

FERMENTAČNÁ PRODUKCIA KYSELINY MLIEČNEJ

V. Výber laktobacilového kmeňa, optimalizácia procesných podmienok a fermentácia s bunkovým recyklom

Ing. VLADIMÍR HERIBAN, Ing. PETER MATUŠ, Doc. Ing. ERNEST ŠTURDÍK, CSc., Ing. VLADIMÍR SITKEY, CSc., Katedra biochemickej technológie ChTF STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, LIKO Výskumný ústav, Miletičova 23, 820 06 Bratislava, SR

Kľúčové slová: mliečne baktérie, mliečna fermentácia, kinetika konverzie a výtážky procesu, membránový reaktor, bunkový recykulus.

1. ÚVOD

V predošlých častiach nášho seriálu Fermentačná produkcia kyseliny mliečnej sme zoznámili čitateľa so stavom poznatkov o kyseline mliečnej a jej výrobe v súčasnej literatúre [1], s hľadaním termofilných producentov kyseliny mliečnej z rodu *Bacillus* [2], charakterizáciou vyselektovaných kmeňov [3] ako aj optimalizáciou mliečnej fermentácie, jej scale-up a izoláciou produktu [4]. Vyvinutý producent *Bacillus coagulans* CCM 4318 i technológia sú vhodné pre efektívnu prípravu kyseliny mliečnej pre technické, potravinárske i farmaceutické účely. Vzhľadom na tradíciu, ale aj niektoré realizačné aspekty vznikla potreba doplniť program vývoja technológie výroby potravinárskej a farmaceutickej kyseliny mliečnej o variant postavený na báze laktobacilového kmeňa.

Zámerom tejto práce bolo preto získať vhodného producenta spomedzi mliečnych baktérií rodu *Lactobacillus*, na základe poznatkov z vývoja fermentácie s kmeňom *Bacillus coagulans* CCM 4318 nájsť aj pre producenta laktobacilového typu optimálne zloženie pôdy, fermentačné podmienky a porovnať produktivitu oboch kmeňov v podmienkach membránového reaktora na báze bunkového recyklu.

2. MATERIÁL

2.1 Študované kmene

Pre skríning laktobacilov boli použité nasledovné kmene: *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009, *L. helve-*

ticus LMG 6413, *L. plantarum* ATCC 8014, *L. leichmanii* ATCC 7830, *L. casei* subsp. *rhamnosus* ATCC 7469, *L. paracasei* subsp. *paracasei* CCM 1753, *L. mali* CCM 2877, *L. casei* subsp. *rhamnosus* CCM 1828 a nasledovné kmene zo zbierky MILCOM Praha: *L. acidophilus* 92, *L. acidophilus* 98, *L. delbrückii* subsp. *bulgaricus* 988, *L. delbrückii* subsp. *bulgaricus* 118, *L. delbrückii* subsp. *bulgaricus* 552, *L. delbrückii* 237, *L. casei* 148, *L. casei* 154, *L. casei* 158, *L. delbrückii* subsp. *lactis* 125, *L. plantarum* 178 a *L. plantarum* 185. Na porovnávacie experimenty slúžil producent kyseliny mliečnej *Bacillus coagulans* CCM 4318.

2.2 Kultivačné médiá

Dve základné pôdy - MRS pre prípravu inokula a krátkodobú úchovu kmeňa a produkčné médium, zo zloženia ktorého sa pri experimentoch vychádzalo, sú detailne popísané v publikácii [3]. V ďalších etapách boli použité aj iné pôdy, ktorých zloženie je uvedené v ďalšom texte.

Modifikovaná produkčná pôda [g.l⁻¹]: sacharóza 80, kvasničný autolyzát 15, (NH₄)₂HPO₄ 2 až 6, MgSO₄.7H₂O 0.2, MnSO₄.5H₂O 0.05 a FeSO₄.7H₂O 0.01.

Minimálne fermentačné médium [g.l⁻¹]: sacharóza 80, kvasničný autolyzát 15, (NH₄)₂HPO₄ 6, MgSO₄.7H₂O 0.2 (rozpúšťané vo vodovodnej vode).

Základná pôda pre bunkový recykulus [g.l⁻¹]: sacharóza 40, kvasničný autolyzát 5, (NH₄)₂HPO₄ 1, MgSO₄.7H₂O 0.1, MnSO₄.5H₂O 0.5 a FeSO₄.7H₂O 0.01 (rozpúšťané vo vodovodnej vode).

Prítokové médium pre bunkový recykus [g.l^{-1}]: sacharóza 40, kvasničný autolyzát 5, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,075, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,025 a $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,005 (rozpúšťané vo vodovodnej vode).

Pôda pre prípravu inokula pre fermentáciu s bunkovým recykrom [g.l^{-1}]: sacharóza 40, kvasničný autolyzát 10, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,05 (rozpúšťané vo vodovodnej vode).

Médiá pre fermentáciu s bunkovým recykrom boli pred sterilizáciou okyslené HCl na pH 5.9 a sterilizované v autokláve 30 min pri 110 °C.

2.3 Chemikálie

Peptón pre bakteriologiu a kvasničný autolyzát boli z Imuny Šarišské Michaľany (SR), kvasničný extrakt od holandskej firmy Gist-Brocades, ako sacharóza bol použitý potravinársky cukor, izotachoforetické roztoky (vodiaci a zakončujúci elektrolyt) dodal Ústav rádioekológie a využitia jadrovej techniky v Košiciach (SR). Kvapalinovochromatografickú kolónu s náplňou Ostion KS-0800 dodala firma Tessek Praha (ČR). Ostatné chemikálie boli čistoty p.a. a pochádzali od firmy Lachema Brno (ČR).

2.4 Prístroje

Trepačkové experimenty boli robené na trepačke typu 357 (Mechanika precyzyjna, Poľsko) pri amplitúde 7 a počte kmitov 125 min^{-1} .

Inokulum bolo pripravované v laboratórnom termostate BT-120 (Laboratní přístroje Praha, ČR).

Na vyhodnocovanie rastu biomasy bol používaný spektrofotometer Spekol 11 (Carl Zeiss Jena, NSR) v sklených kvetkách hrúbky 1 cm.

Mikroskopickú kontrolu sme robili pomocou mikroskopu Laboval 4 (Carl Zeiss Jena, NSR).

Centrifugácia bola uskutočňovaná v odstredivke VE-2 (Mechanika precyzyjna, Poľsko).

Laboratórne fermentačné experimenty boli realizované na fermentore LF-2 (Vývojové dílny ČSAV Praha, ČR) o celkovom objeme 5 l s plnením 2 l. Otáčky boli udržiavané na hodnote 200 min^{-1} . Na reguláciu bola použitá kombinovaná sklená elektróda GEBJ 33 A (Chemoprojekt Satalice, ČR) a regulačný pH meter. Teplota bola udržiavaná na 37 °C obehovým termostatom MLW UH8 (SRN).

Fermentácia s bunkovým recykrom bola robená na fermentore Biolafitte objemu 100 l plnenom 50 l média. Ako mikrofiltračný člen bol použitý modul CerafloTM firmy Millipore (USA) s veľkosťou pórov 0.45 μm . Fermentor bol vybavený pH elektródou Ingold, prietokomerom Platon, obehovým motorom ABB Motors 1.5 kW (Asea Brown Boveri, Švédsko), prevodovka a čerpadlo boli od firmy Johnson Pumpen AG (Švajčiarsko).

Na analýzu fermentačných médií bol používaný izotachoforetický analyzátor ZKI-02 (Ústav rádioekológie a využitia jadrovej techniky, Spišská Nová Ves, SR) v dvojkolónovom usporiadaní a kvapalinový chromatograf zostavený z vysokotlakého čerpadla HPP 5001, diferenciálneho refraktometra RIDK-102, integrátora CI-105 a dvojlíniového zapisovača TZ 4200 (Laboratní přístroje Praha, ČR). Použitá kolóna rozmerov 8 x 250 bola naplnená OSTION-om KS 0800 v H^+ cykle (Tessek Praha, ČR).

3. METÓDY

3.1 Trepačkové experimenty

Boli uskutočňované v 100 ml Erlenmeyerových bankách s plnením 50 ml pôdy. Na inokuláciu sme použili 2 ml čerstvo narastenej kultúry. Kultivácia trvala 28 hodín, vzorky boli odoberané v 0., 4., 8., 12., 24. a 28. hodine. Vyhodnocovaný bol rast biomasy (meraním absorbancie pri 480 nm), v poslednej vzorke aj obsah kyseliny mliečnej, resp. iných kyselín.

3.2 Fermentačné experimenty

V laboratórnom fermentore bol celkový objem fermentačnej pôdy 2 l, objem statickou kultiváciou pripraveného inokula bol 100 ml (5%). Fermentácie boli vedené tak, že hodnota pH bola udržiavaná prídávaním NaOH (10 mol.l^{-1}) a otáčky miešadla boli nastavené na 200 min^{-1} . V priebehu fermentácie bol sledovaný nárast biomasy, tvorba kyselín a spotreba redukujúcich sacharidov. Priebežne bola kontrolovaná čistota mikrobiologického obrazu. Proces bol vyhodnocovaný na základe konverzie substrátu na produkt, ktorá bola stanovovaná ako podiel vzniknutej kyseliny mliečnej a skutočne spotrebovanej sacharózy. Ďalším parametrom používaným pre hodnotenie procesu bola priemerná rýchlosť produkcie počítaná ako podiel množstva vyprodukovanej kyseliny mliečnej pripadajúci na jednotku objemu fermentačnej pôdy za čas o dve hodiny presahujúci posledný nárast koncentrácie produktu.

Experimenty s bunkovým recykrom boli prvých 8 až 10 hodín vedené ako klasické batch fermentácie, po tomto časovom intervale bolo mechanické miešanie nahradené obehom časti fermentačnej pôdy cez mikrofiltračný modul. Objem fermentačnej pôdy bol zo 70 l znížený na 50 l, prebytočným objemom bol prepláchnutý mikrofiltračný modul. Počas takto vedenej fermentácie bol vyvážený odber vyfermentovaného média ako permeátu mikrofiltra a pridávanej čerstvej fermentačnej pôdy na úrovni zriedovacej rýchlosti 0.05 h^{-1} . Vzorky boli odoberané v 4 hodinových intervaloch, vyhodnocované boli rovnaké parametre ako pri batch procesoch. Produkovaná kyselina mliečna bola neutralizovaná roztokom NaOH s koncentráciou 10 mol.l^{-1} .

3.3 Analytické metódy

Sacharóza bola stanovovaná kvapalinovou chromatografiou s využitím náplňovej kolóny rozmerov 8 x 250 s iónexom OSTION KS-0800 v H^+ forme. Mobilnou fázou bola H_2SO_4 (10 mmol.l^{-1}), prietoková rýchlosť 1.0 ml.min^{-1} pri tlaku 1.3 MPa, teplota kolóny 80 °C, detektora 30 °C.

Kyselina mliečna a eventúalna prítomnosť ďalších kyselín bola zisťovaná izotachoforeticky použitím vodiaceho elektrolytu v zložení $10^{-2} \text{ mol.l}^{-1} \text{ HCl} + 2.2 \cdot 10^{-2} \text{ mol.l}^{-1}$ kyselina ϵ -aminokaprónová + 0.1 % metylhydroxyetylcelulóza a zakončujúceho elektrolytu, ktorým bola kyselina kaprónová ($5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$). Použitý analytický prúd mal počas separácie hodnotu 250 μA , počas analýzy 125 μA .

Množstvo biomasy vyjadrovanej ako sušina bolo stanovované spektrofotometricky meraním absorbancie pri

480 nm a použitím rovnice kalibračnej čiary v tvare: sušina $[g \cdot l^{-1}] = 2.67 \times A_{480}$.

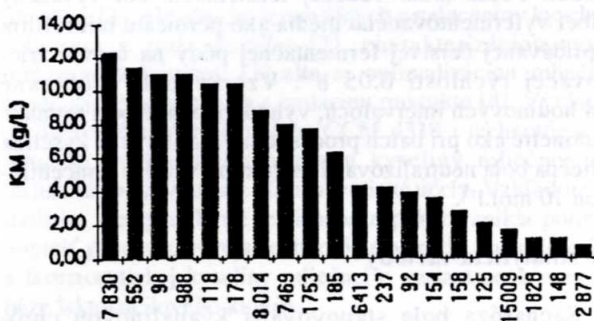
3.4 Štatistické metódy

Pri minimalizácii zloženia média bola použitá štandardná metóda podľa Rosenbroka [5] v kombinácii s t-testom.

4. VÝSLEDKY A DISKUSIA

4.1 Výber producenta

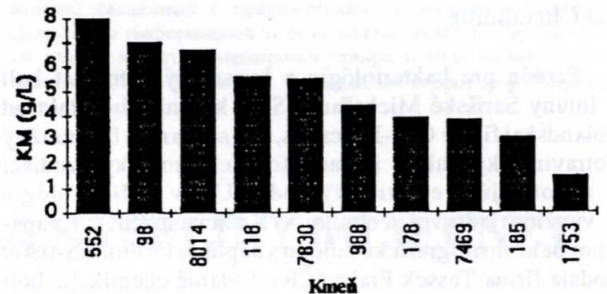
Do skríningu pre účely výberu vhodného producenta boli zvolené laktobacilové kmene z dostupných zbierok tak, aby súbor obsahoval producentov L(+) formy, ale aj D(-) izoméru kyseliny mliečnej. I keď je D(-) konfigurácia pre potravinárske využitie dnes už neprijateľná, prípadné nájdenie výkonného producenta takejto optickej formy by mohlo byť východiskom pre vývoj technológie toho izoméru, ktorý je veľmi vyhľadávaný syntetickými chemikmi pre stereoselektívne reakcie. Primárnym cieľom skríningu zostal výber najvhodnejšieho producenta L(+) kyseliny mliečnej. Vzhľadom na relatívne veľký počet kmeňov, ktoré boli zaradené do výberu, bola pre ich počiatočné posúdenie zvolená metóda trepačkovej kultivácie, ktorej zrejme nevýhoda je v nemožnosti regulácie pH fermentačnej pôdy ako i v diametrálne odlišných hydrodynamických podmienkach kultivačnej baničky a fermentora. Napriek tomu takýto prístup má zmysel, pretože je predpoklad, že nepriaznivé faktory pôsobia na všetky testované kmene približne rovnako negatívne, a nemalo by sa teda stať, aby kmeň, ktorý by bol v podmienkach fermentora vysoko výkonný, sa takýmto neukázal už na úrovni trepačkovej kultivácie.



Obr.1: Produktivity (výťažky kyseliny mliečnej) východiskového súboru laktobacilov po 28 h kultivácie na trepačke pri 37 °C v 100 ml Erlenmeyerových bankách s 50 ml MRS média. Objem inokula 4 %.

V prvom kole skríningu boli všetky vybrané kmene otestované na laboratórnej, bohatej MRS pôde. Cieľom týchto testov bolo nájsť medzi kultúrami tie, ktoré sú za ideálnych podmienok schopné vysokých produkcií. Vychádzali sme z predpokladu, že len takéto kmene budú schopné i na chudobnejších pôdach poskytovať vysoké výťažky, resp. ak niektorý kmeň nevyprodukuje dosta-

točné množstvo kyseliny mliečnej na bohatom médiu, nebude toho spôsobilý ani na chudobnejšej pôde. Výsledky sú na obr.1. Ako vyplýva z údajov v tomto obrázku, produktivita testovaných kmeňov na sacharóze bola veľmi rozdielna. I tie najproduktívnejšie kmene dosiahli len nadpolovičnú konverziu substrátu na produkt, čo je priamy dôsledok nepriaznivých podmienok trepačkovej kultivácie. Napriek tomu tieto výsledky umožnili vylúčiť z ďalších pokusov tie kmene, ktoré sa na sacharóze javili ako málo produktívne (druhá desiatka testovaných kultúr).



Obr.2: Produktivity (výťažky kyseliny mliečnej) vybraného súboru laktobacilov po 28 h kultivácie na trepačke pri 37 °C v 100 ml Erlenmeyerových bankách s 50 ml produkčného média. Objem inokula 4 %.

Desať vybraných kmeňov bolo testovaných v druhom kole trepačkových kultivácií, v ktorom bola použitá podstatne chudobnejšia kultivačná pôda ako MRS v prvom kole. Cieľom takto vedených kultivácií bolo preveriť produkčné schopnosti vybraných kultúr na médiu, ktoré je svojím zložením bližšie reálne použiteľnému médiu v praxi. Výsledky tohto testu sumarizuje obr.2. Ako je z údajov zrejme, na chudobnejšej pôde boli dosiahnuté ešte nižšie konverzie ako na MRS pôde použitej v predošlom stupni skríningu, čo však bolo možné kvôli známej výživovej náročnosti laktobacilov očakávať. Stanovené rozdiely však i tak umožnili jednoznačne vybrať i za týchto podmienok najlepšie kmene, pričom sme vzhľadom na cieľ skríningu, ktorým bol výber potravinársky akceptovateľného producenta pre ďalšiu prácu, vybrali už len tie kultúry, ktoré podľa dostupných literárnych údajov produkujú prevažne L(+) izomér, t.j. *Lactobacillus acidophilus* 98, *L.plantarum* 8014, *L.plantarum* 178, *L.casei* subsp. *rhamnosus* 7469 a *L.plantarum* 185.

Ďalšou etapou špecifikácie najvhodnejšieho producenta boli fermentačné testy v miešanom reaktore, ktoré mali anulovať vplyv nepriaznivých kultivačných podmienok trepačkových pokusov na produktivitu testovaných kultúr a poskytnúť vierohodnejšie údaje o fermentačnej výkonnosti testovaných kmeňov. aby tak bolo možné spoľahlivejšie sa rozhodnúť pre určitú kultúru. Pri zostavení kultivačných podmienok sme vychádzali zo stavu, ktorý sa ukázal ako optimálny v predošlej práci [4]. Výkonnosť kmeňov sme posudzovali podľa dvoch základných parametrov - konverzie spotrebovaného substrátu na produkt a priemernej produkčnej rýchlosti. Použitie bolo produkčné médium [3] a teplota kultivácie 37 °C. Ako ukázali výsledky (tab.1), stabilné pH kultivačnej pôdy a dobré miešanie priniesli podstatne vyššie

výťažky. Pretože každá fermentácia bola vyhodnocovaná na základe súčinu konverzie a priemernej produkčnej rýchlosti (tento súčin jednou hodnotou vyjadruje výhodnosť priebehu procesu tak z hľadiska konverzie, ako aj rýchlosti), ako najvhodnejšie sa v tejto etape výberu javili kmeny *L. casei subsp. rhamnosus* 7469 a *L. plantarum* 178. Rozdielnosť spomínaných súčinov u oboch kmeňov sme však v tomto štádiu nepovažovali za natoľko výraznú, aby bolo možné už na základe týchto výsledkov, dosiahnutých za ešte neoptimálnych kultivačných podmienok a v pôde, ktorej zloženie tiež ešte nebolo optimalizované, jednoznačne určiť ten lepší. Ich výkonnosť bola natoľko blízka, že nebolo možné vylúčiť opačné poradie ich vhodnosti v podmienkach optimalizovaných na tieto kmene.

Tab. 1. Výsledky fermentačných testov piatich na trepačke najproduktívnejších laktobacilových kmeňov. Fermentácie boli robené v laboratórnom fermentore na produkčnom médiu ($[g.l^{-1}]$: sacharóza 80, KH_2PO_4 1, $(NH_4)_2SO_4$ 1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,05 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01), teplota kultivácie 37 °C, neutralizácia 10 mol.l⁻¹, objem inokula 5%.

Kmeň	KM [g.l ⁻¹]	Čas [h]	V [g.l ⁻¹ .h ⁻¹]	K (konv.)	V.K [g.l ⁻¹ .h ⁻¹]
<i>L. acidophilus</i> 98	74,8	49,0	1,53	0,94	1,44
<i>L. plantarum</i> 8014	73,7	46,2	1,60	0,93	1,49
<i>L. plantarum</i> 178	73,0	39,2	1,86	0,91	1,69
<i>L. casei</i> 7469	73,7	37,5	1,97	0,92	1,81
<i>L. plantarum</i> 185	32,0	18,5	1,73	0,40	0,69

Význam symbolov vid' tab 2 a 3.

To bol dôvod, aby sa u oboch kmeňov preskúmal vplyv jedného z najvýraznejších procesných parametrov - pH. Optimálna hodnota tohto parametra môže natoľko ovplyvniť priebeh procesu, že v tomto štádiu bolo nutné brať do úvahy, že by mohla aj zmeniť výkonnosť kmeňov v prospech kultúry v neoptimálnych podmienkach výkonnejšej. Vyhodnotenie jednotlivých fermentácií je v tabuľke 2.

Tab. 2. Základné charakteristiky fermentácií kmeňov *L. plantarum* 178 a *L. casei subsp. rhamnosus* 7469 (KM - finálna koncentrácia laktátu v médiu, V - priemerná produkčná rýchlosť, K - konverzia spotrebovaného substrátu na produkt) pri rôznych hodnotách pH fermentácie. Stanovené boli v laboratórnom fermentore LF-2 plnenom 2 l produkčného média, pri teplote 37 °C, otáčkach miešadla 200 min⁻¹ a neutralizácii 10 mol.l⁻¹ roztokom NaOH.

Kmeň	pH	KM [g.l ⁻¹]	Čas [h]	V [g.l ⁻¹ .h ⁻¹]	K (konv.)	V.K [g.l ⁻¹ .h ⁻¹]
178	6,5	73,0	39,2	1,86	0,91	1,70
178	6,2	74,3	36,0	2,06	0,90	1,86
178	5,8	72,4	34,0	2,13	0,94	2,00
7469	6,5	73,7	37,5	1,97	0,92	1,82
7469	5,8	74,7	37,7	1,98	0,94	1,86

Ako je z údajov v tabuľke zrejme, vzhľadom k predošlým experimentom došlo k zmene poradia výkonnosti posledných dvoch testovaných kmeňov.

V takto vedenom procese sa ako výhodnejší ukázal byť *Lactobacillus plantarum* 178. Dosiahol najvyššiu priemernú produkčnú rýchlosť a súčasne aj najlepšiu konverziu sacharózy na kyselinu mliečnu - až 94%. Pretože tieto výsledky boli lepšie ako u konkurenčného kmeňa, bola pre ďalšiu optimalizáciu vybraná ako potenciálny producent kyseliny mliečnej práve tato kultúra.

4.2 Optimalizácia zloženia média

K ďalším významným parametrom, ktoré v značnej miere determinujú efektívnosť procesu mliečnej fermentácie, je zloženie produkčnej pôdy. Je známe, že významnými zložkami pôdy pre mliečnu fermentáciu sú zdroje fosfátu a asimilovateľného dusíka, nemenej dôležité sú aj niektoré minerálne prvky, ku ktorým patrí najmä Mg^{2+} a Mn^{2+} [6]. To bolo spolu so snahou o zostavenie cenovo čo najmenej nákladnej pôdy hlavným stimulom pre experimenty vedúce k nájdeniu optimálnej a súčasne minimálnej kompozície pôdy, ktorá by zaručovala optimálny priebeh procesu pri jeho súčasnej maximálnej efektívnosti.

Prvým krokom pri modifikácii média bola náhrada KH_2PO_4 a $(NH_4)_2SO_4$ soľou kombinujúcou potrebné zložky (fosfát a amóniový ión) a súčasne vylučujúcou vnášanie nepotrebného draslíka a síranového aniónu - $(NH_4)_2HPO_4$. V prípade dobrého výsledku umožnilo by využívanie takejto pôdy znížiť zasolovanie média podrobujúceho sa po ukončení fermentácie elektrodialýze, ktorú zvýšený obsah solí komplikuje. Na tento účel bolo zostavené tzv. modifikované médium, ktoré sa osvedčilo už pri práci s kmeňom *Bacillus coagulans*. V prvom štádiu bola overovaná len jednorazová náhrada, v ďalšom bol vzhľadom na možný výrazný vplyv testovanej soli na rast mliečneho producenta skúmaný aj dôsledok jej viacnásobného prídavku. Tento prídavok bol rozdelený do troch dávok, z ktorých prvá bola súčasťou pôdy pri začiatku fermentácie, ďalšie dve boli do média pridávané v 5. a 8. hodine fermentácie, čo zodpovedá druhej tretine exponenciálnej fázy a začiatku stacionárnej fázy. Cieľom takto zvoleného pridávania tejto soli bolo dosiahnuť primeraný a čo najdlhšie trvajúci rast buniek, ktorý je základnou podmienkou pre dobrú produkciu. Dosiahnuté výsledky sú v tabuľke 3.

Tab. 3. Dosiahnuté finálne koncentrácie laktátu (KM), časy fermentácií, priemerné produkčné rýchlosti (V) a konverzie substrátu na produkt (K) v experimentoch s modifikovanou pôdou (s obsahom $(NH_4)_2HPO_4$ namiesto KH_2PO_4 a $(NH_4)_2SO_4$ - ozn.MOD) a minimálnym fermentačným médiom (obdobného zloženia ako modifikované, len s vynechaním Mn^{2+} a Fe^{2+} - ozn.MIN). Všetky experimenty boli realizované v laboratórnom fermentore LF-2 plnenom na 2 l, pri teplote 37 °C, otáčkach 200 min⁻¹ a neutralizácii 10 mol.l⁻¹ NaOH s kmeňom *L. plantarum* 178.

Médium	KM [g.l ⁻¹]	Čas [h]	V [g.l ⁻¹ .h ⁻¹]	K (konv.)	V.K [g.l ⁻¹ .h ⁻¹]
MODa	69,3	33,2	2,09	0,86	1,79
MODb	70,6	31,2	2,26	0,87	1,97
MIN	34,7	35,0	0,99	0,82	0,81

a - obsah $(NH_4)_2HPO_4$ 2 g.l⁻¹ pridaný na začiatku fermentácie
b - obsah $(NH_4)_2HPO_4$ celkovo 6 g.l⁻¹ rozdelený na tri rovnaké prídavky v 0., 5. a 8. hodine

Väčšina mliečnych baktérií potrebuje pre svoj optimálny rast a produkciu laktátu aj niektoré minerálne ióny, najmä Mn^{2+} a Fe^{2+} , ktoré sú nutné najmä pre niektoré kinázové enzýmy [6]. Preto sme aj my venovali nájdaniu ich optimálnej koncentrácie pozornosť. Pokúsili sme sa zistiť, či kvasničný autolyzát, ktorý je súčasťou produkčnej pôdy, už samotný neobsahuje dostatočné množstvo uvedených kationov, resp. ktoré a v akom množstve sú v produkčnej pôde deficitné. Výsledky najdôležitejších fermentácií sú opäť v *tabuľke 3*.

Z údajov v *tabuľke* je zrejme, že z hľadiska obsahu $(NH_4)_2HPO_4$ je pre študovaný proces najvýhodnejší jeho trojnásobný prídavok do pôdy uprostred a ku koncu exponenciálnej fázy rastu. Naproti tomu ak sme v médiu ponechali len také množstvo Mn^{2+} a Fe^{2+} , ktoré sa v ňom nachádzalo ako prirodzená zložka kvasničného autolyzáta, došlo k výraznému poklesu produktivity laktátu, z čoho jednoznačne vyplýva, že obsah týchto kationov v samotnom kvasničnom autolyzáte je pre priaznivý priebeh procesu nedostatočný.

Vzhľadom na tieto skutočnosti ako aj poznatky z literatúry o význame kovových kationov v produkčných pôdach pre mliečnu fermentáciu [6] sme sa rozhodli venovať aj tejto problematike adekvátnu pozornosť a realizovať sériu experimentov zameraných na nájdanie minimálnej hladiny kationov kovov v produkčnom médiu, ktorá ešte negatívne neovplyvní priebeh a parametre procesu. Východiskovou pôdou pre túto sériu experimentov bolo modifikované fermentačné médium označené v *tabuľke 3* ako MOD^b. Použili sme Rosenbrockovu metódu plánovaného experimentu, ktorou sme sa v prvom kroku vždy presvedčili, či zvýšenie obsahu testovaného kationu v pôde nebude pôsobiť stimulačne. V prípade negatívneho výsledku sme pokračovali v minimalizácii jeho obsahu, pri kladnej odozve sme hľadali takú hladinu, ktorá bola pre stanovený stimulačný účinok neefektívnejšia. Takýmto spôsobom sme optimalizovali hladiny všetkých preverovaných troch kationov, t.j. Mn^{2+} , Fe^{2+} a Mg^{2+} . Dosiagnuté výsledky sú v *tabuľke 4*.

Tab. 4. Vplyv obsahu kationov Mn^{2+} , Fe^{2+} a Mg^{2+} na priebeh mliečnej fermentácie v modifikovanom médiu, t.j. na dosiahnutú finálnu koncentráciu laktátu (KM), čas fermentácie, priemernú produkčnú rýchlosť (V) a konverziu spotrebovaného substrátu na produkt (K). Všetky experimenty boli realizované v laboratórnom fermentore LF-2 plnenom na 2 l pri teplote 37 °C, frekvenci 200 min⁻¹ a neutralizácii 10 mol.l⁻¹ NaOH s kmeňom *L.plantarum* 178.

Pokus	KM [g.l ⁻¹]	Čas [h]	V [g.l ⁻¹ .h ⁻¹]	K (konv.)	V.K [g.l ⁻¹ .h ⁻¹]
1 ^a	71,4	34,4	2,07	0,94	1,94
2 ^b	61,6	33,7	1,83	0,81	1,48
3 ^c	73,9	30,6	2,42	0,92	2,22
4 ^c	71,2	30,5	2,33	0,94	2,20
5 ^d	72,4	34,6	2,09	0,89	1,87
6 ^e	71,0	34,5	2,06	0,88	1,81

^a základné produkčné médium (80 g.l⁻¹ sacharózy, 15 g.l⁻¹ kv. autolyzáta, 3 x 2 g.l⁻¹ $(NH_4)_2HPO_4$ a obsahom 0,2 g.l⁻¹ $MgSO_4.7H_2O$, 0,05 g.l⁻¹ $MnSO_4.5H_2O$ a 0,01 g.l⁻¹ $FeSO_4.7H_2O$)

^b základné produkčné médium s dvojnásobným obsahom $MgSO_4.7H_2O$ (0,4 g.l⁻¹)

^c základné produkčné médium s dvojnásobným obsahom $MnSO_4.5H_2O$ (0,1 g.l⁻¹)

^d základné produkčné médium bez $FeSO_4.7H_2O$

^e základné produkčné médium s polovičným množstvom $MgSO_4.7H_2O$ (0,1 g.l⁻¹)

Z údajov tejto *tabuľky* je zrejme, že najvýraznejším vplyvom na produktivitu mliečnej fermentácie z hľadiska obsahu kationov je koncentrácia Mn^{2+} v produkčnej pôde - jej zdvojnásobením došlo k významnému urýchleniu procesu pri súčasne zlepšenej konverzii substrátu na produkt. Obdobná úprava koncentrácie Mg^{2+} pozitívny efekt neprinesla. Rovnako nepriaznivá odozva bola zistená v prípade, ak do média nebol pridaný $FeSO_4.7H_2O$ alebo keď fermentácia prebiehala v pôde s polovičným obsahom $MgSO_4.7H_2O$. Všetky takto definované zmeny sú štatisticky významné a možno ich preto považovať za aplikovateľné na túto fermentáciu. Na základe uvedených výsledkov sme urobili aj druhú sériu fermentačných experimentov, kde sme ako východiskové médium považovali v prvej sérii optimalizované zloženie pôdy s dvojnásobným množstvom $MnSO_4.5H_2O$ a pokúsili sme sa overiť, či aj ďalšie zvyšovanie obsahu tohto kationu spolu so zmenami obsahu Fe^{2+} v pôde nebude pôsobiť kladne na efektívnosť procesu. Získané výsledky sú v *tabuľke 5*.

Tab. 5. Vplyv obsahu Mn^{2+} a Fe^{2+} na priebeh mliečnej fermentácie z hľadiska tvorby laktátu (KM), času fermentácie, priemernej produkčnej rýchlosti laktátu (V) a konverzie spotrebovaného substrátu na produkt (K). Fermentácie boli robené za podmienok uvedených v *tabuľke 4*, rozdiel spočíval len v zložení východiskového produkčného média, ktoré obsahovalo dvojnásobné množstvo $MnSO_4.7H_2O$ (0,1 g.l⁻¹). Kmeň *L.plantarum* 178.

Pokus	KM [g.l ⁻¹]	Čas [h]	V [g.l ⁻¹ .h ⁻¹]	K (konv.)	V.K [g.l ⁻¹ .h ⁻¹]
1 ^a	73,9	30,6	2,42	0,92	2,22
2 ^b	72,9	29,3	2,49	0,92	2,29
3 ^c	70,0	31,3	2,24	0,90	2,01
4 ^d	72,8	29,8	2,44	0,94	2,30
5 ^e	72,2	30,0	2,41	0,92	2,22

^a východiskové produkčné médium s dvojnásobným množstvom $MnSO_4.5H_2O$ (0,1 g.l⁻¹)

^b produkčné médium so štvornásobným množstvom $MnSO_4.5H_2O$ (0,2 g.l⁻¹)

^c produkčné médium s dvojnásobným množstvom $MnSO_4.5H_2O$ (0,1 g.l⁻¹), bez $FeSO_4.7H_2O$

^d produkčné médium so štvornásobným množstvom $MnSO_4.5H_2O$ (0,2 g.l⁻¹), bez $FeSO_4.7H_2O$

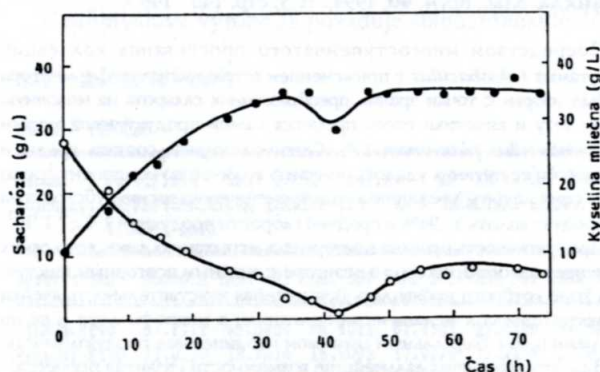
^e produkčné médium so štvornásobným množstvom $MnSO_4.5H_2O$ (0,2 g.l⁻¹), bez $FeSO_4.7H_2O$, s polovičným obsahom $MgSO_4.7H_2O$

Podobne ako v predošlom prípade, i v tejto sérii experimentov realizovanej podľa Rosenbrocka bolo vyhodnocovanie robené štatisticky, s využitím t-testu na hladine významnosti 95%. Ukázalo sa, že zlepšenia dosiahnuté v experimentoch 2^b a 4^d sú na zvolenej hladine významnosti štatisticky významné. Je teda zrejme, že aj ďalšie zvýšenie obsahu Mn^{2+} má na fermentáciu pozitívny vplyv, ktorého váha je tak významná, že za daných okolností prebieha fermentácia efektívne aj v neprítomnosti Fe^{2+} .

Sumárne teda možno konštatovať, že najlepší priebeh mala mliečna fermentácia s kmeňom *L. plantarum* 178 na pôde obsahujúcej 80 g.l⁻¹ sacharózy, 15 g.l⁻¹ kvasničného autolyzátu, 3 x 2 g.l⁻¹ (NH₄)₂HPO₄ (dávkovaneho v 0., 5. a 8. hodine), 0,2 g.l⁻¹ MgSO₄.7H₂O a 0,2 g.l⁻¹ MnSO₄.5H₂O. Produkčný kmeň bol schopný na tomto médiu pri 37 °C pri pH stabilizovanom na 5,8 sfermentovať 77,2 g.l⁻¹ sacharózy na kyselinu mliečnu za 29,8 h s konverziou 94%, čomu zodpovedá priemerná produkčná rýchlosť 2,44 g.l⁻¹.h⁻¹. Možno povedať, že v porovnaní s hodnotami dosahovanými vo svete (uvádza sa produkcia od 1,5 do 4,3 g.l⁻¹.h⁻¹ [8,9,10]) je to priemerný výsledok, treba však brať do úvahy i fakt, že hodnoty na hornej hranici uvedeného rozpätia sú zvyčajne dosahované nie prírodnými, ale geneticky upravovanými kmeňmi.

4.3 Fermentácie s bunkovým recykлом

V ďalšej časti našej práce sme sa pokúsili porovnať výkonnosť laktobacilového kmeňa s našou kultúrou *Bacillus coagulans* CCM 4318 v podmienkach kontinuálnej prevádzky membránového reaktora na báze bunkového recyklu. Tieto experimenty boli realizované už vo väčšom fermentačnom objeme tak, ako je to opísané v časti Metódy. Experimenty sa od seba odlišovali len procesnou teplotou a hodnotou pH udržiavanou v médiu (55 °C, resp. 6,5 pre *Bacillus*, 37 °C, resp. 5,8 pre *Lactobacillus*).



Obr.3: Priebeh kontinuálnej časti mliečnej fermentácie s kmeňom *Lactobacillus plantarum* 178 pri 37 °C a pH 5,8 v 100 l fermentore s bunkovým recykrom. Plnenie 50 l, zried'ovacia rýchlosť 0,04 h⁻¹. Pokles koncentrácie substrátu pod limitnú hodnotu bol kompenzovaný zvýšením zried'ovacej rýchlosti o 60 %.

● kyselina mliečna
○ sacharóza

V prípade laktobacilovej fermentácie (obr.3) sa prietok permeátu pohyboval v rozmedzí 26 až 58 ml . min⁻¹ s priemernou hodnotou 37 ml . min⁻¹, čo predstavuje 2.22 l . h⁻¹ a zried'ovacia rýchlosť 0,044 h⁻¹. V ustálenom stave bola priemerná hodnota koncentrácie kyseliny mliečnej v permeáte 34,8 g.l⁻¹, čo predstavuje 87%-nú konverziu substrátu na produkt. Vzhľadom na fermentačný objem rezultuje z týchto údajov priemerná produktivita systému 1,55 g.l⁻¹.h⁻¹, čo je v porovnaní s hodnotami dosahovanými v obdobných systémoch v zahraničí relatívne veľmi nízko. Za základnú príčinu tohto výsledku (okrem neoptimalizovaných biochemických a bioinžinierskych podmienok)

možno považovať skutočnosť, že pre účely mikro-filtrácie bolo dostupné len zariadenie relatívne vysokej kapacity, ktoré nás postavilo pred voľbu buď neúmerne vysokých nárokov na množstvo pripravovanej sterilnej kultivačnej pôdy, alebo aplikácie relatívne nízkej zried'ovacej rýchlosti, ktorá v konečnom dôsledku ovplyvnila negatívne produktivitu systému. Navyiac - vzhľadom na kapacitu mikrofiltra musel byť jeho výkon obmedzovaný na minimum, čo so sebou prinieslo veľký prietok cez tento člen, avšak len jeho malá časť bola skutočne filtrovaná; väčšina média čerpaného cez by-pass bola vracaná do fermentora bez filtrácie. Takéto vedenie procesu v značnej miere poškodzovalo fyziologický stav buniek a znižovalo ich produktivitu. Ukázalo sa teda, že vývoj membránového reaktora je nevyhnutný začať na úrovni laboratórnych fermentačných objemov.

Priebeh obdobného experimentu s kmeňom *Bacillus coagulans* bol o niečo úspešnejší. Tu sa podarilo počas 37 hodín úspešne aplikovať zried'ovacia rýchlosť 0,225 h⁻¹, čo pri priemernej koncentrácii laktátu v permeáte 1,5 g.l⁻¹ predstavuje produktivitu systému 8,33 g.l⁻¹.h⁻¹ [7]. Hlavným problémom bol mikrofilter, ktorý sa po uvedenej dobe začal upchávať a zabránil tak pokračovaniu experimentu. Bunky sa však ukázali ako odolnejšie voči mechanickým vplyvom mikrofiltračného by-passu.

5. ZÁVERY

Skríningom 20 laktobacilových kmeňov na bohatom komplexnom médiu bolo vybraných desať najproduktívnejších, z ktorých bolo ďalších päť vylúčených na základe nízkej produktivity na chudobnejšom, pre prax reálnom médiu. Na základe fermentačných testov v miešanom reaktore boli z ostávajúcich kmeňov vybrané dva najlepšie, medzi ktorými pri konečnom výbere rozhodla v prospech kmeňa *Lactobacillus plantarum* 178 jeho produktivita pri optimálnom procesnom pH. Pri optimalizácii zloženia produkčnej pôdy pre tento kmeň sa podarilo eliminovať z pôvodnej pôdy dve jej zložky a obmedziť tak ich počet na päť. Bola stanovená optimálna hladina (NH₄)₂HPO₄ ako jedného zo základných komponentov pôdy a spôsob jeho pridávania počas procesu stimulujúci rýchlosť produkcie. Rovnako boli nájdené optimálne koncentrácie ostatných zložiek média. Vybraný kmeň bol po takejto optimalizácii napokon podrobený fermentačnému testu v membránovom reaktore na báze bunkového recyklu. Boli zistené základné vlastnosti tohto kmeňa v podmienkach kontinuálnej kultivácie a naznačené možnosti ďalšieho vývoja tohto procesu.

LITERATÚRA

- [1] HERIBAN,V., ŠTURDÍK,E.: Kvas.prům., 1989, 11,s.328.
- [2] HERIBAN,V.,ŠTURDÍKOVÁ,N.,ŠTURDÍK,E.:Kvas.prům., 1992,8,s.231.
- [3] HERIBAN,V., ŠTURDÍK,E., ŠTURDÍKOVÁ,N.: Kvas.prům., 1992, 10, s.293.
- [4] HERIBAN,V. et al.: Kvas.prům., 1993, 7, s. 197.
- [5] VOTRUBA,J., PROKOP,A.: Matematická optimalizace kultivačních podmínek vo fermentačním průmyslu, Praha 1977.
- [6] BOYAVAL,P.: Lait 69, 1989, s.87.
- [7] SITKEY,V. et al.: XIII. celoštátné biochemické dni, České Budějovice 1992, poster.

- [8] LEH, M. B., CHARLES, M.: J. Ind. Microbiol. 1989, 4, s. 71.
 [9] LUND, B., NORDDAHL, B., AHRING, B.: Biotechnol. Lett. 1992, 9, s. 851.
 [10] CHIARINI, L., MARA, L., TABACCHIONI, S.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 1992, 36, s. 461.

Lektorovala Ing. B. Pardonová
 Do redakce došlo 20.2.1994

Heriban, V.-Matus, P.-Šturdík, E.-Sitkey, V.: Fermentačná produkcia kyseliny mliečnej. V. Výber laktobacilového kmeňa, optimalizácia procesných podmienok a fermentácia s bunkovým recyklom. Kvas. prům., 40, 1994, č. 5, s. 140 - 146

Viacstupňovým skríningom zbierkových kultúr rodu *Lactobacillus* realizovaným na trepačke i vo fermentore bol vybraný kmeň najproduktívnejší z hľadiska konverzie sacharózy na kyselinu mliečnu i kinetiky tohto procesu - *Lactobacillus plantarum* 178. Optimalizáciou zloženia média i spôsobu jeho priživovania bolo dosiahnuté zníženie počtu zložiek média zo siedmich na päť pri súčasnom stúpnutí konverzie substrátu na produkt až na 94 % a priemernej produkčnej rýchlosti $2.4 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Produktivita kmeňa bola testovaná aj v podmienkach kontinuálnej fermentácie v reaktore s bunkovým recyklom, kde sa ukázala zvýšená citlivosť laktobacilovej bunky na mechanické vplyvy v mikrofiltri a jej rozdielna produktivita v porovnaní s bacilovým kmeňom. V práci sú naznačené i ďalšie možnosti vývoja procesu.

Heriban, V.-Matus, P.-Šturdík, E.-Sitkey, V.: Lactic Acid Fermentative Production. V. Selection of *Lactobacillus* Strain, Optimization of Process Conditions and Fermentation with Cell Recycle. Kvas. prům., 40, 1994, No. 5, pp. 140 - 146

By means of multi-staged screening of the *Lactobacillus* sample collections using shaker and fermentor, a most productive strain viewed from saccharose conversion to lactic acid and given process kinetics was selected - *Lactobacillus plantarum* 178. By optimizing medium composition and method applied for its nourishing, a reduction in medium components quantity from seven to five was attained, increasing at the same time substrates conversion per product up to 94% at medium production rate $2.4 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$. The strain productivity underwent also testing in conditions of continuous fermentation in cell recycle reactor, resulting in increased *Lactobacillus* cell sensitivity to mechanical influences during micro-filtration as well as its different productivity compared with bacillus strain. The works outlines further possibilities of the process.

Heriban, V.-Matus, P.-Šturdík, E.-Sitkey, V.: Fermentations Produktion von Milchsäure. V. Auswahl des Laktobazillen-Stammes, Optimierung der Prozeßbedingungen und Fermentation mit Zellen-Recycling. Kvas. prům., 40, 1994, Nr. 5, S. 140 - 146

Mittels Mehrstufen-Screening der Sammlungskulturen von dem Genus *Lactobacillus*, das auf dem Schüttelapparat sowie auch in dem Fermentor realisiert wurde, konnte der produktivste Stamm vom Standpunkt der Konversion der Saccharose zu Milchsäure sowie auch vom Standpunkt der Kinetik dieses Prozesses ausgewählt werden - *Lactobacillus plantarum* 178. Durch die Optimierung der Zusammensetzung des Mediums und seiner Anreicherung wurde die Senkung der Zahl der Mediumbestandteile von sieben auf fünf erzielt, und zwar bei gleichzeitiger Steigerung der Konversion Substrat-Produkt bis auf 94 % und der Produktionsgeschwindigkeit auf $2.4 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Die Produktivität des Stammes wurde auch in den Bedingungen der kontinuierlichen Fermentation in einem Reaktor mit Zellen-Recycling getestet, wobei sich eine erhöhte Empfindlichkeit der Laktobazillen-Zelle auf die mechanischen Einflüsse in dem Mikrofilter und ihre unterschiedliche Produktivität im Vergleich mit dem Bacillen-Stamm gezeigt hat. In der Arbeit werden auch weitere Möglichkeiten der Entwicklung des Prozesses angedeutet.

Херибан, В.-Матуш, П.-Штурдик, Э.-Ситкей, В.: Бродильная продукция молочной кислоты. V. Поодбор лактобацильного штамма, оптимализация условий процесса и ферментация с применением повторного цикла. Квас. прум. 40, 1994, №5, стр. 140 - 146

Посредством многоступенчатого просеивания коллекции штамма *Lactobacillus* с применением встряхивателя и ферментора был избран с точки зрения преобразования сахара на молочную кислоту и кинетики этого процесса самый продуктивный штамм *Lactobacillus plantarum* 178. Оптимализацией состава среды и способа ее питания удалось понизить количество компонент среды из семи на пять, увеличивая одновременно конверсию субстрата на продукт вплоть до 94% и средней скорости продукции $2.4 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Продуктивность штамма подверглась испытанию даже в условиях непрерывного брожения в реакторе с ячеечным повторным циклом, в ходе которого проявилась повышенная чувствительность ячейки лактобацилла к механическим влияниям в микрофилтре и ее по сравнению с бацилльным штаммом неодинаковая продуктивность. В работе намечены дальнейшие возможности развития процесса.