

Možnosti fermentace syrovátky pomocí kvasinek *Kluyveromyces lactis*

Bc. Válková Petra

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. Petra Válková**
Osobní číslo: **T15311**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Možnosti fermentace syrovátky pomocí kvasinek *Kluyveromyces lactis***

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 lactis*.
2. Návrh metodiky stanovení úbytku 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] 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.

[2] ONWULATA, Charles, I. a Peter J. HUTH (eds.). *Whey processing, functionality and health benefits*. Ames: Wiley-Blackwell, 2008. ISBN 978-0-8138-0903-8.

[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] SISO, Gonzáles, M.I. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology*, 1996, 57, 111. ISSN 0960-8524.

[5] 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.

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



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.

děkan



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.

ředitel ústavu

Příjmení a jméno: ...*VALKOVA PETRA*.....

Obor:*TP*.....

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užit 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*9.5.2014*.....

.....*Valkova Petra*.....

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

(1) Vysoká škola nevydělečně 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 nahlázení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

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

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

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

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

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

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licencí, 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

Diplomová práce je zaměřena na syrovátku a její fermentaci pomocí pěti kmenů kvasinek *Kluyveromyces lactis*. Náplní práce byla stručná charakteristika syrovátky (složení a zpracování), alkoholové fermentace a kvasinek, které byly využívány v této práci. Poslední kapitola teoretické části byla zaměřena na biotechnologické zpracování syrovátky.

Praktická část byla věnována fermentaci syrovátky o dvou různých koncentracích. Tato fermentace probíhala při třech kultivačních teplotách a byla sledována během čtyř dnů. Závěrem práce bylo vyhodnocení úbytku laktózy po fermentaci pro daný kmen *Kluyveromyces lactis* za daných podmínek. Po vyhodnocení výsledků bylo zjištěno, že nejvyšších úbytků laktózy bylo dosaženo u vzorků fermentovaných kmeny CCDM 252 a 255. Dále bylo shledáno, že nejintenzivnější úbytky laktózy nastávaly při 28 °C.

Klíčová slova: syrovátka, laktóza, fermentace, kvasinky, *Kluyveromyces lactis*

ABSTRACT

The diploma thesis is focused on whey and its fermentation using five strains of *Kluyveromyces lactis* yeast. The content of the work was a brief description of whey (composition and processing), alcohol fermentation and yeast used in this work. The last part of the theoretical part was focused on the biotechnological processing of whey.

The practical part was devoted to the fermentation of whey with two different concentrations. This fermentation took place at three cultivation temperatures and was monitored within four days. The conclusion of this work was the evaluation of the loss of lactose after fermentation for the given *Kluyveromyces lactis* strain under given conditions. After evaluating the results, it was found that the highest decreases in lactose were achieved in samples of fermented CCDM 252 and 255 strains. Furthermore, the most intense lactose losses occurred at 28 °C.

Keywords: whey, lactose, fermentation, yeast, *Kluyveromyces lactis*

V úvodu této diplomové práce bych chtěla poděkovat své vedoucí paní Ing. Zuzaně Bube-
lové, Ph.D. za trpělivost, odborné vedení, cenné rady a připomínky, které mi poskytla při
vypracování. Dále bych chtěla poděkovat paní Ing. et Ing. Ludmile Zálešákové za spolupráci v
laboratořích.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 CHARAKTERISTIKA SYROVÁTKY	12
1.1 TVORBA SYROVÁTKY	12
1.1.1 Sladká syrovátka.....	13
1.1.2 Kyselá syrovátka	14
1.2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ SYROVÁTKY	15
1.2.1 Mléčný cukr – laktóza	15
1.2.2 Bílkoviny	16
1.2.3 Minerální látky	18
1.2.4 Vitamíny.....	19
1.3 ZPRACOVÁNÍ SYROVÁTKY	19
1.3.1 Předúprava syrovátky	20
1.3.2 Zahuštění syrovátky.....	21
1.3.3 Sušení	21
1.3.4 Frakcionace sušiny v syrovátce	22
2 ALKOHOLOVÁ FERMENTACE	23
2.1 FERMENTAČNÍ PROCESY	23
2.1.1 Vsádkový (Batch) proces	24
2.1.2 Přítokový (Fed-batch) proces	24
2.1.3 Průtokový (kontinuální) proces	25
2.1.4 Kontinuální proces s recyklací	25
2.2 KVASINKY	26
2.2.1 <i>Kluyveromyces</i>	26
2.3 MECHANIZMUS TVORBY ETANOLU	27
3 MOŽNOSTI BIOTECHNOLOGICKÉHO VYUŽITÍ SYROVÁTKY	29
3.1 DERIVÁTY LAKTÓZY	29
3.1.1 Laktitol	29
3.1.2 Laktulóza	29
3.1.3 Laktozylmočovina	30
3.2 SÝR RICOTTA A SYROVÁTKOVÝ NÁPOJ	30
3.3 PRODUKTY FERMENTACE.....	31
3.3.1 Galaktooligosacharidy	31
3.3.2 Kyselina laktobionová	31
3.3.3 Kyselina octová	32
3.3.4 Kyselina propionová.....	32
3.3.5 Kyselina jantarová	32
3.3.6 Kyselina hyaluronová.....	32
3.3.7 Biomasa	33
3.3.8 Etanol	33
3.3.9 Metan.....	35

II	PRAKTICKÁ ČÁST	36
4	CÍL PRÁCE	37
5	METODIKA PRÁCE	38
5.1	POUŽITÉ POMŮCKY A CHEMIKÁLIE	38
5.1.1	Materiál	38
5.1.2	Chemikálie	38
5.1.3	Pomůcky.....	38
5.1.4	Přístroje	38
5.2	POPIS EXPERIMENTU	39
6	VÝSLEDKY A DISKUSE	42
6.1	PRŮBĚH FERMENTACE 3% SYROVÁTKY	43
6.2	PRŮBĚH FERMENTACE 5% SYROVÁTKY	47
6.3	POROVNÁNÍ JEDNOTLIVÝCH KMENŮ KLUYVEROMYCES LACTIS PŘI FERMENTACI LAKTÓZY	51
6.4	SOUHRNNÁ DISKUZE.....	55
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	58
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	63
	SEZNAM OBRÁZKŮ	64
	SEZNAM TABULEK	66

ÚVOD

Syrovátka jako vedlejší produkt při výrobě mléčných produktů se dlouhou dobu považovala za odpadní produkt. Syrovátka se mnohdy vylévala do odpadních vod nebo se využívala v zemědělství jako hnojivo, eventuálně ke krmným účelům. Vypouštěním syrovátky do vodních toků bez řádného vyčištění vedlo k nežádoucím účinkům a negativnímu působení na životní prostředí. Z důvodu velké biochemické spotřeby kyslíku ve vodních tocích docházelo k úhynu ryb a znehodnocení zemědělských půd. Toto zjištění vedlo ke snaze najít alternativní využití syrovátky a komponentů z ní.

Kvůli neustálému růstu produkce sýrů roste i množství syrovátky. Proto si v dnešní době syrovátka našla uplatnění v mnoha oblastech. Především v potravinářském průmyslu a to zejména díky vysokému nutričnímu obsahu. Čerstvá syrovátka slouží k výrobě tvarohů, sýrů, nápojů, ale i másla, a to i v sušené formě, jednak pro přímý trh, ale také jako přísada do některých mléčných, pekařských, cukrárenských a masných výrobků. Dále jsou tu jednotlivé komponenty získávané ze syrovátky, například bílkoviny a laktóza, které se využívají nejen v potravinářském průmyslu, ale také ve farmaceutickém i chemickém.

Další množnou variantou je její přeměna na jiné produkty. Tato přeměna je možná chemickými nebo biotechnologickými procesy. Do biotechnologických procesů řadíme fermentaci (kvašení) pomocí mikroorganismů. Během fermentace syrovátky je možné získat mnoho produktů: alkoholy, kyseliny, biomasu, bioplyn, polysacharidy, aminokyseliny. Produkty tohoto kvašení lze následně využít kromě potravinářského průmyslu i ve farmaceutickém, chemickém, energetickém průmyslu a průmyslu biopaliv.

Cílem diplomové práce bylo sledovat průběh fermentace syrovátky pomocí pěti kmenů kvasinek *Kluyveromyces lactis* a zhodnotit vliv fermentační teploty a koncentrace syrovátky.

Teoretická část je zaměřena na charakteristiku syrovátky, její chemické složení a zpracování. Další část je věnována popisu alkoholové fermentace, charakteristice kvasinek *Kluyveromyces lactis* a nakonec biotechnologickému zpracování syrovátky.

Praktická část obsahuje zhodnocení vlivů podmínek (teplota fermentace, koncentrace syrovátky) na průběh fermentace syrovátky (úbytek laktózy) účinkem vybraných kmenů *Kluyveromyces lactis*.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERISTIKA SYROVÁTKY

Syrovátka je průsvitná tekutina nazelenalé barvy, která vzniká jako vedlejší produkt při výrobě sýrů nebo vzniká koagulací jiných mléčných výrobků, kdy se odstraní pevný podíl tzv. koagulát. Koagulát je složen z pevných složek obsahující hlavně kasein a tuk. Z koagulátu se následně technologickým procesem získává finální výrobek (sýr, tvaroh). Syrovátka může být také definována jako "mléčné sérum", permeát získaný po koagulaci mléčných proteinů po přidání kyseliny nebo proteolytických enzymů, jako je například syřidlo. Syrovátka jako vedlejší produkt během výroby tvarohů a sýrů představuje asi 85 – 95 % objemu mléka při čemž si zachovává okolo 55 % živin. Stejně jako mléko i syrovátka může být různého původu, například kozí, ovčí nebo buvolí. Z hlediska objemu výroby a také z ekonomického hlediska se nejvíce zpracovává syrovátka získaná ze zpracování kravského mléka. Vzhledem ke své biologické a chemické hodnotě se stala základní surovinou pro výrobu různých produktů. Využívá se jednak přímo, ale také nepřímo po předchozí úpravě a zpracování nebo se z ní získávají jednotlivé významné komponenty [1, 2, 3].

Využívání syrovátky má dlouhou historii. Byla objevena náhodně před 8000 lety při zkysnutí mléka a jejím samovolném oddělení. Syrovátka tehdy nesloužila pro lidskou spotřebu, ale spíše jako krmivo pro dobytek a hnojivo. Později se využívala v medicíně. Kolem roku 1794 vznikaly v Evropě lázně, zejména ve Švýcarsku. Ve Spojených státech se syrovátka donedávna využívala hlavně v zemědělství (závlaha a hnojení) nebo se vylévala do řek, kde způsobovala ekologické problémy. Dnes se syrovátka díky novým technologiím využívá mnohem více. Příkladem může být výroba sýrů, fermentovaných nápojů nebo její frakcionace na proteiny nebo laktózu, které mohou být využity nejen v potravinářství, ale také ve farmacii [3,4,5].

1.1 Tvorba syrovátky

Syrovátka, jak již bylo zmíněno, je vedlejším produktem mléčného průmyslu. Tvoří se tedy v průběhu výroby sýrů při koagulaci mléka, kdy vzniká vodná část a kasein. V syrovátce se vyskytuje mnoho živin pocházejícího z mléka, včetně funkčních proteinů, peptidů, lipidů, laktózy, minerálních látek a vitamínů, a proto má velký potenciál, jako zdroj sloučenin s přidanou hodnotou [1].

Dle výroby, respektive postupu použitého srážení kaseinu, existují dva druhy syrovátky: kyselá syrovátka ($\text{pH} < 5$), vznikající při výrobě tvarohu, který je základem pro tvorbu kyselých sýrů jako jsou například syrečky. A poté sladká syrovátka s pH minimálně 5,6 vznikající při výrobě sladkých sýrů [1, 3].

1.1.1 Sladká syrovátka

Vznik sladké syrovátky nejprve začíná prohřátím syrového kravského mléka na pasterační teplotu, aby byla odstraněna případná kontaminující mikroflóra. Poté dochází k přidavku syřidla (chymozinu), které má charakter proteolytických enzymů, proteináz s optimem proteolýzy v kyselém prostředí. Jedná se o syřidlo, které je směsí enzymů získaných extrakcí z žaludků sajících telat. Ale existují i syřidla mikrobiální nebo rostlinná. Sladká syrovátka tedy vzniká koagulací se syřidlem a změnou hodnoty pH na přibližně 6,5. Následně dochází ke sladkému srážení, které má tři fáze a jeho přibližná doba je okolo 20 – 120 minut. Jednotlivé fáze probíhají současně a prolínají se [6, 7].

V primární fázi dochází k štěpení peptidového řetězce κ -kaseinu chymozinem. Chymozin je enzym, který hydrolyzuje peptidovou vazbu na povrchu kaseinové micely v κ -kaseinu obsahujícím 169 aminokyselin. Štěpení probíhá mezi aminokyselinami 105 (Phe) a 106 (Met), kdy vznikají dva řetězce. První řetězec, obsahující aminokyseliny 1 – 105 se nazývá para- κ -kasein, který je hydrofobní a vzniká z něj para- κ -kaseinát vápenatá sraženina. Druhý řetězec začíná 106. a končí 169. aminokyselinou, nazývá se κ -kaseino-glyko-makro-peptid, který je hydrofilní a po vysrážení zůstává v syrovátce. Celkově je hydrolyzováno 80 – 90 % veškerého κ -kaseinu, jež ztrácí funkci ochranného koloidu proti vysrážení. [6].

V sekundární fázi dochází díky narušenému κ -kaseinu a destabilizaci micel k polymeraci micely a vytvoření trojrozměrného gelu (sítě). Vznik tohoto gelu je možný díky přítomnosti vápenatých iontů na jádru micely a teploty vyšší než 10 °C. Přítomnost vápníku umožní vytvářet sraženinu, což vlastně znamená přeorientování se z jedné části vazeb, a to z intramicelární na extramicelární formu. Zvýšení obsahu vápenatých solí způsobí větší výnos syrovátky [6, 7].

Poté vzniká gel, který se prokrajuje a z něj se stává velice měkká sýřenina. K zvýšení hustoty a pevnosti sýřeniny, tedy k synerezi a k uvolnění syrovátky dochází nejprve prohřátím na teplotu okolo 40,5 °C a poté i dalšími kroky, jako jsou prokrojení, kdy menší zrna zadrží

méně syrovátky, snížení pH a případné dohřívání, anebo dosoušení sýřeniny. Po krájení se uvolní nejvíce syrovátky a odstraňuje se jako první. Poté se syrovátka uvolňuje během formování a lisování nebo v průběhu kysání eventuálně při solení. Na pevnost, rychlost synereze sýřeniny a na množství uvolněné syrovátky má vliv i množství použitého syřidla, které závisí na volbě druhu vyráběného sýra. Ve výsledku vzniká asi jen 10 % sýra a zbylou část tvoří syrovátka, která se po vypuštění od sýrařského zrna může dále zpracovávat [6, 7, 8].

1.1.2 Kyselá syrovátka

Kyselé srážení probíhá za přídavku kyselin (citronové, mléčné nebo octové). Druhá varianta je za přídavku bakterií mléčného kvašení, které jsou schopny produkovat kyselinu mléčnou z laktózy nebo pomocí oxidu uhličitého a kyseliny fosforečné. Syrovátka, vzniklá při tomto srážení, dosahuje pH okolo 4,3 – 4,6. Kromě pH se kyselá syrovátka liší od sladké složením. Tento typ srážení se využívá při výrobě tvarohů, sýrů vyráběných z tvarohu, měkkých syrovátkových sýrů a většiny průmyslových kaseinů. [7, 9].

Při fermentačních procesech se laktóza přemění na kyselinu mléčnou v rozmezí okolo 20 – 30 %. Mléko ztrácí svou pufovací schopnost. Po vytvoření dostatečného množství kyseliny se nejprve odštěpí vápník vázaný na kasein. Vzniká tak volný kasein a mléčnan vápenatý. Dále dochází ke snížení disociace karboxylových skupin, kdy se současně vytváří H^+ ionty kyseliny s OH^- ionty zásadité části molekuly kaseinu nedisociované molekuly vody. Množství hydroxylových iontů se snižuje a postupně dojde k zesílení elektrolytické disociace v zásadité části molekuly kaseinu. Postupné narůstání obsahu kyseliny vede k izoelektrickému bodu kaseinu v intervalu od pH 4,6 až do 4,9 [10].

Při teplotách 22 – 25 °C si sraženina po koagulaci mléka zadržuje všechnu vodu. Mechanickým rozmícháním sraženiny a zvýšením teploty dojde k makroskopickému rozdělení fází, kdy se kasein odděluje ve tvaru vloček a zároveň se odděluje tekutá fáze, tedy syrovátka. Vznik sraženiny, množství syrovátky a látek obsažených v syrovátce závisí na síle, množství přidané nebo vytvořené kyseliny, ale také na vápenatých solí kaseinu a pufovacích sloučenin (bílkoviny, citráty atd.). To znamená, že se musí přidat více kyseliny pro dosažení izoelektrického bodu, a tím se zvýší i celková kyselost, při níž se mléko sráží [10].

1.2 Chemické složení syrovátky

Syrovátka je tekutina tvořená z 90 – 94 % vodou, kdy zbylou část tvoří sušina. Největší zastoupení v sušině mají sacharidy a z nich laktóza ($45 - 60 \text{ g.l}^{-1}$), poté jsou to bílkoviny ($6 - 11 \text{ g.l}^{-1}$), minerální látky ve formě solí ($8 - 10 \text{ g.l}^{-1}$), kyselina mléčná ($0,5 - 9 \text{ g.l}^{-1}$) a nejméně lipidů ($0,6 - 5 \text{ g.l}^{-1}$). Minerální soli se skládají z více než 50 % z NaCl, KCl a vápenatých solí (zejména fosfátů). V malém množství obsahuje i kyselinu citrónovou, sloučeniny dusíku (močovinu a kyselinu močovou) a vitamíny skupiny B, C, E i A [2, 3].

Chemické složení syrovátky také rovněž závisí na složení původního mléka, na stupni fermentace laktózy, na stupni zahřátí mléka při pasteraci, a také na případném zředění syrovátky vodou. Dále též na způsobu srážení, kdy kyselá syrovátka obsahuje zpravidla více popelovin a kyseliny mléčné. Naopak sladká syrovátka vzniklá enzymatickým srážením obsahuje více bílkovin a laktózy (viz **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**) [1].

Tabulka 1: Přibližné složení jednotlivých typů syrovátek v % [11, 12].

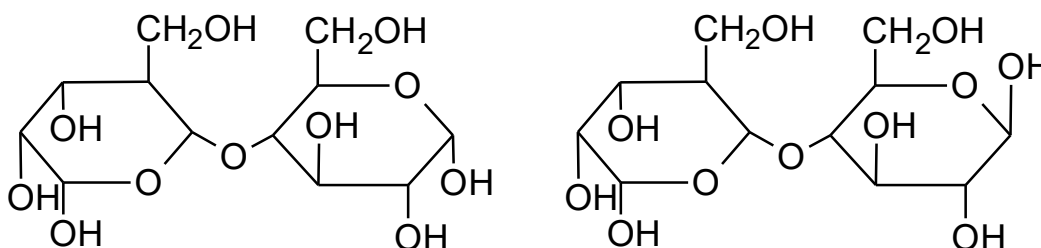
Komponenty	Sladká syrovátka	Kyselá syrovátka
Voda	93,00 - 94,00	93,00 – 95,00
Sušina	6,00	6,40
Laktóza	4,60 – 5,20	4,40 – 4,60
Bílkoviny	0,60 – 1,00	0,60 – 0,80
Nebílkovinné dusíkaté látky	0,20	0,20
Minerální soli	0,50	0,80
Kyselina mléčná	0,05 – 0,20	0,05 – 0,64
Tuk	0,05	0,05

1.2.1 Mléčný cukr – laktóza

Hlavní složkou syrovátkové sušiny je mléčný cukr, laktóza, která tvoří z celkové sušiny okolo 70 %. Z chemického hlediska je laktóza (4-O- β -galaktopyranozyl-D-glukopyranóza, $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) disacharid, skládající se z jedné molekuly glukózy spojené s jednou molekulou galaktózy glykosidickou vazbou β -1,4. Tento sacharid je štěpen enzymem laktázou. Laktóza se v syrovátce vyskytuje ve dvou izomerech, jako α - a β -laktóza (viz *Obrázek 1*). Jednak se mezi sebou liší prostorovým uspořádáním vodíkových a hydroxylových skupin v glukóze. Tato rozdílná uspořádání mají vliv na fyzikální vlastnosti laktózy například na hygroskopicitu, kdy β -laktóza je mnohem více rozpustná za běžných podmínek na rozdíl od α -

laktózy, která je lépe rozpustná při teplotách nad 93,5 °C. Dalším rozdílem je sladivost, kdy β -krystaly anhydridu jsou sladší a výrazně rozpustnější než α -hydrát [2, 13, 14].

Krystaly α -laktózy jsou více citlivé na zvýšení teploty, kdy se stávají méně rozpustnými a po ochlazení koncentrovaného roztoku dochází k rychlejšímu nasycení, kdy začne krystalizovat ve formě α -hydrátu, která dokáže přijmout vodu. Tím se poruší rovnováha mezi α -laktózou a β -laktózou. Porušením rovnováhy začne mutarotace β -laktózy za tvorby α -laktózy, která dále krystalizuje. Rychlost mutarotace je ovlivněna zvyšující se teplotou a změnou pH, kdy rychlost mutarotace se zvyšuje 2,8krát o každých 10 °C. Tato mutarotace má negativní vliv na vlastnosti sušené syrovátky (tvorba slepenců). V závislosti na podmínkách krystalizace může α -laktóza také ovlivnit senzorycké vlastnosti ve výrobcích, kdy krystaly s velikostí 10 – 16 μm mohou vytvořit defekt (pískovitost) [14, 15].



Obrázek 1: Struktura molekul dvou izomerů α - a β -laktózy [14].

Laktóza slouží jako zdroj energie, dále jako stimulant peristaltické aktivity v zažívacím traktu, ovlivňuje absorpci vápníku a fosforu, kromě toho také zajišťuje optimálního množství hořčiku v lidském organismu. Malá část laktózy se využívá v dnešní době jako surovina pro enzymatickou, mikrobiální a chemickou přeměnu na její deriváty. Příkladem může být laktulóza, laktitol, laktosacharóza nebo galaktooligosacharidy [2, 16].

1.2.2 Bílkoviny

Syrovátkové proteiny jsou ekonomicky i technologicky zajímavé produkty díky nutričním a biologickým vlastnostem. Syrovátkové bílkoviny mohou být použity nejen jako jednoduché proteinové doplňky, ale také k výrobě proteinových hydrolyzátů. Složení bílkovin v syrovátce (viz Tabulka 2) od nejvyššího zastoupení je následující: β -laktoglobulin (50 %) a α -laktalbumin (20 %), které se skládají z mnoha esenciálních aminokyselin a dále pak imu-

noglobuliny (10 %), sérový albumin (10 %), laktoferin (3 %) a laktoperoxidázy (0,3 %) [3, 12].

Tabulka 2: Obsah jednotlivých komponent bílkovin v syrovátce [3].

Syrovátkové bílkoviny	Obsah [g.l⁻¹]
Celkové množství	7,0
β -Laktoglobulin	3,5
α -Laktalbumin	1,2
Imunoglobulin	0,7
Sérový albumin	0,4
Laktoferin	0,02 - 0,35
Laktoperoxidáza	0,01 - 0,03

β -Laktoglobulin je rozpustný globulární protein, který má funkci nosiče pro například retinol, vitamín D a cholesterol. Tyto látky může ochránit během průchodu žaludkem, usnadňuje trávení mléčných lipidů. Také hraje důležitou roli ve vývoji pasivní imunity s imunoglobulinem G a při jejím přenosu na novorozence. A v neposlední řadě je zdrojem cysteinu, který je nezbytný pro syntézu glutationu, tripeptidu vytvořeného v játrech na ochranu proti střevním nádorům [3].

α -Laktalbumin je důležitým pro tvorbu laktózy. Má antikarcinogenní vlastnosti a dále se využívá jako lék na chronické onemocnění vyvolané stresem, díky obsahu tryptofanu, jako prekurzoru serotoninu. Sérové albuminy slouží k syntéze lipidů, mají antimutagenní, antioxidantní a antikarcinogenní vlastnosti. Obdobné vlastnosti mají i laktoferin, laktoperoxidáza a imunoglobulin, kdy imunoglobulin spolu s imunoreaktivním enzymovým systémem v syrovátce podporují ochranu a obranu těla proti škodlivým bakteriím, virům a infekčním agens. Syrovátka má tedy v menší míře i léčebné vlastnosti, které mohou také snížit nebo inhibovat alergické reakce. Tyto pozitivní vlastnosti jsou sníženy nebo inaktivovány při zpracování syrovátky, a to zejména tepelnou úpravou, kdy dojde k denuraci proteinů [3, 12].

Sladká syrovátka navíc obsahuje i glykomakropeptid, který vzniká při enzymatické hydrolyze kaseinu. Ošetření mléka vysokými teplotami (121 °C, 83 min) nebo ultrafiltrací má za následek vysrážení syrovátkových bílkovin a tak i snížení nutriční hodnoty syrovátkových proteinů. Syrovátkové bílkoviny obsahují více sirných aminokyselin, než je celkově u

mléčných bílkovin (1,35 % oproti 0,36 %). Nutričně nejhodnotnějšími esenciálními aminokyselinami v syrovátkových bílkovinách jsou zejména lyzin, leucin, izoleucin a valin. Dále z aminokyselin obsahuje cystein a cystin. Obsah lyzinu v syrovátce je vyšší než celkově v mléce (10,5 % oproti 7,75 %) [2, 5].

Pro využití bílkovin v těle je velmi důležitý poměr aminokyselin cysteinu a metioninu. Kdy cystein se vyskytuje až desetkrát více v laktalbuminu než kaseinu. Z tohoto důvodu jsou syrovátkové bílkoviny nezbytné při přípravě potravin pro kojence. Kojencům chybí enzym cystationáza, která přeměňuje metionin na cystein, a proto je syrovátka vhodným zdrojem cysteinu, který ovlivňuje vývoj mozku a správnou funkci jater [12].

Zastoupení a podíl volných aminokyselin v syrovátce je závislý na stupni hydrolyzy kaseinu při výrobě sýrů, přičemž syrovátka obsahuje vyšší podíl těchto volných aminokyselin než samotné mléko (viz Tabulka 3). Porovnat lze i množství volných aminokyselin v jednotlivých druzích syrovátky, kdy v sladké syrovátce je hodnota čtyřikrát vyšší než u mléka a kyselá syrovátka obsahuje až desetkrát více volných aminokyselin než mléko [12].

Tabulka 3: Porovnání obsahů aminokyselin v bílkovinách mléka [g/100g] [12].

Aminokyseliny	Kasein	Laktalbumin	Aminokyseliny	Kasein	Laktalbumin
Tryptofan	1,3	2,2	Cystein	0,38	3,4
Treonin	4,3	5,2	Metionin	3,1	2,3
Izoleucin	6,6	6,2	Fenylalanin	5,4	4,4
Leucin	10,0	12,3	Tyrozín	5,8	3,8
Lyzin	8,0	9,1	Valin	7,4	5,7

V menší míře se v syrovátce vyskytuje i nebílkovinný dusík, a to ve formě purinových zásad. V procesu zpracování syrovátky nehraje toto množství velký význam a nedochází tudíž k žádnému ovlivnění [2].

1.2.3 Minerální látky

Syrovátka je surovinou, která je zejména bohatá na minerální soli. Nejhojnější prvky jsou vápník (Ca), sodík (Na), fosfor (P), hořčík (Mg), a draslík (K), v malém množství i zinek (Zn), železo (Fe), měď (Cu) a mangan (Mn). Složení minerálních látek v sušině syrovátky je velmi proměnlivé a závisí na výrobním procesu při výrobě sýrů. Největší část minerálních látek syrovátky představují fosforečné a vápenaté soli. Vyšší podíl těchto solí se vyskytuje v kyselé syrovátce v důsledku větší kyselosti média, tím i větší rozpustnosti těchto

minerálních látek. Syrovátka je také dobrý zdroj draslíku. Ten hraje zásadní roli v procesech asimilace a katabolizmu na buněčné úrovni a také při přenosu nervových impulsů a svalových kontrakcí [3, 12].

Negativní vliv na minerální látky má použití vysokých teplot, kdy dochází v syrovátce k snížení rozpustnosti minerálních látek, ale také ke snížení nutričních vlastností. Velké množství minerálních látek zejména fosforečnanu vápenatého ovlivňuje spolu s kyselinou mléčnou organoleptické vlastnosti. Jsou odpovědné za nežádoucí slanou, hořkou chuť syrovátky a za hrudkovitost. Tento problém nastává hlavně u kyselé syrovátky. V tomto případě se nejčastěji provádí demineralizace syrovátky elektrodialýzou. Dalším řešením je například přidání ochucující složky, mnohdy ovocným koncentrátem [12].

1.2.4 Vitamíny

Do syrovátky se z mléka dostávají především vitamíny rozpustné ve vodě, které jsou zastoupeny hlavně komplexem vitamínů B. Syrovátka obsahuje více vitamínu B₂ (riboflavinu), než mléko. Za tento jev mohou některé bakterie mléčného kvašení při výrobě sýrů. Role riboflavinu v syrovátce je, že zajišťuje její charakteristickou žluto-zelenou barvu [16].

Kobalamin (vitamín B₁₂) a kyselina listová (vitamín B₉) se v syrovátce nachází navázaný na syrovátkových bílkovinách, na rozdíl od riboflavinu, který se vyskytuje v syrovátce z 95 % ve volné formě. Vitamín C se nachází v malém množství, kdy se tento vitamín rozkládá už při samotné výrobě sýra. Vitamíny rozpustné v tucích jako je A a E se vyskytují jen ve velmi malém množství. Vyšší množství vitamínu A bylo zaznamenáno v ovčí a kozí syrovátce, naopak v kozí syrovátce je významný nedostatek kyseliny listové a kobalaminu [3, 12].

1.3 Zpracování syrovátky

Při výrobě mléčných produktů jako primárního cíle vzniká zároveň i velké procento vedlejšího produktu, tedy mléčné syrovátky. Množství vyprodukované syrovátky v roce 2013 činilo přibližně 180 milionů tun, kdy z tohoto množství je 1,5 milionu tun obsah bílkoviny a 8,6 milionu tun laktózy, což jsou důležité zdroje pro nutriční trh, jako jsou sportovní, klinické a kojenecké výživy. K tomuto je nejvhodnější sladká syrovátka. Zpracování syrovátky znamená i využití jednotlivých složek syrovátky, což zahrnuje předpřípravu (např. filtrace), demineralizaci nebo sušení, které prodlužují dobu trvanlivosti syrovátky. Nejméně

se využívá slaná syrovátka, která odchází po přidání soli k sýřenině, aby se odstranila další kapalina. Tato syrovátka je náročnější na úpravu [11].

1.3.1 Předúprava syrovátky

Před samotným zpracováním syrovátky se provádějí úkony, které umožňují ještě tekutou syrovátku skladovat po určitou dobu. V prvním kroku po odseparování od sýřeniny se syrovátka čistí od nežádoucích reziduí sýrařského prachu. Provádí se filtrace, usazování či odstředování, a to v závislosti na velikosti a množství pevných částic. Poté se syrovátka zbaví nežádoucích forem bílkovin a tuku pomocí cyklonů, odstředivých, nebo vibračních či rotujících separátorů. Z tohoto tuku se získává syrovátková smetana, z níž se vyrábí tukový krém. Ten se používá na výrobu syrovátkového másla nebo syrovátkové smetany, která slouží jako přísada k výrobě sýrů typu mozzarella. Po odseparování těchto složek se syrovátka pasteruje při teplotě 72 – 78 °C po dobu 15 – 20 sekund a poté se chladí na teplotu nižší než 5 °C [11, 17].

Dalšími úpravami se docílí lepšího zpracování syrovátky. Sem patří především odstranění kyseliny mléčné z kyselé syrovátky. Kyselá syrovátka obsahuje až 16krát vyšší koncentraci kyseliny mléčné než syrovátka sladká. Přítomnost kyseliny mléčné v kyselé syrovátce ovlivňuje výsledek sušení, kdy dochází k vyšší adsorpci vlhkosti vzhledem k hygroskopické povaze laktátových iontů. To vede ke vzniku hrudek v prášku a lepkavých usazenin uvnitř sušičky, které nemohou být tolerovány ve výrobním procesu. Nezřídka dochází i k vypouštění kyselé syrovátky do čističky odpadních vod, kde může způsobit snížení pH vody, ale také navýšení chemické a biochemické spotřeby kyslíku, tedy její znečištění. Nejvhodnějšími metodami k odstranění kyseliny mléčné je nanofiltrace, elektrodialýza anebo kombinace těchto metod. Těmito metodami můžeme docílit i výroby demineralizované syrovátky. Další metodou může být neutralizace pomocí přídatku odstředěného mléka nebo výrobků z obilovin, které ale nezakryjí hořkou a adstringentní chuť [11, 18, 19, 20].

Demineralizace znamená snížení obsahu minerálních látek v syrovátce, která je takto vhodná pro přípravu dětské výživy a krmných směsí. Demineralizovat syrovátku lze nejen elektrolýzou, ale také gelovou filtrací nebo pomocí ionexů [17].

1.3.2 Zahuštění syrovátky

Počáteční pokusy o průmyslové odpaření a vysušení syrovátky pochází z roku 1920. Metoda je založena na použití konvenčních válcových sušiček, až se získá koncentrovaná kapalina, která se dále chladí na teplotu tuhnutí. V dnešní době se syrovátka odpařuje na přesycený roztok s obsahem 60 – 73 % pevných látek. Cílem je získat laktózu, kdy chlazením zahuštěné syrovátky vznikají z matečního louhu krystaly, které postupně narůstají. Dle požadované jakosti se krystaly čistí nebo rafinují, nebo se znovu rozpouštějí a rekrystalizují za přítomnosti aktivního uhlí pro odstranění nečistot [4, 11].

Nejprve u syrovátky s obsahem sušiny 6 % je provedena reverzní osmóza, nebo kombinace reverzní osmózy s nanofiltrací, kdy obsah sušiny se navýší na 18 – 25 %. Poté následuje zpracování takto upravené syrovátky k výrobě nebo pokračuje proces odpařování, popřípadě sušení. Další navýšení sušiny nastává při použití mechanické kompresi par. Syrovátka po tomto kroku dosahuje přibližně 45 – 65 % sušiny. Po odpaření se zahuštěná syrovátka rychle zchladí na teplotu 30 – 40 °C a zároveň během chlazení vznikají podmínky pro tvorbu krystalů laktózy. V krystalizačních nádobách se syrovátka 4 – 8 hodin míchá, aby vznikla směs rovnoměrně malých krystalů laktózy [11].

1.3.3 Sušení

Sušení syrovátky probíhá obdobně jako u mléka za použití bubnové sušičky, rozprašovací nebo válcové sušárny. Bubnové sušičky a válcové sušárny jsou více problémové a je tedy zapotřebí spolu se syrovátkou aplikovat i plnidla v podobě pšeničných nebo žitných otrub pro lepší odstraňování sušené syrovátky z povrchu bubnu. Dalším problémem je laktóza, která vytvoří amorfni sklovitou taveninu s nevhodnými fyzikálními vlastnostmi (hnědnutí, hrudkovitost, vysoká hydroskopičnost) [11, 21].

Sušení pomocí rozprašovací sušárny je v dnešní době nejvyužívanější a nejrozšířenější metoda. Rozprašovací sušárna se skládá z odpařovací části, kdy se od syrovátky oddělí více než 90 % vody a z části, kde probíhá mlhové sušení, kterým se odstraní zbylé množství vody. Problém s laktózou je zde řešen pomocí krystalizace, kdy vzniká α -hydrát, jež má lepší fyzikální vlastnosti. Postup zahrnuje zahuštění syrovátky, chlazení a míchání, kdy část laktózy vykrytalizuje a získá se disperze krystalů v syrovátkovém sirupu a poté následuje samotné sušení [11, 21].

1.3.4 Frakcionace sušiny v syrovátce

S obsahem 0,8 % bílkovin, 4,5 % laktózy a 0,2 % minerálních látek a solí, lze syrovátku sušit a pak tedy ji využít přímo nebo jen její frakcionované části. K izolaci syrovátkových bílkovin se využívají membránové separace (frakcionace), iontová výměna nebo chromatografické metody. Vzniká tak syrovátkový proteinový koncentrát a syrovátkový proteinový izolát, které jsou vhodné jako přísady pro kojenecké výživy, sportovní nápoje a posilující proteinové nápoje pro nemocné a starší osoby. Takto získané bílkoviny mají ve výrobcích dobré funkční vlastnosti, tj. rozpustnost, pěnicí, emulgující, gelotvorné a výživové vlastnosti [11].

Syrovátkové proteinové koncentráty jsou vyráběny ze sušeného retentátu, který byl vyroben z ultrafiltrované syrovátky. Ze 100 kg syrovátky vzniká přibližně 17 kg retentátu a 83 kg permeátu. Retentát obsahuje hlavně mléčné bílkoviny a velmi malý podíl mléčného cukru a minerálních látek. Retentát se využívá jednak jako přídavek do mléka nebo jiných potravinářských surovin, popřípadě se suší. Množství proteinu v sušině může být různý, od 35 %, kdy je hodnota podobná jako u odtučněného mléka až po maximální hodnotu 65 %. Navýšením procent sušiny na 80 lze pomocí diafiltrace. Metoda diafiltrace, je proces, který využívá kombinaci ultrafiltrace a dialýzy, při níž dochází k vymytí laktózy [11, 18].

Permeát, který projde procesem ultrafiltrace koncentrátu nebo izolátu obsahuje především laktózu, minerální látky a nebílkovinné dusíkaté látky. Permeát lze díky obsahu dostatečného množství nutrientů využít pro fermentační aplikace nebo může být vysušen a použit jako přídavek do potravin, popřípadě jako surovina, z které lze získat laktózu [18].

2 ALKOHOLOVÁ FERMENTACE

Obecně je fermentace proces, při kterém probíhá přeměna produktu pomocí kvasinek a bakterií. Jedná se o metabolické (katabolické) reakce, při nichž vznikají ze složitějších látek jednodušší. Mezi biologické procesy patří nejen alkoholová fermentace, ale také aerobní fermentace nebo metanové kvašení. Alkoholové kvašení je nejvíce prostudovanou metodou, ale přesto se stále pracuje na zlepšení této metody včetně využití alternativních surovin. Cílem je zajistit snížení výrobních nákladů a zohlednit i dopad výroby na životní prostředí. Surovinami pro přeměnu na produkt etanol, jsou sacharidy, škrobové suroviny i lignocelulózní biomasy [22, 23].

Historie fermentace při výrobě určitých potravin je historicky velice starobylou záležitostí, např. nálezy kvasných nádob na víno pochází již z neolitu (dnešní Irán, Hajji Firuz Tepe, 8500 – 4000 let před naším letopočtem). Kvasné procesy jsou velice intenzivně využívány v potravinářství i dnes při výrobě lihovin, piva, vína, kyselého zelí, octa, kynutého těsta atd. [22].

Větší pozornosti získala až od 19. století přesněji rokem 1897, kdy bratři Buchnerové se zabývali studií, při které bylo zjištěno, že přeměna glukózy na oxid uhličitý a etanol probíhá i během nebuněčného kvašení, tedy pomocí enzymu. To dalo základ biochemickému oboru – enzymologii. Od roku 1930 bylo jasné, že fermentace je komplex metabolických procesů, které vyplývají ze sledu za sebou jdoucích chemických reakcí, z nichž každá je katalyzovaná specifickým enzymem. Dříve byla volena fermentace za anaerobních podmínek, kdy dochází k produkci ATP bez spotřeby kyslíku. Dnes se využívá fermentace i při aerobních podmínkách za použití specializovaných mikroorganismů a za zvláštních podmínek [24].

Nevýhodou fermentace ve výrobě je nestabilita výtěžku, produktivity a konverze produktu. Vliv na tuto labilitu mají výrobní podmínky. Alkoholové kvašení se řadí mezi exotermní reakce, a proto i menší vychýlení teplot při výrobě způsobí narušení podmínek, což vede k nižšímu výnosu produktu a životaschopnosti mikroorganismů [25].

2.1 Fermentační procesy

Fermentační procesy se dělí na vsádkové (Batch), přítokové (Fed-batch), průtokové (kontinuální) a kontinuální s recyklací, které můžou probíhat diskontinuálně, semikontinuálně

nebo kontinuálně. Obecně platí, že optimální teplota se pohybuje okolo 30 °C a pH média je v rozmezí 4 – 4,5 u všech procesů. Další faktory ovlivňující tvorbu etanolu jsou například kvalita používaného izolátu jako inokula, kvalita růstového média nebo míchání média s inokulem, kdy se mění poměr kyslíku a oxidu uhličitého. Každý z těchto kultivačních režimů představuje velmi odlišné ukazatele výkonu v produkci etanolu [23, 26].

2.1.1 Vsádkový (Batch) proces

Batch proces je nejjednodušším typem fermentace a také nejstarším, z něhož vycházejí další metody. Batch proces probíhá jako uzavřená fermentace, diskontinuálně, což znamená, že všechny živiny se přidávají na začátku fermentačního procesu. Počáteční krok procesu zahrnuje pomnožení kvasinek v provzdušněném bioreaktoru, kde jsou mikrobiální buňky násobeny a poté může být medium sterilně zaočkováno do fermentoru. Kultura kvasinek je předmnožena ve stejném médiu jako při finální fermentaci, aby se minimalizoval čas k adaptaci kvasinek. Ve fermentoru jsou zajištěny podmínky potřebné pro anaerobní kultivaci kvasinek, zvyšuje se tím produkce etanolu. Kvašení probíhá bez přídavku čerstvého média nebo odstranění vyčerpaného. Hlavní nevýhody tohoto postupu spočívají v časové náročnosti, pracnosti, ve vyšších provozních nákladech a náročnosti na množství suroviny, potřebné pro každou fermentační šarži, aby se zajistilo dostatečné pomnožení kvasinek. Tento proces pokračuje až do doby, dokud se nedosáhne požadované koncentrace etanolu nebo do vypotřebování živin. Proces je také zastaven, i pokud dojde k nahromadění toxických zplodin. Kvasinky jednou použité při procesu nelze použít opakovaně. Produkce etanolu činí 1 – 3 g/(m³ x hodin). Tato hodnota je nízká v porovnání s náklady [23, 26].

2.1.2 Přítokový (Fed-batch) proces

Přítokový proces je nejpoužívanějším způsobem fermentace. Tento proces probíhá většinou semikontinuálně, kdy část média je periodicky odebírána a nahrazena čerstvým médiem. Jakmile jsou sacharidy spotřebovány kvasinkami, zajistí se přívod čerstvého média do bioreaktoru. V procesu dochází k zvyšování koncentrace substrátu, který inhibuje specifické metabolické pochody, které mají vliv na růst kvasinek. Regulace přítoku čerstvého média je výhodná pro neutralizaci živné půdy pro kvasinky a to vede ke zvýšení výnosu etanolu. Výnos se zvýší o 10 až 14 % produktivity etanolu. Pro vyšší produkci etanolu má vliv i použití imobilizované kvasinkové kultury. Hlavní nevýhody tohoto procesu jsou potíže s

řízením kultivačního prostředí média, tedy jeho parametry. U tohoto procesu je vyšší riziko kontaminace, ale i vyšší náklady [23, 26].

2.1.3 Průtokový (kontinuální) proces

Kontinuální fermentace probíhá tak, že kultivace buněk v bioreaktoru je trvale zásobována čerstvým médiem a zároveň je odstraňována prokvašená zápara. Mikroorganismy jsou regulovány v bioreaktoru tak, aby se udržoval rovnovážný stav a homogenita systému, která je zabezpečena i míchadlem. Rychlost průtoku je pak dána rychlostí růstu kvasinek. Nejstarší systémy kontinuálního procesu jsou takové, které se skládají z jedné a více nádob (kaskáda 10 a více reaktorů), kde médium proudí z jedné nádoby do druhé bez zpětné cirkulace. Na rozdíl od diskontinuálního nebo semikontinuálního procesu probíhá tento proces nepřetržitě bez zastavení, což má za následek zvýšení objemové produktivity etanolu. Postupné zdokonalování tohoto procesu umožnilo zavedení efektivnějších systémů a snížení výrobních nákladů. K optimalizaci se také využívají imobilizované kvasinky nebo alginátové pelety, které mají pozitivní vliv na tvorbu etanolu. Nevýhodou je zvýšená tvorba oxidu uhličitého. Na konci fermentačního procesu mohou vznikat shluky a vločky, které lze odstranit pomocí membránových filtrů, které udržují ředící poměry a zvyšují obsah etanolu. U výsledného produktu je známá koncentrace etanolu, ale také buněčného proteinu, lipidů nebo antibiotik. Další nevýhodou kontinuálního systému je velké riziko kontaminace produktu a dále útoky fágu nebo mutace. Při dlouhodobé kultivaci kvasinek za anaerobních podmínek dochází ke snížení schopnosti produkovat etanol. Nepřetržitý provoz reaktorů je běžný v chemickém průmyslu [23, 26, 27].

2.1.4 Kontinuální proces s recyklací

Jedná se o modifikovaný Batch proces s názvem Melle-Boinot. Tento proces se například využívá při výrobě vína. V podstatě jde o alkoholové kvašení, které se skládá s hydrolyzy sacharózy na glukózu a fruktózu působením invertázy. Poté následuje enzymatická fermentace zymázou, kterou produkují kvasinky. Nejčastěji se k tomuto využívá šťáva z cukrové třtiny, u které se upraví před fermentací obsah cukru na požadovanou úroveň pomocí melasy nebo šťáv z výparníku. Dále se upravuje pH pomocí kyseliny sírové, což má za následek snížení kontaminace. Tento krok trvá přibližně 2 hodiny [23, 28].

Samotný proces spočívá v tom, že se část fermentačního produktu odebere a následně se použije k opakované inokulaci dalšího fermentačního cyklu. Doba přeměny sacharózy kvasinkami trvá přibližně 4 – 6 hodin a fermentace je ukončena během 6 – 10 hodin. Teplota je udržována kolem 32 – 35 °C. Během procesu je nutné chlazení zejména v letním období. Výhodou tohoto procesu je stále dostatečné množství inokula s vyšší odolností proti zbytkovému etanolu. Takto se zrecykluje 90 – 95 % kvasinkových buněk, které se po ukončení fermentace odstředí a oddělí. Kvasinkové buňky se mohou použít opětovně alespoň dvakrát denně v průběhu výrobního období 200 – 250 dnů. V porovnání s kontinuálním procesem Batch je Melle-Boinot výhodnější v rámci výnosů a vyšší produktivity, nižší úrovní znečištění a snazší údržby. Nevýhodou může být zhutňování buněk ve spodní části nádrže, a proto je nádrž vybavená míchadlem při nízkém výkonu [29].

2.2 Kvasinky

Kvasinky jsou heterotrofní eukaryotní organizmy, které náleží k říši hub. Jejich název dostaly díky schopnosti většiny druhů zkvašovat monosacharidy a některé disacharidy i trisacharidy na etanol a oxid uhličitý. Kvasinky tvoří plodnice, rozmnožování probíhá převážně nepohlavně (vegetativní) a to především dělením nebo pučením, ale také pohlavně pomocí věceček. Jejich klasifikace probíhá na základě jejich sexuality na houby věcekaté, houby stopkovýtrusné a nedokonalé (Deuteromycotina). Nižší taxonomické členění (podčeleď, rod, druh a kmen) se stanovuje pomocí morfologických, fyziologických a genetických vlastností, včetně pohlavního rozmnožování [30].

2.2.1 *Kluyveromyces*

Rod *Kluyveromyces* byl poprvé pojmenován v roce 1956 na počest nizozemského mikrobiologa Alberta Jana Kluyvera (1888 – 1956). V roce 1970 zahrnoval rod okolo 21 druhů. Pomocí genového inženýrství se tento počet snížil na pouhých 6 druhů. Mezi nejčastěji používané druhy rodu *Kluyveromyces* jsou *K. lactis* a *K. marxianus* (dříve *Kluyveromyces fragilis*). Tyto druhy umožňují na rozdíl od ostatních druhů využívat xylózu, xylitol, celobiózu, laktózu a arabinózu, jak v pevném, tak i v kapalném médiu. *Kluyveromyces* obsahuje tyto dva geny LAC12 a LAC4, které v tomto pořadí umožňují internalizaci a poté hydrolyzu na glukózu a galaktózu. Díky této schopnosti se využívají v mnoha průmyslových odvětvích a navíc patří mezi skupinu mikroorganismů, které byly schváleny jako GRAS (vše-

obecně považované za bezpečné) americkým úřadem pro chemické látky přidávané do potravin (Food and Drug Administration) [31, 32].

K. lactis se vyskytuje v koloniích krémově, lehce narůžovělé barvy, díky pigmentu pulcherriminu, který produkují. V kapalném médiu tvoří sediment a prstenec. Jejich tvar je elipsoidní nebo kulovitý. Jejich růst je optimální při teplotách v rozmezí 25 °C až 35 °C. Jsou schopny anaerobní fermentace, ale nejsou schopny růstu za těchto podmínek dlouhodobě [31].

Existují dva různé druhy *K. lactis*: domácí *K. lactis* var. *lactis* a divoké *K. lactis* var. *drosophilorum*. Největší rozdíl mezi těmito druhy spočívá v metabolismu laktózy, kdy divoký druh ztratil schopnost zkvašovat laktózu. To znamená, že jsou inaktivovány enzymy β -galaktozidáza a permeáza laktózy. Domácí druh *K. lactis* var. *lactis* se proto používá především v oblasti biotechnologií. Dalším rozdílem je, že *K. lactis* var. *lactis* je heterotalická (s převážně haploidním životním cyklem) na rozdíl od divokého druhu. Velmi často jsou kvasinky *K. lactis* porovnávána s kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae*, které jsou také schopné produkovat etanol. Rozdílem mezi těmito kvasinkami je v primárním metabolismu [31].

V mlékárenském průmyslu se *Kluyveromyces lactis* využívá díky možnosti zkvašovat laktózu například u výroby kefirů. Dále slouží k výrobě nativní β -galaktozidázy a rekombinantního chymozinu. Tento chymozin vykazuje vyšší specifickou aktivitu než tradiční syřidla [31].

K. lactis je schopna také produkovat významné proteiny jako jsou inulinázy, fosfolipázu B, chitinázu, xylanázu a sladce chutnající protein brazzein. Komerčně vyráběny jsou i některé kyseliny, tedy metabolity přeměn xylózy, kyselina xylónová a nebo cukerný alkohol D-arabitol, který se vyrábí přímo ze syrovátky přeměnou arabinózy [31].

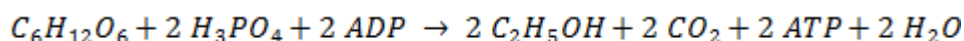
2.3 Mechanismus tvorby etanolu

Etanol vzniká jako jeden z produktů během anaerobní katabolické fermentaci sacharolytickými mikroorganismy. Prvním krokem při alkoholovém kvašení je transport cukrů do buňky. Tento transport probíhá třemi způsoby: jednoduchá difúze, usnadněná difúze nebo aktivní difúze. Disacharidy jsou rozloženy hydrolýzou vně buňky prostřednictvím enzymů na monosacharidy, například glukózu, fruktózu a galaktózu, které jsou přepravovány za po-

moci usnadněné difúze, což je proces, který nespotřebovává žádnou chemickou energii (ATP) [30, 33].

Glukóza dále vstupuje do glykolýzy (Embden-Meyerhof-Parnasova nebo také EMP dráha), spočívající v přeměně hexózu na pyruvát. K hlavním reakcím glykolýzy patří postupná fosforylace hexózu až na fruktózu-1,6-bisfosfát za účasti ATP. Poté pomocí aldolázy je bisfosfát štěpen na dvě molekuly triosafosfátu a po jejich oxidaci na 1,3-bisfosfoglycerát, kdy se zároveň redukuje koenzym NAD^+ v NADH. Vzniklý NADH nemůže být reoxidován v dýchacím řetězci, protože etanolová glykolýza probíhá anaerobně, díky tomu nedochází k přenesení vodíku z NADH. Reoxidace nastává až při poslední fázi etanolové glykolýzy, kdy se vodík přenáší na acetaldehyd, kdy se regeneruje NAD^+ [30, 34].

Z kyseliny 1,3-bisfosfoglycerové se pomocí transferázy odštěpí kyselina fosforečná a ta se přenáší na ADP za vzniku ATP a kyseliny 3-fosfo-D-glycerové. Z té se za katalytického působení enolázy odštěpí voda a vzniká kyselina 2-fosfoenolpyrohroznová. Působením fosfotransferázy se uvolňuje fosfát, který se váže na ADP za vzniku ATP a dále vzniká kyselina pyrohroznová (pyruvát). Tato kyselina je dekarboxylována působením pyruvátdekarboxylázou za vzniku acetaldehydu a oxidu uhličitého. V poslední fázi etanolové glykolýzy je acetyldehyd redukován pomocí NADH, vzniklého při oxidaci glyceraldehyd-3-fosfátu na etanol. Enzymem při tomto konečném kroku je alkoholdehydrogenáza. Při etanolové glykolýze vznikají z 1 molekuly glukózy celkem 4 molekuly ATP, kdy se 2 molekuly ATP spotřebují, to znamená zisk 2 molekul ATP (viz Obrázek 2) [34].



Obrázek 2: Celková účast ATP při alkoholové glykolýze [34].

Množství etanolu je závislé na množství zkvasitelných cukrů v surovině, použitém druhu a kmenu kvasinek, teplotě fermentace, obsahu živin v médiu a dalších faktorech. Etanolové kvašení se využívá při výrobě alkoholických nápojů a etanolu, pro lékařské účely, plní významnou úlohu při použití pekárenského droždí a při průmyslovém etanolovém kvašení vzniká i malé množství glycerolu a v malém množství i vyšší jednosytné alkoholy (propanoly, butanoly a pentanoly) a estery (ovlivňující buket vína) [30, 35].

3 MOŽNOSTI BIOTECHNOLOGICKÉHO VYUŽITÍ SYROVÁTKY

Ze syrovátky, jako vedlejšího produktu, lze získat, jak už bylo dříve zmíněno, mnoho produktů, jako jsou laktóza a její deriváty nebo proteiny získány frakcionací, syrovátková smetana, ale také syrovátkový sýr či tvaroh. Mezi alternativními produkty, které mohou být získávané ze syrovátky, jsou metan, který spolu s oxidem uhličitým tvoří bioplyn, organické kyseliny (kyselina octová, propionová, jantarová, mléčná a citrónová), aminokyseliny (kyselina glutamová, lyzin a treonin), vitamíny (kobalamin a riboflavin), polysacharidy (xantan, dextran, pullulan a gellan), enzymy (β -galaktozidáza a polygalaktouronáza) a jiné sloučeniny (galaktooligosacharidy, fruktóza-1,6-difosfát, 2,3-butandiol, hořečnatovápennatý acétát, laktát amonný, butanol a glycerol) [35].

3.1 Deriváty laktózy

3.1.1 Laktitol

Hydrogenací laktózy vzniká laktitol (4-O- β -D-galaktopyranozyl-D-sorbitol). Sladivost laktitolu je vyšší než u laktózy a podstatně nižší než u sacharózy. Jeho metabolické odbourávání nezávisí na inzulínu a díky tomu se využívá v dietní stravě a také jako sladidlo pro diabetiky. Laktitol je částečně metabolizován v tlustém střevě, kde probíhá jeho hydrolyza na mastné kyseliny s krátkým řetězcem, galaktózu a sorbitol. Jeho účinky jsou mírně laxativní, slouží jako zdroj energie a ovlivňuje metabolismus kyseliny cholové. Esterifikací laktitolu vzniká ester laktitol-palmitát s emulgačním účinkem, který se používá v lidské výživě [2, 36, 37].

3.1.2 Laktulóza

Izomerací laktózy vzniká laktulóza (4-O- β -D-galaktopyranozyl-D-fruktóza). Obvykle k této izomeraci dochází v alkalickém prostředí. Dále pak vzniká i při tepelném zpracování syrovátky, kdy probíhá přeměna menšího podílu laktózy na laktulózu. Laktulóza dosahuje přibližně 48 – 62 % sladivosti sacharózy, je sladší než laktóza a je nestravitelná. Laktulóza je prebiotikum, které má příznivý účinek na růst bifidobakterií ve střevech, kde tyto bakterie produkují kyselinu mléčnou, která má pozitivní vliv na střevní peristaltiku. U dospělého člověka způsobí příjem 3 g laktulózy denně kolonizaci střev bifidobakteriemi ze 47 %. Jedná se tedy o disacharid hojně využívaný ve farmakologii. V medicíně je laktulóza pou-

žívána jako laxativum, tedy projímadlo, ale také spolu s laktitolem mají pozitivní účinek při léčbě jaterní encefalopatie (intoxikace mozku močovinou v důsledku nefunkčnosti jater) a napomáhají v tlustém střevě k redukcii tvorby amoniaku [2, 36, 37].

3.1.3 Laktozylmočovina

Výroba laktozylmočoviny spočívá v přímé reakci laktózy a močoviny v kyselém prostředí. Využití má jako levný zdroj nebílkovinného dusíku pro dobytek, jelikož samotná močovina vede k rychlému růstu toxické hladiny amoniaku [2].

3.2 Sýr Ricotta a syrovátkový nápoj

Syrová syrovátka bez úprav se využívá k rychlé konzumaci v podobě nápojů nebo krmiv. Jednou z možností je také zužitkování tekuté syrovátky pro výrobu syrovátkových sýrů, které se dělí dle doby skladovatelnosti. Sýry spotřebovány v krátké době po výrobě jsou například Ricotta, Requeijão a Manouri, zatímco například Gjetost, Mysost a Myzithra vykazují delší skladovatelnost. Tyto syrovátkové sýry jsou spíše speciality středomořské oblasti (Itálie, Portugalska atd.), ale i například z Norska [38].

Ricotta se obvykle prodává jako čerstvý, zrnitý sýr, který je bílý, měkký a vlhký. Má poměrně nevýraznou nebo nasládlou chuť, kterou má díky sladké syrovátce. Originální Ricotta se vyráběla z ovčí syrovátky. Nyní se přidává plnotučné mléko, nebo částečně odstředěné, kdy tento produkt získal měkčí a jemnější strukturu. Výroba spočívá nejprve smícháním sladké syrovátky s asi 5 – 10 hmotnostních procent mléka, které bylo předeřáté na 40 – 50 °C. Následuje přidání 0,1 % soli a zahřívání na 80 – 85 °C, při této teplotě se přidá kyselina citrónová v množství 0,11 kg/l a míchá se. Tento proces je ukončen po vyvstání bílých vloček na hladinu. Tyto vločky jsou složeny ze syrovátkové bílkoviny, zbytkového tuku, laktózy a minerálních solí. Po odpočinku se tvaroh nabírá do perforovaných forem, ze kterých uniká zbytek syrovátky [38].

Na trhu se vyskytují nápoje z čerstvé syrovátky nebo také v instantní podobě. Obvykle tyto nápoje vznikají namícháním syrovátky s jiným produktem. Fermentované syrovátkové nápoje se vyskytují méně. Jedním z těchto nápojů, které lze zmínit je ovčí nápoj žinčica, jež se vyrábí hlavně na Slovensku. Jedná se o syrovátku, která vznikla během výroby ovčích sýru (oštiepků a parenic). Tato syrovátka je zahřívána na 90 °C a poté je zaočkována sme-

tanovým zákysem, díky tomu získá lahodně smetanovou chuť. Ze 100 litrů syrovátky je možno vyrobit 25 – 30 litrů žinčice [21, 39].

3.3 Produkty fermentace

3.3.1 Galaktooligosacharidy

Pomocí enzymu β -galaktosidázy je možné štěpit laktózu a syntetizovat z ní galaktooligosacharidy. Ve výrobcích galaktooligosacharidy zvyšují viskozitu, u mražených krémů ovlivňují bod tuhnutí a u tepelně opracovaných potravin snižují hnědnutí v důsledku Maillardových reakcí. Zamezují projevům mikrobiální kontaminace výrobků a také mohou být využívány jako inhibitory retrogradace škrobu. V těle mají prebiotický účinek. To má za následek proliferaci bakterií rodu *Bifidobacterium*, jsou tedy vhodné jako přísada do kojenecké výživy a dalších mléčných produktů. Množství vyprodukovaných galaktooligosacharidů je závislé na počáteční koncentraci laktózy, na množství a složení minerálních látek, které inhibují aktivitu β -galaktosidázy (například vápník), jiné ji naopak zvyšují (například hořčík). Dále i vyšší množství bílkovin negativně ovlivňuje jejich tvorbu [32, 37].

3.3.2 Kyselina laktobionová

Kyselina laktobionová (4-O- β -D-galaktopyranozyl-D-glukonová kyselina) je organická kyselina, která má využití jednak v potravinářském průmyslu (antioxidační činidlo a želírující látka), ale také ve farmaceutickém (biomateriály). Má sladkou chuť, nízkou energetickou hodnotu a prebiotické vlastnosti, které lze uplatnit do dětských výživ nebo jako přísada do sladkostí, zmrzlin, mléčných výrobků a pečiva. V současné době se kyselina většinou vyrábí chemickou syntézou z rafinované laktózy. Díky vysokým nákladům se chemická syntéza nahrazuje biotechnologickými metodami z levnějších zdrojů substrátů, jako je například syrovátka. Fermentace probíhá pomocí bakterie *Pseudomonas taetrolens*. Přeměna substrátu, tedy laktózy, ze syrovátky na kyselinu laktobionovou je účinnější za přídavku glukózy, kdy během této fermentace vzniká i kyselina glukonová [37, 40].

3.3.3 Kyselina octová

V syrovátce probíhá octové kvašení aerobním kvašením alkoholu. Tento alkohol (etanol) byl vytvořen při předešlém alkoholovém kvašení za pomoci rodu *Kluyveromyces*. Za octové kvašení jsou zodpovědné bakterie *Acetobacter* sp. [41].

Kyselina octová je důležitá organická chemikálie. Průmyslové využití má kyselina octová jako například acetátové odstraňovače námrazy. Tyto acetátové rozmrazovací prostředky jsou šetrné k životnímu prostředí. Nevýhodou je jejich nákladná výroba. Proto je snaha o levnější výrobu z obnovitelných zdrojů například ze syrovátky nebo biomasy [42].

3.3.4 Kyselina propionová

Při fermentaci syrovátky probíhá i propionová fermentace pomocí bakterií *Propionbacterium* sp. Navazuje na mléčné kvašení, kdy jako substrát slouží kyselina mléčná. Produktem tohoto kvašení je kyselina propionová, octová a oxid uhličitý. Propionová kyselina se může přidávat do obilných výrobků jako účinný prostředek na hubení plísní. Účelem je náhrada za chemické konzervační látky. Estery propionové kyseliny se dále využívají v parfémovém průmyslu. Během fermentace vznikají i jiné kyseliny například kyselina octová, která negativně ovlivňuje růst propionových bakterií. Aby se zvýšila účinnost této fermentace, doporučuje se použít imobilizované buňky bakterií v Ca-alginátu anebo v polyakrylamidovém gelu [41, 43].

3.3.5 Kyselina jantarová

Kyselina jantarová je dikarboxylová kyselina, která vzniká jako meziprodukt citrátového cyklu a také jako jeden z produktů fermentace anaerobního metabolismu. Tato fermentace je umožněna díky bakterii *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, která dokáže zpracovávat laktózu na kyselinu jantarovou. Kyselina jantarová se může používat na výrobu syntetické pryskyřice a biologicky odbouratelné polymery a jako meziprodukt pro chemické syntézy. Stále převládá chemická syntéza jantarové kyseliny. V poslední době je ovšem zájem o výrobu z obnovitelných zdrojů jako je například syrovátka [44].

3.3.6 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová je lineární polysacharid složený z dimerních jednotek N-acetylglukozaminu a kyseliny glukuronové. Tento polysacharid je složkou kůže, chrupav-

ky, pupeční šňůry, ve sklivci a také je přítomný v buněčných stěnách bakterií, jako je *Streptococcus zooepidemicus*. Biologická funkce a specifická aplikace kyseliny hyaluronové závisí na molekulové hmotnosti, kdy vysoká molekulová hmotnost znamená vyšší využití ve farmaceutickém průmyslu například při léčbě artritidy, popálenin nebo v plastické chirurgii. Výhoda této kyseliny je její výborná biologická odbouratelnost a biokompatibilita. Dříve se kyselina hyaluronová extrahovala ze živočišné tkáně (kohoutí hřebínky, hovězí sklivce a lidské pupeční šňůry), ale nyní se stále více živočišná tkáň nahrazuje fermentací pomocí bakterií *Streptococcus zooepidemicus*, která má své výhody například v nižších výrobních nákladech a vyšších výtěžcích. Jako vhodný substrát pro fermentaci se ukázala syrovátka, díky svému obsahu bílkovin jako zdroji dusíkatých látek pro tvorbu kyseliny hyaluronové [45].

3.3.7 Biomasa

Kvasinky schopné svým metabolismem podporovat rychlý růst a produkci biomasy a doprovodných produktů jsou například *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis*, *Candida utilis*, *Kluyveromyces lactis* nebo *K. marxianus*. Z bakterií můžeme uvést *Zymomonas mobilis* gram-negativní bakterii, která je tolerantnější ke koncentraci etanolu a též je schopna produkce biomasy. Růst buněk a fermentace je oproti kvasinkám podstatně nižší, a proto se tato bakterie, tak často nevyužívá [46].

Buněčná biomasa je vynikající doplněk pro zvířata i pro lidskou stravu, protože je důležitým zdrojem ribonukleotidů, poly- a oligosacharidů a proteinů. Tyto výrobky mají kromě jiných aplikací vlastnosti jako imunostimulanty, nosiče, zahušťovadla, stabilizátory a prebiotika. V některých případech, například při extrakci dochucovadel použití *Kluyveromyces* má významné výhody oproti *Saccharomyces* kvasinkám, u kterých se musí nejprve provést odstranění hořkých látek (debitter) [32, 47].

3.3.8 Etanol

Etanol se využívá ve velkém množství v chemickém, farmaceutickém a potravinářském průmyslu ve formě surového materiálu nebo rozpouštědla. Pro produkci etanolu je velmi důležité zvolit kmen s vhodnými fyziologickými vlastnostmi, aby se dosáhlo dobrého využití laktózy ze syrovátky. Roční světová produkce syrovátky činí asi 160 milionů tun s 5 % laktózy, to znamená asi 8 milionů tun laktózy. Kdyby se využila jen polovina tohoto množ-

ství, což dělá množství v USA při konverzní účinnosti 85 %, může vzniknout až 2.300.000 m³ etanolu. To by znamenalo 3,5 % z celkové světové produkce etanolu z roku 2008, která byla přibližně 65 miliónů m³. V roce 2015 se produkce etanolu v USA zvýšila na 67 miliónů m³ [35, 46, 48].

Neustále převládá zavedený postup při výrobě etanolu za použití třtinového cukru nebo kukuřičného škrobu. Nově vznikající technologie hledají alternativy k výrobě bioetanolu ze syrovátky, lignocelulóзовé biomasy nebo z řas [46].

Zájem o etanol mimo potravinářský průmysl je hlavně kvůli výrobě paliva z něj, který je na trhu stále žádanějším. Etanol vzniká asimilací sacharidů mikroorganismy nebo jejich fermentací. Roční produkce průmyslového etanolu činí asi čtyři miliony tun, z nichž 80 % je právě produkována fermentací [48].

Etanol jako slibný zdroj energie, který díky svému vyššímu oktanovému číslu (106 – 110) se stává výkonnější než klasický benzín s oktanovým číslem 91 – 96, proto se etanol přidává k benzínu. Zároveň pokud se zajistí vyšší výparné teplo etanolu ve směsi, zajistí se lepší výkon na rozdíl od čistého benzínu. Vyšší hodnota oktanového čísla (nad 100) znamená, že je palivo více odolné proti samozápalu než čistý izooktan. Výhodou tohoto paliva je jeho nízká cena a slevy na daních, což je výhodou pro podnikatele zabývající se přepravou. Nevýhodou je nedostatek čerpacích stanic s tímto palivem, nutnost hlavně v zimních obdobích většího přídavku benzínu a také, že ne všechny vozy lze přestavit [46].

Bioetanol je okysličené palivo s obsahem 34,7 % kyslíku. Přidáním k benzínu se zvýší spalování o 15 %. To má za následek snížení emise částic a oxidů dusíku. Na rozdíl od benzínu obsahuje bioetanol zanedbatelné množství síry a tedy ve směsi s benzínem nedochází k nadměrnému uvolňování oxidu siřičitého, který je karcinogenní a přispívá k tvorbě kyselých dešťů. Dalším využitím bioetanolu je jako náhrada za metyl-terc-butyleter (MTBE), který se používá jako oktanový zesilovač do benzínu. Jeho velkou nevýhodou je produkce oxidu uhelnatého a oxidu uhličitého při spalování, což má za následek znečištění podzemních vod a poté i pitné vody. Tato voda má nežádoucí účinky, které negativně ovlivňují lidské zdraví. V některých zemích je proto použití MTBE zakázáno [46].

3.3.9 Metan

Proces výroby metanu je založen na činnostech několika skupin anaerobních i fakultativně anaerobních bakterií. Jedná se o anaerobní rozklad výchozích složek na konečný metan ve vzduchotěsných nádržích reaktoru. Výroba metanu probíhá dvoustupňovou anaerobní digestí, která má vyšší výnos než jednostupňová. Při výrobě metanu jsou využity metanogenní bakterie [49, 50].

Výtěžek metanu je závislý na teplotě ve fermentoru, koncentraci syrovátky a velikost vyhnívacích nádrží. Dále je důležitá volba bakterií v tomto procesu, aby se zkrátila doba rozkladu. Proces probíhá ve fermentorech při teplotě 35 °C, které jsou vyhřívány teplou vodou, která se ohřála v jiné části výroby. Při použití termofilního režimu se fermentor přehřívá na teplotu 55 °C. V obvyklých případech je výtěžek plynů 35 – 58 m³ z 1 m³ syrovátky zahuštěné na obsah sušiny 70 – 80 %. Z tohoto množství připadá na metan 60 – 62 % [49].

Metan se využívá například v energetickém průmyslu jako pohonná hmota a také v chemickém průmyslu. Spolu s vodíkem tvoří sloučeninu hytan, která má lepší spalovací vlastnosti než zemní plyn [49, 50].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo sledování vybraných faktorů ovlivňujících fermentační procesy laktózy v modelových vzorcích syrovátky za pomoci vybraných kmenů *Kluyveromyces lactis*. Samotná práce je rozdělená do dvou souvisejících částí, část teoretickou a část praktickou.

Cílem teoretické části bylo:

- charakterizovat vlastnosti, tvorbu, složení a zpracování syrovátky,
- popsat princip alkoholové fermentace, charakterizovat rod kvasinek *Kluyveromyces* a průběh tvorby etanolu,
- popsat možnosti biotechnologického využití syrovátky se zaměřením na získávání etanolu.

Cílem praktické části bylo:

- založení fermentačních pokusů se syrovátkou s využitím 5 kmenů kvasinek *Kluyveromyces lactis*, přičemž byly sledovány tyto faktory:
 - koncentrace syrovátky (3 a 5 % w/w)
 - teplota fermentace (20, 28 a 35 °C)
- analýza úbytku substrátu (laktózy) pomocí HPLC-RI během fermentace (5 odběrů),
- vyhodnocení vybraných faktorů, které mohly ovlivnit průběh fermentace syrovátky a formulace závěrů.

5 METODIKA PRÁCE

5.1 Použité pomůcky a chemikálie

5.1.1 Materiál

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

Kvasinky *Kluyveromyces lactis* – kmeny CCDM 251, 252, 255, 742 a 1054

Fyziologický roztok

5.1.2 Chemikálie

Standardy laktózy, glukózy, galaktózy, fruktózy, maltózy a sacharózy (Sigma - Aldrich)

Standard etanolu 99,8 % (Penta)

Carrez I – 30 % (w/w) ZnSO₄ (Penta)

Carrez II – 15 % (w/w) K₄[Fe(CN)₆] (Penta)

Acetonitril pro HPLC ≥ 99,9 % (Sigma - Aldrich)

Ultra čistá voda pro HPLC (přečištěná systémem Aqua MaxTM Ultra 370 Series; Young Lin)

5.1.3 Pomůcky

Běžné laboratorní sklo a pomůcky

Fermentační nádoby s kvasnými zátkami

Filtrační papír KA 4 (Papírna Perštejn s.r.o. Keseg & Rathouský)

Stříkačkové filtry 0,22 μm (Cronus)

5.1.4 Přístroje

Analytické váhy EP 214 CM (OHAUS)

Inkubátor INCU-Line (VWR International)

Magnetické míchadlo MSH-20D (Vitrum)

Kapalinový chromatograf Shimadzu LC-20AD Prominence

- kvartérní pumpa
- pětikanálový degaser DGU - 20A_{5R}
- autosampler SIL - 20A_{CHT}
- diferenciální refraktometrický detektor RID - 20A (vše Shimadzu)

Kolona Agilent Zorbax NH₂ (4,6 x 250 mm x 5 μm) (Agilent Technologies)

Předkolonový cartridge filtr 0,2 μm (Optimize Technologies)

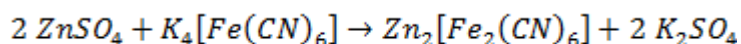
5.2 Popis experimentu

Pro modelové vzorky byla použita sušená demineralizovaná syrovátka, která byla připravena v koncentraci 3 a 5 % (w/w). Obnovená syrovátka byla pasterována při teplotě 72 °C a výdrži 5 minut ve vodní lázni.

Po pasteraci následovalo zchlazení na teplotu fermentace a inokulace příslušným kmenem kvasinek. Inokulum bylo připraveno pomnožením kvasinek v médiu Malt Extract Broth Base při 25 °C po dobu 48 hodin a následným zředěním kvasinkové suspenze 1:9 fyziologickým roztokem. Takto připravené inokulum bylo v množství 1 ml aplikováno do pasterované syrovátky a kvasné nádoby byly uzavřeny kvasnou zátkou.

Takto připravené vzorky byly inkubovány v termostatu při teplotách 20, 28 a 35 °C. Jedna sada vzorků se odebírala pro okamžité hodnocení, tedy v čase 0. Ostatní vzorky se odebíraly postupně v časech 24, 48, 72 a 96 hodin.

Po vytažení vzorků z termostatu bylo nutné zastavit proces fermentace. K tomuto účelu bylo zvoleno číření Carrezovými činidly, které kromě zastavení činnosti enzymů, odstraňují nesacharidové látky rušící stanovení cukrů, především bílkoviny. Čířícího účinku je dosaženo vytvořením sraženiny hexokvanoželeznatanu zinečnatého (viz Obrázek 3).

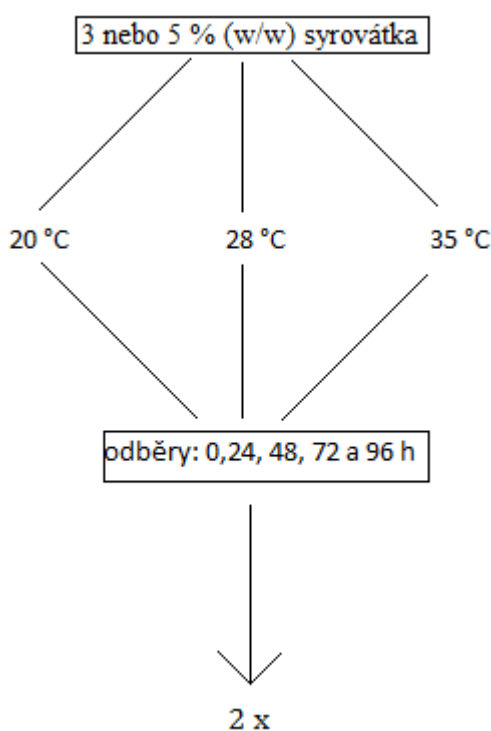


Obrázek 3: Rovnice vzniku sraženiny hexokvanoželeznatanu zinečnatého [51].

Do 10 ml syrovátky byly přidány 2 ml Carrezova činidla I a po důkladném promíchání a stání 1 minutu byly přidány 2 ml Carrezova činidla II. Po uplynutí 1 minuty byly vzorky doplněny po rysku neionizovanou vodou (50 ml odměrná baňka), zfiltrány přes papírový filtr a následně ještě přes stříkačkový filtr.

Takto připravené vzorky byly analyzovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s refraktometrickou detekcí. Byla využita izokratická eluce, jako mobilní fáze byla použita směs acetonitril:voda (70:30) a průtok mobilní fáze byl nastaven na $1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Analýza trvala 20 minut a teplota kolony a detektoru byla udržována na $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Schematicky je experiment zachycen na obrázku (viz Obrázek 4).



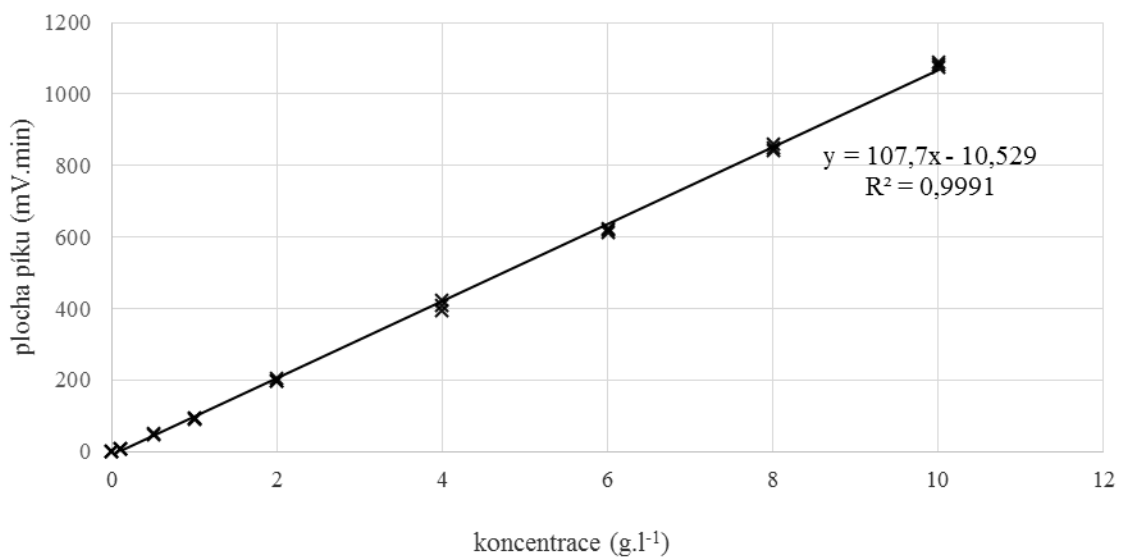
Obrázek 4: Popis experimentu

Výše uvedený postup byl proveden 5krát, tedy pro každý kmen jednou. Pro jeden kmen připraveno celkem 60 kvasných nádob ($5 \text{ odběrové časy} \times 2 \text{ koncentrace syrovátky} \times 3 \text{ teploty inkubace} \times 2 \text{ opakování}$). Z každé kvasné nádoby bylo provedeno 2krát číření. Dohromady tak bylo připraveno 600 vzorků. Každý ze vzorků byl 2krát analyzován pomocí HPLC-RI ($n = 8$).

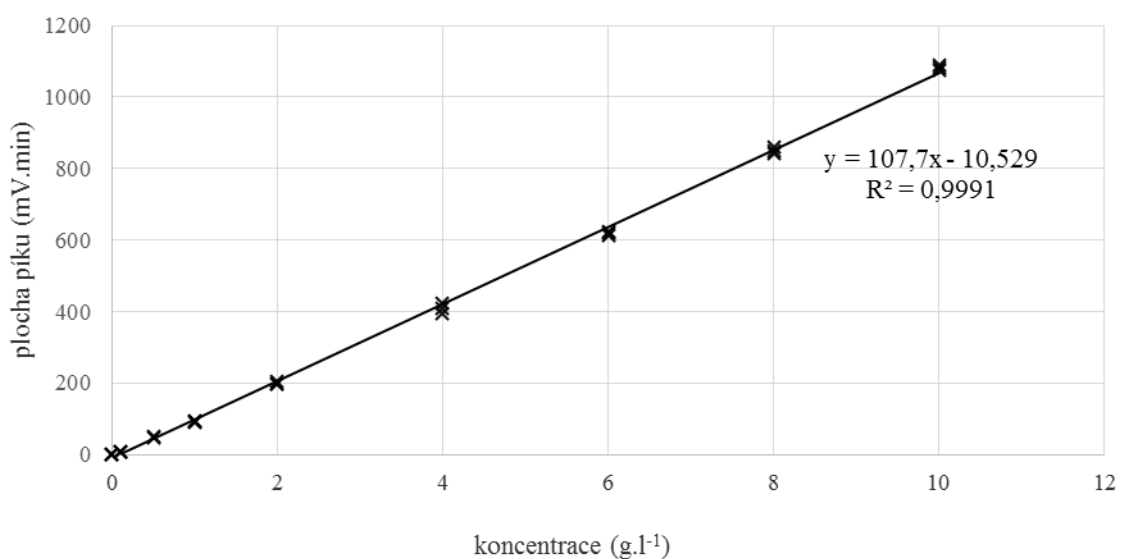
Pro určení obsahu laktózy ve vzorcích byla připravena kalibrační řada o koncentraci 10, 8, 6, 4, 2, 1, 0,5 a 0,1 g.l⁻¹. Z regresní rovnice kalibrační křivky bylo vypočítáno množství laktózy v každém vzorku v %.

6 VÝSLEDKY A DISKUSE

Na obrázku (viz Obrázek 5) je vzorový chromatogram směsného standardu cukrů o koncentraci $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Pomocí programu LabSolution (Shimadzu) byly odečteny plochy píků v jednotkách $\text{mV}\cdot\text{min}$. Na obrázku (viz Obrázek 6) je zobrazena kalibrační přímka laktózy, z jejíž regresní rovnice byly vypočítány koncentrace laktózy v jednotlivých vzorcích. Všechny výsledky koncentrací byly zprůměrovány a vyhodnocovány.



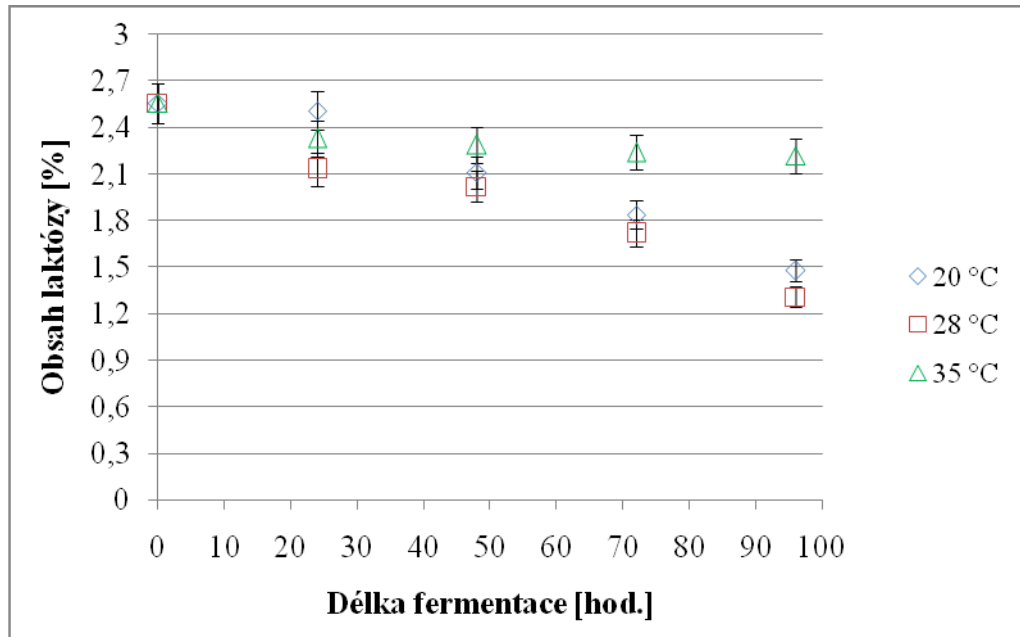
Obrázek 5: Chromatogram směsného standardu cukrů



Obrázek 6: Kalibrační přímka laktózy

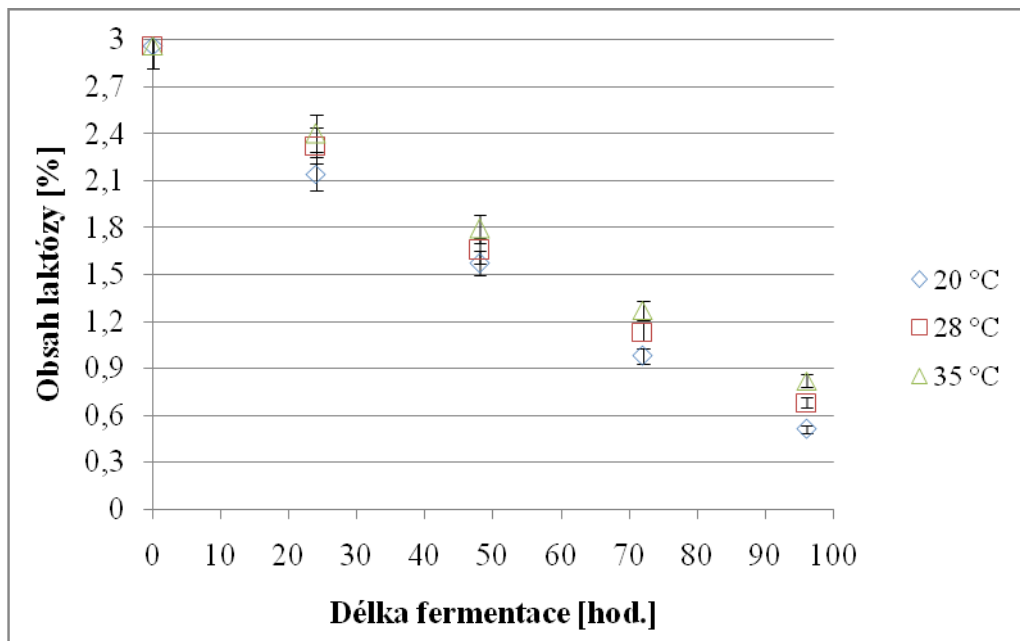
6.1 Průběh fermentace 3% syrovátky

Do grafů (Obrázek 7 - Obrázek 11) byly zaznamenány závislosti obsahu laktózy v procentech na čase ve třech inkubačních teplotách (20, 28, 35 °C). Grafy jsou rozděleny dle kmenů *Kluyveromyces lactis*.



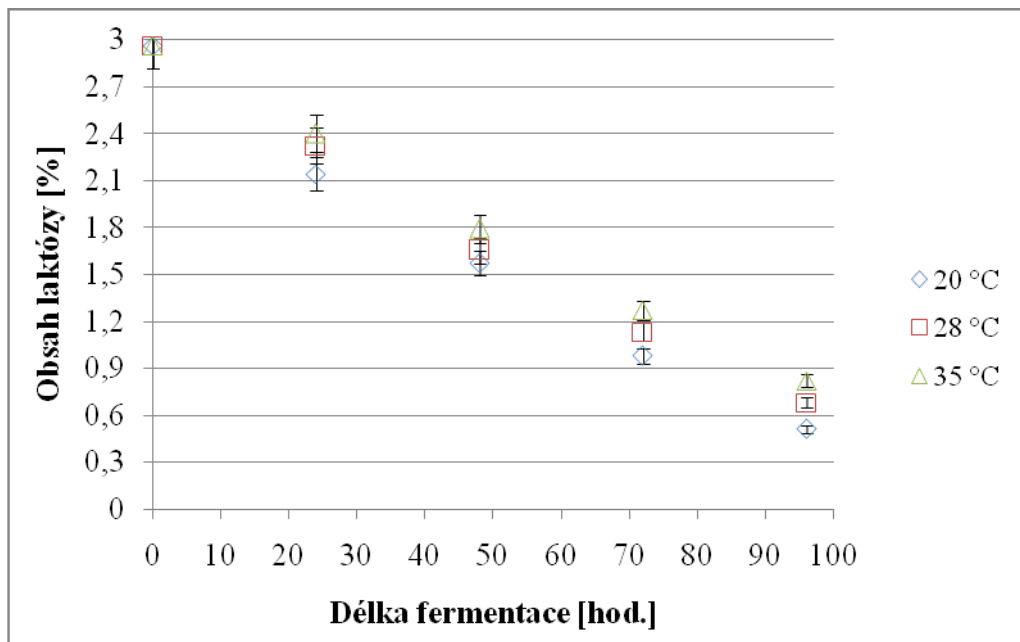
Obrázek 7: Graf závislosti obsahu laktózy na době fermentace v dané teplotě pro kmen CCDM 251

V prvním grafu (viz Obrázek 7) pro kmen CCDM 251 při koncentraci syrovátky 3 % množství laktózy (2,56 %) klesalo ve všech třech teplotách. Značný pokles laktózy byl zaznamenán při teplotě 28 °C. Počáteční množství laktózy se snížilo o 49 % (z 2,56 % na 1,31 %). Naopak nejmenší úbytek byl zaznamenán při teplotě 35 °C, kdy z počátečního množství laktózy bylo zfermentováno pouze 13 % (na 2,22 %).



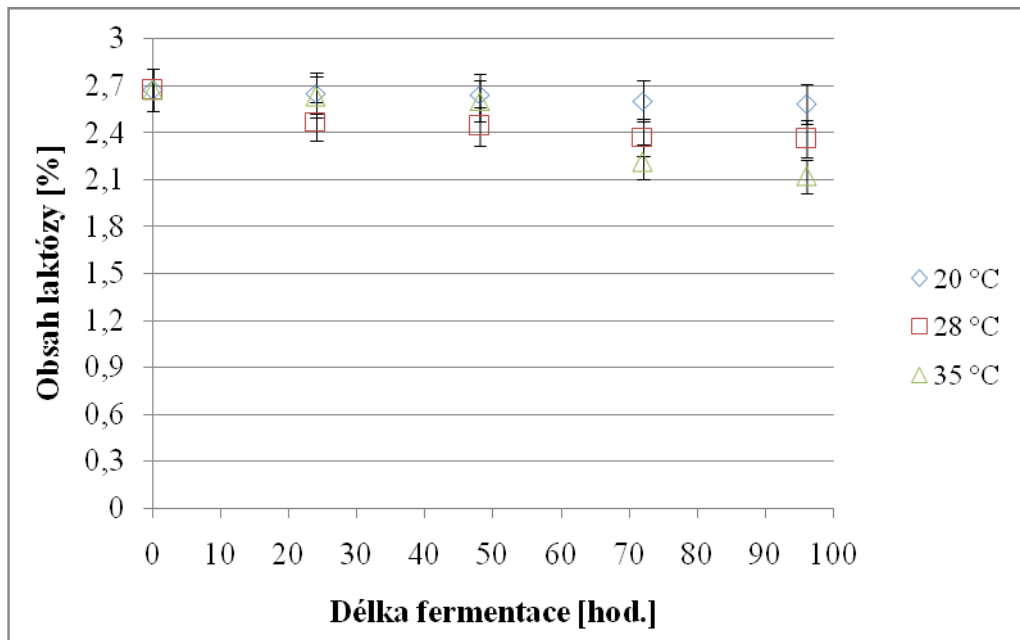
Obrázek 8: Graf závislosti obsahu laktózy na době fermentace v dané teplotě pro kmen CCDM 252

Vzorek fermentovaný kmenem CCDM 252 dle grafu (viz Obrázek 8) vykazoval při všech třech teplotách výrazné snížení obsahu laktózy. Nejvyšší úbytek laktózy probíhal při teplotě 20 °C, úbytek činil 83 % (z 2,96 % na 0,51 %). U zbývajících teplot úbytek činil přibližně 77 % (28 °C) a 72 % (35 °C). Nejintenzivnější poklesy laktózy byly zpozorovány při odběru po 72 hodinách, ale také při odběrech po 96 hodinách. Naopak nejnižší poklesy byly zaznamenány při odběrech po 24 hodinách.



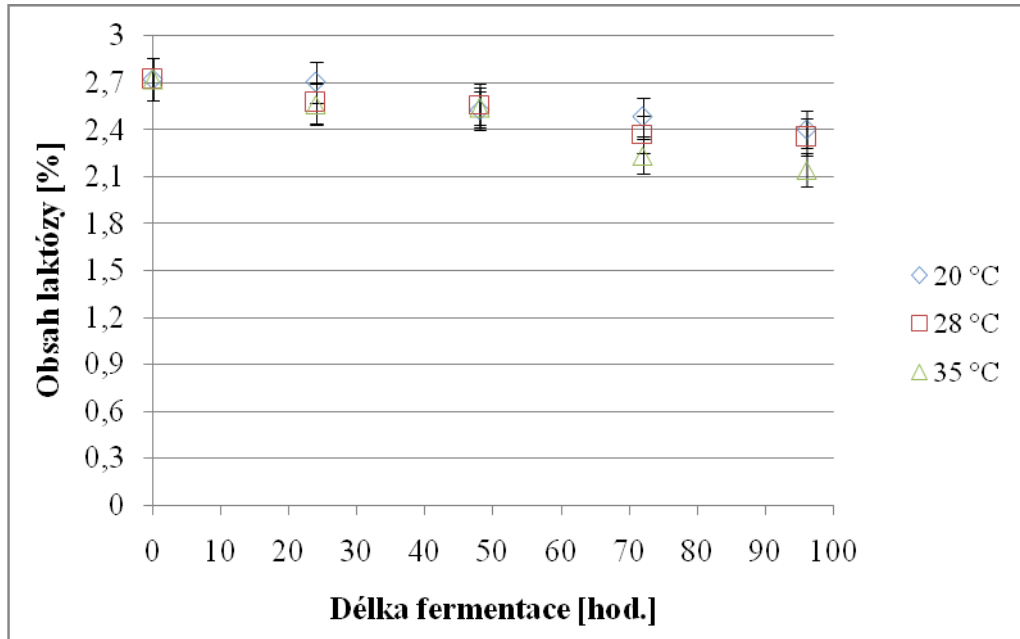
Obrázek 9: Graf závislosti obsahu laktózy na době fermentace v dané teplotě pro kmen CCDM 255

Vzorek po fermentaci kmenem CCDM 255 (viz Obrázek 9) vykazoval úbytek nad 50 % u všech tří teplot. Největší úbytek probíhal při teplotě 28 °C, kdy počáteční množství laktózy (2,43 %) se snížilo o 79 % (na 0,51 %). Naopak nejnižší úbytek 63 % (na 0,9 %) nastal při 20 °C. Nejintenzivnější poklesy laktózy byly zpozorovány při odběru po 48 hodinách, ale také při odběrech po 96 hodinách. Naopak nejnižší poklesy byly zaznamenány při odběrech po 24 hodinách.



Obrázek 10: Graf závislosti obsahu laktózy na době fermentace v dané teplotě pro kmen CCDM 742

Ve vzorku po fermentaci kmenem CCDM 742 (viz Obrázek 10) byl zjištěn nejnižší úbytek laktózy (2,67 %) ze všech zvolených kmenů. Z toho nejvyšší pokles laktózy probíhal při teplotě 35 °C, kde úbytek činil přibližně 21 % (na 2,12 %). Při této teplotě v čase odběru 72 hodin byl zaznamenán i nejintenzivnější pokles obsahu a to o 15 %, u zbylých časů rozdíly byly jen o 1 – 4 %. Nejnižší hodnota úbytku obsahu laktózy, tedy asi jen 3 % (na 2,58 %) byla pozorována při 20 °C.

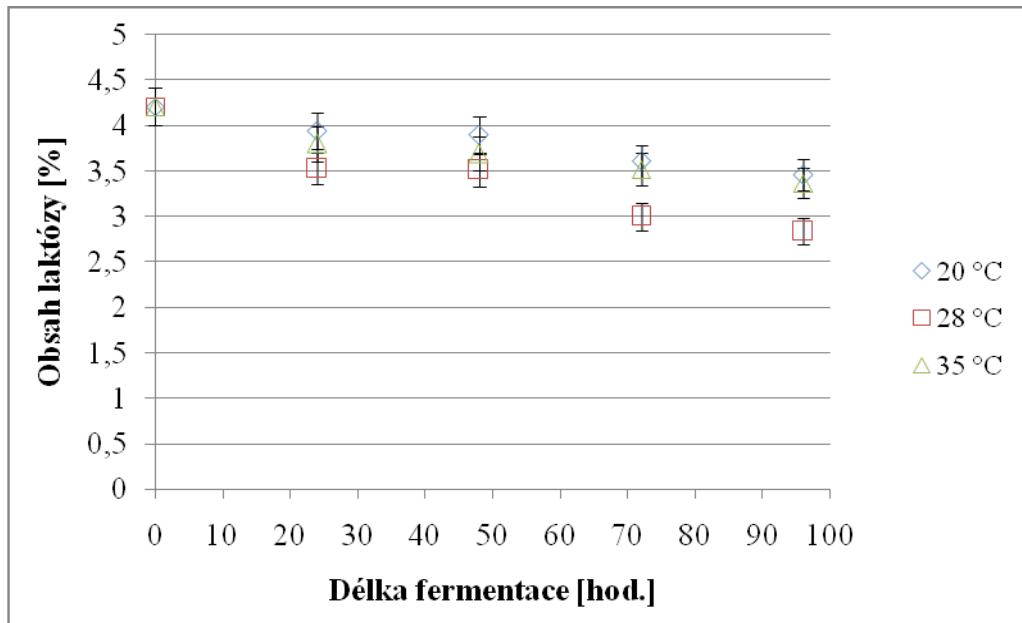


Obrázek 11: Graf závislosti obsahu laktózy na době fermentace v dané teplotě pro kmen CCDM 1054

Ve vzorku po fermentaci kmenem CCDM 1054 (viz Obrázek 11) byl zjištěn také velmi nízký úbytek laktózy (2,72 %). Nejvyšší úbytek byl opět při teplotě 35 °C, tento úbytek činil 21 % (na 2,14 %) a i nejintenzivnějšího úbytku bylo dosaženo při této teplotě při odběru po 72 hodinách (12 %). Nejnižší hodnota úbytku byla opět při 20 °C s 12 % (na 2,40 %).

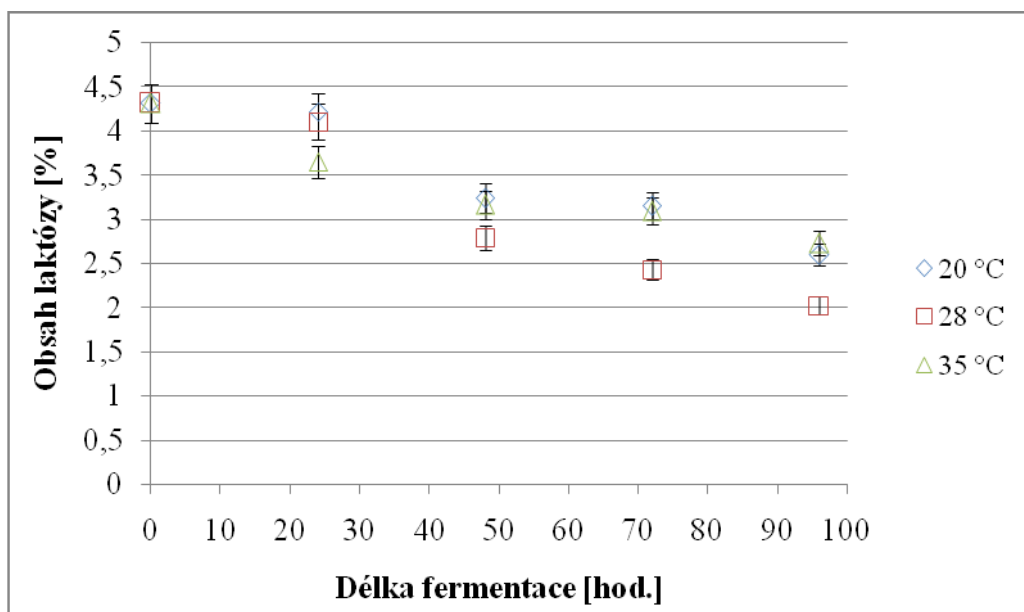
6.2 Průběh fermentace 5% syrovátky

Do grafů (Obrázek 12 – Obrázek 16) byly zaznamenány závislosti obsahu laktózy v procentech na čase ve třech inkubačních teplotách (20, 28, 35 °C) tentokrát pro 5% syrovátku. Grafy jsou opět rozděleny dle jednotlivých kmenů *Kluyveromyces lactis*.



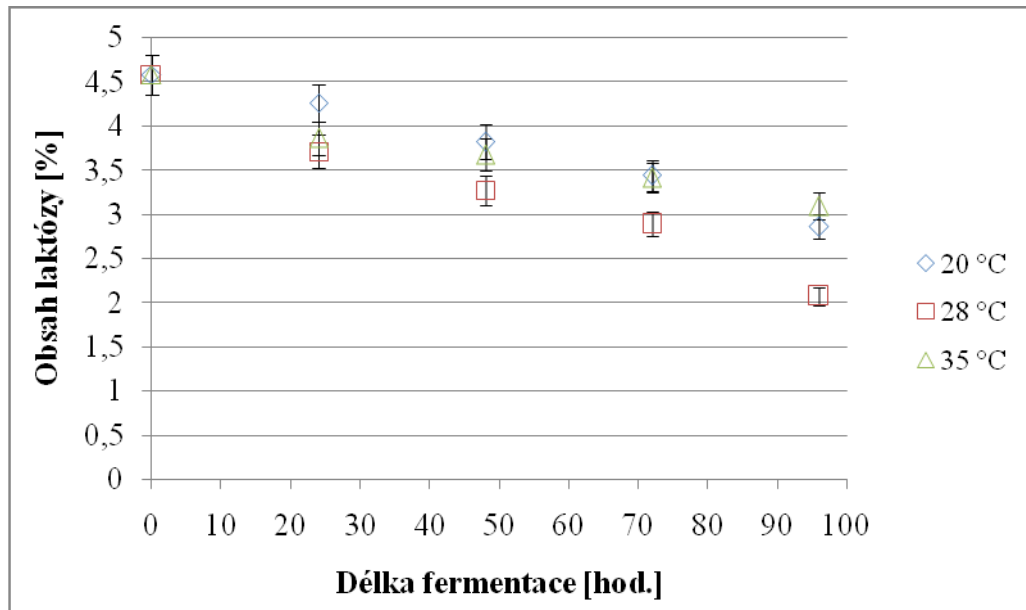
Obrázek 12: Graf závislosti obsahu laktózy na době fermentace v dané teplotě pro kmen CCDM 251

V prvním grafu (viz Obrázek 12) pro kmen CCDM 251 při koncentraci syrovátky 5 % se množství laktózy (4,21 %) snižovalo. Nejvyšší pokles laktózy byl zaznamenán při teplotě 28 °C. Počáteční množství laktózy se snížilo o 33 % (na 2,84 %). Naopak nejmenší úbytek byl pozorován při teplotě 20 °C. Z počátečního množství ubylo 18 % (na 3,46 %). Obdobné množství bylo i při teplotě 35 °C, kde úbytek činil 20 %.



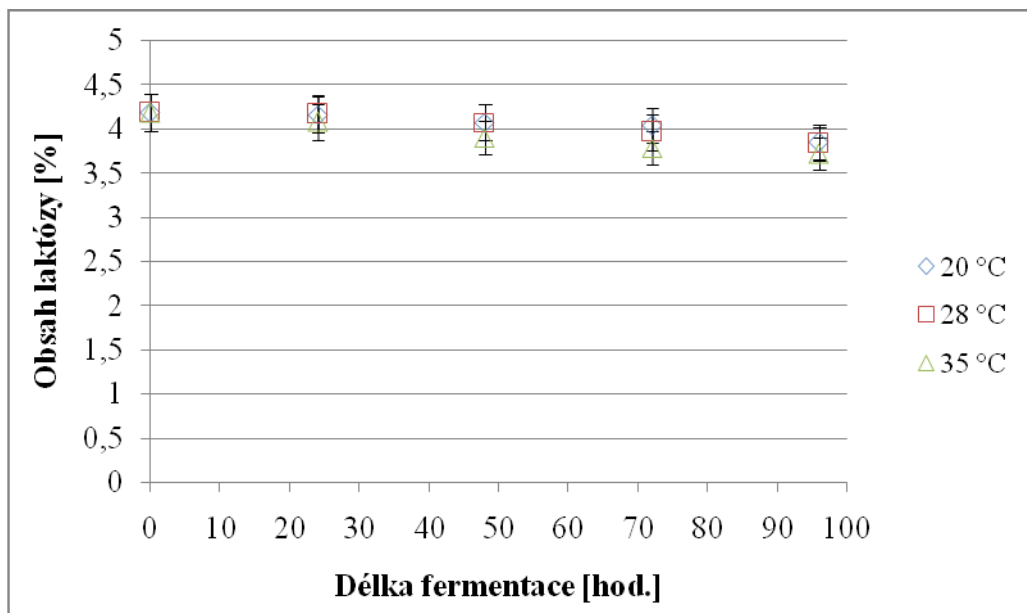
Obrázek 13: Graf závislosti obsahu laktózy na době fermentace v dané teplotě pro kmen CCDM 252

Vzorek po fermentaci kmenem CCDM 252 (viz Obrázek 13) s obsahem laktózy (4,31 %) vykazoval nejvyšší úbytek (nad 50 %) u teploty 28 °C. Naopak nejnižší úbytek 37 % (na 2,73 %) byl zjištěn při 35 °C. Nejintenzivnější poklesy laktózy byly zpozorovány při odběru po 48 a 96 hodinách. Naopak nejnižší poklesy byly zaznamenány při odběrech po 24 hodinách.



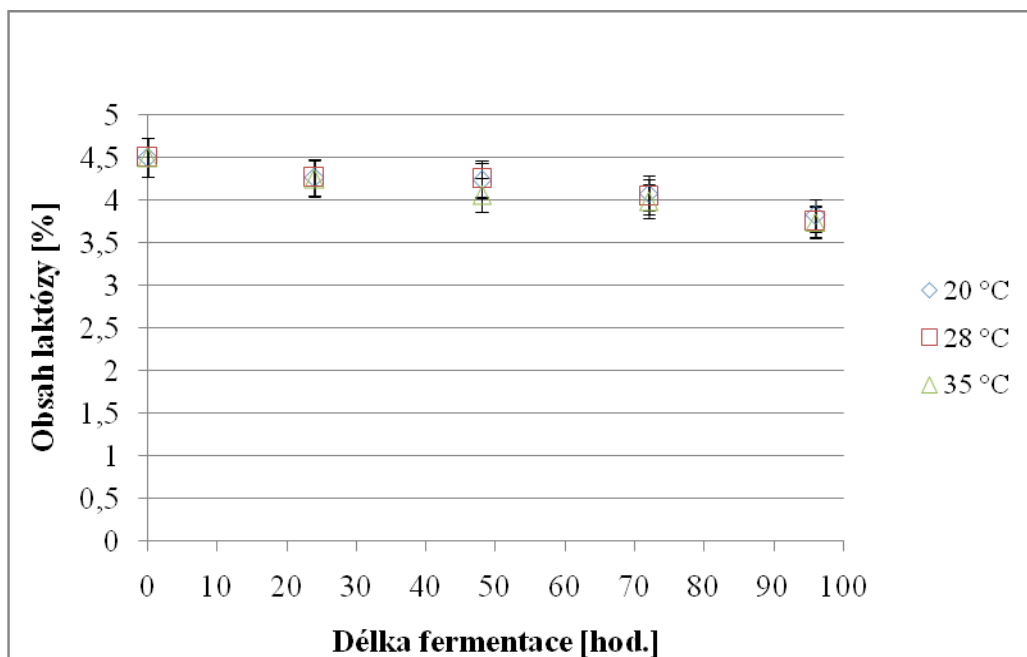
Obrázek 14: Graf závislosti obsahu laktózy na době fermentace v dané teplotě pro kmen CCDM 255

Vzorek fermentovaný kmenem CCDM 255 dle grafu (viz Obrázek 14) vykazoval při všech třech teplotách snížení obsahu laktózy. Nejvyšší úbytek laktózy probíhal při teplotě 28 °C, úbytek činil 55 % z původního množství laktózy (ze 4,58 % na 2,07 %). U zbylých teplot 20 a 35 °C byl úbytek přibližně 38 a 33 % (na 2,86 % a na 3,09 %). Nejintenzivnější rozdíl byl zaznamenán v odběrech po 96 hodině a to při teplotách 20 a 28 °C.



Obrázek 15: Graf závislosti obsahu laktózy na době fermentace v dané teplotě pro kmen CCDM 742

Ve vzorku po fermentaci kmenem CCDM 742 (viz Obrázek 15) byl zjištěn opět nejvyšší úbytek laktózy ze všech zvolených kmenů. Nejvyšší pokles laktózy byl zaznamenán při 35 °C, kde úbytek činil jen 11 % (ze 4,18 % na 3,72 %). Nejnižší hodnota úbytku obsahu laktózy, tedy asi jen 8 % (na 3,85 %), probíhala při obou zbylých teplotách. Během prvních 24 hodin nedošlo při teplotě 20 a 28 °C k téměř žádné fermentaci laktózy.

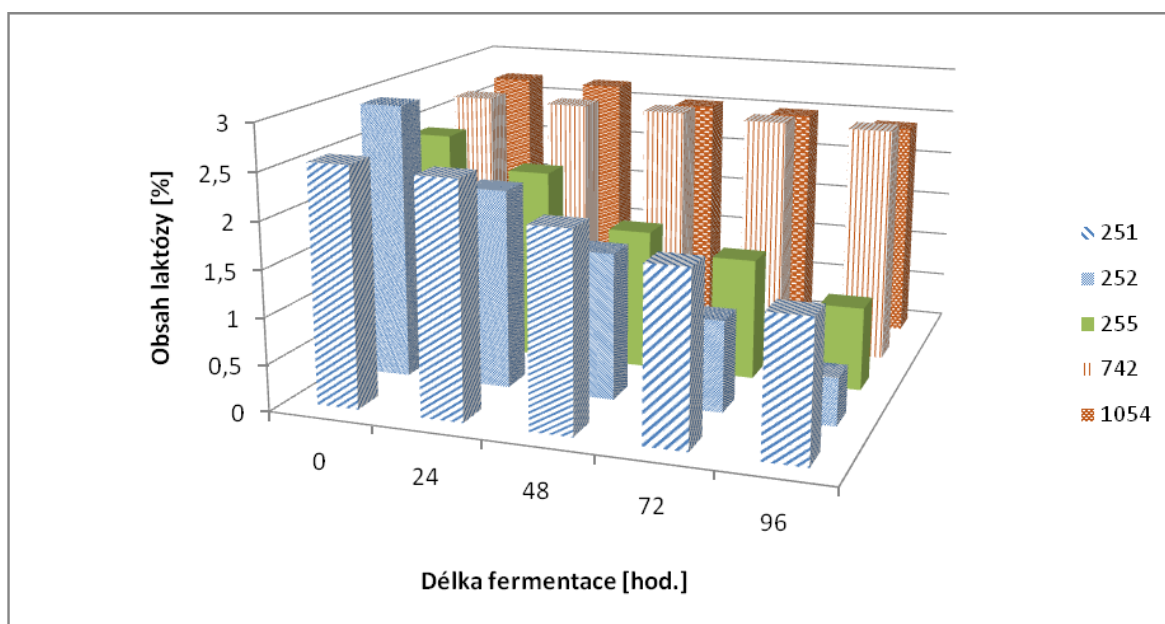


Obrázek 16: Graf závislosti obsahu laktózy na době fermentace v dané teplotě pro kmen CCDM 1054

Ve vzorku po fermentaci kmenem CCDM 1054 (viz Obrázek 16) byl zjištěn velmi malý úbytek laktózy. Nejvyšší úbytek byl při teplotách 28 a 35 °C, tento úbytek činil 15 % (ze 4,50 % na 3,75 %). Nejnižší hodnota úbytku byla při 20 °C s 13 % (na 3,82 %).

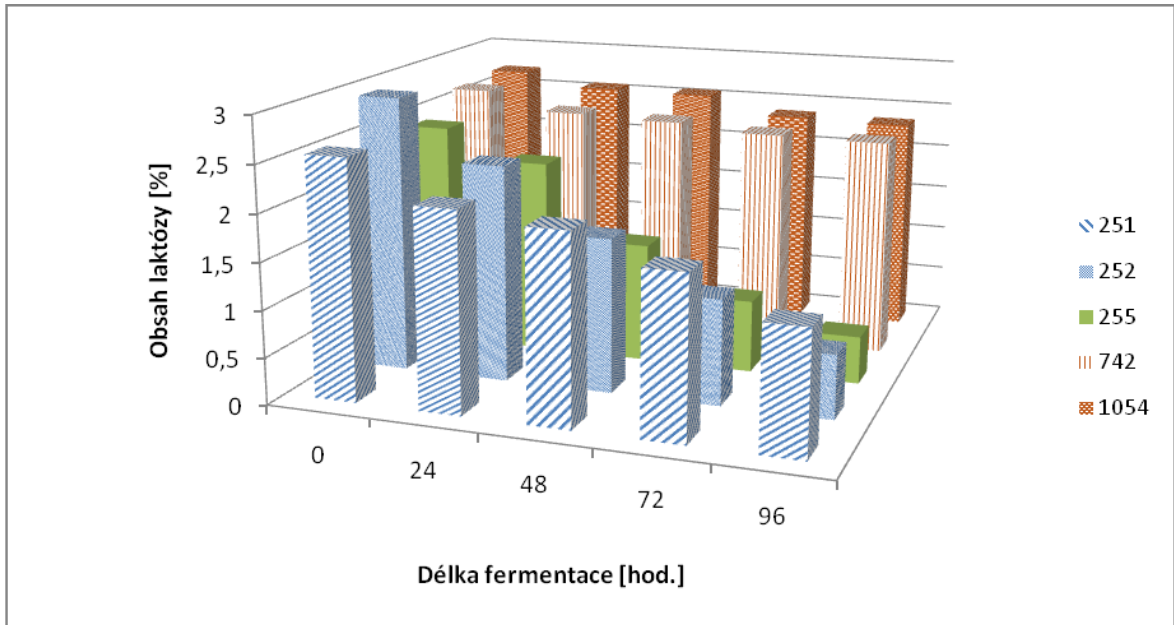
6.3 Porovnání jednotlivých kmenů *Kluyveromyces lactis* při fermentaci laktózy

Pro názornější srovnání účinku jednotlivých kmenů *Kluyveromyces lactis* byly zaznamenány grafy závislosti obsahu laktózy na době fermentace pro 3% syrovátku (viz Obrázek 17 – Obrázek 19) a 5% syrovátku (viz Obrázek 20 – Obrázek 22). Každá z fermentačních teplot byla zobrazena zvlášť.



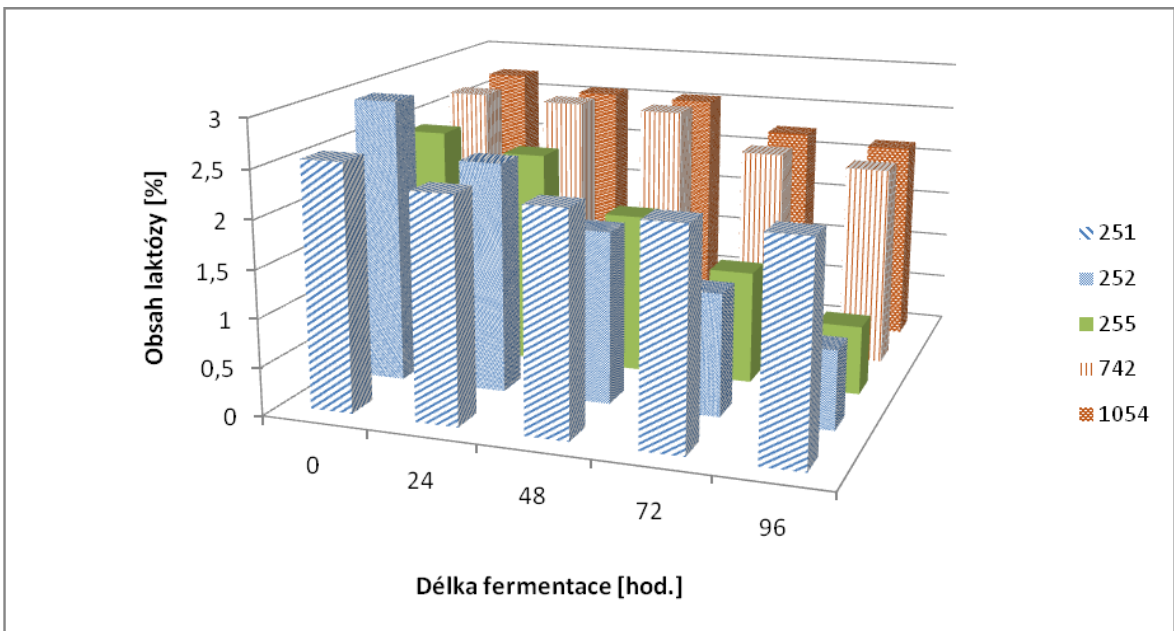
Obrázek 17: Graf závislosti obsahu laktózy na době fermentace 3% syrovátky při 20 °C

Dle tohoto grafu (viz Obrázek 17) lze vyčíst nejvyšší úbytek laktózy u kmene CCDM 252. Naopak nejnižší pokles obsahu laktózy byl pozorován u kmenů CCDM 742 a 1054. Také lze z grafu vyčíst nižší úbytek laktózy do 24 hodiny.



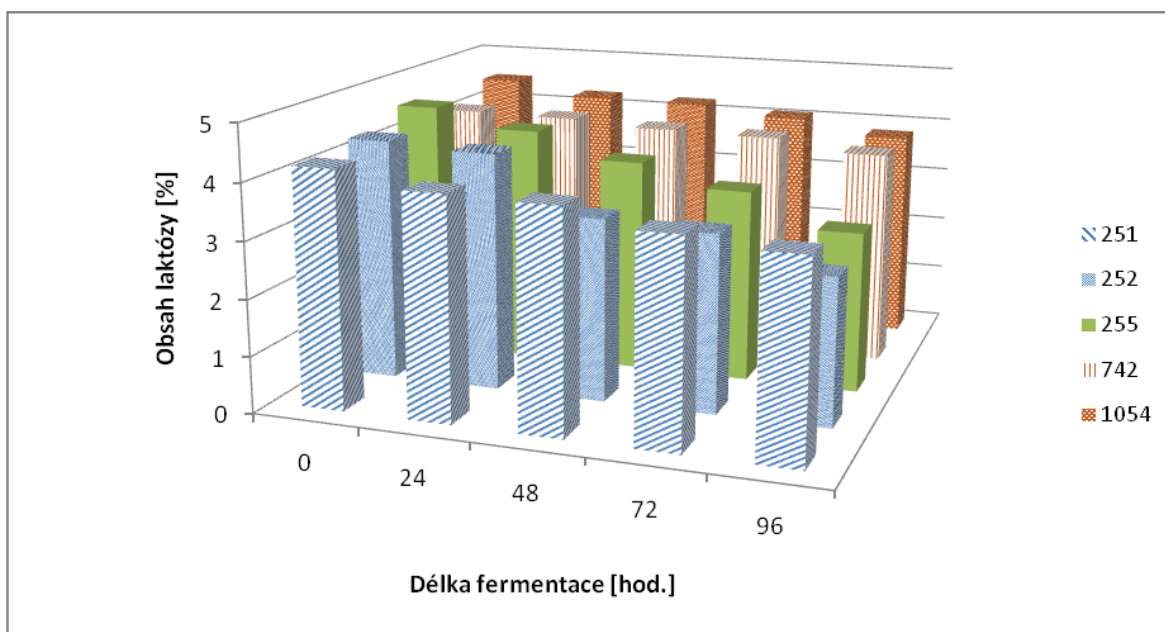
Obrázek 18: Graf závislosti obsahu laktózy na době fermentace 3% syrovátky při 28 °C

Na grafu (viz Obrázek 18) při teplotě 28 °C je zřejmý nejvýraznější úbytek laktózy u kmenů CCDM 252 a 255. Nejnižší úbytek byl opět zjištěn u kmenů CCDM 742 a 1054.



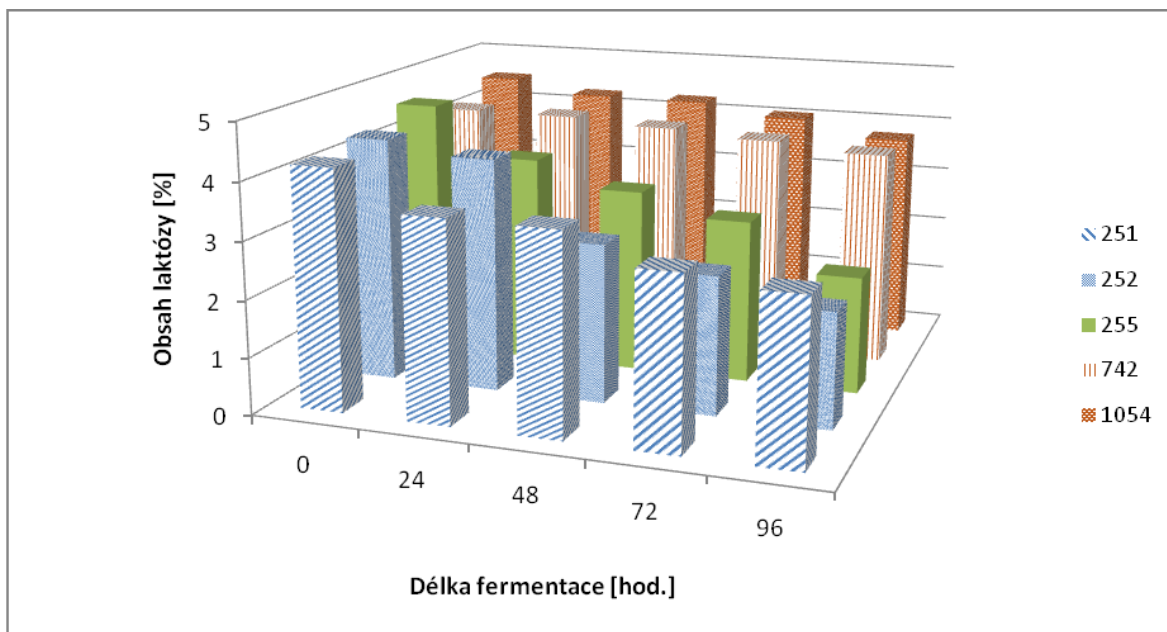
Obrázek 19: Graf závislosti obsahu laktózy na době fermentace 3% syrovátky při 35 °C

U grafu (viz Obrázek 19) při 35 °C pro 3% syrovátku je viditelný pokles laktózy u kmenů CCDM 252 a 255, kdy hodnoty dosahovaly pod 1 %. Pro kmen CCDM 251 nemusela být tato kultivační teplota vhodná. Nejvíce se kvasinky tohoto kmene projevovaly do 24 hodin, kdy z původního množství laktózy (2,56 %) ubylo 9 %, postupem času úbytek činil kolem 1 – 2 %.



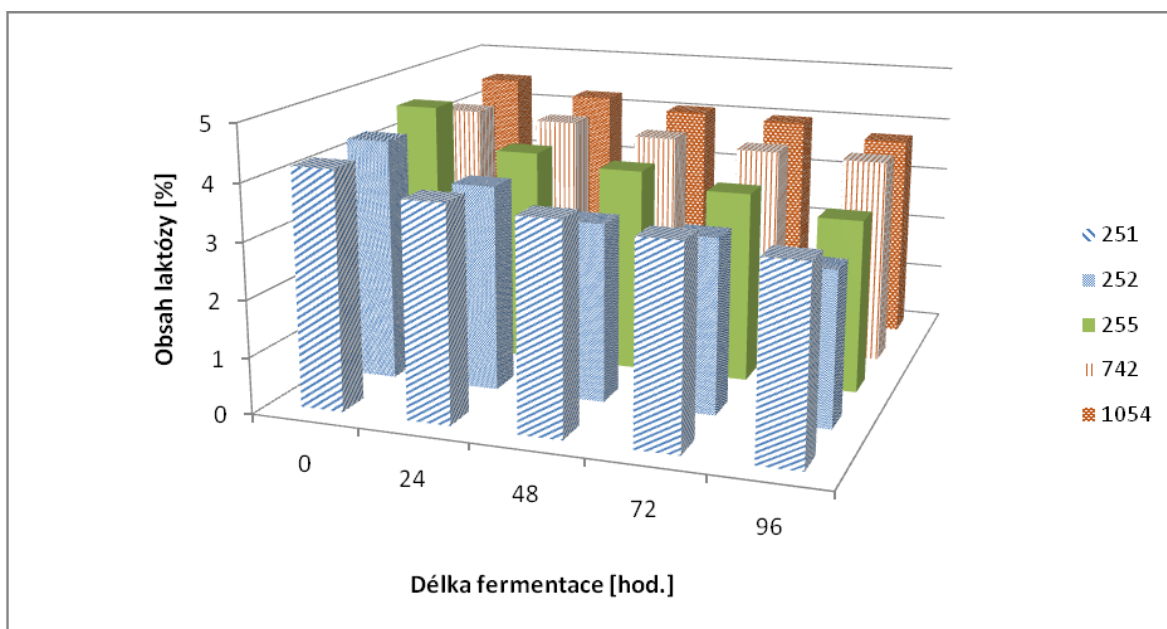
Obrázek 20: Graf závislosti obsahu laktózy na době fermentace 5% syrovátky při 20 °C

V případě 5% syrovátky byly úbytky laktózy u některých kmenů málo patrné, laktóza byla (ve srovnání s 3% syrovátkou) fermentována o poznání méně. Z grafu (viz Obrázek 20) lze při 20 °C vyčíst nejvyšší úbytek laktózy účinkem kmenů CCDM 252 a 255, kdy hodnoty úbytku byly u obou kolem 40 %. Nejméně pak byla laktóza fermentována u kmene CCDM 742 (o 8 %) a CCDM 1054 (o 13 %).



Obrázek 21: Graf závislosti obsahu laktózy na době fermentace 5% syrovátky při 28 °C

Při 28 °C je na grafu (viz Obrázek 21) znatelný úbytek laktózy u kmene CCDM 252 a také 255, kdy úbytek činil zhruba 50 %. U kmene CCDM 251 došlo ke snížení laktózy o 33 %. Kmeny CCDM 742 a 1054 fermentovaly laktózu jen nepatrně.



Obrázek 22: Graf závislosti obsahu laktózy na době fermentace 5% syrovátky při 35 °C

Na posledním grafu (viz Obrázek 22), kdy fermentace 5% syrovátky probíhala při 35 °C, je výsledek obdobný jako při 20 °C. Zřetelné úbytky byly zaznamenány u kmenů CCDM 252 a 255. Nejnižší hodnoty úbytku jsou zejména opět u kmene CCDM 742 (o 11 %) a také u CCDM 1054 (o 15 %).

6.4 Souhrnná diskuze

Ze získaných výsledků a prezentovaných grafů je patrné, že nejvyšších úbytků laktózy, a tedy nejúčinnější fermentace, bylo dosaženo pro většinu kmenů při teplotě 28 °C. Naopak při teplotách 20 a 35 °C probíhala fermentace laktózy v menší míře. Odborná literatura [31, 35] uvádí pro některé kmeny kvasinek *Kluyveromyces* schopnost růstu a fermentace při teplotním optimu 25 – 35 °C a dokonce při teplotách 50 – 55 °C. Výsledky získané v této diplomové práci s těmito informacemi korespondují zejména v případě fermentační teploty 28 °C, která byla pro většinu kmenů optimální pro zkvašování laktózy. Při teplotě 35 °C docházelo k fermentaci laktózy také, ale úbytek byl jen v malém množství. Při vyšších teplotách by bylo v očekávání rychlejšího úbytku laktózy například po 24 hodinách k čemuž nedocházelo. Při teplotě 28 °C, u které byl detekován nejintenzivnější pokles laktózy, byl až při odběru ve 48 hodině, ale také po odběrovém čase 96 hodin. Také při nejnižší použité fermentační teplotě, tj. 20 °C, kvasinky laktózu zkvašovaly, ale opět u většiny kmenů v menší míře než při 28 °C.

Nejen inkubační teplota, ale i koncentrace syrovátky měla vliv na úbytek laktózy. Při nižší koncentraci (tedy 3 %) byl úbytek laktózy procentuálně vyšší než při fermentaci 5% syrovátky. Tyto problémy mohou být přičítány osmotické citlivosti (v důsledku vysokých koncentrací laktózy), ale také nízké toleranci k etanolu, který mohl při fermentaci vzniknout [35].

Rozsah těchto účinků (teploty a koncentrace syrovátky) se zdá být závislý i na zvoleném kmenu kvasinek. Bylo upozorováno, že vyšší tolerance k těmto účinkům měly kmeny CCDM 251, 252 a 255. Zbylé dva kmeny (CCDM 742 a 1054) mohly být jednak citlivější na podmínky fermentace již uvedené, ale i na koncentraci kyslíku, pH a obsahu dalších živin, které mohou hrát klíčovou roli [35]. Nízký pokles laktózy mohl být dále způsoben špatnou adaptibilitou těchto kmenů vůči složení a vlastnostem syrovátky, ale také krátkou dobou inkubace. Přeměna laktózy na galaktózu, glukózu a etanol i v menší míře, může

znamenat, že tyto produkty stačí kvasinkám k jejich přežití. Kdy hlavně galaktóza a glukóza jim slouží jako zdroj uhlíku.

Metoda použitá při tomto výzkumu bude vyžadovat další optimalizaci, aby se dosáhlo přesnějších výsledků. Optimalizaci by byla vhodné provést u přípravy vzorků, zvolením počáteční koncentrace laktózy, výběrem vhodného pH, přidavkem enzymů nebo výběrem fermentačního prostředí (kombinací mikroorganismů). Jednou z možností je také kultivace a adaptace kmene *Kluyveromyces lactis* na dané prostředí syrovátky. Dále bude potřeba optimalizovat metodiku HPLC stanovení tak, aby bylo možné v jednom kroku stanovit nejen množství substrátu (laktózy), ale i produktu fermentace (etanolu).

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo sledování obsahu laktózy po fermentaci pěti kmenů kvasinek *Kluyveromyces lactis* ve vzorcích syrovátky. Byl sledován vliv vybraných faktorů, (fermentační teplota, koncentrace syrovátky) na průběh fermentace během 96 hodin. Sledováním těchto faktorů měly být získány poznatky o tom, při jakých optimálních podmínkách by se mělo množství laktózy maximálně snižovat a přetvářet se na možné produkty.

Prvním sledovaným faktorem bylo pozorovat změny obsahu laktózy při třech fermentačních teplotách (20, 28 a 35 °C). Při zvolených teplotách se nejvíce úbytku laktózy projevvalo při teplotě 28 °C, kdy lze říci, že při této teplotě byly kvasinky nejproduktivnější. Tento výsledek odpovídal s porovnanou odbornou literaturou.

Druhým vyhodnocovaným faktorem bylo porovnat vliv koncentrace syrovátky (3 a 5 %) na průběh fermentace laktózy. Všechny kmeny kvasinek účinněji fermentovaly 3% syrovátku, u 5% syrovátky byly pozorovány menší úbytky laktózy.

Doba inkubace byla třetím faktorem, jenž byl v této práci zkoumán. Fermentace byla sledována v rámci 4 dnů (5 odběrů po 24 hodinách – 0, 24, 48, 72 a 96 hodin). Výsledky byly navzájem porovnány a bylo zjištěno, že nejintenzivnější úbytky laktózy probíhaly většinou při odběru po 48 hodinách. Tento faktor byl ovlivněn i vybranými kmeny, kdy i po 96 hodinách byl zaznamenán výraznější úbytek laktózy.

Posledním posuzovaným faktorem byl rozdíl aktivity 5 kmenů (CCDM 251, 252, 255, 742 a 1054) kvasinek *Kluyveromyces lactis* během fermentace. Z daných kmenů byl jako nejproduktivnější vyhodnocen kmen CCDM 252. Tento kmen vykazoval při všech teplotách i koncentracích syrovátky nejvyšší aktivitu při fermentaci laktózy. Naopak kmeny 742 a 1054 patřily k nejméně účinným.

Syrovátka je důležitý vedlejší produkt sýrařské technologie. Kromě tradičního zpracování roste poptávka po jejím biotechnologickém využití. Jednou z možností je alkoholová fermentace pomocí kvasinek *Kluyveromyces*. Jejich příznivá vlastnost spočívá ve schopnosti zkvašovat laktózu přímo. V této práci byla tato schopnost ověřena, v dalších pracích by bylo vhodné zaměřit se na další faktory, které by mohly průběh fermentace ovlivnit a také vyvinout metodiku pro stanovení etanolu spolu s laktózou (což se v této diplomové práci bohužel nepodařilo).

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] PANESAR, P., J. KENNEDY, D. GANDHI a K. BUNKO. Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry*, 2007, 105, 1-14. ISSN 03088146.
- [2] SISO, Gonzáles, M. I. The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresource Technology*, 1996, 57, 111. ISSN 0960-8524.
- [3] RAMOS, O. L., R. N. PEREIRA, R. M. RODRIGUES, J. A. TEIXEIRA, A. A. VICENTE a F. X. MALCATA. Whey and Whey Powders: Production and Uses. *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier, 2016, 498. ISBN 9780123849533.
- [4] ONWULATA, Charles a Peter HUTH (eds.). *Whey processing, functionality and health benefits*. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2008. ISBN 0813809037.
- [5] VASEY, Christopher. *The whey prescription: the healing miracle in milk*. Rochester, Vt.: Healing Arts Press, 2006. ISBN 1594771278.
- [6] FORMAN, Ladislav. *Mlékárenská technologie II*. Vyd. 2. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1996. ISBN 8070802502.
- [7] ŠUSTOVÁ, Květoslava a Vladimír SÝKORA. *Mlékárenské technologie*. V Brně: Mendelova univerzita, 2013. ISBN 978-80-7375-704-5.
- [8] KRENÍKOVÁ, Věra. *Odpady a druhotné suroviny I*. Ústí nad Labem: Univerzita Jana Evangelisty Purkyně, Fakulta životního prostředí, 2014. ISBN 9788074148699.
- [9] DAVÍDEK, Jiří, Gustav JANÍČEK, Jan POKORNÝ. *Chemie potravin*. SNTL/ALFA: Praha, 1983, 629.
- [10] BŘEZINA, Pavel a Jaroslav JELÍNEK. *Chemie a technologie mléka: určeno pro posl. fak. potravinářské a biochemické technologie*. Praha: Mezinárodní organizace novinářů, 1990. ISBN 8070800755.
- [11] BYLUND, Gösta. *Dairy processing handbook*. 2. Sweden: Tetra Pak Processing Systems AB, 2003. ISBN 9163134276.
- [12] TRATNIK, Ljubica. Uloga sirutke u proizvodnji funkcionalne mliječne hrane. *Mljekarstvo*, 2003, 53, 325-352. ISSN 0026-704X.

- [13] DRAPIER-BECHE, N., Jacques FANNI a Marc PARMENTIER. Physical and Chemical Properties of Molecular Compounds of Lactose. *Journal of Dairy Science*, 1999, 82, 2558-2563. ISSN 00220302.
- [14] GÄNZLE, Michael G., Gottfried HAASE a Paul JELEN. Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. *International Dairy Journal*, 2008, 18, 685-694. ISSN 09586946.
- [15] KADLEC, Pavel. *Technologie potravin II*. Praha: VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-510-7.
- [16] JELEN, P., H. ROGINSKI, J. W. FUQUAY, P. F. FOX. Whey Processing - utilization and products. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. London: Academic Press, 2003, 4, 2745.
- [17] SUKOVÁ, Irena. *Syrovátka v potravinářství*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2006. Potravinářské informace. ISBN 80-7271-173-3.
- [18] CHEN, G. Q., F. I. I. ESCHBACH, M. WEEKS, S. L. GRAS a S. E. KENTISH. Removal of lactic acid from acid whey using electrodialysis. *Separation and Purification Technology*, 2016, 158, 230-237. ISSN 13835866.
- [19] Nejlepší dostupné techniky v průmyslu potravin, nápojů a mléka: Zařízení pro úpravu a zpracování mléka. *eAGRI* [online]. 2012 [cit. 2017-04-30]. Dostupné z: eagri.cz/public/web/file/32314/PriruckaBREFmleko.doc
- [20] SIENKIEWICZ, Tadeusz, Carl-Ludwig RIEDEL. *Whey and whey utilization*. Fachbuchverlag, 1986, 379. ISBN 3343001775.
- [21] MERGL, Miloš a Ladislav FORMAN. *Syrovátka - její užití v lidské výživě a ve výživě zvířat*. Praha: Střed. techn. inform. potrav. prům. VÚPP, 1979, 343.
- [22] FELTL, Tomáš. *Pracovní návod: Fermentace* [online]. 2012 [cit. 2017-04-30]. Dostupné z: www.expoz.cz/sites/default/files/media/texty/50/expoz-pracovninavod-ch18-v01-r01.pdf
- [23] CARDONA, Carlos A., Óscar J. SÁNCHEZ a Luis F. GUTIÉRREZ. *Process synthesis for fuel ethanol production*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2010. ISBN 9781439815984.

- [24] TADEGE, Million. Ethanol fermentation: new functions for an old pathway. *Trends in Plant Scienc*, 1999, 4, 320-325. ISSN 13601385.
- [25] EDITORS a WILLIAM S. ADNEY, et. al. *Biotechnology for fuels and chemicals: The twenty-ninth symposium*. United States: Humana Press, 2009, 812. ISBN 9781603275262.
- [26] SOCCOL, Carlos Ricardo, Ashok PANDEY a Christian LARROCHE. *Fermentation processes engineering in the food industry*. CRC Press, 2013, 510. ISBN 9781439887653.
- [27] *Technologie výroby lihu a destilátů: výroba průmyslového lihu* [online]. 2017 [cit. 2017-04-30]. Dostupné z: web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo
- [28] SOCCOL, Carlos Ricardo, et al. Brazilian biofuel program: An overview. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 2005, 64, 897-904. ISSN 0975-1084.
- [29] Edited by BERNARDES, Marco Aurélio dos Santos. *Biofuel Production-Recent Developments and Prospects*. InTech, 2011, 85-101. ISBN 978-953-307-478-8.
- [30] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. vyd. Praha: Academia, 2008. ISBN 9788020017031.
- [31] SPOHNER, S. C., V. SCHAUM, H. QUITMANN a P. CZERMAK. *Kluyveromyces lactis: An emerging tool in biotechnology*. *Journal of Biotechnology*, 2016, 222, 104-116. ISSN 01681656.
- [32] RUBIO-TEXEIRA, Marta. Endless versatility in the biotechnological applications of *Kluyveromyces LAC* genes. *Biotechnology Advances*, 2006, 24, 212-225. ISSN 07349750.
- [33] BUGLASS, Alan J. *Handbook of alcoholic beverages: technical, analytical and nutritional aspects*. Chichester, West Sussex, England: John Wiley, 2011, 80-86. ISBN 9780470512029.
- [34] ŠÍCHO, Vladislav, Zdeněk VODRÁŽKA a Blanka KRÁLOVÁ. *Potravinářská biochemie*. 2., dopln. a přeprac. vyd. Praha: SNTL, 1981.
- [35] GUIMARÃES, 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, 375-384. ISSN 07349750.
- [36] ALS-NIELSEN, Bodil, Lise L. GLUUD, Christian GLUUD. Non-absorbable disaccharides for hepatic encephalopathy: systematic review of randomised trials. *British Medical Journal*, 2004, 1046-1050. ISSN 0959-8138.
- [37] RUDOLFOVÁ, Jana, Ladislav ČURDA. Prebiotický účinek galaktooligosacharidů a využití laktosy pro jejich produkci. *Chemické listy*, 2005, 99, 168-174.
- [38] PINTADO, Manuela E., Angela C. MACEDO a F. Xavier MALCATA. Review: Technology, Chemistry and Microbiology of Whey Cheeses. *Food Science & Technology International*, 2001, 7, 105-116. ISSN 15321738.
- [39] Ovčí mléko a mléčné výrobky: Ovčí výrobky. *Zootechnika* [online]. 2009 [cit. 2017-04-30]. Dostupné z: www.zootechnika.estranky.cz/clanky/chov-ovci/ovci-mleko-a-mlecne-vyrobky
- [40] ALONSO, Saúl, Manuel RENDUELES a Mario DÍAZ. Simultaneous production of lactobionic and gluconic acid in cheese whey/glucose co-fermentation by *Pseudomonas taetrolens*. *Bioresource Technology*, 2015, 196, 314-323. ISSN 09608524.
- [41] MAWSON, A. John. Bioconversions for whey utilization and waste abatement. *Bioresource Technology*, 1994, 47, 195-203. ISSN 09608524.
- [42] HUANG, Yan a Shang-Tian YANG. Acetate production from whey lactose using co-immobilized cells of homolactic and homoacetic bacteria in a fibrous-bed bioreactor. *Biotechnol Bioeng*, 1998, 60, 498-507. ISSN 0006-3592.
- [43] BOYAVAL, Patrick a Christian CORRE. Continuous fermentation of sweet whey permeate for propionic acid production in a CSTR with UF recycle. *Biotechnology Letters*, 1987, 9, 801-806. ISSN 0141-5492.
- [44] LEE, P. C., W. G. LEE, S. KWON, S. Y. LEE a H. N. CHANG. Batch and continuous cultivation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* for the production of succinic acid from whey. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, 54, 23-27. ISSN 0175-7598.

- [45] AMADO, I. R., J. A. VÁZQUEZ, L. PASTRANA a J. A. TEIXEIRA. Cheese whey: A cost-effective alternative for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. *Food Chemistry*, 2016, 198, 54-61. ISSN 03088146.
- [46] ZABED, H., J. N. SAHU, A. SUELY, A. N. BOYCE a G. FARUQ. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2017, 71, 475-501. ISSN 13640321.
- [47] KOYAMA, Y., R. ZHAO, M. IKE a K. TOKUYASU. *Candida utilis* assimilates oligomeric sugars in rice straw hydrolysate via the Calcium-Capturing-by-Carbonation (CaCCO) process for glutathione- and cell-biomass production. *Bioresource Technology*. 2014, 172, 413-417. ISSN 09608524.
- [48] ZAFAR, Salman a Mohammad OWAIS. Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*. *Biochemical Engineering Journal*, 2006, 27, 295-298. ISSN 1369703x.
- [49] MAWSON, A. John. Bioconversions for whey utilization and waste abatement. *Bioresource Technology*, 1994, 47, 195-203. ISSN 09608524.
- [50] NATHAO, Chananchida, Ubonrat SIRISUKPOKA a Nipon PISUTPAISAL. Production of hydrogen and methane by one and two stage fermentation of food waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2013, 38, 15764-15769. ISSN 03603199.
- [51] DAVÍDEK, Jiří a Jan VELÍŠEK. *Analýza potravin*. 2. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1992. ISBN 80-7080-163-8.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ADP	Adenosindifosfát
ATP	Adosintrifosfát
EMP	Emden-Meyerhof-Parnasova dráha
GRAS	Všeobecně považovaný za bezpečný (Generally Recognized as Safe)
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
MTBE	Metyl-terc-butyleter
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1: Struktura molekul dvou izomerů α- a β-laktózy [14].</i>	16
<i>Obrázek 2: Celková účast ATP při alkoholové glykolýze [34].</i>	28
<i>Obrázek 3: Rovnice vzniku sraženiny hexokvanoželeznatanu zinečnatého [51].</i>	39
<i>Obrázek 4: Popis experimentu.</i>	40
<i>Obrázek 5: Chromatogram směsného standardu cukrů.</i>	42
<i>Obrázek 6: Kalibrační přímka laktózy.</i>	42
<i>Obrázek 7: Graf závislosti obsahu laktózy na době fermentace v dané teplotě pro kmen CCDM 251.</i>	43
<i>Obrázek 8: Graf závislosti obsahu laktózy na době fermentace v dané teplotě pro kmen CCDM 252.</i>	44
<i>Obrázek 9: Graf závislosti obsahu laktózy na době fermentace v dané teplotě pro kmen CCDM 255.</i>	45
<i>Obrázek 10: Graf závislosti obsahu laktózy na době fermentace v dané teplotě pro kmen CCDM 742.</i>	46
<i>Obrázek 11: Graf závislosti obsahu laktózy na době fermentace v dané teplotě pro kmen CCDM 1054.</i>	47
<i>Obrázek 12: Graf závislosti obsahu laktózy na době fermentace v dané teplotě pro kmen CCDM 251.</i>	48
<i>Obrázek 13: Graf závislosti obsahu laktózy na době fermentace v dané teplotě pro kmen CCDM 252.</i>	48
<i>Obrázek 14: Graf závislosti obsahu laktózy na době fermentace v dané teplotě pro kmen CCDM 255.</i>	49
<i>Obrázek 15: Graf závislosti obsahu laktózy na době fermentace v dané teplotě pro kmen CCDM 742.</i>	50
<i>Obrázek 16: Graf závislosti obsahu laktózy na době fermentace v dané teplotě pro kmen CCDM 1054.</i>	50
<i>Obrázek 17: Graf závislosti obsahu laktózy na době fermentace 3% syrovátky při 20 °C.</i>	51
<i>Obrázek 18: Graf závislosti obsahu laktózy na době fermentace 3% syrovátky při 28 °C.</i>	52

<i>Obrázek 19: Graf závislosti obsahu laktózy na době fermentace 3% syrovátky při 35</i>	
<i>°C.....</i>	<i>52</i>
<i>Obrázek 20: Graf závislosti obsahu laktózy na době fermentace 5% syrovátky při 20</i>	
<i>°C.....</i>	<i>53</i>
<i>Obrázek 21: Graf závislosti obsahu laktózy na době fermentace 5% syrovátky při 28</i>	
<i>°C.....</i>	<i>54</i>
<i>Obrázek 22: Graf závislosti obsahu laktózy na době fermentace 5% syrovátky při 35</i>	
<i>°C.....</i>	<i>54</i>

SEZNAM TABULEK

<i>Tabulka 1: Přibližné složení jednotlivých typů syrovátek v % [11, 12].</i>	15
<i>Tabulka 2: Obsah jednotlivých komponent bílkovin v syrovátce [3].</i>	17
<i>Tabulka 3: Porovnání obsahů aminokyselin v bílkovinách mléka [g/100g] [12].</i>	18