

3. Fuller R. (1989): Probiotics in man and animals. *J.Appl.Bacteriol.* **66**:365-378
4. Gibson G. R., Beatty E.R., Wang X., Cummings J.H. (1995): Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterol.* **108**: 975-982.
5. Sinden R. R. (1994): *DNA Structure and Function*, Academic Press, San Diego 1994, s. 34.
6. Drbohlav J., Elich O., Snášelová J., Roubal P., Černý V., Dráb V., Šalaková A. (2008): Výroční zpráva Výzkumného záměru MSM 2672286101 Mléko - významná součást zdravé a bezpečné výživy, Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha 2008
7. Drbohlav J., Elich O., Snášelová J., Roubal P., Černý V., Dráb V., Šalaková A. (2009): Výroční zpráva Výzkumného záměru MSM 2672286101 Mléko - významná součást zdravé a bezpečné výživy, Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha 2009
8. Deasy B.M., Rea M.C., Fitzgerald F., Cogan T.M., Beresford T.P. (2000): A Rapid PCR Method to Distinguish between *Lactococcus* and *Enterococcus*. *System.Appl.Microbiol.* **23**: 510-522.
9. Jackson Ch.R., Fedorka-Cray P.J., Barrett J.B. (2004): Use of a Genus- and Species-Specific Multiplex PCR for Identification of Enterococci. *J.Clin.Microbiol.*, **42**:3558-3565.
10. Dubernet S., Desmasures N., Guéguen M. (2002): A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiol Lett.* **214**: 271-275.
11. Byun R., Nadkarni M. A., Chmour K.-L., Martin F.E., Jacques N.A., Hunter N. (2004): Quantitative analysis of diverse *Lactobacillus* species present in advanced dental caries. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 3128-3136.
12. Walter J., Tannock G.W., Tilsala-Timisjarvi A., Rodtong S., Loach D.M., Munro K., Alatosava T. (2000): Detection and Identification of Gastrointestinal *Lactobacillus* Species by Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Species-Specific PCR Primers. *Appl. Environ.Microbiol.* **66**: 297-303.
13. Fortina M. G., Ricci G., Mora D., Parini C., Manachini P. L. (2001): Specific identification of *Lactobacillus helveticus* by PCR with *pepC*, *pepN* and *htrA* targeted primers. *FEMS Microbiol.Lett.* **198**: 85-89.
14. Kwon H. - S., Yang E. -H., Yeon S. -W., Kang B.-H., Kim T.-Y. (2004): Rapid identification of probiotic *Lactobacillus* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. *FEMS Microbiology Lett.* **239**:267-75.
15. Quere F., Deschamps A., Undaci M. C. (1997): DNA probe and PCR-specific reaction for *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Microbiol.* **82**: 783-790.
16. Song Y.-L., Kato N., Liu Ch.-X., Matsumiya Y., Kato H., Watanabe K. (2000): Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA innergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. *FEMS Microbiol Lett.* **187** : 167-173.
17. Walter J. (2008): Ecological Role of Lactobacilli in the Gastrointestinal Tract:Implications for Fundamental and Biomedical Research. *Appl.Environ. Microbiol.* **74**:4985-4996.
18. Nes I.F., Diep D.B., Holo H. (2007): Bacteriocin Diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Bacteriol.* **189**: 1189-1198.

Přijato do tisku 5.5.2009

Lektorováno 20.5.2009

VYUŽITÍ KYSELINY MLÉČNÉ ZE SYROVÁTKY PRO PŘÍPRAVU POLYLAKTÁTU A TVORBU BIODEGRADOVATELNÝCH PLASTŮ

Drbohlav J.¹, Šalaková A.¹, Sedlářík V.³, Nehyba A.², Cícvárek J.¹

¹ Milcom a.s. Praha

² VÚM s.r.o. Praha

³ Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Utilization of lactic acid bacteria from whey for preparing of polylactate and production of biodegraded plastics

Abstrakt

Při výrobě sýrů a tvarohů vzniká jako odpadní produkt syrovátka. Syrovátka je významná surovina obsahující celou řadu nutričních látek, které lze dále průmyslově využít. Jednou z možností využití je fermentace sladké syrovátky kmeny bakterií mléčného kvašení. Vznikající kyselina mléčná může být dále využita pro tvorbu gelů a fólií polymerací na polylaktát. V naší práci jsme se zaměřili na vytypování nejvhodnějších kmenů ze Sbírký mlékařských mikroorganismů pro fermentaci sladké syrovátky s požadavkem na tvorbu co nejvyššího množství kyseliny mléčné. Současně bylo provedeno porovnání s fermentací s mléčným substrátem. Byly zjištěny rozdíly mezi fermentacemi v různých substrátech a v rychlosti a hloubce prokysávání médií. Z širokého souboru kmenů byl vybrán kmen *Lactobacillus helveticus* CCDM 108 s nejvyšší produkcí kyseliny mléčné. Dobrou schopnost prokysávat sladkou syrovátku prokázaly i kmeny *Lbc. helveticus* CCDM 92, 98, 121, 122, 447.

Abstract

Whey as waste product occurs by cheese and quark production. The whey is a significant raw material containing a range of nutritional matters, which is possible industrial utilize. The fermentation of sweet way by the strains of

INFORMACE

CAMPINA - NEJVĚTŠÍ NĚMECKÝ VÝROBCE ŠKOLNÍHO MLÉKA

Campina vyrábí školní mléko pod značkou "Landliebe". Je to čerstvé mléko s prodlouženou trvanlivostí. 1 litr odtučněného mléka stojí ve škole v současné době 30 centů, mléčný smíšený nápoj (čokoládové s podílem 50 % trhu, vanilkové, jahodové a nově karamelové) se nabízí za 35 centů. EU subvencuje v současné době kg školního mléka nezávisle na obsahu tuku 18 centy. Do základních škol se mléko dodává denně, do školek a družin dva až třikrát týdně. Školky a družiny objednávají převážně 1 litrové lahve (zálohované) s čerstvým plnotučným mlékem nebo také mléko v kartonech nebo 10 litrové nádoby k čerpání nebo také H-mléko. Převažující obal pro základní školy je 0,25 l skleněná láhev, další školy mají v oblibě kartónové obaly nebo automaty. Týdně závod v Kolíně vyrábí ca 300 000 litrů školního mléka, což odpovídá asi 1 milionů obalových jednotek.

Dtsche Milchwirtschaft, 60, 2009, č.4 (ben)

lactic acid bacteria is one of these possibilities. Obtained lactic acid it can be polymerize on polylactate and used father for gel and folia production. In our work we aim on selection the most suitable strains from the Collection of dairy microorganisms for sweet way fermentation with order the highest quantity of produced lactic acid. At the same time was made comparison with a milk substrate. The differences between various substrates and in speed and deep of media souring were founded. The strain *Lactobacillus helveticus* CCDM 108 with the highest lactic acid production was chosen from the wide group of strains. Also the other strains *Lbc. helveticus* CCDM 92, 98, 121, 122, 447 have shown the good ability for lactic acid fermentation.

Úvod

Cílem této práce bylo vybrat vhodné kmeny bakterií mléčného kvašení pro fermentaci sladké syrovátky, která je odpadním produktem při výrobě sýrů a to za účelem dosažení co nejvyšší produkce kyseliny mléčné, kterou by bylo možno následně využít k výrobě biodegradovatelných plastů. Výzkum byl prováděn v rámci projektu MŠMT 2B 8071.

Syrovátka je odpadní produkt při výrobě sýrů. Protože syrovátka obsahuje významné množství mléčného cukru laktózy je jednou z možností jejího zhodnocení, využít ji jako substrát pro fermentaci. Konečným produktem fermentace bakteriemi mléčného kvašení je kyselina mléčná. Fermentační způsob produkce kyseliny mléčné je výhodnější než chemická syntéza, protože se může tvořit opticky čistá kyselina mléčná. Požadavek na opticky čistou kyselinu mléčnou je výrazně vyšší, protože tato může být použita pro výrobu biodegradovatelného polymeru a dalších průmyslových aplikací. (Panesar et al., 2007).

Syrovátka je vážný problém znečištění životního prostředí. Dostane-li se do půdy, ovlivňuje její fyzikální a chemickou strukturu, jejímž výsledkem je snížení úrodnosti. Když se dostane do vod, redukuje vodní život vyčerpáním rozpuštěného kyslíku (Gonzales-Siso, 1996; Marvaha & Kennedy, 1988). Syrovátka představuje hrozbu pro životní prostředí, je proto nezbytné nalézt efektivní a trvalé řešení jejího využití.

Složení a typ syrovátky závisí na zpracování mléka. Syrovátka pocházející ze sýrů vzniká koagulací kaseinu syřidlem nebo koagulačními preparáty, které obsahují chymosin nebo jiné kasein koagulující enzymy (Fox, Guinee, Cogan, & McSweeney, 2000). Ke koagulaci syřidlem dochází přibližně při pH 6,5; tato syrovátka se označuje jako sladká syrovátka. Kyselá syrovátka (pH <5) vzniká fermentací bakteriemi nebo přidavkem organické nebo minerální kyseliny při výrobě čerstvých sýrů a většiny průmyslových kaseinů (Jelen, 2003).

Většina bakterií mléčného kvašení (LAB) je fakultativně anaerobní, kataláza-negativní, nepohyblivá a nesporogenní. Bakterie mléčného kvašení jsou obecně považovány za bezpečné bakterie (GRAS) (Limsowtin, Broome, & Powell, 2003). *Lactobacillus* je zdaleka nejrozšířenější rod bakterií mléčného kvašení a bylo zjištěno více než 125 species

a subspecies (Axelsson, 2004; Euzéby, 1997; Limsowtin et al., 2003). Klíčovou vlastností, definující bakterie mléčného kvašení je produkce kyseliny mléčné jako hlavního nebo jediného produktu fermentace. Základním rysem metabolismu bakterií mléčného kvašení je fermentace sacharidů (Parente & Cogan, 2004). Teoreticky jedna molekula glukózy při homofermentativním kvašení produkuje 2 molekuly kyseliny mléčné a s čistým ziskem 2 ATP molekuly na molekulu glukózy. Při homofermentativním kvašení druhu *Lactobacillus* metabolizují sacharidy podle Embden - Meyerhofova schématu a kyselina mléčná je jediným nebo převažujícím produktem za typických fermentačních podmínek (Limsowtin et al., 2003). Nefermentují pentózy nebo glukonát. Fakultativně heterofermentativní species metabolizují hexózy podle Embden-Meyerhofova schématu, ale pentózy a některé další látky jsou metabolizovány cestou fosfoketolázového schématu za produkce kyseliny mléčné a dalších produktů (typická je kyselina octová a etanol). Obligatorní heterofermentativní species užívají pro metabolismus cukru pouze fosfoketolázové schéma a tak vedle kyseliny mléčné produkují významné množství kyseliny octové anebo etanolu s tvorbou oxidu uhličitého (Axelsson, 2004).

Přítomnost kyslíku může významně ovlivnit metabolismus (Condon, 1987). D-galaktóza je metabolizována buď cestou tagatosa 6-fosfátu nebo podle schématu Leloirra. Schéma podle Leloirra ukazuje, že některé bakterie mléčného kvašení (např. *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* metabolizují pouze polovinu glukózy po transportu laktózy a rozštěpí pomocí galaktózidázy, zatímco galaktóza je vylučována do media (Hickey, Hillier, & Jago, 1986; Hutkins & Morris, 1987). Vylučování je přisuzováno nízké aktivitě galaktokinázy.

Růst bakterií ve fermentačním mediu ovlivňují různé faktory. Vedle komplexu nutričních požadavků, je jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících růst bakterií mléčného kvašení teplota. Pro nejvyšší růst bakterií je potřebná optimální teplota, která závisí na charakteristice použitého mikroorganismu. Když je teplota pod nebo nad optimálním růstem, mikrobiální aktivita je podstatně snížena a mikroorganismy mohou eventuelně hynout (Peleg, 1995; Rosso, Lobry, Bajard, & Flandrois, 1995). Optimální teplota pro růst kolísá podle rodu bakterií mléčného kvašení od 20 do 45 °C (Dicks, Dellaglio, & Collins, 1995; Wood & Holzappel, 1995). V závislosti na optimální teplotě je většina laktobacilů z kategorie mezofilních, nicméně *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (*L. bulgaricus*), *L. thermophilus* a *L. delbrueckii* mohou být zařazeny do kategorie termofilních. Produkce kyseliny mléčné fermentací může být uskutečněna při srovnatelně vysokých teplotách použitím vhodných bakterií. Při fermentaci za použití *L. delbrueckii* a *L. bulgaricus* může být teplota 45 °C a vyšší (Buchta, 1983). *L. helveticus* a *L. acidophilus* mohou být kultivovány v rozmezí teplot 28 - 35 °C. Avšak pro ostatní bakterie jako je *L. casei* preferují teplotu 28 - 35 °C.

Koncentrace vodíkových iontů prostředí během fermentace také ovlivňuje mikrobiální růst a rychlost produkce

produktu. Hodnota pH také ovlivňuje syntézu RNA a syntézu proteinu (Klovrychev, Korolev, & Bulgakova, 1979).

Teplota a pH jsou klíčovými parametry prostředí. Ovlivňují proces produkce kyseliny mléčné. *L. helveticus* vykázal zvýšené využití laktózy a produkci kyseliny mléčné při zvýšené teplotě (23 - 42 °C), maximum produkce kyseliny mléčné bylo při 42 °C (Tango & Ghaly, 1999). Byl studován vliv pH na *L. helveticus* ve vsádkové kultuře a nejvyšší produktivita byla získána při pH 5,5 (Norton, Lacroix, & Vuillemand, 1993). Teplota 42 °C a pH 5,8 byly optimální během produkce kyseliny mléčné kmenem *L. helveticus* při vysoké koncentraci buněk v syrovátkovém ultrafiltrátu (Kulozik & Wilde, 1999). Největší objem produkce kyseliny mléčné pomocí *L. casei* byl získán při 37 °C a pH 5,5 (Büyükkileci & Harsa, 2004). Produkce várky byla 1,87 g/l/h při 37 °C při laboratorní studii, zatímco ve fermentoru byla produkce 3,97 g/l/h.

Experimentální část

Byl proveden výběr kmenů z tuzemských zdrojů, které byly podrobeny opětovné identifikaci molekulárně biologickými metodami. Následně byly provedeny modelové fermentace ve sladké syrovátce. Pro porovnání byly pokusy provedeny i v mléce. Byly zaznamenány kysací křivky jednotlivých kmenů v obou médiích. Dále byla sledována tvorba organických kyselin v syrovátce po ukončené fermentaci.

Použité suroviny

1. Surovátka sladká /výroba sýrů eidam/

Byla stanovena mikrobiální kvalita suroviny před pasterací stanovením počtu koliformních bakterií, stanovením celkového počtu mikroorganismů a stanovením počtu kvasinek a plísní.

stanovení počtu KTJ koliformních bakterií na živné půdě VČŽL 4.10¹

stanovení celkového počtu mikroorganismů na živné půdě GTK 25.10³, z toho aerobních sporulujících mikroorganismů 3.10¹

stanovení počtu KTJ kvasinek a plísní na živné půdě GKCH 1.10¹

chemické složení: sušina 4,2 %

bílkoviny 0,52 %

laktóza 3,35 %

Surovátka byla pasterována po dobu 1 hodiny při teplotě 98 °C.

2. Mléko 1,5 % tuku /pasterované/

Byla stanovena mikrobiální kvalita mléka před druhou pasterací stanovením počtu koliformních bakterií, stanovením celkového počtu mikroorganismů a stanovením počtu kvasinek a plísní

stanovení počtu KTJ koliformních bakterií na živné půdě VČŽL 0

stanovení celkového počtu mikroorganismů na živné půdě GTK 0

stanovení počtu KTJ kvasinek a plísní na živné půdě GKCH 0

chemické složení: sušina 10,62 %

bílkoviny 3,64 %

laktóza 4,87 %

Mléko bylo pasterováno po dobu 1 hodiny při teplotě 98 °C.

3. Kmeny laktobacilů

CCD 7190 T typový kmen *Lbc. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

a kmeny ze Sbírký mlékařských mikroorganismů Laktoflora:

CCDM 92, CCDM 98, CCDM 108, CCDM 121, CCDM 122, CCDM 125, CCDM 150, CCDM 154, CCDM 447, CCDM 552, CCDM 714, CCDM 767, CCDM 768

Zařzení

1. Ionosep - přístroj určený pro analýzy ionogenních materiálů na principu kapilární izotachofórey (ITP)
2. pH metr Jenway 3520 - jednonábové zařzení k měření aktivní kyselosti kontinuálním způsobem

Výsledky

Ve Sbírcé mlékařských mikroorganismů byly vybrány kmeny laktobacilů k testování kysací schopnosti ve sladké syrovátce. Bylo vybráno širší spektrum druhů laktobacilů. Kmeny byly nově identifikovány molekulárně biologickými metodami PCR, rep-PCR a RAPD. Na základě výsledků byly některé kmeny nově přeřazeny v rámci rodu do odpovídajících druhů.

CCDM 92 *Lbc. helveticus*, dříve *Lbc. acidophilus*

CCDM 98 *Lbc. helveticus*, dříve *Lbc. acidophilus*

CCDM 108 *Lbc. helveticus*, dříve *Lbc. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

CCDM 121 *Lbc. helveticus*

CCDM 122 *Lbc. helveticus*

CCDM 125 *Lbc. helveticus*, dříve *Lbc. delbrueckii* subsp. *lactis*

CCDM 150 *Lbc. rhamnosus*

CCDM 154 *Lbc. fermentum*

CCDM 447 *Lbc. helveticus*, dříve *Lbc. delbrueckii* subsp. *lactis*

CCDM 552 *Lbc. helveticus*

CCDM 714 *Lbc. helveticus*

CCDM 767 *Lbc. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

CCDM 768 *Lbc. helveticus*

U základního spektra laktobacilů byla monitorována kysací schopnost v různých substrátech v závislosti na čase. Sledovanými substráty byla sladká syrovátka získaná při výrobě sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou a mléko s obsahem tuku 1,5 % tuku, a to za vhodných podmínek kultivace pro termofilní mikroorganismy.

Po fermentaci byla sledována jejich schopnost produkce kyseliny mléčné a dalších organických kyselin v syrovátce.

Mlékařské kultury byly vedeny dlouhodobě před pokusem v mléce. Pouze kultury CCD 7190 a CCDM 552, 714 a 768 byly obnoveny z lyofilizované formy do tekuté živné půdy MRS bujón. Vybrané mikrobiální kmeny jsou termofilní, kultivační teplota fermentací byla 37 °C.

Tabulky hodnot aktivních kyselostí jednotlivých sledovaných kmenů kultivovaných v mléce (M) a ve sladké syrovátce (S).

Tab. 1 kmen CCDM 92

čas/hod	0	3	6	9	12	15	18	21
pH S	5,78	5,1	4,4	3,82	3,55	3,43	3,39	3,33
pH M	6,41	6,07	4,73	3,91	3,73	3,64	3,58	3,53

Tab. 2 kmen CCDM 98

čas/hod	0	3	6	9	12	15	18	21
pH S	5,84	5,28	4,18	3,69	3,49	3,36	3,28	3,22
pH M	6,38	6,22	5,4	4,18	3,73	3,57	3,49	3,43

Tab. 3 kmen CCDM 108

čas/hod	0	3	6	9	12	15	18	21
pH S	5,84	5,22	4,18	3,71	3,51	3,339	3,3	3,26
pH M	6,52	6,22	5,14	4,00	3,67	3,53	3,44	3,39

Tab. 4 kmen CCDM 121

čas/hod	0	3	6	9	12	15	18	21
pH S	5,84	5,26	4,36	3,88	3,65	3,57	3,49	3,45
pH M	6,36	6,20	5,28	4,08	3,75	3,63	3,57	3,53

Tab. 5 kmen CCDM 122

čas/hod	0	3	6	9	12	15	18	21
pH S	5,96	5,36	4,56	3,92	3,61	3,47	3,39	3,33
pH M	6,44	6,30	5,62	4,44	3,83	3,65	3,57	3,51

Tab. 6 kmen CCDM 125

čas/hod	0	3	6	9	12	15	18	21
pH S	5,66	5,24	4,28	3,88	3,71	3,61	3,55	3,51
pH M	6,44	6,28	5,28	4,11	3,78	3,65	3,59	3,53

Tab. 7 kmen CCDM 150

čas/hod	0	3	6	9	12	15	18	21
pH S	6,01	5,95	5,85	5,69	5,49	5,25	5,07	4,85
pH M	6,61	6,58	6,44	6,18	5,72	4,98	4,36	4,06

Mikrobiální kmeny byly zaočkovány 1 % tekuté matečné kultury do připravených vysoce pasterovaných substrátů a kultivovány při uvedené teplotě po dobu 21 hodin. Po celou dobu fermentace byly sledovány změny v aktivní kyselosti. Měření aktivní kyselosti bylo prováděno postupně jednonábovým pH metrem.

Byly naměřeny aktivní kyselosti testovaných kmenů laktobacilů kultivované v mléce a v syrovátce (tabulky č. 1-14 - Stanovení hodnot aktivních kyselostí jednotlivých sledovaných kmenů), následně byly srovnávány testované kmeny kultivované v syrovátce z hlediska kysací schopnosti v závislosti na čase (grafy č. 1-4 - Srovnání fermentace syrovátky sledovanými kmeny laktobacilů v závislosti na čase) a následuje přehledová tabulka č. 15 obsahu organických kyselin v syrovátkovém substrátě po ukončení fermentace tj. po 21 hodině kultivace.

Diskuze

Pro sledování schopnosti fermentovat sladkou syrovátku a produkovat z ní kyselinu mléčnou bylo vybráno široké spektrum laktobacilů - *Lbc. acidophilus*, *Lbc. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lbc. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lbc. hel-*

Tab. 8 kmen CCDM 154

čas/hod	0	3	6	9	12	15	18	21
pH S	5,94	5,51	4,99	4,71	4,52	4,36	4,17	4,07
pH M	6,55	6,37	4,85	4,15	3,97	3,89	3,83	3,77

Tab. 9 kmen CCDM 447

čas/hod	0	3	6	9	12	15	18	21
pH S	5,72	5,06	4,16	3,75	3,57	3,51	3,44	3,38
pH M	6,47	5,95	4,47	3,72	3,52	3,42	3,35	3,31

Tab. 10 kmen CCDM 552

čas/hod	0	3	6	9	12	15	18	21
pH S	5,86	5,75	5,41	5,15	4,99	4,83	4,73	4,63
pH M	6,40	6,26	6,12	6,05	5,99	5,93	5,89	5,83

Tab. 11 kmen CCDM 714

čas/hod	0	3	6	9	12	15	18	21
pH S	5,96	5,99	5,93	5,75	5,23	4,57	4,05	3,77
pH M	6,44	6,36	5,82	4,72	3,94	3,69	3,59	3,53

Tab. 12 kmen CCDM 767

čas/hod	0	3	6	9	12	15	18	21
pH S	5,99	5,42	5,06	4,86	4,72	4,62	4,52	4,42
pH M	6,44	6,06	4,54	4,04	3,92	3,84	3,80	3,76

Tab. 13 kmen CCDM 768

čas/hod	0	3	6	9	12	15	18	21
pH S	5,91	5,83	5,23	4,27	3,76	3,54	3,42	3,33
pH M	6,56	6,38	5,58	4,42	3,96	3,80	3,73	3,67

Tab. 14 kmen CCM 7190^T

čas/hod	0	3	6	9	12	15	18	21
pH S	6,13	6,13	6,1	5,98	5,78	5,6	5,44	5,36
pH M	6,4	6,39	6,39	6,35	6,25	6,15	6,07	5,95

veticus, *Lbc. fermentum*, *Lbc. rhamnosus* ze Sbírkový mlékařských mikroorganismů Laktoflora (Milcom, a.s.).

Výběr byl zaměřen na kmeny s výraznou aktivní kyselostí v mléce nebo MRS bujónu.

Byly provedeny reidentifikace sbírkových kmenů a některé námi vybrané kmeny byly po provedení reidentifikací molekulárně biologickými metodami přeřazeny v rámci rodu do jiných druhů. Většina z vybraných kmenů byla reidentifikována jako *Lbc. helveticus*, který je v literatuře zmiňován jako vhodný druh při tvorbě kyseliny mléčné.

Pro srovnání s fermentací syrovátky byly provedeny srovnávací fermentace v mléce.

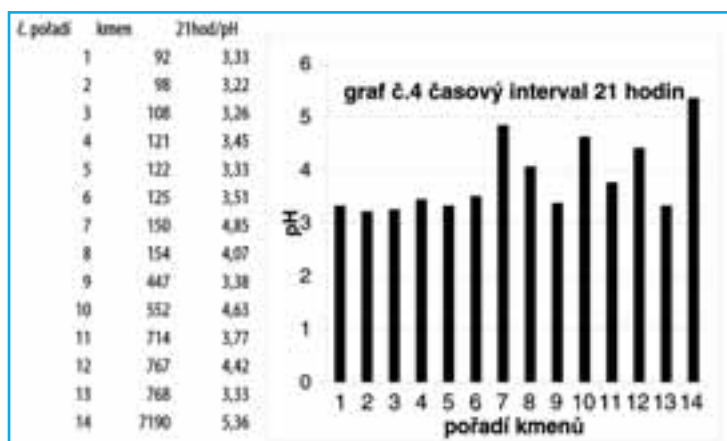
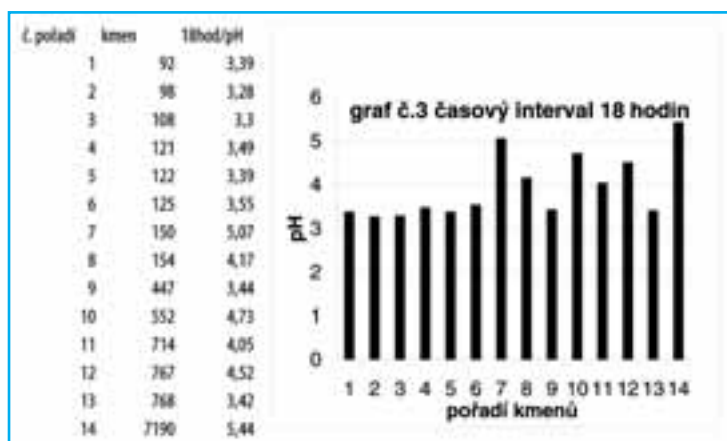
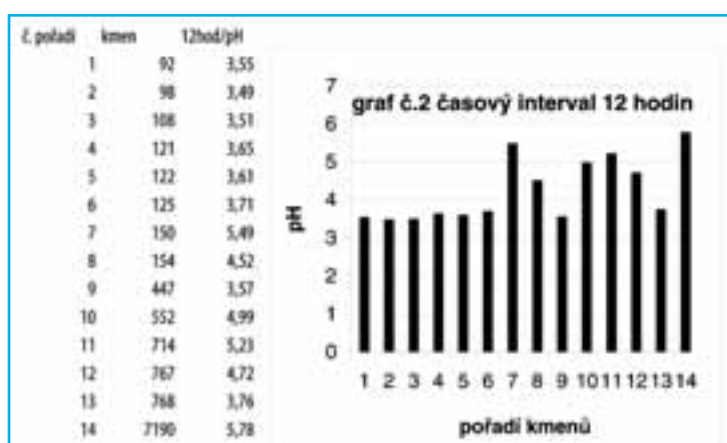
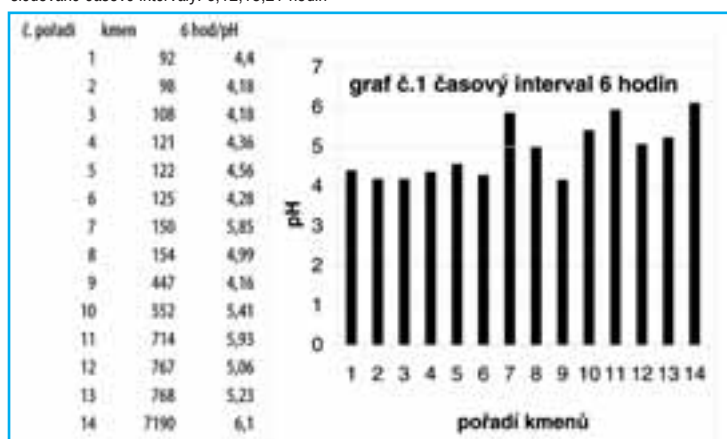
Provedené kysací křivky ukázaly rozdíly mezi jednotlivými kmeny mezi sebou, ale i rozdíly mezi fermentacemi jednoho kmene v různých substrátech, zejména v rychlosti prokysání.

Pro zdárný bezproblémový průběh fermentace a to zejména v podmínkách průmyslové výroby, je od mlékařských kultur požadováno rychlé prokysání substrátu a tím eliminování případné sekundární kontaminace.

Ze skupiny vybraných kmenů se kmeny CCDM 98, 108, 447 vyznačují výrazně rychlým prokysáváním v syrovátce. Jako kritérium sledování byla vzata 6. hodina fermentace.

Graf 1-4 Srovnání fermentace syrovátky sledovanými kmeny laktobacilů v závislosti na čase

sledované časové intervaly: 6,12,18,21 hodin



Tyto kmeny se vyznačují i v dalším průběhu hlubokým prokysáváním.

Fermentace byly ukončeny po 21 hodině. Dobré aktivní kyselosti bylo po 21. hodinách fermentace zaznamenáno ještě u kmenů CCDM 92, 122 a 768.

Přínosné je porovnání schopnosti fermentace souběžně ve dvou substrátech v syrovátce a v mléce.

Obecně lze říci, že kmeny které dobře prokysaly syrovátku, dobře kysaly i v mléce. Pouze kmeny, které před pokusem byly přeočkovávány v MRS bujónu CCDM 552 a CCM 7190, pak hůře fermentovaly mléko i syrovátku, výrazně horší výsledky v syrovátce než v mléce byly zaznamenány u kmenů CCDM 150 a 767.

Syrovátkové substráty fermentované vybranými sledovanými kmeny a fermentovaná mléka byly následně analyzovány z hlediska obsahu organických kyselin.

Nejvyšší množství kyseliny mléčné bylo vytvořeno ze sladké syrovátky po 21 hodinách kultivace při teplotě 37 °C kmenem CCDM 108, následují kmeny CCDM 98, 121, 447.

Závěr

Zaměřili jsme se na sledování kysací aktivity vybraných kmenů laktobacilů ve sladké syrovátce a schopnost tvorby kyseliny mléčné a dalších organických kyselin.

Bylo zjištěno, že kmeny CCDM 98, 108, 447 mají ve sladké syrovátce z dané skupiny kmenů nejrychlejší kysací aktivitu. Hluboké prokysání bylo zaznamenáno po ukončení fermentace i u kmenů CCDM 92, 122, 768. Rychlost prokysání je důležitou technologickou vlastností a prevencí sekundární kontaminace.

Izotachoforetickou analýzou tvorby organických kyselin v syrovátkovém substrátu bylo konstatováno, že ze sledovaných kmenů bylo nejvíce kyseliny mléčné vytvořeno kmenem *Lbc. helveticus* CCDM 108.

Vybrané kmeny s dobrou schopností prokysávat sladkou syrovátku a s výraznou tvorbou kyseliny mléčné budou využity pro další studium zpracování syrovátky na biologicky odbouratelné polymery pro obalové materiály v rámci projektu MŠMT 2B 8071.

Úspěšné vyřešení cílů projektu poskytne vědomosti pro rozvíjení efektivního zpracování syrovátky, jako odpadní látky resp. vedlejšího produktu mlékárenské produkce sýrů, tvarohů a kaseinu a zároveň poskytne znalosti pro rozvíjení produkce snadno degradabilního obalového materiálu na bázi poly-laktidu pocházejícího z kyseliny mléčné vzniklé fermentací laktózy. Efekt výzkumu by se mohl pozitivně promítnout ve snižování zátěže životního prostředí odpadními obalovými materiály.

Tab. 15 Stanovení vybraných kyselin v syrovátce

vzorek	kys. mravenčí		kys. citronová		kys. fosforečná		kys. mléčná		kys. octová		kys. propionová		kys. máselná	
	Cm		Cm		Cm		Cm		Cm		Cm		Cm	
	[g/l]	[mg/kg]	[g/l]	[mg/kg]	[g/l]	[mg/kg]	[g/l]	[mg/kg]	[g/l]	[mg/kg]	[g/l]	[mg/kg]	[g/l]	[mg/kg]
CCDM 125	0,000	0,0	0,469	426,1	0,225	211,9	7,792	7413,8	0,407	386,3	0,128	119,5	0,000	0,0
SD	± 0,000	± 0,0	± 0,031	± 29,4	± 0,047	± 44,3	± 0,139	± 132,1	± 0,003	± 3,1	± 0,001	± 0,7	± 0,000	± 0,0
CCDM 447	0,000	0,0	0,514	468,3	0,269	253,9	8,499	8085,6	0,419	396,9	0,125	116,9	0,000	0,0
SD	± 0,000	± 0,0	± 0,013	± 12,7	± 0,002	± 2,3	± 0,004	± 3,4	± 0,001	± 0,7	± 0,000	± 0,4	± 0,000	± 0,0
CCDM 92	0,000	0,0	0,381	385,6	0,292	293,6	7,648	7694,8	0,411	413,8	0,127	127,9	0,000	0,0
SD	± 0,000	± 0,0	± 0,025	± 24,9	± 0,002	± 1,8	± 0,074	± 74,6	± 0,002	± 1,8	± 0,002	± 1,6	± 0,000	± 0,0
CCDM 98	0,000	0,0	0,779	735,2	0,238	227,5	9,635	9286,3	0,192	184,7	0,107	101,9	0,000	0,0
SD	± 0,000	± 0,0	± 0,085	± 81,4	± 0,006	± 5,8	± 0,078	± 74,9	± 0,001	± 1,0	± 0,000	± 0,0	± 0,000	± 0,0
CCDM 121	0,000	0,0	0,527	500,1	0,244	235,5	8,911	8657,5	0,400	387,4	0,093	89,3	0,000	0,0
SD	± 0,000	± 0,0	± 0,027	± 26,0	± 0,016	± 15,3	± 0,205	± 199,0	± 0,003	± 2,5	± 0,024	± 22,9	± 0,000	± 0,0
CCDM 767	0,000	0,0	1,271	1249,7	0,618	609,3	2,499	2468,5	0,138	136,3	0,054	52,9	0,000	0,0
SD	± 0,000	± 0,0	± 0,004	± 4,1	± 0,018	± 17,9	± 0,082	± 81,3	± 0,001	± 1,1	± 0,003	± 2,7	± 0,000	± 0,0
CCDM 108	0,000	0,0	0,656	631,7	0,235	228,4	9,631	9413,8	0,305	297,6	0,086	83,5	0,000	0,0
SD	± 0,000	± 0,0	± 0,028	± 27,2	± 0,009	± 8,9	± 0,077	± 75,5	± 0,014	± 13,7	± 0,014	± 13,5	± 0,000	± 0,0
CCDM 154	0,000	0,0	1,063	1086,0	0,440	447,4	3,378	3428,3	0,246	250,0	0,058	59,9	0,000	0,0
SD	± 0,000	± 0,0	± 0,006	± 6,3	± 0,007	± 7,4	± 0,061	± 61,7	± 0,003	± 3,3	± 0,000	± 0,0	± 0,000	± 0,0
CCDM 122	0,000	0,0	0,518	547,9	0,258	268,0	7,537	7778,0	0,370	382,7	0,095	99,0	0,000	0,0
SD	± 0,000	± 0,0	± 0,030	± 30,9	± 0,012	± 12,5	± 0,148	± 152,6	± 0,021	± 22,0	± 0,019	± 19,5	± 0,000	± 0,0
CCDM 150	0,000	0,0	1,129	1153,0	0,548	557,4	2,990	3034,1	0,187	190,7	0,062	63,5	0,000	0,0
SD	± 0,000	± 0,0	± 0,021	± 20,9	± 0,010	± 10,5	± 0,037	± 37,6	± 0,003	± 2,6	± 0,001	± 1,2	± 0,000	± 0,0
CCDM 768	0,000	0,0	0,556	579,7	0,300	308,4	7,667	7851,9	0,376	386,2	0,079	81,4	0,000	0,0
SD	± 0,000	± 0,0	± 0,016	± 16,9	± 0,013	± 13,0	± 0,054	± 54,9	± 0,016	± 16,6	± 0,018	± 18,1	± 0,000	± 0,0
CCDM 552	0,000	0,0	1,181	1184,9	0,753	755,5	1,555	1558,3	0,148	148,6	0,112	112,4	0,000	0,0
SD	± 0,000	± 0,0	± 0,012	± 12,4	± 0,015	± 14,6	± 0,027	± 26,8	± 0,001	± 0,7	± 0,003	± 3,2	± 0,000	± 0,0
CCM 7190	0,000	0,0	1,223	1199,0	0,794	781,7	1,170	1155,2	0,157	154,5	0,109	106,7	0,000	0,0
SD	± 0,000	± 0,0	± 0,009	± 9,1	± 0,007	± 6,6	± 0,007	± 6,6	± 0,000	± 0,4	± 0,002	± 2,3	± 0,000	± 0,0
CCDM 714	0,000	0,0	1,071	1038,9	0,390	380,2	5,784	5660,7	0,270	263,3	0,120	116,4	0,000	0,0
SD	± 0,000	± 0,0	± 0,006	± 6,0	± 0,012	± 11,2	± 0,050	± 49,3	± 0,002	± 1,8	± 0,000	± 0,0	± 0,000	± 0,0
KONTROLA	0,000	0,0	1,247	1210,1	0,681	664,8	0,643	632,7	0,103	100,7	0,059	57,1	0,000	0,0
SD	± 0,000	± 0,0	± 0,006	± 6,0	± 0,010	± 9,5	± 0,131	± 127,9	± 0,004	± 3,5	± 0,002	± 1,5	± 0,000	± 0,0

Literatura

- Axelsson, L.** (2004): Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In S. Salminen, A. von Wright, & A. Ouwehand (Eds.), Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects (pp. 1-66). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Buchta, K.** (1983): Lactic acid. In H. J. Rehm & G. Reed (Eds.). Biotechnology (Vol. 3, pp. 409-417). Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH.
- Büyükkileci, A. O., & Harsa, S.** (2004): Batch production of L(+) lactic acid from whey by *Lactobacillus casei* (NRRL B-441). Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 79, 1036-1040.
- Condon, S.** (1987): Responses of lactic acid bacteria to oxygen. FEMS Microbiology Reviews, 46, 269-280.
- Dicks, L. M. T., Dellaglio, F., & Collins, M. D.** (1995): Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 45, 395-397.
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. H.** (2000): Fundamentals of Cheese Science. Gaithersburg: Aspen Publishers.
- Gonzalez-Siso, M. I.** (1996): The biotechnological utilization of cheese whey: A review. Bioresource Technology, 57, 1-17.
- Hickey, M. W., Hillier, A. J., & Jago, G. R.** (1986): Transport and metabolism of lactose, glucose and galactose in homofermentative lactobacilli. Applied and Environmental Microbiology, 51, 825-831.
- Hutkins, R. W., & Morris, H. A.** (1987): Carbohydrate metabolism in *Streptococcus thermophilus*: A review. Journal of Food Protection, 50, 876-884.
- Jelen, P.** (2003): Whey processing. In H. Roginski, J. W. Fuquay, & P. F. Fox (Eds.). Encyclopedia of dairy sciences (Vol. 4, pp. 2739-2751). London: Academic Press.
- Klovrychev, M. F., Korolev, P. N., & Bulgakova, V. G.** (1979): Effect of copper ions and unfavourable pH on protein and RNA synthesis of *Candida utilis*. Microbiology, 47, 357-361.

- Kulozik, U., & Wilde, J.** (1999): Rapid lactic acid production at high cell concentrations in whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus*. Enzyme and Microbial Technology, 24, 297-302.
- Limsowtin, G. K. Y., Broome, M. C., & Powell, I. B.** (2003): Lactic acid bacteria, taxonomy. In H. Roginski, J. W. Fuquay, & P. F. Fox (Eds.). Encyclopedia of Dairy Sciences (Vol. 3, pp. 2739-2751). London: Academic Press.
- Marwaha, S. S., & Kennedy, J. F.** (1988): Review: Whey pollution problem and potential utilization. International Journal of Food Science and Technology, 23, 323-336.
- Norton, S., Lacroix, C., & Vuillemand, J. C.** (1993): Effect of pH on the morphology of *Lactobacillus helveticus* in free-cell batch and immobilized-cell continuous fermentation for lactic acid production from whey permeate. Food Biotechnology, 7, 235-251.
- Panesar, P. S., Kennedy, J. F., Gandhi, D. N., & Bunko, K.** (2007): Bioutilisation of whey for lactic acid production. Food Chemistry, 105, s.1-14.
- Parente, E., & Cogan, T. M.** (2004): Starter cultures: General aspects (3rd ed. In P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, T. M. Cogan, & T. P. Guinee (Eds.). Cheese: Chemistry, physics and microbiology (Vol. 1, pp. 122-147). London: Elsevier Academic Press.
- Peleg, M.** (1995): A model of temperature effects on the microbial populations from growth to lethality. Journal of Science Food and Agriculture, 68, 83-89.
- Rosso, L., Lobry, J. R., Bajard, S., & Flandrois, J. P.** (1995): Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. Applied and Environmental Microbiology, 61, 610-616.
- Tango, M. S. A., & Ghaly, A. E.** (1999): Effect of temperature on lactic acid production from cheese whey using *Lactobacillus helveticus* under batch conditions. Biomass Bioenergy, 16, 61-78.
- Wood, B. J. B., & Holzapel, W. H.** (1995): The genera of lactic acid bacteria (1st ed.). Glasgow: Blackie Academic and Professional.

Přijato do tisku 15. 5. 2009

Lektorováno 15. 6. 2009