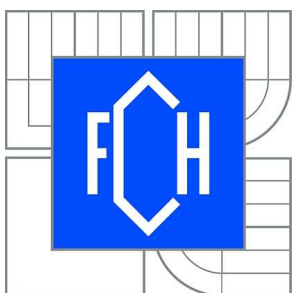


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

UTILIZACE SYROVÁTKY TERMOFILNÍMI MIKROORGANISMY

WHEY UTILIZATION WITH THERMOPHILIC MICROORGANISMS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. ALEXANDRA RYCHOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. LIBOR BABÁK, Ph.D.

BRNO 2010



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0446/2009	Akademický rok: 2010/2011
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Alexandra Rychová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	Ing. Libor Babák, Ph.D.	
Konzultanti:	Ing. Petra Šupinová	

Název diplomové práce:

Utilizace syrovátky termofilními mikroorganismy

Zadání diplomové práce:

- 1) rešerše literatury na téma práce
- 2) provedení několika kultivací termofilních bakterií na syrovátkovém médiu
- 3) vyhodnocení růstových parametrů a vybraných bioinženýrských charakteristik

Termín odevzdání diplomové práce: 3.1.2011

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Alexandra Rychová
Student(ka)

Ing. Libor Babák, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2009

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se věnuje utilizaci syrovátky termofilními bakteriemi rodu *Thermus* a *Geobacillus*. Jako kultivační médium byla použita syrovátka, ze které byly odstraněny bílkoviny. Kultivace probíhaly v Erlenmeyerových baňkách ke stanovení optimálních podmínek růstu jednotlivých mikroorganismů. V průběhu kultivace ve fermentoru byly stanoveny růstové křivky. Míra utilizace syrovátky byla posuzována analytickými metodami stanovujícími koncentraci redukujících cukrů (laktózy) a chemickou spotřebu kyslíku (CHSK) při studiu optimálních podmínek a metodou stanovující koncentraci redukujících cukrů při studiu růstových křivek.

ABSTRACT

This diploma thesis studies the utilization of whey using thermophilic bacteria of the genus *Thermus* and *Geobacillus*. The whey stripped off proteins was used as a cultivation medium during experiments. The cultivation took place in the Erlenmeyer flasks, to assess the optimal conditions for microorganism's growth. During the cultivation in the bioreactor, growth curves were established. The amount of whey utilization was assessed by analytical methods that determine the concentration of reducing saccharides (lactose) and chemical oxygen demand (COD) while studying the optimal conditions and a method determining the concentration of reducing saccharides during growth curves analysis.

KLÍČOVÁ SLOVA

Syrovátka, termofilní mikroorganismy, redukující cukry, CHSK

KEYWORDS

Whey, thermophilic microorganisms, reducing sugars, COD

RYCHOVÁ, A. *Utilizace syrovátky termofilními mikroorganismy*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 86 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Libor Babák, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. 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

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce, panu Ing. Liboru Babákovi, PhD. a slečně Ing. Petře Šupinové za podnětné konzultace, připomínky a za jejich celkový vstřícný přístup.

OBSAH

OBSAH	9
ÚVOD	12
1 TEORETICKÁ ČÁST	13
1.1 Syrovátka	13
1.1.1 Bílkoviny.....	13
1.1.1.1 Kasein.....	14
1.1.1.2 Sérové bílkoviny.....	15
1.1.2 Dusíkaté látky nebílkovinné povahy	15
1.1.3 Popeloviny (minerální látky)	15
1.1.4 Vitamíny.....	16
1.1.5 Mléčný cukr.....	16
1.1.6 Tuk.....	17
1.1.7 Kyseliny.....	17
1.2 Zpracování syrovátky	18
1.2.1 Předběžná úprava syrovátky	18
1.2.1.1 Čištění.....	18
1.2.1.2 Odstranění tuků.....	18
1.2.1.3 Pasterace.....	19
1.2.2 Demineralizace	19
1.2.3 Krystalizace laktosy.....	19
1.2.4 Zahušťování syrovátky	19
1.2.5 Sušení syrovátky.....	20
1.2.5.1 Sušení syrovátky ve válcových sušárnách	20
1.2.5.2 Sušení syrovátky rozprašováním.....	21
1.2.6 Moderní separační metody.....	21
1.2.6.1 Ultrafiltrace a hyperfiltrace.....	21
1.2.6.2 Elektrodialýza.....	22
1.2.6.3 Gelová filtrace	23
1.3 Fermentace syrovátky	23
1.3.1 Produkce biomasy.....	24
1.3.2 Produkce bioplynu.....	24
1.3.3 Produkce etanolu	24
1.3.4 Výroba kyseliny mléčné.....	24
1.3.5 Výroba nápojů.....	25
1.4 Termofilní mikroorganismy	25
1.4.1 Vybrané metabolické dráhy termofilních mikroorganismů.....	26
1.4.2 Rod Bacillus	28
1.4.2.1 Rod Geobacillus.....	29
Geobacillus thermodenitrificans (CCM 2566)	30
Geobacillus thermocatenulatus (CCM 2809)	30

1.4.3	Rod Thermus	31
	Thermus aquaticus (CCM 4465)	31
	Thermus scotoductus (CCM 3486).....	32
1.4.4	Rod Clostridium.....	32
1.4.5	Aktinomycety.....	33
1.4.6	Termofilní houby	33
1.5	Adaptace termofilních mikroorganismů na vysoké teploty	34
1.5.1	Vliv složení lipidů v buněčné membráně.....	35
1.5.2	Proteiny teplotního šoku.....	35
1.5.3	Hydrofobní aminokyseliny	35
1.5.4	Disulfidické můstky.....	36
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	38
2.1	Cíl práce	38
2.2	Použité přístroje.....	38
2.3	Kultura a příprava médií.....	40
2.3.1	Kultura.....	40
2.3.2	Příprava inokulačních médií	40
2.3.3	Příprava kultivačního média	40
2.4	Analytické metody	41
2.4.1	Stanovení sušiny biomasy.....	41
2.4.1.1	Postup stanovení	41
2.4.2	Turbidimetrie a Nefelometrie	41
2.4.2.1	Měření buněčné hustoty.....	42
2.4.2.2	Postup měření.....	44
2.4.3	Stanovení redukujících cukrů podle Somogyiho a Nelsona	44
2.4.3.1	Příprava Somogyi-Nelsonových činidel	44
2.4.3.2	Kalibrace redukujících cukrů	44
2.4.3.3	Postup stanovení vzorků	45
2.4.4	Stanovení chemické spotřeby kyslíku (CHSK).....	45
2.4.4.1	Stanovení CHSK dichromanem draselným	45
2.4.4.2	Příprava oxidačního a katalyzátorového roztoku	45
2.4.4.3	Kalibrace CHSK	46
2.4.4.4	Postup stanovení vzorků	46
2.5	Kultivace - optimalizace podmínek.....	46
2.5.1	Kultivace inokulačního média	47
2.5.2	Kultivace na termostatované třepačce v Erlenmayerových baňkách	47
2.5.3	Testování utilizace syrovátky.....	47
2.6	Kultivace - růstové křivky	47
2.6.1	Bioreaktor (fermentor)	47
2.6.1.1	Vsádkový bioreaktor.....	48
2.6.2	Růstová křivka.....	49
2.6.3	Kultivace inokulačního média	50

2.6.4	Kultivace ve fermentoru.....	50
2.6.4.1	Výpočet bioinženýrských charakteristik	51
2.6.5	Testování biodegradace syrovátky	51
3	VÝSLEDKY A DISKUZE	52
3.1	Kalibrace redukujících cukrů	52
3.2	Kalibrace CHSK	52
3.3	Optimalizace podmínek.....	53
3.3.1	Stanovení sušiny biomasy.....	53
3.3.2	Chemická spotřeba kyslíku.....	55
3.3.3	Stanovení redukujících cukrů	56
3.4	Stanovení růstových křivek	57
3.4.1	Srovnání růstových křivek zástupců rodu <i>Geobacillus</i>	57
3.4.2	Srovnání růstových křivek zástupců rodu <i>Thermus</i>	60
3.4.3	Srovnání růstových křivek rodů <i>Geobacillus</i> a <i>Thermus</i>	62
3.5	Stanovení utilizace syrovátky v průběhu růstu	63
3.5.1	Srovnání utilizace syrovátky v průběhu růstu - rod <i>Geobacillus</i>	63
3.5.2	Srovnání utilizace syrovátky v průběhu růstu - rod <i>Thermus</i>	64
3.6	Bioinženýrské charakteristiky získané z BioCommand	66
	ZÁVĚR	67
	LITERATURA	69
	POUŽITÉ ZKRATKY A SYMBOLY	75
	SEZNAM OBRÁZKŮ	76
	SEZNAM TABULEK	77
	SEZNAM GRAFŮ	78
	PŘÍLOHY	79

ÚVOD

V dnešní době úroveň využití syrovátky a jejích významných složek dosáhla vysokého stupně jak v použití v lidské výživě, tak i ve výživě hospodářských zvířat [1]. Tvoří potencionální zdroj cenných živin i výborných funkčních vlastností [2]. I když je syrovátka odpadní produkt sýrařského průmyslu, je velmi žádané nalézt řešení, jak tento materiál pomocí technických procesů v mlékárně co nejúčinněji využít. Dříve byla syrovátka přímo zkrmována nebo zpracovávána kvasnými procesy, nyní se však nejvíce rozšiřuje zpracování syrovátky sušením [3]. Sušená syrovátka se využívá nejvíce v potravinářství. Největší využití má v mlékařském průmyslu po enzymové hydrolýze laktosy při výrobě nových druhů sýrů, jogurtů, smetany apod. Mimo mlékařského průmyslu se ze syrovátky ve světě vyrábějí různé nápoje, limonády, dokonce i imitace šumivého vína a piva [2]. Z ekologického hlediska vyvstává zájem o podchycení syrovátky. Přímé vypouštění syrovátky do vodních toků a vyloučení silně zatížených odpadních vod není žádané [1].

Technologické zpracování odpadů je zaměřeno na odstranění či maximální snížení obsahu organických látek, dusíkatých látek a fosforu. Likvidace těchto nežádoucích látek může být v odpadních vodách zabezpečena činností některých mikroorganismů. Výhodou tohoto způsobu je možnost kombinace různých druhů odpadů, které lze eliminovat současně. Mezi nevýhody patří nároky mikroorganismů na kultivační podmínky. Není jednoduché a levné tyto podmínky udržovat [5].

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Syrovátka

Syrovátka je odpadní produkt vznikající při výrobě sýrů a tvarohu. Obsahuje asi polovinu sušiny původního mléka. Složení syrovátky je ovlivněno složením původního mléka, tepelným ošetřením mléka před srážením, charakterem použitého srážení, zředěním syrovátky vodou a také stupněm fermentace laktosy. Při sýření se odštěpuje kaseinopeptid, který přechází do sladké syrovátky. V kyselé syrovátce se vyskytuje podstatně více popelovin, především vápníku [6, 7,8, 9].

Složení syrovátky se v různých literárních zdrojích liší, orientační složení je uvedeno v Tabulce 1 Tabulka 1 **Složení sladké a kyselé syrovátky [6][6]**.

Tabulka 1 Složení sladké a kyselé syrovátky [6]

Složka (%)	Sladká syrovátka	Kyselé syrovátka
Sušina	6,0-6,5	5,0-6,0
Laktosa	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
Nebílkovinný dusík	0,18	0,18
Popeloviny	0,5	0,8

1.1.1 Bílkoviny

Proteiny jsou polymery aminokyselin, které vznikly procesem proteosyntézy. Ve své molekule obsahují více než 100 aminokyselin vzájemně spojených peptidovou vazbou. Kromě peptidových vazeb se na vytváření struktury podílejí i vazby disulfidové (-S-S-), esterové a amidové [10]. Mléko je jedním ze zdrojů potravy pro kojenče. Mléčné proteiny zastávají mnoho důležitých biologických rolí, ale některé stále nebyly dokázány [11]. Bílkovinné složení kravského mléka je uvedeno v Tabulka 2 [12].

Tabulka 2 Bílkovinné složení kravského mléka [12]

Protein	Podíl v %	Obsah v g/dm ³
Kaseiny celkem	80	25,6
α-kasein	42	13,4
β- kasein	25	8,0
γ- kasein	4	1,3
κ- kasein	9	2,9

Sérové proteiny celkem	20	6,4
α -laktalbumin	4	1,3
sérový albumin	1	0,3
β -laktoglobulin	9	2,9
imunoglobulin	2	0,6
polypeptidy (proteovy, peptony)	4	1,3

1.1.1.1 Kasein

Kasein je hlavní protein v mléce. U hospodářských zvířat je jeho podíl kolem 80 % z veškerých bílkovin (tj. průměrně kolem 2,6 g z celkových 3,2 g/100 g v kravském mléce). Vyskytuje se ve 4 typech α -, β -, γ -, κ -, které mají řadu genetických variant. Varianty se od sebe liší jak chemickou strukturou, a tak i vlastnostmi. Některé varianty dokonce mohou být příčinou alergie na mléko. Z tohoto důvodu někteří jedinci mohou pít mléko jiných zvířat, protože složení kaseinů je odlišné [13]. Protože kasein se váže na vápník a fosfor, trávení těchto proteinů uvolňuje důležité množství těchto minerálů [11].

Kasein vytváří v mléce micely (Obr. 1). Mléčné výrobky jsou založeny na srážení kaseinu. Kyselé srážení je založeno na působení kyselin (kyseliny vznikající činností bakterií mléčného kvašení nebo přidané), sladké srážení probíhá za přítomnosti syřidla (nejčastěji enzym chymosin z telecích žaludků). V průběhu srážení dochází k porušení stability micel, po vysrážení následuje při výrobě kaseinu promytí a vysušení. Při obou způsobech dochází na rozdílném principu k porušení stability kaseinových micel, a tím jejich vysrážení. Kyselé srážení se využívá při výrobě jogurtů, tvarohů, výjimečně při výrobě některých sýrů a při výrobě kyselého kaseinu. Při sladkém srážení vzniká většina sýrů a sladký kasein [13].



Obr. 1 Kaseinové micely [4]

1.1.1.2 Sérové bílkoviny

Sérové neboli syrovátkové proteiny se z mléka získávají po odstranění kaseinu [1]. Hlavními bílkovinami syrovátky jsou laktoglobulin a laktalbumin; mezi vedlejší bílkoviny syrovátky řadíme proteosy, peptony, krevní bílkoviny a laktoferin [12]. Minoritními, ale biologicky významnými proteiny jsou vysokomolekulární globulární glykoproteiny (imunoglobuliny) s účinností protilátek. Dalším specifickým proteinem je makroglobulin, který způsobuje shlukování tukových globulí v syrovém mléce. To má za následek vznik větších částic až posléze vrstvu smetany na povrchu mléka [14].

Laktalbumin se podobá albuminu vaječnému nebo krevnímu. Obsah aminokyselin je stejný, ale neobsahuje fosfor. Je rozpustný ve vodě, slabých zásadách a kyselinách, dokonce i ve zředěných roztocích solí. V mléce se vyskytuje ve formě monomolekulárního koloidního roztoku. Laktalbuminu odpovídají 3 různé proteiny: α -laktalbumin, β -laktoglobulin a „krevní“ sérumalbumin. Tento protein má výrazné redukující vlastnosti a vykazuje kyselý charakter. Zahříváním denaturuje, úplného vysrážení lze teoreticky dosáhnout při pH = 4,75 – 4,8 a teplotě nad 72 °C. V praxi se nejvíce osvědčila hodnota pH = 4,5 – 4,7 a teplota 85 – 95 °C [1].

Laktoglobulin do mléka přechází pravděpodobně z krve. Pro svůj ochranný charakter je též nazýván jako imunoglobulin. Také tento protein neobsahuje fosfor a má kyselý charakter. Skládá se ze dvou složek: euglobulinu a pseudoglobulinu. Stejně jako laktalbumin se vyskytuje v mléce v podobě monomolekulárního koloidního roztoku, ale laktoglobulin je nerozpustný ve vodě a zředěných kyselinách. Rozpustný je pouze ve slabých roztocích solí, zředěných zásadách a silných kyselinách. Ve slabě kyselém prostředí denaturuje a rychle koaguluje při zvýšené teplotě. Rychlost denaturace stoupá s teplotou. Maximální koagulace nastává při zahřívání a hodnotách pH = 4,78 – 4,8. Vyskytuje-li se laktoglobulin v kyselém prostředí při teplotě 115 – 120 °C, dochází k hydrolyze [1].

1.1.2 Dusíkaté látky nebílkovinné povahy

Do syrovátky přechází z mléka i většina nebílkovinných dusíkatých látek (především puriny), které představují 5 – 7 % veškerého dusíku v mléce. Jedná se o nepatrné příměsi močoviny, xantinu, guaninu, hypoxantinu, adeninu, kreatinu, kreatininu, alantoinu, rhodanidů, amoniaku aj. Proces zpracování syrovátky není těmito látkami nijak zásadně ovlivněn [1].

1.1.3 Popeloviny (minerální látky)

Mezi hlavní složky popelovin syrovátky se řadí fosforečné a vápenaté soli. Při sýření se část vápníku váže s kaseinem na nerozpustný parakasein, který přechází do sýra. Při výrobě tvarohu přechází z kaseinu do syrovátky ve formě nerozpustné soli.

Mimo jiné popel syrovátky obsahuje také draslík, sodík, hořčík, železo, síru a chlór. Tyto minerální látky se v syrovátce vyskytují v podobě kationů a anionů [1].

1.1.4 Vitamíny

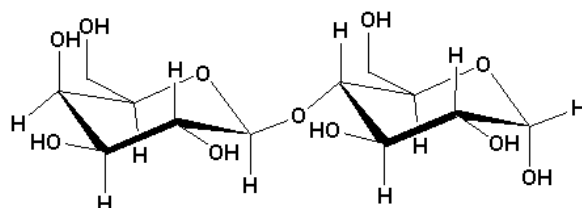
Biologická hodnota syrovátky je určena též obsahem vitamínů. Vyskytují se zde převážně vitamíny skupiny B (B₁, B₂, B₆, B₁₂), kyselina pantotenová, vitamín C, A a biotin. Vitamínové složení se liší podle typu syrovátky, tyto rozdíly jsou uvedeny v Tabulka 3 [8].

Tabulka 3 Vitaminové složení sušené syrovátky [8]

Vitamín	Sladká syrovátka	Kyselá syrovátka
Vitamín A [MJ/100 g]	69-240	47-165
Vitamín C [mg/100 g]	0-9,08	0-0,99
Vitamín B6 [mg/100 g]	0,36-0,77	0,46-0,96
Vitamín B12 [μg/100 g]	0,9-3,7	0,15-3,7
Vitamín E- tokoferol [μg/100 g]	14-249	19-169
Vitamín B1- thiamin [μg/100 g]	0,38-0,59	0,35-0,58
Vitamín B2- riboflavin [mg/100 g]	1,70-2,92	1,57-2,35
Kyselina pantotenová [mg/100 g]	8,2-15,0	7,0-14,2
Biotin [μg/100 g]	8,2-15,0	7,0-14,2
Niacin [mg/100 g]	0,76-2,03	0,61-2,51
Kyselina listová [μg/100 g]	4,2-30,0	14,6-59,4
Cholin [mg/100 g]	62-173	60-171

1.1.5 Mléčný cukr

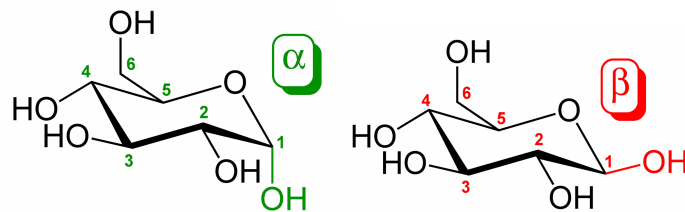
Hlavní složkou syrovátky je mléčný cukr – laktosa (Obr. 2). Tvoří asi 70 - 80% sušiny a 2 - 8% hmotnosti mléka.



Obr. 2 Strukturní vzorec laktosy [15]

Laktosa je disacharid, který se skládá z D-galaktosy a D-glukosy. Sacharidické jednotky jsou vázány 1,4- β -glykosidickou vazbou. Vyskytuje se ve dvou izomerech: α - a β -izomer. Liší se v orientaci vodíku a hydroxylové skupiny na prvním uhlíku glukosy (Obr. 3). Oba izomery se navzájem mění, tento úkaz se nazývá mutarotace. Mutarotace je ovlivněna faktory jako teplota, koncentrace a pH (acidita) roztoku. Při pokojové teplotě nastává rovnováha v poměru asi 40% α -laktosy a 60% β -laktosy. Každý izomer má odlišné vlastnosti (např. rozpustnost nebo krystalická struktura), což má za následek různé vlastnosti laktosy za různých podmínek [16].

Řadí se mezi redukující disacharidy, což umožňuje přítomnost a koncentraci laktosy stanovit Fellingovým a Tollensovým činidlem. Vyskytuje se téměř výhradně v mléce savců. V kravském mléce se vyskytuje 4,5 - 5% mléčného cukru, v mateřském mléce až 7%. V syrovátce je laktosa obsažena skoro ve stejném množství jako v mléce [8, 6, 17].



Obr. 3 Rozdíl ve struktuře α - a β -izomeru glukosy [18]

1.1.6 Tuk

Tuk bývá v syrovátce přítomen jen v nepatrném množství nebo vůbec (v případě dokonalého odstředění syrovátkové smetany) [8].

1.1.7 Kyseliny

Z organických kyselin se v syrovátce vyskytuje především kyselina citronová, mléčná, propionová, octová a mravenčí. Nejvyšší obsah kyselin je v kyselé syrovátce, která je odpadním produktem výroby tvarohu. Složení kyselin závisí převážně na aktivitě a složení mikroflóry. Z tohoto důvodu číselné údaje uváděné v literatuře mají značný rozptyl. Složení kyselin závisí také na jejich stanovení, rozdílné hodnoty získáme při stanovení kyselin samostatně nebo jako celého spektra kyselin. Nejvyšší bývá obsah kyseliny citronové (kolem 150 mg/100 g) a kyseliny mléčné (40 – 120 mg/100 g). Při výrobě kaseinu může do syrovátky přecházet i malé množství minerálních kyselin, např. chlorovodíkové [8].

1.2 Zpracování syrovátky

Výroba sýrů neustále roste. Jen v EU by měl roční nárůst produkce sýrů, tedy i syrovátky, být asi 2 % [19]. Produkce syrovátky ve světě se pohybuje v rozmezí 180–190 mil. tun. Při výrobě 1 kg sýra vznikne cca 10 kg syrovátky [20]. Za jeden den může při výrobě sýrů vzniknout až 10^6 l za den [21]. Vysoké objemy produkované syrovátky mají za následek hledání nových postupů jejího zpracování a aplikace pro vyvinuté produkty [19].

Při zpracování syrovátky dochází k získání a využití jednotlivých složek (hlavně bílkoviny a laktosa) a nebo se využívá při fermentačních procesech jako živné médium [22]. Syrovátka dodává potravinám vysokou nutriční hodnotu a upravuje fyzikálně-chemické vlastnosti. Může se využívat při výrobě mléčných výrobků, dezertů, pomazánek, dresinků, mražených krémů, pekařských výrobků, nápojů, tyčinek, snacků, čokolády, cukrovinek a také kojenecké výživy. Syrovátkové proteiny mohou částečně nahradit proteiny živočišné. Deriváty ovlivňují texturu potravin, dodávají hutnost a zvyšují zahušťovací schopnosti, které jsou srovnatelné se škroby [8].

1.2.1 Předběžná úprava syrovátky

1.2.1.1 Čištění

Syrovátka se téměř vždy čistí od nežádoucích zbytků sraženiny (sýrařský prach), které mohou negativně ovlivňovat průběh dalších procesů (ucpávání tepelných výměníků, poškozování a ucpávání membrán) a rozpustnost, chuť a vůni produktu. Využívá se kombinace usazování, scezování a odstředování, nebo samotné odstředování. Volba vhodného postupu závisí na velikosti a množství pevných částic. Při velkém množství sraženin se používají samoodkalovací odstředivky (kontinuálním odstraňování kalů) [1, 8, 23].

1.2.1.2 Odstranění tuků

Při výrobě sýrů přechází do syrovátky určitý podíl tuku, který je rovněž vhodné odstranit. Může ovlivnit průběh dalšího zpracování a kvalitu a stabilitu produktu. K odstranění tuku se používá další odstředivka, pomocí které se dosáhne odstranění tuku (pod 0,5 %, aby neucpával póry membrány) [1, 8, 23].

1.2.1.3 Pasterace

Chemická i mikrobiologická jakost syrovátky je zabezpečena pasterací, která obvykle probíhá při 72 až 78 °C po dobu 15 až 20 s. Některé varianty postupů však používají teploty v rozsahu 62 až 95 °C. V tomto kroku p ředúpravy se sníží počet živých mikroorganismů a inaktivuje se fosfatáza a chymozin. Před pasterací musí být syrovátka uchovávána co nejkratší dobu při teplotách do 5 °C [1, 8, 23].

1.2.2 Demineralizace

Dalším zásadním požadavkem pro efektivní zpracování a pro použitelnost syrovátky v krmivech a potravinách je demineralizace, tj. odstranění solí. Soli negativně ovlivňují sensorické vlastnosti. Demineralizace je nutná zvláště u kyselé syrovátky před zahušťováním. Využívá se gelová filtrace (chromatografické dělení), iontoměniče, elektrodialýza a membránové techniky. Odsolená syrovátka (diluát) představuje 90 – 95 % původní suroviny, koncentrát solí 5 – 10 % [1, 8, 23].

1.2.3 Krystalizace laktosy

Krystalizace laktosy usnadní sušení a zabránění lepivosti produktu. Probíhá např. při 20 až 35 °C, po dobu 2 až 24 hod v krystalizačním tanku. Po ukončení následuje rychlé ochlazení. Zhruba ze 70 % laktosu krystalizuje za vzniku malých krystalů, které neovlivňují následné sušení rozprašováním. V průběhu procese se snižuje podíl bezvodé amorfni laktosy, která způsobuje lepení prášku na stěny, značnou hygroskopičnost produktu a jeho tvrdnutí a špatnou rozpustnost. Vykrytalizovanou laktosu je možno dále využít. Tento proces obvykle bývá vícestupňový [1, 8, 23].

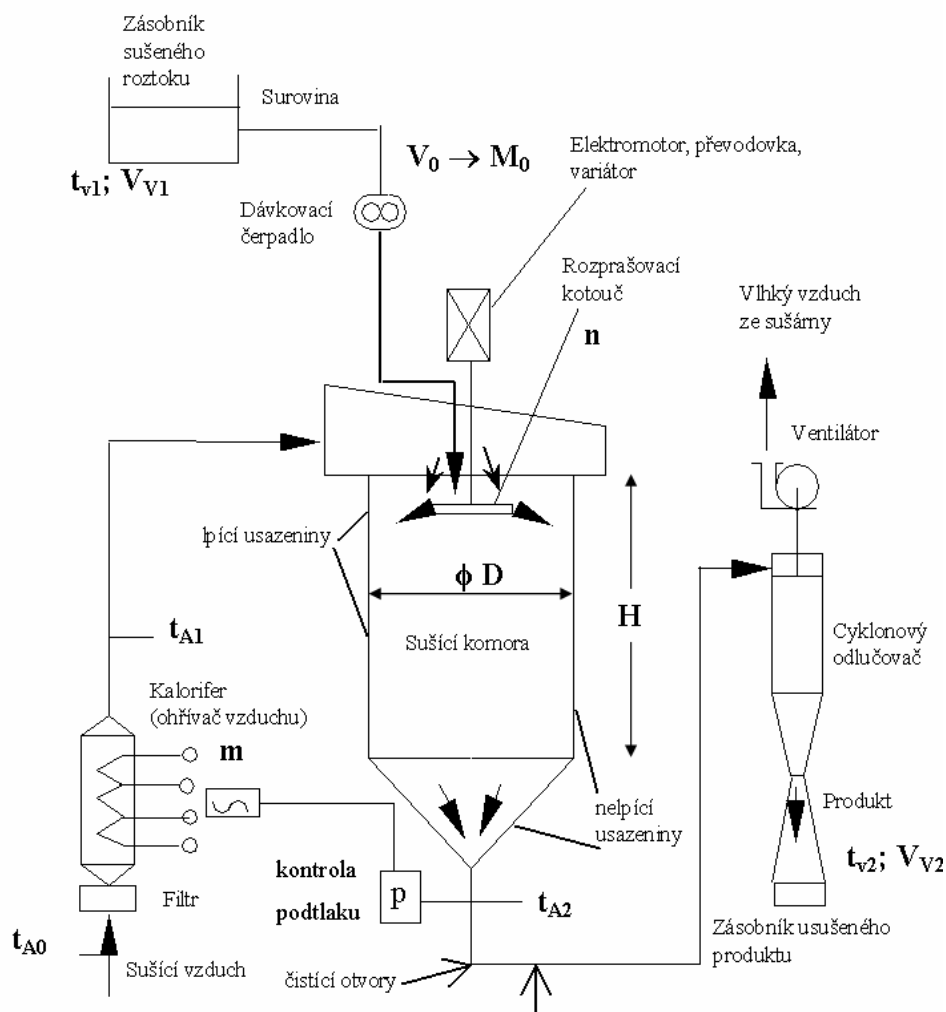
1.2.4 Zahušťování syrovátky

Syrovátka obsahuje 93 až 96 % vody, což je hlavní technologický i ekonomický problém jejího zužitkování. Nejvyužívanějším a nejběžnějším způsobem dehydratace je zahušťování na průmyslových odparekách, které jsou většinou stejné jako pro mléko. Nejlépe se osvědčily filmové vícestupňové odparky s klesajícím filmem. S ohledem na možnou denaturaci bílkovin obsažených v syrovátce by teplota dehydratace neměla překročit teplotu 75 °C, následuje-li proces sušení samostatně. Je-li odpařování součástí sušícího procesu (zpracování syrovátky pro pekařské účely), doporučuje se odpařování při teplotě nad 75 °C. V průběhu odpařování nastává problém s pěněním syrovátky, který je možno vyřešit správnou konstrukcí odparek. Konstrukci ovlivňuje též stupeň zahuštění, protože se stupněm zahuštění vzrůstá prudce viskozita [1, 8, 23].

1.2.5 Sušení syrovátky

1.2.5.1 Sušení syrovátky ve válcových sušárnách

Tento technologický postup je velmi komplikovaný vysokým obsahem laktosy v syrovátce, jelikož během sušení nevykristalizuje, ale vytvoří se z ní amorfni sklovitá tavenina s nevhodnými fyzikálními vlastnostmi. Struktura je nehomogenní, dochází k hnědému zbarvení (vlivem Maillardovy reakce) a zvyšuje se hygroskopičnost. Tyto komplikace je možno vyřešit sušením syrovátky ve směsi se šrotu, sójovou moukou nebo odstředěným mlékem. Výsledný produkt ovšem není srovnatelný s produkty sušenými rozprašováním [1].



Obr. 4 Schéma laboratorní rozprašovací sušárny Anhydro využívané k sušení syrovátky [24]

1.2.5.2 Sušení syrovátky rozprašováním

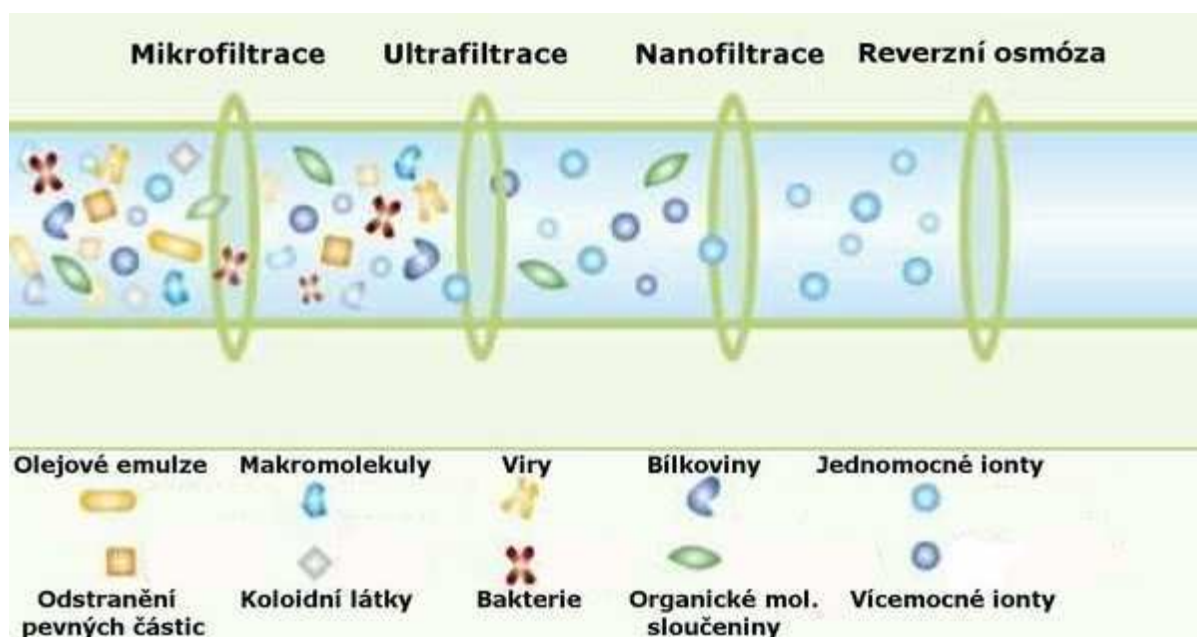
Toto je nejrozšířenější postup průmyslového zpracování syrovátky. Syrovátka je nejprve dehydratována odpařováním a zbylé množství vody je odstraněno v rozprašovacích sušárnách (příkladem je sušárna Anhydro na Obr. 4). Odpařování na víceúrovňových odparkách je energeticky a ekonomicky výhodnější než vlastní sušení rozprašováním, z toho důvodu převládá odpařit maximální množství vody na odparkách. Stupeň zahuštění syrovátky je technologicky omezen viskozitou vzniklého syrovátkového sirupu. Se zvyšující se koncentrací viskozita velmi prudce vzrůstá, silně zahuštěné roztoky vykazují o 4 – 5 řádů vyšší viskozitu než syrovátka původní.

I při tomto postupu vzniká amorfni laktosa, pokud není předem vykrytalizovaná. Obsahuje-li syrovátka laktosu vykrytalizovanou v podobě α -monohydrátu, snižuje se hydroskopičnost a celkově se zlepšují fyzikální vlastnosti [1].

1.2.6 Moderní separační metody

1.2.6.1 Ultrafiltrace a hyperfiltrace

Rozdílnost jednotlivých metod je dána velikostí procházejících částic a velikostí tlakového rozdílu, který je hnací silou procesu. Jako vlastní filtrační podložka slouží polopropustná membrána. Na rozdíl od klasické filtrace, při které je tok kapaliny veden kolmo k ploše filtru, při membránových filtracích kapalina teče podél membrány. Klasickou filtraci využíváme k oddělení částice o rozměrech 10^{-3} až 10^{-5} m, ultrafiltrací částice 10^{-5} až 10^{-8} m a hyperfiltrací 10^{-8} až 10^{-10} m (viz Obr. 5). Při membránových procesech tedy dochází k oddělení na úrovni molekulových hmotností [25].



Obr. 5 Zobrazení závislosti velikosti pórů membrány na velikosti prošlých částic [25]

Ultrafiltrační membrány zadržují látky do molekulové hmotnosti 500. Látky s nižší molekulovou hmotností po průchodu tvoří tzv. ultrafiltrát, látky s vyšší molekulovou hmotností proudí podél membrány ve formě koncentrátu. Ultrafiltrační membrána propouští čisté rozpouštědlo (vodu), ionty, soli, aminokyseliny, peptidy, jednoduché cukry. Jsou nepropustné pro makromolekulární látky, např. proteiny. Tlak se pohybuje v rozmezí 0,07 až 3,5 MPa.

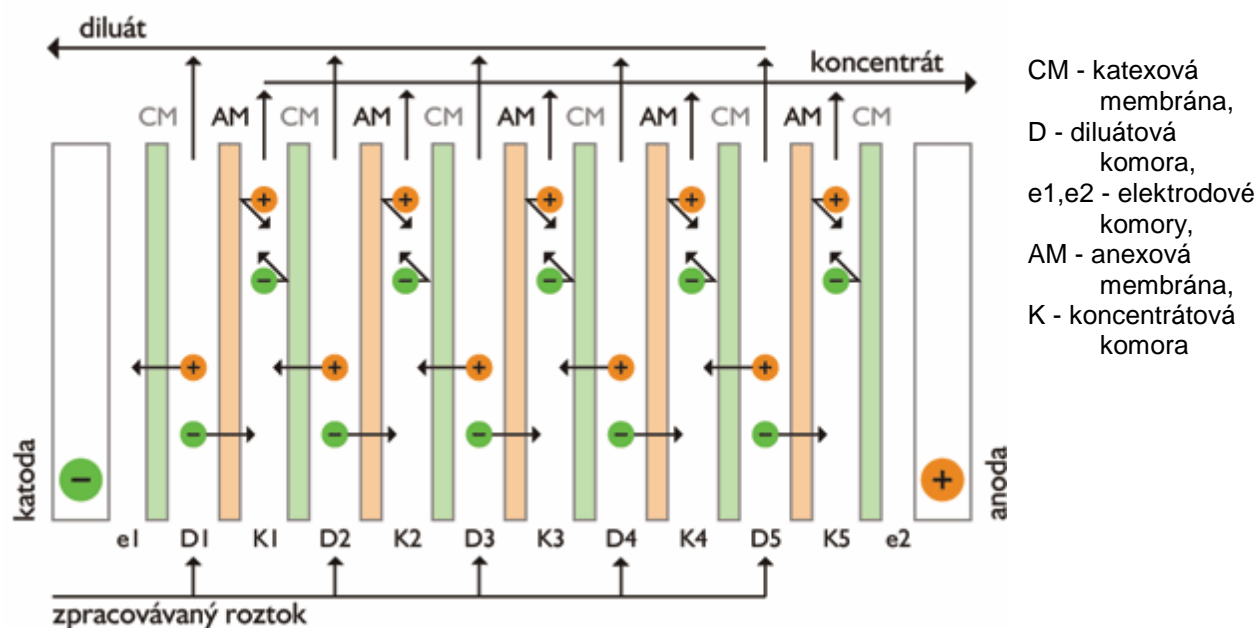
Při hyperfiltraci je membrána propustná pouze pro rozpouštědlo a rozpuštěné látky, dokonce i ionty a soli se zadržují v roztoku a proudí podél membrány. Při hyperfiltraci se používají tlaky v rozmezí 2,8 až 8,4 MPa. Rozpouštědlo a rozpuštěné látky tvoří tzv. hyperfiltrát. Hyperfiltrace může být použita místo odpařování. V běžné praxi je využívána k odsolování mořské vody.

V mlékárenském průmyslu má větší vyhlídky ultrafiltrace, jelikož je schopna oddělit mléko od syrovátky. Používané membrány mají velkou separační účinnost, permeabilitu, mechanickou pevnost a odolnost vůči čistícím prostředkům. Účinnost membrány je dána velikostí pórů. Z hlediska materiálu se využívají membrány vyrobené z acetátu celulosy, nitrátu celulosy, PVC, nylonu, polysulfonů, ... [1, 8, 23]

1.2.6.2 Elektrodiálýza

Jedná se o membránovou metodu vhodnou k demineralizaci syrovátky. Ionty jsou z roztoku odstraněny pomocí elektrického napětí a iontových selektivních membrán. Zařízení obsahuje kationové a aniontové propustné membrány, mezi nimiž střídavě protéká syrovátka a vodný roztok solí. Ionty přecházejí vlivem napětí ze syrovátky do roztoku solí.

Při jednom průchodu sestavou membrán se odstraní asi 10 % popelovin, opakovaným postupem lze odstranit až 90 %. Míra odsolení závisí na velikosti náboje a na velikosti iontů. Nejvyšší je u draslíku, mnohem nižší je u vápníku. Demineralizovaný roztok syrovátky lze dále zahušťovat [26].



Obr. 6 Schématické znázornění separačního procesu elektrodiálýzy [27]

1.2.6.3 Gelová filtrace

Gelová filtrace se využívá pro separaci složek o různé molekulové velikosti. Čerpaná kapalina protéká jednou nebo několika nádržemi, které obsahují nabobtnalé kuličky dextransu. Malé molekuly vniknou do gelu a ulpí v něm, velké molekuly gelem projdou. Jedná se o jednofázový proces umožňující dělení. V některých případech je nutné ředění kapaliny. V případě syrovátky je tuto metodu možno použít k separaci proteinů. Sérové bílkoviny si uchovávají své funkční vlastnosti, což je žádoucí.

V praxi se využívá různá kombinace výše popsaných metod k separaci žádaných složek syrovátky [26].

1.3 Fermentace syrovátky

Jelikož syrovátka obsahuje asi 4,5 % sacharidů, stává se vhodným substrátem pro bakterie, plísně nebo kvasinky. Metabolickými dráhami těchto organismů vznikají ze sacharidů cenné produkty především pro krmné účely, etanol, bioplyn, organické kyseliny, vitamíny, enzymy, polysacharidy, lipidy a organolepticky účinné látky. Produkty metabolismů je možno využít též při výrobě nápojů. Každý produkt vzniká z metabolismu jiného mikroorganismu (plísně, kvasinky i bakterie) a za použití zcela jiných podmínek (odlišné pH, různá koncentrace živin a různé nároky na kyslík). V některých případech je nutné podmínky v průběhu fermentace upravovat nebo odvádět produkt, aby nedocházelo k inhibici růstu a metabolismu mikroorganismů [1, 8].

1.3.1 Produkce biomasy

Produkce biomasy probíhá většinou za aerobních podmínek. Využívá se syrovátka, syrovátková melasa nebo laktosový permeát. Nejčastěji se syrovátka využívá k produkci kvasinek *Candida fragilit*, *Candida utilis*, *Candida tropicalis* nebo *Saccharomyces cerevisiae*. Po ukončení růstu mikroorganismů dochází k separaci biomasy a případně jejímu zkoncentrování či sušení [1, 8].

1.3.2 Produkce bioplynu

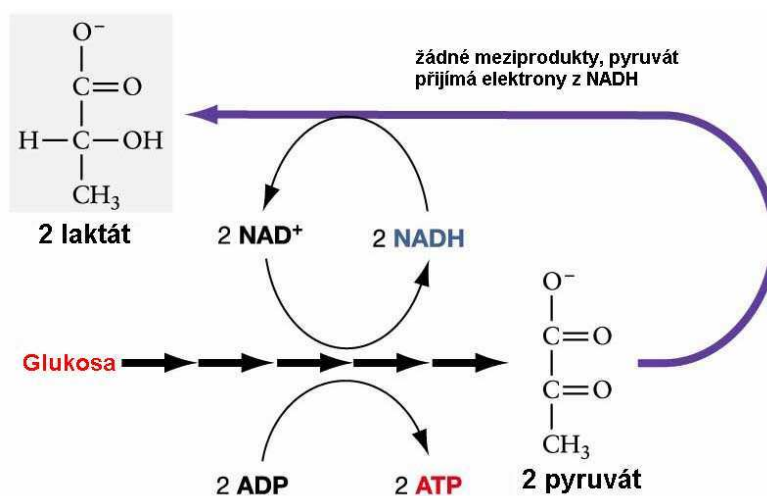
Fermentací za anaerobních podmínek lze postupným štěpením (hydrolýza laktosy, štěpení glukosy, organických kyselin) a dekarboxylací vhodnými mikroorganismy získat bioplyn, což je směs metanu a oxidu uhličitého [8].

1.3.3 Produkce etanolu

Anaerobní fermentací lze ze syrovátky volbou vhodných mikroorganismů a podmínek vyrobit etanol s výtěžností 86 až 94 % (asi 682 l etanolu z 1 tuny laktosy) [8].

1.3.4 Výroba kyseliny mléčné

Kyselina mléčná je jedna z nejvyužívanějších kyselin, které vznikají fermentací, v potravinářském, chemickém, papírenském i farmaceutickém průmyslu. Jako substrát se využívá syrovátka nebo syrovátková melasa po výrobě mléčného cukru [1]. Pomocí bakterií mléčného kvašení dochází k přeměně laktosy na kyselinu mléčnou pomocí mléčného kvašení (Obr. 7). Během fermentace se kyselina neutralizuje a po prokvašení se médium zahřeje a zfiltruje. Filtrát se zahustí a vzniklý mléčnan vápenatý se převede pomocí kyseliny sírové na kyselinu mléčnou a nerozpustný síran vápenatý, který se oddělí. Z takto získané kyseliny mléčné lze rafinací získat látku v potravinářské jakosti [8].



Obr. 7 Průběh mléčného kvašení [28]

1.3.5 Výroba nápojů

Při výrobě nápojů se využívají mléčné bakterie, občas v kombinaci s kvasinkami (např. *Kluyveromyces fragilis* nebo *Candida pseudotropicalis*, je-li médium obohaceno sacharosou tak i *Saccharomyces cerevisiae*). Surovinou je syrovátka s i bez proteinů, s obsahem solí i částečně demineralizovaná. *Saccharomyces cerevisiae* není schopna fermentovat laktosu, která zůstává v nápoji. Výhodou výroby nápojů fermentací syrovátky je, že obsahují složky syrovátky i produkty metabolismu mikroorganismů. Mezi nevýhody patří příliš vysoký obsah solí a kyselin nebo nestabilita bílkovinného zůstatku [8].

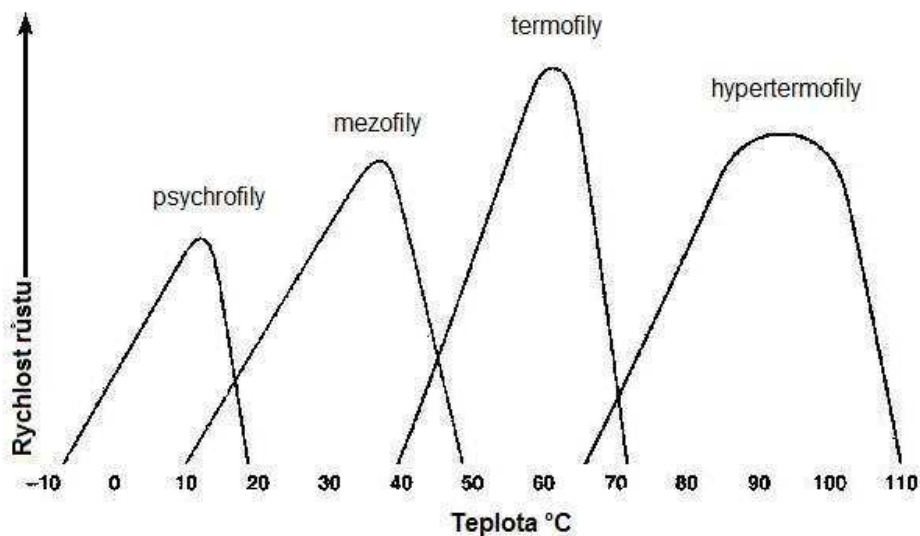
1.4 Termofilní mikroorganismy

Mikroorganismy je možno dělit do skupin dle optimální teploty růstu. Možné rozdělení je uvedeno na Obr. 8. U termofilních mikroorganismů se optimum pohybuje nad 45 °C, pro většinu se pohybuje v rozmezí 50 až 60 °C. Některé kmeny druhu *Bacillus Stearothermophilus* mohou růst výjimečně i při teplotě až 80 °C, archaeobakterie (extrémní termofily) dokonce při teplotách nad 100 °C. Většina není schopna reprodukce při teplotách 28 až 30 °C, někteří zástupci dokonce ani při teplotách nižších než 40 °C.

Termofilní mikroorganismy mají své zástupce mezi rody *Bacillus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, řadí se sem také některé aktinomycety a zástupci jiných rodů. Vyznačují se mimořádně vysokou metabolickou aktivitou a rychlostí růstu za optimální teploty.

Vyskytují se v půdě, v kompostech, v chlévské mrvě, v uskladněném vlhkém materiálu (rašelině, seně, obilí), v bahně, tj. všude tam, kde činnost mezofilních mikroorganismů přispěla ke zvýšení teploty na 40 až 45 °C. Termofilní mikroorganismy teplotu dále zvyšují a je možno, že dojde k samovznícení materiálu, které jim slouží k růstu.

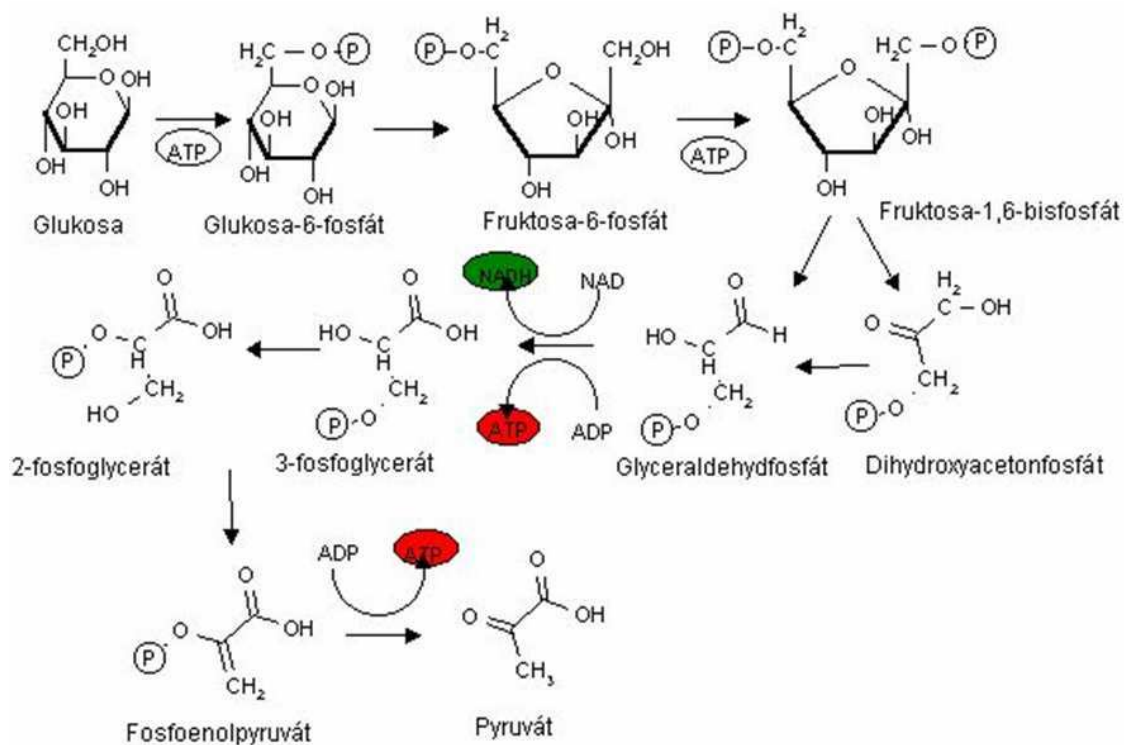
Průmyslové využití termofilů značně vzrůstá. Kromě biotechnologických aplikací, produkce extracelulárních enzymů, se využívají také při zpracování či odbourávání odpadů a zneškodnění vedlejších produktů průmyslových procesů [29].



Obr. 8 Rozdělení mikroorganismů podle optimální teploty růstu [29]

1.4.1 Vybrané metabolické dráhy termofilních mikroorganismů

Základním katabolickým procesem při metabolismu sacharidů je glykolýza (Obr. 9), která probíhá bez ohledu na přítomnost kyslíku. Dochází k oxidaci sacharidu na pyruvát, jehož další zpracování se dále liší u aerobního a anaerobního metabolismu a taktéž u jednotlivých mikroorganismů.

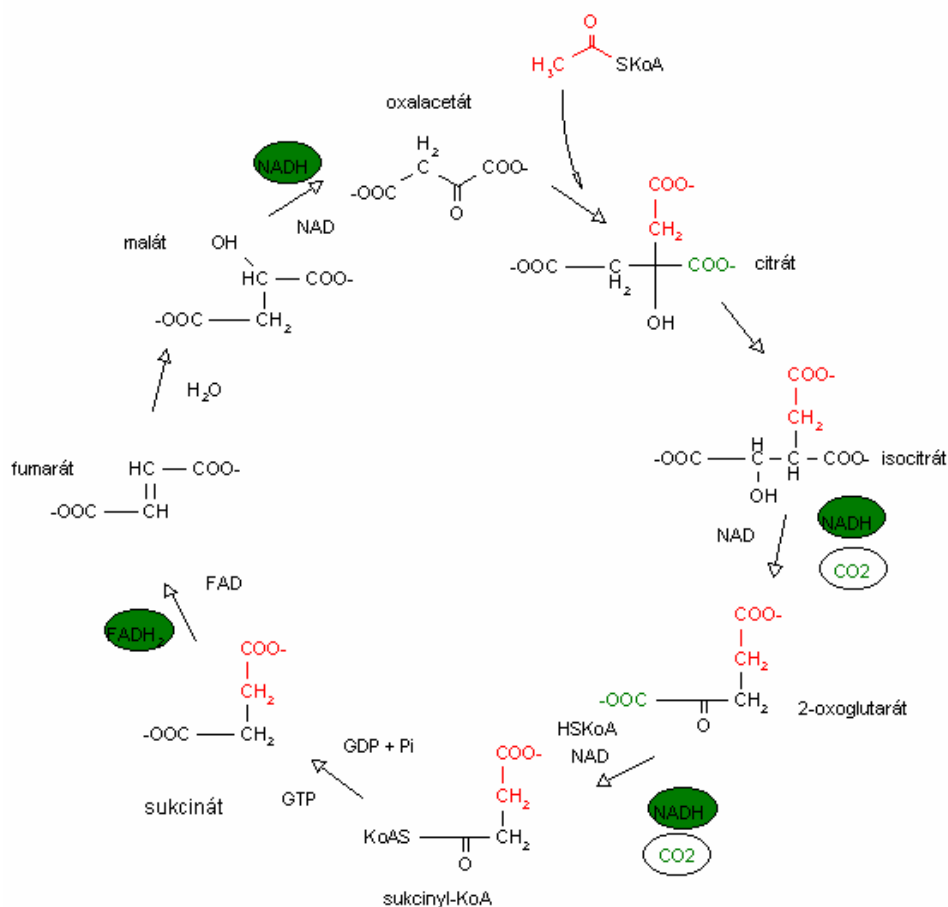


Obr. 9 Glykolýza [30]

Lipidy jsou odbourávány pomocí extracelulárního enzymu (lipasa), který je schopen odštěpit mastné kyseliny. Kyseliny jsou poté aerobním způsobem oxidovány v procesu zvaném β -oxidace. Produkty této metabolické dráhy jsou acetylkoenzym A a mastná kyselina o 2 uhlíky kratší [29].

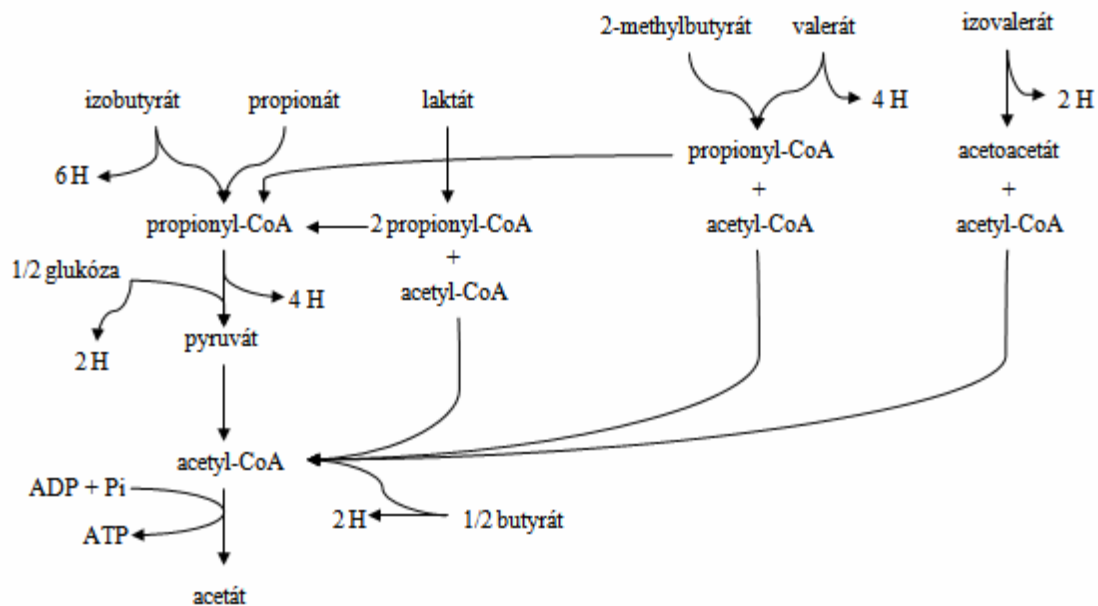
Před využitím peptidů a bílkovin je nutné jejich rozštěpení na jednotlivé aminokyseliny. Bílkoviny jsou štěpeny extracelulárními proteasami. U aminokyseliny dochází k deaminaci. Vzniká amoniak a organické kyseliny, které jsou dále metabolizovány [29].

Nejdůležitějším aerobním katabolickým procesem, do něhož vstupují produkty odbourávání sacharidů, lipidů, bílkovin a dalších látek je tedy citrátový cyklus (Obr. 10).

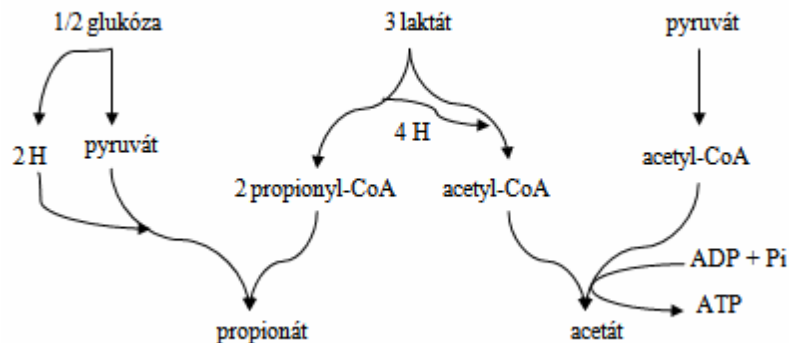


Obr. 10 Citrátový cyklus [31]

Zajímavostí termofilních mikroorganismů je metabolismus a transformace organických kyselin, který se liší při aerobních a anaerobních podmínkách (Obr. 11, 12) [29].



Obr. 11 Metabolismus organických kyselin za aerobních podmínek [32]



Obr. 12 Metabolismus organických kyselin za anaerobních podmínek [32]

1.4.2 Rod *Bacillus*

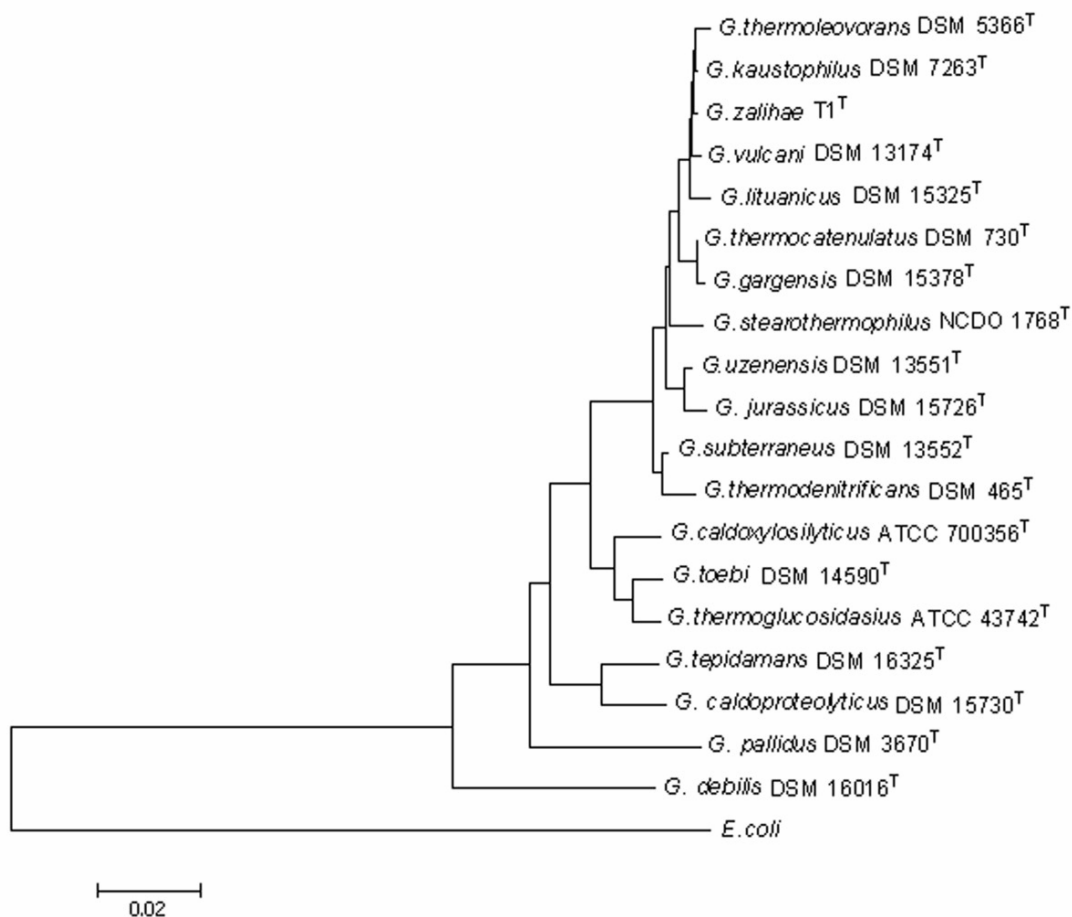
Při podrobném zkoumání, a hlavně genovým sekvencováním 16S-rRNA zástupců rodu *Bacillus* byla odhalena výrazná fylogenetická heterogenita. Díky získaným poznatkům byl tento rod reorganizován. Vzniklo tak postupně několik fylogenetických skupin reklasifikovaných na nové rody uvedených v Tabulce 4. Nejvýznamnější termofilní rody jsou *Thermobacillus*, *Ureibacillus* a *Geobacillus* [33].

Tabulka 4 Přehled nových rodů vzniklých reorganizací rodu *Bacillus* [33]

Rod	Stručný popis
<i>Bacillus</i>	aerobní nebo fakultativně anaerobní, tyčinkovité, tvořící endospory
<i>Amphibacillus</i>	fakultativně anaerobní
<i>Alicyclobacillus</i>	acidofilní, mírně termofilní
<i>Peanibacillus</i>	fakultativně anaerobní, mezofilní
<i>Aneurinibacillus</i>	aerobní, mezofilní
<i>Brevibacillus</i>	aerobní, mezofilní
<i>Halobacillus</i>	mírně halofilní
<i>Virgibacillus</i>	mezofilní, mírně halotolerantní
<i>Gracilibacillus</i>	mezofilní, některé halotolerantní
<i>Salibacillus</i>	mírně halofilní
<i>Anoxybacillus</i>	striktně nebo fakultativně anaerobní, alkalifilní, mírně termofilní
<i>Thermobacillus</i>	aerobní, termofilní
<i>Filobacillus</i>	aerobní, alkalitolerantní, halofilní
<i>Ureibacillus</i>	aerobní, termofilní
<i>Geobacillus</i>	aerobní nebo fakultativně anaerobní, termofilní

1.4.2.1 Rod *Geobacillus*

Zástupci tohoto druhu tvoří peritrichní tyčinkovité buňky, které se vyskytují buď jednotlivě, nebo v krátkých řetězcích. Mají sice grampozitivní buněčnou stěnu, ale při barvení může docházet k pozitivnímu nebo negativnímu výsledku. Tvoří spory, které jsou elipsoidní nebo válečkovité. Spory jsou umístěny terminálně nebo subterminálně. Kolonie na pevném médiu mají různý tvar a velikost. V některých médiích mohou produkovat pigment. Rod *Geobacillus* patří mezi chemoorganotrofní mikroorganismy, je aerobní nebo fakultativně anaerobní. Vedle kyslíku může být akceptorem elektronů u některých druhů také dusičnan. Teplotní rozmezí růstu se pohybuje v rozsahu 37 – 75 °C, optimum nastává při 55 – 65 °C. Optimální hodnota pH je 6,2 – 7,5, ale jsou schopny růst v rozsahu pH 6 – 8,5 [34]. Taxonomické zařazení rodu *Geobacillus*: kmen Firmicutes → třída Bacilli → řád Bacillales → čeleď Bacillaceae [35]. Fylogenetický strom rodu *Geobacillus* znázorňuje Obr. 13.



Obr. 13 Fylogenetický strom rodu *Geobacillus* [36]

***Geobacillus thermodenitrificans* (CCM 2566)**

Původní kultura byla izolována ze šťávy cukrové řepy v Rakousku. Kolonie jsou ploché s laločnatými okraji bílé až béžové barvy. Optimální teplota růstu je 50 – 65 °C a optimálním pH 6 – 8. Je schopen redukovat dusičnany, které za anaerobních podmínek slouží jako akceptory elektronů. Hydrolyzuje škrob a využívá glukosu, fruktosu, maltosu, trehalosu, manosu, laktosu, celobiosu, galaktosu, xylosu, ribosu a arabinosu. Přirozeně se vyskytuje v půdě [33].

***Geobacillus thermocatenulatus* (CCM 2809)**

Kultura byla izolována z termálního vrtu na Uralu. Bakterie jsou dlouhé tenké tyčinky v nerozvětvených řetězcích, které se v tekutém médiu mohou shlukovat. Tvoří nažloutlé, kulaté a vyvýšené, hladké a mazlavé kolonie na pevném médiu. Rozmezí teplot vhodných pro růst je 35 – 78 °C. Jako jeden z produktů metabolismu jsou tvořeny granule kyseliny polyhydroxybutyrové. Z glukosy, levulose, galaktosy, sacharosy, celobiosy, manitolu, glycerolu a dextrinu tvoří kyseliny [33].

1.4.3 Rod *Thermus*

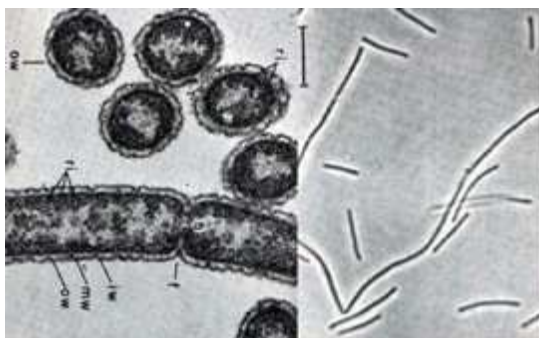
První objevení zástupců rodu *Thermus* bylo podnětem pro detailní studie fyziologie termofilních bakterií. Jeho objev byl velice jednoduchý, jelikož kultivace je velmi snadná. Bylo použito slané syntetické médium, které se ukázalo jako vhodné pro růst řas vyskytujících se v horkých pramenech. Do média byly přidány nízké koncentrace organických sloučenin a kultivace probíhala při 70 °C. Teplota je v tomto případě velmi důležitá. Do této doby probíhaly kultivace pouze při 55 °C, což znemožňovalo růst termofilních mikroorganismů s vyšší teplotou růstu [37].

Zástupci rodu *Thermus* jsou gramnegativní aerobní bakterie, nicméně některé nově izolované druhy rostou i v anaerobním prostředí, kde využívají dusičnany jako finální akceptory elektronů. Tento rod netvoří endospory [38].

Morfologie organismu je do značné míry ovlivněna teplotou růstu a fází růstu. Organismus se obvykle vyskytuje v podobě vláken, je-li teplota nad 75 °C. Při teplotě 65 až 70 °C jsou vlákna tvořena pouze ve stacionární fázi růstu kultury [37].

***Thermus aquaticus* (CCM 4465)**

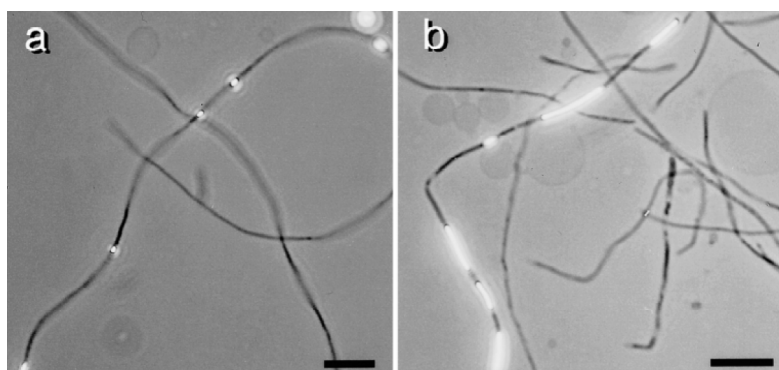
Elektronová mikroskopie odhalila, že *Thermus aquaticus* má gramnegativní buněčnou stěnu a také velmi složitou strukturu sféroplastu (Obr. 14). Charakteristická struktura byla potvrzena u mnoha kultur *Thermus aquaticus*. Skládá se z několika samostatných buněk, které jsou obklopené membránou. Podrobné studie prokázaly, že tato membrána je složena z vnějších buněčných obalových vrstev, které se částečně oddělily z buněčného povrchu. Vznik kulových útvarů pravděpodobně zahrnuje nějakou asociaci a interakci vnějších buněčných obalů většího množství oddělených buněk. Předpokládá se, že dochází k částečnému oddělení vnější vrstvy stěny a následnému splnutí těchto vrstev u sousedních buněk [37].



Obr. 14 Mikroskopický obraz buněk *Thermus aquaticus* [39]

***Thermus scotoductus* (CCM 3486)**

Tento mikroorganismus byl izolován z neutrálních horkých pramenů bohatých na obsah sulfidů na Islandu. Je fakultatивно mixotrofní a je schopen oxidovat sloučeniny obsahující síru. Thiosíran a elementární síru využívá jako dárce elektronů, kyslík a dusičnany jako akceptory elektronů a acetát a jiné organické sloučeniny jako zdroj uhlíku. Po několika dnech růstu na médiu obsahujícím thiosíran tvoří globule oxidu (Obr. 15) [40].



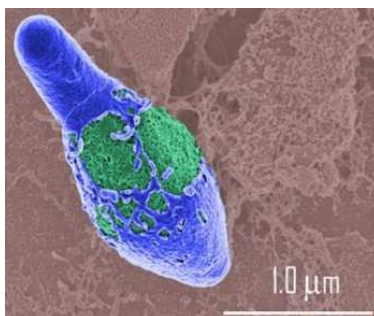
a – počáteční tvorba globulí.

b – konečný stav po vytvoření globulí oxidu

Obr. 15 Bakteriální vlákna obsahující globule síry po růstu v médiu s 16 mmol.l^{-1} thiosíranem [40].

1.4.4 Rod Clostridium

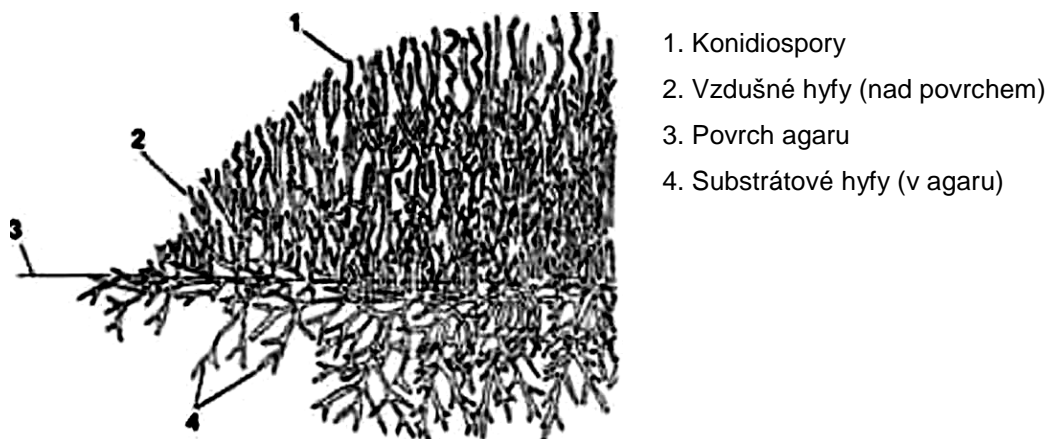
Buňky zástupců rodu *Clostridium* tvoří grampozitivní sporotvorné peritrichní tyčinky, jsou obligátně anaerobní. Nejvíce se zástupci tohoto rodu vyskytují v potravinářství, kde je jejich přítomnost nežádoucí. Projevují se tvorbou nepříjemně páchnoucích sloučenin, produkcí velkého množství plynu při anaerobní oxidaci sacharidů a v neposlední řadě produkcí velmi nebezpečných toxinů (*Clostridium botulinum* produkující botulotoxin – Obr. 16). Velkým problémem v konzervářství jsou spory *Clostridium thermosaccharolyticum*, které přežívají běžné sterilační teploty aplikované na nekyselé konzervy. Optimální teplota je v rozmezí 55 až 62 °C, při teplotě pod 30 °C je fyziologie buňky již velmi narušená. Z tohoto důvodu způsobuje kažení konzerv jen při jejich skladování za vyšších teplot [41].



Obr. 16 Mikroskopický obraz buňky *Clostridium botulinum* [42]

1.4.5 Aktinomycety

Aktinomycety jsou grampozitivní aerobní bakterie, které jsou morfologií více podobné vláknitým houbám. Hyfy tvoří mycelium na povrchu i uvnitř agaru, tento úkaz je znázorněn na Obr. 17. K rozmnožování dochází pomocí spor, některé rody tvoří sporangia s endosporami [43].



Obr. 17 Růst aktinomycet na agaru [43]

Jsou to typické půdní bakterie. Termofilní zástupci se výrazně podílejí na degradaci organických sloučenin. Rod *Thermomonospora* je schopen rozkládat i lignocelulosový komplex. Důležitou mikroflórou kompostu je rod *Thermoactinomyces*, který bývá původcem samovznícení sena, slámy apod. [29]

1.4.6 Termofilní houby

Při srovnání množství termofilních eukaryotních a prokaryotních organismů dospějeme k závěru, že mezi eukaryotními organismy je termofilů velmi málo. Mezi tyto výjimky řadíme převážně houby, které ovšem nedisponují příliš velkou schopností odolávat vysokým teplotám. Maximální teplota růstu se pohybuje v rozmezí 60 – 70 °C a teplotní optimum je kolem 50 °C. Představují rozmanitou skupinu různých druhů, mezi zástupce patří například *Mucor pusillus*, *Thermomyces lanuginosus* (Obr. 18), *Thermoascus aurantiacus*, *Chaetomium thermophile*, *Talaromyces thermophilus*, *Stilbella thermophila*, *Canariomyces thermophila*, *Thielavia terrestris*. Jsou hlavní složkou mikroflóry, která se vytváří na nahromaděném rostlinném materiálu, tj. všude tam, kde je teplo, vlhko a dostatek kyslíku pro jejich rozvoj [44].



Obr. 18 Mikroskopický obraz buňky *Thermomyces lanuginosus* [45]

1.5 Adaptace termofilních mikroorganismů na vysoké teploty

Během adaptace mikroorganismu na některý ze stresových faktorů dochází v buňkách ke změnám evolučním nebo fyziologickým. Evoluční změny nastávají při dlouhodobém působení na více generací mikroorganismů. Dochází ke zvýhodnění mikroorganismů, které mají pro dané podmínky lepší genetickou výbavu. Jsou dlouhodobé a předávají se geneticky následující generaci. Změny fyziologické nastávají v důsledku přirozených regulačních mechanismů každého mikroorganismu. Jedná se o rychlou adaptaci na změnu prostředí. Tyto změny se nedědí, ale potomci jsou schopni reagovat obdobně [46].

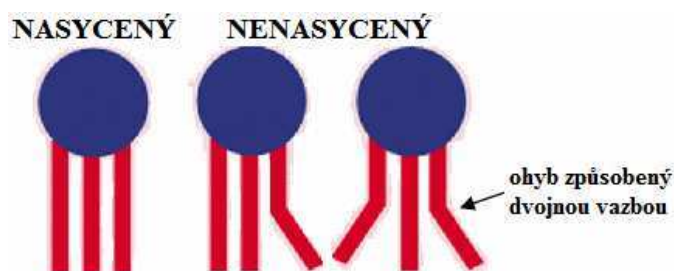
Při vysoké teplotě dochází nejčastěji k denaturaci bílkovin. Metabolismus a život buňky souvisí s enzymy, které se denaturaci nevyhnou. Dalším problémem může být poškození cytoplasmatické membrány. Zvyšuje se její propustnost, při překročení určité hranice se buněčná cytoplazma vylíje do okolního prostředí [46].

Při lokálních změnách teploty dochází k fyziologické adaptaci. Dochází ke změně složení cytoplasmatické membrány a ochraně bílkovin. Fluidita a propustnost membrány je zabezpečena změnou poměru mezi nasycenými mastnými kyselinami na jedné straně a nenasyčenými a rozvětvenými na straně druhé. Nasycené mastné kyseliny zvyšují teplotu tuhnutí. Bílkoviny je možno ochránit produkcí tzv. bílkovin teplotního šoku (heat shock proteins, HSP). Nejen, že jsou schopny zabránit denaturaci, ale jsou schopny označit poškozené bílkoviny [46].

Jestliže není výkyv teploty krátkodobý, musí docházet k evolučním změnám. Tedy ke genetické adaptaci, při které dochází ke změně ve struktuře bílkovin. V molekulách se nachází menší podíl hydrofobních aminokyselin a více disulfidických můstků. Po adaptaci jsou bílkoviny při nižších teplotách rigidnější, což zamezí jejich rozmnožování. Struktura musí být změněna u všech důležitých bílkovin (enzymů), které se zúčastňují metabolismu mikroorganismu. Dojde-li k mutaci jen jediné bílkoviny, nastane celková ztráta adaptace [46].

1.5.1 Vliv složení lipidů v buněčné membráně

Tuky jsou syntetizovány z mastných kyselin a glycerolu. Nenasycené mastné kyseliny mají jednu až čtyři dvojné vazby, které způsobují "ohyby" v uhlíkovém řetězci a mají vliv na fluiditu lipidové membrány. Rozdílné struktury nasyceného a nenasyceného fosfolipidu jsou zobrazeny na Obr. 19. Nasycené tuky jsou více shluknuté, při nižších teplotách téměř pevné. Nenasycené tvoří díky ohybům nepravidelnou strukturu, při nižších teplotách jsou tekuté [37].



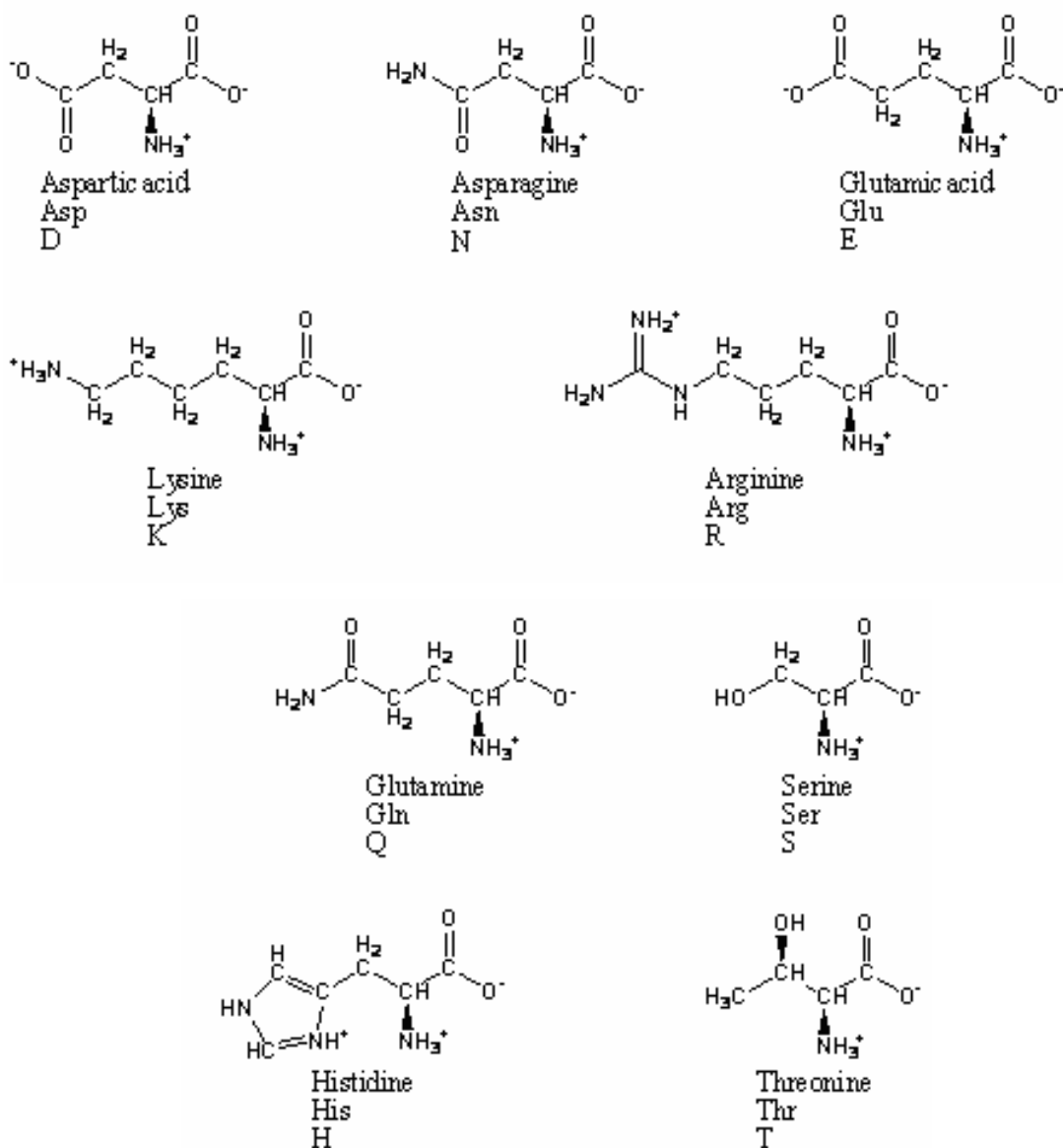
Obr. 19 Struktura nasyceného a nenasyceného fosfolipidu [47]

1.5.2 Proteiny teplotního šoku

Proteiny teplotního šoku (HSP) se nacházejí ve všech buňkách. Jsou indukované, když buňka podstupuje některý typ environmentálního stresu jako teplo, chlad a nedostatek kyslíku. Proto se občas nazývají také jako stresové proteiny. Jejich názvosloví je nejčastěji odvozeno od molekulové hmotnosti (např. hsp60, hsp70, hsp90). V buňkách jsou přítomné také za optimálních podmínek. Pomáhají hospodařit s ostatními proteiny, aby byly ve správné formě, na správném místě a ve správný čas. Pomáhají nové či porušené proteiny poskládat do podoby, která je základní pro jejich funkci. Pohybují se z jednoho oddělení buňky do jiného i přes různé blány. Mimo to dopravují staré proteiny do proteazomu, kde dochází ke štěpení na peptidy a aminokyseliny [48].

1.5.3 Hydrofobní aminokyseliny

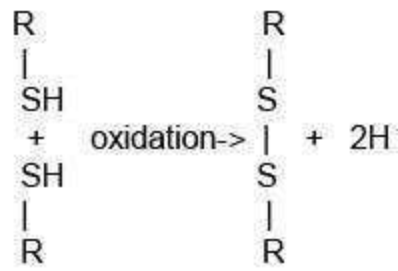
Mezi esenciálními aminokyselinami je 9 hydrofobních: glycin, alanin, valin, leucin, isoleucin, methionin, fenylalanin, tryptofan a prolin (Obr. 20). Hydrofobní jsou postranní řetězce (zejména C-H vazby). Tyto postranní řetězce málo interagují s molekulami vody. Nacházejí se nejen v jádru globulárních proteinů, ale také v místě spojů mezi proteinovými podjednotkami [49].



Obr. 20 Strukturí vzorce esenciálních hydrofóbních aminokyselin [50]

1.5.4 Disulfidické můstky

Prostorové uspořádání proteinů může být pozměněno kovalentními i nekovalentními interakcemi. Z kovalentních se využívají pouze disulfidické vazby [51]. Disulfidický můstek je tvořen vazbou bočních řetězců dvou cysteinů (jediná základních stavebních aminokyselin obsahující skupinu –SH v bočním řetězci). Tvoří se pouze v oxidovaném stavu a mají vliv na uspořádání terciární struktury [52]. Vznik disulfidického můstku oxidací zobrazuje reakce (Obr. 21). Z nekovalentních interakcí je nejdůležitější interakce dipól-dipól [53].



Obr. 21 Vznik disulfidické vazby v oxidovaném stavu [54]

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Cíl práce

Cíl diplomové práce byl zaměřen na studium podmínek růstu dvou vybraných kmenů rodu *Thermus* a dvou vybraných kmenů rodu *Geobacillus* na syrovátkovém médiu. Prvním úkolem bylo stanovit optimální podmínky růstu každého mikroorganismu. Zjištěné optimální podmínky byly využity při kultivaci ve fermentoru a stanovení růstových křivek.

Při stanovení optimálních podmínek byla studována utilizace syrovátky. Sledovala jsem obsah organických látek v syrovátce pomocí stanovení CHSK a obsah redukujících cukrů podle Somogyiho a Nelsona.

2.2 Použité přístroje

Fermentor BioFlo®/CelliGen™ 115, New Brunswick (Obr. 22)

Termostatovaná třepačka Heidolph® Promax 1020 (Obr. 23)

Spektrofotometr Unicam Helios ε (Obr. 24)

Ultrospec™ 10 Cell Density Meter (Obr. 26)

Centrifuga Hettich EBA 20

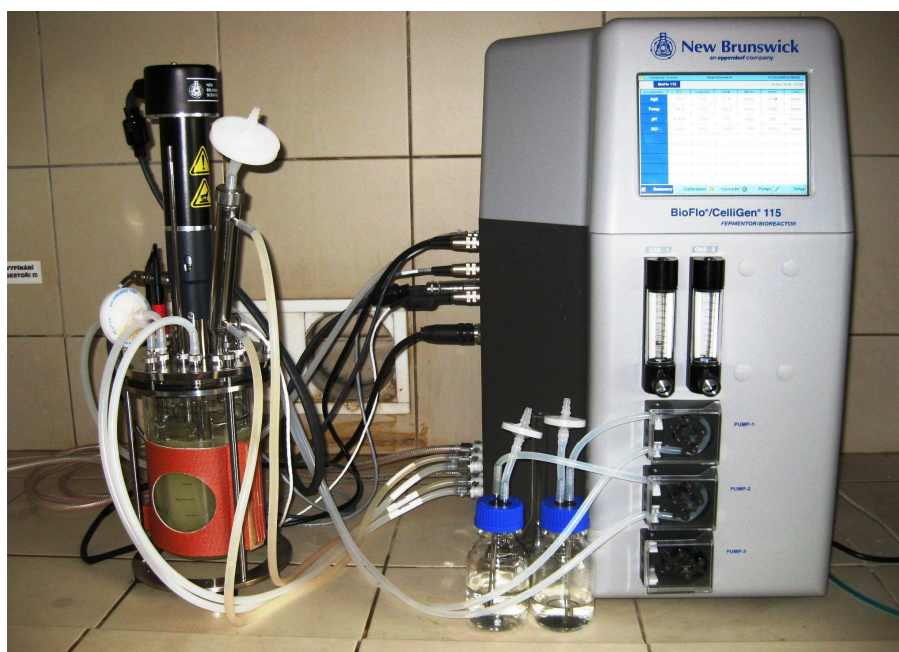
Pečící trouba Mora 524

Analytické váhy

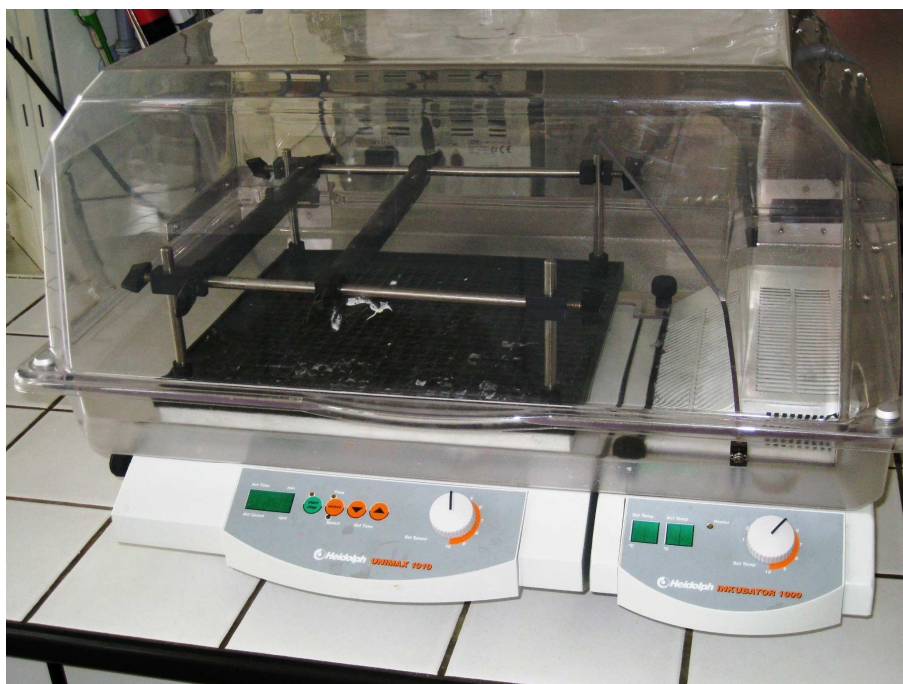
Kombinovaná lednice BOSH

Termostat Memmert

Běžné laboratorní sklo



Obr. 22 Fermentor BioFlo®/CelliGen™ 115, New Brunswick



Obr. 23 Termostatovaná třepačka Heidolph® Promax 1020



Obr. 24 Spektrofotometr Unicam Helios ε

2.3 Kultura a příprava médií

2.3.1 Kultura

Ke kultivaci byly použity termofilní kultury pořízené z České sbírky mikroorganismů:

- *Thermus scotoductus* CCM 3486
- *Thermus aquaticus* CCM 4465
- *Geobacillus thermodenitrificans* CCM 2566
- *Geobacillus thermocatenuans*. CCM 2809

Termofilní mikroorganismy byly kultivovány na syrovátce získané při výrobě sýru Hermelín a dodala ji firma Pribina spol. s r.o.

2.3.2 Příprava inokulačních médií

Pro oživení a pomnožení kultur se využívá syntetických médií a složení uvedené v Tabulka 5, 6.

Tabulka 5 Složení kultivačního média pro rod *Geobacillus*

Pepton	5 g
Masový extrakt	3 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,01 g
Destilovaná voda	1000 ml

Tabulka 6 Složení kultivačního média pro rod *Thermus*

Pepton	8 g
Kvasničný extrakt	4 g
NaCl	2 g
Destilovaná voda	1000 ml

2.3.3 Příprava kultivačního média

Kultivačním médiem byla upravená syrovátka. Bílkoviny ze syrovátky byly vysráženy přidávkem 0,5 mol.l⁻¹ H₂SO₄ na pH = 4,6 (odstranění kaseinu) a následným povařením 20 min při 105 °C (odstranění α-laktoglobulinu a β-laktoglobulinu). Takto upravená syrovátka byla odstředěna při 6 000 ot.min⁻¹ po dobu 10 min. Odstředěná syrovátka byla upravená 0,5 mol.l⁻¹ NaOH (respektive 0,5 mol.l⁻¹ H₂SO₄) na pH 5, 6, 7, 8 a 9.

2.4 Analytické metody

2.4.1 Stanovení sušiny biomasy

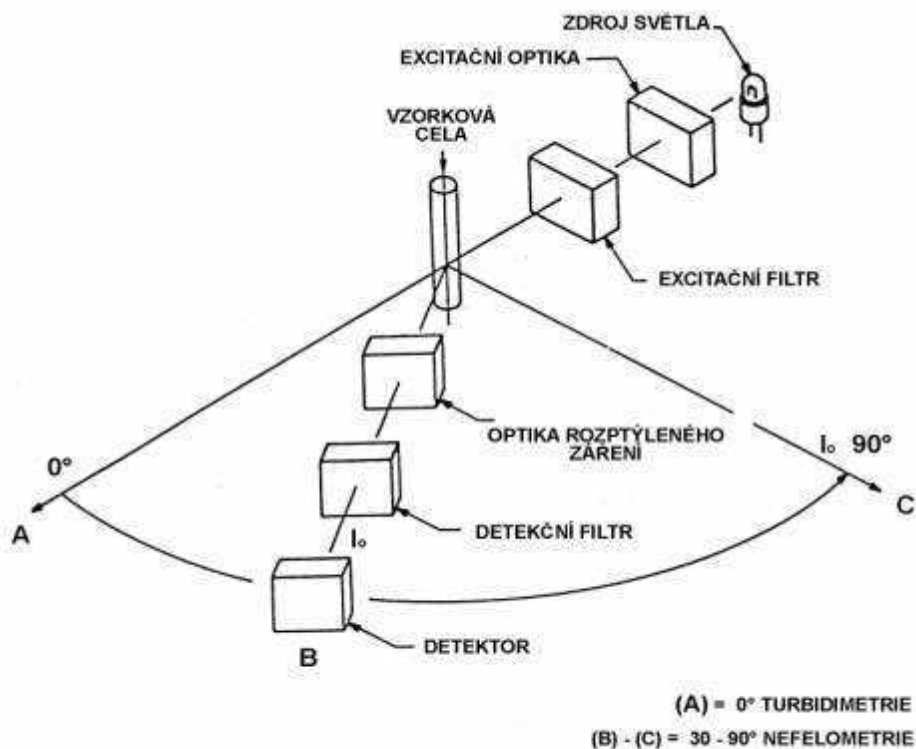
V potravinářském průmyslu je nejpoužívanější arbitrážní metodou ke stanovení sušiny a vody sušení při 105 °C. Sušení při této teplotě probíhá až do konstantního úbytku hmotnosti. Při této metodě dochází k difúzi, tzn. transportu vody z vnitřních vrstev na povrch, a odpařování povrchové vody. Konstantní hmotnosti dosáhneme, když nastane rovnováha mezi parciálním tlakem odpařované vody na povrchu materiálu a parciálním tlakem sušícího média. Rychlost sušení ovlivňuje povaha vzorku, tvar částic, množství navážky, teplota, vlhkost, rychlost a směr proudění sušícího média [55].

2.4.1.1 Postup stanovení

V našem případě bylo odebráno 10 ml vzorku, ten byl zcentrifugován 10 min při 6 000 ot.min⁻¹. Sediment získaný při centrifugaci byl promyt vodou, protřepán na vortexu a opět zcentrifugován. Sediment byl protřepán s malým množstvím vody a kvantitativně převeden do předem zvážené a vysušené odpařovací misky a byl sušen při 105 °C. Po dokonalém vysušení byla miska se vzorkem zvážena na analytických vahách a z rozdílů hmotností byla stanovena sušina. Supernatant po první centrifugaci byl využit k dalším analýzám. Supernatant po druhé centrifugaci byl vylit do odpadu.

2.4.2 Turbidimetrie a Nefelometrie

Základem turbidimetrie a nefelometrie je měření procházejícího světla, které je zeslabené rozptylem na částicích. Základním předpokladem pro reprodukovatelnost výsledků je získání suspenze, která je dostatečně stálá. K měření absorbance záření koloidním roztokem nebo roztokem zakaleným jemnou sraženinou se využívají absorpční spektrofotometry a fotometry. Schéma turbidimetrie a nefelometrie je uvedeno na Obr. 25.



Obr. 25 Schematické znázornění turbidimetrie a nefelometrie [56]

Fotometrická citlivost je nepřímo úměrná vlnové délce. Mezi absorbcí a koncentrací částic (pro malé částice) je obvykle pozorován lineární vztah. Tento lineární vztah se ovšem může měnit se změnou vlnové délky záření. Na výsledek má vliv také vznik částic odlišné velikosti. Pro měření turbidity bezbarvé suspenze se využívá jakýkoliv fotometr nebo spektrofotometr. U této metody je nutné eliminovat vliv interferujících látek, i kdyby to mělo snížit citlivost měření.

Závislost intenzity prošlého záření na vlastnostech absorbujícího prostředí je exponenciální a je dána vztahem $I_t = I_0 \cdot e^{-\tau \cdot \ell}$, kde I_t udává intenzitu prošlého záření, I_0 udává intenzitu světelného zdroje, τ je turbiditní koeficient a ℓ je světelná dráha (tloušťka kyvety) [57].

Turbidimetrická měření zákalu (OD) kultivačních médií v průběhu růstu bakteriálních buněk se provádí při hodnotě $\lambda = 600$ nm.

2.4.2.1 Měření buněčné hustoty

Cell density meter biowave WPA CO 8000 (Obr. 26) je přístroj určený k měření hustoty buněk v suspenzi. Výsledky je možno uložit do paměti nebo po připojení přenést do PC nebo vytisknout. Výsledky jsou udávány v jednotkách absorpance (OD).

K měření je možno použít různé druhy kyvet a zkumavek o průměru 10, 12 a 16 mm. K měření využívá LED diodu s neomezenou životností a pro měření nejsou potřeba žádné filtry. Před samotným měřením stačí přístroj zapnout a je připravený pro použití (odpadává časová ztráta způsobená zahříváním přístroje). Výsledky jsou srovnatelné s většími a dražšími spektrofotometry. Specifikace přístroje uvedená od výrobce je uvedena v Tabulka 7 [58].



Obr. 26 Cell density meter biowave WPA CO 8000

Tabulka 7 Specifikace přístroje Cell density meter biowave WPA CO 8000 [58]

Vlnová délka	600 nm
Vlnový rozsah	40 nm
Rozsah	Optická hustota - 0,3 A až 1,99 A
Přesnost	< ± 0,05 A při 1 A
Reprodukovatelnost	± 0,02 A při 1 A
Ovládací prvky	6 tlačítek - on/off, REF, TEST, paměť, reset, vyvolat paměť/tisk
Držák kyvet	Nepohyblivý s otvorem pro výtok vody. Akceptuje semi-mikro a makro kyvety s optickou délkou 10 mm nebo kulaté zkumavky o průměru 16mm. Může akceptovat zkumavky 10 a 12 mm s adaptérem (nestandardní)
Výstup	RS232
Paměť	99 údajů
Displej	Uživatelský LCD
Požadavky výkonu	Externí adaptér (110 nebo 220 V) nebo interní dobíjecí NiMH baterie
Přibližné rozměry	180 x 150 x 60 mm
Váha	0,5 kg

2.4.2.2 Postup měření

Růst buněčné kultury byl stanoven měřením optické hustoty při 600 nm (A_{600}) pomocí přístroje Cell density meter biowave WPACO 8000. Jako blank bylo použito kultivační médium. Při hodnotě OD vyšší než 0,90 byl vzorek i blank naředěn (viz jednotlivá měření).

2.4.3 Stanovení redukujících cukrů podle Somogyiho a Nelsona

Sacharidy jsou organické látky patřící do skupiny polyhydroxyderivátů (aldehydů nebo ketonů). Jsou to sloučeniny uhlíku, vodíku a kyslíku, které se liší strukturou a velikostí molekuly. Základní stavební jednotkou je monosacharid. Jednotlivé monosachridy jsou mezi sebou vázané glykosidickou vazbou. Z hlediska počtu sacharidických jednotek je dělíme na monosacharidy, oligosacharidy a polysacharidy. Konec polymeru, který obsahuje poloacetalový hydroxyl, se označuje jako redukující konec a je zodpovědný za redukční vlastnosti sacharidů [59].

2.4.3.1 Příprava Somogyi-Nelsonových činidel

Somogyi-Nelsonovo činidlo I bylo připraveno rozpuštěním 24 g uhličitanu sodného, 16 g hydrogenuhlčitanu sodného, 144 g síranu sodného a 12 g vlnanu sodno-draselného v 800 ml destilované vody.

Somogyi-Nelsonovo činidlo II bylo připraveno rozpuštěním 4 g pentahydrátu síranu měďnatého a 24 g síranu sodného ve 200 ml destilované vody.

Somogyi-Nelsonovo činidlo III bylo připraveno rozpuštěním 25 g molybdenanu amonného ve 450 ml destilované vody. K roztoku poté bylo přidáno 21 ml koncentrované kyseliny sírové a 3 g heptahydrátu hydrogenarseničnanu sodného.

2.4.3.2 Kalibrace redukujících cukrů

Ze standardního roztoku laktosy (1 g laktosy byl rozpuštěn v 1000 ml odměrné baňce) byla připravena série 10-ti ml odměrných baněk roztoků o koncentraci 0,1 – 0,9 g laktosy na 1 litr vody, k ředění byla použita destilovaná voda. Do zkumavky bylo pipetováno 0,5 ml Somogyiho činidla (I. + II. v poměru 4:1) a přidáno 0,5 ml zásobního roztoku. Důkladně promíchaný roztok byl 10 minut zahříván ve vodní lázni a následně ochlazen na laboratorní teplotu. Poté bylo do zkumavky přidáno 0,5 ml Nelsonova roztoku (činidlo III.) a roztok byl doplněn 3,5 ml destilované vody. Obsah zkumavky byl dobře promíchan a měřen na spektrofotometru proti vodnému blanku při 530 nm. Po změření absorbance byly výsledky vyneseny do grafu jako závislost absorbance na koncentraci laktosy. Body kalibrační křivky byly proloženy lineární regresí a její parametry byly použity pro výpočet koncentrace redukujících cukru ve vzorku.

2.4.3.3 Postup stanovení vzorků

Do zkumavky bylo pipetováno 0,5 ml Somogyiho činidla (I. + II. v poměru 4:1) a přidáno 0,5 ml supernatantu. Důkladně promíchaný roztok byl 10 minut zahříván ve vodní lázni a následně ochlazen na laboratorní teplotu. Poté bylo do zkumavky přidáno 0,5 ml Nelsonova roztoku (činidlo III.) a roztok byl doplněn 3,5 ml destilované vody. Obsah zkumavky byl dobře promíchán a měřen na spektrofotometru proti vodnému blanku při 530 nm. Z parametrů lineární regrese byla vypočítána koncentrace redukujících cukrů ve vzorcích.

2.4.4 Stanovení chemické spotřeby kyslíku (CHSK)

Chemická spotřeba kyslíku je definována jako hmotnostní koncentrace kyslíku. Je ekvivalentní hmotnosti oxidačního činidla spotřebovaného na oxidaci oxidovatelných látek obsažených v jednom litru vody. Mezi tyto oxidovatelné látky patří organické sloučeniny obsažené ve vodě. Můžeme tedy říci, že tato metoda patří mezi nespecifické ukazatele vody a výsledek slouží k odhadu organického znečištění. Výsledky jsou většinou udávány v mg.l^{-1} , pouze u velmi znečištěných vod v g.l^{-1} [60].

2.4.4.1 Stanovení CHSK dichromanem draselným

Organické látky jsou oxidovány dichromanem draselným v silně kyselém prostředí kyseliny sírové při dvouhodinovém varu (teplota cca 150 °C). Jako katalyzátor vystupují stříbrné ionty. Při oxidaci se dichromanové ionty redukují na ionty chromité. Metoda se nejčastěji používá pro všechny typy vody [60].

2.4.4.2 Příprava oxidačního a katalyzátorového roztoku

Pro přípravu oxidačního roztoku bylo naváženo 10,2148 g dichromanu didraselného, který byl předem vysušen do konstantní hmotnosti při 105 °C po dobu 1,5 hod. Navážka byla rozpuštěna v 500 ml destilované vody. Za stálého míchání bylo přidáno 167 ml koncentrované kyseliny sírové a 33,33 g síranu rtuťnatého.

Katalyzátorový roztok byl připraven rozpuštěním 10 g síranu stříbrného v koncentrované kyselině sírové o objemu 1 l.

2.4.4.3 Kalibrace CHSK

Ze standardního roztoku hydrogenftalanu draselného (0,851 g hydrogenftalanu draselného bylo rozpuštěno v 1000 ml odměrné baňce) byla připravena série 10-ti ml odměrných baněk roztoků o koncentraci 50 – 800 mg.l⁻¹ CHSK_{Cr}, k ředění byla použita destilovaná voda. Ze zásobního roztoku byl odebrán 1 ml a bylo přidáno 9 ml vody. Z naředěného vzorku bylo pipetováno 2,5 ml do uzavíratelné zkumavky. Ke vzorku bylo přidáno 1,5 ml oxidačního roztoku a 3,5 ml katalyzátorového roztoku. Zkumavky byly uzavřeny, promíchány a zahřívány 2 hodiny při 150 °C. Po dokonalém vychladnutí zkumavek byl obsah zředěn 5 ml destilované vody. Po promíchání byla měřena absorbance při 600 nm proti vodnému blanku. Po změření absorbance byly výsledky vyneseny do grafu jako závislost absorbance na koncentraci laktosy. Body kalibrační křivky byly proloženy lineární regresí a její parametry byly použity pro výpočet koncentrace redukujících cukrů ve vzorku.

2.4.4.4 Postup stanovení vzorků

Ze supernatantu byl odebrán 1 ml a bylo přidáno 9 ml vody. Z tohoto naředěného vzorku bylo pipetováno 2,5 ml do uzavíratelné zkumavky. Ke vzorku bylo přidáno 1,5 ml oxidačního roztoku a 3,5 ml katalyzátorového roztoku. Zkumavky byly uzavřeny, promíchány a zahřívány 2 hodiny při 150 °C. Po dokonalém vychladnutí zkumavek byl obsah zředěn 5 ml destilované vody. Po promíchání byla měřena absorbance při 600 nm proti vodnému blanku. Z parametrů lineární regrese byla vypočítána koncentrace oxidovatelných látek ve vzorcích.

2.5 Kultivace - optimalizace podmínek

Jak rychlost mikrobiálního růstu, tak rychlost tvorby produktů závisí na řadě pracovních podmínek, jako jsou teplota, pH, koncentrace rozpuštěného kyslíku, koncentrace substrátu, iontová síla a redoxní potenciál fermentačního média. Při optimalizaci podmínek se nejčastěji zaměřujeme na první tři podmínky.

Teplota má na fyziologii buněk obrovský vliv. Je-li teplota nižší o 10 °C než je teplota optimální, může být rychlost růstu organismů poloviční. Při teplotě vyšší než je teplota optimální rychlost růstu prudce klesá. Vedle růstu ovlivňuje teplota také tvorbu produktů.

Optimální pH je u každého organismu jiné. Není-li hodnota pH optimální, spotřebovává se energie na udržení buněčné populace a množství spotřebované energie je vyšší. U některých organismů může docházet k adaptaci na různé hodnoty pH, je-li jejich změna malá a pomalá. V průběhu kultivace se pH mění, proto je nedílnou součástí celého fermentačního procesu použití regulačního systému.

Rozpuštěný kyslík je velmi důležitým substrátem pro aerobní organismy. Jelikož jeho rozpustnost ve vodě je velmi nízká, bývá často limitujícím substrátem. Nedostatek kyslíku můžeme zajistit aerací (probubláváním média vzduchem). U kvasinek je kritická koncentrace rozpuštěného kyslíku mnohem vyšší než u bakterií [61].

2.5.1 Kultivace inokulačního média

Do 500 ml Erlenmayerovy baňky bylo připraveno 200 ml média dle Tabulka 5, 6. Inokulační médium bylo zaočkováno 20 ml kultury. Baňky byly umístěny na třepačku a byla zahájena kultivace pro 65 °C a 110 ot.min⁻¹. Kultivace probíhala bez vnějšího zásahu 48 hodin.

2.5.2 Kultivace na termostatované třepačce v Erlenmayerových baňkách

Bílkoviny ze syrovátkového média byly vysráženy 0,5 mol.l⁻¹ kyselinou sírovou (úprava pH na hodnotu asi 4,6) a následným povařením, po dobu 20 minut ve vodní lázni při teplotě asi 105 °C. Po důkladném vysrážení následovala centrifugace při 6000 ot.min⁻¹ po dobu 10 minut.

Při optimalizaci podmínek byly upravovány tyto hodnoty:

1. teplota: 60 °C, 65 °C, 70 °C
2. pH: 5, 6, 7, 8, 9

Při optimalizaci pH bylo médium upravováno 0,1 mol.l⁻¹ hydroxidem sodným (resp. 0,1 mol.l⁻¹ kyselinou sírovou. Kultivace při optimalizaci pH probíhala na třepačce při teplotě 65 °C, 110 ot.min⁻¹, po dobu 48 hodin. Při optimalizaci teploty probíhala kultivace v termostatu, hodnota pH média byla 7.

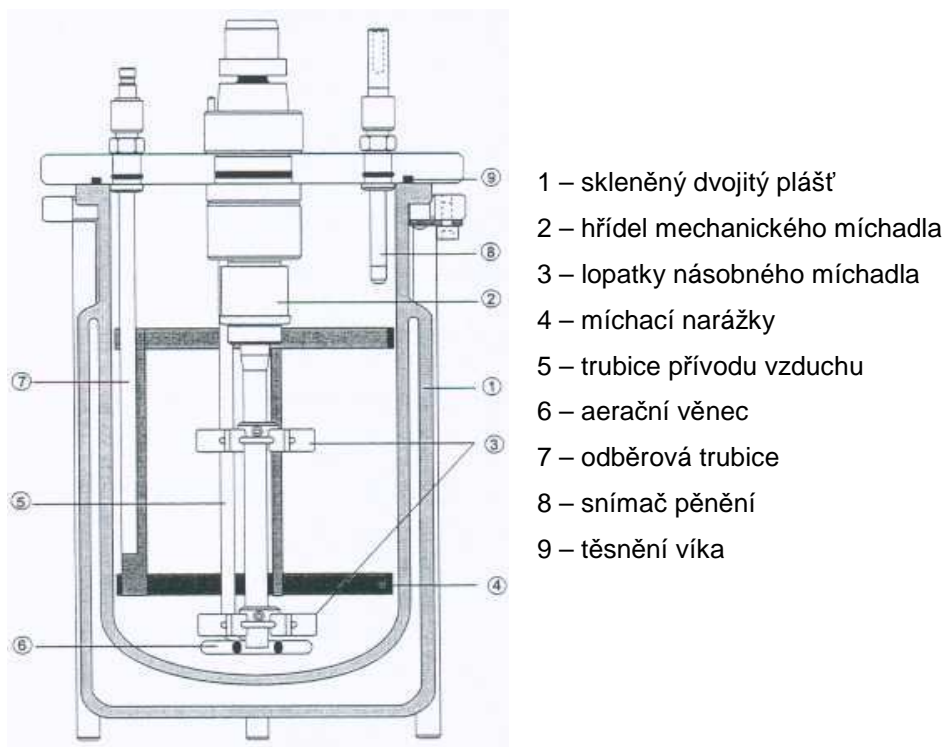
2.5.3 Testování utilizace syrovátky

Míra utilizace syrovátky byla posuzována analytickými metodami stanovujícími koncentraci redukcujících cukrů (laktosy) a chemickou spotřebu kyslíku (CHSK).

2.6 Kultivace - růstové křivky

2.6.1 Bioreaktor (fermentor)

Průmyslový bioreaktor neboli fermentor je uzavřená, kovová nebo skleněná (většinou menší objemy) nádoba tvaru válce postaveného na výšku. Je opatřen zařízením, které umožňuje přivádět výchozí látky a další složky média a odvádět meziprodukty a odpadní látky. Mezi další vybavení patří zařízení umožňující promíchávání a systém potrubí, ventilů, čidel a regulátorů, které slouží k udržování požadované teploty, pH a případně i koncentrace jednotlivých složek. Schéma běžného bioreaktoru je znázorněno na Obr. 27 [62].



Obr. 27 Schématické znázornění bioreaktoru [63]

2.6.1.1 Vsádkový bioreaktor

Toto uspořádání je u fermentorů nejběžnější. Do reaktoru se vloží fermentační médium a inokulum. Po nastavení žádaných podmínek (získaných nejčastěji při optimalizaci) zde roste biomasa a dochází k produkci žádaných metabolitů. Po dosažení žádaných parametrů nebo spotřebování substrátu se proces přeruší, fermentor se vyprázdní a připraví pro novou vsádku.

Mezi výhody tohoto uspořádání patří možnost sterilizace média, redukce nebezpečí kontaminace a mutace, snadná změna reakčních podmínek vsádek, relativně malá spotřeba média a inokula. Hlavní nevýhodou je časová ztráta, neboť fermentor se musí vyprazdňovat, čistit a znovu plnit. Časová ztráta také vzniká v důsledku lag-fáze na počátku každé vsádky.

Ideální by bylo, kdyby vstupy nástřikem byly nulové. Toho ovšem nejde dosáhnout, jelikož jsou do reaktoru během procesu vnášeny další komponenty (např. kyselina, zásada, odpěňovací činidlo,...) a při aerobní kultivaci také aerační plyn (nejčastěji vzduch). Při výpočtech se ale předpokládá, že nástřiky a odtoky jsou nulové [64].

2.6.2 Růstová křivka

Zaočkujeme-li mikrobiální kulturu do nového životního prostředí (nového média), můžeme sledovat množství mikroorganismů v závislosti na čase. Po vynesení těchto hodnot do grafu získáme tzv. růstovou křivku. Ta má obvykle tvar vyobrazený na Obr. 28 a je na ní možné vysledovat několik charakteristických fází. Růstová křivka získána přímým počítáním po stacionární fázi klesá, protože mikroskopicky počítáme pouze živé buňky, a křivka po turbidimetrickém měření se drží na stejné hodnotě, protože tato metoda nerozlišuje živé a mrtvé buňky [46].

Lag-fáze: Nastává adaptace na nové prostředí. Během této fáze se buňky nemnoží, ale může docházet k odumírání starších. Také dochází k tvorbě potřebných enzymů a buňky zvětšují svůj objem. Délka lag-fáze je závislá na složení prostředí, zejména velikost a stáří inokula a na podmínkách, do kterých je mikroorganismus zaočkován.

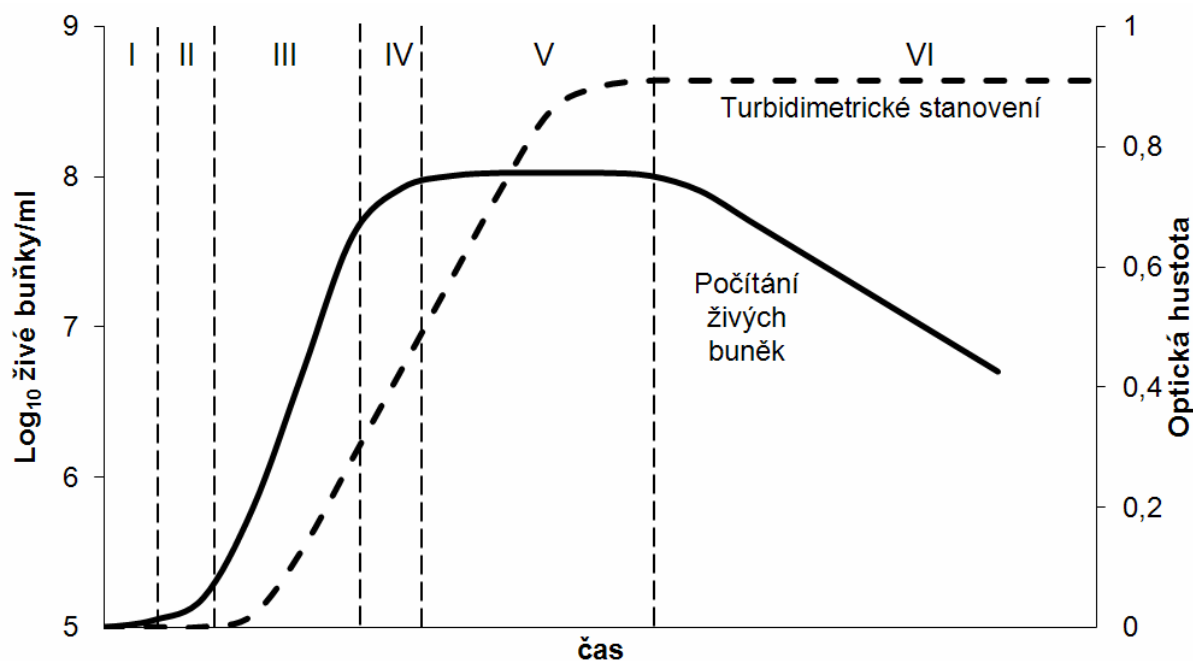
Fáze zrychlujícího se růstu: V této fázi je kultura plně přizpůsobena a buňky se začínají množit s narůstající rychlostí dělení. Zvyšuje se intenzita metabolismu a také nastává vysoká citlivost na nepříznivé vlivy prostředí.

Exponenciální fáze: Při exponenciální fázi nastává intenzivní množení buněk. Jejich počet roste geometrickou řadou. Metabolismus je aktivní a rychle se využívá substrát. Rychlost dělení je konstantní a úbytek buněk odumíráním je minimální.

Fáze zpomalujícího se růstu: Rozmnožování buněk a metabolismus se postupně zastavují. Rychlost dělení se snižuje v důsledku vyčerpání živin a hromadění metabolitů.

Stacionární fáze: V této fázi růstu se vyrovnává počet odumírajících buněk s přírůstkem. Nastává tzv. nedostatek „biologického prostoru“.

Fáze postupného odumírání: Zvyšuje se úbytek buněk (převaha nad přírůstkem) a rychlost dělení klesá pod nulovou hodnotu [65].



I - Lag-fáze, II - Fáze zrychlujícího se růstu, II - Exponenciální fáze, IV - Fáze zpomalujícího se růstu, V - Stacionární fáze, VI - Fáze postupného odumírání

Obr. 28 Fáze růstové křivky [66]

2.6.3 Kultivace inokulačního média

Do 500 ml Erlenmayerovy baňky bylo připraveno 200 ml média dle Tabulka 5, 6. Inokulační médium bylo zaočkováno 20 ml kultury. Baňky byly umístěny na třepačku a byla zahájena kultivace pro 65 °C a 110 ot.min⁻¹. Kultivace probíhala bez vnějšího zásahu 48 hodin.

2.6.4 Kultivace ve fermentoru

Bílkoviny ze syrovátkového média byly vysráženy 0,5 mol.l⁻¹ kyselinou sírovou (úprava pH na hodnotu asi 4,6) a následným povařením po dobu 20 minut ve vodní lázni při teplotě asi 105 °C. Po důkladném vysrážení následovala centrifugace při 6000 ot.min⁻¹ po dobu 10 minut.

Fermentor byl naplněn 1,5 l syrovátkového média. Na řídicí jednotce byly nastaveny hodnoty pH a teplota odpovídající pro optimální růst. Na zaočkování bylo použito 200 ml inokula. Kultivace probíhala do stacionární fáze. Jednotlivé vzorky byly stanoveny turbidimetricky i vážkově.

2.6.4.1 Výpočet bioinženýrských charakteristik

Z hodnot koncentrace biomasy byly vypočítány základní bioinženýrské charakteristiky (měrná růstová rychlost, produktivita a výtěžnostní koeficient).

Pro výpočet měrné růstové rychlosti je linearizován vztah $c = c_0 \cdot e^{\mu \cdot t}$, kde c vyjadřuje koncentrace biomasy v jednotlivých odběrech v exponenciální fázi, c_0 je koncentrace na počátku exponenciální fáze, μ je měrná růstová rychlost a t vyjadřuje čas jednotlivých odběrů v exponenciální fázi. Po linearizaci dostaneme vztah $\ln c = \ln c_0 + (\mu \cdot t)$, do grafu vyneseme funkci $f(t) = \ln c$, body proložíme lineární regresí. Z rovnice regrese zjistíme hodnotu měrné růstové rychlosti, která je vyjádřena jako směrnice přímky [64].

Produktivita byla vypočítána dle vzorce $p = \frac{dc}{t}$, kde dc je rozdíl koncentrací na konci a počátku exponenciální fáze a t je čas, ve kterém nastává konec exponenciální fáze [64].

Výtěžnostní koeficient $Y_{X/S}$ se vztahuje na množství substrátu, což v tomto případě byly redukující cukry. Pro výpočet byl použit vztah $Y_{X/S} = \frac{dc}{ds}$, kde dc je rozdíl koncentrací biomasy na konci a počátku exponenciální fáze a ds je rozdíl koncentrací redukujících cukrů na konci a počátku exponenciální fáze [64].

2.6.5 Testování biodegradace syrovátky

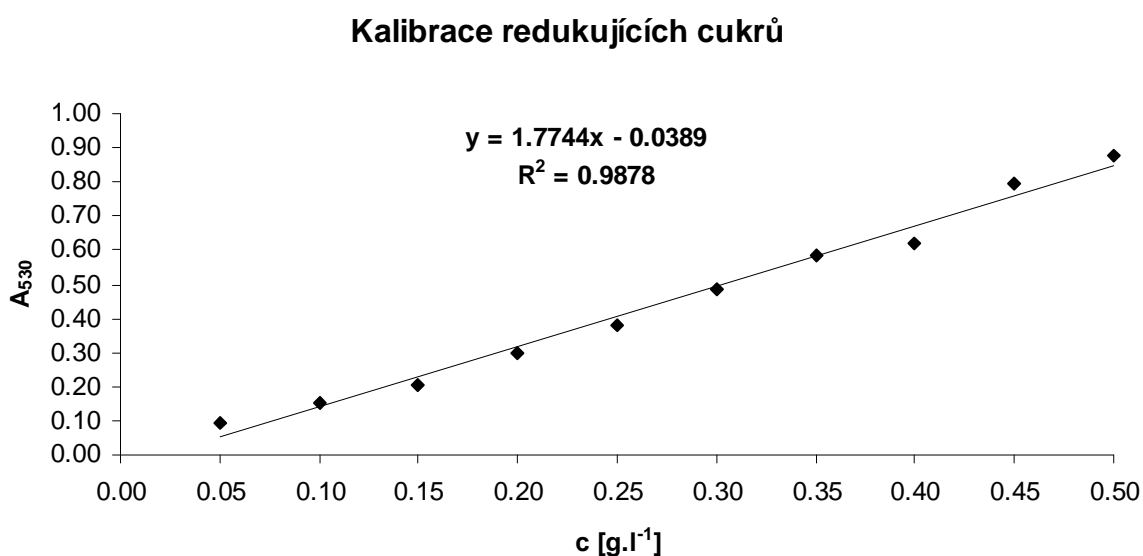
Míra utilizace syrovátky byla posuzována analytickými metodami stanovujícími koncentraci redukujících cukrů (laktosy).

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Kalibrace redukcujících cukrů

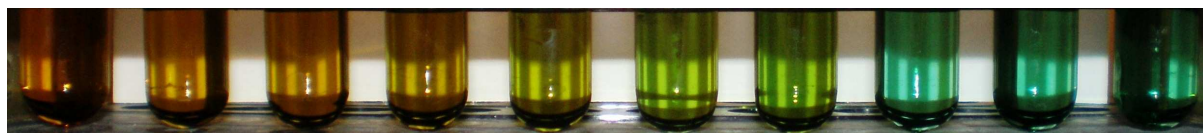
Kalibrační křivka byla sestrojena z hodnot absorbance získaných proměřením kalibračních roztoků. Hodnoty absorbance jsou uvedeny v Tabulka 8 a vyneseny do Graf 1. Z rovnice lineární regrese byly vypočítány koncentrace redukcujících cukrů ve vzorcích.

Graf 1 Závislost absorbance na koncentraci redukcujících cukrů



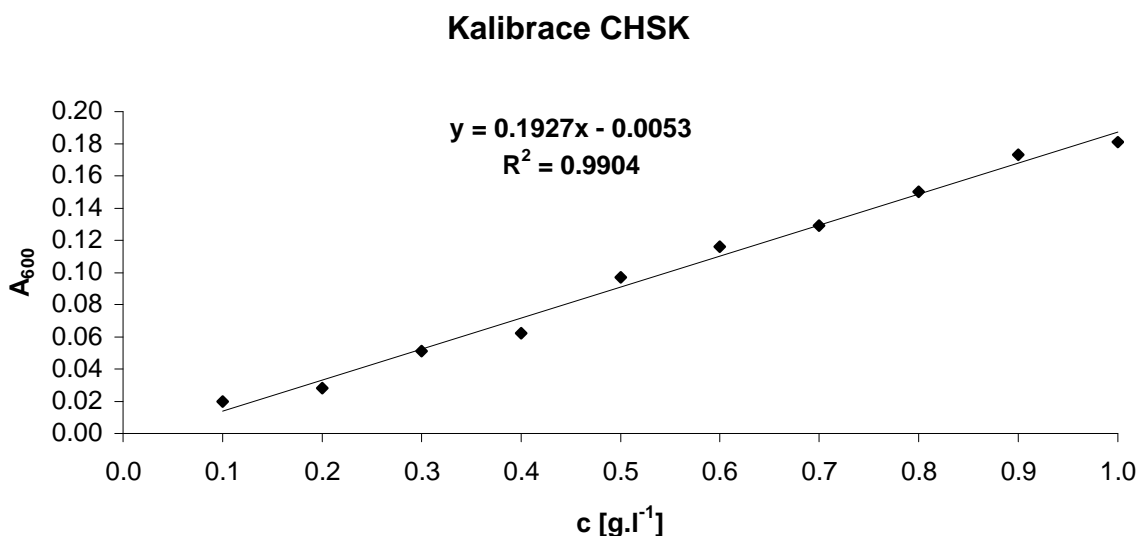
3.2 Kalibrace CHSK

Kalibrační křivka byla sestrojena z hodnot absorbance získaných proměřením kalibračních roztoků. Hodnoty absorbance jsou uvedeny v Tabulce 9 a vyneseny do Graf 1. Z rovnice lineární regrese byly vypočítány koncentrace oxidovatelných látek ve vzorcích.



Obr. 29 Kalibrační roztoky pro stanovení CHSK

Graf 2 Závislost absorpance na koncentraci oxidovatelných látek



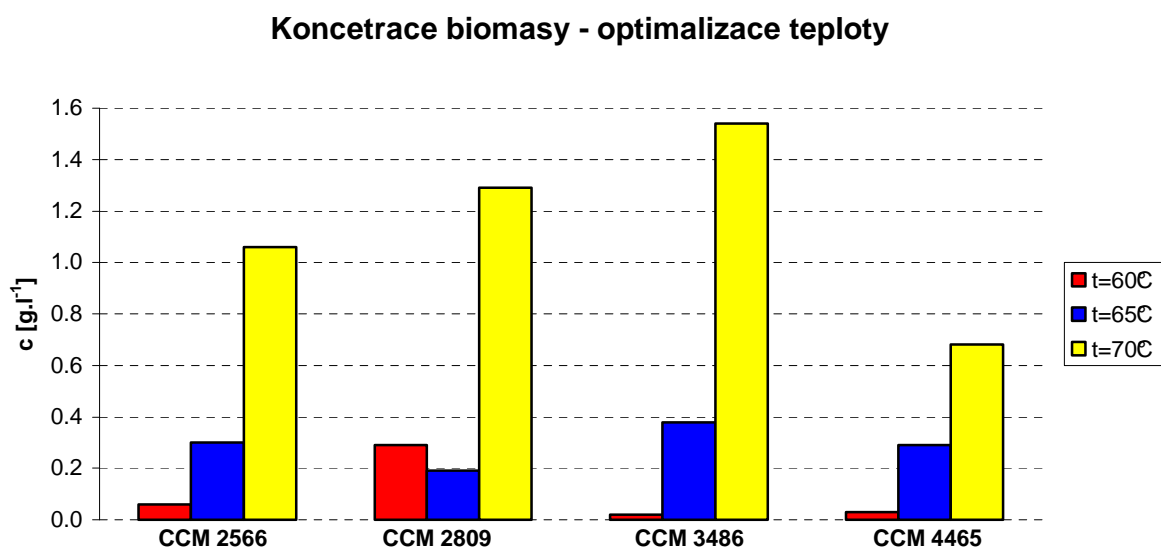
3.3 Optimalizace podmínek

Pro stanovení optimálních podmínek byl zkoumán vliv teploty kultivace (60 °C, 65 °C, 70 °C) a pH kultivačního média (5, 6, 7, 8, 9) na růst mikroorganismů. Při vyhodnocování byl brán ohled na koncentraci biomasy a na CHSK. Koncentrace redukujících cukrů nebyla zohledněna, jelikož v průběhu růstu docházelo ke štěpení laktosy a utilizaci jednodušších sacharidů v syrovátce, což ovlivňuje konečnou koncentraci redukujících cukrů. Růstové křivky byly následně sledovány při stanovených optimálních podmínkách.

3.3.1 Stanovení sušiny biomasy

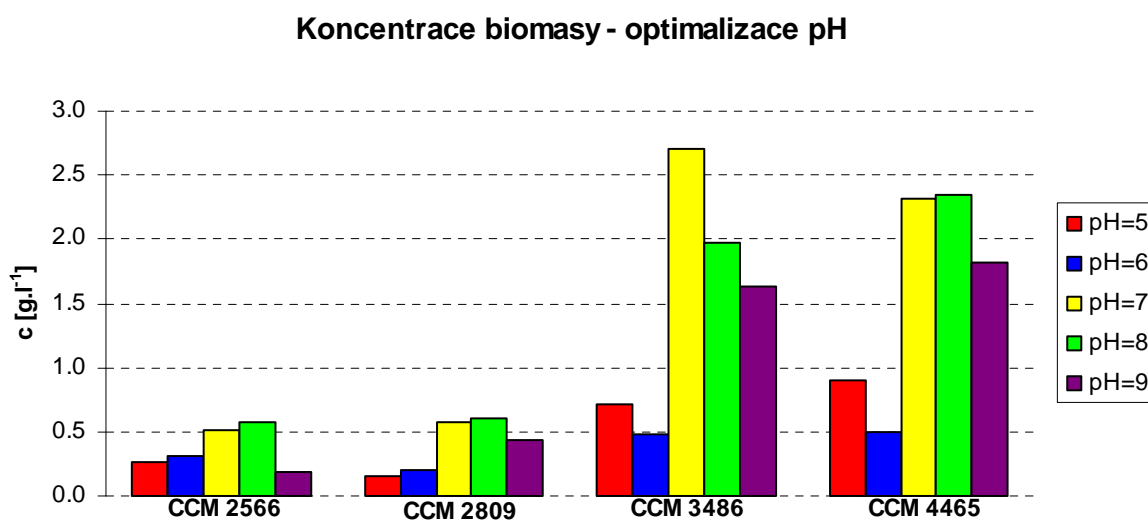
Koncentrace biomasy byla stanovena gravimetrickou metodou. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 10, 11 a vyneseny do Grafu 3, 4.

Graf 3 Srovnání koncentrace biomasy při optimalizaci teploty



Srovnáním koncentrací biomasy při optimalizaci teploty byla zjištěna pro všechny mikroorganismy optimální teplota 70 °C.

Graf 4 Srovnání koncentrace biomasy při optimalizaci pH

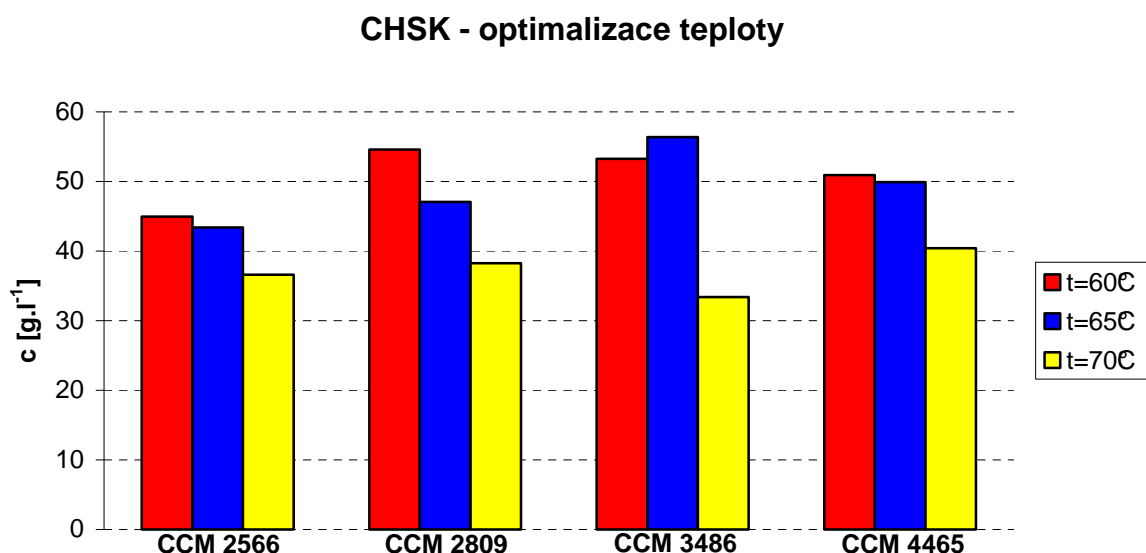


Srovnáním koncentrací biomasy při optimalizaci pH pro oba zástupce rodu *Geobacillus* a *Thermus scotoductus* bylo zjištěno, že hodnoty se při pH 7 a 8 téměř nelišily (rozdíly mohly být způsobeny chybou měření), z tohoto důvodu bylo stanoveno optimální pH na hodnotu 7,5. Optimální hodnota pH pro *Thermus aquaticus* je 7.

3.3.2 Chemická spotřeba kyslíku

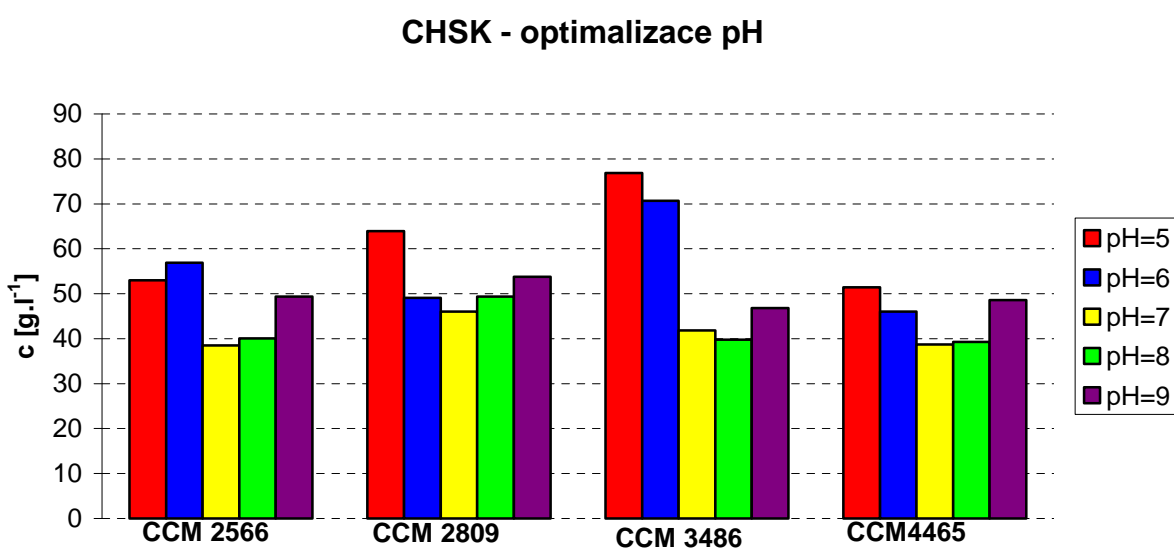
Koncentrace oxidovatelných látek byla stanovena dichromanem draselným. Všechny vzorky bylo nutno ředit 50x. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 12, 13 a vyneseny do Grafu 5, 6.

Graf 5 Srovnání koncentrace oxidovatelných látek při optimalizaci teploty



Srovnáním koncentrací oxidovatelných látek při optimalizaci teploty byla zjištěna pro všechny mikroorganismy optimální teplota 70 °C. Tyto výsledky se shodují s hodnotami získanými při stanovení biomasy.

Graf 6 Srovnání koncentrace oxidovatelných látek při optimalizaci pH



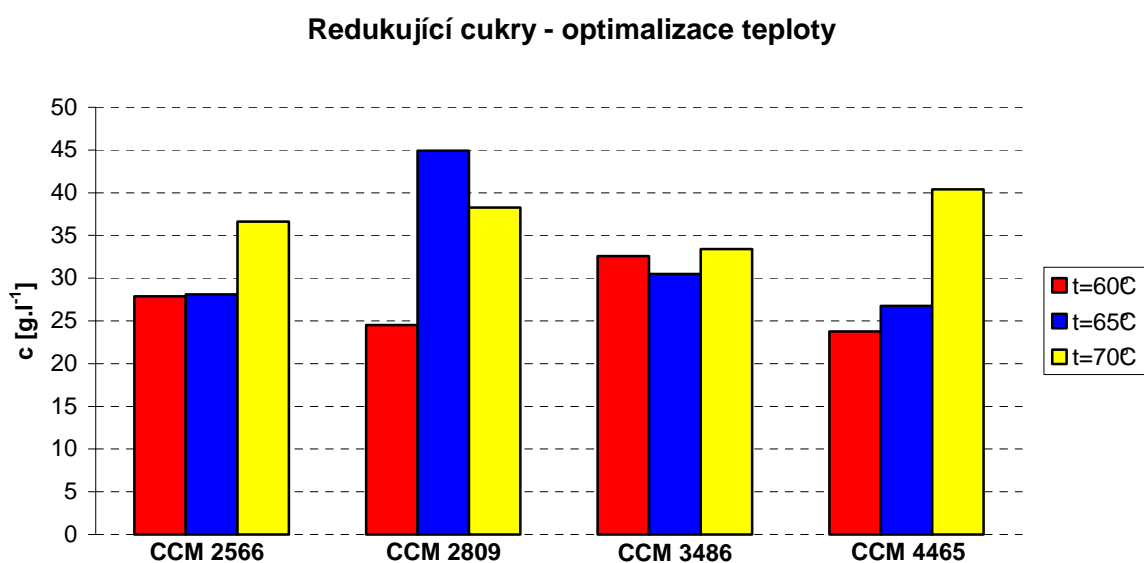
Srovnáním koncentrací oxidovatelných látek při optimalizaci pH bylo zjištěno, že pro *Geobacillus thermodenitrificans* a *Thermus scotoductus* je optimální pH 7, ovšem při pH 8 nabývaly koncentrace podobných hodnot. Pro *Geobacillus thermocatenuatus* nabývala koncentrace podobné hodnoty při pH 6, 7, 8 a *Thermus aquaticus* má optimum při pH 8, ovšem při pH 7 byly hodnoty koncentrace podobné.

3.3.3 Stanovení redukujících cukrů

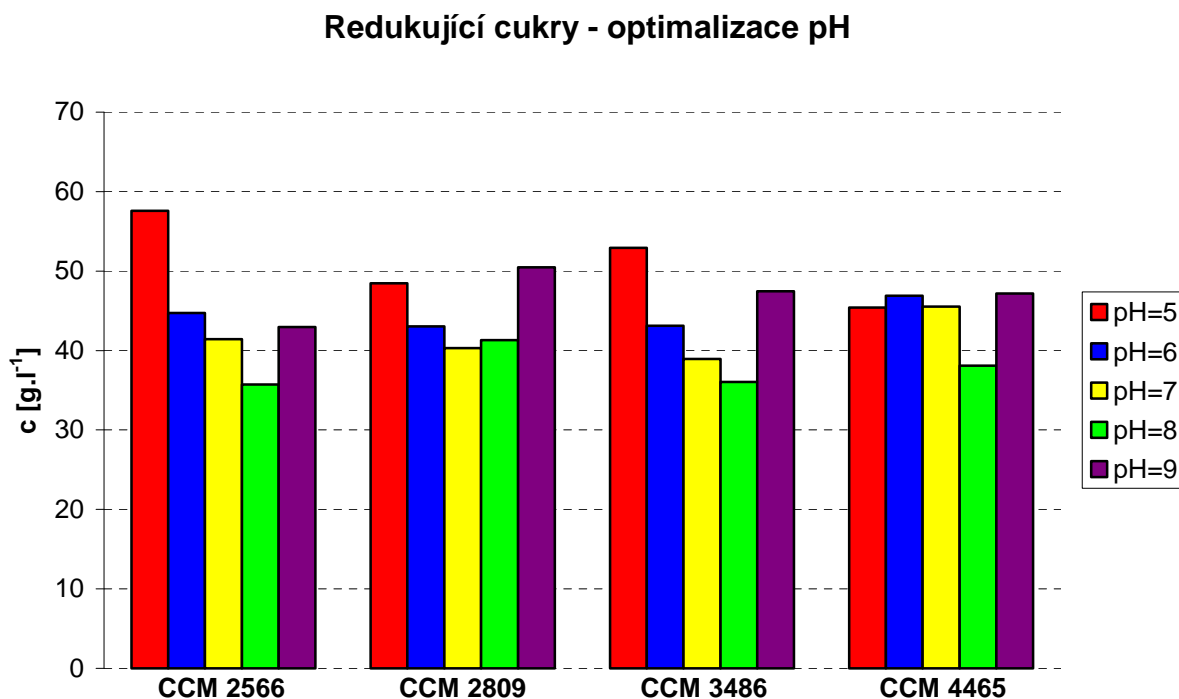
Koncentrace redukujících cukrů byla stanovena metodou podle Somogyiho a Nelsona. Všechny vzorky bylo nutno ředit 100x. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 14, 15 a vyneseny do Graf 7, 8.

Výsledky získané při stanovení redukujících cukrů nebyly brány v potaz při určování optimálních podmínek. Z výsledků koncentrace biomasy a koncentrace oxidovatelných látek bylo zjištěno, že pro oba zástupce rodu *Geobacillus* a pro *Thermus scotoductus* je optimální teplota 70 °C a optimální pH bylo stanoveno na 7,5 z důvodu malých rozdílů ve výsledcích při pH 7 a 8. Optimální teplota pro *Thermus aquaticus* je taktéž 70 °C a optimální hodnota pH byla zohledněna výsledkům koncentrace biomasy na pH = 7.

Graf 7 Srovnání koncentrace redukujících cukrů při optimalizaci teploty



Graf 8 Srovnání koncentrace redukujících cukrů při optimalizaci pH



3.4 Stanovení růstových křivek

Byly studovány podmínky růstu vybraných mikroorganismů v syrovátkovém médiu při stanovených optimálních podmínkách. Růst byl sledován jako závislost hodnoty absorbance měřené při 600 nm (A_{600}) na čase a jako závislost koncentrace biomasy na čase.

3.4.1 Srovnání růstových křivek zástupců rodu *Geobacillus*

Hodnoty absorbance a koncentrace biomasy získané v průběhu kultivace ve fermentoru při 70 °C, pH = 7,5, 150 ot.min⁻¹ a vzdušnění 0,5 l.min⁻¹ jsou uvedeny v Tabulce 16, 17 a vyneseny do Grafu 9, 10.

Z grafu závislosti absorbance na čase a koncentrace biomasy na čase pro *Geobacillus thermodenitrificans* bylo zjištěno, že první exponenciální fáze probíhala od 1. do 13. hodiny kultivace. Následovala stacionární fáze, která trvala 6 hodin. Druhá exponenciální fáze probíhala od 19. do 25. hodiny. Od 26. hodiny se kultura vyskytovala ve stacionární fázi růstu.

Z grafu závislosti absorbance na čase a koncentrace biomasy na čase pro *Geobacillus thermocatenulatus* bylo zjištěno, že první exponenciální fáze probíhala od 1. do 13. hodiny kultivace. Následovala stacionární fáze, která trvala 7 hodin. Druhá exponenciální fáze probíhala od 20. do 25. hodiny. Od 26. hodiny se kultura vyskytovala ve stacionární fázi růstu.

Pro oba mikroorganismy byly spočítány měrné růstové rychlosti (směrnice lineární regrese, viz. Graf 17, 18 v Příloze), produktivity systému a výtěžnostní koeficienty. Pro výpočet byly použity hodnoty koncentrace biomasy:

– *Geobacillus thermodenitrificans*

- 1. exponenciální fáze: $\mu_1 = 0,1039 \text{ h}^{-1}$

$$p_1 = \frac{0,96 - 0,26}{13} = 0,0538 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

$$Y_{X/S} = -\frac{0,96 - 0,26}{55,143 - 69,338} = 0,0438 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$$

- 2. exponenciální fáze: $\mu_2 = 0,0267 \text{ h}^{-1}$

$$p_2 = \frac{1,17 - 1,01}{25} = 0,0064 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

$$Y_{X/S} = -\frac{1,17 - 1,01}{53,369 - 94,180} = 0,0039 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$$

– *Geobacillus thermocatenulatus*

- 1. exponenciální fáze: $\mu_1 = 0,0604 \text{ h}^{-1}$

$$p_1 = \frac{0,63 - 0,29}{13} = 0,0262 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

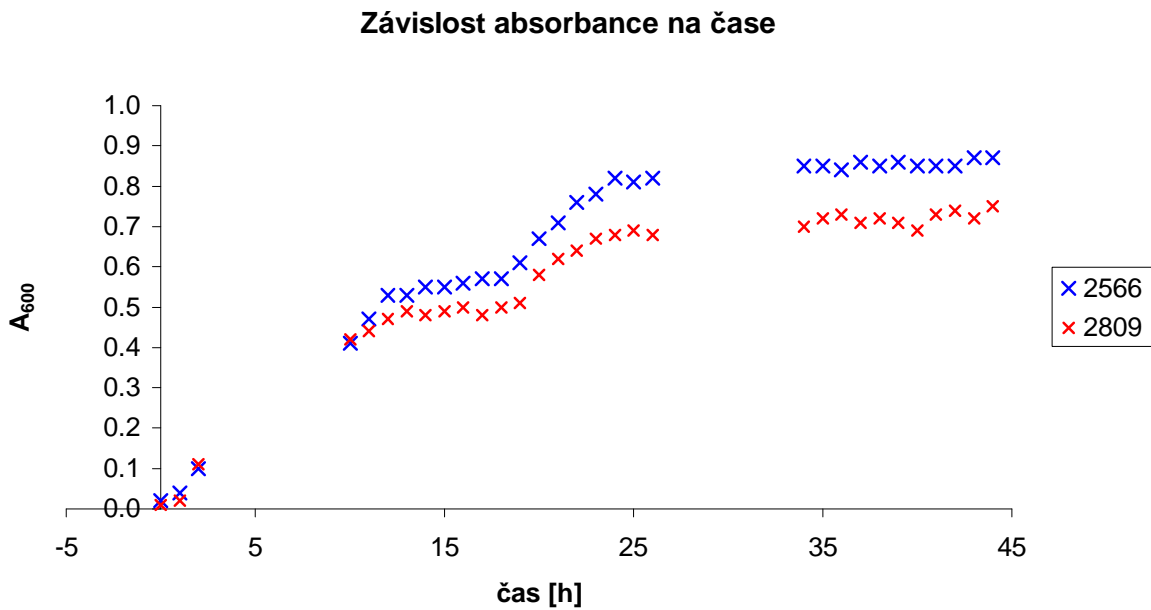
$$Y_{X/S} = -\frac{0,63 - 0,29}{26,753 - 39,174} = 0,0274 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$$

- 2. exponenciální fáze: $\mu_2 = 0,0340 \text{ h}^{-1}$

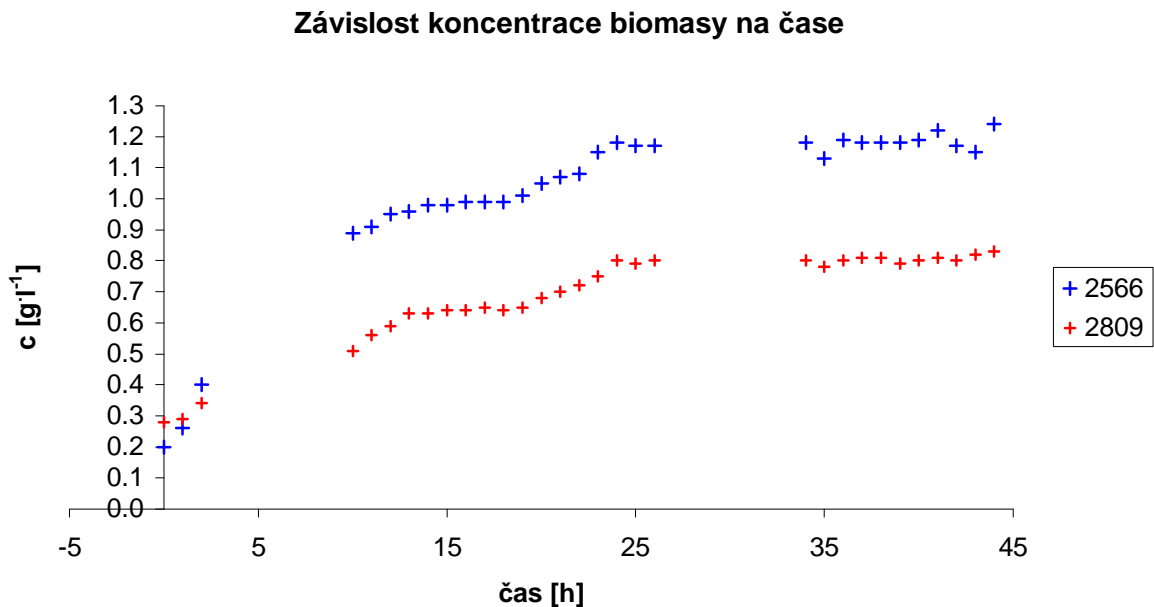
$$p_2 = \frac{0,79 - 0,68}{25} = 0,0044 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

$$Y_{X/S} = -\frac{0,79 - 0,68}{35,625 - 67,564} = 0,0034 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$$

Graf 9 Srovnání růstových křivek zástupců rodu *Geobacillus* jako závislost absorbance na čase



Graf 10 Srovnání růstových křivek zástupců rodu *Geobacillus* jako závislost koncentrace biomasy na čase



Srovnáním růstových křivek mikroorganismů rodu *Geobacillus* bylo zjištěno, že nárůst množství buněk v exponenciální fázi není příliš strmý. U *Geobacillus thermodenitrificans* byly naměřeny vyšší hodnoty absorbance i koncentrace biomasy, z čehož lze vyvodit, že pro tento mikroorganismus je složení kultivačního média vhodnější.

3.4.2 Srovnání růstových křivek zástupců rodu *Thermus*

Podmínky kultivace se u zástupců tohoto rodu lišily v hodnotě pH. Obě kultivace probíhaly při 70 °C, 150 ot.min⁻¹ a vzdušnění 0,5 l.min⁻¹. Hodnota pH u *Thermus aquaticus* byla 7 a u *Thermus scotoductus* byla 7,5.

Hodnoty absorbance a koncentrace biomasy získané v průběhu kultivace ve fermentoru jsou uvedeny v Tabulce 18, 19 a vyneseny do Grafu 11, 12. Od 19. hodiny bylo při stanovení absorbance nutné vzorek 5x ředit (hodnoty absorbance byly přepočítány, aby hodnoty v grafu nepřesáhly 1).

Z grafu závislosti absorbance na čase a koncentrace biomasy na čase pro *Thermus aquaticus* bylo zjištěno, že exponenciální fáze probíhala od 4. do 27. hodiny kultivace. Následovala stacionární fáze růstu od 28. hodiny.

Z grafu závislosti absorbance na čase a koncentrace biomasy na čase pro *Thermus scotoductus* bylo zjištěno, že exponenciální fáze probíhala od 5. do 27. hodiny kultivace. Následovala stacionární fáze růstu od 28. hodiny.

Pro oba mikroorganismy byly spočítány měrné růstové rychlosti (směrnice lineární regrese, viz. Graf 19, 20 v Příloze), produktivity systému a výtěžnostní koeficienty. Pro výpočet byly použity hodnoty koncentrace biomasy:

– *Thermus aquaticus*

○ $\mu = 0,0667 \text{ h}^{-1}$

$$p = \frac{2,35 - 0,45}{27} = 0,0704 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

$$Y_{X/S} = -\frac{2,35 - 0,45}{43,902 - 72,081} = 0,0674 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$$

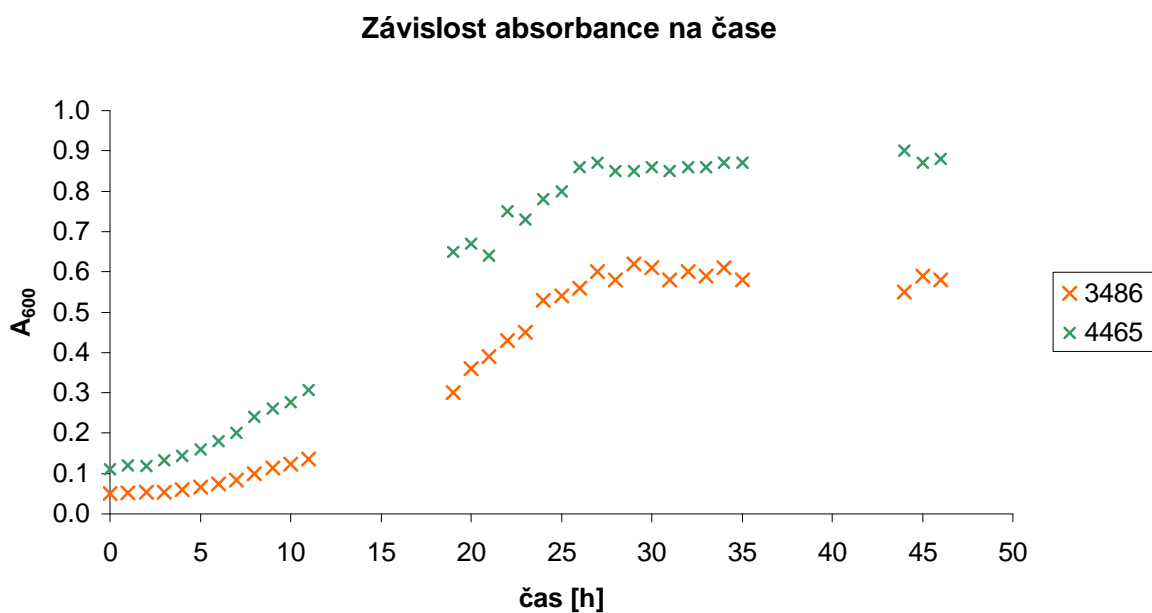
– *Thermus scotoductus*

○ $\mu = 0,0626 \text{ h}^{-1}$

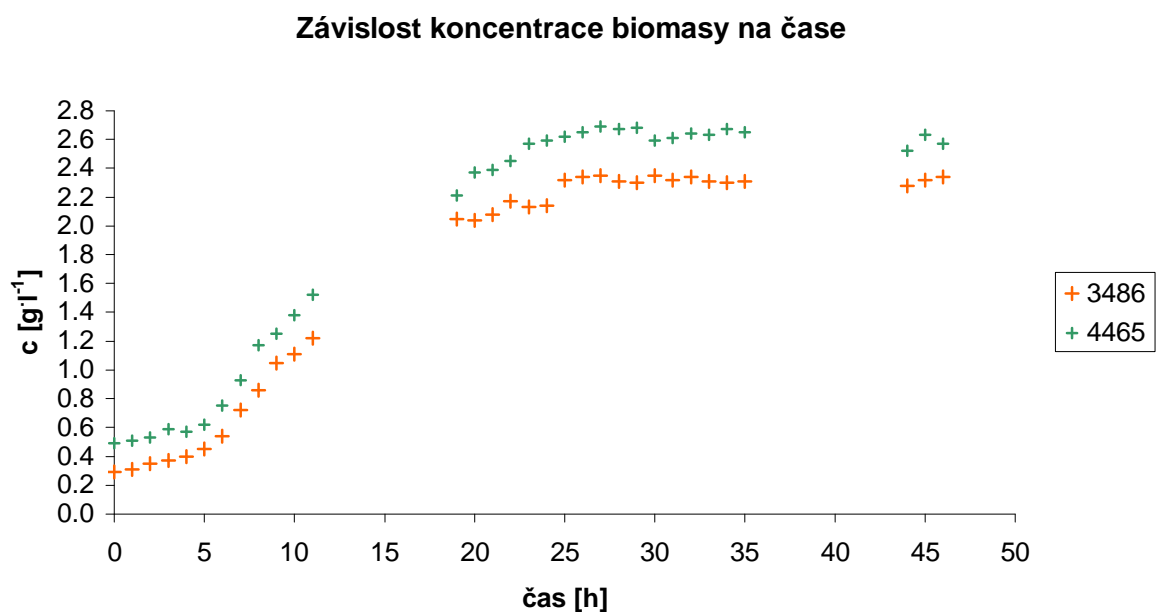
$$p = \frac{2,69 - 0,57}{27} = 0,0785 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

$$Y_{X/S} = -\frac{2,69 - 0,57}{92,369 - 108,149} = 0,1343 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$$

Graf 11 Srovnání růstových křivek zástupců rodu *Thermus* jako závislost absorbance na čase



Graf 12 Srovnání růstových křivek zástupců rodu *Thermus* jako závislost koncentrace biomasy na čase



U *Thermus aquaticus* byly naměřeny vyšší hodnoty absorbance i koncentraci biomasy, z čehož lze vyvodit, že v kulturačním médiu narostlo více buněk tohoto mikroorganismu.

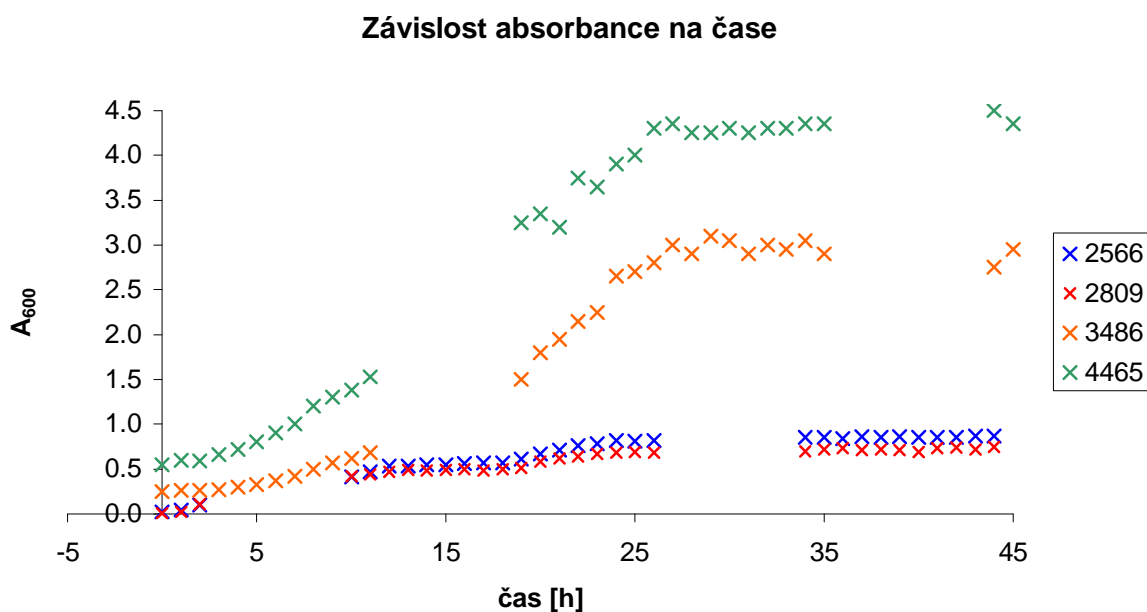
3.4.3 Srovnání růstových křivek rodů *Geobacillus* a *Thermus*

V Grafech 13, 14 je graficky zpracované srovnání růstových křivek jako závislost absorbance na čase a koncentrace biomasy na čase rodů *Geobacillus* a *Thermus*. U rodu *Thermus* nebyly hodnoty absorbance podělené ředěním, aby byl zřejmý rozdíl nárůstu.

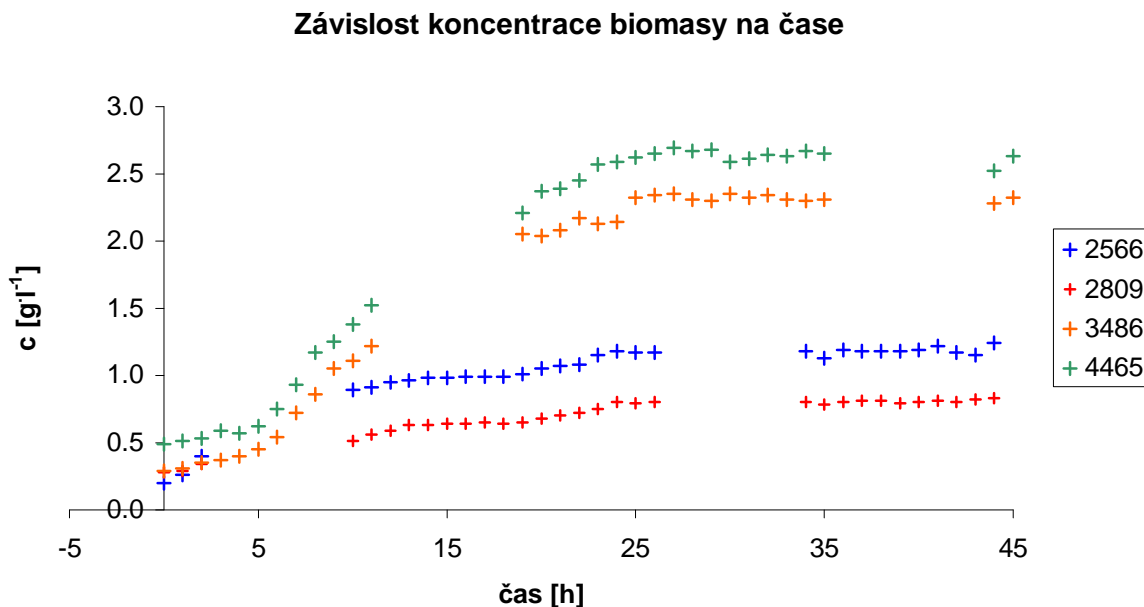
U rodu *Geobacillus* byly pozorovány dvě exponenciální fáze růstu, u rodu *Thermus* byla pozorována pouze jedna. Tento rozdíl může být způsoben odlišným enzymatickým vybavením buněk. Dle mého názoru, obsahují buňky zástupců rodu *Geobacillus* menší množství enzymů schopných štěpit laktosu obsaženou v syrovátce. Z tohoto důvodu nastala první stacionární fáze již ve 14. hodině, ve které mikroorganismy produkovaly sekundární metabolity využitelné pro další růst (2. exponenciální fázi růstu).

Je též zřejmé, že syrovátka je vhodnější kultivační médium pro rod *Thermus*, což dokazují vyšší hodnoty absorbance i koncentrace biomasy.

Graf 13 Srovnání růstových křivek zástupců rodů *Geobacillus* a *Thermus* jako závislost absorbance na čase



Graf 14 Srovnání růstových křivek zástupců rodů *Geobacillus* a *Thermus* jako závislost koncentrace biomasy na čase



3.5 Stanovení utilizace syrovátky v průběhu růstu

V průběhu růstu jednotlivých mikroorganismů byla sledována míra utilizace syrovátky analytickou metodou stanovující koncentraci redukujících cukrů.

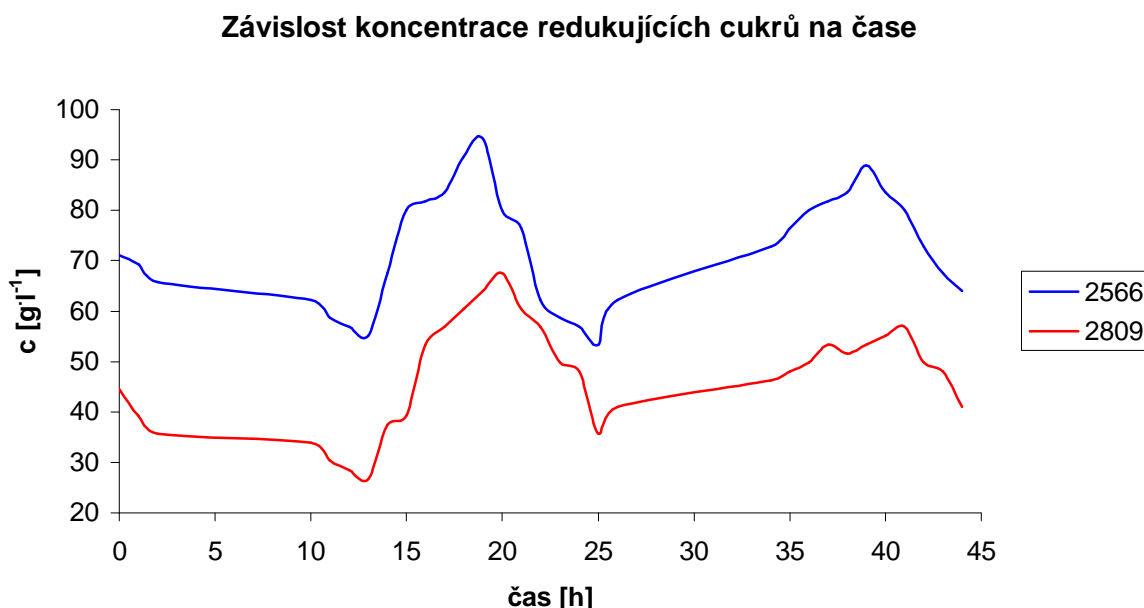
3.5.1 Srovnání utilizace syrovátky v průběhu růstu - rod *Geobacillus*

Hodnoty absorbance a koncentrace redukujících cukrů získané v průběhu kultivace jsou uvedeny v Tabulce 20,21 a vyneseny do Grafu 15. Všechny vzorky bylo nutné 1000x ředit.

Z Grafů 9 a 10 je patrné, že u *Geobacillus thermodenitrificans* probíhala do 13. hodiny první exponenciální fáze růstu. Tato skutečnost je zřejmá také na Grafu 15, při exponenciální fázi dochází k postupnému spotřebovávání jednoduchých sacharidů. Od 14. hodiny do 19. hodiny mikroorganismy přešly do fáze stacionární, ve které štěpily laktosu. Od 19. hodiny opět došlo k nárůstu rychlosti množení mikroorganismů a tím pádem se snižovala koncentrace redukujících cukrů, a to do 25. hodiny. Mírně rostoucí hodnoty koncentrace redukujících cukrů ve druhé stacionární fázi byly zřejmě způsobeny tvorbou sekundárních metabolitů, které mohly být dále využity k růstu. Třetí exponenciální fáze ovšem nenastala a to z důvodu vyčerpání jiných živin v kultivačním médiu.

U *Geobacillus thermothermocatenulatus* je průběh spotřeby a tvorby redukujících cukrů téměř totožný a odpovídá růstovým křivkám na Grafech 9 a 10.

Graf 15 Srovnání redukujících cukrů v průběhu růstu zástupců rodu *Geobacillus* jako závislost koncentrace na čase



3.5.2 Srovnání utilizace syrovátky v průběhu růstu - rod *Thermus*

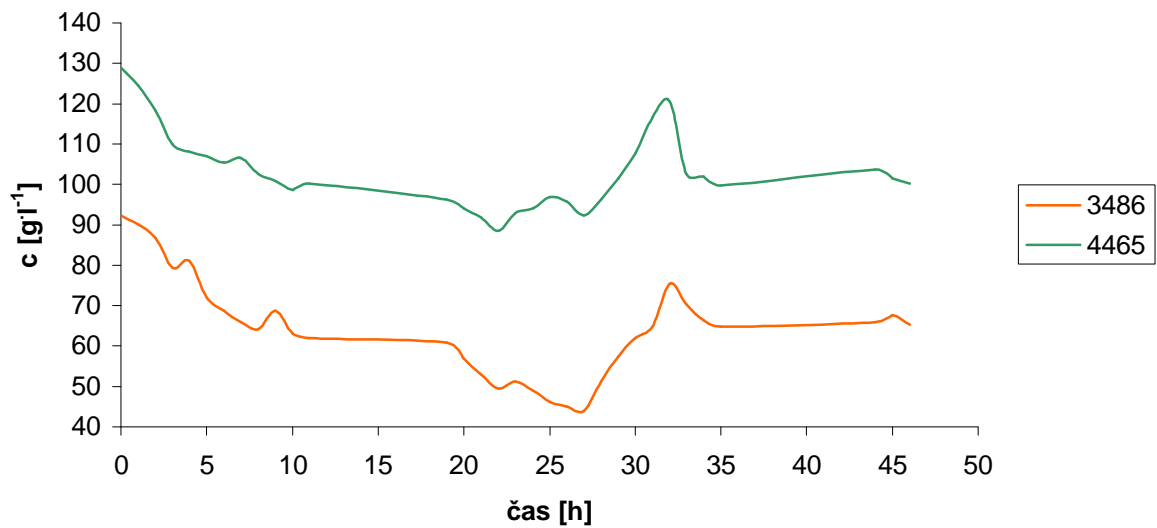
Hodnoty absorbance a koncentrace redukujících cukrů získané v průběhu kultivace jsou uvedeny v Tabulce 22,23 a vyneseny do Grafu 16. Všechny vzorky bylo nutné 1000x ředit.

Z Grafů 11 a 12 je patrné, že u *Thermus aquaticus* probíhala od 5. hodiny do 27. hodiny exponenciální fáze růstu. Tato skutečnost je zřejmá také na Grafu 15, při exponenciální fázi dochází k postupnému spotřebovávání jednoduchých redukujících sacharidů. Od 28. hodiny mikroorganismy přešly do fáze stacionární, ve které zřejmě štěpily laktosu a vznikaly redukující cukry, jejichž koncentrace rostla až do 32. hodiny. Následující pokles jejich koncentrace je způsoben využíváním cukrů k zajištění viability buněk. I když v kultivačním médiu byl jistě dostatečný obsah využitelných sacharidů, k dalšímu růstu nedošlo, a to z důvodu vyčerpání jiných živin v substrátu.

U *Thermus scotoductus* je průběh spotřeby a tvorby redukujících cukrů téměř totožný a odpovídá růstovým křivkám na Grafech 11 a 12.

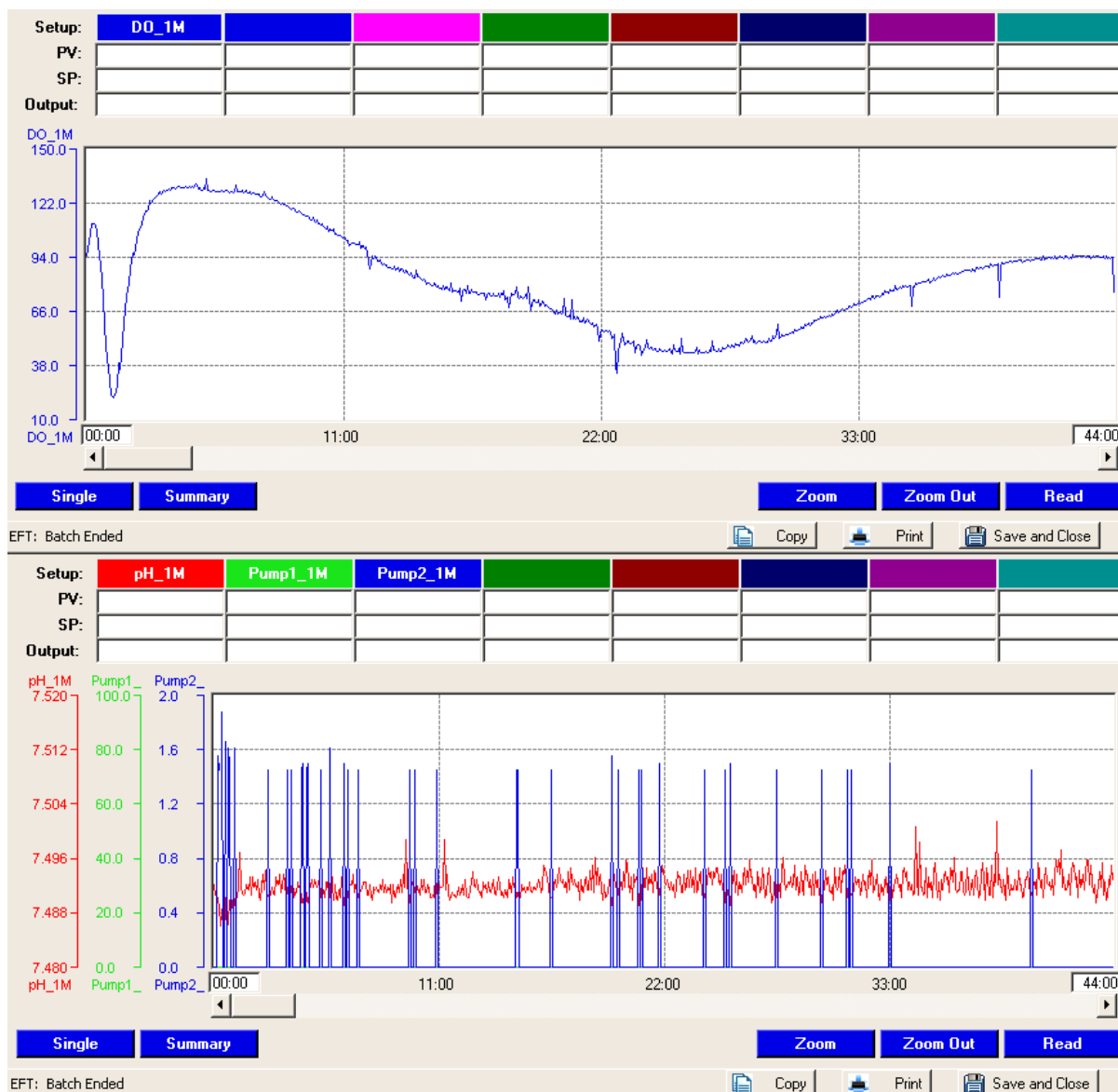
Graf 16 Srovnání redukujících cukrů v průběhu růstu zástupců rodu *Thermus* jako závislost koncentrace na čase

Závislost koncentrace redukujících cukrů na čase



3.6 Bioinženýrské charakteristiky získané z BioCommand

Software BioCommand dodáván k fermentoru BioFlo®/CelliGen™ 115 zaznamenává data v průběhu kultivace a ihned je zakresluje do grafů dle zadaných parametrů. Na Obr. 30 je možno vidět vzorové grafy průběhu změny koncentrace kyslíku, změny pH a množství přidávaných roztoků upravujících pH.



Obr. 30 Vzorové grafy vykreslené programem BioCommand

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo sledovat utilizaci syrovátky zkoumáním tvorby a spotřeby redukujících cukrů termofilními bakteriemi rodu *Geobacillus* a *Thermus*. Utilizace syrovátky v průběhu studia růstových křivek byla popsána koncentrací redukujících cukrů. Ke stanovení sloužil supernatant získaný centrifugací odběrů při gravimetrické analýze koncentrace biomasy. Všechny zkoumané mikroorganismy mají enzymatické vybavení schopné štěpit laktosu na jednodušší monosacharidy (D-galaktosa a D-glukosa). Na počátku růstu mikroorganismy spotřebovávají ze substrátu lépe využitelné zdroje energie a uhlíku a dochází taktéž k enzymatickému štěpení laktosy a následnému využití štěpných produktů. Stacionární fáze se vyznačuje opětovným štěpením zbytkového množství laktosy k zabezpečení fyziologických pochodů buněk, ovšem limitace jinými živinami v substrátu zabraňuje dalšímu růstu mikroorganismů.

Před studiem růstových křivek byly optimalizovány podmínky růstu jednotlivých mikroorganismů (teplota, pH). Optimalizace byla vyhodnocena z hlediska koncentrace biomasy a CHSK. Koncentrace redukujících cukrů nebyla při vyhodnocování optimalizace zohledněna.

Optimální teplota růstu všech mikrobiálních kultur byla stanovena na hodnotu 70 °C. Optimální pH pro *Geobacillus thermodenitrificans*, *Geobacillus thermocatenulatus* a *Thermus scotoductus* bylo stanoveno na hodnotu 7,5 a pro *Thermus aquaticus* byla určena hodnota 7. Tyto hodnoty byly nastaveny na řídicí jednotce bioreaktoru před každou kultivací a byl studován růst jednotlivých bakterií.

U obou zástupců rodu *Geobacillus* se v průběhu růstu vyskytly dvě exponenciální fáze. Mezi nimi nastala stacionární fáze, v průběhu které byla laktosa štěpena na jednodušší redukující sacharidy využitelné pro růst ve druhé exponenciální fázi. Grafy znázorňující průběh spotřeby a tvorby redukujících cukrů odpovídají růstovým křivkám.

U *Geobacillus thermodenitrificans* nastaly exponenciální fáze růstu v rozmezí od 1. do 13. hodiny a od 19. do 25. hodiny kultivace. U obou exponenciálních fází byly spočteny základní bioinženýrské charakteristiky: měrná růstová rychlost $\mu_1 = 0,1039 \text{ h}^{-1}$ a $\mu_2 = 0,0267 \text{ h}^{-1}$, produktivita $p_1 = 0,0538 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ a $p_2 = 0,0064 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, výtěžnostní koeficient $Y_{1(X/S)} = 0,0438 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ a $Y_{2(X/S)} = 0,0039 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$.

Pro *Geobacillus thermocatenulatus* bylo zjištěno, že první exponenciální fáze probíhala od 1. do 13. hodiny kultivace a druhá exponenciální fáze probíhala od 20. do 25. hodiny. Bioinženýrské charakteristiky zde nabývají hodnot: měrná růstová rychlost $\mu_1 = 0,0604 \text{ h}^{-1}$ a $\mu_2 = 0,0340 \text{ h}^{-1}$, produktivita $p_1 = 0,0262 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ a $p_2 = 0,0044 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, výtěžnostní koeficient $Y_{1(X/S)} = 0,0274 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ a $Y_{2(X/S)} = 0,0034 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$.

Srovnáním růstových křivek a porovnáním vypočtených hodnot charakteristik u mikroorganismů rodu *Geobacillus* bylo zjištěno, že nárůst množství buněk v exponenciální fázi není příliš strmý. U *Geobacillus thermodenitrificans* byly naměřeny vyšší hodnoty absorbance i koncentrace biomasy, z čehož lze vyvodit, že pro tento mikroorganismus je složení kultivačního média vhodnější. Tento fakt potvrzují i hodnoty bioinženýrských charakteristik.

U obou zástupců rodu *Thermus* se v průběhu růstu vyskytla pouze jedna exponenciální fáze. Grafy znázorňující průběh spotřeby a tvorby redukujících cukrů odpovídají růstovým křivkám.

U *Thermus aquaticus* nastala exponenciální fáze růstu v rozmezí od 4. do 27. hodiny kultivace. Byly spočteny základní bioinženýrské charakteristiky: měrná růstová rychlost $\mu = 0,0667 \text{ h}^{-1}$, produktivita $p = 0,0704 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, výtěžnostní koeficient $Y_{X/S} = 0,0674 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$.

Pro *Thermus scotoductus* bylo zjištěno, exponenciální fáze probíhala od 5. do 27. hodiny kultivace. Vypočtené bioinženýrské charakteristiky nabývají u tohoto mikroorganismu hodnot: měrná růstová rychlost $\mu = 0,0626 \text{ h}^{-1}$, produktivita $p = 0,0785 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, výtěžnostní koeficient $Y_{X/S} = 0,1343 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$.

U *Thermus scotoductus* byly naměřeny vyšší hodnoty absorbance i koncentraci biomasy, z čehož lze vyvodit, že v kultivačním médiu narostlo více buněk tohoto mikroorganismu.

Mikrobiální růst je ovlivněn řadou faktorů. Vedle teploty růstu a pH kultivačního média se jedná o inhibici substrátem, kyslíkovou limitaci a v neposlední řadě je růst závislý na složení kultivačního média. Dostupnost živin ze syrovátky závisí na původním složení mléka, charakteru srážení mléka, teplotě pasterace, stupni zředění syrovátky vodou a stupni fermentace laktosy. Jelikož výroba každého mléčného produktu vyžaduje různé technologické procesy, tak i vznikající odpadní syrovátka má odlišné složení a fyzikálně-chemické vlastnosti.

LITERATURA

- [1] 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.
- [2] VACOVÁ, T. *Mléko a mlíčne přípravky vo výžive*. Bratislava : Alfa, 1986. 215 s.
- [3] BALCAR, J. *Výroba sušených a zahuštěných mléčných výrobků*. Praha : SNTL, 1978. 326 s.
- [4] *Kaseinové micely*. Dostupné z WWW:
<http://biomikro.vscht.cz/groups/lab255/html/mleko_cz.html>
- [5] LAPARA, T. M.; ALLEMAN, J. E. . Thermophilic aerobic biological wastewater treatment. *Water Research* [online]. 1999, 4, [cit. 2010-05-02]. Dostupný z WWW:
<<http://www.sciencedirect.com>>.
- [6] KADLEC, P. *Technologie potravin II*. Praha : VŠCHT, 2002. 236 s. ISBN 80-7080-510-2.
- [7] DRDÁK, M., et al. *Základy potravinářských technologií*. Bratislava : Malé Centrum, 1996. 512 s. ISBN 80-967064-1-1.
- [8] SUKOVÁ, I. *Syrovátka v potravinářství*. Praha : Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2006. 36 s. ISBN 80-7271-173-3.
- [9] ČEPIČKA , J. a kol. *Obecná potravinářská technologie*. 1. vyd. Praha : VŠCHT, 1995. 246 s. ISBN 80-7080-239-1.
- [10] HOZA, I.; KRAMÁŘOVÁ, D. *Potravinářská biochemie I*. Zlín : Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2005. 168 s. ISBN 80-7318-295-5.
- [11] ROGINSKI, Hubert. *Encyklopedia of Dairy Science*. London : Academic Press, 2003. ISBN 0-12-227235-8.
- [12] WALZEM, R. L. Health enhancing properties of whey proteins and whey fractions. In *Manuals, Guides & Monographs*. Arlington : U.S. Dairy Export Council, 1999 [cit. 2010-05-02]. Dostupné z WWW:
<http://www.usdec.org/files/PDFs/2008Monographs/ProteinsFractions_English.pdf>.
- [13] Kasein. *A-Z slovník pro spotřebitele* [online]. [cit. 2010-05-02]. Dostupný z WWW:
<<http://www.agronavigator.cz/az/vis.aspx?id=92329>>.
- [14] MEISEL, H. Biochemical Properties of Regulatory Peptides Derived from Milk Proteins. *Biopolymers* [online]. 1997, vol. 43, [cit. 2010-05-02]. Dostupný z WWW:
<<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/40270/PDFSTART>>.

- [15] *Laktosa* [online]. Dostupný z WWW:
<<http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc471/pages/Lecture4/LACTOSE.GIF>>
- [16] *www.lactose.com : Lactose: some basic properties and characteristics* [online]. 2009 [cit. 2010-05-02]. Dostupné z WWW: <<http://www.lactose.com/basic/basic.html>>.
- [17] *Market developments industry challenges for lactose derivatives* [online]. 2007 [cit. 2010-05-02]. Dostupné z WWW:
<http://www.agronavigator.cz/UserFiles/File/agronavigator/Kvasnickova_2/1all.pdf>
- [18] *Rozdíl ve struktuře α - a β -izomeru glukosy*. Dostupné z WWW:
<<http://www.answers.com/topic/carbohydrate>>
- [19] VESELÁ, P. Syrovátka = Hodnotná surovina. In *Mléko a sýry 2003*. Praha, 2003 [cit. 2010-05-02]. Dostupné z WWW:
<<http://www.vscht.cz/tmt/prehličky/2003/souhrny2003.pdf>>.
- [20] SUKOVÁ, I. *Agronavigátor : Využití syrovátky a podmáslí* [online]. 2006 [cit. 2010-05-02]. Dostupné z WWW:
<<http://www.agronavigator.cz/default.asp?ids=154&ch=13&typ=1&val=44503>>.
- [21] ROGINSKI, Hubert. *Encyklopédia of Dairy Science*. London : Academic Press, 2003. ISBN 0-12-227235-8.
- [22] ČEPIČKA , J. a kol. *Obecná potravinářská technologie*. 1. vyd. Praha : VŠCHT, 1995. 246 s. ISBN 80-7080-239-1.
- [23] ZADOW, J. G. . *Whey and Lactose Processing*. Elsevier Applied Science, 1992. 600 s.
- [24] HOFFMAN, P. *Návod na postup měření, vyhodnocení výsledků a návrh sušáren*. In *Experimentální práce - EXP Úloha: Rozprašovací sušárna*. Praha : ČVUT, 2000 [cit. 2010-05-02]. Dostupné z WWW:
<<http://www.fsid.cvut.cz/cz/U218/peoples/hoffman/PREDMETY/EXP+suseni/exp.htm>>.
- [25] *Zobrazení závislosti velikosti pórů membrány na velikosti prošlých částic*. Dostupné z WWW:<<http://www.puresystem.cz/technologie-upravy-vody/fyzikalni/ultrafiltrace.htm>>
- [26] ZIMÁK, E. *Technologie pro 3. ročník SPŠ mlékárenské, obor zpracování mléka*. Praha : SNTL, 1982. 184 s.
- [27] *Schématické znázornění separačního procesu elektrodialýzy*. Dostupné z WWW:
<<http://www.mega.cz/elektrodialyza.html>>
- [28] *Průběh mléčného kvašení*. Dostupné z WWW:
<<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lecturesf04am/lect12.htm>>

- [29] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. oprav. a dopl. vyd. Praha : Academia, 2002. 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [30] *Glykolýza*. Dostupné z WWW: <<http://www.viviente.cz/images/clanky/glykolyza-sacharidy.jpg>>
- [31] *Citrátový cyklus*. Dostupné z WWW: <http://orion.chemi.muni.cz/zakladni_pojmy_z_biochemie/page0044.htm>
- [32] CHU, A., et al. A biochemical model describing volatile fatty acid metabolism in thermophilic aerobic digestion of wastewater sludge. *Water Reseach* [online]. 1996, vol. 30, [cit. 2010-05-02]. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [33] *Bacillus Genetic Stock Center* [online]. 2001 [cit. 2010-05-02]. The Genus *Geobacillus*. Dostupné z WWW: <<http://www.bgsc.org/Catalogs/Catpart3.pdf>>.
- [34] NAZINA, T.N., et al. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2001, vol. 51, [cit. 2010-05-04]. Dostupný z WWW: <<http://ijs.sgmjournals.org/cgi/reprint/51/2/433>>.
- [35] *Geobacillus* [online]. 2002 - 2010 [cit. 2010-05-02]. Dostupné z WWW: <<http://www.uniprot.org/taxonomy/129337>>.
- [36] *Fylogenetický strom rodu *Geobacillus**. Dostupné z WWW: <<http://www.biomedcentral.com/content/figures/1471-2180-7-77-2-l.jpg>>
- [37] BROCK, T. D. . *Thermophilic microorganisms and life at high temperatures*. New York : Springer-Verlag, 1978. 465 s.
- [38] BALKWILL, D. L. et al. Identification of iron-reducing *Thermus* strains as *Thermus scotoductus*. *Extremophiles* [online]. 2004, 8, [cit. 2010-02-16]. Dostupný z: <<http://www.springerlink.com>>.
- [39] *Mikroskopický obraz buněk *Thermus aquaticus**. Dostupné z WWW: <<http://www.mbio.ncsu.edu/MB451/lecture/ChamyPlanctoDeino/lecture.html>>

- [40] SKIRNISDOTTIR, S., et al. Isolation and characterization of a mixotrophic sulfur-oxidizing *Thermus scotoductus*. *Extremophiles* [online]. 2001, vol. 51, [cit. 2010-05-04]. Dostupný z WWW: <<http://www.springerlink.com/content/dncx7c08drc6q5ac/fulltext.pdf>>.
- [41] AHLUWALIA S. S; GOYAL, D. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresource Technology*. [online]. 2007, 98, [cit. 2010-02-16]. Dostupný z: <<http://www.sciencedirect.com>>.
- [42] *Mikroskopický obraz buňky Clostridium botulinum*. Dostupné z WWW: <http://www.madrimasd.org/blogs/salud_publica/wp-content/blogs.dir/97/files/819/o_clostridium_botulinumG.jpg>
- [43] *Růst aktinomycet na agaru*. Dostupné z WWW: <<http://www.studentsguide.in/microbiology/mollicutes-lforms-rickettsias-chlamydias/actinomycetes-filamentous-bacteria.html>>
- [44] MAHESWARI, R.; BHARADWAJ, G.; MAHALINGESHWARA, K. Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes. *Microbiology and molecular biology reviews* [online]. 2000, vol. 64, [cit. 2010-05-04]. Dostupný z WWW: <<http://mibr.asm.org/cgi/reprint/64/3/461.pdf>>.
- [45] *Mikroskopický obraz buňky Thermomyces lanuginosus*. Dostupné z WWW: <http://philjournalsci.dost.gov.ph/images/T_lanuginosus.jpg>
- [46] Přednášky z mikrobiologie pro studenty FŽP UJEP. Dostupné z WWW: <<http://fzp.ujep.cz/~trog/>>
- [47] *Struktura nasyceného a nenasyceného fosfolipidu*. Dostupné z WWW: <<http://telstar.ote.cmu.edu/biology/downloads/membranes>>
- [48] KUHN, D. J.; ZEGER, E. L.; ORLOWSKI, R. Z. Proteasome inhibitors and modulators of heat shock protein function . *Update on Cancer Therapeutics* [online]. 2006, vol 1, [cit. 2010-05-04]. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [49] JAENICKE, R., et al. Life at Low Temperatures : Protein structure and function at low temperatures. *The Royal Society* [online]. 1990, vol. 326, [cit. 2010-05-04]. Dostupný z WWW: <<http://www.jstor.org/pss/2398703>>.
- [50] *Strukturní vzorce esenciálních hydrofóbních aminokyselin*. Dostupné z WWW: <<http://www.bioinformaticaindeklas.nl/en/images/aminoacids.png>>
- [51] VOLKIN, D. B. ; KLIBANOV, A. M. . Thermal Destruction Processes in Proteins Involving Cystine Residues. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. 1987, vol. 262, [cit. 2010-05-04]. Dostupný z WWW: <<http://www.jbc.org/content/262/7/2945.full.pdf+html>>.

- [52] BEEBY, M. , et al. The genomics of disulfide bonding and protein stabilization in thermophiles. *PLoS Biology* [online]. 2005 Sept., vol 3, [cit. 2010-05-04]. Dostupný z WWW: <<http://www.plosbiology.org>>.
- [53] VIELLE, C.; ZEIKUS, G. J. Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability . *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 2001, vol. 65, no. 1, [cit. 2010-05-04]. Dostupný z WWW: <<http://mibr.highwire.org/>>.
- [54] *Vznik disulfidické vazby v oxidovaném stavu.* Dostupné z WWW: <<http://photos1.blogger.com/blogger/3994/1373/1600/oxidation-.jpg>>
- [55] PRÍBELA, A. *Analýza potravín.* 2. vyd. Bratislava : STU, 1991. 394 s. ISBN 80-227-0398-2.
- [56] *Schematické znázornění turbidimetrie a nefelometrie.* Dostupné z WWW: <<http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/hypertext/200620/hypertext/BOJVABV.htm>>
- [57] ŠTERN, P. Současné možnosti turbidimetrie a nefelometrie. *Klinická biochemie a metabolismus* [online]. 2006, roč. 14, no. 3 [cit. 2009-03-05], s. 146-151. Dostupný z WWW: <<http://nts.prolekare.cz/cls/odkazy/kbm0603-146.pdf>>
- [58] *Montreal-Biotech-CO 8000 Biowave Personal Cell Density Meter* [online]. c1993-2009 [cit. 2009-03-15]. Dostupný z WWW: <<http://www.montreal-biotech.com/Products/?link=CO+8000+Biowave+Personal+Cell+Density+Meter>>.
- [59] Přednáška z Fyziologie výživy pro studenty MUNI. Dostupné z WWW: <is.muni.cz/do/1499/el/estud/fsps/js06/t031/Sacharidy.ppt>
- [60] Stanovení chemické spotřeby kyslíku (CHSK). Dostupné z WWW: <http://uiozp.ft.utb.cz/uiozp/studmat/200892283432/Uloha_2_CHSK_Kubel.pdf>
- [61] HARTMAN, M.; BERAN, Z. *Základy biochemického inženýrství.* Praha - Suchdol : Ústav chemických procesů AV ČR, 1996. 211 s.
- [62] VODRÁŽKA, Z. *Biotechnologie.* 1. vyd. Praha : Academia, 1992. 209 s. ISBN 80-200-0293-6.
- [63] BABÁK, L. . *Modelování a optimalizace kultivací průmyslově důležitých termofilních mikroorganismů.* Brno, 2005. 159 s. Dizertační práce. VUT v Brně.
- [64] KAŠTÁNEK, F. *Bioinženýrství.* 1. vyd. Praha : Academia, 2001. 334 s. ISBN 80-200-0768-7.
- [65] Přednášky z Mikrobiologie pro farmaceuty pro studenty VFU. Dostupné z WWW: <http://fvl.vfu.cz/sekce_ustavy/mikrobiologie/mikrobiologie_pro_farmaceuty/index.html>

[66] *Fáze růstové křivky*. Dostupné z WWW:
<home.icpf.cas.cz/gavlasova/Mikrobiologie/06%5B1%5D.ppt>

POUŽITÉ ZKRATKY A SYMBOLY

A	absorbance
c [g·l ⁻¹]	koncentrace
CCM	Czech collection of microorganisms (Česká sbírka mikroorganismů)
CHSK [g·l ⁻¹]	chemická spotřeba kyslíku
CHSK_{Cr} [g·l ⁻¹]	chemická spotřeba kyslíku dichromanem draselným
COD	chemical oxygen demand
EU	Evropská unie
HSP	heat shock proteins (proteiny teplotního šoku)
μ [h ⁻¹]	měrná růstová rychlost
mil.	milion
OD	optical density (optická hustota)
ot·min⁻¹	otáčky za minutu
P [g·l ⁻¹ ·h ⁻¹]	produktivita
PVC	polyvynilchlorid
rRNA	ribosomální kyselina ribonukleová
spol. s r.o.	společnost s ručením omezeným
Y_{xs} [g·g ⁻¹]	výtěžnostní koeficient

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Kaseinové micely [4].....	14
Obr. 2 Strukturní vzorec laktosy [15].....	16
Obr. 3 Rozdíl ve struktuře α - a β -izomeru glukosy [18].....	17
Obr. 4 Schéma laboratorní rozprašovací sušárny Anhydro využívané k sušení syrovátky [24].....	20
Obr. 5 Zobrazení závislosti velikosti pórů membrány na velikosti prošlých částic [25]	21
Obr. 6 Schématické znázornění separačního procesu elektrodialýzy [27]	23
Obr. 7 Průběh mléčného kvašení [28]	24
Obr. 8 Rozdělení mikroorganismů podle optimální teploty růstu [29]	26
Obr. 9 Glykolýza [30].....	26
Obr. 10 Citrátový cyklus [31].....	27
Obr. 11 Metabolismus organických kyselin za aerobních podmínek [32].....	28
Obr. 12 Metabolismus organických kyselin za anaerobních podmínek [32]	28
Obr. 13 Fylogenetický strom rodu <i>Geococcus</i> [36]	30
Obr. 14 Mikroskopický obraz buněk <i>Thermus aquaticus</i> [39].....	31
Obr. 15 Bakteriální vlákna obsahující globule síry po růstu v médiu s 16 mmol.l ⁻¹ thiosíranem [40].	32
Obr. 16 Mikroskopický obraz buňky <i>Clostridium botulinum</i> [42]	32
Obr. 17 Růst aktinomycet na agaru [43]	33
Obr. 18 Mikroskopický obraz buňky <i>Thermomyces lanuginosus</i> [45].....	34
Obr. 19 Struktura nasyceného a nenasyceného fosfolipidu [47]	35
Obr. 20 Strukturní vzorce esenciálních hydrofóbních aminokyselin [50]	36
Obr. 21 Vznik disulfidické vazby v oxidovaném stavu [54]	37
Obr. 22 Fermentor BioFlo®/CelliGen™ 115, New Brunswick	38
Obr. 23 Termostatovaná třepačka Heidolph® Promax 1020.....	39
Obr. 24 Spektrofotometr Unicam Helios ϵ	39
Obr. 25 Schematické znázornění turbidimetrie a nefelometrie [56].....	42
Obr. 26 Cell density meter biowave WPA CO 8000	43
Obr. 27 Schématické znázornění bioreaktoru [63]	48
Obr. 28 Fáze růstové křivky [66].....	50
Obr. 29 Kalibrační roztoky pro stanovení CHSK	52
Obr. 30 Vzorové grafy vykreslené programem BioCommand	66

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Složení sladké a kyselé syrovátky [6].....	13
Tabulka 2 Bílkovinné složení kravského mléka [12].....	13
Tabulka 3 Vitaminové složení sušené syrovátky [8].....	16
Tabulka 4 Přehled nových rodů vzniklých reorganizací rodu <i>Bacillus</i> [33]	28
Tabulka 5 Složení kultivačního média pro rod <i>Geobacillus</i>	40
Tabulka 6 Složení kultivačního média pro rod <i>Thermus</i>	40
Tabulka 7 Specifikace přístroje Cell density meter biowave WPA CO 8000 [58].....	43
Tabulka 8 Hodnoty absorbance kalibračních roztoků při stanovení redukujících cukrů.....	79
Tabulka 9 Hodnoty absorbance kalibračních roztoků při stanovení CHSK.....	79
Tabulka 10 Koncentrace biomasy při optimalizaci teploty.....	79
Tabulka 11 Koncentrace biomasy při optimalizaci pH.....	79
Tabulka 12 Koncentrace oxidovatelných látek při optimalizaci teploty	79
Tabulka 13 Koncentrace oxidovatelných látek při optimalizaci pH	79
Tabulka 14 Koncentrace redukujících cukrů při optimalizaci teploty	80
Tabulka 15 Koncentrace redukujících cukrů při optimalizaci pH	80
Tabulka 16 Hodnoty absorbance a koncentrace biomasy v průběhu růstu <i>Geobacillus</i> <i>thermodenitrificans</i>	80
Tabulka 17 Hodnoty absorbance a koncentrace biomasy v průběhu růstu <i>Geobacillus</i> <i>thermocatenulatus</i>	81
Tabulka 18 Hodnoty absorbance a koncentrace biomasy v průběhu růstu <i>Thermus</i> <i>aquaticus</i>	81
Tabulka 19 Hodnoty absorbance a koncentrace biomasy v průběhu růstu <i>Thermus</i> <i>scotoductus</i>	82
Tabulka 20 Hodnoty absorbance a koncentrace redukujících cukrů v průběhu růstu <i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	82
Tabulka 21 Hodnoty absorbance a koncentrace redukujících cukrů v průběhu růstu <i>Geobacillus thermocatenulatus</i>	83
Tabulka 22 Hodnoty absorbance a koncentrace redukujících cukrů v průběhu růstu <i>Thermus aquaticus</i>	83
Tabulka 23 Hodnoty absorbance a koncentrace redukujících cukrů v průběhu růstu <i>Thermus scotoductus</i>	84

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Závislost absorbance na koncentraci redukujících cukrů	52
Graf 2 Závislost absorbance na koncentraci oxidovatelných látek	53
Graf 3 Srovnání koncentrace biomasy při optimalizaci teploty	53
Graf 4 Srovnání koncentrace biomasy při optimalizaci pH.....	54
Graf 5 Srovnání koncentrace oxidovatelných látek při optimalizaci teploty	55
Graf 6 Srovnání koncentrace oxidovatelných látek při optimalizaci pH	55
Graf 7 Srovnání koncentrace redukujících cukrů při optimalizaci teploty	56
Graf 8 Srovnání koncentrace redukujících cukrů při optimalizaci pH	57
Graf 9 Srovnání růstových křivek zástupců rodu Geobacillus jako závislost absorbance na čase.....	59
Graf 10 Srovnání růstových křivek zástupců rodu Geobacillus jako závislost koncentrace biomasy na čase.....	59
Graf 11 Srovnání růstových křivek zástupců rodu Thermus jako závislost absorbance na čase	61
Graf 12 Srovnání růstových křivek zástupců rodu Thermus jako závislost koncentrace biomasy na čase.....	61
Graf 13 Srovnání růstových křivek zástupců rodů Geobacillus a Thermus jako závislost absorbance na čase	62
Graf 14 Srovnání růstových křivek zástupců rodů Geobacillus a Thermus jako závislost koncentrace biomasy na čase	63
Graf 15 Srovnání redukujících cukrů v průběhu růstu zástupců rodu Geobacillus jako závislost koncentrace na čase	64
Graf 16 Srovnání redukujících cukrů v průběhu růstu zástupců rodu Thermus jako závislost koncentrace na čase	65
Graf 17 Linearizace koncentrace biomasy v exponenciálních fázích a výpočet měrné růstové rychlosti pro CCM 2566	84
Graf 18 Linearizace koncentrace biomasy v exponenciálních fázích a výpočet měrné růstové rychlosti pro CCM 2809.....	85
Graf 19 Linearizace koncentrace biomasy v exponenciální fázi a výpočet měrné růstové rychlosti pro CCM 3486.....	85
Graf 20 Linearizace koncentrace biomasy v exponenciální fázi a výpočet měrné růstové rychlosti pro CCM 4465.....	86

PŘÍLOHY

Tabulka 8 Hodnoty absorbance kalibračních roztoků při stanovení redukujících cukrů

c [g.l ⁻¹]	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45	0,50
A ₅₃₀	0,092	0,150	0,206	0,298	0,378	0,485	0,587	0,622	0,797	0,876

Tabulka 9 Hodnoty absorbance kalibračních roztoků při stanovení CHSK

c [g.l ⁻¹]	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
A ₆₀₀	0,020	0,028	0,051	0,062	0,097	0,116	0,129	0,150	0,173	0,181

Tabulka 10 Koncentrace biomasy při optimalizaci teploty

	c [g.l ⁻¹]		
	60 °C	65 °C	70 °C
CCM 2566	0,06	0,30	1,06
CCM 2809	0,29	0,19	1,29
CCM 3486	0,02	0,38	1,54
CCM 4465	0,03	0,29	0,68

Tabulka 11 Koncentrace biomasy při optimalizaci pH

	c [g.l ⁻¹]				
	pH = 5	pH = 6	pH = 7	pH = 8	pH = 9
CCM 2566	0,26	0,31	0,52	0,57	0,19
CCM 2809	0,16	0,20	0,57	0,60	0,44
CCM 3486	0,71	0,48	2,71	1,98	1,63
CCM 4465	0,90	0,50	2,31	2,35	1,81

Tabulka 12 Koncentrace oxidovatelných látek při optimalizaci teploty

	c [g.l ⁻¹]		
	60 °C	65 °C	70 °C
CCM 2566	44,966	43,409	37,442
CCM 2809	54,567	47,042	40,036
CCM 3486	53,269	56,383	37,701
CCM 4465	50,934	49,896	45,226

Tabulka 13 Koncentrace oxidovatelných látek při optimalizaci pH

	c [g.l ⁻¹]				
	pH = 5	pH = 6	pH = 7	pH = 8	pH = 9
CCM 2566	53,010	56,902	38,480	40,036	49,377
CCM 2809	63,908	49,118	46,004	49,377	53,788
CCM 3486	76,881	70,654	41,853	39,777	46,783
CCM 4465	51,453	46,004	38,739	39,258	48,599

Tabulka 14 Koncentrace redukujících cukrů při optimalizaci teploty

	c [g.l ⁻¹]		
	60 °C	65 °C	70 °C
CCM 2566	27,891	28,117	36,626
CCM 2809	24,510	44,911	38,261
CCM 3486	32,569	30,484	33,414
CCM 4465	23,777	26,764	40,402

Tabulka 15 Koncentrace redukujících cukrů při optimalizaci pH

	c [g.l ⁻¹]				
	pH = 5	pH = 6	pH = 7	pH = 8	pH = 9
CCM 2566	57,591	44,742	41,417	35,725	42,938
CCM 2809	48,461	43,051	40,290	41,304	50,490
CCM 3486	52,914	43,108	38,937	36,063	47,447
CCM 4465	45,418	46,883	45,531	38,092	47,165

Tabulka 16 Hodnoty absorbance a koncentrace biomasy v průběhu růstu *Geobacillus thermodenitrificans*

čas [h]	A ₆₀₀	c [g.l ⁻¹]	čas [h]	A ₆₀₀	c [g.l ⁻¹]
0	0,02	0,20	23**	0,78	1,15
1*	0,04	0,26	24**	0,82	1,18
2*	0,10	0,40	25**	0,81	1,17
10*	0,41	0,89	26	0,82	1,17
11*	0,47	0,91	34	0,85	1,18
12*	0,53	0,95	35	0,85	1,13
13*	0,53	0,96	36	0,84	1,19
14	0,55	0,98	37	0,86	1,18
15	0,55	0,98	38	0,85	1,18
16	0,56	0,99	39	0,86	1,18
17	0,57	0,99	40	0,85	1,19
18	0,57	0,99	41	0,85	1,22
19**	0,61	1,01	42	0,85	1,17
20**	0,67	1,05	43	0,87	1,15
21**	0,71	1,07	44	0,87	1,24
22**	0,76	1,08			

* - první exponenciální fáze růstu

** - druhá exponenciální fáze růstu

Tabulka 17 Hodnoty absorbance a koncentrace biomasy v průběhu růstu *Geobacillus thermocatenulatus*

čas [h]	A ₆₀₀	c [g.l ⁻¹]	čas [h]	A ₆₀₀	c [g.l ⁻¹]
0	0,01	0,28	23**	0,67	0,75
1*	0,02	0,29	24**	0,68	0,80
2*	0,11	0,34	25**	0,69	0,79
10*	0,42	0,51	26	0,68	0,8
11*	0,44	0,56	34	0,70	0,80
12*	0,47	0,59	35	0,72	0,78
13*	0,49	0,63	36	0,73	0,80
14	0,48	0,63	37	0,71	0,81
15	0,49	0,64	38	0,72	0,81
16	0,50	0,64	39	0,71	0,79
17	0,48	0,65	40	0,69	0,80
18	0,50	0,64	41	0,73	0,81
19	0,51	0,65	42	0,74	0,80
20**	0,58	0,68	43	0,72	0,82
21**	0,62	0,70	44	0,75	0,83
22**	0,64	0,72			

* - první exponenciální fáze růstu

** - druhá exponenciální fáze růstu

Tabulka 18 Hodnoty absorbance a koncentrace biomasy v průběhu růstu *Thermus aquaticus*

čas [h]	A ₆₀₀	c [g.l ⁻¹]	čas [h]	A ₆₀₀	c [g.l ⁻¹]
0	0,11	0,49	23*	0,73	2,57
1	0,12	0,51	24*	0,78	2,59
2	0,12	0,53	25*	0,80	2,62
3	0,13	0,59	26*	0,86	2,65
4*	0,14	0,57	27*	0,87	2,69
5*	0,16	0,62	28	0,85	2,67
6*	0,18	0,75	29	0,85	2,68
7*	0,20	0,93	30	0,86	2,59
8*	0,24	1,17	31	0,85	2,61
9*	0,26	1,25	32	0,86	2,64
10*	0,28	1,38	33	0,86	2,63
11*	0,31	1,52	34	0,87	2,67
19*	0,65	2,21	35	0,87	2,65
20*	0,67	2,37	44	0,90	2,52
21*	0,64	2,39	45	0,87	2,63
22*	0,75	2,45	46	0,88	2,57

* - exponenciální fáze růstu

Tabulka 19 Hodnoty absorbance a koncentrace biomasy v průběhu růstu *Thermus scotoductus*

čas [h]	A ₆₀₀	c [g.l ⁻¹]	čas [h]	A ₆₀₀	c [g.l ⁻¹]
0	0,05	0,29	23*	0,45	2,13
1	0,05	0,31	24*	0,53	2,14
2	0,05	0,35	25*	0,54	2,32
3	0,05	0,37	26*	0,56	2,34
4	0,06	0,40	27*	0,60	2,35
5*	0,07	0,45	28	0,58	2,31
6*	0,07	0,54	29	0,62	2,30
7*	0,08	0,72	30	0,61	2,35
8*	0,10	0,86	31	0,58	2,32
9*	0,11	1,05	32	0,60	2,34
10*	0,12	1,11	33	0,59	2,31
11*	0,14	1,22	34	0,61	2,30
19*	0,30	2,05	35	0,58	2,31
20*	0,36	2,04	44	0,55	2,28
21*	0,39	2,08	45	0,59	2,32
22*	0,43	2,17	46	0,58	2,34

* - exponenciální fáze růstu

Tabulka 20 Hodnoty absorbance a koncentrace redukujících cukrů v průběhu růstu *Geobacillus thermodenitrificans*

čas [h]	A ₅₃₀	c [g.l ⁻¹]	čas [h]	A ₅₃₀	c [g.l ⁻¹]
0	0,062	71,113	23	0,055	58,692
1	0,061	69,338	24	0,054	56,918
2	0,059	65,790	25	0,052	53,369
10	0,057	62,241	26	0,057	62,241
11	0,055	58,692	34	0,063	72,887
12	0,054	56,918	35	0,065	76,436
13	0,053	55,143	36	0,067	79,985
14	0,060	67,564	37	0,068	81,759
15	0,067	79,985	38	0,069	83,534
16	0,068	81,759	39	0,072	88,857
17	0,069	83,534	40	0,069	83,534
18	0,073	90,631	41	0,067	79,985
19	0,075	94,180	42	0,063	72,887
20	0,067	79,985	43	0,060	67,564
21	0,065	76,436	44	0,058	64,015
22	0,057	62,241			

Tabulka 21 Hodnoty absorbance a koncentrace redukujících cukrů v průběhu růstu *Geobacillus thermocatenulatus*

čas [h]	A ₅₃₀	c [g.l ⁻¹]	čas [h]	A ₅₃₀	c [g.l ⁻¹]
0	0,047	44,497	23	0,050	49,820
1	0,044	39,174	24	0,049	48,046
2	0,042	35,625	25	0,042	35,625
10	0,041	33,850	26	0,045	40,948
11	0,039	30,302	34	0,048	46,271
12	0,038	28,527	35	0,049	48,046
13	0,037	26,753	36	0,050	49,820
14	0,043	37,399	37	0,052	53,369
15	0,044	39,174	38	0,051	51,594
16	0,052	53,369	39	0,052	53,369
17	0,054	56,918	40	0,053	55,143
18	0,056	60,466	41	0,054	56,918
19	0,058	64,015	42	0,050	49,820
20	0,060	67,564	43	0,049	48,046
21	0,056	60,466	44	0,045	40,948
22	0,054	56,918			

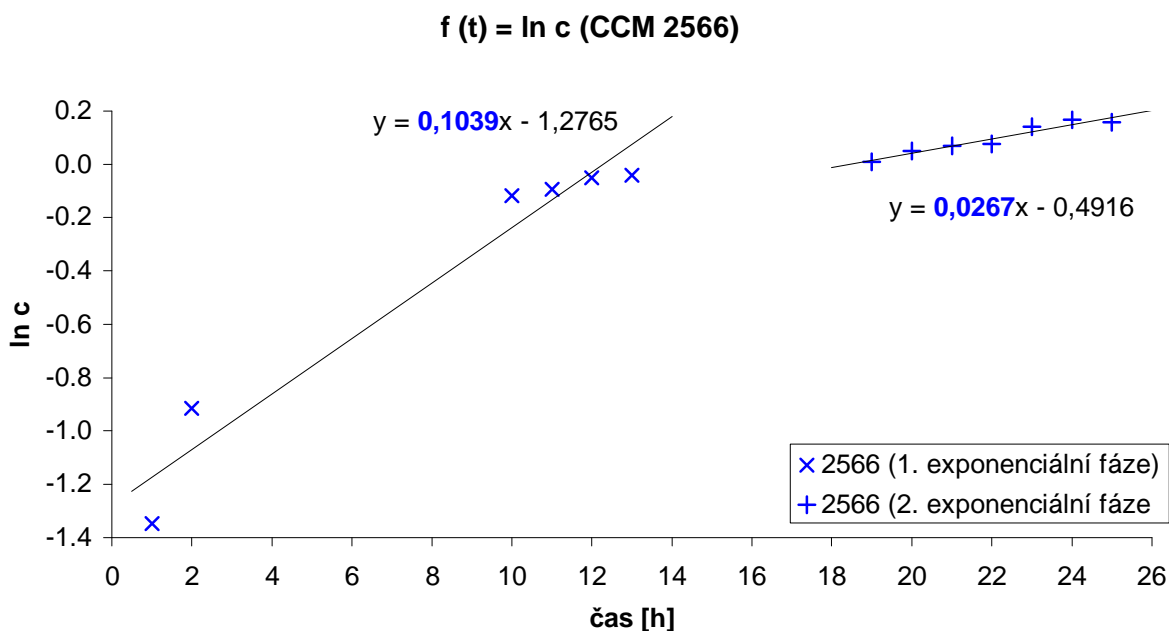
Tabulka 22 Hodnoty absorbance a koncentrace redukujících cukrů v průběhu růstu *Thermus aquaticus*

čas [h]	A ₅₃₀	c [g.l ⁻¹]	čas [h]	A ₅₃₀	c [g.l ⁻¹]
0	0,125	92,369	23	0,052	51,229
1	0,121	90,115	24	0,048	48,974
2	0,115	86,734	25	0,043	46,156
3	0,102	79,407	26	0,041	45,029
4	0,105	81,098	27	0,039	43,902
5	0,089	72,081	28	0,052	51,229
6	0,083	68,699	29	0,063	57,428
7	0,078	65,881	30	0,071	61,936
8	0,075	64,191	31	0,076	64,754
9	0,083	68,699	32	0,095	75,462
10	0,073	63,064	33	0,086	70,390
11	0,071	61,936	34	0,079	66,445
19	0,069	60,809	35	0,076	64,754
20	0,062	56,864	44	0,078	65,881
21	0,055	52,919	45	0,081	67,572
22	0,049	49,538	46	0,077	65,318

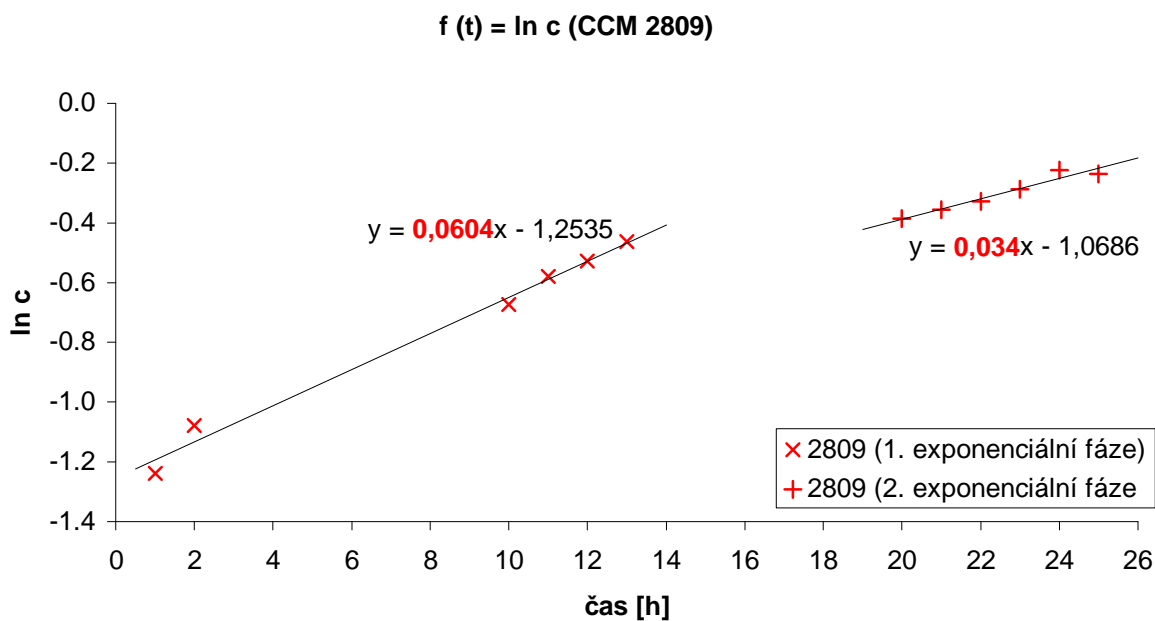
Tabulka 23 Hodnoty absorbance a koncentrace redukujících cukrů v průběhu růstu *Thermus scotoductus*

čas [h]	A ₅₃₀	c [g.l ⁻¹]	čas [h]	A ₅₃₀	c [g.l ⁻¹]
0	0,19	129,001	23	0,126	92,933
1	0,182	124,493	24	0,128	94,060
2	0,171	118,294	25	0,133	96,878
3	0,156	109,840	26	0,131	95,751
4	0,153	108,149	27	0,125	92,369
5	0,151	107,022	28	0,132	96,314
6	0,148	105,331	29	0,141	101,386
7	0,15	106,459	30	0,152	107,586
8	0,143	102,514	31	0,168	116,603
9	0,14	100,823	32	0,175	120,548
10	0,136	98,569	33	0,143	102,514
11	0,139	100,259	34	0,142	101,950
19	0,132	96,314	35	0,138	99,696
20	0,128	94,060	44	0,145	103,641
21	0,124	91,806	45	0,141	101,386
22	0,118	88,424	46	0,139	100,259

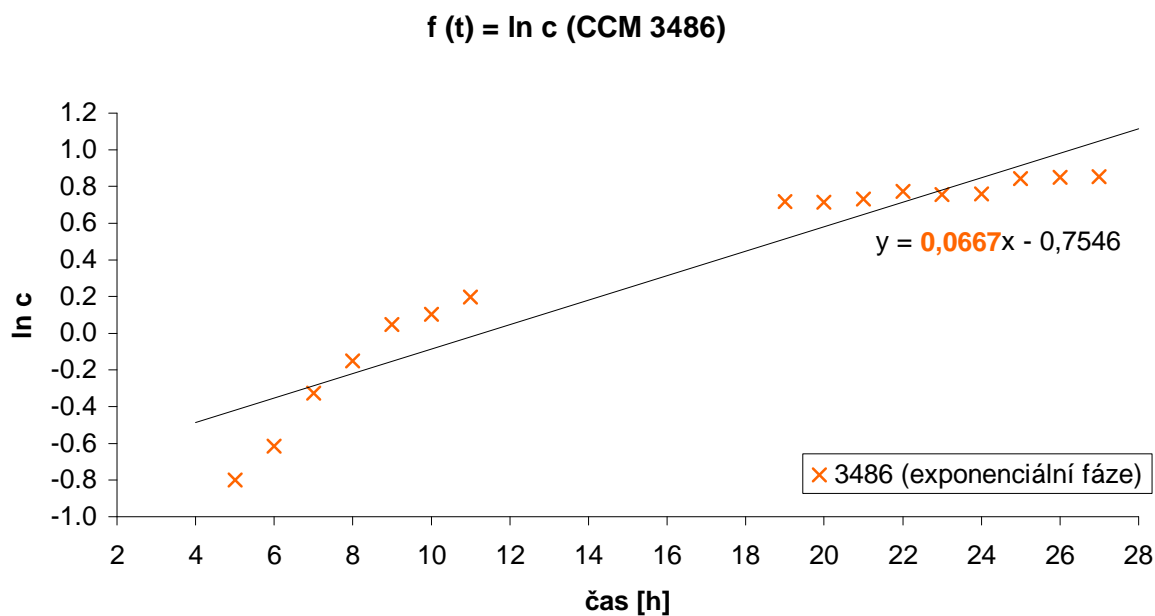
Graf 17 Linearizace koncentrace biomasy v exponenciálních fázích a výpočet měrné růstové rychlosti pro CCM 2566



Graf 18 Linearizace koncentrace biomasy v exponenciálních fázích a výpočet měrné růstové rychlosti pro CCM 2809



Graf 19 Linearizace koncentrace biomasy v exponenciální fázi a výpočet měrné růstové rychlosti pro CCM 3486



Graf 20 Linearizace koncentrace biomasy v exponenciální fázi a výpočet měrné růstové rychlosti pro CCM 4465

