

TARTU ÜLIKOOL
BIOLOOGIA-GEOGRAAFIA TEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Indrek Suitso

Bacillus coagulans SIM-7 võrdlus kahe
laktobatsilli tüvega piimhappe tootmisel

Magistritöö
geneetika erialal

Juhendaja: Allan Nurk

Tartu 2004

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID.....	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1. Piimhappekäärimine.....	6
1.1.1. Homofermentatiivne piimhappekäärimine.....	7
1.1.2. Heterofermentatiivne piimhappekäärimine.....	8
1.2. Piimhappe produtsendid.....	9
1.2.1. Laktobatsillid.....	10
1.2.2. Batsillid	11
1.3. Produktsiooni mõjutavad tegurid	13
1.3.1. Kultiveerimine	13
1.3.2. Söötmed	14
1.3.2.1. Süsinikuallikad.....	15
1.3.2.2. Lämmastikuallikad.....	17
1.3.3. Temperatuur	17
1.3.4. Happelisus.....	18
2. MATERJAL JA METOODIKA	20
2.1. Kasutatud tüved.....	20
2.2. Söötmed	20
2.3. Kasvatuste korraldus	22
2.4. Neutraliseerimine	23
2.5. Glükoosi kontsentratsiooni määramine.....	24
2.6. Piimhappe kontsentratsiooni määramine	24
2.7. Biomassi kontsentratsiooni määramine.....	24
2.8. Andmetöötlus	25
3. TULEMUSED JA ARUTELU	26
3.1. Tulemused.....	27
3.1.1. Optimaalse temperatuuri määramine	27
3.1.2. Optimaalse happelisuse määramine	34
3.1.2.1. Neutraliseerimine ammooniumhüdrosiidiga.....	34
3.1.2.2. Neutraliseerimine naatriumhüdrosiidiga.....	37

3.1.3. Neutraliseerijate võrdlemine	40
3.1.4. Tüvede võrdlemine neile sobivatel tingimustel	45
3.1.5. Glükoosi kontsentratsiooni mõju	49
3.2. Arutelu	54
KOKKUVÕTE.....	58
SUMMARY	59
KASUTATUD KIRJANDUS	60

KASUTATUD LÜHENDID

ATP	adenosiintrifosfaat
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
BC7	<i>Bacillus coagulans</i> SIM-7 (DSM 14043)
EMP	Emden-Meyerhof-Parnas
HPLC	kõrgsurve vedelikkromatograaf
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
LD4	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii</i> (DSM 20074)
LL3	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis</i> (DSM 20073)
LDH	laktaadi dehüdrogenaas
NAD ⁺	nikotiinamiidadeniindinukleotiidi oksüdeeritud vorm
NADH	nikotiinamiidadeniindinukleotiidi redutseeritud vorm
PEP	fosfoneoolpüruvaat
PDH	püruvaadi dehüdrogenaas
PFL	püruvaadi formiaadi lüaas

SISSEJUHATUS

Piimhapet on toiduainete säilitamiseks kasutatud juba aastatuhandeid. Klassikalised piimhappebakterid tõrjuvad elutegevuse käigus välja patogeeneid ja annavad toidule meeldiva maitse ning aroomi. Tänapäeval on piimhappe kasutusvõimalused märksa laiemad. Seda tarvitab nii keemia-, ravimi-, kosmeetika- kui ka tekstiilitööstus. Tehnilise piimhappe osas pole organoleptilised parameetrid määrava tähtsusega. Esikohale tõusevad kääritamise kiirus ning produkti kõrge lõppkontsentratsioon. Seetõttu on hakatud otsima tüvesid piimhappe tööstusliku tootmise tarvis. Ideaalne produtsent peaks taluma temperatuure, kus potentsiaalsed reostajad elada ei suuda; tootma ainult ühte piimhappe optilist isomeeri; kannatama kõrget süsinikuallika ja produkti kontsentratsiooni ning olema tolerantne hapniku suhtes. Lisaks tootma kohe kasvatusel alguses piisaval hulgal biomassi, et kääritustükkel võimalikult lühike oleks. Lõhnal ega maitset pole määravat tähtsust, loeb ainult piimhappe omahind.

Bakter *Bacillus coagulans* SIM-7 vastab nendele nõudmistele. Meie töögrupis on seda bakterit uuritud juba paar aastat. On kindlaks tehtud kasvatamiseks vajalikud parameetrid, optimeeritud sööde ning lihvitud kultiveerimismeetodeid. Siiski polnud enne käesoleva töö valmimist teaduslikku alust väita, et *B. coagulans* SIM-7 oleks parem produtsent kui klassikalised piimhappebakterid. Kirjanduses leidis küll andmeid piimhappebakterite parameetrite kohta, kuid kahjuks ei saanud neid meie tulemustega kõrvutada: liiga erinevad olid kasvatamise tingimused. Erapooletuks hinnanguks tuli erinevaid tüvesid võrrelda sarnastes oludes.

Käesoleva töö eesmärgiks oli võrrelda tüve *B. coagulans* SIM-7 (DSM 14043) klassikaliste piimhappebakteritega. Selleks tuli esmalt leida piimhappe produktsiooniks optimaalsed parameetrid erinevate bakteritüvede jaoks: temperatuur, happelisus ning neutraliseerimise viis.

Olen tänulik kõigile, kes selle töö valmimist otseselt või kaudselt toetasid.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Piimhappekäärimine

Inimkond tunneb piimhappekäärimist juba ammustest aegadest. Hiinas kasutati seda köögiviljade hapendamisel tuhandeid aastaid tagasi. Esimene kirjalik tõend piimhappekäärimise rakendamise kohta pärineb siiski Euroopast. Plinius kirjeldas kapsaste hapendamist esimesel sajandil m.a.j. (Doyle *et al.*, 1997).

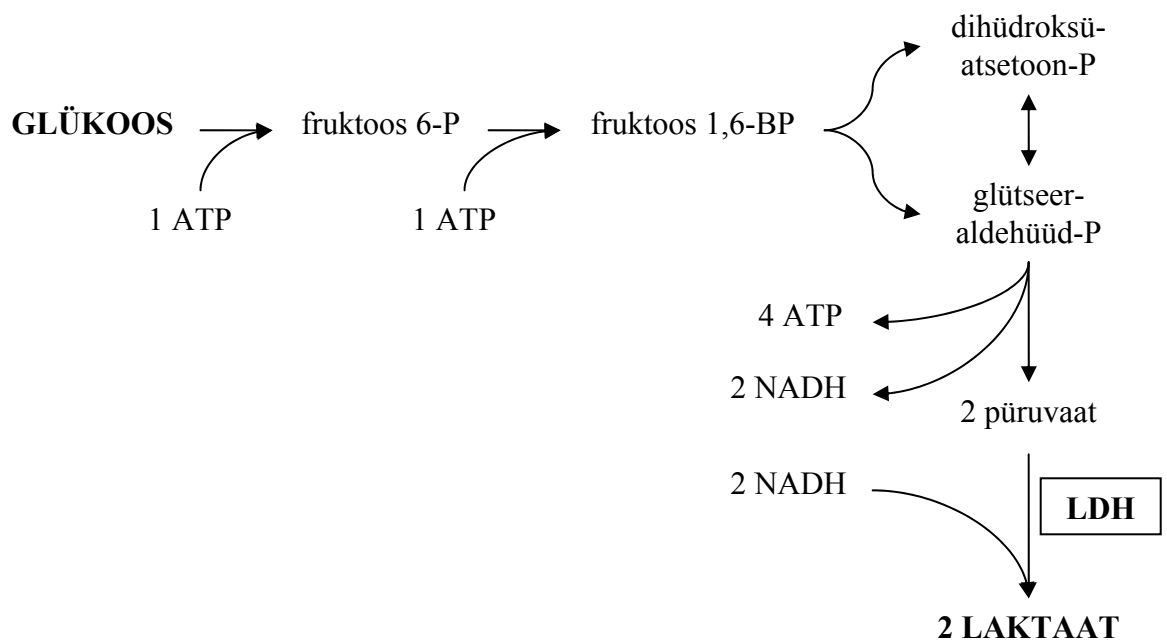
Tänapäeval kasutatakse piimhapet veelgi laiemalt. Lisaks toiduainete säilitamisele on tal oluline roll naha parkimisel, keemia-, ravimi-, kosmeetika- ning tekstiilitööstuses. Aastane toodang on tõusnud 80 000 tonnini, sellest 90% on saadud mikroobse fermentatsiooni tulemusena. Tööstuslikult hakati piimhapet fermenteerima juba 1881. aastal. Ülejäänud 10% tehakse sünteetiliselt laktonitriili hüdroolüüsides. Kuna tulemuseks on L- ja D-laktaadi ratseemiline segu, ei saa sünteetilist piimhapet toiduainetööstuses kasutada; on ju D-laktaat suurtes kogustes tervisele kahjulik. Seevastu mikroobsel fermentatsioonil on võimalik kasutada tüvesid, mis toodavad ainult üht või teist piimhappe optilist isomeeri (Hofvendahl *et al.*, 1997).

Viimane on väga oluline kui piimhapet kasutada bioloogiliselt laguneva plastiku toorainena. Kuna piimhappel on nii hüdroksüül- kui ka karboksüülrühm, on võimalik monomeerid ühendada polüestriks. Polülaktaat on tugev, vastupidav, hästi töödeldav ning bioloogiliselt lagundatav. Ainult puhast L-laktaati on võimalik kasutada optiliste kaablite, vedelkristallide ning kvaliteetplastiku toorainena (Ohara *et al.*, 1996).

Mikroobse fermentatsiooni kasuks räägib ka tõik, et toorainena on võimalik kasutada piimatööstuse jääke – näiteks vadakut –, või odavaid polüsahhariide nagu näiteks tärklist või tselluloosi. Tänu odavale toormele on võimalik piimhappe omahinda langetada ühe Ameerika dollarini kilogrammi eest (Åkerberg *et al.*, 2000).

1.1.1. Homofermentatiivne piimhappekäärimine

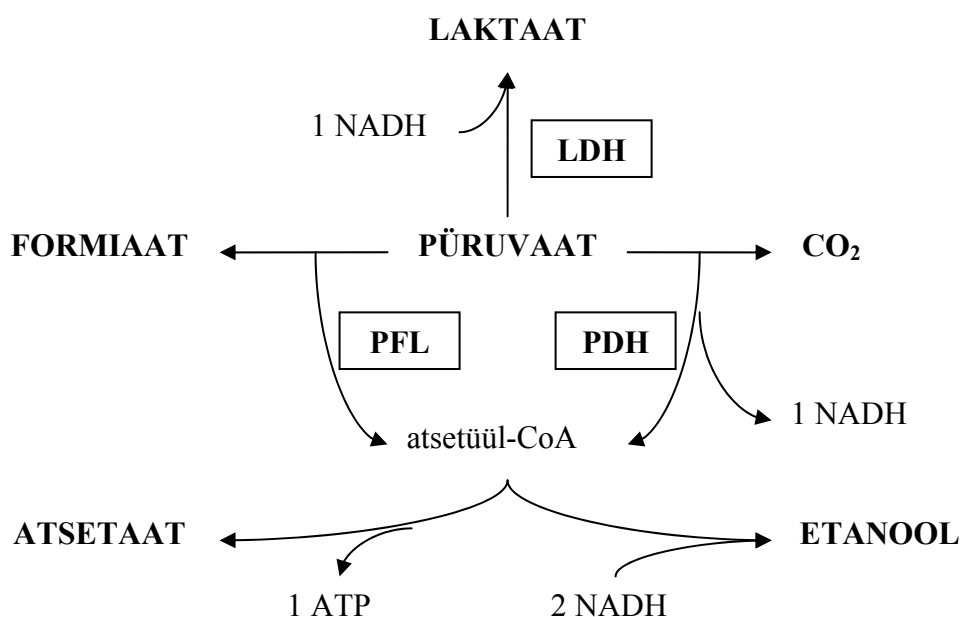
Homofermentatiivse piimhappekäärimise käigus tekib valdava produktina piimhape (vt joonis 1). Muid saadusi on alla 10%. Glükoos suunatakse Embden-Meyerhof-Parnase (EMP) ratta, mida tuntakse ka fruktoos-bisfosfaat aldolaasi raja nime all. Seal tehakse 1 moolist glükoosist summaarselt 2 mooli laktaati. Vabanenud energia kasutatakse 2 mooli ATP tegemiseks substraatses fosforüülimise käigus. Lisaks redutseeritakse 2 NAD⁺ molekuli 2 NADH-ks. Need omakorda oksüdeeritakse siis, kui ensüüm laktaadi dehüdrogenaas (LDH) püruvaati laktaadiks redutseerib (Litchfield, 1996).



Joonis 1. Homofermentatiivne piimhappekäärimine: Embden-Mayerhof-Parnase rada. Lühendid: P- fosfaat, BP- bisfosfaat, LDH- laktaadi dehüdrogenaas (Hofendahl *et al.*, 2000).

Tekkiva piimhappe optiline vorm sõltub laktaadi dehüdrogenaasist. L-LDH teeb L-laktaati ning D-LDH vastavalt D-laktaati. Leidub mikroorganisme, kellel on ainult ühte tüüpi ensüüme, aga ka neid, kellel on mõlemad. Viimasel juhul sõltub loodava produkti isomeersus söötme koostisest, pH-st, temperatuurist jt. teguritest. Välised tegurid võivad mikroobe homofermentatiivsest käärimisest kõrvale kallutada. Madala

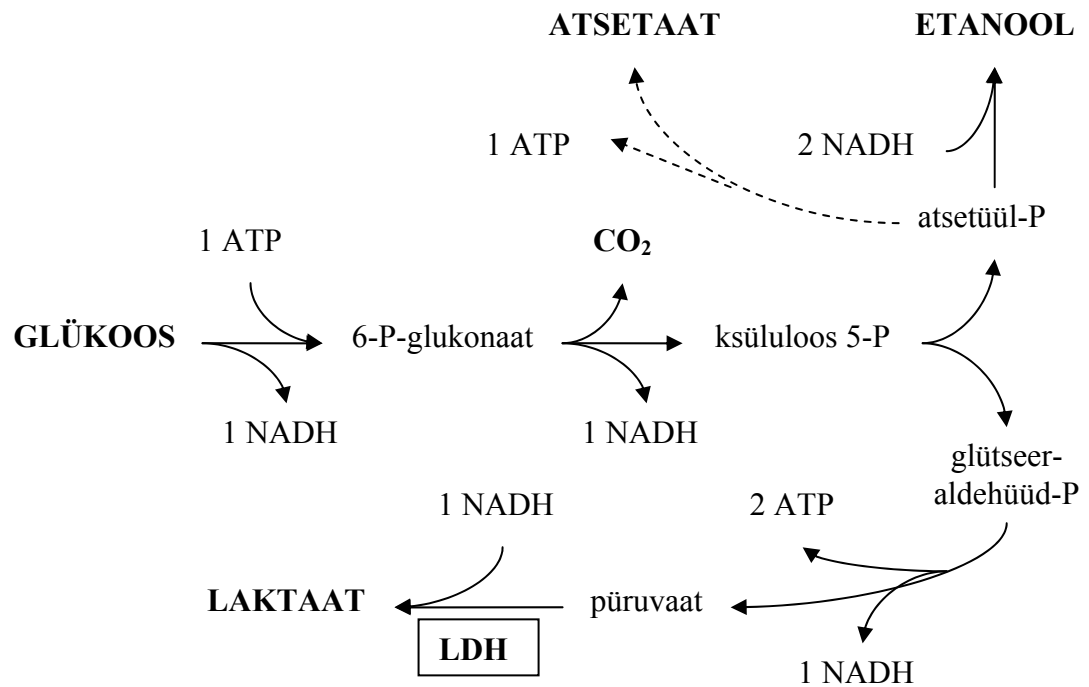
temperatuuri, sobimatu pH, glükoosi nappuse või teiste suhkrute olemasolul võib mikroobide püruvaadi metabolism muutuda. Hapete segu tekkelise fermentatsiooni (vt joonis 2) käigus tekib nii laktaati, süsihappegaasi, formiaati, atsetaati kui ka etanooli (Hofvendahl *et al.*, 2000).



Joonis 2. Hapete segu tekkeline fermentatsioon. Lühendid: LDH- laktaadi dehüdrogenaas, PDH- püruvaadi dehüdrogenaas, PFL- püruvaadi formiaadi lüaas (Hofvendahl *et al.*, 2000).

1.1.2. Heterofermentatiivne piimhappekäärimine

Heterofermentatiivne piimhappekäärimine kulgeb fosfoketolaasi raja kaudu (vt joonis 3). Seda kasutavad obligaatset heterofermenteerijad heksooside ja pentooside tarvitamiseks, aga ka fakultatiivsed heterofermenteerijad pentooside kääritamiseks. Fosfoketolaasi rajal tehakse glükoosist lisaks laktaadile ka süsihappegaasi, etanooli ning atsetaati (Hofvendahl *et al.*, 2000).



Joonis 3. Heterofermentatiivne piimhappekäärimine: fosfoketolaasi rada. Lühendid: P- fosfaat, LDH- laktaadi dehüdrogenaas (Hofendahl *et al.*, 2000).

1.2. Piimhappe produtsendid

Juba esimesed põllumehed ja karjased muistses Sumeris märkasid piimaga toimuvaid muutusi. Piima fermenteeriti ja juustu valmistati Eufrati ning Tigriise vahel juba 8000 aastat tagasi (Ross *et al.*, 2002). Bakterite avastamiseni jõuti alles käsikäes optika arenguga. 1659. aastal leidis Kircher piimas baktereid, kuid nende isoleerimise, täpsema kirjeldamise ning teadliku rakendamiseni jõuti alles 19. sajandi lõpus ja 20. sajandi alguses (Jay, 1986).

Kui Öhtumail kasutati toidu fermenteerimisel või konserveerimisel eelkõige piimhappebaktereid, siis Oriendis eelistati hallitusseeni. Perekonna *Mucor*, *Monila* ning *Rhizopus* hallitusi rakendati nii sojaubade, riisi, manioki kui ka kapsaste hapendamisel (Doyle *et al.*, 1997). Kuna käesolevas töös hallitusseeni ei kasutatud, keskendume eelkõige piimhappebakteritele.

Piimhappebakterid jaotatakse Bergey bakterimääraja järgi kolme rühma.

1. Grampositiivsed kokid nagu näiteks *Lactococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Pediococcus* spp., *Saccharococcus* spp., *Streptococcus* spp. jt.

2. Mittesporuleeruvad grampositiivsed pulgad (*Lactobacillus* spp.).

3. Endospore moodustavad grampositiivsed pulgad ja kokid: *Bacillus* spp., *Sporolactobacillus* spp. (Holt *et al.*, 1994).

Kõik nad käärivad sahhariide peamiselt piimhappeks. Enamasti on need bakterid liikumatud pulgad või kokid, kes katalaasi puudumise tõttu eelistavad anaeroobset või mikroaeroobset keskkonda. Happe suhtes on nad vastupidavad, taludes pH 5-st madalamaid tingimusi. Temperatuuri optimum on lai, sõltuvalt perekonnast 20-45°C. Inimese tervisele nad enamasti ohtu ei kujuta, vaid mõned streptokokid on patogeensed (Hofvendahl *et al.*, 2000).

1.2.1. Laktobatsillid

Laktobatsillid on inimese elus väga olulisel kohal. Nende abil hapendatakse kõögivilju, kaitstakse toitu riknemise eest, fermenteeritakse vorsti, valmistatakse mitmesuguseid piimatooteid. Vähem taibatakse nende tähtsust probiontidena suus, seedekulglas või tupes. Kahjuks leidub selles perekonnas ka toidu rikkujaid ning patogeene. Laktobatsillid on grampositiivsed mittesporuleeruvad liikumatud pulgad. Ilma heemita söötmel kasvades ei suuda nad katalaasi sünteesida. Mõned neist võivad nitraate redutseerida (Hammes *et al.*, 2004).

Süsteemiliselt on perekond väga heterogeenne. Näiteks G-C sisaldus kõigub vahemikus 33-55 mol%, kuigi üldiselt ei tohiks see perekonna sees üle 10% erineda. Fenotüübiliste iseärasuste järgi on takson omakorda kolmeks grupiks jaotatud.

1. gruppi kuuluvad obligaatsed homofermentatiivsed laktobatsillid. Need bakterid käärivad glükoosi edukalt piimhappeks, ei suuda aga kasutada pentoose ega glukonaati. Sellesse gruppi on kantud termofiilsed bakterid *Lb. delbrueckii*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. lactis* ning *Lb. leichmanii*. DNA 80% homoloogia tõttu võib tänapäeval need liike nimetada ka *Lb. delbrueckii* alamliikideks. *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus*'t kasutatakse jogurti valmistamisel. Samuti osaleb ta koos *Lb. helveticus*'e ning *Lb. delbrueckii subsp. lactis*'ega Emmentali, Gorgonzola, Mozarella jt. juustude valmistamisel. *Lb. delbrueckii subsp. delbrueckii* abil valmib haputainas (Stiles *et al.*, 1997).

2. grupis on fakultatiivselt heterofermentatiivsed laktobatsillid, kes suudavad heksoose laktaadiks kääritada. Samuti võivad nad pentoose laktaadi ja atsetaadi tegemiseks kasutada. Peamised toiduga seotud liigid on *Lb. casei* ning *Lb. plantarum*. *Lb. casei* suudab koloniseerida inimese seedekulglat, samas esineb mitmesugustes piimatoodetes ning isegi silo valmistamisel. Juustutööstuses võib ta olulist kahju tekitada, eritades tsitraati ning süsihappegaasi. Ka *Lb. planarum* segab juustu, veini ning tsitruseliste mahla tootmist. Samas on ta oma kohal liha- ning teraviljatoodete fermenteerimisel (Stiles *et al.*, 1997).

3. grupp sisaldab obligaatseid heterofermentatiivseid baktereid, kes käärivad heksoose laktaadiks, atsetaadiks, süsihappegaasiks ning etanooliks. Eriti iseloomulik on gaasi teke glükoosi tarvitamisel. Mõned selle grupi bakterid kahjustavad sel moel Gouda ning Edami juustu nagu näiteks *Lb. bifermentas*. Paljusid 3. grupi liikmeid saab kasutada haputaina valmistamisel: *Lb. sanfransisco*, *Lb. pontis*, *Lb. panis* ning *Lb. brevis* (Stiles *et al.*, 1997).

Enamus laktobatsille teeb ainult ühte piimhappe optilist isomeeri. Laktaadi dehüdrogenaas on stereospetsiifiline ensüüm, mis suudab valmistada kas L- või D-laktaati. Aga leidub ka selliseid baktereid, kes suudavad toota piimhappe ratseemset segu. Hämmastavalt ettearvamatult võib olla keskkonnatingimuste mõju. Näiteks nii *Lb. delbruecii subsp. delbrueckii* kui ka *subsp. lactis* valmistavad kirjanduse andmetel ainult D-laktaati (Hammes *et al.*, 2004). Kuid on täheldatud, et *Lb. delbruecii subsp. delbrueckii*'t tärklise peal kasvatades on võimalik saada kuni 95% L-laktaadi. Samas ei sunni pH ega söötme koostise muutmine selliseid L-laktaadi produtsente nagu näiteks *Lb. amylophilus* või *Lb. rhamnosus* piimhappe teist isomeerset vormi tootma (Hofvendahl *et al.*, 2000).

1.2.2. Batsillid

Selle perekonna esindajaid ei loetud pikka aega klassikaliste piimhappebakterite kilda. Kui B.W. Hammer 1915. aastal avastas *Bacillus coagulans*'i, siis peeti seda kahjulikuks toidu rikkujaks, mis kalgendas piima. Ebameeldiva maitse ning lõhna tõttu polnud batsillide kasutamine toitude valmistamisel mõeldav (Jay, 1986).

Kui piimhapet hakati väljaspool toiduainetööstust tarvitama, tõusid esikohale hoopis teised kriteeriumid. Tooraine pidi olema odav, protsess kiire, reostusohut minimaalne, kääritsemine rangelt homofermentatiivne ning produkti optiline isomeersus ühtne.

1980. aastate lõpus hakati uurima *Bacillus*'e perekonna esindajate kasutusvõimalusi. Sobivaks kandidaadiks osutus *B. coagulans*, mis ei nõudnud häid tingimusi, suutis aga taluda temperatuure, mis välistasid mikroobse reostuse ohu (Herbian *et al.*, 1993).

Tüvi *B. coagulans* TB/04 saavutas suurima piimhappe kontsentratsiooni ning biomassi 52°C juures. Piimhappe teke oli eelistatud anaeroobsetes tingimuses, biomass aga aeroobsetes. Suurim piimhappe kontsentratsioon saavutati pH-l 6,5; biomassi teke jäi stabiilseks pH vahemikus 6,0-7,0. Kõrged suhkru kontsentratsioonid mõjusid pärssivalt piimhappe tootmisele. Peamiseks takistuseks osutus aga lämmastikuallikas. Maksimaalse biomassi hulga, kasvukiiruse, piimhappe tekkekiiruse ning lõppkontsentratsiooni ja suhkru äratarvitamiseks vajas tüvi kallist pärmiekstrakti. Vajalikke vitamiine ja kasvufaktoreid suutis tüvi omastada nii pulbrilisest kui ka vedelast pärmiekstraktist (Payot *et al.*, 1999).

Piisavalt palju leitud perekonnas tüvesid, kes suutsid toota ainult ühte piimhappe optilist isomeeri. *B. cereus*'e, *B. thuringensis*'e ning *Bacillus*'e tüve SHO-1 kasvatamisel 33°C juures ilmnes, et üle 90% tekkis L-laktaati. Seda ei suutnud väärata ka kasvutingimuste muutmine, nagu näiteks aereerimine. Tõsi, *B. coagulans* ning *B. subtilis* ei tootnud sobimatu temperatuuri tõttu anaeroobses keskkonnas praktiliselt üldse piimhapet. Aeroobsetes tingimustes moodustas *B. coagulans*'i niigi napist piimhapest kõigest 68% L-vorm (Ohara *et al.*, 1996).

Käesolevas töös kasutatud *B. coagulans* SIM-7 on termofiilne bakter, kelle kasvuks optimaalne temperatuur on 55-57°C. Ensüümi katalaas olemasolu teeb ta tolerantseks hapniku suhtes. Samas tähendab tsütokroom c puudumine, et puudub hingamisahel ning kogu energia tuleb suhkrute kääritamisest L-laktaadiks. Antud bakteri tüvi suudab kasvada monosahhariididest glükoosil, fruktoosil, galaktoosil, mannoosil; disahhariididest sahharoosil, maltoosil ja tsellobioosil; polüsahhariididest tärklisel. Laktoosi, kaseiini ega želatiini ta ei tarvita. Antud tüve isoleeris Jaan Simiskeri töörühm Rakvere Piiritusetehase ülekuumenenud nisust. *B. coagulans* SIM-7 DSM 14043 on patenteeritud (Simisker *et al.*, 2002).

Eelnevate uurimistöödega on tuvastatud, et homofermentatiivne *B. coagulans* SIM-7 ei hakka söötme koostise ega kasvutingimuste muutmise tagajärjel glükoosi heterofermentatiivselt käärutama (Malsub, 2003). Lisaks on tehtud kindlaks pH vahemik (6,2-6,6), kus 35 tunni jooksul tarvitati ära kogu perioodilises kultuuris olnud suhkur (Medijainen, 2002). Suur töö on ära tehtud ka söötmete uurimise ning optimeerimise osas. Ideaalilähedastel tingimustel suudab antud tüvi perioodilises kultuuris 24 tunniga viia piimhappe kontsentratsiooni 1 M-ni (Michelson, 2003).

1.3. Produktsiooni mõjutavad tegurid

1.3.1. Kultiveerimine

Baktereid saab vedelsöötmes kasvatada kolmel viisil: perioodilises, poolpidevas ning pidevkultuuris.

Perioodilise kultuuri puhul külvatakse inokulum valmis söötmesse. Kõik bakterite kasvuks vajalik – süsiniku- ja lämmastikuallikad ning muud kasvufaktorid – on söötmes juba olemas. Kultiveerimise käigus midagi juurde ei lisata ega ära ei võeta. Kasv perioodilises kultuuris lõpeb siis, kui mõni oluline söötme komponent otsa saab või jääkained baktereid kahjustama hakkavad. Piimhappe tööstuslikul tootmisel eelistatakse seda võimalust, kuna nii saavutatakse piisavalt suur piimhappe lõppkontsentratsioon. Mida enam on söötmes produkti, seda odavam on puhastamine, seega langeb toote omahind. Teiseks perioodilise kultuuri eeliseks on väiksem reostusoht võrreldes teiste kultiveerimisviisidega (Hofvendahl *et al.*, 2000).

Fermentatsiooni, kus kasvatuse ajal lisatakse fermenterisse toitaineid, nimetatakse poolpidevaks kultuuriks. Tööstuses rakendatakse seda harva, kuigi nii on võimalik saagikust tõsta. Nimelt peab kasvatuse lõpuks olema söötmes 7-10% piimhapet, et puhastamine majanduslikult tasuv oleks. See omakorda eeldaks suhkru kontsentratsiooni tõstmist söötmes üle 10%, mis hakkaks aga bakterite kasvu inhibeerima. Inhibitsiooni saaks vältida, kui algselt madala suhkruisaldusega söötmesse seda kasvatuse käigus juurde lisada (Gonçalves *et al.*, 1991).

Vältimaks tooraine suure algkontsentratsiooni ning produkti kuhjumisega kaasnevaid probleeme, kasutatakse pidevkultuuri. Sellisel juhul jooksutatakse fermenterist söödet läbi kiirusega, mis võimaldab bakteritel produkti toota maksimaalse kiirusega. Piimhappe produktsiooni kiirus on sellisel juhul küll suur, kuid lõppkontsentratsioon jääb madalaks. Probleemaatiline on ka steriilsuse tagamine. Nende oluliste puuduste tõttu tööstuses pidevkultuuri eriti ei rakendata (Litchfield, 1996).

1.3.2. Söötmed

Söötmed jagatakse koostise järgi kolme rühma: looduslikud, sünteetilised ning kompleks söötmed.

Looduslike söötmete koostis on kindlalt defineerimata. Neid valmistatakse piimast, lihapuljongist, marja- või puuviljamahladest. Arvestades piimhappebakterite laialdast kasutamist, võib loodusliku söötme tähendus nende puhul ulatuda kalast riisini ning vadakust kurgimahalani (Passos *et al.*, 1994). Üldiselt kasutatakse defineerimata söötmeid biomassi tootmiseks või kultuuride säilitamiseks.

Sünteetilised söötmed on keemiliselt kirjeldatavad. Nad valmistatakse destilleeritud vee ja puhaste kemikaalide baasil. Söötmed sisaldavad süsinikku, lämmastikku, fosforit, väävlit, energiaallikat ning kasvufaktoreid, mida bakterid ise pole võimelised sünteesima. Seda tüüpi söötmeid kasutatakse laborites uurimaks mikroobide eritatud ühendeid ning nõudeid kasvumeediumi suhtes (Heinaru *et al.*, 1998).

Komplekssöötmete koostis on täpselt defineerimata. Lisaks mineraalainetele sisaldavad nad ka ebamääraseid lisandeid: pärimi-, liha- ja taimeekstrakte, mis peaksid rahuldama lämmastikuvajaduse. Vaid vähesed mikroobid suudavad nimetatud lisandeid kohe kasutada. Alles valgu happelise või ensümaatilise lagundamise tagajärjel tekkinud ühendid nagu näiteks peptoon või trüptoon on kasutatavad. Komplekssöötmetel kasvatatakse enamikke heterotroofseid baktereid ning seeni (Heinaru *et al.*, 1998).

Olenemata söötme tüübist, peab see sisaldama piisavalt mikroelemente (Mn, Zn, Mo, Cu, Ni, V, Se, Si, W jt.) ning makroelemente (C, H, N, O, P, S, K, Na, Ca, Mg, Fe jt.). Mikroobid on oma nõudmistes nii erinevad, et kõiki rahuldavat kasvukeskkonda pole olemas. Siiski on mõned universaalsed nõudmised; sööde peab sisaldama vett, süsiniku- ja lämmastikuallikaid, mineraalaineid ning orgaanilisi kasvufaktoreid.

Süsinikku on tarvis orgaaniliste ühendite valmistamiseks, see moodustab poole bakteri kuivmassist. Lämmastikku vajatakse aminohapete aminorühmade moodustamiseks. Makroergiliste ühendite ning nukleiinhapete sünteesil on lisaks lämmastikule tarvis ka fosforit. Mikroelemendid on tavaliselt ensüümide kofaktoriteks. Kasvufaktorid on looduslikud orgaanilised ained, mida mikroobid ise sünteesida ei suuda. Näiteks koensüümidenä toimivad vitamiinid, mõned aminohapped, puriinid, pürimidiinid. Lisaks söötme koostisele mängib olulist rolli ka selle happelisus. Hoidmaks ära kultiveerimise ajal toimuvaid pH muutusi, lisatakse puhverdavaid komponente, nagu näiteks fosfaate (Heinaru *et al.*, 1998).

Kuna piimhappebakterid elavad looduses külluslikes tingimuses – piimas, lihas, aedviljadel, loomade sisikonnas –, on nad miljonite aastate jooksul muutunud toitumise suhtes abituks. Enam ei suuda nad kõiki B grupi vitamiine ega aminohappeid sünteesida, vaid on harjunud neid saama söötmest. Selle iseärasuse tõttu on söötme koostisel eriline roll piimhappe tootmisel (Hofvendahl *et al.*, 1997).

1.3.2.1. Süsinikuallikad

Laboritingimustes piimhappe tootmiseks on kõige sobivamad süsinikuallikad rafineeritud suhkrud: glükoos, laktoos, sahharoos, maltoos ning tärkliis (Litchfield, 1996).

Suurim piimhappe kontsentratsioon ning tekkimise kiirus on saavutatud süsinikuallikana glükoosi kasutades. Arabinoos, fruktoos, laktoos ega ksüloos ei suuda viinamarjasuhkrule konkurentsi pakkuda. Vaid mannoosi kääritamine annab võrdväärse või isegi parema tulemuse. Loomulikult sõltub tulemus fermenteerimisel kasutatavast liigist. Näiteks *Lactococcus lactis* annab glükoosi süsinikuallikana tarvitades parema tulemuse kui maltoosil kasvades. Seevastu *Lb. helveticus* saavutab suurima piimhappe kontsentratsiooni just maltoosi tarvitades (Hofvendahl *et al.*, 2000). Vältimaks inhibitsiooni, ei ületa glükoosi algkontsentratsioon söötmes enamasti 10% piiri. *Lb. delbrueckii* puhul on perioodilises kultuuris püütud algkontsentratsiooni tõsta 30%-ni, kuid edutult (Gonçalves *et al.*, 1991).

Laktoosi kasutamine piimhappe valmistamiseks ei ole jõukohane kõikidele piimhappebakteritele, kuna eeldab laktoosi permeaasi ning β -galaktosidaasi olemasolu. Tänu nendele ensüümidele suudavad bakterid laktoosi läbi raku membraani transportida

ning selle disahhariidi glükoosiks ja galaktoosiks hüdrolüüsida. Ka laktoosi puhul hakkavad kõrged algkontsentratsioonid pärssivalt mõjuma. Optimaalseks peetakse vahemikku 40-80 g/l, alla selle ei saavutatud kasvatuse lõpuks piisavalt kõrget piimhappe kontsentratsiooni (Tango *et al.*, 1999).

Piimhapet võib teha nii nisu-, maisi-, kartuli-, riisi-, rukki-, sorgo- kui ka odratärklisest (Hofvendahl *et al.*, 1999). Enamasti vedeldatakse ning suhkrustatakse tärklis amülaaside ning proteaasidega. Sellisel juhul viivad kääritamist läbi enamasti laktobatsillid: *Lb. planarum*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. helveticus*, *Lb. casei* (Javanainen *et al.*, 1995) jt. Kuid leidub ka ise amülaase valmistavaid amülolaktilisi piimhappebaktereid, kes suudavad tärklis hüdrolüüsida. Näiteks *Lb. fermentum*, *Lb. amylovorus*, *Lb. amylophilus*, *Lb. manihontivorans* (Guyot *et al.*, 2000) jt.

Rafineeritud suhkruid piimhappeks kääritades vähenevad kulutused produkti puhastamisele. Majanduslikult pole siiski kasulik kallist suhkrust suhteliselt odavat piimhapet toota. Seepärast püütakse toorainena kasutada puidu- ning toiduainetööstuse jääke. Kasutatakse nii vadakut, melassi, vanapaberit kui ka linna reovett (Litchfield, 1996).

Väga perspektiivikas on vadaku kasutamine toorainena. See sisaldab valku, mineraalaineid ning 4-5% laktoosi. Samas on hind täiesti konkurentsivõimeline, kuna piimatööstuse jaoks on tegemist jääkproduktiga, millest tuleb vabaneda. Aastas tekib seda $145 \cdot 10^6$ tonni, millest ainuüksi laktoos moodustab $6 \cdot 10^6$ tonni (Gonzalez, 1996). Vadaku baasil toodavad piimhapet peamiselt *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lb. helveticus* ning *Lb. casei*.

Vanapaberit, taimset massi ning puidujäätmeid hüdrolüüsides võib polümeere lagundades saada heksoosidest glükoosi, galaktoosi ja mannoosi; pentoosidest ksüloosi ja arabinoosi. Neid monomeere annab aga tarvitada toorainena piimhappe tegemisel. Võimalusi tselluloosi kääritamiseks pakuvad sellised bakterid nagu *Lb. delbrueckii* ning *Lb. rhamnosus* (Hofvendahl *et al.*, 2000).

1.3.2.2. Lämmastikuallikad

Laktobatsillid ei suuda kasvada söötmes, mis sisaldab vaid suhkrut ning mineraal- ja ammooniumsooli. Piiratud biosünteesivõime tõttu vajavad nad mõningaid aminohappeid, B grupi vitamiine, puriine ning pürimidiine. Mõned bakterid – näiteks *Lb. helveticus* – on piisava peptidaase aktiivsusega, et hankida enamus vajalikke aminohappeid piimavalke lõhkudes (Nakajima *et al.*, 1998). Aga kui laktokokkide jaoks valmistada sünteetiline sööde, peaks see sisaldama 18-19 erinevat aminohapet (van Niel *et al.*, 1999). Tööstuslikus mastaabis oleks see mõeldamatu ning seepärast kultiveeritakse piimhappebaktereid kompleks söötmes. Kõige paremini sobib lämmastikuallikaks pärmiekstrakt (Amrane *et al.*, 1998). Selle laiemat kasutamist piirab aga kõrge hind.

Leidmaks odavat asendajat pärmiekstraktile on proovitud söötmele lisada vadakuvalgu hüdrolysaati, linnase idusid, maisi leotist või hüdrolyüsitud nisu kliisid (Hofvendahl *et al.*, 1997). Odra täisterajahust on hüdrolyüsamise teel püütud saada söödet, mis rahuldaks nii süsiniku- kui ka lämmastikuvajaduse (Javanainen *et al.*, 1995). *Lb. rhamnosus*'e kasvatamisel vitamiinidega rikastatud sojajahu hüdrolysaadil on saadud häid tulemusi (Kwon *et al.*, 2000). On ka andmeid, mille kohaselt võib pärmiekstrakti asendada tavalisest presspärmist valmistatud autolüsaadiga. Näiteks omavalmistatud pärmiautolüsaati kasutades on võimalik saavutada 37% kõrgem produktiivsus kui "Dicfo" pärmiekstrakti kasutamisel (Michelson, 2003).

Lämmastiku ammendumisel kasvatusel käigus kultuuri kasv peatub ning piimhappe tootmine lõpeb. Samas säilitavad *Lb. helveticus*'e rakud eluvõime ning olulist biomassi vähenemist ei toimu. Seevastu süsinikuallika lõppemise korral järgneb kiire rakkude autolüüs ja biomassi vähenemine (Amrane *et al.*, 1997).

1.3.3. Temperatuur

Sõltuvalt liigist võib piimhappebakterite optimaalne kasvutemperatuur ulatuda 20-45°C (Kandler *et al.*, 1986). Tööstuses kasutatakse meelsasti mesofiilseid laktobatsille – *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. planarum* –, kuna nii on mikroobse reostuse oht väiksem. Täielikult võiks steriilsusest loobuda, kui tarvitusele võtta termofiilsed

piimhappebakterid. Näiteks *B. coagulans* TB/04 optimaalne temperatuur kasvuks ning piimhappe produktsiooniks on 52°C (Payot *et al.*, 1999). *B. coagulans* SIM-7 temperatuuri optimum jääb veelgi kõrgemale: 54°C ja 56°C vahele (Medijainen, 2002). Kuna steriilimisega kaasnenud kulutuste äralangemine vähendab tööstuslikus mastaabis toodetava piimhappe omahinda, on huvi uute termofiilsete tüvede vastu suur.

Temperatuuri mõju piimhappe produktsioonile on vähe uuritud. Kohati leidub andmeid, et madalamatel temperatuuridel on küll *Lb. casei* piimhappe produktsiooni kiirus suurem, kuid kõrgematel temperatuuridel saavutatakse suurem piimhappe lõppkontsentratsioon (Hujanen *et al.*, 1996). Aga on ka arvamusi, et samal temperatuuril on võimalik saavutada mõlema maksimumid (Åkerberg *et al.*, 1998).

1.3.4. Happelisus

Enamus baktereid on keskkonna happelisuse suhtes tundlikud, olles võimelised kasvama suhteliselt kitsas pH vahemikus. Piimhappebakterid on selles suhtes vastupidavamad. Nad suudavad oma membraanil säilitada prootongradiendi hoolimata keskkonna pH muutustest või tsütoplasma hapustumisest. Laktobatsillid suudavad taluda rakusisest pH-d 4,2 ning rakuvälist 3,5 (Kashket, 1987).

Selle ebatavalise vastupidavuse seletamiseks on püstitatud mitmeid teooriaid. Ühe hüpoteesi kohaselt on laktobatsillide tsütoplasma teiste piimhappabakteritega võrreldes aluselisem. Seega suudavad nad taluda kõrgemaid dissotsieerumata piimhappe kontsentratsioone. Suurem happetaluvus võib olla tingitud ka rakusisest pH-d reguleeriva prooton-ATPaasi kõrgemast efektiivsusest (Gätje *et al.*, 1991).

Piimhappe tootmise seisukohast on siiski mõistlik fermenteerida kindlas pH vahemikus. Enamasti neutraliseeritakse produkt ammoniaagiga või naatriumhüdroksiidiga tiitrides või lisatakse söötmesse puhver, mis hoiab kindlat pH-d. On võimalik ka piimhappe eemaldamine ekstraheerimise, adsorbeerimise või elektrodialüüsi teel (Hofvendahl *et al.*, 2000).

Produkti eemaldamine võib olla isegi parem lahendus kui neutraliseerimine, sest baktereid ei kahjusta mitte ainult sobimatu pH, vaid ka kogunev produkt. Näiteks *Lb. helveticus*'e kasvu ning produktsiooni mõjutab lisaks pH tasemele ka piimhappe dissotsieerumata vorm. Hapustades söödet soolhappega ühe ühiku võrra, langes

bakterite kasvukiirus kaks korda; kasutades aga piimhapet, lakkas kasv sootuks (Gätje *et al.*, 1991). On ka andmeid selle kohta, et nii piimhappe ioonne vorm (Schepers *et al.*, 2002) kui ka kogu rakusisene laktaat võivad mõjuda pärssivalt (Gonçalves *et al.*, 1997).

Selle kohta, kuidas inhibitsioon toimib, on mitmeid hüpoteese. Enim levinud teooria kohaselt tungib piimhappe dissotsieerumata vorm tsütoplasmasse ning dissotsieerub seal aluselise keskkonna tõttu. Selle tagajärjel väheneb prootongradient, mis omakorda raskendab suhkru transporti raku. Ilma suhkruta pole aga võimalik teha substraatses fosforüülimise teel ATP-d, mille energial töötab prooton-ATPaas. Sel moel prootongradiendist ilma jäänud rakk hukkub (Gätje *et al.*, 1991).

Teise teooria kohaselt väheneb rakkude kasv ning produktsiooni kiirus ensüümide aktiivsuse muutumise tõttu. Happelise keskkonna tõttu ei suuda *Lb. bulgaricus*'e β -galaktosidaas laktoosi lõigata ning bakter ei saa seda süsinikuallikat enam kääritamiseks kasutada (Venkatesh *et al.*, 1993). Samuti on pH tundlik laktaadi dehüdrogenaas, mille aktiveerimine fruktoos 1,6-bisfosfaadi poolt on muutunud tingimustes raskendatud (Hofvendahl *et al.*, 1999*). Ka prooton-ATPaas, mis vastutab rakusisese pH hoidmise eest, on suuteline rahuldavalt töötama vaid kindlas pH vahemikus (Nannen *et al.*, 1991).

Käesoleva töö eesmärgiks oli võrrelda tüve *B. coagulans* SIM-7 (DSM 14043) klassikaliste piimhappebakteritega. Selleks tuli esmalt leida piimhappe produktsiooniks optimaalsed parameetrid erinevate bakteritüvede jaoks: temperatuur, happelisus ning neutraliseerimise viis.

2. MATERJAL JA METOODIKA

2.1. Kasutatud tüved

Käesolevas töös kasutati kolme piimhappebakterite tüve. Neist kaks esimest on tüüpüvedena tuntud laktobatsillid: *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii* DSM 20073 (ATCC 14933) (Hofvendahl *et al.*, 2000) ning *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* DSM 20074 (ATCC 9649) (Cooper *et al.*, 1983). Kolmas tüvi kuulus batsillide hulka. Selle isoleeris Jaan Simiskeri juhitud töörühm Rakvere Piiritusetehase teraviljajäätmetest. Eeva Heinaru ning Eve Vedler tegid kindlaks bakteri süstemaatilise kuuluvuse: *Bacillus coagulans* SIM-7 DSM 14043 (Simisker *et al.*, 2002).

Nimetatud baktereid säilitati 30% propaantrioolis külmutatuna -80°C juures.

2.2. Söötmed

Põhiliselt toimusid kasvatused BC söötmes, harvem selle modifikatsioonides (vt tabel 1). Laktobatsillide inokulume kasvatati teatud aja samasuguses vedelsöötmes, nagu edasisel kultiveerimiselgi. Batsilli inokulumi ettekasvatamiseks kasutati tardsöödet BC_t.

Pärmiautolüsaadi tegemiseks külmutati esmalt AS Salutaguse Pärmitehase toodetud presspärm -18°C juures. Seejärel suspendeeriti üks osa pärmirakke kahes osas deioniseeritud vees. Segamisel kiirusega 100 p/min lüüsusid rakud 48°C juures 36 tunniga (Michelson, 2003). Kartulimahl saadi riivitud kartulite nõrutamisel läbi nn. juusturiide (Lopp, 2004). Fosfaatpuhver (pH 5,5) oli valmistatud 1 M K₂HPO₄ ning 1 M KH₂PO₄-st. M3 tähistas 0,88 M KH₂PO₄ ning 0,06 M K₂HPO₄ segu. M2 oli 0,88 M NaH₂PO₄ ning 0,06 M K₂HPO₄ vesilahus. Mg-segu koosnes 0,35 M MgCl₂ ning 0,35 M MgSO₄-st. "Mikroelemendid" sisaldasid bakterite kasvuks vajalikke mikroelemente (Bauchop *et al.*, 1960). Söötmete tegemiseks kasutati keedetud vett. Keetmine oli vajalik katlakivi teket põhjustava kareduse kõrvaldamiseks.

Söötmete steriilimiseks filtreeriti need läbi 0,2 µm pooriga membraanfiltriga.

Tabel 1. Ühe liitri BC söötme ning selle modifikatsioonide tegemiseks kasutatud komponendid.

Komponendid	BC	BC t	BC sp	BC l
Glükoos	126,1 g	15 g	144,2	erinev
Pärmiekstrakt	25	7,5	-	-
Pärmiautolüsaat	-	-	185,7 ml	112 ml
Trüptoon	-	10 g	-	-
Nutrient Broth	-	-	-	8,4 g
Kartulimahl	-	-	-	84 ml
Fosfaatpuhver	-	pH-ni 5,5	-	-
M3	2,3 ml	-	2,3 ml	-
M2	-	-	-	1,4 ml
Mg-segu	893 µl	-	893 µl	-
Mikroelemendid	2,3 ml	2,5 ml	2,3 ml	-
MgSO ₄	-	-	-	12,6 mg
FeCl ₃	-	-	-	200 mg
TWEEN 80	1 ml	-	-	0,9 ml
Agar	-	15 g	-	-
Keedetud kraanivesi mahuni	1000 ml	1000 ml	1000 ml	1000 ml

DeMan-Rogosa-Sharpe'i (MRS) söödet kasutati eelkõige laktobatsillide inokulumide kasvatamiseks. Mõned kasvatused viidi läbi selle modifitseeritud variandis (vt tabel 2). Neid söötmeid autoklaaviti 112°C juures ülerõhul 0,5 atmosfääri 20 minutit.

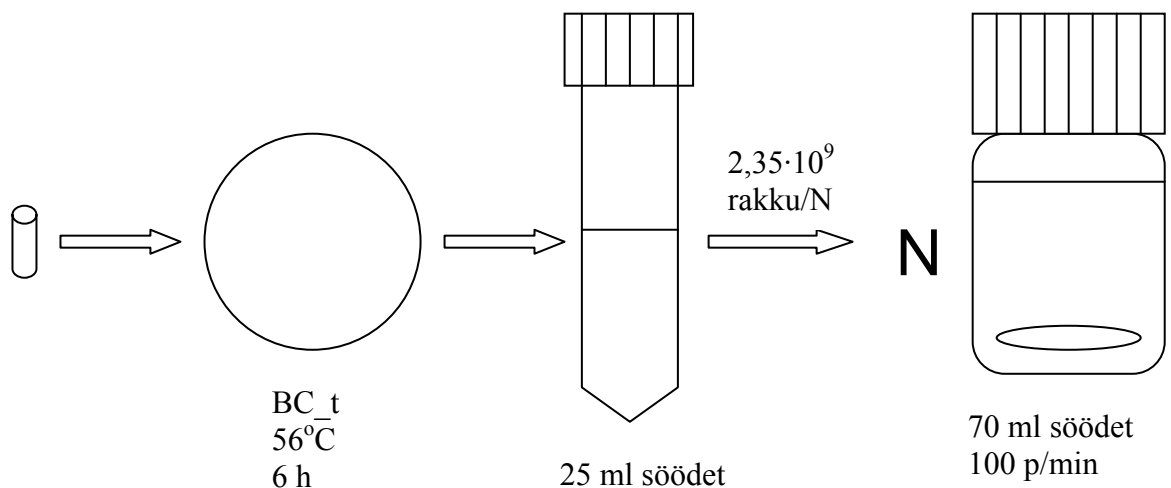
Tabel 2. Ühe liitri MRS ning MRS_1 söötme tegemiseks kasutatud komponendid.

Komponendid	MRS (deMan <i>et al.</i> , 1960)	MRS 1 (Nurk, 2004)
Pärmiekstrakt	5 g	15 g
Trüptoon	10 g	5
Aju infusioon	10 g	5 g
Glükoos	20 g	erinev
TWEEN 80	1 g	1
K ₂ HPO ₄	2 g	2
NH ₄ Cl	2 g	-
Naatriumtsitraat	2 g	-
Naatriumatsetaat	-	5 g
Ammooniumtsitraat	-	2 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g	0,2 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,05	0,05 g
Destilleeritud vesi mahuni	1000 ml	1000 ml

2.3. Kasvatuste korraldus

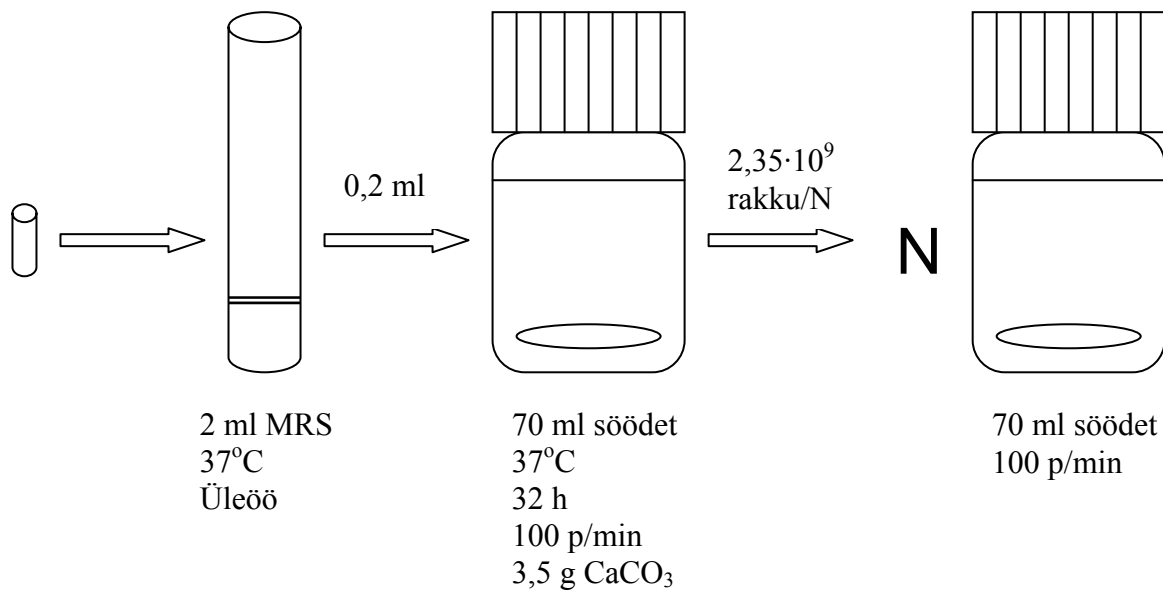
Baktereid kasvatati vedelkultuuris 70 ml mahus. Segamine toimus magnetsegajatega 100 p/min. Kindla temperatuuri hoidmiseks olid Jenway 1103 Hotplate & Stirrer termostaadid (Jenway, USA). pH, neutraliseerija, kääritustsükli aeg, neutraliseerimise viis ning proovide võtmise kord oli erinevates kasvatustes erinev. Ettekasvatuse korraldus olenes tüvede hapnikutaluvusest.

Külmutatud säilituskultuurist võetud *B. coagulans* SIM-7 kasvatati 6 tundi BC_t tardsöötmele 56°C termostaadis. Seejärel suspendeeriti rakud antud kasvatuses söötmes, loendati gorjajevi kambris ning külvati kasvatusnõudesse $2,35 \cdot 10^9$ rakku (vt joonis 4). Edasi toimus kasvatus vastavalt antud katse eesmärkidele.



Joonis 4. Batsillide külmutatud säilituskultuuri ettevalmistamine inokuleerimiseks ning kasvatuste korraldus. N tähistab kasvatusnõude arvu.

Säilituskultuurist võetud külmutatud laktobatsillid kasvatati ette ultraheliga degaseeritud vedelsöötmetes. Primaarne inokulum kasvas mineraalõliga kaetud MRS söötmes. Üleöö kasvanud kultuurist läks 0,2 ml edasi sekundaarsesse inokulmi (70 milliliitrit kasvatuses söödet, millele oli puhverdamiseks lisatud 3,5 g CaCO₃). Sekundaarne inokulum kasvas 32 tundi 37°C pideval segamisel 100 p/min. Enne edasikülvi loendati bakterid gorjajevi kambris, et inokulumi suurus oleks $2,35 \cdot 10^9$ rakku (vt joonis 5). Edasi toimus kasvatus vastavalt antud katse eesmärkidele.



Joonis 5. Laktobatsillide külmutatud säilituskultuuri ettevalmistamine inokuleerimiseks ning kasvatuste korraldus. N tähistab kasvatusnõude arvu.

2.4. Neutraliseerimine

Neutraliseerijatena olid tarvilusel 4,04 M NaOH, 4,1 M NH₄OH või pulbriline CaCO₃.

Kahe esimese puhul kasutati kindla pH taseme hoidmiseks automaattitraatorit Titrino 719 S (Metrohm, Šveits). Tiitrimisel kulunud neutraliseeriija maht ajas salvestati TitroScan (Akrom-Ex, Eesti) tarkvara abil.

3,5 g CaCO₃ kaaluti kasvatuspudelisise ning autoklaaviti koos anumaga. Vahetult enne kasvatust mõõdeti anumasse steriilne sööde ning inokulum. Sellisel juhul puhverdas CaCO₃ tekkiva piimhappe kohe ega lasknud isegi kasvatus lõpus pH-l langeda alla 5±0,2 ühiku.

2.5. Glükoosi kontsentratsiooni määramine

Leegis steriilitud süstlanõelaga võeti kasvatuspudelist 1 ml kultuuri ning inkubeeriti seda 10 minutit 65°C termostraadis. Seejärel tsentrifugeeriti kultuuri 5 min 12000 p/min ning eraldati supernatant. Sellest või selle lahjendusest mõõdeti glükoosi kontsentratsioon, kasutades kommertsiaalset reaktiivide komplekti (Biocon, Saksamaa).

2.6. Piimhappe kontsentratsiooni määramine

Kasvatuspudelist võeti steriilse süstlanõelaga 1 ml kultuuri ning hoiti seda 10 minutit 65°C juures. 100 µl soojast kultuurist tehti 10-kordne lahjendus 5 mM H₂SO₄-sse, mida järgnevalt tsentrifugeeriti 5 minutit 12000 p/min ja eraldati supernatant. See filtreeriti läbi 0,22-0,45 µm filtri (Sigma, Sartorius), tehti sobivad lahjendused ning mõõdeti piimhappe sisaldus kasutades kõrgsurvekromatograafiat.

Aparatuur koosnes Kontron Instruments HPLC süsteemist (pump 522, autosampler 560, DAD detektor 540, kolonnitermostaat HP 1100).

Kolonniks oli Aminex 87H 300x7,8 mm (Bio-Rad), prekolonn Phenomenex SecurityGuard Carbo-H⁺. Süsteemi käitamiseks ning tulemuste analüüsiks kasutati HPLC tarkvara Kroma 2000. Mobiilne faas oli 5 mM H₂SO₄ (Analytical grade, 96%; Reanal). Eluendi voolutuskiirus oli 0,6 ml/min ning kolonni temperatuur 35°C. Standardina kasutati 10 (5; 25; 50) mM Li-laktaati (Sigma), ning orgaaniliste hapete standard (Bio-Rad Organic Acid Standard). Proovi (20 µl) analüüsiaeg süsteemis oli 30 minutit, ning neeldumist mõõdeti lainepikkusel 210 nm. Kromatogramm integreeriti, kasutades piigi pindala (ühendi kontsentratsiooni) arvutamiseks piigi kõrgust ja laiust ½ kõrgusel. (Jõgi, 2004).

2.7. Biomassi kontsentratsiooni määramine

Biomassi määramisel lähtuti eeldusest, et poole bakteri kuivmassist moodustab valk. Seega võeti kasvatuspudelist steriilse süstlanõelaga 1 ml proovi, tsentrifugeeriti 5

minutiga rakud põhja 12000 p/min ning pesti sadet kaks korda 0,9% NaCl lahusega. Seejärel suspendeeriti sade üles 1M NaOH-s. Saadud lüsaadist määrati valgu kontsentratsioon Lowry meetodil (Lowry *et al.*, 1951). Saadud tulemuste järgi arvutati biomass.

2.8. Andmetöötlus

Automaattitraatoritelt iga 10 minuti järel saadud andmed salvestati MS Exceli tabelina. Neutraliseerija kulu järgi arvutati tekkinud piimhappe kontsentratsioon:

$$C \text{ (g/l)} = \frac{[\text{piimhappe molaarmass (90 g/mol)}] \times [\text{neutr. konts. (M)}] \times [\text{neutr. kulu ajahetkeks (ml)}]}{[\text{söötme algmaht (70 ml)}] \times [\text{neutr. kulu ajahetkeks (ml)}]}$$

Piimhappe ning biomassi tekkekiirus arvutati järgneva valemi järgi (Yeh *et al.*, 1991):

$$\frac{dx_i}{dt_i} = \frac{1}{2} \left(\frac{x_{i+1} - x_i}{t_{i+1} - t_i} + \frac{x_i - x_{i-1}}{t_i - t_{i-1}} \right)$$

Selles tähistab x biomassi või piimhappe kontsentratsiooni (g/l) ajahetkel t . Aega mõõdeti tundides.

Piimhappe saagis arvutati selle absoluuthulga jagamisel kulunud glükoosi absoluuthulgaga. Arvesse võeti ka tiitrimisest tingitud mahu suurenemine. Saagise arvutamisel ei võetud arvesse söötme koostises esinevaid muid suhkruid, tsitraaditsükli vaheühendeid ega glükogeenseid aminohappeid.

3. TULEMUSED JA ARUTELU

Käesolevas töös võrreldi kaht klassikalist piimhappebakterit *Bacillus coagulans* SIM7-ga. Hindamiskriteeriumiks oli nende võimekus toota piimhapet.

Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii DSM 20074 (edaspidi: LD4) võeti võrdlusesse lähtudes kirjanduslikest lähteandmetest. Tüvi on laia temperatuuritaluvusega: teda on kasvatatud vahemikus 37-47°C. Lisaks on see tüvi võimeline kasvama nii glükoosil, melassil, laktoosil kui ka hüdrolüüsitud nisujahul. Piimhappe lõppkontsentratsiooniks on mõõdetud 106 g/l ning saagis tarbitud substraadi kohta on 0,82 g/g (Hofvendahl *et al.*, 2000).

Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis DSM 20073 (edaspidi LL3) kohta olid teada järgnevad algandmed. Ta suutis 45°C juures jõuda piimhappe kontsentratsioonini 82 g/l. Piimhappe saagis kulunud glükoosi suhtes oli 70 tunnise fermentatsiooni järel 0,82 g/g. Samuti oli väga sobiv antud tüve võime toota optiliselt puhast D-laktaati (Cooper *et al.*, 1983). Kuna *Bacillus coagulans* suudab produtseerida ainult L-laktaati, oleks vajadusel olnud võimalik tuvastada vastastikust kontaminatsiooni ensümaatilisel piimhappe optilist puhtust kontrollides.

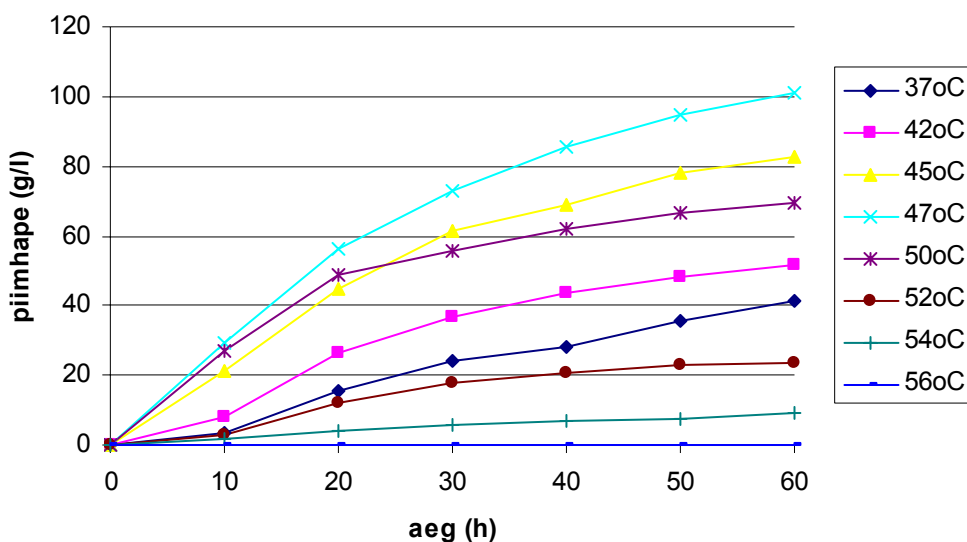
Bacillus coagulans SIM-7 DSM 14043 (edaspidi BC7) on äratanud huvi eelkõige oma termofiiluse poolest: vähesed piimhappebakterid suudavad kasvada temperatuuril 58°C ning seejuures saavutada piimhappe tekkekiiruseks ligikaudu 10 g/lh. Optimaalses pH vahemikus (6,2-6,6) võib piimhappe saagis kulunud glükoosi suhtes ulatuda 0,9 g/g-ni (Medijainen 2002).

Kuigi nimetatud tüvesid on eraldi uuritud, pole eri allikatest pärit andmed aga võrreldavad, kuna kasvatamise tingimused on olnud erinevad. Sestap tuligi läbi viia otsesed võrdluskatsed. Esmalt tehti kindlaks temperatuurioptimumid, kasvatades baktereid söötmes, millele oli stabiilse pH hoidmiseks lisatud CaCO₃. Seejärel algasid optimaalse pH ning neutraliseerija otsingud. Nendes katsetes hoiti kindlat pH taset NaOH või NH₄OH-ga tiitrides. Lõpus võrreldi tüvesid neile sobivates tingimuses.

3.1. Tulemused

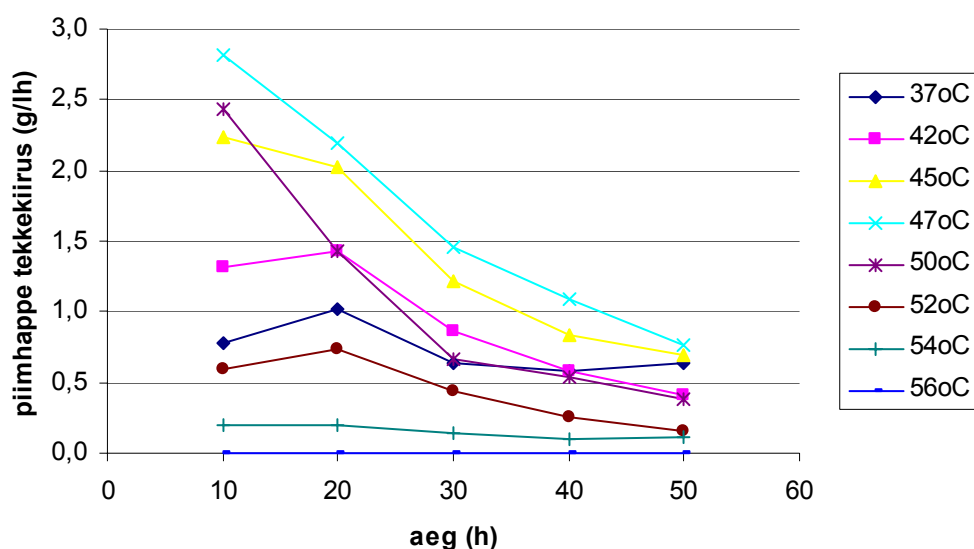
3.1.1. Optimaalse temperatuuri määramine

Tüvesid LL3, LD4 ning BC7 kasvatati BC söötmes, kuhu oli puhverdamiseks lisatud CaCO_3 . Lahustudes reageeris CaCO_3 toodetud piimhappega ning tekkisid kaltsiumlaktaat ning süsihappegaas. Meetod võimaldas kontrollida pH taset rakkudele suboptimaalses pH vahemikus. pH tase jäi isegi kasvatusel lõpus $5 \pm 0,2$ piiridesse. CaCO_3 -ga puhverdamisel oli kääritusprotsessi kontrollivaks faktoriks neutraliseerija lahustumise kiirus. Kui kääritusel tekkinud piimhapet siduvat Ca-iooni lahuses piisavalt ei esine, sööde hapustub ja represseeriva pH tõttu käärituse tempo aeglustub. Fermentatsioon toimus perioodilises kultuuris ning kestis 60 tundi. Kultuuri segati magnetsegajaga 100 p/min. Iga 10 tunni tagant võeti proove, millest määrati piimhappe ning glükoosi sisaldus. Baktiereid kasvatati 37°C, 42°C, 45°C, 47°C, 50°C, 52°C, 54°C ning 56°C juures.



Joonis. 6. Optimaalse temperatuuri määramine LL3-e jaoks. Piimhappe teke erinevatel temperatuuridel läbiviidud kasvatuste puhul.

LL3. Erinevatel temperatuuridel piimhappe teket jälgides, paikneb LL3-e optimum 47°C kandis (vt joonis 6). Sellest madalamatel või kõrgematel temperatuuridel oli produktsioon märgatavalt madalam. Eriti pärssivalt mõjus temperatuuri tõstmine üle 50°C. Piimhappe tekke maksimaalse kiiruse hindamine oli raskendatud, sest kümnendaks tunniks oli parimatel kasvatustel kultuuri intensiivse kasvu, seega ka maksimaalse produktiivsuse faas, möödunud (vt joonis 7). Siiski oli piimhappe arvutuslik tekkekiirus 2,82 g/lh kättesaadav vaid 47°C juures kasvanud LL3-e rakkudele. Võttes hindamiskriteeriumiks piimhappe keskmise tekkekiiruse kogu kääritudtsükli kohta, oli neis tingimustes 47°C optimaalne temperatuur. Seevastu piimhappe saagis kulunud glükoosi suhtes ei sõltunud olulisel määral temperatuurist (vt tabel 3).

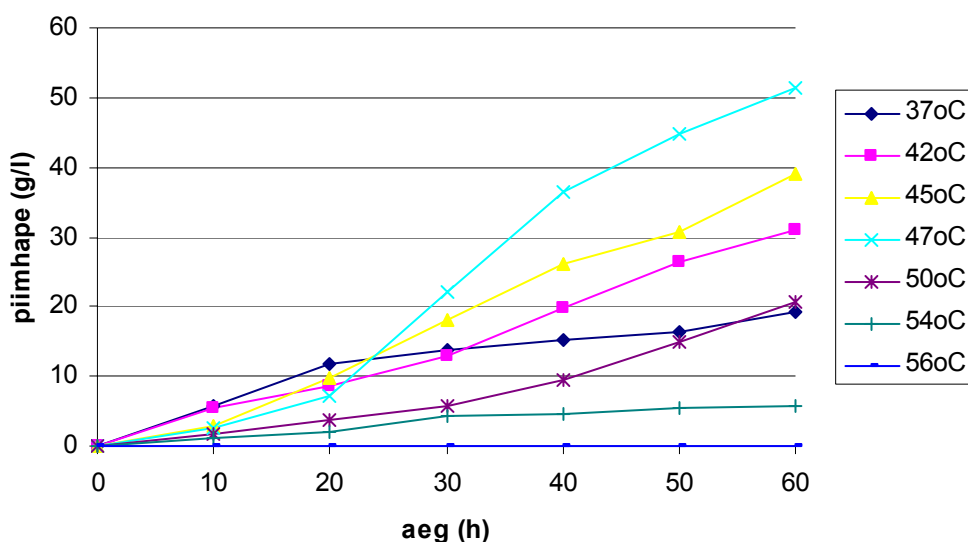


Joonis 7. Optimaalse temperatuuri määramine LL3-e jaoks. Piimhappe tekkekiirus erinevatel temperatuuridel läbiviidud kasvatuste puhul.

Tabel 3. Optimaalse temperatuuri määramine LL3-e jaoks. Piimhappe keskmise tekkekiiruse ning saagise sõltuvus temperatuurist.

Temperatuur (°C)	37	42	45	47	50	52	54	56
Piimhappe keskmine tekkekiirus (g/lh)	0,73	0,92	1,40	1,66	1,09	0,43	0,15	0,00
Piimhappe saagis glükoosi suhtes (g/g)	1,17	1,07	0,99	1,01	1,09	1,17	0,85	0,00

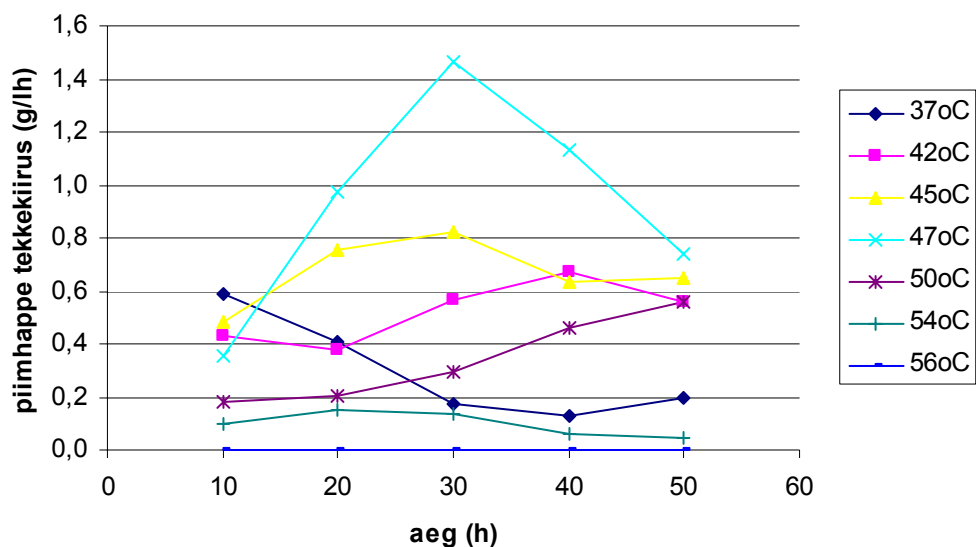
LD4. Ka LD4-a puhul toimus kõige intensiivsem piimhappe tootmine 47°C juures, jõudes 60. tunniks 51,3 g/l. Sealjuures tuleb mainida, et parim produktiivsus avaldus alles poole kasvatusel peal, enne seda domineerisid madalamal temperatuuril läbi viidud kasvatused (vt joonis 8). Piimhappe tekkekiiruse maksimumid on sõltuvalt temperatuurist ajaliselt laiali paisatud: 37°C oli see enne 10. tundi ning 50°C juures peale 50. tundi. 47°C juures kasvanud LD4-a piimhappe tekkekiirus ületas kõiki teisi peaaegu kogu kasvatusel jooksul (vt joonis 9). Ka piimhappe keskmine tekkekiirus oli sellel temperatuuril kõige suurem. Piimhappe saagisel kindel haripunkt puudus. Mida kõrgemale tõusis temperatuur, seda madalam oli saagis (vt tabel 4).



Joonis 8. Optimaalse temperatuuri määramine LD4-a jaoks. Piimhappe teke erinevatel temperatuuridel läbiviidud kasvatuste puhul.

Tabel 4. Optimaalse temperatuuri määramine LD4-a jaoks. Piimhappe keskmise tekkekiiruse ning saagise sõltuvus temperatuurist.

Temperatuur (°C)	37	42	45	47	50	54	56
Piimhappe keskmine tekkekiirus (g/lh)	0,30	0,52	0,67	0,94	0,34	0,10	0
Piimhappe saagis glükoosi suhtes (g/g)	1,39	1,12	1,01	0,92	0,82	0,87	0

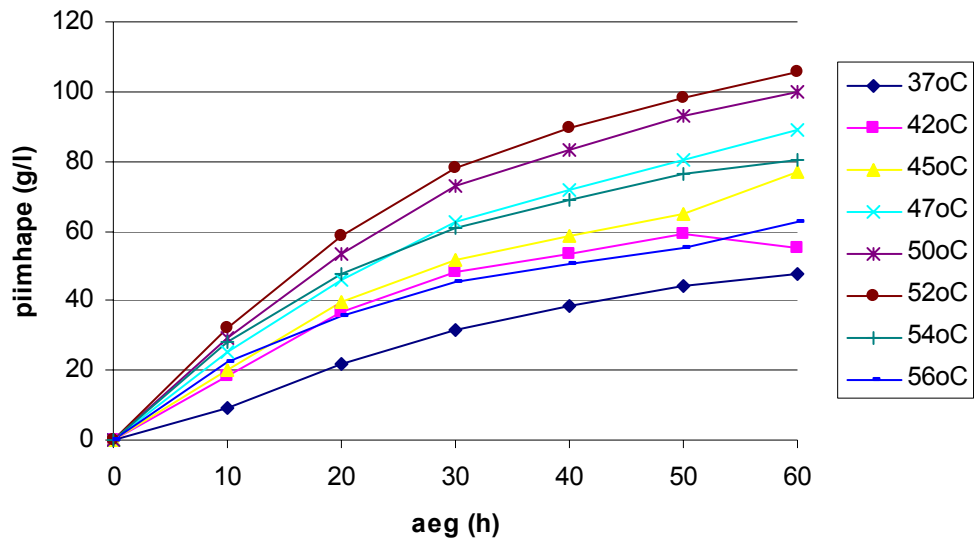


Joonis 9. Optimaalse temperatuuri määramine LD4-a jaoks. Piimhappe tekkekiirus erinevatel temperatuuridel läbiviidud kasvatuste puhul.

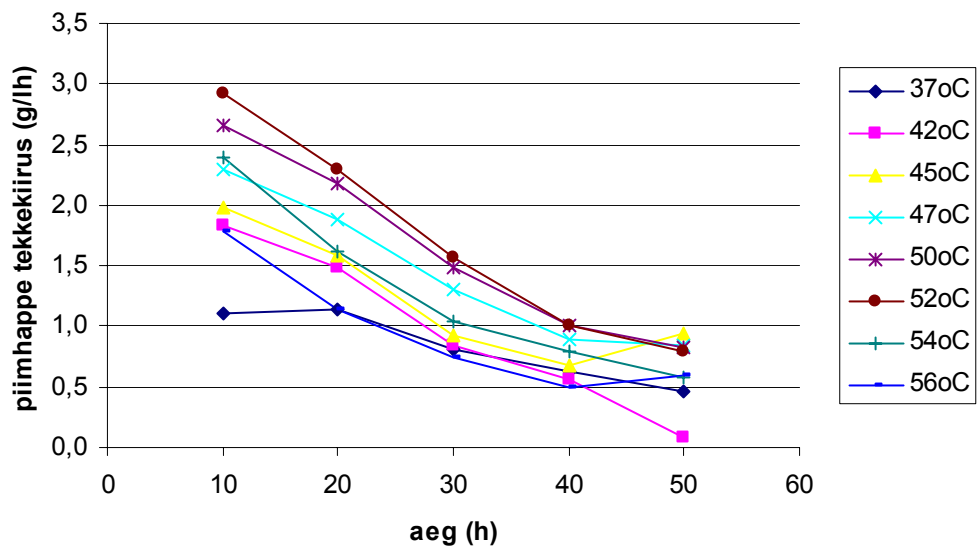
BC7. Erinevalt kahest eelmisest tüvest käärivas BC7 glükoosist piimhapet eelistatult 52°C juures. Sellest madalamad või kõrgemad temperatuurid tõid kaasa piimhappe tekke minimaalse vähenemise (vt joonis 10). Piimhappe suurimat tekkekiirust oli antud katsekorralduse juures raske hinnata. Kõikide käärivate algus oli küllalt kiire ja kümnendaks tunniks maksimaalse produktsiooni faas läbitud. Olemasolevatele andmetele tuginedes loeti parimaks 52°C kasvanud BC7-e kultuur (vt joonis 11). Piimhappe saagis kulunud glükoosi suhtes jäi üldjoontes muutumatuks, kuigi on märgata väikest saagise suurenemist kõrgematel temperatuuridel (vt tabel 5).

Tabel 5. Optimaalse temperatuuri määramine BC7-e jaoks. Piimhappe keskmise tekkekiiruse ning saagise sõltuvus temperatuurist.

Temperatuur (°C)	37	42	45	47	50	52	54	56
Piimhappe keskmine tekkekiirus (g/l/h)	0,83	0,96	1,22	1,44	1,63	1,72	1,28	0,95
Piimhappe saagis glükoosi suhtes (g/g)	0,96	0,93	1,06	0,96	0,96	1,00	1,05	1,11



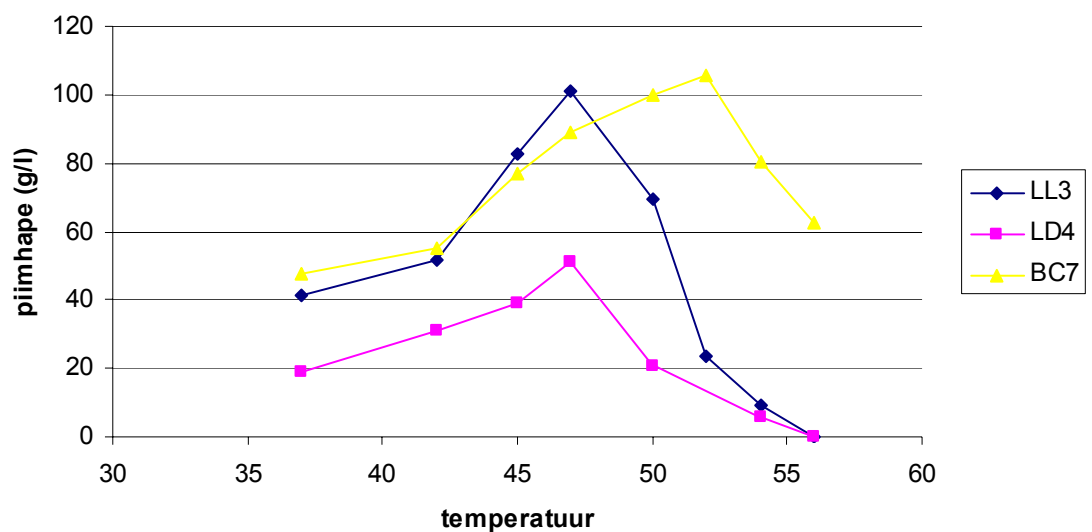
Joonis 10. Optimaalse temperatuuri määramine BC7-e jaoks. Piimhappe teke erinevatel temperatuuridel läbiviidud kasvatuste puhul.



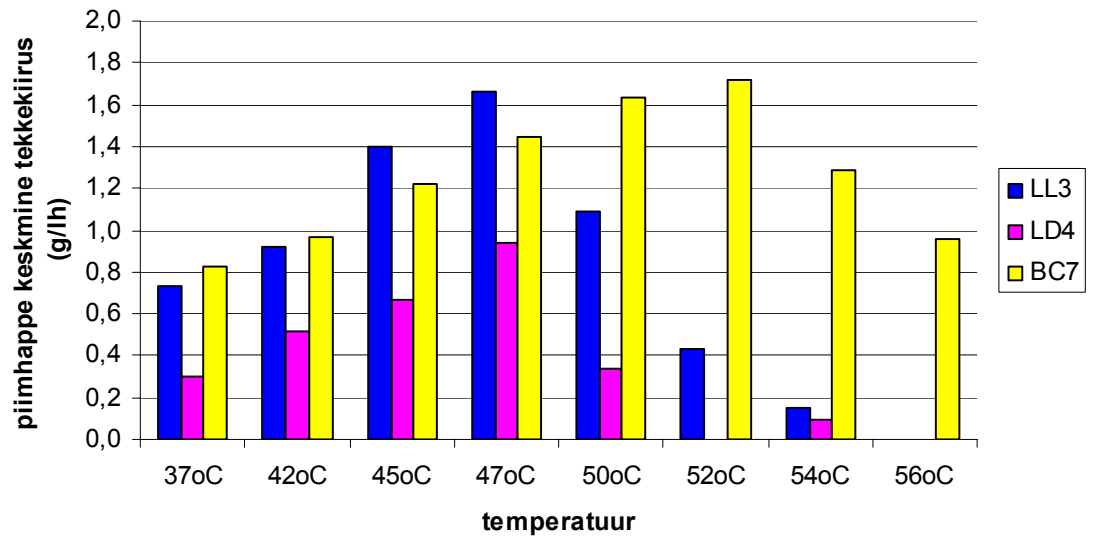
Joonis 11. Optimaalse temperatuuri määramine BC7-e jaoks. Piimhappe tekkekiirus erinevatel temperatuuridel läbiviidud kasvatuste puhul.

Esmapilgul tundusid erinevate tüvede kasvatamisel saadud tulemused sarnased olevat. Kui aga võtta kõigi kolme 60. tunniks saavutatud piimhappe kontsentratsioonid ning ühele graafikule panna, hakkavad erinevused kohe silma (vt joonis 12). Nii LL3-e kui ka LD4-a optimum oli 47°C juures, kuid piimhappe kontsentratsioon oli väga

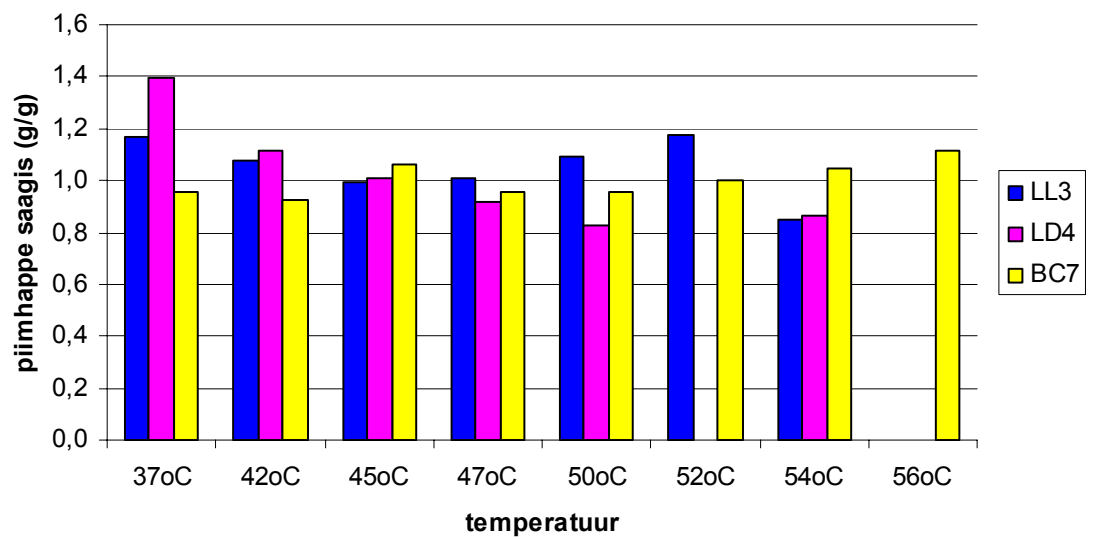
erinev, 101 g/l ja 51 g/l vastavalt. Sealjuures tuleb silmas pidada, et LL3-e ning BC7-e tulemused olid võrdväärsed. Saavutatud piimhappe lõppkontsentratsioon mõlema tüve puhul ulatus üle 100 g/l, vahe oli kõigest 5 g/l BC7-e kasuks. Märkatava eelise andis aga viimase termofiilsus. Temperatuuridel, kus laktobatsillide elutegevus puudus, suutis batsill endiselt piimhapet toota. Piimhappe keskmise tekkekiiruse võrdlemine kõigil kolmel piimhappebakteril korraga näitas samuti BC7-e paremust (vt joonis 13). LD4-a saavutatud tulemused jäid teiste tüvedega võrreldes madalamaks. LL3-e ja BC7-e keskmised piimhappe tekkekiirused osutusid neis katsetingimustes sarnasteks. Aga BC7-e puhul püüsid need kõrgetena laiemas temperatuurivahemikus. Samuti rääkis batsilli kasuks piimhappe saagis kulunud glükoosi suhtes. Kui laktobatsillidel oli märgata saagise langust optimaalsest kõrgemal temperatuuril, siis BC7-e puhul võis märgata selle väikest tõusu (vt joonis 14). Ilmselt tänu väga rikka söötme kasutamisele oli antud meetodika juures võimalik saada saagiseid üle suhtarvu üks. Kuigi osadel juhtudel võis selles oma osa olla ka mõõtmisvigadel, on see ilmselt seletatav peale glükoosi ka muude söötme komponentide konverteerimisega piimhappeks.



Joonis 12. Optimaalse temperatuuri määramine. Tüvede LL3, LD4 ja BC7 võrdlus 60. tunniks saavutatud piimhappe kontsentratsiooni põhjal.



Joonis 13. Optimaalse temperatuuri määramine. Tüvede LL3, LD4 ja BC7 võrdlus piimhappe keskmise tekkekiiruse põhjal.



Joonis 14. Optimaalse temperatuuri määramine. Tüvede LL3, LD4 ja BC7 võrdlus piimhappe saagise põhjal.

3.1.2. Optimaalse happelisuse määramine

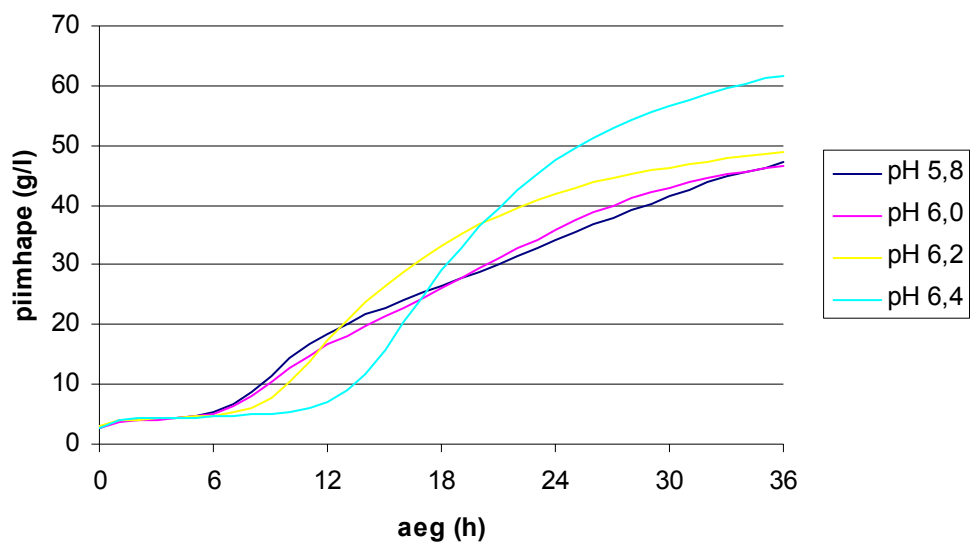
BC7-e puhul on pH optimum juba kindlaks määratud (Medijainen 2002). Kuna antud töös kasutati teistsuguseid tingimusi, siis tuli seda korrata. Eelkõige selle pärast, et ainult standardsetes tingimustes läbi viidud kasvatused annavad tulemusi, mis lubavad erinevate tüvede omadusi adekvaatselt võrrelda. Nii näitasid eelmised, CaCO₃ manulusega kääritused näiteks BC7-e puhul madalamat temperatuurioptimumi kui varem täheldatud. Seega ühtede tingimuste muutmine võis mõjutada ka teisi parameetreid. Teiseks vajas uurimist ka bakterite tundlikkus erinevate neutraliseerijate suhtes. Nendes katsetes ei saanud kasutada LD4-a, kuna ta mitmes katseseerias lihtsalt ei kasvanud. Ilmselt oli mingi katse parameeter väljaspool selle tüve taluvuspiiri. Kuna antud tüve produktiivsus eelmises katseseerias oli märgatavalt madalam ülejäänud tüvedest, edaspidi LD4-a kasvatustest loobuti.

Need katseseeriad viidi läbi perioodilises kultuuris, kus nii eelkasvatuse kui ka põhikäärituse söötme (BC) algne glükoosi kontsentratsioon oli 700 mM. Kasvatused toimusid kindla pH väärtuse juures: 5,8; 6,0; 6,2 ja 6,4. Automaattitraatorites kasutati neutraliseerijana 4,04 M NaOH-d või 4,1 M NH₄OH-d. Fermentatsioon BC söötmes kestis 36 tundi. LL3-e kasvatati 47°C ning BC7-t 52°C juures. Kultuuri segati magnetsegajaga 100 p/min. Piimhappe kontsentratsioon ning selle tekkekiirus arvutati välja kulunud neutraliseerija mahu järgi. Nimetatud meetodi kontrollimiseks võeti iga 12 tunni tagant proove, millest määrati piimhappe ning glükoosi kontsentratsioon katseliselt. Piimhappe saagis kulunud glükoosi suhtes arvutati välja just nende proovide põhjal.

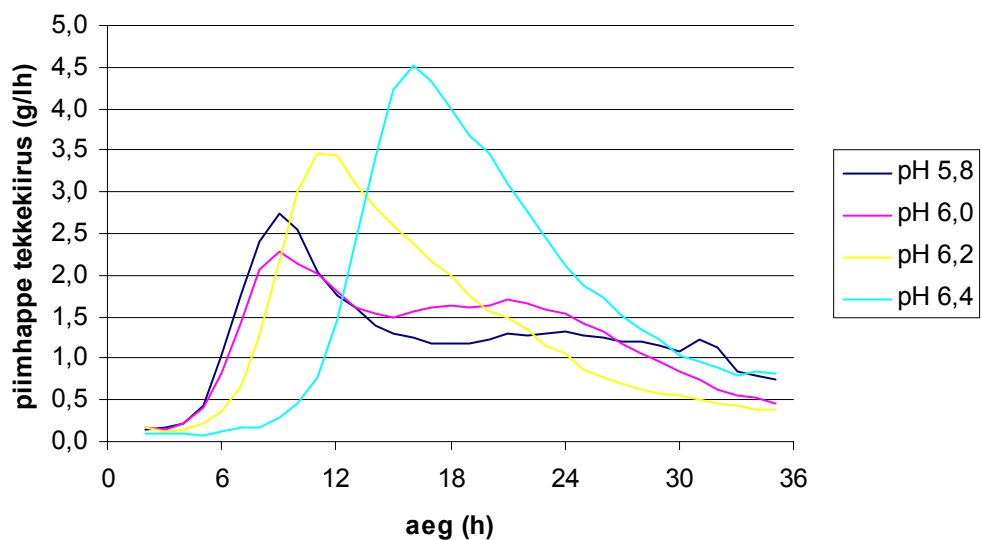
3.1.2.1. Neutraliseerimine ammooniumhüdrosiidiga

LL3. Esimesed katseseeriad, kus glükoosi algkontsentratsioon oli 700 mM ja neutraliseerijaks NH₄OH andsid esmapilgul raskesti interpreteeritavaid tulemusi. Esimese kuue tunni jooksul LL3 piimhapet praktiliselt ei tootnud (vt joonis 15). Tähelepanuväärne oli tõik, et parima tulemuseni jõudnud kultuur alustas tootmist teistest hiljem. Sama – 6,4 pH tasemega kasvatus – näitas ennast heast küljest ka piimhappe tekkekiiruse graafikul (vt joonis 16). Haripunkt jäi küll ajaliselt kasvatus

keskmisesse faasi, ületas aga muudel pH tasemetel saavutatud piimhappe tekkekiirusi. Ka piimhappe keskmine tekkekiirus oli kõige suurem pH 6,4 juures. Samas, piimhappe saagis kulunud glükoosi suhtes oli sellel pH väärtusel madalam. Piimhappe saagise maksimum oli pH 6,0 – 6,2 juures (vt tabel 6).



Joonis 15. Neutraliseerimine ammooniumhüdroksiidiga erinevatel pH väärtustel. Neutraliseerija kulu järgi arvatud piimhappe teke LL3-e kultuuri puhul.

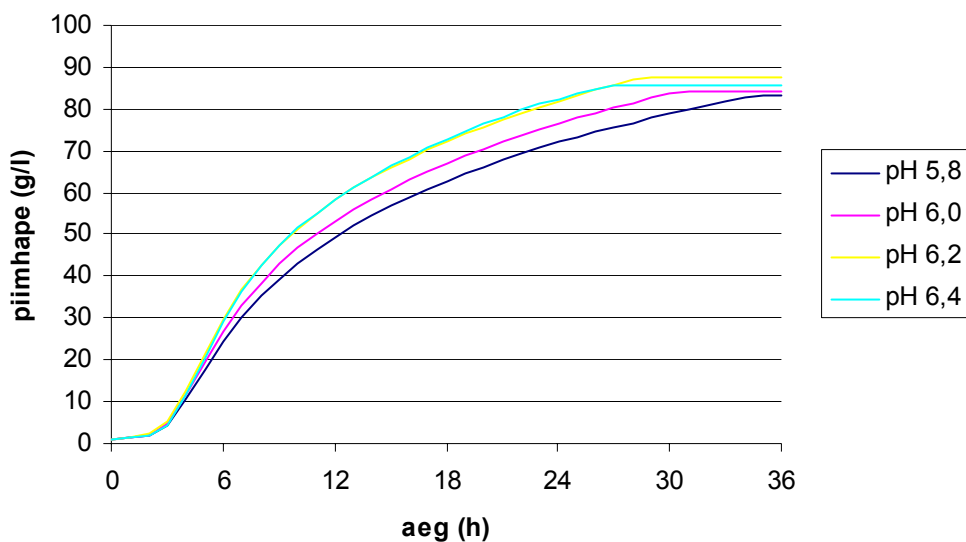


Joonis 16. Neutraliseerimine ammooniumhüdroksiidiga erinevatel pH väärtustel. Neutraliseerija kulu järgi arvatud piimhappe tekkekiirus LL3-e kultuuri puhul.

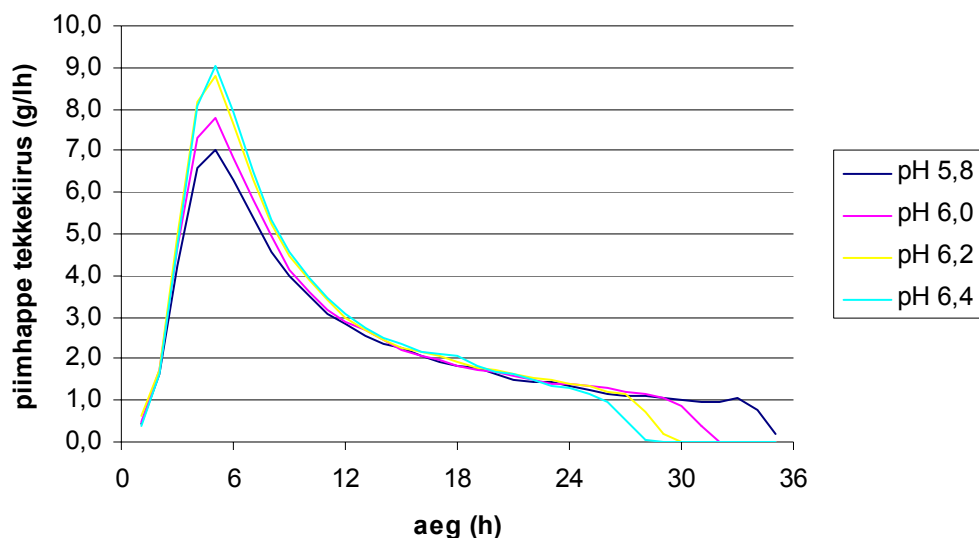
Tabel 6. Neutraliseerimine ammooniumhüdroksiidiga erinevatel pH väärtustel. Piimhappe keskmine tekkekiirus ja saagis LL3-e kultuuri puhul.

pH	Piimhappe keskmine tekkekiirus (g/lh)	Piimhappe saagis kulunud glükoosi suhtes (g/g)
5,8	1,24	0,98
6,0	1,23	1,05
6,2	1,29	1,06
6,4	1,66	0,98

BC7. Ammooniumhüdroksiidiga neutraliseeritud BC7 jõudis pooleteise ööpäevaga söötmetest ära kasutada kogu glükoosi, millega kaasnes järsk piimhappe tekke lõpp (vt joonis 17). Kinnituseks eelnevatele andmetele, jäi tootmiseks optimaalne pH vahemik 6,2 ning 6,4 vahele. Ka piimhappe suurim tekkekiirus saavutati selles piirkonnas (vt joonis 18). pH-l 6,2 hoitud kultuur saavutas küll kõrgeima piimhappe kontsentratsiooni ning tekkekiiruse, kuid edumaa teiste ees oli minimaalne. Veelgi enam, piimhappe keskmise tekkekiiruse järgi tuleks eelistada pH taset 6,2; saagise järgi aga 6,4 (vt tabel 7).



Joonis 17. Neutraliseerimine ammooniumhüdroksiidiga erinevatel pH väärtustel. Neutraliseerija kulu järgi arvutatud piimhappe teke BC7-e kultuuri puhul.



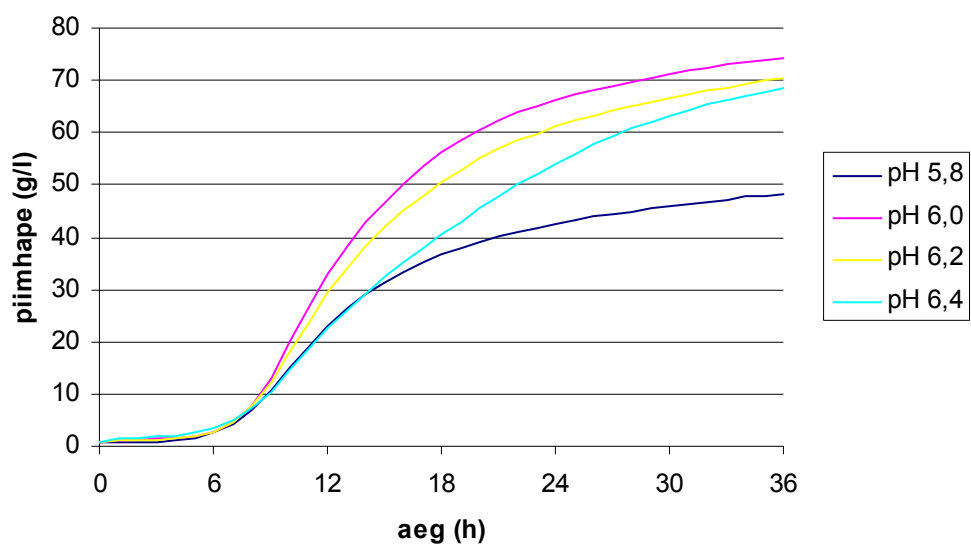
Joonis 18. Neutraliseerimine ammooniumhüdroksiidiga erinevatel pH väärtustel. Neutraliseerija kulu järgi arvatud piimhappe tekkekiirus BC7-e kultuuri puhul.

Tabel 7. Neutraliseerimine ammooniumhüdroksiidiga erinevatel pH väärtustel. Piimhappe keskmine tekkekiirus ja saagis BC7-e kultuuri puhul.

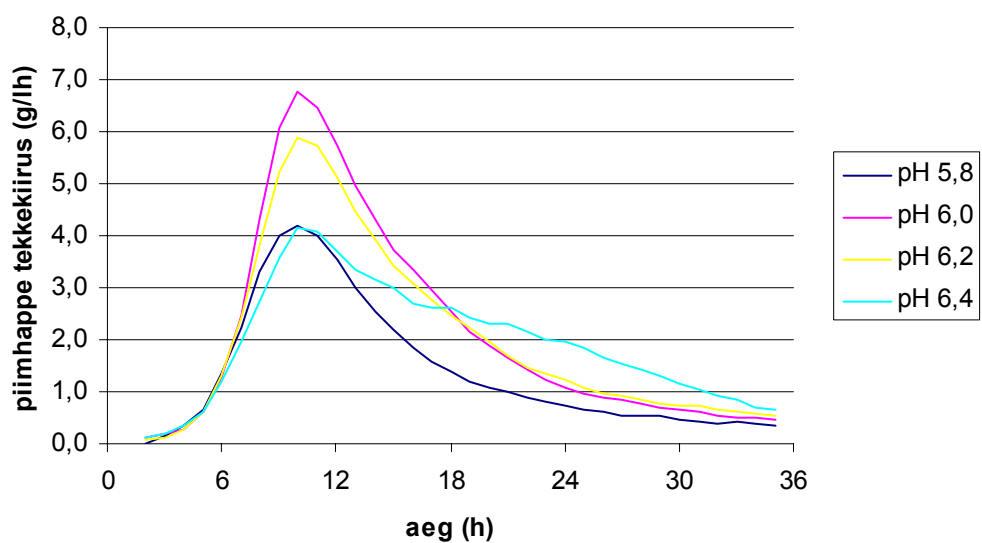
pH	Piimhappe keskmine tekkekiirus (g/h)	Piimhappe saagis kulunud glükoosi suhtes (g/g)
5,8	2,35	0,88
6,0	2,38	0,96
6,2	2,46	0,99
6,4	2,42	1,00

3.1.2.2. Neutraliseerimine naatriumhüdroksiidiga

LL3. Kõrge glükoosi algkontsentratsiooni kasutamisel saavutati naatriumhüdroksiidiga neutraliseerimisel LL3-e puhul paremad tulemused kui ammooniumhüdroksiidiga. Piimhappe tekkimisel mingit inhibitsiooni ei täheldatud (vt joonis 19). Peale kuuendat tundi algas intensiivne piimhappe kontsentratsiooni tõus, mis 36. tunniks hakkas happelisemate kasvatuste puhul ilmutama platoole jõudmise märke. Päris otsa glükoos siiski ei saanud. Nii piimhappe lõppkontsentratsiooni kui ka tekkekiiruse põhjal on selle tüve produktsiooniks optimaalseim pH 6,0 (vt joonis 20). Seda väidet toetas ka piimhappe keskmise tekkekiiruse ning saagise kõrgem tase antud pH juures (vt tabel 8).



Joonis 19. Neutraliseerimine naatriumhüdroksiidiga erinevatel pH väärtustel. Neutraliseerija kulu järgi arvatud piimhappe teke LL3-e kultuuri puhul.

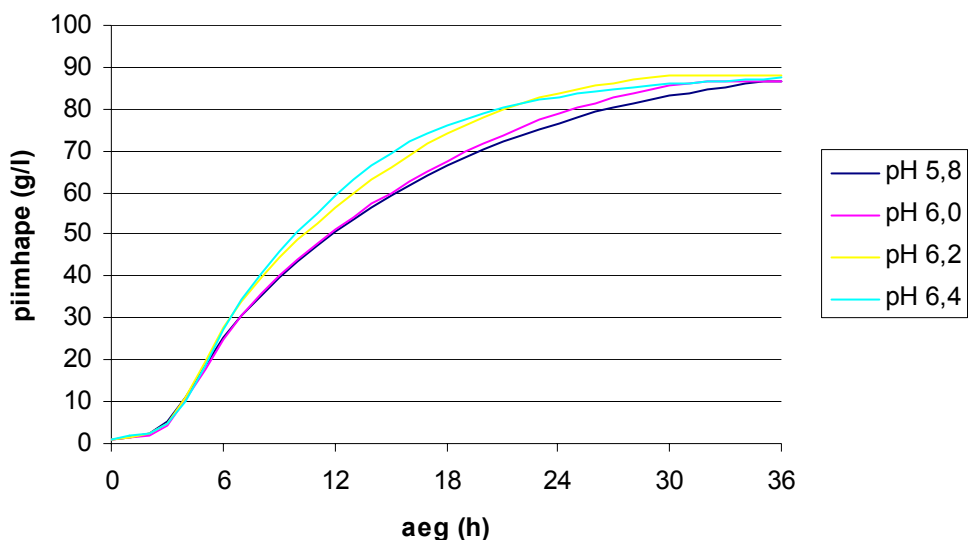


Joonis 20. Neutraliseerimine naatriumhüdroksiidiga erinevatel pH väärtustel. Neutraliseerija kulu järgi arvatud piimhappe tekkekiirus LL3-e kultuuri puhul.

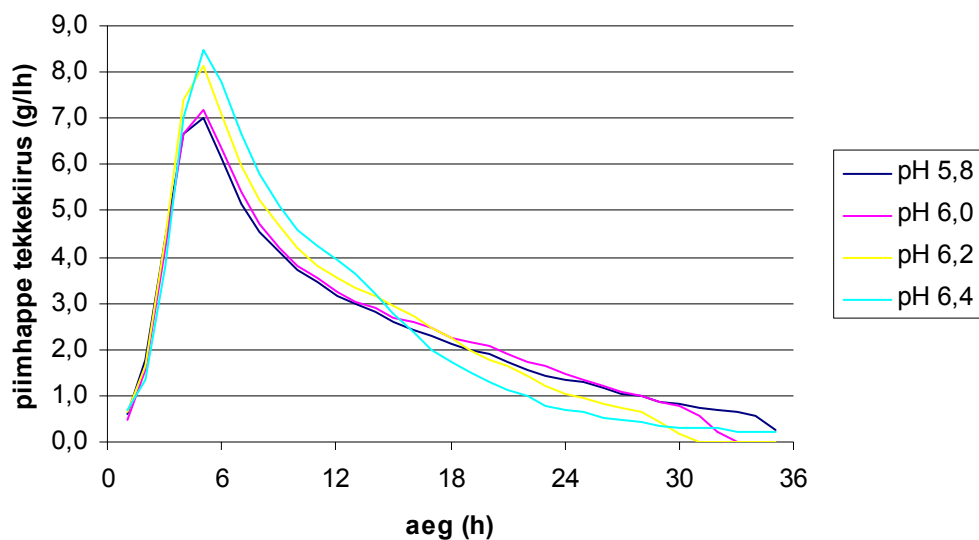
Tabel 8. Neutraliseerimine naatriumhüdroksiidiga erinevatel pH väärtustel. Piimhappe keskmine tekkekiirus ja saagis LL3-e kultuuri puhul.

pH	Piimhappe keskmine tekkekiirus (g/lh)	Piimhappe saagis kulunud glükoosi suhtes (g/g)
5,8	1,35	1,09
6,0	2,09	1,22
6,2	1,98	0,98
6,4	1,91	0,80

BC7. Suurima piimhappe lõppkontsentratsiooni saavutas BC7 pH 6,2 juures (vt joonis 21). pH-l 6,4 kasvatatud kultuur saavutas kasvatus käigus piimhappe tekitamisel minimaalse edumaa, kuid selle lõppkontsentratsioon jäi madalamaks ning 36. tunniks ei suutnud kogu glükoosi ära tarbida. Fermentatsiooni lõppu iseloomustas väga väike, aeglaselt sumbuv produktiivsus, nn. kustumine. Piimhappe tekkekiirus oli suurim pH 6,4 juures kasvatatud kultuuril, kuigi vahe oli minimaalne (vt joonis 22). Seevastu piimhappe keskmine tekkekiirus oli kõikidel pH tasemetel praktiliselt sama. Ka saagise põhjal oli raske mingeid järeldusi teha: tulemused olid liiga sarnased (vt tabel 9). Saadud andmete baasil on piimhappe tootmiseks optimaalseim pH 6,2.



Joonis 21. Neutraliseerimine naatriumhüdroksiidiga erinevatel pH väärtustel. Neutraliseerija kulu järgi arvutatud piimhappe teke BC7-e kultuuri puhul.



Joonis 22. Neutraliseerimine naatriumhüdroksiidiga erinevatel pH väärtustel. Neutraliseerija kulu järgi arvatud piimhappe tekkekiirus BC7-e kultuuri puhul.

Tabel 9. Neutraliseerimine naatriumhüdroksiidiga erinevatel pH väärtustel. Piimhappe keskmine tekkekiirus ja saagis BC7-e kultuuri puhul.

pH	Piimhappe keskmine tekkekiirus (g/h)	Piimhappe saagis kulunud glükoosi suhtes (g/g)
5,8	2,43	0,81
6,0	2,44	0,86
6,2	2,47	0,86
6,4	2,45	0,85

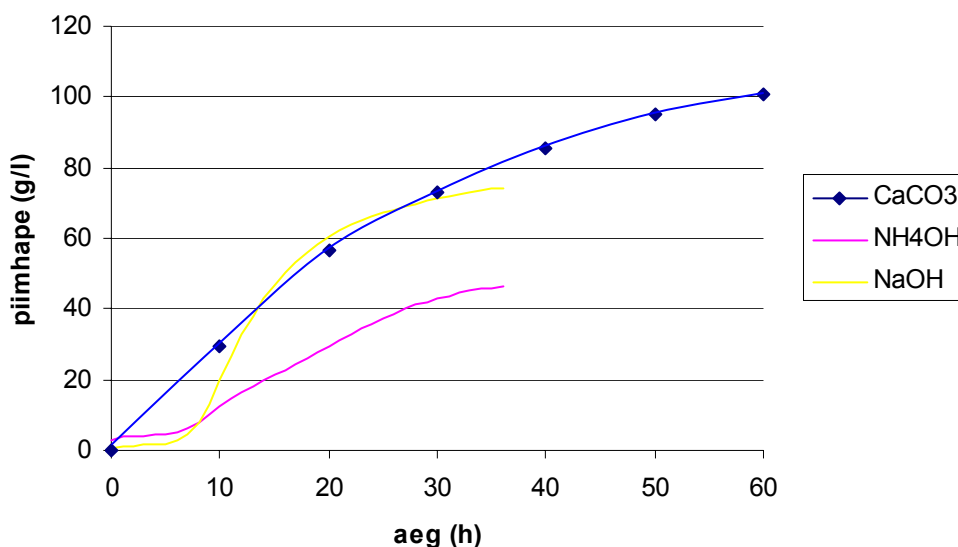
3.1.3. Neutraliseerijate võrdlemine

Eelnevate katsetega sai kinnitust fakt, et võttes kriteeriumiks piimhappe tekke, oli BC7-e pH optimum tõepoolest 6,2. Lisaks tehti kindlaks, et LL3-e puhul jäi see 6,0 juurde. Katsete käigus selgus, et kasutades neutraliseerijana NaOH, NH₄OH või CaCO₃, käituvad tüved mõneti erinevalt. Seetõttu tuli täpsustavalt uurida erinevate neutraliseerijate mõju tüvede piimhappe tootlikkusele.

Kasvatused toimusid optimaalsetes tingimustes. LL3-e kasvatati temperatuuril 47°C ning pH 6,0 juures. BC7-e vastavad parameerid olid 52°C ning 6,2. BC söödet segati 100 p/min. NaOH ning NH₄OH kulu järgi arvutati tekkinud piimhappe kontsentratsioon. Saadud tulemuste kontrollimiseks võeti iga 12 tunni tagant proove,

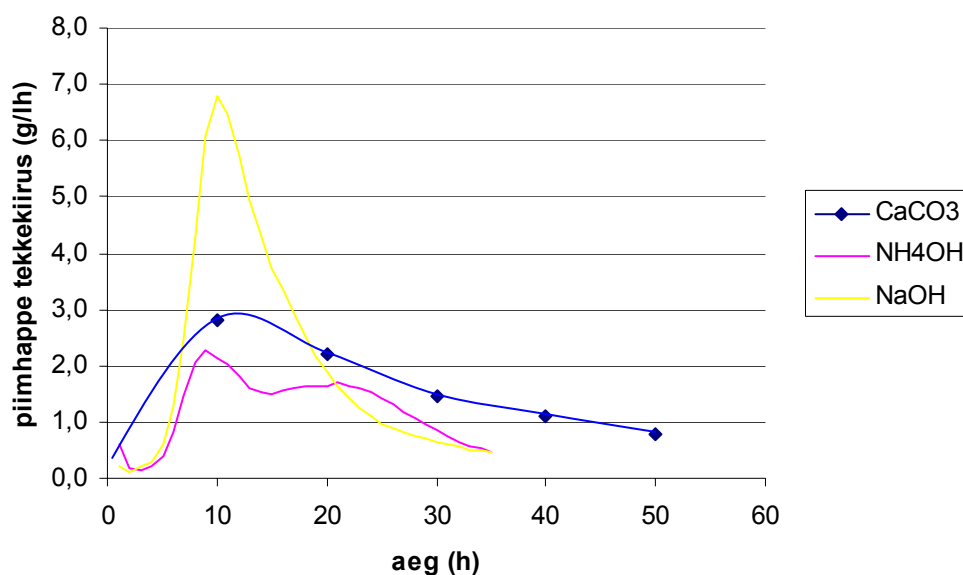
millest mõõdeti piimhappe ning glükoosi sisaldust. CaCO_3 -ga puhverdades pH kõikus, jäädes kasvatusel lõpus $5 \pm 0,2$ piiridesse. CaCO_3 -ga puhverdatud katsetes võeti proove 10-tunnise intervalliga, määramaks glükoosi ning piimhappe kontsentratsiooni.

LL3. Vaadates piimhappe tekkimise graafikuid LL3-e puhul, üllatas hea tulemusega CaCO_3 -ga puhverdatud kasvatus (vt joonis 23). Kuni kolmekümnenda tunnini oli piimhappe teke täiesti võrreldav NaOH-ga tiitritud kasvatusel omaga. Aga kui viimane ilmutas 36. tunnil platoole jõudmise märke, jätkas CaCO_3 -ga puhverdatud kasvatus endiselt piimhappe tootmist. See võib olla seletatav kääritud lõpp-produkti, piimhappe osalise väljasadenemisega kaltsiumisoolana. Väljasadenenud kaltsiumlaktat ei avalda rakkudele osmootset survet ja seega on piimhappe väljutamine tsütoplastist kergem. NH_4OH -ga neutraliseerimine oli antud tingimustes aga väheproduktiivne.



Joonis 23. Neutraliseerijate võrdlemine LL3-e näitel. Piimhappe teke CaCO_3 , NH_4OH ning NaOH-ga neutraliseeritud kasvatuses.

Vaadates graafikut, kus on kujutatud piimhappe tekkekiirust, on antud tingimustes parim neutraliseerija NaOH (vt joonis 24). NaOH-ga neutraliseeritud kasvatuses saavutati piimhappe tekkekiiruse haripunkt kümnendal tunnil. See ületas kaks korda CaCO_3 -ga puhverdatud kasvatusel tulemust. NH_4OH -ga neutraliseeritud kasvatusel graafik aga annab tunnistust inhibitsioonist. CaCO_3 -ga ning NH_4OH -ga neutraliseeritud kasvatusel piimhappe saagis kulunud glükoosi suhtes oli praktiliselt võrdne. Piimhappe keskmine tekkekiirus oli NaOH-ga tiitrimisel märgatavalt suurem (vt tabel 10).



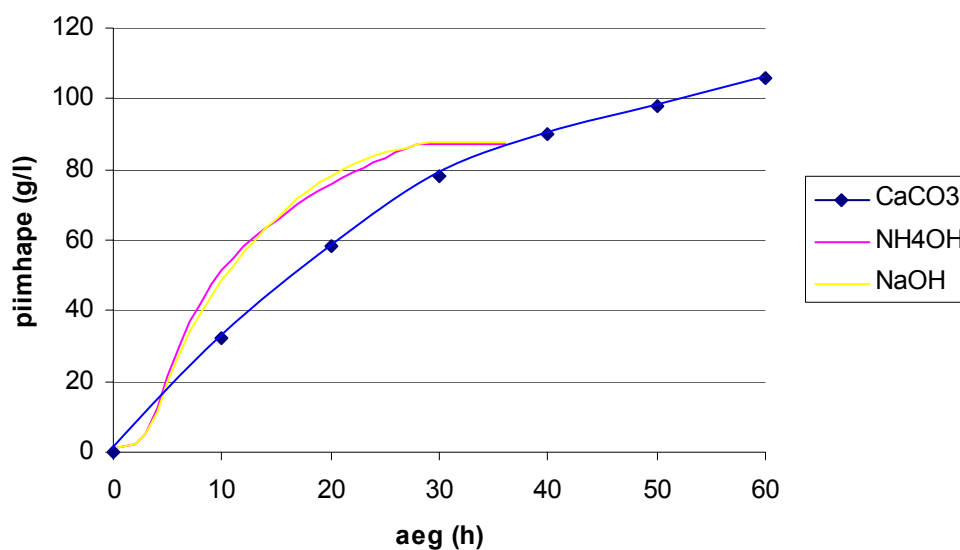
Joonis 24. Neutraliseerijate võrdlemine LL3-e näitel. Piimhappe tekkekiirus CaCO₃, NH₄OH ning NaOH-ga neutraliseeritud kasvatustes.

Tabel 10. Neutraliseerijate võrdlemine LL3-e näitel. Piimhappe keskmine tekkekiirus ning saagis 36 tunni jooksul CaCO₃, NH₄OH ning NaOH-ga neutraliseeritud kasvatustes.

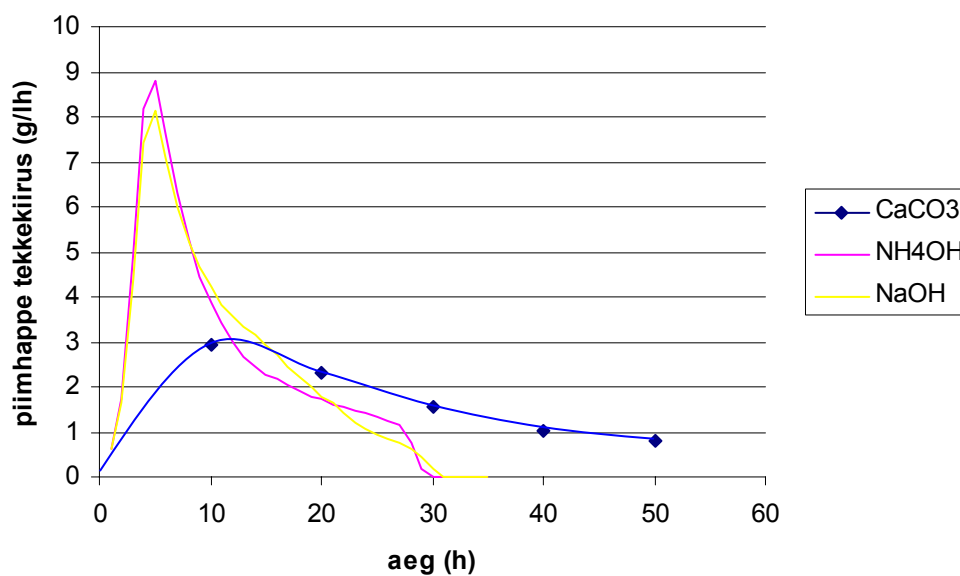
Neutraliseerija	Piimhappe keskmine tekkekiirus (g/lh)	Piimhappe saagis kulunud glükoosi suhtes (g/g)
CaCO ₃	1,66	1,01
NH ₄ OH	1,23	1,05
NaOH	2,09	1,22

BC7. Piimhappe tekkimise osas polnud BC7-e puhul suurt vahet, kas neutraliseerimiseks kasutati NaOH-d või NH₄OH-d. Vaid kasvatuste lõpuosas ilmses NaOH kasutamisel kerge inhibitsioon. Küll aga erines neist CaCO₃-ga puhverdatud kasvatuse tulemus (vt joonis 25). Kui tiitrimisega kindlal pH väärtusel hoitud BC7 suutis 30 tunni jooksul söötimest ära tarvitada kogu glükoosi, siis CaCO₃-ga puhverdatud kasvatuse piimhappe tootmine kulges aeglasemas tempos. Kuni 40. tunnini jäid selle kasvatuse tulemused teistele alla, hiljem aga tõus jätkus.

Piimhappe tekkekiirust hinnates oli optimaalseim neutraliseerija NH₄OH (vt joonis 26). Täiesti võrreldava tulemuse andis ka NaOH-ga tiitritud kasvatus. Seevastu CaCO₃-ga puhverdades küündis piimhappe tekkekiirus vaid kolmandikuni teiste neutraliseerijate omast, kuid saagis oli kõrgem (vt tabel 11).



Joonis 25. Neutraliseerijate võrdlemine BC7-e näitel. Piimhappe teke CaCO₃, NH₄OH ning NaOH-ga neutraliseeritud kasvatustes.

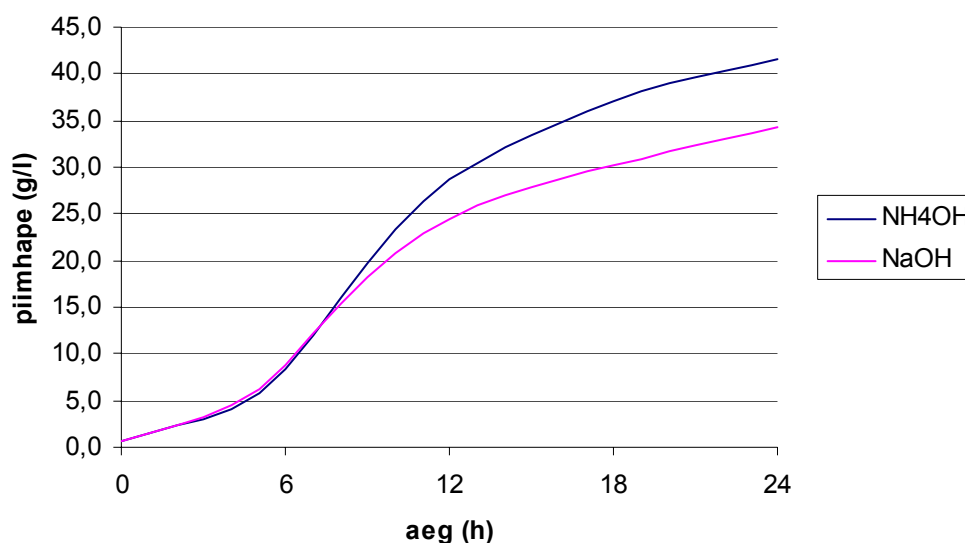


Joonis 26. Neutraliseerijate võrdlemine BC7-e näitel. Piimhappe tekkekiirus CaCO₃, NH₄OH ning NaOH-ga neutraliseeritud kasvatustes.

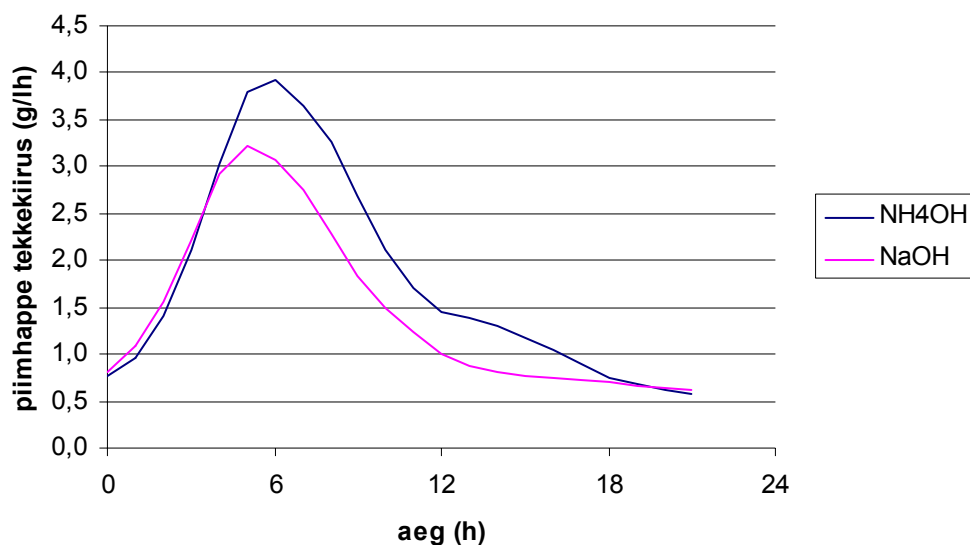
Tabel 11. Neutraliseerijate võrdlemine BC7-e näitel. Piimhappe keskmine tekkekiirus ning saagis 36 tunni jooksul CaCO₃, NH₄OH ning NaOH-ga neutraliseeritud kasvatustes.

Neutraliseerija	Piimhappe keskmine tekkekiirus (g/lh)	Piimhappe saagis kulunud glükoosi suhtes (g/g)
CaCO ₃	1,72	1,00
NH ₄ OH	2,46	0,99
NaOH	2,47	0,86

LL3. Kasutades kõrget glükoosi algkontsentratsiooni kasvas LL3 paremini NaOH-ga neutraliseerides. Kasvatades seda tüve 500 mM glükoosisaldusega MRS_1 söötmel (mida segati 100 p/minutis) pH 6,0 ning 45°C juures, neutraliseerides tekkivat piimhapet võrdlevalt NaOH ja NH₄OH-ga, oli tulemus vastupidine (vt joonis 27). Ka piimhappe tekkekiirust arvestades tuleks neis tingimustes neutraliseerijana eelistada NH₄OH-d (vt joonis 28). Biomassi määramisel saadud andmeid analüüsid selgus, et suuri erinevusi ei olnud, väikese edumaa saavutas NH₄OH-ga tiitritud kasvatus (vt tabel 12).



Joonis 27. Neutraliseerijate võrdlemine LL3-e näitel. Piimhappe teke 500 mM glükoosi kontsentratsiooniga MRS_1 söötmes NH₄OH ning NaOH-ga neutraliseeritud kasvatustes.



Joonis 28. Neutraliseerijate võrdlemine LL3-e näitel. Piimhappe tekkekiirus 500 mM glükoosi kontsentratsiooniga MRS_1 söötmes NH₄OH ning NaOH-ga neutraliseeritud kasvatustes.

Tabel 12. Neutraliseerijate võrdlemine LL3-e näitel. Biomassi teke MRS_1 söötmel NH₄OH ning NaOH-ga neutraliseeritud kasvatustes.

Aeg (h)	NH ₄ OH-ga neutraliseerides saavutatud biomass (g/l)	NaOH-ga neutraliseerides saavutatud biomass (g/l)
0	0,076	0,076
2	0,2	0,24
4	0,46	0,52
7	1,32	1,32
17	1,44	1,3
24	0,82	0,74

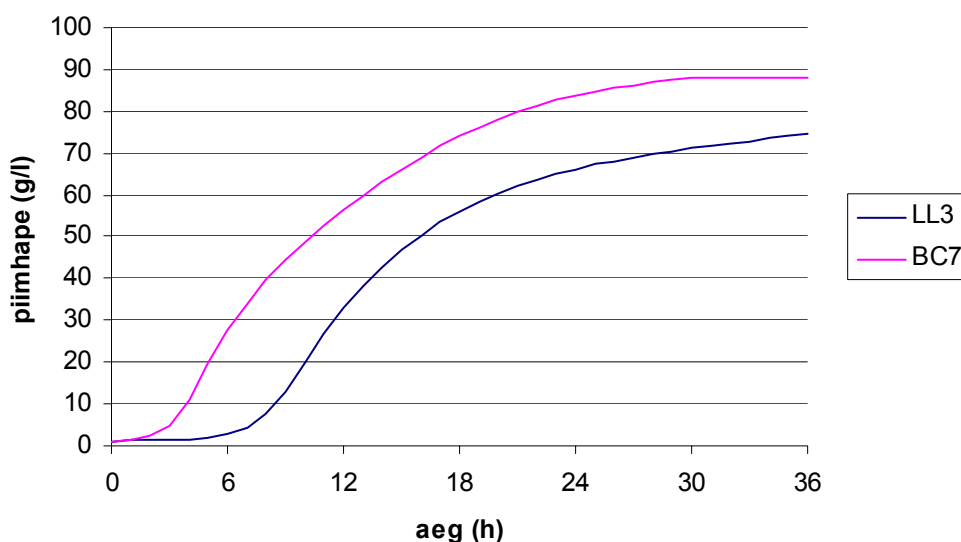
3.1.4. Tüvede võrdlemine neile sobivatel tingimustel

Teinud kindlaks piimhappe tootmiseks sobivad parameetrid, oli võimalik läbi viia järgmine etapp: kahe tüve produktiivsuse võrdlus erinevatel söötmetel ja täpsustada neutraliseerijate toimet nendele tüvedele.

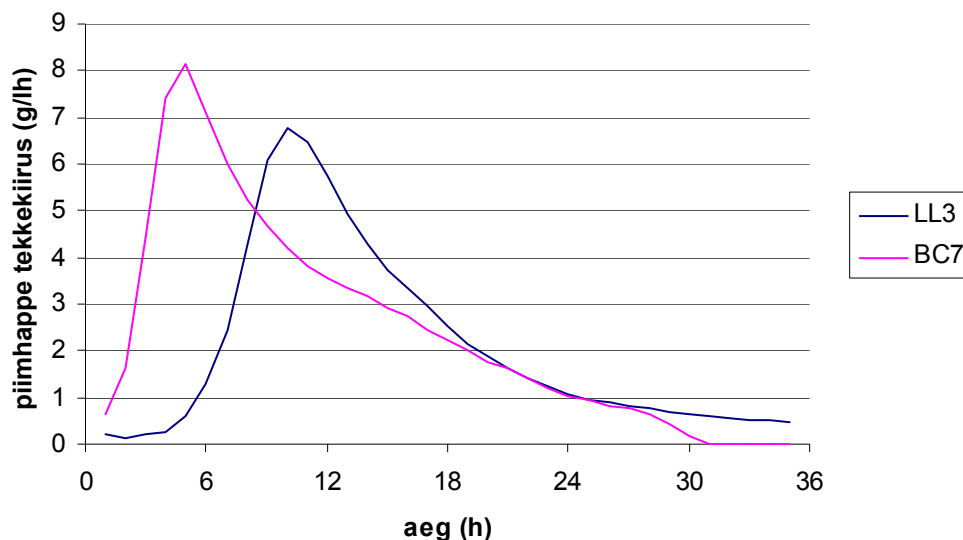
LL3-e ja BC7-e järgmine võrdluskatse toimus BC söötmes, mida segas magnetsegaja 100 p/min. Temperatuurid olid vastavalt 47°C ning 52°C. Naatriumhüdroksiidiga tiitrides hoiti pH taset vastavalt 6,0 ning 6,2. Piimhappe kontsentratsioon arvutati neutraliseerimiseks kulunud NaOH järgi. Lisaks võeti iga 12

tunni järel proovid piimhappe ning glükoosi määramiseks. Nende proovide põhjal on arvatud piimhappe saagis kulunud glükoosi suhtes.

Piimhappe tekkimist kajastavat graafikut vaadates ilmneb BC7-e paremus. See tüvi tootis 36 tunni jooksul rohkem piimhapet kui LL3 (vt joonis 29). Teiseks algas kääritamine praktiliselt paari tunni jooksul, samas kui LL3-e lag-faas kestis vähemalt kuus tundi. Ka piimhappe tekkekiiruse osas saavutas BC7 laktobatsilliga võrreldes parema tulemuse (vt joonis 30). Ta saavutas maksimaalse kiiruse juba 5. tunnil, s. t. viis tundi enne laktobatsilli. LL3-e piimhappe keskmine tekkekiirus jäi batsilli omale alla: 2 g/lh võrreldes 2,47 g/lh. Kuid ühes parameetri osas oli laktobastill batsillist üle – see oli piimhappe saagis kulunud glükoosi suhtes. Kui BC7-el jääb saagis 0,86 g/g piiridesse, siis LL3 annab arvutusliku väärtuse 1,22 g/g. Mõlema tüve produktsioonikõveraid iseloomustab väga väike piimhappe produktsioonikiirus kasvatuse viimases kolmandikus.



Joonis 29. LL3-e ja BC7-e võrdlus 700 mM glükoosi kontsentratsiooniga BC söötmes tüvedele sobival pH-l ning temperatuuril. Piimhappe teke.

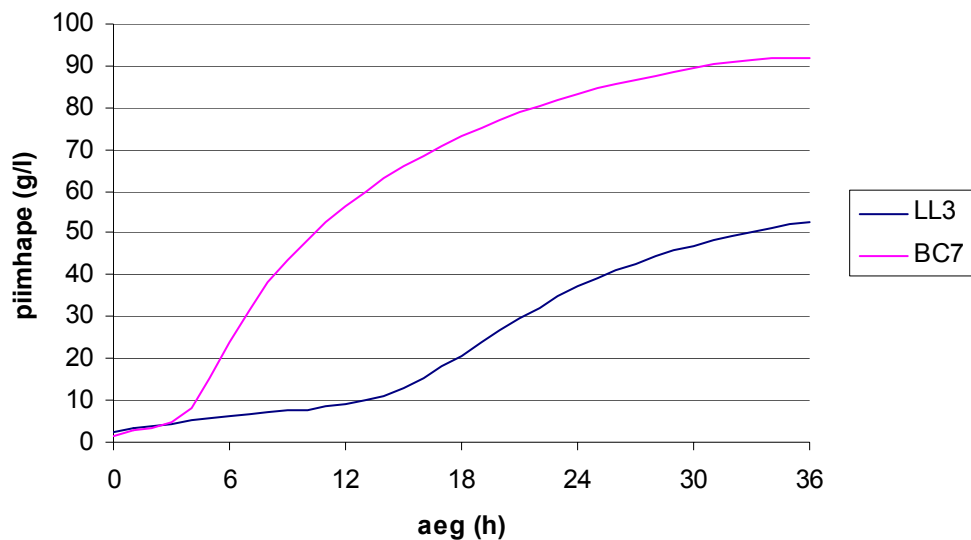


Joonis 30. LL3-e ja BC7-e võrdlus 700 mM glükoosi kontsentratsiooniga BC söötmes tüvedele sobival pH-l ning temperatuuril. Piimhappe tekkekiirus.

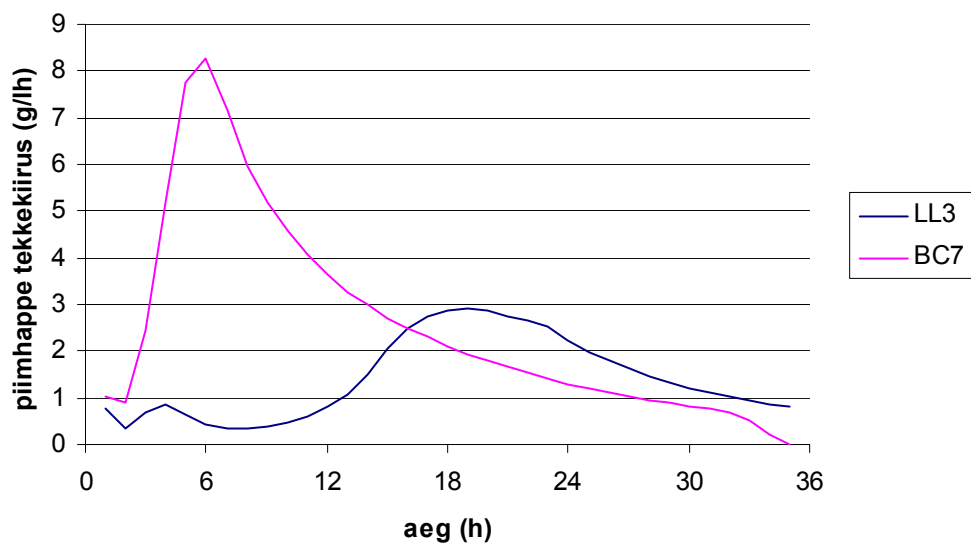
Varasemates optimeerimiskatsetes jäeti tähelepanuta tüvede nõuded kasvumeediumile, kasutades väga rikkaid, kommertsiaalsetel komponentidel põhinevaid söötmeid.

Järgmises võrdluskatses kasvatati tüvesid kummalegi sobival pH-l ning temperatuuril. Söötmes tõsteti glükoosi tase 700 mM-lt 800 mM-ni ning pärmiekstrakt asendati omavalmistatud pärmiautolüsaadiga. Materjali ja meetodika osas kannab see sööde nime BC_sp.

Kõrgem süsinikuallika kontsentratsioon ning lämmastikuallika vahetus mõjustas oluliselt LL3-e piimhappe teket. Selle kontsentratsioon hakkas tõusma alles peale 12. tundi. Samas BC7-e puhul niisugust inhibitsiooni ei täheldanud; 36. tunniks oli ta kogu glükoosi ära tarvitanud (vt joonis 31). Piimhappe tekkekiiruse graafikut vaadates selgus, et selles hinnale optimeeritud söötmes, mis sobis hästi BC7-e jaoks, polnud LL3-el mingit šanssi: inhibitsioon oli niivõrd tugev (vt joonis 32). Keskmine piimhappe tekkekiirus oli LL3-el 1,41 g/lh, mis oli 45% madalam võrreldes BC7-e saavutatud 2,57 g/lh-ga. Piimhappe saagis kulunud glükoosi suhtes oli suhteliselt sarnane, kuid batsilli kasuks: 0,94 g/g võrreldes 0,87 g/g.



Joonis 31. LL3-e ja BC7-e võrdlus 800 mM glükoosi kontsentratsiooniga BC_sp söötmes tüvedele sobival pH-l ning temperatuuril. Piimhappe teke BC7-e jaoks optimeeritud söötmes.

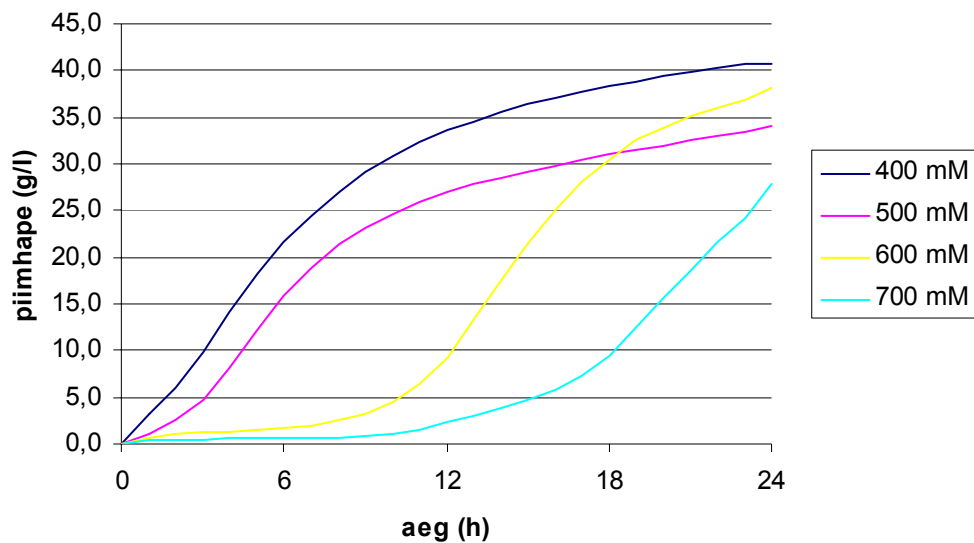


Joonis 32. LL3-e ja BC7-e võrdlus 800 mM glükoosi kontsentratsiooniga BC_sp söötmes tüvedele sobival pH-l ning temperatuuril. Piimhappe tekkekiirus BC7-e jaoks optimeeritud söötmes.

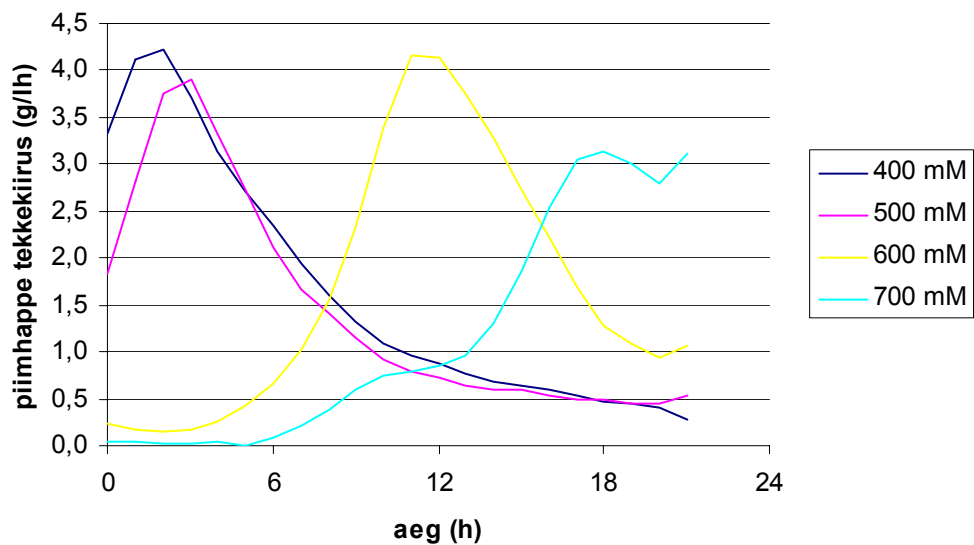
3.1.5. Glükoosi kontsentratsiooni mõju

Eelmises katseseerias avaldas glükoosi taseme tõstmine söötmes tugevat negatiivset mõju LL3-e piimhappe toodangule. Oletati, et kõrge suhkrute algkontsentratsioon on peamine LL3-e kasvu ja piimhappe produktsiooni inhibeeriv faktor. Järgnevates katsetes jälgiti glükoosi kontsentratsiooni mõju batsilli ning laktobatsilli piimhappe tootmisele.

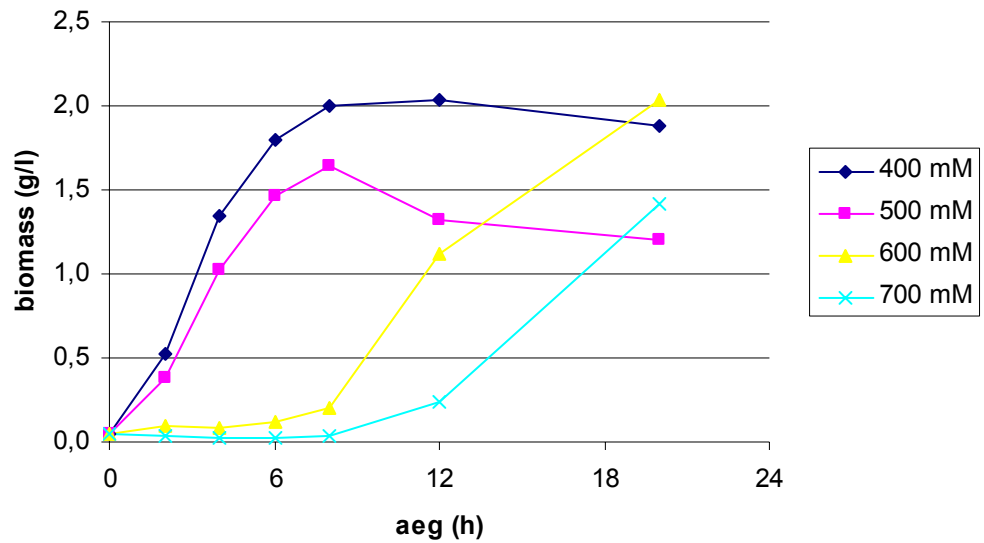
LL3. LL3-e rakke kasvatati 45°C juures MRS_1 söötmel pidevalt magnetsegajaga segades 100 p/min. Automaattitraatorid hoidsid NaOH-d tiitrides pH taset 6,0 piires. Neljas kasvatuspudelil oli erinev glükoosi algkontsentratsioon: 400 mM; 500 mM; 600 mM ning 700 mM. Erinev varasemast kasvatusmetoodikast oli ka eelkasvatuste kulg. Kui varem oli inokulumiks kasutatud kultuur eel-adapteeritud kõrgele, 700 mM glükoosi kontsentratsioonile ja pH oli reguleeritud CaCO₃-e kasutamisega, siis nüüd kasvatati rakke ette 800 mM glükoosi kontsentratsioonil aktiivse pH tiitrimisega, kasutades NaOH-d. Piimhappe tekke seisukohalt osutus parimaks 400 mM sööde. Eriti silmatorkav oli lag-faasi pikkuse sõltuvus glükoosi kontsentratsioonist (vt joonis 33). Ka piimhappe tekkekiiruse põhjal eelistas laktobatsill madalamat suhkrutaset. Kui 600 mM glükoosisisaldusega söötme puhul saavutati suurim tekkekiirus alles 12. tunnil, siis 400 mM puhul jäi see 4. tunni piirimaile (vt joonis 34). Biomassi juurdekasvu vaadates sai selgeks kõrgete glükoosi kontsentratsioonide inhibeeriv mõju LL3-e rakkudele. 600 mM ning 700 mM glükoos ei lasknud rakkudel kasvama hakata enne 6. tundi, samas madalamatel suhkrutasetel algas biomassi juurdekasv loetud tundide jooksul (vt joonis 35).



Joonis 33. Glükoosi kontsentratsiooni mõju LL3-ele. Piimhappe teke 400 mM; 500 mM; 600 mM ning 700 mM glükoosisaldusega MRS_1 söötmes.

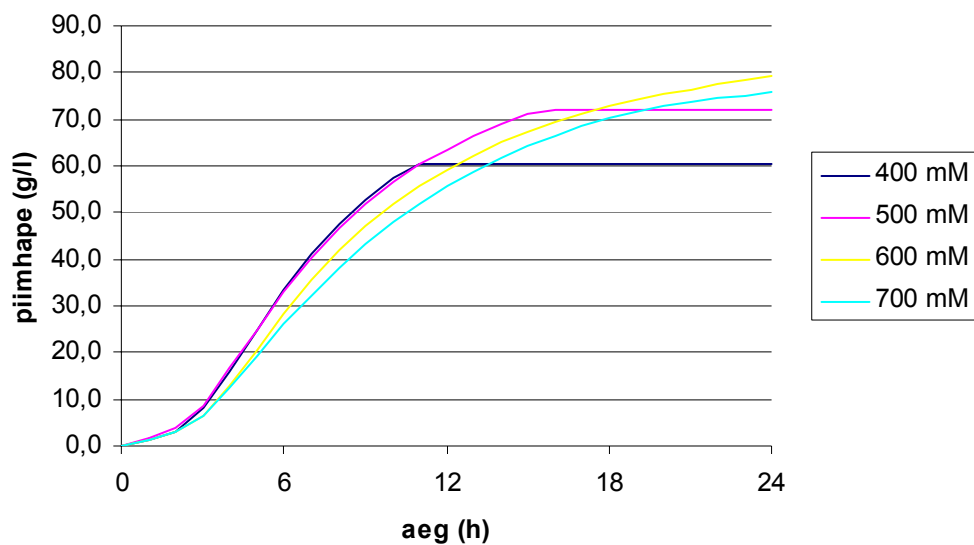


Joonis 34. Glükoosi kontsentratsiooni mõju LL3-ele. Piimhappe tekkekiirus 400 mM; 500 mM; 600 mM ning 700 mM glükoosisaldusega MRS_1 söötmes.

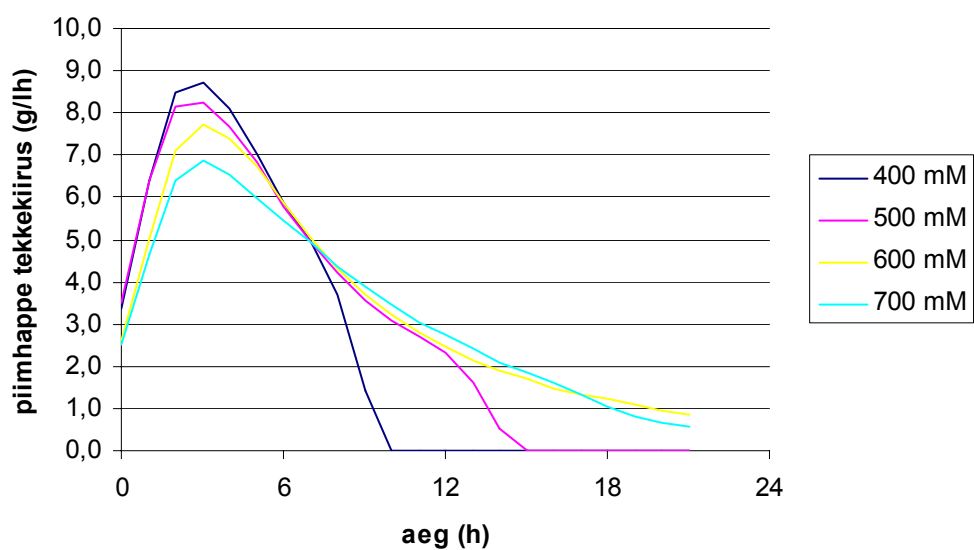


Joonis 35. Glükoosi kontsentratsiooni mõju LL3-ele. Biomassi teke 400 mM; 500 mM; 600 mM ning 700 mM glükoosisisaldusega MRS_1 söötmes.

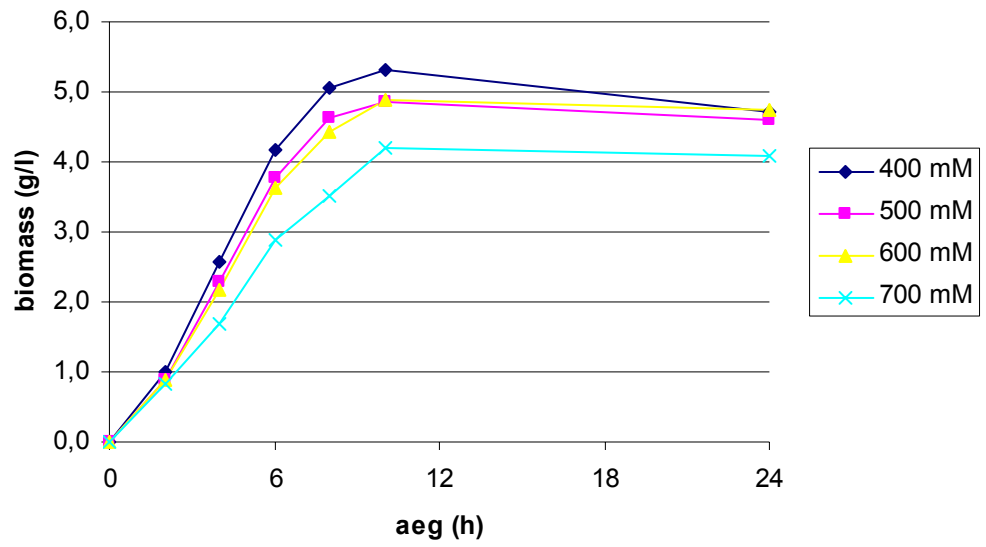
BC7. Antud katseseeria eelkasvatus toimus analoogselt LL3-e samalaadse kasvatusena. BC7 kasvas BC_1 söötmel, mida segati magnetsegajaga 100 p/min. Kasvatuspudeleid hoiti temperatuuril 55,5°C ning püsiv pH 6,2 saavutati neis NaOH-ga tiitrides. Glükoosi kontsentratsioon oli söötmes 400 mM; 500 mM; 600 mM või 700 mM. Loomulikult tarbis kogu suhkru ära ning jõudis platoole esimesena see kultuur, mille glükoosisisaldus oli kõige madalam. Vaadates aga produktsioonikõvera kuju ning tõusu, polnud olulist vahet 400 mM ning 500 mM glükoosi algkontsentratsiooniga kultuuridel. Mingit tugevat inhibitsiooni polnud märgata ka kõrgematel suhkru kontsentratsioonidel (vt joonis 36). Piimhappe tekkekiirust vaadates olid tulemused veelgi võrdväärsemad: kulminatsioon saabus kõigil 5. tunnil. Harja kõrgus ning kasvatuselõpuosa tulemused olid erinevamad (vt joonis 37). Biomass kasvas kõige kiiremini 400 mM glükoosi algkontsentratsiooniga söötmes kultiveerides, kuid ka siin olid tulemused sarnased (vt joonis 38). Glükoosi madalamad kontsentratsioonid olid küll eelistatud, kuid ka kõrgemad ei toonud kaasa märgatavat biomassi kasvu langust. Kokkuvõttes ei olnud BC7 glükoosi kontsentratsiooni muutuste suhtes nii tundlik kui LL3.



Joonis 36. Glükoosi kontsentratsiooni mõju BC7-ele. Piimhappe teke 400 mM; 500 mM; 600 mM ning 700 mM glükoosisaldusega BC_1 söötmes.



Joonis 37. Glükoosi kontsentratsiooni mõju BC7-ele. Piimhappe tekkekiirus 400 mM; 500 mM; 600 mM ning 700 mM glükoosisaldusega BC_1 söötmes.

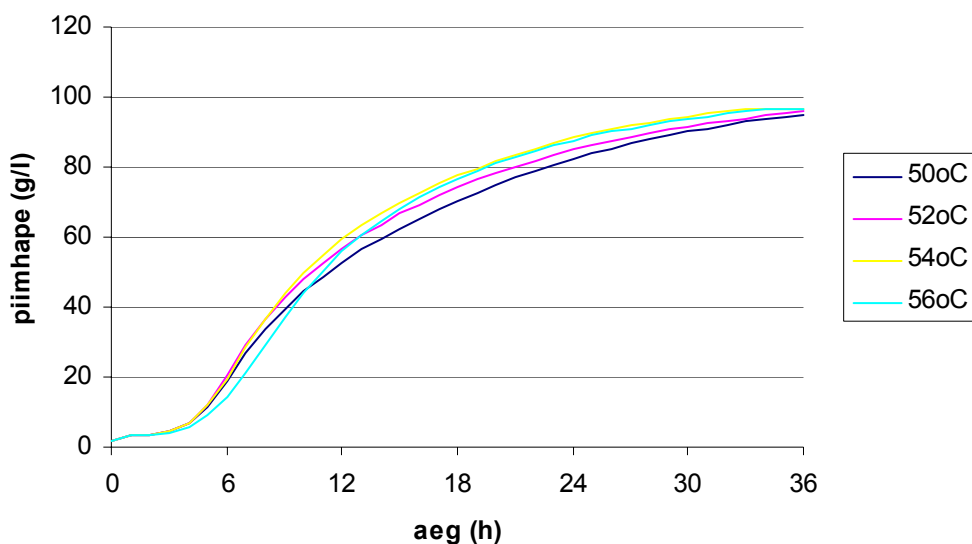


Joonis 38. Glükoosi kontsentratsiooni mõju BC7-ele. Biomassi teke 400 mM; 500 mM; 600 mM ning 700 mM glükoosisaldusega BC_1 söötmes.

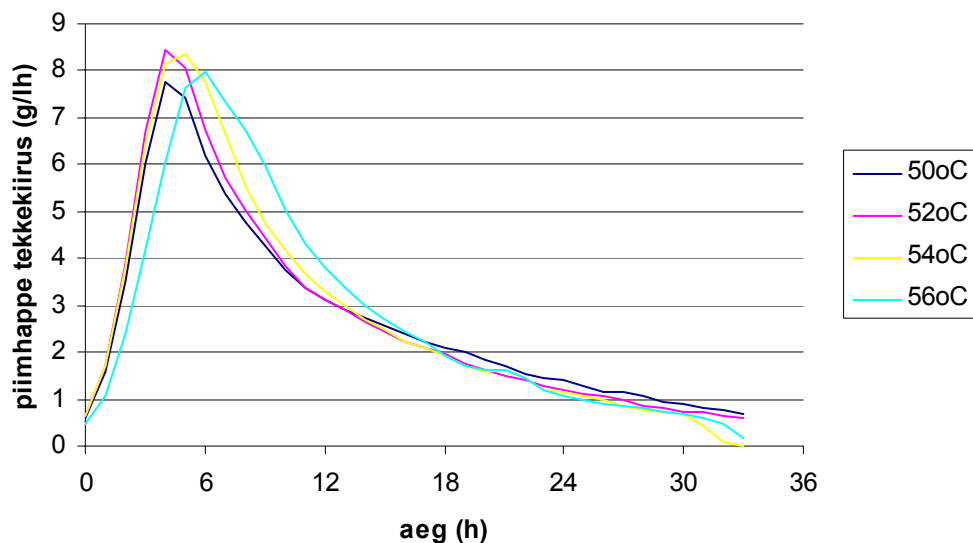
3.2. Arutelu

Bacillus coagulans SIM-7 on termofiilne L-laktaadi tootja, keda oleks võimalik rakendada kääritamisel tööstuslikus mastaabis. Tüve eripärade dokumenteerimiseks tuli läbi viia võrdluskatsed teiste piimhappebakteritega. Saavutatud tulemuste põhjal ületas *Bacillus coagulans* SIM-7 (DSM 14043) *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii* tüve DSM 20074 ning *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*'e tüve DSM 20073 mitme olulise parameetri poolest.

Piimhappe tootmiseks optimaalse temperatuuri otsimine CaCO₃-ga puhverdatud söötmes näitas BC7-e termofiilsust. Kui laktobatsillid saavutasid maksimaalse piimhappe kontsentratsiooni 47°C juures ning sellest kõrgematel temperatuuridel toimus järsk langus, siis BC7 saavutas haripunkti alles 52°C piiril. Peale seda hakkas piimhappe kontsentratsioon küll langema, kuid suhteliselt laugelt. Tegelikult oleks võimalik soodsates tingimuses temperatuuri optimum isegi 58°C viia.



Joonis 39. Optimaalse temperatuuri määramine BC7-e jaoks NaOH-ga tiitritud pH väärtusel 6,2. Piimhappe teke erinevatel temperatuuridel.



Joonis 40. Optimaalse temperatuuri määramine BC7-e jaoks NaOH-ga tiitritud pH väärtusel 6,2. Piimhappe tekkekiirus erinevatel temperatuuridel.

Nii näiteks kasvatades batsilli NaOH-ga tiitrides püsivalt pH 6,2 juures, suutis ta kõrgeima piimhappe kontsentratsioonini jõuda temperatuuril 54°C (vt joonis 39). Kuigi piimhappe tekkekiiruse graafiku järgi saavutas kõige parema tulemuse 52°C juures kasvanud kultuur, jõuti just kõrgematel temperatuuridel kõige varem glükoosi ammendumiseni (vt joonis 40).

Kui CaCO₃-ga neutraliseerimisel oli karbonaadi lahustuvuse, tüvele sobiva pH optimumi ja temperatuuri keerukate seoste tõttu optimaalseks temperatuuriks 52°C, aktiivsel tiitrimisel lahustuvate alustega oli saagis just kõrgematel temperatuuridel parem. Kõrgete temperatuuride (57 – 58°C) kasutamine eeldab selle väga hoolikat jälgimist, sest neis tingimustel aeglustub bakterite kasv juba väiksemagi ülekuumenemise tõttu. Tüve kasvu optimum on ilmselt mõne kraadi võrra madalamal kui kasvust mittesõltuva kääritusfaasi temperatuuri optimum.

Peale esimest etappi loobuti katsetest LD4-aga, kuna selle tüve piimhappe produktsiooni tulemused jäid ülejäänud kahele tüvele selgelt alla. Kui LL3 ja BC7 jõudsid mõlemad toota üle saja grammi liitris, siis LD4 küündis vaid pooleni sellest.

Piimhappe tootmiseks optimaalse pH leidmine osutus problemaatiliseks, kuna LL3 ei talunud standardse perioodilise kääritamise katsekorralduse juures ammoniumhüdrosiidiga tiitrimist. Kasutades neutraliseerijana naatriumhüdrosiidi, tuvastati et LL3 eelistas pH-d 6,0 ning BC7 6,2. Sealjuures tuleb tähele panna, et pH

kõikumine isegi 0,2 ühiku võrra muutis kardinaalselt LL3-e piimhappe tekkekiirust ning lõppkontsentratsiooni (vt jooniseid 19 ja 20). Samas oli BC7 tunduvalt tolerantsem: 36. tunniks saavutatud lõppkontsentratsioon jäi praktiliselt samaks pH vahemikus 5,8-6,4 (vt joonis 21).

Neutraliseerija valiku puhul ilmnes, madalamatel glükoosi kontsentratsioonidel ning rikkalikumas söötmes oli võimalik NH_4OH puhul kergemini ilmnevat inhibitsiooni vältida ning saada isegi NaOH-ga tiitritud kasvatustest paremaid tulemusi (vt joonis 27). Seega on NH_4OH kasutatav vaid järeltoitelise fermentatsiooni korral. NaOH kasutamisel on LL3-e osmootse rõhu taluvus millegipärast mõneti parem, kuid kas võimalus vältida järeltoitelist fermenteerimist kompenseerib joonisel 27 kujutatud produktiivsuste erinevust, on eraldi optimeerimisülesanne. Väga sobiv on LL3-e jaoks CaCO_3 -ga neutraliseerimine (vt joonis 23). Sel viisil õnnestub toota suhteliselt suure saagise juures piimhapet lõppkontsentratsioonini, mida teiste neutraliseerijate puhul ei saavutatud. Laktobatsilli madal pH optimum ja väike kasvukiirus sobivad antud neutraliseerimismeetodiga.

BC7-e puhul on neutraliseerijate valiku üle otsustamisel olukord teistsugune. CaCO_3 -e tarvitamine ei võimaldaks ära kasutada tüve kiiret kasvumist ja head produktiivsust. Kontrollides aktiivselt pH taset tiitrimisega, saavutati ühe ööpäevaga sama piimhappe lõppkontsentratsioon, kui CaCO_3 -ga puhverdades kahega (vt joonis 25). Kuigi NaOH ja NH_4OH käitusid BC7-e puhul fermentatsioonitsükli esimesel 2/3 sarnaselt, ilmneb käärituse viimasel kolmandikul NaOH kasutamisel produktsiooni kiirem "kustumine", võrreldes ammooniumhüdrosiidi kasutamisega. Selle tulemusena on NaOH puhul probleemiks kogu söötmes oleva glükoosi äratarvitamine. "Kustuv" produktsioonitsüklik kulub väga palju aega saavutamaks jääksuhkruteta laktaadilahust.

Võrreldes BC7-e ja LL3-e piimhappe produktiivsusi, ilmneb selge seaduspärasus. BC7-e kultuur kasvab kiiremini ja suurema rakutiheduseni kui LL3. Selle tulemusena on batsilli kultuuris rohkem piimhapet tootvaid rakke ja kultuuri piimhappe produktiivsus seega suurem. Kuna rakkude kasvuks kulutatakse aga rohkem süsinikku ja energiat, on BC7-e puhul saagis kulutatud glükoosi suhtes väiksem kui LL3-el.

Mis puutub võimet taluda erinevaid glükoosi kontsentratsioone, siis BC7 suutis elada ja piimhapet produtseerida laias vahemikus, ilma et suhkur oluliselt pärssima oleks hakanud (vt joonis 36). Seevastu LL3 ei suutnud taluda kõrgemaid glükoosi kontsentratsioone. Need tõid kaasa pika lag-faasi, biomassi kasv algas hilja. Kuna piimhappe teke sõltub otseselt tootvate rakkude hulgast, jäi pärssitud kasvuga kultuuri

produktsoon madalaks (vt joonis 35). Glükoosi kontsentratsiooni vähendades oli võimalik inhibitsiooni vältida.

Üldiselt osutus LL3 keskkonnatingimuste suhtes väga labiilseks. Juba inokulumi kasvatades tuli teda kaitsta hapniku eest. Spooride puudumine tähendas regulaarseid ümberkülve ning külmutatud säilituskultuuride tegemist. Ümberkülvide käigus ilmes veel üks ebameeldivus: pikk kohanemisperiood. Näiteks tavalisest kõrgem glükoosi kontsentratsioon söötmes ning pärmiekstrakti asendamine oma valmistatud pärmiautolüsaadiga venitas lag-faasi tosina tunni pikkuseks (vt joonis 31). Tüvi ilmutas tundlikkust osmootse šoki suhtes. Nende puuduste tõttu tuli ette juhtumeid, kus BC7 kontamineeris LL3-e kultuuri. Vastupidist ei juhtunud aga iialgi.

Töö käigus ilmnisid mitmed BC7-e tugevad küljed. Äärmiselt kasulikuks osutus termofiilsus. Autoklaavimisest ning teistest steriilimismeetoditest võis loobuda. Kontaminatsioonist tingitud katsete ebaõnnestumist pole siiani esinenud. Arvestades potentsiaalset kasutamist tööstusliku tüvena, tähendas see võimalust kokku hoida steriilimiskulutuste arvelt. Võime taluda neutraliseerijana nii ammonium- kui ka naatriumhüdroksiidi vastas samuti tööstuse huvidele, kuna see muudaks tootmisprotsessi paindlikumaks. Sobiv oli ka suhteliselt lai pH vahemik, kus piimhappe toodang praktiliselt samaks jäi. Kõigi eelpool mainitud omaduste tõttu aklimatiseerus BC7 suhteliselt hästi: lag-faas oli võimalik lühendada alla kolme tunni. Isegi glükoosi kontsentratsioonidel, mis mõjusid inhibeerivalt LL3-e peale, suutis ta kohe kasvatusel alguses paljunema hakata, mis omakorda võimaldas kiiret piimhappe produktsiooni.

KOKKUVÕTE

Piimhappe mikrobioloogilisel tootmisel rakendatakse eelistatult klassikalisi piimhappebaktereid. Aga kuna tööstusliku piimhappe puhul pole maitse ega lõhn enam olulised, on hakatud otsima uusi produtsente, mis toodaksid kõrgetel temperatuuridel ühte puhast piimhappe optilist isomeeri. Antud tingimusele vastavat *Bacillus coagulans* SIM-7 (DSM 14043) võrreldi käesolevast töös kahe laktobatsilliga: *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii* (DSM 20074) ning *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* (DSM 20073).

Esmalt tehti kindlaks uuritavate tüvede piimhappe tootmiseks sobivad parameetrid neutraliseerides kasvukeskkonda CaCO_3 -ga. Laktobatsillide temperatuurioptimum piimhappe produktsiooniks oli 47°C , samas kui batsill saavutas parima produktiivsuse temperatuuril 52°C . Et *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii* (DSM 20074) piimhappe tootlikkus oli teistest poole väiksem, elimineeriti see tüvi edasistest võrdlustest. pH optimaalne väärtus tüvel *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* (DSM 20073) oli 6,0 ning tüvel *Bacillus coagulans* SIM-7 (DSM 14043): 6,2.

Saadud tulemused näitasid, et tüve *Bacillus coagulans* SIM-7 (DSM 14043) eelised võrreldes *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*'ega (DSM 20073) on järgmised.

1. Tüvi on termofiilsem.
2. Talub kõrget osmootset rõhku.
3. Talub kääritamisel hästi hapnikku, on aeroobsetes tingimustes kiire kasvuga.

Sellest tulenevalt on tüve *Bacillus coagulans* SIM-7 (DSM 14043) perioodilises kultuuris kääritades võimalik erinevate neutraliseerijate manulusel saavutada kõrgeid piimhappe lõppkontsentratsioone. Tüve puhul on inokulumi käitlemine lihtne ja puudub vajadus söötmete steriilimiseks. Tüve produktiivsus säilib laiemas temperatuuri ja pH vahemikus kui *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*'el (DSM 20073). Tänu kiiremale kasvule ja kultuuri suuremale tihedusele on *Bacillus coagulans* SIM-7 (DSM 14043) piimhappe kääritustsükkel umbes 1/3 võrra lühem.

Järelikult sobib *Bacillus coagulans* SIM-7 (DSM 14043) hästi piimhappe tööstuslikuks produtsendiks.

SUMMARY

Usually lactic acid bacteria (LAB) are used to produce lactic acid microbiologically. Nowadays for chemical industry new thermophilic strains are searched to produce optically pure lactic acid isomers. In the present paper that kind of bacterium *Bacillus coagulans* SIM-7 (DSM 14043) was compared to two lactobacilli: *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii* (DSM 20074) and *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* (DSM 20073) in this paper.

Growth parameters for production of lactic acid by these bacteria were determined in the medium neutralized with CaCO₃. Optimal temperature of lactic acid production for lactobacilli was 47°C, meanwhile bacillus obtained best results at 52°C. Due to low production of lactic acid *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii* (DSM 20074) was eliminated from further study. So optimal pH was determined for the two strains only – *Bacillus coagulans* SIM-7 (DSM 14043): 6.2 and *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* (DSM 20073): 6.0.

Results obtained showed that advantages of *Bacillus coagulans* SIM-7 (DSM 14043) compared with *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* (DSM 20073) are the following.

1. Strain is more thermophilic.
2. Tolerates high osmotic pressure.
3. During fermentation tolerates oxygen, growth is fast at aerobic conditions.

So *Bacillus coagulans* SIM-7 (DSM 14043) can produce high concentrations of lactic acid in batch cultures neutralized with different neutralizers. Treatment of inoculum is simple and there is no need to sterilize medium. Productivity of the strain remains stable in wider range of temperature and pH than *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* (DSM 20073) can stand. As a result of faster growth and bigger density of the culture of *Bacillus coagulans* SIM-7 (DSM 14043) the cycle of fermentation of is 1/3 shorter.

Therefore we suggest *Bacillus coagulans* SIM-7 (DSM 14043) as an industrially suitable producer of lactic acid.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Amrane, A., Prigent, Y. (1997) Growth and lactic acid production coupling for *Lactobacillus helveticus* cultivated on supplemented whey: influence of peptidic nitrogen deficiency. *Journal of Biotechnology*. **55**:1-8.
- Amrane, A., Prigent, Y. (1998) Influence of yeast extract concentration on batch cultures of *Lactobacillus helveticus*: growth and production coupling. *World J. of Microbiol Biotechnol.* **14**: 529-534.
- Åkerberg, C., Hofvendahl, K., Zacchi, G., Hahn-Hägerdal, B. (1998) Modelling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentrations on the kinetics of lactic acid production by *Lactococcus lactis ssp. lactis* ATCC 19435 in whole-wheat flour. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **49**: 682-690.
- Åkerberg, C., Zacchi, G. (2000) An economic evaluation of the fermentative production of lactic acid from wheat flour. *Bioresource Technology*. **75**: 119-126.
- Bauchop, T., Eldsen, S.R. (1960) The growth of microorganisms in relation to their energy supply. *J. Gen. Microbiol.* **23**: 469-475.
- Cooper, B., Kuesters, W., Martin, C., Siegel, H. (1983) Verfälschung zur Herstellung optisch reiner D- oder L-Milchsäure. *Eur. Pat. Appl. Patent*. EP 00720101983: A2.
- Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (1997) *Food Microbiology*, Washington DC, ASM Press.
- Gonçalves, L.M.D., Ramos, A., Almeida, J.S., Xavier, A.M.R.B., Carrondo, M.J.T. (1997) Elucidation of the mechanism of lactic acid growth inhibition and production in batch cultures of *Lactobacillus rhamnosus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **48**: 346-350.

- Gonçalves, L.M.D., Xavier, A.M.R.B., Almeida, J.S., Carrondo, M.J.T. (1991) Concomitant substrate and product inhibition kinetics in lactic acid production. *Enzyme and Microbial Technology*. **13**: 314-319.
- Gonzalez, M.I. (1996) The Biotechnological utilization of cheese whey: a Review. *Bioresource Technology*. **57**: 1-11
- Guyot, J.P., Calderon, M., Morlon-Guyot, J. (2000) Effects of pH control on lactic acid fermentation of starch by *Lactobacillus manihontivorans* LMG 18010^T. *Journal of Applied Microbiology*. **88**: 176-182.
- Gätje, G., Gottschalk, G. (1991) Limitation of growth and lactic acid production in batch and continuous cultures of *Lactobacillus helveticus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **34**: 446-449.
- Hammes, W.P., Weiss, N., Holzapfel, W. (2004) *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbial Community*, III edition, New York, Springer-Verlag. <http://link.springer-ny.com/link/service/book/10125/>.
- Heinaru, E., Talpsep, E. (1998) *Mikrobioloogia praktikum*. Tartu, AS Atleks.
- Herbian, V., Šturdik, E., Zalibera, L., Matuš, P. (1993) Process and metabolic characteristics of *Bacillus coagulans* as a lactic acid producer. *Letters in Applied Microbiology*. **16**: 243-246.
- Hofvendahl, K., Åkerberg, C., Zacchi, G., Hahn-Hägerdal, B. (1999) Simultaneous enzymatic wheat saccharification and fermentation to lactic acid by *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **52**: 163-169.
- Hofvendahl, K., Hahn-Hägerdal, B. (1997) L-lactic acid production from whole wheat flour hydrolysate using strains of *Lactobacilli* and *Lactococci*. *Enzyme and Microbial Technology*. **20**: 301-307.

- Hofvandahl, K., Hahn-Hägerdal, B. (2000) Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*. **26**: 87-107.
- Hofvendahl, K., van Niel, E.W., Hahn-Hägerdal, B. (1999*) Effect of temperature and pH on growth and product formation of *Lactococcus lactis ssp. lactis* ATCC 19435 growing on maltose. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **51**: 669-672.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H., Staley, J.T., Williams, S.T. (1994) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, IX edition, Baltimore, Williams & Wilkins.
- Hujanen, M., Linko, Y.-Y. (1996) Effect of temperature and various nitrogen sources on L(+)-lactic acid production by *Lactobacillus casei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **45**: 307-313.
- Javanainen, P., Linko, Y.-Y. (1995) Lactic acid fermentation on barley flour without additional nutrients. *Biotechnol. Tech.* **9**: 543-548.
- Jay, J.M. (1986) *Modern Food Microbiology*, III edition, New York, Van Nostrand Reinhold.
- Jõgi, E. (2004) *Isiklikud andmed*.
- Kandler, O., Weiss, N. (1986) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, IX edition, Baltimore, Williams & Wilkins.
- Kashket, E.R. (1987) Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiology Reviews*. **46**: 233-244.
- Kwon, S., Lee, P.C., Chang, Y.K., Chang, N. (2000) Production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* with vitamin-supplemented soybean hydrolysate. *Enzyme and Microbial Technology* **26**: 209-215.

- Litchfield, J.H. (1996) Microbiological production of lactic acid. In: *Advances in Applied Microbiology*, Academic Press.
- Lopp, H. (2004) *Isiklikud andmed*.
- Lowry, O.N., Rosenbrough, A., Farr, K., Randall, K. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **36**: 265-275.
- de Man, J.C., Rogosa, M., Sharpe, M.E. (1960) A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*. **23**: 130-135.
- Malsub, T. (2003) *Bacillus coagulans* SIM-7 alternatiivsed metabolismirajad. Bakalaureusetöö. Tartu Ülikool.
- Medijainen, L. (2002) Bakteri *Bacillus coagulans* SIM-7 kasvu ja laktaadi produktsiooni sõltuvus kasvumeediumi pH-st. Magistritöö biokeemia alal. Tartu Ülikool.
- Michelson, T. (2003) Produktiivsusele optimeeritud fermentatsioon *Bacillus coagulans* tüvega SIM-7. Magistritöö geneetika erialal. Tartu Ülikool.
- Nakajima, H., Kunji, E.R.S., Poolman, B., Konings, W.N. (1998) Amino acid transport In *Lactobacillus helveticus*. *FEMS Microbiology Letters*. **158**: 249-253.
- Nannen, N.L., Hutkins, R.W. (1991) Intracellular pH effects in lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*. **74**: 741-746.
- Niel, van, E.W.J., Hahn-Hägerdal, B. (1999) Nutrient requirement of lactococci in defined growth media. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **52**: 617-627.
- Nurk, A. (2002) *Isiklikud andmed*.

- Ohara, H., Yahata, M. (1996) L-lactic acid production by *Bacillus sp.* in anaerobic and aerobic culture. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. **81**: 272-274.
- Passos, F.P., Fleming, H.P., Ollis, D.F., Felder, R.M., McFeeters, R.F. (1994) Kinetics and modeling of lactic acid production by *Lactobacillus planarum*. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**: 2627-2636.
- Payot, T., Chemaly, Z., Fick, M. (1999) Lactic acid production by *Bacillus coagulans* – Kinetic studies and optimization of culture medium for batch and continuous fermentations. *Enzyme and Microbial Technology*. **24**: 191-199.
- Ross, R.P., Morgan, S., Hill, C. (2002) Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*. **79**: 3-16.
- Schepers, A.W., Thibault, J., Lacroix, C. (2002) *Lactobacillus helveticus* growth and lactic acid production during pH-controlled batch cultures in whey permeate/yeast extract medium. PartII: kinetic modeling and model validation. *Enzyme and Microbial Technology*. **30**: 187-194.
- Simisker, J., Nurk, A., Heinaru, A. (2002) Thermophilic microorganism *Bacillus coagulans* strain SIM-7 DSM 14043 for the production of L(+)-lactate from fermentable sugars and by means named microorganisms. PCT WO 02/074934 A1.
- Stiles, M.E., Holzapfel, W.H. (1997) Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*. **36**: 1-29.
- Tango, M.S.A., Ghaldy, A.E. (1999) Kinetic modeling of lactic acid production from batch submerged fermentation of cheese whey. *Transactions of the ASAE*. **42**: 1791-1800.
- Venkatesh, K.V., Okos, M.R., Wankat, P.C. (1993) Kinetic model of growth and lactic acid production from lactose by *Lactobacillus bulgaricus*. *Process Biochemistry*. **28**: 231-241.

Yeh, P.L.-H., Bajpai, R.K., Iannot, E.L. (1991) An improved kinetic model for lactic acid fermentation. *J. Ferment. Bioeng.* **71**: 75-77.