Fermentačná produkcia kyseliny mliečnej

III. Charakterizácia vyselektovaných termofilných kmeňov

Ing. Vladimír HERIBAN, Doc. Ing. Ernest ŠTURDÍK, CSc., Ing. Nora ŠTURDÍKOVÁ, Katedra biochemickej technológie ChTF STU, 812 37 Bratislava

Kľúčové slová: mliečne baktérie, mliečna fermentácia, selekcia producenta, fermentačné charakteristiky produkčného kmeňa, rýchlosť konverzie a výťažky substrátov, homofermentativita, aerofilnosť a termotolerancia kmeňov.

579 663

1. ÚVOD

Význam kyseliny mliečnej v dnešnej praxi naďalej rastie paralelne s tým, ako sa rozširuje spektrum jej aplikácií. To podmieňuje i stály záujem výskumu o nové poznatky z tejto oblasti. Najviac pozornosti je v súčasnosti venované problematike biochemicko-inžinierskeho zdokonaľovania mliečnej fermentácie. Podrobnejší retrospektívny literárny prehľad je uvedený v práci [1].

Na našom pracovisku je rozvíjaný program vývoja technológie mliečnej fermentácie, ktorého súvislosti sú popísané v predošlej práci [2]. Jej výsledkom bol súbor 9 potenciálnych termofilných producentov konvertujúcich sacharózu na kyselinu mliečnu charakterizovaný základnými mikrobiologickými a biochemickými vlastnosťami. Táto práca sa zaoberá podrobnejším definovaním vlastností súboru významných pre ich aplikáciu v miešanom reaktore a na reálnej surovine. Zámerom bolo špecifikovať producenta s najlepšimi predpokladmi pre vyvíjanú technológiu.

2. MATERIÁL

2.1 Študované kmene

Deväť monokultúr študovaných v tejto práci bolo na základe predošlých výsledkov [2] vybraných z pôvodne 30 izolátov získaných zo vzoriek rezkolisovej vody, difúznej šľavy a saturačnej šľavy cukrovarov v Trnave a Trenčianskej Teplicy.

2.2 Kultivačné média

MRS médium (príprava inokula, krátkodobá úchova): peptón 10 g, kvasničný extrakt 5 g, sacharóza 20 g, Tween 80 1 ml, K_2HPO_4 2g, trihydrát octanu sodného 5 g, citran amónny 2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0,05 g a destilovaná voda 1000 ml. Po rozpustení všetkých zložiek média bolo pH upravené na 5,4 a pôda bola sterilizovaná bežným spôsobom v autokláve (20 min pri 121 °C).

Sladinové médium (fermentačné testy): čerstvá pivovarnícka sladina s koncentráciou redukujúcich sacharidov 70 ± 5 g/l sacharózy bola obohatená nasledovnými minerálnymi soľami: KH_2PO_4 1 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g/l, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0,05 g/l a $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01 g/l. Pôda bola sterilizovaná rovnako ako predošlé médium.

Produkčné médium (fermentačné testy): čistá sacharóza alebo surový cukor 80 g, kvasničný autolyzát 15 g, KH_2PO_4 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0,05 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01 g a destilovaná voda 1000 ml. Médium bolo po rozpustení všetkých zložiek sterilizované bežným postupom v autokláve.

2.3 Chemikálie

Peptón pre bakteriológiu a kvasničný autolyzát boli od Imuny Šarišské Michal'any, kvasničný extrakt od holandskej firmy Gist-

Brocades, Porapak QS bol od americkej firmy Waters Associates, Ostion KS-2 zo Spolku pre chemickú a hutnú výrobu v Ústí nad Labem; ostatné chemikálie v čistote p.a. dodala Lachema Brno.

2.4 Prístroje

Pre baničkové kultivácie bola použitá trepačka typu 357, amplitúda 7, počet kmitov 125 min^{-1} (Mechanika precyzyjna Poľsko).

Fermentačné experimenty boli robené na laboratórnom fermentore LF-2 (Vývojové dielny ČSAV Praha) celkového objemu 5 l s náplňou 2,0 l, frekvencia otáčok 220 min^{-1} .

Analýza prchavých kyselín bola zabezpečená pomocou plynového chromatografu Chrom 4 osadeného sklenou náplňovou kolónou s Porapakom QS (Laboratórny prístroj Praha) s integrátorom CI-100 a zapisovačom TZ 4620.

Statické kultivácie boli robené v biologickom termostate BT 120 (Laboratórny prístroj Praha).

Odstredivka použitá v experimentoch bola poľskej výroby typu WE-2 (Mechanika precyzyjna).

Bol používaný mikroskop Laboval 4 nemeckej firmy Zeiss Jena.

3. METÓDY

3.1 Trepačkové experimenty

Erlenmeyerove banky o objeme 100 ml s 2 g $CaCO_3$ alebo bez neho boli sterilizované 3-krát po 3 hodiny pri 160 °C v teplovzdušnej sušiarňi. Prestávky medzi jednotlivými sterilizáciami boli minimálne 24 hodín. Do vysterylizovanej banky bolo sterilne preliaty 50 ml kultivačného média a očkované 2 ml husto narastenej kultúry. Banky boli umiestnené na trepačke a ich obsah kultivovaný pri 50 °C, resp. podľa potreby. Vzorky boli odoberané v 6-hodinových intervaloch počas 48 hodín (vrátane nulte hodiny, mimo 18. a 42. hodiny, kedy to nebolo možné z technických dôvodov).

3.2 Fermentácia v laboratórnom fermentore

Inokulum pre pokusy vo fermentore bolo pripravované naočkovaním 50 ml MRS pôdy s 2 g $CaCO_3$ 2 ml husto narastenej kultúry z konzervy. Banky boli kultivované staticky v termostate pri 50 °C 24 hodín. Po mikroskopickej kontrole čistoty bol ich obsah použitý pre zaočkovanie fermentačnej pôdy v laboratórnom fermentore.

Vlastné fermentačné experimenty boli robené vo fermentore celkového objemu 5 l s plnením 2 l. Pred naplnením bol fermentor sterilizovaný parou 35 - 40 min pri 121 °C. Po naplnení pôdou (1,9 l) a ochladení na 45 - 50 °C bol očkovaný 100 ml inokula. Fermentačná teplota bola udržiavaná na 50 ± 1 °C pri frekvencii otáčok 220 min^{-1} , pH bolo stabilizované na hodnote $6,1 \pm 0,05$ prídavkom roztoku NaOH (c = 40 % hmot.). Vyhodnocovaný bol rast kultúry, úbytok substrátu a spotreba neutralizačného činidla, u konečnej vzorky aj homofermentatívny priebeh.

3.3 Sledovanie rastu baktérií

Nárast biomasy pri trepačkových a fermentorových pokusoch bol sledovaný turbidimetricky meraním absorbancie pri 650 nm v 1 cm kyvetách na spektrofotometri Spekol 11. Vlnová dĺžka bola určená ako absorpčné maximum sledovanej biomasy v rozsahu 200 až 800 nm. Závislosť medzi absorbanciou a sušinou bola daná kalibračnou čiarou, resp. vzťahom sušina [g/l] = $5,65 \times A_{650} + 0,28$.

3.4 Stanovenie sacharózy

Vzhľadom na prítomnosť viac ako jedného redukujúceho cukru v analyzovanej vzorke bola použitá metóda Luffa-Schoorla v upravenej forme. K 25 ml destilovanej vody v 100 ml banke boli pridané 0,5 - 1,0 ml vzorky podľa predpokladaného obsahu redukujúcich cukrov a 5 ml HCl (1:5). Po premiešaní obsahu bola banka zahrievaná na vodnom kúpeli (71 °C) na teplotu 67 - 69 °C (2 - 3 min), ktorá bola udržiavaná presne 5 minút. Potom bola banka ochladená. K invertovanej vzorke prenesenej do 250 ml banky bolo pridané 25 ml Luffovho roztoku (388 g kryštalického Na_2CO_3 bolo rozpustených v 400 ml vody a roztok bol prevedený do 1000 ml odmernej banky). Po jeho ochladení boli pridané roztoky 50 g kyseliny citrónovej v 50 ml vody a 25 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ v 100 ml vody a po premiešaní bola banka doplnená po značku vodou [3] a obsah sa varil pod spätným chladičom 10 minút. Po ochladení a pridaní 3 g KI a 20 ml 25 % hmot. H_2SO_4 bol obsah stitovaný $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ($c = 0,1 \text{ mol.l}^{-1}$) do slabozltého sfarbenia. Pred dotitrovaním bol pridaný škrobový maz. Slepý pokus bol robený bez inverzie, pričom namiesto vzorky bola pridaná destilovaná voda. Obsah redukujúcich cukrov bol vypočítaný z rozdielu spotrieb roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ pri slepom pokuse vlastnom stanovení. Výsledok bol vyjadrený v g sacharózy v 1 l.

3.5 Stanovenie kyseliny mliečnej

Kyselina mliečna bola stanovená podľa Brotza a Schaefera [4]. Princíp spočíva v oxidácii inak neprchavej kyseliny mliečnej s H_5IO_6 na acetaldehyd, ktorý je ľahko detegovateľný plynovou chromatografiou. Bola použitá sklená náplňová kolóna hrúbky 3 mm, dĺžky 1,8 m naplnená adsorbentom Chromosorb prepravovaným podľa citovanej práce. Teplota kolóny bola 120 °C, detektora a injektora 180 °C a tlak dusíka 81 060 Pa. Vzorka bola po prevedení na voľné kyseliny (OSTION KS-2) zriedená na koncentráciu do 2% kyseliny mliečnej, nástrekované bolo 0,3 μl vzorky.

3.6 Analýza homofermentativity

Obsah prchavých kyselín ako vedľajších produktov fermentácie bol stanovený na plynovom chromatograme pri teplote 3 mm náplňovej kolóny 190 °C. Dĺžka kolóny 1,2 m, náplň Porapak QS, tlak dusíka 101 325 Pa, prietok vodíka 30 ml.min^{-1} a vzduchu 0,5 l.min^{-1} . Vzorka (5 ml) bola pre tento účel po sцентрифugovaní biomasy prevedená na kyseliny katexom OSTION KS-2, pričom sa zriedila dvojnásobne až trojnásobne. Katexová kolóna mala objem 20 ml, náplň 15 ml katexu. Regenerácia bola robená HCl 10 % hmot. - dvojnásobkom objemu ionexu. Nástrek vzorky - 1 μl .

4. VÝSLEDKY A DISKUSIA

U deviatich kultúr vybraných na základe predbežných acidifikačných a identifikačných testov [2] sme na pivovarskej sladine posúdili produktivitu v reálnych fermentačných podmienkach. Šesť najlepších sme podrobili ďalšej analýze z hľadiska štúdia fermentácie reálnych substrátov vrátane posúdenia čistoty

produktu. Celkový posup prác je znázornený v tabuľke 1. Vzhľadom na obmedzený rozsah tohto textu sú v ďalšom uvádzané konkrétne výsledky iba u štyroch v konečnom dôsledku najlepších kmeňov.

4.1 Fermentácie a homofermentativita

Na otestovanie produktivity vybraných kmeňov v podmienkach miešaného reaktora sme ako fermentačné médium najprv použili pivovarskú sladinu, ktorú sme svojím zložením považovali za blízku optimálnemu médiu pre mliečne baktérie. Tieto fermentačné experimenty boli pre nás mierou produkčných schopností kultúr v médiu blízkom optimu a umožnili nám vybrať tie kmene, ktoré majú predpoklady pre maximálnu produkciu kyseliny mliečnej vo fermentore. Ukázalo sa, že 6 z 9 testovaných kmeňov (č. 11, 16, 17, 20, 21, 22) výhodne konvertuje cukry takmer kvantitatívne. Pribeh fermentácií u 4 najlepších kmeňov je na obr. 1 až 4.

Obr. 1. Kinetika fermentácie izolátu mliečnych baktérií č. 11 v laboratórnom fermentore LF-2 s obsahom 1,9 l pôdy a 0,1 l inokula na sladine (—) a na produkčných médiách s obsahom čistej sacharózy (---), resp. surového cukru (—) ako jediného zdroja uhlíka.

Teplota 50 ± 1 °C, pH $6,1 \pm 0,05$, spotreba roztoku NaOH (●), frekvencia miešania 220 min^{-1} . Nárast biomasy (●) indikovaný zmenou absorbancie pri 650 nm (A_{650}), úbytok substrátu (●) poklesom obsahu redukujúcich sacharidov (RS).

U takto zúženej skupiny kmeňov sme ďalej zisťovali vzťah charakteru substrátu k ich produktivite. Ako fermentačné médiá pre tieto testy sme vybrali pôdu na báze čistej sacharózy, resp. surového cukru. Ako porovnávacie médium slúžila pivovarská sladina. Naším úmyslom bolo na fermentácii čistej sacharózy zistiť schopnosť kultúr utilizovať tento substrát v podmienkach semisyntetického média ako potenciálnej fermentačnej pôdy v praxi. Fermentácia surového cukru bola mierou odolnosti kultúr voči inhibičným látkam, reálne sa vyskytujúcich v cukrovárnických substrátoch (obr. 1 až 4). Cukorný roztok bol doplnený kvasničným autolýzátom a minerálnymi soľami.

Z priebehu jednotlivých fermentácií je zrejmé, že s poklesom obsahu živných látok, resp. zvyšovaním stupňa nečistoty substrátu, produktivita vždy klesala. Najproduktívnejším kmeňom na pivovarskej sladine bol izolát č. 11, na čistej sacharóze mal najlepšiu priemernú produktivitu izolát č. 17, nečistoty surového cukru najlepšie znášal kmeň č. 21. Rozdiely v priemerných produktivitách štvorice producentov na troch testovaných substrátoch sú sumarizované na obr. 5. V porovnaní s priemernými produktivitami tohto procesu udávanými v literatúre [5]

rozmedzím 1 až 3 kg.m⁻³.h⁻¹ možno najmä v prípade pivovarskej sladiny, ale aj čistej sacharózy hovoriť o porovnateľných výsledkoch.

Tab. 1. Koncepcia práce pri získaní producenta kyseliny mliečnej

Cieľ etapy	Spôsob riešenia	Označenie	a počet vzoriek
Získať živé kultúry a vylúčiť z nich populáciu iných ako mliečnych baktérií, vybrať predbežne najproduktívnejšie kmene	Čistenie, izolácia a reizolácia kultúr	1 - 30	30
Vybrať izoláty najproduktívnejšie v reálnych fermentačných podmienkach, identifikácia do stupňa druh	Experimenty vo fermentore. Charakterizácia a identifikácia	9,11,16 17,20,21 22,31,32	9
Zistiť vplyv reálnych substrátov na produktivitu, vylúčiť heterofermentanty	Experimenty vo fermentore. Analýza produktov	11,16,17 20,21,22	6
Definovať vlastnosti kmeňov vybraných pre prax. Definitívne taxonomické zaradenie	Trepačkové a fermentorové experimenty. Taxonomické štúdium v Čs. zbierke mikroorganizmov v Brne	11,17 21,22	4

Obr.2. Kinetiky fermentácie izolátu mliečnych baktérií č.17 za podmienok špecifikovaných v texte k obr.1

Z porovnania priemerných produktívít vybranej štvorice kmeňov možno usúdiť, že vzhľadom na veľký rozdiel medzi priemernými produktivítami na pivovarskej sladine a na čistej sacharóze u kmeňov 11 a 22 sú ich nároky na živné látky vo fermentačnom médiu vyššie, ako je tomu u kmeňov 17 a 21.

Podobne možno z veľkého rozdielu priemerných produktívít kmeňa č. 17 na čistej sacharóze a surovom cukre usúdiť, že izolát je citlivý na inhibičné látky nachádzajúce sa v surovom cukre. Z porovnania fermentačných vlastností testovaných kmeňov sa nám z hľadiska praktického využitia ako najperspektívnejší javil v tomto štádiu výskumu izolát č.17, ktorého produktivita v optimálnych živných podmienkach je veľmi dobrá, pričom pri fermentácii čistej sacharózy v semisyntetickej pôde (táto kombinácia sa javí pre prax ako najpravdepodobnejšia) dochádza k najmenšiemu poklesu produkcie. Jeho nevýhodou je však vysoká citlivosť na nečistoty surového cukru. Túto skutočnosť však nemožno absolutizovať, pretože vo fermentačných experimentoch bola použitá len jedna šarža surového cukru.

Obr.3. Kinetiky fermentácie izolátu mliečnych baktérií č.21 za podmienok špecifikovaných v texte k obr.1

Obr.4. Kinetiky fermentácie izolátu mliečnych baktérií č.22 za podmienok špecifikovaných v texte k obr.1

Ďalším selekčným parametrom, ktorý zúžil počet kmeňov zo 6 na 4 (vylúčili sme izoláty č.16 a 20), bola homofermentativita produktu. Pre analýzy sme vybrali vzorky z fermentácií čistej sacharózy, aby sme na minimum obmedzili riziko vzniku problémov pri plynovochromatografickej analýze a súčasne získali výsledky z média, ktoré sa najviac približuje reálnemu. Zistili sme, že kmeň č.11 produkuje do 0,1 % obj. prechavých kyselín na objem fermentačného média, kmeň č.17 a 22 do 0,4 % obj. a kmeň č.21 do 0,6 % obj. Izoláty č.16 a 20 tvorili až 8-10 % obj. vedľajších produktov.

Ukázalo sa teda, že kmene č. 11, 17, 21 a 22 možno považovať za homofermentatívne. S prihliadnutím na dosiahnuté priemerné

produktivity a možnosť zníženia tvorby vedľajších produktov úpravou kultivačných podmienok sa kmeň č.17 javí byť potenciálnym budúcim priemyselným producentom kyseliny mliečnej.

Obr. 5. Priemerné produktivity testovaných kmeňov charakterizované množstvom vyprodukovanej kyseliny mliečnej (KM) na rôznych substrátoch v laboratórnom fermentore LF-2 za podmienok špecifikovaných v texte k obr. 1

4.2 Aerotolerancia a termotolerancia

K veľmi dôležitým poznatkom potrebným najmä pre optimalizáciu a scale-up technológie patrí u mliečnych baktérií ich vzťah ku kyslíku a teplote. Mliečne baktérie sú známe ako mikroorganizmy s metabolizmom na rozhraní aerobiózy a anaerobiózy. V rámci tohto rozhrania existujú ešte jemné rozdiely, takže niektoré kmene sú mikroaerofilné, iné mikroaerotolerantné a ďalšie striktné anaeróby. U striktných anaeróbov kyslík pôsobí ako metabolický jed, čím negatívne zasahuje do produkcie kyseliny mliečnej [6].

Podobne nie je jednoznačný ani vzťah mliečnych baktérií k teplote. Pretože produkcia kyseliny mliečnej týmito baktériami je čiastočne spojená s rastom, je pre účinnú konverziu dôležité poznať aj optimálnu teplotu rastu, aby bolo možné v technológii zabezpečiť čo najdlhší rast biomasy a tak udržať tvorbu kyseliny mliečnej na maximálnej úrovni čo najdlhšie.

Preto sme pri charakterizácii potenciálnych producentov považovali za nevyhnutné definovať ich vzťah ku kyslíku a teplote. Napriek špecifikácii izolátu č.17 ako najperspektívnejšieho z hľadiska kinetiky a konverzie sacharózy na kyselinu mliečnu, zaradili sme sem aj ďalšie tri z poslednej skupiny štyroch izolátov, pretože ak by sa u doteraz najlepšieho kmeňa č.17 prejavili vyššie nároky na kyslík ako u ostatných troch, mohlo by to mať nepriaznivý vplyv na ekonomiku procesu. Naviac - predpokladali sme, že niektoré rozdiely v kinetike konverzie a homofermentatívne priebehu, zistené u súboru izolátov č.11, 17, 21 a 22, by bolo možné odstrániť v smere zlepšenia optimalizáciou kultivačných podmienok. Preto sme poznatky o vzťahu testovaných izolátov ku kyslíku a teplote získali porovnaním statickej a trepačkovej kultivácie štyroch fermentačne najlepších kmeňov pri teplotách od 47 do 57 °C. Statická kultivácia (v skutočnosti s občasným premiešaním raz za cca 6 h) simulovala podmienky relatívne anaeróbného procesu. Vychádzali sme z predstavy, že ak niektorá z kultúr bude striktný anaerób, väčší prestup kyslíka do média pri trepačkovej kultivácii bude pôsobiť tak inhibične na metabolizmus, že nebude kompenzovateľný lepším prísunom živín a pomerne stabilným pH média. Predpokladali sme teda, že ak kultúry budú mikroaerofilné, prejaví sa to ich značne lepším nárastom na trepačke v porovnaní so statickou kultiváciou. Pre

overenie tejto vlastnosti v škále teplôt pripadajúcich do úvahy pri budúcej optimalizácii technológie bol porovnávaný simulovaný anaeróbny a aeróbny rast pri piatich teplotách. U každého kmeňa bol z porovnania rastových kriviek pri každej teplote zrejmy výrazný rozdiel v prospech trepačkovej kultivácie. Usúdili sme, že malé množstvá kyslíka v médiu sú kultúrami tolerované, preto ich možno pokladať za mikroaerotolerantné.

Obr. 6. Stanovenie optimálnej teploty rastu u súboru testovaných kultúr mliečnych baktérií. Kultivácia bola uskutočnená na trepačke v 100 ml Erlenmeyerových bankách s obsahom 50 ml MRS pôdy s 2 % hmot. sacharózy, objem inokula 5 % hmot.. Nárast biomasy vyhodnotený spektrofotometricky meraním absorbancie pri 650 nm (A_{650}) po 47 h, pri kultivačnej teplote 50 °C po 24 h.

Obr. 7. Vplyv teploty na rast testovaných kultúr. Kultivácia bola uskutočnená na trepačke v 100 ml Erlenmeyerových bankách s obsahom 50 ml MRS pôdy s 2 % hmot. sacharózy, objem inokula 5 % obj. Nárast biomasy vyhodnotený spektrofotometricky meraním absorbancie pri 650 nm (A_{650}) po 47 h, pri kultivačnej teplote 50 °C po 24 h.

Porovnaním nárastu jednotlivých kultúr pri piatich teplotách sa ukázalo, že u izolátov č.11, 17 a 21 bol maximálny nárast dosiahnutý pri teplote 50 °C (už za 24 h), monokultúra č.22 najlepšie rástla pri teplote 52 °C (ovšem až za 47 h). Výhodnosť teploty 50 °C pre zmienené tri kultúry je zrejma aj zo skutočnosti, že u ostatných teplôt ani dvojnásobná kultivačná doba nestačila na dosiahnutie takého nárastu, ako tomu bolo za 24 hodín pri

teplote 50 °C. Podobne u izolátu č. 22 nebola intenzita rastu dosiahnutá pri 52 °C porovnateľná s nárastom pri žiadnej inej teplote. Vzhľadom k tomu, že pri 50 °C u väčšiny kultúr rast kulminoval, sú do obrázkov č. 6 a 7 pre rast pri 50 °C zaradené hodnoty absorbcie po 24 hodinách, v ostatných prípadoch po 47 hodinách. Z týchto výsledkov je zrejmé, že testované kmene možno z hľadiska ich rastu a teda aj produkcie výrazne ovplyvniť teplotou. Domnievame sa preto, že pri potenciálnom nasadení týchto kmeňov ako producentov by bolo z hľadiska rentability procesu potrebné dodržať pri č. 11, 17 a 21 kultivačnú teplotu 50 °C, resp. u č. 22 52 °C (obr. 6 a 7).

Zosumarizovaním poznatkov o vzťahu kultúr č. 11, 17, 21 a 22 ku kyslíku a teplote, o homofermentatívite priebehu, stupni a kinetike konverzie sacharózy na kyselinu mliečnu sme dospeli k záveru, že za najperspektívnejší pre ďalší vývoj budeme považovať izolát č. 17, ktorý sa ukázal ako mikroaerotolerantný s optimálnou teplotou rastu 50 °C, s veľmi dobrou produktivitou v optimálnych živných podmienkach i pri fermentácii čistej sacharózy na semisyntetickej pôde (táto kombinácia sa pre prax javí ako najpravdepodobnejšia). Tento kmeň, v rámci predchádzajúcej práce [2] identifikovaný ako *Bacillus coagulans*, sme sa v ďalšom rozhodli preštudovať z hľadiska citlivosti na chemické a fyzikálne vplyvy prostredia s cieľom optimalizácie kultivačných podmienok a tým zlepšenia kinetiky a stupňa konverzie sacharózy na kyselinu mliečnu pri súčasnom znížení tvorby vedľajších produktov.

5. ZÁVER

Po stanovnení spektra metabolických produktov jednotlivých kultúr a ich aerotolerancie a termotolerancie bol ako najperspektívnejší vybraný kmeň identifikovaný ako *Bacillus coagulans*. Táto kultúra z hľadiska kinetiky produkcie a stupňa konverzie substrátu na produkt patrila k najlepším, mala veľmi dobrú homofermentativitu, najlepšiu produktivitu na semi-syntetickej pôde, je mikroaerotolerantná, jej teplotné rastové optimum je v rozmedzí 50 ± 1 °C a dobre znáša nečistoty bežne sa vyskytujúce v sacharózových substrátoch.

LITERATÚRA

- 1 HERIBAN, V., ŠTURDÍK, E.: Kvas. prům., 35, 1989, s. 328.
- 2 HERIBAN, V. et al.: Kvas. prům., 38, 1992, s. 231
- 3 DAVÍDEK, J. et al.: Laboratorní příručka analýzy potravin, 1, vyd., SNTL Praha 1977.
- 4 BROTZ, P.G., SCHAEFER, D.M.: J. Microbiol. Meth, 6, 1987, s. 139.
- 5 MURREY, M.Y. (ed.): Comprehensive Biotechnology, Oxford, Pergamon Press, 1985, s. 761.
- 6 KRIEG, N.R., HOLC, J.G. (eds.): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 6th ed. Baltimore, Williams and Wilkins 1984.

Lektorovala Doc. Ing. K. Demnerová

Heriban, V. - Šturdík, E. - Šturdíková, N.: Fermentačná produkcia kyseliny mliečnej. III. Charakterizácia vyselektovaných termofilných kmeňov. Kvas. prům., 38, 1992, č. 10, s. 293 - 297

9 vyselektovaných produkčných kmeňov rodu *Bacillus* bolo podrobených ďalšiemu štúdiu. Jeho ťažisko spočívalo v posúdení ich produkčných schopností v podmienkach miešaného reaktora na čistej sacharóze a ďalších médiách, kde bola testovaná ich odolnosť voči nečistotám, resp. hľadaná ich maximálna produktivita. Súčasne bola stanovená ich homofermentatívnosť, aerotolerancia a termotolerancia. Na základe získaného súboru poznatkov bol pre ďalšiu optimalizáciu procesu vybraný najefektívnejší kmeň identifikovaný ako *Bacillus coagulans*.

Герибан, В. - Штурдик, Е. - Штурдикова, Н.: Ферментативная продукция молочной кислоты III. Характеристика селекционных термофильных штаммов. Квас. прум. 38, 1992, №10, стр. 293 - 297

Десять селекционных производственных штаммов вида *Бациллы* подвергли дальнейшему исследованию, центр тяжести которого состоял в обсуждении их продуктивных свойств в условиях перемешиваемого реактора на чистой сахарозе и в других средах, где исследовалась их устойчивость в отношении к загрязнениям или же искалась их максимальная продуктивность. Одновременно была определена их гомоферментативность, аэротолерантность и термотолерантность. На основе полученного комплекса сведений для дальнейшей оптимизации процесса был избран наиболее эффективный штамм, идентифицированный как *Bacillus coagulans*.

HERIBAN, V. - ŠTURDÍK, E. - ŠTURDÍKOVÁ, N.: Fermentation Production of Lactic Acid. III. Characteristics of Selected Thermophilic Strains. Kvas. prům., 38, 1992, No. 10, pp 293-297.

Further study was performed with 9 selected production *Bacillus* strains. Their production properties were tested in an agitated reactor on pure saccharose and further media containing impurities. Other parameters tested were: homofermentative metabolism and their sensitivity to oxygen and heat. For further process optimization the strain identified as *Bacillus coagulans* has been selected as the best one.

Heriban, V. - Šturdík, E. - Šturdíková, N.: Fermentative Milchsäureproduktion. III. Charakteristik der ausselektierten thermophilen Stämme. Kvas. prům., 38, 1992, Nr. 10, S. 293 - 297

9 ausselektierte Produktionsstämme der Gattung *Bacillus* wurde ausführlich studiert. Das Studium orientierte sich vor allem auf die Beurteilung der Produktionsfähigkeiten der reiner Saccharose und weiteren Medium, wo ihre Beständigkeit gegenüber Verunreinigungen getestet bzw. ihre maximale Produktivität gesucht wurde. Zugleich wurde auch ihre Homofermentativität, Aerotoleranz und Thermotoleranz bestimmt. Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse wurde für die weitere Prozeßoptimisation der effektivste Stamm ausgewählt, der als *Bacillus coagulans* identifiziert wurde.