

TARTU ÜLIKOOL
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
GENEETIKA ÕPPETOOL

Karin Kask

**Laktaadi tootmine *Bacillus coagulans* SIM-7 DSM
14043 vegetatiivsete rakkude ning spooridega**

Magistritöö

Juhendajad: Allan Nurk, Ph. D.
dots. Andres Mäe, Ph. D.
Eerik Jõgi, M. Sc.

TARTU 2007

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1. Piimhappe tootmine bakteriaalsel fermentatsioonil	6
1.1.1. Piimhappe produtsendid	7
1.1.2. Piimhapekäärimine	8
1.1.3. Kultiveerimisviisid	9
1.1.4. Süsinikuallikad	10
1.1.5. Lämmastikallikad ja kasvufaktorid	11
1.1.6. Perekonna <i>Bacillus</i> esindajad laktaadi produtsentidena	12
1.1.6.1. <i>Bacillus coagulans</i> SIM-7	14
1.2. Sporuleeruva bakteri elutsükkel	14
1.2.1. Sporulatsioon	15
1.2.2. Vegetatiivse raku moodustumine	17
1.3. Osmootne stress	18
1.4. Uurimistöö eesmärgid	20
2. MATERJAL JA METOODIKA	22
2.1. Kasutatud bakteritüvi	22
2.2. Kasutatud söötmed	22
2.3. Spooride puhastamine	23
2.4. Osmotolerantsuse hindamine	23
2.5. Kasvatuste korraldus	25
2.6. Kasvatuste inokuleerimine	25
2.7. Spooride idanemise ja väljakasvu jälgimine	25
2.8. Biomassi kontsentratsiooni määramine	26
2.9. Glükoosi kontsentratsiooni määramine	26
2.10. Andmetöötlus	26
3. TULEMUSED JA ARUTELU	28
3.1. Glükoosi algkontsentratsiooni mõju <i>B. coagulans</i> SIM-7 kasvule ja laktaadi produktsioonile	28

3.1.1. Laktaadi lõppkontsentratsioon	28
3.1.2. Fermentatsioonitsükli kestus	29
3.1.3. Laktaadi tekkekiirus	30
3.1.4. Laktaadi saagis	32
3.1.5. Biomass	33
3.2. <i>B. coagulans</i> SIM-7 vegetatiivsete rakkude ja spooride osmotolerantsus	35
3.3. Piimhappe tootmine <i>B. coagulans</i> SIM-7 aktiveeritud spooridega	38
3.3.1. Spooride idanemistingimuste optimeerimine kääritusprotsessis I	39
3.3.2. <i>Bacillus coagulans</i> SIM-7 spooride idanemine	42
3.3.3. Spooride idanemistingimuste optimeerimine kääritusprotsessis II	44
3.3.4. Piimhappe tootmine 126 g/l glükoosi algkontsentratsiooniga söötmes	47
3.4. Piimhappe tootmine <i>B. coagulans</i> SIM-7 puhastamata spooridega	51
3.4.1. Piimhappe tootmine 45 g/l glükoosi algkontsentratsiooniga söötmes	51
3.4.2. Piimhappe tootmine 126 g/l glükoosi algkontsentratsiooniga söötmes	54
KOKKUVÕTE	57
SUMMARY	59
KASUTATUD KIRJANDUS	61

KASUTATUD LÜHENDID

<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
BP	bisfosfaat
CFU/ml	<i>colony forming unit per ml</i>
DPA	dipikoliinhape
<i>Ec.</i>	<i>Enterococcus</i>
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
L _c	laktaadi lõppkontsentratsioon (g/l)
LDH	laktaadi dehüdrogenaas
MOPS	3-(N-morfoliin)propaansulfoonhape
OD	optiline tihedus
PDH	püruvaadi dehüdrogenaas
PFL	püruvaadi formiaadi lüaas
P	fosfaat
P _k	keskmise laktaadi produktiivsus fermentatsioonitsükli (g/lh)
P _{max}	maksimaalne laktaadi produktiivsus fermentatsioonitsükli (g/lh)
P _{maxT}	maksimaalse laktaadi produktiivsuse saavutamiseks kulunud aeg (h)
SASP	<i>small acid-soluble protein</i>
<i>R.</i>	<i>Rhizopus</i>
rpm	<i>rotations per minute</i>
SDS	naatrium-dodetsüülsulfaat
SIM-7	<i>Bacillus coagulans</i> SIM-7 DSM 14043
SIS	sporulatsiooni indutseeriv sööde
spoorid glc ⁺	glükoosi juuresolekul idanenud spoorid
spoorid glc ⁻	glükoosi juuresolekuta idanenud spoorid
T	fermentatsioonitsükli kestus (h)
Tris	Tris(hüdrometüül)aminometaan
YE	pärmiekstrakt

SISSEJUHATUS

Piimhape, mida laialdaselt kasutatakse toiduainetööstuses, on leidnud viimasel ajal üha enam rakendust ka teistes tööstusvaldkondades. Suurenenud laktaadinõudluse rahuldamiseks ja tööstusliku tehnoloogia kaasajastamiseks, sealhulgas tootmise keskkonnasäästlikumaks muutmiseks, üritatakse leida uusi piimhappe produtsente.

Seni on piimhappe tootmiseks bakteriaalsel fermentatsioonil kasutatud enamasti klassikalisi piimhappebaktereid perekonnast *Lactobacillus*, *Lactococcus*, kuid järjest enam leidub andmeid perekonna *Bacillus* esindajate võimalikust rakendamisest piimhappe tootmisel. Viimastel on klassikaliste piimhappebakterite ees mitmeid eeliseid. Perekonnast *Bacillus* on leitud termofiilseid piimhappet produtseerivaid tüvesid, mis võimaldavad vähendada kulutusi kasvukeskkonna steriilsuse tagamiseks. Lisaks termofiilsusele pole *Bacillus*'e tüved toitainete suhtes nii nõudlikud kui traditsioonilised piimhappebakterid ning *Bacillus*'te sporuleerumisvõime lihtsustab säilituskultuuride hoidmist ja fermentatsioonikeskkonna inokuleerimist.

Kui teaduskirjandust *Bacillus*'te vegetatiivsete rakkude rakendamisest laktaadi tootmisel on niigi minimaalselt, siis *Bacillus*'e spooridega fermentatsioonikeskkonna inokuleerimisest on veel vähem andmeid. Sellest tulenevalt oli käesoleva uurimistöo üheks eesmärgiks selgitada välja fermentatsioonisöötmes oleva glükoosi algkontsentratsiooni mõju laktaadi produktsioonile, kasutades inokulumina *Bacillus coagulans* SIM-7 vegetatiivseid rakke. Teiseks eesmärgiks oli uurida *Bacillus coagulans* SIM-7 vegetatiivsete rakkude ja spooride osmotolerantsust, kasutades keskkonna osmootse rõhu tõstmiseks nii NaCl kui ka glükoosi. Kolmandaks, uurida *Bacillus coagulans* SIM-7 spooride rakendamisvõimalusi fermentatsioonisöötme inokuleerimiseks ja efektiivseks laktaadi tootmiseks.

Olen tänulik kõigile, kes mulle selle töö kirjutamisel ja katsete läbiviimisel abiks olid.

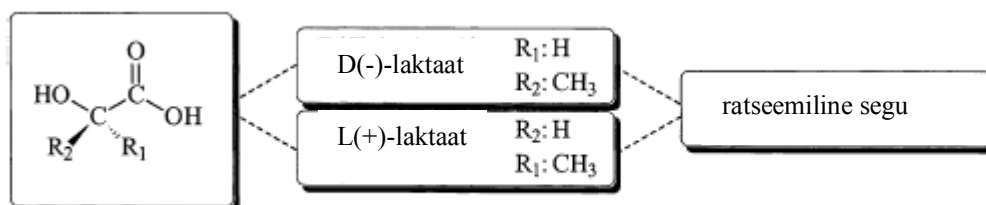
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Piimhappe tootmine bakteriaalsel fermentatsioonil

Laktaat ehk piimhape ehk 2-hüdroksü-propaanhape on looduses kõige laiemalt levikuga karboksüülhape, mille isoleeris esmakordselt Rootsi keemik C. W. Scheele 1780. aastal piimast (Narayanan *et al.*, 2004; Panesar *et al.*, 2007). Kommertsiaalne piimhappe tootmine algas 1881. aastast C. E. Avery eestvõttel USA-s (Litchfield, 1996).

Oma mitmekülgse tõttu on laktaat laialt kasutusel toiduaine-, farmaatsia-, naha-, tekstiili-, kosmeetika- ja keemiatööstustes (Hofvendahl ja Hahn-Hägerdal, 2000; Litchfield, 1996; Narayanan *et al.*, 2004). Lisaks tõuseb laktaadi ülemaailmne tootmine tänu polülaktaadist valmistatava biodegradeeruva plastiku kasvavale turule (van Maris *et al.*, 2004). Hetkel on laktaadinõudlus 130 000 – 150 000 tonni aastas (Rojan *et al.*, 2007).

Kuna piimhappe molekulis on üks asümmeetriline süsiniku aatom, esineb laktaat kahe optilise isomeerina, D(-)- ja L(+)-laktaadina (joonis 1) (Hujanen ja Linko, 1996).



Joonis 1. Laktaadi isomeerid: D(-)-laktaat ja L(+)-laktaat ning ratseemiline segu (LD-laktaat) (Södergard ja Stolt, 2002).

Tänapäeval toodetakse kogu maailmas umbes 90% piimhapest bakteriaalsel fermentatsioonil ning ülejäänud sünteetiliselt laktonitriili hüdrolüüsil. Eelistatult kasutatakse piimhappe fermentatiivset tootmist, sest sünteetilisel tootmisel tekib alati piimhappe ratseemiline segu - LD-laktaat (Panesar *et al.*, 2007). Piimhappe tootmine bakteriaalsel fermentatsioonil võimaldab toota ühte kindlat optiliselt puhast isomeeri või ratseemilist segu olenevalt sellest, millist bakteritüve kasutatakse. Mikrobioloogilise fermentatsiooni eeliseks on ka see, et substraadina on võimalik kasutada odavaid polüsahhariidseid põllumajanduslikke toormeid (Hofvendahl ja Hahn-Hägerdal, 2000; Rojan *et al.*, 2007).

1.1.1. Piimhappe produtsendid

Piimhappe produtsentidena käsitletakse mikroorganisme, kes fermenteerivad suhkruid peamise lõpp-produktina piimhappeks. Looduslikult leidub neid toitaineterikastes keskkondades, kuna nende biosünteesivõime on piiratud. Piimhappebakterid, keda juba iidsetest aegadest on kasutatud toitude kääritamisel, olid ühed esimesed mikroorganismid, kes võeti kasutusele toiduainetööstuses (Hofvendahl ja Hahn-Hägerdal, 2000).

Piimhappebakterid on fülogeneetiliselt mitmekesine organismide rühm, mille tuumiku moodustavad bakterid perekondadest *Lactococcus*, *Lactobacillus* (*Lb.*), *Leuconostoc*, *Pediococcus* ja *Streptococcus*. Lisaks kuuluvad laktaati tootvate mikroorganismide hulka bakterid perekondadest *Aerococcus*, *Bacillus* (*B.*), *Carnobacterium*, *Enterococcus* (*Ec.*), *Oenococcus*, *Saccharococcus*, *Sporolactobacillus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* (Hofvendahl ja Hahn-Hägerdal, 2000; Liu, 2003; Panesar *et al.*, 2007). Piimhapet toodavad ka toitainete suhtes vähenõudlikud ja happetolerantsed hallitusseened perekonnast *Rhizopus* (*R.*), *Mucor* ja *Monilia* (Litchfield, 1996; van Maris *et al.*, 2004) ning pärmidest *Saccharomyces cerevisiae* ja *Kluyveromyces lactis* (Narayanan *et al.*, 2004).

Enamik piimhappebaktereid on grampositiivsed, fakultatiivsed anaeroobid, katalaasnegatiivsed, liikumisvõimetud, mittesporuleeruvad kokid ja kepid. Kasvuks ja piimhappe tootmiseks optimaalne temperatuur sõltub perekonnast, jäädes enamasti 20 – 45 °C vahele. Piimhappebakteritel on kõrge happetaluvus, mistõttu nad suudavad elada keskkonnas, mille pH jääb alla 5. Lisaks puudub neil funktsionaalne elektrontranspordiahel, mistõttu energiat toodetakse fermentatsiooni käigus substraatsel fosforülimisel (Hofvendahl ja Hahn-Hägerdal, 2000; Panesar *et al.*, 2007).

Viimastel aastakümnetel on järjest enam piimhappe produtsente leitud perekonnast *Bacillus*, kuhu kuuluv tüvi *B. coagulans* SIM-7 on käesoleva töö uurimisobjektiks. Esmakordselt kirjeldas *B. coagulans*'i 1915. aastal B. W. Hammer, kes isoleeris selle mikroobiliigi esindaja riknenud piimast (De Clerck *et al.*, 2004).

B. coagulans on grampositiivne pulkbakter, raku diameetriga 0,6 – 1 µm. Sporoogeense organismina moodustab mikroob terminaalset või tsentraalselt asetsevaid endospore. *B. coagulans* on atsidofiilne, termotolerantne mikroaerofiilse metabolismiga organism, kelle kasvutemperatuurid jäävad sõltuvalt tüvest vahemikku 30 – 61 °C ning keskkonna pH taluvus vahemikku 4 – 11 (De Clerck *et al.*, 2004; Patel *et al.*, 2006).

Enamik piimhapet produtseerivaid mikroorganisme toodavad vaid ühte kindlat laktaadi isomeeri olenevalt sellest, kas organism omab L(+)- või D(-)-laktaadi dehüdrogenaasi (LDH) (Burgos-Rubio *et al.*, 2000). Vähesed piimhappebakterid, näiteks *Lb. sake*, *Lb. curvatus*, *Lb. fermentum* ja *Lb. plantarum* omavad laktaadi ratsemaasi, mis katalüüsib L(+)-laktaadi konversiooni D(-)-laktaadiks, nii et fermentatsioonikeskkonda tekib ratsemiline segu (Liu, 2003; Zhang *et al.*, 2007).

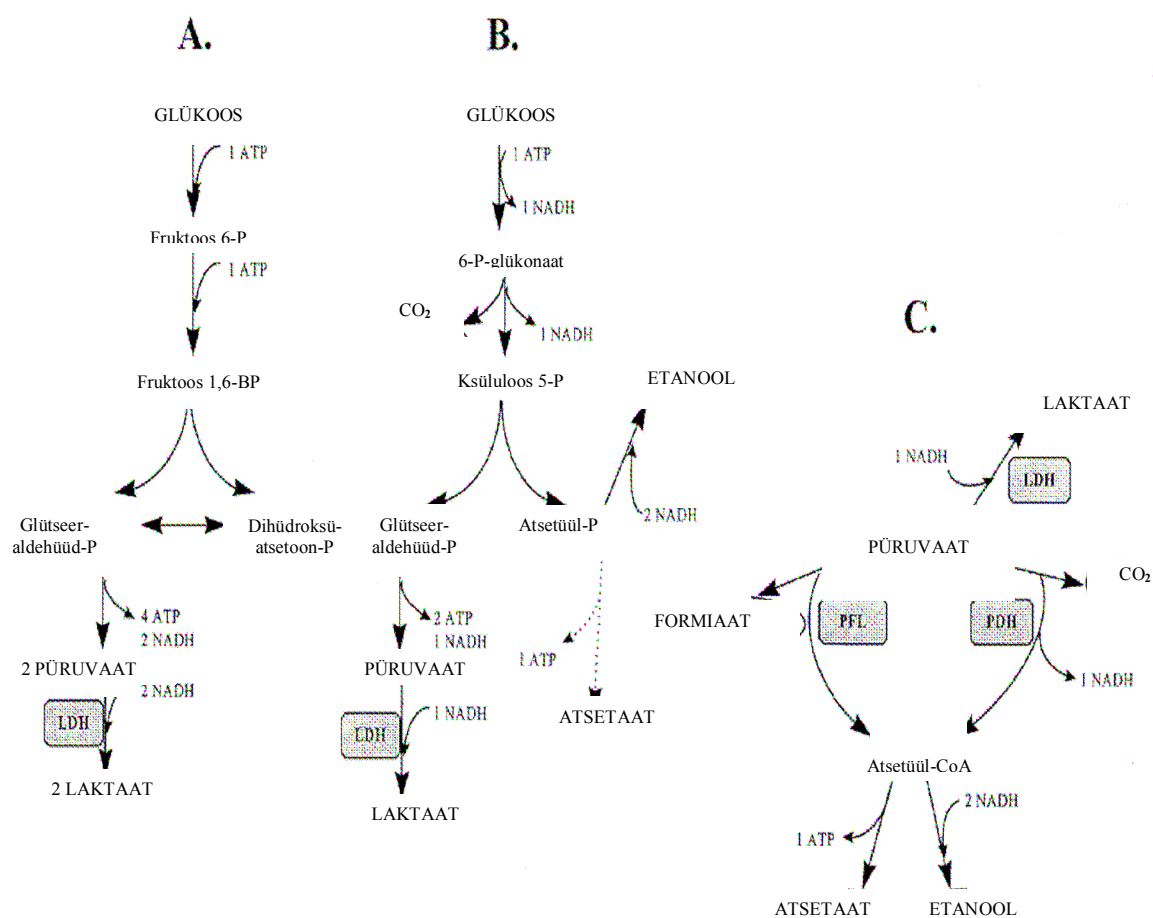
1.1.2. Piimhapekäärimine

Piimhappebakterid jaotatakse suhkru katabolismi radade ja lõpp-produktide järgi homo- ja heterofermentatiivseteks (Hofvendahl ja Hahn-Hägerdal, 2000).

Homofermentatiivsed liigid konverteerivad suhkru vähemalt 90% ulatuses piimhappeks. Sahhariid metaboliseeritakse laktaadiks Embden-Meyerhof-Parnase (EMP) rajal (Hofvendahl ja Hahn-Hägerdal, 2000; Litchfield, 1996). Teoreetiliselt tekib EMP rajal glükoosi konversioonil laktaadiks ühe mooli substraadi kohta kaks mooli produkti (van Maris *et al.*, 2004). Summaarne energeetiline saagis on 2 ATP-d ühe glükoosi molekuli kohta (Panesar *et al.*, 2007). Glükolüüsi käigus redutseeritakse iga glükoosi molekuli kohta 2 NAD⁺ molekuli ning NADH reoksüdeeritakse püruvaadi redutseerimisel laktaadiks LDH reaktsioonis (joonis 2 A) (Burgos-Rubio *et al.*, 2000).

Heterofermenteerijad lagundavad suhkru pentoosfosfoketolaasi rajal, mille produktideks on lisaks laktaadile veel CO₂, etanool ja atsetaat (joonis 2 B) (Hofvendahl ja Hahn-Hägerdal, 2000).

Mõned homofermentatiivsed piimhappebakterid võivad teatud tingimustes minna osaliselt üle teiste orgaaniliste hapete produktsioonile. Sellise nihke põhjuseks võib olla optimaalsest madalam temperatuur, kõrgem pH, glükoosi limitatsioon või teiste suhkrute olemasolu. Klassikalisele homofermentatiivsele rajale lisandub sel juhul püruvaadi alternatiivne metabolism püruvaadi-formiaadi lüaasi (PFL) või püruvaadi dehüdrogenaasi (PDH) kaudu. Produktideks on laktaat, CO₂, formiaat, atsetaat ja etanool (joonis 2 C) (Hofvendahl ja Hahn-Hägerdal, 2000; Panesar *et al.*, 2007).



Joonis 2. Piimhappebakterite käiritamistüübid: homofermentatiivne (A.), heterofermentatiivne (B.) ja segahappeline (C.).

Lühendid: P – fosfaat; BP – bisfosfaat; LDH – laktaadi dehüdrogenaas; PDH – püruvaadi dehüdrogenaas; PFL – püruvaadi formiaadi lüaas (Hofvendahl ja Hahn-Hägerdal, 2000).

1.1.3. Kultiveerimisviisid

Baktereid kasvatatakse vedelsöötmes põhiliselt kolmel erineval viisil:

1. Mittepidev ehk perioodiline ehk *batch*-kultuur. Tegemist on suletud süsteemiga, kus kõik bakteritele kasvuks vajalik, süsiniku- ja lämmastikallikad ning muud kasvufaktorid on söötmes juba enne algkultuuriga inokuleerimist. Kasvatuse käigus enam midagi juurde ei lisata ega ära ei võeta (Hofvendahl ja Hahn-Hägerdal, 2000). Perioodiline kultuur on kõige

tavalisem meetod tööstuslikuks laktaadi tootmiseks, kuigi protsess on limiteeritud madala produktiivsuse ning substraadi ja lõpp-produkti inhibitsiooniga (Hujanen *et al.*, 2001).

2. Poolpidev ehk järeltoiteline ehk *fed-batch* kultuur. Tegemist on perioodilise kultuuriga, kus kasvatus käigus lisatakse fermenterisse toitaineid, kuid kasutatud söödet ei eemaldata. Kasutades poolpidevat kultiveerimist, saab vältida substraadi inhibitsiooni (Roukas ja Kotzekidou, 1998).

3. Viimasel ajal on üha enam hakatud tööstuses rakendama pidev- ehk läbivoolukultuuri (Hujanen *et al.*, 2001). Tegemist on avatud süsteemiga, kuhu pidevalt lisatakse värsket söödet ning sama kogus kasutatud söödet võetakse ära. Produkti eemaldatakse kiirusega, mis võimaldaks toota seda mikroobile liigiomase maksimaalkiirusega (Hofvendahl ja Hahn-Hägerdal, 2000). Antud meetodiga saab vältida tooraine suurte algkontsentratsioonide ja produkti kuhjumisega kaasnevaid probleeme (Litchfield, 1996).

1.1.4. Süsinikuallikad

Süsinikku vajatakse rakus kõikide orgaaniliste ühendite ülesehitamiseks. Laboritingimustes on piimhappe tootmiseks kõige sobivamad süsinikuallikad rafineeritud suhkrud: glükoos, laktoos, sahharoos, maltoos ja tärklis (Litchfield, 1996).

Tööstuses üritatakse laktaadi tootmise toorainena rakendada põllumajanduse ning toiduaine- ja puidutööstuse jääkprodukte (Hofvendahl ja Hahn-Hägerdal, 2000). Laia kasutust on leidnud vadak, mis on juustutööstuse jääkprodukt, sisaldades vett, valke, mineraalsooli, vitamiine ja 4 – 5% laktoosi (Roukas ja Kotzekidou, 1998). Rakendatud on ka melassi, mis on suhkrutööstuse jääkprodukt ning sisaldab kuni 50% sahharoosi ja 6 – 9% valke (Chiarini *et al.*, 1992; Wee *et al.*, 2004). Kirjanduses leidub andmeid ka datli- ja kurgimahlade kasutamisest süsinikuallikana, kuna mõlemad sisaldavad kergesti lagundatavaid suhkruid, eelkõige glükoosi ja fruktoosi (Lu *et al.*, 2001; Nancib *et al.*, 2000). Viimasel ajal on laktaati hakatud tootma ka toidujäätmetest mittesteriilse fermentatsiooni teel. Toidujäätmed sisaldavad suhkruid ja teisi bakterite kasvuks vajalikke toitaineid (Akao *et al.*, 2007; Sakai ja Ezaki, 2006).

Lignotsellulooset materjali (vanapaber, puidu- ja põllumajandusjäätmed) hüdrolüüsides saab heksoosidest glükoosi, galaktoosi ja mannoosi; pentoosidest ksüloosi ja arabinoosi. Neid monomeere on võimalised piimhappe tootmiseks kasutama

piimhappebakterid (näiteks *Lb. rhamnosus*), kes lagundavad nii heksoose kui ka pentoose (Hofvendahl ja Hahn-Hägerdal, 2000).

1.1.5. Lämmastikallikad ja kasvufaktorid

Paljudel piimhappebakteritel on piiratud võime sünteesida mõnesid kasvuks ja bioloogiliseks aktiivsuseks vajalikke vitamiine, aminohappeid, puriine ja pürimidiine. Seepärast kasvatatakse neid põhiliselt komplekssoõtmetel, mis sisaldavad suurel hulgal lämmastikallikaid ja kasvustimulaatoreid. Mikroobide kasvust kui ka laktaadi produktsioonist lähtudes on paljude lämmastikallikate hulgast parim pärmiekstrakt (YE) (Hofvendahl ja Hahn-Hägerdal, 2000; Yoo *et al.*, 1997).

YE on pärmirakkude lahustuvate komponentide kontsentraat, mis on saadud kontrollitud autolüüsi käigus õlle- või pagaripärmist (*Saccharomyces cerevisiae*). YE sisaldab väikestes kogustes spetsiifilisi kasvufaktoreid ning on hea B vitamiinide allikas (foolhape, nisiin, pantoteenhape, püridamiin, riboflaviin) (Yoo *et al.*, 1997). YE põhikomponentideks on proteiinid, peptiidid ja aminohapped. Lisaks leidub YE-s veel lahustuvaid süsivesikuid, orgaanilisi happeid (atsetaat, propioonhape, suktsinaat), puriine, pürimidiine, nukleosiide, nukleotiide, nukleiinhappeid ja ka lipiide (Hernawan ja Flut, 1995).

YE lisamine söötmesse tõstab nii biomassi kui ka laktaadi tekkekiirust ning lühendab fermentatsioonitsükli kestust. Lisaks alaneb jääksuhkru hulk söötmes ning suureneb laktaadi lõppkontsentratsioon (Yoo *et al.*, 1997). Tegemist on ülimalt efektiivse, kuid kalli söötmekomponendiga, mistõttu pole YE tööstuslikuks laktaadi tootmiseks otstarbekas. Sellepärast otsitakse pidevalt uusi lämmastikallikaid, mida kombineeritakse YE-ga või kasutatakse söötmes ainsa lämmastikallikana (Kurbanoglu ja Kurbanoglu, 2003).

Viimasel ajal on piimhappebakterite vahendusel laktaadi tootmiseks hakatud kasutama söötmeid, mille lämmastikallikaks on tööstuse jääkproduktid. Kirjanduses leidub andmeid toiduainetööstuse (melass, kalajäänuste hüdroolüsaat, oinasarve hüdroolüsaat) (Chiarini *et al.*, 1992; Gao *et al.*, 2007; Kurbanoglu ja Kurbanoglu, 2003) ja põllumajanduse (teraviljaleotis, heinaekstrakt, linnaseekstrakt) (Cheng *et al.*, 1991; Hujanen ja Linko, 1996; Pauli ja Fitzpatrick, 2002) jääkproduktide rakendamisest lämmastikallikana piimhappe bakteriaalsel fermentatsioonil. Lisaks on lämmastikallikana kasutatud fermentatsioonitsükli läbiteinud piimhappebakterite rakkude hüdroolüsaati (Gao *et al.*, 2007). Antud meetodid

tagavad odava substraadi ning vähendavad keskkonna reostatust (Kurbanoglu ja Kurbanoglu, 2003).

1.1.6. Perekonna *Bacillus* esindajad laktaadi produtsentidena

Piimhape, mille kasutamine on laialdaselt levinud toiduainetööstuses, on leidnud viimasel ajal üha enam rakendust ka teistes tööstusvaldkondades. Seetõttu otsitakse pidevalt uusi rangelt homofermentatiivseid piimhappe produtsente, kes oleksid võimelised konverteerima odava substraadi optiliselt puhtaks laktaadiks ja seda suhteliselt kiiresti (Ohara ja Yahata, 1996).

Klassikalised piimhappebakterid on enamasti mesofiilid (20 – 45 °C). Seetõttu on mittesteriilsel kultiveerimisel toitaineterikastel söötmetel kontaminatsioonioht suur. 1980. aastatel hakati uurima *Bacillus*'e perekonna esindajate kasutusvõimalusi laktaadi tootmiseks. Leiti, et termofiilsed tüved perekonnast *Bacillus* on laktaadi tööstuslikuks tootmiseks lausa ideaalsed, kuna vähenevad kulutused kasvukeskkonna steriilsuse tagamiseks (Payot *et al.*, 1999). Lisaks termofiilsusele pole *Bacillus*'e tüved toitainete (eriti lämmastikallika) suhtes nii nõudlikud kui traditsioonilised piimhappebakterid ning antud perekonna sporuleerumisvõime lihtsustab säilituskultuuride hoidmist ja fermentatsioonisöötme inokuleerimist (Heriban *et al.*, 1993; Jõgi *et al.*, 2006; Sakai ja Ezaki, 2006). Kirjandust *Bacillus*'te rakendamisest laktaadi tootmisel leidub esialgu veel vähe.

Eesmärgiga leida uusi võimalikult puhta laktaadi tootjaid, on tehtud võrdlevat uurimistööd mitmete tüvedega perekonnast *Bacillus*. Baktereid kasvatati perioodilises kultuuris temperatuuril 33 °C. Tüve SHO-1, *B. cereus*'e ja *B. thuringiensis*'e toodetud L(+)-laktaadi optiline puhtus oli vastavalt 99%, 98,8% ja 96,8%, saagisega üle 90% (Ohara ja Yahata, 1996).

Payot *et al.* (1999) optimeerisid *B. coagulans* tüve TB/04 kasvutingimusi perioodilises kultuuris. Antud tüvi saavutas suurima piimhappe kontsentratsiooni ja biomassi temperatuuril 52 °C. Suhteliselt stabiilselt tekkis biomassi pH vahemikus 6,0 – 7,0, suurim laktaadi produktsioon toimus pH-l 6,5. Maksimaalse biomassi hulga, kasvukiiruse, piimhappe tekkekiiruse ja lõppkontsentratsiooni saavutamiseks vajab tüvi YE-d (Payot *et al.*, 1999).

Uurimaks süsinikuallika kontsentratsioonile mõju laktaadi produktsioonile, kasvatati *Bacillus* sp. tüve 17C5 perioodilises kultuuris temperatuuril 50 °C ning pH-l 5. Söötmes kasutati 0,5% teraviljaleotist ning erinevaid süsinikuallika kontsentratsioone (20 g/l, 60 g/l, 72 g/l). Süsinikuallikaks oli suhkruroo hemitselluloosi hüdroolüsaat, mis sisaldas 86% ksüloosi, 12,5% glükoosi ja 1,5% arabinoosi. Kõigis läbiviidud kasvatustes metaboliseeris antud tüvi esimesena glükoosi ja arabinoosi. Sõltumata süsinikuallika algkontsentratsioonist, tootis *Bacillus* sp. tüvi 17C5 alati vähemalt 99% optiliselt puhast L(+)-laktaati. Piimhappe saagis langes suhkru kontsentratsiooni tõustes 90%-lt 86%-le. Maksimaalne laktaadi lõppkontsentratsioon (55,8 g/l) saavutati, kui söötmes kasutati 60 g/l suhkrut (Patel *et al.*, 2004). *Bacillus coagulans* P4-102B ja *Bacillus coagulans* 36D1 tootsid hemitselluloosi hüdroolüsaadist 95% optiliselt puhast L(+)-laktaati (Patel *et al.*, 2006).

Kirkovits ja Edlauer (1992) võrdlesid erinevate süsinikuallikate mõju laktaadi tootmisele, kasutades fermenteerijana *B. coagulans* DSM 5196. Viimane oli võimeline tootma laktaati temperatuuril 60 °C, kuid optimaalne temperatuur oli 52 °C. Kasvades söötmes, mis sisaldas 190 g/l sahharoosi ja 3 g/l YE-d, tootis tüvi 39 tunni jooksul 140 g/l optiliselt puhast (99,8%) L(+)-laktaati. Kasutades samas kontsentratsioonis glükoosi saadi 49 tunniga laktaadi kontsentratsiooniks 133 g/l (Kirkovits ja Edlauer, 1992).

Viimastel aastatel on hakatud uurima perekonna *Bacillus* esindajate kasutusvõimalusi laktaadi tootmiseks toidujäätmetest mittesteriilsetes tingimustes. Kasvades toidujäätmete hüdroolüsaadil (55 °C, pH 6,5), tootis *B. coagulans* NBRC 12583 97% optiliselt puhast L(+)-laktaati kiirusega 1,36 g/lh (Sakai ja Yamanami, 2006). *B. licheniformis* TY7 produtseeris analoogses katses (50 °C, pH 6,5) 97% optiliselt puhast L(+)-laktaati ligikaudu poole kiiremini (2,5 g/lh) (Sakai ja Ezaki, 2006).

Erinevalt kahest eelnevast läbiviidud kasvatusel, Akao (2007) oma kaastöötajatega toidujäätmeid ei inokuleerinud. Kasvatused viidi läbi eeldusel, et piimhappebaktereid eksisteerib toidujäätmetes niigi. Toidujäätmete mittesteriilsel fermentatsioonil temperatuuril 55 °C osutus domineerivaks kääritajaks *B. coagulans*, kes tootis 97% optiliselt puhast L(+)-laktaati (Akao *et al.*, 2007).

Kirjanduses leidub viiteid, et *B. coagulans* toodab α -amülaasi (Keating *et al.*, 1998). Kuna tähtsaks on tööstuses üks laialdasemalt kasutatavaid süsinikuallikaid, võib *Bacillus*'te α -amülaasi produtseerimisvõime osutada vajalikuks tema kasutamisel tööstuslikuks laktaadi tootmiseks, vähendades kulutusi tähtsaks hüdroolüüsile.

1.1.6.1. *Bacillus coagulans* SIM-7

TÜMRI biokeemia õppetoolis isoleeritud *B. coagulans* tüvi SIM-7 on homofermentatiivne L(+)-laktaadi produtsent, kes on võimeline kasvama temperatuuril kuni 65 °C, kuid optimaalne temperatuur kasvuks on 55 – 57 °C. Katalaasi olemasolu tõttu on *B. coagulans* SIM-7 hapniku suhtes tolerantne (Simisker *et al.*, 2002).

Kogu energia toodetakse suhkrute kääritamisel L(+)-laktaadiks. *B. coagulans* SIM-7 kasvab monosahhariididest glükoosil, fruktoosil, galaktoosil ja mannoosil; disahhariididest sahharoosil, maltoosil ja tsellubioosil; polüsahhariididest tärklisel. Laktoosi, kaseiini ega želatiini tüvi SIM-7 ei lagunda (Simisker *et al.*, 2002).

Eelnevate uurimistöödega on tuvastatud, et homofermentatiivne *B. coagulans* SIM-7 ei hakka söötme koostise ega kasvutingimuste muutumise tagajärjel glükoosi heterofermentatiivselt käärutama (Malsub, 2003). Laktaadi moodustumiseks on kõige efektiivsem pH vahemikus 6,2 - 6,6 (Medijainen, 2002).

Suur töö on ära tehtud ka *B. coagulans* SIM-7 kasvuks ja laktaadi produktsiooniks vajalike söötmete väljatöötamise osas. Ideaalilähedastes tingimustes suudab *B. coagulans* SIM-7 perioodilises kultuuris 24 tunniga viia piimhappe kontsentratsiooni 1 M-ni (90 g/l). Parimaks kasvufaktorite ja lämmastikallikaks osutus omavalmistatud pärmilüüsi (185,7 ml/l) (Michelson, 2003; Michelson *et al.*, 2006).

Uurimistöö, kus võrreldi *B. coagulans* SIM-7 ja klassikaliste piimhappebakterite (*Lb. delbrueckii* erinevate tüvede) efektiivsust laktaadi toomisel, tõestas tüve SIM-7 paremust. *B. coagulans* SIM-7 oli termofiilsem, talus kõrgemat osmootset rõhku ja hapnikku, võimaldas saavutada kõrgemat piimhappe lõppkontsentratsiooni ja lühemat kääritustsükli (Michelson *et al.*, 2006; Suitso, 2004).

1.2. Sporuleeruva bakteri elutsükkel

Sporuleeruva bakteri elutsükkel jaguneb põhiliselt kolmeks etapiks: vegetatiivne kasv ja paljunemine, sporulatsioon, idanemine. Kasvu soodustavates tingimustes toimub intensiivne rakkude jagunemine. Toitainete lõppemisel elavad rakud põhiliselt varuainete baasil ja/või lähevad sporulatsiooni. Spooridena võivad rakud püsida sajandeid. Vanimad seniavastatud *Bacillus*'e spoorid on 250 miljonit aastat vanad (Vreeland *et al.*, 2000).

Keskkonningimuste paranedes toimub aktiveeritud spooride idanemine, rakkude väljakasv ja paljunemine (Ponnuraj *et al.*, 2000).

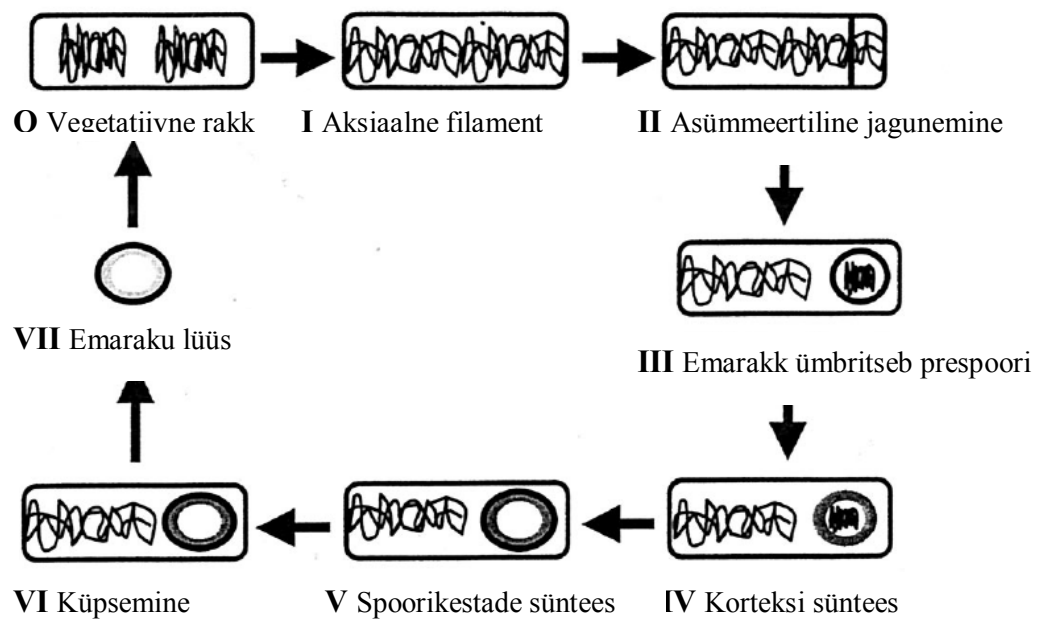
Bakterite sporulatsiooni ja spooride idanemise mehhanismid, mida on eelkõige uuritud perekonna *Bacillus* ja *Clostridium* liikidel, on üldjoontes sarnased kõikidel sporogeensetel mikroobidel. Erinevusi esineb vaid sporulatsiooni ja spooride idanemist indutseerivates tingimustes (Henriques ja Moran, 2000).

1.2.1. Sporulatsioon

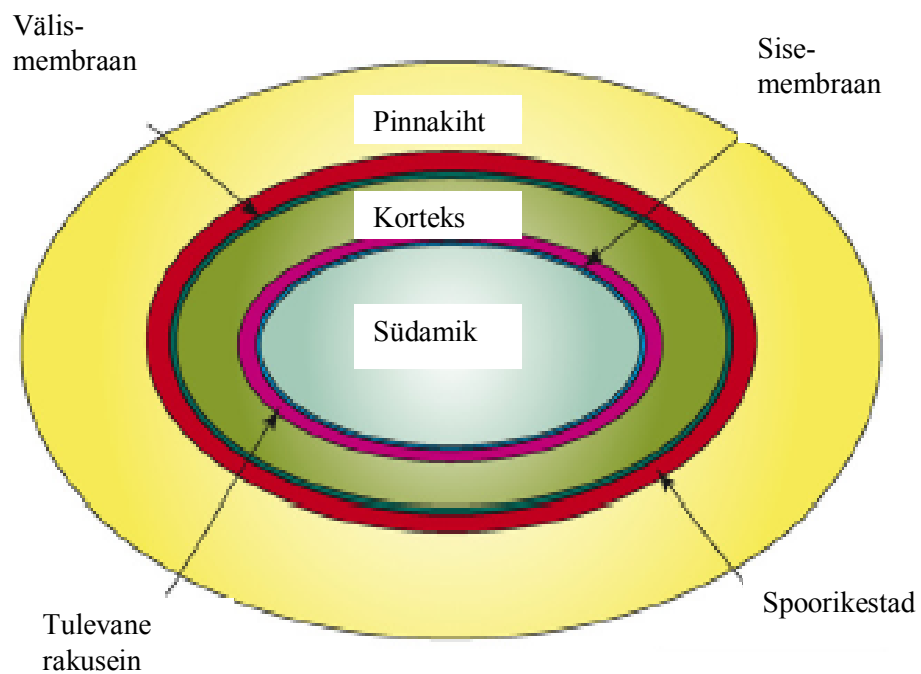
Rakkude eksponentsiaalset kasvu pärssivate tingimuste (toitainete lõppemine, toksiliste jääkproduktide akumulatsioon, sobimatu temperatuur ja pH) ilmnedes moodustavad bakterid spore. Protsess võtab sõltuvalt liigist aega 7 - 8 tundi (Wang *et al.*, 2006).

Kuna endospori moodustamine on energiat ja aega nõudev protsess, üritavad bakterid toitainete lõppemisel keskkonnas esmalt muul moel hakkama saada. Alternatiivideks on antibiootikumide ja ekstratsellulaarsete proteaaside süntees. Lisaks suureneb ebasoodsate tingimuste ilmnedes raku liikuvus, kemotaksis, kompetentsus võõr-DNA suhtes ning biofilmide moodustamine. Vaid viimase võimalusena otsustab rakk sporuleeruda (Msadek, 1999).

Sporulatsiooni minevas rakus moodustub DNA replikatsioonile järgnevalt pikki rakku ulatuv DNA aksiaalne filament. Järgnevalt toimuva raku asümmeetrilise jagunemise tulemusel tekivad suur emarakk ja väike prespoor. Sellele järgnevalt ümbritseb emarakk prespoori ning algab prespoori korteksi (modifitseeritud peptidoglükaan) moodustumine. Samal ajal väheneb prespoori ruumala ja veesisaldus ning pH muutub happelisemaks. Seejärel transporditakse emaraku poolt sünteesitud püridiin-2,6-dikarboksüülhape ehk dipikoliinhape (DPA) prespoori. Sporogeneesi hilisemates faasides moodustuvad emaraku poolt sünteesitud kattevalkudest prespoori välispinnale spoorikestad, mida võib omakorda katta veel valguline pinnakiht. Järgnevalt toimub spoori küpsemine, mille käigus saavutab prespoor spoorile omase resistentsuse mitmesugustele faktoritele. Selles faasis seonduvad spoori DNA-ga SASP-id (*small acid-soluble proteins*). Sporulatsiooni lõpptulemusena moodustub vegetatiivse raku tsütoplasmas raku puhkevorm ehk endospoor, mis emaraku lüües vabaneb ning säilib ebasoodsas keskkonnas pikka aega (joonis 3) (Setlow, 2007). Spoori ehitus on väljatoodud joonisel 4.



Joonis 3. Sporulatsiooni etapid (Hilber ja Piggot, 2004).



Joonis 4. Spoori ehitus (Setlow, 2007).

Erinevalt vegetatiivsest rakust omab endosporid pakse spoorikesti, mis tagavad resistentsuse mitmesugustele kemikaalidele (kloroform), ensüümidele (lüsotsüüm) ja mehhaanilistele faktoritele (Cabrera-Hernandez *et al.*, 1999). Samas aga võimaldavad spoorikestades olevad retseptorid tunnetada keskkonnatingimuste muutusi ja neile vastavalt reageerida (eriti toitainete olemasolule) (Henriques ja Moran, 2000).

Endospori südamikule on omane kõrge Ca^{2+} -DPA sisaldus ning dehüdreeritus, mis tagavad spoorile kuumaresistentsuse ja rakusiseste ensüümide aktiivsuse languse (Henriques ja Moran, 2000; Setlow, 2007). Lisaks on endosporid resistentsamad UV kiirgusele ja seda SASP-ide olemasolu tõttu spoori südamikus (Cabrera-Hernandez *et al.*, 1999; Setlow, 2007).

Käesolevas uurimistöös kasutatud bakter *B. coagulans* SIM-7 moodustab subterminaalse paigutusega endospore, mille eluvõimelisus säilib temperatuuril 85 °C vähemalt 40 minutit (Simisker *et al.*, 2002). *B. coagulans* tüve SIM-7 sporulatsiooni esilekutsumiseks on töötatud välja sporulatsiooni indutseeriva söötme (SIS) koostis. Vastandlikest nõuetest tulenevalt sisaldab SIS rikkalikult lämmastikallikat (YE) ning limiteerivas koguses fosforiühendeid ja süsinikuallikat. Lisaks on välja selgitatud *B. coagulans* tüve SIM-7 sporulatsiooniks optimaalne temperatuur (40 – 55 °C) ja pH (5,5) (Jõgi *et al.*, 2006; Tšertova, 2005).

1.2.2. Vegetatiivse raku moodustumine

Kasvu soodustavates tingimustes moodustub spoorist taas vegetatiivne rakk ja seda kolme etapi tulemusel: aktivatsioon, idanemine, väljakasv (Setlow, 2003).

Soodsate tingimuste ilmnedes vajavad spoorid aktivatsiooni. Aktivatsioon on protsess, mis tõstab populatsiooni idanemise kiirust ja võimaldab suuremal hulgal spooridest idaneda. Enimkasutatavaks ja tõenäoliselt efektiivseimaks aktiveerimismeetodiks on spooride kuumutamine kõrgemal temperatuuril. Kuumašokk peab aset leidma vahetult enne spooride külvamist, kuna aktivatsiooniprotsess on kergesti pöörduv (Collado *et al.*, 2003).

Idanemise ja sellele järgneva väljakasvu käigus saab aktiveeritud spoorist aktiivse metabolismiga rakk. Spoori idanemine on kiire protsess, võttes aega vaid minuteid, väljakasv aga tunde (Setlow, 2003).

Spooride idanemist indutseerivad nii füüsilised (sobiv pH, kestade mehhaanilised vigastused), keemilised (Ca^{2+} -DPA, KCl, KBr) kui ka füsioloogilised (aminohapped, suhkrud, nukleosiidid) faktorid. (Setlow, 2003).

Idanemise esimeses staadiumis põhjustab germinandi (enamasti toitaine) seondumine spoori sisemembraanil asuva retseptoriga monovalentsete katioonide (H^+), DPA ja viimasega seotud divalentsete katioonide (Ca^{2+}) väljavoolu spoori südamikust, tõstes spoorisisest pH-d (6,5 – 7,7) ning võimaldades spoori südamikul mõningal määral rehüdreeruda. Lisaks on näidatud, et Ca^{2+} -DPA eksport aktiveerib vähemalt ühe korteksi lüütilise ensüümi (CwIJ). Idanemise teises staadiumis toimub spoori korteksi ja kestade hüdrolüüs, mis võimaldab suuremal hulgal veel spoori südamikku jõuda. Viimane põhjustab spoori südamiku ruumala suurenemise ning tagab mitmete ensüümide aktiveerumise (Moir, 2003; Setlow, 2003; Setlow, 2007).

Spooride idanemine põhineb sporulatsiooni käigus sünteesitud ning seni inaktiivses seisundis olnud idanemiseks vajaminevate ensüümide järk-järgulises aktivatsioonis. Lisaks kasutab idanev spoor ka idanemise käigus tekkinud laguprodukte. Sellest tulenevalt ei vaja idanemisprotsess eksogeenseid energiaallikaid (Moir, 2003; Setlow, 2003).

Idanemise lõpuks taastatud ensüümide aktiivsus võimaldab idanenud spooril välja kasvada. Väljakasvamise käigus toimub SASP-ide lagundamine spetsiifiliste proteaaside poolt, mis vabastab DNA transkriptsiooniks ning varustab raku aminohapetega valgu biosünteesi käivitamiseks (Ponnuraj *et al.*, 2000). Vajadusel toimub DNA reparatsioon. Lisaks taastatakse vegetatiivsele rakule omane metabolism ning moodustuvad vegetatiivsele rakule spetsiifilised rakustruktuurid. Väljakasvamise tulemusena saab idanenud spoorist jagunemisvõimeline vegetatiivne rakk (Setlow, 2003; Setlow, 2007).

Käesolevas töös kasutatud bakteri *B. coagulans* SIM-7 spooride idanemine sõltub eelkõige söötme pH-st, olles efektiivseim madalatel pH väärtustel (5,0 – 6,0). Lisaks on kindlaks tehtud, et juba 18 g/l glükoosi kontsentratsioon söötmes mõjub idanemisele inhibeerivalt (Jõgi *et al.*, 2006; Tšertova, 2005).

1.3. Osmootne stress

Looduses puutuvad enamik mikroorganisme kokku osmootse rõhu muutustega elukeskkonnas. Hüperosmootsed tingimused (väliskeskkonnas on lahustunud ainete hulk

kõrgem kui rakus) põhjustavad vee väljavoolu, mis võib halvimal juhul viia raku plasmolüüsini. Vastupidises olukorras, hüposmootsetes tingimustes (väliskeskkonnas on lahustunud ainete kontsentratsioon madalam kui raku sees) toimub passiivne vee sissevool, viies halvimal juhul raku lüüsini (Poolman, 2002).

Raku surma vältimiseks on bakteritel olemas mehhanismid, et kohendada intratsellulaarne lahustunud ainete kontsentratsioon vastavalt keskkonna osmolaarsuse muutustele. Hüperosmootsetes tingimustes akumulerevad bakterid osmoprotektoreid. Osmoprotektoritena on kasutusel ioonid (K^+) ja neutraalse laenguga orgaanilised ained (aminohapped, glütsiin-betaiin, suhkrud) (Poolman ja Glaasker, 1998). Kuna ioonide kõrged kontsentratsioonid inhibeerivad ensüümide aktiivsust, eelistavad bakterid neutraalseid orgaanilisi aineid. Viimaseid on võimalik akumulereida molaarsetes kontsentratsioonides ilma, et sellega kaasneks negatiivne mõju makromolekulide struktuurile ja funktsioonile (Poolman, 2002).

Osmoprotektoreid on võimalik sünteesida tsütoplasmas, aga ka transportida rakku väliskeskkonnast. Kuna piimhappebakterid on piiratud biosünteesivõimega, saavad nad antud ained ümbritsevast keskkonnast (Wood *et al.*, 2001). Perekonna *Bacillus* esindajad on võimelised lisaks transpordile ka ise mõningaid osmoprotektoreid sünteesima (Hoffmann *et al.*, 2002).

B. subtilis'es toimub hüperosmootse stressi algfaasis kiire K^+ akumulatsioon, mis osmootse stressi kasvades indutseerib neutraalse laenguga osmoprotektorite üleskorjamise või biosünteesi. Selline mehhanism võimaldab vältida suurtes kogustes K^+ kuhjumist rakku (Wood *et al.*, 2001). *B. subtilis*'e jaoks on proliin primaarne raku poolt sünteesitav osmoprotektor. Peale *B. subtilis*'e on proliini võimelised sünteesima ka *B. licheniformis* ja *B. megaterium*. *B. cereus*, *B. circulans* ja *B. thuringensis* sünteesivad osmootse stressi korral glutamaati; *B. alcalophilus*, *B. psychrophilus* ja *B. pasteurii* ektoiini (tetrahüdropürimidiin) (Kuhlmann ja Bremer, 2002).

Lisaks proliini sünteesile on *B. subtilis* võimeline transportima osmoprotektoreid (proliin, glütsiin-betaiin) rakku väliskeskkonnast (Hoffmann *et al.*, 2002). Glütsiin-betaiini (trimetüleeritud glütsiin) olemasolu söötmes tingib kohese proliini biosünteesi/transpordi peatumise, millele järgneb glütsiin-betaiini rakku transportimine (Boch *et al.*, 1994).

Piimhappebakterites K^+ kontsentratsiooni tõusu hüperosmootsete tingimuste ilmnedes täheldatud pole. Pigem toimub piimhappebakterites stressi algfaasist alates aminohapete ning teiste orgaaniliste ainete akumulereimine (Poolman ja Glaasker, 1998).

Lb. plantarum ATTC 14917 akumulereib hüperosmootsetes tingimustes glutamaati ja proliini (Glaasker *et al.*, 1996), *Lb. plantarum* P743 aga glutamaati ja aspartaati (Kets ja de Bont, 1997). Vabade aminohapete puudusel lagundavad nii piimhappebakterid kui ka *Bacillus*'ed ekstratsellulaarseid peptiide (Nekolny ja Chaloupka, 2000; Piuri *et al.*, 2003). Nagu *B. subtilis*'egi puhul, on piimhappebakterite eelistatuimaks osmoprotektoriks siiski glütsiin-betaiin (Glaasker *et al.*, 1996).

Enamik piimhappebaktereid omavad vaid väheseid mehhanisme, millega reguleerida rakusisest lahustunud ainete kontsentratsiooni vastuseks ekstratsellulaarse osmootse rõhu muutustele. Põhjuseks on väike genoom ja ökoloogiline nišš, sest piimhappebakterid on harjunud elama suhteliselt stabiilses ja toitainerikas keskkonnas (Obis *et al.*, 2001).

Kirjanduses on andmeid, et perekonna *Bacillus* (*B. cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*) liikide spoorid on osmootsele rõhule vastupidavamad kui vegetatiivsed rakud. Spoorid iseenesest ei ole tundlikud osmootsele rõhule. Küll aga on näidatud, et kasvukeskkonna osmootne rõhk võib mõjutada spooride idanemis- ja väljakasvamisprotsesse (Tovar-Rojo *et al.*, 2003).

Spooride idanemise ja väljakasvu käigus toimub SASP-ide lagundamine aminohapeteks (põhiliselt glutamaat ja glutamiin), mida on võimalik kasutada osmoprotektoritena (Ruzal *et al.*, 1994).

1.4. Uurimistö eesmärgid

Tänapäeval toodetakse suur osa piimhapest traditsiooniliste piimhappebakterite vahendusel, kasutades inokulumina mikroorganismide vegetatiivseid rakke. Perekonna *Bacillus* esindajad piimhappe produtsentidena annavad võimaluse kasutada sissekülvinna lisaks vegetatiivsetele rakkudele ka spore. Kui teaduskirjandust *Bacillus*'te vegetatiivsete rakkude rakendamisest laktaadi tootmisel on niigi minimaalselt, siis *Bacillus*'e spooridega fermentatsioonikeskkonna inokuleerimisest on veel vähem andmeid. Sellest tulenevalt on käesoleva uurimistö eesmärkideks seatud:

1. selgitada välja fermentatsioonisöötmes oleva glükoosi algkontsentratsiooni mõju laktaadi produktsioonile, kasutades inokulumina *B. coagulans* tüve SIM-7 vegetatiivseid rakke;

2. uurida *B. coagulans* tüve SIM-7 vegetatiivsete rakkude ja spooride osmotolerantsust, kasutades keskkonna osmootse rõhu tõstmiseks nii NaCl kui ka glükoosi;
3. uurida *B. coagulans* tüve SIM-7 spooride rakendamisvõimalusi fermentatsioonisöötme inokuleerimiseks ja efektiivseks laktaadi tootmiseks.

2. MATERJAL JA METOODIKA

2.1. Kasutatud bakteritüvi

Töös kasutatud tüvi isoleeriti Jaan Simiskeri poolt juhitud töörühmas Rakvere Piiritusetehase teraviljajäätmetest. Mikroobi süstemaatiline kuuluvus on määratud TÜMRI geneetika õppetoolis. Tüvi on võetud arvele DSMZ-s (Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen) nime all *Bacillus coagulans* SIM-7 DSM 14043. Käesolevas töös kasutatakse nime lihtsustatud kirjaviise *B. coagulans* SIM-7 ja SIM-7.

B. coagulans SIM-7 rakke säilitati 20% glütseroolis temperatuuril -80 °C.

2.2. Kasutatud söötmed

Vegetatiivsete rakkude eelkasvatusteks kasutati tardsöödet (edaspidi *Bc*-sööde), mis sisaldas 7,5 g/l YE-d (Bacto), 10 g/l trüptooni (Bacto), 4 g/l glükoosi (Sigma) ja 15 g/l agarit (Difco). Puhversüsteemina kasutati kaaliumfosfaatpuhvrit [1 M K_2HPO_4 (pH 9,05) ja 1 M KH_2PO_4 (pH 4,12)], millega viidi söötme pH 5,5-ni. Vahetult enne söötme väljavalamist Petri tassidele lisati 2,3 ml/l steriilseid mikroelemente (Bauchop ja Elsdén, 1960).

Osmotolerantsuse hindamiseks lisati *Bc*-söötmesse vastavalt 15 g/l, 29 g/l, 44 g/l ja 58 g/l NaCl või varieeriti glükoosi kontsentratsioone (45 g/l, 90 g/l, 135 g/l, 180 g/l).

Sporulatsiooni indutseeriv sööde (SIS) sisaldas 10 g/l YE-d, 15 g/l agarit, 250 µl/l Mg-segu (0,35 M $MgCl_2$ ja 0,35 M $MgSO_4$), 2,5 ml/l mikroelemente ja 10 mM $MnSO_4 \cdot x H_2O$. 3-(N-morfoliin)propaansulfoonhappega (MOPS, 40 mM) viidi söötme pH 5,5-ni.

Piimhappe tootmist jälgiti vedelsöötmetes, mille põhikoostises kasutati süsinikuallikana glükoosi erinevates kontsentratsioonides (tabel 1). Kõik vedelsöötmed tehti keedetud kraanivette, kuhu lisati 25 g/l YE-d ning mineraalaineid: 2,3 ml/l mikroelemente (Bauchop ja Elsdén, 1960), 2,3 ml/l M2-e (0,88 M NaH_2PO_4 ja 0,06 M K_2HPO_4) ja 893 µl/l Mg^{2+} -segu (0,35 M $MgCl_2$ ja 0,35 M $MgSO_4$).

Mikroelementide segu sisaldab 10,75 g/l MgO, 2,0 g/l CaCO₃, 51,3 g/l HCl, 4,5 g/l FeSO₄ x 7H₂O, 1,44 g/l ZnSO₄ x 7H₂O, 1,12 g/l MnSO₄ x 4H₂O, 0,25 g/l CuSO₄ x 5H₂O, 0,28 g/l CoSO₄ x 7H₂O, 0,06 g/l H₃BO₃ (Bauchop ja Eldsen, 1960).

2.3. Spooride puhastamine

B. coagulans tüve SIM-7 rakud külvati SIS tardsöötmele ning inkubeeriti temperatuuril 56 °C 24 tundi. Seejärel eraldati spoorid vegetatiivsetest rakkudest modifitseeritud standardmeetodil (Nicholson ja Setlow, 1990): SIS tardsöötmele 1 M NaCl-ga mahapestud rakkude suspensiooni tsentrifugeeriti 12 000 rpm (*rotations per minute*) 10 minutit (MiniSpin, Eppendorf, rootor F 45-12-11). Saadud sade pesti ¼ mahus 1 M KCl/0,5 M NaCl lahusega ning tsentrifugeeriti 12 000 rpm 10 minutit. Seejärel suspendeeriti sade ¼ mahus 50 mM Tris [Tris(hüdrometüül)aminometaan] - HCl-s (pH 7,2), mis sisaldas 50 µg/ml lüsootsüümi. Suspensiooni inkubeeriti temperatuuril 50 °C 1 tund ning tsentrifugeeriti 12 000 rpm 10 minutit. Järgnevalt pesti sadet 1 mahu 1 M NaCl ja 0,05% SDS-ga (naatrium-dodetsüülsulfaat), millele järgnes kolm pesu jahutatud ddH₂O-ga. Iga pesu järel tsentrifugeeriti suspensiooni 12 000 rpm 10 minutit.

Saadud suspensiooni puhtust kontrolliti mikroskoobi (Olympos CX41) abil, vaadeledes preparaati faas-kontrast süsteemis 1000 x suurendusega. Sporulatsiooni efektiivsus oli alati üle 90%. Puhastatud spoorid säilitati ddH₂O-s temperatuuril 4 °C.

Kasvatusseeriates nr. 5 ja 6 kasutati inokulumina puhastamata spoorid. Antud juhul pesti SIS söötmele üleskasvanud kultuur maha ddH₂O-ga ning säilitati temperatuuril 4 °C.

2.4. Osmotolerantsuse hindamine

B. coagulans tüve SIM-7 osmotolerantsuse määramiseks valmistatud söötmed inokuleeriti tüve SIM-7 vegetatiivsete rakkude või aktiveeritud (temperatuuril 70 °C 30 minutit) spooridega. Pärast 24-tunnist inkubatsiooni temperatuuril 56 °C loeti kolooniad ning arvutati osmotolerantsus (%): NaCl (või glükoosi) sisaldanud tassidelt üles kasvanud

kolooniate hulk võrreldes kontrolltassidega (*Bc*-sööde). Tulemused on esitatud kolme katse aritmeetilise keskmisena.

Tabel 1. Ülevaade *Bacillus coagulans* tüvega SIM-7 tehtud kasvatustest.

Kasvatus- seeria nr.	Inokulum	Inokulum (rakku/ml)	Glükoos (g/l)	Märkused
1	vegetatiivsed rakud	10^8	4 – 180	glükoosi algkontsentratsioonid söötmes: 4, 9, 18, 36, 54, 72, 90, 108, 126, 144, 162, 180 g/l
2	vegetatiivsed rakud	10^7	45	fermentatsioonisöötme inokuleerimine eelnevalt termostaadis aktiveeritud spooridega → idanemine (55,5 °C pH 5,5 1 h)
	aktiveeritud spoorid			
3	vegetatiivsed rakud	10^7	45	fermentatsioonisöötme inokuleerimine spooridega → aktiveerimine (70 °C 30 min) → idanemine (55,5 °C pH 5,5 1 h) → glükoosi lisamine
	spoorid			
4	vegetatiivsed rakud	10^7	126	fermentatsioonisöötme inokuleerimine spooridega → aktiveerimine (70 °C 30 min) → idanemine (55,5 °C pH 5,5 1 h) → glükoosi lisamine
	spoorid			
5	vegetatiivsed rakud	10^7	45	fermentatsioonisöötme inokuleerimine spooridega → aktiveerimine (70 °C 30 min) → idanemine (55,5 °C pH 5,5 1 h) → glükoosi lisamine
	puhastatud spoorid			
	puhastamata spoorid			
6	vegetatiivsed rakud	10^7	126	fermentatsioonisöötme inokuleerimine spooridega → aktiveerimine (70 °C 30 min) → idanemine (55,5 °C pH 5,5 1 h) → glükoosi lisamine
	puhastatud spoorid			
	puhastamata spoorid			

2.5. Kasvatuste korraldus

Kõik fermentatsioonid viidi läbi perioodilises kultuuris. Baktreid kasvatati 70 ml vedelkultuuris 100 ml kasvatuspudelites. Kasvutemperatuur 55,5 °C tagati termostaadiga Jenway 1103 Hotplate & Stirrer (Jenway, USA). Kultuuri segati pidevalt magnetsegajaga (180 rpm). Kultiveerimisel kasutati pH-staati – automaattitraatorit Titrino 719S (Metrohm, Šveits), mis tiitris pH-l $6,18 \pm 0,02$, kasutades neutraliseerijana 4,1 M NH_4OH -d.

Tiitrimisandmed registreeriti TitrinoScan (Acrom-Ex, Eesti) tarkvara kasutades ja salvestati *Microsoft Excel*'is. Fermentatsiooni efektiivsuse hindamise parameetriteks võeti fermentatsiooni kestus (h), maksimaalne laktaadi kontsentratsioon (g/l), laktaadi produktiivsus (g/h) ja laktaadi saagis (%). Kasvatused teostati kolmes korduses ning tulemustest võeti aritmeetiline keskmine.

2.6. Kasvatuste inokuleerimine

Kasvatusseerias nr. 1, mille eesmärk oli hinnata erinevate glükoosi algkontsentratsioonide mõju laktaadi tootmisele, inokuleeriti vedelsöödet tüve SIM-7 vegetatiivsete rakkudega (10^8 vegetatiivset rakku/ml). Võrdlevates kasvatustes (kasvatusseeriad nr. 2 – 6) tüve SIM-7 spooridega inokuleeriti fermentatsioonimeediumit tihedusega 10^7 vegetatiivset rakku/ml. Katseks vajalik inokulum kasvatati üles *Bc*-söötmele temperatuuril 56 °C 2 tunni jooksul.

Katsed (kasvatusseeriad nr. 2 – 6) toota laktaati, inokuleerides tüve SIM-7 spooridega viidi läbi eelneva eelkasvatusega, kasutades kultuuri algtihedusega 10^7 spoori/ml (tabel 1).

2.7. Spooride idanemise ja väljakasvu jälgimine

B. coagulans tüve SIM-7 spooride idanemist ja väljakasvu jälgiti kasvatusseerias nr. 2, kus fermentatsioonimeediumit inokuleeriti aktiveeritud spooridega. Alates fermentatsioonisöötme inokuleerimisest (0 h) võeti 1-tunniste vahedega 6 tunni jooksul 0,5

ml proovi. Kultuuri optilise tiheduse (OD) muutusi ajas jälgiti spektrofotomeetriga HP8453 lainepikkusel 600 nm. Vajalikud lahjendused tehti füsioloogilisse lahusesse (0,9% NaCl).

Lisaks OD jälgimisele tehti väljakülve *Bc*-söötmele. Vegetatiivsete rakkude arvukuse määramiseks külvati proov (sobiv lahjendus) otse *Bc*-söötmele. Spooride arvukuse määramiseks kuumutati proovi (sobivat lahjendust) 15 minutit temperatuuril 80 °C.

Väljakülvid tehti tilgakülvi meetodil (*drop plate*). Petri tassi põhi jagati neljaks sektoriks, kuhu külvati 3 x 10 µl proovi sobivat lahjendust. Pärast tilga imendumist söötmesse inkubeeriti tase temperatuuril 56 °C 24 tundi. Seejärel loeti kolooniad ning tulemus väljendati ühikutes CFU/ml (*colony forming units per ml*).

2.8. Biomassi kontsentratsiooni määramine

Biomassi kontsentratsiooni määramisel lähtuti eeldusest, et poole bakteri kuivmassist moodustab valk. Fermentatsiooni lõpust võetud 0,5 ml proovi tsentrifugeeriti 9 000 rpm 5 minutit ning bakterisadet pesti kaks korda 0,9% NaCl lahusega. Seejärel suspendeeriti sade üles 1 M NaOH-s. Pärast inkubeerimist temperatuuril 100 °C 10 minutit määrati tekkinud lüsaadist valgu kontsentratsioon Lowry meetodil (Lowry *et al.*, 1951). Saadud tulemuste põhjal arvutati biomassi kontsentratsioon.

2.9. Glükoosi kontsentratsiooni määramine

Fermentatsiooni lõpust võetud 0,5 ml proovi tsentrifugeeriti 9 000 rpm 5 minutit. Supernatandist (vajadusel selle lahjendustest ddH₂O-s) mõõdeti glükoosi kontsentratsioon, kasutades kommertsiaalset reaktiivide komplekti (Biocon, Saksamaa).

2.10. Andmetöötlus

Kasvatuse jooksul automaattitraatoritelt iga 10 minuti järel saadud andmed salvestati *Microsoft Excel*'is tabelina. Neutraliseerija kulu järgi arvutati laktaadi kontsentratsioon:

$$\text{Laktaadi } c \text{ (g/l)} = \frac{\left[\text{laktaadi molaarmass} \left(90 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \right) \right] \times \left[\text{neutraliseerija} \right] \times \left[\text{neutraliseerija kulu} \right]}{\left[\text{söötme alhmaht (70ml)} \right] + \left[\text{neutraliseerija kulu} \right]} \times \left[\text{ajahetkeks (ml)} \right]$$

Antud valemis tähistab c kontsentratsiooni (g/l).

Laktaadi kontsentratsioonist lähtuvalt arvutati laktaadi tekkimise kiirus tunnis, kasutades valemit:

$$\frac{dc_i}{dt_i} = \frac{1}{2} \left(\frac{c_{i+1} - c_i}{t_{i+1} - t_i} + \frac{c_i - c_{i-1}}{t_i - t_{i-1}} \right)$$

Antud valemis tähistab c kontsentratsiooni (g/l) ajahetkel t . Aega mõõdeti tundides.

Piimhappe saagis arvutati piimhappe absoluuthulga jagamisel kulunud glükoosi absoluuthulgaga. Arvesse võeti ka tiitrimisest tingitud mahu suurenemine.

3. TULEMUSED JA ARUTELU

3.1. Glükoosi algkontsentratsiooni mõju *B. coagulans* SIM-7 kasvule ja laktaadi produktsioonile

Antud uurimistöo üheks eesmärgiks oli selgitada välja süsinikuallika kontsentratsiooni mõju *B. coagulans* SIM-7 laktaadi produktsioonile. Süsinikuallikaks valisime tüve SIM-7 poolt eelistatuma suhkru glükoosi. Tagamaks bakteri lämmastiku, vitamiinide ja kasvufaktorite vajaduse, rikastasime söödet kompleksse lämmastikallika YE-ga (25 g/l).

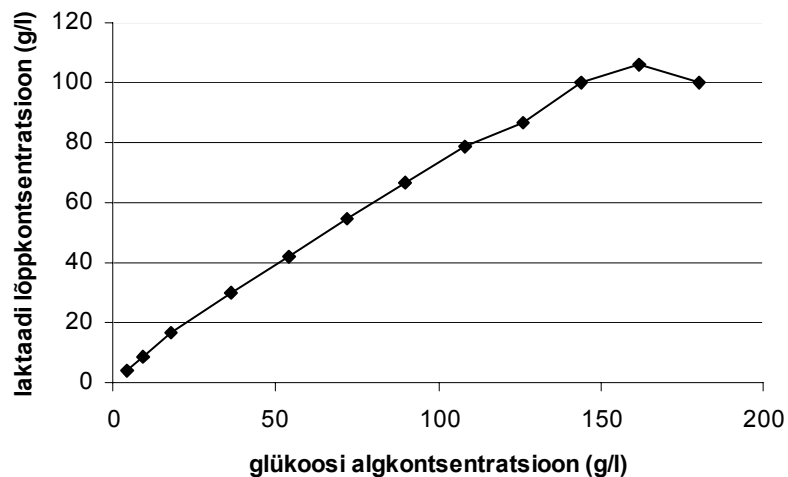
Esimeses katseseerias kasvatati *B. coagulans* tüve SIM-7 vegetatiivseid rakke (algtihedusega 10^8 rakku/ml) perioodilises kultuuris ning varieeriti glükoosi kontsentratsioone (4 – 180 g/l, teisendatult 0,02 - 1 M) söötmes. Glükoosi algkontsentratsioonidel 4 - 144 g/l kestis fermentatsioon kuni süsinikuallika otsalõppemiseni kasvukeskkonnas. Antud juhul oli fermentatsioonijärgne glükoosi kontsentratsioon söötmes < 0,2 g/l. Kõrgematel glükoosi algkontsentratsioonidel (162 g/l ja 180 g/l) katkestati fermentatsioon 74. tunnil, kuna kasvatus lõpus (70. – 74. tunnil) tootis tüvi laktaati väga madala kiirusega (keskmiselt 0,1 g/l/h). Fermentatsioonijärgselt detekteeriti 162 g/l ja 180 g/l glükoosi algkontsentratsioonidega söötmetes jääksuhkrut vastavalt 6,6 g/l ja 24 g/l.

Järgnevalt vaadeldakse glükoosi algkontsentratsiooni mõju laktaadi lõppkontsentratsioonile, fermentatsioonitsükli kestusele, laktaadi tekkekiirusele ja saagisele ning SIM-7 biomassi produktsioonile.

3.1.1. Laktaadi lõppkontsentratsioon

Laktaadi lõppkontsentratsioon (g/l) arvutati fermentatsiooni käigus kulunud neutraliseerija hulga järgi, kasutades peatükis 2.10. väljatoodud valemit.

Katses glükoosi algkontsentratsiooniga kuni 162 g/l oli eksperimendi tulemus ootuspärane – tüvi SIM-7 tootis seda enam piimhapet, mida kõrgem oli söötmes süsinikuallika algkontsentratsioon. Maksimaalne piimhappe lõppkontsentratsioon (108 g/l) saavutati kasvatuses, kus glükoosi algkontsentratsiooniks oli 162 g/l (joonis 5).



Joonis 5. Glükoosi algkontsentratsioonide (4 g/l – 180 g/l) mõju *B. coagulans* SIM-7 laktaadi produktsioonile (g/l).

Sarnaselt meie tulemusele produtseeris *Lb. casei* maksimaalselt laktaati söötmes glükoosi algkontsentratsiooniga 160 g/l (Hujanen *et al.*, 2001). Lisaks leidis Bulut (2003) oma kaastöötajatega, et *R. oryzae* toodab maksimaalsel hulgal laktaati 150 g/l glükoosi algkontsentratsiooniga söötmes. Kirjanduses on andmeid ka edukast piimhappe produktsioonist kõrgemate glükoosi algkontsentratsioonide korral. Näiteks Gonçalves *et al.* (1991) leidsid, et *Lb. rhamnosus* toodab seda enam laktaati, mida kõrgem on glükoosi algkontsentratsioon (50 - 200 g/l) söötmes. Maksimaalne laktaadi kontsentratsioon saavutati kasvatuses, mis sisaldas 200 g/l glükoosi (Gonçalves *et al.*, 1991). Ka *Ec. faecalis*'e jaoks oli maksimaalne glükoosi algkontsentratsioon 200 g/l. Kõrgematel glükoosi algkontsentratsioonidel lõpp-produkti hulga tõusu ei täheldatud (Yun *et al.*, 2003).

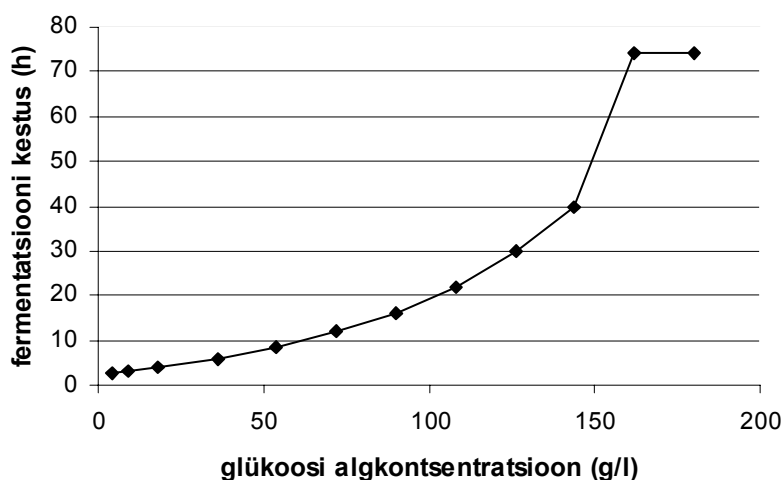
Nagu kirjanduse andmetest, aga ka meie katsetulemustest selgub, toodavad erinevad mikroorganismid maksimaalsel hulgal piimhapet söötmes, kus glükoosi kontsentratsioon on kuni 150 g/l, mõnikord isegi kuni 200 g/l.

3.1.2. Fermentatsioonitsükli kestus

Fermentatsioonitsükli kestust (h) arvestati fermentatsioonisöötme inokuleerimisest (0 h) kuni glükoosi ammendumiseni söötmes (erandiks 162 g/l ja 180 g/l glükoosi algkontsentratsioonidega kasvatused).

Kasvatuseeriat nr. 1 analüüsid on näha, et glükoosi algkontsentratsiooni tõustes pikenes fermentatsiooniaeg, sest suurema koguse substraadi täielikuks tarvitamiseks kulus rohkem aega. Kuni 144 g/l glükoosi algkontsentratsioonide kasutamine söötmes tagas fermentatsiooni lõppemise 40 tunni sees (joonis 6).

Kuigi maksimaalne laktaadi hulk (108 g/l) saavutati 162 g/l glükoosi algkontsentratsiooniga fermentatsiooniprotsessis, tootis tüvi SIM-7 peaaegu sama hulga laktaati (100 g/l) 144 g/l glükoosiga ja seda ligi poole lühema aja jooksul (74 h asemel 40 h) (joonised 5 ja 6). Seega, fermentatsiooniaega silmas pidades ei ole efektiivne tõsta tüve SIM-7 fermentatsioonimeediumis glükoosi algkontsentratsiooni üle 144 g/l.



Joonis 6. Glükoosi algkontsentratsioonide (4 g/l – 180 g/l) mõju *B. coagulans* SIM-7 fermentatsiooni kestusele (h).

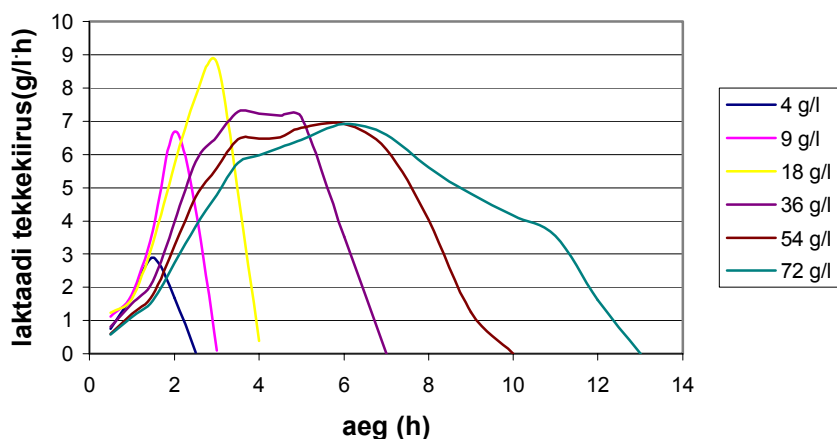
3.1.3. Laktaadi tekkekiirus

Produtseeritud laktaadi hulk (g/l) ja fermentatsiooni kestus (h) määravad ära piimhappe tekkekiiruse ehk produktiivsuse (g/lh) (peatükk 2.10).

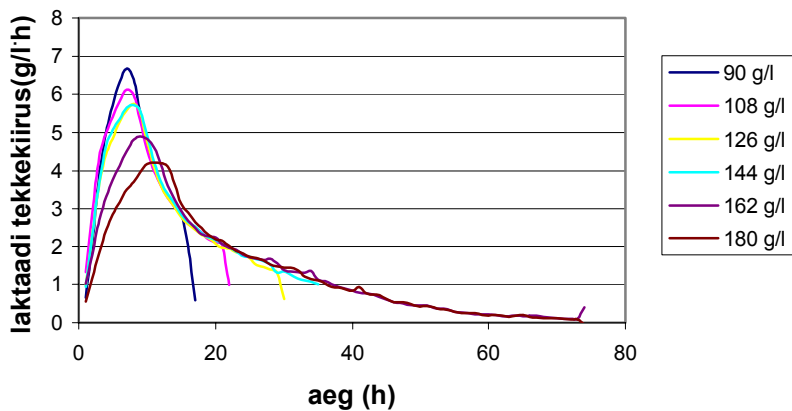
Tõstes söötmes glükoosi algkontsentratsiooni (4 – 18 g/l), ilmnes tüvel SIM-7 laktaadi tekkekiiruse tõus (2,9 g/lh-lt 8,8 g/lh-le) (joonis 7A). Maksimaalse produktiivsuse (8,8 g/lh) saavutas SIM-7 söötmes glükoosi algkontsentratsiooniga 18 g/l. Glükoosi algkontsentratsioonidel 18 - 180 g/l langes laktaadi tekkimise kiirus lineaarselt söötmes

glükoosi algkontsentratsiooni tõstes (8,8 g/lh-lt 4,2 g/lh-le). Seoses glükoosi algkontsentratsiooni tõstmisega kuni 180 g/l saavutati maksimaalne laktaadi tekkekiirus pikema aja jooksul (kasvatuse 1,5. kuni 11. tunniks) (joonis 7A ja 7B).

A.



B.

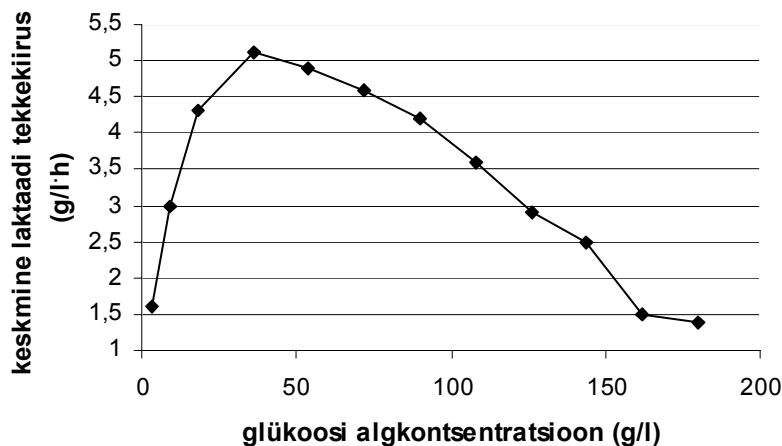


Joonis 7 A. Glükoosi algkontsentratsioonide (4 – 72 g/l) mõju *B. coagulans* SIM-7 laktaadi tekkekiirusele (g/lh).

B. Glükoosi algkontsentratsioonide (90 – 180 g/l) mõju *B. coagulans* SIM-7 laktaadi tekkekiirusele (g/lh).

Tüvel SIM-7 kaasnes glükoosi hulga tõstmisega (4 – 36 g/l) söötmes keskmise produktiivsuse tõus (1,6 g/lh-lt 5,1 g/lh-ni). Suurim keskmine laktaadi tekkimise kiirus (5,1 g/lh) saavutati 36 g/l glükoosiga söötmes. Sellest kõrgematel glükoosi

alkkontsentratsioonidel (36 – 180 g/l) keskmine piimhappe tekkekiirus langes (5,1 g/lh-lt 1,4 g/lh-le) (joonis 8).



Joonis 8. Glükoosi algskontsentratsioonide (4 g/l – 180 g/l) mõju *B. coagulans* SIM-7 keskmisele laktaadi produktiivsusele (g/lh).

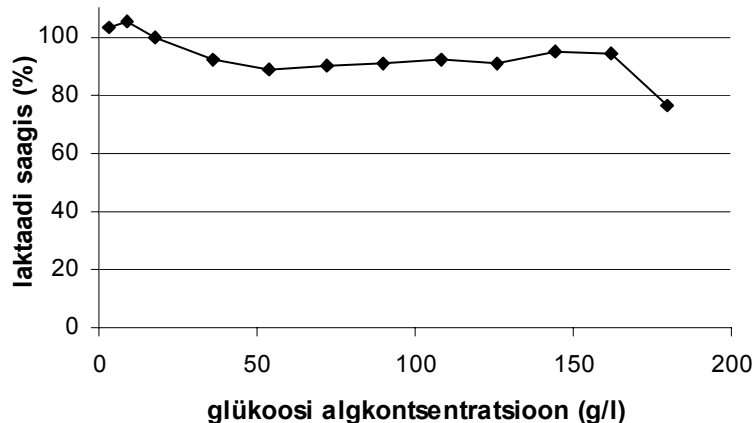
Ka teaduskirjanduses on näidatud, et suureneva glükoosi algskontsentratsiooniga fermentatsioonides kaasneb laktaadi tekkekiiruse langus. Glükoosi algskontsentratsioonidel 50 g/l - 250 g/l põhjustas suurem kogus glükoosi *Ec. faecalis*'e kultuurile produktiivsuse languse 9,72 g/lh-lt 2,31 g/lh-le (Yun *et al.*, 2003). Wee *et al.* (2004) leidsid, et tõstes melassi kontsentratsiooni (130 - 333 g/l), langeb *Ec. faecalis*'e keskmine laktaadi tekkimise kiirus 4,3 g/lh-lt 1,5 g/lh-le.

3.1.4. Laktaadi saagis

Laktaadi saagis arvutati toodetud piimhappe hulga (g/l) jagamisel tarbitud glükoosi hulgaga (g/l). Samas arvestati ka fermentatsioonikeskkonna neutraliseerimisest tingitud söötme ruumala suurenemist.

Enamiku kasutatud glükoosi kontsentratsioonide korral (4 – 162 g/l) saavutas tüvi SIM-7 laktaadi saagiseks vähemalt 90%. Vaid kasvatuses glükoosiga 180 g/l jäi laktaadi saagis madalaks (76%), kuna kääritusprotsess ei kestnud kogu süsinikallika tarvitamiseni (joonis 9). Antud juhul jäi 24 g/l ehk 13% algsest glükoosist laktaadiks fermenteerimata.

Seega, saavutamaks kõrget laktaadi saagist, ei tohiks glükoosi algkontsentratsioon tüve SIM-7 fermentatsioonisöötmes ületada 162 g/l.



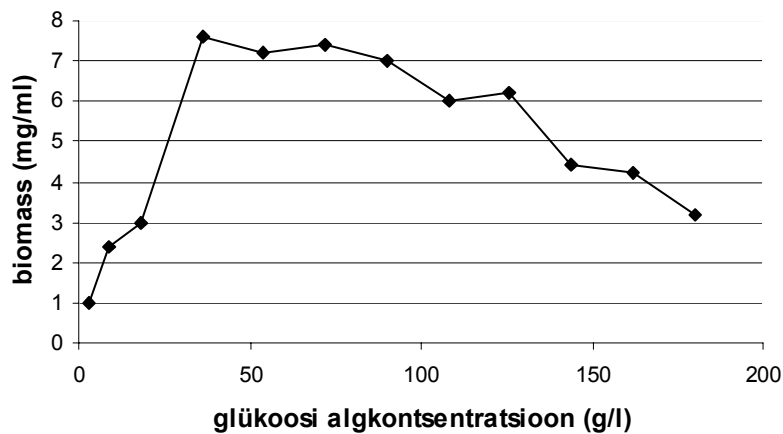
Joonis 9. Glükoosi algkontsentratsioonide (4 g/l – 180 g/l) mõju *B. coagulans* SIM-7 laktaadi saagisele (%).

Teaduskirjanduses on andmeid, et kõrgetel glükoosi algkontsentratsioonidel jääb söötmesse palju jääksuhkrut (Yun *et al.*, 2003). Kasvades 100 g/l glükoosil, konverteeris *Lb. casei* 84% glükoosist laktaadiks (Hujanen *et al.*, 2001). Kõrgetel glükoosi algkontsentratsioonidel (200 – 250 g/l) jäi *R. oryzae* puhul isegi 40 - 50% algsest glükoosist kasutamata (Bulut *et al.*, 2003). *Lb. rhamnosus* jättis 200 g/l glükoosiga kasvatuses laktaadiks konverteerimata 30% algsest suhkrust (Gonçalves *et al.*, 1991).

3.1.5. Biomass

Kasvatuste lõpus (süsinikuallika otsalõppemisel; 162 g/l ja 180 g/l glükoosiga söötmetes vastavalt 74. tunnil) võetud proovidest määrati Lowry meetodil (Lowry *et al.*, 1951) valgu kontsentratsioon. Eeldades, et poole bakteri massist moodustab valk, arvutati tüve SIM-7 biomassi kontsentratsioon (mg/ml).

Tüvi SIM-7 saavutas seda suurema biomassi (1 – 7,6 mg/ml), mida kõrgem oli glükoosi algkontsentratsioon söötmes (4 g/l – 36 g/l). Maksimalne biomass (7,6 mg/ml) saavutati 36 g/l glükoosiga fermentatsioonis. SIM-7 tootis stabiilselt biomassi üle 7 mg/ml, kui laktaadi tootmiseks kasutati söötmes 36 – 90 g/l glükoosi. Söötme glükoosisisaldus üle 90 g/l põhjustas tüve SIM-7 biomassi produktsiooni languse (joonis 10).



Joonis 10. Glükoosi algkontsentratsioonide (4 g/l – 180 g/l) mõju *B. coagulans* SIM-7 biomassi produktsioonile (mg/ml).

Saadud tulemustest selgub, et *B. coagulans* SIM-7 biomassi produktsiooniks on optimaalne glükoosi algkontsentratsioon söötmes 36 – 90 g/l (joonis 10). Madala suhkrusisaldusega (4 – 18 g/l) söötmetes on SIM-7 kesine biomassi produktsioon tingitud kiirest glükoosi ammendumisest kasvumeediumis. Kõrgetel suhkru algkontsentratsioonidel (108 – 180 g/l) on biomassi produktsiooni limiteerivaks faktoriks ilmselt liiga kõrge algne glükoosi ning hiljem tekkinud produkti hulk kasvumeediumis, mis tõstab rakkude väliskeskkonna osmootset rõhku. Sellistes tingimustes peavad rakud esmajärjekorras tagama enda ellujäämise hüperosmootses keskkonnas, mistõttu on biomassi produktsioon aeglustunud.

Saavutamaks piisavalt kõrget laktaadi kontsentratsiooni, oleks majanduslikult otstarbekas kasutada kõrgeid (vähemalt üle 100 g/l) süsinikuallika algkontsentratsioone (Yun *et al.*, 2003). Kuna substraadi kõrgeid kontsentratsioone pärssivad mikroorganismide kasvu, kasutatakse söötmetes suhteliselt madalaid (kuni 100 g/l) glükoosi algkontsentratsioone (Gonçalves *et al.*, 1991). Nagu *B. coagulans* SIM-7-gi puhul, inhibeerivad *Lb. rhamnosus*'e ja *Ec. faecalis*'e kasvu glükoosi kontsentratsioonid üle 100 g/l (Hujanen *et al.*, 2001; Yun *et al.*, 2003). *Lb. plantarum*'i biomassi produktsioonile mõjub inhibeerivalt juba 50 g/l glükoosi (Girauld *et al.*, 1991).

Kirjanduses leidub viiteid ka laktoosi kõrgete algkontsentratsioonide pärssivast toimest. *Lb. helveticus*'e kasv on maksimaalne laktoosi algkontsentratsioonidel 40 - 80 g/l. Sellest madalam substraadi kontsentratsioon limiteerib ning kõrgem inhibeerib kasvu

(Tango ja Ghaly, 1999). Wee *et al.* (2004) varieerisid *Ec. faecalis*'e kasvumeediumis melassi kontsentratsioone ning leidsid, et biomassile mõjusid positiivselt melassi algkontsentratsioonid kuni 267 g/l.

Käesoleva katseseeria tulemusena selgus, et optimaalsed glükoosi algkontsentratsioonid laktaadi tootmiseks perioodilises kultuuris, kasutades inokulumina *B. coagulans* SIM-7 vegetatiivseid rakke, on 126 – 144 g/l. Efektiivseks biomassi tootmiseks ei tohiks aga glükoosi algkontsentratsioonid söötmes ületada 90 g/l.

126 g/l-st madalamate glükoosi algkontsentratsioonide kasutamine ei taga majanduslikult efektiivset laktaadi produktsiooni. 144 g/l kõrgematel suhkru algkontsentratsioonidel väheneb *B. coagulans* SIM-7 võimekus konverteerida glükoosi laktaadiks suurenenud osmootse rõhu tõttu. Kasvukeskkonna suurenenud osmootne rõhk on tingitud kõrgest substraadi (glükoosi) ning järjest kasvava produkti (NH₃-laktaat) kontsentratsioonist söötmes (Bulut *et al.*, 2003). Roukas ja Kotzekidou (1998) on näidanud, et kõrgetel substraadi kontsentratsioonidel põhjustab alanenud veeaktiivsus kombinatsioonis plasmolüüsiga laktaadi produktiivsuse ja suhkru utiliseerimise languse.

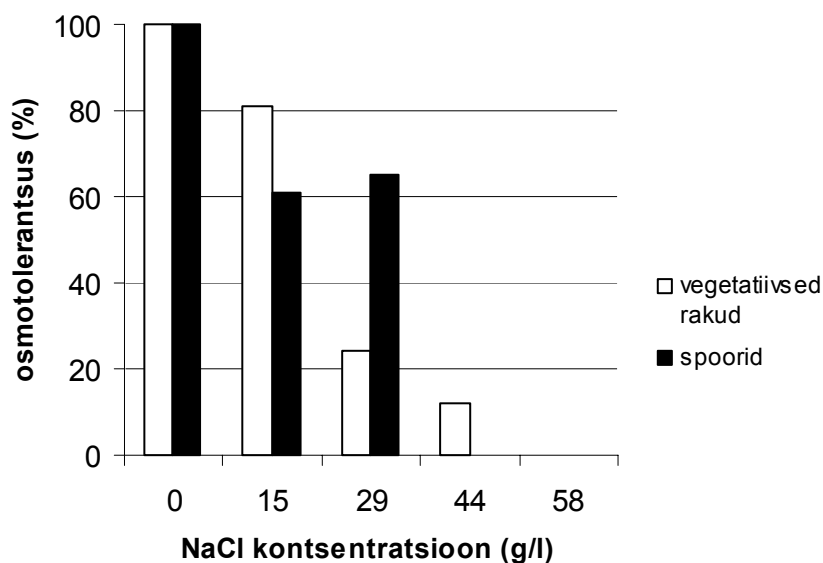
3.2. *B. coagulans* SIM-7 vegetatiivsete rakkude ja spooride osmotolerantsus

Teaduskirjanduses leidub andmeid, et mitmete perekonna *Bacillus* liikide spoorid on võimelised idanema, väljakasvama ning vegetatiivselt paljunema kõrge osmootse rõhuga keskkondades (Tovar-Rojo *et al.*, 2003). Sellest tulenevalt tekkis idee kasutada *B. coagulans* SIM-7 spore inokulumina piimhappe tootmisel. Eelnevalt otsustasime võrrelda *B. coagulans* SIM-7 spooride osmotolerantsust tüve vegetatiivsete rakkudega.

Keskkonna osmootset rõhku mõjutavad nii ioonsed (soolad) kui ka mitteioonsed (suhkrud) ained (Poolman, 2002). Osmotolerantsuse all mõistame mikroobi võimet kasvada kõrge soola/suhkru kontsentratsiooniga söötmes. Käesolevas töös väljendati osmotolerantsus protsendina: NaCl (või glükoosi) sisaldanud tassidelt üles kasvanud kolooniade hulk võrreldes kontrolltassidega (*Bc*-sööde).

Esmalt võtsime vaatluse alla tüve SIM-7 võime kasvada erinevate soola kontsentratsioonide korral. Selleks kasutasime *Bc*-söödet, millele oli lisatud NaCl, vastavalt

15 g/l, 29 g/l, 44 g/l ja 58 g/l (teisendatult 0,25 M, 0,5 M, 0,75 M ja 1 M). Kontrolliks kasutasime NaCl-ta *Bc*-söödet. Tassid inokuleeriti tüve SIM-7 vegetatiivsete rakkude või eelnevalt aktiveeritud spooridega. Spooride aktiveerimiseks kasutati enimkasutatavat meetodit – spooride kuumutamine temperatuuril 70 °C 30 minutit. Katsetulemused on toodud joonisel 11.



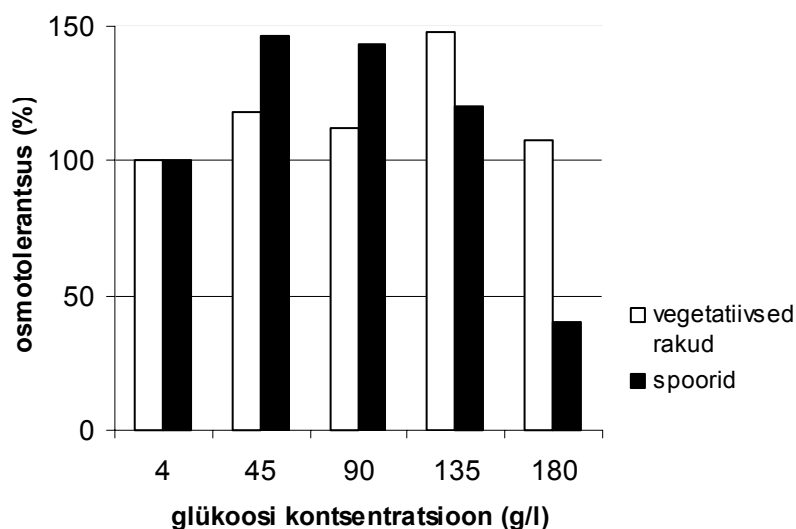
Joonis 11. Erinevate NaCl kontsentratsioonide (15 g/l – 58 g/l) mõju *B. coagulans* SIM-7 vegetatiivsete rakkude ja aktiveeritud spooride kasvule. Osmotolerantsus (%): NaCl sisaldanud tassidelt üles kasvanud kolooniate hulk võrreldes kontrolltassidega (NaCl-ta *Bc*-sööde). Tulemused on esitatud kolme paralleelse korduse aritmeetilise keskmisena.

Katsetulemustest selgus, et tüve SIM-7 vegetatiivsed rakud ei talu kõrgeid soola kontsentratsioone kasvukeskkonnas. Rakkude elujõulisus langes lineaarselt NaCl hulga kasvuga söötmes. 58 g/l NaCl sisaldusega tassidel tüve SIM-7 vegetatiivsete rakkude kasvu enam ei täheldatud. Tüve SIM-7 aktiveeritud spooridega inokuleeritud kasvumeediumitelt detekteeriti bakteri kasv kuni 29 g/l NaCl korral. Sellest kõrgematel soola kontsentratsioonidel (44 g/l ja 58 g/l) ei olnud SIM-7 spoorid enam võimelised idanema ja sellest tulenevalt kolooniaid moodustama (joonis 11).

Joonisel 11 väljatoodud tulemused tõestasid, et tüve SIM-7 vegetatiivsed rakud on osmootse stressi suhtes tolerantsemad kui aktiveeritud spoorid. Vastupidiselt meie andmetele on *B. cereus*'e, *B. megaterium*'i ja *B. subtilis*'e vegetatiivsed rakud osmootsele

stressile tundlikumad kui spoorid. *B. cereus*'e spoorid olid võimelised idanema ja kasvama 44 g/l NaCl sisaldavas keskkonnas. *B. megaterium*'i ja *B. subtilis*'e spoorid talusid isegi kõrgemaid soola kontsentratsioone (117 g/l) söötmes. *B. cereus*'e ja *B. megaterium*'i vegetatiivsed rakud ei suutnud kasvada juba 29 g/l NaCl olemasolul kasvumeediumis (Tovar-Rojo *et al.*, 2003).

Lisaks sooladele tõstavad kasvukeskkonna osmootset rõhku ka suhkrud (Poolman, 2002). Analoogne eksperiment viidi läbi glükoosiga, varieerides selle kontsentratsioone (45 g/l, 90 g/l, 135 g/l, 180 g/l, teisendatult 0,25 M, 0,5 M, 0,75 M, 1 M) *Bc*-söötmes. Kontrollina kasutasime *Bc*-söödet, mis sisaldas 4 g/l glükoosi. Tulemused on esitatud joonisel 12.



Joonis 12. Erinevate glükoosi kontsentratsioonide (45 g/l – 180 g/l) mõju *B. coagulans* SIM-7 vegetatiivsete rakkude ja aktiveeritud spooride kasvule. Osmotolerantsus (%): 45 g/l – 180 g/l glükoosi kontsentratsioonidega tassidelt üles kasvanud kolooniate hulk võrreldes kontrolltassidega (4 g/l glükoosiga *Bc*-sööde). Tulemused on esitatud kolme paralleelse korduse aritmeetilise keskmisena.

Nagu jooniselt 12 näha on enamik tulemustest üle 100%. Antud asjaolu on tingitud sellest, et osmotolerantsuse (%) arvutamisel võrreldi 45 g/l – 180 g/l glükoosi kontsentratsioonidega tassidelt üles kasvanud kolooniate hulka kontrolltassidega, mis

sisaldasid vaid 4 g/l glükoosi. Just kontrolltasside madal suhruisaldus (4 g/l) põhjustas osmotolerantsuse tõusu üle 100%.

Glükoosi kontsentratsiooni varieerimine kasvukeskkonnas ei mõjutanud märkimisväärselt tüve SIM-7 vegetatiivsete rakkude kasvu. Vaid 135 g/l glükoosiga tassidelt kasvas mõnevõrra rohkem kolooniaid üles kui teistelt. Ka tüve SIM-7 spooride idanemine ja väljakasv ei olnud mõjutatud glükoosi kontsentratsioonist (4 g/l – 135 g/l) söötmes. Erandiks oli 180 g/l glükoosiga sööde, millelt kasvas üles vähem kolooniaid kui teistelt tassidelt. Tõenäoliselt oli põhjuseks kõrge suhkru kontsentratsiooni pärssiv mõju spooride idanemisele (joonis 12).

Nagu katsest näha, aga ka kirjandusest teada, on suhkrute poolt põhjustatud stress bakteritele talutavam kui soolastress. Glaasker *et al.* (1996) nentisid, et *Lb. plantarum*'i kasvule avaldas 6% KCl 35% sahharoosiga võrreldavat mõju. Ka *B. subtilis* talus suhkrustressi paremini kui soola oma. 0,5 M NaCl-ga ja 0,8 M sorbitooliga söötmetes oli *B. subtilis*'e ellujäämus võrreldes kontrolliga vastavalt 70% ja 100% (Ikeuchi *et al.*, 2003).

Põhjuseks on rakkude võime kasutada suhkruid osmoprotektoritena, aga ka energiaallikana. Algul põhjustavad kõrged suhkru kontsentratsioonid keskkonna lahustunud aine hulga tõusu. Pikapeale suhkru kontsentratsioon raku sees ja söötmes tasakaalustub, kuna bakterid transpordivad suhkru spetsiifiliste transporteritega rakku (Poolman, 2002).

Kahe eelpool toodud katse tulemused tõestasid, et erinevalt teistes *Bacillus*'test (*B. cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*) on *B. coagulans* SIM-7 vegetatiivsed rakud osmotolerantsemad kui aktiveeritud spoorid, seda eriti soolastressi korral.

Kuna tüve SIM-7 spoorid idanesid edukalt 135 g/l glükoosi juuresolekul, ning 126 g/l ja 144 g/l glükoosi kontsentratsioonid on optimaalsed piimhappe tootmiseks, kasutades SIM-7 vegetatiivseid rakke, otsustasime proovida fermentatsioonisöötme inokuleerimist tüve SIM-7 aktiveeritud spooridega.

3.3. Piimhappe tootmine *B. coagulans* SIM-7 aktiveeritud spooridega

Väga oluline etapp piimhappe tootmisel on inokuleerimiseks vajaliku starterkultuuri ettevalmistamine. Starterkultuurina vegetatiivsete rakkude kasutamine eeldab eelkasvatuse läbiviimist ning on seega aeganõudev.

Spooride kasutamine piimhappe tootmiseks annab mitmeid eeliseid. Esmalt, mikroobikultuuri säilitamine spooride kujul on hõlbus, kuna selline säilituskultuur ei idane ilma spetsiaalse aktivatsioonita (Jõgi *et al.*, 2006).

Teiseks, spooride kasutamine sissekylvina võimaldab ajaliselt ja ruumiliselt eraldada vajaliku rakumaterjali tootmise ning nende kasutamise fermentatsiooniprotsessis inokulumina. Vastupidiselt, vegetatiivsete rakkude puhul on hädavajalik ajaliselt ja ruumiliselt kompleksne lahendus värske inokulumi valmistamiseks (Jõgi *et al.*, 2006).

Kolmandaks, spooride kasutamine inokulumina välistab eelkasvatuse vajaduse. Kasutades spoore inokulumina piimhappe tootmiseks, saame spoorid otse säilituskultuurist fermentatsioonisöötmesse külvata (Sakai ja Ezaki, 2006). Esmalt peame vaid looma tingimused spooride efektiivseks aktivatsiooniks ja idanemiseks.

B. coagulans SIM-7 spooride aktivatsiooni tagab 30-minutiline inkubatsioon temperatuuril 70 °C. Vältimaks deaktivatsiooni, tuleb seejärel kiiresti luua tingimused spooride idanemiseks. Tšertova (2005) tegi kindlaks, et *B. coagulans* SIM-7 spooride idanemine sõltub eelkõige söötme pH-st, olles efektiivseim madalatel pH väärtustel (5,0 – 6,0).

Järgnevalt uurisimegi *B. coagulans* SIM-7 spooride kasutamise võimalusi piimhappe tootmiseks.

3.3.1. Spooride idanemistingimuste optimeerimine kääritusprotsessis I

Kasvatusseeria nr. 2 viidi läbi eesmärgiga uurida spooride kasutamise võimalikkust inokulumina laktaadi tootmiseks.

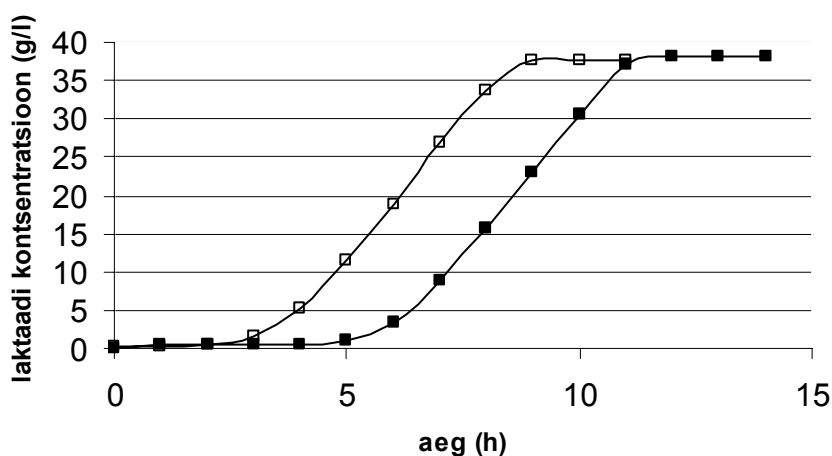
Kasvatused viidi läbi perioodilises kultuuris, kasutades süsinikuallikana glükoosi (45 g/l), ning tüve lämmastikuvajadus tagati YE-ga (25 g/l). Fermentatsioonisöötmed inokuleeriti paralleelselt *B. coagulans* SIM-7 vegetatiivsete rakkude (10^7 rakku/ml) ja eelnevalt termostaadis aktiveeritud (70 °C 30 minutit) spooridega (10^7 spoori/ml).

Inokuleerides fermentatsioonisöödet spooridega, tuleb esmalt luua sobivad idanemistingimused. Käesolevas töös kasutatud bakteri *B. coagulans* SIM-7 spooride idanemine sõltub eelkõige söötme pH-st, olles efektiivseim madalatel pH väärtustel (5,0 – 6,0) (Tšertova, 2005). Juhindudes Tšertova (2005) uurimistöö tulemustest, inkubeerisime tüve SIM-7 aktiveeritud spooridega inokuleeritud fermentatsioonisöödet ühe tunni vältel

pH-l 5,5. Kasvatuse alguspunktiks (0 tund) loeti aeg, mil söötme pH viidi 6,18-ni (fermentatsiooni läbiviimise pH).

Kasvatused kestsid kuni süsinikuallika otsalõppemiseni söötmes (glükoosi lõppkontsentratsioon < 0,2 g/l). Tulemused on esitatud joonistel 13 ja 14 ning tabelis 2.

Laktaadi lõppkontsentratsioon 38 g/l saavutati vegetatiivsete rakkudega kasvatuses 11 tunni jooksul, aktiveeritud spooridega vastavalt kaks tundi varem (kasvatuse 9. tunnil) (joonis 13).



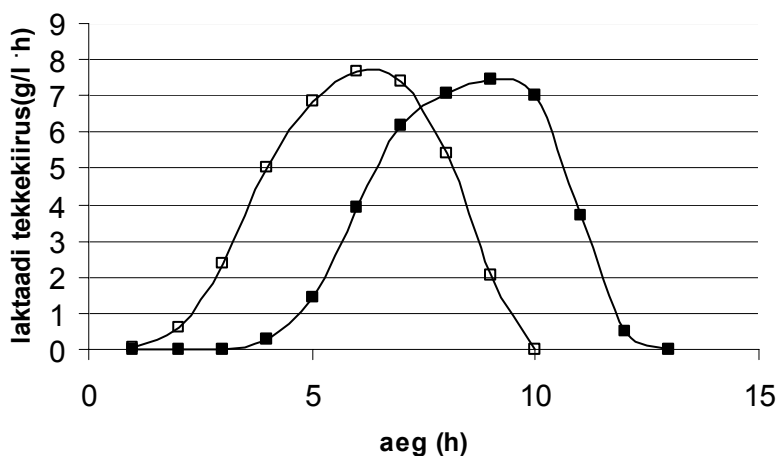
Joonis 13. Piimhappe tootmiseks kasutatud inokulumi mõju laktaadi produktsioonile (g/l). 45 g/l glükoosi algkontsentratsiooniga fermentatsioonisöödet inokuleeriti *B. coagulans* SIM-7 vegetatiivsete rakkude (■) või aktiveeritud spooridega (□). Viimaseid inkubeeriti enne kasvatuse algust 1 tund pH-l 5,5, tagamaks spooride idanemist.

Kasvumeediumi inokuleerimine tüve SIM-7 vegetatiivsete rakkude või aktiveeritud spooridega tagas samaväärse maksimaalse laktaadi produktiivsuse (vastavalt 7,5 g/lh ja 7,7 g/lh) ja piimhappe saagise (vastavalt 94% ja 93%) (joonis 14; tabel 2).

Tulenevalt pikemast kohanemisajast kasvukeskkonnaga, saavutati tüve SIM-7 vegetatiivsete rakkudega kasvatuses maksimaalne laktaadi tekkekiirus hiljem (9. tunniks) ja keskmine piimhappe tekkekiirus madalam (3,5 g/lh) kui aktiveeritud spooridega (vastavalt 6. tunniks ja 4,2 g/lh) (joonis 14; tabel 2).

Antud katse tõestas, et tüve SIM-7 aktiveeritud spoore on võimalik rakendada piimhappe tootmiseks. Lisaks selgus, et *B. coagulans* SIM-7 aktiveeritud spooride

kasutamine inokulumina tagab kõrgema keskmise laktaadi tekkekiiruse ja sellest tulenevalt ka lühema fermentatsioonitsükli kui vegetatiivseid rakke inokulumina kasutades.



Joonis 14. Piimhappe tootmiseks kasutatud inokulumi mõju laktaadi tekkekiirusele (g/lh). 45 g/l glükoosi algkontsentratsiooniga fermentatsioonisöödet inokuleeriti *B. coagulans* SIM-7 vegetatiivsete rakkude (■) või aktiveeritud spooridega (□). Viimaseid inkubeeriti enne kasvatusel algust 1 tund pH-l 5,5, tagamaks spooride idanemist.

Tabel 2. Keskmise laktaadi produktiivsuse ja saagise sõltuvus inokulumist 45 g/l glükoosi algkontsentratsiooniga fermentatsioonikeskkonnas. Aktiveeritud spore inkubeeriti enne kasvatusel algust 1 tund pH-l 5,5, tagamaks spooride idanemist.

Inokulum	P_k (g/lh)	Laktaadi saagis (%)
aktiveeritud spoorid	4,2	93
vegetatiivsed rakud	3,5	94

Lühend: P_k : keskmine laktaadi produktiivsus fermentatsioonitsükli

Madalam keskmine laktaadi tekkekiirus ja pikem fermentatsioonitsükkel tulenes tüve SIM-7 vegetatiivsete rakkude pikemast kohanemisajast kasvukeskkonnaga (joonis 13).

Tõenäoliselt ei ole *B. coagulans* SIM-7 vegetatiivsete rakkude algtihedus 10^7 rakku/ml piisav, alustamaks kohest piimhappe tootmist 45 g/l glükoosiga fermentatsioonikeskkonnas.

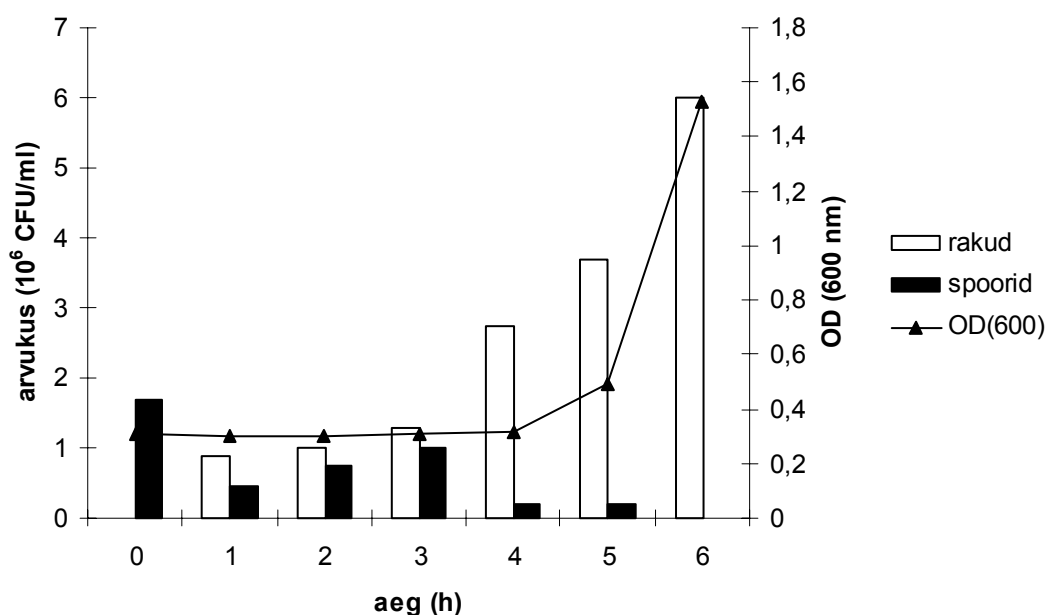
Tüve SIM-7 aktiveeritud spooridega inokuleeritud kasvatuse varasem algus võib olla tingitud spooride aktiveerimisel toimunud bakterikultuuri sünkronisatsioonist. Antud juhul kasvasid rakud välja korraga samast arengufaasist. Lisaks on võimalik, et spoori idanemise ja väljakasvamise käigus toimuv SASP-ide ja spoorikestade lagundamine tagab bakteritele lisa-osmoprotektoreid (Ruzal *et al.*, 1994). Viimased võimaldavad suhkru poolt põhjustatud keskkonna kõrgema osmootse rõhuga kiiremini kohaneda ja sellest tulenevalt ka varem piimhapet tootma hakata.

3.3.2. *Bacillus coagulans* SIM-7 spooride idanemine

B. coagulans SIM-7 aktiveeritud spooride kasutamisel fermentatsiooniprotsessi inokulumina on esmatähtis tagada sobivad tingimused spooride idanemiseks. Nagu kasvatusseeriast nr. 2 selgus, idanesid tüve SIM-7 aktiveeritud spoorid edukalt fermentatsioonisöötmes pH-l 5,5. Järgnevalt otsustasime jälgida idanemisprotsessi kulgu ajas. Levinuim meetod spooride idanemise hindamiseks on kultuuri OD mõõtmine lainepikkusel 600 nm. Spooride idanemine põhjustab kultuuri OD tõusu. Lisaks OD muutuse jälgimisele tegime väljakülve.

Antud katse läbiviimiseks kasutati kasvatusseerias nr. 2 aktiveeritud spooridega läbiviidud fermentatsiooni. Proove võeti alates fermentatsioonisöötme inokuleerimisest tüve SIM-7 aktiveeritud spooridega (sealhulgas ühetunniline inkubatsioon pH-l 5,5) 1-tunniste vahedega 6 tunni jooksul. Proov jagati kaheks, millest üht osa kuumutati temperatuuril 80 °C 15 minutit, tagamaks vegetatiivsete rakkude surma, samas aga ka spooride aktiveerumist. Tehtud väljakülvist saadi spooride arvukus (CFU/ml) fermentatsioonimeediumis antud ajahetkel. Teine osa proovist külvati ilma eelneva kuumutamiseta, mis võimaldas leida vegetatiivsete rakkude arvukuse (CFU/ml) kultuuris. Kuigi viimases ei tagatud spooridele aktiveerumistingimusi, ei olnud välistatud ka mõningane spooride idanemine ja väljakasv. Tulemused on esitatud joonisel 15.

Kuna proove hakati võtma alates aktiveeritud spooride inkubeerimisest pH-l 5,5, kuid kasvatuse alguspunktiks loeti aeg, mil söötme pH viidi 6,18-ni (fermentatsiooni pH), esineb joonisel 15 võrreldes joonistega 13 ja 14 ühetunnine nihe.



Joonis 15. *Bacillus coagulans* SIM-7 spooride idanemise ja väljakasvu suktsessioon fermentatsiooni käigus. Ajahetk 0 tähistab söötme inokuleerimist tüve SIM-7 aktiveeritud spooridega, ajahetk 1 aga spooride ühetunnise inkubatsiooni lõppu pH-l 5,5. Seega võrdub joonisel 15 väljatoodud ajahetk 1 tund fermentatsiooniprotsessi alguspunktiga (joonis 13 ja 14 – 0 tund). Tulemused on esitatud kolme paralleelse korduse aritmeetilise keskmisena.

Kultuuri OD hakkas tõusma peale 4. tundi (joonis 15). Jooniselt 13 selgub, et samal ajal (kasvatuse 3. tunnil) saab alguse detekteeritav piimhappe toomine. Juba tunni möödudes söötme inokuleerimisest on täheldatav vegetatiivsete rakkude olemasolu meediumis (joonis 15). 4 tunni möödudes on spooride eduka idanemise ja väljakasvu tulemusel toimunud märkimisväärne vegetatiivsete rakkude osakaalu tõus fermentatsioonimeediumis (joonis 15), mis väljendub detekteeritavas piimhappe produktsioonis (joonis 13).

Vaadates spooripopulatsiooni kasvatuse esimestel tundidel (0 – 5. tund), ei ole esialgu märgata mingit seaduspärasust. Peale söötme inokuleerimist on täheldatav spooride arvukuse kõikumine. Kui 1. tunnil ongi märgata spooride hulga vähenemist kasvumeediumis, siis 3. tunniks on spooride osakaal jällegi suurenenud. 6. tunnil spoore kasvumeediumis enam ei detekteeritud (joonis 15).

Spooride kõikuv arvukus on seletatav spoorikultuuri heterogeensusega. Palop (1997) kaastöötajatega kirjeldas *B. coagulans* tüve STCC 4522 spooridel kahe alampopulatsiooni olemasolu – temperatuuritundlik ja kuumaresistentne. Sarnast nähtust on *B. coagulans* SIM-

7 puhul kirjeldanud ka Tšertova (2005). Kahe alampopulatsiooni olemasolule viitab mõlemal juhul asjaolu, et kõrgel temperatuuril (≥ 100 °C) toimub algselt kiire spooride arvukuse langus ehk kuumatundliku populatsiooni inaktivatsioon. Sellele järgneb mõningane spooride arvukuse tõus ajas ja jällegi langus (Palop *et al.*, 1997; Tšertova, 2005).

Võimalik, et käesolevas uurimistöös joonisel 15 nähtav spooride arvukuse kõikumine ajas on seletatav samuti kahe alampopulatsiooni olemasoluga. Antud juhul oleks tegu kiiresti uue keskkonnaga kohaneva ja seal idaneva alampopulatsiooni ning aeglasemalt adapteeruva ja idaneva alampopulatsiooniga. Esimese alampopulatsiooni idanemine ja väljakasv toimub paari tunni jooksul peale sissekülvi. Teine aga vajab idanemiseks ja väljakasvuks enam aega.

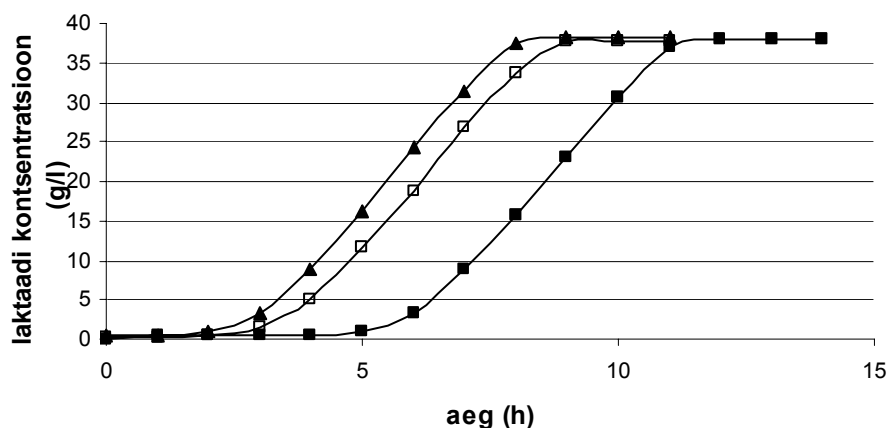
3.3.3. Spooride idanemistingimuste optimeerimine kääritusprotsessis II

Eespool kirjeldatud katsetes inokuleerisime fermentatsioonikeskkonda eelnevalt termostaadis temperatuuril 70 °C 30 minutit kuumutatud (aktiveeritud) *B. coagulans* SIM-7 spooridega. Lihtsustamaks fermentatsiooni läbiviimist, otsustasime välja selgitada, kas *B. coagulans* SIM-7 spore on võimalik aktiveerida otse fermentatsioonisöötmes.

Tšertova (2005), kes uuris glükoosi mõju *B. coagulans* SIM-7 spooride idanemisele jõudis järeldusele, et juba 18 g/l glükoosi kontsentratsioon söötmes mõjub idanemisele inhibeerivalt. Põhjuseks toodi välja suhkru poolt põhjustatud osmootne stress (Tšertova, 2005). Sellest tingituna otsustasime uurida, kuidas idanevad *B. coagulans* SIM-7 spoorid fermentatsioonikeskkonnas, kus puudub glükoos.

Arvestades eelpool toodud asjaolusid, inkubeerisime *B. coagulans* SIM-7 spooridega (10^7 spoori/ml) inokuleeritud fermentatsioonisöödet (ilma glükoosita) temperatuuril 70 °C 30 minutit, tagamaks spooride aktivatsiooni. Seejärel alandasime fermentatsioonikeskkonna temperatuuri (55,5 °C) ning viisime söötme pH 5,5-ni, soodustamaks aktiveerunud spooride idanemist. Tunni aja möödudes lisasime glükoosi (45 g/l) ning tõstisime pH 6,18-ni, võimaldamaks piimhappe tootmist. Kontrollina viisime läbi kasvatused tüve SIM-7 vegetatiivsete rakkude (10^7 rakku/ml) ja glükoosi juuresolekul idanenud spooridega (10^7 spoori/ml). Kasvatuste alguspunktiks (0 tund) loeti aeg, mil söötme pH viidi 6,18-ni (fermentatsiooni läbiviimise pH). Kasvatused kestsid kuni süsinikuallika otsalõppemiseni söötmes (glükoosi lõppkontsentratsioon $< 0,2$ g/l). Tulemused on esitatud joonistel 16 ja 17 ning tabelis 3.

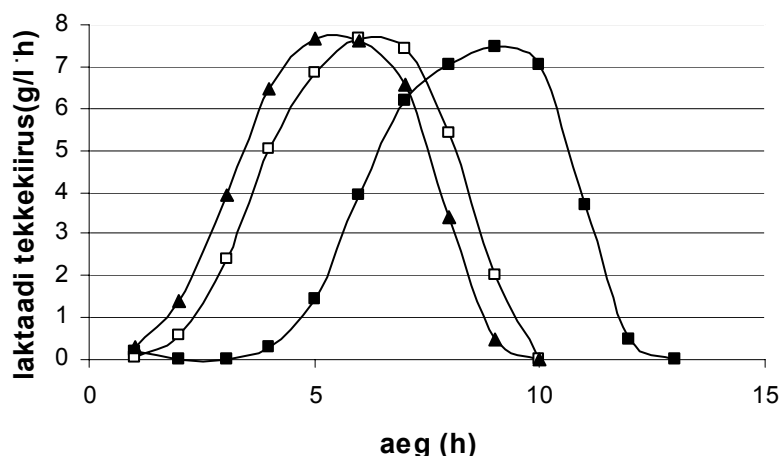
Tüve SIM-7 spooride idanemine glükoosita söötmes võimaldas lõpetada fermentatsioonitsükli ühe tunni võrra varem (8 h) kui glükoosi juuresolekul idanenud spooridega kasvatuses (9 h) ning 3 tundi varem kui vegetatiivsete rakkudega inokuleerides (11 h) (joonis 16).



Joonis 16. Piimhappe tootmiseks kasutatud inokulumi mõju laktaadi produktsioonile (g/l). 45 g/l glükoosi algkontsentratsiooniga fermentatsioonikeskkonda inokuleeriti *B. coagulans* SIM-7 vegetatiivsete rakkude (■), eelnevalt aktiveeritud (70 °C 30 min) (□) või aktiveerimata (▲) spooridega. Viimased aktiveeriti (70 °C 30 min) söötmes koheselt peale inokuleerimist. Spooride idanemine (55,5 °C pH 5,5 1 h) viidi läbi glükoosiga (□) või glükoosita (▲) fermentatsioonisöötmes.

Tüve SIM-7 spooridega läbiviidud kasvatuses saavutati maksimaalne laktaadi tekkekiirus (7,7 g/lh) fermentatsiooni 5. - 6. tunniks, vegetatiivsete rakkudega (7,5 g/lh) vastavalt 9. tunniks (joonis 17).

Spooride idanemine glükoosi juuresolekuta võimaldas tüvel SIM-7 saavutada kõrge keskmise laktaadi tekkekiiruse (4,8 g/lh). Glükoosi juuresolekul idanenud spooridega toodeti piimhappet mõnevõrra aeglasemalt (4,2 g/lh) ning vegetatiivsete rakkudega inokuleeritud kasvatuses veelgi aeglasemalt (3,5 g/lh). Viimane oli ligikaudu $\frac{3}{4}$ glükoosi juuresolekuta idanenud spooridega saavutatud keskmisest laktaadi tekkekiirusest (4,8 g/lh). Kõigil kolmel juhul produtseeriti laktaati saagisega üle 90% (tabel 3).



Joonis 17. Piimhappe tootmiseks kasutatud inokulumi mõju laktaadi tekkekiirusele (g/lh). 45 g/l glükoosi algkontsentratsiooniga fermentatsioonisöödet inokuleeriti *B. coagulans* SIM-7 vegetatiivsete rakkude (■), eelnevalt aktiveeritud (70 °C 30 min) (□) või aktiveerimata (▲) spooridega. Viimased aktiveeriti (70 °C 30 min) söötmes koheselt peale inokuleerimist. Spooride idanemine (55,5 °C pH 5,5 1 h) viidi läbi glükoosiga (□) või glükoosita (▲) fermentatsioonisöötmes.

Tabel 3. Keskmise laktaadi produktiivsuse ja saagise sõltuvus inokulumist 45 g/l glükoosi algkontsentratsiooniga fermentatsioonikeskkonnas. Spooride idanemistingimused: 55,5 °C, pH 5,5, 1 tund.

Inokulum	P_k (g/lh)	Laktaadi saagis (%)
vegetatiivsed rakud	3,5	94
spoorid glc^+	4,2	93
spoorid glc^-	4,8	95

Lühendid: P_k : keskmine laktaadi produktiivsus fermentatsioonitsükli; spoorid glc^+ : glükoosi juuresolekul idanenud spoorid; spoorid glc^- : glükoosi juuresolekuta idanenud spoorid.

Antud kasvatusseeria tulemustest selgub, et *B. coagulans* SIM-7 spooride kasutamine inokulumina tagab eelkõige lühema kääritusprotsessi kui vegetatiivseid rakke

sissekülvina kasutades. Sarnast asjaolu on täheldanud ka Rosenberg (2005) kaastöötajatega, kasvatades *B. coagulans* CCM 4318 80 g/l glükoosi algkontsentratsiooniga söötmes. Antud juhul toodeti spooridega inokuleeritud kasvatuses 24 tunni jooksul 77,5 g/l laktaati ning saavutati keskmiseks piimhappe tekkekiiruseks 3,2 g/lh. Sissekülvina vegetatiivsete rakkude kasutamine võimaldas sama hulga laktaati (77,5 g/l) toota 25 tunni jooksul ning saavutada keskmiseks piimhappe tekkekiiruseks 3,1 g/lh (Rosenberg *et al.*, 2005).

Lisaks sai selgeks, et tüve SIM-7 spooride aktiveerimine (70 °C 30 min) söötmes ja idanemine glükoosi juuresolekuta (55,5 °C pH 5,5 1 h) tagab efektiivsema kääritusprotsessi, (eriti protsessi kestust silmas pidades) kui enne sissekülvit termostaadis aktiveeritud ja glükoosi juuresolekul idanenud spooride kasutamine sissekülvina. Spooride idanemine glükoosita keskkonnas võimaldab varasemat kääritustsükli algust (joonis 16). Sellest tulenevalt on ka keskmine laktaadi produktiivsus kõrgem ja fermentatsioon lühem kui glükoosi juuresolekul idanenud spooridega kasvatuses.

Efektiivsema kääritusprotsessi tagab spooride idanemine glükoosi juuresolekuta, mis kinnitab Tšertova (2005) andmeid, et glükoos avaldab inhibeerivat mõju spooride idanemisele. Spooride aktiveerimine söötmes lihtsustab eelkõige fermentatsiooni läbiviimist. Sellest tulenevalt kasutasime edaspidistes kasvatuses *B. coagulans* tüve SIM-7 spooridega kasvatusseerias nr. 3 väljatöötatud spooride aktiveerimis- ja idanemistingimusi.

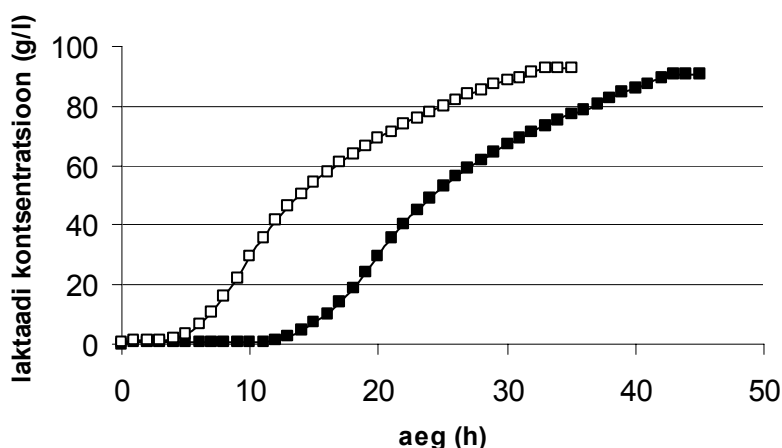
3.3.4. Piimhappe tootmine 126 g/l glükoosi algkontsentratsiooniga söötmes

Järgnevalt otsustasime kasutada *B. coagulans* SIM-7 spoore inokulumina 126 g/l glükoosi algkontsentratsiooniga fermentatsiooniprotsessis, ja seda kahel põhjusel. Esiteks, kasvatused tüve SIM-7 spooridega 45 g/l glükoosiga söötmes (kasvatusseeria nr. 3) näitasid, et spooridega inokuleeritud fermentatsioon on lühem ja kõrgema laktaadi tekkekiirusega kui vegetatiivsete rakkudega läbiviidud kasvatus. Teiseks, kasvatusseeriast nr. 1 selgus, et 126 g/l glükoosi kontsentratsioon fermentatsioonisöötmes on optimaalne, tootmaks laktaati *B. coagulans* SIM-7 vegetatiivsete rakkudega (10^8 rakku/ml).

Kasvatusseeria nr. 4 viidi läbi perioodilises kultuuris 126 g/l glükoosi algkontsentratsiooniga fermentatsioonimeediumis. Söödet inokuleeriti paralleelselt *B. coagulans* SIM-7 vegetatiivsete rakkude (10^7 rakku/ml) ja spooridega (10^7 spoori/ml). Spooride aktiveerimine ja idanemine tagati analoogselt kasvatusseerias nr. 3 kasutatuga.

Kasvatused kehtsid kuni süsinikuallika otsalõppemiseni (glükoosi lõppkontsentratsioon < 0,2 g/l) söötmes. Tulemused on esitatud joonistel 18 ja 19 ning tabelis 4.

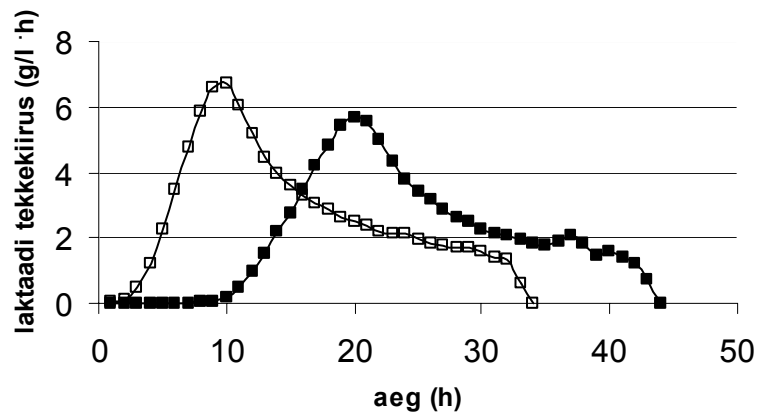
Lõplikuks laktaadi kontsentratsiooniks kasvatustes tüve SIM-7 vegetatiivsete rakkude ja spooridega saadi vastavalt 91 g/l ja 92 g/l. Põhiline erinevus seisnes fermentatsiooni kestuses. Tüve SIM-7 spooride kasutamine inokulumina võimaldas 10 tundi lühemat kääritudsükli (33 h) kui vegetatiivsete rakkude kasutamine sissekylvina (43 h) (joonis 18).



Joonis 18. Piimhappe tootmiseks kasutatud inokulumi mõju laktaadi produktsioonile (g/l). 126 g/l glükoosi algkontsentratsiooniga fermentatsioonisöödet inokuleeriti *B. coagulans* SIM-7 vegetatiivsete rakkude (■) või spooridega (□). Spooride aktiveerimine (70 °C 30 min) ja idanemine (55,5 °C pH 5,5 1 h) viidi läbi glükoosita fermentatsioonisöötmes.

Fermentatsioonisöötme inokuleerimine spooridega võimaldas tüvel SIM-7 saavutada maksimaalse piimhappe tekkekiiruse (6,7 g/l/h) kasvatusel 10. tunniks. Vegetatiivsete rakkudega inokuleeritud kasvatuses toodeti maksimaalsel kiirusel (5,7 g/l/h) piimhapet kasvatusel 20. tunniks (joonis 19).

Erinevused fermentatsiooniprotsessi keskmises laktaadi tekkekiiruses olid samad, mis kasvatusseerias nr. 3: vegetatiivsete rakkude kasutamine tingis ¼ võrra madalama keskmise laktaadi tekkekiiruse (2,1 g/l/h) kui sissekylvina tüve SIM-7 spooride kasutamine (2,8 g/l/h). Mõlemas fermentatsioonis saadi laktaadi saagiseks vähemalt 95% (tabel 4).



Joonis 19. Piimhappe tootmiseks kasutatud inokulumi mõju laktaadi tekkekiirusele (g/lh). 126 g/l glükoosi algkontsentratsiooniga fermentatsioonisöödet inokuleeriti *B. coagulans* SIM-7 vegetatiivsete rakkude (■) või spooridega (□). Spooride aktiveerimine (70 °C 30 min) ja idanemine (55,5 °C pH 5,5 1 h) viidi läbi glükoosita fermentatsioonikeskkonnas.

Tabel 4. Keskmise laktaadi produktiivsuse ja saagise sõltuvus inokulumist 126 g/l glükoosi algkontsentratsiooniga fermentatsioonikeskkonnas. Spooride aktiveerimine (70 °C 30 min) ja idanemine (55,5 °C pH 5,5 1 h) viidi läbi glükoosita fermentatsioonisöötmes.

Inokulum	P_k (g/lh)	Laktaadi saagis (%)
vegetatiivsed rakud	2,1	95
spoorid	2,8	97

Lühend: P_k : keskmine laktaadi produktiivsus fermentatsioonitsükli

Tulemustest selgub, et tüve SIM-7 spooride aktiveerimine söötmes ja idanemine glükoosi juuresolekuta tagab efektiivse kääritusprotsessi lisaks 45 g/l glükoosi algkontsentratsiooniga söötmes ka kõrgema suhkru algkontsentratsiooniga (126 g/l) fermentatsioon.

Järgnevalt võrdlesime antud katse tulemusi kasvatuseeria nr. 1 omadega, kus 126 g/l glükoosi algkontsentratsiooniga fermentatsioonisöödet inokuleeriti tüve SIM-7 vegetatiivsete rakkudega (10^8 rakku/ml) (tabel 5).

Võrdlusest selgub, et hoolimata 3 tundi pikemast fermentatsioonitsükli kestusest (30 h asemel 33 h), saavutatakse spooridega alustatud kasvatuses kõrgem maksimaalne laktaadi tekkimise kiirus (6,7 g/lh) kui vegetatiivsete rakkudega (5,8 g/lh). Samas, fermentatsioonitsükli keskmine piimhappe produktiivsus oli mõlemal juhul sarnane (2,8 g/lh – 2,9 g/lh). Lisaks võimaldas tüve SIM-7 spooridega inokulatsioon toota laktaati kõrgema saagisega (97%) kui vegetatiivsete rakkude puhul (91%) (tabel 5).

Tabel 5. Kasvatuseeria nr. 1 vegetatiivsete rakkudega (10^8 rakku/ml) ja kasvatuseeria nr. 4 spooridega (10^7 spoori/ml) inokuleeritud 126 g/l glükoosi algkontsentratsiooniga kasvatuste tulemuste võrdlus.

Kasvatuseeria nr.	Inokulum	L_c (g/l)	T (h)	P_{max} (g/lh)	P_{maxT} (h)	P_k (g/lh)	Laktaadi saagis (%)
1	vegetatiivsed rakud	92	30	5,8	8	2,9	91
4	spoorid	92	33	6,7	10	2,8	97

Lühendid: L_c : laktaadi lõppkontsentratsioon; T: fermentatsioonitsükli kestus; P_{max} : maksimaalne laktaadi produktiivsus fermentatsioonitsükli; P_{maxT} : maksimaalse laktaadi produktiivsuse saavutamiseks kulunud aeg; P_k : keskmine laktaadi produktiivsus fermentatsioonitsükli.

Võrdlusest selgub, et hoolimata kümnekordsest sissekülvi suuruse vahest (spoorid - 10^7 spoori/ml; vegetatiivsed rakud - 10^8 rakku/ml), on erinevused laktaadi tootmise efektiivsuses minimaalsed. Nii mõnegi parameetri puhul (laktaadi lõppkontsentratsioon, maksimaalne tekkekiirus, saagis) tagas spooride kasutamine efektiivsema laktaadi tootmisprotsessi.

Kasvatuseeriaid nr. 2 – 4 kokku võttes selgub, et spooride kasutamine fermentatsioonisöötme inokuleerimiseks on igati õigustatud. Lisaks hõlpsale säilitamisele ning eelkasvatuse välistamisele võimaldab spooride kasutamine inokulumina ka lühemat kääritustsükli kui vegetatiivseid rakke kasutades.

3.4. Piimhappe tootmine *B. coagulans* SIM-7 puhastamata spooridega

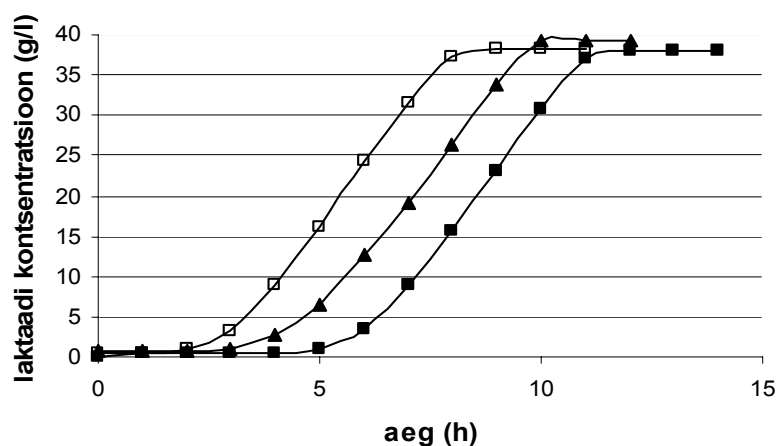
Eelpoolt toodud kasvatused tõestasid *B. coagulans* SIM-7 spooride paremust inokulumina vegetatiivsete rakkude ees piimhappe tootmisprotsessis. Spooride kasutamisel mastaapseks piimhappe tootmiseks on limiteerivaks etapiks puhta spoorikultuuri saamine. Spooride puhastamine on aeganõudev ja mitmeid erinevaid etappe vajav protsess. Sellest tingituna otsustasime uurida, kuidas mõjutab piimhappe tootmise efektiivsust fermentatsioonikeskkonna inokuleerimine puhastamata spooridega. Antud juhul sisaldas *B. coagulans* SIM-7 kultuur lisaks spooridele ka mõningal määral vegetatiivseid ja surnud rakke.

3.4.1. Piimhappe tootmine 45 g/l glükoosi algkontsentratsiooniga söötmes

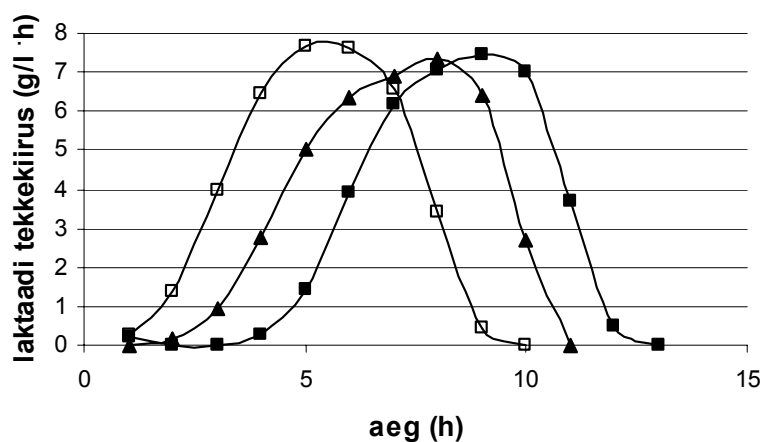
Kasvatusseeria nr. 5 viidi läbi perioodilises kultuuris 45 g/l glükoosi algkontsentratsiooniga fermentatsioonimeediumis. Söödet inokuleeriti *B. coagulans* SIM-7 puhastamata spooridega (10^7 spoori/ml). Spooride aktivatsiooni-ja idanemistingimused olid analoogsed kasvatusseerias nr. 3 kasutatuga. Kasvatused kestsid kuni süsinikuallika otsalõppemiseni (glükoosi lõppkontsentratsioon $< 0,2$ g/l) söötmes. Kontrollina viidi läbi kasvatused tüve SIM-7 vegetatiivsete rakkude (10^7 rakku/ml) ja puhastatud spooridega (10^7 spoori/ml) (kasvatusseeria nr. 3). Tulemused on esitatud joonistel 20 ja 21 ning tabelis 6.

Nagu katsetulemustest näha kestis kääritustsükkel tüve SIM-7 puhastamata spooridega inokuleerides 10 tundi, olles tunni võrra lühem vegetatiivsete rakkudega inokuleeritud fermentatsiooniprotsessist (11 tundi), samas aga 2 tundi pikem kui sissekylvina puhtaid spoore (8 tundi) kasutades (joonis 20).

Maksimaalselt laktaadi produktiivsusest jäi puhastamata spooridega kasvatus (7,3 g/lh) alla nii vegetatiivsete rakkude (7,5 g/lh) kui ka puhastatud spooridega (7,7 g/lh) inokuleeritud fermentatsioonidele. Samas aga saavutati maksimaalne laktaadi tekkekiirus puhastamata spooridega kasvatuses varem kui see juhtus kasutades sissekylvina vegetatiivseid rakke (9. tunni asemel 8. tunnil) (joonis 21).



Joonis 20. Piimhappe tootmiseks kasutatud inokulumi mõju laktaadi produktsioonile (g/l). 45 g/l glükoosi algkontsentratsiooniga fermentatsioonisöödet inokuleeriti *B. coagulans* SIM-7 vegetatiivsete rakkude (■), puhastatud spooride (□) või puhastamata spooridega (▲). Spooride aktiveerimine (70 °C 30 min) ja idanemine (55,5 °C pH 5,5 1 h) viidi läbi glükoosita fermentatsioonisöötmes.



Joonis 21. Piimhappe tootmiseks kasutatud inokulumi mõju laktaadi tekkekiirusele (g/lh). 45 g/l glükoosi algkontsentratsiooniga fermentatsioonisöödet inokuleeriti *B. coagulans* SIM-7 vegetatiivsete rakkude (■), puhastatud spooride (□) või puhastamata spooridega (▲). Spooride aktiveerimine (70 °C 30 min) ja idanemine (55,5 °C pH 5,5 1 h) viidi läbi glükoosita fermentatsioonisöötmes.

Söötme inokuleerimine tüve SIM-7 puhastamata spooridega võimaldas saavutada protsessi keskmiseks piimhappe produktiivsuseks 3,9 g/lh, olles kõrgem vegetatiivsete

rakkudega inokuleeritud kasvatuses saavutatust (3,5 g/lh), kuid jäädes alla puhaste spooridega läbiviidud fermentatsiooni keskmisele laktaadi produktiivsusele (4,8 g/lh) (tabel 6).

Fermentatsioonisöötme inokuleerimine tüve SIM-7 puhastamata spooridega võimaldas toota piimhapet saagisega 97%, mis oli kõrgem puhaste kultuuridega läbiviidud kasvatuses saavutatust (vegetatiivsed rakud - 94%, spoorid - 95%) (tabel 6).

Tabel 6. Keskmise laktaadi produktiivsuse ja saagise sõltuvus inokulumist 45 g/l glükoosi algekonsentratsiooniga fermentatsioonikeskkonnas. Spooride aktiveerimine (70 °C 30 min) ja idanemine (55,5 °C pH 5,5 1 h) viidi läbi glükoosita fermentatsioonisöötmes.

Inokulum	P_k (g/lh)	Laktaadi saagis (%)
vegetatiivsed rakud	3,5	94
puhastatud spoorid	4,8	95
puhastamata spoorid	3,9	97

Lühend: P_k: keskmine laktaadi produktiivsus fermentatsioonitsükklis

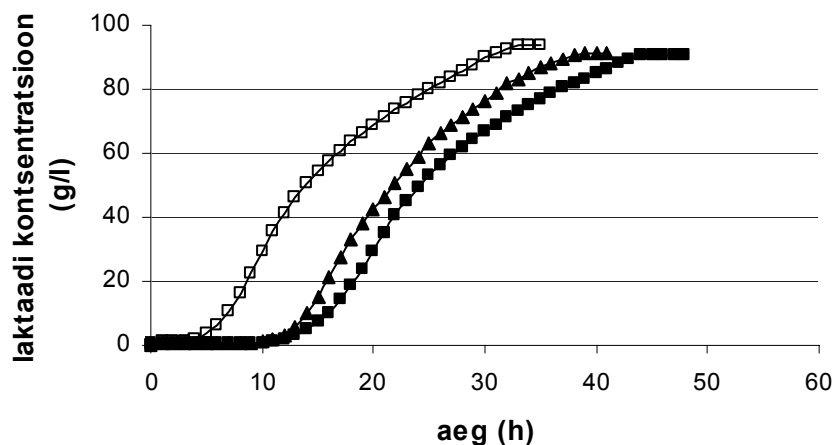
Puhastamata spooridest koosnev inokulum sisaldab lisaks spooridele veel surnud rakke ja stressifaktoreid. Surnud rakkudest vabanenud sporuleerumist indutseerivad signaalmolekulid jäävad antud juhul inokulumi alles, pidurdades spooride idanemist ja väljakasvu. Sellest tuleneb ka puhastamata spooridega inokuleeritud kasvatuses hilisem algus võrreldes puhastatud spooridega läbiviidud kääritusprotsessiga.

Antud katseseeria tulemusi kokku võttes selgub, et fermentatsioonisöötme inokuleerimine *B. coagulans* SIM-7 puhastamata spooridega ei taga küll sama efektiivset piimhappe tootmist kui kasutades puhtaid spoore inokulumina (eriti laktaadi tekkekiirust silmas pidades), samas aga saavutatakse mõnevõrra parem tulemus kui inokuleerides fermentatsioonisöödet vegetatiivsete rakkudega.

3.4.2. Piimhappe tootmine 126 g/l glükoosi algkontsentratsiooniga söötmes

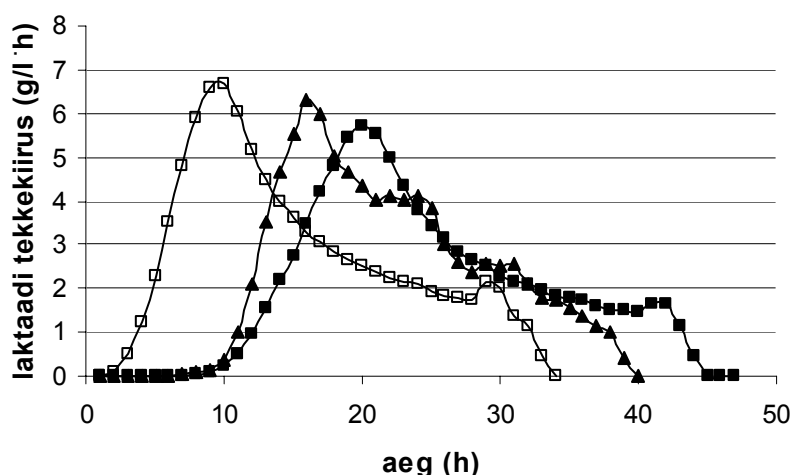
Kasvatusseeria nr. 5 tulemused tõestasid, et *B. coagulans* SIM-7 puhastamata spore on võimalik kasutada sissekülvimaterjalina piimhappe tootmisel. Antud asjaolust tingituna otsustasime (katseseeria nr. 5-ga) analoogse katse läbi viia 126 g/l glükoosi algkontsentratsiooniga söötmes, kuna nagu eelnevalt tõestatud, on 126 g/l glükoosi algkontsentratsioon optimaalne piimhappe tootmiseks, kasutades kääritajana bakterit *B. coagulans* SIM-7. Katseseeria nr. 6 erines eelmisest (nr. 5) vaid glükoosi algkontsentratsiooni (45 g/l asemel 126 g/l) poolest. Kasvatused kestsid kuni süsinikuallika otsalõppemiseni (glükoosi lõppkontsentratsioon < 0,2 g/l) söötmes. Tulemused on esitatud joonistel 22 ja 23 ning tabelis 7.

Fermentatsioonisöötme inokuleerimine tüve SIM-7 puhastamata spooridega tagas 39-tunnise kääritustsükli, mis oli 4 tundi lühem kui vegetatiivsete rakkudega inokuleeritud fermentatsioon, samas aga 6 tundi pikem kui sissekülvinä puhtaid spore kasutades (joonis 22).



Joonis 22. Piimhappe tootmiseks kasutatud inokulumi mõju laktaadi produktsioonile (g/l). 126 g/l glükoosi algkontsentratsiooniga fermentatsioonisöödet inokuleeriti *B. coagulans* SIM-7 vegetatiivsete rakkude (■), puhastatud spooride (□) või puhastamata spooridega (▲). Spooride aktiveerimine (70 °C 30 min) ja idanemine (55,5 °C pH 5,5 1 h) viidi läbi glükoosita fermentatsioonisöötmes.

Maksimaalselt laktaadi produktiivsusest jäi puhastamata spooridega kasvatus (6,3 g/lh) alla puhastatud spooridega (6,7 g/lh) alustatud fermentatsioonile, olles aga parem vegetatiivsete rakkudega kasvatuses, kus maksimaalseks piimhappe tekkimise kiiruseks saadi 5,7 g/lh. Lisaks saavutati maksimaalne laktaadi tekkekiirus puhastamata spooridega kasvatuses varem kui see juhtus kasutades sissekylvina vegetatiivseid rakke (20. tunni asemel 16. tunniks) (joonis 23).



Joonis 23. Piimhappe tootmiseks kasutatud inokulumi mõju laktaadi tekkekiirusele (g/lh). 126 g/l glükoosi algkontsentratsiooniga fermentatsioonisöödet inokuleeriti *B. coagulans* SIM-7 vegetatiivsete rakkude (■), puhastatud spooride (□) või puhastamata spooridega (▲). Spooride aktiveerimine (70 °C 30 min) ja idanemine (55,5 °C pH 5,5 1 h) viidi läbi glükoosita fermentatsioonisöötmes.

Söötme inokuleerimine tüve SIM-7 puhastamata spooridega võimaldas saavutada kõrgema protsessi keskmise piimhappe produktiivsuse (2,3 g/lh) kui sissekylvimaterjalina vegetatiivseid rakke kasutades (2,1 g/lh), ent jäi siiski alla tüve SIM-7 puhastatud spooridega inokuleeritud kasvatuses saavutatule (2,8 g/lh). Piimhappe saagis küündis kõigis kolmes kasvatuses vähemalt 95%-ni (tabel 7).

Antud katse tulemused tõestasid taas, et efektiivseima piimhappe tootmisprotsessi tagab inokulumina *B. coagulans* SIM-7 puhaste spooride kasutamine. Samas aga selgus, et sissekylvina tüve SIM-7 puhastamata spore rakendades on võimalik saavutada paremaid tulemusi kui fermentatsioonisöödet vegetatiivsete rakkudega inokuleerides. Lisaks, tehes järeleandmisi spooride puhastamises, kaotame eelkõige fermentatsiooniprotsessi kiiruses.

Tabel 7. Keskmise laktaadi produktiivsuse ja saagise sõltuvus inokulumist 126 g/l glükoosi alghkontsentratsiooniga fermentatsioonikeskkonnas. Spooride aktiveerimine (70 °C 30 min) ja idanemine (55,5 °C pH 5,5 1 h) viidi läbi glükoosita fermentatsioonisöötmes.

Inokulum	P_k (g/lh)	Laktaadi saagis (%)
vegetatiivsed rakud	2,1	95
puhastatud spoorid	2,8	97
puhastamata spoorid	2,3	96

Lühend: P_k: keskmine laktaadi produktiivsus fermentatsioonitsükklis.

KOKKUVÕTE

Piimhappe mikrobioloogilisel tootmisel on eelistatult kasutatud klassikalisi piimhappebaktereid. Kuna piimhape on järjest enam leidnud rakendust väljaspool toiduainetööstust, on laktaadinõudluse rahuldamiseks hakatud otsima uusi produtsente.

Käesolevas uurimistöös kasutati piimhappe produtsendina *Bacillus coagulans* tüve SIM-7. Antud tüvel on klassikaliste piimhappebakterite ees mitmeid eeliseid. Esiteks võimaldab *B. coagulans* SIM-7 termofiilne olemus viia piimhappe tootmist läbi mittesteriilsetes tingimustes. Teiseks lihtsustab tüve sporuleerumisvõime säilituskultuuride hoidmist ja fermentatsioonisöötme inokuleerimist.

Antud töö üheks eesmärgiks oli selgitada välja fermentatsioonisöötmes oleva glükoosi algkontsentratsiooni (4 g/l – 180 g/l) mõju laktaadi produktsioonile, kasutades inokulumina *B. coagulans* SIM-7 vegetatiivseid rakke. Fermentatsiooniprotsessi efektiivsuse hindamiseks jälgiti järgmisi parameetreid: fermentatsiooni kestus (h), laktaadi lõppkontsentratsioon (g/l), tekkekiirus (g/l/h) ning saagis (%). Lisaks hinnati *B. coagulans* SIM-7 biomassi produktsiooni (mg/ml).

Uurimistöõ teiseks eesmärgiks oli uurida *B. coagulans* SIM-7 vegetatiivsete rakkude ja spooride osmotolerantsust, kasutades keskkonna osmootse rõhu tõstmiseks nii NaCl kui ka glükoosi.

Kolmandaks eesmärgiks oli uurida võimalusi rakendamaks *B. coagulans* SIM-7 spoores fermentatsioonisöötme inokuleerimiseks. Võrdlusmomendi tagamiseks viidi paralleelselt *B. coagulans* SIM-7 spooridega kasvatusi läbi ka *B. coagulans* SIM-7 vegetatiivsete rakkudega. Töö käigus töötati välja optimaalsed tingimused spooride idanemiseks fermentatsioonisöötmes. Lisaks uuriti puhastamata spooride kasutamisevõimalusi inokulumina fermentatsiooniprotsessis.

Uurimistöõ käigus jõuti järgmistele järeldustele:

1. Optimaalsed glükoosi algkontsentratsioonid laktaadi tootmiseks perioodilises kultuuris, kasutades inokulumina *B. coagulans* SIM-7 vegetatiivseid rakke, on 126 – 144 g/l. Efektiivseks *B. coagulans* SIM-7 biomassi tootmiseks ei tohiks glükoosi algkontsentratsioonid söötmes ületada 90 g/l.

2. *B. coagulans* SIM-7 vegetatiivsed rakud on nii NaCl kui ka suhkru poolt põhjustatud osmootse stressi suhtes tolerantsemad kui spoorid.

3. Kasutades *B. coagulans* SIM-7 spore inokulumina piimhappe tootmiseks, tuleb luua tingimused spooride idanemiseks. Idanemise tagab aktiveerunud spooride inkubeerimine ühe tunni jooksul glükoosita fermentatsioonisöötmes (55,5 °C, pH 5,5).

4. *B. coagulans* SIM-7 spooride kasutamine inokulumina piimhappe tootmiseks võimaldab saavutada ¼ võrra kõrgema fermentatsiooniprotsessi laktaadi tekkekiiruse kui söötme inokuleerimisel vegetatiivsete rakkudega.

5. *B. coagulans* SIM-7 spooride kasutamine fermentatsioonisöötme inokulumina võimaldab vähendada sissekülvi hulka ligi 10 korda, samas aga säilitada kõrge laktaadi produktsioon ja tekkimise kiirus.

6. Fermentatsioonikeskkonna inokulumina on võimalik kasutada ka *B. coagulans* SIM-7 puhastamata spore. Viimastega inokuleeritud fermentatsioon jääb puhastatud spooridega läbiviidud kasvatusel alla põhiliselt fermentatsiooniprotsessi kiiruses.

SUMMARY

Lactic acid has become one of the most required organic acids in the world. This is the reason why so many attempts have been made to find new efficient lactic acid producers and to improve the fermentation process.

Bacillus coagulans SIM-7 is a lactic acid producer, used in this work. *Bacillus coagulans* SIM-7 has several advantages over the classical lactic acid bacteria. Firstly, the thermophilic nature of *B. coagulans* SIM-7 enables to produce lactic acid under unsterile conditions. Secondly, spore forming capacity simplifies maintenance of stock cultures and inoculation of fermentation media.

One of the aims was to investigate the effect of various initial glucose concentrations (4 g/l – 180 g/l) on lactic acid production using vegetative cells of *B. coagulans* SIM-7 as an inoculum. The following parameters related to effectiveness of fermentation process were estimated: fermentation time (h), concentration of lactic acid produced (g/l), yield of lactic acid (%) and lactic acid productivity (g/lh). In addition, biomass production (mg/ml) of *B. coagulans* SIM-7 was estimated.

Secondly, in addition to glucose, the effect of different salt (NaCl) concentrations in the medium on the viability of both, *B. coagulans* SIM-7 vegetative cells and spores were estimated.

And finally, we performed a comparative study of using spores and vegetative cells as an inoculum for lactic acid production. The optimal conditions for spore germination in fermentation media were found. In addition, we investigated the possibility of using unpurified spores of *B. coagulans* SIM-7 as an inoculum for lactic acid production.

Conclusions based on the experimental data obtained are following:

1. The optimal initial concentrations of glucose in the medium for lactic acid fermentation by *B. coagulans* SIM-7 are 126 – 144 g/l, based on economical considerations. Growth of *B. coagulans* SIM-7 is inhibited when culture medium with initial glucose concentration above 90 g/l is used.

2. It was proved that vegetative cells of *B. coagulans* SIM-7 have higher tolerance for osmotic pressure than spores.

3. Activation and germination of *B. coagulans* SIM-7 spores in fermentation media (without glucose, pH 5,5) provides effective fermentation process.

4. Using equal amount of inoculum (10^7 cells/ml), lactic acid productivity in fermentation with vegetative cells was $\frac{1}{4}$ lower than productivity achieved in fermentation inoculated with spores.

5. Inoculating fermentation media with spores of *B. coagulans* SIM-7 enables to decrease the amount of inoculum about 10 fold, without losing in lactic acid productivity parameters.

6. Using unpurified spores of *B. coagulans* SIM-7 as an inoculum provides effective lactic acid production.

KASUTATUD KIRJANDUS

Akao, S., Tsuno, H., Cheon, J. (2007) Semi-continuous L-lactate fermentation of garbage without sterile condition and analysis of the microbial structure. *Water Research*, 41: 1774 – 1780.

Bauchop, T., Eldsen, S. R. (1960) The growth of microorganisms in relation to their energy supply. *Journal of Genetic Microbiology*, 23: 469 - 475.

Boch, J., Kempf, B., Bremer, E. (1994) Osmoregulation in *Bacillus subtilis*: synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from exogenously provided choline. *Journal of bacteriology*, 176: 5364 – 5371.

Bulut, S., Elibal, M., Ozer, D. (2003) Effect of different carbon sources on L(+)-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. *Biochemical Engineering Journal*, 21: 33 - 37.

Burgos-Rubio, C. N., Okos, M. R., Wankot, P. C. (2000) Kinetic study of conversion of different substrates to lactic acid using *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnology Progress*, 16: 305 - 314.

Cabrera-Hernandez, A., Sanchez-Salas, J. L., Paidhungat, M., Setlow, P. (1999) Regulation of four genes encoding small, acid-soluble spore proteins in *Bacillus subtilis*. *Gene*, 232: 1 – 10.

Cheng, P., Mueller, R. E., Jaeger, S., Bajpai, R., Ianotti, E. L. (1991) Lactic acid production from enzyme-thinned corn starch using *Lactobacillus amylovorus*. *Journal of Industrial Microbiology*, 7: 27 - 34.

Chiarini, L., Mara, L., Tabacchioni, S. (1992) Influence of growth supplements on lactic acid production in whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36: 461 – 464.

Collado, J., Fernandez, A., Rodrigo, M., Camats, J., Martinez-Lopez, A. (2003) Kinetics of deactivation of *Bacillus cereus* spores. *Food Microbiology*, 20: 545 – 548.

De Clerck, E., Forsyth, G., Rodrigues-Diaz, M., Lebbe, L., Logan, N. A., De Vos, P. (2004) Polyphasic characterization of *Bacillus coagulans* strains, illustrating heterogeneity within this species, and emended description of the species. *Systematic and Applied Microbiology*, 27: 50 - 61.

Gao, M.-T., Hirata, M., Toorisaka, E., Hano, T. (2007) Lactic acid production with the supplementation of spent cells and fish wastes for the purpose of reducing impurities in fermentation broth. *Biochemical Engineering Journal*, Article in press.

Girauld, E., Lelong, B., Raimbault, S. (1991) Influence of pH and initial lactate concentration on the growth of the *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36: 96 - 99.

Glaasker, E., Konings, W. N., Poolman, B. (1996) Osmotic regulation of intracellular solute pools in *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bacteriology*, 178: 575 – 582.

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: 66 - 75.

Henriques, A. O., Moran, C. P., Jr. (2000) Structure and assembly of the bacterial endospore coat. *Methods*, 20: 95 – 110.

Heriban, 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.

Hernawan, T., Flut, G. (1995) Chemical and cytological changes during autolysis of yeasts. *Journal of Industrial Microbiology*, 14: 440 - 450.

Hilbert, D. W., Piggot, P. J. (2004) Compartmentalization of gene expression during *Bacillus subtilis* spore formation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68: 234 – 262.

Hoffman, T., Schütz, A., Brosius, M., Völker, A., Völker, U., Bremer, E. (2002) High-salinity-induced iron limitation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 184: 718 – 727.

Hofvendahl, K., Hahn-Hägerdal, B. (2000) Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*, 26: 87 - 107.

Hujanen, M., Linko, S., Linko, Y. Y., Leisola, M. (2001) Optimization of media and cultivation conditions for L(+)(S)-lactic acid production by *Lactobacillus casei* NRRL B-441. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51: 146 – 160.

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.

Ikeuchi, T., Ishida, A., Tajiri, M., Nagata, S. (2003) Induction of salt tolerance in *Bacillus subtilis* IFO 3025. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96: 184 – 186.

Jõgi, E., Nurk, A., Kask, K. (2006) Meetod sporgeensete fermenteerivate termofiilsete mikroorganismide tüvede endosporide saamiseks ja saadud endosporide kasutamine fermentatsiooni inokuleerimiseks. Eesti Patendi Aplikatsioon nr. P200600034.

Keating, L., Kelly, C., Fogarty, W. (1998) Mechanism of action and the substrate-dependent pH maximum shift of the α -amylase of *Bacillus coagulans*. *Carbohydrate Research*, 309: 311 - 318.

Kets, E. P. W., de Bont, J, A. M. (1997) Effect of carnitines on *Lactobacillus plantarum* subjected to osmotic stress. *FEMS Microbiology Letters*, 146: 205 – 209.

Kirkovits, A. E., Edlauer, H. (1992) Microorganism of the species *Bacillus coagulans*. United States Patent nr. 5,079,164.

Kuhlmann, A. U., Bremer, E. (2002) Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus* ssp. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 772 – 783.

Kurbanoglu, E. B., Kurbanoglu, N. J. (2003) Utilization for lactic acid production with a new acid hydrolysis of ram horn waste. *FEMS Microbiology Letters*, 225: 29 - 34.

Litchfield, J. H. (1996) Microbiological production of lactic acid. *Advances in Applied Microbiology*, 42: 45 - 95.

Liu, S. Q. (2003) Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 83: 115 - 131.

Lowry, O. N., Rosenbrough, A., Farr, K., Randall, K. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biology and Chemistry*, 36: 265 - 275.

Lu, Z., Fleming, H. P., McFeeters, R. F. (2001) Differential glucose and fructose utilization during cucumber juice fermentation. *Food Microbiology and Safety*, 66: 162 – 166.

Malsub, T. (2003) *Bacillus coagulans* SIM-7 alternatiivsed metabolismirajad. Bakalaureusetöö geneetika erialal, Tartu Ülikool.

Medijainen, L. (2002) Bakteri *Bacillus coagulans* SIM-7 kasvu ja laktaadi

produksiooni sõltuvus kasvumeediumi pH-st. Magistritöö biokeemia erialal, Tartu Ülikool.

Michelson, T. (2003) Produktiivsusele optimeeritud fermentatsioon *Bacillus coagulans* tüvega SIM-7. Magistritöö geneetika erialal, Tartu Ülikool.

Michelson, T., Kask, K., Jõgi, E., Talpsep, E., Suitso, I., Nurk, A. (2006) L(+)-lactic acid producer *Bacillus coagulans* SIM-7 DSM 14043 and its comparison with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* DSM 20073. *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 861 – 867.

Moir, A. (2003) Bacterial spore germination and protein mobility. *TRENDS in Microbiology*, 10: 452 – 454.

Msadek, T. (1999) When the going gets tough: survival strategies and environmental signaling networks in *Bacillus subtilis*. *TRENDS in Microbiology*, 5: 201 – 207.

Nancib, N., Nancib, A., Boudjelal, A., Benslimane, C., Blanchard, F., Bourdant, J. (2000) The effect of supplementation by different nitrogen sources on the production of lactic acid from date juice by *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus*. *Bioresource Technology*, 78: 149 - 153.

Narayanan, N., Roychoudhury, P. K., Srivastava, A. (2004) L(+)-lactic acid fermentation and its polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology*, 7: 167 - 179.

Nekolny, D., Chaloupka, J. (2000) Protein catabolism in growing *Bacillus megaterium* during adaptation to salt stress. *FEMS Microbiology Letters*, 184: 173 – 177.

Nicholson, W. L., Setlow, P. (1990) Sporulation, germination and outgrowth p. 391 – 450. In C. R. Harwood, S. M. Cutting (ed.), *Molecular Biological Methods for Bacillus*, John Wiley and Sons, Sussex, England.

Obis, D., Guillot, A., Mistou, M. Y. (2001) Tolerance to high osmolality of the *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *cremoris* is related to the activity of betaine transport system. *FEMS Microbiology Letters*, 202: 39 – 44.

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.

Palop, A., Sala, F., Condon, S. (1997) Occurrence of a highly heat-sensitive spore subpopulation of *Bacillus coagulans* STCC 4522 and its conversion to a more heat-stable form. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 2246 – 2251.

Panesar, P. S., Kennedy, J. F., Gandhi, D. N., Bunko, K. (2007) Bioutilization of whey for lactic acid production. *Food Chemistry*, Article in press.

Patel, M., Ou, M., Ingram, L. O., Shanmugan, K. T. (2004) Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate to L(+)-lactic acid by a thermotolerant acidophilic *Bacillus* sp. *Biotechnology Letters*, 26: 865 - 868.

Patel, M., Ou, M. S., Harbrucker, R., Aldrich, H. C., Buszko, M. L., Ingram, L. O., Shanmugan, K. T. (2006) Isolation and characterization of acid-tolerant, thermophilic bacteria for effective fermentation of biomass-derived sugars to lactic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 3228 – 3235.

Pauli, T., Fitzpatrick, J. J. (2002) Malt combing nuts as nutrient supplementation to whey permeate for producing lactic acid by fermentation with *Lactobacillus casei*. *Process Biochemistry*, 38: 1 - 6.

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.

Piuri, M., Sanchez-Rivas, C., Ruzal, S. M. (2003) Adaptation to high salt in *Lactobacillus*: role of peptides and proteolytic enzymes. *Journal of Applied Microbiology*, 95: 372 – 379.

Ponnuraj, K., Rowland, S., Nessi, C., Setlow, P., Jedrzejak, M. J. (2000) Crystal structure of a novel germination protease from spores of *Bacillus megaterium*: structural arrangement and zymogen activation. *Journal of Molecular Biology*, 300: 1 - 10.

Poolman, B. (2002) Transporters and their roles in LAB cell physiology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82: 147 – 164.

Poolman, B., Glaasker, E. (1998) Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Molecular Microbiology*, 29: 397 – 407.

Rojan, J. P., Nampoothiri, K. M., Pandey, A. (2007) Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview of process developments and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74: 524 – 534.

Rosenberg, M., Rebroš, M., Křištofikova, L., Malatova, K. (2005) High temperature lactic acid production by *Bacillus coagulans* immobilized in LentiKats. *Biotechnology Letters*, 27: 1943 – 1947.

Roukas, T., Kotzekidou, P. (1998) Lactic acid production from deproteinized whey by mixed cultures of free and coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells using fedbatch culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 22: 199 - 204.

Ruzal, S. M., Alice, A. F., Sanchez-Rivas, C. (1994) Osmoresistance of spores from *Bacillus subtilis* and the effect of *ssp* mutations. *Microbiology*, 140: 2173 – 2177.

Sakai, K., Ezaki, Y. (2006) Open L-lactic acid fermentation of food refuse using thermophilic *Bacillus coagulans* and fluorescence *In Situ* hybridization analysis of microflora. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101: 457 – 463.

Sakai, K., Yamanami, T. (2006) Thermotolerant *Bacillus licheniformis* TY7 produces optically active L-lactic acid from kitchen refuse under open condition. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102: 132 – 134.

Setlow, P. (2003) Spore germination. *Current Opinion in Microbiology*, 6: 550 – 556.

Setlow, P. (2007) I will survive: DNA protection in bacterial spores. *TRENDS in Microbiology*, 15: 172 – 180.

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. Rahvusvaheline Patent nr. PTC WO 02/074934 A1.

Suitso, I. (2004) *Bacillus coagulans* SIM-7 võrdlus kahe laktobatsilli tüvega piimhappe tootmisel. Magistritöö geneetika erialal, Tartu Ülikool.

Södergard, A., Stolt, M. (2002) Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. *Progress in Polymer Science*, 27: 1123 - 1163.

Zhang, B., He, P., Ye, N., Shao, L. (2007) Enhanced isomer purity of lactic acid from the non-sterile fermentation of kitchen wastes. *Bioresource Technology*, Article in press.

Tango, M. S. A., Ghaly, A. E. (1999) Kinetic modeling of lactic acid production from batch submerged fermentation of cheese whey. *Transactions of the ASAE*, 42: 1791 - 1800.

Tovar-Rojo, F., Cabrera-Martinez, R. M., Setlow, B., Seltow, P. (2003) Studies on the mechanism of the osmoresistance of spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Microbiology*, 95: 167 – 179.

Tšertova, N. (2005) *Bacillus coagulans* SIM-7 DSM 14043 sporulatsioonist ja idanemisest. Bakalaureusetöö geneetika erialal, Tartu Ülikool.

van Maris, A. J. A., Konings, W. N., van Dijken, J. P., Pronk, J. T. (2004) Microbial export of lactic and 3-hydroxypropanoic acid: implications for industrial fermentation processes. *Metabolic Engineering*, 6: 245 - 255.

Vreeland, R. H., Rosenzweig, W. D., Powers, D. W. (2000) Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature*, 407: 897 – 900.

Wang, S. T., Setlow, B., Conlon, E. M., Lyon, J. L., Imamura, D., Sato, T., Setlow, P., Losick, R., Eichenberger, P. (2006) The forespore line of gene expression in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology*, 358: 16 – 37.

Wee, Y. J., Kim, J. N., Yun, J. S., Ryu, H. W. (2004) Utilization of sugar molasses for economical L(+)-lactic acid production by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 35: 568 - 573.

Wood, J. M., Bremer, E., Csonka, L. N., Kraemer, R., Poolman, B., vander Heide, T., Smith, L. T. (2001) Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 130: 437 - 460.

Yoo, I. K., Chang, H. N., Lee, E. G., Chang, Y. K., Moon, S. H. (1997) Effect of B vitamin supplementation on lactic acid production by *Lactobacillus casei*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84: 172 - 175.

Yun, J. S., Wu, Y. J., Ryu, H. W. (2003) Production of optically pure L(+)-lactic acid from various carbohydrates by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1. *Enzyme and Microbial Technology*, 33: 416 - 423.