

Stanovení vitamínů B v sýrech

Bc. Gabriela Kratinová

Diplomová práce
2009



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav potravinářského inženýrství

akademický rok: 2008/2009

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

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

Téma práce: **Stanovení vitamínů B v sýrech**

Zásady pro vypracování:

Úvod

I. Teoretická část

- Charakterizace jednotlivých vitamínů skupiny B.
- Technologie výroby sýrů a jejich dělení.
- Popsat princip kapalinové chromatografie – HPLC.

II. Praktická část

- vypracovat metodiku stanovení vitamínů B v sýrech.
- Stanovení vitamínů B ve vybraných vzorcích sýrů.

Závěr



Rozsah práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] VELÍŠEK, J. Chemie potravin 2, OSSIS, Tábor 1999.

[2] CABALARO, G. Encyklopedia of human nutrition, second edition, Oxford 2005.

[3] <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/vitamins/>.

[4] CHURAČEK, J. a kol. Analytická separace látek, 1. vydání, SNTL, Praha 1990.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Daniela Kramářová, Ph.D.

Ústav potravinářského inženýrství

Datum zadání diplomové práce:

26. února 2009

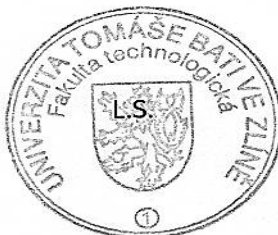
Termín odevzdání diplomové práce:

31. května 2009

Ve Zlíně dne 31. května 2009



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
vedoucí katedry

ABSTRAKT

Diplomová práce byla zaměřena na stanovení vitamínů B-komplexu v mléčných výrobcích, převážně v sýrech. Teoretická část se věnuje popisu vitamínů B-komplexu, složením mléka a rozdělení sýrů. V praktické části byly stanoveny některé z vitamínů B-komplexu ve vybraných druzích sýrů, např. Eidam, Ementál, Niva, Jadel a Bystřický tvaroh. Pro analýzu byla vybrána metoda HPLC s UV/VIS detekcí.

Klíčová slova: vitamíny B-komplexu, HPLC, mléko, sýr, UV/VIS

ABSTRACT

This thesis was focused on assesment vitamins B-complex in milk products, mainly in czech cheeses. The theoretic part applies to description vitamins B-complex, milk composition and dividing cheeses. Some of the vitamins B- complex was measured in choice kinds cheeses, e.g. Eidam, Emental, Niva, Jadel and Bystricky curd. To analysis the method HPLC with UV/VIS detection was choice.

Keywords: vitamins B-complex, HPLC, milk, cheese, UV/VIS

OBSAH

ÚVOD	7
1 VITAMÍNY SKUPINY B	10
1.1 THIAMIN.....	10
1.2 RIBOFLAVIN.....	11
1.3 NIACIN.....	13
1.4 KYSELINA PANTOTENOVÁ.....	16
1.5 PYRIDOXIN.....	18
2 MLÉKO A MLÉČNÉ VÝROBKY	20
2.1 NUTRIČNÍ HODNOTA MLÉKA A MLÉČNÝCH VÝROBKŮ.....	20
2.2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ KRAVSKÉHO MLÉKA.....	20
2.2.1 DUSÍKATÉ LÁTKY.....	21
2.2.1.1 Kaseiny.....	22
2.2.1.2 Syrovátkové bílkoviny.....	23
2.2.1.3 Nebílkovinné dusíkaté látky.....	24
2.2.2 MLÉČNÝ TUK.....	24
2.2.3 SACHARIDY.....	26
2.2.4 MINERÁLNÍ LÁTKY.....	27
2.2.5 VITAMÍNY.....	29
2.2.6 ENZYMY.....	30
2.2.7 HORMONY.....	31
2.2.8 PLYNY.....	32
2.3 KVALITA MLÉKA PRO VÝROBU SÝRŮ.....	32
2.3.1 TECHNOLOGICKÉ VLASTNOSTI MLÉKA.....	32
2.3.2 MIKROBIÁLNÍ JAKOST.....	33
2.4 CHARAKTERISTIKA SÝRŮ.....	34
2.5 VÝROBA SÝRŮ.....	36
2.6 CHARAKTERISTIKA JEDNOTLIVÝCH SKUPIN SLADKÝCH SÝRŮ.....	42
3 HPLC - VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRFIE	46
3.1 DĚLENÍ CHROMATOGRFICKÝCH METOD.....	46
3.2 SESTAVA KAPALINOVÉHO CHROMATOGRFU.....	48
3.2.1 JEDNOTLIVÉ SOUČÁSTI HPLC.....	49
4 METODIKA	55
4.1 MATERIÁL.....	55

4.1.1	VZORKY SÝRŮ PRO ANALÝZU OBSAHU VITAMÍNŮ B	55
4.2	POUŽITÉ POMŮCKY A PŘÍSTROJE	57
4.3	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	58
4.4	EXTRAKCE VITAMÍNŮ B Z VYBRANÝCH DRUHŮ SÝRŮ	58
4.4.1	EXTRAKCE VITAMÍNU B ZE VZORKU 30% EIDAMU	58
4.4.2	EXTRAKCE VITAMÍNŮ SK. B ZE VZORKŮ: LUČINA, GERVAIS, BYSTRICKÝ TVAROH A EMENTÁL.....	59
4.4.3	EXTRAKCE VITAMÍNU SK. B ZE VZORKŮ: 30% EIDAM, HERMELÍN.....	59
4.4.4	EXTRAKCE VITAMÍNU SK. B ZE VZORKŮ: NIVA, VLTAVÍN, PIVNÍ SÝR, POLOOŠTIEPOK, BALKÁNSKÝ SÝR, JADEL.....	60
4.5	KALIBRAČNÍ KŘIVKY PRO CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ VITAMÍNŮ SK. B	60
4.6	CHROMATOGRAFICKÁ ANALÝZA.....	61
5	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	62
5.1	VÝSLEDKY MĚŘENÍ KALIBRAČNÍCH KŘIVEK	62
5.1.1	KALIBRAČNÍ KŘIVKA PRO STANOVENÍ VITAMÍNU B ₁	62
5.1.2	KALIBRAČNÍ KŘIVKA PRO STANOVENÍ VITAMÍNU B ₃	63
5.1.3	KALIBRAČNÍ KŘIVKA PRO STANOVENÍ VITAMÍNU B ₅	65
5.1.4	KALIBRAČNÍ KŘIVKA PRO STANOVENÍ VITAMÍNU B ₆	67
5.2	ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ	69
5.3	VÝSLEDKY EXTRAKCE VITAMÍNŮ SK. B VE VZORKU 30% EIDAMU	69
5.4	VÝSLEDKY EXTRAKCE VITAMÍNU SK. B ZE VZORKŮ: LUČINA, GERVAIS, BYSTRICKÝ TVAROH A EMENTÁL.....	70
5.5	VÝSLEDKY EXTRAKCE VITAMÍNŮ SK. B ZE VZORKŮ: 30% EIDAM, HERMELÍN.....	73
5.6	VÝSLEDKY EXTRAKCE VITAMÍNŮ SK. B ZE VZORKŮ: NIVA, VLTAVÍN, PIVNÍ SÝR, POLOOŠTIEPOK, BALKÁNSKÝ SÝR, JADEL	74
	ZÁVĚR	79
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	81
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	85
	SEZNAM OBRÁZKŮ	86
	SEZNAM TABULEK.....	87
	SEZNAM GRAFŮ	88
	SEZNAM PŘÍLOH.....	89

ÚVOD

Mezi základní složky lidské potravy, spolu s bílkovinami, tuky a sacharidy, patří vitamíny. Ty jsou řazeny mezi biologické katalyzátory. Podílí se ve velké míře na množství metabolických procesů v lidském organismu.

Vitamíny jsou esenciálními látkami, většinu z nich si tělo nedovede vytvořit samo, a proto je člověk musí získávat z potravy. Jejich množství v organismu je poměrně malé, zato však mají velký vliv na biologické pochody.

Dnešní uspěchaná doba jejich potřebu zvyšuje, avšak se spíše setkáváme s opakem. Lidé se dávají přednost rychloobčerstvení před plnohodnotnou stravou. To pak způsobuje nedostatek vitamínů a může být příčinou různých onemocnění.

Tato práce se zabývá stanovením množství některých vitamínů ze skupiny B-komplexu. Jedná se především o vitamín B₃ (kyselina nikotinová a její amid), vitamín B₅ a vitamín B₆. Mezi hlavní zdroje těchto vitamínů patří maso, vnitřnosti a obiloviny. Dále pak mléko a mléčné výrobky, jimiž se bude tato práce zabývat. Mléko je také důležitým zdrojem živočišných bílkovin, tuků a sacharidů. Obdobné je to i s mléčnými výrobky. Liší se především množstvím tuků a bílkovin.

Pro stanovení byla vybrána jako separační metoda vysokoúčinná kapalinová chromatografie – HPLC. Tvoří základ moderní analytické chemie. Je ceněna pro její vysokou citlivost a selektivitu. Umožňuje separovat termolabilní kapalné i tuhé látky.

Cílem této práce bylo praktické stanovení především vitamínů B₃ a B₆ v mléce a mléčných výrobcích za využití metody HPLC. Diplomová práce volně navazuje na předcházející bakalářskou práci, jíž úkolem bylo provést literární rešerši o využití metody HPLC pro stanovení výše jmenovaných vitamínů.

Poděkování, motto

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucí diplomové práce Ing. Daniele Kramářové, Ph.D za odborné vedení, spolupráci, trpělivost a cenné připomínky.

Dále bych chtěla poděkovat rodině a svému příteli za trpělivost a podporu během celého studia.

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

Ve Zlíně

.....

Podpis diplomanta

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 VITAMÍNY SKUPINY B

Vitamíny jsou esenciálními složkami potravy. Patří mezi exogenní nízkomolekulární sloučeniny, tzv. biokatalyzátory. Působí ve velmi malých koncentracích, ale důležité je zdůraznit jejich esenciálnost – většinou není organismus schopen si tyto látky sám syntetizovat.

Rozlišujeme vitamíny podle jejich rozpustnosti ve vodě (hydrofilní vitamíny) nebo v tucích (lipofilní vitamíny).

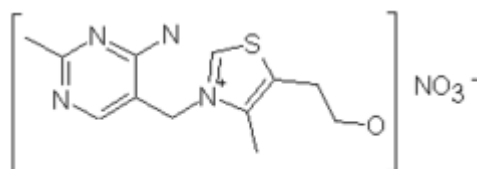
Mezi vitamíny B komplexu patří:

- Vitamín B₁ (thiamin),
- Vitamín B₂ (riboflavin),
- Vitamín B₃ (kyselina nikotinová a její amid),
- Vitamín B₅ (kyselina pantothenová),
- Vitamín B₆ (pyridoxin),
- Vitamín B₉ (kyselina listová),
- Vitamín B₁₂ (kyanokobalamin).

Dále pak k hydrofilním vitamínům přiřazujeme: vitamín C, biotin, kyselinu lipovou. [1,2,3]

1.1 Thiamin

Thiamin obsahuje pyrimidinový cyklus (4-amino-2-metyl-pyrimidin) spojený metylenovou skupinou na C-5 s dusíkem tiazolového cyklu 5-(2-hydroxyetyl)-4-metyltiazolu. V čistém stavu je to krystalická látka o bodu tání 248 – 250 °C, která je při laboratorní teplotě velmi dobře rozpustná.



Thiamine Mononitrate

Thiamin

V lidském těle se vyskytuje v několika fosforylovaných formách: thiaminmonofosfát (TMP), thiamintrifosfát (TTP) a thiamindifosfát (TDP).

Hraje důležitou roli při odbourávání cukrů, dekarboxylaci kyseliny pyrohroznové apod. Podílí se také na konečném odbourávání metabolických produktů tuků a bílkovin.

Thiamin je značně termostabilní, především v kyselém prostředí. V neutrální a alkalickém prostředí se poměrně rychle oxiduje na fyziologicky neúčinný tiochrom, popř. na účinný thiamindisulfid.

Deficience thiaminu je označována jako nemoc zvaná beri-beri. Jejími projevy jsou svalová únava, nechutenství, hubnutí a podrážděnost. Příčinou avitaminózy (totální nedostatek vitamínu) bývá často alkoholismus. Beri-beri se také vyskytuje v zemích, kde hlavní složku potravy tvoří loupaná rýže.

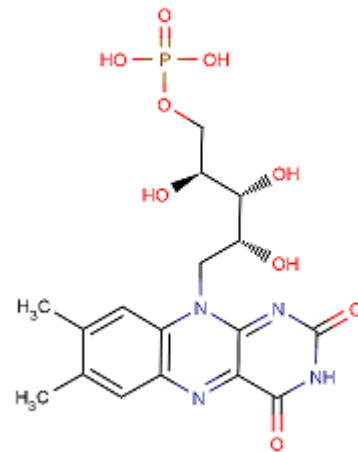
Hlavními zdroji jsou obecně potraviny bohaté na sacharidy – obiloviny, luštěniny, ale také vepřové maso a játra. [1, 2, 4, 5, 6]

Doporučená denní dávka thiaminu se přepočítává na energetický příjem, neboť při vyšší energetické spotřebě je nezbytný i vyšší přísun thiaminu. Souvisí také s přísunem sacharidů v potravě. Proto na každých 4200 kJ energie získané z cukrů se doporučuje příjem 0,4 – 0,6 mg.den⁻¹ thiaminu. U dospělých osob s denním příjmem energie 12600 kJ je doporučený příjem thiaminu 1,2 mg.den⁻¹. [7]

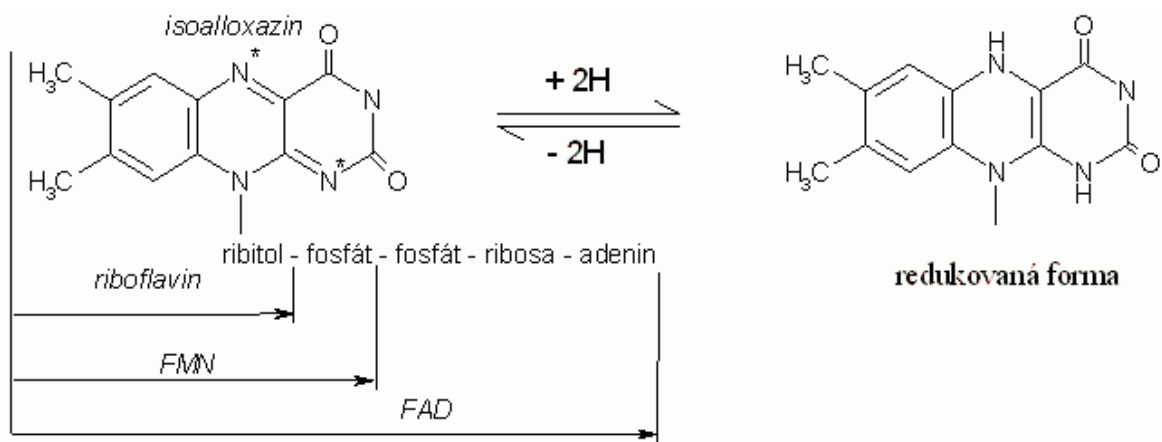
1.2 Riboflavin

Tento vitamín patří do skupiny flavinů. Riboflavin je chemicky 6,7-dimetyl-9-(1-D-ribidyl) isoallxazin. Je to žlutá krystalická látka o bodu tání až 275 – 292 °C. Lehce se rozpouští ve vodných roztocích alkalických hydroxidů. V kyselém prostředí je riboflavin značně stálý vůči teplu. Je velmi citlivý především na světelné záření.

Vyskytuje se jako volná látka, ale existuje i ve formě riboflavin-5'-fosfátu (flavinmononukleotidu, FMN) nebo flavinadeninudínukleotidu (FAD).

*Riboflavin**Flavinmonofosfát – FMN*

Fosforilované formy se uplatňují v biochemických systémech jako koenzymy oxidoredukčních enzymů. Flavoproteiny obsahující FMN a FAD s riboflavinem jako kofaktorem se účastní jedno nebo dvouelektronových oxidoredukčních reakcí.

*Příklad oxidoredukční reakce*

Například v dýchacím řetězci (mitochondrie) jsou centrálním producentem energie. Dále jsou rozhodující pro metabolismus sacharidů, tuků a proteinů. Riboflavin je důležitý pro dobrý stav kůže, očí a funkce srdce a dalších orgánů.

Deficience se neprojevuje příliš vážnými příznaky. Většinou se jedná o zánět ústních koutků, rtů nebo jazyka, zčervenáním jazyka nebo zanícením spojivek. Také může vést ke světloloplosti.

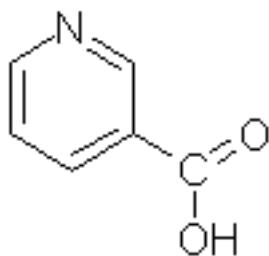
Podobně jako thiamin se riboflavin využívá k fortifikaci některých potravin, např. pšeničné mouky a cereální snídaně. Také se používá k barvení vybraných potravin – především cereálních výrobků.

K nejbohatším zdrojům riboflavinu patří hlavně živočišné produkty, jako jsou játra, vejce, sýr a maso. Pro vegetariány může tento vitamín být proto nedostatkovým a měli by jej přijímat v tabletách. [1, 2, 4, 6]

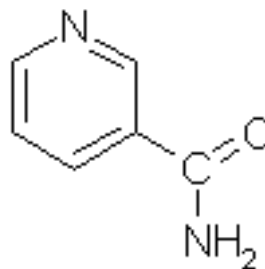
Doporučená denní dávka vitamínu se udává od $0,4 \text{ mg} \cdot \text{den}^{-1}$ (pro kojence) do $1,7 \text{ mg} \cdot \text{den}^{-1}$ (pro adolescenty a dospělé muže). U žen je denní spotřeba poněkud nižší ($1,2 - 1,3 \text{ mg} \cdot \text{den}^{-1}$), u těhotných a kojících žen se denní spotřeba pohybuje v rozmezí $1,6 - 1,8 \text{ mg} \cdot \text{den}^{-1}$ i více. [7]

1.3 Niacin

Vitamín B₃ je společným označením pro kyselinu nikotinovou (3-pyridinkarboxylová kyselina) a její amid (nikotinamid), dříve nazývaný jako vitamín PP (Pelagra Preventive factor). Kyselina nikotinová je bezbarvá krystalická látka bez zápachu, s bodem tání $234 - 237 \text{ }^\circ\text{C}$. Od $150 \text{ }^\circ\text{C}$ začíná kyselina nikotinová sublimovat. Na vzduchu i v roztoku je naprosto stálá a s řadou kyselin velmi snadno tvoří soli.



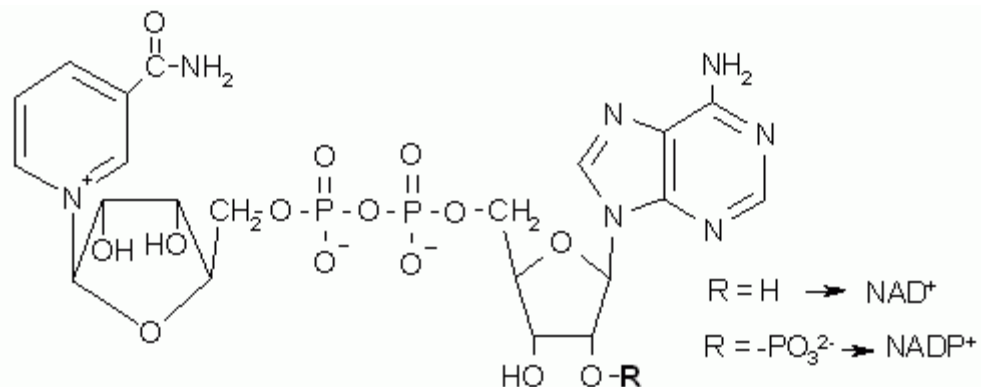
Kyselina nikotinová



Nikotinamid

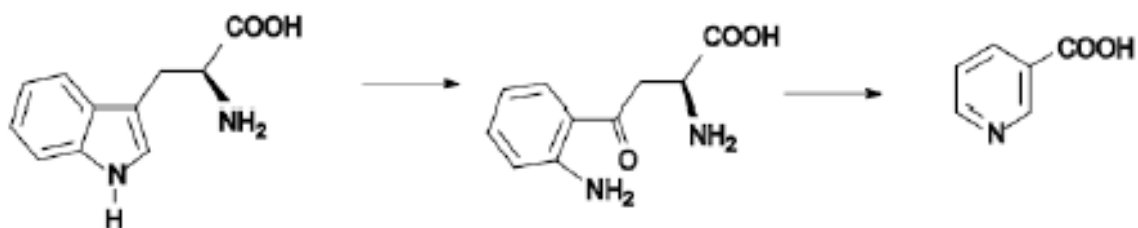
Obě látky jsou biologicky stejně účinné a velmi stabilní. Lidský organizmus je schopen částečně syntetizovat niacin z aminokyseliny tryptofanu pomocí enzymů obsahující jako kofaktor vitamin B₆ – pyridoxin. [1, 2, 3]

Z kyseliny nikotinové a jejího amidu v biologických systémech vznikají dva koenzymy. Nikotinamid je součástí nikotinamidadeninukleotidu (NAD) a nikotinamidadeninukleotidfosfátu (NADP), v nichž je pyridinový kruh spojen N-glykosidicky s ribózou. Ribosid nikotinamidu je prostřednictvím kyseliny fosforečné vázán na adenosin.



NAD⁺, NADP⁺

NAD (resp. NAD⁺ jeho oxidovaná forma a NADH jeho redukovaná forma) a jeho fosforečný ester NADP (NADP⁺ a NADPH) jsou součástí kofaktorů – tzv. koenzymů *pyridinových dehydrogenáz*. Princip jejich funkce spočívá v odejmutí dvou atomů vodíku ze substrátu. Poté předají vodíky příslušnému akceptoru a samy se opět reoxidují na původní formu. Obě formy se účastní přenosu elektronů v respiračních systémech, např. jsou nepostradatelné ve většině reakcí Krebsova cyklu nebo ve Waldově cyklu v sítnici oka. Podílí se také na přeměně cukrů, tuků, aminokyselin, cholesterolu, steroidních hormonů a mnoha dalších látek. Při etanolovém kvašení umožňuje odjetím dvou atomů vodíku vznik etanolu z acetaldehydu. NAD⁺ je také zapojen do neredoxních reakcí při mobilizaci vápníku a při replikaci a reparaci DNA. [3, 6, 8, 9]



Syntéza kyseliny nikotinové z tryptofanu

Jen malá část tohoto vitamínu se vstřebává v žaludku. Převážná většina je vstřebána v tenkém střevě. Pasivní i usnadněná difúze umožňuje jeho přenos z krevního řečiště. Kontroluje správnou tvorbu buněk na správném místě a také zajišťuje případnou opravu poškozených molekul DNA. Studie ukazují, že může být důležitým protirakovinným faktorem. Niacin hlídá funkčnost nervového systému a udržuje v krvi dostatečné množství kyslíku. Zabraňuje shlukování krevních destiček. Kyselina nikotinová zabraňuje uvolňování mastných kyselin z tukové tkáně, což vede ke snížené tvorbě lipoproteinu VLDL a LDL, které nesou cholesterol. Tím se tedy podílí na snižování hladiny cholesterolu v krvi. Vysoké dávky niacinu také napomáhají tvorbě červených krvinek (používá se při léčbě oběhových obtíží).

Je vitamínem důležitým pro udržení mentální a nervové rovnováhy a je důležitý pro normální činnost nervového systému. [5, 6, 7, 8, 10]

Mírný nedostatek vitamínu B₃ se projevuje nespavostí, nechutenstvím, bolestmi břicha a dalšími nespecifickými příznaky. Závažná deficiencie niacinu se projevuje jako nemoc zvaná pelagra. Pelagra je nemoc tří D - *dermatitis, diarrhoea, demence*. Kožní příznaky postihují symetricky ruce, lokty, nohy, kolena a ruce. Tyto stavy vedou k trvalé pigmentaci s ložisky ztlustělé či ztenčené kůže. Dochází ke změnám na sliznicích úst, žaludku a střev. Dalšími příznaky jsou nervozita, nespavost, bolesti hlavy, svalová slabost, závratě, třes, ztráta chuti a čichu, deprese, halucinace a demence.

Ve Španělsku v roce 1735 byla popsána souvislost mezi kukuřicí a pelagrou. Niacin v kukuřici velmi pevně vázán a lidské tělo ho proto není schopno vstřebat. Lépe je absorbován z živočišných tkání. Další oblasti kde byla pelagra popsána je severní Amerika, Mexiko, Egypt, také i Chorvatsko a některé africké státy.

Hypervitaminóza se příliš nevyskytuje, ve výjimečných případech se mohou vyskytovat ekzémy, vyrážky, svědění a bolesti hlavy či alergické reakce. Pacienti trpící na dnu, by se měli vyvarovat vyšším dávkám, protože niacin brání vylučování kyseliny močové. [8, 11, 12, 13]

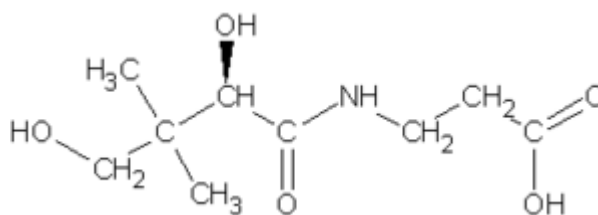
Niacin se vyskytuje jak v živočišné, tak i v rostlinné stravě. V potravinách živočišného původu převažuje nikotinamid a to hlavně ve formě NAD^+ a NADP^+ . Mezi významné zdroje patří vnitřnosti, kvasnice, maso (skopové, hovězí, vepřové), červené ryby (tuňák, losos), také sem řadíme mléko a mléčné výrobky, vejce.

V rostlinných zdrojích se naopak vyskytuje kyselina nikotinová. Obiloviny mají značně velký obsah niacinu, a však loupání a mletí způsobuje velké ztráty (závisí na stupni vymletí mouky). Dalšími zdroji jsou rýže, luštěniny (hrách, fazole). Překvapivě bohatým zdrojem niacinu je pražená káva. Zelené kávové boby obsahují velké množství alkaloidu trigonellinu, který při pražení degraduje na kyselinu nikotinovou a sensoricky aktivní pyridiny. [1, 6, 14]

Je důležité započítávat jak samotný příjem niacinu potravou, tak i ten, který se syntetizuje v játrech z tryptofanu. Doporučená denní dávka (DDD) pro muže je 15 - 20 $\text{mg}\cdot\text{den}^{-1}$, pro ženy 13 - 15 $\text{mg}\cdot\text{den}^{-1}$ a pro děti 9 - 16 $\text{mg}\cdot\text{den}^{-1}$. [13]

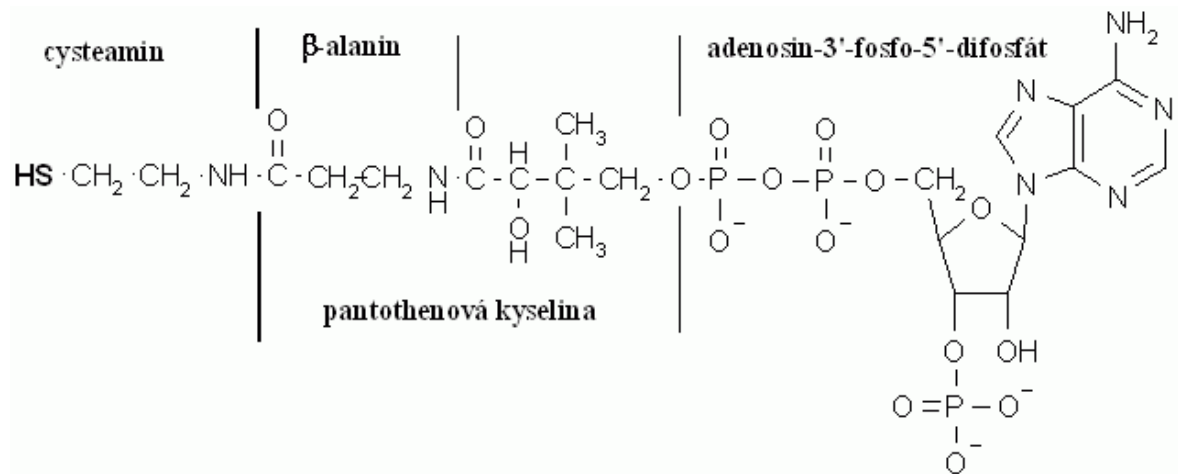
1.4 Kyselina pantotenová

Chemicky je kyselina pantotenová tvořená spojením aminokyseliny β -alaninu a kyseliny pantoové. V přírodě se vyskytuje jen D(+) forma: D-(+)- α,γ -dihydroxy- β -dimethylbutyryl- β' -alanin. Kyselina pantotenová je termolabilní slabě nažloutlá olejovitá kapalina velmi dobře rozpustná ve vodě, v roztoku je stabilní při pH 5,5 – 7,0. Kyselina pantotenová tvoří řadu krystalických solí (např. sodnou, vápenatou, s chininem) rozpustných ve vodě.



Kyselina pantotenová

Biologicky aktivní formou kyseliny pantotenové je *koenzym A* (CoA nebo CoASH) a *ACP* (Acyl-Carrier Protein). Koenzym A je účinnou složkou enzymů (*transacyláz*) přenášejících zbytky karboxylových kyselin. Nejběžnější látkou je acetyl-CoA přenášející acetylové skupiny, v němž je kyselina octová vázána jako tioester na tiolovou skupinu cysteaminu. Dalšími acyl-CoA jsou malonyl-CoA, sukcinyl-CoA a jiné látky (významné v metabolismu cukrů, tuků, bílkovin).



Koenzym A - CoA

ACP (Acyl-Carrier Protein) je protein, na který se při biosyntéze mastných kyselin váže tioesterovou vazbou acylový zbytek. Dále je součástí *acyl-CoA syntetázy* a dalších *syntetáz*.

CoA se také účastní Krebsova cyklu, je nutný při syntéze cholesterolu a steroidních hormonů, porfyrinů a nukleových kyselin. Acetylací vzniká acetylcholin (přenáší nervové impulsy). CoA je tedy skutečnou křižovatkou řady metabolických cest.

Deficience kyseliny pantotenové je velmi vzácná, neboť se vyskytuje téměř ve všech potravinách. Z nedostatku vznikají závažné poruchy ve štěpení a syntéze bílkovin. V počátečním období nedostatku se objevuje zvýšená potřeba spát během dne, později zácpa, ztráta chuti k jídlu, nespokojenost, pálení nohou, žaludeční obtíže, duševní únava, infekce dýchacích cest.

Zdroji kyseliny pantotenové jsou prakticky všechny potraviny jak živočišného, tak i rostlinného původu. Z živočišných zdrojů je to například maso, zvláště pak vnitřnosti, dále vejce a sýry. V mléce je obsah vitamínu nízký. Jako zástupce rostlinných zdrojů můžeme uvést kvasnice, otruby, luštěniny, ořechy, dokonce i včelí mateří kašička. [1, 2, 5, 7, 15, 16]

DDD kyseliny pantotenové se uvádí pro muže 7 - 10 mg.den⁻¹, pro ženy 4 - 7 mg.den⁻¹ a pro děti 5 mg.den⁻¹. Léčebné dávky jsou 50 - 100 mg.den⁻¹. [15]

1.5 Pyridoxin

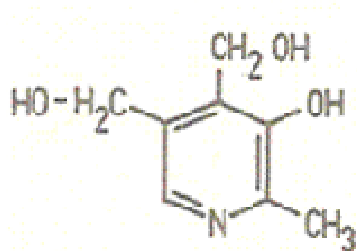
Pyridoxin je označení pro třídu látek se stejným biologickým účinkem.

Řadíme zde: **pyridoxol** (2-metyl-3-hydroxy-4,5-bishydroxymethylpyridin),

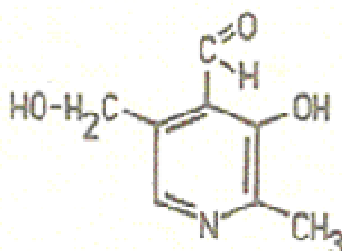
pyridoxal (2-metyl-3-hydroxy-4-formyl-5-hydroxymethylpyridin),

pyridoxamin (2-metyl-3-hydroxy-4-aminomethyl-5-hydroxymethylpyridin).

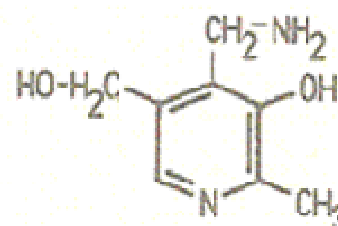
Tento vitamín je ve vodě rozpustný a tvoří bezbarvé krystalky o bodu tání 160 °C. Celá třída má bazický charakter a s minerálními kyselinami tvoří ve vodě rozpustné soli. Je relativně stálý v kyselých roztocích a méně stálý v neutrálním a alkalickém prostředí, zvláště na světle.



Pyridoxol



Pyridoxal



Pyridoxamin

Velmi důležitou metabolicky aktivní formou pyridoxinu je pyridoxal-5'-fosfát a pyridoxamin-5'-fosfát, které jsou totiž součástí kofaktorů enzymů. Přítomnost pyridoxinu je velmi významná pro metabolismus aminokyselin. Dále zasahuje do metabolismu tuků – je potřebný k převedení polynenasycených mastných kyselin na jiné látky (např. prostaglandiny). Účastní se metabolismu cholesterolu a působí preventivně proti vzniku aterosklerózy. Pyridoxin má důležitou roli v metabolismu homocysteinu, jež je nezávislým rizikovým faktorem vzniku ischemické choroby srdeční a cévních onemocnění.

Pyridoxin v nervových procesech funguje jako látkový přenašeč. Zprostředkovává impulzy mezi nervovými buňkami. Zasahuje i do metabolismu nukleových kyselin. Podobně jako vitamín A a niacin, se pyridoxin účastní procesu růstu u dětí a mládeže, řídí dělení a spe-

cializaci buněk. Proto je tento vitamín velmi důležitý pro těhotné ženy. [1, 3, 7, 11, 14, 17, 18]

Deficience tohoto vitamínu způsobuje především nervové poruchy a zvýšenou neurosvalovou dráždivost (cukání, víček, u dětí až křečemi), zapomnětlivost, záněty sliznice dutiny ústní. Příčinou nedostatku může být snížený příjem potravy nebo také špatná absorpce vitamínu v trávicím ústrojí. Antagonistou mohou být i některé léky, např. isoniazid, který se používá k léčbě tuberkulózy. Perorální antikoncepční přípravky, jako je penicilamin, isoniazid nebo hydralazin, také snižují množství vitamínu v organismu. Také alkohol snižuje vstřebávání, protože etanol se přemění na acetaldehyd a při jeho detoxikaci v játrech se defosforyluje pyridoxalfosfát. Tím ztrácí svou funkci v metabolismu aminokyselin. [3, 5, 7, 14]

V našich podmínkách však hypovitaminóza či avitaminóza je velice vzácná, neboť pyridoxin je obsažen široké škále potravin. Také střevní mikroflóra dovede vytvořit relativně velké množství tohoto vitamínu

K předávkování pyridoxinem může dojít jen při užívání většího množství po dobu několika měsíců až let. Projevuje se únavou, podrážděností, depresí a zánětem nervů, který způsobuje obtíže při chůzi. Postupně se objevuje necitlivost v rukou a nohou, to může vést až k ochrnutí.

V potravinách rostlinného původu se vyskytuje především pyridoxol a pyridoxal. Dobrým zdrojem vitamínu jsou obiloviny, celozrnné cereální výrobky, obilné klíčky. Nejbohatším zdrojem jsou potraviny živočišného původu, hlavně červené maso, drůbež, ryby, droždí a vnitřnosti. Dále sem patří i vaječný žloutek. V těchto potravinách se vyskytuje pyridoxal a pyridoxamin a to ve formě fosforečných esterů. [1, 8, 19]

Doporučená denní dávka u mužů činí 1,7 – 2,0 mg a u žen 1,4 – 1,6 mg. U těhotných žen je tato dávka vyšší, 6 – 20 mg. Potřeba se v průběhu těhotenství zvyšuje souběžně s růstem plodu. [20]

2 MLÉKO A MLÉČNÉ VÝROBKY

Mléko a mléčné výrobky jsou součástí potravy člověk a již několik tisíc let. Nejvíce je využíváno mléko kravské. Další část spotřeby tvoří mléka jiného původu – ovčí, kozí, buvolí, nebo velbloudí.

Jakost mléka a mléčných výrobků je zásadně ovlivněna jakostí produkovaného mléka – veškeré zákroky při ošetřování a zpracování mléka mohou do určité míry omezit nedostatky, které mléko nabylo při jeho nevhodném získávání a ošetřování v prvovýrobě, ale nemohou je odstranit úplně. O jakosti mléčných výrobků se rozhoduje již na pastvě, ve stáji, při krmení, při dojení a ošetřování mléka. [21, 22]

2.1 Nutriční hodnota mléka a mléčných výrobků

Mléko je produkt mléčných žláz samic savců. Několik dní po porodu je nejprve vylučováno tzv. mlezivo (kolostrum). Značně se liší od zralého mléka: má vysokou sušinu, vysoký obsah bílkovin a vysoký obsah imunoglobulinů – protilátek a vitamínu, pro upevnění imunity mláděte. Po 10 dnech se obsah složek stabilizuje do parametrů zralého mléka. Z technologického hlediska je mlezivo nevhodné pro průmyslové zpracování.

Podle vzájemného poměru kaseinových a albuminových bílkovin rozlišujeme zralá mléka na kaseinová (kravské, kozí, ovčí, velbloudí) a albuminová (lidské, psí, kočičí a kobyly).

Poměr jednotlivých živin v mléku je značně proměnlivý. Závisí na dědičných vlastnostech plemene dojnic, na zdravotním stavu, na biologické hodnotě a množství krmiv, na době laktace a stáří dojnic. [21, 22]

2.2 Chemické složení kravského mléka

Mléko je složitý systém polydispezních částic:

- disperzní, emulzní fáze: velikost částic nad 10^{-6} m – patří sem mléčný tuk,
- koloidní fáze: velikost částic 10^{-8} – 10^{-6} m, jsou jemně rozptýleny a opticky vzniká dojem rozpustnosti – patří sem bílkoviny a nerozpustné soli – částice jsou hydratovány, což brání shlukování a následnému srážení,
- pravý roztok: velikost částic pod 10^{-9} m – sacharidy a minerální látky.

Kravné mléko obsahuje 87 – 88 % vody, 12 – 13 % sušiny z toho tvoří:

- dusíkaté látky (hrubá bílkovina) 3,2 – 3,6 %,
- mléčný tuk 3,5 – 4,5 %,
- sacharidy 4,0 – 5,0 %,
- minerální látky do 1 %,
- dále sušina obsahuje vitamíny, enzymy, hormony, plyny a pigmenty. [21]

2.2.1 Dusíkaté látky

Dusíkaté látky mléka tvoří nejkomplexnější složku mléka, určují základní fyzikální a chemické vlastnosti mléka a některé z nich kromě nutriční hodnoty mají vysoce významné biologické funkce (imunoglobuliny, laktoferin, enzymy, aj.).

Základní rozdělení dusíkatých látek mléka:

- Kasein – komplex fosfoproteinů, které jsou syntetizovány mléčnou žlázou a tvoří v mléce přežvýkavců převážnou část bílkovin. Z mléka je možno je vysrážet při pH 4,6 a teplotě 20 °C.
- Syrovátkové bílkoviny (bílkoviny mléčného séra) – globulární bílkoviny, rozpustné při pH 4,6. Tvoří asi 1/5 z obsahu čistých bílkovin.
- Proteoso-peptony – tepelně stabilní fosfoproteiny, rozpustné při pH 4,6. Tvoří si 2 – 6 % čistých bílkovin.
- Ostatní bílkoviny mléka – minoritní látky bílkovinné povahy (enzymy, lipoproteiny apod.)
- Nebílkovinné dusíkaté látky – velký počet látek, které obsahují dusík, odpovídá 250 – 300 mg N. l⁻¹ mléka.

Hrubá bílkovina (3,2 - 3,6 %) celk. N x 6,38	Čistá bílkovina (3,0 - 3,3 %) 93 - 95 % celk. N	Kasein (2,4 - 2,6 %) 76 - 86 % z č. bílkovin	α-kasein	42%
		Syrovátkové bílkoviny (0,5 - 0,7 %) 14 - 24 % z č. bílkovin	β-kasein	25%
	Nebílkovinné dusíkaté látky (25 - 35 mg/100 g) 5 - 7 % celk. N		κ-kasein	9%
		γ-kasein	4%	
			α-laktalbumin	4%
			β-laktoglobulin	9%
			sérum albumin	1%
			imunoglobuliny	2%
			proteoso-peptony	4%
			močovina	50%
			(20 - 30 mg/100 g)	
			amoniak, kreatin,	
			kys.močová atd.	50%

Obr. 1: Rozdělení a zastoupení základních dusíkatých látek kravského mléka [21]

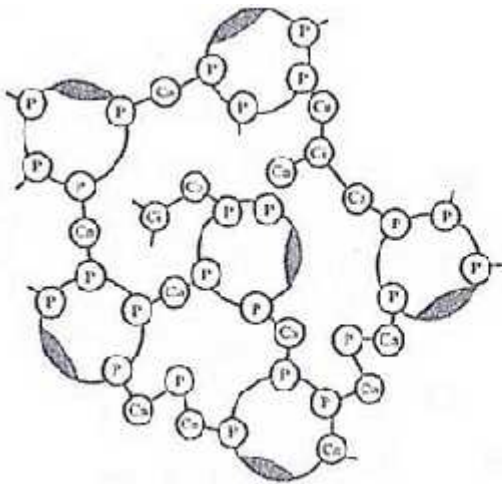
2.2.1.1 Kaseiny

Kasein je hlavní bílkovinou mléka, syntetizovanou mléčnou žlázou. Jedná se o komplex frakcí fosfoproteinů, u kterých je známa i aminokyselinová skladba a struktura. Základními frakcemi jsou α_s , β a κ -kasein, ostatní frakce kaseinu se považují za deriváty. Všechny frakce kaseinu, mimo κ -kasein, jsou vysoce citlivé na přítomnost vápníku v mléce. Proti vysrážení je chráněn právě přítomnost κ -kaseinu. Působením enzymu *chymozinu* dochází k rozštěpení κ -kaseinu, který tím ztrácí svůj ochranný vliv na ostatní frakce a veškeré frakce kaseinu se vysráží ve formě vápenatých solí. Také zředěnou kyselinou, ať již přidanou nebo vytvořenou mléčným kysáním, lze vysrážet volný kasein při pH 4,6. Obou těchto způsobů se používá k výrobě sýrů a to buď tzv. sladkým srážením pomocí *chymozinu* nebo kyselým srážením působením kyselin.

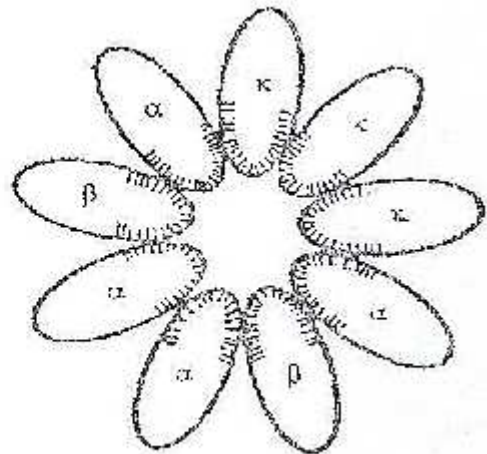
Frakce, označované jako λ -kasein, jsou fragmenty α_{s1} -kaseinu. Frakce, označené jako γ -kaseiny, jsou produkty degradace β -kaseinu proteolytickými enzymy nativního mléka.

Kaseiny nejsou v mléce ve formě monomerů, ale jsou agregovány do kaseinových komplexů a micel. Nepolární části jednotlivých molekul jsou orientovány do centra submicely, kde se uplatňují hydrofobní interakce. Polární části molekul kaseinů, tzn. fosfoserinové zbytky molekul α_s - kaseinů a β - kaseinů a treoninový zbytek s vázanými oligosacharidy v molekule κ -kaseinu, interagují s vápenatými ionty a vodou. Jednotlivé submicely se vzájemně spojují do micel prostřednictvím fosfátových (fosfoserinových) skupin α_s - kaseinů

a β – kaseinů s vápenatými ionty buď přímo, nebo prostřednictvím volných fosfátů a citrátů. Typická micela kravského mléka obsahuje asi 20 000 molekul kaseinů. Micelu tvoří přibližně: 92 % kaseinů, 3 % vápenatých iontů, 3 % anorganického (volného) fosfátu, 2 % fosfátu vázaného jako fosfoserin, 0,4 % citrátu a do 0,5 % sodné, draselné a hořečnaté ionty. Průměr micel se pohybuje mezi 50 až 300 nm. Počet micel bývá asi $1 \cdot 10^{12}$. ml⁻¹ mléka.



Obr. 2: Spojení submicel



Obr. 3: Příčný řez submicelou, čárkovaně je vyznačena hydrofobní část

2.2.1.2 Syrovátkové bílkoviny

Syrovátkové neboli sérové bílkoviny zůstávají v syrovátce po vysrážení kaseinu při pH 4,6. Na rozdíl od kaseinu, který snáší var, jsou syrovátkové bílkoviny citlivé k záhřevu a již při 70 °C se sráží, nevratně denaturují. Mají vyšší nutriční hodnotu než kasein. Největší podíl z frakcí má **β -laktoglobulin** (50 %), který stejně jako **α -laktalbumin** (25 %) je syntetizován v mléčné žláze. Složením jsou tyto bílkoviny velmi výhodné, je zde vysoký obsah aminokyselin (mimo metionin, toho kasein obsahuje více). Velice cenný je obsah cystinu a tryptofanu, který kasein neobsahuje. α -laktoalbumin je zjišťován v každém mléce, které obsahuje laktózu, protože je nezbytný pro její syntézu a má významnou biologickou funkci jako součást některých enzymů.

Další dvě bílkovinné frakce jsou **sérumalbumin** a **imunoglobuliny**. Jejich podíl v mléce zdravých krav v laktaci je relativně nízký, výrazně se však zvyšuje jejich obsah v mlezivu (imunoglobuliny) a také v mastitidním mléce (sérum albumin). Do mléka přecházejí přímo

z krevního řečiště. Imunoglobuliny mají význam pro získání imunity a patří rovněž mezi antibakteriální látky mléka.

Poslední skupinou látek jsou tzv. **proteoso-peptony**. Jsou tvořeny jen malým podílem bílkovinných složek obsahujících fosfor. Spíše se jedná o přechod mezi bílkovinami a kratšími peptidy.

V mléce byl také zjištěn specifický minoritní protein **makroglobulin**, který tvoří příčné vazby membrán tukových globulí a způsobuje jejich shlukování, což má za následek vytvoření vrstvy smetany na povrchu mléka. Záhřev nad 100 °C několik minut tento protein blokuje.

2.2.1.3 *Nebílkovinné dusíkaté látky*

Tyto látky zůstávají v roztoku po vysrážení veškerých bílkovin mléka 12% kyselinou trichlóroctovou. Mají rozdílnou strukturu i význam. Největší podíl z těchto látek tvoří močovina (50 %). Dále jsou zde přítomny volné aminokyseliny, resp. jednoduché peptidy, kyselina močová, kreatin, kreatinin, kyselina orotová, nukleotidy, vitamíny skupiny B, amoniak apod.

Močovina je přirozenou součástí mlék, přechází z krve do mléka. Vlivem nadměrného zkrmování dusíkatých látek a nedostatku energie v krmné dávce stoupá jejich obsah v mléce. Podle množství močoviny v mléce se určuje správnost sestavené krmné dávky dojnic. [21, 22, 23, 24, 25]

2.2.2 **Mléčný tuk**

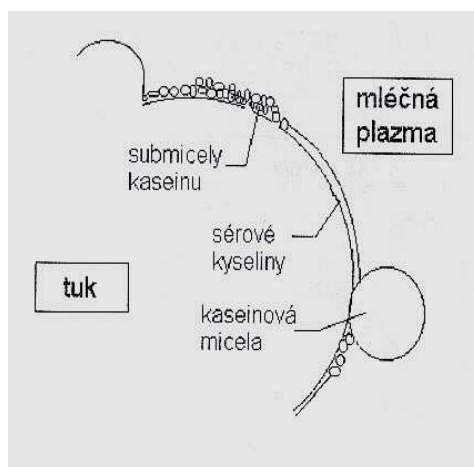
Základními složkami mléčného tuku jsou: tri-, di- monoacylglyceroly, volné mastné kyseliny, fosfolipidy, steroly, estery sterolů, uhlovodíky a v tucích rozpustné vitamíny. Hlavní podíl lipidů mléka tvoří asi z 98 % triacylglyceroly. Složení do značné míry ovlivňuje plemeno, krmná dávka, roční období a zdravotní stav dojnic.

Mastné kyseliny (MK) se v mléce nachází v nízkých koncentracích. Z nenasycených MK tvoří největší podíl kyseliny C₁₄, C₁₆ a C₁₈, z nenasycených kyselina olejová. Nízkomolekulární MK s C₄, C₆ a C₈ dodávají mléčnému tuku typickou chuť a vůni. Především nenasycené MK (v *cis* formách) zvyšují biologickou hodnotu mléčného tuku. Nezanedbatelný

význam má obsah esenciální MK - kyselina linolová (C_{18:2}), α - a γ -linolenová (C_{18:3}), arachidonová (C_{20:4}) v *cis* konfiguracích.

Specifickou vlastností mléčných lipidů je, že převážná část z nich se nachází v syrovém mléce v tukových kapénkách (kuličkách). Hovoří se o disperzi mléčného tuku v mléčné plazmě nebo o emulzi mléčného tuku v odstředěném mléce. Tuková kapénka má velikost 0,1 – 22 μm , nejčastěji (cca 90 % z celkového počtu) se vyskytují kapénky o velikosti 2 – 3,5 μm . V 1 ml mléka jsou asi 1,5 - 6 mld. tukových kapének, při tučnosti mléka 3,7 – 1 %. Při homogenizaci se jejich počet zvyšuje, roztříští se na menší částice, a tím je zabráněno vystávání mléčného tuku v konzumním mléce.

Tukové kuličky jsou chráněny dvouvrstevnou membránou obsahující velké množství fosfolipidů. **Lipofilní (nepolární) vrstva** je orientována dovnitř tukové kapénky – obsahuje triacylglyceroly, cholesterol, karoteny a lipofilní vitamíny. **Hydrofilní (polární) vrstva** je orientována k vodní fázi mléka a nese bílkovinné složky (albumin, globulin a kasein).



Obr. 4: Tuková kapénka

Membrány tukových kuliček zabraňují vzájemnému splynutí tukových kapének ve velké útvary především svým elektrickým nábojem. Delším skladováním nebo dalšími vlivy (třepání, zmrznutí,...) může dojít, především v zahřátém mléce, k uvolnění tuku, vzniká tzv. volný tuk. Tento tuk snadněji podléhá rozkladu, není-li mléko odpovídajícím způsobem vychlazeno. Např. působením bakteriálních *lipáz* může dojít rychlému rozkladu tuku (lipolýze). Zvýšený obsah volných MK pak znehodnocuje mléko jako surovinu pro technologické účely.

Fosfolipidy tvoří významnou skupinu lipidů mléka. Jejich koncentrace je přibližně 0,03 – 0,05 %. Na své molekule mají estericky vázanou kyselinu fosforečnou, na níž je ještě vázán cholin, etanolamin nebo serin. Z fosfolipidů bývá nejčastěji zastoupen fosfatidylcholin z 33 %, fosfatidyletanolamin z 38 %, sfingomyelin z 23 % atd. Fosfolipidy se vyskytují převážně v membráně tukových kuliček, při stloukání smetany na máslo se poruší membrána, získáme tuk z vnitřní části tukových kuliček (triacylglyceroly) a obaly z fosfolipidů přecházejí do podmáslí.

Mléčné lipidy také obsahují steroly, případně jejich estery. Důležitým zástupcem živočišných sterolů je cholesterol, jehož koncentrace v mléce je 0,010 – 0,015 %. V menší míře je zde i ergosterol, který je prekurzorem vitamínu D₂.

Charakteristické zbarvení mléčného tuku je způsobeno přítomností karotenoidních barviv. Tato žlutá nebo červená barviva jsou rozpustná v tucích a chemicky se řadí mezi tetraterpeny (karoteny, xantofyly). Nejvýznamnější z karotenů je β-karoten, který je prekurzorem vitamínu A. Mléčný tuk obsahuje tedy vitamíny rozpustné v tucích A, D a dále pak vitamín E a K. [21, 22, 24, 26, 27]

2.2.3 Sacharidy

Hlavním zástupcem sacharidů v mléce je laktóza. Tvoří 98 % sacharidů, zbytek jsou monosacharidy glukóza a galaktóza, oligosacharidy, aminosacharidy a estery sacharidů.

Laktóza se nachází v různém množství v mléce všech savců, proto se nazývá mléčný cukr. Tento disacharid složený z glukózy a galaktózy je tvořen v mléčné žláze z krevní glukózy. Galaktóza je tvořena až v mléčné žláze biochemickými procesy také z glukózy.

Laktóza je rozpuštěna ve vodě a dodává mléku nasládlou chuť, přítomnost ostatních rozpuštěných látek vytváří osmotický tlak v mléce. Vedle laktózy jsou v mléce i další cukry, a však ve velmi malých množstvích.

Malé množství sacharidů se nachází buď ve volné formě, nebo jsou částečně navázány na proteiny, lipidy anebo fosfáty. Např. aminosacharidy jsou růstovým faktorem mikroorganismů *Bifidobacterium bifidum*.

Laktóza je pro lidský organizmus využívána jako zdroj energie a její příjem vede ke zvýšení hladiny glukózy v krvi. Laktóza samotná je málo hydrolyzovatelná v gastrointestinálním traktu, proto musí být přednostně štěpena *laktázou*, enzymem přítomným v epitelial-

ních buňkách mukózních membrán tenkého střeva, na glukózu a galaktózu. Ty jsou pak lépe absorbovány a jsou také vhodným substrátem pro intestinální mikroflóru. Vzniká kyselina mléčná, která inhibuje růst nežádoucích hnilobných bakterií a podporuje acidofilní flóru. Kyselé prostředí také zlepšuje rozpustnost solí kalcia a tím jeho absorpci.

U některých jedinců se může vyskytnout intolerance na laktózu, ta je zapříčiněna sníženou produkcí nebo až nepřítomností *laktázy*. Laktóza v tenkém střevě není štěpena a váže na sebe vodu. To způsobuje trávicí obtíže, jako je nadýmání, pocity nevolnosti a průjem. Lidé s deficiencí *laktázy* však mohou konzumovat výrobky mléčně kysané, v nichž byla laktóza již přeměněna mléčnými bakteriemi na kyselinu mléčnou. [21, 26, 28]

2.2.4 Minerální látky

Minerální látky se do mléka dostávají prostřednictvím krve. Epitelové buňky mléčné žlázy mají schopnost shromažďovat minerální látky, a ty se pak snadno vstřebávají do mléka. V mléčném séru se minerální látky vyskytují v různých formách, a to v roztoku, koloidní formě nebo jsou vázány na některé organické součásti mléka. Všechny tyto formy jsou ve vzájemné rovnováze mezi sebou navzájem i s ostatními složkami mléka. Např. velikost a vlastnosti kaseinových micel ve vztahu k množství Ca, Mg, P a citrátu, vliv pH nebo také záhřev mléka. Z hlediska nutriční výživy mají minerální látky vliv na stupeň bobtnání koloidů, regulují osmotický tlak (K a Na soli) a koncentraci vodíkových iontů. Jsou také aktivátory enzymů nebo jejich složek a mají rozhodující úlohu pro udržení acidobazické rovnováhy v organismu.

Minerální látky, které kravské mléko obsahuje, se dělí na:

- majoritní prvky (makroelementy): Ca, P, Na, K, Cl, Mg, S,
- minoritní prvky: Fe, Zn,
- stopové prvky (mikroelementy): B, Co, Si, Cu, Mn, Mo, Br, Al, I.

Tab. 1: Obsah energie, hlavních živin a vybraných minerálních látek v přírodních a tavených sýrech. [29]

Typ sýra	Bílkoviny [g.100 g ⁻¹]	Tuk [g.100 g ⁻¹]	Energie [kJ.100 g ⁻¹]	Ca [mg.100 g ⁻¹]	P [mg.100 g ⁻¹]	Na [mg.100 g ⁻¹]
Měkký tvaroh	19	0,3	370	100	200	30
Tučný tvaroh	14	12	740	70	170	30
Tvarůžky	30	0,8	550	150	270	1900
Hermelín	20	20	1200	400	300	1100
Eidam 30 % t.vs.	29	16	1100	900	620	850
Eidam 45 % t.vs.	26	26	1400	750	570	780
Čedar 50 % t.vs.	26	32	1700	750	530	490
Ementál	27	29	1600	1010	650	229
Tavený sýr 30 % t.vs.	18	11	700	490	180 -1200	920
Tavený sýr 70 % t.vs.	11	36	1540	280	Ø 700	750

Za významné minerální látky v sýrech se považují vápník a fosfor. Jejich správný poměr je velice důležitý pro vstřebávání vápníku. V sýrech je tento poměr 1 : 0,8 někdy až 2 : 1 (vápník : fosfor). Z tabulky 1 lze tedy vyčíst, že mezi nejlepší zdroje patří především déle zrající sýry, jako je ementál, eidam 30 % t.vs., eidam 40 % t.vs. a čedar 50 % t.vs. Měkké a hlavně tavené sýry mají vysoký obsah fosforečných solí, které mohou mít ve větších dávkách pro organismus i opačný účinek. Tělo se snaží vyrovnávat zvýšenou hladinu fosforu vápníkem, který odjímá z kostí a zubů, což může mít negativní vliv především na děti.

Vápník a fosfor se vyskytují v několika různých formách, a to v roztoku, koloidní formě kalcium-fosfát a vázány na kaseinový komplex. Jednotlivé formy jsou závislé na obsahu bílkovin, zejména kaseinu, dále také na zdravotním stavu dojníc, stadiu laktace apod. Mezi další významné minerální látky mléka patří draslík a citráty.

Minerální látky jsou využívány zejména pro zdravý vývoj kostry, podporuje zdraví zubů, a také jsou důležité jako prevence osteoporózy a vysokého krevního tlaku. [24, 26, 28, 30]

2.2.5 Vitamíny

Mléko obsahuje jak vitamíny rozpustné ve vodě, tak vitamíny rozpustné v tucích (jejich množství závisí na obsahu tuku v mléce). Zvýšené hladiny vitamínu jsou především mlezivu, jelikož je to prakticky jediným zdrojem potravy sajícího mláděte. Další vliv na množství vitamínů má také roční doba. Letní období, doba zeleného krmení a pastvy – mléko obsahuje více karotenů a vitamínů A, D, E a K.

Vitamín A – retinol je nejvýznamnější aktivní látkou skupiny vitamínů v živočišných tkáních. Důležitým provitamínem je β -karoten, který se jako jediný nachází v mléce. Mlezivo obsahuje asi 10 x více provitamínu A a vitamínu A než zralé mléko – mlezivo má typické zbarvení po karotenoidech. Dobrým zdrojem vitamínu jsou mléčné výrobky s vyšším obsahem tuku a máslo.

Vitamín D – kalciferoly jsou skupinou steroidních hormonálních prekurzorů, nejvýznamnější z nich je cholekalciferol neboli vitamín D₃ a ergokalciferol neboli vitamín D₂. Vitamíny D vznikají působením UV záření z prekurzorů. Tento vitamín je též nazývaný jako antirachitický, protože má velký vliv na metabolismy vápníku a fosforu. V zimních měsících je jeho obsah až čtyřikrát nižší než v letním období, důležitou roli v tom hraje letní pastva zvířat.

Vitamín E – tokoferoly. Základní strukturu tvoří tokoferoly a tokotrienoly. Hlavní složku vždy tvoří α -tokoferol. Živočišné tuky obsahují mnohem méně vitamínu E než rostlinné oleje. Vitamíny E slouží jako důležité antioxidanty, chrání buněčné membrány před volnými radikály.

Vitamín K. Aktivitu tohoto vitamínu vykazují deriváty menadionu s nenasyceným isoprenoidním postraním řetězcem. Vitamín K je částečně syntetizován v bacheru, ale i přesto je jeho obsah v mléce nízký. Ke značným ztrátám dochází při vystavení mléka dennímu světlu.

Thiamin je významným kofaktorem enzymů. V mléce se vyskytuje nejvíce ve volné formě (50 – 75 %), také jako difosfát (18 – 45 %) a méně vázaný na bílkoviny (5 – 17 %). Je tvořen bacherovou mikroflórou. Při sušení nebo tepelném záhřevu jsou ztráty mezi 10 – 20 %.

Riboflavin je také součástí důležitých kofaktorů (FMN, FAD). Riboflavin vykazuje žlutozelenou fluorescenci, ta je typická pro mléčné sérum. Podobně jako ostatní vitamíny skupiny B je riboflavin tvořen v bachoru, proto je jeho obsah v kravském mléce vyšší než v mléce mateřském. Během technologického zpracování nedochází k výrazným ztrátám, jedná se jen o několik málo procent. Ve fermentovaných výrobcích se nachází větší množství riboflavinu než v samotném mléce, jelikož je syntetizován i přidanými mikroorganismy.

Niacin je společným názvem pro kyselinu nikotinovou a její amid. Obsah niacinu v mléce je poměrně nízký. Větší množství vitamínu obsahují sýry, nebo také jogurty, protože niacin mohou produkovat některé bakterie mléčného kysání. Ztráty při zpracování a skladování bývají minimální.

Kyselina pantotenová se ve všech potravinách vyskytuje jen v malém množství, částečně jako volná a převážná část vitamínu je ve vázané formě (koenzym A, acylkoenzym A a ACP). V mléce je obsah vitamínu nízký, je však větší než v mlezivu. Jen v některých druzích sýrů bylo nalezeno vyšší množství. Při delším skladování dochází k větším ztrátám.

Pyridoxin je kofaktorem řady enzymů účastnících se metabolismu aminokyselin. Také pyridoxin je syntetizován bachorovou mikroflórou, ale i přes to je obsah vitamínu v mléce a sýrech nízký v porovnání s ostatními živočišnými produkty. Technologickým zpracováním dochází jen k menším ztrátám, avšak při skladování ztráty rychle narůstají, až 45 %. [23, 28, 31]

2.2.6 Enzymy

V mléce byl stanoven velký počet enzymů, které je možno rozdělit podle původu:

- nativní: vyprodukované mléčnou žlázou,
- mikrobiální: z kontaminující mikroflóry,
- aditivní: přidávané záměrně při technologických operacích.

Enzymy se koncentrují v povrchových vrstvách tukových kuliček a přecházejí do smetany, nebo jsou vázány na bílkoviny mléka a srážejí se s nimi. Výrazná aktivita enzymů byla zaznamenána v mlezivu. Z technologického hlediska jsou enzymy ve většině případů (kdy

jsou záměrně přidávány) nežádoucí, a proto jsou záhřevem mléka denaturovány a inaktivovány.

Zjištění složení enzymů mléka je využíváno i k diagnostice zdravotního stavu mléčné žlázy, rozlišení druhů mlék různých savců nebo mleziva. Dále stanovení enzymů slouží ke kontrole tepelného záhřevu, hodnocení nebezpečí rozkladu jednotlivých složek mléka působením enzymů apod.

Významnými enzymy mléka jsou: **laktoperoxidáza**, která rozkládá peroxid vodíku na vodu a atomární kyslík, působí tedy mikrobicidně. **Xantinoxidáza** oxiduje xantin na hypoxantin a dále pak na kyselinu močovou. Ve zdravém mléce je aktivita malá, ale v mléce od mastitidních dojnic se výrazně zvyšuje. **Katalázy** také rozkládají peroxid vodíku na vodu a kyslík. Mléko **katalázu** obsahuje vždy, ale její aktivita je malá. **Lipázy** hydrolyzují acylglyceroly na glycerol a mastné kyseliny, jejich aktivita je závislá na stádiu laktace. **Fosfatázy** mají schopnost hydrolyzovat estericky vázané kyseliny fosforečné z různých substrátů. **Proteázy** jsou přirozenou součástí mléka – endogenní alkalické i kyselé **proteázy**. Mléko může také obsahovat **proteázy** z kontaminující mikroflóry, především psychrotrofní. Jejich inaktivace je nesnadná, protože se inaktivují až při teplotě 75 – 80 °C po dobu 10 – 20 minut, takže často mohou působit i při zrání sýrů. **Lysozym** je přirozenou součástí obranného systému mléka, protože štěpí glykosidickou vazbu mukoproteinů v buněčné stěně grampozitivních bakterií. Aktivita se snižuje v průběhu laktace. Zvýšená koncentrace indikuje poruchu sekrece mléka. [21, 25]

2.2.7 Hormony

Hormony jsou produkovány žlázami s vnitřní sekrecí. Katalyzují a řídí mnoho metabolických procesů v organismu a snadno se dostávají do mléka. Pro konzumenta zde hrozí nebezpečí, že při léčbě dojnic hormonálními preparáty, se tyto látky mohou dostat i do mléka. Proto zákon Ministerstva zdravotnictví 332/2008 sb. O veterinární péči stanoví tzv. ochrannou lhůtu. To je období mezi posledním podáním léčivého přípravku zvířatům za běžných podmínek používání příslušného přípravku a okamžiku, kdy lze od těchto zvířat získávat potraviny tak, aby bylo zajištěno, že tyto potraviny neobsahují rezidua léčivého přípravku v možných přesahujících maximální limity stanovené zvláštními právními předpisy a předpisy Evropských společenství. Tyto maximální limity jsou uvedeny ve vyhlášce Ministerstva zdravotnictví 273/2000 sb. [28, 32]

2.2.8 Plyny

Čerstvě nadojené mléko obsahuje průměrně 6 – 9 obj. % plynů, převážná část je tvořena CO₂ (5 - 7 %). Značná část plynů se do mléka dostává až po styku se vzduchem, ale podíl oxidu uhličitého pravděpodobně přechází do mléka z krve. Po určité době stání klesá množství rozpuštěných plynů v důsledku ustanovení rovnováhy mezi mlékem a ovzduším. Proto ihned po nadojení je titrační kyselost mléka vyšší v důsledku zvýšeného obsahu CO₂. Malé množství kyslíku stimuluje růst aerobních mikroorganismů, ale naopak může také kyslík oxidovat kyselinu askorbovou a tuky. [21]

2.3 Kvalita mléka pro výrobu sýrů

Mléko pro výrobu sýrů musí splňovat, vedle standardních ukazatelů daných platným legislativním rámcem (např. zákon 224/2008 O potravinách a tabákových výrobcích, vyhláška 203/2003 sb. O veterinárních požadavcích na mléko a mléčné výrobky, vyhláška Ministerstva zemědělství 77/2003 Sb., která stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje, atd.), i další požadavky jak na jeho technologické vlastnosti, tak i na jeho mikrobiologickou kvalitu. [33]

2.3.1 Technologické vlastnosti mléka

Technologické vlastnosti mléka, které jsou důležité při jeho zpracovávání na sýry:

- syřitelnost,
- kysací schopnost,
- tepelná stabilita.

Syřitelnost mléka je schopnost srážet se syřidlem a vytvořit kvalitní koagulát. Tento proces má několik fází. Nejprve dojde proteolýze κ -kaseinu, ten se rozdělí na para- κ -kasein a κ -kaseinmakropeptid. Hydrolyzovaný κ -kasein není schopen plnit funkci ochranného koloidu a za účasti Ca²⁺ dochází ke vzniku gelu (syřeniny). Syřitelnost je podmíněna velkou řadou faktorů. Vedle celkového obsahu bílkovin je důležitý poměr zastoupení kaseinu (jeho frakcí, velikost a stav kaseinových micel), nekaseinových bílkovin i bílkovin syrovátky. Dále pak důležitou roli hraje např. obsah vápníku, tuku a hodnota pH. Také technolo-

gické operace ovlivňují syřitelnost. Pasterace mléka prodlužuje dobu koagulace, sýřenina je pak měkčí a zhoršuje se odstraňování syrovátky ze sýřeniny. Proto se používá jen šetrná pasterace.

Kysací schopnost mléka je rozhodující pro růst čistých mlékářenských kultur. Bakterie mléčného kysání jsou vysoce citlivé na vnější podmínky. Mléko musí obsahovat všechny potřebné složky pro přidané kultury. Významnou roli sehrává zastoupení minerálních látek a jejich formy, pH mléka, obsah vitamínů. Nežádoucí je obsah kontaminantů a jiných látek, které působí inhibičně. Mezi tyto nežádoucí látky se také řadí přirozeně přítomné obranné látky mléka (imunoglobuliny, *lysozym*, laktoferin, apod.). Technologicky nevhodná jsou mléka mastitidních dojnic, mleziva, mléka od dojnic s metabolickými poruchami, které mají změněná chemická složení, nenormální kyselost atd. Další faktorem, který ovlivňuje kysací schopnost, je jeho následné ošetření po nadojení a doba a podmínky dalšího skladování v zemědělské prvovýrobě nebo v mlékárně. Vlivem chlazení dochází k fyzikálně-chemickým změnám, rozpadu kaseinových micel, zmenšení jejich stupně hydratace, ke změnám v rovnováze jednotlivých forem minerálních látek a ke zvyšování pH. V důsledku těchto změn dochází i ke zhoršování růstu většiny bakterií mléčného kysání.

Tepelná stabilita neboli relativní odolnost mléčných bílkovin proti vysrážení při záhřevu, je velice důležitá při technologickém zpracování, jako je vysoká pasterace (mléko na výrobu jogurtů), UHT záhřevu nebo při klasické sterilaci (ošetření smetany). Nejvýznamnější vliv má složení, skladba bílkovin, minerálních látek a jejich vzájemné vztahy. Bílkoviny mléčného séra jsou citlivější než frakce kaseinu, proto mlezivo, starodojné a mastitidní mléko vykazují horší tepelnou stabilitu. Mezi další faktory ovlivňující tepelnou stabilitu patří pH mléka (optimální tepelnou stabilitu má mléko při pH 6,5 – 6,6 a změny rovnováh v mléce v důsledku skladování při nízkých teplotách, aj.).

Na všechny tyto faktory má dále velký vliv plemeno skotu, stádium laktační periody, počet laktací, zdravotní stav a výživa dojnic.

2.3.2 Mikrobiální jakost

Čerstvě nadojené mléko od zdravé dojnice není sterilní, vždy obsahuje malé množství mikroorganismů. Určité množství mikroorganismů do mléčné žlázy vniká strukovými kanálky, proto je důležité oddojení tzv. bakteriální zátky (2 – 3 stříky z každého struku). Pak je ve-

meno omyto pitnou vodou, osušeno a může začít vlastní dojení. Tímto způsobem se snižuje celkový počet mikroorganismů v mléce.

Od okamžiku nadojení je mléko vystaveno působení sekundární kontaminace. Mezi hlavní činitele patří kontaminace povrchem struku, rukou a oblečením dojiče, prostředím stáje a dojírny, filtrací mléka, používanou vodou, dojícím zařízením od strukových násadců až po úchovné nádrže, aj. Mikrobiální jakost mléka je rozhodujícím faktorem. Obecně by měl být celkový počet mikroorganismů co nejnižší. Dále by měl být dán důraz i na podrobnější charakteristiku těchto nežádoucích mikroorganismů. Musí být zajištěn:

- nízký počet psychrotrofních mikroorganismů (především z důvodu minimalizace přítomnosti jejich termostabilních enzymů),
- absence bakterií máselného kvašení,
- absence hnilobných a plynotvorných bakterií. [21, 34, 35]

2.4 Charakteristika sýrů

Sýrů je mnoho a jejich rozdělení je celá řada.

➤ *PODLE SUROVINY:*

- přírodní sýry – vyráběné přímo z mléka,
- tavené sýry – vyráběné zpracováním přírodních sýrů,
- syrovátkové sýry – mléčný výrobek získaný vysrážením syrovátky nebo směsi syrovátky s mlékem,
- analogy a imitace sýrů – produkty, kde je mléčný protein nebo tuk nahrazen rostlinným.

➤ *PODLE OBSAHU TUKU V SUŠINĚ:*

- vysokotučné (nad 60 %),
- plnotučné (45 – 60 %),
- polotučné (25 – 45%),
- nízkotučné (10 – 25 %),
- odtučněné (pod 10 %).

➤ *PODLE VYHLÁŠKY 77/2003 Sb.[33]:*

- čerstvé sýry – nezrající sýr tepelně neošetřený po prokysání,
- tvaroh – nezrající sýr získaný kyselým srážením, které převládá nad srážením pomocí syřidla,
- zrající sýr – sýr, u kterého po prokysání došlo k dalším biochemickým a fyzikálním procesům,
- tavený sýr – sýr, který byl tepelně upraven za přídavku tavicích solí.

➤ *PODLE ZÁKLADNÍCH TECHNOLOGICKÝCH PRINCIPŮ:*

- **SLADKÉ SÝRY** (ke srážení bylo použito syřidlo)
 - 1) Měkké nezrající sýry (pomazánky, krémový sýr, solený – Cottage)
 - 2) Měkké zrající sýry:
 - A) sýry zrající pod mazem (Romadur),
 - B) plísňové sýry:
 - a) sýry s plísní na povrchu (Hermelín, Camembert),
 - b) sýry s plísní v těstě (Niva, Roquefort),
 - c) sýry s kombinovaným nárůstem plísně (Vltavín),
 - C) pařené sýry - finální struktura je vláknitá (Parenica),
 - D) sýry zrající v solném nálevu:
 - a) sýry nelisované (Balkánský sýr),
 - b) sýry lisované (Akawi),
 - c) sýry pařené (Jadel),
 - E) sýry zrající v chladu (Blatěcké zlato, Pivní sýr).
 - 3) Tvrdé sýry:
 - A) sýry s vysokodohříváním sýřeninou:
 - a) sýry ementálského typu (Primátor),
 - b) sýry bez tvorby ok (Moravský blok),
 - c) sýry ke strouhání,

- B) sýry s nízkodohřívanou sýřeninou: a) sýry eidamského typu,
b) sýry s hnětenou sýřeninou,
c) sýry s mletou sýřeninou typu Čedar.
- KYSELÉ SÝRY (mléko se sráží působením kyseliny mléčné, která je produktem bakterií mléčného kysání)
 - A) nezrající kyselé sýry (tvarohy, především průmyslový tvaroh),
 - B) zrající kyselé sýry (Olomoucké tvarůžky).

Existují i jiná obdobná technologická rozdělení, která se liší v některých detailech zpracování. Také je možné dělit sýry podle další parametrů, jako je druh použitého mléka (kravské, kozí, ovčí, atd.) nebo konzistence (extra tvrdé, tvrdé, polotvrdé, poloměkké, měkké). Většinu tvrdých sýrů lze upravovat uzením, pro rozšíření sortimentu sýrů na trhu a získání nových sensorických vlastností. [36, 37, 38]

2.5 Výroba sýrů

Výroba sladkých sýrů je založena na tvorbě sýřeniny ze sladkého mléka a jejím dalším zpracováním. Dle druhu vyráběného sýra se mohou jednotlivé technologie odlišovat. Základní technologické operace při výrobě sladkých sýrů:

1) Tepelné ošetření mléka

U nás se sýry vyrábí především z pasterovaného mléka. Využívá se tzv. šetrná pasterace, která probíhá po dobu 15 – 20 minut při teplotě 72 °C. Při vysoké pasteraci by došlo ke zvýšené denaturaci sérových bílkovin, tím by se zhoršil přístup enzymů ke κ -kaseinu, sérové bílkoviny by byly zadrženy v sýřenině, došlo by k větší vazbě vody a snížení jakosti.

2) Úprava mléka před zpracováním

Mléko se musí upravit, aby mělo požadované složení a standardizovala se výroba. Nejprve se provádí standardizace tuku v sušině, v některých případech (sýry s plísní v těstě) se provádí i homogenizace mléčného tuku – tuk je přístupnější lipolytickým enzymům. I přes šetrnou pasteraci dochází k porušení rovnováhy koloidní a rozpustné formy vápníku (část rozpustného vápníku přechází na nerozpustný), pro obnovení sýři-

telnosti mléka se přidávají před sýřením vápenaté soli ve formě CaCl_2 . Přídavek je přibližně 10 – 40 ml nasyceného roztoku na 100 l mléka. Dále se do mléka může přidávat dusičnan sodný (NaNO_3) nebo draselný (KNO_3), aby zabránil duření sýrů, způsobené činností koliformních bakterií a bakterií máselného kvašení. V některých zemích je užívání těchto látek zakázáno. Dusičnanu se přidává cca 10 g. 100 l^{-1} mléka. Vyšší přídavky jak vápenatých solí, tak i dusičnanu by mohly způsobit hořkost. U některých sýrů je přidáváno i barvivo (přírodní sýr Zlato). Upravuje se také teplota mléka na požadovanou hodnotu – obvykle 30 – 35 °C.

Nejdůležitější je však přídavek **čistých mlékařských kultur (ČMK)**, je podmiňující pro dobrou jakost finálních výrobků. Snížení pH před sýřením ovlivňuje rychlost sýření, jeho průběh, kvalitu sýřeniny i zrání sýrů. ČMK mají mít vedle schopnosti vhodného průběhu mléčného kvašení i další vlastnosti, jako vhodnou proteolytickou a lipolytickou aktivitu, odolnost vůči inhibičním látkám a bakteriofágům, schopnost inhibovat škodlivou mikroflóru aj. Pro výrobu se používají tzv. primární a sekundární kultury.

Primární kultury (základní kultury) zajišťují prokysání mléka i sýrů, uvolňují enzymy podílející se následně na tvorbě aroma. Mezofilní kultury tvoří smetanový zákys, který se někdy používá i pro předzrání mléka (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*). Termofilní kultury jsou využívány pro sýry s vysokodohřívavou sýřeninou (*Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*).

Sekundární kultury (doplňkové) jsou specifické pro jednotlivé druhy sýrů. Pro tvrdé sýry se využívá zejména *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei*, dále pro hlubší proteolýzu se volí *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. U sýrů ementálského typu se používají bakterie propionového kvašení – *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii*, *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. Při výrobě sýrů zrajících pod mazem se přidává mazová kultura *Brevibacterium linens* spolu s kvasinkovými kulturami – *Mycoderma*. Doplňková kultura pro sýry s plísní na povrchu je využita plísňová kultura *Penicillium camamberti*, *Penicillium caseicolum* a *Penicillium candidum*. Pro sýry s modrou plísní v těstě se mléko očkuje plísňovou kulturou *Penicillium roqueforti*.

3) Sýření mléka

Po provedení všech potřebných úprav se do mléka přidává vypočítané množství syřidla, které zajistí sražení mléka a vytvoření vhodné sýřeniny za optimální dobu pro daný druh sýra. Syřidlo se přidává zředěné a důkladně se s mlékem promíchá, aby sražení bylo stejnoměrné. Po promíchání se musí zastavit pohyb mléka, srážení musí probíhat v klidu, aby nedocházelo k potrhání sýřeniny a k větším ztrátám bílkovin a tuku do syrovátky.

Účinek syřidla spočívá v působení proteolytických enzymů na kasein. Sýření probíhá ve třech fázích. V primární fázi dochází k destabilizaci kaseinových micel, protože enzymovým působením syřidla ztrácí κ -kasein funkci ochranného koloidu. *Chymozin* hydrolyticky štěpí vazbu mezi 105 a 106 aminokyselinou a jsou získány dva zbytky para- κ -kasein a κ -kaseinmakropeptid. Poklesem náboje micel se v následné sekundární fázi tyto kaseinové micely spojují. Podmínkou koagulace jsou volné ionty vápníku a vhodná teplota. Při teplotě pod 10 °C ke srážení nedochází. Na začátku koagulace jsou částičky kaseinu orientovány zcela nahodile, později se řadí do řetězců, které pak přecházejí do trojrozměrné mřížky – gel/sýřenina. Krájením sýřeniny při výrobě sýrů se vytvoří otevřený systém, který dovolí odtok vody – syrovátky. Gel se začíná smršťovat a nastává synereze (odtékání syrovátky). Příliš rychlé srážení způsobuje velký úbytek syrovátky a zhoršenou výtěžnost sýrů. V terciární fázi se uplatňuje působení syřidlového enzymu, který podporuje proteolytické zrání sýrů. V této fázi se také zásadně projevují enzymy ČMK odpovídajícího druhu sýra.

4) Zpracování sýřeniny

Zpracování sýřeniny zahrnuje řadu operací podle jednotlivých druhů sýrů, které zajišťují tvorbu vhodného zrna pro následné formování. Zpracování sýrů je velmi náročné a vyžaduje zkušenosti. Krájení sýřeniny na syrové zrno je jedním z nejdůležitějších úkonů. Aby syrovátka snadno odcházela, musí se nakrájet, za tímto účelem se využívá systém harf s krájecími noži. Velikost zrna závisí na druhu sýra. Pro měkké sýry se volí velikost 1 – 3 cm, aby zrno bylo vodnaté a kysání rychlé, pro tvrdé sýry se používají velikosti 3 - 6 mm, tím je dosaženo vysoké sušiny a pomalejšího kysání. Zrno se míchá v syrovátce, kde se částice posouvají, otáčejí a ještě mění tvar, což podporuje omývání zrn a odvodnění a úbytek proteinů, cukrů a minerálních solí, které ze zrna vystupují. Dochází ke zpevňování povrchu zrna. U některých sýrů se provádí i odpuštění syrovátky a přidání tzv. prací vody. Ta sníží obsah živin a mohou se tak lépe regulovat

mikrobiální procesy. U tvrdých sýrů se zrno ještě dohřívá, to podporuje synerezi, zvyšuje se sušina zrna, kaseinové částičky se tak přibližují a umožní vyrobit jemné malé zrno. Výše dohřívací teploty závisí na druhu sýra:

- nízkodohříváné sýry: 36 – 37 °C (obsah t.vs. 30 %), 39 – 40 °C (t.vs. 45 %),
- vysokodohříváné sýry: 48 – 53 °C (ementálské sýry) nebo až 56 °C (Parmezán).

K vytužení zrna se využívá dosoušení – je to míchání sýřeniny v syrovátce po dosažení konečné teploty. Účelem dosoušení je zvyšování sušiny zrna, má vliv na probíhající prokysávání, které rovněž upravuje konzistenci a jakost vyráběných sýrů. Nízkodohříváné sýry se dosouší 20 – 30 minut a vysokodohříváné 30 – 60 minut. [22, 40, 41, 42]

5) Formování sýrů

Jakmile je zrno ve výrobníku dobře dosušeno, vypouští se do tvořítek k formování. Každý druh sýra má již historickým vývojem daný tvar a velikost. Tvořítka jsou nejčastěji kovová nebo plastová, jejich plášť je perforovaný k usnadnění odtoku syrovátky. Při plnění tvořítek musí být zrno vypuštěno co nejdříve (do 10 min.), musí být co nejpravdělnější a sýry u nichž se vyvíjejí oka, se musí plnit a formovat pod syrovátkou. U měkkých sýrů se využívá samovolného odkapávání syrovátky, konečný tvar získají tlakem své hmotnosti. Tyto sýry se několikrát obracejí (3 – 5x), aby se zajistil rovnoměrný odvod syrovátky. U tvrdých sýrů (Eidamská cihla, Ementál) se používá lisování, odtok syrovátky je rychlejší. Počáteční tlak je nižší, to aby se nevytvořila silná kůra bránící dalšímu odtoku syrovátky. Tlak musí být rovnoměrný ve všech částech sýrů. Lisování probíhá obvykle 2 – 4 hodiny. Zvláštním druhem odstraňování syrovátky je paření sýrů. Dochází i ke změně konzistence a regulaci mikrobiologických procesů (zástupcem je přírodní sýr Zlato). Pro formování sýrů je důležitá okolní teplota (dle druhu sýra). Současně s odkapáváním a lisováním již v sýrech dochází k mléčnému kysání.

6) Solení sýrů

Solením sýrů se zlepšuje chuť a stravitelnost, zpevňuje se pokožka, takže sýr lépe drží tvar, zlepšuje se konzistence, reguluje se obsah vody a usměrňuje se mikroflóra, průběh mléčného kysání a zrání. Množství soli v sýrech se značně liší podle druhu:

- nízký obsah NaCl (do 1,5 %) mají převážně čerstvé sýry,
- střední obsah NaCl (1,5 – 3,0 %) mají sýry holandského a ementálského typu,
- vyšší obsah NaCl (až 6,0 %) mají např. sýry s plísní v těstě (Niva) nebo Olomoucké tvarůžky,
- velmi vysoký obsah NaCl (nad 6 %) má skupina sýrů zrajících v solném nálevu.

Rozeznáváme několik způsobů solení sýrů:

- a) *Solení do mléka* – NaCl se přidává do mléka ještě před zasyřením. Výhodou je dokonalé rozptýlení, ale naopak nevýhodou je značný úbytek při zpracování a problematické využití syrovátky (příliš se nepoužívá).
- b) *Solení do těsta* – po odpuštění části syrovátky se přidává NaCl. Sůl napomáhá vystužení zrna, snižuje slepitelnost zrna a umožňuje vytvoření dutinek ve hmotě, které jsou nezbytné pro růst aerobních plísní – výroba sýrů s plísní v těstě.
- c) *Solení na sucho* – přídavek NaCl se vtírá do pokožky vytvarovaného sýra. Používá se sůl s většími krystaly (malé se příliš rychle vstřebávají a vytvoří kůru), u větších je však proces solení zdlouhavější. Celkově je to velmi pracný způsob, protože solení se několikrát opakuje (po vstřebání předchozí dávky). Solení na sucho je možno použít u lisovaných bílých sýrů.
- d) *Solení v solné lázni* – sýry se vkládají do solné lázně (roztoku) buď volné, anebo na paletách, solná lázeň má definované složení (koncentrace NaCl 18 – 22 %, pH 4,8 – 5,4, teplota 12 – 22 °C podle druhu sýra). Důležitá je doba ponoření (od desítek minut až po 5 dní). Během solení vlivem difúze pronikají přes pokožku a drobnými kanálky do sýra rozpuštěné látky (zejména NaCl), rychlost průniku závisí na koncentračním spádu (na počátku je nejvyšší). V opačném směru pronikají do solné lázně zbytky laktózy, kyselina mléčná a další rozpustné látky, proto je nutné udržovat parametry vodní lázně v požadovaném rozmezí (doplňovat NaCl, sledovat kyselost, aj.). Tento způsob je v dnešní době nepoužívanější.

Sůl prostupuje od povrchu do středu sýra, vytvoří se tzv. solný prstenec – největší koncentrace soli je na povrchu a pod ním jsou pásma s nižším obsahem soli. K vyrovnání obsahů dochází obvykle až v průběhu zrání a pro přeměně jednotlivých sýrařských zrn v celistvou hmotu.

Po vysolení se sýry nechají 1 – 2 dny oschnout, následně se balí do expedičních, resp. zracích obalů (nejčastěji cryovakových obalů). Případně se povrch sýrů ošetří (voskuje), a pak zrají bez dalších obalů.

7) Zrání sýrů

Zrání sýrů je popisováno jako veškeré biochemické procesy probíhající v sýrech působením mikrobiálních enzymů, případně i syřidla. Změny postihují prakticky všechny složky sýra. K největším změnám dochází u laktózy a mléčných bílkovin, u některých sýrů dochází i ke změně tuku. Také se mění formy vazby a distribuce solí. Biochemické procesy během zrání je možné rozdělit do tří základních fází:

- a) *Rozklad laktózy bakteriemi mléčného kvašení a vznik kyseliny mléčné:* hlavní rozklad nastává již při formování sýrů, během odkapávání a lisování. Úplné vymizení laktózy u polotvrdých a tvrdých sýrů nastává v prvních dnech zrání. Vytvořená kyselina uvolní z kaseinu vápník za vzniku mléčnanu vápenatého. Poté vzniká monokalciumkaseinát, který bobtná ve vodě a roztoku NaCl. Vápenaté soli ovlivňují slepování syřeniny a vytvoření homogenní hmoty. Během 24 hodin dochází k přeměně anorganických solí v rozpustné soli, což ovlivní zastoupení solí v sýrech a výslednou kyselost sýra.
- b) *Reakce kyseliny mléčné:* dochází ke snížení kyselosti sýra (zvýšení pH) jednak vazbou kyseliny mléčné a jednak jejím mikrobiologickým rozkladem na kyselinu propionovou (příp. octovou), CO₂, vody i další sloučeniny. U tvrdých sýrů se kyselina mléčná rozkládá v celé hmotě a dochází k vytvoření typických ok působením CO₂. Kyselina mléčná se však může rozkládat také aerobně od povrchu dovnitř mikroflórou na povrchu sýra.
- c) *Proteolýza bílkovin:* proteolýza může probíhat anaerobně v celé hmotě (tzv. primární zrání), nebo aerobně od povrchu dovnitř (tzv. sekundární zrání). Působením enzymů ČMK a syřidla se vytvářejí peptidy o vysoké molekulové hmotnosti. Ty jsou dále hydrolyzovány na peptidy s nízkou molekulovou hmotností. Při delší do-

bě zrání mohou vznikat ještě kratší peptidy, dipeptidy, případně i aminokyseliny. Tyto peptidy však způsobují nahořklou chuť, proto je důležitý správný výběr kultur, syřidla a dodržování hygienicko-sanitárních předpisů a technologických postupů. Mléčný tuk podléhá při zrání nejmenším změnám. Pouze u sýrů s plísní v těstě kde dochází k rozkladu mléčného tuku za vzniku metylketonů, které těmto sýrům dodávají typickou chuť a vůni.

Rozsah zrání (většinou u měkkých sýrů) definujeme jako podíl ve vodě rozpustných dusíkatých látek, tj. albumóz a peptonů, k celkovému dusíku.

Hloubkou zrání (spíše u tvrdých sýrů) rozumíme množství aminokyselin a produktů jejich rozkladu k celkovému dusíku. (U plísňových sýrů probíhá kromě velké hloubky zrání i velký rozsah zrání.)

Během zrání řady sýrů je žádoucí tvorba ok. Zárodky ok jsou dány optimální aktivitou mikroflóry produkující CO₂. Velmi důležitá je teplota zrání, při nízkých teplotách je tvorba ok velice pomalá a vznikají tzv. slepé sýry. Naopak zvýšení teplot může způsobit rychlé uvolňování CO₂ a tvorbu velkého počtu malých velmi malých ok. Při náhlém ochlazení se sýry mohou tzv. uzavřít.

Zrání sýrů probíhá ve zracích sklepích. Optimální podmínky teploty a relativní vlhkosti jsou závislé na typu sýra. Během zrání se sýry ošetřují – umývají, obracejí, propichují, atd. Některé sýry zrají v obalech, které zároveň slouží jako expediční obal, jiné zrají pod nátěrem. Optimální doba zrání se různí podle druhu sýra: do 24 hodin (čerstvé sýry), do několika dnů (Romadur, Hermelín), týdnů (Zlato, Niva) až měsíců (Pivní sýry, Moravský bochník, Eidamská cihla, Primátor), někdy i několik let (Parmezán). Z ekonomických důvodů však výrobci dobu zrání značně zkracují. [22, 39, 40, 41, 42]

2.6 Charakteristika jednotlivých skupin sladkých sýrů

Jednotlivé skupiny sýrů se liší způsoby zpracování syřeniny, způsobem zrání, obsahem sušiny, tuku v sušině, atd.

- 1) Měkké sýry: Jejich charakteristickým znakem je měkká, soudržná až drobivá konzistence. Sýřenina se většinou pouze krájí, nepřihřívá se ani nedosouší, odlučování syrovátky probíhá často bez lisování.
- a) *Měkké nezrající sýry (čerstvé sýry)*: výrobní proces se skládá z vysrážení mléka, pokračování sýřeniny, formování, odloučení potřebného podílu syrovátky, poté následuje mléčná fermentace, vysolení a balení. Výroba sýrů s vyšším obsahem tuku (až 65 % t.v.s.) jako jsou smetanové sýry, máslové sýry, aj.
- b) *Měkké zrající sýry*: tyto sýry se nechávají zrát pod mazovou kulturou *Brevibacterium linens*, která tvoří typický oranžovohnědý maz na povrchu. Sýřeninu je třeba zpracovat opatrným krájením se střídáním fází klidu a drobení. Sýry jsou pevné, měkčí konzistence, uvnitř mohou být dutinky. Hlavním zástupcem je Romadúr, Dezertní sýr, apod.
- c) *Plísňové sýry s plísní na povrchu*: sýry se vyznačují jemnou sýrovou chutí a pikantní chutí po žampionech. Využívají se plísně *Penicillium camemberti*, *Penicillium candidum* a *Penicillium caseicolum*. Standardizovaná směs se upravuje na titrační kyselost 8,5 – 9,0 SH, následně se sýří a přidává se suspenze plísně. Ztužené zrno se po oddělení syrovátky tvaruje. Musí se 4x obracet (kvůli rovnoměrnému nárůstu plísně), poprvé ihned po tvarování, poté po 10, po 100 a naposledy po 240 minutách. Při zrání nejprve narůstá plíseň, a pak dochází k vlastnímu zrání (obden se obrací). Hlavními zástupci jsou Hermelín, Camembert.
- d) *Plísňové sýry s plísní v těstě*: pro tyto sýry je typický mramorovitý nebo stromečkový nárůst modrozelené plísně *Penicillium roqueforti*. Smetana se pro standardizaci homogenizuje (resp. tuk), aby se zlepšil přístup lipolytických enzymů. Pak se přidává první podíl plísňové kultury. Při zpracování sýřeniny se přidává druhý podíl plísňové kultury. Dále se přidává NaCl pro zvýšení tuhosti pokožky zrna a tím i snížení slepitelnosti. Následně se hmota formuje a v tvořítkách se vkládá do odkapních rámců. Zrání je také dvoustupňové: v první fázi narůstá plíseň, v druhé fázi dochází k rozsáhlé proteolýze i lipolýze. Během zrání se sýry otáčejí vždy o 1/3 obvodu. Aerobní podmínky jsou zajištěny propichováním celé hmoty sýra (50 – 60 vpichů). Typickým představitelem je Roquefort, u nás Niva.

- e) *Plísňové sýry s kombinovaným nárůstem plísně*: výroba těchto sýrů je spojením výroby. Zástupcem je Vltavín.
- f) *Pařené sýry*: typická je plastická sýřenina, která umožňuje snadnější tvarování. Polotovar se vyrábí obdobně jako tvrdé a polotvrdé sýry s nízkodohřívanou sýřeninou. Vylisovaná a prokysaná sýřenina se rozkrájí na hranoly (cca 2 – 3 cm), které jsou vkládány do pařicího stroje (lázeň 80 – 85 °C). Do pařicí vody se někdy přidává i NaCl, čímž se hmota osolí. Změklou hmotu následující hnětací šneky zpracují na plastickou. Surovina se rychle tvaruje a chladí. Solení je možné provádět i nasucho. Po vysolení se vakuově balí do plastové fólie. Zástupci jsou Parenica, Oštiepok, Mozzarella, Kaškaval.
- g) *Měkké sýry zrající v solném nálevu (bílé sýry)*: vyrobené sýry se ukládají do solného nálevu, ve kterém zůstávají až do doby konzumace. U Balkánského sýru se sýřenina formuje do bloků, po odkapání a prokysání se krájí na kostky, které se vysolí a ukládají do plechovek, pak se zalévají solným nálevem. Sýřenina Akawi se lisuje v plachetkách a nechá se prokysat. Po vysolení se ukládá do plechovek a zalévá solným nálevem. U Jadelu se sýřenina napařuje, aby získala tažnou konzistenci, a pak se splétá do pletenců. Po vychlazení se solí na sucho, následně se ukládá do plechovek a zalévají solným nálevem.
- h) *Měkké sýry zrající v chladu*: mají odlišný způsob zrání. Těsně po formování a lisování se některé sýry napařují (pro vláčnou konzistenci). Po vysolení se sýry ukládají do sklepů s nízkou teplotou (6 – 10 °C). Zrání probíhá pomaleji a podílejí se na něm i enzymy syřidla. Zrají obvykle ve zracích fóliích a po dobu několika týdnů. Nejznámější zástupci: Blaťácké zlato, Tylžský sýr, pikantní Pivní sýr.

2) Tvrdé sýry:

- a) *Nízkodohřívané tvrdé sýry*: při výrobě sýrů eidamského typu je odčerpána část syrovátky a nahrazena tzv. prací vodou. Dále je hmota dohřívána a lisována. Dvouteplotně se prosoluje, to zabezpečuje i správný průběh fermentace. Chuť sýrů je mléčně nakyslá, jemně sýrová, konzistence roztíratelná. Na řezu jsou malá, pravidelná a hladká oka velikosti hrášku. Sýry typu čedar mají trochu odlišnou výrobu. Sýřenina se předlisuje do kompaktních bloků, a pak se rozkrájí na menší hranolky, ty se za překládání při teplotě 35 °C nechají prokysat. Prokysaná a odkapaná sýřenina se ro-

zemele na nepravidelné kousky (tento proces se označuje jako čedarizace) a smíchá se solí (obsah soli je cca 2 – 5 %). Prosolené zrno se plní do forem, ve kterých se pak sýry lisují. Tyto bloky se nechávají zrát několik měsíců. Mohou se přidávat i různá koření. Zástupci jsou Cheddar, Chester (hlavně v angloamerických zemích).

- b) *Vysokodohříváné tvrdé sýry*: sýry se vyrábějí ve větších bochnících nebo blocích. Mají tužší, ale zároveň vláčnou konzistenci. Jejich chuť a vůně je jemně nasládlá až sýrově mandlová. Hlavním znakem je vysoká teplota (45 – 56 °C) dohřívání a dosoušení. Používají se termofilní sacharolytické kultury a bakterie propionového kvašení (směsná ementálská kultura – *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus thermophilus*, doplňková kultura – *Lactobacillus casei*), která vytvářejí velká oka velikosti vlašského ořechu. Dosušené zrno se pod vrstvou syrovátky napouští do forem. Sýry zrají 3 – 4 týdny v chladném sklepě (o teplotě 10 °C), poté v kvasném sklepě (teplota 22 – 26 °C), kde se tzv. otevírají (vytváří se oka) a ve středové části zaoblují (mají čočkovitý tvar). Nakonec se vrací zpět do chladného sklepa. [22, 44, 45]

3 HPLC - VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) v dnešní době tvoří základ moderní instrumentální analytické chemie. Je velmi ceněna pro svou vysokou citlivost a selektivitu. Využívá se pro rozdělení směsí v případech, kdy se už jiné separační techniky nedají použít. HPLC umožňuje přímé stanovení organických i anorganických látek. Výhodou chromatografických metod je jejich schopnost rozdělit a případně i kvantitativně stanovit desítky až stovky složek vzorku.

V potravinářství se vysokoúčinná kapalinová chromatografie používá pro dělení a stanovení různých organických sloučenin jako např. konzervačních látek, barviv, kontaminantů, antibiotik, alkaloidů, narkotik, aminokyselin, steroidních látek, hormonů a mastných kyselin, dále pak anorganických sloučenin a vitamínů. Nejčastěji se využívá pro stanovení i separaci hydrofilních vitamínů – C a skupinu vitamínů B.

Všechny chromatografické separační metody jsou založeny na rovnovážné distribuci složek vzorku mezi dvě fáze, z nich jedna je mobilní druhá stacionární. Aby docházelo k výše uvedené distribuci, musí existovat fázové rozhraní mezi stacionární a mobilní fází, která unáší složky vzorku tak, aby obtékala stacionární fází. Při dělení dochází k opakovanému vytváření rovnovážných stavů separovaných látek mezi mobilní a stacionární fází. Široký výběr materiálů pro stacionární a mobilní fází v chromatografii umožňuje dělní látek, které se jen velmi málo od sebe liší ve fyzikálních i chemických vlastnostech. [46, 47, 48]

3.1 Dělení chromatografických metod

Chromatografických metod je velké množství a mohou se dělit podle různých hledisek.

1) Podle mobilní fáze:

- kapalinová chromatografie, kde mobilní fází je kapalina,
- plynová chromatografie, kde mobilní fází je plyn.

2) podle způsobu provedení stacionární fáze:

- kolonová (sloupcová) chromatografie, kde stacionární fáze je umístěna v trubici (koloně),

- plošná (planární) chromatografie, dále se dělí na papírovou a tenkovrstvou techniku.
- 3) podle principu separace:
- rozdělovací chromatografie využívá rozdílné rozpustnosti molekul analytů mezi mobilní a stacionární fází,
 - při adsorpční chromatografii probíhají na povrchu nosiče (adsorbentu) specifické interakce, rozhodující je rozpustnost složek v rozpouštědle a jejich adsorbovatelnost na daný adsorbent,
 - gelová permeační chromatografie slouží k mechanickému dělení analytů na pórovité struktuře gelu (což je stacionární fáze), menší molekuly vzorku se v pórech gelu zdržují déle než ty velké,
 - iontově výměnná chromatografie je založena na výměně iontů mezi funkčními skupinami stacionární fáze (měnič iontů) a fáze mobilní; v mobilní fázi musí být vždy rozpuštěný elektrolyt,
 - afinitní chromatografie je vysoce selektivní, váže na stacionární fázi právě určité složky analytu.

Tab. 2: Rozdělení chromatografických metod podle principu separace [49]

Název metody	Povaha procesu	Veličina	Stacionární fáze
			Mobilní fáze
Adsorpční	adsorpce	adsorpční izoterma	tuhý sorbent
			kapalina, plyn
Rozdělovací	extrakce	rozdělovací konstanta	kapalina na nosiči
			kapalina, plyn
Iontová	elektrostatické interakce, difúze	náboj, disociační konstanta, průměr iontu	ionex
			kapalina
Gelová	difúze	molekulová hmotnost	kapalina v gelu
			kapalina
Afinitní	specifická interakce	-	nosič ligandu
			kapalina

- 4) podle způsobu práce:
- eluční chromatografie: analyzovaná směs je jednorázově vnášena do proudu mobilní fáze; analyty jsou eluovány podle rostoucí velikosti interakce se stacionární fází;

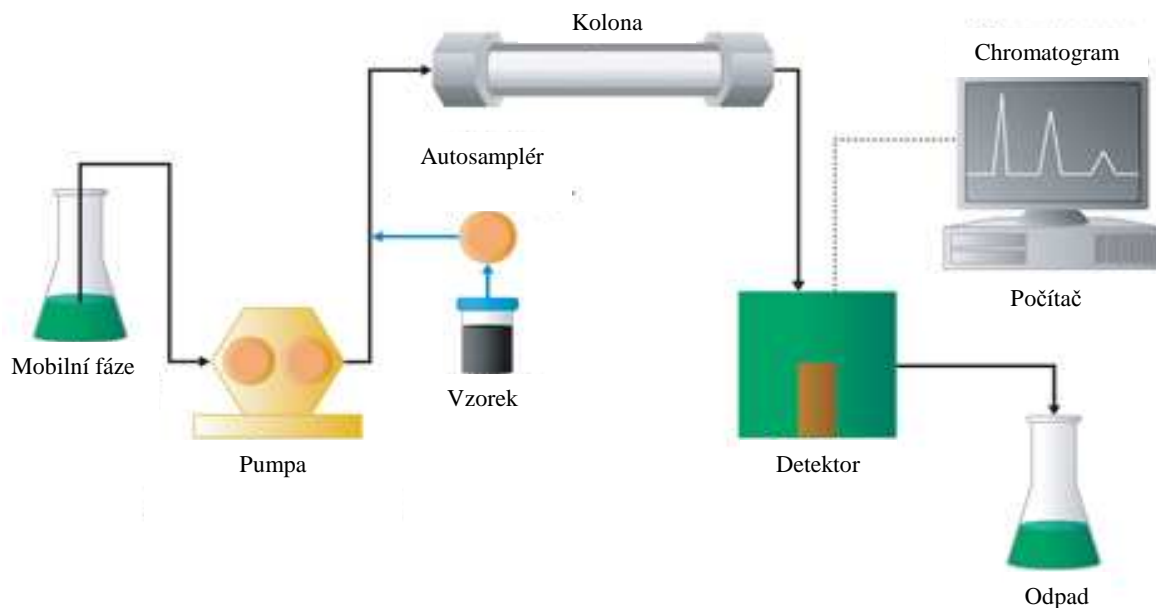
dělí se na izokratickou eluci (jedna mobilní fáze konstantního složení) a gradientovou eluci (pro úplné rozdělení všech složek a zkrácení doby eluce, v průběhu eluce se postupně mění složení mobilní fáze, např. jeho iontová síla, pH, atd.),

- vytěšňovací eluce: mobilní fáze se sorbuje na kolonu silněji než kterákoliv složka vzorku a působí jako vytěšňovací činidlo, přičemž tlačí vzorek před sebou,
- frontální eluce je založena na kontinuálním přivádění vzorku na kolonu; nejprve z kolony vychází nejméně sorbovaná látka a postupně se k ní přidávají další až po nejvíce sorbovanou; nakonec se z kolony eluuje směs vzorku v mobilní fázi o původním složení. [48, 50, 51, 52]

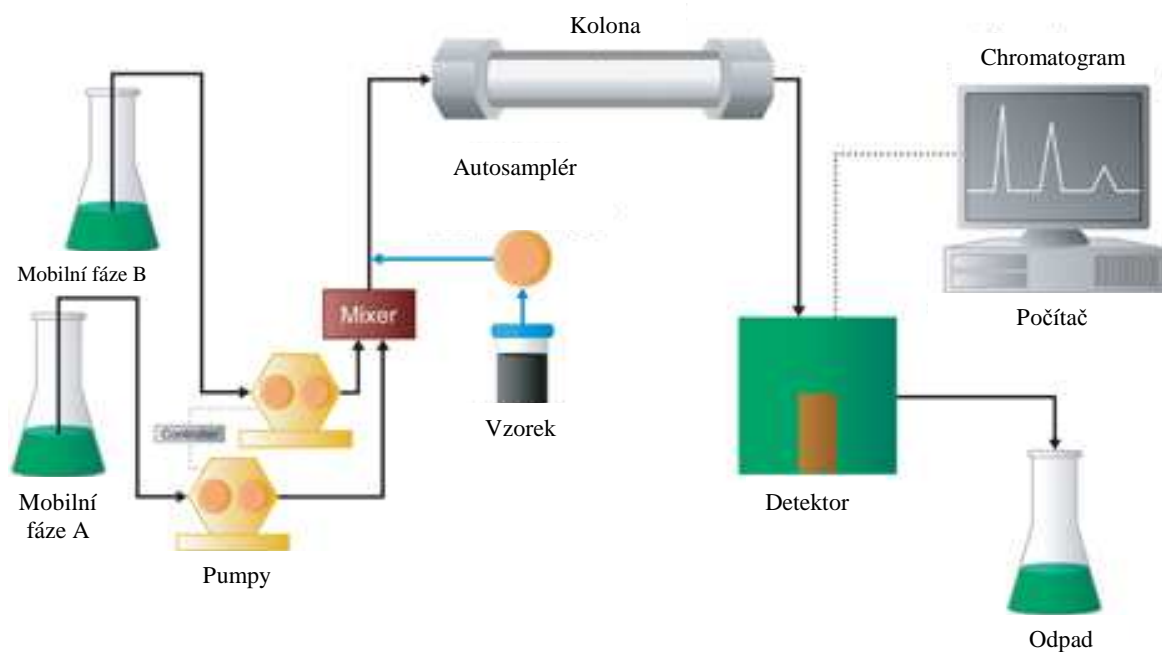
3.2 Sestava kapalinového chromatografu

Základní vybavení pro kapalinový chromatograf se skládá ze zásobníku mobilní fáze, kdy mobilní fáze je čerpána nejčastěji vysokotlakou pístovou pumpou do separační kolony. Do mobilní fáze je přes dávkovací kohout vstříkován vzorek určený k separaci. Mobilní fáze unáší vzorek přes kolonu, kde dochází k jeho separaci (eluci). Detektor monitoruje zóny analytu vycházejícího z kolony a tím i koncentraci jednotlivých separovaných složek. Počítač pak zpracuje získané výsledky do přehledného chromatogramu, kde každý pík (eluční křivka) charakterizuje koncentrační profil analytu v zóně. Dalším užitečným doplňkovým zařízením je např. předkolona, která chrání separační kolonu před případnými nečistotami (nebezpečí zničení kolony), dále jsou to pak ochranné filtry, zařízení na odplynování mobilní fáze atd.

Následující obrázky 4 a 5 zobrazují uspořádání chromatografu pro izokratickou a gradientovou eluci. Liší se v čerpání mobilní fáze. Při gradientové eluci jsou nasávány postupně dvě různé mobilní fáze.



Obr. 5: Chromatografické uspořádání pro izokratickou eluci [53]



Obr. 6: Chromatografické uspořádání pro gradientovou eluci [53]

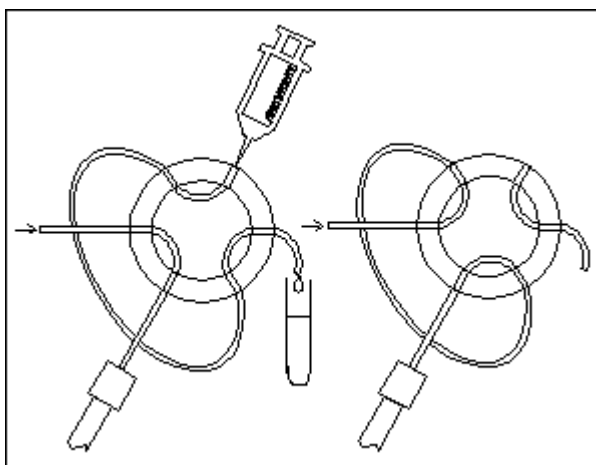
3.2.1 Jednotlivé součásti HPLC

Čerpadlo mobilní fáze (pumpa) musí vyvíjet velmi vysoké tlaky, až desítky MPa. Zajišťuje stabilitu a bezpulznost průtoku mobilní fáze. Čerpadla jsou konstruována z materiálů odolných vůči korozi, a to i při použití agresivních mobilních fází. Z funkčního hlediska rozeznáváme tato čerpadla:

- 1) pneumatická,
- 2) pulzní – pístová s membránou i bezmembránová,
- 3) s lineárním posunem – injektorová,
- 4) rotační – zubová a lopatková,
- 5) peristaltická.

Rotační a peristaltická čerpadla však neprodukuje dostatečně vysoký tlak, a proto se v HPLC nepoužívají. Vysokotlaká čerpadla můžeme ještě rozlišovat podle regulace dopravy mobilní fáze, a to buď na čerpadla produkující konstantní tlak, nebo konstantní průtok.

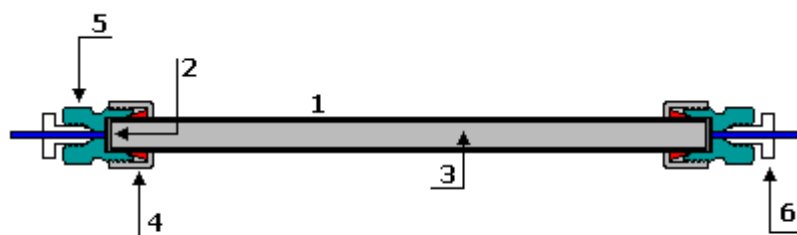
Dávkovací zařízení – v současné době se používají výhradně vícecestné dávkovací ventily se smyčkou (dávkování je reprodukovatelné, lze automatizovat). Objem smyčky bývá od několika nanolitrů až po mililitry. Otočením ventilu se vnitřní prostor ventilu naplněný vzorkem přesune do proudu mobilní fáze a je unášen do chromatografické kolony.



Obr. 7: Dávkovací kohouty

Předkolony plní ochrannou funkci. Tyto malé kolony jsou naplněny stejným sorbentem, jaký je v chromatografické koloně. Jsou umístěny mezi dávkovač a kolonu a slouží k odstraňování tuhých i rozpuštěných rušivých kontaminantů v mobilní fázi nebo ve vzorku.

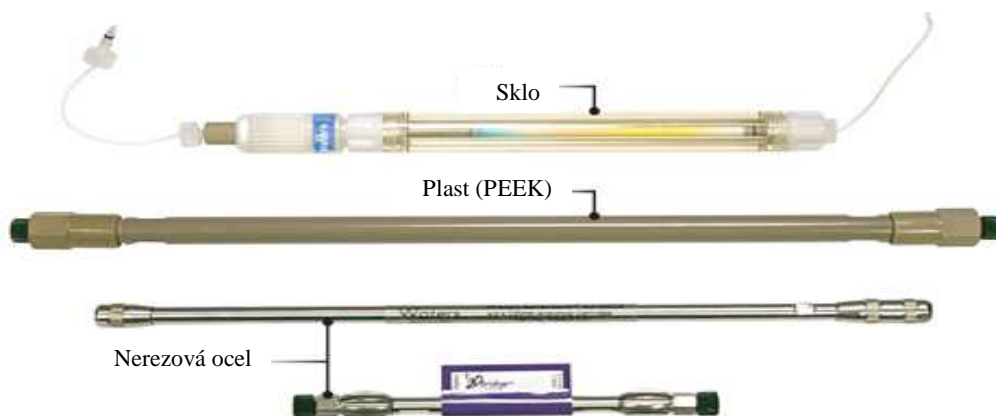
Kolony pro kapalinovou chromatografii jsou rovné trubice tvořené chemicky inertním obalem, který musí vydržet vysoké tlaky a vnitřní povrch mít dostatečně hladký. Nejpoužívanějším materiálem je nerezová ocel, plasty (PEEK) nebo sklo.



Obr. 8: Chromatografická kolona [48]

Vlastní klasická HPLC kolona se skládá z kovového pláště (1), který je uzavřen porézní kovovou fritou (2), která zabraňuje uvolňování stacionární fáze (3) z kolony a současně umožňuje plynulý průtok mobilní fáze. Oba konce kolony jsou ukončeny převlečným ochranným kroužkem (4) a koncovou hlavicí (5), ve které je navrtán vstup pro kapiláru se šroubem (6).

Všeobecně lepší výsledky se dosahují s kovovými kolonami, jejichž vnitřní stěny jsou vrтанé a leštěné. Případnou pórovitost a nežádoucí aktivitu kovových kolon je možné odstranit vnitřním potahem teflonu nebo skla. Rozměry kolon i velikost částic náplně, jsou závislé na jejich účelu, k němuž jsou použity. Dnes jsou nejčastěji využívány kolony plněné pórovitými náplněmi s částicemi o průměru 1 – 5 μm . Délka kolon se pohybuje mezi 5 – 25 cm a vnitřní průměr mezi 2 – 5 mm. S rostoucí délkou kolony se zvyšuje účinnost separace, doba analýzy a pracovní tlak. A s klesající délkou a průměrem kolony a s klesajícím průměrem částic náplně vzrůstá citlivost analýzy.



Obr. 9: Ukázky chromatografických kolon [54]

Materiály pro plnění kolon jsou většinou založeny na anorganické matici, na niž mohou být chemicky vázané nebo zakotvené různé stacionární fáze.

Chromatografický detektor je umístěn na konci kolony a zaznamenává rozdíl mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze obsahující eluovanou složku celou detektoru.

Často se rozlišují detektory koncentrační a hmotnostní:

- koncentrační detektory reagují na změnu hmotnostní koncentrace složky v eluentu, nezávisle na přívodu složky do detektoru,
- hmotnostní detektory naopak reagují na změnu hmotnostního toku složky v eluentu do detektoru.

Podle detekčních principů se detektory mohou dělit:

- univerzální detektory poskytují signál úměrný určité vlastnosti eluátu jako celku, např. refraktometry, kalorimetry a kapacitní detektory,
- selektivní detektory mají signál úměrný pouze koncentraci analyzované látky v eluentu – fotometry, pracují v ultrafialové (UV), viditelné (VIS) nebo infračervené (IR) oblasti spektra, dále fluorimetry, potenciometry a coulometry.

Vhodný detektor musí splňovat několik základních podmínek: schopnost detekce všech komponent vzorku, co největší specifičnost, vysokou citlivost a nízkou úroveň šumu. Dále je důležitá okamžitá a lineární odezva detektoru v co nejširším koncentračním rozmezí, detekovatelnost minimálního množství nebo koncentrace složky, reprodukovatelnost odezvy, atd. Pro HPLC se nejvíce využívají tyto detektory:

Spektrofotometrické detektory (UV/VIS) měří absorpci záření v oblasti vlnových délek od 190 – 800 nm. V dnešní době patří k nejběžněji používaným detektorům. Nejdokonalejší spektrofotometrické detektory jsou schopny pomocí diodového pole proměřit celá absorpční spektra během průchodu látky kvetou v určené oblasti vlnových délek.

Fluorescenční detektor je vysoce selektivní a citlivý, poskytuje odezvu pro látky vykazující fluorescenci. Principem je měření sekundárního záření (emisního), které látky vydávají po absorpci primárního elektromagnetického záření (excitačního).

Refraktometrický detektor měří změnu indexu lomu mezi eluátem a čistou mobilní fází. Citlivost detektoru se zvětšuje s rozdílným indexem lomu mezi eluátem a mobilní fází.

Elektrochemické detektory jsou založeny na měření elektrické vodivosti a náboje. Detektor měří proud při průchodu redukovatelné či oxidovatelné látky měrnou celou, ve které jsou

umístěny elektrody. Na elektrody je vloženo pracovní napětí nezbytné pro průběh elektrochemické reakce.

Vodivostní detektory jsou řaseny mezi univerzální detektory. Principem je měření elektrické vodivosti eluátu v průtokové cele mezi dvěma elektrodami. Tyto elektrody jsou napojeny na střídavé napětí, aby se zabránilo jejich polarizaci. Látky určené k analýze by se měly dostatečně rozpouštět a mít dostatečně velkou permitivitu. [46, 48, 50, 51, 52, 55, 56, 57]



Obr. 10: Chromatografická sestava, na které byla provedena analýza vzorků sýrů

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 METODIKA

4.1 Materiál

4.1.1 Vzorky sýrů pro analýzu obsahu vitamínů B

SLADKÉ SÝRY:

1) Měkké nezrající:

Lučina: Smetanový termizovaný sýr, t.vs. 25,5 %, sušina 36 %

- Složení: mléko, smetana, čisté mlékařské kultury, jedlá sůl

Gervais: lahodný tvarohový sýr, t.vs. 20 %, sušina 32 %

- Složení: tvaroh 80 %, mléko, jedlá sůl, stabilizátor: karubin

2) Měkké zrající:

A) Sýry zrající v chladu:

Pivní sýr: Jarošovský dezertní pivní sýr, poloměkký plnotučný zrající sýr, t.vs. 48 %, sušina 48 %

- Složení: mléko, jedlá sůl max. 4 %, barvivo β -karoten, konzervant dusičnan sodný, mlékařské kultury

B) Plísňové:

- s plísní na povrchu:

Hermelín: PRIBINA, spol. s r.o., Král sýru HERMELÍN, sýr s plísní na povrchu, t.vs. 23 %, sušina 46 %

- Složení: mléko, čisté mlékařské kultury, *Penicillium candidum*

- s plísní v těstě:

Niva: MADETA, Jihočeská Niva, sýr s modrou plísní uvnitř hmoty, polotvrdý sýr, t.vs. 20 %, sušina 52 %

- Složení: mléko, jedlá sůl max. 5,5 %, mlékařské kultury, ušlechtilá plíseň *Penicillium roqueforti*

- s kombinovaným nárůstem plísně:

Vltavín: Povltavské mlékárny a.s., Sedlčanský dvouplísňový sýr, poloměkký zrající plnotučný sýr s bílou plísní na povrchu a se zelenou plísní v těstě, t.vs. 30 %, sušina 53 %

- Složení: mléko, smetana, jedlá sůl, mlékárenské kultury, *Penicillium candidum*, *Penicillium roqueforti*

C) Pařené:

Polooštiepok: LIPTOV, sýry z horských oblastí, neuzený, pařený nezrající sýr, t.vs. min 50%, sušina 49 %

- Složení: pasterované mléko, mlékárenské kultury, syřidlo CaCl_2 , sůl, baleno v ochranné atmosféře

D) Zrající v solném nálevu:

a) nelisované:

Balkánský sýr: Billa, spol. s r. o., přírodní bílý sýr v solném nálevu, t.vs. 45 %, sušina 39 %

- Složení: pasterované mléko, mlékárenské kultury, sůl, syřidla

b) pařené:

Jadel: Mlékárna Bystřice pod Hostýnem, přírodní pařený bílý sýr, t.vs. 37 %, sušina 54 %

- Složení: mléko, jedlá sůl (4 – 7 %), mlékárenské kultury, CaCl_2

3) Tvrdé:

A) S vysokodohřívanou sýřeninou

Ementál: President Golgenburg, sýr ementálského typu, plátky, plátkový tvrdý sýr, t.vs. 45 %, sušina 62 %

- Složení: mléko, jedlá sůl, čisté mlékařské kultury, baleno v ochranné atmosféře: dusík, CO_2

B) S nízkodohřívanou sýřeninou:

Eidam 30%: MADETA, Jihočeský Eidam 30%, plátky, Eidamský blok, přírodní polotvrdý blok, t.vs. 30%, sušina 50 %

- Složení: mléko, jedlá sůl max. 2,5 %, mléčné kultury, baleno v ochranné atmosféře: dusík, CO₂

KYSELÉ SÝRY

Bystřický tvaroh měkký: t.vs. 0,5 %, sušina 21,5%

- Složení: pasterované mléko, syřidlo, smetanová kultura

4.2 Použité pomůcky a přístroje

- Předvážky (Kern, SRN)
- Analytické váhy (Scholler instruments, Adam, AFA 210LC)
- Temperovací vodní lázeň (Memmert, SRN)
- Termostat
- Běžné laboratorní sklo a pomůcky
- Dávkovací stříkačka (Hamilton, USA)
- Mikrofiltry 0,45 μm, Nylon (Supelco, USA)
- Chromatografická aparatura pro HPLC (Hewlett Packard 1100)
 - Vakuový odplyňovací modul
 - Binární pumpy
 - Termostat kolon
 - Detektor UV/VIS
 - Dávkovací ventil analytický smyčkový (objem smyčky 20 μl)
 - Kolona SUPELCOLSIL LC8 [150 x 4,6 mm; 5 μm]
 - PC pro vyhodnocování s programem ChemStation – Instrument (Agilent, USA)

4.3 Použité chemikálie

- Metanol pro HPLC, (vyrobena Merck KGa, Darmstadt, Germany)
- Dihydrogenfosforečnan draselný - KH_2PO_4 (vyrobena Penta)
- Kyselina trichloroctová – TCA (dodavatel Lukeš, Uherský Brod)
- Kyselina chlorovodíková – HCl (dodavatel Lukeš, Uherský Brod)
- Chlorid sodný – NaOH
- Standardy: thiaminhydrochlorid, nikotinamid, kyselina D-pantotenová (vyrobena pro Supelco, Bellefonte, PA, USA), pyridoxin – celá triáda vitamínu (vyrobena Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika)
- Enzymy:
 - a) *Clara-diaštáza* (směs enzymů: *α -amyláza, celuláza, invertáza, peptidáza, fosfatáza a sulfatáza*), (vyrobena Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika)
 - b) *fromáza* (uměle průmyslově připravený enzym, vyrábí se z plísně *Rhizomanie miehei*, jde o firemní název; tato *proteáza* se používá místo *chymozinu*)
- Carez I (15% roztok ZnSO_4), Carez II (30% roztok $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$)
- redestilovaná voda

4.4 Extrakce vitamínů B z vybraných druhů sýrů

Extrakce vitamínů B z vybraných druhů sýrů byla provedena čtyřmi různými způsoby. V principu jsou si podobné, jen se postupně zlepšoval způsob odstranění nežádoucích látek (štěpné enzymatické produkty na bázi peptidů apod.), které ovlivňovaly výslednou detekci.

4.4.1 Extrakce vitamínu B ze vzorku 30% Eidamu

Pro extrakci bylo naváženého 12 g (s přesností na 0,0001 g) na jemno nastrohaného sýra. Vzorek byl kvantitativně převeden do třecí misky, po částech byl k němu přidáván 1% roztok *diastázy* o objemu 80 ml a vzorek byl rozetřen. Enzym byl použit za účelem hydrolyzy bílkovin, lipidů a dalších nežádoucích látek navázaných jako např. fosforečné estery. Tato směs byla kvantitativně převedena do Erlenmayerovy baňky obalené hliníkovou fólií, aby se zabránilo přístupu světla. Poté byla baňka se vzorkem vložena na 1 h do třepací vodní

lázně o teplotě 25 °C. Po hodině byla umístěna na 24 h do termostatu o teplotě 30 °C. Poté, byl ke vzorku přidán 1 ml 80% kyseliny trichloroctové (TCA) pro vysrážení zbývajících bílkovin, peptidů a jiných látek. Pro vyčiření vzorku byly použity 2 ml roztoku Carez I a 2 ml roztoku Carez II. Vše bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky (taktéž obalené hliníkovou fólií) o objemu 250 ml a doplněno redestilovanou vodou na daný objem. Poté byl tento roztok dvoustupňově zfiltrován přes filtrační papír (modrý).

Příprava *clara-diastry* probíhala odděleně. Požadovaný objem redestilované vody byl nejprve upraven na pH 4,5, a pak byl v tomto pufru enzym rozpuštěn. Jako další varianta byl odzkoušen enzym v prostředí o pH 6.

4.4.2 Extrakce vitamínů sk. B ze vzorků: Lučina, Gervais, Bystřický tvaroh a Ementál

Z jednotlivých druhů sýrů bylo naváženo vždy 12 g s přesností na 0,0001 g. Vzorky byly kvantitativně převedeny do třecích misek, postupně k nim byla přidávána 1% *diastáza* o objemu 80 ml (připravené při pH 4,5 a pH 6,0) a 0,5 ml *fromázy*. *Fromáza* byla přidána pro zlepšení efektu hydrolýzy bílkovin a lipidů – běžně se používá v mlékárenském průmyslu. Pak byly vzorky, kvantitativně převedeny do Erlenmayerových baněk obalených hliníkovou fólií, umístěny do třepací lázně o 25 °C na 1 h. Po vyjmutí, byly přeneseny do termostatu na 24 h o 30 °C. Pro inaktivaci nežádoucích enzymů byl proveden 7 minutový záhřev ve vodní lázni o teplotě 95 °C. Po ochlazení byla přidána 80% TCA o objemu 1 ml a pro vyčiření 2 ml Carez I a 2 ml Carez II. Směs byla kvantitativně převedena do odměrné baňky, obalené hliníkovou fólií o objemu 250 ml a doplněna po rysku redestilovanou vodou. Následovně byla provedena dvoustupňová filtrace přes filtrační papír.

4.4.3 Extrakce vitamínu sk. B ze vzorků: 30% Eidam, Hermelín

Z těchto sýrů bylo odebráno k extrakci 5 g s přesností na 0,0001 g. Ke snížené navážce bylo postupně přidáno 50 ml *diastázy* o koncentraci 0,5 % a rozmícháno v třecí misce. *Diastáza* byla připravena při pH 4,5 a 6,0. Přídavek *fromázy* se nezměnil, 0,5 ml. Rozetřené vzorky byly kvantitativně převedeny do Erlenmayerových baněk obalených hliníkovou fólií a byly dány na 1 h do třepací lázně (25 °C), poté na 24 h do termostatu o teplotě 30°C.

Po vyjmutí byly vzorky zahřívány 15 minut ve vodní lázni o teplotě 80 °C. Potom byly

zchlazeny a pro vysrážení zbývajících nežádoucích látek byla přidána 80% TCA o objemu 1 ml. K vyčiření byl použit 1 ml Carez I a 1 ml Carez II. Vše bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky, obalené hliníkovou fólií o objemu 250 ml a doplněno redestilovanou vodou. Poté byly vzorky dvoustupňově zfiltrány přes filtrační papír.

4.4.4 Extrakce vitamínu sk. B ze vzorků: Niva, Vltavín, Pivní sýr, Pološtiepok, Balkánský sýr, Jadel

Pro extrakci bylo z každého vzorku odebráno 5 g s přesností na 0,0001 g. Pro zdokonalení hydrolyzy bylo přidáno ke každému vzorku 50 ml 0,1 mol.dm⁻³ kyseliny chlorovodíkové (HCl). V třecích miskách bylo vše rozetřeno a kvantitativně převedeno do Erlenmayerových baněk obalených v hliníkové fólii. Poté byly baňky zahřáty po dobu 30 minut ve vodní lázni o teplotě 95 °C. Po vyjmutí z lázně byly vzorky zchlazeny a jejich pH upraveno hydroxidem sodným (NaOH) na hodnotu 6,0. K těmto vzorkům, o známém objemu, byla přidána *diastáza* tak, aby její výsledná koncentrace v roztoku činila 1 %. Také byla přidána *fromáza* o objemu 0,5 ml. Vzorky byly umístěny na 1 h do třepací lázně o teplotě 25 °C a na 24 h do termostatu o teplotě 30 °C. Potom byla ke vzorkům přidána 80% TCA o objemu 1ml, 1 ml Carez I a 1 ml Carez II. Směsi byly kvantitativně převedeny do odměrných baněk, obalených hliníkovou fólií o objemech 250 ml a doplněny redestilovanou vodou po rysku. Vzorky byly dvoustupňově zfiltrány, nejprve přes filtrační papír, a poté přes mikrofiltr o průměru pórů 0,2 μm.

4.5 Kalibrační křivky pro chromatografické stanovení vitamínů sk. B

K vytvoření kalibračních křivek pro chromatografickou analýzu bylo použito standardů: thiaminhydrochlorid, nikotinamid, kyselina pantotenová a pyridoxin – celá triáda vitamínu. Riboflavin se nepodařilo detekovat touto metodou, proto byl z analýzy vyřazen. Standardy byly rozpuštěny v mobilní fázi, výchozí koncentrace roztoku standardů byla 6 μg.ml⁻¹, kalibrační řada roztoků byla získána ředěním standardních roztoků mobilní fází. Kalibrační křivky byly sestrojeny jako závislost plochy píku [mA.V.s⁻¹] na koncentraci standardu [μg.ml⁻¹].

4.6 Chromatografická analýza

Extrakce vitamínů sk. B ze vzorků sýrů bylo provedeno čtyřmi metodami uvedených v kapitolách 4.4.1, 4.4.2, 4.4.3 a 4.4.4. Získané filtráty byly ještě přefiltrovány přes HPLC filtr (nylon, 0,45 μm), a pak byl vždy dávkován alikvotní podíl 20 μl do HPLC. Pro separaci byla použita kolona SUPELCO SIL LC8 [150 x 4,6 mm; 5 μm]. Složení mobilní fáze bylo 0,1 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ dihydrogenfosforečnan draselný (pH 7,0 upraveno pomocí NaOH) a metanol v poměru 90:10. Eluce byla izokratická. Průtok mobilní fáze byl 1,0 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Signál byl snímán detektorem UV/VIS DAD při vlnových délkách 204 nm (pro detekci niacinu a kyseliny pantotenové) a 220 nm (pro detekci thiaminu a pyridoxinu). Retenční čas thiaminu byl 11,8 min, niacin 3,9 min, kyseliny pantotenové 2,5 min a pyridoxin 3,1 min.

Vyhodnocení výsledků bylo provedeno za použití chromatografického softwaru ChemStation – Instrument. Tento program vyhodnotil plochy píků [$\text{m}\cdot\text{A}\cdot\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$] v závislosti na retenčním čase vitamínu.

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 Výsledky měření kalibračních křivek

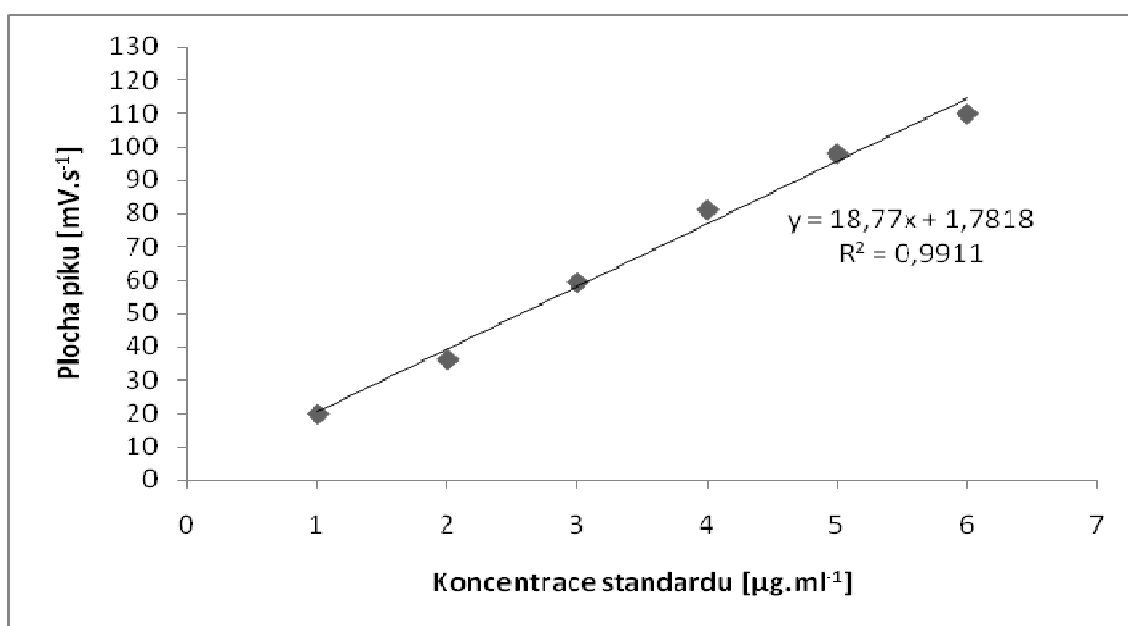
5.1.1 Kalibrační křivka pro stanovení vitamínu B₁

Kalibrace standardu vitamínu B₁ byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 4.5. Tato kalibrace byla provedena se vzorky o koncentraci 6,0; 5,0; 4,0; 3,0; 2,0 a 1,0 µg.ml⁻¹. Každá koncentrace byla proměřena čtyřikrát při vlnových délkách 204 nm, 220 nm a 270 nm. Výsledky měření jsou uvedeny v následující tabulce 4 a znázorněny na grafu 1.

Tab. 3: Plochy píků vitamínu B₁

Koncentrace [µg.ml ⁻¹]	plocha píku při λ:		
	λ = 204 nm	λ = 220 nm	λ = 270 nm
1µg.ml ⁻¹	0	20,577	33,2436
	0	17,82317	33,4733
	0	21,5128	33,0529
Ø	0	19,97099	33,2566
2µg.ml ⁻¹	37,5787	45,1829	49,7286
	31,50058	42,5367	50,6741
	0	37,51991	44,1027
	0	19,9058	42,4877
Ø	34,53964	36,2863275	46,748275
3µg.ml ⁻¹	48,8487	59,8525	66,5408
	45,261	60,7165	68,6658
	44,522	56,3422	64,8026
	56,0537	60,8112	66,751
Ø	48,67135	59,4306	66,69005
4µg.ml ⁻¹	72,127	75,3392	85,0839
	84,8332	81,3782	87,4115
	73,7484	83,3599	88,9999
	83,1334	84,6479	85,5483
Ø	78,4605	81,1813	86,7609
5µg.ml ⁻¹	103,5955	98,2051	100,975
	96,5797	92,5356	98,7074
	100,2795	102,662	98,2705
	116,1937	98,6716	95,9199
Ø	104,1621	98,018575	98,4682

Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	plocha píku při λ :		
	$\lambda = 204 \text{ nm}$	$\lambda = 220 \text{ nm}$	$\lambda = 270 \text{ nm}$
6 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	120,0527	108,865	116,514
	123,9215	110,852	117,6305
	130,6082	108,427	117,7976
	138,1318	111,739	117,4168
$\bar{\emptyset}$	128,17855	109,97075	117,339725



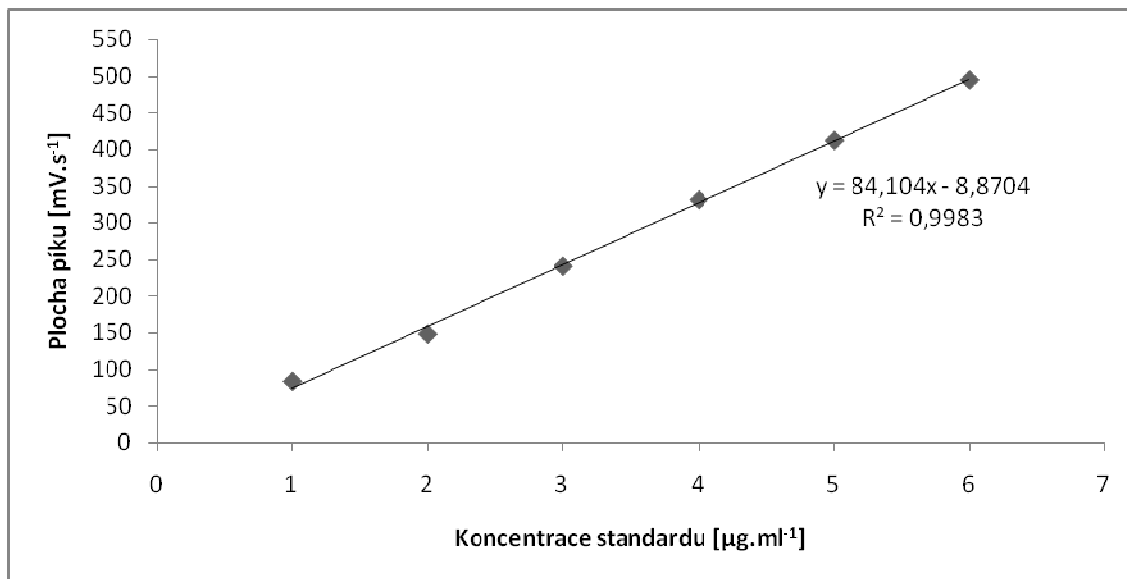
Graf 1: Kalibrační křivka vitamínu B₁ s rovnicí regrese (při vlnové délce 220 nm)

5.1.2 Kalibrační křivka pro stanovení vitamínu B₃

Kalibrace byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 4.5. Proměřené koncentrace vzorků byly: 6,0; 5,0; 4,0; 3,0; 2,0 a 1,0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Každá koncentrace byla proměřena čtyřikrát při vlnových délkách 204 nm, 220 nm a 234 nm. Měření jsou uvedena v následující tabulce 5 a grafu 2.

Tab. 4: Plochy píků vitamínu B₃

Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	plocha píku při λ :		
	$\lambda = 204 \text{ nm}$	$\lambda = 220 \text{ nm}$	$\lambda = 234 \text{ nm}$
$1\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	83,7846	87,0813	37,079
	81,0605	84,3618	36,6652
	85,0605	87,233	37,2812
	84,3434	87,233	37,37017
Ø	83,56225	86,477275	37,0988925
$2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	166,7598	135,3758	73,0931
	130,109	170,41	72,717
	165,2673	165,2673	72,6357
	131,13097	131,1309	72,9967
Ø	148,3167675	150,546	72,860625
$3\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	248,3661	256,3453	109,563
	247,878	257,221	110,1567
	217,9258	225,251	96,3865
	250,048	256,7234	109,7265
Ø	241,054475	248,885175	106,458175
$4\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	330,37	341,3809	146,2164
	332,0763	342,0182	146,4501
	331,9788	341,9897	146,4763
	332,4712	341,8102	146,2744
Ø	331,724075	341,79975	146,3543
$5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	411,4569	424,3854	181,9353
	412,721	425,5262	182,2309
	412,721	425,6292	182,445
	414,6207	423,6031	181,5712
Ø	412,8799	424,785975	182,0456
$6\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	497,774	514,4663	220,4649
	491,911	507,6195	217,4699
	496,4888	512,6779	219,8397
	495,4888	513,8958	220,4199
Ø	495,41565	512,164875	219,5486



Graf 2: Kalibrační křivka vitamínu B₃ s rovnicí regrese (při vlnové délce 204 nm)

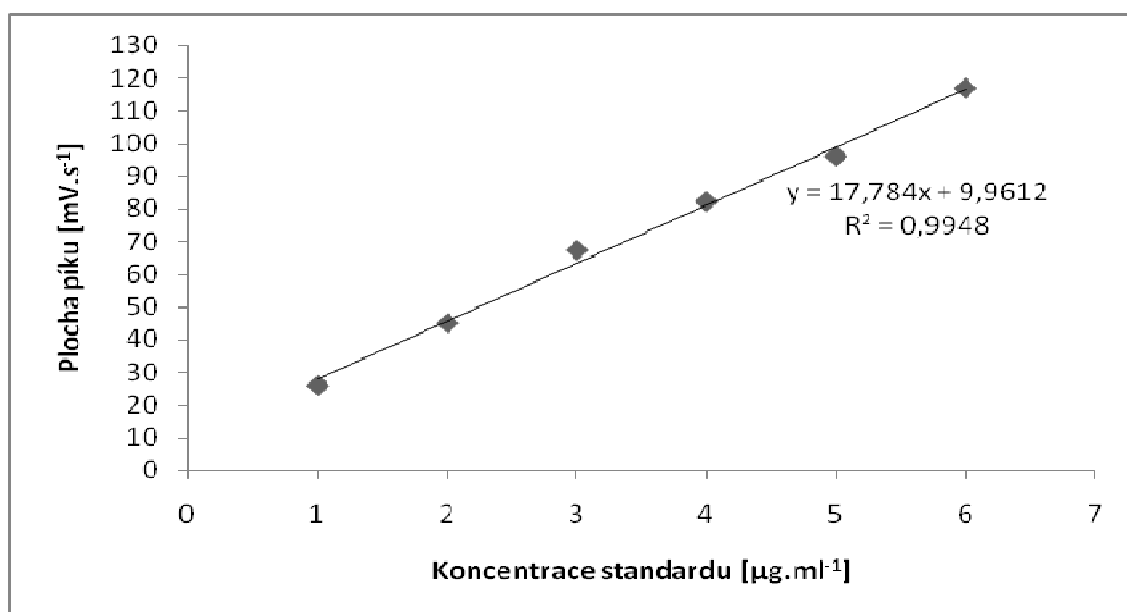
5.1.3 Kalibrační křivka pro stanovení vitamínu B₅

Kalibrace vzorků standardu byla provedena dle postupu v kapitole 4.5. Kalibrace byla měřena pro koncentrace 6,0; 5,0; 4,0; 3,0; 2,0 a 1,0 μg.ml⁻¹. Každá z koncentrací byla měřena čtyřikrát při vlnových délkách 204 nm a 220 nm. Hodnoty jsou uvedeny v následující tabulce 6 a grafu 3.

Tab. 6: Plochy píků vitamínu B₅

Koncentrace [μg.ml ⁻¹]	plocha píku při λ:	
	λ = 204 nm	λ = 220 nm
1 μg.ml ⁻¹	31,4004	0
	22,4124	0
	27,3246	0
	22,62034	0
Ø	25,93944	0
2 μg.ml ⁻¹	45,3195	0
	47,0521	0
	40,0717	0
	47,4005	0
Ø	44,96095	0

Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	plocha píku při λ :	
	$\lambda = 204 \text{ nm}$	$\lambda = 220 \text{ nm}$
$3\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	62,6228	6,8074
	62,7665	6,8
	65,07368	7,5009
	78,7643	6,5703
Ø	67,30682	6,91965
$4\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	83,282	10,2212
	81,7073	10,2943
	83,117	10,2342
	80,6246	10,31012
Ø	82,18273	10,26496
$5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	96,4658	12,9415
	96,00714	12,8626
	95,9073	12,915
	95,80201	12,9
Ø	96,04556	12,90478
$6\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	116,7908	15,1029
	116,9324	15,5876
	116,9324	15,1002
	116,5617	15,0312
Ø	116,8043	15,20548



Graf 3: Kalibrační křivka vitamínu B₅ s rovnicí regrese (při vlnové délce 204 nm)

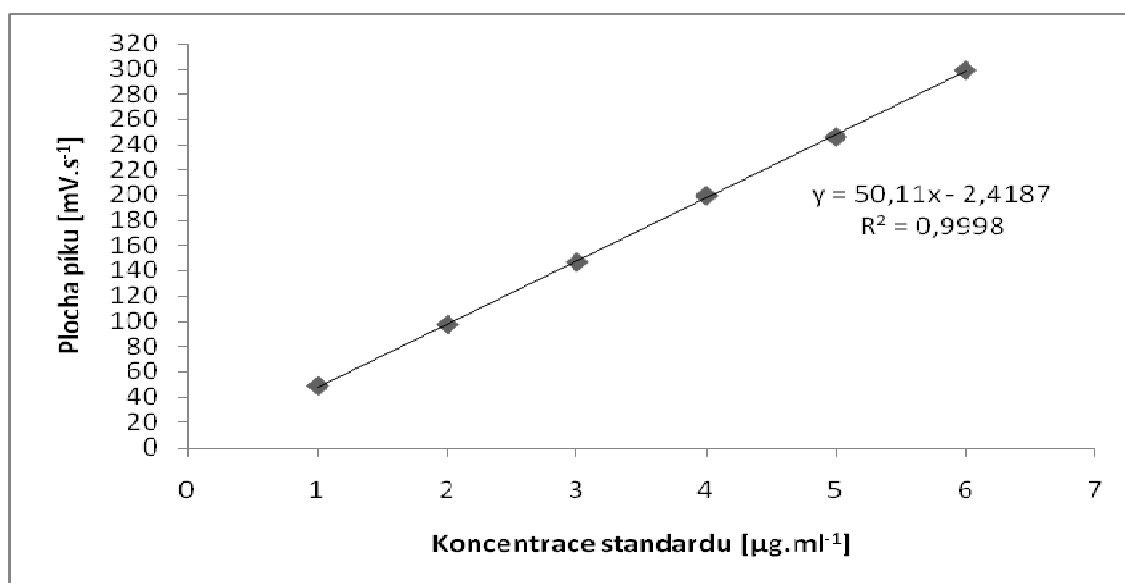
5.1.4 Kalibrační křivka pro stanovení vitamínu B₆

Kalibrace vitamínu B₆ byla provedena podle postupu, uvedeném v kapitole 4.5. Vzorky standardu byly proměřeny při koncentracích 6,0; 5,0; 4,0; 3,0; 2,0 a 1,0 µg.ml⁻¹. Každá koncentrace byla čtyřikrát měřena při vlnových délkách 204 nm, 220 nm a 324 nm. Získané hodnoty jsou uvedeny v následující tabulce 7 a grafu 4.

Tab. 6: Plochy píků vitamínu B₆

Koncentrace [µg.ml ⁻¹]	plocha píku při λ:		
	λ = 204 nm	λ = 220 nm	λ = 324 nm
1µg.ml ⁻¹	26,1584	48,6858	17,083
	25,6658	48,5497	18,1757
	25,8535	48,4591	18,0835
	26,4145	48,2238	18,0564
Ø	26,02305	48,564867	17,78073
2µg.ml ⁻¹	63,1449	96,0702	35,8723
	54,6445	97,9801	36,5236
	52,6611	97,7624	36,6837
	59,9549	97,0865	36,4609
Ø	57,60135	97,2248	36,38513
3µg.ml ⁻¹	93,0008	148,0453	55,3223
	92,3939	146,7177	54,98632
	91,5821	145,4767	54,4444
	94,8047	146,9175	54,75582
Ø	92,94538	146,7893	54,87721
4µg.ml ⁻¹	106,0801	200,1502	74,651
	109,3047	199,5487	74,7095
	107,3506	199,6689	74,472
	109,8777	199,0009	74,17037
Ø	108,1533	199,59218	74,50072
5µg.ml ⁻¹	138,09	246,97005	92,2485
	136,4595	246,8597	92,3118
	138,09	246,6372	92,10476
	138,132	244,7665	91,2539
Ø	137,6929	246,30836	91,97974

Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	plocha píku při λ :		
	$\lambda = 204 \text{ nm}$	$\lambda = 220 \text{ nm}$	$\lambda = 324 \text{ nm}$
$6\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	163,8708	302	112
	168,735	295,619	110,236
	161,7463	298,639	111,253
	162,087	301,05	112,518
\emptyset	164,1098	299,327	111,5018



Graf 4: Kalibrační křivka vitamínu B₆ s rovnicí regrese (při vlnové délce 220 nm)

Podle chromatogramů bylo učeno, že nejlepší detekce vitamínů je při těchto vlnových délkách, viz tabulka 8. Této tabulce jsou dále uvedeny příslušné rovnice kalibračních křivek daných vitamínů, ty byly použity pro přepočty ploch píků na koncentrace vitamínů sk. B ve vzorcích sýrů.

Tab. 7: Rovnice kalibračních křivek vitamínů sk. B

Vitamín	Vlnová délka [nm]	Kalibrační křivka	Retenční čas [min]
B ₁	220	$y = 18,77x + 1,7818$	11,8
B ₃	204	$y = 84,104x - 8,8704$	3,9
B ₅	204	$y = 17,784x + 9,9612$	2,5
B ₆	220	$y = 50,11x - 2,4187$	3,1

5.2 Zpracování výsledků

Výsledky byly statisticky zpracovány, aby bylo možné poskytovat stále stejné výsledky pro řadu opakovaných stanovení pro nezávislá měření.

Malé, nepravidelné odchylky od skutečné hodnoty se určují statisticky ze souboru opakovaných analýz a ovlivňují reprodukovatelnost stanovení.

Aritmetický průměr všech výsledků se nejvíce blíží hodnotě, která se stanoví podle vzorce:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^n \frac{x_i}{n} \quad (1)$$

Nahodilé chyby měření se počítají pomocí směrodatné odchylky, podle vzorce:

$$S.D. = \sqrt{\frac{1}{n-1} \left(\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \right)} \quad (2)$$

5.3 Výsledky extrakce vitamínů sk. B ve vzorku 30% Eidamu

Extrakce vitamínů sk. B byla provedena podle postupu v kapitole 4.4.1. K analýze byly odebrány dva vzorky o hmotnosti 12 g. K prvnímu vzorku byla přidána *clara-diastáza* připravená při pH 4,5 a ke druhému vzorku byla přidána *clara-diastáza* připravená při pH 6,0. Získané filtráty vzorků 30% Eidamu byly použity pro chromatografickou analýzu podle postupu, uvedeném v kapitole 4.6. Každý filtrát byl pětkrát analyzován (viz chromatogram 1 v příloze I).

V tabulce 9 jsou uvedeny průměrné hodnoty pěti měření plochy píků při pH 4,5 a 6,0. Plochy píků byly přepočítány na koncentraci [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$] vitamínů ve vzorcích a převedeny na $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ sýra.

Tab. 8: Výsledky měření vzorků 30% Eidam při pH 4,5 a 6,0

Vitamín	Plocha píku A [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace vitamínu [μg.ml ⁻¹]	Koncentrace vitamínu [mg.100 g ⁻¹] ± S.D.*
pH 4,5			
B ₃	31,69	0,4823	1,0014 ± 0,0011
B ₅	10,80	0,0472	0,0979 ± 0,0008
B ₆	29,60	0,6390	1,3268 ± 0,0012
pH 6,0			
B ₃	29,77	0,4594	0,9509 ± 0,0012
B ₅	29,30	0,4461	0,9233 ± 0,0015
B ₆	47,89	1,0040	2,0779 ± 0,0009

* S.D. – směrodatná odchylka

Pro lepší extrakci vitamínů sk. B se ukázalo, že příprava *clara-diafézy* při pH 6,0 je výhodnější. Obecně bylo dosaženo vyšší koncentrace vitamínů (mimo vitamín B₃). Dokonce průměrná koncentrace vitamínu B₆ byla 2,0779 mg.100 g⁻¹. Dále vitamín B₃, extrahovaný za stejných podmínek, měl průměrnou koncentraci 0,9509 mg.100 g⁻¹ a vitamín B₅ 0,9233 mg.100 g⁻¹.

Podle výrobce je optimální pH pro přípravu enzymu 6,0. To se potvrdilo i v následujících analýzách. U většiny vzorků byla analyzována vyšší koncentrace vitamínů, když byl enzym připraven při pH 6,0.

5.4 Výsledky extrakce vitamínu sk. B ze vzorků: Lučina, Gervais, Bystřický tvaroh a Ementál

Extrakce vitamínů sk. B byla provedena podle kapitoly 4.4.2. Z každého druhu sýra byly odebrány dva vzorky, vždy první byl upraven *clara-diafézou* připravenou při pH 4,5 a druhý při pH 6,0. Ke všem vzorkům byla také přidána *fromáža* pro zlepšení efektu vysrážení nežádoucích látek. Získané filtráty byly použity pro chromatografickou analýzu podle postupu uvedeného v kapitole 4.6. Každý filtrát byl pětkrát analyzován (viz chromatogramy 2 – 5 v přílohách II, III, IV a V).

V tabulkách 10 – 13 jsou uvedeny průměrné hodnoty z pěti měření při pH 4,5 a 6,0. Plochy píků byly přepočítány pomocí příslušných rovnic kalibračních křivek na koncentraci [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$] vitamínů ve vzorcích a převedeny na $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ sýra.

Tab. 9: Výsledky měření vzorků Lučina při pH 4,5 a 6,0

Vitamín	Plocha píku A [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace vitamínu [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace vitamínu [$\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$] \pm S.D.*
pH 4,5			
B₃	88,00	1,1518	2,3439 \pm 0,0010
B₅	20,10	0,5701	1,1602 \pm 0,0012
B₆	21,90	0,4853	0,9874 \pm 0,0012
pH 6,0			
B₃	x	x	x
B₅	19,55	0,5392	1,1133 \pm 0,0014
B₆	22,95	0,5063	1,0453 \pm 0,0009

* S.D. – směrodatná odchylka

Extrakce vitamínů sk. B ve vzorcích Lučina byla výhodnější, když byla přidána *clara-dia*stáza připravená při pH 4,5, podařilo se stanovit všechny tři vitamíny. Průměrný obsah vitamínu B₃ byl 2,3439 $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$, ve druhém vzorku nebyl detekován. V prvním vzorku měl vitamín B₅ průměrnou koncentraci 1,1602 $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$, ve druhém 1,1133 $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$. Jen vitamín B₆ měl ve druhém vzorku vyšší průměrnou koncentraci (1,0453 $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$) než v prvním (0,9874 $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$).

Tab. 10: Výsledky měření vzorků Gervais při pH 4,5 a 6,0

Vitamín	Plocha píku A [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace vitamínu [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace vitamínu [$\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$] \pm S.D.*
pH 4,5			
B₃	x	x	x
B₅	23,45	0,7585	1,5743 \pm 0,0009
B₆	26,25	0,5721	1,1875 \pm 0,0012
pH 6,0			
B₃	x	x	x
B₅	22,60	0,7107	1,4634 \pm 0,0014
B₆	25,15	0,5502	1,1329 \pm 0,0015

* S.D. – směrodatná odchylka

Při analýze vzorků Gervais se nepodařilo detekovat, ani v jednom ze vzorků, vitamín B₃. Průměrná koncentrace vitamínů B₅ (1,5743 mg.100 g⁻¹) a B₆ (1,1875 mg.100 g⁻¹) byla vyšší při přidavku *clara-diastry* připravené při pH 4,5. Ve druhém vzorku byla koncentrace vitamínů: 1,4634 mg.100 g⁻¹ B₅ a 1,1329 mg.100 g⁻¹ B₆.

Tab. 11: Výsledky měření vzorků Bystřického tvarohu při pH 4,5 a 6,0

Vitamín	Plocha píku A [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace vitamínu [µg.ml ⁻¹]	Koncentrace vitamínu [mg.100 g ⁻¹] ± S.D.*
pH 4,5			
B ₃	67,50	0,9080	1,8641 ± 0,0013
B ₅	17,70	0,4352	0,8933 ± 0,0013
B ₆	23,20	0,5112	1,0495 ± 0,0010
pH 6,0			
B ₃	96,00	1,2469	2,5571 ± 0,0009
B ₅	18,60	0,4858	0,9962 ± 0,0012
B ₆	23,55	0,5182	1,0627 ± 0,0010

* S.D. – směrodatná odchylka

Při extrakci vitamínů sk. B ze vzorku Bystřického tvarohu byla zjištěna vyšší koncentrace vitamínů při přidavku *clara-diastry* připravené při pH 6,0. Vitamín B₃ měl koncentraci 2,5571 mg.100 g⁻¹, vitamín B₅ 0,9962 mg.100 g⁻¹ a vitamín B₆ 1,0627 mg.100 g⁻¹.

Tab. 12: Výsledky měření vzorků Ementálu při pH 4,5 a 6,0

Vitamín	Plocha píku A [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace vitamínu [µg.ml ⁻¹]	Koncentrace vitamínu [mg.100 g ⁻¹] ± S.D.*
pH 4,5			
B ₃	65,50	1,2469	2,5571 ± 0,0015
B ₅	30,50	0,4858	0,9962 ± 0,0012
B ₆	21,20	0,5182	1,0627 ± 0,0012
pH 6,0			
B ₃	75,50	1,0032	2,0672 ± 0,0013
B ₅	72,00	0,3489	0,7189 ± 0,0014
B ₆	22,10	0,4893	1,0083 ± 0,0010

* S.D. – směrodatná odchylka

Extrakce vitamínů sk. B ze vzorků Ementálu byla výhodnější u prvního vzorku. Vitamíny B₃ (2,5571 mg.100 g⁻¹) a B₆ (1,0627 mg.100 g⁻¹) měly v prvním vzorku průměrnou koncentraci vyšší než ve druhém. Jen vitamín B₅ měl průměrnou koncentraci ve druhém vzorku koncentraci vyšší, a to 7,1887 mg.100 g⁻¹.

5.5 Výsledky extrakce vitamínů sk. B ze vzorků: 30% Eidam, Hermelín

Extrakce vitamínů sk. B u vzorků 30% Eidam a Hermelín byla provedena podle návodu v kapitole 4.4.3. Na rozdíl od předešlých vzorků, byla zde snížena navážka a přídavek *clara-dia*stázy (připravené při pH 4,5 a 6,0), přídavek *fromázy* se nezměnil. K inaktivaci enzymů byl použit záhřev vzorků ve vodní lázni. Získané filtráty byly použity pro chromatografickou analýzu popsanou v kapitole 4.6. Každý vzorek byl pětkrát analyzován (viz chromatogramy 6 a 7 v příloze VI a VII).

V tabulkách 14 a 15 jsou uvedeny průměrné hodnoty pěti měření ploch píků při pH 4,5 a 6,0. Plochy píků byly přepočítány pomocí příslušných rovnic kalibračních křivek na koncentraci [$\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$] vitamínů ve vzorcích a převedeny na mg.100 g⁻¹ sýra.

Tab. 13: Výsledky měření vzorků 30% Eidamu

Vitamín	Plocha píku A [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace vitamínu [$\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace vitamínu [mg.100 g ⁻¹] \pm S.D.*
pH 4,5			
B ₃	x	x	x
B ₅	20,10	0,5701	2,7924 \pm 0,0012
B ₆	25,33	0,5738	2,7123 \pm 0,0013
pH 6,0			
B ₃	x	x	x
B ₅	10,30	0,0191	0,0934 \pm 0,0009
B ₆	26,80	0,5831	2,8589 \pm 0,0011

* S.D. – směrodatná odchylka

Ve vzorcích 30% Eidamu se nepodařilo detekovat vitamín B₃ v žádném ze vzorků. Průměrná koncentrace vitamínů B₅ (2,7924 mg.100 g⁻¹) a B₆ (2,7123 mg.100 g⁻¹) byla vyšší, když byla přidána *clara-dia*stáza připravená při pH 4,5, lze tudíž předpokládat lepší hydrolyzu vzorku.

Tab. 14: Výsledky měření vzorků Hermelínu

Vitamín	Plocha píku A [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace vitamínu [µg.ml ⁻¹]	Koncentrace vitamínu [mg.100 g ⁻¹] ± S.D.*
pH 4,5			
B ₃	x	x	x
B ₅	x	x	x
B ₆	29,00	0,627	3,1272 ± 0,0011
pH 6,0			
B ₃	x	x	x
B ₅	26,62	0,9367	4,6063 ± 0,0012
B ₆	25,51	0,5573	2,7407 ± 0,0012

* S.D. – směrodatná odchylka

Ve vzorcích Hermelínu se nepodařilo detekovat vitamín B₃ v obou případech a vitamín B₅ ve vzorcích s přidavkem *clara-diaštázy* připravené při pH 4,5. U ostatních vitamínů byla detekována poměrně vysoká průměrná koncentrace. Vitamín B₆ měl koncentraci 3,1272 mg.100 g⁻¹ (*clara-diaštáza* při pH 4,5) a 2,7407 mg.100 g⁻¹ (*clara-diaštáza* při pH 6,0). Vitamín B₅ měl průměrnou koncentraci 4,6063 mg.100 g⁻¹ (*clara-diaštáza* při pH 6,0).

Obecně se dá říci, že koncentrace vitamínů sk. B u plísňových sýrů je vyšší než u jiných druhů. Vliv na to má produkce vitamínů sk. B samotnými plísněmi.

5.6 Výsledky extrakce vitamínů sk. B ze vzorků: Niva, Vltavín, Pivní sýr, Pološtiepok, Balkánský sýr, Jadel

Extrakce vitamínů sk. B z uvedených vzorků, byla provedena podle návodu uvedeného v kapitole 4.4.4. Ke snížené navážce vzorků byla ještě přidána 0,1 mol.dm⁻³ HCl a vše bylo zahřáto ve vodní lázni. Byla přidána *fromáza* a *clara-diaštáza* ke vzorkům s upraveným pH na hodnotu 6,0. Získané filtráty byly použity pro chromatografickou analýzu, podle postupu v kapitole 4.6. Každý filtrát byl analyzován pětkrát (viz chromatogramy 8 – 13 v přílohách VIII - XIII).

V tabulkách 16 – 21 jsou uvedeny průměrné hodnoty pěti měření ploch píků. Plochy píků byly přepočítány pomocí příslušných rovnic kalibračních křivek na koncentraci [µg.ml⁻¹] vitamínů ve vzorcích a převedeny na mg.100 g⁻¹ sýra.

Tab. 15: Výsledky měření vzorku Nivy

Vitamín	Plocha píku A [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace vitamínu [μg.ml ⁻¹]	Koncentrace vitamínu [mg.100 g ⁻¹] ± S.D.*
B₃	24,75	0,3997	1,9929 ± 0,0008
B₅	21,42	0,6443	3,2123 ± 0,0012
B₆	31,69	0,6807	3,3935 ± 0,0013

* S.D. – směrodatná odchylka

Průměrná koncentrace ve vzorku Nivy byla u vitamínu B₃ 1,9929 mg.100 g⁻¹. U vitamínů B₅ (3,2123 mg.100 g⁻¹) a B₆ (3,3935 mg.100 g⁻¹) byla analyzována hodně vysoká průměrná koncentrace.

Také zde je nutno zmínit přítomnost plísní, které produkují vlastní vitamíny sk. B a zvyšují tak celkovou koncentraci ve vzorku.

Tab. 16: Výsledky měření vzorku Vltavínu

Vitamín	Plocha píku A [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace vitamínu [μg.ml ⁻¹]	Koncentrace vitamínu [mg.100 g ⁻¹] ± S.D.*
B₃	45,00	0,6405	3,1848 ± 0,0014
B₅	16,90	0,3902	1,9400 ± 0,0012
B₆	28,90	0,6250	3,1077 ± 0,0010

* S.D. – směrodatná odchylka

Ve vzorku sýru Vltavín byla detekována poměrně vysoká průměrná koncentrace vitamínů B₃ (3,1848 mg.100 g⁻¹) a B₆ (3,1077 mg.100 g⁻¹). Průměrná koncentrace vitamínu B₅ byla 1,9400 mg.100 g⁻¹.

I tento sýr obsahuje plísně, dokonce dva druhy, a ty se podílejí na produkci vlastních vitamínů sk. B.

Tab. 17: Výsledky měření vzorku Pivního sýra

Vitamín	Plocha píku A [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace vitamínu [μg.ml ⁻¹]	Koncentrace vitamínu [mg.100 g ⁻¹] ± S.D.*
B₃	x	x	x
B₅	19,96	0,5622	2,7700 ± 0,0012
B₆	34,55	0,7278	3,6347 ± 0,0013

* S.D. – směrodatná odchylka

Při extrakci vitamínů sk. B ve vzorku Pivního sýra se nepodařilo detekovat vitamín B₃. Průměrná koncentrace vitamínu B₅ byla 2,7700 mg.100 g⁻¹. U vitamínu B₆ byla analyzována dosti vysoká koncentrace, průměrná hodnota činila 3,6347 mg.100 g⁻¹.

Tab. 18: Výsledky měření vzorku Polooštiepok

Vitamín	Plocha píku A [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace vitamínu [μg.ml ⁻¹]	Koncentrace vitamínu [mg.100 g ⁻¹] ± S.D.*
B ₃	14,70	0,2803	1,3912 ± 0,0014
B ₅	15,50	0,3114	1,5460 ± 0,0012
B ₆	22,13	0,4899	2,4319 ± 0,0012

* S.D. – směrodatná odchylka

Extrakcí vitamínů sk. B ve vzorku Polooštiepok byla detekována průměrná koncentrace vitamínů B₃ (1,3912 mg.100 g⁻¹), B₅ (1,5460 mg.100 g⁻¹) a B₆ (2,4319 mg.100 g⁻¹).

Tab. 19: Výsledky měření vzorku Balkánský sýr

Vitamín	Plocha píku A [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace vitamínu [μg.ml ⁻¹]	Koncentrace vitamínu [mg.100 g ⁻¹] ± S.D.*
B ₃	x	x	x
B ₅	13,60	0,2046	1,0086 ± 0,0008
B ₆	x	x	x

* S.D. – směrodatná odchylka

Ve vzorku Balkánského sýra se nepodařilo analyzovat vitamíny B₃ a B₆. Byl detekován pouze vitamín B₅ a jeho průměrná koncentrace činila 1,0086 mg.100 g⁻¹.

Tab. 20: Výsledky měření vzorku Jadel

Vitamín	Plocha píku A [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace vitamínu [μg.ml ⁻¹]	Koncentrace vitamínu [mg.100 g ⁻¹] ± S.D.*
B ₃	33,35	0,502	2,4813 ± 0,0015
B ₅	93,00	0,4669	2,3080 ± 0,0010
B ₆	x	x	x

* S.D. – směrodatná odchylka

Při extrakci vitamínů sk. B ve vzorku síru Jadel byla detekována průměrná koncentrace vitamínu B₃ (2,4813 mg.100 g⁻¹). Velice vysoká průměrná koncentrace byla analyzována u vitamínu B₅, tato hodnota činila 23,0797 mg.100 g⁻¹. A vitamín B₆ se naopak stanovit nepodařilo.

U některých vzorků byl detekován i vitamín B₁, ale jeho množství bylo tak malé, že jej nebylo možné stanovit. Vysvětlením je buď nevhodně zvolená metoda, nebo příliš nízká koncentrace vitamínu ve vzorcích. Metoda byla ověřena metodou standardního přídávku.

Během experimentu se metoda extrakce vyvíjela a postupně se tak zlepšovala čistota eluátů pro následující analýzu na HPLC. Pro zlepšení efektu extrakce bych však doporučila zařadit SPE – extrakci na pevnou fázi. Tento separační proces je využíván před nástřikem do HPLC. Dochází ke zkoncentrování analytu a také se tím usnadní analýza. Jsou odstraněny interferující nečistoty, které také snižují životnost analytické kolony nebo celého chromatografického systému.

Separální extrakční proces SPE zahrnuje kapalnou a pevnou fázi. Pevná fáze má vyšší afinitu k žádané látce než k rozpouštědлу, v kterém je analyt rozpuštěn – analyt zůstává a koncentruje se na povrchu a nečistoty jsou vymývány pryč.

Obvyklý postup pro SPE:

- Pevná fáze je promyta nepolárním rozpouštědlem, to smočí povrch a prostoupí pevnou fází a ta je aktivována. Aktivační činidlo závisí na povaze pevné látky.
- Vzorek je nanesen na pevnou fázi a působením gravitace jí prostoupí. Dojde k selektivnímu zachycení analytu na pevné fázi.
- Když vzorek prochází přes pevnou fázi, analyty ze vzorku se zachycují na sorbentu, mezitím rozpouštědlo a ostatní látky (nečistoty) procházejí skrz pevnou fázi pryč.
- Pevná fáze je pak promyta pufrům nebo rozpouštědlem k odstranění úpornějších nečistot.
- Analyt zachycený v pevné fázi je eluován ve specifickém rozpouštědle nebo pufru.
- Získaný eluát je použit pro vlastní separaci v chromatografickém systému.

V některých studiích zabývajících se stanovením vitamínů sk. B, byla využita právě SPE extrakce. Například při stanovení vitamínů v Tarhaně, tradičním tureckém chlebu, byla využita SPE s náplní Sep-Pak C₁₈ (500 mg) [58].

V další studii [59], extrakce ve vodě rozpustných látek ze sýrů, byla využita SPE-C₁₈ s náplní acetonitrilu (5 ml) a deionizovanou vodou (10 ml).

NIELSEN K. F. a kol. pro extrakci ze sýru s modrou plísní a podobných typů sýrů, použili SPE s nábojnicemi obsahující 1 cm³ silica gel 60 pevně vázaný mezi 2 disky z 3 mm Vyon Sheet (pórovitý lineární polyetylen) v 5 ml stříkačkách [60].

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce byla optimalizace extrakčního postupu vitamínů skupiny B v mléčných výrobcích se zaměřením na sýry.

Vitamíny skupiny B, ve vodě rozpustné látky, jsou nezbytné pro správné fungování organismu. Podporují růst a proto jsou velmi důležité pro děti. Mají pozitivní vliv na kvalitu pokožky, vlasů a nehtů, pomáhají léčit kožní onemocnění. Dále se podílejí na metabolismu cukrů, tuků a bílkovin. Mohou zpomalovat proces předčasného stárnutí. A podporují krve tvorbu, tím předchází chudokrevnosti.

Mezi hlavní živočišné zdroje těchto vitamínů patří všechny druhy mas (hovězí, vepřové, kuřecí) a vnitřnosti., dále jsou to ryby, kvasnice, vejce a samozřejmě mléko a mléčné výrobky, tedy sýry, tvarohy, máslo apod. K rostlinným zdrojům můžeme zařadit celozrnné výrobky, ořechy, semínka, také ovoce, zelenina i luštěniny.

Pro chromatografické stanovení vitamínů B₃, B₅ a B₆ v mléčných výrobcích byla využita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie HPLC. K separaci byla použita kolona SUPELCOLSIL LC8 [150 x 4,6 mm; 5 μm]. Mobilní fáze se skládala z 0,1 mol.dm⁻³ dihydrogenfosforečnanu draselného (na pH 7,0 upraveného pomocí NaOH) a metanolu v poměru 90:10. Eluce byla izokratická. Průtok mobilní fáze byl 1 ml.min⁻¹. Signál byl snímán detektorem UV/VIS DAD při vlnových délkách 204 nm a 220 nm.

Pro analýzu byly vybrány vzorky sýrů a tvarohu běžně dostupných v obchodní síti. Výběr vzorků byl volen podle rozdělení technologických principů výroby jednotlivých druhů sýrů. Měkké nezrající sýry – Lučina, Gervais, měkké zrající sýry: sýry zrající v chladu - Pivní sýr, plísňové sýry - Hermelín, Niva, Vltavín, pařený sýr – Polooštiepok, sýry zrající v solném nálevu – Balkánský sýr, Jadel. Tvrdé sýry s nízkodohřívavou sýřeninou – 30% Eidam, sýry s vysokodohřívavou sýřeninou – Ementál. Mezi kyselé sýry patří Bystřický tvaroh.

Všechny vzorky byly hydrolyzovány pomocí enzymů *fromázy* a *clara-diaféazy*. *Clara-diaféaza* byla připravena při pH 4,5 a 6,0. Jen u vzorků v poslední metodě (kapitola 5.5), proběhla extrakce pouze při pH 6,0, protože se ukázalo, že optimální pH přípravy je právě 6,0 a nebylo třeba stanovení při pH 4,5. Při pH 6,0 byly detekovány kvantitativní koncentrace vitamínů.

Obecně se obsah vitamínu B₃ ve všech sýrech pohyboval mezi hodnotami 0,9509 – 3,1848 mg.100 g⁻¹. Nejvyšší obsah byl stanoven ve Vltavínu. Průměrná koncentrace vitamínu B₃ v sýrech však byla okolo 2 – 2,5 mg.100 g⁻¹. Mezi sýry s vyšší koncentrací toho vitamínu patří Vltavín, Bystřický tvaroh, Jadel a Ementál.

Obsah vitamínu B₅ byl stanoven v rozmezí od 0,7189 do 4,6063 mg.100 g⁻¹. Maximální hodnota byla analytována u Hermelínu. Průměrně se však koncentrace vitamínu pohybovala mezi 1,5 – 2,7 mg.100 g⁻¹. Jen Niva vykazovala vyšší koncentraci nad 3,2 mg.100 g⁻¹. Tedy k sýrům s vyšší koncentrací vitamínu B₅ se řadí Hermelín, Niva, Pivní sýr a Jadel.

Vitamín B₆ měl rozsah koncentrace v sýrech mezi hodnotami 1,0083 – 3,6347 mg.100 g⁻¹. Nejvyšší obsah byl stanoven v Pivním sýru. Průměrná koncentrace však byla spíše nižší, pohybovala se v mezích od 1 do 2,5 mg.100 g⁻¹. Mimo Vltavín (3,4 mg.100 g⁻¹) a Hermelín (2,7 mg.100 g⁻¹), ty měly průměrně vyšší obsah vitamínu B₆. Mezi sýry s větším obsahem tohoto vitamínu patří Pivní sýr, Vltavín, Hermelín a Polooštiepok.

Celkově se dá říci, že Hermelín, Vltavín, Niva, Pivní sýr a Jadel, obsahují vysoké množství vitamínů skupiny B. U plísňových sýrů se předpokládá, že v důsledku přítomnosti plísní, bude koncentrace vitamínů skupiny B vyšší. Plísně jsou totiž schopny “tvořit” tyto vitamíny jako produkty svého metabolismu. Tato teorie se tedy potvrdila.

Pro zlepšení extrakce vitamínů bylo ještě navrženo zařadit, před chromatografické stanovení, metodu SPE – extrakci pevnou fází.

Mléko a mléčné výrobky obsahují velmi cenné vitamíny, nejen vitamíny sk. B, a minerální látky (např. vápník, fosfor), proto by měli být často zařazovány do našeho jídelníčku.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 2*, OSSIS, Tábor 1999
- [2] DAVÍDEK, J. a kol. *Chemie potravin*, SNTL/ALFA, Praha 1983
- [3] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D., BUDÍNSKÝ, P. *Potravinářská biochemie II*, skriptum UTB Academia centrum Zlín, Zlín 2006
- [4] BLATNÁ, J., BUDĚŠÍNSKÝ, Z. a kol. *Vitamíny, jejich chemie a biochemie*, Nakladatelství československé akademie věd, Praha 1961
- [5] FRANCIS, F. J. *Wiley Encyclopedia of Food Science and Technology*, 2nd edition, Johl Wiley and Sons, 1999
- [6] Dostupné na: <http://pi.oregonstate.edu/infocenter/vitamins/>
- [7] Dostupné na: <http://cs.wikipedia.org/wiki/B-komplex>
- [8] CABALARO, G. *Encyclopedia of human nutrition*, Second edition, Oxford 2005
- [9] Dostupné na:
http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=nikotinamidadenindinukleotid
- [10] GAUDINEAU, C., AUCLAIR, K. Inhibitor of human P450 enzymes by nicotinic acid and nikotinamide, *Department of Chemistry, McGill University, Canada* 2004
- [11] UNGEROVÁ-GÖBOLOVÁ, V. *Vitamíny, účinné látky podporující zdraví*, Mnichov 1997
- [12] HOFFMANN, G. F. *Dědičné metabolické poruchy*, Grada Publishing a. s. 2006
- [13] Dostupné na: <http://vitainfo.cz/eshop/detail.php?idzb=262>
- [14] AGERBO, P., ANDERSEN, H. F. *Vitamíny a minerály pro zdravý život*, Fenosan 1996
- [15] Dostupné na: <http://vitainfo.cz/eshop/detail.php?idzb=264>
- [16] Dostupné na:
http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=kyselina_pantothenova
- [17] Studie: ŽÁK, A. *Klinický význam hyperhomocysteinémie*, IV. Interní klinika 1. LF UK a VFN, Praha, dostupné na: www.lfhk.cuni.cz/pfspol/athero/HOMOCYSTEIN.doc

[18] Dostupné na:

<http://www.lekarna.cz/pyridoxin-leciva-inj-5x1ml-50mg-injekcni-roztok/>

[19] Dostupné na: http://new.bbc.co.uk/2/hi/health/medical_notes/91597.stm

[20] Dostupné na: <http://vitainfo.cz/eshop/detail.php?idzb=263>

[21] GAJDŮŠEK, S. *Laktologie*, skriptum MZLU v Brně, 2003

[22] HRABĚ, J., BŘEZINA, P., VALÁŠEK, P. *Technologie výroby potravin živočišného původu*, skriptum UTB Academia centrum Zlín, Zlín 2006

[23] DOLEŽAL, O. *Mléko, dojení, dojírna*, Agrospoj, Praha 2000

[24] Dostupné na: home.zf.jcu.cz/~samkova/eamos-1/slozeni1.doc

[25] FORMAN, L. *Mlékárenská technologie II*, VŠCHT, Praha 1994

[26] TAMINE, A. Y. *Structure of Dairy Products*, Blackwell Publishing, 2007

[27] HOUŠKA, M. *Mléko, mléčné výrobky a polotovary*, Výzkumný ústav potravinářského průmyslu, Praha 1991

[28] GAJDŮŠEK, S. *Mlékařství II (cvičení)*, skriptum MZLU v Brně, 1999

[29] Dostupné na:

http://www.fzv.cz/web/fzv-poskytuje/tiskovemeterialy/cesky_fenomen/syry_vyznam

[30] Dostupné na: <http://www.ordinace.cz/clanek/mleko-ano-ci-ne/>

[31] Dostupné na: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Kalciferol>

[32] Dostupné na internetových stránkách Ministerstva vnitra České republiky:

- zákon 332/2008 sb. O veterinární péči:

<http://www.mvcr.cz/clanek/sbirka-zakonu-stejnopisy-sbirky-zakonu.aspx>,

- vyhláška 273/2000 sb., která stanoví nejvyšší přípustné zbytky veterinárních léčiv

<http://aplikace.mvcr.cz/archiv2008/sbirka/2000/sb079-00.pdf>

[33] Dostupné na internetových stránkách Ministerstva vnitra České republiky

-zákon 224/2008 sb. O potravinách a tabákových výrobcích

<http://www.mvcr.cz/clanek/sbirka-zakonu-stejnopisy-sbirky-zakonu.aspx>

- vyhláška 203/2003 sb. O veterinárních požadavcích na mléko a mléčné výrobky, ...
<http://aplikace.mvcr.cz/archiv2008/sbirka/2003/sb073-03.pdf>
- vyhláška 77/2003 sb., která stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, ...
<http://aplikace.mvcr.cz/archiv2008/sbirka/2003/sb032-03.pdf>
- [34] ČEJNA, V., MLČEK, J., CHLÁDEK, G. *Posouzení vhodnosti mléka k výrobě sýrů z hlediska vlivu plemenné příslušnosti dojnice*, MZLU v Brně, 2006
- [35] KOUŘIMSKÁ, L., BABIČKA, L., POUSTKOVÁ, I. *Praktikum pro faremní zpracovatele mléka (Seminář pro praxi), Výroba sýrů*, Česká zemědělská univerzita v Praze, 2006
- [36] ČERNÝ, V. *Výroba sýrů*, MILCOM, a. s., Výzkumný ústav mlékárenský Praha, pracoviště Tábor, 2006
- [37] Dostupné na: http://www.madeta.cz/assets/files/Skola_syru/3.rozdeleni_syru.pdf,
- [38] Dostupné na: <http://aplikace.mvcr.cz/archiv2008/sbirka/2003/sb032-03.pdf>
- [39] TEPLÝ, M. a kol. *Výroba sýrů, kaseinů a kaseinátů*, SNTL/ALFA, Praha 1985
- [40] OLŠANSKÝ, Č., KNĚZ, V. *Výroba tvrdých sýrů eidamského a ementálského typu*, ČAZ, VÚPP Praha, 1971
- [41] FOX, P. F., McSWEENEY, P. L. H., COGAN, T. M., GUINEE, T. P. *Cheese – Chemistry, Physics and Microbiology*, 3rd edition, Elsevier, 2004
- [42] ZAJKOVSKIJ, A. S. *Chemie a fyzika mléka a mléčných výrobků*, SNTL, Praha 1960
- [43] FOX, P. F., GUINEE, T. P., COGAN, T. M., McSWEENEY, P. L. H. *Fundamentals of Cheese Science*, Springer – Verlag, 2000
- [44] INBURG, A. *Lexikon sýrů: výroba, původ, druhy, chuť*, Rebo Production, 2004
- [45] WEIMER, P., BART, C. *Improving the flavor of Cheese*, Woodhead Publishing, 2007
- [46] KARDOŠ, E., BEREK, D. *Základy kapalinové chromatografie*, ALFA, Bratislava 1978
- [47] ARMAREGO, W. L. F., CHAR, C. L. L. *Purification of Laboratory Chemicals*, 5th edition, Elsevier Science, USA 2003

- [48] Dostupné na: <http://hplc.sweb.cz>
- [49] Dostupné na: www.usf.cz/soubory/fytochemie_uvod.doc
- [50] DEAN, J. A. *Chemické dělicí metody*, SNTL, Praha 1974
- [51] Dostupné na: <http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>
- [52] Dostupné na: http://is.muni.cz/th/195604/prif_b/Bakalarska_prace.txt
- [53] Dostupné na: <http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10049064> (obrázky)
- [54] Dostupné na: <http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10049068> (obrázky)
- [55] CHURÁČEK, J. a kol. *Analytická separace látek*, 1. Vydání, SNTL, Praha 1990
- [56] KOMÁREK, K. a kol. *Reakční chromatografie v organické analýze*, 1. Vydání, SNTL, Praha 1989
- [57] Nové typy HPLC kolon SUPELCO, In *Novinky Sigma Aldrich*, 2005
- [58] EKINCI, R., KADAKAL, C. Determination of Seven Water-soluble Vitamins in Tarhana, a Traditional Turkish Cereal Food, by High-Performance Liquid Chromatography, Pamukkale University, College of Engineering, Department of Food Engineering, Camlik, Denizli, 20020, Turkey, *Journal Article – ACTA Chromatographica No. 15. 2005*
- [59] MANETTA, A. C., Di GIUSEPPE, L. a kol. High-performance liquid chromatography with post-column derivatisation and fluorescence detection for sensitive determination of aflatoxin M₁ in milk and cheese, Department of Food nad Feed Science, University of Teramo, Viale f. Crispi 212, 64100 Teramo, Italy, *Journal Article 2005*
- [60] NIELSEN, K. F. a kol. Andrastins A – D, Penicillium roqueforti Metabolites Consistently produced in Blue-Mold-Ripened Cheese, Center for Microbial Biotechnology, BioCentrum-DTU, Technical University of Denmark, Building 221, DK-2800 Kgs. Lyngby, Denmark, *Journal Article - J. Agric. Food Chem., 2005*

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
TMP	Thiaminmonofosfát
TTP	Thiamintrifosfát
TDP	Thiamindifosfát
FMN	Flavinmononukleotid
FAD	Flavinadenindinukleotid
NAD	Nikotinaminadenindinukleotid
NADP	Nikotinaminadenindinukleotidfosfát
DNA	Kyselina deoxyribonukleová
VLDL	Very Low-Density Lipoprotein – lipoproteiny o velmi nízké hustotě
LDL	Low-Density Lipoprotein – lipoproteiny o nízké hustotě
DDD	Doporučená denní dávka
CoA	Koenzym A (také CoASH)
ACP	Acyl-Carrier Protein
NPN	Nebílkovinné dusíkaté látky
MK	Mastné kyseliny
t.vs.	Tuk v sušině
UHT	Ultra-High Temperature – ultratepelné ošetření (mléka)
ČMK	Čisté mlékařské kultury
UV	Oblast ultrafialového spektra
VIS	Oblast viditelného spektra
IR	Oblast infračerveného spektra
TCA	Kyselina trichlóroctová

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Rozdělení a zastoupení základních dusíkatých látek kravského mléka.....	23
Obr. 2: Spojení submicel.....	24
Obr. 3: Příčný řez submicelou, čárkovaně je vyznačena hydrofobní část.....	24
Obr. 4: Tuková kapénka.....	27
Obr. 5: Chromatografické uspořádání pro izokratickou eluci.....	51
Obr. 6: Chromatografické uspořádání pro gradientovou eluci.....	51
Obr. 7: Dávkovací kohouty.....	52
Obr. 8: Stavba chromatografické kolony.....	53
Obr. 9: Ukázky chromatografických kolon.....	53
Obr. 10: Chromatografická aparatura, na které byla provedena analýza vzorků sýrů.....	55

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Obsah energie, hlavních živin a vybraných minerálních látek v přírodních a tavených sýrech.....	29
Tab. 2: Rozdělení chromatografických metod podle principu separace.....	49
Tab. 3: Plochy píků vitamínu B ₁	64
Tab. 4: Plochy píků vitamínu B ₃	65
Tab. 5: Plochy píků vitamínu B ₅	67
Tab. 6: Plochy píků vitamínu B ₆	68
Tab. 7: Rovnice kalibračních křivek vitamínů sk. B.....	70
Tab. 8: Výsledky měření vzorků 30% Eidam při pH 4,5 a 6,0.....	70
Tab. 9: Výsledky měření vzorků Lučina při pH 4,5 a 6,0.....	71
Tab. 10: Výsledky měření vzorků Gervais při pH 4,5 a 6,0.....	72
Tab. 11: Výsledky měření vzorků Bystřického tvarohu při pH 4,5 a 6,0.....	72
Tab. 12: Výsledky měření vzorků Ementálu při pH 4,5 a 6,0.....	73
Tab. 13: Výsledky měření vzorků 30% Eidamu.....	74
Tab. 14: Výsledky měření vzorků Hermelínu.....	74
Tab. 15: Výsledky měření vzorku Nivy.....	75
Tab. 16: Výsledky měření vzorku Vltavínu.....	75
Tab. 17: Výsledky měření vzorku Pivního sýra.....	76
Tab. 18: Výsledky měření vzorku Polooštiepok.....	76
Tab. 19: Výsledky měření vzorku Balkánský sýr.....	76
Tab. 20: Výsledky měření vzorku Jadel.....	77

SEZNAM GRAFŮ

- Graf 1: Kalibrační křivka vitamínu B₁ s rovnicí regrese (při vlnové délce 220 nm).....65
- Graf 2: Kalibrační křivka vitamínu B₃ s rovnicí regrese (při vlnové délce 204 nm).....66
- Graf 3: Kalibrační křivka vitamínu B₅ s rovnicí regrese (při vlnové délce 204 nm).....68
- Graf 4: Kalibrační křivka vitamínu B₆ s rovnicí regrese (při vlnové délce 220 nm).....69

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha I: Chromatogram 1 - stanovení vitamínů sk. B v 30% Eidamu (12g)

Příloha II: Chromatogram 2 – stanovení vitamínů sk. B v Lučině

Příloha III: Chromatogram 3 – stanovení vitamínů sk. B v Bystřickém tvarohu

Příloha IV: Chromatogram 4 – stanovení vitamínů sk. B v Ementálu

Příloha V: Chromatogram 5 – stanovení vitamínů sk. B v Gervais

Příloha VI: Chromatogram 6 – stanovení vitamínů sk. B v 30% Eidamu (5g)

Příloha VII: Chromatogram 7 – stanovení vitamínů sk. B v Hermelínu

Příloha VIII: Chromatogram 8 – stanovení vitamínů sk. B v Nivě

Příloha IX: Chromatogram 9 – stanovení vitamínů sk. B ve Vltavínu

Příloha X: Chromatogram 10 – stanovení vitamínů sk. B v Pivním sýru

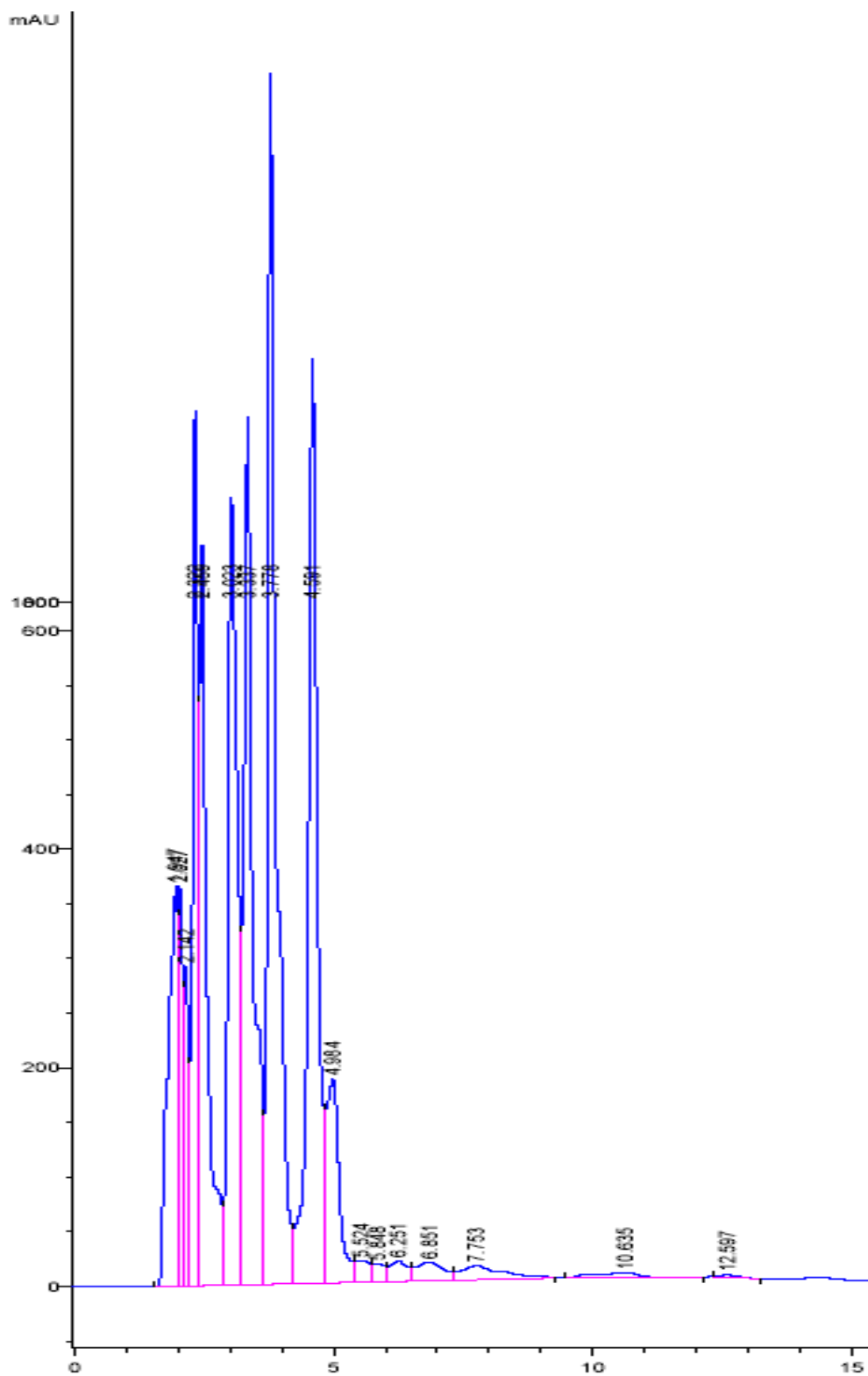
Příloha XI: Chromatogram 11 – stanovení vitamínů sk. B v Polooštiepku

Příloha XII: Chromatogram 12 – stanovení vitamínů sk. B v Balkánském sýru

Příloha XIII: Chromatogram 13 – stanovení vitamínů sk. B v Jadelu

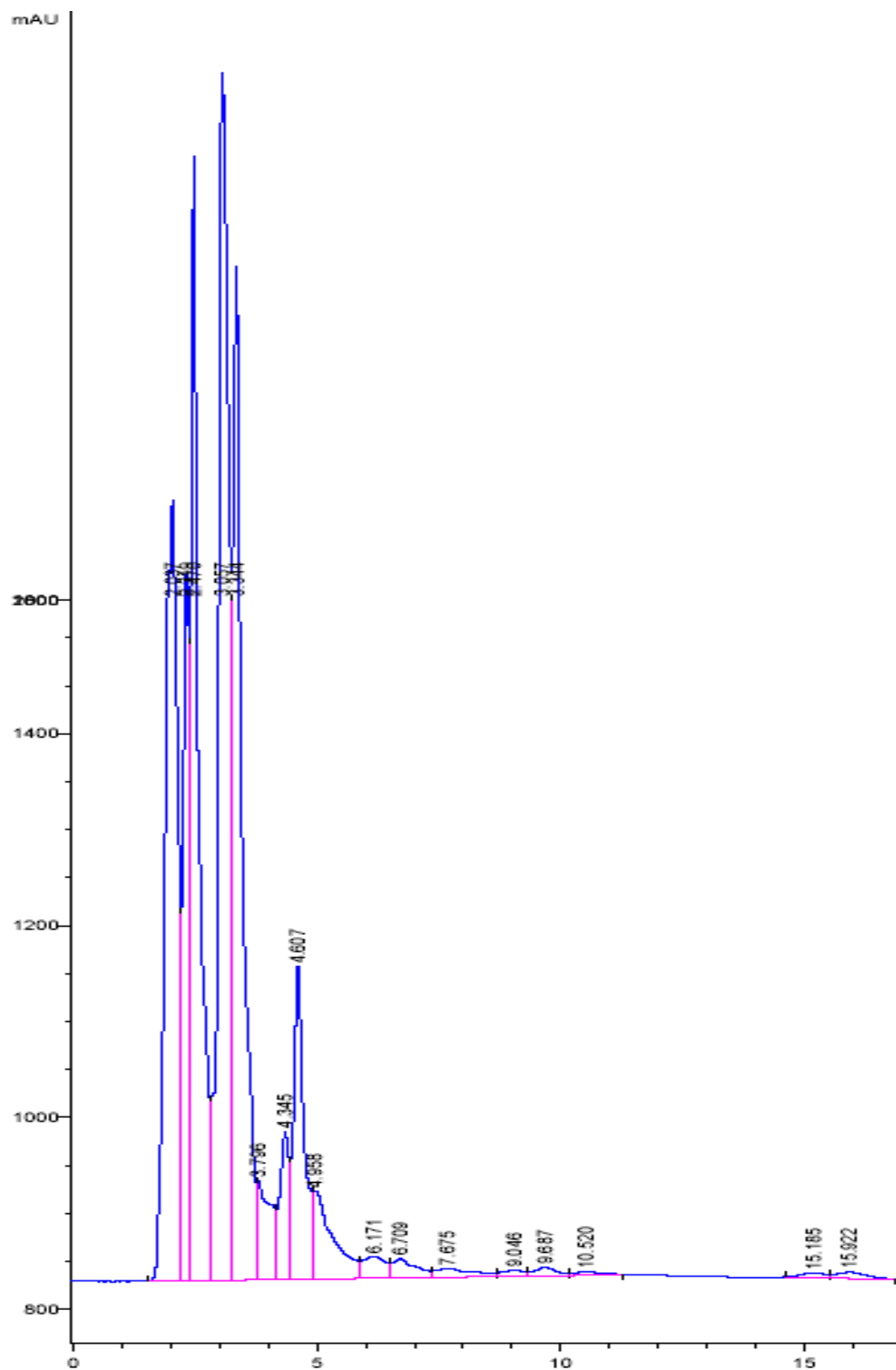
PŘÍLOHA PI: CHROMATOGRAM 1 - STANOVENÍ VITAMÍNŮ SK. B V 30% EIDAMU (12G)

(pH 4,5, vlnová délka 220 nm)

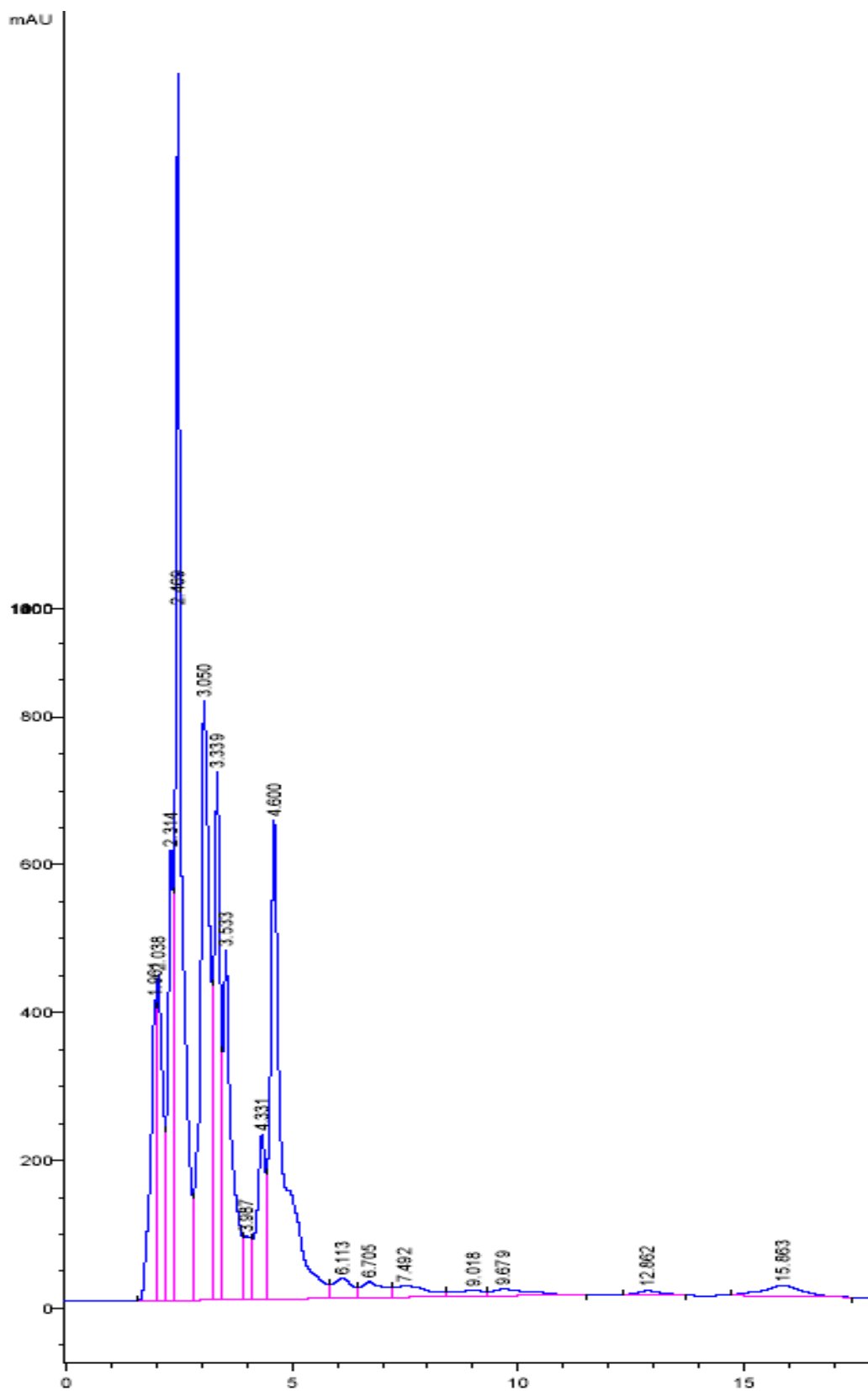


PŘÍLOHA II: CHROMATOGRAM 2 - STANOVENÍ VITAMÍNŮ SK. B V LUČINĚ

(pH 6,0, vlnová délka 204 nm)

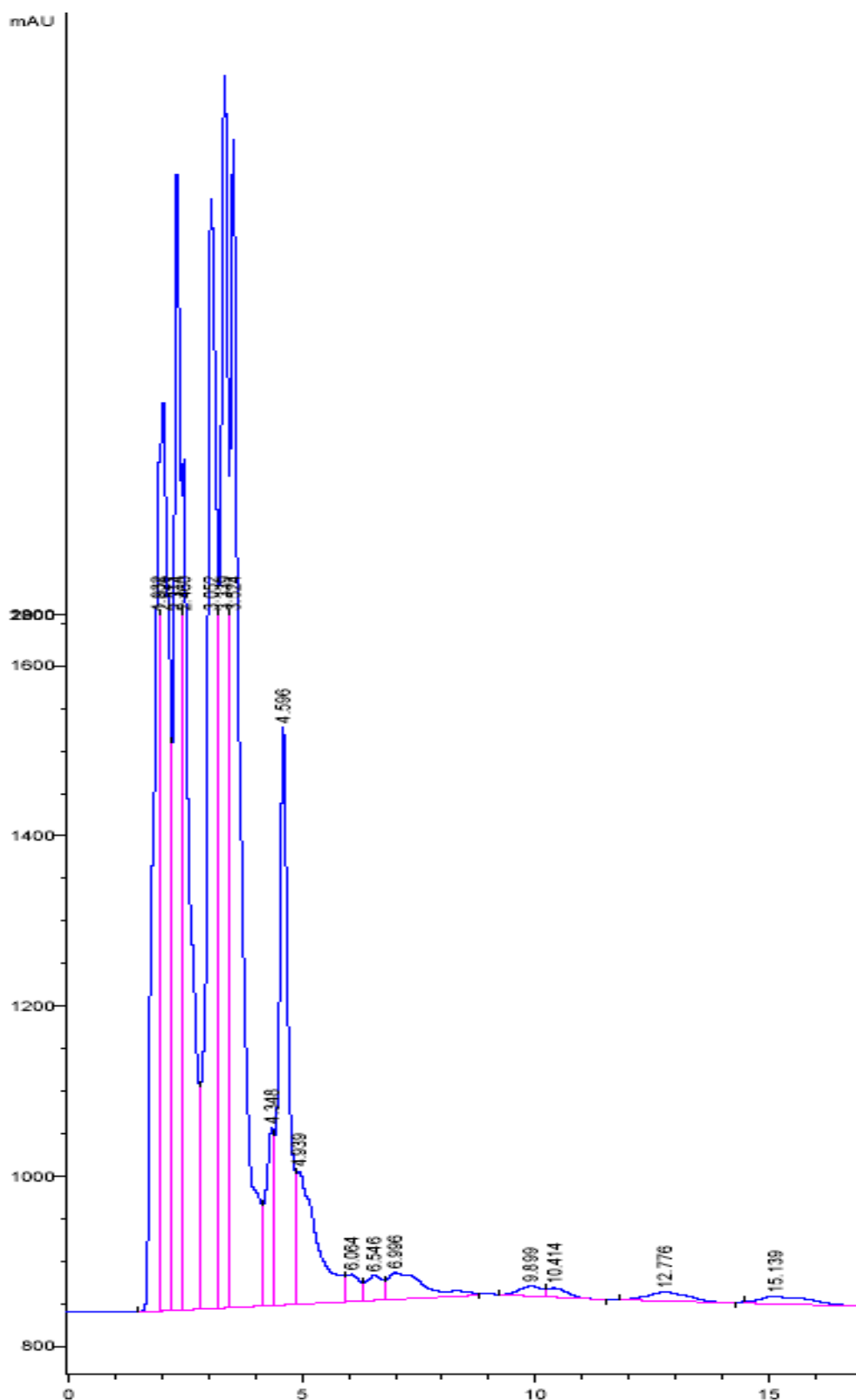


**PŘÍLOHA III: CHROMATOGRAM 3 - STANOVENÍ VITAMÍNU SK.
B V BYSTRICKÉM TVAROHU (pH 4,5, vlnová délka 220 nm)**

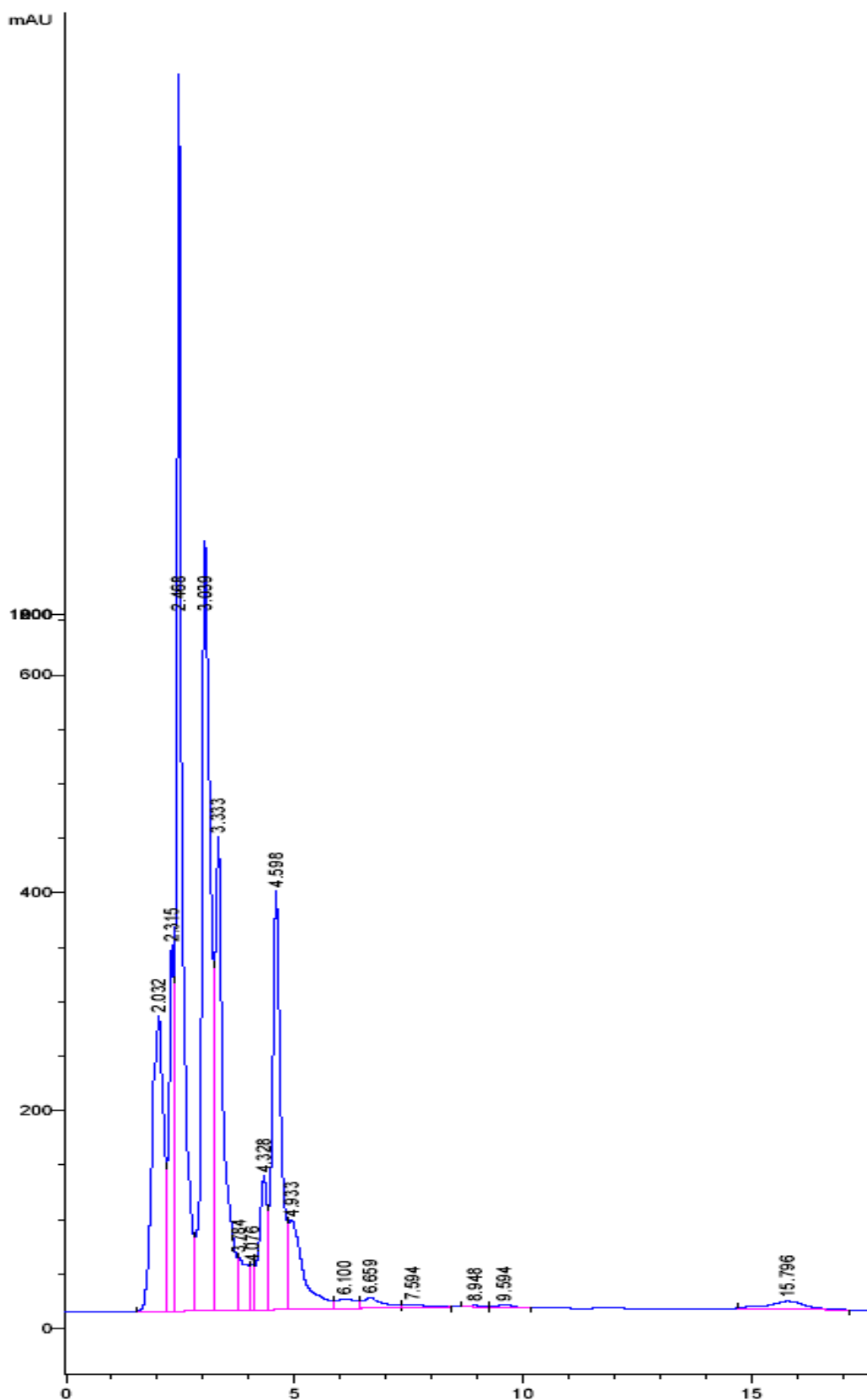


PŘÍLOHA IV: CHROMATOGRAM 4 - STANOVENÍ VITAMÍNŮ SK.

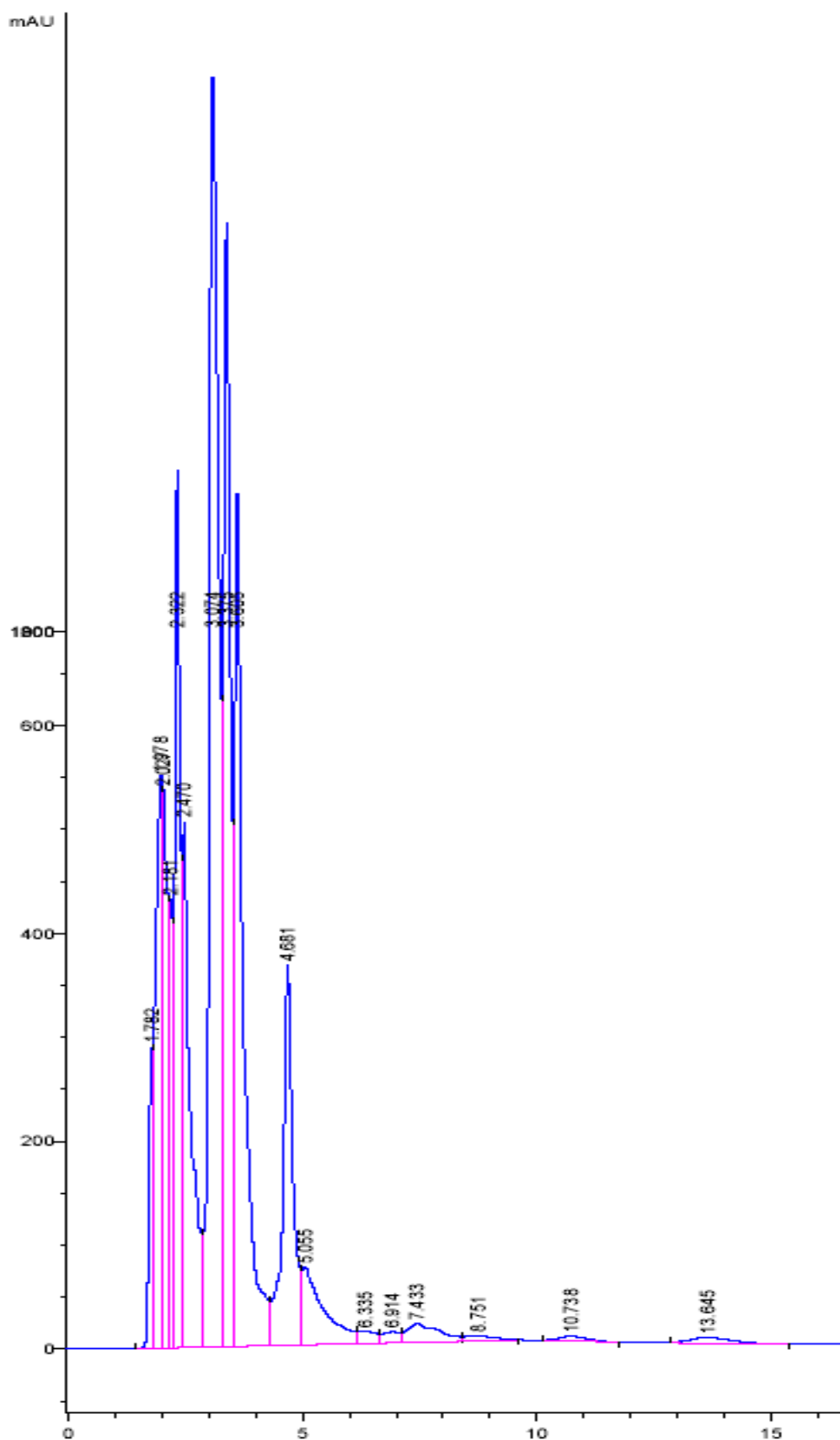
B V EMENTÁLU (pH 6,0, vlnová délka 204 nm)



PŘÍLOHA V: CHROMATOGRAM 5 - STANOVENÍ VITAMÍNŮ SK. B V GERVAIS (pH 4,5, vlnová délka 220 nm)

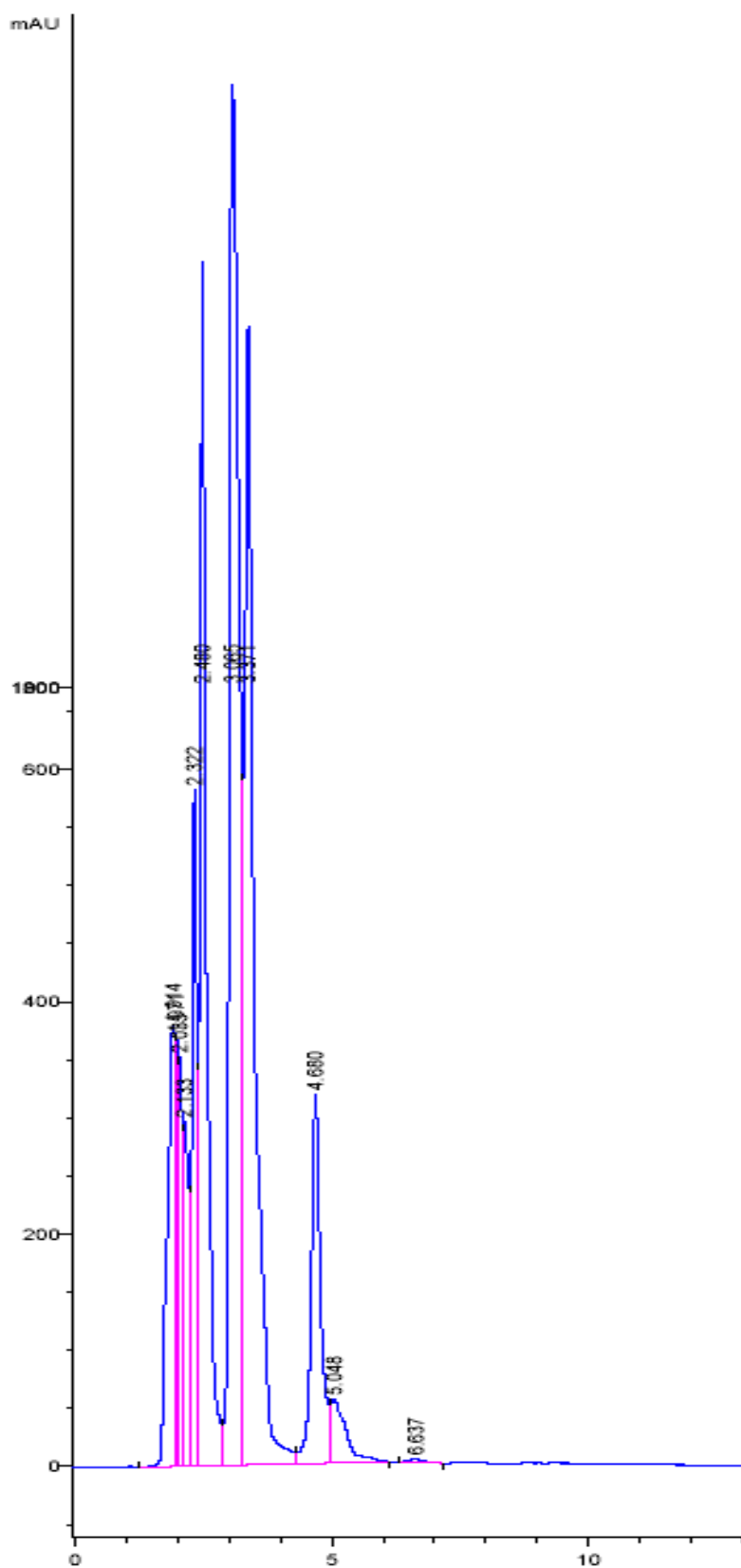


PŘÍLOHA VI: CHROMATOGRAM 6 - STANOVENÍ VITAMÍNŮ
SK. B V 30% EIDAMU (5g) (pH 6,0, vlnová délka 204 nm)



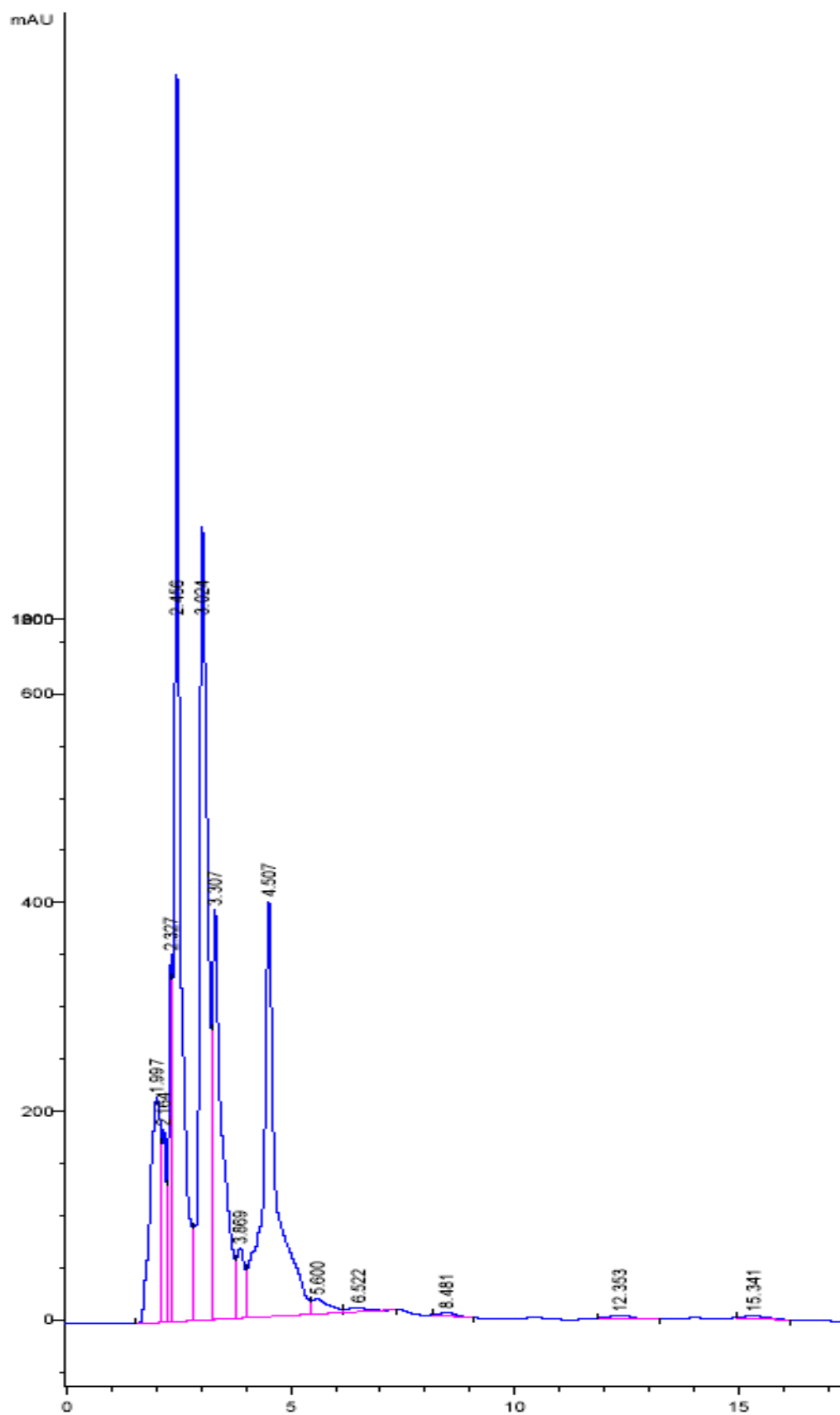
PŘÍLOHA VII: CHROMATOGRAM 7 – STANOVENÍ VITAMÍNŮ SK.

B V HERMELÍNU (pH 6,0, vlnová délka 204 nm)



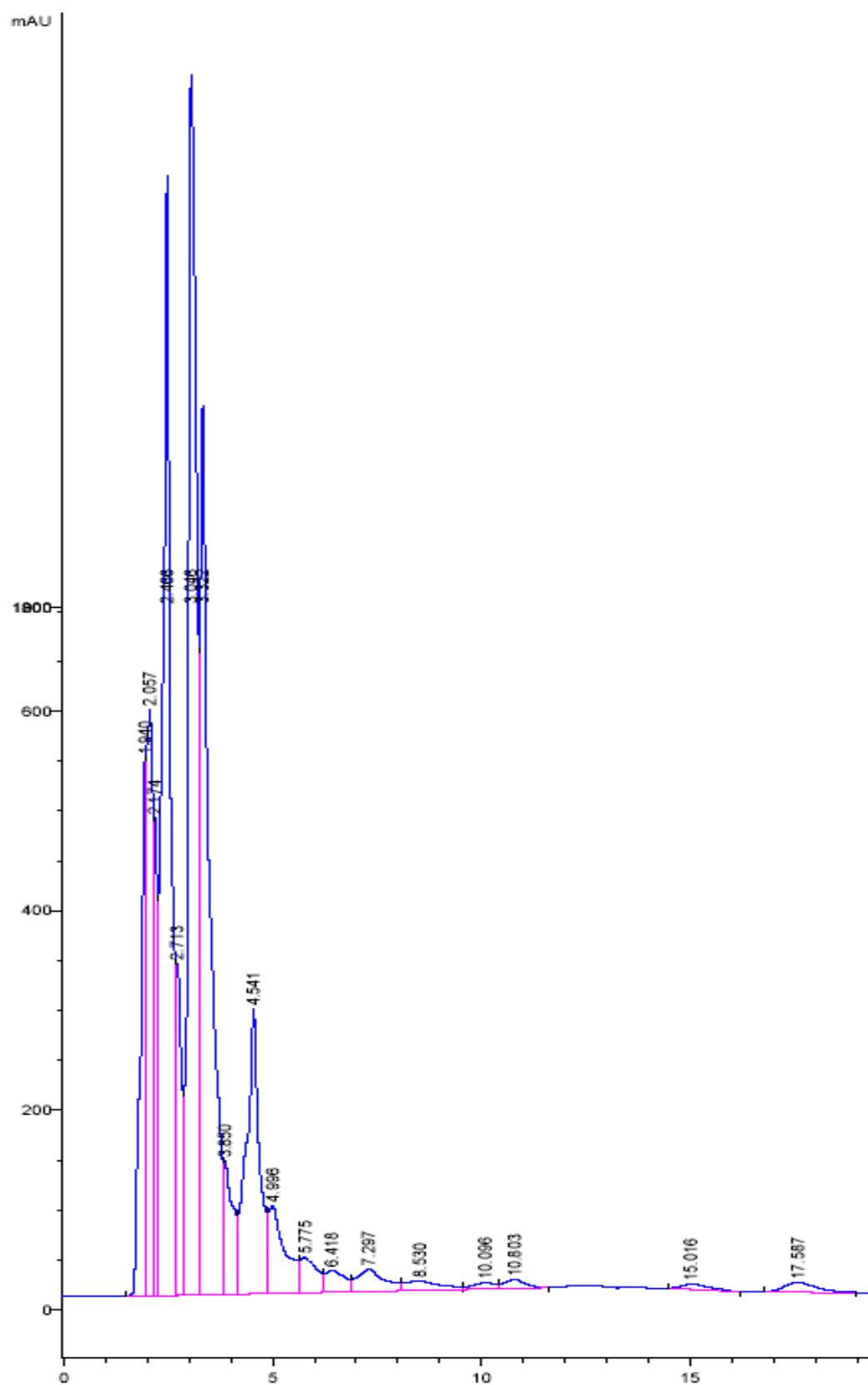
PŘÍLOHA VIII: CHROMATOGRAM 8 - STANOVENÍ VITAMÍNŮ

SK. B V NIVĚ (pH 6,0, vlnová délka 220 nm)



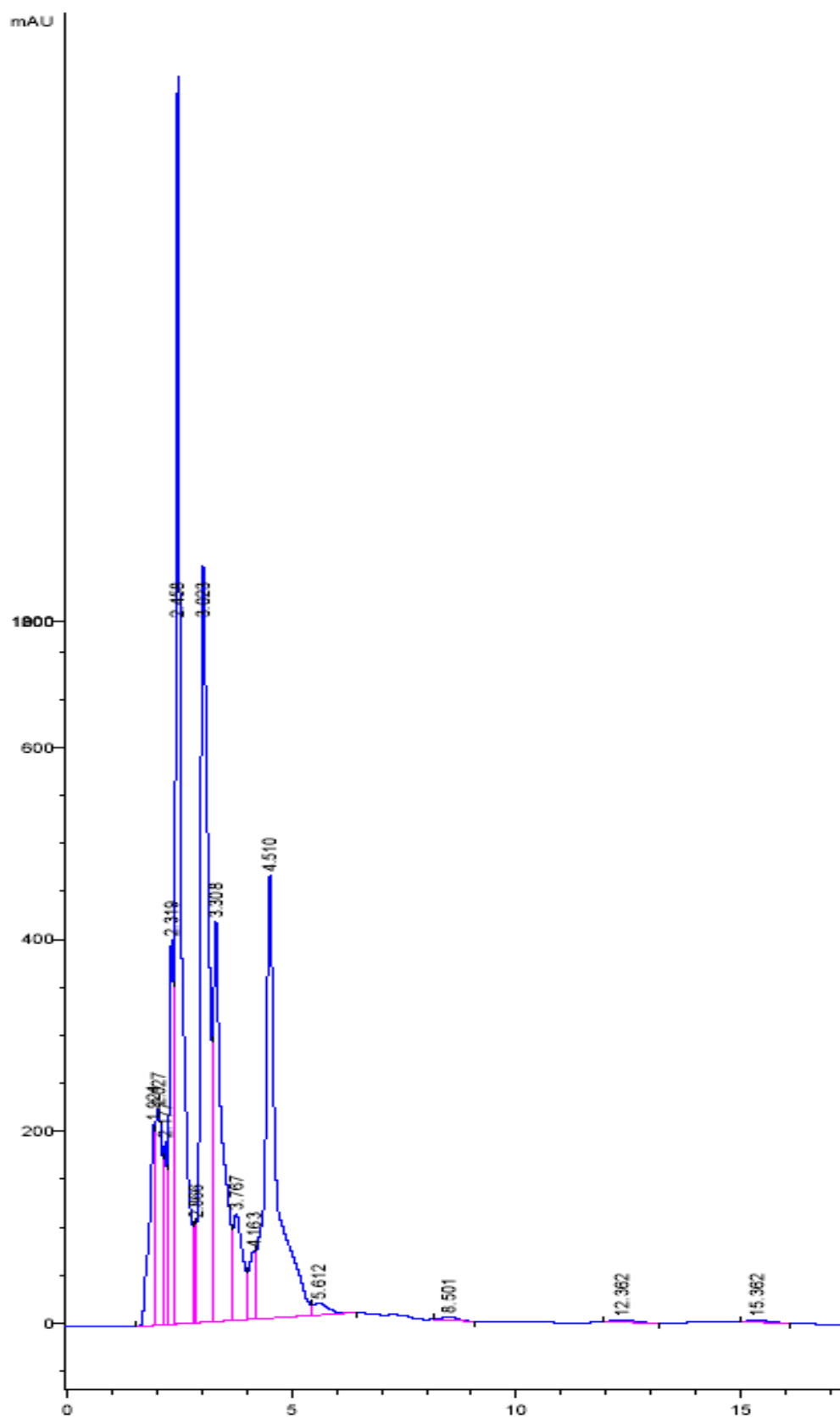
PŘÍLOHA IX: CHROMATOGRAM 9 - STANOVENÍ VITAMÍNŮ SK.

B VE VLTAVÍNU (pH 6,0, vlnová délka 204 nm)



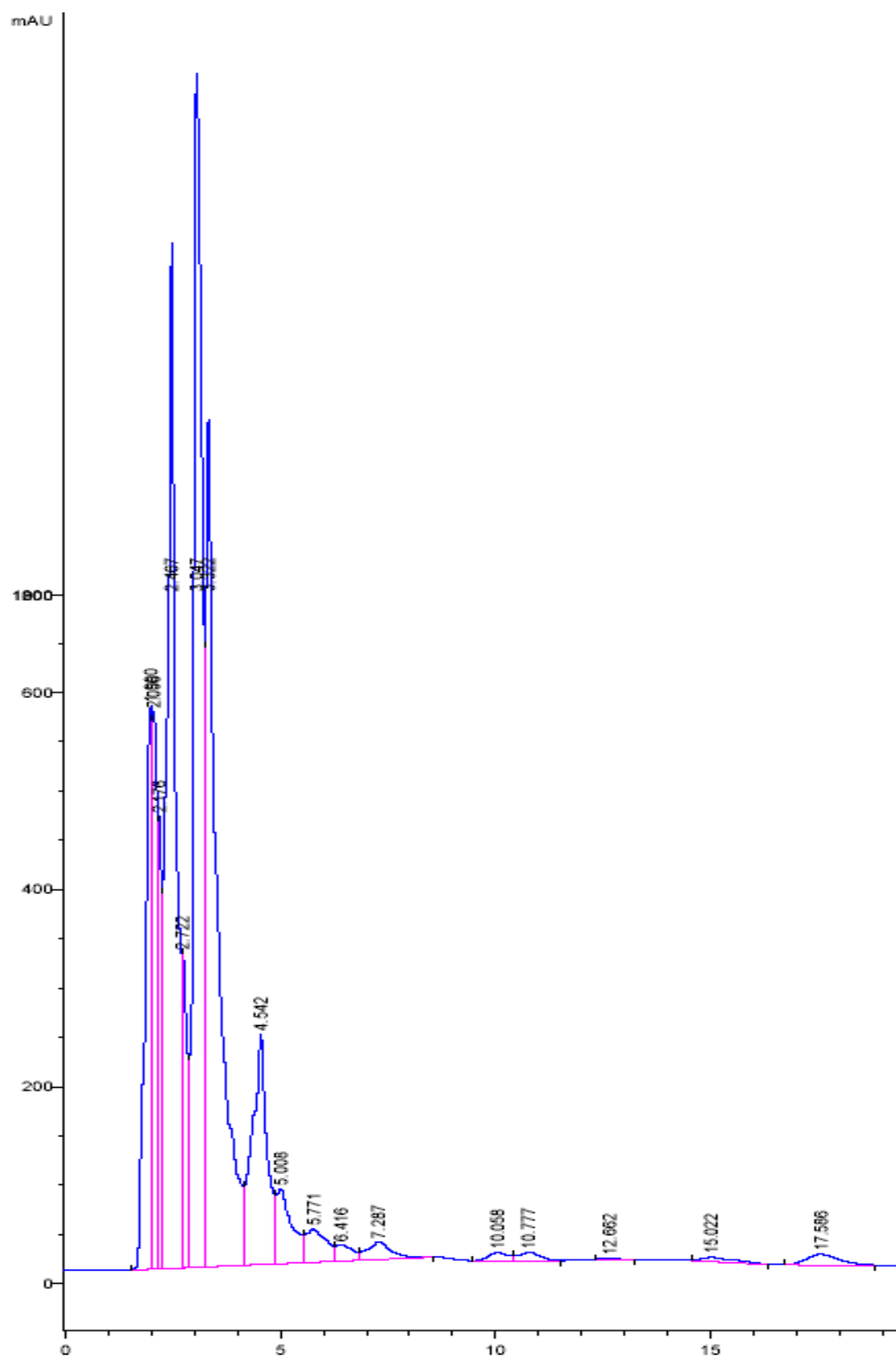
PŘÍLOHA X: CHROMATOGRAM 10 - STANOVENÍ VITAMÍNŮ SK.

B V PIVNÍM SÝRU (pH 6,0, vlnová délka 220 nm)

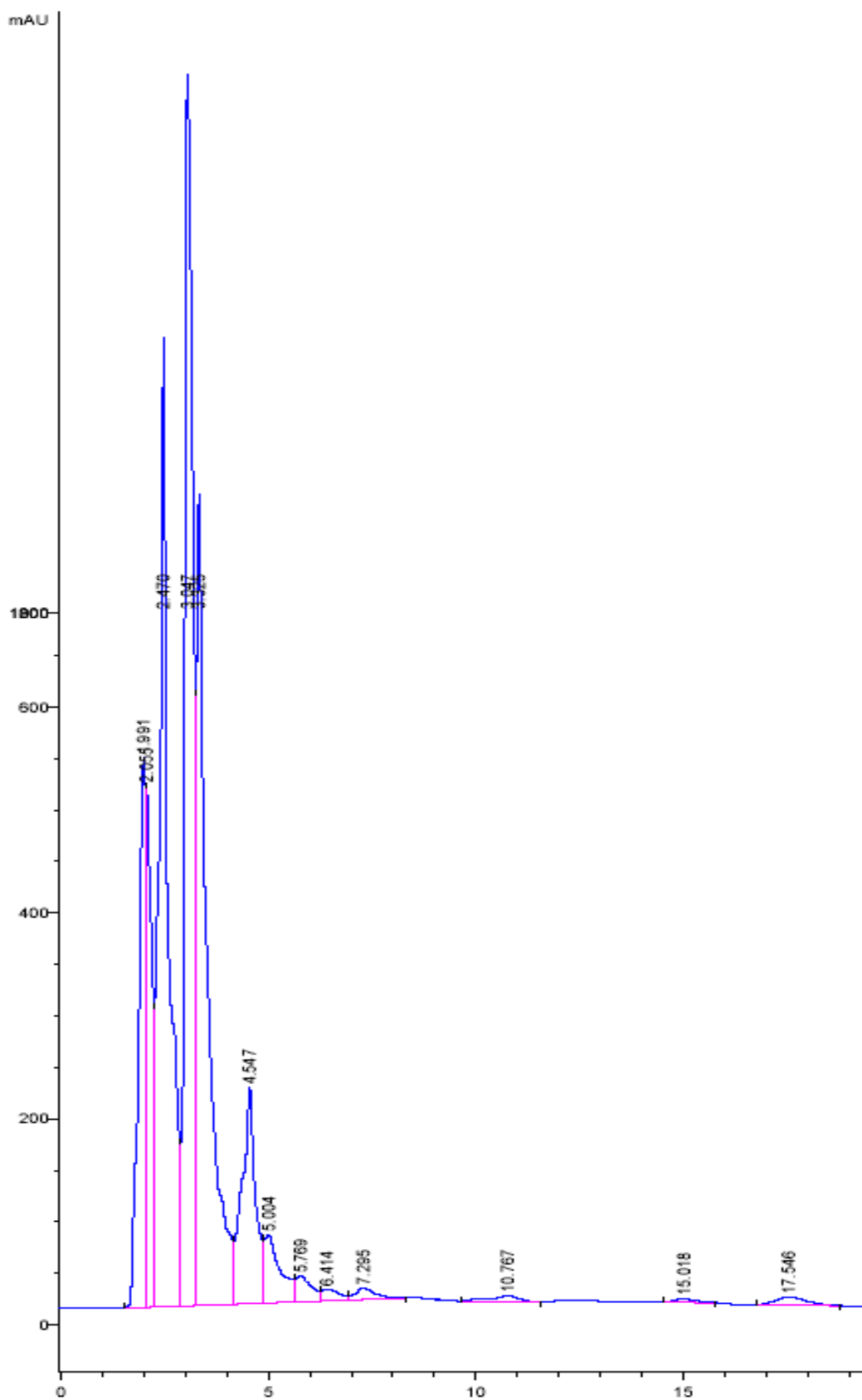


PŘÍLOHA XI: CHROMATOGRAM 11 - STANOVENÍ VITAMÍNŮ SK.

B V POLOOŠTĚPKU (pH 6,0, vlnová délka 204 nm)



**PŘÍLOHA XII: CHROMATOGRAM 12 - STANOVENÍ VITAMÍNŮ
SK. B V BALKÁNSKÉM SÝRU (pH 6,0, vlnová délka 204 nm)**



PŘÍLOHA XIII: CHROMATOGRAM 13 - STANOVENÍ VITAMÍNŮ

SK. B V JADELU (pH 6,0, vlnová délka 204 nm)

