

# **Stanovení obsahu laktózy v jogurtech v závislosti na době skladování**

Bc. Alena Minářová

---

Diplomová práce  
2011

 **Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně**  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav biochemie a analýzy potravin

akademický rok: 2010/2011

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Alena MINÁŘOVÁ**  
Osobní číslo: **T090264**  
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Stanovení obsahu laktózy v jogurtech v závislosti na době skladování**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Charakteristika jogurtu, chemické složení.
2. Laktóza a její metabolismus v jogurtu.
3. Metabolismus laktózy v lidském organismu.
4. Metody stanovení laktózy v mléčných výrobcích.

### II. Praktická část

1. Metodika stanovení laktózy.
2. Stanovení laktózy v průběhu skladování ve vybraných vzorcích jogurtu.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: tiskněná/elektronická

Seznam odborné literatury:

- [1] TAMIME, A., ROBINSON, R. /Yoghurt: Science and Technology/. /2nd ed., reprinted 2001/. Boca Raton, FL : CRC Press, 2001. 619 s. ISBN:9780849317859.
- [2] WONG, Noble, ed. ; JENNESS, Robert. /Fundamentals of Dairy Chemistry/. /Third ed.; /ed. 1999/. Gaithersburg, Maryland : Aspen Publishers, 1999. 779 s. ISBN:0834213605.
- [3] LI, Betty W.; SCHUHMAN, Priscilla J. ; HOLDEN, Joanne M. Determination of Sugars in Yogurt by Gas-Liquid Chromatography. J. Agric. Food Chem.. 1983, 31, s. 985-989.
- [4] CHIESA, Luca Maria, et al. Gas chromatographic determination of galactose in milk Example of a switching valve used for the protection of the capillary column. Journal of Chromatography A., 1999, 847, s. 47-51.
- [5] FOX, P, ed. ; MCSWEENEY, P.L.H. /Dairy Chemistry and Biochemistry/. London : Blackie Academic & Professional, 1998. XIV, 478 s. ISBN:0412720000.
- [6] HUI, Y, ed. /Dairy Science and Technology Handbook/. New York, N.Y:VCH, 1993. 3 sv., 1304 s. ISBN:978156081078.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Markéta Šípálová

Ústav biochemie a analýzy potravin

Datum zadání diplomové práce:

25. února 2011

Termín odevzdání diplomové práce:

20. května 2011

Ve Zlíně dne 21. března 2011

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.

*děkan*



doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.

*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: Bc. Alena Minářová

Obor: Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby <sup>1)</sup>;
- 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 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> 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 <sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užit své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně dne 18.5.2011

.....

---

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

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

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

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

<sup>2)</sup> 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).

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

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-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 přihlédne k vyšší výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Tato diplomová práce se zabývá problematikou laktózy, jogurtů a obsahu laktózy v jogurtech. Hlavním cílem práce bylo sledování obsahu laktózy ve vzorcích jogurtů, které byly chladírensky skladovány různě dlouhou dobu. Pro stanovení laktózy byla vybrána metoda plynové chromatografie s hmotnostně-spektrometrickým detektorem a konkrétní podmínky byly optimalizovány. Na závěr byla vyhodnocena hydrolytická činnost enzymů bakterií mléčného kvašení během skladování jogurtů. Z výsledků vyplývá, že si bakterie mléčného kvašení do značné míry zachovávají kysací schopnost i během chladírenského skladování jogurtů.

**Klíčová slova:** laktóza, jogurt, bakterie mléčného kvašení, fermentace, stanovení laktózy

## **ABSTRACT**

This thesis deals with the lactose, yoghurt and lactose content in yoghurt. The main objective was to monitor the lactose content in yoghurt samples, which were stored in the refrigerator for different lengths of time. For the determination of lactose was selected method of gas chromatography-mass spectrometric detection and specific conditions were optimized. At the end of this work hydrolytic activity of lactic acid bacteria enzymes was evaluated during yoghurt storage. The results show that lactic acid bacteria are largely retained the fermentation ability during refrigerated storage of yoghurt.

**Keywords:** lactose, yoghurt, lactic acid bacteria, fermentation, lactose determination

Upřímné poděkování patří mé vedoucí diplomové práce paní Ing. Markétě Šípalové, za cenné rady a připomínky, odborné vedení i praktickou pomoc při tvorbě diplomové práce.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>11</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>12</b>
<b>1 CHARAKTERISTIKA JOGURTU, CHEMICKÉ SLOŽENÍ</b> .....	<b>13</b>
1.1 ÚVOD .....	13
1.2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ JOGURTU .....	16
1.2.1 Sacharidy .....	16
1.2.2 Bílkoviny .....	17
1.2.3 Tuky .....	18
1.2.4 Vitamíny.....	19
1.2.5 Minerály .....	20
1.3 VÝROBA JOGURTU .....	21
1.3.1 Úprava mléka .....	22
1.3.2 Přídavek stabilizátorů.....	23
1.3.3 Přídavek sladících složek .....	24
1.3.4 Přídavek různých dalších složek .....	25
1.3.5 Homogenizace.....	26
1.3.6 Tepelné ošetření .....	26
1.3.7 Fermentační proces .....	27
1.3.8 Přídavek ovoce a/nebo aromat a barviv .....	28
1.3.9 Chlazení.....	29
1.3.10 Balení .....	29
1.3.11 Skladování, transport, distribuce.....	30
<b>2 LAKTÓZA A JEJÍ METABOLISMUS V JOGURTU</b> .....	<b>32</b>
2.1 ÚVOD .....	32
2.2 CHEMICKÉ A FYZIKÁLNÍ VLASTNOSTI LAKTÓZY .....	33
2.2.1 Struktura .....	33
2.2.2 Rozpustnost .....	33
2.2.3 Krystalizace .....	34
2.2.4 Sladivost.....	34
2.3 BIOSYNTÉZA LAKTÓZY .....	36
2.4 VÝZNAMNÉ REAKCE LAKTÓZY .....	37
2.4.1 Hydrogenace laktózy – výroba laktitolu.....	37
2.4.2 Isomerace laktózy – výroba laktulózy .....	37
2.4.3 Oxidace laktózy – výroby galaktosylglukonové kyseliny .....	38
2.4.4 Výroba laktosylmočoviny.....	39
2.4.5 Hydrolýza laktózy .....	39
2.4.6 Fermentace laktózy.....	40
2.4.7 Maillardova reakce.....	40
2.5 METABOLISMUS LAKTÓZY V JOGURTU .....	41
2.5.1 Homofermentativní kvašení laktózy v jogurtu.....	41
2.5.2 Heterofermentativní kvašení laktózy v jogurtu .....	42
2.5.3 Aktivita $\beta$ -galaktozidázy v mikroorganismech pro fermentaci jogurtu .....	43



2.5.4	Produkce kyseliny mléčné.....	43
2.5.5	Další produkty fermentace cukrů v jogurtech .....	44
<b>3</b>	<b>METABOLISMUS LAKTÓZY V LIDSKÉM ORGANISMU.....</b>	<b>45</b>
3.1	FYZIOLOGIE TRÁVENÍ A VSTŘEBÁVÁNÍ .....	45
3.2	TRÁVENÍ A VSTŘEBÁVÁNÍ LAKTÓZY .....	48
3.3	INTOLERANCE LAKTÓZY .....	51
<b>4</b>	<b>METODY STANOVENÍ LAKTÓZY V MLÉČNÝCH VÝROBCÍCH.....</b>	<b>54</b>
4.1	POLARIMETRICKÉ STANOVENÍ LAKTÓZY .....	54
4.2	STANOVENÍ LAKTÓZY POMOCÍ OXIDO-REDUKČNÍ TITRACE .....	54
4.3	GRAVIMETRICKÉ STANOVENÍ LAKTÓZY .....	55
4.4	KOLORIMETRICKÉ STANOVENÍ LAKTÓZY .....	55
4.5	SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ LAKTÓZY .....	56
4.6	ENZYMATICKO-KRYOSKOPICKÉ STANOVENÍ LAKTÓZY .....	56
4.7	ENZYMATICKÉ STANOVENÍ LAKTÓZY .....	56
4.8	STANOVENÍ LAKTÓZY POMOCÍ HPLC .....	57
4.9	STANOVENÍ LAKTÓZY POMOCÍ PLYNOVÉ CHROMATOGRRAFIE .....	58
4.9.1	Derivatizace vzorků.....	59
4.9.2	Přístrojové vybavení.....	59
4.9.3	Aplikace GC.....	62
<b>II</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST.....</b>	<b>64</b>
<b>5</b>	<b>STANOVENÍ OBSAHU LAKTÓZY V JOGURTECH METODOU PLYNOVÉ CHROMATOGRRAFIE.....</b>	<b>66</b>
5.1	STANOVENÍ LAKTÓZY V PRŮBĚHU SKLADOVÁNÍ VE VYBRANÝCH VZORCÍCH JOGURTU.....	66
5.1.1	Příprava vzorků .....	66
5.1.2	Chemikálie a spotřební materiál.....	68
5.1.3	Přístroje a pomocné vybavení .....	68
5.2	METODIKA STANOVENÍ LAKTÓZY METODOU PLYNOVÉ CHROMATOGRRAFIE .....	70
5.3	POSTUP PRÁCE.....	71
5.4	STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ .....	73
5.5	VÝSLEDKY .....	<b>CHYBA! ZÁLOŽKA NENÍ DEFINOVÁNA.</b>
	<b>DISKUZE A ZÁVĚR.....</b>	<b>78</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>80</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>88</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>90</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>91</b>
	<b>SEZNAM GRAFŮ .....</b>	<b>92</b>

<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>93</b>
---------------------------	-----------

## ÚVOD

Laktóza – mléčný cukr, je základní sacharidická složka mléka veškerých savců. Je to disacharid složený z glukózy a galaktózy, které jsou vázány  $\beta$ -glykosidickou vazbou. Laktóza je vedle tuků a bílkovin hlavní nutriční složkou mléka, je nejdůležitějším zdrojem energie kojených mláďat. Dále hraje laktóza klíčovou úlohu při výrobě zakysaných mléčných produktů a výrazně ovlivňuje texturu zahuštěných a mražených mléčných výrobků. Obsah laktózy v mléce je kromě mnoha jiných faktorů ovlivněn především druhem savce, kdy kravské, kozí a ovčí mléko obsahuje kolem 5 %, zatímco mateřské mléko obsahuje až 7 % laktózy.

Přijatá laktóza je hydrolyticky štěpena enzymem  $\beta$ -galaktozidázou (konkrétně laktáza-phlorizin hydrolázou) neboli laktázou v tenkém střevě savců. Laktáza se nachází ve sliznici duodena a jejuna (konkrétně v membráně kartáčového lemu enterocytů). U velké části lidské populace (přibližně 70 %), především v Asii, Africe a Jižní Americe, se po skončení období kojení výrazně sníží produkce laktázy. Tato laktázová deficience – hypolaktázie, vede k malabsorpci laktózy (porucha vstřebávání), příp. se vyskytnou projevy intolerance laktózy.

Jogurt je tradiční kysaný mléčný produkt, který se vyrábí bakteriální fermentací mléka. Nejčastěji používanou fermentační kulturou bývá symbiotická směs kultur *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* a *Lactobacillus delbruechii* subsp. *bulgaricus*, které fermentují laktózu na kyselinu mléčnou.

Vzhledem k tomu, že v nekonzervovaných jogurtech zůstávají bakterie mléčného kvašení živé, dochází během skladování k částečnému dokysávání výrobků, přestože hydrolytická aktivita bakteriálních enzymů je při chladírenských teplotách nízká. Úbytek laktózy v jogurtech během dokysávání je právě předmětem zkoumání v praktické části této diplomové práce.

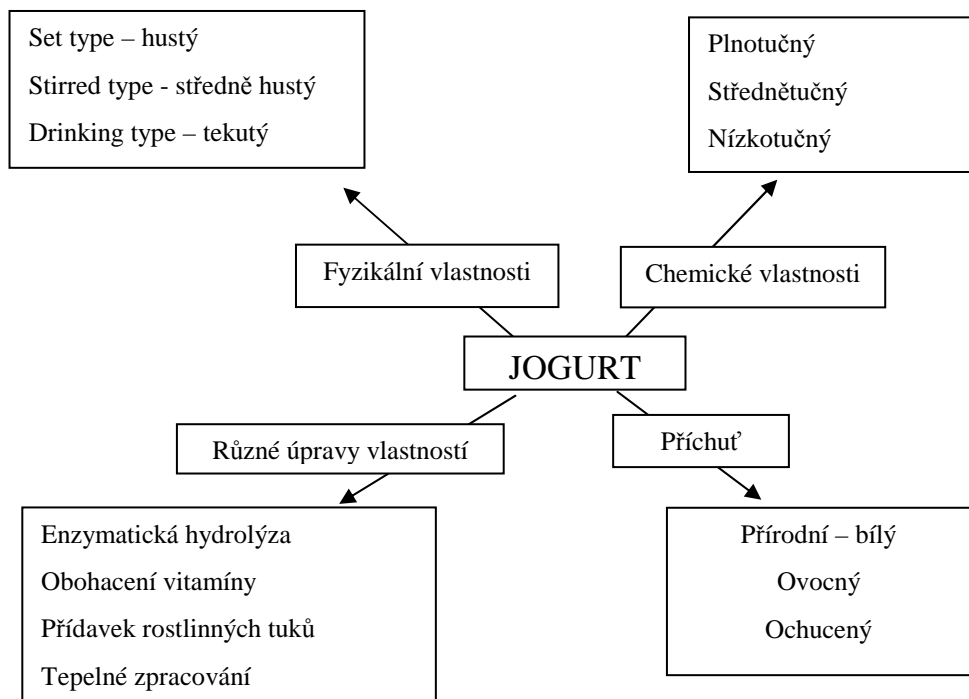
## TEORETICKÁ ČÁST

# 1 CHARAKTERISTIKA JOGURTU, CHEMICKÉ SLOŽENÍ

## 1.1 Úvod

Jogurt je tradiční fermentovaný mléčný výrobek. Předpokládá se, že lidé začali zkvašovat mléko na výrobek podobný jogurtu již před 10 – 15 tis.lety, po přechodu od sběračů po výrobce potravin a domestikaci zvířat. Archeologické nálezy dokazují první výrobce jogurtu v Mezopotámii, Severovýchodní Africe a Asii [1]. Dnes je výroba jogurtu rozšířena po celém světě a zvláště v posledních desetiletích spotřeba jogurtů značně vzrostla.

Jogurt se vyrábí bakteriální fermentací mléka. V různých částech světa se používá mléko mnoha savců, nejrozšířenější je ovšem mléko kravské. Nejčastěji používanou fermentační kulturou bývá symbiotická směs kultur *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, které fermentují laktózu na kyselinu mléčnou. Pro zvýšení tukuprosté sušiny se běžně do mléka před fermentací přidává sušené nebo kondenzované odtučněné mléko, sušená nebo kondenzovaná smetana, podmásílí, mléčné bílkoviny, laktóza nebo/a syrovátka; případně se mléko zahušťuje, aby bylo dosaženo krémové až pudinkové konzistence[1,2].



Obr.1.1 Schéma klasifikace jogurtů [1]

Jogurty lze klasifikovat podle mnoha aspektů, základní schematické rozdělení je naznačeno na Obr. 1.1.

Dle české legislativy (77/2003 Sb. Vyhláška, kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy, jedlé tuky a oleje) se jogurtem rozumí kysaný mléčný výrobek získaný kysáním mléka, smetany, podmáslí nebo jejich směsi pomocí mikroorganismů *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (jako protosymbiotická směs). Kromě této základní jogurtové kultury mohou být přidávány kmeny produkující kyselinu mléčnou a pomáhající dotvářet specifickou chuťovou nebo texturovou charakteristiku výrobku. Optimální poměr obou základních kmenů musí být zachován. Obsah živých mikroorganismů musí být minimálně  $10^7$  na 1 g jogurtu [3].

Tab.1.1 Požadavky na obsah tuku v kysaných mléčných výrobcích [3]

Druh výrobku	Obsah tuku (% hmot.)	Obsah sušiny tukuprosté (v % hmot. nejméně)
Kysaná smetana	více než 10,0 včetně	
Kysané mléko včetně jogurtového	více než 0,5	8,0
Kysané mléko odtučněné	méně než 0,5 včetně	
Podmáslí	méně než 1,5 včetně	7,0
Jogurt bílý smetanový	více než 10,0 včetně	
Jogurt bílý	více než 3,0 včetně	8,2
Jogurt bílý se sníženým obsahem tuku	méně než 3,0	
Jogurt bílý nízkotučný nebo odtučněný	méně než 0,5 včetně	

Jogurt by měl mít celkovou titrační kyselost (jako kyselina mléčná) vždy nejméně 0,3 %. Minimálně 0,15 % celkové kyselosti musí být získána fermentací, což je ověřováno kontrolou přítomnosti D(-) i L(+) enantiomerů kyseliny mléčné [2].

Kromě klasických jogurtů, které jsou kapalné, se dnes vyrábí také jogurty v dalších skupenstvích – koncentrované, mražené nebo sušené jogurty [1].

Především pro pacienty s laktózovou intolerancí (dále jen LI) jsou vyráběny jogurty se sníženým obsahem laktózy nebo bezlaktózové, v nichž je laktóza hydrolyzována  $\beta$ -D-galaktosidázou na glukózu a fruktózu. Výsledný produkt je sladší než nehydrolyzovaný, protože laktóza má nižší sladivost než glukóza a fruktóza [1].

## 1.2 Chemické složení jogurtu

Fermentované mléčné výrobky obecně patří díky svému složení mezi nutričně hodnotné potraviny. Sacharidy, tuky a bílkoviny v kysaných mléčných výrobcích jsou lépe stravitelné než v mléce, protože jsou částečně hydrolyzovány fermentací. Především pro pacienty s intolerancí laktózy je výhodná částečná hydrolyza laktózy, ale také přítomnost laktázy v samotných kulturách. Obsah vitamínů bývá fermentací nezměněn nebo mírně snížen, kromě obsahu kyseliny listové, který bývá mírně zvýšen. Na přímý obsah minerálů fermentace nemá velký vliv, ale zlepšuje se využitelnost vápníku, železa a fosforu [4].

Tab.1.2 Některé typické hodnoty základních složek mléka a jogurtů ve 100 g produktu [1]

Složka	Mléko - plnotučné	Jogurt			
		Plnotučný	Nízkotučný	Nízkotučný/ovocný <sup>a</sup>	Jogurt řeckého typu
Voda (g)	87,8	81,9	84,9	77	77
Energetická hodnota (kcal)	66	79	56	90	115
Bílkoviny (g)	3,2	5,7	5,1	4,1	6,4
Tuk (g)	3,9	3,0	0,8	0,7	9,1
Sacharidy (g)	4,8	7,8	7,5	17,9	Neuvedeno
Vápník (mg)	115	200	190	150	150
Fosfor (mg)	92	170	160	120	130
Sodík (mg)	55	80	83	64	Neuvedeno
Draslík (mg)	140	280	250	210	Neuvedeno
Zinek (mg)	0,4	0,7	0,6	0,5	0,5

<sup>a</sup> – nutriční hodnota ovocných jogurtů se mění podle druhu a obsahu ovoce, sladidel a stabilizátorů

### 1.2.1 Sacharidy

V přírodním bílém jogurtu bez přídavku sladidel se z cukrů vyskytuje především laktóza, obsah dalších sacharidů je zanedbatelný. I přes fermentační proces, zůstává obsah laktózy vysoký, především díky umělému zvyšování tukuprosté sušiny přídavkem sušeného mléka,



syrovátky aj. Přestože je obsah laktózy v jogurtech přibližně stejný jako v mléce, je laktóza v jogurtu a jiných fermentovaných mléčných výrobcích mnohem stravitelnější než v mléce. Předpokládá se, že bakterie pokračují ve fermentaci i při průchodu trávicím traktem s tím, že jsou částečně chráněny před žaludečními kyselinami v koagulátu jogurtu. A především, i když je bakterie usmrcena, její buněčný obal dále chrání laktázu před silnou žaludeční aciditou. Tímto způsobem se dostane laktáza bez znehodnocení až do střeva, kde se působením žlučových kyselin uvolní z buněčných obalů a může se účastnit hydrolyzy laktózy. Z tohoto důvodu některé výzkumy dokazují, že endogenní laktáza pocházející z fermentačních mikroorganismů má lepší účinky na zažívání pacientů s LI než komerční laktázové preparáty [1,5].

Bakterie mléčného kvašení fermentují laktózu na kyselinu mléčnou, která se v jogurtu vyskytuje ve dvou izomerech, D(-) a L(+). *S. thermophilus* vytváří L(+) formu, zatímco *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* D(-) izomer nebo racemickou směs DL v závislosti na linii. L(-) izomer kyseliny mléčné je snadno tráven, zatímco D(+) forma se metabolizuje obtížně a je dokázáno, že nadměrný příjem může způsobovat acidózu u dětí [1].

Především do ovocných jogurtů se přidávají stabilizátory, aby se zabránilo vysrážení syrovátky během distribuce. Často jsou to polysacharidy s hydrokoloidními vlastnostmi – přírodní gumy, karagenany, deriváty celulózy. Mají příznivý účinek na zažívání – zlepšení zažívání jako „střevní plnivo“; absorpce některých potenciálně nebezpečných bakteriálních metabolitů; částečná stabilizace hladiny glukózy; snížení hladiny cholesterolu v krvi [6]; zpomalení průchodu laktózy zažívacím traktem v důsledku koagulace s bílkoviny, což prodlužuje čas pro rozštěpení laktózy a zmírní tak příznaky LI. Použití těchto stabilizátorů je ovšem omezené, protože jsou většinou nákladné a levnější alternativy často způsobují nepříjemnou chuť jogurtu [1,6].

### 1.2.2 Bílkoviny

Mléko je velmi bohaté na bílkoviny a jejich obsah v jogurtech je často ještě zvýšen přidávkou dalších mléčných surovin kvůli zvýšení tukuprosté sušiny. Mléčné bílkoviny se dělí na kaseiny – 24-28 g/litr mléka ( $\alpha_{s1}$  kaseiny,  $\alpha_{s2}$  kaseiny,  $\beta$  kaseiny a  $\kappa$ -kaseiny), syrovátkové bílkoviny – 9-11 g/litr mléka ( $\beta$ -laktoglobuliny,  $\alpha$ -laktalbuminy, sérové globuliny a imuno-

globuliny), bílkoviny tukových membrán (MFGM A-D), minoritní bílkoviny (transferin, laktoferin, glykoproteiny, vitamin B12 aj.) a enzymy [1,4].

Z hlediska výživové kvality jsou především významné  $\alpha$ -laktalbuminy a  $\beta$ -laktoglobuliny, které se skládají z mnoha esenciálních aminokyselin. Tyto bílkoviny jsou výborně stravitelné a v jogurtech jsou také částečně rozštěpeny a koagulovány proteolytickou činností bakterií mléčného kvašení, což usnadňuje jejich zpracovatelnost a využitelnost. Při fermentaci interaguje denaturovaný  $\beta$ -laktglobulin prostřednictvím disulfidických vazeb s  $\kappa$ -kaseinem, což má také za následek zvýšení viskozity jogurtu [1,4].

### 1.2.3 Tuky

Mléčný tuk obsahuje především triacylglyceroly, steroly (nejčastěji cholesterol), fosfolipidy (v membránách tukových kuliček), karotenoidy, vitamíny A, D, E, K a také diacylglyceroly, monoacylglyceroly a volné mastné kyseliny, jejichž obsah roste především při lipolýze – tedy také při fermentaci. Triacylglyceroly jsou uspořádány do tukových kuliček o velikosti 1-5  $\mu\text{m}$  [4], které jsou bipolární. Obaly kuliček tvoří membrány složené z fosfolipidů a MFGM bílkovin. Kuličky jsou jemně dispergovány (emulze tuku ve vodě), což usnadňuje přístup trávicích enzymů a zvyšuje tak využitelnost mléčného tuku až na 99 %. Mléčný tuk se skládá z velkého množství různých mastných kyselin (přes 400 [1]) včetně pro člověka esenciálních – kyselina linolová, linolenová. 60-70 % z nich jsou nasycené MK, 25-35 % mononenasyčené a kolem 4 % polynenasycené MK [7].

Jogurty obsahují obvykle 0,5 – 10 % tuku, v závislosti na úpravě tučnosti použitého mléka [1,2,4].

Tab.1.3 Obsah vybraných MK v jogurtech (množství ve 100g) [4]

Mastné kyseliny		Bílý, plnotučný	Bílý, nízkotučný	Ovocný, nízkotučný
Nasycené	Máselná	0,1	0,05	0,03
	Kapronová	0,07	0,03	0,02
	Kaprylová	0,04	0,02	0,01
	Kaprinová	0,09	0,04	0,03
	Laurová	0,11	0,05	0,04

	Mastné kyseliny	Bílý, plnotučný	Bílý, nízkotučný	Ovocný, nízkotučný
	Myristová	0,34	0,16	0,11
	Palmitová	0,89	0,42	0,29
	Stearová	0,32	0,15	0,1
Nenasycené	Palmitolejová	0,07	0,03	0,02
	Olejová	0,74	0,35	0,25
	Linolová	0,06	0,03	0,02
	Linolenová	0,03	0,01	0,01

#### 1.2.4 Vitamíny

Koncentrace vitamínů v jogurtu se díky tepelným úpravám a fortifikacím mléka, použitým bakteriím a různým podmínkám fermentace liší od koncentrace v samotném mléce. Fortifikace vitamíny A a C je možná, ale při dvoutýdenním skladování dochází ke ztrátám nad 50 % [8]. Zvláště v nízkotučných jogurtech je obohacení vitamínem A velmi vhodné, aby byla zachována nutriční hodnota mléka. Jogurtové kultury, použité za správných podmínek (působení bakterií 3-4 hodiny, inkubační teplota 42 °C), dokáží zvyšovat obsah některých vitamínů až o 20 % [9]. Jedná se o thiamin, riboflavin, pyridoxin, kyselinu listovou a biotin [1,4,8,9].

Tab.1.4 Obsah vitamínů v mléce a jogurtech [1]

Vitamín	Mléko		Jogurt		
	Plnotučné	Odtučněné	Plnotučný	Nízkotučný	Ovocný/nízkotučný
Retinol (μg)	52	1	28	8	10
Karoten (μg)	21	N	21	5	4
Thiamin (B1) (μg)	30	40	60	50	50
Riboflavin (B2) (μg)	170	170	270	250	210
Pyridoxin (B6) (μg)	60	60	100	90	80
Kyanokobalamin (B12) (μg)	0,4	0,4	0,2	0,2	0,2
Vitamin C (mg)	1	1	1	1	1

Vitamín	Mléko		Jogurt		
	Plnotučné	Odtučněné	Plnotučný	Nízkotučný	Ovocný/nízkotučný
Vitamin D ( $\mu\text{g}$ )	0,03	N	0,04	0,01	0,01
Vitamin E ( $\mu\text{g}$ )	90	N	50	10	10
Kyselina listová ( $\mu\text{g}$ )	6	5	18	17	16
Kyselina nikotinová ( $\mu\text{g}$ )	100	100	200	100	100
Kyselina pantothenová ( $\mu\text{g}$ )	350	320	500	450	330
Biotin ( $\mu\text{g}$ )	1,9	1,9	2,6	2,9	2,3
Cholin (mg)	12,1	4,8	-	0,6	-

N-nepatrné množství

### 1.2.5 Minerály

Obsah minerálů na 100 g výrobku je v jogurtu v porovnání s mlékem vyšší, protože je zvýšen podíl tukuprosté sušiny. Také biologická dostupnost minerálů z jogurtu oproti mléku roste, protože většina minerálů se zde díky nízkému pH vyskytuje v iontové podobě [1,2].

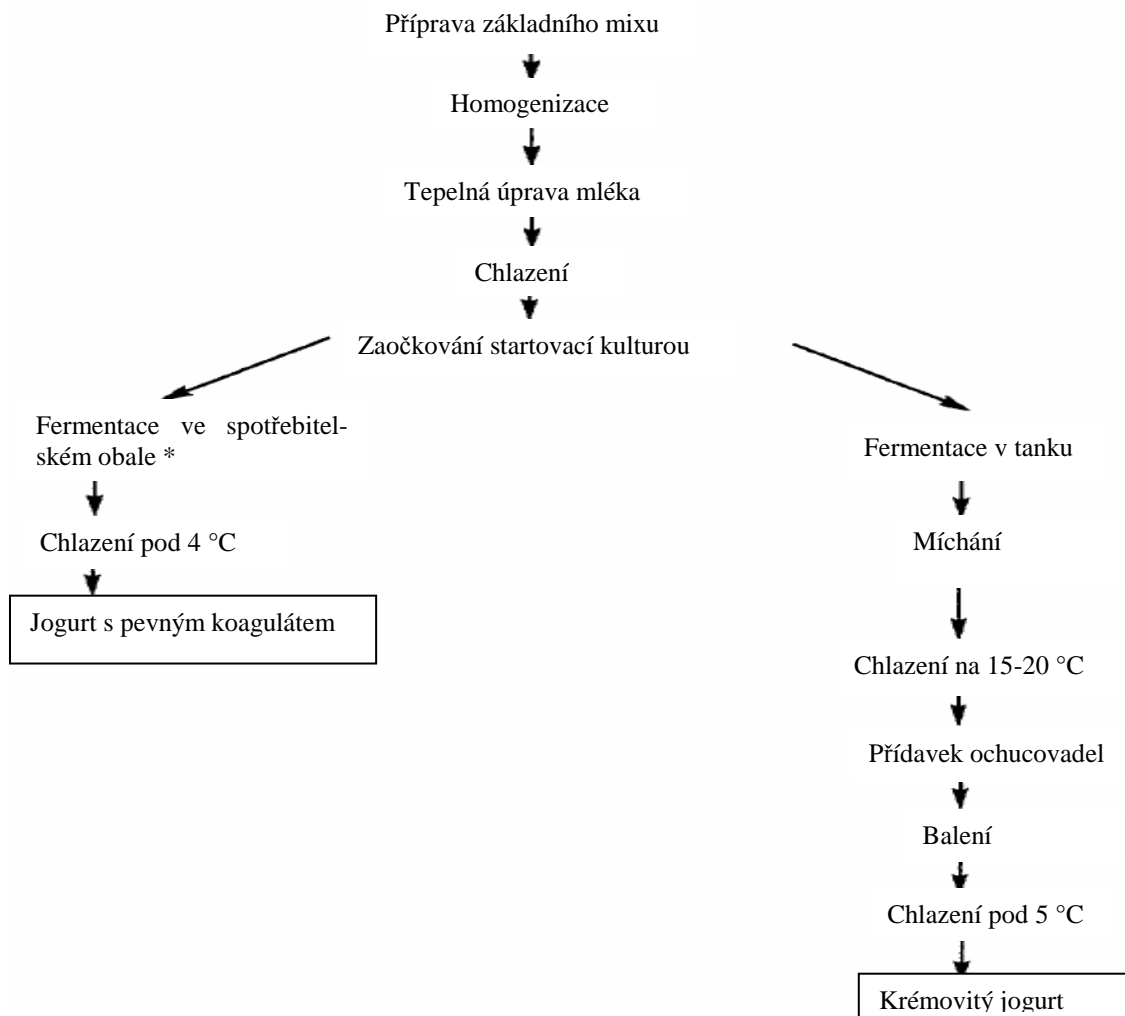
Jogurt je zejména vynikajícím zdrojem vápníku, jehož vstřebatelnost a využitelnost z jogurtu je výrazně vyšší oproti jiným zdrojům [10]. Podobné je to i s fosforem, hořčíkem a zinkem [11]. Jogurty také obsahují poměrně velké množství sodíku a draslíku, proto nejsou vhodné pro výživu kojenců do šesti měsíců věku [12]. Obsah minerálních solí v mléce může být případně sníženo před zpracováním na jogurt. Z obsahu stopových prvků v jogurtu stojí za zmínku železo, jód a zinek [1,2,10,11,12].

Tab.1.5 Obsah některých makrominerálů v mléce a jogurtu (mg/100g produktu) [4]

Produkt	Vápník	Fosfor	Hořčík	Sodík	Draslík
<b>Plnotučné mléko</b>	119	93	13	49	152
<b>Nízkotučné mléko</b>	122	95	14	50	154
<b>Čistý nízkotučný jogurt</b>	183	144	17	70	234

### 1.3 Výroba jogurtu

Základní surovinou pro výrobu jogurtu je mléko. Nejpoužívanější je mléko kravské, ale v různých částech světa se používá také mléko buvolí, kozí, ovčí, koňské a prasečí. Tučnost použitého mléka se upravuje na plnotučné, částečně odtučněné – polotučné nebo nízkotučné. Jogurty se dají dělit podle různých hledisek, odlišnými výrobními procesy se získají jogurty různých reologických vlastností: *set type* – jogurt s pevným koagulátem, fermentace probíhá ve spotřebitelském obale; *stirred type* – krémovitý jogurt, fermentace probíhá v tancích před plněním do jednotlivých obalů a *drinking type* – tekutý, při jehož výrobě se nepřidávají žádné látky pro zvýšení tukuprosté sušiny, případně se ředí jogurty fermentované v tancích [1,13,14].



Obr. 1.2 Schéma výroby jogurtů [15] \* - možnost přidání sladidel nebo/a ovocné složky (příp. ovocné příchutě)

Stabilitu, viskozitu, texturu a mikrostrukturu výrobku může ovlivnit mnoho faktorů: přidané látky zvyšující tukuprostou sušinu a stabilizátory, podmínky zpracování mléka (tlak při homogenizaci, tepelné opracování aj.), startovací kultury (druhy, podmínky), čas a rychlost chlazení, mechanická manipulace, po výrobní zacházení (dodržování chladírenského řetězce, otřesy atd.) [1].

### 1.3.1 Úprava mléka

Základní suroviny pro výrobu jogurtů – mléko a smetana – musí být kvalitní, především prosté různých inhibitorů kysání jako jsou antibiotika, rezidua čistících prostředků, mléko z žláz postižených mastitidou, mlezivo nebo žluklé mléko. Také nesmí být mikrobiálně kontaminované, metabolity nežádoucích mikroorganismů mohou omezovat růst bakterií mléčného kvašení a také způsobovat negativní změny v konzistenci, chuti a vůni jogurtu. Mléko se uchovává v izolovaných tancích, do 1 hodiny musí být zchlazeno pod 10 °C a do dvou hodin pod 5 °C. Z tanků se vyzvedává ve dvoudenních intervalech [2].

Před začátkem samotné výroby je třeba mléko zbavit nečistot jako jsou epitelové buňky a leukocyty z vemene dojnice, zbytky slámy, hlíny aj. Nejčastěji se k tomuto účelu používají tkaninové filtry a/nebo odstředivky. Při výrobě jogurtu většinou není třeba mléko baktofugovat nebo mikrofiltrat, protože nežádoucí mikroorganismy jsou později inaktivovány při teplem ošetření [1].

Chemické složení mléka se výrazně liší při porovnávání mléka různých živočišných druhů. Nicméně i v rámci jednoho druhu jsou významné rozdíly ve složení v závislosti na plemenu, fázi laktace, věku dojnice, intervaly mezi dojeními, ročním období, teplotě prostředí, způsobu chovu a výživy, zdravotním stavu dojnice atd. Proto je nutné zejména obsah tuku, sušiny a tukuprosté sušiny v mléce pro výrobu jogurtů standardizovat [1].

Při standardizaci obsahu tuku se mléko na talířových odstředivkách rozdělí na odstředěné mléko a smetanu a poté se opět míchají na požadovanou tučnost. Nízkotučné jogurty obsahují kolem 0,5 % tuku, střednětučné kolem 1,5 % a tučné nad 3 % tuku. Dle české legislativy (77/2003 Sb. Vyhláška, kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy, jedlé tuky a oleje) [3] musí být obsah tukuprosté sušiny v jogurtech 8,2 hmot. %. Zvýšení tukuprosté sušiny mléka – fortifikace se děje přídavkem sušeného nebo kondenzovaného odtučněného mléka, sušené nebo kondenzované smetany, podmáslí,

mléčných bílkovin, laktózy, syrovátky a/nebo nemléčných proteinů; případně zahuštěním na vakuových odparkách nebo membránovou filtrací. Fortifikace mléka výrazně ovlivňuje reologické vlastnosti, jako konzistenci a viskozitu jogurtu. Nejčastěji se obohacuje mléko na obsah 12-20 % tukuprosté sušiny, nejlepších vlastností jogurtu se dle [16] dosáhlo při obsahu 15-16 % [1,3,16].

### 1.3.2 Přídavek stabilizátorů

Tab.1.6 Klasifikace stabilizátorů (gum) používaných při výrobě jogurtu [1]

Přírodní gummy	Modifikované přírodní nebo polysyntetické gummy	Syntetické gummy
Rostlinné exudáty: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Arabská guma</li> <li>• Tragakantová guma</li> <li>• Karayská guma</li> </ul> Rostlinné extrakty: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pektiny</li> </ul> Semenná drť: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Karobová guma</li> <li>• Guma guar</li> </ul>	Deriváty celulózy: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Karboxymethylcelulóza</li> <li>• Methylcelulóza</li> <li>• Hydroxyethylcelulóza</li> <li>• Hydroxypropylcelulóza</li> <li>• Hydroxypropylmethylcelulóza</li> <li>• Mikrokrystalická celulóza</li> </ul>	Polymery <ul style="list-style-type: none"> <li>• Polyvinyl deriváty</li> <li>• Polyetylen deriváty</li> </ul>
Mořské řasy: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agar</li> <li>• Algináty</li> <li>• Karagenan</li> <li>• Furcelleran</li> </ul>	Produkty fermentace: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dextran</li> <li>• Xantan</li> </ul>	
Cereální škroby <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pšeničný</li> <li>• Kukuřičný</li> </ul>	Různé deriváty: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pektin se sníženým obsahem metoxy skupin</li> <li>• Propylenglykol alginát</li> <li>• Želetinované škroby</li> <li>• Modifikované škroby (karboxymethyl-, hydroxyetyl- a hydroxypropyl-škrob)</li> </ul>	
Živočišné produkty <ul style="list-style-type: none"> <li>• Želatina</li> <li>• Kasein</li> </ul>		
Sojová bílkovina		

Stabilizátory přidávané do mléka pro výrobu jogurtů obecně patří mezi polysacharidy a jsou buď přírodní, modifikované přírodní, polysyntetické nebo syntetické. Klasifikace těch-

to gum je znázorněna v Tab.1.6. Použití stabilizátorů je v mnoha zemích legislativně omezeno [1].

Základním důvodem pro přidání stabilizátorů do mléka pro výrobu jogurtu je zlepšení a udržení textury, konzistence, viskozity a vzhledu jogurtu. Při i po výrobě je jogurt vystaven mechanickému namáhání, při výrobě také tepelnému opracování, což může mít za následek zhoršení jeho reologických vlastností – např. snížení viskozity, nebo se dokonce může oddělit syrovátka. Přídavek stabilizátorů těmto vadám zabraňuje. Jsou to hydrokoloidy, které vážou vodu a zvyšují viskozitu zesíťováním struktury pomocí záporně nabitých skupin [1].

### 1.3.3 Přídavek sladících složek

Pro zmírnění kyselé chuti se do jogurtů přidávají různé cukry a sladidla. Jedná se zejména o ovocné a ochucené jogurty, méně žádané jsou sladké přírodní (bílé) jogurty. Množství a druh přidaných sladících složek je závislý na mnoha faktorech, jako je obsah přírodních cukrů v použitém ovoci, preference spotřebitelů, zdravotní hledisko, možný inhibiční účinek na jogurtové kultury, právní aspekty a ekonomické důvody [1,5].

Celkový obsah cukrů v jogurtu se skládá ze tří složek – zbytkové mléčné cukry (laktóza, galaktóza, glukóza), cukry v ovoci (od citrónů, které obsahují pouze cca 1,6 g cukrů na 100 g po hrozinky s 65 g) a cukry přidané do jogurtu nebo do ovoce [1].

Sladící složky se přidávají nejčastěji až do finálního jogurtu, protože přídavek cukru do mléka před fermentací inhibuje činnost bakterií, zejména *L.delbrueckii* subsp.*bulgaricus* [17]. Přídavkem cukru nad 9 g na 100 g mléka se snižuje kyselost i viskozita finálního jogurtu [18]. Na druhou stranu ničí kontaminující mikroorganismy, zejména osmofilní kvasinky a plísně. Přídavek cukru ovlivňuje činnost mikroorganismů zvýšeným osmotickým tlakem a sníženou aktivitou vody [1,17,18].

Nejčastěji přidávanou sladící složkou je sacharóza, která se přidává buď v krystalické formě nebo ve formě sirupu. Sirup se snadněji rozpouští a rozmíchává, na druhou stranu ovšem obsahuje přes 30 % vlhkosti a tak snižuje sušinu produktu a jogurt řídne [1].

Jiným přírodním sladidlem, které je možné použít, je invertní cukr, nejčastěji invertní sacharózový sirup, který se vyrábí kyselou hydrolyzou cukru (sacharózy) za tepla, stupeň inverze se může pohybovat mezi 10-90 % a vzniká D-glukóza a D-fruktóza. Výhoda sirupu



z invertního cukru spočívá v tom, že sirup i přes vysoký obsah cukru – např. 77 g/100 g, inverze 50 % je možno udržet v nevykrystalizované formě [19]. Rozpouštění a rozmíchávání v jogurtu je pak snadnější [1,19].

Z dalších přírodních cukrů se požívá glukóza a fruktóza, které se vyrábějí ze škrobu, a glukózo-galaktózový sirup, který se vyrábí kyselou nebo enzymatickou hydrolýzou laktózy ze syrovátky. Surovátka vzniká ve velkém množství jakožto vedlejší produkt při výrobě sýru a kaseinu [1].

Používaným modifikovaným přírodním sladidlem je cukerný alkohol sorbitol, který se vyrábí konverzí aldehydické skupiny na molekule glukózy na alkoholickou. Velkou výhodou je pomalé vstřebávání sorbitolu ze střeva do krevního řečiště, proto je velmi vhodný k použití pro diabetiky. Příjem sorbitolu je však omezený, protože ve větších dávkách působí projímavě [1,20].

Velmi diskutované je použití syntetických sladidel. Cyklamátům a sacharinu už byly v mnoha studiích prokázány toxické účinky, jejich použití je legislativně omezené a cyklamáty jsou dokonce v mnoha zemích úplně zakázány. O něco lepší pozici má aspartam, kterému FDA (US Food and Drug Administration) a mnoho zdravotnických organizací v USA přisoudily zdravotní nezávadnost. Bezpečnost byla potvrzena ve více než 100 klinických a toxikologických studiích [21].

#### 1.3.4 Přídavek různých dalších složek

Někteří výrobci mléčných produktů přidávají z různých důvodů do mléka při zpracování na jogurt další přídatné látky. Může to být např. enzym penicilináza, který inaktivuje antibiotikum penicilin, kterým byly léčeny krávy s mastitidou. Přítomnost antibiotik ve mléce je sice legislativně omezena, ale i malé množství ATB negativně ovlivňuje činnost fermentačních bakterií [1,22].

Při zpracování ovoce se v některých případech používají různé konzervační látky, které pak přecházejí také do ovocných jogurtů. V těchto je pak přítomnost konzervantů omezeně povolena (kyselina sorbová a její  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  a  $\text{Ca}^{2+}$  soli, oxid siřičitý a kyselina benzoová). V přírodních (bílých) jogurtech konzervanty být nesmí. Někteří výrobci pak ve snaze prodloužit trvanlivost produktů přidávají určité množství konzervantů do ovocných jogurtů.

Jejich použití je však diskutabilní, protože mnoho studií prokázalo negativní vliv konzervantů na jogurtové kultury [1,23].

Někteří výrobci jogurty fluoridují, fortifikují určitými vitamíny (zejména A a C) nebo minerály (zejména Ca a Fe), přidávají mastné kyseliny nebo vyrábějí jogurt se sníženým obsahem sodíku [1].

Zvláště do ovocných nebo ochucených jogurtů výrobci často přidávají přírodní nebo syntetická barviva a aromata. Jejich použití je u nás legislativně ošetřeno Vyhláškou č. 130/2010 Sb., kterou se mění vyhláška č. 4/2008 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin [24].

### 1.3.5 Homogenizace

Mléko i jogurt jsou heterogenní směsi kapalin - emulze tuku ve vodě, pro které je typická snaha o rozdělení fází a tudíž tuk vystává postupně na povrch. Proto je třeba mléko před fermentací homogenizovat. Při homogenizaci se zmenšují tukové kuličky z 1-10  $\mu\text{m}$  pod 2  $\mu\text{m}$  proháněním mléka přes úzké štěrbiny vysokotlakého čerpadla pod tlakem cca 14-18 MPa. Pro optimální výsledek se při homogenizaci používá rozmezí teplot 50-70  $^{\circ}\text{C}$  [1,2].

Tukové kuličky jsou po homogenizaci menší, zároveň mají větší povrch a změní se složení jejich membrán. Také dojde ke zlepšení hydrofilních vlastností kaseinových micel, které se rozpadají na submicely a dále se shlukují v konglomeráty. Tím se zvětšuje jejich celkový povrch, kterým se adsorbují na tukové kuličky, čímž se sníží jejich aglutinace a zmenší se vztahová síla (vystávání tuku). Větší počet tukových kuliček zesiluje schopnost mléka odrážet světlo, proto se kysané mléčné produkty zdají bělejší. Homogenizací se dále snižuje pravděpodobnost samovolné synereze syrovátky, zlepšuje se textura jogurtu a pocit v ústech, který požití jogurtu vyvolává [25,26].

### 1.3.6 Tepelné ošetření

Mléko pro výrobu jogurtu je nutné tepelně ošetřit. Používané teploty a časy mohou být různé, od šetrného termizačního záhřevu při 65  $^{\circ}\text{C}$  na několik sekund až po UHT sterilační

záhřev při cca 150 °C po dobu několika sekund. Nejčastěji se používá 85 °C po dobu 30 min nebo 95 °C po dobu 10 min [1,2,25].

Tepelné ošetření mléka pro výrobu jogurtu se provádí z několika důvodů:

- Vytváří se relativně sterilní prostředí pro činnost startovacích kultur tím, že jsou zničeny v podstatě všechny vegetativní formy patogenních mikroorganismů přítomných v syrovém mléce; některé spory termofilů případně tepelně stabilní enzymy mohou zůstat aktivní.
- Vytváří se vhodnější prostředí pro růst mikroaerofilních mléčných kultur, protože zahříváním ze suroviny uniká vzduch.
- Rozkládají se mléčné složky, především bílkoviny, za vzniku peptonů a sulfhydrylových skupin, které slouží jako výživa pro startovací kultury.
- Denaturují se a sráží laktalbuminy a laktglobuliny, které zvyšují viskozitu a zlepšují (zhušťují) konzistenci finálního produktu [1,2].

Při tepelném ošetření se část rozpustných Ca, K a P solí mění na nerozpustné formy (při zahřátí 85 °C na 30 min se 16 %  $\text{Ca}^{2+}$  změní na nerozpustný  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  [27]). Zahřátím se zároveň ničí některé vitamíny, zejména citlivé jsou B6, B12 a C. Při zvýšené teplotě se mléko částečně zbaví některých pachů (např. z krmiv), zároveň ale může dojít ke vzniku některých nežádoucích pachů a příchutí (např. po karamelu díky Maillardově reakci mezi laktózou a aminoskupinami bílkovin). Vysokou teplotou se denaturují bílkoviny, které jsou pak pro člověka stravitelnější [1,27].

### 1.3.7 Fermentační proces

Kultury mikroorganismů pro fermentaci mléka při výrobě jogurtu se vybírají podle jejich kysací schopnosti, tvorby aromatických látek (především acetaldehyd, acetoin a diacytel), sklonu k sekundárnímu kysání, životaschopnosti v mléčné směsi při přidávání různých dalších složek, konzistence vytvořeného koagulátu, sklonu k synerezi aj. U nás se používají mikroorganismy *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (jako protosymbiotická směs v poměru koků k tyčinkám mezi 1:1 až 1:2). K nim je možno ještě přidat další mikroorganismy, které také produkují kyselinu mléčnou. Pro zlepšení pozitivní účinků na zažívání někteří výrobci přidávají kmeny *Lacto-*

*bacillus acidophilus*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* aj. [1,25].

Tepelně ošetřené mléko se zchladí na teplotu vhodnou pro činnost kysacích bakterií, a zaočkuje se 1-2 % dávkou namnožené jogurtové kultury. Pro fermentaci krátkou inkubační dobou je to přibližně 40-45°C na 2,5 až 3,5 hodiny a pro dlouhodobou fermentaci cca 30 °C po dobu cca 16-18 hodin [28]. Měřítkem času fermentace je dosažení požadované titrační kyselosti, nejčastěji 70-75 (2,5 mmol/l) nebo pH 4,1 až 4,6 [25]. Pro kvalitní proces zrání je třeba směs kultur mícháním homogenně rozptýlit v mléčné směsi [1,25,28].

Při výrobě jogurtů s pevným koagulátem (set type) se mléko zaočkované kysacími kulturami plní do spotřebitelských obalů (skleněné, plastové), které se uloží ke zrání do zracích komor nebo lázní. Mléčná směs pro krémovité jogurty (stirred type) se přivádí pro zrání do fermentačního tanku spolu s rozmnoženou kulturou, poté se důkladně promíchá a nechá zrát nejlépe bez míchání. Nerezový zrací tank je opatřen kónickým dnem pro snadnější vypouštění a dutým dvouvrstvým pláštěm pro oběh teplé a studené vody nebo vzduchu a účinným, ale šetrným míchacím systémem. Na konci inkubační doby je koagulát v tanku opatrně promíchán [1,2,25].

### 1.3.8 Přídavek ovoce a/nebo aromat a barviv

Při výrobě jogurtu s pevným koagulátem se ochucující složky (nejčastěji ovocný džem nebo marmeláda, které mohou být také aromatizovány nebo barveny) přidávají dvěma způsoby: Buď se dávkuje na dno spotřebitelského obalu, na ně se pak plní zaočkovaná zahuštěná mléčná směs, obal se uzavře a následně se nechává zrát a chladí; nebo se ochucující složka přidává až na zralý bílý, částečně vychlazený jogurt s poté se teprve obal uzavírá a dochlazuje [1,25].

Při výrobě krémovitého ochuceného jogurtu se ochucující složky přivádějí čerpadlem do fermentačního tanku ke zralému jogurtovému koagulátu a s ním jsou šetrně rozmíchány. Poté se plní do spotřebitelských obalů a chladí [1,25].

Ovoce přidávané do jogurtu se výjimečně používá čerstvé, ve většině případů se především kvůli standardizaci produktu přidává ovoce konzervované, které obvykle vedle ovoce obsahuje cukr (příp. sirup nebo náhradní sladidla), stabilizátory, aroma, barviva a potravi-

nářské kyseliny nebo regulátory kyselosti [29]. Přidává se buď jeden druh (oblíbené jsou např. jahoda, broskev, borůvka aj.) nebo směsi ovoce (např. lesní směs aj.) [1,29].

Pro zvýraznění chuti a barvy ovoce, případně náhradu za ovoce se přidávají do ovocných složek jogurtů (příp. do jogurtů) různé aromatické látky a barviva. Mohou to být přírodní, přírodě-identické nebo syntetické látky. Použití syntetických ochucovadel a barviv je ve většině zemí legislativně omezeno [1].

Kromě ovocných jogurtů se vyrábějí také všelijaké jinak ochucené jogurty. Populární jsou příchutě jako čokoláda, různé ořechy, káva, vaječný likér aj. [29].

### 1.3.9 Chlazení

Po dosažení požadované titrační kyselosti nebo hodnoty pH je třeba jogurt co nejrychleji zchladit pod 10 °C (nejlépe na cca 5 °C), aby se fermentační proces prakticky ukončil. Chlazení ovšem nemůže být příliš rychlé, protože by mohlo dojít k synerezi syrovátky v důsledku příliš rychlé kontrakce bílkovinné základny [1,30].

Chlazení může být jednostupňové nebo dvoustupňové. Při jednostupňovém chlazení se jogurt chladí přímo z inkubační teploty pod 10 °C, teprve potom se přidávají ochucující složky (pokud se jedná o ochucený jogurt) a výrobek se balí. Při teplotě kolem 5 °C je ovšem jogurt už příliš viskózní a proto je manipulace s ním (přečerpávání, rozmíchávání ochucovadel aj.) obtížnější a riskantnější z hlediska synereze syrovátky. Především při výrobě krémovitých jogurtů se tedy častěji používá chlazení dvoustupňové, kdy se nejprve jogurt zchladí na přibližně 20 °C, pak se přidají ochucující složky, důkladně se promíchají s jogurtem a plní se do spotřebitelských obalů, ve kterých se pak pomalu (za cca 12 hodin) dochlazují na 5 °C [1,2].

### 1.3.10 Balení

Výběr obalových materiálů a balení je dosti podstatnou součástí výroby jogurtů, protože obal je velmi důležitý, pokud má být jogurt dopraven ke spotřebiteli v bezvadném stavu. Obal musí chránit výrobek před nečistotami, cizími tělesy, mikroorganismy a plyny (např. kyslíkem) z vnějšího prostředí a také před světlem, které může způsobit odbarvení

ochucených jogurtů nebo oxidaci tuků. Jogurt nesmí z obalu unikát a zároveň by nemělo docházet ani k vypařování vody, protože se tím mění složení a konzistence jogurtu a také klesá hmotnost výrobku. Zároveň obal nesmí propouštět ven těkavé látky, které dávají jogurtu aroma a dovnitř nežádoucí pachy. Obaly musí být navrženy tak, aby usnadňovaly manipulaci při plnění, skladování i distribuci výrobků. Dále jsou obaly nositeli důležitých informací pro spotřebitele, jako je název a popis výrobku, datum použitelnosti, složení, nutriční hodnota, název a adresa výrobce aj. [1].

Obal musí být samozřejmě zdravotně nezávadný a mezi ním a jogurtem nesmí docházet k žádným chemickým reakcím. Někteří výrobci plní jogurty do vratných nebo nevratných skleněných obalů s kovovým víčkem, ale častěji jsou dnes používány jednorázové plastové kelímky. Nejvyužívanějšími plasty pro výrobu jogurtových obalů jsou polyethylen – PE, polypropylen – PP, polyester – PS a polyvinylchlorid – PVC. Naplněné kelímky jsou tepelně nepropustně spojeny s hliníkovou fólií, která je potažena termoplastovým nátěrem (z PE, etylenvinylacetátokopolymeru – EVA, PS nebo PVC) kvůli odolnosti proti kyselému pH jogurtu [1,25].

### 1.3.11 Skladování, transport, distribuce

Aby se jogurt dostal ke konečnému spotřebiteli v bezvadném stavu a měl co možná nejdelší trvanlivost, musí se optimalizovat podmínky skladování a distribuce. Při nevhodných podmínkách se množí jogurtové kultury, nastává druhotné kysání, překysání a případně i vznik nežádoucích příchutí; nebo dojde ke kontaminaci nebo rekontaminaci nežádoucí mikroflórou a jejich metabolity produkt znehodnocují. Nejvýznamnější biochemické reakce, které mohou při skladování probíhat jsou: oxidace tuků, hydratace bílkovinných složek, odbarvování ovocné složky, změna vzhledu a konzistence povrchu jogurtu vysycháním [1,25].

V prvních 24 – 48 hodinách skladování se zlepšují fyzikální charakteristiky koagulátu jogurtu (hydratace a stabilizace kaseinových micel), proto je výhodné prodej oddálit [1].

Jogurty by měly být skladovány při teplotách 0-10 °C, nejlépe pod 5 °C, nesmí docházet k výkyvům teplot. Sklady by měly být dobře izolovány, aby neunikal chlad. Manipulace s výrobky musí být šetrná, aby nedošlo k porušení obalů případně synerezi syrovátky. Sklady musí být dobře odvětrané, vzduch by měl cirkulovat. Pokud jsou jogurty baleny v prů-

hledných obalech, mělo by být použito speciální osvětlení, aby nedocházelo k odbarvování ovocné složky [1,2,25].

Při přepravě je potřeba zachovat teplotu 0-10 °C pomocí klimatizovaných dopravních prostředků. Obtížné je zabránit otřesům a vibracím, které často vedou k poškození struktury a konzistence jogurtu případně i k synerezi syrovátky. Z tohoto důvodu se přidávají do jogurtů stabilizátory. Vibracím se také částečně zabrání, když se kartóny s jogurty naskládají na palatách, pevně ovinou fólií dohromady [1].

Na prodejnách musí být jogurty uchovány v chladicích zařízeních (0-10 °C) až do nákupu spotřebitelem. Spotřebitel by měl jogurt také uchovávat v chladničce, až do okamžiku konzumace [1].

## 2 LAKTÓZA A JEJÍ METABOLISMUS V JOGURTU

### 2.1 Úvod

Laktóza – mléčný cukr, je základní sacharidická složka mléka veškerých savců. Z dalších cukrů se v mléce vyskytuje glukóza (50 mg/l) a stopové množství fruktózy, glukózaminů, galaktózaminů a neutrálních a kyselých oligosacharidů [13].

Obsah laktózy v mléce je závislý na mnoha faktorech – živočišném druhu samice (Tab.2.1), fázi laktace, výživě a zdraví samice aj. Laktóza spolu se sodnými, draselnými a chloridovými ionty, má rozhodující úlohu v udržování osmotické rovnováhy v mléčných žlázách. Např. při mastitidě (zánět parenchymu prsní žlázy) se zvýší hladina NaCl v mléce a adekvátně k tomu se sníží produkce laktózy [13,4].

Laktóza je vedle tuků a bílkovin hlavní nutriční složkou mléka, hraje klíčovou roli při výrobě zakysaných mléčných produktů a výrazně ovlivňuje texturu zahuštěných a mražených mléčných výrobků. U velké části lidské populace (přibližně 70 %), především v Asii, Africe a Jižní Americe, se po skončení období kojení výrazně sníží produkce laktázy (enzym, kterým je laktóza štěpena). Tato laktázová deficiencie – hypolaktázie, vede k malabsorpci laktózy (porucha vstřebávání), příp. se vyskytnou projevy intolerance laktózy [13,31].

Tab.2.1 Koncentrace laktózy (%) v mléce vybraných živočišných druhů [13]

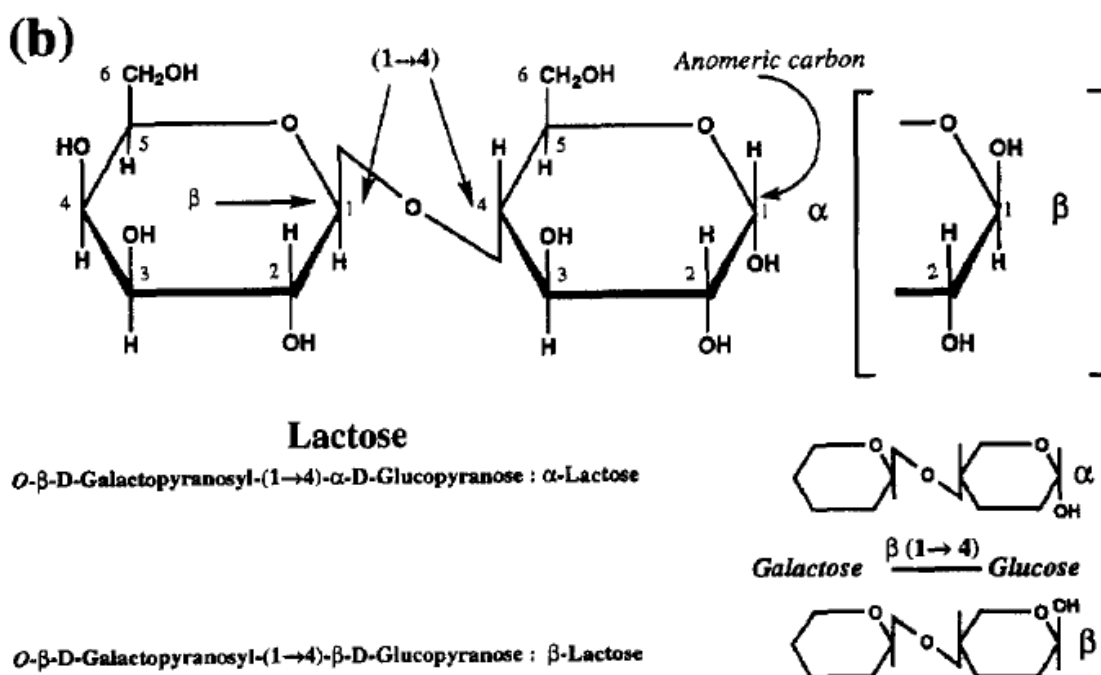
Druh	Laktóza	Druh	Laktóza	Druh	Laktóza
Kalifornský lachtan	0,0	Myš	3,0	Kočka (domestifikovaná)	4,8
Arktický lachtan	0,0	Morče	3,0	Prase	5,5
Medvěd černý	0,4	Pes (domestikovaný)	3,1	Kůň	7,0
Delfín	0,6	Jelen sika	3,4	Šimpanz	6,2
Ježura	0,9	Koza	4,1	Makak	7,0
Plejtváček obrovský	1,3	Slon indický	4,7	Člověk	7,0
Králík	2,1	Kráva	4,8	Osel	7,4
Jelen lesní	2,6	Ovce	4,8	Zebra	7,4
Lachtan šedý	2,6	Vodní buvol	4,8	Kočkodan	10,2
Krysa	2,6				



## 2.2 Chemické a fyzikální vlastnosti laktózy

### 2.2.1 Struktura

Laktóza, O- $\beta$ -D-galaktopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glukopyranosa je disacharid složený z glukózy a galaktózy, které jsou spojeny  $\beta$  1 $\rightarrow$ 4 glykosidickou vazbou. Volný poloacetalový hydroxyl na molekule glukózy (uhlík C1) má redukující účinky, proto patří laktóza mezi tzv. redukující sacharidy. Tento hydroxyl může být v poloze cis nebo trans k hydroxylové skupině na uhlíku C2, rozlišujeme tedy  $\alpha$ - a  $\beta$ - anomer [13].



Obr.2.1 Strukturální vzorec laktózy [13]

### 2.2.2 Rozpustnost

Striktně vzato, rozpustnost  $\alpha$ -laktózy ve vodě při 20 °C je 7 g/100 ml a  $\beta$ -laktózy 50 g/100 ml. Jenže ve vodném roztoku dojde k mutarotaci mezi anomery, až se ustaví rovnováha – 62,7 $\beta$  : 37,3 $\alpha$  (= 1,6 $\alpha$ :1 $\alpha$   $\rightarrow$  1,6 $\times$ 7 + 1 $\times$ 7 = 18,2) Konečná rozpustnost laktózy ve vodě při 20 °C bude tedy 18,2 g/100 ml [13,32].

Rozpustnost  $\alpha$ -laktózy je mnohem více závislá na teplotě než rozpustnost  $\beta$ -laktózy jejich křivky rozpustnosti se protnou při teplotě 93,5 °C [13,32].

### 2.2.3 Krystalizace

Při teplotách do 93,5 °C vykrytalizuje z vodného roztoku laktóza v nejstabilnější konformaci  $\alpha$ -laktóza (obsah vody 5 %). Krystaly jsou tvrdé a rozpouštějí se pomalu. Velikost a množství krystalů je závislé na podmínkách krystalizace a hraje klíčovou úlohu v textuře kondenzovaných mlék a mražených nebo sýrových krémů.  $\alpha$ -laktóza se dá ve vakuu vysušit (nad 100 °C) na hygroskopický  $\alpha$ -anhydrid. Pokud se krystalizace provádí při teplotách nad 93,5 °C, vzniká bezvodá  $\beta$ -laktóza ( $\beta$ -anhydrid).  $\alpha$ - a  $\beta$ - forma laktózy se liší v rozpustnosti, velikosti a tvaru krystalů, hygroskopicitě, specifické otáčivosti a sladkosti [4,13].

Ve srovnání s jinými sacharidy má laktóza relativně nízkou rozpustnost, zpět z roztoku ale krystalizuje obtížně, má tendenci vytvářet přesycené roztoky. Když je roztok laktózy velmi rychle vysušen, viskozita roztoku se tak rychle zvýší, že krystalizace není možná a vznikne amorfní hygroskopická směs  $\alpha$ - a  $\beta$ -laktózy (laktózový sirup, laktózové sklo) [4,13].

Ve vodných roztocích je konfigurace poloacetalového hydroxylyu kolem anomerického uhlíku C1 na molekule glukózy velmi nestabilní a může se snadno měnit – mutarotace. Rychlost mutarotace je silně závislá na pH prostředí. V rovnováze při 20 °C se laktóza rozpouštěná ve vodě skládá z 37,3 %  $\alpha$ -anomeru a 62,7 %  $\beta$ -anomeru [4,13].

### 2.2.4 Sladivost

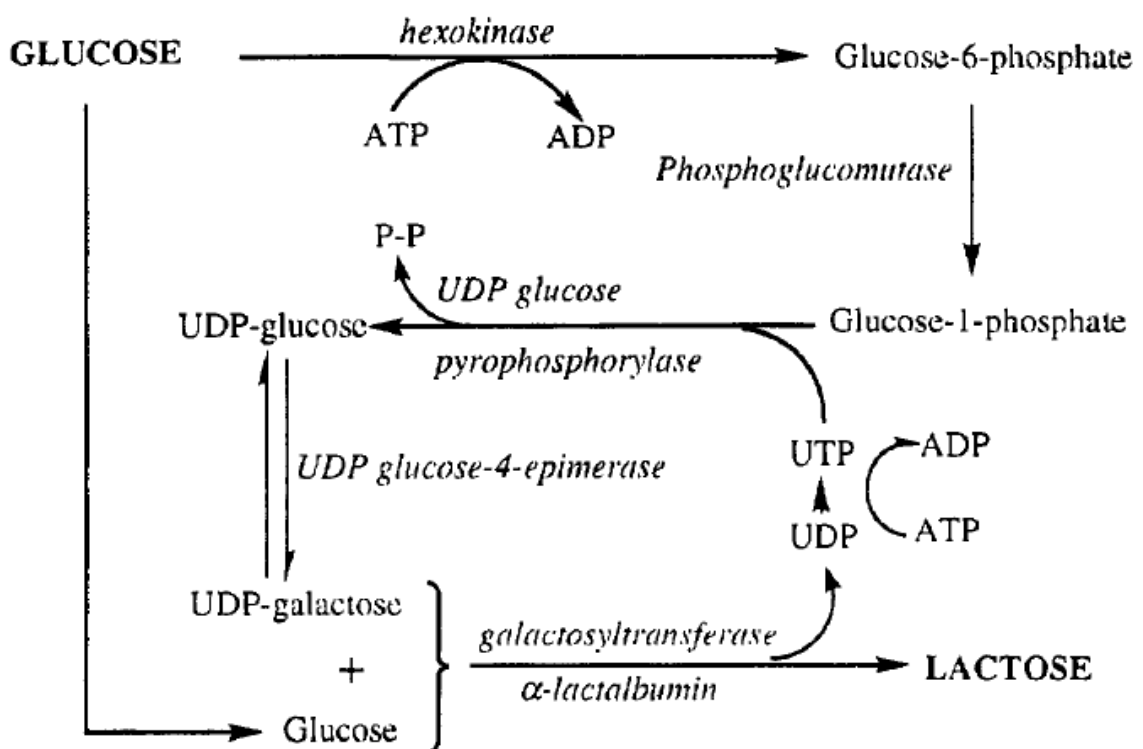
Sladivost cukrů je vlastnost, která se zřetelně mění s koncentrací cukru v roztoku. Proto porovnání sladivostí typu: cukr A je tolikrát sladší než cukr B, je možné pouze, uvažujeme-li stejně koncentrované roztoky (porovnání některých cukrů je uvedeno v Tab. 2.2). Laktóza je relativně sladivější ve vyšších než v nižších koncentracích. V 1 % roztoku dosahuje laktóza pouze asi 16 % sladivosti sacharózy, proto se většinou nepřidává do potravin jako sladidlo, ale podílí se spíše na tvorbě textury, chuti a vazbě vody. Roztok  $\beta$ -laktózy je sladivější než roztok  $\alpha$ -laktózy [4,13,32].

Tab.2.2 Relativní sladivost některých sacharidů (procenta koncentrace, která dává odpovídající sladivost) [4]

Sacharóza	Glukóza	Fruktóza	Laktóza
0,5	0,9	0,4	1,9
1,0	1,8	0,8	3,5
2,0	3,6	1,7	6,5
2,0	3,8	-	6,5
2,0	3,2	-	6,0
5,0	8,3	4,2	15,7
5,0	8,3	4,6	14,9
5,0	7,2	4,5	13,1
10,0	13,9	8,6	25,9
10,0	14,6	-	0
10,0	12,7	8,7	20,7
15,0	17,2	12,8	27,8
15,0	20,0	13,0	34,6
20,0	21,8	16,7	33,3

### 2.3 Biosyntéza laktózy

Laktóza je syntetizována v mléčných žlázách savců a to z glukózy, která je získána z krve. Jedna molekula glukózy je přeměněna na UDP-galaktózu (pomocí čtyř enzymů – tzv. Le-oirova cesta), která je donorem pro spojení s další molekulou glukózy (akceptor). Tato reakce je katalyzována laktózsyntaxázou, což je enzymový komplex  $\beta$ -4-galaktozyltransferázy a  $\alpha$ -laktalbuminu [13,31].



Obr.2.2 Biosyntéza laktózy [13]

## 2.4 Významné reakce laktózy

Laktóza reaguje obdobně jako jiné sacharidy. Může vzniknout glykosidická vazba mezi dvěma monosacharidy; může proběhnout reakce na redukčním konci molekuly glukózy; může proběhnout reakce na hydroxylové skupině nebo může vzniknout vazba uhlík-uhlík [33].

Laktitol, laktulóza a galaktosylglukonová kyselina (lactobionic acid) jsou hlavní deriváty laktózy, při jejichž vzniku zůstane zachována  $\beta$ 1-4 vazba [13].

### 2.4.1 Hydrogenace laktózy – výroba laktitolu

Laktitol je syntetický cukerný alkohol, který se vyrábí redukcí laktózy (molekula glukózy je redukována na sorbitolovou skupinu). Hydrogenace se obvykle provádí za zvýšené teploty i tlaku, katalyzována pomocí Raneyova niklu [13,31].

Laktitol je vhodný pro použití jako nízkokalorické sladidlo, protože vyššími organismy není metabolizován. Nemá tedy vliv na hladinu glukózy v krvi a sekreci insulinu. Také je mu přisuzována schopnost redukovat absorpci sacharózy, snižovat hladinu cholesterolu v krvi a játrech a být antikariogenní (není metabolizován bakteriemi v ústní dutině, proto nepodporuje vznik zubního kazu) [13]. Má sladivost odpovídající cca 30-40 % sladivosti sacharózy [34]. Není resorbován ani hydrolyzován v tenkém střevě, ale je fermentován mikroflórou tlustého střeva, proto vykazuje mírně laxativní účinky [4,13,31,34].

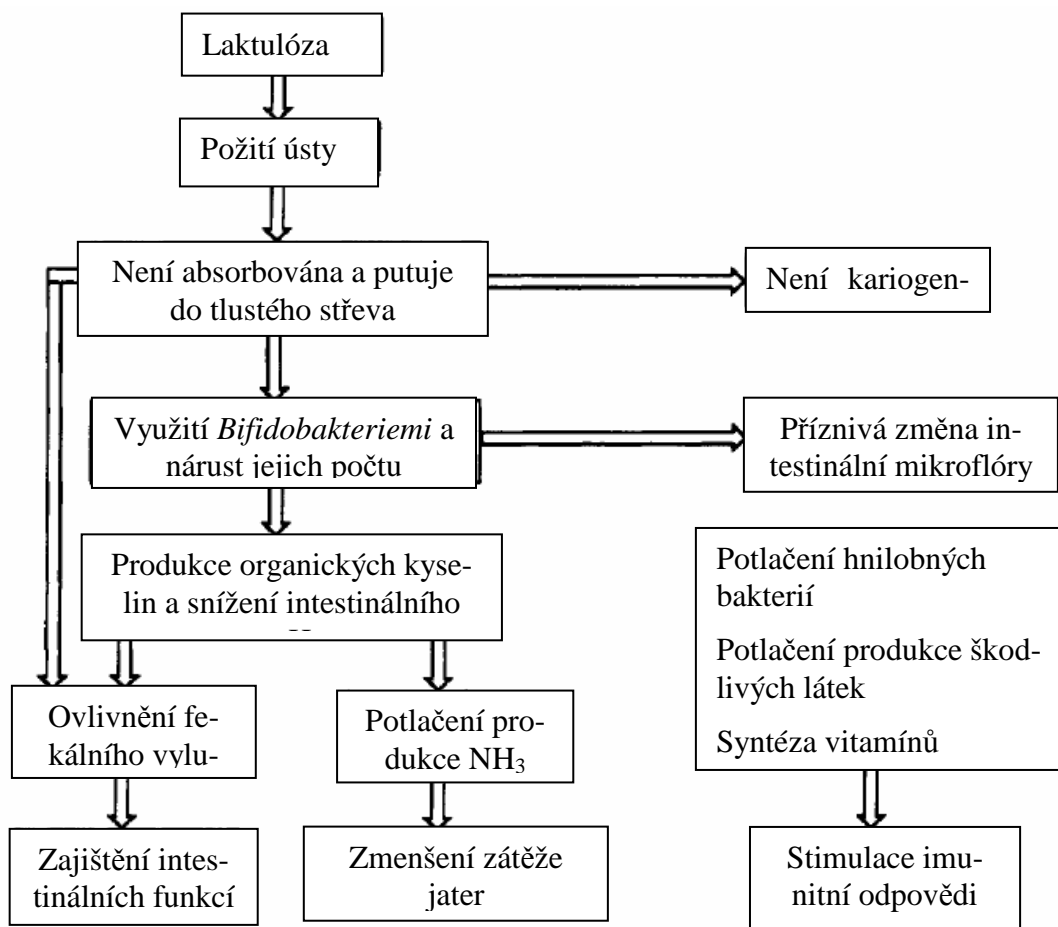
Esterifikací laktitolu jednou nebo více mastnými kyselinami můžou být vyrobeny potravinové emulgátory, analogicky jako ze sorbitolu. Nejdůležitější z nich je laktitol palmitát [4].

### 2.4.2 Isomerace laktózy – výroba laktulózy

Laktulóza je syntetický disacharid, je to izomer laktózy, který vznikne transformací aldosové složky molekuly (glukózy) na ketosovou (fruktózu). Isomerace se provádí za mírně alkalických podmínek a vzniká při ní také menší množství vedlejšího produktu – epilaktózy [13].

Laktulóza je sladší než laktóza a dosahuje přibližně 48-62 % sladivosti sacharózy [13]. Obdobně jako laktitol je antikariogenní a není hydrolyzován v tenkém střevě  $\beta$ -

galaktozidázou, proto pokračuje do tlustého střeva, kde je fermentována bakteriemi mléčného kvašení včetně bifidobakterií. Proto se dnes laktulóza hodně využívá k pozitivnímu ovlivnění střevní flóry, snížení střevní pH a zabránění rozvoji nežádoucích hnilobných bakterií. Například je běžně přidávána do mléčných kojeneckých výrobků pro simulaci bifidogenních a mírně laxativních vlastností mateřského mléka. Ve vyšších dávkách má laktulóza nezanedbatelné laxativní účinky, proto se využívá k léčbě portosystémové encefalopatie a chronické zácpy [4]. Laktulóze je také přisuzována schopnost potlačit růst některých nádorových buněk [4,13,31].



Obr.2.3 Vliv laktulózy na zdraví [13]

### 2.4.3 Oxidace laktózy – výroby galaktosylglukonové kyseliny

Galaktosylglukonová kyselina (lactobionic acid) se připravuje mírnou oxidací volné karboxylové skupiny laktózy. Oxidace může být provedena chemicky (Pt, Pd nebo Bi), elektroly-

ticky, enzymaticky nebo fermentací. Užívá se například v alkalických roztocích jako chelační činidlo pro vyvázání některých kovů (např. Fe), kdy EDTA není účinná. Dále je to konzervant roztoků pro orgány před transplantací, inhibitor koroze a činidlo zabráňující vzniku kotelního kamene [13,31].

#### 2.4.4 Výroba laktosylmočoviny

Laktosylmočovina se vyrábí z laktózy a močoviny v kyselém prostředí. Močovina se podává jako levný zdroj dusíku pro dobytek. Po požití močoviny ovšem rychle roste toxická hladina amoniaku v krvi, proto se močovina převádí na méně nebezpečnou laktosylmočovinu [13].

#### 2.4.5 Hydrolýza laktózy

Laktóza může být hydrolyzována enzymem  $\beta$ -galaktozidázou neboli laktázou (obdobně jako ve střevech savců) nebo zředěnými roztoky silných kyselin [13].

Jako zdroj laktázy se používají plísně (hl. *Aspergillus* spp.) a kvasinky (hl. *Kluyveromyces* spp.). Při enzymatické hydrolýze nejprve vzniká glukóza a galaktóza v přibližně stejném poměru, ale následně mohou být spotřebovány pro tvorbu vyšších galaktooligosacharidů díky galyktosyltransferasové aktivitě laktázy. V některých případech se toho využívá záměrně, oligosacharidy se přidávají např. do kojeneckých výživ jako prebiotika - nejsou resorbovány v tenkém střevě, pokračují do tlustého střeva, kde podporují růst bakterií – např. užitečných *Bifidobacterium* spp.. Glukózo-galaktózový sirup dosahuje přibližně 70 % sladivosti sacharózy, ale vedle levně vyráběných glukózových a glukózo-fruktózových sirupů nenašel příliš uplatnění. Mnohem větší význam má hydrolýza laktózy pro rozvíjející se trh s bezlaktózovými mléčnými výrobky pro pacienty s laktózovou intolerancí [13,31].

Vůči působení organických kyselin je laktóza mnohem odolnější než jiné cukry, např. glukóza. Při analýze směsi těchto dvou cukrů, může být úspěšně použita kyselina citrónová, která sacharózu spolehlivě hydrolyzuje, ale laktózu ne. K hydrolýze laktózy se používají zředěné roztoky silných minerálních kyselin, což ovšem není pro potravinářský průmysl příliš vhodné [4,13].

#### 2.4.6 Fermentace laktózy

Laktóza je velmi dobře zkvasitelná pomocí bakterií mléčného kvašení (hl. *Lactococcus* spp. a *Lactobacillus* spp.) na kyselinu mléčnou, čehož se hojně využívá při výrobě kysaných mléčných výrobků. Kyselina mléčná se používá k okyselení potravin a nápojů, v kosmetickém průmyslu, při výrobě plastů aj. Zajímavé je použití kys. mléčné při výrobě polymerních biomateriálů, především bioodbouratelých stehů. Převedená na amoniumlaktát se přidává jako nebílkovinný zdroj dusíku do krmiv pro zvířata [13,31].

Pomocí kvasinek (hl. *Kluyveromyces* spp.) je zase laktóza fermentována na etanol. Tato výroba lihu ovšem nemůže finančně konkurovat fermentaci sacharózy nebo chemické výrobě etanolu [13].

Jako substrát pro *Xanthomonas campestris* je laktóza využívána při výrobě xantanové gumy, která má v potravinářství rozsáhlé použití [13].

#### 2.4.7 Maillardova reakce

Laktóza je redukující cukr, proto se může podílet na Maillardově reakci vedoucí k neenzymatickému hnědnutí, především za zvýšené teploty. V případě laktózy reaguje karbonylová skupina s aminoskupinami (nejčastěji s  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> skupinou lysinu v bílkovinách). Vznikne laktosamin, který se může přesmyknout (Amadoriho přesmyk) na 1-amino-2-keto-laktózu. Tato látka patří mezi tzv. Amadoriho sloučeniny, které v závislosti na okolním prostředí mohou dále reagovat na melanoidy, aromatické sloučeniny aj. [4,13].

Zatímco v mnoha potravinách je neenzymatické hnědnutí žádoucí (např. chlebová kůrka, pivo, topinky, pražená káva aj.), v mléce a mléčných výrobcích má jeho přítomnost negativní důsledky jako hnědé zbarvení, zápach, mírný pokles výživové hodnoty („ztráta“ lysinu) a zhoršení rozpustnosti sušeného mléka. Některé produkty Maillardovy reakce mají antioxidační vlastnosti. Reakce jsou nevratné [4,13].



## 2.5 Metabolismus laktózy v jogurtu

Bakterie mléčného kvašení nevyužívají žádné energetické systémy jako NADH, citrátový cyklus aj., energii získávají výhradně kvašením sacharidů [35]. Z jednoho molu laktózy vzniká 1 mol galaktózy, 2 moly kyseliny mléčné a energie pro růst bakterií (při homofermentativním kvašení). K přenosům energie dochází především cestou substrátové fosforylace a ATPáz cytoplazmatické membrány [36]. *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, subsp. *bulgaricus* a *Lactobacillus acidophilus* fermentují laktózu v jogurtu homolyticky (vzniká pouze kyselina mléčná) – homofermentativní kvašení a *Bifidobacterium* spp. fermentuje laktózu v jogurtu heterolyticky (vedle kys. mléčné vznikají další produkty) – heterofermentativní kvašení [1,2,35,36].

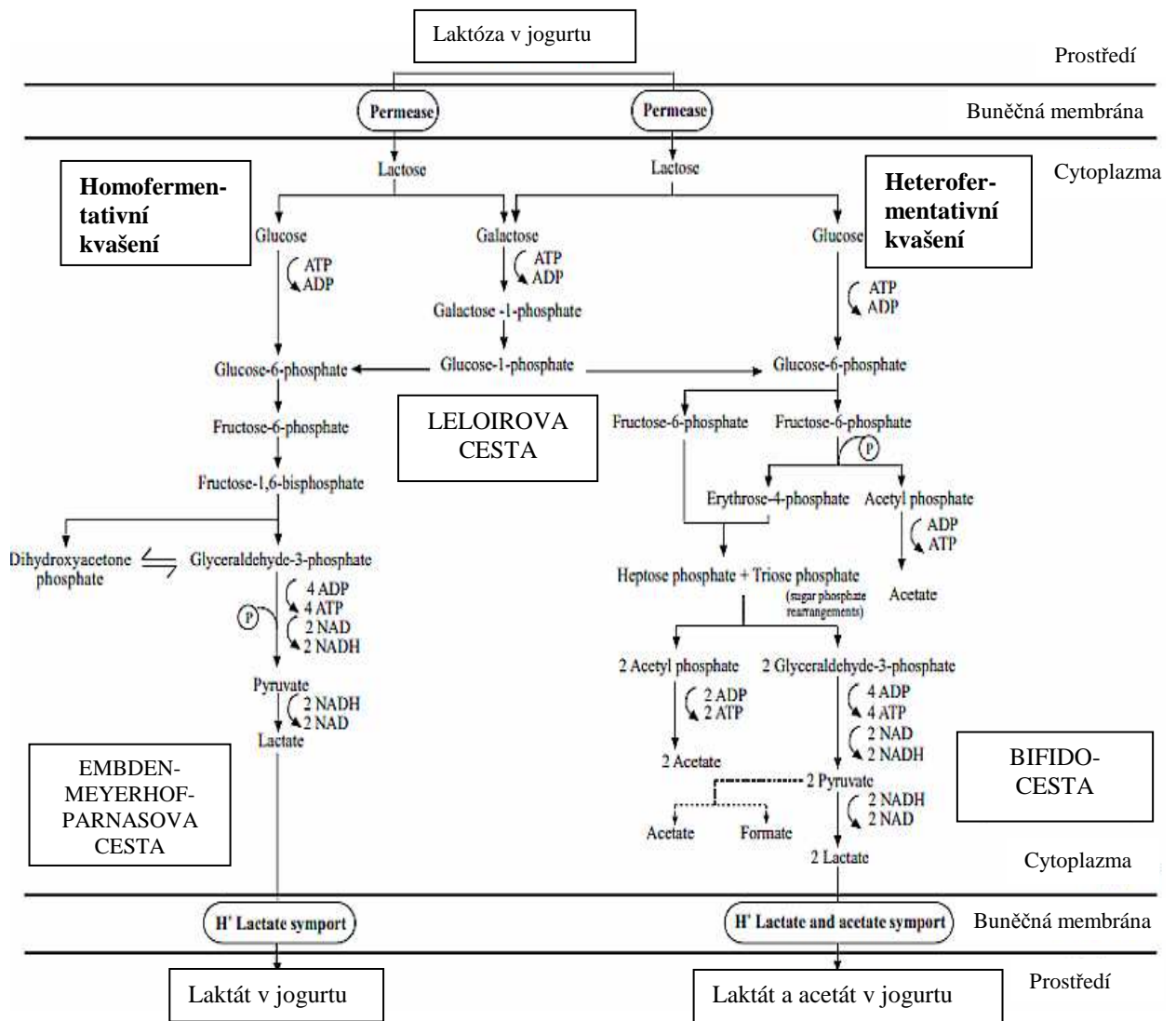
### 2.5.1 Homofermentativní kvašení laktózy v jogurtu

Pro transport do cytoplazmy mikrobiální buňky *S.thermophilus*, *L.delbruckii* a *L.acidophilus* je laktóza fosforylována pomocí fosfoenolpyruvátu (PEP) v membráně buňky a přenesena prostřednictvím PEP – fosfotransferázového systému (PEP:PTS) [37] nebo je přenesena v nefosforylované podobě pomocí permeáz [1,4,37].

Po přenosu do cytoplazmy pomocí PEP:PTS systému je laktóza-6-fosfát hydrolyzována  $\beta$ -galaktozidázou ( $\beta$ -gal) na glukózu a galaktózu-6-fosfát. Galaktóza-6-fosfát je buď transformována přes tagatózu na glycerinaldehyd-3-fosfát a pokračuje Emben-Mayerhof-Parnasovou (EMP) cestou katabolismu glukózy, nebo je defosforylována a vyloučena v nezměněné podobě z mikrobiální buňky. V případě přenosu pomocí cytoplazmatických bílkovin – permeáz laktóza není fosforylována a je hydrolyzována  $\beta$ -galaktozidázou ( $\beta$ -gal) na glukózu a galaktózu. Glukóza pokračuje EMP katabolickou cestou a galaktóza je vyloučena z buňky. Pouze v případě vyčerpání glukózy je galaktóza katabolizována Loleirovou cestou na glukóza-1-fosfát [38] a pokračuje EMP cestou. Produktem EMP cesty je laktát [1,4,38].

### 2.5.2 Heterofermentativní kvašení laktózy v jogurtu

Z kultur běžně používaných pro výrobu jogurtu, fermentuje laktózu heterolyticky pouze *Bifidobacterium* spp. Do bakteriální buňky je laktóza transportována jen v nefosforylované formě pomocí permeáz. V cytoplasmě proběhne enzymatická hydrolýza ( $\beta$ -gal) na glukózu a galaktózu. Glukóza pokračuje Bifido-cestou katabolismu glukózy a galaktóza je vyloučena z buňky. Pouze v případě vyčerpání glukózy je galaktóza katabolizována Loleirovou cestouna glukóza-1-fosfát [38] a pokračuje Bifido-cestou. Produktem Bifido-cesty katabolismu glukózy je laktát a acetát v molárním poměru 3:2 [39]. Heterofermentativním kvašením 1 molu laktózy vzniká 5 mol ATP, takže je to energeticky výhodnější proces než homofermentativní kvašení, při které vznikají jen 4 moly ATP [1,4,38,39,40].



Obr.2.4 Homo- a heterofermentativní kvašení laktózy v jogurtu [1]  
 (přenos laktózy přes cytoplazmatickou membránu pomocí permeáz)

### 2.5.3 Aktivita $\beta$ -galaktozidázy v mikroorganismech pro fermentaci jogurtu

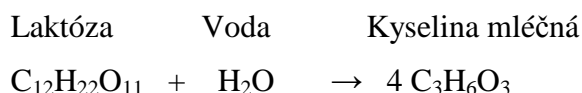
*S. thermophilus* a *L. delbrückii* subsp. *bulgaricus* jsou kromě výroby zakysaných mléčných produktů využívány také jako alternativní zdroj laktázy, která se využívá zejména pro výrobu bezlaktózových nebo nízkolaktózových mléčných výrobků [1].

Optimální aktivita streptokokové  $\beta$ -gal byla zjištěna při neutrálním pH, teplotě 55 °C v pufru  $Mg^{2+}$  ionty a přítomnost kravské žluči (0,15 ml/100 ml) aktivitu stimuluje, kdežto EDTA má inhibiční účinek [41]. Streptokoková laktáza je teplotně stabilnější než podobný enzym získaný izolací z kvasinek [1,41].

B-gal z *L.delbrückii* subsp. *bulgaricus* má nejvyšší aktivitu při pH 6,5-7,0, ale stabilní je již při pH 5,8, nutná je přítomnost  $Mg^{2+}$  iontů, teplotní optimum 55 °C [1,42].

### 2.5.4 Produkce kyseliny mléčné

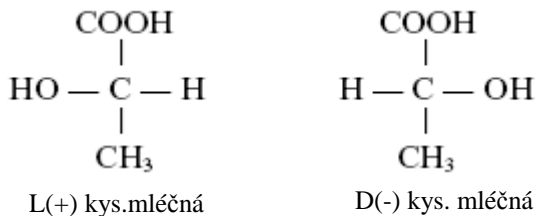
*S. thermophilus* a *L. delbrückii* subsp. *bulgaricus* katabolizují laktózu v jogurtu především na kyselinu mléčnou a *Bifidobacterium* spp. na kyselinu mléčnou a octovou. Složitý biochemický proces konverze lze sumarizovat do rovnice:



Laktózy jako substrátu pro fermentaci je ve vyráběném jogurtu dostatek, ale když vznikající kyselina mléčná dosáhne koncentrace nad 1,5 %, začne působit inhibičně na růst bakterií. Fermentace se v podstatě ukončí snížením teploty na cca 5 °C, kdy bakterie zůstanou živé, ale jejich fermentační činnost je téměř zastavena [2].

Pro syntézu laktátu z pyruvátu, používají bakterie mléčného kvašení enzym laktátdehydrogenázu, která může mít různou stereospecifitu, což má za následek vznik L-(+), D-(-) nebo LD-(±) izomeru kyseliny mléčné. *S.thermophilus* produkuje především L(+) kys. mléčnou [43] a *L.delbrückii* subsp.*bulgaricus* D(-) kys. mléčnou [44]. L(+) izomer kys. mléčné je pro člověka mnohem snadněji stravitelný, než D(-) izomer. Především pro kojence do 6 měsíců věku je D(-) izomer nevhodný. Stereochemické složení kys. mléčné v jogurtu se dá do značné míry ovlivnit poměrem bakterií ve startovací kultuře a úpravou inkubačních podmínek. Čím větší je obsah D(-) izomeru, tím má jogurt ostřejší a kyselejší chuť. Obvyk-

le se jogurt vyrábí s obsahem 45-60 % L(+) a 55-40 % L(-) izomeru kys. mléčné [45]. *L. acidophilus* produkuje LD(±) a *Bifidobacterium* spp. L(+) izomer kys. mléčné. Bifidobakterie ovšem produkují vedle kys. mléčné také kys. octovou, takže jogurt výrazně okyselují [1,2,4,43,44,45].



Vzniklá kyselina mléčná má velký význam pro tvorbu organoleptických charakteristik jogurtu. Koloidní  $\text{Ca}^{2+}$  z vápenato-fosforečnано-kaseinového komplexu v micelách se sráží na nerozpustný  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , až je postupně všechn vápník v micelách vyčerpán, při pH 4,6 – 4,7 se začne srážet kaseinová frakce a také vzniká laktát vápenatý. Tím se vytvoří textura a konzistence jogurtu – tvorba jogurtového gelu. V neposlední řadě účinkuje kys. mléčná jako konzervační činidlo [1,2].

### 2.5.5 Další produkty fermentace cukrů v jogurtech

Bakterie mléčného kvašení mají různou schopnost produkovat extracelulární heteropolysacharidy (EPS) složené z mnoha lineárních nebo rozvětvených opakujících se jednotek sestávajících z di-až hepta-sacharidů, které často obsahují další skupiny, např. aminy. Přítomnost těchto látek pozitivně ovlivňuje konzistenci, texturu a stabilitu jogurtu a také působí příznivě na zažívání spotřebitele [46]. Výnosy EPS vyrobené jogurtovými kulturami mohou dosáhnout až 40 mg/100 ml [1,46,47].

Bakterie mléčného kvašení produkují mnoho těkavých i netěkavých látek, které mají vedle kys. mléčné velký vliv na chuť a vůni jogurtu. Jsou to především: netěkavé kyseliny (pyrohroznová, šřavelová, jantarová), těkavé kyseliny (mravenčí, octová, propionová, máselná), karbonylové sloučeniny (acetaldehyd, aceton, acetoin, diacetyl) a různé produkty metabolismu laktózy, proteinů a tuků [1].

### 3 METABOLISMUS LAKTÓZY V LIDSKÉM ORGANISMU

#### 3.1 Fyziologie trávení a vstřebávání

Pro lidský organismus je nezbytně nutné přijímat živiny z okolního prostředí. Potrava je mechanicky a chemicky zpracovávána – trávení; selektované látky jsou resorbovány stěnou gastrointestinálního traktu (GIT) – vstřebávání; nárazovitý příjem potravy je vyrovnáván – skladování; trávení (spolu s vlastním imunitním systémem) likviduje mikroorganismy – ochrana a při zpracování a vstřebávání potravy jsou uvolňovány endokrinně aktivní látky [48].

GIT se pro zjednodušení dělí na čtyři hlavní části – horní (ústa, jícen, žaludek), střední (tenké střevo), dolní (tlusté střevo, konečník) a akcesorní orgány podléjící se na funkci GIT, ale ležící mimo vlastní trávicí trubici (slinné žlázy, játra a pankreas) [49].

V **ústech** je potrava mechanicky zpracovávána (žvýkána) a zároveň je senzorycky hodnocena její kvalita. Dále se zde potrava částečně rozpouští ve slinách a začíná proces vyrovnání její teploty s teplotou těla. Ve slinách jsou již obsaženy některé enzymy, ale hlavní část štěpení živin začíná až v žaludku, protože v ústech je potrava obvykle jen krátce. **Jícenem** je potrava transportována do žaludku pomocí polykacího reflexu a peristaltických vln [48].

V **žaludku** se potrava postupně mění v tráveninu – chymus. Žaludek se skládá z proximální části (3/4 žaludku), která slouží k přechodnému uskladnění chymu a z distální – pylorické části, kde je chymus rozměňován na částice menší než 1 mm, tráven a porcován. Pohyb chymu v žaludku zajišťuje složitý systém peristaltických vln. Silná kyselina chlorovodíková (pH až okolo 1) spolu s  $\alpha$ -amylázou ze slin štěpí škroby na oligosacharidy a monosacharidy, rozbíhá se intenzivní enzymatický rozklad bílkovin (především pepsinem) a začíná emulgace tuků [48,50].

**Tenké střevo** se skládá ze tří částí: duodenum (dvanáctník), jejunum (lačník) a ileum (kyčelník), je dlouhé 3 až 7 m v závislosti na svalovém tonu a široké kolem 3 cm. Sliznice tenkého střeva je výrazně zřasená, na povrchu je množství drobných výběžků – klků a luminární povrch enterocytů je tvořen kartáčovým lemem (mikroklky), proto je výsledný absorpční povrch obrovský. Povrch sliznice se neustále obnovuje, celý epitel se obmění přibližně za 5 dní. Odumřelé enterocyty se odlupují z vrcholu klků a stávají se součástí

obsahu střev. Výměnu podporuje zejména vláknina v potravě, která tímto výrazně přispívá k prevenci mnoha onemocnění včetně nádorových. Posun chymu střevem zajišťují kontrakce a relaxace jednotlivých vrstev hladké svaloviny, které jsou řízeny nervově a hormonálně [48,50].

Do střeva jsou secernovány pro jeho činnost nezbytné tekutiny – střevní šťáva, pankreatická šťáva a žluč. Sekrece je řízena nervově a hormonálně. Střevní a pankreatická šťáva obsahují velké množství  $\text{HCO}_3^-$  iontů, které neutralizují kyselé pH chymu po příchodu z žaludku. Střevní šťáva, která je secernována z membrány kartáčového lemu enterocytů, je tvořena v množství cca 1,5 až 2,6 litrů za den a obsahuje peptidázy a dipeptidázy; sacharázu, maltázu, laktázu a izomaltázu; malé množství střevní lipázy a některé fosfolipázy. Pankreatická šťáva je tvořena v exokrinním oddíle slinivky břišní v množství cca 1 až 2 litry za den a z enzymů obsahuje proteázy a profosfolipázy (v neaktivní podobě);  $\alpha$ -amylázu; pankreatickou lipázu; deoxyribonukleázu a ribonukleázu. Žluč je tvořena v játrech v množství cca 0,7 – 1,2 litru na den. Neobsahuje enzymy, ale je nezbytná pro trávení a transport tuků a jejich metabolitů, vstřebávání těchto látek a také jsou s ní vylučovány cholesterol a další produkty metabolismu tuků jako žlučová barviva (bilirubin). Přibližně polovina žluči je z jater uvolněna do duodena a druhá polovina shromažďována a intenzívně zahušťována ve žlučníku [48,49,50].

Škroby jsou štěpeny intraluminálně (uvnitř střeva)  $\alpha$ -amylázami na disacharidy a některé oligosacharidy, které jsou pak štěpeny celulárně (enzymy v kartáčovém lemu luminální membrány enterocytů) pomocí sacharázy, maltázy, laktázy a izomaltázy na jednotlivé monosacharidy. Triacylglyceroly jsou nejprve v duodenu emulgovány pomocí žlučových kyselin a následně spojeny s kolipázou, což umožní jejich rozklad pankreatickou lipázou. 30 % stravitelných proteinů je intraluminálně štěpeno pankreatickými endo- a exopeptidázami a zbývajících 70 % je štěpeno celulárně peptidázami kartáčového lemu enterocytů. Jednotlivé monosacharidy a aminokyseliny jsou specializovanými transportními mechanismy vstřebávány do intersticia enterocytů (a odtud do portální krve) v duodenu příp. v proximální části jejunu. Lipidické látky jsou v oblasti kartáčového lemu uvolňovány ze žlučových micel a vstřebávány v jejunu a teprve v ileu jsou resorbovány žlučové kyseliny. Kromě základních živin se v tenkém střevě vstřebává voda, ionty a vitamíny [48,50].

**Tlusté střevo** (colon) je dlouhé cca 1,4 m a široké 5-8 cm, skládá se ze slepého střeva (caecum) s červovitým výběžkem (appendix), tračnicku a konečníku (rectum). Chymus se zde

zahušťuje a mění se jeho elektrolytické složení, stává se z něj stolice. Kromě regulace objemu a dokončení vstřebávání živin má kolon důležitou rezervoárovou funkci (skladování stolice až do možného vyprázdnění – defekace). Sliznice není zvrásněna do klků, jako u tenkého střeva, ale luminální membránu enterocytů tvoří kartáčový lem (mikroklky). enterocyty se obmění cca jednou za 5-7 dní. Svalovina tlustého střeva je hladká, kromě nejdistanějšího uzávěru rekta, který je příčně pruhovaný a tedy vůlí ovladatelný (zevní svěrač). Defekace umožňuje vůlí řízený parasympatický defekační reflex. Pohyby tlustého střeva jsou řízeny nervově a hormonálně. Do tlustého střeva je secernován především hlen, který napomáhá utváření stolice a  $\text{HCO}_3^-$  ionty, které vyrovnávají pH snížené činností četných bakterií. Tyto bakterie jsou obligátně anaerobní, štěpí vlákninu, nestrávené živiny, především cukry a podílejí se na vzniku některých vitamínů (důležitá je zejména produkce vitamínu K). Bakterie svojí činností produkují také přibližně 7-10 litrů střevních plynů denně (oxid uhličitý, vodík, sirovodík a metan), z nichž pouze cca 0,6 l se uvolňuje rektem a zbytek je vstřebáván do krve [48,49,50].

### 3.2 Trávení a vstřebávání laktózy

Přijatá laktóza prochází gastrointestinálním traktem v podstatě nezměněna až do tenkého střeva, kde začíná její enzymatické štěpení. Ve sliznici duodena a jejunu zdravého člověka (konkrétně v membráně kartáčového lemu enterocytů) se nachází enzym  $\beta$ -galaktozidáza -  $\beta$ -D-galactosido galaktohydrolase EC 3.2.1.23 (konkrétně laktáza-phlorizin hydroláza – lactose galactohydrolase EC 3.2.1.108) neboli laktáza [51].

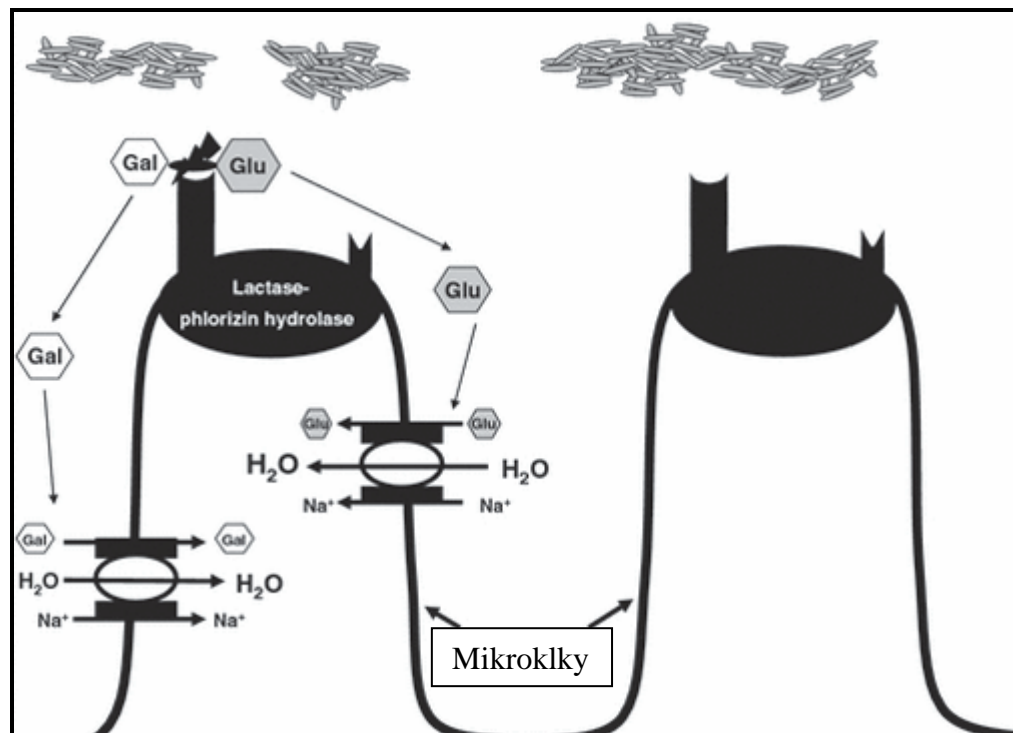
Laktáza-phlorizin hydroláza (LPH) má dvě enzymatické aktivity – laktázovou (hydrolyza laktózy) a glukosidázovou (rozklad glukosidů jako je flavonoid phlorizin a pyridoxin-5'- $\beta$ -D-glukosid) [52]. Jako jediný enzym, který štěpí laktózu, je LPH nepostradatelná pro všechny novorozené savce. Lidská LPH je detekovatelná již v 8. týdnu těhotenství, od 34. týdne aktivita roste a dosahuje nejvyšší hodnoty v době narození. Během kojení a především po odstavení u většiny savců postupně klesá až na nedetekovatelnou hladinu, v důsledku běžných mutarotačních regulací tohoto enzymu. Této regulaci podléhá také větší část lidské populace, která laktózu nakonec vůbec nestráví [52]. Pouze přibližně 30 % dospělé populace je laktóz-tolerantní a to především obyvatelé severní Evropy a Ameriky. Tato tolerance pravděpodobně souvisí se zavedením chovu mléčného skotu v Evropě před 10 000 lety. Tolerance laktózy je tedy v současné době považována za důsledek genetické mutace laktázového genu. Jiné vysvětlení přetrvávání aktivity laktázy u člověka i v době po skončení příjmu mateřského mléka je přítomnost aktivního vazebného místa pro phlorizin [52,53].

LPH má pH optimum mezi 5,5 až 6 a na štěpení laktózy se podílí přibližně z 90 %. Zbývající podíl na štěpení má kyselá laktáza, která se nachází v lysozomech enterocytů a má pH optimum od 4 do 4,5. V cytoplasmě se ještě nachází hetero- $\beta$ -galaktozidáza, která se ovšem na štěpení laktózy nepodílí [54]. Většina LPH se nachází v oblasti středního jejunu, kde je pro ni optimální pH a také nízká koncentrace bakterií, které by laktózu fermentovaly [53,54].

Enzym LPH je produkován jako peptidický prekurzor o molekulové hmotnosti 220 kDa, který je značně post-transkripčně modifikován při transportu na povrchu buněk na protein o molekulové hmotnosti 150 kDa. Na modifikaci enzymu se podílí také prostředí v lumenu jejunu, především aminokyseliny trypsinu, který produkuje slinivka břišní [53].



LPH hydrolyticky štěpí  $\beta$  1 $\rightarrow$ 4 glykosidickou vazbu v molekulách přijaté laktózy na molekuly glukózy a galaktózy (viz Obr.3.1), které jsou absorbovány střevními enterocyty do krve. Tento transport je specificky ovlivněn množstvím  $\text{Na}^+$  ve střevním lumen. Vyšší množství  $\text{Na}^+$  při povrchu buněk urychluje prostup membránou, naopak nižší koncentrace  $\text{Na}^+$  transport tlumí. Glukóza a galaktóza prostupují membránou do intersticia buněk prostou nebo usnadněnou difúzí a odtud pak difundují do krve. Glukóza se stane zdrojem energie a galaktóza se účastní tvorby glykolipidů a glykoproteidů nebo je v játrech konvertována na glukózu [33,53].



Obr.3.1 Štěpení laktózy laktáz-phlorizin hydrolázou [12]

Ihned po vstupu do buňky je glukóza esterifikována kyselinou fosforečnou pomocí glukokinázy na glukóza-6-fosfát, který je následně u vyšších organismů odbouráván glykolýzou nebo v pentózovém cyklu. Glykolýza se odehrává v cytosolu a slouží k uvolnění energie z molekul sacharidů, výslednými produkty jsou dvě molekuly pyruvátu, dvě molekuly ATP a dvě molekuly NADH. Pyruvát může být za anaerobních podmínek mléčně fermentován na laktát nebo etanolově fermentován na etanol; tyto fermentace mají velký význam pro regeneraci NADH na  $\text{NAD}^+$ . Za aerobních podmínek je pyruvát v mitochondriích oxidačně dekarboxylován na acetylkoenzym A (na jeden pyruvát je potřeba 15 molekul ATP). Acetyl-Co-A dále pokračuje do Krebsova (citrátového) cyklu, kde je metabolizován na  $\text{CO}_2$  a

H<sub>2</sub>. Vodík je dále předán řetězcům oxidoredukčních enzymů (dýchací řetězec), kde je postupně oxidován na vodu za stupňovitého uvolňování energie, která je uložena opět do vazeb ATP (oxidační fosforylace). Menší část glukózy, která není podrobena glykolýze, vstupuje do pentózového cyklu, který umožňuje přeměnu glukózy na prekurzory pro biosyntézu nukleotidů a poskytuje energeticky bohaté redukční činidlo NADPH [55,56,57].

Část galaktózy vzniklé po rozštěpení laktózy je derivatizována na galaktózaminy, které jsou použity pro tvorbu glykoproteinů a glykolipidů, jež jsou důležitými stavebními prvky buněčných membrán. Tento způsob využití galaktózy je důležitý především pro mladý organismus, který má omezenou možnost galaktózu syntetizovat [13]. Větší část galaktózy je ovšem v játrech konvertována na glukózu. Nejprve je prostřednictvím galaktokinázy fosforylována na galaktóza-1-fosfát, který je pomocí uridyltransferázy konvertován na glukóza-1-fosfát a ten je pomocí fosfoglukomutázy přesmyknut na glukóza-6-fosfát. Glukóza-6-fosfát je pak standardně podroben glykolýze nebo vstupuje do pentózového cyklu [57,58,59].

### 3.3 Intolerance laktózy

Jak již bylo zmíněno výše, přibližně 70 % dospělé lidské populace trpí hypolaktázií, tedy nedostatkem laktázy, nutné k strávení laktózy [53]. Hypolaktázie vede k malabsorpci laktózy (porucha vstřebávání), případně k projevům laktózové intolerance. Především obyvatelé Asie, Jižní Ameriky, Afriky a Jižní Evropy jsou laktáz-deficitní. V Africe je to 90-95 % a v Thajsku dokonce 97 % obyvatel [60]. Příznaky a projevy hypolaktázie (příp. intolerance laktózy) jsou velmi individuální a nesnášenlivost často není diagnostikována. Většina laktóz-intolerantních osob dobře snáší určité menší množství laktózy [53,54,60].

Hypolaktázie se vyskytuje ve třech formách: vrozená, primární a sekundární.

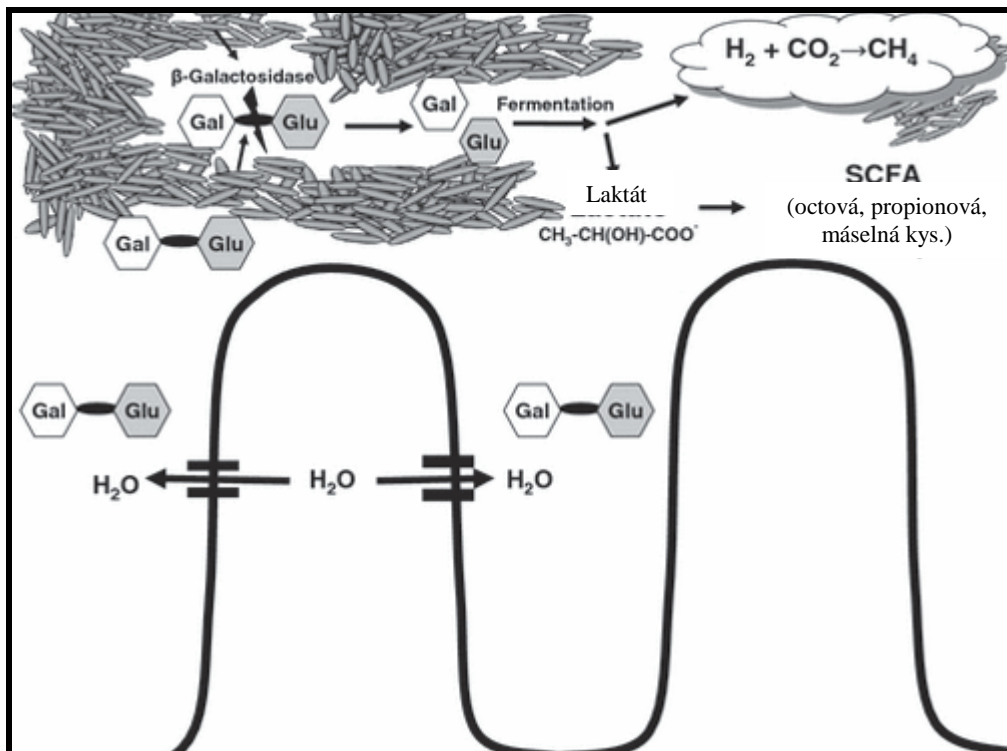
- Vrozená nesnášenlivost laktózy je extrémně vzácná autozomálně recesivní porucha a její molekulární základ je nejasný [61]. Jedinci s vrozenou LI již od prvního kojení nesnášejí mateřské mléko, neprospívají a příjem laktózy musí být doživotně zastaven.
- Většina laktóz-intolerantních osob má primární formu hypolaktázie, což je v podstatě fyziologický stav, jelikož jejich laktázový gen v DNA není modifikován jako u osob, které si i po skončení kojení stále vytvářejí dostatek laktázy pro štěpení laktózy (dva nukleotidové polymorfizmy v oblasti 14 až 22 kD od začátku transkripce laktázy v intronu laktázového genu MCM6) [61].
- sekundární forma bývá následkem gastrointestinální poruchy, která poškozuje tenké střevo (např. virové gastroenteritidy, giardióza nebo celiakální sprue). Po vyléčení poškozeného střeva často příznaky LI odezní [53,61].

Při malabsorpci laktózy (viz Obr.3.2), není přijatá laktóza v duodenu laktázou rozštěpena a produkty nejsou absorbovány, ale postupuje GITem dál do tlustého střeva, kde může vyvolat symptomy laktózové intolerance [53].

Intoleranci laktózy lze definovat jako výskyt příznaků zažívacích poruch jako průjem, nadýmání, nevolnost, plynatost, bolesti a křeče břicha, kručení v břiše, zvracení a/nebo zácpa po požití laktózy ve standardním tolerančním laktózovém testu [62]. U některých pacientů se můžou vyskytovat další symptomy, jako bolesti svalů, kloubů a hlavy, letargie, poruchy krátkodobé paměti, závratě, alergie (ekzémy, svědění, rýma, astma), srdeční arytmie, bolesti v krku, akné nebo deprese [63,64]. Množství laktózy, které způsobí symptomy intolerance

ce, je značně individuální a závisí na stupni nedostatku laktázy i formě potravin, ve které je laktóza přijata [65].

Nestrávená laktóza je v tračníku anaerobně zkvašována tamní mikroflórou na mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA), vodík, metan a oxid uhličitý, čímž se zvyšuje kyselost a tlak ve střevě. Překyselení a zvýšená osmotická zátěž vede k větší sekreci elektrolytů a vody do střeva, čímž se zrychlí průchod tráveniny a objevují se symptomy intolerance laktózy uvedené výše (především řídká stolice a průjem). Vznikající plyny způsobují nadýmání v tenkém střevě a plynatost v tlustém střevě. U některých pacientů se vlivem produkce metanu snižuje motilita střev a dochází k zácpám [66,67].



Obr.3.2 Osud laktózy ve střevě při malabsorpci laktózy [53]

Existuje několik možností diagnostiky malabsorpce laktózy. Při tolerančním testu se podává obvykle 50 g laktózy a monitoruje se obsah glukózy v krvi nebo obsah vodíku ve vydechovaném vzduchu. Může být měřeno také vylučování uhlíku  $^{13}C$ , po podání laktózy značené tímto neradioaktivním izotopem uhlíku nebo množství galaktózy v moči po podání etanolu a laktózy. Spolehlivou, ale invazivní metodou je jejunální biopsie. Zatím nepříliš používaná je genotypizace pomocí PCR testu, díky které ale může být rozlišena primární malabsorpce od získané (sekundární) [53,54,63].

Tolerance laktózy u pacientů s LI je značně individuální a záleží na mnoha faktorech, včetně náplně žaludku nebo druhu potravin, ve které je laktóza přijata. Doporučuje se pravidelná konzumace malých dávek laktózy, jimiž sice není indukována tvorba laktázy, ale postupně dochází ke zlepšení symptomů LI a zvýšení tolerance laktózy, protože se mění mikroflóra tlustého střeva [68].

Již v kapitole o složení jogurtu (Kap. 1.2) bylo zmíněno, že laktóza v jogurtech (resp. ve fermentovaných mléčných výrobcích) je mnohem lépe snášena než laktóza v mléce. Kromě toho, že je v těchto produktech obsah laktózy snížen fermentací (i když často také zvýšen přidávkem složek pro zvýšení tukuprosté sušiny), přežívá mikrobiální  $\beta$ -galaktozidáza chráněna buněčným obalem bakterie průchod kyselým prostředím žaludku a v střevě pak napomáhá při štěpení přijaté laktózy. Konzistence fermentovaných produktů také zpomaluje průchod tráveniny GITem. *L.delbruckii* subsp. *bulgaricus* výrazně zlepšuje trávení laktózy, *S. thermophilus* a *L. acidophilus* a *Bifidobacterium bifidum* mají na trávení laktózy menší vliv [1,68,69].

Možností pro pacienty s LI jsou enzymové preparáty  $\beta$ -galaktozidázy mikrobiálního původu, kterými je možno laktózu v mléce hydrolyzovat nebo přímo užít enzymový preparát ve formě tablet nebo kapslí. V poslední době se už i na českém trhu stále více rozšiřuje mléko i široká škála mléčných výrobků, které jsou nízkolaktózové nebo bezlaktózové. Laktóza v těchto produktech je buď enzymaticky hydrolyzována, nebo chromatograficky odseparována [68,70].

Kromě výskytu laktózy v mléce a mléčných výrobcích si pacienti s LI musí dávat pozor na její výskyt v mnoha dalších potravinách, kde bývá přidána za účelem zlepšení textury, zvýšení osmotického tlaku nebo viskozity, jako reaktant Maillardovy reakce, příp. jako nosič aromat, příchutí a barviv. Jedná se především o pečivo, cukrovinky, masné produkty, margaríny, různá instantní jídla aj. Nezanedbatelný je také výskyt laktózy v léčivech, kde se používá zejména jako výborné tabletovací činidlo a plnivo, inertní a netoxické, s příjemně nasládlou chutí [13,71].

## 4 METODY STANOVENÍ LAKTÓZY V MLÉČNÝCH VÝROBCÍCH

Principiálně je laktózu možno stanovit několika způsoby: polarimetricky, oxido-redukční titrací, gravimetricky, kolorimetricky, spektrofotometricky, kryoskopicky, enzymaticky a chromatograficky [4].

### 4.1 Polarimetrické stanovení laktózy

Laktóza patří mezi opticky aktivní látky, protože má ve své molekule asymetrický - chirální uhlík. Opticky aktivní látky stáčejí rovinu polarizovaného světla. Tato optická otáčivost se měří na přístroji zvaném polarimetr. Stanovení pomocí polarimetrie je omezeno na vzorky obsahující pouze jednu opticky aktivní látku [72,73].

Úhel stáčení roviny polarizovaného světla a koncentrace opticky aktivní látky jsou přímo úměrné, což je možno vyjádřit vztahem:

$$\alpha = [\alpha]_D^{20} l c,$$

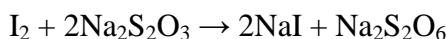
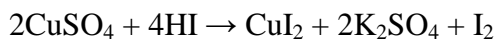
kde  $\alpha$  je naměřený úhel stočení,  $[\alpha]_D^{20}$  měrná otáčivost měřené látky při teplotě 20°C a vlnové délce (nejčastěji D sodíková výbojka – 589,3 nm),  $l$  tloušťka vrstvy opticky aktivní látky – dráhy světla v dm a  $c$  koncentrace měřené látky v g/ml. Pro výpočet koncentrace se vypracuje kalibrační křivka [13,73].

Bezvodá laktóza má  $[\alpha]_D^{20} = +55,4^\circ$  a laktóza monohydrát  $+52,6^\circ$ . Vzorek mléka nebo mléčného výrobku musí být nejprve zbaven dalších složek pomocí vysrážení (vyčiření) a filtrace. Laktóza v čirém filtrátu je zavedena v kyvetě do polarimetru a je změřen úhel stáčení. Z kalibrační závislosti je vypočtena koncentrace laktózy [2,4,13].

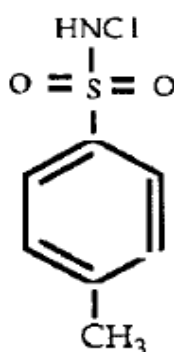
### 4.2 Stanovení laktózy pomocí oxido-redukční titrace

Laktóza má volný poloacetalový hydroxyl na molekule glukózy (uhlík C1), který má redukující účinky, proto je schopna redukovat oxidační činidla. Pro stanovení obsahu laktózy se obvykle redukuje měď v alkalickém síranu měďnatém (Fehlingovo činidlo) nebo chloramin-T. Vzorek musí být nejprve zbaven bílkovin a tuků vysrážením a zfiltrváním [13].

Alkalický roztok  $\text{CuSO}_4$  je za varu laktózou redukován na  $\text{Cu}_2\text{O}$ , který je zfiltrován, vysušen a zvážen. Oxidace jednoho molu laktózy (360 g) dává 1 mol  $\text{Cu}_2\text{O}$  (143 g). Nezareagované množství  $\text{CuSO}_4$  se stanoví jodometricky:



Při titraci Fehlingova činidla není bod ekvivalence příliš ostrý, proto se dnes upřednostňuje použití chloraminu-T místo  $\text{CuSO}_4$  [13,73].



Obr.4.1 Chloramin T [1]

### 4.3 Gravimetrické stanovení laktózy

Při gravimetrickém stanovení se opět využije redukcí vlastností laktózy.  $\text{Cu}_2\text{O}$  vyredukováný z Fehlingova činidla se vysuší a zváží a obsah laktózy ekvivalentní k obsahu  $\text{Cu}_2\text{O}$  se určí z tabulek (Munson-Walkerovy tabulky) [2].

### 4.4 Kolorimetrické stanovení laktózy

Kolorimetrie je subjektivní optická metoda stanovení koncentrace založená na porovnávání intenzity zabarvení roztoku o neznámé koncentraci s intenzitou zabarvení roztoků o známých koncentracích. Laktóza jako redukcí cukr reaguje za varu a v silně kyselém prostředí s fenolem a antronem za vzniku barevných roztoků. Metoda je poměrně citlivá, ale v roztoku nesmí být další redukcí cukr a musí se pracovat za přesně stanovených a kontrolovaných podmínek [4,13,72].



Obr.4.2 Fenol a antron (zleva) [13]

#### 4.5 Spektrofotometrické stanovení laktózy

Využitím redukčních vlastností laktózy může být vyredukován kov z některé své sloučeniny a následně spektrofotometricky stanoven. Využívá se např.  $\text{PdCl}_2$  (paladometrická metoda), oxido-redukční reakce mezi redukujícím cukrem a  $\text{Pd(II)}$  běží kvantitativně i stechiometricky (1:1). Opět je nutné nejprve odstranit bílkoviny a tuky; reakce se provádí za alkalických podmínek. Absorbance je měřena při vlnové délce 410 nm a obsah laktózy je spočítán pomocí vypracované kalibrační křivky [74].

#### 4.6 Enzymaticko-kryoskopické stanovení laktózy

Enzymaticko-kryoskopická metoda je založená na přidávání laktózy v pufru do vzorků výrobků a stanovení rozdílů mezi bodem mrazu ihned po míchání a po inkubaci po dobu 1 hod při 37 °C. Koncentrace laktózy je přímo úměrná rozdílu mezi teplotami v rozsahu 1-5 %. Metoda nevyžaduje odstranění proteinů ze vzorků a přítomnost jiných redukujících nebo neredukujících cukrů nezkresluje výsledek [75].

#### 4.7 Enzymatické stanovení laktózy

Bylo popsáno několik metod enzymatického stanovení laktózy. Jednou z nich je Boehringer-Mannheimova metoda, kdy je laktóza ve vzorku hydrolyzována na glukózu a galaktózu v přítomnosti  $\beta$ -galaktozidázy a vody. D-galaktóza je následně oxidována  $\text{NAD}^+$  na galaktonovou kyselinu v přítomnosti  $\beta$ -galktózdehydrogenázy. Množství redukovaného nikotinamid-adenin dinukleotidu (NADH) je ve stechiometrickém poměru k množství galaktonové kyseliny a je měřeno spektrofotometricky při 340 nm.





Metoda je přesná a spolehlivá, ale vzhledem k práci s enzymy vyžaduje zvýšenou kontrolu časů a teplot [2,76].

#### 4.8 Stanovení laktózy pomocí HPLC

Vysokoučinná kapalinová chromatografie je dnes běžně používaná metoda pro stanovení laktózy ve vzorcích mléčných výrobků. Nejvhodnější je kombinace s refraktometrickým detektorem. Vzorek je obvykle vysrážen kyselinou sírovou a přefiltrován. Filtrát je pak vstřikován přímo do kolony se stacionární fází na bázi silikagelu s kyano- nebo amino-skupinami a mobilní fáze bývá směs acetonitrilu s vodou. Rychlost průtoku bývá 1-2 ml/min a retenční čas laktózy je zpravidla mezi 10-20 min [77]. Množství laktózy ve vzorku pak může být pohodlně kvantifikováno porovnáváním píků s píky standardů (je třeba použít standardy pro  $\alpha$ - i  $\beta$ -anomer laktózy) [2,4,77].

## 4.9 Stanovení laktózy pomocí plynové chromatografie

Metoda plynové chromatografie bude v této kapitole podrobněji popsána, protože je v praktické části této diplomové práce použita.

Chromatografie („barvopis“, z řec. chroma=barva) je separační analytická metoda umožňující rozdělit, identifikovat a stanovit mnoho látek organického i anorganického původu [72].

Chromatografická metoda je založená na dělení mezi dvěma fázemi. První fáze je nepohyblivá – stacionární (sorbet) a přes ni prochází pohyblivá fáze – mobilní. Mobilní fáze u plynové chromatografie - GC je plynná. Pomocí GC se stanovují látky s nízkou a střední molekulovou hmotností, ty s vyšší molekulovou hmotností se stanovují pomocí kapalinové chromatografie - LC. Netěkavé látky (jako např.laktóza), které mají být stanoveny pomocí GC se musí nejprve derivatizovány. Separací proces může být založen na adsorpci, rozdělování, výměně iontů aj., nebo na rozdílech ve fyzikálně-chemických vlastnostech látek, jako je jejich velikost, hmotnost, objem atd. Kromě GC a LC existuje také chromatografie papírová, tenkovrstvá, vylučovací a superkritická fluidní [72,73].

Po nástřiku vzorku do chromatografické kolony se vytvoří eluční pás – zóna, která obsahuje směs složek. Jednotlivé složky jsou dále unášeny mobilní fází různou rychlostí vzhledem k jejich rozdílné afinitě k sorbetu. Kromě toho je průběh separace také ovlivněn rychlostí průtoku mobilní fáze, velikostí difúze složek v obou fázích aj. Po výstupu z kolony procházejí rozdělené složky detektorem, který indikuje jejich přítomnost v eluátu a zaznamená eluční pík (křivku). Pík je zpravidla charakterizován plochou píku ( $A$ ), výškou píku ( $h$ ) a šířkou píku v poloviční výšce ( $w_h$ ). Tyto veličiny pak mají přímý vztah ke koncentraci detekované složky [72,73].

Grafický záznam odezvy detektoru se nazývá chromatogram a obvykle znázorňuje závislost koncentrace eluované látky na objemu, čase nebo vzdálenosti [72].

Účinnost chromatografické kolony, na které závisí kvalita výsledku, je charakterizována tvarem eluční křivky. Čím více látka v koloně difunduje, tj. čím je širší difúzní zóna, tím je křivka – pík širší (neostrý, rozmytý) a účinnost systému nižší [72,73].

#### 4.9.1 Derivatizace vzorků

Pokud jsou stanovované látky málo těkavé (není možno dostatečně je zplynit při nástřiku) je nutno vzorek předem upravit pomocí derivatizace (převedení analytu na jeho těkavější derivát). Dalším důvodem pro derivatizaci analytu je zlepšení procesu dělení (např. blokáce polárních funkčních skupin), snížení meze detekce aj. Příklady reakcí: silylace alkoholů, fenolů, karboxylových slouč., cukrů, karboxylových kys.; acetylace aminů, fenolů; dekarboxylace, alkylace, cyklizace, esterifikace, redukce karboxylových kys.; cyklizace etherů aj. [72,73,78].

Nejčastěji používanou a nejuniverzálnější reakcí pro derivatizaci (včetně derivatizace laktózy) je silylace. Jedná se o nahrazení kyselého vodíku na různých sloučeninách za alkylsilyl- nebo halogensilyl-skupinu. Tyto deriváty jsou obecně více těkavé, méně polární a teplotně stabilnější než původní látky. Nejpopulárnější silylační činidla jsou trimetylsilyl etery a estery [73,78].

#### 4.9.2 Přístrojové vybavení

##### *Stacionární fáze*

V plynové rozdělovací chromatografii GC se používá jako mobilní fáze plyn (nosný plyn) a jako stacionární fáze kapalina zakotvená na povrchu pevné fáze. Plynová adsorpční chromatografie GSC používá také jako mobilní fází plyn, ale stacionární fází je pevná látka – adsorbent. Stacionární – zakotvená fáze je vybírána podle charakteru látek, které chceme rozdělit. Na polárních stacionárních fázích se dělí látky polární a s rostoucí polaritou fáze roste i selektivita kolony. Nepochybně látky se rozdělují na nepolárních fázích podle svých fyzikálních charakteristik (podle teploty varu). Stacionární fáze musí za pracovních podmínek netěkavé, teplotně stálé, chemicky inertní, a dělené složky se v nich musí dobře rozpouštět nebo se na ně dobře adsorbovat [72,73].

Jako kapalně stacionární fáze se běžně používají rozpouštědla jako polyethylenglykoly, polypropylenglykoly, polyestery, polysiloxany. Tloušťka filmu naneseného na vnitřní povrch kolony se pohybuje mezi 0,1  $\mu\text{m}$  až 5,0  $\mu\text{m}$  [79]. Materiál nosiče kapalně stacionární fáze (u náplňových kolon, u kapilárních není přítomen) musí být chemicky inertní (aby nedošlo

k chvostování píků) a musí jen minimálně adsorbovat. Obvykle se používají různé druhy křemeliny, silikagel, skleněné kuličky, teflon aj. Jejich sorpční aktivita se často omezuje působením minerálních kyselin a hydroxidů a také úpravou pomocí chlorsilanů – silanizace, která předchází nanesení kapalné fáze [72,73,79].

Mezi obvykle užívané pevné stacionární fáze - adsorbenty se řadí silikagel, aluminosilikáty a zeolity, které jsou částečně specifické. Nespecifickým adsorbentem s velkým, homogenním povrchem jsou grafitizované termické saze GTCB (aktivní uhlí) [72,73].

### ***Nosný plyn***

Nosný plyn musí být inertní (nesmí interagovat s unášenou látkou ani se stacionární fází), slouží jen jako transportní médium. Do chromatografického systému se pouští obvykle z tlakové lahve, kde bývá pod tlakem 40 MPa. Dále nesmí obsahovat kyslík, musí být dobře vysušen a svou charakteristikou by se měl blížit ideálnímu plynu. Obyčejně se používá helium nebo dusík, méně často pak vodík, argon, oxid uhličitý a jiné plyny. Nosný plyn se volí také v závislosti na typu použitého detektoru. Před nástřikem do kolony musí být ještě vhodně regulován tlak a rychlost průtoku plynu. Používané tlaky se pohybují kolem 100 až 500 kPa v závislosti na typu, velikosti a náplni kolony. Průtoková rychlost nosného plynu je nepřímo úměrná druhé odmocnině vnitřního průměru kolony. Jako příklad: pro kolonu o vnitřním průměru 4 mm se volí rychlost 60 ml/min [72,73,79].

### ***Dávkovací zařízení***

Dávkování vzorku do proudu nosného plynu podléhá přísným kritériím – analyt musí být vpraven do kolony co nejrychleji a zabrat co nejmenší prostor (ideálně jedno teoretické patro). Kapalné vzorky se vstříkují pomocí mikrostříkačky s přesně definovaným objemem mezi 0,1  $\mu$ l až 10  $\mu$ l a vyhříváné nad teplotu varu analyzované látky, aby byl vzorek okamžitě zplyněn. Plynné vzorky se dávkuje obvykle pomocí kapilár s přesně definovaným objem, které jsou spojeny do systému vícecestných ventilů. Těžce zplynitelné vzorky je třeba před dělením derivatizovat [72,80].

### ***Kolony***

Kolony v GC jsou náplňové nebo kapilární. Náplňové kolony jsou trubice o délce od několika centimetrů po několik metrů (obvykle 1 až 3 m) vyrobené ze skla, nerezavějící oceli nebo taveného křemene. S různým vnitřním průměrem (obvykle 2 až 4 mm) [79]. Stacionární fázi (viz výše) je adsorbent (např. porézní polymery) nebo nosič se zakotvenou kapalnou fází (impregnované inertní částice) [72,79].

Kapilární kolony jsou dnes více používané než náplňové. Mají vnitřní průměr 0,1 mm až 0,53 mm a délku 5 až 60 m [79]. Kapiláry, vyrobené z taveného křemene, případně z nerezové oceli nebo skla, jsou stočeny do šroubovice. Vnitřní stěna kapiláry je potažena filmem stacionární fáze (může být chemicky vázána) a z vnější strany je kapilára obalena polymerní vrstvou z důvodu odolnosti vůči mechanickému poškození [72,73,79].

### ***Detektory***

Obecně je detektor zařízení na zviditelnění analytického signálu. Musí být co možná nejcitlivější, univerzální pro mnoho typů chromatografovaných sloučenin, a nejlépe necitlivý na změny teploty a průtoku mobilní fáze. Signál má být stabilní a dostatečně rychle reagovat na změnu složení procházejícího eluentu. Mezi odezvou detektoru a koncentrací analytu musí být lineární závislost a lineární rozsah detektoru (poměr nejvyšší a nejnižší koncentrace, mezi kterou je odezva detektoru lineární) byl měl být co nejširší. Mez detekce (nejmenší množství látky - v gramech na ml nosného plynu – které je ještě na pozadí šumu detektoru možné detekovat) by měla být co nejnižší. Aby analyt v detektoru nekondenzoval, volí se teplota o něco vyšší než je teplota v koloně. V GC se používá především plamenově ionizační detektor FID, z dalších detektorů je to teplotně vodivostní, elektronového záchytu, hmotnostně-spektrometrický, spektrofotometrický v IČ oblasti s Fourierovou transformací aj. [72,73,79].

*Katarometr* (teplotně vodivostní detektor TCD) je universální detektor s širokou oblastí linearit a se střední citlivostí. Hlavní součástí je zahříváné odporové vlákno, které se protékajícím plynem ochlazuje, a tím se mění jeho vodivost. Vodivost nosného plynu musí být co možná nejodlišnější od hodnoty vodivosti analytu, čemuž nejlépe vyhovuje helium a vodík, které mají tepelnou vodivost přibližně o jeden řád vyšší než ostatní plyny a páry

organických látek [20]. V praxi se většinou katarometr skládá ze dvou měrných cel, do první (referenční) se přivádí čistý nosný plyn a do druhé (indikační) plyn z kolony [72,73].

*Ionizační detektory* využívají elektrické vodivosti nabitých částic. Plyn je tedy po příchodu do detektoru ionizován a pak pokračuje do elektrického pole, kde se změní vodivost v závislosti na množství nabitých částic (koncentraci analyzované látky). Odezva je následně zesílena zesilovačem a zapsána. V plamenovém ionizačním detektoru FID jsou analyty ionizovány spálením v miniaturním kyslíko-vodíkovém plamenu. Zdrojem ionizace v heliovém ionizačním detektoru HeD jsou heliové atomy vzbuzené do metastabilního stavu, což se děje absorpcí radioaktivního záření a zároveň působením silného elektrického pole [72,73].

*Detektor elektronového záchytu ECD* používá jako zdroj ionizace radioaktivní zářič. Hlavní části zařízení jsou emitor radioaktivního záření (tritium,  $^{63}\text{Ni}$ ) a kolektor. Vlivem měkkého  $\beta$  záření je nosný plyn – dusík nebo argon ionizován, čímž vznikne proud pomalých elektronů, který je zachycován heteroatomy ve vzorku (halogeny, dusík, síra, fosfor, olovo aj.). Tím se sníží ionizační proud, což je právě ukazatelem koncentrace heteroatomů ve vzorku. Mez detekce ECD detektoru je o několik řádů nižší než u FID, proto je tento detektor velmi vhodný pro stopovou analýzu (např. pesticidů v životním prostředí) [72,73].

*Hmotnostně spektrometrický detektor MS* rozděluje ionizované částice analyzovaných látek v elektromagnetickém poli podle hmotnosti (dráha částic o různé hmotnosti se působením elektromagnetického pole odlišně zakřivuje a dopadá na detekční desku). K vyhodnocování výstupu se používají databanky částic [72,73].

### 4.9.3 Aplikace GC

Chromatogram jako výstup GC, který je tvořen soustavou píků, které jsou v ideálním případě ostré, symetrické a odpovídají gaussovskému rozdělení. Osa x nejčastěji znázorňuje čas, po který chromatografický zápis probíhal. Je-li vzorek správně rozložen, pak každý pík odpovídá jedné složce v analyzované směsi [72].

Pro kvalitativní vyhodnocení chromatogramu (identifikace rozdělených složek) se sledují retenční veličiny. Retenční čas ( $t_R$ ) je celkový čas, který příslušný analyt stráví v separační koloně (vždy pro danou látku charakteristický) a jeho hodnota odpovídá vrcholu píku. Re-

tenční objem ( $V_R$ ) je objem mobilní fáze, který projde kolonou za dobu, kterou příslušný analyt stráví v separační koloně. Porovnáním retenčních dat jednotlivých komponent vzorku se současně získanými retenčními daty vhodně zvoleného, přesně definovaného standardu je vzorek identifikován [72].

Pro kvantitativní vyhodnocení chromatogramu je rozhodující plocha píku (i výška), která určuje koncentraci jednotlivé komponenty ve směsi. Plocha píku je dnes vypočítána pomocí příslušného softwaru automaticky. Na stejné koloně a za stejných podmínek je třeba proměřit také série standardů (roztoky těch látek, které budeme vyhodnocovat ve vzorku, o přesně definované koncentraci) a v příslušném programu se vytvoří kalibrační křivka – závislost středních naměřených hodnot na koncentracích roztoků standardů. Porovnáním s hodnotami naměřenými pro analyzovanou látku získáme koncentraci dané látky ve směsi [72,73].

GC je universální instrumentální analytická metoda, která nachází velké uplatnění především v petrochemickém průmyslu a průmyslu organických syntéz. Zvláště po rozvoji derivatizace začala být intenzivně využívána také v lékařství, biologii a biochemii (např. stanovení lipidů nebo steroidů v tělních tekutinách), při kontrolách životního prostředí (PCB, ovzduší aj.) nebo v potravinářství [72,73].

## **PRAKTICKÁ ČÁST**



## CÍL PRÁCE

Hlavním cílem této diplomové práce bylo sledování obsahu laktózy ve vzorcích jogurtů, které byly chladírensky skladovány různě dlouhou dobu.

Tento hlavní cíl byl naplněn prostřednictvím následujících dílčích cílů:

1. Výběr vhodné metodiky přípravy vzorků.
2. Výběr a optimalizace metody stanovení laktózy ve vzorcích jogurtů pomocí GC-MS.
3. Vyhodnocení hydrolytické činnosti enzymů bakterií mléčného kvašení během skladování.

## 5 STANOVENÍ OBSAHU LAKTÓZY V JOGURTECH METODOU PLYNOVÉ CHROMATOGRAFIE

### 5.1 Stanovení laktózy v průběhu skladování ve vybraných vzorcích jogurtu

Za účelem stanovení změny obsahu laktózy v jogurtech v závislosti na době skladování byly vyrobeny jogurty o koncentraci 12 a 16 % sušiny a skladovány 1, 3, 5, 7, 10, 20 a 30 dní. Z jogurtů byly odebrány reprezentativní vzorky, které byly vymrazeny, lyofilizovány, upraveny, derivatizovány a poté v nich byla stanovena laktóza pomocí metody plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickým detektorem.

#### 5.1.1 Příprava vzorků

Na výrobu základní mléčné směsi k fermentaci bylo použito sušené polotučné mléko Lactis (1,5 % tuku v sušině) od výrobce ASP Czech s.r.o. a pitná voda. Důkladným rozmícháním a rozpuštěním byly připraveny zahuštěné směsi o hmotnostní koncentraci 12 a 16 % sušiny. Požadovaná množství sušeného mléka byla odvážena na předvážkách s přesností 0,01 g, navážky spolu s výpočtem obsahu tuku v sušině shrnuje následující tabulka:

Tab. 5.1 Navážka surovin pro výrobu jogurtů se sušinou 12 %

Suroviny	Navážka na 500 g vzorku [g]	Obsah tuku ve vzorku [%]	Obsah tuku v sušině vzorku [%]
Sušené mléko	63,15	1,89	15,79
Voda	436,85	-	-

Tab. 5.2 Navážka surovin pro výrobu jogurtů se sušinou 16 %

Suroviny	Navážka na 500 g vzorku [g]	Obsah tuku ve vzorku [%]	Obsah tuku v sušině vzorku [%]
Sušené mléko	84,21	2,53	15,81
Voda	415,79	-	-

Dále byl proveden pasterační záhřev. Pasterace proběhla ve vodní lázni při teplotě  $95 \pm 1$  °C a výdrž 5 min.

Po rychlém ochlazení na teplotu 37 °C byla směs zaočkována sušenou jogurtovou kulturou pro přípravu kysaných mléčných potravin Laktoflorou jogurtovou od výrobce MILCOM a.s., která obsahovala mikrobiální kmeny *LbC. delbruckii* subsp. *bulgaricus* a *Str. thermophilus*.

Na množství 0,5 l směsi bylo použito 1,5 g lyofilizovaných kultur, které byly ve směsi důkladně rozmíchány. Zaočkováná směs byla rovnoměrně rozdělena do hliníkových misek na vzorky.

Fermentace probíhala u každého vzorku zvlášť, v jednotlivých obalech v termostatu při teplotě  $42 \pm 1$  °C po dobu 6 hodin. Po vychlazení byly jogurty skladovány v chladničce při teplotě  $6 \pm 2$  °C po dobu 1, 3, 5, 7, 10, 20 a 30 dní. V těchto dnech byly jogurty vždy vymrazeny při -80 °C po dobu minimálně 12 hodin a následně lyofilizovány dva dny při -40 °C (Sloha 1-4 LSC, Labicom, s.r.o., Praha). Lyofilizované vzorky byly homogenizovány a uchovány při teplotě -20 °C pro následné chromatografické stanovení laktózy.

V 1., 5., 10., 20. a 30. dni skladování bylo také ve vzorcích jogurtů měřeno pH pomocí vpichového pH metru (EUTECH INSTRUMENTS Malajsie) s následujícími výsledky:

Tab. 5.3 Průměrné hodnoty pH jogurtů se sušinou 12 % v průběhu skladování

Den skladování	Hodnota pH jogurtů $\pm$ Standardní chyba
1	$4,24 \pm 0,051^a$
5	$4,20 \pm 0,061^a$
10	$4,14 \pm 0,061^a$
20	$4,14 \pm 0,030^a$
30	$4,07 \pm 0,033^a$

<sup>a</sup> ... hodnoty se stejným písmenem v horním indexu nejsou statisticky významné ( $P \leq 0,05$ )

Tab. 5.4 Průměrné hodnoty pH jogurtů se sušinou 16 % v průběhu skladování

Den skladování	Hodnota pH jogurtů ± Standardní chyba
1	4,48 ± 0,125 <sup>a</sup>
5	4,38 ± 0,068 <sup>a</sup>
10	4,35 ± 0,088 <sup>a</sup>
20	4,21 ± 0,085 <sup>a</sup>
30	4,15 ± 0,005 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> ... hodnoty se stejným písmenem v horním indexu nejsou statisticky významné ( $P \leq 0,05$ )

### 5.1.2 Chemikálie a spotřební materiál

#### *Základní chemikálie*

- Pyridin p.a. (Lachner)
- Hydroxylamin hydrochlorid p.a. (Lachner)
- Hexametyldisilazan p.a. (Fluka)
- Trifluoroctová kyselina 99% (Sigma-Aldrich)
- Etylester kyseliny octové p.a. (Lachner)
- Síran sodný bezvodý (Lachner) p.a.

#### *Standardy*

- Laktosa monohdrát p.a. (Lachner)

### 5.1.3 Přístroje a pomocné vybavení

#### *Přístroje a zařízení*

- Analytické váhy GRC-200-EC (A & D Instruments, LTD.)
- Ultrazvuk PS 04000 A Ultrasonic compact cleaner – Powersonic
- Třepačka Bio Vortex V1, Biosan, Bio Tech, Praha

- Centrifuga Hettich EBA 21
- Centrifuga Hettich MIKRO 200R
- Plynový chromatograf s hmotnostní detekcí (GC-MS-QP2010, Shimadzu)

***Pomocné laboratorní vybavení***

- Centrifugační zkumavky se šroubovacím uzávěrem a stojánky
- Skleněné pipety, balonek, kádinky, lžičky
- Automatická mikropipeta a plastové pipetovací špičky
- Skleněné vialky

## 5.2 Metodika stanovení laktózy metodou plynové chromatografie

Pro stanovení laktózy v jednotlivých vzorcích jogurtů byla vybrána metoda plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickým detektorem. O plynové chromatografii bylo obecně pojednáno už v teoretické části.

Konkrétní použitá metodika byla vypracována podle [81], [82] a [83] a dále optimalizována.

Před samotným GC stanovením je třeba netěkavé látky, jako je i laktóza, vhodně derivatizovat – převést na těkavé deriváty. Za tímto účelem byla pro toto stanovení vybrána silylace pomocí hexamethyldisilazanu. Před samotnou silylační reakcí byla laktóza zreagována na svůj oxim pomocí roztoku hydroxylaminhydrochloridu v pyridinu. Vzorky byly čištěny ultrazvukem a centrifugovány.

Pro stanovení laktózy byl použit plynový chromatograf s hmotnostní detekcí (GC-MS-QP2010, Shimadzu) Použitá kolona SLB-5ms má adsorpční povrch na bázi silphenylenového polymeru s polaritou odpovídající poly(5 % phenyl/95 % methylsiloxanu). Nosným plynem bylo helium.

### 5.3 Postup práce

- **Úprava vzorků:**

Vymražené a lyofilizované vzorky jogurtů byly uchovávány v hliníkových miskách v exsikátoru. Vzorky byly zhomogenizovány ve třecí misce. Následně byly do provedení analýzy uchovány při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

- **Navážka:**

Do čistých a suchých centrifugačních zkumavek bylo na analytických vahách naváženo vždy po cca 0,15 g vzorku.

- **Tvorba oximu:**

Rozpuštěním pomocí třepačky byl připraven roztok hydroxylamin hydrochloridu v pyridinu (o koncentraci 25 mg hydroxylamin hydrochloridu na 1 ml pyridinu). Ke každému vzorku jogurtu ve zkumavce byl automatickou pipetou napipetován 1 ml roztoku. Každý vzorek byl třikrát střídavě 10 min ultrazvukován a třikrát 0,5 min míchán na třepačce.

- **Silylace:**

Ke každému vzorku ve zkumavce bylo přidáno 1 ml hexamethyldisilazanu a 4 kapky trifluoroctové kyseliny. Obsah každé zkumavky byl promíchán pomocí třepačky.

- **Úprava vzorků před GC stanovením:**

Vzorky ve zkumavkách byly 20 min centrifugovány (rychlostí 6000 otáček/min.). Z každé zkumavky byl automatickou pipetou odebrán 1 ml supernatantu do skleněné vialky a proudem tekutého dusíku o čistotě N 5.0 odpařen dosucha. Pro vyčištění a vysušení bylo ještě do každé vialky přidáno 3 ml etylesteru kyseliny octové a 1 g bezvodého síranu sodného. Poté byly vzorky centrifugovány 30 min při rychlosti 15 000 otáček/min. "

- **GC stanovení:**

Pro samotné GC stanovení byly vialky umístěny do autosampleru chromatografu a pomocí softwaru přístroje byly nastaveny následující podmínky:

- Kolona – SLB-5ms, délka 30 m, šířka 0,25  $\mu\text{m}$ , průměr 0,25 mm
- Teplota kolony – 25 °C
- Teplota nástřikového prostoru – 25 °C
- Nástřik – 1  $\mu\text{l}$
- Split: 1:1
- Nosný plyn – Helium – tlak 100 kPa, celková rychlost průtoku 4,9 ml/min, rychlost průtoku kolonou 1,93 ml/min, lineární rychlost 49,7 cm/s

- **Detekce**

Na hmotnostně spektrometrickém detektoru byly nastaveny následující podmínky:

- Teplota detekce – 200 °C
- Okolní teplota – 25 °C

- **Vyhodnocení**

Plochy píků byly získány integrací pomocí softwaru GC SOLUTION. Ze standardů byla sestavena kalibrační křivka. Do rovnice kalibrační křivky pak byla dosazena data jednotlivých vzorků a byly vypočítány konkrétní koncentrace  $\alpha$ - i  $\beta$ -anomeru laktózy.



#### 5.4 Statistické vyhodnocení výsledků

Naměřená data byla statisticky zpracována pomocí programu Unistat v. 5.5. Byla použita metoda vícerozměrné parametrické analýzy rozptylu (ANOVA). Pro stanovení statisticky významných rozdílů mezi průměrnými hodnotami byl použit Tukeyho test na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

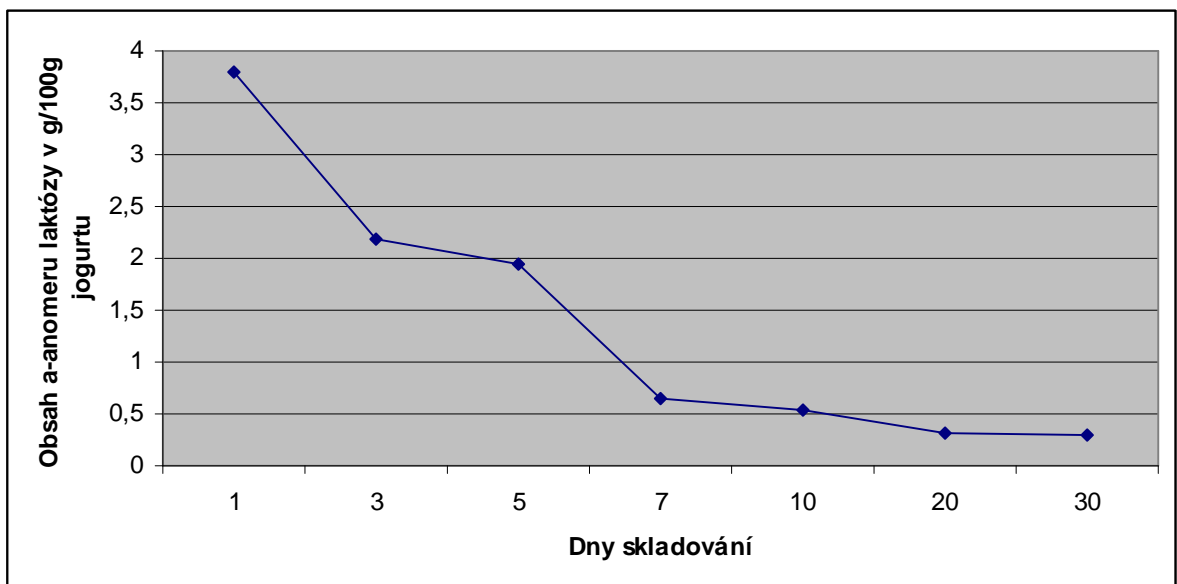
## 5.5 Výsledky

Tab. 5.5 Průměrný obsah  $\alpha$ -anomeru laktózy ve vzorcích jogurtů s obsahem sušiny 12 %, skladovaných 1 až 30 dní (g/100 g jogurtu)

Den skladování	Průměrný obsah $\alpha$ -anomeru laktózy $\pm$ Standardní chyba
1	$3,80 \pm 0,079^a$
3	$2,19 \pm 0,047^b$
5	$1,95 \pm 0,029^c$
7	$0,64 \pm 0,018^d$
10	$0,54 \pm 0,001^d$
20	$0,31 \pm 0,004^e$
30	$0,29 \pm 0,004^e$

<sup>a,b,c,d,e</sup> ... hodnoty ve sloupci se stejným písmenem v horním indexu nejsou statisticky významné ( $P \leq 0,05$ )

Graf 5.1 Závislost obsahu  $\alpha$ -anomeru laktózy ve vzorcích jogurtů s obsahem sušiny 12 % na době skladování

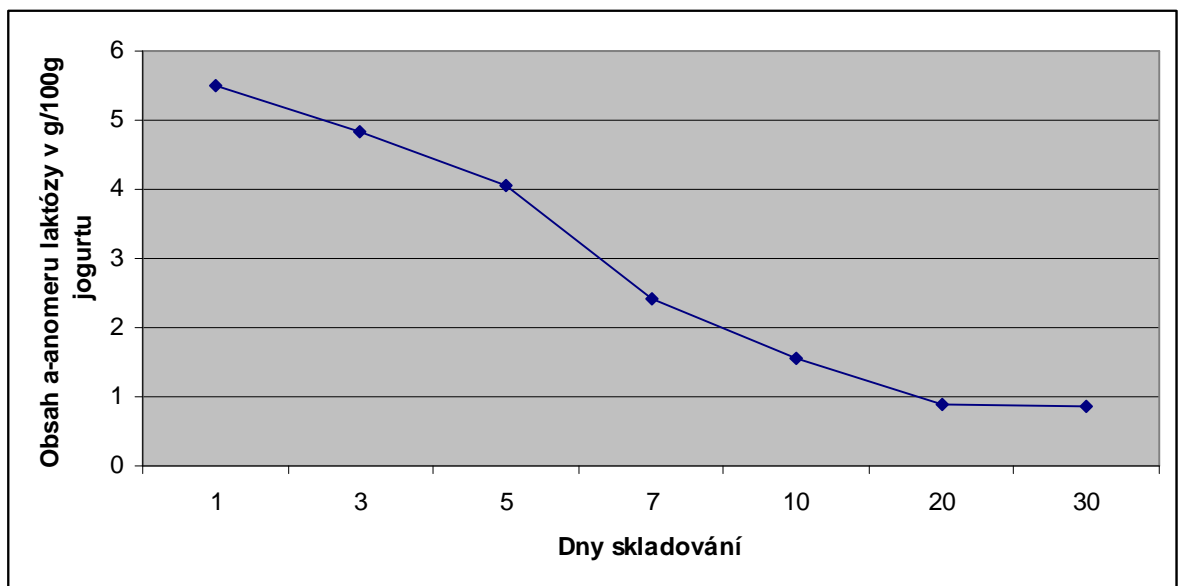


Tab. 5.6 Průměrný obsah  $\alpha$ -anomeru laktózy ve vzorcích jogurtů s obsahem sušiny 16 %, skladovaných 1 až 30 dní (g/100 g jogurtu)

Den skladování	Průměrný obsah $\alpha$ -anomeru laktózy $\pm$ Standardní chyba
1	5,49 $\pm$ 0,109 <sup>a</sup>
3	4,82 $\pm$ 0,012 <sup>b</sup>
5	4,06 $\pm$ 0,079 <sup>c</sup>
7	2,43 $\pm$ 0,034 <sup>d</sup>
10	1,54 $\pm$ 0,012 <sup>e</sup>
20	0,88 $\pm$ 0,012 <sup>f</sup>
30	0,87 $\pm$ 0,005 <sup>f</sup>

a,b,c,d,e,f ... hodnoty ve sloupci se stejným písmenem v horním indexu nejsou statisticky významné ( $P \leq 0,05$ )

Graf 5.2 Závislost obsahu  $\alpha$ -anomeru laktózy ve vzorcích jogurtů s obsahem sušiny 16 % na době skladování

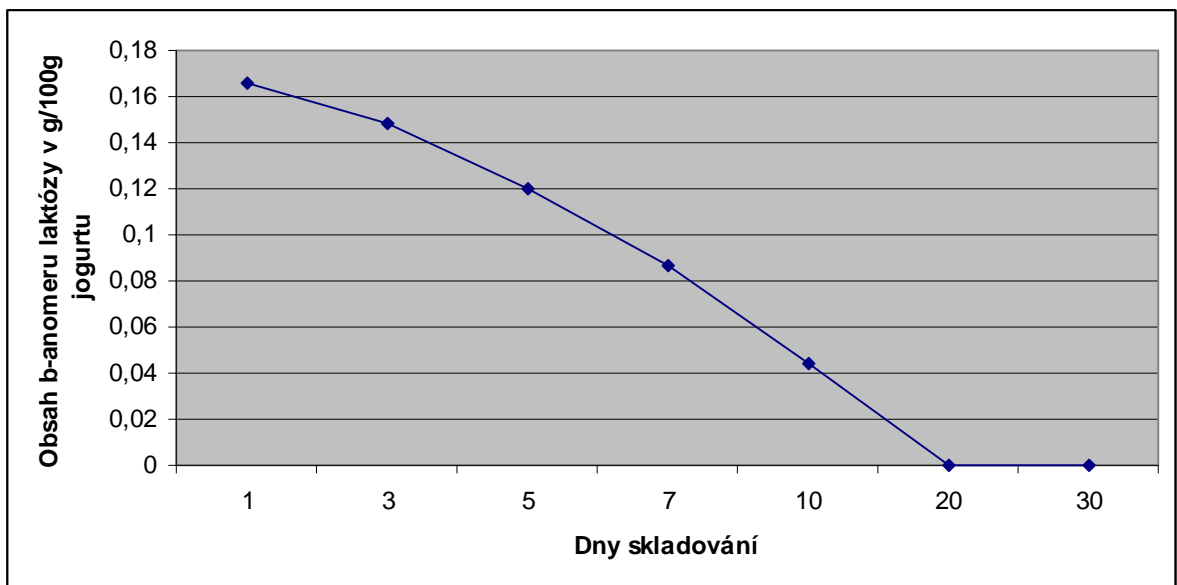


Tab. 5.7 Průměrný obsah  $\beta$ -anomeru laktózy ve vzorcích jogurtů s obsahem sušiny 12 %, skladovaných 1 až 30 dní (g/100 g jogurtu)

Den skladování	Průměrný obsah $\beta$ -anomeru laktózy $\pm$ Standardní chyba
1	0,17 $\pm$ 0,004 <sup>a</sup>
3	0,15 $\pm$ 0,002 <sup>b</sup>
5	0,12 $\pm$ 0,004 <sup>c</sup>
7	0,09 $\pm$ 0,001 <sup>d</sup>
10	0,04 $\pm$ 0,002 <sup>e</sup>
20	0,00 $\pm$ 0,000 <sup>f</sup>
30	0,00 $\pm$ 0,000 <sup>f</sup>

a,b,c,d,e,f ... hodnoty ve sloupci se stejným písmenem v horním indexu nejsou statisticky významné ( $P \leq 0,05$ )

Graf 5.3 Závislost obsahu  $\beta$ -anomeru laktózy ve vzorcích jogurtů s obsahem sušiny 12 % na době skladování

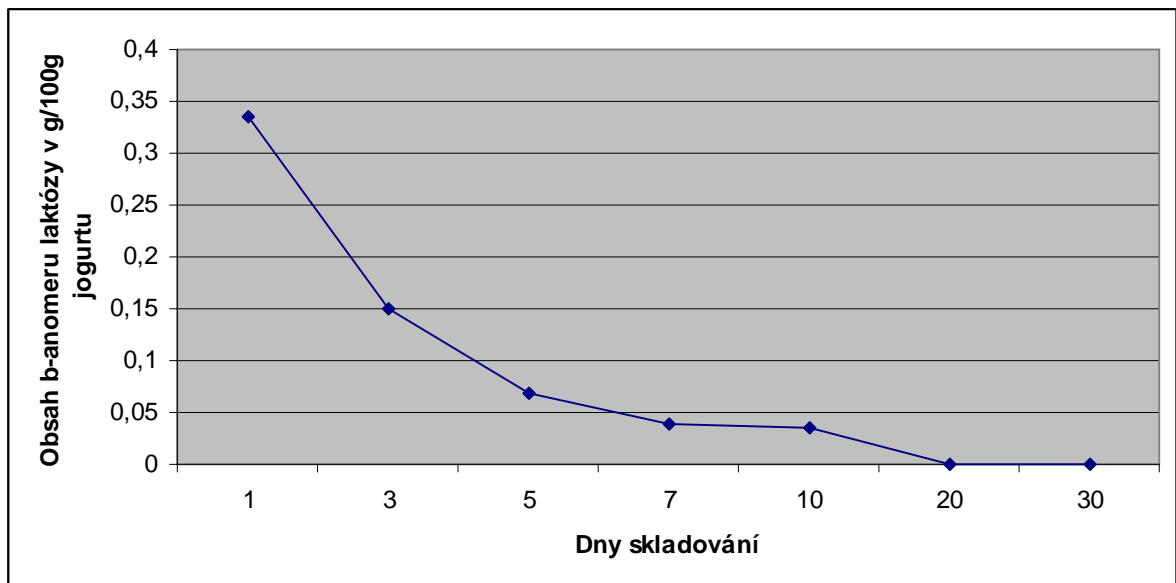


Tab. 5.8 Průměrný obsah  $\beta$ -anomeru laktózy ve vzorcích jogurtů s obsahem sušiny 16 %, skladovaných 1 až 30 dní (g/100 g jogurtu)

Den skladování	Průměrný obsah $\beta$ -anomeru laktózy $\pm$ Standardní chyba
1	$0,34 \pm 0,010^a$
3	$0,15 \pm 0,006^b$
5	$0,07 \pm 0,004^c$
7	$0,04 \pm 0,002^d$
10	$0,03 \pm 0,001^d$
20	$0,00 \pm 0,000^e$
30	$0,00 \pm 0,000^e$

a,b,c,d,e ... hodnoty ve sloupci se stejným písmenem v horním indexu nejsou statisticky významné ( $P \leq 0,05$ )

Graf 5.4 Závislost obsahu  $\beta$ -anomeru laktózy ve vzorcích jogurtů s obsahem sušiny 16 % na době skladování



## DISKUZE A ZÁVĚR

V upravených vzorcích jogurtů o sušině 12 a 16 % byl metodou GC-MS měřen obsah  $\alpha$ - a  $\beta$ -anomeru laktózy. Měření bylo provedeno po 1, 3, 5, 7, 10, 20 a 30 dnech skladování. U všech vzorků obsah  $\alpha$ - a  $\beta$ -anomeru laktózy v průběhu skladování výrazně klesl.

U jogurtů s obsahem sušiny 12 % došlo k nejvýraznějšímu poklesu obsahu  $\alpha$ -anomeru laktózy mezi 1. a 3. a 5. a 7. dnem skladování. Od 7. do 20. dne klesal obsah už jen mírně a po 20. dni už téměř neklesal. Celkově klesl v průběhu skladování obsah  $\alpha$ -anomeru laktózy v jogurtu o sušině 12 % z  $3,8 \pm 0,079$  g na  $0,29 \pm 0,004$  g ve 100 g jogurtu, tedy o 92,4 %.

Ve vzorcích jogurtů o sušině 16 % klesal obsah  $\alpha$ -anomeru laktózy výrazně a relativně rovnoměrně až do 20. dne skladování. Mezi 20. a 30. dnem byl už pokles jen mírný. Celkově klesl v průběhu skladování obsah  $\alpha$ -anomeru laktózy v jogurtu o sušině 16 % z  $5,49 \pm 0,109$  g na  $0,87 \pm 0,005$  g ve 100 g jogurtu, tedy o 84,2 %.

Obsah  $\beta$ -anomeru laktózy v jogurtech o sušině 12 % klesal v průběhu skladování rovnoměrně, 20. den již byla naměřena nulová hodnota. Z původních  $0,17 \pm 0,004$  g ve 100 g jogurtu o sušině 12 % klesl obsah  $\beta$ -anomeru až na nulový obsah, tedy o 100 %.

Obsah  $\beta$ -anomeru laktózy v jogurtech o sušině 16 % klesal výrazněji mezi 1. a 5. dnem skladování, 20. den již byla naměřena nulová hodnota. Z původních  $0,34 \pm 0,010$  g ve 100 g jogurtu o sušině 16 % klesl obsah  $\beta$ -anomeru až na nulový obsah, tedy o 100 %.

Výrazný pokles obsahu  $\alpha$ -anomeru a  $\beta$ -anomeru laktózy v jogurtech během skladování je možno přisoudit hydrolytické činnosti bakterií mléčného kvašení, které si i při chladírenských podmínkách částečně uchovaly fermentační schopnost. Tuto skutečnost potvrzují také klesající hodnoty pH jogurtů v průběhu skladování. Fermentační proces dále pokračuje, z laktózy vzniká další kyselina mléčná, pH produktu se snižuje. V jogurtech o sušině 12 % se pH během skladování snížilo z  $4,24 \pm 0,051$  až na hodnotu  $4,07 \pm 0,033$  a v jogurtech o sušině 16 % z  $4,48 \pm 0,125$  na  $4,15 \pm 0,005$ . Určitý menší podíl na okyselení mají pravděpodobně také další fermentační produkty bakterií mléčného kvašení jako těkavé i netěkavé organické kyseliny a volné mastné kyseliny, které byly lipolýzou uvolněny z triacylglycerolů.

Klesající hodnoty obsahu laktózy v jogurtech během skladování zjistili také v [85]. Výrazný pokles zaznamenali během prvního dne po fermentaci, další dny už obsah laktózy klesal jen mírně.

Obsah laktózy se při výrobě sušeného mléka nestandardizuje jako obsah tuku a může tedy ve výrobcích do jisté míry kolísat. Nicméně je to veličina relativně stálá a v kravském mléce nabývá průměrně hodnot 4,8 % [4]. V rovnováze při 20 °C se laktóza rozpuštěná ve vodě skládá z 37,3 %  $\alpha$ -anomeru a 62,7 %  $\beta$ -anomeru. Obsah  $\alpha$ - a  $\beta$ -anomeru v sušeném mléce je závislý na sušině výrobku, obsahu tuku a teplotě, průměrně se pohybuje kolem 40 % pro  $\alpha$ -anomer a 60 %  $\beta$ -anomer laktózy [84].

Po proběhlé fermentaci je ovšem situace opačná – obsah  $\alpha$ -anomeru je ve všech vzorcích jogurtů několikanásobně vyšší než obsah  $\beta$ -anomeru laktózy. Také v průběhu skladování obsah  $\beta$ -anomeru dále výrazně klesá, ve 20. dni už dosahuje v podmínkách tohoto stanovení neměřitelných hodnot. Dá se tedy předpokládat, že bakterie mléčného kvašení přednostně fermentují  $\beta$ -anomer laktózy, protože produkují převážně  $\beta$ -galaktozidázu.

Z uvedených výsledků vyplývá, že hydrolytická aktivita bakterií mléčného kvašení v jogurtech je i při chladírenském skladování dosti významně zachována. Vystává otázka, jak při výrobě jogurtů zajistit stále stejnou, standardní jakost produktů pro spotřebitele. Při poklesu pH z  $4,48 \pm 0,125$  na  $4,15 \pm 0,005$ , jak tomu bylo u jogurtů se sušinou 16 %, bude tato změna velmi pravděpodobně sensoricky zaznamenána. Pasterační nebo sterilační záhřev po fermentaci nepřichází v úvahu, protože jogurty nemohou být (dle platné české legislativy [3]) tepelně ošetřeny po kysacím procesu a musí obsahovat minimálně  $10^7$  živých mikroorganismů v 1 g produktu. Jednou z možností snížení hydrolytické aktivity bakterií mléčného kvašení v jogurtech během skladování by mohlo být zrychlení a zintenzívnění chlazení po fermentačním zákroku, zde však hrozí nebezpečí synerese syrovátky.

Zajímavé jsou výsledky také pro pacienty s intolerancí laktózy. Díky výrazným poklesům obsahu laktózy během skladování jogurtů je možno doporučit nákup výrobků až před skončením doby spotřeby. Otázkou je, jestli by se i u komerčních produktů dosáhlo stejných výsledků.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] TAMIME, A., ROBINSON, R. *Yoghurt: Science and Technology*. 2nd ed., reprinted 2001. Boca Raton, FL: CRC Press, 2001. 619 s. ISBN:9780849317859.
- [2] HUI, Y, ed. *Dairy Science and Technology Handbook*. New York, N.Y:VCH, 1993. 3 sv., 1304 s. ISBN:978156081078.
- [3] Vyhláška Ministerstva zemědělství ČR 77/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje, v aktuálním znění.
- [4] WONG, Noble, ed. ; JENNESS, Robert. *Fundamentals of Dairy Chemistry*. Third ed.; [ed. 1999]. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers, 1999. 779 s. ISBN:0834213605.
- [5] ONWULATA, C. I., RAO, D. R.. VANKINENI, P. Relative efficiency of yogurt, sweet acidophilus milk, hydrolyzed-lactose milk, and a commercial lactase tablet in alleviating lactose maldigestion. *Am. J. Clin. Nutr.*. 1989, **49**, s. 1233–1237.
- [6] JENKINS, D. Effect of pectin, guar gum, and wheat fibre on serum-cholesterol. *The Lancet*. 1975, **305**, 7916, s. 1116-1117.
- [7] LAMPERT, L. M. *Modern Dairy Products*, 3rd edition. New York: Chemical Publ. Co., 1975. 448 s. ISBN:0820603600.
- [8] ANON. (1997a) In *Addition of Micronutrients to Food*. London: Institute of Food Science & Technology, 1997. ISBN:0905367146.
- [9] KNEIFEL, W., HOLUB, S., WITRHMANN, M. Monitoring of B-complex vitamins in yogurt during fermentation. *Journal of Dairy Research*. 1989, **56**, s. 651-656.
- [10] RASIC, J. Lj. Nutritive value of yoghurt. *Cultured Dairy Products Journal*. 1987, **22**, 3, s. 6-9.
- [11] BUTTRISS, J. Nutritional properties of fermented milk products. *International Journal of Dairy Technology*. 1997, **50**, s. 21–27.
- [12] DOYLE, W., CRAWFORD, M. A., LAURANCE, B. M. Evaluation of yogurt as a weaning food. *Health visitor*. 1981, **54**, 10, s. 424-425.
- [13] FOX, P, ed., MCSWEENEY, P. L. H. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. London: Blackie Academic & Professional, 1998. XIV, 478 s. ISBN:0412720000.



- [14] TAMIME, A. Y. *Structure of Dairy Products*. John Wiley & Sons., 2007. 322 s. ISBN:978-1-4051-2975-6.
- [15] ROBINSON, R. K., TAMIME, A. Y. Manufacture of yoghurt and other fermented milks, in *Modern Dairy Technology*, 2nd ed, Vol.2. London: Elsevier Applied Science. 1993. s. 1-48. ISBN:978-1851669240
- [16] TAMIME, A.Y., DAVIES, G., HAMILTON, M. P. The quality of yoghurt on retail sale in Ayrshire: Part 1. chemical and microbiological evaluation. *Dairy Industries International*. 1987, **52**, 6, s. 19-21.
- [17] MARSHALL, V. M. E., MABITT, L. A. The use of single starter organisms for yoghurt manufacture. *Journal of the Society of Dairy Technology*. 1980, **33**, 3, s. 129-130.
- [18] KIM, H. J., KIM, T. J. YOON, H. J. *Dairy Science Abstracts*. 1995, **57**, 595.
- [19] JUNK, W. R., PANCOAST, H. M. *Handbook of Sugars*, 2d ed. Westport: AVI Publishing, 1980. 598 s. ISBN: 0870553488.
- [20] DAVIDSON, S., PASSMORE, R., BROCK, J. F. TRUSWELL, A. S. *Human Nutrition and Dietetics*, 7th Edition. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1979. 641 s. ISBN:0443017646.
- [21] HENKEL J. Sugar substitutes. Americans opt for sweetness and lite. *FDA Consumer Magazine* (DIANE Publishing), 1999, **33**, 6, s. 12–6.
- [22] WILLIAMS, R. A., SINGLETON, P., LAMBERT, P. A. (1996) *Antimicrobial Drug Action – The Chemical Treatment of Infectious Diseases*. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 1996. ISBN:9781872748818.
- [23] SANYAL, M. K., YADAV, P. L., DUBEY, P. C. Use of preservatives for improving shelf life of curd (dahi). *Journal of Food Science and Technology – Mysore*, 1990, **27**, s. 388-389.
- [24] Vyhláška Ministerstva zdravotnictví ČR 130/2010 Sb., kterou se mění vyhláška č. 4/2008 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin.
- [25] HYLMAR, B. *Výroba kysaných mléčných výrobků*. Vyd.1. Praha: SNTL, 1986, 209 s. ISBN:04-812-86.

- [26] TAMIME, A. Y., MARSAHLL, V. M. E. In *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, 2nd Edition, Ed. by Law, B.A. London: Blackie Academic & Professional, 1997, s. 57–152. ISBN:0751403466.
- [27] KANNAN, A, JENNESS, R. Relation of milk serum proteins and milk salts to the effect of heat treatment on rennet clotting. *Journal of Dairy Science*. 1961, **44**, s. 808-822.
- [28] HRABOVA, H. HYLMAR, B. *Dairy Science Abstracts*. 1987, **49**, 22.
- [29] MOGENSEN, J. *Dairy Science Abstracts*. 1995, **57**, 15.
- [30] RASIC, J. L. KURMANN, J. A. (1978) *Yoghurt – Scientific Grounds, Technology, Manufacture and Preparations*. Copenhagen: Technical Dairy Publishing House, 1978. ISBN:19780440494.
- [31] MCSWEENEY, P. L .H., FOX, P. F. (2009). *Advanced Dairy Chemistry, Volume 3 - Lactose, Water, Salts and Minor Constituents* (3rd Edition). Springer - Verlag. 825 s. ISBN:978-0-387-84864-8.
- [32] SMITT, G. *Dairy Processing - Improving Quality*. Woodhead Publishing, 2003. 536 s. ISBN:978-1-85573-676-4.
- [33] HOLEČEK, M. *Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin*. 1. vyd. Praha: Grada, 2006. 286 s. ISBN 80-247-1562-7.
- [34] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 1*. Vyd. 2. uprav. Tábor : OSSIS, 2002. 331 s. ISBN:8086659003.
- [35] LAWRENCE, R. C., THOMAS T. D. TERZAGHI, B. E. Cheese starters. *Journal of Dairy Research*. 1976, **43**, s. 141-193.
- [36] NANNEN, N. L., HUTKINS, R. W. Protontranslocating adenosine triphosphatase activity in lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci*. 1991, **74**, s. 747–751.
- [37] MCKAY, L. L., WALTER, L. A, SANDINE, W. E., ELLIKER, P. R. Involvement of Phosphoenolpyruvate in Lactose Utilization by Group N Streptococci. *Journal of Bacteriology*. 1969, **99**, 2, s. 603–610.

- [38] HUTKINS, R. W., MORRIS, H. A. MCKAY, L. L. Galactokinase activity in *Streptococcus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1985, **50**, s. 777-780.
- [39] BUCHANAN, R. E., GIBBONS, N. E. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed. Baltimore: Williams and Wilkins Co., 1974. 1246 s. ISBN:0683011170.
- [40] STANIER, R. Y., DOUDOROFF, M. and ADELBERG, E. A. *The Microbial World*, 3rd ed. N.Y. Prentice-Hall: Englewood Cliffs, 1970. 873 s. ISBN:0135810175.
- [41] GARMAN, J., COOLBEAR, T. SMART, J. The effect of cations on the hydrolysis of lactose and the transferase reactions catalysed by  $\beta$ -galactosidase from six strains of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1996, **46**, s. 22-27.
- [42] YOAST, S., ADAMS, R. M., MAINZER, S. E., MOON, K., PALOMBELLA, A. L., SCHMIDT, B. F. Generation and Characterization of Environmentally Sensitive Variants of the  $\beta$ -Galactosidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1994, **60**, s. 1221-1226.
- [43] GARVIE, E. I. Lactate dehydrogenase of *Streptococcus thermophilus*. *J. Dairy Res.* 1978, **45**, s. 515-518.
- [44] GASSER, F. Electrophoretic characterization of lactic dehydrogenases in the genus *Lactobacillus*. *Journal of General Microbiology*. 1970, **62**, s. 223-239.
- [45] PUHAN, Z., BANHEGYI M., FLUELER, O. Die durch Milchsäurebakterien verursachten Veränderungen während der Lagerung von Joghurt bei verschiedenen Temperaturen. *Schweiz. Milch Forsch.* 1973, **2**, s. 53-59.
- [46] RAMCHANDRAN, L. *Physico-chemical and therapeutic properties of low-fat yogurt as influenced by fat replacers, exopolysaccharides and probiotics*. PhD thesis. Werribee Campus, VIC, Australia: Victoria University, 2009. 322 s.
- [47] CERNING, J. Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. *Lait*. 1995, **75**, s. 463-472.

- [48] TROJAN, S. *Lékařská fyziologie*. 4., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2003. 771 s. ISBN 80-247-0512-5.
- [49] SILBERNAGL, S.; LANG, F. *Atlas patofyziologie člověka*. Vyd. 1. české. Praha: Grada, 2001. 390 s. ISBN 8071699683.
- [50] GANONG, W. F. *Přehled lékařské fyziologie*. 20. vyd., Czech Edition. Praha: Galén, 2005. ISBN 80-7262-311-7.
- [51] FERNANDEZ P., CANADA F., JIMENÉZ-BARBERO J., MARTÍN-LOMAS, M. Substrate specificity of small-intestinal lactase: Study of the steric effects and hydrogen bonds involved in enzyme-substrate interaction. *Carbohydr. Res.* 1995, **271**, 1, s. 31–42.
- [52] KAUR, K., KAMALJIT, M., SAFRUN, M. A. Hypolactasia as a molecular basis of lactose intolerance. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*. 2006, **43**, 5, s. 267-274
- [53] LOMER, M. C. E., PARKES, G. C., SANDERSON J. D. Review Article: Lactose Intolerance in Clinical Practice – Myths and Realities, *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2008, **27**, 2, s. 93-103.
- [54] SIEBER, R., STRANSKY M., DE VRESE M. Laktoseintoleranz und Verzehr von Milch und Milchprodukten. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*. 1997, **36**, 4, s. 375-393.
- [55] Gilbert, H.F. *Basic Concepts in Biochemistry - A Student's Survival Guide* (2nd Edition). McGraw-Hill, 2000. 343 s. ISBN:978-0-07-135657-2.
- [56] VODRÁŽKA, Z., KRÁLOVÁ, B., ŠÍCHO, V. *Potravinářská biochemie*. 2., dopl a přeprac. vyd. Praha : SNTL, 1981. 360 s.
- [57] MURRAY, R. K., GRANNER, D. K., MAYES, P. A., RODWELL, V. W. *Harper's Illustrated Biochemistry* (26th Edition). McGraw-Hill, 2003. 693 s. ISBN:978-0-07-138901-3.
- [58] CRAMER D. W., GREENBERG E.R. et al. A case-control study of galactose consumption and metabolism in relation to ovarian cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2000, **9**, s. 95–101.

- [59] FUKUYAMA, T. T., O'KANE D. J. Galactose metabolism. I. Pathway of carbon in fermentation by *Streptococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 1962, **84**, s. 793-796.
- [60] MUSIL, J. Molekulové základy klinické biochemie. Praha: Grada, 1994. 377 s. ISBN:8071690562.
- [61] SWALLOW, D. M. Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. *Annu Rev Genet.* 2003, **37**, s. 197-219.
- [62] ALM, L. *Lactose intolerance*. In ROGINSKY H., FUQUAY J. W., & FOX P. F. (Eds.) *Encyclopedia of dairy sciences* (s. 1533–1537). London, UK: Academic Press., 2002. ISBN: 0122272358
- [63] GUGATSCHKA, M., DOBNING, *et al.* Molecularly-defined lactose malabsorption, milk consumption and anthropometric differences in adult males. *QJM.* 2005, **98**, s. 857-863.
- [64] MATTHEWS, S. B, WAUD, J. P., ROBERTS, A. G., CAMPBELL, A. K. Systemic lactose intolerance: a new perspective on an old problem. *Postgrad Med J.* 2005, **81**, s. 167-173.
- [65] SCHAAFSMA, G. Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. *International Dairy Journal.* 2008, **18**, s. 458–465.
- [66] COX, T. M. *Enzyme deficiency*. In: BROSTOFF, J., CHALLACOMBE, S. J. *Food Allergy and Intolerance*, 2nd edn. London: Saunders, 2002. s. 365-85. ISBN:0702020389
- [67] PIMENTEL, M., LIN, H. C, ENAYATI, P., *et al.* Methane, a gas produced by enteric bacteria, slows intestinal transit and augments small intestinal contractile activity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006, **290**, s. 1089-95.
- [68] ČURDA, L. Mléčné výrobky a intolerance laktózy, *Potravinářská revue.* 2006, **4**, s.19-22.
- [69] MARTINI, M. C., KUKIELKA, D., SAVAIANO, D. A. Lactose digestion from yogurt: influence of a meal and additional lactose. *Am J Clin Nutr.* 1991, **53**, s. 1253-8.

- [70] JELEN, P., TOSSAVAINEN, O. Low lactose and lactose-free milk and dairy products - prospects, technologies and applications. *Australian Journal of Dairy Technology*. 2003, **58**, s. 161-165.
- [71] EADALA, P., WAUD, J. P., MATTHEWS, S. B., GREEN, J. T., CAMPBELL, A. K. Quantifying the 'hidden' lactose in drugs used for the treatment of gastrointestinal conditions. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2009, **29**, s. 677-687.
- [72] HOLZBECHER, Z., CHURÁČEK, J. *Analytická chemie*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1987, 663 s.
- [73] PATNAIK, P. *Dean's Analytical Chemistry Handbook (2nd Edition)*. McGraw Hill, 2004. 1143 s. ISBN:978-0-07-141060-1.
- [74] PETRUSHEVSKA-TOZI, L., BAUER-PETROVKA, B. Spectrophotometric Determination of Lactose in Milk with PdCl<sub>2</sub>. *J. Agric. Food Chem.* 1997, **45**, s. 2112-2114.
- [75] ZARB, J. M., HOURIGAN, J. A. An enzymatic, cryoscopic method for the estimation of lactose in milk products. *N.Z. J. Dairy Sci. Technol.* 1979, **14**, s. 171.
- [76] KLEYN, D. H. Determination of lactose by an enzymatic method. *J Dairy Sci.* 1985, **68**, 10, s. 2791-2798.
- [77] DONER, L. W., HICKS, K. B. *Lactose and the sugars of honey and maple: Reactions, properties and analysis*. In: *Food Carbohydrates* LINEBACK, D. R., INGLET, G. E. (Editors). Westport, Conn.: AVI Publishing Co., 1982. s. 74-112. ISBN:087055400X.
- [78] BLAU, K.; KING, G. S. *Handbook of derivatives for chromatography*. London: Heyden, 1977. 576 s. ISBN 0-85501-206-4.
- [79] Ministerstvo zdravotnictví ČR. *Český lékopis 2009*. Praha : Grada, 2009. (3968 s., CD-ROM) ISBN 978-80-247-2994-7.
- [80] SCOTT, R. P. W. Principles and Practise of Chromatography. In *Chrom-Ed Book Series* [online]. [s.l.] : Libraryforscience, 2003 [cit. 2011-04-19]. Dostupné z WWW: <<http://www.chromatography-online.org/>>.
- [81] LI, B. W., SCHUHMANN, P. J. ; HOLDEN, J. M. Determination of Sugars in Yogurt by Gas-Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 1983, **31**, s. 985-989.

- [82] ROJAS-ESCUADERO, E., ALARCÓN-JIMÉNEZ, A. L., ELIZALDE-GALVÁN, P., ROJO-CALLEJAS, F. Optimization of carbohydrate silylation for gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2004, **1027**, s. 117–120.
- [83] CHIESA, L. M., et al. Gas chromatographic determination of galactose in milk Example of a switching valve used for the protection of the capillary column. *Journal of Chromatography A*. 1999, **847**, s. 47-51.
- [84] CHOI, R. P., TATTER, C. W., O'MALLEY, C. M., FAIFBANKY, B. W. A solubility method for the determination of alpha and beta lactose in dry products of milk. *J. Dairy Sci.* 1949, **32**, s. 391-397.
- [85] ALM, L. Effect of Fermentation on Lactose, Glucose, and Galactose Content in Milk and Suitability of Fermented Milk Products for Lactose Intolerant Individuals. *J. Dairy Sci.* 1982, **65**, 346-352.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

ADP	Adenosindifosfát
ATB	Antibiotická léčiva
ATP	Adenosintrifosfát
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EC (number)	The Enzyme commission (number)
ECD	Electron Capture Detector
EDTA	Etylendiamintetraoctová kyselina
EMP cesta	Emben-Mayerhof-Parnasova cesta
EPS	Extracelulární heteropolysacharidy
FDA	US Food and Drug Administration
FID	Flame Ionization Detector
GC	Gas Chromatography
GIT	Gastrointestinální trakt
GTCB	Graphitized thermal carbon black
<i>L. delbrueckii</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
LC	Liquid Chromatography
LI	Laktózová intolerance
LPH	Laktáza-phlorizin hydroláza
MCM6	Minichromosome maintenance complex component 6
MFGM	Milk Fat Globule Membrane
MK	Mastné kyseliny
MSD	Mass Spectrometry Detector
NAD <sup>+</sup>	Nikotinamid adenin dinukleotid – oxidovaná forma
NADH	Nikotin adenin dinukleotid – redukována forma



---

NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
p.a.	Per analysis
PCB	Polychlorované Bifenyly
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEP	fosfoenolpyruvát
PEP:PTS	fosfoenolpyruvát – fosfotransferázový systém
<i>S. thermophilus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
Sb.	Sbírka (zákonů České republiky)
SCFA	Short-chain Fatty Acids
TCD	Thermal Conductivity Detector
UDP-galaktóza	Uridindifosfát-galaktóza
UHT	Ultra High Temperature
β-gal	β-galaktozidáza

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obr.1.1 Schéma klasifikace jogurtů [1] .....	13
Obr.1.2 Schéma výroby jogurtů [15] .....	21
Obr.2.1 Strukturní vzorec laktózy [13] .....	33
Obr.2.2 Biosyntéza laktózy [13] .....	36
Obr.2.3 Vliv laktulózy na zdraví [13] .....	38
Obr.2.4 Homo- a heterofermentativní kvašení laktózy v jogurtu [1].....	42
Obr.3.1 Štěpení laktózy laktáz-phlorizin hydrolázou [12].....	49
Obr.3.2 Osud laktózy ve střevě při malabsorpci laktózy [53] .....	52
Obr.4.1 Chloramin T [1] .....	55
Obr.4.2 Fenol a antron (zleva) [13] .....	56

**SEZNAM TABULEK**

Tab.1.1 Požadavky na obsah tuku v kysaných mléčných výrobcích [3].....	14
Tab.1.2 Některé typické hodnoty základních složek mléka a jogurtů ve 100 g produktu [1].....	16
Tab.1.3 Obsah vybraných MK v jogurtech (množství ve 100g) [4] .....	18
Tab.1.4 Obsah vitamínů v mléce a jogurtech [1].....	19
Tab.1.5 Obsah některých makromineralů v mléce a jogurtu (mg/100g produktu) [4] .....	20
Tab.1.6 Klasifikace stabilizátorů (gum) používaných při výrobě jogurtu [1].....	23
Tab.2.1 Koncentrace laktózy (%) v mléce vybraných živočišných druhů [13] .....	32
Tab.2.2 Relativní sladivost některých sacharidů (procenta koncentrace, která dává odpovídající sladivost) [4].....	35
Tab. 5.1 Navážka surovin pro výrobu jogurtů se sušinou 12 % .....	66
Tab. 5.2 Navážka surovin pro výrobu jogurtů se sušinou 16 % .....	66
Tab. 5.3 Průměrné hodnoty pH jogurtů se sušinou 12 % v průběhu skladování.....	67
Tab. 5.4 Průměrné hodnoty pH jogurtů se sušinou 16 % v průběhu skladování.....	68
Tab. 5.5 Průměrný obsah $\alpha$ -anomeru laktózy ve vzorcích jogurtů s obsahem sušiny 12 %, skladovaných 1 až 30 dní .....	74
Tab. 5.6 Průměrný obsah $\alpha$ -anomeru laktózy ve vzorcích jogurtů s obsahem sušiny 16 %, skladovaných 1 až 30 dní .....	75
Tab. 5.7 Průměrný obsah $\beta$ -anomeru laktózy ve vzorcích jogurtů s obsahem sušiny 12 %, skladovaných 1 až 30 dní .....	76
Tab. 5.8 Průměrný obsah $\beta$ -anomeru laktózy ve vzorcích jogurtů s obsahem sušiny 16 %, skladovaných 1 až 30 dní .....	77

**SEZNAM GRAFŮ**

Graf 5.1 Závislost obsahu $\alpha$ -anomeru laktózy ve vzorcích jogurtů s obsahem sušiny 12 % na době skladování.....	74
Graf 5.2 Závislost obsahu $\alpha$ -anomeru laktózy ve vzorcích jogurtů s obsahem sušiny 16 % na době skladování.....	75
Graf 5.3 Závislost obsahu $\beta$ -anomeru laktózy ve vzorcích jogurtů s obsahem sušiny 12 % na době skladování.....	76
Graf 5.4 Závislost obsahu $\beta$ -anomeru laktózy ve vzorcích jogurtů s obsahem sušiny 16 % na době skladování.....	77

## SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P1: Příklad chromatogramu.....	94
--	----

## PŘÍLOHA P I: PŘÍKLAD CHROMATOGRAMU

Záznam píků  $\alpha$ - a  $\beta$ -anomeru laktózy ve vzorku jogurtu o sušině 16 %, 1 den skladování.

