

Sledování úbytku laktózy během fermentace mléka s použitím HPLC-RI

Bc. Kateřina Chodáková

Diplomová práce
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav analýzy a chemie potravin

akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina Chodáková**
Osobní číslo: **T12837**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Sledování úbytku laktózy během fermentace mléka s použitím HPLC-RI**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Obecná charakteristika mléčných výrobků a jejich význam ve výživě člověka
2. Obecná charakteristika monosacharidů a oligosacharidů
3. Možnosti extrakce monosacharidů a oligosacharidů z mléčných výrobků
4. Možnosti stanovení monosacharidů a oligosacharidů pomocí HPLC-RI

II. Praktická část

1. Sledování fermentace mléka v různých časových intervalech za použití vybraných bakteriálních kultur
2. Stanovení pH a SH
3. Stanovení laktózy, glukózy a galaktózy s využitím HPLC-RI
4. Statistické hodnocení a diskuze získaných výsledků

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

1. GAJDŮŠEK, Stanislav. Laktologie, 1. vydání. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003, 78 s. ISBN 80-7157-657-3.
2. KADLEC, Pavel et al. Technologie potravin, 1. vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002, 236 s. ISBN 80-7080-510-2.
3. SMIT, Gerrit. Dairy processing: Improving quality, 1st edition. Boca Raton: CRC Press, 2003, 546 s. ISBN 0-8493-1758-4.
4. VELÍŠEK, Jan. Chemie potravin I., 2. vydání. Tábor: OSSIS, 2002, 331 s. ISBN 80-8665-900-3.
5. RAESSLER, Michael. Sample preparation and current applications of liquid chromatography for the determination of non-structural carbohydrates in plants. Trends in Analytical Chemistry, 2011, roč. 30, č. 11. ISSN 0165-9936.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Zuzana Bubelová, Ph.D.**

Ústav technologie potravin

Datum zadání diplomové práce: **20. ledna 2015**

Termín odevzdání diplomové práce: **24. dubna 2015**

Ve Zlíně dne 20. ledna 2015


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




Ing. Jiří Mlček, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Chodáková Kateřina

Obor: knTVP

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 užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 22.4.2015

.....
Cezl

²¹ 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 nahlázení 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.

²² 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).

²³ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní díla:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odírá-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 se zabývá problematikou mléčné fermentace probíhající účinkem šesti bakteriálních kultur, používaných v mlékařském průmyslu. Hlavním cílem práce bylo sledování probíhající fermentace na základě snižování aktivní kyselosti, zvyšování titrační kyselosti a sledování úbytku laktózy ve vzorcích mléka, které byly zaočkovány kulturami a inkubovány po různě dlouhou dobu (do dosažení izoelektrického bodu) při 2 různých teplotách. Pro stanovení laktózy byla použita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s refraktometrickou detekcí. Z výsledků vyplývá, že fermentace k dosažení izoelektrického bodu trvala v rozmezí 4,5 – 13 hod. Delší čas byl vždy, podle očekávání, dosažen při nižší kultivační teplotě. Aktivní kyselost se v průběhu fermentace snižovala v průměru o hodnotu 2,2 a titrační kyselost se průměrně zvyšovala o 27 °SH. Průměrný úbytek laktózy byl o 35 % z původního obsahu.

Klíčová slova: mléko, jogurt, mlékařské mikrobiální kultury, laktóza, fermentace, pH, °SH, HPLC, RI

ABSTRACT

Diploma thesis deals with milk fermentation proceeding by the action of 6 bacterial cultures which are used in milk industry. The main aim of this thesis was to observe fermentation process based on the decrease of active acidity, increase of titratable acidity and loss of lactose. Milk samples were inoculated with microbial cultures and incubated for various time periods (up to isoelectric point) at 2 different temperatures. High-performance liquid chromatography with refractive index detection was used for the lactose determination. The results imply that fermentation (up to isoelectric point) took about 4,5 – 12 hours. Longer fermentation time was obtained, according to expectation, at lower incubation temperature. Active acidity decreased by 2,2 and titratable acidity increased by 27 °SH during the fermentation. Lactose decline reached 35 % from the original amount.

Keywords: milk, yoghurt, milk bacterial cultures, lactose, fermentation, pH, °SH, HPLC, RI

Mé poděkování patří zejména vedoucí diplomové práce paní Ing. Zuzaně Bubelové, Ph.D. za ochotu a trpělivost při zpracování diplomové práce, cenné rady, a také za odborné vedení a praktickou pomoc. Dále bych chtěla poděkovat paní Ing. Ludmile Zálešákové za pomoc při práci v laboratoři.

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

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST.....	12
1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA MLÉČNÝCH VÝROBKŮ A JEJICH VÝZNAM VE VÝŽIVĚ ČLOVĚKA	13
1.1 MLÉKO A MLÉČNÉ VÝROBKY.....	13
1.1.1 Základní chemické složení mléka a mléčných výrobků	14
1.1.2 Chemické složení kravského mléka	14
1.1.2.1 Dusíkaté látky	16
1.1.2.2 Lipidy	17
1.1.2.3 Sacharidy	18
1.1.2.4 Enzymy	18
1.1.2.5 Vitaminy	19
1.1.2.6 Minerální látky.....	20
1.1.3 Základní skupiny mléčných výrobků	20
1.1.3.1 Fermentované mléčné výrobky.....	21
1.1.3.2 Zahuštěné mléčné výrobky	21
1.1.3.3 Sušené mléčné výrobky	22
1.1.3.4 Mražené mléčné výrobky.....	22
1.1.3.5 Sýry.....	22
1.2 MLÉKO A MLÉČNÉ VÝROBKY VE VÝŽIVĚ ČLOVĚKA	23
2 MLÉKAŘSKÉ MIKROBIÁLNÍ KULTURY, CHARAKTERISTIKA JOGURTŮ	25
2.1 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ.....	25
2.1.1 Homofermentativní a heterofermentativní fermentace laktózy	25
2.1.2 Dělení BMK dle teplotního optima.....	26
2.1.2.1 Mezofilní bakteriální kultury	26
2.1.2.2 Termofilní bakteriální kultury (jogurtové)	26
2.2 JOGURTY	27
2.2.1 Výroba jogurtů	27
2.2.1.1 Klasická výroba / Set Type	28
2.2.1.2 Tanková výroba / Stirred Type	29
2.2.1.3 Jogurtový nápoj / Drink Type	29
3 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA VYBRANÝCH MONOSACHARIDŮ A OLIGOSACHARIDŮ.....	30
3.1 ROZDĚLENÍ SACHARIDŮ	30
3.1.1 Monosacharidy	31
3.1.1.1 Významné monosacharidy mléka.....	31
3.1.2 Oligosacharidy	31
3.1.2.1 Významné oligosacharidy mléka.....	32
3.2 METODY STANOVENÍ SACHARIDŮ	33
4 MOŽNOSTI EXTRAKCE MONOSACHARIDŮ A OLIGOSACHARIDŮ	

	Z MLÉČNÝCH VÝROBKŮ.....	35
4.1	EXTRAKČNÍ ČINIDLA	35
4.1.1	Izolace sacharidů extrakcí deionizovanou vodou	35
4.1.2	Izolace sacharidů extrakcí etanolem	35
4.2	ČINIDLA POUŽÍVANÁ K ČIŘENÍ.....	36
4.2.1	Čiření podle Carreze	36
4.2.2	Čiření neutrálním octanem olovnatým.....	36
4.2.3	Čiření zásaditým octanem olovnatým.....	37
4.2.4	Čiření podle Herlese.....	37
4.2.5	Čiření kyselinou fosfowolframovou	37
4.2.6	Ostatní čiridla	37
5	MOŽNOSTI STANOVENÍ MONOSACHARIDŮ A OLIGOSACHARIDŮ POMOCÍ HPLC-RI	38
5.1	OBECNÉ ZÁSADY HPLC	38
5.2	SCHÉMA KAPALINOVÉHO CHROMATOGRAFU	39
5.2.1	HPLC detektory	40
5.2.1.1	Refraktometrické detektory	41
5.3	STANOVENÍ SACHARIDŮ	43
5.3.1	Hydrofilní interakční chromatografie	44
5.3.2	Molekulová vylučovací chromatografie.....	44
5.3.3	Iontově výměnná chromatografie	45
	II PRAKTICKÁ ČÁST	46
	CÍL PRÁCE	47
6	MATERIÁL A METODY	48
6.1	MATERIÁL.....	48
6.1.1	Použité bakteriální kultury	48
6.1.1.1	Jogurtová kultura Laktoflora	48
6.1.1.2	Jogurtová kultura YB1	48
6.1.1.3	Termofilní mléčná kultura TH-3.....	49
6.1.1.4	Termofilní mléčná kultura LH-B02.....	49
6.1.1.5	Mezofilní aromatická kultura YY-88	49
6.1.1.6	Mezofilní aromatická kultura CHN-22.....	50
6.1.2	Chemikálie	50
6.1.3	Přístroje a pomůcky.....	50
6.2	METODY.....	51
6.2.1	Pasterace a fermentace mléka	51
6.2.2	Stanovení aktivní a titrační kyselosti	51
6.2.3	Příprava vzorku pro stanovení sacharidů	51
6.2.4	Stanovení sacharidů pomocí HPLC-RI.....	52
7	VÝSLEDKY A DISKUZE	53
7.1	VÝSLEDKY STANOVENÍ AKTIVNÍ A TITRAČNÍ KYSELOSTI.....	53
7.1.1	Jogurtová kultura Laktoflora.....	53
7.1.2	Jogurtová kultura YB1	55

7.1.3	Termofilní mléčná kultura TH-3	57
7.1.4	Termofilní mléčná kultura LH-B02	58
7.1.5	Mezofilní aromatická kultura YY-88	60
7.1.6	Mezofilní aromatická kultura CHN-22	61
7.2	VÝSLEDKY STANOVENÍ LAKTÓZY METODOU HPLC-RI	63
7.2.1	Jogurtová kultura Laktoflora	65
7.2.2	Jogurtová kultura YB1	66
7.2.3	Termofilní mléčná kultura TH-3	67
7.2.4	Termofilní mléčná kultura LH-B02	68
7.2.5	Mezofilní aromatická kultura YY-88	69
7.2.6	Mezofilní aromatická kultura CHN-22	70
7.3	SROVNÁNÍ ÚČINKU POUŽITÝCH KULTUR	71
ZÁVĚR		74
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY		75
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK		80
SEZNAM OBRÁZKŮ		81
SEZNAM TABULEK		83
SEZNAM PŘÍLOH		84

ÚVOD

Cílem diplomové práce zabývající se tématem „Sledování úbytku laktózy během fermentace mléka s použitím HPLC-RI“ bylo zjistit, jak rozdílné mlékařské kultury (jogurtové, termofilní a mezofilní) mohou ovlivnit průběh fermentace a s tím spojené probíhající změny v mléce. Sledováno bylo také, jaký vliv mají zvolené inkubační teploty na aktivitu živých mikroorganismů.

Mléko a mléčné výrobky jsou velmi oblíbenou potravinou a hrají důležitou roli ve výživě člověka. Spoustu konzumentů má mléko či mléčný výrobek ve svém jídelníčku každý den a stále narůstá obliba zejména fermentovaných mléčných výrobků, a to hlavně z dietních důvodů. Mléko a mléčné výrobky mají vysokou výživovou hodnotu a obsahují všechny tři základní živiny: bílkoviny, tuky a sacharidy. Dále obsahují vitaminy a některé minerální látky, a jsou důležitým zdrojem dobře vstřebatelného vápníku. Konzumace mléka je důležitá již od dětství, kde hraje významnou ochrannou roli ve vztahu k osteoporóze. Mezi nejrozšířenější funkční potraviny na světě se dnes řadí jogurt. Jogurt se vyznačuje použitými živými mikroorganismy v průběhu technologické výroby a procesem fermentace, při které dochází ke změně aktivní a titrační kyselosti a hlavně ke změně obsahu laktózy. Skutečnost, že vlivem bakterií mléčného kvašení dochází ke štěpení laktózy na kyselinu mléčnou a jiné metabolity, se mohou jogurty stát i součástí jídelníčku u osob, které mají diagnostikovanou sníženou toleranci laktózy nebo úplnou intoleranci.

Obsah laktózy v mléku a mléčných výrobcích se může stanovovat metodami polarimetrickými, refraktometrickými, chemickými apod. Nejspolehlivější výsledky v detekci sacharidů dává metoda HPLC v kombinaci s refraktometrickou detekcí, která je především určena pro detekci sacharidů.

Teoretická část práce se zabývá obecnou charakteristikou mléka a mléčných výrobků, jejich hlavními složkami (zaměřuje se především na sacharidy), bakteriemi mléčného kvašení a jejich vlivem na štěpení disacharidu laktózy a výrobu jogurtů. Dále práce pojednává o možnosti extrakce sacharidů a jejich následném stanovení. Náplní praktické části bylo zaočkování mléka jogurtovými kulturami Laktoflora a YB1, termofilními TH3 a LHB02 a mezofilními YY88 a CHN 22 a následná inkubace při 2 různých teplotách. Práce je především zaměřena na sledování změn aktivní a titrační kyselosti a úbytku laktózy během probíhající fermentace na základě použitých kultur.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA MLÉČNÝCH VÝROBKŮ A JEJICH VÝZNAM VE VÝŽIVĚ ČLOVĚKA

1.1 Mléko a mléčné výrobky

V obecné rovině je možné mléko definovat jako tekutý sekret samic savců, jehož primární a přirozenou funkcí je zabezpečit výživu narozeného mláděte. Složení a fyzikální vlastnosti této komplexní biologické tekutiny (mléka) se liší od druhu k druhu a odráží nutriční potřeby mláďat [1,2]. Sekrety mléčné žlázy se dělí na dvě skupiny – mléka nezralá a mléka zralá. Nezralé mléko (mlezivo) je vylučováno mléčnou žlázou na konci gravidity před porodem (předběžné mlezivo) a hned po porodu (mlezivo pravé). Mlezivo není využíváno k průmyslovému zpracování. Přejchod mleziva v mléko zralé trvá průměrně 7 – 10 dní po porodu [3].

Mléko v souvislosti s technologií mléčných výrobků lze definovat takto:

- Mléko je produkt získaný jednoduchým nebo vícenásobným dojením savců, které jsou chovány za účelem produkce mléka.
- Mléčné výrobky jsou vyráběny výhradně z mléka. V některých případech se mohou přísady do výrobků přidávat během výroby, ale nemohou nahradit zcela ani částečně mléčné složky.
- Rekombinované mléčné výrobky jsou výrobky, ve kterých mléko nebo mléčné složky tvoří hlavní část. Mléčné složky nemohou být nahrazeny přísadami [4].

Podle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004, stanovující zvláštní hygienické předpisy pro potraviny živočišného původu (v platném znění), se syrovým mlékem rozumí mléko produkované sekrecí mléčné žlázy hospodářských zvířat, které nebylo podrobeno ohřevu nad 40°C a nebylo ani ošetřeno žádným způsobem s rovnocenným účinkem [1].

Mléčný výrobek je výrobek vyrobený z mléka savců. Během vývoje mlékárenské technologie byly vyvinuty následující skupiny mléčných výrobků: mléko, acidofilní mléčné výrobky, máslo, sýry a produkty s dlouhou použitelností. Jednotlivé produkty procházejí charakteristickým zpracováním mléka. Většinou mají mléčné výrobky vyšší energetickou hodnotu. V dnešní době mezi hlavní spotřební mléčné produkty patří jogurty, kysané mléčné výrobky, sýry a smetana [4].

Při zpracování mléka pro následnou výrobu mléčných výrobků, je mléko vystaveno podmínkám, které urychlují nebo snižují vazby mezi jednotlivými složkami. Z nutričního hlediska mají značný význam zejména vazby typu bílkovina – sacharid, které se zúčastňují komplexu Maillardových reakcí. Dochází ke ztrátě esenciální aminokyseliny lyzinu, který se účastní reakcí prostřednictvím volné aminoskupiny. Její vazbou se sacharidy může dojít buď k tvorbě vazeb rezistentních k enzymům, tedy ke snížení obsahu využitelného lyzinu nebo až k úplné destrukci této aminokyseliny. V obou případech dochází ke snížení nutriční hodnoty [5,6].

1.1.1 Základní chemické složení mléka a mléčných výrobků

Jednotlivé druhy mléka se vzájemně od sebe liší rozdílným poměrem základních složek a živin, a to má za následek i rozdílné vlastnosti. Všechny mléka obsahují specifické bílkoviny a tuky, které jsou lehce stravitelné. Většina mlék obsahuje laktózu, minerální látky, vitaminy a další složky, které mohou být důležité. Tyto složky jsou uspořádány následovně: lipidy ve formě emulgovaných kuliček potažených membránou, proteiny v koloidní disperzi jako micely a většina minerálních látek a laktóza v pravém roztoku [3,6,7]. Struktura a vlastnosti jednotlivých složek mléka hluboce ovlivňují celkové vlastnosti mléka a mají významný vliv na zpracování mléka [8]. Nejvýznamnější surovinou pro výrobu mléčných výrobků je kravské mléko, proto se další kapitola diplomové práce bude věnovat chemickému složení kravského mléka.

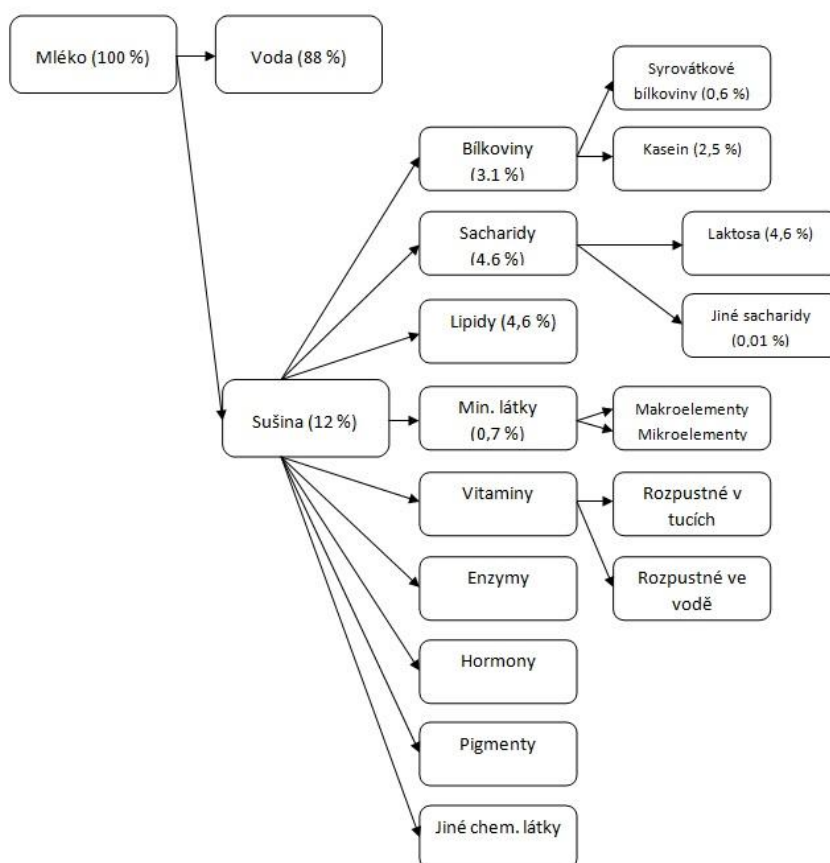
1.1.2 Chemické složení kravského mléka

Chemické složení kravského mléka je závislé na celé řadě faktorů, ke kterým patří plemeno skotu, jeho genetický potenciál, výživa, aktuální zdravotní stav, pořadí a fáze laktace apod. Kravské mléko obsahuje průměrně 86,0 – 88,0 % vody a 12,0 – 14,0 % sušiny. Průměrný obsah živin v kravském mléce je uveden na Obr. 1, ale v obecné rovině lze uvést následující složení kravského mléka (v % hmotnostních):

- obsah dusíkatých látek (tzv. celkový dusík dle Kjeldahla, vynásobený faktorem 6,38): 3,1 – 3,8 %,
- obsah tuku: 3,5 – 5,5 %,
- obsah laktózy: 4,5 – 5,0 %,
- minerální látky: 0,7 – 0,8 %,
- vitaminy, enzymy, hormony atd.: 0,2 – 0,5 % [1,3].

Voda je hlavní složkou mléka a slouží hlavně jako rozpouštědlo. V mléce se voda vyskytuje ve dvou formách, a to forma volná a vázaná. Volná voda tvoří převážnou část vody v mléce a je v ní rozpuštěna laktóza, minerální látky, apod. Vázaný podíl vody se vyskytuje zejména navázaný na koloidní frakci mléka, tvořící hydratační obal supramolekulárních struktur (zejména kaseinové micely a tukové kuličky). V mléčných výrobcích (máslo, sýr, apod.) je možné nalézt chemicky vázanou vodu, např. ve formě hydratované vody v proteinu [1,4,9].

Sušina kravského mléka u zdravých dojníc zřídka klesá pod 12 %, množství tuku nebývá menší než 3,0 % a tukuprostá sušina nemá klesnout pod hodnotu 8,5 %. Mezi jednotlivými složkami mléka existují určité zákonité vztahy, např. mezi obsahem sušiny, obsahem tuku a specifickou hmotností. Na základě obsahu sušiny, tukuprosté sušiny a tuku v sušině lze usuzovat na porušení mléka přidávkem vody nebo odstraněním tuku [5,10].

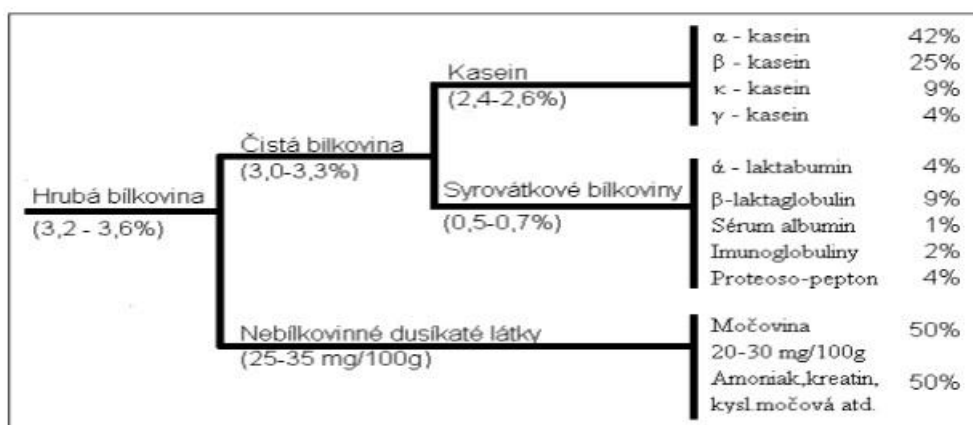


Obr. 1 Průměrné složení kravského mléka (v hm. %) [3]

1.1.2.1 Dusíkaté látky

Dusíkaté látky tvoří nejkompexnější složku mléka a vzhledem k nutričnímu a technologickému významu je jejich studiu věnována ze všech složek mléka největší pozornost. Tyto látky také určují základní fyzikální a chemické vlastnosti mléka a některé z nich kromě nutriční hodnoty mají vysoce významné biologické funkce (imunoglobuliny, laktoferin, enzymy aj.) [9].

Dusíkaté látky obsažené v mléce lze rozdělit na bílkovinné a nebílkovinné. V mléce se nachází velmi vhodná směs dvou skupin bílkovin (kaseinů a sérových bílkovin), která umožňuje dokonalé využití všech aminokyselin. Mléčné bílkoviny proto řadíme (spolu s vaječnými proteiny) k bílkovinám plnohodnotným [5]. Přehled základních dusíkatých látek kravského mléka je uveden na Obr. 2.



Obr. 2 Rozdělení a zastoupení základních dusíkatých látek kravského mléka [9]

Kasein mezi bílkovinami mléka převládá (tvoří asi 4/5 čistých bílkovin). Je to komplex fosfoproteinů, které jsou syntetizovány mléčnou žlázou a tvoří v mléce přežvýkavců převážnou část bílkovin. Kasein obsahuje všechny nepostradatelné aminokyseliny. Z hlediska jejich kvantitativního zastoupení je zvláště cenný pro vysoký obsah lyzinu. Závažnější je nízký obsah cystinu a tryptofanu. Z mléka je možno kasein vysrážet okyselením při pH 4,6 a teplotě 20°C. K základním frakcím kaseinového komplexu patří následující 4 proteiny:

- α_{S1} -kasein (přibližně 38 – 42 % kaseinových bílkovin),
- α_{S2} -kasein (přibližně 9 – 11 % kaseinových bílkovin),

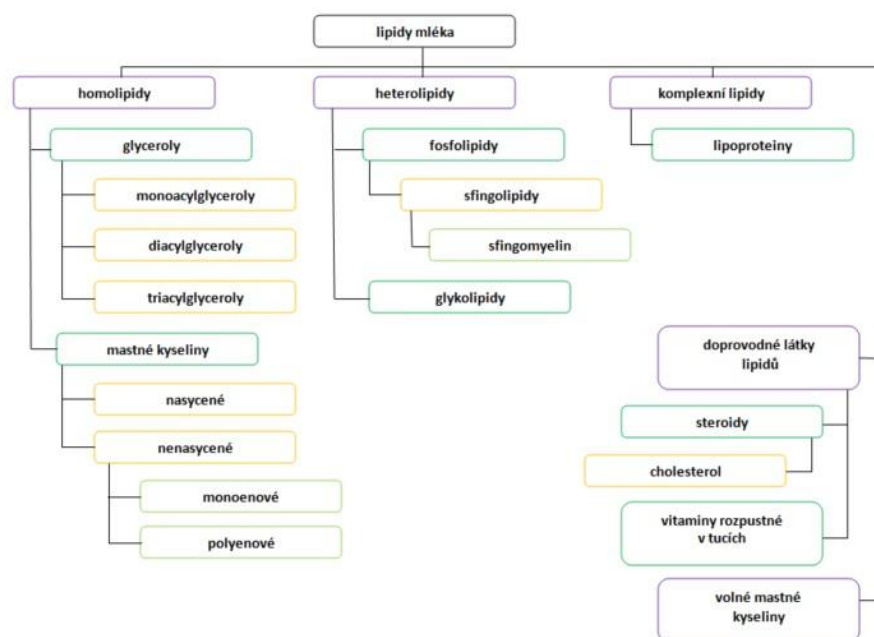
- β -kasein (přibližně 32 – 35 % kaseinových bílkovin),
- κ -kasein (přibližně 10 – 15 % kaseinových bílkovin) [1,5,9].

Syrovátkové bílkoviny (resp. bílkoviny mléčného séra) jsou globulární bílkoviny, rozpustné při pH 4,6. Hlavními syrovátkovými bílkovinami jsou β -laktoglobulin (58 %) a α -laktalbumin (13 %), zatímco imunoglobuliny, sérový albumin a proteoso-peptony jsou v syrovátce přítomny v daleko menším rozsahu. Obsah všech nepostradatelných aminokyselin je s výjimkou metioninu vyšší než v kaseinu. Velmi cenný je vysoký obsah cystinu a tryptofanu, na který je kasein chudý. Některé syrovátkové bílkoviny jsou syntetizovány mléčnou žlázou. Tvoří asi 1/5 z obsahu čistých bílkovin [5,7,9].

Nebílkovinné dusíkaté látky tvoří velký počet látek, obsahujících dusík, které odpovídají 250 až 300 mg N v litru mléka. K nejvýznamnějším patří močovina, kreatinin, kyselina močová, amoniak a aminokyseliny [5,7,9].

1.1.2.2 Lipidy

Kravné mléko obsahuje přibližně 3,5 – 4,5 hm. % lipidů, z čehož přibližně 97 – 98 % tvoří triacylglyceroly. V mléce se dále vyskytují tzv. minoritní lipidy, kam řadíme především diacylglyceroly, monoacylglyceroly, volné mastné kyseliny, fosfolipidy, cholesterol a estery cholesterolu [1]. Složení mléčných lipidů je uvedeno na Obr. 3.



Obr. 3 Zastoupení lipidů v mléce [11]

Specifickou vlastností mléčných lipidů je, že převážná část se jich nachází v mléce ve formě tukových kuliček vyskytujících se v emulzi olej ve vodě. Počet v 1 ml mléka se pohybuje kolem hodnoty $1,5 \text{ až } 6 \cdot 10^{10}$ (při tučnosti 3,7 až 4,1 %) a jejich průměr se může pohybovat v intervalu od 0,1 do 15 μm , převážná část však má průměr v intervalu od 2 do 3,5 μm . Mléčné lipidy jsou jedny z nejsložitějších tuků v potravě. Mléčný tuk ovlivňuje vlastnosti mléka, hlavně texturu, chuť a stabilitu mléčných výrobků, a je také zdrojem energie, esenciálních mastných kyselin, vitaminů a několika dalších látek. V mléčném tuku bylo identifikováno více než 400 různých mastných kyselin. Pevná část z nich se však nachází v mléce v nízkých koncentracích nebo ve stopových množstvích. Z nasycených mastných kyselin tvoří největší podíl kyselina myristová (14 uhlíků), palmitová (16 C) a stearová (18 C) a z nenasycených kyselina olejová. V mléčném tuku bylo prokázáno také určité malé množství volných mastných kyselin, což souvisí především se stářím tuku [9,12,13,14].

1.1.2.3 Sacharidy

V kravském mléce se nachází přibližně 4,5 – 5,0 hm. % sacharidů, přičemž základním sacharidem je laktóza. Laktóza se vyskytuje specificky jen v mléce, proto je také nazývána mléčný cukr. Disacharid laktóza (glukóza a galaktóza spojené glykosidickou vazbou β -1 \rightarrow 4) je tvořen v mléčné žláze z krevní glukózy, galaktóza je tvořena až v mléčné žláze biochemickými procesy také z glukózy. Vedle laktózy jsou nalézány v mléce v malém množství další sacharidy částečně ve volné formě a částečně vázané na proteiny, lipidy nebo fosfáty. K minoritním sacharidům v mléce patří zejména: D-glukóza, D-fruktóza, D-galaktóza, L-fukóza, *N*-acetyl-D-galaktózamin, *N*-acetyl-D-glukózamin, kyselina *N*-acetylneuraminová, laktulóza a oligosacharidy [1,9].

Obecná charakteristika sacharidů je blíže popsána v kapitole 3.

1.1.2.4 Enzymy

V kravském mléce, jako biologické tekutině, byl detekován velký počet enzymů. Kromě nativních enzymů (pochází z leukocytů a z buněk mléčné žlázy) obsahuje nadojené mléko i mikrobiální enzymy z kontaminující mikroflóry. Některé enzymy jsou v mléce koncentrovány v povrchových vrstvách tukových kuliček a přecházejí do smetany, jiné naopak jsou vázány na bílkoviny mléka a společně s nimi se i sráží. Záhřevem mléka dochází k denaturaci a inaktivaci enzymů [9]. Mezi významné enzymy kravského mléka

patří: proteázy (mezi základní proteázy se řadí plazmin – alkalická proteáza a katepsin D – kyselá proteáza), lipázy, esterázy, fosfatázy (mezi základní fosfatázy se řadí kyselá a alkalická fosfatáza), nukleázy (deoxyribonukleázy, ribonukleázy), lysozym, amylázy (α -amyláza, β -amyláza), ostatní hydrolytické enzymy (*N*-acetyl- β -D-glukózáminidáza, α -manoamidáza, β -D-glukuronidáza, adenzinotriřosfatáza, laktáza), laktoperoxidáza, kataláza, xantinoxidáza, sulfhydryloxidáza, peroxididismutáza, glutationperoxidáza, laktátdehydrogenáza, transferázy, aldoláza (fruktóza-bisfosfátaldoláza), lyáza, izomeráza a ligáza. K nejčastěji zastoupeným a nejdůležitějším skupinám enzymů v mléce se řadí oxidoreduktázy a hydrolázy [1].

1.1.2.5 Vitaminy

Vitaminová hodnota mléka je velmi variabilní. Kolísání obsahu jednotlivých vitaminů ovlivňuje plemeno dojnic, způsob ustájení, zdravotní stav, roční období, způsob krmení, způsob ošetření, skladování a technologické zpracování. Mléko je z hlediska krytí potřeb lidského organizmu výborným zdrojem vitaminu A, dobrým zdrojem ve vodě rozpustného vitaminu B₂ – riboflavinu a zajiřtuje i dostatečný přísun dalších vitaminů ze skupiny B. Mléko je poměrně chudé na vitamin C [2,14,15].

Přehled o průměrném obsahu jednotlivých vitaminů v mléce udává následující Tab. 1.

Tab. 1 Obsah vitaminů v kravském mléce [16]

Vitamin		Obsah vitaminů (mg.kg ⁻¹)	Rozpustnost
Označení	Název		
A	retinol, axeroftol	0,3 – 1,0	Rozpustné v tucích
D	kalCIFerol	0,001	
E	tokoferol	0,2 – 1,2	
K	fylochinon	0,01 – 0,03	
B ₁	tiamin	0,3 – 0,7	Rozpustné ve vodě
B ₂	riboflavin	0,2 – 0,3	
B ₆	pyridoxin	0,2 – 2,0	
B ₁₂	kobalamin	0,01 – 0,03	
B ₅	kys. pantotenová	0,4 – 4,0	
B ₃	niacin	0,8 – 5,0	
C	kys. askorbová	5,0 – 20	

1.1.2.6 Minerální látky

Mléko a další mléčné produkty jsou důležitým zdrojem významných minerálních látek, zejména vápníku, fosforu, hořčíku, draslíku a stopových prvků jako je zinek. Kravské mléko obsahuje průměrně 7,3 g minerálních látek v 1 l. Tento obsah je ovlivněn řadou faktorů, včetně fáze laktace, přírodních vlivů a genetiky [12,17]. Obsah hlavních minerálních látek v mléce je uveden v Tab. 2.

Minerální látky jsou v mléce přítomny v různé formě. Jednak jsou v mléčném séru, roztoku nebo koloidní formě a jednak jsou vázány na některé organické součásti mléka. Jednotlivé formy minerálních látek jsou ve vzájemných rovnováhách mezi sebou i k ostatním složkám mléka [9]. Nejvýznamnější rovnováha v mléce je mezi obsahem vápníku a fosforu. Tyto prvky jsou hlavními složkami kostí a zubů lidského organismu. Mléko je hlavním zdrojem vápníku v lidské potravě a nedá se v tomto směru nahradit jinou potravinou. Kravské mléko a ostatní mléčné výrobky jsou vynikajícím zdrojem a poskytují přibližně 300 mg vápníku v jedné porci. Využitelnost vápníku z mléka je umocňována přítomností vitamínu D a příznivým poměrem k bílkovinám [12,17,18].

Tab. 2 Obsah hlavních minerálních látek v mléce [9]

Prvek	Obsah v mléce (g.l ⁻¹)	
	Průměrná hodnota	Interval
Ca	1,21	0,9 – 1,4
P	0,95	0,7 – 1,2
K	1,50	1,0 – 2,0
Na	0,47	0,3 – 0,7
Cl	1,03	0,8 – 1,4
Mg	0,12	0,05 – 0,24
S	0,32	0,2 – 0,4

1.1.3 Základní skupiny mléčných výrobků

Historie uvádí, že mléčné výrobky byly vyvinuty hlavně k ochraně hlavních složek mléka v období přebytkové produkce, a také za účelem usnadnění přepravy na vzdálenější trhy. To vše vedlo k tomu, že technologie výroby a sortiment mléčných výrobků se postupně rozšiřoval a přizpůsoboval se k splnění spotřebitelské poptávky [19]. Dle vyhlášky 77/2003 Sb., ve znění pozdějších předpisů, jsou mléčné výrobky definovány jako výrobky vyrobené

výlučně z mléka, přičemž látky nezbytné pro jeho výrobu mohou být přidány, jen když tyto látky nejsou použity za účelem nahrazení všech nebo některé části složek mléka [20,21].

Sortiment a nabídka mléčných výrobků je v dnešní době velmi rozsáhlá. Členění mléka a mléčných výrobků na jednotlivé druhy, skupiny a podskupiny je uvedeno v Příloze P I. V následujících kapitolách jsou představeny základní skupiny mléčných výrobků.

1.1.3.1 Fermentované mléčné výrobky

Fermentované mléčné výrobky mají již odedávna v lidské výživě své stálé místo. Mnohé z nich se významně uplatňují v léčebné výživě a při různých dietách. U fermentovaných výrobků byl prokázán pozitivní vliv na lidský trávicí systém, a také vliv na kontrolu cholesterolu v séru [19].

Přednosti fermentovaných mléčných výrobků spočívají v sensorických a výživových vlastnostech a v delší trvanlivosti. V mléce probíhá spontánní nebo řízené kvašení pomocí bakterií mléčného kvašení (nejčastěji se používají bakterie rodu *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* či *Lactococcus*) a kvasinek za pomoci enzymů, a přitom se štěpí především mléčný cukr a vzniká kyselina mléčná, oxid uhličitý, případně etanol, dále se v různé míře štěpí bílkoviny a tuky a vznikají specifické látky. Mléčné zakysané výrobky jsou přirozeně biologicky konzervovanými výrobky, vlivem kyselosti vytvářené mléčnými mikroorganismy. Tyto organismy zároveň zvyšují stravitelnost mléka. Kysané mléčné výrobky jsou často tolerovány i těmi, kteří laktózu nesnášejí [22,23].

Podrobněji se fermentovaným mléčným výrobkům, přesněji řečeno jogurtům, věnuje kapitola 2.

1.1.3.2 Zahuštěné mléčné výrobky

Zahuštěné (kondenzované) mléčné výrobky se vyznačují vyšším obsahem sušiny. Zahuštěným mlékem nebo zahuštěnou smetanou se rozumí mléčný výrobek, slazený nebo neslazený, získaný částečným odpařením vody ze smetany nebo z mléka plnotučného, odtučněného nebo částečně odtučněného nebo z jejich směsi. Výhodou zahuštěných mléčných výrobků je delší trvanlivost, snížení nákladů na dopravu i skladování. Ochrana před nežádoucí činností mikroorganismů je zajištěna u zahuštěného mléka neslazeného sterilací finálního výrobku, u zahuštěného mléka slazeného je to vytvořením hypertonického prostředí pro mikroorganismy (přídavek cukru) [20,24].

1.1.3.3 Sušené mléčné výrobky

Sušení je jednou z možností prodloužení údržnosti mléka a některých mléčných výrobků, a to v důsledku odejmutí vody. Podmínky sušení jsou voleny tak, aby usušený produkt byl dobře obnovitelný (zejména ve vodě). Sušené mléko nebo sušená smetana jsou dle komoditní Vyhlášky 77/2003 Sb. definovány jako mléčný výrobek v prášku získaný sušením mléka plnotučného, odtučněného nebo částečně odtučněného nebo smetany, případně jejich směsi, s obsahem vody nejvýše 5 % hmotnostních. Optimální obsah sušiny mléka je 96 – 98 %. Sušením mléčných surovin se dosáhne jejich konzervace, a také redukce hmotnosti a objemu. Získané práškové výrobky jsou snadno obnovitelné, s minimálními organoleptickými změnami a funkčními vlastnostmi, což umožňuje jejich snadné použití v ostatních oblastech potravinářského průmyslu [1,21,24].

1.1.3.4 Mražené mléčné výrobky

Mraženými mléčnými výrobky (krémy) se dle Vyhlášky 77/2003 Sb. rozumí výrobky získané zmrazením směsi připravené v závislosti na skupině mraženého krému, zejména vody, mléka, smetany, tuku, cukru a dalších složek, pevné nebo pastovité konzistence, který je uváděn do oběhu a určen ke konečné spotřebě ve zmrazeném stavu. Mražené mléčné výrobky mohou obsahovat i emulgátory, stabilizátory, aromatické látky a případně další komponenty. Při mražení je do výrobku zašlehán definovaný objem vzduchu (zášleh 70 – 140 %). Mražené krémy se mohou dělit na následující skupiny: smetanové, mléčné, s rostlinným tukem, vodové, ovocné a sorbet.

Vyhláška 77/2003 Sb. definuje také zmrazení jako technologický proces konzervace výrobků rychlým snížením teploty na teplotu minus 18 °C a nižší v souladu s ustanoveními zvláštního právního předpisu [21,25].

1.1.3.5 Sýry

Sýrem dle Vyhlášky 77/2003 Sb. rozumíme mléčný výrobek vyrobený vysrážením mléčné bílkoviny z mléka působením syřidla nebo jiných vhodných koagulačních činidel, prokysáním a oddělením podílu syrovátky. Sýry představují velmi různorodou oblast mléčných výrobků s velmi širokým spektrem. Značné možnosti modifikace jsou dány používanými technologickými operacemi, při nichž dochází k fermentačním změnám mléčné sušiny. Vyhláška 77/2003 Sb. definuje různé typy sýrů: čerstvý sýr (nezrající sýr tepelně neošetřený po prokysání), tvaroh (nezrající sýr získaný kyselým srážením, které

převládá nad srážením pomocí syřidla), zrající sýr (sýr, u kterého po prokysání došlo k dalším biochemickým a fyzikálním procesům) a tavený sýr (sýr, který byl tepelně upraven za přídavku tavících solí) [21,22,25]

Sýry lze dělit podle několika kritérií:

- Klasifikace přírodních sýrů podle konzistence ve vztahu k obsahu vody v tukuprosté hmotě sýrů – extra tvrdý, tvrdý, polotvrdý, poloměkky a měkký.
- Klasifikace přírodních sýrů podle obsahu tuku v sušině – vysokotučný, plnotučný, polotučný, nízkotučný a odtučněný.
- Klasifikace přírodního sýra podle zrání – sýr nezrající (čerstvý, termizovaný), sýr zrající (na povrchu, s mazem na povrchu, v celé hmotě) a sýry zrající – plísňové (s tvorbou charakteristické plísně na povrchu, s tvorbou charakteristické plísně uvnitř hmoty, dvouplísňový) [21].

1.2 Mléko a mléčné výrobky ve výživě člověka

Mléko a mléčné výrobky mají ve výživě člověka klíčové postavení, protože obsahují v dostatečném množství a optimálně vyváženém poměru všechny výživné i esenciální látky, které mladý organismus potřebuje pro stavbu a výživu těla. Mléko je nenahraditelný pokrm kojenců, ale i důležitá součást stravy pro dospívající, dospělé, staré a nemocné lidi. Jednotlivé složky mléka mají vysokou nutriční hodnotu a jsou v něm obsaženy ve snadno resorbovatelné formě [2,3]. Zejména pro evropskou populaci a obyvatele Severní Ameriky hrají mléko a mléčné výrobky významnou roli v dietě, kde představují pokrytí 20 – 30 % bílkovin stravy, cca 15 % lipidů a asi 80 % vápníku z potravy [18]. Mléko obsahuje řadu významných, jinak obtížně dosažitelných látek. Z nutričního hlediska se jedná zejména o mléčné bílkoviny, především o tzv. syrovátkové nebo „sérové“ bílkoviny a dále o kasein. Zastoupení bílkovin v mléce, dále zinku a lysozymu se podílí na zvýšení imunitních reakcí organismu (tj. jeho obranyschopnosti). V mléce se vyskytují také polypeptidy a malé množství nukleotidů. I tyto látky se podílejí na ochranných pochodech v organismu [17].

Podle odborníků přes výživu, kteří sestavili potravinovou pyramidu znázorňující skladbu, doporučené množství a poměr druhů potravin ve správně složeném jídelníčku, mléko a mléčné výrobky mají vysokou výživovou hodnotu a nachází se ve třetím patře potravinové pyramidy. Zde se nachází taktéž maso nebo masné výrobky, luštěniny, vejce a ryby. Mléko a mléčné výrobky své místo v tomto patře získaly hlavně proto, že mléko

je zdrojem velmi kvalitních bílkovin. Ze sacharidů obsahuje mléko téměř výlučně laktózu. Každý jedinec by měl sníst 2 – 3 porce mléka/mléčných výrobků denně (1 porce: 1 sklenice mléka 250 ml, 1 kelímek jogurtu 200 ml, sýr 55 g). Mléko obsahuje i kyselinu otrovou, která snižuje hladinu LDL cholesterolu.

Někteří lidé mohou trpět nesnášenlivostí laktózy. V tomto případě laktóza není štěpena a její zvyšující se koncentrace způsobuje zvyšování osmotického tlaku a přechod vody přes sliznici do střeva. Výslednými symptomy je tlak ve střevě, větry, kolika a průjem. Nejedná se však v žádném případě o alergii. Lidé trpící touto nesnášenlivostí ve většině případů dobře snášejí kysané mléčné výrobky, kde je laktóza bakteriemi mléčného kvašení přeměněna na kyselinu mléčnou. Mléko je zdrojem vitamínu A, D, vitamínů skupiny B a minerálních látek, zejména pak vápníku. Konzumace mléka a mléčných výrobků je důležitá zejména kvůli této minerální látce. Hraje nezbytně důležitou roli při stavbě kostí a zubů, při srážení krve i činnosti svalstva. Jeho nedostatečným příjmem vzniká onemocnění – osteoporóza. Mléko je dobrým substrátem pro kulturní mikroorganismy a řadí se mezi dobře stravitelné potraviny. Ve výživě člověka má svůj význam i díky svému detoxikačnímu vlivu při otravách [9,18,20,26].

2 MLÉKAŘSKÉ MIKROBIÁLNÍ KULTURY, CHARAKTERISTIKA JOGURTŮ

Mikrobiální mlékařské kultury jsou mikroorganismy či jejich směsi, které se používají při výrobě fermentovaných výrobků a sýrů. Základním biochemickým procesem, který po jejich inokulaci do mléka probíhá, je štěpení laktózy se vznikem různých metabolitů [18].

2.1 Bakterie mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení (BMK) tvoří velkou skupinu čistých mlékařských kultur. Jedná se o bakterie tvořící přirozenou skupinu nepohyblivých, nesporulujících grampozitivních koků a tyčinek, které enzymaticky fermentují laktózu, za fakultativně anaerobních (mikroaerofilních) podmínek, na kyselinu mléčnou. Současně mohou vznikat i další produkty, jako je kyselina máselná, kyselina octová, etanol, oxid uhličitý aj. Hlavními funkcemi bakterií mléčného kvašení je funkce prokysávací, aromatizující a funkce dieteticko-léčebná. Mezi BMK patří především zástupci rodů *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* a *Lactobacillus* [8,18].

BMK fermentují laktózu dvěma metabolickými cestami. Při první z nich, uplatňující se především u rodu *Lactococcus*, je laktóza transportována do buněk fosfoenolpuruvát dependentním fosfotransferázovým systémem a je zde hromaděna jako laktóza-6-fosfát, který je hydrolyzován 6-fosfo- β -D-galaktosidázou za vzniku glukózy a galaktóza-6-fosfátu. Tyto jsou následně metabolizovány na mléčnou kyselinu. Při druhé cestě, uplatňující se především u rodu *Lactobacillus*, je laktóza akumulována specifickou permeázou a pak intracelulárně hydrolyzována β -galaktosidázou na glukózu a galaktózu. Glukóza je metabolizována na mléčnou kyselinu, zatímco galaktóza je uvolňována do média [27].

2.1.1 Homofermentativní a heterofermentativní fermentace laktózy

Podle použitého kmene mikroorganismu mohou vznikat, vedle kyseliny mléčné a oxidu uhličitého, ještě i jiné metabolity, například těkavé kyseliny nebo etanol. V prvním případě, kdy BMK způsobují fermentaci laktózy téměř výhradně na kyselinu mléčnou (nejméně 90 %), se jedná o homofermentativní kvašení. Mezi homofermentativní BMK lze zařadit *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Pediococcus* sp., z tyčinek jsou to hlavně zástupci rodu *Lactobacillus*: *Lb. lactis*, *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*

a *Lb. helveticus*. Naproti tomu heterofermentativní kvašení je charakterizováno tím, že vedle mléčné kyseliny (nejméně 50 %), vznikají ještě další konečné produkty jako acetaldehyd, diacetyl, kyselina octová, CO₂, etanol. Hlavními zástupci heterofermentativních BMK jsou *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *dextranicum*, *L. mesenteroides* ssp. *cremoris*, *Lactobacillus fermentum*, *Lb. brevis* a *Lb. buchneri* [18,27].

2.1.2 Dělení BMK dle teplotního optima

Bakterie mléčného kvašení dle optimální kultivační teploty se dělí na mezofilní a termofilní bakteriální kultury.

2.1.2.1 Mezofilní bakteriální kultury

Fermentované mléčné výrobky obsahující jako základní kulturu mezofilní, označovanou také jako smetanová, se obvykle dělí na kysaná mléka, kysané podmásli, kysané smetany a různě upravené a zahuštěné kysané mléčné výrobky. Obsahuje mikroorganismy rodů *Lactococcus* a *Leuconostoc*, které se podle požadovaného typu fermentace používají v různých kombinacích. Optimální teplota pro růst mikroorganismů kultury je 16 – 23 °C, inkubační doba 16 – 20 hodin. Má kysací a aromatvornou schopnost, proteolytická schopnost je, v porovnání např. s termofilními sýrařskými kulturami, malá. Snížením pH mléka na 4,5 a méně se uplatní bakteriostatický až baktericidní účinek. Kultura se vyznačuje tvorbou kyselin, CO₂ a aromatických látek, především diacetylu [20,24].

2.1.2.2 Termofilní bakteriální kultury (jogurtové)

Mezi termofilní BMK při výrobě jogurtů se řadí dva základní rody, a to *Streptococcus* a *Lactobacillus*. Z hlediska použité klasické jogurtové kultury, se jogurt definuje jako výrobek obsahující živé bakterie *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (homofermentativní tyčinka) a *Streptococcus thermophilus* (homofermentativní streptokok). Některé jogurty mohou mít i přídavek ostatních bakterií, např. probioticky aktivních. Tyto dva základní mikroorganismy jsou v symbiotickém vztahu – lactobacily uvolňují proteolýzou bílkovin aminokyseliny, těmi je stimulován růst streptokoků, které stimuluje tvorbu kyseliny mravenčí a tím růst a metabolismus lactobacilů. Optimální teplota inkubace při použití klasické kultury je 40 – 45 °C, při této teplotě je produkce kyseliny mléčné a koagulace kaseinu, která začíná při pH 5,3 a je ukončena při pH 4,5, dokončena za 3 – 4 hodiny. Hlavní aromatickou látkou je acetaldehyd [20,24].

2.2 Jogurty

Dle Vyhlášky 77/2003 Sb. je jogurtem kysaný mléčný výrobek získaný kysáním mléka, smetany, podmáslí nebo jejich směsi za použití jogurtové kultury. Kromě jogurtové kultury se mohou přidávat i kmeny produkující kyselinu mléčnou a pomáhají tak dotvářet specifickou chuťovou nebo texturovou charakteristiku jogurtu. Poměr těchto kmenů musí být ale zachován v optimálním poměru. Předepsaný minimální počet živých mikroorganismů v 1 g jogurtu je 10^7 [21,24].

Zvláštní skupinou jogurtů jsou výrobky obohacené o probiotické kultury např. z rodu *Bifidobacterium*, dále o vybrané kmeny *Streptococcus thermophilus* a další kultury, které vykazují prokazatelné probiotické účinky. Z původních klasických jogurtů se vyvinula široká paleta výrobků různého obsahu tukuprosté sušiny (od 9 až po 17 %) a tuku (od 0,1 až po 30 %) s různou konzistencí: tekutou – nápoje (drinking yoghurt), krémovitou (stirred yoghurt) nebo s pevným koagulátem (set yoghurt) [24].

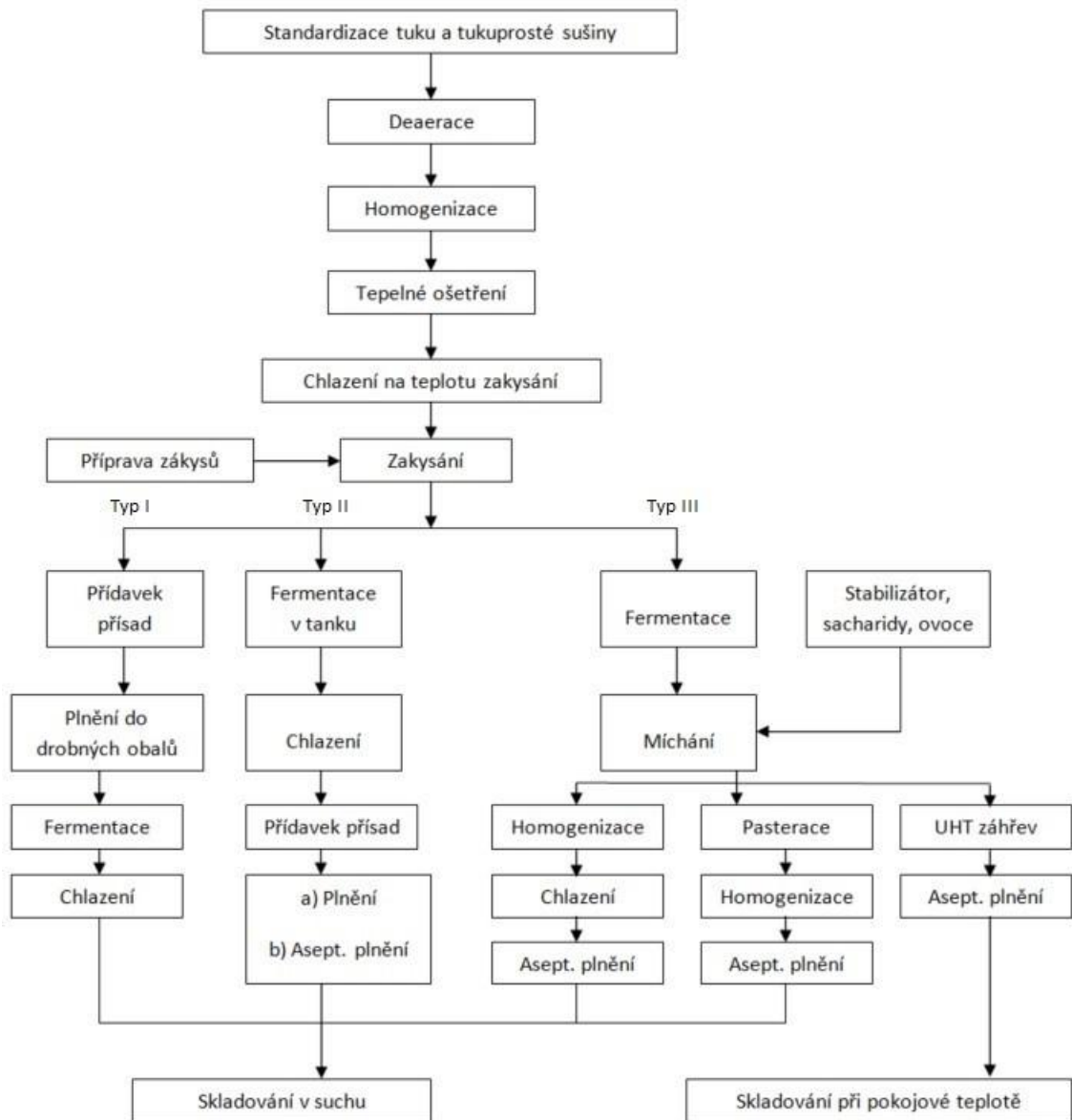
2.2.1 Výroba jogurtů

Výroba jogurtů zahrnuje spoustu jednotlivých technologických operací, kde jejich pořadí se určuje podle typu vyráběného jogurtového výrobku. Základní surovinou pro výrobu je mléko, které musí vytvořit vhodné podmínky pro růst bakterií mléčného kvašení. Mléko musí splňovat požadavky na jakost syrového mléka. Negativně působí na kysací schopnost mléka vysoký počet mikroorganismů a vysoký počet psychrotrofních mikroorganismů. Z hlediska chemického složení je důležitý obsah tukuprosté sušiny, která by měla být vyšší než 8,9 %. Z dalších složek mléka je významný obsah laktózy v mléce, základního substrátu pro BMK a obsah kyseliny citronové, který ovlivňuje obsah diacetylu ve fermentovaných mléčných výrobcích [18,28].

Podle fermentace a dalších technologických operací lze rozdělit jogurtové výrobky na tři základní typy:

- Set Type – fermentovaný výrobek s nerozmíchaným koagulátem.
- Stirred Type – výrobek s rozmíchaným koagulátem.
- Drink Type – výrobek s nízkou viskozitou určený k pití [28].

Obecné schéma výroby fermentovaných mléčných výrobků je zobrazeno na Obr. 4.



Obr. 4 Schéma výroby fermentovaných mléčných výrobků [28]

2.2.1.1 Klasická výroba / Set Type

U typu I / Set Type se do mléka zaočkovaného zákysovou kulturou přidávají přísady (aromata, ovocný podíl) a takto upravená směs se plní do drobných spotřebitelských obalů (plastové kelímky, skleněné láhve), ve kterých výrobek zraje (fermentuje, inkubuje se) při optimální teplotě. Teplota zrání je stanovena od 42 do 45 °C po dobu cca 3 – 3,5 hodiny a očkuje se 1 – 2 % jogurtové kultury. Inkubace probíhá ve vodních lázních, zracích skříních nebo zracích komorách. Po skončení fermentace je třeba rychle výrobek vychladit [6,24].

2.2.1.2 Tanková výroba / Stirred Type

U typu II / Stirred Type se jogurt vyrábí z nezahuštěného mléka; jakmile proběhne fermentace, je gel (zfermentované mléko / koagulát) jemný, hladký a tekutější. Inokulace a zrání (inkubace) probíhá ve fermentačním tanku. Fermentační teploty se pohybují okolo 35 °C po dobu 16 – 18 hodin. Před ukončením fermentace je směs rychle zchlazena. Na závěr se obsah promíchá a čerpá do dávkovacího zařízení. Konzistence vytvořeného koagulátu se naruší mechanickými operacemi, obvykle se zlepší během 24 hodin, ale nedosáhne původní kvality. Pro zlepšení konzistence je možné přidávat stabilizátory [6,24].

2.2.1.3 Jogurtový nápoj / Drink Type

U typu III / Drink Type je výroba obdobná jako u stirred type. Fermentace opět probíhá ve fermentačním tanku. Při následujících operacích zahrnujících podle typu výrobku tepelné ošetření (pasterace, UHT záhřev), příp. homogenizaci výrobku, je zcela rozrušena struktura vzniklého koagulátu. Tyto výrobky jsou charakteristické nižším obsahem sušiny. Výrobky ošetřené tepelně po fermentaci se liší zásadně od výrobků tepelně neošetřených, neboť neobsahují živé mikroorganismy kysaných kultur. Dle vyhlášky 77/2003 Sb. tyto produkty neřadíme mezi kysané mléčné výrobky; jedná se o mléčné výrobky tepelně ošetřené po kysacím procesu [6,24].

3 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA VYBRANÝCH MONOSACHARIDŮ A OLIGOSACHARIDŮ

Sacharidy tvoří podstatnou složku potravin rostlinného i živočišného původu a obvykle tvoří hlavní část tzv. „extraktivních látek bezdusíkatých“. Názvem sacharidy se označují polyhydroxyaldehydy a polyhydroxyketony, které obsahují v molekule minimálně tři alifaticky vázané uhlíkové atomy, a také sloučeniny, které se z nich tvoří vzájemnou kondenzací za vzniku acetalových vazeb, tj. látky, ze kterých vznikají sacharidy hydrolýzou. K sacharidům se také řadí sloučeniny vzniklé ze sacharidů oxidačními, redukčními, substitučními a jinými reakcemi [10,13,29,]. Zásadní úlohu při vzniku sacharidů má fotosyntéza zelených rostlin, která poskytuje glukózu. Glukóza se svými deriváty se potom uplatňuje ve vzájemné přeměně sacharidů a v řadě katabolických pochodů (glykolýza, kvašení, atd.) [30].

Funkce sacharidů jsou různé. V buňkách plní následující funkce:

- využívají se především jako zdroj energie (některé polysacharidy, oligosacharidy a monosacharidy; 1 g cukru poskytuje 17 kJ, tj. 4 kcal, energetická výtěžnost cukerných alkoholů je jen 10 kJ.g⁻¹, tj. 2,4 kcal.g⁻¹), a proto se spolu s bílkovinami a lipidy řadí k hlavním živinám
- jsou základními stavebními jednotkami mnoha buněk, chrání buňky před působením různých vnějších vlivů (např. některé polysacharidy a složené sacharidy)
- jsou biologicky aktivními látkami (např. oligosacharidy mléka) nebo složkami mnoha biologicky aktivních látek, jako jsou glykoproteiny, některé koenzymy, hormony, vitaminy aj. [13].

3.1 Rozdělení sacharidů

Podle počtu cukerných jednotek (cyklů monosacharidů) vázaných v molekule se sacharidy dělí na:

- monosacharidy (1 cyklus)
- oligosacharidy (2 až 10 cyklů)
- polysacharidy neboli glykany (10 a více cyklů)
- složené, také komplexní neboli konjugované sacharidy.

3.1.1 Monosacharidy

Monosacharidy tvoří nejjednodušší skupinu sacharidů a většina z nich může být nazývána cukry. Podle přítomných charakteristických skupin v molekule rozlišujeme dva typy monosacharidů, aldózy a ketózy. Podle počtu atomů uhlíku v molekule pak rozeznáváme triózy, tetrózy, pentózy, hexózy, atd. [31].

3.1.1.1 Významné monosacharidy mléka

Nejrozšířenějším přírodním monosacharidem je D-glukóza (hroznový cukr). V čistém stavu je glukóza bílá krystalická látka sladké chuti. V přírodě se vyskytuje běžná konformace D-glukózy, která stáčí rovinu polarizovaného světla doprava. Glukóza je stavební jednotkou maltózy, laktózy, sacharózy a nejdůležitějších polysacharidů (škrobu, glykogenu a celulózy). Rozpouští se ve vodě, zředěném i koncentrovaném etanolu, metanolu, pyridinu, acetonu a kyselině octové. Bod tání se pohybuje v rozmezí od 141 °C do 150 °C. Hustota, refrakce a viskozita roztoků glukózy je blízká hodnotám roztoků sacharózy. D-glukózu lze získat krystalizací z rostlinných šťáv, zejména z hroznů révy vinné. Technicky se vyrábí kyselou a enzymovou hydrolýzou bramborového a kukuřičného škrobu, nebo dvoustupňovým procesem ze dřeva. D-glukóza je základním a nejrychlejším zdrojem energie pro všechny tělesné tkáně [13,32].

Galaktóza je stejně jako glukóza monosacharid složený z šesti uhlíků a aldehydovou skupinou (aldohexóza). Vyskytuje se jako součást disacharidu laktózy a derivátů sacharidů (mukoproteiny a cerebrosidy). Galaktóza je v játrech přeměňována na glukózu, tato přeměna může být narušena při dědičném onemocnění tzv. galaktosemie). Bod tání galaktózy je 167 °C [31].

3.1.2 Oligosacharidy

Oligosacharidy vznikají spojením dvou až deseti stejných nebo různých monosacharidových jednotek glykosidickou (poloacetalovou) vazbou mezi α - nebo β -anomerní hydroxylovou skupinou monosacharidu a libovolnou hydroxylovou skupinou jiného monosacharidu [30].

Během vzniku oligosacharidů mohou nastat dvě rozdílné situace. Pokud zůstává ve vzniklé molekule disacharidu (oligosacharidu) minimálně jeden poloacetalový hydroxyl volný, označujeme daný sacharid jako redukující (redukuje Fehlingův roztok). Takový sacharid, stejně jako výchozí monosacharid, vykazuje v roztocích mutarotaci a vyskytuje se tedy

jako α - nebo β -anomer. Mezi redukující disacharidy patří např. maltóza, isomaltóza, cellobióza a laktóza. Pokud jsou všechny poloacetalové hydroxyly blokovány vazbou, označujeme daný sacharid jako neredukující. Do této skupiny řadíme sacharosu a trehalózu [10,13,30].

Systematické názvosloví bere v případě redukujících disacharidů za základ názvu jméno monosacharidu s volnou poloacetalovou hydroxylovou skupinou, před nějž se uvede název substituujícího monosacharidu a vyznačí se příslušná anomerní konfigurace (α nebo β). Nejvýznamnějšími oligosacharidy vyskytujícími se jako přirozené složky potravin jsou oligomery D-glukózy neboli glukooligosacharidy, ve kterých je glukóza jediným nebo převládajícím monosacharidem. Neméně významné oligosacharidy jsou galaktooligosacharidy, které se skládají z D-galaktózy, D-glukózy, D-fruktózy, případně i z dalších monosacharidů. Dominujícím disacharidem tohoto typu v mléku a v mléčných výrobcích je laktóza [13].

3.1.2.1 Významné oligosacharidy mléka

Laktóza je redukujícím disacharidem vyskytujícím se v mléce savců. Mléko v menším množství obsahuje také D-glukózu a řadu různých volných oligosacharidů. Laktóza je samozřejmě přítomna i ve všech výrobcích obsahujících mléko (např. čokoláda, zmrzlina). Nejstabilnější formou je monohydrát α -laktózy (α -monomeru). V této formě laktóza krystalizuje z vodných roztoků při teplotě do 93,5 °C. Při sušení ve vakuu při teplotě nad 100 °C vzniká hygroskopický α -anhydrid. Krystalizací z vodných roztoků při teplotě nad 93,5 °C vzniká bezvodá β -laktóza (β -anhydrid). Při rychlém sušení roztoků laktózy, např. také při sušení mléka, vzniká amorfni hygroskopická směs α - a β -laktózy. Relativní sladivost laktózy je asi 40 % (20 – 60 %) sladivosti sacharózy [6,9,13].

Fyziologické rozpětí obsahu laktózy v kravském mléce je cca od 4,55 do 5,30 % s průměrnou hodnotou kolem 4,80 % (obsah laktózy je vyjádřen jako monohydrát, při vyjádření jako bezvodá laktóza je tato hodnota 4,57 %). Obsah laktózy kolísá především se stadiem a pořadím laktace, dojivosti a zdravotním stavem mléčné žlázy krav [9].

Laktóza sehrává jednu z důležitých rolí v technologii řady mléčných výrobků i ve výživě člověka. Laktóza například:

- je substrátem pro bakterie mléčného kvašení, které tvoří z laktózy kyselinu mléčnou a podmiňují tak výrobu řady kysaných mléčných výrobků a sýrů,
- je zdrojem energie pro sající mlád'ata,
- dodává mléku mírně nasládlou chuť,
- spoluurčuje osmotický tlak v mléce,
- ovlivňuje texturní vlastnosti zahuštěných, sušených a mražených produktů,
- participuje na interakcích, které probíhají během tepelného ošetření mléka [1].

Hydrolyza laktózy na příslušné monosacharidy je uskutečňována enzymem laktázou (β -galaktosidázou) v tenkém střevě. Velká část lidské populace (podobně jako další savci) produkuje tento enzym jen v dětském věku. V dospělosti enzym u řady jedinců chybí. Nedostatečné množství nebo úplné vymizení enzymu může mít za následek vznik laktózové malabsorpce (snížené vstřebávání) a laktózové intolerance (nesnášenlivost). U kojenců po porodu je aktivita laktázy nízká, protože i první kolostrum má méně laktózy. Zvýšení obsahu laktózy pak indikuje zvyšování aktivity laktázy [6,13].

Laktázu produkují také bakterie mléčného kvašení, které fermentují laktózu až na mléčnou kyselinu (L- nebo D-mléčnou kyselinu nebo racemát). Mléčné kysané výrobky, jako jsou např. jogurty a acidofilní mléko, mohou proto bez problémů konzumovat i lidé s deficiencí laktázy [9,13].

Laktóza se používá jako sladká látka, a slouží také jako surovina pro výrobu některých potravinářských oligosacharidů a alditolů (laktulózy, laktosacharózy, galaktooligosacharidů, laktitolu, či galaktózy) [13].

3.2 Metody stanovení sacharidů

Metod pro stanovení sacharidů v potravinách je mnoho. V případě, že se sacharidy analyticky zvlášť neurčují, počítají se do 100 po odečtení procentuálního množství bílkovin, tuku, vlákniny, minerálních látek (popela) a vody. Kvalitativně se sacharidy dokazují barevnými reakcemi, fenylyhydrazinem, popřípadě redukcí Fehlingova roztoku, Nylanderova činidla apod. (redukční účinek karbonylových skupin). Sacharidy lze stanovit i metodami fyzikálními (polarimetrie, refraktometrie), fyzikálně chemickými (kolorimetrie, fotometrické vyhodnocování chromatogramů), chemickými (vážkově a titračně) a metodami biochemickými (kvasnými). Zvláštní místo v moderní analýze sacharidů zaujímají metody chromatografické, obdobně jako v analýze aminokyselin, mastných

kyselin atd. Chromatografické metody umožňují dělení cukrů, jejich důkaz i stanovení [29,33]. Stanovení sacharidů pomocí kapalinové chromatografie je věnována kapitola 5.3.

4 MOŽNOSTI EXTRAKCE MONOSACHARIDŮ A OLIGOSACHARIDŮ Z MLÉČNÝCH VÝROBKŮ

Sacharidy z potravinářských surovin a potravin se většinou izolují extrakcí. Extrakce je nejjednodušší a nejzákladnější separační metodou, používanou k čištění analytu z interferujících látek nebo z matice s použitím rozpouštědla. Princip této metody je založen na přechodu složky ze směsi látek v kapalně či tuhé fázi do jiné kapalně fáze, a patří mezi základní operaci při práci v organické laboratoři. Rozpouštědla a směsi rozpouštědel používané k extrakci obsahují vodu, alkoholy (etanol, metanol), chloroform, případně jejich směsi. Pokud nalezneme vhodné extrakční činidlo, je extrakce velmi účinnou separační metodou [33,34,35].

Výsledné cukerné roztoky získané extrakcí je nutné dále upravit čiřením. Účelem čiření je odstranění zákalu a rozpuštěných nesacharidových opticky aktivních látek (bílkoviny apod.), příp. také barviv z cukerného extraktu. Na použitá čiridla je kladen jeden základní požadavek, čiridlo nesmí adsorbovat cukry. Zpravidla se přidávkem čirícího prostředku k cukernému extraktu vytvoří sraženina a následnou filtrací je získán čirý roztok [34,36].

4.1 Extrakční činidla

Extrakčními činidly při extrakci sacharidů bývá jedním rozpouštědlem voda (nebo vodný roztok), zatímco druhé rozpouštědlo je organické, většinou se používá etanol [34].

4.1.1 Izolace sacharidů extrakcí deionizovanou vodou

Princip metody je založen na přechodu rozpustných sacharidů do deionizované vody. K izolaci je potřeba 25 g vzorku a 10 ml vody. Po smíchání následuje extrakce po dobu 3 – 5 minut při teplotě 50°C. Po uplynutí doby extrakce se extrakt dále zpracovává pomocí čirících činidel. Stanovení koncentrace sacharidů lze zjistit metodou HPLC ve spojení s refraktometrickým detektorem. Při použití vody jako extrakčního činidla lze předcházet enzymovým změnám přidáním malého množství chloridu rtuťnatého. Je důležité dodržovat teplotu extrakce, aby nedošlo k porušení koloidního systému vzorku [34,37].

4.1.2 Izolace sacharidů extrakcí etanolem

Dalším způsobem, jak izolovat sacharidy ze vzorku, je pomocí 80% roztoku etanolu. K izolaci je potřeba 5 až 10 g jemně rozemletého vzorku, který se následně extrahuje 1 hodinu 100 ml 80% etanolu při laboratorní teplotě za občasného míchání. Potom

se etanolový extrakt zfiltruje, k nerozpustnému zbytku se přidá dalších 100 ml 80% etanolu a zahřívá se 1 hodinu na vroucí lázni pod zpětným chladičem. Získaný etanolový extrakt se doplní v odměrné baňce na určitý objem a zfiltruje se. V alikvotní části takto připraveného extraktu se odstraní etanol odpařením na vroucí vodní lázni do sucha, odparek se rozpustí ve 100 ml vody a zahřeje na 80 °C, čímž se vysrážejí balastní nerozpustné látky. Tekuté vzorky se zahustí do sirupovité konzistence a dále zpracovávají jako etanolové extrakty.

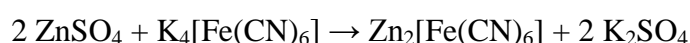
Extrakce 80% etanolem je mnohem vhodnější především u vzorků, u kterých může docházet k enzymovým změnám, např. k tvorbě redukujících cukrů ze škrobu nebo k enzymové inverzi sacharózy [34,35,37].

4.2 Činidla používaná k čiření

Ideální čiřící prostředek neexistuje, jeho použití se řídí druhem analyzovaného materiálu a zvolenou metodou stanovení cukrů. Adsorbenty jako hydroxid hlinitý a infusoriová hlínka (křemelina) mají převážně malý čiřící efekt, adsorbenty s vyšší adsorpční mohutností naproti tomu dobře odbarvují, ale při tom zároveň částečně adsorbují především redukující cukry. Jako čiřících prostředků se používá jednak látek, které srážejí koloidní látky, a také se využívá adsorpce koloidních látek na vhodné sorbenty [34].

4.2.1 Čiření podle Carreze

Při tomto postupu je dosaženo čiřícího účinku vytvořením objemné sraženiny hexakynoželeznanu zinečnatého v cukerném roztoku. Používá se 5 ml 30% síranu zinečnatého (Carrez I) a 5 ml 15% hexakynoželeznanu draselného (Carrez II) na 100 ml cukerného roztoku. Toto čiřidlo má vysokou účinnost zvláště v kyselém prostředí. Neutrální a alkalické roztoky je nutno nejdříve okyselit mírně zředěnou kyselinou octovou. Carrezovo činidlo dokonale odstraňuje bílkoviny a méně slizovité látky. Podstatou srážení je následující reakce [34,38]:



4.2.2 Čiření neutrálním octanem olovnatým

Neutrální roztok 35% octanu olovnatého (roztok PbO v CH₃COOH) se přidává ke vzorku v takovém množství, až se přestane tvořit sraženina, k dokonalému vysrážení balastních látek se přidá ještě malý nadbytek čiřidla. Případný zákal způsobený uhličitánem

olovnatým se odstraní 10% hydrogenfosforečnanem sodným. Při tomto způsobu čiření se odstraní všechny opticky aktivní organické kyseliny, avšak odstranění bílkovin je nedokonalé. Neutrální octan olovnatý je vhodný pro čiření neutrálních roztoků, méně vhodný je pro kyselé roztoky [34,38].

4.2.3 Čiření zásaditým octanem olovnatým

Použité množství zásaditého octanu olovnatého (PbO s $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COOH})_2$) se při čiření sacharidového extraktu pohybuje od 5 do 30 ml, v případě práškovité formy se přidává v množství maximálně 1,5 g na 100 ml čiřeného roztoku. Nejvíce se využívá v cukrovarnické analytice, jelikož velmi dobře odstraňuje bílkoviny i všechny opticky aktivní kyseliny z neutrálních nebo slabě alkalických šťáv. Jeho účinnost je ovlivněna prostředím, v kyselém prostředí je nižší [34,38].

4.2.4 Čiření podle Herlese

Podstatou čířidla je zásaditý dusičnan olovnatý (adiční sloučenina PbO s $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$), který vzniká smíšením roztoku dusičnanu olovnatého a hydroxidu sodného. K získání maximální čířící schopnosti se přidá k roztoku nejdříve určitý podíl roztoku dusičnanu olovnatého, dobře se rozmíchá, a potom se přidá stejný podíl roztoku hydroxidu sodného. Čířidlo je vhodné pro roztoky slabě kyselé, neutrální i slabě alkalické. Silně alkalické roztoky je nutno předem neutralizovat zředěnou kyselinou octovou na fenolftalein [34,38].

4.2.5 Čiření kyselinou fosfowolframovou

Kyselina fosfowolframová ($\text{H}_3[\text{P}(\text{W}_3\text{O}_{10})_4]$) se používá jako 5 % vodný roztok v množství od 2 ml do 10 ml na 100 ml roztoku cukru podle množství nečistot. Je zvláště výhodná pro kyselé roztoky. Dobře odstraňuje bílkoviny a jejich štěpné produkty [34,38].

4.2.6 Ostatní čířidla

Z ostatních čířidel se používá ještě kyselina wolframová, kyselina trichloroctová, tanin (10%), hydroxid hlinitý (pro velmi slabě zabarvené roztoky) a aktivní uhlí, které však částečně adsorbuje i cukr. Čiření je možné i pomocí ionexů, které se používají především k odstranění rušících anorganických solí, aminokyselin apod. [34].

5 MOŽNOSTI STANOVENÍ MONOSACHARIDŮ A OLIGOSACHARIDŮ POMOCÍ HPLC-RI

Tam, kde běžné metody užívané v analýze cukrů, jako metody polarimetrické, refraktometrické, chemické apod. mají omezené použití, tj. pro analýzu směsí cukrů, dávají nejspolehlivější výsledky metody chromatografické [29].

Chromatografické metody patří do skupiny separačních metod, které jsou založeny na rozdílné distribuci dělených látek ve směsi mezi dvě různé nemísitelné fáze: mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou). V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina. Stacionární fází pak může být buď tuhá látka, nebo kapalina, ukotvená na tuhém nosiči. Stacionární fáze je umístěna v chromatografické koloně ve formě sorbentu. Mobilní fáze protéká tímto sorbentem, tzv. chromatografickým ložem. Nejčastějším uspořádáním kapalinové chromatografie je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, High Performance Liquid Chromatography). Při tomto uspořádání je mobilní fáze přiváděna do systému pomocí čerpadla za vysokého tlaku [36,39].

5.1 Obecné zásady HPLC

Kapalinová chromatografie je jednou z chromatografických separačních (dělicích) metod. V případě kolonové chromatografie je k dělení látek používána chromatografická kolona naplněná drobnými částicemi vhodného materiálu – sorbentu. Určitá oblast sorbentu je přístupná pro molekuly vzorku a tvoří tzv. stacionární fází. Mezi částicemi sorbentu protéká kolonou kapalina (mobilní fáze, eluent). Při běžné eluční metodě je roztok vzorku nastříknut v úzké zóně na začátek kolony. V kontaktu se sorbentem každá složka vzorku přechází zčásti do stacionární fáze ve snaze dosáhnout termodynamické rovnováhy. Velikost retence (zadržení) složky na stacionární fází je charakterizována retenčním faktorem k .

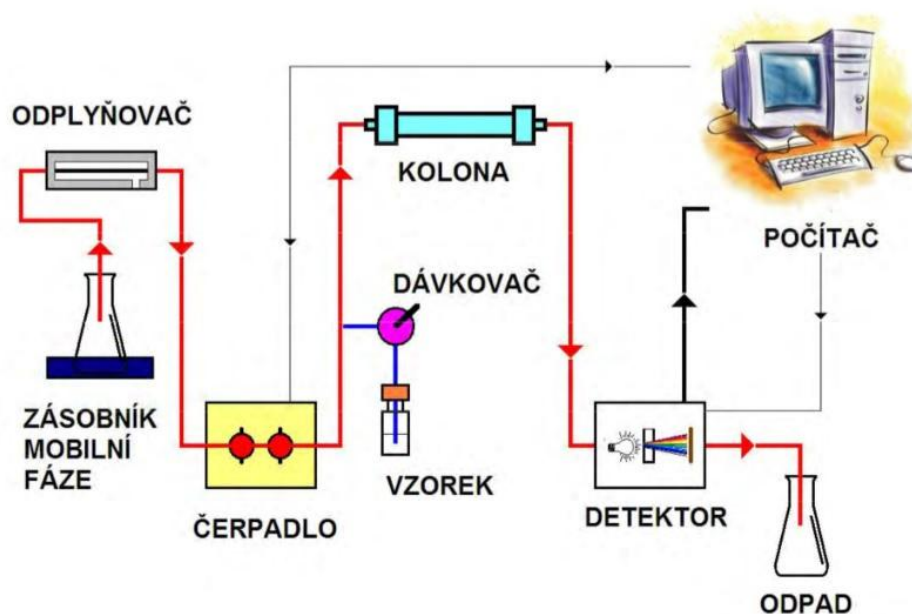
Mobilní fáze vystupující z kolony je vedena do detektoru, který na základě změny některé fyzikální nebo fyzikálně-chemické veličiny indikuje přítomnost separovaných složek. Grafický záznam závislosti signálu detektoru na čase se nazývá chromatogram. Počátek chromatogramu je kladen do okamžiku nástřiku vzorku na kolonu. Každé rozdělené složce odpovídá na chromatogramu jeden pík. Poloha jejího vrcholu se nazývá retenční čas t_R a z objemového průtoku mobilní fáze F_m lze vypočítat retenční objem V_R ($V_R = F_m \cdot t_R$) [40].

5.2 Schéma kapalinového chromatografu

Kapalinový chromatograf se skládá z těchto částí, které mají následující funkce:

- uchování a transport mobilní fáze (zásobníky mobilní fáze, vysokotlaké čerpadlo)
- dávkování vzorku (autosampler, manuální dávkovací ventil)
- separace látek (chromatografická kolona, termostat kolony)
- detekce látek (detektor)
- záznam dat pro následné vyhodnocení (počítač a software) [39].

Schéma kapalinového chromatografu je uvedeno na Obr. 5. Kapalinový chromatograf může mít samozřejmě řadu obměn.



Obr. 5 Schéma kapalinového chromatografu [41]

Zásobníky mobilní fáze jsou nejčastěji skleněné nádoby o objemu 0,1 – 2,5 l, opatřené ryskami a uzávěrem z inertního plastu s předvrtanými otvory pro teflonové hadičky. Mobilní fáze se čerpá přes filtry odstraňující mechanické nečistoty.

Odplyňovače (degasery) mohou být buď membránové vakuové (mobilní fáze protéká semipermeabilní hadičkou umístěnou ve vakuu), heliové (mobilní fáze se probublává heliem, které vytěsňuje rozpuštěné plyny) nebo lze odplyňovat filtrací za vakua nebo ultrazvukem.

Čerpadla mobilní fáze pumpují mobilní fázi do systému. Umožňují programovat složení mobilní fáze v čase při gradientové eluci. Pracují při vysokých tlacích (HPLC do 400 bar). Čerpadla mohou být buď pístová (z principu pulzní tok, který je pomocí různých technických řešení převeden na bezpulzní; jsou nejčastější) nebo stříkačková (na bázi injekční stříkačky; dokonale bezpulzní tok mobilní fáze).

HPLC předklony jsou krátké kolony zařazované těsně před analytickou kolonu. Chrání kolonu tím, že zachytávají mechanické nečistoty a látky, které se ireverzibilně váží na kolonu. Obsahují stejnou stacionární fázi jako kolona.

HPLC kolony jsou kovové, skleněné, křemenné nebo plastové trubice obsahující stacionární fázi. Kolony mohou být buď náplňové, nebo monolitické [41].

Detektory jsou podrobněji popsány v následující kapitole.

5.2.1 HPLC detektory

Detektory jsou v HPLC systému umístěny za chromatografickou kolonou a zaznamenávají rozdíl v signálu mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze obsahující analyt. Nejčastěji se dělí na detektory koncentrační (reagují na změnu hmotnostní koncentrace složky v eluentu nezávisle na rychlosti přívodu složky do detektoru) a hmotnostní (reagují na změnu hmotnostního toku složky v eluentu do detektoru). Jiný způsob dělení je na detektory nedestrukční (nedochází k chemické změně detekované komponenty) a destruktivní (detekovaná komponenta se ireverzibilně mění). Rozdělení HPLC detektorů je uvedeno v Tab. 3.

Existují čtyři přístupy používané pro HPLC detekci:

- detekce univerzální vlastnosti společné pro všechny analyty
- detekce specifické vlastnosti vzorku
- detekce změny mobilní fáze
- spojené techniky (připojení nezávislé analytické techniky HPLC) [39].

Tab. 3 Rozdělení HPLC detektorů [39]

Detektory univerzální	Detektory specifické vlastnosti vzorku	Změna mobilní fáze	Spojené techniky
refraktometrický CAD ELSD	UV-VIS fluorescenční elektrochemický radioaktivní vodivostní chemiluminiscenční- dusíkový	CAD MS ELSD	MS infračervený NMR

[Vysvětlivky: CAD (Charged Aerosol Detector) – Aerosolový detektor nabitých částic, ELSD (Evaporative Light Scattering Detector) – Odpařovací detektor rozptylu světla, UV-VIS (Ultraviolet-visible spectrophotometry) – Ultrafialová-viditelná spektrofotometrie, MS (Mass spectrometry) – Hmotnostní spektrometrie, NMR (Nuclear magnetic resonance) – Nukleární magnetická rezonance].

5.2.1.1 Refraktometrické detektory

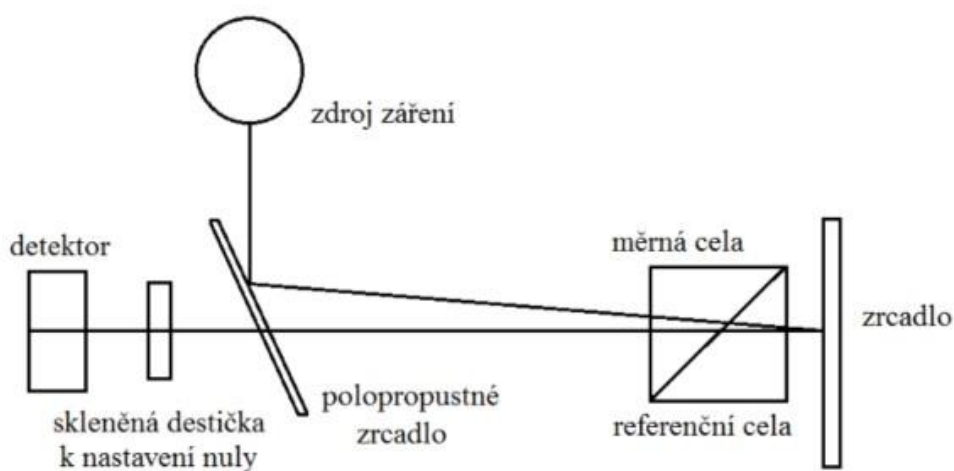
Refraktometrická detekce (RID – Refractive Index Detection) je jedna z možných detekcí v HPLC. Tento typ detekce se hlavně využívá pro analýzu sacharidů. Princip RID spočívá v měření indexu lomu eluentu vyvolaného rozpuštěnou látkou. V zásadě všechny rozpuštěné látky ovlivňují eluent refraktometrického detektoru a jednotlivé citlivosti látek se mění. Velkou výhodou této detekce je, že může být použita pro kvantifikaci různých analytů. Další výhodou RID je možnost aplikování detekce bez potřeby chromoforních skupin, fluorescenčních skupin nebo dalších specifických vlastností molekuly analytu [35,42]. Refraktometrické detektory ovšem mají i řadu nevýhod. Jednou z nevýhod RID je menší citlivost, která není v mnoha případech tak dobrá, jako u jiných typů detekce. Také není možné použít pro mobilní fázi eluce s gradientem, a to z důvodu velkých změn indexu lomu mobilní fáze. Index lomu je citlivý na změny teploty, proto je nutné udržovat konstantní teplotu v průběhu celého měření. Odezva RID je úměrná rozdílu indexu lomu eluátu v měrné cele a indexu lomu mobilní fáze v referenční cele detektoru. Odezva se uvádí v libovolných jednotkách RID, v závislosti na nastavení, ale je vždy úměrná koncentraci analytu. Refraktometrický detektor je vhodný pro látky, které neabsorbují a nefluoreskují (cukry, lipidy, polymery) [42]. Jednotlivé vlastnosti RI detektoru jsou uvedeny v Tab. 4.

Tab. 4 Vlastnosti RI detektoru [43]

	RI
typ detektoru	nedestruktivní
odezva	univerzální
měřená veličina	index lomu
typická citlivost (hmotnost/ml)	μg
lineární rozsah	10^{-4}
závislost odezvy na průtoku	ano
teplotní závislost	vysoká (10^{-4} jed. ind. Lomu)
gradientová eluce	ne

Podle konstrukce jsou rozlišovány dva typy diferenciálních refraktometrů, a to deflexní (výchylkový) a reflexní (Fresnelův).

Deflexní refraktometr (schéma viz Obr. 6) využívá paprsku vycházejícího ze zdroje. Tento paprsek se odrazí na polopropustném zrcadle ve směru měřící cely a postupně prochází měrnou a referenční celou. Po projití oběma celami se paprsek na zrcadle odrazí a vrací se stejnou cestou zpět. Po průchodu polopropustným zrcadlem dopadá na planparalelní destičku a na hranu zrcadlového hranolu, od něhož se odrazí na dvojici spárovaných fotoelektrických čidel. Změna indexu lomu v měrné cele se projeví výchylkou paprsku dopadajícího na zrcadlový hranol a na fotoelektrické čidlo dopadá různý světelný tok. Rozdíl těchto světelných toků je převáděn na elektrický signál citlivější, čím větší bude rozdíl mezi indexem lomu eluátu a indexem lomu mobilní fáze [39].



Obr. 6 Schéma deflexního refraktometrického detektoru [44]

Fresnelův typ refraktometru jen konstruován na základě Fresnelova zákona odrazu světla. Lze odvodit, že množství světla odražené na ploše fázového rozhraní s rozdílnou optickou hustotou (sklo-kapalina) závisí na úhlu dopadajícího světla a na indexu lomu obou médií tvořících fázové rozhraní. Detektor tedy měří intenzitu světla odraženého z fázového rozhraní mezi kapalinou a skleněným hranolem jak v měrné, tak i ve srovnávací cele. Rozdíl v toku záření dopadajícího na dva fotoelektrické články z měrné a referenční cely j mírou koncentrace složek [39].

5.3 Stanovení sacharidů

Cukry patří mezi velmi polární látky (záporné hodnoty $\log P$), které ve své molekule neobsahují chromofor, proto jejich retence v HPLC systému i detekce může být problematická. Pro detekci musí být často použity tzv. univerzální detektory, jako jsou RID, ELSD či CAD.

Z fyzikálně-chemických vlastností (polarita, přítomnost mnoha hydroxylových skupin ve struktuře látek) vyplývá, že pro separaci cukrů může být použito několik HPLC separačních módů: hydrofilní interakční chromatografie (HILIC), molekulová vylučovací chromatografie (SEC), anebo iontově výměnná chromatografie (IEC) na anexech. Výběr techniky závisí na matici vzorku, na cíli separace a na rozpustnosti analytů v rozpouštědlech typických pro daná chromatografická uspořádání [45].

Před vlastním stanovením sacharidů metodou HPLC je nutné připravit analyzovaný vzorek. Vlastní příprava vzorku může zahrnovat odstranění interference, oddělení jednoho typu sacharidů od jiného typu nebo zvýšení jejich koncentrace a převedení analytu do více vhodné formy pro detekci nebo separaci [36].

Vysoké rozlišení s dostatečnou citlivostí poskytuje anexová iontová chromatografie se speciálně povrchově upraveným anexem (kvartérní aminy) ve spojení s amperometrickým detektorem, RI detektorem nebo detektorem ELS. Alternativou je použití metody HILIC. Jako stacionární fáze je používána propylaminová fáze a mobilní fází je voda-acetonitril (70 – 80 % acetonitrilu). Se zvyšujícím se obsahem vody klesá retence cukrů. Pro separaci α - a β -anomerů slouží propylaminová fáze chemicky vázaná na silikagel [45].

5.3.1 Hydrofilní interakční chromatografie

HILIC (Hydrophilic interaction chromatography) může být chápána jako rozšířená chromatografie na normální fázi s vodnými mobilními fázemi. Tato separační technika je vhodná pro polární a hydrofilní látky.

Ovlivnění retence v HILIC je velmi podobné jako při normální fázi. Retence se zvyšuje s polaritou solutu a snižuje se zvýšením polaritu mobilní fáze (klesá s rostoucím podílem vody nebo pufru). Mobilní fáze je naopak obdobná mobilním fázím používaných v reverzní chromatografii a používá se voda nebo pufr s organickým rozpouštědlem. Stacionární fáze je velmi hydrofilní: silikagel, polární vázané fáze, polární polymerní fáze a iontoměnič. Hydrofilnější stacionární fáze více poutá vodu z mobilní fáze a retence solutu se zvyšuje. Stacionární fáze se tak chová jako „přenašeč“ vody, ale tento mechanismus má i své výjimky, které nejsou dostatečně prostudované. V případě separace sacharidů chromatografií HILIC, kdy se použijí chemicky vázané různé aminové fáze, dochází k různé retenci v závislosti na použitém chemicky vázaném ligandu.

Jako druhý mechanismus, který se uplatňuje, je mechanismus iontové výměny, neboť mnohé stacionární fáze mají vlastnosti iontoměnič. Tento mechanismus může být s úspěchem použit při ovlivnění selektivity separace. K ovlivnění retence se používá také přídavek pufrů do mobilní fáze. Retence klesá se zvyšující se koncentrací solí. Vliv pH závisí na vlastnostech solutu, v případě, že dochází k disociaci solutu, retence se zvyšuje oproti neutrálním solutům.

Klasickým příkladem separace technikou HILIC je separace sacharidů, aminokyselin, peptidů a polárních organických kyselin a zásad. Při separaci sacharidů se používá aminopropylová fáze jako stacionární a mobilní fáze acetonitril-voda (70:30) ve spojení s refraktometrickým detektorem, UV detektorem při vlnové délce 200 nm nebo ELS detektorem. V případě UV detekce je možné použít i gradientové eluce [43].

5.3.2 Molekulová vylučovací chromatografie

SEC (Size-exclusion chromatography) je chromatografická metoda, jejíž základní princip spočívá v oddělování látek podle jejich molekulové hmotnosti. Princip rozdělování je nerovnovážný a nazývá se vylučovací nebo také síťový efekt. Používá se hlavně pro separaci různých polymerů a pro separaci polymerů z malých molekul. Tato metoda se také často nazývá gelová chromatografie podle typu stacionární fáze (gelu) používaného

v klasické kapalinové chromatografii. Separace v molekulové vylučovací chromatografii se provádí na porézní stacionární fázi [42]. Molekuly látky jsou nesený protékající mobilní fází kolonou, která je naplněná porézním materiálem (gelem), přičemž pronikají (permeací) do rozpouštědlem naplněných pórů gelu. Malé molekuly difundují do pórů gelu a jsou tak zpomalovány oproti molekulám velkým, větší molekuly difundují jen do větších pórů a velké molekuly, které přesahují průměr pórů a nemohou proniknout a jsou unášeny mobilní fází z kolony bez jakéhokoli zadržení. Rozhodující úlohu při separaci hraje velikost a tvar solutu a velikost a tvar pórů stacionární fáze [33,39,52].

5.3.3 Iontově výměnná chromatografie

Tento druh chromatografie je určen pro separaci nabitých částic schopných existovat během separačního procesu v iontové podobě. Separovány mohou být kladně i záporně nabití ionty. Podstatou separace je rozdílná afinita dělených látek k iontovýměnným skupinám iontoměniče. Částice bez náboje prochází kolonou bez zadržení. Jako stacionární fáze se používá materiál na bázi silikagelu nebo organické polymery. Vodné fáze tvoří vodné tlumivé roztoky, jejichž ionty (protiionty) jsou v dynamické rovnováze s ionty měniče. Důležité jsou měniče iontů (ionexy), které ve styku s vodnou fází uvolňují elektrostatickou disociací ionty, a ty mohou být nahrazeny ionty z roztoku, které mají k měniči větší afinitu. Podle iogenních skupin ionexů rozlišujeme katexy a anexy.

- Katexy – nerozpustné polymerní polyvalentní kyseliny, které uvolňují a vyměňují kationty, na nosiči je vázána kyselá skupina (sulfonová, karboxylová).
- Anexy – nerozpustné polymerní polyvalentní báze uvolňující a vyměňující anionty, na nosiči je vázána bazická skupina (kvartérní dusíkatá báze, primární nebo sekundární amin) [36,45,46].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

CÍL PRÁCE

Hlavním cílem této diplomové práce bylo sledování fermentace mléka působením různých bakteriálních kultur. Průběh fermentace byl sledován na základě snižování hodnot pH, zvyšování titrační kyselosti a poklesu obsahu laktózy.

Tento hlavní cíl byl naplněn prostřednictvím následujících dílčích cílů:

1. Stanovení časových intervalů vhodných pro sledování průběhu fermentace dle vybrané bakteriální kultury při vhodné inkubační teplotě.
2. Stanovení hodnot pH a °SH v daných časových intervalech.
3. Stanovení obsahu laktózy s využitím metody HPLC-RI.
4. Vyhodnocení činnosti bakteriálních kultur.

6 MATERIÁL A METODY

6.1 Materiál

Základním použitým materiálem bylo selské mléko o objemu 1 l od firmy Olma, a.s. Jednalo se o plnotučné mléko bez standardizace obsahu tuku (nejméně 3,5 % a maximálně 4 % tuku) vyrobeného z českého mléka. Mléko bylo ošetřeno vysokou pasterací a homogenizováno.

Výživové údaje / 100 ml (převzato z obalu mléka):

- Energetická hodnota 270 kJ / 640 kcal
- Tuky 3,6 g
 - Z toho nasycené mastné kyseliny 2,3 g
- Sacharidy 4,6 g
 - Z toho cukry 4,6 g
- Bílkoviny 3,2 g
- Sůl 0,10 g.

Mléko bylo zakoupeno v běžné maloobchodní síti.

6.1.1 Použité bakteriální kultury

Celkem bylo použito šest mlékařských kultur, z toho 2 jogurtové, 2 termofilní jednokmenové a 2 mezofilní. Bližší specifikace jsou uvedeny v následujících podkapitolách.

6.1.1.1 Jogurtová kultura *Laktoflora*

Laktoflora obsahuje druhy *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus* a dále obsahuje mléko, sušené mléko a laktózu. Kultura je dodávaná v lyofilizované formě od firmy Milcom. Doporučené dávkování této kultury je 3 g na litr mléka. Výrobce doporučuje kultivaci při 42 °C po dobu 4 – 5 hodin [47]. Fermentace v rámci experimentu probíhala při teplotě 37 °C a 43 °C. Pro teplotu 37 °C byl zvolen odběrový čas po 1 hodině, pro teplotu 43 °C byl odběrový čas po ½ hodině.

6.1.1.2 Jogurtová kultura *YB1*

Kultura YB1 je složená stejně jako Laktoflora z *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus*. Výrobce kultury MicroMilk ji dodává v lyofilizované

podobě. Dávkování této kultury je 0,1 g na litr [48]. Fermentace probíhala taktéž při teplotě 37 °C a 43 °C. Odběrové časy byly totožné s Laktoflorou, pro teplotu 37 °C byly zvoleny 1 hodinové intervaly, pro teplotu 43 °C ½ hodinové intervaly.

6.1.1.3 Termofilní mléčná kultura TH-3

Kultura TH-3 je definovaný kmen termofilní kultury mléčného kysání se zvýšenou bakteriofágovou rezistencí. Kultura obsahuje kmen *Streptococcus thermophilus* a je dodávána hluboce mražená, v granulované formě, od firmy Chr. Hansen. Kulturu lze dle výrobce použít např. pro výrobu sýrů typu Pasta Filata či výrobku typu Laban, netvoří aroma ani plyny. Kultura může být aplikována samostatně nebo v kombinaci s ostatními kulturami mléčného kvašení, např. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* nebo *Lactobacillus helveticus*. Dávkování této kultury je 0,1 g na litr [49]. Fermentace probíhala stejně jako u ostatních termofilních kultur při teplotě 37 °C a 43 °C. Pro teplotu 37 °C byl zvolen odběrový čas po 1 hodině, pro teplotu 43 °C byl odběrový čas po ½ hodině.

6.1.1.4 Termofilní mléčná kultura LH-B02

Kultura LH-B02 je definovaný kmen termofilní kultury mléčného kysání. Kultura obsahuje kmen *Lactobacillus helveticus* a je dodávána lyofilizovaná, v granulované formě, od firmy Chr. Hansen. Výrobce doporučuje kulturu především pro produkci italských a švýcarských sýrů, a to jak samostatně, tak i v kombinaci s jinými kulturami, např. se *Streptococcus thermophilus* či *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Doporučený očkovací poměr je 0,1 g na litr [50]. Fermentace probíhala při teplotě 37 °C a 43 °C. Pro teplotu 37 °C byl zvolen odběrový čas po 1 hodině, pro teplotu 43 °C byl odběrový čas po ½ hodině.

6.1.1.5 Mezofilní aromatická kultura YY-88

Kultura obsahuje směs kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus helveticus*. Kultura je dodávána hluboce mražená, v granulované formě, od firmy Chr. Hansen. Kultura vytváří aroma a oxid uhličitý a je vhodná zejména pro výrobu sýrů typu Gouda, Eidam, Leerdam či Samsoe. Doporučené množství inokula je 0,1 g na litr [51]. Tato kultura byla vybrána s ohledem na přítomnost zástupců termofilních BMK. Fermentace probíhala při teplotě 37 °C a 43 °C. Pro obě teploty byly zvoleny 1 hodinové intervaly odběrů.

6.1.1.6 Mezofilní aromatická kultura CHN-22

Kultura obsahuje směs kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetyllactis*. Kultura je dodávána lyofilizovaná, v granulované formě, od firmy Chr. Hansen, je určena pro přímé očkování. Kultura vytváří aroma a oxid uhličitý. Je vhodná pro výrobu fermentovaného mléka, fermentované smetany a mnoha druhů sýrů tvořících oka. Doporučený očkovací poměr je 0,1 g na litr a inkubační teplota 22 – 30 °C [52]. Fermentace probíhala při teplotě 25 °C a 30 °C. Pro obě teploty byl zvolen odběrový čas po 1 hodině.

6.1.2 Chemikálie

K experimentu byly použity následující chemikálie: Carrez I (30% ZnSO₄; Penta), Carrez II (15% K₄[Fe(CN)₆]; Penta), chemikálie dodávané k titrátoru (HANNA Instruments), ultračistá voda pro HPLC (přečištěná systémem Aqua MaxTM Ultra 370 Series; Young Lin), Acetonitril pro HPLC (≥ 99,9 %; Sigma-Aldrich), standardy glukózy, galaktózy a laktózy (Sigma-Aldrich).

6.1.3 Přístroje a pomůcky

Kapalinový chromatograf Shimadzu LC-20AD Prominence

- kvartérní pumpa
- pětikanálový degaser DGU-20A_{5R}
- autosampler SIL-20AC_{HT}
- diferenciální refraktometrický detektor RID-20A (vše Shimadzu)

Kolona Agilent Zorbax NH₂ (4,6 x 250 mm x 5 μm)

Předkolonový cartridge filtr 0,2 μm (Optimize Technologies)

Inkubátor INCU-Line (VWR International)

Titrátor HI 84529 (HANNA Instruments)

Analytické váhy GR-200-EC (A & D Instruments)

Magnetické míchadlo s ohřevem MSH-20D (Vitrum)

Vpichový pH metr (Eutech)

Filtrační papír KA 4 (Papírna Pernštejn Keseg & Rathouzský)

Stříkačkové filtry 0,22 μm (Cronus)

Inkubační láhve o objemu 100 ml a 1000 ml

Běžné laboratorní pomůcky a sklo

6.2 Metody

6.2.1 Pasterace a fermentace mléka

Nejdříve bylo mléko pasterováno ve sterilní inkubační lahvi při teplotě 95 °C po dobu 2 min. Vysoká pasterace byla použita za účelem žádoucí denaturace sérových bílkovin, podpoření schopnosti bílkovin vázat vodu (syrovátku) a tím zabránění jejího uvolnění při skladování. Při vysoké pasteraci totiž dochází k navázání β -laktoglobulinu na κ -kasein prostřednictvím disulfidického můstku [1]. Po ukončení pasterace bylo mléko rychle zchlazeno na teplotu inokulace, která se odvíjela dle typu mikroflóry použité pro fermentaci (viz kapitola 6.1.1). Po dosažení požadované teploty bylo dané množství bakteriální kultury (viz kapitola 6.1.1) sterilně zaočkováno do mléka. Po dokonalém rozpuštění kultury bylo mléko rozděleno do 100 ml sterilních inkubačních lahví, jejichž počet závisel na předpokládaném počtu odběrových intervalů. Pro každý odběr byly připraveny 3 lahve. Lahve byly uloženy do inkubátoru, kde probíhala fermentace při dané teplotě (viz kapitola 6.1.1).

6.2.2 Stanovení aktivní a titrační kyselosti

Aktivní kyselost (pH) je dána koncentrací oxoniových iontů v měřeném vzorku. Aktivní kyselost byla měřena vždy 3x vpichovým pH-metrem se skleněnou elektrodou. Jakmile bylo dosaženo pH 4,6 (tedy izoelektrického bodu), byla fermentace ukončena.

Titrační kyselost podle Soxhlet-Henkela se vyjadřuje ve stupních SH. Při stanovení titrační kyselosti bylo naváženo 20 g vzorku, bylo přidáno 60 ml ultračisté vody a dále bylo postupováno dle pokynů výrobce automatického titrátoru. Titrační kyselost byla v každém časovém intervalu stanovena také 3x.

6.2.3 Příprava vzorku pro stanovení sacharidů

Při každém odběru vzorků byla kromě stanovení aktivní a titrační kyselosti prováděna i extrakce sacharidů ze vzorku a následné čiření (opět ve 3 opakováních).

Pro extrakci sacharidů bylo naváženo 25 g vzorku, ke kterému bylo přidáno asi 10 ml ultračisté vody. Sacharidy byly extrahovány po dobu 5 min při teplotě 50 °C na magnetickém míchadle [35]. Obsah kádinky byl následně kvantitativně převeden do odměrné baňky (100 ml), bylo přidáno 2x5 ml Carrezových činidel a odměrná baňka byla doplněna po rysku vodou. Obsah baňky byl přefiltrován přes papírový filtrační papír KA 4 (pomalá rychlost filtrace) a následně ještě přes stříkačkový mikrofiltr s velikostí porů 0,2 μm [36].

6.2.4 Stanovení sacharidů pomocí HPLC-RI

Sacharidy byly stanoveny na kapalinovém chromatografu Shimadzu vybaveném refraktometrickým detektorem. Jako mobilní fáze byl použit 70% acetonitril ve vodě. Vzorky byly eluovány izokraticky při průtoku 1,4 ml.min⁻¹. Délka analýzy byla 15 minut [36]. Každý ze 3 připravených vzorků byl analyzován 2x (n = 6).

Před vlastním stanovením byly pro všechny tři sacharidy sestrojeny kalibrační křivky. Kalibrační řady byly naředěny ze zásobních roztoků standardů o koncentraci 100 g.l⁻¹. Pro glukózu a laktózu byly využity koncentrace 0,1 – 10 g.l⁻¹ a pro galaktózu 0,5 – 10 g.l⁻¹. Z daných koncentračních rozmezí vyplývá i mez stanovitelnosti – pro glukózu a laktózu 0,1 g.l⁻¹ a pro galaktózu 0,5 g.l⁻¹. V těchto rozpětích byla závislost plochy píku na koncentraci lineární. Každý bod kalibračních křivek byl proměřen 3x. Z regresních rovnic byl vypočítán obsah sacharidů v g.100 g⁻¹ vzorku.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Výsledky stanovení aktivní a titrační kyselosti

Narůstající kyselost syrovátky s časem nad hodnotu nativní kyselosti je způsobena rozkladem laktózy na mléčnou kyselinu činností mikroorganismů. Mezi aktivní a titrační kyselostí mléka neexistuje absolutní závislost, neboť hodnoty závisejí na pufrací (tlumivé) schopnosti přítomných solí a bílkovin. Díky jejich tlumivým vlastnostem se přídavek kyseliny nebo zásady projeví až poté, co se jimi zneutralizují. Platí tedy, že při zvyšující se titrační kyselosti nedochází zpočátku v důsledku pufracího systému k velkým změnám v hodnotě pH mléka. Jakmile dojde k vyčerpání kapacity pufracího systému, pH se začne měnit v závislosti na titrační kyselosti. Tato skutečnost je využívána především při růstu řady mikroorganismů v mléce [53,54].

Kyselou reakci mléka a mléčných výrobků způsobují mléčné bílkoviny, konkrétně jejich volné karboxylové skupiny, které nejsou zapojeny do peptidických vazeb. Dále některé kyselce reagující soli, například fosfáty a citráty, rozpuštěný oxid uhličitý a organické kyseliny, především kyselina mléčná [55].

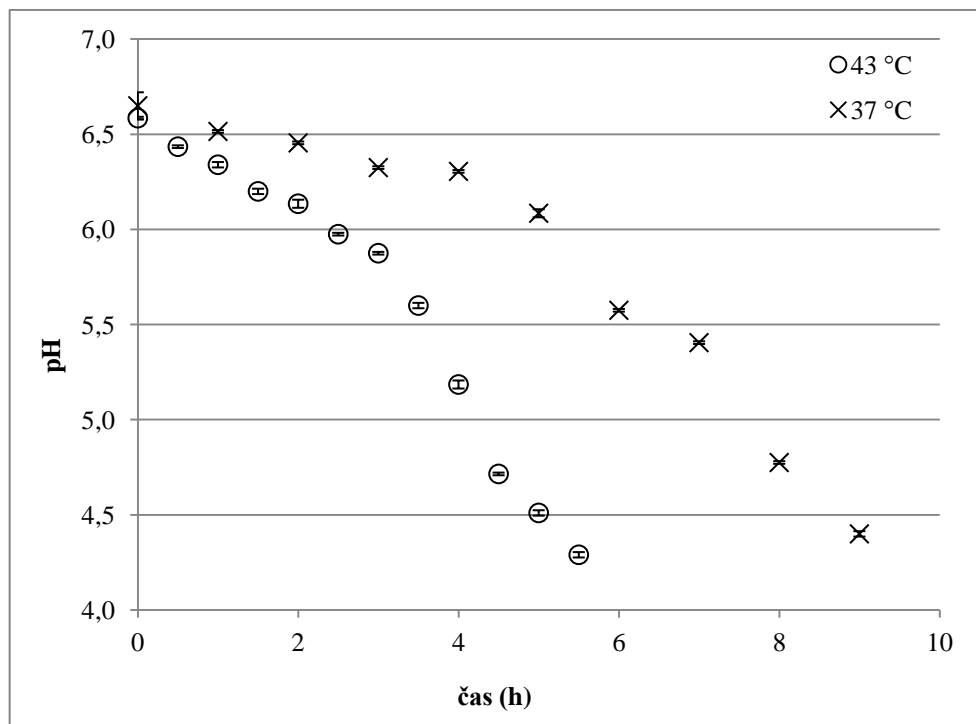
Počáteční hodnoty aktivní i titrační kyselosti byly vždy stanoveny jak v nezaočkovaném mléku, tak i v inokulovaném mléku v čase 0. Vzhledem k tomu, že se tyto hodnoty od sebe nijak významně nelišily, jsou dále v kysacích křivkách znázorněny pouze hodnoty získané v čase 0. Zatímco pH se v mléce před fermentací pohybovalo v rozmezí 6,54 – 6,61, počáteční hodnoty titrační kyselosti (TK) se průměrně pohybovaly okolo 5,5 °SH, což jsou běžné hodnoty pro mléko ošetřené vysokou pasterací [53].

7.1.1 Jogurtová kultura Laktoflora

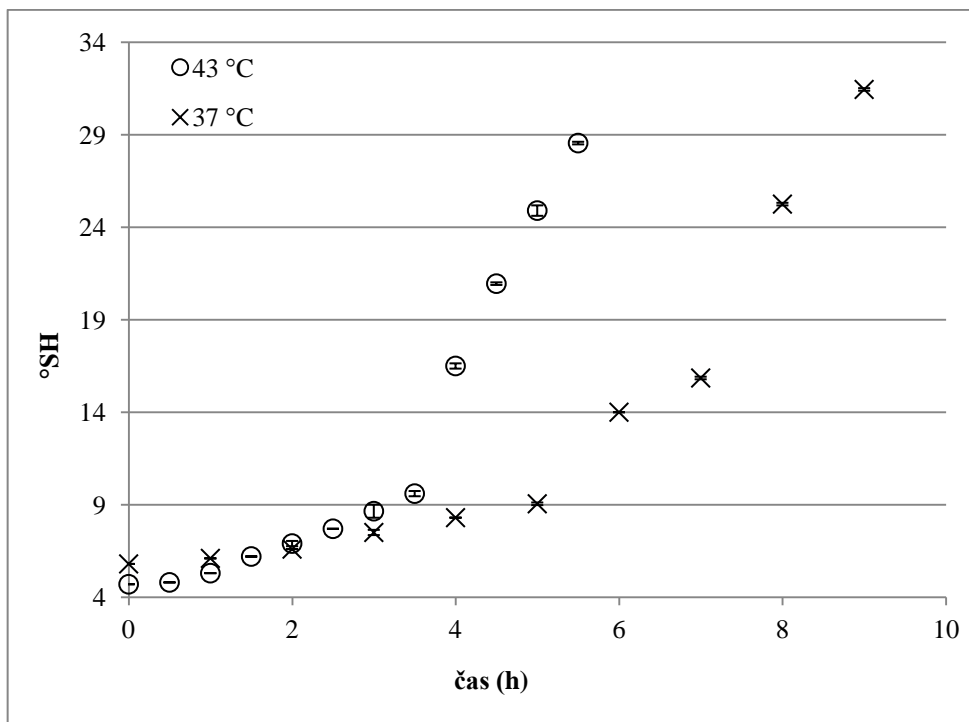
Fermentace probíhala při 43 a 37 °C. Závislosti změny aktivní a titrační kyselosti na čase jsou pro obě kultivační teploty uvedeny na Obr. 7 a 8. Při teplotě 37 °C bylo dosaženo izoelektrického bodu v čase devíti hodin, kdy byla naměřena průměrná hodnota pH 4,40. Ve stejnou dobu byla naměřena průměrná hodnota TK 31,45 °SH. Pokles pH byl zezáčátku fermentace pozvolný, k výraznějšímu poklesu došlo po čtyřech hodinách fermentace. TK pomalu stoupala po dobu pěti hodin, po uplynutí této doby byl nárůst hodnoty rychlejší.

Fermentace při teplotě 43°C probíhala rychleji, což je dáno tím, že jogurtová kultura je termofilní kulturou s optimální teplotou kolem 42 – 43 °C [56]. Izoelektrický bod byl

překročen po uplynutí pěti hodin, kdy byla naměřena průměrná hodnota pH 4,51. Ve stejném okamžiku byla průměrná TK 24,90 °SH. Pokles hodnoty pH byl ze začátku opět velmi pozvolný, postupně s uplynutou dobou fermentace se zrychloval. Hodnota °SH též ze začátku stoupala velmi pomalu, nárůst se zrychlil po uplynutí čtyř hodin.



Obr. 7 Závislost změny pH na čase působením jogurtové kultury Laktoflora

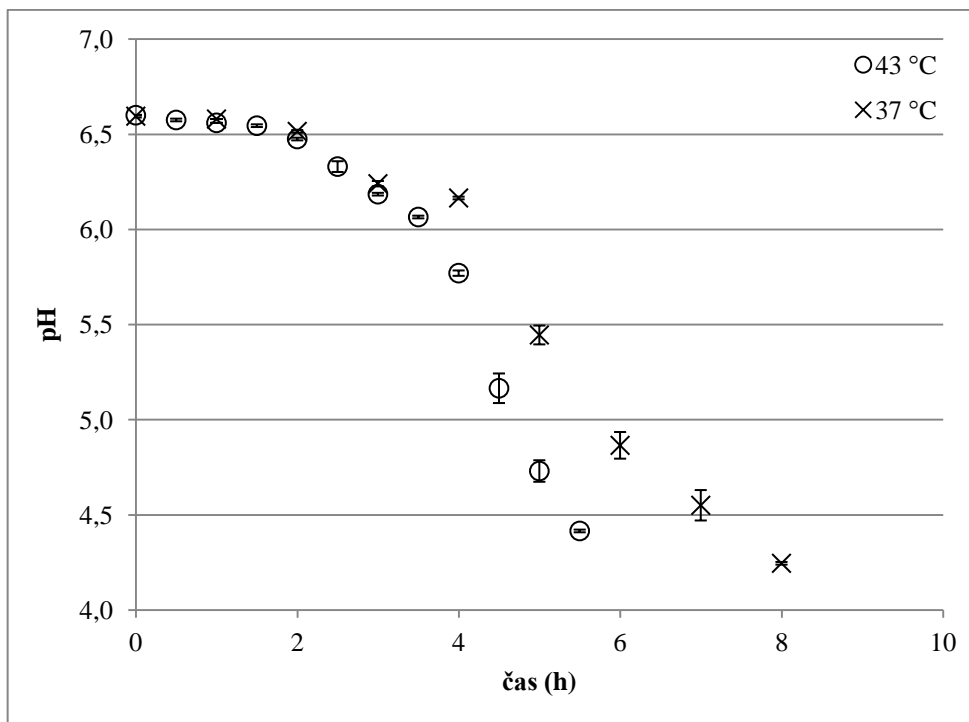


Obr. 8 Závislost změny °SH na čase působením jogurtové kultury Lactoflora

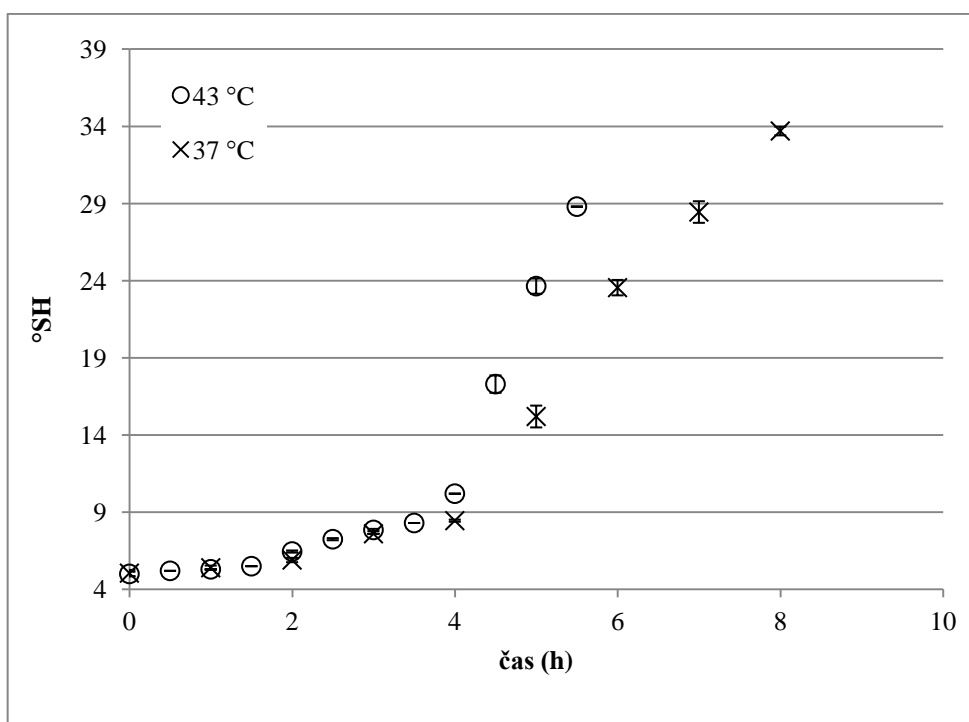
7.1.2 Jogurtová kultura YB1

Fermentace mléka zaočkovaného touto jogurtovou kulturou probíhala při 43 a 37 °C. Závislosti změny aktivní a titrační kyselosti na čase jsou pro obě kultivační teploty uvedeny na Obr. 9 a 10. Izoelektrického bodu při teplotě 37 °C bylo dosaženo po uplynutí sedmi hodin, kdy průměrná hodnota pH byla 4,55. V tomto okamžiku se průměrná hodnota TK rovnala 28,45 °SH. S přibývajícím časem byl pokles pH výraznější. Hodnota °SH ze začátku fermentace stoupala velmi pozvolna, k rychlému nárůstu došlo po uplynutí pěti hodin.

Fermentace mléka při teplotě 43 °C byla mírně rychlejší, což je opět dáno teplotním optimem termofilní mikroflóry. Izoelektrického bodu bylo dosaženo v čase 5,5 hodin, kdy průměrná hodnota pH se rovnala 4,42. V tomto čase průměrná hodnota TK byla 28,80 °SH. Pokles pH byl ze začátku fermentace velmi pozvolný a postupně se zrychloval. Hodnota °SH též ze začátku stoupala velmi pozvolna, k rychlejšímu nárůstu došlo po uplynutí 4,5 hodin.



Obr. 9 Závislost změny pH na čase působením jogurtové kultury YB1

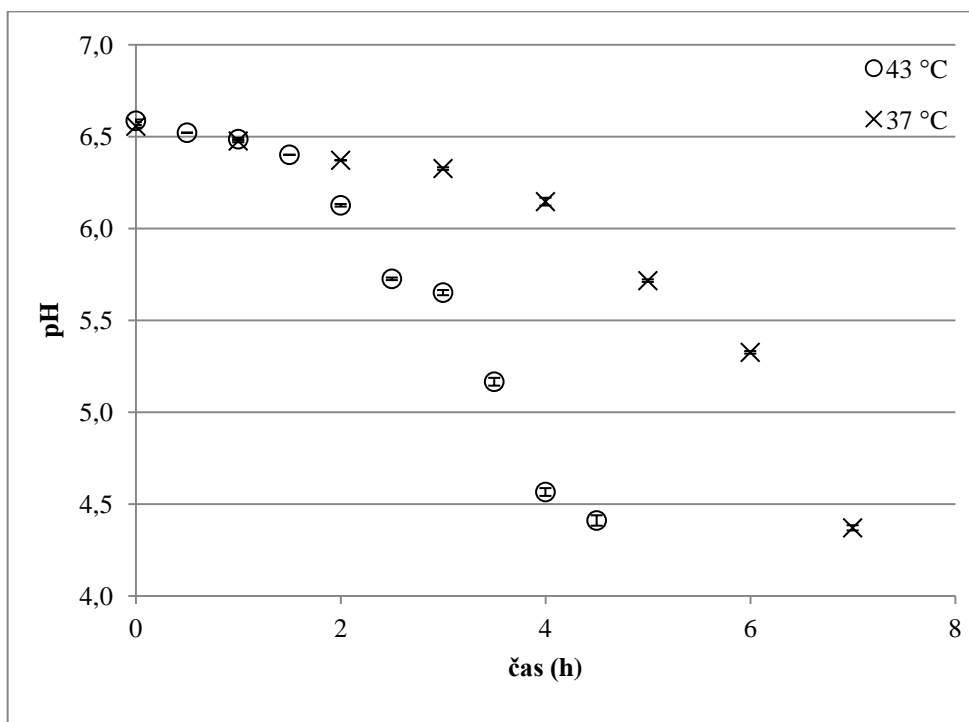


Obr. 10 Závislost změny °SH na čase působením jogurtové kultury YB1

7.1.3 Termofilní mléčná kultura TH-3

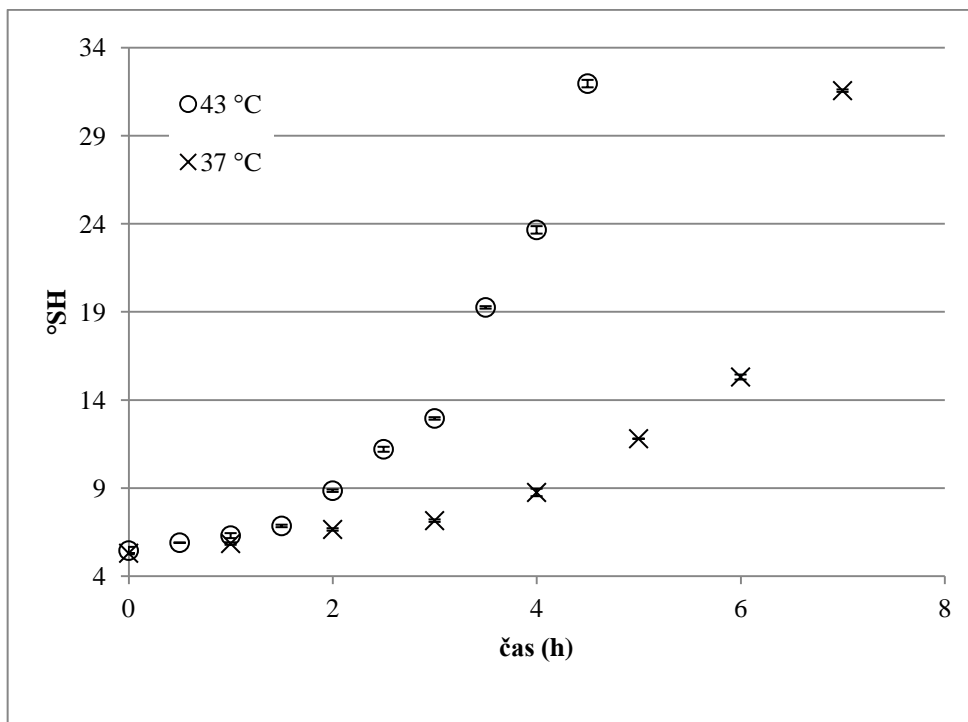
Fermentace probíhala při 43 a 37 °C, podobně jako u obou jogurtových kultur. Závislosti změny aktivní a titrační kyselosti na čase jsou pro obě kultivační teploty uvedeny na Obr. 11 a 12. Při teplotě 37 °C bylo dosaženo izoelektrického bodu v čase sedmi hodin, kdy průměrná hodnota pH byla 4,37 a hodnota TK 31,55 °SH. Pokles pH byl pozvolný, nejvýraznější pokles nastal v poslední hodině, to stejné probíhalo i u TK, nejdříve byl nárůst pozvolný a v poslední hodině byl nejvýraznější.

Fermentace probíhající při teplotě 43 °C trvala po dobu čtyř hodin. Po uplynutí této doby byla průměrná hodnota pH 4,57 a TK 23,65 °SH. Pokles pH byl pozvolný s občasným výraznějším poklesem a nárůst °SH byl zezáčátku pozvolný s tendencí se ke konci fermentace zrychlovat.



Obr. 11 Závislost změny pH na čase působením termofilní mléčné kultury

TH-3

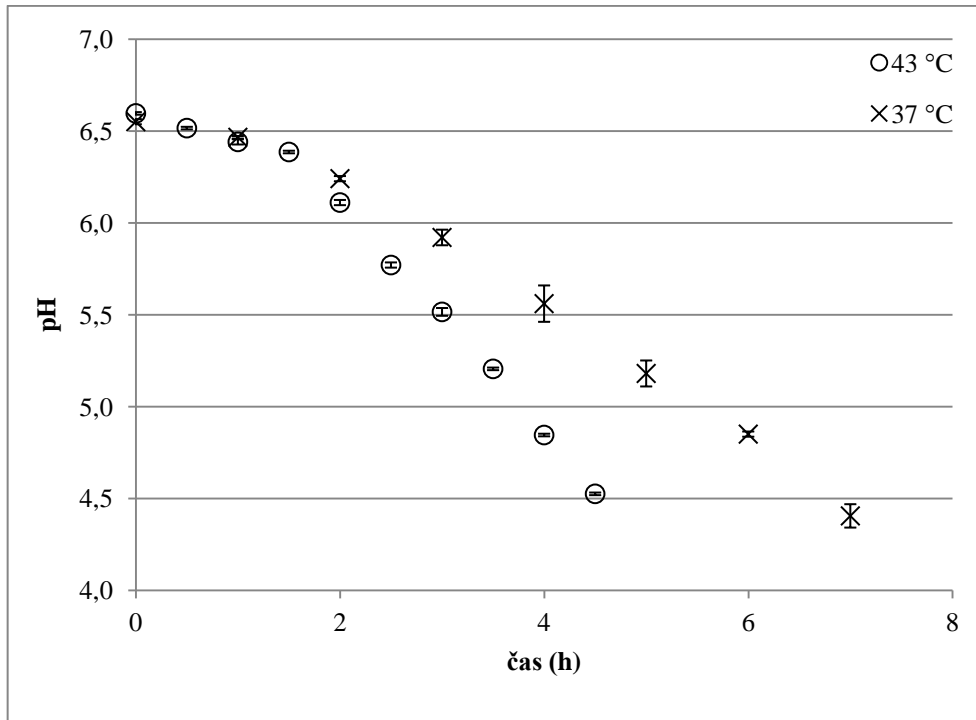


Obr. 12 Závislost změny °SH na čase působením termofilní mléčné kultury TH-3

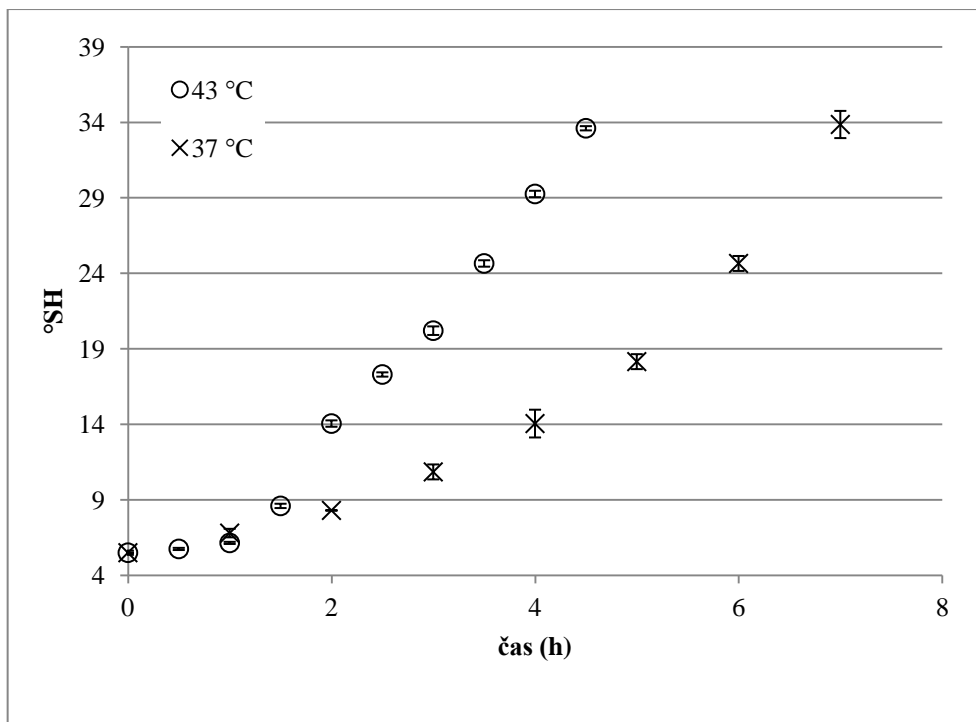
7.1.4 Termofilní mléčná kultura LH-B02

Fermentace mléka zaočkovaného touto kulturou probíhala opět při 43 a 37 °C. Závislosti změny aktivní a titrační kyselosti na čase jsou pro obě kultivační teploty uvedeny na Obr. 13 a 14. Při teplotě 37 °C probíhala fermentace po dobu sedmi hodin, kdy bylo výsledné pH 4,41 a TK 33,85 °SH. Pokles pH byl pozvolný a nárůst °SH byl s přibývajícím časem rychlejší.

Při teplotě 43 °C byla fermentace ukončena po 4,5 hodinách s průměrnou hodnotou pH 4,53 a TK 33,60 °SH. Pokles pH byl stejně jako v případě nižší kultivační teploty pozvolný. Nárůst °SH byl též ze začátku pozvolný, k výraznějšímu zrychlení došlo od 2. hodiny fermentace.



Obr. 13 Závislost změny pH na čase působením termofilní mléčné kultury LH-B02

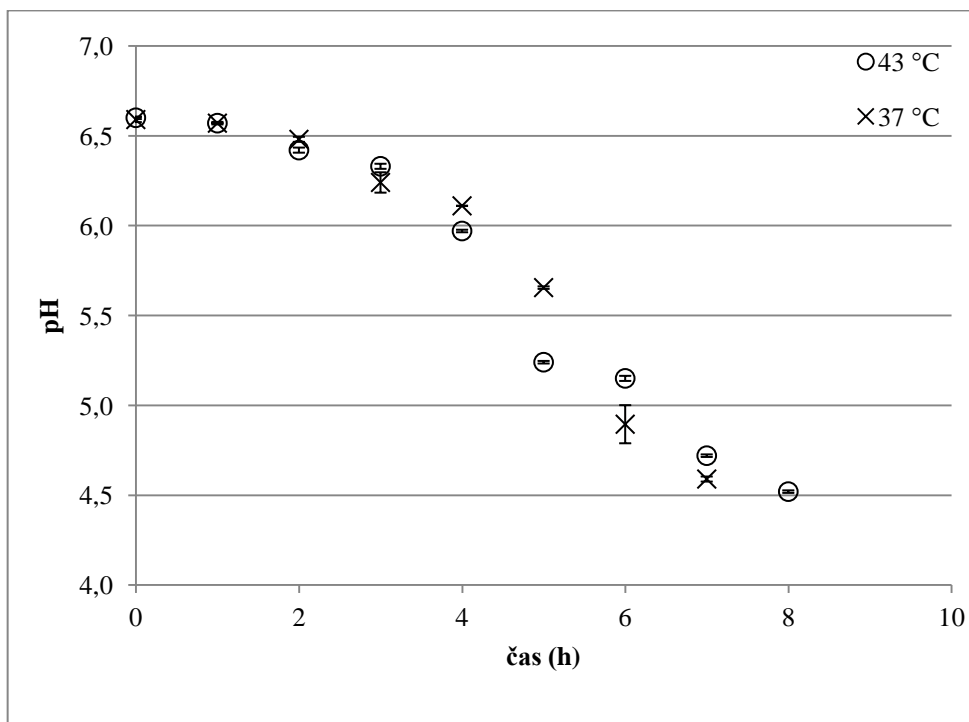


Obr. 14 Závislost změny °SH na čase působením termofilní mléčné kultury LH-B02

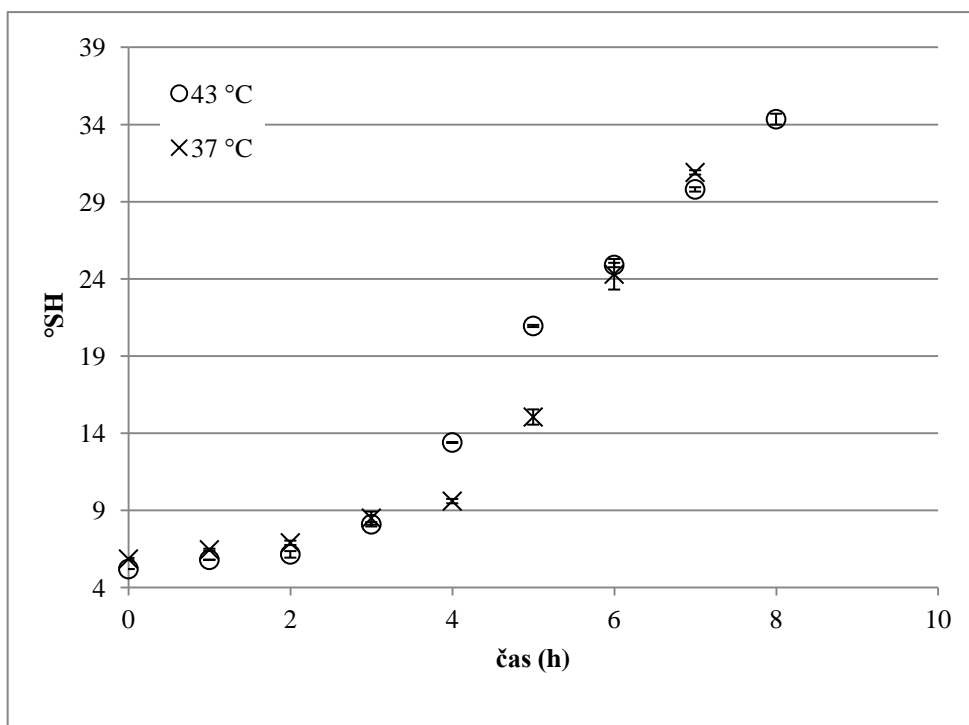
7.1.5 Mezofilní aromatická kultura YY-88

Kultura YY-88 je sice mezofilní, ale kromě mezofilních druhů obsahuje i bakterie termofilní, a proto pro ni byly zvoleny fermentační teploty 43 a 37 °C. Závislosti změny aktivní a titrační kyselosti na čase jsou pro obě kultivační teploty uvedeny na Obr. 15 a 16. Fermentace mléka probíhala při obou zvolených teplotách téměř stejně, což je jasně patrné z kysacích křivek. Fermentace při teplotě 37 °C byla ukončena o hodinu dříve (po uplynutí sedmi hodin), kdy průměrná hodnota pH byla 4,59 a TK 30,90 °SH. Pokles hodnot pH byl ze začátku fermentace velmi pozvolný, ke konci došlo k mírnému zrychlení. Hodnota °SH též ze začátku fermentace stoupala pozvolně, k výraznému zlomu došlo po uplynutí pěti hodin.

Fermentace při teplotě 43 °C trvala o hodinu déle. Izoelektrický bod byl překročen v čase osmi hodin, kdy průměrná hodnota pH byla 4,53 a TK 34,35 °SH. Nicméně již po 7 hodinách fermentace bylo pH 4,72 – tedy velmi blízké izoelektrickému bodu. Pokles pH byl pozvolný, hodnota TK výrazněji stoupala po čtyřech hodinách fermentace. Prakticky totožné průběhy kysacích křivek při 37 i 43 °C odpovídají výše zmíněnému zastoupení mezofilní i termofilní mikroflóry v kultuře.



Obr. 15 Závislost změny pH na čase působením mezofilní aromatické kultury YY-88

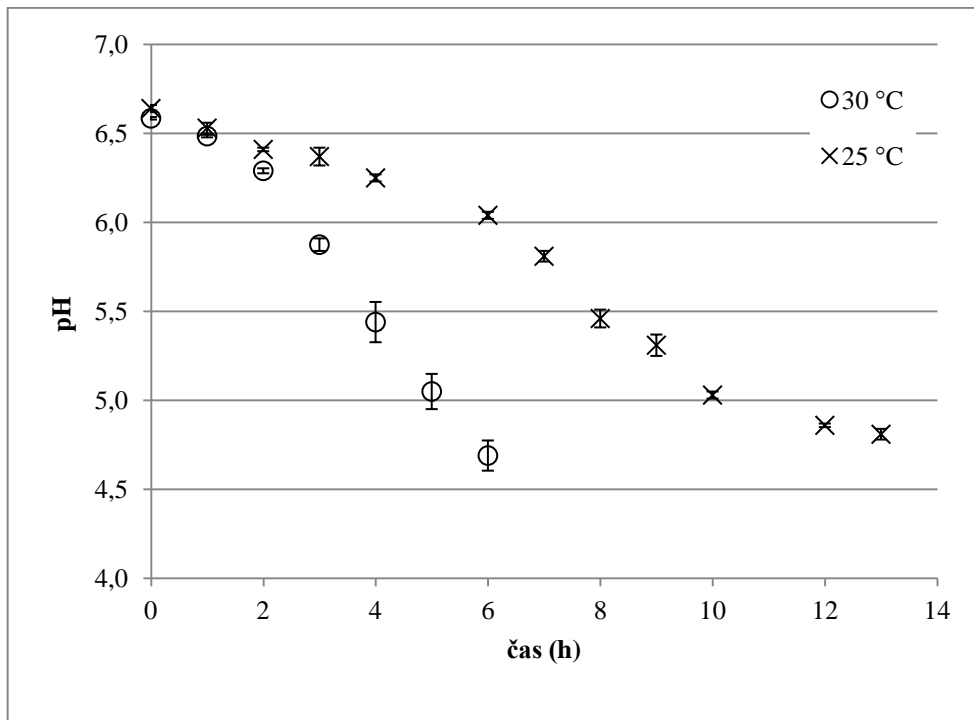


Obr. 16 Závislost změny $^{\circ}\text{SH}$ na čase působením mezofilní aromatické kultury YY-88

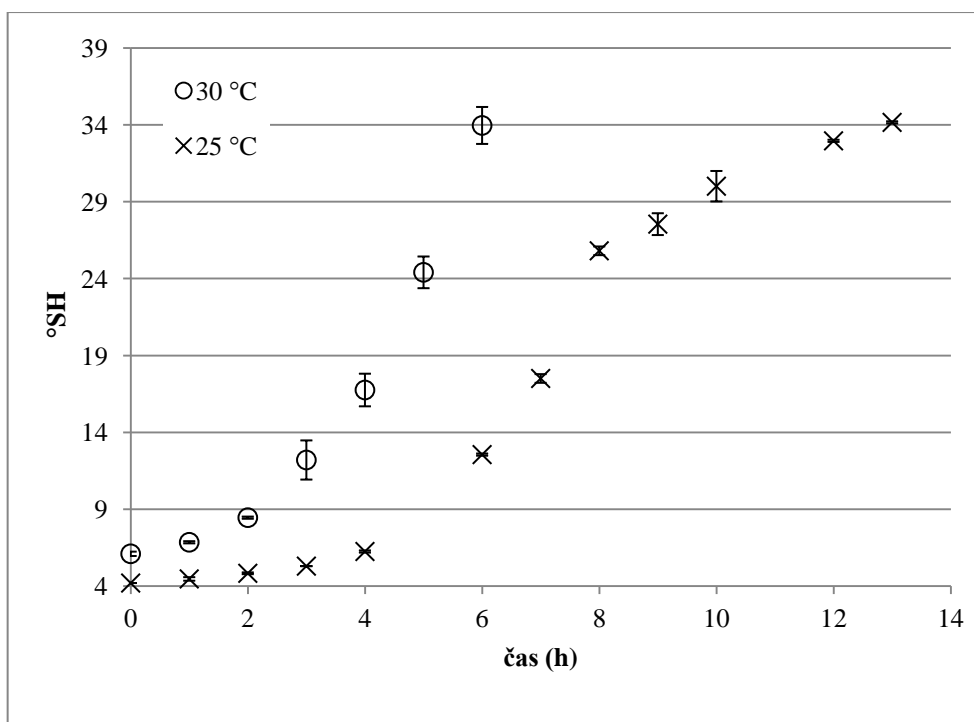
7.1.6 Mezofilní aromatická kultura CHN-22

Pro tuto kulturu byly vybrány fermentační teploty 30 a 25 °C. Závislosti změny aktivní a titrační kyselosti na čase jsou pro obě kultivační teploty uvedeny na Obr. 17 a 18. Ve vzorku mléka fermentovaném při teplotě 25 °C nebylo dosaženo izoelektrického bodu ani po uplynutí 13 hodin. V tomto okamžiku byla průměrná hodnota pH 4,81. Pokles hodnoty pH byl po celou dobu fermentace velmi pozvolný. Průměrná hodnota TK v době ukončení fermentace byla 34,2 °SH. Nárůst hodnoty °SH byl s porovnáním poklesem hodnoty pH progresivnější, zejména od 6. hodiny kultivace.

Naopak během fermentace mléka zaočkovaného mezofilní kulturou CHN-22 při teplotě 30 °C, bylo dosaženo izoelektrického bodu v čase šesti hodin. Průměrné pH v době ukončení fermentace byla 4,69 a hodnota TK 33,95 °SH. Hodnota pH během celé fermentace pozvolna klesala. Naopak hodnota °SH s přibývajícím časem stoupala výrazněji, hlavně po uplynutí tří hodin.



Obr. 17 Závislost změny pH na čase působením mezofilní aromatické kultury CHN-22



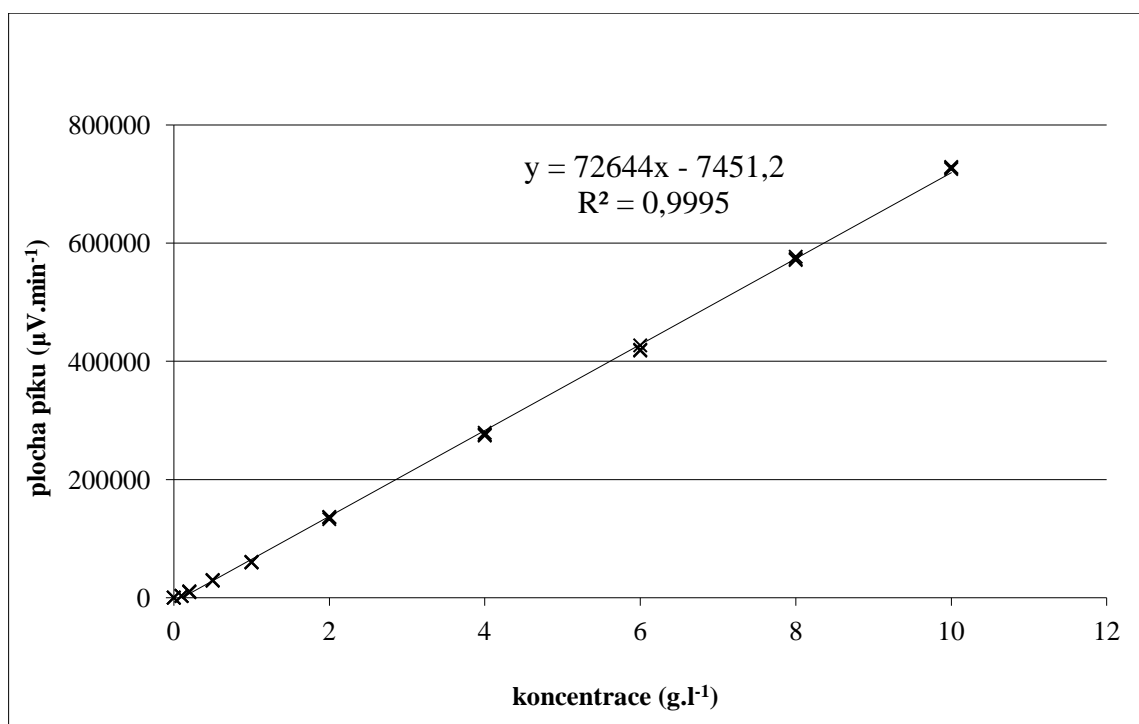
Obr. 18 Závislost změny °SH na čase působením mezofilní aromatické kultury CHN-22

7.2 Výsledky stanovení laktózy metodou HPLC-RI

V následující části experimentu byl sledován proces štěpení laktózy vlivem použitých kultur při dvou různých fermentačních teplotách. V průběhu experimentu bylo použito více šarží selského mléka, a to hlavně z důvodu krátké trvanlivosti a probíhajícího měření v průběhu několika týdnů. To může být důvodem, proč se počáteční obsahy laktózy v mléce liší (rozmezí 4,59 – 5,46 %, což je bráno jako běžný rozptyl v mléce).

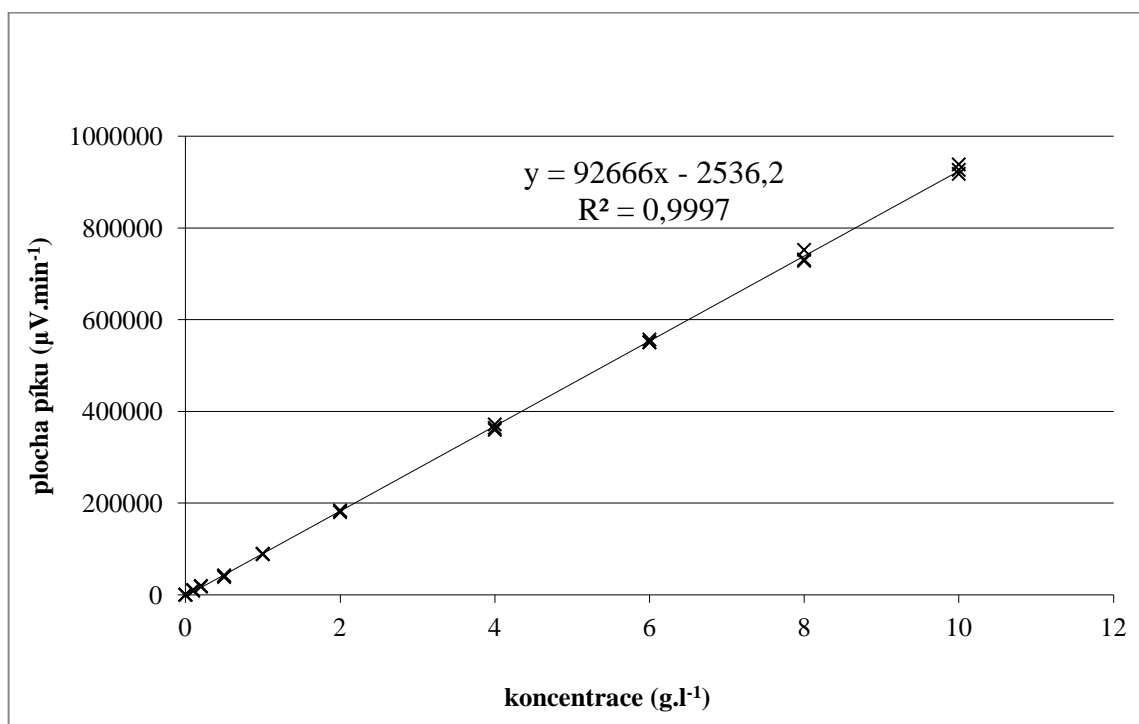
Fermentace je proces, při kterém dochází k přeměně části laktózy obsažené v mléku na kyselinu mléčnou a další sloučeniny, které dávají výrobku jeho charakteristické chuťové vlastnosti. V mléce působením vzniklé kyseliny mléčné dojde ke koagulaci bílkovin a k odštěpení vápníku vázaného na kasein, který se viditelně nesráží, ale bobtná. Vlivem kyseliny mléčné vzniká konzistence typická pro jogurt [8,18].

Získané hodnoty koncentrace laktózy obsažené ve vzorcích mléka, byly vypočítány pomocí rovnice kalibrační křivky, která je zobrazena na Obr. 19. Kalibrační křivka byla sestavena na základě závislosti ploch píků na koncentracích roztoků standardů [44].



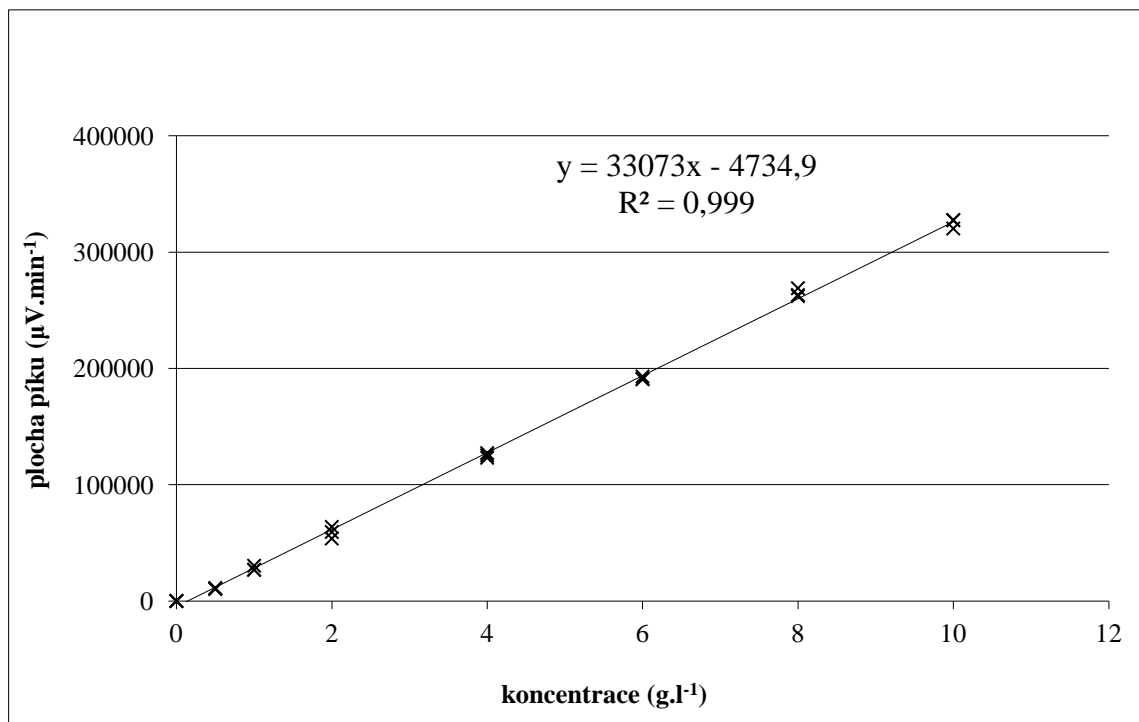
Obr. 19 Kalibrační křivka pro laktózu

Obsah volné glukózy a galaktózy ve vzorcích mléka ani v průběhu fermentace nebyl vůbec detekován. Množství těchto sacharidů bylo pravděpodobně pod mezí stanovitelnosti navržené metody. Kalibrační křivky byly ovšem stanoveny i pro tyto sacharidy a jsou uvedeny na Obr. 20 a 21. Ze všech 3 kalibračních přímek je patrné, že v rámci testovaných rozpětí koncentrací ($0,1 - 10 \text{ g.l}^{-1}$ pro laktózu a glukózu a $0,5 - 10 \text{ g.l}^{-1}$ pro galaktózu) byla závislost plochy píku na koncentraci lineární, čemuž odpovídají vysoké koeficienty determinace (min. 0,999).



Obr. 20 Kalibrační křivka pro glukózu

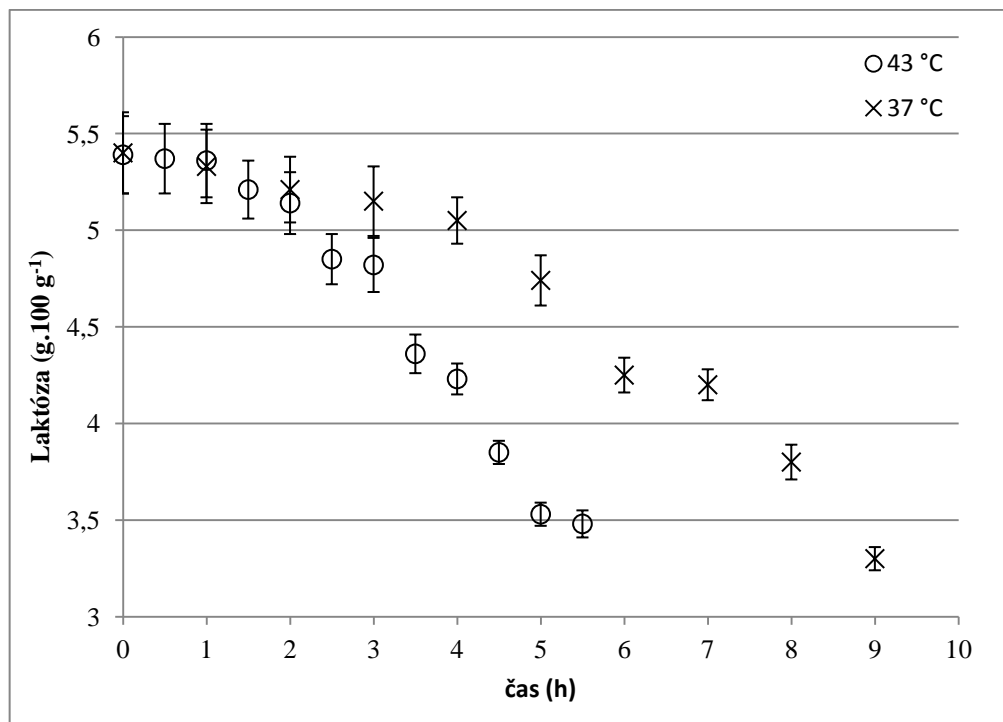
Obsah laktózy byl u každé fermentace stanoven jak v nezaočkovaném mléce, tak i v zaočkovaném v čase 0, ale vzhledem k tomu, že se získané výsledky od sebe prakticky nelišily, tak jsou v práci uvedeny pouze hodnoty v čase 0.



Obr. 21 Kalibrační křivka pro galaktózu

7.2.1 Jogurtová kultura Laktoflora

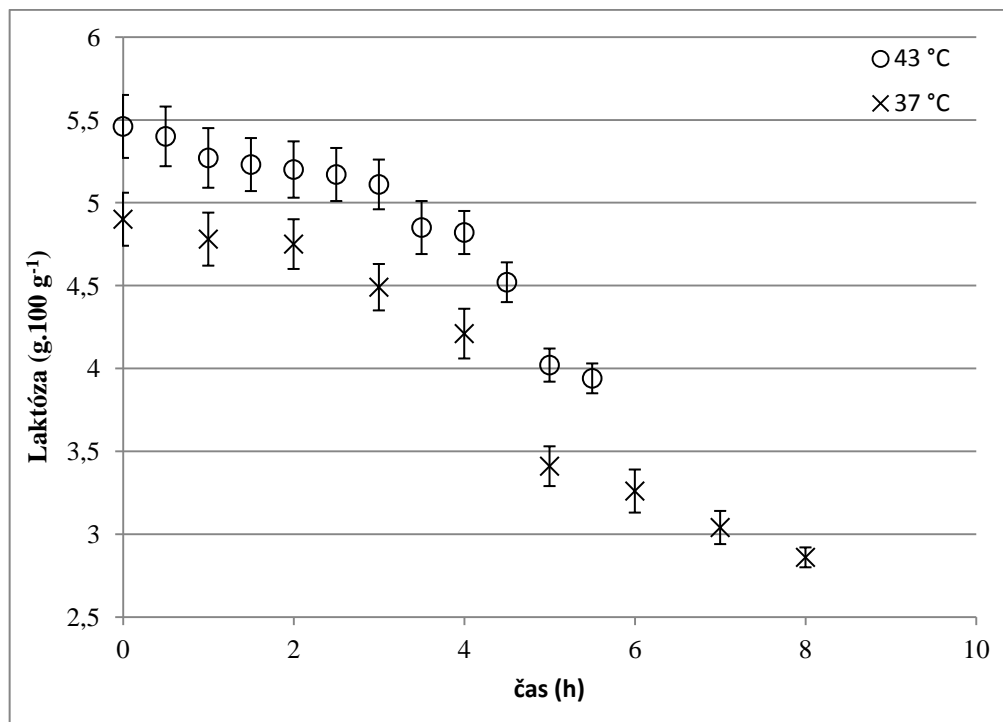
Mléko zaočkované kulturou Laktoflora vykazovalo rychlejší průběh procesu štěpení laktózy při vyšší teplotě (43 °C). Jak je vidět na Obr. 22, znázorňujícím závislost změny obsahu laktózy na čase pro obě kultivační teploty, mléko, které bylo fermentováno při teplotě 43 °C má výrazně nižší obsah laktózy v čase 5 hodin. V tomto čase při teplotě 37 °C byl obsah laktózy 4,74 g.100 g⁻¹ a při teplotě 43 °C 3,53 g.100 g⁻¹. Počáteční obsah laktózy byl u obou vzorků téměř stejný 5,39 g.100 g⁻¹ (43 °C) a 5,4 g.100 g⁻¹ (37 °C), ale konečný obsah se lišil. Vzorek mléka, u kterého probíhala fermentace po dobu 9 hodin při teplotě 37 °C, obsahoval v době dosažení izoelektrického bodu 3,3 g.100 g⁻¹ laktózy (o 39 % méně), zatímco druhý vzorek při teplotě 43 °C po 5,5 hodinách 3,48 g.100 g⁻¹ (úbytek o 35 %).



Obr. 22 Závislost změny obsahu laktózy na čase působením jogurtové kultury *Laktoflora*

7.2.2 Jogurtová kultura YB1

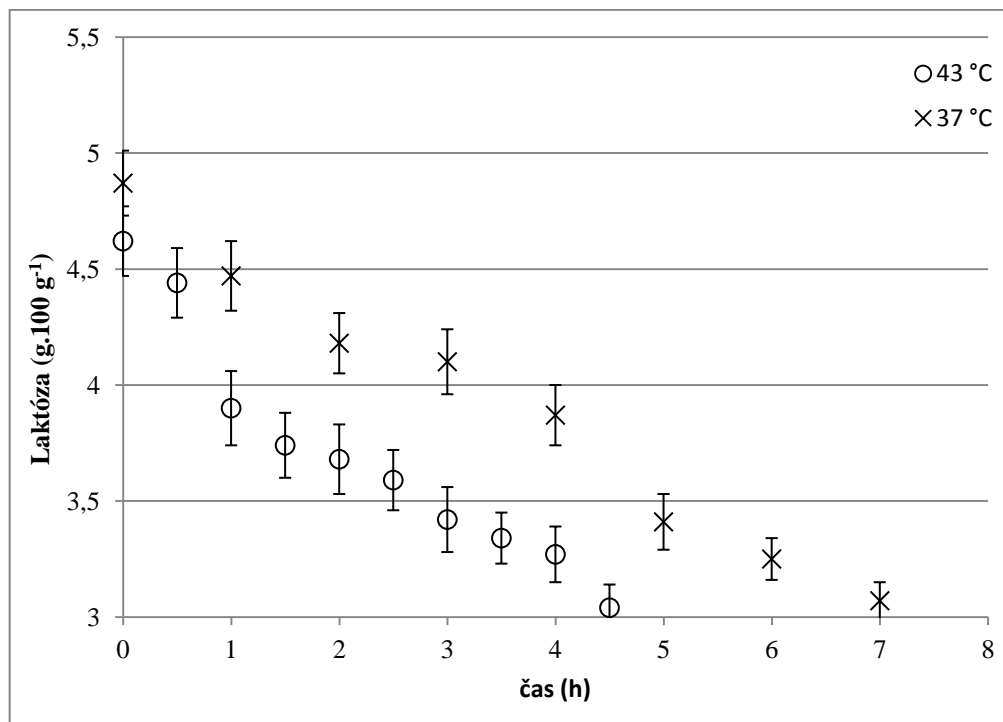
Proces fermentace mléka zaočkovaného kulturou YB1 probíhal při teplotě 37 °C a 43 °C. Počáteční obsah laktózy u mléka fermentovaného při teplotě 43 °C byl 5,46 g.100 g⁻¹ a u druhého mléka 4,9 g.100 g⁻¹ (fermentační teplota 37 °C). Závislost změny obsahu laktózy na čase je pro obě kultivační teploty uvedena na Obr. 23. Celková doba fermentace trvala déle při teplotě 37 °C, kde byl i celkově výraznější úbytek laktózy (42 %). Po osmi hodinách fermentace mléko obsahovalo pouze 2,86 g.100 g⁻¹ laktózy, z původního obsahu 4,9 g.100 g⁻¹. Konečný obsah laktózy v mléce, které bylo fermentováno při teplotě 43 °C, byl 3,94 g.100 g⁻¹, došlo tedy ke snížení obsahu laktózy o 28 %. Proces štěpení laktózy u vzorku mléka při teplotě 43 °C byl ze začátku velmi pomalý. Průběh kysacích křivek je u obou teplot velmi podobný.



Obr. 23 Závislost změny obsahu laktózy na čase působením jogurtové kultury YB1

7.2.3 Termofilní mléčná kultura TH-3

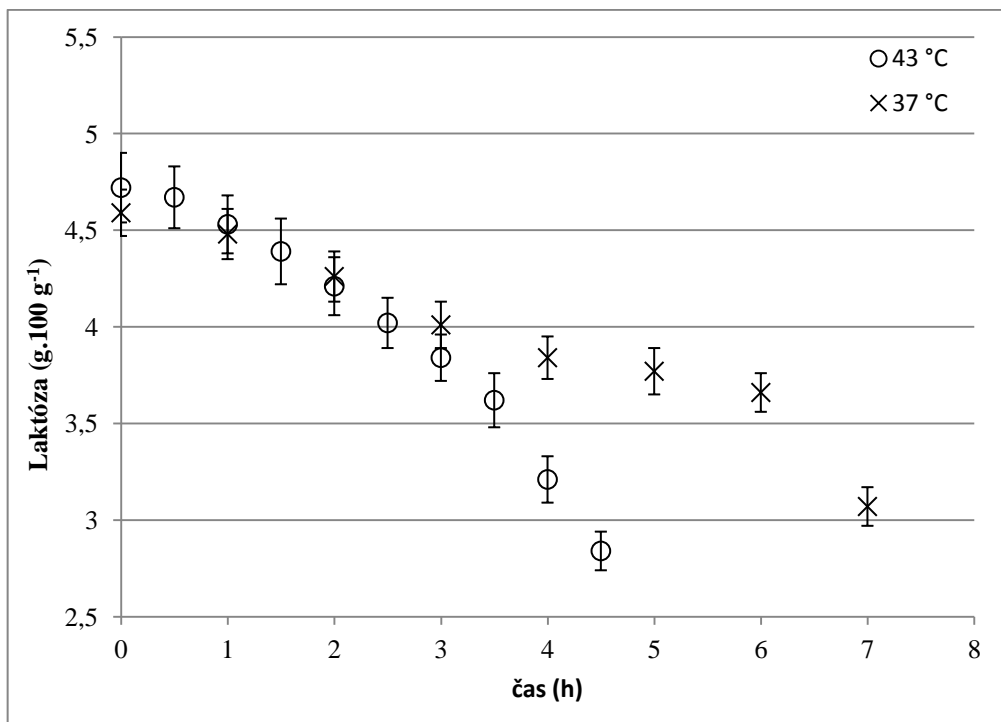
Počáteční obsah laktózy u mléka, zaočkovaného kulturou TH-3, byl $4,62 \text{ g.100 g}^{-1}$ (43°C) a $4,87 \text{ g.100 g}^{-1}$ (37°C). Závislost změny obsahu laktózy na čase je pro obě kultivační teploty uvedena na Obr. 24. Konečný obsah laktózy, stejně jako procentuální úbytek, byl u obou vzorků mléka téměř stejný, i když celková doba fermentace při zvolených teplotách se lišila o 2,5 hodiny. Mléko, fermentované při teplotě 43°C , v době dosažení izoelektrického bodu obsahovalo $3,04 \text{ g.100 g}^{-1}$ laktózy (což je o 34 % méně), druhý vzorek mléka při teplotě 37°C po sedmi hodinách fermentace obsahoval $3,07 \text{ g.100 g}^{-1}$ (o 37 % méně). Jak je na obrázku vidět, rozdíl v obsahu laktózy se pomalu zvyšoval ve stejných odběrových časech. Proces štěpení byl u obou vzorků konstantní s občasným výraznějším skokem.



Obr. 24 Závislost změny obsahu laktózy na čase působením termofilní mléčné kultury TH-3

7.2.4 Termofilní mléčná kultura LH-B02

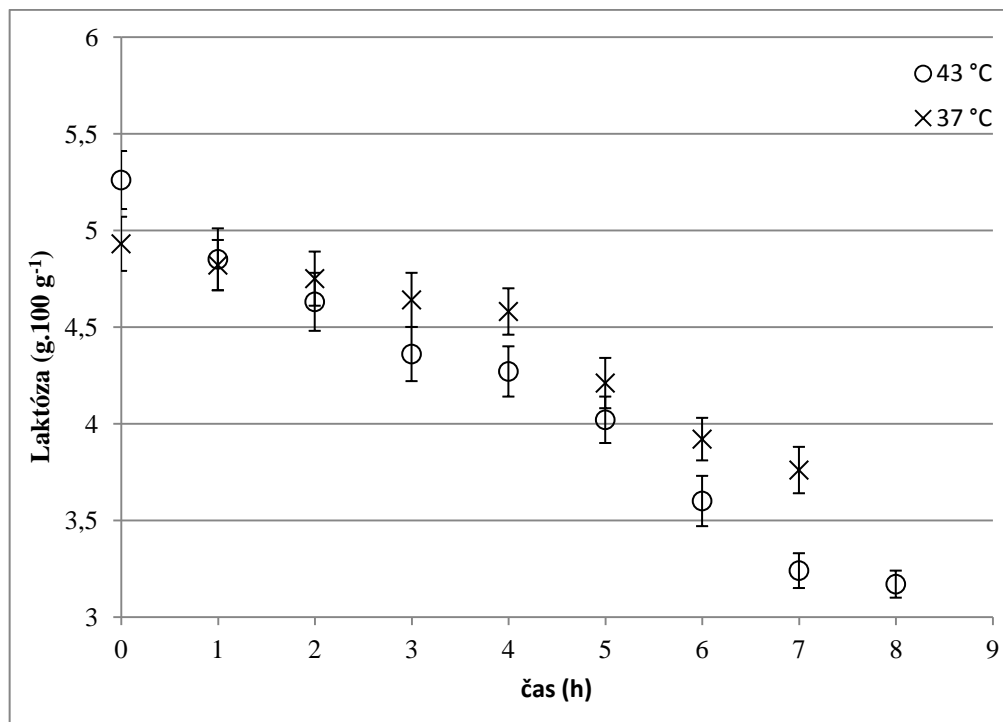
Proces fermentace mléka zaočkovaného kulturou LH-B02 probíhal při teplotě 37 °C a 43 °C, jako u předešlých vzorků. Jak je vidět na Obr. 25, znázorňující závislost změny obsahu laktózy na čase pro obě kultivační teploty, ve vzorku mléka, který byl fermentován při teplotě 43 °C, proběhl mnohem rozsáhlejší proces štěpení laktózy za kratší dobu, než u druhého vzorku. Počáteční obsah laktózy u mléka, zaočkovaného touto kulturou, byl 4,72 g.100 g⁻¹ (43°C) a 4,59 g.100 g⁻¹ (37 °C). U vzorku mléka fermentovaného při teplotě 43 °C se obsah laktózy snížil o 1,88 g.100 g⁻¹ (40 %), konečný obsah byl 2,84 g.100 g⁻¹. U druhého vzorku se po sedmi hodinách fermentace obsah snížil jen o 1,52 g.100 g⁻¹ laktózy (33 %) a konečný obsah byl 3,07 g.100 g⁻¹ laktózy. Proces štěpení laktózy u vzorku mléka při teplotě 37 °C byl velmi pomalý, zrychlení nastalo až v poslední hodině. Průběh kysací křivky (zejména ve 2. polovině) je výrazně odlišný od kysací křivky pro 43 °C.



Obr. 25 Závislost změny obsahu laktózy na čase působením termofilní mléčné kultury LH-B02

7.2.5 Mezofilní aromatická kultura YY-88

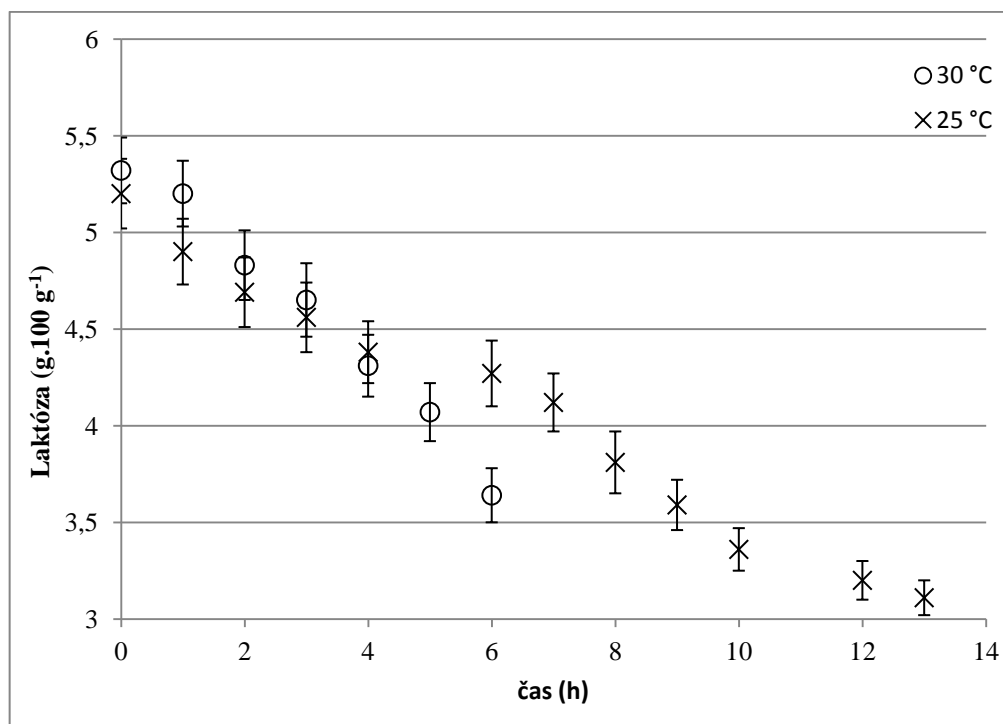
Proces štěpení laktózy v mléce, které bylo zaočkované kulturou YY-88 a fermentováno při teplotě 43 °C, byl rozsáhlejší než u mléka se stejnou kulturou při nižší teplotě (37 °C). Závislost změny obsahu laktózy na čase je pro obě kultivační teploty uvedena na Obr. 26. Celková doba fermentace byla o hodinu delší při teplotě 43 °C, ale úbytek laktózy byl výraznější. Z počáteční hodnoty 5,26 g.100 g⁻¹ laktózy byl obsah o 2,09 g.100 g⁻¹ (40 %) menší na konci fermentace. Při teplotě 37 °C bylo množství laktózy nižší pouze o 1,17 g.100 g⁻¹ (24 %) z původního obsahu 4,93 g.100 g⁻¹. S přibývajícím časem fermentace se proces štěpení laktózy zrychloval při obou kultivačních teplotách. Kysací křivky mají pro obě teploty velmi podobný průběh, což odpovídá i prakticky totožným závislostem aktivní a titrační kyselosti na čase (viz Obr. 15 a 16).



Obr. 26 Závislost změny obsahu laktózy na čase působením mezofilní aromatické kultury YY-88

7.2.6 Mezofilní aromatická kultura CHN-22

Vzorek mléka zaočkovaný kulturou CHN-22 vykazoval rychlejší průběh procesu štěpení laktózy při vyšší zvolené teplotě (30 °C). Jak je vidět na Obr. 27, znázorňujícím závislost změny obsahu laktózy na čase pro obě kultivační teploty, vzorek mléka, který byl fermentován při teplotě 30 °C, dosáhl po šesti hodinách fermentace téměř stejného obsahu laktózy jako vzorek, který byl fermentován při teplotě 25 °C v době devíti hodin. Počáteční obsah laktózy byl pro obě teploty podobný, a to 5,32 g.100 g⁻¹ (30 °C) a 5,2 g.100 g⁻¹ (25 °C). Rozdíl v konečném obsahu laktózy v mléce, při ukončení fermentace, byl už větší. Vzorek mléka, který byl fermentován při teplotě 30 °C, obsahoval po šesti hodinách fermentace 3,64 g.100 g⁻¹ laktózy, tj. o 32 % laktózy méně. Naproti tomu druhý vzorek, při fermentační teplotě 25 °C po 13 hodinách, obsahoval o 40 % laktózy méně (výsledný obsah byl 3,11 g.100 g⁻¹). Zatímco při 30 °C byl pokles obsahu laktózy poměrně prudký (téměř lineární), kysací křivka pro 25 °C má podstatně pozvolnější průběh.



Obr. 27 Závislost změny obsahu laktózy na čase působením mezofilní aromatické kultury CHN-22

7.3 Srovnání účinku použitých kultur

Během experimentu byly použity dva rozdílné typy mlékařských kultur s jinou optimální teplotou pro činnost mikroorganismů. Dvě jogurtové a 2 jednodmenové termofilní, pro které je vhodná inkubační teplota 43 – 45 °C a dvě mezofilní s teplotním optikem 20 – 40 °C [56]. Na rozkladu laktózy, změně aktivní a titrační kyselosti v mléčných výrobcích se především podílejí BMK. Působením BMK dochází ke štěpení disacharidu laktózy a jedním ze vznikajících metabolitů tohoto procesu je kyselina mléčná, která má vliv na celkové okyselování prostředí a s tím spojené snížení hodnoty pH. Souběžně se snižováním aktivní kyselosti dochází k postupnému nárůstu titrační kyselosti vlivem přítomných kyselin. Proces fermentace díky působením BMK má i vliv na celkový obsah laktózy ve fermentovaných mléčných výrobcích. S přibývajícím délkou fermentace se úměrně snižuje obsah laktózy ve výrobku [4,18].

Mléka, která byla zaočkována jogurtovými kulturami (Laktoflora, YB1), měla v obou případech rychlejší průběh fermentace při teplotě 43 °C. Zaznamenání izoelektrického bodu u jogurtové kultury Laktoflora trvalo při teplotě 43 °C o půl hodiny

méně, než při použití kultury YB1. Naopak při zvolené nižší teplotě 37 °C účinkem jogurtové kultury YB1 byla doba dosažení izoelektrického bodu kratší o dvě hodiny v porovnání s Laktoflorou. Největší úbytek laktózy byl zaznamenán u vzorku mléka, který byl zaočkován kulturou YB1 a fermentován při teplotě 37 °C (42 %). Naopak nejmenší úbytek byl zaznamenán u vzorku mléka zaočkovaného stejnou kulturou, ale fermentovaného při vyšší teplotě 43 °C (28 %). Zvolená nižší teplota 37 °C u obou kultur měla za následek větší úbytek laktózy.

U obou jednokmenových termofilních kultur (LH-B02 – *Lactobacillus helveticus* a TH-3 – *Streptococcus thermophilus*) byl zaznamenán nárůst TK při zvolených teplotách téměř stejný. Doba fermentace k dosažení izoelektrického bodu probíhala stejně dlouho. Jediný malý rozdíl byl v kultuře LH-B02, kde při zvolené teplotě 43 °C byla fermentace pomalejší o ½ hodiny než u druhé termofilní kultury při stejné teplotě. Úbytek laktózy byl u obou kultur v rozmezí 34 – 40 %. Nejrozsáhlejší proces štěpení laktózy proběhl u vzorku mléka zaočkovaného kulturou LH-B02 při teplotě 43 °C a naopak nejméně rozsáhlý proces byl u vzorku mléka zaočkovaného stejnou kulturou, ale fermentovaného při teplotě 37 °C.

Mezofilní kultury v porovnání s ostatními kulturami vždy vykazovaly pomalejší průběh fermentace mléka při zvolených teplotách. Mezofilní kultury prokázaly nejlepší účinek na fermentaci při teplotě 30 °C (CHN-22) a při teplotě 37 °C (YY-88), tedy vždy při vyšších kultivačních teplotách. Z toho je vidět, že nejvhodnější teplota pro optimální růst je 30 °C – 35 °C [56]. Příliš nízká teplota není vhodná. Mléko zaočkované mezofilní aromatickou kulturou CHN-22 mělo při zvolené teplotě 25 °C celkově nejpomalejší průběh fermentace, kde ani po uplynutí 13 hodin nebylo dosaženo izoelektrického bodu. I přesto, že mléko zaočkované kulturou CHN-22 při teplotě 25 °C mělo nejpomalejší průběh fermentace, u tohoto mléka došlo k největšímu snížení obsahu laktózy, a to o 40 %. Naopak nejmenší úbytek laktózy (24 %) byl zaznamenán u mléka fermentovaného při teplotě 37 °C a zaočkovaného kulturou YY-88.

Ačkoli u mezofilní kultury YY-88 byl zaznamenán rychlejší průběh fermentace při zvolené nižší teplotě (což ovšem mohlo být způsobeno rozdílnými počátečními obsahy laktózy), lze konstatovat, že fermentace byla obecně rychlejší u vyšší inkubační teploty.

Pokles aktivní kyselosti a nárůst titrační kyselosti byl u většiny kultur ze začátku pozvolný, což odpovídá lag-fázi mikroorganismů, s výraznějším zlomem po určité době fermentace.

BMK jsou používány jako „starterové kultury“ při výrobě fermentovaných potravinářských výrobků, především díky jejich metabolické aktivitě při přeměně bílkovin, cukrů a tuků, jejich schopnosti přispívat k lepší stravitelnosti potravin a jejich konzervaci. Stejně tak mají schopnost zlepšovat texturu a sensorický profil finálních produktů [27]. Jak je dokázáno v experimentu této diplomové práce, opravdu BMK mají velký vliv na vlastnosti fermentovaných mléčných výrobků. Při všech zvolených teplotách došlo ke změnám aktivní a titrační kyselosti, a také k úbytku laktózy. Aktivita BMK byla také poznat na vzhledu a aroma vzorků mléka v průběhu fermentace. S přibývajícím délkou fermentace získávaly výrobky pevnější konzistenci, byl patrný vznik gelu vlivem kyselého srážení. Vznikalo také výraznější aroma, charakteristické pro jogurt. Aroma bylo nejvýraznější u obou mezofilních kultur a také u obou jogurtových kultur a kultury TH-3, která je složkou jogurtových kultur. Všechny tyto kultury patří mezi aromatvorné. Naopak *Lactobacillus helveticus* (kultura LH-B02) výrazné aroma netvořil. Míra aktivity a růstu bakterií mléčného kvašení je závislá na produkci proteináz, peptidáz a specifických transportních systémů peptidů a aminokyselin [27].

Výsledky experimentu ukázaly, že zvolené jogurtové a termofilní kultury fermentovaly o něco více laktózy na kyselinu mléčnou, případně jiné metabolity (v obou případech průměrně 36 %), než použité mezofilní kultury, které metabolizovaly v průměru 34 % laktózy. Tato skutečnost je dána především zvolenými fermentačními teplotami v porovnání s teplotními optimy jednotlivých kultur. I přesto, že u kultury CHN-22 byly zvolené nižší fermentační teploty než u ostatních kultur.

Provedená extrakce sacharidů ze vzorků a následné čiření pomocí Carrezových činidel se ukázaly jako vhodný postup pro následné stanovení obsahu laktózy v kysaných mléčných výrobcích pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s refraktometrickou detekcí. Stanovení titrační kyselosti pomocí automatického titrátoru bylo oproti klasické titraci velmi rychlé.

I přesto, že ve zkoumaných vzorcích došlo ke snížení obsahu laktózy, stále by výrobky po ukončení fermentace (po dosažení izoelektrického bodu) nebyly vhodné pro jedince s intolerancí laktózy. V tomto případě by musela fermentace probíhat déle nebo by bylo potřeba doplnit proces fermentace i jinou metodou mající vliv na štěpení laktózy ve výrobku, tj. např. využití enzymu laktázy (β -galaktosidázy).

ZÁVĚR

Fermentované mléčné výrobky se řadí ze zdravotního a výživového hlediska mezi velmi cenné potraviny, které mají ve srovnání s mlékem mnoho předností. Obsažené bakterie mléčného kvašení mají velký vliv na celý výrobek i na zdraví konzumenta. Ovlivňují průběh fermentace, a tím spojené vlastnosti fermentovaného výrobku (konzistenci, aroma, chuť, složení a změnu aktivní a titrační kyselosti). Mezi jejich hlavní význam patří vliv na obsah laktózy ve fermentovaných mléčných výrobcích. Žádoucí změna obsahu laktózy v mléčných výrobcích se v poslední době stává jednou z hlavních problematik mlékárenského průmyslu. S přibývajícím nárůstem diagnostikované snížené vstřebatelnosti a intolerance laktózy roste na trhu poptávka po výrobcích se sníženým obsahem laktózy či úplně bezlaktózových výrobcích. V tomhle ohledu mohou fermentované mléčné výrobky uspokojit velkou část poptávky. Hlavním problémem je, že je velmi malá informovanost populace o účinku fermentovaných mléčných výrobků na zdraví populace a o možnosti sníženého obsahu laktózy v těchto výrobcích.

V rámci diplomové práce byl sledován účinek 6 bakteriálních kultur (2 jogurtových, 2 jednokmenových termofilních a 2 mezofilních) běžně používaných v mlékárenském průmyslu na průběh fermentace mléka. Při 2 inkubačních teplotách byl sledován pokles aktivní kyselosti, nárůst titrační kyselosti a zároveň úbytek obsahu laktózy. Délka fermentace (ukončená dosažením izoelektrického bodu) byla vždy kratší při vyšší kultivační teplotě (4,5 – 8 hod), pro nižší teplotu inkubace dosáhla 7 – 13 hod. Aktivní kyselost se snížila o 1,83 – 2,35, titrační kyselost se zvýšila o 23,8 – 29,95 °SH. Úbytek laktózy se pohyboval v rozmezí 24 – 42 %. K neúčinnějším kulturám je možné zařadit obě jednokmenové termofilní kultury, které při optimální inkubační teplotě vykazovaly nejrychlejší fermentaci (pouze 4,5 hodiny). Obě kultury také zapříčinily výrazné snížení obsahu laktózy (nad 30 %). Nejvyšší pokles laktózy byl ovšem zaznamenán u jogurtové kultury YB1 (42 %).

Dle mého názoru by bylo určitě zajímavé pokračovat v tomto tématu a nesledovat pouze úbytek laktózy během fermentace, ale i po ukončení fermentace. Lze očekávat, že snižování koncentrace laktózy ve výrobcích bude pokračovat i během skladování v lednici. Také by mohlo být zajímavé sledovat nejen úbytek laktózy během fermentace, ale i nárůst vznikající kyseliny mléčné.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BUŇKA, F., V. PACHLOVÁ, L. BUŇKOVÁ a M. ČERNÍKOVÁ. *Mlékárenská technologie I*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, Academia Centrum, 2013. ISBN 978-80-7454-254-1.
- [2] ČERNÁ, Marie. *Nutriční hodnota mléka a mléčných výrobků*. Praha: Středisko technických informací potravinářského průmyslu VÚPP, 1979.
- [3] HRABĚ, J., P. BŘEZINA a P. VALÁŠEK. *Technologie výroby potravin živočišného původu (bakalářský směr)*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, 2006. ISBN 80-7318-405-2.
- [4] SPREER, Edgar. *Milk and Dairy Product Technology*. New York: CRC Press, 1998. ISBN 0-8247-0094-5.
- [5] BŘEZINA, P., A. KOMÁR a J. HRABĚ. *Technologie, zbožíznalství a hygiena potravin živočišného původu, II. Část*. Vyškov: Vysoká vojenská škola pozemního vojska, 2001. ISBN 80-7231-079-8.
- [6] SMIT, Gerrit. *Dairy processing: Improving quality*. Boca Raton: CRC Press, 2003. ISBN 0-8493-1758-4.
- [7] MEURANT, Gerard. *Handbook of Milk Composition*. 2. vydání. USA: Academia Press, 1995. ISBN 0-12-384430-4.
- [8] ROBINSON, K. Richard. *Dairy Microbiology Handbook: The Microbiology of Milk and Milk Products*. 3rd Edition. New York: John Wiley & Sons, 2005. ISBN 0-471-38596-4.
- [9] GAJDŮŠEK, Stanislav. *Laktologie*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003. ISBN 80-7157-657-4.
- [10] COULTATE, P. Tom. *Food – The Chemistry of its Components*. 5th Edition. Cambridge: RSC Publishing, 2009. ISBN 978-0-85404-111-4.
- [11] ŠRÁMEK, Vratislav a Ludvík KOSINA. *Obecná a anorganická chemie*. 2. vydání. Olomouc: Fin Publishing, 2008. ISBN 80-718-2099-7.
- [12] MILLER, D. G., J. K. JARVIS a L. D. MCBEAN. *Handbook of Dairy Foods and Nutrition*. 3rd Edition. Boca Raton: CRC Press, 2006. ISBN 0-8493-2828-4.
- [13] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 1, 2, 3*. 2. upr. vydání. Tábor: Osis, 2002. ISBN 80-86659-03-8.

- [14] DAVÍDEK, J., J. HAJŠLOVÁ, J. POKORNÝ a J. VELÍŠEK. *Chemie potravin*. 2. vydání. Praha: VŠCHT, 1991. ISBN 80-7080-097-6.
- [15] GAJDŮŠEK, Stanislav a Vladimír KLÍČNÍK. *Mlékařství*. 2. vydání. Brno: Vysoká škola zemědělská, 1993. ISBN 80-7157-073-7.
- [16] KUČERA, Jiří. *Význam mléka a mléčných výrobků ve výživě člověka*. Brno, 2008. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Fakulta sportovních studií.
- [17] JIRCOVÁ, Petra. *Mléko a mléčné výrobky jako zdroj cenných živin pro obyvatele ČR*. České Budějovice, 2014. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.
- [18] JANŠTOVÁ, B., L. VORLOVÁ, P. NAVRÁTILOVÁ, M. KRÁLOVÁ, L. NECIDOVÁ a E. MAŘICOVÁ. *Technologie mléka a mléčných výrobků*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2012. ISBN 978-80-7305-637-7.
- [19] MUEHLHOFF, E., A. BENNETT a D. MCMAHON. Milk and Dairy Products in Human Nutrition. In: *FAO* [online]. Řím, 2013 [cit. 2015-01-05]. Dostupné z: <http://www.fao.org/docrep/018/i3396e/i3396e.pdf>.
- [20] KADLEC, Pavel. *Technologie potravin I, II*. Praha: VŠCHT, 2002. ISBN 80-7080-509-9, ISBN 80-7080-510-2.
- [21] ČESKO. Vyhláška ze dne 1. července 2003, kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje, v platném znění. In: *Sbírka právních předpisů 77/2003 Sb.* 2003. Dostupné také z: <http://www.esipa.cz/sbirka/sbsrv.dll/sb?DR=SB&CP=2003s077&prsmscode=SMI TIYXN>.
- [22] BABIČKA, Luboš. Průvodce světem potravin, rady spotřebitelům, na co si dát pozor při nakupování a manipulaci s potravinami. In: *Bezpečnost potravin* [online]. Praha: Ministerstvo zemědělství, 2012 [cit. 2015-01-20]. Dostupné z: http://www.bezpecnostpotravin.cz/UserFiles/publikace/Pr%C5%AFvodce_sv%C4%9Btem_potravin-web.pdf.
- [23] A-Z Slovník pro spotřebitele, Fermentované mléčné výrobky. In: *Bezpečnost potravin* [online]. Praha: Ministerstvo zemědělství [cit. 2014-12-02]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/92467.aspx>.
- [24] ŠUSTOVÁ, Květoslava a Vladimír SÝKORA. *Mlékárenská technologie*. Brno: Mendelova univerzita, 2013. ISBN 978-80-7375-704-5.

- [25] LUKÁŠOVÁ, Jindra. *Hygiena a technologie mléčných výrobků*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2001. ISBN 80-7305-415-9.
- [26] Zdravý životní styl, Potravinová pyramida. In: *Foodnet* [online]. Praha: Potravinářská komora České republiky, 2012 [cit. 2014-11-20]. Dostupné z: <http://zdravi.foodnet.cz/cze/pages/potravinova-pyramida.html>.
- [27] LEGAROVÁ, Veronika. *Posouzení kvality sladké syrovátky vzhledem k možnosti využití pro potravinářské účely*, Praha, 2011. Disertační práce. Česká zemědělská univerzita v Praze, fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, katedra kvality zemědělských produktů.
- [28] PLOCKOVÁ, M., P. KADLEC, K. MELZUCH a M. VOLDŘICH. *Technologie potravin: Co byste měli vědět o výrobě potravin?* Ostrava: Key Publishing, 2009. ISBN 978-80-7418-051-4.
- [29] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2. přeprac. vydání. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- [30] ČEGAN, Alexander a Lucie KORECKÁ. *Biochemie pro bakalářské studium chemie a technické chemie*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2008.
- [31] FELLNEROVÁ, Ivana. Sacharidy přehled. In: *UPOL* [online]. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2010 [cit. 2014-12-16]. Dostupné z: http://www.zoologie.upol.cz/osoby/fellnerova/pdf_nuevo/Sacharidyprehled2010_3.pdf.
- [32] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-0600-1.
- [33] KUBÁŇ, Vlastimil a Petr KUBÁŇ. *Analýza potravin*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007. ISBN 978-80-7375-036-7.
- [34] DAVÍDEK, Jiří a kol. *Laboratorní příručka analýzy potravin*. 2. vydání. Praha: SNTL, 1981.
- [35] RAESSLER, Michael. Sample preparation and current applications of liquid chromatography for the determination of non-structural carbohydrates in plants. *Trends in Analytical Chemistry*. 2011, roč. 30, č. 11, s. 1833-1843. ISSN 0165-9936.
- [36] SANZ, M. a I. MARTÍNEZ-CASTRO. Recent developments in sample preparation for chromatographic analysis of carbohydrates. *Journal of Chromatography A*, 2007, roč. 1153, č. 1-2 s. 74-89. ISSN 0021-9673.

- [37] HÁLKOVÁ, J., J. RIEGLOVÁ a M. RUMÍŠKOVÁ. *Kvantitativní chemická analýza*. 2. vydání. Újezd u Brna: I. Straka, 2001. ISBN 80-86494-01-2.
- [38] DAVÍDEK Jiří a Jan VELÍŠEK. *Analýza potravin*. Praha: VŠCHT, 1992. ISBN 80-7080-163-8.
- [39] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Praha: Europrint, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [40] SÝKORA, D. a J. FÄHNRIICH. Kapalinová chromatografie a absorpční UV spektrofotometrie. In: *VŠCHT* [online]. Praha: VŠCHT, [cit. 2014-12-10]. Dostupné z: http://old.vscht.cz/anl/lach1/6_LC.pdf.
- [41] CVAČKA, Josef. Instrumentace pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografi. In: Univerzita Karlova v Praze [online]. Praha: Univerzita Karlova v Praze, 10.11.2010 [cit. 2014-12-10]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc2.pdf>.
- [42] MOLDOVEANU, C. Serban a Victor DAVID. *Essentials in modern HPLC Separations*. Waltham: Elsevier, 2013. ISBN 978-0-12-385013-3.
- [43] DOUŠA, Michal. *Česká chromatografická škola – HPLC 2015* [online]. [cit. 2015-01-06]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/>.
- [44] CHURÁČEK Jaroslav a Pavel JANDERA. *Separace látek: kapalinová vysokoúčinná kolonová chromatografie*. 2. vydání. Praha: SNTL, 1986.
- [45] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Praha: Europrint, 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.
- [46] ŠTULÍK, Karel a kol. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0852-9.
- [47] MILCOLM. *Aplikační list ke kultuře Laktoflora*.
- [48] MICROMILK. *Aplikační list ke kultuře YB1*.
- [49] CHR. HANSEN. *Aplikační list ke kultuře TH3*.
- [50] CHR. HANSEN. *Aplikační list ke kultuře LH-B02*.
- [51] CHR. HANSEN. *Aplikační list ke kultuře YY-88*.
- [52] CHR. HANSEN. *Aplikační list ke kultuře CHN-22*.
- [53] BŘEZINA, Pavel a Jaroslav JELÍNEK. *Chemie a technologie mléka*. Praha: VŠCHT, 1990. ISBN 80-7080-075-5.

- [54] ŠEBELA, F., B. DUŠEK a J. PAVEL. *Mlékařství*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1964.
- [55] ČERNÁ, Eva a Zdeněk CVAK. *Analytické metody pro mléko a mlékárenské výrobky. Díl 1., Chemie*. Praha: Výzkumný ústav potravinářského průmyslu, 1987.
- [56] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. opr. a dopln. vydání. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BMK	Bakterie mléčného kvašení.
CAD	Charged Aerosol Detector / Aerosolový detektor nabitých částic.
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector / Odpařovací detektor rozptylu světla.
HILIC	Hydrophilic interaction chromatography / Hydrofilní interakční chromatografie.
HPLC	High Performance Liquid Chromatography / Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.
IEC	Ion-exclusion chromatography / Iontově výměnná chromatografie.
MS	Mass Spectrometry / Hmotnostní spektrometrie.
NMR	Nuclear Magnetic Resonance / Nukleární magnetická rezonance.
RID	Refractive Index Detector / Refraktometrický detektor.
SEC	Size-exclusion chromatography / Molekulová vylučovací chromatografie.
TK	Titrační kyselost.
UV-VIS	Ultraviolet-visible spectrophotometry / Ultrafialová-viditelná spektrofotometrie.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1	Průměrné složení kravského mléka (v hm. %) [3]	15
Obr. 2	Rozdělení a zastoupení základních dusíkatých látek kravského mléka [9]	16
Obr. 3	Zastoupení lipidů v mléce [11]	17
Obr. 4	Schéma výroby fermentovaných mléčných výrobků [28]	28
Obr. 5	Schéma kapalinového chromatografu [41]	39
Obr. 6	Schéma deflexního refraktometrického detektoru [44]	42
Obr. 7	Závislost změny pH na čase působení jogurtové kultury Laktoflora	54
Obr. 8	Závislost změny °SH na čase působení jogurtové kultury Laktoflora	55
Obr. 9	Závislost změny pH na čase působení jogurtové kultury YB1	56
Obr. 10	Závislost změny °SH na čase působení jogurtové kultury YB1	56
Obr. 11	Závislost změny pH na čase působení termofilní mléčné kultury TH3	57
Obr. 12	Závislost změny °SH na čase působení termofilní mléčné kultury TH3	58
Obr. 13	Závislost změny pH na čase působení termofilní mléčné kultury LH-B02	59
Obr. 14	Závislost změny °SH na čase působení termofilní mléčné kultury LH-B02	59
Obr. 15	Závislost změny pH na čase působení mezofilní aromatické kultury YY- 88	60
Obr. 16	Závislost změny °SH na čase působení mezofilní aromatické kultury YY- 88	61
Obr. 17	Závislost změny pH na čase působení mezofilní aromatické kultury CHN- 22	62
Obr. 18	Závislost změny °SH na čase působení mezofilní aromatické kultury CHN-22	62
Obr. 19	Kalibrační křivka pro laktózu	63
Obr. 20	Kalibrační křivka pro glukózu	64
Obr. 21	Kalibrační křivka pro galaktózu	65
Obr. 22	Závislost změny obsahu laktózy na čase působení jogurtové kultury Laktoflora	66
Obr. 23	Závislost změny obsahu laktózy na čase působení jogurtové kultury YB1	67
Obr. 24	Závislost změny obsahu laktózy na čase působení termofilní mléčné	

kultury TH-3	68
Obr. 25 Závislost změny obsahu laktózy na čase působením termofilní mléčné kultury LH-B02	69
Obr. 26 Závislost změny obsahu laktózy na čase působením mezofilní aromatické kultury YY-88	70
Obr. 27 Závislost změny obsahu laktózy na čase působením mezofilní aromatické kultury CHN-22	71

SEZNAM TABULEK

Tab. 1	Obsah vitaminů v kravském mléce [16]	19
Tab. 2	Obsah hlavních minerálních látek v mléce [9]	20
Tab. 3	Rozdělení HPLC detektorů [39]	41
Tab. 4	Vlastnosti RI detektoru [43]	42

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: Členění mléka a mléčných výrobků dle vyhlášky č. 77/2003 na druhy, skupiny a podskupiny [21]	85
--	----

**PŘÍLOHA P I: ČLENĚNÍ MLÉKA A MLÉČNÝCH VÝROBKŮ DLE
VYHLÁŠKY Č. 77/2003 NA DRUHY, SKUPINY A PODSKUPINY [21]**

Druh	Skupina	Podskupina
Mléko	tekuté	odtučněné nebo odstředěné částečně odtučněné nebo polotučné plnotučné plnotučné selské nestandardizované
	zahuštěné	odtučněné, slazené nebo neslazené částečně odtučněné nebo polotučné slazené nebo neslazené plnotučné, slazené nebo neslazené
	sušené	odtučněné částečně odtučněné nebo polotučné plnotučné
Smetana	tekutá	ke šlehání vysokotučná
	zahuštěná	
	sušená	
Kysaný mléčný výrobek	jogurt	nízkotučný nebo odtučněný se sníženým obsahem tuku smetanový
	jogurtové mléko	
	acidofilní mléko	
	kefír	
	kefírové mléko	
	kysané mléko nebo smetanový zákys	
	kysaná nebo zakysaná smetana	
	kysané podmáslí	
	kysaný mléčný výrobek s bifido kulturou	
Mléčný výrobek tepelně ošetřený po kysacím procesu		

Mléčný výrobek obohacený přídavkem mlékařské kultury		
Máslo mlékárenské a koncentráty mléčného tuku	máselný tuk nebo mléčný tuk bezvodý	
	máselný koncentrát	
	čerstvé máslo	
	máslo	
	máslo stolní	
	máslo se sníženým obsahem tuku	
	máslo s nízkým obsahem tuku nebo nízkotučné	
Složený mléčný výrobek	mléčný roztíratelný tuk (máselný přípravek)	
	mléčný roztíratelný tuk se sníženým obsahem tuku	
	mléčný roztíratelný tuk nízkotučný	
	máslo s přídavkem alkoholu	
Tvaroh	měkký nebo odtučněný nízkotučný nebo jemný polotučný tučný	termizovaný
	tvrdý na strouhání ke strouhání	
Sýr	přírodní	nezrající terminovaný
		zrající zrající pod mazem zrající v celé hmotě s plísní na povrchu s plísní uvnitř hmoty dvouplísňový v solném nálevu, bílý
		extra tvrdý (ke strouhání)
		tvrdý

		polotvrdý poloměkký měkký
	tavený	nízkotučný (roztíratelný) vysokotučný (roztíratelný)
	syrovátkový	
Bílkovinný mléčný výrobek	kasein potravinářský	kyselý sladký
	kaseinát potravinářský	
	mléčná bílkovina	