

Príprava zmrazených a lyofilizovaných kultúr baktérií pre kvasenie zeleniny

RENÁTA RADOŠOVSKÁ - TOMÁŠ KUCHTA

Súhrn. Sledovalo sa prežívanie bakteriálnych kultúr pre kvasenie zeleniny (*Lactobacillus pentosus*, *Pediococcus parvulus*) pri dlhodobom uskladnení v lyofilizovanej a zmrazenej forme. Osvedčila sa lyofilizácia v 10 % roztoku sušeného odtučneného mlieka. Pri zmrazovaní sa ako kryoprotektanty osvedčili 35 % sacharóza alebo 30 % betaín pre *L.pentosus* a 20 % glycerol alebo 30 % betaín pre *P.parvulus*.

V predchádzajúcej práci [1] bolo izolovaných niekoľko kmeňov baktérií z rodov *Lactobacillus* a *Pediococcus*, vhodných na kvasenie zeleniny. Vzhľadom na to, že pripravené čerstvé štartovacie kultúry pomerne rýchlo strácajú viabilitu, zamerala sa práca na spôsoby prípravy dlhodobo skladovateľných koncentrovaných kultúr. Na tento účel sa používa rozprašovacie sušenie, lyofilizácia a zmrazovanie [2,3]. Predbežné pokusy ukázali nízke prežívanie našich kultúr baktérií pri ich rozprašovanom sušení (B.Glončáková, osobné oznámenie), čo je v súlade so skúsenosťami iných [2,3]. Preto sa úsilie sústredilo na postupy zmrazovania a lyofilizácie.

Spoločným krokom oboch postupov je zmrazovanie. Je známe, že pri zmrazovaní živých buniek, resp. pri ich následnom rozmrazovaní, môže dôjsť k ireverzibilným zmenám v bunkových štruktúrach. Dôsledkom takéhoto poškodenia je smrť bunky resp. jej znížená metabolická aktivita po rozmrazení [4]. Do určitej miery možno poškodeniu zabrániť použitím vhodných kryoprotektantov. Pre bakteriálne kultúry sa najlepšie výsledky

Ing. Renáta Radošovská, RNDr. Tomáš Kuchta, CSc., Výskumný ústav potravinársky, pracovisko Modra, Štefánikova 45, 900 01 Modra.

dosiaľ dosiahli s glycerolom [5-7], sacharózou [6,8], laktózou [8], trehalózou [9], resp. zmrazovaním v mlieku [5,10].

Pri lyofilizácii sa bakteriálna biomasa suspenduje vo vhodnom roztoku, zmrazí a suší vo vákuu. Mieru prežívania baktérií, ktorá je inak nízka, možno zvýšiť použitím vhodných protektantov. Dobrý ochranný účinok pri lyofilizácii je známy pri 10 % roztoku sušeného odtučneného mlieka, prípadne doplnenom ďalšími protektantmi - želatínou [11], kyselinou askorbovou [12] alebo adonitolom [13].

Vychádzajúc zo spomenutých publikovaných údajov, zistených prevažne pre mliečne baktérie, optimalizovala sa príprava zmrazených a lyofilizovaných koncentrovaných kultúr baktérií na kvasenie zeleniny.

Materiál a metódy

Použili sa kmene *Lactobacillus pentosus* kal9w a *Pediococcus parvulus* kap3i [1], ktoré sa kultivovali v médiu MRS [14] pri 30°C za miešania 2 Hz do hustoty kultúry $A_{560} = 1,0$ až 1,2, ak nie je uvedené inak. Biomasa sa premyla 0,9 % roztokom NaCl a suspendovala v sterilných roztokoch protektantov. Ako protektanty sa použili: glycerol (Serva), sacharóza (Lachema), betaín (Sigma), adonitol (Sigma), trehalóza (Sigma), Sunar a odtučnené sušené mlieko (Promil).

Pre lyofilizáciu sa suspenzie kultúr plnili po 0,5 ml do sklenených lyofilizačných skúmaviek a zmrazili v etanolovom kryostate pri -30°C. Lyofilizovalo sa v lyofilizátore Leybold Lyovac GT2 počas 12 h. Po lyofilizácii boli vzorky evakuované a zatavené. Pred testovaním prežívania baktérií boli lyofilizáty rehydrované pôvodným množstvom pôdy MRS a inkubované 1 h pri 30°C.

Pre zmrazovanie sa suspenzie kultúr rozplnili po 1 ml do plastických skúmaviek a zmrazili v etanolovom kryostate pri -30°C. Vzorky sa skladovali v mrazničke pri -20°C a pred testovaním prežívania baktérií sa rozmrazili pri laboratórnej teplote.

Počet jednotiek, tvoriacich kolónie (CFU), sa určil po nariedení vzoriek 0,9 % roztokom NaCl a nanesení na platne MRS [14]. Platne sa kultivovali pri 30°C 24 h (kmene z rodu *Lactobacillus*) alebo 72 h (*Pediococcus*).

Výsledky a diskusia

So zámerom pripraviť koncentrované kultúry, ktoré by si uchovali životaschopnosť počas dlhej doby skladovania, lyofilizovali sa kultúry v roztokoch rôznych protektantov. Dobré výsledky sa dosiahli pri suspendovaní kultúr v 10 % roztoku sušeného odtučneného mlieka. Prežívanie baktérií *L.pentosus* kal9w pri jednotlivých krokoch lyofilizácie v tomto roztoku uvádza tab.1. Zmrazením a lyofilizáciou síce dochádza k úhynu 95 % baktérií, avšak pripravený lyofilizát je veľmi trvanlivý - počas 3 mesiacov skladovania pri 5°C alebo -20°C sa zachováva v lyofilizáte 100 % pôvodných živých baktérií. Podobné výsledky sa získali tiež s kmeňom *P.parvulus* kap3i i s inými kmeňmi z rodu *Lactobacillus* (podrobné výsledky sa neuvádzajú).

Tabuľka 1. Úbytok živých baktérií *L.pentosus* kal9w počas jednotlivých krokov lyofilizácie.

Table 1. Survival of *L.pentosus* kal9w during freeze-drying.

Pred zmrazením ¹	100 %
Po zmrazení ²	80 %
Po lyofilizácii ³	5 %
Po skladovaní 6 mes. pri 5°C ⁴	5 %

1 - Before freezing, 2 - after freezing, 3 - after drying, 4 - after 6-months storage at 5°C.

Menej výhodným ako sušené odtučnené mlieko sa ukázal Sunar. Lyofilizáty pripravené v roztokoch Sunaru boli ťažko rehydrovateľné, zrejme pre vyšší obsah tuku. Suspenzie baktérií v 1 mol.l⁻¹ a 2 mol.l⁻¹ glycerole, 1 mol.l⁻¹ a 2 mol.l⁻¹ sacharóze a v 1 mol.l⁻¹ a 2 mol.l⁻¹ betaíne sa ukázali ako nevhodné pre lyofilizáciu, keďže sa vzorky vždy skôr roztopili ako došlo k sublimácii vody.

Zvýšenie prežívania kultúr pri lyofilizácii prídavkom ďalších protektantov do mlieka nebolo úspešné. Prídavok 0,3 mol.l⁻¹ adonitolu, trehalózy, sacharózy ani betaínu však prežívanie nezvýšil (podrobné výsledky sa neuvádzajú).

Úbytok živých baktérií pri lyofilizácii závisel tiež od pomeru bakteriálnej biomasy a suspenďačného roztoku protektantu. Zistilo sa, že pre dostatočné prežívanie je potrebná hustota buniek aspoň 5.10⁹ ml⁻¹.

Na základe uvedených výsledkov sa odporúča pre dlhodobé uchovávanie kultúr baktérií na kvasenie zeleniny tento postup:

Baktérie sa kultivujú v pôde MRS do začiatku stacionárnej fázy, odstredia a premyjú 0,9 % roztokom NaCl. Biomasa sa suspenduje v sterilnom 10 % roztoku sušeného odtučneného mlieka v pomere 1 objemový diel biomasy ku 1 až 5 objemovým dielom roztoku. Suspenzie sa naplnia do lyofilizačných nádob, rýchlo zmrazia na -30°C a lyofilizujú. Lyofilizáty sa vakuovo uzavru a skladujú pri teplote 5°C alebo nižšej.

Lyofilizované kultúry na kvasenie zeleniny, pripravené týmto postupom, majú trvanlivosť porovnateľnú s publikovanými trvanlivosťami lyofilizovaných kultúr pre použitie v mliekárstve [11-13].

Kým kultúry lyofilizované v mlieku sú vhodné pre dlhodobé skladovanie, pre praktické použitie je obsah sušeného mlieka nevhodný, pretože pri priamom použití do nálevov šalátov by sa prejavil nežiadúcim zákalom. Pre tento účel sa preto vyskúšala príprava zmrazených kultúr. Prežívanie kultúr *L.pentosus* kal9w a *P.parvulus* kap3i pri zmrazovaní a skladovaní pri použití rôznych kryoprotektantov uvádzajú tabuľky 2. a 3. Ukázalo sa, že pre zmrazovanie kultúr *L.pentosus* kal9w je vhodné použitie 35 % roztoku sacharózy, alebo 15 % a 30 % roztoku betaínu. Podobné výsledky sa dosiahli tiež s inými kmeňmi z rodu *Lactobacillus* (podrobné výsledky sa neuvádzajú). Na kryoprotekciu kultúr *P.parvulus* kap3i sa ukázal vhodný 20 % roztok glycerolu a 30 % roztok betaínu.

Tabuľka 2. Prežívanie kultúr *L.pentosus* kal9w pri zmrazovaní v roztokoch rôznych kryoprotektantov.

Table 2. Effect of cryoprotective agents on survival of *L.pentosus* kal9w in frozen cultures.

Doba skladovania ¹	Hustota [CFU/ml]					
	Glycerol ²		Sacharóza ³		Betaín ⁴	
	10 %	20 %	35 %	50 %	15 %	30 %
0	5,1.10 ¹³	5,1.10 ¹³	5,1.10 ¹³	5,1.10 ¹³	5,1.10 ¹³	5,1.10 ¹³
1 mesiac ⁵	2,6.10 ¹²	2,9.10 ¹²	3,0.10 ¹¹	2,2.10 ¹²	1,0.10 ¹³	4,0.10 ¹³
2 mesiace ⁵	4,1.10 ⁸	3,7.10 ⁶	8,0.10 ⁹	1,0.10 ¹⁰	1,5.10 ¹²	3,3.10 ¹²
6 mesiacov ⁵	5,6.10 ⁷	1,4.10 ⁶	1,5.10 ⁸	2,0.10 ⁶	6,3.10 ⁷	1,1.10 ¹⁰
12 mesiacov	0	0	7,9.10 ⁴	0	1,9.10 ⁶	5,7.10 ⁹

1 - Storage duration, 2 - glycerol, 3 - sucrose, 4 - betaine, 5 - month(s).

Tabuľka 3. Prežívanie kultúr *P.parvulus* kap3i pri zmrazovaní v roztokoch rôznych kryoprotektantov.

Table 3. Effect of cryoprotective agents on survival of *P.parvulus* kap3i in frozen cultures.

Doba skladovania ¹	Hustota [CFU/ml]					
	Glycerol ²		Sacharóza ³		Betaín ⁴	
	10 %	20 %	35 %	50 %	15 %	30 %
0	$7,2 \cdot 10^8$	$7,2 \cdot 10^8$	$7,2 \cdot 10^8$	$7,2 \cdot 10^8$	$7,2 \cdot 10^8$	$7,2 \cdot 10^8$
1 mesiac ⁵	$2,7 \cdot 10^6$	$4,0 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^7$	$1,0 \cdot 10^7$	$1,1 \cdot 10^6$	$4,4 \cdot 10^6$
2 mesiace ⁵	$1,1 \cdot 10^5$	$4,6 \cdot 10^5$	$2,4 \cdot 10^4$	$1,6 \cdot 10^5$	$1,4 \cdot 10^4$	$8,0 \cdot 10^5$
6 mesiacov ⁵	0	$2,8 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^3$	0	$3,2 \cdot 10^2$	$1,9 \cdot 10^4$
12 mesiacov	0	$8,4 \cdot 10^2$	0	0	0	$6,8 \cdot 10^2$

1 - Storage duration, 2 - glycerol, 3 - sucrose, 4 - betaine, 5 - month(s).

Suspenzie baktérií v týchto roztokoch boli odolné voči 1- až 2-násobnému rozmrazeniu a opätovnému zmrazeniu. Viacnásobné rozmrazenie a opätovné zmrazenie malo negatívny účinok na počet prežívajúcich baktérií (podrobné údaje sa neuvádzajú).

Úbytok živých baktérií pri zmrazovaní závisel tiež od veku kultúry. Ukázalo sa, že najlepšie prežívajú kultúry z konca exponenciálnej, resp. začiatku stacionárnej fázy (A_{560} 0,8 až 1,2; podrobné údaje sa neuvádzajú).

Na základe uvedených výsledkov sa odporúča pripravovať zmrazené koncentrované kultúry na kvasenie zeleniny týmto postupom:

Baktérie kultivovať v pôde MRS do začiatku stacionárnej fázy, odstrediť a premyť 0,9 % roztokom NaCl. Biomasu suspendovať v sterilnom roztoku kryoprotektantu v pomere 1 objemový diel biomasy k 1 objemovému dielu roztoku. Ako kryoprotektant použiť pre kmene z rodu *Lactobacillus* sacharózu alebo betaín a pre kmene z rodu *Pediococcus* glycerol alebo betaín. Suspenzie naplniť do zmrazovacích nádob, rýchlo zmraziť na -30°C a uskladniť pri -20°C .

Takto pripravené zmrazené kultúry majú trvanlivosť porovnateľnú s publikovanými trvanlivosťami zmrazených kultúr pre použitie v mliekárstve [6-8].

Literatúra

1. KUČHTA, T. - POLÍVKA, L.: Bulletin PV, 32, 1993, č.3-4, s.247-256.
2. FOSTER, E.M.: J. Dairy Sci., 45, 1962, s.1290.
3. STADHOUDERS, J. - JANSEN, L.A. - HUP, G.: Neth. Milk Dairy J., 23, 1969, s.182.
4. MAZUR, P.: Cryobiology, 14, 1977, s.251.
5. VALLES, E. - MOCQUOT, G.: Lait, 48, 1968, s.631.
6. STADHOUDERS, J. - HUP, G. - JANSEN, L.A.: Neth. Milk Dairy J., 25, 1971, s.229.
7. EFSTATHIOU, J.D. - McKAY, L.L. - MORRIS, H.A. - ZOTTOLA, E. A.: J. Milk Food Technol., 38, s.444.
8. CHAVARRI, F.J. - DE PAZ, M. - NUNEZ, M.: Biotechnol. Lett., 10, 1988, s.11.
9. DE ANTONI, G.L. - PÉREZ, P. - ABRAHAM, A. - ANÓN, M.C.: Cryobiology, 26, 1989, s.149.
10. MOSS, C.W. - SPECK, M.L.: Appl. Microbiol., 11, 1963, s.326.
11. DAMJANOVIC, V. - RADULOVIC, D.: Cryobiology, 4, 1967, s.30.
12. SINHA, R.N. - DUDANI, A.T. - RANGANATHAN, B.: J. Food Sci., 39, 1974, s.641.
13. DE VALDÉZ, G.F. - DE GIORI, G.S. - DE RUIZ HOLGADO, A.A.P. - OLIVER, G.: Appl. Environ. Microbiol., 45, 1983, s.302.
14. DE MAN, J.C. - ROGOSA, M. - SHARPE, M.E.: J. Appl. Bacteriol., 23, 1960, s.130.

Do redakcie došlo 18.8.1993.

Preparation of frozen and freeze-dried cultures of bacteria for vegetables fermentation

Summary

Preservation of bacterial starters for vegetables fermentation (*Lactobacillus pentosus*, *Pediococcus parvulus*) was studied. Good results were achieved with freeze-drying using 10 % skimmed milk as protectant. When frozen cultures were being prepared, 35 % sucrose or 30 % betaine were efficient cryoprotective agents for *L.pentosus*, while 20 % glycerol or 30 % betaine were efficient with *P.parvulus*.

Produkcia kyseliny L-mliečnej a γ -linolénovej pomocou vláknitých húb rodu *Rhizopus*

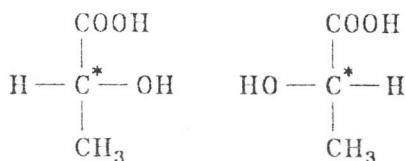
LUDMILA KRIŠTOFÍKOVÁ - MICHAL ROSENBERG - ERNEST ŠTURDÍK

Súhrn. Prezentované sú poznatky o produkcii kyseliny L-mliečnej vláknitými hubami z rodu *Rhizopus*. Rozoberajú sa mikrobiologické, biochemické a technologické aspekty tvorby kyseliny L-mliečnej vláknitých húb. Biomasa týchto húb je cenným zdrojom mikrobiálnych lipidov, predovšetkým polynenasýtených mastných kyselín. Príspevok podáva prehľad o biosyntéze lipidov i faktoroch, ktoré ju ovplyvňujú v procese tvorby kyseliny L-mliečnej. Práca podáva prehľad aj o využití kyseliny mliečnej a γ -linolénovej v potravinárstve a v iných odvetviach priemyslu.

Fermentačná výroba kyseliny mliečnej patrí historicky k najstarším poznaným mikrobiálnym technológiám. Tvorba kyseliny mliečnej bola podrobne študovaná z aspektu genetického, biochemického, mikrobiologického, bioinžinierskeho a technologického [1]. Kyselina mliečna sprevádza tvorbu mnohých metabolitov produkovaných širokou paletou baktérií, kvasiniek a vláknitých húb. Napriek produkcii kyseliny mliečnej mnohými druhmi mikroorganizmov, z hľadiska priemyselnej výroby sú doposiaľ využívané len homofermentatívne baktérie patriace do rodu *Lactobacillus*. Veľmi perspektívne sa javí možnosť využitia vláknitých húb z rodu *Rhizopus* na produkciu kyseliny L(+) mliečnej, ktorú je možné spojiť s efektívnou prípravou polynenasýtených mastných kyselín, predovšetkým kyseliny γ -linolénovej [2].

prom.chem. Ludmila Krištofiková, Ing. Michal Rosenberg, CSc., doc.Ing. Ernest Šturdík, CSc., Katedra biochemickej technológie, Chemickotechnologická fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

Kyselina mliečna je jedným z najdlhšie známych príkladov opticky aktívnej zlúčeniny:



D(-) mliečna kyselina

L(+) mliečna kyselina

Z fyziologického hľadiska je dôležité, že kyselina L(+) mliečna sa v tele vyšších živočíchov metabolizuje, pokým D(-) forma sa z tela vylučuje. Z racemickej kyseliny sa preto využije len L(+) zložka. Schéma vzniku opticky aktívnej a racemickej kyseliny mliečnej je uvedená na obr.1.

Vláknité huby rodu *Rhizopus* produkujú len L(+) formu kyseliny mliečnej, čo je mimoriadne atraktívne pre použitie produktu v potravinárstve,



Obr.1. Schéma vzniku opticky aktívnej a racemickej kyseliny mliečnej v rámci mikrobiálneho metabolizmu [3].

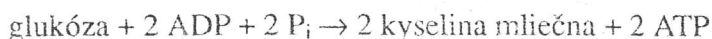
Fig.1. The scheme of optically active and racemic lactic acid in the frame of microbial metabolism [3].

1 - pyruvic acid, 2 - lactate dehydrogenase, 3 - lactic acid, 4 - lactate racemase.

farmácii, plastikárstve a pod. V príspevku podávame stručný prehľad dostupných poznatkov v oblasti produkcie kyseliny mliečnej rodom *Rhizopus* s cieľom poukázať na odlišnosti bakteriálnej fermentácie a produkcie kyseliny L(+) mliečnej pomocou vláknitých húb.

1. Bakteriálna fermentácia

Výroba kyseliny mliečnej prostredníctvom baktérií má v celosvetovej produkcii stále výsadné postavenie. Homofermentatívne, tzv. mliečne baktérie konvertujú glukózu na kyselinu mliečnu v anaeróbných podmienkach prostredníctvom glykolýzy [4]:



Mliečne baktérie sú charakteristické tým, že produkujú okrem L-formy kyseliny mliečnej taktiež D-formu, pričom ich vzájomný pomer je charakteristický pre každého producenta. Z homofermentatívnych baktérií, napr. *Lactobacillus delbrueckii*, *L.bulgaricus*, *L.lactis*, tvoria predovšetkým D-laktát [5,6], *L.acidophilus* produkuje DL-laktát a len *Lactococcus lactis* a *Lactococcus cremoris* generujú predovšetkým L-formu kyseliny [7,8]. Čistú L-formu kyseliny syntetizuje len niekoľko mutačne šľachtených kmeňov [9].

Laktobacily sú sčasti anaeróbne, najčastejšie však mikroaerofilné. Sú náročné na živiny, a preto rastú na bežných kultivačných pôdach len veľmi slabo, prípadne na nich vôbec nerastú. Pre svoj dobrý rast si vyžadujú tlmivé živné pôdy s dostatočným obsahom komplexných organických dusíkatých zlúčenín, rastových látok, určitých anorganických iónov a skvasiteľných sacharidov ako zdrojov energie [10]. Súhrnne je problematika bakteriálnej produkcie kyseliny mliečnej diskutovaná v prácach [1,3,11].

2. Produkcia kyseliny L-mliečnej pomocou *Rhizopus* spp.

2.1. Mikroorganizmy

I keď bola tvorba kyseliny mliečnej ako sprievodného metabolitu pozorovaná v rôznych druhoch vláknitých húb, väčšie množstvo tejto kyseliny produkuje len rod *Rhizopus*, druhy *R.oryzae* a *R.arrhizus* [12]. Druhy rodu

Rhizopus, taxonomicky zaradené do radu *Mucorales*, sú v prírode veľmi rozšírené. Vyskytujú sa hlavne v pôde ako mineralizátory organickej hmoty, rozkladajú napr. celulózu, proteíny, škrob, často spôsobujú kontaminácie potravín. Sú to mikroskopické huby tvoriace vzdušné mycélium s bohatou sporuláciou. Tvorba kyseliny L(+) mliečnej vláknitými hubami bola popísaná už v r. 1936. Lockwood [13] izoloval kmeň *Rhizopus oryzae*, ktorý pri povrchovej kultivácii konvertoval glukózu na kyselinu mliečnu v prítomnosti CaCO_3 . Niektoré kmene *Rhizopus spp.* okrem kyseliny mliečnej tvoria aj iné organické kyseliny, a to napr. fumarovú a jablčnú. Tieto kmene nie sú vhodné pre priemyselné využitie na produkciu kyseliny mliečnej [14]. V súčasnej dobe v oblasti humánnej výživy našli uplatnenie mikromycéty z rodu *Rhizopus* pri výrobe fermentovaných potravín. Perspektívne sa črtá využitie tejto vláknitej huby pri príprave mikrobiálnych metabolitov (organické kyseliny, enzýmy, látky využiteľné v gerontológii).

2.2. Biochemizmus tvorby laktátu

Kmene rodu *Rhizopus* produkujú výlučne L(+) kyselinu mliečnu za anaeróbnych i aeróbnych podmienok. Kyselina mliečna produkovaná za anaeróbnych podmienok zo sacharidických substrátov je priamym produktom glykolýzy. Za anaeróbnych podmienok *Rhizopus spp.* produkujú jednu molekulu kyseliny mliečnej z jednej molekuly glukózy. Ako vedľajší produkt sa tvorí etanol a oxid uhličitý [15].

Za aeróbnych podmienok výťažky kyseliny mliečnej prevyšujú 1 mól na 1 mól spotrebovanej glukózy. Z jednej molekuly glukózy vzniká 1,5 mólu kyseliny mliečnej a 0,2 mólu etanolu. Výťažok 75 % kyseliny mliečnej, získanej kultiváciou *Rhizopus oryzae* za vysoko aeróbnych podmienok, potvrdil fakt, že tvorba kyseliny mliečnej je stimulovaná kyslíkom [16].

Mechanizmus oxidačnej tvorby kyseliny mliečnej z glukózy objasňuje Carson a Foster [17]. Kyselina pyrohroznová ako základný prekursor je tvorená glykolýzou, alebou z kyseliny oxáloctovej. Dva móly kyseliny pyrohroznovej sú potrebné na oxidačnú tvorbu 1 mólu kyseliny mliečnej, ďalšie dva uhlíky vytvárajú aktívny C_2 -prekursor a zároveň sa uvoľní 1 mól CO_2 . Kondenzačnou reakciou medzi dvoma C_2 -prekursorami vznikajú potrebné intermediáty oxidačnej syntézy kyseliny pyrohroznovej. Pritom sa nedá jednoznačne rozlíšiť cyklus štvoruhlíkových a šesťuhlíkových zlúčenín.

Kyselina mliečna môže vznikať aj z kyseliny jablčnej. Mechanizmom konverzie štvoruhlíkovej dikarboxylovej kyseliny na kyselinu mliečnu je

pravdepodobne spojenie oxidačno-redukčnej a dekarboxylačnej reakcie, ako popísal Kortes [18] pre tvorbu kyseliny mliečnej u kyseliny jablčnej prostredníctvom tkaniva cicavcov, alebo z kyseliny oxaloctovej Wood-Waksmanovou reakciou.

Jedným z kľúčových enzýmov pri tvorbe laktátu je laktátdehydrogenáza (LDH). *NAD-závislá LDH* je enzým, ktorý katalyzuje redukciu pyruvátu na kyselinu mliečnu prostredníctvom NADH, ale spätnú reakciu nie. *LDH* zo skupiny húb patriacich do triedy *Zygomycetes*, rodu *Rhizopus*, zo skupiny kmeňov tvoriacich kyselinu mliečnu nebola veľmi študovaná. Obayashi [19] izoloval a čiastočne purifikoval *L-LDH* z *Rhizopus oryzae*, pričom zistil, že enzým katalyzuje obe reakcie, t.j. redukciu pyruvátu a oxidáciu laktátu. Podrobnejšie štúdie [20] tohto druhu ukázali, že *NAD-závislá LDH* pôsobí len v smere redukcie pyruvátu, teda je podobná na *LDH* niektorých baktérií [21,22]. Oxidáciu laktátu, ako bolo ukázané, spôsobuje *NAD-nezávislá LDH*, ktorá je aktívna len v neskorších fázach rastu; v porovnaní s *NAD-závislou LDH*, ktorá je aktívna v mladom, nesporulujúcom mycéliu. Množstvo *NAD-závislej LDH* v mycéliu závisí od zloženia média, hlavne od obsahu glukózy, alebo iného využiteľného zdroja uhlíka. Vyššie koncentrácie glukózy podporujú syntézu *LDH*.

Regulácia produkcie kyseliny mliečnej u kmeňa *R.oryzae* môže byť vzťahnutá k faktorom determinujúcim syntézu a aktivitu *LDH*. Relatívne nízka afinita k *NADH* a väzba *NADH* s enzýmom zabezpečuje, že pyruvát je konvertovaný na laktát len vtedy, keď tvorba *NADH* je spojená s glykolýzou. Kontrole syntézy enzýmu bude tiež predchádzať odklon redukcie pyruvátu na laktát s výnimkou, keď je glukóza prítomná v nadbytku, t.j., keď je jej viac než sú rastové požiadavky húb. Foster [16] navrhol "výmenný metabolizmus" na účet akumulácie organických kyselín hubami pri vysokej koncentrácii zdroja uhlíka. Uvažoval, že odklon intermediátov do "výmennej dráhy" vzniká jednoducho ako výsledok saturácie enzýmu katalyzujúceho rýchlosť limitujúci krok v "normálnej dráhe" substrátom. Existencia "výmenného metabolizmu" je vlastne kontrola metabolizmu sacharidov v skorších fázach glykolýzy.

Pritchard [23] detegoval *NAD-nezávislú LDH* (*L-laktát :acceptor oxidoreduktáza*), ktorá katalyzuje oxidáciu *L*-mliečnej kyseliny na kyselinu pyrohroznovú. Tento enzým sa syntetizoval až po vyčerpaní glukózy z média a zániku *LDH-závislej od NAD*. Pri štúdiu vzťahu medzi utilizáciou glukózy, obsahom kyseliny mliečnej a enzýmovou aktivitou zistil, že maximum aktivity *NAD-závislej LDH* sa zhoduje s periódou rýchlej utilizácie glukózy

(exponenciálna fáza), pokým aktivita *NAD-nezávislej LDH* sa zvyšovala po vyčerpaní glukózy z média pri vyšších koncentráciách laktátu.

2.3. Využiteľné substráty a výživové nároky

Vláknité huby rodu *Rhizopus* sú schopné využívať okrem glukózy, ako najľahšie využiteľného zdroja uhlíka, aj iné substráty vzhľadom k ich enzýmovému vybaveniu. Kmene rodu *Rhizopus* sú známe tvorbou amylolytických enzýmov, hlavne α -amylázy a glukoamylázy [24]. Vlastnosti týchto enzýmov boli detailne študované [25-27], pričom bolo zistené, že niektoré ich vlastnosti sú zhodné s amylázami produkovanými *Aspergillus niger* [28]. Z uvedeného vyplýva, že ako substráty pre produkciu kyseliny mliečnej sa môžu používať škrob, škrobnaté suroviny alebo ich hydrolyzáty. V ostatnom období sa ako substráty začínajú využívať poľnohospodárske produkty, napr. raž, kukurica, ryža [29-31]. Perspektívne zaujímavým C-zdrojom sa javí aj sacharóza a odpady pri jej výrobe, ktoré sú schopné kmene *Rhizopus spp.* priamo konvertovať na kyselinu L(+) mliečnu [32]. Okrem vyššie uvedených substrátov sa pozorovala efektívna tvorba kyseliny mliečnej taktiež na xylóze, galaktóze, manóze, fruktóze, celobióze a maltóze [33].

Okrem zdroja uhlíka (ako bolo uvedené vyššie) je nevyhnutný pre rast buniek tiež zdroj dusíka, prítomnosť makro- a mikroelementov v médiu. Zdrojom dusíka potrebného pre rast buniek *Rhizopus sp.* je najčastejšie uvádzaný $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ v koncentrácii 0,04 % [13]. Margulius a kol. [34] použili ako zdroj dusíka NH_4NO_3 , pričom dosiahli rovnaký výťažok kyseliny mliečnej, ako keď bol použitý síran amónny. Seaby [35] zistil, že *R. oryzae* utilizuje v kvapalnom médiu NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 a močovinu. Je teda zrejmé, že optimálny zdroj dusíka je potrebné determinovať pre každého potenciálneho producenta zvlášť.

Pre tvorbu kyseliny mliečnej je dôležitý pomer medzi obsahom uhlíka a dusíka. Ak médium obsahuje viac dusíka, tvorí sa predovšetkým biomasa, kyselina mliečna v menšej miere. V literatúre sa ako najvhodnejší uvádza pomer C:N v rozmedzí 50:1 až 100:1 [36].

Ako zdroj fosforu, ktorý je nevyhnutný pre biochemizmus bunky (tvorba ATP), sa používa KH_2PO_4 a K_2HPO_4 . Medzi biogénne prvky potrebné pre rast mikroorganizmu patrí horčík, ktorý sa pridáva do média vo forme $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ v koncentrácii 0,004 - 0,04 %. Zaujímavý je vplyv zinočnatých a železnatých iónov na tvorbu kyseliny mliečnej niektorými kmeňmi

Rhizopus spp. v médiu s glukózou ako zdrojom uhlíka. Ak sa použije v médiu Zn^{2+} bez prítomnosti Fe^{2+} , dosiahne sa iba vysoký nárast biomasy, nie však tvorba kyseliny mliečnej. Pri použití 0,01 % FeSO_4 a 0,005 % ZnSO_4 sa vytvorí 84,5 g kyseliny mliečnej zo 100 g glukózy [37].

2.4. Podmienky fermentácie

Fermentačnú produkciu kyseliny L(+) mliečnej rodom *Rhizopus* ovplyvňuje viacero faktorov, predovšetkým zloženie kultivačného média, teplota, pH a aerácia.

Hodnota pH prostredia vo veľkej miere ovplyvňuje rast mikroorganizmu a produkciu metabolitov. Kmene rodu *Rhizopus* rastú v rozmedzí pH 3,5 až 8. Optimálna hodnota pH pre rast je 5 až 6. Ak pH klesne pod 3,5, rast i tvorba kyseliny mliečnej sa zastavuje [38]. Lockwood [13] zistil, že pre maximálnu produkciu kyseliny mliečnej kmeňom *R. oryzae* je nevyhnutná prítomnosť CaCO_3 v médiu ako neutralizačného činidla. Tento poznatok potvrdil aj Hang [39] bez bližšieho objasnenia pozorovaného javu. *Rhizopus spp.* rastie dobre pri teplotách 20 až 45°C, optimálna produkcia kyseliny je však v teplotnom rozmedzí 30 - 35°C. Nároky na aeráciu sú vysoké predovšetkým vo fáze rastu huby, v procese syntézy laktátu sa významne znižujú [40].

Imobilizácia mikroorganizmov je vo všeobecnosti atraktívna pre priemyselné fermentácie, nakoľko sa jej prostredníctvom zvyšuje výťažok žiadaného produktu. Je len samozrejmé, že aj na zefektívnenie produkcie kyseliny mliečnej boli študované možnosti využitia imobilizovaných buniek [41-43]. Tieto môžu byť imobilizované v akrylamide alebo Ca-alginátovom géli. Takto upravené sú schopné utilizovať glukózu aj sacharózu v kontinuálnom systéme. Produktom je vysokočistá kyselina L(+) mliečna a jej špecifická rýchlosť produkcie je 1,8-krát vyššia ako u voľných buniek [44].

Priemyselnú výrobu mliečnanu vápenatého pomocou vláknitých húb popisuje americký patent [45], podľa ktorého produkcia prebiehala na 13 % glukózovom médiu pri 35°C a pH 6,0 po dobu 57 hodín. Čínski autori [46] dosiahli 78,9 % konverziu 15 % glukózy na kyselinu mliečnu kmeňom *Rhizopus sp.* R47 pri 35°C za 48 hodín kultivácie. Nami vyselektovaný kmeň *Rhizopus arrhizus* CCM 8109 poskytuje 75 - 80 % konverziu sacharidických substrátov (glukóza, sacharóza, škrob, škrobnaté hydrolyzáty, melasa) za 48 hodín fermentácie [32]. Našou snahou je však uskutočňovať také zásahy do fermentačného procesu, aby v priebehu produkcie laktátu, alebo

bezprostredne po jej skončení bola maximálne stimulovaná tvorba lipidu s vysokým obsahom polynenasýtených mastných kyselín v mycéliu producenta. Postup takejto prípravy mikrobiálnych lipidov je odlišný od doposiaľ používaných prístupov, keď fermentácia tukotvorného mikroorganizmu prebiehala na bohatých komplexných pôdach v podmienkach submerznej kultivácie 4 až 6 dní, pričom po separácii biomasy bolo fermentačné médium odpadom.

2.5. Odpadová biomasa ako zdroj mikrobiálnych lipidov

Mikroorganizmy sú potenciálnym zdrojom lipidov. Pod pojmom tukotvorné mikroorganizmy rozumieme tie, ktoré obsahujú v mycéliu viac ako 20 - 25 % lipidov. Tieto mikroorganizmy môžu slúžiť ako potenciálny zdroj lipidov pre priemyselné využitie. Aj keď je veľké množstvo prác zameraných na výsostne teoretické štúdie membránových lipidov, je problematika tvorby lipidov u *Rhizopus spp.* zaujímavá aj z aplikačného hľadiska, ako to dokumentuje patentová literatúra z ostatných rokov [47-49].

Triacylglyceroly v bunkách kvasiniek a húb tvoria 92 % z celkových lipidov. Podrobná analýza zvyškov mastných kyselín ukázala, že druhý uhlík glycerolu je esterifikovaný nenasýtenou mastnou kyselinou. Mastné kyseliny sú v lipidoch húb vo väčšom zastúpení ako mastné kyseliny v lipidoch kvasiniek [50].

Nadprodukcia lipidov v eukaryotickej bunke je podmienená množstvom enzýmu *ATP:citrátlyázy* v cytoplazme bunky. Význam tohto enzýmu spočíva v tom, že tvorí z citrátu acetylkoenzým A, ktorý slúži ako substrát pre syntézu mastných kyselín. Tukotvorné mikroorganizmy akumulujú citrát v mitochondriách, odtiaľ ho transportujú do cytoplazmy a tu je štiepený *ATP:citrátlyázou*. Netukotvorné mikroorganizmy tento enzým neobsahujú, preto je tvorba lipidov málo efektívna. Tento proces prebieha iba u kvasiniek a húb, baktérie tvoria acetyl-CoA z pyruvátu priamo v cytoplazme [51].

Syntéza mastných kyselín je ovplyvňovaná mnohými fyzikálnymi a fyzikálno-chemickými faktormi ako sú napr. zdroj uhlíka, dusíka, mikroelementy, teplota, pH, aktuálna koncentrácia kyslíka [52]. Je známe, že pre akumuláciu lipidov v mycéliu mikroorganizmu sú vhodným zdrojom sacharidy. Aj keď je efektívnosť transformácie glukózy na lipid najlepšia, percentuálne zastúpenie lipidov v bunke môže byť rôzne a často je vyššie pri použití iného uhlíkatého substrátu [53,54].

Významným faktorom zodpovedným najmä za rast biomasy je zdroj dusíka. Podľa niektorých prác [55,56] je akumulácia lipidov spriahnutá najmä s prítomnosťou NH_4^+ iónov v kultivačnom médiu. Zároveň však zvýšená akumulácia lipidov vedie k ich menšej nenasýtenosti. Syntéza lipidov prebieha v celej fáze rastu až do vyčerpania zdroja uhlíka. V prvej fáze, keď sú všetky zložky média v prebytku, narastá množstvo biomasy, ale obsah lipidov je približne rovnaký. Ak bunky nemajú využiteľný zdroj dusíka, zastavuje sa proteosyntéza, avšak uhlíkatý substrát je ďalej konvertovaný na lipidy. So vzrastajúcim pomerom C:N stúpa množstvo vytvorených lipidov a ich zastúpenie v biomase, klesá však zastúpenie nenasýtených mastných kyselín. Je to spôsobené zmenou pomeru množstiev štruktúrnych lipidov k zásobným. Rôzne množstvo a druh dusíkatých látok ovplyvňuje nielen štrukturalizáciu lipidov a ich obsah v sušine, ale aj charakter rastu a fyziológiu mycélia (napr. prídavok peptónu výrazne ovplyvňuje tvorbu peletiek [57]).

Minerálne prvky majú vplyv na aktiváciu enzýmov potrebných k biosyntéze mastných kyselín. Prídavok Zn^{2+} do média pri kultivácii kmeňa *Mortierella romannia* spôsobuje zvýšenie množstva kyseliny γ -linolénovej. Podobne aj železo zvyšuje nenasýtenosť lipidov, ale do určitej miery inhibuje lipogézu [55]. Zo stimulátorov majú pozitívny vplyv na lipogézu antioxidanty ako sú tokoferoly, ubichinóny, steroidné hormóny, alkány a iné [50,58,59].

Tvorba lipidov je závislá vo veľkej miere aj od kultivačnej teploty. Stupeň nenasýtenosti mastných kyselín klesá so vzrastajúcou teplotou, hlavne znížením obsahu kyseliny linolovej a γ -linolénovej. Mikroorganizmy pri nižších teplotách syntetizujú lipidy s nižším bodom topenia, čo dosahujú väčšou nenasýtenosťou, vetvením a skracovaním reťazca mastných kyselín [60]. Zastúpenie mastných kyselín sa mení aj v závislosti od pH. Kolísanie celkových množstiev nenasýtených mastných kyselín pri prechode z neutrálneho pH do kyslej oblasti je podobné ako pri zvyšovaní teploty [56].

3. Použitie kyseliny mliečnej a γ -linolénovej

Kyselina mliečna má široké použitie ako acidifikačný agens, ale uplatňuje sa aj vo forme solí, esterov a ďalších derivátov. Na začiatku storočia boli laktáty využívané hlavne v kožiarskom a textilnom priemysle. Až ne-

skôr sa oblasť aplikácie kyseliny mliečnej rozšírila. Dnes možno rozdeliť aplikáciu kyseliny mliečnej na dve základné skupiny:

- aplikácia v potravinárstve, farmácii a kozmetike
- aplikácia ako chemikálie v rôznych oblastiach priemyslu.

V potravinárstve sa používa kyselina mliečna ako okysľovací prostriedok do potravín a nápojov. Kyselina L(+) mliečna a jej soli sú kompletne netoxické, preto sa môžu používať ako potravinárske aditívum. Navyše je prirodzenou zložkou organizmu, preto nie je cudzorodým elementom v potravinách. Má oproti iným kyselinám (napr. octovej) lahodnú chuť a je prakticky bez zápachu. V medicíne a kozmetike sa kyselina mliečna používa pri liečení niektorých kožných ochorení. Používa sa tiež ako prísada do mlieka dojčiat za účelom regulácie intestinálnej flóry u detí. Mliečnan vápenatý slúži ako zdroj vápnika pre organizmus.

Kyselina mliečna sa používa v kožiarskom priemysle na odvápnovanie koží, v textilnom priemysle ako moridlo určené na farbenie textílií. V metalurgii sa kyselina mliečna využíva na čistenie povrchov kovov, pretože nespôsobuje koróziu. Perspektívne je využitie kyseliny mliečnej v plastikárskom priemysle, hlavne pri výrobe biodegradabilných plastov.

Kyselina γ -linolénová (GLA) je jedna z esenciálnych mastných kyselín. Má kľúčové postavenie pri premene linolovej kyseliny na arachidónovú a ďalšie kyseliny radu ω -6. Nedostatočné množstvo GLA a iných polynenasýtených mastných kyselín v organizme môže byť príčinou rôznych ochorení, alebo zhoršenia existujúceho stavu choroby, napr. u ľudí so srdcovo-cievnyimi chorobami, zhubnými nádormi, reumatickými chorobami, bronchiálnou astmou a pod. [61].

Požiadavku dostatočného príjmu vyšších polynenasýtených mastných kyselín, zvlášť v kritických obdobiach života, možno účelne riešiť cestou výživy. V súčasnosti sa v zahraničí vyvíjajú rôzne nutrične orientované preparáty s GLA. Zdrojom tejto mastnej kyseliny sú doposiaľ najmä semená niektorých rastlín a morské ryby. Potenciálnymi producentmi tejto kyseliny sú tiež mikroorganizmy. Súhrnne je problematika produkcie a aplikácie kyseliny γ -linolénovej rozoberaná v práci [62].

Tento krátky literárny prehľad by mal dostatočne poukázať na atraktivitu produkcie kyseliny L(+) mliečnej a γ -linolénovej pomocou vláknitých húb rodu *Rhizopus*. Uvedený mikroorganizmus, doposiaľ študovaný osobitne na produkciu obidvoch kyselín, umožňuje totiž spojenie prípravy dvoch odlišných metabolitov v jednom fermentačnom cykle. Navyac, je veľmi

dobrým a atraktívnym modelom na štúdium vzťahov medzi produkciou primárnych metabolitov a lipogenezou u vláknitých húb.

Literatúra

1. Second Symposium on Lactic Acid Bacteria, Wageningen, Holandsko 1987, FEMS Microbiol. Rev., 46, 1987.
2. ROSENBERG, M. - KRIŠTOFÍKOVÁ, L. - PROKSA, B. - MAGDOLEN, P.: Biotechnol. Lett., 14, 1992, s.45.
3. BUCHTA, K.: Biotechnology, 3, Weinheim, Verlag-Chemie 1983, s.409.
4. MILSOM, P.E.: Food Technology, 1, Amsterdam, Elsevier 1987, s.273.
5. HONGO, M. - NOMURA, Y. - IWAHARA, M.: Appl. Environ. Microbiol., 52, 1986, s.314.
6. RHEE, S.K. - PACK, M.Y.: J. Bacteriol., 144, 1980, s.217.
7. LEE, D.A. - COLLINS, E.B.: J. Dairy Sci., 59, 1976, s.405.
8. JORGENSEN, M.H. - NICOLAISEN, K.: Appl. Microbiol. Biotechnol., 25, 1987, s.313.
9. HERIBAN, V. - ŠTURDÍK, E.: Kvas. prhm., 36, 1989, s.328.
10. ARPAI, J. - BARTL, V.: Potravinárska mikrobiológia, Bratislava, Alfa 1977, s.82.
11. VICKROY, T.B.: In: Comprehensive Biotechnology, 3, Oxford, Pergamon Press 1985, s.761.
12. LOSEL, D.M.: In: Microbial Lipids, 2, London, Academic Press 1989, s.367.
13. LOCKWOOD, L.A.B. - WARD, G.E. - MAY, D.E.: J. Agr. Res., 53, 1936, s.849.
14. RAUCH, J. - MITSCH, J.: Biochem. Z., 320, 1950, s.384.
15. WAKSMAN, S.A. - FOSTER, J.W.: J. Agr. Res., 57, 1938, s.873.
16. FOSTER, J.W.: Chemical Activities of Fungi, New York, Academic Press, New York, 1949, s.312.
17. CARSON, S.F. - FOSTER, J.W.: Arch. Biochem. Biophys., 33, 1951, s.448.
18. KORTES, S. - OCHOA, S.: J. Biol. Chem., 176, 1948, s.176.
19. OBAYASHI, A. - YORIFUGI, T. - YAMAGATA, T. - IJICHI, T. - KANIE, M.: Agr. Biol. Chem., 30, 1966, s.717.
20. PRITCHARD, G.G.: Biochim. Biophys. Acta, 250, 1971, s.25.
21. WITTENBERGER, C.L. - FULCO, J.G.: J. Biol. Chem., 242, 1967, s.2917.
22. TARMY, E.M. - KAPLAN, N.O.: J. Biol. Chem., 243, 1968, s.2587.
23. PRITCHARD, G.G.: Biochim. Biophys. Acta, 250, 1971, s.25.
24. YAMAMOTO, T. - MIAHARA, I. - YAMAMOTO, S. - FUJITA, K.: Denpun Kugaku, 37, 1990, s.129.
25. TANAKA, Y. - ASHIKARI, T. - NAKAMURA, N. - KIUCHI, N. - SHIBANO, Y. - AMACHI, T. - YOSHIZUMI, H.: Agric. Biol. Chem., 50, 1986, s.965.
26. YU, R. - HANG, Y.D.: World J. Biotechnol., 6, 1990, s.15.
27. YU, R. - HANG, Y.D.: Food Chem., 40, 1991, s.301.
28. PAZUR, J.H. - LIU, B. - MISKIEL, F.J.: Biotechnol. Appl. Biochem., 12, 1990, s.63.
29. HANG, Y.D.: US Pat. 4 963 487, 1991.
30. YU, R. - HANG, Y.D.: Biotechnol. Lett., 11, 1989, s.597.
31. CAO, B. - XU, J. - KUANG, Q.: Shipin Yu Fajiao Gongye, 1, 1991, s.37.
32. KRIŠTOFÍKOVÁ, L. - ROSENBERG, M. - VLNOVÁ, A. - ŠAJBIDOR, J. - ČERTÍK, M.: Folia Microbiol., 36, 1991, s.451.
33. ROSENBERG, M. - KRIŠTOFÍKOVÁ, L. - ŠTURDÍK, E.: World J. Microbiol. Biotechnol., 1993. (v tlači).
34. MARGULIUS, M. - VISHNIAK, V.: J. Bacteriol., 81, 1961, s.1.
35. SEABY, D.A. - McCracken, A.R.: J. Sci., Food Agric., 44, 1988, s.289.

36. BYRNE, G.S. - WARD, O.P.: *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 1989, s.912.
37. HONGO, M. - UYEDA, M.: *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 1972, s.273.
38. HARAYAMA, F. - YASUKIVA, H.: *J. Brew. Soc. Japan*, **82**, 1987, s.697.
39. HANG, Y.D. - HANAMCI, H. - WOODAMS, E.E.: *Biotechnol. Lett.*, **11**, 1989, s.299.
40. ROSENBERG, M. - KRIŠTOFÍKOVÁ, L.: *PV* 614-92, 1992.
41. HORITSU, H. - TAKAHASHI, Y. - ADACHI, S. - XIOA, R. - HAYASHI, T. - KAWAI, K.: In: *Bioreactor immobilized enzymes and cells*, London, Elsevier 1988, s.287.
42. KAGURU, I.: *Japan Pat.* 111 943, 1985.
43. SAKATA, K. - MASAKIHO, T.: *Japan Pat.* 63 273 447, 1989.
44. TAMADA, M. - ANJUMAN, A.R. - SUHARNI, S.: *J. Ferment. Bioeng.*, **74**, 1992, s.379.
45. SNELL, R.L. - LOWERY, C.H.E.: *US Pat.* 3 125 494, 1964.
46. JIANG, M. - WU, Z. - XU, M. - BAI, Z. - XIE, H. - SUN, W.: *Weishengwn Kuebao*, **31**, 1991, s.41.
47. HERBERT, R.A. - KEITH, S.M.: *Eur. Pat.* 153 134, 1989.
48. HERBERT, R.A. - KEITH, S.M.: *US Pat.* 4 851 343, 1989.
49. NISHIMURA, M. - HASEGAWA, M. - WASAKI, R.: *Eur. Pat.* 296 351, 1987.
50. RATLEDGE, C.: In: *Comprehensive Biotechnology*, **3**, Oxford, Pergamon Press 1985, s.983.
51. BOULTON, L.A. - RATLEDGE, C.: *J. Gen. Microbiol.*, **127**, 1984, s.169.
52. ROSE, A.M.: *Microbiol. Lipids*, **2**, 1989, s.255.
53. VEETE, J.D.: In: *Lipids in Fungal Growth and Reproduction*, London, Academic Press, 1989.
54. HEREDIA, L. - RATLEDGE, C.: *Biotechnol. Lett.*, **10**, 1988, s.25.
55. HANSSON, L. - DOSTALEK, M.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 1986, s.12.
56. WASSEF, M.K.: *Adv. Lip. Res.*, **15**, 1977, s.159.
57. BYRNE, G.S. - WARD, O.P.: *Biotechnol. Bioeng.*, **7**, 1989, s.912.
58. MIYAZIMA, M. - IIDA, M. - IIZUKA, H.: *J. Ferment. Technol.*, **64**, 1986, s.5.
59. MATYASHOVA, R.N. - KAVICHINA, T.N. - ROMANOVA, I.B.: *Microbiologyia*, **56**, 1987, s.991.
60. GRIGOROV, V.S. - KORNEEVA, D.S.: *Biotechnologyia*, **4**, 1988, s.206.
61. HORROBIN, D.F.: *Rev. Contemp. Pharmacother.*, **1**, 1990, s.1.
62. ČERTÍK, M.: *Farmaceutický obzor*, **62**, 1993, s.289.

Do redakcie došlo 17.8.1993.

Production of L-lactic acid and γ -linolenic acid by *Rhizopus* spp.

Summary

Information on the production of the L-lactic acid by the filamentous fungi genus *Rhizopus* is presented. Microbiological, biochemical and technological aspects of the L-lactic acid formation by filamentous fungi are discussed. Paper presents a review about the lipid biosynthesis during formation of the L-lactic acid by *Rhizopus* spp. The biomass of this fungi is the valuable source of microbial lipids, mainly polyunsaturated fatty acids. The paper presents also the information concerning the usage of both metabolites in food and other industries.