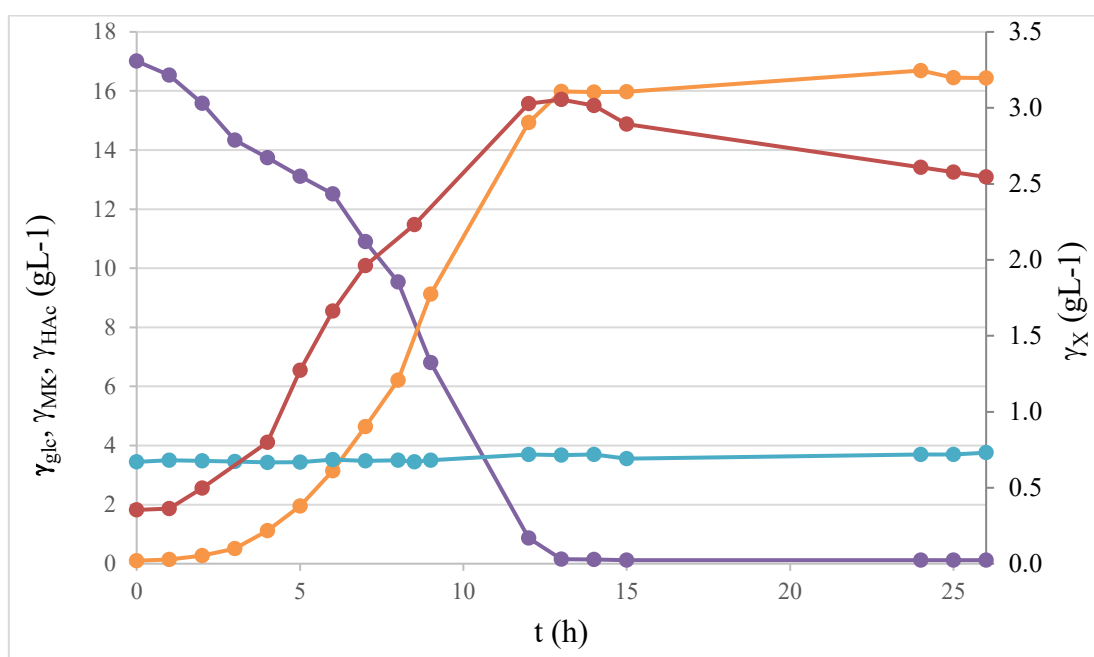
Dodatkom preko noći poraslog inokuluma (5 % vol/vol) započet je uzgoj bakterija *L. gasseri* Hi 41/3/2 (producent L-(+)-mliječne kiseline) i Hi 26/13/10 (producent D-(-)-mliječne kiseline) i proizvodnja mliječne kiseline u MRS hranjivoj podlozi. Kao glavni izvor ugljika korištena je glukoza ($\gamma_{\text{glc}} \approx 20 \text{ g L}^{-1}$) koja se nalazi kao sastojak hranjive MRS podloge. Prije početka uzgoja u hranjivu podlogu dodan je antibiotik eritromicin u koncentraciji od 10 ppm

Rezultati

kako bi se osiguralo da samo genetski modificirani sojevi koji imaju gen za rezistenciju na eritromicin rastu tijekom navedenih uzgoja.

4.2.1. Uzgoj bakterije *Lactobacillus gasseri* Hi 41/3/2 u hranjivoj MRS podlozi

Uzgoj bakterije *L. gasseri* Hi 41/3/2 proveden je u hranjivoj MRS podlozi ($\gamma_{\text{glc}} \approx 20 \text{ g L}^{-1}$) i trajao je 26 sati. Uzorci su izuzimani u pravilnim vremenskim intervalima kako bi se pratila potrošnja supstrata, rast biomase i proizvodnja mliječne kiseline (Slika 11.).



Slika 11. Promjena koncentracije glukoze (●), biomase (●), mliječne (●) i octene kiseline (●) tijekom šaržnog uzgoja bakterije *Lactobacillus gasseri* Hi 41/3/2 u hranjivoj MRS podlozi ($\gamma_{\text{glc}} \approx 20 \text{ g L}^{-1}$) pri 37°C i pH vrijednosti 5,5.

Brzina potrošnje supstrata tijekom uzgoja bakterije *Lactobacillus gasseri* Hi 41/3/2 u MRS podlozi ($\gamma_{\text{glc}} \approx 20 \text{ g L}^{-1}$) iznosila je $0,20 \text{ h}^{-1}$, te se nakon 15 h bioprocesa glukoza u potpunosti iscrpila iz podloge. Lag faza je trajala oko 1 h nakon čega bakterija raste eksponencijalno ($t_{\text{eksp}} = 11 \text{ h}$) i postiže maksimalnu specifičnu brzinu rasta od $1,02 \text{ h}^{-1}$. Prinos mliječne kiseline iznosi $16,34 \text{ g L}^{-1}$, a koeficijent konverzije $Y_{\text{P/S}}$ iznosi $0,97 \text{ g g}^{-1}$ te je neznatno manji od vrijednosti dobivenih za *L. gasseri* Hi 26/13/10 ($Y_{\text{P/S}} = 0,99 \text{ g g}^{-1}$ u MRS podlozi; $Y_{\text{P/S}} = 0,99 \text{ g g}^{-1}$ u modificiranoj MRS podlozi) i vrlo sličan vrijednostima dobivenim

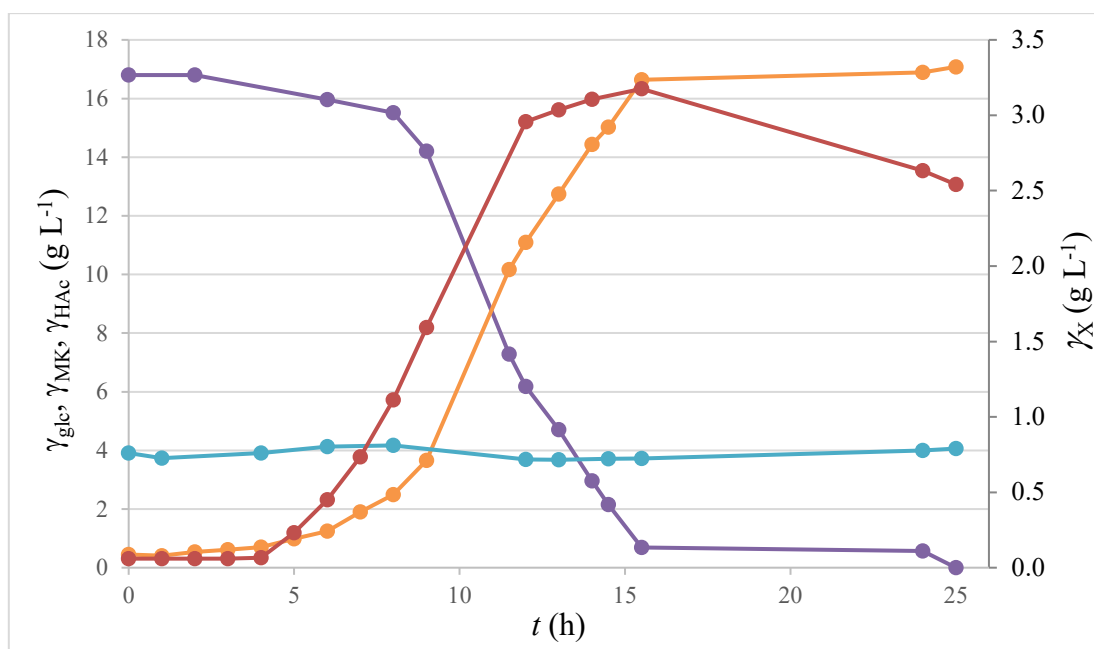
za *L. gasseri* JCM 1131^T ($Y_{P/S} = 0,96$ u MRS podlozi). Produktivnost procesa proizvodnje mliječne kiseline u ovoj podlozi iznosi $Pr_P = 0,63 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ što je za 24 % manje od odgovarajuće vrijednosti za *L. gasseri* Hi 41/3/2 uzgajan u modificiranoj MRS podlozi (Tablica 13.). Ostali pokazatelji uspješnosti procesa rasta bakterije *L. gasseri* Hi 41/3/2 i proizvodnje mliječne kiseline navedeni su u Tablici 10.

Tablica 10. Pokazatelji uspješnosti rasta bakterije *Lactobacillus gasseri* Hi 41/3/2 i proizvodnje mliječne kiseline u MRS podlozi ($\gamma_{\text{glc}} = 20 \text{ g L}^{-1}$) pri 37°C i pH vrijednosti od 5,5.

t_{lag}	1 h
t_{eksp}	11 h
$Y_{X/S}$	0,16 g g ⁻¹
$Y_{P/S}$	0,97 g g ⁻¹
$Pr_{X/S}$	0,10 g L ⁻¹ h ⁻¹
$Pr_{P/S}$	0,63 g L ⁻¹ h ⁻¹
r_P	0,59 h ⁻¹
r_S	0,20 h ⁻¹
μ_{max}	1,02 h ⁻¹

4.2.2. Uzgoj bakterije *Lactobacillus gasseri* Hi 26/13/10 u hranjivoj MRS podlozi

Uzgoj bakterije *L. gasseri* Hi 26/13/10 u hranjivoj MRS podlozi vođen je tijekom 25 sati. Tijekom uzgoja uzorci su uzimani u pravilnim vremenskim razmacima kako bi se pratio rast biomase, potrošnja supstrata i nastajanje mliječne kiseline (Slika 12.).



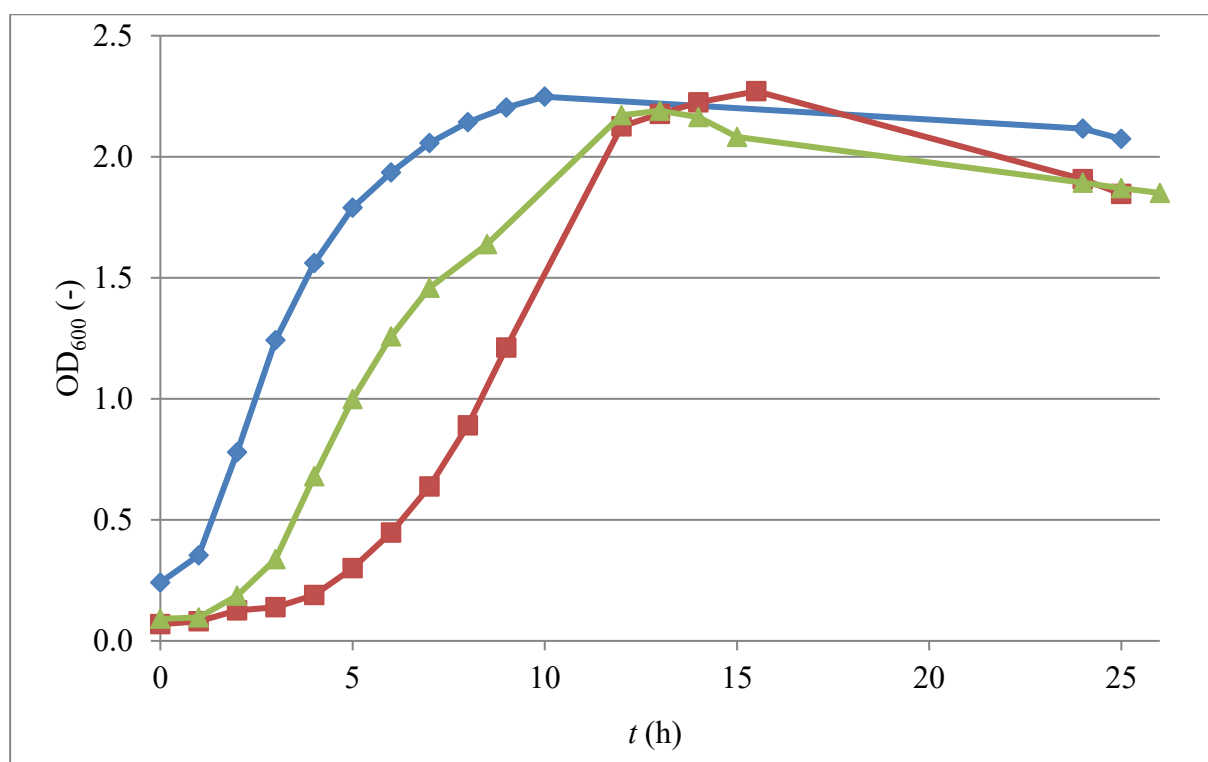
Slika 12. Promjena koncentracije glukoze (●), biomase (●), mliječne (●) i octene kiseline (●) tijekom šaržnog uzgoja bakterije *Lactobacillus gasseri* Hi 26/13/10 u hranjivoj MRS podlozi ($\gamma_{glc} \approx 20 \text{ g L}^{-1}$) pri 37°C i pH vrijednosti 5,5.

Tijekom uzgoja bakterije *Lactobacillus gasseri* Hi 26/13/10 u MRS podlozi ($\gamma_{glc} \approx 20 \text{ g L}^{-1}$) brzina potrošnje supstrata iznosila je $0,42 \text{ h}^{-1}$, te je nakon 15 h bioprocasa koncentracija glukoza u podloge iznosila $0,69 \text{ g L}^{-1}$. Lag faza je trajala oko 4 h nakon čega bakterija raste eksponencijalno ($t_{eksp} = 8 \text{ h}$) i postiže maksimalnu specifičnu brzinu rasta od $0,34 \text{ h}^{-1}$. Prinos mliječne kiseline iznosi $16,63 \text{ g L}^{-1}$, a koeficijent konverzije $Y_{P/S}$ iznosi $0,99 \text{ g g}^{-1}$ nešto veći od vrijednosti dobivenim za *L. gasseri* JCM 1131^T ($Y_{P/S} = 0,96$ u MRS podlozi). Produktivnost procesa proizvodnje mliječne kiseline u ovoj podlozi iznosi $Pr_P = 0,66 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ što je identično vrijednosti za *L. gasseri* JCM 1131^T u MRS podlozi (Tablica 8.). Ostali pokazatelji uspješnosti procesa rasta bakterije *L. gasseri* Hi 26/13/10 i proizvodnje mliječne kiseline navedeni su u Tablici 11.

Promjena optičke gustoće tijekom uzgoja bakterija *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T, *L. gasseri* Hi 41/3/2 i *L. gasseri* Hi 26/13/10 prikazana je na Slici 13.

Tablica 11. Pokazatelji uspješnosti rasta bakterije *Lactobacillus gasseri* Hi 26/13/10 i proizvodnje mliječne kiseline u MRS podlozi ($\gamma_{\text{glc}} \approx 20 \text{ g L}^{-1}$) pri 37°C i pH vrijednosti od 5,5.

t_{lag}	4 h
t_{eksp}	8 h
$Y_{\text{X/S}}$	0,18 g g ⁻¹
$Y_{\text{P/S}}$	0,99 g g ⁻¹
$Pr_{\text{X/S}}$	0,12 g L ⁻¹ h ⁻¹
$Pr_{\text{P/S}}$	0,66 g L ⁻¹ h ⁻¹
r_{p}	0,32 h ⁻¹
r_{s}	0,42 h ⁻¹
μ_{max}	0,34 h ⁻¹



Slika 13. Promjena optičke gustoće (OD₆₀₀) tijekom uzgoja bakterija *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T (◆), *Lactobacillus gasseri* Hi 26/13/10 (■) i *Lactobacillus gasseri* Hi 41/3/2 (▲) uzgojenih u MRS podlozi ($\gamma_{\text{glc}} \approx 20 \text{ g L}^{-1}$).

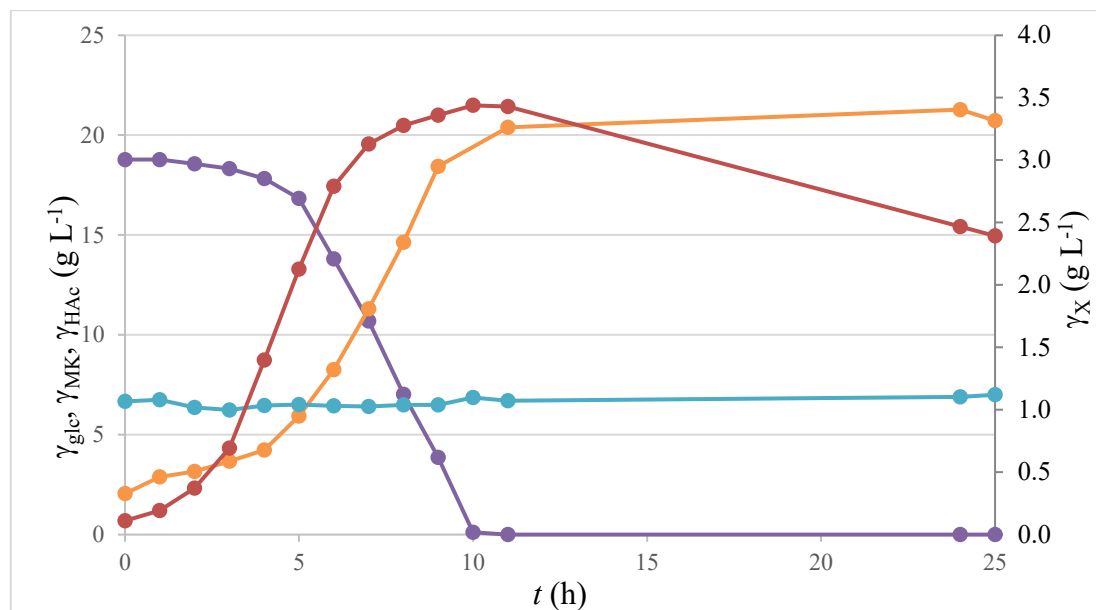
4.3. Uzgoj genetički modificiranih sojeva bakterija *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T u modificiranoj MRS podlozi

Nakon što je utvrđena pogodnost genetski modificirane bakterije *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T za proizvodnju L- odnosno D- mliječne kiseline u hranjivoj MRS podlozi, proveden je uzgoj sojeva bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus gasseri* Hi 41/3/2 i *Lactobacillus gasseri* Hi 26/13/10 na hidrolizatu predobrađene pšenične slame. Postupak hidrolize predobrađene pšenične slame proveden je s pomoću enzimskog kompleksa Cellic CTec2 koji se sastoji od celulaza, β -glukozidaze i hemicelulaza (poglavlje 3.2.3.). Efikasnost hidrolize glukana iz predobrađene pšenične slame iznosila je 100 %. Nakon provedenog procesa hidrolize, dobiveni hidrolizat je korišten kao glavni izvor ugljika u modificiranoj MRS podlozi (poglavlje 3.1.2.1.). Korištenjem obnovljivih sirovina i nusproizvoda poljoprivredne industrije dolazi do smanjenja cijene konačnog proizvoda – mliječne kiseline, ali i do smanjenja potražnje, i cijene škrobnih sirovina koje se koriste u prehrambenoj industriji (Yuan i sur., 2018; Turner i sur., 2016).

Bioproces proizvodnje mliječne kiseline u modificiranoj MRS podlozi u kojoj je kao glavni izvor ugljika korišten hidrolizat predobrađene pšenične slame s pomoću dva genetski modificirana soja *Lactobacillus gasseri* Hi 41/3/2 (poglavlje 4.3.1.) i *Lactobacillus gasseri* Hi 26/13/10 (poglavlje 4.3.2.) proveden je u bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom pri 37°C i pH vrijednosti od 5,5 jedinica.

4.3.1 Uzgoj bakterije *Lactobacillus gasseri* Hi 26/13/10 u modificiranoj MRS podlozi

Uzgoj bakterije *Lactobacillus gasseri* Hi 26/13/10 u modificiranoj MRS podlozi u kojoj je kao glavni izvor ugljika, umjesto glukoze, korišten hidrolizat predobrađene pšenične slame trajao je 25 sati pri čemu su u pravilnim vremenskim razmacima uzimani uzorci kako bi se mogli odrediti osnovni parametri procesa (Slika 14.) i izračunati pokazatelje uspješnosti procesa (Tablica 12.).



Slika 14. Promjena koncentracije glukoze (●), biomase (●), mliječne (●) i octene kiseline (●) tijekom šaržnog uzgoja bakterije *Lactobacillus gasseri* Hi 26/13/10 u modificiranoj MRS podlozi u kojoj je kao glavni izvor ugljika dodan hidrolizat predobrađene pšenične slame pri 37°C i pH vrijednosti 5,5.

Tijekom uzgoja bakterije *Lactobacillus gasseri* Hi 26/13/10 u modificiranoj MRS podlozi u kojoj je kao glavni izvor ugljika korišten hidrolizat predobrađene pšenične slame glukoza se troši brzinom od $0,29 \text{ h}^{-1}$, te se nakon 11 h bioprocesa glukoza u potpunosti iscrpljuje iz podloge. Lag faze je trajala oko 2 h nakon čega bakterija raste eksponencijalno ($t_{\text{exp}} = 5 \text{ h}$) i postiže maksimalnu specifičnu brzinu rasta od $0,56 \text{ h}^{-1}$. Prinos mliječne kiseline iznosi $18,67 \text{ g L}^{-1}$, a koeficijent konverzije $Y_{P/S}$ iznosi $0,99 \text{ g g}^{-1}$ te je vrlo sličan vrijednostima dobivenim za *L. gasseri* Hi 41/3/2 ($Y_{P/S} = 0,97 \text{ g g}^{-1}$ u MRS podlozi; $Y_{P/S} = 0,99 \text{ g g}^{-1}$ u modificiranoj MRS podlozi) i *L. gasseri* JCM 1131^T ($Y_{P/S} = 0,96$ u MRS podlozi). Produktivnost procesa proizvodnje mliječne kiseline u ovoj podlozi iznosi $Pr_P = 0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ što je za 14 % odgovarajuće vrijednosti za *L. gasseri* Hi 26/13/10 uzgajan u MRS podlozi (Tablica 11.), a za 11 % manje od Pr_P određeno za *L. gasseri* Hi 41/3/2 u modificiranoj MRS podlozi (Tablica 13.).

Tablica 12. Pokazatelji uspješnosti rasta bakterije *Lactobacillus gasseri* Hi 26/13/10 i proizvodnje mliječne kiseline u modificiranoj MRS podlozi pri 37°C i pH vrijednosti od 5,5.

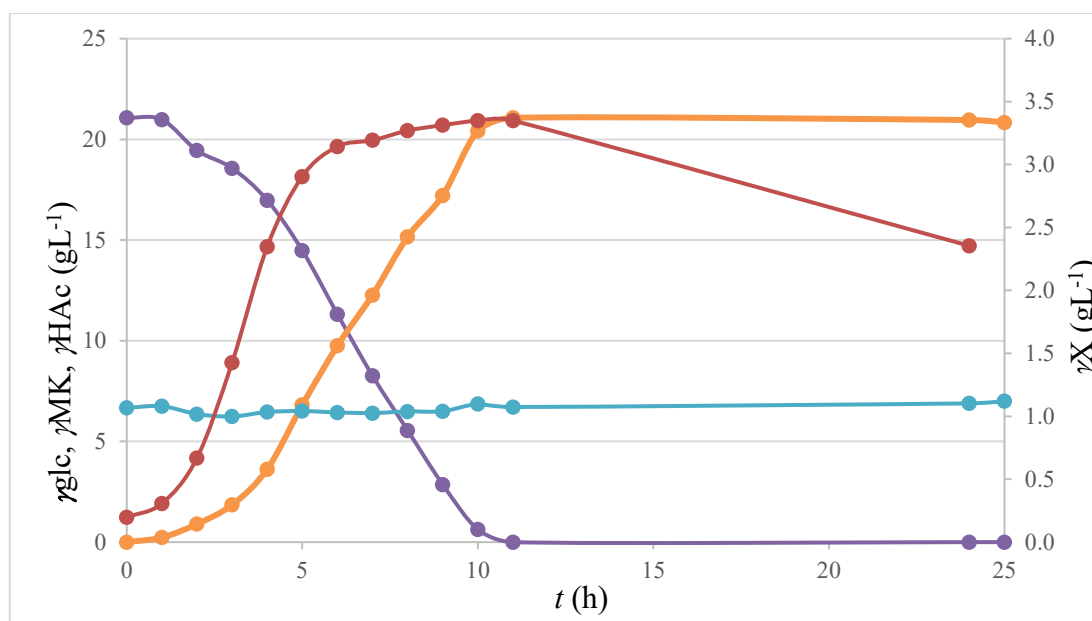
t_{lag}	2 h
t_{eksp}	5 h
$Y_{\text{X/S}}$	0,18 g g ⁻¹
$Y_{\text{P/S}}$	0,99 g g ⁻¹
$Pr_{\text{X/S}}$	0,13 g L ⁻¹ h ⁻¹
$Pr_{\text{P/S}}$	0,75 g L ⁻¹ h ⁻¹
r_{p}	0,29 h ⁻¹
r_{s}	0,29 h ⁻¹
μ_{max}	0,56 h ⁻¹

Yamada i suradnici (2017) su s pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae* proizvodili D-(-)- mliječnu kiselinu pri čemu je koeficijent konverzije supstrata u produkt iznosila $Y_{\text{P/S}} = 0,65 \text{ g g}^{-1}$ što je znatno manje od koeficijenta konverzije glukoze u mliječnu kiselinu dobivenog uzgojem bakterije *Lactobacillus gasseri* Hi 26/13/10 u standardnoj MRS hranjivoj podlozi ($Y_{\text{P/S}} = 0,99 \text{ g g}^{-1}$) i modificiranoj MRS hranjivoj podlozi s hidrolizatom predobrađene pšenične slame kao glavnim izvorom ugljikohidrata ($Y_{\text{P/S}} = 0,99 \text{ g g}^{-1}$). Produktivnost procesa proizvodnje mliječne kiseline s pomoću kvasca *S. cerevisiae* iznosila je $Pr_{\text{P}} = 2,8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ te je znatno veća od produktivnosti procesa proizvodnje D-(-)-mliječne kiseline u ovom radu ($Pr_{\text{P}} = 0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Povećana produktivnost procesa proizvodnje mliječne kiseline u radu Yamada i suradnika (2017) posljedica je visoke početne koncentracije supstrata (100 g L⁻¹ glukoze) i načina provođenja procesa polukontinuiranim postupkom. Ovim postupkom moguće je postići više koncentracije konačnog proizvoda što je jedna od glavnih prednosti u odnosu na šaržni postupak (Marić i Šantek, 2009).

4.3.2 Uzgoj bakterije *Lactobacillus gasseri* Hi 41/3/2 u modificiranoj MRS podlozi

Eksperimentalni podaci dobiveni tijekom bioprocesa odvojene hidrolize predobrađene pšenične slame s kompleksom celulolitičkih enzima i fermentacije nastalih jednostavnih

ugljikohidrata u modificiranoj MRS podlozi s pomoću bakterije *Lactobacillus gasseri* Hi 41/3/2 (producent L-(+)-mliječne kiseline) pokazuju da ova bakterija raste i proizvodi mliječnu kiselinu (Slika 15.). Bioproces je praćen tijekom 25 sati pri čemu su u pravilnim vremenskim razmacima uzimani uzorci u kojima je određena koncentracija supstrata, biomase i mliječne kiseline (Slika 15.). U izuzetim uzorcima određena je koncentracija drugih ugljikohidrata koji nastaju hidrolizom predobrađene pšenične slame, kao što su ksiloza i arabinoza. Ovaj mikroorganizam nije trošio navedene ugljikohidrate, te stoga na Slici 15. nisu prikazane ove vrijednosti.



Slika 15. Promjena koncentracije glukoze (●), biomase (●), mliječne (●) i octene kiseline (●) tijekom šaržnog uzgoja bakterije *Lactobacillus gasseri* Hi 41/3/2 u modificiranoj MRS podlozi, u kojoj je kao glavni izvor ugljika korišten hidrolizat predobrađene pšenične slame, pri 37°C i pH vrijednosti 5,5.

Tijekom uzgoja bakterije *Lactobacillus gasseri* Hi 41/3/2 u modificiranoj MRS podlozi u kojoj je kao glavni izvor ugljika korišten hidrolizat predobrađene pšenične slame glukoza se troši brzinom od $0,20 \text{ h}^{-1}$, te se nakon 11 h bioprocesa u potpunosti iscrpljuje iz podloge. Ova bakterija nakon vrlo kratke lag faze ($t_{\text{lag}} = 1 \text{ h}$) raste eksponencijalno ($t_{\text{exp}} = 5 \text{ h}$) i postiže maksimalnu specifičnu brzinu rasta od $0,67 \text{ h}^{-1}$. Navedena vrijednost za specifičnu brzinu rasta bakterije *L. gasseri* Hi 41/3/2 u MRS podlozi bila je za oko 50 % veća i iznosila je $1,02 \text{ h}^{-1}$ (Tablica 10.) Prinos mliječne kiseline iznosi $21,7 \text{ g L}^{-1}$, a koeficijent konverzije $Y_{P/S}$ iznosi 0,99

Rezultati

g g^{-1} te je vrlo sličan vrijednostima dobivenim za *L. gasseri* Hi 26/13/10 ($Y_{P/S} = 0,99 \text{ g g}^{-1}$ u MRS podlozi; $Y_{P/S} = 0,99 \text{ g g}^{-1}$ u modificiranoj MRS podlozi) i *L. gasseri* JCM 1131^T ($Y_{P/S} = 0,96$ u MRS podlozi). Produktivnost procesa proizvodnje mliječne kiseline u ovoj podlozi iznosi $Pr_P = 0,83 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ što je za 11 % do 32 % veće nego odgovarajuće vrijednosti za *L. gasseri* Hi 26/13/10 i *L. gasseri* JCM 1131^T (Tablica 8. – Tablica 13.).

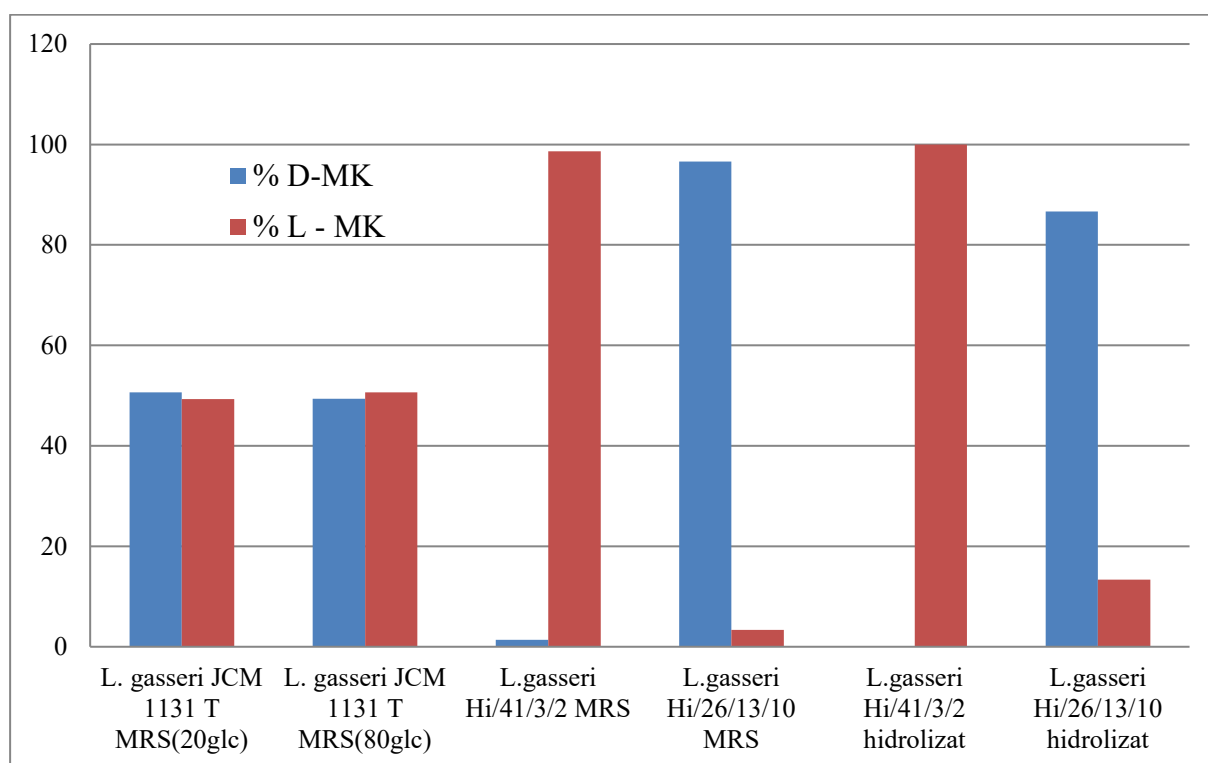
Usporedimo li produktivnost i koeficijent konverzije supstrata u produkt bakterije *Lactobacillus gasseri* Hi 41/3/2 (Tablica 13.) s istim vrijednostima za bakteriju *Bacillus coagulans* DSM 2314, producenta L-(+)-mliječne kiseline, koja je uzgajana na pšeničnoj slami tretiranoj vapnom ($Y_{P/S} = 0,74 \text{ g g}^{-1}$, $Pr_P = 0,74 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$; Mass i sur., 2008) vidljivo je da *L. gasseri* ima 33 % veći $Y_{P/S}$ i oko 12 % veću Pr_P .

Tablica 13. Pokazatelji uspješnosti rasta bakterije *Lactobacillus gasseri* Hi 41/3/2 i proizvodnje mliječne kiseline u modificiranoj MRS podlozi pri 37°C i pH vrijednosti od 5,5.

t_{lag}	1 h
t_{eksp}	5 h
$Y_{X/S}$	0,15 g/g
$Y_{P/S}$	0,99 g/g
$Pr_{X/S}$	0,12 $\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$
$Pr_{P/S}$	0,83 $\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$
r_P	0,27 h^{-1}
r_S	0,20 h^{-1}
μ_{max}	0,67 h^{-1}

4.4. Određivanje D-(-)- i L-(+)- stereoizomera mliječne kiseline

Za određivanje udjela D-(-)- odnosno L-(+)-stereoizomera mliječne kiseline u uzorcima izuzetim tijekom uzgoja bakterija *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T, *Lactobacillus gasseri* Hi 41/3/2 i *Lactobacillus gasseri* Hi 26/13/10 u različitim MRS podlogama korišten je Megazyme KD-LATE enzimski kit (poglavlje 3.3.4.). Dobiveni rezultati prikazani su na Slici 13.



Slika 16. Udio D-(-)- odnosno L-(+)-stereoizomera mliječne kiseline u uzorcima izuzetim tijekom uzgoja bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T, *Lactobacillus gasseri* Hi 41/3/2 i *Lactobacillus gasseri* Hi 26/13/10 u različitim MRS podlogama.

Enzimskim testom određeno je da bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T tijekom uzgoja u MRS podlozi s niskom ($\approx 20 \text{ g L}^{-1}$) i MRS podlozi s visokom koncentracijom glukoze ($\approx 80 \text{ g L}^{-1}$) proizvodi D-(-)- i L-(+)-mliječnu kiselinu u omjeru 1:1. Genetički modificirani soj bakterije *Lactobacillus gasseri* Hi 26/13/10 koji ima inaktiviran gen za L-laktat dehidrogenazu (*L-ldh1* gen) proizvodi D-(-)-mliječnu kiselinu s udjelom od 96,62 % u MRS podlozi ($\gamma_{\text{glc}} \approx 20 \text{ g L}^{-1}$), dok u modificiranoj MRS podlozi, u kojoj je hidrolizat

predobrađene pšenične slame korišten kao glavni izvor ugljika, udio D-(-)-mliječne kiseline bio za oko 10 % manji i iznosi je 86,67 %.

Drugi genetički modificirani soj bakterije *Lactobacillus gasseri* Hi 41/3/2 koji ima inaktiviran gena za D-laktat dehidrogenazu (*D-ldh* gen) proizvodi L-(-)-mliječnu kiselinu s udjelom od 98,61 % u MRS podlozi ($\gamma_{\text{glc}} \approx 20 \text{ g L}^{-1}$), dok u modificiranoj MRS podlozi, u kojoj je hidrolizat predobrađene pšenične slame korišten kao glavni izvor ugljika, udio L-(-)-mliječne kiseline je 100 %. Vrlo visoki postotak proizvedene L-(-)-mliječne kiseline u MRS podlozi s glukozom i modificiranoj MRS podlozi s hidrolizatom predobrađene pšenične slame svrstava ovaj soj bakterije kao potencijalno industrijsko primjenjiv radni mikroorganizam. Prednosti koje ovaj soj posjeduje je proizvodnja optički čiste L-(+)-mliječne kiseline na hidrolizatu otpadnih lignoceluloznih sirovina. Nadalje ovaj stereoizomer mliječne kiseline se može asimilirati i razgraditi u ljudskom tijelu te se iz istog razloga može koristiti u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Turner i sur., 2016; Wang i sur., 2015), kao i za proizvodnju polilaktata – polimera mliječne kiseline visokog stupnja kristaličnosti i čvrstoće (Yuan i sur., 2018).

5. ZAKLJUČCI

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

1. Bakterija *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T uzgajana šaržnim postupkom u MRS hranjivoj podlozi ($\gamma_{\text{glc}} = 20 \text{ g L}^{-1}$) pri 37°C i pri pH vrijednosti od 5,5 jedinica proizvodi mliječnu kiselinu uz koeficijent konverzije glukoze u mliječnu kiselinu od 0,96 g_P g_{glukoze}⁻¹ i produktivnost procesa od 0,66 g L⁻¹ h⁻¹. U navedenim uvjetima uz mliječnu kiselinu ne nastaju drugi produkti fermentacije.
2. Bakterija *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T može rasti pri povišenim koncentracijama glukoze ($\gamma_{\text{glc}} \approx 80 \text{ g L}^{-1}$) i proizvoditi mliječnu kiselinu s nešto manjim vrijednostima za koeficijent konverzije glukoze u mliječnu kiselinu ($Y_{\text{P/S}} = 0,82 \text{ g g}^{-1}$) i produktivnost procesa od 0,45 g L⁻¹ h⁻¹ u odnosu na fermentaciju provedenu u MRS podlozi s niskom početnom koncentracijom glukoze [$\gamma_{\text{glc}} \approx 20 \text{ g L}^{-1}$; $Y_{\text{P/S}} = 0,96 \text{ g g}^{-1}$; $Pr_{\text{P}} = 0,66 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$].
3. Genetički modificirani sojevi bakterije *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T (*Lactobacillus gasseri* Hi 41/3/2, producent L-(+)-mliječne kiseline i *Lactobacillus gasseri* Hi 26/13/10, producent D-(-)-mliječne kiseline) proizvode mliječnu kiselinu s koeficijentom konverzije glukoze u mliječnu kiselinu ($Y_{\text{P/S}}$) većim od 0,95 g g⁻¹ i produktivnosti procesa proizvodnje mliječne kiseline od 0,67 g L⁻¹ h⁻¹ u MRS podlozi ($\gamma_{\text{glc}} = 20 \text{ g L}^{-1}$) pri 37°C i pH 5,5. Oba genetički modificirana soja bakterije *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T u navedenim uvjetima uz mliječnu kiselinu ne proizvode druge nusprodukte fermentacije.
4. Genetički modificirani sojevi bakterije *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T (*Lactobacillus gasseri* Hi 41/3/2, producent L-(+)-mliječne kiseline i *Lactobacillus gasseri* Hi 26/13/10, producent D-(-)-mliječne kiseline) mogu rasti u modificiranoj MRS podlozi u kojoj je kao glavni izvor ugljikohidrata dodan hidrolizat predobrađene pšenične slame i proizvoditi mliječnu kiselinu jednakom uspješnošću kao i u MRS podlozi uz $Y_{\text{P/S}}$ od 0,99 g g⁻¹ i Pr_{P} od 0,67 g L⁻¹ h⁻¹ za *Lactobacillus gasseri* Hi 41/3/2, odnosno $Y_{\text{P/S}}$ od 0,97 g g⁻¹ i Pr_{P} od 0,68 g L⁻¹ h⁻¹ za *Lactobacillus gasseri* Hi 26/13/10.

Zaključci

5. Enzimskim testom određeno je da bakterija *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T proizvodi oba stereoizomera mliječne kiseline u gotovo podjednakim udjelima u hranjivoj MRS podlozi (% D-(-)-MK 50,7 i % L-(+)-MK 49,3), kao i u hranjivoj MRS podlozi s povišenom koncentracijom glukoze ($\gamma_{\text{glc}} = 80 \text{ g L}^{-1}$) (% D-(-)-MK 49,4 i % L-(+)-MK 50,6).
6. Genetički modificirana bakterija *Lactobacillus gasseri* Hi 26/13/10 proizvodi D-(-)-mliječnu kiselinu ($w_{\text{D-(-)-MK}} = 96,62 \%$), dok genetički modificirana bakterija *Lactobacillus gasseri* Hi 41/3/2 proizvodi L-(+)-mliječnu kiselinu ($w_{\text{L-(+)-MK}} = 98,61 \%$) u hranjivoj MRS podlozi.
7. Enzimskim testom određeni su i udjeli stereoizomera mliječne kiseline proizvedenih s pomoću genetički modificiranih sojeva bakterije *Lactobacillus gasseri* u modificiranoj MRS podlozi gdje je kao izvor ugljika korišten hidrolizat predobrađene pšenične slame, te je udio pojedinog stereoizomera mliječne kiseline iznosio redom 86,67 % D-(-)-MK i 13,33 % L-(+)-MK za fermentaciju s pomoću *Lactobacillus gasseri* Hi 26/13/10 i 100 % L-(-)-MK za fermentaciju s pomoću bakterije *Lactobacillus gasseri* Hi 41/3/2.

6. LITERATURA

1. Anonymus 1, Viscozyme L,
<<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/v2010?lang=en®ion=HR>>
. Pristupljeno 6. veljače 2019.
2. Anonymus 2, Cellulase, enzyme blend
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/sae0020?lang=en®ion=HR&gclid=CjwKCAiAv9riBRANEiwA9Dqv1Yl3oxcm3GipHRJoTF4Eh9BO6JjFr8YDKkHwj1DYnHw_ks0azRfehoCRTsQAvD_BwE>. Pristupljeno 6. veljače 2019.
3. Anonymus 3, D-/L-Lactic Acid (D-/L-Lactate) (Rapid) Assay Kit
<<https://secure.megazyme.com/DL-Lactic-Acid-Assay-Kit>>. Pristupljeno 6. veljače 2019.
4. 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** (4), 286 – 301.
5. Bajpai, P. (2016) Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production, 1. izd. Springer Singapore, Singapur.
6. Bušić, A., Marđetko, N., Kundas, S., Morzak, G., Belskaya, H., Šantek Ivančić, M., Komes, D., Novak, S., Šantek, B. (2018) Bioethanol Production from Renewable Raw Materials and Its Separation and Purification: A Review. *Food Technol. Biotechnol.* **56** (3), 289 – 311.
7. De Man, J. D., Rogosa, M., Sharpe, M. E. (1960) A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bact.* **23**, 130-135.
8. Demirbas, A. (2008) Heavy metal adsorption onto agro-based waste materials: a review. *J. Hazard. Mater.* **157**, 220-229.

9. Farah, S., Anderson, D. G., Langer, R. (2016) Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications — A comprehensive review. *Adv Drug Deliver Rev.* **107**, 367 – 392.
10. Ghaffar, T., Irshad, M., Anwar, Z., Aqil, T., Zulifqar, Z., Tariq, A., Kamran, M., Ehsan, N., Mehmood, S. (2014) Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on production to purification. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* **7**(2), 1 – 8.
11. Jiang, T., Qiao, H., Zheng, Z., Chu, Q., Li, X., Yong, Q., Quyang, J. (2016) Lactic Acid Production from Pretreated Hydrolysates of Corn Stover by a Newly Developed *Bacillus coagulans* Strain. *PloS One.* **11,12** (2), 1 – 13. doi: 1371/journal.pone.0149101
12. 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.
13. 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.
14. Marić, V., Šantek, B. (2009) Biokemijsko inženjerstvo, 1.izd., Golden Marketing - Tehnička knjiga, Zagreb.
15. Masutani, K., Kimura, Y. (2018) Present Situation and Future Perspectives of Poly(lactic acid). U: *Advances in Polymer Science* 279 – Synthesis, Structure and Properties of Poly(lactic acid) (Di Lorenzo, M. L., Androsch, R., ured.). Springer International Publishing AG, Cham, Switzerland, str.1-26.
16. Megazyme (2018) D-lactic Acid (D-Lactate) (Rapid) and L-lactic acid (L-lactate) Assay Procedures K-DLATE 08/18. Megazyme, Co. Wicklow, Irska.
17. Röper, H. (2015) Industrial Products from Starch. 56th Starch Convention, Detmold, <<http://www.agfdt.de/loads/st05/roepeabb.pdf>>. Pristupljeno 6. veljače 2019.

18. Swathi, A., Sridevi, V., Rao, G.H. (2015) Optimized lactic acid production from whey using hybrid design and ridge analysis. *J. Biochem. Tech.* **6** (2), 945-951.
19. Taleghani, H. G., Najafpour, G. D., Ghoreyshi, A. A., (2016) A study on the effect of parameters on lactic acid production from whey. *Pol. J. Chem. Tech.* **18** (1), 58 – 63.
20. Taskila, S., Ojamo, H. (2013) The Current Status and Future Expectations in Industrial Production of Lactic Acid by Lactic Acid Bacteria. U: *Lactic Acid Bacteria* (Kongo, J. M., ured.), IntechOpen, London, Ujedinjeno Kraljevstvo, str. 615-632.
21. Turner, T. L., Zhang, G. C., Oh, E. J., Subramaniam, V., Adiputra, A., Subramaniam, V., Skory, C. D., Jang, J. Y., Yu, B. J., Park, I., Jin, Y. S. (2016) Lactic Acid Production From Cellobiose and Xylose by Engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **113** (5), 1075 – 1083.
22. Vidović P. (2017) Proizvodnja mliječne kiseline na hidrolizatu pšenične slame dobivenom alkalnom predobradom u visokotlačnom reaktoru, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno – biotehnološki fakultet, Zagreb.
23. Vidra, A., Tóth, A. J., Németh, Á. (2017) Lactic acid production from cane molasses. *Liquid Waste Recovery* **2**, 13 – 16.
24. Wang, Y., Tashiro, Y., Sonomoto, K. (2015) Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits. *J. Biosci. Bioeng.* **1**, 10 – 18.
25. Yamada, R., Wakita, K., Mitsui, R., Ogino, H. (2017). Enhanced D-lactic Acid Production by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Following Optimization of the Global Metabolic Pathway. *Biotechnol. Bioeng.* **114**, 2075–2084.
26. Yuan, S.F., Hsu, T., C., Wang, C. A., Jang, M. F., Kuo, Y. C., Alper, H. S., Gup, G. L., Hwang, W. S. (2018) Production of optically pure L(+)-lactic acid from waste plywood chips using an isolated thermotolerant *Enterococcus faecalis* SI at a pilot scale. *J. Ind. Microbiol. Biot.* **45**, 961–970.

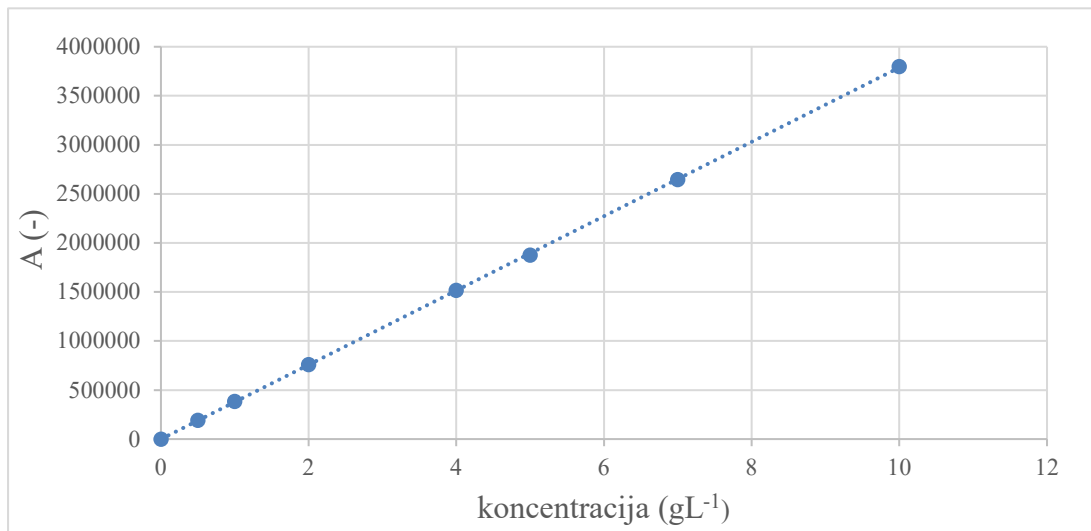
27. Yun, J. S., Wee, Y. J., Ryu, H. W. (2003) Production of optically pure L(+)-lactic acid from various carbohydrates by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1. *Enzyme Microb. Tech.* **33**, 416 – 423.
28. Juturu, W., Wu, J. C. (2016) Microbial production of lactic acid: the latest development, *Crit. Rev. Biotechnol.*, **36**(6), 967-977.
29. Zhang, C., Zhou, C., Assavasirijinda N., Yu, B., Wang, L., Ma Y. (2017) Non-sterilized fermentation of high optically pure d-lactic acid by a genetically modified thermophilic *Bacillus coagulans* strain. *Microb. Cell. Fact.* **16** (213), 1 – 10.
30. Zhao, K., Qiao, Q., Chu, D, Gu, H., Dao, H., Zhang, J., Bao, J. (2013) Simultaneous saccharification and high titer lactic acid fermentation of corn stover using a newly isolated lactic acid bacterium *Pediococcus acidilactici* DQ2. *Biores. Technol.* **135**, 481 - 489.

7. PRILOZI

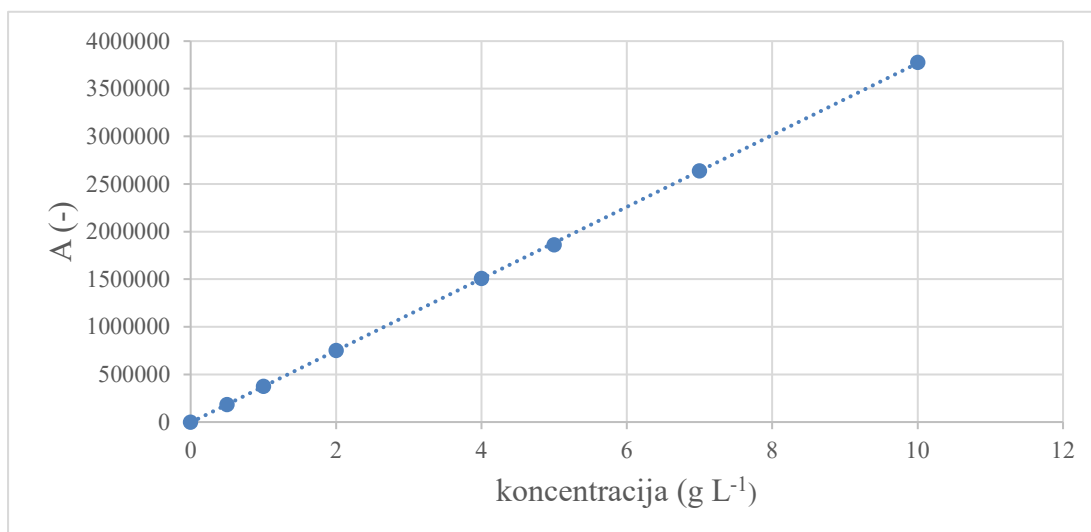
7.1. Popis kratica

Oznaka veličine	Veličina	Jedinica
t_{lag}	lag faza rasta	[h]
t_{eksp}	eksponencijalna faza rasta	[h]
r_s	brzina potrošnje supstrata	[h ⁻¹]
μ_{max}	maksimalna specifična brzina rasta biomase	[h ⁻¹]
r_p	brzina proizvodnje mliječne kiseline	[h ⁻¹]
$Y_{P/S}$	koeficijent konverzije glukoze u mliječnu kiselinu	[g g ⁻¹]
Pr_p	produktivnost proizvodnje mliječne kiseline	[g L ⁻¹ h ⁻¹]
PS	pšenična slama	
PPS	predobrađena pšenična slama	
E/S	omjer mase dodanog enzima po gramu supstrata	[%]
ksi	ksiloza	
$arab$	arabinoza	
BMK	bakterije mliječne kiseline	
MK	mliječna kislina	
OK	octena kislina	
WT	<i>Lactobacillus gasseri</i> JCM 1131 ^T	

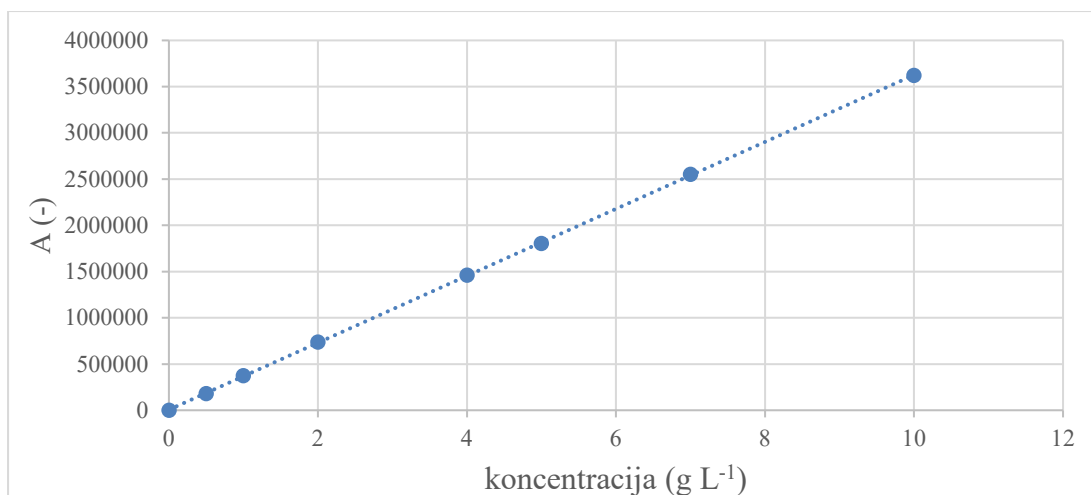
7.2. Baždarni dijagrami za određivanje koncentracije supstrata i proizvoda tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)



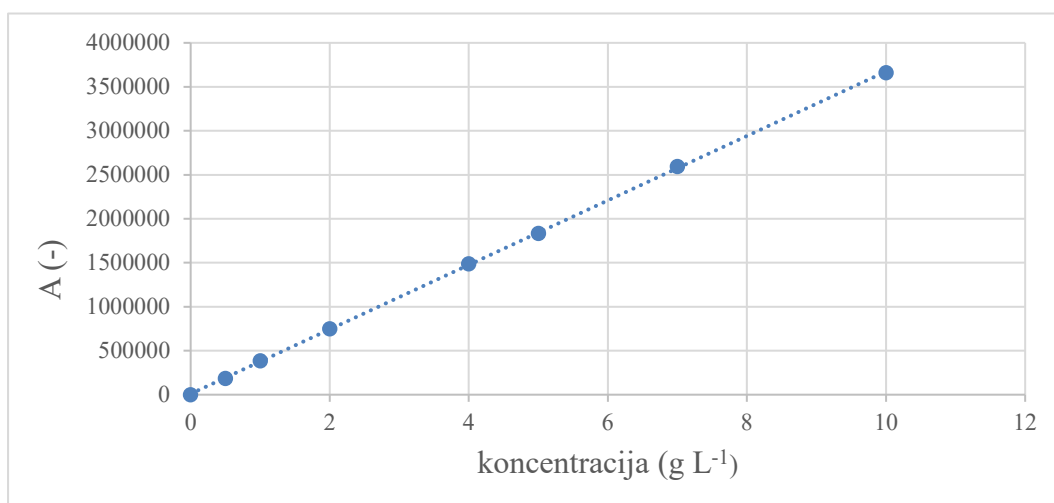
Slika 17. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije celobioze.



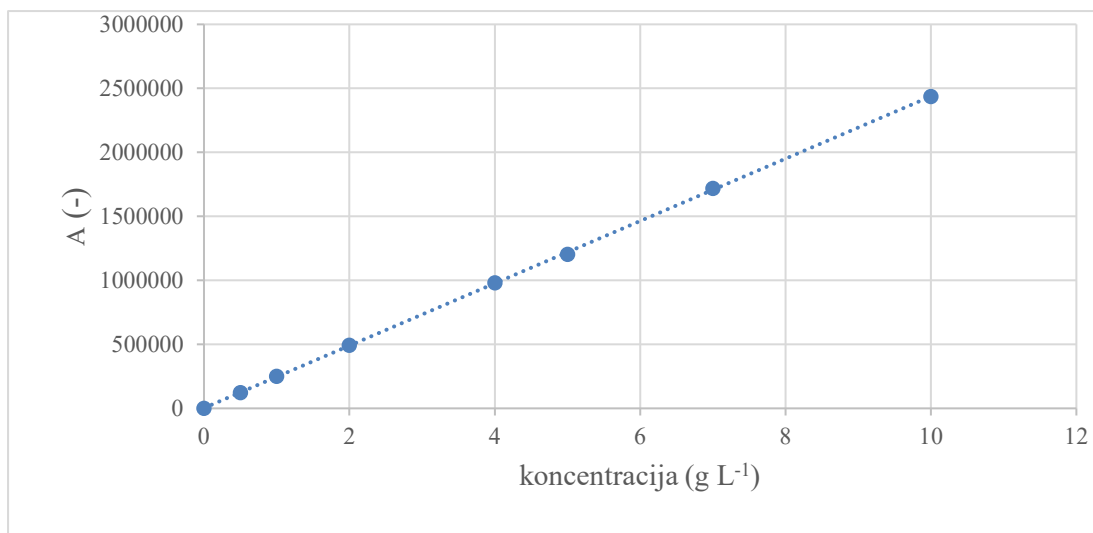
Slika 18. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije glukoze.



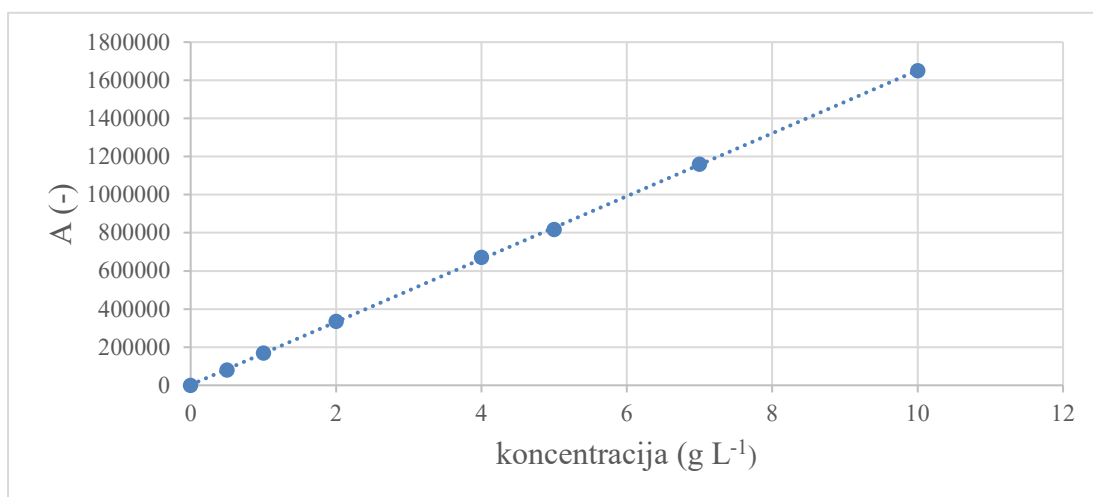
Slika 19. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije ksiloze.



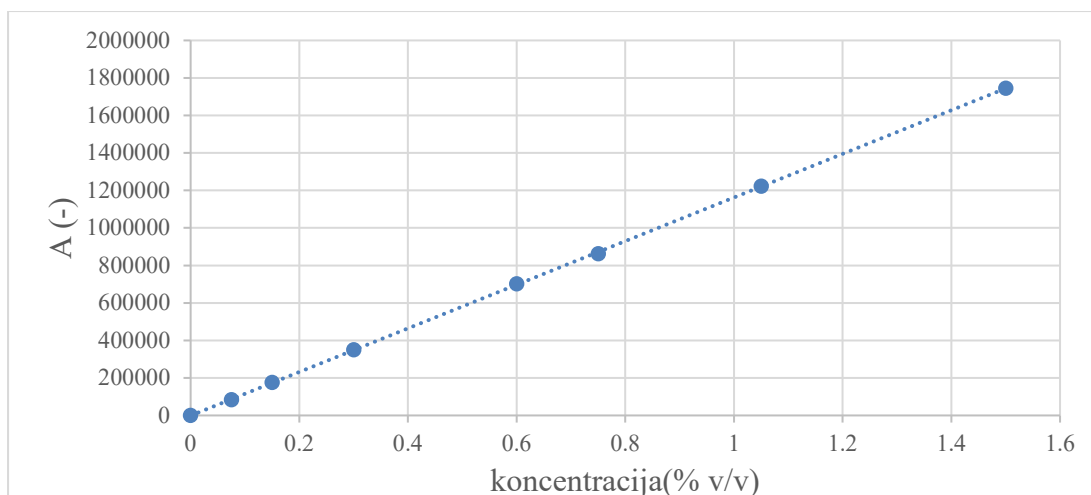
Slika 20. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije arabinoze.



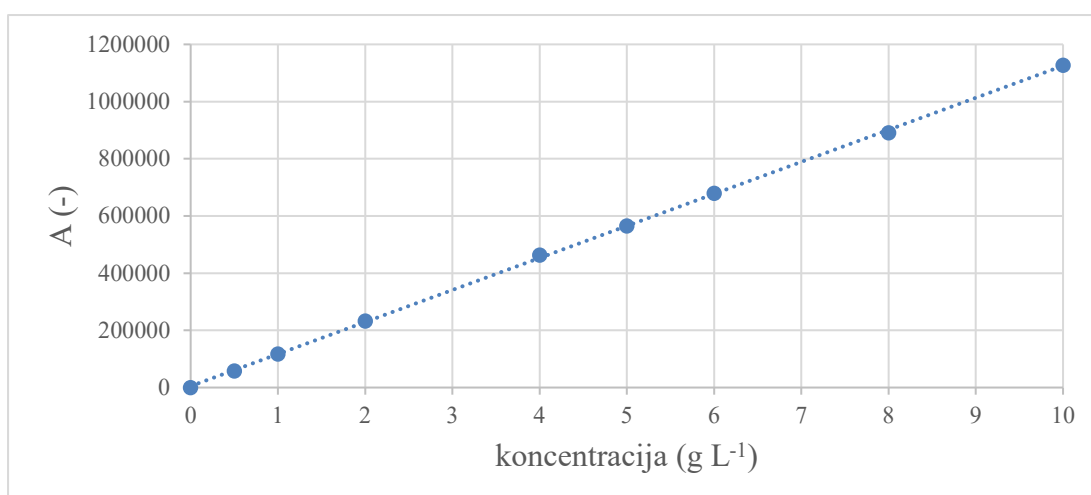
Slika 21. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije mliječne kiseline.



Slika 22. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije octene kiseline.



Slika 23. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije etanola.



Slika 24. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije mravlje kiseline.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mog rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'J. Grab', is written above a horizontal line.

Ime i prezime studenta