

Možnosti využití syrovátky v biotechnologiích

Michaela Petreňová

Bakalářská práce
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Michaela Petreňová**

Osobní číslo: **T12654**

Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Možnosti využití syrovátky v biotechnologiích**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakterizujte vlastnosti syrovátky.
2. Popište význam, principy a možnosti využití tlakových membránových separací.
3. Uvedte možnosti využití syrovátky v biotechnologiích.

II. Praktická část

1. Sledujte vybrané hydrolytické procesy laktosy v modelových vzorcích syrovátky.
2. Vyhodnoťte výsledky měření a formulujte závěry.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] PALATÝ, Zdeněk a Bohumil BERNAUER. Membránové procesy. Vyd. 1. V Praze: Vysoká škola chemicko-technologická, 2012, 282 s. ISBN 978-80-7080-808-5.

[2] MOULIN, G. a P. GALZY. Whey, a Potential Substrate for Biotechnology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 1984, č. 1, s. 347-374.

[3] GUIMARAES, P.M.R., J.A. TEIXEIRA a L. DOMINGUES. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnology Advances*. 2010, č. 28, s. 375-384.

[4] ROUSSOS, S a Bohumil BERNAUER. *New horizons in biotechnology*. 2nd ed. Boston: Kluwer Academic Publishers, c2003, xviii, 449 p. ISBN 14-020-1718-9.

[5] SHETTY, Kalidas a Bohumil BERNAUER. *Food biotechnology*. 2nd ed. New York: CRC Press, Taylor, 2006, 1982 p. ISBN 08-247-5329-1.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. František Buňka, Ph.D.**

Ústav technologie potravin

Datum zadání bakalářské práce: **2. února 2015**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. května 2015**

Ve Zlíně dne 2. února 2015


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: PETŘENOVÁ MICHAELA

Obor: CHTP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 4.5.2015

Petřenová Michaela

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlédnutí veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídně k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Předkládána bakalářská práce je zaměřená na problematiku využití syrovátky v biotechnologiích. Teoretická část popisuje chemické složení a vlastnosti syrovátky, dále jsou vysvětleny tlakové membránové separační procesy a možnost jejich aplikace v mlékárenském průmyslu, v poslední kapitole jsou vypsány možnosti využití syrovátky v biotechnologiích.

V praktické části byly sledovány vybrané hydrolytické procesy laktosy v modelových vzorcích syrovátky. Závěrem celé práce je vyhodnocení závislosti obsahu monosacharidů na faktorech, jež působily na vzorky během hydrolysy laktosy.

Klíčová slova: syrovátka, biotechnologie, membránové procesy, fermentace

ABSTRACT

Bachelor thesis was focused on whey usage in biotechnology. In the theoretical part, chemical composition and properties of whey, the pressure membrane separation processes and the usage in dairy industry were described. The last part dealt with the possibility of whey usage in biotechnology.

The practical part was focused on observation of specific hydrolytic processes of lactose in model whey samples. The dependence of monosaccharides contents on selected factors influencing lactose hydrolysis was evaluated.

Keywords: whey, biotechnology, membrane processes, fermentation

Největší poděkování patří vedoucímu mé bakalářské práce, doc. Ing. Františku Buňkovi, Ph.D., za cenné rady a připomínky, ale především za jeho ochotu, trpělivost a věnovaný čas. Dále bych chtěla poděkovat paní Ing. Zuzaně Bubelové, Ph.D. a paní Ing. et Ing. Ludmile Zálešákové za spolupráci v laboratořích.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 SLOŽENÍ A VLASTNOSTI SYROVÁTKY	12
1.1 CHEMICKÉ SLOŽENÍ SYROVÁTKY	12
2 MEMBRÁNOVÉ SEPARAČNÍ PROCESY V MLÉKÁRENSTVÍ	17
2.1 TLAKOVÉ MEMBRÁNOVÉ PROCESY	18
2.1.1 Mikrofiltrace.....	19
2.1.2 Ultrafiltrace	20
2.1.3 Nanofiltrace	22
2.1.4 Reverzní osmosa	23
3 MOŽNOSTI VYUŽITÍ SYROVÁTKY V BIOTECHNOLOGIÍCH	25
3.1 PRODUKCE KVASNICOVÉ BIOMASY	27
3.1.1 Kvasnicový autolysát.....	28
3.1.2 Produkce β -galaktosidasy.....	28
3.2 MLÉČNÉ KVAŠENÍ SYROVÁTKY	28
3.2.1 Bakterie mléčného kvašení.....	28
3.2.2 Mléčné kvašení.....	29
3.2.3 Produkce kyseliny mléčné za pomoci buněčných systémů	30
3.2.4 Produkce kyseliny mléčné za použití imobilizovaných buněk.....	30
3.2.5 Produkce syrovátkových nápojů.....	30
3.3 PRODUKCE PEKAŘSKÉHO DROŽDÍ	31
3.4 ETANOLOVÉ KVAŠENÍ SYROVÁTKY.....	31
3.5 OCTOVÉ KVAŠENÍ.....	32
3.6 PROPIONOVÉ KVAŠENÍ.....	32
3.7 PRODUKCE METANU	33
II PRAKTICKÁ ČÁST	34
4 CÍL PRÁCE	35
5 METODIKA PRÁCE	36
5.1 POUŽITÉ POMŮCKY A CHEMIKÁLIE	36
5.2 POPIS EXPERIMENTU	36
5.3 POUŽITÉ METODY	37
5.3.1 Příprava roztoků syrovátky o požadovaném pH	37
5.3.2 Dávkování enzymu a inkubace vzorků	37
5.3.3 Zastavení působení enzymu a filtrace	37
5.3.4 Vyhodnocování vzorků	38
6 VÝSLEDKY A DISKUSE	40

6.1	ZÁVISLOST KONCENTRACE MONOSACHARIDŮ NA pH PROSTŘEDÍ A NA KONCENTRACI ENZYMU VE VZORKU	41
6.2	ZÁVISLOST KONCENTRACE MONOSACHARIDŮ NA DOBĚ PŮSOBENÍ ENZYMU A NA TEPLOTĚ INKUBACE	45
ZÁVĚR		48
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY		49
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK		55
SEZNAM OBRÁZKŮ		56
SEZNAM TABULEK		57

ÚVOD

Syrovátka byla dlouhou dobu považována za pouhý vedlejší produkt při výrobě sýrů a likvidovala se jako odpad. Má velkou biochemickou spotřebu kyslíku, tudíž její vypouštění do vodných toků bez řádného vyčištění na vodu je nežádoucí a znehodnocuje životní prostředí. Ve vodách vede ke spotřebování kyslíku, což má za následek úhyn ryb, a znehodnocuje zemědělskou půdu. Z důvodu rostoucí ekologické zátěže byla snaha najít další využití pro syrovátku a komponenty z ní.

V dnešní době se již syrovátka využívá v mnoha oblastech, od výživy člověka, až po výrobu rozložitelných polymerů. Největší uplatnění má stále v potravinářském průmyslu, kde se s ní můžeme setkat jako s nápojem nebo v sušené formě. Sušená syrovátka se na trh dodává buď přímo, nebo se při dává do některých mléčných, pekařských i masných výrobků. Velká část syrovátky se zpracovává na jednotlivé komponenty: bílkoviny, laktosa. Ty se pak prodávají nebo se dále využívají, jak v potravinářském, farmaceutickém, tak i chemickém průmyslu.

Další s možností využití syrovátky je její přeměna na jiné produkty. Přeměny syrovátky se docílí buď pomocí chemických látek, ale častěji pomocí mikroorganismů nebo jejich částí. Toto využití řadíme do biotechnologických procesů. Fermentací (kvašením) syrovátky za použití širokého spektra bakterií a kvasinek je možné získat rozmanité produkty: kyseliny, alkoholy, biomasy, bioplyny, nápoje. Produkty kvašení se pak využívají v potravinářském, farmaceutickém, chemickém, energetickém a plastikářském průmyslu.

Cílem této bakalářské práce je popsat hydrolytické procesy laktosy v modelových vzorcích syrovátky a sledovat vliv vybraných faktorů na tuto hydrolysu.

Teoretická část pojednává o syrovátce, membránových separačních procesech, které se využívají pro úpravu a zpracování syrovátky, a o možnostech využití syrovátky v biotechnologiích.

V praktické části je pak popsána studie, jež hodnotí vliv faktorů, působících během hydrolysy laktosy v modelových vzorcích syrovátky, (pH prostředí, koncentrace aplikovaného enzymu, teplotu inkubace a její délku) na obsah monosacharidů.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 SLOŽENÍ A VLASTNOSTI SYROVÁTKY

Podle vyhlášky č. 77/2003 Sb. která stanovuje požadavky na mléko a mléčné výrobky se syrovátkou rozumí mléčný výrobek vznikající jako vedlejší produkt při výrobě sýrů, včetně tvarohů a kaseinů [1].

Dá se také charakterizovat jako mléčné sérum žlutozelené barvy, získané po vysrážení kaseinu. Z mléka, které představuje 100 % je při srážení přibližně 15 % mléčných složek vysráženo na sýřeninu a zbylých 85 % dále využíváno jako syrovátka. Ta se díky svému složení a vlastnostem stala základní surovinou pro výrobu různých produktů [2].

Složení a vlastnosti syrovátky závisí především na způsobu, kterým se kasein vysráží z mléka [2].

Sladká syrovátka vzniká takzvaným sladkým srážením kaseinu za použití syřidla. Jako syřidlo se využívá enzym rennin neboli chymosin, který se extrahuje ze slezů žaludků sajících telat, ale v dnešní době je již běžnější mikrobiální varianta získávání. Tímto způsobem se vyrábějí sladké sýry [3].

Při kyselém srážení je potřeba snížit pH mléka, což je způsobeno přímým přidavkem minerálních nebo organických kyselin, nebo přidavkem bakterií mléčného kvašení (čistých mlékárenských kultur), které metabolizují laktosu za vzniku kyseliny mléčné [4]. Tímto srážením se vyrábějí některé tvarohy, kyselé sýry a kaseiny a jako vedlejší produkt vzniká kyselá syrovátka [3].

1.1 Chemické složení syrovátky

Z hlediska složení můžeme syrovátku charakterizovat jako vodný roztok laktosy s vysokým obsahem minerálních solí a nízkým obsahem syrovátkových bílkovin, které zůstali v syrovátce po vysrážení kaseinu [5].

Hlavní složkou sušiny syrovátky je laktosa, která u kravského mléka dosahuje hodnoty kolem 4-5%. Značnou část sušiny tvoří proteiny a to nejen syrovátkové, ale také i část kaseinových. Neméně podstatnou složkou jsou minerální látky a vitaminy [3]. V malém množství je obsažena i kyselina mléčná, citrónová, nebílkovinné sloučeniny dusíku jako například močovina a další [6]. Složení obou druhů syrovátky se částečně liší (Tabulka 1) [3]. Kyselá syrovátka obsahuje menší množství laktosy, která je přeměněná na kyselinu

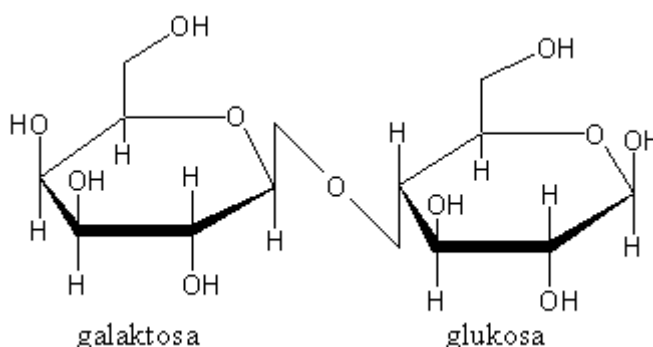
mléčnou a vyšší množství solí, které je způsobeno zvýšením podílu rozpuštěného vápníku vlivem kyselého prostředí. Složení syrovátky také záleží na složení mléka a na použitých podmínkách výrobního procesu [7]. Jako ostatní složky jsou počítány nezmíněné minerální látky, vitaminy, kyseliny a enzymy.

Tabulka 1: Složení sladké a kyselé syrovátky uvedené v hmotnostních % [3,8].

Složky [% w/w]	Sladká syrovátka	Kyselá syrovátka
Voda	93,00 - 94,00	94,00 - 95,00
Celková sušina	6,10 - 7,00	5,90 - 6,80
Laktosa	4,60 - 5,20	4,40 - 4,60
Proteiny	0,60 - 1,00	0,50 - 0,80
Tuk	0,03 - 0,05	0,01 - 0,03
Vápník	0,04 - 0,06	0,12 - 0,16
Fosfor	0,10 - 0,30	0,20 - 0,45
Kyselina mléčná	0,08 - 0,20	0,63 - 0,75
Ostatní složky	0,10 - 0,20	0,10 - 0,20

Laktosa

Laktosa neboli také mléčný cukr je mírně sladký redukující disacharid vyskytující se v mléce savců. Z chemického hlediska se jedná o β -D-galaktopyranosyl- α -D-glukopyranosu.



Obrázek 1: Vzorec laktosy

Dodává mléku nasládlou chuť a ve vodě je dobře rozpustný, avšak podstatně méně než jeho monosacharidové jednotky (galaktosa a glukosa). Laktosa představuje hlavní energetickou složku mléka a mléčných výrobků, avšak pro některé konzumenty, kteří mají nedostatek střevního enzymu β -galaktosidasy, který jí štěpí na jednodušší monosacharidy, je prakticky nestravitelná [9]. Důležitou funkci má v podpoře intestinální absorpce vápníku, hořčíku a fosforu [10]. Laktosa vytváří vhodné prostředí pro rozvoj řady bakterií, čímž tvoří syrovátku velmi náchylnou k mikrobiální kontaminaci [7].

Syrovátkové bílkoviny

Syrovátkové bílkoviny jsou bílkoviny, které zůstanou v syrovátce po vysrážení kaseinu. Nazývají se také sérové bílkoviny, či bílkoviny mléčného séra. Mají vysokou biologickou hodnotu a jsou využívány nejen v potravinářství, ale také v kosmetice a farmaceutických přípravcích [5].

β -laktoglobulin

β -laktoglobulin je jeden z hlavních bílkovin kravského mléka a představuje asi 50 % všech syrovátkových bílkovin [10]. Je to globulární protein, rozpustný ve zředěném solném roztoku při pH 4,60. Jeho molekulová hmotnost je 18kDa a skládá se ze 162 aminokyselin, které jsou složené do složitějších struktur: α -šroubovice a β -skládaného listu [11,12]. V nativní formě je citlivý na faktory, díky nimž denaturuje: teplo a pH [11]. Slouží jako vynikající zdroj biologicky aktivních peptidů [7].

α -laktalbumin

Druhou převládající bílkovinou v syrovátce je α -laktalbumin. Vyskytuje se v mléce všech živočišných druhů a jedná se o globulární protein, který je tvořen v mléčné žláze a jeho molekulová hmotnost je 14 kDa [13,14]. Dohromady jej tvoří 123 aminokyselin. Váže vápník a má vysokou afinitu k jiným kovovým iontům. Navázané Ca^{2+} mají zásadní význam pro zachování struktury proteinu. α -laktalbumin se vyznačuje tím, že je ze syrovátkových bílkovin tepelně nejstálější, pokud však nemá ve svém okolí dostatečné množství Ca^{2+} , stává se velmi nestabilním [11]. Je plně syntetizován v mléčné žláze, kde působí jako koenzym pro biosyntézu laktosy [10].

Imunoglobuliny

Imunoglobuliny nesou biologickou funkci protilátek a jsou ve velkém množství přítomny v mlezivu všech kojících druhů, aby mláďatům zajistily pasivní imunitu. V mlezivu tvoří až 80 % z celkového množství bílkovin, ve zralém mléce jen 1 - 2 %. Jedná se o minoritní vysokomolekulární globulární glykoproteiny, které jsou rozděleny do různých tříd na základě jejich fyzikálně-chemické struktury a biologické aktivity. Základní struktura všech imunoglobulinů je složená ze dvou řetězců s menší molekulovou hmotností (kolem 23 kDa) a ze dvou řetězců s větší molekulovou hmotností (kolem 50 kDa), které jsou spojeny disulfidovými vazbami. Kompletní základní molekula má tvar písmene Y a má molekulovou hmotnost 160 kDa [10].

Další syrovátkové bílkoviny

Mezi vedlejší proteiny, jež jsou přítomny v syrovátce, patří proteoso-peptony, bovinní sérový albumin a laktoferin [10].

Bovinní sérový albumin představuje přibližně 5 % syrovátkových bílkovin. Není syntetizován v mléce, ale přechází do mléka z krve. Obsahuje 582 aminokyselinových zbytků a molekulovou hmotnost 66 kDa [15]. Molekula tohoto proteinu má specifická vazebná místa pro hydrofobní molekuly a jak v krvi, tak i v mléce funguje jako nosič volných mastných kyselin [16].

Laktoferin spolu s laktoperoxidasou jsou nejmenší syrovátkové bílkoviny. Laktoferin je glykoprotein charakterizovaný molekulovou hmotností 80 kDa a je složen z 692 aminokyselin. Má schopnost vázat a přenášet Fe^{3+} ionty. Je součástí vrozeného imunitního systému a podílí se na specifických imunitních reakcích [15].

Tuk

Tuk je v syrovátce přítomný pouze v malém množství 0,10 - 0,80 %. V případě dokonalého odstředění syrovátkové smetany je obsah tuku ještě menší [6,7].

Minerální látky a soli

V mléce je obsaženo okolo 20 minerálních látek, které jsou z hlediska lidské výživy považovány za důležité (Na, K, Cl, Ca, Mg, P, Fe, Cu, Zn, Mn, Se, I, Cr, Co, Mb, F, As, Ni, Si, B). Převážná část těchto látek při výrobě sýrů přechází do syrovátky a ovlivňuje její vlastnosti i nutriční hodnotu [10]. Minerální látky v syrovátce se vyskytují ve formě

organických a anorganických sloučenin. Jedná se převážně o soli kyseliny fosforečné, mléčné, uhličitě, citrónové, popřípadě i chlorovodíkové a sírové. Největší podíl tvoří soli draselné a vápenaté [7]. Buď se nachází ve formě roztoků, v koloidní formě nebo vázány na jednotlivé složky mléka. Do mléka jsou přenášeny z krve [12]. Jak v mléce, tak i v syrovátce jsou nejvíce zastoupeny draslík, vápník, chlor, fosfor a sodík [17].

Obsah minerálních látek v mléce není konstantní, ale je ovlivněný řadou faktorů, jako je stupeň laktace, zdravotní stav zvířete a environmentální a genetické faktory [17].

Vitaminy

V mléce jsou obsaženy prakticky veškeré vitaminy, jelikož je to jediný zdroj pro sající mláďata. Významný vliv na množství vitaminů má roční doba, stádium laktace a výživa dojnic [12]. Z mléka do syrovátky přechází převážný podíl vitaminů rozpustných ve vodě a jen malé množství vitaminů rozpustných v tucích. To je způsobeno tím, že v syrovátce je přítomno jen velice malé nebo žádné množství tuku. Syrovátka je tedy významným zdrojem vitaminů skupiny B ale také malého množství vitamínu C [7]. Riboflavin udává syrovátce její typickou žlutozelenou barvu [12].

2 MEMBRÁNOVÉ SEPARAČNÍ PROCESY V MLÉKÁRENSTVÍ

Membránovým separačním procesem se rozumí metody, při nichž se využívají k rozdělení směsi dvou či více složek selektivní polopropustné membrány. Membrána je tenká vrstva, anebo fólie, která propouští z nástřiku jen určité látky neboli permeát a jiné zadržuje, ty se nazývají retentát [18]. Jak retentát, tak i permeát jsou produktem.

Existuje několik mechanismů separace pomocí membrán, které se mohou i kombinovat.

- Na základě různých velikostí částic.
- Na základě různé afinity směsi k materiálu, z něhož je vyrobená membrána a různé rychlostí difúze membránou.
- Na základě elektrochemických interakcí mezi složkami směsi a materiálem membrán [19].

Membránové procesy se dále dělí. Využívají se procesy tlakové, elektromembránové, separace plynů a par, pervaporace a další [19]. Následující text se zabývá pouze tlakovými membránovými procesy, které se využívají v mlékárenském průmyslu [20].

V mlékárenském průmyslu jsou membránové procesy využívány již od roku 1960. Při moderním zpracování mléka a mléčných výrobků hrají membrány výraznou roli při čištění mléka, zvýšení koncentrace některých složek, jakož i oddělení specifických složek z mléka nebo jeho vedlejších produktů. V roce 2013 potravinářský průmysl představoval 20 - 30 % z celkového obrátu membrán po celém světě a každý rok toto množství roste. Přibližně 2/3 plochy membrán instalovaných v mlékárenských provozech se využívají ke zpracování vedlejších produktů a zbylá 1/3 pro zpracování mléka [20].

Použití membránových filtrací má řadu výhod. Nemusí se používat zahřívání na vyšší teploty, tudíž se minimalizuje nepříznivý vliv teploty na složky mléka a zamezí se změnám sensorických vlastností. Membrány zachytí jak velkou část mikroorganismů, tak i chemické látky (herbicide, pesticidy, barviva) a sediment, který by mohl nepříznivě ovlivňovat produkt. Selektivita membrán je velmi vysoká a její nároky na provoz i čištění jsou velmi nízké. Navíc jsou tyto metody jednoduché na provedení. K získání požadovaného efektu je však často zapotřebí použít kombinaci membrán, spíše než jednoduché membrány [20].

2.1 Tlakové membránové procesy

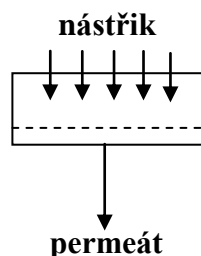
Mezi tlakové membránové procesy se řadí separační metody, jež využívají polopropustné membrány jako separačního elementu a hnací síly je docíleno tlakovým rozdílem. Tyto procesy separace mají oproti tepelným či chemickým metodám zpracování mnoho výhod. Neovlivňují chuťové vlastnosti produktu, neničí důležité složky, jako jsou například vitaminy, nevznikají při nich další odpadní látky a nejsou energeticky náročné [19].

Mezi tlakové membránové procesy patří čtyři typy separačních technik a to mikrofiltrace (MF), ultrafiltrace (UF), nanofiltrace (NF) a reverzní osmóza (RO). Jednotlivé techniky se od sebe liší ve velikosti používaných tlakových rozdílů, ve vlastnostech membrán a v transportním mechanismu, který převažuje. Vhodný typ techniky se pak vybírá podle separovaných částic nebo molekul. Výběr je také závislý na chemických vlastnostech rozpouštědla [21].

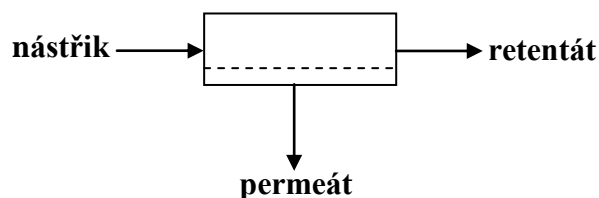
Tlakový rozdíl, který je využíván jako hnací síla nad a pod membránou způsobuje, že molekuly rozpouštědla, resp. nízkomolekulární látky, membránou projdou a větší molekuly a částice se na membráně zachytí. V posloupnosti od MF k UF, NF až k RO, velikost separovaných částic klesá, tudíž velikost pórů se zmenšuje, a je zapotřebí stále vyššího tlaku aby se překonal odpor membrán proti transportu. I přes tyto rozdíly neexistuje přímá hranice mezi jednotlivými typy tlakových membránových procesů [19].

Celkově se však nyní požadavky na tlak snižují a to díky aplikaci membrán z vhodnějších materiálů. Membrány musí mít velkou separační účinnost, odpovídající propustnost, stabilitu vůči samovolné hydrolyze, odolnost proti čisticím prostředkům, mechanickou pevnost a snadnou čistitelnost [7].

DEAD-END



CROSS-FLOW



Obrázek 2: Schématické znázornění uspořádání dead-end a cross-flow filtrace.

V praxi se objevují dva způsoby filtrací, které se dělí z hlediska procesního uspořádání:

- a) **Dead-end**= Nástříkový proud natéká kolmo na membránu a částice, které se zachytí, tvoří na povrchu membrány vrstvu neboli koláč. Čím je vrstva na membráně větší, tím se snižuje průtok permeátu.
- b) **Cross-flow**= Nástřík protéká podél povrchu membrány velkou rychlostí. Částice roztoku se na povrchu membrány zachycují jen v malém množství a filtrační koláč vzniká jen z části anebo vůbec [21].

Membránové procesy se čím dál tím více požívají v oblasti mlékárenských technologií. Snižují finanční náklady jak na technologii úpravy mléka a výrobu mléčných výrobků, tak i na transport a umožňují výrobu nových produktů [22]. Zastupují i více tradiční procesy používané při zpracování mléka. Například místo odstředování a baktofugace se může aplikovat mikrofiltrace, k zahuštění se nemusí využívat pouze odpařování, ale také reversní osmosa, která je méně náročná na energii [20].

2.1.1 Mikrofiltrace

Mikrofiltrace je metoda, která se nejvíce podobá klasické filtraci. Mikrofiltrační membrány mají velikost pórů v rozmezí 0,05 - 10,00 μm a vyrábí se z organických (polymery) i z anorganických látek (keramika, kov, sklo) [21]. Tato separační technika se využívá pro dělení suspenzí a disperzí. Problém u této metody je v zanášení membrán, které se alespoň částečně řeší vhodným výběrem materiálu membrány, u kterého musí být zvolena vhodná velikost pórů a bere se ohled i na absorpci materiálu [19].

Použití v mlékárenském průmyslu nachází v redukci bakteriálních spor a mikroorganismů, při frakcionaci mléčných bílkovin a odstraňování mléčného tuku z mléka.

Redukce množství bakterií

Mikrofiltrace představuje alternativu k tepelnému ošetření mléka. Tepelným ošetřením mléka při teplotě 85 - 129°C v kombinaci s nízkým časem (teplota 120°C po dobu maximálně 2 s) se získá ESL (Extended Shelf Life) mléko, které má snížený počet bakterií a spor a jeho trvanlivost je prodloužena až na 21 dnů při teplotě 8°C. Stejného účinku lze dosáhnout mikrofiltrací přes membránu s velikostí pórů 1,40 μm . Na rozdíl od tradičního tepelného ošetření mléka, při kterém se mikroorganismy usmrcují a chemické složení mléka je pozměněno, mikrofiltrace odstraňuje bakterie, spory, odumřelé buňky a nečistoty

z mléka fyzicky, záchytem na membráně bez nežádoucích změn chemického složení jako je denaturace sérových bílkovin či změna forem vápníku. Pro lepší účinnost se používá kombinace s mírným zahřevem [20,26].

Kromě mléka se mikrofiltrace za účelem snížení počtu mikroorganismů aplikuje i u syrovátky a u roztoku NaCl, který se používá k solení sýrů [20,26].

Frakcionace mléčných proteinů

Mléčné bílkoviny jsou využívány jako vysoce hodnotné přísady do potravin a léčiv. Mikrofiltrací se dá získat mléko bohaté na kasein (retentát) a syrovátkové bílkoviny, bez obsahu kaseinových micel a tuku (permeát). K frakcionaci mléčných proteinů se používá velikost membrán 0,20 μm a není zapotřebí použití vysokých teplot či chemických látek. Mléko se zvýšeným obsahem kaseinových bílkovin je vhodné k výrobě sýrů [20,26].

Odstranění mléčného tuku

Tradičně se mléčný tuk v podobě smetany, odděluje z mléka energeticky náročnou separací v odstředivce, ve které se využívá odstředivé síly. Mikrofiltrací lze smetanu odseparovat s použitím menší energie a bez poškození membrán tukových kuliček. K této separaci se používá membrán s velikostí 2,00 μm [20,26].

2.1.2 Ultrafiltrace

Ultrafiltrace slouží pro záchyt makromolekulárních a koloidních látek z roztoků. Je to určitý přechod mezi mikrofiltrací a nanofiltrací. Velikost pórů membrán používaných při této separační metodě je od 10,00 nm do 0,05 μm . Jedná se o čistě porézní membrány, jejichž reakce je daná poměrem velikosti a tvaru zachycovaných molekul a velikosti pórů. Transport molekul je přímo úměrný velikosti působícího tlaku [19].

Jelikož má ultrafiltrační membrána menší póry a menší pórovitost než mikrofiltrační, dochází na ní k vyššímu hydrodynamickému odporu. Aktivní vrstva se obvykle pohybuje v tloušťce menší než 1,00 μm . Komerčně vyráběné ultrafiltrační membrány se vyrábí z polymerních materiálů: polysulfony, polyvinylfluoridy, polyakrylonitril, acetáty celulosy, polyimidy a polyamidy. Z anorganických materiálů se využívá: Al_2O_3 a ZrO_2 [21].

Využívá se pro velké množství aplikací, kdy je zapotřebí oddělit z roztoků koloidní a makromolekulární látky, popř. i mikroorganismy a jiné případné nečistoty [21].

Separace syrovátkových proteinů a laktosy

Izolace proteinů ze syrovátky se provádí nejčastěji pomocí membránové ultrafiltrace. Jak již bylo uvedeno výše, syrovátkové bílkoviny jsou velmi kvalitní, a proto se jedná o velice časté zpracování syrovátky [24]. Syrovátkové proteinové koncentráty se komerčně dělí podle obsahu bílkovin a funkčních vlastností [25]:

- Syrovátkový proteinový koncentrát (WPC - Whey Protein Concentrate) obsahuje 34 - 80 % bílkovin.
- Syrovátkový proteinový izolát (WPI - Whey Protein Isolate) je tvořen až z 99 % bílkovinami a obsah laktosy je pouze 0,5 % [20,22].

Proteinový retentát se nazývá syrovátkový proteinový koncentrát a filtrát je známý jako syrovátkový permeát. V závislosti na složení a využití koncentrátu může být požadováno jeho odsolení, které se provádí nanofiltrací, ionoměničově nebo elektrodialýzou [24].

Ze syrovátkového permeátu se dále získává laktosa. Princip spočívá v zahuštění syrovátky nebo permeátu, pomocí reversní osmosy, odpařováním či kombinací těchto dvou způsobů, na 50% hmotnosti laktosy a následně řízené krystalizaci chlazením po dostatečně dlouhou dobu aby došlo k nukleaci a odpovídajícímu růstu krystalů laktosy. Ty se poté izolují od matečního louhu a následně se suší při teplotě 120 - 180°C. Takto vyrobená laktosa je považována za potravinářskou surovinu měla by být alespoň 99%. Laktosa pro farmaceutické využití vyžaduje další kroky čištění, aby se odstranily stopy bílkovin, riboflavinu, fosfotičnanů a kyseliny mléčné [24].

Využití laktosy v potravinářství ale i farmacii je velké. Používá se jako doplněk v dětské výživě v cukrárenské výrobě, do pekárenských a masných výrobků. Ve farmaceutickém průmyslu se laktosa používá jako pomocná látka pro většinu tablet, protože je inertní, neškodná, nehydrokopická a je k dispozici ve vysoké čistotě a má dobré vazebné vlastnosti [24].

Odstraňování laktosy

Ultrafiltrace je jedním ze způsobů výroby mléka Lactose Free [26]. Na membráně se jako retentát zachycují jak kaseinové, tak syrovátkové bílkoviny a v permeátu je odseparovaná laktosa a část minerálních látek a vitamínů. Laktosa se poté nahrazuje jiným cukrem [27].

Používá se také pro zakoncentrování stejné jako nanofiltrace a reverzní osmosa, tento proces bude zmíněn a vysvětlen až v podkapitole: Reverzní osmosa.

2.1.3 Nanofiltrace

Nanofiltrace primárně slouží k oddělování organické nízkomolekulární látky a vícevalentní soli od jednovalentních a od molekul rozpouštědla. Při tomto procesu je nutno překonat osmotický tlak a k tomu se aplikují tlaky v rozmezí 100 - 400 MPa [19].

Při nanofiltraci se využívá co nejmenší tloušťky aktivní vrstvy a to pod 1 μm a velikosti pórů menších než 2 nm. Nejvhodnější k separaci vodných systémů jsou hydrofilní polymery, které mají nízkou propustnost pro separovanou složku. Separační vlastnosti nanofiltračních membrán jsou výrazně ovlivněny nábojem membrány a také pH prostředí, které, v případě ionizujících organických látek, ovlivňuje dělicí schopnost membrány [21].

Nanofiltrační membrány jsou nepropustné pro některé soli a vysoce účinné ke zpomalení organických sloučenin s molekulovou hmotností v rozmezí od 0,30 do 1,00 kDa. Díky této vlastnosti se používají k změkčování vody při úpravě pitné vody. Membrány jsou rovněž vysoce propustné pro monovalentní soli, jako jsou NaCl a KCl, a pro nízkomolekulární sloučeniny, čehož se využívá při odsolování a koncentrování syrovátky jako alternativa k odpařování a elektrodialyze [21].

Demineralizace

Demineralizace neboli odstraňování minerálních látek ze syrovátky se používá například k výrobě syrovátky, jež se přidává do kojenecké nebo speciální výživy [26]. Nanofiltrací se odstraní maximálně 36 % minerálních látek a jsou odstraňovány převážně jednomocné ionty. Tato metoda se kombinuje s elektrodialýzou a klasickou iontovou výměnou [27].

K elektrodialyze se používá zařízení, jež se skládá z řady iontově selektivních membrán uspořádaných v nosné konstrukci v párech se střídavou propustností. Tím vznikají dva prostory, v jednom dochází k zředování solí a v druhém k jejich koncentraci [7].

Výhodou použití nanofiltrace je současné zahušťování syrovátky a minimální ztráty na laktose a bílkovinách [27].

2.1.4 Reverzní osmosa

Membránová separace, jež je schopná oddělit molekuly s nízkou molekulární hmotností i jednovalentní ionty z vodných roztoků se nazývá reverzní osmóza. V poslední době se nároky na aplikovaný tlak snížily z 600 - 1000 MPa na 0,6 - 20 MPa [19,23].

Odlišností od obyčejné osmosy je v působení tlaků. Jak u osmosy, tak u reverzní osmosy přechází rozpouštědlo vhodnou polopropustnou membránou, která odděluje dva prostory. V jednom prostoru se nachází pouze rozpouštědlo a v druhém roztok nízkomolekulární látky. Rozpuštěná látka má vlivem rozdílu chemických potenciálů tendenci proniknout do rozpouštědla, čemuž je membránou, která je propustná pouze pro rozpouštědlo, zamezeno. U osmosy tím v prostoru s roztokem přibývá rozpouštědla až do vyrovnání osmotického tlaku rozpouštědla a hydrostatickým tlakem sloupce roztoku. Při reverzní osmose je však osmotický tlak překonán vnějším tlakem a tím přechází rozpouštědlo z roztoku do prostoru s čistým rozpouštědlem. Nízkomolekulární látka je membránou zachycována [21].

Jako materiál pro reverzně- osmotické membrány se nejvíc využívá esterů celulosy, především diacetátu a triacetátu celulosy. Jsou vhodné díky jejich velké propustnosti pro vodu a malé permeability pro sůl. Nevýhodou však je jejich malá chemická, bakteriální a tepelná odolnost. Používají se také aromatické polyamidy, které taky dobře zachycují sůl, ale jejich propustnost je nižší [21].

Koncentrování

Způsoby pro zakoncentrování tedy zahuštění syrovátky byly vyvinuty s cílem snížit náklady na její dopravu a skladování a získat mikrobiologicky stabilnější produkt. Nejčastějším způsobem pro zahuštění je reverzní osmosa, je dobře přizpůsobená pro malé výrobní jednotky. Jedná se o jednoduchý proces, při kterém membrána, používaná u reversní osmosy, propouští pouze vodu a tím se nepropuštěné látky zakoncentrovávají. Může se používat zahušťování i pomocí NF a UF [24].

Syrovátka se zahušťuje na 18 až 38 % sušiny pro účel transportu, na 40 až 60 % k přidávání do krmiv pro zvířata a syrovátka se sušinou 70 až 75 % se využívá jako liz pro zvířata. Koncentrování se provádí jako předstupeň před sušením, protože syrovátka obsahuje velké množství vody, které by se pouhým sušením odstraňovalo špatně, a tento proces by byl velmi finančně náročný [24].

Čištění vody

Reversní osmosa se dá také využít pro čištění vody, což je velice důležitá část mlékárenského průmyslu [26]. Mlékárenský průmysl má vysokou spotřebu vody a vytváří velké množství vody odpadní: 0,20 až 10 l na 1 l zpracovaného mléka. Voda je využívána k procesům zahřívání, chlazení a udržování potřebné úrovně čistoty. Čištění vody, která byla použita k technologickým procesům i té, která byla získána z produktů sušením, zahušťováním a dalšími procesy, umožňuje její opětovné použití. To snižuje náklady na vodu a chrání tím životní prostředí. Z mlékáren nesmí být vypouštěna nevyčištěná odpadní voda, jelikož vypuštění některých látek (př.: syrovátka → vysoká hodnoty biochemické spotřeby kyslíku BSK → úhyn ryb) a chemikálií by mohlo způsobit úhyn organismů ve vodním řečišti a znehodnotit půdu v okolí řek [36].

3 MOŽNOSTI VYUŽITÍ SYROVÁTKY V BIOTECHNOLOGIÍCH

Existuje několik způsobů jak dále využít syrovátku nebo jí zlikvidovat jako odpadní surovinu. Mohou být rozděleny do tří hlavních kategorií, které se však mohou navzájem prolínat.

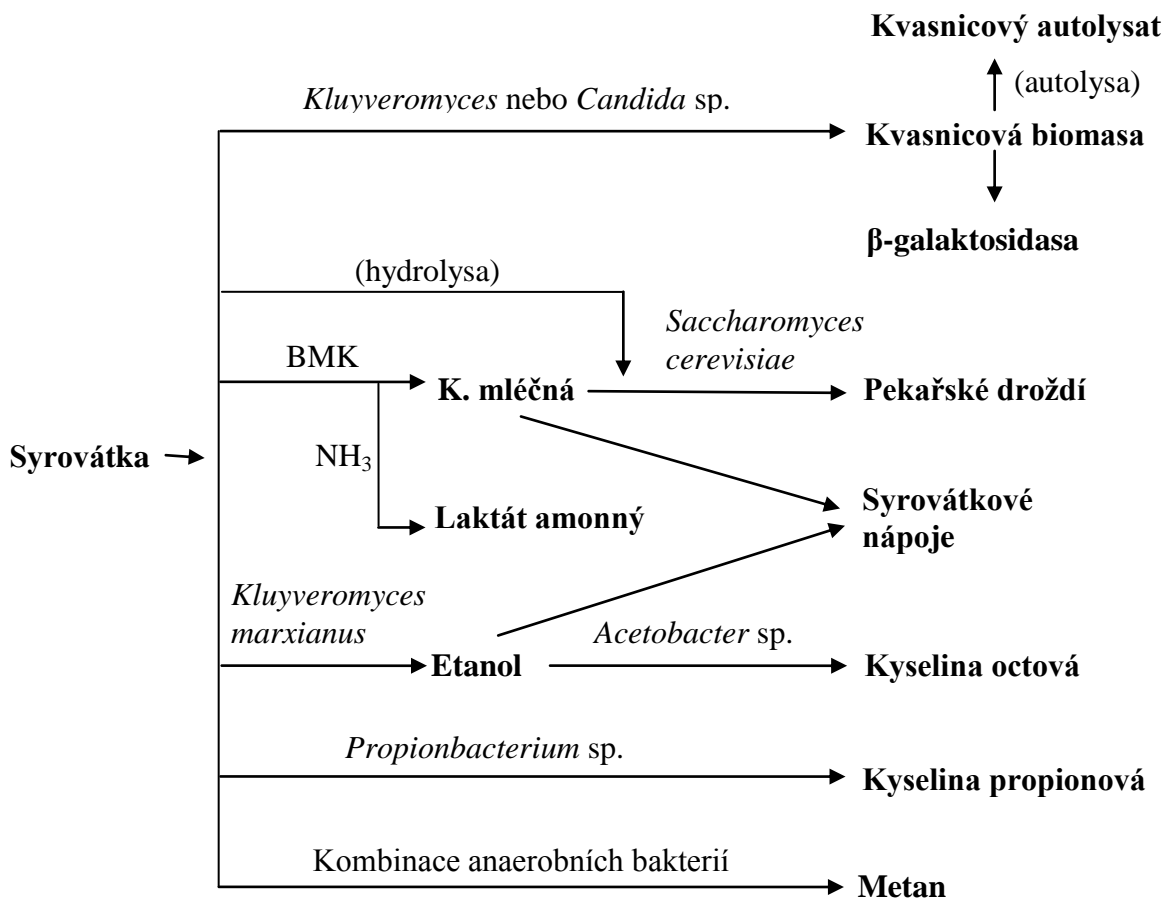
- 1) Přímé využití nebo likvidace - Syrovátka je používána po žádné nebo minimální úpravě. Zde můžeme zahrnout využití syrovátky jako krmiva pro zvířata, přímé použití celé nebo proteinů zbavené syrovátky jako složky potravin a nápojů nebo její čištění na vodu.
- 2) Stabilizace - Syrovátka je zpracována fyzikálními a/nebo chemickými postupy, které jí učiní podstatně stabilnější k mikrobiální degradaci. Zde se řadí odstranění bílkovin ultrafiltrací nebo tepelnou denaturací, zkoncentrování reverzní osmózou a/nebo odpařením, krystalizace laktosy a sušení. Takto upravená syrovátka nebo její části jsou dále využívány v potravinářském, farmaceutickém či chemické průmyslu. Některé mohou být také dále využity k přeměně.
- 3) Přeměna - Laktosa obsažená v syrovátce je zpracována pomocí biotechnologií. To znamená, že je činností mikroorganismů nebo chemických látek přeměňována na jiné látky. K tomuto využití se může používat celá, deproteinisovaná, zahuštěná, popřípadě i sušená syrovátka [3].

Přibližně 50 % z celkové produkce syrovátky se zpracuje do různých potravinářských výrobků, z toho asi 45 % se využívá přímo v kapalné formě, 30 % v sušené formě, 15 % tvoří laktosa a vedlejší produkty vzniklé při jejím odstranění, zbytek produkce tvoří syrovátkový bílkovinný koncentrát [2].

Vzhledem k tomu, že hlavní složkou syrovátky je laktosa, ve které jsou přítomny i rozpustné vitamíny, minerály a proteiny, je syrovátka výborným médiem pro růst mikroorganismů. Proto je hojně využívána v biotechnologických procesech. Tyto procesy se řadí do třetí kategorie možností dalšího využití syrovátky, tedy do přeměny. Laktosa a další látky jsou v průběhu zmíněných procesů štěpeny a přeměňovány na další produkty. Jedná se převážně o průmyslovou výrobu některých kyselin, alkoholů nebo biomasy [2,38,39].

Biotechnologie se dají charakterizovat jako všechny technologie, které využívají živé organismy nebo jejich součásti k výrobě nebo modifikaci produktů, k cílené modifikaci rostlin, živočichů a mikroorganismů pro specifická použití [28].

Jak lze vidět na obrázku (Obrázek 3), syrovátka se může využít jako výchozí substrát pro velké množství produktů. Použitím kvasinek rodu *Kluyveromyces* nebo *Candida* vzniká kvasnicová biomasa, ze které je možno hydrolyzou vzniklých kvasinek získat kvasnicový autolysát a β -galaktosidasu. Bakterie mléčného kvašení přemění laktosu v syrovátce na kyselinu mléčnou, který má širokou škálu použití a její fermentací pomocí *Saccharomyces cerevisiae* vzniká pekařské droždí. Kyselina mléčná slouží jako substrát i pro bakterie druhu *Propionibacterium*, které produkují kyselinu propionovou. Kvasinky druhu *Kluyveromyces marxianus* fermentují laktosu na etanol, z něhož pak působením bakterií rodu *Acetobacter* vzniká kyselina octová. Metan se vyrábí fermentací syrovátky kombinací anaerobních mikroorganismů [3].



Obrázek 3: Schéma možností využití syrovátky v biotechnologiích.

Syrovátka, převážně laktosa v ní, se přeměňuje anaerobní oxidací uskutečňovanou chemoorganotrofními mikroorganismy, které takto získávají energii. Tento způsob rozkladu se nazývá fermentace neboli kvašení. Podle produktů, které tímto štěpením organického substrátu vznikají, rozlišujeme několik druhů kvašení: etanolové, mléčné, octové a další [29].

Výhody fermentačních procesů:

- Probíhají za mírných podmínek (teplota, pH).
- Spotřebovávají málo energie.
- Je potřeba relativně nízkých investičních a provozních nákladů [30].

Fermentační pochody jsou už dlouhou dobu používány pro výrobu kvašených nápojů a potravin, nyní tvoří řadu velmi důležitých odvětví potravinářského průmyslu. Například pro výrobu piva, vína, destilátů, jogurtů, některých pekárenských výrobků, mléčně kvašené zeleniny, ale také pro výboru octa a pekárenského droždí. Použití však nalezneme i v dalších odvětvích, jako například při výrobě chemických látek.

V současné době existují dvě možnosti fermentace syrovátky a to:

- 1) Přeměna laktosu obsažené v syrovátce na jednodušší cukry, které poté mohou být vybranými mikroorganismy vhodně metabolisovány.
- 2) K fermentaci použít mikroorganismy, které jsou schopny metabolisovat přímo laktosu ze syrovátky, bez předcházející přeměny na jednodušší cukry [24].

3.1 Produkce kvasnicové biomasy

K výrobě kvasnicové biomasy se používá zpravidla syrovátka zbavená proteinů, jelikož použité mikroorganismy nejsou schopny metabolisovat. Využívá se tedy syrovátkový permeát v němž jsou pěstovány kvasinky, převážně: *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Torulopsis bovina* a *Candida sp.* [3].

Kvasinky se většinou pěstují kontinuálním procesem, při kterém se udržuje pH 3,50 a teplota 38°C. Vyšší teplota a nízké pH je zvoleno z důvodu nižšího rizika kontaminace. Výtěžek sušené biomasy je 50 % hmotnosti obsahu syrovátky obsažené v původním substrátu. Biomasa se odděluje odstředěním, poté se provede její hydrolysa zahřátím na 85°C a nakonec se suší. Získaná biomasa obsahuje 48 až 52 % bílkovin [3].

Kvasnicová biomasa neboli také krmné droždí se používá jako potravinový doplněk do krmiv v množství 5 - 10 %. V tomto případě by však obsah bílkovin měl být nižší než 45%. Nutriční vlastnosti kvasnic jsou spojeny s obsahem aminokyselin, sterolů, mastných kyselin a vitamínů. Funkční vlastnosti jako je uchovávání velké vazebné energie, dobrá vaznost vody a zahušťující vlastnosti zajišťují možnost použití v potravinářském i farmaceutickém průmyslu [3,30].

3.1.1 Kvasnicový autolysát

Autolýza znamená poškození a rozložení buněk jejich vlastními enzymy z lysozymu. Autolýza kvasinek umožňuje extrakci enzymů (viz. Produkce β -galaktosidasy) a jsou při ní uvolňovány do okolí proteiny, aminokyseliny a další části buňky [24].

3.1.2 Produkce β -galaktosidasy

Enzym β -galaktosidasa se získává enzymatickou hydrolysou kvasinek (*Kluyveromyces fragilis* a *Kluyveromyces lactis*) nebo plísní (*Aspergillus niger*). Což znamená, že se může vyrábět z kvasnicové biomasy daného druhu kvasinek. Vyrobený enzym se poté využívá k hydrolyse laktosy [24].

3.2 Mléčné kvašení syrovátky

Z celkového množství kyseliny mléčné, který je každý rok na světě vyrobená se přibližně 90 % vyrábí fermentací bakteriemi mléčného kvašení a zbytek se vyrábí synteticky.

Kyselina mléčná a její deriváty jsou široce používány v potravinářském, farmaceutickém textilním, kožedělném průmyslu a dalších chemických aplikacích převážně jako okyselující a konzervační látky. Potravinářský průmysl představuje přibližně 85 % poptávky po kyselině mléčné, zbylých 15 % je využíváno v nepotravinářském průmyslu [31]. Kyselina mléčná se rovněž může použít pro výrobu kyseliny polymléčné, což je biodegradabilní polyester [2].

3.2.1 Bakterie mléčného kvašení

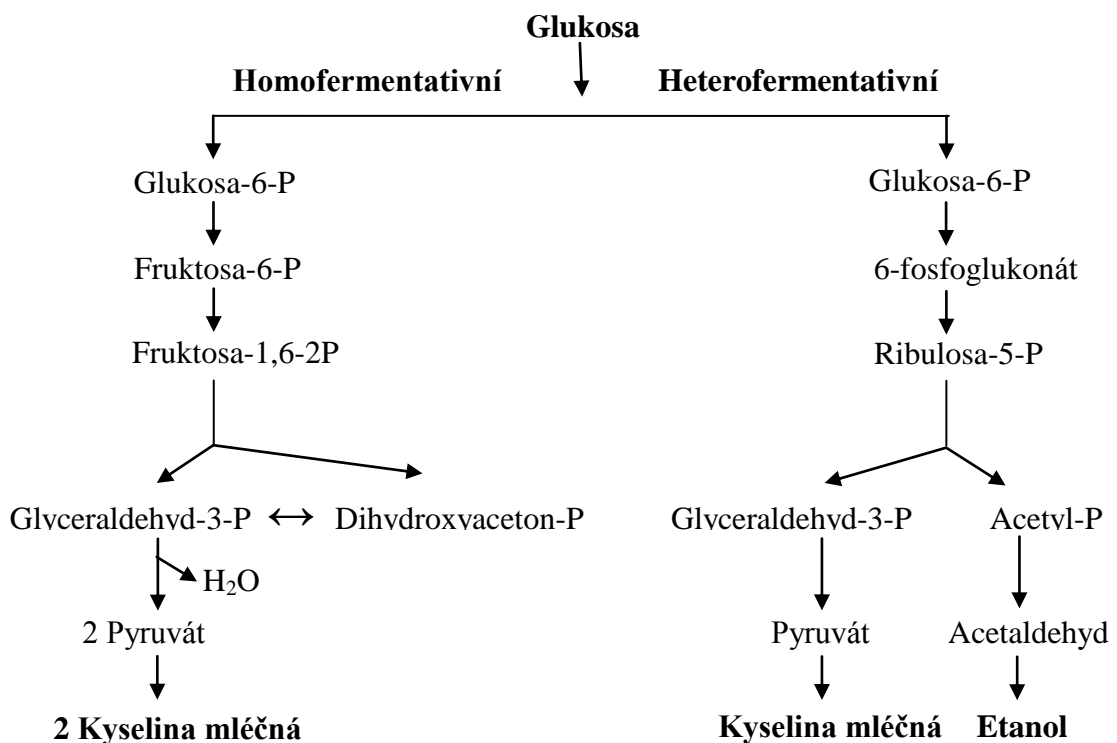
Většina bakterií mléčného kvašení jsou fakultativně anaerobní, Gram-pozitivní, kataláza-negativní, nepohyblivé a netvoří spory. Jsou schopny metabolizovat laktosu přičemž jejich klíčovou vlastností je produkce kyseliny mléčné jako hlavního nebo jediného produktu.

Jsou vysoce tolerantní ke kyselému prostředí a při fermentaci vytvářejí pro svůj druh typické produkty. Hlavními rody těchto bakterií jsou *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* a *Streptococcus* [2].

3.2.2 Mléčné kvašení

Bakterie mléčného kvašení dělíme podle jejich metabolismu na:

- Obligátně homofermentativní, které fermentují hexosy primárně na kyselinu mléčnou (*Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* a některé druhy *Lactobacillus*).
- Obligátně heterofermentativní, které fermentují hexosy na směs kyseliny mléčné, octové a mravenčí, etanolu a oxidu uhličitého, a pentosy fermentují na kyselinu mléčnou a octovou (některé druhy *Lactobacillus* a *Leuconostoc*).
- Fakultativně heterofermentativní, které při optimálních podmínkách fermentují hexosy homofermentativně na kyselinu mléčnou, a pentosy na kyselinu mléčnou a octovou [2].



Obrázek 4: Obecné schéma homofermentativní a heterofermentativní fermentace glukosy.

Jedná se o anaerobní kvasný pochod, při němž bakterie z jednoduchých sacharidů (v případě syrovátky z laktosy) vyrábějí kyselinu mléčnou a další využitelné produkty jako je etanol a oxid uhličitý [2].

Do syrovátky se přidávají buď přímo buňky příslušné kultury, nebo imobilizované buňky.

3.2.3 Produkce kyseliny mléčné za pomoci buněčných systémů

Pro výrobu kyseliny mléčné ze syrovátky je nejvhodnější naočkování bakterií *Lactobacillus helveticus*, která vytváří téměř dvojnásobné množství kyseliny mléčné než ostatní bakterie mléčného kvašení. Jedná se o homofermentativní bakterii, která produkuje racemickou (DL-) směs kyseliny mléčné [2]. Dalším důležitým důvodem pro používání této bakterie je její velká tolerance k nízkému pH a vysoké koncentraci kyseliny mléčné [32]. Optimální podmínky růstů jsou při teplotě 42°C a pH 5,80. Produktivita tohoto systému se pohybuje okolo 3,97 g.h⁻¹ na l nezředěné syrovátky. Je však samozřejmě možné použít k zaočkování jakékoliv jiné bakterie mléčného kvašení i jejich kombinace, aby se dosáhlo požadovaného složení produktu [2].

3.2.4 Produkce kyseliny mléčné za použití imobilizovaných buněk

Imobilizace v biotechnologii znamená použití buněk, organel, enzymů popřípadě jiných proteinů, které jsou fyzikálně nebo chemicky zafixované na pevném povrchu nebo zadrženy membránou za účelem zvýšení jejich stability a umožnění jejich opakovaného a/nebo kontinuálního používání [2].

Využití imobilizovaných buněk, má několik výhod: umožňuje vyšší hustotu buněk v bioreaktoru, zlepšuje stabilitu produktu, umožňuje opětovné použití a nepřetržitý provoz a vylučuje potřebu oddělit buňky ze substrátu produktů po zpracování [2].

Pro imobilizaci buněk bakterií mléčného kvašení se většinou používá kovalentní vazba a jako nosič může sloužit dřevní štěpka, cihelné částice, porézní sklo nebo vaječné skořápky. Imobilizují se nejčastěji bakterie rodu *Lactobacillus* a *Lactococcus* [2].

3.2.5 Produkce syrovátkových nápojů

Syrovátkové nápoje se získávají fermentací různých druhů bakterií mléčného kvašení. Používají se heterofermentativní druhy, jelikož je žádoucí tvorba etanolu a oxidu uhličitého

aby se dosáhlo typických sensorických vlastností. Další možností je přidání kvasinek produkujících etanol k bakteriím mléčného kvašení (viz. níže) [3].

3.3 Produkce pekařského droždí

Jedním z principů výroby pekařského droždí je pomocí kvasinek druhu *Saccharomyces cerevisiae*. Cílem je získat produkt, který by vyhovoval požadavkům pekárenské výroby, což jsou: vysoká mohutnost kynutí v těstě, mikrobiální čistota a trvanlivost.

Bakterie mléčného kvašení nejdříve metabolisují laktosu na kyselinu mléčnou, která podporuje množení kvasinek druhu *Saccharomyces cerevisiae*. Je vhodné nepoužívat homofermentativní bakterie mléčného kvašení, jež produkují velké množství kyseliny mléčné, která by mohla způsobit inhibici kvasinek. Proto se pro kvašení syrovátky používá *Streptococcus thermophilus*, který kromě kyseliny mléčné štěpí laktosu na glukosu a galaktosu. Pro zvýšení množství jednoduchých cukrů v substrátu, nebo při použití jiných bakterií mléčného kvašení se do substrátu přidá hydrolysovaná syrovátka.

Pekařské droždí se získává za aerobních podmínek, růst kvasinek je optimální při pH 5 - 6 a při 25 - 35°C, přičemž výtěžnost konečného produktu se pohybuje okolo 31 % biomasy na utištěvaný cukr. Množství vytvořené biomasy je závislé na mnoha faktorech. Je důležité dodržovat optimální kultivační podmínky [6,24].

3.4 Etanolové kvašení syrovátky

Průmyslová výroba etanolu se uskutečňuje v lihovarech. V jiných státech (USA, Nový Zéland) existuje již několik lihovarů, které vyrábí etanol ze syrovátky a kde se zpracovává až 50% celkového objemu syrovátky. Nejvyužívanějším mikroorganismem pro přeměnu laktosy na etanol jsou kvasinky *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus* a *Candida pseudotropicalis*. Jsou schopné utištěvat až 95 % laktosy z nezahuštěné syrovátky s účinností 80 - 85 % předpokládané účinnosti 0,538 kg etanolu na kg spotřebované laktosy [24, 40].



Obrázek 5: Sumární rovnice vzniku etanolu z hexosy po EMP dráze

Z ekonomického hlediska je produkce etanolu z nezahuštěné syrovátky neproveditelné, jelikož lze dosáhnout pouze 2 % obsahu etanolu a následný proces destilace by byl velice finančně náročný. Proto se používá zahuštěná deproteinisovaná syrovátky, aby se dosáhlo většího zakoncentrování laktosy a tím větší výtěžnosti etanolu. Musí se však brát v potaz i to, že růst mikroorganismů je ovlivněn nejen přítomností substrátu ale také množstvím metabolitu v okolí a to hlavně vytvářeného etanolu, glycerolů, esterů, vyšších alkoholů, organických kyselin a dalších. Optimální koncentrace laktosy v substrátu se udává 150 g laktosy na l syrovátky. Toto množství cukru může vyprodukovat 8 % (v/v) etanolu [24].

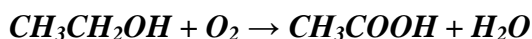
K alkoholovému kvašení se používají také jiné kvasinky rodu *Saccharomyces* nebo *Torula*

Jak již bylo zmíněno, etanol tvoří i bakterie mléčného kvašení. Jedná se však o jiný metabolický proces než u kvasinek a množství vzniklého etanolu je menší, tudíž nejsou vhodné k průmyslové výrobě etanolu [6].

Etanolové kvašení se využívá při výrobě alkoholických nápojů, vzniklý etanol jako biopalivo do spalovacích motorů. Má vlastnosti rozpouštědla, používá se k extrakci nebo k čištění. V kosmetickém průmyslu je jednou ze složek deodorantů. Může být také dále zpracováván na jiné produkty, jako je například kyselina octová [33, 40].

3.5 Octové kvašení

Kyselina octová vzniká aerobním kvašením alkoholu (etanolu vzniklého při alkoholovém kvašení) pomocí bakterií rodu *Acetobacter*. Jedná se o princip výroby octa [3].



Obrázek 6: Sumární rovnice vzniku kyseliny octové z etanolu

Kyselina octová je také důležitým chemickým produktem s širokým spektrem použití. Používá se k produkci vinylacetátu, který slouží jako monomer pro výrobu polyvinylacetátu. Dále slouží jako rozpouštědlo při přípravě čistých chemických sloučenin [37].

3.6 Propionové kvašení

Propionové kvašení probíhá pomocí propionových bakterií *Propionibacterium* a *Clostridium propionicum*. Většinou navazuje až na mléčné kvašení a jako substrát

využívá kyselinu mléčnou, kterou až poté zpracovává na kyselinu propionovou, octovou a oxid uhličitý.

Hlavním produktem propionovým kvašením syrovátky je karboxylová propionová kyselina, která se používá až ze 70 % jako konzervační látka do potravin a krmiv, ale využití má také pro další chemickou úpravu při výrobě celulosových plastů, parfémů, herbicidů a léčiv [34].

3.7 Produkce metanu

Praktická aplikace anaerobního rozkladu na metan se provádí ve fermentačních vzduchotěsných nádržích, v nichž mikroorganismy rozkládají syrovátku, a vzniklý metan je zadržován v reaktoru [3].

Tento proces využívá činností několika skupin anaerobních popřípadě i fakultativně anaerobních bakterií. Hydrolytické bakterie syrovátku nejprve rozloží na krátké řetězce těkavých mastných kyselin, oxid uhličitý a vodík. Mastné kyseliny, jež jsou vyšší než kyselina octová, jsou pak degradovány acetogenickými bakteriemi na kyselinu octovou, oxid uhličitý a vodík, tedy látky sloužící jako hlavní substrát pro metanogenní bakterie [3].

Mnoho bakterií, které se podílí na tomto procesu, roste jen pomalu, čímž se prodlužuje doba rozkladu. Je vhodné používat zahuštěnou syrovátku, aby se snížily nároky na velikost vyhnívacích nádrží. Většina fermentorů se provozuje při teplotě 35°C a jsou vytápěny teplou vodou ohřivanou v jiných částech provozu. Někdy je běžný také termofilní režim, kde se fermentor zahřívá až na teplotu 55°C [3].

Obvyklý výtěžek plynů je 35 - 58 m³ z 1 m³ syrovátky zahuštěné na obsah sušiny 70 - 80 %. Přičemž množství metanu z celkového množství vyprodukovaného plynu je 60 - 62 % [3].

Metan se dá využít v energetickém průmyslu, jako pohonná látka a samozřejmě má využití i v chemickém průmyslu [3,35].

PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem předkládané bakalářské práce bylo sledování vybraných faktorů ovlivňujících hydrolytické procesy laktosy v modelových vzorcích syrovátky. Samotná práce je rozdělena do dvou souvisejících částí, část teoretickou a část praktickou.

Cílem teoretické části bylo:

- charakterizovat vlastnosti a složení syrovátky,
- popsat význam a principy tlakových membránových separací a možnosti jejich aplikace v mlékárenském průmyslu,
- vypsát biotechnologické procesy, v kterých může být syrovátka použita jako substrát, a produkty, které se mohou těmito procesy vyrábět.

Cílem praktické části bylo:

- samotné sledování vybraných hydrolytických procesů laktosy ve vzorcích syrovátky,
- zjištění množství glukosy a galaktosy, které vznikly při štěpení laktosy,
- vyhodnocení faktorů, jež mohly ovlivňovat průběh štěpení a formulovat závěry.

5 METODIKA PRÁCE

5.1 Použité pomůcky a chemikálie

Běžné laboratorní sklo

Filtrační papír KA 4; Papírna Pernštejn Keseg & Rathouzský

Stříkačkové filtry 0,22 μm ; Cronus

Ultra čistá voda pro HPLC - přečištěná systémem Aqua Max™ Ultra 370 Series; Young Lin

β -galaktosidasa; Sigma - Aldrich

Carrez I - 30% ZnSO_4 ; Penta

Carrez II - 15% $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$; Penta

Acetonitril pro HPLC $\geq 99,9\%$; Sigma - Aldrich

Standardy glukózy a galaktózy; Sigma - Aldrich

5.2 Popis experimentu

Pro modelovou výrobu vzorků se použila sušená syrovátka, která byla ve vodě rozmíchána na 15 % (w/w) sušiny. Obnovená syrovátka byla rozdělena na 5 částí, z nichž každá byla upravena na jinou hodnotu pH (6,50; 6,75; 7,00; 7,25; 7,50). Každá část s daným pH se rozdělila do 6 odměrných baněk a vždy do 2 se napipetoval stejný objem enzymu β -galaktosidasy (takový objem aby se dosáhlo koncentrace 3; 5; 7 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$). Takto připravené 2 sady vzorků po 15 odměrných baňkách se nechaly inkubovat v termostatu při požadované teplotě (30; 35; 40°C). Jedna sada se odebírala pro následující hodnocení po 6 a druhá po 24 hodinách inkubace při příslušné teplotě. Do vyjmutých vzorků byly přidány Carrezova činidla pro zastavení činnosti enzymu, a následně byli zfiltrováni. Část filtrátu byla odebrána do vialek.

Výše uvedený postup se prováděl 3 krát. Dohromady bylo zhotoveno 90 typů vzorků (5 úrovní pH \times 3 koncentrace enzymu \times 3 teploty inkubace \times 2 doby inkubace). Hodnocení vzorků (zjišťování koncentrace monosacharidů – glukosy a galaktosy) se provádělo pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Získané chromatogramy byly vyhodnoceny.

5.3 Použité metody

5.3.1 Příprava roztoků syrovátky o požadovaném pH

Sušená syrovátka byla rozpuštěná ve vodě o teplotě přibližně 30°C na koncentraci 15 % (w/w). Tato koncentrace byla zvolena, protože počítáme s pokračováním výzkumu na zahuštěné syrovátce, která bude odebírána od výrobce disponujícího reversní osmosou (zahušťování na 15 – 18 % w/w). Promíchaná disperze rozpuštěné syrovátky byla rozdělena na 5 částí a u každé bylo upraveno pH pomocí pH-metru Spear (Eutech Instruments) na požadovanou hodnotu: 6,50; 6,75; 7,00; 7,25; 7,50. Jelikož naměřené neupravené pH syrovátky bylo 6,24, byla pro dosažení požadovaných hodnot pH použita zásada a to 0,5 mol·l⁻¹ roztok NaOH.

Každá směs o daném pH se rozpipetovala po 25ml do šesti 50ml odměrných baněk.

5.3.2 Dávkování enzymu a inkubace vzorků

Do připravených odměrných baněk byl přidán enzym β -galaktosidasa. Byly pipetovány tři různé objemy enzymu, aby se dosáhlo požadovaných koncentrací enzymu a to: 3; 5; 7 g·l⁻¹. Stejně množství enzymu bylo přidáno vždy do dvou odměrných baněk se vzorkem o stejném pH. Tímto krokem byly připraveny 2 sady vzorků po 15 odměrných baňkách, v každé byl vzorek s jinou kombinací pH a koncentrací enzymu.

Takto připravených 30 odměrných baněk se zazátkovalo, lehce promísilo a vložilo do termostatu, který byl nastavený na příslušnou teplotu. Jedna sada vzorků se nechala inkubovat po dobu 6 hodin a druhá po dobu 24 hodin.

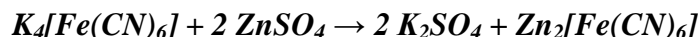
5.3.3 Zastavení působení enzymu a filtrace

Po vytáhnutí vzorků z termostatu bylo nutné zastavit působení enzymu, aby dále neštěpil laktosu a nezkresloval tak výsledky. K tomuto účelu bylo zvoleno čerění.

Vzorky byly vyčerény podle Carreze přidáním 5ml ZnSO₄ a 5 ml K₄[Fe(CN)₆]. Použitím Carrezových činidel se ukončila činnost enzymu a vysrážely se přítomné bílkoviny.

Carrezová činidla se používají k čiření (k odstranění bílkovin). K ukončení působení β -galaktosidasy byla zvolena, protože enzym má bílkovinnou strukturu. Činidla jsou dvě a používají se dohromady. Jako první se aplikuje Carrez I 30 % (w/w) ZnSO₄, který se

alespoň minutu promíchává se vzorkem, poté se přidá Carrez II 15 % (w/w) $K_4[Fe(CN)_6]$. Směs se promíchá a nechá se pár minut působit. Čiřicího účinku je dosaženo vytvořením sraženiny hexokyanoželeznatanu zinečnatého [41].



Obrázek 7: Rovnice vzniku sraženiny hexokyanoželeznatanu zinečnatého

Poté byly odměrné baňky doplněny destilovanou vodou po rysku, jejich obsah se promíchal a nechal se filtrovat přes filtrační papír.

Získaný filtrát byl pomocí stříkačky nadávkován vždy do dvou vialek. Na stříkačku byl při dávkování přidán stříkačkový filtr, aby se zajistila čistota konečného vzorku.

Tabulka 2: Výroba vzorků při jedné dané teplotě

15% ROZTOK SYROVÁTKY									
pH 6,50		pH 6,75		pH 7,00		pH 7,25		pH 7,50	
c 3 [g·l ⁻¹]	6 hod.	c 3 [g·l ⁻¹]	6 hod.	c 3 [g·l ⁻¹]	6 hod.	c 3 [g·l ⁻¹]	6 hod.	c 3 [g·l ⁻¹]	6 hod.
	24 hod.		24 hod.		24 hod.		24 hod.		24 hod.
c 5 [g·l ⁻¹]	6 hod.	c 5 [g·l ⁻¹]	6 hod.	c 5 [g·l ⁻¹]	6 hod.	c 5 [g·l ⁻¹]	6 hod.	c 5 [g·l ⁻¹]	6 hod.
	24 hod.		24 hod.		24 hod.		24 hod.		24 hod.
c 7 [g·l ⁻¹]	6 hod.	c 7 [g·l ⁻¹]	6 hod.	c 7 [g·l ⁻¹]	6 hod.	c 7 [g·l ⁻¹]	6 hod.	c 7 [g·l ⁻¹]	6 hod.
	24 hod.		24 hod.		24 hod.		24 hod.		24 hod.

5.3.4 Vyhodnocování vzorků

Vyhodnocení vzorků bylo prováděno pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Byl použit kapalinový chromatograf Shimadzu LC - 20AD Prominence:

- pumpa
- pětikanálový degaser DGU - 20A_{5R}
- autosampler SIL - 20AC_{HT}
- diferenciální refraktometrický detektor RID-20A (vše Shimadzu - Kyoto, Japonsko)

Kolona: Agilent Zorbax NH₂: 4,6 x 250 mm x 5 µm (Agilent Technologies - Santa Clara, USA)

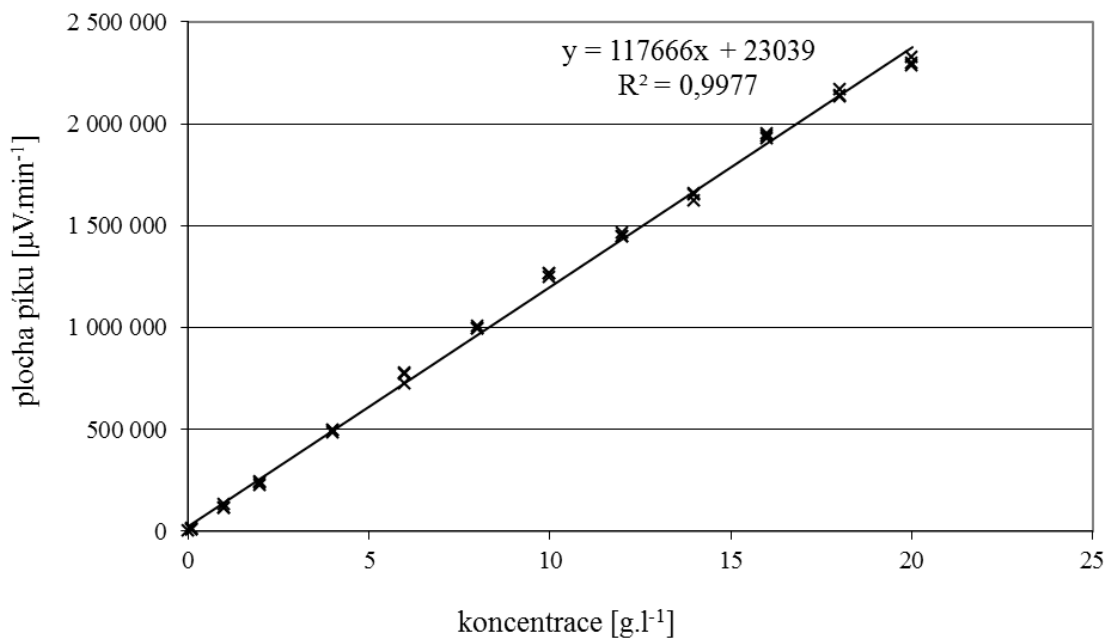
Předkolonový in-line filtr: 0,2 µm (Optimize Technologies - Oregon City, USA)

Podmínky separace:

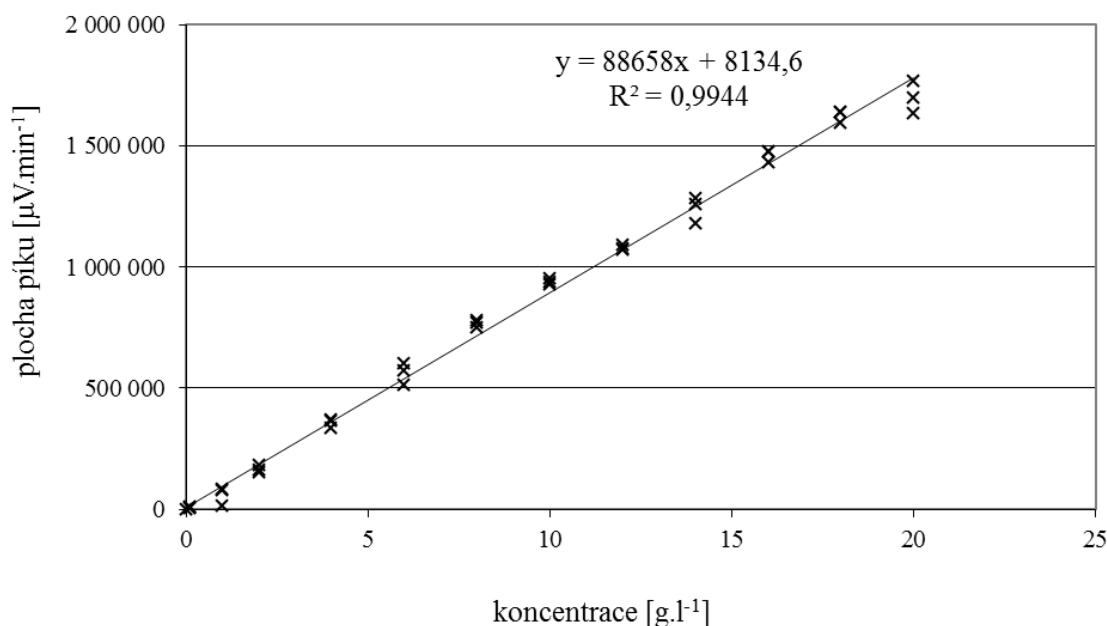
Jednalo se o izokratickou eluci. Jako mobilní fáze byla použita směs: acetonitril-voda (70:30) a průtok mobilní fáze byl nastaven na 1,40 ml.min⁻¹. Nástřik vzorku byl o objemu 20 µl a celková analýza trvala 12 minut. Každý ze vzorků se proměřoval 2x. Po celou dobu vyhodnocování vzorků se teplota kolony a detektoru udržovala na 25 °C.

6 VÝSLEDKY A DISKUSE

Výstupem z chromatografu byly chromatogramy se dvěma píky. První odpovídal glukose a druhý galaktose. Pomocí programu LabSolution (Shimadzu) byly odečteny plochy píku v jednotkách $\mu\text{V}\cdot\text{min}^{-1}$. Koncentrace monosacharidů v jednotkách $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ byly poté vypočteny z kalibračních přímek standardů (Obrázek 8, Obrázek 9), které byly vyhotoveny předem, za stejných podmínek separace jako vzorky. Výsledky koncentrací byly zprůměrovány a vyhodnocovány.



Obrázek 8: Kalibrační přímka- glukosa



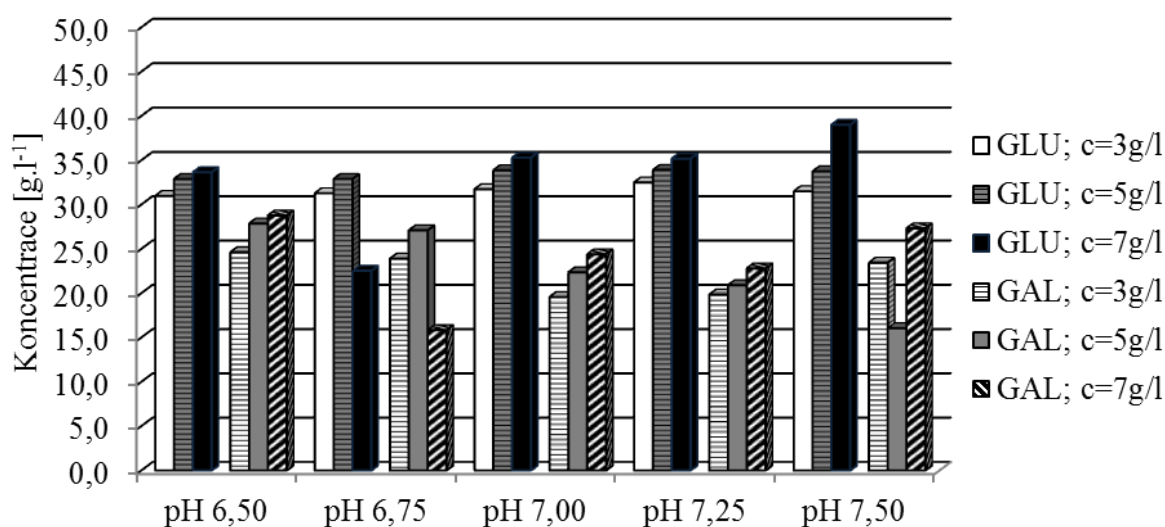
Obrázek 9: Kalibrační přímka- galaktosa

Výsledky koncentrací monosacharidů glukosy a galaktosy, které vznikly štěpením laktosy ze syrovátky byly porovnávány v závislosti na faktorech, které na vzorky při štěpení působily: pH prostředí a koncentrace přítomného enzymu, teplota při inkubaci a její doba.

6.1 Závislost koncentrace monosacharidů na pH prostředí a na koncentraci enzymu ve vzorku

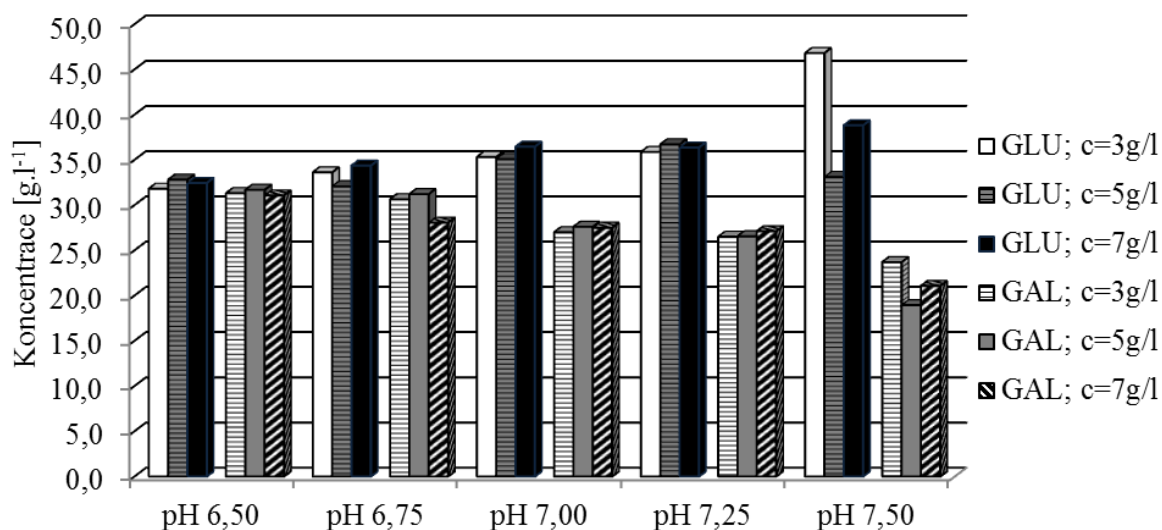
V následujících grafech (Obrázek 10 - 15) jsou vyjádřeny závislosti koncentrace vzniklých monosacharidů na pH prostředí a na použité koncentraci enzymu. Předpokládalo se, že optimální rychlost hydrolysy laktosy bude při pH 7,00 a bylo potřeba zjistit, jaké množství enzymu bude vhodné aplikovat do syrovátky, aby se v daném čase rozštěpila laktosa.

Grafy jsou rozděleny podle teploty a délky inkubace.



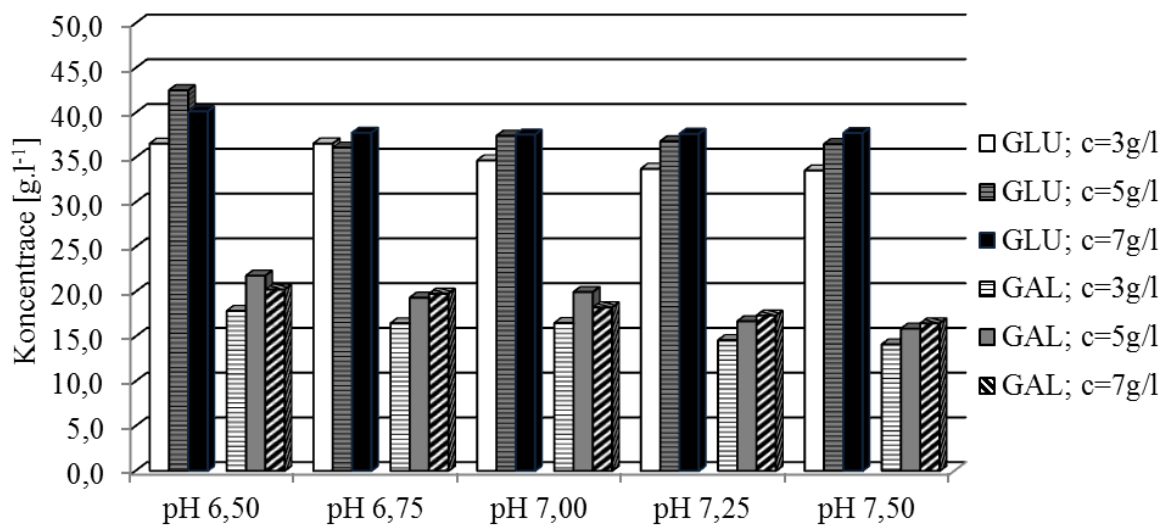
Obrázek 10: Závislost koncentrace monosacharidů (GLU – glukosy a GAL – galaktosy) na hodnotě pH a použité koncentraci enzymu (3 - 7 g/l) při teplotě 30°C po dobu 6 hodin

Na vzorcích inkubovaných při teplotě 30°C po dobu 6 hodin lze pozorovat, že v těch, jež obsahují větší množství enzymu, je větší koncentrace monosacharidů.



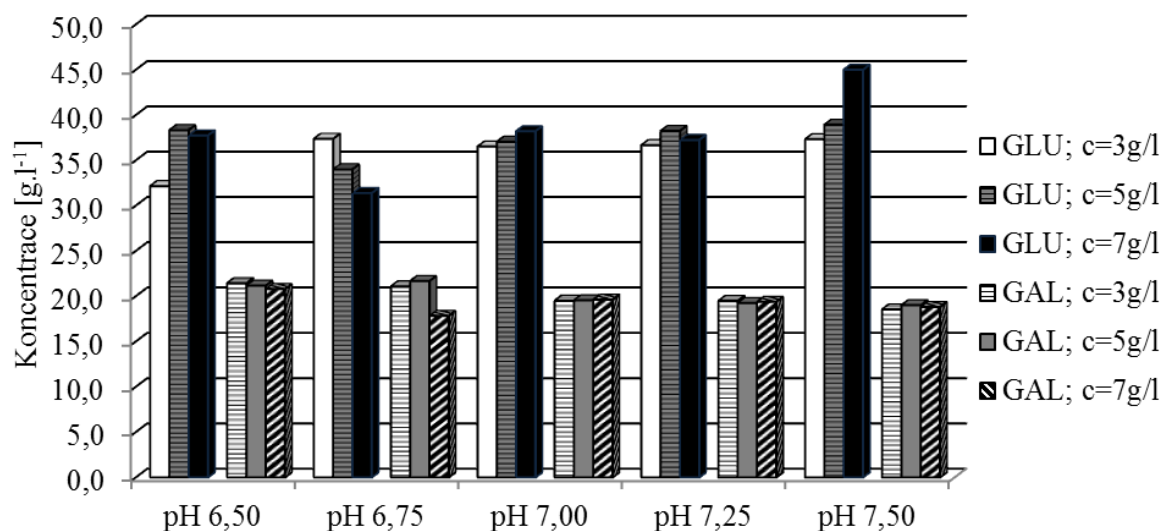
Obrázek 11: Závislost koncentrace monosacharidů (GLU – glukosy a GAL – galaktosy) na hodnotě pH a použité koncentraci enzymu (3 - 7 g/l) při teplotě 30°C po dobu 24 hodin

U vzorků inkubovaných při teplotě 30°C po dobu 24 hodin se koncentrace sacharidů u vzorků s různými koncentracemi enzymu vyrovnaly a rozdíly již nejsou výrazné.



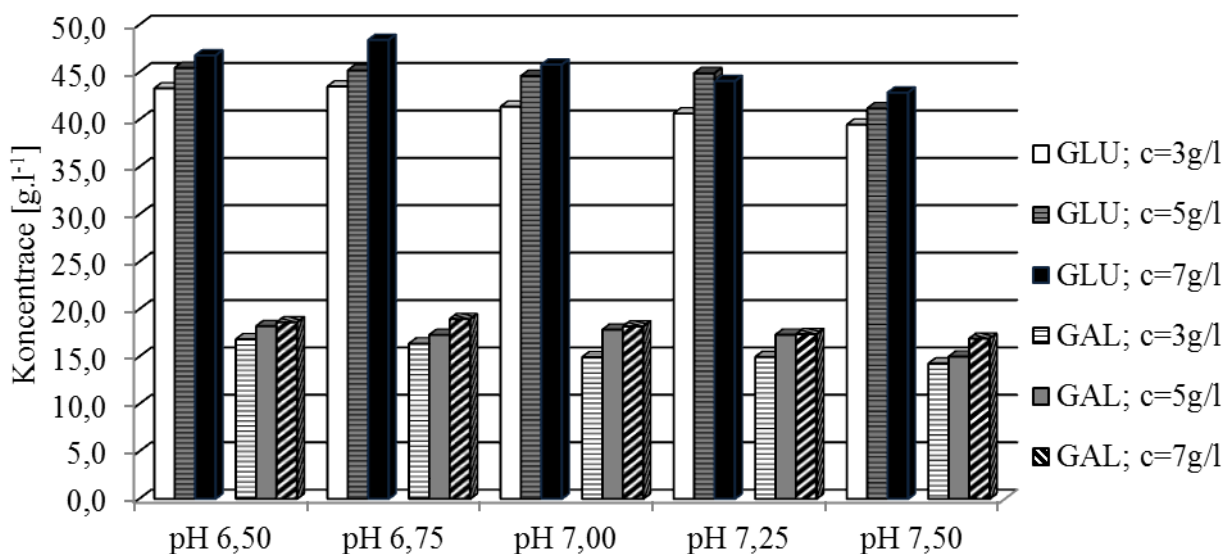
Obrázek 12: Závislost koncentrace monosacharidů (GLU – glukosy a GAL – galaktosy) na hodnotě pH a použité koncentraci enzymu (3 - 7 g/l) při teplotě 35°C po dobu 6 hodin

U vzorků inkubovaných při 35°C po dobu 6 hodin jde vidět, že vzorky s vyšší použitou koncentrací enzymu, mají větší koncentraci monosacharidů než vzorky s nižší koncentrací.



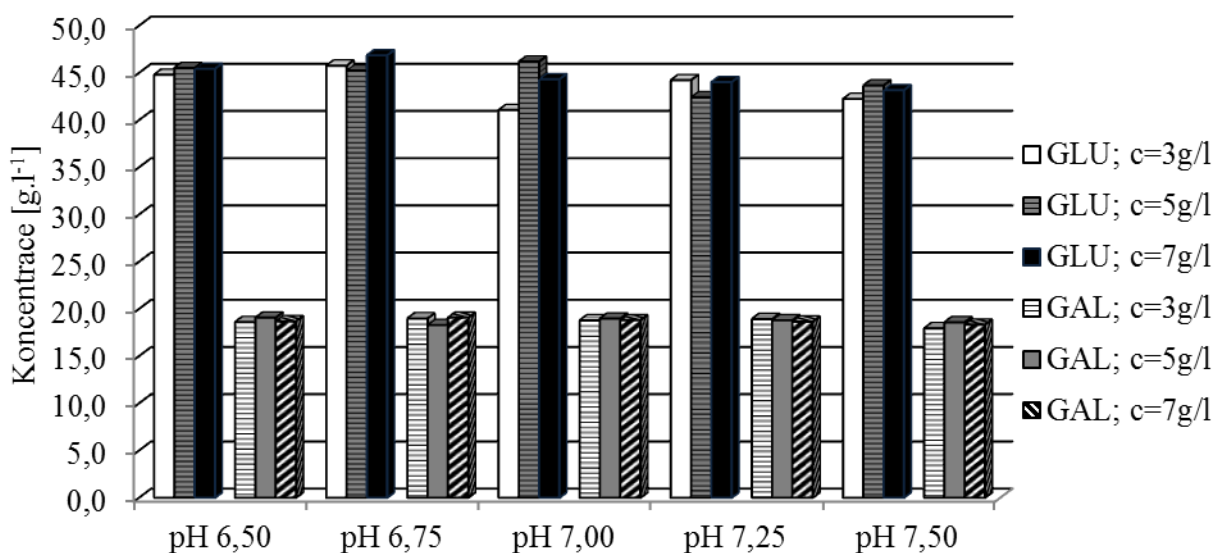
Obrázek 13: Závislost koncentrace monosacharidů (GLU – glukosy a GAL – galaktosy) na hodnotě pH a použité koncentraci enzymu (3 - 7 g/l) při teplotě 35°C po dobu 24 hodin

Po 24 hodinách při teplotě 35°C se koncentrace uvolněných monosacharidů vyrovnala.



Obrázek 14: Závislost koncentrace monosacharidů (GLU – glukosy a GAL – galaktosy) na hodnotě pH a použité koncentraci enzymu (3 - 7 g/l) při teplotě 40°C po dobu 6 hodin

U grafu vzorků inkubovaných po dobu 6 hodin při 40°C je vidět rozdílná koncentrace jednoduchých cukrů u vzorků obsahujících jiné množství enzymu. S množstvím enzymu roste množství monosacharidů.



Obrázek 15: Závislost koncentrace monosacharidů (GLU – glukosy a GAL – galaktosy) na hodnotě pH a použité koncentraci enzymu (3 - 7 g/l) při teplotě 40°C po dobu 24 hodin

Vzorky inkubované při 40°C po dobu 24 hodin, obsahují přibližně stejné koncentrace glukosy a galaktosy, bez závislosti na použitém množství enzymu.

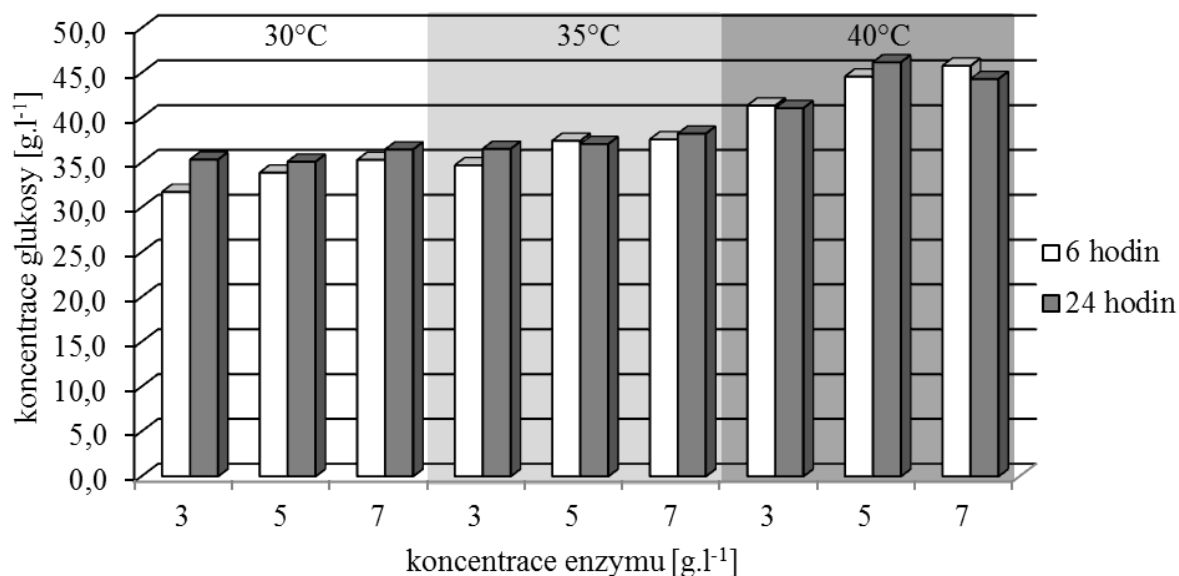
Předpoklad, že při pH 7,00 se laktosa bude štěpit optimálně, nebyl potvrzený, protože mezi množství vzniklých cukrů, které vznikly štěpením laktosy při stejné koncentraci enzymů, za stejné teploty, za stejnou dobu, ale při jiném pH prostředí, není zřetelně viditelný pravidelný rozdíl. V informačním listu o výrobku, bylo uvedeno, že optimální pH pro působení enzymu je v rozmezí pH 6,80 - 7,40 [42]. Jako výsledek tohoto výzkumu je rozšíření intervalu uvedeného v literatuře. Bylo zjištěno, že štěpení laktosy pomocí enzymu β -galaktosidasy není závislé na pH, pokud se jedná o pH v rozmezí 6,50 - 7,50.

Dále bylo tímto hodnocením zjištěno, že množství aplikovaného enzymu ovlivňuje rychlost hydrolysy. S vyšší koncentrací enzymů, roste rychlost štěpení laktosy. Pokud však proces probíhá delší dobu, tak tento faktor ztrácí na důležitosti. Za určitou dobu se totiž koncentrace vzniklých monosacharidů vyrovnají, ať je použita jakákoli koncentrace enzymu. Množství enzymu, jež je při hydrolyse použito, ovlivňuje z velké části cenu celého procesu. Proto je vhodné používat ho co nejmenší množství, které je úměrné reálně aplikovatelné inkubační době.

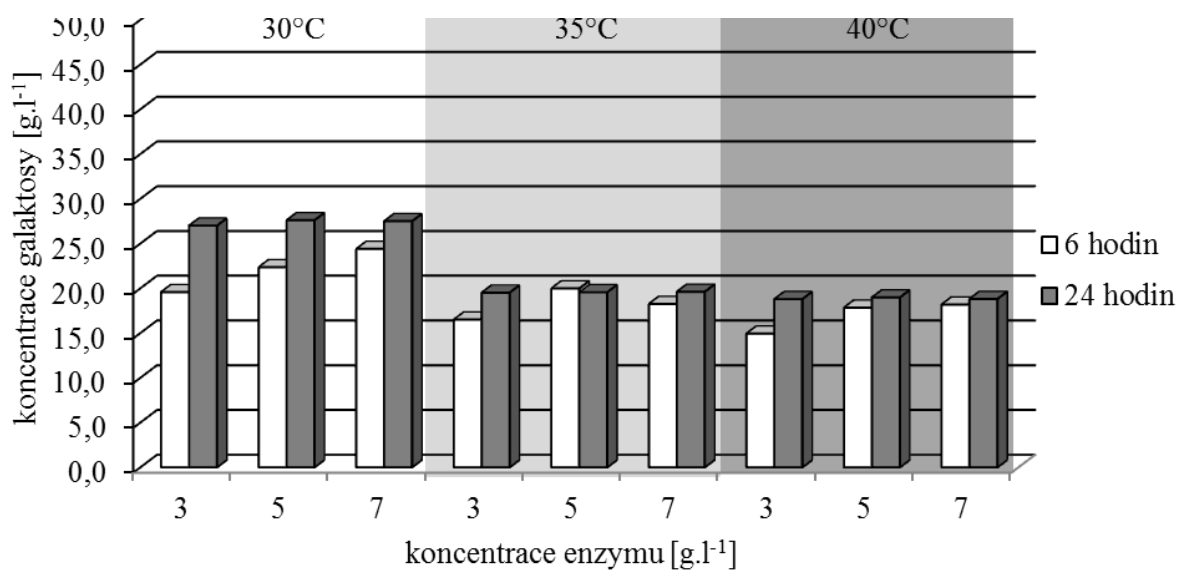
6.2 Závislost koncentrace monosacharidů na době působení enzymu a na teplotě inkubace

Na grafech (Obrázek 16 a 17) jsou vyobrazeny výsledky koncentrací jednotlivých monosacharidů v závislosti na době působení enzymu a koncentraci enzymu ve vzorku. Grafy jsou rozděleny podle vyhodnocovaného monosacharidu a podle teploty, při které se vzorky inkubovaly. Faktor působení pH prostředí byl z dalšího vyhodnocování a grafů vyřazen, jelikož v předchozí kapitole se neukázal výrazný vliv změny hodnot pH (v rozmezí 6,50 – 7,50) na koncentraci monosacharidů.

V tomto výzkumu byly zvolené nižší teploty: 30; 35; 40°C, aby se zjistilo, jak bude probíhat hydrolysa laktosy při těchto teplotách.



Obrázek 16: Závislost koncentrace glukosy na době inkubace při pH 7,00



Obrázek 17: Závislost koncentrace galaktosy na době inkubace při pH 7,00

Předpoklad byl, že koncentrace vzniklých monosacharidů se v rozmezí 6 a 24 hodin měnit nebude. Úvaha vycházela z toho, že jak u vzorků které se inkubovali po dobu 24 hodin, tak u vzorků které se inkubovali pouze 6 hodin, nebylo měřením zaznamenáno žádné množství laktosy.

Koncentrace vzniklé glukosy se při všech inkubačních teplotách s delším časem měnila o velmi malé množství a většinou jen u vzorků a nižší použité koncentrací enzymu.

Oproti tomu množství galaktosy se při všech teplotách s delším časem zvyšovalo výrazněji. Větší nárůst koncentrace galaktosy byl u vzorků s nižší použitou koncentrací enzymů.

Hydrolysa laktosy probíhala nejrychleji při teplotě 40°C. V informačním listě enzymu [43], byla uvedená optimální teplota 50 - 55°C. Výsledek výzkumu je informace, že i při nižší teplotě než je optimální, je štěpení laktosy relativně rychlé (vyplývá z poměrně malých rozdílů mezi zjišťovanými koncentracemi monosacharidů po 6 a 24 hodinách inkubace). Použitím nižší teploty se sníží energetické nároky na hydrolytické štěpení laktosy, ale zároveň se prodlouží doba procesu.

Metoda použita při tomto výzkumu bude vyžadovat další optimalizaci, aby se dosáhlo přesnějších výsledků. Optimalizace by bylo vhodné provést jak u přípravy vzorků, srážecího kroku, tak i při výběru hodnocených faktorů. Tyto úpravy by měly přispět k lepšímu vyhodnocení optimální kombinace teploty, času a množství použitého enzymu, která by se poté dala aplikovat do provozu.

ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo sledování vybraných hydrolytických procesů laktosy v modelových vzorcích syrovátky. Sledováním těchto faktorů měly být získány poznatky o tom, při jakých optimálních podmínkách by měla být prováděna hydrolyza syrovátky pomocí enzymu β -galaktosidasy.

Prvním faktorem, který se hodnotil, bylo pH prostředí. Bylo použito pět hodnot pH: 6,50; 6,75; 7,00; 7,25; 7,50 a vyhodnocována jeho závislost na množství vyprodukovaných monosacharidů na daný čas. Při všech hodnotách pH prostředí byl však výtěžek stejný, proto se dá říct, že aktivita enzymu je stejná v rozmezí pH 6,50 - 7,50.

Druhým vyhodnocovaným faktorem byla použita koncentrace enzymu. Vyhodnocovaly se tři koncentrace: 3; 5; 7 g.l⁻¹. Ze získaných výsledků bylo potvrzeno, že s vyšší koncentrací enzymu stoupá rychlost hydrolysy. Při zvolených hodnotách množství enzymu nebyl časový rozdíl dosažení konečné koncentrace produktů příliš velký.

Teplota inkubace byla třetím faktorem, jenž byl v této práci zkoumán. Při výzkumu se aplikovaly teploty: 30; 35; 40°C. Výsledky ukázaly, že optimální teplotou ze zkoušeného intervalu je 40°C. Při této teplotě hydrolysa probíhala nejrychleji.

Posledním faktorem byla doba inkubace. Všechny vzorky se vyhodnocovali po 6 a následně po 24 hodinách, poté byly tyto výsledky navzájem porovnávány. Bylo zjištěno, že již po 6 hodinách byla značná část laktosy v syrovátce rozštěpena a převedena na jednoduché cukry i při použití nejmenší koncentrace enzymu. Po 24 hodinách byly koncentrace monosacharidů (u vzorků se stejnou použitou teplotou, stejným pH prostředí a různým množstvím použitého enzymu) vyrovnané. Z toho bylo vyvozeno, že po 24 hodinách byla hydrolysa laktosy ukončená. Výsledkem vyhodnocování tohoto faktoru je informace, že při pH prostředí 6,50 – 7,50, koncentraci enzymu 3; 5; 7 g.l⁻¹ a teplotách 30; 35 a 40°C je lepší provádět hydrolysu laktosy po dobu 24 hodin než pouze 6 hodin.

Aby se výsledky daly využít v praxi, bude potřeba ještě provést další výzkumy. Pro pokračování v práci by bylo vhodné vyzkoušet kombinace menšího množství enzymu s delším časem. Prospěšné by také bylo vyhodnocovat vzorky po více intervalech než jen po 6 a 24 hodinách, aby se mohla určit optimální kombinace teploty, času a množství použitého enzymu. Použitelná kombinace těchto tří faktorů musí být efektivní a ekonomicky přijatelná pro aplikování do provozu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ANONYM. Česko. Vyhláška č. 77/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. *Sbírka zákonů České republiky*. 2003, částka 32, s. 2488-2516. ISSN 1211-1244.
- [2] PANESAR, P., J. KENNEDY, D. GANDHI, K. BUNKO. Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry* [online]. 2007, vol. 105, issue 1, s. 1-14 [cit. 2015-03-08]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.03.035. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814607002816>
- [3] MAWSON, A.J.. Bioconversions for whey utilization and waste abatement. *Bioresource Technology* [online]. 1994, vol. 47, issue 3, s. 193-207 [cit. 2015-03-07]. DOI: 10.1007/978-0-387-35766-9_10. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0960852494901805>
- [4] TSAKALI, E., K. PETROTOS, A. D' ALLESSANDRO, P. GOULAS. A review on whey composition and the methods used for its utilization for food and pharmaceutical products. *Educational Institute of Larisa, Greece* [online]. 2006, s. 1-8 [cit. 2015-03-02]. Dostupné z: www.fabe.gr/images/stories/SYNEDRIA/8.pdf
- [5] ILLANES, A, L. WILSON, C. ALTAMIRANO, R. CONEJEROS, K. BUCHHOLZ, D. ABEDI, L. ZHANG, M. PYNE a C. Perry CHOU. Whey upgrading by enzyme biocatalysis. *Electronic Journal of Biotechnology* [online]. 2011, vol. 14, issue 6, s. 363-368 [cit. 2015-03-09]. DOI: 10.1002/9780470627303.index. Dostupné z: www.fabe.gr/images/stories/SYNEDRIA/8.pdf
- [6] BECERRA, M., M. E. CERDÁN, M. I. GONZÁLEZ-SISO. Biobutanol from cheese whey. *BMC journals* [online]. 2015 [cit. 2015-02-02]. DOI: 10.1186/s12934-015-0200-1. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1186/s12934-015-0200-1>.
- [7] SUKOVÁ, I. *Syrovátka v potravinářství*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2006, 60 s. Potravinářské informace. ISBN 80-7271-173-3.

- [8] NZ INSTITUTE OF CHEMISTRY. *Chemical Processes in New Zealand*. Second edition. Christchurch, 1998. Dostupné z: http://www.nzic.org.nz/ChemProcesses/chem_processes.html
- [9] MILLER, G. D., J. K. JARVIS a Lois D MCBEAN. *Handbook of dairy foods and nutrition*. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press, 2007, 407 s. ISBN 0849328284.
- [10] PARK, Young W. *Bioactive components in milk and dairy products*. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2009, 426 p. ISBN 0813819822.
- [11] FANUN, M. *Colloids in biotechnology*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2011, 523 p. Surfactant science series, v. 152. ISBN 1439830800.
- [12] BUŇKA, F. *Mlékárenská technologie I*. Vyd. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2013, 258 s. ISBN 978-80-7454-254-1.
- [13] REN, J., D. I. STUART, K. R. ACHARYA. Alpha-Lactalbumin Possesses a Distinct Zinc Binding Site. *The Journal of biological chemistry* [online]. 1993, Vol. 268, No. 26, s. 19292-19298 [cit. 2015-03-18]. Dostupné z: http://www.researchgate.net/publication/14833384_Alpha-lactalbumin_possesses_a_distinct_zinc_binding_site
- [14] VEPRINTSEV, D. B., S. E. PERMYAKOV, E. A. PERMYAKOV, V. V. ROGOV, K. M. CAWThERN, L. J. BERLINER. Cooperative thermal transitions of bovine and human apo- α -lactalbumins: evidence for a new intermediate state. *FEBS Letters* [online]. 1997, vol. 412, issue 3, s. 625-628 [cit. 2015-03-18]. DOI: 10.1016/s0014-5793(97)00841-7. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9276479>
- [15] MOLLEA C., L. MARMO, F. BOSCO. Valorisation of Cheese Whey, a By-Product from the Dairy Industry, *Food Industry*. 2013, ISBN: 978-953-51-0911-2, InTech, DOI: 10.5772/53159. Dostupné na: <http://www.intechopen.com/books/food-industry/valorisation-of-cheese-whey-a-by-product-from-the-dairy-industry>
- [16] KILARA A., M.V. Vaghela. Whey proteins, *Proteins in food processing*. Cambridge, Eng.: Woodhead Pub., 2004, s.72-99 [cit. 2015-01-04]. ISBN 0849325366.

- [17] CASHMAN, K. D., F. GAUCHERON, K. SZE, B. LÖNNERDAL, M. TOLONEN, A. FLYNN, M. C. NEVILLE, P. ZHANG, J. C. ALLEN. Milk minerals (including trace elements) and bone health. *International Dairy Journal* [online]. 2006, vol. 16, issue 11, s. 577-592 [cit. 2015-03-23]. DOI: 10.1016/b978-012384430-9/50025-1. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694606001622>
- [18] JULLOK, Nora. Potential innovations in separation technology by nature-inspired membranes: beneath and beyond the Earth's crust. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* [online]. 2014, vol. 89, s. 475-478 [cit. 2015-03-15]. DOI: 10.1002/jctb.4291. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jctb.4291/abstract>
- [19] PALATÝ, Z., B. BERNAUER. *Membránové procesy*. Vyd. 1. V Praze: Vysoká škola chemicko-technologická, 2012, 282 s. ISBN 978-80-7080-808-5.
- [20] KUMAR, P., N. SHARMA, R. RANJAN, S. KUMAR, Z. F. BHAT, D. K. JEONG. Perspective of Membrane Technology in Dairy Industry: A Review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* [online]. 2013, vol. 26, issue 9, s. 1347-1358 [cit. 2015-03-15]. DOI: 10.5713/ajas.2013.13082. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4093403/>
- [21] MIKULÁŠEK, Petr. *Tlakové membránové procesy*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2013, 254 s. ISBN 978-80-7080-862-7.
- [22] HENNING, D. R., R. J. BAER, A.N. HASSAN, R. DAVE, B.K. MORTENSEN. Major Advances in Concentrated and Dry Milk Products, Cheese, and Milk Fat-Based Spreads. *Journal of Dairy Science* [online]. 2006, vol. 89, issue 4, s. 1859-1868 [cit. 2015-03-22]. DOI: 10.1016/b0-12-227235-8/00313-8. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030206721877>
- [23] QUIST-JENSEN, C.A., F. MACEDONIO a E. DRIOLI. 2015. Membrane technology for water production in agriculture: Desalination and wastewater reuse. *Desalination* [online]. **364**: 17-32 [cit. 2015-05-06]. DOI: 10.1016/j.desal.2015.03.001. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.proxy.k.utb.cz/science/article/pii/S001191641500140X>

- [24] MOULIN, G., P. GALZY. Whey, a Potential Substrate for Biotechnology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* [online]. 1984, vol. 1, issue 1, s. 347-374 [cit. 2015-03-15]. DOI: 10.1080/02648725.1984.10647790. Dostupé z: <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/02648725.1984.10647790>
- [25] ATRA, R., G. VATAI, E. BEKASSY-MOLNAR, A. BALINT. Investigation of ultra- and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose. *Journal of Food Engineering* [online]. London: Applied Science Publishers, 2005, vol. 67, issue 3, s. 133-155 [cit. 2015-02-06]. DOI: 10.1007/978-94-011-2894-0_4. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877404002109>
- [26] ANONYM. Membrane Filtration in the Dairy Industry. *GEA Process Engineering* [online]. 2012, s. 20, [cit. 2015-03-05]. Dostupné z: http://www.geafiltration.com/filtration_library/membrane_filtration_dairy_industry.pdf
- [27] PAN, K., Q. SONG, L. WANG, B. CAO. A study of demineralization of whey by nanofiltration membrane. *Desalination* [online]. 2011, vol. 267, 2-3, s. 217-221 [cit. 2015-05-02]. DOI: 10.1016/j.desal.2010.09.029. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011916410006788>
- [28] NAGEL, B., H. DELLWEG, L. M. GIERASCH. Glossary for chemists of terms used in biotechnology (IUPAC Recommendations 1992). *Pure and Applied Chemistry* [online]. 1992, vol. 64, issue 1 [cit. 2015-02-08]. DOI: 10.1351/pac199264010143. Dostupné z: iupac.org/publications/pac/64/1/0143/pdf
- [29] KADLEC, Pavel, Karel MELZOCH a Michal VOLDŘICH. *Procesy a zařízení potravinářských a biotechnologických výrob: [technologie potravin]*. Vyd. 1. Ostrava: Key Publishing, 2012, 494 s. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-086-6
- [30] RYCHTERA, M., J. PÁČA. *Bioinženýrství kvasných procesů*. 2. opr. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1987, 154 s.
- [31] JOHN, R. P., A. S. GS., K. M. NAMPOOTHIRI, A. PANDEY. Direct lactic acid fermentation: Focus on simultaneous saccharification and lactic acid

- production. *Biotechnology Advances* [online]. 2009, vol. 27, issue 2, s. 145-152 [cit. 2015-02-08]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.10.004. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975008001067>
- [32] SCHEPERS, A. W., J. THIBAUT, C. LACROIX. Continuous lactic acid production in whey permeate/yeast extract medium with immobilized *Lactobacillus helveticus* in a two-stage process: Model and experiments. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2006, vol. 38, 3-4, s. 324-337 [cit. 2015-05-02]. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2004.07.028. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014102290500431X>
- [33] BAEYENS, J., Q. KANG, L. APPELS, R. DEWIL, Y. LV, T. TAN. Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol. *Progress in Energy and Combustion Science* [online]. 2015, vol. 47, s. 60-88 [cit. 2015-05-02]. DOI: 10.1016/j.pecs.2014.10.003. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360128514000689>
- [34] WANG, Z., E. M. AMMAR, A. ZHANG, L. WANG, M. LIN, S. YANG. Engineering *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* for enhanced propionic acid fermentation: Effects of overexpressing propionyl-CoA. *Metabolic Engineering* [online]. 2015, vol. 27, s. 46-56 [cit. 2015-05-02]. DOI: 10.1016/j.ymben.2014.10.005. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511314005911>
- [35] DAVIS, W., M. MARTÍN. Optimal year-round operation for methane production from CO₂ and water using wind energy. *Energy* [online]. 2014, vol. 69, s. 497-505 [cit. 2015-05-02]. DOI: 10.1016/j.energy.2014.03.043. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360544214003077>
- [36] VOURCH, Mickael, Béatrice BALANNEC, Bernard CHAUFER. Nanofiltration and reverse osmosis of model process waters from the dairy industry to produce water for reuse. *Desalination* [online]. 2005, vol. 172, issue 3, s. 245-256 [cit. 2015-05-03]. DOI: 10.1016/j.desal.2004.07.038. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.proxy.k.utb.cz/science/article/pii/S0011916405800426#>

- [37] YONEDA, N., S. KUSANO, M. YASUI, P. PUJADO, S. WILCHER. Recent advances in processes and catalysts for the production of acetic acid. *Applied Catalysis A: General* [online]. 2001, vol. 221, 1-2, s. 253-265 [cit. 2015-05-03]. DOI: 10.1016/s0926-860x(01)00800-6. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.proxy.k.utb.cz/science/article/pii/S0926860X01008006>
- [38] ROUSSOS, S., B. BERNAUER. *New horizons in biotechnology*. 2nd ed. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2003, 449p. ISBN 14-020-1718-9.
- [39] SHETTY, K., B. BERNAUER. *Food technology*. 2nd ed. New York: CRC Press, 2006, 1982p. ISBN 08-247-5329-1.
- [40] GUIMARÃES, P. M.R., J. A. TEIXEIRA, L. DOMINGUES, A. KILARA a M. T. PATEL. 2010. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnology Advances* [online]. **28**(3): 409-448 [cit. 2015-02-02]. DOI: 10.1007/978-94-011-2894-0_11. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975010000224>
- [41] ANONYM., Deproteinisation. *Megazyme International Ireland* [online]. [cit. 2015-04-08]. Dostupné z: http://www.megazyme.com/docs/default-source/analytical-applications-downloads/deproteinisation_110120.pdf?sfvrsn=4
- [42] ANONYM, β -Galactosidase from *E. coli*, *Sigma- Aldrich*, [online]. [cit. 2015-05-03]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Datasheet /7/g3153dat.pdf>
- [43] ANONYM, β -Galactosidase, *MP Biomedicals*, [online]. [cit. 2015-05-03]. Dostupné z: <http://www4.mpbio.com/ecom/docs/proddata.nsf/%28webtds2%29/150039>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

MF	Mikrofiltrace
UF	Ultrafiltrace
NF	Nanofiltrace
RO	Reverzní osmosa
ESL	Extended shlef life
WPC	Whey protein concentrate
WPI	Whey protein isolate
BSK	Biologická spotřeba kyslíku
EMP	Embden-Meyerhof-Parnasova dráha
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Vzorec laktosy.....	13
Obrázek 2: Schématické znázornění uspořádání dead-end a cross-flow filtrace.....	18
Obrázek 3: Schéma možností využití syrovátky v biotechnologiích.....	26
Obrázek 4: Obecné schéma homofermentativní a heterofermentativní fermentace glukosy.....	29
Obrázek 5: Sumární rovnice vzniku etanolu z hexosy po EMP dráze.....	31
Obrázek 6: Sumární rovnice vzniku kyseliny octové z etanolu.....	32
Obrázek 7: Rovnice vzniku sraženiny hexokvanoželeznatanu zinečnatého.....	38
Obrázek 8: Kalibrační přímka- glukosa.....	40
Obrázek 9: Kalibrační přímka- galaktosa.....	41
Obrázek 10: Závislost koncentrace monosacharidů (GLU – glukosy a GAL – galaktosy) na hodnotě pH a použité koncentraci enzymu (3 - 7 g/l) při teplotě 30°C po dobu 6 hodin.....	42
Obrázek 11: Závislost koncentrace monosacharidů (GLU – glukosy a GAL – galaktosy) na hodnotě pH a použité koncentraci enzymu (3 - 7 g/l) při teplotě 30°C po dobu 24 hodin.....	42
Obrázek 12: Závislost koncentrace monosacharidů (GLU – glukosy a GAL – galaktosy) na hodnotě pH a použité koncentraci enzymu (3 - 7 g/l) při teplotě 35°C po dobu 6 hodin.....	43
Obrázek 13: Závislost koncentrace monosacharidů (GLU – glukosy a GAL – galaktosy) na hodnotě pH a použité koncentraci enzymu (3 - 7 g/l) při teplotě 35°C po dobu 24 hodin.....	43
Obrázek 14: Závislost koncentrace monosacharidů (GLU – glukosy a GAL – galaktosy) na hodnotě pH a použité koncentraci enzymu (3 - 7 g/l) při teplotě 40°C po dobu 6 hodin.....	44
Obrázek 15: Závislost koncentrace monosacharidů (GLU – glukosy a GAL – galaktosy) na hodnotě pH a použité koncentraci enzymu (3 - 7 g/l) při teplotě 40°C po dobu 24 hodin.....	44
Obrázek 16: Závislost koncentrace glukosy na době inkubace při pH 7,00.....	46
Obrázek 17: Závislost koncentrace galaktosy na době inkubace při pH 7,00.....	46

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Složení sladké a kyselé syrovátky uvedené v hmotnostních % [3,8].....	13
Tabulka 2: Výroba vzorků při jedné dané teplotě.....	38