

Změny proteinové frakce plnotučného sušeného mléka

Bc. Gabriela Nagyová

Diplomová práce
2009



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav potravinářského inženýrství

akademický rok: 2008/2009

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Gabriela NAGYOVÁ**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Změny proteinové frakce plnotučného sušeného mléka**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

- Charakterizujte proteiny mléka.
- Popište změny proteinů během sušení a skladování.

II. Praktická část

- Založte sladovací pokusy.
- Provedte stanovení WPNI, indexu rozpustnosti, obsahu aminokyselin a frakcí proteinů pomocí elektroforézy.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

- [1] BŘEZINA, P. a JELÍNEK, J. Chemie technologie mléka, vydalo VŠCHT v Čs. Redakci VN MON, Praha 1990. ISBN 80-7080-075-5.
- [2] HURRELL, R. F. and CARPENTER, K. J. Protein Crosslinkong, Vol. 86B, ed. by M. Friedman, Plenum Press, New York, 1977, p. 255.
- [3] LABUZA, T. P., TANNENBAUM, S. R. and KAREL, M. (1970) Water content and stability of low-moisture and intermediate-moisture foods. Food Technology 24, 35 -- 42.
- [4] LAEMLI U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- [5] KIRKEBY, S., MOE, D. and BOG-HANSEN, T.C. (1993) The silver staining procedure of sodium dodecyl sulfate gels may be accelerated by shortening fixation time. Electrophoresis 14: 51-55.
- [6] GUERRA-HERNÁNDEZ, E., LEON, C., CORZO, N., GARCÍA-VILLANOVA, B. and ROMERA, J. M. (2002) Chemical changes in powder infant formulas during storage. Society of Dairy Technology 55, 171 -- 176.
- [7] GONZÁLES PEREYRA, A. S., NARANJO, G. B., MALEC, L. S. and VIGO, M. S. (2003) Available lysine, protein, digestibility and lactulose in commercial infant formulas. International Dairy Journal 13, 95 -- 99.
- [8] RAMIRÉZ-JIMERÉZ, A., GARCÍA-VILLANOVA, B. and GUERRA-HERNÁNDZ, E. (2004) Effect of storage conditions and iclusion of milk on available lysine in infant cereals. Food Chemistry 85, 239 -- 244.
- [9] Niro method No. A 21a Whey Protein Nitrogen Index.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Eva Okénková

Ústav potravinářského inženýrství

Datum zadání diplomové práce:

17. února 2009

Termín odevzdání diplomové práce:

31. května 2009

Ve Zlíně dne 31. května 2009

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
vedoucí katedry

ABSTRAKT

Cílem práce bylo posoudit změny proteinové frakce sušeného plnotučného mléka v závislosti na různých podmínkách skladování. Vyšší teplota skladování při vyšší relativní vlhkosti měla vliv na obsah vody, využitelnost lysinu a obsah jednotlivých aminokyselin. Vliv slunečního záření se projevil pouze při měření rozpustnosti a rozpadu proteinových frakcí. Podmínky skladování neměly vliv na hodnoty WPNI indexu a ke změnám docházelo pouze v závislosti na době skladování. Rovněž výsledky SDS-PAGE byly odlišné v závislosti na době skladování.

Klíčová slova:

Sušené mléko, protein, skladování, teplota, relativní vlhkost

ABSTRACT

The aim of this work was passing judgment changes on protein fractions in whole dry milk depending on different storage conditions. Higher storage temperature at higher relative humidity influenced water content, lysin availability and single aminoacids content. In fluent solar radiation displayed only at measurement solubility and protein fraction disintegration. Storage conditions didn't have influence over funds WPNI index and changes happened only depending on storage time. As well record SDS- PAGE were to be different depending on storage time.

Keywords:

Dry milk, protein, storage, temperature, relative humidity

Ráda bych poděkovala Ing. Evě Okénkové za odborné vedení, spolupráci a velmi cenné rady, které mi pomohli při tvorbě diplomové práce.

Motto:

„Tajemstvím úspěchu v životě není dělat to, co se nám líbí, ale nalézt zalíbení v tom, co děláme.“

Prohlašuji, že jsem na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautorka.

Ve Zlíně

.....

Podpis studenta

OBSAH

ÚVOD	8
I TEORETICKÁ ČÁST	9
1 CHARAKTERISTIKA MLÉKA	10
1.1 CHEMICKÉ SLOŽENÍ MLÉKA	10
1.1.1 Sušina	10
1.1.2 Voda	10
1.1.3 Mléčný tuk.....	11
1.1.4 Laktosa	11
1.1.5 Nebílkovinné dusíkaté látky.....	11
1.1.5.1 Močovina, amoniak, kyselina močová.....	11
1.1.5.2 Lipoproteiny.....	12
1.1.6 Minerální látky	12
1.1.7 Enzymy.....	12
1.1.8 Vitaminy.....	12
1.1.8.1 Vitaminy rozpustné v tucích	13
1.1.8.2 Vitaminy rozpustné ve vodě	13
2 PROTEINY MLÉKA	15
2.1 KLASIFIKACE A NOMENKLATURA MLÉČNÝCH PROTEINŮ.....	15
2.1.1 Kaseiny.....	15
2.1.1.1 Nomenklatura kaseinů	16
2.1.1.2 Kaseinové micely.....	17
2.1.1.3 Funkční vlastnosti kaseinů.....	18
2.1.2 Syrovátkové proteiny.....	19
2.1.2.1 Nomenklatura syrovátkových bílkovin.....	19
2.1.3 Minoritní proteiny	22
2.2 BIOLOGICKÁ ROLE MLÉČNÝCH PROTEINŮ	22
2.3 VLIVY PŮSOBÍCÍ NA OBSAH PROTEINŮ V MLÉCE.....	23
2.4 FRAKCIONACE A IZOLACE MLÉČNÝCH PROTEINŮ	24
2.4.1 Zónová elektroforéza.....	25
2.4.2 Chromatografie mléčných proteinů.....	25
3 ZMĚNY A VLASTNOSTI SUŠENÉHO MLÉKA	27
3.1 NEŽÁDOUCÍ ZMĚNY BĚHEM SUŠENÍ	27
3.2 FYZIKÁLNÍ A FUNKČNÍ VLASTNOSTI SUŠENÉHO MLÉKA.....	27
3.2.1 Struktura prášku	28
3.2.2 Tekutost.....	29
3.2.3 Složky popela	29
3.2.4 Rozpustnost	30
3.2.5 Absorpce vody.....	30
II PRAKTICKÁ ČÁST	31
4 CÍL PRÁCE	32
5 METODIKA PRÁCE	33

5.1	ANALYZOVANÉ VZORKY	33
5.2	POUŽITÉ PŘÍSTROJE, ZAŘÍZENÍ A CHEMIKÁLIE	34
5.2.1	Přístroje	34
5.2.2	Chemikálie	35
5.2.2.1	Stanovení WPNI indexu	35
5.2.2.2	Stanovení –SH skupin.....	35
5.2.2.3	Stanovení aminokyselin	35
5.2.2.4	SDS-PAGE	36
5.2.2.5	Stanovení využitelného lysinu	36
5.3	METODIKY STANOVENÍ.....	37
5.3.1	WPNI index.....	37
5.3.2	Index rozpustnosti	38
5.3.3	Stanovení tepelně-aktivovaných sulfhydrylových skupin sušeného mléka	38
5.3.4	Obsah vody.....	38
5.3.5	Stanovení aminokyselin	39
5.3.6	Elektroforéza proteinů (SDS-PAGE)	40
5.3.7	Stanovení využitelného lysinu.....	40
6	VÝSLEDKY A DISKUSE	41
	ZÁVĚR	53
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	54
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	58
	SEZNAM OBRÁZKŮ	59
	SEZNAM TABULEK.....	60
	SEZNAM PŘÍLOH.....	61

ÚVOD

Mléko a mléčné výrobky mají ve výživě člověka klíčové postavení. Je to nenahraditelný pokrm kojenců, ale i důležitá součást stravy pro dospívající, dospělé, staré a nemocné lidi.

Mléko má ve výživě každého člověka velký význam. Jedním z nich je ochrana trávicího traktu, jelikož mléko působí jako pufr při překyselení žaludku a uplatňuje se při nedostatku enzymatické činnosti a poruchách vstřebávání, také ochraňuje jaterní buňky využitím proteinů, a to především kyseliny orotové, čímž dochází k rychlejší regeneraci jaterních buněk. Proteiny dále napomáhají látkové výměně tuků a normalizují obsah cholesterolu, tím přispívají k ochraně srdce a oběhové soustavy. Využitím fosforu a vápníku obsaženého v mléce dochází k tvorbě a posílení kostí.

Mléko má ale také negativní význam. Při zvýšené konzumaci mléka a mléčných výrobků může dojít ke zvyšování hladiny vápníku v těle a k vyvolání patologického ztuhnutí kostí. Vysoký příjem tuků může vést k obezitě. Především u malých dětí se může objevit alergie na proteiny mléka, která se projevuje již po několika hodinách po požití kravského mléka a to nejčastěji v období, kdy děti přecházejí z mateřského mléka na umělou výživu, jejímž základem je právě mléko kravské.

Mléčné proteiny se konzumují především v mléce a mléčných výrobcích v nichž (především v tvarohu a sýrech) jsou značně koncentrovány. Koncentráty mléčných proteinů (kaseináty, proteinové komprecipitáty a syrovátkové proteiny) se uplatňují v masných výrobcích (uzeniny a konzervy), mražených smetanových krémech, tavených sýrech, pečivu, cukrářských výrobcích a hotových jídlech pro své stabilizační a emulgační účinky. Rovněž krmné směsi mohou být obohaceny o mléčné proteiny.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERISTIKA MLÉKA

Mléko je tekutý sekret mléčné žlázy savců. Sekrety mléčné žlázy se dělí na dvě skupiny, a to mléka nezralá a mléka zralá. Nezralé mléko (mlezivo) je vylučováno pomocí mléčné žlázy na konci gravidity před porodem (předběžné mlezivo) a hned po porodu (mlezivo pravé). Přejít z mleziva v mléko zralé trvá po porodu 7 - 10 dní. Podle vzájemného poměru kaseinové a albuminové části bílkovin rozlišujeme mléka albuminová (ženské, psí, kočičí) a mléka kaseinová (kravské, kozí, velbloudí). V našich podmínkách se průmyslově zpracovává především mléko kravské, v menší míře mléko ovčí a kozí. [1]

1.1 Chemické složení mléka

Tabulka 1: Chemické složení mléka

Složka	Obsah složky [%]
Voda	86-88
Sušina celkem	12-14
Tuk	3-5
Proteiny	3,2-3,5
Laktosa	4,5-5
Minerální látky	1

1.1.1 Sušina

Sušina mléka je tvořena bílkovinami, tukem, laktosou, minerálními látkami a enzymy, které jsou ve zralém a zdravém kravském mléce obsaženy v ustálených poměrech a během laktace se jen nepatrně mění, což je způsobeno faktem, že mléko je produktem živého organismu. [2]

1.1.2 Voda

Voda je přirozenou a nezbytnou složkou mléka, nositelem a rozpouštědlem celého systému. Převážnou část tvoří volná voda, ve které jsou rozpuštěny minerální látky a mléčný cukr ve formě pravého roztoku. Volnou vodu lze oddělit odpařením nebo vymražením v podobě ledových krystalků. Hydratační voda je navázaná na koloidy mléka,

keré v ní bobtnají, popř. na jejich povrchu vytváří určitý druh hydratačních obalů. Hydratační voda se dá odstranit zahřevem na 102 – 105 °C. Krystalická voda je vázaná velmi silně, jde tedy o vodu chemicky vázanou, která je obsažena v látkách schopných krystalizovat a je možno ji vytěsnit až vysokými teplotami. [3]

1.1.3 Mléčný tuk

Základními složkami mléčného tuku jsou triacylglyceroly, diacylglyceroly, monoacylglyceroly, volné mastné kyseliny, fosfolipidy, steroly, estery sterolů a uhlovodíky. Zhruba 98 % lipidů je tvořeno triacylglyceroly. Složení mléčného tuku a také jeho vlastnosti se mění a to hlavně poměr nasycených, nenasycených a polynenasycených mastných kyselin, jež určují nutriční hodnotu. Vyšší podíl nenasycených a polynenasycených mastných kyselin zvyšuje nutriční hodnotu tuku. Lipidy mléka jsou obecně dobře stravitelné. [2, 3]

1.1.4 Laktosa

Laktosa tvoří část tukuprosté sušiny a patří mezi redukující sacharidy. Vyskytuje se jen v mléce a proto je nazývána mléčný cukr. Při tepelném ošetření laktosa reaguje s volnými aminokyselinami Maillardovou reakcí a způsobuje tak změnu chuti a barvy mléka. Obsah laktosy je poměrně stabilní, kolísá v rozmezí od 4,6 do 4,9 %. Tvoří důležitou součást při výživě novorozenců v prvních dnech života. Laktosa má vliv na barvu a chuť mléčných výrobků s prodlouženou trvanlivostí a to zejména v průběhu jejich skladování. [2, 3, 4]

1.1.5 Nebílkovinné dusíkaté látky

Mezi nebílkovinné dusíkaté látky patří močovina, kyselina močová, amoniak, lipoproteiny a kreatin.

1.1.5.1 Močovina, amoniak, kyselina močová

Močovina je konečný produkt metabolismu bílkovin a je tvořena z amoniaku v játrech. Do mléka proniká močovina z krve dojnice, kde její koncentrace kolísá v průběhu dne. Amoniak je produkován během tkáňového metabolismu rozkladem bílkovin. [2,5]

1.1.5.2 Lipoproteiny

Lipoproteiny jsou složeny z proteinů a nekovalentně asociovaných lipidů, přičemž lipidy bývají převážně jádrem makromolekuly a proteiny v hydratované formě tvoří jejich obal. Lipoproteiny se rozdělují do kategorií podle toho, jakým způsobem nesou cholesterol v séru a to na lipoproteiny s nízkou nebo s vysokou hustotou. [6]

1.1.6 Minerální látky

Minerální látky jsou přítomny v mléčném séru v roztoku nebo koloidní formě a jsou vázány na organické součásti mléka. Jednotlivé formy minerálních látek jsou ve vzájemných rovnováhách mezi sebou i k ostatním složkám mléka. Vztah velikosti, stavu a vlastností kaseinových micel má souvislost s množstvím vápníku, hořčíku a fosforu. V syrovém mléce se obsah minerálních látek pohybuje v rozmezí 0,7 - 0,8 % a do mléka jsou přenášeny z krve. Kravské mléko je bohaté především na vápník, draslík, fosfáty a citráty. Ideální poměr mezi vápníkem a fosforem v mléce je 1 : 3. [1, 2]

1.1.7 Enzymy

Enzymy jsou syntetizovány v mléčné žláze a některé se dostávají do mléka z krve. Kromě nativních enzymů obsahuje nadojené mléko i mikrobiální enzymy kontaminující mikroflóru. Řada enzymů se podílí na přirozeném antibakteriálním systému mléka, některé mohou katalyzovat biochemické reakce, které vedou ke vzniku sensorických vad mléka nebo mléčných výrobků, případně i ke změně technologických vlastností. Některé enzymy jsou v mléce koncentrovány v povrchových vrstvách tukových kuliček a přecházejí do smetany, jiné jsou vázány na bílkoviny mléka a společně s nimi se sráží. Záhřevem mléka dochází k denaturaci a inaktivaci enzymů. [2]

1.1.8 Vitaminy

V mléce, jako prvotním a prakticky jediným zdroji potravy sajícího mláděte, jsou přítomny veškeré vitaminy, i když koncentrace některých z nich je pouze minimální. U většiny vitaminů jsou však všeobecně zvýšené hladiny v mlezivu.

1.1.8.1 Vitaminy rozpustné v tucích

Mléko obsahuje poměrně málo vitamínu A a jeho obsah je úměrný obsahu tuku. Pasterací, vysokoteplotním ohřevem (UHT) a při sušení se ztrácí do 6 % vitamínu, k dalším ztrátám pak dochází skladováním. V přítomnosti kyslíku a na světle mohou být změny

rychlejší. V sušeném mléce je vitamin velmi stabilní, i při dlouhodobém skladování nepřesahují ztráty 10 %.

Hladina vitamínu D v mléce je ovlivněna řadou faktorů, např. výživou a ročním obdobím.

Obsah vitamínu E je rovněž ovlivněn složením krmiva a ročním obdobím. V nepřítomnosti kyslíku a oxidovaných lipidů je vitamin E během průmyslového zpracování poměrně stabilní.

Obsah vitamínu K v mléce je nízký. Během skladování a tepelného zpracování potravin nedochází k významným ztrátám vitamínu K. [2]

1.1.8.2 Vitaminy rozpustné ve vodě

Vitamin B₁ se v mléce vyskytuje jak volný, tak také vázaný na bílkoviny (5 - 17 %). Během tepelného ošetření nebo sušení mléka se za běžných podmínek ztráty vitamínu pohybují v rozmezí 10 - 20 % a ani při skladování tepelně ošetřeného mléka nedochází k výrazným ztrátám.

Vitamin B₂ se v mléce vyskytuje jako volná látka, dále ve formě flavinmononukleotidu (FMN) a flavinadeninukleotidu (FAD) vázaných na α -kasein nebo β -kasein. Při technologických operacích jsou ztráty vitamínu zanedbatelné.

Mléko obsahuje malý podíl vitamínu B₃. Ztráty vitamínu při zpracování i skladování nebyly pozorovány.

Obsah vitamínu B₅ v mléce je oproti jiným živočišným zdrojům nepatrný. Tepelným ošetřením dochází ke ztrátám do 5 %, při skladování dosahují ztráty 20 – 35 %. Během sušení a skladování sušených mlék jsou ztráty vitamínu rovněž minimální.

Obsah vitamínu B₆ v mléce je proti ostatním živočišným produktům zanedbatelný. Během tepelného zpracování mléka jsou ztráty nepatrné, ale ztráty během skladování již zanedbatelné nejsou a dosahují 40 - 45 %.

V mléce je hlavním vitamínem B₁₂ adenosylkobalamin a methylkobalamin. Obsah vitamínu se za běžných podmínek průmyslového zpracování nemění.

Mléko má jako zdroj vitamínu C zanedbatelný význam. Při skladování však dochází k jeho značným ztrátám. U sušených mléčných výrobků obohacených vitamínem C, které jsou navíc balené v inertní atmosféře, je stabilita vitamínu C relativně dobrá. [2]

2 PROTEINY MLÉKA

Sekrece proteinů byla pozorována ve všech druzích mléka a to v různém množství od 1 % u lidského mléka do 20 % v mléce králičím. První separaci mléčných kaseinů popsal v roce 1814 Berzelius. S vývojem dalších sofistikovaných analytických metod během následujících let bylo charakterizováno více než 200 typů proteinů v kravském mléce. Proteiny kravského mléka jsou sledovány z hlediska izolace, charakterizace konstrukčních vlastností, funkčních a biosyntetických cest. Z tohoto důvodu jsou výrazem „mléčné proteiny“ myšleny proteiny kravského mléka. [7]

2.1 Klasifikace a nomenklatura mléčných proteinů

Proteiny mléka jsou velmi heterogenní skupinou molekul a proto jsou pro jednoduchý popis rozděleny do pěti hlavních kategorií: kaseiny, syrovátkové proteiny, lipoproteiny, enzymy a ostatní minoritní proteiny. Heterogenita mléčných proteinů je komplikovaná přítomností genetických variant, které byly identifikovány u dalších zvířat. S vývojem molekulární biologie a zlepšením klonovací techniky je možno zvýšit různorodost mléčných proteinů řízenou mutagenezí.

Pokud je pH čerstvě nadojeného mléka upraveno na hodnotu 4,6, vytvoří se asi z 80-ti % celkového proteinu sraženina. Schopnost mléčných proteinů srážet se při pH 4,6 byla použita jako základ pro klasifikaci do dvou hlavních skupin a to kaseinové a nekaseinové (syrovátkové) proteiny. [8]

2.1.1 Kaseiny

Kaseiny jsou důležité kvůli svým nutričním a funkčním vlastnostem. U novorozenců jsou metabolizovány a schopny nést značné množství vápníku a fosforu (ve formě fosfátu), což jsou důležité částice pro stavbu těla. V sýrech kasein poskytuje strukturální elementy zodpovědné za strukturální, stavební vlastnosti a určuje emulsifikační kapacitu. V ostatních aplikacích je jejich snadná hydratace a silné interakce s ostatními komponenty udělala kasein vhodnou přísadou do lepidel a dalších surovin. [9]

2.1.1.1 Nomenklatura kaseinů

Separace a izolace čistých bílkovin objevila primární sekvenci a posttranslační modifikace každého z proteinů. Rovněž byla vytvořena systematická nomenklatura a ihned aplikována na proteiny kravského mléka. Kaseiny ostatních živočichů jsou klasifikovány analogicky s mlékem kravským, pokud nemají významné změny v sekvenci aminokyselin. [8]

α_{s1} -kasein je hlavní prvek kaseinu, má největší negativní síť nábojů v neutrálním prostředí a v molekule jsou pouze jednovalentní kationy. Hydrofobicita je nejvyšší v oblasti reziduí 25, 90 - 110, a 140 - 190. α_{s1} -kasein má velice kyselou oblast mezi rezidui 38 a 78, které jsou zodpovědné za těsnou vazbu s vápníkem (fosfátem) a anomální pohyblivost při SDS-PAGE, pokud chybí divalentní kationty. [2, 9, 10]

α_{s2} -kasein je méně zastoupený komponent, nejméně hydrofobní ze všech kaseinů a nejvíce variabilní k fosforylaci v kaseinové sekvenci. Jsou tři fosfopeptidové oblasti reziduí 5 - 18, 49 - 68 a 126 - 145. α_{s2} -kasein má velkou hydrofobickou oblast mezi rezidui 90 - 120. Tento protein je pohotově hydrolyzován plazminem v řadě míst. V mléce je proporce α_{s2} -kaseinu známá jako dimer tvořený disulfidickými můstky mezi monomery Cys36 a Cys40. Výzkumy prokázaly, že monomerní α_{s2} -kasein se chová velmi podobně jako α_{s1} -kasein, s výjimkou tvorby vazeb v přítomnosti chloridu sodného (NaCl) o koncentraci vyšší než $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. [9]

β -kasein je nejvíce hydrofobním kaseinem. Jsou zde dvě oblasti reziduí, kde dochází ke štěpení plazminem 28 - 29 a 105 - 106 respektive 107 - 108 a jedna oblast reziduí, která může být štěpena chymozinem 189 - 190/192 - 193. Relativně jednoduchá eluce β -kaseinu z HIC kolony (kolona založena na hydrofobních interakcích) ukazuje na mnoho hydrofobních skupin, které s matrix kolony nereagují efektivně. Cirkulární dichroismus (CD) a ostatní spektrální metody indikují, že β -kasein má malou sekundární strukturu v prostředí rozředěného, nízko-ionicky pevného rozpouštědla při pokojové teplotě. Při zvýšené teplotě bylo pozorováno významně zvýšené zahušťování. [9, 10]

κ -kasein tvoří 10 - 12 % veškerých kaseinů a hraje rozhodující roli ve stabilizaci kaseinových micel. Po enzymatickém rozštěpení destabilizuje koloidní kaseinový systém. Enzymatické rozštěpení, které změnu přináší, je důležité pro kojence z nutričního hlediska. S vápenatými ionty tvoří rozpustné soli a v jejich přítomnosti se stabilizuje α_{s1} -kasein

a β -kasein. Kromě fosforu jsou v kaseinu přítomny také sacharidy a to konkrétně D-galaktopyranóza, N-acetyl-D-galaktosamin a N-acetylneuraminová kyselina. [2, 9]

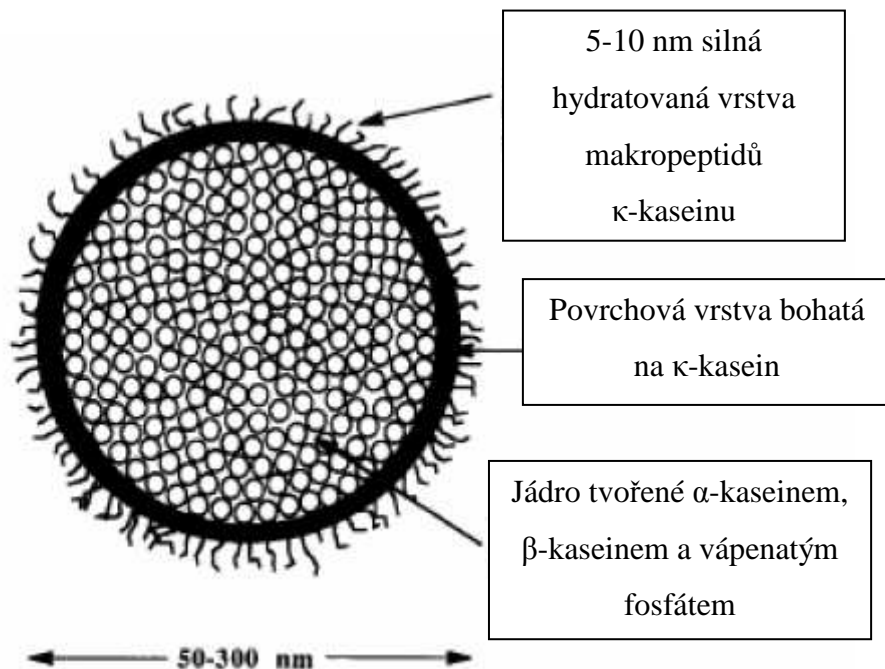
2.1.1.2 Kaseinové micely

Kasein vytváří v mléce mikroskopické částice – micely, které jsou uspořádány v submicelách a spojují se do micel prostřednictvím fosfoserinových zbytků a vápenatých iontů.

Micela obsahuje asi 20 000 molekul kaseinů o složení:

- 93 % kaseinů,
- 3 % vápenatých iontů,
- 3 % anorganického fosfátu,
- 2 % fosfátu vázaného jako fosfoserin,
- 0,4 % citrátu,
- 0,5 % sodíkových, draslíkových a hořečnatých iontů.

Průměrná velikost kaseinových micel je 50-300 nm v závislosti na poměru α_s -kaseinu, κ -kaseinu a obsahu vápenatých iontů. [2]



Obrázek 1: Kaseinová micela

2.1.1.3 Funkční vlastnosti kaseinů

Kaseinové produkty mají velké množství funkčních vlastností, díky kterým jsou užitečné jako potravinové přísady. Základními funkčními vlastnostmi jsou emulgace tuku, stabilita pěny a posilování textury potravinových produktů.

Rozpustnost je důležitý a nezbytný předpoklad pro mnoho dalších funkcí kaseinů a je důležitou vlastností pro aplikace kaseinu. Kasein je nerozpustný při pH 4,0 - 5,0, ale je vysoce rozpustný při pH vyšším než 5,5. Dále je rozpustný při pH nižším než 3,5, ale v této oblasti je mnohem viskosnější než v neutrální oblasti pH. Pro praktičnost jsou tedy všechny kaseiny před zpracováním rozpuštěny v alkalickém prostředí.

Koagulace a tvorba gelu jsou nežádoucími vlastnostmi především v mléce do kávy, polévkách, šťávách, nápojích a tekutých nutričních nebo lékařských přípravcích. Formace kyselých nebo syřidlových gelů je přizpůsobená formaci terciální struktury kaseinové sítě.

Viskozita kaseinů je důležitá vlastnost u mnoha tekutých výrobků jako jsou polévky, omáčky, šťávy a u výrobků, kde je použita zápražka. Stavba textury je důležitá v polotekutých výrobcích jako imitace sýrů a cukrovinky. Povaha kaseinových molekul je flexibilní a to díky změněné sekundární a terciální struktuře, která má vysoký obsah prolinu, což se spojuje s vyšší viskozitou výrobků.

Emulsifikace tuku nebo oleje je důležitá vlastnost ve všech přísadách do jídel, u mlék do kávy, šlehaných cukrovinek, imitací sýrů, polévek, šťáv a masových produktů. Schopnost proteinů poskytovat stabilitu závisí na schopnosti kaseinu bránit se proti sloučení. Pro srovnání emulsifikačních vlastností bylo použito mnoho emulsifikačních parametrů např. emulzní kapacita, aktivní index emulsifikace, vnoření proteinu do tukových kuliček a stabilita krému.

Schopnost **tvorby pěny** je důležitou funkční vlastností kaseinů využívaná při aplikaci kaseinu do cukrovinek v podobě např. šlehané pěny. Vlastnosti spojené s tvorbou pěny se nazývají objem pěny a stabilita pěny. Jsou závislé na koncentraci proteinů, iontovém prostředí a na přítomnosti dalších potravinových komponent jako jsou cukry a tuk. [11, 12, 13, 14]

2.1.2 Syrovátkové proteiny

Syrovátkové proteiny zůstávají v mléce po vysrážení kaseinu a nejvyšší obsah je v mlezivu. Mají význam pro získání imunity, patří mezi antibakteriální látky mléka, zabezpečují obranu proti mikroorganismům a toxinům, váží antigen, neutralizují toxiny a zvyšují fagocytózu mikroorganismů. [7]

2.1.2.1 Nomenklatura syrovátkových bílkovin

Syrovátkové bílkoviny byly rozpouštěny síranem měďnatým nebo v polovičním množství síranu amonného. Rozpuštěná část je „laktoglobulin“ a nerozpuštěná „laktalbumin“. Další výzkum identifikoval krystalický materiál v laktalbuminové frakci a byly izolovány dva proteiny, a to „ α -laktalbumin“ a „ β -laktoglobulin“. Teprve později byl v této frakci nalezen „sérum albumin“, „imunoglobulin“ a „proteoso-peptony“. [8]

α -laktalbumin je druhým nejvíce zastoupeným proteinem mezi syrovátkovými bílkovinami a poprvé byl izolován před více než 60-ti lety. Hraje důležitou roli ve vývoji metod pro studium chemických a fyzikálních vlastností proteinů. α -laktalbumin nemá jen nutriční význam, ale je také klíčovou součástí enzymatického systému, který katalizuje syntézu laktosy, hlavního karbohydrátu v mléce. α -laktalbumin hraje důležitou roli ve výzkumu proteinů. Stal se modelem pro studium mechanismu sbalování proteinů do nativní struktury. α -laktalbumin je syntetizován v mléčné žláze a jeho obsah je vyšší v mléce všežravců, masožravců a býložravců s jednoduchým žaludkem. Samotný polypeptidový řetězec α -laktalbuminu se skládá ze 123 aminokyselinových zbytků včetně osmi cysteinů, které jsou kovalentně spojeny čtyřmi disulfidickými můstky. Molární hmotnost α -laktalbuminu je 14186 Da. α -laktalbumin má velmi vysokou biologickou hodnotu (vysoký obsah cystinu, tryptofanu a lysinu), vykazuje kyselou reakci, je rozpustný v čisté vodě a nejstabilnější vůči tepelnému působení. Neobsahuje žádný fosfor a proto není citlivý vůči syřidlovému enzymu. Obsahuje pevně vázané vápenaté ionty, které výrazně ovlivňují stabilitu a strukturu, ale na druhou stranu nemají vliv na syntézu laktosy.

Pokud bychom chtěli vápenaté ionty odstranit, vyžadovalo by to prodloužené tepelné ošetření s použitím chelatinu nebo rozrušení struktury v nízké oblasti pH. Hlavní funkcí α -laktalbuminu je produkce laktosy a hraje roli i v glykosyltransferasové

regulaci. V kombinaci s mastnými kyselinami by měl α -laktalbumin mít atopický efekt na některé rakovinné buňky. [15, 16, 17, 18]

β -laktoglobulin je nejvíce zastoupená syrovátková bílkovina mléka. Jeho obsah byl stanoven až na 50 % všech syrovátkových bílkovin, což odpovídá přibližně 10-ti % všech bílkovin v mléce. β -laktoglobulin má globulární tvar s přesně definovanou terciární strukturou. Na začátku je molekula tvořena α -helixem, na konci je struktura β -skládaného listu. U přežvýkavců existuje β -laktoglobulin jako dimer v rozmezí pH od 3 do 7. Při pH nad 7,5 dochází k přesně definovaným strukturním změnám, které se označují jako tzv. Tanfordovy transformace. Tanfordovy transformace jsou pozorovány, poskytuje-li β -laktoglobulin anomální výsledky pro jeden ionizovatelný zbytek proteinu. Tato strukturní změna může probíhat pouze při měnícím se pH na levotočivých otáčkách triolových skupin. β -laktoglobulin je syntetizován v mléčné žláze, není rozpustný v čisté vodě (rozpouští se ve zředěných roztocích neutrálních solí). Při záhřevu nevratně denaturuje, je méně kyselý než α -laktalbumin, neobsahuje fosfor a chybí mu aminokyselina hydroxyprolin. Vyvolává vařivou příchut' mléka. Ve velké míře je obsažen v nezralém mléce a mléce masožravců. Složení aminokyselin β -laktoglobulinu bylo poprvé popsáno v roce 1949. Poté následovaly další studie a kompletní sekvence byla publikována v roce 1972. Použití vysoko-účinného rentgenu a nukleární magnetické resonance (NMR) prokázalo disulfidický můstek mezi aminokyselinami cys106 a cys119 a že molekula cys121 je volný thiol. Zjištěný volný thiol se v nativní formě projevoval jako nereaktivní. Dostupným pro reakce se stává teprve potom, co se bílkovina do určité míry rozvine, nebo pokud je přidána močovina v množství přinejmenším $6 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Tepelný záhřev blízko neutrální oblasti pH má také vliv na thiolovou skupinu v β -laktoglobulinové molekule. Všechny β -laktoglobuliny se spojují do malých hydrofobních molekul. Jejich strukturální podobnost k lipoproteinům indikuje to, že mohou mít transportní roli mastných kyselin pro novorozence. [19, 20, 21, 22]

Fyzikální funkcí β -laktoglobulinu je transport zatím nejasných látek, protože široký výběr malých hydrofobních molekul neposkytuje žádný klíč k identifikaci fyzikálních vazeb. Mastné kyseliny, především kyselina palmitová, byly nalezeny navázány na čerstvě izolované mléko, ale na druhé straně prasečí mléko mastné kyseliny neváže. Z čehož vyplývá, že β -laktoglobulin pravděpodobně není tím pravým ligandem pro mastné kyseliny.

Během zpracování mléka se může číslo fyzikálních a chemických reakcí měnit, protože reaktivní skupiny vystavené vyšší energii (teplota nebo tlak) reagují rychleji. β -laktoglobulin je zahrnut v mnoha procesech, a proto je intensivněji studován zvláště na molekulové úrovni. [23]

Pokud se změní prostředí β -laktoglobulinu, změní se struktura proteinu. V případě záhřevu v neutrálním prostředí na teplotu nad 60 °C se formuje série polymerů, které jsou viditelné při identifikaci SDS-PAGE. Polymery jsou formovány pomocí disulfidických můstků katalyzovaných thiolem. Volný cysteinový zbytek interaguje s disulfidickou vazbou a váže se na jinou skupinu, čímž vytváří volné místo pro jiný zbytek. Při tepelném záhřevu β -laktoglobulinu nevznikají pouze dimery vázané disulfidickým můstkem, ale také monomery obsahující nenativní disulfidické můstky.

Reakce zahrnující strukturální změny, jako výsledek vnitřní výměny na disulfidických můstcích, jsou zodpovědné za tepelně-indukované gely vyrobené z izolovaných syrovátkových proteinů, které jsou pozorovatelné na zahřátém povrchu mléčných výrobků. Reakce často zahrnuje β -laktoglobulin a κ -kasein, zatímco od syrovátky odvozené materiály obsahují β -laktoglobulin a α -laktalbumin. [22]

Sérum albumin je nejhojněji zastoupený protein krevního séra (tvoří až 60 % sérových bílkovin). Je syntetizován v játrech. Reversibilně váže a transportuje mastné kyseliny, bilirubin, hormony a další. Je dosti kyselý a v neutrálním prostředí existuje ve formě aniontu. Albumin se výrazně podílí na regulaci osmotického tlaku krve. Tvoří pohotovostní zásobu aminokyselin pro tělní buňky. Zvýšené hladiny byly pozorovány při zánětlivých onemocněních. [24]

Imunoglobuliny jsou extrémně heterogenní skupinou a jejich identifikace je založena na imunochemických vlastnostech. V mléce bylo identifikováno 5 skupin imunoglobulinů (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD). Jejich základní struktura je stejná jako u ostatních imunoglobulinů, obsahují dva těžké a dva lehké polypeptidové řetězce kovalentně navázané disulfidickou vazbou. Molární hmotnost se pohybuje od 50 do 70 kDa pro těžký řetězec v závislosti na typu proteinu a kolem 25 kDa pro řetězec lehký. Různorodost imunoglobulinů je způsobená rozdílností v aminokyselinové sekvenci a karbohydrátových skupinách v molekule. [25, 26]

2.1.3 Minoritní proteiny

Mezi minoritní proteiny patří laktoferrin, transferrin, ceruloplasmin, β_2 -mikroglobulin a další proteiny.

Laktoferrin je nehematický glykoproteid nesoucí železo a skládá se z polypeptidového řetězce obsahujícího 690 aminokyselinových zbytků o molární hmotnosti okolo 80 kDa. Ceruloplasmin zaujímá funkci přenašeče mědi a byl detekován v mléce, kolostru a krevním séru. β_2 -mikroglobulin, známý jako laktollin, je součástí komplexu tkáňové snášenlivosti. [27, 28, 29]

S vývojem dalších sensitivních analytických metod jsou identifikovány stále nové proteiny a jsou řazeny právě do skupiny minoritních proteinů.

2.2 Biologická role mléčných proteinů

Mléko je jediným zdrojem proteinů pro sající mláďata. Mléčné proteiny tvoří heterogenní skupinu sloučenin s širokým okruhem molekulárních struktur a vlastností. Hrají mnoho důležitých biologických rolí, které zatím nebyly určeny.

Kaseiny mají uvolněnou strukturu kvůli vysokému poměru prolinu, proto jsou vnímavé k hydrolýze zažívacími enzymy. Shlukují se při vysoké koncentraci vápníku a fosforu, proto trávení kaseinu uvolňuje významné množství jednotlivých minerálů, které se následně stanou dostupnými pro mláďata.

α -laktalbumin je důležitý pro vznik laktosy. Podle osmoregulační teorie produkce mléka závisí jeho obsah právě na přítomnosti laktosy.

Pro β -laktoglobulin nebyla dosud připsána žádná biologická role, ačkoli jde pravděpodobně o retinol-vázající protein a může být zapojený do aktivace lipas.

Serum albumin a různé imunoglobuliny jsou zapojeny do ochrany proti infekci a poskytují pasivní imunitu.

Proteiny přenášející železo (laktoferrin a transferrin) a proteiny přenášející foláty a měď slouží jako zdroj esenciálních prostetických skupin pro kojence. [30]

2.3 Vlivy působící na obsah proteinů v mléce

Velké variace v koncentraci a reaktivních proporcích proteinů mléka mohou přispívat k různorodosti ve vlastnostech a funkcích proteinových komponent. Absolutní koncentrace proteinů se mění od 1 % u lidského do 24 % u zaječímho mléka a poměr mezi kaseinem a syrovátkovými bílkovinami se pohybuje v rozmezí 0,25 : 1 v lidském mléce po 6,3 : 1 v mléce kozím. Obsah a složení proteinů se velice liší v závislosti na genetické vybavenosti, výživě a krmení, sezónních vlivech, plemeni, průběhu laktace, zdravotním stavu a individualitě zvířete.

Genetická vybavenost má vliv na obsah jednotlivých složek. Vysoké koeficienty dědičnosti pro obsah bílkovin, obsah tuku a produkci bílkovin za laktaci umožňuje účinnou selekci zvyšování obsahu mléčných složek podpořenou rovněž úzkým vztahem mezi obsahem tuku a obsahem bílkovin.

Vliv výživy a krmení dojníc na kvalitu mléčné bílkoviny je dán proporcionalním zastoupením všech dusíkatých látek v mléce, přičemž nejvíce žádaný je obsah kaseinu. Z hlediska výživy dojníc je důležitá energetická složka krmné dávky a poměr obsahu energie a dusíkatých látek. Optimální poměr krmné dávky zaručuje největší obsah bílkovin v mléce

i vysokou doživost, a to zejména v prvním stadiu laktace. Krmení ovlivňuje také obsah močoviny v mléce.

Sezónní vlivy často souvisí se složením krmné dávky. Při pastvě roste podíl kaseinu a α -laktalbuminu a nepatrně se snižuje množství nebílkovinných dusíkatých látek. Obecně platí, že obsah bílkovin v létě klesá, nejstabilnější obsah bílkovin je v zimních měsících tzn. v prosinci, lednu a únoru.

Tabulka 2: Obsah proteinů u různých plemen krav [%]

Kravské plemeno	Obsah proteinů [%]
Holstein	3,42
Ayrshir	3,58
Persey	3,86
Gubernské	4,02

Mléčné složky mají na začátku i na konci **laktace** odlišné složení i vlastnosti, proto by se nemělo míchat mlezivo a mléko na konci laktace. Obsah bílkovin je zpravidla nižší na vrcholu laktace tzn. ve 2. a 3. měsíci. Ke konci laktace dochází k poklesu dojivosti a nárůstu obsahu bílkovin v mléce.

Zdravotní stav je pro obsah složek mléka důležitým faktorem. Narušení fyziologických funkcí organismu dojnice způsobuje zhoršenou jakost mléka. Výsledkem je, že dochází k vzestupu hladiny sérových bílkovin a také nebílkovinných dusíkatých látek. [31, 32, 33]

2.4 Frakcionace a izolace mléčných proteinů

Směs proteinů v mléce může být separována a charakterizována pomocí různých fyzikálně-chemických metod. Metody jsou založeny na různé rozpustnosti a na srážení kaseinu, přesto prakticky neexistuje přesná metoda na jednoduchou frakcionaci kaseinu, protože i některé nekaseinové proteiny se mohou za určitých podmínek srážet a tím způsobit chybu v měření.

V roce 1938 byla objevena chemická metoda pro kvantitativní distribuci proteinů v mléce, která byla schopná rozdělit proteiny na kaseiny, globuliny, laktalbumin a proteoso-peptony. Jako základ pro separaci byl použit poměr sedimentace proteinů z mléka po dialýze proti fosfátovému pufru.

Jednotlivé kaseiny mohou být získány přidavkem 6-ti $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku močoviny a přidavkem vody k oddělení jednotlivých komponent. α -kaseinový komplex je nerozpustný v 4,5 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ močoviny při pH 4,6 - 4,8 a β -kasein je rozpustný v močoviny o koncentraci 3,3 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, ale nerozpustný při koncentraci 1,7 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Frakcionace s použitím močoviny ale není průkazná, protože některé κ -kaseinové frakce zůstávají v roztoku močoviny s β -kaseinem.

Jiná metoda je založena na přidavku 6,6 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku močoviny a 3,5 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku kyseliny sírové. Roztok je smíchán s vodou a složky bohaté na α_{s1} -kasein se sráží rychle a složky s β -kaseinem se sráží pomalu. Supernatant je potom bohatý zdroj κ -kaseinu. Nekaseinové komponenty získané z proteinové frakce mohou být odděleny elektroforézou.

Ve většině případů se nezíská finální produkt o vysoké čistotě. Proto jsou důležité další frakcionační a izolační kroky zahrnující různé typy elektroforézy a chromatografie, které jsou nezbytné k dosažení požadované čistoty. Použitím elektroforetických metod

se získají čisté bílkoviny jen v analytickém množství. Značně větší kvantita čistých bílkovin je získána pomocí chromatografických metod. [34]

2.4.1 Zónová elektroforéza

Proteiny v mléce mají široký okruh izoelektrických bodů a molárních hmotností. Na základě rozdílných molárních hmotností jsou rozděleny elektroforetickými procedurami, které mohou být adaptovány na frakcionaci a izolaci proteinů v mikrogramových nebo nanogramových množstvích. Pro elektroforézu mléčných bílkovin je používán filtrační papír, celulosový acetát, škrob, agarosa a polyakrylamidový gel. Koncentrace akrylamidu a síťovacích činidel může být měněna pro přípravu gelu s různou velikostí pórů ke zvětšení separace založené na molární hmotnosti. Denaturační prvky, jako je dodecylsulfát sodný a močovina mohou být v gelu obsaženy pro zrychlení reakce stejně jako redukující prvky, např. merkaptoethanol a dithiothreitol. [35]

2.4.2 Chromatografie mléčných proteinů

Pro frakcionaci a izolaci mléčných proteinů byly vyvinuty různé typy chromatografie založené na výměně elektronů, odlišné molekulové hmotnosti anebo hydrofobní interakci.

Chromatografie založená na gelové filtraci byla použita na frakcionaci a izolaci proteinů z mléka, kaseinu anebo celé proteinové frakce. Princip je založen na rozdílné kapacitě proteinů v závislosti na jejich molekulární hmotnosti, protože na tomto principu pronikají do pórů gelu stacionární fáze. Velké molekuly jsou vyjmuty z gelu a rychle vymývány. Gelová permeační chromatografie není pro frakcionaci proteinů mléka vhodná, protože odejmutím vápníku dochází k disociaci micel do velkých polydisperzních agregátů a může dojít ke změně vlastností kaseinů a tím ke znemožnění měření. V přítomnosti močoviny a redukujících látek kasein disociuje na monomerní formy dosahující molární hmotnosti od 15 do 25 kDa, které jsou příliš uzavřené pro efektivní separaci.

Syrovátkové bílkoviny jsou úspěšně frakcionovány pomocí filtrační chromatografie. Při použití kolony Superose 12 jsou frakce úspěšně rozděleny v pořadí imunoglobuliny, serum albumin, β -laktoglobulin a α -laktalbumin. [35]

Iontovyměnná chromatografie je v dnešní době nejvíce využívaná pro frakcionaci mléčných bílkovin. Metoda je založena na vazbě směsi elektricky nabitých proteinů

na matici a eluci komponent s rostoucí koncentrací solí. Přítomnost močoviny a redukujících činidel jako jsou 2-merkapt ethanol nebo dithiothreitol je nezbytná pro efektivní frakcionaci kaseinů. [36]

Frakcionace jednotlivých kaseinů může být získána použitím diethylaminoethylcelulosové kolony (DEAE-celulosa) a elucí NaCl při pH 8,6 a přidavku 6-ti mol·l⁻¹ močoviny. DEAE-celulosa chromatografie poskytuje separaci syrovátkových bílkovin s rozdělením na α -laktalbumin, β -laktoglobulin, serum albuminy a imunoglobuliny. Množství proteinu, který může být frakcionován na koloně je relativně malý ($\mu\text{g} / \text{mg}$), a závisí na velikosti kolony. Při stanovení dochází k rozpuštění syrovátkových bílkovin v roztoku močoviny o různé koncentraci při pH 7,4 a následnému rozdělení jednotlivých frakcí přidavkem NaCl a poslední fází je filtrace. [37]

Další možností frakcionace mléčných proteinů je využití vysokoúčinné kapalinové separace s použitím DEAR-15 HR iontově-výměnné chromatografie s gradientem NaCl při pH 7,0.

Použití HPLC s reverzní fází (RP-HPLC) a hydrofobními interakcemi (HI-HPLC) závisí na hydrofobní interakci mezi stacionární fází a proteiny. U RP-HPLC absorpce probíhá ve vodném roztoku nízké iontové aktivity a vymývání je dosaženo snížením hydrofobity mobilní fáze. U HI-HPLC je adsorpce proteinů provedena ve vodném roztoku vysokou iontovou aktivitou a eluce je provedena redukcí iontové síly mobilní fáze. Syrovátkové proteiny a kaseiny mohou být refraktovány pomocí hydrofobní interakce kolony.

Studie se zabývaly frakcionací kaseinu s použitím RP-HPLC, kdy je kasein rozpuštěn při pH 7,0 v pufru obsahujícím močovinu, redukován a nastříknut do kolony. Komponenty jsou eluovány interakcí různých koncentrací acetonitrilu.

Metody separace byly použity nejen na frakcionaci kaseinů a syrovátkových bílkovin mléka, ale také k izolaci minoritních mléčných proteinů včetně enzymů, lipidových globulárních membránových proteinů a ostatních rozmanitých proteinů obsažených v potravinách. [36, 38]

3 ZMĚNY A VLASTNOSTI SUŠENÉHO MLÉKA

3.1 Nežádoucí změny během sušení

Při sušení mohou být nutričně hodnotné látky potravin vystaveny čtyřem nežádoucím změnám:

1. odstranění koloidně vázané vody sníží bobtnací, popřípadě rozpouštěcí (instantivní) schopnost sušené látky. Bobtnací schopnost zůstává v podstatě zachována, odstraní-li se pouze voda volná. V praxi tento požadavek nelze splnit, protože pouhým odstraněním volné vody se nedosáhne dostatečného konzervačního účinku osmotického tlaku,
 2. sušení potravin při vyšších teplotách podporuje rychlost oxidačních reakcí, což se projeví ztrátou vitamínu C a jiných redukčních látek,
 3. dochází k neenzymatickému hnědnutí vlivem Maillardovy reakce. Vznikají temně zbarvené, hořké melanoidy, jejichž vznik podporuje velká koncentrace sušiny. Tvoří se především při dosušování nebo až při skladování sušených potravin. Maillardova reakce způsobuje změnu barvy, chuti a zhoršuje rozpouštěcí schopnost, a to zvláště u potravin sušených sprejovým sušením,
 4. za vysokých teplot vzniká nebezpečí zhoršení chuti i barvy vlivem karamelizace cukrů.
- [40]

3.2 Fyzikální a funkční vlastnosti sušeného mléka

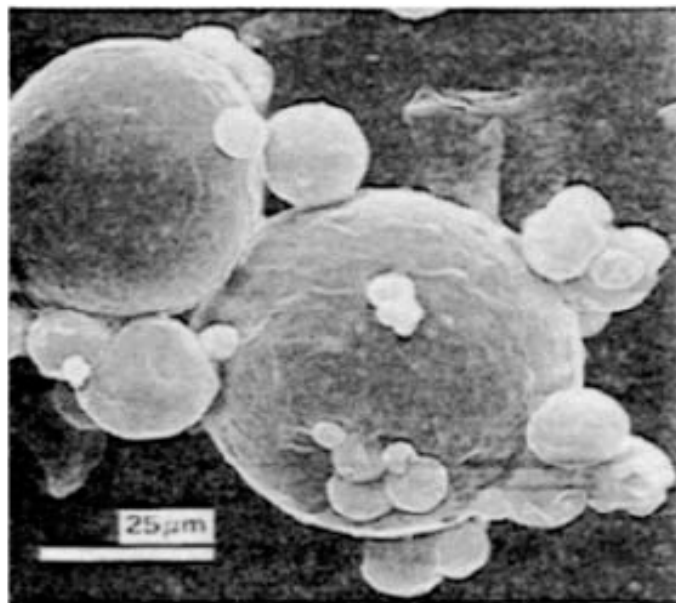
Vlastnosti sušeného mléka jsou kategorizovány jako fyzikální, funkční, biochemické, mikrobiologické a sensorické. Mezi jednotlivými vlastnostmi je významný vztah, který ovlivňuje konečnou kvalitu sušeného produktu. Fyzikální a funkční vlastnosti jsou velmi důležité, pokud je vyrobený prášek připravovaný pro následnou rekombinaci nebo pro další průmyslové zpracování. Při použití sušeného mléka jako potravinové přísady může být prášek náchylný ke změnám barvy, dostupný cizím pachům, přístupný hydrataci, tvorbě disperse a rozpustnosti ve vodě.

Hlavními vlastnostmi, které určují kvalitu mléčného prášku, a které ji mohou nejvíce ovlivňovat jsou struktura prášku, rozpustnost, obsah vody, složky popela a tekutost.

3.2.1 Struktura prášku

Struktura prášku je nejvíce ovlivněna technologií sušení. Prášek vyrobený na válcové sušárně má komponentní strukturu nehomogenního tvaru a není zde uzavřen žádný vzduch. Válcově vyrobené složky mléka mají nízkou objemovou hustotu ($0,3 - 0,5 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$) právě kvůli nehomogenní struktuře.

Částice sprejově sušeného mléka jsou kulovité o průměru 10-250 μm , obsahují uzavřený vzduch a to buď velké centrální vakuoly nebo menší vakuoly, které jsou distribuovány přes interiér složek. Povrch sprejově sušeného mléka je obvykle hladký, ale může být i vrásčitý. Přítomnost složek s diferencovanou morfologií ve stejném vzorku je připsaná různým podmínkám sušení. [41]



Obrázek 2: Struktura prášku sprejově sušeného mléka



Obrázek 3: Struktura prášku válcově sušeného mléka

3.2.2 Tekutost

Tekutost je schopnost prášku téct volně jako písek, bez tvorby hrudek a shluků. Je měřena jako čas v sekundách, který prášek potřebuje k tomu, aby se jednotlivá zrníčka dostala přes štěrbinu rotačního bubnu. Hrudky, které se mohou v mléce tvořit, jsou důsledkem nekompletně vykrytalizované laktosy. Při normálních podmínkách je laktosa v mléce ve formě monohydrátových krystalů a zbytek je amorfní. Pokud není produkt hermeticky uzavřen, amorfní laktosa absorbuje vodu z atmosféry a formuje se do monohydrátových krystalů. Krystalizace následně způsobuje hrudkovatění. Tekutost ovlivňuje velikost, tvar, hustota a elektrický náboj. Velké částice tečou mnohem snadněji než drobné. Tekutost může být zlepšena přidáním různých aditiv, pohlcovačů vlhkosti jako je silikagel, fosfát vápenatý a další.

3.2.3 Složky popela

Popeloviny jsou v sušeném mléce tvořeny přehřátými nebo spálenými částicemi. Jejich barva se pohybuje od lehce hnědé po černou. Popeloviny obvykle vznikají z mléčné hmoty

v tuhé fázi, která byla držena déle v evaporátoru a sušena, čímž došlo k přehřátí nebo spálení.

Sušení je vždy doprovázeno Maillardovou reakcí. Částečná barevná změna závisí na aplikovaných procesech, sušících parametrech a skladování.

3.2.4 Rozpustnost

Rozpustnost je jednou z vlastností sušeného mléka popisující kvalitu standardů. Snížená rozpustnost je vážným defektem, který může vést až k zamítnutí produktu nákupčím. Důvodem snížení rozpustnosti sušeného mléka je denaturace proteinů. Řádné tepelné ošetření zlepšuje stabilitu konečného obnoveného produktu. Hlavním faktorem ovlivňujícím rozpustnost je rovnováha iontů, pH a přídavek soli při výrobě sušeného mléka.

3.2.5 Absorpce vody

Schopnost vázat a udržet vodu je velmi sledovanou vlastností všech sušených produktů. Absorpce vody sušeného mléka je ovlivněna sušícími procesy během výroby, vhodným balením a skladováním výrobku. Z fyzikálních funkcí je to zastoupení jednotlivých proteinů, pH, obsah solí, iontová síla a teplota. I další funkce jako viskozita, schopnost tvorby gelu a pěny jsou závislé na interakci voda – protein. [42, 43, 44]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem praktické části diplomové práce bylo posoudit změny proteinů v sušeném plnotučném mléce při různých podmínkách skladování. Změny proteinů byly sledovány jako dusík nedenaturovaných syrovátkových proteinů v sušeném mléce (WPNI index), index rozpustnosti, tepelně-aktivované –SH skupiny, jednotlivé aminokyseliny a využitelný lysin. Jednotlivé proteiny byly rovněž separovány elektroforézou (SDS-PAGE).

5 METODIKA PRÁCE

5.1 Analyzované vzorky

Pro analýzu byly použity vzorky plnotučného válcově sušené mléko firmy YOG s.r.o., Bojkovice. Mléko s obsahem tuku 3,5 % (w/w) bylo pasterováno při 90 °C po dobu 5 sekund. Po pasteraci bylo mléko zahuštěno na 34 % sušiny na vakuové odparce a následně válcově sušeno při 120 – 130 °C za atmosférického tlaku.

Tabulka 3: Charakteristika vzorků

Sklad. pokus	WPNI index [mg·g ⁻¹ prášku]	Index rozpustnosti [ml neroz.pod.]	- SH skupiny [absorbance]	Obsah vody [% (w/w)]	Obsah tuku [% (w/w)]
I	3,493±0,001	1,050±0,001	0,141±0,020	1,720±0,002	25,7
II	2,900±0,001	1,838±0,001	0,269±0,016	3,276±0,002	24,46

Tabulka 4: Podmínky skladování

Vzorek	Podmínky skladování
A	Teplota 20°C, suché místo, bez přístupu světla
B	teplota 37 °C, relativní vlhkost 23 %, bez přístupu světla
C	teplota 37 °C, relativní vlhkost 43 %, bez přístupu světla
D	vystaven slunečnímu záření
E	Teplota 20°C, suché místo, bez přístupu světla
F	teplota 20 °C, relativní vlhkost 23 %, bez přístupu světla
G	teplota 20 °C, relativní vlhkost 43 %, bez přístupu světla
H	vystaven slunečnímu záření

Relativní vlhkost 23 % byla vytvořena v exsikátoru použitím nasyceného roztoku octanu draselného a vlhkost 43 % byla dosažena nasyceným roztokem uhličitanu draselného.

Skladovací pokus označen I trval 67 dní a skladovací pokus s označením II měl délku 91 dní. Parametry vzorků byly sledovány v intervalu doby 14 dní. Všechny vzorky byly analyzovány za stejných podmínek a stanovení bylo provedeno vždy šestkrát vedle sebe.

Aminokyseliny byly analyzovány po uplynutí doby 30 dní. Delší časový interval byl zvolen vzhledem k málo výrazným změnám v obsahu jednotlivých aminokyselin. Ve stejných časových intervalech bylo provedeno i elektroforetické dělení proteinových frakcí.

5.2 Použité přístroje, zařízení a chemikálie

Analýzy probíhaly v laboratořích Ústavu technologie a mikrobiologie potravin a Ústavu biochemie a analýzy potravin na Fakultě technologické Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně. Všechny použité chemikálie byly v čistotě pro analýzu (p.a.)

5.2.1 Přístroje

- analytické váhy (ADAM, AFA-210 LC),
- předvážky (Kern, SRN),
- temperovaná vodní lázeň (Memmert, SRN),
- sušárna (Venticell, BMT),
- elektrický vařič (ETA),
- centrifuga (Guber Centrifuge, Nova Safety 3670),
- spektrofotometr (Libra S6),
- Tillmans-Stroheckerovy zkumavky,
- termoblok (Labicom, Olomouc),
- aminokyselinový analyzátor AAA 400 (Ingos, Praha),
- pipety – 1 ml, 5 ml, 20 ml, 50 ml,
- Erlenmeyerovy baňky,
- exsikátor,
- hliníková vysoušečka,
- Ependorfova zkumavka,
- suchý blokový termostat (Bio TDB-100),
- aparatura na SDS-PAGE,

- centrifuga Hermle Z300K.

5.2.2 Chemikálie

5.2.2.1 Stanovení WPNI indexu

- chlorid sodný (Lachema, Brno),
- kyselina chlorovodíková 10 g / 100 ml,
- destilovaná voda.

5.2.2.2 Stanovení –SH skupin

- síran amonný (Lachema, Brno),
- roztok DTNB (39,37 mg 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoová kyselina) v 10 ml 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,0),
- fosfátový pufr o pH 6,7 (50 ml 0,1M dihydrogenfosforečnanu draselného, 17,74 ml 0,1M NaOH, doplnění destilovanou vodou do 100 ml),
- fosfátový pufr o pH 7,0 (50 ml 0,1M dihydrogenfosforečnanu draselného, 29,54 ml 0,1M NaOH, doplnění destilovanou vodou do 100 ml),
- fosfátový pufr o pH 8,0 (50 ml 0,1M dihydrogenfosforečnanu draselného, 46,85 ml 0,1M NaOH doplnění destilovanou vodou do 100 ml),
- destilovaná voda.

5.2.2.3 Stanovení aminokyselin

- pufr o pH 2,2 - 14 g kyseliny citrónové, 11,50 g NaCl, 5,00 ml TDG,
- pufr A – 11,11 g monohydrát kyseliny sírové, 4,04 g dihydrát citrát sodný, 9,09 g chlorid sodný, 0,10 g azid sodný, 2,50 ml thiodiglykol,
- pufr B - 10,00 g monohydrát kyseliny sírové, 5,60 g dihydrát citrát sodný, 9,29 g chlorid sodný, 0,10 g azid sodný, 2,50 ml thiodiglykol,
- pufr C – 7,53 g monohydrát kyseliny sírové, 9,06 g dihydrát citrát sodný, 18,00 g

chlorid sodný, 0,10 g azid sodný, 2,50 ml thiodiglykol,

- pufr D - 9,06 g dihydrát citrát sodný, 52,60 g chlorid sodný, 0,10 g azid sodný, 2,05 g kyseliny borité, 0,50 g hydroxidu sodného,
- 6 M kyselina chlorovodíková (Lachema, Brno),
- oxidační směs – kyselina mravenčí : peroxid vodíku 9 : 1, 0,1 M kyselina chlorovodíková.

5.2.2.4 SDS-PAGE

- 2-merkaptóetanol (SERVA Elektrophoresis GmbH),
- 20% SDS gel – akrylamid, N, N'-metylen-bisakrylamid, deionizovaná voda,
- 15% separační gel – 30% roztok akrylamidu, Tris pufr o pH 8,8, deionizovaná voda, 10% SDS, 10% persíran amonný, TEMED, (N, N, N',N'- tetra-methylendiamin),
- 5% koncentrační gel – 30% roztok akrylamidu, Tris pufr o pH 6,8 deionizovaná voda, 10% SDS, 10% persíran amonný, TEMED,
- vzorkový pufr – 0,062 M Tris-HCl, 5% merkaptóetanol, 10% glycerol, bromfenolová modř,
- fixační roztok – 10% kyselina trichloroctová (10 ml kyseliny, 90 ml destilované vody),
- barvicí roztok – 0,25% Coomassie Blue R-250, 50% (v/v) metanol, 10% (v/v) kyselina octová,
- odbarvovací roztok – 25% (v/v) metanol, 10% (v/v) kyselina octová.

5.2.2.5 Stanovení využitelného lysinu

- 8% hydrogenuhličitan draselný (Penta, Chrudim),
- 3% FNDB v etanolu (1-flouoro-2,4-dinitrobenzen),
- reagenty ionto-výměnné chromatografie.

5.3 Metodiky stanovení

5.3.1 WPNI index

WPNI index určuje míru tepelné degradace syrovátkových proteinů.

Tabulka 5: Klasifikace tepelné degradace proteinů [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ prášku]

Klasifikace	WPNI [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ prášku]
high heat powder	$\leq 1,5$
Medium heat powder	1,51 – 5,99
low heat powder	$\geq 6,0$

Kasein a ostatní tepelně denaturované syrovátkové proteiny jsou odstraněny filtrací po vysrážení obnoveného mléka NaCl. Filtrát obsahuje všechny nedenaturované syrovátkové proteiny, které jsou po přidavku HCl schopny denaturovat a vyvinout zákal v závislosti na koncentraci. Intenzita zákalu je měřena spektrofotometricky při vlnové délce 420 nm. Výsledky jsou vyjádřeny přímo jako mg dusíku nedenaturovaných mléčných proteinů v 1 g sušeného mléka ($\text{mg WPN}\cdot\text{g}^{-1}$).

2 g sušeného mléka byly obnoveny ve 20-ti ml destilované vody a bylo přidáno 8 g NaCl. Vzorek sušeného mléka byl inkubován na vodní lázni při teplotě $34\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 30 minut, přičemž prvních 15 minut byl roztok promícháván. Po inkubaci byla provedena filtrace a odebráno 5 ml čirého filtrátu do 100 ml odměrné baňky. K filtrátu bylo přidáno 50 ml nasyceného roztoku NaCl a takto připravený vzorek byl použit jako slepý pokus pro nastavení hodnoty transmitance na 100 % při vlnové délce 420 nm. Do odměrné baňky se vzorkem a NaCl bylo přidáno několik kapek HCl (10 g / 100 ml) a byla změřena transmitance.

Hodnota WPNI se vypočítá z následujícího vzorce:

$$WPNI = \frac{(100 + (T \cdot x + 3,16 \cdot T)) \cdot B}{100} \quad (1)$$

kde

T...transmittance [%]

x...obsah vody [% w/w]

B...obsah bílkovin [% (g/100g)]

[45]

5.3.2 Index rozpustnosti

Index rozpustnosti je objem nerozpustného podílu zkoušeného sušeného mléka. Množství nerozpustného podílu v ml bylo odečteno přímo na stupnici v dolní části kalibrované zkumavky.

13 g plnotučného mléka bylo obnoveno v 90-ti ml destilované vody o teplotě 50 °C. Teplota obnoveného mléka byla udržována po dobu 5-ti minut na vodní lázni a poté byl vzorek ochlazen na 20 °C. Z ochlazeného vzorku bylo odebráno 10 ml do Tillmans-Stroheckerovy zkumavky a po doplnění destilovanou vodou po rysku byl vzorek centrifugován po dobu 15 minut při 1200 ot·min⁻¹. [46]

5.3.3 Stanovení tepelně-aktivovaných sulfhydrylových skupin sušeného mléka

Metoda je založena na sledování míry žlutého zbarvení ve vzorcích a na následném srovnání se speciálně připraveným standardem se známou koncentrací volných -SH skupin. Výsledky jsou uvedeny jako hodnota absorbance.

K 5-ti ml obnoveného mléka byl přidán 0,1 ml roztoku DTNB, 1 ml 0,1 M fosfátového pufru o pH 8,0; 4 ml destilované vody a 2 g síranu amonného. Takto připravený vzorek byl řádně promíchán a zfiltrován. Ve filtrátu byla měřena absorbance při 412 nm.

Slepý pokus byl připraven stejně pouze 5 ml obnoveného mléka bylo nahrazeno 5-ti ml fosfátového pufru o pH 6,7. [47]

5.3.4 Obsah vody

Obsah vody se stanoví sušením při teplotě 87 ± 2 °C po dobu 6-ti hodin, čímž nedochází k porušení organických látek.

Do předsušené a zvážené hliníkové vysoušečky byly naváženy 3 g vzorku s přesností na 0,0001 g a byly sušeny po dobu 6-ti hodin při teplotě 87 ± 2 °C. Po dosažení konstantního úbytku hmotnosti byl vzorek zchlazen v exsikátoru a zvážen.

Obsah vody se vypočítá ze vzorce:

$$x = \frac{a \cdot 100}{n} \quad (2)$$

kde

a...úbytek na váze sušením [g]

n...navážka vzorku [g]

[48]

5.3.5 Stanovení aminokyselin

Vlastnímu stanovení aminokyselin předcházela hydrolyza vzorku, která byla provedena následovně: Do 200 ml vialky bylo naváženo 50 mg sušeného mléka s přesností na 0,0001 g

a přidáno 15 ml 6 M HCl. Takto připravená vialka byla vyfouknutá argonem, umístěna do termobloku a zahřívána na teplotu 110 °C \pm 1 °C po dobu 24 hodin. Po hydrolyze byl vzorek vychlazen na teplotu 20 °C, zfiltrován a odpařen na vakuové rotační odparce. Pro stanovení sirných aminokyselin byla nejprve provedena oxidace za použití směsi HCOOH : H₂O₂ (9 : 1) následována otevřenou hydrolyzou na olejové lázni při teplotě 110 °C \pm 1 °C po dobu 24 hodin. Po hydrolyze byly vzorky zfiltrovány do 250 ml odměrné baňky a doplněny 0,1 M HCl. Odpařováno bylo 25 ml na rotační vakuové odparce, odparek byl dvakrát promyt destilovanou vodou a kvantitativně převeden do 25 ml odměrné baňky a doplněn pufrům o pH 2,2.

Aminokyseliny byly analyzovány pomocí ionto-výměnné chromatografie. 100 μ l hydrolyzovaného extraktu bylo nastříknuto do aminokyselinového analyzátoru AAA400. K separaci aminokyselin došlo iontově-výměnnou chromatografií s použitím kolony 370 mm x 3,7 mm, a po následné ninydrinové reakci byl vzorek spektrofotometricky detekován při 440 nm pro prolin a 570 nm pro ostatní aminokyseliny. Aminokyseliny byly eluovány pufrům A po dobu 0 - 5 minut, pufrům B 5 - 32 minut, pufrům C 32 - 44 minut a pufrům D 44 - 75 minut. Teplota na koloně byla udržována

prvních 60 minut na hodnotě 60 °C, v době 90 – 102 minut byla nastavena na 74 °C. Retenční čas jednotlivých aminokyselin byl 0,3 ml·ml⁻¹. [49]

5.3.6 Elektroforéza proteinů (SDS-PAGE)

SDS-PAGE je separační metoda ke stanovení proteinů na základě odlišné molekulové hmotnosti, při které se uplatňuje elektrické pole.

Z obnoveného a centrifugovaného (3000 x g po dobu 30 minut) vzorku mléka bylo odpipetováno 250 µl do ependorfové zkumavky, přidáno 25 µl 2-merkaptoetanolu, 50 µl 20% SDS a 175 µl vzorkového pufru. Promíchaný vzorek byl povařen při teplotě 100 °C po dobu 10 minut na suchém blokovém termostatu. Z takto připraveného vzorku bylo nanášeno 20 µl do předem připraveného gelu. Gel pro elektroforézu byl sestaven z 15% separačního a 5% koncentračního gelu. Po doputování čela elektroforézy ke spodní hranici separačního gelu byl proces ukončen, koncentrační gel byl odstraněn a separační byl zpevněn fixačním roztokem a následně obarven.

Gel byl vyhodnocen požitím programu Ultra Quant 6.0 a výsledky jsou prezentovány jako dendrogramy. [50, 51]

5.3.7 Stanovení využitelného lysinu

K 0,1 g sušeného mléka by přidán 1 ml 8% (w/v) hydrogenuhličitanu sodného. Vzorek byl řádně promíchán a poté nechán 10 minut stát, načež bylo přidáno 1,5 ml 3% FNDB (v/v) rozpuštěného v etanolu. Po zazátkování byl vzorek třepán při pokojové teplotě 2 hodiny a na vodní lázni byl ze vzorku odpařen etanol. Po ochlazení následovala hydrolýza a stanovení lysinu na AAA400 analyzátoru stejným postupem jako při stanovení aminokyselin. [49]

6 VÝSLEDKY A DISKUSE

Výsledky jsou uváděny jako aritmetický průměr ze šesti provedených analýz. Odhad vzniklých nahodilých chyb během měření je uveden jako směrodatná odchylka za výsledkem (průměr \pm S. D.). Výpočet výsledků byl proveden pomocí zadaných funkcí a vzorců programu Microsoft Office Excel 2003.

Tabulka 6: Výsledky stanovení WPNI indexu I. skladovacího pokusu [$\text{mg WPN}\cdot\text{g}^{-1}$]

Vzo- rek/skladování	A	B	C	D
0 dní	1,720 \pm 0,001	1,720 \pm 0,001	1,720 \pm 0,001	1,720 \pm 0,001
14 dní	2,415 \pm 0,003	2,135 \pm 0,005	3,842 \pm 0,050	3,255 \pm 0,006
27 dní	2,250 \pm 0,002	2,711 \pm 0,003	4,525 \pm 0,003	2,998 \pm 0,001
41 dní	3,574 \pm 0,050	3,255 \pm 0,001	4,385 \pm 0,006	4,424 \pm 0,004
67 dní	3,992 \pm 0,001	4,917 \pm 0,006	4,888 \pm 0,001	4,521 \pm 0,003

Tabulka 7: Výsledky stanovení WPNI indexu II. skladovacího pokusu [$\text{mg WPN}\cdot\text{g}^{-1}$]

Vzo- rek/skladování	E	F	G	H
0 dní	2,900 \pm 0,001	2,900 \pm 0,001	2,900 \pm 0,001	2,900 \pm 0,001
14 dní	2,250 \pm 0,022	3,830 \pm 0,050	4,950 \pm 0,005	2,740 \pm 0,004
27 dní	3,170 \pm 0,050	4,470 \pm 0,003	4,430 \pm 0,001	4,130 \pm 0,005
41 dní	3,460 \pm 0,005	4,750 \pm 0,001	4,460 \pm 0,002	4,290 \pm 0,020
67 dní	3,580 \pm 0,040	4,920 \pm 0,005	4,950 \pm 0,006	4,380 \pm 0,006
83 dní	4,030 \pm 0,007	5,160 \pm 0,008	5,300 \pm 0,006	4,590 \pm 0,007
97 dní	4,300 \pm 0,023	5,480 \pm 0,014	5,560 \pm 0,005	4,780 \pm 0,008

Hodnoty WPNI pro relativní vlhkosti 23 % a 43 % jsou po 67 dnech skladování na stejné úrovni a je tedy možno vyvodit závěr, že relativní vlhkost nemá při dlouhodobějším skladování vliv na změnu WPNI. Vliv vlhkosti se projevil v prvních dnech skladování, kdy jsou patrné výrazné změny WPNI při relativní vlhkosti 43 %. První skladovací pokus probíhal při teplotě 37 °C a druhý při teplotě 20 °C. Jak je patrné z tabulek 6 a 7, není vliv teploty skladování výrazný.

Prezentovaná data mohou vést k závěru, že významnější vliv na hodnoty WPNI, kromě výrobních podmínek, má především obsah tuku a dalším spolupůsobícím faktorem je délka skladování. Podmínky, za kterých jsou vzorky uskladněny, nemají výrazný vliv na hodnoty WPNI.

Tabulka 8: Výsledky stanovení indexu rozpustnosti I. pokusu [ml nerozpustného podílu]

Vzo- rek/Skladování	A	B	C	D
0 dní	1,050±0,001	1,050±0,001	1,050±0,001	1,050±0,001
14 dní	1,300±0,001	1,300±0,001	1,100±0,002	1,200±0,002
27 dní	1,000±0,001	0,800±0,004	0,750±0,032	0,850±0,004
41 dní	1,650±0,015	2,100±0,001	1,750±0,035	2,000±0,001
67 dní	1,750±0,001	2,200±0,002	2,500±0,002	2,150±0,002

Tabulka 9: Výsledky stanovení indexu rozpustnosti II. pokusu [ml nerozpustného podílu]

Vzo- rek/Skladování	E	F	G	H
0 dní	1,838±0,001	1,838±0,001	1,838±0,001	1,838±0,001
14 dní	1,750±0,001	2,000±0,001	1,800±0,002	1,150±0,002
27 dní	2,000±0,001	1,800±0,003	2,500±0,001	1,800±0,008
41 dní	2,050±0,005	1,800±0,032	2,600±0,050	2,000±0,001
67 dní	2,300±0,008	2,000±0,004	3,000±0,004	2,500±0,004
83 dní	2,500±0,005	2,500±0,007	3,500±0,007	2,800±0,007
97 dní	2,700±0,007	2,700±0,004	3,800±0,004	3,000±0,004

Během skladování dochází ke zvyšování indexu rozpustnosti. Při skladování za vyšších teplot a relativních vlhkostí došlo ke snížení rozpustnosti po 27 dnech, zatímco při pokojové teplotě skladování je pokles ihned po 14 dnech. Pokles může být způsoben ustanovením rovnováhy v systému, přičemž dosažení rovnovážného stavu za vyšších teplot trvá delší dobu. Změny rozpustnosti mohou být způsobeny krystalizací amorfní laktosy, která velmi snadno absorbuje vlhkost. Za normální teploty je většina laktosy ve formě monohydrátu a proto je ustavení rovnováhy rychlejší. Zhoršení rozpustnosti vlivem působení relativní vlhkosti je výraznější. Během skladování za vyšších teplot došlo

také ke změně barvy prášku vlivem probíhajících Maillardových reakcí. Vznikající produkty mohly být rovněž faktorem, který se na zvyšujícím indexu rozpustnosti podílel.

Skladování při relativní vlhkosti 43 % má prokazatelný vliv na obsah nerozpustného podílu sušeného mléka a to bez ohledu na teplotu skladování.

Vzorky D a H, jež byly skladovány za přístupu světla, měly stejný trend změny rozpustnosti jako vzorky A a E. Dalo by se tedy říci, že sluneční záření nemá na index rozpustnosti vliv.

Změny rozpustnosti mohou být také do jisté míry ovlivněny obsahem tuku a to především tuku volného, který obaluje částice sušeného mléka a tím zhoršuje jejich rozpustnost. Výrazným faktorem, který ovlivňuje množství rozpustného podílu, je především použitá technologie sušení. Z prezentovaných dat v tabulkách 8 a 9 je patrné, že relativní vlhkost 43 % má výrazný vliv na zhoršení rozpustnosti, která je dále podporována dlouhodobým skladováním vzorku.

Tabulka 10 : Výsledky stanovení –SH skupin I. skladovacího pokusu [absorbance]

Vzo- rek/Skladování	A	B	C	D
0 dní	0,141±0,020	0,141±0,020	0,141±0,020	0,141±0,020
14 dní	1,177±0,091	1,572±0,0733	0,534±0,038	1,853±0,025
27 dní	0,268±0,178	0,218±0,055	0,262±0,113	0,655±0,062
41 dní	0,255±0,051	0,421±0,152	0,437±0,288	1,201±0,001
67 dní	0,635±0,041	0,747±0,076	1,265±0,056	1,160±0,0675

Tabulka 11: Výsledky stanovení –SH skupin II. skladovacího pokusu [absorbance]

Vzorek	E	F	G	H
0 dní	0,269±0,016	0,269±0,016	0,269±0,016	0,269±0,016
14 dní	0,349±0,003	0,722±0,001	0,333±0,005	1,634±0,001
27 dní	0,208±0,008	0,175±0,019	1,034±0,171	0,021±0,007
41 dní	0,132±0,003	0,573±0,091	0,986±0,461	0,106±0,001
67 dní	0,933±0,002	0,276±0,001	0,839±0,005	0,344±0,003
83 dní	0,391±0,016	0,373±0,002	0,704±0,002	0,611±0,013
97 dní	0,486±0,003	0,413±0,005	0,834±0,004	0,854±0,004

Studie uvedená v Journal of Dairy Science (2000), jež je součástí metodiky, prokázala, že do dosažení určité teploty dochází ke zvyšování aktivity – SH skupin a po dosažení teploty 90 °C aktivita klesá. Nicméně výsledky uvedené v předkládané práci tento trend nepotvrzují. Výsledky nejsou homogenní a nelze z nich vyvozovat žádné závěry. Válcově sušené mléko vypadá jako nevhodný substrát pro stanovení –SH skupin. Jelikož –SH skupiny souvisí s obsahem sirných aminokyselin a především methioninem a cysteinem, je lepší zaměřit se na stanovení jednotlivých aminokyselin.

Tabulka 12: Výsledky stanovení obsahu vody I. skladovacího pokusu [% (w/w)]

Vzo- rek/Skladování	A	B	C	D
0 dní	1,720±0,002	1,720±0,002	1,720±0,002	1,720±0,002
14 dní	2,468±0,010	2,010±0,021	4,119±0,004	3,197±0,001
27 dní	2,862±0,003	2,151±0,002	4,358±0,001	3,837±0,001
41 dní	3,222±0,001	3,378±0,013	5,104±0,002	4,248±0,004
67 dní	3,728±0,005	4,214±0,001	5,822±0,002	4,565±0,001

Tabulka 13: Výsledky stanovení obsahu vody II. skladovacího pokusu [% (w/w)]

Vzo- rek/Skladování	E	F	G	H
0 dní	3,276±0,002	3,276±0,002	3,276±0,002	3,276±0,002
14 dní	3,276±0,014	3,398±0,002	3,450±0,002	3,278±0,001
27 dní	3,381±0,025	3,401±0,002	3,613±0,005	3,384±0,015
41 dní	3,410±0,009	3,515±0,008	3,691±0,006	3,430±0,001
67 dní	3,487±0,009	3,594±0,005	3,739±0,004	3,505±0,001
83 dní	3,508±0,002	3,649±0,011	3,861±0,013	3,532±0,005
97 dní	3,617±0,014	3,784±0,021	4,011±0,008	3,690±0,007

V průběhu I. skladovacího pokusu došlo ke zvýšení obsahu vody. Stejný rostoucí trend obsahu vody ve vzorcích je patrný také z výsledků II. skladovacího pokusu. Během skladování při vyšší teplotě dochází k rychlejšímu nárůstu vlhkosti vzorků, která je navíc umocněna vlivem relativní vlhkosti prostředí. Při skladování za relativní

vlhkosti 43 % jsou změny obsahu vody velmi prudké, zatímco při nižších relativních vlhkostech nedochází k tak rapidní vazbě vody na částice mléčného prášku.

Výrazný vliv slunečního záření na obsah vody nebyl prokázán, jak je možno vidět z tabulek 12 a 13.

Za hlavní faktor, který ovlivňuje obsah vlhkosti v sušeném mléce, je možno bezesporu označit vlhkost okolního prostředí. Vlhkost prášku je také výrazně ovlivněna teplotou skladovacích prostor, kdy teplota pravděpodobně umožňuje lepší vaznost vody ze skladovaného prostředí. Se zvyšujícím se obsahem vody v sušeném mléce může dojít ke snadnějšímu plesnivění, lepšímu přístupu mikroorganismů, ke změnám barvy, chuti a ztrátě nutričních látek.

Tabulka 12: Výsledky stanovení jednotlivých aminokyselin I. skladovacího pokusu [$\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]

AMK [$\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]	0 dní			27 dní			67 dní		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Cys	2,409±0,017	2,774±0,066	2,543±0,088	2,774±0,066	2,769±0,101	2,543±0,088	2,763±0,055	2,688±0,041	2,465±0,067
Met	5,743±0,080	7,092±0,309	6,310±0,384	7,092±0,309	7,20±0,056	6,310±0,384	7,036±0,342	6,719±0,099	5,797±0,108
Asp	16,601±0,595	16,195±0,011	15,969±0,460	16,195±0,011	16,702±0,925	15,969±0,460	21,411±0,578	17,381±0,809	17,855±0,748
Thre	10,187±0,455	9,738±0,014	9,029±0,260	9,738±0,014	10,148±0,556	9,029±0,260	11,476±0,349	9,511±0,427	9,691±0,492
Ser	11,508±0,465	10,877±0,325	9,925±0,102	10,877±0,325	10,915±0,604	9,925±0,102	13,318±0,328	11,010±0,564	11,113±0,066
Glu	51,917±1,678	42,188±1,270	40,736±1,163	42,188±1,270	44,295±2,269	40,736±1,163	50,616±2,663	42,679±0,891	43,674±3,036
Prol	22,153±0,658	25,071±1,576	22,176±0,222	25,071±1,576	24,703±1,431	22,176±0,222	26,464±0,492	22,309±1,077	22,224±1,066
Gly	4,046±0,109	4,123±0,025	3,934±0,023	4,123±0,025	4,302±0,220	3,934±0,023	4,833±0,045	4,074±0,266	4,012±0,196
Ala	7,005±0,470	6,766±0,101	6,514±0,020	6,766±0,101	7,105±0,389	6,514±0,020	7,935±0,032	6,611±0,453	6,558±0,328
Val	13,358±0,487	14,248±0,036	13,418±0,046	14,248±0,036	14,736±0,761	13,418±0,046	16,015±0,250	13,460±0,790	13,260±0,378
Ile	11,043±0,264	11,217±0,008	10,750±0,022	11,217±0,008	11,657±0,573	10,750±0,022	12,512±0,197	10,679±0,607	10,453±0,558
Leu	20,296±0,616	20,497±0,082	19,527±0,201	20,497±0,082	21,166±1,032	19,527±0,201	23,282±0,147	19,746±1,141	19,410±0,854
Tyr	10,014±0,329	10,637±0,087	9,848±0,044	10,637±0,087	10,766±0,667	9,848±0,044	11,508±0,142	10,583±0,626	9,720±0,509
Phe	10,399±0,435	10,500±0,040	10,142±0,144	10,500±0,040	10,775±0,547	10,142±0,144	11,719±0,135	9,935±0,607	9,997±0,0487
His	5,765±0,136	5,787±0,045	5,093±0,117	5,787±0,045	5,977±0,271	5,093±0,117	6,850±0,133	5,778±0,337	5,259±0,248
Lys	14,438±0,434	14,661±0,039	11,981±0,097	14,661±0,039	15,048±0,633	11,981±0,097	18,411±0,141	15,258±1,021	11,110±0,457
Arg	8,917±0,570	6,169±0,031	7,138±0,540	6,169±0,031	7,758±0,154	7,138±0,540	9,687±0,116	8,173±0,454	7,149±0,359

Tabulka 13: Výsledky stanovení jednotlivých aminokyselin II. pokusu [$\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]

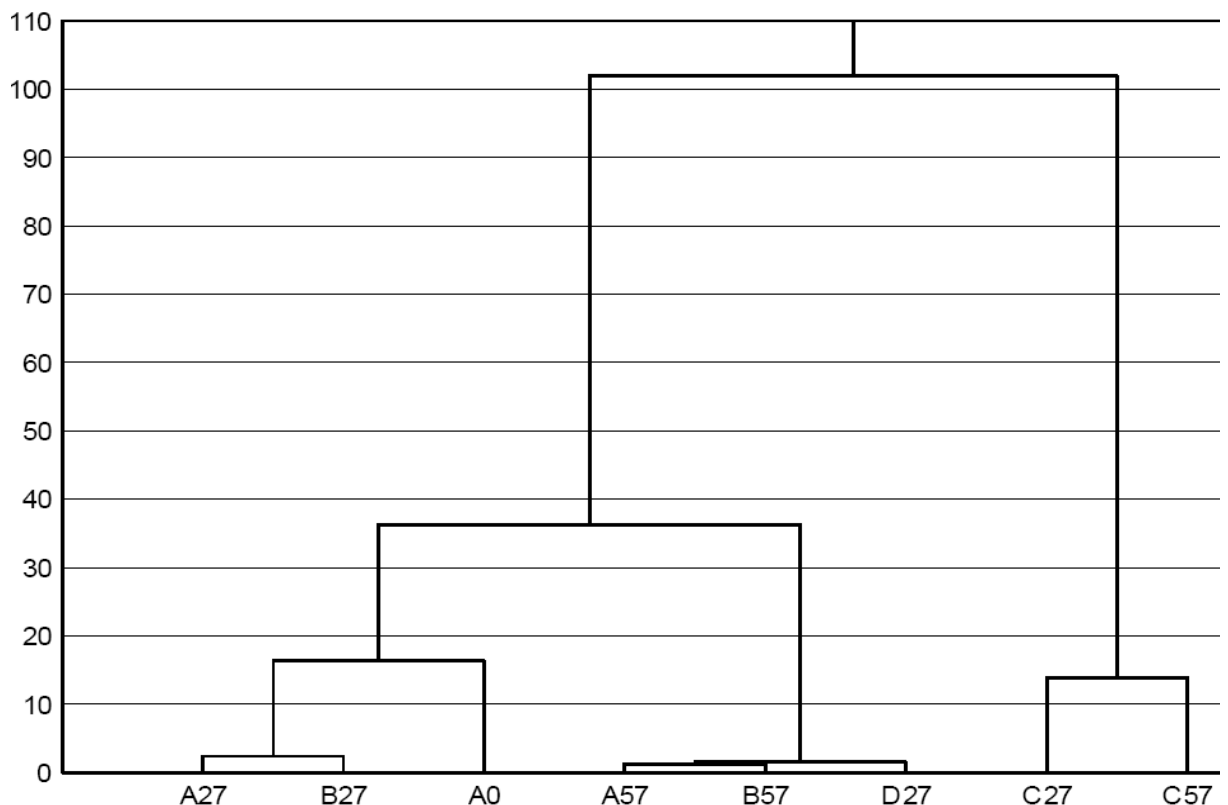
AMK [$\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]	0 dní			27 dní			67 dní			97 dní		
	E	F	G	H	E	F	G	H	E	F	G	
Cys	2,930±0,070	2,430±0,080	2,610±0,110	2,700±0,060	2,460±0,140	2,740±0,050	2,470±0,020	2,630±0,130	3,03±0,220	2,550±0,250	2,460±0,160	
Met	8,960±0,240	7,800±0,660	6,870±0,210	7,240±0,160	7,330±0,440	8,170±0,070	7,410±0,015	7,790±0,340	8,270±0,770	14,460±1,200	15,850±1,120	
Asp	19,740±0,220	19,490±0,420	16,300±0,220	19,130±0,531	19,020±0,270	18,490±0,230	15,250±0,323	17,520±1,433	16,910±1,200	16,910±1,110	14,440±0,563	
The	11,550±0,120	10,920±0,240	9,180±0,109	10,810±0,374	10,560±0,140	10,430±0,150	8,370±0,174	9,700±0,830	8,710±0,230	8,61±0,090	8,990±0,181	
Ser	14,380±0,720	13,250±0,290	11,050±0,146	12,940±0,407	12,520±0,170	12,110±0,190	9,830±0,216	11,420±0,926	2,150±0,050	2,000±0,110	1,770±108	
Glu	50,890±0,540	48,590±1,390	40,500±0,754	46,640±1,752	43,850±0,600	44,100±1,630	37,070±1,822	40,660±3,650	43,630±3,200	43,790±3,090	37,590±1,490	
Pro	25,410±0,320	24,640±0,540	20,540±0,247	24,270±0,955	24,100±0,320	23,400±0,360	19,270±0,343	22,190±1,760	23,610±1,590	23,740±1,440	20,250±0,871	
Gly	4,860±0,120	4,790±0,120	4,0100±0,069	4,740±0,145	4,610±0,090	4,500±0,090	3,740±0,096	4,240±0,334	4,400±0,250	4,370±0,290	3,750±0,175	
Ala	9,210±0,140	8,290±0,200	6,920±0,111	8,150±0,234	7,800±0,100	7,620±0,020	6,380±0,214	7,180±0,548	6,850±0,560	6,860±0,590	5,880±0,133	
Val	16,980±0,270	16,560±0,380	13,790±0,156	16,090±0,486	16,370±0,260	15,860±0,230	13,120±0,317	15,050±1,162	15,100±1,020	15,100±1,160	12,980±0,531	
Ile	13,520±0,430	13,140±0,400	11,050±0,165	12,940±0,270	13,140±0,170	12,750±0,160	10,560±0,230	12,060±0,918	11,440±0,730	11,420±0,860	9,840±0,458	
Leu	24,870±0,098	24,430±0,630	20,460±0,264	24,030±0,695	23,990±0,310	23,250±0,230	19,190±0,425	22,060±1,706	21,450±1,480	21,550±1,440	18,420±0,757	
Tyr	12,560±0,650	12,060±0,230	9,530±0,177	11,210±0,250	11,470±0,180	11,200±0,160	9,180±0,196	10,530±0,722	7,500±0,700	7,610±0,0660	6,68±0,188	
Phe	12,780±0,320	12,420±0,650	10,410±0,112	12,270±0,379	12,080±0,140	11,750±0,140	9,700±0,207	11,130±0,868	10,620±0,710	10,710±0,670	9,14±0,383	
His	8,090±0,330	7,640±0,440	7,550±0,289	8,200±0,523	7,420±0,380	7,400±0,190	6,180±0,120	6,760±0,551	6,070±0,110	6,100±0,080	5,330±0,204	
Lys	20,090±0,640	19,430±0,960	16,270±0,525	19,200±0,310	18,670±0,340	18,090±0,150	14,410±0,265	17,040±1,391	16,530±1,140	16,530±1,110	13,580±0,548	
Arg	10,780±0,760	10,280±0,230	8,38±0,155	10,270±0,455	10,180±0,550	9,970±0,400	7,870±0,161	9,220±0,576	8,190±0,710	8,290±0,530	6,950±0,308	

I přesto, že analýza jednotlivých aminokyselin probíhala s větší časovou prodlevou než stanovení ostatních parametrů, nebyly prokázány výrazné změny v obsahu aminokyselin. U I. skladovacího pokusu byl nejvyšší obsah aminokyselin naměřen po 27 dnech skladování při relativní vlhkosti 23 %, přičemž po 57 dnech skladování byly hodnoty nejvyšší u vzorku skladovaného dle návodu výrobce. U II. skladovacího pokusu byl nejvyšší obsah aminokyselin sledován po 27 a 97 dnech skladování, po 67 dnech skladování to bylo u vzorku při relativní vlhkosti 23 %. Lze tedy říci, že pokud je sušené mléko skladováno tak, jak udává výrobce, dochází k nejmenšímu poklesu obsahu jednotlivých aminokyselin. Pokud je vzorek skladován při vyšší relativní vlhkosti, dochází pravděpodobně k nejvyšším ztrátám. Výsledky I. skladovacího pokusu mají nižší hodnoty aminokyselin než skladovací pokus II. Jsou-li vzorky skladovány při vyšších teplotách, pozorované ztráty jsou vyšší.

Studie Blocka a kol. (2002) prokazovaly 10-ti % ztráty tryptofanu a argininu. Mírně snížený byl obsah prolinu a tyrosinu. Ztráta histidinu, leucinu a kyseliny glutamové byla pozorována pouze u sušeného mléka při a_w 0,57 [52].

Hodnoty prezentované Blockem a kol. jsou dobře srovnatelné s výsledky skladovacích pokusů v předkládané práci. 10-ti % ztráty argininu byly pozorovány vždy pouze u vzorků skladovaných při 37 °C. U nižších teplot se tento trend nepotvrdil.

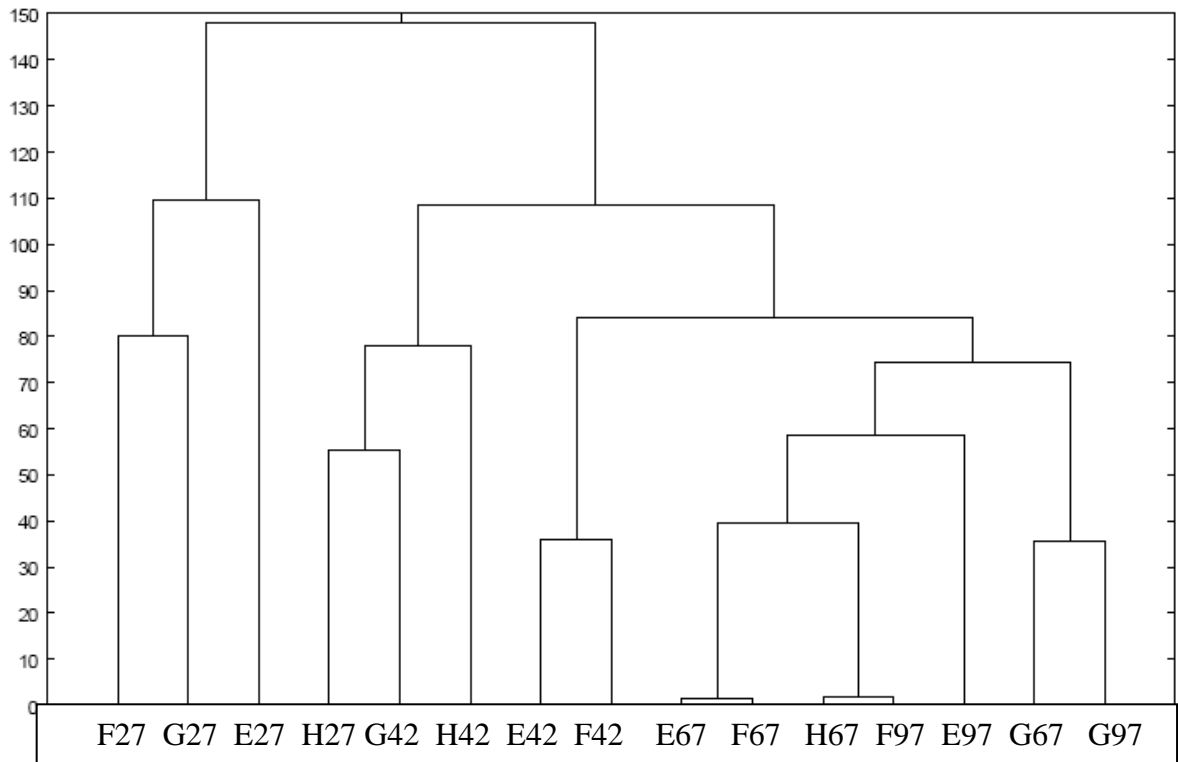
Obrázek 4 : Dendrogram I. skladovacího pokusu



Z dendrogramu pro I. skladovací pokus je patrné, že se vzorky v rámci doby skladování výrazně lišily. Kontrolní vzorek a vzorek skladovaný při relativní vlhkosti 23 % mají po 27 dnech skladování shodný proteinový profil, který se nepatrně liší od počátku skladování. Profil vzorku D po 27 dnech skladování se však velmi výrazně přiblížil vzorkům A a B po 57 dnech skladování, zatímco vzorek C měl po celou dobu skladování podobný proteinový profil. Ze získaných výsledků je možno konstatovat, že sluneční záření do jisté míry urychluje degradaci proteinů, aniž by se změnil obsah jednotlivých aminokyselin.

Relativní vlhkost 43 % taktéž umocňuje degradaci, nicméně delší doba skladování už nemá na rozpad proteinů na jednotlivé frakce výrazný vliv, což je z dendrogramu dobře patrné. Zvolená nižší vlhkost skladování 23 % neprokázala výrazný vliv na změnu proteinů, jelikož změny jsou v korelaci s kontrolním vzorkem A.

Obrázek 5: Dendrogram II. skladovacího pokusu



II. skladovací pokus poskytuje podobné výsledky jako dendrogram pro I. zvolenou skupinu skladovaných vzorků, je zde patrný vliv podmínek a doby skladování. Výrazněji se však projevuje vliv nejen slunečního záření, ale také vlhkosti. Relativní vlhkost 43 % ovlivňuje rozpad proteinů na jednotlivé frakce až po dobu 67 dní a při skladování už není vliv vlhkosti patrný. Kontrolní vzorek E a vzorek F mají stejně jako u I. skladovacího pokusu podobný profil. Na základě výsledků SDS-PAGE je tedy možno říci, že k určitým změnám proteinových frakcí dochází vlivem slunečního záření a působení relativní vlhkosti kolem 43 %.

Tabulka 14: Výsledky stanovení zreagovaného lysinu I. skladovacího pokusu

Skladování/Hodnoty		Zreagovaný lysin	% z celkového lysinu
0 dní		0,710±0,220	4,92
27 dní	A	0,747±0,220	5,10
	B	0,865±0,220	5,75
	C	1,014±0,220	8,40
67 dní	A	0,790±0,220	5,17
	B	0,792±0,220	5,90
	C	1,066±0,220	9,59

Tabulka 15: Výsledky stanovení zreagovaného lysinu II. skladovacího pokusu

Skladování/Hodnoty		Zreagovaný lysin	% z celkového lysinu
0 dní		0,680±0,098	3,38
27 dní	E	0,770±0,540	3,97
	F	0,800±0,560	4,21
	G	0,740±0,080	4,58
	H	0,930±0,121	4,87
67 dní	E	1,030±0,143	4,54
	F	1,260±,560	6,99
	G	1,170±0,540	8,12
	H	1,410±0,210	8,30
97 dní	E	1,580±0,320	9,54
	F	2,000±0,087	12,07
	G	1,920±0,970	14,14

V případě I. skladovacího pokusu hodnoty využitelného lysinu klesaly, přičemž nejvyšší pokles byl pozorován při relativní vlhkosti skladování 43 %. Jelikož hodnoty při skladování za relativní vlhkosti 23 % se příliš neliší od standardních podmínek, lze usoudit, že vyšší relativní vlhkost a teplota výrazně snižuje využitelnost lysinu. U II. skladovacího pokusu byl rovněž pozorován zvyšující se trend hodnot, přičemž největší změny byly pozorovány při skladování za přístupu světla. Při nižší teplotě skladování nebyl pozorován výrazný vliv relativní vlhkosti na využitelnost lysinu.

Studie provedená Malecem (2001) prokázala, že rozsah blokace lysinu byl význačně vyšší při nízké a střední hodnotě a_w než při vysoké hodnotě a_w . Nejnižší snížení obsahu využitelného lysinu bylo registrováno při aktivitě vody 0,98. Při teplotě 37 a 50°C byla využitelnost lysinu největší při aktivitě vody 0,52. [53]

Výsledky studie provedené Malcem (2001) prokazují vliv vlhkosti a teploty na využitelnost lysinu. Hodnoty prezentované Malcem jsou dobře srovnatelné s výsledky skladovacích pokusů v předkládané práci. Lze tedy říci, že na využitelnost lysinu má vliv skladování za vyšších teplot při vyšších vlhkostech, kdy dochází k výraznému úbytku využitelného lysinu.

Při nižších teplotách skladování nemá relativní vlhkost výrazný vliv na změny lysinu. Dalším faktorem, který působí na změny využitelného lysinu, se ukazuje sluneční záření. Důvodem může být rychlejší postup oxidačních změn tuku a pravděpodobná vzájemná reakce oxidačních produktů s lysinem.

ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo posoudit změny proteinů v sušeném plnotučném mléce při různých podmínkách skladování. Změny proteinů byly sledovány jako dusík nedenaurovaných syrovátkových proteinů v sušeném mléce (WPNI index), index rozpustnosti, tepelně-aktivované –SH skupiny, jednotlivé aminokyseliny a využitelný lysin. Jednotlivé proteiny byly rovněž separovány elektroforézou (SDS-PAGE).

Vyšší teplota skladování vzorku se projevila zvýšením obsahu vody a využitelnosti lysinu a také ztráty jednotlivých aminokyselin byly u vyšší teplotě skladování vyšší. Naopak vliv skladovací teploty se vůbec neprojevil u měření indexu rozpustnosti.

Relativní vlhkost 43 % měla negativní dopad na využitelnost lysinu, obsah jednotlivých aminokyselin a rovněž rozpad proteinů na jednotlivé frakce stanovený metodou SDS-PAGE byl při této relativní vlhkosti vyšší. Naopak index rozpustnosti a obsah vody s rostoucí relativní vlhkostí rostl.

Vliv slunečního záření se projevoval snížením využitelnosti lysinu a také rozpad proteinů na jednotlivé frakce byl vlivem slunečního záření vyšší.

Délka skladování se nejvíce projevila u měření WPNI indexu. Podmínky skladování neměly na WPNI index vliv a změny hodnot byly pozorovány pouze při zvyšující se době skladování. Rovněž u SDS-PAGE byly výsledky vzorků v rámci doby skladování výrazně odlišné. Dlouhodobým skladováním dochází i ke zhoršení rozpustnosti vzorku.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] HRABĚ, J., BŘEZINA, P. VALÁŠEK, P.: *Technologie výroby potravin živočišného původu*, 1. vyd. Zlín: UTB ve Zlíně 2006.
- [2] GAJDŮŠEK, S.: *Laktologie*. 1. vyd. Brno: Mendlova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2003.
- [3] ZIMÁK, E.: *Technologie*. 1.vyd. Praha: SNTL, 1982.
- [4] HOZA, I., VELICHOVÁ H.: *Fyziologie výživy*. Zlín: UTB Zlín, 2005.
- [5] BUCEK, P.: *Vybrané problémy měření obsahu močoviny v mléce a možnosti využití obsahu močoviny ve šlechtění dojeného skotu* [online] [cit. 2009-03-14]. Dostupný z: <http://www.cmsch.cz/docs/mocovina-mereni.doc>
- [6] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ D.: *Potravinová biochemie I*. 1. vyd. Zlín: UTB ve Zlíně, 2005.
- [7] FOX, P.F.: Proteins. *Journal of Dairy Science* 83. s.203-247.
- [8] EIGEL, W.N., BUTLER, J.E.: Nomenclature of proteins of cow's milk. *Journal of Dairy Science* 67.s.1599-1631.
- [9] SWAISGOOD, H.E.: Chemistry of the caseins. *Advanced Dairy Chemistry*. s.63-110.
- [10] HOLT, C., SAWYER, L.: Caseins as rheomorphic proteins: interpretation of primary and secondary structures of the α_{S1} -, β - and κ -kaseins. *Journal of the Chemical Society*, 89. s.2683-2692.
- [11] FARRELL, H.M.: Physical equilibria: proteins. *Foundation of Dairy Chemistry*. s. 461-510.
- [12] MULVIHILL, D.M.: Production, functional properties and utilization of milk protein products. *Advanced Dairy Chemistry*. s.369-404.
- [13] SOUTHWARD, C.R.: Manufacture and applications of edible casein products. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* 20. s.79-101.
- [14] SOUTHWARD, C.R.: Utilization of milk components: casein. *Modern Dairy Technology*. s.375-432.

- [15] BREW, K., GROBLER, J.A.: α -laktalbumin. *Advanced Dairy Chemistry*. s.191-229
- [16] α -laktalbumin [online]. [cit. 2009-14-3]. Dostupný z:
http://www.cojeco.cz/index.php?s_term=&s_lang=2&detail=1&id_desc=394286
- [17] BREW, K., VANAMAN, T. C., HILL. R.L.: The role of α -laktalbumin and the A protein in lactose synthesis. *Proceedings of National Academy of Sciences* 59. s.491-497.
- [18] RADFORD, S.E., DOBSON, C.M.: Insight into protein folding using physical techniques: study of lysozyme and α -laktalbumin. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 347. s.17-25.
- [19] McKANZIE, H.A.: Beta-lactoglobulins. *Chemistry and Molecular Biology*. s.257-330
- [20] QIN, B.Y. et.al.: Structural basis of the Tanford transition of bovine β -lactoglobulin. *Biochemistry* 37. s.75-83
- [22] β -lactoglobulin [online]. [cit. 2009-14-3]. Dostupný z:
http://www.cojeco.cz/index.php?s_term=&s_lang=2&detail=1&id_desc=394286
- [22] KRAULIS, P.J.: A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *Journal of Food Science* 53. s.743-745,752
- [23] KINSELLA, J.E., WITEHEAD, D.M.: Proteins in whey: chemical, physical and functional properties. *Advances in Food and Nutrition Research* 33. s.343-438
- [24] KODÍČEK, M.: *Výkladový slovník*. [online]. [cit. 2009-20-3]. Dostupný z:
http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=albumin_serovy
- [25] HANSON, L.A.: Antiviral and antibacterial factors in human milk. *Biology of human milk*. s.141-157
- [26] KORHONEN, H.: Milk immunoglobulins and complement factors. *British Journal of Nutrition* 84. s.75-80
- [27] BAYLESS, K.J.: Isolation and biological properties of lactoferrin from bovine milk. *Protein Expression and Purification* 9. s.309-314

- [28] WOOTEN, L., SHULZE, R.A.: Ceruloplasmin is found in milk and amniotic fluid and may have a nutritional role. *Nutritional Biochemistry* 7. s.632-639
- [29] GROVES, M.L., GREENBERG, R.: Beta₂-microglobulin and its relationship to the immune system. *Journal of Dairy Science* 65. s.317-325
- [30] BOS, C., GAUDICHON, C., TOME, D.: Nutritional and physiological criteria in the assessment of milk protein quality for humans. *Journal of the American College of Nutrition* 19. s.191-205
- [31] *Základní faktory působící na množství a složení dusíkatých látek* [online]. [cit. 2009-25-3]. Dostupný z: <http://zoo.unas.cz/ZZP/1.%20cviceni.doc>
- [32] NG-KWEI-HANG, K.F., HAYES, J.F., MOXLEY, J.E.: Environmental influence on protein content and composition of bovine milk. *Journal of Dairy Science* 65. s. 1993-1998
- [33] NG-KWEI-HANG, K.F., HAYES, J.F., MOXLEY, J.E.: Variation in milk protein concentrations associated with genetic polymorphism and environmental factors. *Journal of Dairy Science* 70. s. 563-570
- [34] IMADIFIDON, G.I., NG-KWEI-HANG, K.F.: Isolation and purification of β -lactoglobulin. *Journal of Dairy Science* 83. s.101-104
- [35] SWEISGOOD, H.E.: Chemistry of milk protein. *Developments in Dairy Chemistry*. s.1-59
- [36] NG-KWEI-HANG, K.F., Pelissier, J.P.: Rapid separation of bovine by mass ion exchange chromatography. *Journal of Dairy Research* 56. s.391-397
- [37] WEI, T.M., WHITNEY, R.M.: Batch fractionation of bovine caseins with diethylaminoethyl cellulose. *Journal of Dairy Science* 68. s.1630-1636
- [38] NG-KWEI-HANG, K.F., DONG, C.: Semi-preparative isolation of bovine casein components by high-performance liquid chromatography. *International Dairy Journal* 4. s.99-110
- [39] GAJDŮŠEK, S.: *Mlékařství II*. 1. vyd. Brno: Mendlova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 1998.

- [40] VALÁŠEK, P.: *Konzervace a balení potravin*. [online]. [cit. 2009-28-3].
Dostupný z: www.cepac.cz
- [41] SAITO, Z.: Particle structure in spray-dried whole milk and instant milk as related to lactose crystallization. *Food Microstructure* 4. s.333-340
- [42] CARIC, M., KALAB, M.: Effect of drying techniques on milk powders quality and microstructure. *Food Microstructure* 6. s.171-180
- [43] KALAB, M, CARIC, M.: Composition and some properties of spray-dried retentates obtained by the ultrafiltration of milk. *Food Microstructure* 8. s. 225-233
- [44] SINGH, H. NEWSTEAD, D.F.: Aspects of proteins in milk powder manufacture. *Advanced dairy Chemistry*. s.735-765
- [45] Determination of Undenatured Whey Protein Nitrogen in Non-fat Dry Milk (WPNI). *Metod No. A 21 a*
- [46] Stanovení indexu rozpustnosti. *Návody pro laboratorní cvičení z Analýzy potravin*, Univerzita Tomáše Bati, Zlín, 2009
- [47] Spectrophotometric Method for Determination of Heat-Activated Sulfhydryl Groups of Skimmilk. *Journal of Dairy Science* 51. Technical Notes
- [48] ČSN ISO 57 0105
- [49] BUŇKA, F a kol.: Effect of acid hydrolysis time on amino acid determination in casein and processed cheeses with different fat content. *Journal of Food Composition and Analysis* (2009), doi:10.1016/j.jfca.2008.10.023
- [50] LAELMI, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227. s.680-685
- [51] SAMBROOK. J., RUSSEL, D. W.: *Molecular cloning a laboratory manual volume 3*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2001.
- [52] BLOCK, J. D. a kol.: Monitoring nutritional quality of milk powders: capillary electrophoresis of the whey protein fraction compared with other methods. *International Dairy Journal* 13. s.87-94
- [53] MALEC, L. S.: Influence of water activity and storage temperature on lysine availability of milk like system. *Food Research International* 35. s.849-853

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

CD	Cirkulární dichroismus.
DEAE	Diethylaminoethylcelulosová kolona.
FAD	Flavinadenosindinukleotid.
FMN	Flavinmononukleotid.
HI-HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie založená na hydrofobní interakci.
NMR	Nukleární magnetická resonance.
RP-HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie na reversní fázi.
S.D.	Směrodatná odchylka.
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulfát polyakrylamidová gelová elektroforéza.
UHT	Vysokotepelný ohřev.
WPNI	Dusík nedenaturovaných syrovátkových proteinů netučného mléka.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Kaseinová micela.....	17
Obrázek 2: Struktura prášku sprejově sušeného mléka.....	28
Obrázek 3: Struktura prášku válcově sušeného mléka.....	29
Obrázek 4: Dendrogram I. skladovacího pokusu.....	49
Obrázek 5: Dendrogram II. skladovacího pokusu.....	50

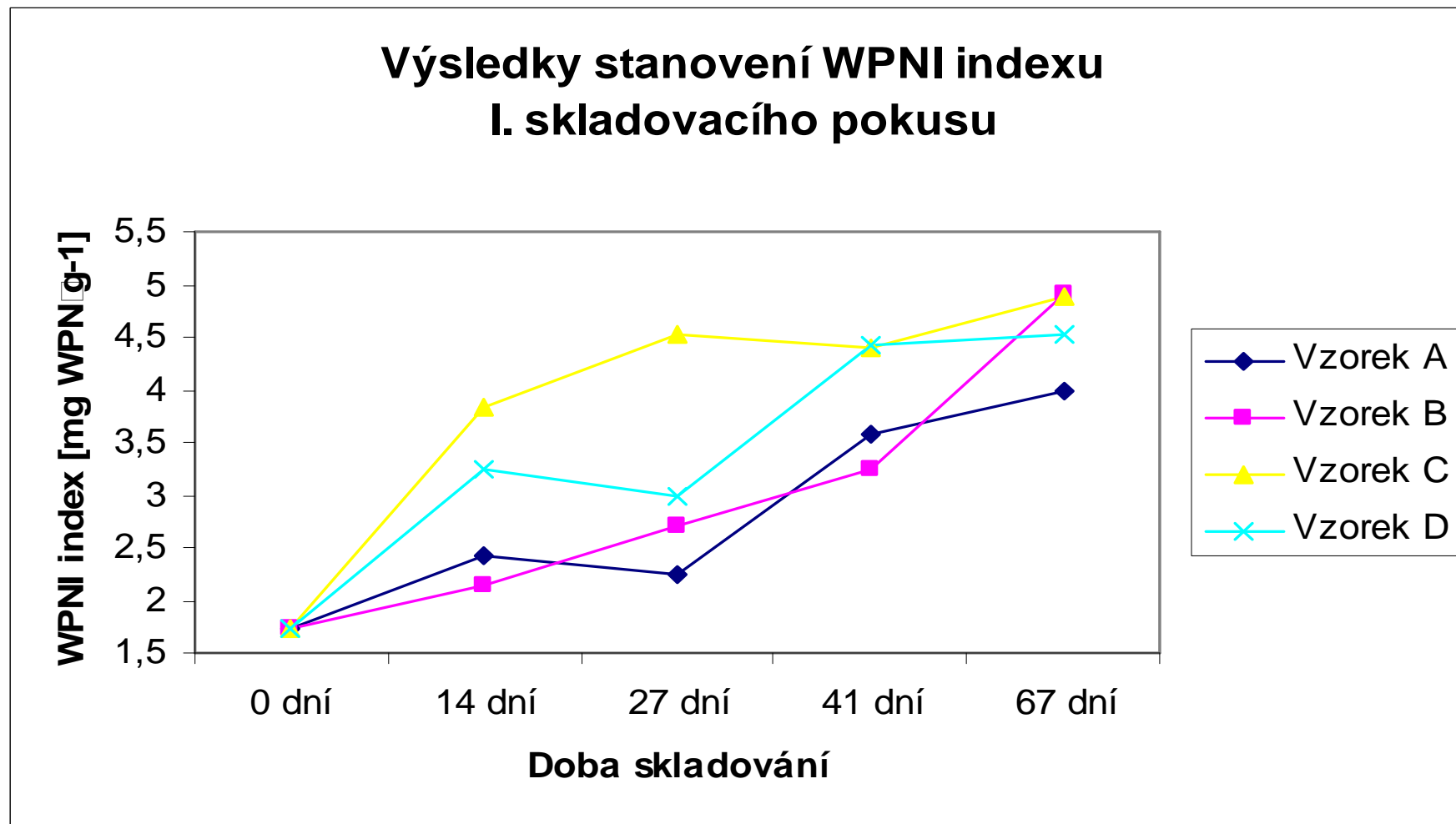
SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Chemické složení mléka	10
Tabulka 2: Obsah proteinů u různých plemen krav [%]	23
Tabulka 3: Charakteristika vzorků	33
Tabulka 4: Podmínky skladování.....	33
Tabulka 5: Klasifikace tepelné degradace proteinů [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ prášku].....	37
Tabulka 6: Výsledky stanovení WPNI indexu I. skladovacího pokusu [$\text{mg WPN}\cdot\text{g}^{-1}$].....	41
Tabulka 7: Výsledky stanovení WPNI indexu II. skladovacího pokusu [$\text{mg WPN}\cdot\text{g}^{-1}$].....	41
Tabulka 8: Výsledky stanovení indexu rozpustnosti I pokusu [ml nerozpustného podílu]..	42
Tabulka 9: Výsledky stanovení indexu rozpustnosti II. pokusu [ml nerozpustného podílu]	42
Tabulka 10: Výsledky stanovení –SH skupin I. skladovacího pokusu [absorbance].....	43
Tabulka 11: Výsledky stanovení –SH skupin II. skladovacího pokusu [absorbance].....	43
Tabulka 12: Výsledky stanovení obsahu vody I. skladovacího pokusu [% (w/w)].....	44
Tabulka 13: Výsledky stanovení obsahu vody II. skladovacího pokusu [% (w/w)].....	44
Tabulka 12: Výsledky stanovení jednotlivých aminokyselin I. skladovacího pokusu [$\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]	46
Tabulka 13: Výsledky stanovení jednotlivých aminokyselin II. skladovacího pokusu [$\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]	47
Tabulka 14: Výsledky stanovení zreagovaného lysinu I. skladovacího pokusu.....	51
Tabulka 15: Výsledky stanovení zreagovaného lysinu II. skladovacího pokusu	51

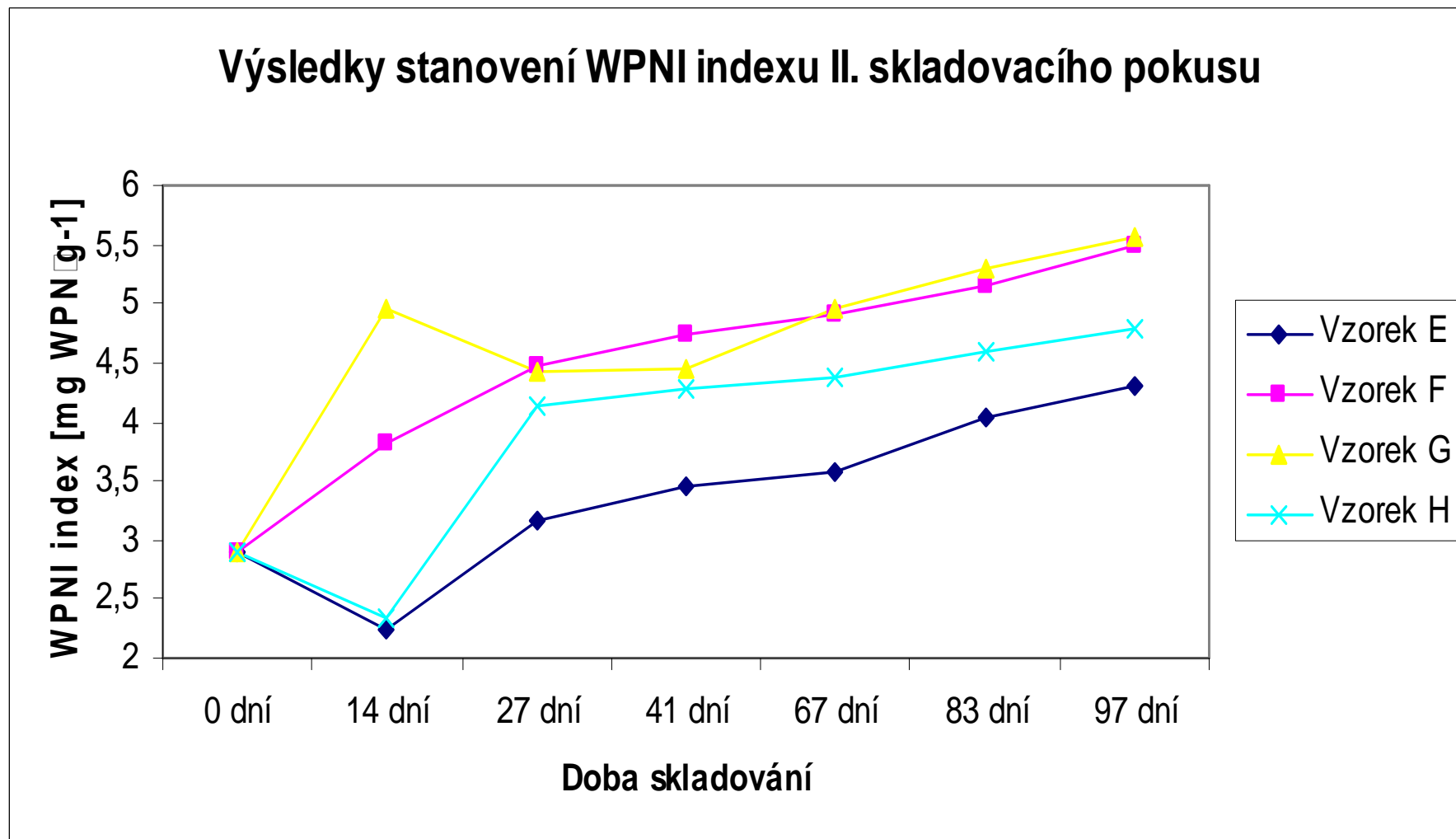
SEZNAM PŘÍLOH

Příloha I: Grafické zobrazení změn během skladování pro jednotlivá stanovení

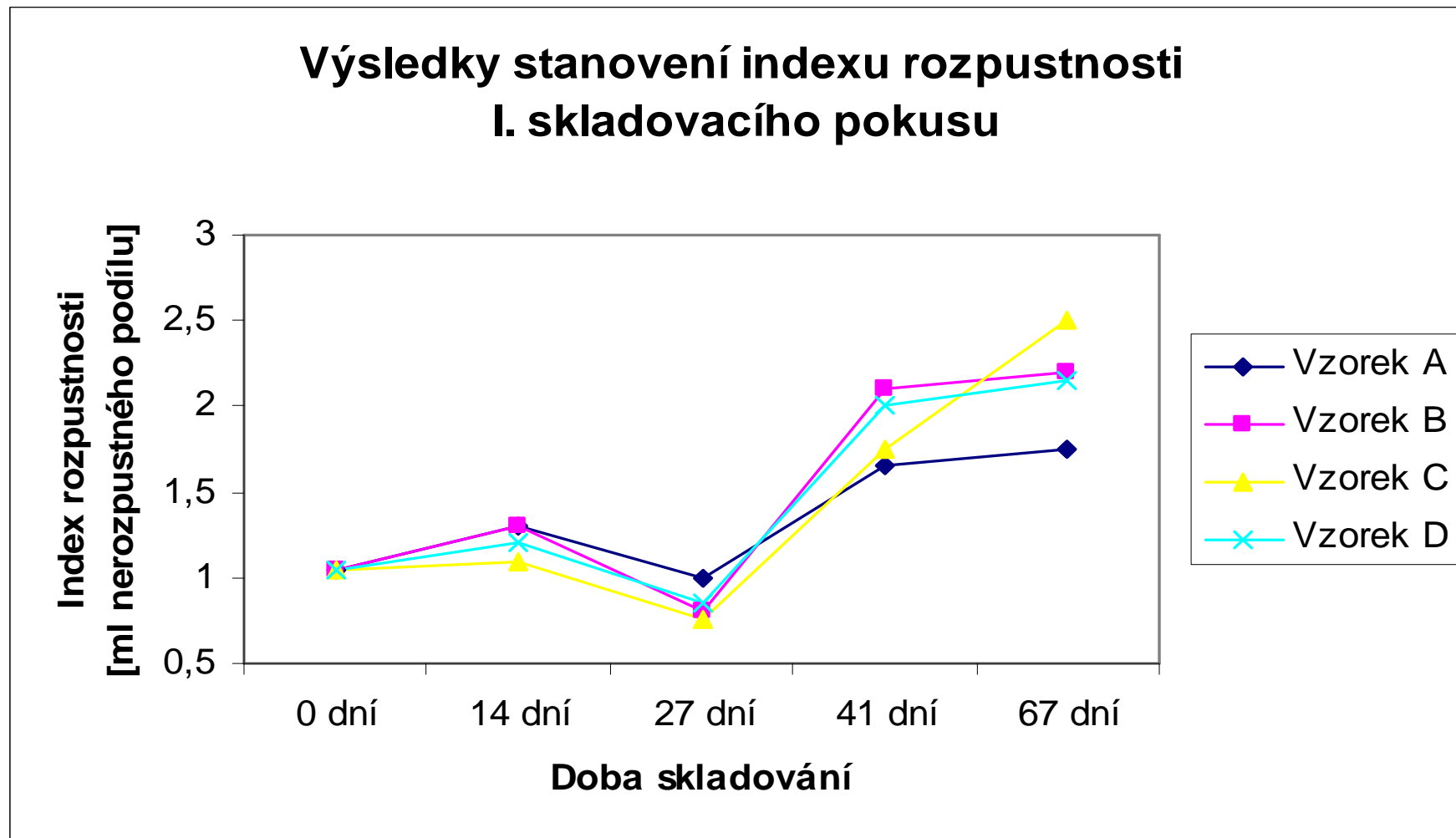
Graf 1: Výsledky stanovení WPNI indexu I. skladovacího pokusu



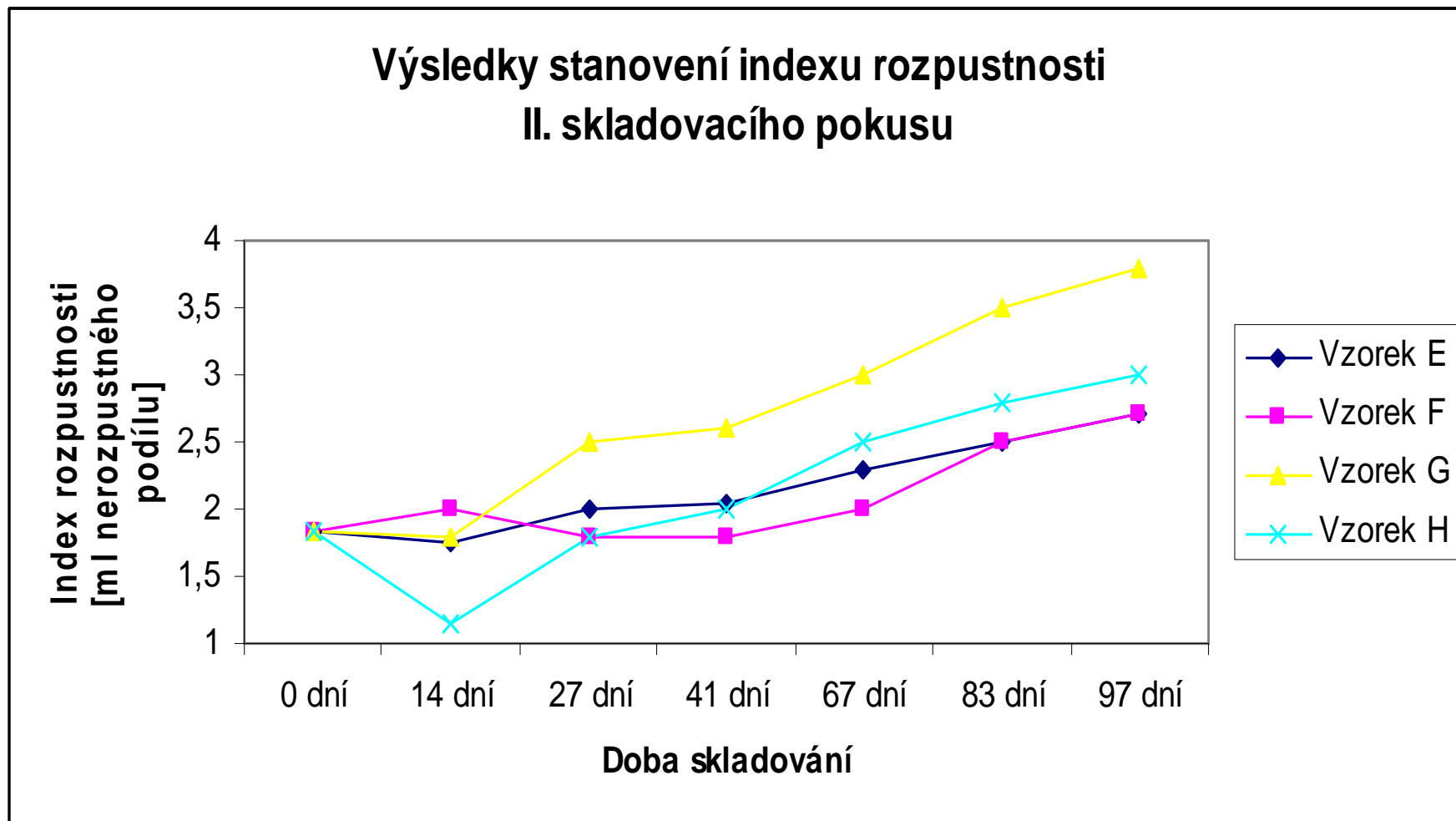
Graf 2: Výsledky stanovení WPNI indexu II. skladovacího pokusu



Graf 3: Výsledky stanovení indexu rozpustnosti I. skladovacího pokusu

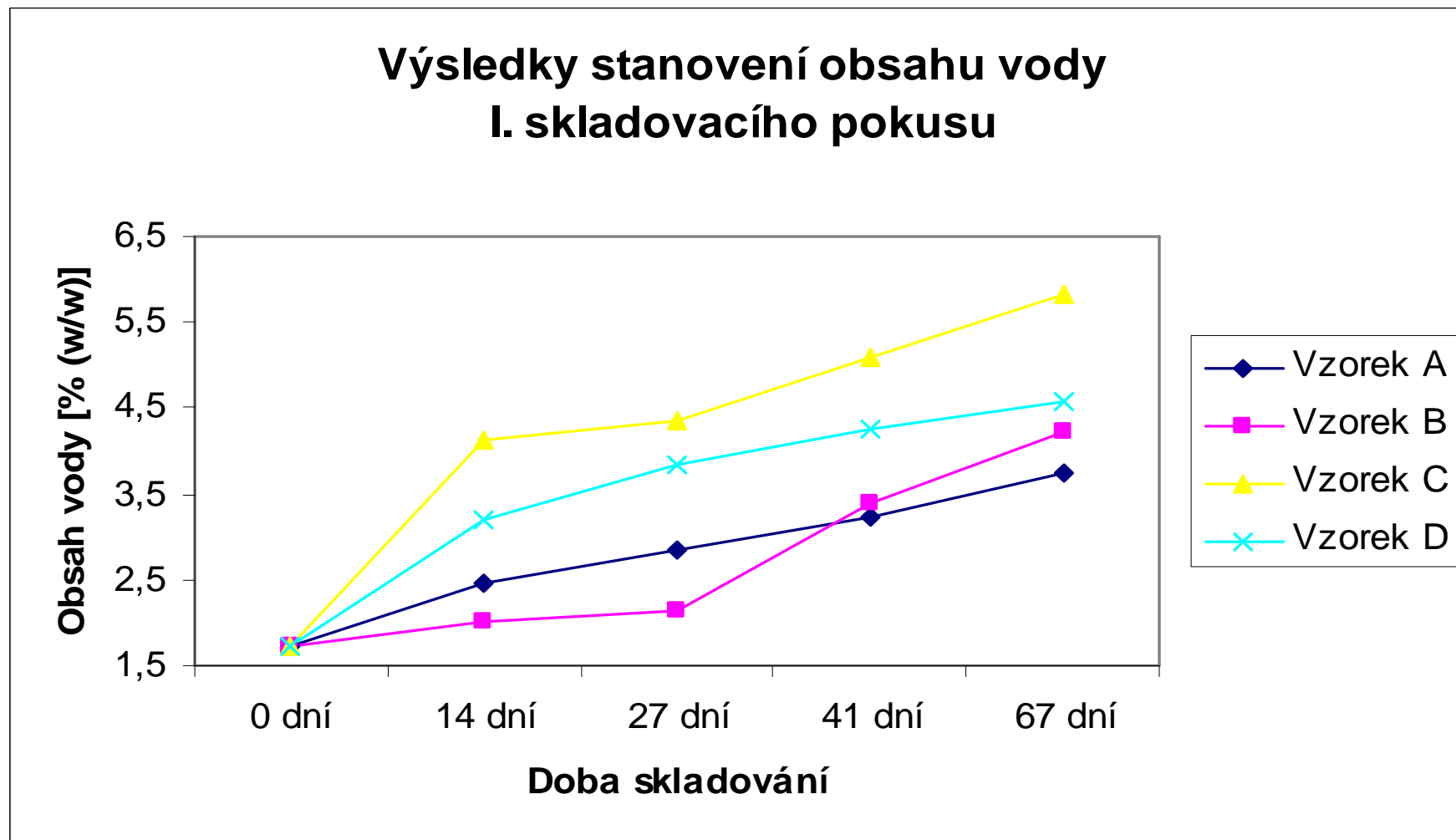


Graf 4: Výsledky stanovení indexu rozpustnosti II. skladovacího pokusu

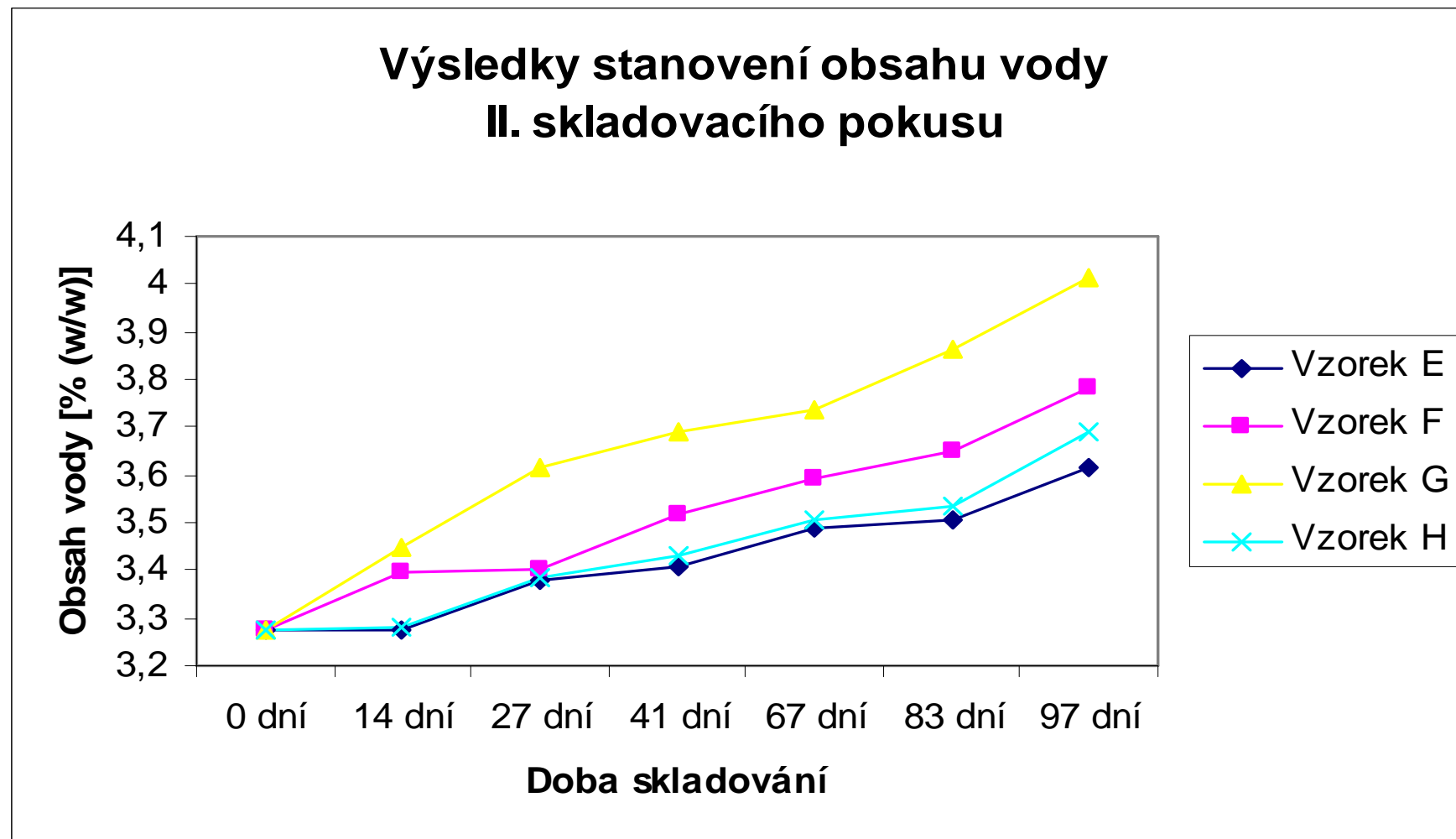


Graf

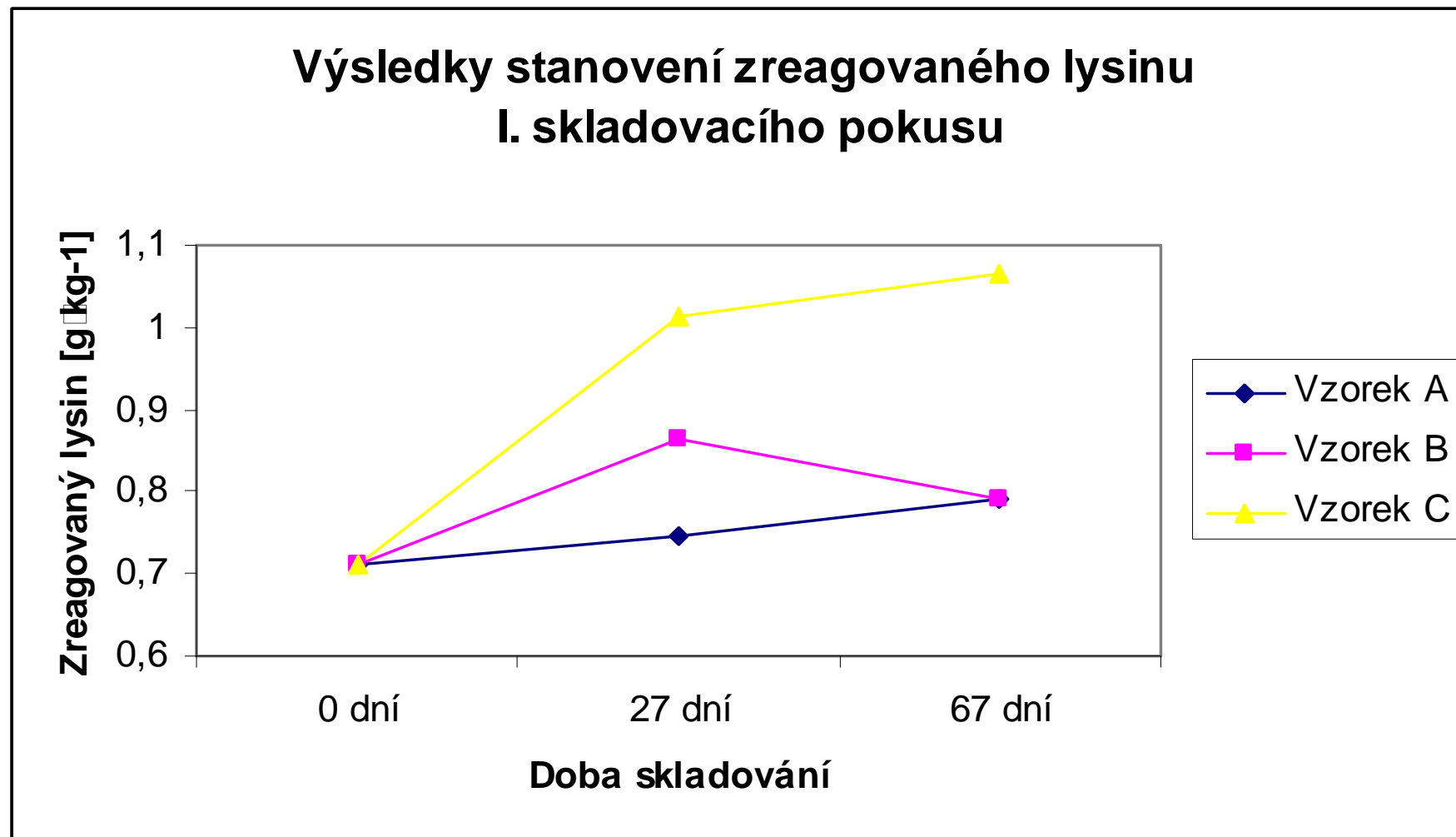
Graf 5: Výsledky stanovení obsahu vody I. skladovacího pokusu



Graf 6: Výsledky stanovení obsahu vody II. skladovacího pokusu



Graf 7: Výsledky stanovení zreagovaného lysinu I. skladovacího pokusu



Graf 8: Výsledky stanovení zreagovaného lysinu II. skladovacího pokusu

