

metrické průměry uvedené v tabulce 1 potvrzují vysokou hygienickou úroveň technologie ZD Jeseník. Hodnoty naměřené v jednotlivých měsících byly vyrovnané a pohybovaly se od 10 do 250 CFU/ml. Počty *E. coli* nepřekročily hranici 1 000 CFU/ml a byly zaznamenány pouze tři pozitivní případy, kde se počet pohyboval od 30 do 40 CFU/ml.

Výsledné hodnoty ostatních druhů mikroorganismů

Výsledky druhového zastoupení sledovaných mikroorganismů byly naprosto vyhovující. Počet *S. aureus* byl negativní nebo dosáhl počtu 10 CFU/ml u pěti vzorků. V současné době neexistuje předpis nebo nařízení pro počet *S. aureus* v syrovém mléce. Podle již neplatné vyhlášky 203/2003 Sb., která však platila do konce roku 2006, limitní hodnota pro *S. aureus* v syrovém kravském mléce určeném pro přímou spotřebu činila 500 CFU/ml. V případě sporotvorných mikroorganismů byl potvrzen pouze jeden pozitivní vzorek mléka *B. cereus* (30 CFU/ml), výskyt *B. licheniformis* byl častější, pozitivní v 10 případech a počet se pohyboval od 0 do 20 CFU/ml. V současné době neexistuje žádný předpis pro výskyt *Bacillus* spp. v syrovém mléce, pouze ČSN 57 0529 stanovuje limitní hodnotu pro termorezistentní bakterie 2000 CFU/ml. Výskyt ostatních druhů *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. a *Campylobacter* spp. byl ve všech vzorcích mléka negativní. I když v našem případě byly výsledky patogenních mikroorganismů negativní, je jejich výskyt běžný u mléčného skotu. Jejich přítomnost je závislá na zdravotním stavu zvířat a významně se liší mezi farmami (Jayarao a kol., 2006).

Výsledky celkového počtu mikroorganismů (CPM) u sterilních lahví z laboratoře a komerčně dostupnými lahvemi z automatů

Získané výsledky byly vyhodnoceny jednoduchými statistickými testy a výsledná hodnota korelačních koeficientů pro oba automaty byla $r_1=0,99$ a $r_2=0,98$. Podle naměřených hodnot a vysokých hodnot korelačních koeficientů lze tvrdit, že typ použitých odběrných lahví nemá vliv na výsledek sledových počtů mezofilních mikroorganismů (CPM), potažmo i na výsledky ostatních mikrobiologických parametrů.

Závěr

Závěrem lze konstatovat, že mléko ze sledovaných automatů mělo vyrovnané výsledky během celého období sledování. Výsledky PSB a mikrobiologických analýz zcela vyhovovaly požadavkům pro syrové kravské mléko. Jako doplňující informaci uvádíme, že i ostatní mléčné parametry (tuk, bílkovina, tukuprostá sušina a obsah inhibičních látek) vyhovovaly normovaným hodnotám v každém sledovaném vzorku. Z výsledků veterinárních kontrol bylo zjištěno, že od začátku provozu obou automatů nebyla vznesena ze strany kontrolního orgánu žádná kritická připomínka.

(Publikace byla podporována výzkumným projektem MSMT OPVK CZ.1.07/2.3.00/09.0081, INGO LA10030,

MZe NAZV QH81111 a výzkumným záměrem MSM 2672286101).

Přijato do tisku 7. 5. 2011

Lektorováno 23. 5. 2011

Použitá literatura

- NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 853/2004 ze dne 29. dubna 2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu.
- ČSN EN ISO 4833 - Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda pro stanovení celkového počtu mikroorganismů - Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C. ČNI Praha, 2003.
- ČSN ISO 4832 - Mikrobiologie. Všeobecné pokyny pro stanovení počtu koliformních bakterií. Technika počítání kolonií. ČNI Praha, 1995.
- ČSN EN ISO 6888-1 - Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda stanovení počtu koagulázopozitivních stafylokoků (*Staphylococcus aureus* a další druhy) - Část 1: Technika s použitím agarové půdy podle Baird-Parkera. ČNI Praha, 2000.
- ČSN EN ISO 6579 - Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda průkazu bakterií rodu *Salmonella*. ČNI Praha, 2003.
- ČSN EN ISO 10272-1 - Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu *Campylobacter* spp. - Část 1: Metoda průkazu. ČNI Praha, 2006.
- ČSN ISO 7932 - Mikrobiologie. Všeobecné pokyny pro stanovení počtu *Bacillus cereus*. Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C. ČNI, Praha, 1995.
- ČSN EN ISO 11290-1 - Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu *Listeria monocytogenes* - Část 1: Metoda průkazu. ČNI Praha, 1999.
- JAYARAO B. M., DONALDSON S. C., STRALEY B. A., SAWANT A. A., HEGDE N. V., BROWN J. L. (2006). A survey of foodborne pathogens in bulk tank milk and raw milk consumption among farm families in Pennsylvania. *J. Dairy Sci.*, 89, s. 2451-2458.
- Ostatní SOP u hlavního autora.

SLEDOVÁNÍ TVORBY VODÍKU PŘI FERMENTACI RŮZNÝCH MÉDIÍ KMENEM *CLOSTRIDIUM BUTYRICUM* E16A

Havlíková Š.¹, Kvasničková E.², Rittich B.³, Španová A.³

¹ Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

² MILCOM a.s.

³ VUT Brno FCH

Monitoring of hydrogen formation during the fermentation of different media with *Clostridium butyricum* E16A

Abstrakt

Práce byla zaměřena na sledování produkce vodíku při fermentaci různých médií kmenem *Clostridium butyricum* E16A v laboratorním fermentoru LABFORS 4. Testována byla produkce tohoto plynu v bujónu s glukózou a laktózou a ve dvou typech syrovátky - obnovené sušené syrovátce a syrovátce z pokusných výrob sýrů eidamského typu. Procento vodíku ve volně odcházejících plynech z fermenta-

toru zaznamenané detektory nebylo ovlivněno zdrojem cukrů ve fermentovaném médiu a bylo statisticky významně vyšší při pH 5,6.

Klíčová slova: klostridium, fermentor LABFORS 4, vodík, syrovátka

Abstract

The work was focused on monitoring hydrogen production during fermentation of different media in the laboratory fermenter LABFORS 4 with *Clostridium butyricum* E16A strain. Production of gas was tested in broth with glucose and lactose and into two whey - restored whey and whey from the experimental manufacture of cheese Edam type. Percentage of hydrogen in free exhausted gases from the fermenter recorded by detector was not affected by source of sugars in the fermented medium and was statistically significant higher at pH 5,6.

Key words: Clostridium, fermenter LABFORS 4, hydrogen, whey

1. Úvod

Biologická produkce vodíku je jednou z možností získávání vodíku s poměrně nízkými náklady a při nízkých teplotách. Je to proces příznivý i pro životní prostředí, protože při něm jsou zpracovávány odpadní látky. V případě zpracování mléka je dostupným zdrojem vodíku syrovátka a možnými producenty vodíku sacharolytická klostridia. Součástí řešení grantu MŠMT 2B08070 bylo v loňském a letošním roce sledování růstu klostridií v laboratorním fermentoru a vlivu složení kultivačního média na růst klostridií a produkci plynů.

Dále byl sledován vliv složení kultivačního média na růst klostridií a produkci plynů. Testovány byly kmeny klostridií ze souboru vytvořeného z námi izolovaných klostridií, ze sbírkových kmenů a dalších klostridií poskytnutých jinými organizacemi - VŠCHT Praha a VÚCHS s.r.o. Rapotín. Z velkého souboru byly po molekulární identifikaci a předběžných testech vybrány 4 kmeny a postupně testovány. Dílčí výsledky testování jednoho kmene jsou uvedeny v tomto článku.

2. Materiál a metody

Clostridium butyricum E16A, MILCOM a.s.

RCMB - tekuté médium o složení na 1 litr:

Lab Lemco 10 g, kvasničný extrakt 3 g, pepton 5 g, glukóza 5 g, škrob rozpustný 1 g, chlorid sodný 5 g, octan sodný 3 g

Cystein hydrochlorid (Sigma-Aldrich, C6852) - roztok o koncentraci 5 g/l

RCML - tekuté médium o složení stejné jako RCMB, 5 g glukózy nahrazeno 10 g laktózy

Syrovátka z pokusných výrob sýrů eidamského typu (SOP č. 24, MILCOM. a.s.)

Syrovátka sušená (Bohemilk, Opočno, ČR)

RCM agar OXOID (Oxoid CM0151, UK), s přídavkem 10 ml roztoku neutrální červeni na 1000 ml (0,5% v 60% etanolu)

Izotachoforetický analyzátor Villa Labeco, SK

Laboratorní fermentor LABFORS 4 (INFORS AG, Sweiz)

Detektory plynů BlueSense pro-H₂ a -CO₂ (Bluesense gas sensor GmbH, Germany)

3. Pracovní postup

Všechny fermentace byly prováděny při konstantní teplotě 37°C.

Před zahájením fermentace byla nakalibrována pH elektroda a pumpa pro příkrm, odtah a přídavek 0,5 M NaOH. Celá nádoba fermentoru s příslušenstvím byla sterilována v autoklávu při teplotě 121°C 30 minut.

Do nádoby fermentoru bylo sterilně převedeno fermentační médium, dusíkem vytěsněn vzduch a médium bylo po nastavení parametrů fermentace zaočkováno 40 ml inokula kmene *Clostridium butyricum* E16A. Po přídavku inokulaci a 4 ml cystein hydrochloridu bylo médium ještě jednou propláchnuto dusíkem.

Parametry nastavené jako konstantní: teplota 37°C, otáčky míchadla 70 ot/min., pH 6,9 nebo 5,6.

Parametry vázané na údaje čidel: přídavek 0,5 M NaOH v ml, odtah v ml, přídavek sterilního média v ml.

Parametry sledované: H₂ a CO₂ v % volně odcházejících plynů.

V průběhu fermentace byly pomocí podtlaku odebírány vzorky v množství cca 10-15 ml odběrovou trubicí zavedenou do fermentoru. Ve vzorcích byly stanovovány nižší masné kyseliny a počty klostridií plotnovou metodou na RCM agaru.

4. Výsledky a hodnocení:

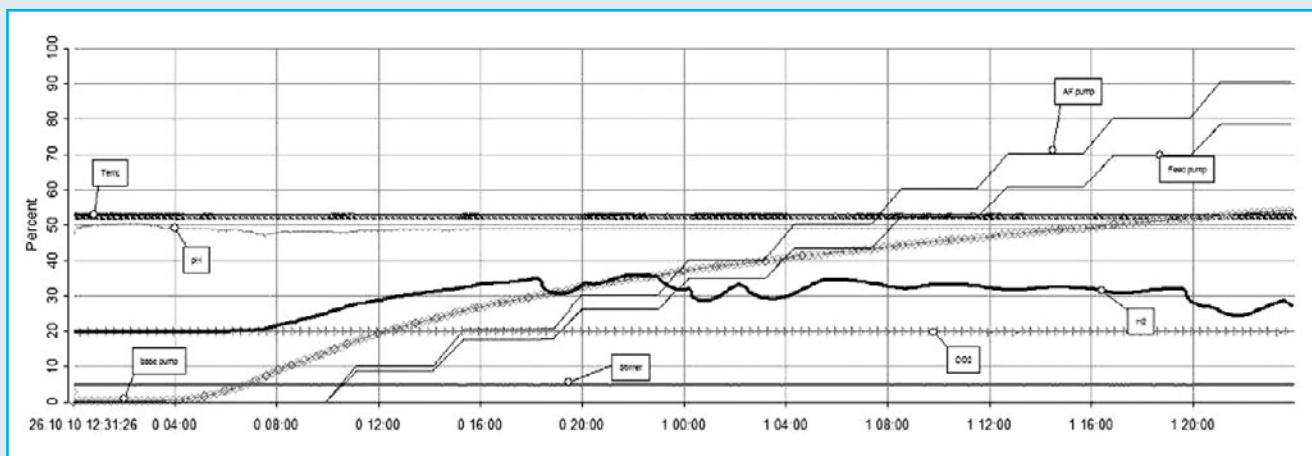
Kmen E16A byl izolován na pracovišti MILCOM a.s. v Táboře a identifikován na pracovišti VUT, FCH, Ústav chemie potravin a biotechnologií v Brně metodou rodově specifické PCR (Rittich a kol., 2010) jako *Clostridium butyricum*. Podle výsledků zkumavkového testu v RCM médiu produkoval tento kmen značné množství plynů, a proto byl, kromě jiných kmenů, vybrán k pokusným fermentacím.

První fermentace byly provedeny v médiu RCMB o uvedeném složení, pH 6,9 a 5,6. První hodnota pH respektuje optimální pH pro klostridia obecně, druhá hodnota pH - 5,6 je blízká hodnotě pH předpokládaného cílového média - odpadní syrovátky.

Další dvojice fermentací byla provedena v médiu o stejném složení jako RCMB, ale s nahrazením glukózy laktózou. Médium bylo označeno RCML a opět byly fermentace provedeny při uvedených hodnotách pH 6,9 a 5,6.

Protože cílovým médiem je syrovátka, použili jsme jako fermentační médium jednak obnovenou sušenou syrovátku s obsahem laktózy 4,5% a reálnou syrovátku z pokusných výrob sýra eidamského typu. Hodnoty pH nastavené pro fermentaci byly u obou syrovátek rovněž 6,9 a 5,6.

Obr. 1 Grafický záznam fermentace v programu IRIS



Příklad grafického záznamu fermentace v programu IRIS je na obr. č. 1.

Grafy produkce vodíku ve všech čtyřech médiích jsou na obr. 2 až 5.

Kolísání hodnot v grafických záznamech je způsobeno poklesem tlaku ve fermentační nádobě při odběru vzorků.

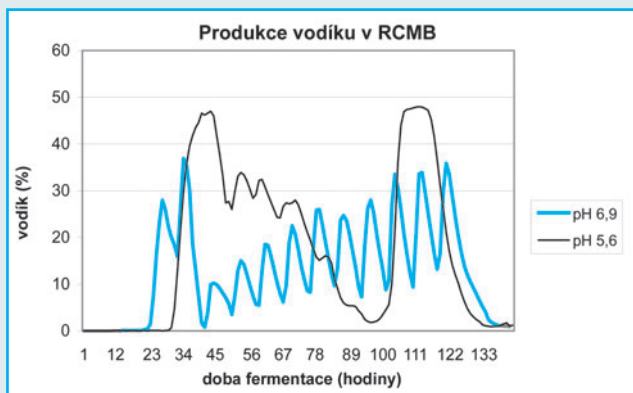
4.1 Vliv pH

Vliv pH na produkci vodíku byl u čtyř testovaných médií zřejmý - při nižší z obou testovaných hodnot pH (5,6) bylo procento vodíku ve volně odcházejících plynech vyšší ve třech případech, v jednom téměř shodné. Podle údajů z literatury (Chen a kol., 2005) se vodík začíná vyvíjet, když buněčný růst klostridií je v druhé polovině exponenciální fáze a pokračuje během fáze stacionární. Při pH blízkém neutrální hodnotě (pH 6,0) dochází k prudkému nárůstu buněk a celkové buněčné hmoty, ale tím se následně zároveň snižuje produkce vodíku. Při nižším pH je nárůst buněčné hmoty pomalejší a produkce vodíku vyšší (Chen a kol., 2005). Maximální produkci vodíku při fermentaci při pH 5,6 s jiným kmenem *Clostridium butyricum* uvádějí i další autoři (Masset a kol., 2010).

4.2 Vliv zdroje uhlíku na produkci H₂

Vliv obsahu cukrů (10 g/l glukózy v RCMB, 20 g/l laktózy v RCML, 35 g/l v syrovátce z pokusných výrob

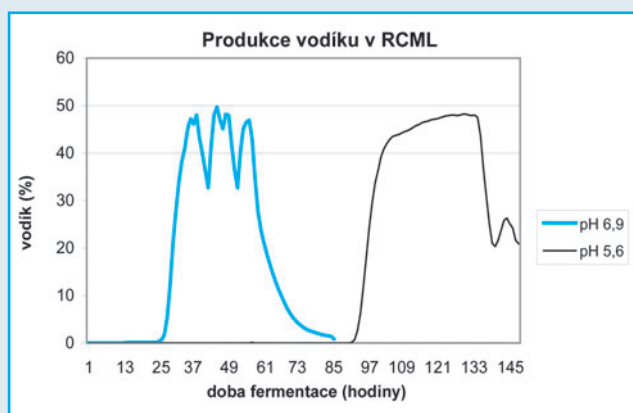
Obr. 2 Produkce vodíku v RCMB při různých pH - % vodíku ve volně odcházejících plynech.



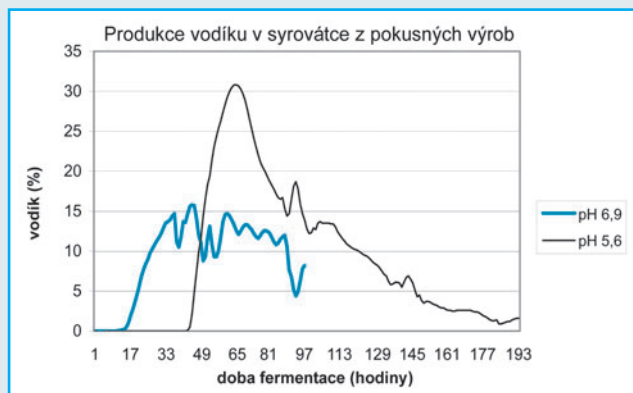
a 45 g/l v obnovené syrovátce) se nejevil jako rozhodující. Vyšší koncentrace laktózy v syrovátkách než v RCML neznamenala vyšší produkci vodíku. Je to v souladu se zjištěním řady autorů, např. (Cai a kol., 2010), kteří se zabývali testováním jiných kmenů *Cl. butyricum*.

Nižší produkce vodíku v syrovátce ve srovnání s produkcí vodíku v bujónech pravděpodobně souvisí s vyšší koncentrací cukrů. V syrovátce byl obsah laktózy vyšší než v bujónu RCML a mohla se tak projevit substrátová inhibice (Chen a kol., 2005).

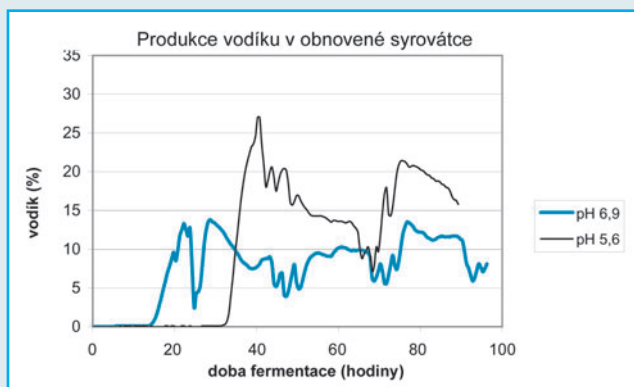
Obr. 3 Produkce vodíku v RCML při různých pH - % vodíku ve volně odcházejících plynech.



Obr. 4 Produkce vodíku v syrovátce z pokusných výrob - % vodíku ve volně odcházejících plynech.



Obr. 5 Produkce vodíku v obnovené syrovátce - % vodíku ve volně odcházejících plynech.



4.3 Produkce vodíku v syrovátce

Při porovnání produkce vodíku testovaným kmenem v syrovátce z pokusných výrob a obnovené syrovátce je zřejmé, že u obnovené syrovátky je produkce vyšší při pH 5,6 - dosahovala až 27 % (obr. 5), při pH 6,9 byly hodnoty zaznamenané detektory do 15 %. U syrovátky z pokusných výrob, odebrané na konci výroby po praní a dosoušení zrna, byla produkce vodíku opět vyšší při nastavené hodnotě pH 5,6 - dosahovala i nad 30 %, při pH 6,9 byla nižší stejně jako u obnovené syrovátky - do 15 % (obr. 4). Proti rychlému nárůstu produkce vodíku v bujónech při vyšší hodnotě pH byl v syrovátce růst produkce vodíku pomalejší.

4.4 Vztah mezi produkcí vodíku a poměrem kyseliny máselné a octové

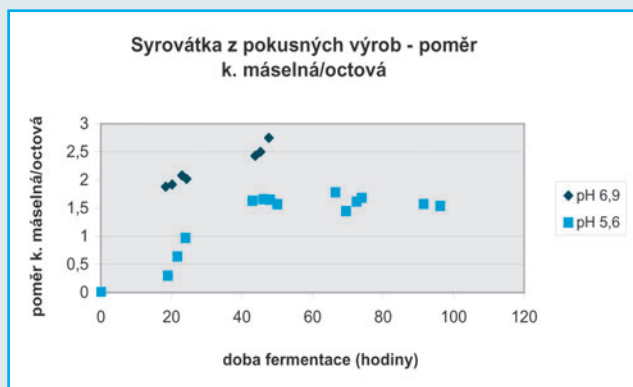
U jiného kmene *Cl. butyricum* je uváděna nejvyšší produkce vodíku v kontinuálním zařízení při koncentraci glukózy 30 g/litr. Při nižší koncentraci glukózy klesá produkce vodíku a klesá i poměr kyselina máselná/octová. (Kim a kol., 2006).

V grafech na obr. 6 a 7 je poměr obou uváděných kyselin znázorněn pro obě syrovátky a obě hodnoty pH. Při hodnotě pH 6,9 byl u obou syrovátek vyšší - 2,75 a 2,65 nejvyšší hodnoty, při hodnotě pH 5,6 nižší - nejvyšší dosažené hodnoty byly 1,78 a 2,01. Ke konci fermentace syrovátky z pokusných výrob produkce vodíku klesala (obr. 4) a klesala i hodnota poměru kyseliny máselné a octové (obr. 6). Při fermentaci obnovené syrovátky produkce vodíku nevykazovala po dobu fermentace stálý pokles a hodnota poměru kyseliny máselné a octové rovněž neklesala.

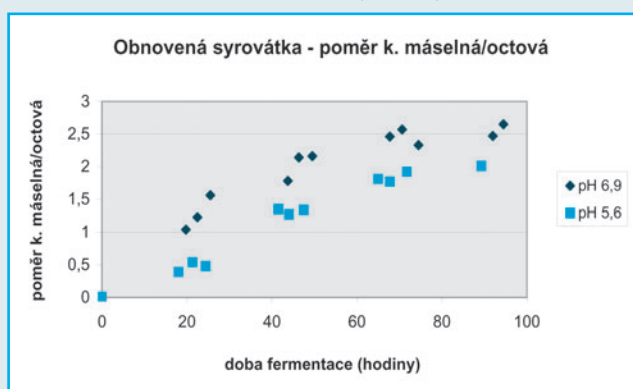
5. Závěr

Testovaný kmen byl ve všech testovaných médiích - dvou bujónech, obnovené syrovátce a syrovátce z pokusných výrob - schopen produkce vodíku. Podíl vodíku ve volně odcházejících plynech byl ve všech případech vyšší při nižším pH. To se jeví jako výhodnější v případě využití pro

Obr. 6 Poměr kyseliny máselné a octové ve vzorcích z fermentace syrovátky z pokusných výrob.



Obr. 7 Poměr kyseliny máselné a octové ve vzorcích z fermentace obnovené syrovátky.



možné zpracování syrovátky i z hlediska případných nákladů na její neutralizaci před zaočkováním i během fermentace.

Práce pokračují s dalšími vybranými kmeny s cílem vytvořit produkční konsorcium klostridií.

Poděkování

Tato práce vznikla za finanční podpory MŠMT, grantu 2B08070 a výzkumného záměru MSM 2672286101.

Literatura:

- KIM S.-H.; HAN S.-K.; SHIN H.-S (2006): Effect of substrate concentration on hydrogen production and rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. *Process Biochemistry*, 41, (1), s. 199-207.
- MASSET, J., HILIGSMANN, S., HAMILTON, CH., BECKERS, L., FRANCK, F., THONART, P. (2010): Effect of pH on glucose and starch fermentation in batch and sequenced-batch mode with a recently isolated strain of hydrogen-producing *Clostridium butyricum* CWB/1009. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, (8), s. 3371-3378.
- CAI, G.; JIN, B.; SAINT, CH.; MORIS, P. (2010): Metabolic flux analysis of hydrogen production network by *Clostridium butyricum* W5: Effect of pH and glucose concentration. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, (13), s. 6681-6690.
- WEN-MING CHEN, ZE-JING TSENG, KUO-SHING LEE, JO-SHU CHANG (2005): Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30, s. 1063-1070.

Přijato do tisku 24. 4. 2011

Lektorováno 3. 6. 2011