

Využití kvasinek *Kluyveromyces marxianus* při fermentaci syrovátky

Bc. Kateřina Havlíčková

Diplomová práce
2017



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina Havlíčková**
Osobní číslo: **T15369**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie potravin**
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Využití kvasinek *Kluyveromyces marxianus* při fermentaci syrovátky**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakteristika syrovátky, jejího chemického složení, vzniku a zpracování.
2. Charakteristika alkoholové fermentace.
3. Možnosti biotechnologického využití syrovátky s důrazem na získávání etanolu.

II. Praktická část

1. Založení fermentačních pokusů se syrovátkou s využitím několika kmenů kvasinek *Kluyveromyces marxianus*.
2. Návrh metodiky pro stanovení úbytku fermentačního substrátu (laktózy) pomocí HPLC.
3. Sledování vybraných faktorů na průběh fermentace syrovátky.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

- [1] ONWULATA, Charles, I. a Peter J. HUTH (eds.). *Whey processing, functionality and health benefits*. Ames: Wiley-Blackwell, 2008. ISBN 978-0-8138-0903-8
- [2] GUIMARAES, Pedro, M.R., José A. TEIXEIRA a Lucília DOMINGUES. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnology Advances*, 2010, 28, 375384. ISSN 0734-9750
- [3] PESCUA, Micaela, Graciela Font de VALDEZ a Fernanda MOZZI. Whey-derived valuable products obtained by microbial fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99, 61836196. ISSN 1432-0614
- [4] ZAFAR, Salman, Mohammad OWAIS, Mohammed SALEEMUDDIN a Sattar HUSAIN. Batch kinetics and modelling of ethanolic fermentation of whey. *International Journal of Food Science and Technology*, 2005, 40, 597604. ISSN 1365-2621
- [5] SISO, González, M.I. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology*, 1996, 57, 111. ISSN 0960-8524

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Zuzana Bubelová, Ph.D.

Ústav technologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

3. února 2017

Termín odevzdání diplomové práce:

28. dubna 2017

Ve Zlíně dne 3. února 2017



L.S.


doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan


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

Příjmení a jméno: Bc. Kateřina Havličková

Obor: Technologie právních

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 obhajoby¹⁾;
- 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. 3²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ 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 § 60³⁾ 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 26.4.2017

Havličková

²¹⁾ 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 nevydávalečně 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 nahlížení 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.

²²⁾ 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).

²³⁾ 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). Odpirá-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 přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato diplomová práce je zaměřena na oblast v problematice využití kvasinek *Kluyveromyces marxianus* při fermentaci syrovátky, přesněji na stanovení úbytku laktózy při fermentaci syrovátky pomocí dvou kmenů kvasinek *Kluyveromyces marxianus*. Průběh fermentace byl sledován v syrovátce o dvou koncentracích (3 a $5 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) při třech inkubačních teplotách (20 , 28 a $35 \text{ }^\circ\text{C}$). Úbytek laktózy byl analyzován v pěti časových intervalech (0 , 24 , 48 , 72 a 96 hodin) pomocí metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s refraktometrickou detekcí (HPLC-RI). Z výsledků je patrné, že doba fermentace a koncentrace syrovátky mají podstatný vliv na průběh fermentace a konečné množství laktózy ve vzorku. Dále se také ukázalo, že teplota $28 \text{ }^\circ\text{C}$ je optimální pro růst kvasinek a zároveň i pro maximální úbytek laktózy v syrovátce. Kromě alkoholové fermentace byla také sledována enzymatická hydrolýza laktózy pomocí β -galaktosidázy. Enzym byl do syrovátky aplikován ve dvou koncentracích (1 a $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) a průběh hydrolýzy byl sledován po dobu 6 hodin. Enzymatická hydrolýza laktózy zapříčinila úbytek laktózy a nárůst hydrolytických produktů, tj. glukózy a galaktózy. Dvojnásobná koncentrace enzymu byla účinnější, úplného štěpení laktózy bylo dosaženo již po 5 hodinách hydrolýzy.

Klíčová slova: syrovátka, alkoholová fermentace, *Kluyveromyces marxianus*, laktóza, enzymatická hydrolýza.

ABSTRACT

This thesis is focused on the using of *Kluyveromyces marxianus* during fermentation of whey. Specifically, this thesis is focused on determining of the lactose decrease during fermentation of whey using two strains of yeast *Kluyveromyces marxianus*. The process of fermentation was monitored in whey at two concentrations (3 and 5 g·100 g⁻¹) and at three incubation temperatures (20, 28 and 35 °C). The decrease of lactose was measured at defined time intervals (0, 24, 48, 72 a 96 h) by HPLC with refractometric detection (HPLC-RI).

The results showed that the fermentation time and concentration of whey have a considerable influence on the fermentation process and the final amount of lactose in the sample. Furthermore, also the temperature of 28 °C appeared to be optimal for the optimal growth of yeast and thus optimal for maximum decrease of lactose in whey. In addition to alcohol fermentation, enzymatic hydrolysis of lactose by β -galactosidase was also observed. The enzyme was applied to the whey in two concentrations (1 and 2 g·l⁻¹) and the process of hydrolysis was monitored for 6 hours. Enzymatic hydrolysis of lactose has led to a decrease in lactose and an increase in hydrolytic products, i.e. glucose and galactose. Double concentration of the enzyme was more effective, complete lactose cleavage was achieved after 5 hours of hydrolysis.

Keywords: whey, alcoholic fermentation, microorganism, *Kluyveromyces marxianus*, lactose. enzymatic hydrolysis.

Mé hlavní poděkování patří vedoucí práce paní Ing. Zuzaně Bubelové, Ph.D. za ochotu, vstřícnost, trpělivost, cenné rady a konzultace při zpracování diplomové práce a v neposlední řadě za odborné vedení a praktickou pomoc. Dále bych ráda poděkovala paní Ing. Ludmile Zálešákové za pomoc při práci v laboratoři, za ochotu a odborné rady.

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

OBSAH

ÚVOD.....	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 SYROVÁTKA	13
1.1 ZÍSKÁVÁNÍ SYROVÁTKY	13
1.2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ SYROVÁTKY	14
1.2.1 Bílkoviny	14
1.2.2 Mléčný cukr.....	15
1.2.3 Dusíkaté látky nebilkovinné povahy	16
1.2.4 Tuk	16
1.2.5 Kyseliny.....	16
1.2.6 Vitamíny.....	17
1.2.7 Minerální látky a stopové prvky.....	18
1.3 ZPRACOVÁNÍ SYROVÁTKY	18
1.3.1 Příprava syrovátky před dalším zpracováním	19
1.3.2 Demineralizace.....	19
1.3.3 Krystalizace laktózy	20
1.3.4 Zahušťování syrovátky	20
1.3.5 Sušení syrovátky.....	21
1.3.6 Separční metody	21
1.4 MIKROBIOLOGIE SYROVÁTKY	23
1.5 VYUŽITÍ SYROVÁTKY	23
2 FERMENTACE SYROVÁTKY	25
2.1 FERMENTACE LAKTÓZY	25
2.1.1 Homofermentativní mléčná fermentace	25
2.1.2 Heterofermentativní mléčná fermentace	26
2.1.3 Alkoholová fermentace	28
2.2 BIOTECHNOLOGICKÉ VYUŽITÍ SYROVÁTKY V POTRAVINÁŘSTVÍ.....	29
2.2.1 Výroba nápojů	29
2.2.2 Výroba sýrů	30
2.2.3 Výroba polysacharidů a aminokyselin	31
2.2.4 Výroba kyseliny mléčné a propionové	31
2.3 PRODUKCE BIOMASY, BIOPLYNU A ETANOLU.....	31
3 KVASINKY.....	34
3.1 ROD <i>KLUYVEROMYCES</i>	34
4 SLEDOVÁNÍ PRŮBĚHU FERMENTACE SYROVÁTKY POMOCÍ HPLC-RI	36

4.1	PRINCIP HPLC	37
4.2	ÚPRAVA VZORKU PŘED STANOVENÍM	38
4.3	STANOVENÍ ÚBYTKU LAKTÓZY POMOCÍ HPLC	38
II	PRAKTICKÁ ČÁST	40
5	CÍL PRÁCE	41
6	MATERIÁL A METODY	42
6.1	MATERIÁL	42
6.1.1	Fermentační médium a mikroorganizmy	42
6.1.2	Chemikálie	42
6.1.3	Pomůcky	42
6.1.4	Přístroje	42
6.2	METODY	43
6.2.1	Příprava fermentačního média (obnovené syrovátky)	43
6.2.2	Pasterace syrovátky	43
6.2.3	Příprava kvasinek	43
6.2.4	Aplikace kvasinek do syrovátky	44
6.2.5	Fermentace a odběr vzorků	44
6.2.6	Příprava vzorků pro stanovení laktózy	44
6.2.7	Příprava kalibrační řady pro stanovení sacharidů	44
6.2.8	Stanovení sacharidů pomocí HPLC-RI	45
6.2.9	Sledování průběhu enzymatické hydrolýzy laktózy	45
7	VÝSLEDKY A DISKUZE	46
7.1	KALIBRAČNÍ PŘÍMKY VYBRANÝCH SACHARIDŮ	46
7.2	STANOVENÍ ÚBYTKU LAKTÓZY POMOCÍ HPLC V SYROVÁTCE	48
7.3	ENZYMATICKÁ HYDROLÝZA LAKTÓZY	53
	ZÁVĚR	55
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	56
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	62
	SEZNAM OBRÁZKŮ	63
	SEZNAM TABULEK	64

ÚVOD

Tato diplomová práce je zaměřena na využití kvasinek *Kluyveromyces marxianus* při fermentaci syrovátky. Toto téma je velmi důležité, protože syrovátka nachází uplatnění prakticky ve všech odvětvích potravinářského průmyslu a stala se nedílnou součástí lidské výživy. Tato práce je orientována na kvasinky *Kluyveromyces marxianus*, což je mléčná kvasinka s aktivními probiotickými vlastnostmi.

V dnešní době nabývá syrovátka, vznikající při výrobě sýrů, rychle na popularitě. Nebylo tomu tak vždy. V minulosti byla syrovátka brána jako méně cenný produkt srážení mléka a to díky svému využití, které bylo především ke zkrmování zvířat. Syrovátka byla využívána i k jiným účelům než ke zkrmování zvířaty (výroba polysacharidů, kyselin či produkce biomasy). Také získala využití při zdravotnických procesech, a to již ve 4. st. n. l. Od nedávna si našla syrovátka své uplatnění i v naší společnosti a dá se říci, že se stala složkou lidské stravy. Dnes díky podkladům, které se syrovátkou zabývají, víme, že syrovátka, brána jako vedlejší produkt při mlékárenské výrobě, má velice pozitivní účinky na lidské zdraví díky látkám minerálním a vitamínům, laktóze a kvalitním bílkovinám. Výživové hodnoty staví syrovátku na přední místa v potravinářském průmyslu. Syrovátka lidskému tělu prospívá nejen vnitřně, ale i vnějším použitím. Při vnitřním použití pomáhá vyloučit toxické látky z metabolismu, podporuje činnost ledvin, upravuje metabolismus, zlepšuje látkovou výměnu a účinně napomáhá snižování hladiny cholesterolu.

Nyní význam syrovátky výrazně vzrostl, což má spojitost s využíváním nemalých objemů syrovátky vzhledem k množství výroby sýrů a s ochranou životního prostředí, zejména zátěží odpadních vod. Stále se hledají další způsoby využití a technologie zpracování syrovátky.

V teoretické části diplomové práce je pozornost věnována syrovátce, fermentaci syrovátky (laktózy) a jejímu biotechnologickému využití, stručné charakteristice kvasinek, a to především *Kluyveromyces marxianus*.

Cílem praktické části této diplomové práce je laboratorní kvantitativní stanovení úbytku laktózy při fermentaci pomocí kvasinek *Kluyveromyces marxianus* v syrovátce. Spolehlivou metodou pro stanovení laktózy je metoda kapalinové chromatografie (HPLC) za použití refraktometrické detekce, která byla použita v této diplomové práci.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 SYROVÁTKA

Dle vyhlášky č. 397/2016 ve znění pozdějších předpisů, kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy, jedlé tuky a oleje, je syrovátka mléčný výrobek vznikající jako vedlejší produkt při výrobě sýrů, včetně tvarohů a potravinářských kaseinů. Syrovátkou může být i mléčná složka uvolňovaná po fermentaci při výrobě jiných mléčných výrobků, zejména u jogurtů či mléčných dezertů [1].

Syrovátku podle výsledných produktů můžeme dělit na kyselou a sladkou. Složení syrovátky je ovlivněno strukturou nativního mléka, přídavkem vody a mírou fermentace laktózy [2]. Nelze opomenout odlišnost ve složení syrovátky vyplývající z aktivity srážecího činidla a přidaných kultur během počátečních kroků výroby sýrů [3]. Jestliže bude vyrobeno 1 kg sýru, vznikne přibližně 10 kg syrovátky [2, 3].

Jedná se o velmi obtížně údržnou kapalinu, což je dáno vysokým obsahem mikroorganismů a zředěných živin [4]. Syrovátka se pro své biologické rysy využívá k výrobě produktů, které mají důležitou úlohu při našem stravování [5]. Syrovátka má pozitivní účinky na lidské zdraví. Mezi pozitivní účinky řadíme regulaci hmotnosti, vysokého tlaku, zlepšení imunity, svalové interakce a vstřebávání živin. Kromě toho napomáhá správné činnosti ledvin a metabolismu, a také podporuje snižování cholesterolu v krvi [2]. Bylo zjištěno, že syrovátka obsahuje značné množství drahocenných a kvalitních složek, sloužících jak pro výživu lidí, tak i pro krmivářské účely [5, 6]. Nyní dochází k technologickému růstu zpracování syrovátky, což se ukázalo jako pokrok v této oblasti potravinářství [7].

1.1 Získávání syrovátky

Syrovátka je produktem při výrobě sýrů, tvarohů a kaseinu. Během výroby sýrů, u které dochází ke srážení bílkovin za pomoci enzymatického syřidla, jde o syrovátku sladkou (sladké srážení). Podle původu lze dělit syřidla na živočišná, mikrobiální a rostlinná. Při výrobě tvarohů a kaseinu vzniká syrovátka kyselá (kyselé srážení). Kyselá syrovátka vzniká působením kyseliny mléčné, produkované bakteriemi mléčného kvašení z laktózy. Při srážení kaseinových bílkovin za pomoci minerálních kyselin u výroby kaseinátů pak vzniká jako vedlejší produkt kaseinová syrovátka [5]. Kyselé srážení má podstatu v nízké rozpustnosti kaseinu při dosažení izoelektrického bodu (což je pH 4,6 – 4,9). Kyselina odštěpuje fosforečnan vápenatý, který je vázaný na kasein. Díky této reakci dochází k vzniku gelu.

Srážení je velmi citlivé na teplotu. Při vyšší teplotě reakce probíhá rychleji. Naopak k tvorbě gelu nedojde, pokud teplota klesne pod 6 °C [8].

Tabulka č. 1: Složení sladké a kyselé syrovátky [77,78]

Složka (%)	Syrovátka sladká	Syrovátka kyselé
Sušina	5,0 - 7,0	5,0 - 7,0
Laktóza	4,5 - 5,2	1,5 - 4,5
Bílkoviny	0,55 - 1,0	0,55 - 1,0
Tuk	0,05 - 1,0	0,05 - 1,0
Popeloviny	0,3 - 0,7	0,3 - 0,8

1.2 Chemické složení syrovátky

Složení sladké a kyselé syrovátky se v jednotlivých literárních zdrojích mírně liší (viz. Tabulka č. 1). Složení syrovátky je proměnlivé vzhledem k obsahu složek v mléce a postupu výrobního procesu. Sladká syrovátka má pH 5,9 – 6,6 a syrovátka kyselé má pH 4,6 – 5,0 [2].

1.2.1 Bílkoviny

Bílkoviny jsou polymery aminokyselin sestávající procesem proteosyntézy. Molekula proteinu obsahuje více jak 100 aminokyselin. Tyto aminokyseliny jsou spojeny peptidovou vazbou [9]. Celkový obsah bílkovin reprezentují bílkoviny sérové (kolem 90 %) a kasein (kolem 10 %). V syrovátce jsou sérové bílkoviny obsaženy takřka v totožném množství jako v původním mléce [2].

Sérové lze také označit, jako syrovátkové bílkoviny můžeme definovat jako skupinu proteinů, které po vysrážení kaseinu při pH 4,6 (izoelektrický bod kaseinu) a při teplotě 20 °C

setrvávají rozpustné v mléčném séru popřípadě v syrovátce. Mezi sérové bílkoviny řadíme β -laktoglobulin, α -laktalbumin, sérový albumin, imunoglobulin, laktoferin [10].

β -laktoglobulin prezentuje přibližně 50 % sérových bílkovin a asi 10 % celkového proteinu kravského mléka. Jde o charakteristický globulární protein, který velmi snadno denaturuje. α -laktalbumin představuje okolo 20 – 25 % sérových bílkovin a přibližně 4 – 5 % celkového proteinu kravského mléka. Jedná se o metaloprotein, který poutá ve své molekule vápenatý iont. Sérové albuminy se v mléce vyskytují v hodnotě $0,24 - 0,60 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Tyto proteiny se v mléce nachází ve zvýšeném množství při zánětlivých onemocněních. Imunoglobuliny jsou vysokomolekulární glykoproteiny nacházející se v mléce v množství 3 %. Ve zvýšeném množství se nalézají v mlezivu. Tyto proteiny jsou velmi důležité při přenosu imunitního systému z matky na mládě. Poslední ze zmíněných proteinů je laktoferin, který se váže na železité ionty a je součástí antioxidačního systému mléka a v neposlední řadě má bakteriostatickou funkci [44].

Obecněji lze říct, že tyto bílkoviny můžeme dělit na albuminy (β -laktoglobulin, α -laktalbumin) a minoritní, avšak biologicky hodnotné globuliny. Globuliny se označují jako imunoglobuliny díky svému ochrannému charakteru. Mezi sérové bílkoviny řadíme také proteózo-peptonovou frakci a transferin [2].

Další bílkovinou syrovátky je kasein, jehož podstatná část ovšem zůstává v sýrenině. Kasein se vyskytuje ve 4 základních frakcích α -, β -, γ -, κ -. Jednotlivé frakce se od sebe liší svými vlastnostmi a chemickou strukturou [11].

1.2.2 Mléčný cukr

Mléčný cukr je kvantitativně nejdůležitější složkou syrovátky. Mléčný cukr neboli laktóza je disacharid složený z D-glukózy a D-galaktózy. Zmíněné monosacharidy jsou navzájem spojeny $\beta(1-4)$ glykosidickou vazbou [2].

Laktóza má dobrou výživovou hodnotu, je zdrojem energie, která je rychle a lehce využitelná. Sladivost laktózy je značně nižší než sladivost např. glukózy či sacharózy, avšak energetický obsah má stejný jako ostatní cukry. Laktóza je citlivá na působení enzymů (i mikrobiálních), hydrolyzuje se zpočátku na monosacharidy a dále až na organické kyseliny (především na kyselinu mléčnou) [13].

Laktóza zaujímá 70 – 80 % z celkového množství syrovátkové sušiny. Vyskytuje se ve dvou izomerních formách. První formou je nehygroskopická α -laktóza a druhou je hygroskopická β -laktóza. Při vysokých teplotách (130 °C) začíná laktóza žloutnout a při teplotách kolem 170 °C a více vzniká hnědý laktokaramel [6]. Rozpustnost α - i β -laktózy je velmi rozdílná. β -laktóza je mnohem více rozpustná při laboratorní teplotě, zatímco α -laktóza až nad 93,5 °C. U mutarotace, která probíhá při pokojové teplotě, převažuje varianta α -laktózy, což se projevuje celkovou nízkou rozpustností laktózy při laboratorní teplotě a značně větší rozpustností při teplotách blízcích se 93 °C [14].

U jedinců s nižším obsahem enzymu β -galaktosidázy v trávicím traktu se může projevit intolerance na mléčný cukr, způsobující především zažívací obtíže [12]. Charakteristickými příznaky laktózové intolerance jsou bolesti břicha, plynatost, křeče a zvracení [13, 15]. Nesnášenlivost mléka se může projevit až v průběhu života. Laktóza totiž není rozštěpena a tak nedochází k její resorpci. Léčba laktózové intolerance spočívá ve vyřazení mléčných výrobků, či jen čerstvého mléka ze stravy pacienta [45].

1.2.3 Dusíkaté látky nebílkovinné povahy

Dusíkaté látky nebílkovinné povahy reprezentují 5 – 7 % veškerého dusíku v mléce. Jedná se zejména o puriny [2]. Jde o tak zanedbatelné množství, že nemá žádný vliv na zisk laktózy ze syrovátky. Dále mezi tyto látky řadíme močovinu, kyselinu močovou, xantin, adenin, amoniak, kreatin, a některé aminokyseliny [16].

1.2.4 Tuk

Tuk se v syrovátce nachází v minimálním množství. Běžně se jedná přibližně o 1 %, množství tuku může stoupat s tučností mléka před zpracováním [17]. V případě dokonalého odstředění syrovátkové smetany se tuk nebude vyskytovat v syrovátce vůbec [2]. V mléčném tuku se vyskytují vitamíny rozpustné v tucích (A, D, E, K), dále zahrnuje celou škálu biologicky aktivních látek, jako např. hormony a enzymy [13].

1.2.5 Kyseliny

V syrovátce se nejčastěji vyskytují tyto organické kyseliny: citronová, mravenčí, propionová, octová a mléčná. Množství a rozmanitost těchto kyselin závisí na druhu syrovátky a také na činnosti a množství mikroflóry v mléce. Vyšší obsah kyselin najdeme v syrovátce

kyselé z výroby tvarohů. Nejvíce bývá zastoupena kyselina citronová ($150 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) a na druhém místě je kyselina mléčná ($40 - 120 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$). Syrovátka kaseinová může zahrnovat také nepatrné množství minerálních kyselin jako např. kyselinu chlorovodíkovou [2].

1.2.6 Vitamíny

Syrovátka má pro svou biologickou hodnotu významné postavení ve výživě [6]. Tato biologická hodnota je dána právě přítomnými vitamíny. Jedná se především o vitamíny rozpustné ve vodě a nepříliš je zastoupena skupina vitamínů rozpustných v tucích. Nejvíce jsou zastoupeny vitamíny skupiny B (B_1 , B_2 , B_5 , B_6 , B_{12}), vitamín C, biotin a vitamín A [2].

Mléko kravské či jiných přežvýkavců obsahuje významné množství riboflavinu – vitamínu B_2 . V kyselém prostředí je tento vitamín rezistentní vůči ohřevu ($120 \text{ }^\circ\text{C}$) a účinku oxidačních činidel. Veškerý riboflavin odchází při výrobě sýrů z mléka do syrovátky [13].

Zastoupení vitamínů v syrovátce se liší podle typu syrovátky, tyto rozdíly jsou představeny v Tabulce č. 2.

Tabulka č. 2: Obsah vitamínů v sušené syrovátce [2]

Vitamín	Syrovátka sladká	Syrovátka kyselá
Vitamín B_1 ($\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	0,38 – 0,59	0,35 – 0,58
Vitamín B_2 ($\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	1,70 – 2,92	1,57 – 2,35
Vitamín B_3 ($\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	0,76 – 2,03	0,61 – 2,51
Vitamín B_5 ($\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	8,2 – 15,0	7,0 – 14,2
Vitamín B_6 ($\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	0,36 – 0,77	0,46 – 0,96
Vitamín B_9 ($\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	4,2 – 30,0	14,6 – 59,4
Vitamín B_{12} ($\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	0,9 – 3,7	0,15 – 3,7
Vitamín C ($\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	0 – 9,08	0 – 0,99
Biotin ($\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	8,2 – 15,0	7,0 – 14,2
Vitamín A ($\text{MJ} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	69 – 240	47 – 165
Vitamín E ($\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	14 – 249	19 – 169

1.2.7 Minerální látky a stopové prvky

Popeloviny neboli minerální látky jsou nedílnou součástí syrovátky. Minerální látky se nachází ve dvou formách, a to v organické a anorganické. Organická forma (0,1 – 0,4 %), zastupující minoritní stranu, je tvořena solemi kyseliny citronové, mléčné, fosforečné, uhlíčitě popřípadě chlorovodíkové a sírové. Druhou formou minerálních látek, majoritní, je forma anorganická (0,6 – 0,7 %). Do této skupiny řadíme draslík, sodík, hořčík, síru, železo, chlór, a to ve formě ionizované [2]. Složkou minerálních látek jsou fosforečné a vápenaté soli [6]. Obsah minerálních látek v syrovátce je zobrazen v Tabulce č. 3.

Tabulka č. 3: Obsah minerálních látek v sušené syrovátce [2]

Minerální látky	Obsah
Draslík ($\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	130
Vápník ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	60
Sodík ($\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	42
Hořčík ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	8
Zinek ($\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	0,3
Železo ($\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	67
Jód ($\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	8,6
Měď ($\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	1
Kobalt ($\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	0,8

1.3 Zpracování syrovátky

Technologické zpracování syrovátky je spjato s důležitou vlastností mléka, jde o vlastnost srážení. Srážení je proces, při kterém dochází k přechodu z koloidního roztoku do stavu sraženiny [8]. Účelem zpracování syrovátky je především získání využitelných a velmi drahocenných surovin [2]. Během zpracování syrovátky se získávají konkrétní cenné slož-

ky (především bílkoviny a laktóza), sloužící také např. jako živné medium při fermentačních procesech [18].

Zpracování syrovátky lze rozdělit do následujících kroků: příprava a demineralizace syrovátky, krystalizace laktózy, zahušťování syrovátky a sušení.

1.3.1 Příprava syrovátky před dalším zpracováním

Syrovátka se před dalším zpracováním musí upravit. Jedná se především o negativní ovlivnění během dalšího zpracování, musí se tedy syrovátka zbavit nežádoucí sraženiny tzv. sýrašského prachu. Pokud by tento krok nebyl učiněn, mohlo by dojít k znehodnocení výsledného produktu. Pro odstranění sýrašského prachu se používá úkonu usazování, scezování a odstředování. Při čištění jde především o množství a velikost částic. Dalším důležitým postupem je odstranění tuku odstředěním. Jedná-li se o syrovátku z výroby sýrů, která obsahuje obvykle vyšší množství tuku, je dobré odstranit i malé množství tuku pro lepší následný průběh zpracování. Za pomoci odstředivky lze dosáhnout obsahu tuku 0,5 %, což lze považovat za tolerantní množství. Závěrečným procesem je pasterace, tento krok je důležitý hlavně z hlediska mikrobiologické a chemické údržnosti syrovátky. Pasterace se obvykle realizuje při 72 – 78 °C po dobu 15 – 20 s. Tímto zákrokem dojde k inaktivaci alkalické fosfatázy, která je indikátorem správně provedené pasterace. Syrovátka je následně zchlazena na 5 °C [2, 20].

1.3.2 Demineralizace

Demineralizace je odstranění minerálních látek a solí ze syrovátky. Minerální látky v syrovátce tvoří 6 – 15 % sušiny. Demineralizace je nutným požadavkem pro další zpracování a také pro další využití v potravinářském průmyslu. Soli negativně ovlivňují senzorické hodnocení produktu a jsou nežádoucí i v krmivářství [2]. Při demineralizaci se s největší frekvencí využívá elektrodialýza, která se pokládá za membránový proces poskytující separaci jednotlivých látek [19]. Demineralizace lze také provádět pomocí gelové filtrace, iontoměníčů a membránovými technikami – včetně zmíněné elektrodialýzy. Syrovátka zbavená soli (diluát) reprezentuje 90 – 95 % původní suroviny, koncentrát soli potom 5 – 10 % [2].

1.3.3 Krystalizace laktózy

Krystalizace laktózy se během zpracování syrovátky provádí především za účelem snížit či úplně zabránit negativnímu vlivu laktózy na syrovátku. Jde zejména o komplikace při zahušťování a sušení jako je vysoká viskozita, lepivosti či hygroskopicitu. Např. α -hydrát laktózy, při normálních podmínkách stabilní, se mění vlivem zahřívání (65 °C) syrovátky na α -anhydrid. Ten je velmi silně hygroskopický a má za následek lepivost syrovátkového prášku [6].

Krystalizace laktózy probíhá při teplotě 20 – 25 °C a po dobu 2 – 24 hodin v krystalizačním tanku. Následně dochází k ochlazení syrovátky [19]. Přibližně 70 % laktózy je ve formě malých krystalů, které již nezpůsobují obtíže při dalším zpracování [2]. Krystalizace laktózy může také sloužit k úplnému oddělení laktózy ze syrovátky. Syrovátka se zahušťuje na sušinu 58 – 62 % při teplotě 70 °C v odpařovací stanici. Krystalizace je způsobena řízeným chlazením a setím, izolované krystaly jsou dále odděleny od matečného louhu v dekantacní odstředivce. Oddělené krystaly jsou promývány a následně sušeny. Matečný louh je opět zahuštěn a sušen. Takto upravený matečný louh je označen jako delaktóvaná sušená syrovátka [21].

1.3.4 Zahušťování syrovátky

Syrovátka obsahuje 93 – 95 % vody. Tento fakt znamená velké ekonomické a technologické problémy. Odstranění určitého množství vody se nejčastěji provádí pomocí odparky. S největší frekvencí se v mlékařství využívají vícestupňové filmové odparky s padajícím (klesajícím) filmem. Syrovátka se zahušťuje na požadovanou sušinu (kolem 50 – 60 %), při teplotě do 75 °C. Tato teplota je volena v souvislosti s možnou denaturací bílkovin. Pro pekárenské účely je možné zahušťovat syrovátku teplotou nad 75 °C [2].

Konstrukce odparky musí být v takovém stavu, aby nedocházelo k pění syrovátky. K pění je více náchylná syrovátka sladká, syrovátka kyselá je k pění náchylná spíše méně [6]. Zahušťování syrovátky je možno také provádět pomocí membránového postupu reverzní osmózy, kdy přes membránu projdou pouze molekuly vody. Lze tímto způsobem zahustit syrovátku na 25 % sušiny. Velkou výhodou reverzní osmózy je, že nedochází k denaturaci bílkovin [21]. Během zahuštění syrovátky na 65 % a více mohou krystaly laktózy vypadnout už během odpařování [6].

1.3.5 Sušení syrovátky

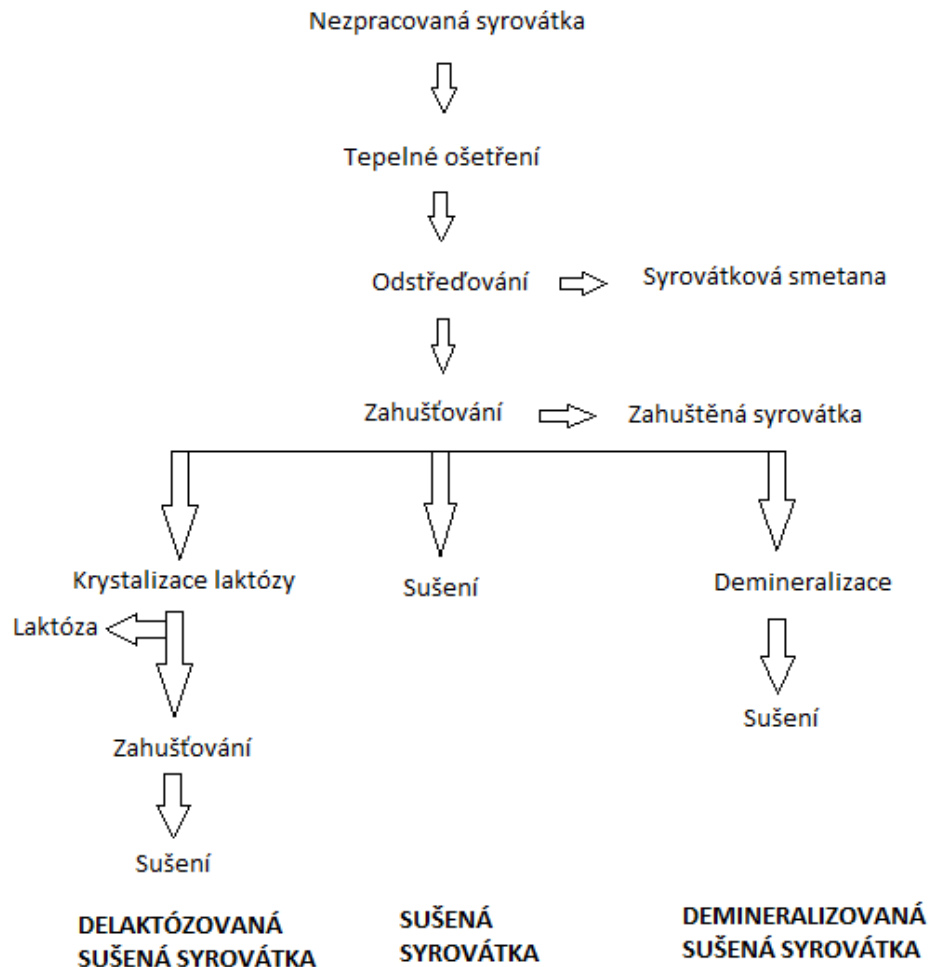
Sušení syrovátky se provádí za účelem odstranění podstatné části vody ze syrovátky. Musí se volit taková teplota, aby nedocházelo k poškození bílkovin, které jsou na teplotu citlivé. Pro udržení jejich fyzikálně-chemických vlastností a výživové hodnoty se využívají nižší teploty sušení. Realizace sušícího procesu závisí na viskozitě syrovátky, která je dána koncentrací jednotlivých komponentů, teplotou, fází krystalizace laktózy, množství a velikostí krystalů, typem a pH syrovátky a také obsahem bílkovin [2].

Sušení syrovátky můžeme rozdělit na sušení ve válcových sušárnách nebo sušení v rozprašovacích sušárnách. Sušení syrovátky ve válcových sušárnách je velmi komplikovaný způsob zpracování z důvodů vyššího obsahu laktózy [19]. Vedle laktózy také způsobuje problémy kyselina mléčná, která je velmi hygroskopická a lepí se na strojní zařízení sušičky a tím snižuje účinnost sušícího procesu. Proto se u syrovátky kyselé před sušením musí provést neutralizace hydroxidem vápenatým nebo hořečnatým [22]. Při sušení syrovátky v rozprašovací sušárně nastává odpaření vody. Tento proces zařazujeme mezi nejrozšířenější způsob při zpracování syrovátky. Získaná sušená syrovátka má okolo 95 % sušiny. Složení syrovátky se odvíjí od stupně úpravy před samotným sušením [2]. Postup sušení syrovátky je zobrazen na Obrázku č. 1.

1.3.6 Separační metody

S rostoucím rozvojem technologie se také v potravinářství uplatňují metody dříve nepoužívané. Během zpracování syrovátky se s novou dobou a vývojem využívají moderní metody jako např. separační metody založené na membránových procesech. Mezi tyto metody řadíme ultrafiltraci, gelovou filtraci, reverzní osmózu a elektrodialýzu [23]. Základním principem membránové filtrace je separace tekutiny na dvě hlavní složky – permeát a retentát. Separace probíhá průchodem kapaliny přes polopropustnou membránu [24].

Ultrafiltrace se odvíjí od dělení látek na základě molekulových hmotností. Látky, které mají nižší molekulovou hmotnost, prochází membránou jako permeát. Látky s vyšší molekulovou hmotností proudí naopak ve formě koncentrátu. Při této metodě se nejvíce využívá tlak 0,07 – 3,5 MPa, a je možno získat částice o velikosti 10^{-5} – 10^{-8} [2, 6, 23].



Obrázek č. 1: Postup zpracování sušené syrovátky [21]

Gelová filtrace má za úkol oddělit frakce o různé velikosti molekul. Gelová filtrace se nejčastěji využívá k oddělení bílkovin od ostatních složek syrovátky. Také touto metodou můžeme získat roztok minerálních solí či laktózu [6, 23].

Reverzní osmóza je proces, při kterém dochází k zahušťování syrovátky. K odstranění vody se využívá tlak 30 – 40 barů a teplota kolem 25 – 30 °C [2, 23].

Poslední uvedenou metodou je elektrodialýza. Tato metoda je vhodná k odsolování syrovátky, k tzv. demineralizaci. Princip této metody se zakládá na tom, že se ionty ze syrovátky (roztoku) odstraňují za podpory elektrického napětí a iontových selektivních membrán [23].

1.4 Mikrobiologie syrovátky

Syrovátka je pro své chemické složení výborným živným médiem pro velkou škálu mikroorganismů. Je to především dáno vysokým obsahem vody, ve které se mohou vyskytovat jak patogenní mikroorganismy, tak i bakterie, kvasinky či houbové mikroorganismy [25]. Nejčastěji se v syrovátce nacházejí bakterie mléčného kvašení (BMK). Nejrozšířenějším rodem BMK je rod *Lactobacillus* zahrnující se do čeledi *Lactobacillaceae*. Dále do BMK řadíme rod *Leuconostoc* z čeledi *Leuconostocaceae* [27].

Nelze opomenout rozšířenou skupinu mikroorganismů z čeledi *Enterobacteriaceae* a stafylokoky. Předním zástupcem čeledi *Enterobacteriaceae* a hlavním zástupcem koliformních mikroorganismů je *Escherichia coli*. Tato bakterie je součástí střevní mikroflóry teplokrevných zvířat i člověka, avšak její výskyt v syrovátce je považován za indikátor fekálního znečištění. Dalším velmi důležitým mikroorganizmem vyskytujícím se v syrovátce je *Staphylococcus aureus*. Významným negativem tohoto patogenu jsou jeho enterotoxiny, které jsou zodpovědné za vznik některých alimentárních či alergických onemocnění [26]. Mezi patogenní mikroorganismy pak rovněž řadíme *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes* a také rod *Salmonella* [28].

1.5 Využití syrovátky

Tato kapitola je zaměřena na nefermentační využití syrovátky, tedy především využití ke krmným účelům a dále jako přísada do různých potravin. Ke krmným účelům může být syrovátka buď v tekutém stavu, nebo jako složka krmných směsí. Syrovátku lze považovat za významnou součást ve výživě všech druhů hospodářských zvířat. Syrovátka má velmi pozitivní vliv na zdravotní stav zvířat. Více se dává přednost sušené syrovátce. Zvláště ve výživě selat a telat v brzkém období odstavu je sušená syrovátka přidávána k mléčným krmným směsím. Je také velmi důležitým doplňkem krmných dávek pro mladá hospodářská zvířata, prasata, dojnice a drůbež [6, 72].

Kromě zkrmování se syrovátka využívá v pekárenském, masném a mléčném průmyslu. V neposlední řadě lze syrovátku přidávat do suchých směsí a polévek. V současnosti se sladká syrovátka v pekárenském průmyslu využívá denně, zatímco u kyselé syrovátky lze přemýšlet pouze nad kvasem a obdobnými produkty. Je také možné v tomto průmyslu využívat nekoncentrovanou syrovátku, ale vzhledem k vysokým nákladům za dopravu se tato

varianta použití syrovátky téměř nevyužívá. Běžným komponentem při výrobě chleba a pečiva se stala sušená syrovátka [39]. Sušenou syrovátkou lze nahradit část mléka nebo jiných složek. Doplňkem sušené syrovátky lze zvýšit nutriční hodnotu pečiva či další jakostní parametry. Přednosti uplatnění sušené syrovátky v pekárenské výrobě mohou být: zadržení vlhkosti, zlepšení textury výrobku, lepší emulgace, hnědnutí, zvýšení obsahu bílkovin ve výrobku [2].

Syrovátka, především její bílkoviny jsou velmi často přidávány do jogurtů jako stabilizátory. Při produkci mražených smetanových krémů lze využít pro navýšení výživové hodnoty tekutou syrovátku v původním stavu, demineralizovanou, zahuštěnou či sušenou syrovátku. Pro zlepšení konzistence výsledného produktu taveného sýra lze také přidávat syrovátku či syrovátkové bílkoviny [2, 6].

V masném průmyslu se syrovátka využívá jako např. náhrada určitého dílu masa. V tomto případě se jedná o koncentrát syrovátkových bílkovin a vody [2]. Tento koncentrát lze využít např. při výrobě uzenin. Přídavkem 4 % bílkovinného koncentrátu se navýší vaznost vody a schopnost emulgace tuků [6].

Biotechnologicky je však nejvýznamnější využití fermentované syrovátky a využití fermentovaných syrovátkových produktů při výrobě potravin. Tato problematika bude rozebrána v následující kapitole této práce.

2 FERMENTACE SYROVÁTKY

Fermentace (kvašení) je biochemický děj, při kterém se organické látky přeměňují za účasti mikrobiálních enzymů na jednodušší látky. Fermentace syrovátky je jednou z hlavních možností využití syrovátky. Jedná se o nejrozšířenější pravděpodobnost zpracování. Tento fakt je dán především obsahem cukru v syrovátce. Vzhledem k tomu, že syrovátka obsahuje 4,5 % sacharidů, je příhodným substrátem pro BMK, kvasinky či plísně. Tyto mikroorganismy produkují během fermentace hodnotné látky, díky kterým se fermentované produkty ze syrovátky dostávají do popředí našeho zájmu. Laktóza v syrovátce (případně po rozštěpení na glukózu a galaktózu) může mít za úkol produkci biomasy, etanolu, bioplynu. Dále také slouží k produkci organických kyselin, aminokyselin, polysacharidů, vitamínů, enzymů a ochucovacích látek, nebo k zhotovení nápojů [2].

2.1 Fermentace laktózy

Laktózu je možné nalézt v mléce i v syrovátce, ve které plní funkci primárního zdroje energie pro mikrobiální metabolismus BMK. Díky těmto bakteriím je laktóza velmi dobře zkvasitelná na glukózu a galaktózu. Glukóza je metabolizována na mléčnou kyselinu, a galaktóza je uvolňována do média [53, 54]. Kyselina mléčná se ve velké míře používá při výrobě kysaných mléčných výrobků, okyselení vybraných potravin a nápojů či při výrobě polymerních biomateriálů [52]. Nejrozšířenějším postupem jejího katabolického rozložení je homofermentativní mléčné kvašení. Druhým v menší míře zastoupeným mléčným kvašením je typ heterofermentativní [25].

Alkoholová fermentace je anaerobní kvašení typické pro kvasinky rodu *Saccharomyces* či *Kluyveromyces*. Jedná se o proces přeměny sacharidů na alkohol a oxid uhličitý.

Dále nelze opomenout fermentaci laktózy na etanol za pomoci kvasinek, především kvasinek *Kluyveromyces* spp., kterým bude věnována celá kapitola v této práci [52].

2.1.1 Homofermentativní mléčná fermentace

Bakterie mléčného kvašení fermentují laktózu dvěma metabolickými drahami. Pokud se jedná o homofermentativní druhy, jako např. *Lactococcus lactis*, jsou sacharidy převedeny do buněk systémem fosfotransferáz. Během této cesty jsou sacharidy fosforylovány. Laktóza je fosforylována na laktóza-6-fosfát a hydrolyzována na galaktózu-6-fosfát a glukózu.

Galaktóza-6-fosfát je dále degradován na glycerinaldehyd-3-fosfát. Glukóza je fosforylována na glukózu-6-fosfát. Veškeré fosfátované sacharidy jsou aktivovány na fruktóza-6-bisfosfát. Hromadný produkt fruktóza-1,6-bisfosfát je dále upraven Embden-Meyerhofovou-Parnasovou cestou přes glycerinaldehyd-3-fosfát a jiné metabolity na kyselinu pyrohroznovou. Tato kyselina je pak přeměněna na L(+) kyselinu mléčnou, prakticky jediný produkt homofermentativní fermentace [54, 66].

Druhou možností, uplatňující se převážně u některých představitelů rodu *Lactobacillus*, je laktóza shromažďována specifickou permeázou a pak intercelulárně hydrolyzována β -galaktosidázou na glukózu a galaktózu. Glukóza je metabolizována na kyselinu mléčnou, zatímco galaktóza je propouštěna do růstového média. Postup transformace glukózy na kyselinu mléčnou probíhá tak, že jednotka glukózy dle Embden-Meyerhofova-Parnasova schématu (viz. Obrázek č. 2) přejde fosforylací a izomerací na fruktózu-1,6-bisfosfát, který se díky vlivu aldolázy štěpí na dva triózafosfáty, a to glycerinaldehyd-3-fosfát a dihydroxyacetonfosfát. Glycerinaldehyd-3-fosfát se působením příslušné dehydrogenázy oxiduje a vzniká 1,3-bisfosfoglycerát. Příčinou defosforylace a enolizace vzniká kyselina pyrohroznová [67, 68]. Galaktóza je nejdříve fosforylována na galaktóza-1-fosfát, dále přejde na glukóza-1-fosfát a za pomoci enzymu fosfoglukomutázy vzniká glukóza-6-fosfát, který je meziproduktem glykolýzy [68]. Na Obrázku č. 3 je pak také znázorněna přeměna pyruvátu na acetoin a diacetyl.

Výsledkem homofermentativního kvašení je D, L-kyselina mléčná. Do tohoto typu mléčné fermentace lze zařadit řadu zástupců bakterií jako např.: *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus leichmanii*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus faecium*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* a *Pediococcus acidilactici* [27, 29].

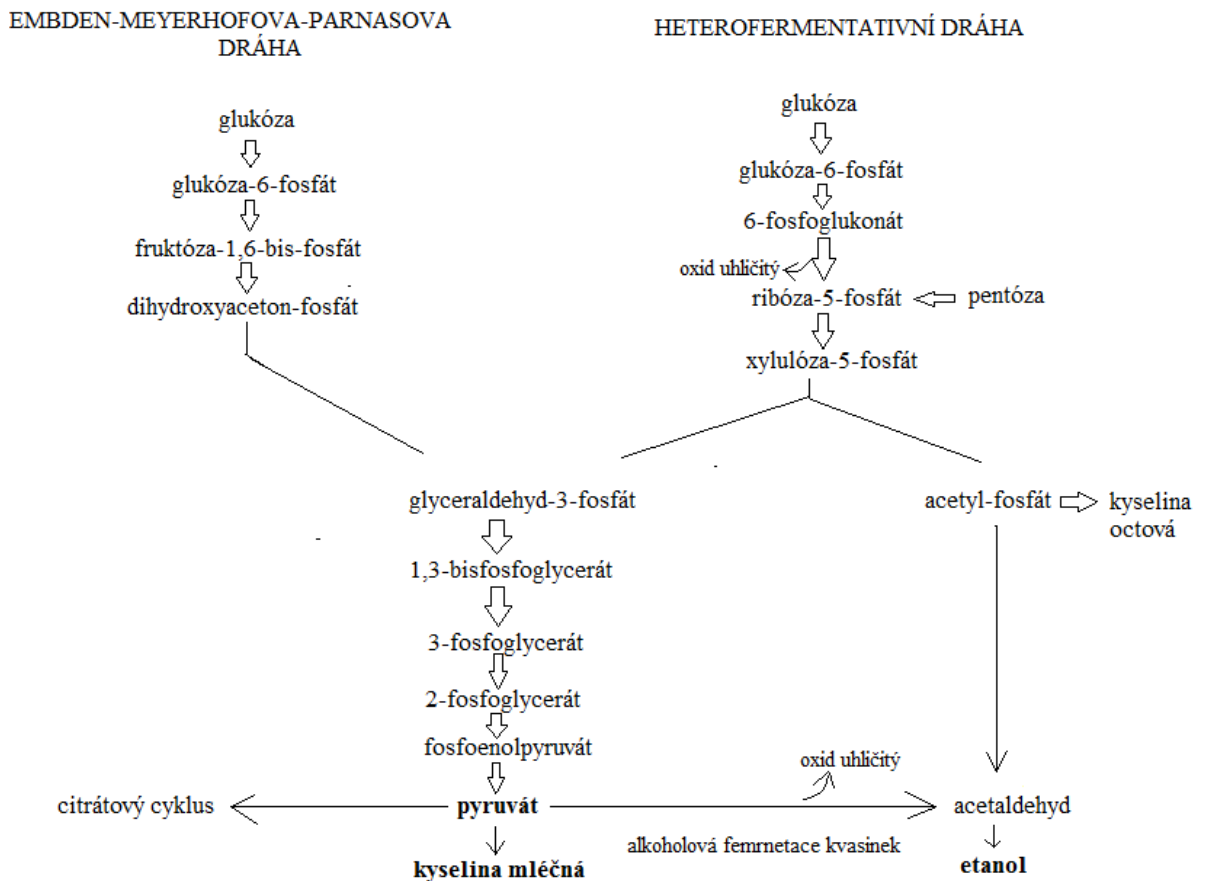
V praktickém ohledu homofermentativní kvašení nikdy nedosáhne 100% konverze, jelikož se může kromě biomasy tvořit různé množství vedlejších produktů [69].

2.1.2 Heterofermentativní mléčná fermentace

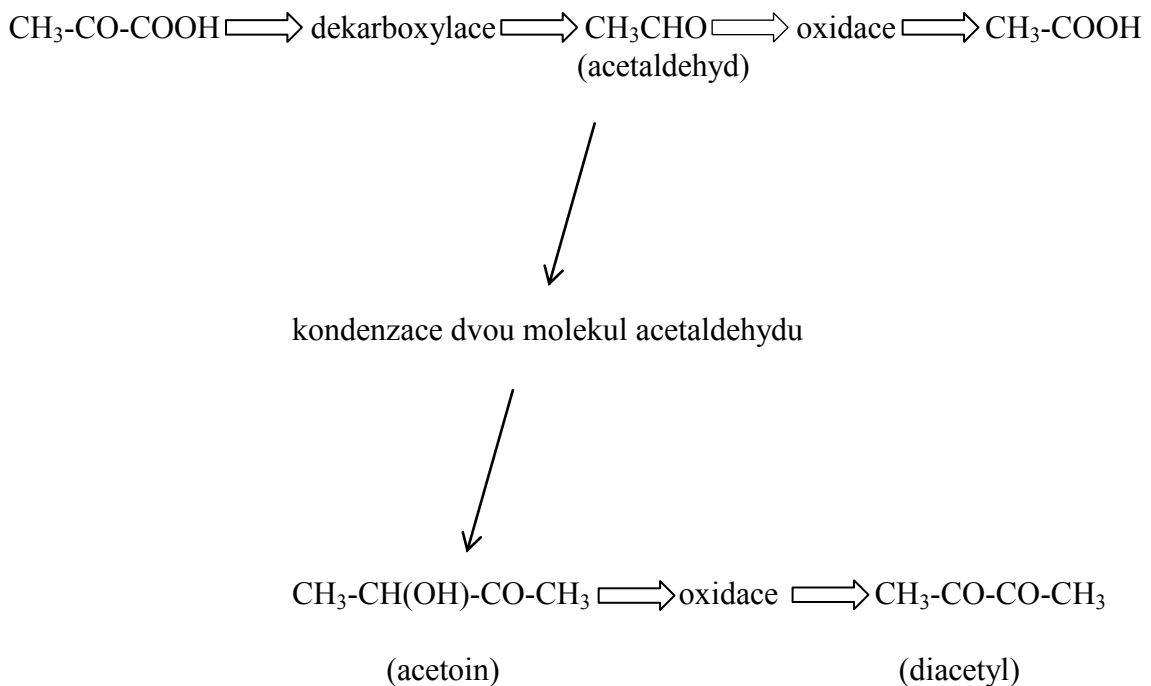
Heterofermentativní bakterie mléčného kvašení vytvářejí stejné množství kyseliny mléčné, etanolu a oxidu uhličitého a stopové množství kyseliny octové. Po vniknutí do buňky jsou intracelulární sacharidy fosforylovány kinázami (např. glukokináza, fruktokináza) na

glukózu-6-fosfát a fruktózu-6-fosfát. Fruktóza-6-fosfát je transformována izomerázou na glukózu-6-fosfát. Glukóza-6-fosfát je dále metabolizována za vzniku oxidu uhličitého na glyceraldehyd-3-fosfát a acetylfosfát. Acetylfosfát je dále přes acetyl-CoA a acetyldehyd přeměněn na etanol. Glyceraldehyd-3-fosfát je přetvořen glykolytickými enzymy na kyselinu pyrohroznovou a pak na L(+) kyselinu mléčnou [66].

Mezi zástupce tohoto typu mléčné fermentace řadíme např.: *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus hilgardii*, *Leuconostoc cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc lactis* nebo *Leuconostoc dextranicum* [27].



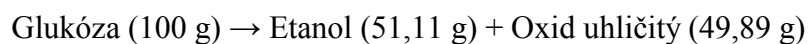
Obrázek č. 2: Homofermentativní a heterofermentativní mléčné kvašení [„upraveno podle“ 75]



Obrázek č. 3: Přeměna pyruvátu na acetoin a diacetyl [27]

2.1.3 Alkoholová fermentace

Přeměnou sacharidů na alkohol se blíže věnoval Pasteur již v 19. století. Alkoholová fermentace se uskutečňuje za anaerobních podmínek. Biochemické procesy v průběhu alkoholové fermentace jsou základním a velmi důležitým procesem v mnoha odvětvích potravinářství. Při alkoholové fermentaci vzniká alkohol a oxid uhličitý na principu přeměny sacharidů. Během této reakce nepřeměňují kvasinky jen cukry na alkohol a jiné vedlejší produkty, ale uvolňují se i aroma a produkují nové sloučeniny. Reakci lze popsat Gay-Lussacovou základní rovnicí alkoholového kvašení. Tato rovnice vystihuje teoretické kvantitativní vztahy mezi cukrem a hlavními zplodinami alkoholové fermentace [70, 74].



Je nutné podotknout, že ze 100 g cukru nevznikne 51,1 g alkoholu ale 47 – 48 g. Příčinou je, že tato rovnice nevyjadřuje složitost enzymatických procesů, kde vzniká kromě hlavních produktů i mnoho vedlejších.

Podstatou reakce je přeměna pyruvátu a produkce etanolu a oxidu uhličitého. Fermentace se uskutečňuje ve dvou krocích. První reakce je dekarboxylace pyruvátu pomocí pyruvát-dekarboxylázy na acetaldehyd, kdy vznikne oxid uhčitý. Druhým postupem je redukce acetaldehydu na etanol katalyzovaná alkoholodehydrogenázou za přítomné oxidace redukovaného kofaktoru NADH na NAD^+ , který se vrací do glykolýzy [71].

2.2 Biotechnologické využití syrovátky v potravinářství

Každý výrobek vyprodukovaný fermentací syrovátky vzniká z metabolismu určitého mikroorganismu, a za použití zcela odlišných podmínek. Těmito podmínkami je možné metabolismus mikroorganismů regulovat (pH, teplota prostředí, množství živin, koncentrace kyslíku) a je možné taktéž řídit průběh fermentace, což je klíčovým postupem, aby nedocházelo k inhibici růstu mikroorganismů a daného metabolitu fermentace [2].

2.2.1 Výroba nápojů

Obchodní síť s fermentovanými nápoji je neustále se vyvíjející oblast potravinářského průmyslu. V dnešní době stoupá spotřeba těchto mléčných nápojů, z nichž syrovátkové nápoje prezentují nové rozvíjející se součásti netradičních mléčných výrobků [30, 31].

Jednou z nejrozšířenějších možností využití syrovátky je výroba nápojů. V tomto případě je značnou výhodou její vysoký obsah vody. Čerstvá syrovátka v tekutém stavu má značné náklady za dopravu a nelze opomenout její tendenci kažení během skladování [32]. Navíc čerstvá syrovátka má nevhodné sensorické vlastnosti [33]. Přes tyto obtíže se osvědčilo zpracování čerstvé syrovátky jako nejlepší ekonomické a především technologické řešení. Hlavně z tohoto důvodu bylo velké úsilí vloženo do rozvoje syrovátkových nápojů, aby byl vyroben nápoj s dobrými sensorickými vlastnostmi, tj. především chutí a vůní [34].

V dnešní době najdeme na obchodních pultech mnoho alternativ syrovátkových nápojů jako např. syrovátkové nápoje s ovocnou složkou, bez alkoholu, alkoholické, se sójou, s hydrolyzovanou laktózou a další. Syrovátkové nápoje jsou určeny pro rozsáhlou řadu konzumentů, od dětí přes dospělé až po seniory [33, 34].

K fermentaci syrovátky se používají s nejpočetnějším zastoupením BMK v kombinaci s kvasinkami (*Kluyveromyces fragilis* nebo *Candida pseudotropicalis*). Je-li syrovátka obohacena sacharózou, tak lze použít i *Saccharomyces cerevisiae*. Tato kvasinka však

laktózu obsaženou v médiu nefermentuje, a ta následně ve fermentovaném nápoji zůstává v nezměněném množství. Substrátem pro tyto mikroorganismy může být jak syrovátka s obsaženými bílkoviny, tak i deproteinovaná syrovátka. Aplikuje-li se proces alkoholového kvašení, je možno získat nápoj s daným obsahem alkoholu, pro tento způsob využití se osvědčila kvasinka *Kluyveromyces marxianus* v imobilizované formě [2]. Produkce syrovátkových nápojů za pomoci mléčného či alkoholového kvašení je jednou z hlavních možností jak přidat významnou hodnotu syrovátce [35].

2.2.2 Výroba sýrů

Podstatnou roli při využití syrovátky v potravinářství hrají také syrovátkové sýry. Syrovátkové sýry jsou stanoveny dle legislativy jako sýry získané koagulací nebo koncentrováním syrovátky s nebo bez přídavku mléka a mléčného tuku [17].

Během zpracování sýrů se využívají syrovátkové bílkovinné produkty buď pro neobvyklý charakter získaných produktů či jako dílčí náhrada dražší suroviny [2]. Syrovátkové sýry můžeme rozdělit do dvou základních druhů. Prvním druhem/typem sýrů je proslulý sýr typu Ricotta. Jde o italský druh sýru obsahující 70 – 80 % vody a 5 % syrovátkových bílkovin především vysrážených teplem. Charakteristická je pro tento sýr také mírně nasládlá až kyselá chuť [17]. Ze 100 kg sladké syrovátky a přídavku 5 kg mléka je možno získat 5 kg Ricotty o složení 2,5 % tuku, 16 % bílkovin, 3,5 % laktózy, 1 % minerálních látek a celkové sušiny 20 – 23 % [38].

Druhým typem syrovátkového sýru je norský typ Mysost (známý také jako Gjetost, Primost, Brunost nebo Gudbrandsdalsost). Jedná se o hnědý syrovátkový sýr [36]. U tohoto typu sýrů má převahu laktóza (33 – 45 % podle daného typu produktu) [37]. Nejpopulárnějším hnědým sýrem v norských oblastech je Gudbrandsdalsost, označovaný jako G-35, obsahující 35 % tuku v sušině. Při výrobě tohoto sýru je do syrovátky z kravského mléka přidávána smetana, kravské či kozí mléko. Dalším méně tučným sýrem z této řady je Mager Mysost, který má 7 % tuku v sušině. Tyto dva zmíněné sýry patří mezi sýry tvrdé. Roztíratelný je pak sýr Primost s obsahem vody přes 30 %. Do sýrů norského typu řadíme dále i Flóte Mysost sýr smetanový syrovátkový a pravý kozí sýr Ekte Gjetost [38].

2.2.3 Výroba polysacharidů a aminokyselin

Výroba polysacharidů vychází ze skutečnosti, že syrovátka je vhodný substrát pro produkci mikrobiálních polysacharidů xantanů např. za pomoci *Xanthomonas campestris* (*Alcaligenes*, *Hansenula* a dalších) [2, 40].

Výroba aminokyselin povstává za pomoci *Brevibacterium lactofermentum* a také *E. coli*, z hydrolyzovaného syrovátkového extraktu, z kterého byl připraven extracelulárně akumulovaný lyzin a treonin [2].

2.2.4 Výroba kyseliny mléčné a propionové

Kyselina mléčná je v mnoha průmyslech (farmaceutický, papírenský, chemický, potravinářský) jednou z nejvyužívanějších kyselin vznikající při fermentaci aplikací BMK (např. *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus*). Jako základ (médium) pro tyto bakterie lze využít jak syrovátku, tak i syrovátkovou melasu [6].

Tento substrát se využívá pro mléčné kvašení, kdy dochází k přeměně laktózy na kyselinu mléčnou pomocí výše zmíněných bakterií. V průběhu fermentace se kyselina neutralizuje uhličitánem vápenatým. Po prokvašení se vzniklé médium zahřeje a následně zfiltruje. Filtrát se zahustí a vytvořený mléčan vápenatý se upraví pomocí kyseliny sírové na kyselinu mléčnou a nerozpustný síran vápenatý, který je nutno oddělit. Z tohoto procesu získanou kyselinu mléčnou lze rafinací vytěžit látku v potravinářské kvalitě. Pokud se přibližně 90 % laktózy ze syrovátky či syrovátkové melasy přemění na kyselinu mléčnou, je výtěžnost 50 % kyseliny mléčné ve vztahu k syrovátce (původnímu obsahu sušiny) 7,5 – 8 % [2].

Pro výrobu kyseliny propionové je příhodným substrátem syrovátka, která je obohacená bílkovinnými hydrolyzáty. Tento způsob fermentace je časově velmi náročným postupem a dosahuje se produktivity 0,45 – 0,75 %. Produktivita je ovlivněna dobou trvání fermentace [2].

2.3 Produkce biomasy, bioplynu a etanolu

Produkce biomasy se převážně koná za účasti kyslíku, což je tzv. za aerobních podmínek. K tomuto procesu je možné využít jak syrovátku, tak i syrovátkovou melasu nebo laktózo-vý permeát. Výroba biomasy se ve světě váže k několika různým postupům (např. systém

SAV (Francie), BELL (Francie) a INCO (Polsko)), které jsou charakterizovány určitými kroky. Tyto systémy povstávají z odlišně koncentrovaného substrátu, z kterého byly či nebyly odňaty bílkoviny nebo soli. K produkci biomasy jsou s největší frekvencí uplatňovány kvasinky *Candida fragilis*, *Candida utilis*, *Candida tropicalis* nebo *Saccharomyces cerevisiae*. Posledním krokem je separace biomasy s následným zkoncentrováním či sušením, tento krok se však aplikuje až po ukončení růstu mikroorganismů [2, 6].

Produkce bioplynu může nastat při fermentaci syrovátky nebo při fermentaci odpadních vod, které tvoří mlékárenské výroby. Produkce bioplynu probíhá za anaerobních podmínek. K zisku bioplynu dochází při štěpení laktózy či dekarboxylaci. Bioplyn je směsí metanu (62 %) a oxidu uhličitého (38 %) [2, 73]. Bioplyn lze využít k produkci tepla, elektrické energie nebo jako palivo [41]. Např. zdroj [42, 46] uvádí, že z 220 000 000 l syrovátky lze získat 775 000 m³ bioplynu.

V přírodním prostředí se etanol nachází volně v důsledku spontánního alkoholového kvašení či dýchání rostlinných organismů. Etanol je hořlavá, bezbarvá a páchnoucí kapalina, kterou lze bez omezení mísit s vodou. Její zápach lze přirovnat k alkoholickému pachu [47]. Etanol vázaný v rozdílných esterech se podílí na tvorbě aroma, značného množství potravin. Má velký vliv na chuť a vůni mnoha nápojů. Také má podstatné účinky na energetickou hodnotu nápojů. Tento energetický účinek je v 1g etanolu roven 29 kJ [48].

V potravinářském průmyslu se etanol využívá pro výrobu lihovin, dezertních vín, k výrobě kyseliny octové, jako konzervační prostředek nebo k výrobě trestí [50]. V širším měřítku se dá hovořit o bohaté možnosti využití etanolu dále např. v průmyslu kosmetickém, farmaceutickém nebo i chemickém [51].

Mezi nejstarší chemické reakce k výrobě etanolu řadíme zkvašování určitých sacharidů či zkvašování obilnin [49]. Etanol lze také produkovat ze sulfítoých výluhů, z celulózoého materiálu nebo syrovátky. Je možné ho dále získat v pekárenském průmyslu z unikajících par v průběhu pečení chleba [47].

Produkce etanolu probíhá za anaerobních podmínek. Zhotovení etanolu lze provést fermentací syrovátky nebo permeátu za pomoci bakterií, kvasinek či plísní s výtěžností 86 – 94 %. Mezi bakterie můžeme zařadit např. *Streptococcus lactis*, mezi kvasinky např. *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae* a mezi plísně např. *Aspergillus niger*. Většina mikroorganismů nemá schopnost přímé přeměny laktózy na

etanol, z tohoto důvodu se provádí hydrolýza laktózy enzymem β -galaktosidázou. Pro produkci etanolu byl navrhnut fermentační přístroj, ve kterém dochází pomocí enzymu ke konverzi syrovátky na alkohol. Závěrečným produktem je 70 % roztok etanolu, který se destilací změní na motorové palivo. Existují však i další postupy (např. „Carbery“), ze kterých vzejde destilát potravinářské kvality a dále ho lze zpracovávat jako lihovinu [2, 43].

3 KVASINKY

Kvasinky jsou heterotrofní eukaryotní organizmy, které patří mezi houby (*Fungi*). Jejich pojmenování je odvozeno od schopnosti zkvašovat monosacharidy a vybrané disacharidy na etanol a oxid uhličitý [26, 29].

Kvasinky rostou především v koloniích sestávajících z jednotlivých buněk s průměrem 3 – 15 μm . Tvar těchto mikroskopických hub je dán rodovou příslušností. Teplota umožňující kvasinkám růst je v rozmezí od $-2 - 48\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dle optimální teploty růstu je možné kvasinky dělit na psychrofilní ($-2 - 20\text{ }^{\circ}\text{C}$), mezofilní ($0 - 48\text{ }^{\circ}\text{C}$) a termofilní (od $20\text{ }^{\circ}\text{C}$) [55, 56].

Tyto organizmy jsou schopné růst v rozsáhlém spektru kyselého pH až do 18 % etanolu. Značné množství kvasinek roste v přítomnosti 55 – 60 % sacharózy. Kvasinky mají schopnost tvorby některých barviv. Množí se zejména nepohlavně (vegetativně), pro ně typickým způsobem rozmnožování je dělení buněk, tzv. pučení [57].

Pro růst kvasinek je nutná přítomnost vzdušného kyslíku. Kvasinky spadají do obligátních aerobů. Avšak značná část kvasinek se řadí do fakultativně anaerobních mikroorganismů. Při anaerobní kultivaci vyžadují alespoň stopové množství [58].

Kvasinky mají nepostradatelný význam ve fermentačním průmyslu. Zejména se jedná o výrobu piva, vína, kvasnic a v neposlední řadě výroba pečiva. Mezi negativní působení kvasinek lze zahrnout kažení masa, ryb, mléčných výrobků, výrobků studené kuchyně a výrobků s vysokým obsahem sacharidů [56].

3.1 Rod *Kluyveromyces*

Rod *Kluyveromyces* se dříve řadil do rodu *Saccharomyces*, v průběhu let však došlo vlivem řady bádání a výzkumů k objevení skutečnosti, že svými morfologickými a fyziologickými znaky se od rodu *Saccharomyces* liší. Od tohoto rodu se rod *Kluyveromyces* liší také absencí hexózové represe dýchání. Rod *Kluyveromyces* se užívá pro výrobu β -galaktosidázy, inulinázy a pektinázy [58, 56].

Druhy rodu *Kluyveromyces* mohou produkovat pseudomycelium, pravé mycelium tvořit nedokážou. V kultivačních kapalných půdách vhodných pro tento rod tvoří tenký povlak. Biomasa tvořená těmito kvasinkami je mnohdy formována hemovými červenohnědými

barvivy. Řadí se mezi teplomilné kvasinky, jejich růst je možný i při teplotách okolo 47 °C [59].

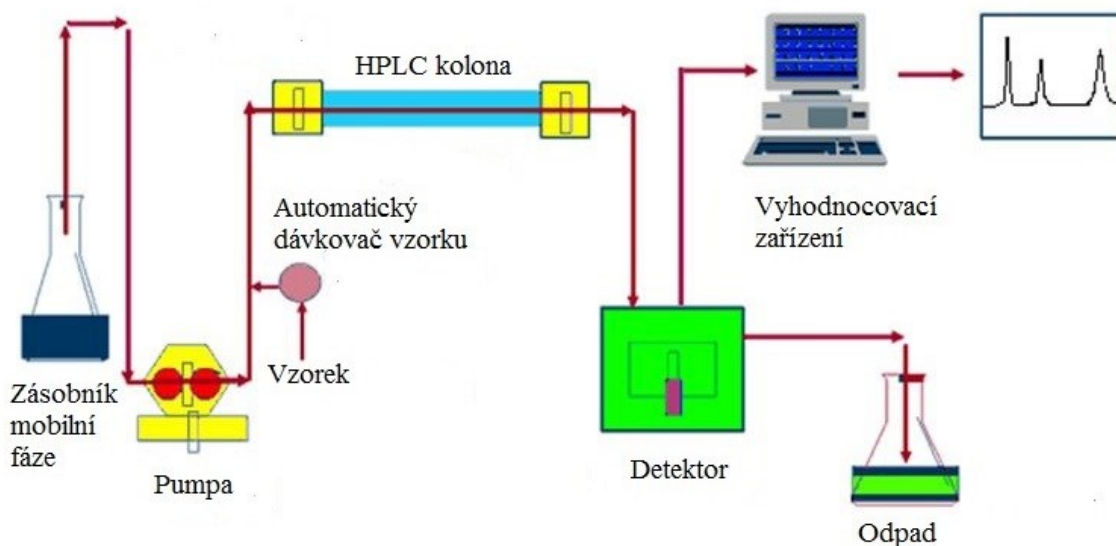
Kluyveromyces marxianus se pokládá za vesměs bezpečný mikroorganismus. Tento mikroorganismus byl kultivován především z mléčných produktů [60]. *Kluyveromyces marxianus* byl studován pro svou zvýšenou lipolytickou produkci enzymů v případě tributyrinu, což vykazuje přednost lipáz vzhledem k triacylglycerolům s krátkými řetězci mastných kyselin. Tepelná stabilita zmíněných enzymů je srovnatelná se stabilitou lipáz termofilních mikroorganismů. *Kluyveromyces marxianus* je zvláště zajímavý mikroorganismus v ohledu na jeho vlastnosti, které z něj činí zvláště vhodného zástupce pro průmyslové aplikace. Mezi ně patří rychlý nárůst ve vybrané půdě, termotolerance, schopnost zkvašovat celou řadu cukrů, sekreci lytických enzymů, a produkci etanolu fermentací [61].

Kluyveromyces lactis tvoří na rozdíl od *Kluyveromyces marxianus* kulovité spóry. Druhý uvedený mikroorganismus tvoří srpkovité či ledvinovité spóry. *Kluyveromyces marxianus* subsp. *lactis* fermentuje laktózu, z tohoto důvodu se využívá k fermentaci mléčné syrovátky. Tato kvasinka je také složkou tzv. keřirových zrn (směs kvasinek a bakterií). Oba tyto mikroorganismy mají takřka shodné využití v potravinářství [26, 58].

4 SLEDOVÁNÍ PRŮBĚHU FERMENTACE SYROVÁTKY POMOCÍ HPLC-RI

Kapalinová chromatografie je jednou z chromatografických separačních metod. Kapalinový chromatograf (viz Obrázek č. 4) je tvořen následujícími částmi: čerpadlo (uchování a doprava mobilní fáze), dávkovač vzorku, kolona (separace látek), detektor a vyhodnocující zařízení (počítač s daným softwarem) [61].

Mobilní fáze se nachází v tzv. zásobnících, které jsou nejčastěji v objemu 0,1 – 2,5 l. Pro dosažení čistoty mobilní fáze se tato fáze čerpá přes filtry. Dalším důležitým technickým vybavením je čerpadlo mobilní fáze, které pumpuje mobilní fázi do systému. Existují dva druhy čerpadel: pístová a stříkačková. Před samotnou kolonou se může nacházet předkolona, která chrání kolonu před mechanickými nečistotami. Kolony mohou být kovové, skleněné, křemenné či plastové. Kolona obsahuje stacionární fázi. Detektory se nachází za kolonou a jejich úkolem je registrace rozdílů v signálu mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze s analytem. Tyto hodnoty (rozdíly) se pomocí počítačového programu vyhodnotí [61, 63].



Obrázek č. 4: Schéma kapalinového chromatografu [76]

4.1 Princip HPLC

Základním principem vysokoúčinné kapalinové chromatografie je vnesení vzorku mezi dvě fáze, které jsou nemísitelné. Zkoumaný vzorek je nanesen na nepohyblivou (stacionární) fázi. U kolonové chromatografie je stacionární fáze tvořena kolonou. Vzorek je unášen pohyblivou (mobilní) fází. Aby se dostal vzorek do vnitřního zařízení přístroje, je nutné mít u kapalinové chromatografie i dávkovací zařízení. Toto zařízení plní směšovací funkci. Pohyb mobilní fáze zajišťuje čerpadlo. Mobilní fáze (eluent) se pohybuje mezi částicemi sorbentu. Na sorbent se zachytávají molekuly vzorku v úsilí dosáhnout rovnovážného rozložení mezi mobilní a stacionární fází. Avšak tato rovnováha je narušována neustále se pohybující mobilní fází. Díky tomuto kroku dochází k separaci složek vzorku. Z kolony vstupuje mobilní fáze přímo do detektoru. V detektoru jsou detekované složky vzorku evidovány do chromatografu. Záznam z chromatografu je znázorněn jako chromatogram tj. grafický záznam signálu. Každý tento signál je v grafu zapsán jako tzv. pík [40].

Pro stanovení cukrů se nejčastěji využívá refraktometrická detekce. Zásadou refraktometrické detekce je měření indexu lomu rozpuštěného eluentu oproti mobilní fázi. Reakce detekce je přímo úměrná rozdílu indexu lomu mobilní fáze v referenční cele a indexu lomu eluátu v měrné cele, která vychází z kolony. Velmi důležitým parametrem je teplota během celého měření, která musí být po celou dobu konstantní. Podstatné je odstranění plynů z mobilní fáze nebo také ze vzorků. Je to velmi důležité pro správnou detekci, neboť ji plyny dokážou ovlivnit nebo dokonce znemožnit. Druhou důležitou skutečností je udržení neměnného průtoku mobilní fáze bez pulsů [61, 38].

Značnou nevýhodou tohoto typu detektoru je jeho snížená citlivost, detekční hranice sacharidů je okolo 5 μg . Refraktometrický detektor lze rozlišovat podle konstrukce na dva základní typy: deflexní (výchylkový) a reflexní (Fresnelův). Reflexní refraktometr je projektován na základě Fresnelova zákona o odrazu světla. Detektor měří na dva fotoelektrické články sílu světla odraženého z fázového rozhraní mezi kapalinou a skleněným hranolem. Měří jak v měrné, tak i ve srovnávací cele. Deflexní refraktometr využívá paprsku vycházejícího ze zdroje, který se odrazí od polopropustného zrcadla ve směru měřicí cely, kde prochází měrnou a referenční celou. Po průchodu oběma celami se paprsek od zrcadla odrazí a vrací se totožnou cestou zpět. Po průchodu polopropustným zrcadlem dopadá na planoparalelní destičku a také na hranu zrcadlového hranolu. Od tohoto hranolu se odrazí na dvoji-

ci spárovaných fotoelektrických čidel. Tento princip způsobí změnu indexu lomu v měrné cele a projeví se výchylkou paprsku dopadajícího na zrcadlový hranol, a na fotoelektrické čidlo dopadne různý světelný tok. Diference těchto světelných toků je transformována na elektrický signál [62].

4.2 Úprava vzorku před stanovením

Ze vzorků fermentované syrovátky se laktóza izoluje pomocí extrakce. Jedná se o přechod složky nacházející se ve směsi látek v kapalně nebo tuhé fázi do jiné kapalně formy. Takto modifikovaný vzorek je nutné upravit pomocí čiření. Krok čiření je prováděn za úkolem odstranit bílkoviny a zákal. V praxi se běžně využívají pro čiření např. kovová čiridla, tani-ny, enzymy, rostlinné uhlí, zeminy nebo také soli kyseliny křemičité. Vzniklou sraženinu je nutné odstranit filtrací [64].

4.3 Stanovení úbytku laktózy pomocí HPLC

V dnešní době se např. pro stanovení laktózy, nárůstu obsahu etanolu a dalších látek v syrovátce či mléčných produktech používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Nejvíce výhodná je kombinace s refraktometrickým detektorem. Vzorek (filtrát) je vstřikován přímo do kolony obsahující stacionární fázi, která je na bázi silikagelu s kyano- nebo aminoskupinami. Jako mobilní fáze se s největší frekvencí používá směs acetonitrilu s vodou. Rychlost průtoku se pohybuje okolo $1 - 2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a retenční čas pro laktózu je mezi 15 – 20 min. Obsah laktózy ve vzorku je kvantifikován srovnáváním píků s píky standardů na základě kalibračních přímek [65].

Stanovením úbytku laktózy či dalších komponentů pomocí kapalinové chromatografie s refraktometrickým detektorem se zabývalo mnoho odborných prací. Např. v práci [79] bylo cílem práce najít vhodnou metodu pro sledování obsahu laktózy a jejích metabolitů při fermentaci syrovátky. V této práci byly zmíněné látky také stanoveny pomocí HPLC s RI detektorem. Rozdílem byly aplikované kultury. Jednalo se o sušené termofilní jogurtové kultury. Stejně jako v této práci, bylo výsledkem snížení obsahu laktózy ve vzorku a zvýšení obsahu jejích metabolitů. Vybraná metoda se i v tomto případě zvolila správně. Další studií, která se touto problematikou zabývala, je práce [80]. V této práci je zmíněn úbytek laktózy při fermentaci syrovátky vybranými mikroorganismy a také produkce etanolu. Je

tedy zřejmé, že kapalinová chromatografie s refraktometrickým detektorem je v této problematice správně zvolenou technikou.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části této práce bylo charakterizovat syrovátku po chemické stránce, její zpracování, mikrobiologii a využití. Dále bylo cílem popsat fermentaci syrovátky (laktózy) se zaměřením na alkoholovou fermentaci s využitím kvasinek *Kluyveromyces marxianus*. V neposlední řadě bylo úkolem zaměřit se na možnost fermentace syrovátky kvasinkami *Kluyveromyces marxianus* pomocí HPLC s refraktometrickou detekcí.

Cílem praktické části bylo sledování průběhu fermentace syrovátky s využitím dvou kmenů kvasinek *Kluyveromyces marxianus*. Pro splnění tohoto cíle byly založeny fermentační pokusy při třech různých teplotách a průběh fermentace (tj. úbytek laktózy) byl sledován v 5 časových intervalech pomocí HPLC-RI. Jako substrát byla použita sušená demineralizovaná syrovátka o 2 různých koncentracích. Dílčím cílem bylo též sledovat průběh enzymatické hydrolýzy laktózy na výchozí monosacharidy pomocí enzymu β -galaktozidáza (laktáza).

6 MATERIÁL A METODY

6.1 Materiál

6.1.1 Fermentační médium a mikroorganizmy

Sušená demineralizovaná syrovátka D90 (Moravia Lacto a.s.)

Kluyveromyces marxianus CCDM 269

Kluyveromyces marxianus CCDM 265

6.1.2 Chemikálie

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

Carrez I (30% ZnSO_4 ; Penta)

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

Ultra čistá voda určená pro kapalinovou chromatografii (přečištěná systémem Aqua MaxTM Ultra 370 Series; Young Lin)

NaOH ($0,25 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; Penta)

Enzym Laktozym 2600L (Sigma-Aldrich)

Směsný standard cukrů (fruktóza, glukóza, galaktóza, sacharóza, maltóza, laktóza; Sigma Aldrich)

6.1.3 Pomůcky

Filtrační papír KA 5 (Papírna Pernštejn Keseg & Rathouzský)

Stříkačkové filtry $0,22 \mu\text{m}$ (Cronus)

Fermentační nádoby s kvasnými zátkami

Běžné laboratorní sklo a pomůcky

6.1.4 Přístroje

Přístrojové vybavení pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii:

- Kapalinový chromatograf Shimadzu LC-20AD Prominence s kvartétní pumpou, pětikanálovým degaserem DGU-20A_{5R}, autosamplerem SIL-20AC_{HT} a diferenciálním refraktometrickým detektorem RID-20A (vše Shimadzu)
- Kolona Agilent Zorbax NH₂ (4,6 x 250 mm x 5 μm)
- Předkolonový cartridge filtr 0,2 μm (Optimize Technologies)

Inkubátor INCU-Line (VWR International)

Analytické váhy GR-200-EC (A & D Instruments)

Magnetické míchadlo MSH-20D (Vitrum)

6.2 Metody

6.2.1 Příprava fermentačního média (obnovené syrovátky)

Sušená syrovátka byla smíchána s teplou deionizovanou vodou. Množství syrovátky a destilované vody bylo vždy řízeno tak, aby byly výsledné koncentrace syrovátky 3 g·100 g⁻¹ (3 % hm.) a 5 g·100 g⁻¹ (5 % hm.). Sušená syrovátka s vodou byla umístěna na magnetické míchadlo, aby došlo k dostatečnému rozpuštění syrovátky bez hrudek a pevných částic. V průběhu míchání bylo měřeno pH a popř. pomocí roztoku NaOH upraveno pH syrovátky na 7.

6.2.2 Pasterace syrovátky

Obnovená syrovátka byla převedena do fermentačních nádob, které byly předem popsány (koncentrace syrovátky, kmen kvasinek, teplota inkubace a čas odběru). Syrovátka byla pasterována při 72 °C po dobu 5 minut (teplota byla kontrolována vpichovým teploměrem umístěným v jedné z nádob). Po pasteraci byly lahve zchlazeny na inokulační teplotu (podle zvolené teploty kultivace).

6.2.3 Příprava kvasinek

Kvasinky kmene *Kluyveromyces marxianus* CCDM 269 a *Kluyveromyces marxianus* CCDM 265 byly pomnoženy v médiu Malt Extract Broth Base při 25 °C po dobu 48 hodin. Před inokulací byla suspenze kvasinek 10x zředěna fyziologickým roztokem.

6.2.4 Aplikace kvasinek do syrovátky

Do pasterované a zchlazené syrovátky byl napipetován 1 ml daného kmene kvasinek z předem připraveného inokula. Na fermentační nádoby byla umístěna kvasná zátka, do které byla nalita převařená voda. Kvasná zátka umožňuje únik kvasných plynů (CO_2) z nádoby, ale neumožní přístup vzduchu dovnitř.

6.2.5 Fermentace a odběr vzorků

Fermentace inokulovaného substrátu probíhala při teplotě 20 °C, 28 °C a 35 °C v inkubátoru. Průběh fermentace byl sledován po dobu 5 dní, ve 24 hodinových intervalech (čas T_0 na počátku fermentace – před inokulací, T_1 po 24 hodinách, T_2 po 48 hodinách, T_3 po 72 hodinách a T_4 po 96 hodinách. V každém intervalu byly odebrány dva paralelní vzorky.

6.2.6 Příprava vzorků pro stanovení laktózy

10 ml vzorku bylo pipetováno do 50 ml baňky. Dále byly přidány 2 ml Carreze I a po promíchání 2 ml Carreze II. Takto vyčiřený vzorek byl po 5 minutách doplněn po rysku destilovanou vodou a filtrován přes filtrační papír. Posledním krokem byla mikrofiltrace vzorku přes stříkačkový filtr do popsané vialky. Každý z paralelně odebraných vzorků byl takto připraven 2x.

6.2.7 Příprava kalibrační řady pro stanovení sacharidů

Nejdříve byl připraven směsný standard sacharidů složený z glukózy, galaktózy, fruktózy, sacharózy, maltózy a laktózy o koncentraci každého cukru $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Z tohoto standardu byla připravena kalibrační řada o koncentraci: $0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, $0,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, $2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, $4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, $6 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, $8 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Na základě regresních rovnic příslušných kalibračních přímek byly vypočítány obsahy jednotlivých cukrů ve vzorcích v $\text{g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (% hm.).

6.2.8 Stanovení sacharidů pomocí HPLC-RI

Sacharidy byly stanoveny za shodných podmínek na kapalinovém chromatografu s refraktometrickým detektorem. Mobilní fází byl 70% acetonitril ve vodě. Složení mobilní fáze zůstalo po celou dobu analýzy totožné (izokratická eluce). Vzorky byly analyzovány při 25 °C a průtoku mobilní fáze rychlostí 1,4 ml·min⁻¹. Délka analýzy byla 20 minut. Každý z připravených vzorků byl analyzován 2x (tj. n = 8).

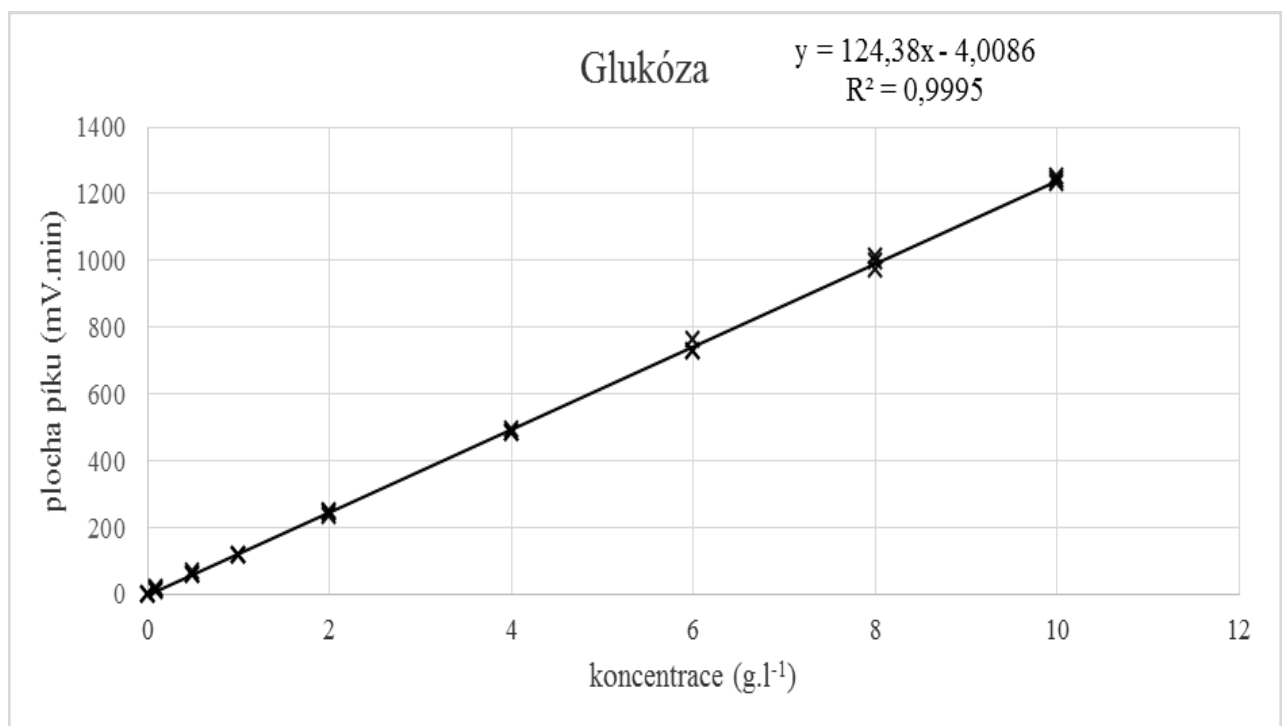
6.2.9 Sledování průběhu enzymatické hydrolyzy laktózy

Obnovená syrovátka o koncentraci 5 g·100 g⁻¹ byla připravena dle postupu uvedeného v kapitole 6.2.1. Do média byl aplikován enzym Laktozym (β-galaktosidáza) v takovém množství, aby výsledná koncentrace v médiu byla 1 g·l⁻¹ a 2 g·l⁻¹. Hydrolyza probíhala v inkubátoru při teplotě 37 °C, což je optimální teplota pro působení enzymu. Průběh hydrolyzy byl sledován po dobu 6 hodin, v hodinových intervalech (čas T₀ na počátku hydrolyzy – před aplikací enzymu), T₁ po 1 hodině, T₂ po 2 hodinách, T₃ po 3 hodinách a T₄ po 4 hodinách T₅ po 5 hodinách a T₆ po 6 hodinách. V každém intervalu byly odebrány dva paralelní vzorky. Příprava vzorků pro stanovení laktózy, glukózy a galaktózy byla provedena dle postupu uvedeného v kapitole 6.2.6 a vlastní stanovení cukrů dle kapitoly 6.2.8.

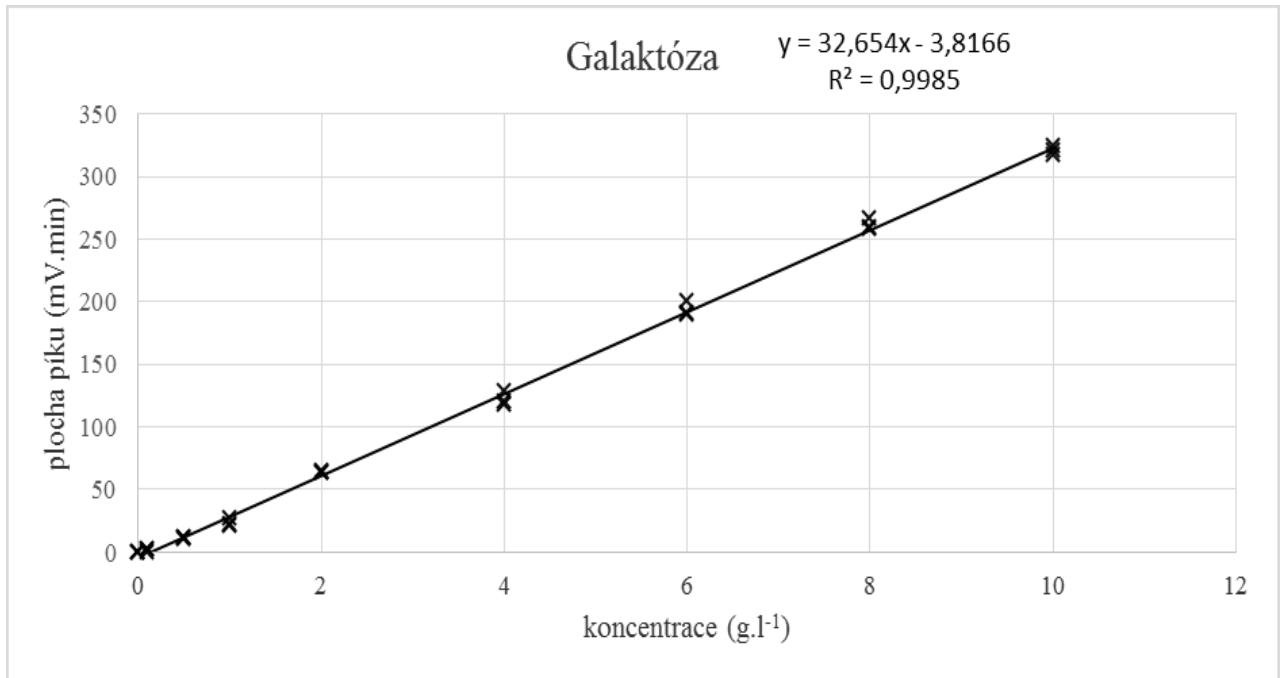
7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Kalibrační přímky vybraných sacharidů

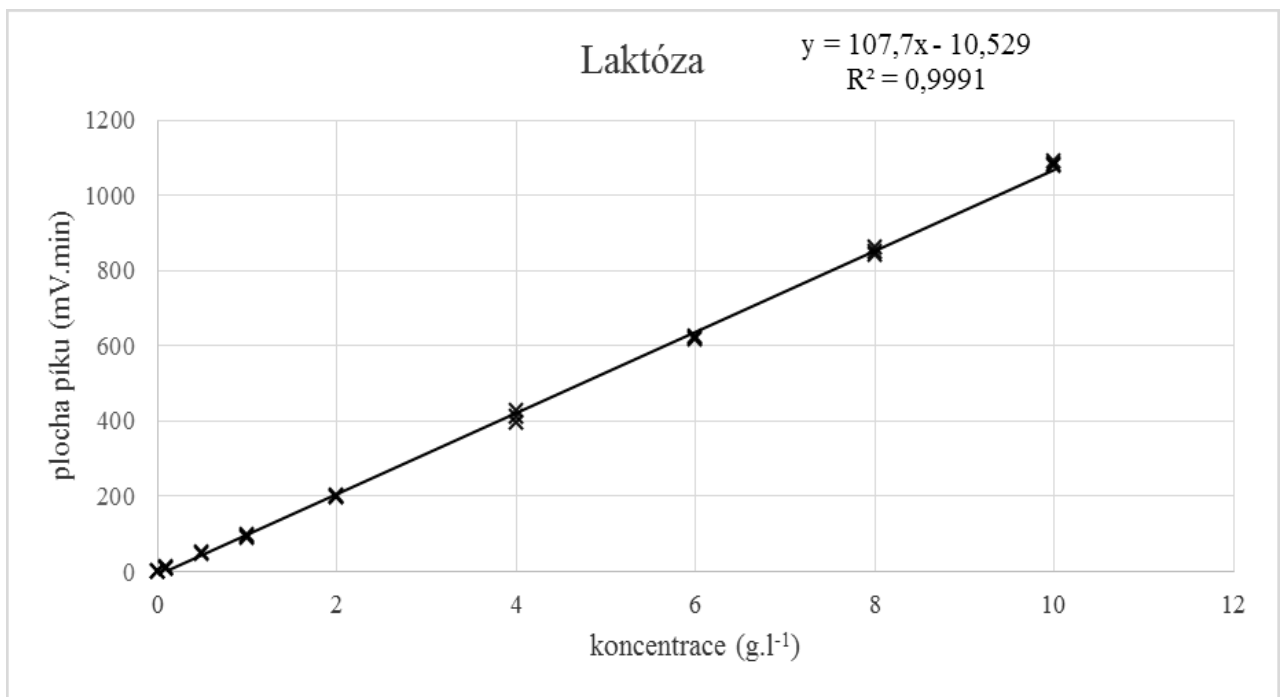
Kalibrační přímky byly sestaveny pro glukózu, galaktózu a laktózu. Koncentrace zásobních roztoků standardů byla 100 g.l^{-1} . Zásobní roztok pro standardy byl zhotoven ředěním na koncentraci $0,1 - 10 \text{ g.l}^{-1}$. Každý samostatný bod kalibrační řady byl proměřen 3x. Kalibrační křivky včetně s rovnicí regrese a korelačním koeficientem jsou zobrazeny na Obrázku č. 5 – 7.



Obrázek č. 5: Kalibrační přímka pro glukózu

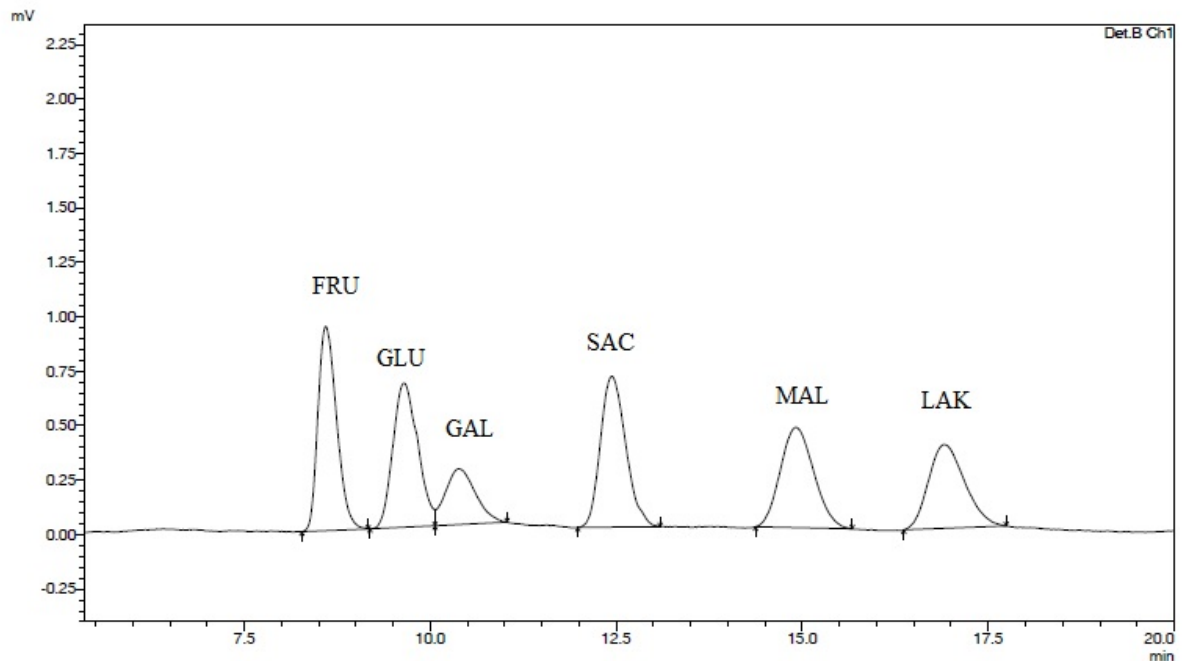


Obrázek č. 6: Kalibrační přímka pro galaktózu



Obrázek č. 7: Kalibrační přímka pro laktózu

Na Obrázku č. 8 je zobrazen chromatogram směšného standardu fruktózy (FRU), glukózy (GLU), galaktózy (GAL), sacharózy (SAC), maltózy (MAL) a laktózy (LAK) o koncentraci 10 g.l^{-1} .

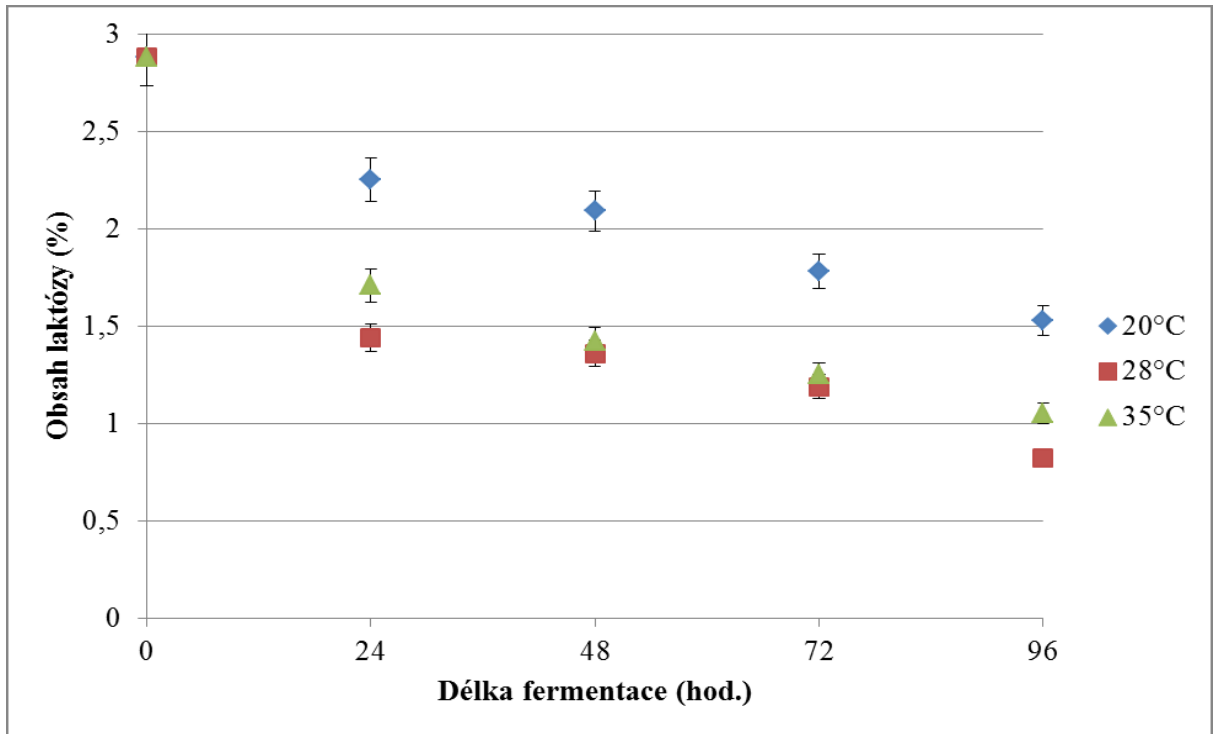


Obrázek č. 8: Chromatogram směsného standardu

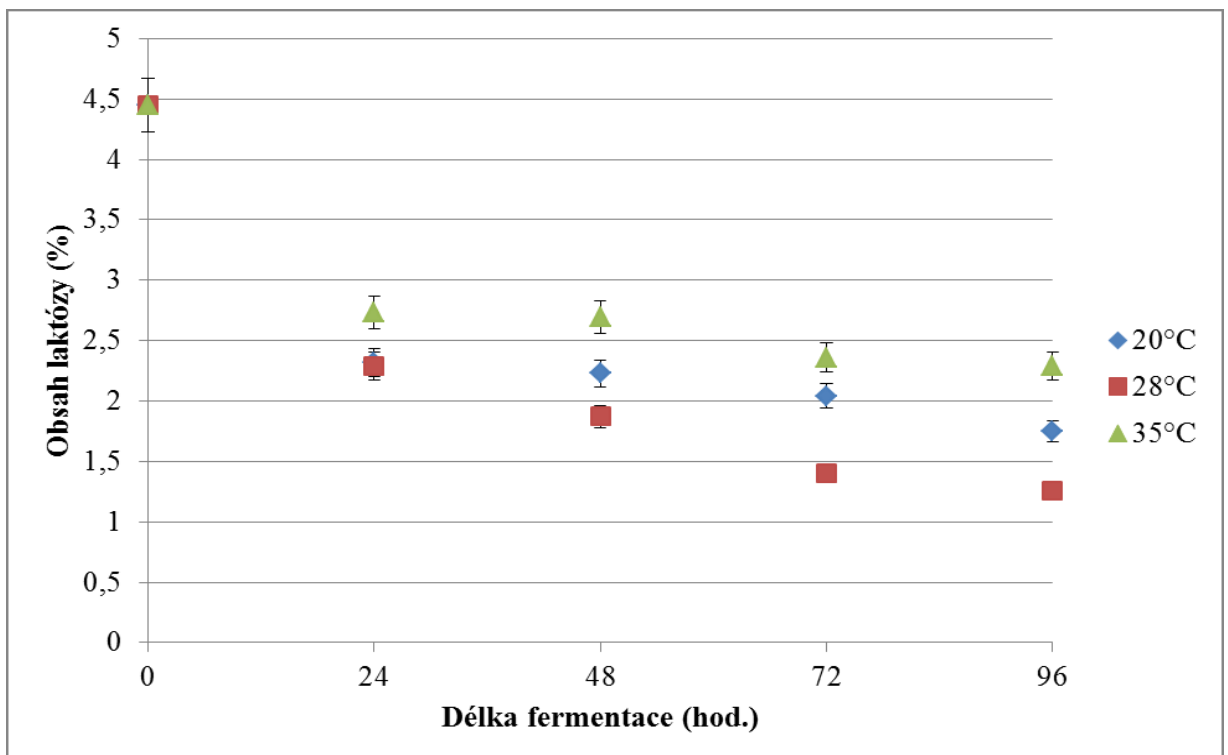
7.2 Stanovení úbytku laktózy pomocí HPLC v syrovátce

Alkoholová fermentace probíhala u obou vybraných kmenů kvasinek *Kluyveromyces marxianus* při teplotách 20 °C, 28 °C a 35 °C. Koncentrace syrovátky byla 3 g·100 g⁻¹ a 5 g·100 g⁻¹.

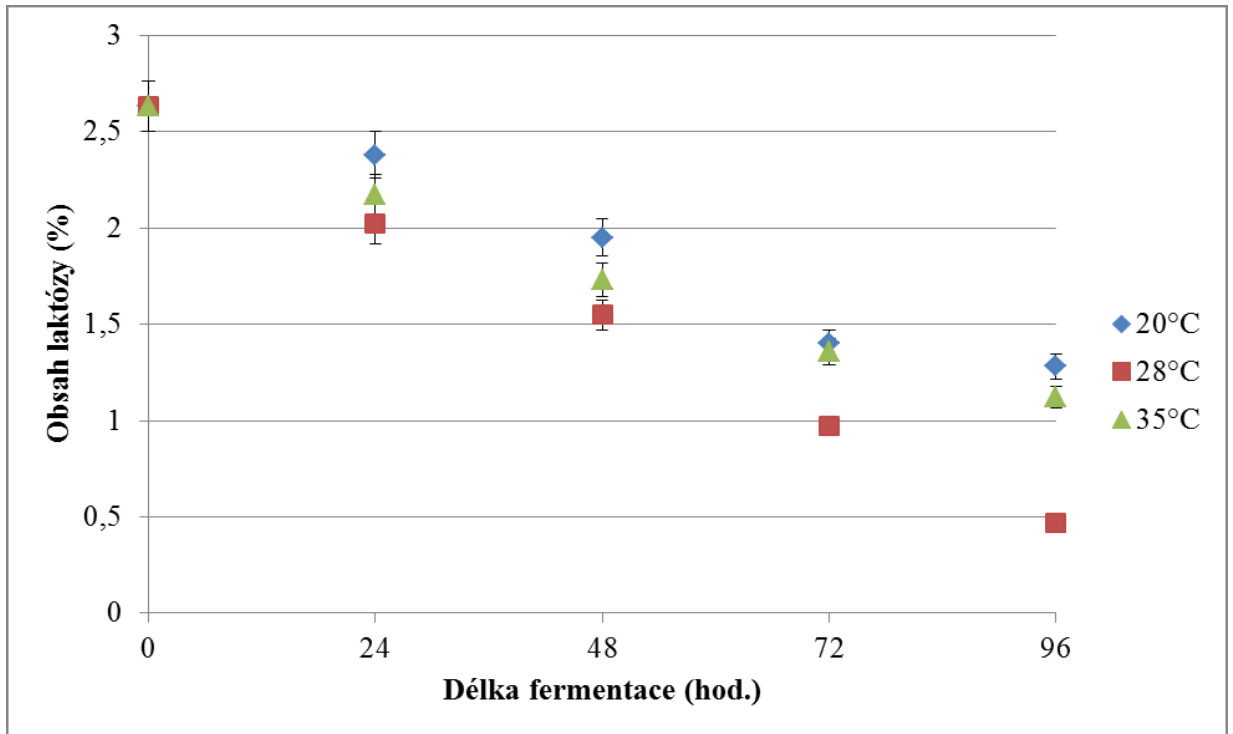
Výsledky sledování změn obsahu laktózy v průběhu fermentace syrovátky pomocí HPLC-RI jsou uvedeny na Obrázku č. 9 – 12. Při tomto sledování ve vybraných vzorcích syrovátky během fermentace bylo zjištěno, že po přidání kvasinek do vzorku došlo k poměrně malému úbytku laktózy, který se však s narůstající délkou fermentace zvyšuje.



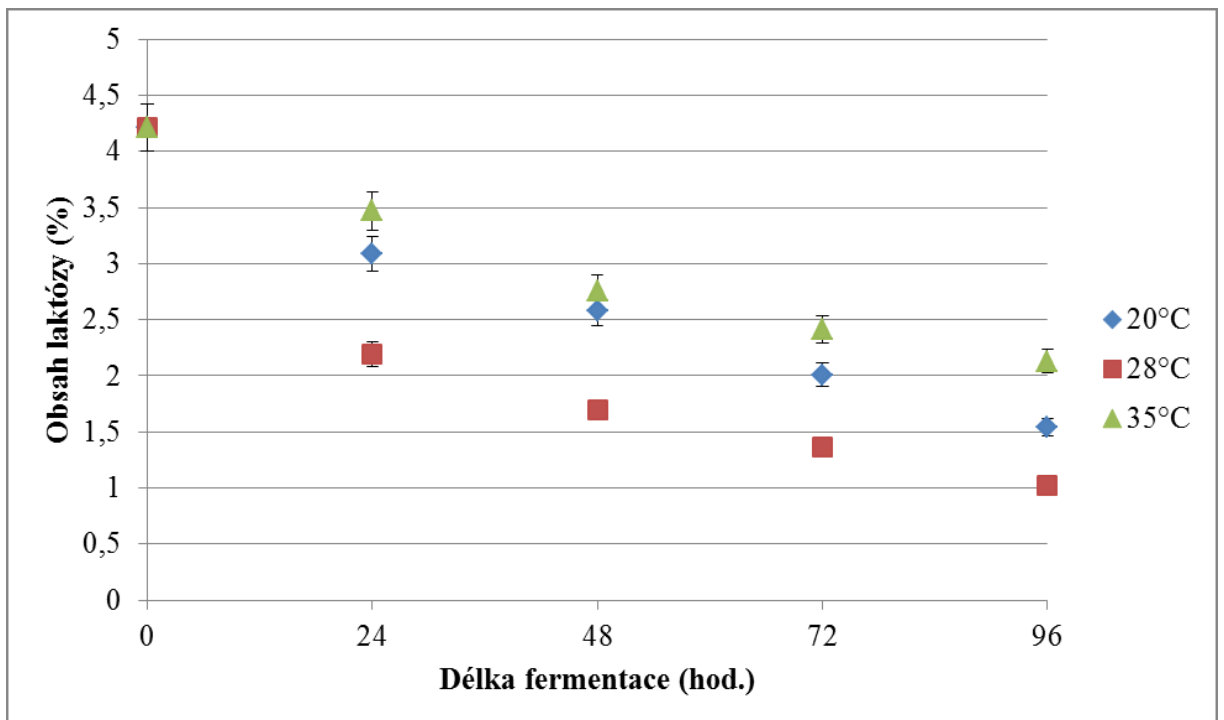
Obrázek č. 9: Fermentace laktózy v syrovátce o koncentraci $3 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, pomocí kvasinek *Kluyveromyces marxianus* CCDM 265



Obrázek č. 10: Fermentace laktózy v syrovátce o koncentraci $5 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, pomocí kvasinek *Kluyveromyces marxianus* CCDM 265



Obrázek č. 11: Fermentace laktózy v syrovátce o koncentraci $3 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, pomocí kvasinek *Kluyveromyces marxianus* CCDM 269



Obrázek č. 12: Fermentace laktózy v syrovátce o koncentraci $5 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, pomocí kvasinek *Kluyveromyces marxianus* CCDM 269

Jak je patrné z výše uvedených Obrázků č. 9 a 10 pro kvasinky kmene *Kluyveromyces marxianus* CCDM 265, se obsah laktózy ve vzorku syrovátky v průběhu fermentace snižoval. U jednotlivých teplot je viditelný rozdíl rychlosti úbytku laktózy. Konstantní úbytek lze sledovat u teploty 20 °C v syrovátce o koncentraci 3 g·100 g⁻¹. Po 24 hodinách došlo k poklesu o 22 %, po 48 hodinách o 27 %, po 72 hodinách o 32 %. Po 4 dnech se obsah laktózy snížil o 47 %. Na rozdíl od teploty 28 °C, která je optimální pro růst kvasinek. Při této teplotě bylo možné očekávat maximální úbytek laktózy a z výsledků je zřejmé, že při této teplotě po 96 hodinách fermentace došlo k vyhodnocení nejnižší hodnoty, došlo k úbytku laktózy téměř o 72 %. Lze tedy říct, že naše očekávání bylo potvrzeno. Při teplotě 35 °C byla laktóza také fermentována více než o 50 % svého původního množství. Při této teplotě byl znatelný pokles obsahu laktózy během prvních 24 hodin fermentace, kdy došlo k úbytku o 41 %.

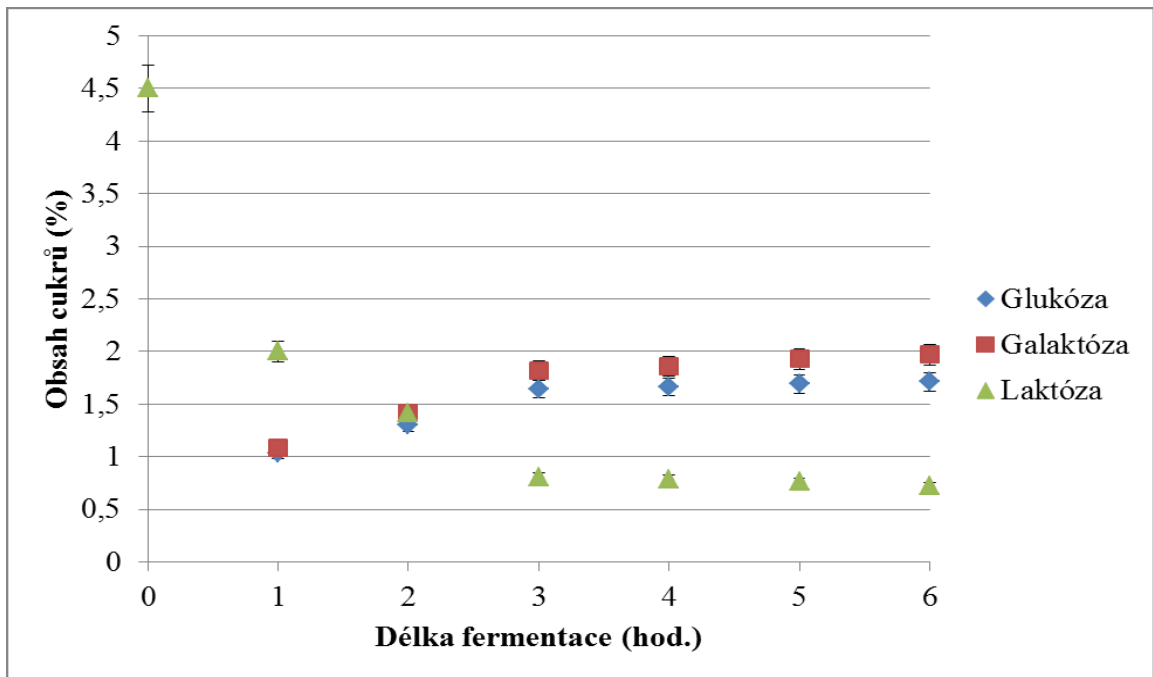
Koncentrace syrovátky měla také velký vliv na konečné množství laktózy ve vzorku. Je zřejmé, že při téměř dvojnásobné koncentraci syrovátky bude i v počátku měření téměř dvojnásobné množství laktózy. Opět u zvýšené koncentrace syrovátky byl největší zaznamenaný úbytek laktózy při teplotě 28 °C. Mezi prvním a druhým odběrem je o 49 % snížené množství laktózy, než tomu bylo u 3 g·100 g⁻¹ koncentrace syrovátky. Tento fakt může být dán rychlejší fermentací kvasinek, neboť měli pro svou činnost možnost fermentovat větší množství substrátu. U teploty 20 °C došlo k poklesu obsahu laktózy po 4 dnech o 60 % a u teploty 35 °C byl po stejném časovém intervalu snížen obsah o 49 %,

Z Obrázku č. 11 a 12 pro kvasinky kmene *Kluyveromyces marxianus* CCDM 269 lze konstatovat, že obsah laktózy také v průběhu fermentace klesal. Stejně jako u předchozího kmene se teplota 28 °C osvědčila u obou koncentrací syrovátky jako optimální pro růst kvasinek a tedy i pro maximální úbytek laktózy. Po ukončení 96 hodinové fermentace u tohoto kmene kvasinek v syrovátce o koncentraci 3 g·100 g⁻¹, při teplotě 28 °C byl zjištěn pokles hodnoty laktózy téměř o 76 %. Při teplotě 20 °C byl obsah laktózy v syrovátce snížen o 10 % po 48 hodinách o 26 % po 72 hodinách o 47 % a v poslední den odběru o 52 %. U stejné teploty ale dvojnásobné koncentrace byl pokles obsahu laktózy po 24 hodinách o 27 % po 48 hodinách o 39 %, po 72 hodinách o 52 % a po 4 dnech o 63 %. Při teplotě 35 °C byl obsah laktózy u obou koncentrací syrovátky po ukončení fermentace téměř o 50 % snížený.

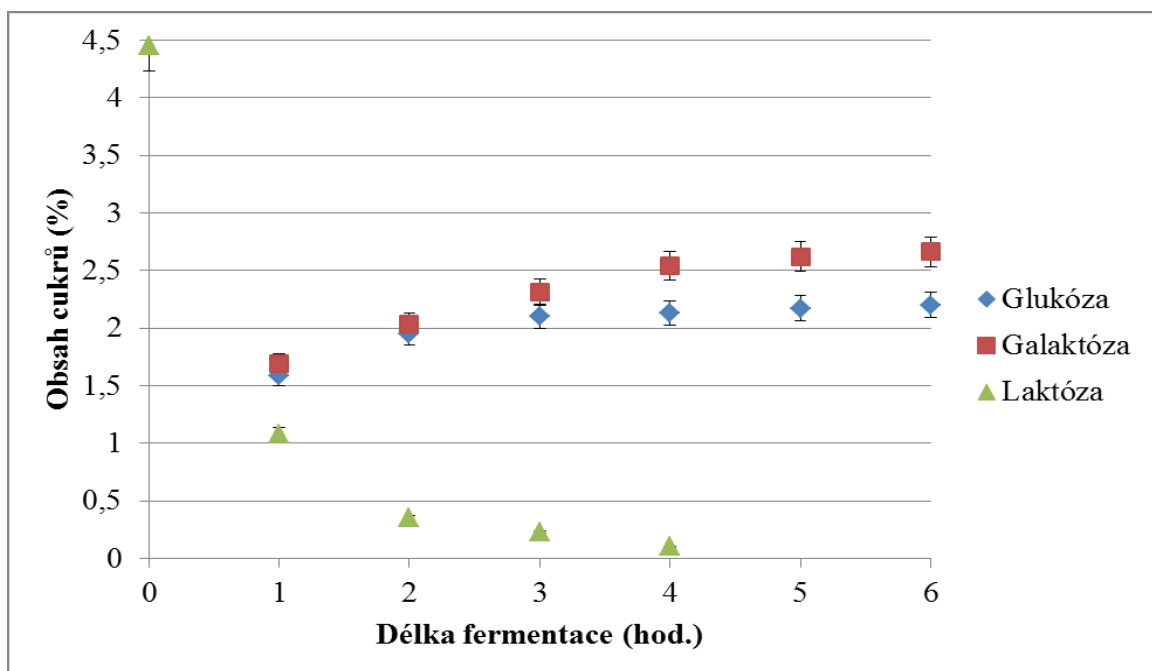
S jistotou lze říct, že je jistě mnoho odborných studií zabývajících se naší problematikou. Je jasné, že kvasinky *Kluyveromyces marxianus* jsou schopny fermentovat syrovátku a tím být prospěšné pro další zpracování a využití tohoto cenného produktu vznikajícího při výrobě sýrů.

7.3 Enzymatická hydrolýza laktózy

Enzymatická hydrolýza laktózy byla provedena u vzorků syrovátky o koncentraci $5 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. Aplikován byl enzym o koncentraci 1 a $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Výsledky stanovení jsou uvedeny na Obrázku č. 13 a 14.



Obrázek č. 13: Enzymatická hydrolýza laktózy pomocí laktázy o koncentraci $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$



Obrázek č. 14: Enzymatická hydrolýza laktózy pomocí laktázy o koncentraci $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$

Při enzymatické hydrolýze laktózy došlo k úbytku laktózy a nárůst hydrolytických produktů, tj. glukózy a galaktózy. Hydrolýza probíhala po celou dobu fermentace rovnoměrným tempem. Je možné tento průběh sledovat u obou koncentrací enzymu. Glukóza a galaktóza se vyskytovaly v téměř shodném množství v každý čas odběru, je však z Obrázku č. 13 a 14 zřejmé, že galaktóza vykazovala nepatrně vyšší množství než druhý hydrolytický produkt glukóza. V počátečním čase 0 u obou koncentrací enzymu nebyla glukóza ani galaktóza stanovena. U koncentrace enzymu $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ byl obsah laktózy po 1 hodině fermentace snížen o 55 %, po 2 hodinách o 68 %, po 3 hodinách o 82 %, po 4 hodinách o 82 %, po 5 hodinách o 82 % a po 6 hodinách fermentace se obsah laktózy snížil až o 84 %. Množství glukózy se po přidavku této koncentrace enzymu navýšilo o 66 % po 6 hodinách fermentace. Obsah galaktózy se navýšil o 81 %.

Dvojnásobná koncentrace enzymu znamenala rychlejší hydrolýzu. Obsah laktózy se během první hodiny fermentace snížil o 76 %, po 2 hodinách o 92 %, po 3 hodinách o 95 % a po 4 hodinách fermentace o 98 %. Již po 5 hodinách byla laktóza úplně hydrolyzována na rozdíl od přidavku poloviční koncentrace enzymu, kde by pro úplnou hydrolýzu bylo zapotřebí pokračovat v délce fermentace minimálně další hodinu či dvě. Množství glukózy se u aplikované dvojnásobné koncentrace enzymu navýšilo o 39 % po 6 hodinách fermentace. Obsah galaktózy se pak navýšil o 57 %.

V práci [80] byla publikována fermentace syrovátky pomocí *Saccharomyces cerevisiae*. Pro stanovení laktózy byla rovněž použita kapalinová chromatografie s refraktometrickou detekcí. Ve všech vzorcích syrovátky byla laktóza zcela fermentována. Výtěžnost etanolu byla 53/59 % – 78/84 %, dle vzorků. V této práci byl také zkoušen kmen kvasinek *Kluyveromyces marxianus*, a také s pozitivním výsledkem fermentace laktózy jako v této diplomové práci.

V odborné publikaci [81] je zaznamenána přeměna syrovátky na alkohol a biomasu pomocí kvasinek *Kluyveromyces marxianus*. Tato práce zdůrazňuje vhodnost pěti různých kmenů kvasinek *Kluyveromyces marxianus* při fermentaci syrovátky. Teploty pokusů byly 30 °C, 34 °C a 37 °C. Koncentrace syrovátky byla v rozpětí od 5 do 15 %. Všechny kmeny fermentovaly syrovátku za úbytku laktózy v odlišných koncentracích použité syrovátky a teploty. Teplota 34 °C se ukázala v této studii jako optimální pro fermentaci syrovátky. Závěrem bylo potvrzení správného výběru v použití kvasinek *Kluyveromyces marxianus* při fermentaci syrovátky.

ZÁVĚR

Tato předložená diplomová práce má posoudit možnosti využití kvasinek *Kluyveromyces marxianus* při fermentaci laktózy v syrovátce. Byla zkoušená fermentace syrovátky kulturami dvou kmenů kvasinek rodu *Kluyveromyces marxianus* při teplotách 20 °C, 28 °C a 35 °C. Úbytek laktózy byl sledován HPLC-RI.

Uspokojivé výsledky byly dosaženy u obou testovaných kmenů. Z výsledků vyplývá, že oba kmeny fermentovaly syrovátku za úbytku laktózy. Nejvýhodnější teplotou pro tuto činnost kvasinek se osvědčila teplota 28 °C. Další dvě testované teploty také zapříčinily úbytek laktózy, avšak zmíněná teplota 28 °C byla optimální. Fermentací syrovátky těmito kmeny byla snížena koncentrace laktózy v syrovátce minimálně o polovinu původního množství. Koncentrace syrovátky měla také významný vliv na průběh fermentace a množství konečné laktózy. U koncentrace 5 g·100 g⁻¹ syrovátky byl znatelný výrazný úbytek v množství laktózy během prvních 24 hodin fermentace.

U enzymatické hydrolýzy laktózy byl evidentní úbytek laktózy v prospěch nárůstu hydrolytických produktů glukózy a galaktózy v obou aplikovaných koncentracích enzymu. V případě přidavku enzymu o koncentraci 2 g·l⁻¹ byla laktóza již po 5 hodinách zcela hydrolyzována.

Syrovátka je důležitým vedlejším produktem v sýrařské technologii, je třeba ji dále zpracovávat a jednou z možností je alkoholová fermentace. V této diplomové práci bylo prokázáno, že kvasinky *Kluyveromyces marxianus* jsou schopny laktózu v syrovátce fermentovat. Dle mého mínění by bylo velmi poutavou možností dále pokračovat v této práci a pokusu. Nesledovat úbytek laktózy jen v průběhu fermentace. Zahrnout do studie i sledování úbytku laktózy po skončení fermentace, nebo zvolit další faktory ovlivňující fermentaci syrovátky. Další poutavou alternativou by mohlo být sledování nárůstu etanolu během fermentace syrovátky.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ČESKO. Vyhláška č. 397 ze dne 12. prosince 2016 o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. In: *Sbírka zákonů české republiky*. 2016, částka 162, 6261 s.
- [2] SUKOVÁ, I., *Syrovátka v potravinářství*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2006, 60 s. ISBN 80-7271-173-3.
- [3] GALLARDO-ESCAMILLA, F. J., KELLY, A. L., DELAHUNTY, C. M.: Sensory Characteristics and Related Volatile Flavor Compound Profiles of Different Types of Whey. *Journal of Dairy Science*, 2005, **88**, 2689 – 2699 s.
- [4] LUKÁŠOVÁ, J., *Hygiena a technologie mléčných výrobků*. Vyd. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2001, 180 s. ISBN 80-7305-415-9.
- [5] KLEIBEUKER, J., Whey in animal nutrition, *A valuable ingredient.*, European Whey Processors Association [online], Belgie, 2006 [cit. 2016-12-11]. Dostupné z: WWW:<<http://ewpa.euromilk.org/publications.html>>.
- [6] FORMAN, L., MERGL M., *Syrovátka: její užití v lidské výživě a ve výživě zvířat*. 1. Vyd. Praha: Středisko technických informací potravinářského průmyslu, 1979, 343 s.
- [7] LIKLER, L.; AUGUSTA, P., *Historie mlékárenství v Čechách, na Moravě a ve Slezsku II*. 1. Vyd. Praha: MILPO MEDIA s.r.o., 2001, 219 s. ISBN 80-86098-19-2.
- [8] NAVRÁTILOVÁ, P., KRÁLOVÁ, M., JANŠTOVÁ, B., PŘIDALOVÁ, H., CUPÁKOVÁ, Š., VORLOVÁ, L., *Hygiena produkce mléka*. 1.Vyd. Brno: VFU, 2012, 129 s. ISBN 978-80-7305-625-4.
- [9] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D., *Potravinářská biochemie I.*, Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2005, 168 s., ISBN 80-7318-295-5.
- [10] LUHOVY B., AKHAVON T., ANDERSEN H., Whey Proteins in the Regulation of Food Intake and Satiety, *Journal of the Am. College of Nutrition*, 2007, **26**, 704 – 712 s.
- [11] ROGINSKI, H. *Encyklopedia of Dairy Science*. London: Academic Press, 2003, 907 s., ISBN 0-12-227235-8.
- [12] HŘIVNA L., *Technologie sacharidů*. 1. Vyd. Brno: Mendelova univerzita v Brně. 2014, 158 s., ISBN 978-80-7509-022-5.
- [13] PAVELKA, A., *Mléčné výrobky pro naše zdraví*. 1. Vyd. Brno: Litera, 1996, 105 s. ISBN 80-85763-09-5.

- [14] JELEN, P., MICHEL, C., Sensory impact in protein-standardised milk. *Milchwissenschaft*, 1999, **54**, 438 – 441 s.
- [15] SHORTT C., O'BRIEN, J., *Handbook of Functional Dairy Product*, CRC Press, 2004, 293 s.
- [16] ZIMÁK, E., *Technologie pro 3. Ročník SPŠ mlékárenské, obor zpracování mléka*. Praha: SNTL, 1982, 184 s.
- [17] ŠUSTOVÁ K., SÝKORA V., *Mlékárenské technologie*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2013, 223 s. ISBN 978-80-7375-704-5.
- [18] ČEPIČKA, J., a kol. *Obecná potravinářská technologie*. 1. Vyd. Praha: VŠCHT, 1995, 246 s. ISBN 80-7080-239-1.
- [19] KADLEC, P.; MELZOCH, K.; VOLDŘICH, M.: *Co byste měli vědět o výrobě potravin? Technologie potravin*. 1. Vyd. Ostrava: KEY PUBLISHING s.r.o., 2009, 536 s. ISBN 978-80-7418-051-4.
- [20] ZADOW, J. G., *Whey and Lactose Processing*. London, Elsevier Applied Science, 1992. 600 s.
- [21] VARNAM, A. H., SUTHERLAND J. P., *Milk and Milk Products. Technology, Chemistry and Microbiology*. Maryland: Aspen Publishers, 2001, 451 s. ISBN 0-8342-1955-7.
- [22] EARLY, R., *The technology of dairy products*. 2. Vyd., Thomson Science, London, 1998, 446 s., ISBN 0 7514 0344 X.
- [23] JELEN, P., Whey processing. Utilization and Products. In *Encyclopedia of Dairy Journal*. 2011, 731 – 737 s.
- [24] REKTOR A., VATAI G., Membrane filtration of Mozzarella whey. *Desalination*, **162**, 2004, 279 – 286 s.
- [25] PANESAR, P. S.; KENNEDY, J. F.; GANDHI, D. N.; BUNKO, K. Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry*, **105**, 2007, 1 – 14 s.
- [26] ŠILHÁNKOVÁ, L.: *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologie*. 3. Vyd. Praha: ACADEMIA, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [27] VELÍŠEK, J.; HAJŠLOVÁ, J., *Chemie potravin II*. 3. Vyd. Tábor: OSSIS, 2009, 623 s. ISBN 978-80-86659-16-9.
- [28] JIČÍNSKÁ, E., HAVLOVÁ, J., *Patogenní mikroorganismy v mléce a mlékárenských výrobcích*. 1. Vyd. UZPI: Praha, 1995, 106 s. ISBN 80-85120-47.

- [29] VLKOVÁ, E., RADA, V., KILLER, J., *Potravinářská mikrobiologie*. 2. Vyd. Praha: Česká zemědělská univerzita, 2009, 62 s.
- [30] GALLARDO-ESCAMILLA, F. J., KELLY, A. L., DELAHUNTY, C. M., Mouthfeel and flavour of fermented whey with added hydrocolloids. *International Journal of Dairy Science*, 2007, **17**, 308 – 315 s.
- [31] PESCUA, M., HEBERT, E. M., MOZZI, F., FONT DE VALDEZ, G., Whey fermentation by thermophilic acid bacteria: Evolution of carbohydrates and protein content. *Food Microbiology*, 2008, **25**, 442 – 451 s.
- [32] JENSEN, R. G., KROGER, M., The importance of milk and milk products in the diet. *Handbook of Dairy Foods and Nutrition*. 2. vyd., 2000, 51 – 52 s.
- [33] JELEN, P., Whey cheeses and beverages. *Whey and lactose processing*. New York: Elsevier Applied Science, 1992, 157 – 193 s.
- [34] KOFFI, E., SHEWFELT, R., WICKER, L., Storage stability and sensory analysis of UHT processed whey-banana beverages. *Journal of Food Quality*, 2005, **28**, 386 – 401 s.
- [35] SALMINEN, S., GORBACH, S., SALMINEN, K., Fermented whey drink and yogurt-type product manufactured using *Lactobacillus* strain. *Food Technology*, 1991, **45**, 112 s.
- [36] LUCEY, J. A., Cheese. Acid – and acid/Heat Coagulated Cheese. In *Encyclopedia of Dairy Science*, 2011, 698 – 705 s.
- [37] JELEN, P., Technologické pokroky ve výrobě syrovátkových sýrů, Praha, *Celostátní přehledky sýrů*, Česká společnost chemická, 2001, 42 – 46 s.
- [38] ROBINSON, R. K., *Dairy Microbiology Handbook*. 3. Vyd., New York: John Wiley and Sons, Inc., 2002, 765 s.
- [39] KOPÁČOVÁ O., Syrovátka v pekařských výrobcích. *Bakers Journal*, 65 (1), 2009, 11 s.
- [40] FOX, P. F., *Advanced Dairy Chemistry: Lactose, water, salts and vitamins*. 2. Vyd., Londýn: Chapman and Hall, 1997, 536 s., ISBN 0 412 63020 6.
- [41] PORTEOUS, A., *Dictionary of environmental science and technology*. 4. Vyd., Chichester, John Wiley and Sons Ltd, 2008, 794 s.
- [42] WAINWRIGHT, M., *An introduction to environmental biotechnology*. Kluwer Academic Publishers, Wainwright, 1999, 171 s.
- [43] OREOPOULOU, V., RUSS, W., *Utilization of by-products and treatment of waste in the food industry*. Springer Science + Business Media, New York, LLC, 2007, 316 s.

- [44] BUŇKA, F., PACHLOVÁ V., ČERNÍKOVÁ M., *Mlékárenská technologie I*. Vyd. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2013, 47 – 51 s. ISBN 978-80-7454-254-1.
- [45] KOHOUT, P., *Výživa u pacientů s idiopatickými střevními záněty*. 1. Vyd. Praha: MAXDORF, 2004, 174 s. ISBN 80-734-5023-2.
- [46] BAILEY, K. W., *Marketing and pricing of milk and dairy products in the United States*. 1. Vyd., Blackwell, Iowa State University Press, 1997, 281 s., ISBN 0-8138-2750-7.
- [47] RYCHTERA, M., UHER J., PÁČA J., *Lihovarství, droždářství a vinařství*. Vyd. 2. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1991, 126 s. ISBN 80-708-0117- 4.
- [48] VELÍŠEK, J., *Chemie potravin 2. upr.* Vyd. Tábor: OSSIS, 2002, 331 s. ISBN 80-866-5903-8.
- [49] JULÁK, J., *Klinicky významné bakterie*. Vyd. 1. Praha: Triton, 2012, 123 s. ISBN 978-807-3875-886.
- [50] MOTTL, J., *Nápoje – výroba, ošetřování, podávání*. Vyd. 2. Praha: Grada, 1999, s. 79 – 83. ISBN 80-7169-811-3.
- [51] KAVINA, J., *Zbožiznalství potravinářského zboží pro 3. Ročník*. Vyd. 1. Praha: SNTL Praha, 1997, 267 – 288 s. ISBN 815141-95-74.
- [52] FOX, P, ed., MCSWEENEY, P. L. H. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Londýn: Blackie Academic & Professional, 1998. XIV, 478 s. ISBN:0412720000.
- [53] CLAR, J. P., New products from an old proces, *Food Technology Fermentation*, 2004, **58**, 75 – 76 s.
- [54] BOHAČENKO, I., PINKROVÁ, J., PEROUTKOVÁ, J., PECHAČOVÁ, M., Fermentace směsí laktózy a laktulózy kmenem *Lactobacillus acidophilus*. *Chemické listy*, 101, 2007, 911 – 915 s.
- [55] GÖRNER, F.; VALÍK, L. *Aplikovaná mikrobiologie požívatin*. 1. Vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004. 528 s. ISBN 80-967064-9-7.
- [56] BENDO VÁ, O., JANDEROVÁ, B., *Vybrané kapitoly z biotechnologií*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1999, 93 s. ISBN 80-7066-204-2.
- [57] JAY, J. M., LOESSNER, M. J., GOLDEN, D. A. *Modern Food Microbiology*. Seventh Edition, New York: Springer, 2005, 790 s. ISBN 0-387-23180-3.
- [58] KOČKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A., *Taxonómia kvasinek a kvasinkových mikroorganismů*. Bratislava: Alfa, 1990, 699 s. ISBN 80-05-00644-6.

- [59] TVRZOVÁ, Z., CHUMCHALOVÁ, L., NĚMEC, J., PÁČOVÁ, M., *Miniatlas mikroorganismů*. [online], Brno, 2006 [cit. 2016-12-11] Dostupné z: WWW:<<http://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps06/mikroorg/web/index.html>>
- [60] KURTZMAN, C. P., Molecular taxonomy of the yeasts. *Yeast*, 1994, **10**, no. 13, 1727 – 1740 s.
- [61] DEIVE, F. J., COSTAS, M., LONGO, M. A., Production of a thermostable extracellular lipase by *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol. Lett.*, 2003, **25**, no. 17, 1403 – 1406 s.
- [62] NOVÁKOVÁ, L., DOUŠA, M., *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Praha: Europrint, 2013, ISBN 978-80-260-4243-3.
- [63] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. Vyd. Ostrava, 2003, 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [64] HÁLKOVÁ, J., RIEGLOVÁ J., RUMÍŠKOVÁ M., *Kvalitativní chemická analýza*. 2. Vyd. Újezd u Brna: I. Straka, 2001, 93 s. ISBN 80-864-9401-2.
- [65] DONER, L. W., HICKS, K. B. Lactose and the sugars of honey and maple: Reactions, properties and analysis. In: *Food Carbohydrates*, 1982, 74 – 112 s. ISBN:087055400.
- [66] VELÍŠEK, J., CEJPEK, K., *Biosynthesis of Food Components*. 1. Vyd. Tábor: OSSIS, 2008, 512 s. ISBN 978-80-86659-12-1.
- [67] HYLMAR, B., *Zvyšování nutričních a dietetických vlastností mléka bakteriemi mléčného kvašení*. 1. Vyd. Praha: Výzkumný ústav potravinářského průmyslu, 1985, 141 s.
- [68] ZEHNÁLEK, J., *Biochemie 2*. 1. Vyd. Brno: MZLU, 2003, 202 s. ISBN 978-80-7157-716-4.
- [69] MASÁK, J.; PELECHOVÁ, J., PLACHÝ, J., *Speciální mikrobiální technologie*. 1. Vyd. Praha: VŠCHT, 1992, 301 s. ISBN 80-7080-142-5.
- [70] VODRÁŽKA, Z., *Biochemie*. Sacharidy a jejich metabolismus, Praha: ACADEMIA, 2007, 39 – 62 s. ISBN 978-80-200-0600-4.
- [71] VOET, D., VOET J. G., *Biochemistry*. 4. vydání. Hoboken, 2011, 53 s. ISBN 04-709-1745-8.
- [72] GUIMARÃES, P., M. R., TEIXEIRA A. J., DOMINGUES L., Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnology Advances*, 2010, **28**, 375 – 384 s. ISSN 0734-9750.
- [73] SISO, GONZÁLES, M. I., The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology*, 1996, **57**, 1 – 11 s. ISSN 0960-8524.

- [74] ZAFAR, S., OWAIS M., SALEEMUDDIN M., HUSAIN S., Batch kinetics and modelling of ethanolic fermentation of whey. *International Journal of Food Science and Technology*, 2005, **40**, 597 – 604 s. ISSN 1365-2621.
- [75] *Lactic acid fermentation in Sourdough* [online] [cit. 2016-11-26]. Dostupné z: WWW:<<http://www.thefreshloaf.com/node/10375/lactic-acid-fermentation-sourdough>>.
- [76] KŘÍŽENECKÁ, S., SYNEK, V., *Základy analytické chemie*. 1. Vyd. Ústí nad Labem: Univerzita J. E. Purkyně v Ústí nad Labem, Fakulta životního prostředí, 2014, ISBN 978-80-7414-804-0.
- [77] KADLEC, P. *Technologie potravin II*. Praha: VŠCHT, 2002, 236 s. ISBN 80-7080-510-2.
- [78] GAJDŮŠEK S., *Mlékařství II*. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2000, 142 s. ISBN 80-7157-342-6.
- [79] LEGAROVÁ V., KOUŘÍMSKÁ L., *Metody sledování změn obsahu laktózy a dalších analytů během fermentace syrovátky*. Praha: Chemické listy, 2011, **105**, 869 – 873 s.
- [80] GUIMARÃES, P., M. R., TEIXEIRA A. J., DOMINGUES L., Fermentation of high concentrations of lactose to ethanol by engineered flocculent *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Eng. Q.*, 2008, **30**, 1953 – 1958 s. ISSN 10529-008-9779-1
- [81] S. GRBA, V. STEHLIK-TOMAS, D. STANZER, N. VAHČIC a A. ŠKRLINA, Selection of Yeast Strain *Kluyveromyces marxianus* for Alcohol and Biomass Production on Whey, *Chem. Biochem. Eng. Q.*, 2002, **16**, 13 – 16 s.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

HPLC High Performance Liquid Chromatography/Vysokoučinná kapalinová chromatografie

RI Refractive index/Index lomu

BMK Bakterie mléčného kvašení

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek č. 1: Postup zpracování sušené syrovátky [21]</i>	22
<i>Obrázek č. 2: Homofermentativní a heterofermentativní mléčné kvašení [75]</i>	27
<i>Obrázek č. 3: Přeměna pyruvátu na acetoin a diacetyl [27]</i>	28
<i>Obrázek č. 4: Schéma kapalinového chromatografu [76]</i>	36
<i>Obrázek č. 5: Kalibrační přímka pro glukózu</i>	46
<i>Obrázek č. 6: Kalibrační přímka pro galaktózu</i>	47
<i>Obrázek č. 7: Kalibrační přímka pro laktózu</i>	47
<i>Obrázek č. 8: Chromatogram směsného standardu</i>	48
<i>Obrázek č. 9: Fermentace laktózy v syrovátce o koncentraci 3 g·100 g⁻¹, pomocí kvasinek Kluyveromyces marxianus CCDM 265</i>	49
<i>Obrázek č. 10: Fermentace laktózy v syrovátce o koncentraci 5 g·100 g⁻¹, pomocí kvasinek Kluyveromyces marxianus CCDM 265</i>	49
<i>Obrázek č. 11: Fermentace laktózy v syrovátce o koncentraci 3 g·100 g⁻¹, pomocí kvasinek Kluyveromyces marxianus CCDM 269</i>	50
<i>Obrázek č. 12: Fermentace laktózy v syrovátce o koncentraci 5 g·100 g⁻¹, pomocí kvasinek Kluyveromyces marxianus CCDM 269</i>	50
<i>Obrázek č. 13: Enzymatická hydrolýza laktózy pomocí laktázy o koncentraci 1 g·l⁻¹</i>	52
<i>Obrázek č. 14: Enzymatická hydrolýza laktózy pomocí laktázy o koncentraci 2 g·l⁻¹</i>	52

SEZNAM TABULEK

<i>Tabulka č. 1: Složení sladké a kyselé syrovátky [77, 78]</i>	14
<i>Tabulka č. 2: Obsah vitamínů v sušené syrovátce [2]</i>	17
<i>Tabulka č. 3: Obsah minerálních látek v sušené syrovátce [2]</i>	18