

Sledování změn luminiscenčního spektra mléka a mléčného tuku během záhřevu

Bc. Bronislava Hájková

Diplomová práce
2019

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie potravin
akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Bronislava Hájková**
Osobní číslo: **T17313**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie potravin**
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Sledování změn luminiscenčního spektra mléka a mléčného tuku během záhřevu**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Složení mléka a mléčného tuku
2. Vliv záhřevu na chemické složení mléka a mléčného tuku
3. Základní charakteristika luminiscenční spektroskopie

II. Praktická část

1. Naměření luminiscenčních spekter mléčného tuku a mléka s různou tučností bez záhřevu
2. Zachycení změn luminiscence mléčného tuku a mléka během záhřevu
3. Vyhodnocení spekter a diskuze výsledků

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

- [1] STRASBURG, G. M. a R. D. LUDESCHER. Theory and applications of fluorescence spectroscopy in food research. Trends in Food Science and Technology. 1995, 6, 69–75.
- [2] SHAIKH, S. a C. O'DONNELL. Applications of fluorescence spectroscopy in dairy processing: a review. Current Opinion in Food Science. 2017, 17, 16–24.
- [3] FOX, P. F. a P. L. H. McSWEENEY. Dairy Chemistry and Biochemistry. Blackie Academic and Professional, 1998, 478 p.
- [4] AHMAD, N., SALEEM, M. a M. SHAHID. Studying heating effects on desi ghee obtained from buffalo milk using fluorescence spectroscopy. PLOS ONE. 2018, 13(5).

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Martina Bučková, Ph.D.**
Ústav technologie potravin

Datum zadání diplomové práce: **2. února 2019**

Termín odevzdání diplomové práce: **3. května 2019**

Ve Zlíně dne 2. února 2019

L.S.

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Jiří Miček, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Hájková Bronista va...

Obor: Technologie potravin

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 30.4.2019

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Diplomová práce je věnována možnostem využití metody luminiscenční spektroskopie pro sledování změn mléka a mléčného tuku během záhřevu. Teoretická část práce je věnována popisu chemického složení mléka a mléčného tuku, změnám jejich chemického složení v průběhu tepelného záhřevu a obecné charakteristice luminiscenční spektroskopie.

Praktická část je orientována na naměření luminiscenčních spekter mléčného tuku a mléka s různou tučností, zachycení a vyhodnocení jejich změn v závislosti na teplotě a délce záhřevu vzorků. U vzorků mléčného tuku byly vyhodnocovány píky s emisí při vlnové délce 410 nm a 525 nm s použitím excitační vlnové délky 315 nm. U sledovaných píků byla zaznamenána významná změna intenzity luminiscence v intervalu 120-140 °C, který odpovídá hodnotám kouřového bodu másla. U vzorků mléka byla interpretace výsledků ztížena jeho vícesložkovou strukturou poskytující široké překrývající se fluorescenční pásy. Byl hodnocen pík s emisí 345 nm při použití excitační vlnové délky 280 nm, který vykazoval s rostoucí teplotou pokles intenzity emise.

Klíčová slova: mléko, mléčný tuk, luminiscenční spektroskopie, lumifory, emisní spektrum

ABSTRACT

This thesis deals with the possibilities of using the luminescence spectroscopy method for monitoring of milk and milk fat changes during heating. The theoretical part of the thesis is a summary description of chemical composition of milk and milk fat, changes in their chemical composition during the thermal heating and also the general characteristics of luminescence spectroscopy.

The practical part of the thesis is focused on the measurement of milk fat luminescence in milk samples with different fat content; interception and evaluation of changes depending on the temperature and time of sample heating. For milk fat samples, peaks at 410 nm and 525 nm were observed using an excitation wavelength of 315 nm. For these specific peaks, a significant change in luminescence intensity was observed when the temperature of

samples was within the range of 120 – 140°C, which corresponds to the smoke point of butter. But there was a difficulty in interpretation of the milk samples results, caused by milk multicomponent structure providing broad overlapping fluorescent bandwidths. Using an excitation wavelength of 280 nm, a specific 345 nm peak was evaluated; and it was found out, that increasing temperature causes emission intensity decrease.

Keywords: milk, milk fat, luminescence spectroscopy, lumifors, emission spectrum

“Všechno se zdá být nemožné, až do momentu, než je to hotové.“

Nelson Mandela

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí své diplomové práce Mgr. Martině Bučkové, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnost, ochotu a pomoc při jejím vypracování, rovněž Ing. Ludmile Zálešákové za pomoc při zpracování experimentu v laboratoři, Ústavu elektroniky a měření FAI UTB ve Zlíně za umožnění měření a Ing. Michaelle Mikuličové za ochotu a pomoc při realizaci tohoto měření.

Moje další poděkování patří paní Jarmile Rajznauerové, která je mojí zaměstnavatelkou, za pochopení, podporu a bezproblémové umožnění studia.

Významná část díků náleží rovněž mým nejbližším spolupracovníkům za důvěru, podporu a pravidelný přísun optimismu.

Největší díl díků ovšem patří celé mé rodině, obzvláště manželovi a dcerám za pochopení, oporu a velkou dávku trpělivosti během mého studia.

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

OBSAH

ÚVOD.....	11
I TEORETICKÁ ČÁST.....	12
1 CHARAKTERISTIKA MLÉKA A MLÉČNÉHO TUKU.....	13
1.1 CHEMICKÉ SLOŽENÍ KRAVSKÉHO MLÉKA	13
1.1.1 Mléčné proteiny	13
1.1.2 Sacharidy.....	16
1.1.3 Vitamíny.....	16
1.1.4 Minerální látky	17
1.1.5 Enzymy	17
1.2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ MLÉČNÉHO TUKU	18
1.2.1 Triacylglyceroly	19
1.2.2 Mastné kyseliny	19
1.2.3 Fosfolipidy	20
1.2.4 Doprovodné látky lipidů	21
1.2.5 Tukové kuličky.....	22
2 VLIV ZÁHŘEVU NA CHEMICKÉ SLOŽENÍ MLÉKA A MLÉČNÉHO TUKU	23
2.1 VLIV ZÁHŘEVU NA PROTEINY MLÉKA	23
2.1.1 Vliv záhřevu na kaseiny	23
2.1.2 Vliv záhřevu na syrovátkové bílkoviny	24
2.2 VLIV ZÁHŘEVU NA SACHARIDY	24
2.2.1 Vliv záhřevu na laktózu	25
2.3 VLIV ZÁHŘEVU NA VITAMÍNY A MINERÁLNÍ LÁTKY	26
2.4 VLIV ZÁHŘEVU NA ENZYMY	26
2.5 VLIV ZÁHŘEVU NA LIPIDY	27
3 LUMINISCENČNÍ SPEKTROSKOPIE	28
3.1 LUMINISCENCE.....	28
3.1.1 Excitované stavy	29
3.1.2 Zhasínání excitovaných stavů	30
3.1.3 Charakterizace luminiscence.....	30
3.2 LUMIFORY	32
3.3 APLIKACE FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE PŘI HODNOCENÍ KVALITY MLÉKA A MLÉČNÝCH VÝROBKŮ.....	33
II PRAKTICKÁ ČÁST	36
4 CÍL PRÁCE	37
5 MATERIÁL A PŘÍSTROJE.....	38
5.1 MATERIÁL.....	38
5.2 PŘÍSTROJE A SOFTWARE	38
6 METODIKA	39

6.1	PŘÍPRAVA TEPLOTNÍCH ŘAD VZORKŮ	39
6.2	MĚŘENÍ LUMINISCENČNÍCH CHARAKTERISTIK VZORKŮ.....	40
7	VÝSLEDKY A DISKUSE	42
7.1	VÝBĚR VHODNÉ EXCITAČNÍ VLNOVÉ DÉLKY	42
7.2	LUMINISCENČNÍ SPEKTRA MÁSLA.....	43
7.2.1	Závislost intenzity luminiscence na době záhřevu.....	45
7.2.2	Závislost intenzity luminiscence na teplotě záhřevu.....	51
7.3	LUMINISCENČNÍ SPEKTRA MLÉKA	54
7.3.1	Závislost intenzity luminiscence na době záhřevu.....	56
7.3.2	Závislost intenzity luminiscence na teplotě záhřevu.....	58
	ZÁVĚR	59
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	61
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	67
	SEZNAM OBRÁZKŮ	68
	SEZNAM TABULEK.....	70
	SEZNAM PŘÍLOH.....	71

ÚVOD

V současné době existuje na trhu stále se rozšiřující nabídka rozmanitých mléčných výrobků. V souvislosti s tímto trendem však zároveň dochází k nežádoucímu nahrazování jejich složek např. rostlinnými tuky, bílkovinami a dalšími přísadami. Vzhledem k této situaci vzrůstá potřeba nalezení vhodných metod pro analýzu chemického složení, respektive kontrolu kvality mléčných výrobků s důrazem na rychlost a šetrnost těchto metod.

Klasické metody mikrobiologické a chemické analýzy mléka poskytují přesné a objektivní výsledky, jejich zásadní nevýhodou však zůstává časová náročnost analýzy a nutnost chemických úprav vzorků, tudíž jejich znehodnocení.

Vzhledem k těmto skutečnostem se jeví použití optických metod jako vhodná alternativa ke klasickým postupům analýzy. Fluorescenční spektroskopie je rychlá a nedestruktivní technika, jejíž pomocí lze získat informace o nejrůznějších změnách ve složení mléka a mléčných výrobků.

Tato práce se zabývá využitím fluorescenční spektroskopie k detekci stupně tepelného ošetření mléka a mléčného tuku. Teoretická část popisuje chemické složení mléka a mléčného tuku, jeho změny způsobené tepelným ošetřením a objasněním principů luminiscenční spektroskopie. Praktická část práce se zabývá naměřením luminiscenčních spekter a sledováním jejich změn v závislosti na teplotě a době záhřevu.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERISTIKA MLÉKA A MLÉČNÉHO TUKU

Z fyziologického hlediska lze mléko definovat jako tekutý sekret mléčné žlázy samic savců, který primárně slouží jako zdroj výživy mláďat [1,2].

Na základě poměru zastoupení kaseinových a syrovátkových bílkovin lze mléka dělit na kaseinová a albuminová. Majoritní skupina savců v přírodě produkuje mléka albuminová, avšak pro potravinářské využití mají nepochybně větší význam mléka kaseinová, mezi která patří zejména mléko kravské, ovčí nebo kozí [1,2].

Mléka produkovaná v průběhu laktační periody zvířat mají různorodé chemické složení a vlastnosti. Na základě těchto charakteristik je možné rozdělit je na mléka nezralá, ke kterým se řadí především mlezivo – sekret bohatý na sérové bílkoviny (zejména imunoglobuliny) sloužící k výživě mláďat v prvních dnech po porodu – a mléka zralá s typickým chemickým složením a vlastnostmi [1,2].

1.1 Chemické složení kravského mléka

Chemické složení kravského mléka je podmíněno množstvím faktorů, ke kterým lze zařadit například plemeno skotu, genetickou výbavu, prostředí, druh krmiva, zdravotní stav, sezonnost, geografickou příslušnost a řadu dalších [1,2,3,4].

Průměrné složení kravského mléka lze definovat takto:

- voda 86,0 – 88,0 %
- sušina 12,0 – 14,0 %
 - obsah dusíkatých látek 3,1 – 3,8 %
 - obsah tuku 3,5 – 5,5 %
 - obsah laktózy 4,5 – 5,0 %
 - minerální látky, vitamíny, hormony, enzymy a další [1].

1.1.1 Mléčné proteiny

Proteiny jsou vysokomolekulární látky (biopolymery), které jsou tvořeny polypeptidovými řetězci. Jsou nejkomplexnější složkou mléka a určují jeho nutriční hodnotu. Mléčné pro-

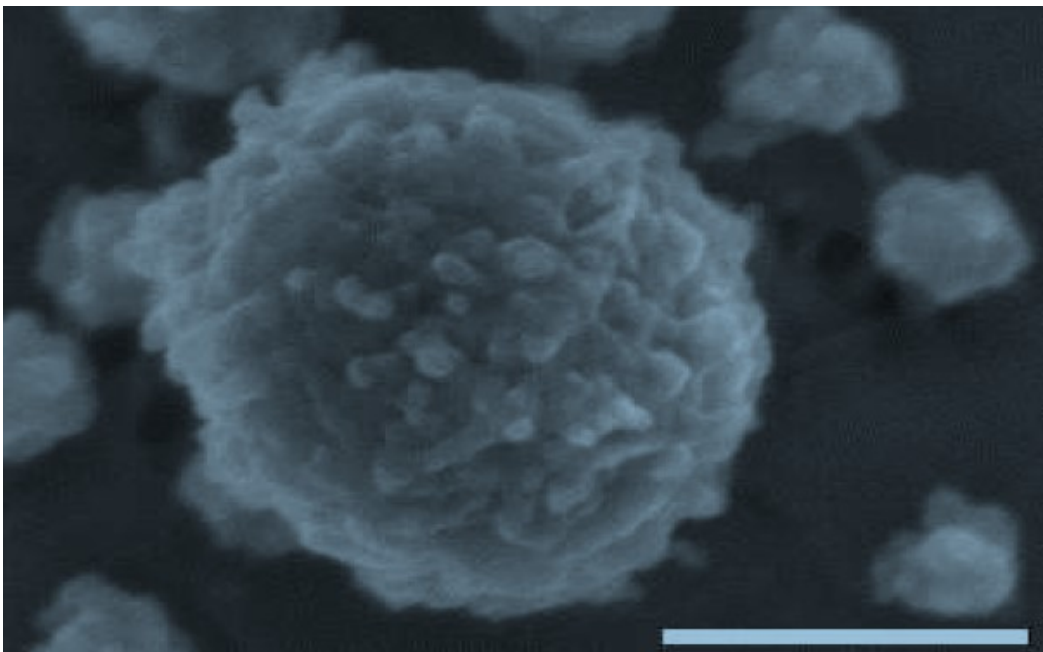
teiny lze na základě jejich rozpustnosti v izoelektrickém bodě kaseinu (při pH 4,6) rozčlenit na proteiny kaseinové a syrovátkové [1,5,6].

Kaseiny

Kaseinové bílkoviny tvoří přibližně 80 % čistých bílkovin mléka. Jedná se o komplex fosfoproteinů. Při pH 4,6 se kaseinové bílkoviny sráží. Řadí se k nim tyto základní frakce:

- α_{s1} – kasein
- α_{s2} – kasein
- β – kasein
- κ – kasein

Biologické funkce kaseinů jsou určovány jejich složením, pružnou konformací a tím jak mezi sebou tyto polypeptidové řetězce interagují. Tyto faktory rovněž rozhodují o tom, jak se kaseiny chovají při výrobě mléčných výrobků nebo jakým způsobem je lze použít jako funkční složky v jiných potravinách. Kaseiny se v mléce při teplotách nad 5 °C shlukují do komplexů v přítomnosti koloidního fosforečnanu vápenatého za pomoci vodíkových vazeb a elektrostatických interakcí [1,6,7]. Na obrázku 1 je možné pozorovat ukázkou takového komplexu - tzv. kaseinové micely.



Obrázek 1: Zobrazení kaseinové micely elektronovým rastrovým mikroskopem (měřítko 200 nm) [8]

Syrovátkové bílkoviny

Syrovátkové (sérové) bílkoviny jsou zastoupeny v bílkovině mléka přibližně dvaceti procenty. Na rozdíl od kaseinů neobsahují atomy fosforu, které mají důležitou roli při srážení mléka. Z tohoto důvodu sérové bílkoviny zůstávají po vysrážení mléka v syrovátce [1,2,5,9].

Mezi syrovátkové bílkoviny se řadí:

- α – laktalbumin
- β – laktoglobulin
- imunoglobuliny
- sérový albumin
- transferin
- laktoferin
- proteozo – peptony [1].

V tabulce 1 je uvedeno zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí v mléku i v samotném proteinu.

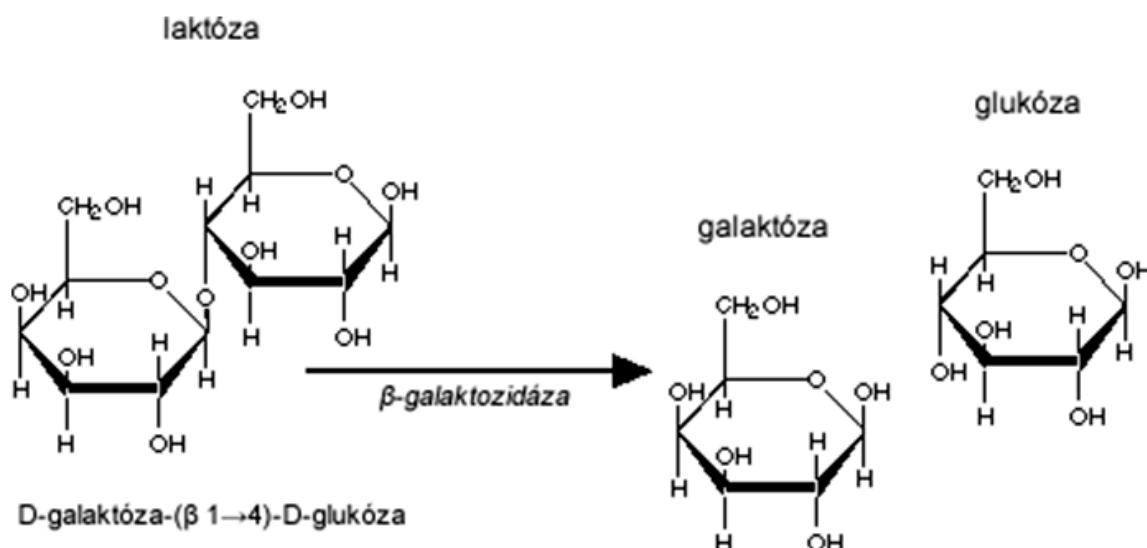
Tabulka 1: Zastoupení bílkovinných frakcí v mléku [10]

Protein	obsah v g.kg ⁻¹ mléka	obsah v g.100g ⁻¹ proteinu
<i>celkový kasein</i>	26	78,3
α_{s1}-kasein	10,7	32
α_{s2}-kasein	2,8	8,4
β-kasein	8,6	26
κ-kasein	3,1	9,3
γ-kasein	0,8	2,4
<i>syrovátkové bílkoviny</i>	6,3	19
β-laktoglobulin	3,2	9,8
α-laktalbumin	1,2	3,7
sérový albumin	0,4	1,2
proteozo-pepton	0,8	2,4
<i>Imunoglobuliny</i>	0,8	2,4
IgG₁, IgG₂	0,65	1,8
IgA	0,14	0,4
IgM	0,05	0,2
minoritní proteiny	0,9	2,7
Laktoferin	0,1	
proteiny membrán tukových kuliček	0,7	2,0

1.1.2 Sacharidy

Hlavním sacharidem v mléce je redukující sacharid laktóza. Tento disacharid složený z D-galaktózy a D-glukózy spojených β 1-4 glykosidickou vazbou, často také označovaný jako mléčný cukr, má v mléce řadu významných funkcí. V první řadě slouží jako zdroj energie, mléko má díky němu charakteristickou sladkou chuť a ovlivňuje senzorycké vlastnosti řady mléčných výrobků [1,2,3,5].

Laktóza se v mléce vyskytuje ve dvou izomerních formách alfa a beta, které jsou ve vzájemné rovnováze. Pro lepší stravitelnost je v trávicím traktu hydrolyzována enzymem β -galaktozidázou (viz Obr. 2) známou rovněž jako laktáza. Při deficitu laktázy dochází ke vzniku laktóзовé intolerance [1,5].



Obrázek 2: Štěpení laktózy β -galaktozidázou [11]

Kromě laktózy obsahuje mléko menšinové množství monosacharidů, jako jsou: D-galaktóza, D-glukóza, D-fruktóza, deoxycukrů např. L-fukóza, aminocukrů: D-glukosamin, D-galaktosamin, kyselina neuraminová, a rovněž různé oligosacharidy fungující jako prebiotika [1,2,12].

1.1.3 Vitamíny

Primární funkcí vitamínů obsažených v mléku je zajištění optimálního růstu a funkce metabolismu u mláďat. Tyto nízkomolekulární látky působí jako katalyzátory biochemických reakcí organismu a napomáhají regulaci metabolismu [1,2,5,12].

Vitamíny se dělí do dvou základních skupin na základě svých fyzikálních vlastností - na vitamíny rozpustné v tucích, které jsou součástí tukových kuliček a vitamíny rozpustné ve vodě. V mléku jsou v různých koncentracích zastoupeny obě skupiny vitamínů, jejich konkrétní koncentrace v mléku přibližuje tabulka 2 [1,2,3,5,12].

Tabulka 2: Koncentrace jednotlivých vitamínů v mléku [12]

vitamín	chemický název	koncentrace v mléce .kg ¹	přítomnost v mléce
A	Retinol	0,7-1,3 mg	Tuk
B ₁	Thiamin	0,5 mg	Sérum
B ₂	Riboflavin	1,8 mg	Sérum
B ₃	Niacin	8 mg	Plasma
B ₅	kys. pantothenová	3,5 mg	Sérum
B ₆	Pyridoxin	0,5 mg	Sérum
B ₇	Biotin	20-40 µg	Sérum
B ₉	kyselina listová	50-60 µg	Protein
B ₁₂	kobalamin	4,5 µg	Protein
C	kyselina askorbová	10-25 mg	Sérum
D	kalCIFeroly	0,1-0,8 µg	Tuk
E	tokoferoly	1 -1,5 mg	Tuk
K	menachinon	10-50 µg	Tuk

1.1.4 Minerální látky

Minerálními látkami se rozumí anorganické prvky. Podle množství v potravine se dělí na makrobiogenní, jejichž množství v potravine lze vyjádřit ve stovkách až tisících mg/kg, mikrobiogenní, vyskytující se v desítkách mg/kg a stopové, jejichž množství lze vyjádřit v mg/kg či méně. Na základě fyziologického významu lze minerální látky rozlišit na prvky esenciální, jež jsou důležité pro zajištění biologických funkcí organismu, neesenciální a toxické. V mléku se minerální látky vyskytují většinou ve formě solí, v koloidní formě, v pravém roztoku nebo navázány na další složky mléka. Ve větším množství lze zaznamenat obsah vápníku, sodíku, hořčíku, draslíku či fosforu. Minoritními minerálními složkami jsou např. železo, zinek, selen. Lidský organismus dokáže velmi dobře absorbovat minerální látky obsažené v mléku a to především vápník [1,2,3,5,12,13].

1.1.5 Enzymy

Enzymy jsou rovněž řazeny k minoritním složkám mléka. Jedná se o makromolekulární bílkovinné látky, jejichž hlavní funkcí je katalytická aktivita potřebná pro řadu biochemic-

kých reakcí. V kravském mléce se nachází rozsáhlá skupina přibližně 100 nejrozličnějších enzymů, které jsou obsaženy ve velmi nízké koncentraci. Tyto enzymy se dělí na dvě základní skupiny – enzymy nativní a enzymy mikrobiální. Výskyt mikrobiálních enzymů v mléce zpravidla ukazuje na sekundární kontaminaci a je v mléce nežádoucí pro možný negativní vliv na výslednou kvalitu mléčných výrobků. Nativní enzymy jsou vázány na různé složky mléka, případně se vyskytují volně v mléčném séru. Většina enzymů nemá pro zpracování mléka zásadní význam, výjimkou jsou enzymy působící jako přirozená antimikrobiální ochrana, např. lysozym, případně enzymy sloužící jako ukazatele správnosti tepelného ošetření mléka (alkalická fosfatáza) [1,2,12].

1.2 Chemické složení mléčného tuku

Lipidy lze obecně charakterizovat jako organické sloučeniny rostlinného či živočišného původu zahrnující ve své struktuře esterově vázané mastné kyseliny s minimálním počtem čtyř uhlíků v molekule, jejichž společným znakem je nepolární charakter. Z nutričního hlediska jsou lipidy významnou složkou potravin ovlivňující zdravý vývoj a činnost lidského organismu. Důležitou součástí mléčného tuku je obsah doprovodných látek, např. antioxidantů či vitamínů a rovněž esenciálních mastných kyselin, zejména kyseliny linolové. Obsah a složení tuku v mléce je velmi variabilní a je ovlivněno řadou vnějších i vnitřních faktorů [5,12,14].

Na základě chemického složení se lipidy řadí do čtyř základních skupin:

- Homolipidy
- Heterolipidy
- Komplexní lipidy
- Doprovodné látky lipidů

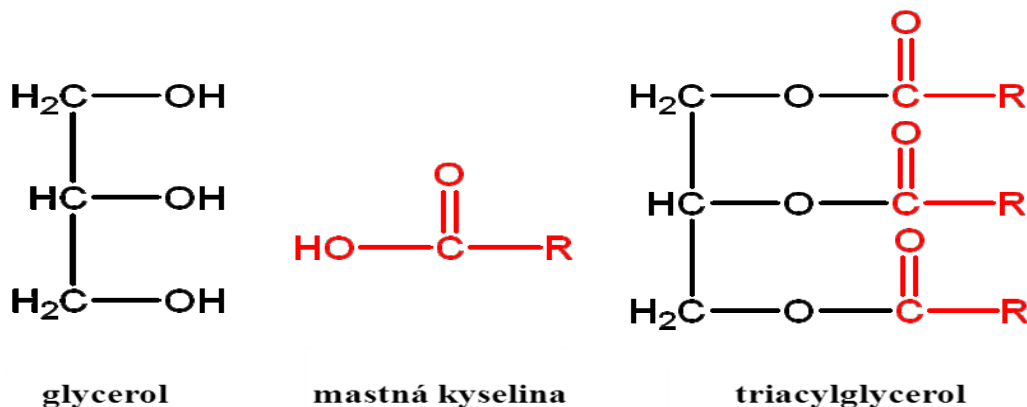
Homolipidy, nebo také jednoduché lipidy, jsou estery mastných kyselin a alkoholů. Naproti tomu heterolipidy obsahují mimo mastné kyseliny a alkoholu další sloučeniny vázané kovalentní vazbou. V komplexních lipidech se vyskytují mimo kovalentní vazby rovněž vazby vodíkové či hydrofobní interakce [5,14].

V kravském mléce tvoří převážnou část (97 – 98 %) homolipidy. Nejzákladnější složku lipidů kravského mléka tvoří triacylglyceroly – estery mastných kyselin a glycerolu. V menší míře se vyskytují rovněž diacylglyceroly a monoacylglyceroly [1,2,12].

V menší míře jsou zastoupeny heterolipidy a další elementy: volné mastné kyseliny, cholesterol, estery cholesterolu, fosfolipidy, vitamíny rozpustné v tucích, karotenoidy, laktony [1,2,12].

1.2.1 Triacylglyceroly

Triacylglyceroly jsou sloučeniny, jejichž základní složku tvoří glycerol, na který jsou vázány esterovou vazbou tři mastné kyseliny (viz Obr. 3). Tyto navázané kyseliny se mohou vyskytovat v různých kombinacích. Mohou být všechny stejné, nebo různé [5,12].



Obrázek 3: Obecný vzorec triacylglycerolu [15]

1.2.2 Mastné kyseliny

Mléčný tuk obsahuje široké spektrum mastných kyselin, většina z nich se však vyskytuje pouze ve stopových koncentracích. V tabulce 3 je uvedeno zastoupení vybraných mastných kyselin v mléčném tuku. Většinou jsou v mléčném tuku zastoupeny nasycené mastné kyseliny (nejvíce kyselina palmitová). Typickým znakem mléčného tuku u přežvýkavců je vysoký obsah mastných kyselin s krátkým řetězcem, které dodávají mléku typickou chuť a vůni [2,12,16].

Tabulka 3: Obsah mastných kyselin v mléčném tuku [12]

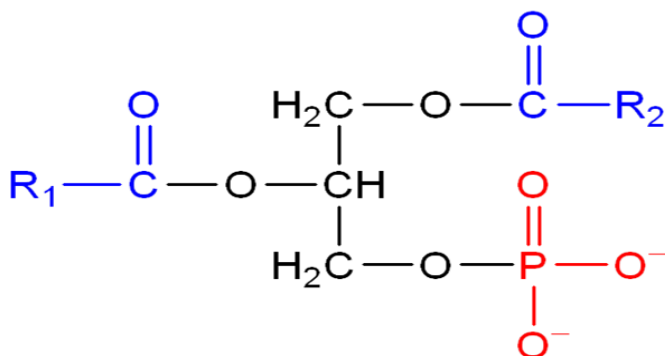
mastné kyseliny	mastná kyselina triviální název	mastná kyselina systematický název	kravské mléko [mg/g mléčného tuku]
nasycené			
C4:0	másečná	butanová	3,7
C6:0	kapronová	hexanová	2,4
C8:0	kaprylová	oktanová	1,5
C10:0	kaprinová	dekanová	3,2
C12:0	laurová	dodekanová	3,6
C14:0	myristová	tetradekanová	11,1
C16:0	palmitová	hexadekanová	28,3
C18:0	stearová	oktadekanová	11,8
nenasycené monoenové			
C14:1n-5	myristoolejová	9-cis-tetradecenová	0,9
C16:1n-7	palmitoolejová	9-cis-hexadecenová	1,6
C18:1n-9	olejová	9-cis-oktadecenová	18,8
C18:1n-9	elaidová	9-trans-oktadecenová	
C18:1n-7	vakcenová		4,2
nenasycené polyenové			
řada n-6			
C18:2n-6	linolová	9-cis-,12-cis- oktadekadienová	0,9-3,7
C18:3n-6	γ-linolenová	6,9,12-all-cis- oktadekatrienová	0,1-1,4
C20:4n-6	arachidonová	5,8,11,14-all-cis- eikosatetraenová	0,8-3,0
řada n-3			
C18:3n-3	α-linolenová	9,12,15-all-cis- oktadekatrienová	0,4-0,6

1.2.3 Fosfolipidy

Ačkoliv fosfolipidy představují méně než 1% celkových lipidů, mají důležitou roli. Obsahují esterově vázanou kyselinu fosforečnou (viz Obr. 4) a jsou přítomny hlavně v membránách tukových kuliček. Jejich úkolem je zajištění stability tukové emulze. Při nízké koncentraci jsou rozpustné ve vodě, nad hranici kritické micelární koncentrace se shlukují do tzv. micel [2,5,12].

Na základě chemického složení se fosfolipidy dělí do čtyř základních skupin:

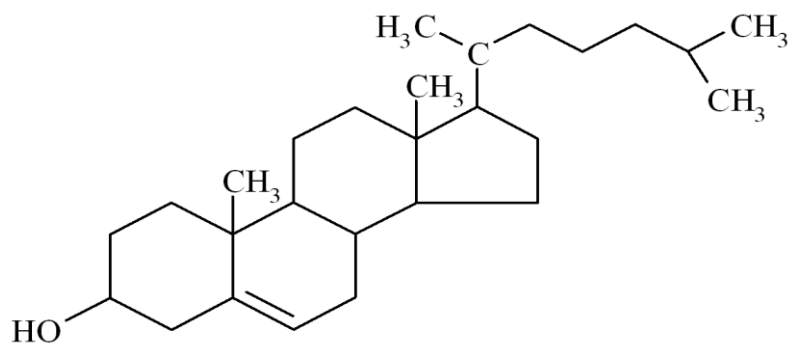
- Fosfatidy
- Lyzofosfatidy
- Sfingofosfolipidy
- Plazmalogeny [5].



Obrázek 4: Obecný vzorec fosfolipidů [17]

1.2.4 Doprovodné látky lipidů

V mléku jsou obsaženy kromě lipidů také další látky lipofilní povahy, jež bývají souhrnně označovány jako lipoidy. K této skupině se řadí zejména uhlovodíky a alifatické alkoholy, steroidy, lipofilní barviva a vitamíny. K nejznámějším sterolům patří cholesterol (viz Obr. 5). Jeho obsah v mléce je ve srovnání s ostatními potravinami velmi nízký. Většina cholesterolu (až 90%) je ve volné formě, zbývajících přibližně 10% se vyskytuje ve formě esterů cholesterolu [2,5,12].

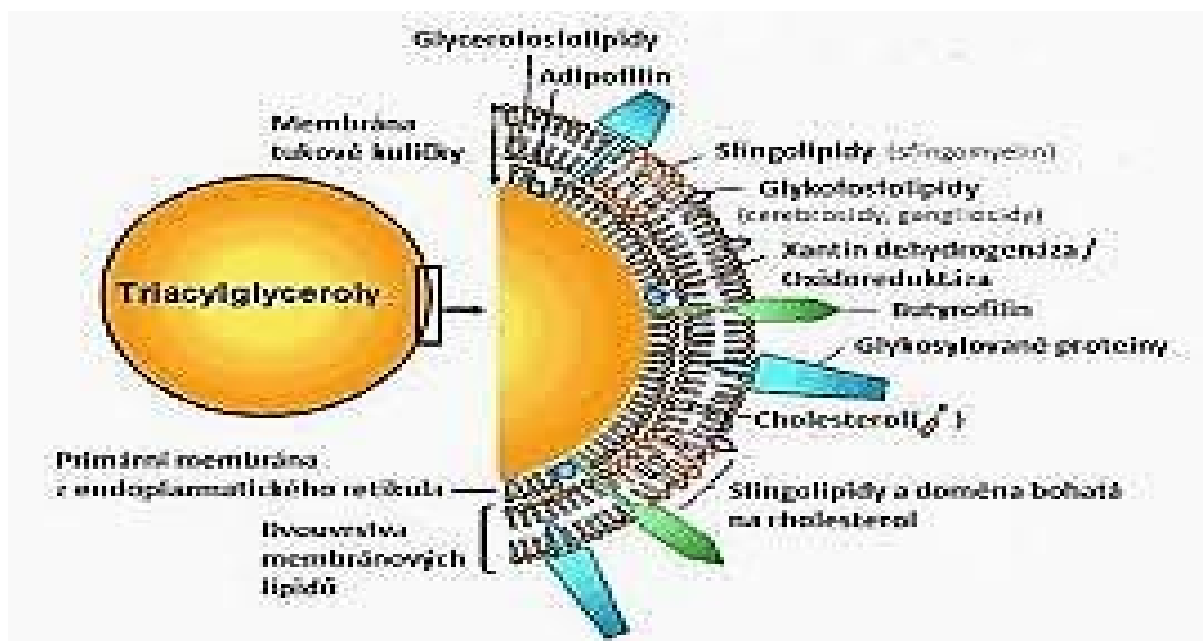


Obrázek 5: Vzorec cholesterolu [18]

Další významnou skupinu doprovodných látek tvoří karotenoidy. Nejrozšířenějším karotenoidem v mléku je β – karoten. Tento provitamin vitamínu A je původcem typické nažloutlé barvy mléka. Jeho obsah v mléku je velmi kolísavý a to v závislosti na výživě dojnice a ročním období [2,5,12].

1.2.5 Tukové kuličky

Tuk se v mléce vyskytuje ve formě emulze typu olej ve vodě. Vodnou fází tvoří mléčná plazma, olejová fáze je tvořena tukovými kuličkami. Jádrem tukové kuličky je tvořeno triacylglyceroly, tyto jsou obaleny membránou. Hlavní funkce membrány spočívá ve stabilizaci tukových kuliček ve vodné fázi mléčné plazmy a obraně proti nežádoucímu působení lipolytických enzymů. Uspořádání membrány je komplikovaný systém sestávající z proteinů, fosfolipidů, neutrálních lipidů, cerebrozidů, cholesterolu, enzymů, ostatních minoritních složek a vody (viz Obr. 6). Všechny tyto složky vytváří tzv. protein – fosfolipidovou trojvrstvu [2,12].



Obrázek 6: Složení membrány tukové kuličky [19]

2 VLIV ZÁHŘEVU NA CHEMICKÉ SLOŽENÍ MLÉKA A MLÉČNÉHO TUKU

Mléko slouží jako jedna ze základních surovin určených pro lidskou výživu už dlouhá staletí. V minulosti bylo zvykem zpracovávat mléko doma a uchovávat jej v chladných a temných sklepech. Přestože čerstvě nadojené mléko obsahuje inhibiční látky sloužící jako přirozený obranný systém proti patogenním mikroorganismům, nelze tyto obranné mechanismy považovat za dostačující. S rozvojem mlékárenství rostou nároky na zachování mikrobiologické nezávadnosti a prodloužení údržnosti mléka a mléčných výrobků. Na základě těchto požadavků se tepelné ošetření stalo běžně používaným postupem při zpracování mléka. V současnosti je používáno několik typů tepelného ošetření mléka v závislosti na délce a teplotě záhřevu – termizace, pasterace, sterilace a UHT záhřev [2,20].

V porovnání s řadou jiných potravin vykazuje mléko velmi dobrou tepelnou stabilitu. Během tepelného ošetření ovšem přesto dochází k řadě fyzikálně – chemických změn u jednotlivých složek mléka, které ovlivňují jeho organoleptické, nutriční i technologické vlastnosti [2,12,20].

2.1 Vliv záhřevu na proteiny mléka

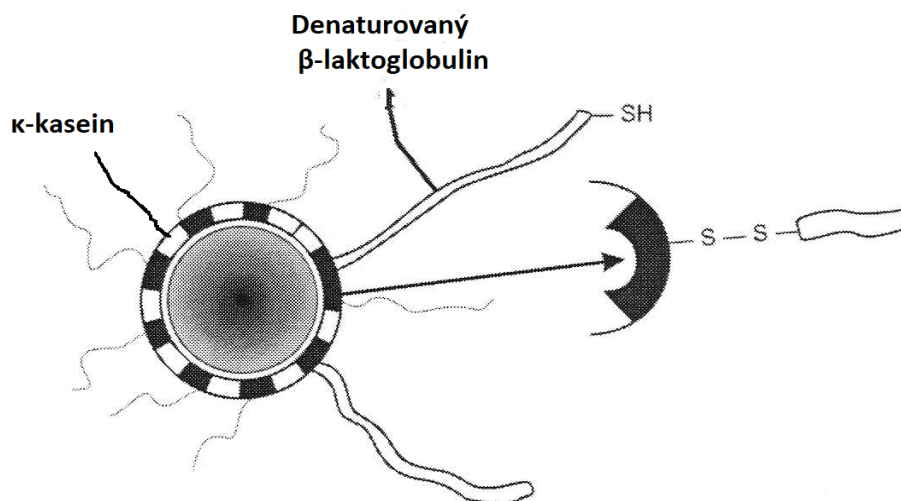
Složkou mléka, která je pravděpodobně nejvíce ovlivněna tepelným ošetřením, jsou proteiny.

2.1.1 Vliv záhřevu na kaseiny

Kaseinové bílkoviny disponují velmi dobrou tepelnou stabilitou, díky které je možné vyrábět široké spektrum tepelně upravených mléčných výrobků bez významnějších změn fyzikálních vlastností. Tato skutečnost je způsobena velmi malým procentem výskytu sekundárních a terciálních struktur v kaseinové molekule. Nicméně vzhledem ke schopnosti kaseinů navázat vysoké množství vápenatých iontů způsobené jejich fosforylací, může během záhřevu nad 140°C docházet k jejich koagulaci. V přítomnosti redukujících sacharidů může rovněž v průběhu tepelného ošetření docházet k Maillardovým reakcím, při kterých vzniká řada sensoricky aktivních látek [2,12].

2.1.2 Vliv záhřevu na syrovátkové bílkoviny

Na rozdíl od kaseinů jsou syrovátkové bílkoviny typické globulární proteiny s vysokým obsahem sekundárních a terciálních struktur, díky čemuž jsou velmi citlivé k denaturaci různými činidly, včetně tepelného záhřevu. K denaturaci syrovátkových bílkovin dochází již při teplotách 70°C a vyšších. Nejcitlivější k působení vyšších teplot je β -laktoglobulin denaturující již při zmiňované teplotě 70°C. Denaturovaný β -laktoglobulin má klíčovou úlohu při změnách vlastností tepelně ošetřeného mléka. Na obrázku 7 lze vidět, jak přes volné -SH skupiny tvoří komplexy s κ -kaseinem. Tyto komplexy mají zásadní vliv na syřitelnost mléka, jeho tepelnou stabilitu a vaznost vody. K denaturaci imunoglobulinů dochází při teplotách přesahujících 74°C. Výjimkou mezi sérovými bílkoviny je α -laktalbumin, k jeho denaturaci dochází až při teplotách nad 100°C. Z nutričního hlediska je denaturace syrovátkových bílkovin významným procesem ke zlepšení jejich stravitelnosti [1,20,21].



Obrázek 7: Interakce β -laktoglobulinu s κ -kaseinem [22]

2.2 Vliv záhřevu na sacharidy

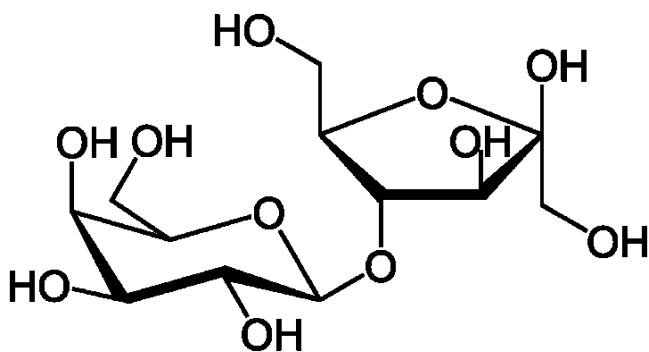
Rovněž sacharidy v mléce během působení vysoké teploty mohou vstupovat do řady reakcí způsobující změny v jejich chemickém složení, jako jsou mutarotace, různé izomerace, hydrolýza, vznik těkavých aromatických sloučenin. Tyto změny se však při běžném tepelném ošetření mléka zpravidla nevyskytují [1,20,23].

2.2.1 Vliv záhřevu na laktózu

Během záhřevu dochází minimálně ke třem významným reakcím způsobujícím změnu chemických vlastností laktózy – vznik laktulózy, tvorba organických kyselin a soubor Maillardových reakcí [24].

Vznik laktulózy

Laktulóza (viz Obr. 8) se běžně v syrovém kravském mléku nevyskytuje. Vzniká izomerací laktózy, přesněji přeměnou glukózy obsažené v laktóze na její izomer fruktózu. Tento epimer vzniká vlivem působení tepelného záhřevu za mírně alkalických podmínek sledem reakcí nazývaných Lobry de Bruyn- Alberda van Ekenstein drahou, při které dochází k přesmyku aldóz na ketózy. Z výživového hlediska je laktulóza považována za účinné prebiotikum napomáhající správnému fungování mikroflóry tlustého střeva. Z tohoto důvodu je jako potravinový doplněk přidávána do řady potravin. V technologické praxi je laktulóza využívána jako ukazatel tepelného poškození mléka, její přítomnost napomáhá rozlišit mléko pasterované od sterilizovaného [1,2,20,25,26,27].



Obrázek 8: Chemická struktura laktulózy [28]

Vznik organických kyselin

Reakce, při kterých se z laktózy tvoří organické kyseliny, probíhají pouze při teplotách vyšších než 100°C. Zahřátím mléka dochází k úbytku oxidu uhličitého a tím zvýšení pH. Za těchto podmínek laktóza degraduje na kyseliny – v první řadě na kyselinu mravenčí, v minoritním množství vzniká také kyselina mléčná [1,20,25].

Maillardovy reakce

Během záhřevu mléka může docházet ke vzniku Maillardových reakcí za účasti laktózy jakožto redukcujícího sacharidu s aminokyselinami. Tyto reakce jsou častější u mléka ošetřeného velmi vysokou sterilační teplotou. Mají negativní vliv na organoleptické vlastnosti mléka, především na jeho barvu a chuť [1,29].

2.3 Vliv záhřevu na vitamíny a minerální látky

Vitamíny rozpustné v tucích mají relativně dobrou tepelnou stabilitu, při záhřevu kolem 100°C nedochází k jejich významným ztrátám. Jiná situace nastává u vitamínů rozpustných ve vodě. Velká většina těchto mikronutrientů je velmi citlivá k záhřevu a působením vysokých teplot dochází k jejich citelným ztrátám. Výjimku v tomto případě tvoří vitamín B₂ – Riboflavin. Při použití pasteračních teplot nedochází k žádným ztrátám vitamínu, během UHT záhřevu jsou pozorované změny jen minimální [2,30].

Přestože jsou minerální látky zastoupeny v mléku poměrně nízkým procentem, mají vliv na velké množství procesů, které v mléku probíhají. Záhřev mléka má jen minimální vliv na přítomné formy minerálních solí, výjimku však v tomto případě tvoří uhličitaný a fosforečnan vápenatý. Většina potencionálního uhličitanu se vyskytuje v mléku ve formě CO₂, který se záhřevem odpařuje a dochází k poklesu pH mléka. V případě fosforečnanu vápenatého dochází při zvýšení teploty k jeho vysrážení a vzniku jeho koloidní formy [1,2].

2.4 Vliv záhřevu na enzymy

Tepelným ošetřením mléka dochází k inaktivaci většiny přítomných enzymů a to jak nativních, které jsou přirozenou součástí mléka, tak i exogenních, které byly syntetizovány kontaminujícími mikroorganismy. Inaktivací přítomných enzymů dochází ke zvýšení stability mléka a následně také mléčných výrobků. Vzhledem k velkému množství a rozmanitosti enzymů obsažených v mléku existuje množství kombinací různých teplot a časů potřebných k jejich inaktivaci. Zvláštní skupinu tvoří enzymy, jejichž inaktivace je používána jako ukazatel správnosti provedení tepelného ošetření. Je to především alkalická fosfatáza, jejíž inaktivace potvrzuje správnost provedení pasterace mléka a laktoperoxidáza jako indikátor potvrzení úspěšného průběhu vysoké pasterace [2,12,31].

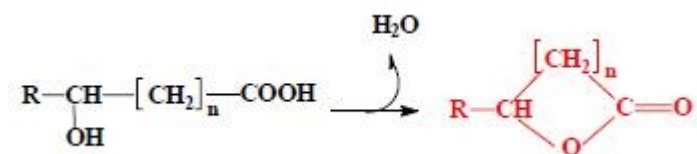
2.5 Vliv záhřevu na lipidy

Tepelné ošetření mléka má na strukturu mléčných lipidů zpravidla jen minimální vliv. Vzhledem k rozdílům v hustotě mezi tukovou a vodnou fází vyplouvají tukové kuličky na povrch, kde dochází k jejich agregaci podporované specificky u kravského mléka kryoglobuliny (skupina imunoglobulinů), a vzniká tak povrchová vrstva smetany. Pokud však aplikujeme záhřev nad 70°C, dochází k nevratné denaturaci kryoglobulinů a narušení tvorby této povrchové vrstvy [2].

Další změny pozorované během tepelného ošetření mléka u lipidů se odehrávají v membránách tukových kuliček. Mícháním zejména teplého mléka, v němž je tuk tekutý, může způsobit změny ve velikosti tukových kuliček v důsledku jejich koalescence nebo narušení. K významnému narušení dochází zejména při UHT ošetření. Během záhřevu nad 70°C dochází k denaturaci membránových proteinů a jejich interakcím s různými aminokyselinami, zejména cysteinem. V takovém případě může dojít k uvolnění H₂S zapříčínující vznik nepříjemné chuti, nebo interakcím se syrovátkovými bílkovinami prostřednictvím disulfidových můstků. V tomto případě dochází při teplotách vyšších než 100°C ke vzniku vrstvy denaturovaných syrovátkových bílkovin na povrchu tukových kuliček. Membránové proteiny mohou rovněž podléhat Maillardovým reakcím [1,2,32,33,34].

V důsledku působení vysokých teplot může dojít k separaci Cu a tím zvýšení oxidační stability mléčného tuku. Během působení velmi vysokých teplot dochází k tvorbě volného tuku, který je mnohem náchylnější k oxidaci způsobující žluknutí tuku [1,2,35].

Působením velmi vysokých teplot dochází ke konverzi hydroxykyselin na laktony (viz Obr. 9) čímž dochází k vývoji žádoucích organoleptických vlastností mléčného tuku [1].



Obrázek 9: Obecné schéma vzniku laktonu [36]

Může také dojít k uvolnění mastných kyselin a jejich interesterifikaci, ale tyto změny nenašávají v průběhu klasického tepelného ošetření. Polynenasycené mastné kyseliny (především kyselina linolová) mohou být přeměněny na konjugované izomery pouze během působení velmi vysokých teplot [1].

3 LUMINISCENČNÍ SPEKTROSKOPIE

Luminiscenční spektroskopie patří k moderním analytickým metodám využívaným v nej-různějších vědních oborech včetně potravinářství. Její použití nabízí benefity v podobě jednoduchosti, spolehlivosti a rychlosti analýzy a charakterizace potravin bez nutnosti jejich porušení či rozkladu. Cílem luminiscenční spektroskopie je vyhodnocení spektra vzniklého luminiscenčním zářením [37,38,39].

3.1 Luminiscence

Luminiscence je charakterizována jako stav, kdy pevná, kapalná nebo plynná látka vydává elektromagnetické záření, které značně převyšuje tepelné vyzařování molekul dané látky. K vyvolání luminiscence je nezbytná absorpce energie. Tuto prvotní energii označujeme jako budící či excitační energii, která se dále dělí na základě toho, jakým způsobem je látce dodána. Následkem dodání příslušné energie se látka dostává do excitovaného elektronového stavu charakteristického vyšší hladinou energie. Při návratu z excitovaných elektronových stavů zpět na původní hladinu energie dochází ke zmiňované luminiscenci [38,39,40].

Podle zdroje excitační energie rozlišujeme následující druhy luminiscence:

- Chemiluminiscence - energii poskytuje zpravidla exotermní chemická reakce
- Bioluminiscence – v tomto případě je zdrojem biochemická reakce, je typická pro živé organismy, např. světlušky
- Radioluminiscence – jako zdroj slouží radioaktivní záření
- Krystaloluminiscence – vznik luminiscence v průběhu krystalizace anorganických sloučenin
- Elektroluminiscence – energii poskytuje elektrický proud
- Fotoluminiscence – zdrojem excitační energie je viditelné záření nebo UV záření.

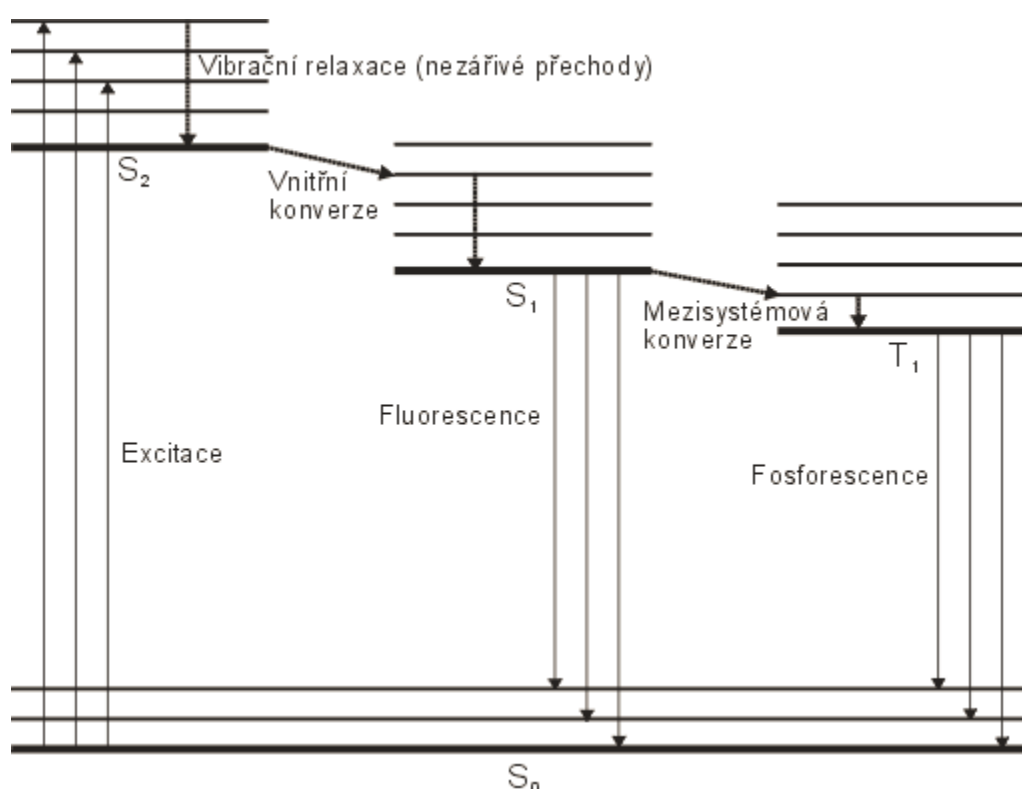
Luminiscence se dále dělí na:

- Fluorescenci – během fluorescence nedochází ke změně spinu v průběhu energetického přechodu. Emise záření je vyvolána jedním nebo více spontánními přechody a je typická velmi krátkou dobou dohasínání.

- Fosforescenci – v průběhu fosforescence dochází k zakázanému přechodu, který je charakteristický změnou spinu. Návrat z excitovaných stavů se vyznačuje delší dobou dohasínání, řádově $> 10^{-8}$.

- Zpožděnou fluorescenci – tento povolený zářivý přechod probíhá ze stejné energetické hladiny jako v případě fluorescence ale s podstatně delší dobou dohasínání, která je přibližně stejná jako během fosforescence [39,40,42].

To jak tyto elektronové přechody probíhají, přibližuje Jablonského diagram (viz Obr. 10) [43].



Obrázek 10: Jablonského diagram [43]

3.1.1 Excitované stavy

Základní energetický stav molekuly - S_0 - je stavem s nejnižší energií. Pokud molekula v tomto základním stavu absorbuje foton, dochází k vybuzení valenčního elektronu, tzv. excitaci elektronu do orbitalu s vyšší energií a vzniká tzv. excitovaný stav [41,44,45].

Existují dva typy excitovaných stavů:

- Singletový stav je takový, ve kterém jsou všechny spiny spárovány. Tento stav je typický při fluorescenci.

- Tripletový stav se vyznačuje dvěma nepárovými elektrony s rovnoběžnými spiny, typický pro fosforescenci.

Rychlost absorpce fotonů je velmi rychlá a probíhá v rozmezí $10^{-14} - 10^{-15}$ s. Naopak fluorescenční emise se vyznačují výrazně pomalejší rychlostí, v průměru asi $10^{-5} - 10^{-10}$ s. Vzhledem k tomu, že přechod z tripletového do singletového stavu je podstatně pomalejší než přechod singlet – singlet, fosforescenční emise trvají v řádu $10^{-4} - 10$ a více s. [41,45].

3.1.2 Zhasínání excitovaných stavů

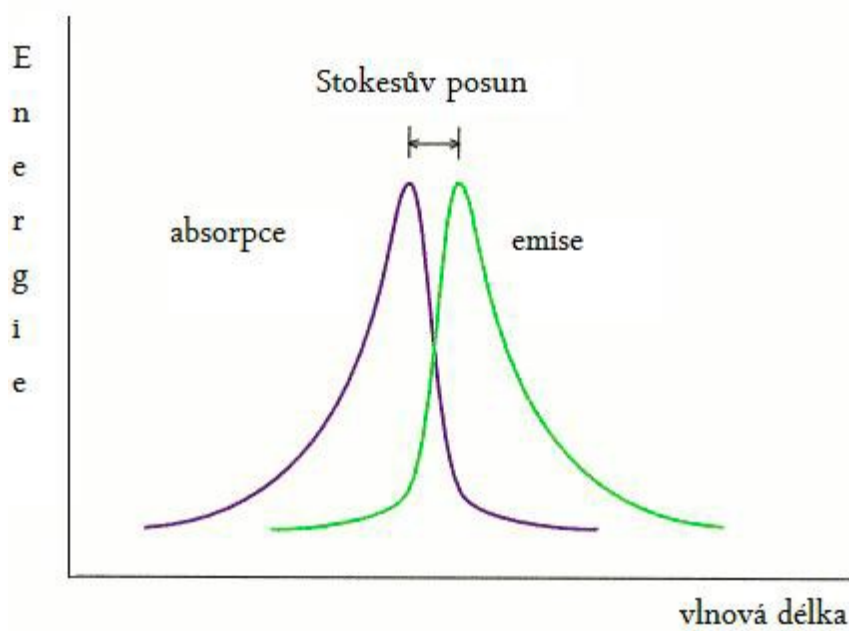
Excitovaný stav molekuly je přechodným jevem. Vzhledem k tomu, že molekula přijatou energii emituje, nastává návrat z vybuzeného stavu zpět do stavu základního. K tomuto návratu může docházet třemi základními způsoby:

- Zářivé přechody – jedná se o přechod molekuly z vyšší energetické hladiny do nižší emisí fotonu. K tomuto přechodu dochází buď spontánně, nebo je vyvolán působením vnějšího účinku elektromagnetického záření.
- Nezářivé přechody – nedochází ke změně energie systému a z tohoto důvodu není emitováno záření.
- Fotochemické reakce – v tomto případě dochází díky absorpci světla ke vzniku různých organických látek – typickým příkladem je fotosyntéza [42,45].

3.1.3 Charakterizace luminiscence

Luminiscenci lze charakterizovat několika základními znaky. Patří k nim zejména:

- Emisní spektrum je možné vyjádřit jako závislost intenzity emitovaného záření na vlnové délce. Emisní spektrum je měřeno při konstantní vlnové délce.
- Excitační spektrum je vyjádřením závislosti absorpce záření fluoroforu na vlnové délce, měřeno rovněž při konstantní vlnové délce.
- Zrcadlové pravidlo vyjadřuje skutečnost, že emisní a excitační spektra u organických sloučenin mají téměř stejný tvar, jsou však zrcadlově obrácená.
- Stokesův posun porovnává energii absorbovaného záření s energií emitovanou při přechodu molekuly zpět do základního stavu. Na obrázku 11 lze pozorovat, že vlnová délka emisního záření je větší než vlnová délka záření excitačního [38,46].

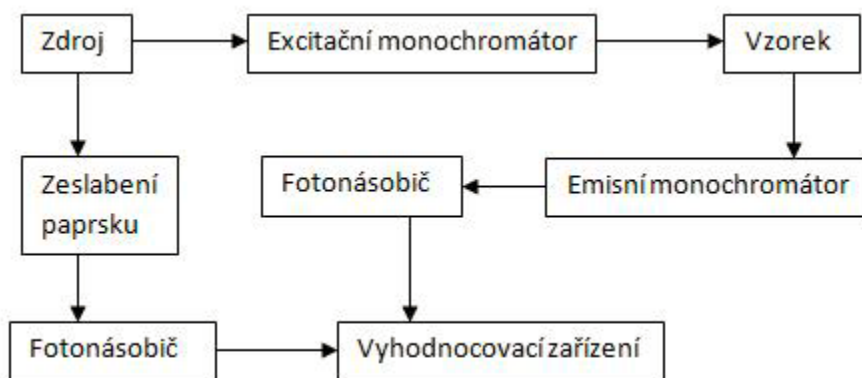


Obrázek 11: Stokesův posun [43]

- Kvantový výtěžek Φ_f je veličina, kterou lze vyjádřit účinnost luminiscence, je definován jako závislost počtu vyzářených fotonů k počtu fotonů absorbovaných.
- Vavilovův zákon – Doba trvání vybuzeného stavu molekul v roztoku a kvantový výtěžek nezávisí na vlnové délce excitačního záření, z čehož je odvozena standardní vlastnost fluorescence, že emisní spektra jsou nezávislá na vlnové délce excitace [40,41,46,47].

K charakterizaci spektrálního složení emitovaného záření jsou používány monochromátory. Zpravidla je používán jeden pro emisi a druhý pro excitaci. Budící zdroj dodává excitační energii do zkoušeného vzorku za vzniku luminiscenčního záření. Za pomoci detektoru je následně zaznamenaný optický signál přeměněn na signál elektrický. Tento elektrický signál je poté zpracován příslušným softwarem. Výsledkem měření jsou výše zmiňovaná emisní a excitační spektra. Jednoduché schéma fluorescenčního spektrometru je znázorněno na obrázku 12 [39,42].

Vzhledem ke skutečnosti, že luminiscenční záření se ze vzorku šíří všemi směry, je používáno k jeho zachycení různých uspořádání měřící aparatury. K nejběžněji používaným patří uspořádání na průchod a uspořádání na odraz [41].



Obrázek 12: Schéma fluorescenčního spektrometru [39]

3.2 Lumifory

Základním předpokladem vzniku luminiscence u sledovaného vzorku je schopnost jeho molekul absorbovat viditelné nebo UV záření. Čím větší schopnost má daná látka absorbovat energii, tím výraznější luminiscenci lze pozorovat [38,44].

Jako lumifory jsou označovány látky, které mají schopnost absorbovat energii a následně ji emitovat ve formě světla. Takovéto látky přítomné ve sloučeninách jim pak dodávají schopnost fluorescence, která je pozorována převážně u organických sloučenin. Významnou úlohu však mají rovněž funkční skupiny, které jsou s lumifory vázány. V závislosti na druhu navázané skupiny je intenzita luminiscence zesilována nebo zeslabována. Lumifory se dělí do dvou hlavních kategorií:

- Vnitřní lumifory jsou takové, které se ve sloučenině přirozeně vyskytují.
- Vnější lumifory jsou záměrně přidávány ke vzorku testované látky. Tyto lumifory jsou též označovány jako fluorescenční značky či fluorescenční sondy [48,49].

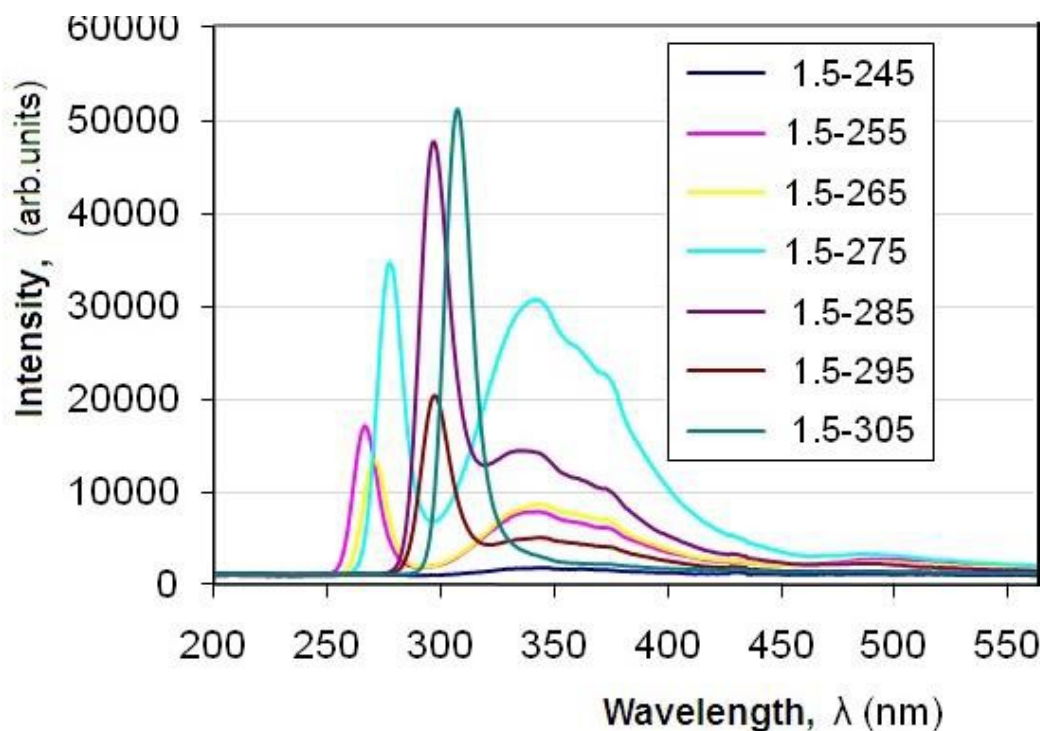
Molekuly způsobující vlastní fluorescenci testovaného vzorku jsou především aromatické aminokyseliny, redukované formy NADH, lipofilní vitamíny, hemoglobin či chlorofyl. Vnější neboli nevlastní fluorofory používané pro značení biomolekul jsou většinou fluorescenční barviva jako např. fluorescein nebo dansyl chlorid [48,49].

3.3 Aplikace fluorescenční spektroskopie při hodnocení kvality mléka a mléčných výrobků

Mléčné výrobky obsahují řadu sloučenin, které mají schopnost luminiscence. Díky obsahu těchto látek je možné použít metodu luminiscenční spektroskopie ke sledování průběhu nejrozličnějších změn v mléku a mléčných výrobcích. Mezi lumifory mléka patří zejména vitamíny rozpustné v tucích a to především vitamín A, dále produkty Maillardových reakcí, riboflavin, tryptofan, chlorofyly, nikotinamid adenin dinukleotid (NADH), produkty oxidace lipidů. Každý z těchto fluoroforů má jedinečné excitační a emisní spektrum, jehož pomocí je možné identifikovat strukturální změny molekuly [50].

Mezi chemické reakce vyvolané působením vysokých teplot na mléko a mléčné výrobky patří denaturace proteinů, Maillardovy reakce a degradace termolabilních vitamínů uvedených v kapitole 2.3. Za pomoci určitých fluorescenčních markerů lze sledovat změny způsobené různým stupněm tepelného zpracování. Jedná se zejména o riboflavin, tryptofan a produkty Maillardových reakcí [50,51,52].

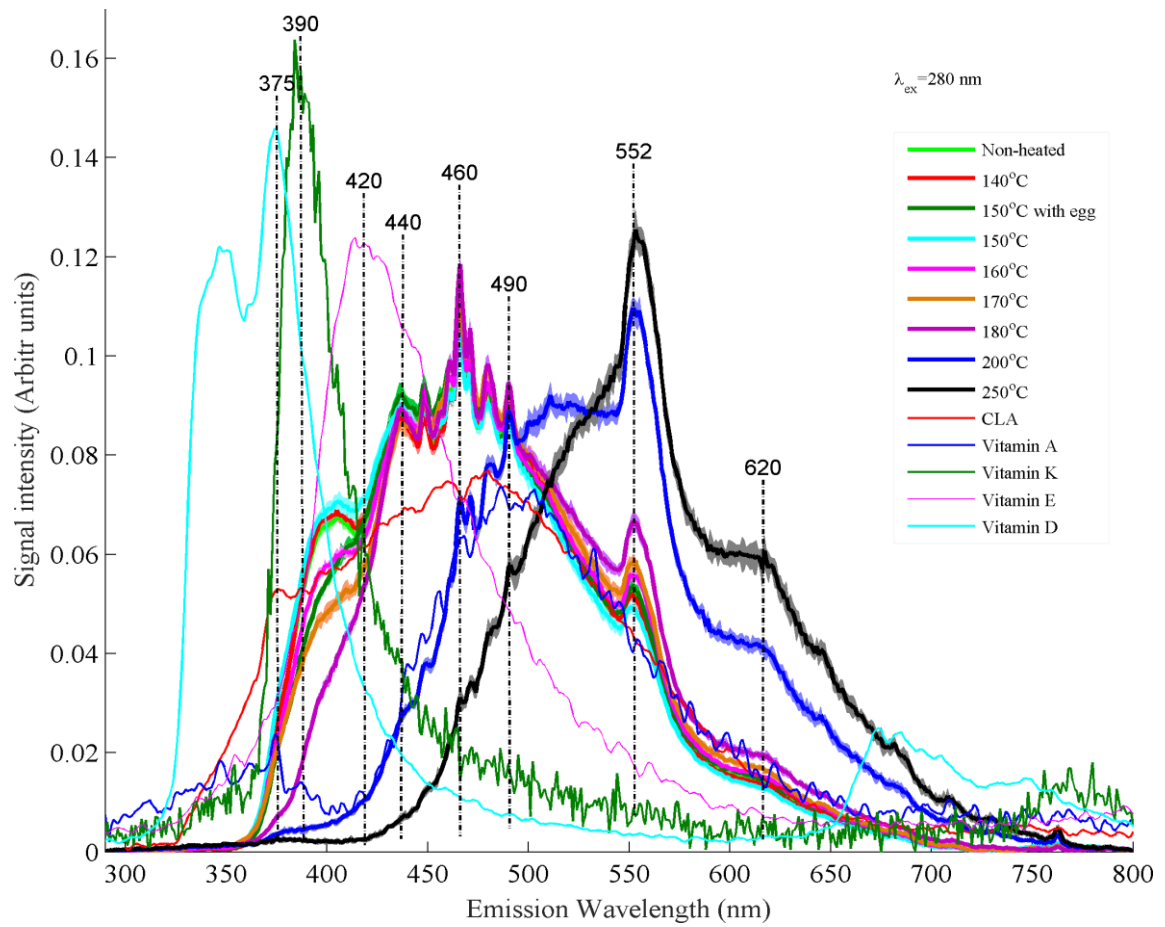
Na obrázku 13 jsou znázorněna spektra mléka s obsahem tuku 1,5 % naměřená při různých excitačních vlnových délkách. U všech vzorků lze zaznamenat výrazné píky v oblasti kolem 335 nm a 373 nm, které lze přičítat přítomnosti aromatických aminokyselin, nukleových kyselin a tryptofanových zbytků. U jednoho vzorku je patrný slabý vrchol v oblasti kolem 500 nm pravděpodobně v důsledku fluorescence riboflavinu. Vyšší odezva byla zaznamenána při použití excitačních vlnových délek 275nm, 285 nm a 305 nm [53].



Obrázek 13: Fluorescenční spektra mléka s tučností 1,5% měřená při různých excitačních vlnových délkách [53]

Na obrázku 14 je zobrazen záznam fluorescenčního spektra másla ghee naměřená při excitační vlnové délce 280 nm. Jsou zde uvedena emisní spektra vzorků před záhřevem a po záhřevu na teploty v rozsahu 140°C – 250°C po dobu 5 minut. Pro srovnání jsou zde rovněž zobrazena emisní spektra pro konjugovanou kyselinu linolenovou (CLA) a vitamíny A, D, E a K rovněž měřená při excitační vlnové délce 280 nm. Fluorescenční spektrum CLA vykazuje maxima v oblasti 450 – 480 nm, při 490 nm je zřetelná emise vitamínu A. Maximální emise vitamínu K jsou zaznamenány při 390 nm, pro vitamín D je to maximum při 390 nm, vitamín E vykazuje nejvyšší hodnoty emise při 420 nm [51].

U zahřátých vzorků lze sledovat významné spektrální změny. Fluorescenční pásy při vlnové délce 390, 440, 460 a 490 nm vykazují postupné snižování intenzity při teplotě nad 150 °C, což ukazuje na tepelnou oxidaci mononenasycených mastných kyselin, vitamínů a isomerů CLA. V oblasti od 350 do 490 nm je pozorován celkový pokles intenzity píku, který může být spojen s oxidací vitamínů K, D a E rozpustných v tucích, zatímco v další oblasti 490- 650 nm lze pozorovat celkové zvýšení intenzity, které může být spojeno s oxidací izomerů vitamínu A vznikem oxidačních produktů při 552 a 620 nm [51].



Obrázek 14: Fluorescenční spektra při $\lambda_{ex}=280\text{nm}$ ukazující srovnání mezi zahřátými a nezahřátými vzorky ghee, CLA a vitamíny A,D,E a K [51]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo využití metody fluorescenční spektroskopie pro sledování změn mléčného tuku, popř. mléka, ke kterým dochází během záhřevu.

Teoretická část byla orientována na:

- základní interpretaci chemického složení mléka a mléčného tuku a jejich změny probíhající v důsledku tepelného záhřevu
- popis základních principů luminiscenční spektroskopie
- možnost použití luminiscenční spektroskopie pro sledování změn, ke kterým dochází u mléka během záhřevu

Praktická část práce byla orientována na měření luminiscenčních charakteristik mléčného tuku a mléka s různou tučností, což zahrnovalo:

- Přípravu vzorků mléka s rozdílnou dobou a teplotou záhřevu
- Přípravu vzorků mléčného tuku s rozdílnou dobou a teplotou záhřevu
- Získání luminiscenčního profilu mléka a mléčného tuku
- Získání emisních spekter tepelně ošetřených vzorků mléka a mléčného tuku
- Sledování změn luminiscenčních charakteristik s narůstající teplotou záhřevu vzorku a délkou působení konkrétní teploty.

5 MATERIÁL A PŘÍSTROJE

5.1 Materiál

Máslo Krajanka (zakoupeno v obchodním řetězci LIDL)

Hodnoty uvedené výrobcem na obalu: sušina 84 % (w/w), mléčný tuk 82 % (w/w)

Výrobce

Mlékárna Čejetičky, spol. s r.o., Nádražní 14, 293 01 Mladá Boleslav

Mléko čerstvé polotučné Krajanka (zakoupeno v obchodním řetězci Coop – Terno)

Hodnoty uvedené výrobcem na obalu: tuky 1,5 g/100 ml, sacharidy 4,7 g/100 ml, bílkoviny 3,3 g/100 ml, sůl 0,1 g/100 ml

Mléko čerstvé plnotučné Krajanka (zakoupeno v obchodním řetězci Coop – Terno)

Hodnoty uvedené výrobcem na obalu: tuky 3,5 g/100 ml, sacharidy 4,4 g/100 ml, bílkoviny 3,3 g/100 ml, sůl 0,1 g/100 ml

Výrobce

Mlékárna Čejetičky, spol. s r.o., Nádražní 14, 293 01 Mladá Boleslav

5.2 Přístroje a software

PC – 1 Photon Counting 001 Steady-State Spectroscopfluorometer (ISS, USA)

VINCI – Multidimensional Fluorescence Spectroscopy (software)

Magnetické míchadlo s ohřevem MSH 20 D

Běžné laboratorní sklo a pomůcky

6 METODIKA

6.1 Příprava teplotních řad vzorků

Postup přípravy vzorků másla

Vzorky pro účely měření luminiscenčních charakteristik másla vystaveného stoupajícímu záhřevu byly připraveny následujícím způsobem. V prvním kroku bylo nutné připravit zdrojový tepelně neupravený vzorek másla. Ten byl připraven tak, že tepelně neupravené máslo bylo pouze rozpuštěno do kapalné podoby, přefiltrováno přes gázu do hliníkové mističky a schlazeno.

V dalším kroku byly připraveny řady vzorků vystavené záhřevu na teploty 80°C, 100°C, 120°C, 140°C, 160°C a 180°C následovně:

- Máslo bylo rozpuštěno do kapalné podoby.
- Na předvážkách bylo naváženo 100 g kapalného másla.
- Máslo bylo zahříváno do dosažení teploty 80°C.
- Ihned po dosažení požadované teploty byl odebrán vzorek o objemu 10 ml, přefiltrován do hliníkové mističky, uzavřen hliníkovou fólií a okamžitě schlazen na ledu.
- Za udržování dosažené teploty byly odebírány další vzorky v časových úsecích 5, 10, 15 a 20 minut od dosažení požadované teploty.
- V dalším kroku bylo opět odebráno 100 g másla a proveden záhřev na 100°C, následné kroky probíhaly stejně jako u prvního záhřevu.
- Tímto postupem bylo finálně připraveno pro každou teplotu 5 vzorků, celkem tedy třicet vzorků vystavených záhřevu na teploty 80°C, 100°C, 120°C, 140°C, 160°C a 180°C a jeden zdrojový vzorek.
- Vzorky byly před provedením měření uchovávány při teplotě 4 – 8°C.

Postup přípravy vzorků mléka

Pro měření luminiscenčních spekter mléka byly vzorky připraveny následovně:

- Byly připraveny tepelně neupravené vzorky polotučného i plnotučného mléka a to tak, že mléko bylo vytemperováno na teplotu 20°C a poté byl odebrán do zkumavky vzorek o objemu 10 ml.
- Dále byly přichystány řady vzorků vystavené ohřevu na teploty 70, 80 a 90 °C.

- Mléko o objemu 150ml bylo zahříváno do dosažení teploty 70 °C.
- Ihned po dosažení požadované teploty byl odebrán vzorek o objemu 10 ml do zkumavky.
- Za udržování dosažené teploty byly odebírány do zkumavek další vzorky v časových úsecích 5, 10, 15, 20 a 30 minut od dosažení požadované teploty.
- Pro další teplotní řadu bylo opět odměřeno a zahříváno 150 ml mléka.
- Touto metodou bylo postupně připraveno 6 vzorků pro každou teplotu.
- Celkem bylo tedy přichystáno 18 vzorků polotučného mléka a 18 vzorků plnotučného mléka vystaveného záhřevu, jeden vzorek polotučného mléka a jeden vzorek plnotučného mléka bez záhřevu.
- Vzorky byly uchovávány při teplotě 4 – 8 °C, před samotným měřením byly temperovány na okolní teplotu.

6.2 Měření luminiscenčních charakteristik vzorků

Veškerá měření luminiscenčních spekter byla realizována na přístroji PC – 1 Photon Counting 001 Steady-State Spectrofluorometer (viz Obr. 15). Tento vysoce citlivý, kompaktní, počítačem řízený fotonometrický spektrofotometr je určený pro aplikace ve fyzikální chemii, biochemii, fyziologii, molekulární biologii či environmentální analýze. Následné zpracování naměřených dat pro vyhodnocení intenzity fluorescence proběhlo v programu VINCI - Multidimensional Fluorescence Spectroscopy.

Funkci budícího zdroje excitace plní vysokotlaká xenonová oblouková lampa, která vytvoří dostatečnou energii pro excitaci měřeného vzorku. Budící paprsek prochází přes excitační a emisní monochromátor. Monochromátory jsou optické mřížky, jejichž otáčením dochází k nastavení excitační a emisní vlnové délky. Funkci detektoru plní fotonásobič pracující v režimu čítání jednotlivých fotonů.

Samotné měření vzorků probíhalo v uspořádání na odraz. Vzorky byly umístěny v hliníkových mističkách ve vodorovné poloze do temné komory tak, aby měření proběhlo bez vlivu vnějšího světla. Do této komory byl vyveden z přístroje optický kabel (viz Obr. 16).



Obrázek 15: PC – 1 Photon Counting 001 Steady-State Spectrofluorimeter [54]



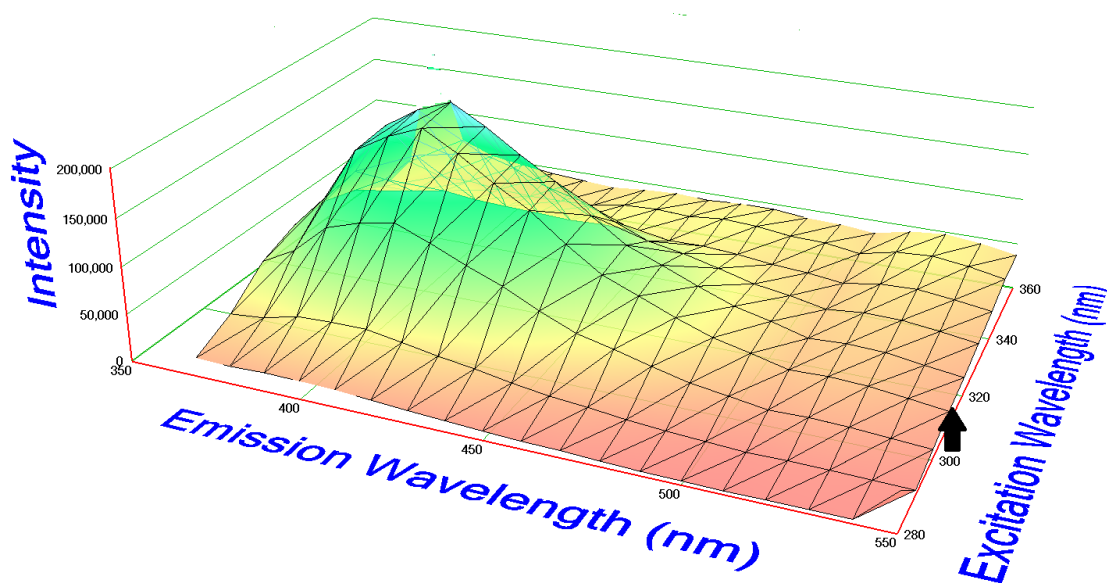
Obrázek 16: Měření vzorků v temné komoře

7 VÝSLEDKY A DISKUSE

7.1 Výběr vhodné excitační vlnové délky

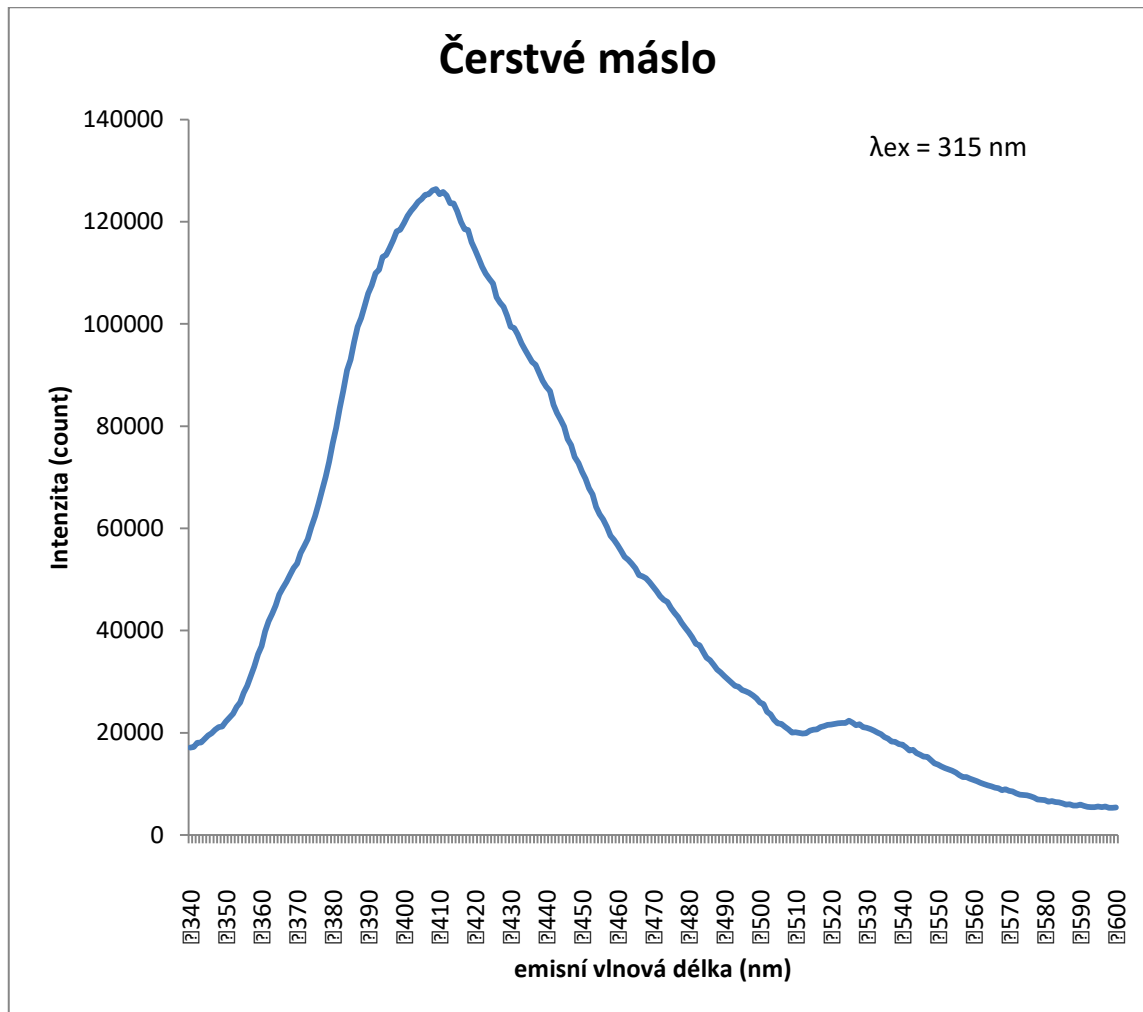
Proměřením tepelně neupravených vzorků mléka a másla spektrofotometrem byla získána jejich luminiscenční charakteristika, tzv. 3D mapa. Jedná se o závislost intenzity fluorescence na excitační a emisní vlnové délce. Na ose y je vynesena intenzita (counts), na ose x emisní vlnová délka (nm) a na ose z excitační vlnová délka (nm). Na obrázku 17 je zobrazena 3D mapa másla. Na základě této luminiscenční charakteristiky byla zvolena taková excitační vlnová délka, která poskytuje nejvhodnější podmínky potřebné k měření intenzity luminiscence. Jedná se o takovou excitační vlnovou délku, při které intenzita emise dosahuje nejvyšších hodnot.

Z obrázku je zřejmé, že maximální emise probíhá v rozsahu vlnových délek 310 – 320 nm. Z tohoto důvodu byla pro naměření spekter mléčného tuku zvolena excitační vlnová délka 315 nm. Obdobným způsobem byly proměřeny rovněž vzorky polotučného a plnotučného mléka. Jejich luminiscenční charakteristiky jsou uvedeny v přílohách PI a PII. Pro následné měření vzorků mléka byla na základě charakteristik zvolena optimální excitační vlnová délka 280 nm, aplikovaná rovněž ve studii Dimitrova et al.(2014) [53].



Obrázek 17: Luminiscenční charakteristika másla

7.2 Luminiscenční spektra másla



Obrázek 18: Emisní spektrum čerstvého másla

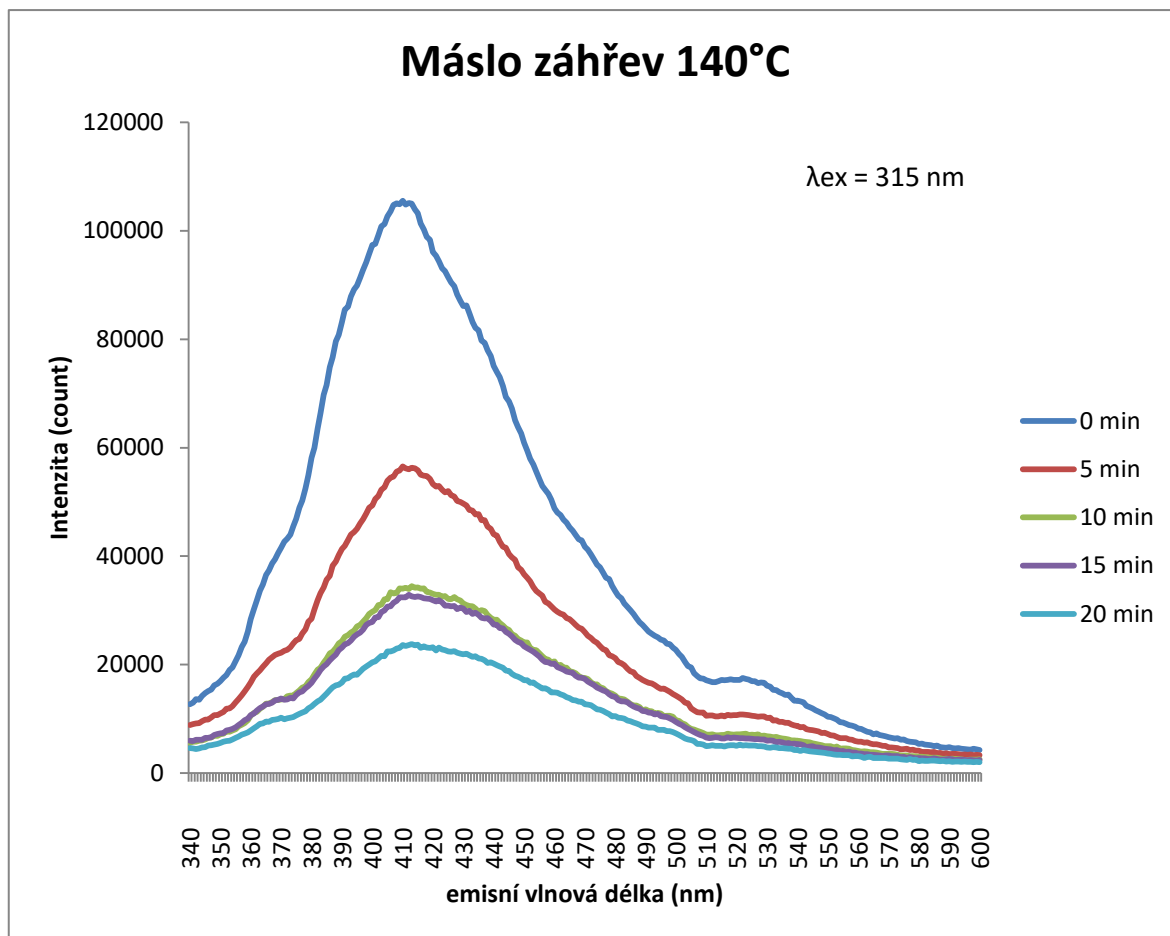
Obrázek 18 ukazuje emisní spektrum tepelně neupraveného vzorku čerstvého másla, který byl změřen při excitační vlnové délce 315 nm v rozmezí emisních vlnových délek 340 – 600 nm. Při bližším pohledu lze na této luminiscenční křivce vysledovat několik výrazných vrcholů. Nejvýraznější pík lze pozorovat v rozmezí vlnových délek 350 – 490 nm s maximální emisí při hodnotě vlnové délky 410 nm. Další méně výrazný pík je možné rozlišit v oblasti 360 – 370 nm s maximem 368 nm, velmi nevýrazný píky lze pozorovat při 393 nm a v rozmezí hodnot 494 – 505 nm s maximem při hodnotě emise 500 nm. Ještě jeden pík lze sledovat v oblasti 520 – 540 nm, jeho maximum má hodnotu 525 nm. Studie Dimitrova et al.(2014) uvádí, že píky v oblasti kolem 370 nm lze přičíst přítomnosti aromatických aminokyselin, nukleových kyselin a tryptofanových zbytků [53]. Vlastní

fluorescence mléčných proteinů je způsobena třemi aromatickými aminokyselinami: tryptofanem, tyrosinem a fenylalaninem, přičemž největší intenzitu fluorescence vykazuje tryptofan. Podle studie Ahmad et al. (2018) rovněž v oblasti 380 – 500 nm fluoreskují izomery CLA a oblast kolem 380 - 390 nm odpovídá zejména vitamínům rozpustným v tucích. Koncentrace lipofilních vitamínů obsažených v mléčném tuku přibližuje kapitola 1.1.3 v tabulce č. 2. Výrazné vrcholy v této oblasti jsou pozorovány především pro vitamíny D (375 nm) a K (390 nm). Je tedy pravděpodobné, že píky, které byly naměřeny při hodnotách emise 368 nm a 393 nm odpovídají těmto vitamínům [51,55]. Lze také porovnat se spektry jednotlivých vitamínů zobrazených na obrázku 14. Pro přesnější interpretaci spekter by bylo potřebné použít softwaru k vyhodnocení píků, který umožní jejich zvýraznění.

Vitamín E vykazuje emisi v širokém pásmu od 350 – 600 nm s vrcholem při 420 nm (Ahmad et al., 2018), jiná studie naopak uvádí maximum emise při 525 nm (Kongbonga et al.), což se shoduje s naměřenou hodnotou vzorku másla (viz Obr 18) [51,56].

Ze studie Kongbonga et al. (2011) lze usuzovat, že oblast mezi 400 – 500 nm odpovídá přítomnosti produktů oxidace, zejména aldehydů a ketonů [51,56].

7.2.1 Závislost intenzity luminiscence na době záhřevu

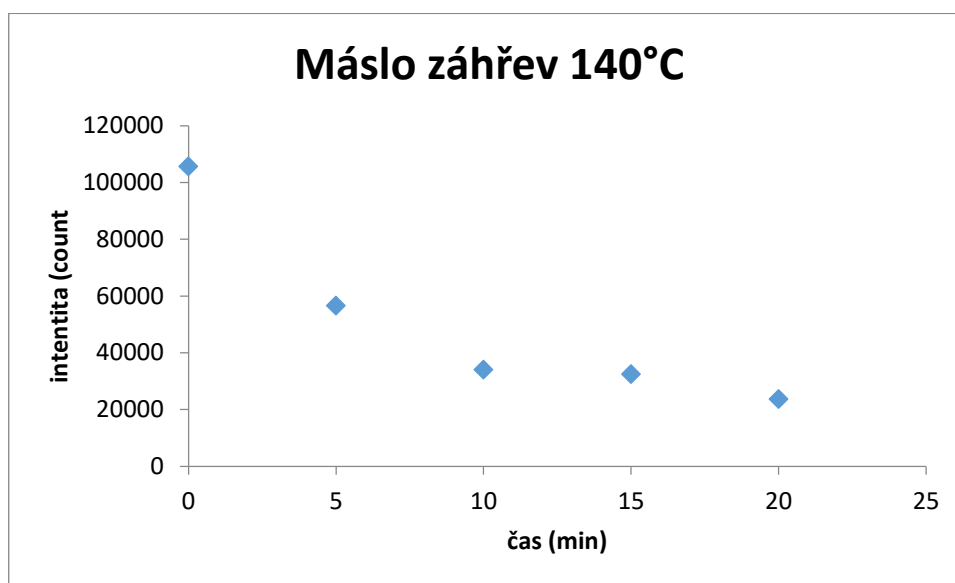


Obrázek č. 19: Emisní spektrum másla po záhřevu na 140°C po dobu 0 – 20 minut

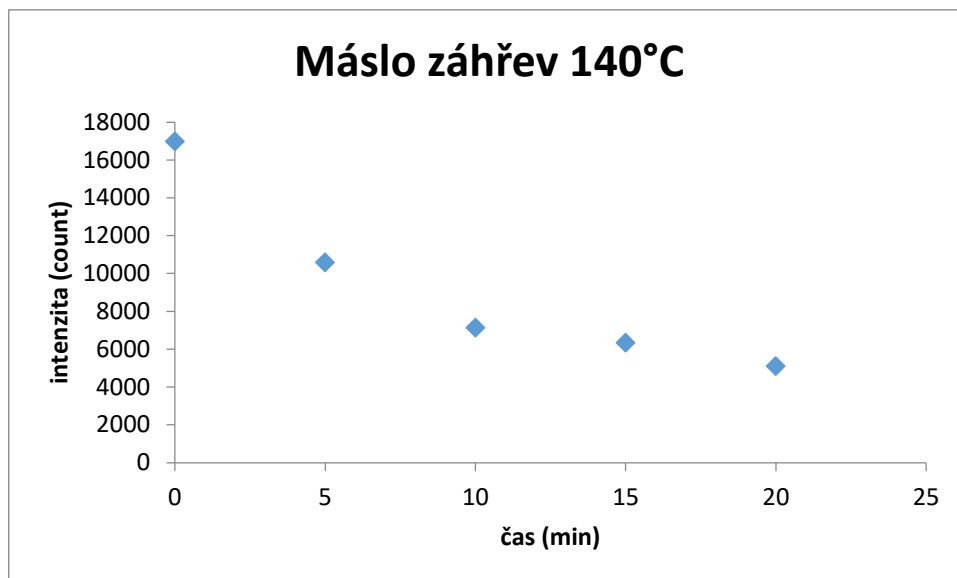
Cílem tohoto experimentu bylo sledovat změny luminiscenčních spekter v souvislosti s narůstající teplotou záhřevu vzorků másla a dobou působení dané teploty pro teploty v rozsahu 80 – 180°C. Na obrázku 19 je zobrazen graf závislosti intenzity luminiscence másla po záhřevu na teplotu 140 °C na době působení této teploty. Jednotlivé luminiscenční křivky představují fluorescenční spektra pěti vzorků, jež byly vystaveny dané teplotě v různých časových intervalech. První vzorek byl odebrán ihned po dosažení teploty 140°C, následoval odběr dalších čtyř vzorků vždy po pěti minutách, v časech 5, 10, 15 a 20 min od záhřevu. Z grafu je patrné, že s narůstající dobou expozice vzorku dané teplotě dochází k poklesu intenzity luminiscence. Maximální hodnoty intenzity záření tedy vykazuje vzorek, který byl odebrán ihned po dosažení potřebné teploty. Maximální naměřené hodnoty přesahovaly 105000 countů. Po záhřevu v trvání 20 minut je patrný prudký pokles intenzity luminiscence. Maximální hodnoty u tohoto vzorku nepřesahují 24000 countů.

Pro následující vyhodnocení závislosti intenzity luminiscence na době záhřevu byly vybrány dva nejvýraznější píky s emisí 410 nm a 525 nm.

Na obrázku 20 je znázorněna závislost intenzity luminiscence na době záhřevu pro pík na 410 nm. Z grafu je zřejmý postupný pokles intenzity, nejedná se ovšem o lineární závislost. Mezi časy 0 min a 5 min je parný prudký pokles intenzity z hodnoty 105540 countů na 56553 countů. V čase 10 min už pokles není tak strmý, rozdíl činí jen 22654 countů. Mezi dobou záhřevu 10 min a 15 min dochází k určité stabilizaci luminiscence, hodnoty se liší jen o 15089 countů. Po dvaceti minutách záhřevu dochází opět k prudšímu poklesu intenzity záření na konečnou hodnotu 23628 countů. Velmi podobný trend poklesu luminiscence je zřejmý také u druhého sledovaného píku s emisí na 525 nm (viz Obr 21).



Obrázek 20: Závislost intenzity luminiscence másla na době záhřevu při teplotě 140°C – pík na 410 nm

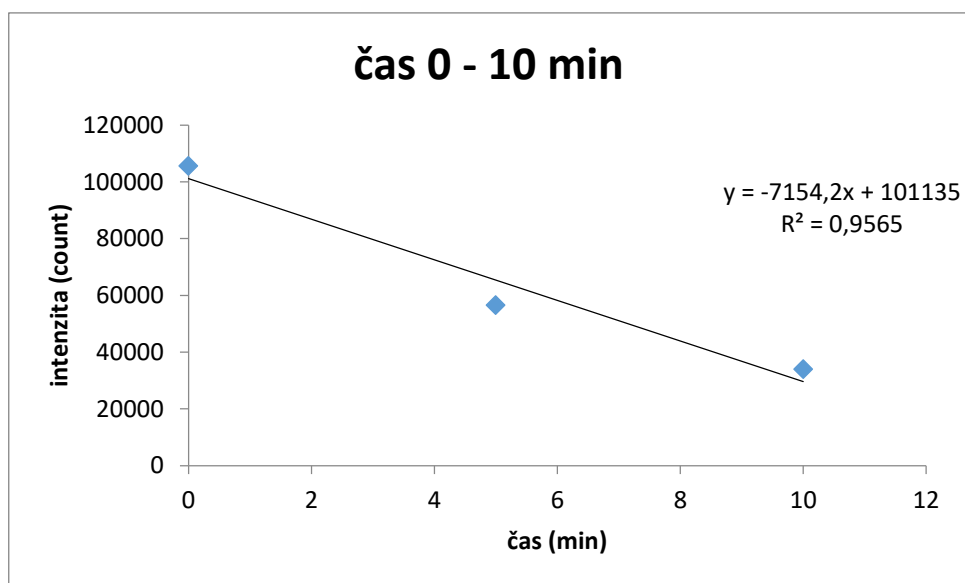


Obrázek 21: Závislost intenzity luminiscence másla na době záhřevu při teplotě 140°C – pík na 525 nm

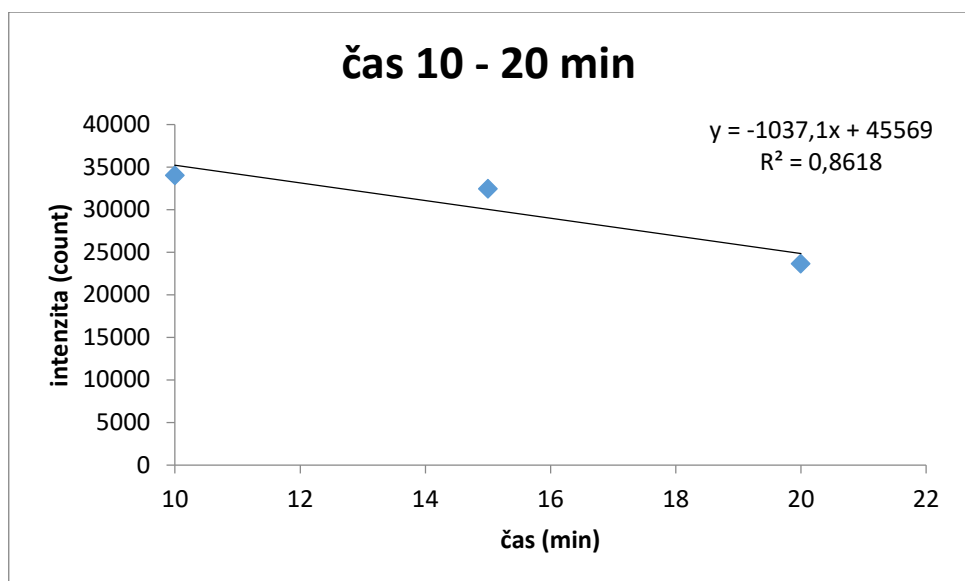
U sledovaných píků je tedy zřetelně patrný pokles intenzity luminiscence s narůstající dobou záhřevu. Lze tedy předpokládat, že s narůstajícím časem dochází k postupné tepelné oxidaci složek mléčného tuku. Tento pokles v dané oblasti je pozorován také ve studii Ahmad et al.(2018), při záhřevu trvajícím 5 minut [51]. Současně je ve všech případech patrná jistá stabilizace intenzity fluorescence mezi časy 10 a 15 minut záhřevu.

U obou vrcholů je však možné rozlišit dvě oblasti s patrnou lineární závislostí, kdy jedna oblast zahrnuje délku záhřevu 0 – 10 minut, druhá oblast probíhá v časovém intervalu záhřevu 10 – 20 minut.(viz Obr 20 a 21). Tento trend je patrný u všech sledovaných teplot. V případě teploty záhřevu na 80°C je patrná lineární závislost v celém rozsahu měřených časů. Na obrázku 22, 23, 24 a 25 jsou vyneseny grafy těchto oblastí pro sledované píky při teplotě záhřevu 140°C. Z těchto grafů je patrné, že byly zachyceny dva procesy, ke kterým během záhřevu vzorků dochází. Tyto dvě oblasti grafu byly vyhodnocovány odděleně. Výsledky byly proloženy přímkou pro získání směrnice trendu (viz Obr. 22, 23, 24, 25). Tato směrnice může být považována za charakteristiku daného dílčího procesu, kde odpovídá rychlosti poklesu luminiscence během tepelného záhřevu. Takovým způsobem byly vyhodnoceny všechny grafy závislosti intenzity emise píků 410 nm a 525 nm, kdy u každého grafu byly odděleně vyhodnoceny dvě oblasti vykazující lineární závislost. Tyto grafy jsou uvedeny v příloze P III pro pík na 410 nm a v příloze P IV pro pík na 525 nm. Pro

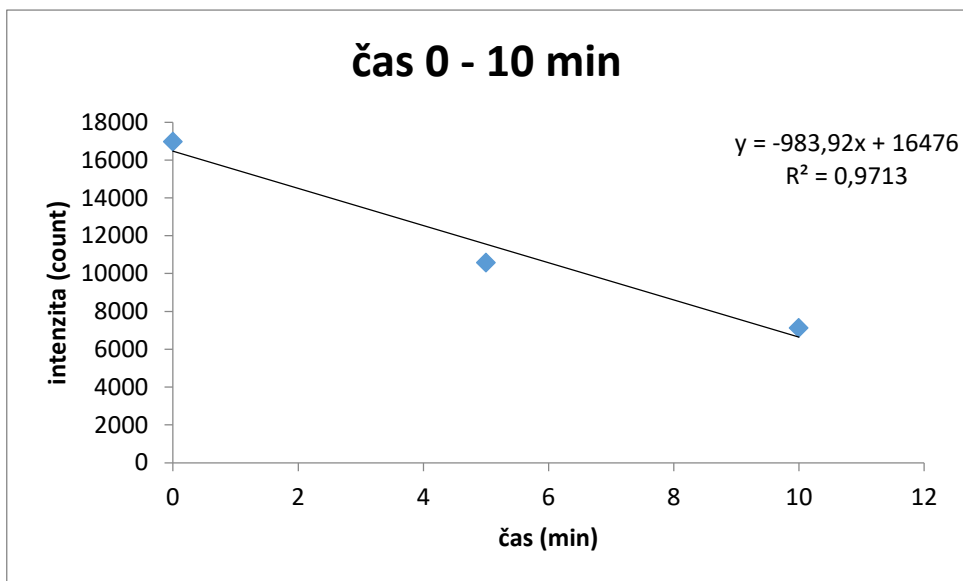
zachycení poklesu luminiscence se projevilo odběr vzorků v intervalu 5 minut jako nedostatečný pro přesnější interpretaci výsledků. Pro upřesnění výsledků by bylo potřeba větší množství naměřených hodnot. Tento problém by bylo možné řešit např. odběrem vzorků v intervalu jedné minuty.



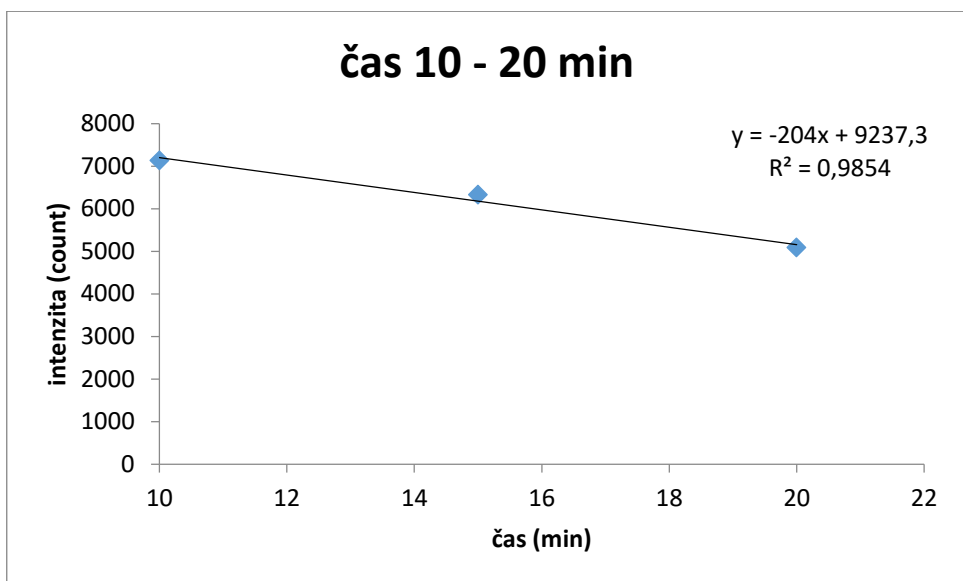
Obrázek 22: Závislost intenzity luminiscence másla na době záhřevu při teplotě 140°C – pík na 410 nm čas 0 – 10 min



Obrázek 23: Závislost intenzity luminiscence másla na době záhřevu při teplotě 140°C – pík na 410 nm čas 10 – 20 min



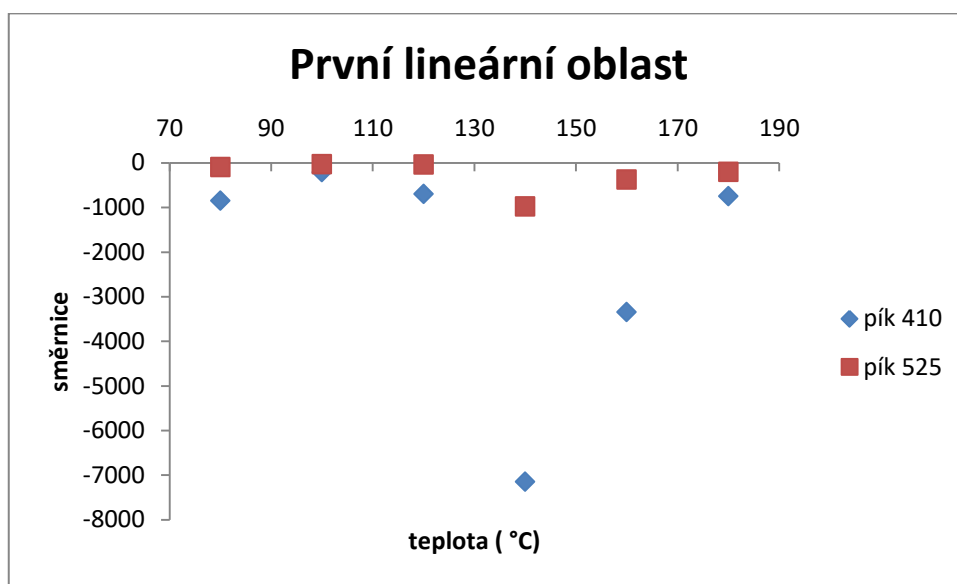
Obrázek 24: Závislost intenzity luminiscence másla na době záhřevu při teplotě 140°C – pik na 525 nm čas 0 – 10 min



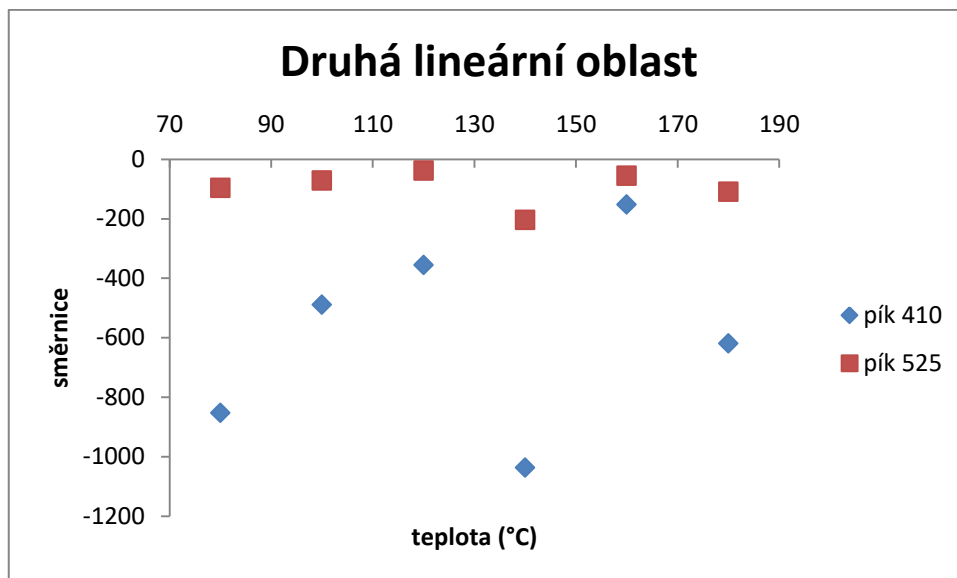
Obrázek 25: Závislost intenzity luminiscence másla na době záhřevu při teplotě 140°C – pik na 525 nm čas 10 – 20 min

Rychlost změny luminiscence

Jako další možnost, která se nabízí pro vyhodnocení měření, je sledování závislosti zaznamenaných směrnic na teplotě záhřevu vzorků. Tyto zaznamenané směrnice vyjadřují rychlost změny luminiscence. Směrnice sledovaných lineárních oblastí pro píky na 410 nm a 525 nm byly vyneseny do grafů v závislosti na teplotě záhřevu (viz Obr 26 a 27). Z grafického znázornění závislosti směrnice obou lineárních oblastí na teplotě záhřevu je zřejmé, že zde není patrný trend, který by bylo možné jednoduchým způsobem vyhodnotit. Interpretace tohoto děje a možných chemických změn ve vzorcích je velmi komplikovaná a vyžadovala by další současně provedené analýzy jednotlivých složek ve vzorku. Přesto lze z grafů zaznamenat výraznou změnu směrnice u teploty 140 °C pro oba sledované emisní píky.

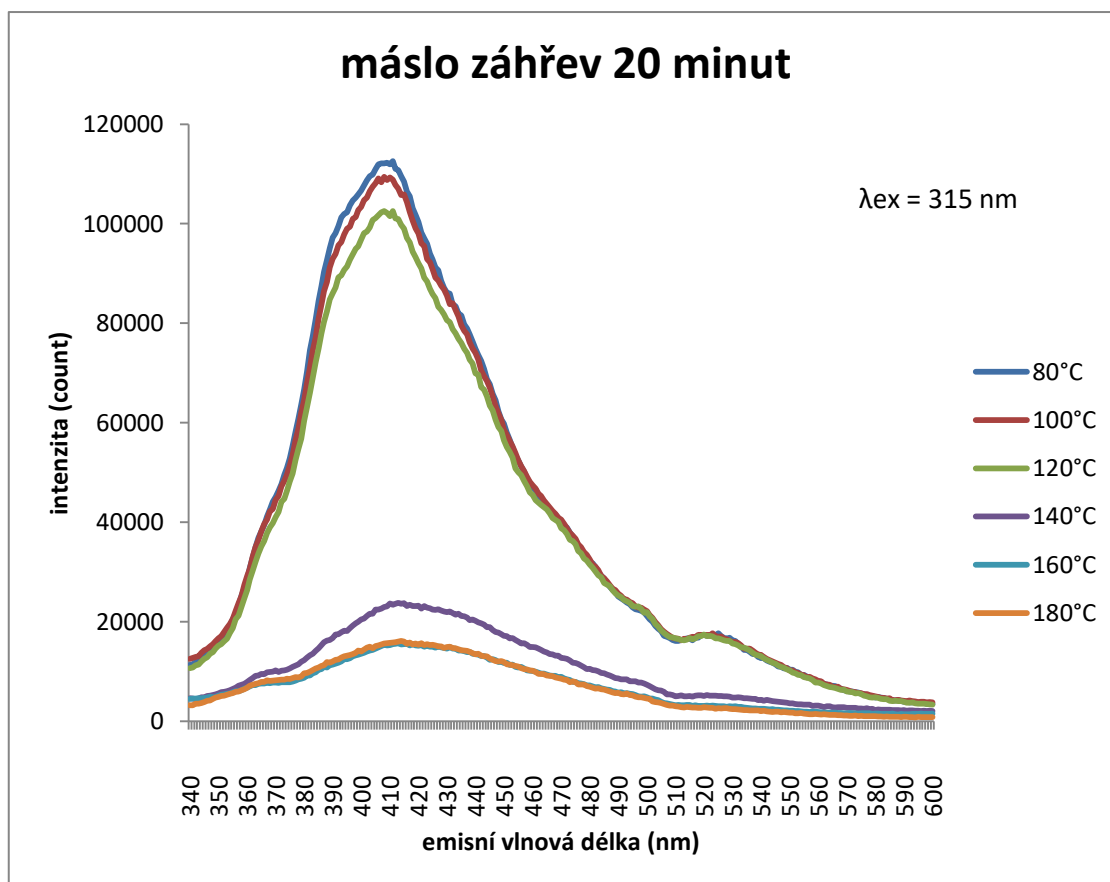


Obrázek 26: Závislost směrnice poklesu intenzity luminiscence na teplotě záhřevu během 0-10 min trvání záhřevu.



Obrázek 27: Závislost poklesu intenzity luminiscence na teplotě záhřevu během 10-20 min trvání záhřevu.

7.2.2 Závislost intenzity luminiscence na teplotě záhřevu

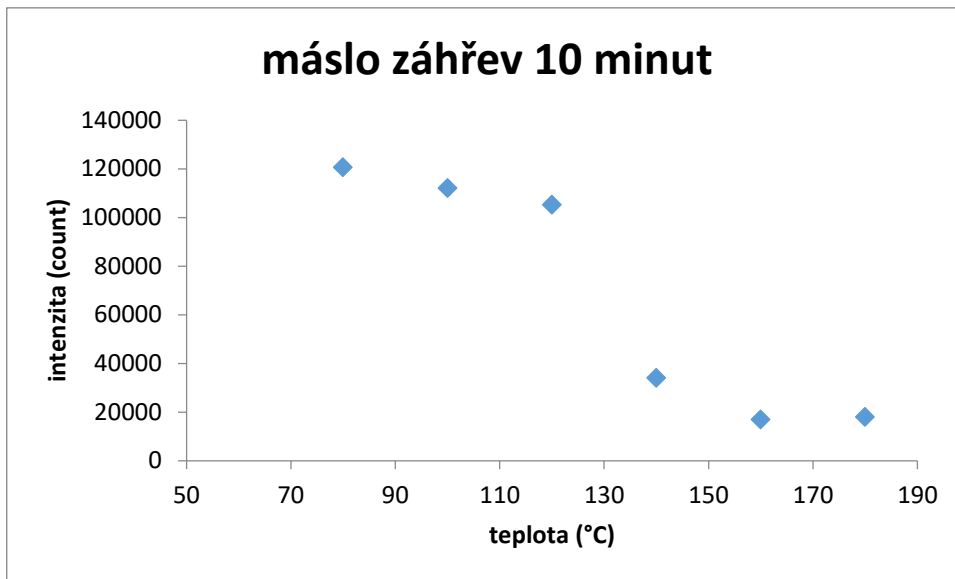


Obrázek 28: Závislost intenzity luminiscence másla na teplotě záhřevu v čase 20 min

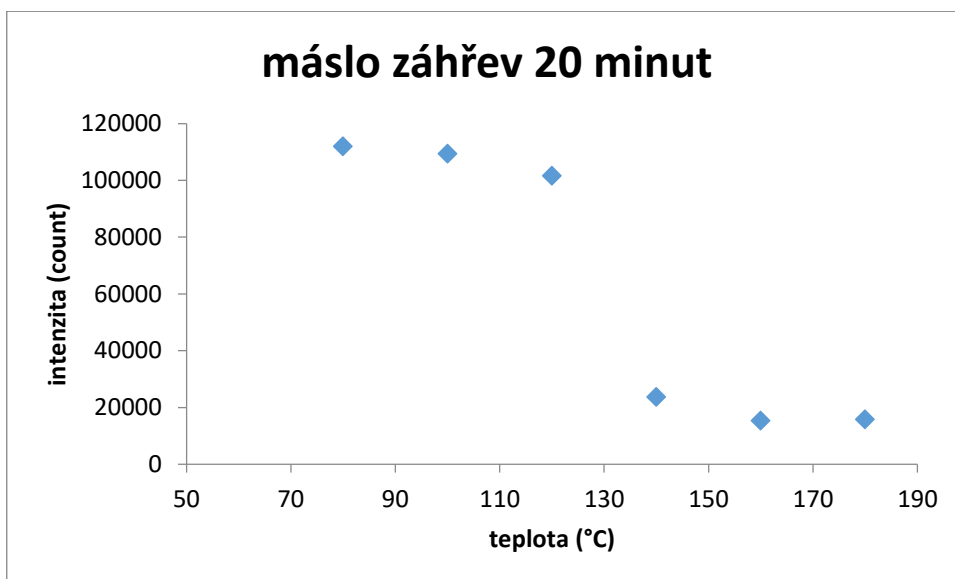
Na změny luminiscence mléčného tuku nemá vliv pouze doba záhřevu při konstantní teplotě, ale jak je patrné z grafu na obrázku 25, významné rozdíly v luminiscenční odezvě jsou patrné rovněž při použití různých teplot. Při zahřívání mléčného tuku dochází k celé řadě souběžně probíhajících oxidačních a hydrolytických reakcí. S narůstající teplotou a dobou záhřevu, jak je patrné z grafu, dochází ke snižování intenzity luminiscence. Při srovnání s dostupnou literaturou [51] by tato změna mohla poukazovat na postupnou degradaci tuků, vitamínů a izomerů CLA. Z grafu je zřejmé, že při teplotách do 120°C si máslo zachovává tepelnou stabilitu a nedochází k významným změnám luminiscence ve srovnání s tepelně neupraveným vzorkem. V rozmezí teplot 121°C – 149 °C se nachází tzv. kouřový bod másla. Kouřový bod souvisí s tepelnou oxidací volných mastných kyselin. V tomto bodě dochází k přepalování tuku, uvolňování sekundárních oxidačních produktů a vzniku kouře. Hodnota kouřového bodu je závislá na řadě faktorů, jako jsou objem použitého tuku, velikost nádoby, přítomnost vzdušných produktů a především obsah volných mastných kyselin. Čím více volných mastných kyselin tuk obsahuje, tím rychleji degraduje a dochází k produkci kouře. Také čas působení teploty hraje významnou roli. Při déletrvajícím záhřevu dochází ke snižování hodnoty kouřového bodu. [57,58].

Z grafů závislosti intenzity fluorescence na teplotě záhřevu pro pík při 410 nm při době záhřevu 10 a 20 minut (viz Obr. 26 a 27) je zřejmé, že působením narůstajících teplot dochází k poklesu intenzity fluorescence. Nejedná se však o lineární závislost, nelze tedy potvrdit korelaci mezi změnou intenzity luminiscence a teplotou záhřevu.

Na zmíněných grafech ovšem lze vysledovat velmi výrazný skokový pokles intenzity a to od teploty záhřevu 140 °C a výše. Tento trend je možné pozorovat u všech měřených časů záhřevu (viz Obr 26 a Obr 27). V souladu s literaturou, která uvádí hodnoty kouřového bodu pro máslo v rozmezí 121 – 149 °C lze tedy zaznamenat také výrazný pokles hodnot luminiscence vzorku při dosažení kouřového bodu [58].

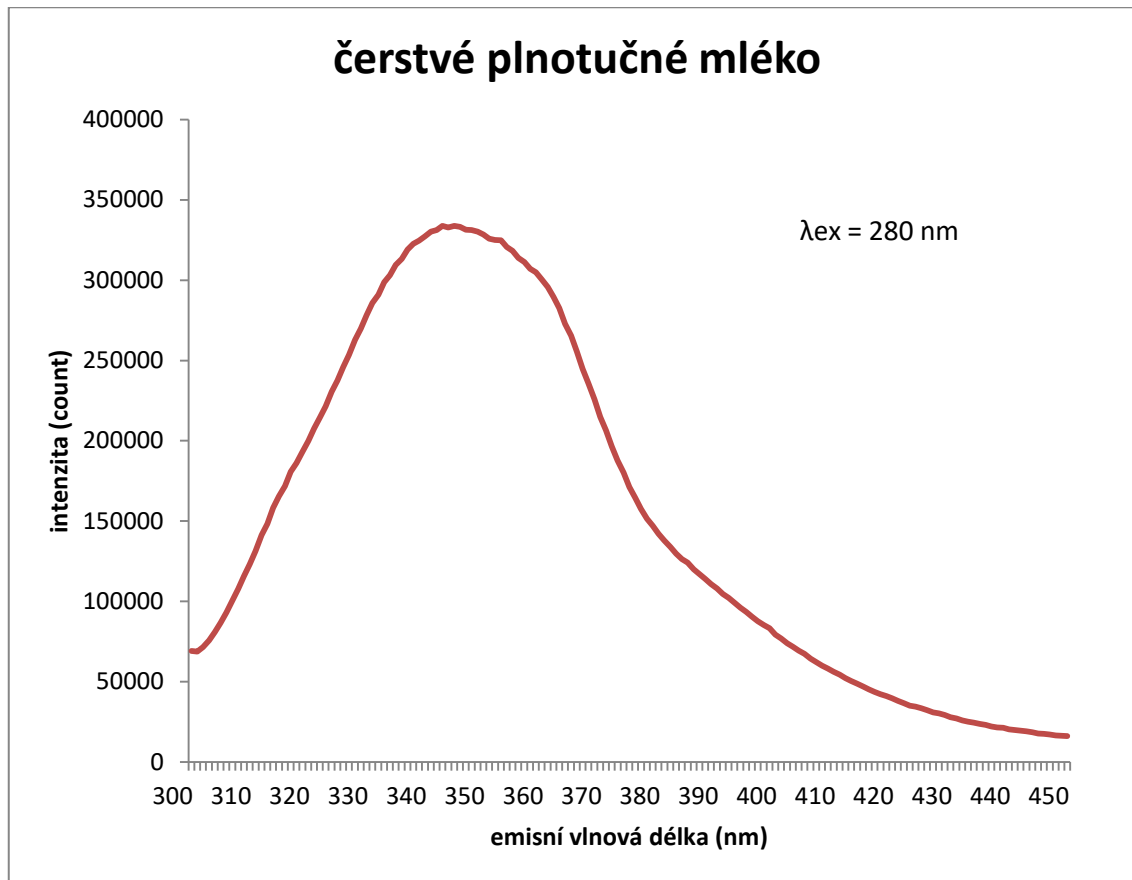


Obrázek 29: Závislost intenzity luminiscence másla na teplotě záhřevu v čase 10 min - pík na 410 nm.



Obrázek 30: Závislost intenzity luminiscence másla na teplotě záhřevu v čase 20 min - pík na 410 nm.

7.3 Luminiscenční spektra mléka



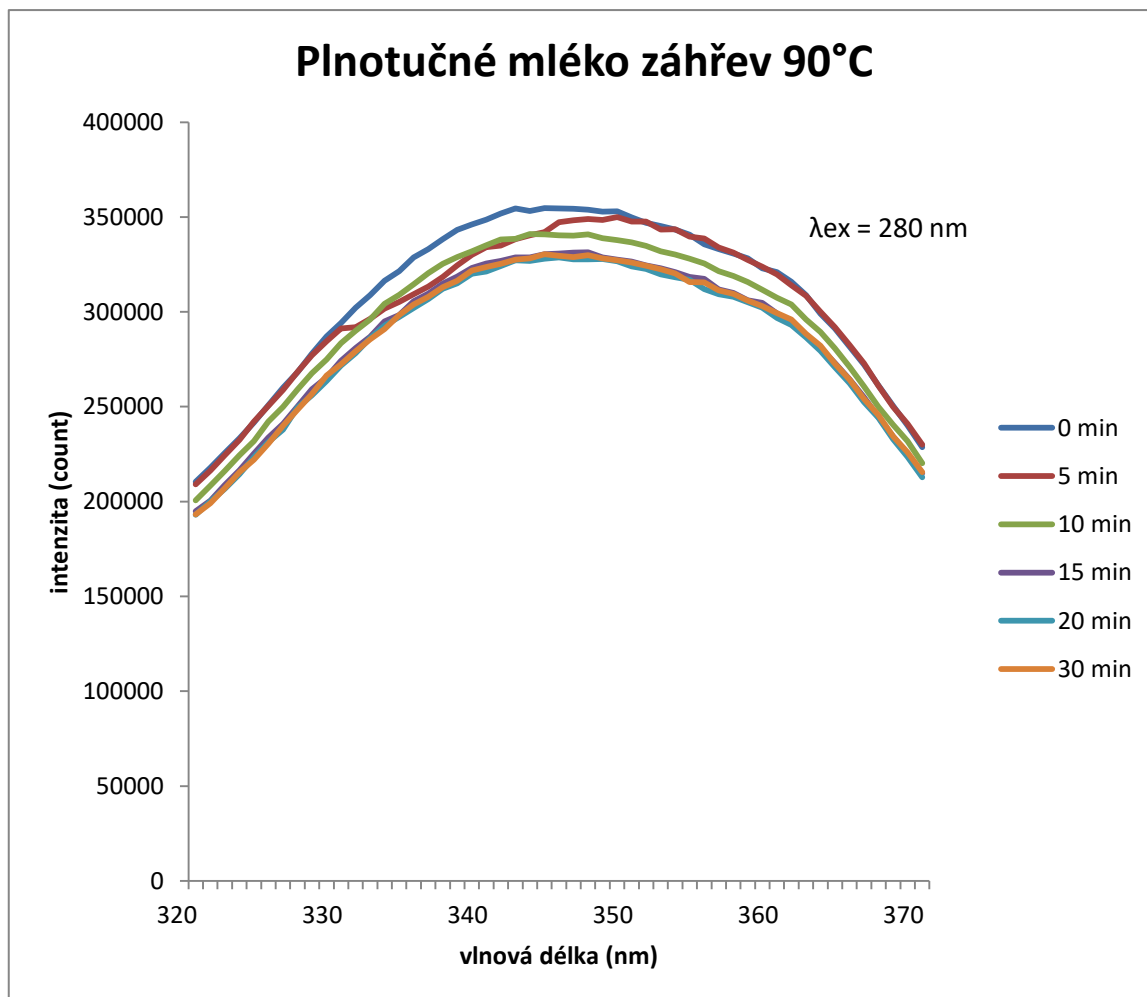
Obrázek 31: Emisní spektrum čerstvého plnotučného mléka

Získaná spektra vzorků čerstvého polotučného a čerstvého plnotučného mléka vykazují výraznou podobnost s nepatrně vyšší emisí v případě plnotučného mléka. Graf na obrázku 28 je výsledkem měření luminiscence tepelně neupraveného vzorku čerstvého plnotučného mléka. Tento vzorek byl měřen při excitační vlnové délce 280 nm v rozmezí emisních vlnových délek 300 – 450 nm. Toto fluorescenční spektrum je velmi jednoduché a hladké, téměř bez identifikovatelných píků. Jediný výrazný pík je možné sledovat v rozmezí emisních vlnových délek 300 – 400 nm s vrcholem v hodnotě 345 nm. Interpretace korelace chemického složení s fluorescenčními signály není v tomto případě jednoduchá. Vzorky mléka totiž obsahují komplexní proteiny, které typicky poskytují široké překrývající se fluorescenční pásy odvozené od řady aminokyselinových zbytků, především tryptofan, tyrozin a fenylalanin. Studie Dimitrova et al.(2014) uvádí, že píky v oblasti kolem 370 nm lze přičíst přítomnosti aromatických aminokyselin, nukleových kyselin a tryptofanových zbytků [53]. Vlastní fluorescence mléčných proteinů je způsobena třemi aromatickými

aminokyselinami: tryptofanem, tyrosinem a fenylalaninem, přičemž největší intenzitu fluorescence vykazuje tryptofan. [59].

Pík odpovídající emisní vlnové délce 345 nm lze přičítat emisi tryptofanu. Podle studie Dufour et Kulmyrzaev (2002) maximální emise tryptofanu odpovídá hodnotě 335 nm. Rovněž Dimitrova et. al (2014) uvádí ve své studii hodnotu maximální emise tryptofanu 335 nm. Jelikož jsou fluorescenční produkty Maillardových reakcí navázány na proteiny, může docházet k přenosu fluorescence mezi zbytky tryptofanu v proteinech a molekulami vykazujícími maximální emisní vlnovou délku přibližně 340 nm (Birlouez-Aragon et al, 1998). [53,60,61].

7.3.1 Závislost intenzity luminiscence na době záhřevu

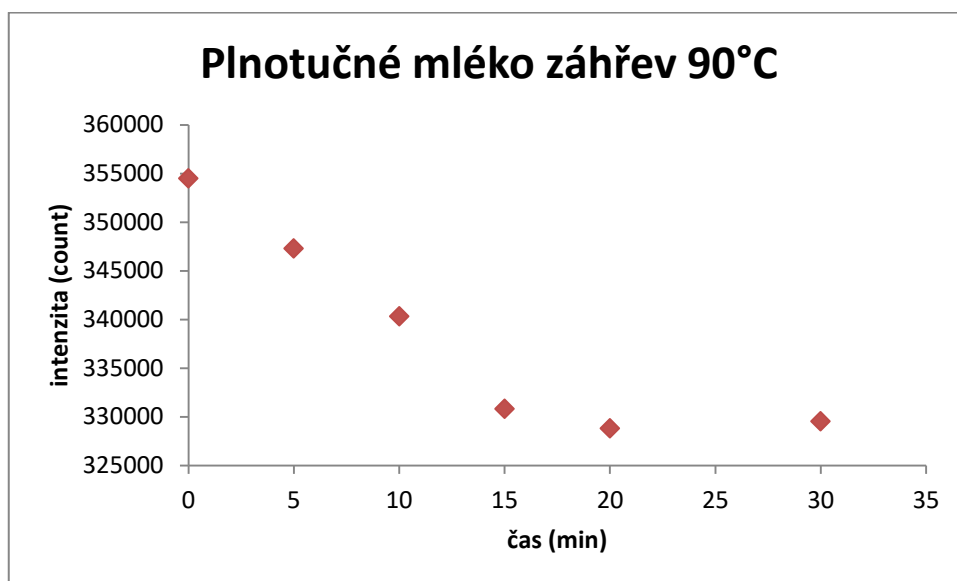


Obrázek 32: Emisní spektrum plnotučného mléka po záhřevu na 90°C po dobu 0 – 30 min

Spektrální změny plnotučného mléka při teplotě 90°C můžeme sledovat v grafu na obrázku 29. Vzorky mléka byly při dosažení požadované teploty odebírány v intervalech 0, 5, 10, 15, 20 a 30 min. V grafu je zřetelně pozorovatelná změna intenzity emisních spekter jednotlivých vzorků s rostoucí dobou výdrže při dané teplotě v intervalu 330 – 360 nm.

Tepelné zpracování vede k mnoha chemickým a strukturním změnám v mléku, které závisí na teplotě a délce ohřevu. Jedním z mechanismů podílejících se na negativních důsledcích tepelného ošetření je Maillardova reakce, která vede ke snížení nutriční hodnoty proteinů a tvorbě hnědých sloučenin v mléce. Rozsah reakce může být hodnocen stanovením obsahu furosinu a laktulózy. Furosin a laktulóza mohou být použity jako indikátory tepelného poškození mléka a pro rozlišení mléka UHT, pasterizovaného mléka a sterilizovaného mléka v nádobách. Studie Andersen et al. (2008) a Dufour et Kulmyrzaev (2002), nastiňují mož-

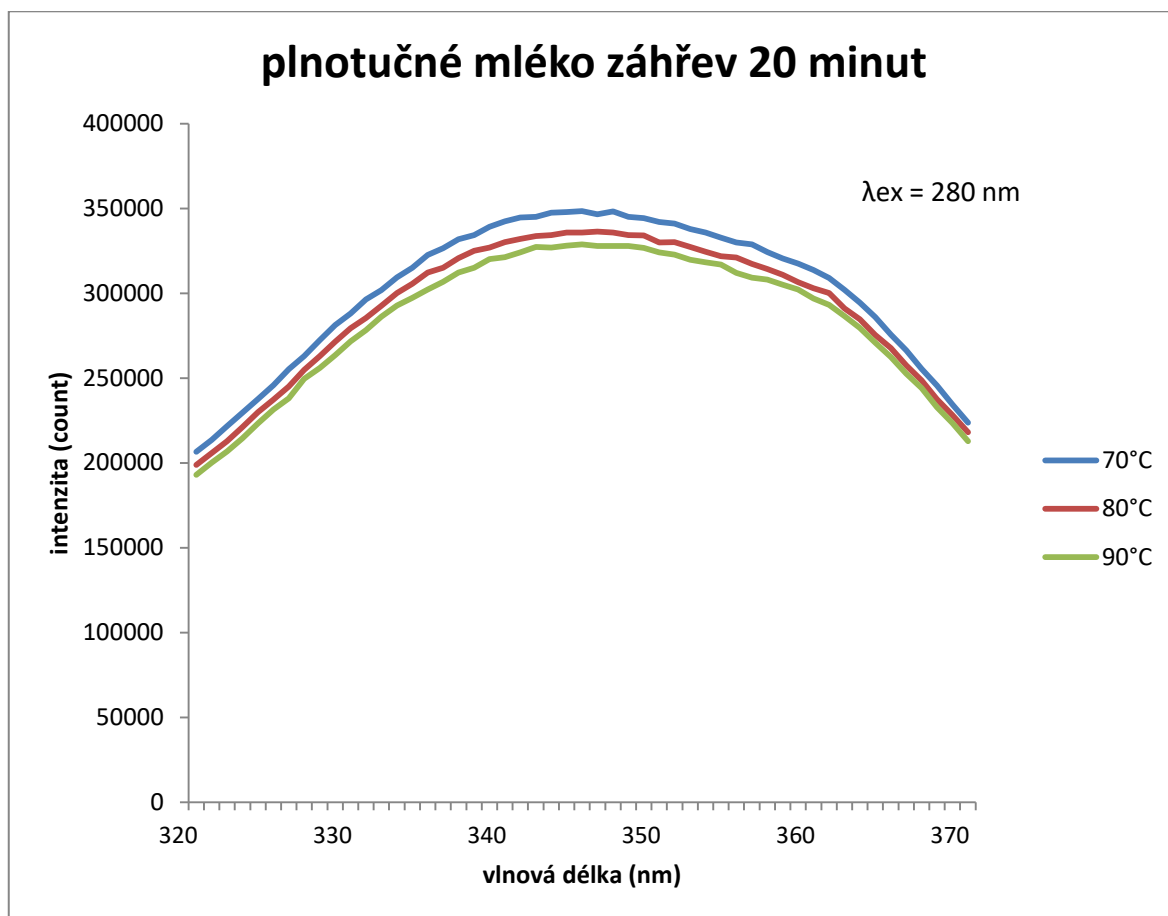
nost detekce furosinu a laktulózy pomocí tryptofanové fluorescence. Furosin a laktulóza nejsou luminiskujícími sloučeninami, byla však potvrzena silná korelace mezi změnou tryptofanové fluorescence a změnou koncentrace furosinu a laktulózy. Naopak Birlouez-Aragon et al.(1998) zjistili pouze vysoké korelace u mléka ošetřeného UHT. U pasterizovaného nebo sterilizovaného mléka nedošlo k žádné korelaci s obsahem laktulózy nebo furosinu. Vzhledem k rozdílným výsledkům je využití fluorescence tryptofanu k detekci tepelného ošetření mléka předmětem dalších výzkumů [60, 61].



Obrázek 33: Závislost intenzity luminiscence plnotučného mléka na době záhřevu při teplotě 90°C – pík na 345 nm

Z grafu závislosti intenzity luminiscence na době záhřevu při teplotě 90°C pro pík na emisní vlnové délce 345 nm (viz Obr. 29) je patrný klesající trend intenzity emitovaného záření. Podobně jako u vzorků másla lze vysledovat dvě lineární oblasti v časech 0 – 15 min a 15 – 30 min. Luminiscence tryptofanu poskytuje informace o struktuře proteinu (Dufour et Kulmyrzaev, 2002). Na základě těchto naměřených dat lze usuzovat na postupnou degradaci tryptofanu s narůstající dobou záhřevu. Intenzita fluorescence má klesající trend při vystavení teplotní zátěži po dobu 15 minut, při dalším trvání zátěže pozorujeme spíše konstantní hodnotu emise [60].

7.3.2 Závislost intenzity luminiscence na teplotě záhřevu



Obrázek 34: Závislost intenzity luminiscence na teplotě záhřevu plnotučného mléka v čase 20 minut

Na obrázku 34 je znázorněna závislost intenzity luminiscence na teplotě záhřevu v čase 20 minut. Je možné zaznamenat klesající trend intenzity fluorescence při zvyšující se tepelné zátěži. Vzorky mléka byly vystaveny záhřevu na teploty 70, 80 a 90°C. Vzhledem k tomuto nízkému počtu bodů v hodných k vyhodnocení je obtížné interpretovat míru závislosti intenzity fluorescence tryptofanu při působení narůstajících teplot. Dalším omezujícím faktorem při hodnocení probíhajících změn ve vzorcích je vícesložková struktura mléka. Jednou z příčin se jeví i fakt, že tepelné ošetření způsobuje částečnou denaturaci mléčných proteinů a tvorbu fluorescenčních produktů Maillardovy reakce, které rovněž vykazují významnou fluorescenci ve sledované oblasti. V důsledku denaturace je část tryptofanového prostředí v proteinech modifikována (Dufour et Kulmyrzaev, 2002) [60].

ZÁVĚR

Tato diplomová práce je zaměřena na sledování luminiscenčních spekter mléka a mléčného tuku a posouzení možností využití metody fluorescenční spektroskopie k identifikaci změn jejich luminiscence v závislosti na teplotě a době záhřevu. Pro měření byly zvoleny vzorky másla, čerstvého polotučného mléka a čerstvého plnotučného mléka.

Nejprve byly připraveny teplotní řady vzorků určené k měření. Máslo bylo zahříváno na teploty 80, 100, 120, 140, 160 a 180°C. Po dosažení požadované teploty byly odebírány vzorky v časech 0, 5, 10, 15 a 20 min. Mléko bylo zahříváno na teploty 70, 80 a 90°C, vzorky byly odebírány v časech 0, 5, 10, 15, 20 a 30 min. Následovalo proměření všech získaných vzorků.

Vzorky másla byly proměřeny na excitační vlnové délce 315 nm v rozmezí emisních vlnových délek 340 – 600 nm. Při bližším pohledu je na luminiscenčních spektrech vzorků patrný výskyt několika identifikovatelných píků. Tyto vrcholy se nachází na vlnových délkách 368, 393, 410, 500 a 525 nm a odpovídají především oxidačním produktům, lipofilním vitamínům a aromatickým aminokyselinám obsaženým v mléčném tuku. U všech píků je zaznamenán viditelný pokles intenzity emise s narůstající teplotou záhřevu. Pro přesnější interpretaci výsledků by bylo vhodné použití většího počtu měření a zpracování pomocí příslušných statistických metod.

Další zřetelně viditelná změna v intenzitě emise jednotlivých složek másla byla zaznamenána při sledování závislosti intenzity fluorescence na teplotě záhřevu. Zpočátku pozvolně klesající intenzita luminiscence vzorku vykazovala při dosažení teploty 140°C prudký pokles. Tato skoková změna koreluje s teplotou odpovídající hodnotě kouřového bodu másla. Tento trend bylo možné pozorovat u všech měřených časů.

Měření vzorků mléka probíhalo na excitační vlnové délce 280 nm v rozmezí emise 300 – 450 nm. Emisní spektrum mléka je prosté, nevykazuje dílčí píky. Jediné výrazné maximum v naměřených spektrech představuje pík s emisí na vlnové délce 345 nm. Tento vrchol je v literatuře přiřazován luminiscenci tryptofanu a mastných kyselin. Překážku znesnadňující identifikaci spektrálních signatur jednotlivých složek představují komplexní proteiny obsažené v mléku. Tyto poskytují typické široké překrývající se fluorescenční pásy. Přesnější popis spekter by bylo možné provést při větším počtu měření a za použití softwaru schopného zvýraznit polohy jednotlivých píků.

Z provedeného měření je možné vysledovat sestupnou tendenci emise tryptofanu v závislosti na čase záhřevu. Interpretace míry závislosti intenzity fluorescence během působení narůstajících teplot je ztížena nedostačujícím počtem měření, vícesložkovou strukturou mléka a částečnou denaturací proteinů způsobující modifikaci tryptofanového prostředí.

Fluorescenční spektroskopie se řadí k moderním analytickým metodám, které se nabízí jako rychlá alternativa ke klasickým analytickým postupům. Její nespornou výhodou je rychlost, vysoká citlivost a použití bez předchozí chemické úpravy vzorků. Tyto benefity jsou důvodem, pro který je metoda stále častěji cílem výzkumů pro aplikaci v nejrůznějších oborech.

Na základě provedených měření a posouzení výsledků z dosud zveřejněných studií, které se zabývají danou problematikou je zřejmé, že jednoznačná interpretace změn probíhajících během záhřevu v mléku a mléčném tuku je komplikovaná. Přesto je však možné i bez doplňujících a upřesňujících metod použít luminiscenční spektroskopii k zachycení změn v mléku a mléčném tuku zapříčiněných tepelnou zátěží.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BUŇKA, František et al, 2013. *Mlékárenská technologie I*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. ISBN 978-80-7454-254-1.
- [2] FOX, P.F., MCSWEENEY, P.L.H., 2004. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Springer - Verlag, 478 s. ISBN 978-0-412-72000
- [3] PEREIRA, Paula C., 2014. Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition*. Elsevier, (30), 619 - 627.
- [4] LINDMARK-MÅNSSON, H., FONDÉN, R., PETTERSSON, H.E., 2003. Composition of Swedish dairy milk. *International Dairy Journal* [online]. 13(6), 409-425 [cit. 2018-07-22]. DOI: 10.1016/S0958-6946(03)00032-3. ISSN 09586946. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694603000323>
- [5] VELÍŠEK, Jan, 1999. *Chemie potravin 1*. 1. vyd. Nová tiskárna Pelhřimov, s.r.o. : [s.n.], 352 s. ISBN 80-902391-3-7.
- [6] HOLT, C. et al., 2013. Invited review: Caseins and the casein micelle: their biological functions, structures, and behavior in foods. *Journal of Dairy Science*. American Science Dairy Asociation, 96(10), 6127-6146.
- [7] AHMAD, SAFRAZ et al., 2009. Physico-chemical changes in casein micelles of buffalo and cow milks as a function of alkalisation. *Dairy Science & Technology*. 89(3-4), 387.
- [8] DALGLEISH, D.S., P.A. SPANGNUOLO a H.D. GOFF, 2004. A possible structure of casein micelle based on high-resolution field-emission scanning elektron microscopy. *International Dairy Journal*. 14(12), 1025-1031.
- [9] BŘEZINA, P., JELÍNEK, J., 1990. *Chemie a technologie mléka*. 1. vyd. Praha : VŠCHT Praha Čs. redakci VN MON, 325 s. ISBN 80-7080-075-5.
- [10] WALSTRA, P., GEURTS, T.J., NOOMEN, A., JELLEMA, A., van BOEKEL, MAJS. 1999, *Dairy technology. Principles of milk properites and processes*. 1st ed. USA: Marcel Dekker, Inc., 727 p.
- [11] obrázek štěpení laktózy β -galaktozidázou dostupný z <https://biopedia.sk/molekularna-biologia/regulacia-genovej-expresie>

- [12] JANŠTOVÁ, B. NAVRÁTILOVÁ, P., 2014. *Produkce mléka a technologie mléčných výrobků*. Brno: VFU Brno. ISBN 978-80-7305-712-1.
- [13] BURROW, K. et al., 2018. Dairy Minerals Have a Positive Effect on Bone Health?. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 17(4), 989-1005 [cit. 2018-09-24]. DOI: 10.1111/1541-4337.12364. ISSN 15414337. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/1541-4337.12364>
- [14] ULLRICH, L., 1990. *Chémia a technológia jedlých tukov a olejov*. 1. vyd. Bratislava : Slovenské vydavateľstvo technickej literatury, n.p., 436 s.
- [15] obrázek obecný vzorec triacylglycerolu dostupný z:
https://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/files/58/
- [16] VIRIATO, R.L.S., et al., 2018. Milk fat as a structuring agent of plastic lipid bases. *Food Research International*. Elsevier, (111), 120 - 129. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.05.015. ISBN 0963-9969. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996918303715>
- [17] obrázek obecný vzorec fosfolipidů dostupný z
<https://eluc.kr-olomoucky.cz/verejne/lekce/2491>
- [18] obrázek vzorec cholesterolu dostupný z
https://www.google.com/search?q=vzorec+cholesterolu&client=firefox-b&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwje09rC3q7dAhUSPVAKHem2AcoQ_AUICigB&biw=1366&bih=638#imgrc=eM6XHAc8Fqf_SM:
- [19] LOPEZ CH. et al., 2010. Lipid rafts in the bovine milk fat globule membrane revealed by the lateral segregation of phospholipids and heterogeneous distribution of glycoproteins. *Food chemistry*, 22-33.
- [20] CLAEYS, Wendie L. et al., 2013. Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food Control*. Elsevier, (31), 251-262.
- [21] NEEDS, E.C et al., 2000. Comparison of heat and pressure treatments of skim milk, fortified with whey protein concentrate, for set yogurt preparation: effects of milk proteins and gel structure . *Journal Of Dairy Research*. (67), 329-348.
- [22] BYLUND, G., 1995. *Dairy processing handbook*. Lund: Tetra Pak Processing Systems AB, 436 p.

- [23] SINGH, H., & CREAMER, L. K. ,1992. Heat stability of milk. In: Fox, P.F. , *Advanced Dairy Chemistry Proteins* . London: Elsevier Applied Science, 621-656.
- [24] RADA-MENDOZA, M., VILLAMIEL M., OLANO A., 2002. Dissolved air effects on lactose isomerisation and furosine formation during heat treatment of milk. *Le Lait* [online]., 82(5), 629-634 [cit. 2018-09-19]. DOI: 10.1051/lait:2002038. ISSN 0023-7302. Dostupné z: <http://www.edpsciences.org/10.1051/lait:2002038>
- [25] MARTÍNEZ-MONTEAGUDO, S. I., D.A. SALDAÑA, M., 2015. Kinetics of lactulose formation in milk treated with pressure-assisted thermal processing. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* [online]., 28, 22-30 [cit. 2018-09-19]. DOI: 10.1016/j.ifset.2014.12.010. ISSN14668564.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1466856415000041>
- [26] ANDREWS, G. R., 1986. Formation and occurrence of lactulose in heated milk. *Journal of Dairy Research*, 53(4), 665 – 680.
- [27] NOOSHKAM, M., BABAZADEH, A., JOOYANDEH, H., 2018. Lactulose: Properties, techno-functional food applications, and food grade delivery system. *Trends in Food Science & Technology*. Elsevier, 80(10), 23-34. DOI: 10.1016/j.tifs.2018.07.028. ISSN 09242244.
- [28] obrázek chemická struktura laktulózy dostupný z:
<https://chemistry.stackexchange.com/questions/15520/why-does-lactulose-turn-dark>
- [29] CARDOSO, H. B. et al., 2019. Maillard induced aggregation of individual milk proteins and interactions involved. *Food Chemistry* [online]. 276, 652-661 [cit.2018-11-26]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.10.061. ISSN03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814618318260>
- [30] GRAŻYNA, C., CZECZOT, H., AMBROZIAK, A., a BIELECKA, M. M., 2017. Natural antioxidants in milk and dairy products. *International Journal of Dairy Technology* [online]., 70(2), 165-178 [cit. 2018-09-19]. DOI: 10.1111/1471-0307.12359. ISSN 1364727X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/1471-0307.12359>
- [31] GRIFFITHS, M. W., PHILLIPS J. D., MUIR D.D., 1981. Thermostability of Proteases and Lipases from a Number of Species of Psychrotrophic Bacteria of Dairy Origin. *Journal of Applied Bacteriology* [online]., 50(2), 289-303

- [32] DUFOUR, E., RIAUBLANC, A., 1997. Potentiality of spectroscopic methods for the characterisation of dairy products. 1. Front-face fluorescence study of raw, heated and homogenised milks. *Lait*. Elsevier/Inra, (77), 657-670.
- [33] SUNDS, A. V., RAUH, V.M., SØRENSEN, J., LARSEN, L. B., 2018. Maillard reaction progress in UHT milk during storage at different temperature levels and cycles. *International Dairy Journal* [online]. 2018 77, 56-64
- [34] CALVO, M. M., DE LA HOZ, L., 1992. Flavour of heated milks. A review. *International Dairy Journal* [online]. 2(2), 69-81
- [35] GATHERCOLE, J., REIS, M.G., AGNEW, M. et al. 2017. Molecular modification associated with the heat treatment of bovine milk. *International Dairy Journal* [online]., 73, 74-83
- [36] obrázek obecné schéma vzniku laktonu dostupný z:
<https://eluc.kr-olomoucky.cz/verejne/lekce/2463>
- [37] STRASBURG, G. M., LUDESCHER, R.D., 1995. Theory and application of fluorescence spectroscopy in food research. *Trends in Food Science & Technology*. Elsevier, (6), 69-75.
- [38] LAKOWICZ J., R., 1999. Principles of fluorescence spectroscopy, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- [39] KLOUDA, P. 2003. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vydání. Ostrava: 132 s., ISBN 80-86369-07-2
- [40] Principy fluorescenční spektroskopie [online] [cit. 2013-04-18] Dostupné z www: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/principy.htm>
- [41] PELANT, I. VALENTA, J., 2006. Luminescenční spektroskopie. Praha: Academia, 327 s. ISBN 80-200-1447-0
- [42] SKOOG, D. A., F. J., HOLLER a S. R. CROUCH, 2007. *Principles of instrumental analysis*. 6th ed. /. Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole, ISBN 04-950-1201-7.
- [43] GREMLICA, Miroslav, 2010. Fluorescenční spektrofotometrie a její aplikace v materiálově orientovaných vědách. Zlín. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce Prof. Ing. Lubomír Lapčík, Ph.D.

- [44] NĚMCOVÁ, I., ČERMÁKOVÁ, L., RYCHLOVSKÝ, P., 1997. Spektrometrické analytické metody I.1. vydání. Praha: Univerzita Karlova - Karolinum, 166 s.
ISBN 382- 81-97
- [45] RENDELL, D., MOWTHORPE, D. J., 1987. *Fluorescence and phosphorescence spectroscopy*. New York: Published on behalf of ACOL,. Analytical Chemistry by Open Learning. ISBN 978-047-1913-801.
- [46] FIŠAR, Z., 2003. Fluorescenční spektroskopie v neurovědách. [online] Dostupné z www: <http://www1.lf1.cuni.cz/%7Ezfishar/fluorescence/Default>.
- [47] LAPČÍK, Lubomír, 1989. *Fotochemické procesy*. Bratislava: Alfa, ISBN 80-050-0049-9
- [48] Fluorofory v biomedicíně. [online] [cit. 2018-11-26] Dostupné z www: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/fluorofory.htm>
- [49] ILČÍK, Petr, 2013. Použití luminiscenční spektrofluorimetrie pro stanovení riboflavinu. Zlín. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce Mgr. Martina Bučková, PhD.
- [50] KULMYRZAEV, A. A., LEVIEUX, D., DUFOUR, E., 2005. Front-Face Fluorescence Spectroscopy Allows the Characterization of Mild Heat Treatments Applied to Milk. Relations with the Denaturation of Milk Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 53(3), 502-507 [cit. 2018-11-26]. DOI: 10.1021/jf049224h. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf049224h>
- [51] AHMAD, N., SALEEM, M., SHAHID, M., 2018. Studying heating effects on desi ghee obtained from buffalo milk using fluorescence spectroscopy. *PLOS ONE*, 13(5).
- [52] SHAIKH, S., O'DONNELL, C., 2017. Applications of fluorescence spectroscopy in dairy processing: a review. *Current Opinion in Food Science.*, 17, 16-24.
- [53] DIMITROVA, T.L. et al., 2014. Scattering and fluorescence spectra of cow milk. *Bulgarian Chemical Communications*. (46), 39 – 43
- [54] obrázek spektrofluorometr dostupný z:
<http://www.iss.com/fluorescence/instruments/pc1.html>
- [55] ANDERSEN, CH. M., MORTENSEN, G., 2008. Fluorescence Spectroscopy: A Rapid Tool for Analyzing Dairy Products. *Journal of agricultural and food chemistry*. (56), 720 -729.
- [56] KONGBONGA, Y. G. M. et al., 2011. Characterization of Vegetable Oils by Fluorescence Spectroscopy. *Food and Nutrition Sciences*. 02, 692-699 DOI: 10.4236/fns.2011.27095
- [57] Nutrition Experts from Dole Food Company, 2002. *Encyclopedia of Foods - A Guide to Healthy Nutrition*. (pp. 391). Elsevier. Retrieved from

<https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpEFAGHN0D/encyclopedia-foods-guide/encyclopedia-foods-guide>

[58] ALFRED, Thomas, 2002. *Fats and Fatty Oils. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim: Wiley-VCH. ISBN ISBN 978-3-527-30673-2.

[59] MUNGKARNDEE, Radeemada et al., 2016. Fluorescence sensor array for identification of commercial milk samples according to their thermal treatments. *Food chemistry*. Elsevier, (197), 198 - 204.

[60] KULMYRZAEV, A., DUFOUR, E., 2002. Determination of lactulose and furosine in milk using front-face fluorescence spectroscopy. *Lait*. INRA, EDP Sciences, (82), 725 - 735. DOI: DOI: 10.1051/lait:2002045.

[61] BIRLOUEZ –ARAGON, I. et al, 1998. A rapid fluorimetric method to estimate the heat treatment of liquid milk, *Int. Dairy J.* 8 771–777.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

CLA Konjugovaná kyselina linolová

UHT Ultra-high temperature

NADH Nikotinamid adenin dinukleotid

mg/kg Jednotka koncentrace miligram na kilogram

nm Nanometr

min Minuta

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr.1: Zobrazení kaseinové micely elektronovým rastrovým mikroskopem (měřítko 200 nm) [8].....	14
Obr.2: Štěpení laktózy β -galaktozidázou [11].....	16
Obr.3: Obecný vzorec triacylglycerolu [15].....	19
Obr.4: Obecný vzorec fosfolipidů [17].....	21
Obr.5: Vzorec cholesterolu [18].....	21
Obr. 6: Složení membrány tukové kuličky [19].....	22
Obr. 7: Interakce β -laktoglobulinu s κ -kaseinem [22].....	24
Obr. 8: Chemická struktura laktulózy [28].....	25
Obr. 9: Obecné schéma vzniku laktonu [36].....	27
Obr. 10: Jablonského diagram [43].....	29
Obr. 11: Stokesův posun [43].....	31
Obr. 12: Schéma fluorescenčního spektrometru [39].....	32
Obr. 13: Fluorescenční spektra mléka s tučností 1,5% měřená při různých excitačních vlnových délkách [53].....	34
Obr. 14: Fluorescenční spektra při $\lambda_{ex}=280\text{nm}$ ukazující srovnání mezi zahřátými a neza- hřátými vzorky ghee, CLA a vitamíny A,D,E a K [51].....	35
Obr. 15: PC – 1 Photon Counting 001 Steady-State Spectrofluorimeter [54].....	41
Obr. 16: Měření vzorků v temné komoře.....	41
Obr. 17: Luminiscenční charakteristika másla.....	42
Obr 18: Emisní spektrum čerstvého másla.....	43
Obr 19: Emisní spektrum másla po záhřevu na 140°C po dobu 0 – 20 minut.....	45
Obr 20: Závislost intenzity luminiscence másla na době záhřevu při teplotě 140°C – pík na 410 nm.....	46
Obr 21: Závislost intenzity luminiscence másla na době záhřevu při teplotě 140°C – pík na 525 nm	47

Obr 22: Závislost intenzity luminiscence másla na době záhřevu při teplotě 140°C – pík na 410 nm čas 0 – 10 min	48
Obr 23 Závislost intenzity luminiscence másla na době záhřevu při teplotě 140°C – pík na 410 nm čas 10 – 20 min.....	48
Obr 24: Závislost intenzity luminiscence másla na době záhřevu při teplotě 140°C – pík na 525 nm čas 0 – 10 min	49
Obr 25: Závislost intenzity luminiscence másla na době záhřevu při teplotě 140°C – pík na 525 nm čas 10 – 20 min	49
Obr 26: Závislost směrnice poklesu intenzity luminiscence na teplotě záhřevu během 0-10 min trvání záhřevu.....	50
Obr 27: Závislost poklesu intenzity luminiscence na teplotě záhřevu během 10-20 min trvání záhřevu.....	51
Obr 28: Závislost intenzity luminiscence másla na teplotě záhřevu v čase 20 min	51
Obr 29: Závislost intenzity luminiscence másla na teplotě záhřevu v čase 10 min - pík na 410 nm.....	53
Obr 30: Závislost intenzity luminiscence másla na teplotě záhřevu v čase 20 min - pík na 410 nm.	53
Obr 31: Emisní spektrum čerstvého plnotučného mléka	54
Obr 32: Emisní spektrum plnotučného mléka po záhřevu na 90°C po dobu 0 – 30 min....	56
Obr 33: Závislost intenzity luminiscence plnotučného mléka na době záhřevu při teplotě 90°C – pík na 345 nm.....	57
Obr 34: Závislost intenzity luminiscence na teplotě záhřevu plnotučného mléka v čase 20 minut.....	58

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Zastoupení bílkovinných frakcí v mléku [10].....	15
Tabulka 2: Koncentrace jednotlivých vitamínů v mléku ($\mu\text{g}\cdot 100\text{ g}^{-1}$) [12].....	17
Tabulka 3: Obsah mastných kyselin v mléčném tuku [12].....	20

SEZNAM PŘÍLOH

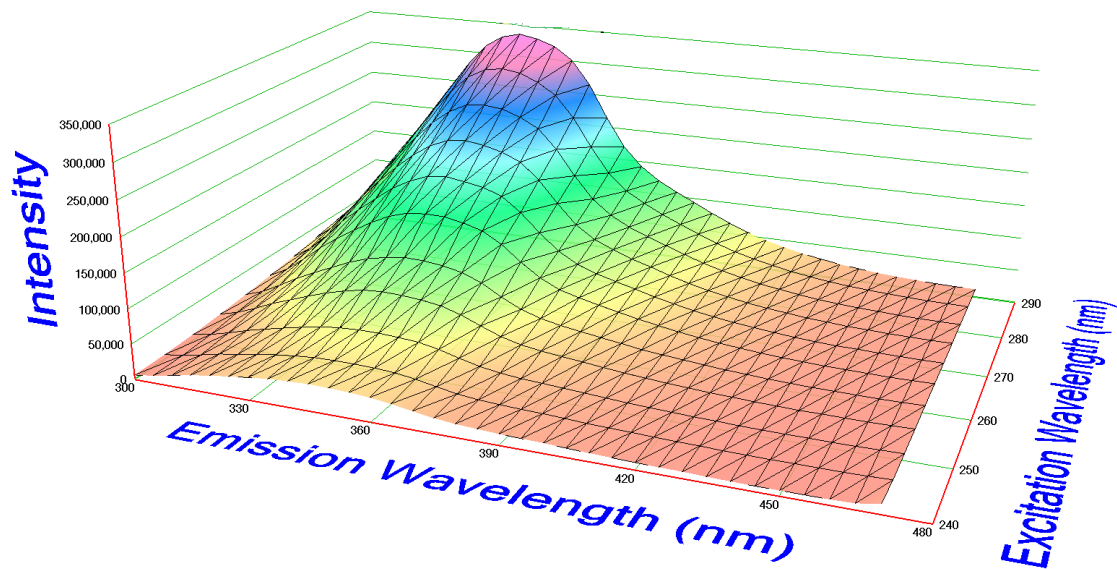
Příloha PI: Luminiscenční charakteristika polotučného mléka

Příloha PII: Luminiscenční charakteristika plnotučného mléka

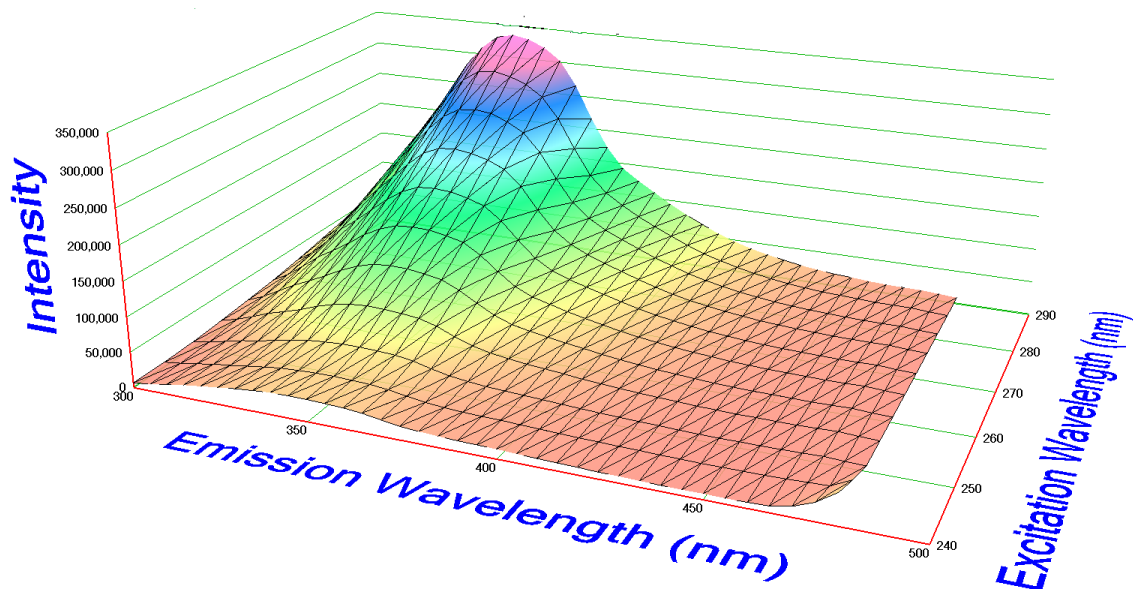
Příloha PIII: Závislost intenzity luminiscence másla na době záhřevu při sledovaných teplotách – pík na 410 nm

Příloha PIV: Závislost intenzity luminiscence másla na době záhřevu při sledovaných teplotách – pík na 525 nm

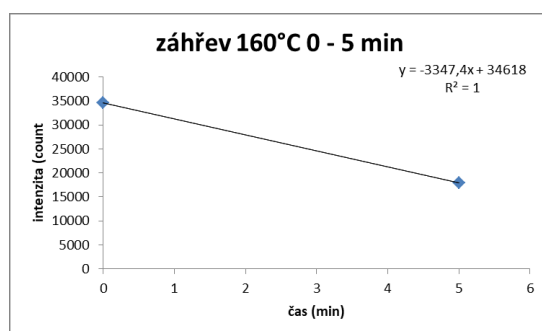
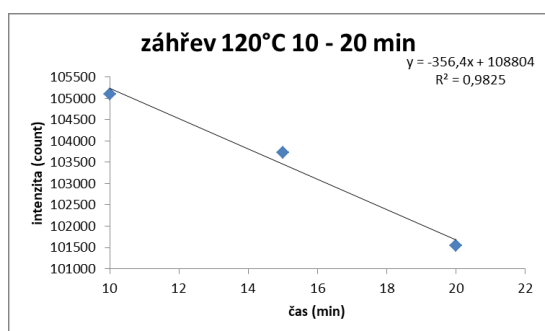
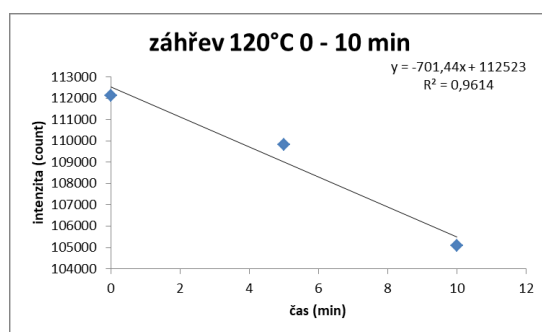
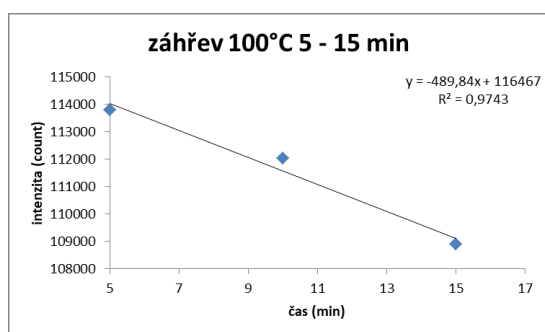
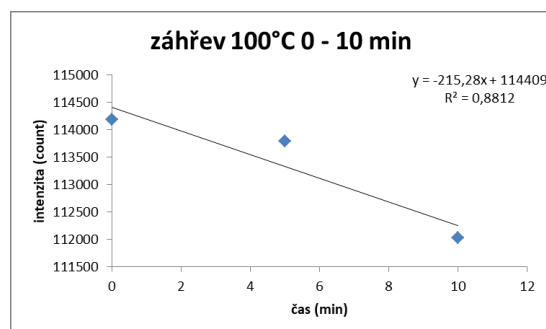
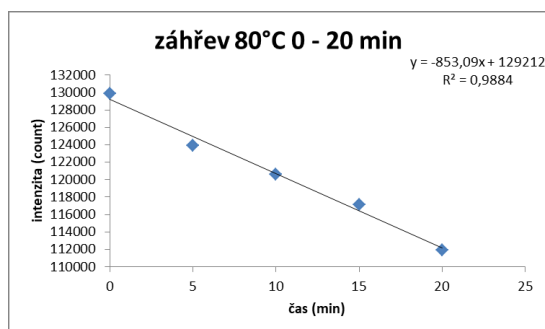
PŘÍLOHA P I: LUMINISCENČNÍ CHARAKTERISTIKA POLOTUČNÉHO MLÉKA

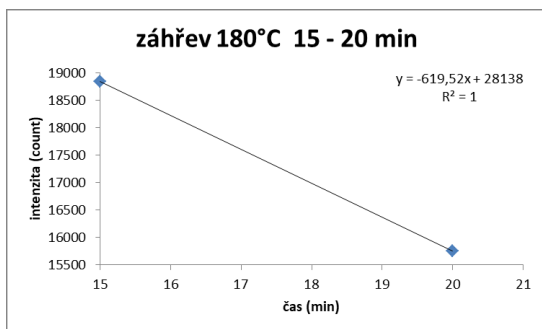
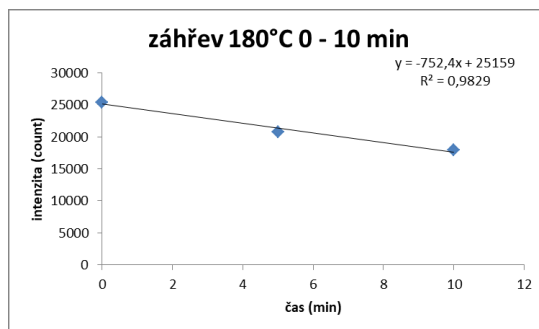
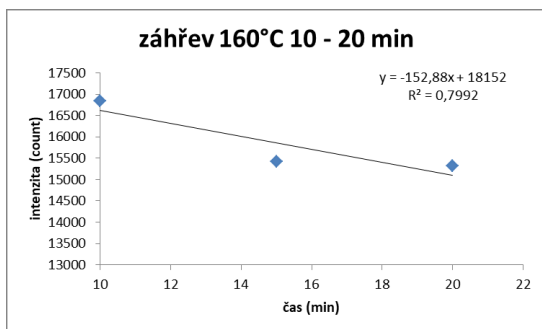


PŘÍLOHA P II: LUMINISCENČNÍ CHARAKTERISTIKA PLNOTUČNÉHO MLÉKA



PŘÍLOHA P III: ZÁVISLOST INTENZITY LUMINISCENCE MÁSLA NA DOBĚ ZÁHŘEVU PŘI SLEDOVANÝCH TEPLOTÁCH – PÍK NA 410 NM





PŘÍLOHA P IV: ZÁVISLOST INTENZITY LUMINISCENCE MÁSLA NA DOBĚ ZÁHŘEVU PŘI SLEDOVANÝCH TEPLOTÁCH – PÍK NA 525 NM

