

# **Stanovení volných mastných kyselin v jogurtech v závislosti na skladování**

Bc. Jan Knotek

---

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. Jan KNOTEK**  
Osobní číslo: **T100115**  
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Stanovení volných mastných kyselin v jogurtech  
v závislosti na skladování**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Charakteristika jogurtu, chemické složení.
2. Volné mastné kyseliny a jejich metabolismus v jogurtu.
3. Metody stanovení volných mastných kyselin v mléčných výrobcích.

### I. Praktická část

1. Metodika stanovení volných mastných kyselin.
2. Stanovení volných mastných kyselin v průběhu skladování ve vybraných vzorcích jogurtů.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/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] FOX, P, ed. ; MCSWEENEY, P.L.H. Dairy Chemistry and Biochemistry. London : Blackie Academic & Professional, 1998. XIV, 478 s. ISBN:0412720000.
- [4] DE JONG, C., BADINGS, H. T.: Determination of free fatty acids in milk and cheese. Procedure for extraction, clean up, and capillary gas chromatographic analysis. Journal of High Resolution Chromatography. 1990, vol. 13, p. 94-98.
- [5] HUERTA-GONZALEZ, L; WILBEY, R.A. Determination of Free Fatty Acids Produced in Filled-milk Emulsions as a Result of the Lipolytic Activity of Lactic Acid Bacteria. Food Chemistry. 2001, vol. 72, no. 3 s. 301-307. ISSN:0308-8146.

Vedoucí diplomové práce:

**Ing. Markéta Šípalová**  
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*

## **ABSTRAKT**

Diplomová práce se zabývá stanovením obsahu volných mastných kyselin v jogurtech v závislosti na skladování. V teoretické části je popsána výroba jogurtů a také jejich chemické složení. Dále jsou popsány analytické metody pro stanovení volných mastných kyselin. V praktické části byly vyrobeny vzorky jogurtů o různé sušině (10 %, 12 %, 14 % a 16 %). Tyto vzorky byly skladovány v chladírenské teplotě a v určitých intervalech (1., 5., 7., 10., 20. a 30. den skladování) byly podrobeny analýze na obsah volných mastných kyselin. Pro toto stanovení byla použita metoda SPE a GC-FID. Obsah volných mastných kyselin vykazoval v průběhu skladování rostoucí trend.

Klíčová slova: jogurt, bakterie mléčného kvašení, extrakce na pevné fázi, plynová chromatografie

## **ABSTRACT**

This thesis deals with the determination of free fatty acids in yoghurt depending on storage. The theoretical part describes the production of yoghurts and their chemical composition. Then the analytical methods for determination of free fatty acids are described. Yoghurt samples with different dry matter content (10 %, 12 %, 14 % and 16 %) were prepared in the practical part. These samples were stored in refrigerated temperature and the content of free fatty acids was analyzed in intervals 1st, 5th, 7th, 10th, 20th and 30th day of storage. For this determination SPE and GC-FID methods were used. The content of free fatty acids showed increasing trend during storage.

Keywords: yoghurt, lactic acid bacteria, solid phase extraction, gas chromatography

Chci poděkovat své vedoucí diplomové práce slečně Ing. Markétě Šípalové za její neocenitelné rady a nejen odbornou pomoc při tvorbě téhle práce. Také děkuji dalším kantorům Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, kteří mi poskytli rady. Děkuji své rodině a přátelům za jejich podporu ve studiu.

Každý člověk byl zrozen pro nějaké dílo. Každý, kdo chodí po této zemi, má nějaké povinnosti k životu.

Ernest Hemingway

Prohlašuji, že jsem na bakalářské/diplomové práci pracoval(a) samostatně a použitou literaturu jsem citoval(a). V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uveden(a) jako spoluautor(ka).

Ve Zlíně

.....

Podpis studenta

# OBSAH

ÚVOD.....	8
<b>I I. TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>9</b>
<b>1 JOGURT .....</b>	<b>10</b>
1.1 ÚPRAVA MLÉKA PRO VÝROBU JOGURTU .....	10
1.2 OŠETŘENÍ MLÉKA .....	11
1.2.1 Pasterace mléka .....	11
1.2.2 Odstředování mléka .....	12
1.2.3 Homogenizace .....	12
1.2.4 Deaerace .....	12
1.2.5 Ochlazení a inokulace .....	12
1.2.6 Chlazení a skladování výrobku .....	13
1.3 MIKROORGANISMY FERMENTUJÍCÍ MLÉKO .....	13
1.3.1 Čisté mlékařské kultury.....	13
1.3.2 <i>Streptococcus salivarius subsp. thermophilus</i> .....	14
1.3.3 <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> .....	14
<b>2 LIPIDY JOGURTU .....</b>	<b>15</b>
2.1 MASTNÉ KYSELINY .....	15
2.1.1 Nasycené mastné kyseliny .....	15
2.1.1.1 Kyselina butanová.....	16
2.1.1.2 Kyselina kapronová .....	16
2.1.1.3 Kyselina kaprylová .....	17
2.1.1.4 Kyselina kaprinová .....	17
2.1.1.5 Kyselina laurová .....	17
2.1.1.6 Kyselina myristová .....	17
2.1.1.7 Kyselina palmitová .....	17
2.1.1.8 Kyselina stearová.....	17
2.1.2 Nenasycené mastné kyseliny.....	18
2.1.2.1 Monoenové mastné kyseliny .....	18
2.1.2.2 Polyenové nenasycené mastné kyseliny .....	18
2.1.2.3 Volné mastné kyseliny.....	18
<b>3 METABOLISMUS LIPIDŮ .....</b>	<b>20</b>
3.1 B – OXIDACE MASTNÝCH KYSELIN .....	21
3.2 CITRÁTOVÝ CYKLUS.....	22
<b>4 METODY STANOVENÍ VOLNÝCH MASTNÝCH KYSELIN .....</b>	<b>25</b>
4.1 IZOLACE FFA .....	25
4.1.1 Destilace vodní parou.....	25
4.1.2 Extrakce rozpouštědlem a pevnou – kapalnou fází.....	25
4.1.3 Superkritická fluidní extrakce (SFE) .....	25
4.1.4 Extrakce na pevné fázi (Solid Phase Extraction - SPE).....	25
4.1.5 Kondicionování (předúprava) kolonky .....	26
4.2 PRINCIP ELUCE .....	26
4.3 PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE.....	29
4.3.1 Mobilní fáze a regulátor průtoku.....	30
4.3.2 Čistící zařízení.....	30

4.3.3	Injektor .....	30
4.3.4	Kolona .....	31
4.3.5	Plamenově ionizační detektor .....	31
4.3.6	Tepelně vodivostní detektor .....	31
4.4	PRACOVNÍ TECHNIKY PLYNOVÉ CHROMATOGRRAFIE .....	32
4.4.1	Eluční metoda.....	32
4.4.2	Frontální metoda .....	32
4.4.3	Vytěšňovací metoda .....	32
4.4.4	Imerzní chromatografie (vakantochromatografie) .....	32
4.5	KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE .....	32
4.5.1	Čerpadlo .....	33
4.5.2	Dávkovač.....	33
4.5.3	Kolony .....	33
4.5.4	Detektor.....	34
4.6	HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE.....	34
4.7	PAPÍROVÁ A TENKOVRSŤVÁ CHROMATOGRRAFIE .....	34
4.8	FOURIEROVA TRANSFORMACE INFRAČERVENÉ SPEKTROMETRIE (FTIR).....	35
4.9	INFRAČERVENÁ SPEKTROMETRIE .....	36
4.10	NUKLEÁRNÍ MAGNETICKÁ REZONANCE (NMR) .....	36
<b>II</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>37</b>
<b>5</b>	<b>JOGURT .....</b>	<b>38</b>
5.1	VÝROBA VZORKŮ .....	38
5.2	ÚPRAVA MLÉKA A OČKOVÁNÍ MIKROORGANISMŮ .....	39
5.3	STANOVENÍ PH.....	40
5.3.1	Výsledky pH.....	40
5.3.2	Diskuze a závěr .....	42
5.4	STANOVENÍ VOLNÝCH MASTNÝCH KYSELIN .....	43
5.4.1	Použité chemikálie .....	43
5.4.2	Použitá zařízení .....	43
5.4.3	Potup stanovení volných mastných kyselin .....	43
5.5	STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ .....	46
5.6	VÝSLEDKY STANOVENÍ VOLNÝCH MASTNÝCH KYSELIN .....	46
5.6.1	Obsah volné mastné kyseliny valerové .....	46
5.6.2	Obsah volné mastné kyseliny tridekanové.....	49
5.6.3	Obsah volné mastné kyseliny myristové.....	51
5.6.4	Obsah volné mastné kyseliny palmitové.....	54
5.6.5	Obsah volné mastné kyseliny olejové .....	56
5.7	DISKUZE A ZÁVĚR .....	58
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>60</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>61</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>68</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>69</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>71</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>72</b>

## ÚVOD

Fermentované mléčné výrobky, mezi které se řadí také jogurt, jsou z nutričního i zdravotního hlediska velmi vhodné pro konzumaci spotřebitelem. Podle oficiálních výživových doporučení by měl běžný spotřebitel sníst denně 2 až 3 porce mléčných výrobků, kam bezesporu jogurt patří stejně jako mléko, sýry nebo tvaroh. Hlavním důvodem je zejména vysoký obsah plnohodnotných bílkovin a vápníku. Ten je nezbytně nutný pro tvorbu kosti, zubů a funkci nervového systému. Vápník je samozřejmě možné přijímat v různých formách, ale v současné době se málo zdůrazňuje, že pro lidský organismus je nejlépe vstřebatelný, a tedy využitelný právě vápník přirozeně se vyskytující v mléčných výrobcích. Důležitá je ale i přirozená přítomnost fosforu, který je dalším prvkem nezbytným pro stavbu kosti a zubů a který je v mléce navíc vůči vápníku v optimálním poměru. Kromě toho jogurt obsahuje různé vitamíny, například skupiny B, a výživově významné stopové prvky.

Jogurt je vyroben fermentací mléka pomocí mléčných bakterií rodu *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. Fermentace je jednou z nejdůležitějších metod pro údržbu a úpravu mléka, kdy je prodloužena jeho trvanlivost. Celkový vjem typický pro jogurty, stejně jako chuť a vůně, jsou ovlivněny mastnými kyselinami. Množství volných mastných kyselin u fermentovaných výrobků je ovlivněno startovací kulturou. Tato práce se zabývá sledováním obsahu volných mastných kyselin v jogurtech v průběhu jejich skladování při chladírenské teplotě.



## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 JOGURT

Fermentace je jedna z nejstarších metod, je praktikována úpravou mléka na výrobky s prodlouženou trvanlivostí. Výroba mléka souvisí s domestikací krav, koz či ovcí. Výrobní proces i přes zdokonalování je stále náročný. Důležitá je vhodná mikrobiální kultura, která hraje důležitou úlohu při tvorbě textury, chuti a jiných sensorických vlastnostech jogurtu. Pomocí bakterií mléčného kvašení se jedná o výrobky fermentované [1].

Fermentaci můžeme označit i jako kvas, jedná se o přeměnu látek za účasti enzymů mikroorganismů. Aktivitou mikroorganismů dochází k přeměně organických látek, obvykle sacharidů a vznikají nové látky syntetizující nebo energeticky chudší. V potravinářství se fermentace využívá při výrobě octa, droždí, alkoholických nápojů, kysaných mléčných výrobků, zrání sýrů, kvašení zeleniny, kynutí těsta a výrobě fermentovaných uzenin [2].

K výrobě fermentovaných výrobků jsou používány izolované čisté mlékařské kultury, převážně bakterie mezofilní nebo termofilní. Podle způsobu kvašení bývají bakterie rozlišovány na homofermentativní, heterofermentativní nebo kvasinky - u kvasinek kromě mléčného kysání probíhá i alkoholové kvašení [3,4].

Jogurtem se rozumí kysaný mléčný výrobek získaný kysáním mléka, podmásli, smetany nebo jejich směsí pomocí mikroorganismů. Mikroorganismy nacházející v jogurtu bývají [4]:

- *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*
- *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*

Jogurt bývá fermentován dvěma způsoby. Jedním ze způsobů je plnění set type, druhým způsobem bývá stirred type. U set type bývá kultura zaočkována uzavřená do ke-límku, kde dochází ke zrání jogurtu. Tato technika je spolehlivá a univerzální, obsahující pevný nerozmíchaný koagulát. Nevýhodou zde bývá, že nelze hotový výrobek vidět, kdy hrozí nebezpečí tvorby hrudek [5].

Druhý typem bývá stirred type, kdy zrání probíhá ve fermentačním tanku. Produkt získá požadované vlastnosti, koagulát zde bývá rozmíchan [5].

### 1.1 Úprava mléka pro výrobu jogurtu

Vývoj výroby jogurtu byl vyvíjen od jednoduché přípravy v domácí produkci až po velkoprodukcí. Cisternová vozidla sváží mléka, během přepravy a skladování nesmí stoup-

nout teplota nad 6 °C. Po svozu mléka následuje čištění mléka pomocí filtrů a odstředování. Tuk je oddělen pomocí odstředivek, který je použit pro pozdější stanovení tučnosti. Senzorické vlastnosti musí být typické pro mléko – barva, konzistence, vzhled, chuť a vůně. Bez zjevných změn, příchutí a pachů [6].

## 1.2 Ošetření mléka

Tepelná stabilita mléka bývá důležitá při technologickém ošetření mléka. Schopnost mléčných bílkovin odolat vysrážení při tepelnému záhřevu. Tato vlastnost je ovlivněna skladbou minerálních látek, bílkovin a jejich vzájemnými vztahy [7, 8, 9].

Z minerálních látek je důležitý obsah fosforu a vápníku. Aktivita vápníku ovlivňuje koloidní stabilitu kaseinu, tedy i termostabilitu mléka a srážení mléka a sladké srážení mléka. Celkový obsah vápníku v mléce bývá průměrně 120 mg.l<sup>-1</sup>, z toho 30 % je ve formě rozpustné jako hydrogenfosforečnan a citrát. Značná část vápníku se nachází v mléce v nerozpustné formě (koloidní fosforečnan vápenatý) [7, 8, 9].

Nadojené mléko má pH 6,4 – 6,8. Bod mrznutí je -0,54 až -0,57 °C a souvisí se stálostí osmotického tlaku [7, 8, 9].

Pasterizace se rozumí devitalizací choroboplodných zárodků z 99 až 99,9 % saprofitické mikroflóry. Snahou pasterizace je, aby fyzikální vlastnosti mléka a jeho biologické hodnoty, jejich změny byly co nejmenší [7, 8, 9].

### 1.2.1 Pasterace mléka

Mléko musí být v mlékárenském závodě tepelně ošetřeno, aby bylo zdravotně nezávadné a trvanlivé. Pasterace je záhřev mléka na teploty obvykle do 100 °C, kdy dochází k usmrcení vegetativních forem mikroorganismů a minimální změně chemických vlastností, které se mohou projevit změnou chuti a nutriční hodnoty [7, 8, 9].

Na výrobu jogurtů se používá vysoká pasterace, při 85°C po dobu 5 s. Někdy se používají i vyšší teploty, i nad 100°C případně delší záhřev. Vysokou pasterizací je inaktivována laktoperoxidasa. Nastává více než 50 % denaturace sérových bílkovin a změna rozpustného vápníku na koloidní formu [7, 8, 9].

### 1.2.2 Odstředování mléka

Odstředování je odtučnění mléka a získání smetany. Používají se talířové samoodkaľovací odstředivky. Oddělení mléčné plazmy a tuku je způsobeno rozdílnou měrnou hmotností. Tukové kuličky se pomocí odstředivé síly shromažďují ve středu bubnu odstředivky ve formě smetany [9, 10].

### 1.2.3 Homogenizace

Cílem homogenizace je zmenšení velikosti tukových kuliček pod 1  $\mu\text{m}$ . Homogenizace probíhá za vysokého tlaku (20 - 25 MPa) úzkou štěrbinou homogenizační hlavy (0,1 mm). Tukové kuličky bývají tříštěny vlivem vysoké smykové rychlosti. Teplota bývá 55 až 80 °C. Aby se tukové kuličky opět neshlukovaly, mléko musí obsahovat dostatek bílkovin. Při nedostatku bílkovin vzniknou větší shluky tukových kuliček [10].

### 1.2.4 Deaerace

Rozprášení do mírného vakua za snížených teplot o 7 – 8 °C. Snahou je minimalizace vzduchu a tím zmenšení rizika oxidace tuku. Rozstříknutí mléka do komory s mírným vakuem. Odstraní se vzduch a většina těkavých látek, které mohou nepříznivě ovlivnit senzorické vlastnosti mléka [10].

### 1.2.5 Ochlazení a inokulace

Ochlazení a inokulace se provádí po tepelném ošetření mléka. Teplota média se liší podle typu bakteriálních kultur a teplotu dodržovat. Inokulační teplota pro mezofilní bakteriální kultury bývá 20 – 30 °C, pro termofilní 42 – 45 °C [11].

Zaočkování kulturami se provádí aseptickým transferem daného množství bakteriální kultury do kultivačního media. Očkuje se 2 – 5 % startovacích kultur. Po promíchání inokula s kultivačním mediem bakterie se začnou množit. Doba inkubace se liší podle druhu bakterií a velikosti inokula trvá 3 – 20 hodin. Bakterie se rychle pomnožují a fermentují přítomnou laktosu za vzniku kyseliny mléčné. Bakterie podle typu fermentace můžeme dělit [11, 12, 13]:

- Homofermentativní – tvoří výhradně kyselinu mléčnou
- Heterofermentativní – kromě kyseliny mléčné vznikají i jiné chuťově významné látky (etanol, kyselinu octovou, kyselinu mravenčí a oxid uhličitý)

### 1.2.6 Chlazení a skladování výrobku

Po získání požadované kyselosti se zastaví bakteriální růst pomocí zchlazení na 10 – 12 °C po dobu 6 hodin. Jestli je potřeba kulturu skladovat déle než 6 hodin, teplota bude snížena na 5 °C [12, 13].

## 1.3 Mikroorganismy fermentující mléko

Kysané mléčné výrobky patří mezi tradiční výrobky, vznikají kysáním mléka, smetany, podmáslím nebo jejich směsi za použití mikroorganismů. Mnohé mikroorganismy mají vhodné sensorické vlastnosti, delší trvanlivost a jiných pozitivních vlastností z fyziologie výživy [4, 13].

Pro růst mikroorganismů a dokonalé fermentaci je nutné dodržení podmínek pro růst specifických mikroorganismů. Každá metabolická cesta se skládá z více reakcí, proto je důležitá i reakce enzymů, která kontroluje a udržuje funkce mikrobiálních buněk.

Vlastnosti v jogurtu ovlivňuje *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. Důležitým enzymem ve fermentovaných výrobcích zapojených do katabolizmu laktózy je hlavně  $\beta$ -galaktosidázou. Dané mikroorganismy jsou brány jako komerční zdroj laktázy [14].

### 1.3.1 Čisté mlékařské kultury

Čisté mlékařské kultury (ČMK) bývají označovány jako specifické bakterie mléčného kvašení. Při inokulaci mléka dochází metabolickými pochody k tvorbě charakteristických produktů mléka. Mléčné výrobky bývají ovlivněny ČMK, které mají za následek změnu smyslových vlastností a nutriční hodnot. Bakterie jsou děleny do několika rodů a druhů, liší se svými nároky na teploty, citlivostí na NaCl, přítomnost enzymů a metabolických drah. Podle potřeb růstu požadovaných mikroorganismů bývá přizpůsoben i technologický postup úpravy mléka. Růst nežádoucích mikroorganismů bývá potlačen pasterací, kdy docházím k zamezení růstu technologicky a choroboplodných mikroorganismů [15].

Mikroorganismy dělíme podle teplot na termofilní a mezofilní, dále na homofermentativní a heterofermentativní [16].

Mikrobiální kultury jsou šlechtěny a pěstovány dnes již pro komerční účely, kdy do mlékáren bývají dodávány koncentrované, lyofilizované či zmražené [15].

### 1.3.2 *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*

Grampozitivní koky, fakultativně anaerobní, fermentují sacharidy na kyselinu mléčnou, malé množství kyseliny octové, mravenčí, etanolu a CO<sub>2</sub>. Streptokoky jsou většinou citlivé na antibiotika a chemoterapeutika. Optimální teplota růstu je 37 °C, pro růst vyžadují aminokyseliny, peptidy, puriny, pyrimidiny a vitaminy. Nepohyblivé, nesporeující bakterie. Při vyšších koncentracích NaCl (více než 2 %) nerostou, případně odumírají [16,17, 18].

Citlivý na antibiotika, dobře kvasí laktózu a sacharózu. Často bývá kombinován s mnoha proteolytickými laktobacily jako startovací kultury. Streptokoky rostou rychleji než laktobacily. Přebytek kyslíku bývá odstraněn Streptokoky [16,17, 18].

### 1.3.3 *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*

Laktobacily jsou homofermentativní, fakultativně anaerobní, grampozitivní nepohyblivé tyčinky. Hlavním metabolitem je kyselina mléčná, dále octová, etanol a CO<sub>2</sub>. Patří mezi termofilní bakterie, zkvašující laktosu. V potravinách tvoří chuťové a těkavé látky – acetaldehyd, diacetyl, kyselinu octovou, aminokyseliny. Optimální růst je při teplotě 42 °C, jedná se o acidotolerantní až acidofilní bakterie rostoucí i při pH prostředí 4,0 [16, 17, 19].

V potravinách laktobacily obdrželi pozornost pro svou schopnost proteolýzy kvašení potravin. Rozkládají bílkoviny až na jednotlivé peptidy [20].

Použité kultury se při zrání symbioticky ovlivňují. *L. bulgaricus* částečně odbourává kasein, čímž uvolňuje zejména valin, histidin, metionin, kyselinu glutamovou a leucin. Z těchto štěpů pak zejména valin působí stimulačně na rozvoj *S. thermophilus*. Streptokoky pak produkují kyselinu mléčnou, která snižuje pH media na optimum pro růst *L. bulgaricus*. Zvyšováním kyselosti se pak omezuje rozvoj streptokoků. Produkce kyseliny mléčné začíná asi po 30 minutách inkubace, tj. po prvním dělení použité mikroflóry. Kyselina mléčná hraje důležitou roli při konzervaci, kdy zabraňuje růstu hnilobných bakterií. Aromatické látky, zejména acetaldehyd, vznikají později [21].

Streptokoky rostou dříve, produkují látky, které pomáhají růst laktobacilům později. Laktobacily rostou později a svou proteolytickou aktivitou produkují aminokyseliny, sloužící k následné činnosti streptokoků. Touto symbiózou dochází v jogurtu k tvorbě aromatických látek. Hlavní složkou těchto látek bývá acetaldehyd [19,21].

## 2 LIPIDY JOGURTU

Lipidy jsou heterogenní skupinou sloučenin, včetně tuků, olejů, steroidů, vosků a jiných příbuzných sloučenin. Mají spíše společné chemické než fyzikální vlastnosti. Jsou relativně nerozpustné ve vodě a rozpustné v nepolárních rozpouštědlech (chloroform, ether). Jsou důležitou složkou stravy pro jejich vysokou energetickou hodnotu, rozpustnost vitamínů v tucích a esenciální mastné kyseliny [22].

Lipidy jsou důležitou složkou potravin a tvoří jedny z hlavních živin nezbytných pro zdraví a vývoj organismu. V potravinách se mohou nacházet mastné kyseliny vzniklé průmyslovou výrobou činností a jinými lidskými aktivitami (např. cukerné alkoholy s vyššími mastnými kyselinami), v praxi se nezařazují k přírodním látkám, ale přiřazují se k lipidům [23, 24]. Lipázy v jogurtu pochází ze startovacích kultur nebo při mikrobiální kontaminaci, které přežili tepelné ošetření mléka. Podle druhu jogurtu se liší i jejich obsah tuku [4]:

- Jogurtu bílý smetanový – více než 10 %
- Jogurt bílý – více než 3 %
- Jogurt bílý se sníženým obsahem tuku – méně než 3 %
- Jogurt bílý nízkotučný nebo odtučněný – méně než 0,5 %

### 2.1 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny jsou základní složkou lipidů. Tvoří důležitou složku lipidů. Jsou složeny z karboxylových kyselin s alifatickým uhlovodíkovým řetězcem. Triacylglyceroly představují 97 – 98% celkových tuků ve většině druhů mléka [24, 25].

V potravinách se lipidy vyskytují jako [24, 25, 26]:

- nasycené mastné kyseliny
- nenasycené mastné kyseliny s jednou dvojnou vazbou (monoenové)
- nenasycené mastné kyseliny s několika dvojnými vazbami (polyenové)
- mastné kyseliny s trojnými vazbami

#### 2.1.1 Nasycené mastné kyseliny

Nasycené mastné kyseliny většinou nerozvětvený řetězec se sudým počtem uhlíkových atomů. Kyseliny s lichým počtem uhlíků se nacházejí jako minoritní podíl v tucích přežvýkavců. V rostlinných olejích je poměr nenasycených k nasyceným kyselinám vyšší

než v živočišných tucích. Nasycené mastné kyseliny mají mnohem vyšší bod tání než nenasyčené. Mléčné tuky obsahují mastné kyseliny s kratším řetězcem [27, 28].

Nasycené mastné kyseliny v jogurtech se nachází s nižším počtem uhlíků. Byly nalezeny i nenasyčené mastné kyseliny s lichým počtem atomů uhlíku [24, 27, 29].

Tab. 1 Obsah nasycených mastných kyselin v jogurtech (%) [27]

<i>Kyselina</i>	<i>Jogurt bílý</i>	<i>Jogurt nízkotučný</i>	<i>Jogurt odtučněný</i>
Butanová	0,1	0,05	0,005
Kapronová	0,07	0,03	0,004
Kaprylová	0,04	0,02	0,002
Kaprinová	0,09	0,04	0,005
Laurová	0,11	0,05	0,006
Myristová	0,34	0,16	0,019
Palmitová	0,89	0,42	0,049
Stearová	0,32	0,15	0,018

#### **2.1.1.1 Kyselina butanová**

Kyselina butanová, jejíž triviální název je kyselina máselná. Má nejmenší počet atomů uhlíku ze všech mastných kyselin. Nachází se ve žlutém másle, parmezánu a především v sýru. Charakteristická je nepříjemným zápachem a ostrou chutí, v organických rozpouštědlech bývá rozpustná. Teplota tání je  $-5,7\text{ }^{\circ}\text{C}$  [30].

#### **2.1.1.2 Kyselina kapronová**

Kyselina kapronová jejíž systematický název je kyselina hexanová. Slabě nažloutlá nebo bezbarvá, mastná kapalina nepříjemného zápachu. Rozpustná v alkoholu a etheru. Bývá využívána jako antimikrobiální pesticid při zacházení s potravinami. Kozí mléko obsahuje vyšší podíl kyseliny kapronové, způsobující typickou vůni mléka [31].



### **2.1.1.3 Kyselina kaprylová**

Kyselina kaprylová obsahující osm atomů uhlíku, systematický název kyselina oktanová. Vyskytující se v kokosovém ořechu, mateřském mléce, špatně rozpustná ve vodě, žluklého pachu. Na rozdíl od kyseliny máselné má vyšší bod tání (16,6 °C). V potravinářství bývá využívána nepřímo jako antimikrobiální ochrana tvořící povlak např. pro citrusové plody [32].

### **2.1.1.4 Kyselina kaprinová**

Kyselina kaprinová nebo dekanová kyselina. Rozpustná ve většině organických rozpouštědel, nerozpustná ve vodě. Nacházející se v oleji z palmových jader a kokosovém oleji, také dodává typickou vůni kozímu mléku spolu s kyselinami kaprylovou a kapronovou [31].

### **2.1.1.5 Kyselina laurová**

Kyselina laurová nacházející se v kokosových a palmojadrových olejích, značné množství se nachází i v mléce. Nerozpustná ve vodě, rozpustná v organických rozpouštědlech. Využívá se jako analgetikum v lékařství, smácedla, alkydové pryskyřice, potravinářské přísady. Bod tání je 45 °C [31, 33].

### **2.1.1.6 Kyselina myristová**

Kyselina myristová, velké množství se nachází v muškátovém oříšku, dále ji nalezneme v kokosovém oleji, jader palmy a spermiích. Bývá využívána na mýdla, kosmetiku a přídatné složky potravin [31].

### **2.1.1.7 Kyselina palmitová**

Kyselina palmitová či hexadekanová, za běžných podmínek pevná bílá látka, nacházející se v palmovém oleji, másle, sýrech, mase a mléce [31].

### **2.1.1.8 Kyselina stearová**

Kyselina stearová stejně jako kyselina palmitová patří k vyšším mastným kyselinám. Ester kyseliny s glycerinem tvoří složky tuků. Za běžné teploty je pevná a bezbarvá, tající při teplotě 70,1 °C. Využívá se k výrobě mýdel a svíček, balení potravin. Smísením kyseliny stearové a palmitové vzniká stearin [31, 34].

### 2.1.2 Nenasycené mastné kyseliny

Nenasycené mastné kyseliny obsahují jednu nebo více dvojných a trojných vazeb. Jednotlivé mastné kyseliny se od sebe liší postavením dvojných vazeb, počtem atomů a jejich prostorových konfigurací. Některé mastné kyseliny mají své triviální názvy. Nenasycené mastné kyseliny mají nižší bod tání než nasycené mastné kyseliny. Některé jsou esenciální a mají příznivý vliv na zdraví člověka.

Můžeme rozdělit podle počtu dvojných vazeb [24, 27, 35]:

- Monoenové nenasycené mastné kyseliny
- Polyenové nenasycené mastné kyseliny

#### 2.1.2.1 Monoenové mastné kyseliny

Nenasycené mastné kyseliny jsou obsaženy především v olejích. Liší se navzájem počtem atomů, prostorovou konfigurací a polohou dvojně vazby. Mají antioxidační účinky, antropogenní antiarterogenní efekt. Celkový příjem by měl činit 1/3 celkového příjmu tuků [36, 37].

#### 2.1.2.2 Polyenové nenasycené mastné kyseliny

Polyenové nenasycené mastné kyseliny jsou velmi důležité ve výživě, v přírodních lipidech se vyskytuje jen několik v podstatném množství. Nejvýznamnější je kyselina linolová. Kyselina linolová je jednou z esenciálních živin. Snižuje HDL cholesterol a zvyšuje peroxidaci LDL cholesterolu [38, 39].

Dalším zástupcem je kyselina linolenová se třemi dvojnými vazbami, bývá přítomna v menším množství. Rychle podléhá degradaci a zhoršuje organoleptické vlastnosti výrobku. Jako esenciální mastná kyselina má nízkou biologickou účinnost [36, 40].

#### 2.1.2.3 Volné mastné kyseliny

Volné mastné kyseliny jsou především krátký až středně dlouhý řetězec. Mohou se chovat jako prekurzory pro další reakce, které vyrábějí těkavé látky a další sloučeniny. Mléčný tuk ve fermentovaných výrobcích hraje velkou roli, ovlivňující chuť a celkový vjem výrobku. Při vysokých koncentracích mohou některé kyseliny vést k nežádoucí chuti [36].

Množství volných mastných kyselin u kvašených výrobků je ovlivněna startovací kulturou. Volné mastné kyseliny bývají výsledkem hydratací tuků nebo oleje s vlhkostí. Pro-

ces bývá urychlen teplem a tlakem. Výskyt může být urychlen manipulací, skladováním a dalšímu procesy. Obsah volných mastných kyseliny bývá ovlivněn enzymatickou hydrolyzou [36].

Volné mastné kyseliny jsou všudypřítomné a nachází se ve všech živočišných tkáních, mají antimykotické, antivirové, antimikrobiální vlastnosti, které bývají využívány zejména na sliznicích plic a kůži. Volné mastné kyseliny mají vliv na enzymové systémy, jejich činnost je v organismech regulována. Nenasycené mastné kyseliny se rychleji ukládají do buněčných membrán [39, 40].

Příjem volných mastných kyselin ve stravě je nízký, spíše bývají přijímány vyšší mastné kyseliny, které bývají částečně tráveny v žaludku a v tenkém střevě pomocí enzymů bývají štěpeny na mastné kyseliny. Člověk není schopen syntetizovat mastné kyseliny n - 3 a n - 6. Především se jedná o kyseliny linolovou a  $\alpha$  - linolenovou [39, 40].

### 3 METABOLISMUS LIPIDŮ

Metabolismus je souhrn biochemických reakcí probíhajících v buňce, bývá nutný pro rovnováhu, množení a růst bakterií. Reakce metabolismu vytváří podmínky bakterií pro přísun energie, tak reakce využití a příjem anorganických i organických sloučenin [38].

Bakteriální buňky bývají schopny získat energii z různých zdrojů, základním zdrojem bývá světlo, dále anorganické a organické sloučeniny. Využívání energie světelné nazýváme fotosyntetické, ostatní chemosyntetické [38].

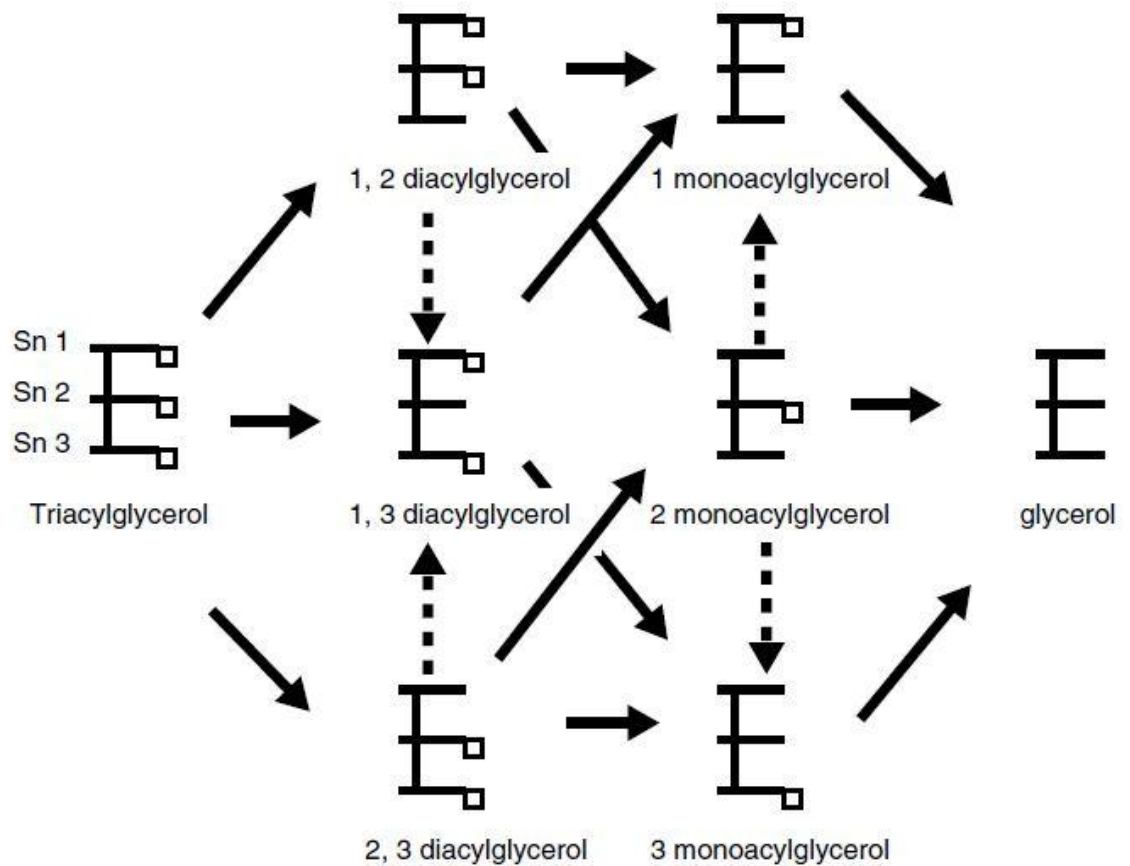
Lipidy představují jednu z hlavních složek energie pro metabolické dráhy v organismu člověka. Působením hydroláz se volné mastné kyseliny vyskytují v malém množství, bývají vázány především jako amidy nebo estery v heterolipidech a homolipidech. Mastné kyseliny se sudým počtem uhlíků se vyskytují častěji než s lichým [39].

Trávení lipidů přijatých ve stravě začíná v duodenu (dvanáctníku) působením pankreatické šťávy, obsahuje enzymy trávicí tuky – lipáza, cholesterol - esteráza a fosfolipáza). Přítomností žlučových kyselin, syntetizují se v játrech a vylučovány žlučníkem do tenkého střeva. Hydrolýzou molekul triglyceridů reagujících s vodou. Výsledné produkty bývají diacylglyceridu a mastných kyselin. Glycerol a mastné kyseliny bývají konečnými produkty [40].

Acyl glyceroly tvoří 96 – 98 % z celkového počtu mléčných tuků. Ostatní frakce tvoří fosfolipidy, steroly a tuku rozpustné vitamíny, mastné kyseliny. Lipidy se v mléce nachází ve formě kapének tuku, membránové kapénky a mléčné sérum. Množství tukových frakcí se liší podle druhu savce, plemene, stádia laktace a kruhu krmiva. Acyl glyceroly v mléce bývají tvořeny molekulou glycerolu a jednou, dvěma či třemi mastnými kyselinami [40, 41].

Enzymy triacylglycerolů bývají nazývány jako lipázy, jejich působení bývá specifické. Lipázy rozkládají triacylglyceroly na diacylglyceroly, monoacylglyceroly až na samotný glycerol a mastné kyseliny. Triacylglyceroly lipáz jogurtu mohou pocházet ze startovacích kultur. Inaktivace lipáz bývá prováděna pasteračními teplotami. Jakékoliv zvýšení obsahu mastných kyselin bývá způsobeno metabolickými pochody mikroorganismů. Hydrolýza tuku startovacími kulturami probíhá pouze omezeně, avšak chuť jogurtu může být tímto způsobem ovlivněna. Při skladování jogurtu dochází ke znatelnému zvýšení těkavých mastných kyselin. Laktobacily produkují mnohem více kyselin než streptokoky. Množství

mastných kyselin bývá ovlivněno druhem mléka (kravské, ovčí, kozí), teplotě a trvání inkubace, tepelném zpracování mléka [42, 43].



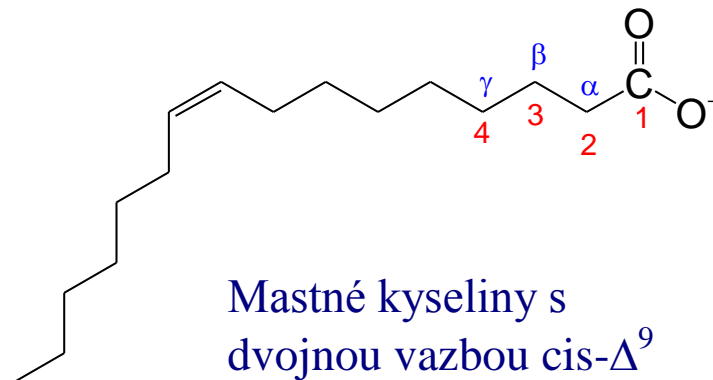
Obr. 1 Rozklad TAG [44]

Triacylglyceroly se skládají z glycerolu a tří mastných kyselin. Působením enzymů dochází ke ztrátě jedné mastné kyseliny, vznikají diacylglyceroly. Rozkladem další mastné kyseliny vzniká monoacylglycerol a při úplném odstranění mastných kyselin vzniká samostatný glycerol a mastné kyseliny [45].

### 3.1 $\beta$ – oxidace mastných kyselin

Degradací mastných kyselin bývá nazývána  $\beta$  – oxidace, kdy oxidace začíná na uhlíku C – 3 ( $\beta$  – uhlík). Oxidace probíhá v mitochondriích u eukaryotických buněk, obdobně jako citrátový cyklus. Jedná se o tedy o cyklický pochod, kdy se zkracuje řetězec mastných kyselin vždy o dva atomy uhlíku. Proces probíhá do doby, kdy se celá mastná kyselina rozloží na acetalové zbytky vázající se na CoA. Jedná se o katabolický proces, kdy řetězec

mastných kyselin se postupně rozpadá až na acetyl – CoA. Oxidace probíhá v citrátovém cyklu [43, 45].



Obr. 2  $\beta$  – oxidace uhlíku C – 3

Rozštěpení mastných kyseliny  $\beta$  – oxidací příslušného acyl – CoA probíhá v následujících krocích [42, 43, 45]:

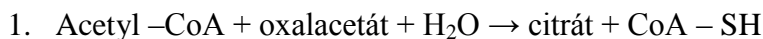
- Tvorba dvojně vazby trans –  $\alpha$ ,  $\beta$  – dehydrogenací enzymem acyl – CoA - dehydrogenasou
- Hydratace dvojně vazby enoyl – CoA – hydratasou za vzniku 3 – L – hydroxyacyl – CoA
- $\beta$  – hydroxyacyl - CoA je dehydrogenován 3 – L – hydroxyacyl – CoA - dehydrogenasou za tvorby  $\beta$  – oxoacyl – CoA
- Štěpení vazeb  $C_\alpha$  -  $C_\beta$  v thiolické reakci CoA katalyzované thiolasou za vzniku acetyl – CoA, který je o dva atomy uhlíku kratší než původní acetyl – CoA

### 3.2 Citrátový cyklus

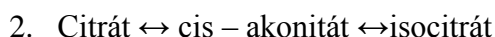
Citrátový cyklus (Krebsův cyklus) je aerobní metabolická dráha, při které vzniká NADH + H<sup>+</sup> a posléze ATP z pyruvátu či acetyl – S – CoA. U eukaryotických buněk probíhá v mitochondriích v matrixu. V citrátovém cyklu dochází k oxidační degradaci u eukaryotických a prokaryotických buněk. Můžeme říci, že se jedná o centrum veškerého metabolismu odpovídající za oxidaci většiny mastných kyselin, cukrů i aminokyselin vytvářejí-

cích biosyntetické prekurzory. V citrátovém cyklu dochází jak k anaboličným, tak kataboličným reakcím, což je označováno jako amfibičny metabolismus [42, 43, 45].

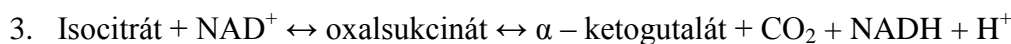
Citrátový cyklus má několik fází:



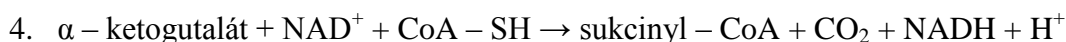
Acetalový zbytek navázaný na CoA a čtyřuhlíkatý oxalacetát jsou katalyzovány citráksyntázou a vznikne šestiuhlíkatý citroyl-CoA.



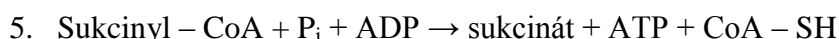
Přeměna citrátu na isocitrát, kdy je katalyzována akonitázou. Citrát je dehydratován na cis-akonitát a následně rehydratován a isocitrát.



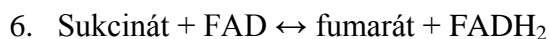
Dehydrogenací izocitrátu, vzniká oxalsukcinát, který bývá katalyzován isocitrátdehydrogenázou. Dekarboxylací oxalsukcinátu vzniká  $\alpha$ -ketogutalát. Koenzym  $\text{NAD}^+$  je redukován na  $\text{NADH} + \text{H}^+$ .



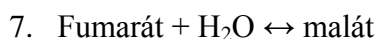
V dalším kroku dochází k dekarboxylaci  $\alpha$ -ketoglutarátu. Enzymy katalyzující reakci se sdružují do  $\alpha$ -ketoglutarátdehydrogenázového komplexu. K reakci jsou potřebné kofaktory thiamindifosfát, kyselina lipoová,  $\text{NAD}^+$ , FAD a koenzym A.



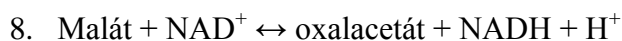
Sukcinyl-CoA na sukcinát je katalyzován enzymem sukcinátthiokinasa (sukcinyl-CoA-synthetasa). Vzniklý fosfát je navázan na GDP a nakonec vzniká ATP.



Oxidací dvojně vazby sukcinátu pomocí sukcinátdehydrogenasy vzniká fumarát. Současně je redukován koenzym FAD na  $\text{FADH}_2$ .



Fumarát je katalyzován enzymem fumarasou, která katalyzuje dvojnou vazbu za vzniku malátu.



Malátdehydrogenasa vytvořena oxalacetát. Oxidací alkoholické skupiny malátu na keton, přičemž redukuje molekulu  $\text{NAD}^+$  na  $\text{NADH} + \text{H}^+$  [42, 43, 45]. Viz příloha I. Citrátový cyklus.



## 4 METODY STANOVENÍ VOLNÝCH MASTNÝCH KYSELIN

### 4.1 Izolace FFA

#### 4.1.1 Destilace vodní parou

Destilace vodní parou se provádí pouze u látek, které se s vodou nemísí, případně málo rozpustné a bývají málo těkavé. Tento způsob se využívá pro čištění látek, které se při teplotě varu běžně rozkládají, případně podléhají jiným změnám [69].

#### 4.1.2 Extrakce rozpouštědlem a pevnou – kapalnou fází

Vzhledem k rozdílné rozpustnosti mastných kyselin v rozpouštědlech, kdy rozpustnost se zvyšuje délkou řetězce mastných kyselin a v lipidech klesá. Jako nejčastěji používaná rozpouštědla bývají diethylether a hexan [61].

Extrakce FFA pomocí acetonitrilu za přítomnosti  $H_2SO_4$ , snížené pH pomáhá odvádět volné mastné kyseliny. Bezvodý  $Na_2SO_4$  váže vlhkost i pomocné extrakce FFA [61].

#### 4.1.3 Superkritická fluidní extrakce (SFE)

Při této technice bývá používán vysoce stlačený  $CO_2$ . Používá se superkritická tekutina, která je viskozitou podobná plynu [62, 63].

#### 4.1.4 Extrakce na pevné fázi (Solid Phase Extraction - SPE)

Extrakce pevnou fází je proces úpravy vzorků, extrakce žádané látky z kapalného vzorku či oddělení látky od rušivé matrice, zejména bílkovin. Odstranění rušivých látek je zdoluhavý a manuální proces. Extrakce pevnou fází je nejvýkonnější technika pro rychlou a selektivní přípravou vzorku. Často se tato metoda používá pro stanovení vzorků ve farmaceutickém průmyslu, stanovení metabolitů v krvi, séru a moči [47, 48].

Extrakce na pevné fázi (Solid Phase Extraction – SPE) bývá používána pro přípravu vzorků za použití množství organických rozpouštědel. Vyčištění vzorků souvisí s manuální úpravou, kdy se zbavíme bílkovin a dalších nežádoucích látek. Látky molekul bývají zachyceny na pevné fázi kolony viz. Obr. 3 SPE kolona se stacionární fází [50].

Průchod kolonou bývá urychlen na výstupu kolony pomocí kompresoru, kdy bývá zaručená těsnost přiléhavé kolony k nádobě. Oddělení pomocí SPE bývá účinná pro mastné kyseliny, tuky a oleje. Mezimolekulové interakce, které bývají ovlivněny chemickým slo-

žením vzorku. Avšak malé molekuly bývají absorbovány mnohem lépe než velké a tím vycházejí dříve z kolonky [50].

Principem je zachycení molekul látky na pevném sorbentu, které v důsledku mezimolekulárních interakcí ulpívají na sorbentu [49].

Provedení SPE se skládá z tří kroků [47]:

- Kondicionování kolonky
- Dávkování vzorku
- Promývání

#### 4.1.5 Kondicionování (předúprava) kolonky

Kolonky (stacionární fáze) je ve tvaru stříkačky Obr. 3 SPE kolona se stacionární fází. Příprava kolony na interakci složek vzorku s pevnou fází, která je umožněna solvatací pevné fáze. Kolona se propláchne rozpouštědlem, kdy dochází k aktivaci pevné fáze pro interakci se vzorkem. Mobilní fáze obsahující požadované analyty jsou předány stacionární fázi. Před proplachem kolony se mobilní fáze zbaví nežádoucích složek. Kolonky jsou na jedno použití, liší se svou náplní sorbentů a velikostí [48, 49].

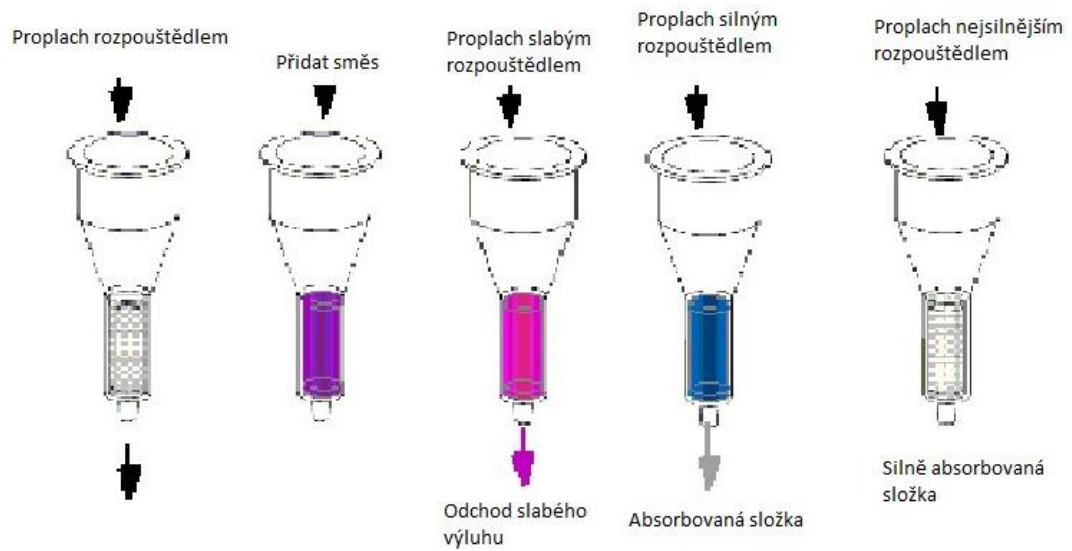


Obr. 3 SPE kolona se stacionární fází

## 4.2 Princip eluce

- Promývání kolonky před dávkováním vzorku rozpouštědlem
- Přidáním směsi - izolovaná látka zůstane v koloně, částmi rušící matrice (stacionární fázi)
- Proplach silným rozpouštědlem – odstranění nežádoucích složek matrice vzorku z kolony

- Proplach nejsilnějším rozpouštědlem – čistá látka je vymyta a nežádoucí matrix zůstává absorbována v koloně [50]



Obr. 4 Princip eluce



Obr. 5 SPE aparatura

1. 12 pozicová skleněná vana
2. obsahující 3 podpěry
3. dvě desky o 13 mm a 16 mm
4. desku pro autosampler
5. 12 svorek
6. aminopropylová kolonka
7. přístroj pro vytvoření podtlaku ve skleněné vaně
8. teflonové jehly
9. Polyetylénový adaptér 3 ml SPE kolonky

Extrakce pevnou fází využívá alkalických nebo kyselých látek. Jako zásaditá bývá používána KOH a z kyselin se jedná o kyselinu křemičitou. Dojde k odstranění kyseliny mléčné, což usnadňuje stanovení nižších mastných kyselin. [64].

Později se u mléčných výrobků extrahovalo pomocí diethyletheru nebo směsí diethyletheru v kyselém prostředí s  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Tyto extrakty byly upraveny oxidem hlinitým, kdy

byly odstraněny neutrální části vzorku. Di-isopropynoletheru s obsahem 6% kyseliny mravenčí extrahovány mastné kyseliny a následně měřeny pomocí GC [65].

V roce 1990 byl upraven postup, kdy 3% kyselina mravenčí byla přidána k diethyletheru [66].

Téhož roku 1990 mastné kyseliny byly extrahovány etherem:heptanu (1:1, obj.), byl přidán aminopropyl a neutrální lipidy byly odstraněny pomocí směsi rozpouštědel chloroform/ 2 – propanol (2:1), následně byly volné mastné kyseliny eluovány diethyletherem s obsahem 2% kyseliny mravenčí [67].

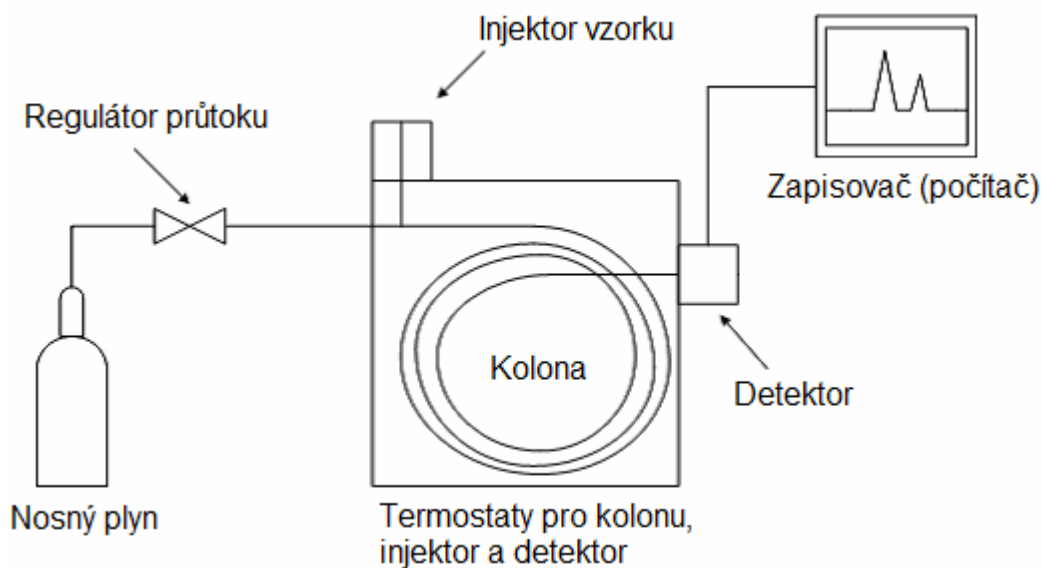
### 4.3 Plynová chromatografie

V chromatografii bývá nesčetné množství laboratorních separačních procesů založených na rozdílu migrace. Jedná se o jednoduché a rychlé provedení analýzy, malé množství vzorku a účinná separace látek. Vzorek je dávkován do proudu plynu, mobilní fázi je nosný plyn, kterým byly částice unášeny. Vzorek, aby mohl být použit pro plynovou chromatografii, musel být přeměněn na plyn. Plynová chromatografie je separační, analytická metoda pro stanovení plynů a těkavých látek z malého množství vzorku a určit výši dané složky. Důležitý je injekční port, přes který byl vzorek dávkován. Regulovaný průtok nosného plynu, který nese vzorek do kolony, detektoru a následuje zpracování údajů. Důležitá je teplota kolony, proto se nachází v termostatu. Signál z detektoru bývá vyhodnocován a z časového průběhu intenzity signálu určuje se kvantitativní a druh složek vzorku [51].

Plynovou chromatografií se stanovují pouze látky, které mají nízkou molekulovou hmotnost, jsou tepelně stálé. Bývá využívána k separaci plynů, nedisociovaných kapalin a pevných organických molekul. Nelze ji využít pro separaci makromolekul, anorganických a organických solí [52].

Mobilní fázi bývá nosný plyn, v našem případě se jedná o helium. Helium je bezbarvý plyn, bez zápachu. Tvoří jednoatomové molekuly a patří mezi vzácné plyny. Stejně jako vzácné plyny je inertní. Plyn musí obsahovat nejnižší podíl kritických nečistot [49].

Vzorek byl převeden na plyn, aby mohl být transportován, v koloně složky bývají separovány na základě schopnosti poutat se na stacionární fázi. Složky opouštějící kolonu jsou zachyceny detektorem. Detektor vyhodnocuje signál a z časového průběhu intenzitu signálu, kdy se určí kvantitativní zastoupení složek [49].



Obr. 6 Schéma plynového chromatografu [49]

#### 4.3.1 Mobilní fáze a regulátor průtoku

Zdrojem nosného plynu je tlaková láhev, která obsahuje různé druhy plynu. Každý plyn má jiné vlastnosti. Plyn unáší vzorek kolonou a vůči ostatním složkám musí být inertní. Při výběru plynu hraje i role cena, toxicita a bezpečnost práce. Nosným plynem může být helium, argon, dusík, vodík a oxid uhličitý. Vodík je hořlavý, výbušný případně hydrogenuje s některými složkami vzorku [53].

Regulátor průtoku udržuje konstantní průtokovou rychlost plynu v koloně. Průtok plynu není závislý na teplotě, nosném plynu a rozměru kolony [49, 52].

#### 4.3.2 Čistící zařízení

Čistící zařízení zbavuje nosný plyn nežádoucích ostatních plynů zejména reaktivního kyslíku, který může poškodit stacionární fázi. Dále zachycuje vlhkost a nečistoty nosného plynu [53].

#### 4.3.3 Injektor

K zavedení vzorku do proudu nosného plynu slouží dávkovač (injektor). Roztoky jsou dávkovány injekční stříkačkou přes pryžové septum, které odděluje vnitřní prostor od vnějšího injektoru. V injektoru se nachází skleněná vložka sloužící k odpaření vysokou teplotou vzorku a správnému promíchání par vzorku s nosným plynem [49, 52].

Před kolonou se nachází dělič toku, díky kterému se do kolony dostane pouze část nastříkovaného množství. Nástřik bez děliče toku bývá využíván pro stopové analýzy vzorku nebo pro analýzu směsí látek lišící se bodem varu [54].

#### 4.3.4 Kolona

V plynové chromatografii se využívají dva typy kolon – náplňové a kapilární. Náplňové kolony bývají naplněné sorbenty pokrytými kapalnou fází. Vyrobeny bývají z oceli nebo skla. Náplní sorbentů může být např. silikagel, grafitové saze. Jako syta bývají využívány hlinitokřemičitany. Separace složek mezi nosným plynem a stacionární kapalnou fází probíhající pouze rozdělovacím principem [54].

Stacionární fází u kapilární kolony bývá nosičem její vnitřní stěna. Bývají vyráběny z taveného křemene. Menší průměry kolon vede k vyšší účinnosti, ale na úkor snížení kapacity. Z tohoto důvodu nebývají dlouhé kolony, protože by byl prodloužen čas separace [50].

#### 4.3.5 Plamenově ionizační detektor

V plamenově ionizačním detektoru proudí plyn přes dvě elektrody, mezi nimiž vzniká elektrické napětí. Molekuly plynu jsou ionizovány v kyslíkovodíkovém plameni. Před vstupem nosného plynu do hořáku se mísí s vodíkem a vzduch je přiváděn z vnějšku. Elektrický proud a ionizace se zvýší přítomností složky. Nejvhodnější jako nosný plyn bývá dusík, který detekuje všechny složky, kromě anorganických plynů a par. Z organických látek nereaguje na kyselinu mravenčí a formaldehyd [49, 50].

#### 4.3.6 Tepelně vodivostní detektor

Tepelně vodivostní detektor pracuje na principu tepelné vodivosti. Jedná se o univerzální nedestruktivní detektor. Detektor se skládá z platinové spirály zasunuté do kovového bloku. Spirálou prochází proud, který ji žhaví. Přítomné složky mění tepelnou vodivost prostředí kolem žhaveného vlákna, vzniká tak elektrický odpor. Tepelně vodivostní detektor bývá konstruován se dvěma spirálami, přes měrnou prochází nosný plyn s rozdělenými složkami a druhou prochází čistý plyn [51].

## 4.4 Pracovní techniky plynové chromatografie

### 4.4.1 Eluční metoda

Eluční metoda je založena na jednorázovém vymývání dávkovaného vzorku plynem. Do proudu nosného plynu byl vzorek dávkován najednou. Nejdříve z kolony vychází složka, která se nejméně zachycuje na stacionární fázi. Podle času, za který vyjdou složky z kolony, jsou tvořeny píky [49].

### 4.4.2 Frontální metoda

Frontální metoda pracuje kontinuálně přívodem vzorku do kolony. Z kolony nejdříve vychází nejméně sorbované látky, nejvíce sorbované látky odchází později. Nakonec z kolony vychází nosný plyn [49].

### 4.4.3 Vytěšňovací metoda

Vytěšňovací metoda spočívá v jednorázovém dávkování vzorku do proudu nosného plynu. Vytěšňující činidlo jsou páry látky, které v koloně sorbuje silněji než kterákoliv složka vzorku. Činidlo při sorpci na stacionární fázi posouvá složky před sebou. V koloně se vytváří zóny od nejméně sorbující složky po vytěšňovací činidlo [49].

### 4.4.4 Imerzní chromatografie (vakantochromatografie)

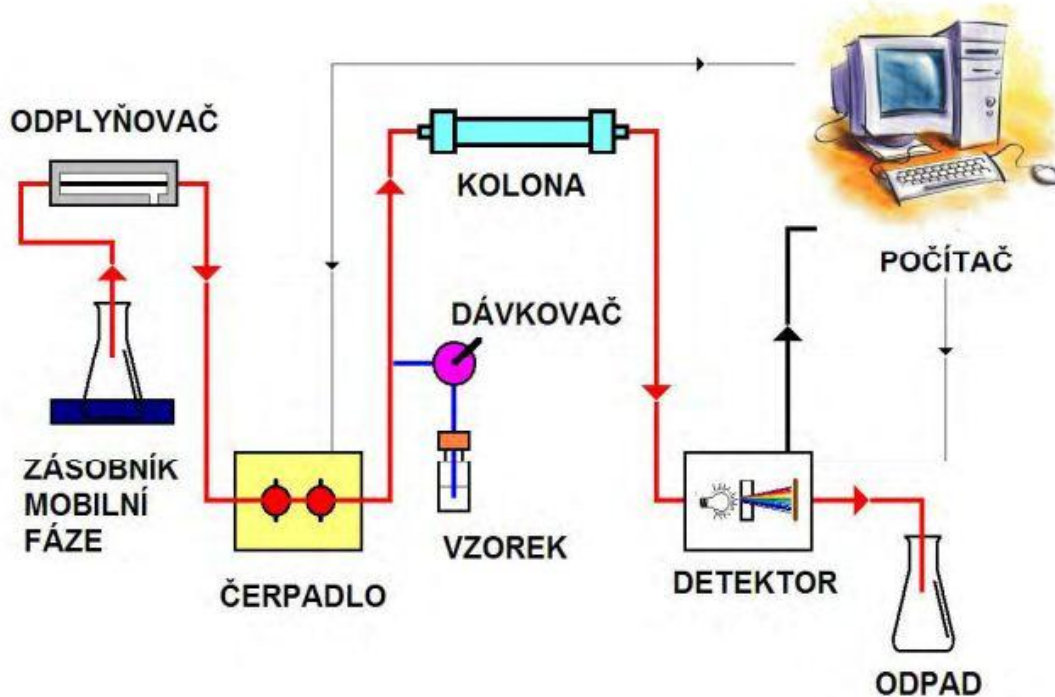
Jedná se o kombinaci frontální a eluční techniky. Směs procházející kolonou utvoří ustálený stav rovnováhy mezi analyzovanou směsí a sorbentem. Poté se do proudu směsi vpraví dávka nosného plynu, který v koloně vytvoří oblast bez sorbujících složek [49].

## 4.5 Kapalinová chromatografie

Kapalinovou chromatografii tvoří mobilní fázi kapalina. Rozdílem mezi plynovou chromatografií je interakce mezi stacionární fází, ale používá se i mobilní fáze. Analytická složka se během separace rozděluje na mobilní a stacionární fázi. Afinita analitu je závislá na čase, který stráví v jedné nebo druhé části [54].

Kapalinová chromatografie naplněná skleněnou trubicí dole zakončenou kohoutem a fritou, zrnitým sorbentem s velkým průměrem částic. Působením gravitační síly postupují částice kolonou, vzorky se od sebe separují a opouštějí v různých částech kolonu [49,53].





Obr. 7 Schéma účinné kapalinové chromatografie

#### 4.5.1 Čerpadlo

Čerpadlo čerpá vodu pomocí membránových nebo pístových čerpadel. U membránového čerpadla bývá vyhrazen prostor mezi pístem naplněný pracovní kapalinou, která je oddělena od prostoru s mobilní fází. Pístové čerpadlo pracuje na principu výtlačku a sání [54].

#### 4.5.2 Dávkoč

Dávkování bývá prováděno injekčním zařízením, které může být automatické nebo ruční. Injekční zařízení bývá vyrobeno z inertních materiálů (nerezová ocel) [49].

#### 4.5.3 Kolony

V kapalinové chromatografii bývají používány kolony náplňové. Bývají to kolony naplněné nosiči nebo sorbenty pokryty kapalnou fází. Principem separace je rozdělení stacionární a mobilní fáze, kdy se neuplatňují absorpční schopnosti mezi jednotlivými fázemi [54].

Výhodou kapalinové chromatografie bývá, že nepotřebuje termostat a pracuje při laboratorní teplotě [54].

#### 4.5.4 Detektor

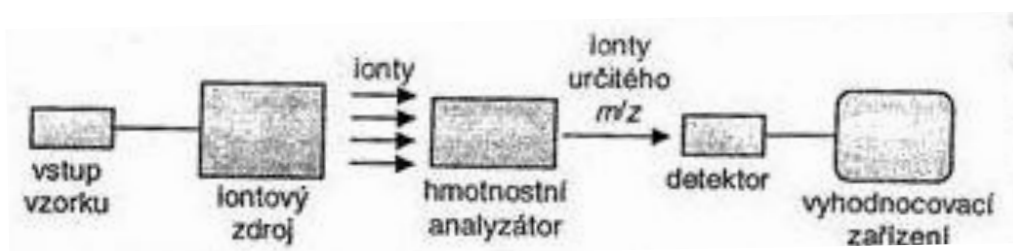
Citlivost detektoru bývá selektivní pro analyty a málo citlivé pro mobilní fázi. Využívány bývají různé detektory [49, 54]:

- Fotometrický – měřena je zde absorpce eluátu vycházejícího z kolony
- Refraktometrický – měří zde rozdíly indexu lomu čisté mobilní fáze a eluátu
- Fluorescenční – principem absorpce ultrafialového záření a následně vysílat záření o vyšší vlnové délce

### 4.6 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je separační metoda, pracující s dělením látek podle poměru hmotnosti a náboje fragmentu. Určením hmotnosti částic nebo stanovení elementárního složení molekuly či vzorku. Stanovení chemické struktury molekul, kterými jsou peptidy a jiné chemické sloučeniny. Principem jsou ionizující chemické sloučeniny, nabitě molekuly a jejich hmotnosti vzhledem k náboji [55].

Vzorek je ionizován nárazem letících elektronů nebo využívá chemickou ionizaci, kdy ionty vznikají chemickou reakcí [55].



Obr. 8 Schéma hmotnostní spektrometrie [49]

### 4.7 Papírová a tenkovrstvá chromatografie

Při těchto chromatografiích je stacionární fáze umístěna na ploše. Stacionární fáze v papírové chromatografii bývá kapalina zachycená na papíře. Mobilní fází bývá kapalina.

V papírové chromatografii bývá mobilní fází kapalina zachycena na tenké vrstvě. Stacionární fází bývá voda na papíře, mobilní fází bývají organická rozpouštědla nebo jejich směsi, které se nemísí s vodou nebo se mísí pouze částečně [56].

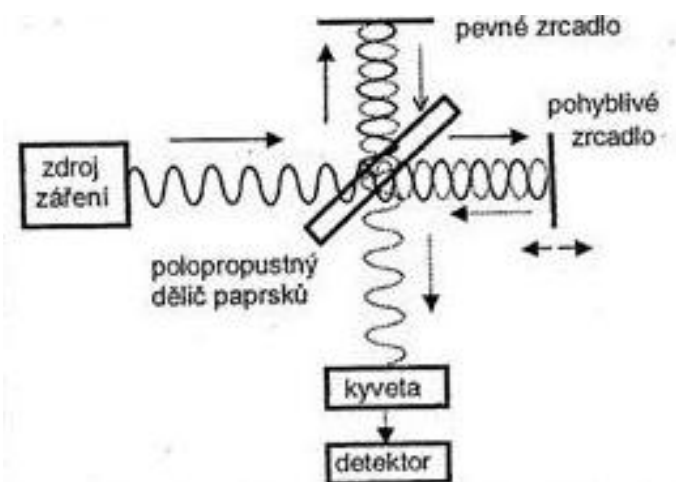
Jednoduchou, rychlou chromatografickou metodou bývá tenkovrstvá chromatografie, která může být charakterizována jako chromatografie na otevřené koloně. Stacionární fázi často užívanou bývá oxid hlinitý, silikagel. Stacionární fáze bývají nanášeny na hliníkové fólie a na skleněných deskách [56].

Principem chromatografií je nanesení vzorku na vrstvu papíru nebo tenkou vrstvu papíru pomocí mikropipety. Mobilní fáze vzlíná tenkou vrstvou nebo papírem pomocí kapilárních sil. Dělené látky vzorku se méně či více zpožďují rozpuštěním nebo adsorpcí se stacionární fází a tím se vzájemně dělí. Hnací silou mobilními fázemi jsou kapilární síly, kdy rychlost závisí na velikosti pórů. Rychlost stacionární fáze nelze konstantně kontrolovat [49, 56].

#### 4.8 Fourierova transformace infračervené spektrometrie (FTIR)

Fourierova transformace infračervené spektrometrie, jejichž principem je rozklad infračerveného záření v hranolovém nebo mřížkovém monochromátoru. Spektrometr zesiluje nebo zeslabuje záření z polychromatického zdroje. Část paprsku dopadá na polopropustný dělič paprsků a od něj je odrazen na pevné zrcadlo. Od zrcadla je opět odražen zpět na dělič paprsků. Další část paprsků projde polopropustným děličem paprsků, kdy je odražen od pohyblivého zrcadla zpět do děliče a odráží se dolů ke kyvetě. V děliči se druhá část paprsku setkává s první a spolu interferují [49].

Žhavená tyčinka karbidu křemíku bývá využívána jako zdroje záření. Kyveta obsahuje okénka, určené pro měření roztoků, musí být z materiálu propouštějící infračervené záření [49].



Obr. 9 Schéma FTIR [49]

## 4.9 Infračervená spektrometrie

Při infračervené spektrometrii dochází k absorpci infračerveného záření molekulami látek. Infračervené záření má nižší energii a větší vlnovou délku a než viditelné a ultrafialové záření. Místo vlnové délky bývá využíván vlnčet [49].

Energie infračerveného záření nestačí na změny elektronových stavů, což způsobuje pouze změny rotačních a vibračních stavů. Kolem svého těžiště rotuje molekula, kdy v plynech ji lze měřit, avšak v tuhých a kapalných látkách splývá. Atomy mezi sebou vibrují, kdy energie bývá závislá na hmotnosti atomů a vazbách mezi atomy [49].

## 4.10 Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Principem bývá magnetický moment atomů v magnetickém poli, kdy bývají orientovány do poloh, které odpovídají určitým energetickým hladinám. Přejed jádra na vyšší energetickou hladinu bývá způsoben absorpcí elektromagnetického záření v oblasti krátkých rádiových vln. Otáčející se jádro kolem své osy, kdy ve vnějším magnetickém poli osa koná procesní pohyb. Proton ve vnějším magnetickém poli může zaujmout různé orientace, podle energetické hladiny. Při nižší energetické hladině jádra bývá magnetický moment orientován stejně jako magnetické pole. Jádro s vyšší energetickou hladinou míří magnetický moment směrem proti vnějšimu magnetickému poli [57].

Do rotující skleněné kyvety byl umístěn vzorek, kyveta se nachází v silném homogenním magnetickém poli s jižním a severním pólem. Magnetické pole je vytvářeno elektromagnetem, který bývá napájen zdrojem. Zdrojem je napájen i radiofrekvenční vysílač tvořící vysokofrekvenční pole. Detektorem je radiofrekvenční přijímač, jedná se o cívku vinutou kolem kyvety. Směr siločar magnetického pole kolmo na kyvetu a na směr osy cívky zdroje. Vyhodnocovací zařízení vyhodnotí radiofrekvenční signál. Výška signálu se liší svou koncentrací vzorku [49, 57].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 5 JOGURT

Jogurt je fermentovaný polotuhý výrobek vzniklý kysáním mléka, smetany, podmásli nebo jejich směsí pomocí mikroorganismů. Využívají se mléka savců, pro komerční účely bývá využíváno kravské mléko. Pro fermentaci se používají mikroorganismy *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* [4].

Jogurty stejně jako další fermentované výrobky bývají často využívány při různých dietách a léčebných výživách. Senzorické vlastnosti jogurtu bývají ovlivněny mikroorganismy. Před inokulací mléka, předchází mnoho úprav mléka. Před očkováním startovací kultury do mléka je nutné zajištění sterilační čistoty mléka [5, 6].

### 5.1 Výroba vzorků

Pro přípravu jogurtu bylo použito sušené mléko, které bylo následně rozmícháno ve vodě. Byly vyrobeny vzorky o různých koncentracích sušiny:

- 10 % sušiny (Obr. 36 Vzorek jogurtu s obsahem 10% sušiny)
- 12 % sušiny (Obr. 37)
- 14 % sušiny (Obr. 38)
- 16 % sušiny (Obr. 39)

Výroba jogurtu spočívala v rozmíchání sušeného mléka s vodou při různých koncentracích. Na předvázkách bylo naváženo požadované množství sušeného mléka s přesností na 0,01 g. Poté navážené množství bylo zalito vodou, následovalo důkladné promíchání všech komponentů, aby došlo k dokonalé homogenizaci a nezůstávaly usedliny na dně případně stěnách nádoby.

Sušené mléko bylo zakoupeno od firmy ASP Czech s.r.o., jedná se o polotučné mléko Lactis baleno v 10 kg balení.

Tab. 2 Navážka surovin pro přípravu jogurtu při 10 % sušině

<b>Vypočtený tuk</b>	1,58	
<b>Vypočtený tuk v sušině</b>	15,79	
<b>Surovina</b>	Množství (kg)	Na 500 g
<b>mléko polotučné</b>	0,1053	52,65
<b>voda</b>	0,8947	447,35

Tab. 3 Navážka surovin pro přípravu jogurtu při 12 % sušiny

<b>Vypočtený tuk</b>	1,89	
<b>Vypočtený tuk v sušině</b>	15,79	
<b>Surovina</b>	Množství (kg)	Na 500 g
<b>mléko polotučné</b>	0,1263	63,15
<b>voda</b>	0,8737	436,85

Tab. 4 Navážka surovin pro přípravu jogurtu při 14 % sušiny

<b>Vypočtený tuk</b>	2,21	
<b>Vypočtený tuk v sušině</b>	15,79	
<b>Surovina</b>	Množství (kg)	Na 500 g
<b>mléko polotučné</b>	0,1474	73,7
<b>voda</b>	0,8526	426,3

Tab. 5 Navážka surovin pro přípravu jogurtu při 16 % sušiny

<b>Vypočtený tuk</b>	2,53	
<b>Vypočtený tuk v sušině</b>	15,79	
<b>Surovina</b>	Množství (kg)	Na 500 g
<b>mléko polotučné</b>	0,1684	84,2
<b>voda</b>	0,8316	415,8

## 5.2 Úprava mléka a očkování mikroorganismů

Pasterací se v praxi rozumí usmrcení vegetativních forem bakterií, málo termorezistentních plísní a kvasinek pomocí tepla. Během pasterace je snahou, aby nedošlo ke změnám biologických hodnot a fyzikálních vlastností mléka.

Po dokonalém rozmíchání sušeného mléka ve vodě bylo takto připravené mléko vloženo do vodní lázně a pasterováno na teplotu  $95 \pm 1$  °C po dobu výdrže 5 minut, poté bylo zchlazeno na teplotu zaočkování ( $37 \pm 1$  °C). Jako čistá mlékařská kultura byla použita sušená jogurtová směs *Laktoflora*. Pasterované mléko bylo zaočkováno sušenou kulturou *Laktoflora* jogurtovou (MILCOM a.s.), kdy na požadované množství 0,5 l bylo naváženo 1,5 g. Lyofilizovaná kultura byla v mléce dobře promíchána.

Bylo vyrobeno celkem 160 vzorků jogurtů, kdy jejich výroba byla rozdělena na dvě série, resp. dva procesy inkubace, pro vyšší objektivnost výsledků.

Kultivace probíhala v termostatu při  $42 \pm 1$  °C po dobu 6 hodin. Po kultivaci byly jogurty vloženy do chladničky na 24 hodin.

Výrobky byly skladovány v lednici při teplotě  $6 \pm 2$  °C po celkovou dobu 30 dní. Stanovení pH a volných mastných kyselin bylo provedeno v 1., 5., 10., 20. a 30. den skladování.

### 5.3 Stanovení pH

Stanovení pH bylo provedeno pomocí vpichového pH metru (EUTECH INSTRUMENTS Malajsie).

#### 5.3.1 Výsledky pH

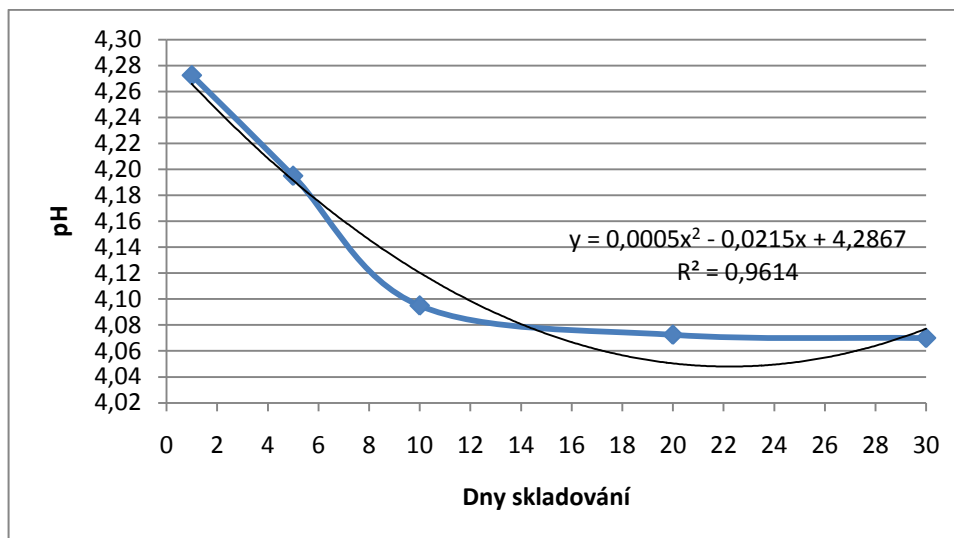
Ve vzorcích jogurtů bylo měřeno pH v 1., 5., 10., 20. a 30. den skladování. Hodnoty pH se liší mezi výrobky s rozdílným obsahem sušiny. U všech výrobků dochází v průběhu skladování k poklesu pH.

Tab. 6 pH vzorků jogurtů v jednotlivých dnech skladování

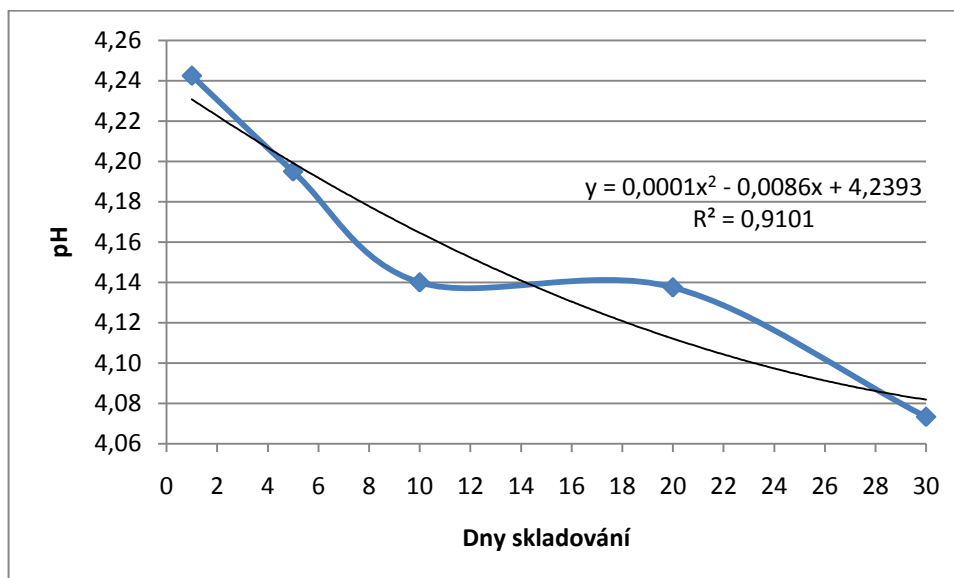
Obsah sušiny v jogurtu	Den skladování				
	1.	5.	10.	20.	30.
	průměr ± S.E.	průměr ± S.E.	průměr ± S.E.	průměr ± S.E.	průměr ± S.E.
10 %	$4,27 \pm 0,056^a$	$4,20 \pm 0,044^{ab}$	$4,10 \pm 0,028^b$	$4,07 \pm 0,008^b$	$4,07 \pm 0,029^b$
12 %	$4,24 \pm 0,051^a$	$4,20 \pm 0,061^a$	$4,14 \pm 0,061^a$	$4,14 \pm 0,030^a$	$4,07 \pm 0,033^a$
14 %	$4,30 \pm 0,087^a$	$4,22 \pm 0,038^a$	$4,19 \pm 0,068^a$	$4,14 \pm 0,045^a$	$4,12 \pm 0,015^a$
16 %	$4,48 \pm 0,125^a$	$4,38 \pm 0,068^a$	$4,35 \pm 0,088^a$	$4,21 \pm 0,085^a$	$4,15 \pm 0,005^a$

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

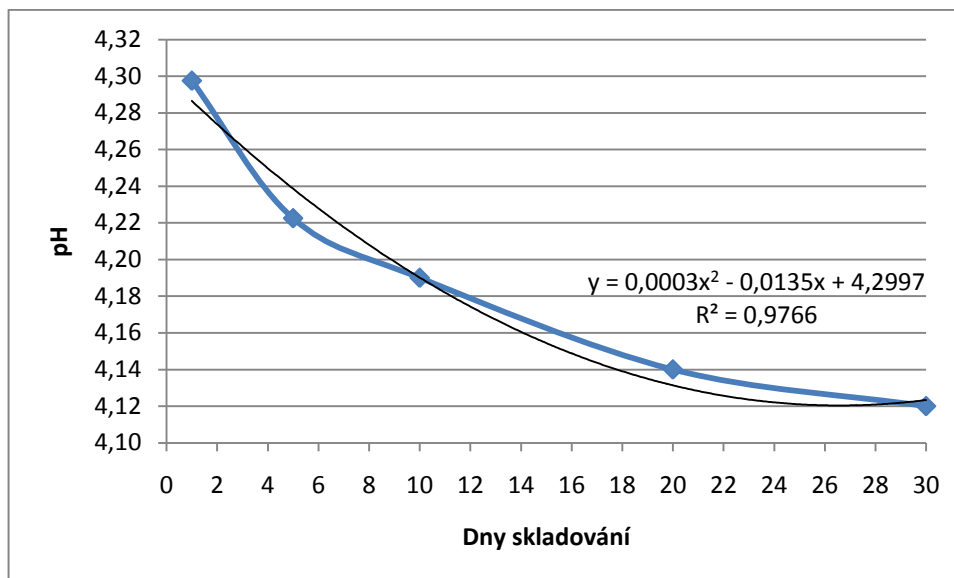




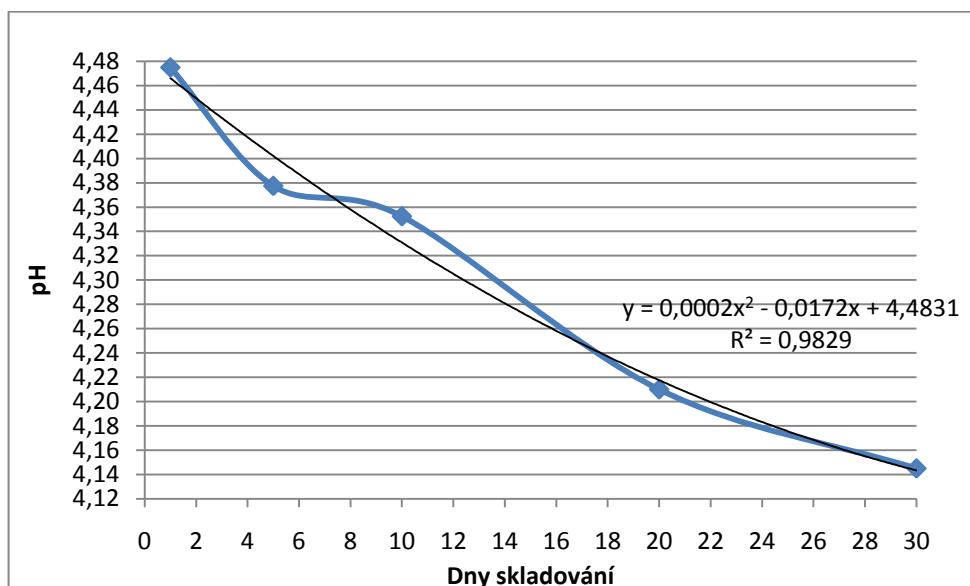
Obr. 10 Závislost pH jogurtu s obsahem 10% sušiny na době skladování



Obr. 11 Závislost pH jogurtu s obsahem 12% sušiny na době skladování



Obr. 12 Závislost pH jogurtu s obsahem 14% sušiny na době skladování



Obr. 13 Závislost pH jogurtu s obsahem 16% sušiny na době skladování

### 5.3.2 Diskuze a závěr

U všech vzorků jogurtů (10 %, 12 %, 14 % a 16 % sušiny) došlo v průběhu skladování k poklesu hodnot pH, což je patrné z tabulky Tab. 6 a stejně tak u Obr. 10, Obr. 11, Obr. 12, Obr. 13. U vzorků jogurtů s obsahem sušiny 12 % došlo v průběhu skladování k poklesu pH se statisticky významnými rozdíly ( $P \leq 0,05$ ). Pro modelaci klesajícího trendu hodnot pH byla použita polynomická funkce. Pokles hodnot pH je způsoben bakteriemi mléčného kvašení, které fermentují laktosu na kyselinu mléčnou a dochází tak ke snížení pH jogurtové matrice [22]. Zároveň také může být tento pokles ovlivněn lipolýzou TAG na

volné mastné kyseliny, které se vzhledem ke svým chemickým vlastnostem mohou také podílet na snižování pH.

## 5.4 Stanovení volných mastných kyselin

Stanovení volných mastných kyselin bylo provedeno pomocí kombinace dvou metod, kdy jedna [58] byla zvolena pro extrakci volných mastných kyselin z matrice jogurtu a druhá [59] byla použita pro esterifikaci získaných volných mastných kyselin.

### 5.4.1 Použité chemikálie

- Chloroform, p.a., stab – obsah 99,5 %, hustota 1,486 – 1,494, destilační rozmezí 59,5 – 62 °C,  $M = 119,38$  g/mol. Firma Lach – ner s.r.o.
- n –Pentan, p.a. – Firma Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod
- Diethylether stabilizovaný p.a. – obsah 99 %, destilační rozmezí 34 – 35 °C,  $M = 74,12$  g/mol. Firma Lach – ner s.r.o.
- Kyselina mravenčí 85 % čistá –  $M = 46,03$  g/mol. Firma Lach – ner s.r.o.
- 2 - propanol – hustota 0,78 g/cm<sup>3</sup>,  $M = 60,1$  g/mol
- Síran sodný bezvodný P.A. –  $M = 142,04$  g/mol. Firma Lach – ner s.r.o.
- 1,4 – Dioxane G.R stab. –  $M = 88,11$  g/mol. Firma Lach – ner s.r.o.
- Sodium methoxide – Firma SIGMA – ALDRICH
- Sodium hydrogencitrate sesquihydrate, 99% - Firma SIGMA - ALDRICH

### 5.4.2 Použitá zařízení

- SPE manifold
- Kolonky (Amino Box, made in USA, SempliQ, Agilent Technologies)
- GC-FID

### 5.4.3 Potup stanovení volných mastných kyselin

- 1) Vzorek jogurtu o hmotnosti 10 g byl navážen na analytických vahách s přesností na 0,001 g do zkumavek s uzavíratelným hrdlem.
- 2) Smícháním s 10 ml etanolu, 1 ml 2,5 M kyseliny sírové byl vzorek extrahován 15 ml diethyletheru/pentan (poměr 1:1). Zkumavky byly vloženy do centrifugy při 2500 otáčkách za minutu po dobu 20 minut.

- 3) Došlo k oddělení horní vrstvy tuku s mlékem, kdy horní vrstva byla následně převedena do Erlenmayerovy baňky o obsahu 100 ml. Pro absorpci zbytkové vody byl přidán 1 g bezvodného Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
- 4) Na kolonku promytou 10 ml pentanu byl následně převeden vzorek Erlenmayerovy baňky. Erlenmayerova baňka byla propláchnuta 3 ml diethyl-etheru a tento obsah byl opět převeden na kolonku. Následně byla kolonka propláchnuta 10 ml rozpouštědla chloroform/2 – propanol v poměru 2:1 v/v.
- 5) Kolonka byla následně promyta 2,5 ml 2% kyseliny mravenčí v diethyl-etheru a filtrát byl jímán do čistých zkumavek. Filtrát byl odpařen do sucha pomocí N<sub>2</sub>.
- 6) K odpařenému filtrátu bylo přidáno 5 ml dioxanu a vzorek byl převeden do dělicí nálevky.
- 7) Dále bylo přidáno 5 ml 5% methoxidu v methanolu, vzorek byl promíchán a nechán stát 90 sekund.

Poté byl přidán pentan, vzorek byl krátce promíchán a bylo přidáno 10 ml 15% citrátu.

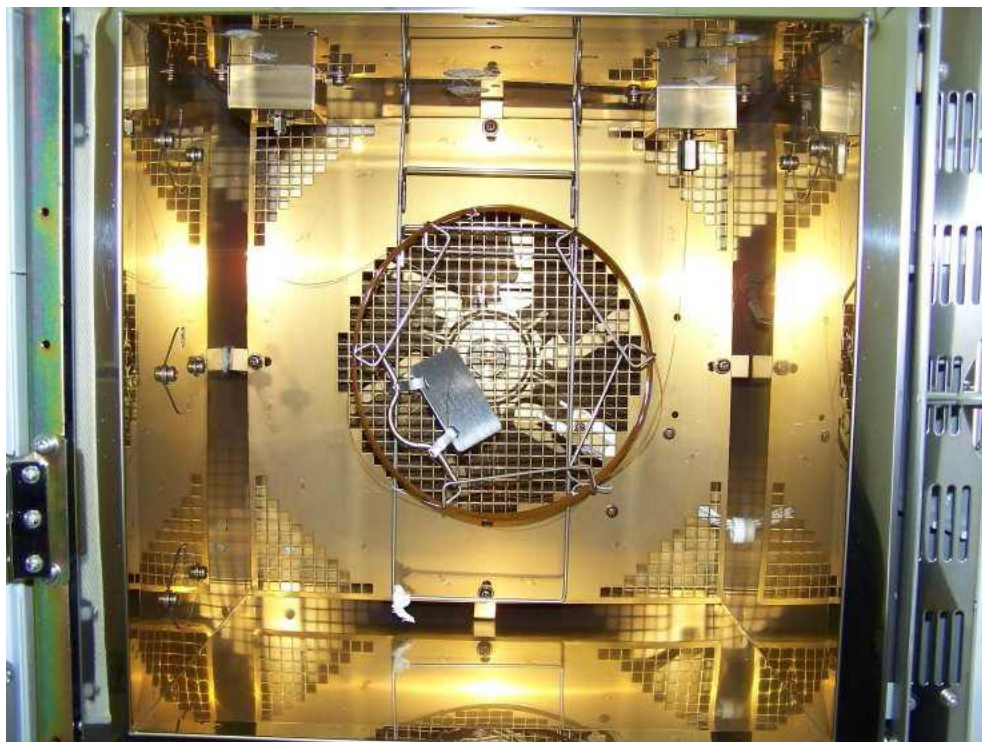
Takto připravený vzorek byl následně analyzován pomocí GC-FID. Podmínky měření na

GC-FID jsou uvedeny v tabulce

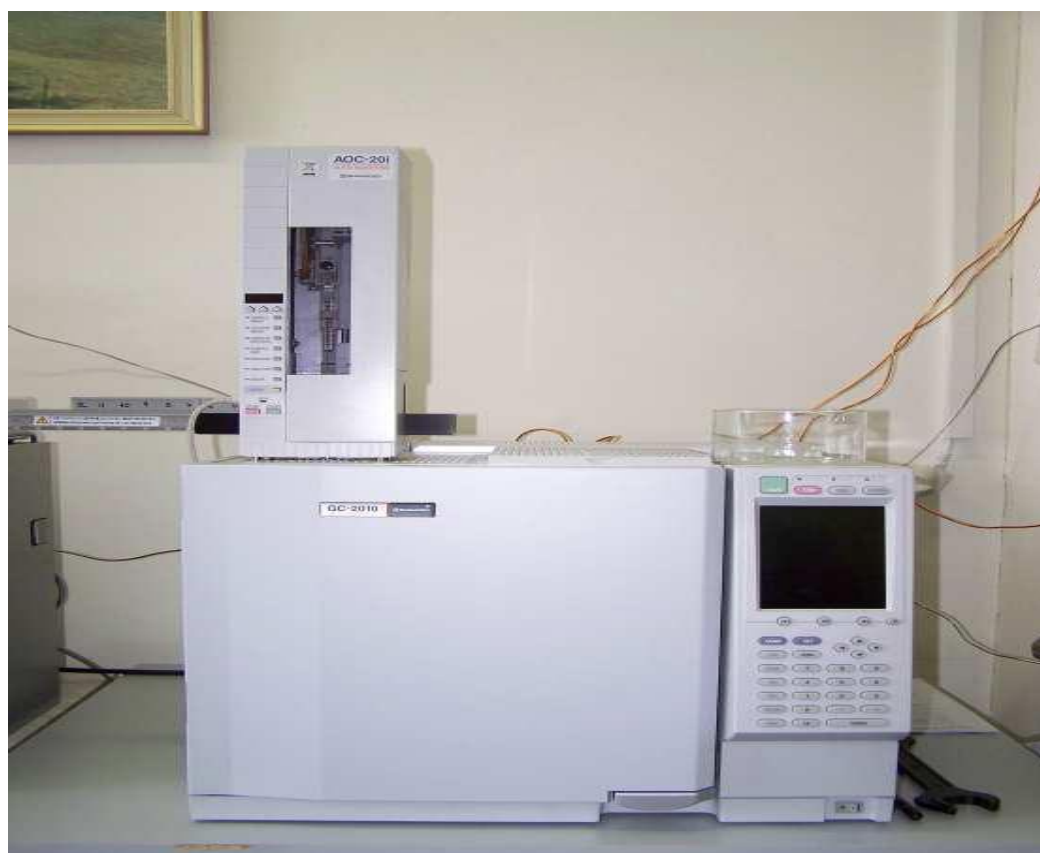
- 8) Tab. 7 na Obr. 14 Kolona SPB – PUFA [36] je znázorněna kolona a na Obr. 15 přístroj GC-FID, na kterém byly vzorky měřeny.
- 9) Výsledky byly zpracovány pomocí softwaru GC SOLUTION.
- 10) Pomocí GC-FID byly stanoveny methylestery jednotlivých volných mastných kyselin, které byly převedeny na dané mastné kyseliny vynásobením koeficientem (tento koeficient byl vypočten podílem molární hmotnosti mastné kyseliny ku molární hmotnosti methylesteru volné mastné kyseliny).
- 11) Kvalitativní i kvantitativní analýza byla provedena porovnáním se standardy.

Tab. 7 Technické parametry GC

teplota kolony	40 °C
teplota při nástřiku	250 °C
délka programu	25 minut
režim vstřikování	split (1:15)
nosný plyn	He
kolona	SLB - 5ms
parametry kolony	30 m x 0,25 mm I.D., 0,25 µm



Obr. 14 Kolona SPB – PUFA [36]



Obr. 15 Plynový chromatograf GC-FID [36]

## 5.5 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  $\alpha = 0,05$ .

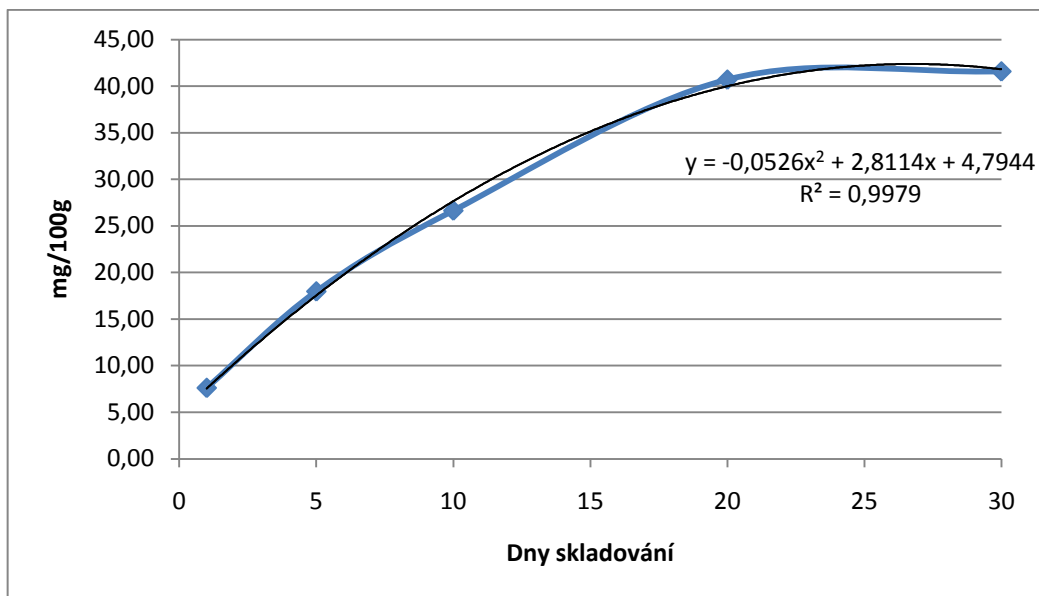
## 5.6 Výsledky stanovení volných mastných kyselin

### 5.6.1 Obsah volné mastné kyseliny valerové

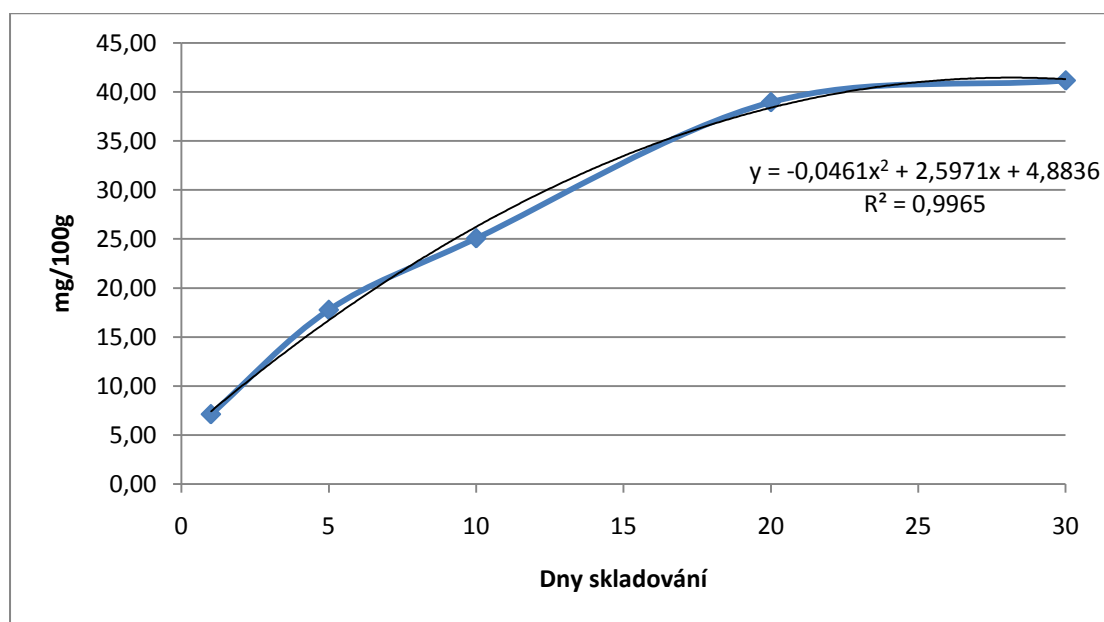
Tab. 8 Obsah volné mastné kyseliny valerové (mg/100g) v průběhu skladovacího pokusu u vzorků jogurtů s různým obsahem sušiny

Obsah sušiny v jogurtu	Den skladování				
	1.	5.	10.	20.	30.
	průměr ± S.E.	průměr ± S.E.	průměr ± S.E.	průměr ± S.E.	průměr ± S.E.
10 %	7,62 ± 0,495 <sup>a</sup>	17,98 ± 0,481 <sup>b</sup>	26,65 ± 0,520 <sup>c</sup>	40,71 ± 0,876 <sup>d</sup>	41,59 ± 0,219 <sup>d</sup>
12 %	7,14 ± 0,433 <sup>a</sup>	17,77 ± 0,727 <sup>b</sup>	25,07 ± 0,485 <sup>c</sup>	38,94 ± 1,647 <sup>d</sup>	41,15 ± 1,202 <sup>d</sup>
14 %	8,72 ± 0,358 <sup>a</sup>	17,57 ± 0,422 <sup>b</sup>	26,65 ± 0,414 <sup>c</sup>	41,13 ± 1,323 <sup>d</sup>	43,09 ± 0,937 <sup>d</sup>
16 %	8,07 ± 0,487 <sup>a</sup>	17,37 ± 0,347 <sup>b</sup>	26,51 ± 0,570 <sup>c</sup>	42,36 ± 0,934 <sup>d</sup>	45,16 ± 1,318 <sup>d</sup>

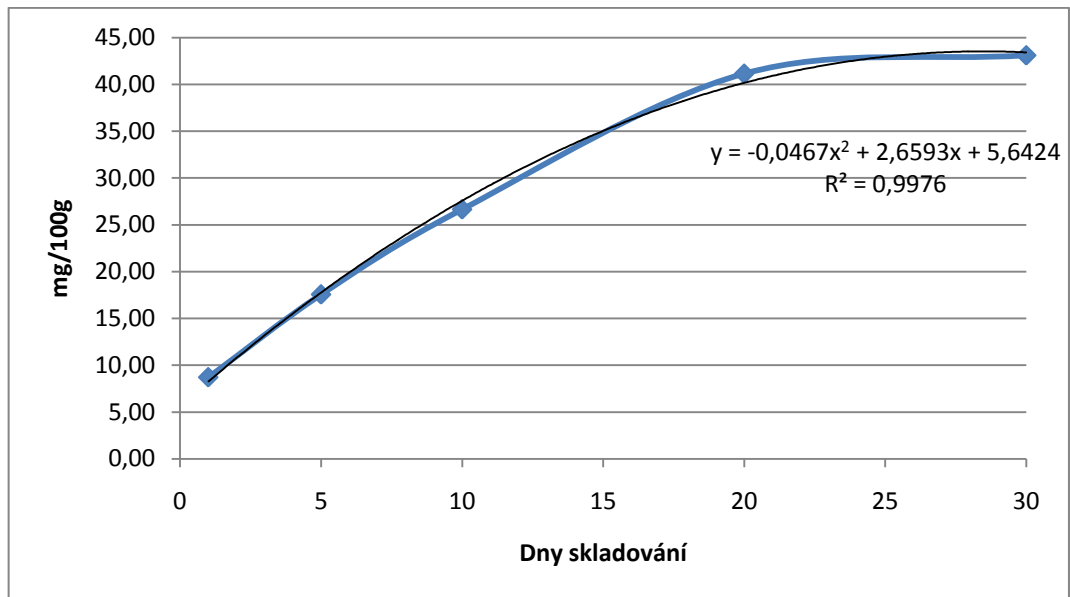
<sup>a,b,c,d</sup> ... hodnoty na řádku se stejným písmenem v horním indexu nejsou statisticky významné ( $P \leq 0,05$ )



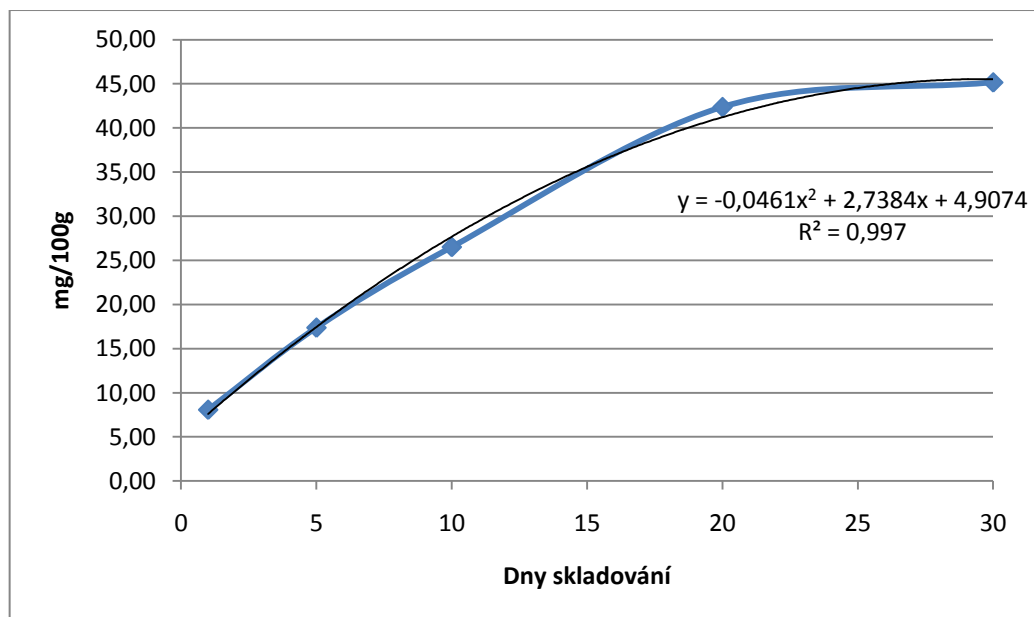
Obr. 16 Obsah volné kyseliny valerové ve vzorcích jogurtu s 10 % obsahem sušiny



Obr. 17 Obsah volné kyseliny valerové ve vzorcích jogurtu s 12 % obsahem sušiny



Obr. 18 Obsah volné kyseliny valerové ve vzorcích jogurtu s 14 % obsahem sušiny



Obr. 19 Obsah volné kyseliny valerové ve vzorcích jogurtu s 16 % obsahem sušiny

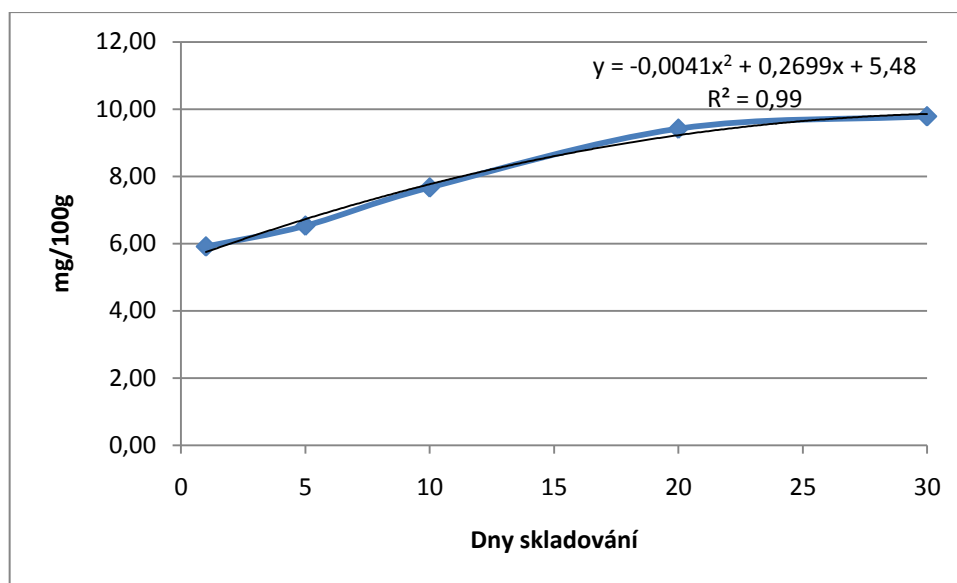


### 5.6.2 Obsah volné mastné kyseliny tridekanové

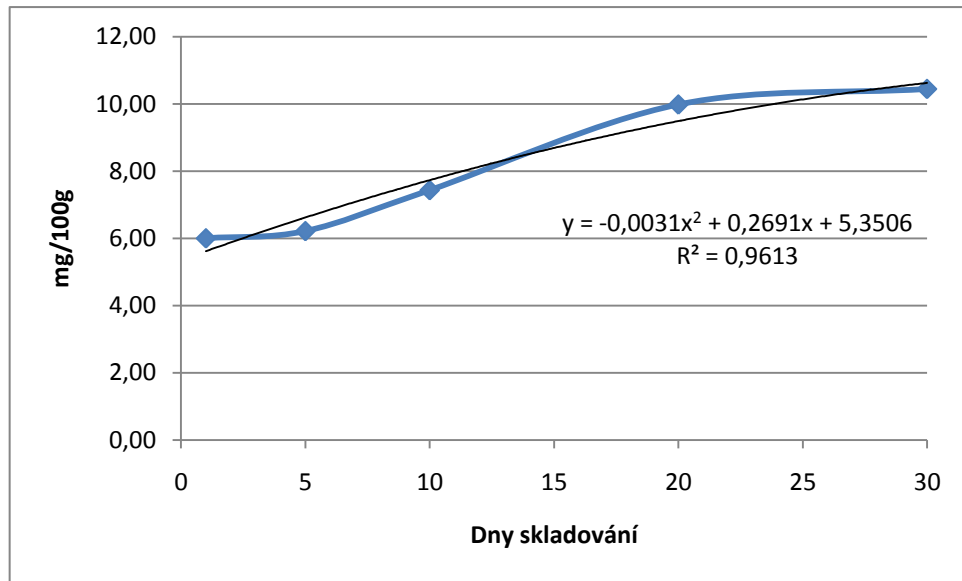
Tab. 9 Obsah volné mastné kyseliny tridekanové (mg/100g) v průběhu skladovacího pokusu u vzorků jogurtů s různým obsahem sušiny

Obsah sušiny v jogurtu	Den skladování				
	1.	5.	10.	20.	30.
	průměr ± S.E.	průměr ± S.E.	průměr ± S.E.	průměr ± S.E.	průměr ± S.E.
10 %	5,91 ± 0,102 <sup>a</sup>	6,53 ± 0,20 <sup>ab</sup>	7,67 ± 0,026 <sup>b</sup>	9,42 ± 0,469 <sup>c</sup>	9,79 ± 0,534 <sup>c</sup>
12 %	6,00 ± 0,115 <sup>a</sup>	6,21 ± 0,177 <sup>a</sup>	7,43 ± 0,193 <sup>b</sup>	9,98 ± 0,074 <sup>c</sup>	10,45 ± 0,226 <sup>c</sup>
14 %	5,65 ± 0,138 <sup>a</sup>	6,01 ± 0,012 <sup>a</sup>	8,80 ± 0,085 <sup>b</sup>	10,98 ± 0,094 <sup>c</sup>	10,82 ± 0,086 <sup>c</sup>
16 %	5,30 ± 0,331 <sup>a</sup>	6,05 ± 0,113 <sup>ab</sup>	6,44 ± 0,134 <sup>b</sup>	10,21 ± 0,140 <sup>c</sup>	10,55 ± 0,314 <sup>c</sup>

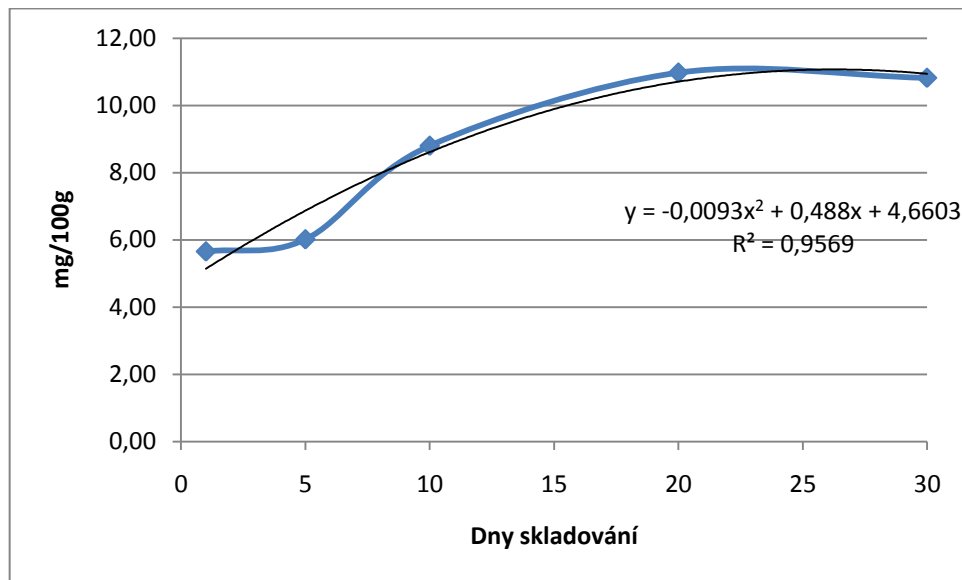
<sup>a,b,c</sup> ... hodnoty na řádku se stejným písmenem v horním indexu nejsou statisticky významné ( $P \leq 0,05$ )



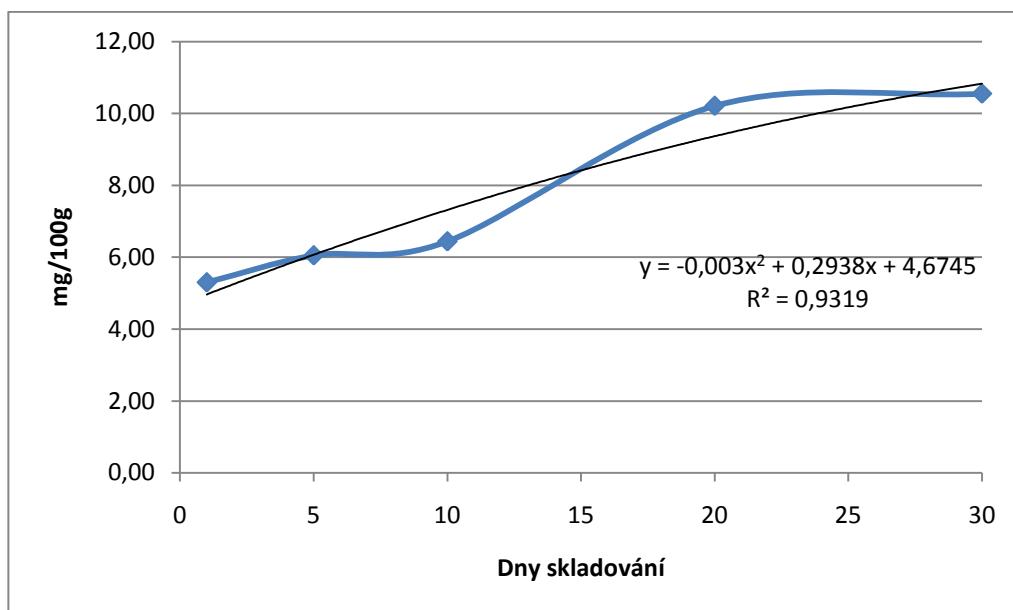
Obr. 20 Obsah volné kyseliny tridekanové ve vzorcích jogurtu s 10 % obsahem sušiny



Obr. 21 Obsah volné kyseliny tridekanové ve vzorcích jogurtu s 12 % obsahem sušiny



Obr. 22 Obsah volné kyseliny tridekanové ve vzorcích jogurtu s 14 % obsahem sušiny



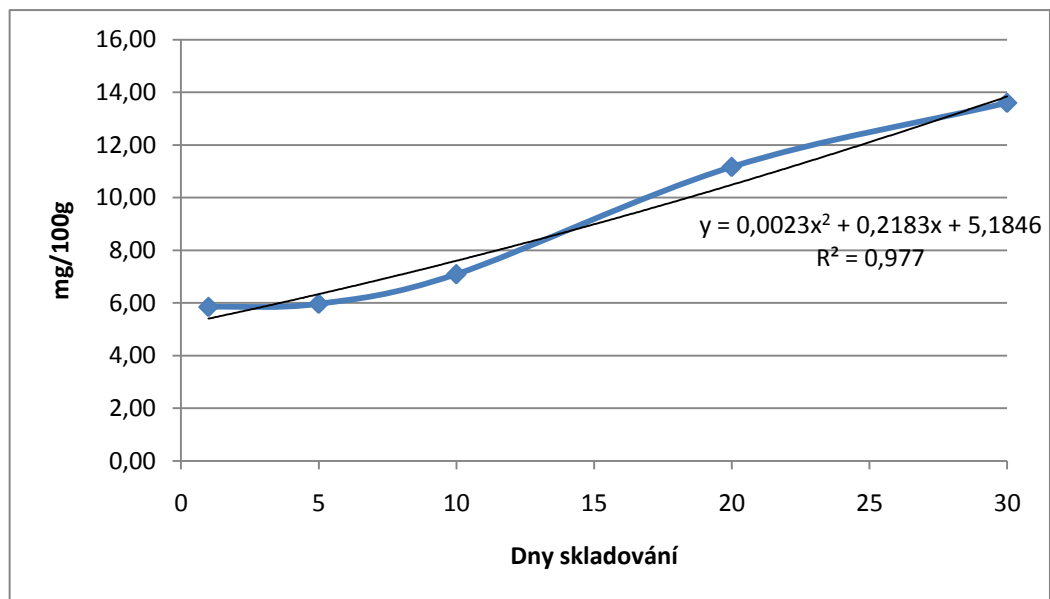
Obr. 23 Obsah volné kyseliny tridekanové ve vzorcích jogurtu s 16 % obsahem sušiny

### 5.6.3 Obsah volné mastné kyseliny myristové

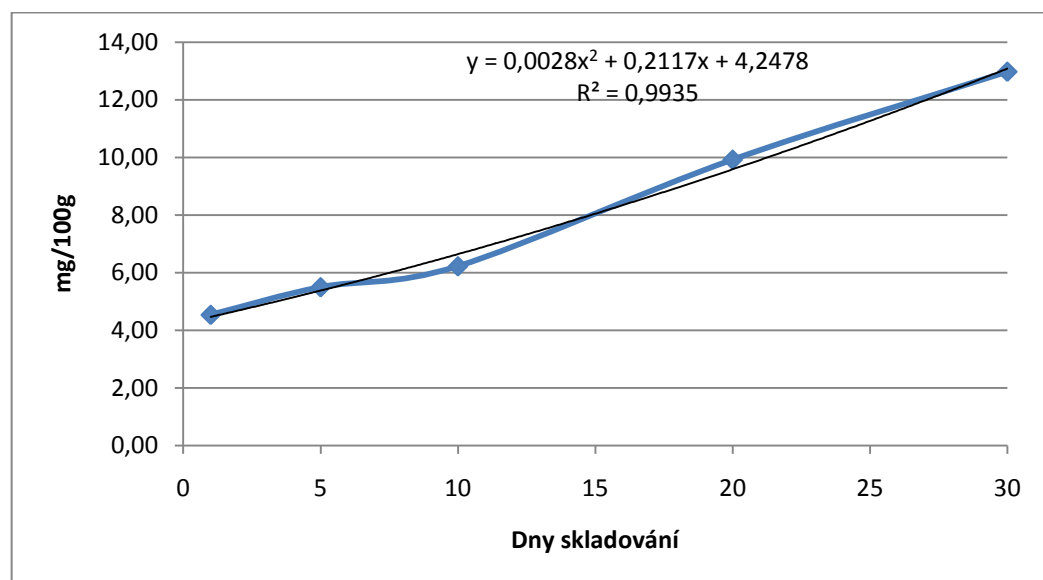
Tab. 10 Obsah volné mastné kyseliny myristové (mg/100g) v průběhu skladovacího pokusu u vzorků jogurtů s různým obsahem sušiny

Obsah sušiny v jogurtu	Den skladování				
	1.	5.	10.	20.	30.
	průměr ± S.E.	průměr ± S.E.	průměr ± S.E.	průměr ± S.E.	průměr ± S.E.
10 %	5,84 ± 0,301 <sup>a</sup>	5,96 ± 0,340 <sup>ab</sup>	7,10 ± 0,156 <sup>ab</sup>	11,17 ± 0,432 <sup>c</sup>	13,60 ± 0,506 <sup>d</sup>
12 %	4,53 ± 0,392 <sup>a</sup>	5,49 ± 0,522 <sup>ab</sup>	6,22 ± 0,178 <sup>ab</sup>	9,92 ± 0,401 <sup>c</sup>	12,98 ± 0,469 <sup>d</sup>
14 %	6,38 ± 0,363 <sup>a</sup>	8,06 ± 0,400 <sup>ab</sup>	8,39 ± 0,318 <sup>ab</sup>	10,86 ± 0,260 <sup>c</sup>	12,39 ± 0,461 <sup>c</sup>
16 %	7,48 ± 0,432 <sup>a</sup>	7,85 ± 0,481 <sup>ab</sup>	9,27 ± 0,412 <sup>abc</sup>	10,39 ± 0,521 <sup>c</sup>	14,20 ± 0,229 <sup>d</sup>

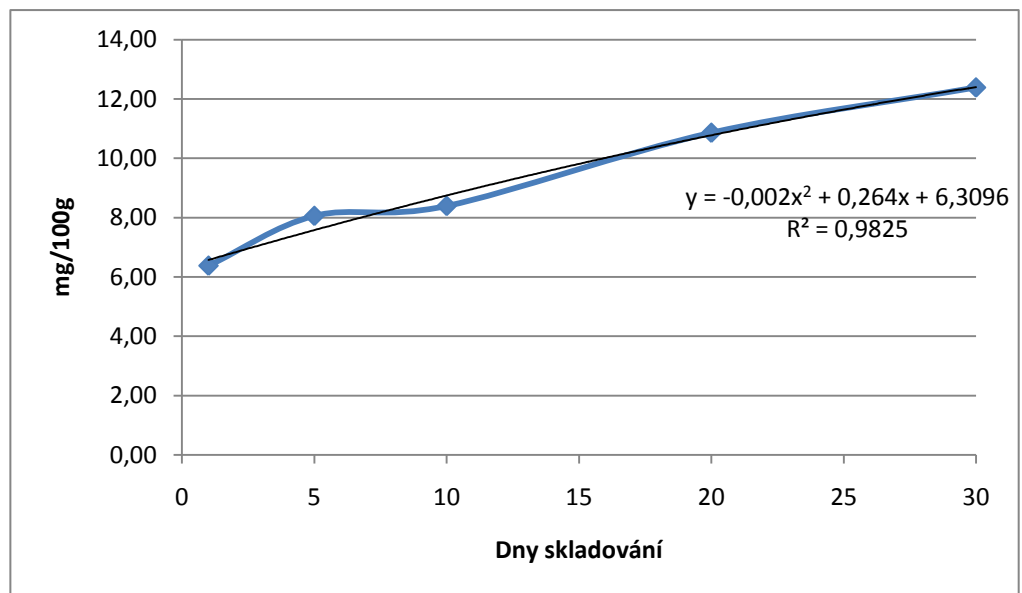
<sup>a,b,c,d</sup> ... hodnoty na řádku se stejným písmenem v horním indexu nejsou statisticky významné ( $P \leq 0,05$ )



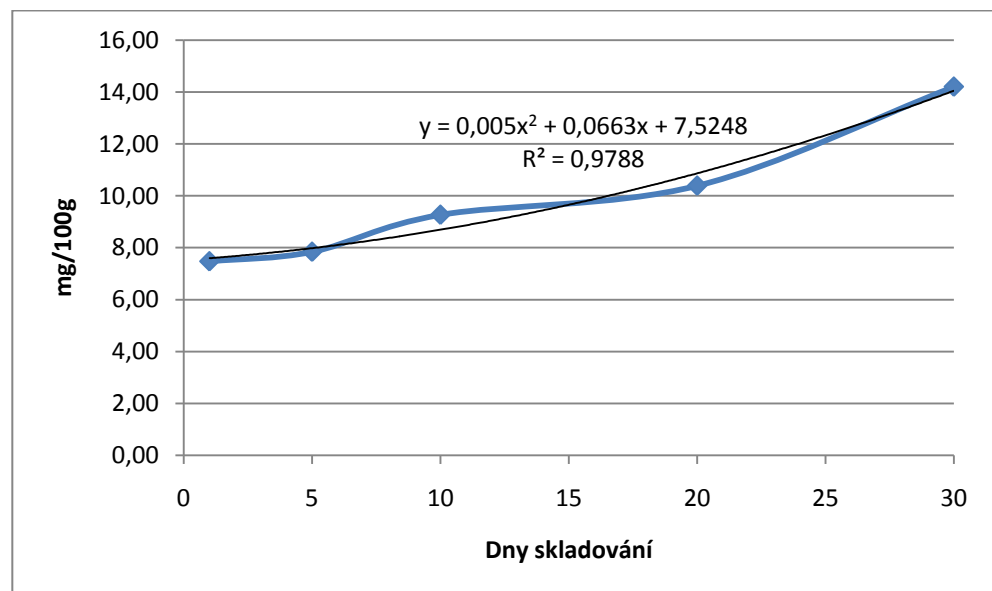
Obr. 24 Obsah volné kyseliny myristové ve vzorcích jogurtu s 10 % obsahem sušiny



Obr. 25 Obsah volné kyseliny myristové ve vzorcích jogurtu s 12 % obsahem sušiny



Obr. 26 Obsah volné kyseliny myristové ve vzorcích jogurtu s 14 % obsahem sušiny



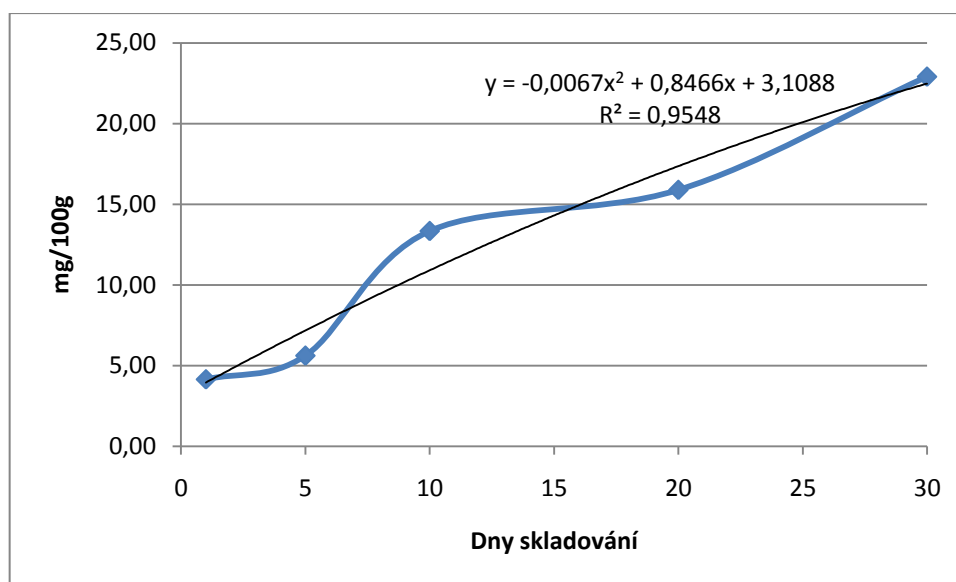
Obr. 27 Obsah volné kyseliny myristové ve vzorcích jogurtu s 16 % obsahem sušiny

### 5.6.4 Obsah volné mastné kyseliny palmitové

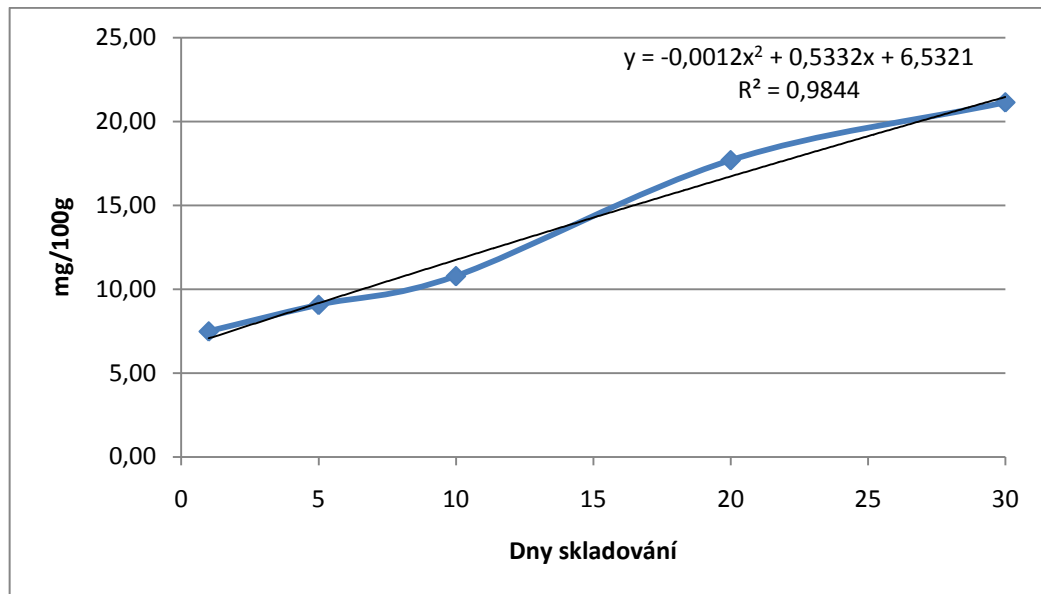
Tab. 11 Obsah volné mastné kyseliny palmitové (mg/100g) v průběhu skladovacího pokusu u vzorků jogurtů s různým obsahem sušiny

Obsah sušiny v jogurtu	Den skladování				
	1.	5.	10.	20.	30.
	průměr ± S.E.	průměr ± S.E.	průměr ± S.E.	průměr ± S.E.	průměr ± S.E.
10 %	4,13 ± 0,237 <sup>a</sup>	5,60 ± 0,092 <sup>a</sup>	13,33 ± 0,405 <sup>b</sup>	15,88 ± 0,527 <sup>c</sup>	22,91 ± 0,461 <sup>d</sup>
12 %	7,48 ± 0,556 <sup>a</sup>	9,06 ± 0,170 <sup>ab</sup>	10,78 ± 0,236 <sup>b</sup>	17,69 ± 0,677 <sup>c</sup>	21,14 ± 0,421 <sup>d</sup>
14 %	4,23 ± 0,456	10,45 ± 0,322	12,75 ± 0,243	21,60 ± 0,271	23,74 ± 0,870
16 %	4,05 ± 0,480 <sup>a</sup>	7,15 ± 0,392 <sup>b</sup>	12,94 ± 0,541 <sup>c</sup>	22,11 ± 0,641 <sup>d</sup>	26,48 ± 1,324 <sup>d</sup>

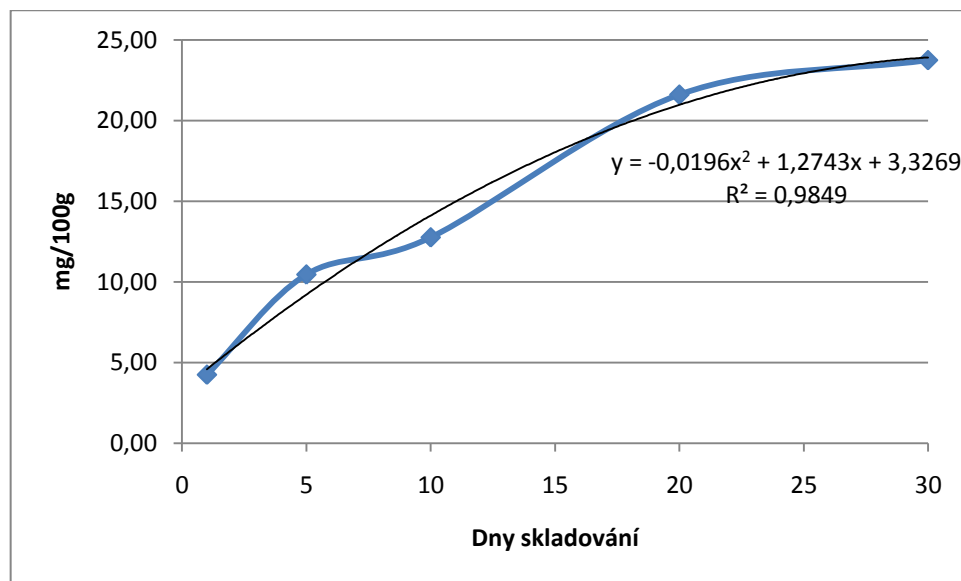
<sup>a,b,c,d</sup> ... hodnoty na řádku se stejným písmenem v horním indexu nejsou statisticky významné ( $P \leq 0,05$ )



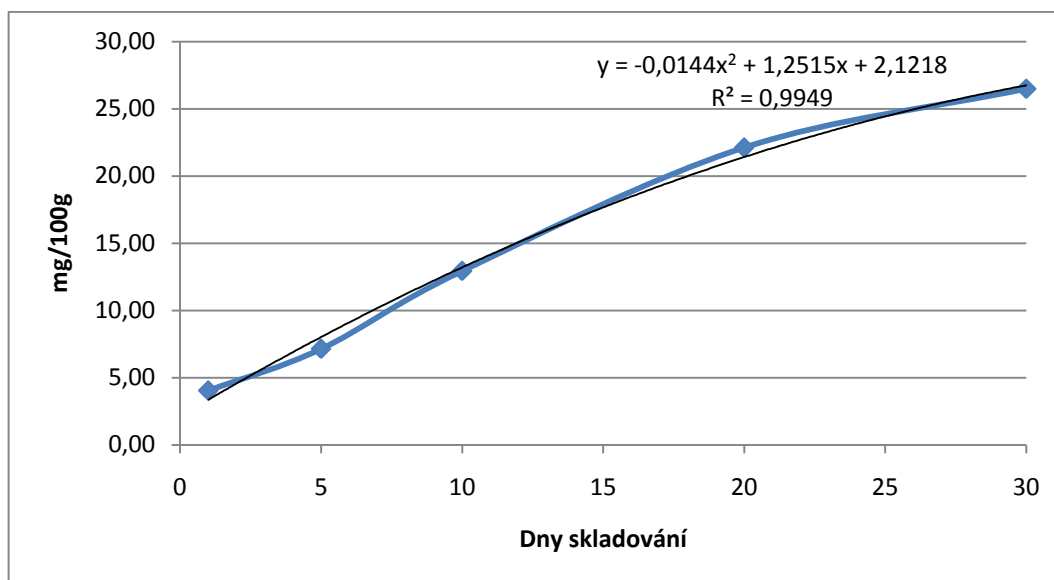
Obr. 28 Obsah volné kyseliny palmitové ve vzorcích jogurtu s 10 % obsahem sušiny



Obr. 29 Obsah volné kyseliny palmitové ve vzorcích jogurtu s 12 % obsahem sušiny



Obr. 30 Obsah volné kyseliny palmitové ve vzorcích jogurtu s 14 % obsahem sušiny



Obr. 31 Obsah volné kyseliny palmitové ve vzorcích jogurtu s 16 % obsahem sušiny

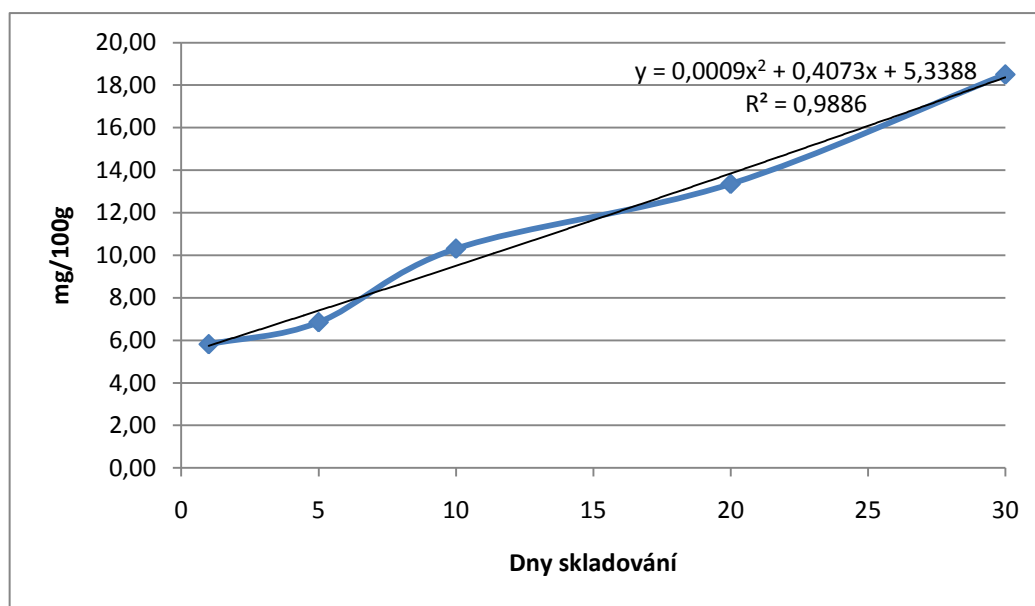
### 5.6.5 Obsah volné mastné kyseliny olejové

Tab. 12 Obsah volné mastné kyseliny olejové (mg/100g) v průběhu skladovacího pokusu u vzorků jogurtů s různým obsahem sušiny

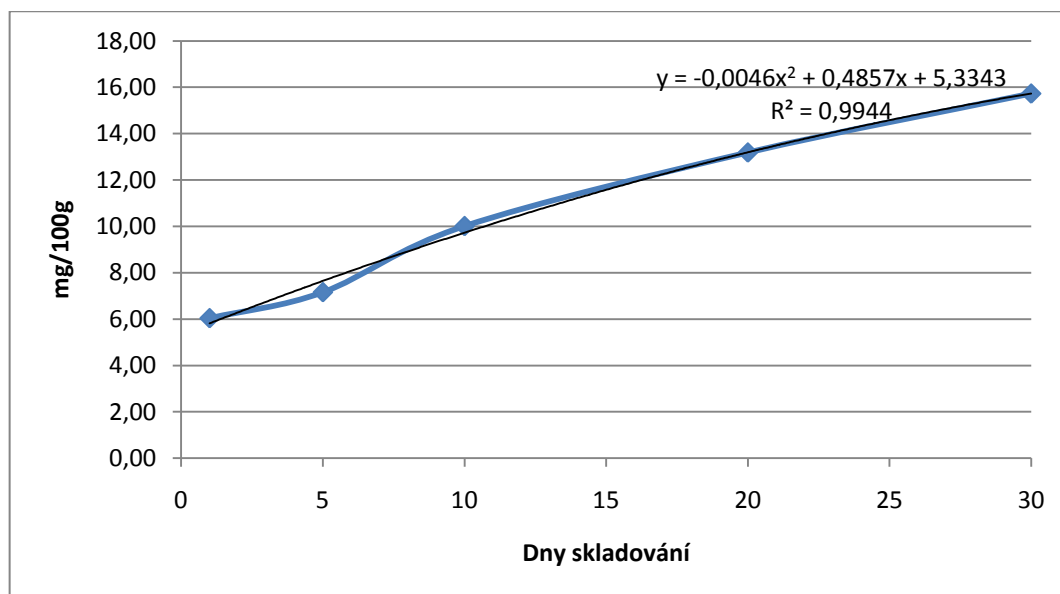
Obsah sušiny v jogurtu	Den skladování				
	1.	5.	10.	20.	30.
	průměr ± S.E.	průměr ± S.E.	průměr ± S.E.	průměr ± S.E.	průměr ± S.E.
10 %	5,82 ± 0,085 <sup>a</sup>	6,85 ± 0,227 <sup>a</sup>	10,31 ± 0,218 <sup>b</sup>	13,36 ± 0,265 <sup>c</sup>	18,51 ± 0,338 <sup>d</sup>
12 %	6,04 ± 0,139 <sup>a</sup>	7,16 ± 0,172 <sup>b</sup>	10,01 ± 0,238 <sup>c</sup>	13,18 ± 0,368 <sup>d</sup>	15,72 ± 0,220 <sup>e</sup>
14 %	6,67 ± 0,277 <sup>a</sup>	8,11 ± 0,265 <sup>a</sup>	11,79 ± 0,197 <sup>b</sup>	13,32 ± 0,277 <sup>c</sup>	16,17 ± 0,562 <sup>d</sup>
16 %	7,20 ± 0,394 <sup>a</sup>	10,69 ± 0,622 <sup>b</sup>	14,36 ± 0,436 <sup>c</sup>	15,86 ± 0,534 <sup>c</sup>	18,21 ± 0,466 <sup>d</sup>

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

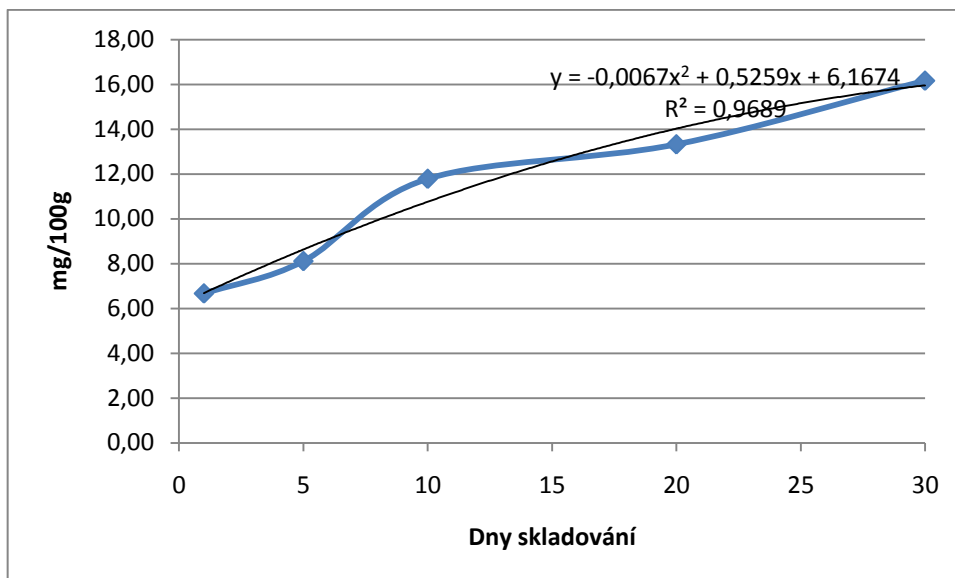




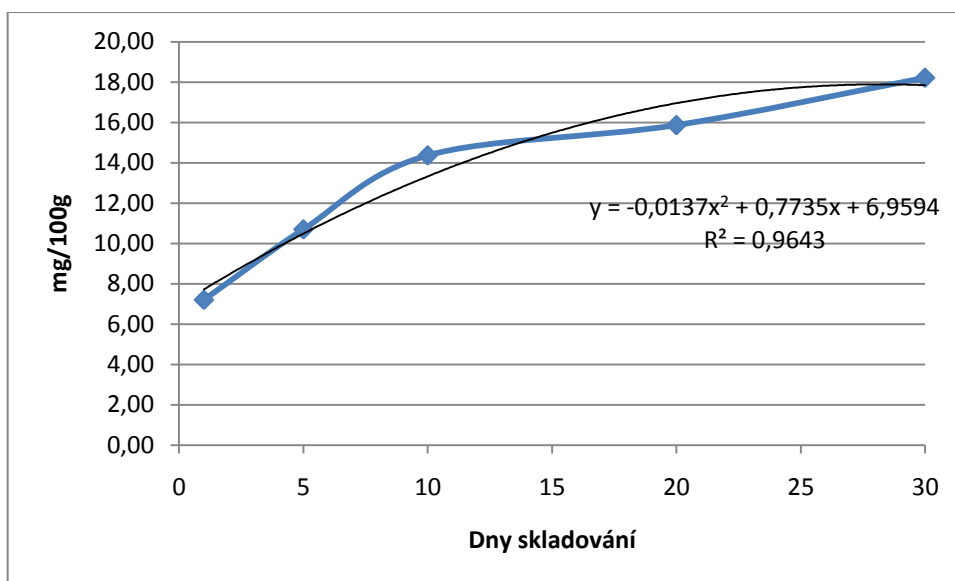
Obr. 32 Obsah volné kyseliny olejové ve vzorcích jogurtu s 10 % obsahem sušiny



Obr. 33 Obsah volné kyseliny olejové ve vzorcích jogurtu s 12 % obsahem sušiny



Obr. 34 Obsah volné kyseliny olejové ve vzorcích jogurtu s 14 % obsahem sušiny



Obr. 35 Obsah volné kyseliny olejové ve vzorcích jogurtu s 16 % obsahem sušiny

## 5.7 Diskuze a závěr

Z výsledků uvedených v předcházející kapitole je patrné, že ve vzorcích jogurtů, byly stanoveny následující volné mastné kyseliny:

### 5.7.1 Valerové kyseliny (Obsah volné mastné kyseliny valerové

- Tab. 8, Obr. 16, Obr. 17, Obr. 18, Obr. 19)
- Tridekanové kyseliny (Tab. 9, Obr. 20 Obsah volné kyseliny tridekanové ve vzorcích jogurtu s 10 % obsahem sušiny Obr. 21, Obr. 22, Obr. 23)
- Myristové kyseliny (Tab. 10, Obr. 24, Obr. 25, Obr. 26, Obr. 27)
- Palmitové kyseliny (Tab. 11, Obr. 28, Obr. 29, Obr. 30, Obr. 31 Tab. 11 Obsah volné mastné kyseliny palmitové (mg/100g) v průběhu skladovacího pokusu u vzorků jogurtů s různým obsahem sušiny)
- Olejová kyseliny (Tab. 12 Obsah volné mastné kyseliny olejové (mg/100g) v průběhu skladovacího pokusu u vzorků jogurtů s různým obsahem sušiny Obr. 32, Obr. 33, Obr. 34, Obr. 35)

S rostoucí dobou skladování dochází k nárůstu obsahu volných mastných kyselin u všech vzorků jogurtů. Tento fakt může být způsoben probíhající enzymatickou lipolýzou TAG na jednotlivé volné mastné kyseliny [22]. V roce 2007 byly publikovány výsledky podobného skladovacího pokusu [68] s tím rozdílem, že se jednalo o slaný jogurt (turecký) s kozího mléka. Z výsledků tohoto pokusu taktéž vyplynul rostoucí trend volných mastných kyselin, kdy ve třicátém dni skladování došlo ke stagnaci nárůstu jejich obsahu. Tato stagnace u 30. Dne skladování se také projevila v našem skladovacím pokusu, což je patrné z grafického zobrazení výsledků.

Pro modelaci trendu vývoje obsahu volných mastných kyselin ve vzorcích jogurtů byla použita polynomičká funkce.

## ZÁVĚR

Hlavním cílem diplomové práce bylo stanovení obsahu volných mastných kyselin ve vzorcích jogurtů. Ze sušeného polotučného mléka byly připraveny vzorky jogurtů o sušině 10 %, 12%, 14 % a 16 %. Skladovací pokus v chladírenské teplotě ( $6 \pm 2$  °C) trval celkem 30. dní a vzorky byly analyzovány 1., 5., 10., 20. a 30. den skladování. Předmětem analýz bylo stanovení pH a obsahu volných mastných kyselin.

V průběhu skladování došlo k poklesu pH, u všech zkoumaných vzorků se 30. den blížilo pH hodně 4,1. Tento pokles pH byl předpokládán, jelikož působením bakterií mléčného kvašení dochází k fermentaci laktosy na kyselinu mléčnou, která je hlavním faktorem snižujícím pH. Další faktor, který by mohl ovlivnit pH, jsou volné mastné kyseliny. Výsledky této práce ukazují na rostoucí trend v obsahu volných mastných kyselin v jogurtech v průběhu skladování. Rozdíly mezi nárůsty obsahu jednotlivých volných mastných kyselin jsou ve většině případů statisticky významné. Statisticky významné rozdíly, mezi obsahem jednotlivých volných mastných kyselin ve vzorcích jogurtů jsou vyznačeny v tabulkách (Tab. 8, Tab. 9, Tab. 10, Tab. 11, Tab. 12.)

Při extrakci volných mastných kyselin z jogurtu byla použita metoda SPE (Solid Phase Extraction) a po esterifikaci volných mastných kyselin na methylestery byly tyto následně stanoveny metodou GC-FID.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] Mayes, Peter A.; Botham, Kathleen M. . *Lipids of Physiologic Significance*. Knowel [online]. 2003, 14, [cit. 2011-03-27]. Dostupný z WWW: <knowel.com>.
- [2] *Informační centrum bezpečnosti potravin* [online]. 2009 [cit. 2011-05-09]. Fermentace. Dostupné z WWW: <<http://www.agronavigator.cz/az/vis.aspx?id=92242>>.
- [3] Tamime, A.Y. ; Robinson, R.K. . *Yoghurt*. 1999. Cambridge : Published by Woodhead Publishing Limited, 1999. 619 s. ISBN 1855733994.
- [4] *77 Vyhláška* [online]. Ostrava : Nakladatelství ekonomické a právní literatury Ostrava, 2003 [cit. 2011-03-27]. Sbírka zákonů. Dostupné z WWW: <<http://www.sagit.cz/pages/sbirkatxt.asp?zdroj=sb03077&cd=76&typ=r>>.
- [5] Tamime, A.Y.; Robinson, R.K. (2007). *Tamime and Robinson's Yoghurt - Science and Technology (3rd Edition)*.. Woodhead Publishing. Online version available at:  
[http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?\\_EXT\\_KNOVEL\\_DISPLAY\\_bookid=3001&VerticalID=0](http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=3001&VerticalID=0)
- [6] Drdák, M., et al. *Základy potravinářských technologií*. Bratislava : Malé centrum, 1996. 512 s. ISBN 80-967064-1-1.
- [7] Kadlec, Pavel, et al. *Technologie potravin II.*. 1. vyd. Praha : Vysoká škola chemicko-technologická Praha, 2007. 236 s. ISBN 80-7080-510-2.
- [8] Simeonová, Jana; INGR, Ivo; Gajdůšek, Stanislav . *Zpracování a zbožiznalství živočišných produktů*. Brno : Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2003. 124 s. ISBN 978-80-7157-708-9.
- [9] Tamime, A.Y.; Robinson, R.K. (1999). *Yoghurt Science and Technology (2nd Edition)*.. Woodhead Publishing. Online version available at:  
[http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?\\_EXT\\_KNOVEL\\_DISPLAY\\_bookid=158&VerticalID=0](http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=158&VerticalID=0)
- [10] *Homogenizace mléka, deaerace mléka* [online]. Praha : VŠCHT, 2005. 7 s. Referát. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. Dostupné z WWW: <[http://eso.vscht.cz/cache\\_data/1206/www.vscht.cz/tmt/studium/tmv/tmv\\_podklady03.pdf](http://eso.vscht.cz/cache_data/1206/www.vscht.cz/tmt/studium/tmv/tmv_podklady03.pdf)>.
- [11] Fox, P.F.; McSweeney, P.L.H. Milk lipids. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. 1998, 97-77281, s. 5-37.

- [12] Valášek, Pavel; Rop, Otakar. *Základy konzervace potravin : doplňkové texty k základnímu kurzu*. Zlín : Univerzita Tomáše Bati, 2007. 1 CD-ROM ; s. ISBN 978-80-7318-587-9.
- [13] Rop, Otakar; Valášek, Pavel; Hoza, Ignác. *Teoretické principy konzervace potravin I*. Vyd. 1. Zlín : Univerzita Tomáše Bati, 2005. 130 s. ISBN 80-7318-339-0.
- [14] Hrabě, Jan; Březina, Pavel; Valášek, Pavel. *Technologie výroby potravin živočišného původu : bakalářský směr*. Vyd. 1. Zlín : Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2006. 180 s. ISBN 8073184052.
- [15] Lukášová, J.: *Hygiena a technologie mléčných výrobků*, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2001
- [16] Zourari, A.; Accolas, J.P.; Desmazeaud, M.J. *Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria*[online]. France : Station de Recherches Laitières, 1991 [cit. 2011-05-10]. Dostupné z WWW: <[http://lait.dairyjournal.org/index.php?option=com\\_article&access=standard&Itemid=129&url=/articles/lait/pdf/1992/01/lait\\_72\\_1992\\_1\\_1.pdf](http://lait.dairyjournal.org/index.php?option=com_article&access=standard&Itemid=129&url=/articles/lait/pdf/1992/01/lait_72_1992_1_1.pdf)>.
- [17] Gancel, Frederique; Novel, Georges. *Exopolysaccharide Production by Streptococcus salivarius ssp. thermophilus Cultures. 1. Conditions of Production* [online]. France : Universite de Caen, 1994 [cit. 2011-04-09]. Dostupné z WWW: <[http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(94\)77000-4/abstract](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(94)77000-4/abstract)>.
- [18] Adams, M; Moss, M. *Food microbiology*. 3rd ed. Cambridge, UK : RSC Publishing, 2008. 463 s. ISBN 978-0-85404-284-5
- [19] *Potravinářská mikrobiologie I : Mikroorganizmy v potravinářství Distanční text* [online]. UTB Zlín : CEPAC-Morava, 2007 [cit. 2011-04-21]. Dostupné z WWW: <<http://utb.cepac.cz/Screens/Default.aspx>>.
- [20] Peltoniemi, Kirsi; Vestanto, Erkki; Palva, Airi. *Genetic characterization of an oligopeptide transport system from Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. © Springer-Verlag [online]. 2002, 177, [cit. 2011-04-17].
- [21] Šilhánoková, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologii*. Vyd. 3. [i.e. 4.], opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. [i.e. 2. vyd.]. Praha : Academia, 2008. 363 s. ISBN 978-80-200-1703-1
- [22] Wong, Noble P. *FUNDAMENTALS OF DAIRY CHEMISTRY* [online]. U.S. Department of Agriculture : University of Minnesota, 1999. 0-442-20489-2.

- [23] Hui, Y.H. *Dairy Science and Technology Handbook*. Eureka, California : 3006 "S" Street, 1993. ISBN 1-56081-078-5.
- [24] Velišek, Jan. *Chemie potravin I.* Tábor : OSSIS, 1999. 352 s. ISBN 80-902391-3-7.
- [25] Deman, John M. *Principles of Food Chemistry (3rd Edition)*. Springer - Verlag : [s.n.], 1999. 595 s. ISBN 978-1-59124-786-9.
- [26] *CHEMIE TUKŮ A JINÝCH LIPIDŮ: Distanční text* [online]. UTB Zlín : CEPAC-Morava, 2007 [cit. 2011-04-21]. Dostupné z WWW: <<http://utb.cepac.cz/Screens/Default.aspx>>.
- [27] McMurry, J. (2007). *Organická chemie* (6.. vyd.). (J. K. Jonas, Překl.) Brno: VUTIUM
- [28] Frye, C.P.; Kilara, A. *Regulations for Product Standards and Labeling* [online]. Oxford, UK : Dairy Processing & Quality Assurance, 2009 [cit. 2011-04-04]. Dostupné z WWW: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780813804033.ch6/summary>>.
- [29] WILEY, John. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products* [online]. 2005. Shahidi, Fereidoon : [s.n.], 2005 [cit. 2011-04-12]. Dostupné z WWW: <<http://www.knovel.com>>. ISBN 978-1-60119-121-2.
- [30] Flick, E.W. (1998). *Industrial Solvents Handbook (5th Edition)*.. William Andrew Publishing/Noyes. Online version available at:  
[http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?\\_EXT\\_KNOVEL\\_DISPLAY\\_bookid=363&VerticalID=0](http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=363&VerticalID=0)
- [31] Lewis, Richard J., Sr. (2007). *Hawley's Condensed Chemical Dictionary (15th Edition)*.. John Wiley & Sons. Online version available at:  
[http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?\\_EXT\\_KNOVEL\\_DISPLAY\\_bookid=2822&VerticalID=0](http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=2822&VerticalID=0)
- [32] Smith, Jim; Hong-Shum, Lily (2003). *Food Additives Data Book*.. Blackwell Publishing. Online version available at:  
[http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?\\_EXT\\_KNOVEL\\_DISPLAY\\_bookid=1381&VerticalID=0](http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=1381&VerticalID=0)
- [33] Lewis, Richard J., Sr. (2002). *Hawley's Condensed Chemical Dictionary (14th Edition)*.. John Wiley & Sons. Online version available at:  
[http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?\\_EXT\\_KNOVEL\\_DISPLAY\\_bookid=704&VerticalID=0](http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=704&VerticalID=0)

- [34] Lewis, Richard J. Sr. (2004). *Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials (11th Edition) Volumes 1-3.* John Wiley & Sons. Online version available at:  
[http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?\\_EXT\\_KNOVEL\\_DISPLAY\\_bookid=1332&VerticalID=0](http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=1332&VerticalID=0)
- [35] Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. *Chemie potravin*. Vyd. 2. Praha : Vysoká škola chemicko-technologická, 1991. 142 s. ISBN 8070800976.
- [36] Macek K, Michal. *Zastoupení mastných kyselin v semenech lničky seté (Camelina sativa)*. UTB Zlín, 2010. 73 s. Diplomová práce. UTB Zlín.
- [37] VELÍŠEK, Jan; HAJŠLOVÁ, Jana. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor : OSSIS, 2009. 2 s. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [38] JULÁK, Jaroslav. *Úvod do lékařské bakteriologie*. 1. vyd. Praha : Karolinum, 2006. 404 s. ISBN 80-246-1270-4.
- [39] Hui, Y.H. (1993). *Dairy Science and Technology Handbook, Volumes 1-3.* John Wiley & Sons.  
Online version available at:  
[http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?\\_EXT\\_KNOVEL\\_DISPLAY\\_bookid=1196&VerticalID=0](http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=1196&VerticalID=0)
- [40] Tamime, A.Y.; Robinson, R.K. (1999). *Yoghurt Science and Technology (2nd Edition)*. Woodhead Publishing.  
Online version available at:  
[http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?\\_EXT\\_KNOVEL\\_DISPLAY\\_bookid=158&VerticalID=0](http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=158&VerticalID=0)
- [41] Wong, Noble P.; Jenness, Robert; Keeney, Mark; Marth, Elmer H. (1999). *Fundamentals of Dairy Chemistry (3rd Edition)*. Springer - Verlag.  
Online version available at:  
[http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?\\_EXT\\_KNOVEL\\_DISPLAY\\_bookid=938&VerticalID=0](http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=938&VerticalID=0)
- [42] Kotyza, Jaromír, et al. *Úvod do klinice biochemie a enzymologie pro studující lékaře*. Praha : Univerzita Karlova v Praze - Nakladatelství Karolinum, 2007. 156 s. ISBN 978-80-246-1350-5.
- [43] Voet, Donald; VOET, Judith G. *Biochemistry*. 4th ed. Hoboken : John Wiley & Sons, 2011. xxv, 142853 s. ISBN 978-0-470-57095-1
- [44] Diwan, Joyce, Fatty Acid Oxid



- [45] Hoza, Ignác; Budinský, Pavel; Kramářová, Daniela. *Potravinářská biochemie III.*. Vyd. 1. Zlín : Univerzita Tomáše Bati, 2006. 123 s. ISBN 80-7318-396-X.
- [46] Krebs% C5% AFv cyklus. In *Wikipedia : the free encyclopedia* [online]. St. Petersburg (Florida) : Wikipedia Foundation, 2011-05-04, last modified on 2006 [cit. 2011-05-11]. Dostupné z WWW: <[http://cs.wikipedia.org/wiki/Krebs%C5%AFv\\_cyklus](http://cs.wikipedia.org/wiki/Krebs%C5%AFv_cyklus)>.
- [47] Self, Ron (2005). *Extraction of Organic Analytes from Foods - A Manual of Methods.*. Royal Society of Chemistry. Online version available at:  
[http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?\\_EXT\\_KNOVEL\\_DISPLAY\\_bookid=3043&VerticalID=0](http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=3043&VerticalID=0)
- [48] Cornelis, R., Caruso, J.; Crews, H., Heumann, K. (2003). *Handbook of Elemental Speciation - Techniques and Methodology*. John Wiley & Sons. Online version available at:  
[http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?\\_EXT\\_KNOVEL\\_DISPLAY\\_bookid=3010&VerticalID=0](http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=3010&VerticalID=0)
- [49] Klouda, Pavel. *Moderní analytické metody. 2., upr. a dopl. vyd.* Ostrava : Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [50] Solid phase extraction. *Published by Lotus* [online]. 2002, [cit. 2011-04-24]. Dostupný z WWW: <[http://www.forumsci.co.il/HPLC/SPE\\_site.pdf](http://www.forumsci.co.il/HPLC/SPE_site.pdf)>.
- [51] Lee, Philip W. (2003). *Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals, Volumes 1-2.*. John Wiley & Sons. Online version available at:  
[http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?\\_EXT\\_KNOVEL\\_DISPLAY\\_bookid=951&VerticalID=0](http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=951&VerticalID=0)
- [52] Wankat, Phillip C. (1986). *Large-Scale Adsorption and Chromatography, Volumes 1-2.*. Knovel. Online version available at:  
[http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?\\_EXT\\_KNOVEL\\_DISPLAY\\_bookid=1217&VerticalID=0](http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=1217&VerticalID=0)
- [53] Koleske, J.V. *Paint and coating testing manual: fourteenth edition of the Gardner-Sward handbook* [online]. Philadelphia : ASTM International, 1995 [cit. 2011-04-24]. Dostupné z WWW:  
<<http://books.google.cz/books?id=ri6FkY2xvgcC&lpg=PP1&pg=PA4#v=onepage&q&f=false>>.

- [54] Cvačka, Josef . Instrumentace pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii [online]. Praha : Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, 2010 [cit. 2011-04-24]. Dostupné z WWW: <[www.natur.cuni.cz/faculty/veda-a-vyzkum/cvacka/toggleMode](http://www.natur.cuni.cz/faculty/veda-a-vyzkum/cvacka/toggleMode)>.
- [55] Hernychová, Lenka . Základy hmotnostní spektrometrie. In *Základy hmotnostní spektrometrie* [online]. Hradec Králové : Ústav molekulární patologie, Fakulta vojenského zdravotnictví, 2007 [cit. 2011-03-27]. Dostupné z WWW: <[http://www.pmfhk.cz/Prednasky/Hmotnostni\\_spektrometrie\\_08.pdf](http://www.pmfhk.cz/Prednasky/Hmotnostni_spektrometrie_08.pdf)>.
- [56] Suchánková, Jana. PC\_TLC. 2006,[cit. 2011-04-02]. Dostupný z WWW: <[www.fineprint.cz](http://www.fineprint.cz)>.
- [57] Nukleární magnetická rezonance (NMR). In *Nukleární magnetická rezonance (NMR)* [online]. Praha : Matematicko-fyzikální fakulta, 2009 [cit. 2011-05-05]. Dostupné z WWW: <[physics.mff.cuni.cz/vyuka/zfp/txt\\_410.pdf](http://physics.mff.cuni.cz/vyuka/zfp/txt_410.pdf)>.
- [58] Suter, Bea ; GROB, Konrad ; Pacciarelli, Bruno. *Determination of fat content and fatty acid composition through 1-min transesterification in the food sample; principles*. Springer-Verlag. 1997, 204, s. 252 - 258.
- [59] De Jong, Catriens; Badings, Herman T. Determination of free fatty acids in milk and cheese. *Journal of High Resolution Chromatography*. 1990, vol. 13, s. 95 - 97.
- [60] Tamime, A.Y.; Robinson, R.K. *YOGHURT : Science and Technology* [online]. England : Published by Woodhead Publishing Limited, 1999. ISBN 1855733994.
- [61] Kilcawley, K.N., Wilkinson, M.G., Fox, F.P. 2001. *A survey of lipolytic and glycolytic endproducts in commercial Cheddar enzyme-modified cheese*. *J. Dairy Sci.* 84, 66–73.
- [62] Spangelo, A., Karijord, O., Svensen, A., Abrahamsen, R.K. 1986. *Determination of individual free fatty acids in milk by strong anion-exchange resin and gas chromatography*. *J. Dairy Sci.* 69, 1787–1792.
- [63] Christie, W.W. 2003a. *Lipid Analysis, Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids*. 3rd edn, The Oily Press, Bridgwater, England.
- [64] Tuomala, T., Kallio, H. 1996. *Identification of free fatty acids and some other volatile flavour compounds from Swiss cheese using online supercritical fluid extraction-gas chromatography*. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 203, 236–240.

- [65] Deeth, H.C., Fitz-Gerald, C.H., Snow, A.J, 1983. A gas chromatographic method for the quantitative determination of free fatty acids in milk and milk products. *N.Z. J. Dairy Sci. Technol.* 18, 13–20.
- [66] De Jong, C., Badings, H.T. 1990. *Determination of free fatty acids in milk and cheese*. Procedures for extraction, clean up and capillary gas chromatographic analysis. *J. High Res. Chrom.* 13, 94–98.
- [67] Innocente, N., Moret, S., Corradini, C., Conte, L.S. 2000. *A rapid method for the quantitative determination of short-chain free volatile fatty acids from cheese*. *J. Agr. Food Chem.* 48, 3321–3323.
- [68] Güler, Z, Changes in salted yoghurt during storage, *International Journal of Food Science and Technology* 2007, 42, 235–245
- [69] Cídllová, Hana. Destilace. *Masarykova Univerzita, Pedagogická fakulta* [online]. 2007, ff, [cit. 2011-05-12]. Dostupný z WWW: <[http://www.ped.muni.cz/wchem/sm/hc/labtechold/soubory/operace/separacni\\_metody/destilace.pdf](http://www.ped.muni.cz/wchem/sm/hc/labtechold/soubory/operace/separacni_metody/destilace.pdf)>.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

CoA	Koenzym A
NADH	Nikotin adenindifosfát
NAD	Nikotinadenindinukleotid
CoA - SH	Koenzym obsahující
P <sub>i</sub>	Fosfor
FAD	Flavinadenin dinukleotid
FFA	Free fatty acids – volné mastné kyseliny

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obr. 1 Rozklad TAG [44] .....	21
Obr. 2 $\beta$ – oxidace uhlíku C – 3 .....	22
Obr. 3 SPE kolona se stacionární fází .....	26
Obr. 4 Princip eluce .....	27
Obr. 5 SPE aparatura .....	28
Obr. 6 Schéma plynového chromatografu [49] .....	30
Obr. 7 Schéma účinné kapalinové chromatografie .....	33
Obr. 8 Schéma hmotnostní spektrometrie [49] .....	34
Obr. 9 Schéma FTIR [49] .....	35
Obr. 10 Závislost pH jogurtu s obsahem 10% sušiny na době skladování .....	41
Obr. 11 Závislost pH jogurtu s obsahem 12% sušiny na době skladování .....	41
Obr. 12 Závislost pH jogurtu s obsahem 14% sušiny na době skladování .....	42
Obr. 13 Závislost pH jogurtu s obsahem 16% sušiny na době skladování .....	42
Obr. 14 Kolona SPB – PUFA [36] .....	45
Obr. 15 Plynový chromatograf GC-FID [36] .....	45
Obr. 16 Obsah volné kyseliny valerové ve vzorcích jogurtu s 10 % obsahem sušiny .....	47
Obr. 17 Obsah volné kyseliny valerové ve vzorcích jogurtu s 12 % obsahem sušiny .....	47
Obr. 18 Obsah volné kyseliny valerové ve vzorcích jogurtu s 14 % obsahem sušiny .....	48
Obr. 19 Obsah volné kyseliny valerové ve vzorcích jogurtu s 16 % obsahem sušiny .....	48
Obr. 20 Obsah volné kyseliny tridekanové ve vzorcích jogurtu s 10 % obsahem sušiny .....	49
Obr. 21 Obsah volné kyseliny tridekanové ve vzorcích jogurtu s 12 % obsahem sušiny .....	50
Obr. 22 Obsah volné kyseliny tridekanové ve vzorcích jogurtu s 14 % obsahem sušiny .....	50
Obr. 23 Obsah volné kyseliny tridekanové ve vzorcích jogurtu s 16 % obsahem sušiny .....	51
Obr. 24 Obsah volné kyseliny myristové ve vzorcích jogurtu s 10 % obsahem sušiny .....	52
Obr. 25 Obsah volné kyseliny myristové ve vzorcích jogurtu s 12 % obsahem sušiny .....	52
Obr. 26 Obsah volné kyseliny myristové ve vzorcích jogurtu s 14 % obsahem sušiny .....	53
Obr. 27 Obsah volné kyseliny myristové ve vzorcích jogurtu s 16 % obsahem sušiny .....	53
Obr. 28 Obsah volné kyseliny palmitové ve vzorcích jogurtu s 10 % obsahem sušiny .....	54

Obr. 29 Obsah volné kyseliny palmitové ve vzorcích jogurtu s 12 % obsahem sušiny .....	55
Obr. 30 Obsah volné kyseliny palmitové ve vzorcích jogurtu s 14 % obsahem sušiny .....	55
Obr. 31 Obsah volné kyseliny palmitové ve vzorcích jogurtu s 16 % obsahem sušiny .....	56
Obr. 32 Obsah volné kyseliny olejové ve vzorcích jogurtu s 10 % obsahem sušiny .....	57
Obr. 33 Obsah volné kyseliny olejové ve vzorcích jogurtu s 12 % obsahem sušiny .....	57
Obr. 34 Obsah volné kyseliny olejové ve vzorcích jogurtu s 14 % obsahem sušiny .....	58
Obr. 35 Obsah volné kyseliny olejové ve vzorcích jogurtu s 16 % obsahem sušiny .....	58
Obr. 36 Vzorek jogurtu s obsahem 10% sušiny.....	74
Obr. 37 Vzorek jogurtu s obsahem 12% sušiny.....	74
Obr. 38 Vzorek jogurtu s obsahem 14% sušiny.....	75
Obr. 39 Vzorek jogurtu s obsahem 16% sušiny.....	75

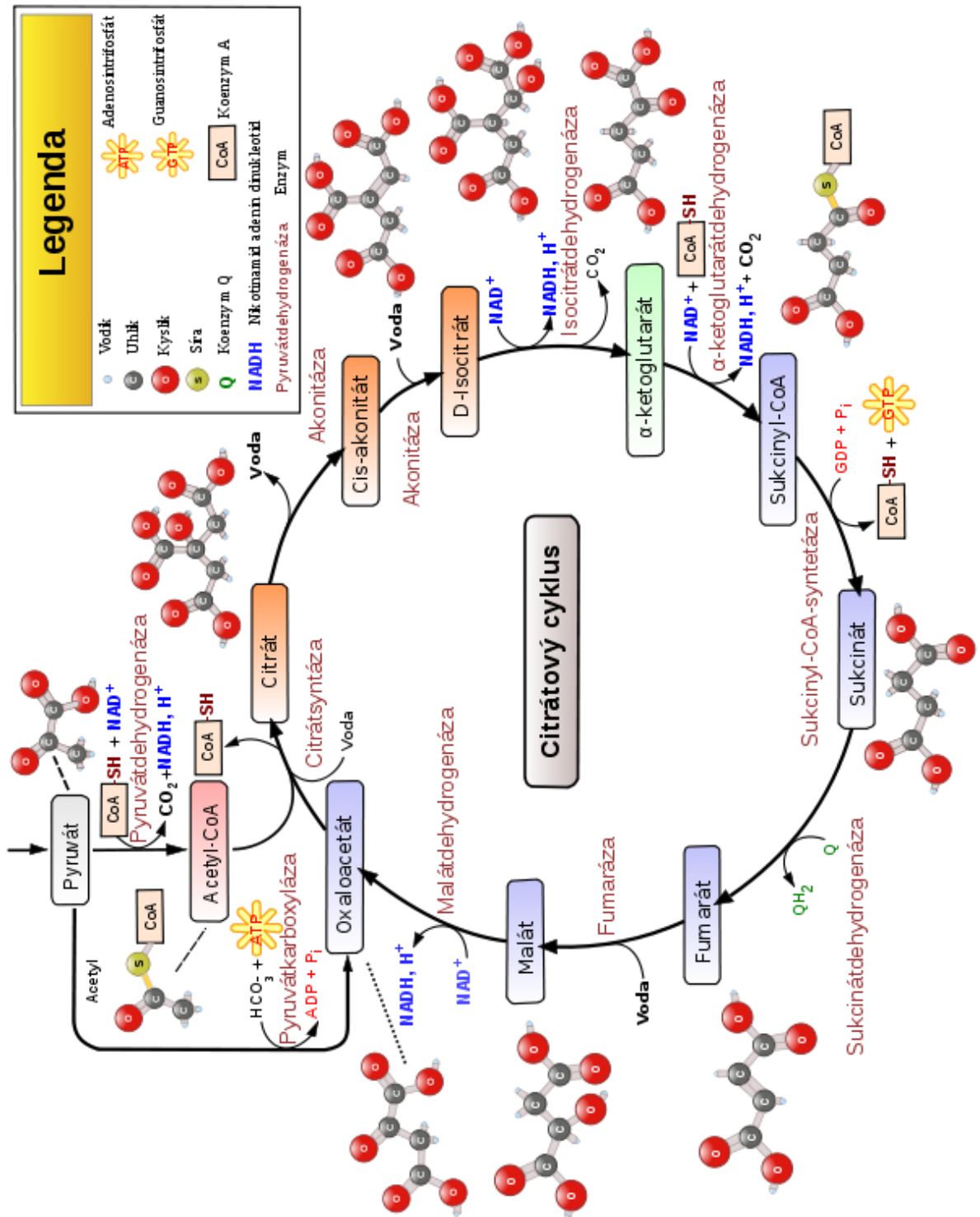
**SEZNAM TABULEK**

Tab. 1 Obsah nasycených mastných kyselin v jogurtech (%) [27].....	16
Tab. 2 Navážka surovin pro přípravu jogurtu při 10 % sušiny.....	38
Tab. 3 Navážka surovin pro přípravu jogurtu při 12 % sušiny.....	39
Tab. 4 Navážka surovin pro přípravu jogurtu při 14 % sušiny.....	39
Tab. 5 Navážka surovin pro přípravu jogurtu při 16 % sušiny.....	39
Tab. 6 pH vzorků jogurtů v jednotlivých dnech skladování.....	40
Tab. 7 Technické parametry GC.....	44
Tab. 8 Obsah volné mastné kyseliny valerové (mg/100g) v průběhu skladovacího pokusu u vzorků jogurtů s různým obsahem sušiny.....	46
Tab. 9 Obsah volné mastné kyseliny tridekanové (mg/100g) v průběhu skladovacího pokusu u vzorků jogurtů s různým obsahem sušiny.....	49
Tab. 10 Obsah volné mastné kyseliny myristové (mg/100g) v průběhu skladovacího pokusu u vzorků jogurtů s různým obsahem sušiny.....	51
Tab. 11 Obsah volné mastné kyseliny palmitové (mg/100g) v průběhu skladovacího pokusu u vzorků jogurtů s různým obsahem sušiny.....	54
Tab. 12 Obsah volné mastné kyseliny olejové (mg/100g) v průběhu skladovacího pokusu u vzorků jogurtů s různým obsahem sušiny.....	56

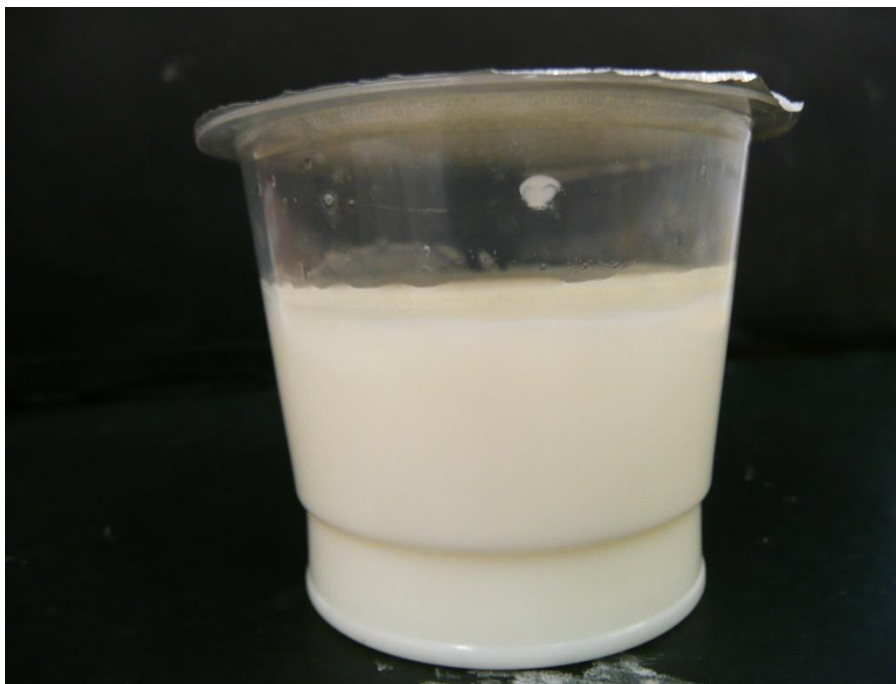
## SEZNAM PŘÍLOH



# PŘÍLOHA P I: CITRÁTOVÝ CYKLUS



**PŘÍLOHA P II:**



Obr. 36 Vzorek jogurtu s obsahem 10% sušiny



Obr. 37 Vzorek jogurtu s obsahem 12% sušiny



Obr. 38 Vzorek jogurtu s obsahem 14% sušiny



Obr. 39 Vzorek jogurtu s obsahem 16% sušiny