VPLYV VÝŽIVY NA PRODUKCIU KYSELINY MLIEČNEJ Z MELASY MIKROORGANIZMOM LACTOBACILLUS DELBRÜCKII (I)

J. ZELINKA, B. CÁBOVÁ*, T. BURIÁNKOVÁ*, G. RUTTKAY*, D. HAĽAMA

Katedra technickej mikrobiológie a biochémie SVŠT v Bratislave

PRIŠLO DO REDAKCIE 16. VIII. 1952

Všeobecná časť

Kyselina mliečna (α-hydroxypropiónová $CH_3 . CHOH . COOH$) je jedna z najstarších známych organických kyselín. Objavil ju r. 1780 Scheele, ktorý ju izoloval z kyslého mlieka. Neskoršie sa ukázalo, že kyselina mliečna je v prírode veľmi rozšírená a upútala pozornosť aj L. Pasteura.

Kyselinu mliečnu môžeme vyrobiť buď synteticky, buď kvasným spôsobom. Priemyselne sa vyrába kvasným spôsobom. Používa sa v potravinárskom, kožiarskom, textilnom, farmaceutickom priemysle a v priemysle plastických hmôt. Z toho je zrejmé, že kyselina mliečna má široké upotrebenie a často slúži ako náhradná látka za niektoré drahšie chemikálie.

U nás je najrozšírenejšou výroba kyseliny mliečnej z melasy, ktorá sa skvasuje mikroorganizmom *Lactobacillus Delbrückii*, ktorý je výhodný z viacerých dôvodov: skvasuje cukor homofermentatívne, čo znamená, že prakticky produkuje len kyselinu mliečnu (najmä vtedy, keď kvasný proces prebieha za úplne sterilných podmienok) a túto kyselinu produkuje pri 50—52 °C, keď sa už väčšina mikroorganizmov nerozmnožuje, čo umožňuje priemyselné skvasovanie zápary bez nebezpečenstva väčšej infekcie.

Aby proces kvasenia prebiehal za optimálnych podmienok, treba poznať požiadavky výživy tohto mikroorganizmu. Týmto sledujeme vypracovanie takého technologického postupu, ktorý by pokiaľ možno s najmenším finančným nákladom a jestvujúcim zariadením dával lepšie výsledky. Súčasne sledujeme cieľ, aby sa uplatnily najnovšie vedecké výsledky pri tomto technologickom postupe.

Otázka výživy mliečnych baktérií a najmä *Lactobacillus Delbrückii* bola predmetom štúdia mnohých autorov [5]. Pretože tieto baktérie zle rastú na obyčajných laboratórnych pôdach, pridávajú sa do týchto pôd rôzne extrakty. Práce posledných rokov prispely k tomu, že spomínané mikroorganizmy môžeme dnes pestovať na známych pôdach. Ako príklad takejto plne syntetickej pôdy, ktorá súčasne objasňuje potrebu výživy týchto baktérií, uvádzame pôdu, ktorú sostavili Pollack a Lindner (1942). Táto pôda, ktorej pH sa upraví na 6,7—6,8, má toto zloženie:

* V rámci Študentskej tvorivosti 1951—1952.

glukóza		20 g
octan sodný		12 g
glycín, dl-alanín, l-leucín, dl-izoleucín, kyselina l-asparágová, dl-valín, l-histidín, l-triptofán, l-prolín, l-hydroxyprolín, dl-serín, dl-treonín, l-tyrozín, l-cystín, dl-metionín, dl-fenylalanín, l-lyzín, l-arginín, l-asparagín	po	10 mg
adenín, guanín, uracil, tymín, xantín	po	10 mg
tiamín, vitamín B_6, kalcium pantotenát, riboflavín, kyselina nikotínová	po	200 μg
inozitol		5 mg
biotín		0,4 μg
koncentrát kyseliny listovej		5 μg
glutamín		0,6 μg
K_2HPO_4		1 g
KH_2PO_4		1 g
$MgSO_4 . 7\ H_2O$		0,4 g
NaCl, $FeSO_4 . 7\ H_2O$, $MnSO_4 . H_2O$	po	0,02 g
doplniť s H_2O		na 1000 ml.

Na tejto pôde rastú mnohé mikroorganizmy, skvasujúce cukor na kyselinu mliečnu. Ale na to, aby sa dosiahol optimálny vzrast, potrebné sú aj iné vzrastové faktory, ktoré sa musia pridať vo forme rôznych extraktov prírodných látok.

Problémom výživy *Lactobacillus Delbrückii* sa v súvislosti s výrobou kyseliny mliečnej zaoberal najmä kolektív V. N. Šapošnikova [4], ktorý svojimi pokusmi (1923) dokázal, že pre *Lactobacillus Delbrückii (Thermobacterium cereale)* nestačí ani úplná smes aminokyselín, ale že je nevyhnutné pridať ako zdroj dusíka komplikované organické zlúčeniny, blízke bielkovinám. Preto títo autori odporúčajú do zápar pridávať extrakty z fazuľovej alebo vikovej múčky.

Lactobacillus Delbrückii je fakultatívny anaerób a závislosť jeho rastu od prítomnosti vzdušného kyslíka nie je ešte jasná. Údaje v literatúre si protirečia. Napr. Stiles a Priess [3] udávajú, že prevzdušňovanie urýchľuje kvasenie, zatiaľ čo podľa Jörgensena [2] privádzanie vzduchu do kultúry rast silne brzdí. Nie je, pravda, vylúčené, že spomínaní autori nepracovali s identickým kmeňom, čo by mohlo vysvetliť nesúhlas ich výsledkov.

Pre túto prácu sme použili jednak výsledky prác kolektívu V. N. Šapošnikova, jednak sme sa pokúsili súčasne uplatniť vzrastové faktory, ktoré obsahuje kukuričný výluh (cornsteep liquor-CSL) používaný v posledných rokoch pri rôznych fermentačných procesoch. Súčasne sme sledovali vplyv vzdušného kyslíka na priebeh kvasenia.

Experimentálna časť

Príprava fazuľového extraktu

150 g rozomletých fazúľ sa rozmiešalo s 1000 ml 3%-ného roztoku

$MgSO_4$ a extrahovalo sa na vodnom kúpeli pri 75 °C tri hodiny. Po ukončení extrakcie sa vylúhovaný šrot odfiltroval cez plátenú plachetku a filtrát sa použil na prípravu zápary.

Príprava zápary

Pre pokus sa použila bežná prevádzková melasová zápara používaná pri výrobe kyseliny mliečnej. Táto zápara obsahuje okrem melasy aj superfosfát a síran amónny.

a) Časť tejto zápary, určená pre skvasovanie bez pridania vzrastových faktorov, zriedila sa vodou na 16 °Bg (500 g zápary sa rozpustilo v 500 ml vody); pH — 6,7.

b) Druhá časť (1000 g) zápary sa zriedila 1000 ml roztokom, ktorý sa pripravil tak, že sa v extrakte zo 150 g fazule, ktorý sa získal uvedeným spôsobom, rozpustily 2 g kukuričného výluhu, načo sa objem upravil na 1000 ml. Takto pripravená zápara mala 17 °Bg; pH — 6,7.

Do súpravy Erlenmayerových baniek (po 200 ml) sa odvážilo po 5 g $CaCO_3$ za účelom neutralizácie vzniknutej kyseliny mliečnej. Do 18 baniek (9 pre prácu za aeróbnych a 9 pre prácu za anaeróbnych podmienok) sa odpipetovalo po 100 ml zápary *b* a do 9 baniek po 100 ml zápary *a*.

Všetky banky sa uzavreli vatovými zátkami a podrobily sa pasterizácii zahrievaním na vodnom kúpeli pri 75 °C po dobu 60 minút. Sterilizáciu nebolo možné použiť preto, aby prítomné bielkoviny nedenaturovaly. Po pasterizácii sa banky ochladily na 50 °C a do každej sa pipetou sterilne pridalo 10 ml prevádzkového zákvasu. Vatové zátky baniek, určených pre kvasenie za anaeróbnych podmienok, vymenily sa za korkové zátky, opatrené vodným uzáverom. Korkové zátky sa zalialy parafínom. Po naočkovaní sa všetky banky uložily v termostate.

Z každej súpravy sa hneď po naočkovaní odobrala jedna banka, u ktorej sa zahriatím na 100 °C a pridaním niekoľko kvapiek nasýteného roztoku urotropínu prerušilo kvasenie a stanovil sa cukor.

Priebeh kvasenia

Teplota v termostate sa pohybovala medzi 49—52 °C. Obsah baniek sa priebehom 24 hodín dvakrát mechanicky premiešal. Priebeh kvasenia sa kontroloval sledovaním úbytku obsahu cukru v zápare. Za 33 hodín po zakvasení sa odobraly banky z každej súpravy, kvasenie sa prerušilo pridaním niekoľko kvapiek urotropínu a zahriatím na 100 °C. V každej vzorke sa stanovil zvyškový cukor podľa Bertranda [1]. Ďalšie vzorky sa potom vždy odoberaly po 24 hodinách.

Obsah Erlenmayerovej banky sa sfiltroval na Büchnerovom lieviku za účelom oddelenia $CaCO_3$. Filtrát sa kvantitatívne prelial do odmernej banky a doplnil sa na 1000 ml. Z tohto roztoku sa zpočiatku bralo na analýzu 5 ml, neskoršie, keď zápara obsahovala malé množstvo cukru, 20 ml.

Ekvivalentné množstvo cukru, zodpovedajúce spotrebe n/10 $KMnO_4$,

odčítalo sa ako invert z empirického grafu [1] a prepočítalo sa na % pôvodného objemu zápary (110 ml).

Priebeh kvasenia v jednotlivých záparách za skúmaných podmienok je vyjadrený úbytkom cukru a je zrejmý z nasledujúcich tabuliek a grafu.

Tab. 1. Spotreba n/10 $KMnO_4$ pri jednotlivých stanoveniach

	I		II		III	
hod. kvasenia	ml n/10 $KMnO_4$ f=0,9615	ml n/10 $KMnO_4$ f=1,0 priemer	ml n/10 $KMnO_4$ f=0,9615	ml n/10 $KMnO_4$ f=1,0 priemer	ml n/10 $KMnO_4$ f=0,9615	ml n/10 $KMnO_4$ f=1,0 priemer
0	17,0 17,15	16,44	17,3 17,3	16,63	17,3 17,3	16,63
33	13,9 14,1	13,46	11,4 11,4	10,96	7,4 7,45	7,13
57	8,5 8,4	8,12	10,35 10,4	9,97	1,3 1,45	1,32
81	3,9 3,9	3,74	2,3 2,2	2,16*	2,2 2,1	2,06*
105	9,0 9,0	8,65*	8,8 8,7	8,41*	1,2 1,2	1,15*
153	6,0 5,9	5,72*	1,4 1,45	1,37*	0,1 0,1	0,096*

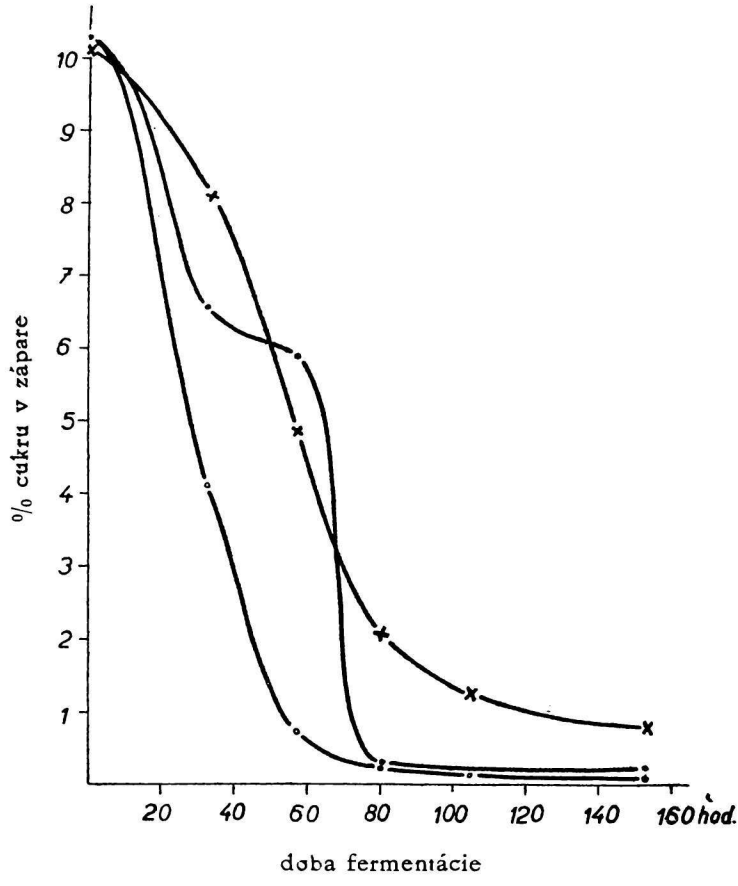
Spotreba n/10 $KMnO_4$ je udaná na 5 ml vzorky.
U hodnôt označených * na 20 ml vzorky.

Tab. 2. Výpočet na % cukru v zápare na základe tab. 1

	I			II			III		
hod. kvas.	ml n/10 $KMnO_4$	cukor		ml n/10 $KMnO_4$	cukor		ml n/10 $KMnO_4$	cukor	
		mg	%		mg	%		mg	%
0	16,44	11100	10,09	16,63	11300	10,27	16,63	11300	10,27
33	13,46	8920	8,11	10,96	7200	6,54	7,13	4540	4,12
57	8,12	5350	4,86	9,97	6480	5,9	1,32	830	0,75
81	3,74	2300	2,09	2,16	330	0,3	2,06	315	0,28
105	8,65	1390	1,26	8,41	1360	1,23*	1,15	180	0,16
153	5,72	900	0,81	1,37	218	0,2	0,1	15,5	0,01

Hodnota označená * sa v grafe nevzala do úvahy, lebo sa považuje za chybnú.

Graf 1. Znázornenie priebehu fermentácie



I. Kvasenie bez prídavku vzrastových faktorov (X)
II. Kvasenie so vzrastovými faktormi za aeróbnych podmienok (•)
III. Kvasenie so vzrastovými faktormi za anaeróbnych podmienok (○)

Súhrn

Z uvedených tabuliek a grafu vidieť, že sa prídavkom fazuľového extraktu a kukuričného výluhu do bežnej prevádzkovej zápary urýchlil priebeh mliečneho kvasenia. Intenzívne kvasenie sa dosiahlo najmä v zápare s obsahom týchto faktorov za anaeróbnych podmienok, ktorá vykvasila na 0,7% cukru už za 57 hodín.

Z pokusu je ďalej zrejmé, že sama melasa neobsahuje všetky organické látky, potrebné pre optimálny priebeh mliečneho kvasenia mikroorganizmom *Lactobacillus Delbrückii*, ako aj to, že sa tieto látky musia do melasy pridávať.

Влияние пропитания на продукцию молочной кислоты из мелассы при помощи микроорганизма Лацтобациллус Делбруцкии (I)

Я. Зелинка, Б. Цабова, Т. Буриянкова, Г. Рутткай, Д. Галяма
Кафедра технической микробиологии и биохимии СВТУЗ в Братиславе

Выводы

Из представленных в работе таблици и рисунка видно, что прибавлением фасольного и кукурузного экстракта, процесс молочного брожения значительно ускорен. Интенсивного брожения было достигнуто особенно в сусле с содержанием этих факторов в анаэробных условиях, где после 57 часов осталось 0,7 % сахара.

Опыт показывает дальще, что самая меласса не содержит все огранические вещества, нужные для оптимального хода молочного брожения, вызванного микроорганизмом ***Lactobacillus Delbrückii*** и что эти вещества надо к мелассе прибавлять.

Получено в редакцию 16 августа 1952 г.

EINFLUSS VON NÄHRSTOFFEN AUF DIE MILCHSÄUERPRODUKTION AUS MELASSE DURCH LACTOBACILLUS DELBRÜCKII (I)

J. ZELINKA, B. CÁBOVÁ, T. BURIANKOVÁ, G. RUTTKAY, D. HAŁAMA

Lehrstuhl für technische Mikrobiologie und Biochemie der Slowakischen technischen Hochschule in Bratislava

Zusammenfassung

Aus den Tabellen und der Abbildung ist die Beschleunigung der Gärung durch Zusatz von Bohnen — und Maisquellwasser (MQW) zur üblichen süssen Maische ersichtlich. Bei Zugabe dieser Faktoren wurde besonders unter anaeroben Bedingungen eine intensive Gärung erzielt. Die Maische war bereits nach 57 Stunden auf 0,7% Restzucker vergoren.

Aus dem Versuch ist zu ersehen, dass die Melasse nicht alle zur Erzielung des optimalen Gärungverlaufes nötigen Faktoren enthält. Sie müssen daher der Maische zugesetzt werden.

In die Redaktion eingelangt den 16. VIII. 1952

LITERATÚRA

1. Bernhauer K., *Gärungschemisches Praktikum*, Berlin 1939.
2. Jörgensen A., *Die Mikroorganismen der Gärungsindustrie*, Jena 1940.
3. Stilles a Priess, J. Bacter. *35*, 70 (1938); *36*, 149 (1938).
4. Šapošnikov V. N., *Techničeskaja mikrobiologija*, Moskva 1948.
5. Zelinka J., *Bakteriálne kvasenie*, Bratislava 1952.