

Využití Ramanovy spektroskopie pro stanovení vybraných kvalitativních parametrů syrovátky

Lenka Kouřilová

Bakalářská práce
2020

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	Lenka Kouřilová
Osobní číslo:	T16841
Studijní program:	B2901 Chemie a technologie potravin
Studijní obor:	Chemie a technologie potravin
Forma studia:	Kombinovaná
Téma práce:	Využití Ramanovy spektroskopie pro stanovení vybraných kvalitativních parametrů syrovátky

Zásady pro vypracování

- 1. Syrovátka – chemické složení, technologie získávání, významné technologické parametry.**
- 2. Možnosti použití syrovátky v potravinářství.**
- 3. Základní princip Ramanovy spektroskopie.**
- 4. Využití Ramanovy spektroskopie pro stanovení jednotlivých složek syrovátky.**

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] FOX, P. F., McSWEENEY, P.L.H. Dairy Chemistry and Biochemistry. Blackie Academic and Professional, 1998, 478 p.
- [2] SMITH, Ewen a Geoffrey DENT. Modern Raman spectroscopy: a practical approach. Chichester: John Wiley, 2005, 210 p.
- [3] SUKOVÁ Dagmar. Syrovátka v potravinářství. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2006. s 60. ISBN 80-7271-173-3.
- [4] LI-CHAN, E. C. Y. Vibrational spectroscopy applied to the study of milk proteins. Le Lait, INRA Editions, 2007, 87 (4-5), 443-458.
- [5] ALVES DA ROCHA, R., PAIVA, I. M., ANJOS, V., FURTADO, M. A. M. a M. J. V. BELL. Quantification of whey in fluid milk using confocal Raman microscopy and artificial neural network. Journal of Dairy Science, 2015, 98 (6), 3559-3567.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Martina Bučková, Ph.D.**
Ústav analýzy a chemie potravin

Datum zadání bakalářské práce: **17. února 2020**
Termín odevzdání bakalářské práce: **22. května 2020**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. RNDr. Iva Burešová, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 17. února 2020

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji 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;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – 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);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem 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.

Prohlašuji,

- že jsem na bakalářské práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá využitím Ramanovy spektroskopie pro stanovení kvalitativních parametrů syrovátky. První část je zaměřena na popis syrovátky, její chemické složení, základní rozdělení dle způsobu získávání, technologii získávání a praktické použití syrovátky v potravinářství. Dále je stručně charakterizována Ramanova spektroskopie, její historie, obecný princip a techniky zesílení. Na závěr se práce zabývá interpretací spekter se zaměřením na bílkoviny syrovátky a také laktózu.

Klíčová slova: syrovátka, Ramanova spektroskopie, vibrační spektroskopie, bílkoviny, laktóza

ABSTRACT

This thesis is focused on application of Raman spectroscopy to determine the qualitative parameters of whey. First part describes the chemical composition of whey, the methods of processing and the practical use of whey in the food industry. Second part is focused on the Raman spectroscopy, the history, the general principle and the technology of increase. Finally, the work explains the interpretation of spectra with a focus on whey proteins and lactose.

Key words: whey, Raman spectroscopy, vibrational spectroscopy, proteins, lactose

Na tomto místě bych chtěla poděkovat Mgr. Martině Bučkové, Ph.D. za vstřícný přístup, cenné připomínky a rady při vypracování mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat mé rodině za vytrvalou podporu během studia.

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

OBSAH

I	ÚVOD	9
II	ZÍSKÁVÁNÍ SYROVÁTKY A JEJÍ CHEMICKÉ SLOŽENÍ	10
1.1	ZÍSKÁVÁNÍ SYROVÁTKY	10
1.1.1	SLADKÁ SYROVÁTKA	11
1.1.2	KYSELÁ SYROVÁTKA	11
1.2	DUSÍKATÉ LÁTKY V SYROVÁTCE	11
1.2.1	BETA-LAKTOGLOBULIN	13
1.2.2	A -LAKTALBUMIN	13
1.2.3	IMUNOGLOBULINY	13
1.2.4	LAKTOFERIN	13
1.2.5	LAKTOPEROXIDÁZA	14
1.2.6	SÉROVÝ ALBUMIN	14
1.2.7	GLYKOMAKROPEPTID	14
1.3	LIPIDY	15
1.4	MLÉČNÝ CUKR	15
1.5	KYSELINY	15
1.6	VITAMINY	16
1.7	MINERÁLNÍ LÁTKY	16
III	TECHNOLOGIE ZPRACOVÁNÍ SYROVÁTKY	18
2.1	PŘEDBĚŽNÁ PŘÍPRAVA SYROVÁTKY	18
2.1.1	ČIŠTĚNÍ	18
2.1.2	ODSTRANĚNÍ TUKU	18
2.1.3	PASTERACE	18
2.2	DEMINERALIZACE SYROVÁTKY	19
2.3	KRYSTALIZACE LAKTÓZY	19
2.4	ZAHUŠŤOVÁNÍ SYROVÁTKY	20
2.5	SUŠENÍ	20
2.6	METODY SEPARACE SLOŽEK SYROVÁTKY	21
2.6.1	IONTOMĚNIČOVÁ CHROMATOGRFIE	21
2.6.2	ELEKTRODIALÝZA	21
2.6.3	MEMBRÁNOVÁ FILTRACE	21
IV	MOŽNOSTI POUŽITÍ SYROVÁTKY V POTRAVINÁŘSTVÍ	23

3.1	VÝROBA SÝRŮ	23
3.1.1	RICCOTA	23
3.1.2	MYSOST	24
3.2	JOGURTY	24
3.3	ZMRZLINA A MRAŽENÉ KRÉMY	25
3.4	KOJENECKÁ VÝŽIVA	25
3.5	MASNÉ VÝROBKY	26
3.6	NÁPOJE	26
3.7	PEKAŘSTVÍ	27
3.7.1	ZVYŠOVÁNÍ OBSAHU BÍLKOVIN VE VÝROBCÍCH.....	27
3.7.2	ZADRŽOVÁNÍ VLHKOSTI	28
3.7.3	ZLEPŠENÍ TEXTURY	28
3.7.4	EMULGOVÁNÍ.....	28
3.7.5	HNĚDNUTÍ.....	28
3.7.6	UCHOVÁNÍ AROMATU A CHUTI	28
3.7.7	NUTNOST ZMĚN RECEPTURY	29
V	RAMANOVA SPEKTROSKOPIE	30
4.1	HISTORIE	30
4.2	C. V. RAMAN	31
4.3	PRINCIP RAMANOVY SPEKTROSKOPIE	31
4.4	VIBRACE	32
4.4.1	DVOUATOMOVÁ MOLEKULA	33
4.4.2	VÍCEATOMOVÁ MOLEKULA	33
4.5	REZONANČNÍ RAMANOVA SPEKTROSKOPIE (RRS)	34
4.6	POVRCHOVĚ ZESÍLENÁ RAMANOVA SPEKTROSKOPIE (SERS)	35
4.7	INTERPRETACE SPEKTER	35
4.8	RAMANOVA SPEKTROSKOPIE PRO STANOVENÍ SYROVÁTKY	36
VI	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	42
VII	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	46
	SEZNAM OBRÁZKŮ	47
	SEZNAM TABULEK	48

ÚVOD

Blahodárné účinky syrovátky jsou známé už od starověku, již ve 4. století př.n.l. byla doporučována Hippokratem jako posilující nápoj. V mlékárenské výrobě, kde syrovátka vznikala při výrobě sýrů, tvarohu a kaseinu, byla dlouhou dobu známa pouze jako vedlejší produkt, sloužící ke krmným účelům. Tento pohled se postupem času změnil a to díky rozvoji poznatků ohledně nutričních benefitů, separačních a zpracovatelských technologií. V dnešní době je syrovátka považována za koprodukt při výrobě sýrů s řadou možných využití v potravinářském průmyslu i farmacii.

V potravinářství se ze syrovátky stala složka využívaná v mnoha odvětvích, ať už se jedná o výrobu mléčných nebo masných výrobků, cukrovinek, nápojů nebo kojenecké výživy. Díky svým funkčním vlastnostem lze syrovátku využít také jako emulgátor, zahušťovadlo, pro její schopnost vázat tuk, tvořit gel a pěnu, použití syrovátky má vliv na chuť, aroma a texturu.

Syrovátka se stává stále populárnější pro její příznivý vliv na zdraví, je nízkokalorická, obsahuje mnoho vitaminů a minerálních látek, působí detoxikačně a podporuje činnost ledvin, kladně ovlivňuje činnost střev a obnovuje střevní mikroflóru, má vliv na snížení hladiny cholesterolu v krvi.

Cílem této práce je popsat možnosti analýzy syrovátky pomocí Ramanovy spektroskopie. Jedná se o vibračně spektroskopickou metodu pojmenovanou po indickém fyzikovi Chandrasekharu Venkatau Ramanovi, který za svoji práci získal v roce 1930 Nobelovu cenu. Tato metoda slouží k identifikaci látek, pro určování jejich složení a struktury. Na stránkách této práce lze najít stručně shrnutou historii Ramanovy spektroskopie, stejně tak jako princip metody, způsoby zesílení a v závěru interpretaci spekter se zaměřením na bílkoviny a také laktózu.

1 ZÍSKÁVÁNÍ SYROVÁTKY A JEJÍ CHEMICKÉ SLOŽENÍ

Syrovátka byla tradičně považována za vedlejší produkt, odpadní látku vhodnou pouze ke krmným účelům. Tento pohled se postupem času změnil a to díky rozvoji poznatků ohledně nutričních benefitů, separačních a zpracovatelských technologií. V dnešní době je syrovátka považována za koprodukt při výrobě sýrů s řadou možných využití v potravinářském průmyslu i farmacii. [1]

Dle vyhlášky č. 397/2016 Sb. lze syrovátku definovat jako mléčný výrobek vznikající jako vedlejší produkt při výrobě sýrů, včetně tvarohů a potravinářských kaseinů; syrovátkou může být i mléčná složka uvolňovaná po fermentaci při výrobě jiných mléčných výrobků, zejména u jogurtů či mléčných dezertů. [2]

Syrovátka obsahuje přibližně 50 % živin obsažených v mléce, hlavní složkou je mléčný cukr, laktóza, představující přibližně 77 % z celkové sušiny, další důležitou složkou jsou bílkoviny zaujímající 12 %, minerální látky, jejichž obsah se pohybuje okolo 10 %, dále malé množství tuku a vitaminy. [1]

Tab.1 Chemické složení tekuté syrovátky [1]

Složka (%)	Sladká syrovátka	Kyselé syrovátka	Kaseinová syrovátka
Sušina (%)	6,20	5,70	6,10
Laktóza (%)	4,80	4,60	4,70
Bílkoviny (%)	0,75	0,30	0,50
Tuky (%)	0,05	<0,01	<0,01
Minerální látky (%)	0,60	0,80	0,90
pH	6,1	4,6	4,4

1.1 Získávání syrovátky

Mezi základní dva typy syrovátky patří syrovátka sladká a kyselé. Toto rozdělení vychází ze způsobu zpracování vedoucí k odstranění kaseinu z mléka. Hlavní rozdíly mezi těmito dvěma typy syrovátky jsou v obsahu minerálních látek, kyselosti a složení syrovátkových bílkovin. Ačkoli tyto rozdíly jsou relativně malé, mohou mít dopad na technologické i nutriční vlastnosti syrovátky.

1.1.1 Sladká syrovátka

Jedná se o typ syrovátky, s níž se lze setkat nejčastěji. Vzniká při výrobě sýrů nebo průmyslových kaseinových produktů, kde je zpracování založeno na koagulaci kaseinu pomocí syřidla, průmyslového přípravku sloužícího na srážení kaseinu, který obsahuje chymosin nebo jiné enzymy.

Vzhledem k tomu, že tento proces a následné odvádění syrovátky probíhá při hodnotě pH 6,0–6,5, je tento typ syrovátky označován jako sladká syrovátka.

Při srážení vznikají fragmenty molekuly kappa-kaseinu nazývané glykomakropeptidy, které zůstávají v syrovátce a představují přibližně 20% z celkového obsahu bílkovin. [3]

1.1.2 Kyselá syrovátka

Druhý typ syrovátky, kyselá syrovátka, je výsledkem procesů využívajících fermentaci bakteriemi mléčného kvašení nebo přidávání organických kyselin ke srážení kaseinu. [3] Vzniká při výrobě čerstvých sýrů a tvarohu a má rozdílné složení oproti sladké syrovátce. Obecně lze říci, že kyselá syrovátka má nižší pH, nižší obsah bílkovin (oproti sladké syrovátce neobsahuje glykomakropeptid), ale na druhou stranu vyšší obsah vápníku, fosforu a kyseliny mléčné. Vzhledem ke kyselé a slané chuti je také omezeno její využití v potravinářství. [4]

1.2 Dusíkaté látky v syrovátce

Mléko obsahuje dva primární zdroje proteinů - kasein a syrovátkové bílkoviny. Kaseiny jsou definovány jako fosfoproteiny, které lze vysrážet z odstředěného mléka okyselením na pH hodnotu 4,6 při 20 °C a tvoří 80 % bílkovin přítomných v mléce. Syrovátkové proteiny zůstávají rozpustné i po vysrážení a tvoří zbývajících 20 % bílkovin. Jedná se o globulární sloučeniny, mezi jejichž hlavní představitele patří β -laktoglobulin, α -alaktalbumin, sérum albumin, laktoferin, imunoglobuliny, enzym laktoperoxidáza a glykomakropeptidy. [5]

Syrovátkové bílkoviny oproti kaseinu prochází rychleji pasáží žaludku a ve střevě jsou pomaleji hydrolyzovány, takže k jejich trávení a absorpci dochází po větší délce střeva.

Syrovátka obsahuje vysoké množství aminokyselin s rozvětveným řetězcem (isoleucin, leucin, valin), aminokyseliny obsahující síru (cystein, methionin), také esenciální

aminokyseliny (lysin, treonin, methionin), které jsou limitující pro některé rostlinné zdroje bílkovin a tím se syrovátka stává jejich ideálním doplňkem. [6]

Kromě bílkovin se na celkovém obsahu dusíku podílí také dusíkaté látky nebílkovinné povahy, jedná se zejména o puriny. Patří mezi ně nepatrné příměsi močoviny, xantinu, hypoxantinu, guaninu, adeninu, kreatinu, kreatininu, amoniaku, alantoinu aj. Na celkovém obsahu dusíku se podílí z 5 – 7 %. [7]

Tab.2 Přehled syrovátkových bílkovin [8]

Syrovátková složka	Obsah z celkových bílkovin	Vlastnosti
β-laktoglobulin	50 - 55 %	zdroj esenciálních rozvětvených aminokyselin
α-laktalbumin	20 - 25 %	bílkovina lidského mateřského mléka zdroj esenciálních rozvětvených aminokyselin
imunoglobuliny	10 - 15 %	bílkovina obsažená v kolostru imunitní modulace
laktoferin	1 - 2 %	antioxidant antibakteriální, antivirotická, antimykotická funkce podporuje růst zdraví prospěšných bakterií vyskytuje se v mléce, slzách, slinách, žluči, krvi a hlenu
laktoperoxidáza	0,50 %	inhibuje růst bakterií
sérum albumin	5 - 10 %	zdroj esenciálních aminokyselin
glykomakropeptid	10 - 15 %	zdroj rozvětvených aminokyselina nízký obsah aromatických aminokyselin - fenylyalaninu, tryptofanu a tyrosinu

Stabilita terciární struktury syrovátkových proteinů je určena různými nekovalentními interakcemi a disulfidovými vazbami, které jsou tvořeny dvěma cysteinovými zbytky. Oproti kaseinu jsou syrovátkové bílkoviny více náchylné na teplotu. Tepelné změny proteinů začínají při 40 °C, zvyšují se s rostoucí teplotou a při teplotě 85 °C je denaturováno okolo 95 % bílkovin. Při neutrálním pH syrovátkový protein denaturuje při teplotním rozmezí 64 - 85 °C, alfa-laktalbumin denaturuje při 64 °C a beta-laktalbumin při 78 °C, pokud teplota přesáhne 85 °C, syrovátkový protein začne agregovat a následně tvořit gel. [9]

1.2.1 β -laktoglobulin

Tato bílkovina je přítomna v mléce většiny savců a představuje asi 50 % syrovátkových bílkovin a přibližně 10 % z celkového obsahu bílkovin v kravském mléce.

β -laktoglobulin má více vazebných míst a je schopný na sebe vázat a přenášet hydrofobní ligandy, mezi které například patří vitamin A a D, mastné kyseliny a fosfolipidy. Slouží také jako zdroj cysteinu, který je důležitý pro syntézu glutathionu. [10]

1.2.2 α -laktalbumin

Druhý nejvyšší obsah bílkovin v syrovátce spadá na α -laktalbumin, jeho obsah se pohybuje okolo 25 %. Tato bílkovina má významnou roli pro produkci mléka, působí totiž na syntézu laktózy v mléčné žláze. Je důležitým zdrojem bioaktivních peptidů a esenciálních aminokyselin, včetně tryptofanu, lysinu, aminokyselin s rozvětveným řetězcem a aminokyselin obsahující síru. Vzhledem ke svým vlastnostem, které zahrnují dobrou rozpustnost ve vodě a tepelnou stabilitu je přidáván do potravinářských produktů. Využívá se například k přeformulování kojenecké výživy tak, aby měla snížený obsah bílkovin a složením se více přiblížila k mateřskému mléku. Díky jedinečnému obsahu tryptofanu má také potenciál jako doplněk výživy pro podporu neurologických funkcí a spánku u dospělých. Mezi další složky α -laktalbuminu, které mohou být užitečné v doplňcích stravy, patří aminokyselina s rozvětveným řetězcem, leucin, ta zvyšuje syntézu proteinů ve svalech a tím podporuje jejich růst a bioaktivní peptidy, které mají prebiotické a antibakteriální vlastnosti. [11]

1.2.3 Imunoglobuliny

Imunoglobuliny se v nejvyšší koncentraci vyskytují v mlezivu, přičemž právě prostřednictvím mateřského mléka dochází k přenosu pasivní imunity na kojence. V syrovátce lze nalézt imunoglobuliny ve formě protilátek: IgG, IgM a sekreční IgA. Z celkového obsahu bílkovin zaujímá 10 – 15 %. [12]

1.2.4 Laktoferin

Glykoprotein, dříve známý jako laktotransferin, byl poprvé izolován z kravského mléka v roce 1939 a po dvou desetiletích byl stanoven jako hlavní protein vázající železo v lidském mléce.

Právě schopnost vázat železo, které je nezbytným substrátem potřebným pro růst většiny bakterií, je principem bakteriostatického účinku, který lze označit za první mechanismus antimikrobiální aktivity laktoferinu. Druhý mechanismus pak zahrnuje přímou interakci laktoferinu a infekčního agens, kdy se laktoferin váže na lipopolysacharid bakteriálních stěn, prostřednictvím peroxidů katalyzovaných ionty železa poškozuje bakterie - ovlivňuje propustnost jejich membrány a vede k lýze bakteriálních buněk.

Na druhou stranu laktoferin podporuje růst bakterií s nízkými požadavky na železo, jako jsou *Lactobacillus* a *Bifidobacteria*, které se obecně považují za prospěšné.

Kromě antimikrobiální aktivity laktoferin zastává v organismu další fyziologické a ochranné funkce, například reguluje absorpci železa ve střevě, působí protizánětlivě, antioxidantně a imunomodulačně. [13]

1.2.5 Laktoperoxidáza

Tento enzym, spadající do skupiny oxidoreduktáz, se vyskytuje jak v mléčných, tak v syrovátkových výrobcích. Štěpí peroxid vodíku na vodu a atomární kyslík, je termostabilní, není inaktivován pasterací, a proto je používán jako metoda kontroly správného provedení této operace, působí antimikrobiálně a lze jej využít jako složku v dentálních výrobcích sloužících k omezení kazivosti zubů. [6]

1.2.6 Sérový albumin

Jedná se o bílkovinu, která není syntetizována mléčnou žlázou, ale do mléka přestupuje z vemen krevním řečištěm. Její koncentrace se zvyšuje během infekčních onemocnění, například během mastitidy. Je schopná na sebe vázat mastné kyseliny a jiné malé molekuly. [6]

1.2.7 Glykomakropeptid

Mezi biologicky aktivní složky syrovátky beze sporu patří glykomakropeptid, který se získává enzymatickým štěpením kappa-kaseinu a představuje 15 – 20 % sérových bílkovin. Podporuje zdraví skrze svoji antimikrobiální, antikariogenní funkci, stimuluje cholecystokinin, vede k prebiotické a imunitní modulaci. Tento peptid má také slibné využití v potravinářském průmyslu, a to díky jeho nutriční hodnotě, schopnosti tvořit pěnu a gel a emulgačním vlastnostem. Glykomakropeptid má velmi nízký obsah aromatických aminokyselin, mezi které mimo jiné patří fenylalanin. Vzhledem k jeho nízkému obsahu

může být glykomakropeptid použit jako složka potravy pro osoby s dědičnou metabolickou poruchou - fenylketonurií. [14]

1.3 Lipidy

Koncentrace tuku v syrovátce je velmi nízká, jeho obsah závisí na technice zpracování. Mezi základní představitele patří triacylglyceroly, následované fosfolipidy, diacylglyceroly, volnými mastnými kyselinami a monoacylglyceroly. Z fosfolipidů lze zmínit zejména sfingomyelin, fosfatidylcholin a fosfatidylethanolamin. Volné mastné kyseliny obsahují poměrově vyšší množství kyseliny máselné, olejové a kaprylové než v mléce. [6]

1.4 Mléčný cukr

Laktóza je hlavním sacharidem v mléce všech savců, mimo tento sacharid lze v mléce nalézt také stopové množství dalších sacharidů, jako je fruktóza, glukosamin, galaktosamin, kyselina neuraminová a neutrální a kyselé oligosacharidy.

Koncentrace laktózy se mezi jednotlivými druhy značně liší, v kravském mléce je ovlivněna plemenem, krmivem, stadiem laktace a možnými nemocemi, například infekcí vemene. Obsah laktózy se během roku postupně snižuje, naopak obsah bílkovina a lipidů v druhé polovině stoupají, infekce vemene - mastitida způsobuje zvýšený obsah chloridu sodného a potlačuje vylučování laktózy.

Mléčný cukr je disacharid skládající se z D – galaktózy a D - glukózy s β – glykosidickou vazbou 4 – 0 – β D – galaktopyranosyl – D glukopyranóza. [15]

Rozpustnost a sladivost laktózy je ve srovnání s jinými cukry nízká. Ze syrovátky ji lze získat procesem krystalizace. Lze ji použít v potravinářském průmyslu, například se využívá jako složka kojenecké výživy, protože ve srovnání se sacharózou je méně kariogenní, ve farmaceutickém průmyslu se pak používá jako plnivo nebo potahovací činidlo na tablety. [16]

1.5 Kyseliny

Mezi nejčastěji se vyskytující kyseliny v syrovátce patří kyselina citronová, mléčná, propionová, octová a mravenčí. Jejich obsah se může značně lišit, přičemž záleží na způsobu zpracování syrovátky a také na tom, zda bylo stanoveno množství celého spektra kyselin nebo zda byly veškeré kyseliny stanoveny jako jedna určitá.

Vyšší obsah kyselin bývá v kyselé syrovátce, ve které vznikají při výrobě tvarohu aktivitou mikroorganismů. Nejvyšší množství lze přisoudit kyselině citronové, její obsah se pohybuje okolo 150 mg/100 g, druhou nejčastější bývá kyselina mléčná s obsahem 40 – 120 mg/100 g.

Na druhé straně, při výrobě kaseinu, dochází k přechodu malého množství minerálních kyselin do syrovátky, například se může jednat o kyselinu chlorovodíkovou. [7]

1.6 Vitaminy

Z mléka do syrovátky přechází velká část vitaminů rozpustných ve vodě, v menším množství pak i vitaminy rozpustné v tucích. Jedná se zejména o vitaminy skupiny B (B₁, B₂, kyselina pantotenová, biotin, B₆, B₁₂), vitamin C a vitamin A. [7]

Tab.3 Vitaminy sladké a kyselé syrovátky [7]

Vitamin	Sladká syrovátka	Kyselé syrovátka
Vitamin A (MJ/100g)	136	107
Vitamin C (mg/100g)	1,41	0,33
Vitamin B ₆ (mg/100g)	0,59	0,62
Vitamin B ₁₂ (µg/100 g)	2,4	2,5
Vitamin E (µg/100 g)	63	71
Vitamin B ₁ (mg/100g)	0,51	0,49
Vitamin B ₂ (mg/100g)	2,14	1,85
Kyselina pantotenová (mg/100g)	11,5	114
Biotin (µg/100 g)	43,0	11,4
Niacin (mg/100g)	1,30	1,16
Kyselina listová (µg/100 g)	11,6	33,2
Cholin (mg/100g)	104	101

1.7 Minerální látky

V syrovátce jsou minerální látky obsaženy ve formě organických (0,1 – 0,4 %) a anorganických (0,6 – 0,7 %) sloučenin. Jejich zdrojem jsou především soli kyseliny fosforečné, mléčné, uhličitě, citronové, chlorovodíkové a sírové. [7]

Z makroelementů největší část tvoří draslík a vápník, dále je přítomen fosfor, sodík a hořčík, z mikroelementů převládá zinek a železo.

Minerální složení sladké a kyselé syrovátky je velmi podobné, nejvyšší rozdíl v hodnotách lze vidět u zinku, kterého je až 20krát více v kyselé syrovátce, v té lze také nalézt až třikrát vyšší obsah vápníku než ve sladké syrovátce. Je to dáno tím, že při výrobě sýru se část vápníku váže s kaseinem a tvoří nerozpustnou sloučeninu, která zůstává v sýru, při výrobě tvarohu naopak přechází vápník do syrovátky a proto je jeho hodnota zde vyšší. [17]

Tab.4 Minerální látky obsažené v kyselé a sladké syrovátce [17]

Minerální látka	Kyselé syrovátka	Sladká syrovátka
Makroprvky (mg/100g)		
Ca	92,8	36,5
Mg	9,0	6,5
Na	39,8	45,5
K	153,0	123,0
P	58,0	43,0
Mikroprvky (µg/100g)		
Zn	234,0	11,0
Fe	106,0	89,0
Cu	6,8	3,5
Mn	2,8	0,6

2 TECHNOLOGIE ZPRACOVÁNÍ SYROVÁTKY

Syrovátka musí být zpracována co nejdříve po jejím získání, její teplota a složení totiž podporuje růst bakterií, jejichž činnost vede k degradaci bílkovin a tvorbě kyseliny mléčné. [18]

2.1 Předběžná příprava syrovátky

2.1.1 Čištění

Nežádoucí zbytky sraženin (sýrařský prach) by mohly negativně ovlivnit průběh dalších procesů (ucpávání tepelných výměníků, poškozování a ucpávání membrán) a proto se při moderních postupech zpracování syrovátky téměř vždy provádí čištění. Tyto sraženiny by navíc také mohly ovlivnit chuť a vůni výsledného produktu. Při procesu čištění se využívá kombinace procesů usazování, scezování a odstředování nebo pouze samotné odstředování, metoda se vybírá podle velikosti a množství pevných částic. Pokud je v syrovátce přítomno velké množství nečistot, pro čištění se používají samoodkalovací odstředivky s kontinuálním odstraňováním kalů. [7]

2.1.2 Odstranění tuku

Pokud syrovátka pochází z výroby sýru, může obsahovat vyšší množství tuku, které je vhodné odstranit kvůli možnosti dalšího zpracování a udržení kvality a stability produktu. Pro tento účel se syrovátka odstřeďuje, ideální je dosáhnout obsahu tuku pod 0,5 %. [7]

Syrovátková smetana, která vzniká při výrobě sýra, může obsahovat až 30 % tuku, částečně ji lze použít pro standardizaci mléka nebo u sýrů s krátkou dobou dozrávání, například u mozzareilly, nevýhodou však je delší doba dozrávání a mírná změna chuti, v některých případech lze syrovátkovou smetanu využít na výrobu syrovátkového másla. [18]

2.1.3 Pasterace

Syrovátka, která má být skladována před zpracováním, musí být buď chlazená nebo pasterizovaná a následně chlazená, a to ihned po odstranění tuku a jemných částic. Pro krátkodobé skladování (do osmi hodin) je obvykle pro snížení bakteriální aktivity dostatečné chlazení na $< 5^{\circ}\text{C}$.

Pro použití pasterace se obvykle používá kombinace teploty 72 - 78 °C po dobu 15 - 20 s, v některých případech se vak používá teplota v rozsahu 62 – 95 °C. Dochází ke

snížení počtu živých mikroorganismů a inaktivuje se alkalická fosfatáza a chymozin. Pasterace se doporučuje pro vyhovění stále přísnějším požadavkům na kvalitu produktu.[7]

2.2 Demineralizace syrovátky

Odstranění minerálů ze syrovátky je další možností jak zvýšit zpracovatelnost a využitelnost tohoto produktu. Demineralizační operace spočívá v odstranění některých kovových iontů a kyseliny mléčné. Tato operace se obvykle provádí elektrodialýzou nebo iontovou výměnou. Výsledkem je produkt, který obsahuje malé množství minerálů a jehož organoleptické vlastnosti byly zachovány. Při následném okyselení na hodnotu pH 4,5 dochází k odstranění 99 % bakterií a 90 % zbytkových lipidů, což vede ke zlepšení emulgačních schopností a stability při skladování.

Demineralizovaná syrovátka se používá v kojenecké výživě, dietních potravinách, cukrovinkách a pekařských výrobcích a může částečně nahradit sušené odstředěné mléko. [19]

2.3 Krystalizace laktózy

Problémy při zahušťování a sušení může způsobovat vysoký obsah laktózy v syrovátce či permeátu. Koncentrát a permeát, který obsahuje více než 55 % sušiny, je totiž při 38 °C nasycen roztokem laktózy.

Předkrystalizace laktózy se provádí pro usnadnění sušení a pro zabránění lepivosti výsledného prášku. Samotná krystalizace probíhá např. při 20 – 35 °C po dobu 2 - 24 hod. v krystalizačním tanku, následně je rychle zchlazena. Asi 70 % laktózy vytvoří malé krystaly, které nijak nevadí při následném rozprašovacím sušení, dojde totiž ke snížení podílu bezvodé amorfni laktózy vznikající při rychlém sušení. Bezvodá amorfni laktóza totiž může způsobovat lepení teplého prášku na stěny, hygroskopičnost výsledného prášku, jeho tvrdnutí a obtížné rozpouštění.

Při vykrytalizování 85 - 90 % laktózy vznikne při rozprašovacím sušení výrobek s 60 % sušiny. Existuje více způsobů krystalizace, tradiční postup se nazývá šaržová krystalizace, v dnešní době se však spíše používá rychlejší kontinuální krystalizace. Tento proces lze také využít pro získání laktózy samotné, s cílem jejího dalšího využití. [7]

2.4 Zahušťování syrovátky

První krok při zahušťování syrovátky obvykle zahrnuje zvýšení sušiny z přibližně 6 % na 18 – 25 % a to pomocí reverzní osmózy nebo kombinací reverzní osmózy s nanofiltrací. Následně může být syrovátka buď transportována na místo pro další zpracování (odpařování a sušení) nebo sušena přímo na místě. [18]

K předběžné koncentraci veškerých složek se v sýrárnách využívá membránový proces - reverzní osmóza, která vede jak k zakoncentrování výsledného výrobku, tak ke snížení přepravních nákladů. Míra zahuštění závisí na viskozitě původní suroviny. Tento postup je vhodný jako předstupeň odpařování.

Pro oddělení vody se používá tlak 30 - 40 bar a teplota 25 - 33 °C a to vzhledem k malé velikosti pórů. Se stoupající koncentrací stoupá i osmotický tlak syrovátky, který musí být vnějším tlakem překonán.

V dnešní době se používají membrány z kompozitu, protože dřívější acetátocelulózové membrány nesnášely teploty nad 30 °C a byly choulostivé na čištění a sanitaci. Membrány z kompozitu naopak snáší teploty i nad 80 °C, jsou stabilní v celém spektru pH a jsou odolné vůči sanitačním prostředkům. [7]

Při koncentraci sušiny nad 25 – 30 % je hospodárnější použít pro odpařování syrovátky odparky s klesajícím filmem nebo trubkové vakuové odparky ve vícestupňovém provedení s mechanickou kompresí par. Využití této metody ke koncentraci syrovátky může zvýšit sušinu z 20 % až na 45 – 65 %. [18]

2.5 Sušení

V 60. letech 20. století byla vyvinuta rozprašovací sušička, která byla poprvé aplikována v roce 1937 a od té doby pokračuje její používání při sušení syrovátky. Laktóza, která je amorfní a hygroskopická se ochladí a krystalizuje na nehygroskopický monohydrát α -laktózy.

Rozprašovací zařízení je tvořeno sušárnou a tryskovým rozprašovačem, proces probíhá v sušících komorách, kde se v prvním stupni získává prášek s 10 – 14% vlhkostí. Při odpařování je nutné udržet nízkou teplotu, aby bylo zabráněno denaturaci. Dále se vlhký prášek dosušuje ve vibračním fluidním lóži na vlhkost v rozmezí 3 – 5 %. [9]

2.6 Metody separace složek syrovátky

2.6.1 Iontoměničová chromatografie

Pomocí této metody je možné dělit nízkomolekulární a vysokomolekulární látky. Stacionární fázi tvoří ionex, na nějž se navaží ionty opačného náboje z dělené látky, poté následuje promývací fáze tak, aby došlo k postupnému uvolňování složek ze směsi.

Použití ionexů se využívá k demineralizaci, nevýhodou však je, že při regeneraci ionexů odpadají silné kyseliny a zásady.

Iontoměničová chromatografie se využívá také pro oddělení bílkovin. Při tomto procesu se nejprve syrovátka okyslí, takže většina bílkovin získá pozitivní náboj. Následně se přidá negativně nabitá umělá pryskyřice, dojde k navázání bílkovin na pryskyřici a vymytí těch, které se nenavázaly. Poté se hodnota pH zvýší, bílkoviny se uvolní a může následovat jejich další zpracování ultrafiltrací. Tímto způsobem získaný WPI (syrovátkový proteinový izolát) obsahuje veškerý β -laktoglobulin, na druhou stranu však obsah α -laktalbuminu a imunoglobulinu je na minimální úrovni nebo není obsažen vůbec. [7]

2.6.2 Elektrodialýza

Elektrodialýza označuje proces, ve kterém jsou ionty přenášeny iontoměničovými membránami za použití elektrického pole. Model elektrodialýzy obsahuje tři hlavní toky: zředěný demineralizovaný proud, koncentrovaný proud, který pohlcuje ionty z ředidla, roztok elektrolytu, který vede proud systémem a chrání elektrody. Tento způsob je využíván pro odstraňování minerálů ze syrovátky před výrobou syrovátkového prášku. [20]

2.6.3 Membránová filtrace

Mezi používané membránové metody patří mikrofiltrace, ultrafiltrace, nanofiltrace a reverzní osmóza. K separaci dochází prostřednictvím semipermeabilní membrány, přičemž se využívá rozdílného tlaku na obou stranách. Oddělovací mechanismus je obecně založen na prosévacím účinku přes tenké filtry s danou velikostí pórů.

Mikrofiltrace se využívá pro odstranění tuku a bakterií ze syrovátky pomocí membrán s poměrně velkými póry ($> 0,1 \mu\text{m}$). Ultrafiltrace se využívá pro separaci syrovátkových proteinů a tyto membrány jsou obvykle charakterizovány separačními schopnostmi založenými na molekulové hmotnosti, označované jako "cut-off". Nanofiltrace se používá k frakcionaci směsi ještě menších molekul, například u částečně

demineralizované syrovátky. Reverzní osmóza slouží k zahušťování, přičemž tímto procesem dochází k odstraňování vody.

Používané membrány musí splňovat některé požadavky, jako je odpovídající propustnost, separační účinnost a stabilita proti samovolné hydrolýze.

Ultrafiltrace se využívá pro frakcionaci syrovátkových proteinů. Při této metodě látky s nízkou molekulovou hmotností jako je laktóza, minerální látky a voda snadno prochází skrz membránu a zůstává zahuštěný substrát skládající se z bílkovin a zbytkového tuku. Syrovátka tímto způsobem může snížit objem až o 95 %, vyšší stupně frakcionace syrovátky se již nedoporučují z důvodu příliš vysoké viskozity retentátu.

Složení syrovátkového proteinového koncentrátu (WPC) závisí na vlastnostech membrány, délce filtračního procesu a použití vody. Pomocí ultrafiltrace lze vyrábět všechny typy WPC s obsahem bílkovin v rozmezí od 25 – 80 %.

Průmyslově vyráběné koncentráty lze rozdělit na:

1. WPC s nízkým obsahem bílkovin (25 – 45 %)
2. WPC se středním obsahem bílkovin (45 – 60 %)
3. WPC s vysokým obsahem bílkovin (60 – 80 %)

Izolovaná syrovátková bílkovina (WPI) je samostatnou kategorií s obsahem proteinů okolo 90% a její příprava probíhá procesem mikrofiltrace z odtučněné syrovátky.

Složení WPC35 odpovídá složení sušeného odstředěného mléka a lze jej využít jako jeho náhradu. Výrobky WPC60 mohou nahradit vaječný bílek v pekárenských a cukrářských výrobcích, WPC80 je využíván v masných a rybích výrobcích. [26]

3 MOŽNOSTI POUŽITÍ SYROVÁTKY V POTRAVINÁŘSTVÍ

Využití syrovátky bývalo jedním z hlavních problémů, její vysoký obsah minerálních látek, v kombinaci s vyprodukovanými velkými objemy a omezenými možnostmi zpracování vytvořily ze syrovátky enviromentální problém. Tento fakt vedl k rozvoji technologických procesů, díky kterým se syrovátka přetváří na produkty s přidanou hodnotou a možností dalšího využití.

V potravinářství se ze syrovátky stala složka využívaná v mnoha odvětvích, ať už se jedná o výrobu mléčných nebo masných výrobků, cukrovinek, nápojů nebo kojenecké výživy. Díky svým funkčním vlastnostem lze syrovátku využít jako emulgátor, zahušťovadlo, také pro její schopnost vázat tuk, tvořit gel a pěnu, použití syrovátky může mít také vliv na chuť, aroma a texturu. [21]

3.1 Výroba sýrů

Syrovátková bílkovina je při výrobě sýrů využívána jako zdroj cenných aminokyselin a také pro dosažení výraznější chuti a jemnější konzistence. Při výrobě syrovátkových sýrů se využívá samotná syrovátka nebo syrovátkový bílkovinný separát, který je buď bez přídavku nebo s přídavkem mléka.

Tyto sýry můžeme rozdělit na dva druhy, a to na Riccotu, která obsahuje 70-80% vody a syrovátkové bílkoviny jsou při výrobě vysráženy teplem. Druhým je sýr norského typu, Mysost, což je hnědý sýr, který obsahuje 33 – 45 % laktózy. Při výrobě sýru Mysost je zpracována prakticky veškerá syrovátka, z hlediska zužitkování syrovátky je tedy mnohem efektivnější než Ricotta, při jejíž výrobě zůstává nevyužito 80 – 85 % částečně deproteinované syrovátky, která není dále snadno využitelná. [7]

3.1.1 Ricotta

Riccottou je myšlen čerstvý, nezrající sýr bílé barvy a měkké konzistence, Jeho chuť není nijak výrazná, avšak může být polosladká v případě, kdy je vyrobena z čerstvé sladké syrovátky. Ricotta byla původně vyráběna v oblastech s vysokou produkcí ovčího mléka, na Sicílii a zejména Sardinii, později však byla distribuována po celé Itálii a dokonce se vyvážela do jiných zemí, zejména USA.

Při výrobě Ricotty je hlavní surovinou syrovátka, která se doplní s 5 – 10 % mléka, které bylo zahřáno na 40 – 50 °C. Následně se přidává 0,1 % soli a pokračuje zahřívání až na 80 - 85 °C. Po dosažení požadované teploty se za pomalého míchání přidá okyselující činidlo (obvykle vodný roztok kyseliny citronové v množství asi 0,11 kg/l). Zahřívání se přeruší ve chvíli, kdy sýřenina vzejde na hladinu, směs poté odpočívá 5 minut a následně se odebírá a nechává odtékat na sítích 4 - 6 hodin v chladné místnosti.

Obvykle lze získat 1 kg ricotty z 15 - 20 litrů syrovátky, výtěžnost se tedy pohybuje okolo 6 %. [22]

3.1.2 Mysost

Nejznámějším syrovátkovým sýrem v Norsku je Mysost. Vyrábí se jako tvrdý nebo pomazánkový sýr ze sladké kravské nebo kozí syrovátky. Existuje několik variant, a to: Brunost, Gjestot, Primost, a Grubransdalsost.

Na přelomu století do klasického Mysostu začali výrobci přidávat smetanu, to vedlo ke změně názvu na Brunost. Pokud bylo pro výrobu použito pouze kozí mléko, pak se jedná o Gjestot, tento sýr je tmavě hnědý, tvrdé struktury. Pro zlepšení sensorických charakteristik se do tohoto sýru začala přidávat smetana, díky tomu došlo ke změně původní barvy na světle hnědou, struktura se stala hladkou a krémovou, tento produkt se nazývá Primost. Grubransdalsost je nejoblíbenější norský syrovátkový sýr. Pro jeho výrobu se využívá směs, která se skládá z 88 % z kozí syrovátky a z 12 % kravského mléka, obvykle se přidává smetana v množství, aby se celková tučnost výrobku pohybovala okolo 3 %. [22]

3.2 Jogurty

V posledních letech byl pozorován nárůst v konzumaci mléčných výrobků. Nejmarkantnější z nich je nárůst ve spotřebě jogurtu. Z toho důvodu je kladen důraz na kvalitativní vlastnosti, přičemž lze tyto vlastnosti modifikovat pomocí syrovátkového prášku.

Do jogurtů lze syrovátku přidávat v různých formách a to buď sladkou syrovátku, WPC, WPI nebo demineralizovanou syrovátku.

V prvním případě se nahrazuje 2,0 - 2,5 % sušeného odstředěného mléka práškem ze sladké syrovátky. Výrobci nejčastěji používají WPC, který se přidává v množství 0,7 - 2,0 %

v případě WPC34 a 0,5 - 0,8 % u WPC80, nahrazení sušeného odstředěného mléka za WPC zvyšuje u výsledného produktu viskozitu a pevnost gelu. Třetím typem je WPI, které se vzhledem k nízkému obsahu laktózy a mléčného tuku používá do jogurtů se sníženým obsahem laktózy. Posledním druhem je demineralizovaný syrovátkový prášek se sníženým obsahem minerálních látek, který urychluje proces fermentace, avšak nízký obsah minerálních látek oslabuje strukturu gelu, proto je nutné přidat hydrolyzáty mléčných bílkovin.

Všeobecně lze říct, že syrovátkové bílkoviny u jogurtů zlepšují chuť, zvyšují viskozitu, zlepšují texturu, mají probiotický efekt a také se podílejí na vyšší nutriční hodnotě. [23]

3.3 Zmrzlina a mražené krémy

Syrovátka a syrovátkové bílkoviny jsou ve výrobě zmrzliny a mražených krémů využívány již 60 let. Na globálních trzích využití syrovátky do mražených mléčných dezertů stále stoupá, což lze přičíst větší dostupnosti vysoce kvalitních syrovátkových výrobků a zvýšené znalosti o aplikaci a výhodách syrovátkových produktů.

Pro výrobu zmrzliny a mražených mléčných výrobků se nejčastěji využívá sladká syrovátka, syrovátka se sníženou laktózou, demineralizovaná syrovátka, kyselá syrovátka (ta se používá pouze pro výrobu sorbetu), WPC v rozmezí 34 – 89 %, WPI 90 %,

Výhodou využití syrovátky tkví ve schopnosti vázat velké množství vody, což vede ke zvýšení viskozity, ale také napomáhá udržet stabilitu při zmrazení a rozmražení, kdy udržuje ve směsi ledové krystalky, které zvyšují odolnost proti tepelnému šoku a umožňují udržet hladkou a krémovou konzistenci. Také snadno tvoří stabilní emulze a mohou zcela nebo částečně nahradit jiné emulgátory. [24]

3.4 Kojenecká výživa

Syrovátková bílkovina se jako zdroj esenciálních bílkovin často využívá pro kojeneckou výživu. Mateřské mléko je považováno za optimální zdroj výživy pro kojence, pokud však není kojení možné, pak se výrobky pro kojeneckou výživu stávají vhodnou alternativou. Pomocí syrovátkových bílkovin je možné pozměnit poměr syrovátkové

bílkoviny : kasein z 20 : 80, což je poměr odpovídající kravskému mléku, na poměr 60 : 40, který již napodobuje složení lidského mateřského mléka.

Bylo zjištěno, že oproti klasické formuli, kojenecká výživa s přidavkem syrovátkového hydrolyzátu podporuje kojenecký imunitní systém, je méně alergenní a pravděpodobně snižují riziko vzniku alergií u novorozenců, byl také zjištěn nižší výskyt atopické dermatitidy a lepší snášenlivost u dětí s diagnostikovanou kolikou [25]

3.5 Masné výrobky

Vysoké výrobní náklady masných výrobků vedou výrobce k zavádění nemasových bílkovinných zdrojů do svých výrobků. Mezi dvě nejdůležitější schopnosti masných bílkovin patří zadržování vody a vázat tuk. Libové maso obsahuje asi 75 % vody, 20 % bílkovin a 5 % tuku. Více než 70 % vody se nachází ve tkáních a je vázána masovými proteiny. Předpokládá se, že množství vody a rozsah, v jakém je vázána ovlivňuje strukturu a šťavnatost masných výrobků. Po porážce je část vody vyloučena během fáze rigor mortis. Tato ztráta může být obnovena pomocí solí a mléčných bílkovin, jako jsou WPC, díky syrovátkovým bílkovinám také zůstává zachována vaznost tuku a obvyklá struktura masného výrobku.

Obohacování šunek syrovátkovými bílkovinami probíhá pomocí vícejehlového systému, kdy dochází ke vstřikování roztoku syrovátkových bílkovin do masa. Po injekci je maso masírováno nebo opakovaně omíláno v roztoku syrovátkových bílkovin nebo ve slaném nálevu. Následně se šunka plní do obalů a vaří se na teplotu jádra mezi 70 – 75 °C.

Nejvhodnější WPC pro tento účel je nízkoteplotní WPC80, který je dobře rozpustný ve 2% solných roztocích. Použitý koncentrát by měl mít nízkou viskozitu, aby nedocházelo k ucpávání jehel, také by neměl mít nepříznivý vliv na chuť, barvu, vzhled a strukturu výsledného výrobku. [26]

3.6 Nápoje

Výroba syrovátkových nápojů byla zahájena v 70. letech 20. století a dodnes je vyvíjena široká škála různých syrovátkových nápojů. Mohou být vyrobeny ze sladké nebo kyselé syrovátky, deproteinizované syrovátky, nativní syrovátky, která byla zředěna vodou, syrovátkovým práškem nebo fermentací syrovátky.

Nealkoholické syrovátkové nápoje zahrnují širokou škálu produktů získaných smícháním sladké, zředěné nebo kyselé syrovátky s různými přísadami, jako jsou tropické ovoce (ale také jiné ovoce, jako jsou jablka, hrušky, jahody nebo brusinky), plodiny a jejich produkty (hlavně otruby), izoláty rostlinných bílkovin, CO₂, čokolády, kaka, vanilkových extraktů a jiných aromatizačních činidel.

Zvláštní pozornost je věnována vývoji syrovátkových nápojů fermentací syrovátky probiotickými bakteriemi, kde nejdůležitějším krokem je výběr vhodné kultury bakterií za účelem vytvoření funkčního nápoje s vysokou výživnou hodnotou a přijatelnými senzorickými vlastnostmi.

Nealkoholické syrovátkové nápoje také zahrnují dietetické nápoje, nápoje s hydrolyzovanou laktózou, mléčné nápoje a práškové nápoje. Syrovátka je velmi dobrá surovina pro výrobu alkoholických nápojů vzhledem k tomu, že hlavní složkou je laktóza (asi 70 %). Alkoholické syrovátkové nápoje zahrnují nápoje s malým množstvím alkoholu (do 1,5 %), syrovátkové pivo a syrovátkové víno. Syrovátkové nápoje jsou vhodné pro širokou škálu spotřebitelů - od dětí po nejstarší. Mají velmi vysokou nutriční hodnotu a dobré terapeutické vlastnosti. [27]

3.7 Pekařství

Syrovátka může být využívána v pekařském a cukrářském průmyslu k výrobě chlebů, koláčků, biskuitů, cookies, muffinů,...

Pekařské výrobky jsou obvykle bohaté na uhlohydráty, ale chudé na bílkoviny, proto je zde prostor pro zvýšení jejich biologické hodnoty. Část mléka a další složky lze nahradit jak kyselou, tak sladkou syrovátkou, může se využít WPC nebo WPI. Například WPC34 může sloužit jako částečná náhrada za vejce i tuk při výrobě sušenek, WPC80 se pak využívá jako náhrada vejce ve výrobcích jako je chleba, koláče, biskuity a muffiny. Využitím koncentráту lze snížit obsah tuku až o 50 % a zároveň zvýšit obsah vlhkosti. [23]

3.7.1 Zvyšování obsahu bílkovin ve výrobcích

Použitím syrovátky v pekařských výrobcích docílíme zvýšení hladiny bílkovin, navíc díky obsahu lyzinu syrovátka kompenzuje nízký obsah této aminokyseliny v pšenici, což je užitečné zejména pro sportovce a seniory. [7]

3.7.2 Zadržování vlhkosti

Na zlepšení zpracovatelnosti těsta a na zadržování vlhkosti má příznivý vliv laktóza, díky jejímu pomalému štěpení, díky kterému zůstává přítomna i během pečení. Dohromady s bílkoviny má tak vliv na snížení rychlosti vysychání při stárnutí pečiva. [7]

3.7.3 Zlepšení textury

Bílkoviny sušené syrovátky nebo syrovátkových koncentrátů mohou tvořit gel, který se teplem zhutňuje, to vede ke zvýšení síly lepku, naopak ostatní složky syrovátky texturu střídky změkčují.

Rychlejší nástup kynutí a lepší zadržování plynu je pak zprostředkováno pomocí laktózy. [7]

3.7.4 Emulgování

Syrovátkové bílkoviny mají velmi dobrou emulgační schopnosti, čímž umožňují snížit použití tuku. Lze je také využít pro výrobu polev, náplní a při povrchové dekoraci výrobků. Jako náhražku vaječného bílku lze použít nativní a modifikované syrovátkové bílkoviny. [7]

3.7.5 Hnědnutí

Kombinace syrovátkových bílkovin a laktózy vede k hnědnutí pekařských výrobků, což je oceňováno zejména u výrobků s nízkým obsahem cukru. Zlatohnědá barva se nemění ani během mrazírenského skladování u výrobků, které se prodávají ihned po rozmražení. Schopnost hnědého zabarvení je využívána také u toustového chleba a také u předpečeného pečiva, určeného k dohotovení v mikrovlnné troubě. [7]

3.7.6 Uchování aromatu a chuti

Sušená syrovátková bílkovina může být také použita místo fermentovatelných cukrů u výrobků s krátkou dobou kynutí, jedná se například o těsta na pizzu. Kromě odpovídajícího hnědého zabarvení je zachována i reziduální sladkost výrobku. Pomocí droždí lze docílit pomalejší fermentace, která vede k rozvoji chuti a aroma a zároveň prodlužuje dobu použitelnosti. [7]

3.7.7 Nutnost změn receptury

Pokud je při výrobě chleba nebo pečiva použita syrovátka, je nutné v receptuře provést určité změny. V případě, kdy je použito 2 – 5 % syrovátky v celkové receptuře, musí se snížit množství sladidla, což může vést ke změně v zabarvení. Pro dosažení žádaných výsledků je zapotřebí použít typ syrovátky, která odolává vysokým teplotám. Při přidání syrovátky do receptury je potřeba snížit dobu hnětení těsta, výsledný výrobek má lepší vzhled, střídka je vlhčí a pružnější, kůrka má lepší zbarvení, mimo to také dochází ke zlepšení vlastností při zmrazování a rozmrazování. [7]

4 RAMANOVA SPEKTROSKOPIE

4.1 Historie

Pružný rozptyl světla byl studován od 19. století známými fyziky, např. A. Einsteinem, lordem Rayleighem a dalšími, při jejich pozorování však nezaznamenali změny frekvencí záření. Ramanův jev byl teoreticky popsán v roce 1923 rakouským kvantovým fyzikem A. Smekalem a o pět let později bylo provedeno první experimentální pozorování neelastického rozptylu světla sirem Chandrasekharem Ramanem a jeho studentem K. S. Krishnanem v Kalkatě, téměř ve stejnou dobu byl experiment proveden i v Moskvě fyziky Landsberg a Mandelstam. V roce 1930 Raman obdržel za svoji práci a přínos v oblasti fyziky Nobelovu cenu a obor spektroskopie byl pojmenován právě po něm. [28]



Obr. 1 C. V. Raman [30]

Vylepšení jednotlivých komponent Ramanova spektrometru přicházelo postupně. Ze začátku Ch. Raman využíval světelné záření jako zdroj, dalekohled jako sběrač paprsků a jako detektor oči. Výzkum se nejprve zaměřil na vylepšení excitačního zdroje. Nejdříve se využívaly různé lampy, ty byly však nepoužitelné z důvodu nízké intenzity. V roce 1914 byla vytvořena rtuťová výbojka, která byla později upravena pro použití v Ramanově spektroskopii. Přelom nastal v roce 1960, kdy došlo k vyvinutí prvního laseru T. Maimanema, jeho využití při spektroskopii vyřešil problém s nízkou intenzitou neelastického rozptylu. K detekci se nejprve používaly fotocitlivé materiály, po druhé světové válce se začaly využívat přístroje fungující na fotoelektrickém jevu. V šedesátých

letech se začal používat dvojitý monochromátor, který byl schopen odstraňovat lépe rozptýlené světlo, později se přešlo na ještě účinnější trojitý monochromátor. V dnešní době se k získání Ramanových spekter využívá také Fourierovy transformace. [29]

4.2 C. V. Raman

Chandrasekhara Venkata Raman se narodil v Tiruchirappalli v jižní Indii 7. listopadu 1888. Jeho otec byl učitelem matematiky a fyziky, takže se již od dětství pohyboval v akademické atmosféře. V roce 1902 nastoupil na President College v Madrasu, kde mu byla udělena zlatá medaile jako vyznamenání pro nejlepšího studenta fyziky, o pět let později získal titul M. A. a také nejvyšší vyznamenání. V letech 1917 - 1948 působil jako profesor nejdříve na Kalkatské univerzitě, později na Indickém ústavu vědy v Bangalore. v roce 1948 se stal ředitelem Ramanova výzkumného ústavu v Bangalore, který sám založil.

Již jako student se věnoval výzkumu v oblasti optiky a akustiky, také se zabýval elektrickou a magnetickou anizotropií a fyziologií lidského vidění.

Některé Ramanovy rané monografie byly vydané jako Buletiny Indické asociace pro kultivaci vědy, zabýval se v nich teorií vibrací smyčcových hudebních nástrojů. V roce 1922 publikoval dílo o molekulární difrakci světla ("Molecular Diffraction of Light"), první z řady studií, které nakonec vedly k výslednému zpracování výzkumu "A new radiation" z 28. února 1928, za který získal v roce 1930 Nobelovu cenu za fyziku. [30]

4.3 Princip Ramanovy spektroskopie

Ramanova spektroskopie vychází z neelastického rozptylu ultrafialového (o vlnové délce přibližně 250 - 400 nm, tj. 25 000 - 40 000 cm⁻¹), viditelného (o vlnové délce přibližně 400 - 700 nm, tj. 14 300 - 5000 cm⁻¹) nebo také blízkého IČ záření molekulou, přičemž rozdíl mezi energií dopadajícího a rozptýleného záření vždy odpovídá některému z vibračních energetických přechodů v molekule:

$$\Delta E = h (v_0 - v_r) \quad [31]$$

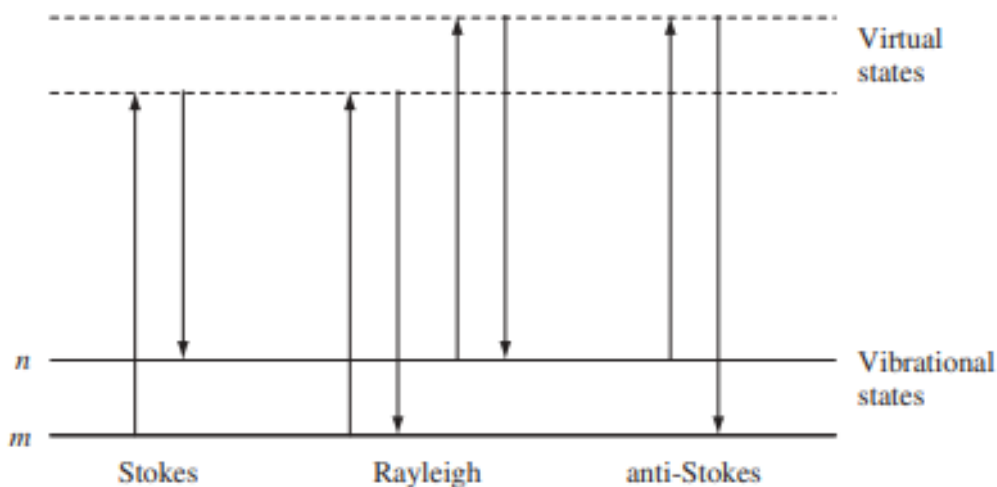
kde $h v_0$ je energie dopadajícího fotonu a $h v_r$ je energie rozptýleného fotonu. [31]

Jestliže viditelné nebo blízké infračervené monochromatické záření o vlnovku v_0 (jehož energie je nižší než energie vedoucí k excitaci valenčních elektronů) dopadne na vzorek, část záření je propuštěno, část absorbováno a část rozptýleno. Pokud je záření rozptylováno makroskopickými částicemi ve vzorku (Tyndalův rozptyl) nebo molekulami

(Rayleighův rozptyl), je vlnčet rozptýleného záření stejný ν_0 jako vlnčet záření dopadajícího. Malá část záření (10^{-6} - 10^{-8}) získá vlnčet jiný, což znamená, že mezi vzorkem a zářením došlo k výměně energie. Tento jev se nazývá nepružná srážka fotonů s vibrujícími molekulami, tato molekula přijme od fotonů část energie a přechází do nekvantovaného stavu.

Molekula se z původně základního elektronového a vibračního stavu po vyzáření nadbytečné energie nemusí do tohoto stavu vrátit, avšak může přejít do vyšších vibračních stavů, jedná se o tzv. Stokesovy čáry. V tomto případě bude vyzářená energie menší než energie přijatá a rozptýlené záření bude mít menší vlnčoty než záření absorbované.

Naopak pokud se molekula nalézala ve vyšším vibračním stavu již před přijetím energie od fotonů, může se po vyzáření vrátit do stavu nižšího nebo základního. Energie vyzářená je poté vyšší než energie přijatá a rozptýlené záření má větší vlnčoty než záření absorbované, jedná se o anti-Stokesovy čáry. Intenzita těchto čar je nižší oproti Stokesovým, jelikož při normální teplotě není mnoho molekul před excitací ve vyšším vibračním stavu. [32,33]



Obr. 2 Diagram energetických hladin po interakci fotonu a molekuly [33]

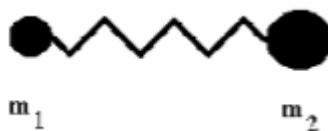
4.4 Vibrace

Podmínkou aktivity vibrací v Ramanově spektru je změna polarizovatelnosti molekuly, tu lze definovat jako schopnost elektrických nábojů v molekule posouvat se vlivem elektrického pole v průběhu vibrace. Vzhledem k faktu, že tuto schopnost mají zejména nepolární části molekul, v Ramanově spektru se projevují intenzivní pásy zejména

pro tyto vazby, kdy dochází při vibraci k výrazné změně polarizovatelnosti, naopak polární části jsou velmi málo polarizovatelné. [33]

4.4.1 Dvouatomová molekula

Při vibracích dvouatomové molekuly dochází k periodickým změnám mezijaderné vzdálenosti. Lze je popsat jako oscilátor tvořený dvěma hmotnými body na pružině, kdy dochází k vychýlení atomů z rovnovážné polohy. Frekvence závisí na síle poutající atomy, tedy na druhu chemické vazby a také na hmotnosti vibrujících atomů. Pokud molekule dodáme energii ve formě elektromagnetického záření s energií rovnou rozdílu energetických hladin, dojde k přechodu mezi nimi, frekvence absorbovaného záření tedy musí být rovna frekvenci vibrace molekuly. Při absorpci energie se zvýší amplituda vibrací, frekvence však zůstává téměř nezměněna. [31]



Obr. 3 Model dvouatomové molekuly [31]

4.4.2 Víceatomová molekula

Víceatomovou molekulu lze popsat jako soustavu hmotných bodů, vázaných silami chemických vazeb. Vibrace víceatomové molekuly je forma kmitavého pohybu, kterou lze popsat jako součet jednoduchých harmonických pohybů, tzv. normálních vibrací. Tato vibrace molekuly je charakterizována frekvencí, směrem a velikostí výchylky jednotlivých atomů, těžiště soustavy však nevibruje. Počet normálních vibrací molekuly je dán počtem vibračních stupňů volnosti.

Základním typem vibrací jsou valenční vibrace (periodická změna vazebných délek) a deformační vibrace (periodická změna vazebných úhlů).

Například u molekuly vody existují tři možné normální vibrace. Při prvních dvou se vychylují atomy ve směru vazby a tak dochází ke změně délky, jedná se o vibraci valenční. Deformační vibraci můžeme nazvat stav, kdy se atomy vychylují přibližně kolmo na směr chemické vazby a dochází při ní ke změně valenčního úhlu, tyto vibrace mají nižší energii a z toho důvodu se nalézají ve spektru při nižších frekvencích než vibrace valenční. [31]



Obr. 4 Příklad vibrace molekuly vody [31]

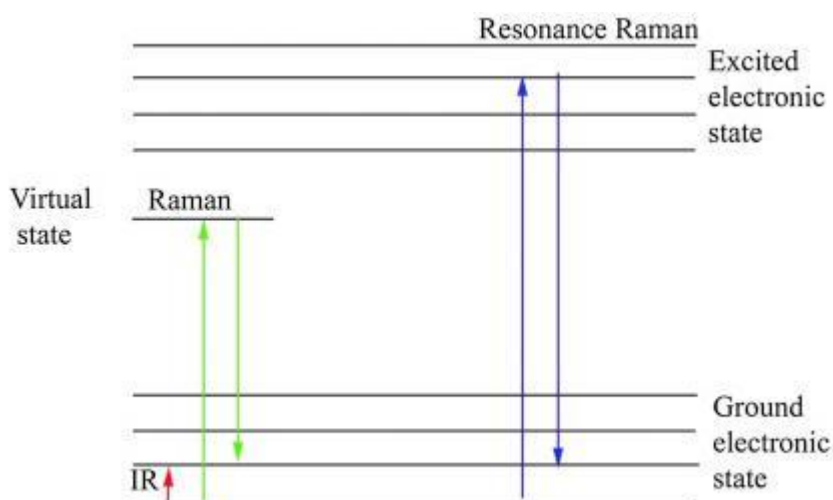
4.5 Rezonanční Ramanova spektroskopie (RRS)

Tento efekt, který se nazývá rezonanční Ramanův rozptyl, využívá laserové světlo, které má frekvenci blízkou energii potřebné na přechod elektronu v molekule zkoumané látky do elektronového excitovaného stavu a rezonuje s ním. Vzorek vyžadovaný pro RRS může být pevný, vláknitý, gel nebo roztok.

Mezi hlavní výhody RRS patří zlepšení citlivosti, které umožňuje detekci vzorku při mikromolární koncentraci, je tedy možné získat spektra vzorků s velmi nízkou koncentrací a to 10^{-6} až 10^{-8} .

Nevýhodou této techniky je to, že laserové světlo použité pro excitaci může poškodit vzorek, tento problém může být vyřešen protřepáním vzorku nebo pomocí průtokových metod.

Rozdíl mezi IR, Ramanovou a rezonanční Ramanovou spektroskopií jsou znázorněny na obrázku níže: [34]



Obr. 5 IR, Ramanova a rezonanční spektroskopie [34]

4.6 Povrchově zesílená Ramanova spektroskopie (SERS)

Povrchem zesíleným Ramanovým rozptylem (Surface-Enhanced Raman Scattering) se rozumí výrazné zesílení Ramanova rozptylu (typicky 10^4 – 10^6) pro molekuly adsorbované na vhodné kovové (nejčastěji stříbrné nebo zlaté) nanosubstráty (elektrody, ostrůvkové filmy, koloidy aj.). K tomuto zesílení dopomáhají dva mechanismy: elektromagnetický, zesilující intenzitu dopadajícího i rozptýleného záření, a to díky excitaci povrchových plasmonů v kovu. Druhým mechanismem je molekulární (chemický), ten zvyšuje polarizovatelnost molekuly v důsledku silné interakce s kovovým povrchem.

Povrchově zesílený Ramanův rozptyl (SERS) byl poprvé demonstrován Fleischmannem a jeho kolegy v roce 1974. Ve studii adsorpce pyridinu na stříbrné elektrodě zaznamenali, že Ramanův rozptyl byl značně silnější, když byly molekuly adsorbované na zdrsňeném povrchu kovu.

Výhodou této metody je možnost pracovat s koncentracemi, které byly dříve pro Ramanovu spektroskopii nedostupné, další výhodou je, že potlačuje fluorescenci, která často u látek zcela překrývala signál Ramanova rozptylu. Nevýhodou SERSu je špatná reprodukovatelnost dat, v případě použití nehomogenních a nestabilních aktivních povrchů.

Mezi nejčastěji používané SERS aktivní povrchy patří stříbrné nebo zlaté koloidy, a to především díky levné a snadné přípravě a relativně úzké distribuci částic. Nevýhodou těchto povrchů je nestabilita povrchových vlastností, jako je typ a koncentrace reziduálních iontů a povrchový potenciál.

V posledních letech je značná pozornost věnována také kovovým nanočásticím imobilizovaným na pevných substrátech, které čerpají benefity jak z kovových koloidů (úzká a dobře definovaná distribuce velikosti částic) tak z pevných povrchů (stabilita a reprodukovatelnost samotných povrchů a následně SERS spekter z nich získaných). Účinné imobilizace zlatých nanočástic lze dosáhnout například použitím vhodného organosilanu, který na skleněných podložkách vytváří samospořádanou vrstvu a přes funkční skupiny na konci řetězců na sebe váže zlaté nanočástice. [35]

4.7 Interpretace spekter

Ramanova spektra stejně tak jako infračervená spektra dávají informace o vibračních (a rotačních) pohybech polyatomových částic (molekul, krystalů). Frekvence vibrací se odvíjí od hmotností zúčastněných atomů a na síle vazeb mezi nimi. Vibrační frekvence

molekul jsou nezávislé na tom, zda je studována infračervená nebo Ramanova spektroskopie, avšak liší se v intenzitě spektrálních linií. V Ramanově spektru je intenzita pásů úměrná druhé mocnině změny polarizovatelnosti během vibrací, na druhou stranu infračervené spektrum je úměrné druhé mocnině změny dipólového momentu.

V infračervených spektrech jsou intenzivní pásy pro vibrace s výraznou dipólovou změnou momentu (OH, -C=C- , -C=C- , -N=N-). V Ramanových spektrech intenzita pásů souvisí se změnou polarizovatelnosti, intenzivnější pásy jsou pro symetrické vibrace a pro vícenásobně symetrické vazby (-C=C- , -N=N-), méně pak pro antisymetrické vibrace. Vzhled spekter pro obě dvě metody je tedy silně ovlivněn symetrií molekul a vibračních pohybů. Pásy molekul s nízkou symetrií lze pozorovat v obou typech spekter, avšak s odlišnou intenzitou. U molekul s vysokou symetrií se stávají spektra navzájem doplňkovými (komplementárními).

V Ramanových spektrech se výrazně projevuje dvojná vazba, s valenční vibrací v oblasti cca $1690\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$ pro nekonjugované a v oblasti $1660\text{--}1580\text{ cm}^{-1}$ pro konjugované alkeny.

Pouze slabými vazbami se projevuje C=O , a to v ketonech, esterech, amidech atd. Avšak pokud se zkombinuje Ramanova a infračervená spektra, lze pak přiřadit pásy v oblasti $1750\text{--}580\text{ cm}^{-1}$ právě pro vibrace C=O nebo C=C nebo je také možno identifikovat odlišný původ pásu.

V případě trojných vazeb je možné sledovat symetricky substituovanou trojnou vazbu, která se projevuje velmi silným pásmem v oblasti $2260\text{--}2160\text{ cm}^{-1}$, čímž je možné její odlišení od nesymetricky substituované, která se nachází v oblasti $2180\text{--}2100\text{ cm}^{-1}$. [36]

4.8 Ramanova spektroskopie pro stanovení syrovátky

Ramanova metoda je nedestruktivní a lze jí analyzovat celou škálu složek potravin, včetně makrosložek (proteiny, lipidy, uhlohydráty a voda) jakož i minoritní složky, karotenové pigmenty nebo syntetická barviva, dokonce i mikroorganismy nebo obalové materiály přicházející do styku s potravinami. Ramanova spektroskopie může být používána jako nástroj pro kontrolu kvality, pro identifikaci složení nebo pro detekci falšování, jakož pro základní výzkum strukturálních nebo konformačních změn, ke kterým dochází během zpracování potravin. [37]

Přestože je syrovátka bohatá na živiny a tudíž má vysokou nutriční hodnotu, je čtyřikrát až pětkrát levnější než mléko. Přidávání syrovátky do mléka se stal jeden z možných způsobů falšování obsahu mléka. Díky syrovátce je totiž možné zvýšit objem bez významné změny celkového obsahu bílkovin a bez změny sensorických kvalit.

K detekci obsahu syrovátky v mléce se používají různé metody, většina z nich se soustřeďuje na obsah glykomakropeptidu, mezi tyto metody patří chromatografie, kapilární elektroforéza a ELISA pro kvalitativní i kvantitativní analýzu. Tyto metody mají řadu výhod, avšak ve většině případů je příprava vzorku a analýza k získání výsledků velmi časově náročná, z toho důvodu se vylučuje využití v potravinářském průmyslu a v hygienických laboratořích.

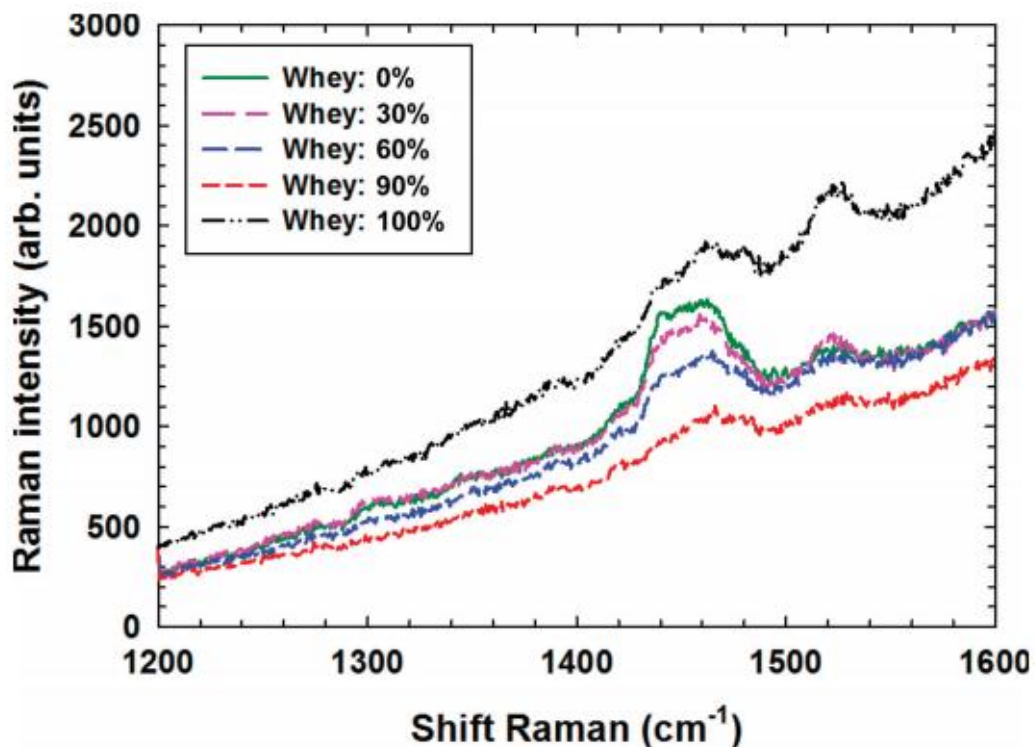
Použití Ramanovy spektroskopie s sebou nese řadu výhod. Na rozdíl od výše uvedených, se tato metoda řadí mezi časově nenáročné, nevyžaduje prakticky žádnou přípravu vzorku a samotná analýza probíhá velmi rychle. Také je možné zkoumat širokou škálu vzorků různého skupenství, bez nutnosti používat chemická činidla a rozpouštědla.

Právě na přídavky syrovátky do mléka a detekci glykomakropeptidu se ve své práci zaměřil R. A. da Rocha z roku 2015. Tato studie byla provedena v Brazílii.

Jako materiál byly použity vzorky mléka od regionální značky Marvim Produtos Agropecuários Ltda. Obsah živin deklarovaný výrobcem zahrnoval proteiny (3,5 %), tuk (3,0 %) a sacharidy (5,0 %). Dále byla použita sladká syrovátka, která byla přidána do mléka tak, aby vznikly roztoky o různém procentuálním obsahu syrovátky (0 – 100 %), celkově bylo připraveno 30 vzorků.

Pro sledování byla použita konfokální Ramanova spektroskopie, která má stejný princip jako Ramanova spektroskopie, avšak používá optický mikroskop k zaostření laseru na konkrétní roviny a skvrny podél vzorku. Oblast pro získávání dat se pohybovala od 1200 do 1600 cm^{-1} . Jako zdroj světla byl použit 514,5 nm argonový iontový laser.

Na obrázku č.6 lze vidět 5 vybraných vzorků v oblasti 1200 - 1600 cm^{-1} , tyto vzorky se liší dle obsahu přidané syrovátky. Lze rozeznat dva významné píky a to při 1430 a 1540 cm^{-1} . Tyto Ramanovy posuny byly identifikovány také Almeidou a kol. ve studii z roku 2011, který je označil za dva hlavní signály pro detekci syrovátky v mléce, kromě toho uvedl oblast asi 3000 cm^{-1} , jež může poukazovat na zvýšený obsah syrovátky. [38]



Obr. 6 Ramanova spektra 5 vzorků mléka falšovaného syrovátkou (0 - 100%) sledované v oblasti $1200 - 1600\text{cm}^{-1}$ [38]

Ramanova spektroskopie je také užitečná pro interpretaci proteinových struktur v syrovátce. Lze nimi pozorovat vibrační přechody přiřazené různým aminokyselinovým postranním řetězcům, jako je vazba S-S a S-H pro cystin a cystein, aromatické kruhy tryptofanu, tyrozinu a fenylalaninu, vazbu C-H pro alifatické aminokyseliny, skupiny COO^- a COOH kyseliny asparagové a glutamové a imidazolové kruhy histidinu. Pásky odpovídající amidu I, amidu III a natahování vazeb poskytují informace o sekundárních strukturách v polypeptidech a proteinech.

Disulfidové a sulfhydrylové skupiny mohou být detekovány v rozmezí $500 - 550\text{cm}^{-1}$ a $2550 - 2580\text{cm}^{-1}$.

Postranní řetězce aromatických aminokyselin vykazují charakteristické píky, z nichž jsou některé užitečné pro sledování polaroty mikrosprostředí nebo přítomnost vodíkové vazby. Například pokud jsou tryptofanové zbytky vystaveny polárnímu vodnému rozpouštědлу, intenzita jejich pásma může být blízko 760cm^{-1} . Přítomnost tryptofanových zbytků byla detekována v zahříváných gelech alfa-laktalbuminu a beta-laktoglobulinu. Pásky

odpovídající tyrozinu lze nalézt v oblasti blízko 850 cm^{-1} a 830 cm^{-1} , který je dobrým indikátorem fenolických hydroxylových skupin.

Na rozdíl od tryptofanu a tyrozinu je například fenylalanin méně citlivý na konformační změny a mikroprostředí, proto lze jeho výrazný pík v oblasti 1006 cm^{-1} použít jako výchozí bod pro určení proteinů.

Zbytky alifatických aminokyselin vykazují protahování vazeb C-H v oblasti $2800 - 3000\text{ cm}^{-1}$ a $1440 - 1465\text{ cm}^{-1}$. Druhá oblast byla některými studiemi popsána jako referenční, jiní informaci o změnách intenzity pásma popsali jako funkci polaroty rozpouštědla nebo mikroprostředí, což by mohlo být využito ke sledování interakcí mezi alifatickými zbytky. Naopak umístění píku odpovídajícího vazbě C-H v oblasti vlnočtu blízko 2940 cm^{-1} může naznačovat jeho citlivost k polaritě mikroprostředí nebo denaturaci proteinů. [39]

Tab.5 Přiřazení typických pásem v Ramanově spektru bílkovin [39]

Zdroj	Vlnočty (cm^{-1})
S-S cystin	510, 525, 545
S-H cystein	2550 - 2580
C-S cystin, cystein, methionin	630 - 670, 700 - 745
Tryptofan	760, 880, 1360
Tyrozin	850/830
Fenylalanin	1005
C=O z COO^- , COOH	1400, 1730
C-H	1453
-C-H nebo =C-H	2880, 2930, 3060
α -Helix	938
Amide I	1650 – 1685
Amide III	1235 – 1270
O-H	3200

Byla publikována komplexní analýza Ramanových spektem pro α -lactalbumin v krystalech, lyofilizovaném stavu a v roztoku. Mezi nejdůležitější pásy patří amid I (1665 cm^{-1}) a amid III (pásy okolo 1260 cm^{-1}), jsou také pozorovány vibrace S – S poblíž

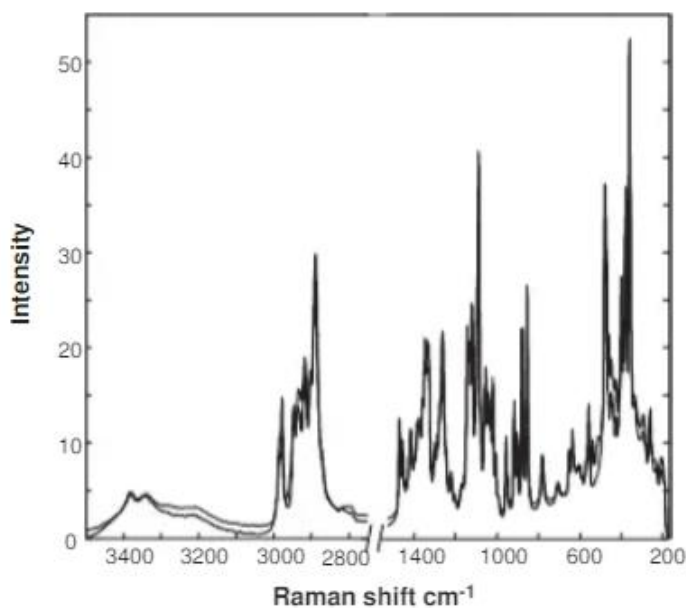
512 cm^{-1} a intenzivní pík charakteristický pro fenylalanin (1009 cm^{-1}), mimo to lze také nalézt skupiny tyrozinu $858/841\text{ cm}^{-1}$. [40]

Ramanovou spektroskopií lze také sledovat přítomnost mléčného cukru v syrovátce. Laktóza se využívá v mnoha průmyslových výrobcích, a to zejména v potravinářství a léčivech. Monohydrát laktózy je pak hlavní složkou syrovátkového permeátu a používá se jako přísada do pomazánek, instantních nápojů, pekárenských výrobků a do dezertů.

V syrovátkovém prášku se laktóza vyskytuje převážně v krystalické formě, mimo to však 10 % tvoří amorfni laktóza, která bývá v některých potravinách a farmaceutických výrobcích nežádoucí. Ramanova spektroskopie se začala používat z důvodu vysoké poptávky po zvýšení kvality potravinářských výrobků s rychlým stanovením kvalitativních parametrů.

Laktózou se zabíral ve své práci z roku 2004 Norgaard a kol. Pro studii byla použita Ramanova spektroskopie s Fourierovou transformací.

Bylo sledováno Ramanovo spektrum dvou vybraných směsí syrovátky s 50 % a 98 % krystalické laktózy. Nejvýraznější byly tři spektrální oblasti s intenzivními píky: $325 - 490\text{ cm}^{-1}$, $845 - 1480\text{ cm}^{-1}$ a $2860 - 3000\text{ cm}^{-1}$. V oblasti $820 - 900\text{ cm}^{-1}$ jsou lokalizovány symetrické kruhy, které jsou indikativní pro anomery a oblast $900 - 1500\text{ cm}^{-1}$ odpovídá vazbám C-O a C-H, které jsou typické pro sacharidy. [41]



Obr. 7 FT-Raman spektra pro vzorek s 50 % a 98 % krystalické laktózy [41]

ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývala využitím Ramanovy spektroskopie pro stanovení některých složek syrovátky. Úvodní část práce byla věnována charakteristice syrovátky, popisu způsobu jejího získávání a využití. Syrovátka v dnešní době již není bezcenným produktem mlékárenského průmyslu, jak tomu bylo v minulosti, kdy byla využívána víceméně ke krmení zvířat. Uplatňuje se při výrobě velké škály výrobků. Při výrobě sýrů, například i u nás oblíbené Riccoty, jogurtů, zmlziny a mražených krémů, masných výrobků, nápojů, kojenecké výživy a dalších.

Použití Ramanovy spektroskopie s sebou nese řadu výhod. Tato metoda je nedestruktivní, nevyžaduje prakticky žádnou přípravu vzorku a samotná analýza probíhá velmi rychle. Také je možné zkoumat vzorky různého skupenství, bez nutnosti používat chemická činidla a rozpouštědla. Díky tomu se minimalizuje spotřeba chemikálií, jednorázově použitelných analytických setů, a tím se snižuje množství odpadu zatěžující životní prostředí. Ramanovou spektroskopií je možné měřit i vodné roztoky, což je pro potravinářské aplikace velmi důležité. Naopak nevýhodou je vysoká pořizovací cena přístroje pro Ramanovu spektroskopii a vyskytující se fluorescence.

Ramanovou spektroskopií lze analyzovat celou škálu složek potravin, včetně makrosložek, jakož i minoritní složky, karotenové pigmenty nebo syntetická barviva, dokonce i mikroorganismy nebo obalové materiály přicházející do styku s potravinami. Ramanova spektroskopie může být používána jako nástroj pro kontrolu kvality, pro identifikaci složení nebo pro detekci falšování, jakož pro základní výzkum strukturálních nebo konformačních změn, ke kterým dochází během zpracování potravin.

Ramanovu spektroskopii lze využít k analýze bílkovin nebo laktózy v syrovátce. Touto metodou je možné také detekovat přítomnost zvýšeného množství syrovátky v mléce a tím odhalit jeho falšování.

Jako hlavní signály pro detekci syrovátky v mléce byly označeny píky 1430 a 1540 cm^{-1} , jako ukazatel obsahu syrovátkových bílkovin byl použit pík 1665 cm^{-1} , pásy okolo 1260 cm^{-1} a pík 1006 cm^{-1} typický pro fenylalanin, který je často využíván pro normování spekter. V případě laktózy se jako nejdůležitější projevila oblast 900 – 1500 cm^{-1} , ve které lze pozorovat vazby typické pro sacharidy.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KLEIBEUKER, J. (2006): Whey in animal nutrition, a valuable ingredient [online]. [cit. 10. 5. 2020]. Dostupný z www: <<http://euromilk.org/ewpa/publications2.aspx?cid=189>>.
- [2] Zákony pro lidi (2020): *Sbírka zákonů ČR* [online]. [cit. 10. 5. 2020]. Dostupný z www: <<https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2016-397>>.
- [3] JELEN, P. (2011): Whey processing. Utilization and products. *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*. S. 731 – 737, Elsevier BV, DOI 10.1016/b978-0-12-374407-4.00495-7.
- [4] LIEVORE, P.; SIMÕES, D. R.; SILVA, K. M.; DRUNKLER, N. L.; BARANA, A. C.; NOGUEIRA, A.; DEMIATE, I. M. (2015): Chemical characterisation and application of acid whey in fermented milk. *Journal of food science and technology*. Roč. 52, č. 4, s. 2083 – 2092.
- [5] FARRELL, H. M.; JIMENEZ – FLORES, R.; BLECK, G. T.; BROWN, E. M. et al (2004): Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision. *Journal of Dairy Science*. Roč. 87, č. 6, s. 1641 – 1674.
- [6] WALZEM, R. L.; DILLIARD, C. J.; GERMAN, J. B. (2002): Whey components: Millenia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: What we know and what we may be overlooking. *Journal of food science and technology*. Roč. 42, č. 4, s. 353 – 375.
- [7] SUKOVÁ, D. *Syrovátka v potravinářství*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2006. s 60. ISBN 80-7271-173-3.
- [8] MARHAL, K. (2004): Therapeutic Applications of Whey Protein. *Alternative Medicine Review*. Roč. 9, č. 2, s. 136 – 156.
- [9] BONNAILLIE, L. M.; TOMASULA, P. M. (2008): Whey Protein Fractionation. S. 15 – 39. In ONWULATA, CH. I.; HUTH, P. J.: *Whey Processing, Functionality and Health Benefits*. Singapur: Fabulous Printers, ISBN 978-0-8138-0903-8.
- [10] TAI, S. T.; CHEN, Y. Y.; CHEN, W. L. (2016): β -Lactoglobulin Influences Human Immunity and Promotes Cell Proliferation. *Biomed Research International*. S. 1 – 12, doi: 10.1155/2016/7123587.

- [11] LAYMAN, D. K.; LÖNNERDAL, B.; FERNSTROM, J. D. (2018): Applications for α -lactalbumin in human nutrition. *Nutrition reviews*. Roč. 76, č. 6, s. 444 – 460.
- [12] GUPTA, A.; JADHAV, J. B.; GUNAWARE, K. D.; SHINDE, B. (2016): Whey Proteins and Its Impact on Human Health Nutrition: Review. *Journal of Analytical & Pharmaceutical Research*. Roč. 3, č. 8, s. 1 – 5, DOI: 10.15406/japlr.2016.03.00083.
- [13] GIANSANTI, F.; PANELLA, G.; LEBOFFE, L.; ANTONINI, G. (2016): Lactoferrin from Milk: Nutraceutical and Pharmacological Properties. *Pharmaceuticals*. Roč. 9, č. 4, s. 1 – 61, DOI: 10.3390/ph9040061.
- [14] RINCÓN, J. J.; SALINAS - MIRALLES, E.; ChÁVEZ - VELA, N.; JIMÉNEZ - VARGAS M. (2018): Glycomacropeptide: Biological Activities and Uses. [online]. [cit. 10. 5. 2020]. Dostupný z [www: <https://www.intechopen.com/books/whey-biological-properties-and-alternative-uses/glycomacropeptide-biological-activities-and-uses>](http://www.intechopen.com/books/whey-biological-properties-and-alternative-uses/glycomacropeptide-biological-activities-and-uses).
- [15] FOX, P. F., MCSWEENEY, P. L. H., (1998): *Dairy chemistry and biochemistry*. New York: Blackie Academic, 478 s., ISBN 0-412-72000-0.
- [16] GUIMARÃES, M. R.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES L. (2010): Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnology Advances*. Roč. 28, č. 3, s. 375 – 384, DOI: 10.1016/j.biotechadv.2010.02.002.
- [17] WONG, N. P.; LaCROIX D. E.; McDONOUGH F. E. (1978): Minerals in Whey and Whey Fractions. *Journal of Dairy Science*. Roč. 61, č. 12, s. 1700 – 1703.
- [18] Dairy Processing Handbook (2020): *Chapter 15, Whey processing* [online]. [cit. 10. 5. 2020]. Dostupné z: <https://dairyprocessinghandbook.tetrapak.com/chapter/whey-processing>.
- [19] LINDEN, G.; LORIENT, D. (1999): *New ingredients in food processing. Biochemistry and agriculture*. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd, 366 s., ISBN 85573 433 5.
- [20] TALEBI, S.; KEE, E. et al (2019): Utilisation of salty whey ultrafiltration permeate with electrodialysis. *International Dairy Journal*. Roč. Č. 99, DOI 104549.

- [21] KHEZRI, S.; SEYEDSALEH, M. M.; EMAMI, N.; DEHGHAN, P. (2016): Whey: Characteristics, Applications and Health Aspects. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research (IJBR)* [online]. [cit. 10. 5. 2020]. Dostupné z www: <https://www.researchgate.net/profile/Sima_Khezri/publication/324007282_Whey_Characteristics_Applications_and_Health_Aspects>
- [22] PINTADO, M. E; MACEDO, A. C.; MALCATA F. X. (2001): Review: Technology, Chemistry and Microbiology of Whey Cheeses. *Food Science and Technology International*. Roč. 7, č. 2, s. 105 – 116.
- [23] KRÓLCZYK, J. B.; DAWIDZIUK, T.; JANISZEWSKA-TURAK, E.; SOLOWIEJ, B. (2016): Use of Whey and Whey Preparations in the Food Industry – a Review. *Polisz Journal of Food and Nutrition Sciences*. Roč. 66, č. 3, s. 157 – 165.
- [24] YOUNG, S. (1999): *Whey products in cold pack pasteurized processed cheese foods and cheese spreads*. U.S. Dairy Export Council, Applications Monograph, 12 s.
- [25] FENELON, M. A.; HICKEY, R. M.; BUGGY, A.; McCARTHY, N.; MURPHY, E. G. (2018): Whey Proteins in Infant Formula. S. 439 – 493. In DEETH, H.; BANSAL, N.: *Whey proteins: from milk to medicine*. London: Academic Press, 746 s., ISBN: 9780128121252.
- [26] WIT, J. N. (2001): *Lectures Handbook of Whey* [online]. [cit. 10. 5. 2020]. Dostupný z www: <http://ewpa.euromilk.org/fileadmin/user_upload/Public_Documents/EWPA_Publications/Lecturer_s_Handbook_on_Whey.pdf>.
- [27] JELIČIĆ, I.; BOŽANIĆ, R., TRATNIK, L. (2008): Whey-based beverages - a new generation of dairy products. *Mljekarstvo*. Roč. 58, č. 3, s. 257 – 274.
- [28] HORN, R. (2009): *Script to Lecture Raman Spectroscopy* [online]. [cit. 10. 5. 2020]. Dostupný z www: <http://www.fhberlin.mpg.de/acnew/department/pages/teaching/pages/teaching__wintersemester__2008_2009/raimund_horn__raman_spectroscopy__090123.pdf>.
- [29] FERRARO, J. R.; NAKAMOTO, K.; BROWN, CH. W. (2003): *Introductory Raman Spectroscopy*. San Diego: Academic Press, 434 s., ISBN 978-0-12-254105-6.
- [30] The Nobel Prize: *Sir Chandrasekhara Venkata Raman Biographical* [online]. [cit. 10. 5. 2020]. Dostupný z www: <<https://www.nobelprize.org/prizes/physics/1930/raman/biographical/>>.

- [31] TRCHOVÁ, M. (2012): *Jak vibrují atomy v molekulách. Ústav makromolekulární chemie, Akademie věd ČR* [online]. [cit. 10. 5. 2020]. Dostupné z: <<http://archiv.otevrenaveda.cz/users/Image/default/C1Kurzy/NH2006pdf/15.pdf>>.
- [32] SMITH, E.; DENT, G. (2005): *Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach*. Chichester: Wiley, 210 s., ISBN 0-471-49794-0.
- [33] NĚMCOVÁ, I.; ČERMÁKOVÁ, L.; RYCHLOVSKÝ P. (2004): *Spektrometrické analytické metody*. Praha: Karolinum, 166 s., ISBN 80-246-0776-X.
- [34] SABU, T.; RAJU, T.; AJESH, K. Z.; RAGHVENDRA, K. M. (2017): *Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization*. Amsterdam: Elsevier, 423 s., ISBN 978-0-323-46140-5.
- [35] Oddělení fyziky biomolekul, Fyzikální ústav UK (2010): *Povrchem zesílený Ramanův rozptyl (SERS) biomolekul* [online]. [cit. 10. 5. 2020]. Dostupný z www: <<http://fu.mff.cuni.cz/biomolecules/problems/sers/>>.
- [36] DENDISOVÁ, M.; ŽVÁTORA, P.; MATĚJKA, P (2017): *Ramanova spektrometrie* [online]. [cit. 10. 5. 2020]. Dostupné z www: <http://old.vscht.cz/anl/lach2/RAMAN.pdf?fbclid=IwAR0VTUbSk25XEtdPcLl2f0LMlhQIcCypPca9_rf3j8qj5SswCecb_GHnImo>
- [37] LI-CHAN, E. C. Y. The applications of Raman spectroscopy in food science. *Trends in food science*. 1996, roč. 7, č. 11, s. 361-370. ISSN 0924-2244.
- [38] ROCHA, R. A.; PAIVA, I. M. et al (2015): Quantification of whey in fluid milk using confocal Raman microscopy and artificial neural network. *Journal of Dairy Science*. Roč. 98, č. 6, s. 3559 – 3567.
- [39] LI-CHAN, E. C. Y. (2007): Vibrational spectroscopy applied to the study of milk proteins. *Dairy Science & Technology*. Roč. 87, č. 4, s. 443 – 458.
- [40] RYGULA, A.; MAJZNER, K.; KACZOR, A. et al (2013): Raman spectroscopy of proteins: a review. *Journal of Raman Spectroscopy*. Roč. 44, č. 8, s. 1061 – 1076.
- [41] NØRGAARD, L.; HAHN M. T. et al (2005): Multivariate near-infrared and Raman spectroscopic quantifications of the crystallinity of lactose in whey permeate powder. *International Dairy Journal*. Roč. 15, č. 12., s. 1261 – 1270.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

WPC	Syrovátkový proteinový koncentrát
WPI	Syrovátkový proteinový izolát
RRS	Rezonanční Ramanova spektroskopie
SERS	Povrchově zesílená Ramanova spektroskopie
E	Energie
h	Planckova konstanta
ν	vlnočet
IR	infračervená spektrometrie

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 C. V. Raman [30]	30
Obr. 2 Diagram energetických hladin po interakci fotonu a molekuly [33]	32
Obr. 3 Model dvouatomové molekuly [31]	33
Obr. 4 Příklad vibrace molekuly vody [31]	34
Obr. 5 IR, Ramanova a rezonanční spektroskopie [34]	34
Obr. 6 Ramanova spektra 5 vzorků mléka falšovaného syrovátkou (0 - 100%) sledované v oblasti $1200 - 1600\text{cm}^{-1}$ [38]	38
Obr. 7 FT-Raman spektra pro vzorek s 50 % a 98 % krystalické laktózy [41]	40

SEZNAM TABULEK

Tab.1 Chemické složení tekuté syrovátky [1]	10
Tab.2 Přehled syrovátkových bílkovin [8]	12
Tab.3 Vitaminy sladké a kyselé syrovátky [7]	16
Tab.4 Minerální látky obsažené v kyselé a sladké syrovátce [17]	17
Tab.5 Přiřazení typických pásem v Ramanově spektru bílkovin [39]	39

