

Možnosti fermentace syrovátky

Radek Bartošík

Bakalářská práce
2017

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie potravin
akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Radek Bartošík**
Osobní číslo: **T13200**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Možnosti fermentace syrovátky**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakterizujte syrovátku, její vznik, chemické složení a možnosti využití.
2. Popište principy alkoholové a mléčné fermentace.
3. Charakterizujte možnosti sledování průběhu fermentace (tj. úbytku substrátu a nárůstu fermentačních produktů) pomocí HPLC .

II. Praktická část

1. Provedte alkoholovou fermentaci obnovené syrovátky a sledujte její průběh prostřednictvím HPLC-RI-UV.
2. Provedte mléčnou fermentaci obnovené syrovátky a sledujte její průběh prostřednictvím HPLC-RI-UV.
3. Získané výsledky diskutujte s odbornou literaturou.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] LUZ SANS María a Isabel MARTÍNEZ-CASTRO. Recent developments in sample preparation for chromatographic analysis of carbohydrates. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1153, 7489. ISSN 0021-9673.

[2] RAESSLER Michael. Sample preparation and current applications of liquid chromatography for the determination of non-structural carbohydrates in plants. *Trends in Analytical Chemistry*, 2011, 30, 18331843. ISSN 0165-9936.

[3] BYLUND Gösta. *Dairy Processing Handbook*. Lund: Tetra Pak Processing Systems AB, 1995.

[4] VINKO I., R. BOŽANIC, Ž. GOLEM, I. KESNER-KOREN a S. MAHNET. Change of lactose content after milk fermentation using various microbial cultures. *Mljekarstvo*, 2011, 61, 161167. ISSN 1846-4025.

[5] LEGAROVÁ Veronika a Lenka KOUŘIMSKÁ. Metody sledování změn obsahu laktosy a dalších analytů během fermentace syrovátky. *Chemické Listy*, 2011, 105, 869873. ISSN 1213-7103.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Zuzana Bubelová, Ph.D.

Ústav technologie potravin

Datum zadání bakalářské práce:

3. února 2017

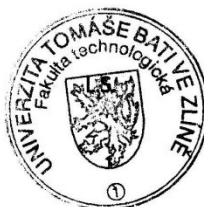
Termín odevzdání bakalářské práce:

5. května 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: Bartošík Radek

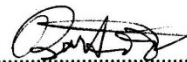
Obor: CHTP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji 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 25.2017



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 nevydávalečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledek 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 vzdělávacímu zařízení (školní dílo):

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

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

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

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

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá možnostmi mikrobiologické fermentace čerstvé i obnovené syrovátky. Teoretická část se zaměřuje na charakteristické vlastnosti syrovátky, její vznik, chemické složení a možnosti využití. Je zde popsán mechanismus alkoholové a mléčné fermentace s důrazem na možnost sledování průběhu procesu na základě změn ve složení substrátu, a nárůstu fermentačních produktů za pomoci HPLC. V praktické části jsou zhodnoceny změny ve fermentovaném substrátu, které byly způsobeny působením různých druhů bakterií mléčného kvašení a kvasinek rodu *Kluyveromyces*.

Klíčová slova: syrovátka, fermentace, bakterie mléčného kvašení, mléčné kvašení, *Kluyveromyces*, alkoholové kvašení

ABSTRACT

This thesis deals with the possibilities of microbiological fermentation of sweet whey and recovered dried whey. The theoretical part focuses on characteristic properties of whey, its origin, chemical composition and possibilities of use. It describes the mechanism of ethanol and milk fermentation, with an emphasis on possibility of observation of fermentation process based on changes in the composition of the substrate and the growth of fermentation products determined by HPLC. In the practical part of thesis the changes in the fermented substrate, which were caused by metabolism of different species of lactic acid bacteria and yeast of the genus *Kluyveromyces*, are evaluated.

Keywords: whey, fermentation, lactic acid bacteria, lactic acid fermentation, *Kluyveromyces*, ethanol fermentation

Chtěl bych tímto srdečně poděkovat vedoucí mé bakalářské práce Ing. Zuzaně Bubelové, Ph.D. a to především za ochotu, rady a profesionální přístup. Poděkování patří i Ing. Ludmile Zálešákové a Ericě Čechové za pomoc v laboratoři.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 SYROVÁTKA	12
1.1 VZNIK	12
1.2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ.....	14
1.2.1 Laktóza.....	15
1.2.2 Bílkoviny.....	16
1.2.3 Vitamíny.....	17
1.2.4 Minerální látky.....	18
2 FERMENTACE	20
2.1 MLÉČNÁ FERMENTACE	20
2.1.1 Homofermentativní mléčná fermentace.....	22
2.1.2 Heterofermentativní mléčná fermentace.....	23
2.2 ALKOHOLOVÁ FERMENTACE	24
2.2.1 Alkoholová fermentace u kvasinek.....	24
2.2.2 Alkoholová fermentace u bakterií.....	25
3 MOŽNOSTI SLEDOVÁNÍ FERMENTACE ZA POMOCI HPLC	27
3.1 ZÁKLADY HPLC	27
3.2 SLEDOVÁNÍ PRŮBĚHU FERMENTACE ZA POMOCI HPLC-RI	28
3.2.1 Analýza za pomoci HPLC-RI	29
3.2.2 Příprava vzorku	29
II PRAKTICKÁ ČÁST	31
4 CÍL PRÁCE	32
5 METODIKA	33
5.1 CHEMIKÁLIE.....	33
5.2 POMŮCKY A PŘÍSTROJE.....	33
5.3 MATERIÁL.....	33
5.4 PRŮBĚH FERMENTACE	34
5.4.1 Mléčná fermentace za využití BMK	34
5.4.2 Alkoholová fermentace za využití kvasinek rodu <i>Kluyveromyces</i>	35
5.5 PŘÍPRAVA VZORKU PRO STANOVENÍ LAKTÓZY POMOCÍ HPLC-RI.....	35
5.6 ANALÝZA HPLC-RI.....	35
6 VÝSLEDKY A DISKUZE	36
6.1 KALIBRAČNÍ PŘÍMKA.....	36
6.2 MLÉČNÁ FERMENTACE	36
6.2.1 Jogurtová kultura Laktoflora.....	37
6.2.2 Jogurtová kultura řeckého typu TY39.....	40
6.2.3 Kultura FD-DVS LH-B02.....	42
6.3 ALKOHOLOVÁ FERMENTACE	44
ZÁVĚR	48
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	49

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	53
SEZNAM OBRÁZKŮ	54
SEZNAM TABULEK.....	56

ÚVOD

Syrovátka byla donedávna považována za méně hodnotný produkt vznikající při zpracování mléka především na tolik ceněný sýr a tvaroh. Její využití bylo z technologických i ekonomických důvodů omezeno především na příměs pro výkrm hospodářských zvířat.

V současné době dochází celosvětově k růstu poptávky po mléčných výrobcích a pozvolný nárůst výroby sýrů, který byl ještě podpořen biotechnologickou výrobou chymozinu, je patrný pro celé období 20. století. Spolu s rostoucí výrobou sýrů a tvarohu roste nejen množství produkované syrovátky, ale také ochota, nebo spíše ekologická a hlavně ekonomická nutnost syrovátku vhodně zužitkovat. V současné době syrovátka nalézá využití ve stále větší míře i jako surovina při výrobě potravin (margaríny, tavené sýry), některých nápojů, kvasničné biomasy, průmyslové výroby etanolu, bílkovinových koncentrátů, izolátů a různých potravinových doplňků.

Pokud pomineme vodu, pak je nejvíce zastoupenou látkou obsaženou v syrovátce laktóza. Právě tento disacharid složený z glukózy a galaktózy slouží během fermentace jako substrát pro použité mikroorganismy. Při homofermentativním mléčném kvašení je laktóza metabolizována především na kyselinu mléčnou, v případě heterofermentativního děje pak ve větší míře vznikají i jiné produkty jako například oxid uhličitý, kyselina octová nebo etanol. Při alkoholové fermentaci dochází k přeměně laktózy na etanol a oxid uhličitý.

Hlavním cílem této práce bylo provést a optimalizovat procesy mléčné a alkoholové fermentace a sledovat změny obsahu jednotlivých sacharidů i získaných konečných produktů. Během mléčné fermentace byly využity různé druhy bakterií mléčného kvašení (dále jen BMK) běžně užívaných v mlékárenském průmyslu (např. *Lactobacillus helveticus*, jogurtová kultura). U alkoholové fermentace byly za pomoci kvasinek rodu *Kluyveromyces* zkoumány změny substrátu a možnosti produkce etanolu.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 SYROVÁTKA

Syrovátka je nažloutlá tekutá látka. Jedná se o mléčné sérum, tedy mléčné plazma zbavené kaseinových bílkovin. Vzniká například srážením kaseinu především při výrobě sýrů a tvarohů. Tato práce se dále zaměřuje na syrovátku tvořenou z kravského mléka, jež tvoří mléčné žlázy samice tura domácího. Teoreticky se ale dá vytvořit z každého mateřského mléka savců [1, 2].

1.1 Vznik

Syrovátka je ta část mléka, která zůstane po odebrání kaseinu a části tuku ať už teplem, změnou pH nebo syřidlem. Nezískává se jako primární produkt ale řadí se mezi produkty vedlejší. Obecně rozlišujeme dva druhy syrovátky, a to sladkou a kyselou. Toto již tradiční dělení je založeno na technologii, při níž vznikne, a hodnotě pH získané suroviny [3].

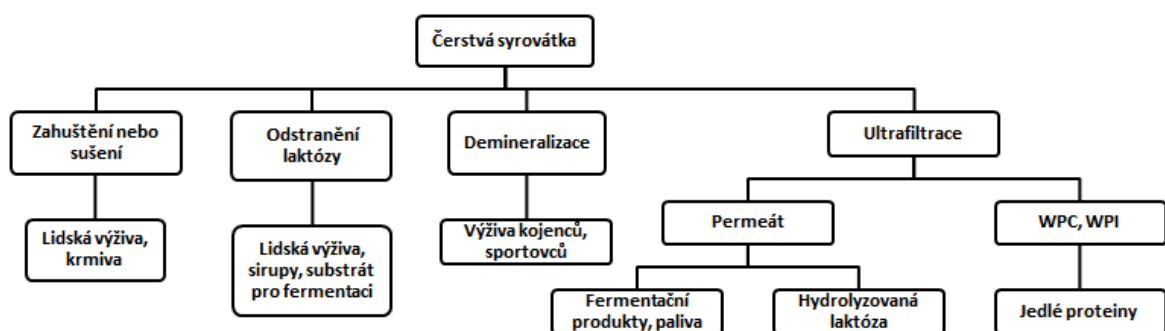
Sladká syrovátka vniká běžně jako vedlejší produkt při výrobě tvrdých, polotvrdých a měkkých sýrů jako například cheddar, mozzarella či u sýrů holandského a ementálského typu. Její pH je pak rovno nebo vyšší než 5,6. Obvyklé rozpětí pH je 5,9 – 6,6 [1, 3].

Kyselá syrovátka je vedlejším produktem především při výrobě některých tvarohů a tvarohových sýrů typu cottage. Má kyselejší povahu, pH je obvykle nižší než 5,1 a nejčastěji je v rozmezí 4,3 – 4,6. Kyselé pH je dosaženo z důvodu mnohem vyšší koncentrace kyseliny mléčné v porovnání se syrovátkou sladkou. To je způsobeno vyšší aktivitou bakterií mléčného kvašení. Kyselá syrovátka také obsahuje znatelně větší množství rozpuštěného vápníku [4]. Při výrobě 1 kg sýru se uvolní přibližně 9 l syrovátky [5].

V některých případech, zejména v anglofonních zemích, se syrovátka dělí přímo podle toho, při jakém zpracování mléka vznikla, např. „cheese whey“ (sýrová syrovátka nebo lépe řečeno syrovátka vzniklá při technologii výroby sýru) nebo „casein whey“ (vzniklá při výrobě kaseinu) [3].

Čerstvá syrovátka přirozeně obsahuje bakterie mléčného kvašení a vysoký podíl laktózy v sušině. Stává se tak ideálním substrátem pro fermentační procesy mléčného kvašení a podléhá rychlé zkáze [4]. Tento proces je sledovatelný především na základě měření úbytku laktózy a nárůstu obsahu kyseliny mléčné. Zjednodušeně lze procesy sledovat i měřením změn pH a titrační kyselosti (dále jen TK) vyjádřené pomocí stupňů Soxlet-Henkla (°SH) či jeho podobných ekvivalentů (°Th, °D).

Pro zabránění nežádoucí fermentace a z toho vyplývajícího znehodnocení suroviny se před dalším využitím provádí pasterace syrovátky. K přímému využití čerstvě pasterované syrovátky dochází jen výjimečně. Má velmi omezenou trvanlivost, velké nároky na skladovací podmínky a hygienu prostředí. Vysoký obsah vody zvyšuje náklady a náročnost transportu. Díky nízkému obsahu sušiny má nedostatečnou koncentraci požadovaných živin. Z těchto důvodů by měla být dále zpracována, nejlépe přímo v mlékárenském podniku. Mezi nejběžnější způsoby zpracování patří zahušťování, sušení, odstranění laktózy, demineralizace či ultrafiltrace (viz Obrázek 1) [1].



Obrázek 1 Některé způsoby zpracování syrovátky a její využití [5]

Zahušťování syrovátky probíhá ve dvou a více fázích ve vakuových odparkách. Po odpaření asi 45 – 65 % původní hmotnosti je koncentrát ochlazen na 15 – 20 °C. Chlazení probíhá za stálého míchání asi 6 – 8 hodin aby se vytvořily co nejmenší krystaly, což omezuje hydroskopičnost syrovátky během sušení. Následně je koncentrát sušen v bubnech nebo metodou sprejové sušení [3].

Velmi častým způsobem úpravy syrovátky jsou různé formy membránových filtrací. Jejich srovnání uvádí Tabulka 1. Mikrofiltrací a ultrafiltrací mohou být v závislosti na velikosti pórů filtru selektivně odděleny mikroorganismy, různé syrovátkové proteiny, tuky nebo nerozpustné soli. Bílkoviny syrovátky vzniklé ultrafiltrací se dělí na syrovátkové bílkovinné koncentráty (WPC) a syrovátkové bílkovinné izoláty (WPI). Koncentráty mohou obsahovat 20 – 89 % syrovátkových bílkovin. Syrovátkové bílkovinné izoláty obsahují alespoň 90 % bílkovin a prakticky neobsahují laktózu. Nanofiltrace je vhodná pro odsolení a částečnou demineralizaci syrovátky. Tato metoda umožňuje separaci laktózy, odstranění až 40 % minerálních látek a zvýšení obsah sušiny syrovátky z 5 až na 40 %. Demineralizovaná syrovátka se pak získává za využití reverzní osmózy nebo elektrodialýzy [3, 5].

Tabulka 1 Druhy a charakteristika membránových filtrací [3, 5]

Typ filtrace	Velikost pórů (nm)	Zachované látky	Molekulová hmotnost zachovaných látek (kDa)
Mikrofiltrace (MF)	20 – 4000	Bakterie, kaseinové micely, olejové emulze	100 – 500
Ultrafiltrace (UF)	20 – 200	Syrovátkové proteiny	1 – 100
Nanofiltrace (NF)	1 – 10	Laktóza	0,1 – 1
Reverzní osmóza (RO)	< 1	Ionty	< 0,1

1.2 Chemické složení

Přesné chemické složení a vlastnosti syrovátky nejsou z důvodu proměnlivého složení kravského mléka a použité technologie, při níž vzniká, přesně definovatelné. Následující Tabulka 2 tedy slouží spíše k vymezení hlavních rozdílů mezi sladkou a kyselou syrovátkou.

Tabulka 2 Složení sladké a kyselé syrovátky [3, 6, 7].

Složka	Sladká syrovátka	Kyselé syrovátka
sušina [%]	6,0 – 6,5	5,0 – 6,0
laktóza [%]	4,5 - 5	3,8 – 4,3
kyselina mléčná [%]	stopy	až 0,8
bílkoviny [%]	0,55	0,55
tuky [%]	0,05 – 0,2	0,05 – 0,2
popeloviny [%]	0,5	0,8
vápník [mg.100 g ⁻¹]	47	103

Již na první pohled je patrné, že hlavní složkou syrovátky je kromě vody především mléčný cukr, laktóza. Kyselá syrovátka obsahuje cukru méně. To je dáno odlišným způsobem technologického zpracování mléka, kdy část tohoto disacharidu je metabolizována na kyselinu mléčnou, která zapříčiňuje i rozdílné hodnoty pH. Značný rozdíl je i v obsahu vápníku. Kyselá syrovátka mívá obvykle násobně větší množství tohoto biogenního prvku. V kyselém prostředí se z kaseinové sraženiny snáze uvolňuje a proniká do syrovátky [4].

Právě proto mají sýry, při nichž vzniká sladká syrovátka vyšší obsah vápníku (viz Tabulka 3).

Tabulka 3 Obsah vápníku v jednotlivých druzích sýru [7].

Typ sýru	Cheddar	Ementál	Mozzarella	Ricotta	Cottage
vápník [mg.100g ⁻¹]	710	772	505	207	83

1.2.1 Laktóza

Laktóza je disacharid tvořený D-galaktózou a D-glukózou. Pro svůj obsah ve mléce se často označuje triviálním názvem „mléčný cukr“. Systematicky se jedná o β -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glukopyranózu. Laktóza je redukující disacharid, v přítomnosti aminokyselin se může účastnit komplexu Maillardových reakcí.

Jedná se o nejvíce zastoupenou organickou látku v syrovátce (obsah v sušině okolo 70 – 80 %). Laktóza slouží jako důležitý zdroj energie jak pro savce, tak pro mikroorganismy [8]. Pro její využití je nejprve potřeba rozštěpit β -glykosidickou vazbu. To se nejčastěji děje enzymaticky β -D-galaktosidázou (laktázou). V lidském těle se tak děje v horní části tenkého střeva, u mikroorganismů se využívají operony, např. lac operon u *E. coli* [9]. Laktóza tedy slouží jako substrát pro mnohé bakterie a kvasinky. V některých případech je tento jev nežádoucí (pasterace mléka), někdy je součástí technologického procesu výroby (využití bakterií mléčného kvašení u fermentovaných mléčných výrobků a sýrů). Příkladem může být homofermentativní mléčné kvašení, kdy po enzymové hydrolýze laktózy na glukózu a galaktózu je galaktóza enzymaticky přeměněna na glukózu a ta pak metabolizována na kyselinu mléčnou [8].

Sladivost roztoku laktózy je přibližně pětikrát nižší než u sacharózy. Přitom má ale vysokou energetickou hodnotu. Ne každý člověk má navíc v těle dostatečné množství enzymu laktázy. Deficience laktázy se nazývá laktózová intolerance. Pak může laktóza z tenkého střeva procházet v nezměněné podobě až do střeva tlustého, kde dochází k její přeměně mikroorganismy. Při fermentaci vznikají plyny, které způsobují plynatost či průjemy. Proto existuje snaha tento disacharid předem rozštěpit na dvě monosacharidové jednotky. Ať už za využití enzymů, či chemicky hydrolyzou ($\text{pH} < 1,5$, $t > 150 \text{ }^\circ\text{C}$) [10].

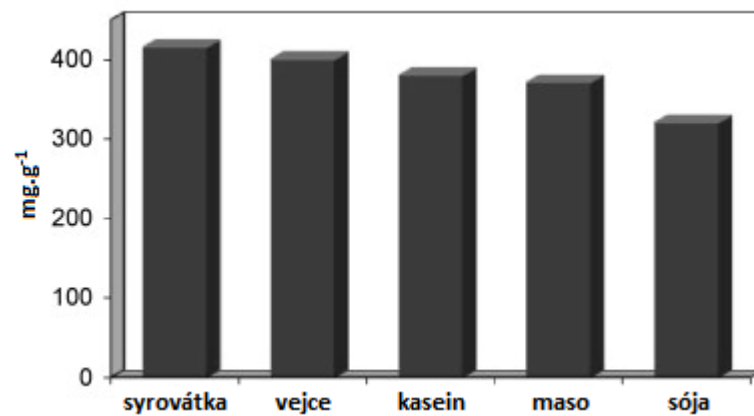
1.2.2 Bílkoviny

Do syrovátky přechází z mléka většina sérových bílkovin (α -laktalbumin, β -laktoglobulin a sérový albumin), imunoglobuliny, malá část kaseinových bílkovin (do 10 % celkového obsahu bílkovin v syrovátce) a při sladkém srážení i glykomakropeptidy (z enzymatické hydrolyzy kaseinu) [11].

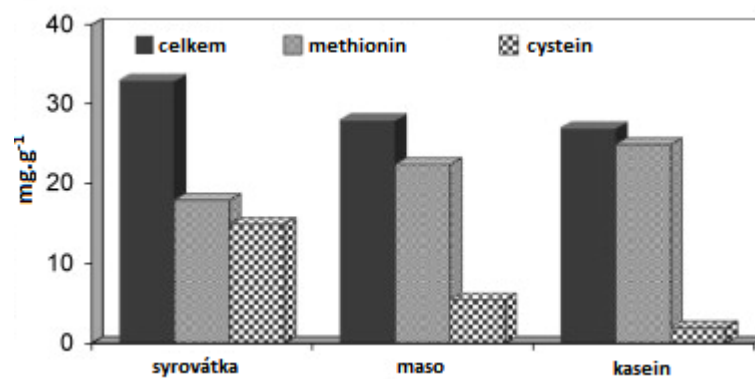
Největší zastoupení má β -laktoglobulin (cca 58 % celkových bílkovin) následován α -laktalbuminem (13 %). β -laktoglobulin patří k nejvýraznějším alergenům mléka s vysokou odolností vůči žaludečnímu trávení. Tepelné ošetření, jako například sterilace, způsobuje nenávratnou denaturaci tohoto proteinu a zvyšuje celkovou stravitelnost syrovátky. Také některé bakterie mléčného kvašení (*Lactobacillus acidophilus*, *L. paracasei* a některé bifidobakterie) dokáží β -laktoglobulin enzymaticky degradovat.

Syrovátkové bílkoviny obsahují velké množství esenciálních aminokyselin (především lyzin, cystein, metionin, leucin, izoleucin a valin). [2, 10] U větvených aminokyselin se předpokládá jejich pozitivní vliv na metabolismus tuků, udržení správné tělesné hmotnosti a homeostáze [12, 13]. Jejich biologická hodnota přesahuje dokonce biologickou hodnotu bílkovin vejce [10]. Množství esenciálních aminokyselin v různých potravinách je zobrazen na Obrázku 2.

Syrovátkové bílkoviny jsou vyváženým zdrojem sirných aminokyselin, které hrají důležitou roli antioxidantů jako prekurzory glutathionu [14]. Jejich obsah v různých druzích potravin zachycuje Obrázek 3.



Obrázek 2 Množství esenciálních aminokyselin v bílkovinách různého původu [2].



Obrázek 3 Množství sirných aminokyselin v bílkovinách různého původu [2].

1.2.3 Vitamíny

Do syrovátky během technologického zpracování přechází z mléka celá řada vitamínů [5] (viz Tabulka 4).

Tabulka 4 Průměrný obsah vitamínů v sušené syrovátce a sušeném mléce [7].

Složka	Sladká syrovátka	Kyselá syrovátka	Plnotučné mléko
Vitamín C [mg.100 g ⁻¹]	1,5	0,9	8,6
Vitamín E – tokoferoly [mg.100 g ⁻¹]	0,03	stopy	0,58 ¹⁾
Vitamín A [IU.100 g ⁻¹]	30	59	934
Vitamín B ₁ – thiamin [mg.100 g ⁻¹]	0,5	0,6	0,3
Vitamín B ₂ – riboflavin [mg.100 g ⁻¹]	2,2	2,1	1,2
Vitamín B ₃ – niacin [mg.100 g ⁻¹]	1,3	1,2	0,6
Vitamín B ₅ – kyselina pantotenová [mg.100 g ⁻¹]	5,6	5,6	-
Vitamín B ₆ – pyridoxin [mg.100 g ⁻¹]	0,6	0,6	0,3
Vitamín B ₉ – kyselina listová [mg.100 g ⁻¹]	12,0	0,3	37,0
Vitamín B ₁₂ – kobalamin [μg.100 g ⁻¹]	2,4	2,5	3,25

1) měřen pouze α-tokoferol

Jedná se především o ve vodě rozpustné vitamíny ze skupiny B (tiamin, riboflavin, pyridoxin, kyselina pantotenová, kyselina listová, biotin a kobalamin). Uvedené srovnání (Tabulka 4) se sušeným plnotučným mlékem má jen orientační charakter (plnotučné mléko není to, ze které se syrovátka vytvořila). Nicméně je běžné, že některé vitamíny (zvláště riboflavin) se v syrovátce vyskytují ve větším množství, než ve mléce, ze kterého byla vyrobena. To je způsobeno metabolickou aktivitou některých bakterií mléčného kvašení používaných při produkci sýrů. Právě díky obsahu riboflavinu má syrovátka typickou žluto-nazelenalou barvu [2, 10].

1.2.4 Minerální látky

Čerstvá syrovátka obsahuje 0,5 – 0,8 % minerálních látek [3] (viz Tabulka 5). Ty jsou v syrovátce obsaženy ve formě organických (0,1 – 0,4 %) a anorganických (0,6 – 0,7 %) sloučenin. Největší zastoupení mají soli kyseliny mléčné, fosforečné, uhličitě, citronové, chlorovodíkové a sírové. Nejvíce jsou zastoupeny draselné a vápenaté soli [4]. U kyselé

syrovátky je pak obsah vápníku řádově větší. To je způsobeno odlišnou technologií vzniku a podmínek, které ji provází. Při vzniku sladké syrovátky z mléka jsou vápník i fosfáty pevněji navázány na kaseinovou sraženinu. U výroby kyselé syrovátky se vlivem nižšího pH vápník do syrovátky snadněji uvolňuje. Významný je i obsah mikroelementů, především železa, mědi a zinku [10].

Tabulka 5 Obsah minerálních látek ve sladké a kyselé syrovátce [7].

Složka	Sladká syrovátka	Kyselé syrovátka
Vápník [mg.100 g ⁻¹]	796	2050
Fosfor [mg.100 g ⁻¹]	932	1349
Sodík [mg.100 g ⁻¹]	1079	968
Draslík [mg.100 g ⁻¹]	2080	2289
Hořčík [mg.100 g ⁻¹]	176	199
Zinek [μg.100 g ⁻¹]	1970	6300
Železo [μg.100 g ⁻¹]	900	1200
Měď [μg.100 g ⁻¹]	70	50
Selen [μg.100 g ⁻¹]	27	27

Z důvodu poměrně vysokého množství solí se při zpracování syrovátky sušením často provádí částečná či úplná demineralizace. Při částečné demineralizaci je za využití ultrafiltrace odstraněno 25 – 30 % solí, takto upravená syrovátka se hodí především pro potravinářské účely (například výroba zmrzlin, tavených sýrů, pekárenství). Na úplnou demineralizaci syrovátky se využívá metoda elektrodialýzy nebo iontové výměny, díky které může být odloučeno 90 – 95 % solí. Takto upravená syrovátka se pak používá u výrobců, kde je snaha o co nejmenší množství obsahu solí (výživa kojenců, sportovců) [3].

2 FERMENTACE

Podle použitých mikroorganismů a prostředí, ve kterém probíhá metabolická aktivita mikroorganismů, se katabolické procesy dělí na aerobní respiraci, anaerobní respiraci a fermentaci (kvašení).

Při aerobní respiraci může být u aerobních či fakultativně aerobních mikroorganismů za vhodných podmínek (především dostatek kyslíku) substrát rozložen až na oxid uhličitý a vodu. Tento způsob metabolismu se spjat s respiračním řetězcem a dochází ke vzniku velkého množství ATP oxidativní fosforylací. Je běžný u rostlinných a živočišných buněk. U některých mikroorganismů při nadbytku organického substrátu, může probíhat jen částečná oxidace často za vzniku organických kyselin. Mezi aerobní formy respirace se pak zahrnují například i citronové nebo octové fermentace (označované též jako aerobní kvašení) [15].

Mikroorganismy s anaerobní respirací v závěrečné fázi dýchání místo kyslíku využívají méně účinná oxidační činidla (dusičnany, sírany, fumaráty apod.) [16].

Fermentace zahrnuje alkoholové, máselné, mléčné či propionové kvašení. Kvašení probíhá za anaerobních podmínek. Místo oxidace kyslíkem je substrát dehydrogenován za pomoci NAD^+ za vzniku CO_2 a $\text{NADH} + \text{H}^+$. Energie ve formě ATP vzniká jen fosforylací na substrátové úrovni. Jelikož tímto způsobem získá mikroorganismus jen poměrně malé množství energie, musí být rozloženo velké množství substrátu. Z energetického hlediska jsou tyto procesy pro organizmy značně nevýhodné, produkty fermentace totiž mají stále vysokou energetickou hladinu. Výsledné metabolity již mikroorganismus nedokáže dále zpracovat, proto jsou anaerobní procesy spjaty s hromaděním produktů energetického metabolismu. Zároveň je nutné vzniklý NADH převést zpět do oxidované formy, aby se cyklus fermentace mohl znovu opakovat [15].

2.1 Mléčná fermentace

Mléčná fermentace probíhá za využití bakterií mléčného kvašení. Tato skupina bakterií nemá původ v taxonech. Zahrnuje různé skupiny mikroorganismů s podobnými vlastnostmi. Patří sem například rody *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* nebo *Streptococcus*. Obvykle se mezi BMK řadí i rod *Bifidobacterium*, a to přesto, že se jedná o fylogeneticky i biochemicky značně odlišnou skupinu bakterií. Obecná charakteristika vybraných rodů BMK je uvedena v Tabulce 6. BMK jsou grampozitivní, nesporulující tyčinky či koky, povětšinou kataláza a oxidáza negativní aerotolerantní anaerobové. Neobsahují

cytochromy, ale některé přijímají kyslík prostřednictvím flavoprotein oxidáz, ten následně slouží k produkci peroxidu vodíku nebo k oxidaci redukované formy NAD. Energií pro svůj metabolismus získávají přeměnou sacharidů především na kyselinu mléčnou. Existují dvě různé metabolické dráhy, které k tomuto účelu slouží. Na jejich základě se bakterie mléčného kvašení dělí na homofermentativní a heterofermentativní [17].

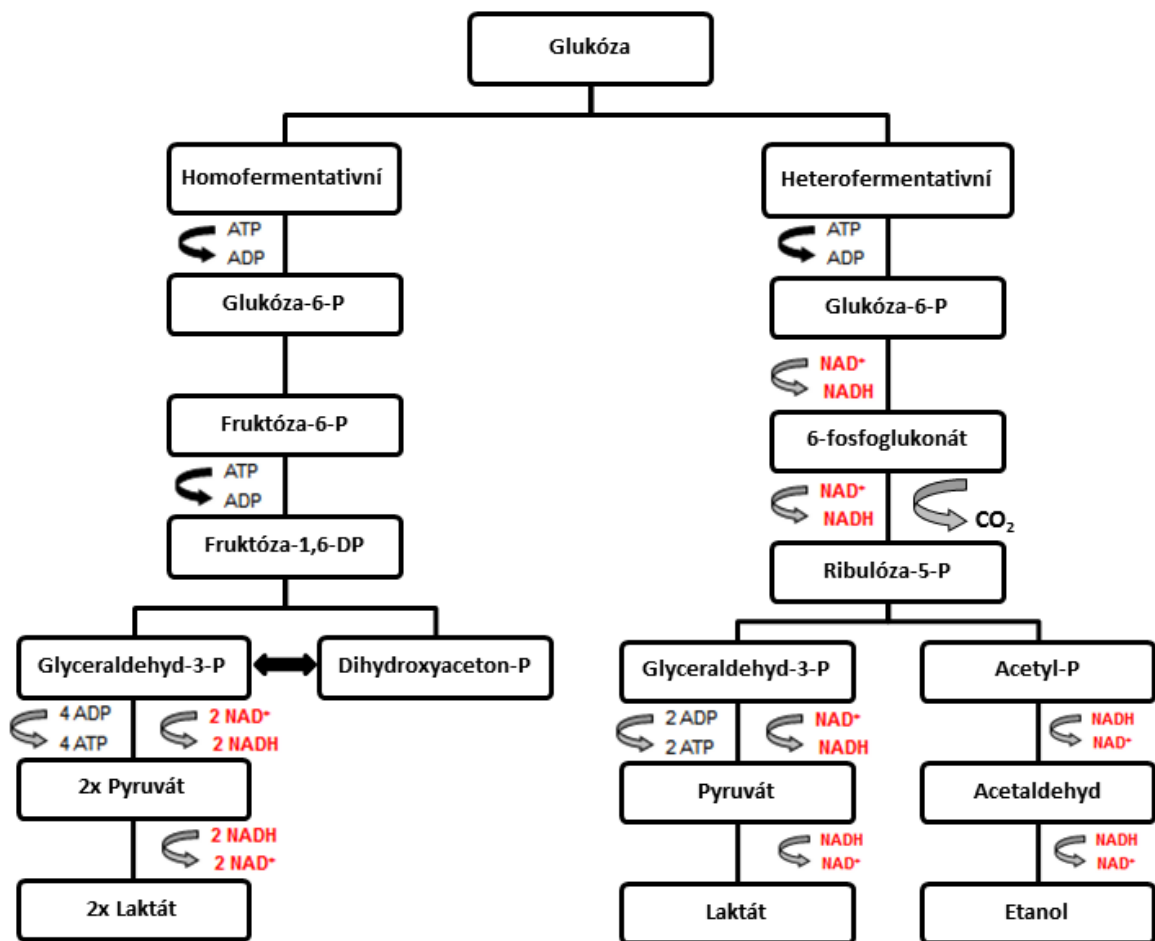
V obou případech je vedlejším produktem metabolismu kyselina mléčná. U heterofermentativního mléčného kvašení vznikají ve větší míře i další produkty (kyselina octová, etanol) [15].

Tabulka 6 Charakteristické vlastnosti některých rodů BMK [17].

Rod BMK	Morfologie	Typ fermentace	Izomer vzniklého laktátu
<i>Lactococcus</i>	koky – tvoří řetězce	homo	L
<i>Leuconostoc</i>	koky – nepravidelné	hetero	D
<i>Pediococcus</i>	koky	homo	DL – macerát
<i>Lactobacillus</i>	tyčinky	homo/hetero	DL, D, L
<i>Streptococcus</i>	koky – tvoří řetězce	homo	L

Především díky produkci kyseliny mléčné mají BMK schopnost inhibovat růst ostatních mikroorganismů. Mohou se proto využít ke zvýšení trvanlivosti či udržení mikrobiologické jakosti a nezávadnosti různých potravin. Princip inhibice je založen nejen na snížení pH a vlivu slabých organických kyselin (mléčná, octová) na transport látek buněčnou membránou. Mnohé BMK (např. některé kmeny *Lactococcus lactis*) vytváří proti konkurenčním bakteriím účinné bakteriociny. Tyto látky pak nacházejí využití v potravinářské praxi jako inhibitory patogenních grampozitivních bakterií (nisin E234, natamycin E235). Některé BMK mohou za vhodných podmínek vytvářet peroxid vodíku. Z důvodu absence katalázy jej ale nedokáží rozložit na vodu a kyslík. Na rozdíl od většiny ostatních bakterií jsou ale na vyšší koncentrace peroxidu vodíku méně citlivé. Jeho tvorba tedy přináší další evoluční výhodu nad jinými bakteriemi. Heterofermentativní BMK vytváří ve větší míře další antimikrobní látku, a to druhý nejnižší alkohol, etanol. Jeho antimikrobní účinky ale v potravinářském průmyslu nejsou na rozdíl od předešlých látek tak výrazné. Koncentrace alkoholu ve fermentovaných mléčných výrobcích je totiž všeobecně velmi nízká [17].

Srovnání homofermentativní a heterofermentativní fermentace glukózy je znázorněno na Obrázku 4.



Obrázek 4 Mechanismus fermentace glukózy u BMK [upraveno podle 17, 18]

2.1.1 Homofermentativní mléčná fermentace

Během homofermentativního metabolismu mléčného kvašení dochází k metabolické přeměně glukózy prakticky jen na jeden produkt, a to kyselinu mléčnou. Fermentace probíhá dle Embden-Meyerhof-Parnasovy dráhy označované jako glykolýza [15].

Jedná se o hlavní katabolický děj chemoorganotrofních mikroorganismů. Během něj dochází ke dvěma fosforylacím glukózy na fruktóza-1,6-difosfát za spotřeby 2 molekul ATP. Následně je fruktóza-1,6-difosfát rozštěpena na dvě fosfotriózy, a to glyceraldehyd-3-fosfát a dihydroxyacetonfosfát. Tyto fosfotriózy jsou udržovány v rovnováze prostřednictvím enzymu triózafosfátizomerázy. Další reakce se účastní jen aldehyd. Při jeho spotřebě ale dochází ke změně rovnováhy a postupně dojde k přeměně dihydroxyacetonfosfátu na

aldehyd za pomoci triózafosfátizomerázy. Glycerinaldehyd-3-fosfát je anaerobně oxidován za vzniku 1,3-bisfosfoglycerátu. Kofaktor NAD^+ se při této reakci redukuje (přijme atom vodíku z aldehydu). Následně dochází k fosforylaci na substrátové úrovni, tvorbě ATP a 3-fosfoglycerátu, ten je izomerizován na 2-fosfoglycerát. Za pomoci enzymu enolázy dochází k redukcí na fosfoenolpyruvát. Pyruvátkináza následně odštěpí fosfát za vzniku nestabilního enolpyruvátu. Při jeho přesmyku na ketopyruvát (označovaný obecně jako pyruvát) dochází k uvolnění energie, která se opět využije při syntéze ATP z ADP. Celkový energetický výtěžek glykolýzy při přeměně jedné molekuly glukózy na 2 pyruváty jsou 2 ATP. Což je využití přibližně jen 5 % energie uložené ve struktuře molekuly glukózy [16, 17, 19].

Pyruvát je následně redukován na laktát za pomoci kofaktoru NADH, načež vzniká jeho oxidovaná forma NAD^+ . Ta opět nalézá využití v glykolýze při dehydrogenaci glycerinaldehyd-3-fosfátu. Díky redukcí pyruvátu tak dochází k vytvoření cyklu oxidované a redukované formy nikotinamidadenin dinukleotidu, která se tímto způsobem neustále recykluje. Reakce přeměny pyruvátu na laktát je katalyzována NAD-laktátdehydrogenázou [15, 19].

Homofermentativní BMK mají široké využití v potravinářském průmyslu. Zvláště ve výrobě fermentovaných mléčných výrobků (např. jogurty, kysané mléko), v sýrařství, při konzervaci zelí, okurek, nebo při kvasné výrobě kyseliny mléčné [15].

2.1.2 Heterofermentativní mléčná fermentace

Heterofermentativní mléčná fermentace je typická pro bakterie rodu *Lactobacillus* či *Leuconostoc*. Během této fermentace dochází k produkci ekvimolekulárního množství CO_2 , etanolu a laktátu. Heterofermentativní BMK neprodukují glykolytický enzym aldolázu, umožňující štěpení fruktóza-1,6-difosfátu na dvě fosfotriózy. Fermentace tedy nemůže probíhat dle Embden-Meyerhof-Parnasovy dráhy. Hexóza, glukóza, je po fosforylaci oxidačním mechanismem hexózafosfátového zkratu převedena na ribulóza-5-fosfát. Během této reakce se uvolňuje oxid uhličitý, který se stává důležitým rozpoznávacím znakem k určení heterofermentativní mléčné fermentace. Ribulóza-5-fosfát je enzymově, fosfoketolázou, rozštěpena na acetylfosfát a glycerinaldehyd-3-fosfát. Aldehyd je převeden na pyruvát a následně na laktát. Reakce probíhá stejným způsobem jako u glykolýzy a také tedy vznikají 2 ATP. Acetylfosfát je fosfát acetyltransferázou katabolizován na acetylkoenzym A. Ten je za pomoci acetylační acetaldehyd dehydrogenázy redukován na acetaldehyd a

následně acetaldehyd dehydrogenázou na etanol. Během těchto redukčních reakcí dochází k regeneraci 2 molekul NAD^+ z NADH [17, 18, 20, 21, 22].

Celkový zisk heterofermentativního mléčného kvašení je pak 1 molekula ATP na každou utilizovanou glukózu. V aerobním prostředí je možná regenerace NAD^+ za využití NADH oxidázy a peroxidázy. Acetylfosfát je převeden na acetát za vzniku molekuly ATP. Tímto způsobem může být celkový energetický zisk energie z 1 molekuly glukózy stejný jako u glykolýzy, a to 2 molekuly ATP [17].

2.2 Alkoholová fermentace

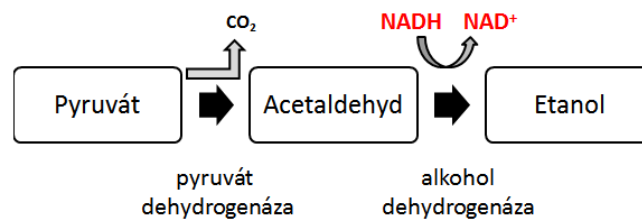
Alkoholová fermentace je proces, při němž kvasinky a některé druhy bakterií katabolizují glukózu za vzniku energie ve formě ATP a vedlejších produktů CO_2 a etanolu. Této skutečnosti se využívá nejen k výrobě etanolu a alkoholických nápojů, ale i v pekárenství při kynutí pečiva nebo v mlékárenství při výrobě kefirů [19].

U kvasinek alkoholová fermentace začíná glykolýzou. Avšak vytvořený pyruvát je dekarboxylován za vzniku acetaldehydu, jenž je alkoholdehydrogenázou redukován na etanol. U bakterií, až na pár výjimek (*Sarcina ventriculi*), alkoholové kvašení probíhá za využití odlišné metabolické dráhy označované jako Entner-Doudoroffova [15].

2.2.1 Alkoholová fermentace u kvasinek

Kvasinky jsou jednobuněčné eukaryotické mikroorganismy patřící mezi houby (říše Fungi). Rozmnožují se nepohlavně pučením, přehrádečným dělením nebo, méně často, příčným dělením (např. rodu *Schizosaccharomyces*). Pohlavní rozmnožování probíhá izogamním nebo heterogamním spájením [23].

Alkoholová fermentace glukózy u kvasinek probíhá do vzniku pyruvátu dle Embden-Meyerhof-Parnasovy dráhy. Pyruvát je následně enzymaticky dekarboxylován pyruvát dehydrogenázou za vzniku acetaldehydu. Ten je redukován alkohol dehydrogenázou a tímto způsobem je recyklován NAD^+ , jenž je potřebný k anaerobní oxidaci glycerinaldehyd-3-fosfátu u glykolýzy. Celý cyklus se za vhodných podmínek neustále opakuje až do vyčerpání glukózy (případně jiných sacharidů vhodných k přeměně na glukózu) nebo nahromadění odpadního produktu (etanolu). Celkový zisk energie při přeměně glukózy na etanol jsou 2 molekuly ATP [24]. Schematicky je přeměna pyruvátu na etanol zachycena na Obrázku 5.



Obrázek 5 Mechanismus alkoholové fermentace pyruvátu na etanol [upraveno podle 19]

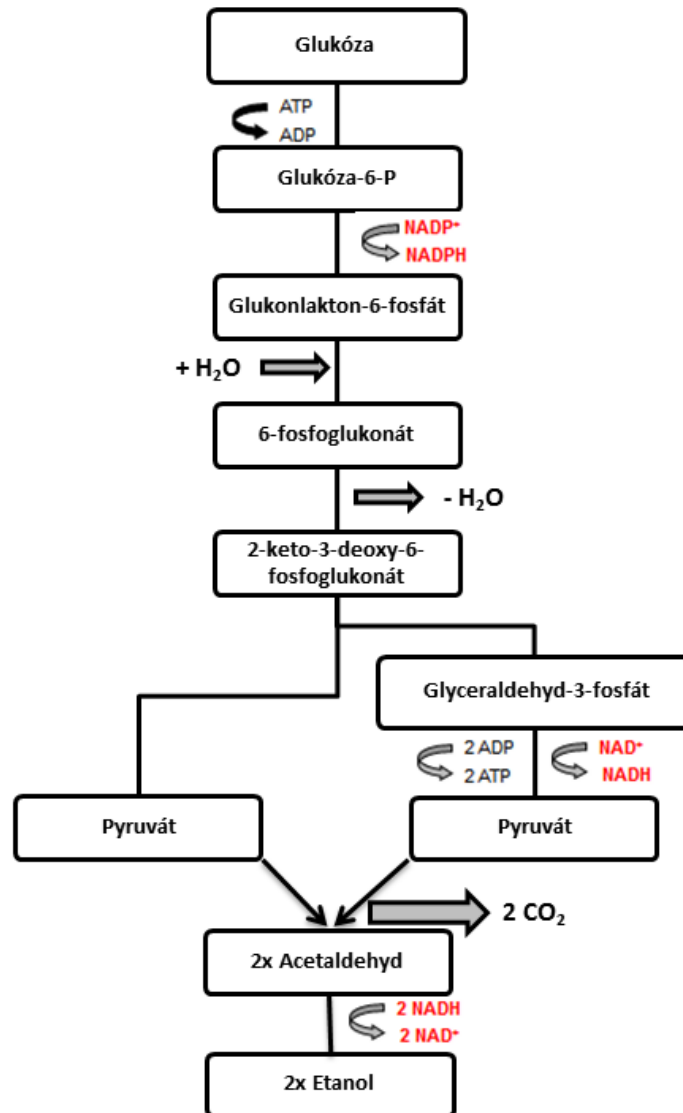
Přestože existuje velké množství morfologicky i fyziologicky odlišných kvasinek a kvasinám podobným hub, jen velmi úzká skupina se využívá v průmyslu a potravinářství. Takto využívané mikroorganismy patří nejčastěji mezi askomycety. Nejčastěji využívanou kvasinkou je *Saccharomyces cerevisiae* a jí podobné kmeny. Všechny tyto kmeny kvasinek jsou schopny katabolicky zpracovávat glukózu, některé fermentují i sacharózu, maltózu a rafinózu. Žádná z nich však nedokáže fermentovat mléčný cukr, laktózu. Ta musí být nejdříve rozštěpena hydrolázou (laktázou). Právě tuto schopnost mají například některé kvasinky rodu *Kluyveromyces* (*Kluyveromyces lactis*, *marxianus*, *marxianus* var. *bulgaricus*), které se běžně vyskytují především ve fermentovaných mléčných výrobcích. Některé kvasinky dokáží růst i v prostředí s velmi vysokým osmotickým tlakem (zasolení, vysoká koncentrace sacharidů). *Hansenula anomala* se tak běžně nachází v nasolených masech, sýrech či ve fermentovaných masných výrobcích. Kvasinky druhu *Zygosaccharomyces bailii* jsou pak známé především svým negativním vlivem na kvalitu a trvanlivost potravin. Dokáží totiž růst i v prostředí s nízkou vodní aktivitou, nízkými hodnotami pH a jsou pozoruhodně odolné vůči běžně využívaným konzervantům (kyselina sorbová, octová a benzoová, oxid siřičitý, etanol, apod.) [17].

2.2.2 Alkoholová fermentace u bakterií

U bakterií probíhá etanolová fermentace po Entner-Doudoroffově metabolické dráze (viz Obrázek 6). Ta navazuje na pentózový cyklus. Glukóza je nejdříve, stejně jako u glykolýzy, aktivována fosforylací na glukóza-6-fosfát. Následně je fosfoglukonát dehydratázou oxidován na glukonlakton-6-fosfát, a ten je dehydrogenován 2-keto-3-deoxy-6-fosfoglukonát aldolázou za vzniku kyseliny 2-keto-3-deoxy-6-fosfoglukonové [25].

Vzniklá kyselina se štěpí na dvě triózy, a to glyceraldehyd-3-fosfát a pyruvát. Glyceraldehyd-3-fosfát je přeměněn na pyruvát stejným způsobem jako u glykolýzy. Vznikají tedy 2

pyruváty, které jsou stejně jako u alkoholové fermentace u kvasinek metabolizovány na etanol za současného vzniku CO_2 . Celkově získaná energie z glukózy za využití Entner-Doudoroffovy dráhy je na rozdíl od glykolýzy poloviční. Vzniknou 2 molekuly ATP. Jedna je ale spotřebována na aktivaci glukózy. Celkový výtěžek je tedy jen jedna molekula ATP [15].



Obrázek 6 Mechanismus alkoholové fermentace (Entner-Doudoroffova [upraveno podle 25, 26]

3 MOŽNOSTI SLEDOVÁNÍ FERMENTACE ZA POMOCI HPLC

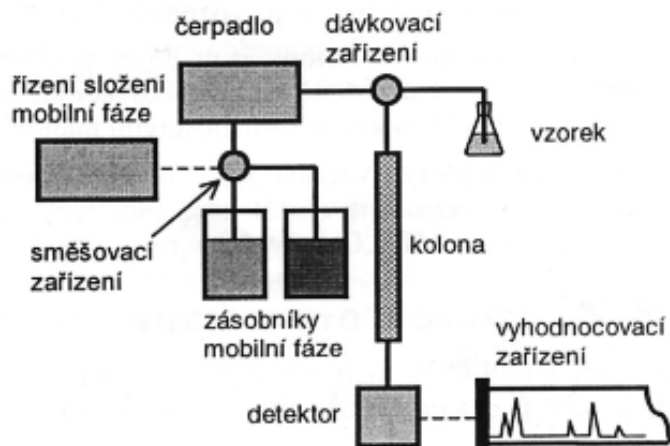
Průběh mikrobiologických fermentací lze sledovat za pomoci různých kvantitativních analytických metod. Ty jsou založeny buď na stanovení úbytku množství substrátu, nebo nárůstu látek vzniklých účinkem metabolismu. Během fermentací obvykle dochází k velkým změnám ve složení substrátu a mnohé mikroorganismy dokáží metabolizovat nejen glukózu ale i další, složitější sacharidy. Je tedy vhodné sledovat všechny druhy sacharidů, které se na fermentaci mohou podílet. To může být umožněno za pomoci využití některých fyzikálně-chemických separačních metod, například chromatografie. Využití plynové chromatografie u sacharidů klade vyšší nároky na přípravu vzorku, které je pro potřeby analýzy nutné převést na těkavé deriváty. Pro určení směsí nejen sacharidů, ale i alkoholů a některých organických kyselin se jako optimální jeví metoda kapalinové chromatografie (např. HPLC-RI/UV/MS nebo aniontová chromatografie s pulzní amperometrickou detekcí (HPAEC-PAD) [15, 27, 28, 29].

3.1 Základy HPLC

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je separační metoda založena na rozdílné distribuci dělených látek ve směsi mezi dvě různé nemísitelné fáze (mobilní a stacionární). Stacionární fáze je sorbent umístěný v případě kolonové adsorbční chromatografie do skleněné, plastové nebo ocelové trubice. Mobilní fází je kapalina protékající kolonou. Do kolony je během analýzy výkonným vysokotlakým čerpadlem nastříknut na začátek kolony vzorek. Ten je adsorbován na sorbent a postupným promýváním mobilní fází je na základě koncentrace složek mezi stacionární (c_s) a mobilní (c_m) fází uvolňován dle hodnot distribuční konstanty (K_D) [30, 31].

$$K_D = \frac{c_s}{c_m}$$

Čím je hodnota distribuční (rozdělovací) konstanty pro danou látku vyšší, tím jsou její molekuly vázány na stacionární fázi delší dobu. Doba zachycení se nazývá retence a její hodnota je většinou měřena za pomoci retenčních faktorů [31]. Schematicky je kapalinový chromatograf znázorněn na Obrázku 7.



Obrázek 7 Schéma kapalinového chromatografu [30]

Separace je ovlivněna povahou mobilní i stacionární fáze. Pokud má mobilní fáze během separace konstantní chemické složení (má stejnou eluční sílu) pak se jedná izokratickou eluci. Ta je vhodná pro separaci látek s podobnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Pokud se ale vlastnosti separovaných látek výrazně liší, je vhodné uplatnit gradientovou eluci. Během ní se složení a eluční síla mobilní fáze během separace může na základě zvoleného programu plynule i skokově měnit. Výhodou je možnost optimalizace separace složitějších vzorků. Gradientovou eluci ale nelze použít u všech druhů detektorů (např. u refraktometrického). Detektory se u HPLC nachází za kolonou se stacionární fází a na základě různých fyzikálně-chemických metod kontinuálně sledují složení elučního roztoku. Signál z detektorů je převeden na chromatogram. Jedná se o graf závislosti intenzity signálu z detektoru na čase trvání separace. Signály na chromatogramu vytváří křivky gaussovského tvaru označované jako píky (eluční křivky) [31].

3.2 Sledování průběhu fermentace za pomoci HPLC-RI

Sledování průběhu fermentace za využití kapalinové chromatografie je založeno na analýze sacharidů sloužících během fermentace jako substrát, a na analýze některých vybraných vznikajících metabolitů. Během fermentace dochází po určitých časových intervalech k odběru vzorků z bioreaktoru (fermentoru), k jejich úpravě (čištění, filtrace) a následné analýze. Během mléčné fermentace se tak kromě sacharidů (nejčastěji laktóza, glukóza a galaktóza), analyzuje i obsah kyseliny mléčné a zvláště u heterofermentativních BMK i etanol a kyselina octová. Během alkoholového kvašení za pomoci kvasinek se často analy-

zují nejen sacharidy a vznikající etanol, ale i další vedlejší produkty, které mohou ovlivnit produktivitu kvasinek (kys. octová, mléčná, uhličitá, glycerol) [28, 32, 33].

3.2.1 Analýza za pomoci HPLC-RI

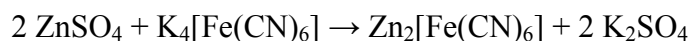
Stanovení sacharidů metodou HPLC s refraktometrickým (RI) detektorem je jednou z nejjednodušších metod, zvláště co se týče pracnosti úpravy vzorků. Ta je jednoduchá, rychlá a zaručuje opakovatelné výsledky. Za pomoci HPLC-RI lze analyzovat velmi široké množství sacharidů, organických kyselin či alkoholů. Výsledné hodnoty naměřené kapalinovou chromatografií jsou srovnatelné s metodami chemickými (např. redukující cukry, Fehling), enzymatickými (např. laktóza, po enzymatické hydrolýze spektrofotometrické stanovení NADH) či ebulioskopií (etanol) [34, 35].

Mezi nevýhody HPLC-RI patří:

- nižší citlivost detekce (o dva až tři řády proti spektrofotometrické detekci)
- teplotní závislost odezvy (teplotu je nutné udržovat v rozmezí $\pm 0,01$ °C)
- nutnost zachování konstantního průtoku mobilní fáze bez pulzů
- nemožnost použití gradientové eluce [31].

3.2.2 Příprava vzorku

Vzorky odebrané během fermentace jsou složitou směsí obsahující látky obsažené v substrátu, vitální mikroorganismy, zbytky odumřelých buněk a produkty fermentačního metabolismu. Vzorek je tedy nutné vyčeřit a zfiltrovat, jinak může dojít k ucpání chromatografické kolony nerozpustnými sloučeninami. K čiření se používá poměrně velké spektrum různých chemikálií, jejichž použití závisí na druhu analýzy a povaze vzorku. Mezi nejběžnější metody patří čiření dle Carreze. Během této metody se ke vzorku přidává 30% roztok síranu zinečnatého (Carrez I) a po promíchání pak 15% roztok hexakvanoželeznatánu draselného (Carrez II). Tato metoda má vysokou účinnost zvláště v kyselém prostředí. Neutrální a alkalické roztoky je nutno nejdříve okyselit mírně zředěnou kyselinou octovou. Carrezovo činidlo dokonale odstraňuje bílkoviny a méně slizovité látky. Je tedy vhodným čiřidlem například pro vzorky z fermentací mléka či syrovátky. Čiřící účinek je založen na vytvoření objemné sraženiny hexakvanoželeznatánu zinečnatého:



Ten na sebe naváže některé nerozpustné sloučeniny, tuky, bílkoviny, část solí a jiné nečistoty. Mezi další způsoby čiření patří například užití octanu olovnatého, hydroxidu hlinitého, kyseliny wolframové nebo trichloroctové [27, 36].

K filtraci vzorku slouží různé druhy filtrů (papírové, membránové). K získání velmi čistých vzorků se stále častěji využívají procesy ultrafiltrace, nanofiltrace a reverzní osmózy. Tyto metody umožňují vysoký stupeň přečištění vzorku a oddělení složitějších sacharidů. Dále mohou zkoncentrovat analyt a tím snížit detekční limit analyzovaných sloučenin [27].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem práce je ověření možností mikrobiologické fermentace syrovátky za pomoci různých druhů bakterií mléčného kvašení a kvasinek rodu *Kluyveromyces*. Změny složení syrovátky byly sledovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s RI detektorem.

Dílčí cíle:

- sledování změn pH, titrační kyselosti a složení syrovátky během fermentace
- porovnání průběhu fermentačních procesů při využití čerstvé a obnovené demineralizované syrovátky o různých koncentracích
- analýza a porovnání změn ve složení substrátu za pomoci HPLC-RI
- porovnání složení metabolitů při využití různých druhů mikroorganismů

5 METODIKA

5.1 Chemikálie

- acetonitril pro HPLC ($\geq 99,9$ %; Sigma-Aldrich)
- ultra čistá voda pro HPLC (přečištěná systémem Aqua Max™ Ultra 370 Series; Young Lin)
- síran železnatý (Penta)
- hexakynoželeznatan draselný (Penta)
- standard laktózy (≥ 99 %; Sigma-Aldrich)
- standard kyseliny mléčné (90 %; Fluka)
- standard etanolu (99,8 %; Penta)

5.2 Pomůcky a přístroje

kapalinový chromatograf Shimadzu LC-20AD Prominence:

- kvartérní pumpa (Shimadzu)
- pětikanálový degaser DGU-20A_{5R} (Shimadzu)
- autosampler SIL-20A_{CHT} (Shimadzu)
- diferenciální refraktometrický detektor RID-20A (Shimadzu)
- kolona Agilent Zorbax NH₂ (4,6 x 250 mm x 5 μ m)
- předkolonový cartridge filtr 0,2 μ m (Optimize Technologies)

vpichový pH metr (Eutech)

automatický titrátor pro analýzu titrační kyselosti HI 84529 (HANNA Instruments)

inkubátor INCU-Line (VWR International)

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

magnetické míchadlo MSH-20D (Vitrum)

stříkačkové filtry 0,22 μ m (Cronus)

filtrační papíry KA 4 (Papírna Perštejn s.r.o. Keseg & Rathouský)

běžné laboratorní pomůcky a sklo

5.3 Materiál

kultury BMK:

- jogurtová kultura Laktoflora (*Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus delbruecki* subsp. *bulgaricus*; Milcom)
- jogurtová kultura řeckého typu TY39 (*Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus delbruecki* subsp. *bulgaricus*; Genesis Laboratories)
- kultura FD-DVS LH-B02 (*Lactobacillus helveticus*; Chr. Hansen)

kvasinkové kultury:

- *Kluyveromyces lactis* CCDM 255
- *Kluyveromyces marxianus* CCDM 269

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

čerstvá sladká syrovátka (získaná během výroby polotvrdého sýru holandského typu v laboratořích ÚTP)

5.4 Průběh fermentace

5.4.1 Mléčná fermentace za využití BMK

Jako substrát byla použita čerstvá sladká syrovátka vzniklá během výroby polotvrdých sýrů a obnovená demineralizovaná syrovátka o koncentraci 15 %. Oba substráty byly pasterovány při 72 °C po dobu 5 minut, obnovená syrovátka byla před pasterací homogenizována mechanickým mícháním za mírného záhřevu přibližně na 35 °C. Po zchlazení na 37 °C proběhla inokulace 3 různými kulturami BMK (viz kapitola 5.3). Zaočkovaný substrát byl opět mechanicky promícháván po dobu 5 minut a po té rozlit do fermentačních nádob.

Fermentace probíhala v inkubátoru při teplotě 43 °C. Vzorke k analýze byly odebrány na počátku fermentace (čas T0, před inokulací BMK) a dále vždy po hodině. Fermentace byla ukončena dosažením izoelektrického bodu (pH 4,6) – v čase T5 v případě obou jogurtových kultur a v čase T7 v případě *L. helveticus*. V každém odběru byla zjištěna aktivní kyselost (pH), titrační kyselost (°SH) a množství laktózy pomocí HPLC. Příprava vzorku pro stanovení laktózy je specifikována v kapitole 5.5. V každém časovém intervalu byly odebrány 2 paralelní vzorky. Aktivní a titrační kyselost byla stanovena 3x (n = 6), vzorky pro stanovení laktózy byly připraveny 2x, a následně 2x analyzovány (n = 8).

5.4.2 Alkoholová fermentace za využití kvasinek rodu *Kluyveromyces*

Byly použity čtyři různé substráty, a to obnovená demineralizovaná syrovátka o třech různých koncentracích (7, 11 a 15 %) a čerstvá sladká syrovátka vzniklá jako vedlejší produkt při výrobě polotvrdých sýrů.

Všechny substráty byly pasterovány (viz kapitola 5.4.1) a zchlazeny na 28 °C. Následně byly substráty inokulovány 2 kmeny kvasinek rodu *Kluyveromyces* (*Kluyveromyces lactis* CCDM 255, *Kluyveromyces marxianus* CCDM 269). Substráty byly rozlity do fermentačních nádob, do kterých byla aplikována kvasná zátka. Fermentace následně probíhala v inkubátoru při teplotě 28 °C. Odběr vzorků probíhal v časech T0 (před inokulací) a dále vždy po 24 hodinách (T1 – T4). Úprava vzorků před analýzou laktózy je charakterizována v kapitole 5.5. Počet stanovení množství laktózy byl opět $n = 8$ (2 paralelní fermentace, 2x úprava vzorku a 2x vlastní analýza). Kromě obsahu laktózy byla v každém časovém intervalu zjištěna také aktivní kyselost ($n = 6$).

5.5 Příprava vzorku pro stanovení laktózy pomocí HPLC-RI

K 25 ml vzorku bylo do 100 ml odměrné baňky přidáno 5 ml Carrezova činidla I. Následně byl vzorek minutu promícháván a posléze nechán 2 minuty v klidu. Pak následoval přídavek 5 ml Carreze II. Vzorek byl opět promícháván 1 minutu a opět nechán v klidu, tentokrát na 5 minut. Odměrná baňka byla doplněna po rysku deionizovanou vodou. Následovala filtrace na filtračních papírech KA 4, mikrofiltrace na stříkačkových filtrech a případně ředění vzorku před vlastní analýzou.

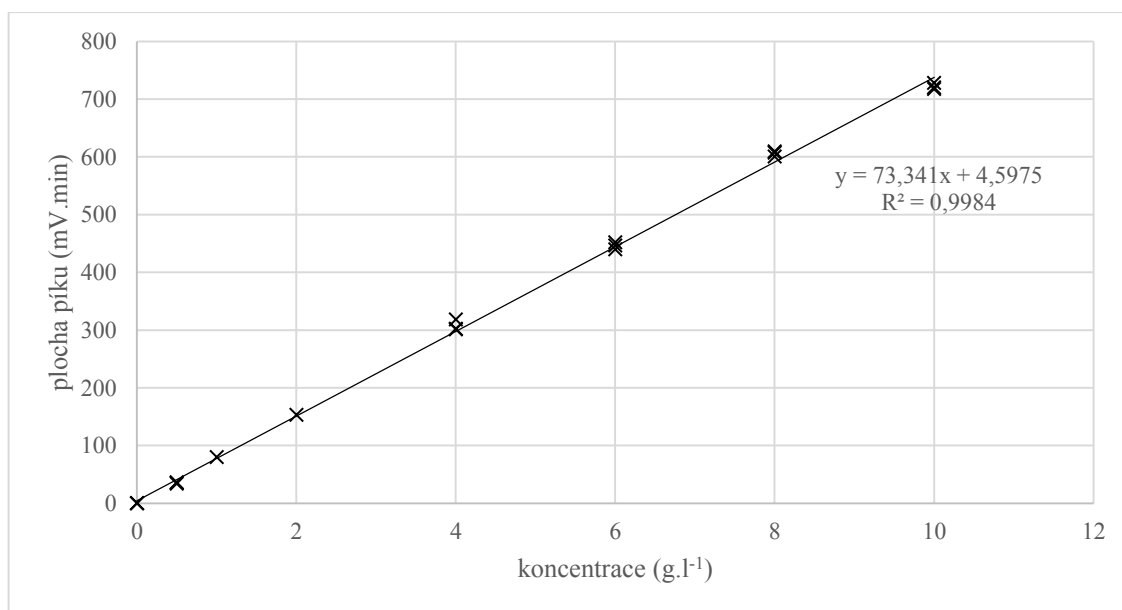
5.6 Analýza HPLC-RI

Separace probíhala za podmínek izokratické eluce. Mobilní fázi tvořila směs acetonitril-voda (80:20) a její průtok činil $1,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Délka analýzy byla 30 minut. Množství laktózy (v %) bylo zjištěno z regresní rovnice kalibrační přímky. Kalibrační řada zahrnovala koncentrace laktózy $0,5 - 10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Kalibrační přímka

Kalibrační přímka laktózy je zobrazena na Obrázku 8. Z rovnice regrese byla určena koncentrace laktózy v každém z analyzovaných vzorků.



Obrázek 8 Kalibrační přímka laktózy

Kyselinu mléčnou a etanol se bohužel pomocí navržené metodiky nepodařilo stanovit. Průběh mléčné a alkoholové fermentace proto byl sledován pouze na základě úbytku substrátu (laktózy), nikoli nárůstu produktů fermentace.

6.2 Mléčná fermentace

Během mléčné fermentace syrovátky za působení BMK dochází k postupnému snižování hodnoty pH a nárůstu titrační kyselosti. Tento jev je způsobem mikrobiologickou přeměnou laktózy na kyselinu mléčnou. Laktóza se během fermentace nejprve štěpí na glukózu a galaktózu. V další fázi fermentace jsou oba monosacharidy (galaktóza po předchozí přeměně na glukózu) přeměňovány na kyselinu mléčnou [33].

Hodnoty aktivní a titrační kyselosti v čase 0 byly vždy měřeny v syrovátce nezaočkované mikroorganismy. Hodnoty pH u 15% roztoku demineralizované syrovátky v čase 0 se pohybovaly v rozmezí 5,97 – 6,11. Hodnota TK, byla v rozmezí 3,9 – 4,8 °SH. U čerstvé

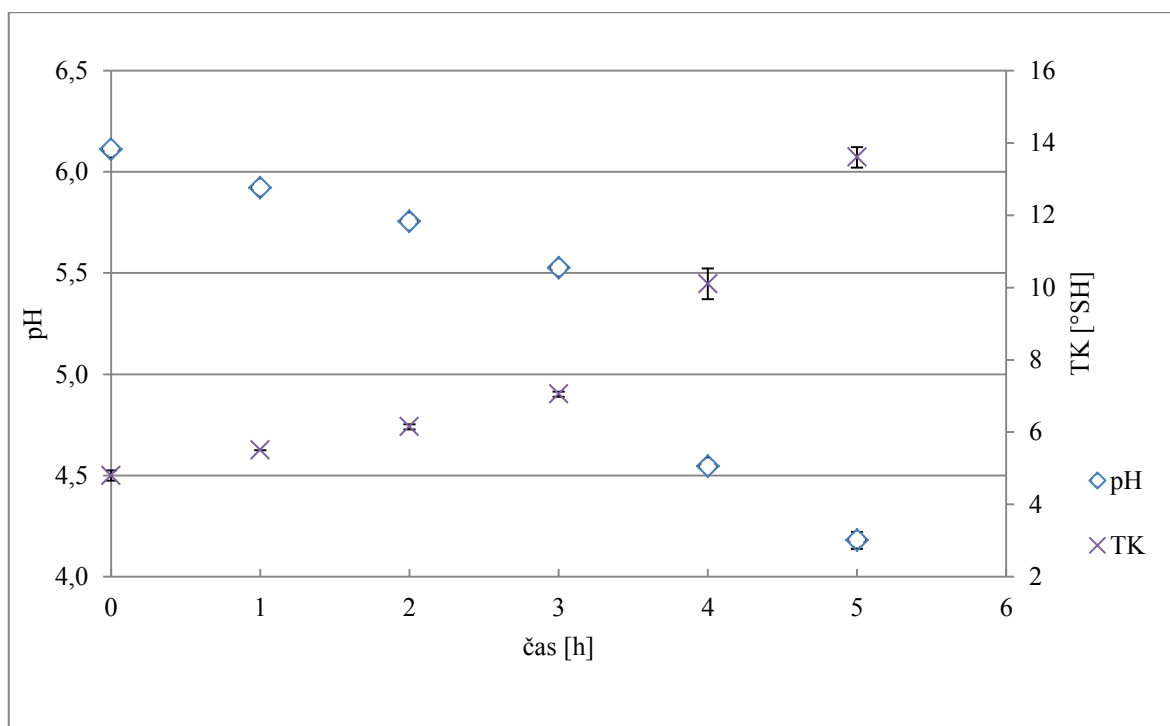
syrovátky byly hodnoty aktivní a titrační kyselosti nepatrně vyšší. pH v čase 0 dosahovalo hodnot 6,00 – 6,26, TK pak 4,2 – 4,8 °SH.

Obsah laktózy stanovený za pomoci HPLC s RI detektorem byl v čase 0 u sušené syrovátky 11,23 ± 0,37 % u čerstvé syrovátky pak 5,06 ± 0,14 %. Analyzované množství laktózy v čerstvé syrovátce odpovídá teoretickým předpokladům (viz Tabulka 2).

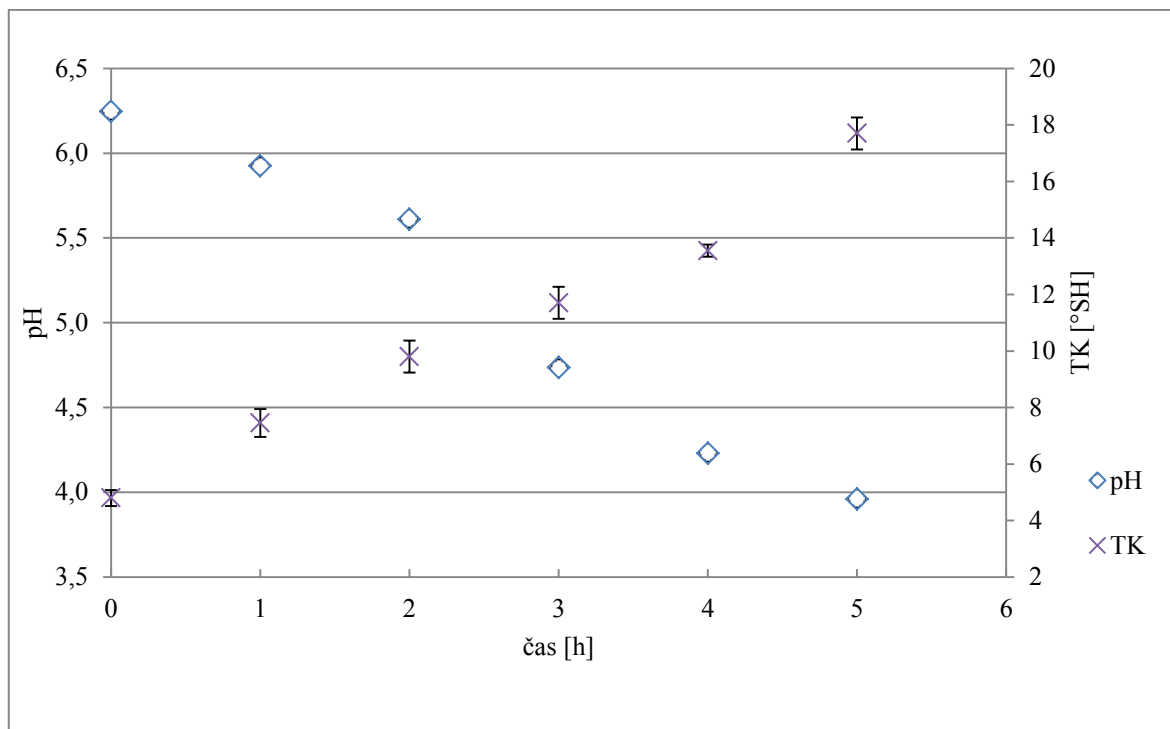
6.2.1 Jogurtová kultura Laktoflora

Výsledky stanovení pH a titrační kyselosti čerstvé a 15% sušené demineralizované syrovátky jsou uvedeny na Obr. 8 a 9. Překročení izoelektrického bodu bylo u obou substrátů dosaženo v čase 4 hodiny. Při využití sušené syrovátky jako substrátu k mléčné fermentaci docházelo v prvních 3 hodinách k velmi pozvolnému poklesu pH. V čase 4 hodin bylo zaznamenáno výrazné snížení aktivní kyselosti spojené s velkým nárůstem titrační kyselosti. Fermentace byla ukončena v čase 5 hodin, kdy byla hodnota pH rovna hodnotě 4,18 a titrační kyselost dosahovala hodnoty 13,6 °SH.

Při využití čerstvé syrovátky docházelo k největšímu snížení hodnoty pH již v čase 3 hodiny. Nárůst TK je nejpatrnější v čase 5 hodin, kdy dosáhl hodnoty 17,7 °SH.



Obrázek 8 Výsledky stanovení pH a titrační kyselosti (sušená syrovátka + Laktoflora)



Obrázek 9 Výsledky stanovení pH a titrační kyselosti (čerstvá syrovátka + Laktoflora)

K největšímu úbytku laktózy u substrátu tvořeného sušenou syrovátkou zaočkované jogurtovou kulturou Laktoflora docházelo v čase 1 a 2 hodiny (viz Obr. 10). Následně byla rychlost utilizace laktózy zpomalena a nejnižší hodnoty dosáhla na konci fermentace v čase 5 hodin, kdy její koncentrace činila 5,37 %. Celkem došlo k zfermentování přibližně 52 % laktózy obsažené v roztoku sušené syrovátky.

U čerstvé syrovátky byl úbytek laktózy patrný především v čase 3 hodiny po inokulaci (viz Obr. 11). V čase 5 hodin byla koncentrace laktózy 1,03 %. Celkem bylo za 5 hodin fermentace jogurtovou kulturou Laktoflora využito téměř 80 % laktózy obsažené v čerstvé syrovátce.

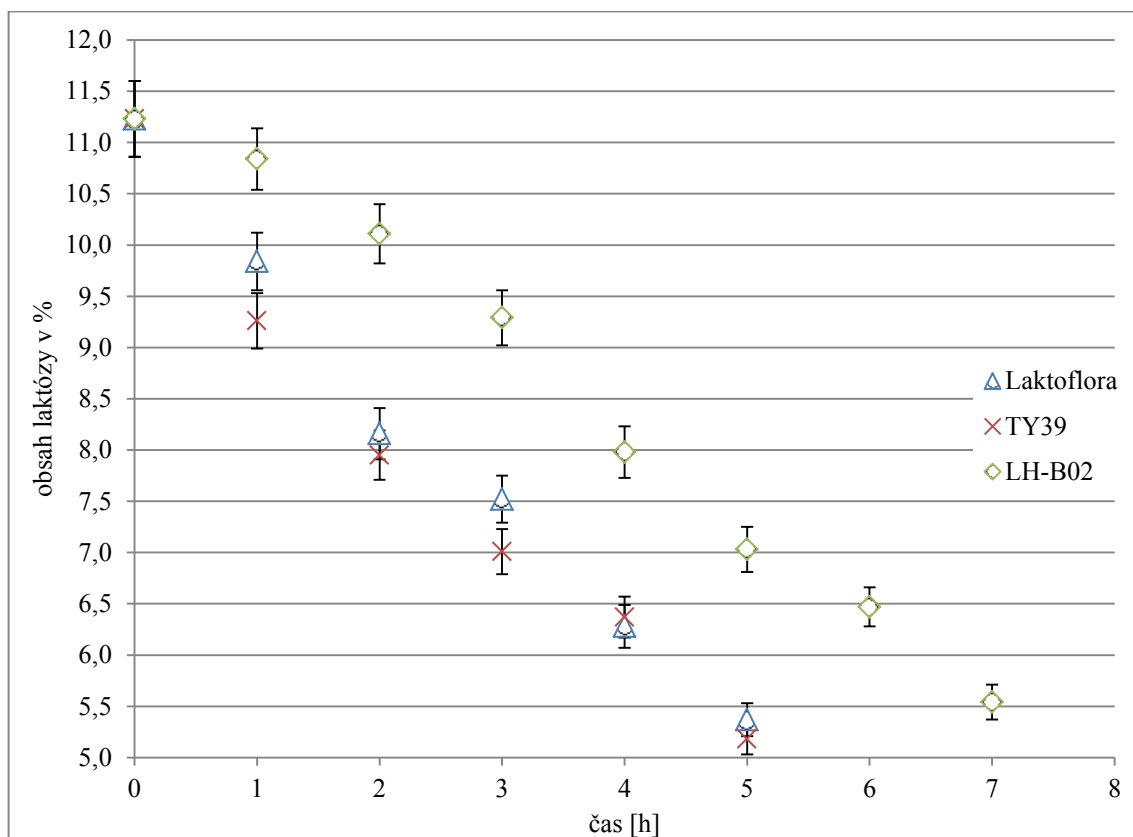
Legarová a kol. [33] analyzovali změny obsahu cukrů (laktózy, glukózy a galaktózy) a mléčné kyseliny během fermentace obnovené syrovátky (sušená syrovátka Lactosérum Moravia Lacto a.s.) pomocí stejné jogurtové kultury Laktoflora. Obnovená syrovátka byla namíchána tak, aby obsah laktózy činil 5,1 %. Analýza sacharidů proběhla za pomoci HPLC Varian (pumpa Varian 9010, Autosampler 9095, detektor Varian RI-4) s analytickou kolonou AminexR HPX-87H, 300 x 7,8 mm, za podmínek metody:

- mobilní fáze: 0,005M H₂SO₄
- průtok: 0,6 ml.min⁻¹

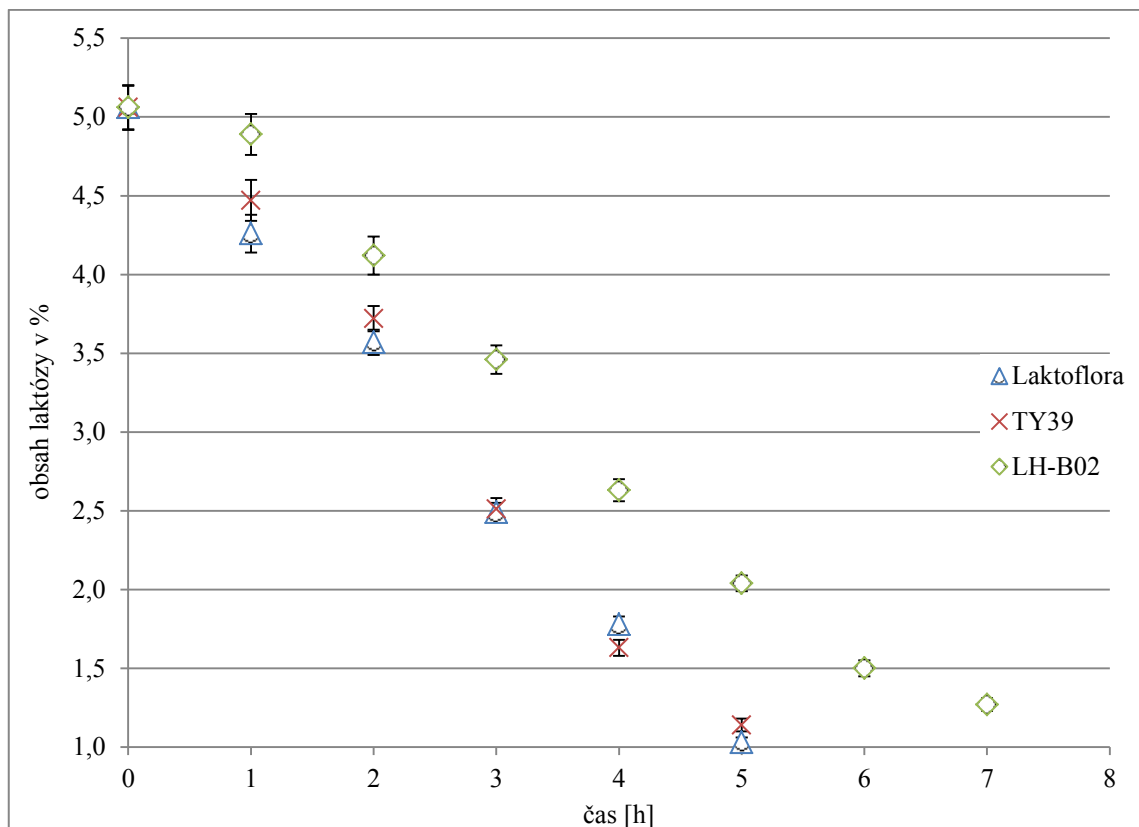
- teplota kolony: 65 °C
- detekce: RI – teplota detektoru 35 °C

Po 4 hodinové fermentaci byl zjištěn úbytek laktózy ve vzorku z původních 5,10 % na 4,35 %, tzn., že úbytek činil cca 0,75 %. Tento úbytek odpovídal 15 % relativních z celkového obsahu laktózy před fermentací.

Tyto úbytky laktózy jsou, při porovnání s fermentací čerstvé syrovátky o podobné koncentraci laktózy (5,06 %) zaznamenané v této práci, výrazně nižší. Za 4 hodiny fermentace se obsah laktózy snížil z 5,06 % na 1,78 %. Celkový procentuální úbytek laktózy byl cca 65 %. Lze tedy pozorovat velké rozdíly průběhu fermentace při použití čerstvé a obnovené syrovátky o podobné koncentraci laktózy.



Obrázek 10 Výsledky stanovení obsahu laktózy během fermentace sušené syrovátky za užití různých BMK



Obrázek 11 Výsledky stanovení obsahu laktózy během fermentace čerstvé syrovátky za užití různých BMK

6.2.2 Jogurtová kultura řeckého typu TY39

Změny aktivní a titrační kyselosti fermentací syrovátky jogurtovou kulturou řeckého typu TY39 jsou uvedeny na Obr. 12 a 13. Změny hodnot byly v prvních 2 hodinách fermentace opět velmi mírné. Probíhá klidová (lag) fáze mikrobiologického růstu. Po dostatečném namnožení kultury došlo v čase 3 hodiny k výraznějšímu snížení hodnoty pH a nárůstu titrační kyselosti.

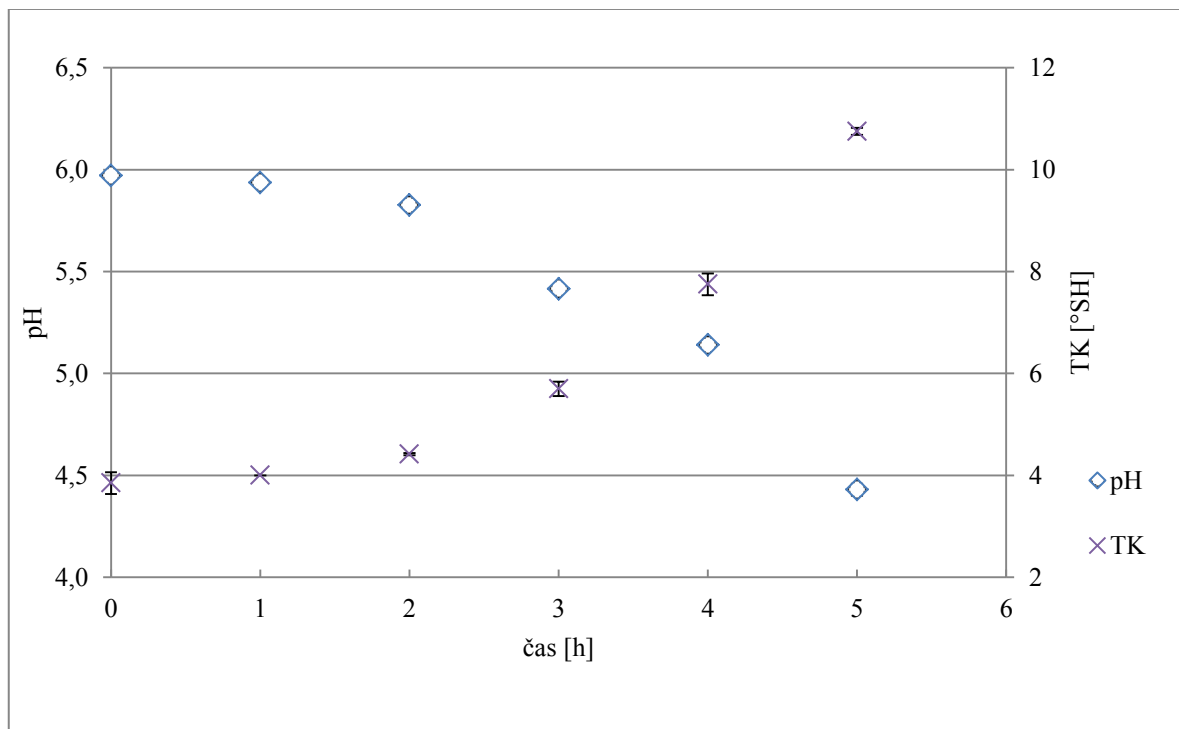
Při užití substrátu tvořeného sušenou syrovátkou byl izoelektrický bod dosažen v čase 5 hodin, kdy pH činilo 4,43. Hodnota TK dosáhla hodnoty 10,8 °SH.

Během fermentace čerstvé syrovátky kulturou TY39 probíhal pokles pH rychleji, zvláště v čase 2 – 4 hodin. Fermentace byla ukončena v čase 5 hodin, kdy byla hodnota pH 3,99 a hodnota TK 14,8 °SH.

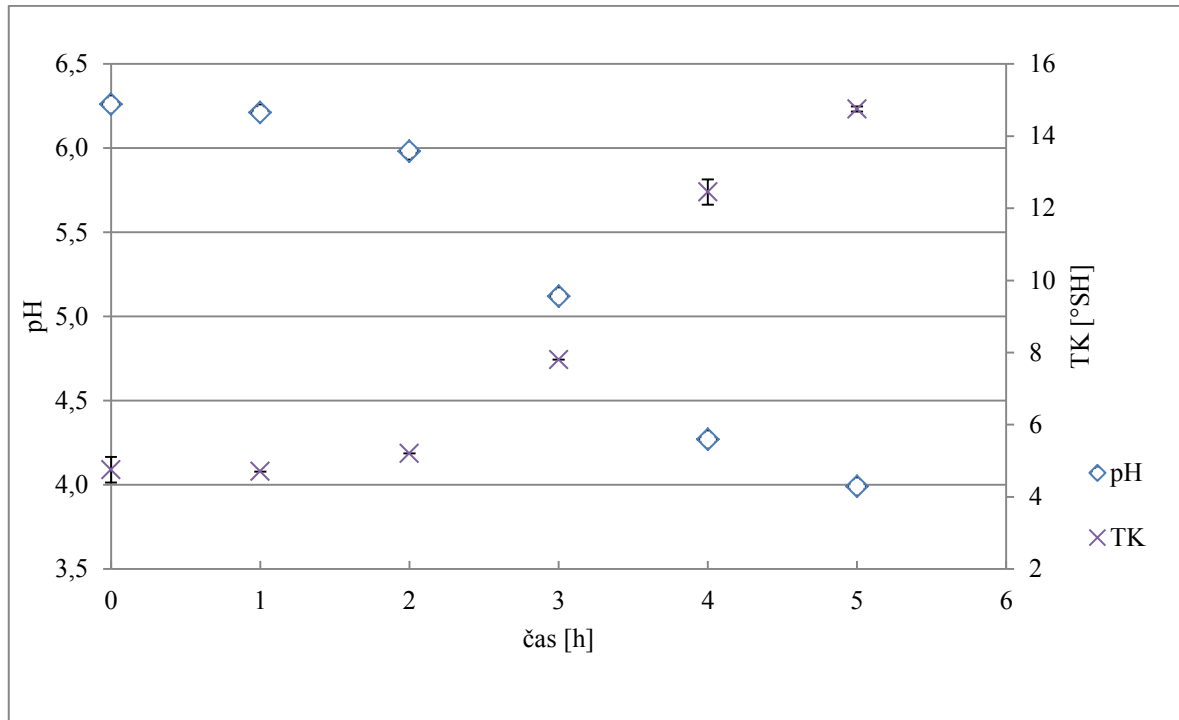
Úbytek obsahu laktózy v substrátu během fermentace byl srovnatelný s jogurtovou kulturou Laktoflora (viz Obr. 10 a 11).

U čerstvé syrovátky největší změna obsahu laktózy nastala v čase 3 hodiny, kdy také došlo k výraznému poklesu pH a růstu naměřených hodnot TK. Koncentrace laktózy v čase 5 hodin byla 1,14 %. Hodnoty obsahu laktózy se v závěru fermentace v čase 5 hodin lišily ve srovnání s kulturou Laktoflora jen nepatrně. Velmi podobné bylo i pH substrátu na konci fermentace.

Výrazný úbytek laktózy u sušené syrovátky nastal již po 1 hodině fermentace, kdy koncentrace laktózy byla stanovena na 9,26 %. Což je ve srovnání v čase 0 hodin úbytek o 17,5 %. V čase 5 hodin byl obsah laktózy 5,18 %. Došlo k utilizaci přibližně 54 % původně obsažené laktózy



Obrázek 12 Výsledky stanovení pH a titrační kyselosti (sušená syrovátka + TY32)

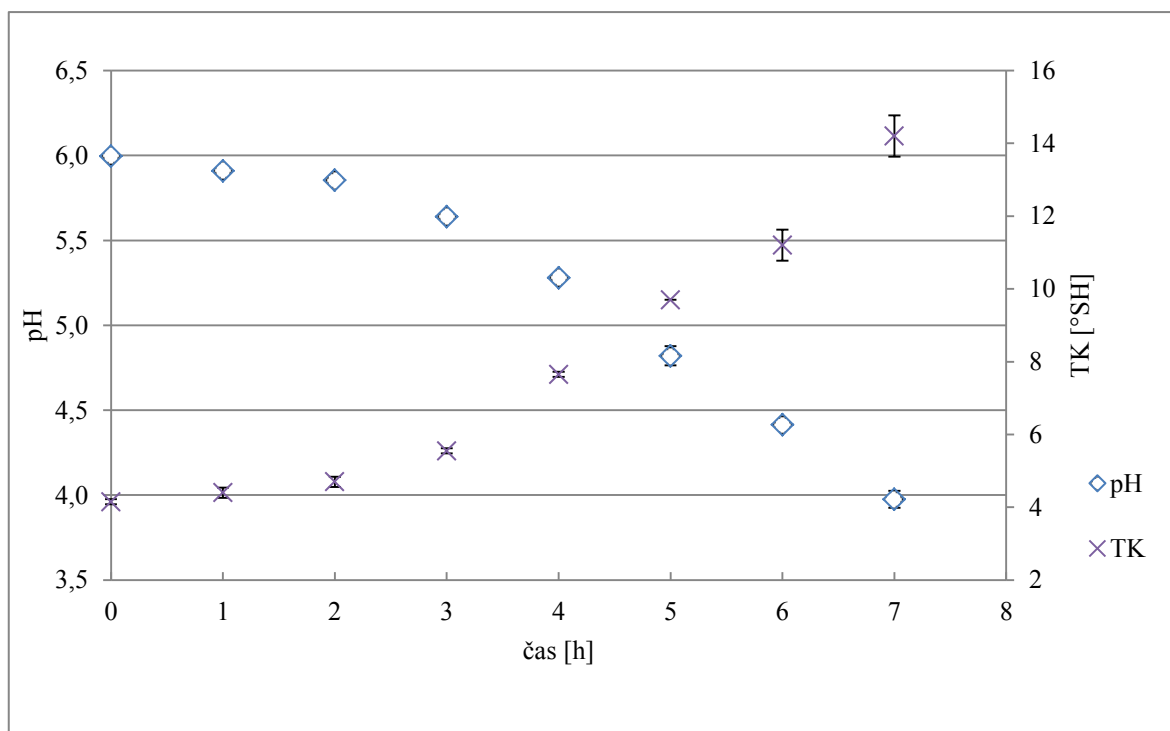


Obrázek 13 Výsledky stanovení pH a titrační kyselosti (čerstvá syrovátka + TY32)

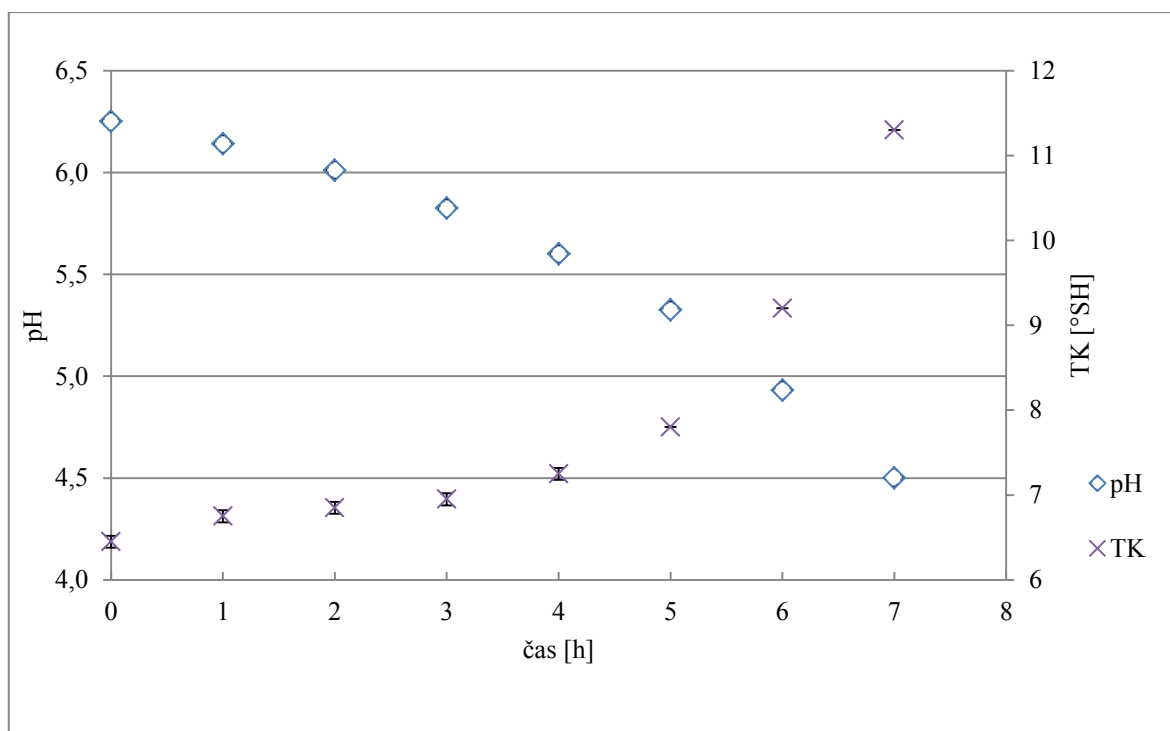
6.2.3 Kultura FD-DVS LH-B02

Fermentace syrovátky inokulované kulturou LH-B02 (*Lactobacillus helveticus*) se vyznačovala velmi pozvolným poklesem aktivní kyselosti u obou použitých substrátů. Proto byla délka fermentací na rozdíl od předešlých kultur BMK prodloužena o 2 hodiny. Změny aktivní a titrační kyselosti jsou uvedeny na Obr. 14 a 15. Nejvyšší nárůsty hodnot TK byly u obou substrátů v posledních hodinách fermentace, především v čase 7 hodin, kdy u čerstvé syrovátky byla dosažena hodnota 11,3 °SH u sušené syrovátky pak 14,2 °SH.

Pozvolný pokles aktivní kyselosti koreluje s mírnějšími úbytky obsahu laktózy během fermentace (viz Obr. 10 a 11). Ve srovnání s jogurtovými kulturami Laktoflora a TY32 byla rychlost přeměny laktózy kulturou LH-B02 výrazně pomalejší. V čase 7 hodin byl u sušené syrovátky obsah laktózy 5,54 %, u čerstvé 1,27 %. Obě hodnoty jsou mírně vyšší než hodnoty obsahu laktózy v čase 5 hodin u kultur Laktoflora a TY32. U sušené syrovátky bylo celkově přeměněno přibližně 51 % původně obsažené laktózy. Při užití čerstvé syrovátky došlo k utilizaci přibližně 75 % původně obsažené laktózy



Obrázek 14 Výsledky stanovení pH a titrační kyselosti (sušená syrovátka + LH-B02)



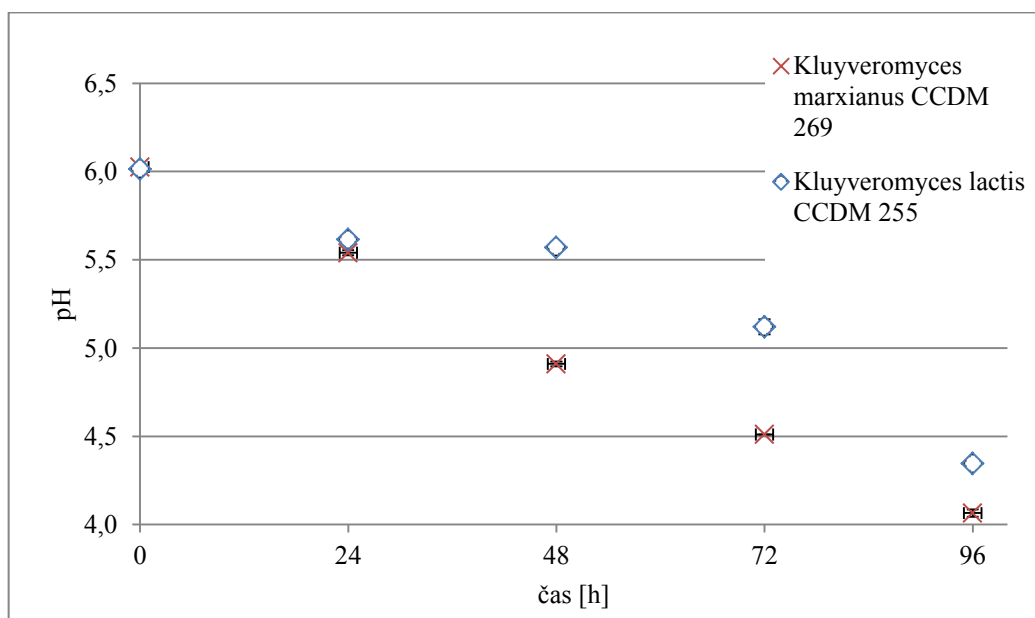
Obrázek 15 Výsledky stanovení pH a titrační kyselosti (čerstvá syrovátka + LH-B02)

6.3 Alkoholová fermentace

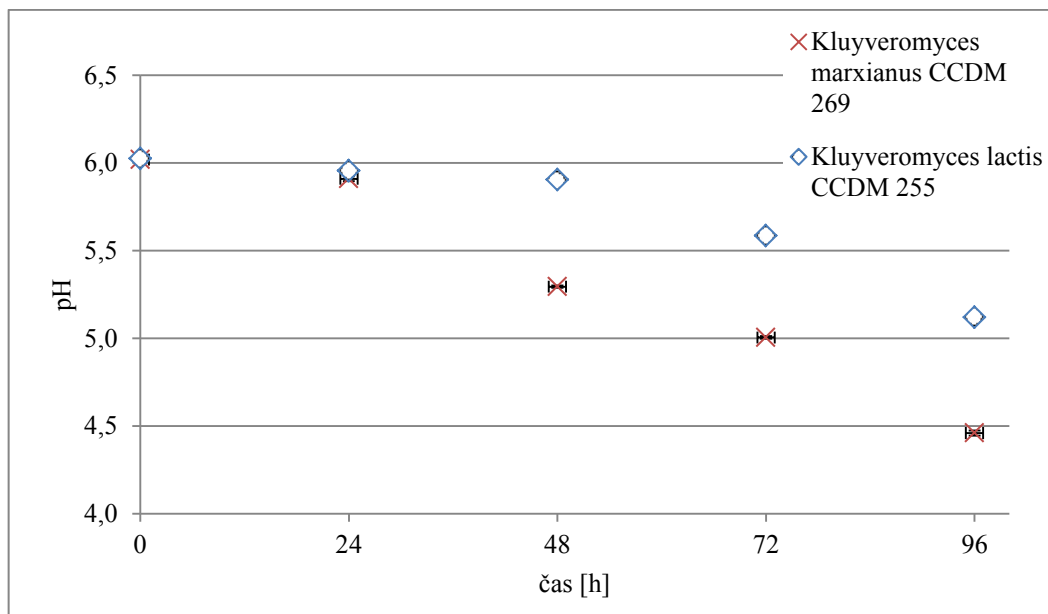
Během alkoholové fermentace syrovátky za působení kvasinek rodu *Kluyveromyces* byla během fermentace zjišťována hodnota aktivní kyselosti a obsah laktózy. Naměřené hodnoty aktivní kyselosti jsou v závislosti na použitém substrátu uvedeny na Obr. 16, 17, 18 a 19.

Během alkoholové fermentace docházelo ke změnám hodnot pH. V případě kvasinek rodu *Kluyveromyces marxianus* byl u všech použitých substrátů nejvyšší pokles hodnot pH v čase 48 hodin. Na konci fermentace v čase 96 hodin byla hodnota pH nejnižší při použití 7% sušené syrovátky, kdy dosáhlo hodnoty 4,07. Se zvyšující se koncentrací použitého substrátu sušené syrovátky rostla v čase 96 hodin hodnota pH.

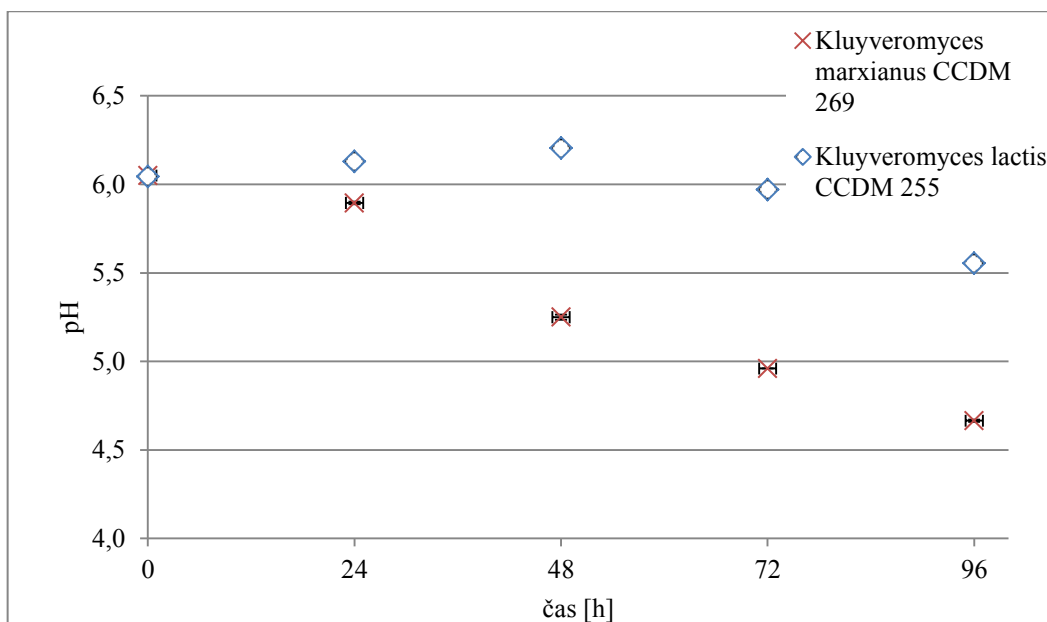
U kvasinek rodu *Kluyveromyces lactis* byl pokles aktivní kyselosti mírnější, zvláště při využití koncentrovanějšího roztoku sušené syrovátky. V případě 15% sušené syrovátky došlo v časech 24 a 48 hodin k mírnému růstu pH (viz Obr. 18). Bylo potvrzeno, že kvasinky *Kluyveromyces lactis* a *Kluyveromyces marxianus* patří mezi mikroorganismy schopné snižovat během fermentace aktivní kyselost syrovátky [37, 38].



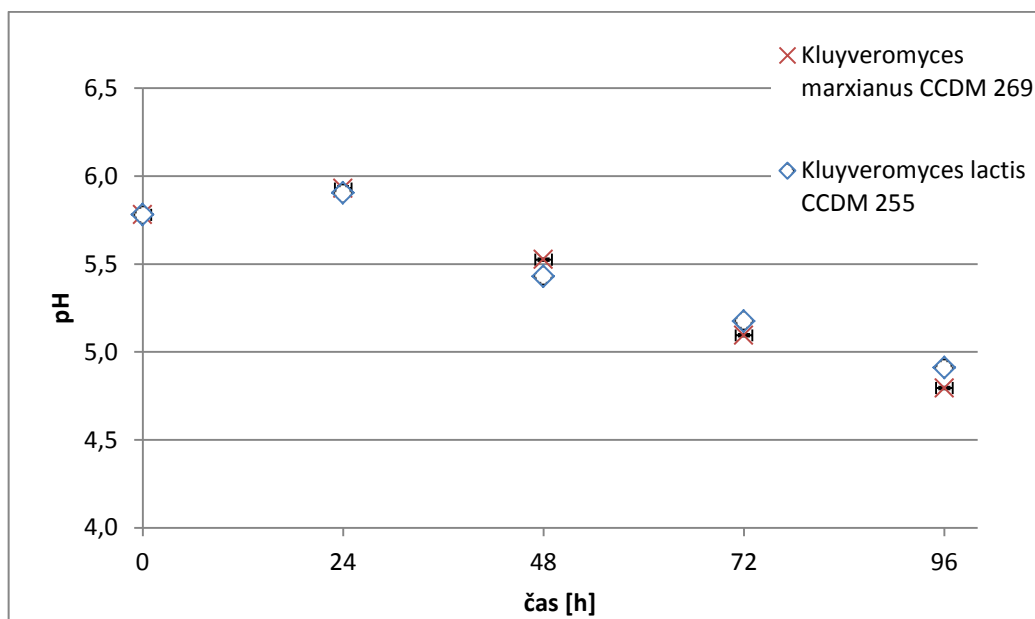
Obrázek 16 Výsledky stanovení pH během alkoholové fermentace (7% sušená syrovátka)



Obrázek 17 Výsledky stanovení pH během alkoholové fermentace (11% sušená syrovátka)

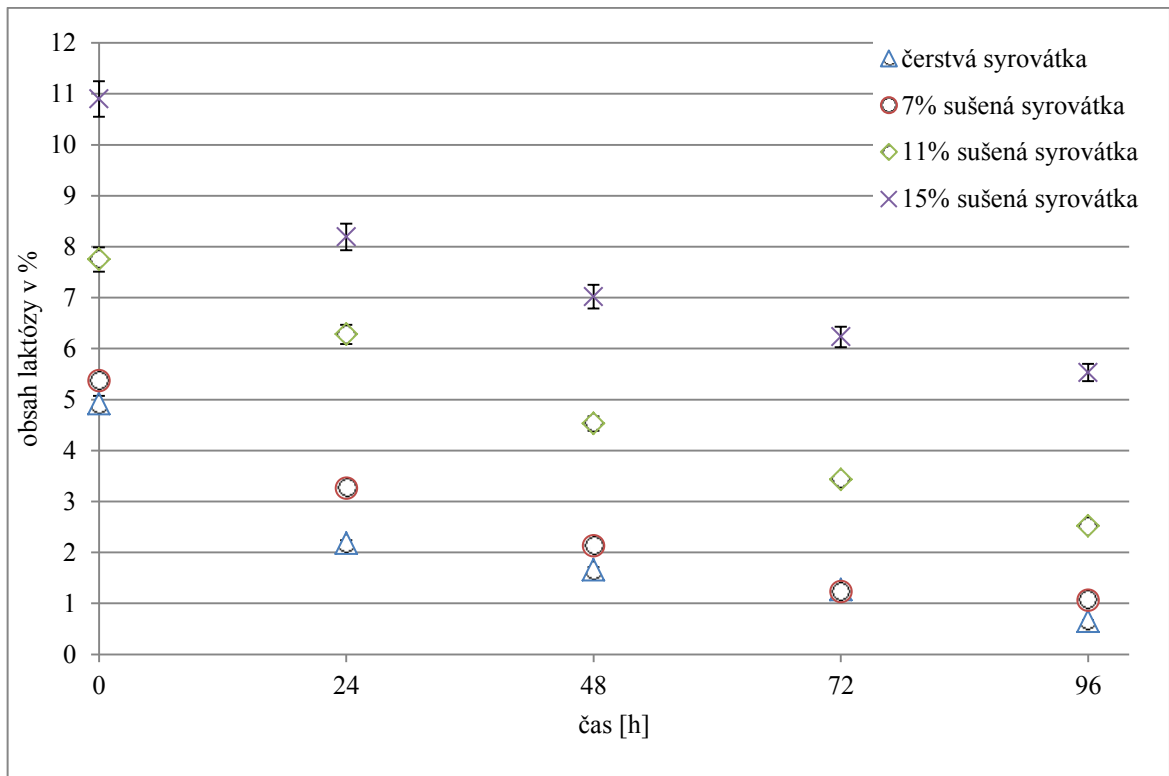


Obrázek 18 Výsledky stanovení pH během alkoholové fermentace (15% sušená syrovátka)

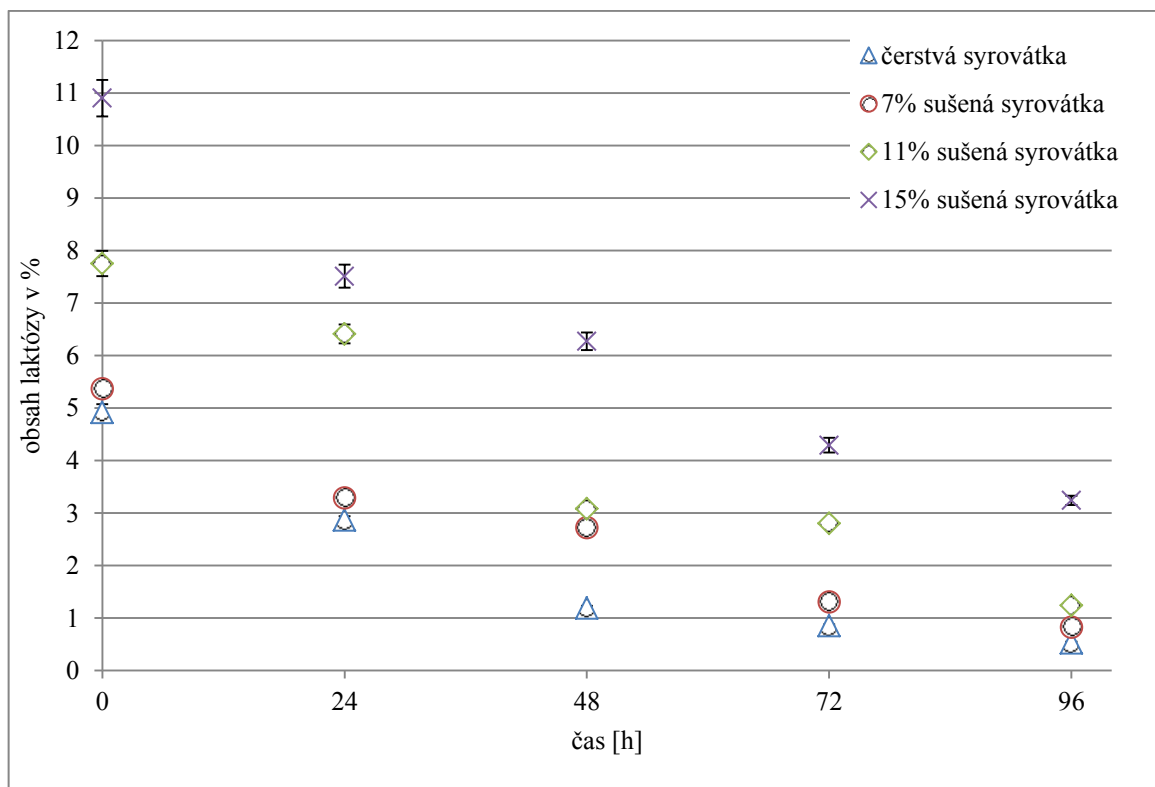


Obrázek 19 Výsledky stanovení pH během alkoholové fermentace (čerstvá syrovátka)

Změny obsahu laktózy během alkoholové fermentace jsou uvedeny na Obr. 20 a 21. U obou druhů kvasinek došlo k výraznému úbytku laktózy především v čase 24 hodin. Pak se pokles obsahu analyzovaného disacharidu zpomaluje. V čase 96 hodin byl obsah laktózy v čerstvé syrovátce v případě *Kluyveromyces marxianus* 0,53 %, u *Kluyveromyces lactis* 0,65 %. Došlo k přeměně 87 – 89 % laktózy původně obsažené v čerstvé syrovátce. Při použití koncentrovaných substrátů sušené syrovátky s vysokým obsahem laktózy se procentuální využití laktózy snižuje. Například u 15% sušené syrovátky fermentované za pomoci *Kluyveromyces lactis* bylo za 96 hodin fermentace přeměněno jen přibližně 49 % původně obsažené laktózy. Celkový úbytek obsahu laktózy se se zvyšující koncentrací původního substrátu zvyšoval, u *Kluyveromyces lactis* ale velmi mírně.



Obrázek 20 Výsledky stanovení obsahu laktózy při alkoholové fermentaci různých substrátů kvasinkami *Kluyveromyces lactis* CCDM 255



Obrázek 21 Výsledky stanovení obsahu laktózy při alkoholové fermentaci různých substrátů kvasinkami *Kluyveromyces marxianus* CCDM 269

ZÁVĚR

Cílem předložené práce bylo popsat charakteristické vlastnosti syrovátky, její vznik, chemické složení a zhodnotit průběhy a možnosti sledování různých druhů fermentací.

Sledování průběhu mléčné fermentace za pomoci měření aktivní a titrační kyselosti se jeví jako jednoduchá, rychlá, ale ne příliš přesná metoda ke stanovení průběhu fermentace. Je ale vhodná pro orientační stanovení stupně prokysání. Průběh fermentace je vhodné validovat například analýzou fermentovaných sacharidů za pomoci HPLC. V lepším případě i analýzou vzniklých produktů metabolismu doplněným o kontrolní mikrobiologický rozbor ubezpečující o mikrobiologické čistotě fermentačního média.

Úprava vzorků syrovátky čiřením dle Carreze a následná analýza zvolenou HPLC metodou se ukázala jako vhodná pro měření změny obsahu laktózy během mléčné a alkoholové fermentace. Tato metoda je přesná, rychlá, jednoduchá na úpravu vzorku a podává opakovatelné výsledky.

Během mléčné fermentace za využití BMK docházelo ke snižování hodnoty pH a nárůstu titrační kyselosti. Byla ověřena schopnost BMK využít laktózu obsaženou v čerstvé i obnovené syrovátce. Nejvyššího množství zfermentované laktózy při mléčné fermentaci čerstvé syrovátky bylo dosaženo za využití jogurtové kultury Laktoflora. Při fermentaci 15% sušené syrovátky byla fermentace nejúčinnější u jogurtové kultury řeckého typu TY39. Při fermentaci syrovátky kulturou LH-B02 (*Lactobacillus helveticus*) fermentace probíhala výrazně pomaleji.

Při alkoholové fermentaci za pomoci kvasinek rodu *Kluyveromyces* docházelo ke snižování hodnoty aktivní kyselosti a k úbytku množství laktózy v substrátu. Byla ověřena schopnost kvasinek rodu *Kluyveromyces* využít laktózu obsaženou v syrovátce. Nejvyšší schopnosti přeměny laktózy u čerstvé i obnovené syrovátky dosahoval druh *Kluyveromyces marxianus* CCDM 269.

K potvrzení hypotéz alkoholové a mléčné fermentace za pomoci kvasinek rodu *Kluyveromyces* a bakterií mléčného kvašení je nutné zoptimalizovat metodiku analýzy etanolu a kyseliny mléčné. V rámci budoucí optimalizace metody alkoholové fermentace by pH substrátu mohlo být za použití pufrů vhodně upraveno na hodnotu ideální pro růst jednotlivých druhů kvasinek rodu *Kluyveromyces*.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] MILLER D. Gregory, Judith K. JARVIS, Lois D. MCBEAN. *Handbook of Dairy Foods and Nutrition*. Third Edition. London: CRC Press, 2006. ISBN 978-0-8493-2828-2.
- [2] SMITHERS W Geoffrey. Whey and whey proteins - From 'gutter-to-gold'. *International Dairy Journal*. Amsterdam: Elsevier, 2008, 18(7), 695-704. ISSN 0958-6946.
- [3] BYLUND Gösta. *Dairy Processing Handbook*. Lund: Tetra Pak Processing Systems AB, 1995. ISBN 978-91-631-3427-2.
- [4] SUKOVÁ Irena. *Syrovátka v potravinářství*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2006. ISBN 80-7271-173-3.
- [5] ONWULATA I. Charles, Peter J. HUTH. *Whey Processing, Functionality and Health Benefits*. Ames: Wiley-Blackwell, 2008. ISBN 978-0-8138-0903-8.
- [6] SPREER Edgar. *Technologie der Milchverarbeitung*. 10. vyd. Hamburg: Behr's Verlag, 2011. ISBN 978-3-89947-841-9.
- [7] *USDA National Nutrient Database for Standard Reference*, Release 28 [online databáze]. Washington D.C.: United States Department of Agriculture, 2015 [cit. 2015-12-28]. Dostupné z: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/>
- [8] KADLEC Pavel a kol. *Technologie potravin II*. Praha: VŠCHT v Praze, 2008. ISBN 978-80-7080-510-7.
- [9] KING C. Robert, William D. STANSFIELD, Pamela K. MULLIGAN. *A Dictionary of Genetics*. Seventh Edition. New York: Oxford University Press, 2006. ISBN 978-0195307610.
- [10] LEGAROVÁ Veronika. *Posouzení kvality sladké syrovátky vzhledem k možnosti využití pro potravinářské účely*. Praha, 2011. Disertační práce. Česká Zemědělská Univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Katedra kvality zemědělských produktů.
- [11] FUQUAY John, Patrick FOX, Paul MCSWEENEY. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Second Edition. Amsterdam: Elsevier, 2011. ISBN 978-0-12-374407-4.
- [12] SMILOWITZ T. Jennifer, Cora J. DILLARD, J. Bruce GERMAN. Milk beyond essential nutrients: The metabolic food. *Australian Journal of Dairy Technology*. Melbourne: Dairy Industry Association of Australia, 2005, 60(2), 77–83. ISSN 0004-9433.

- [13] ZEMEL B. Michael. Role of calcium and dairy products in energy partitioning and weight management. *The American Journal of Clinical Nutrition*. Rockville: American Society for Nutrition, 2004, 79, 907-912. ISSN 0002-9165.
- [14] BAUCHART-THEVRET Caroline, Barbara STOLL, Douglas G. BURRIN. Intestinal metabolism of sulfur amino acids. *Nutrition Research Reviews*. London: The Nutrition Society, 2009, 22, 175–187. ISSN 0954-4224.
- [15] BUŇKOVÁ Leona, Magda DOLEŽALOVÁ. *Obecná mikrobiologie*. Vyd. 2. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2010. ISBN 978-80-7318-973-0.
- [16] VODRÁŽKA Zdeněk. *Biochemie*. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-0600-1.
- [17] ADAMS R. Martin, Maurice O. MOSS. *Food mikrobiologie*. Third edition. Cambridge: RSC Publishing, 2008. ISBN 978-0-85404-284-5.
- [18] WEE Young-Jung, Jin-Nam KIM a Hwa-Won RYU. Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications. *Food Technology and Biotechnology*. Zagreb: Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, 2006, 44(2), 163–172. ISSN 1330-9862.
- [19] TORTORA J. Gerard, Funke R. BERDELL, Case L. CHRISTINE. *Microbiology: An Introduction*. 12th Edition. New Jersey: Pearson Education, 2015. ISBN 978-0-321-92915-0.
- [20] BOCK Anne-Katrin, Jürgen GLASEMACHER, Roland SCHMIDT a Peter SCHÖNHEIT. Purification and Characterization of Two Extremely Thermostable Enzymes, Phosphate Acetyltransferase and Acetate Kinase, from the Hyperthermophilic Eubacterium *Thermotoga maritima*. *Journal of bacteriology*. Berlin: American Society for Microbiology, 1999, 181(6), 1861–1867. ISSN 0021-9193.
- [21] FOX P. F., T. UNIACKE-LOWE, P. L. H. MCSWEENEY a J. A. O'MAHONY. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. 2nd Revised edition. Southport: Springer International Publishing, 2015. ISBN 978-3-319-14891-5.
- [22] SONG Ji-Yoon, Joon-Song PARK, Chang Duk KANG, Hwa-Young CHO, Dongsik YANG, Seunghyun LEE a Kwang Myung CHO. Introduction of a bacterial acetyl-CoA synthesis pathway improves lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*. Amsterdam: Elsevier, 2016, (35), 38–45. ISSN 1096-7176.

- [23] NĚMEC Miroslav, Dagmar MATOULKOVÁ. *Základy obecné mikrobiologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova Univerzita, 2015. ISBN 978-80-210-7923-6.
- [24] KOOLMAN Jan, Klaus-Heinrich ROEHM. *Color Atlas of Biochemistry*. 2nd edition. Stuttgart: Thieme, 2005. ISBN 3-13-100372-3.
- [25] CONWAY Tyrrell. The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. *FEMS Microbiology Reviews*. Amsterdam: Elsevier, 1992, 103(1), 1-27. ISSN 1574-6976.
- [26] VOET Donald a Judith G. VOET. *Biochemistry*. 4th ed. Hoboken: John Wiley, 2011. ISBN 978-0470917459.
- [27] LUZ SANS María a Isabel MARTÍNEZ-CASTRO. Recent developments in sample preparation for chromatographic analysis of carbohydrates. *Journal of Chromatography A*. Amsterdam: Elsevier, 2007, 1153, 74-89. ISSN 0021-9673.
- [28] ŁACZKOWSKA Marta, Ewelina MAŁCZAK, Andrzej BARYGA. Metoda HPLC/RI ke stanovení sacharidů v cukrovarnických meziproduktech a výrobcích. *Listy cukrovarnické a řepařské*. Praha: VUC Praha, 2015, 131(7-8), 254-257. ISSN 1210-3306.
- [29] RAESSLER Michael. Sample preparation and current applications of liquid chromatography for the determination of non-structural carbohydrates in plants. *Trends in Analytical Chemistry*. Amsterdam: Elsevier, 2011, 30, 1833–1843. ISSN 0165-9936.
- [30] KLOUDA Pavel. *Moderní analytické metody*. 2. přeprac. a dopl. vydání. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.
- [31] NOVÁKOVÁ Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Praha: Europrint, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [32] HALL Gerald, Wilhad M. REUTER. HPLC Analysis for the Monitoring of Fermentation Broth During Ethanol Production as a Biofuel. [online]. Shelton: PerkinElmer, 2007, [cit. 2017-01-25]. Dostupné z: https://www.perkinelmer.com/pdfs/downloads/abr_ethanol-biofuelbyhplcappbrief.pdf
- [33] LEGAROVÁ Veronika a Lenka KOUŘIMSKÁ. Metody sledování změn obsahu laktosy a dalších analytů během fermentace syrovátky. *Chemické Listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2011, 105, 869-873. ISSN 1213-7103.

- [34] VINKO Ivana, R. BOŽANIĆ, Ž. GOLEM, I. KESNER-KOREN a S. MAHNET. Change of lactose content after milk fermentation using various microbial cultures. *Mljekarstvo*. Zagreb: Hrvatska mljekarska udruga, 2011, 61(2), 161-167. ISSN 1846-4025.
- [35] LÓPEZ E. Falqué, E. Fernández GÓMEZ. Simultaneous Determination of the Major Organic Acids, Sugars, Glycerol, and Ethanol by HPLC in Grape Musts and White Wine. *Journal of Chromatographic Science*. New York: Oxford University Press, 1996, 34, 254-257. ISSN 0021-9665.
- [36] DAVÍDEK Jiří a kol. *Laboratorní příručka analýzy potravin*. 2. vydání. Praha: SNTL, 1981.
- [37] RODICIO Rosaura, Jürgen J. HEINISCH. Yeast on the milky way: genetics, physiology and biotechnology of *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2013, 30(5), 165–177. DOI: 10.1002/yea.2954. ISSN 1097-0061.
- [38] KUMAR Sachin, Pratibha DHEERAN, Surendra P. SINGH, Indra M. MISHRA, Dilip K. ADHIKARI. Kinetic studies of ethanol fermentation using *Kluyveromyces* sp. IIPE453. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2013, 88, 1874–1884. DOI: 10.1002/jctb.4042. ISSN 1097-4660.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AMP	Adenosinmonofosfát
ATP	Adenosintrifosfát
BMK	Bakterie mléčného kvašení
CCDM	Cultures Collection of Dairy Microorganisms / Sběrka kultur mléčných mikroorganismů
HPLC	High Performance Liquid Chromatography / Vysokoučinná kapalinová chromatografie
IU	International Unit / Mezinárodní jednotka
MF	Mikrofiltrace
NAD ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid
NF	Nanofiltrace
RO	Reverzní osmóza
TK	Titrační kyselost
UF	Ultrafiltrace
WPC	Whey Protein Concentrate / Syrovátkový bílkovinový koncentrát
WPI	Whey Protein Isolate / Syrovátkový bílkovinový izolát

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Některé způsoby zpracování syrovátky a její využití [5].....	13
Obrázek 2 Množství esenciálních aminokyselin v bílkovinách různého původu [2].....	17
Obrázek 3 Množství sirných aminokyselin v bílkovinách různého původu [2].....	17
Obrázek 4 Mechanismus fermentace glukózy u BMK [upraveno podle 17, 18].....	22
Obrázek 5 Mechanismus alkoholové fermentace pyruvátu na etanol [upraveno podle 19].....	25
Obrázek 6 Mechanismus alkoholové fermentace (Entner-Doudoroffova [upraveno podle 25, 26].....	26
Obrázek 7 Schéma kapalinového chromatografu [30]	28
Obrázek 8 Výsledky stanovení pH a titrační kyselosti (sušená syrovátka + Laktoflora).....	37
Obrázek 9 Výsledky stanovení pH a titrační kyselosti (čerstvá syrovátka + Laktoflora).....	38
Obrázek 10 Výsledky stanovení obsahu laktózy během fermentace sušené syrovátky za užití různých BMK	39
Obrázek 11 Výsledky stanovení obsahu laktózy během fermentace čerstvé syrovátky za užití různých BMK	40
Obrázek 12 Výsledky stanovení pH a titrační kyselosti (sušená syrovátka + TY32).....	41
Obrázek 13 Výsledky stanovení pH a titrační kyselosti (čerstvá syrovátka + TY32).....	42
Obrázek 14 Výsledky stanovení pH a titrační kyselosti (sušená syrovátka + LH-B02).....	43
Obrázek 15 Výsledky stanovení pH a titrační kyselosti (čerstvá syrovátka + LH-B02).....	43
Obrázek 16 Výsledky stanovení pH během alkoholové fermentace (7% sušená syrovátka).....	44
Obrázek 17 Výsledky stanovení pH během alkoholové fermentace (11% sušená syrovátka).....	45
Obrázek 18 Výsledky stanovení pH během alkoholové fermentace (15% sušená syrovátka).....	45
Obrázek 19 Výsledky stanovení pH během alkoholové fermentace (čerstvá syrovátka).....	46
Obrázek 20 Výsledky stanovení obsahu laktózy při alkoholové fermentaci různých substrátů kvasinkami <i>Kluyveromyces lactis</i> CCDM 255	47

Obrázek 21 Výsledky stanovení obsahu laktózy při alkoholové fermentaci různých substrátů kvasinkami <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCDM 269	47
---	----

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Druhy a charakteristika membránových filtrací [3, 5].....	14
Tabulka 2 Složení sladké a kyselé syrovátky [3, 6, 7].....	14
Tabulka 3 Obsah vápníku v jednotlivých druzích sýru [7].....	15
Tabulka 4 Průměrný obsah vitamínů v sušené syrovátce a sušeném mléce [7].	18
Tabulka 5 Obsah minerálních látek ve sladké a kyselé syrovátce [7].	19
Tabulka 6 Charakteristické vlastnosti některých rodů BMK [17].....	21