

# **Stanovení riboflavinu v syrovátce s využitím metody luminiscenční spektroskopie**

Barbora Karásková

---

Bakalářská práce  
2018

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie potravin  
akademický rok: 2017/2018

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Barbora Karásková**  
Osobní číslo: **T15928**  
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**  
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Stanovení riboflavinu v syrovátce s využitím metody  
luminiscenční spektroskopie**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Charakteristika a získávání syrovátky.
2. Základní principy luminiscenční spektroskopie.
3. Využití luminiscenční spektroskopie pro hodnocení mléka a mléčných výrobků.

### II. Praktická část

1. Výběr vhodného způsobu pro měření luminiscence syrovátky.
2. Získání luminiscenčních spekter syrovátky a riboflavinu.
3. Získání a vyhodnocení spekter syrovátky s přísady riboflavinu.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] PELANT, Ivan a Jan VALENTA. Luminiscenční spektroskopie. Praha: Academia, 2006. ISBN 80-200-1447-0.

[2] STRASBURG, G. M. a LUDESCHER, R.D. Theory and applications of fluorescence spectroscopy in food research. Trends in Food Science and Technology. 1995, 6, 69-75.

[3] FAGAN, C.C., T.G. FERREIRA, F.A. PAYNE, C.P. O'DONNELL, D.J. O'CALLAGHAN a M. CASTILLO. Preliminary evaluation of endogenous milk fluorophores as tracer molecules for curd syneresis. Journal of Dairy Science. 2011, 94(11), 5350-5358. DOI: 10.3168/jds.2011-4399. ISSN 00220302.

[4] HUANG, Rongmin, Hyun Jung KIM a David B. MIN. Photosensitizing Effect of Riboflavin, Lumiflavin, and Lumichrome on the Generation of Volatiles in Soy Milk. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2006, 54(6), 2359-2364. DOI: 10.1021/jf052448v. ISSN 0021-8561.

[5] SUKOVÁ Dagmar. Syrovátka v potravinářství. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2006. s 60. ISBN 80-7271-173-3.

Vedoucí bakalářské práce:

**Mgr. Martina Bučková, Ph.D.**

Ústav technologie potravin

Datum zadání bakalářské práce:

**2. února 2018**

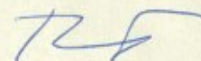
Termín odevzdání bakalářské práce:

**3. května 2018**

Ve Zlíně dne 2. února 2018



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.  
*děkan*



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.  
*ředitel ústavu*



Příjmení a jméno: KARÁŠKOVÁ BARBORA

Obor: CHTP

## 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;
- byla jsem seznámena 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 užít 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, považuji 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 23.4.2018

Karášková

<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 nevyjádřeně 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 předpisy 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, oписy 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 díla:

(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 přejevu 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 jím 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 přihlíží k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Bakalářská práce je věnována možnosti využití luminiscenční spektroskopie pro stanovení riboflavinu v syrovátce. Teoretická část práce byla zaměřena na charakteristiku syrovátky, její získávání a využití v potravinářském průmyslu. Dále byla pozornost věnována vysvětlení základních principů luminiscenční spektroskopie a její využitelnosti v potravinářství.

Praktická část práce byla zaměřena na získání luminiscenčních spekter vzorků syrovátky a jejich vyhodnocení v závislosti na množství riboflavinu. Pozornost byla věnována výběru vhodných podmínek měření – volbě excitační a emisní vlnové délky a formě vzorků, které byly měřeny v pevném a kapalném stavu.

**Klíčová slova:** syrovátka, riboflavin, luminiscenční spektroskopie, emisní a excitační vlnová délka.

## **ABSTRACT**

The bachelor thesis is devoted to the possibility of using luminescence spectroscopy for determination of riboflavin in whey. The theoretical part of the thesis was focused on the characteristics of whey, its production and use in the food industry. Further attention was paid to the explanation of basic principles of luminescence spectroscopy and its application in the food industry.

The practical part was focused on obtaining the luminescence spectra of whey samples and their evaluation depending on the amount of riboflavin. Attention was paid to the selection of appropriate measurement conditions - the choice of excitation and emission wavelengths and the form of samples that were measured in a solid and liquid state.

**Keywords:** whey, riboflavin, luminescence spectroscopy, emission and excitation wavelengths.

Tímto chci poděkovat své vedoucí bakalářské práce Mgr. Martině Bučkové PhD. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost, ochotu a čas věnovaný našim konzultacím v průběhu vypracování této práce.

Dále chci poděkovat Ing. Ludmile Zálešákové za odborné rady při měření v laboratoři.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1 CHARAKTERISTIKA A ZÍSKÁVÁNÍ SYROVÁTKY</b> .....	<b>12</b>
1.1 SLOŽENÍ SYROVÁTKY .....	12
1.1.1 Bílkoviny a dusíkaté látky .....	13
1.1.2 Laktóza .....	13
1.1.3 Tuk .....	13
1.1.4 Kyseliny .....	14
1.1.5 Vitaminy.....	14
1.1.6 Minerální látky a stopové prvky .....	17
1.2 ZÍSKÁVÁNÍ SYROVÁTKY .....	18
1.2.1 Získávání syrovátky při výrobě sýrů .....	18
1.2.2 Získávání syrovátky při výrobě tvarohů .....	19
1.2.3 Získávání syrovátky při výrobě kaseinů a kaseinátů.....	19
1.3 VYUŽITÍ SYROVÁTKY PRO LIDSKOU VÝŽIVU.....	20
<b>2 ZÁKLADNÍ PRINCIPY LUMINISCENČNÍ SPEKTROSKOPIE</b> .....	<b>22</b>
2.1 EMISNÍ A EXCITAČNÍ SPEKTRA .....	23
<b>3 VYUŽITÍ LUMINISCENČNÍ SPEKTROSKOPIE PRO HODNOCENÍ MLÉKA A MLÉČNÝCH VÝROBKŮ</b> .....	<b>25</b>
3.1 ODBORNÉ STUDIE .....	25
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>28</b>
<b>4 CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE</b> .....	<b>29</b>
<b>5 MATERIÁLY A PŘÍSTROJE</b> .....	<b>30</b>
5.1 MATERIÁL A CHEMIKÁLIE .....	30
5.2 POMŮCKY A PŘÍSTROJE.....	30
<b>6 METODIKA</b> .....	<b>34</b>
6.1 PŘÍPRAVA VZORKŮ .....	34
6.2 VÝBĚR VHODNÉHO ZPŮSOBU PRO MĚŘENÍ LUMINISCENČNÍCH SPEKTER .....	35
6.2.1 Výběr excitační vlnové délky.....	35
6.2.2 Uspořádání měření .....	36
6.3 EMISNÍ SPEKTRA SYROVÁTKY A RIBOFLAVINU .....	37
<b>7 VÝSLEDKY A JEJICH DISKUZE</b> .....	<b>40</b>
7.1 LUMINISCENCE VZORKŮ KAPALNÉ SYROVÁTKY S PŘÍDAVKY RIBOFLAVINU .....	41
7.2 LUMINISCENCE VZORKŮ SUŠENÉ SYROVÁTKY S PŘÍDAVKY RIBOFLAVINU.....	44
7.3 LUMINISCENČNÍ SPEKTRA LYOFILIZOVANÉ SYROVÁTKY S PŘÍDAVKY RIBOFLAVINU .....	45
7.4 ODHAD CHYBY MĚŘENÍ .....	47
<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>49</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>50</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK</b> .....	<b>53</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b> .....	<b>54</b>



<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>55</b>
<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>56</b>

## ÚVOD

Syrovátka byla využívána již řeckým lékařem Hippokratem, který ji doporučoval k léčení úplavice. Také obyvatelé starého Říma využívali syrovátku k léčebným účelům. Léčebný dopad syrovátky se udržel i ve středověku. Rovněž Indové a Turci důvěřovali pozitivnímu dopadu syrovátky a používali ji zejména při otravách, souchotinách a vnitřním krvácení. Syrovátka se využívala nejen k léčení lidí, ale i některých zvířat. Sladká syrovátka se využívala při léčení žaludečních a střevních katarů, objevujících se u odstavených telat. Později se syrovátka začala využívat i v potravinářství. Před 30 lety potravinářství spotřebovalo pouze 5 % celkové produkce syrovátky, zbytek sloužil jako krmivo. Od roku 2000 značně vzrostla využitelnost syrovátky pro potravinářské účely. Syrovátka jako krmivo sloužila převážně k výkrmu vepřů. Krmná hodnota syrovátky spočívá hlavně v obsahu bílkovin. Vedle nepatrného množství kaseinu je to v podstatě rozpustný albumin. Krmná hodnota syrovátky je dána také obsahem mléčného cukru, což je hlavní zdroj energie. Rovněž obsah vitaminů má při zkrmování význam. Zejména pro správný růst organismu, což má velký význam u mladého zvířete. Důležitou předností je také obsah soli, které do syrovátky přechází ze zpracovaného mléka. [1] Syrovátka vzniká jako vedlejší produkt při výrobě sýrů, tvarohů a kaseinů. V potravinářství se využívá především tzv. sladká syrovátka, která vzniká při výrobě sýrů. Její aplikace spadá do oblasti pekárenství, konzervárenství a mlékárenství. S rozvojem separačních technik a jejich současnou ekonomickou dostupností se využívají složky syrovátky pro přípravu řady doplňků stravy a také léků. Menšího využití nachází syrovátka kyselá z výroby tvarohů a kyselého kaseinu. [2]

Syrovátka se stala hitem díky řadě příznivých zdravotních vlivů a proto je dnes v popředí zájmu řady odborníků i laické veřejnosti věnující se lidské výživě.

Jedním z vitaminů, který je v syrovátce přirozeně obsažen, je riboflavin, který je řazen k vitaminům B-komplexu. Tento vitamin se účastní řady důležitých metabolických dějů a dává syrovátce její charakteristickou nažloutlou barvu. Navíc jeho molekuly vykazují fluorescenci, což ho řadí k tzv. přirozeným fluoroforům mléka a umožňuje jeho detekci v mléce a mléčných produktech pomocí luminiscenční spektroskopie.

Cílem práce bylo ověřit, zda metoda luminiscenční spektroskopie umožňuje detekovat riboflavin v syrovátce a bylo by možné toto stanovení použít pro kontrolu přídavku riboflavinu do syrovátky.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 CHARAKTERISTIKA A ZÍSKÁVÁNÍ SYROVÁTKY

Syrovátka je řídká, žlutozelená tekutina, která je zbavená sýrových a tučných částí. Její zbarvení je dáno obsahem vitaminů.

Syrovátka se vzhledem ke své vysoké biologické hodnotě stala základní surovinou pro výrobu čtených výrobků, sloužících k výživě lidí nebo hospodářských zvířat. Syrovátka se využívá přímo, nepřímo po předchozí úpravě a zpracování. Ze syrovátky se také získávají jednotlivé významné složky (sacharidy, bílkoviny). Tyto složky pak nacházejí uplatnění v různých odvětvích, jako je potravinářský průmysl, farmacie, krmivářství aj. [4]

Syrovátka vzniká při výrobě sýrů, tvarohů a kaseinu. Sladká syrovátka vzniká při výrobě sýrů, kdy dochází ke srážení bílkovin pomocí enzymatického syřidla. Kyselá syrovátka vzniká při výrobě tvarohu, kdy dochází ke srážení bílkovin po okyselení. [5]

### 1.1 Složení syrovátky

Složení syrovátky je značně proměnlivé a závisí na několika faktorech.

- Velmi důležité jsou vlastnosti mléka, ze kterého je syrovátka získávána.
- Sladká syrovátka je získávána z mléka sladkého, posýřeného a její hodnota kyselosti nepřesáhne 13° SH. Naopak z kyselého nebo zkysaného mléka je získávána kyselá syrovátka, která vždy převyšuje kyselost 13° SH.
- Podstatný význam má také technologie výroby sýrů.
- Úprava syrovátky má zásadní vliv na její složení. Při odstředování, dochází k částečnému snížení nebo až odstranění tuku. Při svařování nebo výrobě mléčného bílku-albuminu, dochází ke snížení bílkovinného obsahu.
- Skladování syrovátky má taktéž velký vliv na její složení. Během uchovávání syrovátka kysne, zvyšuje se tedy její kyselost a snižuje se výživnost asi o 20 %. [1,8]

Obsah jednotlivých složek kyselé a sladké syrovátky je tedy rozdílný a závislý na řadě faktorů a technologickém získávání. [17]

Čerstvá syrovátka obsahuje okolo 93-94 % vody a v průměru okolo 63-70 g/l sušiny, v sušině je nejvíce zastoupena laktóza, pak bílkoviny a ostatní složky.

### 1.1.1 Bílkoviny a dusíkaté látky

Nutričně nejvýznamnější složku syrovátky představují bílkoviny. Celkový obsah bílkovin v syrovátce se pohybuje v rozmezí od 14 – 24 %. [4]

V syrovátce se na celkovém obsahu bílkovin podílí kasein (asi 10%) a sérové bílkoviny (asi 90%). V syrovátce zůstává většina sérových bílkovin, které byly obsaženy v původním mléce. Jejich obsah v syrovátce je variabilní a závisí na tepelném ošetření mléka před srážením a na dalších podmínkách výrobního procesu.

Mezi sérové bílkoviny syrovátky řadíme především:

- Alfa-laktalbumin, který tvoří v syrovátkové bílkovině 25 %.
- Beta-laktoglobulin je zastoupen v syrovátce okolo 50-60 %.
- Sérový albumin, který obsahuje vysoké množství cysteinu.
- Imunoglobuliny

Po odstranění bílkovin přechází do syrovátky i většina dusíkatých látek nebílkovinné povahy. Tyto látky představují 5-7 % veškerého dusíku v mléce. Mezi nejdůležitější patří močovina, kyselina močová, xantin, guanin, hypoxantin, adenin, kreatin, allantoin, rhodanidy, amoniak a některé volné aminokyseliny. [5]

### 1.1.2 Laktóza

Laktóza, často označována jako mléčný cukr, je hlavní složkou sušiny syrovátky. V průměru její obsah v syrovátce činí 46 g/l, nepatrný rozdíl v obsahu je v kyselé a sladké syrovátce (Tab. 1). Mléčný cukr se v syrovátce nachází ve dvou izomerních formách:  $\alpha$ -laktóza a  $\beta$ -laktóza. [5]

Tabulka 1: Složení kyselé a sladké syrovátky [17]

Složka	Kyselé syrovátka (g/l)	Sladká syrovátka (g/l)
Celková sušina	63,0 - 70,0	63,0 - 70,0
Laktóza	44,0 - 46,0	46,0 - 52,0
Bílkoviny	6,0 - 8,0	6,0 - 10,0

### 1.1.3 Tuk

Tuk v syrovátce je přítomen v nepatrném množství, anebo se nevyskytuje vůbec (při dokonalém odstředění syrovátkové smetany k dalšímu zpracování). [5]



### 1.1.4 Kyseliny

V syrovátce se vyskytují především kyseliny: citronová, mléčná, propionová, octová a mravenčí. Nejvyšší obsah kyselin je v kyselé syrovátce z výroby tvarohu a jejich složení závisí na aktivitě a složení mikroorganismů přítomných v mléce. V nejvyšší míře bývá zastoupena kyselina citronová (okolo 150 mg/100g) a kyselina mléčná (40-120 mg/100g). [5]

### 1.1.5 Vitaminy

Do syrovátky přechází z mléka převážný podíl vitaminů rozpustných ve vodě (ca 88 % thiaminu, veškerý riboflavin, 78 % kyseliny askorbové, 90 % kyseliny nikotinové, až 60% kobalaminu) a jen menší množství vitaminů rozpustných v tucích. Obsah vitaminů v syrovátce tedy není z pohledu její nutriční hodnoty zanedbatelný. Jsou obsaženy především vitaminy skupiny B, vitamin C, vitamin A. (Tab. 2) [5]

Tabulka 2: Vitaminové složení sušené syrovátky [5]

Vitaminy	Sladká syrovátka		Kyselé syrovátka	
	střední hodnota	rozmezí	střední hodnota	rozmezí
Vitamin A (MJ/100 g)	136	69-240	107	47-165
Vitamin C (mg/100g)	1,41	0-9,08	0,33	0-0,99
Vitamin B <sub>2</sub> -riboflavin (mg/100g)	2,14	1,70-2,92	1,85	1,57-2,35
Vitamin B <sub>1</sub> -thiamin (mg/100g)	0,51	0,38-0,59	0,49	0,35-0,58
Vitamin B <sub>12</sub> (μg/100g)	2,4	0,9-3,7	2,5	01,5-3,7
Niacin (mg/100g)	1,30	0,76-2,03	1,16	0,61-2,51

#### *Vitamin B<sub>2</sub> (riboflavin)*

Riboflavin řadíme mezi žlutá barviva, tzv. flaviny, které jsou odvozeny od alaxazinu a vyznačují se žlutou fluorescencí. Při vystavení světlu se riboflavin rychle rozkládá. Byla provedena studie, kdy během 100 dnů bylo degradováno až 75 % riboflavinu v sýru vystaveného na světle. Nicméně pokud jsou potraviny uloženy ve tmě, degradace riboflavinu je nevýznamná.

Riboflavin se vyskytuje v každé rostlinné a živočišné buňce; v oční sítnici a v mléce se vyskytuje volný. Kravské mléko i mléko jiných přežvýkavců obsahuje značné množství riboflavinu (1,5-2 mg v 1kg kravského mléka). Kyselé mléka vykazují zvýšený obsah riboflavinu

v důsledku metabolické aktivity použité mikroflóry. Při výrobě sýrů přejde prakticky všechen riboflavin do syrovátky. [4]

Riboflavin se neničí teplem, ale oxidací nebo kyselou reakcí, snadno jej poškodí přímé světlo, zvláště jeho ultrafialová složka. Jeho vysoká fotosenzitivita vyžaduje balení riboflavinu do neprůhledných obalů. Mléko v tetrapakovém obalu si riboflavin uchová, ke zničení dochází pouze, je-li zabaleno v průhledném skleněném obalu. Biologickou využitelnost riboflavinu snižují léky s obsahem estrogeneru, síry a alkoholu.

Mezi přírodní zdroje riboflavinu patří mléko, játra, ledviny, sýry, zelenina, ryby, vajíčka, jogurt a zrniny. [14] Riboflavin se také nachází v masu a v sójovém mléce. Zejména v posledních letech se u západních spotřebitelů značně zvýšila spotřeba sójového mléka. Zvýšený zájem je způsoben povědomím o zdravém přínosu sójových výrobků. Je zajímavé, že obsah riboflavinu v sójovém mléce se pohybuje okolo 2-3 mg/ kg, což je srovnatelné s obsahem riboflavinu v kravském mléce. [16]

Fyziologické účinky riboflavinu v organismu jsou široké. Je nezbytný při růstu a dělení buněk. Chrání zdravou kůži, nehty a vlasy, léčí defekty sliznice ústní dutiny. Má příznivé účinky na zrak, ulevuje od únavy očí. Pomáhá při trávení všech hlavních živin, sacharidů, tuků i bílkovin. Zmírňuje bolesti hlavy při migrénách.

Doporučená denní dávka riboflavinu pro zdravé dospělé osoby se pohybuje v rozmezí od 1,2 – 1,7 mg, během těhotenství a kojení se jeho spotřeba zvyšuje na 2 mg denně. Potřeba se zvyšuje hromaděním stresových situací. Vzhledem k tomu, že je nabídka riboflavinu v průměrném jídelníčku relativně omezená, bývá nejčastěji postrádán. [14]

Vzhledem k jeho fotochemickým vlastnostem byl riboflavin intenzivně studován jako fotosenzibilizátor v potravinářských a biologických systémech.

### ***Vitamin C (kyselina askorbová)***

Vitamin C je rozpustný ve vodě a působí jako antioxidant. Většina živočichů je schopna syntetizovat svůj vlastní vitamin C, pouze lidé, lidoopi a morčata jsou odkázáni na potravinové zdroje.

Přírodními zdroji jsou především citrusové plody, jahody, listová a brukvovitá zelenina, rajčata, meloun cantalup, brambory, paprika a kvěťák.

Vitamin C má důležitou úlohu při tvorbě kolagenu, který je nutný pro růst organismu a opravu poškozených vazivových tkání. Dále snižuje sklon k alergickým reakcím, snižuje krevní tlak a riziko krevních sraženin, zvyšuje účinnost léků při zánětech močových cest, účastní se vstřebávání železa a pomáhá při léčbě nachlazení. [14]

Kyselina askorbová se v potravinách snadno ničí vařením při vysokých teplotách, zejména v přítomnosti mědi. Ztráty vitamínu C lze minimalizovat vařením po kratší dobu s minimálním množstvím vody. Vodu po vaření nevylévat, jelikož obsahuje část vyluhovaného vitamínu C.

Při nedostatečném příjmu vitamínu C nastává onemocnění zvané kurděje. Tato choroba byla běžná mezi námořníky během dlouhých cest, ale také mezi vojáky během válečného tažení a ve věznicích, vyžádala si velký počet obětí. Až v roce 1911 byla jednoznačně prokázána příčina, kterou byl nedostatečný příjem vitamínu C.

Doporučený denní příjem se velmi liší, jak je uvedeno v (Tab. 3). U vitamínu C nehrozí předávkování, jelikož přebytečné množství je z těla vyloučeno. [15] Toho využívá řada autorů k doporučování velmi vysokých dávek vitamínu C v denním příjmu jako prevence vzniku nachlazení, chřipky a dalších infekčních onemocnění. Některé studie uvádí i pozitivní dopad vitamínu C při artritidě, revmatismu a při rychlejším hojení ran.

### ***Vitamin A (retinol)***

Vitamin A se rozpouští v tucích a proto je nutná přítomnost tuků pro jeho řádné vstřebávání v zažívacím ústrojí. Vitamin A se vyskytuje ve dvou formách jednak jako retinol a také jako provitamin A nazývaný karoten. Tělo je schopné tento vitamin v organismu skladovat, proto je důležité nepřekračovat doporučený denní příjem (Tab. 3), aby nedocházelo k předávkování. Dávka vyšší než 50 000 I.U., užívána po dobu více než jednoho měsíce, může vyvolat u dospělých osob toxické příznaky. U dětí může dojít k toxickým příznakům již při překročení 18 000 I.U. Mezi příznaky předávkování patří nadměrné vypadávání vlasů, nevolnost, zvracení, průjemy, poruchy zraku, bolesti hlavy a zvětšená játra. [14]

Světová zdravotnická organizace udává denní doporučenou dávku vitamínu A pro dospělé osoby v množství 800 µg, v době kojení je doporučeno příjem navýšit. [21]

Denní doporučení dávky navržené WHO jsou některými odborníky kritizovány, tvrdí, že se jedná pouze o minimální nutné dávky a velká část populace potřebuje mnohem vyšší dávky.

O tom, jaké jsou nevhodnější dávky, není tedy plné shody, to dokazují hodnoty uvedené v tabulce 3. Potřeba se liší při intenzivní práci v období nemoci, ale také v závislosti na věku, pohlaví a dalších faktorech. [22]

Vitamin A účinkuje proti noční slepotě, posiluje zrak a je využíván při léčbě dalších očních poruch. Podporuje růst kostí a ukládání minerálů v nich, zlepšuje stav vlasů, nehtů a dásní. Pomáhá při léčbě rozedmy plic a při zvýšené funkci štítné žlázy. Má pozitivní dopad i na kůži, léčí akné, kožní defekty, záněty a spáleniny. Přírodními zdroji vitamínu A a jeho prekurzorů je především rybí tuk, játra, vejce, mléko a mléčné produkty, listová zelenina a mrkev. [23]

V odborné literatuře je zmíněna citlivost sloučenin vitamínu A zejména na podmínkách skladování, tepelném záhřevu, zpracování, ale také záleží na typu obalového materiálu a obsahu tuku v mléce. Nicméně zahřívání mléka při teplotách nižších než 100° C má pouze malý vliv na obsah vitamínu A. [24]

Tabulka 3: Doporučený denní příjem vitaminů pro dospělé [15, 21]

Vitaminy	WHO-DDD	Williams	Allen	Leibovitz	Pauling
Vitamin C	<b>80 mg</b>	2500 mg	1500 mg	2500 mg	1000-18 000 mg
Vitamin A	<b>800 µg</b>	15 000 IU	15 000 IU	20 000 IU	20 000-40 000 IU
Thiamin, B <sub>1</sub>	<b>1,1 mg</b>	20 mg	300 mg	100 mg	50-100 mg
Riboflavin, B <sub>2</sub>	<b>1,4 mg</b>	20 mg	200 mg	100 mg	50-100 mg
Niacinamid, B <sub>3</sub>	-	200 mg	750 mg	300 mg	300-600 mg
Pyridoxin, B <sub>6</sub>	<b>1,4 mg</b>	30 mg	350 mg	100 mg	50-100 mg
Kobalamin, B <sub>12</sub>	<b>2,5 µg</b>	0,09 mg	1 mg	0,1 mg	0,1-0,2 mg

### 1.1.6 Minerální látky a stopové prvky

Minerální látky jsou v syrovátce obsaženy ve formě organických sloučenin v množství 0,1-0,4 % a anorganických sloučenin v množství 0,6-0,7 %. Jedná se především o soli kyseliny fosforečné, mléčné, uhličitě, citronové, příp. chlorovodíkové a sírové. Největší podíl tvoří draselné a vápenaté soli. [5]

Velký podíl vápníku je vázaný na kaseinové bílkoviny a při zpracování mléka zůstává v sýru nebo tvarohu.

Tabulka 4: Obsah minerálních látek kyselé a sladké syrovátky [17]

Složka	Kyselé syrovátka (g/l)	Sladká syrovátka (g/l)
Vápník	1,2 - 1,6	0,4 - 0,6
Fosfáty	2,0 - 4,5	1,0 - 3,0
Chloridy	1,1	1,1

## 1.2 Získávání syrovátky

Syrovátka je získávána obvykle jako vedlejší produkt při výrobě sýrů, tvarohů, ale také kaseinu a kaseinátů.

### 1.2.1 Získávání syrovátky při výrobě sýrů

Při výrobě sýrů se využívá sladkého (enzymatického) srážení kaseinových micel. K mléku je přidáváno tzv. syřidlo chymozin (renin). Syřidlo hydrolyzuje  $\kappa$ -kasein, který následně ztrácí funkci ochranného obalu,  $\text{Ca}^{2+}$  ionty proniknou a reagují se třemi frakcemi ( $\alpha$ -s<sub>1</sub>,  $\alpha$ -s<sub>2</sub> a  $\beta$ -kasein) dochází ke tvorbě sýřeniny. Výsledkem je sladká syrovátka, která se dále lisuje. [25]

Proces lisování je velmi důležitým krokem při výrobě sýrů, jehož hlavním úkolem je vytlačení syrovátky z kapilár mezi zrny, ale také vytlačení vody z kapilár v zrně a následně ze sýra. Lisování samo o sobě je poměrně složitým pochodem a to vzhledem k obsahu dvou zcela odlišných fází. Jednak tekutou fází, kterou tvoří syrovátka a tuhou, kterou je sýrové zrno. [6] Při výrobě sýrů procesem lisování je získáno cca 3 % syrovátky.

Součástí linky na lisování sýrů jsou uzavřené sýrařské lisy, které z hygienického hlediska mají jistá úskalí. Přístup pro čištění je značně omezen a dochází ke zvýšenému usazování nečistot. Uzavřené lisy se tedy musí čistit po 20-50h provozu, při 60° C, díky vysoké teplotě následuje energeticky náročné chlazení. [7]

Z tohoto důvodu nizozemský výrobce mlékárenských zařízení Bosgraaf vyvinul linku, kde dosavadní uzavřené lisy byly nahrazeny otevřenými lisami z plastu, které umožňují hygienické a efektivní získávání syrovátky, ale také snadný přístup pro čištění. Usnadněné čištění znamená menší prostoje, snížení spotřeby chemikálií, ale také menší zatížení odpadních vod. Linka je instalována v mlékárně v Dánsku. Syrovátka se během lisování sýra shromažďuje v malých prohlubních na dně plastových van pod lisovacími formami. Díky nízké teplotě



dochází k minimálnímu pomnožení bakterií v syrovátce a nedochází tedy ke zvyšování kyselosti syrovátky. Po lisovacím cyklu, který trvá 60 a 180 minut, se zvláště vany a zvláště lisovací formy po přepravniku posunují do myčky, aby se na povrchu neusadil biofilm. Vany se před posunem do myčky vyprázdí do sběrné nádrže se syrovátkou. [7]

### 1.2.2 Získávání syrovátky při výrobě tvarohů

Syrovátka je vedlejším produktem také při výrobě tvarohů. Tvaroh lze definovat jako kyselý, nezrající sýr, vzniklý převážně kyselým srážením. Při výrobě tvarohu se využívá kyselého srážení. Působením mikroorganismů (bakterií mléčného kvašení) dochází ke zkvašování laktózy na kyselinu mléčnou, s přibývajícím množstvím kyseliny mléčné klesá pH mléka až na hodnotu izoelektrického bodu kaseinu (4,6-4,9). Následně dochází ke vzniku gelu (koagulátu) 3D struktury, potřebné k výrobě tvarohu, jogurtu a tvarohových sýrů. [25].

K odloučení syrovátky dochází na odstředivce. Při výrobě měkkého tvarohu se syrovátka odstraňuje samovolným odfiltrováním přes tkaninu, šetrným lisováním nebo odstředěním. [9]

### 1.2.3 Získávání syrovátky při výrobě kaseinů a kaseinátů

Syrovátka vzniká rovněž při výrobě kaseinů, resp. kaseinátů. Rozlišujeme kyselý a sladký kasein. Kyselý kasein se získává z mléka zvýšením jeho kyselosti působením kyseliny mléčné, vzniklé při bakteriálním kvašení mléka. Kasein sladký se získává ze sladkého mléka působením syřidla.

Zvláště při moderních a velkokapacitních výrobcích se musí zajistit její zpracování a využití. Většinou se suší a dále se využívá do potravinářských výrobků.

Technický kasein se využívá jako surovina pro chemický a jiný průmysl, zatímco kaseináty slouží k potravinářským účelům, jako příměs do různých potravinářských výrobků. V největším množství se vyrábí kaseinát sodný, který se uplatňuje jako emulgační a pěnicí přísada na výrobu majonéz, omáček, kávové smetany, zmrzliny, pudinků, tavených sýrů a tvarohů. Méně se vyrábí kaseinát draselný, který se využívá v dietních masných výrobcích a ve výrobcích s nízkým obsahem sodíku. Kombinace kaseinátu sodného, draselného a vápenatého se využívá k emulgaci, stabilizaci a fortifikaci při výrobě masných výrobků, jogurtů a jiných kysaných mléčných výrobků. [6]

### 1.3 Využití syrovátky pro lidskou výživu

Vzhledem k obsahu nutričně významných látek v syrovátce je snaha o její další využití. Navíc likvidace syrovátky jako odpadu není vůbec snadná a představuje hrozbu pro životní prostředí. Dostane-li se syrovátka do půdy, ovlivňuje její chemickou a fyzikální strukturu, což vede ke snížení úrodnosti. V prostředí vod redukuje vodní život vyčerpáním rozpuštěného kyslíku. [3] Zvláště při moderních a velkokapacitních výrobcích se musí zajistit její zpracování a využití. Většinou se suší a dále se využívá do potravinářských výrobků.

Syrovátka je nutričně velmi kvalitní potravina, její pravidelná konzumace má tedy prokazatelně pozitivní vliv na lidské zdraví. Obsahuje řadu vitaminů, minerálních látek a lehce stravitelných bílkovin. Je tedy stále častěji vyhledávána širokou veřejností.

Syrovátka je nízkokalorická potravina a proto se v posledních letech s oblibou využívá při redukci hmotnosti. Působí detoxikačně, podporuje činnost ledvin, střev, obnovuje střevní mikroflóru, snižuje tvorbu zánětů převážně žaludku a střev. Snižuje hladinu LDL cholesterolu v krvi a reguluje hypertenzi. Zvyšuje imunitu, zmírňuje metabolický stres, zvyšuje fyzickou sílu, zlepšuje svalové funkce a vstřebatelnost živin. [14]

#### Využití syrovátky ve zdravotnictví a potravinářském průmyslu

Syrovátka byla již v historii hojně využívána ve zdravotnictví. Řecký lékař Hippokrates ji doporučoval k léčbě úplavice. V novověku se francouzský lékař Tissot a švýcarský profesor Schönlein zasloužili o vznik speciálních lázeňských středisek s tzv. syrovátkovou kúrou.

V minulosti byla syrovátka dokonce podávána injekčně aplikací pod kůži, používala se při snížení horečky, k podpoření tvorby bílých krvinek a k močopudným účelům. [1]

Dnes je syrovátka hojně využívána při výrobě potravin, převážně v pekařském, mlékárenském a v menší míře i v masném průmyslu např.

- **Pekárenské výrobky** - převážně se syrovátka využívá do chleba a pečiva. Kyselá syrovátka se v pekárenství používá spíše do kvasu.
- **Masné výrobky** - využití koncentráту syrovátkových bílkovin a vody, lze nahradit část masa v masných výrobcích, např. v párcích, docílí se nižšího obsahu tuku i energie. [5]

➤ *Mlékárenské výrobky*

- *Syrovátkové máslo* má vyšší kyselost a nižší údržnost. Odstředěním tuku ze syrovátky se získá syrovátková smetana, která se následně stlouká.
- *Syrovátkové sýry* jsou stále častěji vyhledávány, mezi sýry vyráběné ze syrovátky patří např. ricotta a urda. [25]
- *Syrovátkové nápoje* obsahují vysoký obsah proteinů a díky jejich nutriční hodnotě jsou ideálním zdrojem energie a živin při fyzické námaze, jsou tedy ideální pro kulturisty a atlety. Jsou vhodné i pro malé děti a seniory, jelikož zlepšují absorpci vápníku a jsou vhodné při osteoporóze. [26]

## 2 ZÁKLADNÍ PRINCIPY LUMINISCENČNÍ SPEKTROSKOPIE

Luminiscenční (fluorescenční) spektroskopie je analytickou metodou, která je velmi citlivá, rychlá a nedestruktivní. Během několika sekund poskytne spektrální signatury, které jsou charakteristické pro testovanou látku a mohou být využity např. také pro hodnocení potravinářských výrobků. Úkolem luminiscenční spektroskopie je rozložit studované luminiscenční záření ve spektrum, které lze následně vyhodnocovat. [10,11]

Pozorování luminiscence má dlouhou historii. Svítící ztrouchnivělé pařezy či některé druhy luminiskujícího hmyzu a ryb jsou v přírodě známé od nepaměti, v antické literatuře je možné nalézt popisy světélkujícího moře. Před více než tisícem let znali Číňané a Japonci luminiscenční barvy. V 17. století byl popsán „boloňský kámen“, který v temnotě vysílal červené světlo po předchozí excitaci slunečním zářením. Záhadný jev luminiscence (světélkování) přitahoval pozornost lidí vždy, ale plné porozumění tomuto jevu umožnil až rozvoj kvantové mechaniky počátkem 20. století. [11, 12]

Luminiscencí pevných látek je přebytek elektromagnetického (světelného) záření, které látka vysílá, nad zářením rovnovážným popsaným Planckovým vyzařovacím zákonem. Pojem světlo je zde třeba chápat nejen jako viditelné záření, ale i blízkou infračervenou a ultrafialovou oblast. Z termodynamického hlediska je luminiscence nerovnovážným zářením.

Pro vznik luminiscence je zapotřebí látce dodat energii (nadbytečnou oproti té, kterou si těleso recipročně vyměňuje se svým okolím pomocí rovnovážného elektromagnetického záření). Dodaná energie se v látce přemění na světelné luminiscenční záření. Nazývá se excitační či budící energií, dle způsobu jakým je dodávána klasifikujeme luminiscenční děje na fotoluminiscence, elektroluminiscence, chemiluminiscence, katodoluminiscence, mechanoluminiscence, termoluminiscence a bioluminiscence.

- **Elektroluminiscence** vzniká v důsledku přiložení elektrického pole a průchodu elektrického proudu látkou.
- **Chemiluminiscence** doprovází určitý typ exotermních chemických reakcí. Uvolněné reakční teplo či jeho část se vyzáří ve formě světla.
- **Katodoluminiscence** vzniká při dopadu vysokoenergetického elektronového svazku na stínítko.
- **Mechanoluminiscence** je světlo, které se v jistých případech uvolňuje při mechanické deformaci pevné látky.

- **Termoluminiscence** je stav, kdy je těleso nejprve ochlazeno na nízkou teplotu, poté ozářeno krátkovlnným elektromagnetickým zářením, dojde ke zvyšování teploty, čímž dochází k emisi luminiscenčního záření.
- **Bioluminiscence** je děj, kdy je energie pro vyzáření světla dodána prostřednictvím dějů biologického původu (např. světélkování světlušek či pařežů). [11]
- **Fotoluminiscence** je jev, při kterém u vybraných molekul nastává pohlcení fotonu, čímž se molekula dostává do excitovaného stavu. V tomto stavu může dojít k celé řadě procesů, které se souhrnně označují jako relaxace a molekula se velmi rychle dostane na nejnižší energetickou hladinu prvního excitovaného stavu. Odtud potom přechází zpět do základního stavu, což může být doprovázeno vyzářením fotonu. Vzhledem k tomu, že relaxace jsou v podstatě ztrátami energie, má vyzářený foton menší energii a tedy větší vlnovou délku než foton absorbovaný, jinými slovy dochází ke změně barvy světla (Obr. 1). [12]

## 2.1 Emisní a excitační spektra

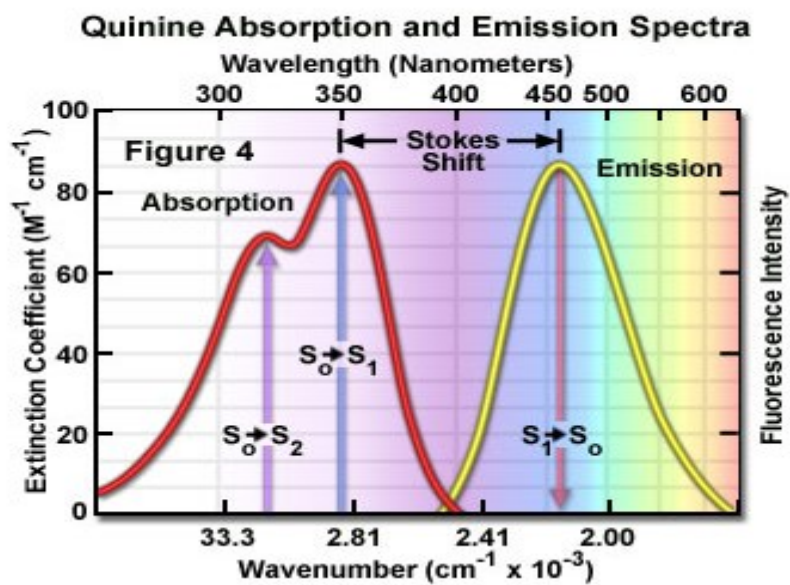
Pro zjištění spektrálního složení luminiscenčního záření jsou v luminiscenční spektroskopii používány monochromátory, které v případě fotoluminiscence mohou být použity také k výběru vhodné budící vlnové délky z excitačního světelného zdroje. Dle toho mluvíme o emisních a excitačních spektrech.

Zdroj světla dodává excitační energii testovanému vzorku, v důsledku toho dochází k emisi luminiscenčního záření, které je následně detekováno. Zaznamenaný optický signál je převeden na elektrický a zpracován pomocí příslušného softwaru. Výstupem měření je závislost intenzity luminiscence  $I_{\text{lum}}$  na vlnové délce  $\lambda_{\text{em}}$  luminiscenčního záření nazývané jako emisní spektrum.

Vzhledem k tomu, že luminiscence vystupuje ze vzorku ve všech směrech, bývá pro zachycení emitovaného světla používáno různé uspořádání experimentální geometrie (uspořádání na průchod světla nebo na odraz v určitém úhlu). [11]

Pro volbu vhodné excitační vlnové délky jsou získávána tzv. excitační spektra, jako závislost intenzity luminiscence na excitační vlnové délce při konstantní emisní vlnové délce. V excitačním spektru je vyhledáno maximum, které se pak použije jako excitační vlnová délka pro získání emisního spektra testované látky.





Obr. 1 Stokesův posun-absorpční a emisní spektra pro chinin [20]

### 3 VYUŽITÍ LUMINISCENČNÍ SPEKTROSKOPIE PRO HODNOCENÍ MLÉKA A MLÉČNÝCH VÝROBKŮ

Fluorescenční spektroskopie je rychlá, citlivá metoda pro charakterizaci molekulárního prostředí a dějů. Tato spektroskopická metoda je rozšířena do celé řady oborů, kde se využívá pro studium struktury molekul a jejich zapojení do funkčních celků. Jedná se především o studium proteinů a dalších biologicky významných molekul v biomedicínských aplikacích, ale také např. o výzkum syntetických polymerů. Využití fluorescenční spektroskopie v potravinářství má obdobný potenciál jako v biologických disciplínách a pomalu se začíná rozvíjet. [13]

Jako přirozené fluorofory v mléce, tzn. molekuly vykazující luminiscenci, jsou označovány aminokyselina tryptofan, riboflavin a vitamin A. Prostřednictvím těchto složek je možné monitorovat změny v mléku a mléčných výrobcích pomocí luminiscenční spektroskopie.

#### Výhody fluorescenční spektroskopie

Největší předností fluorescenční spektroskopie je vysoká citlivost metody, je 100-1000 citlivější než jiné spektrofotometrické techniky.

Fluorescence některých molekul je výrazně ovlivněna prostředím, které je obklopuje. Například tryptofan, který je zanořen do vnitřního hydrofobního prostředí proteinu, má jinou fluorescenční charakteristiku než tryptofan, který se nachází na hydrofilním povrchu proteinu. Tato citlivost fluorescence molekul v závislosti na prostředí umožňuje např. sledovat konformační změny proteinů, jejich denaturaci, příp. interakci proteinů s dalšími složkami potravin.

Další výhodou fluorescenčních technik je rychlost, během krátké chvíle je možné získat velké množství informací. [13]

#### 3.1 Odborné studie

V literatuře je možné nalézt několik prací, které se zabývaly použitím fluorescenční spektroskopie pro charakterizaci některých mléčných výrobků.

Herbert a kol. (2000) používali fluorescenční spektroskopii tryptofanu a vitaminu A ve spojení s chemometrickými technikami k rozlišení mezi měkkými sýry, což mělo za následek míru klasifikace větší než 90 %. [24]

Fluorescenční spektroskopie se také používá při sledování změn sušeného mléka během výroby a skladování (Liu a Metzger, 2007). Bylo zjištěno, že je možné zachytit změny v důsledku Maillardovy reakce, modifikace prostředí tryptofanu, ale také degradace riboflavinu.

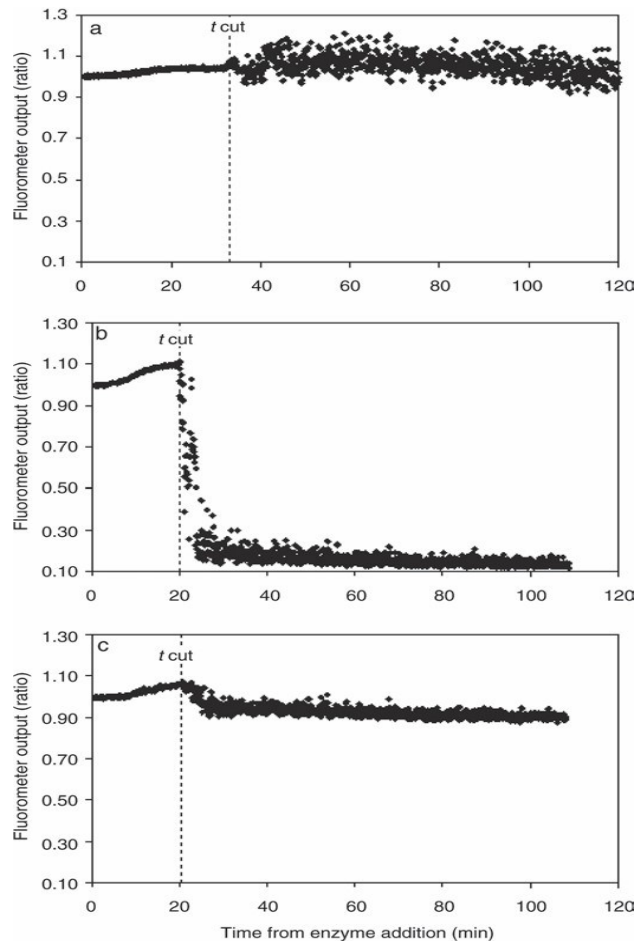
Herbert a kol. (1999) sledovali vývoj fluorescence tryptofanu, který je výsledkem koagulace mléka. Uvedli, že bylo možné zjistit stádia koagulace a rozdíly mezi gely s různými reologickými charakteristikami.

Vývoj fluorescence vitamínu A, riboflavinu a tryptofanu během koagulace mléka a synereze je zobrazen na Obr. 2. Během koagulace se zvýšila fluorescence všech tří fluoroforů o 5, 7, 10, 6 a 6,5 %. Toto zvýšení v procentech dezvy byla menší, než bylo dříve pozorované za stejných podmínek kombinovanou technologií koagulace a synerezy založeném na léhkém zpětném rozptylu blízké infračervenému záření ( $\sim 21 \pm 5$  %, Fagan et al., 2007).

To naznačuje, že systém měření fluorescence může být méně citlivý na změny ke kterým dochází v mléce během koagulace, než snímač zpětného rozptylu světla.

Fluorescenční spektroskopie se používá také k monitorování oxidačních změn v riboflavinu.

Předpokládá se, že fluorofory mléka, vitamínu A, tryptofanu a další fluorescence riboflavinu mohou být použity jako vnitřní značkovací procesy synereze, protože každá z nich bude přednostně interagovat s určitými fázemi a strukturami směsi syrovátky. [24]



Obr. 2 Vývoj fluorescence (a) vitaminu A, (b) tryptofanu, (c) riboflavinu během koagulace mléka a synereze [24]

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**



## 4 CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Hlavním cílem bakalářské práce bylo ověřit, zda je možné pomocí luminiscenční spektroskopie detekovat riboflavin a jeho jednotlivé přídavky v syrovátce.

Pro hlubší pochopení celé problematiky byla v teoretické části věnována pozornost zkoumaným látkám, jako je syrovátka a riboflavin a jejich fluorescenčním schopnostem. Ale také principům luminiscenční spektroskopie a využití luminiscenčních spekter pro hodnocení mléka a mléčných výrobků.

Praktická část byla zaměřena na přípravu vzorků syrovátky s rostoucím podílem přidaného riboflavínu, získání luminiscenčních spekter syrovátky a riboflavínu a závěrečné vyhodnocení intenzity luminiscence syrovátky v závislosti na rostoucí koncentraci přídavků riboflavínu.

## 5 MATERIÁLY A PŘÍSTROJE

### 5.1 Materiál a chemikálie

- Riboflavin ( $C_{17}H_{20}N_4O_6$ ) Sigma Life Science  
množství riboflavinu  $\geq 98\%$
- Sušená syrovátka Mogador s. r. o., ČR

#### Průměrné výživové hodnoty ve 100g syrovátky

Energetická hodnota 1532 kJ

Tuky 0,5g ; z toho nasycené mastné kyseliny: 0,3g

Sacharidy 76g ; z toho cukry: 68g

Bílkoviny 13g

Sůl 2,8g

- Destilovaná voda

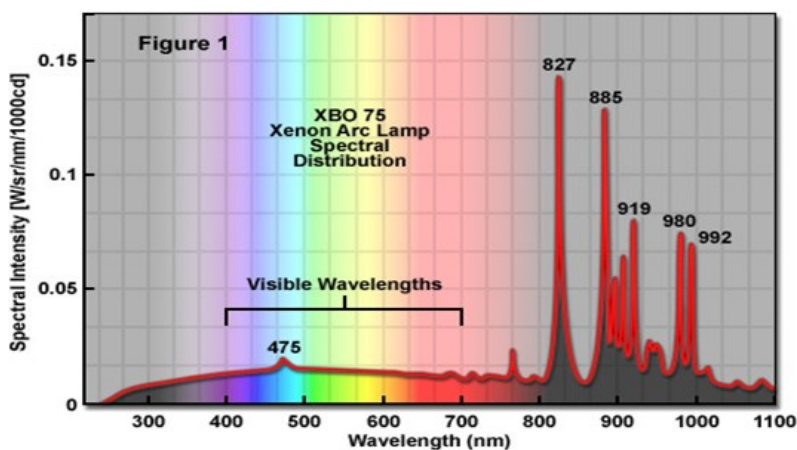
### 5.2 Pomůcky a přístroje

- Analytické váhy GR-200 (Labicom, ČR)
- Sušárna (Venticell 55, BMT Medical Technology s.r.o., ČR)
- Lyofilizátor (ALPHA 1-4 LSC, Christ, Německo)
- PC- 1 PhotonCounting 001 Steady-StateSpectrofluorometer
- Software VINCI – Multidimensional Fluorescence Spectroscopy
- Běžné laboratorní sklo a pomůcky

Veškeré vzorky syrovátky byly měřeny na přístroji PC- 1 PhotonCounting 001 Steady-State Spectrofluorometr (Obr. 5). K vyhodnocení byl použit software VINCI-Multidimensional Fluorescence Spectroscopy. Jako zdroj světla byla použita xenonová výbojka (40 mW). Monochromátory mají rozsah vlnových délek 200-1200 nm. Detektorem je fotonásobič.

- **Xenonová výbojka**

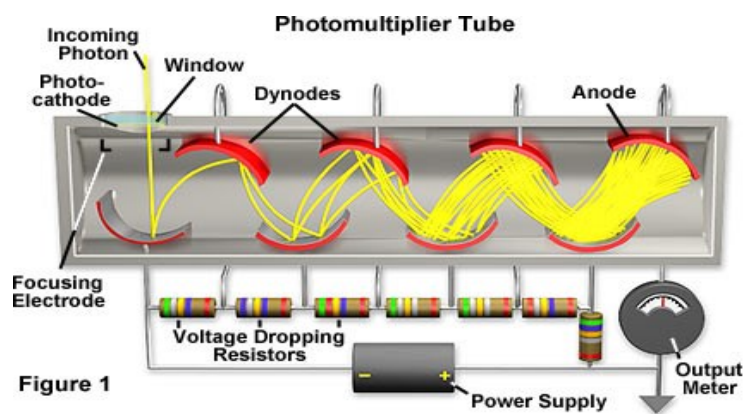
Zdrojem světla u spektrofotometru je xenonová výbojka. Xenonové a rtuťové plazmové výbojky s krátkým obloukem zobrazují nejvyšší intenzitu jasů a díky jejich vlastnostem se blíží k ideálnímu modelu pro bodový zdroj světla. Xenonová výbojka se odlišuje od ostatních zdrojů světla tím, že vytváří jednotné a nepřetržité spektrum v celé viditelné spektrální oblasti. Emisní profil xenonové lampy vykazuje barevnou teplotu přibližně 6000 K (blízké slunečnímu záření) a postrádá významné emisní linky, z tohoto důvodu je xenonová výbojka vhodným zdrojem. (Obr. 3) [18]



Obr. 3 Xenonová lampa [18]

- **Fotonásobič**

Fotonásobiče se používají u většiny fluorimetrů. Musí mít lineární odpověď vůči intenzitě světla. Spektrální odpověď závisí na kovu fotokatody, z něhož je aktivní plocha vyrobena. Většina fotokatod je citlivá v oblasti od UV až do 900 nm. (Obr. 4) [18]



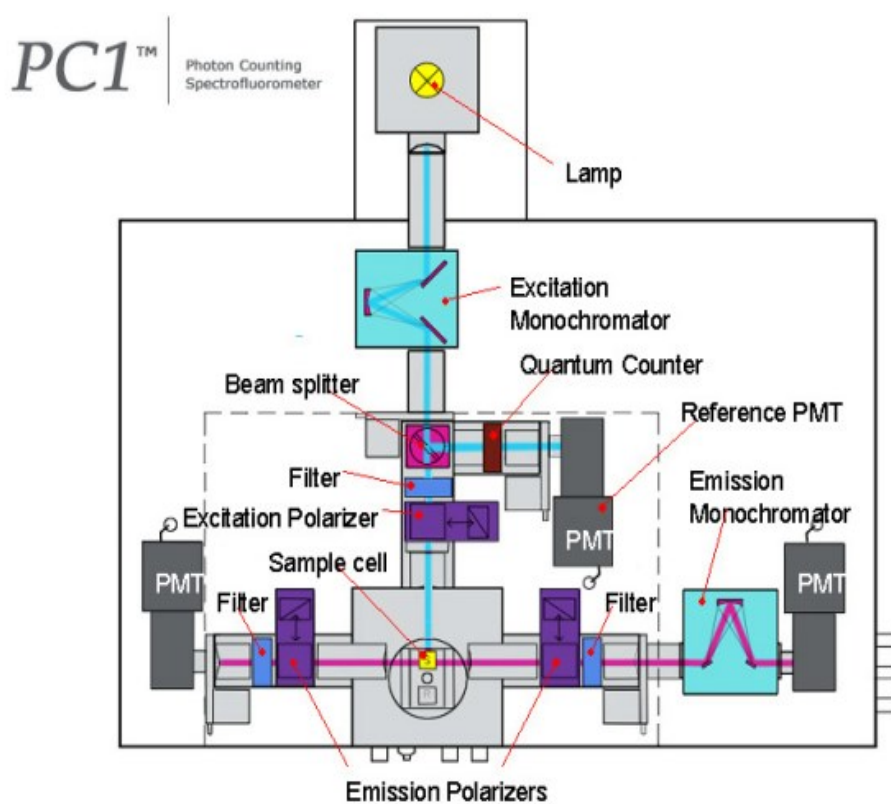
Obr. 4 Fotonásobič [18]



Obr. 5Přístroj PC-1 Photon – counting 001 Steady-State Spectrofluorimeter [19]

- Popis schéma přístroje PC – 1 PhotonCounting 001 Steady-State Spectrofluorometer.

Paprsek z výbojky putuje přes excitační monochromátor, který vymezí jednu požadovanou vlnovou délku. Vlnová délka dopadá na květu se vzorkem, následně záření prochází přes emisní monochromátor, kde dojde k detekci vyzařeného světla vybrané vlnové délky. Intenzita luminiscence je detekována detektorem- fotonásobičem, který zvětší měřený signál. Následně dochází k vyhodnocení ve vyhodnocovacím zařízení (Obr. 6).



Obr. 6 Schéma- PC1 Photon-counting 001 SteadyStateSpectrofluorimeter [19]

## 6 METODIKA

### 6.1 Příprava vzorků

Pro přípravu vzorků byla použita sušená syrovátka. Ze které byla připravena směs o výsledné koncentraci 100g syrovátky/1000 ml destilované vody. Bylo připraveno 2000 ml této směsi, která byla zahřívána na vařiči po dobu 3 minut pro dokonalé rozpuštění.

Dále bylo připraveno 100 ml zásobního roztoku riboflavinu o koncentraci 5 mg/ 100 ml. Z tohoto roztoku bylo ředěním připraveno 100 ml roztoku riboflavinu o koncentraci 0,5 mg/ 100 ml. Zásobní roztok o objemu 1, 2, 3, 4, 5, 6 ml byl přidáván do 100 ml baněk syrovátky k dosažení koncentrační řady přídavek 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3 mg B<sub>2</sub>/100 ml (Tab. 5). Baňka s riboflavinem byla uzavřena a obalena alobalem, pro snížení fotodegradace riboflavinu.

**Tabulka 5:** Koncentrační řady s přídávky riboflavinu

vit. B <sub>2</sub> [mg/100ml] syrovátky	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3
přídavky zásobního roztoku o objemu	1	2	3	4	5	6

Následně byly připraveny roztoky, stejným způsobem, ale 10x zředěny. Byly zvoleny přídávky zásobního roztoku o objemu 1, 2, 3, 4, 5, 6 ml. Výsledná koncentrace přídavek byla 0,005; 0,01; 0,015; 0,02; 0,025; 0,03 mg B<sub>2</sub>/100 ml (Tab. 6).

**Tabulka 6:** Koncentrační řady s přídávky riboflavinu 10x zředěno

vit. B <sub>2</sub> [mg/100ml] syrovátky	0,005	0,01	0,015	0,02	0,025	0,03
přídavky zásobního roztoku o objemu	1	2	3	4	5	6

#### Úprava vzorků před měřením

Připravené vzorky v uvedených koncentračních řadách byly před měřením převedeny zpět do pevného stavu. Jelikož geometrie uspořádání měření na spectrofluorimetru odpovídá měření především pevných vzorků, z tohoto důvodu po obohacení vzorků riboflavinem v kapalné formě byly vzorky opět převedeny do pevného stavu. Pro převedení do pevného stavu byla využita lyofilizace a sušení.

- **Lyofilizace** neboli sušení mrazem probíhalo po dobu 48h, při teplotě  $-40^{\circ}\text{C}$  a tlaku 0,120 mbar. Bylo pipetováno 5ml vzorku do hliníkových misek.
- **Sušení** probíhalo po dobu 2h, při teplotě  $102^{\circ}\text{C}$ . Bylo pipetováno 10ml vzorku do hliníkových misek.

Tímto způsobem byly připraveny tři skupiny vzorků, první skupina vzorků byla ponechána v kapalné formě, druhá skupina byla podrobena lyofilizaci a třetí skupina vzorků byla vysušena. Na obr. 7. je zobrazena syrovátka bez obohacení riboflavinem po lyofilizaci a po sušení. Jak je patrné z obrázku po úpravě syrovátky došlo ke změně barvy i konzistence.



Obr. 7 vlevo (žluté zbarvení)-syravátka po vysušení, vpravo (bílé zbarvení)- syrovátka po lyofilizaci

## 6.2 Výběr vhodného způsobu pro měření luminiscenčních spekter

### 6.2.1 Výběr excitační vlnové délky

Před vlastním měřením bylo potřeba nejprve vybrat vhodnou excitační vlnovou délku, při které budou všechny vzorky měřeny. Z tohoto důvodu byly nejprve naměřeny kompletní luminiscenční charakteristiky riboflavinu a syrovátky, které je možné zobrazit jako tzv. 3D mapy. Tyto mapy zobrazují závislost intenzity fluorescenčního záření na emisních a excitačních vlnových délkách.

Na (Obr. 8) je uvedena 3D mapa vzorku kapalné syrovátky v trojrozměrném obraze. Na ose  $x$  byla vynesena nezávisle proměnná skenovací emisní vlnová délka v jednotkách nm po 1 nm od 480 do 650 nm. Na osu  $z$  byla vynesena druhá nezávisle proměnná excitační vlnová délka v intervalu 350 – 450 nm po 5 nm. Na svislou osu  $y$  byla vynesena závisle proměnná intenzita luminiscence v závislosti na excitační a emisní vlnové délce. Na excitačním monochromátoru byla zvolena excitační vlnová délka 350 nm a emisní vlnová délka, která byla měněna po 1 nm od 480 nm po 650 nm. Naměřené hodnoty intenzity byly vyneseny na svislou osu  $y$ . Stejný proces měření byl zopakován pro další excitační vlnové délky v rozsahu 350 - 450 nm po 5 nm. Výsledkem tohoto procesu je 3D mapa trojrozměrného zobrazení intenzity luminiscenčního záření pro daný vzorek.

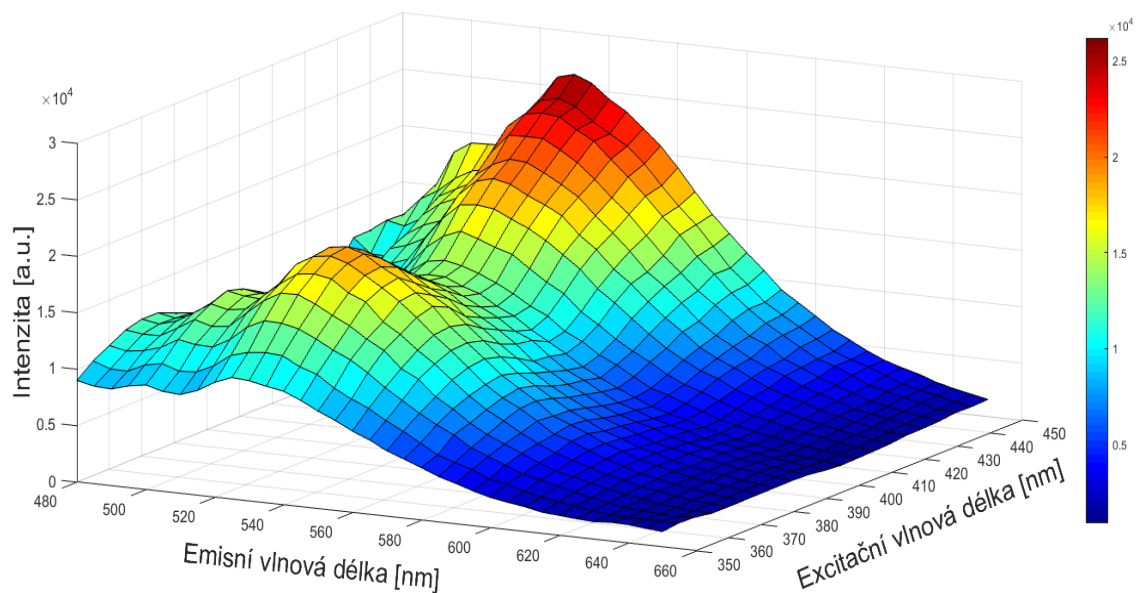
Z luminiscenční charakteristiky syrovátky je možné vyčíst, jak syrovátka v kapalném stavu reaguje na filtrované luminiscenční záření vyzářeného za excitačním monochromátorem. V intervalu excitační vlnové délky 350 – 450 nm je možné pozorovat vzrůstající intenzitu luminiscence reagující na látku syrovátky v kapalném stavu zvyšující emisní vlnovou délkou od 480 nm. Nejvyšších hodnot intenzity emitovaného světla, na kterou syrovátka v roztoku reaguje, bylo dosaženo při emisní vlnové délce 530 nm. S rostoucí emisní vlnovou délkou z excitačního monochromátoru nad 530 nm intenzita luminiscenčního záření klesá. Zkoumané vzorky byly podrobeny pro porovnání stejným parametrům jako ve vzorku syrovátky v kapalném stavu.

Nejvýraznější luminiscenční maximum syrovátky bylo zaznamenáno při excitační vlnové délce 450 nm. Excitační vlnová délka 450 nm byla použita pro proměření všech připravených vzorků syrovátky s přísadkou riboflavinu jak v kapalném, tak v lyofilizovaném a vysušeném formě.

### 6.2.2 Uspořádání měření

Všechna měření byla provedena pomocí optického kabelu, který byl vyveden z přístroje a umístěn ve tmavé odstíněné komůrce. Geometrie luminiscenční aparatury odpovídala uspořádání na odraz pod úhlem 45°. Při takové geometrii měření je eliminován zpětný odraz excitačního záření do optického systému. Tento způsob měření umožňuje měření luminiscence i pro pevné vzorky. Lyofilizované a vysušené vzorky byly měřeny přímo z povrchu v hliníkových misek, kapalně vzorky byly měřeny v křemenné kyvetě 10x10 mm.

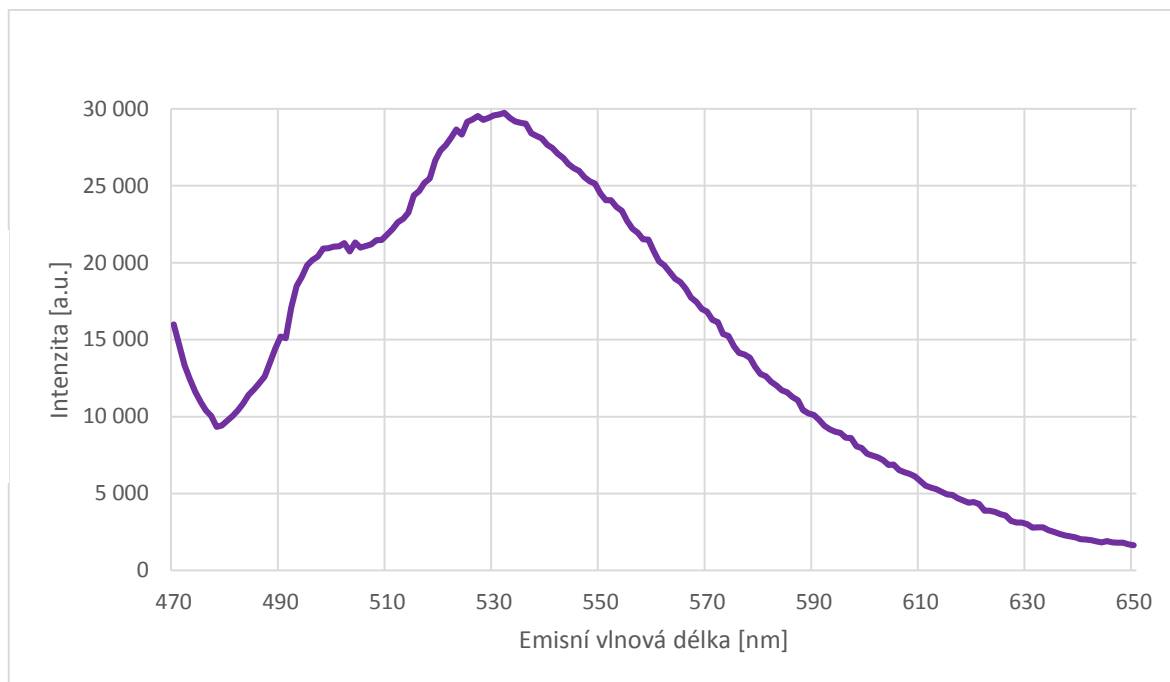




Obr. 8 3D mapa kapalné syrovátky

### 6.3 Emisní spektra syrovátky a riboflavinu

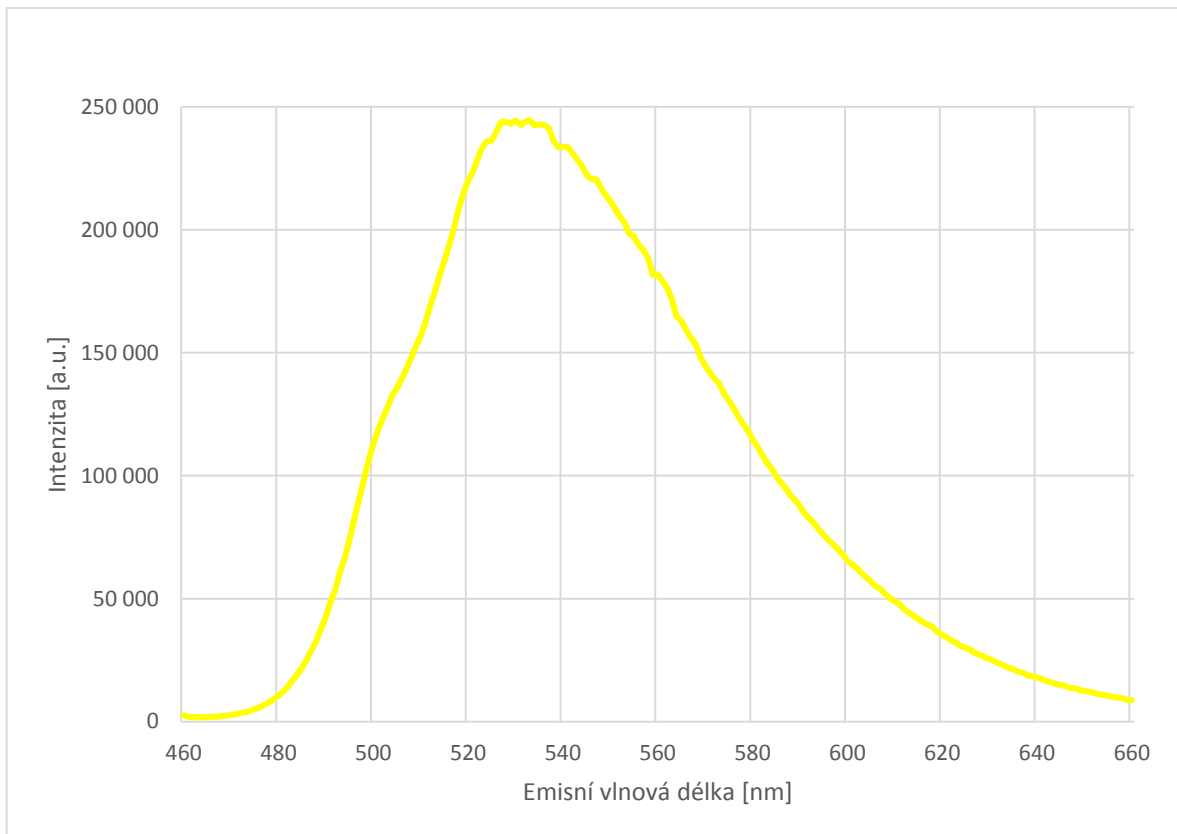
Po výběru excitační vlnové délky 450 nm už je pak možné vzorky proměřovat jen při této vlnové délce, což významně zkracuje dobu nutnou pro získání spektra. Obrázek 9 představuje závislost intenzity luminiscence kapalné syrovátky na emisní vlnové délce po excitaci při 450 nm. Na monochromátoru byla zvolena vlnová délka po 1nm v intervalu 460 nm po 660 nm a na osu y byla vynesena intenzita luminiscence. Luminiscenční maximum je v oblasti 530 nm.



Obr. 9 Luminiscenční spektrum syrovátky v kapalném stavu bez přídavku riboflavinu

Obrázek 10 zobrazuje stejně jako obrázek 9 závislost intenzity luminiscence na emisní vlnové délce při excitační vlnové délce 450 nm. Opět byla zvolena vlnová délka po 1 nm v intervalu 450 nm po 660 nm a byla vynesena závisle proměnná intenzita na osu y. Z obrázku je pozorovatelné luminiscenční maximum při 530 nm, které dosahuje hodnot 245 000 jednotek. Toto maximum se výrazně projevuje i u syrovátky bez přídavku riboflavinu (Obr. 9) a je tedy velmi pravděpodobné, že odpovídá přirozenému obsahu riboflavinu v syrovátce. Na základě proměření vzorků s jednotlivými přídavky riboflavinu bude tedy možné potvrdit, zda se rostoucí koncentrace riboflavinu ve vzorku projeví nárůstem intenzity tohoto luminiscenčního maxima

V levé části spektra syrovátky (Obr.9) v oblasti 460 – 510 nm je zachycen klesající a následně vzrůstající trend, který u čistého riboflavinu nebyl zaznamenán a tudíž odpovídá luminiscenci jiné složky v syrovátce.



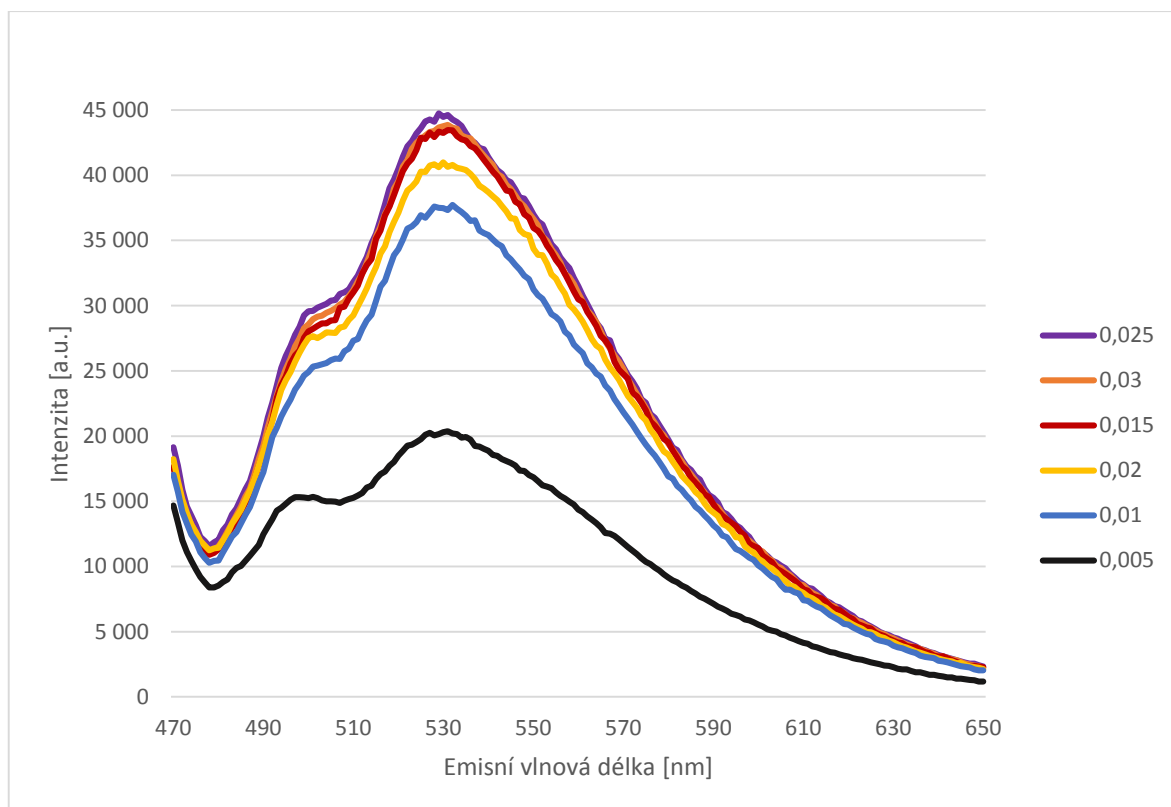
Obr. 10 Luminiscenční spektrum riboflavinu (excitační vlnová délka 450 nm)

## 7 VÝSLEDKY A JEJICH DISKUZE

Z luminiscenční charakteristiky riboflavinu bylo zjištěno, že při excitační vlnové délce 450 nm leží luminiscenční maximum v oblasti 530 nm (Obr. 10). Z tohoto důvodu bylo proměřeno spektrum všech připravených vzorků s přídavkem riboflavinu při excitační vlnové délce 450 nm a byla vyhodnocována intenzita luminiscence odpovídající emisi při 530 nm. Velikost intenzity pak byla vyhodnocena v závislosti na přídavku riboflavinu do vzorku syrovátky. Všechny vzorky byly proměřeny 2-3x a do výsledného hodnocení byl brán vždy průměr těchto hodnot. Takovým způsobem byla vyhodnocena luminiscenční spektra všech vzorků s rostoucím obsahem riboflavinu v kapalně, sušené a lyofilizované formě.

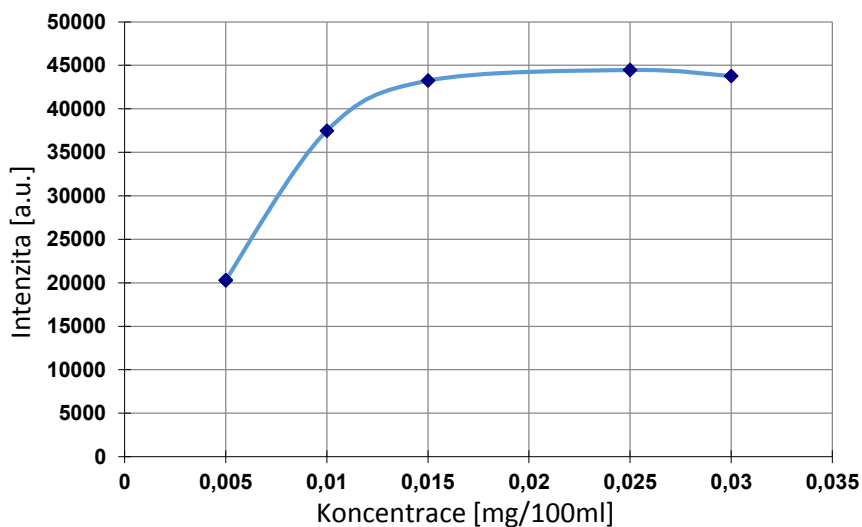
## 7.1 Luminiscence vzorků kapalné syrovátky s přidavky riboflavinu

Na obrázku 11 jsou zobrazena luminiscenční spektra kapalných vzorků syrovátky s přidavky riboflavinu v rozsahu koncentrací od 0,005- 0,03 mg/ 100 ml. Z obrázku je patrný nárůst intenzity luminiscence při 530 nm vlivem přidavku riboflavinu.



Obr. 11 Luminiscenční spektra kapalných vzorků syrovátky s přidavky riboflavinu- koncentrace (0,005-0,03 mg/100ml)

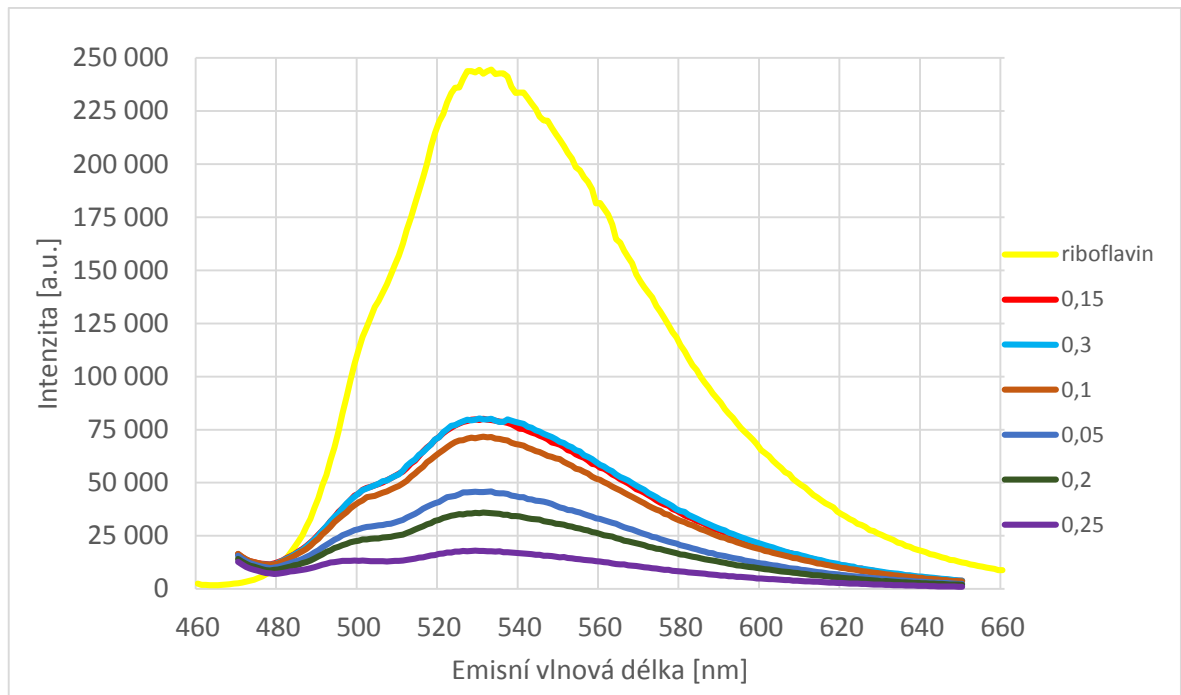
Po vynesení závislosti intenzity emisní vlnové délky na přidavku riboflavinu ve vzorku kapalných syrovátky (Obr. 12) je viditelný nárůst intenzity s rostoucím obsahem riboflavinu v syrovátce. Hodnoty intenzity se pohybují v rozsahu 20 000 – 45 000 jednotek.



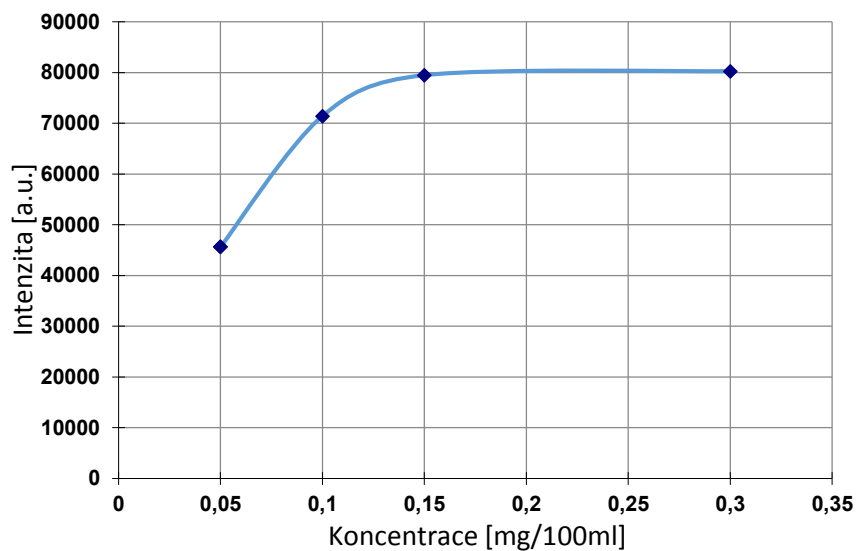
Obr. 12 Luminiscence kapalné syrovátky v závislosti na přidavku riboflavinu (0,005; 0,01; 0,015; 0,025; 0,03 mg/100ml )

Na obrázku 13 jsou zobrazena luminiscenční spektra vzorků kapalné syrovátky s přidavkem riboflavinu v koncentracích 0,05- 0,3 mg/100ml včetně spektra čistého riboflavinu o koncentraci 5mg/100 ml. Projevuje se zde vyšší koncentrace přidavků riboflavinu, hodnoty intenzity se pohybují v rozmezí 20 000- 80 000 jednotek.

Měření vzorků s přidavky riboflavinu v koncentracích 0,2 a 0,25 mg/100 ml byly vzhledem k významné odlehlosti dat vyloučeny ze zpracování do grafu (Obr. 13 a 14).



Obr. 13 Luminiscenční spektra kapalné syrovátky s přidavky riboflavinu (0,05-0,3 mg/ml)



Obr. 14 Luminiscence kapalné syrovátky s přidavky riboflavinu

(0,05; 0,1; 0,15; 0,3 mg/100ml)

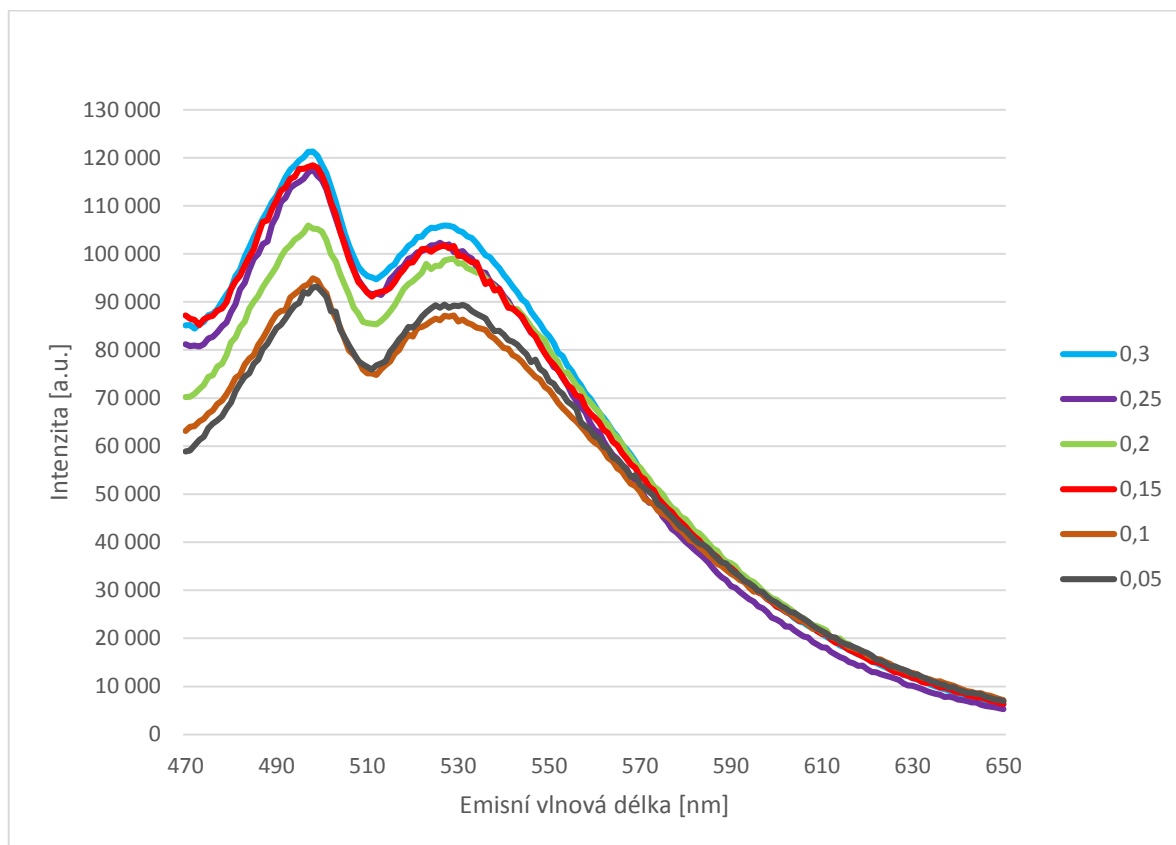
Luminiscence riboflavinu v mléce a sýrech byla sledována v některých studiích, které se věnovaly změnám luminiscence těchto potravin během technologického zpracování a skladování. Z těchto studií vyplývá, že maximální luminiscence riboflavinu v mléce a mléčných

produktech se pohybuje v rozmezí 520-530 nm při excitačních vlnových délkách 380 nm. [27, 28]. Tomu odpovídá i poloha emisního maxima při 530 nm, které bylo v rámci této práce zjištěno a to s použitím excitační vlnové délky 450 nm.

Wold a kol. zjišťovali pokles intenzity riboflavinu v sýrech z kozího mléka v souvislosti s degradací tohoto vitamínu po vystavení vzorků světlu. [27]

## 7.2 Luminiscence vzorků sušené syrovátky s přidavky riboflavinu

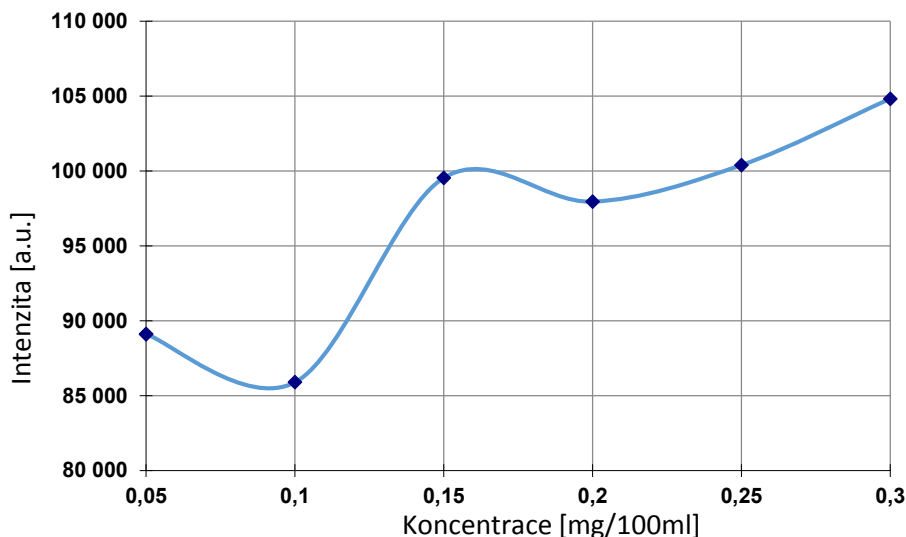
Na obrázku 15 jsou zobrazena emisní spektra jednotlivých vzorků sušené syrovátky s rostoucím přídatkem riboflavinu v koncentracích od 0,05- 0,03 mg/100ml ve vzorku. Z obrázku je patrný vzrůstající trend od nejnižší koncentrace po nejvyšší. Odlišný tvar uvedených emisních spekter ve srovnání se spektry kapalných vzorků (Obr. 11 a 13) je důsledkem změn způsobených záhřevem syrovátky na teplotu 105°C.



Obr. 15 Luminiscenční spektra sušené syrovátky s přidavky riboflavinu



Na obr. 16 je zobrazena závislost intenzity na koncentraci riboflavinu v syrovátce. S rostoucí koncentrací je možné pozorovat rostoucí intenzitu koncentrace od 0,05 po 0,3 mg/100ml. Opět je zřejmý velký rozptyl hodnot intenzity u vzorků s přidavkem 0,1 a 0,15 mg/100ml.

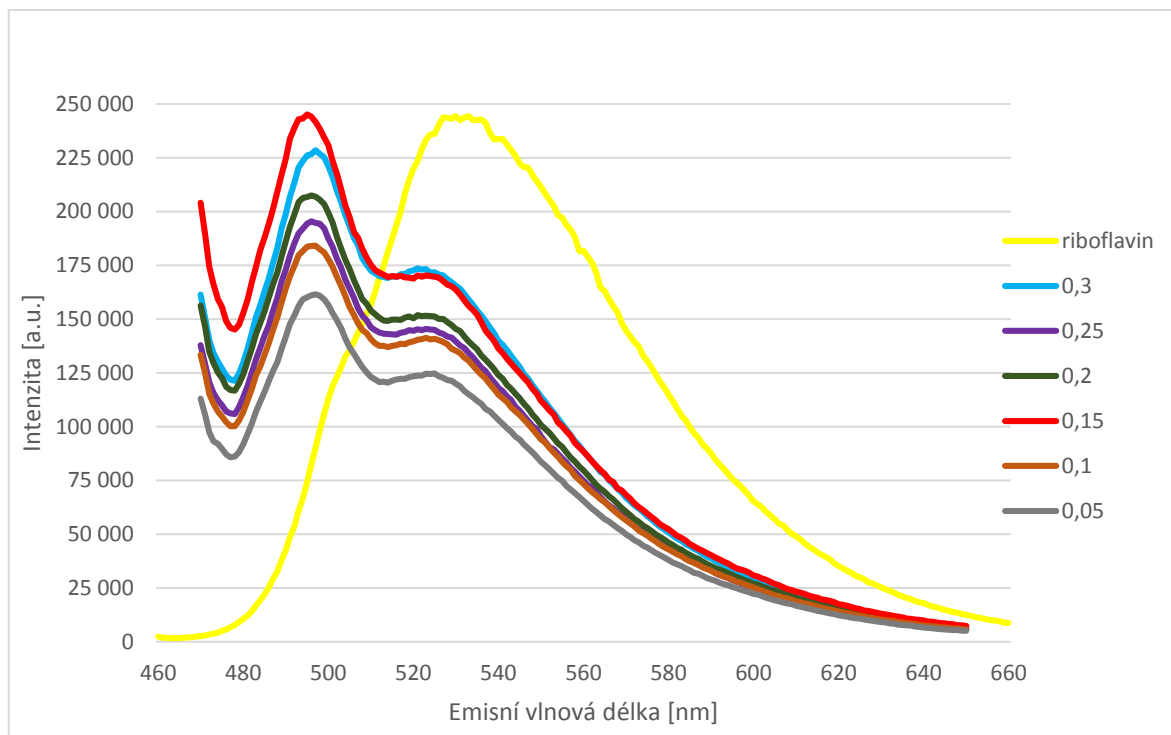


Obr. 16 Luminiscence sušené syrovátky s přidavky riboflavinu 0,05-0,3 mg/100ml

Hodnota intenzity luminiscence při 530 nm se pohybuje v intervalu 85 000 – 105 000 jednotek. Tyto hodnoty jsou vyšší, než u odpovídajících vzorků v kapalně formě, kdy byly naměřeny hodnoty v rozsahu 45 000 – 80 000 jednotek. Obdobné navýšení intenzity luminiscence u vzorků mléka v souvislosti s vyšší sušinou vzorků mléka publikovali Fagan a kol [24]. Tento nárůst intenzity luminiscence byl zaznamenán u riboflavinu a ještě výrazněji u vitamínu A a tryptofanu.

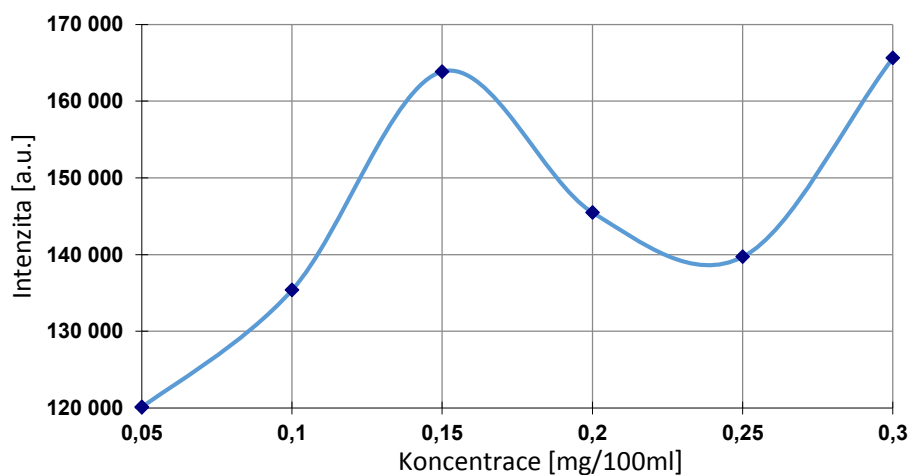
### 7.3 Luminiscenční spektra lyofilizované syrovátky s přidavky riboflavinu

Na obrázku 17 jsou zobrazeny jednotlivé koncentrace od 0,05-0,03 mg/100ml vzorků po lyofilizaci. Je patrný nárůst intenzity luminiscence při 530 nm v závislosti s rostoucím obsahem riboflavinu ve vzorku. Výrazné maximum v oblasti 485-505 nm odpovídá změnám v syrovátce, ke kterým došlo během lyofilizace.



Obr. 17 Emisní spektrum riboflavinu a vzorků lyofilizované syrovátky

Na obrázku 18 je v grafickém zobrazení promítnuta závislost intenzity na koncentraci riboflavinu v syrovátce. S rostoucí koncentrací můžeme pozorovat rostoucí změřenou intenzitu v intervalu koncentrace 0,05 po 0,3 mg/100ml vždy po 0,05. Z obrázku 16 je patrný růst intenzity luminiscence přibližně o 6 000 a.u., při zvýšené koncentraci o 0,05 mg. I v tomto případě je zřejmý velký rozptyl hodnot intenzity luminiscence.



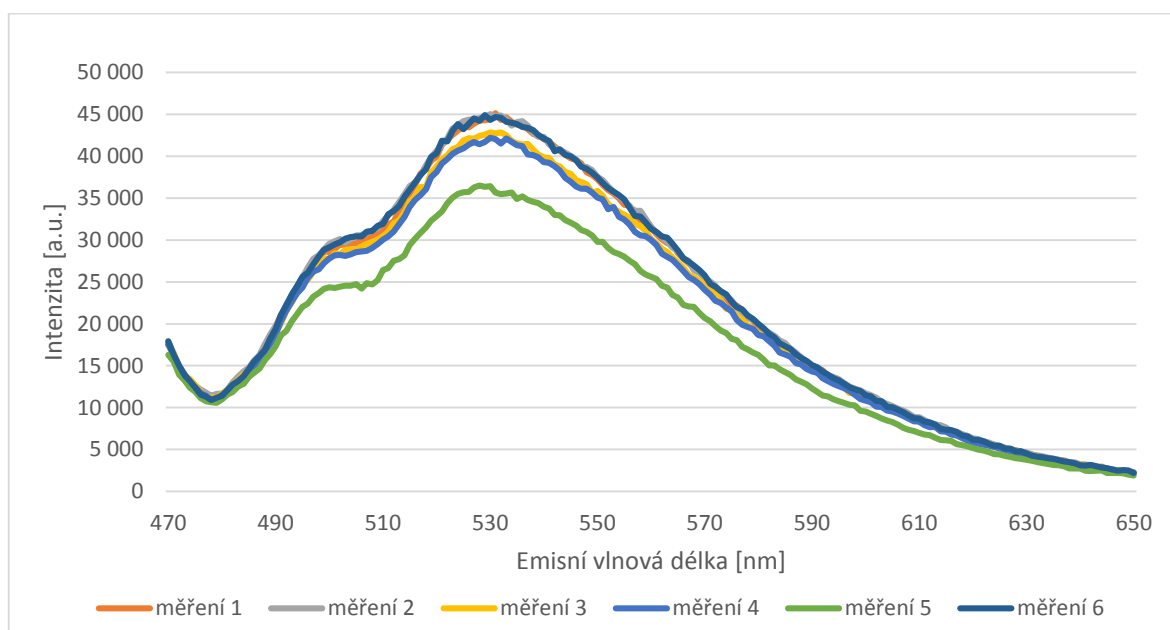
Obr. 18 Závislost luminiscence lyofilizované syrovátky s přidavky riboflavinu

0,05-0,03 mg/100ml

Také u lyofilizovaných vzorků syrovátky bylo zaznamenáno navýšení intenzity luminiscence ve srovnání s kapalnými vzorky stejné koncentrační řady, kdy byly naměřeny hodnoty v rozsahu 45 000 – 80 000 jednotek. Stejně jako u sušených vzorků odpovídá tento trend zjištění, které bylo publikováno autory Fagan a kol. a uvádí zde navýšení intenzity luminiscence u vzorků mléka v souvislosti s vyšší sušinou, viz. také kap. 7.2 [24]. Tento nárůst intenzity byl zaznamenán u všech tří sledovaných fluoroforů v mléku – riboflavinu, vitaminu A a tryptofanu.

#### 7.4 Odhad chyby měření

Pro zjištění odhadu chyby měření luminiscence byl jeden ze vzorků kapalné syrovátky proměřen několikanásobně a ze zaznamenaných dat byla vypočítána směrodatná odchylka (Obr. 19) .



Obr. 19 Kapalná syrovátka s přidavkem riboflavinu 0,03 mg/100ml

Byly vypočteny směrodatné odchylky ze šesti měření jednotlivých emisních vlnových délek v rozmezí 470-650 nm a z nichž byla odvozena celková směrodatná odchylka 1074,19 pro kapalnou syrovátku s přidavkem riboflavinu o koncentraci 0,03 mg/100ml.

Z obrázku 19 je patrná odlišnost hodnot pátého měření od zbývajících měření kapalné syrovátky s koncentrací 0,03 mg/100ml. Po vyřazení hodnot pro páté měření je vypočtena celková směrodatná odchylka 445 a.u. .

Směrodatná odchylka byla vypočtena podle vzorce:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}}$$

[29]

Ve studii X. Liu (2007) byla sledována luminiscence riboflavinu v odtučněném sušeném mléce ve 3 vzorcích od 3 různých výrobců po dobu 8 týdnů za teplotních podmínek 4, 22, 35 a 50°C. Všechny vzorky byly uskladněny v temnotě a občas vystaveny světlu při odebrání vzorků. Výstupem bylo emisní spektrum vlnových délek riboflavinu v rozmezí 400–590 nm při excitační vlnové délce 380nm a excitační spektrum vlnových délek v rozmezí 260–350 nm při emisní vlnové délce 410 nm. Z této studie lze vysledovat shodu měření riboflavinu v odtučněném sušeném mléce s výše uvedeným měřením riboflavinu v syrovátce, kde maximální hodnota riboflavinu dosahuje vrcholu intenzity při emisní vlnové délce 520–230 nm. Studie X. Liu (2007) prokázala, že při vystavení vzorků v průběhu skladování při teplotách 4, 22 a 35°C v období 8 týdnů nebyly zaznamenány žádné rozdíly. Avšak prokázala úbytek riboflavinu při skladování vzorků při teplotě 50°C. [28]

## ZÁVĚR

Hlavním cílem bylo ověřit, zda metoda luminiscenční spektroskopie je schopná zaznamenat změny obsahu riboflavinu v syrovátce a následně vyhodnotit, zda je vhodnou metodou pro stanovení riboflavinu v syrovátce.

Z naměřených a vyhodnocených výsledků je patrný vliv přídavku riboflavinu na intenzitu luminiscence vzorku za prezentovaných podmínek měření. Byla použita excitační vlnová délka 450 nm a vyhodnocována intenzita maxima emisní vlnové délky 530 nm.

Za těchto podmínek bylo nalezeno luminiscenční maximum u vzorku roztoku riboflavinu ve vodě v koncentraci 0,5 mg/100 ml, a také ve vzorcích syrovátky v kapalné, vysušené i lyofilizované formě.

U všech testovaných forem vzorků byl zaznamenán vliv přídavku riboflavinu na hodnotu maxima při 530 nm. Změny intenzity luminiscence v závislosti na rostoucím přídavku riboflavinu na hodnotu maxima při 530 nm byly vyneseny do grafů, byl však zaznamenán velký rozptyl dat, které nevykazovaly lineární charakter.

Z naměřených dat lze přesto konstatovat, že pomocí luminiscenční spektroskopie je možné zaznamenat změny koncentrace riboflavinu v syrovátce. Je však nutné provést řadu dalších měření, prověřit volbu vhodné excitační vlnové délky, proměřit různé koncentrační řady obsahu riboflavinu v syrovátce a také nalézt vhodnou formu vzorků pro měření luminiscence.

Závěrem je možné konstatovat, že metoda luminiscenční spektroskopie je použitelná pro detekci riboflavinu v syrovátce. Výhodou této metody ve srovnání s jinými analytickými technikami je relativní rychlost měření (získání jednoho spektra trvalo cca 10 min), vysoká citlivost, eliminace použití chemikálií a tím také snížení množství odpadu, mezi nevýhody se řadí vyšší náklady na pořízení přístroje.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] **Šiman, Josef.** *Zužitkování syrovátky*. Praha : Průmyslové vydavatelství, 1950. str. 116. OCLC 85303971.
- [2] **Zikán, V., Šalaková, A. a Pechačová, M.** Využití různých druhů syrovátky pro výrobu fermentovaných nápojů s obsahem alkoholu a sycených syrovátkových nápojů. *Mlékařské listy*. 2015, 152, stránky 7-12.
- [3] **Drbohlav, J.; Šalaková, A.; Sedlařík, V.; Nehyba, A.; Cicvárek, J.** Využití kyseliny mléčné ze syrovátky pro přípravu polylaktátu a tvorbu biodegradovatelných plastů. *Mlékařské listy*. 2009, 115, stránky 13-18.
- [4] **Forman, L. a Mergl, M. a kol.** *Syrovátka - její užití v lidské výživě a ve výživě hospodářských zvířat*. 1. vydání. Praha : Středisko technických informací potravinářského průmyslu, 1979. str. 343. Sysno 000554432.
- [5] **Suková, Irena.** *Syrovátka v potravinářství*. Praha : Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2006. str. 60. ISBN 80-7271-173-3.
- [6] **Teplý, Miloš.** *Výroba sýrů, kaseinů a kaseinátů*. Praha : Státní nakladatelství technické literatury, 1985. str. 185. Sysno 000390948.
- [7] **Suková, Irena.** Úspornější čištění a zvýšení výtěžnosti syrovátky: otevřené plastové sýrařské lisy. *čl. 126041*. [Online] 23. 4. 2013. Die Milchwirtschaft, 4, 2013, č. 5, s. 160-161. <http://www.agronavigator.cz/default.asp?typ=1&val=126041&ids=314&ch=13>.
- [8] **Stehlíková, Petra.** Tvarohy, syrovátka. *Moodle - Institutu Klinické a Experimentální Medicíny*. [Online] 1. 2, 2014. <http://www.dlouhovestbezleku.cz/mod/forum/discuss.php?d=155>.
- [9] **Kadlec, Pavel.** *Technologie potravin II*. Praha : Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. str. 236. ISBN 80-7080-510-2.
- [10] **Sikorska, Ewa; Gliszczyńska-Świgło, Anna; Khmelinski, Igor; Sikorski, Marek.** Synchronous Fluorescence Spectroscopy of Edible Vegetable Oils. Quantification of Tocopherols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 7. September 2005, Sv. 53, 18, stránky 6988-6994.

- [11] **Pelant, Ivan a Valenta, Jan.** *Luminiscenční spektroskopie. I., Objemové krystalické polovodiče.* Praha : Academia, 2006. str. 327. ISBN 80-200-1447-0.
- [12] **Krist, Jiří; Géla, František; Fronček, Fabián; Kubala, Martin.** *Luminescence v běžném životě i v laboratoři.* Praha : Česká společnost chemická, 11. 2008. Sv. 102. ISSN:0009-2770.
- [13] **Strasburg, Gale M. and Ludescher, Richard D.** *Theory and applications of fluorescence spectroscopy in food research.* 3. 1995. Trends in Food Science and Technology, Vol. 6. ISSN: 0924-2244.
- [14] **Mindell, Earl and Mundis, Hester.** *Nová vitaminová bible : nejnovější informace o vitamínech, minerálních látkách, antioxidantech, léčivých rostlinách, o doplňcích stravy, léčebných účincích potravin i lécích používaných v homeopatii.* 2. vyd., (dopl., přeprac.). Praha : Ikar, 2006. p. 576. ISBN 80-249-0744-5.
- [15] **Pauling, Linus.** *Jak déle žít a lépe se cítit.* Praha : Argo, 2015. p. 392. ISBN 978-80-257-1225-2.
- [16] **Huang, Rongmin, Kim, Hyun Jung and Min, David B.** *Photosensitizing Effect of Riboflavin, Lumiflavin, and Lumichrome on the Generation of Volatiles in Soy Milk.* Columbus : American chemical Society, 2006. Vol. 54. ISSN 0021-8561.
- [17] **Jelen, P.** Whey Processing. [book auth.] P. F. Fox, John W. Fuquay and Hubert Roginski. *Encyclopedia of dairy sciences.* Amsterdam : Academic Press, 2003, Vol. 4, pp. 2097-2799.
- [18] **Lakowicz, Joseph R.** *Principles of fluorescence spectroscopy.* 3. vyd. New York : Springer, 2006. p. 954. ISBN 978-0-387-31278-1.
- [19] **Hardware manual.** *PC-1 PhotonCounting 001 Steady-State Spectrofluorometer.*
- [20] **Fluorescence Excitation and Emission Fundamentals.** [Online] obr. Stokesův posun. <https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Fundamentals/Fluorescence%20Excitation%20and%20Emission%20Fundamentals.pdf>.
- [21] **Vyhláška č. 225/2008 Sb., kterou se stanoví požadavky na doplňky stravy a na obohacování potravin. Příloha 5.** [Online] cit 2009-2018 Ministerstvo zdravotnictví. <http://eagri.cz/public/web/mze/potravinyl/legislativa/zakon-o-potravinach/provadedci-predpisy-mzd/100065067.html>.

- [22] **Austin, Diane.** *Dokonalé zdraví : [365 rad pro dobrou kondici]*. Praha : Euromedia - Knižní klub, 2000. str. 320. ISBN 80-242-0220-4.
- [23] **Mindell, Earl.** *Vitaminová bible pro 21. století : vše o vitamínech, které budete v tomto století potřebovat*. Praha : Knižní klub, 2000. str. 304. ISBN 80-242-0406-1.
- [24] **Fagan, C. C.; Ferreira, T. G.; Payne, F. A.; O'Donnell, C. P.; O'Callaghan, D. J.; Castillo, M.** *Preliminary evaluation of endogenous milk fluorophores as tracer molecules for curd syneresis*. 11. 2011. Sv. 94. ISSN 0022-0302.
- [25] **Buňka, František.** *Mlékárenská technologie I*. Zlín : Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2013. str. 258. ISBN 978-80-7454-254-1.
- [26] **Beránková, J.** Syrovátkové nápoje. *Mlékařské listy*. 2011, 129, stránky 16-19.
- [27] **Wold, J. P.; Jørgensen, K.; Lundby, F.** *Nondestructive Measurement of Light-induced Oxidation in Dairy Products by Fluorescence Spectroscopy and Imaging* 2002. ISSN 0022-0302.
- [28] **Liu, X. a Metzger, L. E.** Application of Fluorescence Spectroscopy for Monitoring Changes in Nonfat Dry Milk During Storage. *Journal of Dairy Science*. 2007, Sv. vol. 90, Issue 1, stránky 24-37.
- [29] **Klímeck, Petr.** *Aplikovaná statistika : přednášky*. Zlín : Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2008. str. 201. ISBN 978-80-7318-671-5.



**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

RF	Riboflavin
UV	Ultrafialová oblast
DDD	Doporučená denní dávka
WHO	Světová zdravotnická organizace
SH	Soxhlet-Henkel

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

- Obr. 1 *Stokesův posun-absorpční a emisní spektra pro chinin [20]*
- Obr. 2 *Vývoj fluorescence (a) vitamin A, (b) tryptofanu, (c) riboflavinu fluorescence během koagulace mléka a synereze [24]*
- Obr. 3 *Xenonová lampa [18]*
- Obr. 4 *Fotonásobič [18]*
- Obr. 5 *Přístroj PC-1 Photon – counting 001 Steady-State Spectrofluorimeter [19]*
- Obr. 6 *Schéma- PC1 Photon-counting 001 SteadyState Spectrofluorimeter [19]*
- Obr. 7 *Syrovátka po vysušení a po lyofilizaci*
- Obr. 8 *3D mapa kapalně syrovátky*
- Obr. 9 *Luminiscenční spektrum syrovátky v kapalném stavu bez přídavku riboflavinu*
- Obr. 10 *Luminiscenční spektrum riboflavinu (excitační vlnová délka 450 nm)*
- Obr. 11 *Luminiscenční spektra kapalně syrovátky s přídavky riboflavinu- koncentrace (0,005-0,03 mg/100ml)*
- Obr. 12 *Luminiscence kapalně syrovátky v závislosti na přídavku riboflavinu (0,005; 0,01; 0,015, 0,025; 0,03 mg/100ml)*
- Obr. 13 *Luminiscenční spektra kapalně syrovátky s přídavky riboflavinu (0,05- 0,3mg/100ml)*
- Obr. 14 *Luminiscence kapalně syrovátky s přídavky riboflavinu (0,05-0,3mg/100ml)*
- Obr. 15 *Luminiscenční spektra sušené syrovátky s přídavky riboflavinu*
- Obr. 16 *Luminiscence sušené syrovátky s přídavky riboflavinu (0,05-0,3mg/100ml)*
- Obr. 17 *Emisní spektrum riboflavinu a vzorků lyofilizované syrovátky*
- Obr. 18 *Závislostní luminiscence lyofilizované syrovátky s přídavky riboflavinu (0,05-0,03mg/100ml)*
- Obr. 19 *Kapalná syrovátka s přídavkem riboflavinu 0,03 mg/100ml*

**SEZNAM TABULEK**

- Tab. 1 Složení kyselé a sladké syrovátky [17]*
- Tab. 2 Vitaminové složení sušené syrovátky [5]*
- Tab. 3 Doporučený denní příjem vitaminů pro dospělé [15, 22]*
- Tab. 4 Obsah minerálních látek kyselé a sladké syrovátky [17]*
- Tab. 5 Koncentrační řady s přidavky riboflavinu*
- Tab. 6 Koncentrační řady s přidavky riboflavinu 10x zředěno*

## SEZNAM PŘÍLOH

*Příloha PI Hodnoty koncentrací a intenzity syrovátky v kapalně, sušené a lyofilizované podobě – tabulka naměřených hodnot*

**PŘÍLOHA P I: HODNOTY KONCENTRACÍ A INTENZITY  
SYROVÁTKY V KAPALNÉ, SUŠENÉ A LYOFILIZOVANÉ PODOBĚ  
TABULKY NAMĚŘENÝCH HODNOT**

*Tabulka 1: Hodnoty koncentrace (0,005; 0,01; 0,015; 0,025; 0,03 mg/100ml) a intenzity kapalné syrovátky*

<b>Kapalná syrovátka s přidavky RF při 530 nm</b>	
<b>C<sub>RF</sub>[mg/100ml]</b>	<b>I [a.u.]</b>
<b>Koncentrace</b>	<b>Intenzita</b>
0,005	20284,5
0,01	37478,8
0,015	43246,4
0,025	44480
0,03	43772,8

*Tabulka 2: Hodnoty koncentrace (0,05; 0,1; 0,15; 0,3 mg/100ml) a intenzity kapalné syrovátky*

<b>Kapalná syrovátka s přidavky RF při 530 nm</b>	
<b>C<sub>RF</sub>[mg/100ml]</b>	<b>I [a.u.]</b>
0,05	45641,33333
0,1	71428
0,15	79471,2
0,3	80256,8

*Tabulka 3: Hodnoty koncentrace (0,05-0,3 mg/100ml) a intenzity sušené syrovátky*

<b>Kapalná syrovátka s přidavky RF při 530 nm</b>	
<b>C<sub>RF</sub>[mg/100ml]</b>	<b>I [a.u.]</b>
0,05	89105,6
0,1	85894,4
0,15	99538,4
0,2	97953,6
0,25	100393,6
0,3	104818

*Tabulka 4: Hodnoty koncentrace (0,05-0,3 mg/100ml) a intenzity lyofilizované syrovátky*

<b>Kapalná syrovátka s přísávkou RF při 530 nm</b>	
<b>C<sub>RF</sub>[mg/100ml]</b>	<b>I [a.u.]</b>
0,05	120124,3
0,1	135404,5
0,15	163875,6
0,2	145500,4
0,25	139721,6
0,3	165635,5