

Stanovenie riboflavínu v kvasniciach metódou HPLC

Zuzana Kožáková

Bakalárska práca
2007



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav potravinářského inženýrství
akademický rok: 2006/2007

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Zuzana KOŽÁKOVÁ**
Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Stanovení riboflavinu v kvasnicích metodou HPLC**

Zásady pro vypracování:

- 1. zpracovat fyziologii vitamínu B2 a teorii kapalinové chromatografie**
- 2. optimalizovat izolační postup vitamínu B2 z kvasnic**
- 3. stanovit vitamín B2 metodou HPLC**

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Dle doporučení vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Daniela Kramářová, Ph.D.

Ústav potravinářského inženýrství a chemie

Datum zadání bakalářské práce:

8. ledna 2007

Termín odevzdání bakalářské práce:

4. června 2007

Ve Zlíně dne 2. května 2007

Ignác Hoza

prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
děkan



Ignác Hoza

prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
ředitel ústavu

ABSTRAKT

Cieľom tejto práce bola optimalizácia izolačného postupu riboflavínu z droždia a následné stanovenie jeho obsahu v droždí metódou HPLC s UV/VIS detekciou. Obsah riboflavínu bol stanovený v droždí čerstvom a následne boli sledované zmeny obsahu riboflavínu v droždí skladovanom na svetle pri laboratórnej teplote a v tme pri 7°C po 7 a 14 dňoch.

Kľúčové slová: riboflavín, vitamín B₂, chromatografia, HPLC, droždie

ABSTRACT

The aim of this work was to optimize isolation process of riboflavin from yeast, followed by determination of amount of riboflavin in yeast by HPLC with UV/VIS detection. The amount of riboflavin was determined in fresh yeast and then changes were monitored in amount of riboflavin in yeast after subject to light at laboratory temperature and in the dark at 8°C after 7 and 14 days.

Keywords: riboflavin, vitamin B₂, chromatography, HPLC, yeast

Ďakujem vedúcej mojej bakalárskej práce Ing. Daniele Kramárovej, Ph.D. za odborné vedenie, rady a všetky zodpovedané otázky týkajúce sa danej problematiky. Ďalej ďakujem Ing. Magde Hábovej a Jaroslave Živočkej za venovaný čas a ochotu pri meraní praktickej časti bakalárskej práce.

OBSAH

| | |
|--|-----------|
| ÚVOD | 8 |
| I TEORETICKÁ ČASŤ | 9 |
| 1 VITAMÍNY | 10 |
| 1.1 FUNKCIE VITAMÍNOV A DÔSLEDKY ICH NEDOSTATKU | 10 |
| 1.2 VÝSKYT VITAMÍNOV A FAKTORY PÔSOBIACE NA ICH OBSAH V POTRAVINÁCH | 10 |
| 2 RIBOFLAVÍN | 11 |
| 2.1 ŠTRUKTÚRA RIBOFLAVÍNU..... | 11 |
| 2.2 VLASTNOSTI RIBOFLAVÍNU | 12 |
| 2.3 VÝSKYT RIBOFLAVÍNU..... | 13 |
| 2.4 FYZIOLOGIA RIBOFLAVÍNU | 13 |
| 2.5 ZMENY MNOŽSTVA RIBOFLAVÍNU V POTRAVINÁCH PRI SKLADOVANÍ A SPRACOVANÍ..... | 14 |
| 3 MOŽNOSTI STANOVENIA RIBOFLAVÍNU | 15 |
| 4 VYSOKOÚČINNÁ KVAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIA (HPLC) | 16 |
| 4.1 PRINCÍP CHROMATOGRAFICKÝCH METÓD | 16 |
| 4.2 KLASIFIKÁCIA CHROMATOGRAFICKÝCH METÓD | 16 |
| 4.3 PREDNOSTI HPLC | 17 |
| 4.4 PRINCÍP HPLC | 17 |
| 4.4.1 Mechanizmus sorpčných chromatografických procesov..... | 17 |
| 4.5 PRÍSLUŠENSTVO HPLC | 18 |
| 5 DROŽDIE | 21 |
| II PRAKTICKÁ ČASŤ | 25 |
| 6 METODIKA PRÁCE | 26 |
| 6.1 MATERIÁL | 26 |
| 6.2 POUŽITÉ POMÔCKY A PRÍSTROJE..... | 26 |
| 6.3 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE | 27 |
| 6.4 ANALÝZA VZORIEK DROŽDIA..... | 27 |
| 6.4.1 Extrakcia riboflavínu zo vzorky pekárskeho droždia..... | 27 |
| 6.4.2 Stanovenie obsahu riboflavínu vo vzorke droždia metódou HPLC | 28 |
| 6.4.3 Meranie kalibračnej krivky pre stanovenie riboflavínu metódou HPLC | 28 |
| 6.4.4 Metóda vnútorného štandardu | 28 |
| 7 VÝSLEDKY | 29 |

| | | |
|-----|--|-----------|
| 7.1 | OPTIMALIZÁCIA IZOLAČNÉHO POSTUPU VITAMÍNU B ₂ Z DROŽDIA..... | 29 |
| 7.2 | VÝSLEDKY MERANIA KALIBRAČNEJ KRIVKY PRE STANOVENIE RIBOFLAVÍNU METÓDOU HPLC | 29 |
| 7.3 | VÝSLEDKY STANOVENIA OBSAHU RIBOFLAVÍNU V ČERSTVOM DROŽDÍ METÓDOU HPLC | 31 |
| 7.4 | VÝSLEDKY STANOVENIA OBSAHU RIBOFLAVÍNU V DROŽDÍ PO 7 DŇOCH SKLADOVANIA V TME A CHLADE METÓDOU HPLC | 33 |
| 7.5 | VÝSLEDKY STANOVENIA OBSAHU RIBOFLAVÍNU V DROŽDÍ PO 7 DŇOCH SKLADOVANIA NA SVETLE A TEPLE METÓDOU HPLC..... | 34 |
| 7.6 | VÝSLEDKY STANOVENIA OBSAHU RIBOFLAVÍNU V DROŽDÍ PO 14 DŇOCH SKLADOVANIA V TME A CHLADE METÓDOU HPLC | 35 |
| 7.7 | VÝSLEDKY STANOVENIA OBSAHU RIBOFLAVÍNU V DROŽDÍ PO 14 DŇOCH SKLADOVANIA NA SVETLE A TEPLE METÓDOU HPLC..... | 36 |
| 7.8 | VÝSLEDKY ZÍSKANÉ MERANÍM VZORKY ČERSTVÉHO DROŽDIA S PRÍDAVKOM ŠTANDARDU METÓDOU HPLC | 37 |
| | ZÁVER | 40 |
| | ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY | 42 |
| | ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK..... | 44 |
| | ZOZNAM OBRÁZKOV | 45 |
| | ZOZNAM TABULIEK | 46 |
| | ZOZNAM PRÍLOH..... | 47 |

ÚVOD

Organizmus získava energiu a látky potrebné pre jeho výstavbu a fyziologické funkcie prostredníctvom potravy. Popri základných živinách, ako sú proteíny, lipidy a sacharidy, sú neodmysliteľnou súčasťou našej stravy i vitamíny. Heterotrofný organizmus ich nie je sám schopný syntetizovať (niekedy iba v obmedzenej miere), musia byť teda dodávané zvonku. Vitamíny plnia mnoho rôznorodých funkcií, predovšetkým ako kofaktory enzýmov katalyzujú biochemické reakcie, iné plnia napríklad funkciu antioxidantov. Riboflavín je vitamín skupiny B rozpustný vo vode. V biochemických systémoch sa vyskytuje ako voľný i viazaný ako súčasť flavínových enzýmov, vo forme dvoch kofaktorov, FMN a FAD. Tie sú ako súčasť enzýmov v dýchacom reťazci nevyhnutné pre základný bunkový metabolizmus, zúčastňujú sa metabolizmu sacharidov, lipidov i aminokyselín.

Poznanie nutričných faktorov našej stravy umožňuje optimálne zostavenie nášho jedálnička pre zachovanie zdravia, vitality, všetkých životných i reprodukčných funkcií, vrátane dobrého stavu kože, vlasov a nechtov. Sledovaním zmien obsahu riboflavínu pri skladovaní a spracovaní dostávame informácie o jeho stabilite a tým i návod, ako sa týmto stratám vyvarovať. Riboflavín je veľmi citlivý na svetlo, práca s ním teda musí prebiehať za zníženého prístupu svetla. Stanovenie riboflavínu pozostáva z jeho extrakcie zo vzorky a uvoľnení z bielkovinového nosiča kyslou či enzymatickou hydrolyzou a následné stanovenie vybranou metódou. Vďaka rýchlosti, presnosti a nízkej spotrebe vzorky je stále používanjšou metódou HPLC. Princípom tejto chromatografickej metódy je delenie extraktu na základe rozdielnej adsorpcie a veľkosti molekúl jednotlivých zložiek a následné stanovenie najčastejšie pomocou spektrofotometrického alebo fluorescenčného detektora.

Popri mlieku, mäse, vajciach či cereáliach je významným zdrojom riboflavínu i droždie. Množstvo riboflavínu v droždí uvádzané v tabuľkách je $20,8 \text{ mg.kg}^{-1}$. Cieľom tejto bakalárskej práce je optimalizácia izolačného postupu riboflavínu z droždia a následné stanovenie jeho obsahu v droždí metódou HPLC s UV/VIS detekciou. Následne budú porovnané hodnoty obsahu riboflavínu v droždí čerstvom a skladovanom na svetle pri laboratórnej teplote a v tme pri 8°C po 7 a 14 dňoch. Vzhľadom k nízkej stabilite vitamínu B_2 na svetle sa predpokladá, že jeho obsah bude s rastúcou dobou vystavenia slnečnému žiareniu klesať. Za podmienok skladovania v tme pri 8°C by mal zotrvať obsah riboflavínu v skladovanom droždí nezmenený.

I. TEORETICKÁ ČASŤ

1 VITAMÍNY

Potrava obsahuje okrem základných živín veľké množstvo ďalších látok, z ktorých mnohé majú zásadný nutričný význam. K nim patria aj vitamíny, exogénne esenciálne nízkomolekulárne organické zlúčeniny. Heterotrofný organizmus si ich nedokáže sám syntetizovať (niekedy iba v obmedzenej miere) a keďže sú pre jeho život nevyhnutné, musia byť dodávané zvonku.

1.1 Funkcie vitamínov a dôsledky ich nedostatku

Vitamíny zaraďujeme medzi biokatalyzátory, ktoré v organizme vykonávajú vopred dané riadiace a regulačné funkcie. Nie sú pre organizmus ani zdrojom energie, ani stavebnými jednotkami tkanív. V živých objektoch plnia významnú úlohu prekursorov kofaktorov rôznych enzýmov, uplatňujú sa v oxidačne – redukčných systémoch alebo plnia iné rozmanité funkcie. Nedostatok vitamínov sa u živých objektov prejavuje rôznymi poruchami, ktoré v ľahšej forme označujeme ako hypovitaminóza a v ťažšej forme ako avitaminóza. [1]

1.2 Výskyt vitamínov a faktory pôsobiace na ich obsah v potravinách

V potravinách sa vitamíny vyskytujú v množstve od $\mu\text{g.kg}^{-1}$ po stovky až tisíce mg.kg^{-1} podľa druhu vitamínu, ročného obdobia, druhu potraviny a spôsobu jej spracovania. Vyskytujú sa voľné alebo viazané na zložky potravín, hlavne na sacharidy a proteíny. [1]

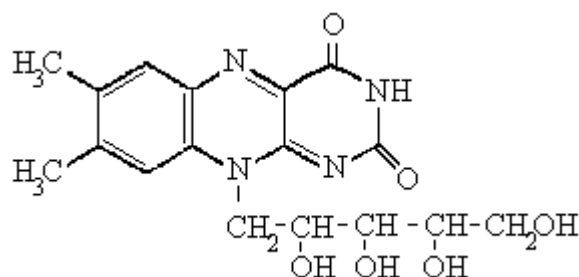
Na obsah vitamínov vplyva u potravín živočíšneho pôvodu skladovanie a spracovanie surovín, u potravín rastlinného pôvodu stupeň zrelosti, klimatické podmienky v priebehu rastu a hnojenie. Väčšina vitamínov je teda citlivá na fyzikálne a chemické vplyvy, patria medzi labilné zložky potravín. Táto vlastnosť je z potravinárskeho hľadiska veľmi dôležitá, pretože obsah vitamínov v potravinách alebo surovinách je indikátorom kvality a šetrnosti technologických postupov pri výrobe a vhodnosti podmienok skladovania surovín a hotových výrobkov. [2]

Vitamíny sú chemicky veľmi rozmanité látky, neexistujú medzi nimi žiadne štruktúrne vzťahy, podľa ktorých by mohli byť klasifikované. Dôležitým rozlišovacím znakom vitamínov je však ich rozpustnosť, podľa ktorej je možné vitamíny rozlíšiť na rozpustné vo vode (hydrofilné, príloha P I) a rozpustné v tukoch (lipofilné, príloha P II). [3]

2 RIBOFLAVÍN

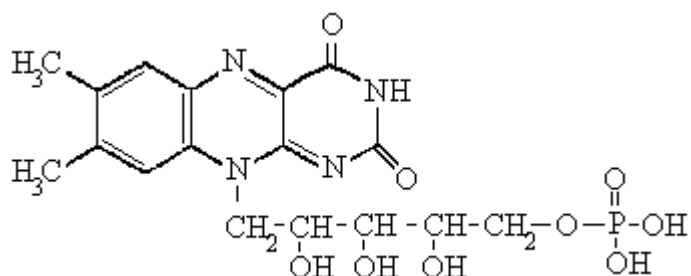
2.1 Štruktúra riboflavínu

Riboflavín patrí do skupiny látok, ktoré sa nazývajú flavíny. Je to žltozelená kryštalická látka, ktorej vodné roztoky majú schopnosť fluorescence. Vo vode sa rozpúšťa v malej miere, ľahko sa rozpúšťa vo vodných roztokoch alkalických hydroxidov. Základom štruktúry riboflavínu je izoalloxazínové jadro, na ktorý je viazaný ribitol, alditol odvodený od D-ribózy. Po chemickej stránke je riboflavín 7,8-dimetyl-10-(-1-D-ribityl)izoalloxazín. [1,3]

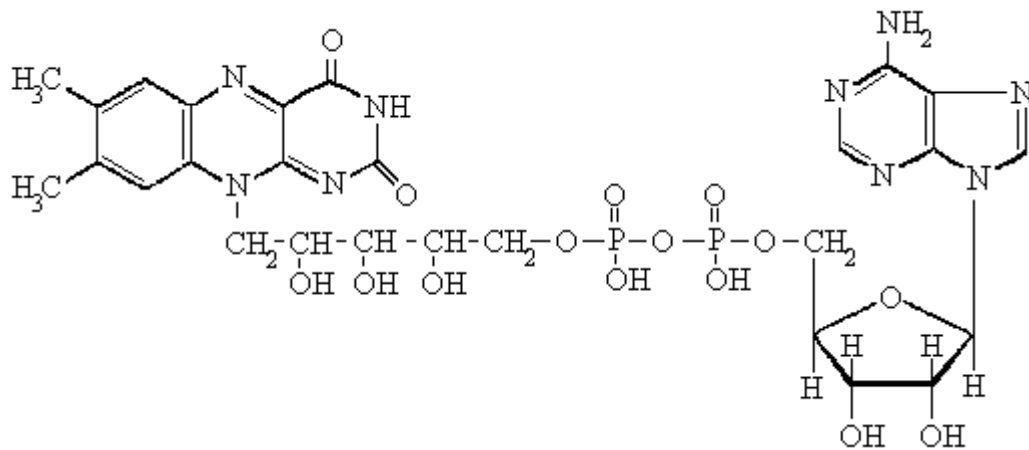


Riboflavín

Riboflavín sa vyskytuje v biochemických systémoch vo forme koenzýmov oxido-redukčných enzýmov (flavínové enzýmy), najbežnejšími sú flavínmononukleotid FMN a flavínadenínukleotid FAD. Zúčastňuje sa teda oxidačne - redukčných reakcií, kedy pri redukcii prijíma dva atómy vodíka za vzniku dvojitej väzby, pričom sa mení na bezfarebný leukoriboflavín, na vzduchu dochádza k jeho spätnej oxidácii. [1]



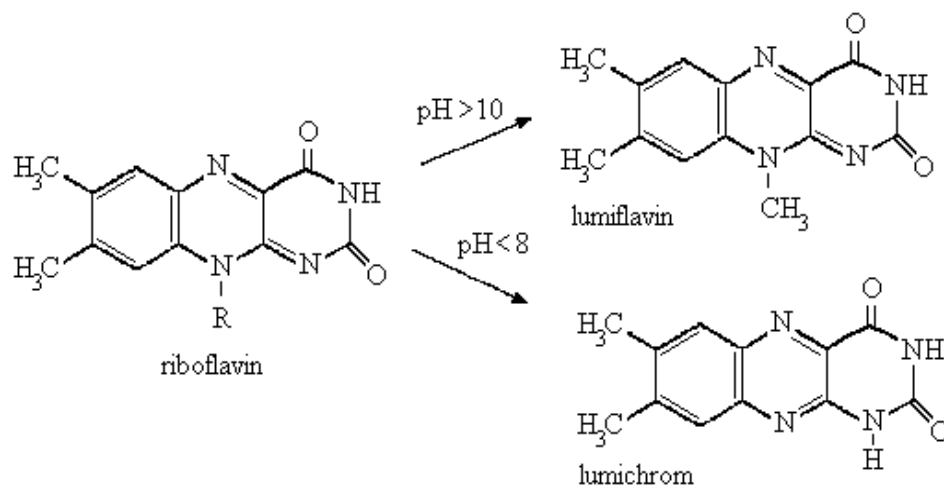
Flavínmononukleotid, FMN



Flavínadeníndinukleotid, FAD

2.2 Vlastnosti riboflavínu

Riboflavín je pomerne značne stály voči teplu, predovšetkým v kyslých roztokoch. V neutrálnych a alkalických roztokoch je veľmi labilný a rozkladá sa za vzniku fyziologicky neúčinných rozkladných produktov. Je citlivý predovšetkým na svetelné žiarenie, vplyvom UV lúčov sa v neutrálnom alebo kyslom prostredí rozkladá na lumichróm a v alkalickom prostredí na lumiflavín. Degradačné produkty riboflavínu spôsobujú rozsiahlu deštrukciu vitamínu C a oxidáciu retinolu, esenciálnych mastných kyselín a esenciálnych aminokyselín. [2]



Obr. 1. Fotolýza riboflavínu

2.3 Výskyt riboflavínu

Voľný riboflavín sa vyskytuje iba v očnej sietnici, srvátke a moči. V potravinách sa vyskytuje viazaný na ich zložky, najčastejšie bielkoviny. Najbohatším zdrojom riboflavínu je pečeň, mlieko a mliečne výrobky, obličky, srdce, drożdžie, vajcia a mäso, obsahujú ho i niektoré druhy zeleniny, v menšej miere chlieb a cereálne výrobky. Riboflavín je taktiež obsiahnutý vo významnej miere v pive, až $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$. Odhaduje sa, že takmer 40 % vitamínu B₂ získaného potravou zaisťuje mlieko a mliečne výrobky, 20% mäso a mäsové výrobky, 15% cereálie, 10% vajcia a taktiež 10% zelenina. Riboflavín je oveľa lepšie vstrebateľný z potravín živočíšneho pôvodu než z potravín rastlinného pôvodu, kde prevládajú kovalentne viazané formy ťažko štiepiteľné *proteázami*. [1,2,4]

Riboflavín sa pridáva do niektorých potravín, ako sú múka a raňajkové cereálie, za účelom fortifikácie. Používa sa aj na farbenie niektorých potravín, napríklad cereálnych výrobkov. Tetrabutyrát riboflavínu bol použitý ako antioxidant. [2]

Tab. 1. Obsah riboflavínu vo vybraných potravinách [5]

| Potravina | Obsah riboflavínu [mg.kg ⁻¹] | Potravina | Obsah riboflavínu [mg.kg ⁻¹] |
|-----------------------|---|---------------------|---|
| bravčové mäso priemer | 1,760 | makrela | 3,520 |
| hovädzie mäso predné | 1,550 | eidamská tehla 45 % | 3,620 |
| hovädzia pečeň | 29,480 | vajce slepačie | 3,300 |
| bravčová pečeň | 26,000 | fazuľa | 2,410 |
| ľadviny hovädzie | 20,010 | drożdžie | 20,800 |
| ľadviny bravčové | 17,720 | pivo svetlé 10° | 0,600 |
| kurence | 1,690 | pivo tmavé 10° | 0,900 |

2.4 Fyziológia riboflavínu

Riboflavín patrí k vitamínom rozpustným vo vode, v tele sa teda uskladňuje len na krátky čas, a preto je potrebné ho dopĺňať. Vstrebáva sa veľmi dobre, viaže sa na proteíny plazmy. Malá časť sa ukladá v pečeni a pľúcach, nadbytok sa z tela vylučuje močom (spôsobuje jeho žlté zafarbenie). Riboflavín, ako súčasť enzýmov v dýchacom reťazci lokalizovanom v mitochondriách, je nevyhnutný pre základný bunkový metabolizmus, má výrazný vplyv na metabolizmus sacharidov, lipidov a aminokyselín a ovplyvňuje celkovú energetickú

premenu v organizme. V organizme sa zúčastňuje aj na procese videnia tak, že premieňa krátkovlnné modré lúče na žltozelené, a tým umožňuje videnie za šera. Okrem toho bola dokázaná účasť riboflavínu na metabolizme ostatných vitamínov skupiny B (pyridoxín, niacín) a v produkcii hormónov v nadobličkách. Riboflavín je dôležitý pre dobrý stav kože, očí, obnovu červených krviniek, funkciu srdca, reguláciu rastu človeka a reprodukciu. [1,6]

Nedostatok vitamínu (hypovitaminóza) bol najčastejšie zistený u vegetariánov, vegánov, osôb ktoré nekonzumujú dostatok mlieka a mliečnych výrobkov, môže byť spôsobený aj stresom organizmu, ochoreniami štítnej žľazy a zápalmi tenkého čreva. Hypovitaminóza vzniká pri nedostatočnom príjme riboflavínu po dobu dlhšiu než 100 dní. Prejavuje sa hlavne zápalovými zmenami kože a slizníc. Denná potreba riboflavínu sa pohybuje od 1,4 do 1,8 mg na deň. [1]

Tab. 2. Návrh výživových doporučených dávok z roku 1999 pre dospelé obyvateľstvo vo veku 19 až 59 rokov ľahko a stredne pracujúce [7]

| Ukazateľ | Jednotka | Ľahko pracujúci | | Stredne ťažko pracujúci | |
|------------------------|----------|-----------------|------|-------------------------|------|
| | | Muži | Ženy | Muži | Ženy |
| Vitamín B ₂ | mg | 1,6 | 1,4 | 1,8 | 1,6 |

2.5 Zmeny množstva riboflavínu v potravinách pri skladovaní a spracovaní

Bežné spôsoby úpravy stravy ako je varenie a pečenie neovplyvňujú vo veľkej miere obsah vitamínu v potravine, ku stratám dochádza až po ožarovaní potravín UV žiarením alebo pri vystavení potravín dennému svetlu. Významnejšie straty riboflavínu sú pri varení cestovín (podľa druhu 35–55 %) a pri varení zeleniny (30–40 %). Pokiaľ je spracovanie surovín prevádzané v podmienkach s obmedzeným prístupom svetla, straty riboflavínu sa znižujú. Straty možno znižovať i obmedzením dĺžky blanširovania pred spracovaním zeleniny, uchovávaním potravín vo vhodných nepriehľadných alebo farebných obaloch a nevystavovaním potravín priamemu slnečnému žiareniu. U mlieka vystaveného slnečnému žiareniu po dobu dvoch hodín dochádza k stratám 20–40 %. [1,2]

3 MOŽNOSTI STANOVENIA RIBOFLAVÍNU

Riboflavín je veľmi citlivý na svetlo, preto je nutné ho stanovovať za zníženého prístupu denného svetla. Stanovenie riboflavínu pozostáva z dvoch častí: najskôr je nutná extrakcia vitamínu z potravy spojená s eventuálnym prečistením a až potom nasleduje jeho vlastné stanovenie.

Na stanovenie riboflavínu sa používa fluorometrická metóda založená na stanovení lumiflavínu, ktorý vzniká fotolýzou riboflavínu v alkalickom prostredí. Pri tejto metóde sa riboflavín zo vzorky uvoľní kyslou alebo enzymatickou hydrolýzou. Po zalkalizovaní sa riboflavín ožiari a vzniknutý lumiflavín sa po extrakcii chloroformom stanoví fluorometricky. Metóda je vhodná pre všetok potravinársky materiál rastlinného i živočíšneho pôvodu. [8]

V dnešnej dobe stále častejšie používanou metódou je vďaka rýchlosti, presnosti a nízkej spotrebe vzorky metóda HPLC. Po extrakcii vitamínu zo vzorky potravín dochádza k chromatografickému rozdeleniu extraktu na základe rozdielnej adsorpcie a veľkosti molekúl jednotlivých zložiek a následné stanovenie riboflavínu najčastejšie pomocou spektrofotometrického alebo fluorescenčného detektoru.

Na stanovenie riboflavínu sa môže použiť i metóda polarografická, menej spoľahlivé výsledky môžeme dosiahnuť i použitím mikrobiologických testov.

4 VYSOKOÚČINNÁ KVAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIA (HPLC)

4.1 Princíp chromatografických metód

Chromatografia je separačná analytická metóda slúžiaca na separáciu a analýzu zložitých zmesí. Jej základným princípom je rozdeľovanie zložiek zmesi medzi mobilnú a stacionárnu fázu. Delenie zložiek vzorky je založené na tom, že rýchlosť pohybu jednotlivých rozpustených molekúl kolónou alebo tenkou vrstvou sorbentu je priamo závislá na rozdelení týchto molekúl medzi mobilnú a stacionárnu fázu. Rozdeľovacia konštanta každej zložky určuje jej zastúpenie v mobilnej fáze v ktorejkoľvek dobe a teda i celkový čas, po ktorý táto zložka zotrúva v stacionárnej fáze (retenčný čas). Ak sú rozdiely v selektívnom spomalení významné, každá zložka sa bude pohybovať kolónou rôznou rýchlosťou závislou na jej sorpčných vlastnostiach. Zložky teda opúšťajú kolónu v rôznom časovom intervale, čo spôsobí ich rozdelenie a umožní ich detekciu. V chromatografii preteká mobilná fáza cez fázu stacionárnu. Plocha styku oboch fáz by mala byť čo najväčšia, na nej prebieha záchyt (retencia) látok unášaných mobilnou fázou a desorpcia zachytenej látky zo stacionárnej fázy späť do prúdiaceho média. Kvapalina teda tečie medzi drobnými zrnkami sorbentu v trubici (kolónové usporiadanie) alebo medzi celulózovými vláknami napríklad v papieri (plošné usporiadanie). Mobilná fáza je pohyblivá fáza chromatografického systému a môže ňou byť buď plyn alebo kvapalina. Stacionárna fáza je nepohyblivá a je ňou tuhá látka alebo film kvapaliny zakotvený na tuhej látke. [9,10,11]

4.2 Klasifikácia chromatografických metód

Podľa typu mobilnej fázy sa chromatografické metódy delia na:

- plynovú chromatografiu (Gas Chromatography, GC) – mobilnou fázou je nosný plyn,
- fluidnú chromatografiu (Fluid Chromatography) – mobilnou fázou je látka v nadkritickom stave,
- plazmovú chromatografiu (Plasma Chromatography) – mobilnou fázou je prúd iónov,
- kvapalinovú chromatografiu, ktorú ďalej môžeme deliť na:

- sorpčnú chromatografiu – separácia sa uskutočňuje špecifickými interakciami nenabitých častíc s povrchom adsorbenta (Liquid–Solid Chromatography, LSC) alebo so stacionárnou fázou nanosenou na nosiči
- rozdeľovaciu (absorpčnú) chromatografiu (Liquid Chromatography, LLC). Patrí sem aj vysokoúčinná sorpčná kvapalinová chromatografia (High Performance Liquid Chromatography, HPLC),
- gélovú (permeačnú) chromatografiu (Gelpermeation Chromatography, GPC) – rozdeľovanie látok prebieha v póroch gélu podľa rozmerov častíc,
- iónovo-výmennú chromatografiu (Ion–Exchange Chromatography, IEC) – rozdelenie iónov spôsobujú interakcie nabitých častíc s nabitým nosičom. [9,10]

4.3 Prednosti HPLC

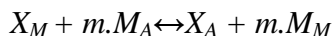
Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia zastáva významné miesto medzi chromatografickými metódami. Výhodou tejto metódy je schopnosť rozdeliť a kvantitatívne stanoviť desiatky až stovky zložiek vzorky, rýchlosť a reprodukovateľnosť rozdelenia, malá spotreba vzorky a možnosť automatizácie. Umožňuje separovať aj termolabilné kvapalné a tuhé látky a jej výhodou je presnosť pri kvantitatívnej analýze. [12]

4.4 Princíp HPLC

Chromatografiu je možné definovať ako migračný proces, v ktorom sú molekuly zložiek vzorky selektívne spomaľované stacionárnou fázou. Pri sorpčnej kvapalinovej chromatografii majú rozhodujúcu úlohu rozdiely v adsorpčných energiách funkčných skupín na povrchu adsorbenta a v rozpustnosti zložiek v stacionárnej fáze. Rozdiely v sorpcii alebo vo veľkosti rozdeľovaných molekúl zapríčínajú rozdielnu rýchlosť pohybu jednotlivých druhov molekúl v kolóne, ich rozdielnu retenciu a tým ich rozdelenie. [12]

4.4.1 Mechanizmus sorpčných chromatografických procesov

Pri adsorpčnej chromatografii prebiehajú špecifické interakcie na povrchu adsorbenta (nosiča). Vzorka a mobilná fáza sú v dynamickej rovnováhe pri obsadzovaní povrchu adsorbenta. Tento konkurenčný proces zapríčiní rozdelenie látky medzi nosiča a mobilnú fázou podľa schémy:



kde X_A , X_M sú koncentrácie vzorky na povrchu adsorbenta a v mobilej fáze

M_A , M_M - koncentrácie mobilnej fázy v eluáte a na povrchu adsorbenta

m - počet molekúl mobilnej fázy desorbovaných z povrchu adsorbenta

adsorpciou molekúl zložky X.

Pre rovnovážny stav platí:
$$K_A = \frac{X_A \cdot M_M}{X_M \cdot M_A}$$

kde K_A je distribučná konštanta (rozdeľovací koeficient).

Pohyb mobilnej fázy porušuje statickú rovnováhu, maximum koncentrácie zložky vzorky X sa pohybuje v smere pohybu mobilnej fázy. Rýchlosť pohybu závisí od vlastností vzorky, mobilnej fázy a adsorbenta.

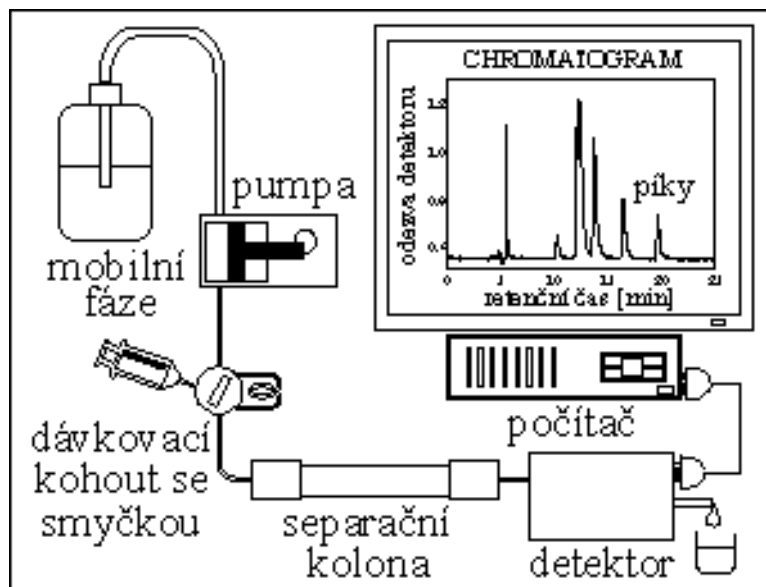
Pri separácii rozdeľovacou (absorpčnou) chromatografiou sa molekuly vzorky rozdelia medzi dve nemišateľné kvapaliny, z ktorých jedna je eluent a druhá je fyzikálne alebo chemicky viazaná na vhodný adsorbent (nosič) a nazýva sa stacionárna fáza. Pre

distribučnú konštantu platí:
$$K_R = \frac{X_S}{X_M}$$

kde X_M a X_S sú koncentrácie zložky v mobilnej a stacionárnej fáze. [12]

4.5 Príslušenstvo HPLC

HPLC je kvapalinovou chromatografiou, kde je mobilnou fázou kvapalina a stacionárnou fázou je film príslušnej látky zakotvený na povrchu nosiča alebo pevný adsorbent. Prístroj, na ktorom sa robia HPLC analýzy sa nazýva kvapalinový chromatograf. Skladá sa z častí, ktoré zabezpečujú transport kvapaliny, rozdeľovanie zmesi a detekciu zložiek. Hlavné súčasti moderného HPLC chromatografu zoradené za sebou tak, ako nimi postupne preteká mobilná fáza: zásobník mobilnej fázy, pumpa, zariadenie na dávkovanie vzorky, kolóna, detektor spojený s počítačom. [9,10]



Obr. 2. Kvapalinový chromatograf [13]



Obr. 3. HPLC HP 1100

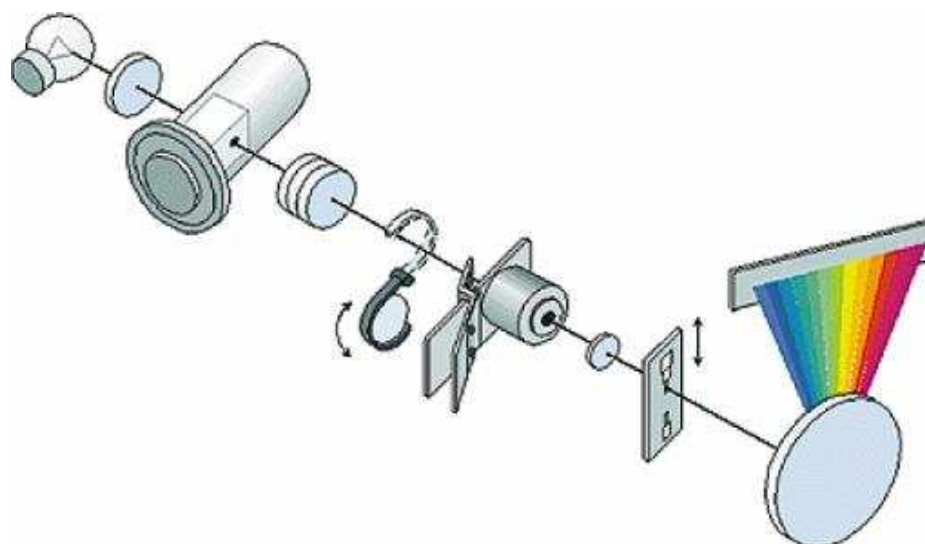


Obr. 4. Kolóna HPLC HP 110

Metóda HPLC existuje ako normálna a ako reverzná. Pri normálnej je stacionárna fáza polárnejšia než mobilná fáza, pri reverznej je to naopak.

Mobilnou fázou môže byť voda, methanol, acetonitril, ich zmesi v rôznych vzájomných pomeroch, pufry a iné. Zásobníkmi bývajú najčastejšie sklenené fľaše. Stacionárna fáza je tvorená mikročasticami silikagélu na ktorých je naviazaná vlastná stacionárna fáza. Môžu ju tvoriť nepolárne uhl'ovodíky alebo polárne uhl'ovodíky s funkčnými skupinami. Ďalšou

súčasťou chromatografu je kolóna (najčastejšia nerezová trubica) plnená mikročasticami stacionárnej fázy, ktoré pri prechode mobilnej fázy kladú odpor. Na to aby mohla prejsť mobilná fáza kolónou je nutný vysoký tlak, ktorý zaisťuje vysokotlaková pumpa. Na dávkovanie vzorky do prúdu mobilnej fázy slúži dávkovacia slučka alebo automatický dávkovač. Detektor podáva informácie o zložení mobilnej fázy pri výstupe z kolóny. Často používaným detektorom u metódy HPLC je detektor spektrofotometrický (UV-VIS), fluorescenčný a elektrochemický (ECD). Podmienkou pre použitie týchto detektorov je, aby daný analyt absorboval žiarenie určitej vlnovej dĺžky (UV-VIS detekcia) alebo aby emitoval fluorescenčné žiarenie (fluorescenčná detekcia). Pokiaľ analyt sám o sebe neabsorbuje žiarenie v oblasti UV-VIS alebo neemituje fluorescenčné žiarenie, je použitie týchto detektorov podmienené derivatizáciou vzorky (vzorka je chemickou reakciou prevedená na zlúčeniny, ktoré majú potrebné vlastnosti - absorpciu UV-VIS, fluorescenciu). Elektrochemický detektor je založený na tom, že zložky eluentu sa v detektore oxidujú alebo redukujú a meria sa intenzita prúdu, ktorý pri týchto procesoch vzniká. Pri vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografii preteká aparátúrou mobilná fáza zo zásobnej fľaše, vedená cez vysokotlakovú pumpu do kolóny, z nej do detektoru a ďalej do odpadu. Výsledkom HPLC analýzy je chromatogram s príslušnými píkmi. [9,14,15]

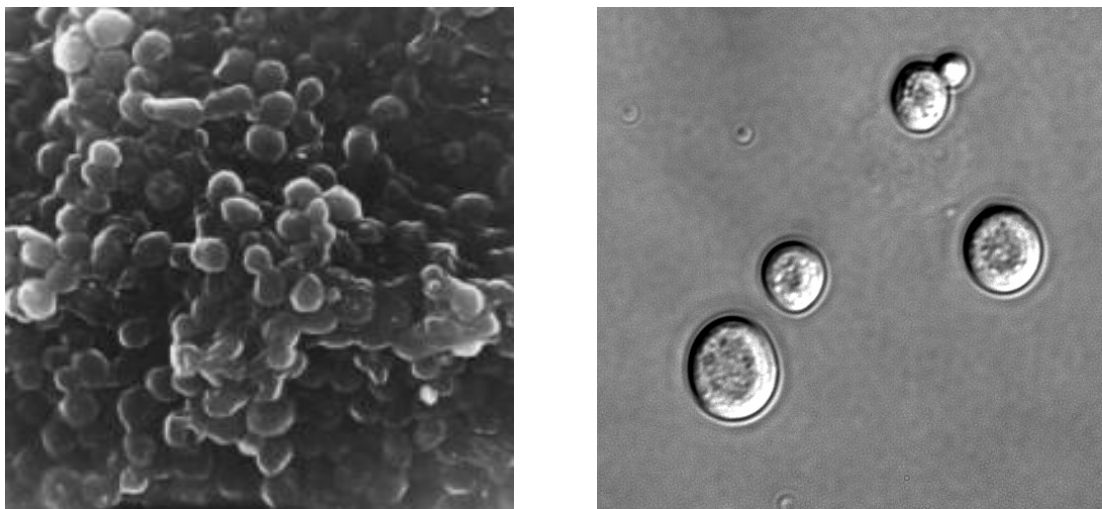


Obr. 5. UV/VIS DAD detektor [16]

5 DROŽDIE

Chlieb ako základná potravina sprevádza ľudstvo od doby, kedy sa z človeka lovca stal poľnohospodár. Neskôr sa zistilo, že cesto pripravené z múky, vody a soli môže nakysnúť pôsobením kvasiniek zo vzduchu, čím vznikne pečivo ľahké, vzdušné, s chutnou kôrkou. Z obilnín sa vyrábalo i pivo, taktiež vykvasené náhodne pomocou vzdušných kvasiniek. Kombinácia oboch poznatkov podnietila ľudí k používaniu pivnej usadeniny na cielené kyprenie cesta pri výrobe pečiva. Vedci L. Pasteur a E. Ch. Hansen potvrdili, že v pive sú živé organizmy ktoré sa rozmnožujú pučaním, môžu žiť a rozmnožovať sa za i bez prístupu kyslíka, vyvolávajú proces fermentácie a podporujú tým tvorbu alkoholu. Zároveň vzniknutý oxid uhličitý kyprí cesto a spôsobuje tým rast jeho objemu. Droždie sa vyrába v dvoch formách: lisované droždie a vitálne sušené droždie. Zo živín sú v droždí významné bielkoviny, vitamíny skupiny B – tiamín, riboflavín a niacín, z minerálov predovšetkým chróm. [17,18]

Podstatou droždia sú pučiace kvasinky druhu *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, droždiarske rasy, pripravené množením čistých kvasničných kultúr pestovaných na cukrových substrátoch. [19]



Obr. 6. Kvasinky

Droždie sa používa pri výrobe bieleho pečiva na vykysnutie cesta. Kvasinky tvoriace droždie fermentujú sacharidy za tvorby alkoholu alebo oxidu uhličitého (Príloha PIII). Tomuto procesu predchádza ethanolová glykolýza (Príloha P IV). .

Tab. 3. Obsah niektorých živín v 1 kg droždia [5]

| | Energia | | Bielkoviny (g) | Tuky (g) | Sacharidy (g) |
|------------------|---------|--------|----------------|----------|---------------|
| | (kJ) | (kcal) | | | |
| Lisované droždie | 4103 | 980 | 106,0 | 4,0 | 130,0 |
| Sušené droždie | 13020 | 3110 | 368,0 | 16,0 | 374,0 |

| | Železo (mg) | Vápnik (mg) | Vitamín B ₁ (mg) | Vitamín B ₂ (mg) | Vitamín C (mg) |
|------------------|-------------|-------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------|
| Lisované droždie | 49,00 | 250 | 0,490 | 20,800 | 0,0 |
| Sušené droždie | 182,00 | 1060 | 1,970 | 60,280 | 0,0 |

Základné suroviny na výrobu droždia:

vybraný kmeň kvasiniek, melasa

Pomocné suroviny:

kyselina sírová, kyselina trihydrogenfosforečná, čpavková voda, biotín, inositol, odpeňovací olej, hydrogenfosforečnan diamónny

Vedľajšie pomocné suroviny

hydroxid sodný, odmasťovač, sanitačné prostriedky

U nás sa na výrobu droždia používa repná melasa, čo je odpadový sirup z cukrovarov. Melasa sa skladuje v melasniciach, z ktorých je prečerpávaná do nádrží, kde sa pripravuje melasový zápar. Keďže melasa má málo dusíku a fosforu pre rast kvasiniek, pridá sa k nej amoniak a dusík. Kvasinky sa pomnožujú v laboratóriách (laboratórna propagácia) anaeróbne v niekoľkých stupňoch. Odtiaľ sa prevedú do prevádzkovej propagácie, kde sa slabo vetrá. Tu sa kultivujú aeróbne v niekoľkých generáciách, pretože je nutné kvasinky adaptovať na vyššie vetranie a nižší obsah živín. Medzi jednotlivými generáciami je vždy

zaradené odstredenie a prepieranie čistou vodou. Výsledkom je kvasničné mlieko. Mlieko sa skladuje niekoľko dní pri 50°C. Kvasničné mlieko je potom nutné prepierať vodou, aby sa z produktu čo najviac vymyla melasa, ktorej prítomnosť významne znižuje trvanlivosť droždia. Takto pripravené mlieko má obsah sušiny 15 hm.%. Jeho filtráciou sa získava biomasa o obsahu sušiny 26 až 30 hm.%. Konečnou operáciou je úprava obsahu vody a formovanie do kvádrov na liberkovacom prístroji [20].



Obr. 7. Výroba droždia



Obr. 8. Kváder droždia

Kvalitný výrobok je svetlo šedý, drobivý, nie sú v ňom dutiny ani miesta svetlejšie či tmavé, vo vode sa ľahko rozptyľuje. Vyschnuté droždie je tvrdé, popraskané, škvrnité, jeho kvasiaca schopnosť je nízka. U droždia sa kontroluje počet kvasiniek divokých kmeňov, či nie je infikované salmonelami a enterobaktériami. Lisované droždie sa v obchodnej sieti vyskytuje v baleniach po 42g, skladovať sa má pri 1 až 10°C, jeho trvanlivosť je 35 dní a doba kysnutia 40 až 60 minút. Jedno balenie sa používa asi na 1kg múky. Sušené droždie sa predáva v 10 alebo 7g vrecúškach, skladovať sa má do 20°C. Má dlhú trvanlivosť (až 18 mesiacov od dátumu výroby) a dlhú dobu kysnutia (2 až 3 hodiny). Jedno balenie odpovedá približne 25g lisovaného droždia. [21,22]

II. PRAKTICKÁ ČASŤ

6 METODIKA PRÁCE

6.1 Materiál

Dr. Moormanns čerstvé pekárske droždíe, balenie 42g, odporúčaná teplota skladovania 0-7°C; výrobca: UNIFERM GmbH&Co.KG, Werne, SRN; distribútor: ALIMPEX FOOD a.s., Praha, ČR

6.2 Použité pomôcky a prístroje

- predvážky (Kern, SRN)
- analytické váhy
- chladnička (Samsung- Calex, CZ)
- temperovaný vodný kúpeľ (Memmert, SRN)
- laboratórne sklo a pomôcky
- odstredivka
- dávkovacia striekačka (Hamilton, USA)
- mikrofiltre 0,45 µm, PTFE (Supelco, USA)
- aparátúra pre HPLC (Hewlett Packard 1100)
 - vakuovaný odplyňovací modul G1322A
 - binárna pumpa G1312A
 - termostat kolón G1316A
 - detektor UV/VIS DAD G1315A
 - dávkovací ventil analytický slučkovací (dávkovací slučka o objemu 20 µl)
 - kolóna SUPELCOSIL - LC8 (15 cm x 4,6 mm; 5 µm, Supelco, USA)
 - PC s vyhodnocovacím programom ChemStation – Instrument1 (Agilent, USA)

6.3 Použité chemikálie

- methanol pre HPLC, gradient grade (Riedel-del Haën, SRN; Sigma- Aldrich, SRN)
- štandard riboflavínu (výrobca Supelco, USA)
- redestilovaná voda
- kyselina trichlóroctová (dodávateľ - ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)
- kyselina chlorovodíková (dodávateľ - ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)
- octan sodný (dodávateľ - ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)
- kyselina mravčia (dodávateľ - ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)
- síran zinočnatý (dodávateľ - ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)
- hexakynoželeznan draselný (dodávateľ - ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)

6.4 Analýza vzoriek droždia

6.4.1 Extrakcia riboflavínu zo vzorky pekárskeho droždia

Na predvážkach bolo navážených 20g vzorky droždia s presnosťou 0,01g. Vzorka bola kvantitatívne prevedená do trecej misky a zhomogenizovaná s 80 ml 0,1M HCl a za pomoci morského piesku. HCl slúži na hydrolýzu FMN a FAD, v ktorých sa riboflavín viaže. Zmes bola kvantitatívne prevedená do 250 ml Erlenmayerovej banky obalenej fóliou. Banka bola vložená do vodného kúpeľa o teplote 97°C na 60 minút a po celú dobu bola intenzívne trepaná. V 50. minúte boli na vyzrážanie proteínov pridané 3 ml 80% kyseliny trichlóroctovej. Po skončení varu bola banka ochladená a k ochladenej zmesi bolo pridaných 10 ml činidla Carrez I (30 hm.% roztok síranu zinočnatého) a 10 ml Carrez II (15 hm.% roztok hexakynoželeznanu draselného) na vyzrážanie polysacharidov. Obsah banky bol kvantitatívne prevedený do 200 ml odmernej banky obalenej fóliou a doplnený po risku redestilovanou vodou. Zmes bola odstredená na odstredivke. Získaný roztok bol pred dávkovaním do HPLC ešte prefiltrovaný filtrom pre HPLC o veľkosti pórov 45 µm.

6.4.2 Stanovenie obsahu riboflavínu vo vzorke droždia metódou HPLC

Z filtrátu pripraveného postupom uvedeným v kapitole 6.4.1 bol na stanovenie použitý alikvotný podiel 20 μl . Bola použitá gradientová elúcia. Jednou zložkou bol methanol a druhou 0,12M octan sodný o pH 4,8 (upravenom 85% kyselinou mravčou). Prietok mobilnej fázy bol 0,8 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Stacionárnou fázou pre separáciu jednotlivých zložiek extraktu bola kolóna SUPELCOSIL LC8 (15cm x 4,6mm; 5 μm). Teplota termostatu pri meraní bola 30°C. Na stanovenie množstva riboflavínu bol použitý UV/VIS detektor, meranie prebehlo pri vlnovej dĺžke 270 nm. Retenčný čas pre riboflavín je približne 9,9 minút. Na vyhodnotenie merania bol použitý chromatografický software ChemStation–Instrument 1 (Agilent Technologies, USA), pomocou ktorého boli zistené plochy pík (mA.V.s⁻¹). Z nameranej kalibračnej krivky potom boli zistené koncentrácie riboflavínu v jednotlivých vzorkách droždia. Meranie bolo prevedené u droždia čerstvého i u droždia skladovaného v tme a chlade (8°C) a na svetle pri laboratórnej teplote po 7 a 14 dňoch.

Tab. 4. Gradient mobilnej fázy

| Minúta | Pomer octan sodný : methanol |
|--------|------------------------------|
| 0 | 87:13 |
| 3 | 87:13 |
| 15 | 0:100 |
| 30 | 0:100 |

6.4.3 Meranie kalibračnej krivky pre stanovenie riboflavínu metódou HPLC

Na meranie kalibračnej krivky sa použil štandard riboflavínu (SULPECO, USA). Pripravil sa zásobný roztok o koncentrácii 4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Zo zásobného roztoku boli pripravené roztoky o koncentráciách 0,1; 0,25; 0,5; 1 a 2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Meranie prebehlo rovnako ako u vzorky kvasníc v kapitole 6.4.2. Kalibračná krivka bola zostrojená ako závislosť nameraných plôch pík (mA.V.s⁻¹) na koncentrácii riboflavínu ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

6.4.4 Metóda vnútorného štandardu

Dve vzorky kvasníc boli pripravené ako v kapitole 6.4.1. K jednej z nich bolo pridaných 0,0008g štandardu riboflavínu. Obsah riboflavínu vo vzorkách bol meraný ako v kapitole 6.4.2.

7 VÝSLEDKY

7.1 Optimalizácia izolačného postupu vitamínu B₂ z droždia

Meranie bolo prevedené s navážkou 16g a s navážkou 20g. Pre lepšiu prehľadnosť grafov bola pri vlastnom meraní volená vyššia navážka.

Extrakcia riboflavínu bola prevedená pomocou 0,1M i 0,2M HCl. Pri vyššej koncentrácii neboli pozorované žiadne výhody pri spracovaní vzorky a nemala ani vplyv na presnosť výsledkov. Preto bola z dôvodu nižšieho okyslenia vzorky a nižšej spotrebe chemikálii volená 0,1M HCl.

Na vyzrážanie proteínov bolo použitých 3 a 5 ml 80% kyseliny trichlóroctovej. V oboch prípadoch došlo k vyzrážaniu. Pilotnými pokusmi bolo vyskúšané, že na vyzrážanie proteínov môžu byť použité len 3 ml 80% kyseliny trichlóroctovej.

Činidlá Carrez I a Carrez II použité na vyzrážanie polysacharidov boli pridané v množstvách oba po 5 ml a oba po 10 ml. V oboch prípadoch vyzrážanie prebehlo, pri použití len 5 ml však došlo k menej dôkladnému vyzrážaniu, čo spôsobilo upchávanie filtra pre HPLC. Z toho dôvodu boli použité množstvá po 10 ml.

K oddeleniu extraktu riboflavínu od tuhého podielu bolo použité odstredenie a filtrovanie za pomoci vývevy. Pri použití odstredivky bol získaný číry roztok vhodný pre meranie HPLC. Použitie vývevy sa nevyplatilo, bol získaný zakalený roztok, ktorý bolo nutné opakovane prefiltrovať. Tento postup bol značne časovo náročný, preto bolo použité odstredenie.

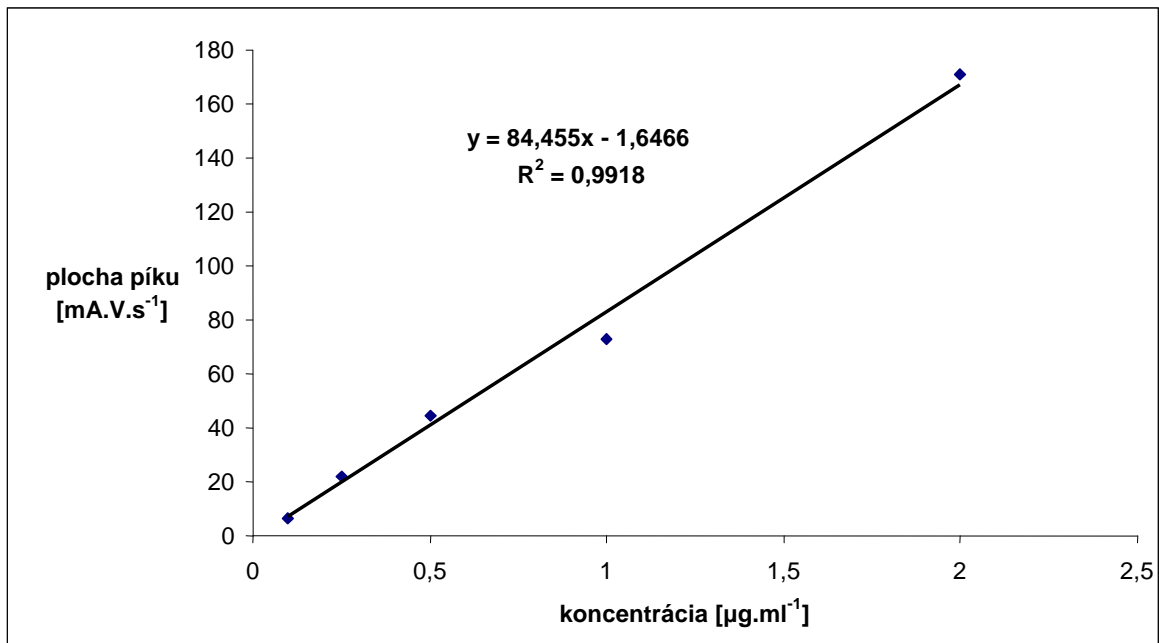
7.2 Výsledky merania kalibračnej krivky pre stanovenie riboflavínu metódou HPLC

Veľkosti plôch píkov u daných koncentrácií boli zmerané podľa postupu v kapitole 6.4.3 a bola vytvorená kalibračná krivka závislosti plôch píkov ($\text{mA}\cdot\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$) na koncentrácii riboflavínu ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Výsledky merania sú uvedené v *Tab. 5.* a grafe kalibračnej krivky *Obr. 9.*

Tab. 5. Kalibrácia riboflavínu

| Koncentrácia riboflavínu [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$] | Plocha píku [$\text{mA}\cdot\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$] | Priemerná plocha píku [$\text{mA}\cdot\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$] |
|--|---|---|
| 0,10 | 5,13 | 6,64 |
| | 6,28 | |
| | 7,18 | |
| | 6,27 | |
| | 8,34 | |
| 0,25 | 21,59 | 22,08 |
| | 22,99 | |
| | 21,43 | |
| | 22,06 | |
| | 22,33 | |
| 0,50 | 47,81 | 44,48 |
| | 48,43 | |
| | 39,62 | |
| | 42,17 | |
| | 44,37 | |
| 1,00 | 68,89 | 72,69 |
| | 82,41 | |
| | 72,02 | |
| | 69,98 | |
| | 70,14 | |
| 2,00 | 172,77 | 171,03 |
| | 170,13 | |
| | 171,23 | |
| | 170,64 | |
| | 170,37 | |

Obr. 9. Kalibrační krivka s regresnou přímkou pro měření HPLC



7.3 Výsledky stanovení obsahu riboflavínu v čerstvém droždí metodou HPLC

Stanovení bylo provedené v dvou paralelních vzorkách čerstvého droždí. Vzorka byla připravená postupem uvedeným v kapitole 6.4.1 a každá byla pětikrát premeraná. Získaná plocha píku byla dosazená do rovnice regresní přímky kalibrační krivky, čím byla zistená koncentrace riboflavínu vo vzorke v $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Vo vzorke označenej I. bola navážka 20,11g, vo vzorke II. 20,71g.

Tab. 6. Obsah riboflavínu vo vzorke čerstvého droždia I.

| Plocha piku [mA.V.s ⁻¹] | Koncentrácia [μg.ml ⁻¹] | Koncentrácia [mg.100 g ⁻¹] |
|--|--|---|
| 17,98 | 0,23 | 0,23 |
| 18,01 | 0,23 | 0,23 |
| 17,12 | 0,22 | 0,22 |
| 17,32 | 0,22 | 0,22 |
| 18,06 | 0,23 | 0,23 |

Tab. 7. Priemerná hodnota riboflavínu vo vzorke čerstvého droždia I.

| Priemerná koncentrácia [mg.100 g ⁻¹] | Smerodajná odchýlka [mg.100 g ⁻¹] |
|---|--|
| 0,226 | 0,005 |

Obsah B₂: 0,226 ± 0,006 mg.100g⁻¹ (α=0,05)

Tab. 8. Obsah riboflavínu vo vzorke čerstvého droždia II.

| Plocha piku [mA.V.s ⁻¹] | Koncentrácia [μg.ml ⁻¹] | Koncentrácia [mg.100 g ⁻¹] |
|--|--|---|
| 19,17 | 0,25 | 0,24 |
| 20,42 | 0,26 | 0,25 |
| 18,63 | 0,24 | 0,23 |
| 19,19 | 0,25 | 0,24 |
| 18,99 | 0,24 | 0,23 |

Tab. 9. Priemerná hodnota obsahu riboflavínu vo vzorke čerstvého droždia II.

| Priemerná koncentrácia [mg.100 g ⁻¹] | Smerodajná odchýlka [mg.100 g ⁻¹] |
|---|--|
| 0,238 | 0,007 |

Obsah B₂: 0,238 ± 0,009 mg.100g⁻¹ (α=0,05)

Priemerná hodnota obsahu riboflavínu v čerstvom droždí:

0,232 ± 0,063 mg.100g⁻¹ (α=0,05)

7.4 Výsledky stanovenia obsahu riboflavínu v droždí po 7 dňoch skladovania v tme a chlade metódou HPLC

Vzorka bola pripravená postupom uvedeným v kapitole 7.4.1. Bola päťkrát premeraná. Získaná plocha píku bola dosadená do rovnice regresnej priamky kalibračnej krivky, čím bola zistená koncentrácia riboflavínu vo vzorke v µg.ml⁻¹. Navážka vzorky droždia po 7 dennom skladovaní v tme a chlade bola 20,19g.

Tab. 10. Obsah riboflavínu vo vzorke droždia po 7 dňoch skladovania v tme a chlade

| Plocha píku [mA.V.s ⁻¹] | Koncentrácia [µg.ml ⁻¹] | Koncentrácia [mg.100 g ⁻¹] |
|--|--|---|
| 20,19 | 0,26 | 0,26 |
| 19,89 | 0,26 | 0,26 |
| 20,22 | 0,26 | 0,26 |
| 19,46 | 0,25 | 0,25 |
| 19,99 | 0,26 | 0,26 |

Tab. 11. Priemerná hodnota obsahu riboflavínu po 7 dňoch skladovania v tme a chlade so smerodajnou odchýlkou

| Priemerná koncentrácia [mg.100 g ⁻¹] | Smerodajná odchýlka [mg.100 g ⁻¹] |
|---|--|
| 0,258 | 0,004 |

Obsah B₂: 0,258 ± 0,005 mg.100g⁻¹ (α=0,05)

7.5 Výsledky stanovenia obsahu riboflavínu v droždí po 7 dňoch skladovania na svetle a teple metódou HPLC

Vzorka bola pripravená postupom uvedeným v kapitole 7.4.1. Bola päťkrát premeraná. Získaná plocha píku bola dosadená do rovnice regresnej priamky kalibračnej krivky, čím bola zistená koncentrácia riboflavínu vo vzorke v µg.ml⁻¹. Navážka vzorky droždia skladovaného na svetle a teple bola 20,23g.

Tab. 12. Obsah riboflavínu vo vzorke droždia po 7 dňoch skladovania v teple a na svetle

| Plocha píku [mA.V.s ⁻¹] | Koncentrácia [µg.ml ⁻¹] | Koncentrácia [mg.100 g ⁻¹] |
|--|--|---|
| 18,36 | 0,24 | 0,24 |
| 16,13 | 0,21 | 0,21 |
| 20,23 | 0,26 | 0,26 |
| 16,94 | 0,22 | 0,22 |
| 17,99 | 0,23 | 0,23 |

Tab. 13. Priemerná hodnota obsahu riboflavínu po 7 dňoch skladovania na svetle a teple so smerodajnou odchýlkou

| Priemerná koncentrácia [mg.100 g ⁻¹] | Smerodajná odchýlka [mg.100 g ⁻¹] |
|---|--|
| 0,232 | 0,017 |

Obsah B₂: 0,232 ± 0,021 mg.100g⁻¹ (α=0,05)

7.6 Výsledky stanovenia obsahu riboflavínu v droždí po 14 dňoch skladovania v tme a chlade metódou HPLC

Vzorka bola pripravená postupom uvedeným v kapitole 7.4.1. Bola päťkrát premeraná. Získaná plocha píku bola dosadená do rovnice regresnej priamky kalibračnej krivky, čím bola zistená koncentrácia riboflavínu vo vzorke v µg.ml⁻¹. Navážka vzorky droždia po 14 dňovom skladovaní v tme a chlade bola 19,98g.

Tab. 14. Obsah riboflavínu vo vzorke droždia po 14 dňoch skladovania v tme a chlade

| Plocha píku [mA.V.s ⁻¹] | Koncentrácia [µg.ml ⁻¹] | Koncentrácia [mg.100 g ⁻¹] |
|--|--|---|
| 24,64 | 0,31 | 0,31 |
| 26,84 | 0,34 | 0,34 |
| 24,96 | 0,32 | 0,32 |
| 21,98 | 0,28 | 0,28 |
| 22,16 | 0,28 | 0,28 |

Tab. 15. Priemerná hodnota obsahu riboflavínu po 14 dňoch skladovania v tme a chlade so smerodajnou odchýlkou

| Priemerná koncentrácia [mg.100 g ⁻¹] | Smerodajná odchýlka [mg.100 g ⁻¹] |
|---|--|
| 0,306 | 0,023 |

Obsah B₂: 0,306 ± 0,029 mg.100g⁻¹ (α=0,05)

7.7 Výsledky stanovenia obsahu riboflavínu v droždí po 14 dňoch skladovania na svetle a teple metódou HPLC

Vzorka bola pripravená postupom uvedeným v kapitole 7.4.1. Bola päťkrát premeraná. Získaná plocha píku bola dosadená do rovnice regresnej priamky kalibračnej krivky, čím bola zistená koncentrácia riboflavínu vo vzorke v µg.ml⁻¹. Navážka vzorky droždia po 14 dňoch skladovania na svetle a teple bola 19,99g.

Tab. 16. Obsah riboflavínu vo vzorke droždia po 14 dňoch skladovania v teple a na svetle

| Plocha píku [mA.V.s ⁻¹] | Koncentrácia [µg.ml ⁻¹] | Koncentrácia [mg.100 g ⁻¹] |
|--|--|---|
| 7,73 | 0,11 | 0,11 |
| 8,79 | 0,12 | 0,12 |
| 7,68 | 0,11 | 0,11 |
| 6,58 | 0,10 | 0,10 |
| 7,62 | 0,11 | 0,11 |

Tab. 17. Priemerná hodnota obsahu riboflavínu po 14 dňoch skladovania na svetle a teple so smerodajnou odchýlkou

| Priemerná koncentrácia [mg.100 g ⁻¹] | Smerodajná odchýlka [mg.100 g ⁻¹] |
|---|--|
| 0,110 | 0,006 |

Obsah B₂: 0,110 ± 0,007 mg.100g⁻¹ (α=0,05)

7.8 Výsledky získané meraním vzorky čerstvého droždia s prídavkom štandardu metódou HPLC

Boli pripravené 2 vzorky droždia postupom uvedeným v kapitole 7.4.1. K 1 z nich bolo pridaných 0,8mg štandardu riboflavínu (SULPECO, USA). Stanovenie riboflavínu prebehlo postupom uvedeným v kapitole 7.4.2. Navážka vzorky droždia bez prídavku štandardu bola 20,17g a s prídavkom štandardu 20,17g.

Tab. 18. Obsah riboflavínu vo vzorke čerstvého droždia bez prídavku štandardu

| Plocha piku [mA.V.s ⁻¹] | Koncentrácia [μg.ml ⁻¹] | Koncentrácia [mg.100 g ⁻¹] |
|--|--|---|
| 20,41 | 0,26 | 0,26 |
| 20,56 | 0,26 | 0,26 |
| 21,47 | 0,27 | 0,27 |
| 21,95 | 0,28 | 0,28 |
| 19,76 | 0,25 | 0,25 |

Tab. 19. Priemerná hodnota obsahu riboflavínu v čerstvom droždí bez prídavku štandardu so smerodajnou odchýlkou

| Priemerná koncentrácia [mg.100 g ⁻¹] | Smerodajná odchýlka [mg.100 g ⁻¹] |
|---|--|
| 0,264 | 0,010 |

Obsah B₂: 0,264 ± 0,012 mg.100g⁻¹ (α=0,05)

Tab. 20. Obsah riboflavínu vo vzorke čerstvého droždia s prídavkom štandardu

| Plocha piky [mA.V.s ⁻¹] | Koncentrácia [μg.ml ⁻¹] | Koncentrácia [mg.100 g ⁻¹] |
|--|--|---|
| 91,36 | 1,10 | 1,10 |
| 93,31 | 1,12 | 1,11 |
| 92,73 | 1,12 | 1,11 |
| 90,84 | 1,10 | 1,10 |
| 90,15 | 1,09 | 1,08 |

Tab. 21. Priemerná hodnota obsahu riboflavínu v čerstvom droždí s prídavkom štandardu so smerodajnou odchýlkou

| Priemerná koncentrácia [mg.100 g ⁻¹] | Smerodajná odchýlka [mg.100 g ⁻¹] |
|---|--|
| 1,100 | 0,011 |

Obsah B₂: 1,100 ± 0,014 mg.100g⁻¹ (α=0,05)

Vo vzorke čerstvého droždia bola zistená priemerná plocha píku $20,83 \text{ mA.V.s}^{-1}$, čo po prepočte z regresnej rovnice odpovedá obsahu riboflavínu $0,264 \text{ mg.100g}^{-1}$. Po pridaní $0,8 \text{ mg}$ štandardu ku vzorke čerstvého bola zistená priemerná plocha píku $91,68 \text{ mA.V.s}^{-1}$, čo po prepočte z regresnej rovnice odpovedá obsahu riboflavínu $1,100 \text{ mg.100g}^{-1}$. Rozdiel v hodnotách odpovedá prídavku štandardu, postup izolácie riboflavínu a jeho stanovenie pri daných chromatografických podmienkach bolo teda overené.

ZÁVER

Cieľom tejto práce bola optimalizácia izolačného postupu riboflavínu a stanovenie jeho obsahu v kvasniciach metódou HPLC. Obsah riboflavínu bol stanovený v čerstvom droždí a v droždí skladovanom na svetle pri laboratórnej teplote a bez prístupu svetla pri 8°C. po 7 a 14 dňoch.

Na stanovenie riboflavínu bola použitá separačná chromatografická metóda vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie HPLC. Separácia bola prevedená na kolóne SUPELCOSIL LC18 (15 cm x 4,6 mm; 5 µm). Bola použitá gradientová elúcia mobilných fáz o zložení 0,12 mol.l⁻¹ octan sodný (pH upravené na 4,8 pomocou 85% kyseliny mravčej) a metanol o počiatočnom pomere 87:13 s gradientom uvedeným v tabuľke 4. Prietok mobilných fáz bol 0,8 ml.min⁻¹ a teplota termostatu kolóny 30°C. Signál bol snímaný detektorom UV/VIS DAD o vlnovej dĺžke 270 nm. Vyhodnotenie výsledkov bolo prevedené pomocou chromatografického softwaru ChemStation–Instrument 1 (Agilent Technologies, USA). Na meranie kalibračnej krivky sa použil štandard riboflavínu (SULPECO, USA). Bola prevedená i metóda vnútorného štandardu pre overenie spoľahlivosti izolačného postupu a chromatografickej separačnej metódy. Výsledky jednotlivých analýz boli spracované pomocou štandardných štatistických parametrov s využitím studentovho rozdelenia náhodných odchýlok pre daný stupeň voľnosti. Výsledky analýzy boli testované na hladine presnosti $\alpha = 0,05$ (95 %).

Priemerný obsah riboflavínu u čerstvého droždia bol $0,232 \pm 0,063$ mg.100g⁻¹ ($\alpha=0,05$). V droždí skladovanom 7 dní v tme pri 8°C $0,258 \pm 0,005$ mg.100g⁻¹ ($\alpha=0,05$) a na svetle pri laboratórnej teplote $0,232 \pm 0,021$ mg.100g⁻¹ ($\alpha=0,05$). V droždí skladovanom 14 dní v tme pri 8°C bola zistený obsah riboflavínu $0,306 \pm 0,029$ mg.100g⁻¹ ($\alpha=0,05$) a na svetle pri laboratórnej teplote $0,110 \pm 0,007$ mg.100g⁻¹ ($\alpha=0,05$). Pri metóde vnútorného štandardu bol zistený priemerný obsah riboflavínu vo vzorke čerstvého droždia bez prídavku štandardu $0,264 \pm 0,012$ mg.100g⁻¹ ($\alpha=0,05$) a s prídavkom 0,8 mg štandardu $1,100 \pm 0,014$ mg.100g⁻¹ ($\alpha=0,05$). Postup izolácie riboflavínu a jeho stanovenie pri daných chromatografických podmienkach bolo overené.

Tabuľková hodnota obsahu riboflavínu v droždí je 20,8 mg.kg⁻¹. Je zjavné, že hodnota riboflavínu nameraná v čerstvom droždí je asi desaťkrát nižšia, čo môže byť spôsobené nevhodnou manipuláciou a skladovaním výrobku. Taktiež nie je možné posúdiť do akej miery prebehla hydrolýza, teda uvoľnenie riboflavínu z bielkovinového nosiča, vzhľadom

k tomu, že k dispozícii nebol štandard FMN a FAD. V droždí skladovanom na svetle pri laboratórnej teplote sa obsah riboflavínu po 7 dňoch nezmenil, s rastúcou dobou vystavenia kvasníc slnečnému žiareniu klesal z dôvodu fotosenzibility riboflavínu, čím bola potvrdená úvodná hypotéza. Popri tom kvasnice i splesnivali, je teda možné využívanie vitamínu B₂ plesňami. Množstvo riboflavínu v kvasniciach skladovaných v tme pri 8°C mierne stúpalo. Dôvodom je pravdepodobne vysychanie kvasníc a tým i zakoncentrovanie vzorky a prípadná produkcia riboflavínu kvasinkami. Predpoklad nezmeneného obsahu riboflavínu za daných podmienok skladovania nebol potvrdený.

ZOZNAM POUŽITEJ LITERATURY

- [1] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D. *Potravinářská biochemie II.*
1. vyd. Zlín: UTB, 2006. 102 s. ISBN 80-7318-395-1
- [2] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 2.*
1. vyd. Tábor: OSSIS, 1999. 328 s. ISBN 80-902391-4-5.
- [3] DAVÍDEK, J. a kol. *Chemie potravin.*
1. vyd. Praha: SNTL, 1983. 632 s.
- [4] ŠÍCHO, Vladislav a kol. *Potravinářská biochemie.*
2. vyd. Praha: SNTL, 1981. 360 s.
- [5] SCHREIBER, V. *Potravinové tabulky.*
Praha: Společnost pro výživu, 1992.
- [6] Riboflavin [online]. Dostupný z www:
<<http://cs.wikipedia.org/wiki/Riboflavin/>>.
- [7] NOVÁK, Václav, BUŇKA, František. *Základy ekonomiky výživy.*
1. vyd. Zlín: UTB, 2005. ISBN 80-7318-262-9
- [8] DAVÍDEK, J. *Laboratorní příručka analýzy potravin.*
Praha: SNTL, 1977.
- [9] Chromatografie [online]. Dostupný z www:
<www.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/chromatografie.doc>.
- [10] BARTUŠEK, M., PAZOUREK, J. *Základy metod analytické chemie.*
- [11] DEAN, J. A. *Chemické dělicí metody*
1. vyd. Praha: SNTL, 1974. 404 s.
- [12] KARDOŠ, Emil, BEREK, Dušan. *Základy kvapalinovej chromatografie.*
1. vyd. Bratislava: Alfa, 1979. 269 s.

- [13] COUFAL, Pavel. High Performance Liquid Chromatography, HPLC [online].
Dostupný z www:
<<http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>>.
- [14] CHURÁČEK, J., FERENČÍK, M. *Biochemické laboratorní metody*.
Praha: Alfa, 1981.
- [15] Vysokoúčinná kapalinová chromatografie HPLC [online]. Dostupný z www:
<http://faf.vfu.cz/fytochem/hplc_gc.pdf>.
- [16] CHURÁČEK, J., JANDERA, P. *Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie*. Praha: SNTL, 1984.
- [17] Historie droždí [online]. Dostupný z www:
<<http://drozdi.cz/index.php?a=historiedrozdi>>.
- [18] Pekařské droždí [online]. Dostupný z www:
<<http://cs.wikipedia.org/wiki/Wikipedista:Limojoe/P%C3%ADskovi%C5%A1t%C4%9B>>.
- [19] Předpis č. 335/1997 Sb. [online]. Dostupný z www:
<[www.pravnipredpisy.cz-předpis č. 335/1997 Sb.](http://www.pravnipredpisy.cz-předpis_č._335/1997_Sb.)>.
- [20] Výroba pekařského droždí [online]. Dostupný z www:
<<http://www.sci.muni.cz/mikrob/kvasbiotech/pekarske/drozdi.html>>.
- [21] Droždí [online]. Dostupný z www:
<<http://pekarny.unas.cz/>>.
- [22] Státní zemědělská a potravinářská inspekce [online]. Dostupné z www:
<<http://www.szpi.gov.cz/cze/informace/koutek/article.asp?id=55219&cat=&ts=9ec4>>.

ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK

| | |
|--------|---|
| FMN | Flavínmononukleotid |
| FAD | Flavínadenínindinukleotid |
| HPLC | Vysokoučinná kvapalinová chromatografia |
| GC | Plynová chromatografia |
| LSC | Kvapalinová sorpčná chromatografia |
| LLC | Kvapalinová rozdeľovacia chromatografia |
| GPC | Gélová chromatografia |
| IEC | Iónovo-výmenná chromatografia |
| UV/VIS | Spektrofotometrický detektor |
| ECD | Elektrochemický detektor |

ZOZNAM OBRÁZKOV

| | |
|--|-----------|
| <i>Obr. 1. Fotolýza riboflavínu</i> | <i>12</i> |
| <i>Obr. 2. Kvapalinový chromatograf [13]</i> | <i>19</i> |
| <i>Obr. 3. HPLC HP 1100... ..</i> | <i>19</i> |
| <i>Obr. 4. Kolóna HPLC HP 110.....</i> | <i>19</i> |
| <i>Obr. 5. Schéma UV/VIS DAD detektoru [14].....</i> | <i>20</i> |
| <i>Obr. 6. Kvasinky</i> | <i>21</i> |
| <i>Obr. 7. Výroba droždia.....</i> | <i>23</i> |
| <i>Obr. 8. Kváder droždia</i> | <i>23</i> |
| <i>Obr. 9. Kalibračná krivka s regresnou priamkou pre meranie HPLC</i> | <i>31</i> |

ZOZNAM TABULIEK

| | |
|---|----|
| <i>Tab. 1. Obsah riboflavínu vo vybraných potravinách [5].....</i> | 13 |
| <i>Tab. 2. Návrh výživových doporučených dávok z roku 1999 pre dospelé obyvateľstvo vo veku 19 až 59 rokov ľahko a stredne pracujúce [7].....</i> | 14 |
| <i>Tab. 3. Obsah niektorých živín v 1 kg droždia [5].....</i> | 22 |
| <i>Tab. 4. Gradient mobilnej fázy</i> | 28 |
| <i>Tab. 5. Kalibrácia riboflavínu</i> | 30 |
| <i>Tab. 6. Obsah riboflavínu vo vzorke čerstvého droždia I.</i> | 32 |
| <i>Tab. 7. Priemerná hodnota riboflavínu vo vzorke čerstvého droždia I.</i> | 32 |
| <i>Tab. 8. Obsah riboflavínu vo vzorke čerstvého droždia II.....</i> | 32 |
| <i>Tab. 9. Priemerná hodnota obsahu riboflavínu vo vzorke čerstvého droždia II.</i> | 33 |
| <i>Tab. 10. Obsah riboflavínu vo vzorke droždia po 7 dňoch skladovania v tme a chlade</i> | 33 |
| <i>Tab. 11. Priemerná hodnota obsahu riboflavínu po 7 dňoch skladovania v tme a chlade so smerodajnou odchýlkou.....</i> | 34 |
| <i>Tab. 12. Obsah riboflavínu vo vzorke droždia po 7 dňoch skladovania v teple a na svetle</i> | 34 |
| <i>Tab. 13. Priemerná hodnota obsahu riboflavínu po 7 dňoch skladovania na svetle a teple so smerodajnou odchýlkou</i> | 35 |
| <i>Tab. 14. Obsah riboflavínu vo vzorke droždia po 14 dňoch skladovania v tme a chlade</i> | 35 |
| <i>Tab. 15. Priemerná hodnota obsahu riboflavínu po 14 dňoch skladovania v tme a chlade so smerodajnou odchýlkou.....</i> | 36 |
| <i>Tab. 16. Obsah riboflavínu vo vzorke droždia po 14 dňoch skladovania v teple a na svetle</i> | 36 |
| <i>Tab. 17. Priemerná hodnota obsahu riboflavínu po 14 dňoch skladovania na svetle a teple so smerodajnou odchýlkou</i> | 37 |
| <i>Tab. 18. Obsah riboflavínu vo vzorke čerstvého droždia bez prídavku štandardu.....</i> | 37 |
| <i>Tab. 19. Priemerná hodnota obsahu riboflavínu v čerstvom droždí bez prídavku štandardu so smerodajnou odchýlkou</i> | 38 |
| <i>Tab. 20. Obsah riboflavínu vo vzorke čerstvého droždia s prídavkom štandardu</i> | 38 |
| <i>Tab. 21. Priemerná hodnota obsahu riboflavínu v čerstvom droždí s prídavkom štandardu so smerodajnou odchýlkou</i> | 38 |

ZOZNAM PRÍLOH

PRÍLOHA P I: HYDROFILNÉ VITAMÍNY

PRÍLOHA P II: LIPOFILNÉ VITAMÍNY

PRÍLOHA P III: PREMENA PYRUVÁTU NA ETHANOL

PRÍLOHA P IV: GLYKOLÝZA

PRÍLOHA P V: ČLENENIE DROŽDIA NA SKUPINY A PODSKUPINY, ZMYSLOVÉ,
FYZIKÁLNE A CHEMICKÉ POŽIADAVKY NA AKOSŤ

PRÍLOHA P VI: CHROMATOGRAMY STANOVENIA OBSAHU RIBOFLAVÍNU V
DROŽDÍ METÓDOU HPLC

PRÍLOHA P VII: ZMENY MNOŽSTVA RIBOFLAVÍNU PRI SKLADOVANÍ V TME
PRI 8°C A NA SVETLE PRI LABORATÓRNEJ TEPLOTE

Príloha P I: hydrofilné Vitamíny

| vitamín | význam | OVD |
|---|---|---------------------------------|
| B₁ tiamín | <ul style="list-style-type: none"> • pomáha premieňať sacharidy na energiu vo svaloch • podporuje správnu funkciu nervovej sústavy a výkonnosť pamäti | 1,3 mg u športovcov 1,8 mg |
| B₂ riboflavín | <ul style="list-style-type: none"> • pomáha spracovať sacharidy, bielkoviny a tuky potravy • podporuje produkciu energie, dobrú kondíciu a vitalitu • zvyšuje športové výkony a tvorbu svalstva • podporuje rast zdravých vlasov a udržiava zdravú pokožku | 1,9 mg u športovcov 2,3 mg |
| B₃ niacín | <ul style="list-style-type: none"> • nevyhnutný pri tvorbe energie zo sacharidov, tukov a bielkovín • potrebný pre správnu činnosť svalov a regeneráciu spojivového tkaniva (chrupaviek, väzív, šliach) • udržiava zdravú pokožku • podporuje správnu funkciu nervovej sústavy • má významnú úlohu pri syntéze pohlavných hormónov | 20 –25 mg u športovcov 30 mg |
| B₅ kyselina pantoténová | <ul style="list-style-type: none"> • zúčastňuje sa pri tvorbe energie zo sacharidov • podporuje odbúravanie tukov a využitie tukov ako zdrojov energie • stará sa o zdravú nervovú sústavu • prevencia a liečba zápalov kĺbov | 6 –8 mg u športovcov 10 mg |
| B₆ pyridoxín | <ul style="list-style-type: none"> • nevyhnutný v chemickej premene aminokyselín a pri tvorbe telesných bielkovín • dôležitý pre správnu činnosť svalov, prevencia svalových kŕčov | 1 –2 mg u športovcov 3 mg |
| B₉ kyselina listová | <ul style="list-style-type: none"> • podporuje delenie buniek a rast telesných tkanív • dôležitá pri tvorbe krvi • vylepšuje kvalitu pokožky | 100 – 200 µg |

| | | |
|--|---|---|
| <p style="text-align: center;">B₁₂ kyanokobalamín</p> | <ul style="list-style-type: none"> • potrebný pre využitie tukov, sacharidov a bielkovín • nevyhnutný pri syntéze aminokyselín • potrebný pri tvorbe krvi • podporuje svalovú činnosť | <p style="text-align: center;">3 µg</p> |
| <p style="text-align: center;">C kyselina askorbová</p> | <ul style="list-style-type: none"> • nevyhnutný pri tvorbe kolagénu (chrupaviek, väzív, šliach) • urýchlňuje hojenie rán • antioxidant • nevyhnutný pri tvorbe karnitínu • ochraňuje pred degeneratívnymi ochoreniami (rakovinou, srdcovo-cievnyimi ochoreniami) • podporuje resorpciu železa | <p style="text-align: center;">100 mg u športovcov 150 mg</p> |
| <p style="text-align: center;">biotín</p> | <ul style="list-style-type: none"> • dôležitý pre normálnu látkovú premenu tukov a bielkovín • pomáha udržiavať zdravú pokožku a vlasy • zmierňuje svalové bolesti a podporuje uvoľnenie svalov | <p style="text-align: center;">150 – 300 µg</p> |

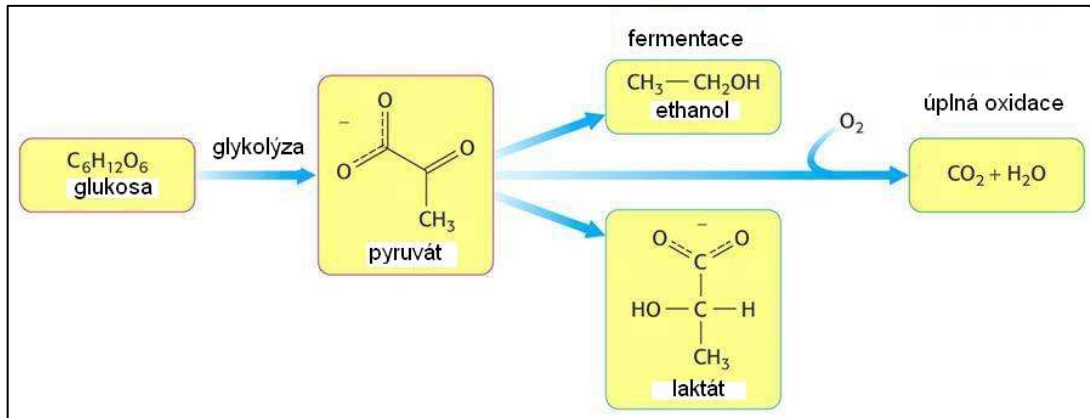
OVD = Odporúčaná výživová dávka / deň

PRÍLOHA P II: LIPOFILNÉ VITAMÍNY

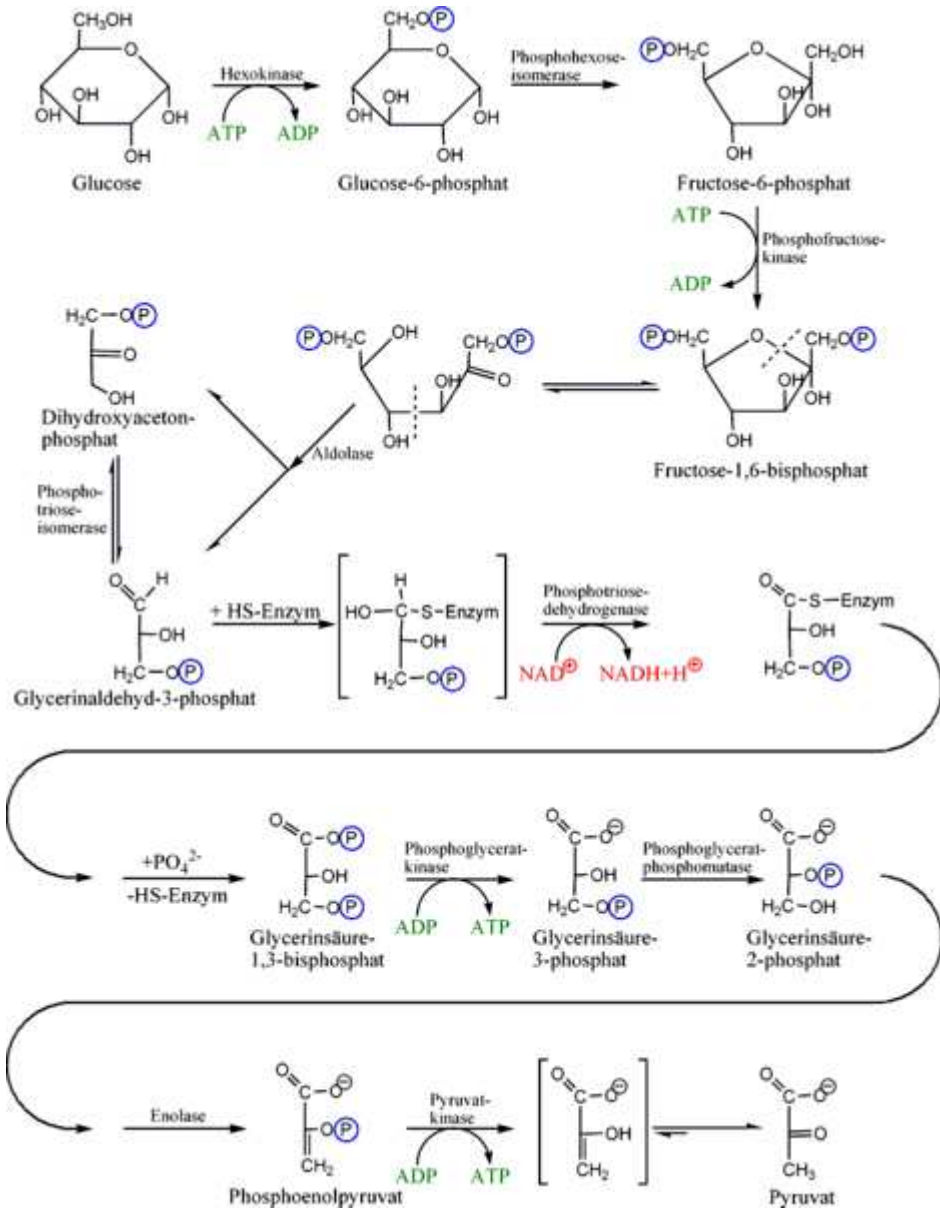
| vitamín | význam | OVD |
|----------------------------------|---|------------------|
| A retinol a β-karotén | <ul style="list-style-type: none"> • zlepšuje videnie a chráni pred šeroslepotou • udržiava pokožku v dobrom stave a ochraňuje ju pred starnutím • podporuje imunitný systém • antioxidant – vychytáva škodlivé voľné radikály, ktoré poškodzujú bunky | 800 – 1200 µg |
| D kalciferol | <ul style="list-style-type: none"> • dôležitý pre vstrebávanie vápnika a fosforu • ochraňuje pred osteoporózou • podporuje imunitný systém • nevyhnutný pre silné zuby a pevné kosti • potrebný pre tvorbu hormónov | 5 – 10 µg |
| E tokoferol | <ul style="list-style-type: none"> • potrebný pre tvorbu energie, podporuje bunkové dýchanie, pričom sa uvoľňuje energia • zabezpečenie normálnej plodnosti u oboch pohlaví • ovplyvňuje látkovú premenu v svalovom a nervovom tkanive • podporuje imunitný systém, pôsobí protizápalovo • antioxidant – ochraňuje bunkové membrány pred deštrukciou voľnými radikálmi | 6 – 12 µg |
| K | <ul style="list-style-type: none"> • nevyhnutný pri zrážaní krvi • podporuje hojenie rán • má význam pri látkovej premene sacharidov a správnej funkcii pečene | 1 – 4 mg |

OVD = Odporúčaná výživová dávka / deň

PRÍLOHA P III: PREMENA PYRUVÁTU NA ETANOL



PRÍLOHA P IV: GLYKOLÝZA



PRÍLOHA P V: ČLENENIE DROŽDIA NA SKUPINY A PODSKUPINY, ZMYSLOVÉ, FYZIKÁLNE A CHEMICKÉ POŽIADAVKY NA AKOSŤ

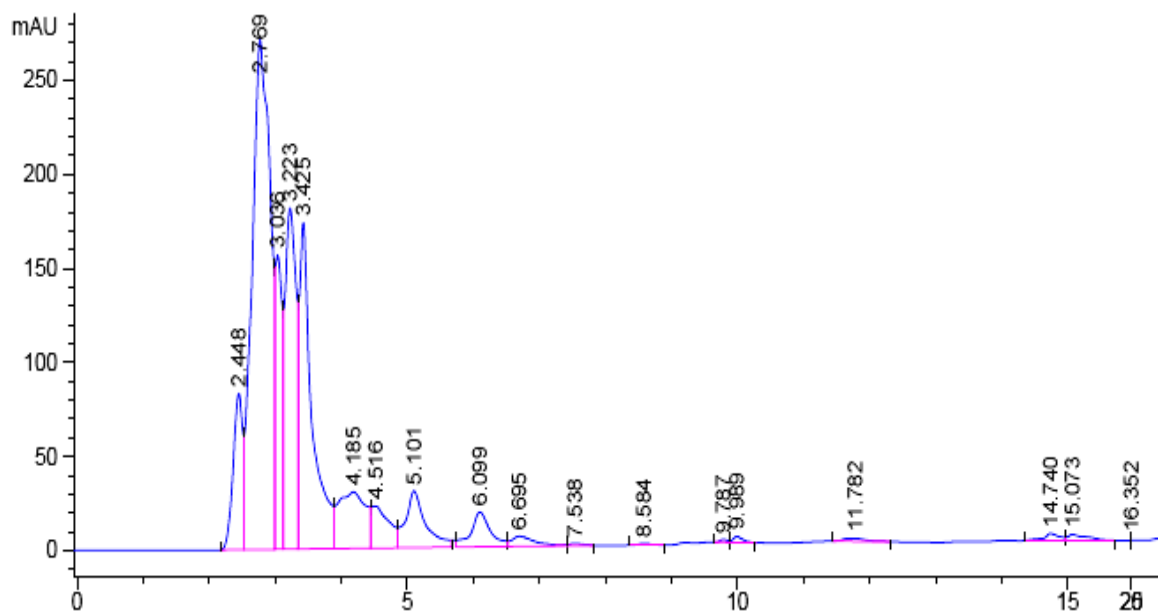
| Druh | Skupina | Podskupina |
|---------|----------|------------|
| Droždie | pekárske | čerstvé |
| | | sušené |
| | jedlé | sušené |

| Droždie | Farba | Vzhľad | Vôňa a chuť |
|---------------------|--------------------------------|--|-------------------------------|
| Pekárske čerstvé | svetlo šedá až svetlo hnedá | bez povlaku a jednotlivých kolónii plesní | čistá, bez známok rozkladu |
| Pekárske sušené | svetlo šedá až svetlo hnedá | suché granule | čistá, bez známok rozkladu |
| Sušené jedlé | svetlo hnedá | drobné lupienky až prach | čistá, bez známok rozkladu |

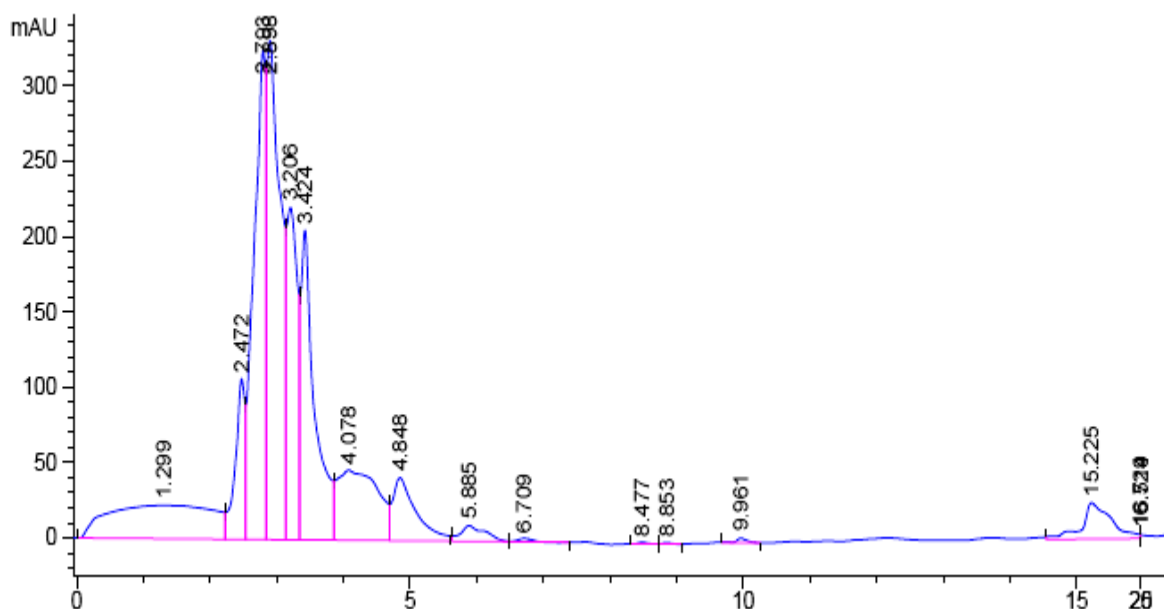
| Droždie | Sušina min. (%) | Mohutnosť kysnutia | Popol v sušine max. (%) | Čistota |
|---------------------|--------------------|-----------------------|----------------------------|---|
| Pekárske čerstvé | 25 | max. 70 minút | 9 | obsah nepravých kvasiniek rodu <i>Torula</i> , <i>Mycoderma</i> , <i>Candida</i> , <i>Pichia</i> je prípustný len v množstvách, ktoré nepriaznivo neovplyvnia droždie |
| Pekárske sušené | 90 | max. 70 minút | 9 | |
| Sušené jedlé | 90 | - | 9 | |

PRÍLOHA P VI: CHROMATOGRAMY STANOVENIA OBSAHU RIBOFLAVÍNU V DROŽDÍ METÓDOU HPLC

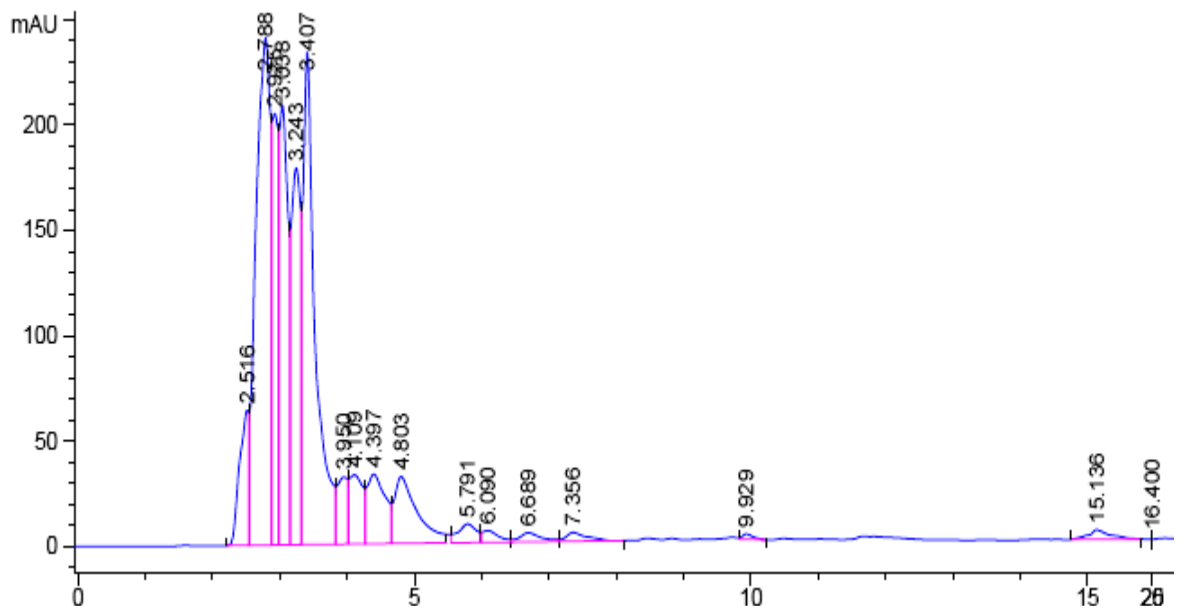
Stanovenie riboflavínu v čerstvom droždí metódou HPLC



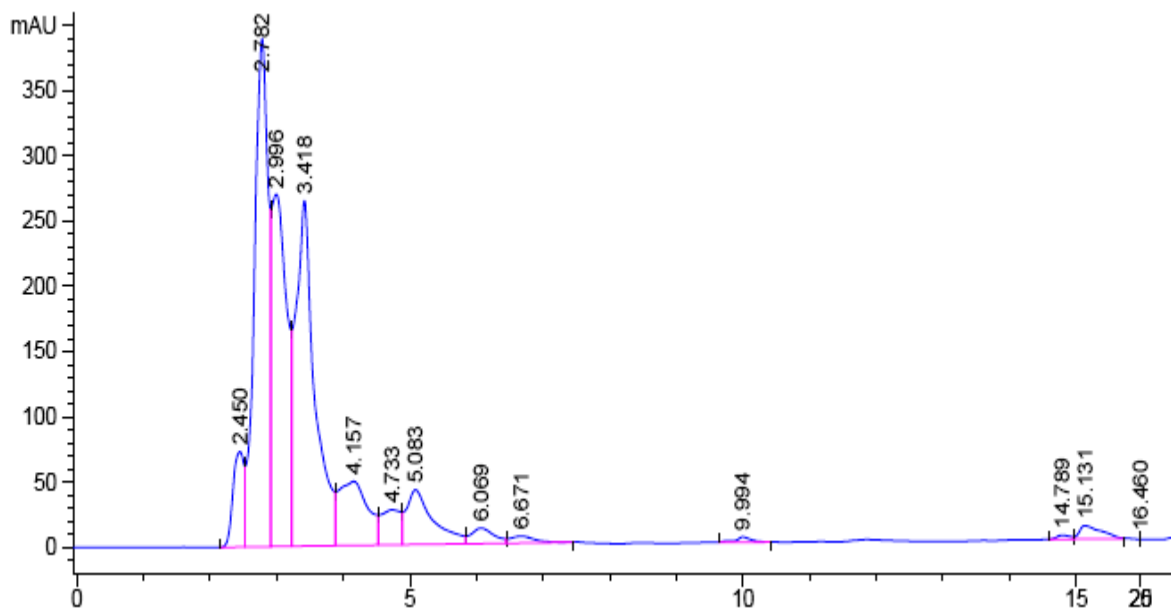
Stanovenie riboflavínu v droždí skladovanom v tme pri 8°C po 7 dňoch metódou HPLC



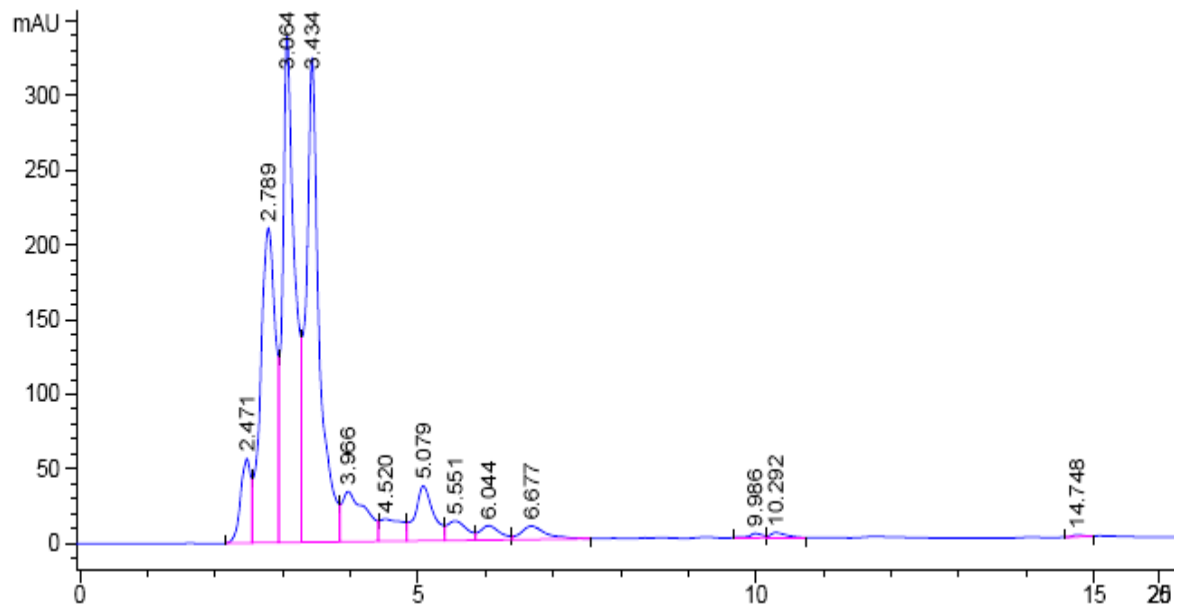
Stanovenie riboflavínu v droždí skladovanom na svetle pri laboratórnej teplote po 7 dňoch metódou HPLC



Stanovenie riboflavínu v droždí skladovanom v tme pri 8°C po 14 dňoch metódou HPLC



Stanovenie riboflavínu v droždi skladovanom na svetle pri laboratórnej teplote po 14 dňoch metódou HPLC



PRÍLOHA P VII: ZMENY MNOŽSTVA RIBOFLAVÍNU PRI SKLADOVANÍ V TME PRI 8°C A NA SVETLE PRI LABORATÓRNEJ TEPLOTE

