

Fermentačná produkcia kyseliny mliečnej

II. Izolácia termofilného producenta

Ing. VLADIMÍR HERIBAN, Ing. NORA ŠTURDÍKOVÁ, Doc. Ing. ERNEST ŠTURDÍK, CSc.,
Katedra biochemickej technológie CHTF STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava

579 663

Kľúčové slová: mliečne baktérie, izolácia monokultúr, identifikácia kmeňov, fermentačné vlastnosti, mliečna fermentácia

ÚVOD

Miesto a postavenie kyseliny mliečnej na svetovom trhu fermentačne vyrábaných organických kyselín je čoraz významnejšie. Je to nielen vďaka jej rozsiahlemu priamemu využitiu, ale najmä aplikáciám, u ktorých zohráva kyselina mliečna úlohu zatiaľ nezastupiteľnej východiskovej suroviny pre výrobu cenných látok (napr. biodegradabilných plastov). Vzhľadom na pomerne dlhú dobu, počas ktorej je táto kyselina fermentačne vyrábaná (už od roku 1881), nie je dnes teoretický výskum mliečnej fermentácie v literatúre často centrom pozornosti. Práce sa viac sústreďujú najmä na genetické štúdiu producentov a najmodernejšie technologické spôsoby zefektívnenia fermentačnej aj izolačnej časti procesu, napr. reaktory s bunkovým recykлом alebo fluidným lôžkom [1-3], alebo elektrodialýza ako spôsob kontinualizácie fermentácie a výhodnej izolácie za súčasnej purifikácie produktu [4,5]. Podrobnejší prehľad prác o mliečnej fermentácii je zhrnutý v predošlom článku [6].

Východiskom pre vývoj mliečnej fermentácie na báze sacharózy bola zmenená ekonomická situácia, ktorá núti aj také výrobné podniky, akými sú cukrovary, aby diverzifikovali svoju výrobu a viac zhodnocovali nielen svoj finálny výrobok, ale aj niektoré medziprodukty. Preto sme sa rozhodli vyvinúť technológiu schopnú spracovať všetky reálne cukrovarnícke produkty pri čo najmenších rizikách kontaminácie, na ktoré sa v cukrovaroch berie osobitný zreteľ. To evokovalo potrebu zamerať sa na termofilného producenta, ktorého rastové a produkčné optimum by prevažovalo optimum zmienených kontaminantov. Súčasným cieľom bolo vypracovať izolačnú a purifikačnú časť procesu na báze najnovších technologických poznatkov tak, aby pri maximálnej efektívnosti poskytovala produkt vysokých kvalít a ekologicky bola prijateľná.

Predkladaná práca zachytáva výsledky skríningu termofila a základné vlastnosti súboru kultúr v ňom získaných.

2. MATERIÁL

2.1 Študované kmene

Pracovali sme s tridsiatimi izolátmi získanými z rezkolisovej vody, difúznej šťavy a saturačnej šťavy cukrovarov v Trnave a Trenčianskej Teplej klasickými technikami. V práci uvádzame výsledky len jedenástich predbežne najlepších kmeňov pracovne označených číslami 9,11,16,17,19,29 (cukrovar v Trnave), 20,21,22,31 a 32 (cukrovar v Trenčianskej Teplej).

2.2 Kultivačné média a roztoky

SL médium (izolácia, kultivácia, čistenie): enzýmový kazeinový hydrolyzát 10 g, kvasničný extrakt 5 g, KH_2PO_4 6 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,58 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,28 g, kyselina citrónová 2 g, sacharóza 20 g, trihydrát octanu sodného 2,5 g, kyselina octová (10%-ný roztok) 10 ml, agar 15 g, destilovaná voda 1000 ml. pH bolo po rozpustení všetkých zložiek upravené na 5,4.

MRS médium (izolácia, kultivácia, identifikácia, čistenie, krátkodobá úchova): peptón 10 g, kvasničný extrakt 5 g, sacharóza 20 g, Tween 80 1 ml, K_2HPO_4 2 g, trihydrát octanu sodného 5 g, citran amónny 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,05 g, agar 15 g a destilovaná voda 1000 ml. Po rozpustení všetkých zložiek bolo pH média upravené na 5,4.

Pri testoch na produktivitu kyselín bolo do pôdy s agarom pred autoklávaním pridané 5 % hm. CaCO_3 , ktorý bol vopred sterilizovaný 3 h v sušiarňi pri 160 °C. Pri úchove kultúr bol použitý prídavok 2 % hmot. CaCO_3 , ktorý bol predtým sterilizovaný za sucha v baničke pri 160 °C trikrát 3 h s prestávkami 24 h.

Rogosove médium (selekcia): peptón 10 g, kvasničný extrakt 5 g, sacharóza 20 g, Tween 80 3 g, K_2HPO_4 6 g, citran amónny 2 g, trihydrát octanu sodného 25 g, ľadová kyselina octová 1,32 ml, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,575 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,12 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0,034 g, agar 15 g a 1000 ml destilovanej vody. Pred autoklavovaním bolo pH upravené na 5 až 5,5. Po schladení, tesne pred naliatím do Petriho misiek bol do vložnej pôdy pridaný roztok špecifického farbiva (anilínovej alebo čínskej modrej).

Sunarové médium (test zrážania mlieka): 130 g Sunaru bolo zmiešaných so 100 ml vody.

Všetky médiá boli sterilizované v autokláve 20 min pri 121 °C.

Roztok čínskej modrej (predbežná identifikácia): Do 100 ml destilovanej vody boli pridané 3 g čínskej modrej. Roztok bol homogenizovaný pretrepaním a po 3 dňoch státi prefiltrovaný. Uchovávaný bol v sterilnom boxe.

Roztok brómkreazolového purpuru (indikátor pre kvasné skúšky): pred sterilizáciou bolo do 1 l pôdy pridané 0,17 g brómkreazolového purpuru rozpusteného v 2 ml etanolu.

2.3 Chemikálie

Sacharóza bola potravinárskej kvality, arabinóza a salicin pre skvasovacie skúšky pochádzali od rakúskej firmy Loba-Chemie, Wien, ostatné sacharidy dodal CHÚ SAV v Bratislave, kvasničný extrakt bol od holandskej firmy Gist Brocades Co. Ltd., agar od firmy Difco (USA), enzýmový kazeínový hydrolyzát a peptón z Imuny Šarišské Michalany a glycerol farmaceutickej kvality zo Slovafarmy Illohovec. Ostatné chemikálie v čistote p.a. a antibiotiká boli z Lachemy Brno.

2.4 Prístroje

Pre statické kultivácie bol používaný anaerostat z JZD Družba Drahaný a biologický termostat BT 120 (Laboratorní přístroje Praha). Trepačkové kultivácie boli uskutočňované na poľskej trepačke typu 357, amplitúda 7, počet kmitov 125 min⁻¹ (Mechanika precyzyjna) s náplňou zriedeného glycerínu. Na centrifugáciu bola použitá odstredivka typu WE-2 (Mechanika precyzyjna, Polsko). Absorbancia bola meraná na prístroji Spekol 11 (Carl Zeiss Jena, Nemecko) v sklenených kyvetách hrúbky 1 cm. Pre lyofilizáciu bol použitý prístroj Leybold-Heraeus (SRN).

Pri práci bol používaný mikroskop Laboval 4 firmy Zeiss, Jena.

3. METÓDY

3.1 Izolácia a čistenie kultúr

Selekcia monokultúr - bola použitá nahromaďovacia metóda s využitím SL kultivačného média s následným výsevom na tuhý variant tej istej pôdy. Kultivácia bola statická (48 h, 50 °C) [7].

Čistenie izolátu - silne kontaminovaná kultúra bola očokovaná do SL média s prídavkom polymyxínu, menej kontaminované vzorky boli naočkované na MRS pôdu s prídavkom toho istého antibiotika. V oboch prípadoch boli jeho prídavky 15, 20 a 25 IU podľa stupňa kontaminácie [8]. Rast pohyblivých tyčínok bol potlačený ampicilínom v koncentráciách 0,1; 0,4 alebo 0,6 µg/ml. Kultivácia prebiehala 1 až 5 dní pri 50 °C. Vyhodnotenie mikroskopické a výsevom na tuhú pôdu s prídavkom anilínovej (čínskej) modrej.

3.2 Charakterizácia rastu

Zmeny v koncentrácii biomasy boli zisťované platňovou zriedovacou metódou (Kochovou metódou) nariadené vzorky boli vysiate na MRS platne a po narastení pri 50 °C bol kvantifikovaný počet kolónií na platni [7], gravimetricky (odvážaním vysušeného sedimentu z 1 ml vzorky) a turbidimetricky (meraním absorbancie pri 650 nm).

3.3 Konzervácia kultúr

Krátkodobá úchova - kultúra narastená pri 50 °C v MRS médiu s prídavkom 2 % CaCO₃ skladovaná pri +4 °C.

Dlhodobá úchova - zmes husto narastenej kultúry a 25 % obj. glycerolu skladovaná pri -18 °C alebo vo forme lyofilizátov [9].

3.4 Identifikačné testy

Gramovo farbenie - robené štandardným postupom podľa [7].

Tvorba spór - bola indukovaná rastom kultúry na platni s MPA pri 50 °C. Prítomnosť spór bola zisťovaná mikroskopicky po odpichnutí narastenej kolónie z platne.

Kataláza - prítomnosť bola stanovovaná štandardným postupom podľa [7].

Acidifikačná schopnosť - bola zisťovaná tromi spôsobmi:

I. Na tuhú MRS pôdu s prídavkom 5 % hm. CaCO₃ bola naočkovaná kultúra a po 48 h pri 50 °C bola pozorovaná tvorba vyčistených zón, tvorených rozpustením CaCO₃ účinkom vyprodukovanej kyseliny.

II. Rovnaké množstvo média po 24 h kultivácii na MRS pôde bez CaCO₃ bolo titrované roztokom NaOH na fenolftaleín. Porovnávala sa spotreba neutralizačného činidla.

III. Kultúra bola naočkovaná do skúmavky so sunarovým médiom a staticky kultivovaná 48 h pri 50 °C. Tvorba kyselín sa prejavila zrazením sunarového média.

Tolerancia k NaCl - testovaná kultúra bola naočkovaná do MRS média s koncentráciou NaCl 2,5,7 alebo 10 % hm. a kultivovaná staticky 40 h pri 50 °C. Hodnotenie rastu bolo vizuálne, spojené s mikrobiologickou kontrolou čistoty kultúry.

Skvasovanie cukrov - MRS médium vysterylizované bez cukru bolo po prídavku 2 % hm. príslušného sacharidu ako jediného zdroja uhlíka a brómkreazolového purpuru ako indikátora očokované testovanou kultúrou s následnou statickou kultiváciou pri optimálnej teplote max. 10 dní. Mikrobiologická čistota bola kontrolovaná po štyroch dňoch. V pozitívnom prípade sa skvasenie cukru prejavilo zožltnutím pôvodne fialového média.

Farbenie špecifickým farbivom - testovaná kultúra bola rozotretá na agarovú platňu s Rogosovým médiom sfarbeným anilínovou modrou. Kolónie mliečnych baktérií sa mali po kultivácii cca 48 h pri 50 °C zafarbiť na modro.

4. VÝSLEDKY A DISKUSIA

Vzhľadom na vytýčený cieľ, t.j. izoláciu bakteriálneho kmeňa schopného pri teplotách okolo 50 °C homofermentatívne konvertovať sacharózu ako jednu z najperspektívnejších surovín aj pri vyššej koncentrácii, príp. aj nižšej čistoty na kyselinu mliečnu, vybrali sme ako hlavné miesta odberu východiskového biologického materiálu s potenciálnym obsahom baktérií spĺňajúcich zvolený cieľ také miesta v technologickej linke výroby repného cukru, kde sa nachádzajú zohriate koncentrované roztoky sacharózy a súčasne bývajú problémy s bakteriálnymi kontamináciami. To dávalo predpoklad získania producenta kyseliny mliečnej odolného voči vyšším teplotám a koncentráciám sacharózy. Takto bolo získaných tridsať izolátov, z ktorých bol na základe ich štúdia vybraný užší súbor jedenástich kultúr ukazujúcich sa ako perspektívne pre zadaný cieľ. V priebehu prác s nimi nám však dve z nich (pracovné označenie 19 a 29) vyhynuli. V ďalšom sú preto uvádzané len výsledky zvyšných deviatich izolátov. Jednotlivé pracovné techniky vychádzali z poznatkov obsiahnutých v poslednom vydaní Bergeyovho manuálu [10] a materiálov zo sympózia o mliečnych baktériách konanom v Holandsku [11].

4.1 Získanie čistých kultúr

Pri spracovaní vzoriek sme používali dve základné média, SL a MRS. Prvé, literatúrou doporučované ako selektívne [12] sme používali pri viac kontaminovaných a rôznorodých vzorkách, na MRS pôde sme spracovávali vzorky s homogénnejším mikrobiologickým obrazom. Väčšinu vzoriek sme vzhľadom na

prítomnosť kokov najprv očkovali na tuhú SL pôdu a odpichnuté narastené kolónie ďalej postupne kultivovali na rovnakom médiu v skúmavke a Erlenmeyerovej banke. Pretože sa pri ďalšej kultivácii na tekutej MRS pôde objavovali kontaminanty vo forme pohyblivých tyčín, ich rast sme potlačili prídavkom ampicilínu. Po tejto kultivácii sme už dostávali čisté kultúry nepohyblivých tyčín. Všetky izoláty sa vyznačovali dobrým rastom v každom stupni pomnoženia, niektoré kmene, napr. č. 11 a 17 mali výraznejší sklon k sedimentácii. Občasné kontaminácie kultúr sme riešili odpichávaním kolónií z rozteru kontaminovaného kmeňa na Petriho miske s Rogosovým médiom. V prípade neúspechu sme používali inú konzervu. Výskyt kontaminácií sa nám podarilo obmedziť najmä po zavedení trojnásobnej sterilizácie baničiek s CaCO_3 s 24 h prestávkami. Typický mikrobiologický obraz jednej z našich kultúr je na obr. 1.



Obr.1 Mikroskopický obraz izolátu č.17 mliečnych baktérií po statickej kultivácii (24 h, 50 °C) na MRS pôde s prídavkom 2% CaCO_3 (zväčšenie 4 000x)

4.2 Konzervácia izolátov

Pri zavedení metód pre úchovu kultúr mliečnych baktérií sme vychádzali z požiadavky ich technickej dostupnosti, materiállovej nenáročnosti a relatívne jednoduchšej zvládnuteľnosti pri súčasnej aplikovateľnosti na krátkodobú aj dlhodobú úchovu. Týmto

zámerom vyhovela metóda uhličitanovej a glycerínovej konzervy a lyofilizácie. Uhličitanová konzerva sa nám osvedčila pre krátkodobú úchovu (2-3 mesiace) najmä pre svoju jednoduchosť a spoľahlivosť. Pre dlhodobejšiu úchovu (6-12 mesiacov) plne vyhovela tzv. glycerínová konzerva [9,11,12].

Lyofilizáciu sme používali u obmedzeného počtu kultúr pre dlhodobé spoľahlivé uchovávanie (podľa literatúry môže takáto konzerva mať životnosť až 10 rokov). Z našich praktických skúseností možno uviesť, že uhličitanová konzerva bez problémov vydržala do 3 mesiacov, pričom jej charakter ju temer ideálne predurčoval pre priame použitie v laboratóriu. Životnosť glycerínových konzerv neprekročila 10 mesiacov; používali sme ich ako záložné. Pre krátkosť času sa nám zatiaľ nepodarilo stanoviť životnosť našich lyofilizátov, ukázalo sa však, že nami zvolený postup revitalizácie znášajú veľmi dobre a sú v krátkom čase pripravené na použitie. Až budúcnosť však ukáže, či bude táto vlastnosť stabilná.

Všeobecne možno konštatovať, že poznatky o vhodnosti glycerolu ako kryoprotektívneho činidla [13,14], resp. o vplyve kombinácie kryoprotektívneho činidla a rehydratačného média na revitalizáciu buniek [11,15,16,17] sa v našich podmienkach potvrdili. Podľa literatúry [18] by síce bolo vhodnejšie používať pre revitalizáciu odstredeného mlieka, nám sa však aj po sterilizácii tohto média v ňom často vyskytovali kokovité kontaminácie, preto sme dávali prednosť MRS pôde, t.j. médiu s nižším percentom revitalizácie, zato však s väčšou istotou zachovania sterility, resp. zabránenia kontaminácie.

4.3 Predbežná charakteristika izolátov

V rámci týchto sérií testov sme z pôvodných 30 izolátov vyčlenili tie monokultúry, ktoré mali najvýraznejšiu tvorbu kyselín, pričom nebolo možné vylúčiť, že patria do skupiny mliečnych baktérií. S týmto cieľom sme všetky izoláty postupne testovali na ich schopnosť farbiť sa na tuhej platni anilínovou modrou, zrážať mlieko, tvoriť číre zóny na agarovej platni s CaCO_3 a okyselať tekuté MRS médium ako dôsledok tvorby kyselín.

Použitím platní zafarbených anilínovou modrou ako kultivačným médiom pre rast testovaných baktérií overovali sme empiricky zistenú vlastnosť mliečnych baktérií adsorbovať toto farbivo a vytvárať modrasté kolónie pri raste na tomto médiu. Rast kultúr sme stimulovali umiestnením misiek do anaerostatu, pretože na rozdiel od plastových obalov lepšie zabezpečoval nielen

Tab.1. Základné charakteristiky izolátov mliečnych baktérií

Číslo izolátu	Izolácia Mikrobiologický obraz pôvodnej vzorky	Predbežné testy							
		zrážanie mlieka (h)	farbenie anilínovou modrou	polomer zóny rozp. CaCO_3 (mm)	celková kyslosť NaOH (ml 0,1 mol.l ⁻¹ na 5 ml vzorky)	G ⁺	Kataláza	Tolerancia k NaCl (% hmot. NaCl)	Poznámka
9	pohyb. a nepohyb. tyčinky	48	+	1,1	3,1	+	±	2;5	slabý rast
11	zmes tyčín a kokov	38	+	1,5	3,5	+	±	2; 5	
16	zmes rôz. dlhých tyčín								
	pohyb. aj nepohyblivých	46	+	2,4	5,7	+	±	2; 5	
17	tyčinky s prímiesou kokov	38	+	2,5	6,0	+	±	2	slabý rast
20	zmes pohyb. a nepohyb. tyčín	48	+	2,8	6,3	+	±	2;5	
21	tyč. s ojedín. prímies. kokov	36	+	4,0	7,0	+	±	2;5	
22	tyč., ojedín. prít. koky	36	+	1,0	3,4	+	±	2; 5; 7	
31	zmes nepohyb. tyčín a kokov	46	±	0,7	1,9	+	±	2; 5	
32	zmes pohyb. a nepohyb. tyčín	46	±	0,9	2,3	+	±	2; 5	

anaerobiózu, ale aj dostatočnú vlhkosť prostredia, nevyhnutnú pre zamedzenie vysušovania agaru pri teplotách okolo 50 °C. V pozitívnych prípadoch bolo sfarbenie kolón zreteľné po 3 až 4 dňoch.

Charakteristickou vlastnosťou mliečnych baktérií je aj zrážanie mlieka do 48 hodín. Negatívny výsledok tohto testu by naznačil, že kultúra by nemusela patriť do skupiny mliečnych baktérií a teda jej acidifikačné vlastnosti nemusia byť zapríčinené tvorbou kyseliny mliečnej. Schopnosť zraziť mlieko bola u súboru kultúr veľmi rozdielna. Tým, ktoré mlieko zrazili, to trvalo najčastejšie menej ako 48 h.

V ďalšom teste sme hľadali kultúry, ktoré na základe predošlých testov mohli byť zo skupiny mliečnych baktérií a vyznačovali sa najlepšou tvorbou kyselín. Túto ich vlastnosť sme posudzovali dvomi metódami: podľa veľkosti čírych zón okolo kolónií vyrastených na tuhej platni s CaCO_3 a podľa spotreby neutralizačného činidla potrebného na neutralizáciu kultivačného média. Prvá bola vhodnejšia pre rutinnú analýzu veľkého počtu kultúr s nižšou presnosťou (najmä vzhľadom na problémy s rastom mliečnych baktérií na tuhom médiu), druhá bola pracnejšia a preto vhodná len pre menší počet kultúr, avšak presnejšia. Výsledky tohto testu patrili medzi najdôležitejšie pre ďalšie zužovanie súboru izolátov. Umožnili z 30 izolátov vyčleniť deväť s najvyššou tvorbou kyselín, pričom na základe predošlých testov sme mohli predpokladať, že môže ísť najmä o kyselinu mliečnu. Konkrétne výsledky týchto monokultúr sú zachytené v tabuľke 1. Ukázalo sa, že medzi kultúrami boli značné rozdiely od takmer nebadateľnej tvorby kyselín až po zreteľnú. Napriek problémom s rastom baktérií na tuhom médiu dosiahli sme pomerne dobrú zhodu výsledkov u oboch metód. Niektoré nezrovnalosti sme okrem spomenutého problému s rastom na tuhom médiu pripísali nerovnomernej vrstve CaCO_3 v agare. Zhodnotením celého súboru sme dospeli k názoru, že obe metódy majú dostatočnú výpovednosť aj prijateľnú spoľahlivosť pre daný účel. Deväť najlepších kultúr z tejto predbežnej charakterizácie sme podrobili vzájomnej hlbšiemu štúdiu.

4.4 Charakterizácia a identifikácia

U zúženej skupiny deviatich izolátov sme pristúpili k zisťovaniu širšieho spektra ich vlastností s cieľom potvrdiť, resp. vylúčiť ich príslušnosť k mliečnym baktériám a bližšie konkretizovať ich vlastnosti.

Najprv sme zistili typ bunkovej steny farbením podľa Grama [7]. Všetkých 9 kultúr bolo jednoznačne grampozitívnych.

Rastom testovaných kultúr na tuhom MPA sme sa pokúsili indukovať tvorbu spór. Vzhľadom na slabý rast na tomto médiu nepodarilo sa nám jednoznačne potvrdiť ani vyvrátiť túto vlastnosť, preto sme i naďalej počítali s tým, že izoláty môžu patriť do rodu *Lactobacillus* alebo *Bacillus*.

V teste na tvorbu katalázy boli výsledky vzhľadom na ich subjektívne posudzovanie nejednoznačné, kultúry sa javili ako katalázovo pozitívne, čo by naznačovalo ich príslušnosť k rodu *Bacillus*.

Pri zisťovaní schopnosti izolátov tolerovať v médiu NaCl sa ukázalo, že rastú pri koncentrácii 2 a 5 % hm., ojedinele (č.22) sa slabý rast prejavoval aj pri 7 % hm. NaCl (tabuľka 1).

Pre bližšiu charakteristiku izolátov po biochemickej (metabolickú) stránke sme urobili kvasné skúšky s niekoľkými cukrami, ktoré mali poskytnúť základné informácie (tabuľka 2). Vzhľadom na náročnosť tejto práce najmä vo vzťahu k taxonómii závery z tejto oblasti sme prenechali etablovanému pracovisku oficiálnej zbierky v Brne. Nám výsledky poslúžili pre zmapovanie základných metabolických vlastností kultúr, pretože vzhľadom na nejednoznačnosť testu na tvorbu spór i úzky súbor testovaných cukrov nebolo z týchto výsledkov možné robiť taxonomické závery. Tie sme získali z Československej zbierky mikroorganizmov v Brne, kde izoláty č. 11,17,21,22 a 32 identifikovali ako *Bacillus coagulans*, izoláty č. 9,16,20 a 31 ako *Bacillus species*.

Modelové fermentačné experimenty ukázali, že väčšina získaných kultúr homofermentatívne konvertuje sacharózu na kyselinu mliečnu s výťažkom väčším ako 80 % pri prijateľných kinetických parametroch procesu.

Tab.2. Skvasovanie vybraných cukrov izolátmi mliečnych baktérií

Číslo izolátu	Aeskulín	Arabinóza	Fruktóza	Galaktóza	Glukóza	Inulín	Laktóza	Maltóza	Manit	Rafinóza	Ribóza	Sacharóza	Sorbit
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	+	-	+	+	+	+	+	+	ž	+	-	+	-
16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
20	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-
21	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
22	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
31	±	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	±
32	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	±	+	+

Producent kyseliny mliečnej z rodu *Bacillus* má okrem niektorých svojich nevýhod (napr. sporogénnosť) aj výhody, medzi ktoré patrí jeho teplotné produkčné optimum, z kinetického aj kvantitatívneho hľadiska dobrá konverzia substrátu a ako vyplýva aj z aktuálnej patentovej literatúry aj jeho menšie nároky na živiny. Tieto vlastnosti ho priamo predurčujú na praktické využitie, preto s ním počítame pre oblasť výroby kyseliny mliečnej zo znečistených substrátov s určením produktu na technické účely. Avšak vzhľadom k tomu, že technológiu výroby kyseliny mliečnej chceme vyvinúť aj pre jej uplatnenie v potravinárstve a farmácii a súčasne do nej zahrnúť aj možnosť rovnako lukratívneho zhodnotenia biomasy, prebieha v súčasnosti na našom pracovisku skríning zameraný na získanie producenta z rodu *Lactobacillus*, ktorý by splnil aj tieto komplexnejšie nároky, ktoré sme si vytýčili.

V nasledujúcich prácach budú prezentované nielen ďalšie mikrobiologické, biochemické a najmä fermentačné charakteristiky, optimalizácia zloženia pôdy a pracovných podmienok, scale-up a izolácia produktu v prípade použitia *Bacillus coagulans*, ale i skríning a vlastnosti producenta z rodu *Lactobacillus*.

5. ZÁVER

Bolo vybraných 9 kmeňov, ktoré sú dobre uchovávateľné v krátkodobých i dlhodobých konzervách s následnou ľahkou oživitelnosťou. Ich kolónie sa farbili na tuhej platni anilínovou modrou, relatívne rýchlo zrážali mlieko a najvýraznejšie okyselovali fermentačné médium, resp. tvorili najväčšie zóny na agare s CaCO_3 . Všetky boli jednoznačne G^+ , tvorba spór však u nich bola v našich podmienkach sporná (veľmi dlhý rast na príslušnej platni). Izoláty boli katalázovo pozitívne s toleranciou k NaCl do 5 % hm., skvasovali charakteristickú škálu cukrov. Identifikáciou v brnenskej zbierke mikroorganizmov sa ukázalo, že ide o sporogénny rod *Bacillus*, konkrétne druhy *coagulans* a *species*. Testy najlepších z nich robené formou modelovej laboratórnej fermentácie ukázali konverziu sacharózy na kyselinu mliečnu nad 80 % pri jej homofermentatívnom priebehu a priemernej produktivite 1,5 g kyseliny mliečnej za hodinu v 11.

HERIBAN,V. - ŠTURDÍKOVÁ,N. - ŠTURDÍK,E.: Fermentačná produkcia kyseliny mliečnej. II. Izolácia termofilného producenta. Kvas. prům., 8, 1992, č. 8 s. 231 - 235

Pre účely vývoja technológie bakteriálnej mliečnej fermentácie bol urobený skrining s cieľom získať termofilného producenta rastúceho na sacharóze s dostatočnou konverziou substrátu na kyselinu mliečnu a prijateľnými kinetickými charakteristikami procesu. Zo vzoriek odobraných z cukrovarníckej výroby bolo klasickými mikrobiologickými technikami získaných tridsať monokultúr, u ktorých boli stanovené základné mikrobiologické a biochemické vlastnosti vrátane produkčných schopností na sacharózovom médiu. Kmene s najlepšími vlastnosťami boli identifikované ako *Bacillus coagulans*. Súčasne boli rozpracované techniky spoľahlivého krátkodobého a dlhodobého uchovávanía týchto kmeňov.

Герибан, В. - Штурдикова, Н. - Штурдик, Е.: Ферментативное получение молочной кислоты. II. Изолирование термофильного продуцента. Квас. прум. 38, 1992, № 8, стр.231 - 235

V celých rozvoji technológie bakteriálnej mliečnej fermentácie bol provedený skrining s cieľom získať termofilného producenta, ktorý by rástol na sacharóze s dostatočnou konverziou substrátu na kyselinu mliečnu a s prijateľnými kinetickými charakteristikami procesu. Zo vzoriek odobraných z cukrovarníckej výroby bolo klasickými mikrobiologickými technikami získaných tridsať monokultúr, u ktorých boli stanovené základné mikrobiologické a biochemické vlastnosti vrátane produkčných schopností na sacharózovom médiu. Kmene s najlepšími vlastnosťami boli identifikované ako *Bacillus coagulans*. Súčasne boli rozpracované techniky spoľahlivého krátkodobého a dlhodobého uchovávanía týchto kmeňov.

HERIBAN,V. - ŠTURDÍKOVÁ,N. - ŠTURDÍK, E.: Fermentation Production of Lactic Acid. II. Isolation of Thermophilic Strain. Kvas. prům. 38, 1992, No. 8, pp 231 - 235

Using classical microbial techniques thirty monocultures were isolated from samples taken from the sugar production. This screening was made with the aim to obtain the thermophilic microorganisms growing on saccharose and being able to convert sugar to lactic acid. All the strains were tested from the standpoint of basic microbiological and biochemical properties. The strains with the best properties were identified as *Bacillus coagulans*. In addition, the preservation techniques for these strains were developed.

HERIBAN,V. - ŠTURDÍKOVÁ,N. - ŠTURDÍK,E.: - Fermentative Milchsäureproduktion. II. Isolation des thermophilen Produzenten. Kvas. prům., 38, 1992, Nr. 8, S. 231 - 235

Für die Zwecke der Entwicklung einer Milchfermentations-Technologie wurde das Screening mit dem Ziel der Gewinnung des thermophilen Produzenten, der des Wachstums auf Saccharose mit einer genügenden Konversion des Substrats auf Milchsäure fähig und durch entsprechende kinetische Prozesscharakteristiken gekennzeichnet ist, durchgeführt. Aus den in der Zuckerproduktion genommenen Proben wurden mittels klassischer Methoden dreissig Monokulturen erzielt, bei denen die grundsätzlichen mikrobiologischen und biochemischen Eigenschaften einschliesslich der Produktionsfähigkeit auf dem Saccharose-Medium bestimmt wurden. Die Stämme mit den besten Eigenschaften wurden als *Bacillus coagulans* identifiziert. Gleichzeitig wurden auch die Techniken der verlässlichen kurz- und langfristigen Aufbewahrung dieser Stämme ausgearbeitet.

LITERATÚRA

- [1] MAJOR,N.C., BULL,A.T.: Biotechnol. Bioeng., 34, 1989, s. 592.
- [2] HAYAKAWA,K. et al.: J.Ferment. Bioeng., 70, 1990, s. 404
- [3] BOER,J.P. et al.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 34, 1990, s. 149.
- [4] de RAUCOURT,A. et al.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 30, 1989, s. 521.
- [5] de RAUCOURT,A. et al.: Appl. Microbiol. Biotechnol., 30, 1989, s. 528.
- [6] HERIBAN,V., ŠTURDÍK,E.: Kvas. prům. 35, 1989, s. 328.
- [7] BETINA,V. et al.: Mikrobiologické laboratorné metódy 1. vyd., Alfa Bratislava 1988.
- [8] VANOS,V., COX,L.: Food Microbiol., 3, 1986, s. 223.
- [9] de VALDEZ,G.F. et al.: Appl. Environ. Microbiol., 2, 1983, s. 302.
- [10] KRIEG,N.R., HOLT,J.G. (eds.): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol.2, Williams and Wilkins, London 1984.
- [11] KONINGS,W.N. et al. (eds.): FEMS Microbiol. Rev., 46, 1987, s. 199.
- [12] STARR,P.M. et al. (eds.): The Prokaryotes 1. ed. Heidelberg, Springer-Verlag 1981.
- [13] ANNE BARBOUR,E., PRIEST,F.G.: Lett. Appl. Microbiol., 2, 1986, s. 69.
- [14] de VALDEZ,G.F. et al.: Cryobiology, 22, 1985, s. 574.
- [15] de VALDEZ,G.F. et al.: Appl. Environ. Microbiol., 3, 1985, s. 1339.
- [16] BOZOGLU,T.F. et al.: Enzyme Microb. Technol., 9, 1987, s. 531.
- [17] de ANTONI,G.L. et al.: Cryobiology, 26, 1989, s. 149.
- [18] de VALDEZ,G.F. et al.: Cryobiology, 20, 1983, s. 560.