

Mikrobiologiczna produkcja kwasu mlekowego z surowców odnawialnych

Patrycja Pietraszek, Katarzyna Dybka, Piotr Walczak, Anna Otlewska, Anna Rygała,
Elżbieta Ołtuszek-Walczak

Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii,
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka
ul. Wólczańska 171/173, 90-924 Łódź, Polska

Abstrakt. Artykuł stanowi przegląd danych dotyczących produkcji kwasu mlekowego na drodze biotechnologicznej z wykorzystaniem odnawialnych źródeł węgla (głównie biomasy roślinnej). Zaprezentowano szerokie spektrum mikroorganizmów syntetyzujących kwas mlekowy (bakterie fermentacji mlekowej, *Bacillus* sp., *Escherichia coli*, grzyby strzępkowe), w tym drobnoustroje uzyskane w wyniku modyfikacji genetycznych. Ponadto opisano substraty skrobiowe, celulozowe i hemicelulozowe oraz odpadowe produkty przemysłowe (melasa, serwatka) stosowane do produkcji kwasu mlekowego. Podjęto próbę charakterystyki czynników wpływających na przebieg i ekonomikę procesu biosyntezy kwasu mlekowego oraz na jakość i ilość otrzymywanego produktu końcowego w konkretnych warunkach hodowli. Autorzy skupili się na metodach ulepszania szczepów produkcyjnych oraz czynnikach wzbogacających podłoża hodowlane w celu zwiększenia wydajności procesu i czystości kwasu mlekowego. Przedstawiono także perspektywy zastosowania kwasu mlekowego, zwłaszcza w odniesieniu do produkcji biodegradowalnego polilaktydu.

słowa kluczowe: kwas mlekowy, PLA, bakterie fermentacji mlekowej, surowce odnawialne

WSTĘP

Stopniowe wyczerpywanie światowych zasobów paliw kopalnych oraz rozwój działań mających na celu ochronę środowiska naturalnego spowodowały intensyfikację badań nad alternatywnymi źródłami materiałów polimerowych. Naukowcy dążą do opracowania technologii produkcji polimerów, które charakteryzowałyby się takimi właściwościami jak znane dotychczas tworzywa sztuczne,

a jednocześnie byłyby łatwo biodegradowalne i otrzymywane ze źródeł odnawialnych. Wytwarzanie polimerów przyjaznych środowisku naturalnemu jest korzystne zarówno ze względu na problem przepełnienia składowisk odpadów komunalnych, ograniczone zasoby surowców petrochemicznych, jak i możliwość zagospodarowania tani, często odpadowych, surowców pochodzenia roślinnego. Wykorzystanie biomasy roślinnej do produkcji materiałów polimerowych pozwala na oszczędności w zużyciu nieodnawialnych surowców kopalnych, co jest dodatkowo zgodne z zasadą zrównoważonego rozwoju.

Jim Jem i in. (2010) szacują, iż do roku 2020 światowa roczna zdolność produkcyjna kwasu mlekowego i przemysłu PLA prawdopodobnie przekroczy milion ton, a w ciągu najbliższych 10–20 lat należy oczekiwać, iż skala przemysłu PLA osiągnie poziom zbliżony do dzisiejszej skali przemysłu tradycyjnych tworzyw sztucznych. Gwałtowny wzrost zapotrzebowania na taktyczny polilaktyd spowodował zatem konieczność zwiększenia produkcji optycznie czystych izomerów kwasu L(+) i/lub D(-) mlekowego z udziałem drobnoustrojów.

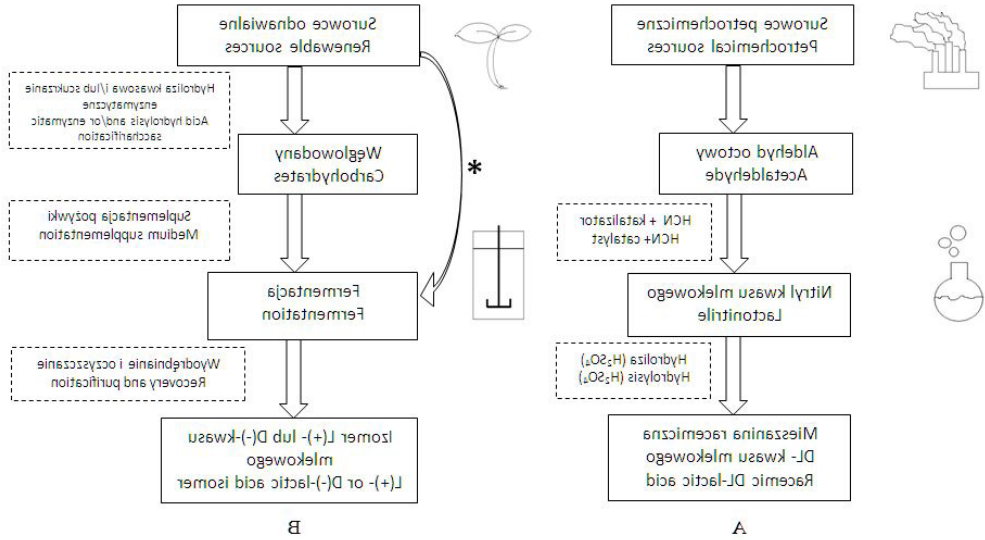
MIKROORGANIZMY PRODUKUJĄCE KWAS MLEKOWY

Obecnie kwas mlekowy (LA, ang. Lactic Acid) produkowany jest głównie (95%) na drodze fermentacyjnej (rys. 1) z wykorzystaniem surowców roślinnych (Jim Jem i in., 2010). Mikroorganizmy zdolne do produkcji kwasu mlekowego to przede wszystkim bakterie fermentacji mlekowej (LAB, ang. Lactic Acid Bacteria). Dominują one wśród producentów kwasu mlekowego wykorzystywanych na skalę przemysłową. Bakterie kwasu mlekowego to zróżnicowana ewolucyjnie grupa mikroorganizmów nieprzetrwalnikujących, katalazoujemnych, względnie beztlenowych, pozbawionych zdolności ruchu. Genom tych drobnoustrojów jest stosunkowo mały i w zależności

Autor do korespondencji:

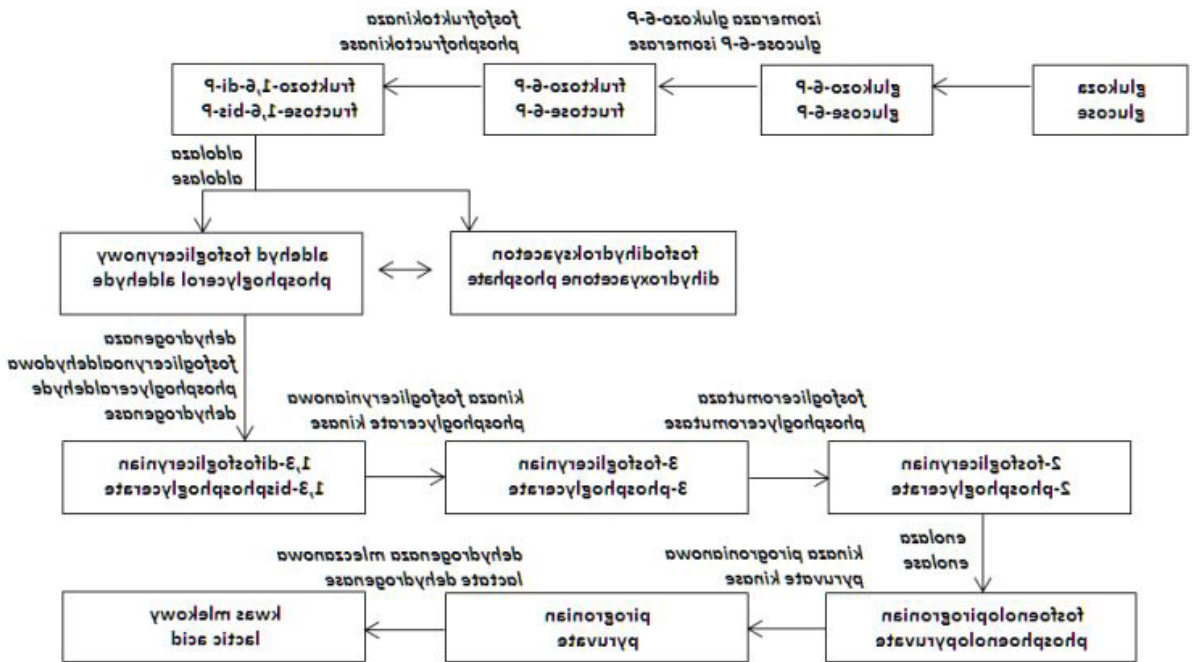
Patrycja Pietraszek
e-mail: patrycja.pietraszek@edu.p.lodz.pl
tel. +48 42 6363639, faks +48 42 6365976

Praca wpłynęła do redakcji 4 lipca 2013 r.



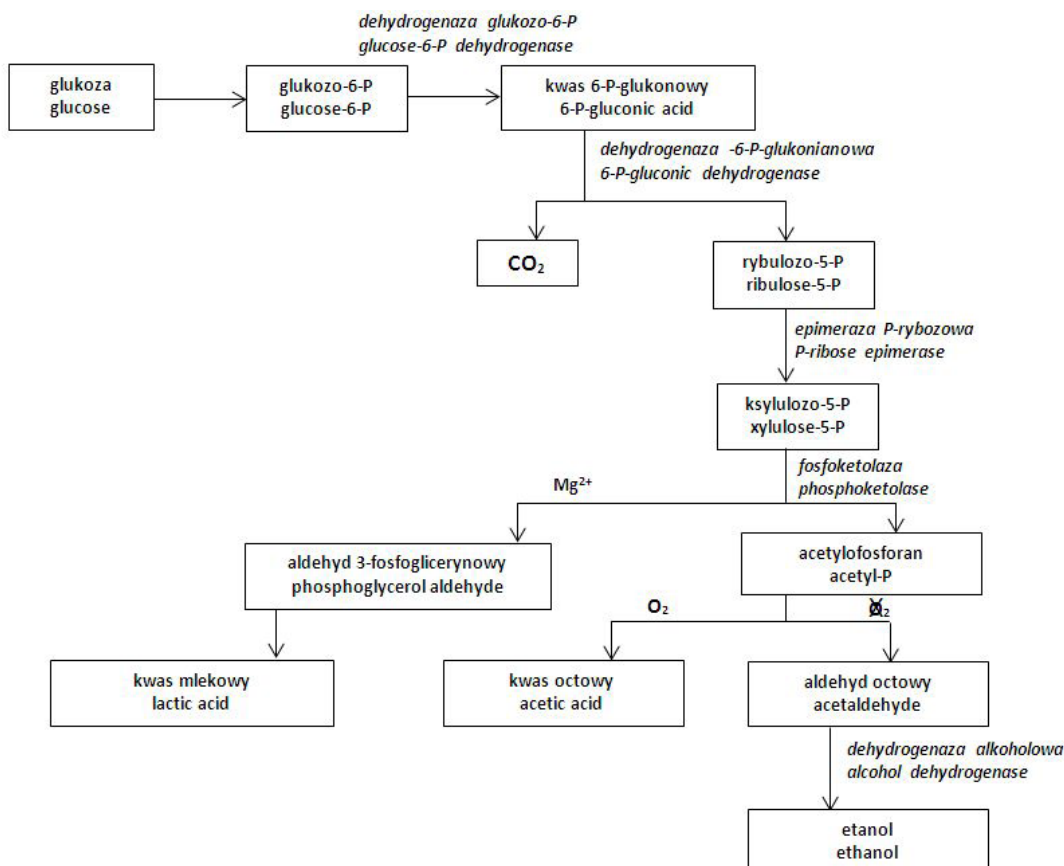
Źródło: opracowanie własne na podstawie Wee i in. (2006)
 Source: author's elaboration on the basis of Wee et al. (2006)

Rys. 1. Schemat produkcji kwasu mlekowego na drodze syntez chemicznej (A) i biotechnologicznej (B)
 Fig. 1. Scheme of lactic acid synthesis based on chemical (A) and biotechnological methods (B).



Źródło: opracowanie własne na podstawie Lipidzisz (2008), Wee i in. (2006)
 Source: author's elaboration on the basis of Lipidzisz (2008), Wee et al. (2006)

Rys. 2. Homofermentatywna przemiana glukozy przez bakterie fermentacji mlekowej (szlak Embdena-Meyerhofa-Parnasa)
 Fig. 2. Metabolic pathway of homofermentative lactic acid bacteria (Embden-Meyerhof-Parnas pathway).



Źródło: opracowanie własne na podstawie Libudzisz i in. (2008) oraz Wee i in. (2006)
Source: author's elaboration on the basis of Libudzisz et al. (2008) and Wee et al. (2006).

Rys. 3. Heterofermentatywna przemiana glukozy przez bakterie fermentacji mlekowej (szlak fosfoketolazy pentozowej)
Fig. 3. Metabolic pathways of heterofermentative lactic acid bacteria (phosphoketolase pathway).

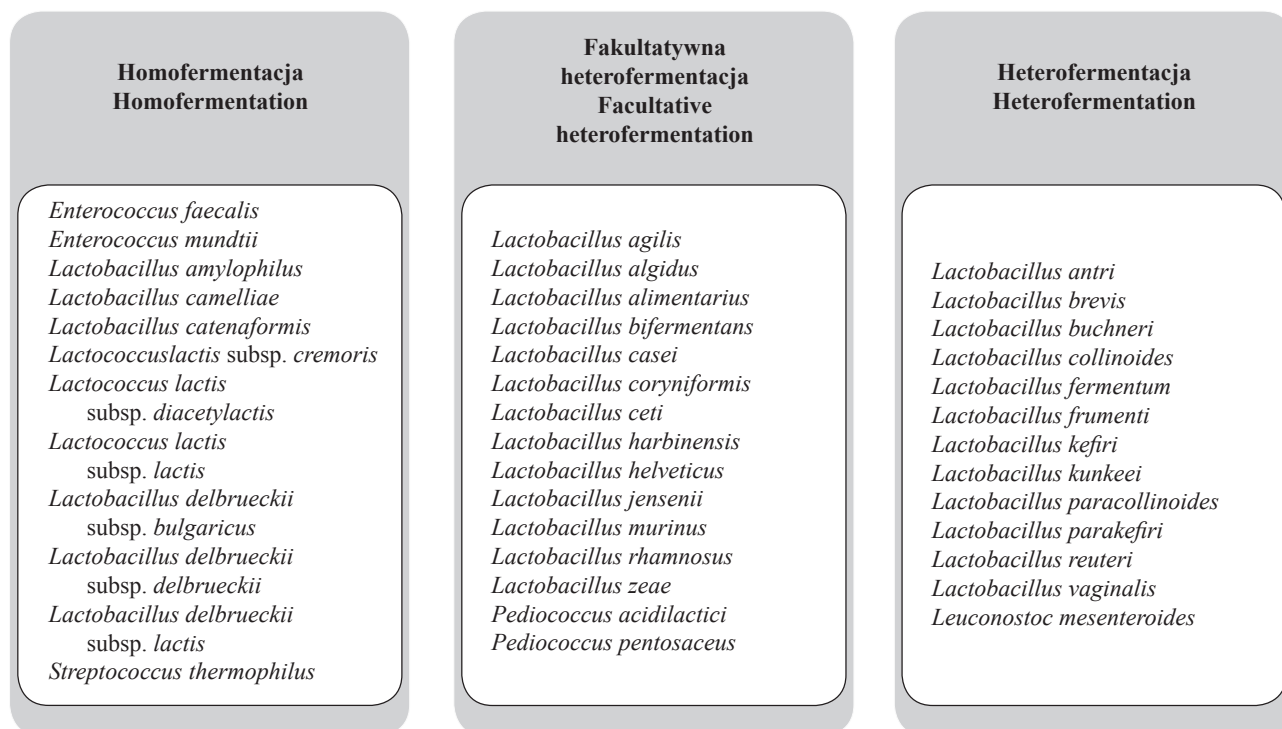
od gatunku zawiera od około 2 do 3 M pz, o zawartości zasad G+C poniżej 56,0% molowych. LAB zasiedlają takie środowiska jak rośliny, mleko i jego przetwory, przewód pokarmowy i układ moczowo-płciowy człowieka i zwierząt.

Do grupy tej należą gramdodatnie ziarniaki z rodzajów *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Weissella*, *Vagococcus* oraz gramdodatnie pałeczki o zróżnicowanej długości z rodzaju *Lactobacillus* i *Carnobacterium*. Ze względu na zbliżone cechy i fermentacyjny metabolizm sacharydów, do bakterii kwasu mlekowego zaliczane są również odległe filogenetycznie bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* (G+C ~54–67% molowych). Wspólną cechą LAB jest zdolność biosyntezy kwasu mlekowego jako głównego metabolitu. Cechą gatunkową bakterii jest natomiast zróżnicowana tolerancja na niskie wartości pH pożywki fermentacyjnej i optymalna temperatura wzrostu. Gatunki mezofilne wykazują zdolność wzrostu w zakresie temperatur od 20 do 28°C i produkcją kwas mlekowy

o stężeniu 1,5% w przeliczeniu na objętość pożywki produkcyjnej; natomiast gatunki termofili najlepiej rozwijają się w temperaturze około 40–45°C, a fermentacja prowadzona z ich udziałem pozwala na wytworzenie do 3,0% kwasu mlekowego w warunkach hodowli niezobojętnianej.

Fermentacja sacharydów z udziałem LAB zachodzi z wykorzystaniem różnych szlaków metabolicznych. Bakterie fermentacji mlekowej ze względu na metabolizm klasyfikuje się jako homofermentatywne (rys. 2), gdy wytwarzają niemal wyłącznie kwas mlekowy, lub heterofermentatywne (rys. 3), gdy oprócz kwasu mlekowego produkowane są CO₂, kwas octowy (warunki tlenowe), aldehyd octowy i/lub etanol (warunki beztlenowe), lub jako fakultatywnie heterofermentatywne (Wee i in., 2006; Libudzisz, 2008; Gajewska, Błaszczuk, 2012). Podział bakterii kwasu mlekowego uwarunkowany typem fermentacji glukozy przedstawiono na rysunku 4.

Kryteria doboru odpowiednich szczepów produkcyjnych zależą od pożądanego typu produktu końcowego fermentacji. Najczęściej preferuje się termofilne szczepy pro-



Źródło: opracowanie własne na podstawie Gajewska, Błaszczak (2012), Walczak i in. (2012), John i in. (2007), Wee i in. (2006), Torino i in. (2001)
 Source: author's elaboration on the basis of Gajewska, Błaszczak (2012), Walczak et al. (2012), John et al. (2007), Wee et al. (2006), Torino et al. (2001).

Rys. 4. Podział wybranych gatunków bakterii fermentacji mlekowej w zależności od typu fermentacji sacharydów
 Fig. 4. Division of selected species of lactic acid bacteria depending on the type of saccharide fermentation.

dukujące kwas mlekowy w krótkim czasie, wytwarzające niewiele produktów ubocznych, a także silnie opanowujące środowisko. Zaletą wykorzystania szczepów termofilnych, tj. bakterii z rodzajów *Streptococcus* lub *Enterococcus*, jest podwyższona temperatura procesu (40–50°C), co zapobiega rozwojowi niekorzystnej mikroflory mogącej zakłócić przebieg fermentacji mlekowej. Dodatkowo jednym z czynników selekcyjnych przy wyborze odpowiednich szczepów jest forma produkowanego kwasu mlekowego. Poszczególne gatunki bakterii fermentacji mlekowej syntetyzują go w trzech formach: prawoskrętnej L(+), lewoskrętnej D(-) oraz ich racemicznej mieszaniny DL. Kwas mlekowy uzyskiwany na drodze syntezy chemicznej produkowany jest wyłącznie w postaci mieszaniny racemicznej i jest nieprzydatny do wytwarzania taktycznego polilaktydu (PLA) o odpowiednich właściwościach termoplastycznych.

Rodzaj syntetyzowanego izomeru optycznego uzależniony jest od stereospecyficzności dehydrogenaz mleczanowych (LDH) oraz aktywności racemazy mleczanowej (konwertującej formę L(+) w D(-), lub odwrotnie). Czystość optyczna kwasu mlekowego jest również istotna dla właściwego przebiegu procesu polimeryzacji PLA. Do-

mieszka enancjomeru D(-) podczas syntezy LL-laktydu, produktu pośredniego procesu polimeryzacji, prowadzi do powstania DL-laktydu, obniża to wydajność syntezy polilaktydu, zmniejsza jego zdolność do krystalizacji, co wpływa na właściwości fizykochemiczne polimeru (termoplastyczność, wytrzymałość, lepkość). PLA może występować w formie homochiralnych, izotaktycznych polimerów L-PLA i D-PLA lub jako heterochiralny, amorficzny polimer o bezładnym rozkładzie jednostek D i L, co może powodować niepożądane zmiany we właściwościach mechanicznych i reologicznych polimeru. Szczepy, które posiadają zdolność biosyntezy kwasu mlekowego w formie L(+), są szczególnie cenne, gdyż istnieje zapotrzebowanie zwłaszcza na produkty będące pochodnymi tego izomeru (Jim Jem i in., 2010; Malinowski, Łubkowski, 2010).

Aktualnie w celu zwiększenia produkcji czystych optycznie izomerów kwasu mlekowego badacze skupiają się na ulepszeniu szczepów produkcyjnych metodami inżynierii genetycznej. Oczywistym obszarem budzącym zainteresowanie naukowców są czynniki wpływające na metabolizm sacharydów. Głównym kierunkiem w tych badaniach jest przede wszystkim inaktywacja genów kodujących specyficzne dehydrogenazy mleczanowe, zwłaszcza

D-specyficzne. Delecja w obrębie genu *ldhL* w wyniku dwustopniowej homologicznej rekombinacji przeprowadzonej przez Ferain i in. (1994) spowodowała, że szczep *Lactobacillus plantarum* DG 301 stał się producentem wyłącznie kwasu D-mlekowego.

Kylä-Nikkilä i in. (2000) uzyskali natomiast ekspresję tylko i wyłącznie genu *ldhL* w dwóch mutantach *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 oznaczonych jako GRL86 i GRL89. Pierwszy z nich otrzymano poprzez delecję regionu promotorowego genu *ldhD*, w wyniku czego jego transkrypcja została zahamowana, drugi wariant polegał zaś na zastąpieniu regionu strukturalnego genu *ldhD* dodatkową kopią fragmentu strukturalnego genu *ldhL* pochodzącą z tego samego szczepu (ekspresja dehydrogenazy L-mleczanowej odbywała się pod kontrolą promotora genu *ldhD*). W wyniku tych modyfikacji uzyskano zwiększenie wydajności procesu biosyntezy kwasu L-mlekowego odpowiednio o 53 i 93% w porównaniu do szczepu CNRZ32. Warto również podkreślić, iż szczep GRL89 produkował o około 20% więcej kwasu mlekowego od mutantu GRL86.

Wśród bakterii produkujących kwas mlekowy wymienić należy również szczepy *Escherichia coli*. Mikroorganizmy te charakteryzują się małymi wymaganiami pokarmowymi, a także zdolnością fermentacji zarówno heksoz, jak i pentoz. Mimo wspomnianych zalet tych drobnoustrojów, wydajność procesu syntezy LA z ich udziałem jest zbyt niska, by można było rozpatrywać zastosowanie tych szczepów do przemysłowej produkcji kwasu mlekowego. Wynika to przede wszystkim z faktu, iż bakterie *Escherichia coli* syntetyzują mieszaninę kwasów organicznych, między innymi kwas D-mlekowy, bursztynowy i mrówkowy (Zhou i in., 2003). Ograniczenia te zostały zredukowane poprzez konstrukcję zmodyfikowanych genetycznie, homofermentatywnych szczepów *Escherichia coli*. Mikroorganizmy te wykazywały zdolność do syntezy sześciokrotnie większej ilości kwasu mlekowego w porównaniu ze szczepem wyjściowym. Kolejne modyfikacje zapewniły wzrost poziomu syntezy D-LA do 0,8 g·g⁻¹ substratu (RR 1), 0,9 g·g⁻¹ (JP 203), a następnie 0,98 g·g⁻¹ substratu dla *Escherichia coli* SZ63. Uzyskany ostatecznie prototypowy, homofermentatywny szczep SZ63 stał się pierwowzorem kolejnej linii mutantów wykazujących zdolność syntezy kwasu L-mlekowego. Wprowadzone modyfikacje dotyczyły przede wszystkim zastąpienia genu kodującego dehydrogenazę kwasu D-mlekowego (D-LDH) dehydrogenazą kwasu L-mlekowego (L-LDH) *Pediococcus acidilactici*. Obejmowały one również mutacje powyżej regionu kodującego L-LDH, w jego obrębie, a także mutacje sekwencji terminatora genu. Otrzymany na tej drodze szczep syntetyzował 45,5 g·l⁻¹ kwasu mlekowego, z wydajnością 0,95 g·g⁻¹ substratu i czystością optyczną 99,5% (Zhou i in., 2003).

Kolejnymi mikroorganizmami zdolnymi do syntezy kwasu mlekowego są gram dodatnie, tlenowe bakterie *Corynebacterium glutamicum*, których zaletą jest możliwość

wzrostu i produkcji kwasów organicznych w pożywce mineralnej. Mikroorganizmy te w warunkach ograniczonego dostępu tlenu syntetyzują mieszaninę kwasów, w tym kwas L-mlekowy. Opierająca się na tym założeniu technologia produkcji LA opracowana przez Yukawa i in. (2007) pozwoliła na uzyskanie wysokiej wydajności syntezy izomeru L, aczkolwiek w procesie tym zaobserwowano również powstawanie kwasu bursztynowego (Okino i in., 2005). Korzystając z tego samego systemu skonstruowano szereg mutantów *Corynebacterium glutamicum* zdolnych do produkcji kwasu D-mlekowego z glukozy, co osiągnięto poprzez ekspresję genu *ldhD* *Lactobacillus delbrueckii* u *Corynebacterium glutamicum*. Wprowadzona modyfikacja pozwoliła na produkcję 120 g kwasu D-LA o czystości optycznej 99,9% w przeliczeniu na litr pożywki produkcyjnej (Okino i in., 2008). Co więcej, uzyskano także zmodyfikowane szczepy zdolne do wykorzystania ksylozy, a także arabinozy w kierunku produkcji kwasu L-mlekowego (odpowiednio ekspresja genów *xylA* oraz *xylB* *E. coli*, ekspresja *araA*, *araB* oraz *araD* *E. coli*). Podczas fermentacji ksylozy stwierdzono ponadto syntezę kwasu bursztynowego, a przy produkcji kwasu mlekowego z arabinozy otrzymano równolegle kwas bursztynowy i octowy. Kolejnym osiągnięciem było skonstruowanie szczepu *Corynebacterium glutamicum* X5C1 zdolnego do produkcji kwasów organicznych nie tylko z cukrów prostych, ale i złożonych. Mikroorganizm ten wykazywał zdolność do jednoczesnego wykorzystania glukozy, ksylozy i celobiozy jako cukrów do produkcji kwasów: mlekowego, bursztynowego i octowego (Sasaki i in., 2008). Wprowadzone modyfikacje pozwoliły zatem na wykorzystanie bakterii *Corynebacterium glutamicum* do fermentacji różnych źródeł węgla, w oparciu o proste pożywki mineralne, a uzyskane kwasy organiczne charakteryzują się wysokim stopniem czystości optycznej. Problemem jest natomiast duża wrażliwość szczepów *Corynebacterium glutamicum* na niskie pH środowiska, a także jednoczesna produkcja wspomnianych już kwasów organicznych obniżająca w efekcie wydajność produkcji LA.

Alternatywą dla produkcji kwasu mlekowego z udziałem przedstawionych gatunków bakterii jest wykorzystanie grzybów strzępkowych z rodzaju *Rhizopus*. Mikroorganizmy te charakteryzują się mniejszymi wymaganiami pokarmowymi, a także większą tolerancją na niskie wartości pH środowiska (Huang i in., 2005). Syntetyzują one wyłącznie izomer L kwasu mlekowego, a ponadto wykazują aktywność amylolityczną, co stwarza możliwość ich wykorzystania do jednoczesnego skuczrania i fermentacji tanich, odpadowych surowców skrobiowych znacznie obniżających koszty procesu syntezy LA (Yin i in., 1997). Poważnym ograniczeniem zastosowania grzybów strzępkowych do przemysłowej produkcji kwasu mlekowego jest z kolei niska wydajność syntezy, warunkowana powstawaniem obok LA również innych kwasów organicznych, takich jak kwas fumarowy, bursztynowy czy jabłkowy, oraz etanolu.

Wydajność procesu, a zatem ilość powstających produktów ubocznych, zależy w znacznym stopniu od napowietrzania środowiska reakcji. W przypadku ograniczonego dostępu tlenu metabolizm *Rhizopus* sp. skierowany jest na produkcję etanolu, podczas gdy w warunkach tlenowych przy zbyt małej efektywności napowietrzania powstają relatywnie małe, w porównaniu z LA, ilości innych kwasów organicznych. Istotne jest zatem utrzymanie właściwego, wydajnego napowietrzania oraz mieszania hodowli, które przyczynią się do zredukowania ilości powstających produktów ubocznych (Wee i in., 2006). Ważnym aspektem produkcji LA z udziałem grzybów strzępkowych jest także ich morfologia. Wzrost *Rhizopus* sp. w postaci strzępek o różnym stopniu rozgałęzienia, rozrzuconych w całej objętości pożywki skutkuje zwiększeniem lepkości brzezki fermentacyjnej, tworzeniem się w fermentorze układu heterogenicznego, który ogranicza wymianę masy i dyfuzję tlenu do środowiska i komórek grzybni. Korzystniejszym układem jest zatem wykorzystanie *Rhizopus* sp. w postaci kłębzków (ang. pellets), których zewnętrzną strefę tworzą krótkie, rozgałęzione strzępki. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, iż zbyt duże rozmiary „pellets” mogą stać się przyczyną utrudnień, które obserwowano w przypadku wolnych strzępek. Istotna jest zatem kontrola wymiarów tworzonych kłębzków odbywająca się poprzez monitorowanie składu pożywki fermentacyjnej, dodatku jonów wapnia czy czasu trwania procesu. Mimo nadzoru nad wymienionymi parametrami procesu, osiągnięta wydajność syntezy wynosi ok. 80%. Alternatywą dla wspomnianych metod jest zastosowanie strzępek immobilizowanych na nośnikach syntetycznych, takich jak gąbka poliuretanowa (Dong i in., 1996), alginian wapnia (Hamamci, Ryu, 1994) lub dimetylowany glikol polietylenowy (Tamada i in., 1992). Zaletą tych układów jest możliwość kilkakrotnego zastosowania, a także redukcja problemu dyfuzji substratów i produktów w środowisku reakcji.

SUROWCE ODNAWIALNE

Niewątpliwe zalety bakterii fermentacji mlekowej w produkcji izomerów kwasu mlekowego spowodowały, iż znalazły one zastosowanie w przemysłowej syntezie tych związków. Należy jednak nadmienić, iż mikroorganizmy te posiadają wysokie wymagania pokarmowe, wynikające z braku zdolności syntezy przez LAB witamin z grupy B oraz aminokwasów. Wymagają one zatem wzbogacania pożywki produkcyjnej organicznymi, łatwo przyswajalnymi źródłami azotu, witaminami oraz mikroelementami (van Niel, Hahn-Hägerdal, 1999; Amrane, 2000). Stosowanie czystych surowców wpływa korzystnie na jakość syntetyzowanego kwasu mlekowego, aczkolwiek jest znacznym obciążeniem finansowym dla procesu produkcji (Rohde i in., 2007). Z uwagi na powyższe, dąży się do zastąpienia drogich substratów podłoża fermentacyjnego, takich jak glukoza czy ekstrakt drożdżowy, ich

tańszymi odpowiednikami. W celu redukcji kosztów procesu biosyntezy LA w badaniach własnych analizowano możliwość zastąpienia ekstraktu drożdżowego kwaśnym hydrolizatem kazeiny. Równolegle prowadzono fermentację w podłożu zawierającym ekstrakt drożdżowy ($5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) oraz w pożywce pozbawionej tego źródła azotu, a zawierającej wyłącznie glukozę ($150 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$), sole mineralne ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4) i witaminy (biotyna, tiamina). Przebieg procesu fermentacji monitorowano oznaczając stężenie glukozy oraz kwasu mlekowego. Największe ilości kwasu mlekowego ($150,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) uzyskano w pożywce zawierającej glukozę, ekstrakt drożdżowy i sole mineralne, podczas gdy w układzie, w którym ekstrakt drożdżowy został zastąpiony kwaśnym hydrolizatem kazeiny, otrzymano jedynie $36 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ kwasu mlekowego. Najmniejsze ilości LA ($19,1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) uzyskano natomiast w pożywce bez dodatku ekstraktu drożdżowego. Badania własne wykazały zatem, iż ekstrakt drożdżowy jest składnikiem umożliwiającym uzyskanie wysokiej wydajności syntezy kwasu mlekowego. Zastąpienie ekstraktu drożdżowego tańszym hydrolizatem kazeiny nie pozwoliło na redukcję kosztów procesu biosyntezy LA, z uwagi na niską wydajność produkcji kwasu.

Nowoczesne podejście do zagadnienia biotechnologicznej produkcji kwasu mlekowego zakłada zastosowanie produktów odpadowych generowanych przez różne gałęzie przemysłu, głównie spożywczego, jak również produktów rolnych. Stosowane w tym celu surowce powinny być przede wszystkim tanie, łatwo dostępne oraz powinny charakteryzować się niskim stopniem zanieczyszczenia. Ważne jest również, aby pozwalały one na szybką i wydajną produkcję kwasu, by nie generowały produktów ubocznych, a także aby ich przygotowanie do procesu fermentacji, a zatem hydroliza zawartych w nich złożonych źródeł węgla, nie generowało zbyt wysokich kosztów (VickRoy, 1985). Opracowanych zostało kilka technologii pozwalających na wykorzystanie w tym celu produktów skrobiowych, celulozowych, serwatki oraz melasy. Ziemiaki oraz melasa obok źródeł węgla zawierają białka, mikroelementy oraz witaminy, mogą zatem stanowić kompleksowy dodatek do podłoża fermentacyjnego nie wymagający innych czynników wzrostu. Surowce o uboższym składzie są natomiast uzupełniane w podstawowe substancje stymulujące wzrost, głównie ekstrakt drożdżowy, którego koszty, podobnie jak ceny surowców sacharydowych, mogą znacznie wpłynąć na ekonomikę procesu syntezy LA. Alternatywą dla tego substratu, analizowaną przez Oh i in. (2005), był namok kukurydziany, którego 85% zasobów azotowych stanowią białka, peptydy oraz aminokwasy. Użycie go do fermentacji, przy zredukowanej ilości ekstraktu drożdżowego ($1,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$), pozwoliło na wzrost produkcji kwasu mlekowego o ok. 106% w stosunku do pożywki pozbawionej tego składnika. Obiecującym rozwiązaniem jest ponadto uzupełnianie pożywki produkcyjnej otrębami ryżowymi oraz psennymi, które nie wymagają stosowania dodatko-

wych form azotu, a pozwalają na osiągnięcie wydajności procesu syntezy na poziomie $129 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, co odpowiada szybkości produkcji $3 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (Yun i in., 2004).

Surowce skrobiowe

Skrobia jest jednym z najczęściej stosowanych surowców naturalnych wykorzystywanych w produkcji kwasu mlekowego, co wiąże się z jej niską ceną oraz dużą dostępnością. Jest ona pozyskiwana głównie z biomasy roślinnej oraz produktów odpadowych (Hofvendahl, Hahn-Hägerdal, 1997). Stosowane w badaniach materiały skrobiowe to przede wszystkim ziemniaki, pszenica, jęczmień, kukurydza, ryż, żyto czy kassawa. Surowce te poddawane są wstępnej obróbce mającej na celu hydrolizę zawartej w nich skrobi do cukrów prostych (Oh i in., 2005). Tradycyjne metody produkcji kwasu mlekowego z tego typu produktów miały kilka etapów. Wstępnie upłynniano skrobię na drodze hydrolizy termicznej ($90\text{--}130^\circ\text{C}$, 15 min), po czym następował etap scukrzania prowadzony drogą enzymatyczną, z udziałem odpowiednich preparatów amylolitycznych. Otrzymane w ten sposób cukry proste poddawano ostatecznie fermentacji mlekowej. Alternatywą dla metody klasycznej jest technika określana jako SSF (ang. simultaneous saccharification and fermentation), która nie wymaga wcześniejszego rozkładu skrobi do glukozy, gdyż jest ona hydrolizowana przez glucoamylazy w trakcie procesu fermentacji (Tsao i in., 1999). Istotną zaletą SSF jest zatem obniżenie inhibicji syntezy kwasu mlekowego poprzez nagromadzenie w środowisku reakcji cukrów prostych, co wpływa ostatecznie korzystnie na szybkość procesu biosyntezy (Huang i in., 2005). Metoda ta pozwala na osiągnięcie wydajności syntezy LA na poziomie $162 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ z $170 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ surowca skrobiowego, co potwierdzają badania prowadzone przez Linko i Javanainen (1996). Proces ten może przebiegać z udziałem bakterii fermentacji mlekowej, wówczas do środowiska reakcji wprowadzone zostają enzymy amylolityczne syntetyzowane np. z udziałem grzybów strzępkowych. Możliwa jest ponadto fermentacja stosująca wyłącznie grzyby strzępkowe jako organizmy umożliwiające jednoczesną hydrolizę surowców skrobiowych i syntezę LA (Huang i in., 2003). Analogicznym rozwiązaniem jest zastosowanie hodowli mieszanym amylolitycznych grzybów strzępkowych i bakterii mlekowych. Przykładem jest fermentacja mlekowa prowadzona z udziałem koimmobilizowanych względnie beztlenowych bakterii *Lactococcus lactis* i tlenowych grzybów strzępkowych *Aspergillus awamori*. W tym układzie strzępki *Aspergillus awamori* zlokalizowane są w powierzchniowych warstwach nośnika syntetycznego, podczas gdy bakterie immobilizowane są wewnątrz matrycy. Enzymy syntetyzowane przez *Aspergillus awamori* umożliwiają hydrolizę skrobi ziemniaczanej do glukozy, która jest fermentowana do kwasu mlekowego z udziałem *Lactococcus lactis*. Dzięki jednoczesnemu wykorzystaniu glu-

kozy przez współpracujące ze sobą mikroorganizmy, nie ma możliwości jej akumulacji, co z kolei pozwala uniknąć represji katabolicznej prowadzącej do inhibicji hydrolizy skrobi. Mimo wielu ograniczeń związanych z zróżnicowanymi wymaganiami wzrostowymi mikroorganizmów, biosynteza prowadzona w takim układzie pozwoliła uzyskać $0,66 \text{ g}$ kwasu mlekowego z 1 g substratu. Ciekawym rozwiązaniem jest zastosowanie do produkcji kwasu mlekowego środowiskowych, a także modyfikowanych genetycznie bakterii fermentacji mlekowej charakteryzujących się zdolnością syntezy enzymów amylolitycznych (ALAB, ang. Amylolytic Lactic Acid Bacteria) (Guyot i in., 2000; Vishnu i in., 2002; Narita i in., 2004). Izolaty środowiskowe pozwalają na fermentację polisacharydów bezpośrednio do kwasu mlekowego, jednakże osiągnięte z ich udziałem wydajności procesu biosyntezy są stosunkowo niskie, co ogranicza możliwości aplikacyjne tych szczepów. Przykładem może być szczep *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010, który syntetyzuje kwas L-mlekowy z wydajnością $0,67 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ cukru, czy *Lactobacillus plantarum* A6, który mimo znacznie wyższej wydajności procesu ($0,84 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ cukru) pozwala na produkcję mieszaniny kwasów L(+) i D(-)-mlekowego (Guyot i in., 2000). Inaczej przedstawia się sytuacja w przypadku szczepu *Streptococcus bovis* 148, który syntetyzuje kwas L-mlekowy o wysokim stopniu czystości optycznej sięgającym $95,6\%$ przy poziomie syntezy zbliżonym do *Lactobacillus plantarum* A6 ($0,88 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ cukru) (Narita i in., 2004). Poszukiwanie, a następnie „screening” ALAB w kierunku wydajnej produkcji kwasu mlekowego jest jednak procesem długotrwałym i wymagającym dużych nakładów finansowych. Czynniki te stały się zatem bodźcem modyfikacji genetycznych bakterii fermentacji mlekowej, które wykazywałyby zdolność syntezy amylaz. Prowadzone w tym kierunku badania pozwoliły na konstrukcję szczepu *Lactococcus lactis* IL 1403/pCUSaA, zdolnego do sekrecji α -amylazy *Streptococcus bovis* 148 (AmyA) (Okano i in., 2007), który zapewnił pozyskanie LA o czystości optycznej rzędu $99,2\%$ i wydajności $0,89 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ cukru, co stwarza perspektywę dla kolejnych badań w tym zakresie.

Podstawowym surowcem skrobiowym stosowanym do produkcji kwasu mlekowego są ziemniaki zarówno w postaci skrobi (Panda, Ray, 2008; Yen, Lee, 2010), jak i soku ziemniaczanego (Huang i in., 2005; Zhang i in., 2007). Surowiec ten oprócz wody, która jest jego głównym składnikiem ($800 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), zawiera węglowodany (170 g), białka (20 g), tłuszcze (1 g), a także witaminy, minerały oraz metale śladowe (9 g). W porównaniu z innymi produktami, takimi jak skórki owoców cytrusowych, buraki cukrowe czy ekstrakt z otrębów pszennych, ziemniaki zawierają wszystkie niezbędne składniki odżywcze zapewniające rozwój mikroorganizmów, głównie grzybów strzępkowych, które wykazują mniejsze wymagania pokarmowe niż bakterie (Tsao i in., 1999). Pozostałe produkty skrobiowe są w większości suplementowane odpowiednimi źródłami

azotu, węgla czy innych pierwiastków. Badania realizowane przez Huang i in. (2003), w których prowadzono jednoczesne upłynnianie i fermentację skrobi ziemniaczanej z udziałem *Rhizopus arrhizus* DAR 36017, wykazały niemal całkowite scukrzenie skrobi, natomiast szacowana wydajność biosyntezy wynosiła $21 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Zastosowane przez grupę badawczą podłoże produkcyjne zawierało wyłącznie sok ziemniaczany oraz węglan wapnia jako czynnik stabilizujący pH podłoża. Podobne rezultaty odnotowano w przypadku fermentacji skrobi ziemniaczanej przez *Rhizopus oryzae* NRRL 395 (Liu i in., 2005), a także przez *Lactobacillus casei* EMCC11093 (Afifi, 2011). Kolejne badania nad syntezą kwasu mlekowego z udziałem bakterii *Lactobacillus casei* MTCC 1423 (Palaniraj, Nagarajan, 2012) wykazały natomiast wzrost wydajności syntezy LA w podłożu hodowlanym zawierającym ekstrakt drożdżowy. Z uwagi na wysokie koszty tego dodatku zastępuje się go tańszymi naturalnymi odpowiednikami, takimi jak namok kukurydziany, którego wpływ na produkcję kwasu mlekowego badano z udziałem bakterii *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 12315 osiągając przy tym syntezę kwasu na poziomie $93 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$.

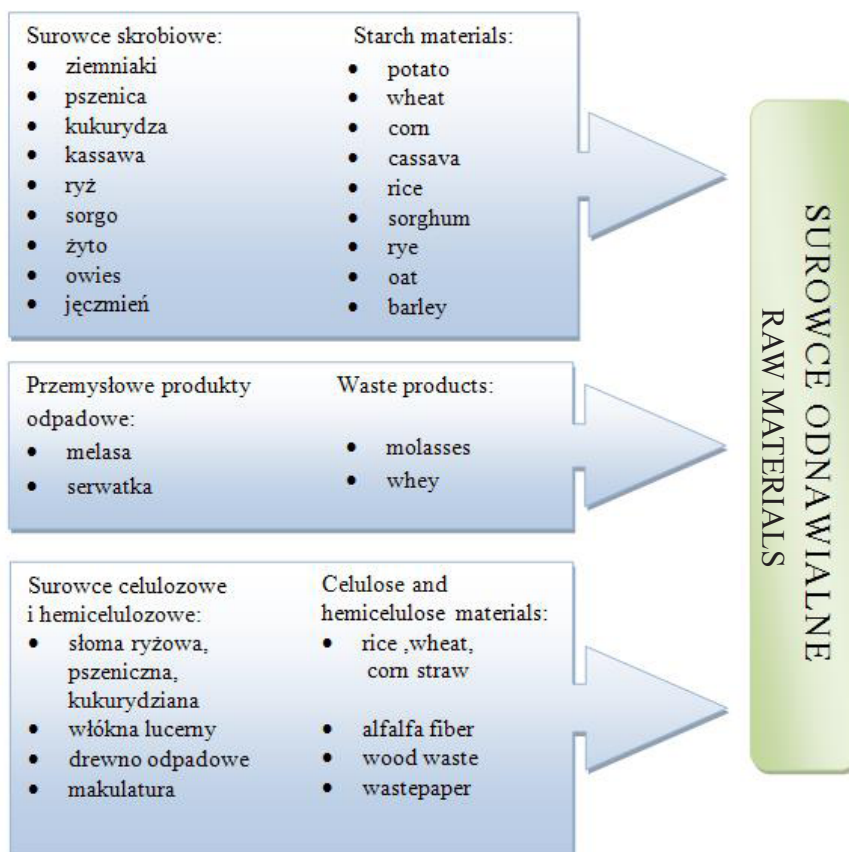
Kolejnym surowcem skrobiowym stosowanym do produkcji kwasu mlekowego jest pszenica. Podobnie jak ziemniak charakteryzuje się wysoką zawartością białek (11%), tłuszczu (1,9%), soli mineralnych (1,7%), błonnika (1,9%) i oczywiście węglowodanów (70%). Frakcję białkową tworzy tutaj gluten, który w tej formie nie może być wykorzystany przez mikroorganizmy syntetyzujące kwas mlekowy. Podłoże zawierające hydrolizowaną mąkę pszeniczną wzbogaca się więc łatwo przyswajalnymi źródłami azotu, ekstraktem drożdżowym, namokiem kukurydzianym lub autolizatem drożdżowym. Poziom zużycia zarówno ekstraktu, jak i namoku jest jednak stosunkowo wysoki i rzutuje na koszty syntezy kwasu, dlatego też zaproponowano zastosowanie glutenu jako źródła peptydów. Proteoliza glutenu może poprzedzać proces hydrolizy skrobi lub odbywać się równoległe z procesem rozkładu polisacharydów. Wzbogacanie podłoża hodowlanego peptydami, których źródłem jest gluten, umożliwia zmniejszenie dawki ekstraktu drożdżowego z $20 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ do $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, a ponadto zapewnia zwiększenie wydajności procesu syntezy LA z 1,86 na $2,31 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (Hetenyi i in., 2008). Mikroorganizmami stosowanymi do produkcji kwasu mlekowego z mąki czy otrębów pszennych są przede wszystkim bakterie mlekowe, takie jak *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, a także *Lactococcus lactis*. Hodowlę tych mikroorganizmów prowadzono w podłożu zawierającym hydrolizowaną mąkę pszenianą z dodatkiem lub bez dodatku ekstraktu drożdżowego. Stwierdzono, iż we wszystkich przypadkach, z wyjątkiem szczepu *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435, wprowadzenie do podłoża ekstraktu skutkowało wzrostem wydajności syntezy LA o 8 do $12 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Wśród badanych szczepów *Lactococcus lactis* stwierdzono porównywalny

poziom syntezy kwasu rzędu $95\text{--}96 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ oraz odpowiednio $106\text{--}107 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ w pożywce z ekstraktem drożdżowym. Na rysunku 5 przedstawiono również inne surowce skrobiowe stosowane do produkcji kwasu mlekowego.

Surowce celulozowe i hemicelulozowe

Biomasa roślinna będąca produktem odpadowym generowanym przez rolnictwo czy leśnictwo jest bogatym źródłem węglowodanów, takich jak celuloza, hemiceluloza oraz pektyny, o różnym stopniu polimeryzacji, zawiera ona ponadto polimery zwane ligninami niebędące cukrami (Doran-Peterson i in., 2008). Podczas gdy celuloza jest liniowym polimerem zbudowanym wyłącznie z cząsteczek glukozy połączonych wiązaniami β -1,4-glikozydowymi, hemicelulozy tworzą rozgałęzione łańcuchy zawierające również reszty innych cukrów prostych, takich jak ksylolozę, mannozę i galaktozę. Pektyny, zwane również poliuronidami, składają się z reszt kwasu galakturonowego tworzących liniowe łańcuchy (homogalakturonian) lub dimerów ramnozy i tego kwasu w układzie rozgałęzionym zawierającym w łańcuchach bocznych arabiniany i galaktany (Rose i in., 2000). Hydroliza tych polimerów jest zatem procesem znacznie bardziej skomplikowanym niż cząsteczek skrobi. Wymaga ona rozdrobnienia mechanicznego materiału umożliwiającego rozerwanie włókien polimerowych, co ułatwia dostęp enzymów hydrolitycznych.

Następnie stosuje się jednoczesną obróbkę termiczną i chemiczną zapewniającą usunięcie lignin (Claassen i in., 1999). Opracowano dotąd kilka technologii z zastosowaniem odpadowej biomasy roślinnej, takiej jak słoma ryżowa (Qi, Yao, 2007), kukurydziana (Cui i in., 2011), włókna lucerny (Sreenath i in., 2011), a także makulatury (Yáñez i in., 2005) czy hydrolizatów drewna (Park i in., 2004) do produkcji kwasu mlekowego. Mikroorganizmami biorącymi udział w procesie fermentacji były bakterie mlekowe *Lactobacillus casei* (Qi, Yao, 2007), *Lactobacillus rhamnosus* (Schmidt, Padukone, 1997) oraz *Lactobacillus delbrueckii* (Chen, Lee, 1997), w tym szczepy uzyskane na drodze inżynierii genetycznej (Adsul i in., 2007) zdolne do rozkładu celobiozy. Zaproponowano także hodowle mieszane prowadzone z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* i *Lactobacillus brevis*. Oprócz bakterii mlekowych do syntezy kwasu mlekowego z surowców celulozowych stosuje się także bakterie *Bacillus coagulans* (Payot i in., 1999; Maas i in., 2008) czy *Enterococcus faecalis* (Wee i in., 2006), a także grzyby strzępkowe *Trichoderma reesei* (Hofvendahl, Hahn-Hägerdal, 2000). Należy zauważyć, iż fermentacja hydrolizatów ligninocelulozowych może ulegać inhibicji z uwagi na obecność w środowisku reakcji związków takich jak furfural, 5-hydroksymetylo-furfural czy kwas octowy, które powstają na etapie wstępnego przetwarzania surowca (Palmqvist, Hahn-Hägerdal, 2000). Zapobiegając tym zjawiskom poddaje się wspomniane surowce detoksyfikacji (Palmqvist, Hahn-Hägerdal, 2000),



Źródło: opracowanie własne
Source: author's elaboration

Rys. 5. Surowce odnawialne wykorzystywane do produkcji kwasu mlekowego
Fig. 5. Raw materials used for lactic acid production.

aczkolwiek znane są również prace, w których adaptuje się LAB do warunków podłoża hodowlanego (Wee i in., 2004).

Przemysłowe produkty odpadowe

Bogatym źródłem węgla organicznego są melasa, będąca produktem ubocznym w produkcji cukru, oraz permeat serwatki generowany przez przemysł mleczarski. Melasa obok wysokiej zawartości cukrów (33–50%), głównie sacharozy, rafinozy oraz cukru inwertowanego, zawiera związki azotu (0,2–2,8%), witaminy (ryboflawinę, pirydoksynę, tiaminę, kwas pantotenowy), a także pierwiastki śladowe (Hofvendahl, Hahn-Hägerdal, 2000). Najczęściej do produkcji kwasu mlekowego z wykorzystaniem melasy stosuje się szczepy *Lactobacillus bulgaricus*, w tym szczepy modyfikowane genetycznie. Prowadzone badania wykazały, iż synteza LA prowadzona przez zmutowany szczep *Lactobacillus bulgaricus* Uc-3 pozwoliła na produkcję 166 g·l⁻¹ kwasu z 190 g·l⁻¹ cukru z wydajnością 4,15 g·l⁻¹·h⁻¹. Zastosowanie melasy zawierającej związki

azotu i witaminy pozwoliło również na redukcję ilości użytego do produkcji ekstraktu drożdżowego (Dumbrepatil i in., 2008). Stwierdzono iż szczep Uc-3 otrzymany na drodze mutagenyzy w ciągu 24 h produkował 4,5 razy więcej LA niż wyjściowy szczep *Lactobacillus bulgaricus* NCIM 2365. Co więcej, *Lactobacillus bulgaricus* Uc-3 wykazujący aktywność enzymów hydrolizujących celobiozę i celotriozę został także wykorzystany do całkowitej fermentacji materiału celulozowego z wydajnością syntezy kwasu mlekowego wynoszącą 80% (Adsul i in., 2007). Fermentacja melasy do kwasu mlekowego może odbywać się także z udziałem szczepów *Enterococcus faecalis* (Wee i in., 2004) czy zmutowanych szczepów *E. coli* syntetyzujących kwas w formie stereoisomeru D (Shukla i in., 2004).

Serwatka, analogicznie do melasy, obok źródła węgla, jakim jest laktoza, zawiera białka, a także sole mineralne i tłuszcze. Całkowite wykorzystanie laktozy możliwe jest w przypadku suplementowania pożywki hodowlanej dodatkowymi źródłami azotu. Opracowane zostały technologie stosujące jako dodatki do medium produkcyjnego ekstrakt drożdżowy, pepton, mleko w proszku, a także namok

kukurydziany i mąkę sojową. Mikroorganizmami stosowanymi do produkcji LA z serwatki są szczepy *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, a także *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis* oraz *Streptococcus thermophilus* (Hofvendahl, Hahn-Hägerdal, 2000).

WYZWANIA I PERSPEKTYWY

Kwas mlekowy jest kwasem organicznym produkowanym w skali przemysłowej przede wszystkim z udziałem mikroorganizmów. Ze względu na swoje właściwości oraz szeroką gamę zastosowań (przemysł spożywczy, farmaceutyczny, kosmetyczny, chemiczny) stanowi obiekt intensywnych badań wielu naukowców. Do dnia dzisiejszego podjęto liczne próby usprawnienia procesu fermentacji sacharydów do kwasu mlekowego. Koncentrowano się na poprawie wydajności i obniżeniu kosztów procesu biotechnologicznego otrzymywania kwasu mlekowego. Podstawowym zagadnieniem jest dobór odpowiednich szczepów produkcyjnych oraz ich ulepszanie np. poprzez modyfikacje genetyczne. Kolejnym aspektem jest stosowanie do produkcji kwasu mlekowego tanich, odnawialnych, powszechnie dostępnych surowców, przy niskim koszcie ich przerobu. Równie istotne jest wyodrębnianie i oczyszczanie kwasu mlekowego dopasowujące go do potrzeb różnych gałęzi przemysłu, w których jest on wykorzystywany.

Obniżenie kosztów wytwarzania kwasu mlekowego jest ważne w aspekcie wzrastającego zapotrzebowania na biodegradowalne tworzywa sztuczne, szczególnie polilaktyd (PLA), nazywany materiałem XXI wieku. PLA jest określany mianem podwójnie zielonego, gdyż nie tylko ulega biodegradacji, ale również jest otrzymywany z surowców odnawialnych. Szacuje się, że koszt kompostowania odpadów z polimerów biodegradowalnych jest sześciokrotnie niższy od recyklingu odpadów z klasycznych tworzyw sztucznych (Jim Jem i in., 2010). Oprócz zastosowań medycznych, PLA jest wykorzystywany w produkcji rolno-spożywczej do wytwarzania biodegradowalnych folii ogrodowych, agrowłóknin, doniczek rozkładających się po wysadzeniu z roślinami do gruntu, opakowań i przedmiotów jednokrotnego użytku (toreb na zakupy, worków na śmieci, butelek do napojów, opakowań produktów mleczarskich, szućców i naczyń) oraz produkcji matryc do kontrolowanego uwalniania nawozów, pestycydów i herbicydów. Stąd też przyszłość biotechnologicznego otrzymywania kwasu mlekowego łączy się nierozdzielnie z tym kierunkiem rozwoju badań.

PODSUMOWANIE

Synteza chemiczna kwasu mlekowego ustąpiła miejsca fermentacji biotechnologicznej. Znaczący wpływ na ten fakt miały zmniejszające się zasoby surowców petrochemicznych, czystość optyczna kwasu warunkująca jego późniejsze wykorzystanie oraz możliwość zagospodarowa-

nia surowców odnawialnych jako substratów do produkcji stereoisomerów kwasu mlekowego. W chwili obecnej wyzwaniem stanowi opracowanie ekonomicznej technologii biosyntezy czystego optycznie monomeru LA, gdyż jego koszty wpływają znacząco na cenę wytwarzanych polimerów. Wiele gatunków mikroorganizmów jest zdolnych do produkcji kwasu mlekowego, jednakże należy podkreślić, że jego ilość i jakość zależy od źródła węgla, warunków hodowli i metabolizmu drobnoustrojów. Zastosowanie metody biotechnologicznej produkcji kwasu mlekowego ze źródeł odnawialnych ma niewątpliwie wiele zalet, jednakże jest jeszcze szereg problemów do pokonania, aby mogła się ona odbywać na masową skalę i była opłacalna ekonomicznie. Aby uzyskiwać konkurencyjny produkt o najlepszych właściwościach, proces jego produkcji musi być nieustannie udoskonalany.

PIŚMIENNICTWO

- Adsul M. G., Varma A. J., Gokhale D. V., 2007.** Lactic acid production from waste sugarcane bagasse derived cellulose. *Green Chem.*, 9: 58-62.
- Affi M.M., 2011.** Enhancement of lactic acid production utilizing liquid potato wastes. *Internation. J. Biol. Chem.*, 5: 91-102.
- Amrane A., 2000.** Evaluation of lactic acid bacteria autohydrolyzate for the supplementation of lactic acid bacteria fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 16: 207-209.
- Chen R., Lee Y.Y., 1997.** Membrane mediated extractive fermentation for lactic acid production from cellulosic biomass. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 63: 435-448.
- Claassen P.A.M., van Lier J.B., Lopez Contreras A.M., van Niel E.W.J., Sijtsma L., Stams A.J.M., de Vries S.S., Weusthuis R.A., 1999.** Utilization of biomass for the supply of energy carriers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52: 741-755.
- Cui F., Li Y., Wan C., 2011.** Lactic acid production from corn stover using mixed cultures of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus brevis*. *Bioresour. Technol.*, 102: 1831-1836.
- Dong X.Y., Bai S., Sun Y., 1996.** Production of L(+)-lactic acid with *Rhizopusoryzae* immobilized in polyurethane foam cubes. *Biotechnol. Letters*, 18: 225-228.
- Doran-Peterson J., Cook D.M., Brandon S.K., 2008.** Microbial conversion of sugars from plant biomass to lactic acid or ethanol. *Plant J.*, 54: 582-592.
- Dumbrepatil A., Adsul M., Chaudhari S., Khire J., Gokhale D., 2008.** Utilization of molasses sugar for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* mutant Uc-3 in batch fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74: 333-335.
- Ferain T., Garmyn D., Bernard N., Hoes P., Delcour J., 1994.** *Lactobacillus plantarum* ldhL gene: overexpression and deletion. *J. Bacteriol.*, 176: 596-601.
- Gajewska J., Błaszczuk M.K., 2012.** Probiotyczne bakterie fermentacji mlekowej (LAB). *Post. Mikrobiol.*, 51: 55-65.
- Guyot J.P., Calderon M., Morlon-Guyot J., 2000.** Effect of pH control on lactic acid fermentation of starch by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010T. *J. Appl. Microbiol.*, 88: 176-182.
- Hamamci H., Ryu D.D.Y., 1994.** Production of L(+)-lactic acid using immobilized *Rhizopus oryzae*. Reactor performance based on kinetic mode and simulation. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 44: 125-133.

- Hetenyi K., Nemeth A., Sevela B., 2008.** Examination of medium supplementation for lactic acid fermentation. *Hungarian J. Chem.*, 36: 49-53.
- Hofvendahl K., Hahn-Hägerdal B., 2000.** Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enz. Microbiol. Technol.*, 26: 87-107.
- Hofvendahl K., Hahn-Hägerdal B., 1997.** L-lactic acid production from whole wheat flour hydrolysate using strains of *Lactobacilli* and *Lactococci*. *Enz. Microbiol. Technol.*, 20: 301-307. [http://www.org.pl/nip/index.php?option=cobro.=com_content&view=article&Itemid=70&id=70&\(dostęp 11.06.2013\)](http://www.org.pl/nip/index.php?option=cobro.=com_content&view=article&Itemid=70&id=70&(dostęp 11.06.2013))
- Huang L.P., Jin B., Lant P., Zhou J., 2003.** Biotechnological production of lactic acid integrated with potato wastewater treatment by *Rhizopus arrhizus*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 78: 899-906.
- Huang L.P., Jin B., Zhou J., 2005.** Simultaneous saccharification and fermentation of potato starch wastewater to lactic acid by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus*. *Biochem. Engin. J.*, 23: 265-276.
- Jim Jem J., van der Pol J.F., de Vos S., 2010.** Microbial lactic acid, its polymer poly(lactic acid) and their industrial applications. ss. 323-346. W: *Plastics from bacteria. Natural functions and applications*; ed. Chen G.-Q. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- 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.
- Kylä-Nikkilä K., Hujanen M., Leisola M., Palva A., 2000.** Metabolic engineering of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 for production of pure L-(+)-lactic acid. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 3835-3841.
- Libudzisz Z., 2008.** Bakterie fermentacji mlekowej. ss. 25-58. W: *Mikrobiologia techniczna. Mikroorganizmy w biotechnologii, ochronie środowiska i produkcji żywności*; red.: Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z., PWN, Warszawa.
- Linko Y.Y., Javanainen P., 1996.** Simultaneous liquefaction, saccharification, and lactic acid fermentation on barley starch. *Enz. Microbiol. Technol.*, 19: 118-123.
- Liu Y., Wen Z., Liao W., Liu C., Chen S., 2005.** Optimization of the process for the production of L (+)-Lactic acid from cull potato by *Rhizopus oryzae*. *Engin. Life Sci.*, 5: 343-349.
- 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: 751-758.
- Malinowski R., Łubkowski D., 2010.** Badanie wpływu temperatury i czasu suszenia na wybrane właściwości polilaktydu (PLA). *Inż. Aparat. Chem.*, 49(5): 77-78.
- Narita J., Nakahara S., Fukuda H., Kondo A., 2004.** Efficient production of L-(+)-lactic acid from raw starch by *Streptococcus bovis* 148. *J. Biosci. Bioengin.*, 97: 423-425.
- Oh H., Wee Y.J., Yun J.S., Han S.H., Jung S., Ryu H.W., 2005.** Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials. *Bioresour. Technol.*, 96: 1492-1498.
- Okano K., Kimura S., Narita J., Fukuda H., Kondo A., 2007.** Improvement in lactic acid production from starch using α -amylase-secreting *Lactococcus lactis* cells adapted to maltose or starch. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 75: 1007-1013.
- Okino S., Inui M., Yukawa H., 2005.** Production of organic acids by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 68: 475-480.
- Okino S., Suda M., Fujikura K., Inui M., Yukawa H., 2008.** Production of D-lactic acid by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 78: 449-454.
- Palaniraj R., Nagarajan P., 2012.** Kinetic studies in production of lactic acid from waste potato starch using *Lactobacillus casei*. *Internation. J. Chem. Tech. Res.*, 4: 1601-1614.
- Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B., 2000.** Fermentation of lignocellulosic hydrolyzates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresour. Technol.*, 74: 25-33.
- Panda S.H., Ray R.C., 2008.** Direct conversion of raw starch to lactic acid by *Lactobacillus plantarum* MTCC 1407 in semi solid fermentation using sweet potato (*Ipomoea patatas* L.) flour. *J. Sci. Industrial Res.*, 67: 531-537.
- Park E.Y., Anh P.N., Okuda N., 2004.** Bioconversion of waste office paper to L-(+)-lactic acid by the filamentous fungus *Rhizopus oryzae*. *Bioresour. Technol.*, 93: 77-83.
- Payot T., Chemal Z., Fick M., 1999.** Lactic acid production by *Bacillus coagulans* – kinetic studies and optimization of culture medium for batch and continuous fermentations. *Enz. Microbiol. Technol.*, 24: 191-199.
- Qi B. Yao R., 2007.** L-lactic acid production using *Lactobacillus casei* by solid state fermentation using rice straw. *BioResources*, 2: 419-429.
- Rohde C., Nawrotzki R., Jäger J., 2007.** Badania laboratoryjne i techniczne fermentacji mlekowej odpadów organicznych. *Ochr. Środ.*, 1: 41-44.
- Rose J.K.C., O'Neil M.A., Albersheim P., Darvil A., 2000.** The primary cell wall of higher plants. ss. 783-808. W: *Carbohydrates in chemistry and biology*; red.: Ernst B., Hart G.W., Sinay P., Wiley-VCH, Weinheim.
- Sasaki M., Jojima T., Inui M., Yukawa H., 2008.** Simultaneous utilization of D-cellobiose, D-glucose and D-xylose by recombinant *Corynebacterium glutamicum* under oxygen-deprived conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 81: 691-699.
- Schmidt S., Padukone N., 1997.** Production of lactic acid from wastepaper a cellulose feedstock. *J. Industrial Microbiol. Biotechnol.*, 18: 10-14.
- Shukla V.B., Zhou S., Yomano L.P., Shanmugam K.T., Preston J.F., Ingram L.O., 2004.** Production of D(-)-lactic acid from sucrose and molasses. *Biotechnol. Lett.*, 26: 689-693.
- Sreenath H.K., Moldes A.B., Koegel R.K., Straub R.J., 2011.** Lactic acid production from agricultural residues. *Biotechnol. Lett.*, 23: 179-184.
- Tamada M., Begum A.A., Sadi S., 1992.** Production of L-(+)-lactic acid by immobilized-cells of *Rhizopus oryzae* with polymer supports prepared by gamma-ray-induced polymerization. *J. Ferment. Bioengin.*, 74: 379-383.
- Torino M.L., Taranto M.P., Sesma F., Font de Valdez G., 2001.** Heterofermentative pattern and exopolisaccharide production by *Lactobacillus helveticus* ATTC 15807 in response to environmental pH. *J. Appl. Microbiol.*, 91: 846-852.
- Tsao G.T., Cao N.J., Du J., Gong C.S., 1999.** Production of multifunctional organic acids from renewable resources. *Adv. Biochem. Engin./Biotechnol.*, 65: 243-280.
- van Niel E.W.J., Hahn-Hägerdal B., 1999.** Nutrients requirements of lactococci in defined growth media. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52: 617-627.

- VickRoy T.B., 1985.** Lactic Acid. ss. 761-776. W: Comprehensive Biotechnology; ed.: M. Moo-Young, Pergamon Press, New York, USA.
- Vishnu C., Seenayya G., Reddy G., 2002.** Direct fermentation of various pure and crude starchy substrates to L(+)-lactic acid using *Lactobacillus amylophilus* GV6. World J. Microbiol. Biotechnol., 18: 429-433.
- Walczak P., Oltuszek-Walczak E., Otlewska A., Rygala A., Dybka K., Pietraszek P., 2012.** Biosynteza stereoizomerów kwasu L i D mlekowego. Ochrona przed Korozją, 9s/A/2012: 94-98.
- Wee Y.J., Yun J.S., Kim D., Ryu H. -W., 2006.** Batch and repeated batch production of L(+)-lactic acid by *Enterococcus faecalis* RKY1 using wood hydrolyzate and corn steep liquor. J. Industr. Microbiol. Biotechnol., 33: 431-435.
- Wee Y.J., Yun J.S., Park D.H., Ryu H.W., 2004.** Biotechnological production of L(+)- lactic acid production from wood hydrolyzate by batch fermentation on *Enterococcus faecalis*. Biotechnol. Lett., 26: 71-74.
- Yáñez R., Alonso J.L., Parajó J.C., 2005.** D-lactic acid production from waste cardboard. J. Chem. Technol. Biotechnol., 80: 76-84.
- Yen H.W., Lee Y.C., 2010.** Production of lactic acid from raw sweet potato powders by *Rhizopus oryzae* in sodium alginate capsules. Appl. Biochem. Biotechnol., 162: 607-615.
- Yin P.M., Nishina N., Kosakai Y., Yahiro K., Park Y., Okabe M., 1997.** Enhanced L(+)- lactic acid production from corn starch in a culture of *Rhizopus oryzae* using an air-lift bioreactor. J. Ferment. Bioengin., 84: 249-253.
- Yukawa H., Omumasaba C.A., Nonaka H., Kos P., Okai N., Suzuki N., Suda M., Tsuge Y., Watanabe J., Ikeda Y., Vertès A.A., Inui M., 2007.** Comparative analysis of the *Corynebacterium glutamicum* group and complete genome sequence of strain R. Microbiology, 153: 1042-1058.
- Yun J.S., Wee Y.J., Kim J.N., Ryu H.W., 2004.** Fermentative production of DL-lactic acid from amylase-treated rice and wheat brans hydrolyzate by a novel lactic acid bacterium, *Lactobacillus* sp. Biotechnol. Lett., 26: 1613-1616.
- Zhang Z.Y., Jin B., Kelly J.M., 2007.** Production of lactic acid and byproducts from waste potato starch by *Rhizopus arrhizus*: role of nitrogen sources. World J. Microbiol. Biotechnol., 23: 229-236.
- Zhou S., Causey T.B., Hasona A., Shanmugam K.T., Ingram L.O., 2003.** Production of optically pure D-lactic acid in mineral salts medium by metabolically engineered *Escherichia coli* W3110. Appl. Environ. Microbiol., 69: 399-407.

P. Pietraszek, K. Dybka, P. Walczak, A. Otlewska, A. Rygala, E. Oltuszek-Walczak

BIOSYNTHESIS OF LACTIC ACID FROM RENEWABLE SOURCES

Summary

This paper presents an overview on biotechnological method of lactic acid production from renewable sources (mainly plant biomass). This article presents a wide spectrum of microorganisms synthesizing lactic acid (lactic acid bacteria, *Bacillus* sp., *Escherichia coli*, filamentous fungi), including microorganisms obtained by genetic modifications. Furthermore, substrates such as starch, cellulose, hemicellulose and industrial waste (molasses, whey) used for the production of lactic acid, have been described. Economics factors related with the lactic acid biosynthesis process and the quality and quantity of the product obtained in specific culture conditions, have been presented. Authors have focused on methods leading to improvement of production process: strains and supplements added to culture media in order to increase the process efficiency and purity of lactic acid. Perspectives of lactic acid applications, in particular for the production of biodegradable polylactide, also have been shown.

key words: lactic acid, PLA, lactic acid bacteria, renewable sources