

# **Optimalizace metody stanovení volných mastných kyselin v reálných systémech**

Bc. Lenka Hasoňová

---

Diplomová práce  
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

akademický rok: 2014/2015

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lenka Hasoňová**

Osobní číslo: **T13402**

Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **Technologie tuků, detergentů a kosmetiky**

Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Optimalizace metody stanovení volných mastných kyselin  
v reálných systémech**

Zásady pro vypracování:

### Teoretická část

1. Možnosti stanovení mastných kyselin.
2. Plynová chromatografie pro stanovení volných mastných kyselin.
3. Lipolytická aktivita mikroorganismů.

### Praktická část

1. Příprava vzorků kultivačních médií a mléka pro sledování lipolytické aktivity mikroorganismů.
2. Sledování lipolytické aktivity mikroorganismů pomocí stanovení volných mastných kyselin ve vzorcích plynovou chromatografií.
3. Vývoj a optimalizace metody.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

1. **BATT, C. A., TORTORELLO, M.** Encyclopedia of Food Microbiology. 2nd Edition. Academic Press, 2014.
2. **HANDLEY, A. J., ADLARD, E. R.** Gas chromatographic techniques and applications. Sheffield Academic Press, Ltd., 2001.
3. **GUNSTONE, F. D.** The Chemistry of Oils and Fats. Sources, Composition, Properties and Uses. Blackwell Publishing, 2004. ISBN 1-4051-1626-9
4. **O'BRIEN, RICHARD D.** Fat and Oils : Formulating and Processing for Applications (3rd Edition). CRC Press, 2009. ISBN 978-1-4200-6166-6.

Vedoucí diplomové práce:

**RNDr. Iva Hauerlandová, Ph.D.**

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce:

**20. ledna 2015**

Termín odevzdání diplomové práce:

**18. května 2015**

Ve Zlíně dne 20. ledna 2015

  
doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
děkan



  
Ing. Martina Černeková, Ph.D.  
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: HASONŮVÁ LENKA

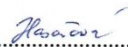
Obor: T.T.DK

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby<sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3<sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60<sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60<sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užit své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 28.5.2015

  
.....

<sup>1)</sup> zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydávalečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

<sup>2)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užit či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jim dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídí k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Předkládaná diplomová práce se zabývá optimalizací metody stanovení volných mastných kyselin v reálných systémech. Konkrétně bylo pracováno se vzorky mléka a smetany, kdy bylo nutné nejdříve extrahovat mléčný tuk z těchto vzorků a následně připravit vzorky methylesterů mastných kyselin. Ty byly poté proměřeny pomocí metody plynové chromatografie a následně byla provedena kvalitativní a kvantitativní analýza výsledků, které byly zpracovány graficky a jednotlivé vzorky byly mezi sebou srovnány. Z výsledků bylo zjištěno, že použitá metoda při takto zvolených parametrech není ke stanovení volných mastných kyselin vhodná a byly navrženy možnosti její další optimalizace. Klíčová slova: extrakce, methylestery mastných kyselin, plynová chromatografie, optimalizace metody, stanovení mastných kyselin

## **ABSTRACT**

The present thesis deals with optimization methods for the determination of free fatty acids in real systems. Specifically, it was worked with samples of milk and cream, it was necessary first to extract the milk fat from these samples and then prepare samples of fatty acid methyl esters. These were subsequently measured using the method of gas chromatography, followed by qualitative and quantitative analysis of the results that have been processed graphically and individual samples were compared with each other. From the results, it was found that the method used is not suitable for the determination of free fatty acids and the possibilities of its further optimization were suggested.

Keywords: fat extraction, fatty acid methyl esters, gas chromatography, method optimization, determination of fatty acids

## Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat zejména vedoucí mé diplomové práce RNDr. Ivě Hauerlandové, Ph.D. za pomoc při psaní této práce. Dále bych chtěla poděkovat celé své rodině za podporu během psaní diplomové práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

# OBSAH

<b>ÚVOD .....</b>	<b>11</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>13</b>
<b>1 MASTNÉ KYSELINY .....</b>	<b>14</b>
1.1 NASYCENÉ MASTNÉ KYSELINY .....	14
Kyselina máselná .....	15
Kyselina kapronová.....	16
Kyselina kaprylová.....	16
Kyselina kaprinová.....	16
Kyselina laurová .....	16
Kyselina myristová.....	16
Kyselina palmitová.....	16
Kyselina stearová .....	17
1.2 NENASYCENÉ MASTNÉ KYSELINY.....	17
Kyselina olejová.....	19
Kyselina eruková.....	19
1.3 ESENCIÁLNÍ MASTNÉ KYSELINY .....	19
Kyselina linolová .....	19
Kyselina $\alpha$ -linolenová .....	20
Kyselina arachidonová .....	20
1.4 MASTNÉ KYSELINY V MLÉCE A MLÉČNÝCH VÝROBCÍCH.....	20
<b>2 MOŽNOSTI STANOVENÍ MASTNÝCH KYSELIN.....</b>	<b>22</b>
2.1 PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE.....	22
2.1.1 Stacionární fáze .....	23
2.1.2 Mobilní fáze .....	23
2.1.3 Průběh separace .....	23
2.1.4 Plynový chromatograf.....	23
2.1.5 Pracovní techniky plynové chromatografie .....	25
2.1.6 Vyhodnocení metody plynové chromatografie .....	25
2.2 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE (HPLC).....	26
2.2.1 Stacionární fáze .....	26
2.2.2 Mobilní fáze .....	27
2.2.3 Průběh separace .....	27
2.2.4 Kapalinový chromatograf .....	27
2.3 TENKOVŘSTEVNÁ CHROMATOGRAFIE.....	28
2.4 PAPIŘOVÁ CHROMATOGRAFIE.....	29
2.5 SPEKTROMETRIE V ULTRAFIALOVÉ A VIDITELNÉ OBLASTI.....	29
2.6 SPEKTROMETRIE V INFRAČERVENÉ OBLASTI.....	30
<b>3 LIPOLYTICKÁ AKTIVITA MIKROORGANIZMŮ .....</b>	<b>32</b>
3.1 LIPOLYTICKÉ ENZYMY.....	33
<b>4 MIKROORGANIZMY S LIPOLYTICKOU AKTIVITOU .....</b>	<b>35</b>
4.1 BAKTERIE S LIPOLYTICKOU AKTIVITOU.....	35
4.1.1 Rod <i>Bacillus</i> .....	35
4.1.2 Rod <i>Pseudomonas</i> .....	36



4.1.3	Rod <i>Streptomyces</i> .....	36
4.2	PLÍSNĚ S LIPOLYTICKOU AKTIVITOU .....	37
4.2.1	Rod <i>Mucor</i> .....	37
4.2.2	Rod <i>Aspergillus</i> .....	37
4.2.3	Rod <i>Rhizopus</i> .....	38
4.2.4	Rod <i>Rhizomucor</i> .....	38
4.2.5	Rod <i>Penicillium</i> .....	38
4.3	KVASINKY S LIPOLYTICKOU AKTIVITOU .....	39
4.3.1	Rod <i>Yarrowia</i> .....	39
4.3.2	Rod <i>Rhodotorula</i> .....	40
4.3.3	Rod <i>Candida</i> .....	40
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>		<b>41</b>
<b>5</b>	<b>POUŽITÝ MATERIÁL .....</b>	<b>42</b>
5.1	MLÉKO A SMETANA .....	42
5.2	VOLNÉ MASTNÉ KYSELINY .....	42
5.3	POUŽITÉ CHEMICKÉ LÁTKY .....	42
5.4	PŘÍSTROJE A VYBAVENÍ .....	43
5.5	PŘÍPRAVA VZORKŮ MLÉKA A JEJICH EXTRAKCE .....	43
5.5.1	Trvanlivé mléko s přídavkem volných mastných kyselin .....	43
5.5.2	Příprava směsi pro extrakci mléčného tuku .....	44
5.5.3	Extrakce mléčného tuku z trvanlivého mléka (I. varianta) .....	44
5.5.4	Příprava vzorků mléka pro extrakci tuku novou metodou (II. varianta) .....	45
5.5.5	Extrakce mléčného tuku (II. varianta) .....	45
5.6	PŘÍPRAVA METHYLESTERŮ MASTNÝCH KYSELIN .....	45
5.6.1	Roztoky pro přípravu methylesterů .....	46
5.6.2	Zásaditě katalyzovaná esterifikace tuku .....	47
5.6.3	Kysele katalyzovaná esterifikace tuku .....	47
5.7	PŘÍPRAVA VZORKŮ SMETANY A JEJICH EXTRAKCE .....	48
5.7.1	Vzorek smetany č. 1 .....	48
5.7.2	Vzorek smetany č. 2 .....	49
5.7.3	Vzorek smetany č. 3 .....	49
5.7.4	Vzorek smetany č. 4 .....	49
5.7.5	Vzorek smetany č. 5 .....	50
5.7.6	Vzorek smetany č. 6 .....	50
<b>6</b>	<b>PLYNOVÁ CHROMATOGRFIE .....</b>	<b>51</b>
6.1	PARAMETRY ANALÝZY VZORKU PLYNOVOU CHROMATOGRFÍ .....	51
6.2	KVALITATIVNÍ VYHODNOCENÍ METODY PLYNOVÉ CHROMATOGRFIE .....	52
6.3	KVANTITATIVNÍ VYHODNOCENÍ METODY PLYNOVÉ CHROMATOGRFIE .....	62
6.4	SHRNUTÍ VÝSLEDKŮ .....	64
6.4.1	Doporučení pro optimalizaci metodiky .....	65
<b>ZÁVĚR .....</b>		<b>67</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>		<b>68</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>		<b>74</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>		<b>75</b>

<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>76</b>
-----------------------------	-----------

## ÚVOD

Mastné kyseliny jsou karboxylové kyseliny s alifatickým uhlovodíkovým řetězcem a jsou stavebními kameny tuků v našem těle. Obecně existuje v přírodních tucích více než 100 různých mastných kyselin. Rozdělit tyto kyseliny můžeme podle různých hledisek, a to zejména podle délky řetězce nebo stupně nasycení.

Díky velké škále mastných kyselin, existuje celá řada metod pro jejich stanovení. Mezi nejnámější metody se řadí vysokoúčinná kapalinová chromatografie, tenkovrstevná a papírová chromatografie, spektrometrie v ultrafialové a infračervené oblasti a metoda, která je základem této diplomové práce a tou je právě metoda plynové chromatografie. Tato analytická, separační metoda je jednou z neúčinnějších a nejpoužívanějších technik pro stanovení volných mastných kyselin v reálných systémech. Pro stanovení je ale nutné provést derivatizaci, což znamená převést netěkavé mastné kyseliny na těkavé methylestery. Mezi základní derivatizační reakce se řadí kyselá a bazická katalyzovaná esterifikace. Methylestery mastných kyselin, které byly připraveny zásaditou katalýzou, by měly být tvořeny pouze vázanými mastnými kyselinami, zatímco kyselá katalyzovaná esterifikace by měla umožnit přípravu methylesterů jak vázaných, tak i volných mastných kyselin. Porovnáním výsledků bazické a kyselá katalýzy by tedy mělo umožnit stanovit obsah volných mastných kyselin.

Stanovení volných mastných kyselin může být využito při studiu lipolytických procesů v potravinách. Lipolytická aktivita je známá u celé řady mikroorganismů, nejen u bakterií, ale i u plísní a kvasinek. Základem lipolytické aktivity je produkce lipolytických enzymů (lipáz), které katalyzují hydrolýzu triacylglycerolů na mastné kyseliny a glycerol. Lipolýza ovlivňuje vlastnosti potravin, jednak je nežádoucím jevem vedoucím ke znehodnocení potravin, při výrobě některých potravin (například sýrů) je ale kontrolovaná lipolýza naopak procesem žádaným a poskytuje daným potravinám charakteristické organoleptické vlastnosti.

Sledování lipolytické aktivity mikroorganismů přímo v reálných matricích potravin je komplikované a v současné době není k dispozici univerzální vhodná testovací metoda, která by mohla být běžně používána v potravinářském průmyslu pro hodnocení kvality výrobků a stupně rozvoje lipolýzy. Taková metoda by mohla být založena právě na srovnání dvou postupů přípravy methylesterů s následnou analýzou vzorků pomocí plynové chromatografie.

Cílem předkládané diplomové práce je právě ověření a případná optimalizace metody stanovení volných mastných kyselin v potravinách.

Konkrétními reálnými systémy, které byly pro práci zvoleny, je mléko a také smetana, které představují velmi významnou část produktů živočišného původu.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 MASTNÉ KYSELINY

Mastné kyseliny (MK) jsou karboxylové kyseliny s alifatickým uhlovodíkovým řetězcem. Ve většině případů mají sudý počet uhlíků a lineární řetězec. Obvykle se nacházejí v esterifikované formě jako součást jiných lipidů, méně často se vyskytují volně. Molekuly mastných kyselin jsou obvykle vázány v molekulách zvaných triacylglyceroly (TAG), které jsou velmi důležité z hlediska výživy člověka. V přírodních tucích bylo identifikováno více než 100 MK. Mezi velmi rozšířené se jich řadí 40. Obecně jsou MK dobře rozpustné zejména ve středně polárních rozpouštědlech a při vyšších teplotách jsou rozpustné zejména v alkoholech. Mastné kyseliny můžeme rozdělit z různých hledisek a to zejména podle délky řetězce nebo podle stupně nasycení. Podle délky řetězce je můžeme rozdělit na MK s krátkým řetězcem, které mají méně než 6 atomů uhlíku v řetězci, dále MK se středně dlouhým řetězcem, které mají počet atomů uhlíku v řetězci 6–12. Dalším typem jsou MK s dlouhým řetězcem, které mají počet atomů uhlíku v řetězci 14–20 a nakonec MK s velmi dlouhým řetězcem, které mají v řetězci více než 20 atomů uhlíku. Podle stupně nasycení se dále dělí na nasycené, nenasyčené s jednou dvojnou vazbou, nenasyčené s více dvojnými vazbami, MK s trojnými vazbami nebo to mohou být mastné kyseliny s acyklickým řetězcem nebo polárními skupinami [1, s. 88][ 2, s. 67] [3, s. 265 ] [4, s. 1].

### 1.1 Nasycené mastné kyseliny

Nasyčené MK obsahují z chemického hlediska ve svém řetězci mezi atomy uhlíku pouze jednoduché vazby. Z fyzikálních vlastností je důležitý zejména bod tání mastných kyselin, který obecně s rostoucím počtem atomů uhlíku v řetězci stoupá. Nasyčené MK mají vyšší bod tání ve srovnání s nenasyčenými MK o stejném počtu uhlíku. Nasyčené MK se taktéž mohou dále dělit podle délky řetězce na nižší a vyšší MK. Nižší nasycené MK ve volné formě nepříjemně zapáchají a při pokojové teplotě jsou v kapalném stavu. Jsou obsaženy v mléčném tuku a jsou snadno stravitelné. Patří mezi ně zejména kyselina máselná (C4:0), kdy C4 značí počet atomů uhlíku v řetězci a 0 je vyjádření počtu dvojných vazeb v řetězci. Dále sem patří kyselina kapronová (C6:0), kaprylová (C8:0) a kaprinová (C10:0). Vyšší nasycené MK jsou při pokojové teplotě tuhé a jsou běžné v rostlinných a živočišných tucích. Oproti nižším nasyceným MK jsou hůře stravitelné. Řadí se mezi ně kyselina laurová (C12:0), myristová (C14:0), palmitová (C16:0), stearová (C18:0), arachová (C20:0) a behenová (C22:0). Nasyčené MK jsou zejména zdrojem energie a jsou stabilní vůči autooxidaci, k té dochází až za vyšších teplot.

Tyto kyseliny jsou v potravě doprovázeny cholesterolem. Zejména nasycené MK s dlouhým řetězcem zvyšují hladinu celkového cholesterolu. Dále tyto kyseliny podporují obezitu a vývoj aterosklerózy, a proto by se měly používat v omezeném množství. Nyní bude uveden stručný přehled nasycených mastných kyselin a jejich označování v tabulce č. 1 a dále v textu budou blíže charakterizovány jednotlivé mastné kyseliny, patřící mezi nasycené [1, s. 88] [5, s. 345] [6, s. 185] [7, s. 215].

*Tab. 1. Přehled nasycených mastných kyselin a jejich označování*

Systematický název	Triviální název	Schematická zkratka	Počet dvojných vazeb
<b>butanová</b>	máselná	C <sub>4:0</sub>	-
<b>hexanová</b>	kapronová	C <sub>6:0</sub>	-
<b>oktanová</b>	kaprylová	C <sub>8:0</sub>	-
<b>dekanová</b>	kaprinová	C <sub>10:0</sub>	-
<b>dodekanová</b>	laurová	C <sub>12:0</sub>	-
<b>tetradekanová</b>	myristová	C <sub>14:0</sub>	-
<b>hexadekanová</b>	palmitová	C <sub>16:0</sub>	-
<b>oktadekanová</b>	stearová	C <sub>18:0</sub>	-
<b>eikosanová</b>	arachová	C <sub>20:0</sub>	-
<b>dokosanová</b>	behenová	C <sub>22:0</sub>	-

### **Kyselina máselná**

Máselná kyselina, jejíž systematický název je kyselina butanová, se řadí mezi nižší nasycené MK. Tato kyselina má 4 atomy uhlíku v řetězci a je nejkratší mastnou kyselinou nacházející se v tucích. Jedná se o olejovitou kapalinu, která má nepříjemný, zatuchlý zápach. Je snadno rozpustná ve vodě, ethanolu nebo diethyletheru. Kyselina máselná se přirozeně vyskytuje v másle, tvrdých sýrech, mléce, jogurtech a v dalších fermentovaných výrobcích [4, s. 3][8, s. 439].

**Kyselina kapronová**

Systematickým názvem kyselina hexanová, která má 6 atomů uhlíku v řetězci. Je to bezbarvá, olejovitá kapalina s nepříjemným zápachem a řadí se mezi nižší nasycené MK. Přírodně se vyskytuje v živočišných tucích a olejích a zejména je zastoupena v kozím mléce, kde způsobuje jeho typickou vůni [4, s. 3].

**Kyselina kaprylová**

Systematicky kyselina oktanová, která má 8 atomů uhlíku v řetězci. Tato kyselina se přirozeně vyskytuje v kravském, kozím mléce a také v mléce kokosových ořechů. Tato kyselina se vyznačuje určitou antimikrobiální aktivitou, která ale nemá v mléce a dalších potravinách větší význam, jelikož je snižována díky tvorbě komplexů s dalšími živinami. Kyselina kaprylová se využívá především v kosmetickém průmyslu [9, s. 106].

**Kyselina kaprinová**

Kyselina dekanová je její systematická název. Tato kyselina má 10 atomů uhlíku v řetězci. Obecně je tato kyselina málo rozpustná ve vodě a používá se zejména v chemickém průmyslu a ve voňavkářství [10, s. 4].

**Kyselina laurová**

Systematicky kyselina dodekanová s 12 atomy uhlíku v řetězci. Tato kyselina se řadí mezi vyšší nasycené MK. Jedná se o bílou, pevnou práškovitou látku se slabým zápachem po oleji nebo mýdлу. Je součástí mnoha rostlinných tuků. Nachází se zejména v palmojádrovém a kokosovém oleji [3, s. 267].

**Kyselina myristová**

Systematicky kyselina tetradekanová s 14 atomy uhlíku v řetězci. Tato kyselina je přítomna především v kokosovém oleji nebo muškátovém oříšku. Používá se v kosmetickém průmyslu a pro výrobu mýdel [4, s. 3].

**Kyselina palmitová**

Systematický název je kyselina hexadekanová, která má 16 atomů uhlíku v řetězci. Nachází se zejména v palmovém oleji, jak už její název napovídá, ale může být také v mase, sýrech, másle nebo jiných mléčných výrobcích. Kyselina palmitová se používá zejména při



výrobě mýdel a kosmetiky, kde se využívá jako palmitát sodný, který se nejčastěji získá zmýdelněním palmového oleje [11, s. 77].

### **Kyselina stearová**

Systematicky oktadekanová kyselina s 18 atomy uhlíku v řetězci. Patří mezi vyšší nasycené MK. Jedná se o bezbarvou voskovitou pevnou látku, která je téměř nerozpustná ve vodě. Kyselina stearová se využívá pro výrobu detergentů, mýdel a kosmetiky jako jsou šampóny a produkty na holení. Kyselina stearová je zastoupena zejména v kakaovém másle a bambuckém másle [12, s. 1] [13, s. 7].

## **1.2 Nenasycené mastné kyseliny**

Nenasycené mastné kyseliny můžeme rozdělit podle počtu dvojných vazeb na nenasycené MK s jednou dvojnou vazbou (monoenové, MUFA) a nenasycené MK s více dvojnými vazbami (polyenové, PUFA). Dále můžeme tyto mastné kyseliny rozdělit podle geometrické izomerie a to na cis-konfiguraci, kdy jsou obě části řetězce umístěny ve stejné rovině proložené dvojnou vazbou a trans-konfiguraci, kdy jsou obě části řetězce na opačných stranách roviny dvojně vazby. Nenasycené MK se nacházejí zejména v rostlinných tucích a to zejména řepkovém nebo kokosovém oleji. V živočišných tucích jsou zastoupeny méně, ale výjimku tvoří rybí tuk, kde je vyšší zastoupení zejména kyseliny eikosapentaenové (EPA) a dokosahexaenové (DHA). Mezi nenasycené MK s jednou dvojnou vazbou patří zejména kyselina olejová ( $C_{18}:1 \Delta^9_{cis}$ ), tento zápis znamená, že kyselina olejová má jednu dvojnou vazbu na 9 uhlíku v poloze cis. Dále kyselina laurolejšová ( $C_{12}:1 \Delta^9_{cis}$ ), myristolejšová ( $C_{14}:1 \Delta^9_{cis}$ ), palmitolejšová ( $C_{16}:1 \Delta^9_{trans}$ ), elaidová ( $C_{18}:1 \Delta^9_{trans}$ ) nebo eruková ( $C_{22}:1 \Delta^{13}_{cis}$ ). Tyto MK jsou zejména zdrojem energie, snižují hladinu cholesterolu a jsou odolnější vůči oxidaci ve srovnání s polyenovými MK. Stravitelnost monoenových MK je dobrá, protože se nacházejí zejména v cis-konfiguraci. Jsou vhodné pro diety, mají pozitivní vliv na snížení pravděpodobnosti výskytu ischemické choroby srdeční. Velmi významné z hlediska výživy jsou zejména nenasycené MK s více dvojnými vazbami, protože některé z nich jsou esenciální, což znamená, že lidský organizmus si je neumí sám vytvořit a jediným jejich zdrojem je právě potrava. S počtem dvojných vazeb v řetězci klesá bod tání tuků, roste jejich rozpustnost ve vodě nebo krevní plazmě a roste taktéž jejich náchylnost k oxidačnímu žluknutí.

Mezi tyto MK patří zejména kyselina linolová ( $C_{18:2} \Delta^{9cis,12cis}$ ),  $\alpha$ -linolenová ( $C_{18:3} \Delta^{9,12,15all-cis}$ ),  $\gamma$ -linolenová ( $C_{18:3} \Delta^{6,9,12all-cis}$ ), arachidonová ( $C_{20:4} \Delta^{5,8,11,14all-cis}$ ), EPA ( $C_{20:5} \Delta^{5,8,11,14,17all-cis}$ ) a DHA ( $C_{22:6} \Delta^{4,7,10,13,16,19all-cis}$ ). Níže budou uvedeny nenasycené mastné kyseliny v tabulce č. 2 a dále v textu budou tyto mastné kyseliny stručně charakterizovány [1, s. 89] [4, s. 6] [6, s. 185] [14, s. 6].

Tab. 2. Nenasycené mastné kyseliny a jejich označování

Označení skupiny	Systematický název	Triviální název	Schematické označení	Počet dvojných vazeb
<b>Monoenové</b>	$\Delta^9$ cis-tetradecenová	myristolejová	$C_{14:1n5}$	1
	$\Delta^9$ cis-hexadecenová	palmitolejová	$C_{16:1n7}$	1
	$\Delta^9$ cis-oktadecenová	olejová	$C_{18:1n9}$	1
	$\Delta^9$ trans-oktadecenová	elaidová	$C_{18:1n9}$	1
	$\Delta^{11}$ trans-oktadecenová	vakcenová	$C_{18:1n7}$	1
	$\Delta^{13}$ cis-dokosenová	eruková	$C_{22:1n7}$	1
	$\Delta^9$ cis-eikosenová	gadolejová	$C_{20:1n11}$	1
<b>Polyenové</b>	$\Delta^{9,11}$ cis-, cis-oktadekadienová	linolová	$C_{18:2n6}$	2
	$\Delta^{9,12,15}$ all- cis-oktadekatrienová	$\alpha$ -linolenová	$C_{18:3n3}$	3
	$\Delta^{6,9,12}$ all- cis-oktadekatrienová	$\gamma$ -linolenová	$C_{18:3n6}$	3
	$\Delta^{5,8,11,14,17}$ all- cis-eikosapentaenová	EPA	$C_{20:5n3}$	5
	$\Delta^{4,7,10,13,16,19}$ all- cis-dokosahexaenová	DHA	$C_{22:6n3}$	6

### **Kyselina olejová**

Systematický název je oktadecenová kyselina, která má 18 atomů uhlíku v řetězci a v poloze 9 má dvojnou vazbu v cis-konfiguraci.

Kyselina olejová se přirozeně vyskytuje v různých rostlinných a živočišných tucích a oleích. Je bezbarvá a bez zápachu. Nachází se zejména v olivovém, slunečnicovém a řepkovém oleji, a proto se doporučuje jejich dostatečný příjem. Je odolnější vůči oxidaci ve srovnání s PUFA mastnými kyselinami. Sodné soli této kyseliny se používají jako emulgační složky do mýdel. V menším množství se tato mastná kyselina používá jako pomocná látka v léčivech anebo jako emulgátor do aerosolových přípravků [1, s. 89] [4, s. 7].

### **Kyselina eruková**

Systematicky kyselina dokosenová, která má 22 atomů uhlíku v řetězci a v poloze 13 má dvojnou vazbu v cis-konfiguraci. Tato kyselina se nachází především v řepkovém oleji a v hořčičném rostlinném oleji. Je považována za kardiotoxickou, a proto byla vypěstována tzv. bezeruková řepka, kde se nachází kyselina eruková pouze v minimálním množství [15, s. 3].

## **1.3 Esenciální mastné kyseliny**

Jedná se o kyseliny, které si lidský organizmus neumí sám syntetizovat. Tudíž je člověk může získat pouze ze stravy. Zároveň jsou pro organizmus velmi důležité, protože ovlivňují biologické pochody v těle. Mohou být typu omega-3 MK nebo omega-6 MK [1 s. 96].

Do skupiny omega-6 patří zejména kyselina linolová,  $\gamma$ -linolenová nebo arachidonová. Do druhé skupiny patří kyselina  $\alpha$ -linolenová, EPA a DHA. Význam esenciálních MK spočívá v tvorbě buněčných a intracelulárních membrán, zlepšují elasticitu cév a odstraňují aterosklerotické pláty v cévách. Dále ovlivňují vývoj spermií a posilují imunitu. Nedostatek esenciálních MK se může projevit například zvýšenou propustností kůže pro vodu, tvorbou ekzémů, suchými vlasy, poruchami rozmnožování a poruchami při menstruačním cyklu. Dále je to zvýšená náchylnost k infekci, porucha srdečního rytmu a otoky kloubů [16, s. 9].

### **Kyselina linolová**

Systematický název je kyselina oktadekadienová, která má v poloze 9 a 12 dvojnou vazbu a obě jsou v cis-konfiguraci. Vyskytuje se prakticky ve všech běžných tucích. Větší množství této kyseliny se nachází ve slunečnicovém a sójovém oleji.

Konjugovaná kyselina linolová (CLA) je společný název pro skupinu izomerů této kyseliny, kdy dvojně vazby jsou v konjugovaném uspořádání. Výskyt CLA je především v mase hovězím nebo skopovém a v plnotučných mléčných výrobcích.

Minimální množství CLA se nachází v olejích a vůbec se nevyskytuje v rybách a drůbeži. Konjugovaná kyselina linolová je stabilnější než samotná kyselina linolová. Mezi fyziologické účinky CLA se řadí zejména snížení obsahu tuku v těle, snížení obsahu lipidů v krvi, působí proti získané cukrovce a má antikancerogenní účinky [17, s. 149].

### **Kyselina $\alpha$ -linolenová**

Systematicky kyselina oktadekatrienová, která má 18 atomů uhlíku v řetězci a v poloze 3, 12 a 15 má dvojně vazby a všechny v cis-konfiguraci. Je přítomna v menších množstvích v rostlinných lipidech. Vyšší koncentrace této kyseliny jsou v řepkovém a sójovém oleji. Dalším zdrojem této kyseliny mohou být ryby nebo třeba ořechy. Lidský organizmus si ji dokáže syntetizovat z kyseliny linolové [17, s. 152] [18, s. 525].

### **Kyselina arachidonová**

Systematicky kyselina eikosatetraenová, která má 20 atomů uhlíku v řetězci a v poloze 5, 8, 11 a 14 má dvojně vazby, všechny v cis-konfiguraci. V potravě se nachází v malém množství a spolu s běžnými MK tvoří složku polárních lipidů. Dále je tato kyselina velmi důležitá pro metabolismus člověka. Lidský organizmus si ji dovede syntetizovat s kyselinou linolové za přítomnosti biotinu [6, s. 186] [19, s. 530].

## **1.4 Mastné kyseliny v mléce a mléčných výrobcích**

Mléko a mléčné výrobky jsou velmi významnou skupinou produktů živočišného původu. Mléko, stejně tak jako smetana a další mléčné výrobky jsou významným zdrojem proteinů, mají významnou nutriční hodnotu a v neposlední řadě poskytují hodnotný mléčný tuk. Tento tuk je velmi dobře stravitelný vzhledem k zastoupení mastných kyselin [20, s. 23]. Konkrétní mastné kyseliny a jejich procentuální zastoupení v mléce je uvedeno níže v tabulce č. 3.

Tab. 3. Zastoupení mastných kyselin v mléce [1, s. 98]

<b>Mastná kyselina</b>	<b>Kravné mléko [% zastoupení MK]</b>	<b>Mateřské mléko [% zastoupení MK]</b>
<b>máseľná</b>	8,0–11,0	4,0–8,0
<b>kapronová</b>	1,0–5,0	1,0–4,0
<b>kaprylová</b>	1,0–3,0	2,0–4,0
<b>kaprinová</b>	2,0–5,0	2,0–6,0
<b>laurová</b>	3,0–6,0	4,0–9,0
<b>myristová</b>	9,0–14,0	8,0–14,0
<b>palmitová</b>	20,0–32,0	18,0–35,0
<b>stearová</b>	8,0–14,0	7,0–15,0
<b>arachová</b>	0,0–1,0	0,0–0,1
<b>olejová</b>	17,0–26,0	18,0–28,0
<b>linolová</b>	0,3–2,2	2,0–5,2
<b>linolenová</b>	0,1–0,8	0,1–1,1
<b>arachidonová</b>	0,4–0,6	0,4–1,5

## 2 MOŽNOSTI STANOVENÍ MASTNÝCH KYSELIN

V přírodě se vyskytuje celá řada mastných kyselin a existuje mnoho metod pro jejich stanovení. Mezi tyto metody se řadí kapalinová chromatografie, tenkovrstevná chromatografie, stanovení pomocí infračervené spektroskopie a celá škála dalších možností stanovení mastných kyselin. Pro stanovení volných mastných kyselin se používá hlavně metoda plynové chromatografie. Aby bylo možné mastné kyseliny stanovit je nutné je nejdříve izolovat z potravinové matrice, pokud se nevyskytují samostatně. Dále je nutné ve většině případů provést jejich derivatizaci, což znamená převést netěkavé mastné kyseliny na látky těkavé.

Derivatizace se provádí zejména při použití metody plynové chromatografie. Mastné kyseliny se převádí zejména na těkavé methylestery. Mezi základní derivatizační reakce se řadí kyselá a bazicky katalyzovaná esterifikace. U kyselá katalyzované esterifikace jsou volné mastné kyseliny esterifikovány zahříváním v přebytku bezvodého methanolu a za přítomnosti kyselého katalyzátoru. Nejčastěji používaným katalyzátorem je fluorid boritý. Vzniklé methylestery se extrahují do izooktanu nebo hexanu. Tuto metodu esterifikace lze použít jak pro volné mastné kyseliny, tak pro MK vázané v triacylglycerolech. Bazicky katalyzovaná esterifikace je založena na zmýdelnění triacylglycerolů a následné esterifikaci volných mastných kyselin v bezvodém methanolu za přítomnosti bazického katalyzátoru. Nejčastěji se používá jako katalyzátor roztok methoxidu sodného v bezvodém methanolu. Tato esterifikace se používá pro MK vázané v triacylglycerolech [21, s. 10] [22, s. 147] [23, s. 240].

### 2.1 Plynová chromatografie

Jednou z nejúčinnějších a nejpoužívanějších metod pro stanovení mastných kyselin (methylesterů MK) je plynová chromatografie (GC). Jedná se o analytickou separační metodu, jejímž principem je rozdělení složek obsažených ve vzorku mezi stacionární (nepohyblivou) a mobilní (pohyblivou) fází. Toto dělení je založeno na rozdílné afinitě složek k stacionární a mobilní fází. Jelikož se jedná o plynovou chromatografii, tak mobilní fází bude plyn (tzv. nosný plyn). Plynová chromatografie slouží nejen k dělení plynů, ale obecně k dělení všech těkavých látek, mnoha organokovových látek nebo pevných organických molekul. Tuto metodu nelze použít pro separaci makromolekul nebo organických a anorganických solí. Při provádění této metody nesmí docházet k rozkladu látek [21, s. 10] [24, s. 20].

### 2.1.1 Stacionární fáze

Stacionární fází v plynové chromatografii může být pevná látka a pak se jedná o chromatografii plyn-pevná látka (GSC). V tomto případě je separační mechanismus adsorpční, kdy o separaci složek vzorku rozhoduje schopnost adsorbovat se na povrch stacionární fáze. Další možností je, že stacionární fáze je kapalina, pak se jedná o chromatografii plyn-kapalina (GLC). Separační mechanismus je v tomto případě rozdělovací. Separované látky jsou mezi mobilní (plyn) a stacionární (kapalina) fází rozděleny podle rozpustnosti a těkavosti [21, s. 10] [25, s. 284].

### 2.1.2 Mobilní fáze

Mobilní fází tvoří nosný film, který zajišťuje transport látek kolonou. Sám nesmí přecházet do stacionární fáze, nesmí se účastnit separačního procesu. Volba nosného plynu je velmi důležitá, musí se zohlednit řada faktorů a to zejména jeho viskozita, čistota, účinnost, reaktivita, cena a v neposlední řadě typ používaného detektoru. Nejčastěji se používá vodík, dusík, helium a argon [21, s. 10].

### 2.1.3 Průběh separace

Vzorek je dávkován do proudu plynu a inertní nosný plyn jej nese kolonou. Vzorek může být nesen kolonou pouze tehdy, přemění-li se ihned na plyn. V koloně se složky obsažené ve vzorku dělí na základě jejich ke stacionární a mobilní fází. Dělení v koloně závisí na tenzi par, polaritě látek a dalších faktorech. Rozdělené složky opouští kolonu a při výstupu z kolony jsou indikovány vhodným detektorem. Poté se vyhodnotí signál z detektoru a z jeho časového průběhu se určí druh a kvantitativní zastoupení složek [21, s. 10] [26, s. 12].

### 2.1.4 Plynový chromatograf

Metoda plynové chromatografie se provádí na zařízení zvaném plynový chromatograf. Toto zařízení se skládá z několika částí. Jednou z částí jsou tlakové lahve, které jsou zdrojem nosného plynu. Poté následuje čistící zařízení, které zbavuje nosný plyn nežádoucích příměsí jiných plynů. Další částí je regulátor tlaku a průtoku nosného plynu. Toto zařízení zajišťuje konstantní průtok nosného plynu přes kolonu a detektor a to bez ohledu na teplotu, rozměry kolony nebo typ nosného plynu.

Velmi důležitou částí je dávkovací zařízení (injektor) přes které vstupují analyzované látky do proudu nosného plynu. Dávkování se provádí pomocí speciální injekční stříkačky přes část zvanou septum, které odděluje vnitřní část injektoru od vnějšího prostředí. Mezi injektor a kolonu může být ještě zařazen dělič toku, který umožňuje vést pouze část odpařeného vzorku na kolonu.

Kolona je část chromatografu, ve které nastává separace složek. Nejčastějšími typy jsou náplňové a kapilární kolony. Náplňové kolony jsou trubice obsahující adsorbent se zakotvenou kapalnou fází. Mají vnitřní průměr 2-3 mm. Materiál, ze kterého jsou vyrobeny, je zejména sklo nebo ocel. Jako náplně adsorbentů se používá silikagel nebo oxid hlinitý. Tyto kolony mají vyšší kapacitu než kolony kapilární, které využívají jako nosič své vnitřní stěny. Mají průměr menší než 1 mm. Nejčastěji se kapilární kolony vyrábějí z křemene a jsou obaleny polyimidovou vrstvou, která dodává materiálu kolony pružnost a tím brání jejímu zlomení. V plynové chromatografii je velmi důležitou proměnnou teplota, a právě proto je kolona umístěna v termostatu a temperována na požadovanou teplotu. Pokud je teplota kolony v průběhu celé analýzy konstantní jedná se pak o izotermální analýzu. V případě, že se teplota kolony během analýzy mění podle teplotního programu, pak se jedná o teplotní gradient. Na separaci složek vzorku má vliv zejména teplota nástřiku, termostatu kolony a teplota detektoru. Obecně platí, že při vyšší teplotě kolony probíhá analýza rychleji, ale zároveň je potřeba vyššího tlaku nosného plynu pro vstup do kolony, aby byla zachována lineární rychlost kolony.

Další částí chromatografu je detektor. Jedná o zařízení, které slouží k detekci látek, které jsou přítomny v nosném plynu. Je velmi důležité, aby použitý detektor byl dostatečně citlivý a selektivní pro stanovované složky. Používá se zejména plamenově ionizační detektor (FID detektor), kdy plyn z kolony vstupuje do kyslíkovodíkového plamene, kde dochází k ionizaci, tedy vzniku nabitých částic. Ionty jsou poté detekovány na polarizovaných elektrodách. Tento detektor je velmi citlivý, dokáže detekovat téměř všechny organické látky, ale není schopen detekovat většinu anorganických par a plynů. Dalším typem detektoru je tepelně vodivostní detektor (TCD detektor), který obsahuje žhavené vlákno a to je ochlazováno protékajícím nosným plynem na určitou teplotu. Průchod látky detektorem způsobí změnu tepelné kapacity plynu a změnu tepelné vodivosti žhaveného vlákna a tím také změnu jeho teploty a elektrického odporu. Jedná se o typ univerzálního detektoru, který se používá zejména při analýze anorganických plynů a nízkomolekulárních organických látek. Jeho detekční limity jsou nižší ve srovnání s FID detektorem.



V plynové chromatografii se mohou používat také další detektory jako je detektor elektro-nového záchytu, který je citlivý zejména na halogeny a sloučeniny obsahující olovo, síru a kyslík nebo hmotnostně spektrometrický detektor, který umožňuje jak detekci složek, tak jejich identifikaci na základě zjištění hmotnostního spektra a porovnáním s knihovnou spekter sloučenin [21, s. 11] [27, s. 375].

### **2.1.5 Pracovní techniky plynové chromatografie**

Existuje několik pracovních technik, které se liší svými pracovními postupy. Jedná se zejména o eluční, frontální a vytěšňovací metody. Tou nejběžnější je metoda eluční, při které je vzorek dávkován jednorázově do proudu nosného plynu ještě před vstupem do kolony. Poté vychází složky z kolony podle toho, jak jsou zadržovány stacionární fází. Podle času, za který vyjde složka z kolony je následně identifikována na chromatogramu, který během analýzy vzniká a je tvořen sérií píků. U této metody se mobilní fázi říká eluent a z kolony pak vychází eluát. Frontální metoda se provádí tak, že vzorky jsou do kolony přiváděny kontinuálně. Vytěšňovací metoda pak využívá opět jednorázové dávkování vzorku do proudu nosného plynu. U této metody se nachází vytěšňovací činidlo, které sytí právě nosný plyn a jedná se o páry látky, které se sorbují silněji než kterákoliv složka obsažená ve vzorku [21, s. 14].

### **2.1.6 Vyhodnocení metody plynové chromatografie**

Po provedení plynové chromatografie získáme chromatogram, ze kterého lze vyhodnotit retenční parametry nebo plochy a výšky píků. Při vyhodnocení je možno provést jak kvalitativní, tak kvantitativní analýzu. U kvalitativní analýzy je pro identifikaci příslušné látky velmi důležité umístění maxima píku, které lze vyjádřit retenčními daty. Mezi retenční data můžeme zařadit retenční čas, což je celkový čas, který stráví příslušná látka v separační koloně. Identifikace na základě retenčního času se provádí tak, že se porovná retenční čas neznámé látky s retenčním časem standardu. U kvantitativní analýzy existuje několik pracovních technik a to zejména metoda absolutní kalibrace, kde se určuje absolutní množství látky na základě kalibračních závislostí. U této metody se sestrojí kalibrační přímka, která udává závislost plochy píku na koncentraci. Při provádění této pracovní techniky je velmi kritický objem nástřiku. Další je metoda vnitřní normalizace, kde se určuje obsah látek ve směsích a množství látky se vyjadřuje jako relativní podíl z celku. Může být použita i metoda vnitřního standardu, kdy se vnitřní standard přidává ke vzorku. Tento standard musí splnit řadu požadavků, zejména nesmí být přítomen v původním vzorku, s žádnou složkou

vzorku nesmí reagovat, musí být oddělen od všech složek, které se nachází ve vzorku. Výhodou této techniky je, že nemusí být známý přesný objem nástřiku vzorku a taktéž jsou zde eliminovány vlivy pracovního prostředí. Metoda standardního přídatku je další používanou pracovní technikou, kdy sem ke vzorku přidává známé množství stanovované látky [21, s. 15] [28, s. 221].

## 2.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC-High Performance Liquid Chromatography) je analytická separační metoda, která má kolonové uspořádání. Tato metoda je založena na separaci analytů (dělené látky ve vzorku) na základě jejich rozdílné distribuce mezi stacionární a mobilní fází. Během separace se uplatňuje řada interakcí a to zejména interakce analyt-mobilní fáze, mobilní fáze-stacionární fáze a sorpce analytů na stacionární fázi. Separační princip může být adsorpční, kdy je využívána rozdílná adsorpce látek ve vzorku na povrch stacionární (pevné) fáze. Dále to může být rozdělovací separační princip, který využívá rozdílnou rozpustnost látek ve vzorku mezi dvěma nemísitelnými kapalinami. Dále může být kapalinová chromatografie s normálními fázemi, kdy je stacionární fáze polární a mobilní fáze nepolární, nebo může být kapalinová chromatografie s obrácenými (reverzními) fázemi, kde je stacionární fáze nepolární a mobilní fáze je polární. V současné době se v praxi mnohem častěji využívá právě ta s obrácenými fázemi. Použití této metody má řadu výhod a to zejména vysokou rychlost, citlivost, dobrou rozlišovací schopnost. Jako každá metoda i tato má své nevýhody a tou je zejména cena a malá kapacita. Kapalinová chromatografie je vhodná pro stanovení tepelně nestálých a netěkavých sloučenin, jelikož není nutné převádět vzorky na plyn [21, s. 25] [29, s. 8] [30, s. 960].

### 2.2.1 Stacionární fáze

Stacionární fáze je vlastně náplň kolony, přes kterou protéká mobilní fáze nesoucí dělené látky. Jak již bylo uvedeno výše, kapalinová chromatografie může mít jak nepolární, tak polární stacionární fázi, záleží na tom, zda se jedná o chromatografii s normální nebo obrácenou fází. Nepolární stacionární fázi je nejčastěji silikagel, který je chemicky modifikovaný nepolárními skupinami, jako je C8 (oktyl) nebo C18 (oktadecyl). Polární náplň je zejména klasický silikagel nebo oxid hlinitý [21, s. 25].

### 2.2.2 Mobilní fáze

Mobilní fázi v kapalinové chromatografii je kapalina. Složení mobilní fáze má velký vliv na účinnost kolony, dobu analýzy nebo na citlivost. U chromatografie s normálními fázemi může být mobilní fází nepolární rozpouštědlo, jako je pentan, hexan, benzen, chloroform, aceton, acetonitril nebo jejich směs. U chromatografie s obrácenými fázemi to může být methanol, ethanol, propanol, tetrahydrofuran, voda, diethylether, dioxan, acetonitril a mnohé další [21, s. 25].

### 2.2.3 Průběh separace

Během separace je analyt, který obsahuje dělené složky, nesen kolonou inertní mobilní fází. Vzorky, které mají vyšší afinitu ke stacionární fázi, budou vymývány z kolony pomaleji a jejich retenční časy budou delší. Kolonu opouštějí nejdříve složky vzorků, které mají nejvyšší afinitu k mobilní fázi a jejich retenční časy budou tudíž nejkratší. Na základě této afinity probíhá dělení složek obsažených ve vzorku [31, s. 4] [32, s. 203].

### 2.2.4 Kapalinový chromatograf

Kapalinový chromatograf se skládá z několika částí. Jednou z nich jsou zásobníky s mobilní fází, jedná se zpravidla o skleněné lahve s přírodní kapilárou a jsou ve většině případů opatřeny filtrační fritou, která odstraňuje mechanické nečistoty. Další částí je odplyňovač mobilní fáze, který je důležitý pro odstranění rozpuštěných plynů. Důležitou součástí je vysokotlaké čerpadlo, které umožňuje mobilní fázi průchod přes kolonu, protože kolony v HPLC jsou naplněny mikročásticemi a ty kladou mobilní fázi velký odpor, tudíž musí být tato fáze pod velkým tlakem, aby prošla kolonou. Důležitými požadavky na kvalitní čerpadlo je zejména stálý průtok, chemická inertnost materiálů a v neposlední řadě automatické vypnutí čerpadla při překročení nastaveného tlakového limitu. Čerpadla jsou dvojího druhu, u izokratických čerpadel je složení mobilní fáze konstantní a u čerpadel gradientových je možné složení mobilní fáze naprogramovat. Injektor slouží jako dávkovací zařízení a nástřikový objem se řídí rozměry kolony, které jsou další částí kapalinového chromatografu.

Důležitou součástí je detektor. Ideálně by měl detekovat všechny látky, měl by mít vysokou citlivost, nízký šum, být necitlivý ke změnám tlaku, průtoku a teplotě. V kapalinové chromatografii se používá fotometrický/spektrofotometrický detektor, který je založen na principu absorpce záření v oblasti vlnových délek 190 až 800 nm. Podmínkou však je, že

detekované látky musí absorbovat záření použité vlnové délky. Tyto detektory mohou mít buď fixní nebo proměnnou vlnovou délku nebo to mohou být detektory se současným záznamem spektra v reálném čase tzv. diode–array detektory. Dalším detektorem, který se používá v kapalinové chromatografii, je diferenciální refraktometrický detektor, který lze použít pro jakýkoliv typ látky, avšak je málo citlivý. Tento detektor zaznamenává rozdíl indexů lomu mezi čistým elučním činidlem a výtokem z kolony. Poslední částí je vyhodnocovací zařízení, které umožní získat kapalinový chromatogram a provede se kvalitativní a kvantitativní analýza, tak jako u plynové chromatografie [21, s. 25].

### 2.3 Tenkovrstevná chromatografie

Jedná se o separační metodu v plošném uspořádání. Principem metody je že mobilní fáze unáší dělené látky vzorku, které se rozdílně zpožďují díky interakci se stacionární fází, čímž dojde k dělení těchto látek ve vzorku. U této metody jsou obecně dva separační principy, a to rozdělovací princip, kdy stacionární i mobilní fáze je kapalina. Druhým principem je adsorpční, kdy stacionární fáze je tuhý adsorbent, a ten může být buď anorganický sorbent jako je třeba silikagel, nebo to může být organický adsorbent jako třeba mikrokrytalická celulóza. V tomto případě je mobilní fáze kapalina.

Samotná analýza probíhá na chromatografické destičce, kde se vyznačí linie startu a čela (rozpuštědla). Během analýzy jsou roztoky vzorků naneseny na vyznačený start mikropipetou. Deska se poté vloží do vyvíjecí komory, která obsahuje vyvíjecí roztok, který má těkavý charakter. Po ukončení se deska vyjme z komory a nechá se vysušit. Poté se provede detekce a to tak že se deska buď ponoří, nebo se provede postřik desky vhodným činidlem. Podle povahy látky se použije vhodné detekční činidlo (fluorescein) a po zaschnutí detekčního činidla se deska pozoruje pod UV zářením při vhodné vlnové délce. Následným krokem je vyhodnocení chromatogramu (destičky). Kvalitativní vyhodnocení se provádí na základě výpočtu tzv. retenčního faktoru. Retenční faktor je poměr vzdálenosti středu skvrny i-tého analytu od startu ke vzdálenosti čela mobilní fáze od startu. Analyty následně identifikujeme porovnáním skvrn analytů se standardy na témže chromatogramu nebo porovnáním retenčních faktorů s publikovanými hodnotami. Kvantitativní vyhodnocení chromatogramu lze provést pomocí fotodenzitometru nebo lze analyty extrahovat z chromatogramu a stanovit je vhodnou metodou v roztoku. Tato metoda se používá především pro ověření čistoty látek nebo třeba při analýze léčiv [33, s. 315] [34, s. 63].

## 2.4 Papírová chromatografie

Stejně jako u tenkovrstevné chromatografie se jedná o analytickou separační metodu v plošném uspořádání. Stacionární fází je chromatografický papír, který je nasycen kapalinou a mobilní fází je v tomto případě kapalina, nejčastěji se jedná o organická rozpouštědla nebo jejich směsi. Při vlastním provedení dochází k tomu, že mobilní fáze vzlíná póry papíru stacionární fáze a při tom unáší látky vzorku, které rozdílně interagují s mobilní a stacionární fází, čímž dochází k separaci těchto látek. Následný postup a vyhodnocení se provádí stejně jako u tenkovrstevné chromatografie. Tato metoda se nejčastěji používá ke stanovení aminokyselin a peptidů [35, s. 111] [36, s. 28].

## 2.5 Spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti

Jedná o molekulovou absorpční spektrometrii v ultrafialové (UV) a viditelné (VIS) oblasti. Podstatou této spektrometrie je absorpce UV a VIS záření molekulami analytu při průchodu světla vzorkem. Schopnost absorpce je dána zejména strukturou dané molekuly a přítomností chromoforu v molekule. Chromofor je seskupení atomů v molekule, která způsobuje absorpci v UV a VIS oblasti. Typický chromofor je karbonyl, azo skupina, aromatická jádra nebo konjugované dieny. Ultrafialové záření je záření v oblasti vlnových délek 190-380 nm. Viditelné záření je v oblasti vlnových délek 380-780 nm. Molekuly látek, které absorbují záření ve VIS oblasti, se projevují jako barevné. Absorpci v UV oblasti se látky nejeví jako barevné. Obecně je nutné při vlastním spektrofotometrickém měření vybrat takovou vlnovou délku, která je analyzovanou látkou pohlcována nejvíce. Během samotné analýzy se proměří absorpční spektrum, které udává závislost schopnosti absorbovat záření různých vlnových délek, které jsou měřeny.

Zařízení, které se používá při spektrometrii, se nazývá absorpční spektrofotometr. Spektrofotometry můžeme rozdělit na jednopaprskové, kdy pouze jeden svazek prochází jak měřeným vzorkem, tak vzorkem srovnávacím a dále dvouprskové kdy jeden svazek světla prochází srovnávacím a druhý svazek měřeným vzorkem. Zdrojem světla je v tomto případě vhodná žárovka anebo výbojka halogenová pro VIS oblast a vodíková pro UV oblast. Existuje řada zásad, které musí být při vlastním měření dodržovány, je to zejména měření ve vhodné kyvetě. Materiál dané kyvety nesmí absorbovat v oblasti vlnových délek, ve které se měří daná látka. Pro UV oblast je vhodná křemenná kyveta a pro VIS oblast skleněná nebo plastová kyveta. Tato kyveta musí být čirá, zvenku suchá a uvnitř nesmí zůstat bublinky vzduchu, dále musí být dostatečně naplněna a musí se během výměny vzorků

vypláchnout nejdříve destilovanou vodou a poté malým množstvím měřeného vzorku. Důležitý je výběr vhodného rozpouštědla, který taktéž nesmí absorbovat v oblasti měření a měřené vzorky musí být ve formě roztoků. Spektrometrie v UV oblasti se používá ke stanovení konjugovaných dienových a trienových mastných kyselin. Vzorek se rozpouští ve vhodném rozpouštědle, nejčastěji hexanu a změří se absorbance proti čistému rozpouštědлу. Obsah konjugovaných dienů a trienů se získá přepočtem naměřené hodnoty absorbance. Dále se tato metoda aplikuje při stanovení barvených látek, bílkovin, některých vitamínů, nukleových kyselin, fenolických látek, aromatických uhlovodíků, heterocyklických sloučenin a slouží k charakterizaci látek neznámých [21, s. 77] [37, s. 389] [38, s. 63].

## 2.6 Spektrometrie v infračervené oblasti

Jedná se o jednu z nejdůležitějších technik, která se zabývá měření optických vlastností materiálů při různých vlnových délkách. Záření IR má větší vlnové délky ale nižší energii ve srovnání s UV a VIS zářením a tudíž nedochází k excitaci elektronů do vyšších stavů. Vlnová délka IR záření se pohybuje v rozmezí 0,78 a 1000  $\mu\text{m}$ . Infračervenou oblast můžeme rozdělit do tří skupin a to na blízkou IR oblast, kde je vlnová délka 0,78-2,5  $\mu\text{m}$ , dále střední IR oblast o vlnové délce 2,5-50  $\mu\text{m}$  a vzdálenou IR oblast, kde je vlnová délka 50-1000  $\mu\text{m}$ .

Podstatou infračervené spektrometrie (IR) je, že infračervené záření je absorbováno molekulami látek ve vzorku při průchodu světla tímto vzorkem. Vychází se z toho, že může být absorbována pouze energie, která odpovídá vibracím a rotacím uvnitř molekuly. Vibrace můžeme rozdělit na deformační, kdy se mění úhel vazby a na valenční, kdy dochází ke změně délky vazby. Výstupem z měření je infračervené spektrum, které je složitější ve srovnání s UV spektrem. Spektrum je grafické vyobrazení, které udává závislost transmittance nebo absorbance na vlnové délce dopadajícího záření. Toto spektrum je zpravidla pásové, přičemž jednotlivé pásy odpovídají vibračním přechodům. Dále se IR spektrum dělí na oblast skupinových vibrací a na oblast otisku prstu, které umožňují identifikovat konkrétní látku. Jenom některé látky poskytují signál v IR spektru a mohou to být látky jejichž molekuly obsahují polární vazby, molekuly složené z různých atomů a nebo organické a anorganické sloučeniny.

Zařízení, které se používá při této metodě, je IR spektrometr, který musí mít zdroj světla, měrnou a srovnávací kyvetu, dále zařízení pro selekci vlnové délky a v neposlední řadě detektor zařízení. V dnešní době se velmi často používá spektrometr s Fourierovou trans-

formací (FTIR). Vzorek pro měření může být jak kapalný, tak pevný nebo plynný. Důležité je zvolit pro měření vhodnou kyvetu a v případě kapalných vzorků vhodné rozpouštědlo. Typickým provedením přípravy vzorků je, že se vzorek homogenizuje s bromidem draselným a z takto připraveného homogenizátu se slisuje tableta, která je následně proměřena na spektrometru. U kapalných vzorků je nejlepší měřit v kyvetě, která má okénka s bromidem draselným. Tato metoda se používá ke stanovení trans mastných kyselin a to tak že se nejdříve triacylglyceroly převedou na methylestery MK a rozpustní se v sirouhlíku. Poté se proměří IR spektrum.

Dále se tato metoda používá ve strukturní analýze, kde slouží k identifikaci látek a dále v kosmetice, medicíně, ve farmacii k hodnocení léčiv, potravinářství pro stanovení cukrů, v kriminalistice pro analýzu drog, identifikaci pachatelů a mnoha dalších odvětví jako je studium síťování nebo určení stupně degradace polymerů [21, s. 84] [39, s. 5].

### 3 LIPOLYTICKÁ AKTIVITA MIKROORGANIZMŮ

Lipolytická aktivita je známá u celé řady mikroorganismů, nejen u bakterií, ale i u plísní a kvasinek. Základem lipolytické aktivity je produkce lipolytických enzymů (lipáz), které katalyzují hydrolýzu triacylglycerolů na mastné kyseliny a glycerol.

Enzymy jsou biochemicky aktivní bílkovinné makromolekuly, které lze najít v živých systémech. Tyto makromolekuly se skládají ze dvou částí a to z bílkovinné části, která se označuje apoenzym a části nebílkovinné, která je označována jako kofaktor. Kofaktorem mohou být kationty kovů, které se označují jako prostetická skupina nebo organické molekuly, které jsou nazývány koenzymy. Koenzymy jsou vázány slabou vazbou s apoenzymy a snadno mohou být oddisociovány. Na druhou stranu prostetická skupina je vázána velmi pevnou kovalentní vazbou na apoenzym.

Funkcí enzymů je enzymová katalýza a právě ta umožňuje průběh veškerých biochemických dějů v buňce, enzymy tak zabezpečují celý buněčný metabolismus. Průběh těchto chemických reakcí vyžaduje velké množství energie a právě enzymy tuto aktivační energii snižují. Enzymy mají ve své molekule tzv. aktivní místa, která jsou odpovědná za jejich katalytickou funkci. Látky, na jejichž přeměně se enzymy podílí, se označují jako substráty. Aktivní místa jsou schopna specificky vázat substrát za vzniku komplexu enzym-substrát. Toto seskupení ale trvá pouze krátkou dobu a komplex se rozpadá na původní enzym a nový produkt. Kromě aktivního místa mohou mít některé enzymy na povrchu své molekuly i místo alosterické. Jedná se o vazebné místo, které slouží k vazbě regulační molekuly, která vyvolá konformační změnu v aktivním místě enzymu, čímž se mění afinita enzymu k substrátu. Vazba takových regulačních molekul (tzv. alosterických efektorů) může mít jak aktivační, tak inhibiční účinek.

Enzymy vykazují jak reakční, tak substrátovou specifitu. Reakční specifita vyjadřuje, že každý enzym katalyzuje pouze jednu z možných přeměn substrátu. Specifita substrátová zase vyjadřuje schopnost enzymu katalyzovat reakce jen určitého substrátu. Aktivita enzymů je ovlivněna řadou faktorů a to zejména koncentrací substrátu, fyzikálními a chemickými vlastnostmi prostředí nebo množstvím enzymu a mnohými dalšími faktory. Mezi fyzikálně-chemické vlastnosti se řadí zejména teplota a pH. Pokud se bude teplota zvyšovat, rychlost reakce se zvýší, ale na druhou stranu je tu nebezpečí denaturace bílkovinné části enzymu. Denaturace je proces, při kterém dojde ke strukturní změně molekuly z vysoce uspořádaného stavu do stavu neuspořádaného. Důležitým faktorem je i pH pro-



středí, protože řada enzymů pracuje pouze v určité oblasti pH. Dále to může být vliv aktivátorů, jelikož řada enzymů je produkována v neaktivní formě a musí být nejdříve aktivována v reakčním prostředí. V neposlední řadě je to vliv inhibitorů, které tlumí aktivitu enzymů. Inhibitory mohou působit nevratně nebo mohou enzym pouze dočasně zablokovat, pak se jedná o reverzibilní (vratnou) inhibici. Tu můžeme dále rozdělit na nekompetitivní, kdy inhibitor ovlivní aktivní centrum, ale i tak se může substrát navázat, průběh reakce se však zpomaluje. Dále je to kompetitivní inhibice, kdy substrát s inhibitorem soutěží o vazebné místo v aktivním centru.

Enzymy lze rozdělit do několika skupin. Jednou z nich jsou oxidoreduktázy, které katalyzují oxidačně-redukční reakce přenosem vodíkových atomů a jsou důležité pro proces dýchání a fotosyntézu. Patří, jsem zejména dehydrogenázy, oxidázy, peroxidázy nebo kataláza. Dále jsou to transferázy, které katalyzují přenos skupin atomů mezi různými skupinami a řadí se mezi ně aminotranferázy nebo třeba acyltransferázy. Transferázy se účastní řady biosyntetických dějů. Hydrolázy jsou další skupinou, která katalyzuje hydrolytické štěpení, jsou to zejména esterázy, peptidázy nebo amylázy. Lyázy jsou enzymy katalyzující nehydrolytické štěpení vazeb, jsou to třeba aldolázy nebo dekarboxylázy. Izomerázy katalyzují vnitromolekulové přesuny atomů a skupin a poslední skupinou jsou ligázy, které katalyzují vznik energeticky náročných vazeb [42, s. 45] [43, s. 432] [44, s. 444].

Jak již bylo řečeno enzymy, které se podílí na lipolytické aktivitě, jsou tzv. lipolytické enzymy.

### 3.1 Lipolytické enzymy

Lipolytické enzymy jsou řazeny mezi karboxylesterázy a katalyzují hydrolyzu triacylglycerolů na glycerol a mastné kyseliny. Některé lipolytické enzymy jsou poměrně málo specifické a za vhodných podmínek mohou katalyzovat i jiné reakce, například syntézu esterů.

Obecně se dělí lipolytické enzymy do tří skupin. První skupina zahrnuje lipolytické enzymy nespecifické. Enzymy, které patří do této skupiny, kompletně hydrolyzují triacylglyceroly na MK a glycerol. Druhou skupinou jsou enzymy, které uvolňují mastné kyseliny z vnějších pozic triacylglycerolu. Třetí skupina zahrnuje enzymy, které preferují některé mastné kyseliny. U lipolytických enzymů se tedy vyskytuje dvojí specifita, a to polohová a substrátová.

Lipolytické enzymy mají velmi široké využití. Používají se při syntéze řady látek a v různých biotechnologických aplikacích. Využívají se v různých odvětvích průmyslu, v kosmetice i farmacii. Lipázy fungují v mírnějších reakčních podmínkách a mají lepší substrátovou specifitu ve srovnání s chemickými katalyzátory. V poslední době se využívají především enzymy produkované psychotrofními a psychrofilními mikroorganismy a to zejména v odvětví potravinářského průmyslu. Tyto enzymy dokáží efektivně fungovat i za nižších teplot, což je vhodné při aplikacích, kde je žádoucí působení ve studené vodě. Používají se i při syntéze některých chemikálií, což dovoluje technologům rozvíjet nové procesy, které jsou blíže procesům, které probíhají v přírodě.

Aktivita lipolytických enzymů však může být i nežádoucí, týká se to především oblasti potravin. Mléčný tuk je rozkládán mikrobiální lipázou. Při tomto rozkladu vznikají volné mastné kyseliny a to zejména kyselina kaprylová, kaprinová, kapronová nebo kyselina máselná. Takto uvolněné volné mastné kyseliny jsou výchozími látkami pro vznik methylketonů. Výše zmíněné produkty lipolýzy mohou mít nežádoucí vliv na organoleptické vlastnosti potravin[45, s. 430] [46, s. 1] [47, s. 3] [48, s. 813].

## 4 MIKROORGANIZMY S LIPOLYTICKOU AKTIVITOU

Mikroorganismy vyznačující se lipolytickou aktivitou mohou být jak bakterie, tak plísně a kvasinky. Mezi kvasinky produkující lipolytické enzymy se řadí rod *Yarrowia*, dále rod *Saccharomyces Reess*, rod *Candida Berkhout* a další. Mezi plísně s lipolytickou aktivitou se řadí rod *Aspergillus*, rod *Mucor*, rod *Penicillium*, rod *Rhizopus* a mezi bakterie se řadí zejména rod *Pseudomonas*, rod *Streptomyces* nebo rod *Bacillus*.

### 4.1 Bakterie s lipolytickou aktivitou

Bakterie patří mezi prokaryotické organismy, které nemají morfologicky diferencované jádro. Velikost bakteriálních buněk je různorodá a závisí na stáří buňky, kultivačních podmínkách, ale i druhů bakterie. Na růst bakterií má vliv řada faktorů, a to třeba pH prostředí, teplota nebo přítomnost kyslíku. Optimální pH pro růst většiny bakterií je v okolí neutrálního bodu a optimální teplota je 25°C – 37 °C. Existují však i bakterie, které rostou při nízkých nebo extrémně vysokých teplotách. Bakterie můžeme rozdělit na grampozitivní a gramnegativní a to podle typu buněčné stěny bakteriální buňky. Buněčná stěna u grampozitivních bakterií je tvořena silnou vrstvou peptidoglykanu a jsou zde navázány teikoové kyseliny. U bakterií gramnegativních je buněčná stěna o poznání tenčí a složitější. Typ buněčné stěny má vliv na celou řadu vlastností mikrobiálních buněk, především pak na jejich citlivost k antimikrobním látkám a nepříznivým faktorům prostředí.

Lipolytickou aktivitou jsou známy bakteriální rody *Bacillus*, *Pseudomonas* nebo *Streptomyces*. Lipázy produkované těmito bakteriemi mohou být intracelulární, ale většinou se jedná o enzymy extracelulární, tedy enzymy produkované z buněk do vnějšího prostředí. Obvykle jsou tyto lipázy stabilní v oblasti pH 4-8 a v rozmezí teplot 27°C–80°C [49, s. 17].

Dále budou v textu uvedeny konkrétní bakterie, které mají lipolytickou aktivitu.

#### 4.1.1 Rod *Bacillus*

Rod *Bacillus* patří mezi sporující grampozitivní tyčinky. Optimální teplota růstu těchto bakterií je 30°C - 45°C. Jak již bylo zmíněno, jsou sporující, a díky vytvářeným sporám jsou velmi odolné vůči vlivům vnějšího prostředí. Endospory bacilů jsou velmi odolné vůči sanitacím prostředkům a odolávají tepelným ošetřením během výroby potravin, jako je pasteurace, sušení nebo třeba mražení. Většina druhů projevuje proteolytickou a amylolytic-

kou aktivitu a řada z nich produkuje antibiotika. Bacily mají taktéž velmi dobré enzymové vybavení, a tudíž mohou způsobit rozklad rozmanitého organického materiálu. Lipolytickou aktivitu vykazuje zejména *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* nebo třeba *Bacillus alcalophilus*. Nejrozšířenější z nich je *Bacillus subtilis*, který tvoří nepravidelné shluky tyčinek. Tato bakterie často kontaminují potraviny. Optimální teplota růstu je 30°C [50, s. 233].

#### 4.1.2 Rod *Pseudomonas*

Jedná se o mírně zakřivené nebo rovné gramnegativní tyčky. Jsou pohyblivé pomocí jednoho nebo více polárních bičíků, jenom nepatrné množství druhů těchto bakterií je nepohyblivých. Pseudomonády jsou široce rozšířeny v přírodě, a to zejména v půdě, na rostlinách, v povrchových vodách nebo ovoci a zelenině. Některé druhy jsou patogenní jak pro člověka, tak zvířata nebo rostliny. Zdrojem uhlíku a energie jsou pro tyto bakterie různé organické sloučeniny. Některé druhy tvoří fenazinová barviva různých odstínů a ty následně uvolňují do prostředí, což způsobuje nežádoucí zbarvení potravin, které mohou pseudomonády kontaminovat. Dále mohou způsobovat kažení masa, dokonce i při chladírenských teplotách během skladování. Jejich významnou vlastností je lipolytická aktivita, kterou se vyznačují zejména druhy *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. cepacia* nebo *P. putida*. *Pseudomonas aeruginosa* se hojně vyskytuje zejména ve vodě a půdě. Je známa pro schopnost vyvolat u oslabených jedinců onemocnění a taky je rezistentní vůči antibiotikům. Roste pouze za přítomnosti kyslíku při teplotním optimu 37°C. Tato bakterie produkuje celou škálu toxických proteinů, které mohou způsobit poškození tkání a dále produkuje pigmenty, zejména žlutozelený fluorescentní pyoverdin nebo modrozelený pyocyanin. Je původcem hnisání ran a spálenin u člověka a kontaminuje i potraviny jako je mléko, zelenina nebo masné výrobky. *Pseudomonas fluorescens* vytváří tyčinky, které jsou rovné nebo mírně zakřivené. Kolonie této bakterie mají nazelenalou barvu, optimální teplota růstu je 20°C–25°C. Vyskytuje se zejména ve vodě, půdě, mase a mléčných výrobcích. Při nízkých teplotách způsobuje rozklad tuků a bílkovin, čímž dochází ke žluknutí masa [50, s. 117].

#### 4.1.3 Rod *Streptomyces*

Rod *Streptomyces* tvoří dlouhá větvená vlákna a kulaté až elipsoidní spory. Jedná se o grampozitivní bakterie, které se nachází především v provzdušněných půdách a pomocí spor se rozmísťují do dalších ekosystémů. Jsou velmi rozšířeny díky jejich růstové nenáročnosti, nepotřebují růstové faktory ani vitaminy. Jsou velmi významnými producent an-

tibiotik, produkují zhruba 70 % prakticky využívaných antibiotik. Prvním vyprodukovaným antibiotikem byl streptomycin, který se začal používat k léčbě tuberkulózy. Tyto bakterie jsou schopny degradovat složité živočišné a rostlinné zbytky včetně aromatických látek, polysacharidů a proteinů. Vyznačují se také lipolytickou aktivitou, kromě lipáz produkují také pektinázy, proteázy nebo třeba amylázy. Lipolytickou aktivitu projevuje zejména *Streptomyces cinnamomeus* [50, s. 210].

## 4.2 Plísně s lipolytickou aktivitou

Plísně jsou vláknité mikroorganismy s eukaryotickým typem buňky a pravým jádrem. Jedná se vlastně o mikroskopické houby. Patří k velmi rozšířeným životním formám, které rostou zejména v prostředí se zvýšenou vlhkostí, ale jsou rozšířeny ubikvitně po celém světě. Rostou zejména v prostředí s kyselým pH a optimální teplotou růstu 20°C – 30 °C. Ke svému životu potřebují kyslík, tudíž se řadí mezi aerobní mikroorganismy. Mohou kontaminovat téměř jakýkoliv substrát, díky jejich dobrému enzymovému vybavení. V přírodě se účastní řady rozkladných činností jako saprofytické organismy, mnohé plísně jsou ale parazitické nebo patogenní, a mohou infikovat živočišné i rostlinné organismy. Mnoho druhů plísní je využíváno záměrně v určitých průmyslových odvětvích, jako je potravinářství pro výrobu sýrů, v chemickém průmyslu k syntéze organických kyselin nebo třeba v průmyslu farmaceutickém pro produkci antibiotik. Mezi plísně vykazující lipolytickou aktivitu se řadí rod *Mucor*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Rhizomucor* nebo *Penicillium* [49, s. 61].

### 4.2.1 Rod *Mucor*

Plísně rodu *Mucor* vytváří bělavý porost s hnědými sporangii kulovitého tvaru na másle, chlebu, ovoci nebo mase. Mohou způsobit onemocnění jak u člověka, tak i u živočichů. Mezi plísně s lipolytickou aktivitou se řadí zejména *Mucor javanicus* nebo *Mucor miehei* [51, s. 151].

### 4.2.2 Rod *Aspergillus*

Plísně rodu *Aspergillus* patří k nejhojněji se vyskytujícím plísním. Mohou způsobit u zvířat i lidí závažná onemocnění a vyskytují se zejména v půdě, potravinách nebo ve vzduchu. Nejčastějšími patogeny jsou *Aspergillus flavus* a *A. fumigatus*, jelikož jimi vyprodukované toxiny jsou karcinogenní. Mezi druhy s lipolytickou aktivitou se řadí *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *A. terreus*, *A. nidulans* a také *Aspergillus carneus*. Mezi nejrozšířenější patří *Aspergillus niger*, tento druh vytváří černé kolonie, které rostou velmi rychle a jsou hrubě

zrnité. Optimální teplota růstu je 35°C–37 °C. Tato plíseň má velmi bohaté enzymatické vybavení a je široce rozšířena v prostředí [52, s. 2] [53, s. 80].

#### 4.2.3 Rod *Rhizopus*

Jedná se o saprofytické houby, které se vyskytují zejména na ovoci, zelenině a obecně na rostlinném materiálu. Některé druhy jsou patogení a mohou být původci až fatálních onemocnění, mohou také produkovat mykotoxiny. Mykotoxiny jsou toxické sekundární metabolity, které produkuje právě mnoho plísní a mohou být kontaminantou řady potravin a krmiv. Plísně rodu *Rhizopus* se používají pro průmyslovou produkci kyseliny fumarové a při výrobě některých léků. Rozmnožují se ve většině případů nepohlavními výtrusy, které se označují jako sporangiospory. Jedná o termofilní druhy, které mohou růst při teplotě až 50 °C. Mezi druhy s lipolytickou aktivitou se řadí zejména *R. oryzae*, *R. delemar*, *R. niveus*, *R. chinensis* nebo *R. arrhizus*. Mezi rozšířené druhy patří *Rhizopus oryzae*, který tvoří bílé kolonie, které postupně přechází do černošedé barvy [54, s. 284] [55, s. 1169].

#### 4.2.4 Rod *Rhizomucor*

Jedná se o houbu vláknitého tvaru, která se vyskytuje zejména na hnilém ovoci a zelenině. Tato plíseň bývá izolována z organického materiálu, ale ve velmi malé míře bývá původcem infekcí u člověka. Lipolytickou aktivitou se vyznačuje druh *R. variabilis*, *R. pusillus* a *R. miehei* [56, s. 472].

#### 4.2.5 Rod *Penicillium*

Jedná se o velmi rozšířený rod plísní vláknitého tvaru, které se vyskytují ve vzduchu, půdě a různých potravinách. Využívají se při výrobě sýrů a zejména pro produkci antibiotik. Mezi druhy s lipolytickou aktivitou se řadí druh *P. roqueforti*, který vytváří kolonie s hladkým, modravě zeleným povrchem paprskovitého vzhledu. Jedná se o plíseň, která není náročná na kyslík, roste i uvnitř sýrů v kyselém prostředí. Hojně produkuje lipolytické enzymy a používá se pro zrání sýrů s plísní v těstě. Dalším druhem je *P. camembertii*, který tvoří vločkovité kolonie, které svou vůní připomínají bramborové slupky. Barevně jsou nejdříve bílé a následně přechází barva do šedozeleň. Je typickou součástí sýrů s plísní na povrchu. Dále *P. caseicolum*, tvoří kolonie vatovitěho vzhledu se stálým smetanovým odstínem, kdy spodní část kolonie je barvy žlutobílé. Bývá součástí porostu u sýrů s plísní na povrchu. *Penicillium nalgiovensis* vytváří kolonie barvy bílé, které přechází do žlutozeleň. Obecně tyto plísně produkují větší množství lipasy [57, s. 11].

### 4.3 Kvasinky s lipolytickou aktivitou

Kvasinky jsou eukaryotické heterotrofní organizmy a řadí se mezi houby. Jejich název je odvozen od schopnosti zkvašovat monosacharidy a disacharidy na oxid uhličitý a etanol. Většina kvasinek je fakultativně anaerobní a pro růst a množení je nezbytná přítomnost kyslíku a živin. Optimální teploty růstu jsou u většiny kvasinek 0°C–48°C. Kvasinky využívají jako zdroj uhlíku a energie především monosacharidy, disacharidy, dále to může být třeba glycerol, etanol nebo metanol. Jedná se o mikroorganismy, které jsou využívány při kvasných výrobcích, tedy mikroorganismy, které jsou velmi využívány v průmyslových odvětvích. Jsou nezastupitelné v řadě průmyslů, jako je farmacie, potravinářský průmysl nebo oblast medicíny. Jsou to organismy, které se používají pro výrobu alkoholických nápojů a kynutého pečiva po tisíce let. V dnešní době jsou využívány i v řadě dalších aplikací, jako je výroba vitaminů nebo organických kyselin. Na druhou stranu ale existují i kvasinky patogenní, které mohou vyvolat onemocnění zejména u oslabeného jedince. Tato onemocnění jsou obvykle špatně léčitelná. Mezi kvasinky s lipolytickou aktivitou se řadí zejména rod *Yarrowia*, rod *Saccharomyces*, *Rhodotorula* a rod *Candida*. Většina lipáz, které jsou produkovány kvasinkami, jsou monomerní glykoproteiny a nevykazují toleranci k vysokým teplotám, protože většina z nich denaturuje při teplotě 60°C a dále jsou tyto enzymy stabilní pouze ve velmi úzkém rozsahu hodnot pH na rozdíl od bakteriálních lipáz [49, s. 45].

#### 4.3.1 Rod *Yarrowia*

Rod *Yarrowia* má jediného zástupce a to *Yarrowia lipolytica*. Jedná se o dimorfní houbu, která není považována za patogenní mikroorganismus. Tato kvasinka byla izolována z mléčných výrobků, potravin a odpadních vod. Jejich lipázy jsou extracelulární i intracelulární. Produkce lipáz je ovlivněna zejména zdrojem uhlíku a dusíku. K významné podpoře produkce lipolytických enzymů vede zejména přítomnost kyseliny olejové, kyseliny linolenové nebo třeba olivového oleje. Dále bylo zjištěno, že glukóza působí naopak inhibičně na produkci těchto enzymů. Pro technologické operace, které využívají enzymy produkované těmito mikroorganismy, je důležité uchovat tyto enzymy do doby, než jich bude potřeba, a velmi dobrou formou pro dlouhodobé skladování je forma lyofilizátu [58, s. 131].

### 4.3.2 Rod *Rhodotorula*

Kvasinky z tohoto rodu jsou houbové jednobuněčné mikroorganismy. Byly izolovány z moči, stolice nebo mlékárenských produktů. Mezi druhy s lipolytickou aktivitou patří *R. glutinis*, *R. minuta* nebo *R. graminis*. Byla sledována produkce lipáz druhem *Rhodotorula glutinis*, a byla zjištěna nevyšší produkce v médiu, který obsahoval olivový olej. Naopak bylo pozorováno, že v přítomnosti palmového a slunečnicového oleje tato aktivita výrazně klesala [59, s. 171].

### 4.3.3 Rod *Candida*

Tento rod se vyznačuje značnou rozmanitostí tvaru buněk. Tyto kvasinky produkují lipázy, které se využívají zejména pro biokatalycké účely. Mezi producenty lipolytických enzymů patří *C. antarctica* a také *C. rugosa* [60, s. 406].



## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 5 POUŽITÝ MATERIÁL

### 5.1 Mléko a smetana

V praktické části diplomové práce byly stanovovány mastné kyseliny v mléce a smetaně. Konkrétně bylo použito UHT (ultra-high temperature processing) trvanlivé plnotučné mléko Pragolaktos s obsahem tuku 3,5 %. Dále bylo pracováno s čerstvým mlékem, které bylo získáno přímo ze zemědělského družstva, a dalším vzorkem byla smetana Kunín s obsahem tuku 31 %.

### 5.2 Volné mastné kyseliny

Do vzorků mléka a smetany byly přidávány některé vybrané volné mastné kyseliny, a to konkrétně:

- Myristová kyselina (FLUKA)
- Olejová kyselina (SIGMA-ALDRICH)
- Stearová kyselina (SIGMA-ALDRICH)
- Palmitová kyselina (MERCK)
- Kaprylová kyselina (SIGMA-ALDRICH)

### 5.3 Použité chemické látky

- Síran sodný (FLUKA)
- Chlorid sodný (PENTA)
- Kyselina sírová (PETR LUKEŠ)
- Metylalkohol (PENTA)
- Dietylexer (PENTA)
- Petrolexer (PENTA)
- Amoniak vodný roztok (PENTA)
- n-HEXAN (PENTA)
- Hydroxid draselný (MIKROCHEM)
- Heptan (SIGMA-ALDRICH)
- Etanol (PENTA)
- Dichlormetan (PENTA)

## 5.4 Přístroje a vybavení

Digitální váhy Kern<sup>CW</sup>, Německo

Topná hnízda (Brněnská Drutěva)

Sušárna ULM 400 memmert

Laboratorní sklo (pipety, dělicí nálevky, chladiče, kádinky, varné baňky, odměrné baňky, zkumavky)

Mikropipeta PhysioCare concept eppendorf research plus

Vakuová odparka Heidolph

Plynový chromatograf Shimadzu GC-14A vybavený FID detektorem

Mikrostříkačka Hamilton 5 $\mu$ l

## 5.5 Příprava vzorků mléka a jejich extrakce

Bylo pracováno s trvanlivým mlékem Pragolaktos a dále také s mlékem čerstvým.

### 5.5.1 Trvanlivé mléko s přidavkem volných mastných kyselin

Bylo připraveno celkem 6 vzorků trvanlivého plnotučného mléka s obsahem tuku 3,5 %. Do těchto vzorků byly přidány volné mastné kyseliny o třech různých koncentracích. Byl připraven vzorek o koncentraci každé z přidávaných kyselin 0,1 g/l, dále vzorek o koncentraci 0,25 g/l a vzorek o koncentraci 0,5 g/l. Vzorky byly připraveny tak, že do kádinky byly naváženy volné mastné kyseliny a to konkrétně kyselina myristová, palmitová, stearová, olejová a kaprylová. V prvních dvou kádinkách byla koncentrace každé volné mastné kyseliny 0,1 g/l, což odpovídá navážce 2 mg každé mastné kyseliny. Jedna z kádinek byla připravena pro uskladnění v lednici a ta druhá na uskladnění při laboratorní teplotě. V dalších dvou kádinkách byla koncentrace každé volné mastné kyseliny 0,25 g/l, což odpovídá navážce 5mg každé mastné kyseliny. Opět byla připravena jedna pro uskladnění v lednici a druhá byla ponechána při laboratorní teplotě. V posledních dvou kádinkách byla koncentrace volných mastných kyselin 0,5 g/l, což odpovídá navážce 10 mg každé mastné kyseliny, přičemž byl opět jeden vzorek připraven pro uskladnění v lednici a druhý pro uskladnění při laboratorní teplotě. Takto připravené navážky byly rozpuštěny v 0,5 ml etanolu. Následně bylo k rozpuštěným mastným kyselinám do každé kádinky přidáno 20 ml

mléka a byly uskladněny tři vzorky do lednice a tři vzorky byly ponechány při laboratorní teplotě.

### 5.5.2 Příprava směsi pro extrakci mléčného tuku

Byla připravena směs dichlormetanu a etanolu v poměru 2:1. Celkem bylo připraveno 300 ml směsi, takže bylo napipetováno 200 ml dichlormetanu a 100 ml etanolu a směs byla promíchána.

### 5.5.3 Extrakce mléčného tuku z trvanlivého mléka (I. varianta)

Bylo odváženo 15 g z předpřipravených vzorků trvanlivého mléka a k nim bylo přidáno 24 ml připravené směsi. Celé množství bylo převedeno do dělicí nálevky, důkladně protřepáno a bylo vyčkáno do oddělení vrstev. K oddělení vrstev nedošlo ani u jednoho z šesti připravených vzorků. Skutečné navážky vzorků jsou uvedeny níže, v tabulce 4.

Tab. 4. Navážky vzorků pro extrakci mléčného tuku

Vzorky lednice		Vzorky laboratorní teplota	
Koncentrace mastných kyselin [g/l]	Skutečná navážka [g]	Koncentrace mastných kyselin [g/l]	Skutečná navážka [g]
0,10	15,020	0,10	15,020
0,25	15,021	0,25	15,019
0,50	15,020	0,50	15,019

Výše uvedeným postupem nebylo dosaženo extrakce tuku ze vzorků mléka. Postup byl následně modifikován, jednak byla upravována extrakční směs rozpouštědel a její přidávané množství, dále byl sledován i vliv teploty extrahovaného vzorku. Poté byl postup zkoušen i s čerstvým mlékem, které nebylo na rozdíl od UHT mléka standardizováno. Ani po různých úpravách postupu a nahrazení UHT mléka čerstvým mlékem nebylo dosaženo uspokojivého výsledku při extrakci mléčného tuku. Proto byl vyhledán jiný postup extrakce za použití jiných rozpouštědel.

#### 5.5.4 Příprava vzorků mléka pro extrakci tuku novou metodou (II. varianta)

Pro další metodu extrakce tuku byly připraveny vzorky jak z UHT mléka, tak i z mléka, které není standardizováno. Byly připraveny vzorky mléka bez přídavku MK a vzorky s přidanými volnými mastnými kyselinami, podobně jako pro první metodu extrakce.

#### 5.5.5 Extrakce mléčného tuku (II. varianta)

Tato metoda extrakce byla provedena podle normy ČSN 570534, EN ISO 1211 (2002): Mléko – Stanovení obsahu tuku – Vážková metoda. Bylo pracováno s výše uvedenými třemi vzorky mléka. Všechny vzorky byly zahřáty na  $38 \pm 1$  °C a poté přeneseny do dělicích nálevek a bylo k nim přidáno 2 ml amoniaku, 10 ml etanolu a 25 ml dietyletheru. Následně byla směs promíchána pod dobu 1 minuty a poté bylo přidáno 25 ml petroletheru a důkladně promícháno po dobu 1,5 minuty. Následně byla směs ponechána 30 minut při laboratorní teplotě do oddělení vrstev. Po uplynutí doby došlo k oddělení vrstev a zakalená část byla odpuštěna do kádinky a čirá část do baňky varné. Zakalená část byla opět převedena do dělicí nálevky a bylo k ní přidáno 5 ml etanolu, 15 ml dietyletheru a směs byla důkladně promíchána. Následně bylo přidáno 15 ml petroletheru a směs byla třepána po dobu 1,5 minut a ponechána sedimentovat na dobu 30 minut. Opět došlo k oddělení vrstev. Po uplynutí této doby byla zakalená část odpuštěna opět do kádinky a čirá část byla přidána do varné baňky k prvnímu podílu. Zakalená část byla poté opět převedena do dělicí nálevky a bylo přidáno 15 ml dietyletheru a důkladně promícháno a následně bylo přidáno 15 ml petroletheru a opět protřepáno 1,5 minuty a ponecháno sedimentovat 30 minut. Po uplynutí této doby opět došlo k oddělení vrstev a zakalená část již byla vylita a čirá část byla přidána k prvním dvěma podílům do varné baňky a všechny tyto podíly byly odpařeny na odparce, a tím byl získán extrahovaný tuk.

Tímto postupem byl ze vzorků extrahován mléčný tuk. Následně byly stejným způsobem extrakce připraveny vzorky o větší navážce (40 g), aby bylo získáno dostatečné množství mléčného tuku pro přípravu methylesterů. Z původní navážky vzorků bylo extrakcí získáno přibližně 3 hm. % tuku.

### 5.6 Příprava methylesterů mastných kyselin

Jelikož se v praktické části této diplomové práce stanovují volné mastné kyseliny pomocí metody plynové chromatografie, je nezbytné převést netěkavé mastné kyseliny na těkavé deriváty a to jsou právě methylestery mastných kyselin. Příprava methylesterů byla prováděna

děna podle normy ES ISO 12966–2: 2012: Rostlinné a živočišné tuky a oleje – Plynová chromatografie methylesterů mastných kyselin – Část 2: Příprava methylesterů mastných kyselin.

### 5.6.1 Roztoky pro přípravu methylesterů

Pro přípravu methylesterů mastných kyselin byly připraveny níže uvedené roztoky. Nejdříve byl připraven metanolický roztok hydroxidu draselného o koncentraci 1 M do 5 ml odměrné baňky.

- Výpočet navážky hydroxidu draselného (KOH)

$$m = C \cdot M \cdot V$$

$$m = 1 \text{ mol/l} \cdot 56,1 \text{ g/mol} \cdot 0,005 \text{ l}$$

$$m = 0,2805 \text{ g KOH}$$

Kde:

M.....molární hmotnost KOH [g/mol]

V..... celkový objem [l]

C.....koncentrace [mol/l]

Konkrétně bylo naváženo 0,280 g KOH a to bylo rozpuštěno v metanolu a převedeno do 5 ml odměrné baňky a doplněno metanolem po rysku.

Dále byl připraven 20% roztok chloridu sodného (NaCl) do 200 ml odměrné baňky.

- Výpočet navážky NaCl

$$W = \frac{m_{\text{složky}}}{m_{\text{celková hmotnost}}}$$

$$0,2 = \frac{m}{200 \text{ g}}$$

$$m = 40 \text{ g NaCl}$$

Bylo naváženo 40,0 g NaCl, rozpuštěno v destilované vodě a převedeno do 200 ml odměrné baňky a doplněno vodou po rysku.

### 5.6.2 Zásaditě katalyzovaná esterifikace tuku

Do 100 ml varné baňky bylo naváženo 0,770 g extrahovaného tuku z trvanlivého mléka a k tomuto vzorku bylo přidáno 7,7 ml metanolu a 0,2 ml 1M metanolickeho roztoku KOH, byly přidány varné kamínky a směs byla ponechána vařit pod zpětným chladičem alespoň 30 minut. Po uplynutí této doby byl obsah baňky zchlazen a přenesen do dělicí nálevky a baňka byla promyta 3,9 ml hexanu a roztok byl přidán do dělicí nálevky spolu se 7,7 ml 20% roztoku NaCl. Tento obsah byl důkladně protřepán a ponechán odstát do oddělení fází. Vodná fáze byla oddělena do další děličky a bylo přidáno 1,9 ml hexanu. Obsah druhé dělicí nálevky byl protřepán a vodná a hexanová fáze byly odděleny. Extrakty hexanu z první a druhé děličky byly spojeny a promyty 5,8 ml 20% roztoku NaCl. Po oddělení vodné fáze byla hexanová fáze vysušena přes bezvodý síran sodný. Vzorky byly po esterifikaci převedeny do 5 ml odměrných baněk a byly připraveny pro stanovení mastných kyselin pomocí plynové chromatografie.

### 5.6.3 Kyselě katalyzovaná esterifikace tuku

Do 100 ml odměrné baňky bylo naváženo 0,296 g extrahovaného tuku a bylo k němu přidáno 8,8 ml metanolu a 0,15 ml koncentrované kyseliny sírové. Poté byly do směsi přidány varné kamínky a směs byla zahřívána pod zpětným chladičem po dobu nejméně 45 minut, kdy nebyl ve varné baňce již pozorován nerozvařený tuk. Po uplynutí této doby byl obsah baňky zchlazen, přenesen do děličky a baňka byla promyta 3,9 ml hexanu a roztok byl přidán do dělicí nálevky spolu se 7,7 ml 20% roztoku NaCl. Celý obsah byl řádně protřepán a ponechán odstát do oddělení vrstev. Následně byla vodná fáze oddělena do druhé dělicí nálevky a bylo k ní přidáno 1,9 ml hexanu, obsah byl protřepán a ponechán odstát do oddělení vrstev. Poté byly hexanové extrakty z první a druhé děličky spojeny a promyty 5,8 ml 20% roztoku NaCl. Po oddělení vodné fáze byla fáze hexanová přefiltrována přes bezvodý síran sodný do 5 ml odměrné baňky. Tímto postupem byl připraven vzorek pro stanovení mastných kyselin pomocí metody plynové chromatografie.

Takto vyrobené methylestery byly připraveny pro analýzu pomocí metody plynové chromatografie. Postup této metody a její vyhodnocení bude uvedeno v kapitole 7.

Obsah tuku v mléce je poměrně nízký. Pro získání dostatečného množství tuku pro přípravu methylesterů je třeba pracovat s poměrně velkými navážkami mléka, které při použité metodě extrakce vyžadují vysokou spotřebu rozpouštědel.

Proto bylo dále pracováno v praktické části této diplomové práce se smetanou Kunín s obsahem tuku 31 %. Bylo to zejména z důvodu ekonomického, jelikož spotřeba rozpouštědel by při větším počtu vzorků mléka byla velká.

## 5.7 Příprava vzorků smetany a jejich extrakce

Bylo pracováno se smetanou Kunín s obsahem tuku 31 %. Nejdříve byl připraven zkušební vzorek, aby na něm bylo otestováno, zda se během extrakce dle II. varianty budou dělit vrstvy. Takže bylo do kádinky naváženo 10 g vzorku smetany a byla provedena extrakce mléčného tuku (II. varianta) jejíž postup je uveden výše. Bylo zjištěno, že tímto postupem extrakce funguje, lze získat mléčný tuk i ze vzorků smetany.

Po zkušebním vzorku bylo nachystáno 6 různých vzorků smetany, které budou dále popsány. Všechny vzorky byly připraveny ve dvou opakováních.

### 5.7.1 Vzorek smetany č. 1

Byl vytvořen vzorek bez přídavku mastných kyselin, tak že bylo do kádinky odváženo 10,5 g smetany. Poté byla provedena extrakce tuku, jejíž postup byl popsán v podkapitole 6.5.7. Extrakcí byly získány přibližně 2 g extrahovaného tuku a následně byly připraveny methylestery mastných kyselin, kdy postup jejich výroby bude uveden dále v textu.

Nejdříve byla provedena zásaditě katalyzovaná esterifikace tuku a to tak že bylo do 100 ml varné baňky naváženo 1,007 g extrahovaného tuku a k tomuto vzorku bylo přidáno 10 ml metanolu a 0,25 ml 1M metanolického roztoku KOH, byly přidány varné kamínky a směs byla ponechána vařit pod zpětným chladičem alespoň 30 minut. Po uplynutí této doby byl obsah baňky zchlazen a přenesen do dělicí nálevky a baňka byla promyta 5 ml hexanu a roztok byl přidán do dělicí nálevky spolu s 10 ml 20% roztoku NaCl. Tento obsah byl důkladně protřepán a ponechán odstát do oddělení fází. Vodná fáze byla oddělena do další děličky a bylo přidáno 2,5 ml hexanu. Obsah druhé dělicí nálevky byl protřepán a vodná a hexanová fáze byly odděleny. Extrakty hexanu z první a druhé děličky byly spojeny a promyty 7,5 ml 20% roztoku NaCl. Po oddělení vodné fáze byla hexanová fáze vysušena přes bezvodý síran sodný. Vzorky byly po esterifikaci převedeny do 5 ml odměrných baňek a byly připraveny pro stanovení mastných kyselin pomocí plynové chromatografie.

Dále byla provedena kysele katalyzovaná esterifikace tuku tak, že do 100 ml odměrné baňky bylo naváženo 0,502 g extrahovaného tuku a bylo k němu přidáno 15 ml metanolu a 0,25 ml koncentrované kyseliny sírové. Poté byly do směsi přidány varné kamínky a směs



byla zahřívána pod zpětným chladičem po dobu nejméně 45 minut. Po uplynutí této doby bylo pokračováno v postupu stejně, jako je to uvedeno u bazicky katalyzované esterifikace tuku.

### 5.7.2 Vzorek smetany č. 2

Další vzorek byl připraven tak, že byly do kádinky naváženy volné mastné kyseliny, a to konkrétně kyselina myristová, palmitová, stearová, olejová a kaprylová, všechny o navážce 10 mg, což odpovídá koncentraci 0,5 g/l každé této mastné kyseliny. Poté bylo toto množství rozpuštěno v 0,5 ml etanolu a bylo přidáno 20 ml smetany. Z takto připraveného vzorku bylo odváženo 10 g pro extrakci tuku, která byla provedena podle postupu, který je uveden v podkapitole 6.5.7. Byly vyextrahovány přibližně 2 g tuku a toto množství bylo použito při přípravě methylesterů, která byla provedena přesně podle postupu uvedeného u vzorku smetany č. 1. Konkrétní navážka pro zásaditě katalyzovanou esterifikaci tuku byla 1,002 g extrahovaného tuku a navážka tuku pro kyselou katalyzovanou esterifikaci byla 0,501 g.

### 5.7.3 Vzorek smetany č. 3

Vzorek smetany č. 3 byl připraven tak, že bylo naváženo 10 g smetany do kádinky a byla provedena extrakce vzorku podle postupu, který je uveden v podkapitole 6.5.7. Byly získány přibližně 2 g extrahovaného tuku a toto množství bylo použito pro přípravu methylesterů, které byly připraveny přesně podle postupu uvedeného u vzorku smetany č. 1. Po extrakci byly do extrahovaného tuku přidány mastné kyseliny a to konkrétně kyselina myristová, palmitová, olejová, stearová a kaprylová, všechno o navážce 10 mg. Navážka extrahovaného tuku pro zásaditě katalyzovanou esterifikaci byla 1,017 g a navážka pro kyselou katalyzovanou esterifikaci byla 0,522 g extrahovaného tuku.

### 5.7.4 Vzorek smetany č. 4

Další vzorek smetany byl připraven tak, že do kádinky byly naváženy volné mastné kyseliny, a to kyselina myristová, palmitová, stearová, olejová a kaprylová, všechny o hmotnosti 50 mg, což odpovídá výsledné koncentraci 2,5 g/l každé této volné mastné kyseliny ve vzorku. Poté byly tyto navážky rozpuštěny v 0,5 ml etanolu a bylo přidáno 20 ml smetany. Z takto připraveného vzorku smetany bylo odváženo 10 g pro extrakci tuku, jejíž postup je uveden v podkapitole 6.5.7. Tímto postupem byly získány přibližně 2 g extrahovaného tuku, který byl použit při přípravě methylesterů, kdy postup jejich výroby je popsán u

vzorku smetany č. 1. Navážka extrahovaného tuku pro zásaditě katalyzovanou esterifikaci byla 1,017 g a pro kyselé katalyzovanou esterifikaci 0,515 g extrahovaného tuku.

#### 5.7.5 Vzorek smetany č. 5

Vzorek smetany č. 5 byl připraven navážením 50 mg kyseliny kaprinové což odpovídá výsledné koncentraci ve vzorku 2,5 g/l. Toto množství bylo rozpuštěno v 0,5 ml etanolu a poté bylo přidáno 20 ml smetany a z takto připraveného vzorku bylo následně odváženo 10 g pro extrakci, který byla provedena podle postupu, který je uveden v podkapitole 6.5.7. Byly získány 2 g extrahovaného tuku, který byl použit při výrobě methylesterů, kdy výroba je popsána u vzorku smetany č. 1. Konkrétně bylo naváženo na zásaditě katalyzovanou esterifikaci 1,032 g tuku a na kyselé katalyzovanou esterifikaci 0,530 g extrahovaného tuku.

#### 5.7.6 Vzorek smetany č. 6

Poslední vzorek smetany byl připraven navážením 50 mg monoacylglycerolu (MAG) kyseliny kaprinové, což odpovídá výsledné koncentraci ve vzorku 2,5 g/l. Tato navážka byla následně rozpuštěna v 0,5 ml etanolu a bylo přidáno 20 ml smetany. Dále bylo odváženo 10 g vzorku pro extrakci, kdy její postup je popsán v podkapitole 6.5.7. Byly získány 2 g extrahovaného tuku pro přípravu methylesterů, která byla provedena podle postupu, který je uveden u vzorku smetany č. 1. Navážka extrahovaného tuku pro zásaditě katalyzovanou esterifikaci byla 1,024 g a pro kyselé katalyzovanou esterifikaci 0,525 g extrahovaného tuku.

Bylo zjištěno, že ze vzorku smetany o hmotnosti 10 g lze extrakcí získat přibližně 2 g extrahovaného tuku, což odpovídá 20% smetaně. Smetana, která byla při extrakci použita má na etiketě uvedeno, že je 31%. Tudíž při použití této metody extrakce nebylo získáno takové množství tuku, které by mělo ve smetaně být, což by mohlo být předmětem další práce, kdy by bylo možno pozměnit podmínky použité metody, nebo by se zvolila další možná metoda extrakce. V tomto případě byla metoda ponechána, jelikož množství extrahovaného tuku bylo dostatečné pro přípravu methylesterů.

Všechny připravené methylestery jak u mléka, tak u smetany byly následně analyzovány pomocí metody plynové chromatografie. Celá metodika a vyhodnocení výsledků provedené metody budou uvedeny v následující kapitole.

## 6 PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE

Jedná se o analytickou separační metodu, která byla použita pro analýzu připravených methylesterů mléčného tuku mléka a smetany.

### 6.1 Parametry analýzy vzorku plynovou chromatografií

Pro analýzu byl použit plynový chromatograf Shimadzu GC-14A s plamenově-ionizačním detektorem (FID, Flame Ionization Detector). Při analýze byla použita kolona DB-wax, 30m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ . K vyhodnocení sloužil software CSW-32.

Nejdříve byl zapnut plynový chromatograf GC 14A Schimadzu a na jeho displeji byly nastaveny podmínky analýzy:

- Teplota nástřiku (INJ) 225 °C;
- teplota detektoru (DET) 230 °C;
- teplota kolony (COL), kde byl programován gradient:
  - COL INIT TEMP 110;
  - COL INIT TIME 3,0;
  - COL PROG RATE 15;
  - COL FINAL TEMP 220;
  - COL FINAL TIME 10.
- Zmáčkne se start;
- zapne se HEATER;
- zapne se detektor (FID ON);
- tlak plynů (plyny byly puštěny v následujícím pořadí):
  - dusík jako nosný plyn, který určuje průtok kolonou 2,5 kg/cm<sup>2</sup>;
  - dusík pro oplachování 0,5 kg/cm<sup>2</sup>;
  - vzduch 0,3 – 0,5 kg/cm<sup>2</sup>;
  - vodík 0,5 kg/cm<sup>2</sup>.
- Zapálí se plamen FID detektoru.
- Pro analýzu byl použit nástřikový objem 2 $\mu\text{l}$ , který byl dávkován mikrostříkačkou.
- Byl spuštěn počítač a otevřena ikona CSW software.
- Následně byla spuštěna ikona Schimadzu GC14.

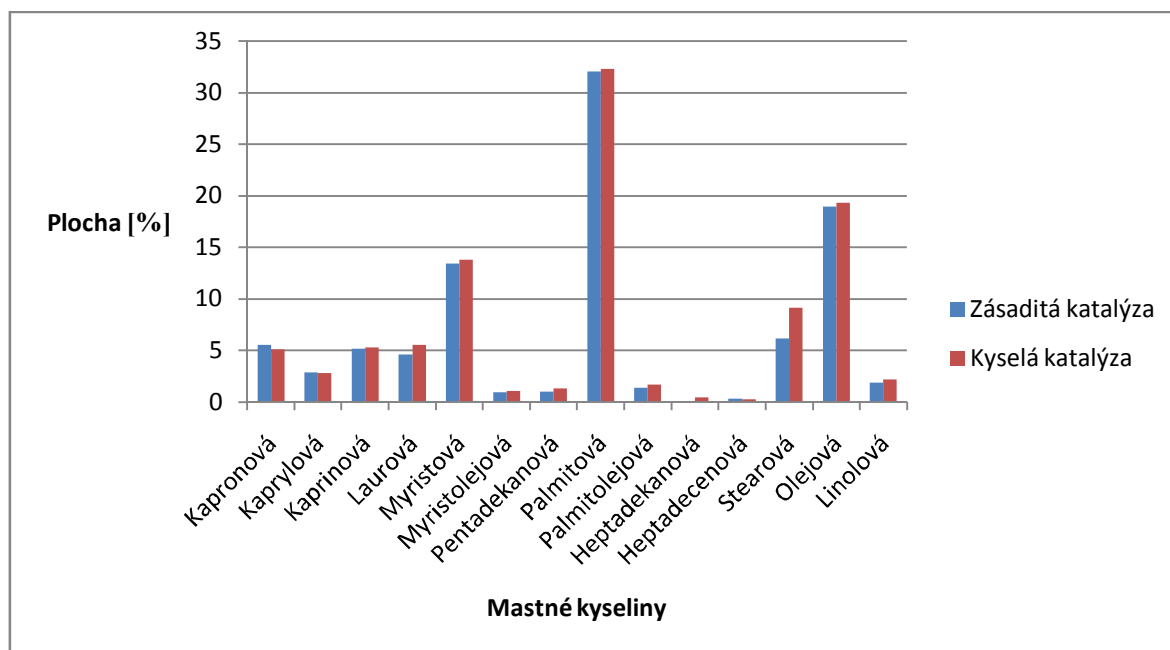
- Byla otevřena „Metoda“ (FILE – OPEN METHOD) CSW32\_laboratoře\_TUKY II. met.
- Byla spuštěna ikona „Waiting“ která umožňuje monitorování základní linie.
- Po kliknutí na ikonku vialky se stříkačkou bylo zobrazeno dialogové okno, kde byly vyplněny informace o analyzovaném vzorku.
- V případě že byla základní linie dostatečně stabilní, bylo možno zahájit vlastní analýzu.
- Do injektoru byly přes septum mikrostříkačkou postupně dávkovány 2  $\mu$ l standardu a následně byl dávkován stejný objem jednotlivých analyzovaných vzorků.
- Vlastní analýza byla spuštěna na ovládacím panelu plynového chromatografu tak, že byl zmáčknut start ihned po nástřiku vzorku a ihned poté bylo kliknuto na ikonku „RUN“.
- Poté byly zaznamenány hodnoty retenčních časů a plochy chromatografických píků ve standardu a v analyzovaných vzorcích.
- Před tím než se nastříkuje další vzorek, bylo nutno nejdříve vyčkat na vychlazení přístroje na počáteční teplotu analýzy (na panelu přístroje svítala kontrolka READY)
- Bylo nutné mezi jednotlivými nástřiky proplachovat stříkačku hexanem a nastříkovaným vzorkem.

## 6.2 Kvalitativní vyhodnocení metody plynové chromatografie

Postupně byly na plynovém chromatografu proměřeny všechny připravené vzorky methylesterů získané z různých vzorků mléka a smetany. Methylestery mastných kyselin, které byly připraveny zásaditou katalýzou, by měly být tvořeny pouze vázanými mastnými kyselinami, zatímco kyselá katalyzovaná esterifikace by měla umožnit přípravu methylesterů jak vázaných, tak i volných mastných kyselin. Porovnání výsledků bazické a kyselá katalýzy by tedy mělo umožnit stanovit obsah volných mastných kyselin. V první fázi práce byla provedena kvalitativní analýza vzorků s cílem zjistit, jaké mastné kyseliny jsou ve vzorku obsaženy a jaké je jejich procentuální zastoupení. Bylo sledováno, zda se takto získané profily MK liší u vzorků získaných bazickou a kyselou katalýzou.

Kvalitativní analýza byla provedena tak, že jednotlivé mastné kyseliny ve vzorcích byly srovnány s analýzou referenčního standardu SUPELCO<sup>TM</sup> 37 Component FAME Mix, která byla provedena za stejných podmínek. Methylestery mastných kyselin byly identifikovány tak, že retenční časy píků standardu byly srovnány s retenčními časy píků připravených vzorků.

Nejdříve byly na plynovém chromatografu proměřeny methylestery samotného vzorku mléka, který byl připraven bazickou a kyselou katalýzou. Každý ze vzorku byl proměřen minimálně třikrát a hodnoty byly následně průměrovány. Získané hodnoty ploch píků (procentuální zastoupení) jednotlivých mastných kyselin z obou katalýz byly následně porovnány a toto srovnání bylo uvedeno níže na obrázku 1.



Obr. 1. Zastoupení jednotlivých mastných kyselin ve vzorcích mléka, které byly připraveny esterifikací za kyselé a bazické katalýzy

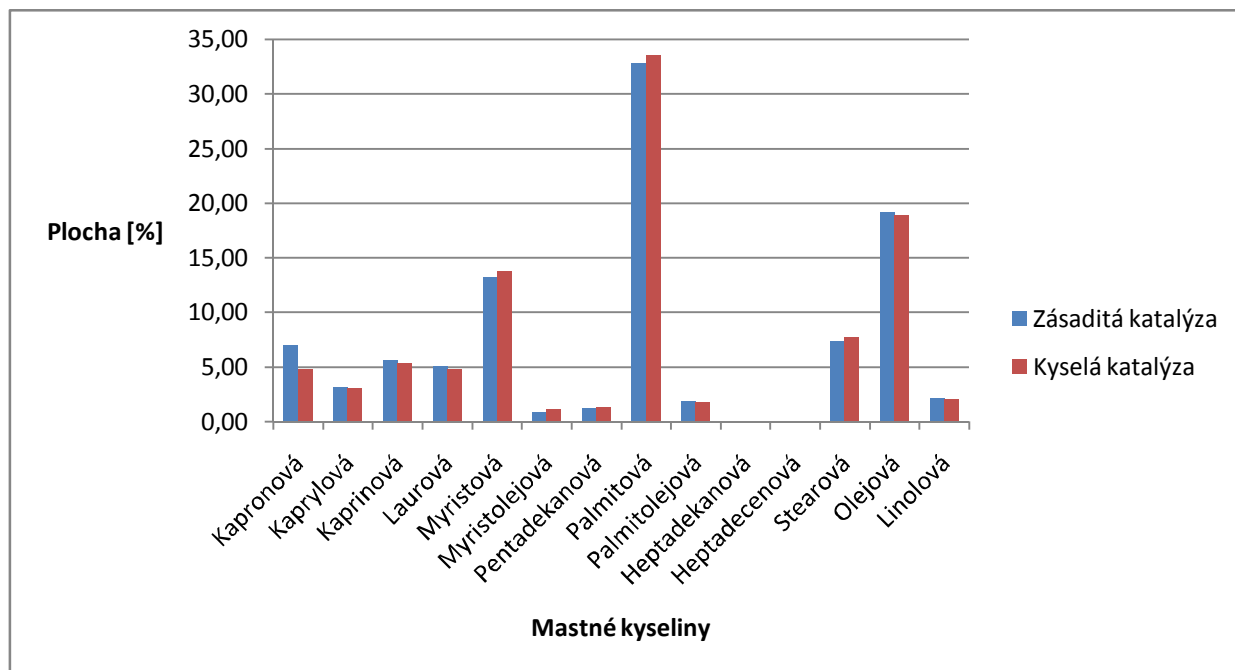
Na obrázku 1. jsou graficky znázorněny jednotlivé procentuální plochy, které odpovídají konkrétním mastným kyselinám. Ve vzorcích bylo identifikováno 14 různých mastných kyselin. Nejvyšší zastoupení měla kyselina palmitová, jejíž obsah v obou vzorcích byl vyšší než 30 %. Toto zjištění odpovídá hodnotám uváděným v literatuře. Kyselina palmitová je nejčastější kyselinou v mléčném tuku a její obsah se pohybuje v rozmezí 23,6 - 31,4 % [61]. Vysoké zastoupení bylo zjištěno i u kyseliny olejové, stearové a myristové, což je opět ve shodě s odbornou literaturou. Obsah kyseliny olejové v mléčném tuku se pohybuje

v rozmezí 14,9 - 22 %, průměrný obsah kyseliny myristové je 11,1 %, obsah kyseliny stearové se pohybuje kolem 10 % [62].

Jak je z obrázku patrné nebyl identifikován žádný zřetelný rozdíl mezi vzorky připravenými kyselou a zásaditou katalýzou. Jak bazická, tak kyselá katalýza ukazují téměř stejné hodnoty zastoupení jednotlivých mastných kyselin. Obsah volných mastných kyselin v mléčném tuku je velice nízký a bývá uváděn řádově v desetinách procent. U vzorků mléka, ve kterých nedošlo k degradaci tukové složky (například činností mikrobiálních enzymů), by tedy měl být obsah volných mastných kyselin zanedbatelný. Z toho plyne, že by neměl být zjištěn rozdílný výsledek u bazicky a kysele katalyzované esterifikace. Tento předpoklad potvrzují i výsledky získané v této práci. Profil MK vzorků mléka je pro bazicky i kysele připravené vzorky téměř shodný.

Stejně srovnání bylo provedeno u vzorků tuku získaného ze smetany. Opět se jednalo o vzorky mléčného tuku, ze kterých byly připraveny methylestery mastných kyselin pomocí dvou metod, tedy za kyselé a zásadité katalýzy.

Každý ze vzorků byl proměřen minimálně třikrát a výsledné hodnoty byly zprůměrovány. Výsledky z obou katalýz byly následně porovnány na obrázku 2.



Obr. 2. Zastoupení jednotlivých mastných kyselin ve vzorcích smetany, které byly získány kyselou a bazickou esterifikací

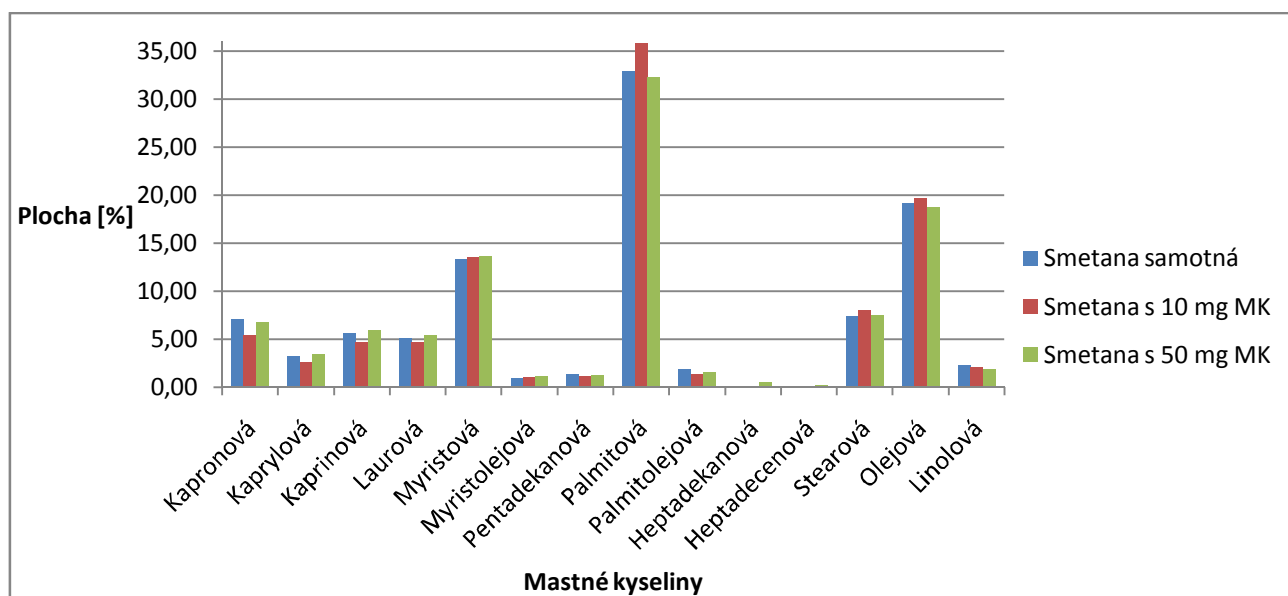
Na obrázku 2. jsou graficky zaznamenány procentuální plochy pík odpovídající konkrétním mastným kyselinám, které jsou obsaženy ve vzorku samotné smetany. Stejně jako u vzorků mléka bylo zjištěno největší zastoupení u kyseliny palmitové, dále byly ve větším množství ve vzorcích přítomny kyseliny myristová, stearová a olejová. Na rozdíl od vzorků mléka, však u smetany nebyly při analýze detekovány kyseliny heptadekanová a heptadecenová. Jejich zastoupení ve vzorcích mléka však bylo velice malé a výtěžnost extrakce tuku byla u smetany nižší než u vzorků mléka.

U vzorků extrahovaných ze smetany stejně jako tomu bylo v případě vzorků z mléka nelze identifikovat výrazné rozdíly mezi výsledky z bazické a kyselá katalýzy. Profily MK u vzorků získaných bazickou a kyselou esterifikací jsou téměř shodné.

Bylo provedeno srovnání výsledků kvalitativní analýzy vzorků smetany a mléka a bylo zjištěno, že získané profily MK vzorků se výrazněji neliší, ať už byly methylestery kyselin připraveny bazickou či kyselou katalýzou. Obsah volných mastných kyselin v mléčném tuku je však velice nízký. Proto byly v další fázi práce připraveny vzorky smetany, do kterých byly přidávány volné mastné kyseliny.

Na plynovém chromatografu byly tedy dále proměřeny připravené vzorky methylesterů s přidavkem volných mastných kyselin, a to konkrétně kyseliny palmitové, stearové, olejové, myristové, laurové a kaprylové. Do jednoho vzorku byly přidány všechny mastné kyseliny.

liny o hmotnosti 10 mg a do druhého vzorku všechny o hmotnosti 50 mg jak již bylo uvedeno výše u přípravy vzorků smetany. Z obou vzorků byly připraveny methylestery jak bazickou, tak kyselou katalýzou. Všechny vzorky byly následně proměřeny na plynovém chromatografu, kdy každý byl opět nastříknut minimálně třikrát a z hodnot byl udělán průměr. Naměřené výsledky byly následně graficky srovnány s výsledky ze samotné smetany, a to pro zásaditě katalyzované vzorky na obrázku 3 a pro kyselou katalyzované vzorky na obrázku 4.



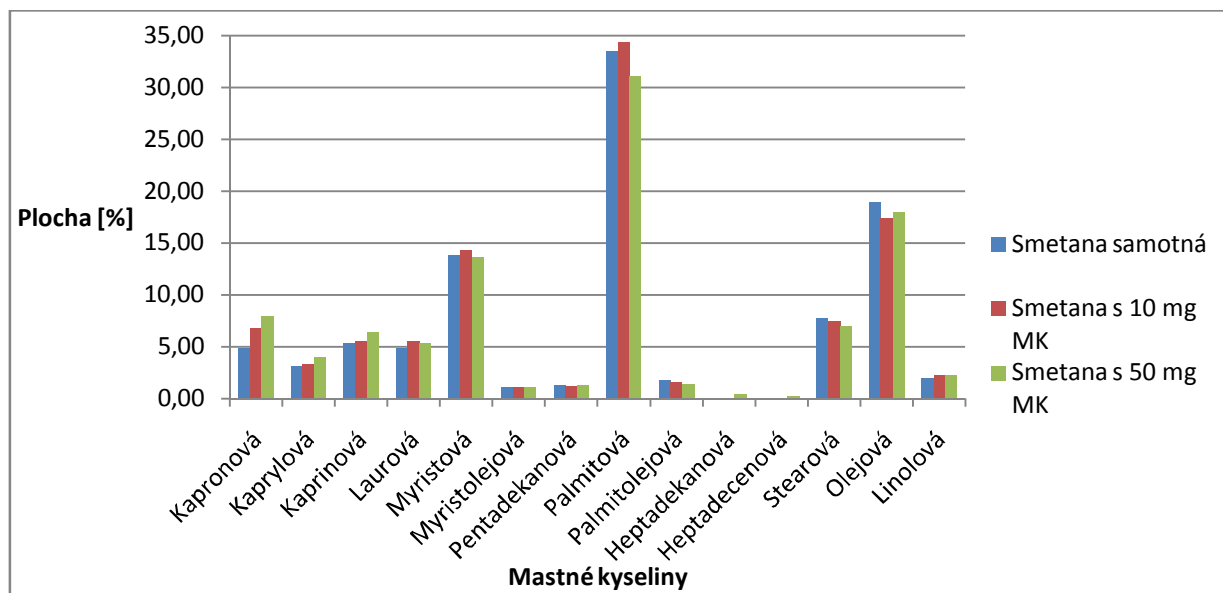
Obr. 3. Zastoupení mastných kyselin ve vzorcích smetany bez přídavku MK a smetany s přídavkem volných MK (bazická katalýza)

Na obrázku 3. je graficky znázorněno srovnání zastoupení jednotlivých mastných kyselin a to u vzorků methylesterů samotné smetany bez přídavku volných mastných kyselin a u vzorků kam byly záměrně přidány volné mastné kyseliny (kaprylová, myristová, olejová, stearová, laurová a palmitová) a to do jednoho vzorku byly přidány všechny o hmotnosti 10 mg a do druhého všechny o hmotnosti 50 mg. Všechny tyto jmenované vzorky methylesterů byly připraveny zásaditě katalyzovanou esterifikací.

Z takto vytvořeného grafického srovnání nejsou viditelné velké rozdíly v procentuálním zastoupení mastných kyselin mezi vzorky samotné smetany a vzorky s přídavkem volných mastných kyselin. Zastoupení jednotlivých kyselin se mezi vzorky liší maximálně v jednotkách procent. Bazická katalýza by měla umožnit vznik methylesterů pouze z vázaných kyselin, zastoupení MK, které byly ve volné formě do vzorků přidány, by se tedy nemělo na výsledném zastoupení těchto kyselin projevit. Lze říci, že tento předpoklad byl analýzou potvrzen.



Stejným způsobem byly analyzovány i vzorky získané kyselou katalýzou.



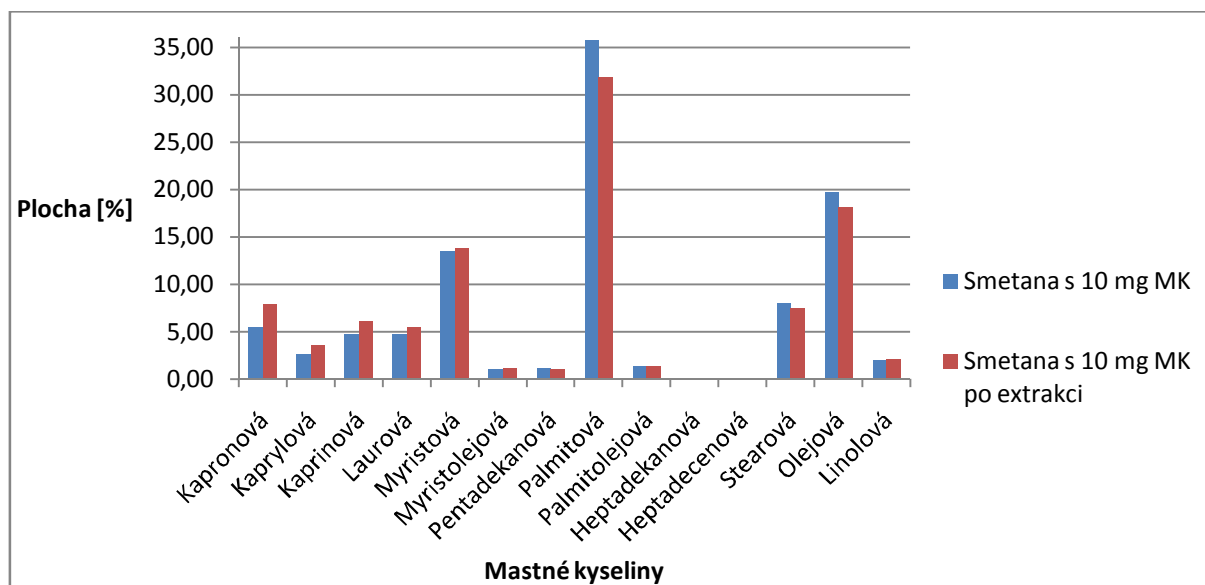
Obr. 4. Zastoupení mastných kyselin ve vzorcích smetany bez přídavku MK a smetany s přídavkem volných MK (kyselá katalýza)

Na obrázku 4. je graficky znázorněno srovnání profilu mastných kyselin ve vzorku samotné smetany a ve vzorcích smetany s přídavkem volných mastných kyselin, kdy do jednoho vzorku byly přidány všechny mastné kyseliny o hmotnosti 10 mg a do druhého o hmotnosti 50 mg.

Kysele katalyzovaná esterifikace by měla vést k převedení vázaných i volných MK na příslušné methylestery. Pokud by tomu tak bylo, měl by se přídavek MK projevit zvýšením procentuálního zastoupení těchto mastných kyselin. Zároveň by zastoupení těchto kyselin mělo být vyšší u vzorků, do kterých byly kyseliny přidány ve vyšší koncentraci. Tento předpoklad však získanými výsledky nebyl potvrzen. Příkladem lze uvést výsledky pro kyselinu palmitovou, která je ve všech vzorcích nejvíce zastoupena. Tato kyselina byla přidána do jednoho ze vzorků o hmotnosti 50 mg ale tento přídavek se podle výsledků vůbec neprojevil. Ve vzorku smetany bez přídavku této kyseliny bylo dokonce její zastoupení vyšší. Stejně je tomu v případě kyseliny olejové a stearové, které byly taktéž přidány do vzorku, ale tento přídavek se nijak neprojevil.

V dalším kroku bylo zjišťováno, zda není příčinou zjištěných výsledků proces extrakce tuku. Byl tedy připraven vzorek smetany, do kterého byly volné mastné kyseliny (palmitová, stearová, olejová, myristová a kaprylová) přidány až po extrakci a to všechny o hmotnosti 10 mg. Z tohoto vzorku byly připraveny methylestery jak zásaditě tak kysele katalyzovanou esterifikací a právě ty byly následně proměřeny na chromatografu. Každý ze

vzorků byl nastříknut minimálně třikrát a výsledky byly následně průměrovány. Poté byly výsledky srovnány se vzorkem smetany, kam byly přidány volné mastné kyseliny před extrakcí, taktéž všechny o hmotnosti 10 mg. Toto srovnání by mělo ukázat, zda je nějaký rozdíl pokud se do vzorků přidávají volné mastné kyseliny před nebo po extrakci. Toto srovnání je uvedeno pro bazicky katalyzované vzorky na obrázku 5 a pro kyselě katalyzované vzorky na obrázku 6.

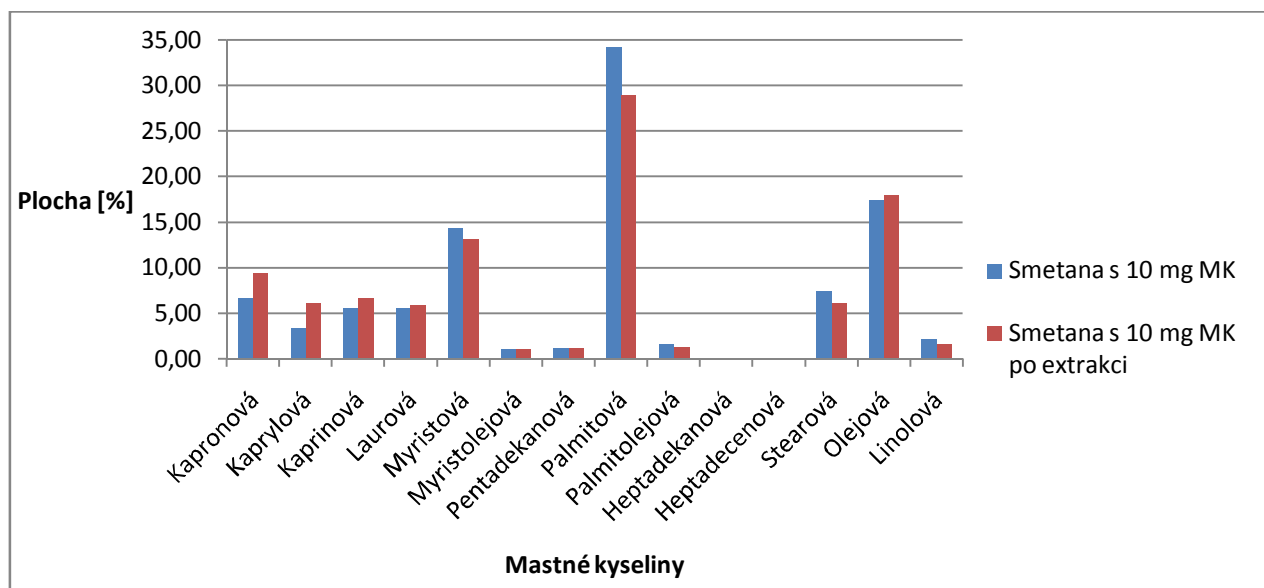


Obr. 5. Zastoupení mastných kyselin ve vzorcích smetany s přidavkem volných MK před a po extrakci (bazická katalýza)

Na obrázku 5 je graficky znázorněno srovnání zastoupení jednotlivých mastných kyselin pro vzorky smetany, kdy k jednomu vzorku byly přidány mastné kyseliny před extrakcí a ke druhému vzorku po extrakci. Tyto vzorky byly připraveny zásaditě katalyzovanou esterifikací.

Z obrázku nejsou patrné významné rozdíly mezi přidavkem mastných kyselin před a po extrakci. Největší rozdíl je patrný u nejvíce zastoupené mastné kyseliny a tou je kyselina palmitová. U kyseliny palmitové, stearové a olejové je vidět že zastoupení mastných kyselin je vyšší u vzorku, kam byly mastné kyseliny přidány před extrakcí. V případě kyseliny kaprylové a laurové je tomu ale naopak. Přestože zjištěné rozdíly jsou malé, naznačují žev extrahovaném vzorku může být nižší obsah kyselin s kratším řetězcem, a že může docházet k určitým ztrátám těchto kyselin během přípravy vzorku extrakcí. Je však třeba opět připomenout, že se jedná o vzorky získané bazickou katalýzou, na kterou by přidavek vol-

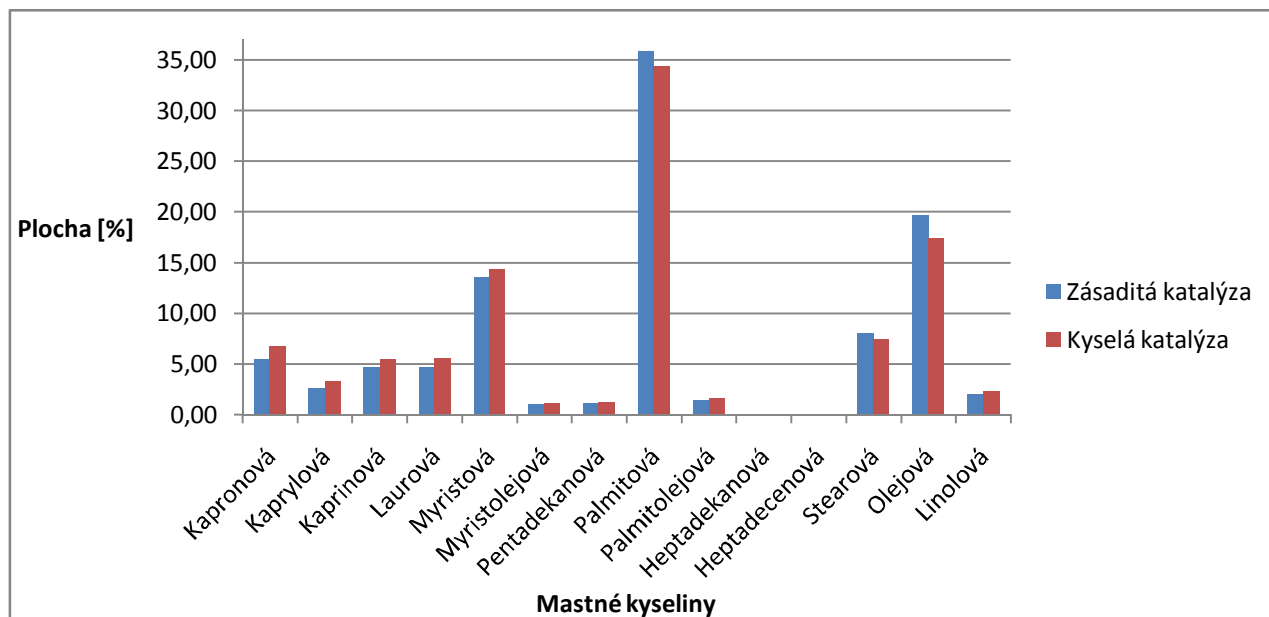
ných MK neměl mít vliv. Vliv přidavku volných MK by se ale měl výrazněji projevit při kyselé katalýze, pro kterou jsou výsledky uvedeny níže.



Obr. 6. Zastoupení mastných kyselin ve vzorcích smetany s přidavkem volných MK před a po extrakci (kyselé katalýza)

Na obrázku 6. jsou graficky znázorněny plochy píků konkrétních mastných kyselin pro vzorky smetany. K jednomu ze vzorků byly přidány mastné kyseliny před extrakcí a ke druhému vzorku byly přidány až po extrakci. Z těchto vzorků byly následně připraveny methylestery kyselé katalyzovanou esterifikací. Z grafu nejsou patrné u většiny mastných kyselin výrazné rozdíly mezi přidavkem mastných kyselin před a po extrakci. Největší rozdíl je pozorován u kyseliny palmitové. U kyseliny palmitové, olejové a stearové je vyšší zastoupení mastných kyselin ve vzorku, kam byly přidány volné mastné kyseliny před extrakcí, ale v případě kyseliny kaprylové a laurové je tomu naopak, což bylo prokázáno i u zásaditě katalyzovaných vzorků. Lze tedy říci, že výsledky při kyselé katalýze jsou obdobné, jako při katalýze zásadité. Během extrakce pravděpodobně dochází i u kyselé katalýzy k určitým ztrátám obsahu mastných kyselin s krátkým řetězcem.

Nakonec byly ještě srovnány výsledky vzorků methylesterů, které byly připraveny zásaditě a kyselou katalyzovanou esterifikací a to konkrétně pro vzorek smetany kam byly přidány mastné kyseliny všechny o hmotnosti 10 mg a tento přírůstek byl před extrakcí. Srovnání těchto výsledků je uvedeno na obrázku 7.



Obr. 7. Zastoupení mastných kyselin ve vzorcích smetany s přidavkem volných MK před extrakcí (bazická a kyselá katalýza)

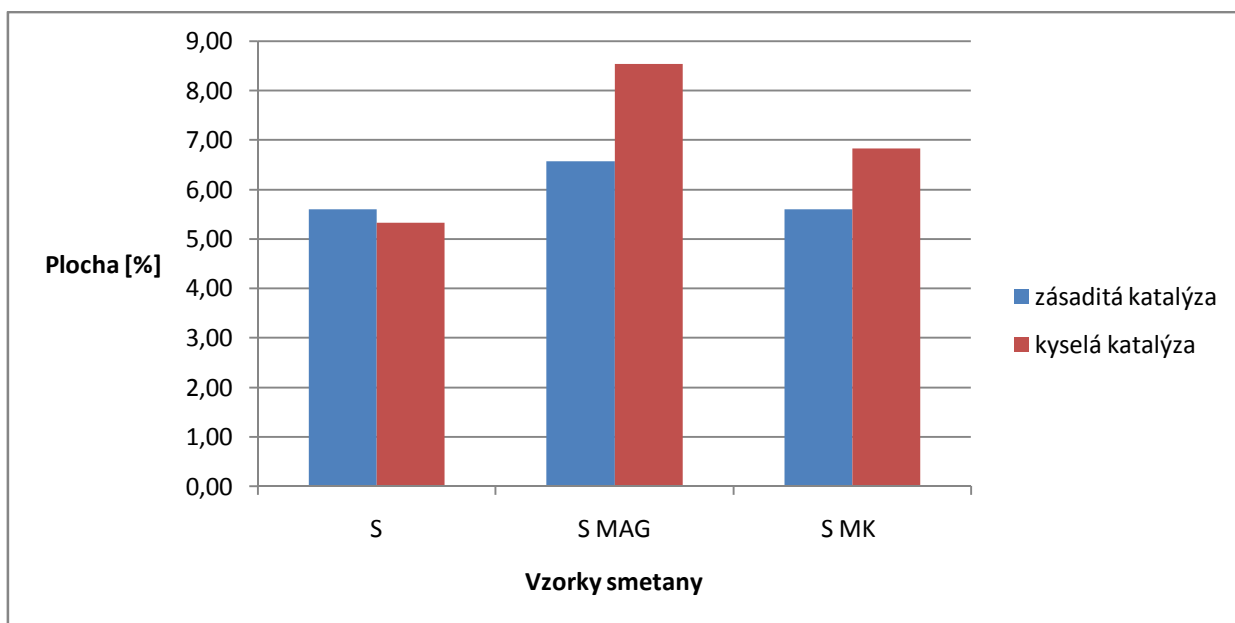
Na obrázku 7. jsou graficky srovnány profily mastných kyselin ve vzorku smetany, kam byly přidány volné mastné kyseliny (palmitová, laurová, myristová, stearová, olejová a kaprylová) před extrakcí a všechny o hmotnosti 10 mg. Z tohoto vzorku byly připraveny methylestery jak zásaditě, tak kysele katalyzovanou esterifikací. Jak je v grafu vidět, tak stejně jako tomu bylo v případě samotné smetany, nejsou zde patrné žádné výrazné rozdíly mezi bazickou a kyselou katalýzou. A to přesto, že při kyselé katalýze by mělo být zastoupení přidaných MK vyšší, vzhledem k tomu, že by měly být esterifikovány volné MK. Mírně vyšší zastoupení mají přidané MK s kratším řetězcem (k. laurová, kaprylová), ale stejný trend je vidět i u ostatních MK s krátkým řetězcem, které do smetany přidány nebyly.

Z naměřených výsledků se nepodařilo prokázat, že zásaditá katalýza esterifikuje vázané mastné kyseliny a kyselá katalýza esterifikuje jak volné, tak vázané mastné kyseliny, jelikož u obou katalýz se naměřené hodnoty téměř vůbec nelišily, tedy nedošlo ke zvýšení zastoupení přidaných MK při kyselé katalýze.

Z tohoto důvodu byla připravena nová série vzorků. Kdy do jednoho vzorku smetany byla přidána volná mastná kyselina, a to konkrétně kyselina kaprinová o hmotnosti 50 mg. Z tohoto vzorku byly následně připraveny methylestery zásaditou a bazickou katalýzou. Do dalšího vzorku smetany byl přidán monoacylglycerol kyseliny kaprinové a z tohoto vzorku byly taktéž následně připraveny methylestery jak zásaditě, tak kysele katalyzova-

nou esterifikací. Kyselina kaprinová představovala přídavek volné MK, monoacylglycerol této kyseliny představoval přídavek vázané formy kyseliny kaprinové.

Takto připravené vzorky byly proměřeny na plynovém chromatografu, každý minimálně třikrát a výsledky byly následně průměrovány. Následně bylo graficky srovnáno procentuální zastoupení kyseliny kaprinové v samotné smetaně kam nebyla přidána, se vzorkem smetany, kam byla záměrně přidána tato kyselina o hmotnosti 50 mg a vzorkem smetany kam byl přidán monoacylglycerol kyseliny kaprinové o hmotnosti 50 mg, kde je tato kyselina ve vázané formě a to jak pro bazicky, tak kyselě katalyzované vzorky.



Obr. 8. Zastoupení kyseliny kaprinové ve vzorcích s přídavkem této kyseliny ve volné a vázané formě (kyselá a bazická katalýza)

Na obrázku 8. je graficky znázorněno srovnání zásadité a kyselé katalýzy tří vzorků smetany. První dva sloupce grafu se týkají samotné smetany, kam nebyla přidána žádná mastná kyselina. Další dva sloupce znázorňují výsledky získané pro smetanu s přídavkem MAG a nakonec jsou v grafu znázorněny výsledky získané pro smetanu s přídavkem volné kyseliny kaprinové.

Zásaditá katalýza by měla esterifikovat vázané mastné kyseliny a kyselá katalýza by měla esterifikovat jak volné, tak vázané mastné kyseliny. Pokud se srovná vzorek samotné smetany se vzorkem, kam byla přidána volná mastná kyselina kaprinová, tak je vidět že kyselá katalýza opravdu rozezná tento přídavek, jelikož se zvýšila procentuální plocha u kyselé katalýzy vzorku s přídavkem volné mastné kyseliny kaprinové oproti vzorku samotné sme-

tany. Při bazické katalýze se ale přídavek volné kyseliny neprojevil a její zastoupení bylo stejné jako ve vzorku samotné smetany.

Pokud se srovná vzorek samotné smetany se vzorkem, kam byl přidán monoacylglycerol kyseliny kaprinové, která je zde ve vázané formě, tak je vidět že zásaditá i kyselá katalýza zaznamenala přídavek této kyseliny, jelikož došlo ke zvýšení procentuální plochy u obou katalýz oproti vzorku samotné smetany.

Tímto experimentem bylo tedy potvrzeno, že existují rozdíly mezi kyselou a bazickou katalýzou a že tyto metody mohou esterifikovat mastné kyseliny v různé formě rozdílně. Je ale třeba poznamenat, že rozdíly ve zjištěných hodnotách jsou velice malé. Navíc patří kyselina kaprinová mezi MK s kratším uhlíkovým řetězcem a z předchozích analýz se zdá, že při kyselé katalýze jsou kyseliny s kratším řetězcem esterifikovány lépe než při bazické katalýze. Výsledek může být ovlivněn i přípravou vzorků. Bylo by tedy třeba výsledky získané v této části podrobněji zkoumat a ověřit, než by z nich bylo možné vyvodit jasný závěr.

Proto byla v další části provedena i kvantitativní analýza vzorků. Vzhledem ke značnému počtu typů MK přítomných ve vzorcích byla zvolena pro tuto analýzu pouze jedna z mastných kyselin, které byly do vzorků přidávány. Jednalo se o kyselinu palmitovou, která byla vybrána i proto, že je ve všech vzorcích přítomna v největším množství

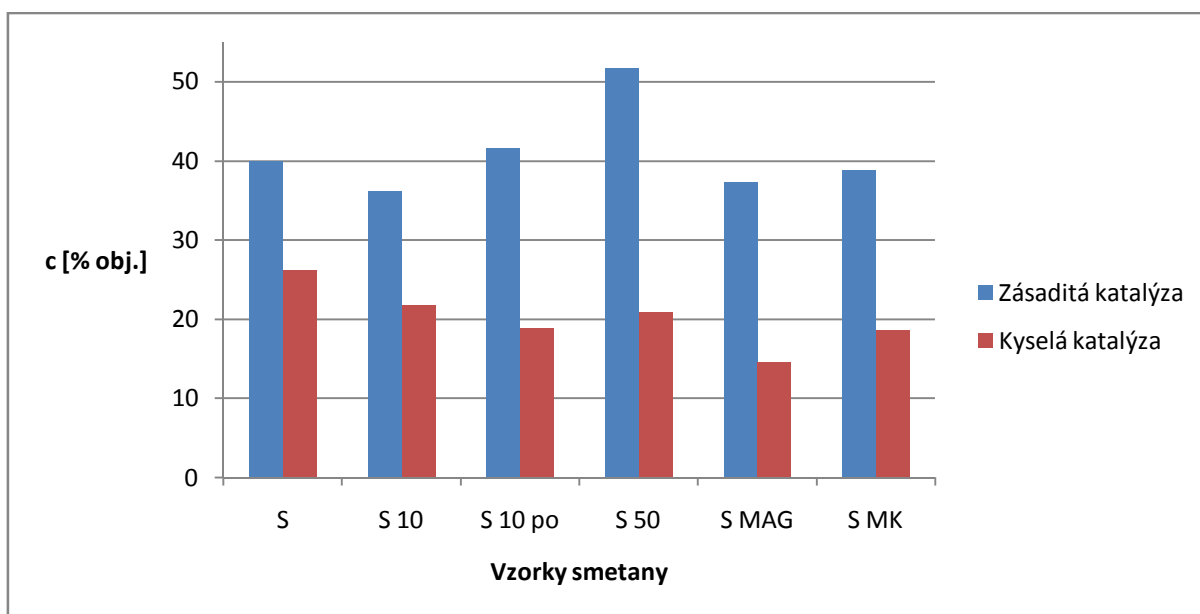
### **6.3 Kvantitativní vyhodnocení metody plynové chromatografie**

Pro kvantitativní vyhodnocení byla zvolena konkrétní mastná kyselina, a to kyselina palmitová, jelikož na základě výsledků z kvalitativní analýzy je patrné, že je zastoupena ve všech vzorcích nejvíce. Nejdříve byla připravena samotná kyselina palmitová ve formě methylesteru a to kyselé katalyzovanou esterifikací. Takto připravený vzorek byl proměřen na plynovém chromatografu a bylo zjištěno, že tento vzorek je čistý, jelikož byl vidět pouze pík kyseliny palmitové.

Následně byly připraveny vzorky methylesterů kyseliny palmitové pro sestavení kalibrační přímky. Koncentrace roztoků byly 100%, 50 %, 25 %, 12,5 % a 6,25 %. Postup přípravy je popsán v metodické části práce.

Takto připravené vzorky byly nastříknuty a proměřeny na plynovém chromatografu a byly zjištěny hodnoty plochy píků kyseliny palmitové (mV/s) v takto připravených vzorcích. Následně byla vytvořena kalibrační přímka závislosti plochy píků na koncentraci roztoku,

z které byla získána rovnice přímky. Z kalibrační závislosti byly následně vypočteny koncentrace kyseliny palmitové ve vzorcích samotné smetany, smetany kam byly přidány volné mastné kyseliny o hmotnosti 10 mg před a po extrakci, dále vzorku smetany kam byly přidány mastné kyseliny o hmotnosti 50 mg, vzorku smetany s přidáním kyseliny kaprinové a vzorku smetany s přidáním monoacylglycerolu kyseliny kaprinové a všechny tyto vzorky se získanou koncentrací kyseliny palmitové byly následně srovnány na obrázku 9.



Obr. 9. Koncentrace kyseliny palmitové v testovaných vzorcích smetany (kyselá a bazická katalýza)

Na obrázku 9. jsou uvedeny přesné koncentrace kyseliny palmitové ve všech připravených vzorcích smetany.

Pokud by za daných podmínek metody platilo, že bazická katalýza umožňuje esterifikaci vázané formy kyseliny a kyselá katalýza esterifikuje navíc i formu vázanou, byly by výsledky následující:

- Ve vzorku samotné smetany je obsah volné kyseliny palmitové nízký. Výsledky získané bazickou a kyselou katalýzou by tedy měly být shodné nebo velmi podobné. Ze získaných výsledků však nelze tento předpoklad potvrdit. Při kyselé katalýze byla zjištěna výrazně nižší koncentrace k. palmitové.
- Obecně u všech vzorků by měla být zjištěna vyšší koncentrace kyseliny palmitové u vzorků připravených za kyselé katalýzy než při katalýze bazické. Zjištěné výsledky jsou však přesně opačné.

- Ve vzorcích s přidavkem volné kyseliny palmitové, by měla být koncentrace této kyseliny vyšší u kyselých katalyzovaných vzorků ve srovnání se vzorkem samotné smetany. Koncentrace kyseliny palmitové v kyselých katalyzovaných vzorcích by měla být vyšší u vzorků s větším přidavkem této kyseliny (S 50) oproti vzorku s nižším přidavkem (S 10). Ve vzorcích však byla zjištěna stejná nebo nižší koncentrace.
- U bazické katalýzy by se zjištěná koncentrace kyseliny palmitové neměla měnit po přidavku této kyseliny ve volné formě. V některých vzorcích je ale zjištěná koncentrace vyšší.

#### 6.4 Shrnutí výsledků

Nejdříve bylo pracováno se standardizovaným UHT mlékem a mlékem čerstvým. Prvním krokem byla extrakce mléčného tuku, ale původně navržený postup nebyl pro tento účel vhodný, proto bylo vyzkoušeno více možností extrakce. Nakonec byla nalezena metoda extrakce, při které došlo k oddělení vrstev, a byl ze vzorku mléka získán extrahovaný tuk. Bylo ale zjištěno, že množství extrahovaného tuku z mléka je velmi malé a spotřeba použitých rozpouštědel při druhé metodě extrakce by byla značná, což by bylo velmi finančně nákladné. Z tohoto důvodu byl vytvořen pouze jeden vzorek mléka a následně bylo v této diplomové práci pracováno se smetanou.

Bylo připraveno šest různých variant vzorků smetany, ty byly následně extrahovány a z extrahovaného tuku byly připraveny methylestery mastných kyselin a to jak kyselou, tak zásaditou katalýzou. Takto připravené vzorky methylesterů jak smetany, tak mléka byly následně proměřeny na plynovém chromatografu a byla provedena kvalitativní a kvantitativní analýza.

U kvalitativní analýzy byly srovnány profily mastných kyselin u různých vzorků připravených kyselou a zásaditou katalýzou. Kyselá katalýza by měla esterifikovat volné a vázané mastné kyseliny a zásaditá katalýza by měla esterifikovat pouze mastné kyseliny vázané. Veškeré naměřené hodnoty byly zpracovány graficky, ale ani v jednom případě nebyly zjištěny výrazné změny mezi profily MK u kyselých a bazických katalýz. Kvalitativní analýzou se však podařilo stanovit zastoupení MK v mléčném tuku a toto zastoupení je ve shodě s dostupnými literárními zdroji.



U kvantitativní analýzy byla vytvořena kalibrační přímka kyseliny palmitové a na jejím základě byla zjištěna přesná koncentrace kyseliny palmitové ve vzorcích smetany. Výsledky této analýzy jsou uvedeny v předchozí kapitole a lze je shrnout konstatováním, že neodpovídají předpokladu, že by touto metodou za těchto podmínek a postupu přípravy vzorků, bylo možné stanovit obsah volných mastných kyselin ve vzorku nebo změnu obsahu těchto kyselin po jejich přidavku.

#### 6.4.1 Doporučení pro optimalizaci metodiky

Celý postup stanovení volných mastných kyselin ve vzorcích mléka a smetany je poměrně komplikovaný a zahrnuje samotnou přípravu vzorku, tedy extrakci mléčného tuku, dále přípravu methylesterů pomocí kyseliny a bazicky katalyzované esterifikace, a nakonec vlastní analýzu vzorků plynovou chromatografií. Každý z výše uvedených dílčích kroků může mít zásadní vliv na konečný výsledek analýzy a měl by být tudíž dále studován a optimalizován.

Předmětem další práce by mohlo být více se zaměřit na metodu použité extrakce, která sice umožnila získání mléčného tuku ze vzorku, ale bylo zjištěno, že ze vzorku smetany o hmotnosti 10 g byly získány pouze 2 g extrahovaného mléčného tuku, což odpovídá pouze 20% smetaně, přičemž v této diplomové práci bylo pracováno se smetanou 31%. Což znamená, že nebylo vyextrahováno dostatečné množství tuku a některé složky přítomné ve smetaně tak mohly být ztraceny nebo je jejich zastoupení mohlo změnit. Byla by možnost nastavit nové parametry této použité extrakce, dále zkoušet vytvořit více vzorků a testovat zda má na extrakci vliv stáří smetany, způsob jejího skladování nebo zvolit další metody extrakce.

Dále by bylo možno vyzkoušet další metody přípravy methylesterů. Jednou z metod by mohla být „general method“ podle normy ES ISO 12966–2:2012 pro přípravu methylesterů mastných kyselin. Dále by mohla být použita metoda s fluoridem boritým nebo by se daly pozměnit parametry metody, která byla použita v této diplomové práci. U jednotlivých metod by mělo být důkladně prověřeno, zda skutečně dokáží „odlišit“ volné mastné kyseliny od vázaných forem.

Dále by mohla být předmětem další studie samotná analýza pomocí plynové chromatografie, kdy by se daly pozměnit samotné parametry této analýzy, nebo by se dal použít plynový chromatograf s dávkovačem vzorku, aby byla minimalizována lidská chyba během nástřiku.

Pro stanovení lipolytické aktivity mikroorganismů by pak bylo zajímavé připravit kulturační médium o přesně definovaném složení acylglycerolů a mastných kyselin. Bylo by však nutné vyřešit, jakým způsobem by byl tuk do média zapracován. Médium obsahující definované tuky o známém množství by umožnilo i bližší popis lipolytických dějů. Dalo by se například zjistit, v jakých polohách nebo jaké mastné kyseliny daný mikroorganismus štěpí.

## ZÁVĚR

Diplomová práce obsahuje teoretickou část, která se zabývá zejména obecnými charakteristikami mastných kyselin, jejich fyzikálními a chemickými vlastnostmi a jejich rozdělením podle různých hledisek. Dále jsou zde popsány konkrétní metody pro stanovení mastných kyselin a to zejména stěžejní metoda této práce a tou je plynová chromatografie. Další kapitolu tvoří lipolytická aktivita mikroorganismů, a to zejména produkce lipolytických enzymů a jejich role v produkci mastných kyselin.

Praktická část této diplomové práce se zabývá konkrétním stanovením volných mastných kyselin ve vzorcích samotného mléka a vzorcích samotné smetany, smetany kam byly přidány volné mastné kyseliny, a to konkrétně kyselina laurová, myristová, palmitová, stearová, olejová a kaprylová, dále vzorky smetany s přídavkem kyseliny kaprinové a vzorek smetany s přídavkem monoacylglycerolu kyseliny kaprinové. Je zde popsána konkrétní příprava vzorků jak mléka, tak smetany. Dále jsou zde postupy extrakce mléčného tuku, přípravy methylesterů a samotná metodika metody plynové chromatografie a její veškeré parametry. Další kapitolou je kvalitativní a kvantitativní vyhodnocení metody plynové chromatografie.

Při závěrečném vyhodnocení výsledků bylo zjištěno, že použitá metoda stanovení volných mastných kyselin v reálných systémech v takovém provedení a s postupy, které byly použity při práci na této diplomové práci, není pro určené účely vhodná. Následně je v praktické části shrnutí veškerých výsledků a jsou zde diskutovány možnosti dalšího testování a práce na optimalizaci této metody.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 1*. 2. upr. vyd. Tábor: OSSIS, 2002, 331 s. ISBN 80-866-5903-8.
- [2] Fatty acids. *IUPAC Compendium of Chemical Terminology* [online]. Research Triangle Park, NC: IUPAC, 2009-06-12, s. - [cit. 2015-03-30]. DOI: 10.1351/goldbook.F02330. Dostupné z: <http://goldbook.iupac.org/F02330.html>
- [3] O'BRIEN, Richard D. *Fats and oils: formulating and processing for applications*. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press, c2009, s. 267-269. ISBN 1420061666.
- [4] CHOW, Ching Kuang. *Fatty acids in foods and their health implications*. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press, c2008, 1281 p. Food science and technology (Taylor. ISBN 08-493-7261-5.
- [5] ENGELKING, Larry R. Saturated and Unsaturated Fatty Acids. *Textbook of Veterinary Physiological Chemistry*. 2015, s. 345-350.
- [6] SVAČINA, Štěpán. *Klinická dietologie*. Vyd. 1. Praha: Grada, 2008. ISBN 978-80-247-2256-6.
- [7] MENSINK, R.P. Fatty Acids: Health Effects of Saturated Fatty Acids. *Encyclopedia of Human Nutrition*. 2013, volume 2, s. 215-219.
- [8] EDITOR-IN-CHIEF, Moselio Schaechter. *Encyclopedia of microbiology*. 3rd ed. S.l.: Elsevier, 2009. ISBN 978-012-3739-445.
- [9] DAVIDSON, P, John Nikolaos SOFOS a Alfred Larry BRANEN. *Antimicrobials in food*. 3rd ed. Boca Raton: Taylor, 2005, 706 p. Food science and technology (Marcel Dekker, Inc.), 145. ISBN 978-082-4740-375.
- [10] GUNSTONE, F, John L HARWOOD a Albert J DIJKSTRA. *The lipid handbook with CD-ROM*. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press, c2007, xiii, 656 p. ISBN 08-493-9688-3.
- [11] FIFE, Bruce. *The palm oil miracle*. Colorado Springs, CO: Picadilly Books, c2007, 191 p. ISBN 978-094-1599-658.
- [12] *Encyclopædia Britannica: Stearic acid* [online]. 2015 [cit. 2015-04-01]. Dostupné z: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/564584/stearic-acid>
- [13] DIJKSTRA, HAMILTON a Wolf HAMM. *Trans Fatty acids*. Oxford, UK: Blackwell Pub., 2008. ISBN 978-1-4051-5691-2.

- [14] CHOW, Ching Kuang. *Fatty acids in foods and their health implications*. 2nd ed. New York: M. Dekker, 2000, xii, 1045 p. Food science and technology. ISBN 08-247-6782-9.
- [15] ZEALAND, Food Standards Australia New. *Erucic acid in food: a toxicological review and risk assessment*. Canberra: Food Standards Australia New Zealand, 2003. ISBN 0642345260.
- [16] SIMOPOULOS, Artemis P a Leslie G CLELAND. *Omega-6/omega-3 essential fatty acid ratio: the scientific evidence*. New York: Karger, c2003, xiii, 173 p. ISBN 38-055-7640-4.
- [17] EDITED BY J. GHISOLFI, Edited by J.G. *Essential fatty acids and infant nutrition: proceedings of the international symposium, May 26-27, 1989, Athens, Greece*. Montrouge, France: John Libbey Eurotext, 1992. ISBN 08-619-6395-4.
- [18] KOBA, Kazunori a Teruyoshi YANAGITA. Health benefits of conjugated linoleic acid (CLA). *Obesity Research* [online]. 2014, vol. 8, issue 6, e525-e532 [cit. 2015-04-03]. DOI: 10.1016/j.orcp.2013.10.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871403X13001968>
- [19] AKOH, Casimir C a David B MIN. *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press/Taylor, c2008, xiii, 914 p. ISBN 14-200-4663-2
- [20] ZSUZSANNA BÖSZE, Editor. *Bioactive components of milk*. New York, NY: Springer, 2008. ISBN 978-038-7740-874.
- [21] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.
- [22] MUKHERJEE, Kumar D a Nikolaus WEBER. *Analysis of lipids*. Boca Raton: CRC Press, c1993, 519 p. ISBN 08-493-3039-4.
- [23] NOLLET, Ed. by Leo M. L. *Handbook of food analysis: Physical characterization and nutrient analysis*. 2. ed., rev. and expanded. New York, NY [u.a.]: Dekker, 2004. ISBN 08-247-5036-5.
- [24] POOLE, C. *Gas chromatography*. 1st ed. Boston: Elsevier, 2012, viii, 743 p. ISBN 978-012-3855-404.

- [25] BROWN, Ian. The role of the stationary phase in gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1963, volume 10, s. 284-293. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)92311-8. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967301923118>
- [26] Gas Chromatography. *LC-GC North America* [online]. 2013, roč. 31, č. 1, s. 12-12 [cit. 2015-04-04]. Dostupné z: <http://web.b.ebscohost.com.proxy.k.utb.cz/ehost/pdfviewer/pdfviewer?sid=b697a36e-6190-46c1-a9f0-d230560ffab8%40sessionmgr115&vid=0&hid=115>
- [27] THE FUNDAMENTALS OF... Gas Chromatography Systems. *Biomedical Instrumentation & Technology* [online]. 2012, volume 46, issue 5, s. 375-379 [cit. 2015-04-04]. Dostupné z: <http://search.proquest.com.proxy.k.utb.cz/docview/1152022567?accountid=15518>
- [28] KUSS, Hans-Joachim a Stavros KROMIDAS. *Quantification in LC and GC: a practical guide to good chromatographic data*. Weinheim: Wiley-VCH, c2009, xviii, 358 p. ISBN 35-273-2301-5.
- [29] NOLLET, Leo M a Fidel TOLDRÁ. *Food analysis by HPLC*. 3rd ed. Boca Raton, FL: CRC Press, c2013, xvi, 1062 p. ISBN 978-143-9830-840.
- [30] CAZES, Jack. *Encyclopedia of chromatography*. 2nd ed. Boca Raton, FL: Taylor, c2005, 2 v. ISBN 08247278782.
- [31] NIESSEN, W. *Liquid chromatography--mass spectrometry*. 3rd ed. / . Boca Raton: CRC/Taylor, c2006, 608 p. Chromatographic science, v. 97. ISBN 978-082-4740-825.
- [32] DONATO, P., P. DUGO a L. MONDELLO. Separation of Lipids. *Liquid Chromatography*. Elsevier, 2013, s. 203. DOI: 10.1016/B978-0-12-415806-1.00009-7. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124158061000097>
- [33] KENKEL, John. *Analytical chemistry for technicians*. 3rd ed. Boca Raton: Lewis Publishers, c2003, 554 p. ISBN 15-667-0519-3
- [34] SHERMA ., Ed. by Joseph.. *Handbook of thin-layer chromatography*. 3. ed., rev. and expanded. New York: Marcel Dekker, 2003. ISBN 02-039-1243-8.

- [35] AHUJA, Satinder. *Chromatography and separation science*. Boston: Academic Press, c2003, xi, 250 p. Separation science and technology (San Diego, Calif.), v. 4. ISBN 01-204-4981-1
- [36] RAAMAN, N. *Phytochemical techniques*. Pitam Pura, New Delhi: New India Publ. Agency, 2006. ISBN 81-894-2230-8.
- [37] NIELSEN, S. *Food analysis*. 4th ed. Dordrecht: Springer, c2010, xiv, 602 p. ISBN 9781441914781.
- [38] VO-DINH, Tuan a G GAUGLITZ. *Handbook of spectroscopy*. Cambridge: Wiley-VCH, c2003, 2 v. (various pagings). ISBN 35-272-9782-0.
- [39] STUART, Barbara. *Infrared spectroscopy: fundamentals and applications*. Hoboken, NJ: J. Wiley, c2004, xv, 224 p. ISBN 04-708-5428-6.
- [40] RÍOS CASTRO, Ángel. *Analysis and detection by capillary electrophoresis*. 1st ed. Editor M Marina, Miguel Valcárcel Cases. Amsterdam: Elsevier, 2005, xxviii, 767 s. Comprehensive analytical chemistry, vol. 45. ISBN 04-445-1718-9.
- [41] *CHEMIE POTRAVIN: Praktická cvičení*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2012. ISBN 978-80-7305-646-9.
- [42] MIŠURCOVÁ, Ladislava. *Základy biologie*. Vyd. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2010. ISBN 978-807-3184-346.
- [43] EDITED BY LEO M.L. NOLLET, Edited by Leo M.L.Fidel Toldrá. *Handbook of dairy foods analysis*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2009. ISBN 978-142-0046-328.
- [44] ARORA, Edited by Dilip K. a Associate editors Paul D.Deepak Bhatnagar ASSOCIATE EDITORS PAUL D. BRIDGE. *Fungal biotechnology in agricultural, food, and environmental applications*. New York: Marcel Dekker, 2004. ISBN 02-039-1336-1.
- [45] NOLLET, Leo M a Fidel TOLDRÁ. *Handbook of dairy foods analysis*. Boca Raton, FL: CRC Press, c2010, xviii, 900 p. ISBN 14-200-4631-4.
- [46] SAXENA, R.K, Anita SHEORAN, Bhoopander GIRI a W.Sheba DAVIDSON. Purification strategies for microbial lipases. *Journal of Microbiological Methods*. 2003, vol. 52, issue 1, s. 1-18. DOI: 10.1016/S0167-7012(02)00161-6. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701202001616>

- [47] WHITEHURST, Robert J a Maarten van OORT. *Enzymes in food technology*. 2nd ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2010, xiv, 368 p. ISBN 14-051-8366-7.
- [48] AKOH, Casimir C a David B MIN. *Food lipids: chemistry, nutrition, and biochemistry*. 2nd ed., rev. and expanded. New York: M. Dekker, c2002, xiii, 1005 p. Food science and technology (Marcel Dekker, Inc.), 117. ISBN 08-247-0749-4.
- [49] BUŇKOVÁ, Leona a Magda DOLEŽALOVÁ. *Obecná mikrobiologie*. Vyd. 2., nezměn. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2010, 190 s. ISBN 978-80-7318-973-0.
- [50] SEDLÁČEK, Ivo. *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007, 270 s. ISBN 80-210-4207-9.
- [51] JOHN I. PITT, John I. Ailsa D. *Fungi and food spoilage*. 3rd ed. Dordrecht: Springer, 1985. ISBN 978-038-7922-072.
- [52] MACHIDA, Masayuki a Katsuya GOMI. *Aspergillus: molecular biology and genomics*. Norfolk, UK: Caister Academic Press, c2010, vii, 238 p. ISBN 19-044-5553-0.
- [53] FESSNER, W a Thorleif ANTHONSEN. *Modern biocatalysis: stereoselective and environmentally friendly reactions*. Weinheim: Wiley-VCH, c2009, xxiii, 375 p. ISBN 978-352-7320-714.
- [54] LENNARTSSON, P.R., M.J. TAHERZADEH a L. EDEBO. Rhizopus. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier, 2014, s. 284. DOI: 10.1016/B978-0-12-384730-0.00391-8. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123847300003918>
- [55] WINN, Washington C a Elmer W KONEMAN. *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams, c2006, xxxi, 1535, 30 p., [79] leaves of plates. ISBN 07-817-3014-7.
- [56] GHERBAWY, Youssuf, Kerstin VOIGT a Lajos FERENCZY. *Molecular identification of fungi*. New York: Springer, c2010, xxi, 501 p. ISBN 9783642050428.
- [57] WEIMER, Edited by Bart C. *Improving the flavour of cheese*. Cambridge: Woodhead publ, 2007. ISBN 978-184-5690-076.
- [58] GEROLD BARTH, Editor. *Yarrowia lipolytica: biotechnological applications*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. ISBN 978-364-2385-834.



- [59] EDITED BY DUANE R. HOSPENTHAL, Edited by Duane R. Micheal G. *Diagnosis and treatment of human Mycoses*. Totowa, N.J: Humana Press, 2007. ISBN 978-159-7453-257.
- [60] ESSER, Karl. *The mycota: a comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research*. 2nd ed. New York: Springer, c2004-  
<c2012>, v. <1-6, 8-10>. ISBN 978364211458810.
- [61] NOLLET, Leo M a Fidel TOLDRÁ. *Handbook of dairy foods analysis* [online]. Boca Raton, FL: CRC Press, c2010, xviii, 900 p. [cit. 2015-02-23]. ISBN 14-200-4631-4. Dostupné z: <http://books.google.cz/books?id=UPEGQsTbjQYC&pg=PA432&dq=lipolytic+activity&hl=cs&sa=X&ei=jy7jU4SFMMyO7Qakq4DYCw&ved=0CDUQ6AEwAw#v=onepage&q=lipolytic%20activity&f=false>
- [62] NOLLET, Leo M a Fidel TOLDRÁ. *Handbook of dairy foods analysis* [online]. Boca Raton, FL: CRC Press, c2010, xviii, 900 p. [cit. 2015-02-23]. ISBN 14-200-4631-4. Dostupné z: <http://books.google.cz/books?id=UPEGQsTbjQYC&pg=PA432&dq=lipolytic+activity&hl=cs&sa=X&ei=jy7jU4SFMMyO7Qakq4DYCw&ved=0CDUQ6AEwAw#v=onepage&q=lipolytic%20activity&f=false>

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

DHA Kyselina dokosahexaenová

EPA Kyselina eikosapentaenová

PUFA Polynenasycená mastná kyselina

CLA Konjugovaná kyselina linolová

FID Plamenově-ionizační detektor

HPLC Vysokoučinná kapalinová chromatografie

GC Plynová chromatografie

IR Infračervená spektrometrie

UV Ultrafialová spektrometrie

KOH Hydroxid draselný

MK Mastná kyselina

TAG Triacylglycerol

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obr. 1. Zastoupení jednotlivých mastných kyselin ve vzorcích mléka, které byly připraveny esterifikací za kyselá a bazická katalýza .....	53
Obr. 2. Zastoupení jednotlivých mastných kyselin ve vzorcích smetany, které byly získány kyselou a bazickou esterifikací .....	55
Obr. 3. Zastoupení mastných kyselin ve vzorcích smetany bez přídavku MK a smetany s přídavkem volných MK (bazická katalýza) .....	56
Obr. 4. Zastoupení mastných kyselin ve vzorcích smetany bez přídavku MK a smetany s přídavkem volných MK (kyselá katalýza) .....	57
Obr. 5. Zastoupení mastných kyselin ve vzorcích smetany s přídavkem volných MK před a po extrakci (bazická katalýza) .....	58
Obr. 6. Zastoupení mastných kyselin ve vzorcích smetany s přídavkem volných MK před a po extrakci (kyselá katalýza) .....	59
Obr. 7. Zastoupení mastných kyselin ve vzorcích smetany s přídavkem volných MK před extrakcí (bazická a kyselá katalýza) .....	60
Obr. 8. Zastoupení kyseliny kaprinové ve vzorcích s přídavkem této kyseliny ve volné a vázané formě (kyselá a bazická katalýza) .....	61
Obr. 9. Koncentrace kyseliny palmitové v testovaných vzorcích smetany (kyselá a bazická katalýza) .....	63

**SEZNAM TABULEK**

<i>Tab. 1. Přehled nasycených mastných kyselin a jejich označování .....</i>	15
<i>Tab. 2. Nenasycené mastné kyseliny a jejich označování.....</i>	18
<i>Tab. 3. Zastoupení mastných kyselin v mléce [1, s. 98] .....</i>	21
<i>Tab. 4. Navážky vzorků pro extrakci mléčného tuku.....</i>	44