

rence získáme komplexnější informace o rozdílech v adhezní schopnosti jednotlivých bakteriálních kmenů a můžeme tak odlišit jednotlivé typy interakcí a molekul, které zprostředkují interakce mezi hostitelem a mikroorganismem.

### Literatura

- FORSTNER, J.F., FORSTNER, G.G. 1994. Gastrointestinal mucus; in Johnson LR (ed): Physiology of the Gastrointestinal Tract. New York, Raven Press, s. 1255-1283.
- ATUMA, C., STRUGULA, V., ALLEN, A., HOLM, L. 2001. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state *in vivo*. *Am. J. Physiol.* 280: s. G922-G929.
- OUWEHAND, A.C., KIRJAVAINEN, P.V., SHORTT, C. AND SALMINEN, S. 1999. Probiotics: mechanisms and established effects. *Int. Dairy J.*, 9, s. 43-52.
- DUNNE, C., O'MAHONY, L., MURPHY, L., THORNTON, G., MORRISSEY, D., O'HALLORAN, S., FEENEY, M., FLYNN, S. ET AL. 2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73, s. S386-S392.
- PAN, W.H., LI, P.L., LIU, Z.Y. 2006. The correlation between surface hydrophobicity and adherence of *Bifidobacterium* strains from centenarians' faeces. *Anaerobe*, 12, s. 148-152.
- COCONNIER, M., KLAENHAMMER, T.R., KERNEIS, S., BERNET, M. AND SERVIN, A.L. 1992. Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2F04 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, s. 2034-2039.
- IZQUIERDO, E., MEDINA, M., ENNAHAR, S., MARCHIONI, E. AND SANZ, Y. 2008. Resistance to simulated gastrointestinal conditions and adhesion to mucus as probiotic criteria for *bifidobacterium longum* strains. *Curr. Microbiol.*, 56, s. 613-618.
- LAPARRA J.M., SANZ Y. 2009. Comparison of *in vitro* models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. *Lett. Appl. Microbiol.*, 49, s. 695-701.
- LI, X.J., YUE, L.Y., GUAN, X.F. AND QIAO, S.Y. 2008. The adhesion of putative probiotic lactobacilli to cultured epithelial cells and porcine intestinal mucus. *J. Appl. Microbiol.*, 104, s. 1082-1091.
- BIANCHI, M.A., DEL RIO, D., PELLEGRINI, N., SANSEBASTIANO, G., NEVIANI, E. AND BRIGHENTI, F. 2004. A fluorescence-based method for the detection of adhesive properties of lactic acid bacteria to Caco-2 cells. *Lett. Appl. Microbiol.*, 39, s. 301-305.
- PONTIER, C., PACHOT, J., BOTHAM, R., LENFANT, B. AND ARNAUD, P. 2001. HT29-MTX and Caco-2 / TC7 monolayers as predictive models for human intestinal absorption: Role of the mucus layer. *J. Pharm. Sci.*, 90, s. 1608-1619.
- PETERSON, M.D. AND MOOSEKER, M.S. 1992. Characterization of the enterocyte-like brush border cytoskeleton of the C2BB6 clones of the human intestinal cell line, Caco-2. *J. Cell Sci.*, 102, s. 581-600.
- CROCIANI, J., GRILL, J.P., HUPPERT, M. AND BALLONGUE, J. 1995. Adhesion of different bifidobacteria strains to human enterocyte-like Caco-2 cells and comparison with *in vivo* study. *Lett. Appl. Microbiol.* 21, s. 146-148.
- LARSEN N, NISSEN P, WILLATS W.G.T. 2007. The effect of calcium ions on adhesion and competitive exclusion of *Lactobacillus* ssp. and *E. coli* O138. *Int. J. Food Microbiol.*, 114, s. 113-119.
- ZARATE, G., MORATA DE, A.V., PEREZ, C.A., GONZALEZ, S. 2002. Some factors affecting the adherence of probiotic *Propionibacterium acidipropionici* CRL 1198 to intestinal epithelial cells. *Can. J. Microbiol.* 48, s. 449-457

Další použitá literatura je k dispozici u autorů.

### Poděkování

Tato práce byla podporována prostředky projektu MZe ČR - QI 91B274 (NAZV-VAK 2008, program Potravinářství).

Přijato do tisku 4. 1. 2011

Lektorováno 24. 1. 2011

## KYSELINA MLÉČNÁ JAKO POLOPRODUKT K VÝROBĚ POLYLAKTÁTŮ A BIODEGRADOVATELNÝCH PLASTŮ

Binder M.<sup>1</sup>, Drbohlav J.<sup>1</sup>, Šalaková A.<sup>1</sup>, Nehyba A.<sup>2</sup>, Sedlařík V.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> VÚM s.r.o. Praha

<sup>2</sup> Milcom a.s. Praha

<sup>3</sup> Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

### Lactid acid as semi product for the production of polylactates and bio-degradable plastics

#### Abstrakt

Sladká syrovátka je v současné době pro většinu sýráren, kde vzniká při výrobě sýrů, odpadním produktem. Poslední trendy ve výzkumu biodegradovatelných plastů na bázi polylaktátů, které by měly sloužit k balení např. potravinářských a dalších výrobků, využívají jako základní surovinu kyselinu mléčnou. Cílem této práce bylo optimalizovat přípravu kyseliny mléčné ze syrovátky, která je významným zdrojem laktózy. Byla sestavena aparatura pro fermentaci sladké syrovátky a na základě výsledků předcházejícího výzkumu vybrán vhodný kmen *Lbc. helveticus* CCDM 98 a zvolena optimální fermentační teplota 42 °C. Jako alternativní surovina byl místo syrovátky použit permeát - odpadní produkt získaný průmyslovou ultrafiltrací odtučněného mléka při výrobě proteinového koncentrátu. Byly použity tři druhy syrovátky a dva druhy permeátu. Některé fermentace proběhly za přidavku suplementu kvasničného extraktu. Průběhy pH v čase u jednotlivých fermentací byly znázorněny graficky a další výsledky sestaveny do tabulky. K posunu reakční rovnováhy byla vznikající kyselina mléčná neutralizována uhličitánem vápenatým. Vzniklý mléčan vápenatý byl konvertován kyselinou sírovou na kyselinu mléčnou a vedlejší produkt síran vápenatý byl dekantací a vakuovou filtrací odstraněn. Následně byla separovaná kyselina mléčná zahuštěna na vakuové odparce a podrobena analýze na obsah především L-kyseliny mléčné a D-kyseliny mléčné a zbytkové laktózy. Z dosavadních výsledků se jako nejlepší jeví fermentace syrovátky s přidavkem 0,5 % kvasničného autolyzátu a uhličitánu vápenatého přidaného jednorázově na začátku fermentace nebo postupně v průběhu fermentace, za použití 11 % inokula *Lbc. helveticus* CCDM 98, kdy došlo k více jak 90 % konverzi laktózy na kyselinu mléčnou.

**Klíčová slova:** syrovátka, permeát, polylaktát, biodegradovatelné plasty

#### Abstract

Sweet whey, which is a by-product in cheese processing, is considered for the most cheese dairies as a waste product.

Recent trends in research on bio-degradable plastics based on polylactates, which should serve for food packaging or others, are using lactic acid as a raw material. The aim of this study was to optimize the preparation of lactic acid from whey, which is an important source of lactose. The equipment for fermentation of sweet whey was prepared and based on the results of previous research, suitable strain of *Lbc. helveticus* CCDM 98 and the optimal fermentation temperature 42 °C was chosen. Instead of whey, the permeate as an alternative raw material was used. Permeate is an industrial waste product which was obtained by ultrafiltration of skimmed milk in the protein concentrate production. Three types of whey and two types of whey permeate were used. Some fermentations took place with the addition of yeast extract supplement. Lactic acid was neutralized by calcium carbonate to shift the reaction equilibrium. The calcium lactate was converted through sulfuric acid to lactic acid and the by-product calcium sulfate was removed by decantation and by vacuum filtration. Subsequently, the separated lactic acid was concentrated by vacuum evaporator and subjected to analysis for the content especially of L-lactic acid, D-lactic acid and residual lactose. From current results, the best approach seem to be whey fermentation with the addition of 0.5 % yeast autolysate and calcium carbonate added once at the beginning of fermentation, or gradually during fermentation, using 11 % inoculum of *Lbc. helveticus* CCDM 98. In this case was observed more than 90 % conversion of lactose into lactic acid.

**Key words:** whey, permeate, polylactate, biodegradable plastic

## Úvod

Kyselina mléčná je v současné době považována za významnou surovinu pro výrobu polylaktátu kyseliny mléčné - biodegradovatelného polymeru a dalších průmyslových aplikací. Způsoby výroby jsou chemická syntéza a biochemické metody.

Biochemické metody využívají mikroorganismy, které fermentují mléčný cukr laktózu na kyselinu mléčnou. Výhodou tohoto způsobu výroby oproti chemické syntéze je produkce opticky čisté kyseliny mléčné, která je vhodnější surovinou pro výrobu polylaktátů než kyselina mléčná získaná chemickou syntézou (Panesar et al., 2007). Jelikož významným zdrojem laktózy je sladká syrovátka (70 - 72 % celkové sušiny) (Jelen, 2003), která je odpadní surovinou při výrobě sýrů, je snaha co nejefektivnějším a nejvhodnějším způsobem zpracovat tuto surovinu (především v ní obsaženou laktózu) na kyselinu mléčnou, a tu pak využít k výrobě biodegradovatelných polylaktátů.

Mikroorganismy, které se používají k fermentaci laktózy, jsou především zahrnuty ve skupině bakterií mléčného kvašení (BMK). Jsou to rody *Lactobacillus* (*L.*), *Leuconostoc* (*Ln.*), *Pediococcus* (*P.*) a *Streptococcus* (*S.*). Společnou vlastností BMK je produkce kyseliny mléčné, která je u heterofermentativních mikroorganismů hlavním a u homofermentativních mikroorganismů jediným produktem fermentace. Nejrozšířenějším rodem BMK je

*Lactobacillus*, u kterého bylo zjištěno více než 125 species a subspecies druhů a poddruhů (Axelson, 2004; Euzeby, 1997; Limsowitinet et al., 2003).

Fermentační proces s použitím BMK je ovlivňován řadou faktorů. Mezi nejdůležitější, vedle nutričních požadavků, je optimální teplota, při které je růst daného mikroorganismu a tedy i fermentace největší.

Pokud je teplota vyšší, nebo nižší než je optimální, bývá mikrobiální aktivita snížena a mikroorganismy mohou případně i hynout (Peleg, 1995; Rosso, Lobry, Bajard, Flandrois, 1995). Optimální teplota růstu kolísá podle rodu od 20 do 45 °C (Dicks, Dellaglio, Collins, 1995; Wood, Holzappel, 1995).

Dalším faktorem ovlivňujícím fermentační proces je koncentrace vodíkových iontů, která ovlivňuje mikrobiální růst a rychlost vzniku produktů. Hodnotu pH ovlivňují nejméně 2 aspekty mikrobiálních buněk, tj. fungování jejich enzymů a transport nutrietů do buňky. To může omezit syntézu metabolických enzymů odpovědných za syntézu nové protoplazmy, pH také ovlivňuje syntézu RNA a syntézu proteinu (Klovrychev, Korolev, Bulgakova, 1979). Hodnota pH je tedy dalším parametrem, který má účinek na produkci kyseliny mléčné.

Optimální pro rychlou a kompletní fermentaci je rozmezí pH 5,5 - 6,0, v některých případech 6,0 - 6,5, a to v závislosti na použité kultuře. K silné inhibici fermentace dochází při nižším pH a fermentace se zastavuje při pH nižším než 4,5. Kyselina mléčná vyrobená během fermentace musí být proto kontinuálně neutralizována. Během vsádkové fermentace je přidáván uhličitán vápenatý jako pufrací činidlo. Různé druhy bakterií mléčného kvašení produkují při fermentaci cukrů buď výhradně L-mléčnou kyselinu, výjimečně pouze D-mléčnou kyselinu, nejčastěji však přibližně stejná množství obou, nebo převažuje jedna forma a měřitelné množství ostatních (Garvie, 1980; Kandler, Weis, 1986; Schleifer, 1986). To závisí na přítomnosti specifické NAD<sup>+</sup> - závislé na laktát dehydrogenáze (nLDH) a vlastní aktivitě BMK.

V minulosti byly použity různé kmeny na zpracování syrovátky (*L. helveticus*, *L. delbrueckii*, subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, etc.). *L. helveticus* je obecně preferovaný mikroorganismus, vzhledem k produkci více než dvojnásobného množství kyseliny mléčné z mléka, ve srovnání s ostatními běžnými BMK (*S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) je homofermentativní a produkuje racemickou směs kyseliny mléčné (DL) v porovnání s pouze pravotočivou kyselinou mléčnou (D) produkovanou *L. delbrueckii* (Roy, Goulet, LeDuy, 1986).

*L. helveticus* prokázal účinnou přeměnu laktózy a vysokou produkci kyseliny mléčné při zvýšené teplotě (23-42°C) s maximem produkce při 42°C (Tango, Ghaly, 1999). Dále byl sledován vliv rozmezí pH na morfologii *L. helveticus* ve vsádkové kultuře, přičemž maximální produktivita byla získána při pH 5,5 (Norton, Lacroix, Vuilleumard, 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).

Nutriční požadavky bakterií mléčného kvašení a zejména jejich dusíkaté zdroje tvoří komplex (Chopin, 1993; Desmazeaud, 1983; Pritchard & Coobear, 1993; Steiner, Ingraham, Wheelis, Painter, 1986; Torriani, Vescovo, Scolari, 1994) a pouze část peptidů, které jsou k dispozici, je metabolizována. Kultivační media, která mohou mít vysoký obsah proteinů, jsou proto obvykle suplementována kvasničným extraktem nebo proteinovým lyzátem (peptony). V mnohých fermentačních studiích je kvasničný extrakt považován za esenciální nutriet pro laktobacily pro účinnou produkci kyseliny mléčné. (Aeschlimann, von Stovkar, 1990; Amrane 2005; Arasaratnam, Senthuran, Balasubramaniam, 1996; El-Sabaeny, 1996; Murad, Abd. El-Ghani, Errat, 1992; Schepers, Thibault, Lacroix, 2002).

## Experimentální část

### Materiál, metody a použité suroviny

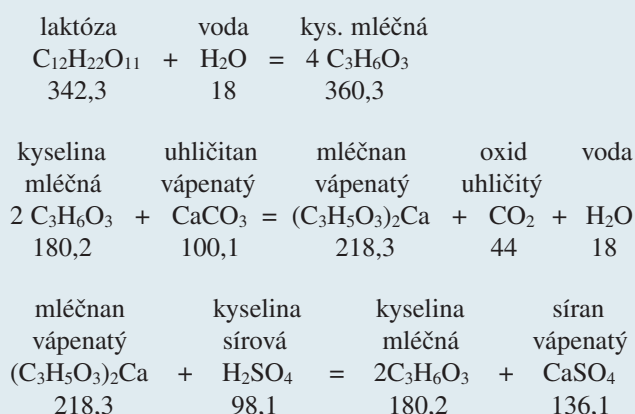
Na základě zjištění, že kmeny *L. helveticus* CCDM 98, 108, 447 mají ve sladké syrovátce z vybraných kmenů skupiny BMK nejrychlejší kysací aktivitu (Drbohlav, Šalaková, Sedlařík, Nehyba, Cívárek, 2009) byl vybrán kmen *Lbc. helveticus* CCDM 98, který byl použit k fermentaci sladké syrovátky - odpadní suroviny z výroby sýru eidamského typu. Jako alternativní surovinu pro přípravu kyseliny mléčné jsme použili permeát - odpadní produkt získaný průmyslovou ultrafiltrací odtučněného mléka při výrobě proteinového koncentráту. Fermentace probíhaly ve fermentační nádobě s elektromagnetickým míchadlem a s elektrickým ohřevem, která byla opatřena teplotním senzorem a pH elektrodou. Teplotní senzor Pt 100 a pH elektroda typu GRYF PCL 121/td byly připojeny k měřicí hlavici MAGIC od firmy GRYF HB, spol. s r.o. Tato sestava senzorů a měřicí hlavice se nazývá inteligentní sonda, kde dochází k přeměně analogového signálu ze senzoru na digitální. Ten je přenášen kabelem pomocí interface na počítač, kde probíhá záznam dat v nastavených časových intervalech při

optimální teplotě 42°C v termostatu BT 120, za míchání a s přidavkem uhličitánu vápenatého jako neutralizačního činidla sloužícímu k posunu reakční rovnováhy. Uhličitán vápenatý byl v některých případech dávkován postupně, v malých dávkách během fermentace, u dalších fermentací jednorázově před začátkem fermentace.

Bylo optimalizováno množství inokula.

Část fermentací byla prováděna bez suplementu a část s přidavkem kvasničného extraktu, jakožto zdroje dusíku, a to ve formě 25 % vodného roztoku. Průběh fermentace byl monitorován průběžným měřením hodnot pH, které byly zpracovány formou kysacích křivek.

Po fermentaci následovala konverze mléčnanu vápenatého 96% kyselinou sírovou (zředěnou 1:1) na kyselinu mléčnou, přičemž vznikl jako vedlejší produkt nerozpustný síran vápenatý - viz následující rovnice.



Reakční směs byla podrobena záhřevu 90-94°C/20 min. a vysrážené bílkoviny a síran vápenatý byly odstraněny dekantací a vakuovou filtrací přes Büchnerovu nálevku. Získaný čirý filtrát byl následně zahuštěn na vakuové odparce a případný zákal byl odstraněn odstředěním na centrifuze Janetzki K70D. Vzorky získané kyseliny mléčné byly podrobeny analýze.

Tab. 1 (pro F1 - F4)

sladká syrovátka z výroby eidamu (pasterovaná při 98 °C po dobu 30 min.)

sušina %	tuk g/100ml	bílk. %	laktóza %	kyselost pH	SH	CPM KTJ	colif. m.o. KTJ	kv. + pl. KTJ	hustota kg/m <sup>3</sup>	sediment z 250 ml ml
6,37	0,16	0,7	4,88	6,27	5,2	7.10 <sup>5</sup>	5.10 <sup>3</sup>	5.10 <sup>1</sup>	1,025	2,0

Tab. 2 (pro F5)

permeát - odpadní produkt získaný průmyslovou ultrafiltrací odtučněného mléka při výrobě proteinového koncentráту (pasterován při 98 °C po dobu 30 min.)

sušina %	tuk g/100ml	bílk. %	laktóza %	kyselost pH	SH	hustota kg/m <sup>3</sup>
4,58	0,00	0,69	4,58	6,30	3,2	1,023

Tab. 3 (pro F6 - F7)

sladká syrovátka z výroby eidamu (pasterovaná při 98 °C po dobu 30 min.)

sušina %	tuk g/100ml	bílk. %	laktóza %	kyselost pH	SH	hustota kg/m <sup>3</sup>
4,58	0,00	0,69	4,58	6,30	3,2	1,023

Tab. 4 (pro F8 - F10)

permeát - odpadní produkt získaný průmyslovou ultrafiltrací odtučněného mléka při výrobě proteinového koncentráту (pasterován při 98 °C po dobu 30 min.)

sušina %	tuk g/100ml	bílk. %	laktóza %	kyselost pH	SH	hustota kg/m <sup>3</sup>
5,52	0,01	0,14	4,86	6,25	3,4	1,024

Tab. 5 (pro F11 - F12)

sladká syrovátka z výroby eidamu (pasterovaná při 98 °C po dobu 30 min.)

sušina %	tuk g/100ml	bílk. %	laktóza %	kyselost pH	SH	hustota kg/m <sup>3</sup>
5,51	0,00	0,68	4,40	6,2	4,3	1,022

*Lactobacillus helveticus* kmen CCDM 98 (MILCOM a.s.)  
Kvaničný extrakt (*IMUNA HARM, a.s., Šarišské Michalany*)

Uhličitan vápenatý srážený čistý  $\text{CaCO}_3$  (Penta a.s.)

Kyselina sírová 96% čistá  $M_m$  98,08 (Penta a.s.)

## Výsledky a diskuze

Bylo provedeno celkem 12 fermentací, při kterých se průběžně vyhotovovaly kysací křivky (grafy č. 1 až 12). Byly optimalizovány rozhodující parametry ovlivňující stupeň konverze a jakosti výsledného produktu kyseliny mléčné. Z kysacích křivek bylo možno posuzovat vliv jednotlivých proměnných na rychlost a dobu prokysávání. Výsledky analýz vzorků produktů byly sestaveny do přehledné tabulky, byl vypočítán stupeň konverze laktózy na kyselinu mléčnou, a na základě těchto hodnot vyhodnocen optimální postup.

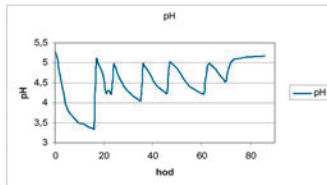
Práce směřovala k optimalizaci podmínek fermentace tak aby v co nejkratším čase došlo k maximální přeměně laktózy na kyselinu mléčnou. Jako výchozí suroviny byly použity postupně tři různé syrovátky z výroby sýru eidamského typu a dva permeáty - odpadní produkty získané průmyslovou ultrafiltrací odtučněného mléka při výrobě proteinového koncentráту.

Na základě předcházejícího výzkumu byl vybrán pro velmi dobrou prokysávací schopnost kmen *L. helveticus* CCDM 98, který byl použit ke všem dvanácti provedeným fermentacím. Jako optimální byla zvolena teplota 42 °C. Některé fermentace byly obohaceny o dusíkaté látky ve formě 0,5 % suplementu kvasničného extraktu (F3, F4, F5P, F6, F11, F12). s cílem urychlit proces fermentace dodáním zdroje živin pro použítou mlékařskou kulturu *L. helveticus* CCDM 98.

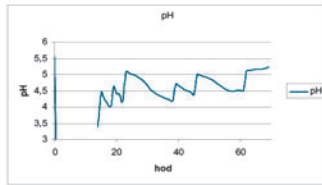
Výsledky byly shrnuty do bilanční tabulky. V tabulce jsou uvedeny hodnoty kyseliny mléčné v hmotnostních %, které by vznikly při teoretické fermentaci 100 % laktózy obsažené ve fermentovaném substrátu, dále obsah bílkovin, zbytkové laktózy a kyseliny mléčné v konečném finálním produktu, % kyseliny mléčné, která vznikla prakticky fermentací substrátu a procenta konverze kyseliny mléčné tj. poměr prakticky vzniklé kyseliny mléčné ke kyselině mléčné vzniklé při teoretické fermentaci 100 % laktózy obsažené ve fermentovaném substrátu. K fermentaci F1 až F4 byla použita stejná syrovátka (viz tabulka č.1). K fermentacím F5 a také k F8, F9 a F10 (tabulka č.4) byl použit permeát. K fermentacím F6 a F7 byla použita syrovátka (tabulka č.3) a u fermentací F11 a F12 syrovátka (tabulka č.5).

Z posouzení grafů průběhu fermentace - závislost pH na čase - vyplývá, že fermentace F1a F2, kde bylo aplikováno

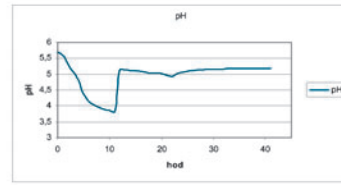
Graf č. 1



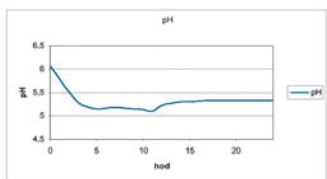
Graf č. 2



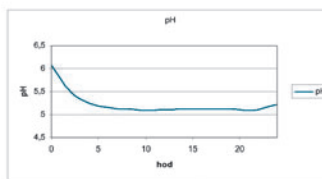
Graf č. 3



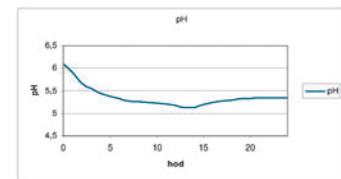
Graf č. 4



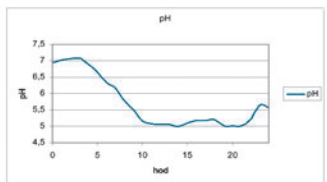
Graf č. 5



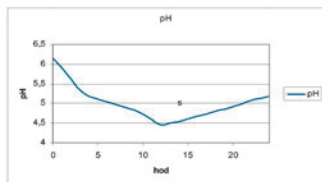
Graf č. 6



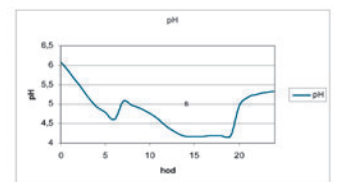
Graf č. 7



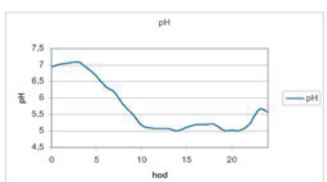
Graf č. 8



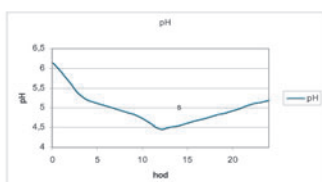
Graf č. 9



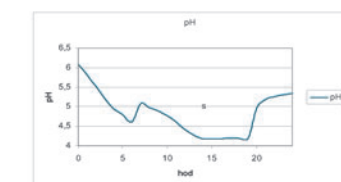
Graf č. 10 F10



Graf č. 11 F11



Graf č. 12 F12





Tab. 6 bilance fermentací

Fermentace	F1	F2	F3	F4	F5P	F6	F7	F8P	F9P	F10P	F11	F12
<b>k. mléčná teoreticky (%)</b>	<b>5,14</b>	<b>5,14</b>	<b>5,14</b>	<b>5,14</b>	<b>4,82</b>	<b>3,67</b>	<b>3,67</b>	<b>5,12</b>	<b>5,12</b>	<b>5,12</b>	<b>4,63</b>	<b>4,63</b>
bílkoviny (%)	0,86	1,23	1,81	2,39	2,69	2,35	1,77	1,81	0,74	0,80	5,11	4,83
zbytková laktóza (%)	0,07	0,17	0,16	0,07	0,09	0,24	0,25	13,87	3,56	33,6	0,26	0,75
k. mléčná spektrofot. Stan.. (%)	15,58	15,95	21,40	19,56	16,29	19,64	14,28	4,65	20,48	9,93	41,68	37,08
k. mléčná L+ (%)	11,22	15,95	15,00	11,08	9,09	10,67	7,93	0,89	17,17	9,71	22,31	19,38
k. mléčná D- (%)	4,36	0	6,40	8,48	7,20	8,97	6,35	3,76	3,31	0,22	19,37	17,70
<b>k. mléč. prakticky (%)</b>	<b>4,45</b>	<b>2,1</b>	<b>2,7</b>	<b>2,90</b>	<b>2,64</b>	<b>2,88</b>	<b>3,01</b>	<b>0,94</b>	<b>2,46</b>	<b>1,00</b>	<b>4,37</b>	<b>4,39</b>
konverze (%)	87	41	53	56	55	78	82	18	48	20	94	95

Pozn. Výsledky jsou uvedeny v hmotnostních %

postupné dávkování CaCO<sub>3</sub> v šesti krocích, probíhaly v průměru po dobu asi 75 hodin. U fermentace F3 jsme přidávali CaCO<sub>3</sub> pouze ve dvou krocích, a to na začátku fermentace menší část (1/4 celkové dávky), po 11 hodinách zbylou část (3/4) celkové dávky. Současně tato fermentace byla první fermentací, kde jsme používali také přírůstek 0,5 % kvasničného extraktu ve formě 25 % vodného roztoku.

Obě skutečnosti, jak způsob dávkování CaCO<sub>3</sub>, tak přírůstek kvasničného extraktu, měly vliv na urychlení procesu fermentace (prakticky trojnásobnému). U fermentace F4 byl přidán celý obsah CaCO<sub>3</sub> ve stechiometrickém poměru už na začátku fermentace. Také u této fermentace byl použit přírůstek 0,5 % kvasničného extraktu a došlo zde k jejímu zkrácení na 12 hodin, tedy zhruba na polovinu času oproti předcházející fermentaci F3. U fermentace F5P a F8P až F10P byla nahrazena výchozí syrovátka permeátem.

U permeátu, kromě prvního pokusu (F5P), kdy došlo k 55 % konverzi, nepřekračovaly výsledky 50 % konverzi.

Proto jsme se u fermentací F11 a F12 vrátili opět k sladké syrovátce, kde jsme dosáhli zatím největšího stupně konverze přes 90 %. Tyto dvě poslední fermentace se odlišují od předcházejících, především zvýšenou dávkou inokula na 11 % a tím, že u fermentace F11 byl dávkován uhlíčan na začátku fermentace, u F12 bylo dávkování rozloženo. První třetina ekvivalentní dávky byla přidána na začátku fermentace, druhá třetina po 6 hodinách a třetí po 19 hodinách.

## Závěr

Z bilancí fermentací shrnutých v bilanční tabulce č.6 je zřejmé, že nejlepšího stupně konverze 94 a 95 %, bylo dosaženo při F11 a F12 fermentaci, což bylo dáno jednak zvýšenou dávkou inokula na 11 % oproti předchozím 5 %, přírůstkem kvasničného extraktu, jako zdroje dusíku a optimalizací dávkování uhlíčanu vápenatého, který jsme přidávali v první dávce 1/3 ekvivalentního množství na začátku fermentace, druhou třetinu po 6 hodinách a třetí třetinu po 19 hodinách.

Práce byla zpracována v rámci projektů MŠMT 2672286101 a 2B 8071.

## Literatura

AESCHLIMANN, A., VON STOCKAR, U. (1990). The effect of yeast extract supplementation on the production of lactic acid from whey permeate by *Lactobacillus helveticus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 32, s. 398-402.

- AMRANE, A. (2003). Seed culture and its effect on the growth and lactic acid production of *Lactobacillus helveticus*. *Journal of General and Applied Microbiology*, 49, s. 21-27.
- AMRANE, A. (2005). Analysis of the kinetics of growth and lactic acid production for *Lactobacillus helveticus* growing on supplemented whey permeate. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80, s. 345-352.
- ARASARATNAM, V., SENTHURAN, A., BALASUBRAMANIAM, K. (1996). Supplementation of whey with glucose and different nitrogen sources for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*. *Enzyme and Microbial Technology*, 19, s. 482-486.
- 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* (s. 1-66). New York: Marcel Dekker, Inc.
- CHOPIN, A. (1993). Organization and regulation of genes for amino acid biosynthesis in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12, s. 21-38.
- 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, s. 395-397.
- EL-SABAENY, A. H. (1996). Influence of medium composition on lactic acid production from dried whey by *Lactobacillus delbrueckii*. *Microbiologia*, 12, s. 411-416.
- GARVIE, E. I. (1980). Bacterial lactate dehydrogenases. *Microbiological Reviews*, 44, s. 106-139.
- JELÉN, P. (2003). Whey processing. In H. Roginski, J. W. Fuquay, P. F. Fox (Eds.). *Encyclopedia of dairy sciences* (Vol. 4, s. 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, s. 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, s. 297-302.
- MURAD, H. A., ABD EL-GHANI, S., EFFAT, B. A. (1992). Utilization of some dairy and food industry wastes in the production of lactic acid. *Egyptian Journal of Dairy Science*, 20, s. 83-90.
- NORTON, S., LACROIX, C., VUILLEMARD, 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, s. 35-251.
- 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.
- PELEG, M. (1995). A model of temperature effects on the microbial populations from growth to lethality. *Journal of Science Food and Agriculture*, 68, s.83-89.
- ROY, D., GOULET, J., LEDUY, A. (1986). Batch fermentation of whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus* for lactic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 24, s. 206-213.
- TANGO, M. S. A., GHALLY, A. E. (1999). Effect of temperature on lactic acid production from cheese whey using *Lactobacillus helveticus* under batch conditions. *Biomass Bioenergy*, 16, s. 61-78.
- PRITCHARD, G. G., COOLBEAR, T. (1993). The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12, s. 179-206.
- STAINER, R. Y., INGRAHAM, J. L., WHEELIS, M. L., PAINTER, P. R. (1986). *The microbial world* (5th ed.). New York: Prentice Hall, s. 495-504.
- TORRIANI, S., VESCOVO, M., SCOLARI, G. (1994). An overview on *Lactobacillus helveticus*. *Annals Microbiology and Enzymology*, 44, s. 163-191.
- SCHEPERS, A. W., THIBAUT, J., LACROIX, C. (2002). *Lactobacillus helveticus* growth and lactic acid production during pH-controlled batch cultures in whey permeate/yeast extract medium. Part I. multiple factor kinetic analysis. *Enzyme and microbial technology*, 30, s. 176-180.

Přijato do tisku 12. 12. 2010

Lektorováno 28. 1. 2011