

Faktory ovlivňující enzymatické srážení mléka

Irena Stašková

Bakalářská práce
2019

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie potravin
akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Irena Stašková**
Osobní číslo: **T17929**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Faktory ovlivňující enzymatické srážení mléka**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. **Stručný popis procesu při enzymatické tvorbě sraženiny mléka.**
2. **Popis vlivů působících na pevnost gelu mléka vytvořeného enzymatickým srážením.**
3. **Vliv tepelného zpracování na vlastnosti gelu mléka vytvořeného enzymatickým srážením.**

II. Praktická část

1. **Stanovení viskoelastické vlastnosti gelu mléka vytvořeného enzymatickým srážením v průběhu jednohodinového sledování.**
2. **Srovnání vlastnosti gelu v závislosti na různých koncentracích chloridu vápenatého a syřidla.**
3. **Formulace závěrů na základě získaných výsledků.**

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] TAMIME A. Y. Structure of dairy products, Ames, Iowa: Blackwell Pub., 2007. ISBN: 978-1-4051-2975-6.

[2] LAW Barry A. a A. Y. TAMIME. Technology of cheesemaking, 2. nd ed. Malden, MA: Blackwell, 2010. ISBN: 978-1-4051-8298-0.

[3] FOX P. F. Cheese: chemistry, physics and microbiology. 3rd ed. London: Elsevier, 2004. ISBN 0-1226-3653-8.

[4] FOX P. F. Fundamentals of cheese science, Gaithersburg, MD: Aspen Pub., 2000. ISBN: 0-8342-1260-9.

[5] Navrátilová, P., Králová M., Janštová, B., Přidalová, H., Cupáková, Š., Vorlová, L., 2012: Hygiena produkce mléka. Veterinární a farmaceutická universita, Brno, 129s. ISBN: 978-80-7305-625-4.

Vedoucí bakalářské práce: **prof. Ing. František Buňka, Ph.D.**
Ústav technologie potravin

Datum zadání bakalářské práce: **2. února 2019**

Termín odevzdání bakalářské práce: **15. května 2019**

Ve Zlíně dne 2. února 2019

L.S.

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Jiří Miček, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno:

Obor:

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně

.....

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

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

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

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

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

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

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpirá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

V teoretické části této bakalářské práce byla popsána tvorba enzymatické sraženiny mléka, a také charakteristické vlivy na pevnost gelu, například množství syřidla, chloridu vápenatého, tuku, hodnoty pH a teploty. Dále byl podrobně popsán vliv tepelného zpracování na vlastnosti a tvorbu gelu mléka za podmínek vytvořeného enzymatickým srážením. Praktická část bakalářské práce byla orientovaná na laboratorní metody v průběhu jednohodinového sledování a bylo vykonáno srovnání naměřených hodnot v různých koncentracích chloridu vápenatého a syřidla.

Klíčová slova: Mléko, sladké srážení mléka, teplota, pH

ABSTRACT

In the theoretical part of this bachelor thesis the formation of enzymatic coagulum of milk was described, as well as the characteristic effects on gel strength, such are the amount of rennet, calcium chloride, fat, pH and temperature. Further, I described in detail the effect of heat treatment on the properties and formation of milk gel under conditions created by enzymatic coagulation. The practical part of the thesis was focused on laboratory methods during one-hour monitoring and subsequent comparison of measured values in various concentrations of calcium chloride and rennet.

Keywords: Milk, sweet milk coagulation, temperature, pH

Tímto chci poděkovat panu prof. Ing. Františku Buňkovi, Ph.D., vedoucímu bakalářské práce, za odborné vedení, za věnovaný čas a za cenné rady a připomínky při zpracovávání této práce. Dále chci poděkovat paní Ing. et Ing. Ludmile Zálešákové, za pomoc a ochotu při práci v laboratoři a v neposlední řadě děkuji také svým nejbližším za velkou podporu.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 KRAVSKÉ MLÉKO	12
1.1 CHARAKTERISTIKA A SLOŽENÍ KRAVSKÉHO MLÉKA	13
1.2 BÍLKOVINY KRAVSKÉHO MLÉKA	13
1.2.1 Kaseinové bílkoviny.....	14
1.2.2 Syrovátkové bílkoviny	15
2 SYŘIDLA A KOAGULAČNÍ ČINIDLA	16
2.1 DEFINICE A ROZDĚLENÍ SYŘIDEL	16
2.1.1 Syřidla živočišného původu	16
2.1.2 Koagulační činidla rostlinného původu	17
2.1.3 Mikrobiální koagulační činidla	18
2.1.4 Geneticky modifikovaná koagulační činidla.....	18
3 SRÁŽENÍ KRAVSKÉHO MLÉKA	19
3.1 SLADKÉ SRÁŽENÍ MLÉKA.....	19
3.1.1 Primární fáze	19
3.1.2 Sekundární fáze	20
3.1.3 Terciální fáze.....	21
3.2 KYSELÉ SRÁŽENÍ MLÉKA	21
3.3 ETANOLOVÉ SRÁŽENÍ	22
4 POPIS Vlivu PUSOBÍCÍ NA PEVNOST GELU MLÉKA VYTVOŘENÉHO ENZYMATICKÝM SRÁŽENÍM	23
4.1 VLIV PH	23
4.2 VLIV SYŘIDLA	24
4.3 VLIV CHLORIDU VÁPENATÉHO (CaCl ₂)	25
4.4 VLIV TUKU A BÍLKOVIN	25
4.5 VLIV TEPLoty	26
4.5.1 Tepelné ošetření mléka	26
4.5.2 Vliv teploty na sýření	27
II PRAKTICKÁ ČÁST	28
5 CÍL PRÁCE	29
6 MATERIÁL A METODY	30
6.1 PŘÍPRAVA VZORKU.....	30
6.2 REOLOGICKÉ MĚŘENÍ	30
7 VÝSLEDKY A DISKUZE	32

7.1	EXPERIMENT I	32
7.2	EXPERIMENT II.....	36
7.3	SOUHRNNÁ DISKUZE	38
ZÁVĚR		40
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....		41
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....		47
SEZNAM OBRÁZKŮ		48
SEZNAM TABULEK.....		49

ÚVOD

V průběhu enzymatického srážení mléka nastávají specifické změny, které nejsou moc v podvědomí spotřebitelů. Tudíž, základním cílem této bakalářské práce je seznámení a popsání změny gelu mléka ovlivněného tepelným zpracováním a dalšími vlivy, jako jsou pH, chlorid vápenatý, syřidlo, tuk a bílkoviny ovlivňující pevnost gelu mléka vytvořeného právě enzymatickým srážením. Všechny výše uváděné parametry se mohou přirozeně odlišovat, nebo uzpůsobovat při výrobě mléčných výrobků a sýrů tak, aby měly přirozené vlastnosti. V teoretické části se tímto problémem zabývám a dále ho analyzuji.

V praktické části této bakalářské práce zkoumám viskoelastické vlastnosti gelu mléka za působení enzymatického srážení. Dalším cílem bylo sledování vlastnosti gelu, jak se chová při různých koncentracích chloridu vápenatého a syřidla.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 KRAVSKÉ MLÉKO

Pro mléko existuje několik různých definic. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 mléko definuje jako tekutý sekret samic savců, který plní funkci výživy mláďate. [1,2]

Podle mezinárodně uznávaných standardů, které jsou uvedeny pod názvem Codex Alimentarius se za mléko označuje sekret mléčné žlázy zvířat produkujících mléko, získané dojením, do kterého nebylo nic přidáno ani z něho nebylo nic odebráno, které je určeno pro konzumaci v tekutém stavu nebo je určeno k dalšímu zpracování. [3]

V České Republice platí další nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1308/2013, které definuje pojmy mléko a konzumní mléko. Podle tohoto nařízení je mléko produkt získaný dojením jedné nebo více krav. Konzumním mlékem se rozumí výrobek, který je dodáván spotřebiteli v neupraveném stavu [4]. Za konzumní mléka se považují produkty uvedené v tabulce 1.

Tabulka 1: Produkty konzumního mléka definované nařízením Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1308/2013. Upraveno dle Evropského nařízení [4].

Produkt	Charakteristika
syrové mléko	nebylo provedeno tepelné ošetření nad 40 °C nebo jiná ošetření s rovnocenným účinkem
plnotučné mléko se standardizací	tepelně ošetřené mléko s obsahem tuku minimálně 3,50 % (m/m) členské státy si mohou určit další kategorii plnotučného mléka s obsahem tuku nejméně 4,00 % (m/m)
plnotučné mléko bez standardizace	tepelně ošetřené mléko, u kterého nebyl žádným způsobem změněn přirozený obsah tuku a to přidáním, odebráním nebo snížením. Obsah tuku u takového mléka nesmí být menší než 3,50 % (m/m)
polotučné mléko	tepelně ošetřené mléko s obsahem tuku nejvýše 1,80 % (m/m) a nejméně 1,50 % (m/m)
odstředěné mléko	tepelně ošetřené mléko nejvýše 0,50 % (m/m)

1.1 Charakteristika a složení kravského mléka

Chemické složení kravského mléka má vliv na jeho kvalitu, chuť i kvalitu produktů z něho vyrobených. Ukazatele, které zásadním způsobem chemické složení kravského mléka ovlivňují, je velké množství. Mezi základní faktory patří plemeno skotu a jeho genetický potenciál. Dále pak to je výživa, způsob chovu, aktuální zdravotní stav, pořadí a fáze laktace. Kravské mléko obsahuje 86,0 - 88,0 % (m/m) vody a 12,0 - 14,0 % (m/m) sušiny. Sušina svým složením pak specifikuje vlastní chemické složení kravského mléka a jeho kvalitu [2,6]. Průměrné složení sušiny kravského mléka je shrnuto v tabulce 2.

Tabulka 2: Průměrné složení sušiny kravského mléka. Upraveno dle [2,6].

Základní složky sušiny	Množství [hmotnostní %]
dusíkaté látky	3,3 - 3,6
tuk	3,5 – 5,5
laktóza	4,5 – 5,0
vitamíny, minerální látky, enzymy, hormony	0,7 – 0,8

1.2 Bílkoviny kravského mléka

Bílkoviny určují základní fyzikálně - chemické vlastnosti mléka. Zároveň mají podstatný vliv i na technologické vlastnosti mléka a to zejména na jeho termostabilitu, syřitelnost a kysací schopnosti. Velmi důležitou biologickou hodnotu dodávají mléku bílkoviny a jsou nejvýznamnější z nutričního hlediska. [2,7]

Hrubé bílkoviny, obsažené v kravském mléce, jsou nejkomplexnější složkou mléka a jsou označovány jako dusíkaté látky [2,7]. Dusíkaté látky obsažené v kravském mléce jsou z 90 - 95 % tvořeny čistými bílkovinami. Zbývající část připadá na ostatní (nebílkovinné) dusíkaté látky. Mezi látky nebílkovinné povahy patří produkty metabolismu, jako např. močovina, amoniak, kreatin, kyselina močová, lipoproteiny a enzymy. [8]

Mléčné bílkoviny dále dělíme podle schopnosti srážet se při pH 4,6 na kaseinové a syrovátkové (sérové). Sirovátkové bílkoviny jsou rozpustné při pH 4,6 a teplotě 30 °C. Setrvávají v koloidním roztoku a následně odchází do syrovátky. U kaseinových bílkovin snížením na pH 4,6 při teplotě 30 °C se docílí izoelektrického bodu kaseinového komplexu u kyselého srážení. Problematikou srážení se podrobněji zabývá kapitola 3. Obě skupiny

bílkovin jsou heterogenní proteiny a obsahují několik individuálních bílkovin. U kravského mléka je poměr kaseinových a syrovátkových proteinů stanoven přibližně na 4:1. [2,9]

V kravském mléce je kaseinový komplex složen ze 4 frakcí, známých jako α_{s1} -, α_{s2} -, β - a κ - kasein. K syrovátkovým proteinům řadíme: α - laktalbumin, β - laktoglobulin, sérum albumin, imunoglobuliny, proteózo - peptony, laktoferin a jiné. [9]

1.2.1 Kaseinové bílkoviny

Z cca 80 % čistých bílkovin jsou tvořeny kaseinové bílkoviny. Z chemického hlediska se jedná o komplex frakcí fosfoproteinů. Kaseinové frakce mají schopnost se vzájemně sdružovat do větších celků, které nazýváme micelami. [2]

Kaseiny jsou tvořeny čtyřmi frakcemi α_{s1} -, α_{s2} -, β - a κ - kasein v zastoupení 45, 10, 34 a 11 % celkového obsahu kaseinu v kravském mléce. Frakce α_{s1} -, α_{s2} - a β - kaseiny s vápenatými ionty tvoří sraženinu. [9]

α_{s1} - kasein - tvoří nerozpustnou sůl v přítomnosti vápenatých iontů. Jedná se o nejvíce citlivou frakci ve spojitosti k vápenatým iontům. [2,10]

α_{s2} - kasein - obdobně jako α_{s1} - kasein tvoří v přítomnosti vápenatých iontů nerozpustnou sůl. Její citlivost vůči vápenatým iontům je ale o něco nižší. [2,10]

β - kasein - jedná se o nejvíce hydrofobní kaseinovou frakci, ze čtyř základních kaseinových frakcí (nicméně má i hydrofilní segment). V přítomnosti vápenatých iontů za běžných teplot výroby, se tvoří nerozpustná sůl. Při teplotách kolem 1 °C se nerozpustná sůl netvoří. [2]

κ - kasein - se nesráží v přítomnosti vápenatých iontů. Stabilizuje α_{s1} -, α_{s2} - a β - kasein v přítomnosti vápenatých iontů a tím vytváří tzv. ochranný koloid. κ - kasein jako jediný glykoprotein obsahuje pouze jeden fosfoserinový zbytek a tím se liší od ostatních kaseinových frakcí. V molekule κ - kaseinu jsou velmi důležité aminokyseliny fenylalanin a metionin v poloze 105 - 106. Mezi těmito aminokyselinami existuje peptidová vazba, která je štěpena enzymem chymosinem, tzv. syřidlem (podrobněji rozebráno viz kapitola 2.1.2). [2,11]

1.2.2 Syrovátkové bílkoviny

Na syrovátkové bílkoviny připadá 20 % čistých bílkovin. V mléce se syrovátkové bílkoviny vyskytují ve formě koloidního roztoku. Řadí se k hydrofilním koloidům a mají globulární charakter. Vyšší nutriční hodnota syrovátkových bílkovin je dána skutečností, že mají vyšší obsah sирných aminokyselin. [12,13]

Syrovátkové bílkoviny dělíme na α - laktalbumin (25 % sérových bílkovin), β - laktoglobulin (50 % sérových bílkovin), sérum albumin, imunoglobuliny, proteózo - peptony, laktoferrin a transferin. [2]

β - laktoglobulin - jedná se o nejvýznamnější syrovátkovou bílkovinu. Rozpouští se ve zředěných roztocích solí (NaCl). Dosahuje vysokých hodnot aminokyselin, lysinu, valinu, cysteinu a cystinu. Při několika sekundovém zahřátí > 70 °C nevratně denaturuje. Na vlastnosti mléka a jeho vhodnost pro další zpracování má tato denaturace zásadní dopad. [2,10,14]

α - laktalbumin - je druhá nejvýznamnější syrovátková bílkovina. Jde o bílkovinu rozpustnou ve vodě oproti předcházejícímu β - laktoglobulinu, který je nerozpustný ve vodě. Je relativně stabilní a denaturuje při teplotách > 100 °C. [15,16]

Imunoglobuliny - hlavní jejich význam spočívá v přenosu imunity z matky na mládě. Denaturují při zahřevu 74 °C s výdrží 15 sekund. Tento přenos se realizuje prostřednictvím například kolostra (až 1,2 %). Pokud se však v „normálním“ mléce vyskytuje zvýšená hladina, je to známka onemocnění dojnice, což vede ke zhoršení kysacích schopností mléka. Imunoglobuliny inhibují bakterie mléčného kvašení, které následně nezksašují laktosu. U zdravých dojnic („normální mléko“) je koncentrace velmi nízká. [2,17]

Sérum albumin - při zánětlivých onemocněních se vyskytuje v mléce. Z celkového počtu syrovátkových bílkovin je zastoupen pouze v malém množství. [18]

2 SYŘIDLA A KOAGULAČNÍ ČINIDLA

V následující kapitole budou podrobněji definovány syřidla, které jsou využívány při zpracování mléka. Syřidlo musí splňovat požadavky nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1332/2008 ze dne 16. prosince 2008 o potravinářských enzymech. [22]

2.1 Definice a rozdělení syřidel

V mlékárenském průmyslu mají syřidla klíčový význam při zpracování mléka. Syřidlo je obecný pojem pro proteinázy používané ke srážení mléka. Proteinázy, které sráží mléko, vyžadují vhodné podmínky, které srážení ovlivňují jako je např. pH a teplota. [23]

Syřidla mají zásadní vliv na kvalitu sýřeniny, včetně výtěžnosti při jejich výrobě. Syřidla dokáží rozštěpit κ - kasein, čímž dojde k vysrážení a oddělení syrovátky a tím se tvoří základní proces při výrobě a kvalitě sýrů. [11,23]

Za klasický syřidlový enzym označujeme chymosin. Syřidlový enzym se dříve získával z žaludků sajících telat. Chymosin je účinnou částí syřidla a v mléce způsobuje polotuhou sraženinu. Takový proces se nazývá sladké srážení a využívá se v mlékárenském průmyslu při výrobě „sladkých sýrů“. [11]

Další možnost získávání může být pomocí geneticky získávaných koagulačních činidel, mikrobiologické cesty, použitím kvasinek, bakterií a plísní. [16]

2.1.1 Syřidla živočišného původu

Z telecích nebo jehněčích žaludků jsou vyráběná přírodní syřidla. Jedná se o extrakt enzymatických látek, získaných ze slézu (čtvrtého žaludku) telat, případně jiných sajících mláďat ve stáří 4 dnů až 3 měsíců. [29]

Ke srážení mléka má dostatečnou proteolytickou aktivitu enzym chymosin. Pro-chymosin, který je vyměšován v telecím žaludku, je působením proteolýzy přeměněn na aktivní formu. [30]

Chymosin se využívá pro výrobu tvrdých sýrů s dlouhou dobou zrání. Kromě chymosinu vylučují přežvýkavci i enzym pepsin, který je však pro srážení mléka nevhodný. Získává se ze žaludků dospělých hospodářských zvířat. V kyselém prostředí žaludku má silnou proteolytickou aktivitu enzym pepsin, který má též schopnost srážet mléko. Navíc výrobky z pepsinového koagulačního činidla mají nahořklou chuťovou stopu. [30]

U čerstvě narozených telat je v jejich žaludku chymosin dominantní proteináza. Dominance chymosinu trvá až do 10. případně 20. týdne. Mladá telata mají malý podíl pepsinu (5 - 20 %) a vysoký podíl chymosinu (80 - 95 %). Podíl chymosinu klesá s věkem až do dospělosti zvířat, např. u dospělého býka se nachází pouze ve stopovém množství. Dospělý skot má mnohem více pepsinu [26]. Na trhu se objevily i jiné náhražky koagulačních činidel, jako prasečí nebo kuřecí pepsin, které však neměly většího využití. Lze tedy říct, že náhražky koagulačních činidel v porovnání s telecím syřidlem dávají nejen jinou chuť sýrům, ale též poskytují nižší výnosy. [30]

2.1.2 Koagulační činidla rostlinného původu

Bílá tekutina, která vzniká v mléčnicích některých rostlin, např. ze stromů kaučovníku se může nazývat „latex“. „Latex“ z fíkovníků je jeden z prvních historicky doložených rostlinných koagulantů. Jsou používány hlavně v oblastech, které produkují fíky. [25]

V plodech, semenech, latexu a také v míze rostlin se mohou vyskytovat rostlinné proteinázy, jejichž největší výskyt je v listech a květech rostlin. [25]

Enzymy rostlinného původu průmyslově vyrobených je stále málo, avšak mají snahu pomalu růst. Zvyšující se spotřeba rostlinných koagulačních činidel pomalu, ale jistě snižuje poptávku po živočišných syřidlech. Důvodem může být náboženství, etické důvody (Judaismus, Islám), případně stravování (vegani). [25,28]

Z různých rostlin lze extrahovat různé výtažky, které mají různě účinnou schopnost srážet mléko. Některé výtažky jsou však příliš proteolytické. Jedná se např. o papain z papájí, bromelain z ananasu a ricin ze semen ricinového oleje. K výrobě sýrů se též používají rostlinné proteázy, jako je papain a bromelain. Mají na kasein takový nespecifický účinek, který může vést ke vzniku nepřijatelné chuti v sýrech. [28]

Z květu rostliny Artyčoku kardového (*Cynara cardunculus*) se získává enzym, který se jeví již odedávna jako vhodný enzym ke srážení mléka a následné výrobě sýrů. [26]

Mezi další rostlinná koagulační činidla patří: Kopřiva dvoudomá (*Urtica dioica*), Jestřabi-
na lékařská (*Galega officinalis*), Pcháč rolní (*Cirsium arvense*), Pcháč obecný (*Cirsium vulgare*). [26]

Ke srážení rostlinného mléka se používají rostlinná koagulační činidla, některá získaná z Artyčoku zeleninového (*Cynara scolymus*) nebo Svízele syřišťového (*Galium verum*), Os-

tropeštrce mariánského (*Silybum marianum*). Výše jmenovaná rostlinná syřidla dokáží vysrážet i kravské mléko. [27]

2.1.3 Mikrobiální koagulační činidla

Neustále zvyšující se spotřeba syřidla vedla vědecký výzkum k nutnosti jeho vývoje pomocí některých mikroorganismů. Na základě výzkumu došlo k výrobě mikrobiálního koagulačního činidla pomocí plísní, kvasinek a bakterií. Právě mikrobiální koagulační činidla jsou v dnešní době alternativou k chymosinovým syřidlům připravovaných při výrobě sýrů. Zabezpečují maximální výtěžnost sýra, srážení mléka a jsou zpravidla vhodné pro všechny druhy sýrů. Během zrání u zrajících sýrů probíhá ve stejné míře odbourání kaseinu, včetně vývoje vůně a chuti, jako při použití živočišného chymosinu. V sýrařské výrobě převažuje využití mikrobiálních koagulačních činidel: *Rhizomucor miehei*, *Cryphonectria parasitica*. [26,31]

2.1.4 Geneticky modifikovaná koagulační činidla

V dnešní době se nejvíce využívají geneticky modifikované mikroorganismy pro výrobu sýrů. Z hlediska nižších výrobních nákladů je výhodná výroba geneticky získaných koagulačních činidel [33]. Geneticky modifikované mikroorganismy jsou takové, u kterých byl pozměněn proteolytický systém. Využívají se také pro výrobu telecího chymosinu, který produkuje tento enzym fermentací. [24]

Koagulační činidla produkovaná geneticky modifikovanými mikroorganismy, jejichž příkladem mohou být druhy, jako: *Aspergillus niger*, *Escherichia coli*, *Kluyveromyces lactis*. [23]

3 SRÁŽENÍ KRAVSKÉHO MLÉKA

Základní technologická vlastnost mléka umožňující výrobu sýrů, tvarohů a kaseinů, je jeho schopnost srážení. Jedná se o schopnost změny stavu koloidního roztoku (solu) ve sraženinu (gel). Sekundárním jevem činnosti je další postupná synerese sraženiny. Tímto způsobem pak dochází k odvodu syrovátky. Existuje celá řada způsobů srážení mléka, některé však nejsou využitelné z důvodu poškození zdraví spotřebitele (např. použití octanu olovnatého). Rozlišujeme dvě základní srážení: kyselé a sladké neboli enzymatické. [19,20]

3.1 Sladké srážení mléka

Jedná se o základní a důležitý proces v mlékárenském průmyslu při výrobě sýrů. Velmi podstatnou součástí pro enzymatické srážení je v kaseinovém komplexu κ - kasein. Ten se vůči přítomnosti Ca^{2+} iontů nesráží. Hlavní součástí syřidla je enzym nazývaný chymosin (renin), který účinkuje v mléce za vzniku pevné sraženiny. Chymosin rozštěpí peptidovou vazbu mezi 105 a 106 aminokyselinou (Phe - Met) v κ - kaseinu. [26]

Jednotlivé fáze srážení mléka syřidlem. [26]

Celý proces srážení mléka syřidlem lze rozdělit na tři fáze, které jsou následující:

- ✓ primární fáze - neboli enzymová, dochází při ní k porušení κ - kaseinu (ochranného koloidu), který má za úkol stabilizovat kaseinové micely,
- ✓ sekundární fáze - nazývána taky koagulační fází, u které dochází působením Ca^{2+} iontů ke tvorbě sraženiny. Sekundární fáze je závislá na teplotě,
- ✓ terciární fáze - při které se uskutečňuje nesespecifická proteolýza bílkovin. [2,34]

3.1.1 Primární fáze

V primární části působením syřidla (chymosinem) dochází k hydrolýze κ - kaseinu a rozštěpení na dvě části. První část κ - kaseinu je hydrofobní, má afinitu k ostatním frakcím, a proto se v přítomnosti Ca^{2+} iontů vysráží společně s ostatními kaseinovými frakcemi. Označuje se jako para - κ - kasein (frakce 1 až 105 aminokyseliny). Druhá část se označuje jako κ - kaseinmakropeptid (frakce 106 až 169 aminokyseliny) [35,36]. κ - kaseinmakropeptid je hydrofilní (díky sacharidické složce), nemá žádnou afinitu k ostatním kaseinovým frakcím, odchází se syrovátkou a je rozpustný v roztocích Ca^{2+} iontů. [36]

Rozštěpením κ - kaseinu dochází ke ztrátě schopnosti stabilizovat kaseinový komplex. Pravděpodobně všechny hlavní typy syřidel hydrolyzují κ - kasein mezi Phe105 - Met106 vazbou. Výjimku tvoří enzym extrahovaný z *Cryphonectria parasitica*, který štěpí Ser104 - Phe105 vazbu. [37]

Vazba Phe - Met je u κ - kaseinu mnohonásobně citlivější na účinek syřidla, než kterékoliv jiné vazby kaseinu. Při hydrolýze však není vazba Phe - Met tolik důležitá. Se stejnou aminokyselinovou sekvencí jako má κ - kasein byl zkoumán vliv vazby Phe - Met a její působení chymosinu na krátké peptidy. [23]

3.1.2 Sekundární fáze

Pokud je mléko sražené za běžných podmínek pH, obsah bílkovin a viskozita se nezvyšují. Většina micel seskupených do krátkých řetězců začnou agregovat a tvořit síť v okamžiku 100 % času srážení mléka, což ale není podstatné. Micely se následně začnou shlukovat a vytvářet gel, pokud dojde k 60 - 85 % hydrolýze κ - kaseinu. Mléko se začíná srážet ještě před kompletním enzymatickým rozštěpením κ - kaseinu (tedy 60 - 85 %) a začíná sekundární fáze srážení. [23,38]

Účinkem primární fáze se destabilizují micely a snižuje se jejich negativní náboj, čímž ztrácejí svůj hydratační obal. Rozštěpený κ - kasein ve vztahu k ostatním frakcím ztrácí svůj stabilizační účinek proti jejich vysrážení, působením vápenatých iontů. Na stupeň pevnosti koagulátu má zásadní vliv koncentrace Ca^{2+} iontů. [39]

V nativní kaseinové micelle spojuje vápník jednotlivé frakce intramicelárně. Při koagulaci spojuje vápník jednotlivé frakce extramicelárně. Na počátku koagulace jsou micely orientovány nahodile. V průběhu gelace se nejprve řadí do řetězců, následně přechází do trojrozměrné struktury. [39]

Srážení je časově limitované zpravidla do 50 minut (optimum 20 - 40 minut) a řízené nejen množstvím přidaného syřidla podle požadavku na výrobu. Při nedodržení časového limitu přechází sekundární fáze v terciální. [2]

3.1.3 Terciální fáze

Nastává působením syřidla po delší dobu, než je požadováno pro sekundární fázi. V tomto případě dochází ke štěpení nejen para - κ - kaseinu, ale i α_{s1} - a β - kaseinu. Jde o pomalé a nežádoucí štěpení, které je dále v sýrech zpomalováno přidavkem NaCl. Nežádoucí reakce, které probíhají v této fázi, pak mohou mít nepříznivý vliv jak na snížení výtěžnosti při výrobě sýrů, tak na vznik chuťových vad. Nahořklou chuť, která je nežádoucím jevem, způsobují nejen některé proteolytické štěpy odtokem do syrovátky, ale i proteázy, které produkují zákysové nebo nezákysové mikroorganismy. [40]

3.2 Kyselé srážení mléka

Kyselé srážení mléka spočívá ve snižování pH, a to z přirozeného pH 6,6 na hodnotu blízkou se bodu pH 4,6, a nižší. Hodnotu pH 4,6 nazýváme izoelektrickým bodem kaseinového komplexu, který je limitujícím bodem pro tzv. kyselé srážení mléka. [2, 26]

Kaseinové micely v běžných podmínkách mléka mají selektivně negativní náboj, vzájemně na sebe působí odpuzivými silami, které zabraňují jejich přiblížení a agregaci. Tudíž se navenek micela chová jako negativně nabitý útvar. [2]

Snižováním pH dochází i ke snížení záporného náboje micel. Kasein se v mléce nachází jako koloidní fosforečnan vápenatý. Uvolňuje se koloidní fosforečnan vápenatý a kasein se stává destabilizovaným. V oblasti pH 5,5 - 5,0 nastává velmi intenzivní disociace koloidního fosforečnanu vápenatého. Dalším snížením pH na tzv. izoelektrický bod kaseinu, dojde k vyrovnání počtu kladných a záporných nábojů a výsledný náboj bílkoviny je neutrální. Nastává snížení odpuzivých sil hydratačního obalu. Dosažením izoelektrického bodu se destabilizované kaseinové micely přestanou odpuzovat a dochází k jejich vysrážení. Vzniká tak polotuhý koagulát - gel. [21,26,36]

Pro kyselé srážení mléka je optimální teplota mléka pohybující se nad 20 °C. Rychlejší tvorba sraženiny s hrubším charakterem nastává při teplotě srážení < 40 °C. Při teplotách > 40 °C je gumovitá, naopak při teplotě < 6 °C se sraženina vůbec nevytváří. [23]

3.3 Etanolové srážení

Dále ještě lze využít dalšího způsobu srážení kaseinových micel působením etanolu. Etanol narušuje hydrataci volné ochranné vrstvy hydrofilního segmentu κ - kaseinu na kaseinové micelle. Dochází k narušení bílkovin obsažených v likéru, které mohou precipitovat nebo gelovatět, díky tomu etanol narušuje stabilitu. [2]

Tepelná koagulace je dalším způsobem vysrážení bílkovin mléka. Za společného přidání vápenatých iontů a snížení hodnoty pH se tento způsob využívá při výrobě vysrážení směsi kaseinových i sérových bílkovin, tzv. koprecipitáty. [2]

4 POPIS Vlivu PUSOBÍCÍ NA PEVNOST GELU MLÉKA VYTVOŘENÉHO ENZYMATICKÝM SRÁŽENÍM

Při výrobě sýrů je běžnou praxí srážení mléka syřidlem. Syřitelnost je považována za důležitou technologickou vlastnost mléka, protože se podílí na kvalitativní i kvantitativní produkci sýrářny. Mléko srážením přechází z koloidního roztoku do stavu, kdy se tvoří kompaktní sraženina (gel). Na vzniklém koagulátu se na základě subjektivního posouzení provede řez k vyhodnocení jeho vizuálních a texturních vlastností. Procesem koagulace jsou ovlivněny výtěžky sýrů a jejich reologické vlastnosti. Koagulace je závislá na mnoha faktorech, jako jsou koncentrace enzymu, teploty, pH a koncentrace Ca^{2+} iontů. [41]

4.1 Vliv pH

Optimální hodnota pH u kravského mléka je v rozpětí hodnot 6,5 - 6,8. [2]

Na rychlost srážení mléka má v počáteční fázi podstatný vliv jeho kyselost, a proto se jeho pH upravuje. Pokud je pH příliš vysoké nebo příliš nízké, mléko se nesráží. Veškeré úpravy pH mléka se provádí před přidáním syřidla. [41]

Na syřitelnost má podstatný vliv pH mléka. Jedná se o důležitý faktor, který ovlivňuje agregační a enzymatickou reakci při sýření. Má přímý vztah na enzymatickou vazbu koagulantu. Například nejvyšší enzymatickou aktivitu při pH 6,0 má chymosin. pH o něco nižší však požadují některé sýřící enzymy jako je například mikrobiální. [42,43]

Obsah tuku a bílkovin v tomto případě přímo ovlivňuje dobu koagulace. Vyšší obsah těchto složek může též časově zkrátit dobu srážení. Oproti tomu, jsou-li hodnoty pH vysoké, negativně ovlivňují srážení. Mezní hodnota nastává při $\text{pH} > 7,5$, kdy dochází k inaktivaci enzymů a tím mléko ztrácí schopnost se srážet. [42,44]

Mastitidní onemocnění a onemocnění končetin velmi často ovlivňuje hodnotu pH. [45]

Na základě studií Oldfield *et. al.* (2000) [46] došlo k závěru, že β - laktoglobulin je méně stabilní při vyšším pH, zatímco stabilita α - laktalbuminu byla relativně nezávislá na účinku pH. [46]

4.2 Vliv syřidla

Zásadním faktorem s podstatnými účinky v technologii zpracování mléka je jeho záhřev na sýřící teplotu. Sýřící teplota podstatně ovlivňuje správnou funkci enzymu. [47]

Velmi podstatná je i koncentrace použitého syřidla. Můžeme říci, že čím více použijeme koncentrovanější syřidlo, tím dosahujeme podstatně lepší kvality vzniklé sýřeniny. Ovšem s koncentrovanějšími syřidly je třeba pracovat obezřetněji, neboť vyžadují velmi přesné dávkování. Byla zjištěna nepřímá úměra mezi dobou koagulace a množstvím enzymu při teplotách kolem 35 °C a průměrnou koncentrací enzymů [26]. Přesnou dávku syřidla je nutné nastavit dle konkrétních požadavků na druh vyráběného sýra, jelikož s ní souvisí konzistence sýřeniny a synerese, které již souvisejí s výtěžností. [48]

K tvorbě měkkých sýrů je možné použít menší množství syřidla. Doba srážení probíhá zpravidla do 50 minut, kdy teplota by měla být 29 - 32 °C. Více syřidla používáme u tvrdých sýrů, aby tato doba srážení byla během 30 - 35 minut při teplotě mléka 31 - 32 °C. Limitní teplotou je považována teplota < 40 °C. [26,49]

Rychlejší vysrážení a zároveň větší tuhost sýřeniny se získá při vysokých dávkách syřidla. Pokud by došlo k obzvláště vysokým dávkám syřidla, byla by sýřenina těžko zpracovatelná na požadovanou velikost zrna a zároveň by byla její konzistence kožovitá. Kožovitost spočívá ve vzniku velkého množství velmi malých zrn (menší než 1 mm), které tímto odcházejí do syrovátky. Hůře se dosahuje sušiny u sýrů, kdy se zrání mění. Sýry se stávají hořké, vlivem většího množství nakumulované syrovátky a laktózy. Sýry mají sklon k prokysání, vytvářet nepravidelná oka a praskliny. Vzniká křehčí a světlejší sraženina, proto sýry zrají pomaleji. [48]

Opačný způsob - nízké dávky syřidla mají účinek tvorby měkké nekompaktní sraženiny a tím se zhoršuje schopnost synerese. [48]

4.3 Vliv chloridu vápenatého (CaCl₂)

Chlorid vápenatý je do standardizovaného mléka přidáván pro zlepšení syřitelnosti a výtěžnosti sýrů. Dále lze přidavkem chloridu vápenatého pozměnit konzistenci sýřeniny a čas sýření. [19]

Při aplikaci vyššího množství Ca²⁺ iontů se může doba sýření zvyšovat, protože přidavkem CaCl₂ snížíme pH mléka, což má za důsledek zvýšení rychlosti proteinové agregace [50]. Pokud koncentrace CaCl₂ překročí hranici $\geq 0,3$ mol/l, může se doba sýření zvýšit [50]. Rychlost srážení mléka má vliv na kvalitu sýřeniny [48,49]. S rostoucím přidavkem CaCl₂ se zvyšuje pevnost gelu, ale pokud překročí určitou mez, pevnost gelu klesá. [2,50]

4.4 Vliv tuku a bílkovin

Syřitelnost jako taková, je velmi ovlivněna změnou obsahu tuku v mléce [51]. Upravuje se i o obsah tuku, dle určitého druhu vyráběného sýra. Úprava se provádí přidáváním smetany nebo odstředěného mléka. [52]

S rostoucí tučností mléka se rychlost synerese a rychlost koagulace mléka zhoršuje. Zpomaluje se srážení a tvorba gelu, které je ovlivňováno tukovými globulemi. Smršťování sýřeniny negativně ovlivňuje množství tuku v mléce, čím více tuku, tím horší smršťování [53]. Sledování návaznosti obsahu bílkovin, hlavně kaseinu, je důležité, jelikož s vyšším obsahem kaseinu se musí zvýšit i obsah tuku ve standardizovaném mléce. [49]

Při výrobě tvrdých sýrů dochází k míchání a krájení sýřeniny a následkem toho se uvolňuje malé množství z celkového mléčného tuku (~ 6 %) do syrovátky. [53]

Obsah tuku má vliv na hustotu. Můžeme říci, že hustota mléka je závislá na teplotě, složení, bodu i rozsahu tání triacylglycerolů. [54]

Obsah bílkovin v mléce rozhoduje o jeho vhodnosti pro výrobu sýrů. Zároveň je důležitý pro ekonomiku výroby, pokud je v mléce hladina bílkovin zvýšena o 0,1 % znamená to snížení spotřeby mléka na vyrobení 1 kg sýrů, případně tvarohu, podle specifikace výrobku o 0,2 až 0,5 litru. [55]

Množství kaseinu a syrovátkových bílkovin zásadně ovlivňuje technologické vlastnosti mléka. i větším množstvím aspektů. Snížením obsahu kaseinu a zvýšením sérových bílkovin, dále změnou poměru vápníku a fosforu. [56,57]

Syřitelnost mléka je přímo úměrná obsahu bílkovin, která však je závislá od ročního období. V zimním období je obsah bílkovin nejvyšší, v letním období je tomu naopak. Obsah bílkovin v mléce též ovlivňuje obsah tukuprosté sušiny, a to v přímé návaznosti na jednotlivá roční období. [58]

Výtěžnost sýrů a hospodárnost při jeho výrobě, zároveň i snížení ztrát, ovlivňuje docílení požadované kvality sušiny. Jedná se o významný faktor pro hospodárnost a též pro zajištění požadované kvality a trvanlivosti sýrů. [59]

4.5 Vliv teploty

4.5.1 Tepelné ošetření mléka

Výroba sýrů je prakticky i legislativně možná ze syrového mléka, u nás se ve značné míře odehrává z pasterovaného mléka. Při výrobě sýrů ze syrového mléka i tepelně ošetřeného mléka může docházet k vadám chuti, vůně, což je způsobeno přítomností nežádoucích mikroorganismů. [38]

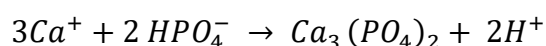
Při výrobě sýrů se nejčastěji používá, tzv. šetrná pasterace, což je při teplotě 71 - 74 °C s výdrží 15 - 20 sekund. Při překročení této teploty se zvyšuje v sýřenině podíl syrovátkových bílkovin, které neodcházejí do syrovátky. Tato skutečnost má sice příznivý vliv na zvyšování výtěžnosti, avšak opačný vliv na možnost dosažení vyšší sušiny sýrů. Vyšší sušina sýru je však jedním ze základních parametrů jejich kvality. [61]

Při použití vysoké pasterace, s teplotou 85 °C s výdrží několika sekund, nastává u kravského mléka denaturace sérových bílkovin, které se váží na κ - kasein. [37,38]

Dochází zde také ke zhoršení přístupu enzymu ke κ - kaseinu, sérové bílkoviny zůstávají zadrženy v sýřenině a také dojde ke zvýšení výtěžnosti sýrů, ovšem i vazbě vody. Za využití vysoké pasterace přechází rozpustné formy vápenatých solí do forem nerozpustných.

Schéma vzniku vápenatých solí. [19,60]

Schéma 1



4.5.2 Vliv teploty na sýření

V sýrařství je zásadním krokem teplota sýřeného mléka. Touto teplotou jsou nejvíce ovlivněny micely a jejich agregace. Teplota může oscilovat v rozpětí 20 - 40 °C, a to na základě typu vyráběného sýra. Teplota sýření ovlivňuje pevnost sýřeniny, agregaci a též zvyšuje rychlost zpevnění gelu. [38,41]

Sýření mléka je ovlivňováno reakcí enzymatické hydrolýzy a fyzikální agregace kaseinových micel. Při velmi nízkých teplotách pod 10 °C je enzym syřidla aktivní a působí na kasein, ale mléko se nesráží. Mezi 10 - 20 °C je koagulace pomalá. Mezi 30 °C a 42 °C je srážení postupné. Při teplotě nad 42 °C začíná srážení klesat a při 55 °C zcela se zastaví. Požadovaná koagulační teplota pro sýření mléka by měla být stálá, optimální interval je 30 - 35 °C. [30,37,60]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Cílem bakalářské práce bylo sledování vývoje pevnosti gelu mléka vytvořeného po dobu 60 minut u vzorků syrového mléka a mléka tepelně ošetřeného dvěma různými teplotními režimy, dále množství chloridu vápenatého a enzymatického syřidla na koagulaci kravského mléka.

Pro docílení výše uvedeného cíle bylo nezbytné:

v teoretické části:

- ✓ popis principu enzymatického srážení mléka,
- ✓ charakterizace účinků dopadajících na pevnost gelu mléka vytvořeného enzymatickým srážením,

v praktické části bylo nutné uskutečnit tyto dílčí cíle:

- ✓ charakterizovat viskoelastické vlastnosti gelu mléka vzniklého enzymatickým srážením,
- ✓ porovnat vlastnosti vzniklého gelu vytvořeného při aplikaci zadaných faktorů (tepelné ošetření mléka, koncentrace chloridu vápenatého a syřidla),
- ✓ vyhodnocení výsledků a formulace závěru.

6 MATERIÁL A METODY

Pro jednotlivá měření bylo použito čerstvě nadojené kravské mléko, které pocházelo z farmy Zlínského kraje.

6.1 Příprava vzorku

Mléko bylo vytemperováno na teplotu $40 \pm 0,1$ °C promícháno a bezprostředně zchlazeno na teplotu 32 °C. Z takto upraveného mléka byl odebrán vzorek syrového mléka, který plnil funkci kontrolního vzorku. Další podíl mléka byl ošetřen daným teplotním režimem. Teplotní režimy ošetření mléka jsou uvedeny v tabulce 3.

V následujícím kroku bylo mléko rozděleno po 40 ml do zkumavek a skladováno do dalšího měření v lednici při teplotě 6 ± 2 °C.

Tabulka 3: Teplotní režimy ošetření mléka.

	Teplota záhřevu [°C]	Doba výdrže [s]
	Experiment I	65
72		20
		40
76		20
		40
80		20
		40
85	20	
Experiment II	Teplota záhřevu [°C]	Doba výdrže [s]
	76	40
	85	20

6.2 Reologické měření

Reologické měření bylo provedeno pomocí reometru HAAKE RheoStress1 (Thermo Scientific, USA) za použití geometrie válec ve válci.

Před každým reologickým měřením byl příslušný vzorek mléka vytemperován na teplotu $40 \pm 0,1$ °C, promíchán a zchlazeno na teplotu 32 °C. Do takto připraveného vzorku mléka byla dávkována daná kombinace poměrů chloridu vápenatého a syřidla a umístěn do geometrie reometru. Použité kombinace poměrů chloridu vápenatého a syřidla jsou uvedeny

v tabulce 4. Po promíchání vzorku v geometrii reometru, bylo na povrch vzorku nanášeno 5 ml oleje pro zabránění odpařování vzorku.

Tabulka 4: Kombinace chloridu vápenatého a syřidla.

Experiment I	Poměr CaCl₂:syřidlo	Množství CaCl₂ [g/litr mléka]	Množství syřidla (950IMCU/ml) [μl/litr mléka]
		1:1	0,1
Experiment II	Poměr CaCl₂:syřidlo	Množství CaCl₂ [g/litr mléka]	Množství syřidla (950IMCU/ml) [μl/litr mléka]
	1:2	0,1	64
	2:1	0,2	32
	2:2	0,2	64

Celé měření bylo zaznamenáváno pomocí softwaru RheoWin a podmínky měření jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5: Podmínky vlastního měření

Podmínky měření	
Frekvence	0,1 Hz
Smyková deformace	0,03 %
Doba měření	60 minut
Geometrie	souosé válce

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

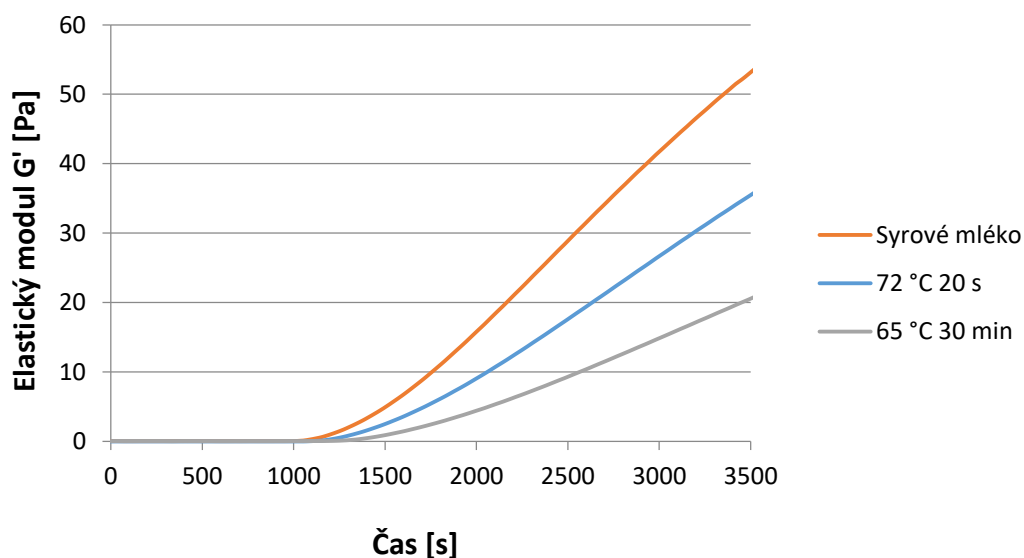
Cílem bakalářské práce bylo sledování vlivu tepelného ošetření mléka, množství chloridu vápenatého a enzymatického syřidla na koagulaci kravského mléka.

Praktická část bakalářské práce byla rozdělena na dva experimenty. V experimentu I byl sledován vliv tepelného ošetření mléka na enzymatické srážení mléka. Pro experiment II byly na základě výsledků experimentu I vybrány teplotní režimy ošetření mléka, a u těchto vzorků byly testovány a porovnány různé kombinace přídatku chloridu vápenatého a syřidla.

7.1 Experiment I

Cílem experimentu I bylo otestovat a porovnat různé tepelné režimy ošetření mléka.

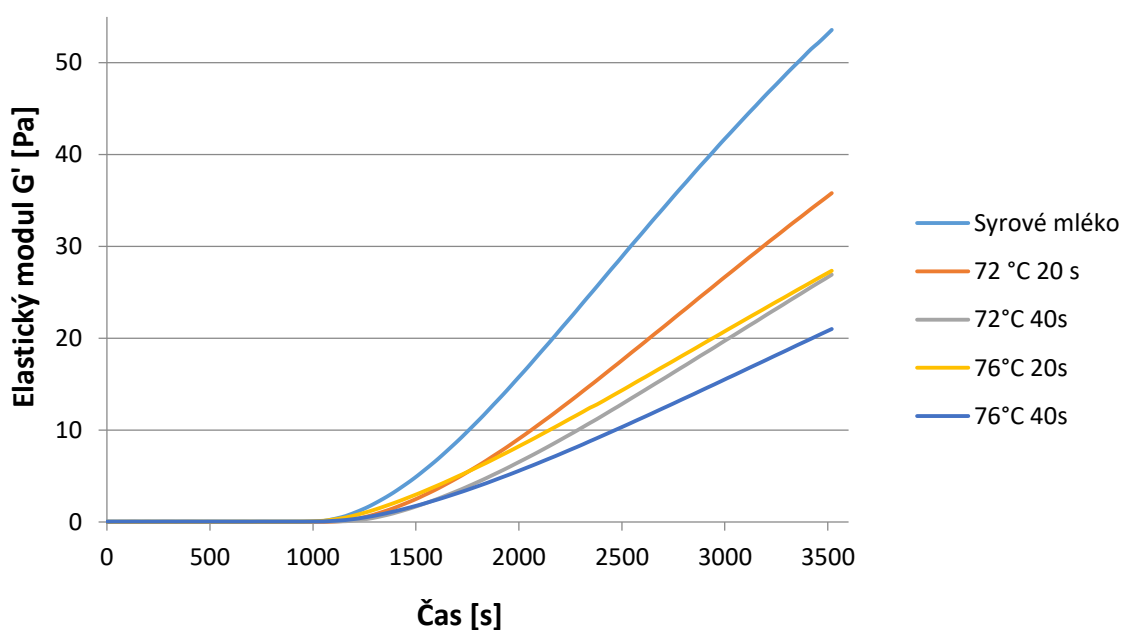
Na obrázku 1 je prezentována závislost elastického modulu pružnosti na čase tvorby gelu po dobu 60 minut u vzorků syrového mléka a mléka tepelně ošetřeného dvěma různými teplotními režimy.



Obrázek 1: Závislost elastického modulu pružnosti G' na čase srážení u mléka syrového a mléka tepelně ošetřeného při teplotě 72 °C 20 sekund a 65 °C 30 minut.

Z výše uvedeného obrázku 1 vyplývá, že u syrového mléka je větší pevnost gelu než u mléka pasterovaného. U tepelně ošetřeného mléka došlo ke snížení rychlosti tvorby gelu a k poklesu maximální hodnoty získané síly gelu.

U syrového mléka je vyšší pevnost gelu, než při tepelném záhřevu na krátkou dobu 72 °C s dobou výdrže 20 sekund. Při čemž záhřev na teplotu 72 °C s dobou výdrže 20 sekund má menší účinek ve srovnání se situací s teplotním záhřevem při teplotě 65 °C po dobu výdrže 30 minut. U syrového mléka byla síla gelu po 60 minut koagulace vyjádřena jako elastický modul pružnosti $G' > 50$ Pa, zatímco u tepelně ošetřeného mléka byla síla gelu $G' > 30$ Pa pro teplotu 72 °C s výdrží 20 sekund a $G' > 20$ Pa pro teplotu 65 °C s výdrží 30 minut.



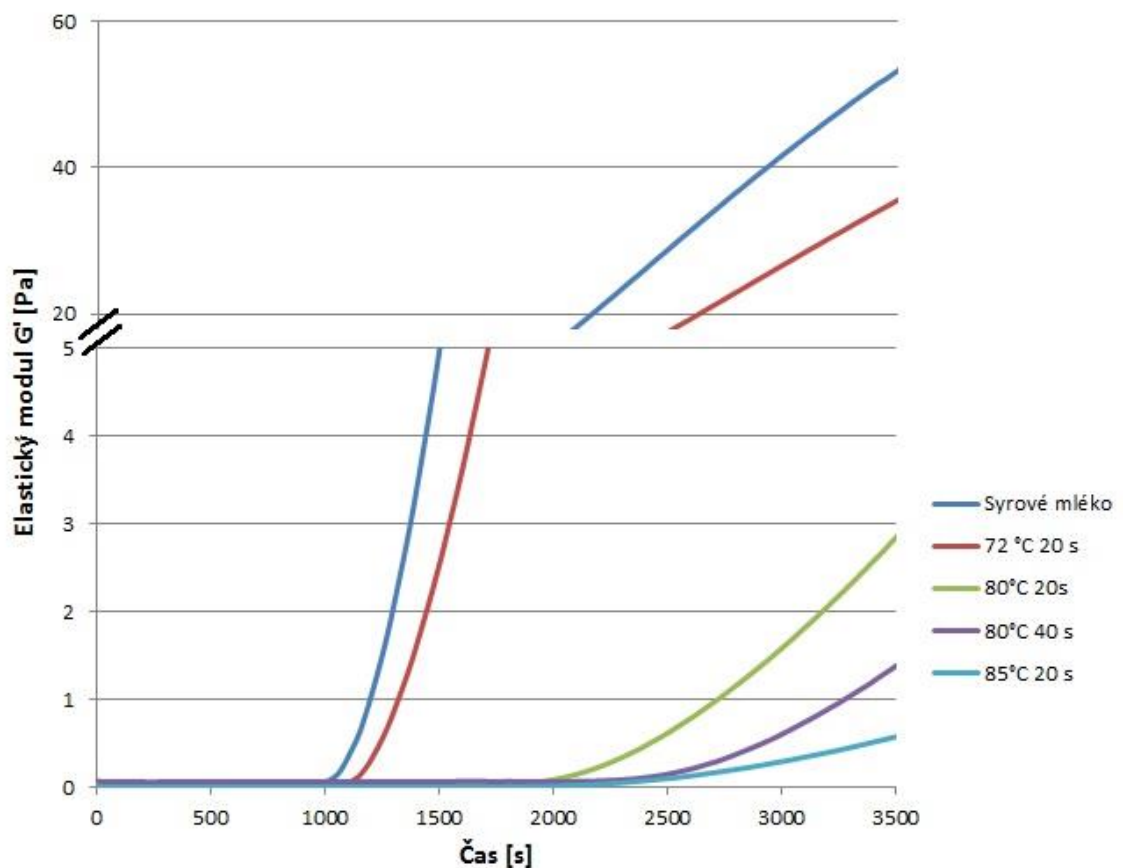
Obrázek 2: Závislost elastického modulu pružnosti G' na čase srážení u syrového mléka a mléka tepelně ošetřeného při teplotě 72 °C s výdrží 20 a 40 sekund a teplotě 76 °C s výdrží 20 a 40 sekund.

Z obrázku 2 je patrné, že při záhřevu na vyšší teplotu s delší dobou výdrže je konečná pevnost gelu nižší. Lze tedy konstatovat, že při tvorbě gelu je kromě teploty tepelného ošetření mléka, důležitá i doba výdrže tepelného záhřevu, která ovlivní rychlost tvorby a sílu vznik-

lého gelu. Je tedy možné pozorovat určitou posloupnost v jeho klesání v závislosti na těchto dvou hodnotách.

Z výsledků vyplývá, že gel u mléka syrového se začal vytvářet již za 1206 sekund \approx 20,1 minut. Při tepelném ošetření mléka, při teplotě 76 °C s výdrží 20 sekund, se gel začal tvořit po 1273,6 sekund \approx 21,2 minut, zatímco při záhřevu na teplotu 72 °C s dobou výdrže 40 sekund se gel vytvořil za 1173 sekund \approx 19,5 minut, což je o 100,6 sekund \approx 1,7 minut později, než při záhřevu na vyšší teplotu s nižší dobou výdrže tepelného záhřevu.

U syrového mléka můžeme pozorovat větší pevnost gelu (charakteristickou strmějším růstem elastického modulu v závislosti na čase), než u tepelně opracovaného mléka (zde nastává pozvolný růst elastického modulu v závislosti na čase). U syrového mléka byla síla gelu po 60 minut koagulace vyjádřena jako elastický modul pružnosti $G' > 50$ Pa. Zatímco u tepelně ošetřeného mléka byla síla gelu $G' > 30$ Pa pro teplotu 72 °C s výdrží 20 sekund, $G' > 25$ Pa pro teplotu 72 °C s výdrží 40 sekund, 76 °C s dobou výdrže 20 sekund a $G' > 20$ Pa pro teplotu 76 °C s výdrží 40 sekund. Z grafu je dále patrné, že gel, který je vytvořen z mlék tepelně ošetřených na teplotu 72 °C s dobou výdrže 40 sekund a 76 °C s dobou výdrže 20 sekund, má srovnatelnou sílu gelu i čas jeho vytvoření.



Obrázek 3: Závislost elastického modulu pružnosti G' na čase srážení u syrového mléka a mléka tepelně ošetřeného při teplotě 72 °C, 80 °C, 85 °C po dobu 20 sekund a 80 °C 40 sekund.

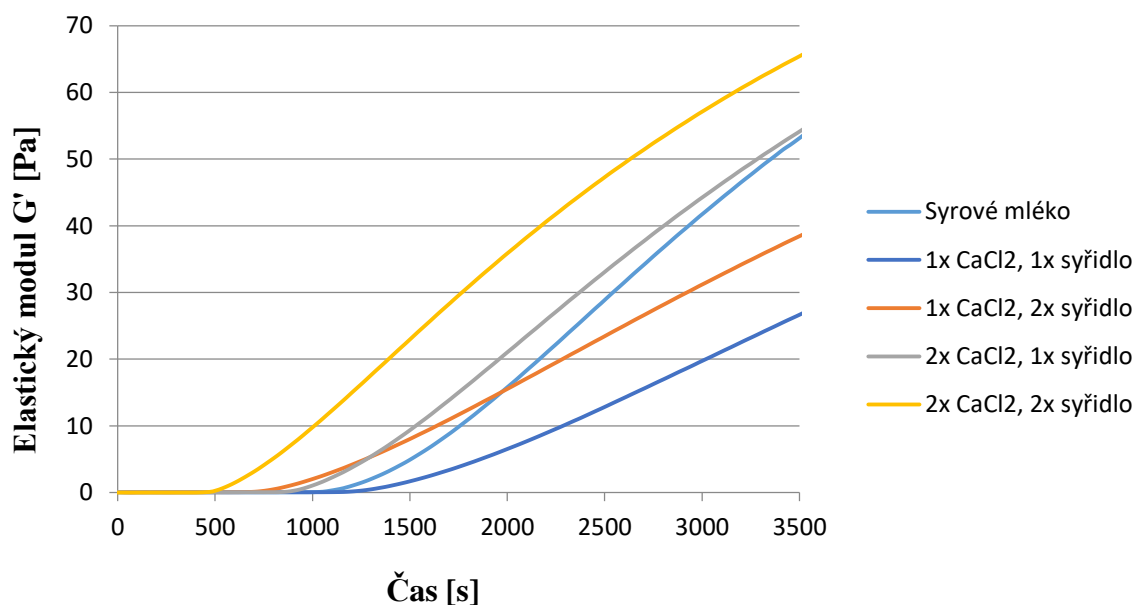
Na obrázku 3 je potvrzeno, že nejpevnější gel vzniká u mléka bez tepelného ošetření, a že se zvyšující se teplotou tepelného záhřevu klesá pevnost vzniklého gelu. Toto tvrzení je podloženo výsledky měření u mléka ošetřeného při teplotě 80 °C a 85 °C s dobou výdrže 20 sekund a při teplotě 80 °C s dobou výdrže 40 sekund. U tepelně ošetřeného mléka nad 80 °C byla síla gelu 2x nižší než u mléka syrového a mléka ošetřeného na teplotu 72 °C po dobu 20 sekund. Pro mléko ošetřené teplotním režimem 80 °C, 20 sekund byla síla gelu po 60 minut koagulace vyjádřena jako elastický modul pružnosti $G' > 2,5$ Pa, pro mléko ošetřené teplotním režimem 80 °C, 40 sekund byly hodnoty velmi nízké $G' > 1,0$ Pa.

Dále lze konstatovat, že rychlost tvorby gelu u mléka ošetřeného při teplotě 80 °C a vyšší, je 2x pomalejší než u mléka syrového a mléka ošetřeného na teplotu 72 °C s dobou výdrže 20 sekund.

Pro zvýšení pevnosti gelu v průmyslu, musí být využito dalších možností, například aplikace chloridu vápenatého a enzymatického syřidla. Tento vliv je popsán v experimentu II.

7.2 Experiment II

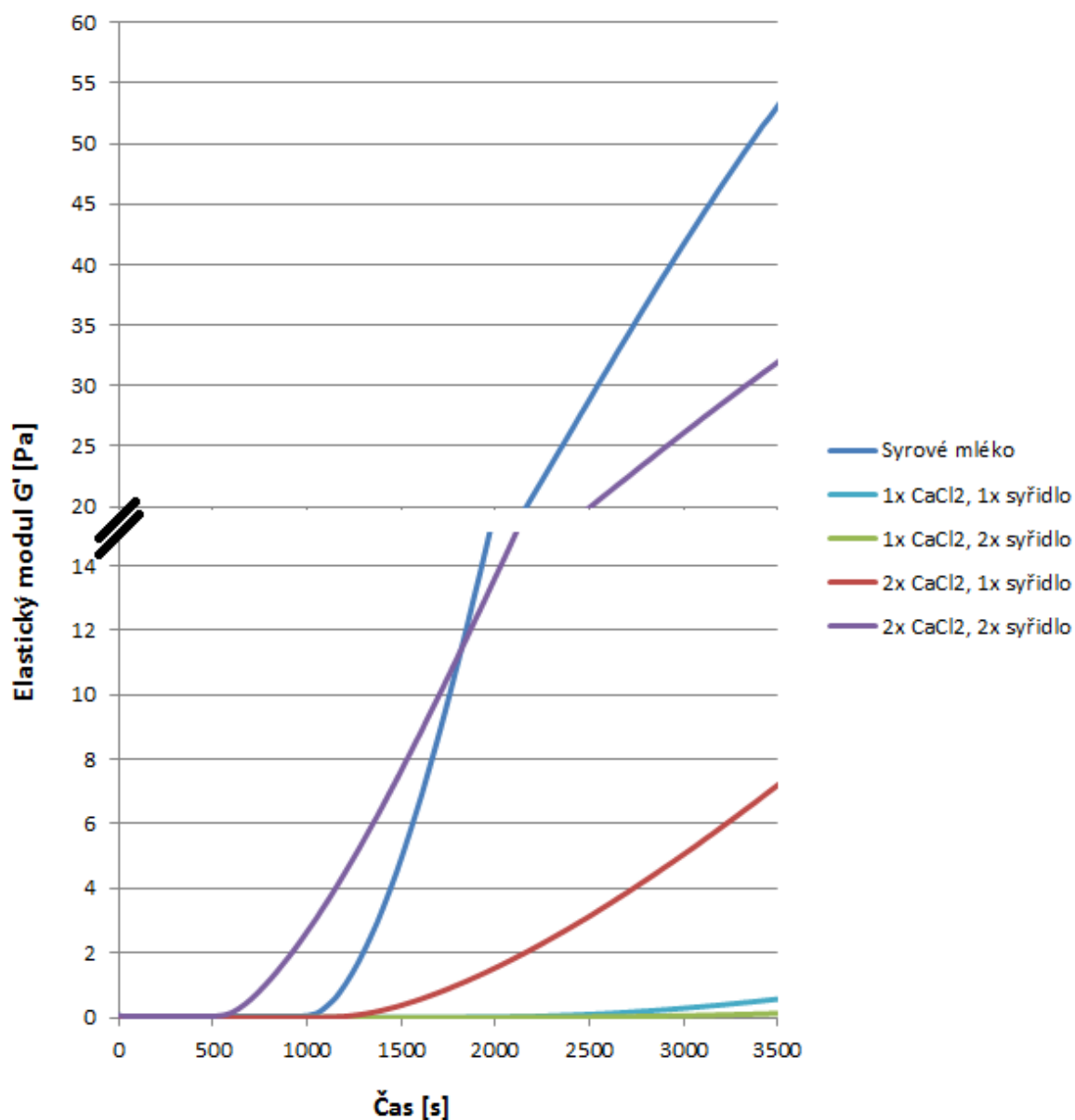
Na základě výsledků z experimentu I byly vybrány dva teplotní režimy 76 °C s výdrží 40 sekund a 85 °C s výdrží 20 sekund. Výsledky měření jsou znázorněny na obrázku 4 pro záhřev na teplotu 76 °C s dobou výdrže 40 sekund a obrázku 5 pro záhřev na teplotu 85 °C s dobou výdrže 20 sekund.



Obrázek 4: Závislost elastického modulu pružnosti G' na čase srážení u syrového mléka a mléka tepelně ošetřeného při teplotě 76 °C 40 sekund a různých poměrech CaCl_2 a syřidla.

Z obrázku 4 lze určit, že nejnižší vliv na tvorbu pevného koagulátu měl poměr (1:1) chloridu vápenatého a enzymatického syřidla, kdy byla síla gelu po 60 minutách koagulace vyjádřena jako elastický modul pružnosti $G' > 20$ Pa a tato hodnota je nejnižší. Poměr (1:2) chloridu vápenatého a enzymatického syřidla je vyjádřen jako elastický modul pružnosti $G' > 30$ Pa a tato hodnota je nižší, než u syrového mléka. Zatímco u poměru (2:1) chloridu vápenatého a enzymatického syřidla byla síla gelu $G' > 50$ Pa srovnatelná se syrovým mlé-

kem, tak pro poměr (2:2) chloridu vápenatého a enzymatického syřidla byla pevnost gelu $G' > 60$ Pa, tedy vyšší v porovnání než u syrového mléka. Lze tedy říci, že se zvyšujícím se poměrem (2:2) chloridu vápenatého a enzymatického syřidla se zvyšuje tvorba pevného koagulátu.



Obrázek 5: Závislost elastického modulu pružnosti G' na čase srážení u syrového mléka a mléka ošetřeného při teplotě 85 °C 20 sekund a různých poměrech CaCl_2 a syřidla.

Na obrázku 5 je popsána tvorba gelu pro mléko tepelně ošetřené na teplotu 85 °C s dobou výdrže 20 sekund. Jak je patrné z obrázku 5 žádný, poměr chloridu vápenatého a enzymatického syřidla neměl vliv na vytvoření pevnějšího gelu, než byl gel syrového mléka. Poměr (1:2) chloridu vápenatého a enzymatického syřidla nevytvořil gel ani po 60 minutách měření, kdežto poměr (1:1) chloridu vápenatého a enzymatického syřidla vytvořil gel, ale až po 45 minutách srážení a to velmi nepatrně. Následující poměr (2:1) chloridu vápenatého a enzymatického syřidla byl vyjádřen jako elastický modul pružnosti $G' > 6 \text{ Pa}$ a tato hodnota je nižší, než u syrového mléka a poměru (2:2) chloridu vápenatého a enzymatického syřidla. Poměr (2:2) chloridu vápenatého a enzymatického syřidla vytvořil gel o síle $G' > 30 \text{ Pa}$. Z výsledků vyplývá, že při nutnosti aplikace teploty záhřevu 85 °C, je nutné použít vyšší koncentrace chloridu vápenatého a enzymatického syřidla k získání pevnějšího gelu.

7.3 Souhrnná diskuze

V této práci byl pomocí dynamické oscilační reometrie popsán vliv tepelného ošetření mléka, přídavku chloridu vápenatého a enzymatického syřidla na tvorbu koagulátu.

Získané výsledky byly vyhodnoceny prostřednictvím křivek pro G' v závislosti na čase t . (Mellema, Walstra, van Opheusden a van Vliet 2002) [62] a Lucey, (2002) [63,64], ve svých studiích uvádějí, že parametr (G') elastický modul pružnosti byl vhodným ukazatelem pro sledování průběhu enzymatické koagulace mléka.

Z výsledků experimentu I vyplývá, že tepelné ošetření mléka má významný vliv na tvorbu gelu. Bylo zjištěno, že vyšší teploty tepelného záhřevu prodloužily čas tvorby gelu a snížily sílu gelu (Harjinder Singh 2001, Lucey (2011), Perreault (2016)). [65,66,67]

Z teorie této problematiky je známé, že tepelné ošetření mléka má vliv na řadu fyzikálně-chemických změn složek obsažených v mléce. Mezi významné změny, ke kterým dochází při zahřívání mléka nad 60 °C, patří denaturace syrovátkových proteinů, interakce mezi denaturovanými syrovátkovými proteiny a kaseinovými micelami a přeměna rozpustného vápníku, hořčíku a fosforu na koloidní stav [65]. Denaturace postihuje převážně sérové bílkoviny v syrovátce, protože mají vyšší počet sekundárních a terciárních vazeb. Výsledkem denaturace je vznik disulfidického můstku, který se tvoří mezi β - laktoglobulinem a

κ - kaseinem. Vytvořený disulfidický můstek může ovlivnit vaznost vody. Je možné tvrdit, že se zvyšující se teplotou zvyšuje počet disulfidických můstků a tím může vytvořený gel vázat větší množství vody. Takto vzniklý gel je málo pevný a je nutná delší doba pro vytvoření tohoto gelu [65,66]. Toto tvrzení bylo prokázáno v experimentu I. Bylo potvrzeno, že pokud bylo mléko ošetřeno teplotou 85 °C po dobu 20 sekund, se gel po 60 minutách koagulace vůbec nevytvořil. S klesající teplotou tepelného ošetření mléka se doba vytvoření gelu zkracovala a zvyšovala se jeho síla. Z výsledků experimentu I byla pevnost gelu největší u mléka syrového - tepelně neopracovaného, i doba jeho vytvoření byla nejkratší. P. F. Fox (1980) [68] uvádí, že je možné kombinovat výši tepelného záhřevu a dobu výdrže podle povahy vyráběného produktu. K dalším zjištěným informacím z experimentu I patří, že lze zvýšit teplotu tepelného ošetření a zkrátit dobu výdrže. Výsledný gel vykazuje obdobné vlastnosti, toto tvrzení je podloženo měřením mléka ošetřeného při teplotě 72 °C 40 sekund a 76 °C 20 sekund.

V experimentu II byla prozkoumána závislost obsahu syřidla a Ca^{+2} iontů na vznik a vlastnosti gelu.

Vyšší koncentrace přídavku enzymatického syřidla vedly k rychlejšímu nárůstu G' . Tento parametr charakterizuje pevnost gelu [62]. Vyšší koncentrace enzymatického syřidla způsobila rychlejší rozvoj koagulace, což bylo potvrzeno sledovanými hodnotami [62,63]. Protože je ve vzorku více hydrolyzovaných kaseinových micel, které jsou schopny efektivně přispívat k tvorbě trojrozměrné sítě protein-gel. Po více než 60 minutách je tvorba gelu rychlejší a vede k vytvoření pevnějšího gelu, jak jednoznačně ukazují hodnoty G' 60 minut. Bylo prokázáno, že přidání více chloridu vápenatého je méně účinné pro významné zvýšení koagulační rychlosti a síly gelu v daném čase.

Vysvětlení lze nalézt ve skutečnosti, že i když vápenaté můstky představují hlavní formu vazby, která určuje povahu mléčného gelu, tato vazba na druhé straně může pouze propojit destabilizované kaseinové micely [62,63]. Lze tedy očekávat, že pokud systém obsahuje nedostatečné množství destabilizovaných kaseinových micel, ani zvýšené množství chloridu vápenatého (nebo přesně i iontů vápníku) může účinně ovlivnit tvorbu a sílu gelu [62,63,64].

ZÁVĚR

Předkládaná bakalářská práce byla zaměřena především na různé tepelné režimy ošetření mléka. Dále pak sledování koagulace mléka v závislosti na odlišných koncentracích chloridu vápenatého a enzymatického syřidla během jednohodinového měření.

Rozbor naměřených jednotlivých výsledků byl realizovaný za účelem zjištění optimalizace různých koncentrací chloridu vápenatého a enzymatického syřidla. Měření probíhalo na přístroji HAAKE RheoStress 1 za použití dynamické oscilační reometrie.

Ze získaných naměřených výsledků a výše uváděných grafů lze konstatovat, že:

- ✓ Ideální teploty ošetření mléka pro sýření s vytvořením stabilního a pevného gelu jsou teploty $< 80\text{ }^{\circ}\text{C}$,
- ✓ Při teplotách $> 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ se stává gel méně stabilní nebo se za 60 minut vůbec nevytvoří,
- ✓ Je možné zvýšit teplotu záhřevu a zkrátit dobu výdrže; velmi podobné vlastnosti vykazovaly gely z mlék ošetřeného teplotními režimy $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ s dobou výdrže 40 sekund a $76\text{ }^{\circ}\text{C}$ s dobou výdrže 20 sekund,
- ✓ Při aplikaci teplot $< 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro ošetření mléka, je výhodné použít vyšší množství chloridu vápenatého a syřidla $\sim 0,2\text{ g}$ na 1 l mléka a $\sim 64\text{ }\mu\text{l}$ (950 IMCU) na 1 l,
- ✓ Výši koncentrace chloridu vápenatého $\sim 0,2\text{ g}$ na 1 l mléka a $\sim 64\text{ }\mu\text{l}$ (950 IMCU) na 1 l mléka enzymatického syřidla vedou k rychlejšímu a pevnějšímu průběhu koagulace,
- ✓ Výběr vhodného tepelného ošetření a kombinace množství chloridu vápenatého a enzymatického syřidla, by měl být zohledněn dle povahy vyráběného produktu.

Výrobci chtějí zvýšit výnos v oblasti výroby sýrů, proto je důležité ke koncentracím chloridu vápenatého a syřidla použít i další technologické parametry (tuk, bílkoviny). Avšak to je předmětem zkoumání dalších výzkumných prací.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 853/2004 ze dne 29. dubna 2004. [online]. Dostupné z:
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:02004R0853-20171121&qid=1525504675579&from=CS>.
- [2] BUŇKA, František. *Mlékárenská technologie I*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2013. ISBN 978-80-7454-254-1.
- [3] JOINT FAO/WHO FOOD STANDARDS PROGRAMME a CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. *Milk and milk products*. 2. ed. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations [u.a.], 2000. ISBN 925-5-104497-X.
- [4] NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 1308/2013 ze dne 17. prosince 2013. [online]. Dostupné z:
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX%3A32013R1308>
- [5] FRELICH, Jan. *Chov skotu*. České Budějovice: Jihočeská univerzita, 2001. ISBN 80-7040-512-0.
- [6] LOUDA, František. *Základy chovu mléčných plemen skotu: František Louda ... [et al.]*. Praha: Institut výchovy a vzdělávání Ministerstva zemědělství České republiky, 1994. Živočišná výroba (Institut výchovy a vzdělávání Ministerstva zemědělství ČR). ISBN 80-7105-070-9.
- [7] ŠÍPALOVÁ, Markéta. *Změny jakostních parametrů mléka a mléčných výrobků: Quality changes of milk and dairy products: teze disertační práce*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, 2012, 47 s. ISBN 978-80-7454-222-0.
- [8] GUETOUACHE, M., B., GUESSAS, S., MEDJEKAL: Composition and Nutritional Value of Raw Milk. *Issues in Biological Science and Pharmaceutical Research*, 2014, 2(10), 115-222.
- [9] HAUG, A., Arne T HØSTMARK, Odd M HARSTAD. *Bovine milk in hu-man nutrition - A review*. *Lipids in Health and Disease* [online]. Biomed Central, 2007, 6(1), 25-25 [cit. 2017-04-15]. DOI: 10.1186/1476-511X-6-25. ISSN 1476511X.
- [10] FORMAGGIONI, P., SUMMER, A., MALACARNE, M., MARIANI, P.: *Milk protein polymorphism: Detection and diffusion aft he genetic variants in Bos genus*. [online]. 1999, 29, 127-165 [cit. 2013-03-16]. Dostupné z:
<http://www.unipr.it/arpa/facvet/annali/1999/formaggioni/formaggioni.htm>
- [11] GAJDŮŠEK, Stanislav. *Mlékařství II*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 1998. ISBN 80-7157-342-6.

- [12] SAMKOVÁ, Eva. *Mléko: produkce a kvalita: Milk: production and quality: vědecká monografie*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 2012, 240 s. ISBN 978-80-7394-383-7.
- [13] KADLEC, Pavel, Karel MELZOCH a Michal VOLDŘICH. *Co byste měli vědět o výrobě potravin?: technologie potravin*. Ostrava: Key Publishing, 2009. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-051-4.
- [14] NAVRÁTILOVÁ, P., KRÁLOVÁ, M., JANŠTOVÁ, B., PŘIDALOVÁ, H., CUPÁKOVÁ, Š., VORLOVÁ, L.: *Hygienu produkce mléka*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2012, 129 s. ISBN: 978-80-7305-624-7.
- [15] URBAN, František. *Chov dojeného skotu*. Praha: Apros, 1997, 289 s. ISBN 80-901100-7-x.
- [16] TAMIME, A.Y. *Structure of dairy products*. Ames, Iowa: Blackwell Pub., 2007. ISBN 978-1-4051-2975-6.
- [17] LUKAŠOVÁ, J.: *Hygienu a technologie produkce mléka*. 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 1999, 101 s.
- [18] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: Osis, 2009. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [19] FORMAN, Ladislav a Josef STRMISKA. *Mlékárství II pro 3. ročník středních odborných učilišť: učební text pro učební obor biotechnik se zaměřením pro mlékárenskou výrobu*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1984. 173 s.
- [20] GRIEGER, Z. A KOLEKTIV: *Hygienu mlieka a mliečnych výrobkov*. 1. vyd. Bratislava: Príroda, 1990, 397 s. ISBN 80-07-00253-7.
- [21] JANŠTOVÁ B., VORLOVÁ L., NAVRÁTILOVÁ P., KRÁLOVÁ M., NECIDOVÁ L., MAŘICOVÁ E.: *Technologie mléka a mléčných výrobků*. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. 2012, 142 s. ISBN 978-80-7305-637-7.
- [22] NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 1332/2008 ze dne 16. prosince 2008. [online]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008R1332&from=EN>
- [23] MC SWEENEY, P.L.H. *Cheese problems solved*. North America. Boca Raton: CRC Press, 2007. ISBN 978-184-5693-534.
- [24] *Dobrý koloniál: Syřidlo - ChyMax M200* [online]. ©2017. [cit. 20.2.2017]. Dostupné z: <https://www.dobrykolonial.cz/syridla-chlorid/chy-max-m200-syridlo500ml/>.

- [25] BLECH, Zushe Yosef. *Kosher food production*. Ames, Iowa: Blackwall Pub., 2004. ISBN 978-0813825700.
- [26] LAW Barry A. a A. Y. TAMIME. *Technology of cheesemaking*, 2nd ed. Malden, MA: Blackwell, 2010. ISBN: 978-1-4051-8298-0.
- [27] PAUKERTO VÁ Ivana. In: Rostlinná syřidla, [online]. [cit. 2011-10-15]. Dostupné z: <http://www.paukertova.cz/view.php?cislocclanku=2009070001>
- [28] BALASUBRAMANIAN, D., BRYCE, C. F. A., DHARMALINGAM, K., GREEN, J., JAYARAMAN, K.: *Concepts in Biotechnology*, Universities Press, Hyderabad, 1996, 515 s. ISBN 81-7371-483-5.
- [29] TEPLÝ M., FRIEDRICH F. *Syřidla, barvy a vosky v mlékárenském průmyslu*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury 1957, 232 s.
- [30] WALSTRA, Pieter, Jan T. M. WOUTER a T. J. GEURTS. *Dairy science and technology*. 2nd ed. Boca Raton: CRC/Taylor & Francis, 2006. Food science and technology, (Taylor & Francis), 146. ISBN 0-8247-2763-0.
- [31] Silveira, G. G. d., Oliveira, G. M. d., Ribeiro, E. J., Monti, R., & Contiero, J.: *Microbial rennet produced by Mucor miehei in solid-state and submerged fermentation*. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2005, 48(6), 931-937.
- [32] Mendelu: Syřidlové srážení mléka [online]. 2015, [cit. 20.2.2017]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=2065&typ=html.
- [33] MANDY, J., DORIS, J., ROHM, R.: *Recent advances in milk clotting enzymes*. International Journal of Dairy Technology [online]. 2011, 64(1), 14-33 [cit. 23.3.2017]. DOI: 10.1111/j.14710307.2010.00633.x. ISSN 1364727x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1471-0307.2010.00633.x>.
- [34] BŘEZINA, Pavel a Jaroslav JELÍNEK. *Chemie a technologie mléka I.část*. Praha: VŠCHT, 1990. ISBN 80-7080-075-5.
- [35] ŠUSTOVÁ Květoslava. *Laktologie, prezenční přednášky*, Brno: Mendelova univerzita, 2010, LS 2010/2011
- [36] FOX, P. F. *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. 3rd ed. London: Elsevier, 2004, ISBN 0-1226-3653-8.
- [37] ROGINSKI Hubert, John W. FUQUAY a P. F. FOX. *Encyclopedia of Dairy Science*, New York: Academy Press, c2003. ISBN 9780122272356.

- [38] FOX, P. F. *Fundamentals of cheese science*, Gaithersburg, MD: Aspen Pub., 2000. ISBN: 0-8342-1260-9.
- [39] THOMPSON, A., BOLAND, M., SINGH, H. *Milk Proteins: from expression to food*, Elsevier, Amsterdam, 2009, 535s., ISBN 978-0-12-374039-7.
- [40] Černý, V., Klepetář, J., Příbyla, L. Měření koagulace mléka působením syřidla. In *Mléko a sýry 2003*. Eds. Štětina J., Čurda L. Praha: Česká společnost chemická, 2003, s. 42 - 48. ISBN 80-86238-31-8.
- [41] NÁJERA, A. I., RENOBALLES, M., & BARRON, L. J. R. *Effects of pH, temperature, CaCl₂ and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk: a multifactorial study*. Food Chemistry, 2002, 80(3), 345-352.
- [42] CELEBI, M., Z. O. OZDEMIR, E. EROGLU a I. GUNEY: *Statistically Defining Optimal Conditions of Coagulation Time of Skim Milk*. Journal of the Chemical Society of Pakistan, 2014, 36(1), 1-5.
- [43] ESTEVES, C. L. C., J. A. LUCEY, T. WANG a E. M. V. PIRES: *Effect of pH on the gelation properties of skim milk gels made from plant coagulants and chymosin*. Journal of Dairy Science, 2003, 86(8), s. 2558–2567.
- [44] IKONEN, T.: *Possibilities of genetic improvement of milk coagulation properties of dairy cows*. Academic dissertation. 2000. University of Helsinki.
- [45] JUSTOVÁ, Andrea. *Vliv zdravotního stavu dojníc na množství, složení a technologické vlastnosti jejich mléka*. Bakalářská práce, Brno, Mendelova univerzita, 2015.
- [46] OLDFIELD, D.J., Singh, Harjinder & W., Taylor, Michael & N. Pearce, Kevin. *Heat-induced interactions of β -laktoglobulin and α -laktalbumin with the casein micelle in pH-adjusted skim milk*. International Dairy Journal, 2000, 10(8), 509-518. DOI: 10.1016 / S0958-6946 (00) 00087-X
- [47] CASTILLO, M., F. A. PAYNE, C. L. HICKS, J. LAENCINA a M.-B. LÓPEZ: *Effect of protein and temperature on cutting time prediction in goats' milk using an optical reflectance sensor*. Journal of Dairy Research, 2003, 70(2), 205-215. DOI: 10.1017/S0022029903006113.
- [48] TEPLÝ, M., MAŠEK, J., A HAVLOVÁ, J. *Syřidla živočišná a mikrobiální*. Praha, Státní nakladatelství technické literatury, 1976, 230 s.
- [49] ŠUSTOVÁ, Květoslava a Vladimír SÝKORA. *Mlékárenské technologie*. Brno: Mendelova univerzita, 2013. ISBN 978-80-7375-704-5.

- [50] NÁJERA, J.A., GONZÁLEZ-SILVA, M., ALONSO, P.L. *Some Lessons for the Future from the Global Malaria Eradication Programme*. PLOS Medicine, 2011, 8(1), 1-7.
- [51] JAVOROVÁ, Jana. *Změna obsahu tuku v bazénových vzorcích mléka v průběhu roku a její vliv na technologické vlastnosti*. Diplomová práce, Brno, Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, 2012.
- [52] SCOTT, R., R.K. ROBINSON a R.A. WILBEY. *Cheesemaking practice*. 3rd ed. Gaithersburg, Md.: Aspen Publication, 1998. ISBN 978-0-7514-0417-3.
- [53] WALSTRA, P. *The syneresis of curd*. 1993, 141-191. In FOX, P. F.: *Cheese: chemistry, physics, and mikrobiology - Volume 1., General aspects*, 2nd ed. Chapman & Hall, London, 1993, 601 s. ISBN 0-412-53500-9.
- [54] MC CARTHY, O. J.: *Physical and Physicochemical properties*. 2003, s. 1812 - 1821. In ROGINSKI H., FUQUAY J. W., FOX P. F.: *Encyklopedia of dairy sciences*. Volume free. Academic Press, London, 2003, ISBN 0-12-227238-2.
- [55] GAJDŮŠEK, Stanislav. *Požadavky na kvalitu mléka pro výrobu sýrů*. In GAJDŮŠEK, Stanislav. *Nové poznatky v syrarskej technologii a technike*, vyd. 1., Žilina, 144-147, 1995, ISBN 80-967362-4-8.
- [56] GAJDŮŠEK, Stanislav. *Laktologie*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003, ISBN 80-7157-657-3. ☺
- [57] GAJDŮŠEK, Stanislav. *Mlékařství*. 2. nezm. vyd. Brno: Vysoká škola zemědělská, 1993. ISBN 80-7157073-7. ☺
- [58] VELECKÁ, Milena. *Změna obsahu bílkovin v bazénových vzorcích mléka v průběhu roku a její vliv na technologické vlastnosti*. Diplomová práce, Brno, Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, 2012.
- [59] KONTOVÁ, Marcela. *Technologické pomocné látky na výrobu syrov*. In KONTOVÁ, Marcela. *Problematika zabezpečenia kvality syrov a ich kontrola*, Zborník prednášok zo školenia, Žilina, 2001, 19-22.
- [60] TROCH, T., LEFEBURE, E., BAETEN, V., COLINET, F., GENGLER, N., SINDIC, M. *Cow Milk Coagulation: Process Description, Variation Factors and Evaluation Methodologies. a Review*. Biotechnologie Agronomie Societe Et Environnement. 2017, 21(4), 276-287. ISSN:1370-6233.
- [61] FORMAN, Ladislav. *Mlékárenská technologie II*. Vyd. 2. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1996. ISBN 80-7080-250-2.

- [62] MELLEMA, M., WALSTRA, P., & H. J. van OPHEUSDEN, J. & van VLIET, T. *Effects of structural rearrangements on the rheology of rennet-induced casein particle gels*. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2002, 98(1), 25-50.
- [63] LUCEY, J.A. *Formation and physical properties of milk protein gels*. *Journal of Dairy Science*, 2002, 85(2), 281-294.
- [64] MOUDRÁ, Kateřina, Vendula PACHLOVÁ, Michaela ČERNÍKOVÁ, Tomáš ŠOPÍK a František BUŇKA. *The combined effects of fat content, calcium chloride, and coagulant concentration on the development of cheese curd structure*. 2017, (73), 92-97.
- [65] Singh, H. (2001). Influence of heat treatment of milk on cheesemaking properties, *International Dairy Journal*, 2001, (11), 543-551.
- [66] Lucey, J.A. *Cheese. Rennet-induced coagulation of milk*. *Encyclopedia of dairy sciences*. London, UK: Elsevier Applied Science, 2011.
- [67] Perreault, V., Turcotte, O., Morin, P., Pouliot, Y., & Britten, M. *Combined effect of denatured whey protein concentrate level and fat level in milk on rennet gel properties*. *International Dairy Journal*, 2016, 55, 1-9.
- [68] FOX, P.F. *Heat-Induced Changes in Milk Preceding Coagulation*, *Journal of Dairy Science*, 1980, 64, 2127-2137.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

NaCl	Chlorid sodný
CaCl ₂	Chlorid vápenatý
Ca ²⁺	Vápenaté ionty
Ser	Serin
Phe	Fenylalanin
Met	Methionin
IMCU	Mezinárodní koagulační jednotka mléka
G'	Elastický modul pružnosti

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Závislost elastického modulu pružnosti G' na čase srážení u mléka syrového a mléka tepelně ošetřeného při teplotě 72 °C 20 sekund a 65 °C 30 minut.	32
Obrázek 2: Závislost elastického modulu pružnosti G' na čase srážení u syrového mléka a mléka tepelně ošetřeného při teplotě 72 °C s výdrží 20 a 40 sekund a teplotě s výdrží 76 °C 20 a 40 sekund.	33
Obrázek 3: Závislost elastického modulu pružnosti G' na čase srážení u syrového mléka a mléka tepelně ošetřeného při teplotě 72 °C, 80 °C, 85 °C po dobu 20 sekund a 80 °C 40 sekund.	35
Obrázek 4: Závislost elastického modulu pružnosti G' na čase srážení u syrového mléka a mléka tepelně ošetřeného při teplotě 76 °C 40 sekund a různých poměrech CaCl_2 a syřidla.	36
Obrázek 5: Závislost elastického modulu pružnosti G' na čase srážení u syrového mléka a mléka ošetřeného při teplotě 85 °C 20 sekund a různých poměrech CaCl_2 a syřidla.	37

SEZNAM TABULEK

<i>Tabulka 1: Produkty konzumního mléka definované nařízením Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1308/2013. Upraveno dle Evropského nařízení [4].</i>	12
<i>Tabulka 2: Průměrné složení sušiny kravského mléka. Upraveno dle [2,6].</i>	13
<i>Tabulka 3: Teplotní režimy ošetření mléka.</i>	30
<i>Tabulka 4: Kombinace chloridu vápenatého a syřidla.</i>	31