

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

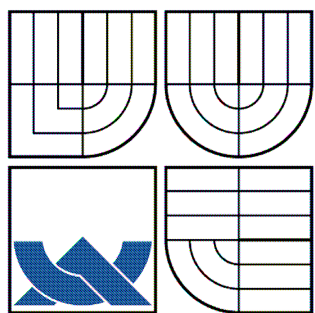
POROVNÁNÍ MIKROBIÁLNÍ METABOLICKÉ
PRODUKCE NA ODPADNÍ A SUŠENÉ SYROVÁTCE
COMPARISON OF MICROBIAL METABOLIC PRODUCTION FROM WASTE AND POWDER WHEY

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

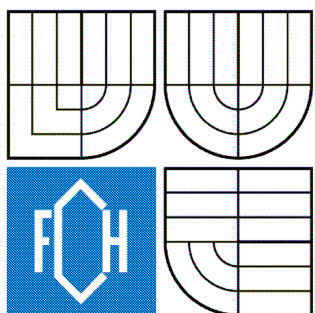
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. PETRA ELEFANTOVÁ

BRNO 2014



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

POROVNÁNÍ MIKROBIÁLNÍ METABOLICKÉ PRODUKCE NA ODPADNÍ A SUŠENÉ SYROVÁTCE

COMPARISON OF MICROBIAL METABOLIC PRODUCTION FROM WASTE AND POWDER WHEY

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. PETRA ELEFANTOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. Mgr. LIBOR BABÁK, Ph.D.

BRNO 2014



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce: **FCH-DIP0736/2012** Akademický rok: **2013/2014**
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student(ka): **Bc. Petra Elefantová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin (N2901)
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)
Vedoucí práce: **Ing. Mgr. Libor Babák, Ph.D.**
Konzultanti: Ing. Petra Šupinová

Název diplomové práce:

Porovnání mikrobiální metabolické produkce na odpadní a sušené syrovátce

Zadání diplomové práce:

1. rešerše literatury
2. zpracování metodiky práce
3. provedení několika kultivací (mezofilních, termofilních) na odpadní a sušené syrovátce se sledováním vybraných metabolitů.
4. diskuse, porovnání, závěr

Termín odevzdání diplomové práce: 9.5.2014

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Petra Elefantová
Student(ka)

Ing. Mgr. Libor Babák, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2013

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Diplomová práce porovnává mikrobiální produkci na odpadní a sušené syrovátce. Syrovátka se získává jako vedlejší produkt při výrobě sýrů. Laktóza (nejlépe ze syrovátky) se pomocí bakterií mléčného kvašení (např. *Lactobacillus*) při vhodných teplotních podmínkách přemění na kyselinu mléčnou. Ve vzorcích byl stanoven pomocí metody HPLC obsah kyseliny mléčné. Byl sledován vliv teploty, vliv koncentrace solí a vliv množství kvasničného extraktu na celkovou produkci tohoto metabolitu. Jako bakterie mléčného kvašení byly použity bakterie rodu *Lactobacillus*. Bylo zjištěno, že při této fermentaci je neoptimálnější teplota 35 °C. Při této teplotě dochází k největší produkci kyseliny mléčné. Nejvyšší koncentrace kyseliny mléčné byla získána při použití 20 g kvasničného extraktu pro sušenou syrovátku a pro odpadní bylo použito 24 g kvasničného extraktu. Při sledování vlivu koncentrace solí na produkci kyseliny mléčné, bylo zjištěno, že použitím pouze $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ se získá nejvíce tohoto metabolitu.

ABSTRACT

The master's thesis discusses the comparison of microbial metabolic production from waste and powder whey. Whey is obtained as a by-product of cheese production. Lactose (preferably whey) using lactic acid bacteria (eg. *Lactobacillus*) under suitable temperature conditions is converted to lactic acid. Effect of temperature, effect of salts and effect of yeast extract on lactic acid production by *L. casei* were investigated. HPLC method was determined lactic acid. In the practical part were used bacteria of the genus *Lactobacillus*. It was found that for dried and waste whey is the optimal temperature of 35 °C. At this temperature is the greatest gain of lactic acid. The highest concentration of lactic acid was obtained by using 20 g of yeast extract for dried whey and for waste whey were used 24 g of yeast extract. When monitoring the effect of salt concentration on the production of lactic acid, it was found that using only $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ gain most of lactic acid.

KLÍČOVÁ SLOVA

Syrovátka, *Lactobacillus casei*, kyselina mléčná, bakterie mléčného kvašení, HPLC, turbidimetrie

KEYWORDS

Whey, *Lactobacillus casei*, lactic acid, lactic acid bacteria, HPLC, turbidimetry

ELEFANTOVÁ, P. *Porovnání mikrobiální metabolické produkce na odpadní a sušené syrovátce*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 83 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Mgr. Libor Babák, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
Podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu diplomové práce Ing. Mgr. Liboru Babákovi, Ph.D. za vedení a Ing. Petře Šupinové za odbornou pomoc a čas, který mi věnovala při vypracování této diplomové práce. Chtěla bych poděkovat Filipu Varholovi, Ing. Lucii Mohelské, Lence Matulové, Andrei Tomečkové a Kristiánu Ďurišovi za pomoc.

OBSAH

ÚVOD	8
1 TEORETICKÁ ČÁST	9
1.1 Syrovátka	9
1.1.1 Mléčné bílkoviny	9
1.1.2 Další složky syrovátky	11
1.1.3 Vitamíny	11
1.1.4 Laktóza	12
1.1.5 Kyseliny	12
1.1.6 Zpracování syrovátky	12
1.2 Kultivace	14
1.2.1 Růstová křivka	14
1.3 Mléčné kvašení	15
1.3.1 Homofermentativní proces	18
1.3.2 Heterofermentativní proces	18
1.4 Bakterie mléčného kvašení	19
1.4.1 Rod <i>Lactobacillus</i>	21
1.4.2 Využití bakterií mléčného kvašení	23
1.5 Kyselina mléčná	25
1.5.1 Využití kyseliny mléčné v průmyslu	26
1.6 Použité analytické metody	27
1.6.1 HPLC	27
1.6.2 Rozdělení HPLC	28
1.6.3 Kapalinový chromatograf	29
1.6.4 Volba chromatografické metody	31
1.6.5 Turbidimetrie	31
2 PRAKTICKÁ ČÁST	33
2.1 Cíl	33
2.2 Použité přístroje, materiál a chemikálie	33
2.2.1 Přístroje a materiál	33
2.2.2 Chemikálie	33
2.3 Příprava roztoků	34
2.3.1 Příprava média s odpadní a sušenou syrovátkou	34
2.3.2 Příprava kultivačního média MRS pro <i>Lactobacillus casei</i>	34
2.3.3 Příprava mobilní fáze	34
2.3.4 Příprava standardů pro stanovení kalibračních křivek	35
2.4 Kultivace	35
2.4.1 Optimalizace teploty	35
2.4.2 Vliv množství kvasničného extraktu	35
2.4.3 Vliv koncentrace solí	35
2.5 Analytická metoda HPLC	36
2.6 Turbidimetrie	36
3 VÝSLEDKY A DISKUZE	37

3.1	Kalibrační křivky sledovaných analytů.....	37
3.2	Vyhodnocení odebraných vzorků při kultivaci pomocí HPLC.....	38
3.2.1	Optimalizace teploty	38
3.2.2	Porovnání tvorby kyseliny mléčné u sušené a odpadní syrovátky – optimalizace teploty	45
3.2.3	Vliv množství kvasničného extraktu	47
3.2.4	Porovnání tvorby kyseliny mléčné u sušené a odpadní syrovátky – vliv množství kvasničného extraktu	52
3.2.5	Vliv koncentrace solí.....	53
3.2.6	Porovnání tvorby kyseliny mléčné u sušené a odpadní syrovátky – vliv koncentrace solí.....	59
4	ZÁVĚR.....	61
5	POUŽITÁ LITERATURA.....	63
6	POUŽITÉ ZKRATKY A SYMBOLY.....	67
7	SEZNAM GRAFŮ.....	68
8	SEZNAM OBRÁZKŮ	70
9	SEZNAM TABULEK.....	71
10	PŘÍLOHY.....	72

ÚVOD

Syrovátka byla náhodně objevena při zkysnutí mléka a jejím samovolným oddělení. V potravinářském průmyslu má syrovátka velmi široké uplatnění. Samozřejmě nejperspektivnější využití syrovátky je v mlékárenském průmyslu, kde se zpracovává enzymovou hydrolýzou laktózy. Laktóza (nejlépe ze syrovátky) se pomocí bakterií mléčného kvašení (např. *Lactobacillus*) při vhodných teplotách přemění na kyselinu mléčnou. [1, 2, 3]

Kyselina mléčná byla objevena v roce 1780. Jedná se o 2 - α -hydroxypropionovou kyselinu se sumárním vzorcem $C_3H_6O_3$. V přírodě se vyskytuje ve dvou aktivních izomerních formách, jako L-forma a D-forma. Až v roce 1881 byla poprvé vyráběna v průmyslovém měřítku v USA a uplatnění našla v potravinářském, mlékárenském, kosmetickém, farmaceutickém i technickém průmyslu. Používá se na prodloužení doby trvanlivosti, také jako regulátor kyselosti či jako látka zvýrazňující chuť. V potravinářském průmyslu se používá jako přísada do nápojů, džusů, sirupů i jako přísada v cukrovarnictví a k výrobě kyselých mouk a těst v pekárenském průmyslu. V technickém průmyslu se používá jako plastifikátor a rozpouštědlo při výrobě esterů. [4, 5, 6, 7, 8, 9]

V diplomové práci byly použity bakterie ze třídy *Lactobacillae*, rodu *Lactobacillus*. Nalezneme je běžně v přírodě, ale nejvíce jsou obsaženy v mléce a ve fermentovaných výrobcích. Také je můžeme nalézt v obilninách, mase, rybích výrobcích, pivě, odpadních vodách, ovoci, víně a v jiných produktech. Všechny kultury BMK (bakterie mléčného kvašení) snižují hodnoty pH, potlačují nežádoucí mikroorganismy, které mohou vznikat, vytváří hydrolytické a katalytické enzymy a tvoří chuťové látky. BMK se používají pro výrobu fermentovaných výrobků. Cílem diplomové práce bylo porovnat metabolickou produkci při použití odpadní a sušené syrovátky a srovnat s výsledky již zjištěnými. [10, 11, 12, 13]

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Syrovátka

Syrovátka se získává jako vedlejší produkt při výrobě sýrů. Její chemické složení závisí na složení mléka, na stupni zahřátí mléka v procesu pasterizace, popř. na zředění syrovátky vodou a také na stupni fermentace laktózy. Syrovátka obsahuje 0,8 – 1,1 % dusíkatých látek, tuku 0,3 – 0,7 %, laktózy 4,5 – 5,0 % a může také obsahovat kyselinu mléčnou i 0,6 – 0,8 % popelovin. Složení sladké a kyselé syrovátky je uvedeno v tabulce 1. V důsledku působení syřidla je ve sladké syrovátce vyšší obsah bílkovin a to asi o 0,1 %. Při srážení vápenatými solemi s kaseinem je ve sladké syrovátce nižší obsah popelovin a to 0,15 %. [1]

Tabulka 1: Složení sladké a kyselé syrovátky [3]

Složka (%)	Sladká syrovátka	Kyselá syrovátka
Sušina	6,0 – 6,5	5,0 – 6,0
Laktóza	4,5 – 5,0	3,8 – 4,3
Kyselina mléčná	stopy	až 0,8
Tuk	0,05 – 0,2	0,05 – 0,2
Čistá bílkovina	0,55	0,55
NPN	0,18	0,18
Popeloviny	0,8	0,8

V sušené syrovátce je obsah bílkovin $135 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, $10 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ tuku, laktózy je $740 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ a vápníku pouze $12 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Vápník není obsažen v sušených syrovátkových bílkovinách. Sušené syrovátkové bílkoviny mají větší obsah bílkovin a to $720 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ a menší obsah laktózy jen $190 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$. [2]

Syrovátka tvoří velmi významný zdroj cenných živin. Má velmi dobré funkční vlastnosti. Koncentráty syrovátkových bílkovin, které se získávají ultrafiltrací, poskytují potravinářskému průmyslu široké možnosti a nejčastěji se používají pro výrobu kojeneckých výživ, v dietních potravinách a ve výživě pro sportovce. Deriváty ovlivňují texturu potravin, dodávají hutnost, zajišťují zahuštění. Ve světě se ze syrovátky již vyrábějí rozličné nápoje, limonády, dokonce i imitace šumivého vína a piva. Také se používá pro přípravu masových omáček, salátů, cukrovinek, pečiva, zmrzlin, pudingů. Pro zlepšení chuti čokolády a koření se dá použít kyselá syrovátka. Samozřejmě nejpřespektivnější využití je v mlékárenském průmyslu, kde se zpracovává enzymovou hydrolýzou laktózy. V mlékárenském průmyslu se z ní vyrábí nové druhy sýrů, jogurtů, smetany apod. [2, 3]

1.1.1 Mléčné bílkoviny

Mléčné bílkoviny jsou tvořeny hlavně komplexem kaseinových bílkovin, které lze z mléka získat jeho srážením kyselinami nebo syřidly. Mléčné bílkoviny také obsahují sérové

bílkoviny. Jejich koncentrace v mléce je uvedena v tabulce 2. Obě skupiny se liší fyzikálními i chemickými vlastnostmi. Mléčné bílkoviny obsahují řadu esenciálních kyselin. Histidin, leucin, isoleucin, lysin, methionin, tryptofan patří mezi nejdůležitější aminokyseliny. Obsahují také neesenciální aminokyseliny, např. kyselinu glutamovou, která ovlivňuje růst a procesy látkové výměny, zasahuje do mozkového a nervového systému. Mléčné bílkoviny snižují hladinu LDL cholesterolu v krvi. [14]

Tabulka 2: Koncentrace proteinů v mléce [15]

	c [g·l⁻¹]	% z celkových proteinů
<i>Celkové proteiny</i>	33	100
<i>Celkové sérové proteiny</i>	6,3	19,3
– α-laktalbumin	1,2	3,7
– β-laktoglobulin	3,2	9,8
– BSA	0,4	1,2
– imunoglobuliny	0,7	2,1
– proteázový pepton	0,8	2,4
<i>Celkové kaseiny</i>	26	79,5
– α _{s1}	10	30,6
– α _{s2}	2,6	8,0
– β	9,3	28,4
– κ	3,3	10,1

Hlavní protein syrovátky je kasein. V kravském mléce tvoří asi 80 % všech mléčných bílkovin. Patří mezi nejdůležitější proteiny. Protože se kasein váže na vápník a fosfor, jeho trávením dochází k uvolnění důležitého množství těchto minerálů. Kasein obsahuje vysoký podíl prolinu a hydrofóbních aminokyselin. Jeho struktura není stabilizována disulfidickými vazbami, proto není pravděpodobně sekundární a terciární struktura pevně dána. Není tvořen pouze jedním typem, ale vyskytuje se v různých variantách, které se od sebe liší složením aminokyselin, obsahem fosforu, chemickými i fyzikálními vlastnostmi. Vyskytuje se ve čtyřech typech α-, β-, γ-, κ- kasein. [14, 16, 17, 18, 19, 20]

Kasein vytváří micely, které jsou rozptýleny ve vodní fázi mléka. Kaseinové micely jsou kulovité a jejich průměr 0,04 až 0,3 μm je menší než u tukových kapánek, které jsou cca 1 μm velké v homogenizovaném mléce. V mléce je rozptýlen do nabobtnalých částic, popřípadě jako samostatné molekuly nebo svazky molekul. Je citlivý na syřidlové enzymy a kyseliny. Působením enzymové nebo kyselá hydrolyzy dochází ke srážení kaseinu do vločkovité podoby nebo do souvislého gelu. Při kyselá i enzymové hydrolyze dochází k porušení stability micel kaseinu a tím k jejich vysrážení. Kyseliny, které se používají na kyselou hydrolyzu, buď vznikají při mléčném kvašení, a nebo jsou přidávány. Sýry

a sladký kasein vznikají při sladkém srážení (enzymovém), kyselé srážení se používá k výrobě jogurtů, tvarohů. [14, 16, 17, 18, 19, 20]

Mezi sérové bílkoviny řadíme laktalbumin a laktoglobulin. Tyto látky jsou rozpustné ve vodě a podléhají tepelné denaturaci. Získávají se po odstranění kaseinu z mléka. Při srážení přecházejí do syrovátky ve formě jemných bílých vloček. V kravském mléce jsou obsaženy jen v malém množství, kdežto u mlék jiných savců nebo v mateřském mléce ženy jsou obsaženy více. Laktalbumin je velmi tepelně stabilní. Laktoglobulin při vyšších teplotách podléhá denaturaci. Denaturovaný laktoglobulin způsobuje větší vaznost vody, proto se využívá při výrobě jogurtů. Vyskytuje se ve formě monomolekulárního koloidního roztoku. α -laktalbumin, β -laktoglobulin a krevní sérum albuminu odpovídají laktalbuminu. Úplnému vysrážení laktalbuminu dosáhneme při $\text{pH} = 4,75 - 4,8$ při teplotě nad $72\text{ }^\circ\text{C}$. Mléčný albumin neobsahuje fosfor a je velmi podobný krevnímu a vaječnému albuminu. [1, 14, 15, 21, 22]

1.1.2 Další složky syrovátky

Syrovátka obsahuje 5 – 7 % dusíkatých látek (především puriny). Minerální soli obsažené v mléce jsou důležitým nutričním faktorem (např. fosfáty vápenaté, hořečnaté). Obsah hlavních minerálních látek v mléce je uveden v tabulce 3. Během sýření se část vápníku váže na nerozpustný parakasein, který dále přechází do sýra. Popel syrovátky obsahuje prvky: draslík, sodík, hořčík, železo, síru a chlór. Tyto prvky se vyskytují v podobě kationtů a aniontů (K^+ , Cl^- , Na^+ , Mg^{2+} , Fe^{2+} , S^{2-}). [14, 21]

Tabulka 3: Obsah hlavních minerálních látek v mléce [23]

Prvek	Obsah v mléce [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]	
	<i>Průměrná hodnota</i>	<i>Interval</i>
Ca	1,21	0,90 - 1,40
P	0,95	0,70 - 1,20
K	1,50	1,00 - 2,00
Na	0,47	0,30 - 0,70
Cl	1,03	0,80 - 1,40
Mg	0,12	0,05 - 0,24
S	0,32	0,20 - 0,40

1.1.3 Vitamíny

Vitamíny jsou životně důležité látky pro udržení zdravého organismu, jeho růstu a pro správný vývoj člověka. Účastní se řady metabolických procesů. Člověk ve většině případů není schopen sám si tyto látky vyprodukovat, proto je musí přijímat v potravě. Do těla jsou přiváděny ve formě provitaminů. Metabolismem jsou provitamíny přeměněny na vitamíny. Dělí se na vitamíny rozpustné v tucích (A, D, E, K) a rozpustné ve vodě (B_1 , B_2 ,

B₆, B₁₂, P, H, M, C). Při dnešních náročných technologiích zpracování mléka dochází k úbytku vitamínů v mléce. [14]

1.1.4 Laktóza

Mléčný cukr neboli laktóza se vyskytuje pouze v mléce savců ve formě vodného roztoku. Je to disacharid galaktózy a glukózy spojený β -glykosidickou vazbou. Laktóza je tvořena α - a β - formou. Rozdílnost těchto forem je dána různým prostorovým uspořádáním vodíkových a hydroxylových skupin. Obě formy se vyskytují v podobě hydrátů. Tvoří hlavní složku syrovátky tj. zhruba 70 – 80 % celkové sušiny. V syrovátce je laktóza obsažena téměř ve stejném množství jako v mléce. Má mírnou sladkou chuť, ale vysokou výživovou hodnotu. Dobře se rozpouští v teplé vodě, ale nerozpouští se v ethanolu. Laktóza se využívá ve farmaceutickém průmyslu, v chemickém průmyslu, v pekařství a při výrobě cukrovinek. Pokud laktózu zahřejeme nad 130 °C, zežloutne a vytvoří hnědý laktokaramel. Laktóza krystalizuje v podobě bílých krystalů. Nejdůležitější vlastností laktózy je její schopnost se přeměnit pomocí mikroorganismů na organické kyseliny, převážně kyselinu mléčnou při mléčném kvašení. Mikroorganismy mohou vytvářet enzym laktázu. Je to enzym, který katalyzuje štěpení laktózy na jednoduché sacharidy (D-glukózu a D-galaktózu). Laktáza je obsažena v zažívacím traktu sajících mláďat. [2, 14, 22, 24]

Mléčný tuk v syrovátce skoro není obsažen, popř. jen v malém množství. Jedná se o triglycerid mastných kyselin, který se skládá z glycerolu a mastné kyseliny (nasyčené i nenasycené). Zahřátím mléka nad 200 °C se tuk v mléce nemění. [14, 25]

1.1.5 Kyseliny

V syrovátce jsou obsaženy také organické kyseliny především kyselina citrónová (obsah kolem 150 mg na 100 g syrovátky), octová, mravenčí, mléčná (obsah 40 – 120 mg na 100 g) a propionová. Složení kyselin je závislé na jejich aktivitě, na složení mikroflóry a na jejich stanovení. V kyselé syrovátce je obsah kyselin největší. [25]

1.1.6 Zpracování syrovátky

V minulosti bylo zpracování syrovátky prováděno jen zřídka. Dnes je to nevyhnutelné kvůli předpisům o mlékárenských odpadních vodách. Ve světě se ročně vyprodukuje 170 mil. tun sýrů, což odpovídá 130 mil. tun syrovátky. Ve výrobě sušené syrovátky vede Francie a USA. Výroba sušené syrovátky ve světě je uvedena v tabulce 4. Země, které mají rozvinutý mlékárenský průmysl, zpracují 50 – 95 % vyprodukované syrovátky. [1, 21, 26, 27]

Tabulka 4: Výroba sušené syrovátky ve světě v r. 2002 [27]

Země	Produkce sušené syrovátky [tis. t]	% využití suroviny
Francie	621	79
USA	506	30
Německo	228	30
Nizozemí	124	35
Austrálie	47	30
Nový Zéland	31	25

Při zpracování syrovátky se získává a zároveň využívá jednotlivých složek (bílkovin, laktózy), samotná syrovátka se dá využít i při fermentačních procesech. Syrovátka se také hojně využívá jako krmivo v zemědělských průmyslech. [1, 21]

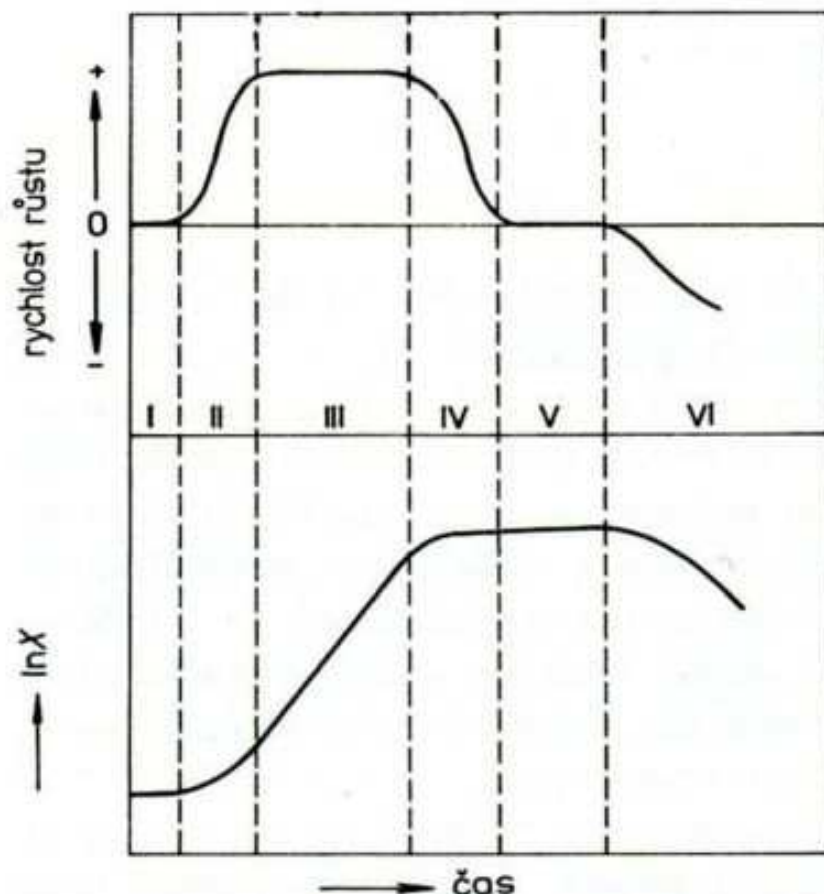
Oddělená syrovátka, vzniklá při výrobě sýrů, musí být předupravena. Jako výchozí surovina se používá sladká syrovátka. Nejdříve se očistí od tzv. syrového prachu, který by mohl negativně ovlivnit průběh dalšího zpracování, chuť a vůni produktu. Čištění se provádí na rotačních filtrech, čistící odstředivce nebo na cyklónových odlučovačích. Volba vhodné metody čištění závisí na velikosti a množství pevných částic. Jelikož při výrobě sýrů přechází značná část tuků do syrovátky, je nutné je tzv. odsmetanit neboli odstranit syrovátkovou smetanou, která obsahuje 25 – 30 % tuku. Tuk by mohl ovlivnit průběh dalšího zpracování, kvalitu i stabilitu výrobku. Odstranění tuku se provádí na odstředivkách. Dále je potřeba zamezit kontaminaci mikroorganismy, proto se provádí pasterizace při teplotě 72 – 78 °C po dobu 15 – 20 s. Tím dojde k inaktivaci fosfatáz a chymozinu. Před pasterizací je nutné uchovat syrovátku při teplotě do 5 °C. [1, 21, 22, 28, 29]

Po pasterizaci se odstraní proteiny. Ty nejprve vysrážíme při teplotě 85 – 95 °C po dobu 20 min, poté centrifugujeme. Centrifugací získáme až 90 % všech bílkovin. Pro efektivnější zpracování syrovátky je nutné ji demineralizovat (odstranit soli). Soli totiž negativně ovlivňují senzorické vlastnosti. Syrovátku je možné demineralizovat gelovou filtrací, pomocí iontoměničů, elektrodialýzou, popř. membránovou technikou. Poté bude syrovátka vhodná i pro přípravu dětské výživy. Abychom mohli snadněji sušit syrovátku, je zapotřebí krystalizace. Při krystalizaci laktózy (probíhá při 20 – 35 °C po dobu 2 – 24 hod. v krystalizačním tanku) odpadá krystalizační sirup a ten se zahustí na vakuové odparce s klesajícím filmem při teplotě 65 °C, který nám syrovátku zahustí na 45 % obsahu sušiny a potom se rozprášením suší. Sušení syrovátky je značně komplikovaný technologický postup díky vysokému obsahu laktózy v syrovátce, která během sušení nevykrystalizovala. Kvůli vysokému obsahu laktózy dojde k hnědému zbarvení. Z tohoto důvodu se velmi často suší syrovátka se šroty, s odstředěným mlékem nebo se sójovou moukou. Bohužel tento produkt není srovnatelný s produkty sušenými rozprášením. [1, 21, 22, 28, 29]

1.2 Kultivace

Kultivace může být vsádková, přítoková či průtočná. Vsádkovou kultivací se myslí uzavřený systém, při kterém se v průběhu kultivace nepřivádějí další složky. Jako grafické znázornění vzrůstu počtu živých buněk se používá růstová křivka. Ta je znázorněna v šesti fázích, při kterých se vlastnosti buňky značně liší. Na začátku kultivace jsou buňky velmi citlivé např. na vysokou teplotu, osmotický tlak, tlak a jiné. [11, 30]

1.2.1 Růstová křivka



Obrázek 1: Růstová křivka [31]

Na osu x se nanáší čas [h] a na osu y logaritmus počtu živých buněk v 1 l. Grafické znázornění růstové křivky je uvedeno na obrázku 1.

Fáze růstové křivky:

- I. Lag fáze: V této fázi se buňky adaptují na nové prostředí, nerozmnožují se, ale spíše odumírají. Začínají zvětšovat svůj objem. Dochází k syntéze indukovatelných enzymů nutných pro využití přítomných substrátů. Tato fáze může být různě dlouhá, závisí to na složení prostředí, zejména

velikosti a stáří inokula, fyziologickém stavu buněk, druhu mikroorganismu. [11, 30]

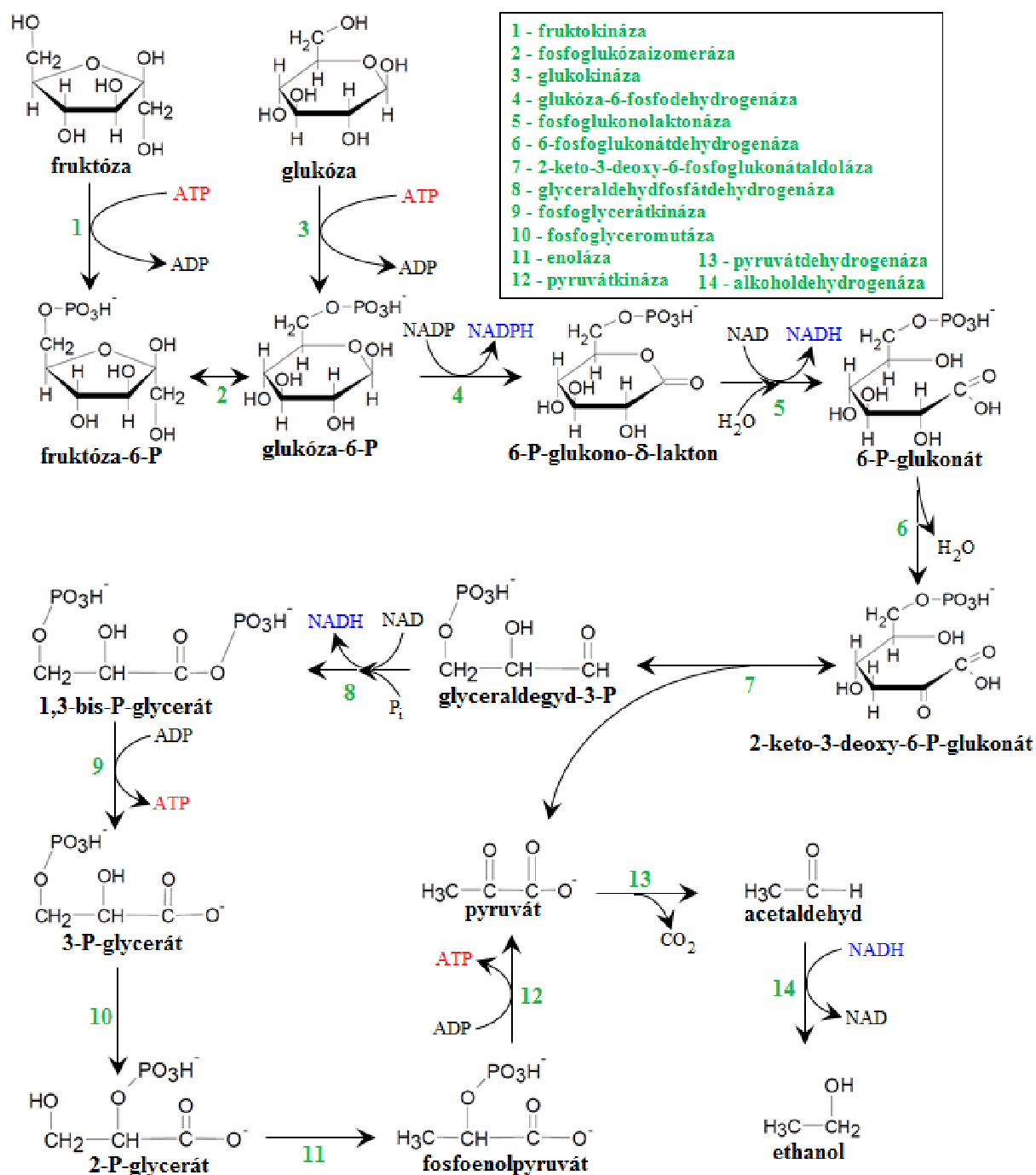
- II. Fáze zrychleného růstu: Tato fáze je akcelerační. Buňka je již přizpůsobena prostředí a začíná se dělit se vzrůstající rychlostí. Zvětšuje se metabolismus. Fáze je většinou velmi krátká. [11, 30]
- III. Exponenciální fáze: Jedná se o velmi intenzivní množení. Buňky rostou geometrickou řadou, mají aktivní metabolismus a rychle využívají substrát, ale nedochází k limitaci živin. Rychlost dělení je konstantní. Fáze je také označována jako logaritmická, jelikož mezi logaritmem počtu buněk a dobou růstu dochází k lineární závislosti. [11, 30]
- IV. Fáze zpomaleného růstu: Při této fázi dochází ke zpomalení rychlosti množení a celkového metabolismu. Rychlost je zpomalena v důsledku bývání živin a nahromaděním metabolitů. Může docházet již k odumírání metabolismu. Při této fázi je možné, že dojde ke změně pH, což nepříznivě ovlivňuje růst. [11, 30]
- V. Fáze stacionární: Dochází k vyčerpání živin nebo vzrůstu koncentrace toxického metabolitu nad určitou hranici, proto se zastavuje přírůstek živých buněk. Vyrovnává se počet odumírajících buněk s přírůstkem. Délka této fáze se liší u jednotlivých mikroorganismů. Dochází k největší produkci sekundárních metabolitů. [11, 30]
- VI. Fáze zrychleného odumírání: Rychlost dělení buněk klesá pod nulu, už se nedělí a umírají. Převládají odumřelé buňky nad přírůstkem. [11, 30]

1.3 Mléčné kvašení

Přeměna sacharidů na kyselinu mléčnou pomocí bakterií mléčného kvašení je jednou z nejdůležitějších procesů v potravinářské mikrobiologii. Kyselina mléčná vzniká dvěma různými fermentačními procesy, a to homofermentativní, nebo heterofermentativní cestou. Fermentace je závislá na druhu přítomných mléčných bakterií. Bakterie zkvašují sacharidy na kyselinu mléčnou. Je možné udělat změnu procesu z homofermentativní cesty na heterofermentativní, a to změnou fermentačních podmínek. Při fermentaci redukované organické sloučeniny jsou primární donory vodíku a jiné organické látky v méně redukované formě jsou akceptory vodíku. Při fermentaci dojde k neúplnému rozkladu substrátů, energie je tedy mnohem menší než při respiraci. Dříve byla fermentace označována jen jako anaerobní proces, kdy došlo k úplnému rozkladu, tedy pravému kvašení, později vědci zjistili, že dochází i k aerobním procesům (nepravé kvašení). Jako výchozí látka

při fermentaci se používají nejvíce sacharidy a jejich deriváty, nebo také meziprodukty jejich metabolismu. Jako deriváty sacharidů se využívá cukerná kyselina glukonová a galakturonová nebo polyalkoholy např. mannitol, nebo glycerol. Polysacharidy a disacharidy např. škroby, celulóza, chitin, či glykogen, se nejdříve rozštěpí na monosacharidy a následně se přemění na glukózu, která je výchozí surovinou pro glykolýzu. Fermentaci uskutečňují mikroorganismy mléčného kvašení, které mohou vyrábět jen určité fermentační produkty a žádné jiné. [6, 10, 32]

Základní metabolický děj ve všech buňkách je glykolýza. Schéma glykolýzy je znázorněn na obrázku 2. Tyto děje probíhají v cytoplazmě, kde najdeme i enzymy, které katalyzují reakce. Avšak enzymy nejsou vázané na buněčné struktury. Glykolýza slouží k uvolnění energie a přeměně sacharidů na jiné produkty. Kompletní schéma glykolýzy popsali vědci v roce 1940. Přeměna glukózy na pyruvát se skládá z 10 dílčích kroků. V prvním kroku glykolýzy je zapotřebí dodání energie. Proto za použití 2 ATP (adenosintrifosfát) se glukóza přemění na glukózu-6-fosfát. Reakci katalyzuje enzym hexokináza, dochází k první fosforylaci. Izomerací glukózy-6-fosfát vzniká fruktóza-6-fosfát. Při druhé fosforylaci, která probíhá nejpomaleji, se přenese další ATP na fruktózu a vznikne fruktóza-1,6-bisfosfát. Následně se štěpí na dva triosafosfáty a to: dihydroxyacetonfosfát a glyceraldehyd-3-fosfát. Dále už vstupuje pouze glyceraldehyd-3-fosfát, zde probíhá fosforylace spojená s oxidací. Reakci katalyzuje glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza za vzniku 1,3-bisfosfoglycerát. Za pomoci enzymu fosfoglycerátkináza vzniká 3-fosfoglycerát. Jeho izomerací vznikne 2-fosfoglycerát. Následně dochází k dehydrataci a vzniku fosfoenolpyruvátu. Posledním krokem glykolýzy je fosforylace fosfoenolpyruvátu za vzniku pyruvátu. Zde se dráha rozděluje a probíhají buď anaerobní, nebo aerobní procesy za vzniku konečných produktů. [8, 32]

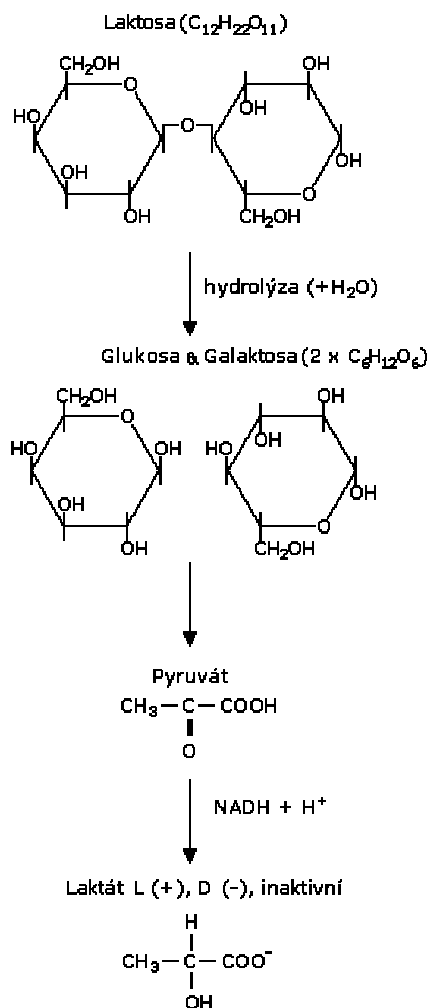


Obrázek 2: Schéma glykolýzy [33]

Pyruvát je konečným příjemcem elektronů. Přeměna pyruvátu na laktát (tj. anion mléčné kyseliny $\text{CH}_3\text{-CHOH-COO}^-$) patří do oblasti fermentací, které mohou probíhat i v buňkách živočichů. Reakci katalyzuje enzym laktátdehydrogenáza. Jako koenzymy oxidoredukčních enzymů patří nikotinamidadenindinukleotid (NAD^+) a jeho fosfát (NADP^+). Jejich redukované formy jsou NADH a NADPH . K prostetickým skupinám patří flavinové kofaktory – FAD (flavinadenindinukleotid) a FMN (flavinmononukleotid). Čistý zisk energie během fermentace je 2 ATP. [8, 10, 11, 32]

1.3.1 Homofermentativní proces

Při mléčném kvašení, při kterém vzniká pouze kyselina mléčná, jde o homofermentativní proces. Při homofermentativním procesu se v praxi nikdy nedosáhne 100 % výtěžku produktu, protože se tvoří i velké množství vedlejších produktů a to: octová kyselina, ethanol, kyselina mravenčí, CO₂ a jiné látky. Za homofermentativní proces jsou označovány procesy, při kterých vzniká 80 % a více konečného produktu. Dráha je znázorněna na obrázku 3. Homofermentativní mléčné kvašení provádí *Lactobacily*, ale také koky např. z rodu *Streptococcus*. Vzniká výhradně jen L-forma laktátu. [8, 10, 11, 32]

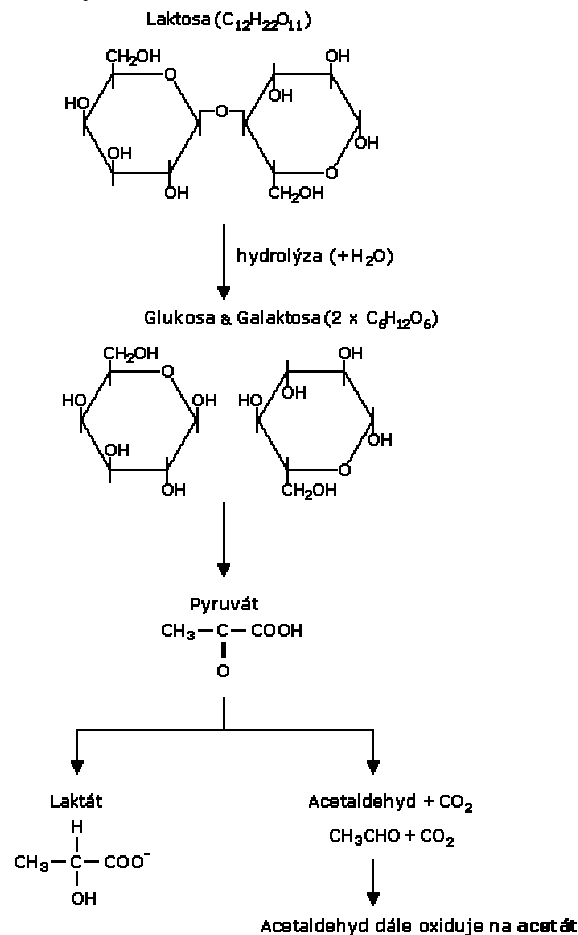


Obrázek 3: Homofermentativní dráha [34]

1.3.2 Heterofermentativní proces

Při heterofermentativním mléčném kvašení vznikají kromě kyseliny mléčné i další produkty, např. oxid uhličitý, ethanol, či kyselina octová. Dráha je znázorněna na obrázku 4. Množství vzniklé kyseliny mléčné a dalších vedlejších produktů je v rovnováze. Vzniklé množství jednotlivých produktů závisí na fermentačních podmínkách a individuálních vlastnostech mikroorganismu. Některé bakterie mléčného kvašení neobsahují aldolázu - to je enzym, který štěpí hexózu-1,6-bisfosfát na dva trifosfáty. Tyto bakterie odbourávají glukózu

oxidačním mechanismem hexózafosfátového zkratu na pentózu-5-fosfát a oxid uhličitý. Na laktát se přemění tedy jen část glukózy. Dráha je znázorněna na obrázku 4. Heterofermentativní proces se dá přirovnat k fosfoketolázovým průběhům. Dekarboxylací a redukcí glukózy vznikne ribóza-5-fosfát a ta je přeměněna epimerázou na xylulózu-5-fosfát. Xylulózu-5-fosfát katalyzuje enzym fosfoketoláza za vzniku glycerinaldehydu-3-fosfát a acetyl-fosfát. Glycerinaldehyd-3-fosfát přejde v pyruvát, který je přeměněn pomocí enzymů glykolytického štěpení na kyselinu mléčnou. Enzym acetátkináza katalyzuje acetyl-fosfát za vzniku acetátu a ten může být konvertován až na ethanol. [8, 9, 10, 11, 32]



Obrázek 4: Heterofermentativní dráha [34]

1.4 Bakterie mléčného kvašení

Před cca 3 miliardy let byly objeveny bakterie mléčného kvašení. Pravděpodobně k tomu došlo ještě před fotosyntetickými cyanobakteriemi. Nicméně jejich produkce začala být rozšířena až objevením mléka produkovaného savci, což bylo před 65 miliony let. Bakterie pak byly používány pro výrobu potravinářských výrobků, jako je chleba, sýr, maso. [35] Mléčné bakterie můžeme rozdělit na tři skupiny bez toho, aniž bychom brali ohled na konečné produkty biosyntézy: [10]

- 2) obligátní homofermentativní bakterie:
nemají glukózu-6-fosfát ani 6-fosfoglukonát-dehydrogenázu, ale obsahují fruktóza-bisfosfát-aldolázu

- 3) fakultativní homofermentativní bakterie:
obsahují glukózu-6-fosfát, fosfoglukonát-dehydrogenázu a fruktóza-bisfosfát-aldolázu
- 4) obligátní heterofermentativní bakterie:
obsahují obě dehydrogenázy, ale neobsahují fruktóza-bisfosfát-aldolázu.
[10]

Bakterie mléčného kvašení tvoří velkou skupinu nepohyblivých, nesporulujících, grampozitivních koků i tyčinek, které sacharidy fermentují za mikroaerofilních podmínek a vytvoří přitom hlavně kyselinu mléčnou. Chemoorganotrofní, neboli chemoheterotrofní mikroorganismy získávají energii oxidací organických sloučenin, které využívají jako zdroje uhlíku a vodíku. [11, 12]

Nejvýznamnější producenti kyseliny mléčné patří do třídy *Lactobacilleae*, která se dělí na 4 rody: *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* a *Leuconostoc*. Dříve sem byly řazeny i bakterie patřící do kmene *Bifidobacterium*, ale protože mají specifickou charakteristiku, tak bylo navrženo, aby tento kmen patřil do řádu *Actinomycetales*. Společný znak třídy *Lactobacilleae* je tvorba kyseliny mléčné. Díky tomuto znaku a biochemických, fyziologických, genotypických, sérologických a dalších znaků se tyto mikroorganismy řadí do systému bakterií. Podle kritérií na zařazování bakterií se mění i jejich nomenklatura. [10, 12]

Vyskytují se běžně v přírodě, nejvíce však v mléce a ve fermentovaných výrobcích. Je možné je také nalézt v obilninách, mase, rybích výrobcích, pivě, odpadních vodách, ovoci, víně, v nakládané zelenině, kysaném zelí, ovocných šťávách, kynutém těstě, sladu, siláži a mnoha jiných produktech. Jsou součástí přirozené mikroflóry ve střevním traktu, ústech i vagíně teplokrevných živočichů. Je možné pozorovat určitou specifičnost a selekci u různých potravinových skupin. U rostlin se více než u živočichů vyskytují tyčinkovité bakterie heterofermentativní a bakterie rodu *Leuconostoc*. V měkkých až polotuhých sýrech a v mléce se vyskytují především zástupci rodu *Lactococcus*. Příslušníci rodu *Lactobacillus* se nacházejí v termofilních produktech a v tuhých sýrech. U masa můžeme převážně najít paličkovité streptobakterie a thermobakterie. [11, 12]

Bakterie mléčného kvašení jsou velmi náročné na výživu. Pro svůj vývoj potřebují kromě uhlíku a dusíku další zdroje a to převážně některé vitamíny skupiny B, minerální soli a růstové látky. Heterofermentativní bakterie potřebují ke svému růstu i thiamin. Nejdůležitější solí pro růst bakterií je fosfát. Jako zdroj uhlíku se používají sacharidy (třtinová a řepná sacharóza, syrovátka), protože obsahují laktózu, glukózu a maltózu. Při průmyslové výrobě se nejčastěji používá dextróza nebo sacharóza. [6]

Bakterie je možné rozdělovat podle optimální teploty jejich růstu a optimální produkci kyseliny mléčné na termotolerantní a mezofilní. Mezi termofilní bakterie zařadíme homofermentativní typy rodu *Lactobacillus*, u nichž je optimální teplota 45 – 62 °C. Do mezofilní skupiny patří homofermentativní bakterie (teplota 37 – 45 °C) a heterofermentativní bakterie s optimální teplotou 28 – 32 °C. [6, 11]

Výsledná aktivita kyseliny mléčné závisí na rodu a druhu použitého mikroorganismu. Bylo to potvrzeno produkcí jednoduchého izomeru kyseliny mléčné z racemické formy, která se vyskytuje v přírodě. Za aktivitu jsou odpovědné dva faktory: stereospecifita laktátdehydrogenázy a přítomnost či nepřítomnost laktátracemázy. [10, 36]

- Stereospecifita laktátdehydrogenázy – mikroorganismus může obsahovat D- i L- formu laktátdehydrogenázy.
- Přítomnost nebo nepřítomnost laktátracemázy – některé druhy bakterií rodu *Lactobacillus* obsahují racemickou směs. [10, 36]

Všechny kultury bakterií mléčného kvašení vykazují čtyři základní funkce, které se v různé míře uplatňují:

- Potlačení nežádoucích mikroorganismů, které mohou vznikat při kontaminaci nebo vyskytující se přirozeně.
- Tvorba enzymů, které se uplatňují při hydrolytických a katalytických procesech.
- Snížení hodnoty pH s určitou rychlostí v různém rozmezí.
- Tvorba chuťových látek, které vznikají při látkové výměně v potravinách a přispívají k dosažení požadovaných vlastností. [10]

1.4.1 Rod *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* byl poprvé popsán v roce 1901 panem Beijerinckem. V roce 1919 pan Orla-Jensen rozdělil tento rod do tří podrodů – *Thermobacterium*, *Streptobacterium* a *Betabacterium*, a to podle jejich optimální růstové teploty a morfologických a fenotypických rysů. Jedná se o největší rod bakterií mléčného kvašení. Ze 13 rodů patřících do skupiny bakterií mléčného kvašení je u rodu *Lactobacillus* doposud popsáno nejvíce druhů cca 80. Zařazení rodu *Lactobacillus* do systému je následující: [10, 12, 37]

doména:	<i>Bacteria</i>
kmen:	<i>Firmicutes</i>
třída:	<i>Bacilli</i>
řád:	<i>Lactobacillales</i>
čeleď:	<i>Lactobacillaceae</i>
rod:	<i>Lactobacillus</i> .

Členové tohoto rodu se řadí mezi grampozitivní nesporulující tyčinkové bakterie. Jejich morfologické vlastnosti se mění s různými podmínkami. Buňky těchto bakterií mají velikost 0,5 – 1,2 x 1,0 – 10 μm. Tyčinky jsou různé délky, nepohybují se a velmi často vytváří řetízky. Jsou to anaerobové nebo fakultativní bakterie. Laktobacily jsou velice náročné na jejich výživu. Pro jejich růst je nutné do média dodat nejen sacharidy jako zdroj energie a uhlíku, ale i nukleotidy, aminokyseliny, peptidy, vitamíny, soli a mastné kyseliny. Sacharidy jsou používány většinou jednoduché, jelikož laktobacily nemají amylolytické enzymy a tím pádem neumí štěpit škrobnaté sacharidy. Při použití škrobnatých sacharidů je nutná jejich hydrolyzace enzymy nebo minerálními kyselinami. Přítomnost těchto bakterií je možné zjistit kvantitativně za pomoci přidavku 3 % roztoku peroxidu vodíku a to tak, že kolonie, které jsou vyrostlé na bohaté agarové půdě tímto roztokem přelijeme a ty bakterie, které neuvolňují bublinky kyslíku, jsou s největší pravděpodobností bakterie rodu *Lactobacillus*. [10, 12, 37]

Homofermentativní bakterie rodu *Lactobacillus*: [10]

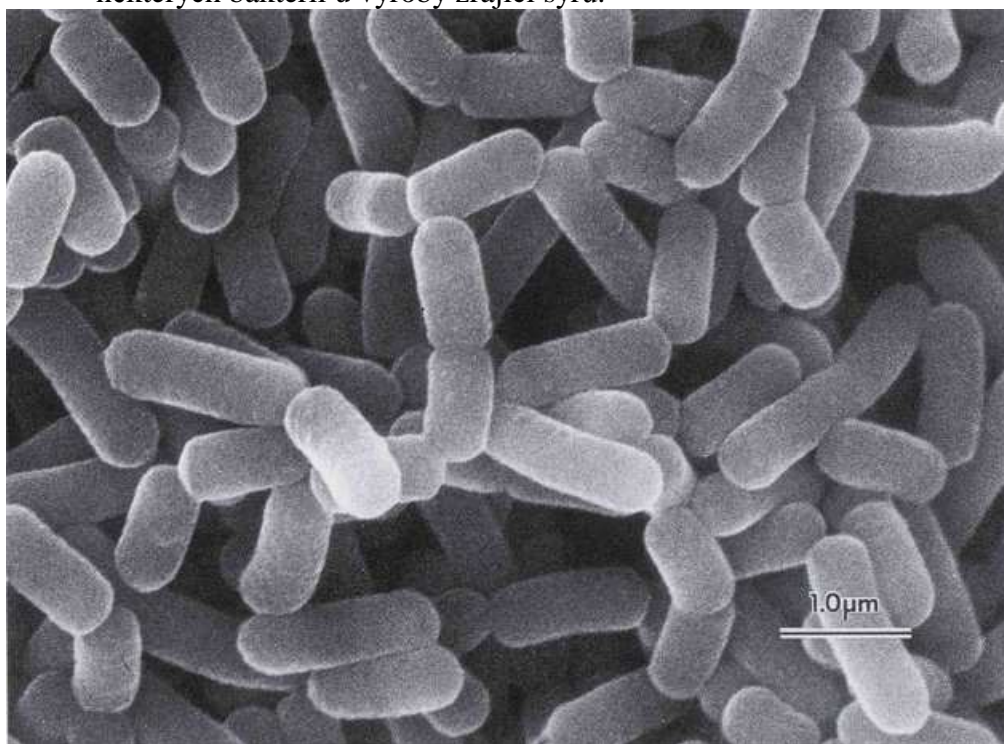
- *Lactobacillus plantarum* – vytváří tyčinky o velikosti 0,7 – 1,0 x 3,0 – 8,0 μm, které jsou buď jednotlivě uspořádány nebo vytváří krátké řetízky. Jsou mikroaerofilní. Teplotní optimum je 30 °C, dokáží růst i při teplotě 10 – 40 °C. Některé kmeny mají proteolytickou aktivitu, zkvašují monosacharidy i disacharidy, nezksvašují však rannózu, škrob a inulín. Používají se jako doplňková sýrařská kultura, protože výrazně štěpí bílkoviny mléka.
- *Lactobacillus acidophilus* – buňky jsou velké 0,5 – 1,0 x 1,0 – 10,0 μm, jsou to grampozitivní tyčinkovité bakterie, které se mohou vyskytovat jednotlivě, ve dvojicích nebo v krátkých řetízcích. Vytváří R- i S-formu. Optimální teplota pro jejich růst je 37 °C, rostou i při teplotě 22 – 48 °C. Jsou součástí zažívacího traktu, kde příznivě ovlivňují střevní mikroflóru, protože hubí hnilobné mikroorganismy. Produkují velké množství kyseliny mléčné, která se poté používá pro výrobu acidofilního mléka, podmáslí a smetany.
- *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* – opět vytváří tyčinky. Rostou dobře při teplotě 40 – 44 °C, ale jejich teplotní maximum je 45 °C a minimum 18 – 22 °C. Nacházejí se v mikroflóře směsných jogurtových kultur, které se používají pro výrobu jogurtů i dalších výrobků. Průmyslově využívány jsou tři kmeny – *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii*, *L. delbrueckii subsp. leichmanii* a *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*. Jejich biologická aktivita dodává výrobkům typickou výrazně kyselou a aromatickou chuť a vůni.

Heterofermentativní bakterie rodu *Lactobacillus*: [10, 38]

- *Lactobacillus brevis* – vytváří nepohyblivé tyčinky se zaoblenými konci a jejich buňky jsou velké 0,7 – 1,0 x 2,0 – 4,0 μm. Nerozkládají kasein, ale zkvašují glukózu, arabinózu, galaktózu, ale nedokážou zkvasit mannitol, dextriny, inulín a škrob. Optimální teplota je 15 °C nebo 37 °C. Můžeme je nalézt v sýrech a rostlinných produktech.
- *Lactobacillus buchneri* – jsou rozšířeny v přírodě ve kvašených substrátech. Vytváří inaktivní formu kyseliny mléčné, z glycidů tvoří kyselinu octovou, oxid uhličitý, alkohol a kyselinu mléčnou. Velikost buněk je

0,35 – 0,7 x 0,7 – 4,0 μm a jejich optimální teplota pro jejich růst je 32 – 37 °C.

- *Lactobacillus fermentum* – je možné je nalézt v mikroflóře mladých a zrajících sýrů. Na agaru mají tvar plochých okrouhlých kolonií podobné kapkám vody. Buňky jsou velké 0,5 – 1,0 x 3,0 – 15 μm . Zkvašují glukózu, maltózu, galaktózu a další sacharidy. Nezkvašují ramnózu, arabinózu, mannitol, inulín, dextran. Optimální teplota je 41 – 42 °C.
- *Lactobacillus casei* – jde o grampozitivní tyčinkovité fakultativně anaerobní bakterie o velikosti 0,7 – 1,1 x 2,0 -4,0 μm . Mikroskopické záznamy je uvedeno na obrázku 5. Neumí syntetizovat porfyryty. Jejich produkcí vzniká kyselina mléčná z hexóz. Pro jejich růst potřebují riboflavin, niacin a kyselinu listovou, ty se používají jako růstové faktory. Tyto bakterie jsou značně využívány v potravinářském průmyslu. Mají uplatnění jako lidská probiotika, které jsou zdraví prospěšné. *L.casei* se využívají jako startovací kultura pro mléčné kvašení a také jako speciální kultury pro urychlení vývoje některých bakterií u výroby zrající sýrů.



Obrázek 5: *Lactobacillus casei* [39]

1.4.2 Využití bakterií mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení mají velký význam při konzervování potravin a jejich fermentační produkty se využívají na prodloužení trvanlivosti živočišných a rostlinných potravin. Cíleně se používají v mlékárenském, masném, tukovém i pekárenském průmyslu. [10, 11, 12]

Pro výrobu fermentovaných výrobků se nejčastěji používají bakterie mléčného kvašení, které jsou již přítomny na fermentovaném substrátu. Kvašení probíhá spontánně.

Avšak pro výrobu fermentovaných výrobků živočišného původu se používají bakterie mléčného kvašení ve formě tzv. zákysů, kultur, zákvasů a startérů. [12]

- Výroba fermentovaného mléka – je to produkt vyroben z pasterovaného nebo sterilovaného mléka o různé tučnosti a sušiny. Vyrábí se fermentací, kdy část laktózy byla přeměněna na kyselinu mléčnou a ta zamezila vzniku nežádoucích bakterií a snížila pH výrobku. Pro fermentované výrobky se používají mezofilní bakterie mléčného kvašení a dělí se na kysaná mléka, kysané smetany a kysané podmásli. Kysaná mléka mají kyselý charakter, kdežto kysané smetany jsou jemné, mírně kyselé mléčné výrobky, které se používají velmi často jako přísada do pokrmů. Jako vedlejší produkt při výrobě másla vzniká kysané podmásli. Při použití termofilních kultur se řadí do fermentovaných mléčných výrobků acidofilní mléka, která mají silně dieteticko-léčebné účinky a ostatní fermentované výrobky s probiotickými bakteriemi mléčného kvašení. Probiotika jsou potraviny nebo výživové doplňky, které obsahují živé bakterie mléčného kvašení, které za normálních podmínek žijí v gastrointestinálním traktu. Tyto bakterie mají pozitivní účinky na organismus lidí i živočichů. Jedná se o bakterie rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. [13]
- Fermentované salámy, uzeniny a klobásy – vyrábí se ze syrového masa, které podléhá fermentačnímu procesu. Používají se homofermentativní startovací kultury mléčného kvašení, které nesmí vytvářet plyn a jiné nežádoucí metabolity. Nejvíce se využívají členy rodu *Lactobacillus* a *Pediococcus*. Kyselina mléčná, která vzniká produkcí těchto bakterií, působí mikrobicidně na patogenní mikroorganismy např. salmonely nebo *Staphylococcus aureus* a prodlužuje trvanlivost uzenářských výrobků. Nežádoucím účinkem však je přemnožení těchto bakterií, jelikož mohou vytvořit kyselou chuť a vůni. Přemnožení bakterií lze vizuálně pozorovat zezelenáním výrobku. [11, 12, 26, 36]
- Jogurty – patří k nejrozšířenějším fermentovaným výrobkům. K výrobě se používají termofilní bakterie mléčného kvašení a to: *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus*. Během fermentace je důležité hlídat poměr těchto mikroorganismů a vytvořit vhodné podmínky pro jejich růst. Jogurty můžeme dělit na ochucené jogurty, ty obsahují i jiné nemléčné složky, a přírodní jogurty. [13]
- Kvašená pekařská těsta – těsto pro přípravu chleba a pečiva se vyrábí z vody, kuchyňské soli, mouky a kypřící přísady. Pro výrobu žitného a pšeničnožitného těsta je nutné kvasit, proto se přidávají startovací bakterie mléčného kvašení, které těsto nakynou. Jedná se o bakterie homofermentativní nebo heterofermentativní z rodu *Lactobacillus*. Bakterie dodají těstu jeho chuť a aroma. [12]
- Fermentovaná zelenina – jde o spontánní fermentaci. Pro výrobu kyselých okurek a zelí se používají bakterie mléčného kvašení a to zejména rodu *Leuconostoc*, méně pak *Lactobacillus*. Fermentovanou zeleninu musíme tzv.

silážovat, abychom zabránili vzniku hnilobných bakterií. V procesu fermentace vzniká kyselina mléčná, která se právě podílí na zabrání růstu nežádoucích mikroorganismů. Mléčná fermentace prodlužuje životnost těchto výrobků a ovlivňuje jejich sensorické vlastnosti, texturu a stravitelnost. [12, 36]

- Tvaroh a sýry – výroba sýrů je velmi složitý proces. Existuje celá řada technologických postupů pro jeho výrobu. Základní surovina pro výrobu sýrů je mléko. Při výrobě sýrů i tvarohů se přidávají kyselé kultury bakterií mléčného kvašení. Tyto bakterie mají plnit funkce: upravovat kyselost mléka před jeho sýřením, ovlivňovat texturu a konzistenci sýrů a tvarohů, vytvářet sensorické vlastnosti (vytvořit kyselinu mléčnou a další organické kyseliny), uplatňovat proteolytické a lipolytické aktivity v průběhu zrání a fermentovat laktózu. U tvrdých sýrů se pro jeho zrání používá účinek bakterií, které přidáváme do mléka před jeho srážení a tím pádem bakterie zrají v celé hmotě najednou. Měkké sýry zrají od povrchu dovnitř. Pro výrobu roztíratelných a plísňových sýrů se použijí příslušné mikrobiální kultury, které zrají pouze na povrchu. [3, 13, 26, 39]
- Kvašení alkoholových nápojů – u výroby alkoholických nápojů se využívá jablečno-mléčného kvašení za použití bakterií mléčného kvašení, kdy dojde k odbourání kyselin. To má za následek změnu kvantitativních a kvalitativních poměrů kyselin ve víně. Méně příznivé kyseliny (citrónová, jablečná a jiné) se mění na kyselinu mléčnou. Kyselost vína a jemnější chuť dosáhneme při sekundární fermentaci, která zajistí i jeho stabilitu. Pro výrobu piva jsou bakterie mléčného kvašení nežádoucí, protože způsobují poruchy zákalu a nepříznivě ovlivňují vůni a chuť piva. [1, 36]

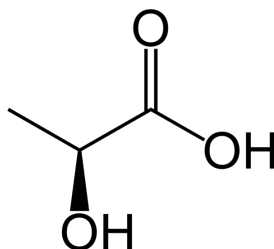
1.5 Kyselina mléčná

Laktóza (nejlépe ze syrovátky) se pomocí bakterií mléčného kvašení (např. *Lactobacillus*) při vhodných teplotách přemění na kyselinu mléčnou. Médium, ve kterém je obsažena laktóza, se zahřeje a zfiltruje. Výsledný filtrát se zahustí. Z mléčnanu vápenatého pomocí kyseliny sírové vznikne kyselina mléčná a nerozpustný síran vápenatý, který se oddělí např. filtrací. V procesu fermentace se kyselina mléčná neutralizuje uhličitanem vápenatým. Pokud se ze syrovátky přemění přibližně 90 % laktózy na kyselinu mléčnou je výtěžnost 50 % ve vztahu k syrovátce. [22]

V roce 1780 kyselinu mléčnou objevil švédský chemik C. W. Scheele v kyselém mléce. Latinský název kyseliny mléčné je acidum latium, její chemický název je 2- α -hydroxypropionová kyselina, sumární vzorec je $C_3H_6O_3$ s registračním číslem v CAS 50-21-5. Kyselina mléčná je hydrokopická, organická, přírodní kyselina. Je to bezbarvá, nebo slabě žlutá strupovitá tekutina kyselé chuti. S mírným, nebo žádným zápachem. Znázorněna na obrázku 3. Molární hmotnost kyseliny mléčné je 90,08 g / mol a její hustota je při 20 °C 1,20 – 1,22 g / cm³. Je dobře mísitelná s lihem, vodou a etherem, nerozpustná v chloroformu. [4, 5, 40, 41]

V přírodě se kyselina mléčná vyskytuje, buď ve dvou aktivních izomerních formách (jako pravotočivá L(+)-forma nebo jako levotočivá D(-)-forma), nebo se může vyskytovat

jako racemická směs. Strukturální vzorec je znázorněn na obrázku 6. Teprve v roce 1890 vědci rozdělili racemickou směs kyseliny mléčné na její opticky aktivní formy. Dříve se totiž domnívali, že se vyskytuje pouze jako pravotočivá, jelikož ji ve svalu stanovili jako pravotočivou. Avšak mikroorganismy produkují její levotočivou formu. Bylo stanoveno, že většina solí kyseliny mléčné a jejích esterů je v levotočivých D(-)-formách a samotná kyselina mléčná je pravotočivá L(+)-forma. Tuto anomálii v optických otáčivostech vysvětlil Lockwood. Domnívá se, že kyselina mléčná je pravotočivá díky tvorbě oxiranového kruhu na uhlíku C₁ a C₂. Oxiranový kruh však estery a soli kyseliny mléčné tvořit nemohou, proto jsou levotočivé. [4, 6]



Obrázek 6: Kyselina mléčná [42]

1.5.1 Využití kyseliny mléčné v průmyslu

Poprvé byla kyselina mléčná vyrobena v průmyslovém měřítku v roce 1881 v USA. Byl to první bioprůmyslový podnik v biotechnologii. Jenže bohužel výroba byla natolik drahá, že byla ukončena. Proto se první úspěch dostavil až v roce 1895, kdy byl otevřen podnik na výrobu kyseliny mléčné v Ingelheimu v Německu. Na výrobu byl použit kmen *Lactobacillus delbrueckii*, který má teplotní optimum 45 – 48 °C. Tento kmen dokáže zaručit zamezení kontaminace a získat dobrý výtěžek kyseliny mléčné. Z kyseliny mléčné, chemickou syntézou (oxidací propenu, nebo použitím peroxidu dusičného za přítomnosti kyslíku), je možné v průmyslovém měřítku připravit kyselinu dusičnou. Tím vznikne slabá kyselina α -nitropropionová, která následně může hydrolyzovat za vzniku kyseliny mléčné a dusičné. Samovolné mléčné kvašení se využívá při konzervaci zelí, okurek a zelené píce, jelikož zabraňuje vzniku hnilobných bakterií. V současné době se pro výrobu kyseliny mléčné v průmyslovém měřítku používají tři druhy homofermentativních mléčných bakterií s teplotním optimem 45 – 48 °C a to: *Lactobacillus delbrueckii subsp. Delbrueckii*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. Leichmannii* a *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*. Kyselina mléčná se prodává ve třech kvalitách. Dělíme ji podle stupně čistoty a to na technickou, farmaceutickou nebo potravinářskou. Nejvíce se kupuje tepelně stálá kyselina mléčná, která se nezbarví ani po několikahodinovém zahřátí na teplotu 200 °C. Proto je důležité ji izolovat a čistit podle toho, jakou potřebujeme kvalitu konečného produktu. [6, 8, 9]

Jak již bylo zmíněno, je možné získat kyselinu mléčnou ve čtyřech stupních kvality:

- Potravinářský stupeň čistoty kyseliny mléčné je většinou bez zápachu, může být bezbarvý a měl by obsahovat 80 % kyseliny mléčné. Používá se jako přísada do nápojů, ovocných džusů, džemů, želatin, sirupů a esencí, protože má

příjemnou nakyslou chuť. Také se používá jako přísada v cukrovarnictví, v konzervačním průmyslu a k výrobě kyselých mouk a těst.

- Technický stupeň čistoty se využívá k činění surové kůže, v textilním průmyslu a pro průmyslovou výrobu esterů jako plastifikátor a rozpouštědlo. Kyselina mléčná má lehce žluto-hnědou barvu a kolísající koncentraci od 20 – 80 % s volnými železnatými ionty.
- Farmaceutický stupeň čistoty obsahuje 87 – 92 % kyseliny mléčné. Používá se na léčení střevního traktu, k výrobě vápenatého mléka a také v hygienických přípravcích pro výrobu čistících léčiv. Kyselina mléčná je čirá, strupovitá a bezbarvá tekutina, bez zápachu a kyselé chuti. Řadí se mezi pomocné látky.
- Pro výrobu polymerů musí být stupeň čistoty menší než 0,01 % a absolutně bezbarvý. V průmyslové výrobě se používá na výrobu fermeží, laků, polymerů a také impregnačních prostředků. [9]

V různých zemích mají vlastní potravinářské kodexy pro přípravu kyseliny mléčné. Důležitým kritériem pro čistotu je tepelná stabilita, kterou stanovíme zahřátím bezbarvé 80 % kyseliny mléčné na teplotu 180 °C. Produkce se v posledním desetiletí odhaduje na cca 50 000 t/r, z toho 2/3 jsou vyprodukovány fermentací. [9]

Samotná kyselina mléčná se využívá jako konzervační prostředek. Nese označení E270. Používá se na prodloužení doby trvanlivosti a také jako regulátor kyselosti či jako látka zvýrazňující chuť. Okyselovací schopnost kyseliny mléčné může být rozdílná, proto je nutné brát ohled na ovlivnění chuti výrobku. Zvyšováním kyselosti se zvýší odolnost vůči mikroorganismům, tím pádem dojde k zabránění vzniku nežádoucích chemických reakcí a vytvoří se podmínky pro průběh potřebné chemické reakce. [13, 43]

Nově se klade důraz na použití kyseliny mléčné v polymeračních reakcích za vzniku polymléčné kyseliny PLA. Výhoda polymléčné kyseliny je, že se dá využít jako náhrada mnoha nebiodegradovatelných plastů, protože ji můžeme velmi snadno získat z obnovitelných zdrojů. Kondenzací kyseliny mléčné vzniká laktid, který je rafinován a polymerován za vzniku polymléčné kyseliny. Jelikož se kyselina mléčná vyskytuje v D- i L-formě, výsledný polymer je vždy z jednoho typu stereoizomeru. Polymléčná kyselina se využívá jako fólie, obal či jako pytel na odpadky. Nahrazuje tím PET (polyethylentereftalát). Kyselina polymléčná se také uplatňuje v oblasti medicíny, protože se velmi dobře snáší s lidskou tkání. [44, 45, 46]

1.6 Použité analytické metody

Jako optimální metoda pro sledování změn obsahu laktózy a během fermentace vznikajících metabolitů byla, v souladu s literaturou, vyhodnocena metoda HPLC.

1.6.1 HPLC

Chromatografie je separační metoda, která je založena na rozdělování sloučenin mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Především se jedná o metodu kvalitativní a kvantitativní analýzy. HPLC (High Performance Liquid Chromatography) je metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie, je to jediná separační metoda, která byla objevena již na začátku 20. století. Do popředí zájmu se dostala na přelomu 60. – 70.let 20. století. S rozvojem

instrumentace se prošlo spoustou modernizací a až dnes se stala vysokoúčinnou. Tato metoda je také nazývána jako vysokotlaká kapalinová chromatografie (High Pressure Liquid Chromatography). [47, 48]

Vzorek je nanášen mezi dvě fáze a to stacionární, která je nepohyblivá a mobilní (pohyblivá). V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina. Analyt je rozdělován mezi tyto dvě fáze. V každé z těchto fází, stráví vzorek jiný čas. Je to určeno afinitou vzorku k těmto fázím. Aby docházelo k této separaci, musí existovat fázové rozhraní mezi těmito dvěma fázemi, které bude unášet složky vzorku tak, aby obtékala stacionární fázi. Při separaci dochází k opakovanému vytváření rovnovážných stavů mezi mobilní a stacionární fází. [48, 49]

1.6.2 Rozdělení HPLC

Podle povahy děje, který při separaci převládá, dělíme HPLC na: [48]

- Rozdělovací – při separaci rozhoduje odlišná rozpustnost složek vzorku.
- Adsorpční – složky vzorku mají různou schopnost adsorbovat se na povrch stacionární fáze.
- Iontově-výměnná – založena na různosti elektrostatických přitažlivých sil mezi funkčními skupinami stacionární fáze a ionty vzorku.
- Gelová permeační – složky vzorku se rozdělují podle odlišnosti jejich velikosti.

Rozdělovací HPLC

Metoda je založena na různé rozpustnosti látek. Stacionární i mobilní fáze je kapalina. Analyt se při této metodě rozděluje mezi dvě nemísitelné fáze. Kapalina zakotvená na pevném nosiči vytváří stacionární fázi. Může být polární či nepolární. Pokud se jedná o kapalinu např. vodu na silikagelu, bude kapalina vykazovat polární vlastnosti a jako mobilní fázi zvolíme méně polární látku, např. hexan. Nejdříve se budou na stacionární fázi eluovat složky vzorku polární a na konec složky méně polární. V tomto případě se bude jednat o chromatografii na normálních fázích (NPC). Jestliže bude stacionární fáze méně polární (uhlovodíky nebo alkyly vázané na silikagel) a jako mobilní fáze bude polární (voda, acetonitril). Dojde k tomu, že se nejdříve budou vázat složky méně polární. Tato metoda se v dnešní době používá hojněji a nazývá se tzn. Chromatografie v systému obrácených fází (RPC) a to z důvodu toho, protože v systému normálních fází může dojít k tomu, že dojde k tak silným interakcím s polární SF, že v rozumném čase nevyjdou z kolony. [47, 48, 49]

Adsorpční HPLC (LSC)

Tato metoda využívá mezimolekulové přitažlivé síly mezi stacionární a mobilní fází. Stacionární fáze bude pevná látka. Sorbenty se od sebe liší svou polaritou popř. kyselostí. Např. zrnité materiály na bázi silikagelu vykazují polární kyselé vlastnosti, zatímco méně využívané látky na bázi oxidu hlinitého zase polární zásadité vlastnosti. Vhodná rozpouštědla (mobilní fáze) volíme z tzv. eluotropní řady, která jsou seřazena podle své eluční síly: pentan, toluen, benzen, ethylbromid, propanol, ethylacetát, izopropylalkohol, dioxan, etanol, aceton. Obecně platí, že polární analyty jsou eluovány polárními rozpouštědly a nepolární nepolárními. [47, 48, 49]

Iontově-výměnná HPLC (IEC)

Jako stacionární fázi využíváme měniče iontů, při kterých dochází k elektrostatickým interakcím mezi stacionární fází a mobilní fází. Nejčastěji jsou využívány: polystyren, celulóza, dextran. Tyto látky mají funkční skupiny kyselé či zásadité povahy. Volíme látky podle povahy reakce. Jako mobilní fáze se používají roztoky pufrů. Při této separaci dojde k přeměně iontů z mobilní fáze do stacionární fáze a naopak. Vše je řízeno změnou pH nebo iontovou silou pufru. [47, 48, 49]

Gelová permeační HPLC (GPC nebo SEC)

Molekuly jsou separovány podle své velikosti. Jako SF se používá gel = jsou to pevné částičky naplně v koloně, které mají přesně definované póry různých velikosti. Nejrychleji jsou eluovány velké molekuly, které neprojdou póry gelu, protečou kolonou a na chromatogramu se ukáží jako první. Při průchodu kolonou jsou malé molekuly unášeny dále a tím pádem mají vyšší hodnoty retenčních časů. [47, 48, 49]

Podle uspořádání stacionární fáze se dělí na:

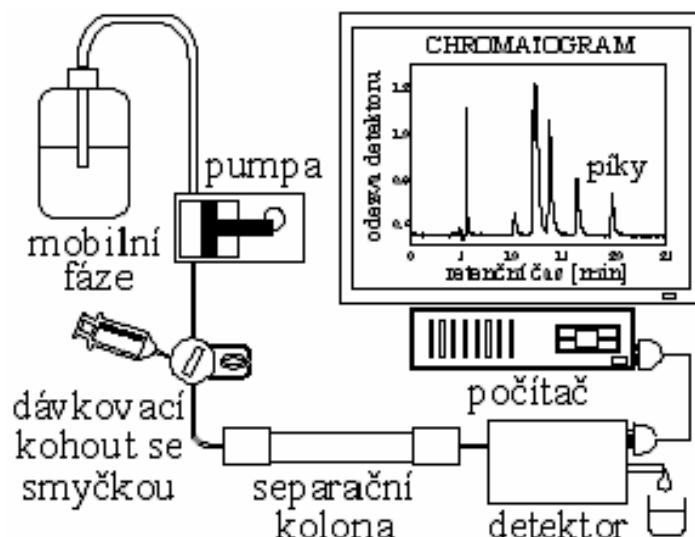
- Kolonovou

Stacionární fáze může být kapalina – sem patří kapalinová rozdělovací chromatografie a gelová permeační chromatografie. Stacionární fáze bude tuhá látka – kapalinová adsorpční chromatografie a iontově-výměnná chromatografie. [47, 48, 49]

- Planární

Stacionární fáze je kapalina – papírová rozdělovací chromatografie a tenkovrstvá rozdělovací chromatografie. Stacionární fáze bude tuhá látka - tenkovrstvá adsorpční chromatografie. [48]

1.6.3 Kapalinový chromatograf



Obrázek 7: Schéma kapalinového chromatografu [48]

Přístroje pro kapalinovou chromatografii jsou mnohem složitější než pro klasickou sloupcovou chromatografii, kde se mobilní fáze pohybuje pouze pomocí gravitační síly. Schéma kapalinového chromatografu je znázorněno na obrázku 7. [48]

Skládá se z těchto částí:

- Zásobníky mobilní fáze

- Čerpadlo – Ze zásobníku se odplyněná mobilní fáze přivádí do čerpadla. Je nutné odplynit mobilní fázi, aby nedocházelo ke vzniku bublin v detektoru, které by se tvořily v důsledku velkého tlakového spádu. Filtr zachycuje mechanické nečistoty a odplyněná mobilní fáze putuje pomocí pístového nebo membránového čerpadla přes dávkovací zařízení do kolony. Dobré čerpadlo je schopné docílit průtoku v rozsahu od několika mikrolitrů až do desítek mililitrů za minutu při tlaku 35 MPa. Vhodné čerpadlo by mělo být vysokotlaké, jelikož částice o velikosti 10 μm kladou velký odpor při průtoku. Existují čerpadla jednopístová a vícepístová. Jednopísté čerpadlo zajistí bezpulzní, ale diskontinuální tok. Zatímco vícepístové zabezpečují kontinuální tok, ale pulzní mobilní fázi, proto je nutné zmírňovat pulsy např. depulzátory. U HPLC se používá gradientová eluce, při které se čerpá mobilní fáze z více zásobníků, a díky tomu můžeme měnit poměr rozpouštědel v průběhu analýzy a tím se zvyšuje eluční síla mobilní fáze. Nebo se používá izokratická eluce, kdy složení mobilní fáze je po celou dobu stejné. [47, 48, 49]
- Dávkovací zařízení - Z čerpadla odtéká kapalina do dávkovacího zařízení. Dávkovací zařízení může významně ovlivnit účinnost separace. Protože při nedokonalém nadávkování, dojde ke změně elučních zón. Dávkovat můžeme pomocí injekčních stříkaček, které přináší řadu nevýhod z hlediska těsnosti, udržení tlaku a vnášení nečistot ze stříkačky. V současnosti se využívá dávkovacího kohoutu. Dávkuje se přes dávkovací smyčku. Jedná se o kapiláru, která má přesně určený průměr, délku a objem. Nejdříve se nastaví poloha load, kdy dojde k naplnění smyčky a následuje inject, při němž dojde k vytlačení mobilní fáze do kolony. Nejpřesnější dávkovací zařízení je pomocí počítače. Kdy je v počítači nahrán program, kde si nastavíme kolik budeme chtít mobilní fáze stříknout do kolony. Výhodou je, že můžeme dávkovat i větší počet vzorků. [47, 48, 49]
- Kolona - Používá se převážně kolona náplňová. Jako materiály se používají silikagel, oxidy kovů, hybridní částice, organické polymery či monolity. Kapalínová chromatografie využívá velkého množství kolon o různé délce, náplni a vnitřního průměru. Nejčastěji se využívají kovové kolony o průměru 1,7 - 5 μm a délce do 25 cm. Jako ochrana kolony se nejčastěji používají tzv. předklony, které jsou umístěné mezi čerpadlem a dávkovacím zařízením. Chrání kolonu před znečištěním a nepropustnými materiály. [47, 48, 49]
- Detektory - Mobilní fáze opouští kolonu s určitou frakcí analyzované směsi (eluent) a směřuje do detektoru. [48]

Existují různé typy detektorů:

- *Fotometrický* – Patří mezi nejpoužívanější detektor. Pracuje v UV a VIS oblasti a měří absorpenci eluentu pomocí kyvet umístěných v zařízení. Jsou poměrně jednoduché, spolehlivé a lze s ním detekovat velký počet látek. Tyto detektory hrají význam při určování homogenity píku. [47, 48, 49]
- *Refraktometrický* – měří index lomu mezi eluátem a čistou mobilní fází. Jsou velmi málo citlivé. Nevýhodou je, že není možné použít gradientovou eluci a je zde závislost indexu lomu na teplotě. [47, 48, 49]

- *Fluorescenční* – založen na principu fluorescence. Jsou zhruba o tři řády citlivější než UV detektory. Analyt je ozářen o určité vlnové délce (tzv. excitační záření) a produkuje záření o vyšší vlnové délce (tzv. emitované záření). Tyto detektory se uplatňují zejména pro biochemicky významné látky. [47, 48, 49]
- Méně používané detektory: FTIP detektor, elektrochemické detektory. [48]

1.6.4 Volba chromatografické metody

- Stacionární fáze:

Syntetické polymery a biopolymery jsou analyty s větší molekulovou relativní hmotností než 2000. Vhodnou volbou je gelová permeační chromatografie. Analyty s molekulovou relativní hmotností menší než 2000 je poměrně hodně. Proto dochází k obtížím při výběru vhodné metody. Závisí hodně na rozpustnosti analytu ve vodě či anorganických nebo organických rozpouštědlech. Analyty rozpustné ve vodě můžeme rozdělit na iontové (anorganické molekuly), pro tyto látky volíme obvykle iontově-výměnnou chromatografii. Abychom mohli separovat kyseliny a zásady, musíme uvážit zda jsou v disociované či nedisociované formě. Pro disociované sloučeniny volíme iontově-výměnnou chromatografii nebo chromatografii na obrácených fázích s dlouhými uhlovodíkovými řetězci, kterou můžeme použít také pro nedisociované sloučeniny. Pro analyty rozpustné v organických rozpouštědlech volíme převážně chromatografii na obrácených fázích s dlouhými uhlovodíkovými řetězci. [47, 48, 49]

- Mobilní fáze:

Významné faktory pro volbu rozpouštědla jsou eluční síla, viskozita, teplota varu a dielektrická konstanta. V případě NPC jsou hojně využívány pentan, dichlormethan, benzen, izooktan a cyklohexan. Vodným roztokům se při této metodě vyhýbáme, jelikož by mohlo dojít k deaktivaci kolony na bázi silikagelu. Pro RPC používáme vodu, metanol, tetrahydrofuran a acetonitril. Při této metodě můžeme separovat mnoho analytů s rozdílnou polaritou. Zvýšením přídatku některého z těchto rozpouštědel má za následek zvýšení eluční síly a snížení retenčního času. [47, 48, 49]

Pro látky, které se málo separují v NPC nebo RPC, volíme spíše IEC. Jako mobilní fázi využíváme roztoky pufrů, které umožňují nastavení pH. Nejčastěji se používá fosfátový, amoniakální a acetátový pufr. Pufr musí mít nízkou koncentraci a musí bránit srážení. Vodu a organické rozpouštědlo používáme při GPC. Jako organické rozpouštědlo volíme převážně tetrahydrofuran nebo chloroform. [47, 48, 49]

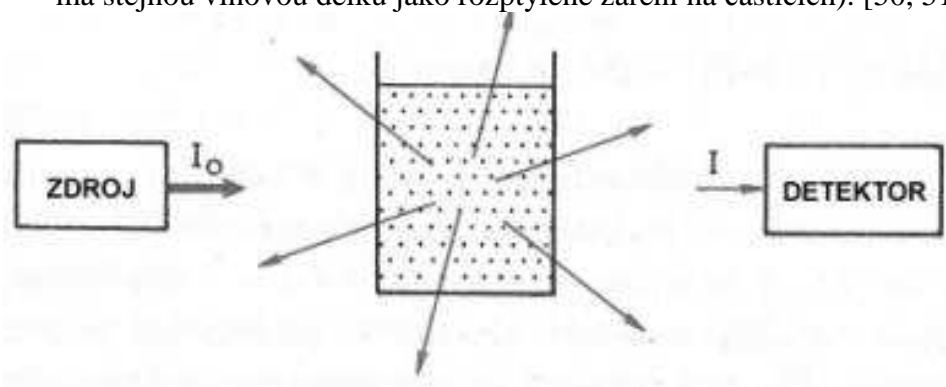
1.6.5 Turbidimetrie

Turbidimetrie je metoda, která je založena na měření stupně zákalu (turbidity). Měří se procházející světlo zeslabené rozptylem na částicích. Při tomto měření je těžké připravit reakční směs, aby byla dostatečně stálá. Proto se nejčastěji využívají ochranné koloidy např. polyethylenglykoly. Absorpce záření procházející koloidním roztokem nebo roztokem zakaleným jemnou sraženinou se měří absorpčními spektrofotometry a fotometry, které využívají zdroje UV-VIS monochromatického záření. Schéma turbidimetru je na obrázku 8.

Při této metodě se vychází ze základních podmínek:

- reakční prostředí (teplota, koncentrace) musí ovlivnit velikost částic,

- přidávají se koloidní roztoky, aby nedocházelo k sedimentaci částic,
- velikost částic musí být stejná a blízká vlnové délce použitého záření,
- na Tyndalově efektu je založen rozptyl (záření, které dopadá na koloidní částice má stejnou vlnovou délku jako rozptýlené záření na částicích). [50, 51]



Obrázek 8: Schéma turbidimetru [50]

Měří se rozpustnost záření roztokem. Výsledkem je absorpce primárního i sekundárního záření v přímém směru. U zředěných disperzních roztocích je přechod mezi absorpční fotometrií a turbidimetrií neostrý. Proto lze měrnou veličinu T_b vyjádřit vztahem:

$$T_b = (\varepsilon + T) \cdot c \cdot L,$$

kde ε - absorpční koeficient, T - turbiditní koeficient, c - koncentrace, L - světelná dráha (tloušťka) měřicí kyvety. Závislost intenzity prošlého záření na vlastnostech absorbujícího prostředí je exponenciální a dá se vyjádřit vztahem:

$$I = I_0 \cdot e^{-\tau \cdot l},$$

kde I = intenzita prošlého záření, I_0 = intenzita světelného zdroje, τ = turbiditní koeficient, l = optická dráha kyvety. [50, 51]

Tato analytická metoda se používá ke stanovení zákalu vody, ke stanovení některých kovů ve formě sulfidů, chloridu stříbrného, síranu barnatého, popřípadě v biochemických analýzách. [50, 51]

2 PRAKTICKÁ ČÁST

2.1 Cíl

Cílem této diplomové práce bylo porovnání produkce kyseliny mléčné při použití sušené a odpadní syrovátky jako substrátu. Pro kultivaci byla použita kultura *Lactobacillus casei* CCM 4978. Byla optimalizována teplota pro tento typ kultury a byl sledován vliv koncentrace solí a vliv množství kvasničného extraktu na celkovou produkci kyseliny mléčné. Ve vzorcích byl stanoven pomocí metody HPLC obsah tohoto metabolitu.

2.2 Použité přístroje, materiál a chemikálie

2.2.1 Přístroje a materiál

- Třepačka Heidolph UNIMAX 1000
- Analytické váhy Pioneer OHAUS
- Filtrační aparatura
- HPLC – kolona Wartex Polymer IEX H-forma, 8•250 mm, předkolona - Wartex Polymer IEX, H-forma, 8•40 mm
- Mikropipety
- Běžné laboratorní sklo
- Ependorfky
- Ultrazvuková čistička Ultrasound
- Cell density meter biowave WPACO 800
- Vortex
- Centrifuga Hettich EBA 20

2.2.2 Chemikálie

- MRS Bouillon, zn.: Carl Roth GmbH
- *Lactobacillus casei* CCM 4798
- Odpadní syrovátka (po výrobě sýru Hermelín poskytnutá firmou Pribina, s.r.o.)
- 96 % H₂SO₄, zn.: Lach-ner, s.r.o.
- Deionizovaná voda
- Glukóza bezvodá, zn.: Lach-ner, s.r.o.
- Laktóza monohydrát, zn.: Carl Roth GmbH
- Galaktóza bezvodá, zn.: Lachema Brno
- 80 % Kyselina mléčná čistá, zn.: Lachema Brno
- Destilovaná voda
- Kvasničný extrakt, zn. Carl Roth GmbH
- K₂HPO₄, zn.: Carl Roth GmbH
- KH₂PO₄, zn.: Lach-ner, s.r.o.
- MgSO₄•7 H₂O, zn.: Lach-ner, s.r.o.
- MnSO₄•H₂O, zn. Penta, Ing. Petr Švec

2.3 Příprava roztoků

2.3.1 Příprava média s odpadní a sušenou syrovátkou

Pro sledování změn laktózy během fermentace byla jako substrát použita sušená a odpadní syrovátka. Sušená syrovátka obsahuje min. 11 % bílkovin, tuk max. 1 % a 69,5 % laktózy. Proto sušená syrovátka byla rozmíchána v destilované vodě, v takovém poměru, aby výsledný obsah laktózy v roztoku odpovídal reálnému obsahu laktóz v čerstvé syrovátce. Na přípravu média pro sušenou syrovátku bylo naváženo 5 g kvasničného extraktu, 0,25 g K_2HPO_4 , 0,25 g KH_2PO_4 , 0,196 g $MgSO_4$, které bylo přepočítáno, protože k dispozici byl heptahydrát síranu hořečnatého a 0,05 g $MnSO_4 \cdot H_2O$. Tento roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 500 ml. Médium bylo vysterilizováno při teplotě 121 °C po dobu 15 min.

Na přípravu média pro odpadní syrovátku bylo naváženo 6 g kvasničného extraktu, 0,3 g K_2HPO_4 , 0,3 g KH_2PO_4 , 0,235 g $MgSO_4$ a 0,06 g $MnSO_4 \cdot H_2O$. Tento roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 400 ml. Médium bylo vysterilizováno při teplotě 121 °C po dobu 15 min. Přehled složení média pro odpadní a sušenou syrovátku je uvedeno v tabulce 5.

Tyto média byla použita i v práci jiných autorů. Do médií byla přidána syrovátka. Sušená i odpadní syrovátka byla naředěna tak, aby vycházela počáteční koncentrace laktózy v rozmezí 10 – 20 g·l⁻¹. Protože při vyšších koncentracích laktózy docházelo k většímu rozdílu mezi jednotlivými píky. Sušené syrovátky bylo vypočítáno, že je potřeba 2,25 g na 150 ml a odpadní syrovátku bylo potřeba 3x naředit.

Tabulka 5: Složení média

Složení média	Sušená syrovátka (500 ml)	Odpadní syrovátka (400 ml)
kvasniční extrakt	5 g	6 g
K_2HPO_4	0,25 g	0,3 g
KH_2PO_4	0,25 g	0,3 g
$MgSO_4$	0,196 g	0,235 g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,05 g	0,06g

2.3.2 Příprava kultivačního média MRS pro *Lactobacillus casei*

Kultivace byla prováděna v Erlenmayerových baňkách. Bylo připraveno MRS médium. Na objem 200 ml bylo naváženo 10,4 g MRS a rozpuštěno ve 200 ml destilované vody. Médium bylo důkladně promícháno a vysterilizováno. MRS médium bylo naočkováno 20 ml kultury *L.casei* a byla zahájena kultivace po dobu 24 hod na temperované třepače za jeho optimálních podmínek tedy 37 °C. Poté bylo inokulum zamraženo pro další použití.

2.3.3 Příprava mobilní fáze

Pro přípravu mobilní fáze byla použita 96 % H_2SO_4 . Odměrná baňka s objemem 1 l byla naplněna deionizovanou vodou a do ní bylo napipetováno 0,278 ml kyseliny sírové, abychom dostali 5 mmol·l⁻¹ H_2SO_4 . Roztok byl důkladně promíchán a zfiltrován pomocí nitrocelulóзовého membránového filtračního papíru s velikostí pórů 0,40 μm. Tím došlo k odstranění nečistot. Následně byla mobilní fáze pomocí ultrazvuku odplyněna. Ultrazvuk byl zapnutý 30 min.

2.3.4 Příprava standardů pro stanovení kalibračních křivek

Byly připraveny standardní roztoky pro analýzu sacharidu a kyseliny mléčné. Koncentrace analytů byly zvoleny podle jejich předpokládaného množství ve vzorcích pro fermentaci. Pro laktózu byly standardy namíchaný o koncentraci 0 – 20 g·l⁻¹. Pro kyselinou mléčnou byl připraven standardní roztok o koncentraci 0,3 – 5 g·l⁻¹.

Pro přípravu kyseliny mléčné o koncentraci 5 g·l⁻¹ bylo napipetováno 0,517 ml do odměrné baňky. Odměrná baňka byla doplněna destilovanou vodou na objem 100 ml. Tím byl získán roztok o nejvyšší koncentraci a poté bylo ředěno na požadované koncentrace. Tento postup ředění byl použit i pro standardní roztoky sacharidu.

Pro laktózu, která byla v laboratoři jako monohydrát, bylo vypočítáno, že na objem 100 ml je potřeba navážít 2,104 g laktózy. Opět bylo doplněno destilovanou vodou na objem 100 ml. Poté bylo ředěno na požadované koncentrace viz. výše.

2.4 Kultivace

2.4.1 Optimalizace teploty

Na samotnou kultivaci bylo použito médium pro sušenou syrovátku. Z připravených solí bylo do čtyř erlenmeyerových baněk odměřeno 150 ml tohoto média a přidáno 2,25 g sušené syrovátky. Bylo zaočkováno lakmusovým mlékem, kde bylo pipetováno 20 ml do každé erlenmeyerovy baňky.

Pro kultivaci odpadní syrovátky bylo použito médium pro odpadní syrovátku. Tohoto média bylo odměřeno 100 ml a přidáno 50 ml odpadní syrovátky. Opět připraveno do čtyř erlenmeyerových baněk. Bylo zaočkováno lakmusovým mlékem, kde bylo pipetováno 20 ml do každé erlenmeyerovy baňky.

Poté byly dvě erlenmeyerovy baňky (s odpadní a sušenou syrovátkou) kultivovány při 25 °C, další dvě při teplotě 30 °C, další dvě při 35 °C a poslední dvě při 40 °C po dobu 24 hod při 150 otáčkách za minutu. Hned na začátku kultivace byly odebrány vzorky 0 (1,8 ml do mikrozkuhavky typu Eppendorf – dále jen eppendorfka) a poté každou hodinu odebírány další vzorky. Vzorky byly zamrazeny pro analýzu na HPLC.

2.4.2 Vliv množství kvasničného extraktu

Na sledování vlivu kvasničného extraktu na produkci kyseliny mléčné byla zvolena navážka kvasničného extraktu 2, 10 a 20 g pro sušenou syrovátku. Pro odpadní syrovátku bylo naváženo 2,4; 12 a 24 g kvasničného extraktu. Navážka kvasničného extraktu byla volena dle článku, ze kterého bylo vycházeno. Obsah solí byl nezměněn. Pro sušenou syrovátku bylo naváženo 0,25 g K₂HPO₄, 0,25 g KH₂PO₄, 0,196 g MgSO₄ a 0,05 g MnSO₄·H₂O. Pro odpadní byla navážka 0,3 g K₂HPO₄, 0,3 g KH₂PO₄, 0,235 g MgSO₄ a 0,06 g MnSO₄·H₂O. Poté byl postup stejný jako při optimalizaci teploty.

2.4.3 Vliv koncentrace solí

Pro přípravu roztoků byly zvoleny 4 různé kombinace výchozích solí, které byly uvedeny v článku.

Sušená syrovátka:

Pro všechny roztoky bylo naváženo 20 g kvasničného extraktu.

Pro 1. roztok byly zvoleny tyto soli: 0,196 g MgSO_4 a 0,05 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Soli byly rozpuštěny v destilované vodě při objemu 500 ml. Tento roztok byl vysterylizován. Bylo odebráno 150 ml tohoto roztoku a poté přidáno 2,25 g sušené syrovátky a 20 ml lakmusového mléka, které bylo připraveno standardním postupem viz 2.3. A tímto postupem se pokračovalo u všech různých kombinací.

Pro 2. roztok bylo naváženo 0,25 g K_2HPO_4 , 0,25 g KH_2PO_4 , 0,196 g MgSO_4 .

U třetí varianty byla zvolena navážka těchto solí: 0,25 g K_2HPO_4 , 0,25 g KH_2PO_4 , 0,05 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

U poslední varianty bylo zvoleno pouze 0,05 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Odpadní syrovátka:

Pro odpadní syrovátku byla navážka kvasničného extraktu 24 g. Pro 1. roztok byly použity tyto soli: 0,235 g MgSO_4 a 0,06 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Pro druhý vzorek: 0,3 g K_2HPO_4 , 0,3 g KH_2PO_4 , 0,235 g MgSO_4 . Pro třetí: 0,3 g K_2HPO_4 , 0,3 g KH_2PO_4 , 0,06 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Pro poslední byl požit jen 0,06 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Kompletní přehled obsahu solí nalezneme v tabulce 6.

Tabulka 6: Obsah solí

	Sušená syrovátka	Odpadní syrovátka
<i>1. Roztok</i>	0,196 g MgSO_4 0,05 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,235 g MgSO_4 0,06 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
<i>2. Roztok</i>	0,25 g K_2HPO_4 0,25 g KH_2PO_4 0,196 g MgSO_4	0,3 g K_2HPO_4 0,3 g KH_2PO_4 0,235 g MgSO_4
<i>3. Roztok</i>	0,25 g K_2HPO_4 0,25 g KH_2PO_4 0,05 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,3 g K_2HPO_4 0,3 g KH_2PO_4 0,06 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
<i>4. Roztok</i>	0,05 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,06 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

2.5 Analytická metoda HPLC

Pro zjištění obsahu sledovaných analytů byly nejprve proměřeny kalibrační křivky roztoků standardů pomocí metody pomocí metody HPLC. Jako mobilní fáze byla použita $5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$, průtok byl nastaven na $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Byla zvolena předkolona Wartex Polymer IEX H-forma s rozměry 8·40 mm a jako hlavní kolona byla použita Wartex Polymer IEX H-forma, 8·250 mm. Teplota kolony byla nastavena na $40 \text{ }^\circ\text{C}$ a tlak byl 1,7 MPa. Jako nástřik do dávkovací smyčky bylo zvoleno 20 μl vzorku. Vzorky byly detekovány pomocí RID a UV/VIS detektoru.

2.6 Turbidimetrie

Z čerstvého inokula bylo odpipetováno po 10 ml vzorku do centrifugačních zkušev. Vzorky byly centrifugovány po dobu 5 min při 6000 rpm. Supernatant nad sraženinou byl vylit do odpadu a získaný sediment z centrifugace byl promyt destilovanou vodou, protřepán na vortexu a převeden do kádinky. Roztok byl ředěn tak, aby výsledná optická hustota byla

v rozmezí 0,9 – 1, protože při vyšší optické hustotě není vztah mezi koncentrací a optickou hustotou lineární a tento rozsah zajišťuje nejvyšší možnou koncentraci. Optická hustota tohoto vzorku byla měřena při 600 nm pomocí přístroje Ultrospec 10, jako blank byla použita voda. Takto naředěným roztokem (nazvaným lakmusové mléko) bylo zaočkované médium pro sušenou i odpadní syrovátku.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Kalibrační křivky sledovaných analytů

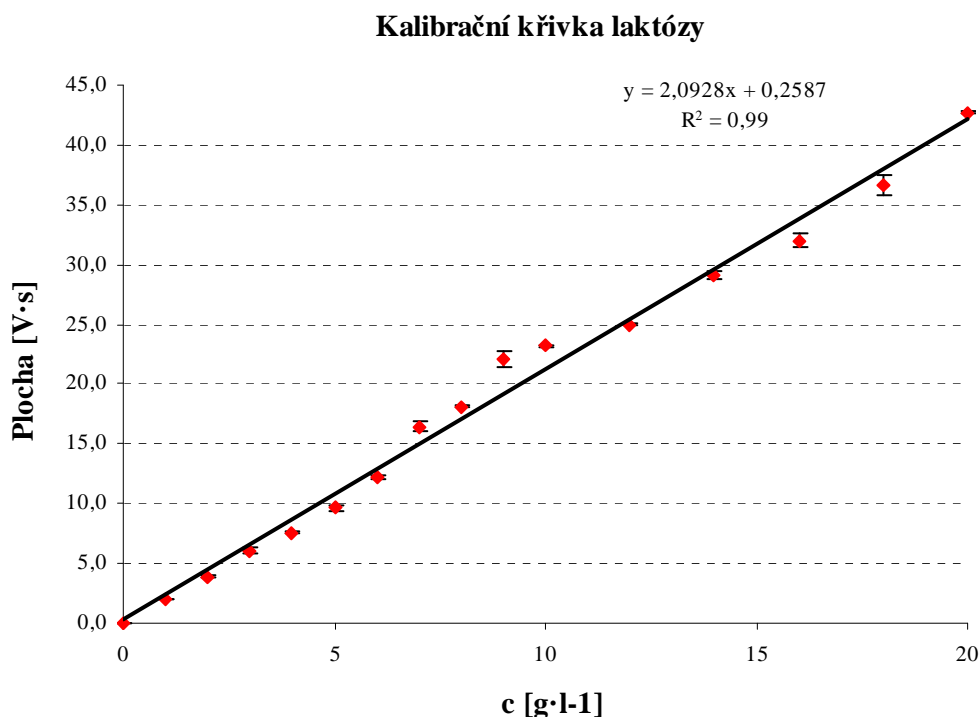
Průměrné retenční časy laktózy a kyseliny mléčné byly viz. tabulka 7.

Tabulka 7: Retenční časy analytů

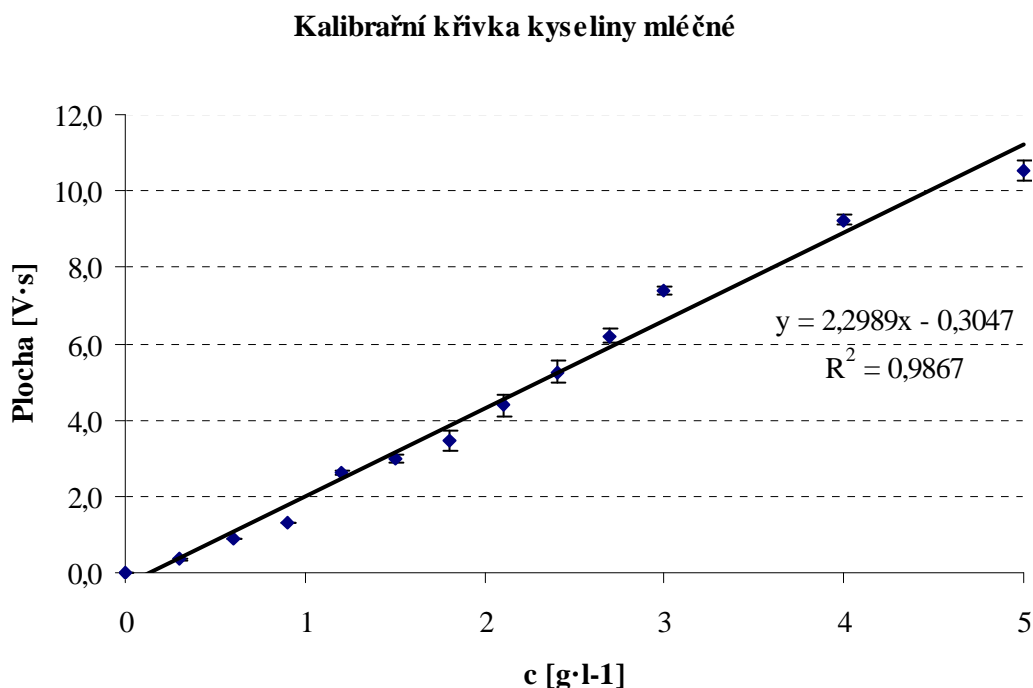
Analyt	Retenční čas [min]
Laktóza	7,547
Kyselina mléčná	12,598

Z plochy píků (tabulky 8 a 9) byly sestaveny kalibrační křivky. Kalibrační křivky a rovnice regrese jednotlivých analytů jsou uvedeny na grafech 1, 2. Ze získaných dat byly vypočítány koncentrace sledovaných analytů.

Graf 1: Kalibrační křivka laktózy



Graf 2: Kalibrační křivka kyseliny mléčné



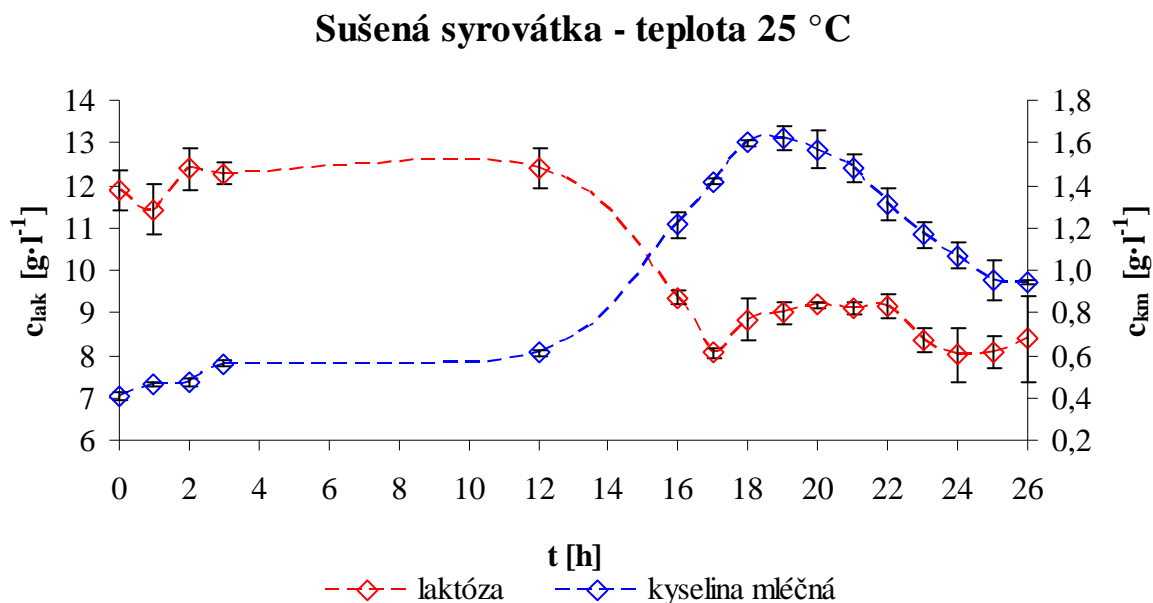
Kalibrační křivky jednotlivých analytů jsou uvedeny spolu s vypočítanou lineární rovnicí, s koeficientem determinace (R^2) a znázorněnými chybovými úsečkami. Obě kalibrační křivky vykazovaly lineární přímkovou závislost. Po sestavení kalibračních křivek bylo podstatou práce sledování změn obsahu laktózy a vznikajícího metabolitu během fermentace syrovátky pomocí bakterií *L.casei*.

3.2 Vyhodnocení odebraných vzorků při kultivaci pomocí HPLC

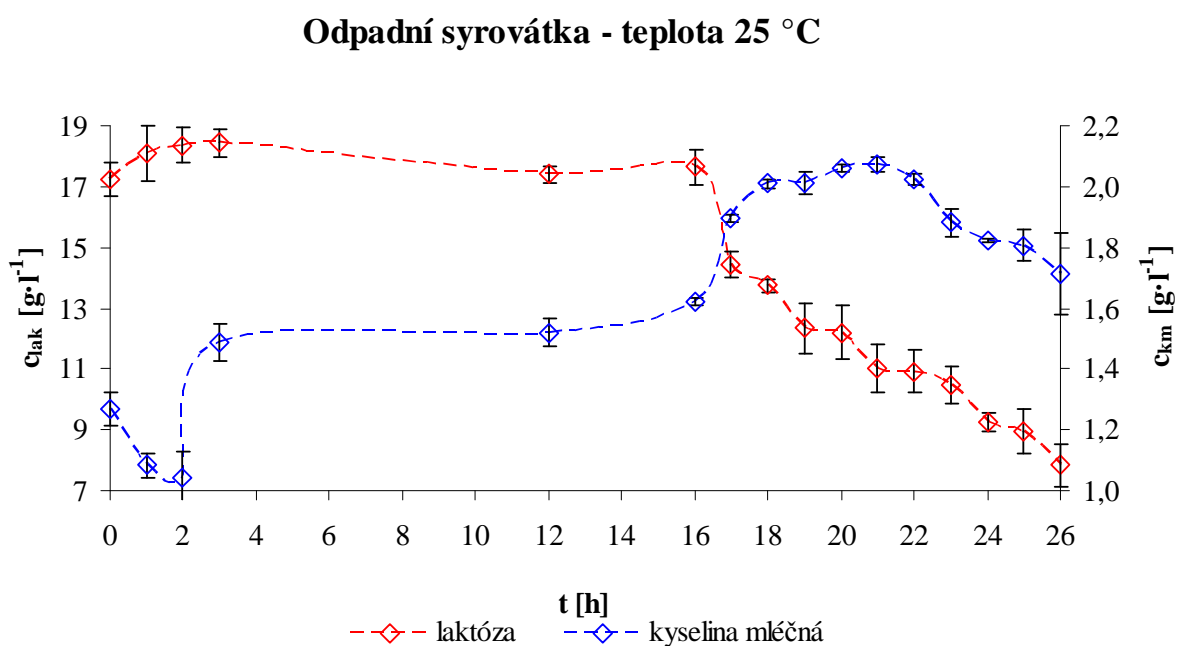
3.2.1 Optimalizace teploty

Růst bakterií ve fermentačním médiu ovlivňují různé faktory. Vedle komplexu nutričních požadavků, je jedním z nejdůležitějších faktorů, ovlivňující růst bakterií mléčného kvašení, teplota. Pro nejvyšší růst bakterií je potřebná optimální teplota. Když je teplota pod nebo nad optimálním růstem, mikrobiální aktivita je podstatně snížena a mikroorganismy mohou eventuelně hynout. Při kultivaci daného mikroorganismu byly podmínky kultivace nastaveny na optimum. Je známo, že optimální teplota pro *L.casei* je 37 °C. Produkce kyseliny mléčné fermentací může být uskutečněna při srovnatelných teplotách. Optimální teplota pro růst bakterií mléčného kvašení se pohybuje mezi rody 20-45 °C. Proto byly zvoleny tyto teploty: 25, 30, 35 a 40 °C. V této kapitole jsou uvedeny výsledky srovnání spotřeby laktózy a metabolické produkce kyseliny mléčné za různých teplot, jako závislost koncentrace laktózy a kyseliny mléčné na čase (grafy 3 –10). Cílem bylo získat neoptimalnější teplotu pro největší produkci kyseliny mléčné. [52, 53, 54]

Graf 3: Spotřeba laktózy a tvorba kyseliny mléčné v závislosti na čase při teplotě 25 °C - sušená syrovátka



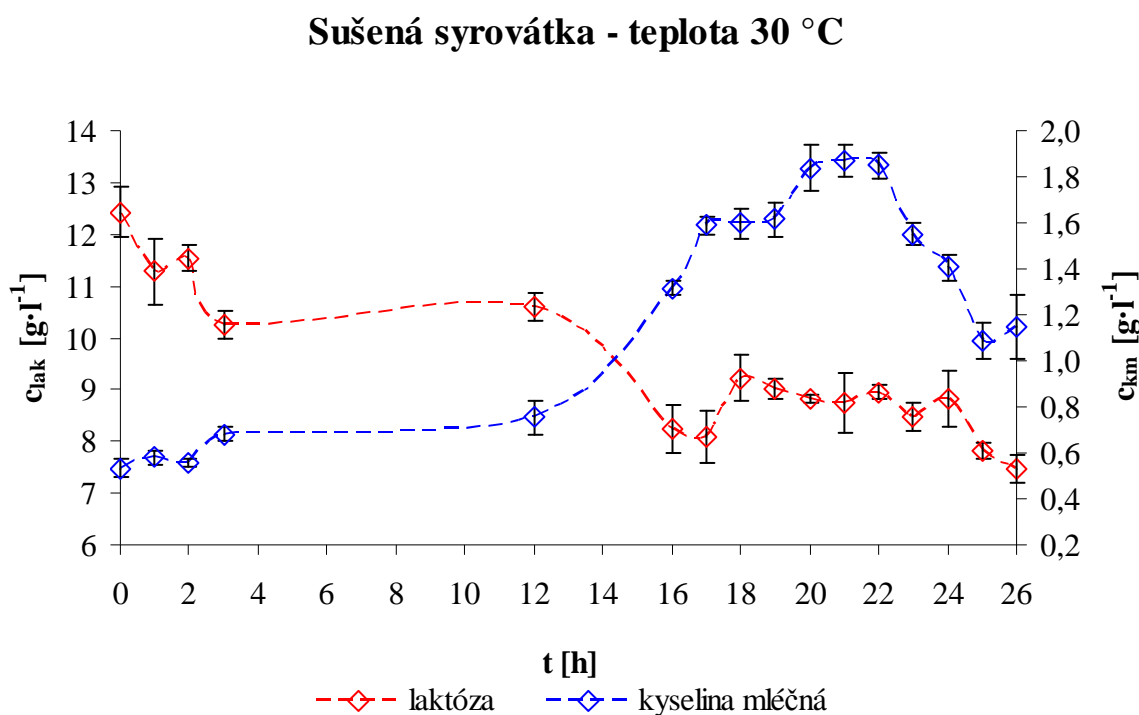
Graf 4: Spotřeba laktózy a tvorba kyseliny mléčné v závislosti na čase při teplotě 25 °C - odpadní syrovátka



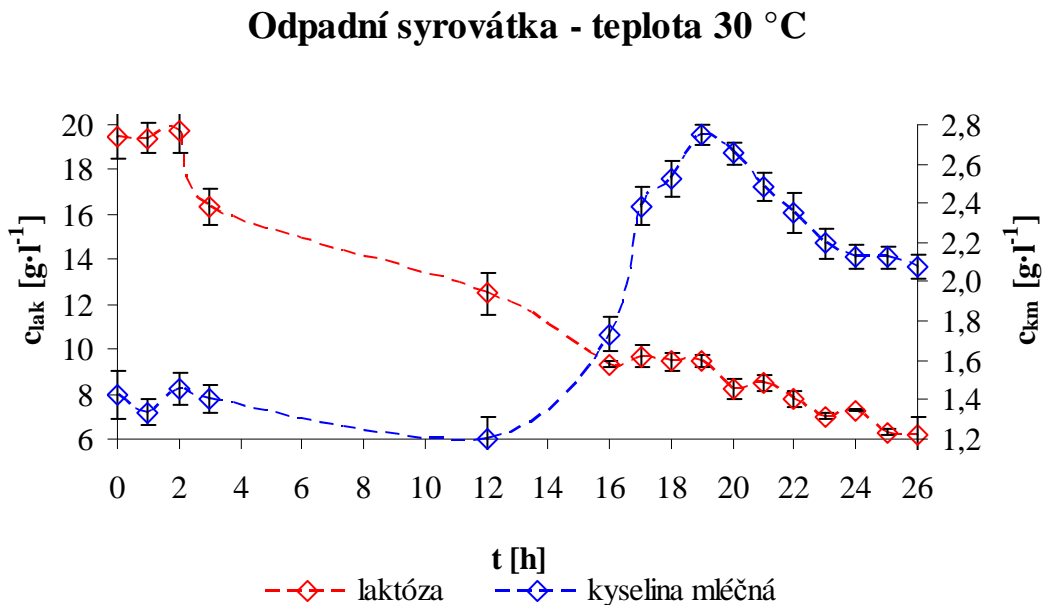
Na grafu 3 lze vidět, že počáteční koncentrace laktózy byla $12,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a po 24 hodinách došlo k jejímu poklesu na nejnižší hodnotu $8,13 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Spotřebovalo se $3,87 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (32,25 %) laktózy. U odpadní syrovátky byla výchozí koncentrace laktózy vyšší než u sušené. Graficky znázorněno na grafu 4. Počáteční koncentrace substrátu byla $17,24 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a došlo k poklesu až na hodnotu $7,85 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Spotřebovalo se $9,39 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (54,47 %) laktózy. Z grafů je patrné, že koncentrace laktózy v průběhu kultivace klesala s časem. Byly tedy

potvrzeny teoretické znalosti, že laktóza slouží jako zdroj uhlíku pro růst mikroorganismů a dále je vlivem metabolických drah spotřebovávána pro vznik metabolitů, v tomto případě se jedná o kyselinu mléčnou. Lze uvažovat, že *L.casei* začaly pomalu produkovat kyselinu mléčnou mezi 3-12 hod. V případě sušené syrovátky byla hodnota kyseliny mléčné na začátku kultivace $0,41 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Nejvyšší produkce nastala při 19. hodině a to $1,62 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Koncentrace kyseliny se zvýšila o $1,21 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. V případě odpadní syrovátky byl zisk kyseliny $2,07 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ při 21. hodině. Nárůst byl pouze $0,9 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Při použití sušené syrovátky bylo získáno této kyseliny více. V obou případech dochází po získání maximálního výtěžku k jejímu poklesu. Pokles byl způsoben tím, že se kyselina mléčná nejspíše začala spotřebovávat jako substrát. Hodnoty plochy píků a koncentrací kyseliny mléčné a laktózy jsou uvedeny v tabulkách 10 a 14.

Graf 5: Spotřeba laktózy a tvorba kyseliny mléčné v závislosti na čase při teplotě $30 \text{ }^\circ\text{C}$ - sušená syrovátka

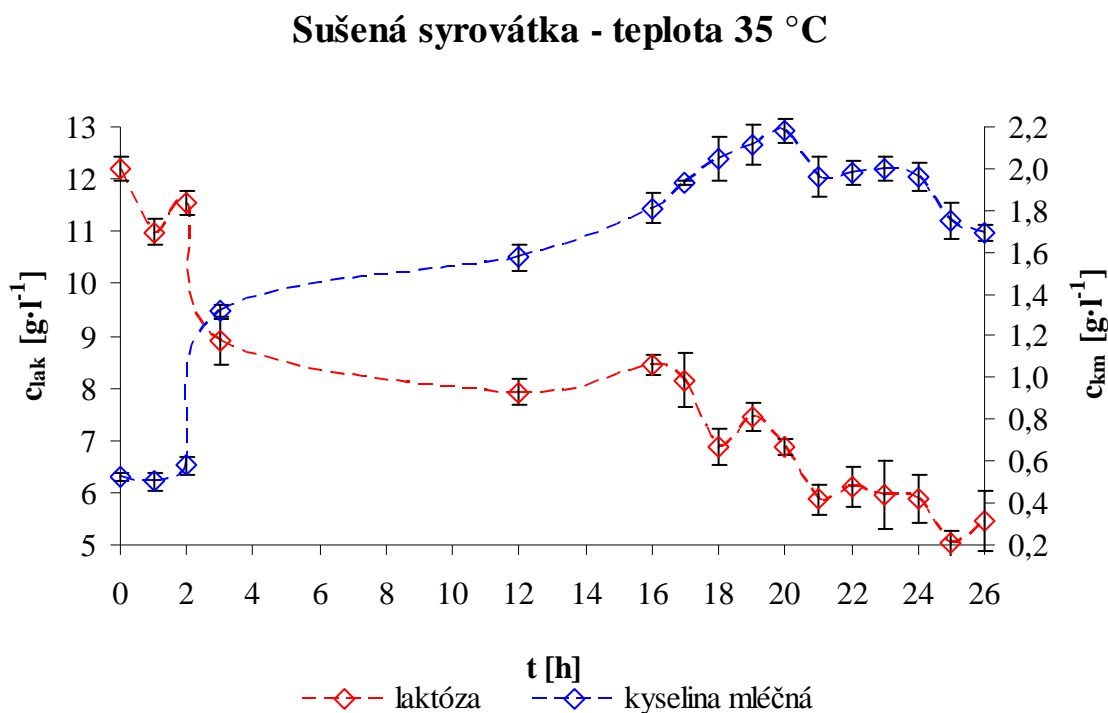


Graf 6: Spotřeba laktózy a tvorba kyseliny mléčné v závislosti na čase při teplotě 30 °C – odpadní syrovátka

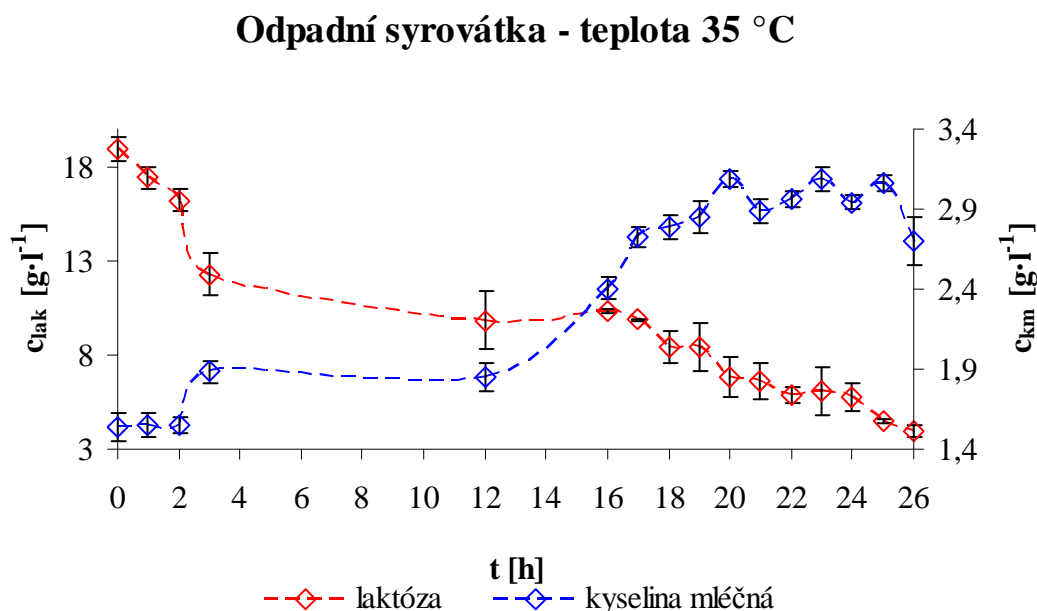


Graf 5 a 6 vyjadřuje časový vývoj koncentrací laktózy a kyseliny mléčné. U sušené syrovátky se spotřebovalo $4,96 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ laktózy, což odpovídá tvorbě kyseliny mléčné, protože se získalo $1,87 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ kyseliny mléčné při 21. hodině. Nárůst byl $1,34 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Znovu došlo k jejímu poklesu. Při použití odpadní syrovátky byla spotřeba laktózy vyšší, činilo to $13,28 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Neodpovídá to tedy tvorbě primárního metabolitu, protože nárůst kyseliny byl téměř stejný jako při sušené, byl $1,33 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Pravděpodobně došlo ke tvorbě i jiných metabolitů. Ke konci kultivace je koncentrace laktózy kolísavá. Mohlo být způsobeno chybou při odečtu píků, protože plocha píků byla relativně velká a každá odchylka má vliv na vypočtenou koncentraci. Pokles kyseliny mléčné ke konci kultivace může být způsoben tím, že se buňky bakterií přestaly množit, nastala stacionární fáze. Při teplotě 30 °C se získalo v obou případech více kyseliny než při teplotě 25 °C. Data jsou shrnuta v tabulkách 11 a 15.

Graf 7: Spotřeba laktózy a tvorba kyseliny mléčné v závislosti na čase při teplotě 35 °C – sušená syrovátka



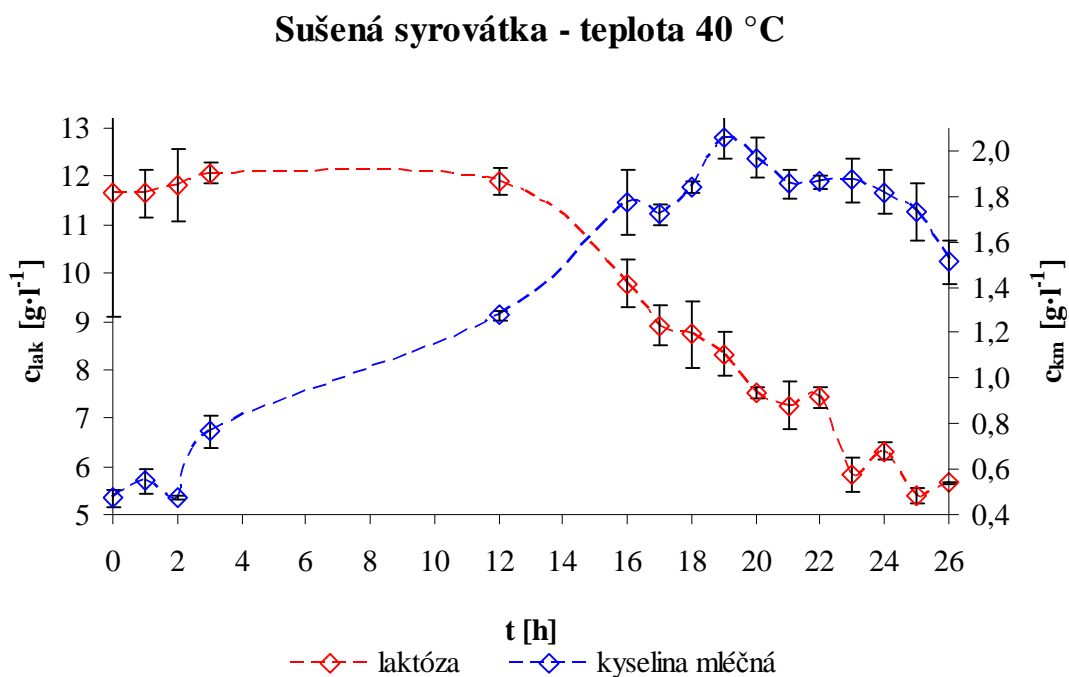
Graf 8: Spotřeba laktózy a tvorba kyseliny mléčné v závislosti na čase při teplotě 35 °C – odpadní syrovátka



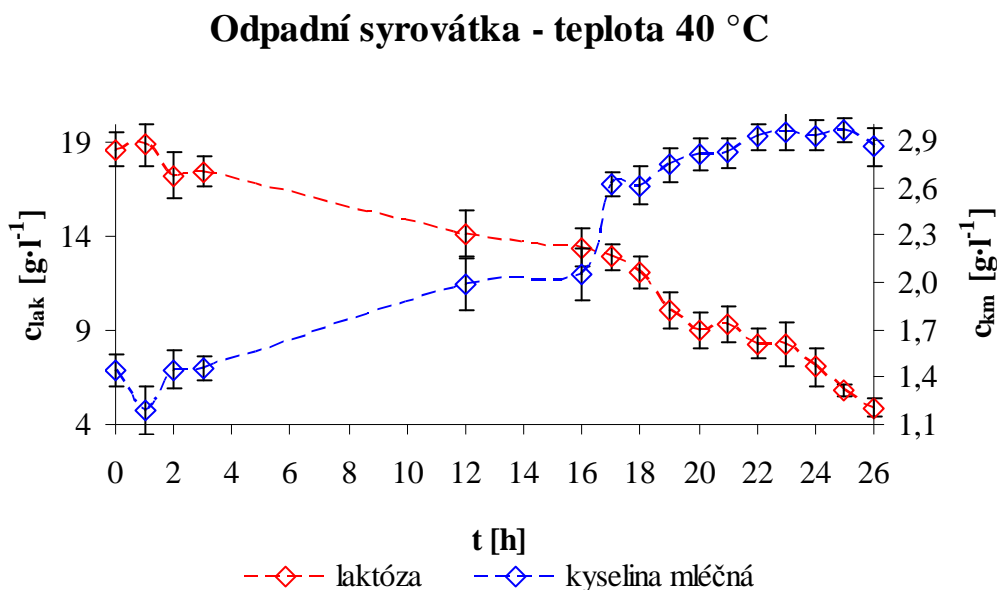
Na grafu 7 a 8 jsou uvedeny hodnoty laktózy a kyseliny mléčné v čase při teplotě 35 °C. Při této teplotě se získalo nejvíce kyseliny v obou případech. Produkce kyseliny byla 1,66 g·l⁻¹ a 1,56 g·l⁻¹ i přesto, že počáteční hodnota laktózy byla téměř stejná jako při teplotě 25 a 30 °C. Po 20. hodině došlo v obou případech opět k poklesu její koncentrace. Způsobeno

tím, že se spotřebovala jako substrát. Laktóza byla téměř využita. U sušené syrovátky to bylo $6,73 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a u odpadní $14,95 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. V případě odpadní syrovátky spotřeba laktózy neodpovídá tvorbě metabolitu. Kolísavé koncentrace laktózy na konci kultivace lze přisoudit chybě měření, protože plocha píku byla relativně velká a každá odchylka má vliv na vypočtenou koncentraci. Tato teplota byla vyhodnocena jako neoptimálnější. Podrobnější hodnoty nalezneme v tabulkách 12 a 16.

Graf 9: Spotřeba laktózy a tvorba kyseliny mléčné v závislosti na čase při teplotě $40 \text{ }^\circ\text{C}$ – sušená syrovátka

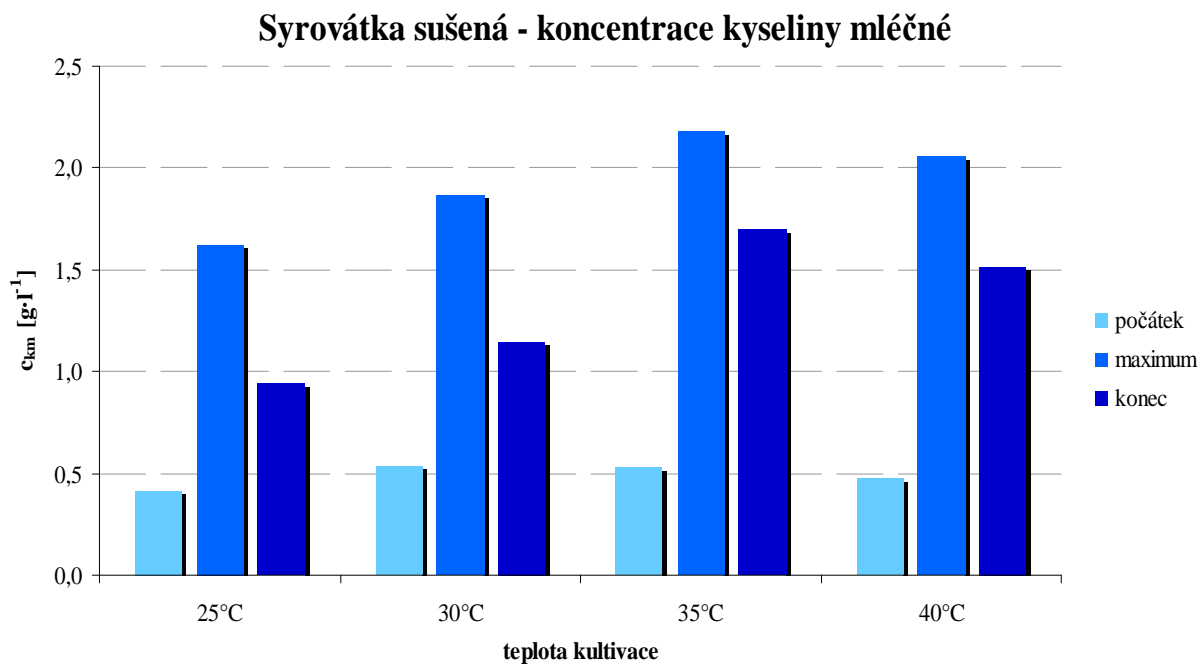


Graf 10: Spotřeba laktózy a tvorba kyseliny mléčné v závislosti na čase při teplotě 40 °C – odpadní syrovátka

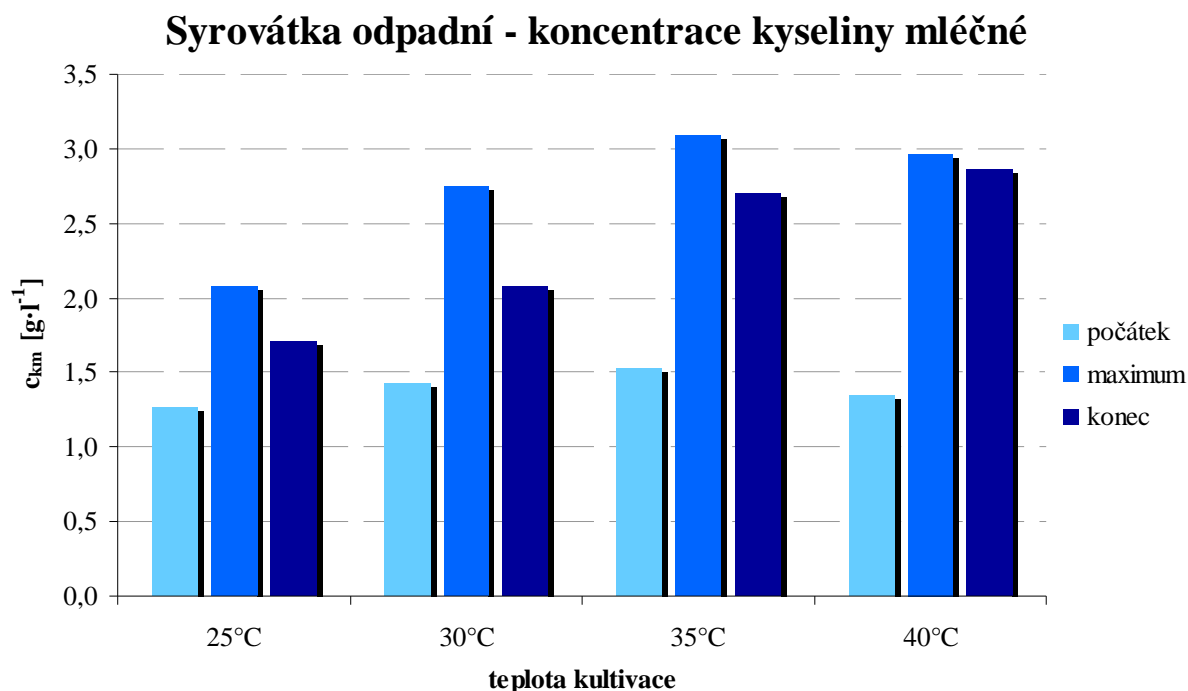


Při teplotě 40 °C byla spotřeba laktózy 6,00 g·l⁻¹ a 13,76 g·l⁻¹, což je méně než při teplotě 35 °C, avšak více jak u teplot 25 a 30 °C. Díky tomu se získaly druhé největší výtěžky. Produkce kyseliny v případě sušené syrovátky byla 1,59 g·l⁻¹ a u odpadní 1,52 g·l⁻¹. Hodinové intervaly jsou znázorněny na grafu 9 a 10. Lze vidět, že *L.casei* začaly laktózu spotřebovávat jako substrát a metabolicky začaly tvořit kyselinu mléčnou, která je jejich primárním metabolitem. Opět spotřeba laktózy u odpadní syrovátky neodpovídá tvorbě kyseliny. Hodnoty o laktóze a kyselině mléčné jsou uvedeny v tabulkách 13 a 17.

Graf 11: Porovnání koncentrace kyseliny mléčné při různých teplotách kultivace – sušená syrovátka



Graf 12: Porovnání koncentrace kyseliny mléčné při různých teplotách kultivace – odpadní syrovátka

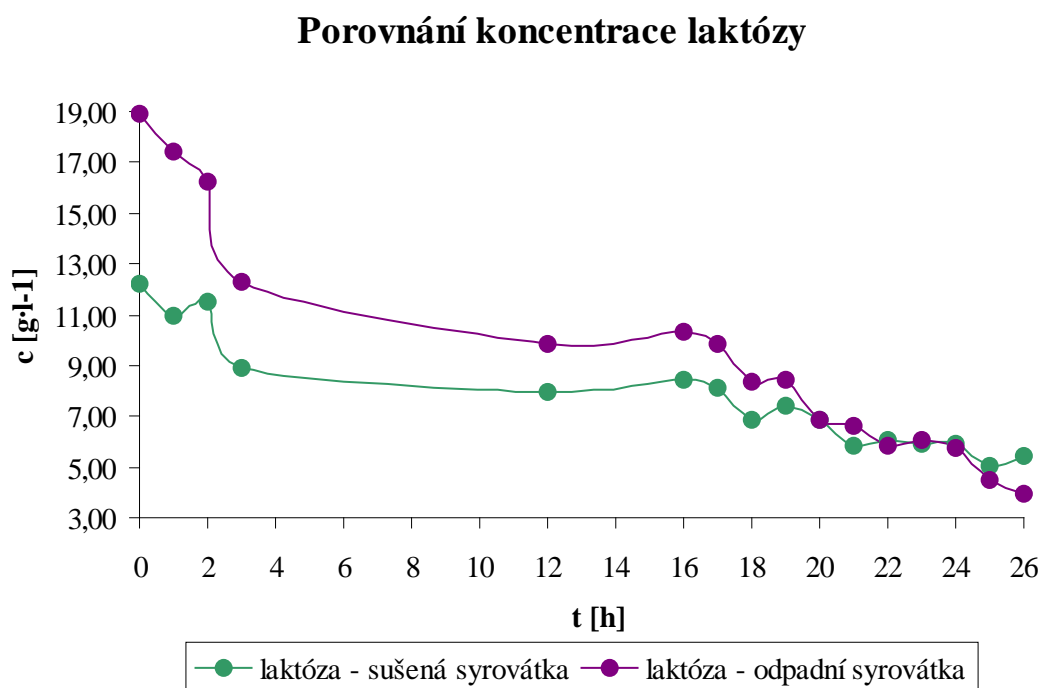


U všech studovaných teplot byly do grafů 11 a 12 pro srovnání produkce vyneseny počáteční hodnoty koncentrace kyseliny mléčné, maximálního výtěžku a hodnoty její koncentrace na konci kultivace. Z grafů je zcela jasné, že počátek kyseliny mléčné byl skoro stejný při všech teplotách. Maximální hodnota byla dosažena při teplotě 35 °C v obou případech. Proto je tato teplota považována za optimální pro produkci. Při této teplotě se prováděly zbylé kultivace. Nejméně vhodnou teplotou je 25 °C, kdy se získalo nejméně kyseliny mléčné. Po 26 hodinách byla stále nejvyšší hodnota kyseliny mléčné při teplotě 35 °C. Jelikož po 21. hodině při všech teplotách docházelo k poklesu kyseliny mléčné, byla kultivace při 26 hodinách zastavena. Při použití odpadní syrovátky byla spotřeba laktózy větší než při použití sušené syrovátky, tzn. že se laktóza spotřebovávala i na jiné metabolity. Ve článku [52] došly k názoru, že při použití *L. casei* byla optimální teplota 37 °C. V jiném článku byla teplota 28 °C hlášena také optimální pro *L. casei*. [53]

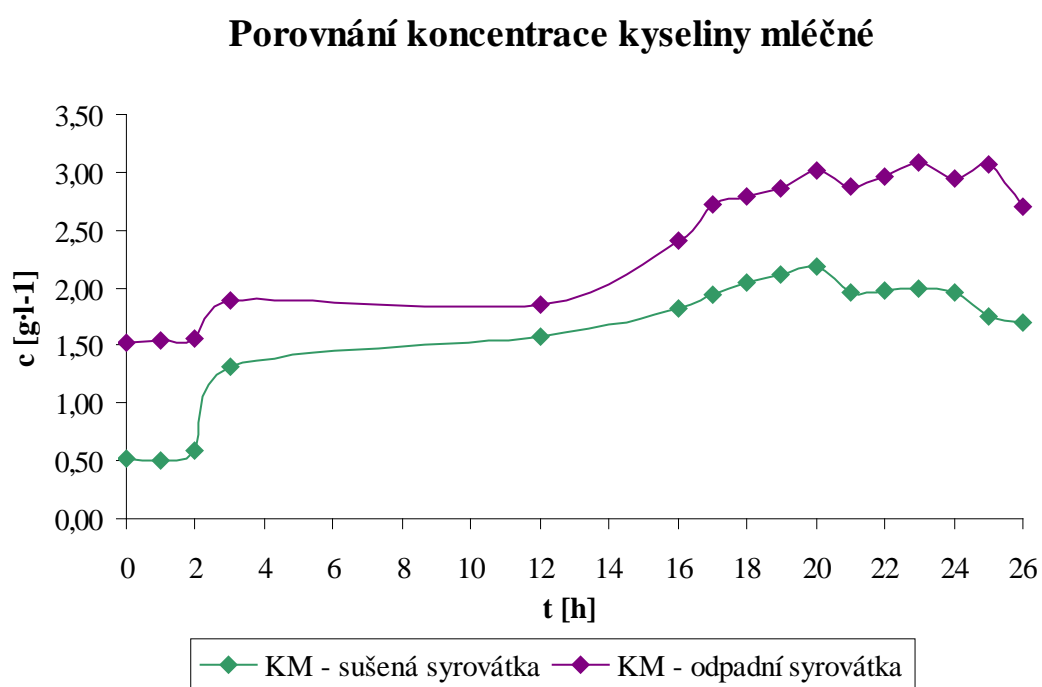
3.2.2 Porovnání tvorby kyseliny mléčné u sušené a odpadní syrovátky – optimalizace teploty

Výsledky potvrzují již jevy zjištěné u předešlých experimentů a to, že produkce metabolitu je významnější a intenzivnější při použití teploty 35 °C. Při porovnání s publikací [55] byla doba fermentace kratší, avšak bylo dosaženo nižších hodnot koncentrace kyseliny mléčné. Pravděpodobně způsobené tím, že byl použit jiný kmen kultury a kultivace nebyla prováděna ve fermentoru. [54]

Graf 13: Porovnání koncentrace laktózy při použití sušené a odpadní syrovátky při 35 °C



Graf 14: Porovnání koncentrace kyseliny mléčné při použití sušené a odpadní syrovátky při 35 °C



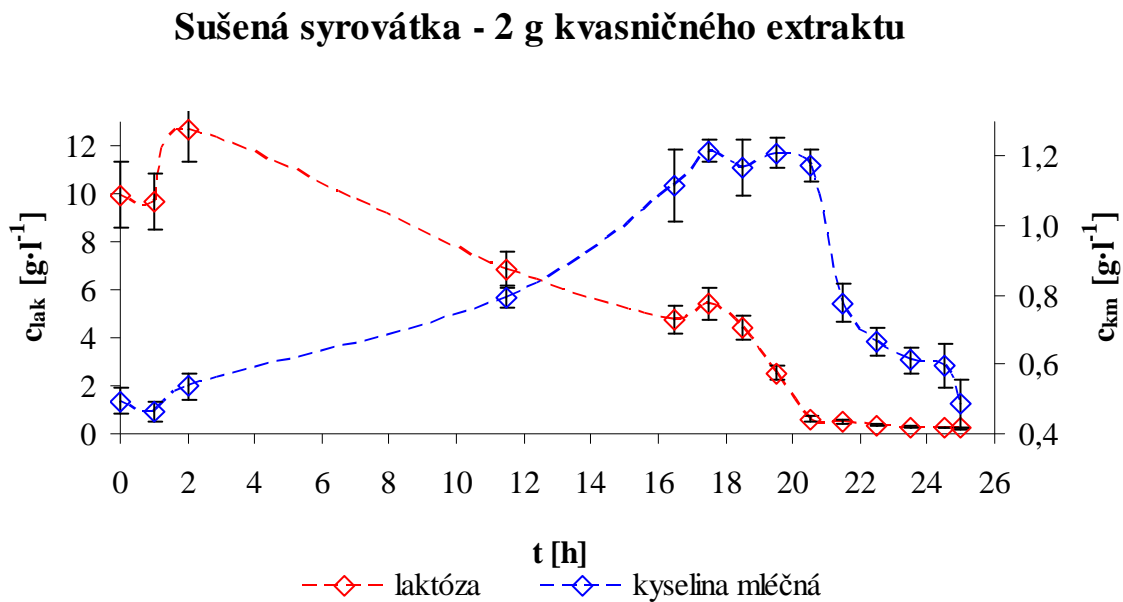
Z grafů 13 a 14 je patrné, že průběh nárůstu koncentrace kyseliny mléčné je v obou případech podobný. Avšak pokles laktózy tomu striktně neodpovídá. V případě odpadní syrovátky je vidět, že laktóza se pravděpodobně spotřebovává nejen na tvorbu kyseliny mléčné, ale i nějaké další metabolity, proto je průběh grafu strmější. V případě sušené syrovátky byla spotřeba laktózy 3 x menší než při použití odpadní. Nárůst koncentrace

kyseliny mléčné byl trochu větší u sušené syrovátky. U sušené syrovátky se získalo $1,66 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a u odpadní $1,56 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Ze zjištěných dat vyplývá, že sušená syrovátka je výhodnější.

3.2.3 Vliv množství kvasničného extraktu

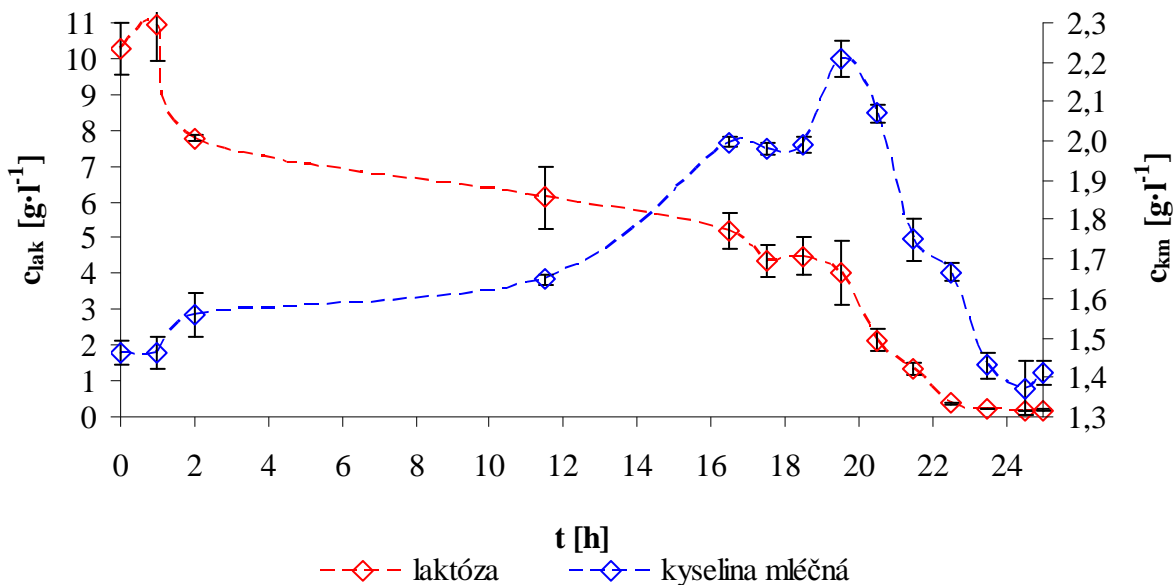
Vychází se z neoptimálnější teploty. Pro kultivaci byla tedy nastavena teplota $35 \text{ }^\circ\text{C}$. Výsledky byly porovnány i s hodnotami 5 a 6 g, které se použily v předešlé kultivaci. Díky zjištění, při optimalizaci teploty, že největší nárůst koncentrace kyseliny mléčné byl okolo 20. hodiny, byla zkrácena doba kultivace na 25 hodin. V této části budeme porovnávat koncentraci laktózy a kyseliny mléčné při použití různého množství kvasničného extraktu. Výsledky jsou zpracovány do grafů (13 – 20) a tabulek (18 – 23).

Graf 15: Spotřeba laktózy a tvorba kyseliny mléčné v závislosti na čase při použití 2 g kvasničného extraktu – sušená syrovátka



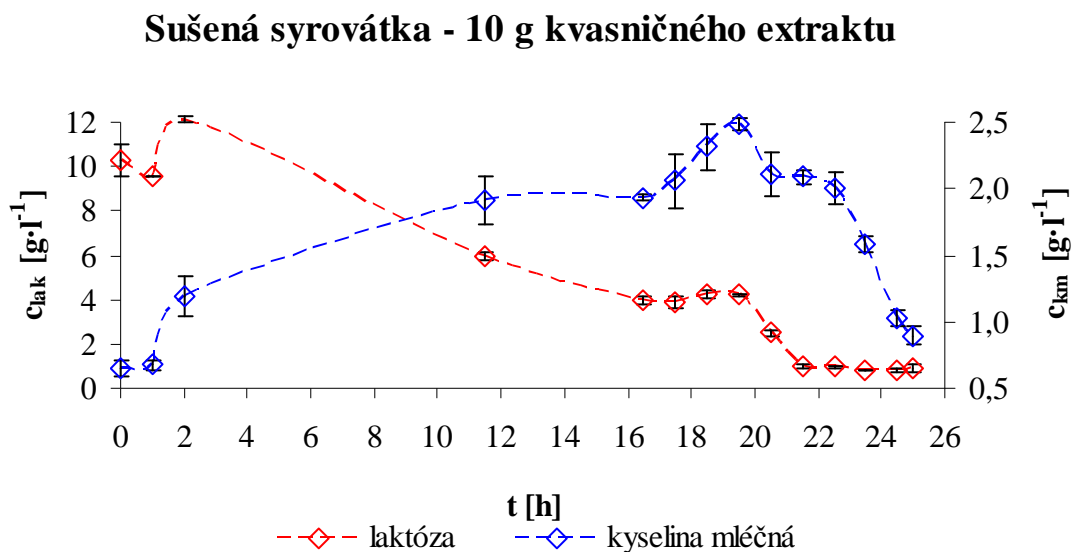
Graf 16: Spotřeba laktózy a tvorba kyseliny mléčné v závislosti na čase při použití 2,4 g kvasničného extraktu – odpadní syrovátka

Odpadní syrovátka - 2,4 g kvasničného extraktu

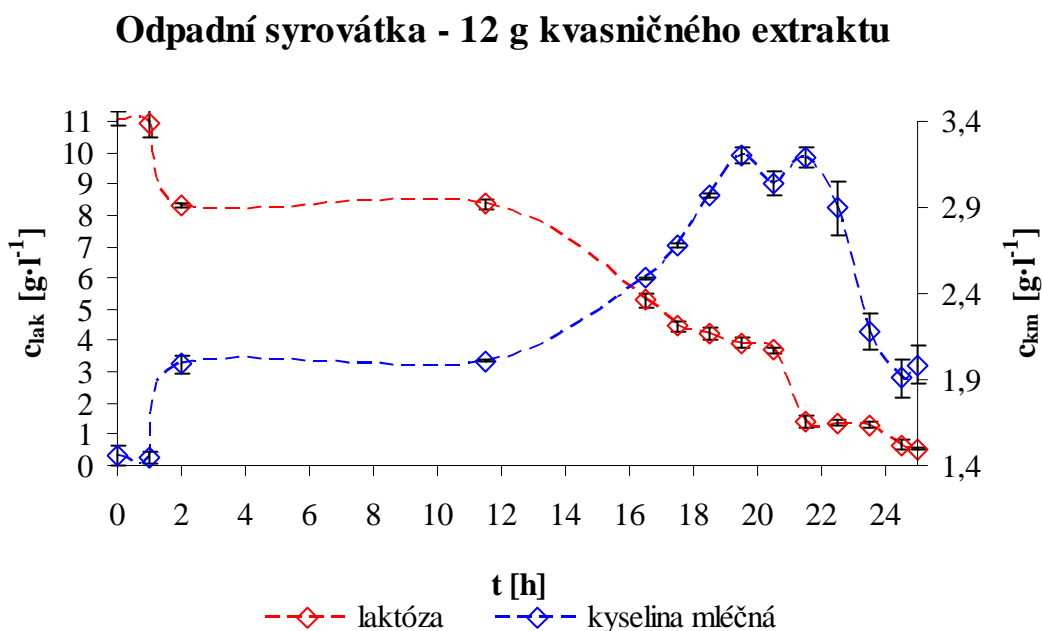


Z grafů 15 a 16 je patrné, že z počátku kultivace došlo k nárůstu laktózy, protože zatím nedocházelo ke tvorbě kyseliny mléčné. Výchozí koncentrace laktózy byla v obou případech skoro stejná a téměř spotřebována. Největší zisk kyseliny mléčné nastal při 17,5. hodině v případě sušené syrovátky, ale u odpadní nastal o 2 hodiny později. Nárůst koncentrace kyseliny mléčné byl $0,72 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a $0,75 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Ke konci kultivace opět dochází k poklesu koncentrace kyseliny mléčné, lze uvažovat, že se jedná o stacionární fázi. Spotřeba laktózy neodpovídá tvorbě kyseliny. Lze tedy říci, že snížením množství kvasničného extraktu ovlivníme tvorbu kyseliny mléčné. Data jsou shrnuta v tabulkách 18 a 21.

Graf 17: Spotřeba laktózy a tvorba kyseliny mléčné v závislosti na čase při použití 10 g kvasničného extraktu – sušená syrovátka

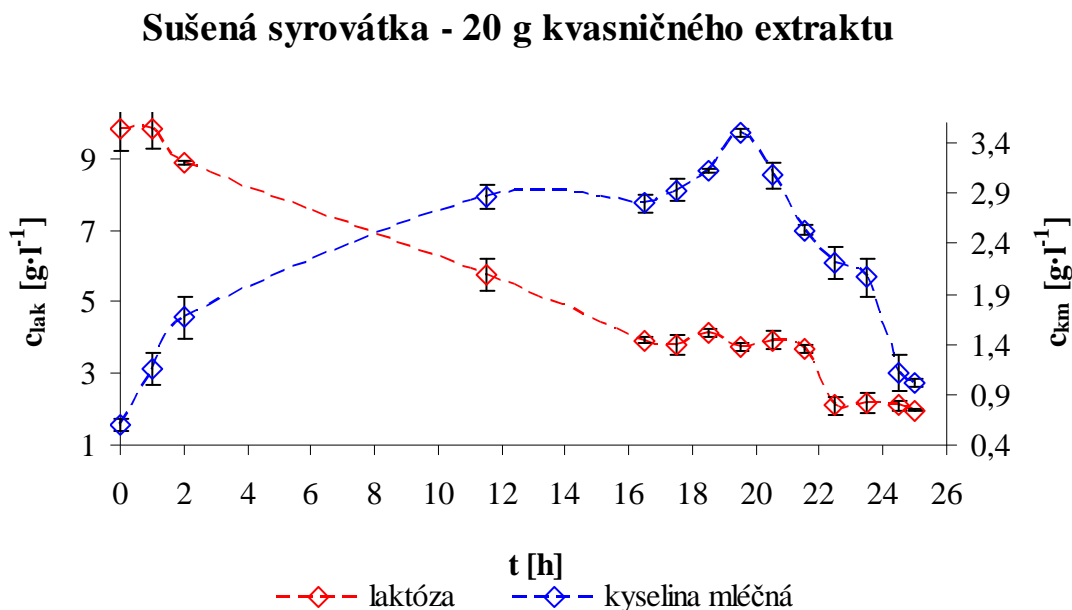


Graf 18: Spotřeba laktózy a tvorba kyseliny mléčné v závislosti na čase při použití 12 g kvasničného extraktu – odpadní syrovátka

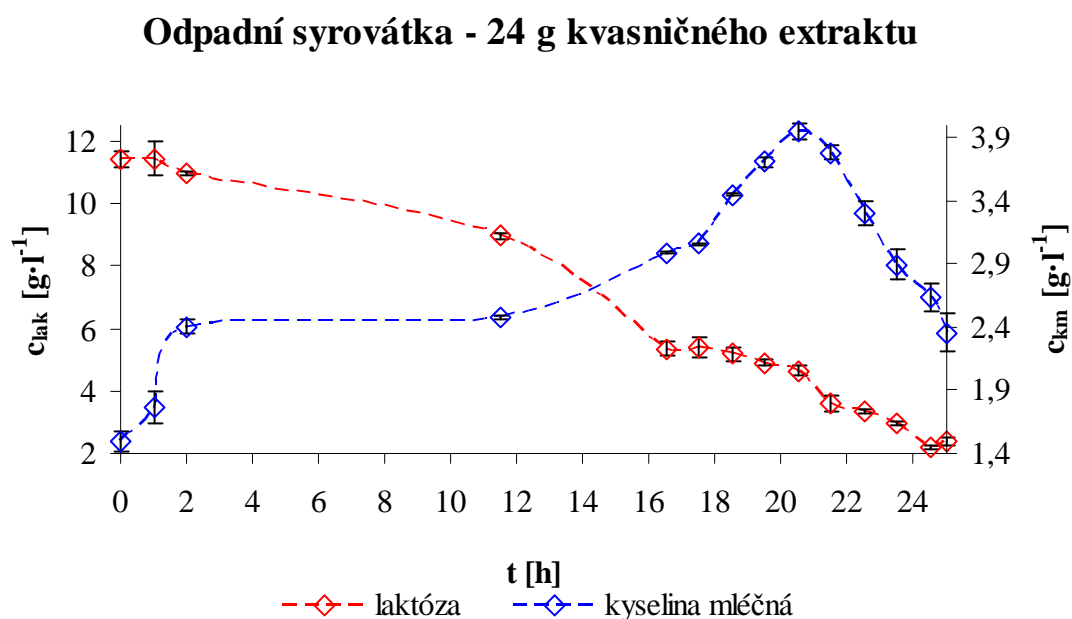


Z počátku kultivace došlo opět k mírnému nárůstu laktózy, protože zatím nedocházelo ke tvorbě kyseliny mléčné. Laktóza byla téměř spotřebována, což v těchto případech odpovídá tvorbě metabolitu. Při použití 10 g kvasničného extraktu se získala vyšší koncentrace kyseliny mléčné než při menších množstvích. Nárůst byl $1,84 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a $1,74 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Po 19,5. hodině dochází k poklesu tvorby kyseliny mléčné. Pravděpodobně se začala spotřebovávat jako substrát. Hodinové intervaly spotřeby laktózy a tvorby kyseliny mléčné jsou znázorněny na grafech 17 a 18. Data jsou shrnuta v tabulkách 19 a 22.

Graf 19: Spotřeba laktózy a tvorba kyseliny mléčné v závislosti na čase při použití 20 g kvasničního extraktu – sušená syrovátka



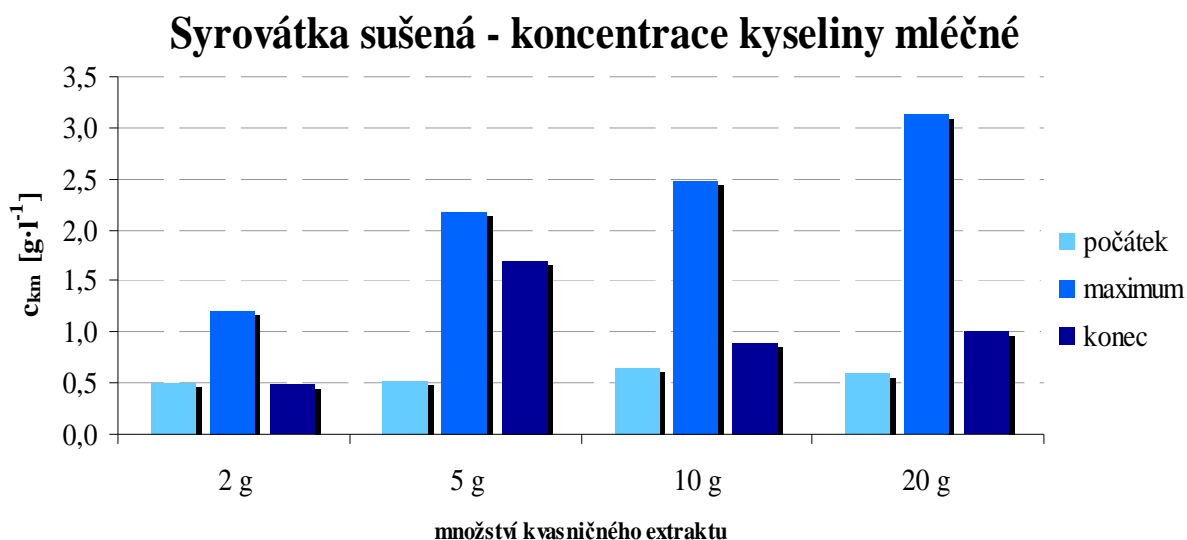
Graf 20: Spotřeba laktózy a tvorba kyseliny mléčné v závislosti na čase při použití 24 g kvasničního extraktu



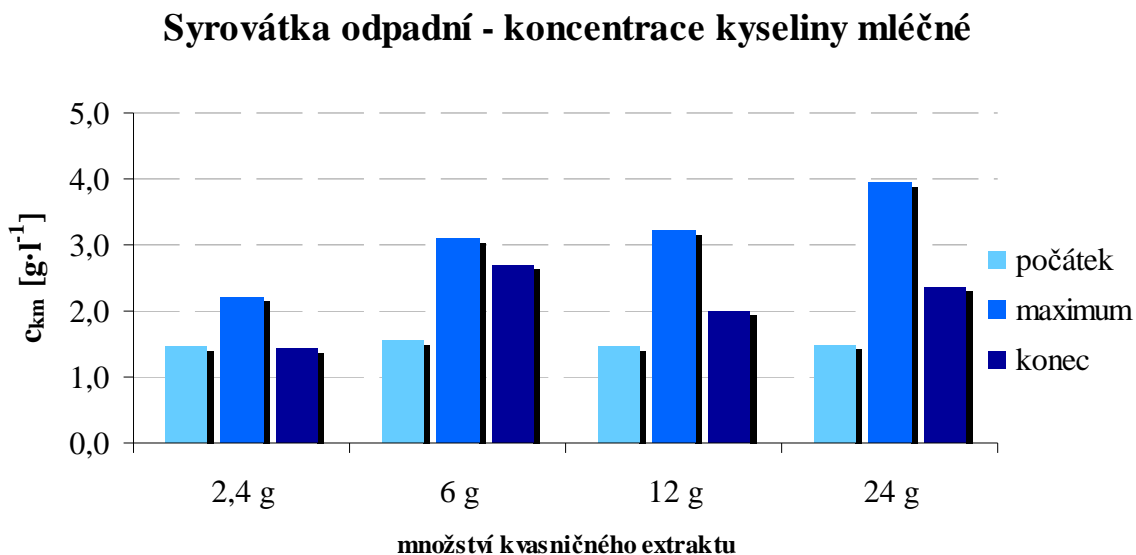
Největší produkce kyseliny mléčné byla při použití 20 a 24 g kvasničního extraktu. Z grafů 19 a 20 lze vyčíst, že od 1. hodiny se začala vytvářet kyselina mléčná. Nárůst kyseliny mléčné byl $2,9 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ a $2,45 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Po 20,5. hodině dochází k poklesu tvorby kyseliny mléčné. Pravděpodobně se začala spotřebovávat jako substrát a lze uvažovat, že nastala stacionární fáze. V tabulce 23 jsou uvedeny všechny hodnoty získané při měření. Tím, že byl získán

největší zisk kyseliny mléčné, tak toto množství se vyhodnotilo jako neoptimálnější a bylo použito pro další experimenty.

Graf 21: Porovnání koncentrace kyseliny mléčné při různých hodnotách kvasničného extraktu – sušená syrovátka



Graf 22: Porovnání koncentrace kyseliny mléčné při různých hodnotách kvasničného extraktu – odpadní syrovátka

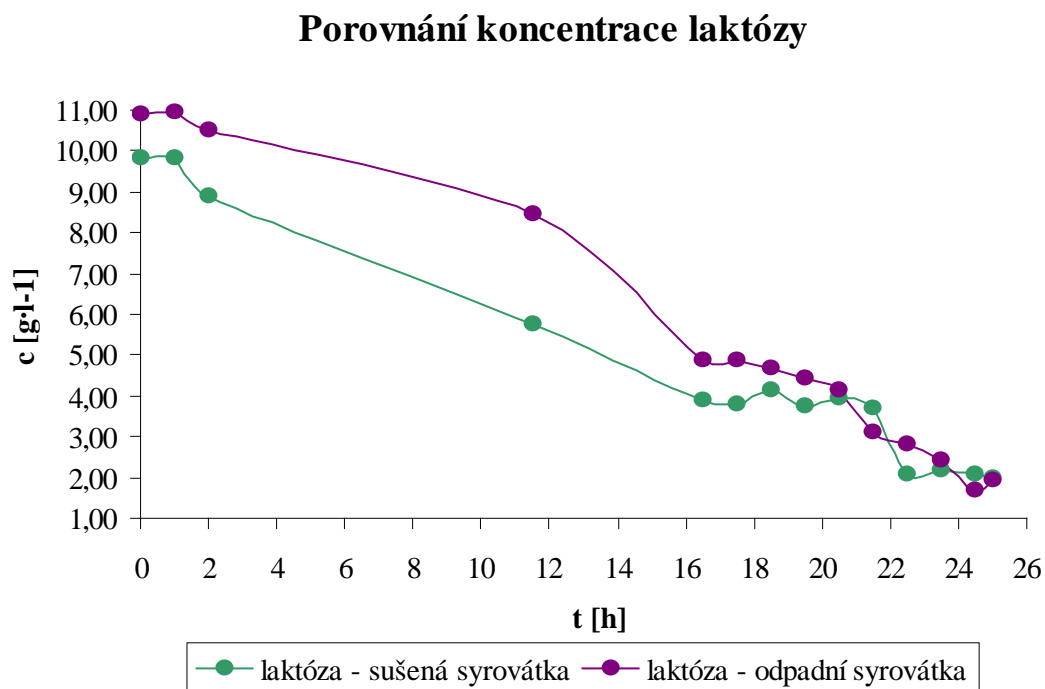


Na grafech 21 a 22 je porovnávána koncentrace kyseliny mléčné při všech hodnotách kvasničného grafu. Je zcela patrné, že neoptimálnější pro tvorbu kyseliny mléčné je použití 20 a 24 g kvasničného extraktu. V těchto případech se laktóza téměř spotřebovala. Nárůst koncentrace kyseliny mléčné byl větší při použití sušené syrovátky, protože u odpadní to bylo 2,45 g·l⁻¹ a u sušené 2,90 g·l⁻¹. Pravděpodobně způsobené tím, že se při použití odpadní syrovátky laktóza spotřebovala i na jiné vzniklé metabolity, které nebyly stanoveny.

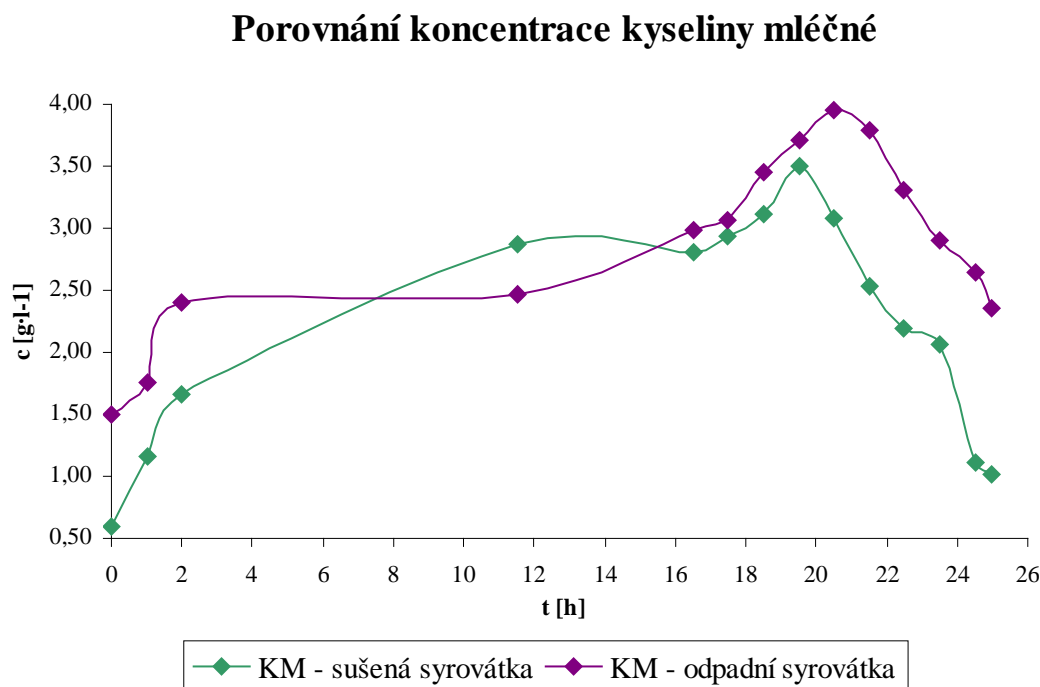
3.2.4 Porovnání tvorby kyseliny mléčné u sušené a odpadní syrovátky – vliv množství kvasničného extraktu

Výsledky nám potvrzují již jevy zjištěné u předešlých studií. [55] Bylo zjištěno, že je neoptimálnější použít větší množství kvasničného extraktu na získání maximální koncentrace kyseliny mléčné.

Graf 23: Porovnání koncentrace laktózy při použití sušené a odpadní syrovátky při 35 °C a množství kvasničného extraktu 20 g pro sušenou a 24 g pro odpadní syrovátku



Graf 24: Porovnání koncentrace kyseliny mléčné při použití sušené a odpadní syrovátky při 35 °C a množství kvasničného extraktu 20 g pro sušenou a 24 g pro odpadní syrovátku

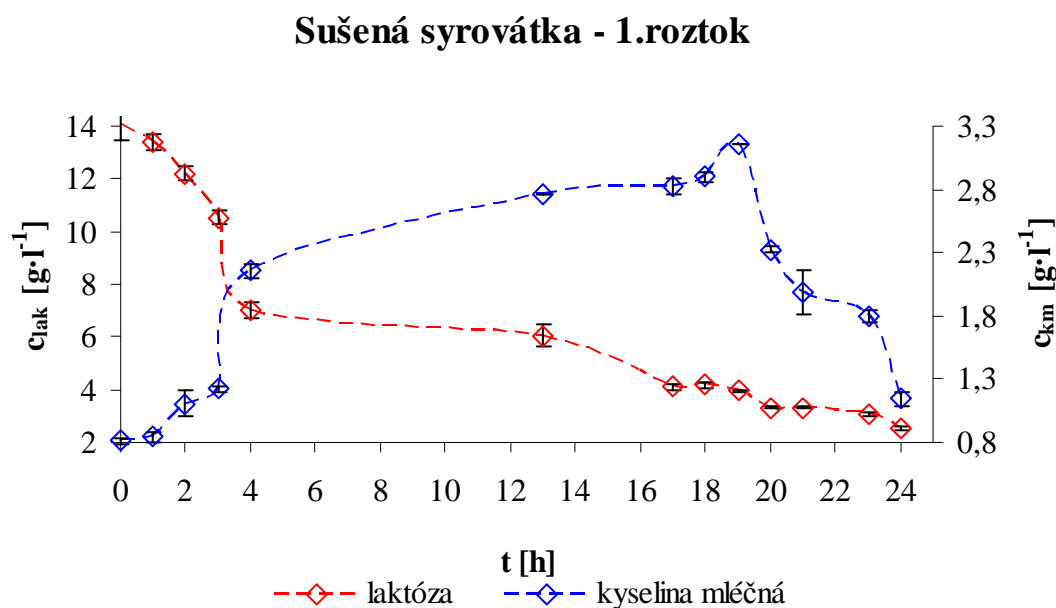


Z výsledků je vidět, že nejen teplota ovlivňuje tvorbu kyseliny mléčné, ale i změna množství kvasničného extraktu ovlivňuje její tvorbu. Je tedy potvrzena předešlá studie na toto téma. [55] Na grafech 23 a 24 je vidět, že sice spotřeba laktózy byla téměř stejná u sušené i odpadní syrovátky, ale získala se větší koncentrace kyseliny mléčné v případě sušené syrovátky. Původní hodnota kyseliny se naměřila $0,6 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a její největší hodnota byla $3,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v 19,5. hodině. Nárůst tedy činil $2,9 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v případě použití sušené syrovátky. Kdežto při použití odpadní syrovátky byl nárůst $2,45 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Znovu se tedy potvrdilo, že je sušená syrovátka vhodnější. V prvním experimentu se měnila pouze teplota, nárůst kyseliny mléčné byl $1,66 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a $1,56 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Při změně množství kvasničného extraktu koncentrace kyseliny mléčné opět vzrostla.

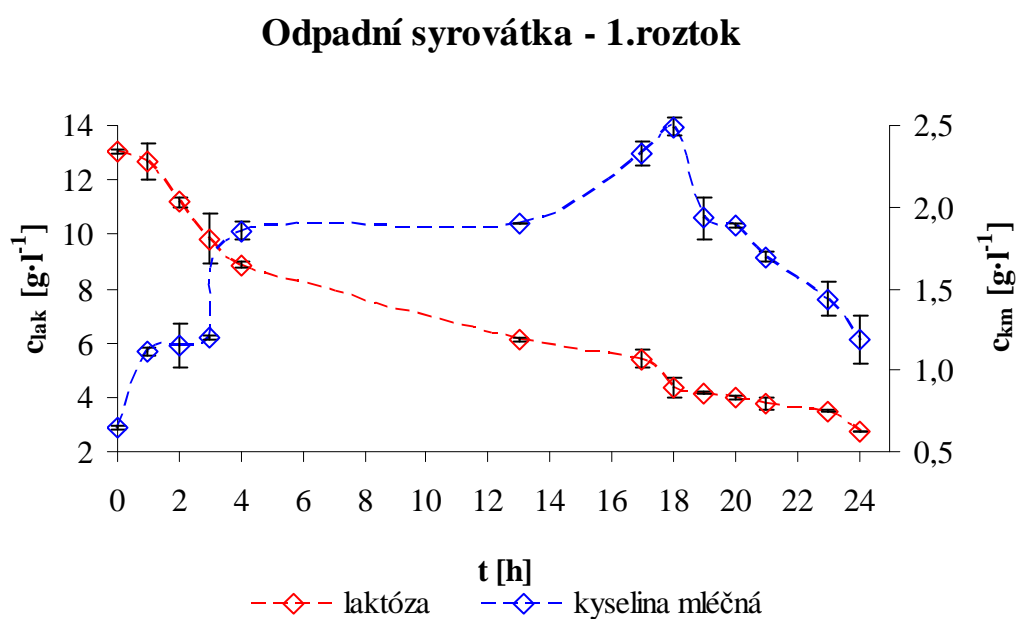
3.2.5 Vliv koncentrace solí

Nakonec byly provedeny se 4 různými kombinacemi výchozích solí dle předešlé studie. [55] Pro první bylo použito MgSO_4 a $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$. Pro druhý roztok se použili K_2HPO_4 , KH_2PO_4 a MgSO_4 . Pro třetí se zvolila navážka těchto solí K_2HPO_4 , KH_2PO_4 a $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$. Ve čtvrtém roztoku byl použit pouze $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$. V poslední části jsou porovnány a diskutovány výsledky při změně použitých solí. [54]

Graf 25: Spotřeba laktózy a tvorba kyseliny mléčné v závislosti na čase pro první roztok – sušená syrovátka

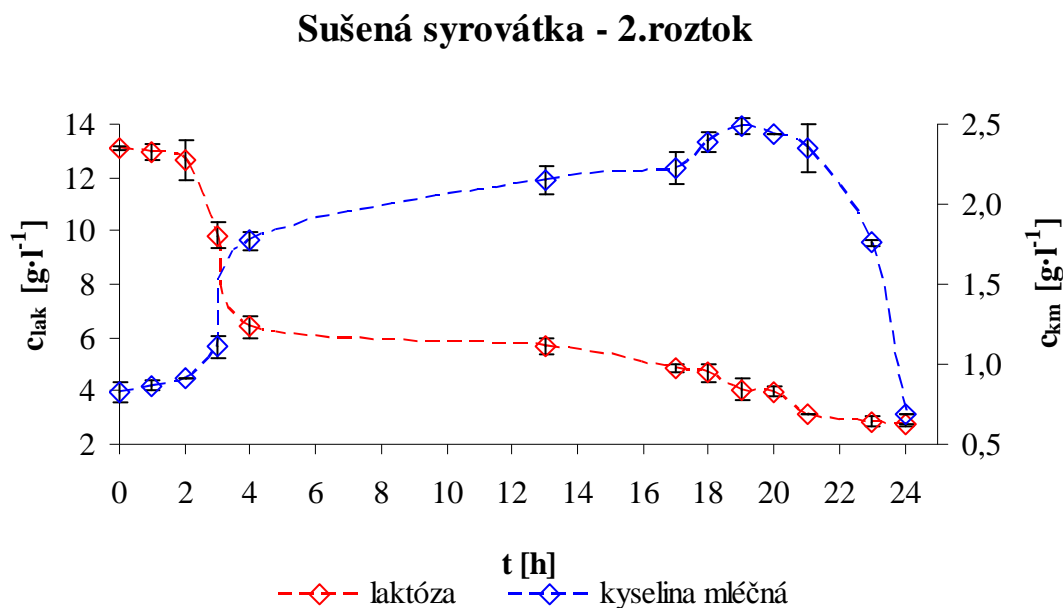


Graf 26: Spotřeba laktózy a tvorba kyseliny mléčné v závislosti na čase pro první roztok – odpadní syrovátka

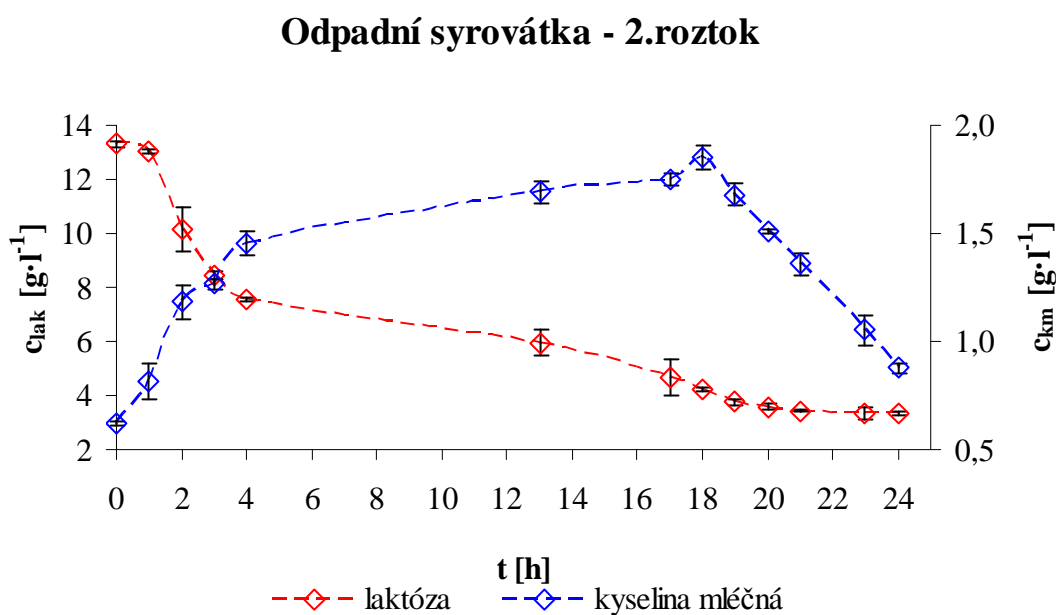


Na grafech 25 a 26 lze vidět, že počáteční koncentrace laktózy byla $13,57 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a $12,55 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Z počátku kultivace dochází k mírnému poklesu laktózy. Až od 3. hodiny dochází k většímu poklesu, protože se více začala tvořit kyselina mléčná. Došlo k nárůstu kyseliny mléčné o $2,35 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a $1,84 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v případě odpadní syrovátky. Po 18. hodině došlo k poklesu. Pokles byl způsoben tím, že se kyselina mléčná nejspíše začala spotřebovávat jako substrát. Spotřeba laktózy odpovídá tvorbě kyseliny mléčné. Data jsou shrnuta v tabulkách 24 a 28.

Graf 27: Spotřeba laktózy a tvorba kyseliny mléčné v závislosti na čase pro druhý roztok – sušená syrovátka



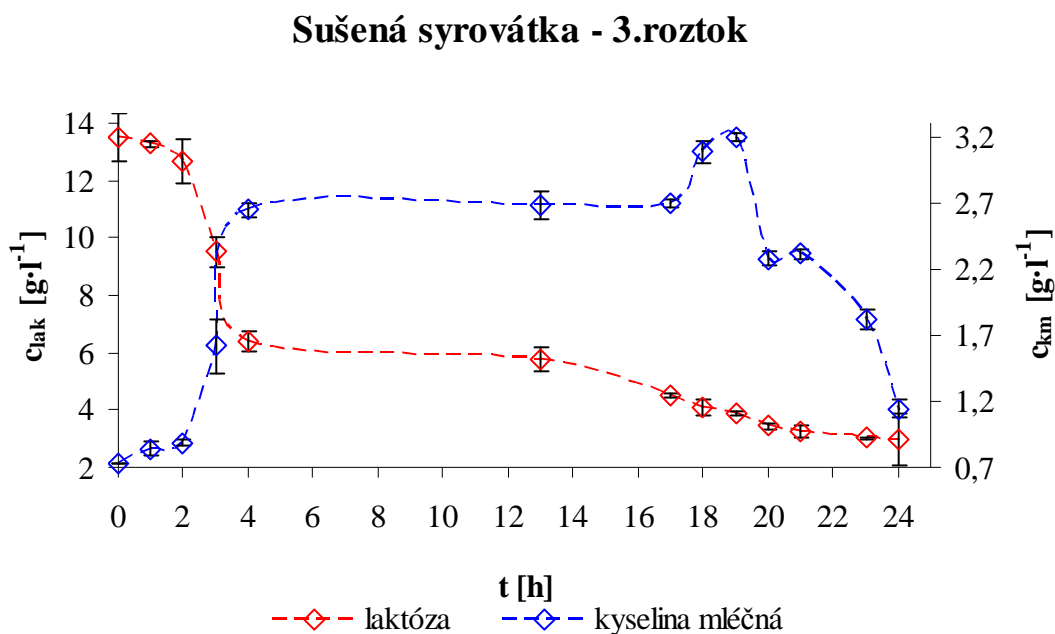
Graf 28: Spotřeba laktózy a tvorba kyseliny mléčné v závislosti na čase pro druhý roztok – odpadní syrovátka



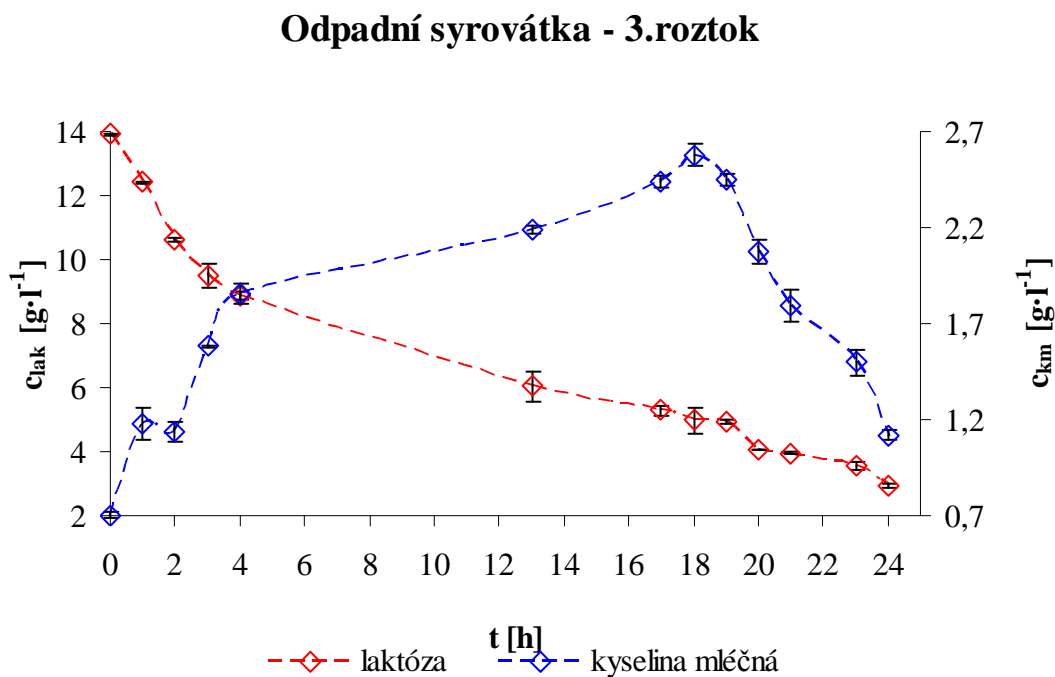
Použitím K_2HPO_4 , KH_2PO_4 a $MgSO_4$ se získalo koncentrace kyseliny mléčné $2,49 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, což je méně než při použití $MgSO_4$ a $MnSO_4\cdot H_2O$. Potvrdilo se, že vynecháním $MnSO_4\cdot H_2O$ dojde k poklesu koncentrace kyseliny. Laktóza se od začátku kultivace začala činností *L.casei* spotřebovávat jako substrát a *L.casei* začaly produkovat kyselinou mléčnou, která je jejich primárním metabolitem. Na grafech 27 a 28 je vidět, že koncentrace kyseliny mléčné s časem roste a po 19. hodině klesá, tzn. že se bakterie přestaly množit. Lze uvažovat,

že nastala fáze stacionární. Získalo se $1,66 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a $1,24 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ kyseliny mléčné. Data jsou shrnuta v tabulkách 25 a 29.

Graf 29: Spotřeba laktózy a tvorba kyseliny mléčné v závislosti na čase pro třetí roztok – sušená syrovátka



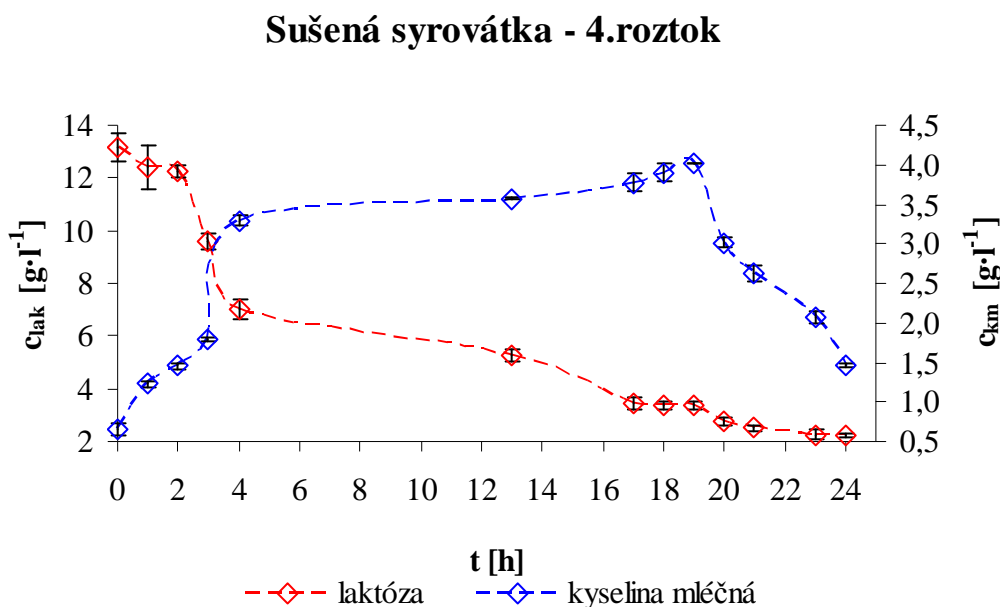
Graf 30: Spotřeba laktózy a tvorba kyseliny mléčné v závislosti na čase pro třetí roztok – odpadní syrovátka



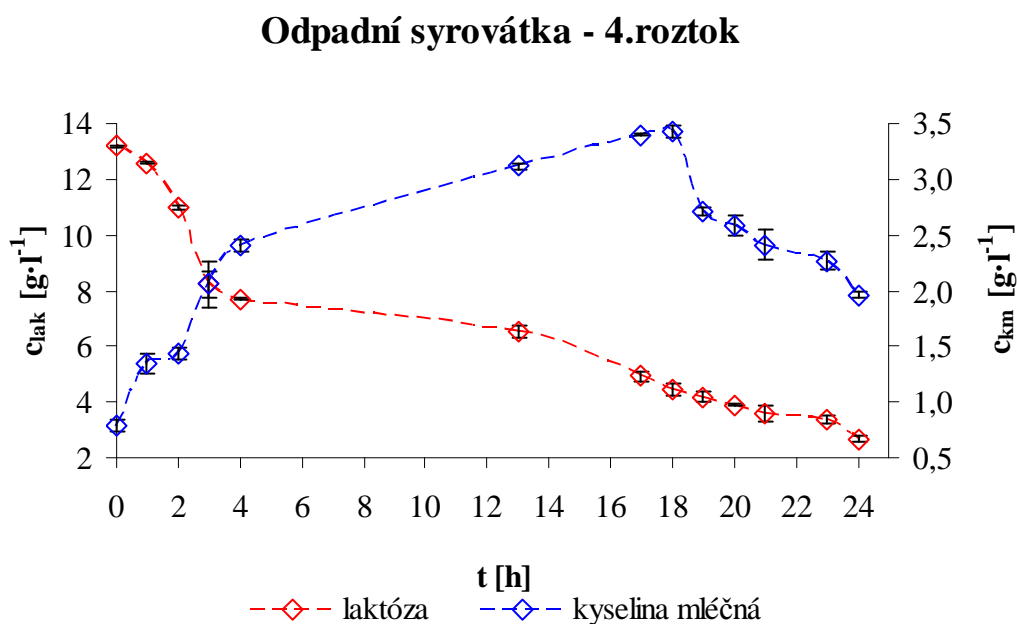
Použití třetího roztoku je výnosnější než při použití prvního a druhého. Výsledky jsou zpracované na grafech 29 a 30. Je vidět, že pokles koncentrace laktózy je velmi podobný.

V obou případech největší nárůst kyseliny mléčné nastal až v 19. hodině. Ke konci kultivace zase dochází k poklesu koncentrace kyseliny mléčné, lze uvažovat, že nastala stacionární fáze. Spotřeba laktózy byla $10,55 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a $10,97 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Nárůst koncentrace kyseliny mléčné byl $2,46 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a $1,87 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Měření se dosáhlo stejných výsledků jak v předešlých studiích. [55] Podrobnější hodnoty nalezneme v tabulkách 26 a 30.

Graf 31: Spotřeba laktózy a tvorba kyseliny mléčné v závislosti na čase pro čtvrtý roztok – sušená syrovátka

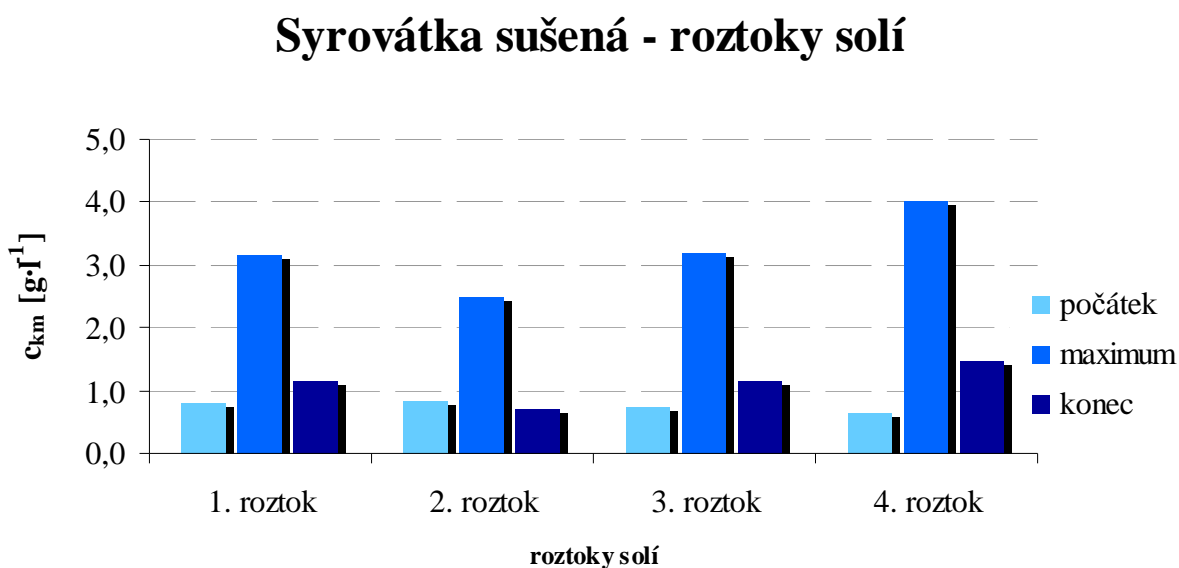


Graf 32: Spotřeba laktózy a tvorba kyseliny mléčné v závislosti na čase pro čtvrtý roztok – odpadní syrovátka

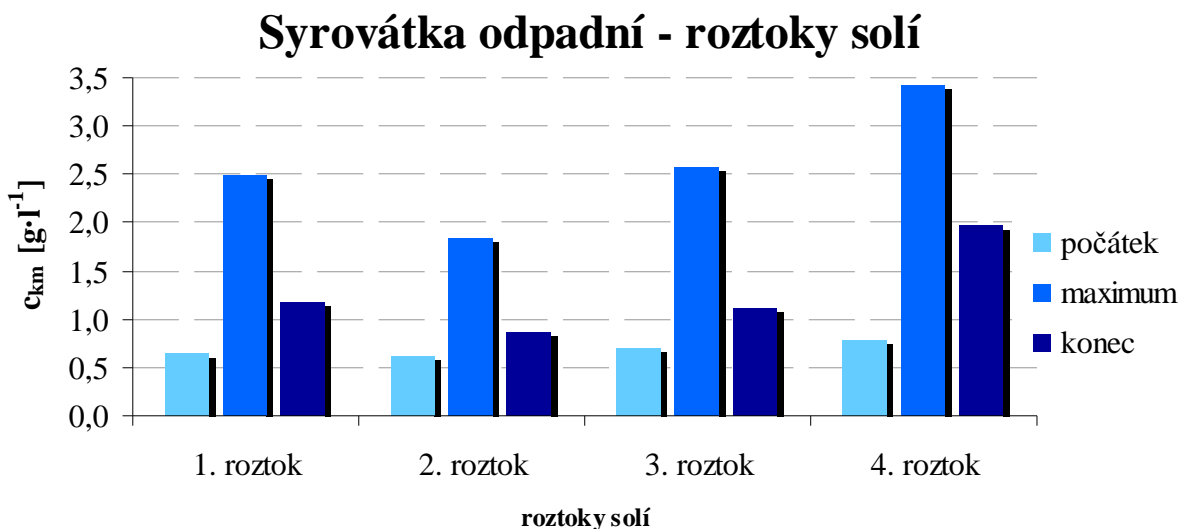


Při použití pouze $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ byla získána koncentrace $4,02 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ kyseliny mléčné u sušené syrovátky. Hodnota nárůstu je $3,37 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, což je nejvíce. Nárůst v případě použité odpadní syrovátky byl $2,64 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Po 19. hodině dochází k poklesu tvorby kyseliny mléčné. Nastala stacionární fáze. Spotřeba laktózy odpovídá tvorbě kyseliny mléčné. Hodinové intervaly spotřeby laktózy a tvorby kyseliny mléčné jsou znázorněno na grafech 31 a 32. Tím, že byla získána největší koncentrace kyseliny mléčné, byl tento roztok vyhodnocen jako neoptimálnější. Potvrdila se teorie, že použitím pouze $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ získáme nejvíce tohoto metabolitu. [55] V tabulkách 27 a 31 jsou uvedeny všechny hodnoty, získané při měření.

Graf 33: Porovnání koncentrace kyseliny mléčné při různých koncentracích použitých solích – sušená syrovátka



Graf 34: Porovnání koncentrace kyseliny mléčné při různých koncentracích použitých solích – odpadní syrovátka



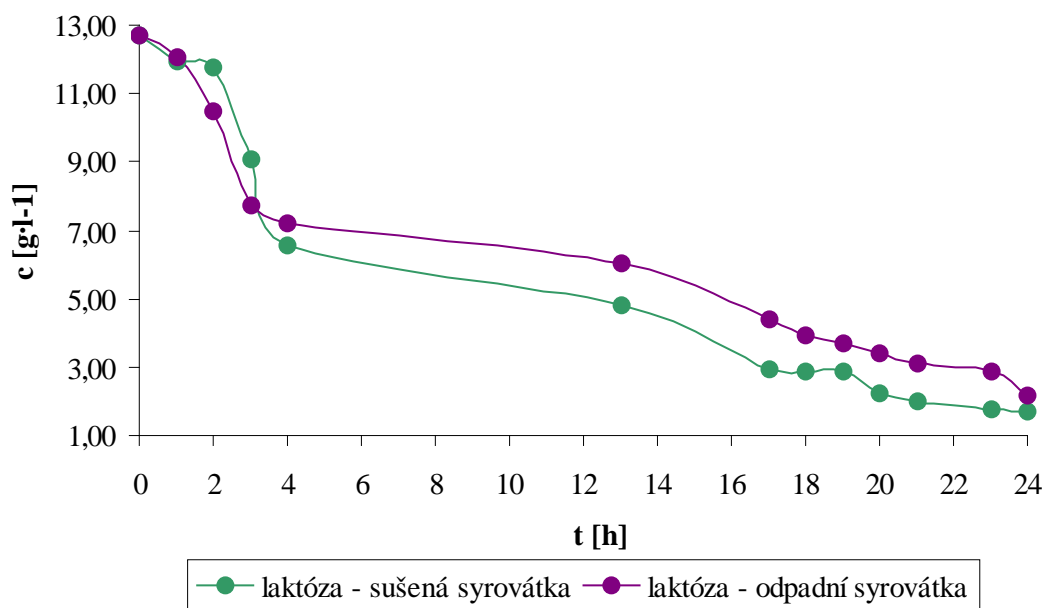
Z grafů 33 a 34 je zcela patrné, že neoptimálnější je použití pouze $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, při kterém se získá nejvyšší koncentrace kyseliny mléčné. Nevhodné je použití K_2HPO_4 , KH_2PO_4 a MgSO_4 , při kterém se dosáhlo nejméně tohoto metabolitu. Porovnáním koncentrace kyseliny mléčné u sušené a odpadní syrovátky, bylo zjištěno, že při použití sušené byla koncentrace kyseliny mléčné znovu větší než při použití odpadní syrovátky.

3.2.6 Porovnání tvorby kyseliny mléčné u sušené a odpadní syrovátky – vliv koncentrace solí

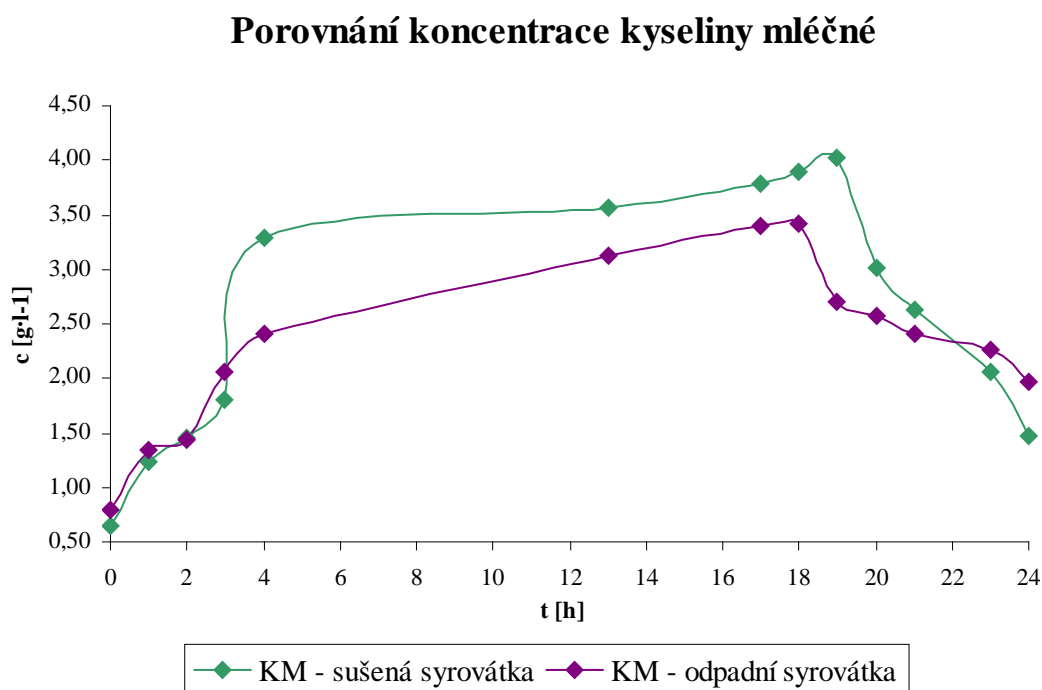
Ze zjištěných údajů při prvním a druhém experimentu se měnily koncentrace solí. Teplota byla $35\text{ }^\circ\text{C}$ a množství kvasničného extraktu bylo 20 g pro sušenou syrovátku a 24 g pro odpadní syrovátku.

Graf 35: Porovnání koncentrace laktózy při použití sušené a odpadní syrovátky při $35\text{ }^\circ\text{C}$ a množství kvasničného extraktu 20 g pro sušenou a 24 g pro odpadní syrovátku a použití čtvrtého roztoku

Porovnání koncentrace laktózy



Graf 36: Porovnání koncentrace kyseliny mléčné při použití sušené a odpadní syrovátky při 35 °C a množství kvasničného extraktu 20 g pro sušenou a 24 g pro odpadní syrovátku a použití čtvrtého roztoku



Při posledním experimentu se vyhodnotilo, že použitím pouze $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ získáme největší koncentraci kyseliny mléčné. Pokud z média odstraníme tuto sůl dojde k poklesu tvorby kyseliny. Potvrdila se předešlá studie. [55] Grafy 35 a 36 porovnávají koncentraci laktózy a kyseliny mléčné u sušené a odpadní syrovátky. Spotřeba laktózy v obou případech je skoro shodná, ale spotřeba laktózy v případě odpadní syrovátky neodpovídala tvorbě kyseliny mléčné. Kdežto v případě sušené syrovátky se získala koncentrace kyseliny mléčné $3,37 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ oproti původní hodnotě. V obou případech po 19,5. hodině začala klesat koncentrace kyseliny mléčné. Nastala tedy stacionární fáze.

4 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo porovnání produkce kyseliny mléčné na odpadní a sušené syrovátce a potvrzení či vyvrácení faktu, že koncentrace solí a množství kvasničného extraktu ovlivňuje její tvorbu. Teplota, množství kvasničného extraktu a koncentrace solí se optimalizovali pro zvýšení využití laktózy a produkce kyseliny mléčné ze syrovátkového média. Pro kultivaci byla použita kultura *Lactobacillus casei* CCM 4978.

V souladu s literaturou [54, 55] se jako optimální způsob pro sledování změn obsahu laktózy a během fermentace vznikajících metabolitů ukázala metoda HPLC. Její analýzou se zjistil obsah laktózy a hlavního metabolitu, tedy kyseliny mléčné, u bakterií *L.casei*. Po sestavení kalibrační křivky ze standardů se zjistila, dle retenčního času píku, daná látka a následně se prostřednictvím plochy píku vypočítala její koncentrace ve vzorku.

Pro kultivaci v Erlenmayerových baňkách se vzhledem k předem zjištěným datům [55] použilo MRS médium tohoto složení: 5 g kvasničného extraktu, 0,25 g K_2HPO_4 , 0,25 g KH_2PO_4 , 0,196 g $MgSO_4$ a 0,05 g $MnSO_4 \cdot H_2O$ pro sušenou syrovátku a pro odpadní syrovátku se MRS médium skládalo z 6 g kvasničného extraktu, 0,3 g K_2HPO_4 , 0,3 g KH_2PO_4 , 0,235 g $MgSO_4$ a 0,06 g $MnSO_4 \cdot H_2O$. Takto připravené MRS médium bylo použito při optimalizaci teploty zvolené v rozmezí 25 – 40 °C.

Růst bakterií ve fermentačním médiu ovlivňují různé faktory. Vedle komplexu nutričních požadavků je jedním z nejdůležitějších faktorů, ovlivňujícím růst bakterií mléčného kvašení, teplota. Tu hledáme optimální, která nám zaručí nejvyšší růst bakterií. Jakmile je teplota pod nebo nad optimálním růstem, mikrobiální aktivita je podstatně snížena a mikroorganismy mohou eventuelně hynout. Při kultivaci daného mikroorganismu byly podmínky kultivace nastaveny na optimum. Je známo, že optimální teplota pro *L.casei* je 37 °C. Produkce kyseliny mléčné fermentací může být uskutečněna při srovnatelných teplotách. Proto byly zvoleny tyto teploty: 25, 30, 35 a 40 °C. Při hledání neoptimálnější teploty se došlo k závěru, že při teplotě 35 °C u sušené syrovátky se získá nejvyšší koncentrace kyseliny mléčné. Na počátku kultivace je koncentrace u všech čtyřech teplotách téměř stejná, avšak při teplotě 35 °C byl nárůst koncentrace 1,66 g·l⁻¹ a získalo se 2,18 g·l⁻¹. Při použití odpadní syrovátky byla také vyhodnocena teplota 35 °C jako neoptimálnější. Při srovnání se sušenou syrovátkou se získalo méně kyseliny mléčné i přesto, že počáteční hodnota laktózy byla vyšší než při použití sušené. Spotřeba laktózy neodpovídala tvorbě kyseliny mléčné. Pravděpodobně se laktóza v případě odpadní syrovátky spotřebovávala ještě na jiné metabolity. V obou případech došlo k poklesu koncentrace tohoto metabolitu kolem 19. – 22. hodině, proto v dalším experimentu se snížila doba kultivace. Mohlo to být tím, že kultura *L.casei* dosáhla stacionární fázi. Snížení doby fermentace je navíc výhodné pro zlepšení ekonomiky procesu.

Další část byla věnována optimalizaci množství použitého kvasničného extraktu. Znovu se potvrdilo, že kvasniční extrakt má vliv na tvorbu kyseliny mléčné, tak jak to uvádějí předešlé studie. Snížením množství došlo k velkému poklesu koncentrace kyseliny mléčné. Při použití 2 g kvasničného extraktu u sušené syrovátky byla spotřeba laktózy 97 %, ale koncentrace kyseliny mléčné se zvýšila pouze o 0,72 a 0,75 g·l⁻¹. Lze tedy říct, že čím více bude použito kvasničného extraktu, tím více získáme tohoto metabolitu. Proto při použití 20 g

kvasničného extraktu při sušené syrovátce se naměřily maximální koncentrace. Nárůst oproti počátku byl $2,9 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. U odpadní syrovátky se vyhodnotilo jako neoptimálnější množství 24 g. V tomto případě bylo získáno $3,95 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a nárůst koncentrace kyseliny mléčné byl $2,45 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Z výsledků je patrné, že se získalo více kyseliny mléčné než při prvním experimentu.

V poslední části se měnily použité soli. Protože při optimalizaci množství kvasničného extraktu bylo zase potvrzeno, že maximální hodnoty koncentrace kyseliny mléčné byly získány kolem 20. hodiny, snížila se doba fermentace a to na 24 hodin. Použitím pouze $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ se zjistilo, že získáme nejvyšší koncentraci kyseliny mléčné. Toto udávají i předešlá studie. [55] Jako nejméně vhodné je použití K_2HPO_4 , KH_2PO_4 a MgSO_4 . Spotřeba laktózy v obou případech je skoro stejná. U odpadní syrovátky nicméně spotřeba neodpovídala tvorbě kyseliny mléčné. Laktóza se pravděpodobně spotřebovávala i na jiné metabolity než jen kyselinu mléčnou. V případě sušené syrovátky se zvýšila koncentrace kyseliny o $3,37 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Pravděpodobně stacionární fáze nastala po 19,5. hodině. Porovnáním koncentrace kyseliny mléčné u sušené a odpadní syrovátky se zjistilo, že při použití sušené byla koncentrace kyseliny mléčné větší než při použití odpadní syrovátky

Diplomovou prací byly potvrzeny teoretické znalosti, že laktóza slouží jako zdroj uhlíku pro růst mikroorganismů a dále je vlivem metabolických drah spotřebovávána pro vznik metabolitů, v tomto případě se jedná o kyselinu mléčnou. Nárůst koncentrace kyseliny mléčné byl ve všech případech větší při použití sušené syrovátky. Pravděpodobně způsobené tím, že se při použití odpadní syrovátky laktóza spotřebovala i na jiné vzniklé metabolity, které nebyly stanoveny. Při srovnání s dřívější publikací [55] bylo potvrzeno, že čím větší množství kvasničného extraktu použijeme, tím více získáme kyselinu mléčnou a také že nejvhodnější je použít pouze $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$. Použitím jiného kmene kultury se získala menší koncentrace primárního metabolitu, jak u sušené, tak i odpadní syrovátky. Pokud tedy budeme uvažovat pouze o ušetření nákladů při průmyslové výrobě, je vhodné použít tento kmen kultury a jako substrát využít sušenou syrovátku. Nicméně v případě získání větší produkce je lepší využít jiného kmene.

5 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] ČEPIČKA, J. a kol.: *Obecná potravinářská technologie*, VŠCHT Praha, 1.vyd., 1995, 246 s., ISBN 80-7080-239-1.
- [2] VACOVÁ, T.: *Mlieko a mliečne prípravky vo výžive*, nakl. Alfa, Bratislava, 1986, 216 s., ISBN 63-033-86
- [3] KADLEC, P. a kol.: *Technologie potravin II*, vyd. VŠCHT, Praha, 1. vyd., 2008, 236 s., ISBN 978-80-7080-510-7.
- [4] PELIKÁN, M., DUDÁŠ, F., MÍŠA, D.: *Technologie kvasného průmyslu*, vyd. Mendlova zemědělská a lesnická univerzita, Plzeň, 2002, 2. vyd., 129 s., ISBN 80-7157-578-X.
- [5] *Československý lékopis – Pharmacopoea bohemoslovakia*, zdravotnické nakladatelství, Avicenum, 4. vyd., Praha, 1987, str. 34-35, ISBN 2383-227-88.
- [6] MASÁK, J., PLACHÝ, J., PELECHOVÁ, J.: *Speciální mikrobiální technologie*, vyd. VŠCHT, Praha, 1992, 300 s., ISBN 92-63-1892.
- [7] PURAC: *Werbung bohemia*, 2003, [online], [cit. 2012-04-01]. Dostupný z WWW: <<http://www.ifcfood.cz/dodav.htm>>.
- [8] VODRÁŽKA, Z.: *Biochemie*, Academia, Praha, 2002, ISBN 978-80-200-0600-4.
- [9] KOMÍNEK, J., KAŠČÁK, J.S., ROEHR, M.: *Biotechnology sekond edition*, 1996, Volume editors, Produkt of primary metabolism, ISBN 3-527-28316-1.
- [10] VESELÁ, M., DRDÁK, M.: *Praktikum z obecné mikrobiologie*, Brno, 1999, VUT Brno, 88 stran, ISBN 80-214-1305-0.
- [11] ŠILHÁNKOVÁ, L.: *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*, Academia, Praha, 2002, 363 stran, ISBN 80-200-1024-6.
- [12] GÖRNER, F., VALÍK, L.: *Aplikovaná mikrobiológia poživatin*, Malé centrum, 524 s., Bratislava, 2004, ISBN 80-967064-9-7.
- [13] VELÍŠEK, J.: *Chemie potravin II*, OSSIS, Tábor, 2002, 303 s., ISBN 80-86659-01-1.
- [14] BALCAR, a kol.: *Výroba sušených a zahuštěných mléčných výrobků*, vyd. SNTL, Praha, 1978, 328 s., 04-824-78.
- [15] UNIVERSITY OF GUELPH. *Dairy Science and Technology* [online]. 2010 [cit. 2012-02-25], Dairy Chemistry and Physics. Dostupné z WWW: <<http://www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/chem.html>>.
- [16] HOZA, I.; KRAMÁŘOVÁ, D. *Potravinářská biochemie I*. Zlín : Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2005. 168 s. ISBN 80-7318-295-5.
- [17] ROGINSKI, Hubert. *Encyklopedia of Dairy Science*. London : Academic Press, 2003, ISBN 0-12-227235-8.
- [18] WALZEM, R. L. Health enhancing properties of whey proteins and whey fractions. In *Manuals, Guides & Monographs*. Arlington : U.S. Dairy Export Council, 1999 [cit. 2012-02-25]. Dostupné z WWW: <http://www.usdec.org/files/PDFs/2008Monographs/ProteinsFractions_English.pdf>.
- [19] ARNDT, T: *Kasein*, Celostátní medicína, 2011, [online]. [cit. 2012-02-25]. Dostupný z WWW: <<http://www.celostnimedicina.cz/kasein.htm>>.
- [20] CORNELL University. *Milkfacts* [online]. 2011 [cit. 2012-02-25]. Milk protein. Dostupné z WWW: <<http://www.milkfacts.info/Milk%20Composition/Protein.htm>>.

- [21] FORMAN, L.; MERGL, M.. *Syrovátka- její využití v lidské výživě a ve výživě hospodářských zvířat*. Praha : Středisko technických informací potravinářského průmyslu VÚPP, 1979. 343 s.
- [22] SUKOVÁ, I.: Syrovátka v potravinářství. *Informační přehledy ÚZEI* [online]. 2006, 46770, [cit. 2012-02-25]. Dostupný z WWW: < http://www.agronavigator.cz/attachments/Sukova_Syrovatka.pdf>.
- [23] KUČERA, J.: *Význam mléka a mléčných výrobků ve výživě* [online]. Brno :Masarykova Univerzita, 2008. 66 s. Bakalářská práce. Masarykova Univerzita. [cit. 2012-02-25]. Dostupné z WWW: < http://is.muni.cz/th/176312/fsps_b/Bakalarska_prace-text.pdf >.
- [24] *Chemie mléka* [online]. 2006 [cit. 2012-02-25]. Sacharidy mléka. Dostupné z WWW: <http://eso.vscht.cz/cache_data/1207/www.vscht.cz/tmt/studium/chemie_mleka/P403_scr.pdf>.
- [25] SUKOVÁ, I. *Syrovátka v potravinářství*. Praha : Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2006. 36 s. ISBN 80-7271-173-3
- [26] DRDÁK, M., STUDNICKÝ, J., MÓROVÁ, E., KAROVIČOVÁ, J.: *Základy potravinářských technologií*, vyd. Malé Centrum, Bratislava, 1996, 512 s., ISBN 80-967064-1-1.
- [27] SUKOVÁ, I.> *Agronavigátor* [online]. 2006 [cit. 2012-02-25]. ÚZEI. Dostupný z WWW:<<http://www.agronavigator.cz/default.asp?ids=175&ch=13&typ=1&val=44235>>.
- [28] *Technologie mlékárenských výrob - 12* [online]. 2005 [cit. 2012-02-25]. Sušené mléčné výrobky. Dostupný z WWW: < http://eso.vscht.cz/cache_data/1206/www.vscht.cz/tmt/studium/tmv/tmv_podklady12.pdf>.
- [29] SUKOVÁ, I.: *Použití membránové techniky v mlékárenství*. ÚZEI: Agronavigator [online]. 11.10.2004, 29830, [cit. 2012-02-25]. Dostupný z WWW: < <http://www.agronavigator.cz/default.asp?ids=418&ch=13&typ=1&val=29830>>.
- [30] *Růstová křivka bakteriální populace*, [online], [cit. 2013-08-21]. Dostupný z www: <http://fvl.vfu.cz/export/sites/fvl/sekce_ustavy/mikrobiologie/mikrobiologie_pro_farmaceuty/pr-2.pdf>.
- [31] *Úprava a čištění vody*, 2010, [online], [cit. 2013-08-21]. Dostupný z www: <http://homen.vsb.cz/hgf/546/Materialy/Radka_2010/zpuv.html>.
- [32] TIMOTHY, P.: *Metabolism Fermentation*, Univerzity of WisconsinMadison, 2000, [online], [cit. 2012-04-09]. Dostupný z www: <<http://dwb.unl.edu/Teacher/NSF/C11/C11Links/www.bact.wisc.edu/mikrotextbook/metaboli sm/Fermentation.html>>.
- [33] ANDRLOVÁ, K.:. *Optimalizace produkce bioethanolu s využitím zymomonas mobillis*, 2013, VUT Brno, 91 stran.
- [34] ZATAMOKO: *Teorie – mléčné kvašení*, [online]. [cit. 2012-04-09]. Dostupný z WWW: < http://www.zatamoko.cz/old/teorie_j.php>.
- [35] MAGUIN, E., MISTOU, M., ANGLADE, P., CHICH,J.: *Lactic acid balteria and proteomic: current knowledge and perspectivess*, Elsevier Science, Francie, 2002, [online], [cit. 2012-04-11]. Dostupný z www: < <http://www.elsevier.com/locate/chromb> >.

- [36]] LIU, S.: *Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacterie in food and beverage fermentations*, Formely New Zealand Dairy Research Institute, 2002, New Zealand, [online], [cit. 2012-04-09]. Dostupný z www: < <http://www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro> >.
- [37] TAXONOMY: *Lactobacillus*, NCBI taxonomy browser, [online], [cit. 2012-04-15]. Dostupný z www: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1578>>.
- [38] JGI: *Lactobacillus casei*, 1997, [online], [cit. 2012-04-15]. Dostupný z www: <<http://genome.jgi-psf.org/lacca/lacca.home.html>>.
- [39] MICROBIOLOGY GLOSSARY: *Lactobacillus casei*, 2012, [online], [cit. 2012-04-15]. Dostupný z www: < <http://microbiologyglossary.wikispaces.com/Lactobacillus+casei> >.
- [40] ŠVEC, P.: *Penta* [online], 2007, [cit. 2012-04-01]. Dostupný z WWW: < <http://www.penta-chem.cz>>.
- [41] KODÍČEK, M.: *Biochemické pojmy*, [online], [cit. 2012-04-01]. Dostupný z WWW: < http://www.vscht.cz/eds/knihy/uid_es-002/ebook.obsah.htm >.
- [42] KYSELINA MLÉČNÁ. *Wikipedie* [online]. [cit. 2012-04-14]. Dostupný z WWW: < <http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Lactic-acid-skeletal.png>>.
- [43] INFORMAČNÍ CENTRUM BEZPEČNOSTI POTRAVIN: *Kyselina*, Bezpečnost potravin, Praha, 2007, [online], [cit. 2012-04-14]. Dostupný z www: < <http://www.agronavigator.cz/az/vis.aspx?id=76668>>.
- [44] VONDRÁŠKOVÁ, Š.: *Plasty vyráběné z rostlin, nikoli z ropy*, 2006, [online], [cit. 2012-04-14]. Dostupný z www: <<http://www.agronavigator.cz/default.asp?typ=1&val=53167>>.
- [45] SEDLAŘÍK, V.: *Biodegradable polymers based on dairy waste*, Tomáš Baťa University in Zlín, 2006, 29 s., ISBN 80-7318-492-3.
- [46] REVAGADE, N., HILBORN, J., GUPTA, B.: *Polylactic acid: An overview*, Elsevier, 2007, Sweden, [online], [cit. 2012-04-15]. Dostupný z www: < <http://www.sciencedirect.com/science>>.
- [47] ŠTULÍK, K. a kol.: *Analytické separační metody*, 1. vyd., nakl. Karolinum Praha 2005, 266 s., ISBN-10: 80-246-0852-2.
- [48] KLOUDA, P.: *Moderní analytické metody*, nakl. Pavel Klouda, Ostrava 2003, 132 s., ISBN 80-86369-07-2.
- [49] CHURÁČEK, J.: *Analytická separace látek*, Praha: SNTL, 1990, 384 s., ISBN 80-03-00569-8.
- [50] VÁVROVÁ, J.: *Turbidimetrie*, [online], [cit. 2013-08-22]. Dostupný z www: http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/JVABU.htm.
- [51] ŠTERN, P.: *Současné možnosti turbidimetrie a nefelometrie*, Klinická biochemie a metabolismus, 2006, [online], [cit. 2013-08-22]. Dostupný z www: <http://nts.prolekare.cz/cls/odkazy/kbm0603-146.pdf>.
- [52] Krischke, W., Schroder, M. and Trosch, W. (1991), Continuous production of L-lactic acid from whey permeate by immobilized *Lactobacillus casei* subsp. *casei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34, 573-578.
- [53] Nabi, B., Gh, R. and Baniardalan, P. (2004), Batch and continuous production of lactic acid from whey by immobilized lactobacillus. *J. Environ. Studies*, 30, 47-53.

[54] Parmjit S. P., Kennedy, F., Knill, CH., Kosseva, M.: Production of L(+) lactic acid using *Lactobacillus casei* from whey, [cit. 2014-04-11]. Dostupný z www: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132010000100027&lng=en&nrm=iso&tlng=en.

[55] Büyükkileci, A., Harza, S.: Batch production of L(+) lactic acid from whey by *Lactobacillus casei* (NRRL B-441).

6 POUŽITÉ ZKRATKY A SYMBOLY

ATP – adenosintrifosfát
LDL – low density lipid
PLA – kyselina polymléčná
PET – polyethylentereftalát
BSA – hovězí sérový albumin
FAD – flavinadenindinukleotid
FMN – flavinmononukleotid
HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
NPC – chromatografie na normálních fázích
RPC – chromatografie na obrácených fázích
LSC – adsorpční chromatografie
IEC – iontově-výměnná chromatografie
GPC – gelová permeační chromatografie
SF – stacionární fáze
UV/ VIS – ultrafialové a viditelné záření
 $c [g \cdot l^{-1}]$ – koncentrace
 α -, β -, γ -, κ - - typy kaseinu
 ε - absorpční koeficient
 T - turbiditní koeficient
 L - světelná dráha
 I - intenzita prošlého záření
 I_0 - intenzita světelného zdroje
 τ - turbidní koeficient
 l - optická dráha kyvety
RID – refraktometrický detektor
 K_2HPO_4 – hydrogenfosforečnan draselný
 KH_2PO_4 – dihydrogenfosforečnan draselný
 $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ – heptahydrát síranu hořečnatého
 $MnSO_4 \cdot H_2O$ – monohydrát síranu manganatého

7 SEZNAM GRAFŮ

GRAF 1: KALIBRAČNÍ KŘIVKA LAKTÓZY	37
GRAF 2: KALIBRAČNÍ KŘIVKA KYSELINY MLÉČNÉ.....	38
GRAF 3: SPOTŘEBA LAKTÓZY A TVORBA KYSELINY MLÉČNÉ V ZÁVISLOSTI NA ČASE PŘI TEPLITĚ 25 °C – SUŠENÁ SYROVÁTKA	39
GRAF 4: SPOTŘEBA LAKTÓZY A TVORBA KYSELINY MLÉČNÉ V ZÁVISLOSTI NA ČASE PŘI TEPLITĚ 25 °C – ODPADNÍ SYROVÁTKA.....	39
GRAF 5: SPOTŘEBA LAKTÓZY A TVORBA KYSELINY MLÉČNÉ V ZÁVISLOSTI NA ČASE PŘI TEPLITĚ 30 °C – SUŠENÁ SYROVÁTKA	40
GRAF 6: SPOTŘEBA LAKTÓZY A TVORBA KYSELINY MLÉČNÉ V ZÁVISLOSTI NA ČASE PŘI TEPLITĚ 30 °C – ODPADNÍ SYROVÁTKA	41
GRAF 7: SPOTŘEBA LAKTÓZY A TVORBA KYSELINY MLÉČNÉ V ZÁVISLOSTI NA ČASE PŘI TEPLITĚ 35 °C – SUŠENÁ SYROVÁTKA	42
GRAF 8: SPOTŘEBA LAKTÓZY A TVORBA KYSELINY MLÉČNÉ V ZÁVISLOSTI NA ČASE PŘI TEPLITĚ 35 °C – ODPADNÍ SYROVÁTKA.....	42
GRAF 9: SPOTŘEBA LAKTÓZY A TVORBA KYSELINY MLÉČNÉ V ZÁVISLOSTI NA ČASE PŘI TEPLITĚ 40 °C – SUŠENÁ SYROVÁTKA	43
GRAF 10: SPOTŘEBA LAKTÓZY A TVORBA KYSELINY MLÉČNÉ V ZÁVISLOSTI NA ČASE PŘI TEPLITĚ 40 °C – ODPADNÍ SYROVÁTKA.....	44
GRAF 11: POROVNÁNÍ KONCENTRACE KYSELINY MLÉČNÉ PŘI RŮZNÝCH TEPLITÁCH KULTIVACE – SUŠENÁ SYROVÁTKA	44
GRAF 12: POROVNÁNÍ KONCENTRACE KYSELINY MLÉČNÉ PŘI RŮZNÝCH TEPLITÁCH KULTIVACE – ODPADNÍ SYROVÁTKA.....	45
GRAF 13: POROVNÁNÍ KONCENTRACE LAKTÓZY PŘI POUŽITÍ SUŠENÉ A ODPADNÍ SYROVÁTKY PŘI 35 °C	46
GRAF 14: POROVNÁNÍ KONCENTRACE KYSELINY MLÉČNÉ PŘI POUŽITÍ SUŠENÉ A ODPADNÍ SYROVÁTKY PŘI 35 °C	46
GRAF 15: SPOTŘEBA LAKTÓZY A TVORBA KYSELINY MLÉČNÉ V ZÁVISLOSTI NA ČASE PŘI POUŽITÍ 2 G KVASNIČNÉHO EXTRAKTU – SUŠENÁ SYROVÁTKA.....	47
GRAF 16: SPOTŘEBA LAKTÓZY A TVORBA KYSELINY MLÉČNÉ V ZÁVISLOSTI NA ČASE PŘI POUŽITÍ 2,4 G KVASNIČNÉHO EXTRAKTU – ODPADNÍ SYROVÁTKA.....	48
GRAF 17: SPOTŘEBA LAKTÓZY A TVORBA KYSELINY MLÉČNÉ V ZÁVISLOSTI NA ČASE PŘI POUŽITÍ 10 G KVASNIČNÉHO EXTRAKTU – SUŠENÁ SYROVÁTKA.....	49
GRAF 18: SPOTŘEBA LAKTÓZY A TVORBA KYSELINY MLÉČNÉ V ZÁVISLOSTI NA ČASE PŘI POUŽITÍ 12 G KVASNIČNÉHO EXTRAKTU – ODPADNÍ SYROVÁTKA.....	49
GRAF 19: SPOTŘEBA LAKTÓZY A TVORBA KYSELINY MLÉČNÉ V ZÁVISLOSTI NA ČASE PŘI POUŽITÍ 20 G KVASNIČNÉHO EXTRAKTU – SUŠENÁ SYROVÁTKA	50
GRAF 20: SPOTŘEBA LAKTÓZY A TVORBA KYSELINY MLÉČNÉ V ZÁVISLOSTI NA ČASE PŘI POUŽITÍ 24 G KVASNIČNÉHO EXTRAKTU	50
GRAF 21: POROVNÁNÍ KONCENTRACE KYSELINY MLÉČNÉ PŘI RŮZNÝCH HODNOTÁCH KVASNIČNÉHO EXTRAKTU – SUŠENÁ SYROVÁTKA.....	51

GRAF 22: POROVNÁNÍ KONCENTRACE KYSELINY MLÉČNÉ PŘI RŮZNÝCH HODNOTÁCH KVASNIČNĚHO EXTRAKTU – ODPADNÍ SYROVÁTKA	51
GRAF 23: POROVNÁNÍ KONCENTRACE LAKTÓZY PŘI POUŽITÍ SUŠENÉ A ODPADNÍ SYROVÁTKY PŘI 35 °C A MNOŽSTVÍ KVASNIČNĚHO EXTRAKTU 20 G PRO SUŠENOU A 24 G PRO ODPADNÍ SYROVÁTKU	52
GRAF 24: POROVNÁNÍ KONCENTRACE KYSELINY MLÉČNÉ PŘI POUŽITÍ SUŠENÉ A ODPADNÍ SYROVÁTKY PŘI 35 °C A MNOŽSTVÍ KVASNIČNĚHO EXTRAKTU 20 G PRO SUŠENOU A 24 G PRO ODPADNÍ SYROVÁTKU	53
GRAF 25: SPOTŘEBA LAKTÓZY A TVORBA KYSELINY MLÉČNÉ V ZÁVISLOSTI NA ČASE PRO PRVNÍ ROZTOK – SUŠENÁ SYROVÁTKA	54
GRAF 26: SPOTŘEBA LAKTÓZY A TVORBA KYSELINY MLÉČNÉ V ZÁVISLOSTI NA ČASE PRO PRVNÍ ROZTOK – ODPADNÍ SYROVÁTKA.....	54
GRAF 27: SPOTŘEBA LAKTÓZY A TVORBA KYSELINY MLÉČNÉ V ZÁVISLOSTI NA ČASE PRO DRUHÝ ROZTOK – SUŠENÁ SYROVÁTKA	55
GRAF 28: SPOTŘEBA LAKTÓZY A TVORBA KYSELINY MLÉČNÉ V ZÁVISLOSTI NA ČASE PRO DRUHÝ ROZTOK – ODPADNÍ SYROVÁTKA.....	55
GRAF 29: SPOTŘEBA LAKTÓZY A TVORBA KYSELINY MLÉČNÉ V ZÁVISLOSTI NA ČASE PRO TŘETÍ ROZTOK – SUŠENÁ SYROVÁTKA	56
GRAF 30: SPOTŘEBA LAKTÓZY A TVORBA KYSELINY MLÉČNÉ V ZÁVISLOSTI NA ČASE PRO TŘETÍ ROZTOK – ODPADNÍ SYROVÁTKA	56
GRAF 31: SPOTŘEBA LAKTÓZY A TVORBA KYSELINY MLÉČNÉ V ZÁVISLOSTI NA ČASE PRO ČTVRTÝ ROZTOK – SUŠENÁ SYROVÁTKA	57
GRAF 32: SPOTŘEBA LAKTÓZY A TVORBA KYSELINY MLÉČNÉ V ZÁVISLOSTI NA ČASE PRO ČTVRTÝ ROZTOK – ODPADNÍ SYROVÁTKA.....	57
GRAF 33: POROVNÁNÍ KONCENTRACE KYSELINY MLÉČNÉ PŘI RŮZNÝCH KONCENTRACÍCH POUŽITÝCH SOLÍCH – SUŠENÁ SYROVÁTKA	58
GRAF 34: POROVNÁNÍ KONCENTRACE KYSELINY MLÉČNÉ PŘI RŮZNÝCH KONCENTRACÍCH POUŽITÝCH SOLÍCH – ODPADNÍ SYROVÁTKA.....	58
GRAF 35: POROVNÁNÍ KONCENTRACE LAKTÓZY PŘI POUŽITÍ SUŠENÉ A ODPADNÍ SYROVÁTKY PŘI 35 °C A MNOŽSTVÍ KVASNIČNĚHO EXTRAKTU 20 G PRO SUŠENOU A 24 G PRO ODPADNÍ SYROVÁTKU A POUŽITÍ ČTVRTÉHO ROZTOKU ...	59
GRAF 36: POROVNÁNÍ KONCENTRACE KYSELINY MLÉČNÉ PŘI POUŽITÍ SUŠENÉ A ODPADNÍ SYROVÁTKY PŘI 35 °C A MNOŽSTVÍ KVASNIČNĚHO EXTRAKTU 20 G PRO SUŠENOU A 24 G PRO ODPADNÍ SYROVÁTKU A POUŽITÍ ČTVRTÉHO ROZTOKU	60

8 SEZNAM OBRÁZKŮ

OBRÁZEK 1: LACTOBACILLUS CASEI [44]	23
OBRÁZEK 2: RŮSTOVÁ KŘIVKA [51]	14
OBRÁZEK 3: KYSELINA MLÉČNÁ [32].....	26
OBRÁZEK 4: SCHÉMA GLYKOLÝZY [31]	17
OBRÁZEK 5: HOMOFERMENTATIVNÍ DRÁHA [35].....	18
OBRÁZEK 6: HETEROFERMENTATIVNÍ DRÁHA [35]	19
OBRÁZEK 7: SCHÉMA KAPALINOVÉHO CHROMATOGRAFU [46]	29
OBRÁZEK 8: SCHÉMA TURBIDIMETRU [48].....	32

9 SEZNAM TABULEK

TABULKA 1: SLOŽENÍ SLADKÉ A KYSELÉ SYROVÁTKY [3].....	9
TABULKA 2: KONCENTRACE PROTEINŮ V MLÉCE [15]	10
TABULKA 3: OBSAH HLAVNÍCH MINERÁLNÍCH LÁTEK V MLÉCE [23]	11
TABULKA 4: VÝROBA SUŠENÉ SYROVÁTKY VE SVĚTĚ V R. 2002 [27]	13
TABULKA 5: SLOŽENÍ MÉDIA	34
TABULKA 6: OBSAH SOLÍ	36
TABULKA 7: RETENČNÍ ČASY ANALYTŮ	37
TABULKA 8: PLOCHY PÍKŮ LAKTÓZY V ZÁVISLOSTI NA KONCENTRACI.....	72
TABULKA 9: PLOCHY PÍKŮ KYSELINY MLÉČNÉ V ZÁVISLOSTI NA KONCENTRACI	72
TABULKA 10: SUŠENÁ SYROVÁTKA – TEPLOTA 25 °C	73
TABULKA 11: SUŠENÁ SYROVÁTKA – TEPLOTA 30 °C	73
TABULKA 12: SUŠENÁ SYROVÁTKA – TEPLOTA 35 °C	74
TABULKA 13: SUŠENÁ SYROVÁTKA – TEPLOTA 40 °C	74
TABULKA 14: ODPADNÍ SYROVÁTKA – TEPLOTA 25 °C	75
TABULKA 15: ODPADNÍ SYROVÁTKA – TEPLOTA 30 °C	75
TABULKA 16: ODPADNÍ SYROVÁTKA – TEPLOTA 35 °C	76
TABULKA 17: ODPADNÍ SYROVÁTKA – TEPLOTA 40 °C	76
TABULKA 18: SUŠENÁ SYROVÁTKA – 2 G KVASNIČNÉHO EXTRAKTU	77
TABULKA 19: SUŠENÁ SYROVÁTKA – 10 G KVASNIČNÉHO EXTRAKTU	77
TABULKA 20: SUŠENÁ SYROVÁTKA – 20 G KVASNIČNÉHO EXTRAKTU	78
TABULKA 21: ODPADNÍ SYROVÁTKA – 2,4 G KVASNIČNÉHO EXTRAKTU.....	78
TABULKA 22: ODPADNÍ SYROVÁTKA – 12 G KVASNIČNÉHO EXTRAKTU.....	79
TABULKA 23: ODPADNÍ SYROVÁTKA – 24 G KVASNIČNÉHO EXTRAKTU.....	79
TABULKA 24: SUŠENÁ SYROVÁTKA – PRVNÍ ROZTOK	80
TABULKA 25: SUŠENÁ SYROVÁTKA – DRUHÝ ROZTOK	80
TABULKA 26: SUŠENÁ SYROVÁTKA – TŘETÍ ROZTOK	81
TABULKA 27: SUŠENÁ SYROVÁTKA – ČTVRTÝ ROZTOK	81
TABULKA 28: ODPADNÍ SYROVÁTKA – PRVNÍ ROZTOK.....	82
TABULKA 29: ODPADNÍ SYROVÁTKA – DRUHÝ ROZTOK.....	82
TABULKA 30: ODPADNÍ SYROVÁTKA – TŘETÍ ROZTOK	83
TABULKA 31: ODPADNÍ SYROVÁTKA – ČTVRTÝ ROZTOK.....	83

10 PŘÍLOHY

Tabulka 8: Plochy píků laktózy v závislosti na koncentraci

c [g·l⁻¹]	Plocha [V·s]	IS
0	0,0	0,0
1	2,0	2,0 ± 0,0
2	3,9	3,9 ± 0,1
3	6,1	6,1 ± 0,2
4	7,6	7,6 ± 0,2
5	9,7	9,7 ± 0,2
6	12,2	12,2 ± 0,2
7	16,5	16,5 ± 0,5
8	18,1	18,1 ± 0,1
9	22,0	22,0 ± 0,6
10	23,2	23,2 ± 0,1
12	25,0	25,0 ± 0,1
14	29,1	29,1 ± 0,4
16	32,0	32,0 ± 0,6
18	36,6	36,6 ± 0,8
20	42,7	42,7 ± 0,1

Tabulka 9: Plochy píků kyseliny mléčné v závislosti na koncentraci

c [g/l]	Plocha [V·s]	IS
0	0,0	0,0
0,3	0,35	0,35 ± 0,04
0,6	0,90	0,90 ± 0,01
0,9	1,31	1,31 ± 0,02
1,2	2,63	2,63 ± 0,06
1,5	3,0	3,0 ± 0,1
1,8	3,5	3,5 ± 0,3
2,1	4,4	4,4 ± 0,3
2,4	5,3	5,3 ± 0,3
2,7	6,2	6,2 ± 0,2
3	8,8	8,8 ± 0,1
4	9,2	9,2 ± 0,1
5	10,5	10,5 ± 0,2

Tabulka 10: Sušená syrovátka – teplota 25 °C

t [h]	Plocha píku [10³ mV·s]	c_{km} [g·l⁻¹]	Plocha píku [10³ mV·s]	c_l [g·l⁻¹]
0	0,41 ± 0,05	0,41	25 ± 1	12,00
1	0,54 ± 0,03	0,46	24 ± 3	11,54
2	0,58 ± 0,04	0,47	26 ± 5	12,50
3	0,81 ± 0,03	0,56	26 ± 1	12,40
12	0,94 ± 0,04	0,61	26 ± 1	12,52
16	2,5 ± 0,3	1,21	19,6 ± 0,3	9,48
17	3,1 ± 0,3	1,42	17 ± 2	8,17
18	3,6 ± 0,4	1,60	19 ± 1	8,97
19	3,6 ± 0,2	1,62	19 ± 1	9,12
20	3,5 ± 0,2	1,57	19,2 ± 0,2	9,30
21	3,2 ± 0,2	1,48	19 ± 1	9,23
22	2,8 ± 0,2	1,31	19 ± 1	9,28
23	2,4 ± 0,2	1,17	17 ± 1	8,47
24	2,2 ± 0,2	1,07	17 ± 1	8,13
25	1,9 ± 0,2	0,95	17 ± 2	8,20
26	1,8 ± 0,3	0,94	18 ± 2	8,51

Tabulka 11: Sušená syrovátka – teplota 30 °C

t [h]	Plocha píku [10³ mV·s]	c_{km} [g·l⁻¹]	Plocha píku [10³ mV·s]	c_l [g·l⁻¹]
0	0,74 ± 0,10	0,53	26 ± 2	12,43
1	0,85 ± 0,09	0,58	23 ± 2	11,28
2	0,80 ± 0,05	0,56	24 ± 2	11,54
3	1,12 ± 0,08	0,68	21,2 ± 0,6	10,25
12	1,3 ± 0,2	0,75	21,9 ± 0,6	10,58
16	2,81 ± 0,08	1,32	17 ± 2	8,25
17	3,5 ± 0,2	1,59	17 ± 1	8,08
18	3,6 ± 0,4	1,60	19,0 ± 0,9	9,23
19	3,6 ± 0,2	1,62	18,6 ± 0,4	9,02
20	4,2 ± 0,4	1,84	18,2 ± 0,2	8,82
21	4,3 ± 0,2	1,87	18 ± 1	8,75
22	4,2 ± 0,5	1,85	18,5 ± 0,3	8,96
23	3,4 ± 0,3	1,55	17,5 ± 0,6	8,48
24	3,0 ± 0,1	1,41	18 ± 1	8,82
25	2,2 ± 0,3	1,09	16,1 ± 0,3	7,82
26	2,4 ± 0,4	1,15	15 ± 3	7,47

Tabulka 12: Sušená syrovátka – teplota 35 °C

t [h]	Plocha píku [10³ mV·s]	c_{km} [g·l⁻¹]	Plocha píku [10³ mV·s]	c_l [g·l⁻¹]
0	0,71 ± 0,06	0,52	25,5 ± 0,5	12,20
1	0,7 ± 0,1	0,50	23 ± 2	10,98
2	0,9 ± 0,1	0,58	24 ± 1	11,54
3	2,81 ± 0,09	1,32	19 ± 1	8,91
12	3,5 ± 0,2	1,58	16,6 ± 0,5	7,93
16	4,1 ± 0,2	1,81	17,7 ± 0,4	8,44
17	4,45 ± 0,02	1,93	17 ± 1	8,15
18	4,7 ± 0,6	2,05	14 ± 2	6,87
19	4,9 ± 0,3	2,11	15,6 ± 0,5	7,44
20	5,1 ± 0,1	2,18	14 ± 2	6,89
21	4,5 ± 0,4	1,96	12,3 ± 0,6	5,87
22	4,6 ± 0,2	1,98	13 ± 2	6,11
23	4,6 ± 0,4	2,00	12 ± 2	5,95
24	4,5 ± 0,2	1,96	12 ± 2	5,88
25	4,0 ± 0,2	1,75	11 ± 1	5,03
26	3,8 ± 0,1	1,69	11 ± 2	5,47

Tabulka 13: Sušená syrovátka – teplota 40 °C

t [h]	Plocha píku [10³ mV·s]	c_{km} [g·l⁻¹]	Plocha píku [10³ mV·s]	c_l [g·l⁻¹]
0	0,6 ± 0,1	0,47	24 ± 5	11,66
1	0,8 ± 0,1	0,55	24 ± 1	11,64
2	0,58 ± 0,03	0,48	25 ± 2	11,81
3	1,4 ± 0,2	0,77	25,2 ± 0,5	12,06
12	2,70 ± 0,05	1,28	24,9 ± 0,6	11,90
16	4,0 ± 0,4	1,77	20 ± 1	9,79
17	3,9 ± 0,1	1,72	18,7 ± 0,9	8,92
18	4,2 ± 0,4	1,84	18 ± 2	8,73
19	4,8 ± 0,3	2,06	17 ± 2	8,33
20	4,5 ± 0,4	1,97	15,7 ± 0,2	7,51
21	4,2 ± 0,2	1,85	15 ± 2	7,26
22	4,26 ± 0,08	1,86	15,7 ± 0,5	7,49
23	4,3 ± 0,5	1,87	12,4 ± 0,8	5,94
24	4,1 ± 0,3	1,82	13,1 ± 0,4	6,25
25	3,9 ± 0,9	1,73	11,4 ± 0,4	5,45
26	3,3 ± 0,5	1,51	11,87 ± 0,05	5,67

Tabulka 14: Odpadní syrovátka – teplota 25 °C

t [h]	Plocha píku [10³ mV·s]	c_{km} [g·l⁻¹]	Plocha píku [10³ mV·s]	c_i [g·l⁻¹]
0	2,7 ± 0,1	1,27	36 ± 1	17,24
1	2,2 ± 0,1	1,08	38 ± 4	18,07
2	2,1 ± 0,2	1,04	38 ± 1	18,35
3	3,3 ± 0,2	1,49	39 ± 1	18,44
12	3,4 ± 0,1	1,52	36,4 ± 0,6	17,41
16	3,6 ± 0,3	1,62	37 ± 1	17,65
17	4,3 ± 0,3	1,89	30 ± 1	14,44
18	4,6 ± 0,4	2,01	29 ± 5	13,74
19	4,6 ± 0,1	2,01	26 ± 3	12,33
20	4,8 ± 0,4	2,06	26 ± 2	12,19
21	4,8 ± 0,6	2,07	23 ± 2	11,04
22	4,7 ± 0,4	2,02	23 ± 3	10,91
23	4,3 ± 0,1	1,88	22 ± 3	10,45
24	4,2 ± 0,2	1,82	19,4 ± 0,6	9,26
25	4,1 ± 0,1	1,80	19 ± 2	8,94
26	3,9 ± 0,4	1,71	16 ± 3	7,85

Tabulka 15: Odpadní syrovátka – teplota 30 °C

t [h]	Plocha píku [10³ mV·s]	c_{km} [g·l⁻¹]	Plocha píku [10³ mV·s]	c_i [g·l⁻¹]
0	3,1 ± 0,3	1,42	41 ± 2	19,48
1	2,9 ± 0,5	1,34	41 ± 1	19,42
2	3,2 ± 0,2	1,45	41 ± 2	19,73
3	3,0 ± 0,2	1,40	34 ± 2	16,34
12	2,5 ± 0,3	1,20	26 ± 2	12,48
16	3,9 ± 0,2	1,73	19,5 ± 0,3	9,33
17	5,6 ± 0,4	2,39	20 ± 1	9,70
18	6,0 ± 0,5	2,53	19,8 ± 0,9	9,45
19	6,6 ± 0,4	2,75	19,8 ± 0,5	9,48
20	6,4 ± 0,1	2,66	17,2 ± 0,2	8,20
21	5,9 ± 0,2	2,48	17,8 ± 0,7	8,50
22	5,6 ± 0,3	2,35	16,4 ± 0,7	7,82
23	5,1 ± 0,2	2,20	14,7 ± 0,3	7,01
24	5,0 ± 0,2	2,13	15,2 ± 0,1	7,28
25	4,9 ± 0,1	2,12	13,1 ± 0,3	6,28
26	4,8 ± 0,2	2,08	13 ± 2	6,20

Tabulka 16: Odpadní syrovátka – teplota 35 °C

t [h]	Plocha píku [10³ mV·s]	c_{km} [g·l⁻¹]	Plocha píku [10³ mV·s]	c_l [g·l⁻¹]
0	3,4 ± 0,3	1,53	40 ± 1	18,93
1	3,4 ± 0,3	1,55	36 ± 1	17,42
2	3,4 ± 0,4	1,55	34 ± 1	16,22
3	4,3 ± 0,3	1,88	26 ± 2	12,27
12	4,2 ± 0,3	1,85	21 ± 3	9,84
16	5,7 ± 0,2	2,40	21,6 ± 0,2	10,32
17	6,5 ± 0,2	2,72	20,7 ± 0,1	9,87
18	6,7 ± 0,2	2,79	18 ± 2	8,40
19	6,9 ± 0,3	2,85	18 ± 3	8,42
20	7,3 ± 0,4	3,09	14 ± 2	6,83
21	7,0 ± 0,4	2,88	14 ± 2	6,62
22	7,2 ± 0,1	2,96	12 ± 1	5,86
23	7,5 ± 0,4	3,09	13 ± 3	6,08
24	7,1 ± 0,3	2,94	12 ± 2	5,74
25	7,4 ± 0,4	3,06	9,4 ± 0,1	4,49
26	6,5 ± 0,4	2,70	8,3 ± 0,7	3,98

Tabulka 17: Odpadní syrovátka – teplota 40 °C

t [h]	Plocha píku [10³ mV·s]	c_{km} [g·l⁻¹]	Plocha píku [10³ mV·s]	c_l [g·l⁻¹]
0	2,9 ± 0,3	1,44	39 ± 2	18,65
1	2,5 ± 0,4	1,19	40 ± 2	18,89
2	3,2 ± 0,3	1,45	36 ± 3	17,28
3	3,2 ± 0,2	1,46	37 ± 2	17,48
12	4,6 ± 0,4	1,99	30 ± 4	14,18
16	4,7 ± 0,4	2,05	28 ± 3	13,43
17	6,3 ± 0,2	2,63	27 ± 1	12,96
18	6,2 ± 0,3	2,61	25 ± 2	12,10
19	6,6 ± 0,3	2,74	21 ± 3	10,07
20	6,8 ± 0,3	2,81	19 ± 4	9,03
21	6,8 ± 0,2	2,82	20 ± 4	9,34
22	7,1 ± 0,4	2,92	17 ± 2	8,31
23	7,1 ± 0,3	2,95	17 ± 2	8,27
24	7,1 ± 0,3	2,93	15 ± 2	7,05
25	7,2 ± 0,2	2,96	12,1 ± 0,6	5,79
26	6,9 ± 0,3	2,86	10 ± 1	4,89

Tabulka 18: Sušená syrovátka – 2 g kvasničného extraktu

t [h]	Plocha píku [10³ mV·s]	c_{km} [g·l⁻¹]	Plocha píku [10³ mV·s]	c_i [g·l⁻¹]
0	0,6 ± 0,1	0,49	20,6 ± 1,4	9,96
1	0,6 ± 0,1	0,46	20 ± 1	9,67
2	0,7 ± 0,1	0,54	26,3 ± 0,9	12,68
11,5	1,4 ± 0,1	0,79	14,0 ± 0,1	6,83
16,5	2,3 ± 0,3	1,11	9,7 ± 0,5	4,75
17,5	2,5 ± 0,1	1,22	11,1 ± 0,5	5,43
18,5	2,4 ± 0,2	1,17	9,0 ± 0,2	4,41
19,5	2,5 ± 0,4	1,21	5,0 ± 0,1	2,52
20,5	2,4 ± 0,1	1,17	1,0 ± 0,5	0,61
21,5	1,4 ± 0,3	0,78	0,8 ± 0,1	0,50
22,5	1,1 ± 0,1	0,67	0,484 ± 0,003	0,35
23,5	0,9 ± 0,1	0,61	0,3 ± 0,1	0,27
24,5	0,9 ± 0,2	0,60	0,26 ± 0,02	0,25
25	0,6 ± 0,2	0,49	0,2 ± 0,1	0,23

Tabulka 19: Sušená syrovátka – 10 g kvasničného extraktu

t [h]	Plocha píku [10³ mV·s]	c_{km} [g·l⁻¹]	Plocha píku [10³ mV·s]	c_i [g·l⁻¹]
0	1,0 ± 0,2	0,65	21 ± 1	9,95
1	1,1 ± 0,1	0,67	19,79 ± 0,03	9,57
2	2,5 ± 0,4	1,20	25,0 ± 0,3	12,11
11,5	4,4 ± 0,5	1,91	12,2 ± 0,3	6,01
16,5	4,4 ± 0,1	1,93	8,1 ± 0,3	4,00
17,5	4,8 ± 0,5	2,06	7,8 ± 0,6	3,92
18,5	5,3 ± 0,5	2,31	8,5 ± 0,4	4,22
19,5	5,2 ± 0,3	2,48	8,6 ± 0,1	4,22
20,5	4,9 ± 0,4	2,10	4,8 ± 0,3	2,47
21,5	4,9 ± 0,3	2,09	1,8 ± 0,2	0,99
22,5	4,6 ± 0,3	2,01	1,7 ± 0,1	0,94
23,5	3,5 ± 0,2	1,59	1,51 ± 0,03	0,84
24,5	2,0 ± 0,2	1,02	1,5 ± 0,2	0,81
25	1,7 ± 0,2	0,90	1,6 ± 0,4	0,87

Tabulka 20: Sušená syrovátka – 20 g kvasničného extraktu

t [h]	Plocha píku [10³ mV·s]	c_{km} [g·l⁻¹]	Plocha píku [10³ mV·s]	c_i [g·l⁻¹]
0	0,9 ± 0,1	0,60	20 ± 1	9,84
1	2,4 ± 0,4	1,16	20 ± 1	9,83
2	3,7 ± 0,5	1,66	18 ± 2	8,88
11,5	6,9 ± 0,3	2,86	11,8 ± 0,9	5,74
16,5	6,7 ± 0,2	2,80	7,9 ± 0,2	3,92
17,5	7,1 ± 0,3	2,93	7,7 ± 0,6	3,79
18,5	7,59 ± 0,05	3,12	8,4 ± 0,2	4,13
19,5	8,6 ± 0,2	3,50	7,6 ± 0,2	3,74
20,5	7,5 ± 0,3	3,08	8,0 ± 0,5	3,93
21,5	6,0 ± 0,1	2,54	7,5 ± 0,2	3,69
22,5	5,2 ± 0,4	2,20	4,1 ± 0,5	2,09
23,5	4,8 ± 0,5	2,06	4,3 ± 0,5	2,18
24,5	2,3 ± 0,5	1,11	4,1 ± 0,3	2,09
25	2,0 ± 0,1	1,01	3,9 ± 0,1	1,97

Tabulka 21: Odpadní syrovátka – 2,4 g kvasničného extraktu

t [h]	Plocha píku [10³ mV·s]	c_{km} [g·l⁻¹]	Plocha píku [10³ mV·s]	c_i [g·l⁻¹]
0	3,2 ± 0,1	1,46	21 ± 2	10,27
1	3,2 ± 0,1	1,46	23 ± 2	10,95
2	3,5 ± 0,5	1,56	16 ± 3	7,78
11,5	3,7 ± 0,3	1,65	13 ± 2	6,12
16,5	4,6 ± 0,4	2,00	11 ± 1	5,21
17,5	4,6 ± 0,4	1,98	9 ± 1	4,35
18,5	4,6 ± 0,5	1,99	9 ± 1	4,49
19,5	5,2 ± 0,2	2,21	8 ± 2	4,05
20,5	4,8 ± 0,1	2,07	4,2 ± 0,7	2,14
21,5	4,0 ± 0,2	1,75	2,6 ± 0,4	1,35
22,5	3,7 ± 0,1	1,67	0,54 ± 0,05	0,38
23,5	3,1 ± 0,1	1,43	0,22 ± 0,04	0,23
24,5	3,0 ± 0,2	1,37	0,12 ± 0,01	0,18
25	3,1 ± 0,1	1,41	0,12 ± 0,04	0,18

Tabulka 22: Odpadní syrovátka – 12 g kvasničného extraktu

t [h]	Plocha píku [10^3 mV·s]	c_{km} [$g \cdot l^{-1}$]	Plocha píku [10^3 mV·s]	c_l [$g \cdot l^{-1}$]
0	3,2 ± 0,2	1,45	22,9 ± 0,4	11,09
1	3,1 ± 0,1	1,44	23 ± 1	10,93
2	4,6 ± 0,2	1,99	17 ± 1	8,31
11,5	4,6 ± 0,1	2,01	17,2 ± 0,3	8,35
16,5	5,9 ± 0,2	2,49	10,8 ± 0,5	5,29
17,5	6,4 ± 0,3	2,68	9,0 ± 0,3	4,45
18,5	7,2 ± 0,3	2,97	8,6 ± 0,4	4,24
19,5	8 ± 1	3,21	7,9 ± 0,4	3,92
20,5	7,4 ± 0,9	3,04	7,4 ± 0,2	3,68
21,5	7,8 ± 0,5	3,19	2,6 ± 0,4	1,39
22,5	7,0 ± 0,4	2,90	2,6 ± 0,2	1,36
23,5	5,1 ± 0,3	2,18	2,5 ± 0,3	1,31
24,5	4,4 ± 0,5	1,91	1,1 ± 0,3	0,67
25	4,6 ± 0,3	1,99	0,9 ± 0,1	0,54

Tabulka 23: Odpadní syrovátka – 24 g kvasničného extraktu

t [h]	Plocha píku [10^3 mV·s]	c_{km} [$g \cdot l^{-1}$]	Plocha píku [10^3 mV·s]	c_l [$g \cdot l^{-1}$]
0	3,3 ± 0,2	1,50	22,6 ± 0,6	10,91
1	4,0 ± 0,3	1,76	23 ± 1	10,94
2	5,7 ± 0,5	2,41	21,7 ± 0,8	10,49
11,5	5,9 ± 0,4	2,48	17,5 ± 0,2	8,47
16,5	7,2 ± 0,2	2,99	9,9 ± 0,5	4,86
17,5	7,4 ± 0,1	3,06	10,0 ± 0,7	4,88
18,5	8,5 ± 0,3	3,45	9,5 ± 0,5	4,67
19,5	9,1 ± 0,1	3,71	9,0 ± 0,2	4,41
20,5	9,8 ± 0,4	3,95	8,4 ± 0,4	4,15
21,5	9,3 ± 0,2	3,78	6,2 ± 0,5	3,09
22,5	8,1 ± 0,3	3,30	5,7 ± 0,1	2,83
23,5	7,0 ± 0,3	2,90	4,9 ± 0,1	2,44
24,5	6,3 ± 0,1	2,64	3,3 ± 0,1	1,70
25	5,6 ± 0,4	2,36	3,7 ± 0,3	1,91

Tabulka 24: Sušená syrovátka – první roztok

t [h]	Plocha píku [10³ mV·s]	c_{km} [g·l⁻¹]	Plocha píku [10³ mV·s]	c_l [g·l⁻¹]
0	1,5 ± 0,3	0,81	28 ± 1	13,57
1	1,56 ± 0,06	0,84	26,7 ± 0,6	12,87
2	2,2 ± 0,1	1,10	24,2 ± 0,6	11,69
3	2,6 ± 0,1	1,22	21 ± 1	10,03
4	5,047 ± 0,003	2,16	13,4 ± 0,6	6,53
13	6,635 ± 0,001	2,76	11,4 ± 0,8	5,56
17	6,8 ± 0,2	2,82	7,3 ± 0,3	3,61
18	7,0 ± 0,1	2,90	7,4 ± 0,2	3,67
19	8 ± 1	3,16	6,9 ± 0,1	3,44
20	5,5 ± 0,1	2,33	5,7 ± 0,1	2,83
21	4,6 ± 0,5	1,98	5,7 ± 0,1	2,83
23	4,1 ± 0,1	1,80	5,1 ± 0,1	2,55
24	2,3 ± 0,2	1,14	4,0 ± 0,1	2,04

Tabulka 25: Sušená syrovátka – druhý roztok

t [h]	Plocha píku [10³ mV·s]	c_{km} [g·l⁻¹]	Plocha píku [10³ mV·s]	c_l [g·l⁻¹]
0	1,5 ± 0,2	0,82	26,1 ± 0,1	12,61
1	1,6 ± 0,1	0,87	26 ± 1	12,43
2	1,731 ± 0,001	0,91	25 ± 2	12,12
3	2,3 ± 0,2	1,11	19 ± 1	9,31
4	4,02 ± 0,01	1,77	12,1 ± 0,9	5,91
13	5,0 ± 0,2	2,15	10,5 ± 0,6	5,15
17	5,2 ± 0,3	2,23	8,9 ± 0,3	4,36
18	5,6 ± 0,2	2,39	8,5 ± 0,7	4,18
19	5,9 ± 0,1	2,49	7,2 ± 0,8	3,55
20	5,78 ± 0,01	2,43	7,0 ± 0,3	3,49
21	5,6 ± 0,4	2,35	5,26 ± 0,04	2,64
23	4,0 ± 0,1	1,76	4,7 ± 0,4	2,35
24	1,15 ± 0,01	0,69	4,38 ± 0,01	2,21

Tabulka 26: Sušená syrovátka – třetí roztok

t [h]	Plocha píku [10³ mV·s]	c_{km} [g·l⁻¹]	Plocha píku [10³ mV·s]	c_l [g·l⁻¹]
0	1,27 ± 0,01	0,74	27 ± 2	13,02
1	1,6 ± 0,1	0,84	26 ± 2	12,77
2	1,7 ± 0,1	0,89	25,2 ± 0,2	12,18
3	3,6 ± 0,5	1,62	19 ± 1	9,02
4	6,3 ± 0,1	2,64	12,1 ± 0,7	5,91
13	6,4 ± 0,2	2,68	10,8 ± 0,8	5,27
17	6,5 ± 0,3	2,69	8,2 ± 0,2	4,03
18	7,5 ± 0,2	3,08	7,3 ± 0,1	3,60
19	7,8 ± 0,1	3,19	6,9 ± 0,5	3,40
20	5,4 ± 0,1	2,28	5,9 ± 0,2	2,93
21	5,4 ± 0,1	2,31	5,5 ± 0,4	2,74
23	4,1 ± 0,2	1,82	5,0 ± 0,1	2,53
24	2,4 ± 0,2	1,14	5 ± 2	2,48

Tabulka 27: Sušená syrovátka – čtvrtý roztok

t [h]	Plocha píku [10³ mV·s]	c_{km} [g·l⁻¹]	Plocha píku [10³ mV·s]	c_l [g·l⁻¹]
0	1,0 ± 0,19	0,65	26 ± 1	12,68
1	2,6 ± 0,1	1,23	25 ± 2	11,92
2	3,2 ± 0,1	1,46	24,4 ± 0,5	11,78
3	4,1 ± 0,1	1,80	19 ± 1	9,07
4	8,05 ± 0,03	3,29	13,4 ± 0,8	6,53
13	8,79 ± 0,02	3,57	9,8 ± 0,5	4,80
17	9,3 ± 0,3	3,78	5,9 ± 0,5	2,94
18	9,6 ± 0,3	3,90	5,7 ± 0,4	2,86
19	9,98 ± 0,03	4,02	5,7 ± 0,3	2,86
20	7,3 ± 0,2	3,02	4,4 ± 0,3	2,25
21	6,3 ± 0,3	2,63	3,9 ± 0,2	1,99
23	4,8 ± 0,2	2,07	3,4 ± 0,4	1,74
24	3,2 ± 0,1	1,47	3,4 ± 0,2	1,73

Tabulka 28: Odpadní syrovátka – první roztok

t [h]	Plocha píku [10³ mV·s]	c_{km} [g·l⁻¹]	Plocha píku [10³ mV·s]	c_l [g·l⁻¹]
0	1,04 ± 0,03	0,65	26,0 ± 0,1	12,55
1	2,3 ± 0,1	1,11	25 ± 1	12,20
2	2,4 ± 0,4	1,15	22,1 ± 0,4	10,67
3	2,51 ± 0,03	1,20	19 ± 2	9,33
4	4,2 ± 0,3	1,85	17,3 ± 0,2	8,38
13	4,361 ± 0,002	1,90	11,5 ± 0,1	5,61
17	5,5 ± 0,2	2,33	10,0 ± 0,7	4,91
18	6 ± 1	2,49	7,8 ± 0,8	3,86
19	4,4 ± 0,3	1,93	7,4 ± 0,1	3,65
20	4,33 ± 0,04	1,89	7,0 ± 0,1	3,47
21	3,8 ± 0,1	1,69	6,5 ± 0,5	3,25
23	3,1 ± 0,3	1,44	6,0 ± 0,1	3,01
24	2,5 ± 0,4	1,19	4,45 ± 0,02	2,25

Tabulka 29: Odpadní syrovátka – druhý roztok

t [h]	Plocha píku [10³ mV·s]	c_{km} [g·l⁻¹]	Plocha píku [10³ mV·s]	c_l [g·l⁻¹]
0	0,96 ± 0,02	0,62	26,5 ± 0,2	12,80
1	1,5 ± 0,3	0,81	26,0 ± 0,1	12,54
2	2,5 ± 0,2	1,18	20 ± 2	9,65
3	2,7 ± 0,1	1,27	16,4 ± 0,3	7,95
4	3,2 ± 0,1	1,46	14,5 ± 0,2	7,05
13	3,8 ± 0,1	1,69	11 ± 1	5,45
17	4,0 ± 0,1	1,75	8 ± 1	4,16
18	4,2 ± 0,3	1,85	7,6 ± 0,2	3,74
19	3,8 ± 0,1	1,68	6,6 ± 0,2	3,26
20	3,32 ± 0,03	1,51	6,2 ± 0,3	3,08
21	2,9 ± 0,1	1,36	5,9 ± 0,1	2,94
23	2,1 ± 0,2	1,05	5,7 ± 0,4	2,84
24	1,6 ± 0,4	0,88	5,6 ± 0,1	2,82

Tabulka 30: Odpadní syrovátka – třetí roztok

t [h]	Plocha píku [10³ mV·s]	c_{km} [g·l⁻¹]	Plocha píku [10³ mV·s]	c_i [g·l⁻¹]
0	1,19 ± 0,03	0,70	27,8 ± 0,1	13,41
1	2,4 ± 0,4	1,18	25 ± 3	11,91
2	2,3 ± 0,8	1,14	21 ± 3	10,14
3	3,51 ± 0,02	1,58	18,6 ± 0,8	9,02
4	4,2 ± 0,1	1,86	17,3 ± 0,3	8,40
13	5,12 ± 0,05	2,19	11 ± 1	5,54
17	5,8 ± 0,1	2,44	9,7 ± 0,3	4,78
18	6,2 ± 0,2	2,58	9 ± 1	4,47
19	5,8 ± 0,1	2,45	9,0 ± 0,1	4,43
20	4,8 ± 0,2	2,08	7,21 ± 0,02	3,57
21	4,1 ± 0,2	1,80	7,0 ± 0,1	3,45
23	3,3 ± 0,2	1,50	6,2 ± 0,2	3,08
24	2,3 ± 0,2	1,12	4,9 ± 0,2	2,44

Tabulka 31: Odpadní syrovátka – čtvrtý roztok

t [h]	Plocha píku [10³ mV·s]	c_{km} [g·l⁻¹]	Plocha píku [10³ mV·s]	c_i [g·l⁻¹]
0	1,4 ± 0,1	0,79	26,3 ± 0,1	12,68
1	2,9 ± 0,1	1,34	25,0 ± 0,4	12,08
2	3,1 ± 0,2	1,43	22 ± 1	10,49
3	4,8 ± 0,5	2,06	16 ± 1	7,72
4	5,7 ± 0,1	2,40	14,83 ± 0,03	7,21
13	7,6 ± 0,1	3,12	12,4 ± 0,5	6,05
17	8,32 ± 0,02	3,40	9,0 ± 0,4	4,41
18	8,4 ± 0,2	3,43	8,0 ± 0,4	3,93
19	6,5 ± 0,1	2,70	7,4 ± 0,4	3,67
20	6,2 ± 0,2	2,58	6,8 ± 0,1	3,40
21	5,7 ± 0,4	2,41	6,2 ± 0,6	3,08
23	5,3 ± 0,2	2,26	5,7 ± 0,3	2,86
24	4,5 ± 0,3	1,96	4,3 ± 0,2	2,18