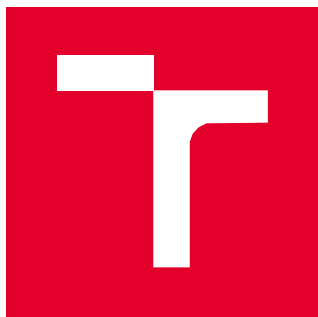




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

SROVNÁNÍ AROMATICKÉHO PROFILU KOZÍHO VS.
KRAVSKÉHO MLÉKA

COMPARISON OF AROMA PROFILE GOAT VS. COW MILK

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Alžběta Pospíchalová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1312/2018
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Alžběta Pospíchalová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.**
Akademický rok: 2018/19

Název diplomové práce:

Srovnání aromatického profilu kozího vs. kravského mléka

Zadání diplomové práce:

1. Zpracujte literární přehled dané problematiky:
 - stručná charakteristika kozího a kravského mléka
 - aromaticky aktivní látky ve mléce (kozí, kravské) – vznik, změny během zpracování
 - možnosti stanovení aromaticky aktivních látek – princip, provedení, přehled aplikací zaměřených na mléko
2. Pomocí metody HS–SPME–GC–MS identifikujte aromaticky aktivní látky ve vzorcích mléka
3. Srovnajte a diskutujte rozdíly v aromatickém profilu kravského vs. kozího mléka

Termín odevzdání bakalářské práce: 10.5.2019

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Alžběta Pospíchalová
student(ka)

doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá porovnáním aromaticky aktivních látek v kozím a kravském mléce. Je sledován obsah aromaticky aktivních látek ve vzorcích kozího a kravského mléka, které byly analyzovány metodou HS-SPME-GC-MS.

V teoretické části je mléko charakterizováno, je popsána jeho tvorba v mléčné žláze dojníc, jeho složení včetně přehledu aromaticky aktivních látek, fyzikálně-chemické a senzorické vlastnosti, vady mléka a jsou popsány rozdíly mezi kravským a kozím mlékem. Dále je popsána plynová chromatografie v kombinaci s technikou mikroextrakce na tuhé fázi v tandemu s hmotnostní spektrometrií.

V experimentální části bylo 13 vzorků kozího a 8 vzorků kravského mléka podrobeno analýze metodou HS-SPME-GC-MS. Vzorky byly analyzovány čerstvé a po tepelném ošetření. Celkem bylo ve vzorcích identifikováno 78 těkavých látek, z chemických skupin byly nejvíce zastoupeny ketony, z hlediska obsahu aldehydy, alkoholy a karboxylové kyseliny. Mezi vzorky byly nalezeny rozdíly v počtu i v obsahu identifikovaných sloučenin, v kozím mléce bylo celkem 64 a v kravském 48 těkavých látek.

ABSTRACT

This diploma thesis deals with the comparison of aroma compounds in goat and cow milk. The content of aroma active substances in samples of goat and cow milk, which were analyzed by HS-SPME-GC-MS method, is monitored.

In the theoretical part, milk is characterized, its formation in the dairy mammary gland is described, its composition including an overview of aromatic active substances, physical and chemical as well as its sensory properties, milk defects and differences between cow's and goat's milk are described. Further, gas chromatography in combination with solid phase microextraction technique in tandem with mass spectrometry is described.

In the experimental part, 13 samples of goat and 8 samples of cow milk were subjected to HS-SPME-GC-MS analysis. Samples were analyzed fresh and after heat treatment. Altogether, 78 volatile substances were identified in the samples. Ketones were the most numerous, aldehydes, alcohols and carboxylic acids were the most abundant chemical groups. There were differences between samples in number as well as in content of the identified compounds, 64 in goat milk and 48 in the cow milk.

KLÍČOVÁ SLOVA

kozí mléko, chutnost, senzorická analýza

KEYWORDS

goat milk, palatability, sensory analysis

POSPÍCHALOVÁ, Alžběta. *Srovnání aromatického profilu koziho vs. kravského mléka* [online]. Brno, 2019 [cit. 2019-04-22]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/115028>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Eva Vítová.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem citovala správně a úplně. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis diplomanta

Poděkování:

Ráda bych poděkovala doc. Ing. Evě Vítové, Ph.D. za odborné vedení, pomoc, ochotu a laskavost při zpracování této diplomové práce. A také chovatelům, kteří poskytli vzorky mléka k analýze.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Produkce mléka	9
2.1.1	Produkce kravského mléka v ČR	9
2.1.2	Produkce kozího mléka v ČR	9
2.2	Tvorba mléka	11
2.3	Složení mléka	12
2.3.1	Mléčné bílkoviny	12
2.3.1.1	Kasein	13
2.3.1.2	Syrovátkové bílkoviny	13
2.3.2	Lipidy	14
2.3.3	Sacharidy	15
2.3.3.1	Laktosa	15
2.3.4	Enzymy	17
2.3.5	Vitaminy	17
2.3.5.1	Vitaminy rozpustné ve vodě	17
2.3.5.2	Vitaminy rozpustné v tucích	18
2.3.6	Minerální látky	18
2.3.7	Aromatické látky v mléce	19
2.3.7.1	Chuť kozího mléka	20
2.4	Mikrobiologie mléka	22
2.5	Senzorická kvalita mléka	22
2.6	Použité metody a experimentální techniky	23
2.6.1	Mikroextrakce tuhou fází	23
2.6.2	Plynová chromatografie	23
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
3.1	Laboratorní vybavení	25
3.1.1	Přístroje	25
3.1.2	Pracovní pomůcky	25
3.2	Analyzované vzorky	25
3.2.1	Podmínky HS-SPME-GC-MS analýzy	27
3.2.2	Vyhodnocení výsledků analýzy	29

4	VÝSLEDKY A DISKUZE	30
4.1	Identifikace těkavých látek ve vzorcích mléka	30
4.2	Srovnání počtu identifikovaných látek ve vzorcích	37
4.2.1	Identifikace sloučenin ve vzorcích kravského mléka	37
4.2.2	Identifikace sloučenin ve vzorcích kozího mléka	38
4.2.3	Srovnání zastoupení aromaticky aktivních látek ve vzorcích kozího a kravského mléka	39
4.3	Srovnání obsahu identifikovaných látek ve vzorcích	40
5	ZÁVĚR	43
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	44
7	SEZNAM ZKRATEK.....	47
8	PŘÍLOHY	48

1 ÚVOD

Mléko neodmyslitelně patří do jídelníčku lidí. Kojenci jsou zcela odkázáni na mléko mateřské. I dospělí lidé následně pokračují v konzumaci mléka od různých hospodářských zvířat po celý svůj život, jelikož je mléko zdrojem všech esenciálních minerálních látek a vitaminů.

Nutriční kvalita mléka závisí nejen na plemeni, kondici a potravě dojnic, ale především na hygieně dojení a následného zpracování mléka. Složení mléka, především obsah a složení mléčného tuku, který nese většinu aromaticky aktivních látek, se během roku mění s ohledem na různorodost potravy a fázi laktace dojnic.

Největší produkce mléka celkově ve světě pochází od krav. Následkem toho jsou běžní konzumenti zvyklí na tento druh mléka, především na jeho chuť. Ostatní druhy mléka jsou pro ně proto chuťově nezvyklé. Především kozí mléko je společností méně oblíbené, kvůli pověstné pachuti. Nicméně pro mnoho lidí je kozí mléko vhodnou alternativou, jelikož je mléčná bílkovina v kozím mléce lépe stravitelná než v mléce kravském a mnohdy se senzorickou kvalitou rovná mléku kravskému.

V chovu dojných koz je nejdůležitější welfare¹ dojnic. Užitek a zájmový chov se od sebe výrazně liší. Rozdíly jsou nejen v počtu chovaných zvířat, ale především v péči o jednotlivá zvířata a hlavně ve způsobu jejich ustájení. Na kvalitě kozího mléka se odráží především čistota prostředí, ve kterém jsou zvířata chována, a způsob a hygiena dojení a uchovávání mléka. Nedostatky ustájení dojnic nebo při dojení se mohou odrazit v senzorické kvalitě.

Cílem této diplomové práce je zpracovat literární rešerši postihující rozdíly mezi kravským a kozím mlékem. V experimentální části byl porovnán aromatický profil, tj. profil těkavých látek, vybraných vzorků kravského a kozího mléka získaných od chovatelů i zakoupených v běžné tržní síti. Pro stanovení těkavých látek byla použita mikroextrakce tuhou fází ve spojení s plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí.

¹ podmínky, ve kterých jsou zvířata chována

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Produkce mléka

V České republice a i celé Evropě je největší produkce mléka kravského, ačkoliv produkce koziho mléka ve světě stále roste. Od roku 2000 do roku 2012 vzrostlo množství vyprodukovaného koziho mléka o necelých 40 %. Průměrná roční spotřeba koziho mléka na obyvatele byla v roce 2012 v Evropě 3,62 kg, zatímco např. v Africe 4,02 kg, jak je vidět v tabulce 1. [1]

Tabulka 1: Produkce koziho mléka ve světě v letech 1990 – 2012 [1, 2]

	Produkce mléka [1000 tun]				Změna [%]	Podíl [%]	Mléko / obyv. kg / rok
	1990	2000	2006	2012	2000 - 2012	2012	2012
Asie	5 486	6 949	7 821	10 410	+49,81	58,35	2,44
Afrika	2 056	2 777	3 129	4 308	+55,13	24,14	4,02
Oceánie	0,025	0,028	-	0,048	+71,43	0,000 02	0,001 3
Evropa	2 162	2 588	2 479	2 537	-1,98	14,20	3,43
EU (28)	1 725	1 983		1 928	-2,77	10,80	3,8
Amerika	467	505	164	510	+0,87	3,31	0,62
Světově	9 980	12 819	13 801	17 846	+39,21	100,00	2,53

2.1.1 Produkce kravského mléka v ČR

Po vstupu ČR do Evropské unie byly zavedeny mléčné kvóty, které platily od 1. 4. 2001 až do 31. 3. 2015. Během těchto 14 let byly kvóty překročeny pouze jednou a to v roce 2005/2006 o 0,6 %. Množství vyprodukovaného kravského mléka je shrnuto v tabulce 2. [3]

Tabulka 2: Přehled produkce kravského mléka v tunách v letech 2009 – 2015 [3]

Kvótový rok	2009/2010	2010/2011	2011/2012	2012/2013	2013/2014	2014/2015
Dodávky	2 623 337	2 569 598	2 652 261	2 718 046	2 747 335	2 876 316
Přímý prodej	3 766	6 933	6 982	7 763	9 956	11 822

2.1.2 Produkce koziho mléka v ČR

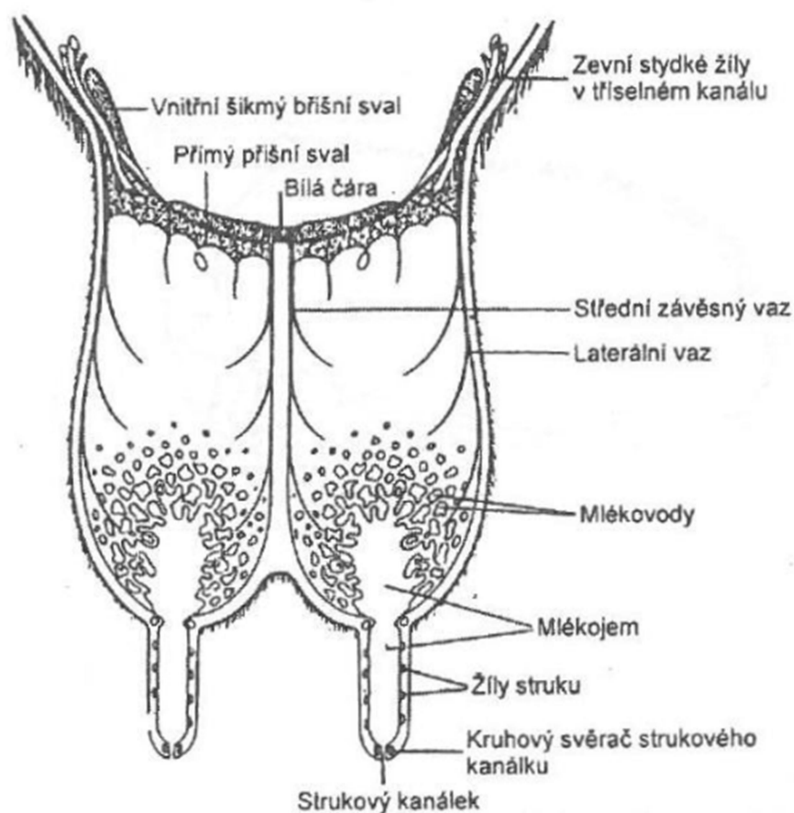
Producenty a zpracovateli koziho mléka a mléčných výrobků jsou v ČR výhradně farmy, jelikož zde není žádná komerční mlékárna ani sýrárna, která by kozí mléko vykupovala a zpracovávala. Od roku 2010 roste množství koz v kontrole užitkovosti, s čímž je spojené i zvýšení produkce koziho mléka, jak je vidět v tabulce 3. Největší podíl koz v kontrole užitkovosti tvoří česká plemena, koza bílá krátkosrstá a hnědá krátkosrstá, poté koza anglonubijská a následují další plemena a kříženci. [4, 5]

Tabulka 3: Přehled výsledků KU koz v letech 2000 – 2018 [4]

Rok	Počet koz v KU		Mléko				
	celkem	laktace	produkce [kg]	tuk [%]	tuk [kg]	bílkoviny [%]	bílkoviny [kg]
2000	2234	986	836	3,70	30,9	2,79	23,3
2001	2275	1144	861	3,51	30,2	2,79	24,0
2002	2443	1247	825	3,42	28,2	2,89	23,8
2003	2627	1504	757	3,36	25,4	2,79	21,1
2004	2547	1547	770	3,22	24,8	2,83	21,8
2005	2980	1857	731	3,35	24,5	3,05	22,3
2006	3028	1839	707	3,33	23,6	3,05	21,5
2007	3157	1746	727	3,29	23,9	3,07	22,4
2008	3300	1801	656	3,41	22,4	3,14	20,6
2009	3592	2042	692	3,23	22,3	3,01	20,8
2010	3677	1997	744	3,23	24,0	3,06	22,8
2011	3611	1931	732	3,47	25,4	3,12	22,8
2012	3939	2389	713	3,23	23,0	3,04	21,7
2013	4244	2603	730	3,26	23,8	3,07	22,4
2014	4466	2870	746	3,22	24,1	3,04	22,7
2015	5144	3318	844	3,00	25,3	3,02	25,5
2016	5755	3778	847	3,22	27,3	3,09	26,2
2017	6104	3898	799	3,34	26,7	3,11	24,8
2018	6093	4087	836	3,18	26,6	3,08	25,8

2.2 Tvorba mléka

Mléko je produktem mléčných žláz samic savců sloužící k výživě jejich mláďat. Mléčná žláza je tvořena ze sekreční tkáně, vývodního systému a krevního, mízního a nervového aparátu. [6, 7]



Obrázek 1: Popis vemenice dojnice [8]

Existuje několik teorií o tvorbě jednotlivých složek mléka, které se vzájemně doplňují, jelikož jednotlivé součásti mléka nevznikají stejnými pochody. Jednotlivé složky mléka pochází z krve dojnice, kdy za jeden den proteče vemenem až 540 litrů². [6]

Filtrační teorie vysvětluje tvorbu mléka jako filtraci složek mléka z krve. Tento výklad ovšem předpokládá, že krev obsahuje veškeré sloučeniny ve stejné formě, v jaké jsou žlázou následně vylučovány. Touto teorií tedy lze vysvětlit pouze přestup globulinu, některých solí a případně i močoviny. Neobjasňuje vznik mléčného tuku, kaseinu, albuminu a laktosy, které se v krvi nevyskytují. [6]

Teorie o buněčné degeneraci popisuje mléčnou sekreci jako degradaci alveolárních³ buněk. Je známo, že velká část těchto buněk konstantně degraduje a jejich složky přecházejí do mléka, ovšem ne v tak velkém množství, což dokazují cytologické obrazy mléka, které by musely být značně bohatší. [6]

² U skotu

³ Lalůčky žlázové tkáně

Teorie buněčného metabolismu předpokládá, že jednotlivé složky mléka jsou vytvářeny látkovým metabolismem alveolárních buněk. Jednotlivé součásti mléka jsou tvořeny ze složek krve, které přecházejí filtrací do alveolárních buněk, kde se přeměňují. [6]

2.3 Složení mléka

Mléko se skládá z různých složek (bílkoviny, tuk, sacharidy, minerální látky, vitaminy). Mléko neplní pouze funkci výživovou, ale také obrannou (obsahuje imunoglobuliny, antimikrobiální látky), podporuje trávení (enzymy, inhibitory enzymů), zároveň obsahuje i růstové hormony. Složení mléka je rozdílné u každého živočišného druhu, jak je zřejmé z tabulky 4. [9]

Tabulka 4: Obsah hlavních složek v mléce různých savců [9]

Savec	Sušina [%]	Tuk [%]	Bílkoviny [%]	Laktosa [%]	Minerální látky [%]
Člověk	12,2	3,8	1,0	7,0	0,2
Skot	12,7	3,7	3,4	4,8	0,7
Buvol	16,8	7,4	3,8	4,8	0,8
Koza	12,3	4,5	2,9	4,1	0,8
Ovce	19,3	7,4	4,5	4,8	1,0
Prase	18,8	6,8	4,8	5,5	-
Kůň	11,2	1,9	2,5	6,2	0,5
Sob	33,1	16,9	11,5	2,8	-
Potkan	32,8	18,3	11,9	2,1	1,8

Složení mléka a dojivost se mění, mají na ně vliv dědičné dispozice dojnice, plemeno, krmná dávka, welfare dojnice, způsob dojení, teplota prostředí, pohyb, onemocnění, laktační doba, věk dojnice atd. Například výživou dojnic je možné ovlivnit množství a kvalitu získávaného mléka. Vyvážená krmná dávka zvyšuje nádoj a obsah sušiny v mléce. Ovlivňuje obsah tuku, bílkovin, laktosy, vitamínů a minerálních látek. Jelikož má složení mléka velký vliv na senzorickou kvalitu, může správné krmení pozitivně ovlivnit chuť, vůni a barvu mléka. [6, 7]

2.3.1 Mléčné bílkoviny

Mléčné bílkoviny jsou tvořeny složitými komplexy dusíkatých látek. Hlavními mléčnými bílkovinami jsou kasein, albumin a globulin. Jediný globulin je shodný s krevním globulinem, laktalbumin je velmi podobný krevnímu albuminu, liší se ovšem ve struktuře. Kasein je naprosto odlišný od jiných tělních bílkovin, vzniká převodem fosforových radikálů z jedné molekuly na druhou díky fermentativnímu působení enzymů. Množství proteinů v mléce je ovlivněno řadou aspektů, jako plemenem a věkem dojnice, pořadím a stádiem laktace, krmením. Největší zastoupení má kasein (asi 80 %), který je v mléce doplněn syrovátkovými proteiny (asi 20 %). Tabulka 5 zobrazuje složení bílkovin v mléce. [6, 7, 9, 10]

Kozí mléko, na rozdíl od mléka kravského, obsahuje méně α_{s1} -kaseinu a více α_{s2} -kaseinu. V kozím mléce je i větší obsah aminokyselin glycínu, lyzinu, kyseliny glutamové, treoninu a naopak méně argininu a sirných aminokyselin. Složení mléčných bílkovin v kozím mléce snižuje jeho termostabilitu. Zároveň má kozí mléko delší dobu srážení syřidlem a nižší pevnost syřeniny. [11]

Tabulka 5: Obsah bílkovin v mléce [9]

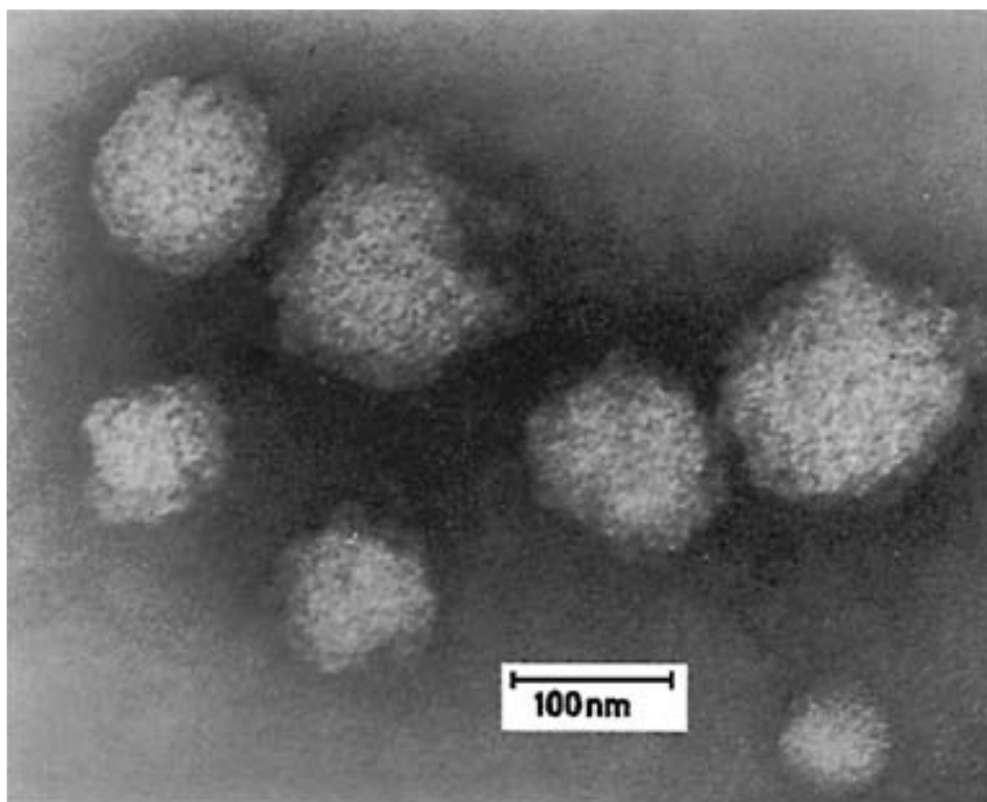
Protein	g / kg mléka	g / 100 g proteinu
<i>Celkový kasein</i>	26	78,5
<i>α_{s1}-kasein</i>	10	31
<i>α_{s2}-kasein</i>	2,6	8
<i>β-kasein</i>	9,3	28
<i>κ-kasein</i>	3,3	10
<i>γ-kasein</i>	0,8	2,4
<i>Syrovátkové bílkoviny</i>	6,3	19
<i>β-laktoglobulin</i>	3,2	9,8
<i>α-laktalbumin</i>	1,2	3,7
<i>sérový albumin</i>	0,4	1,2
<i>Imunoglobuliny</i>	0,8	2,4
<i>Proteiny membrán tukových kuliček</i>	0,7	2

2.3.1.1 Kasein

Kasein je směsí cca 10 různých bílkovin. Obsahuje 4 základní druhy fosfoproteinů, které jsou rozpustné v roztoku vápenatých iontů. Kaseiny se při teplotách vyšších než 5 °C shlukují do micel (viz obrázek 2), jejichž velikost se pohybuje mezi 30 až 60 nm. Kaseinové micely jsou složeny ze submicel, které jsou tvořeny z přibližně 20 molekul kaseinů pomocí hydrofobních sil. V mléce kasein tvoří komplexní sloučeniny s vápníkem a fosforečnanem vápenatým, které mají relativně malou stabilitu. Po přidání kyseliny nebo syřidla (enzym chymozin) se vysráží. Největší zastoupení má v mléce α_s -kasein, následuje β -kasein a κ -kasein. [9, 12, 13, 7]

2.3.1.2 Syrovátkové bílkoviny

Syrovátkové bílkoviny zůstávají v mléčném séru po vysrážení kaseinu. Syrovátkové bílkoviny mají poměrně vysoký obsah aminokyseliny cystinu. Jsou to hydrofilní koloidy s globulárním charakterem a jsou rozpustné při každé hodnotě pH. Mezi syrovátkové bílkoviny patří β -laktoglobulin, α -laktalbumin, sérový albumin, imunoglobuliny a proteoso-pepton. Laktalbumin udržuje stabilitu ostatních složek v mléce, při vyšší teplotě než je 72°C se sráží v podobě bílých vloček. Laktoglobulin se podobá krevnímu globulinu, sráží se při teplotách 72 až 75°C po přidavku kyseliny. Ve větším množství se nachází v mlezivu. [9, 7]



Obrázek 2: Kaseinové micely pod mikroskopem [2]

2.3.2 Lipidy

Mléčný tuk vzniká ze složek krevního tuku a z glycidů. Jeho tvorba je nezávislá na tvorbě ostatních složek mléka a jeho množství ovlivňuje především skladba krmiva. Tuk je v mléce rozptýlen ve formě tukových kuliček. Složení mléčného tuku je uvedeno v tabulce 6. Největší podíl mléčného tuku zaujímají triacylglyceroly, které obsahují velké množství mastných kyselin. V mléčném tuku se vyskytují hlavně mastné kyseliny se sudým počtem uhlíkových atomů. Mastné kyseliny se čtyřmi až šestnácti atomy uhlíku jsou syntetizovány v mléčné žláze z kyseliny octové a β -hydroxymáselné, které vznikají fermentací v bacheru. Nasycené i nenasycené mastné kyseliny s osmnácti atomy uhlíku jsou do mléka přenášeny přímo z krve. Množství tuku v mléce se odvíjí od krmení, roční doby, způsobu dojení, období laktace a věku a zdravotního stavu dojnice. [6, 9, 10, 13, 14]

Tabulka 6: Lipidy obsažené v mléce [2]

Lipid	Podíl z celkových lipidů [%]
Triacylglyceroly	95-96
Diacylglyceroly	1,3-1,6
Monoacylglyceroly	0,02-0,04
Glyceridy ketokyselin	0,9-1,3
Glyceridy hydroxykyselin	0,6-0,8
Volné mastné kyseliny	0,1-0,4
Fosfolipidy	0,8-1
Sfingolipidy	0,06
Steroly	0,2-0,4

Z fosfolipidů jsou v mléce zastoupeny především fosfatidylcholin (lecitin), fosfatidylethanolamin (kefalin) a sfingomyelin. Největší zastoupení má v mléčném tuku lecitin, který je složený ze dvou mastných kyselin, kyseliny glycerinofosforečné a cholinu. Nachází se v membránách tukových kuliček. [6, 9]

Hlavním steroidem v mléce je cholesterol. V 1 g mléčného tuku se nachází asi 2,2-4,1 mg cholesterolu. Další částí, nacházející se v mléčném tuku, jsou karotenoidy. Tato barviva jsou rozpustná v tuku a způsobují oranžové zbarvení. Kozy na rozdíl od krav mění všechny přijatý karoten na vitamin A, proto bývá kozí mléko bělejší. Nejvíce bývá zastoupen karoten (provitamin vitaminu A), méně xantofyl, který vzniká oxidací karotenu. Obsah těchto barviv se odvíjí od krmení a plemene dojnice. [6, 9]

Tuk v kozím mléce se liší od mléka kravského i menším průměrem tukových kuliček, díky čemuž jsou lépe rozptýlené v mléčné plazmě a stávají se tak lépe stravitelnými. Ovšem hůře vyvstává smetana na povrchu mléka, což je způsobeno nejen velikostí tukových kuliček, ale i absencí aglutininu. [11]

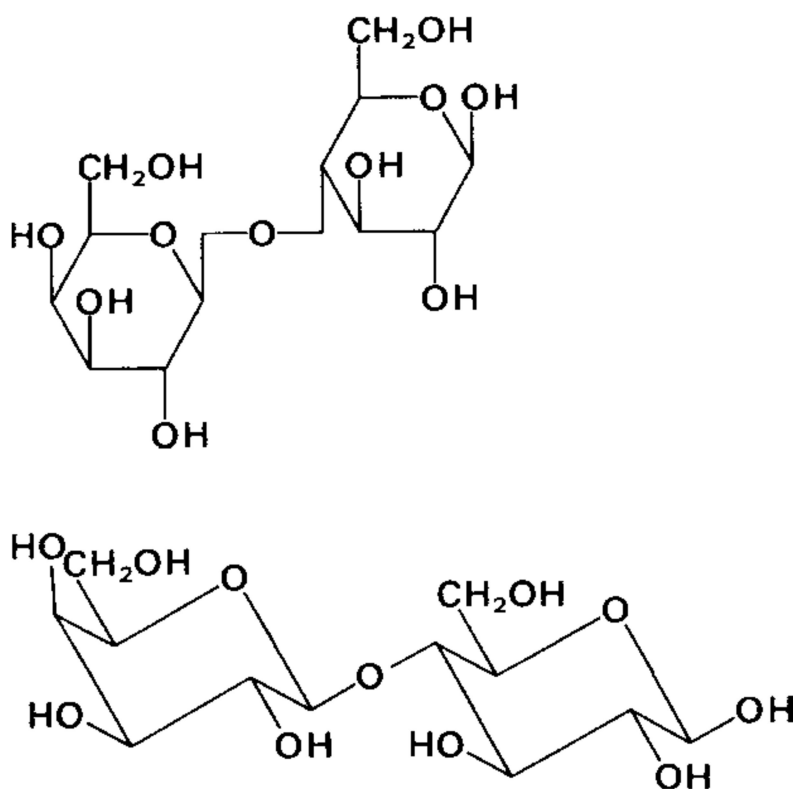
2.3.3 Sacharidy

Hlavním sacharidem v mléce je laktosa. Obsah laktosy ovlivňuje pořadí laktace, plemeno a zdravotní stav dojnice. Jiné sacharidy, jako glukosa, galaktosa, fruktosa a další jsou v mléce pouze ve stopovém množství. [6, 9, 10]

2.3.3.1 Laktosa

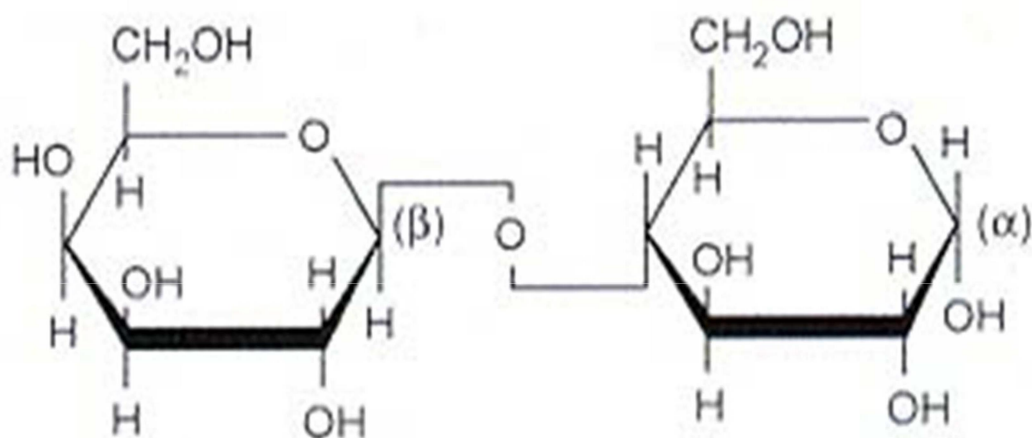
Laktosa je redukující disacharid, který je složený z D-glukosy a D-galaktosy (viz. obrázek 3 a 4) a může existovat jako α i β -anomer. Monosacharidy jsou spojeny β -1,4-glykosidickou vazbou. Systematickým názvem je β -O-D-galaktopyranosyl-(1-4)- α -D-glukopyranosa u α -laktosy a β -O-D-galaktopyranosyl-(1-4)- β -D-glukopyranosa u β -laktosy. Průměrné množství laktosy v mléce je 4,7 % a její sladkost je nižší než sacharosy (asi o 15 %). Je syntetizována v mléčné žláze dojnice. Při delším zahřívání mléka na teplotu okolo 90 °C laktosa karamelizuje, čehož se využívá při výrobě sýru brunost⁴. [6, 9, 13]

⁴ Norský sýr



Obrázek 3: β -laktosa [2]

Laktosa slouží jako zdroj energie, mléku dodává typickou nasládlou chuť, ovlivňuje některé fyzikální vlastnosti mléka (bod varu a mrznutí nebo osmotický tlak), napomáhá absorpci vápníku, přispívá k nutriční hodnotě mléka, podílí se i na barvě a vůni mléka. Člověk může mít na laktosu intoleranci, pokud má nedostatek střevní β -galaktosidasy. [9]



Obrázek 4: α -laktosa [9]

2.3.4 Enzymy

Mléko obsahuje velké množství enzymů, tzv. nativních, které jsou tvořeny mléčnou žlázou. Jsou to organické látky, jejichž nosičem je bílkovina. Mají schopnost řídit rychlost chemických reakcí. Mnoho z nich se podílí na přirozeném antimikrobiálním systému mléka. Některé jsou ovšem katalyzátory různých biochemických reakcí, které mohou způsobit různé senzorické vady. Jiné enzymy jsou používány jako indikátory pro důkaz správného tepelného ošetření mléka. [2, 7, 13]

Enzymy dokáží indikovat zdravotní stav mléčné žlázy (např. zvýšená aktivita), indikace správnosti tepelného ošetření mléka, zvýšená aktivita různých enzymů zapříčiňuje rozklad některých složek mléka, některé enzymy jsou antibakteriální. [9]

Nejdůležitějšími enzymy jsou v mléce peroxidasa, reduktasa, katalasa, lipasa a fosfatasa. Peroxidáza dokáže z peroxidů uvolňovat kyslík a přenášet jej na jiné sloučeniny, které se dokáží oxidovat. Její citlivosti na vysoké teploty se využívá k průkazu vysoké pasterace mléka. Reduktáza má mikrobiální původ a má schopnost odbarvovat, čehož se využívá při zjišťování mikrobiální čistoty mléka – čím více mikroorganismů mléko obsahuje, tím více obsahuje i reduktázy a tím dříve se odbarví přidaná methylenová modř. Kataláza dokáže rozložit peroxid vodíku na vodu a plynný kyslík, toho se využívá při detekci onemocnění vemene dojnice. Čím více plynného kyslíku mléko obsahuje, tím více obsahuje o katalázy a poukazuje na onemocnění vemene. Lipáza rozkládá mléčný tuk, který tímto žlukne. Fosfatáza rozkládá estery kyseliny fosforečné, což se používá jako důkaz vysoké teploty při pasteraci, jelikož je citlivá vůči vysokým teplotám. [6, 7]

2.3.5 Vitaminy

Mléko obsahuje všechny vitaminy v různých variabilních množstvích. Při zpracování mléka se vitaminy rozdělí. Vitaminy rozpustné v tucích zůstanou v mléčném tuku (smetaně) a naopak vitaminy rozpustné ve vodě zůstanou v odstředěném mléce nebo syrovátce. [2, 10]

2.3.5.1 Vitaminy rozpustné ve vodě

Hydrofilní vitaminy jsou, z důvodu svých katalytických účinků, převážně koenzymy při metabolismu bílkovin, sacharidů, tuků a dalších látek. Přehled vitaminů rozpustných ve vodě je v tabulce 7. Tyto vitaminy jsou jednak přijímány potravou a zároveň jsou i syntetizovány v bachoru dojnice. [6, 9]

Tabulka 7: Koncentrace vitaminů v mléce (vodní fáze) [2, 9]

Vitamin	Množství [$\mu\text{g} / 100 \text{ g}$]	Množství [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]
thiamin (B_1)	49	0,4
riboflavin (B_2)	150	1,7
niacin (B_3)	320	1
kyselina panthotenová (B_5)	310	3,5
pyridoxin (B_6)	27	0,6
biotin (B_7)	3,9	0,03
kyselina listová (B_9)	-	0,05
kobalamin (B_{12})	0,07	0,005
kyselina askorbová (C)	-	20

2.3.5.2 Vitaminy rozpustné v tucích

V mléčném tuku se nacházejí vitaminy hydrofobní. Jsou to vitaminy A, D, E a K. Hlavní zastoupení v mléce má vitamin A (retinol a ester retinolu). Množství vitaminů rozpustných v tucích je uvedeno v tabulce 8. Vitamin A vzniká z karotenoidů přijímaných krmivem, vitamin D vzniká působením světla na provitaminy, které jsou v kůži dojnice. [6, 9]

Tabulka 8: Koncentrace vitaminů v mléce (tuková fáze) [2, 9]

Vitamin	Množství [$\mu\text{g} / 100 \text{ g}$]	Množství [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]
retinol (A)	52	0,4
kalciferol (D)	0,03	0,001
tokoferol (E)	20-120	1
fytochinon (K)	0,4-1,8	-

2.3.6 Minerální látky

Minerální látky jsou v mléce přítomny v různých formách, v roztoku, koloidní formě nebo vázány na některé organické složky mléka. Minerální látky jsou do mléka přenášeny z krve, proto jejich množství není stálé, mění se v závislosti na kondici, výživě a dalších aspektech a životních podmínkách dojnic (viz. tabulka 9). Proces přestupu minerálních látek z krve do mléka není jednoduchý. Mléčná žláza množství těchto látek řídí. Mléko oproti krvi obsahuje třináctkrát více vápníku a vápník dokáže z krve odebírat, i když jej má tělo dojnice nedostatek, čímž může vzniknout mléčná horečka. Čím více obsahuje mléko bílkovin, tím více je bohaté i na minerální látky. [6, 7, 10]

Největší zastoupení má draslík, vápník a kyselina fosforečná. Minerální látky se dělí na majoritní prvky (makroelementy), minoritní minerální prvky a stopové prvky (mikroelementy), celkem 20 prvků je esenciálních. Makroprvky jsou vypsány v tabulce 9. Mezi minoritní prvky patří zinek v množství 0,5 mg/l, železo (3,9 mg/l) a měď (0,09 mg/l). Stopovými prvky jsou mangan, jod, fluor, selen, kobalt, chrom, nikl, arsen, molybden a další. [6, 9, 15]

Tabulka 9: Variabilita množství minerálních látek koziho mléka [12]

Složka	Průměrná hodnota	Interval
vápník [mmol / l]	44,53	32,0 – 62,0
hořčík [mmol / l]	4,69	3,2 - 7,9
sodík [mmol / l]	26,66	18,6 – 48,3
draslík [mmol / l]	37,09	15,2 – 55,0
poměr K / Na	1,45	0,7 – 2,6
celkový fosfor [mmol / l]	28,64	24,2 – 33,8
anorganický fosfor [mmol / l]	18,76	7,0 – 33,2
poměr anorg. P / celkový P	65,77	25,3 – 98,2
chloridy [mmol / l]	33,80	11,4 – 60,3

2.3.7 Aromatické látky v mléce

Na chuť mléka má velký vliv skladba krmiva dojníc, především pícniny. Aromaticky aktivní látky obsažené v krmivu se do mléka dostávají přímo adsorpcí v mléčné žláze nebo nepřímo resorpcí epitelem dýchacích cest do krve a z krve do mléka. Žádoucí chuť a vůni mléko dostává především, když jsou dojnice drženy pastevně a pastva je botanicky bohatá a kvalitní. Aromaticky nepříjemné látky přechází z potravy do mléka podobným mechanismem. Záleží nejen na skladbě krmiva, ale i na době mezi krmením a dojením. Nejvíce je mléko ovlivněno krmivem, bylo-li dojnici zkrmeno půl hodiny až dvě hodiny před dojením. V případě, že je dojnice krmena až po dojení, je dostatek času na enzymatický rozklad nevhodných látek nebo jejich vyloučení z těla jiným způsobem. Změny aroma mléka jsou většinou ovlivněny i změnou obsahu tuku, který je nositelem chuti. [16]

Aromaticky aktivní látky, které přecházejí v nezměněné formě z krmiva do mléka jsou především estery, alkoholy, aldehydy a ketony. Například při zkrmování většího množství řepy, rozklad betainu na trimethylamin způsobí rybí pachut'. Hořkou chuť může způsobit krmení velkým množstvím hrachu, vikve nebo sójových bobů. Zatuchlou pachut' způsobuje zkrmování plesnivě siláže nebo senáže. [16-19] Při přidání bazalky do krmné dávky dojníc se na několik dní změnila koncentrace oktan-1-olu (nasládlá, mýdlová chuť), undekan-1-olu (mandarinková chuť) a nonan-2-onu (chuť po plísňovém sýru). Koncentrace těchto látek se nejdříve zvýší a po několika dnech klesne na téměř počáteční hodnotu, jak uvádějí Šípalová a Kráčmar [17].

Vonnými látkami v syrovém mléce nebo v mléce ošetřeném šetrnou pasterací jsou nejčastěji dimethylsulfid, biacetyl, 2-methylbutan-1-ol, (4Z)-hept-4-enal a (2E)-non-2-enal, nacházejí se v mléce v nízkých koncentracích. [20]

Chuť mléka, které je ošetřeno pasterací při vyšší teplotě (nad 73 °C) a chuť UHT mléka je ovlivněna tzv. vařivým aroma. Toto aroma zapříčiňuje sulfan a některé sirné sloučeniny, především dimethylsulfid, dimethyldisulfid a dimethyltrisulfid, které vznikají z proteinů nacházejících se v membránách tukových kuliček a z thiaminu. Důležité jsou také alkan-2-ony (methylketony), které vznikají termickou dekarboxylací β-ketokyselin (hlavně hexan-2-on, heptan-2-on, nonan-2-on), dále γ-laktony a δ-laktony vznikající dehydratací γ-hydroxykyselin a δ-hydroxykyselin (především δ-dekalakton, γ- a δ-dodekalakton) a rovněž biacetyl, hexanal, 3-methylbutanal, (4Z)-hept-4-enal a (2E)-non-2-enal. [20]

Při delším zahřívání mléka na vysokou teplotu (sterilace) ovlivňují chuť mléka i produkty Maillardovy reakce. Jsou to maltol, isomaltol, 5-hydroxymethylfuran-2-karbalehyd, 4-hydroxy-2,5-dimethyl-(2H)-furan-3-on (furanol) a 2,5-dimethylpyrazin. [20]

Vady aroma mléka mohou být způsobeny i poutáním pachů z okolí. Jiné aromatické látky vznikají při chemických a enzymových reakcích v mléce. Problémem může být oxidace lipidů, kdy jsou některé produkty této reakce ve větším množství. Žluklý pach mléka je následkem lipolýzy lipázami mléka nebo lipázami přítomných bakterií a způsobují jej nižší mastné kyseliny (např. máselná nebo laurová). Látky jako třeba (4Z)-hept-4-enal, okt-1-en-3-on a hexanal dávají mléku plné, typicky smetanové aroma, ovšem ve vysokých koncentracích aroma mléka ovlivňují negativně. [16, 20]

Některé vady aroma mléka způsobují mikroorganismy, především psychrofilní bakterie. Bakterie *Pseudomonas fragii* produkují estery, které dávají mléku ovocné aroma. Naopak oxidační chuť mléka může způsobit měď nebo kyselina askorbová. Na chuti se podílí i fáze laktace, např. kovová chuť bývá pozorována při prvním měsíci laktace, naopak hořká chuť začíná být znát od zhruba šestého měsíce laktace. Slanou chuť může způsobit zánět mléčné žlázy. [16, 20]

Působení světelného záření katalyzuje oxidaci mléčného tuku a bílkovin. Reakce začíná rozkladem riboflavinu a následně vznikají aldehydy, thioly a sirné sloučeniny, které nepříznivě ovlivňují chuť mléka. Špatné skladování mléka může mít rovněž negativní vliv na senzorickou kvalitu mléka, jelikož mléko velmi rychle a snadno váže cizí pachy. [21]

2.3.7.1 Chuť koziho mléka

Chuť koziho mléka je, obdobně jako chuť mléka kravského, závislá na mnoha faktorech (např. plemeno dojnice, fáze laktace, roční období, krmení, doživost, tučnost mléka, životní podmínky dojnice a různé látky v mléce). Nejčastěji bývá chuť koziho mléka popisována jako mléčná, kovová, zapařená nebo je cítit po tuku, kozách, stáji, vanilce, seně. Typickou kozí chuť dávají mléku kyseliny kaprinová, kapronová, kaprylová, laurová, pelargonová, 4-ethyloktanová, 4-methyloktanová, indol a skatol, jak je popsáno v tabulce 10. O chuti koziho mléka v závislosti na složení jeho mléčného tuku, konkrétně mastných kyselin, pojednávají Siefarth a Buettner [44] a Morgan a Gaborit [45]. Young a kol. [43] pozorovali změny složení koziho mléčného tuku obsahujícího několik mastných kyselin s rozvětveným řetězcem odpovědných za „kozí“ chuť mléka, po přidání cyklodextrinů, které eliminují pachutí koziho mléka. Další příčinou pachuti u koziho mléka může být jeho náchylnost vůči působení lipáz. Příčinou mohou být i nutriční nedostatky mléka (např. nedostatek vitamínu E nebo kobaltu). [11, 22-24, 43-45]

Dalším problémem může být i nevhodně zvolená krmná dávka dojnic, což může vést ke zvýšení obsahu nenasycených mastných kyselin, které snadno oxidují. O zvyšování obsahu tuku v mléce a zlepšení jeho chuti díky přidávání krmiva bohatého na lipidy, především oleje z řepky olejné, pojednávají Inglingstad a kol. [47]. Nejčastější příčina nepříjemné tzv. „kozí“ pachuti je nedostatečná hygiena při získávání mléka a jeho následném uchovávání a zpracovávání, jelikož mléko velmi snadno poutá pachy z okolí. Zároveň chuť mléka může ovlivnit i příliš pomalé chlazení po nádoji nebo i počínající zánět mléčné žlázy. [11, 22, 47]

Jak ve své studii potvrzují Eknaes a Skeie [25], během roku se chuť koziho mléka rovněž mění. V zimě má mléko chuť po senu nebo sýru, zatímco v létě bývá chuť ovocnější. V zimě mléko obsahuje větší obsah mononenasycených mastných kyselin, zatímco v létě je v mléce obsaženo více nasycených mastných kyselin. U pasoucích se dojnic nemá mléko na jaře tak intenzivní nežádoucí (např. žluklou nebo kyselou) pachutí jako na podzim, protože kvalita pastvy se během roku snižuje. Mléko pasoucích se koz má lepší chuť než mléko dojnic krmených výhradně senem. Ovšem na konci pastevního období (podzim) příkrmování senem napomáhá zlepšit chuť mléka, které by jinak mělo horší chuť z důvodu méně kvalitní pastvy. To, že chuť mléka ovlivňuje více faktorů, ale především jeho složení (množství tuku, bílkovin a laktosy), které je dáno genetickými předpoklady dojnice, uvádí Skjevdal [46]. Zmiňuje také, že částečný vliv na chuť mléka má i fáze laktačního cyklu a krmná dávka. [22, 25, 46]

Kühn a kol. [48] pojednávají o uvolňování „mléčné“ chuti v ústech. Zjistili, že mléčné bílkoviny vytvářejí povlak v ústech a hrdle, čímž zajišťují uvolňování chuti i po polknutí.

Tabulka 10: Aromatické látky obsažené v kozím mléce [22]

Látka	Chuť / vůně
butan-2,3-dion (biacetyl)	máslová
dimethyl disulfid	zapařená, po tuku
okt-1-en-3-on	po houbách
(E)-okt-2-enal	po tuku, po trávě, umělá
(Z)-non-4-enal	po tuku, po trávě
3-methylthiopropional (methional)	po pečených bramborách
(E)-non-2-enal	po tuku, po trávě
(E,Z)-nona-2,6-dienal	po tuku, okurková
kyselina butanová (máselná)	zapařená, sýrová
kyselina 2-methylbutanová	zapařená, sýrová
kyselina 3-methylbutanová	zapařená, sýrová
(E,E)-nona-2,4-dienal	po tuku, po trávě
kyselina pentanová (valerová)	zapařená, sýrová
(E,E)-deka-2,4-dienal	po tuku, po trávě
kyselina hexanová (kapronová)	štiplavá, po moči
fenylethan-2-ol	květinová, ovocná, nasládlá
γ -oktalakton	kokosová
trans-4,5-epoxy-(E)-dek-2-enal	kovová
γ -nonalakton	broskvová, po dřevě
kyselina oktanová (kaprylová)	po tuku, zatuchlá
δ -nonalakton	nasládlá, broskvová
kyselina 4-methyloktanová	zatuchlá, po moči, po stáji
3-methylfenol (<i>m</i> -kresol)	po kůži
γ -dekalakton	broskvová
kyselina nonanová (pelargonová)	po tuku, po kozách, fekální
3-ethylfenol	po tuku, po kůži
δ -dekalakton	kokosová
3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon (sotolon)	kořeněná
kyselina 4-ethyloktanová	po kozách, po stáji
2-aminoacetofenon	květinová, broskvová, mýdlová
3-propylfenon	zatuchlý, po kůži
γ -undekalakton	broskvová
kyselina dekanová (kaprinová)	po tuku, po kozách, po kůži
γ -dodekalakton	mýdlová, po tuku, květinová
γ -(Z)-6-dodekenolakton	květinová
δ -dodekalakton	květinová, po kopretinách
1-benzopyran-2-on (kumarin)	po skořici, nasládlá
1 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>]pyrrol (indol)	fekální, po kozách
kyselina dodekanová (laurová)	mýdlová, po kozách, fekální
3-methylindol (skatol)	po stáji, fekální
kyselina fenylactová	po medu
4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyd (vanilin)	vanilková

2.4 Mikrobiologie mléka

Mléko je vhodným prostředím pro růst mikroorganismů. Dusík poskytují bílkoviny, uhlík a energii naopak laktóza, minerální složení mléka poskytuje množství důležitých prvků. Mikroorganismy vyskytující se v mléce výrazně ovlivňují kvalitu a trvanlivost mléka. Jak již bylo zmíněno (kap. 2.3.7), přítomnost mikroorganismů může být příčinou řady senzorických vad mléka. Největším zdrojem kontaminace mléka je samotné vemeno dojnice, dále se mléko může kontaminovat i nedostatečnou sterilizací všech ploch, se kterými mléko přijde do kontaktu. [7, 26]

V mléce se může přirozeně vyskytovat řada bakterií, včetně patogenních, jako bakterie mléčného kvašení (např. *Streptococcus lactis*), propionového kvašení (např. *Propionobacterium shermanii*), máselného kvašení (např. *Clostridium butyricum*), bakterie rozkládající bílkoviny a tuk (např. *Bacillus subtilis*). Kvasinky se uplatňují především při fermentacích nebo jako ochranné účinné látky (např. *Saccharomyces fragilis* – kefirové kultury). Plísně mohou způsobovat vady mléčných výrobků, nebo naopak je lze využívat při výrobě sýra (např. *Penicillium roqueforti*). [7, 10, 26]

2.5 Senzorická kvalita mléka

Vzhledem k zaměření této práce je důležité zmínit i senzorickou kvalitu. V případě mléka se hodnotí vzhled, barva, konzistence, vůně, chuť a případná pachut' vzorků. Z našeho hlediska budou důležité především vůně, chuť a pachut', poněvadž tyto vlastnosti souvisejí s obsahem těkavých aromatických látek sledovaných v této práci. [27-30]

Vzhled se skládá ze všech viditelných aspektů mléka. Vzhled mléka nejvíce ovlivňuje jeho barva, která by měla mít stejnorodou bílou nebo lehce nažloutlou barvu. Mléko by mělo být homogenní tekutinou bez usazenin, vloček, vyvstávání tuku nebo hrubých nečistot. [34, 35]

Bílou nebo krémovou neprůhlednou barvu mléka způsobuje zejména mléčný tuk a slabě také kasein. Nažloutlou barvu mléka vyvolávají karotenoidy, rozpuštěné v mléčném tuku, a částečně také riboflavin⁵. [15]

Konzistence (textura) mléka by měla být stejnorodá, homogenní, mírně hustší než voda. Mléko by nemělo být slizké, hlenovité, vodnaté, vločkovité, částečně stlučené nebo s jinou výraznou vadou. [34, 35]

Konzistenci mléka určuje především vysoký obsah vody, laktosa a část minerálních látek v roztoku, bílkoviny v koloidní fázi a mléčný tuk v emulzní fázi. [15]

Vůně mléka by měla být typicky mléčná, čistá a výrazná, bez jiných pachů. Závadou je nečistý, kyselý, zatuchlý, hnilobný pach, příp. jiné výrazné cizí vůně. [34, 35]

Vůni mléka mohou negativně ovlivnit cizí pachy, které se dokáží vázat na tukové kuličky. Z tohoto důvodu souvisí vůně mléka s jeho znečištěním, především během jeho získávání a uchovávání. [6, 15]

⁵ vitamin B₂

Chuť (flavour) mléka by měla být hodnocena jako komplexní pocit v ústech při konzumaci. Měla by být typicky mléčná, čistá, příjemně nasládlá a bez jiných příchutí. Neměla by být nečistá, hořká, kyselá, žluklá, zatuchlá nebo s jinou výraznou pachutí (off-flavour). [34, 35]

Sladkou chuť mléka způsobuje převážně laktosa a částečně i mléčný tuk a fosfatidy. Chuť mléka mohou negativně ovlivnit především různé látky z krmiva. [7, 15]

2.6 Použité metody a experimentální techniky

Pro stanovení těkavých (aromatických) látek ve vzorcích mléka byla použita metoda headspace mikroextrakce tuhou fází ve spojení s plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí (HS-SPME-GC-MS).

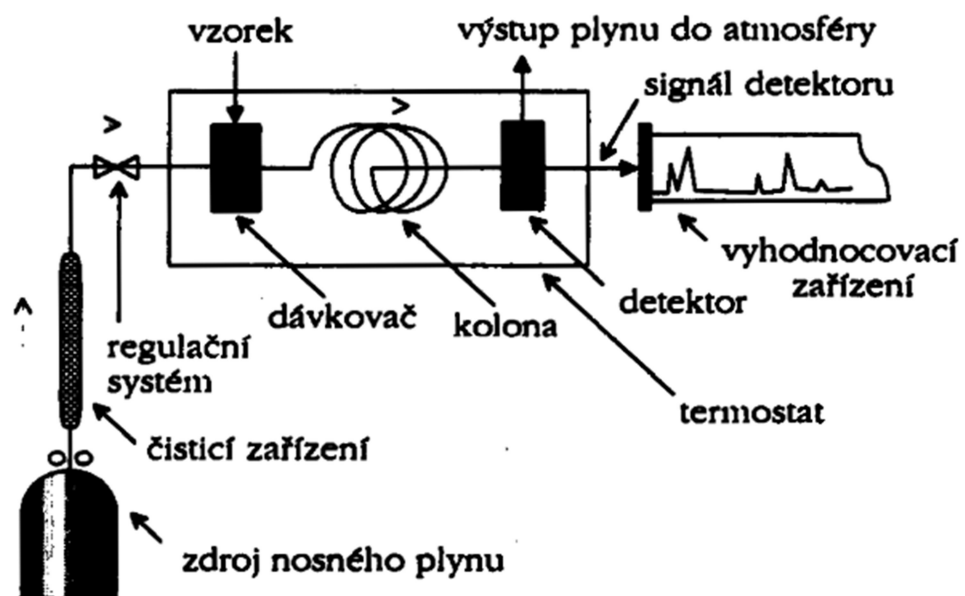
2.6.1 Mikroextrakce tuhou fází

Mikroextrakce tuhou fází je relativně nová, účinná a na aparaturu nenáročná sorpčně desorpční technika využívaná k zkoncentrování analytu. Principem je sorpce analytu na tenkou vrstvu sorbentu obalujícího křemenné vlákno. Tato technika se využívá především ve spojení s kapalinovou nebo plynovou chromatografií. Při použití vhodného typu vlákna je možné dosáhnout lineárních výsledků v široké škále koncentrací a dosáhne se velmi dobré reprodukovatelnosti výsledků i při nízkých koncentracích analytů. Tato metoda je využitelná v různých oblastech, od životního prostředí, přes průmyslovou hygienu, klinickou a forenzní analýzu až po analýzu léčiv. V potravinářství se využívá především k analýze těkavých látek a to i u mléčných a fermentovaných výrobků (např. pivo, víno). [14, 36-39]

Headspace mód (HS) je extrakce, kdy analyt musí překonat vzduchovou bariéru, než dosáhne extrakční fáze na vlákne. Na vlákno se tak nenavážou netěkavé látky nebo vysokomolekulární látky, které mohou být ve vzorku rovněž přítomny. [36]

2.6.2 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie je separační metoda, jejímž principem je rozdělení analytu mezi dvě fáze – mobilní a stacionární. Stacionární fází bývá nejčastěji kapalina imobilizovaná na inertním nosiči, případně povrchově aktivní sorbent. Mobilní fáze je inertní plyn, který proudí a unáší analyzovaný vzorek kolonou. Složky analytu se ve stacionární fázi zdržují určitou dobu (retenční čas) na základě jejich schopnosti poutat se ke stacionární fázi. [41, 42]



Obrázek 5: Popis plynového chromatografu [42]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Laboratorní vybavení

3.1.1 Přístroje

- Plynový chromatograf Trace™ 1310 se split/splitless injektorem (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
nosný plyn: Helium, čistota 4.8., v tlakové lahvi s redukčním ventilem (SIAD, Česká republika)
- Hmotnostní detektor ISQ™ LT Single Quadrupole (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Knihovna spekter NIST/EPA/NIH, Verze 2.0 (Gaithersburg, Maryland, USA)
- Počítač PC, Intel Pentium Procesor
- Lednice

3.1.2 Pracovní pomůcky

- SPME vlákno, DVB/CAR/PDMS 50/30 µm Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA;
- Vialky o objemu 10 ml se šroubovacím magnetickým uzávěrem
- Běžné laboratorní sklo a pomůcky

3.2 Analyzované vzorky

V experimentální části bylo analyzováno celkem 21 vzorků mléka, 13 kozího a 8 kravského, z toho 3 byly zakoupeny v běžné tržní síti a 18 bylo získáno přímo od chovatelů.

Jeden vzorek kozího mléka (Bettine) a 2 vzorky kravského mléka (MADETA Jihočeské mléko polotučné trvanlivé a OLMA Selské mléko čerstvé plnotučné) byly zakoupeny v běžné tržní síti. Zbylé vzorky kozího mléka byly poskytnuty chovateli hnědých krátkosrstých koz z Vysočiny (2 z Okřešic a 1 z Třebíče – Sokolí), všechny tyto vzorky byly analyzovány v den nadojení v syrovém stavu a po ošetření šetrnou pasterací⁶ a po převaření. Jeden z těchto vzorků byl navíc ponechán 3 dny v lednici při teplotě 6 °C a následně analyzován rovněž v syrovém stavu, po ošetření šetrnou pasterací a po převaření. Vzorky kravského mléka pocházely od chovatele mléčného skotu z Okřešic a z mléčného automatu zemědělského družstva „Podlesí“ Čechtín, rovněž byly analyzovány v syrovém stavu, po ošetření šetrnou pasterací a po převaření. Přehled a označení všech analyzovaných vzorků je uveden v tabulce 11.

Pro analýzu byly odměřeny vždy 3 ml vzorku a ihned vpraveny do vialky, která byla uzavřena magnetickým uzávěrem, aby neunikaly těkavé látky.

⁶ 72 °C, 30 s



Obrázek 6: *Kozi mléko Bettine*



Obrázek 7: *Kravné mléko OLMA*



Obrázek 8: Kravské mléko MADETA

Tabulka 11: Přehled a označení vzorků mléka

	Syrové	Pasterované	Převařené	UHT
Kozí od chovatele 1	KoKS	KoKP	KoKV	-
Kozí od chovatele 2	KoSS	KoSP	KoSV	-
Kozí od chovatele 3	KoOS	KoOP	KoOV	-
Kozí od chovatele 3 (starší)	KoOSS	KoOSP	KoOSV	-
Kozí Bettine	-	-	-	KoSu
Kravské od chovatele	KrOS	KrOP	KrOV	-
Kravské z automatu	KrCS	KrCP	KrCV	-
Kravské OLMA	-	KrSuPln	-	-
Kravské MADETA	-	-	-	KrSuPol

3.2.1 Podmínky HS-SPME-GC-MS analýzy

Podmínky HS-SPME extrakce:

- Doba inkubace (temperování): 10 min
- Doba extrakce: 20 min
- Teplota agitátoru (teplota extrakce a inkubace): 40 °C
- Agitátor zapnutý: 5 s
- Agitátor vypnutý: 60 s
- Množství vzorku: 3 ml

- Hloubka ponoření vlákna do vialky: 20 mm

Podmínky GC-MS analýzy:

- kapilární kolona TG-WaxMS (30 m x 0,25 mm x 0,5 μ m)
- teplota injektoru (desorpce): 240 °C
- doba desorpce: 20 min
- dávkování: splitless, ventil uzavřen 10 min
- hloubka ponoření vlákna do injektoru: 40 mm
- nosný plyn: helium, průtok 1 ml·min⁻¹
- teplotní program: 40 °C s výdrží 2 min, vzestupný gradient 3 °C·min⁻¹ do 110 °C s výdrží 10 min, vzestupný gradient 3 °C·min⁻¹ do 200 °C s výdrží 0 min, celková doba analýzy 65 min
- Hmotnostní detektor v modu EI
 - Energie ionizačních elektronů: 70 eV
 - Teplota iontového zdroje: 200 °C
 - Skenovací rozsah m/z: 30–370 amu
 - Rychlost skenování: 0,2 s



Obrázek 9: Plynový chromatograf Trace™ 1310 s hmotnostním spektrometrem ISQ™ LT

3.2.2 Vyhodnocení výsledků analýzy

Těkavé látky byly identifikovány pomocí programu Xcalibur 2.2 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) srovnáním hmotnostních spekter s knihovnou spekter. Vzorek byl vždy analyzován dvakrát ($n = 2$). Obsah identifikovaných sloučenin je vyjádřen semikvantitativně pomocí ploch příslušných píků na chromatogramu.

Výsledky byly zpracovány pomocí programu MS Excel 2010. V rámci statistického vyhodnocení byl pro naměřená data vypočten průměrný retenční čas jako aritmetický průměr pro jednotlivé analýzy (T_R) a relativní odchylka (δT_R) v procentech.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Hlavní cílem této diplomové práce bylo srovnat profil aromaticky aktivních látek ve vzorcích kozího a kravského mléka. Celkem bylo analyzováno 21 vzorků mléka – 8 vzorků mléka kravského a 13 kozího. Dva vzorky mléka kravského a jeden vzorek mléka kozího byly zakoupeny v běžné tržní síti. Ostatní vzorky pocházely přímo od chovatelů. Od těchto vzorků byl vždy jeden vzorek mléko čerstvé syrové, jeden vzorek mléka ošetřeného šetrnou pasterací a jeden vzorek přešlý varem. Navíc bylo kozí mléko od jednoho chovatele ponecháno 3 dny v lednici při teplotě 6 °C a poté analyzováno v syrovém stavu, ošetřené šetrnou pasterací a přešlé varem. Každý vzorek byl proměřen dvakrát. Ukázky chromatogramů jsou uvedeny v přílohách 1 a 2.

4.1 Identifikace těkavých látek ve vzorcích mléka

Pro extrakci aromatických látek ve vzorcích mléka byla použita metoda headspace mikroextrakce tuhou fází ve spojení s plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí (HS-SPME-GC-MS) za podmínek uvedených v kap. 3.2.2. Identifikace byla provedena na základě srovnání hmotnostních spekter s dostupnou knihovnou spekter. Pro identifikaci byla brána v úvahu min. 80% pravděpodobnost shody spekter. Pro zjištění, zda jsou identifikované sloučeniny opravdu aromaticky aktivní, výsledky byly porovnány s dostupnou literaturou a s databázemi aromatických látek. [44, 45, 49]

Obsah aromaticky aktivních látek ve vzorcích byl zjišťován semikvantitativně srovnáním ploch píků jednotlivých sloučenin. Tento přístup se v praxi často používá, i přes určité zjednodušení lze tímto způsobem poměrně dobře postihnout rozdíly mezi vzorky.

V tabulkách 12 a 13 je uveden přehled všech identifikovaných aromatických látek v jednotlivých vzorcích. Vzhledem k mírným odchylkám retenčních časů je vždy uveden průměr ze všech měřených vzorků, ve kterých se daná sloučenina nacházela. Relativní směrodatná odchylka se pohybovala u téměř všech sloučenin pod 1 %, což lze považovat za výbornou opakovatelnost. Pravděpodobnost u všech uvedených sloučenin byla minimálně 80 %.

Tabulka 12a: Přehled těkavých sloučenin identifikovaných ve vzorcích kozího mléka

Název sloučeniny	T _R [min]	Skupina	KoKS	KoKP	KoKV	KoSS	KoSP	KoSV	KoOS	KoOP	KoOV	KoOSS	KoOSP	KoOSV	KoS _u
Ethanol	4,58	alkohol	✓	✓	✓							✓	✓	✓	
Pentan-2-on	5,56	keton		✓											✓
Pentanal	5,64	aldehyd								✓					
3-methylbutanal	5,65	aldehyd					✓	✓							
Ethyl ester octové kyseliny	5,66	ester										✓			
Butan-2,3-dion	5,70	keton													
Metyhl ester butanové kyseliny	5,79	ester													
Trichlormethan	6,81	alkan									✓				
Dimethyl disulfid	8,45	sírná sloučenina		✓											
Hexanal	8,72	aldehyd		✓		✓	✓	✓	✓	✓			✓	✓	✓
Arginin	8,75	aminokyselina									✓				
β-pinen	9,04	ostatní				✓									
Kamfen	9,69	ostatní	✓												
3-methyl-1-butanyl ester octové kyseliny	10,03	ester										✓			
3-methyl-1-butanyl ester octové kyseliny	10,13	ester											✓		
p-xylen (1,4-dimethylbenzen)	10,78	ostatní										✓	✓		
m-xylene (1,3-dimethylbenzen)	12,55	ostatní										✓	✓		
Heptan-2-on	12,61	keton		✓			✓							✓	✓
3-methylhexanal	12,69	aldehyd													
Heptanal	12,70	aldehyd	✓			✓	✓	✓	✓	✓			✓		
Methyl ester hexanové kyseliny	12,76	ester													
Limonen	12,84	ostatní	✓	✓					✓	✓		✓			

Tabulka 12b: Pokračování

Název sloučeniny	T _R [min]	Skupina	KoKS	KoKP	KoKV	KoSS	KoSP	KoSV	KoOS	KoOP	KoOV	KoOSS	KoOSP	KoOSV	KoSu
3-methylbutanol	13,79	alkohol				✓		✓				✓	✓	✓	
Pentanol	15,58	alkohol		✓			✓	✓						✓	
Styren	15,85	alken													
o-cymen (4-isopropyltoluen)	16,63	ostatní	✓	✓	✓										
Mesitylen	16,74	ostatní										✓	✓		
Oktan-2-on	16,96	keton		✓											✓
Oktanal	17,13	aldehyd	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓			✓	✓	✓
Acetoin (3-hydroxybutan-2-on)	17,20	keton	✓		✓	✓		✓				✓	✓	✓	✓
1-hydroxypropan-2-on	18,01	keton												✓	
Methyl ester octové kyseliny	18,04	ester												✓	
6-methylhept-5-en-2-on	19,28	keton							✓	✓		✓	✓	✓	
6-methyl-5-hepten-2-on	19,29	keton												✓	
Hexyl ester mravenčí kyseliny	19,91	ester													
Hexanol	19,92	alkohol								✓		✓	✓		
Dimethyl trisulfid	21,06	siřná sloučenina		✓											
Nonan-2-on	21,38	keton		✓											✓
Nonanal	21,61	aldehyd	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Furfural	24,95	aldehyd												✓	
2-ethylhexanol	25,67	alkohol	✓			✓							✓		
Dekanal	26,01	aldehyd	✓	✓		✓	✓	✓		✓			✓		
Benzaldehyd	27,44	aldehyd	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓			✓	✓	✓
3-hydroxyethyl ester butanové kyseliny	27,46	ester	✓	✓											
(E)-2-nonenal	28,94	aldehyd	✓												

Tabulka 12c: Pokračování

Název sloučeniny	T _R [min]	Skupina	KoKS	KoKP	KoKV	KoSS	KoSP	KoSV	KoOS	KoOP	KoOV	KoOSS	KoOSP	KoOSV	KoSu
Oktanol	28,96	alkohol								✓					
Dimethyl sulfoxid	30,07	sírná sloučenina													
Undekan-2-on	31,33	keton		✓											
Ethyl ester dekanové kyseliny	34,24	ester								✓			✓		
Kyselina másečná	34,87	kyseliny													
Nonanol	36,20	alkohol													
2-furanmethanol	36,75	alkohol	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓		✓	✓	✓
2(5H)-furanon	42,46	keton			✓										
Methyl ester dodekanové kyseliny	44,81	ester													
Tridekan-2-on	45,08	keton													
Ethyl ester hexadekanové kyseliny	46,83	ester	✓											✓	
Kyselina hexanová	47,75	kyseliny	✓	✓	✓	✓	✓	✓							
Benzylalkohol	48,55	alkohol	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓				✓		✓
Dimethyl sulfon	49,69	keton		✓	✓	✓	✓	✓						✓	
Undekanol	52,24	alkohol				✓									
Maltol	52,34	alkohol		✓	✓		✓							✓	
Ethyl ester hexanové kyseliny	52,52	ester							✓						
Methyl ester tetradekanové kyseliny	53,71	ester			✓									✓	
Isopropyl ester myristové kyseliny	54,67	ester										✓			
Kyselina octová	56,11	kyseliny	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓	✓	✓	✓
Kyselina oktanová	56,12	kyseliny	✓	✓	✓	✓	✓	✓							✓

Tabulka 12d: Pokračování

Název sloučeniny	T _R [min]	Skupina	KoKS	KoKP	KoKV	KoSS	KoSP	KoSV	KoOS	KoOP	KoOV	KoOSS	KoOSP	KoOSV	KoSu
Kyselina oktanová	56,12	kyseliny	✓	✓	✓	✓	✓	✓							✓
5-heptyldihydro-2(3H)-furanon	57,50	keton									✓				
Kyselina nonanová	59,70	kyseliny	✓	✓	✓	✓	✓	✓							
2-hydroxy-gamma-butyrolaceton	59,73	keton												✓	
Kaprolakton	59,83	keton													
Methyl ester dekanové kyseliny	60,80	ester													✓
Kyselina tetradekanová	63,45	kyseliny							✓	✓					
Methyl ester hexadekanové kyseliny	67,37	ester										✓			
Benzofenon	69,24	keton							✓						
Kyselina dodekanová	69,85	kyseliny			✓	✓	✓	✓							
5-hydroxymethylfurfural	70,48	aldehyd	✓	✓	✓	✓	✓	✓						✓	
Kyselina pentadekanová	72,88	kyseliny								✓					

Označení vzorků viz tabulka 11.

Tabulka 13a: Přehled těkavých sloučenin identifikovaných ve vzorcích kravského mléka

Název sloučeniny	T _R [min]	Skupina	KrOS	KrOP	KrOV	KrCS	KrCP	KrCV	KrSu Pln	KrSu Pol
Ethanol	4,58	alkohol	✓							
Pentan-2-on	5,56	keton								✓
Pentanal	5,64	aldehyd								
3-methylbutanal	5,65	aldehyd								
Ethyl ester octové kyseliny	5,66	ester								
Butan-2,3-dion	5,70	keton	✓	✓						
Metyhl ester butanové kyseliny	5,79	ester							✓	
Trichlormethan	6,81	alkan							✓	✓
Dimethyl disulfid	8,45	sírná sloučenina								
Hexanal	8,72	aldehyd		✓		✓	✓			✓
Arginin	8,75	aminokyselina			✓					
β-pinen	9,04	ostatní								
Kamfen	9,69	ostatní								
3-methyl-1-butanyl ester octové kyseliny	10,03	ester								
p-xylén (1,4-dimethylbenzen)	10,78	ostatní						✓		
m-xylene (1,3-dimethylbenzen)	12,55	ostatní								
Heptan-2-on	12,61	keton			✓	✓		✓	✓	✓
3-methylhexanal	12,69	aldehyd		✓						
Heptanal	12,70	aldehyd	✓			✓	✓	✓		
Methyl ester hexanové kyseliny	12,76	ester							✓	
Limonen	12,84	ostatní								
3-methylbutanol	13,79	alkohol								
Pentanol	15,58	alkohol	✓	✓					✓	
Styren	15,85	alken							✓	
o-cymen (4-isopropyltoluen)	16,63	ostatní								
Mesitylen	16,74	ostatní						✓		
Oktan-2-on	16,96	keton						✓		✓
Oktanal	17,13	aldehyd	✓	✓		✓	✓	✓		✓
Acetoin (3-hydroxybutan-2-on)	17,20	keton	✓	✓	✓				✓	
1-hydroxypropan-2-on	18,01	keton	✓							
Methyl ester octové kyseliny	18,04	ester								
6-methylhept-5-en-2-on	19,28	keton						✓		
6-methyl-5-hepten-2-on	19,29	keton								
Hexyl ester mravenčí kyseliny	19,91	ester				✓				
Hexanol	19,92	alkohol	✓				✓	✓	✓	
Dimethyl trisulfid	21,06	sírná sloučenina								
Nonan-2-on	21,38	keton			✓				✓	✓
Nonanal	21,61	aldehyd	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Tabulka 13b: Pokračování

Název sloučeniny	T _R [min]	Skupina	KrOS	KrOP	KrOV	KrCS	KrCP	KrCV	KrSu Pln	KrSu Pol
Furfural	24,95	aldehyd								
2-ethylhexanol	25,67	alkohol						✓		
Dekanal	26,01	aldehyd				✓		✓		✓
Benzaldehyd	27,44	aldehyd				✓		✓	✓	✓
3-hydroxyethyl ester butanové kyseliny	27,46	ester								
(E)-2-nonenal	28,94	aldehyd								
Oktanol	28,96	alkohol	✓			✓			✓	
Dimethyl sulfoxid	30,07	sírná sloučenina	✓	✓						
Undekan-2-on	31,33	keton						✓		
Ethyl ester dekanové kyseliny	34,24	ester								
Kyselina máselná	34,87	kyseliny				✓				
Nonanol	36,20	alkohol						✓		
2-furanmethanol	36,75	alkohol	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2(5H)-furanon	42,46	keton	✓	✓						
Methyl ester dodekanové kyseliny	44,81	ester				✓			✓	
Tridekan-2-on	45,08	keton								✓
Ethyl ester hexadekanové kyseliny	46,83	ester								
Kyselina hexanová	47,75	kyseliny	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓
Benzylalkohol	48,55	alkohol	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Dimethyl sulfon	49,69	keton				✓	✓		✓	✓
Undekanol	52,24	alkohol								
Maltol	52,34	alkohol	✓	✓						
Ethyl ester hexanové kyseliny	52,52	ester								
Methyl ester tetradekanové kyseliny	53,71	ester				✓			✓	✓
Isopropyl ester myristové kyseliny	54,67	ester								
Kyselina octová	56,11	kyseliny	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓
Kyselina oktanová	56,12	kyseliny				✓	✓	✓	✓	✓
5-heptyldihydro-2(3H)- furanon	57,50	keton								
Kyselina nonanová	59,70	kyseliny				✓	✓	✓	✓	✓
2-hydroxy-gamma- butyrolaceton	59,73	keton								
Kaprolakton	59,83	keton		✓						
Methyl ester dekanové kyseliny	60,80	ester								

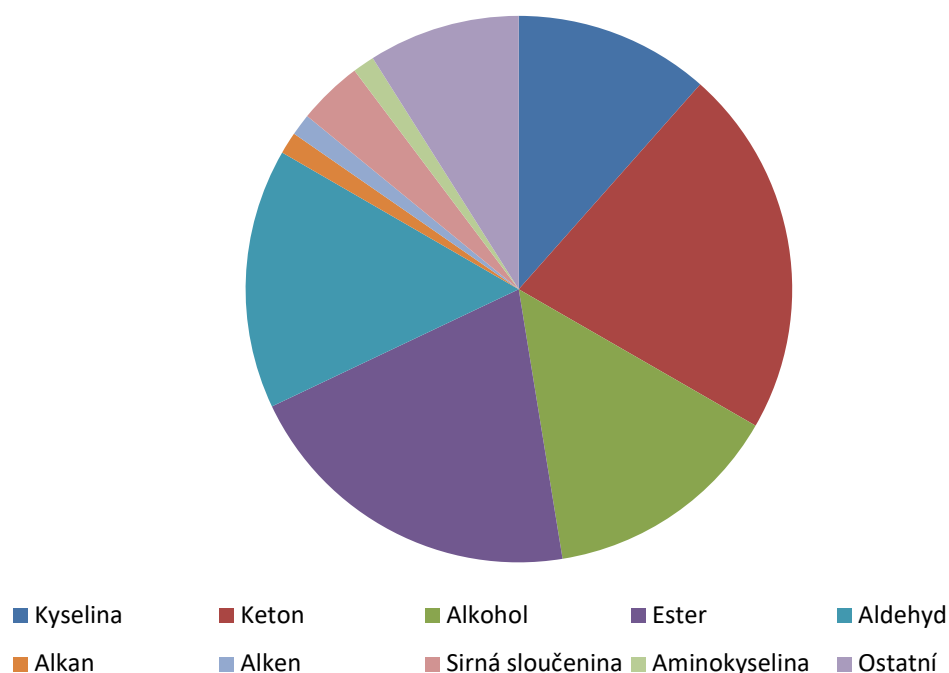
Tabulka 13c: Pokračování

Název sloučeniny	T _R [min]	Skupina	KrOS	KrOP	KrOV	KrCS	KrCP	KrCV	KrSu Pln	KrSu Pol
Kyselina tetradekanová	63,45	kyseliny								
Methyl ester hexadekanové kyseliny	67,37	ester								
Benzofenon	69,24	keton								
Kyselina dodekanová	69,85	kyseliny				✓	✓	✓		✓
5-hydroxymethylfurfural	70,48	aldehyd			✓	✓	✓	✓	✓	✓
Kyselina pentadekanová	72,88	kyseliny								

Označení vzorků viz tabulka 11.

4.2 Srovnání počtu identifikovaných látek ve vzorcích

Celkem bylo ve vzorcích identifikováno 78 těkavých látek, z toho 17 ketonů, 16 esterů, 12 aldehydů, 11 alkoholů, 9 karboxylových kyselin, 7 ostatních látek, 3 sirné sloučeniny a po jednom alkanu, alkenu a aminokyselině (viz graf 1).



Graf 1: Počet identifikovaných látek podle chemických skupin

4.2.1 Identifikace sloučenin ve vzorcích kravského mléka

Ve vzorcích kravského mléka bylo identifikováno celkem 48 těkavých látek, z toho 13 ketonů, 9 alkoholů, 8 aldehydů, 7 karboxylových kyselin, 5 esterů, 2 sloučeniny ostatní, 1 aminokyselina, 1 sirná sloučenina, 1 alkan a 1 alken.

Srovnáním počtu identifikovaných látek jednotlivých vzorků kravského mléka bylo zjištěno, že nejvíce jich obsahoval vzorek KrSuPol a to celkem 26 sloučenin – 6 karboxylových kyselin, 6 alkoholů, 6 ketony, 6 aldehydů, 1 ester a 1 alkan.

Naopak nejméně těkavých látek obsahoval vzorek KrOV a to celkem 9 sloučenin, z nichž 3 byly ketony, 2 alkoholy, 2 aldehydy, 1 karboxylová kyselina a 1 aminokyselina.

Vzorky kravského mléka od chovatele a z mléčného automatu se od sebe lišily v průměru o 6 sloučenin. Mléko zakoupené v běžné tržní síti se od těch čerstvých lišilo znatelněji. Největší počet identifikovaných látek obsahoval vzorek KrSuPol. Zároveň je malý rozdíl mezi vzorky polotučného a plnotučného mléka. Překvapivě je mléko polotučné bohatší celkem o 3 látky. Největší rozdíl je v počtu aldehydů, kterých je více v mléce polotučném, naopak esterů je více v mléce plnotučném.

U vzorků KrOS, KrOP a KrOV nebyl nalezen ani jeden ester. Se zvyšující se tepelnou úpravou vzorků klesal nejen celkový počet nalezených těkavých látek, ale rovněž klesl počet sloučenin u každé chemické skupiny, jak je vidět v tabulce 14.

Porovnáním lze tvrdit, že hlavní roli v kravském mléce hrají především aldehydy, alkoholy a karboxylové kyseliny, jak je vidět v grafu 2.

4.2.2 Identifikace sloučenin ve vzorcích kozího mléka

Ve vzorcích kozího mléka identifikováno celkem 64 těkavých látek, z toho 14 ketonů, 13 esterů, 11 aldehydů, 9 alkoholů, 8 karboxylových kyselin, 6 ostatních látek, 2 sirné sloučeniny a 1 aminokyselinu.

Nejméně identifikovaných těkavých sloučenin bylo ve vzorku KoOV, a to celkem 5 sloučenin, a to 1 keton, 1 alkohol, 1 aldehyd, 1 alkan a 1 aminokyselina.

Nejvíce těkavých látek bylo nalezeno ve vzorku KoKP a to celkem 27 sloučenin – 6 ketonů, 6 aldehydů, 5 karboxylových kyselin, 5 alkoholů, 2 sirné sloučeniny, 2 ostatní sloučeniny a 1 ester.

Rozdíly mezi vzorky kozího mléka od různých chovatelů jsou především v celkovém počtu identifikovaných těkavých látek, kdy nejvíce sloučenin bylo nalezeno v mléce od chovatele 1, naopak nejméně v čerstvém mléce od chovatele 3. Mléko od chovatelů se počtem identifikovaných látek příliš nelišilo od mléka kupovaného v běžné tržní síti.

Záhřev měl na vzorky jen malý vliv. U většiny vzorků kozího mléka se množství sloučenin se zahřevem snižovalo, kromě staršího mléka od chovatele 3, kdy se počet sloučenin naopak zvyšoval.

Stáří mléka ovlivnilo znatelně počet těkavých látek v mléce. Ve starším mléce bylo nalezeno průměrně o 20 látek více než v mléce čerstvém. Změnil se převážně počet ketonů, alkoholů, esterů a aldehydů.

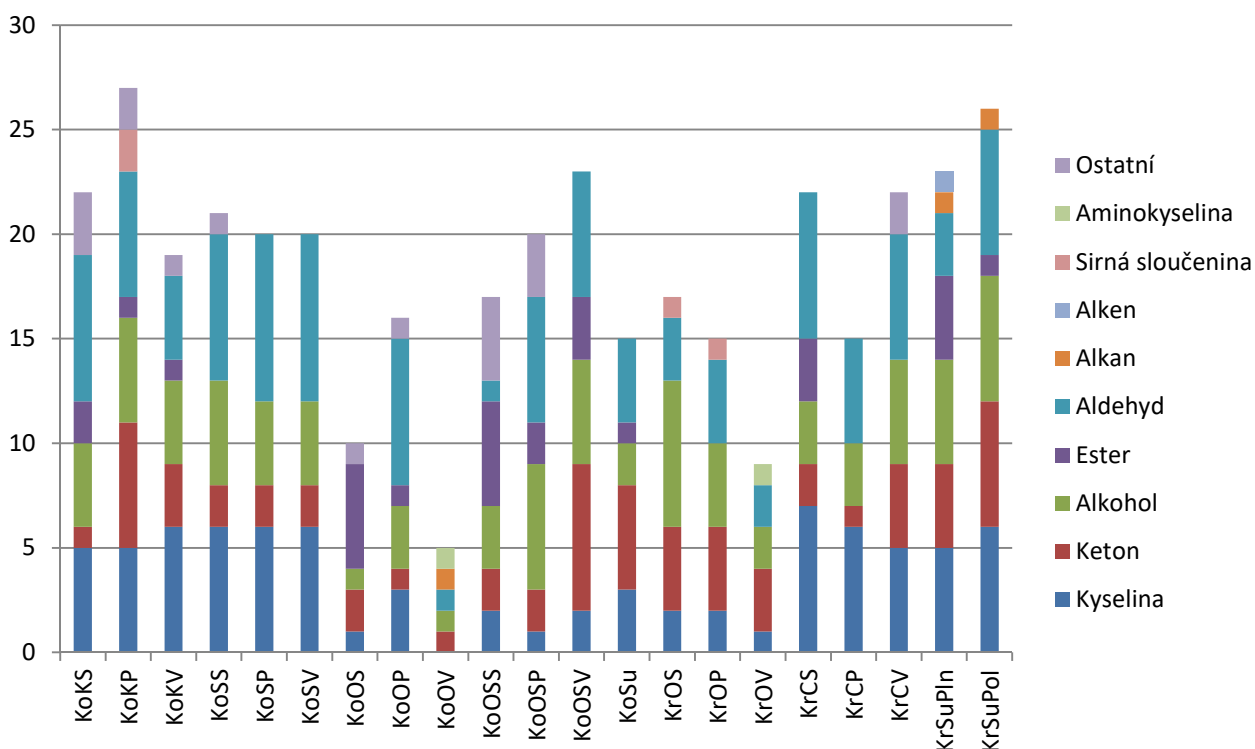
Rovněž u vzorků mléka kravského lze říci, že největší zastoupení mají v kozím mléce aldehydy, alkoholy a karboxylové kyseliny (viz graf 2).

Přehled zastoupení všech chemických skupin u vzorků kozího i kravského mléka je znázorněn v tabulce 14 a grafu 2.

4.2.3 Srovnání zastoupení aromaticky aktivních látek ve vzorcích kozího a kravského mléka

Vzorky kozího mléka byly na těkavé látky bohatší. Celkem v nich bylo identifikováno o 16 aromaticky aktivních látek více než ve vzorcích mléka kravského. V kozím mléce bylo nalezeno o 8 esterů, 4 ostatní sloučeniny, 3 aldehydy, 1 keton, 1 karboxylovou kyselinu a 1 sirnou sloučeninu více než v mléce kravském. Alkoholů bylo v obou druzích mléka nalezeno stejně, tedy 9. Naopak v kravském mléce byly nalezeny navíc 1 alkan a 1 alken, které se v kozím mléce nevyskytovaly.

Některé těkavé látky byly identifikovány pouze ve vzorcích kravského mléka, např. kaprolakton, nonanal, kyselina máselná, methyl ester kyseliny butanové a další (celkem 13, viz tabulka 13). Naopak některé sloučeniny byly nalezeny pouze v kozím mléce, jako např. pentanal, furfural, dimethyl disulfid a trisulfid, limonen, kyselina pentadekanová a tetradekanová, benzofenon a další (celkem 30, viz tabulka 12).



Graf 2: Přehled zastoupení sloučenin dle chemických skupin; značení vzorků viz tabulka 11

Tabulka 14: Přehled zastoupení sloučenin dle chemických skupin; značení vzorků viz tabulka 11

Vzorek	Kyselina	Keton	Alkohol	Ester	Aldehyd	Alkan	Alken	Sírná sloučenina	Aminokyselina	Ostatní	Celkem
KoKS	5	1	4	2	7	0	0	0	0	3	22
KoKP	5	6	5	1	6	0	0	2	0	2	27
KoKV	6	3	4	1	4	0	0	0	0	1	19
KoSS	6	2	5	0	7	0	0	0	0	1	21
KoSP	6	2	4	0	8	0	0	0	0	0	20
KoSV	6	2	4	0	8	0	0	0	0	0	20
KoOS	1	2	1	5	0	0	0	0	0	1	10
KoOP	3	1	3	1	7	0	0	0	0	1	16
KoOV	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	5
KoOSS	2	2	3	5	1	0	0	0	0	4	17
KoOSP	1	2	6	2	6	0	0	0	0	3	20
KoOSV	2	7	5	3	6	0	0	0	0	0	23
KoS _u	3	5	2	1	4	0	0	0	0	0	15
KrOS	2	4	7	0	3	0	0	1	0	0	17
KrOP	2	4	4	0	4	0	0	1	0	0	15
KrOV	1	3	2	0	2	0	0	0	1	0	9
KrCS	7	2	3	3	7	0	0	0	0	0	22
KrCP	6	1	3	0	5	0	0	0	0	0	15
KrCV	5	4	5	0	6	0	0	0	0	2	22
KrSuPln	5	4	5	4	3	1	1	0	0	0	23
KrSuPol	6	6	6	1	6	1	0	0	0	0	26

4.3 Srovnání obsahu identifikovaných látek ve vzorcích

Obsah aromaticky aktivních látek ve vzorcích byl zjišťován semikvantitativně srovnáním ploch píků jednotlivých sloučenin. Tento přístup se v praxi často používá, i přes určité zjednodušení lze tímto způsobem poměrně dobře postihnout rozdíly mezi vzorky.

Srovnání obsahu identifikovaných těkavých látek ve všech vzorcích je znázorněn v grafu 3, jsou z něj dobře patrné rozdíly mezi vzorky.

Ve vzorcích kozího mléka bylo největší zastoupení karboxylových kyselin vzorku KoKV. Ketonů bylo nejvíce ve vzorcích KoS_u, alkoholy byly nejvíce zastoupeny ve vzorcích KoOSV, největší množství esterů bylo ve vzorcích KoOS, aldehydy byly nejvíce obsaženy ve vzorku KoOSV, ostatní sloučeniny se nejvíce vyskytovaly ve vzorku KoOSS, alkany ve vzorku KoOV, aminokyseliny ve vzorku KoOV, sírné sloučeniny ve vzorku KoKP a alkeny se nenacházely v kozím mléce žádné.

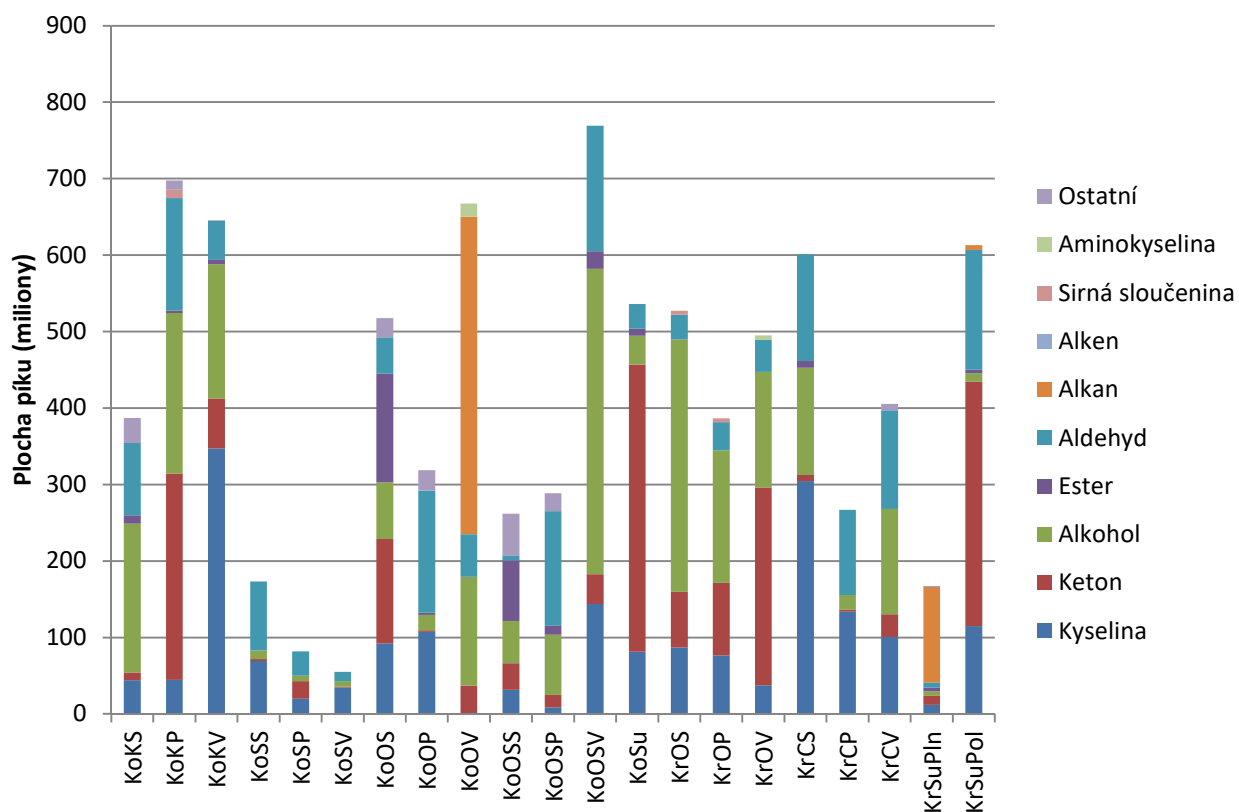
Ve vzorcích kravského mléka byl největší obsah karboxylových kyselin ve vzorku KrCS. Ketonů bylo nejvíce ve vzorku KrSuPol, alkoholy byly nejvíce zastoupeny ve vzorku KrOS. Největší množství esterů bylo ve vzorku KrCS, aldehydy byly nejvíce obsaženy ve vzorku KrSuPol, ostatní sloučeniny se nejvíce vyskytovaly ve vzorku KrCV, alkany ve vzorku KrSuPln, aminokyseliny ve vzorku KrOV, sírné sloučeniny ve vzorku KrOP a alkeny ve vzorku KrSuPln.

Celkově bylo nejvíce karboxylových kyselin ve vzorku kozího mléka KoKV, ketonů ve vzorku kozího mléka KoSu, alkoholů ve vzorku kozího mléka KoOSV, esterů ve vzorku kozího mléka KoOS, aldehydů ve vzorku kozího mléka KoOSV, alkan ve vzorku kozího mléka KoOV, alken ve vzorku kravského mléka KrSuPln, sirné sloučeniny ve vzorku kozího mléka KoKP, aminokyselina ve vzorku kozího mléka KoOV a ostatní sloučeniny ve vzorku kozího mléka KoOSS.

Rozdíl v celkovém obsahu těkavých látek u mléka kravského a kozího nebyl příliš velký, ovšem vyšší byl u mléka kravského. Rozdíly byly především v obsahu jednotlivých chemických skupin. Průměrně více karboxylových kyselin bylo u vzorků kravského mléka, stejně jako ketonů a alkoholů. Obsah aldehydů, alkenů, sirných sloučenin a aminokyselin byl téměř stejný. Naopak obsah esterů, alkanů a ostatních sloučenin byl vyšší u kozího mléka.

Mezi vzorky kozího mléka od jednotlivých chovatelů byly relativně velké rozdíly v průměrném obsahu těkavých látek. Nejmenší průměrný obsah identifikovaných látek byl ve vzorcích mléka od chovatele 2, naopak nevyšší u chovatele 1. Rozdíl mezi čerstvým a starším mlékem nebyl příliš velký, ovšem překvapivě byl menší obsah těkavých látek v mléce starším. Rozdíl mezi mlékem kupovaným a od chovatelů nebyl příliš výrazný, dalo by se zařadit mezi mléko od chovatele 1 a od chovatele 3.

Mezi vzorky kravského mléka byly relativně velké rozdíly v průměrném obsahu identifikovaných sloučenin. Největší obsah těkavých sloučenin byl ve vzorku KrSuPol, tedy kupovaném polotučném mléce, naopak nejnižší ve vzorku KrSuPln, tedy kupovaném plnotučném mléce. Rozdíl mezi mlékem čerstvým od chovatele a z mléčného automatu nebyl příliš výrazný, větší obsah látek byl ovšem v mléce od chovatele. Záhřevem se obsah těkavých látek snížil.



Graf 3: Obsah těkavých látek podle chemických skupin ve vzorcích mléka; značení vzorků viz tabulka 11

5 ZÁVĚR

Hlavní cílem této diplomové práce bylo srovnat profil aromaticky aktivních látek ve vzorcích kozího a kravského mléka pomocí metody headspace mikroextrakce tuhou fází ve spojení s plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí (HS-SPME-GC-MS).

Celkem bylo analyzováno 21 vzorků mléka, z toho 13 vzorků bylo mléko kozí a 8 mléko kravské. Tři vzorky mléka byly zakoupeny v běžné tržní síti, ostatní pocházely přímo od chovatelů a byly analyzovány v syrovém stavu, i po tepelném ošetření.

Celkem bylo ve vzorcích identifikováno 78 těkavých látek, z toho 17 ketonů, 16 esterů, 12 aldehydů, 11 alkoholů, 9 karboxylových kyselin, 7 ostatních látek, 3 sirné sloučeniny a po jednom alkanu, alkenu a aminokyselině. Na sloučeniny bohatší bylo mléko kozí, ve kterém bylo identifikováno celkem 64 sloučenin, v kravském mléce bylo nalezeno celkem 48 těkavých látek. V obou druzích mléka byly nejvíce zastoupeny ketony. Ze vzorků kozího mléka byl na těkavé sloučeniny nejbohatší vzorek KoKP (pasterované od chovatele 1)(27 sloučenin) a naopak nejméně jich bylo ve vzorku KoOV (převařené od chovatele 3)(5 sloučenin). Ze vzorků kravského mléka bylo nejvíce aromaticky aktivních látek nalezeno ve vzorku KrSuPol (zakoupené polotučné)(26 sloučenin) a naopak nejméně ve vzorku KrOV (převařené od chovatele)(9 sloučenin).

Mezi vzorky byly nalezeny rozdíly v počtu i v obsahu identifikovaných sloučenin. Některé těkavé látky byly identifikovány pouze ve vzorcích kravského mléka, např. kaprolakton, nonanal, kyselina máselná, methyl ester kyseliny butanové a další (celkem 13). Naopak některé sloučeniny byly nalezeny pouze v kozím mléce, jako např. pentanal, furfural, dimethyl disulfid a trisulfid, limonen, kyselina pentadekanová a tetradekanová, benzofenon a další (celkem 30).

Obsah aromaticky aktivních látek ve vzorcích byl zjišťován semikvantitativně srovnáním ploch píků jednotlivých sloučenin. Průměrně bylo větší množství těkavých látek v mléce kravském, kromě esterů, alkanů a ostatních sloučenin, kterých se nacházelo více v mléce kozím. V důsledku tepelného ošetření mléka došlo ke snížení počtu i obsahu identifikovaných sloučenin.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] SKAPETAS, B. a V. BAMPIDIS. Goat production in the world: Present situation and trends. *Livestock Research for Rural Development* [online]. Fundacion CIPAV, 2016, **28**(11), [cit. 2016-11-29]. ISSN 01213784. Dostupné z: <http://www.lrrd.org/lrrd28/11/skap28200.html>
- [2] BELITZ, Hans-Dieter, Werner GROSCHE a Peter SCHIEBERLE. *Food chemistry*. 4th, rev. and extended ed. Berlin: Springer, 2009. ISBN 978-3-540-69933-0.
- [3] Správa mléčných kvót. *Státní zemědělský intervenční fond* [online]. Praha [cit. 2019-04-15]. Dostupné z: <https://www.szif.cz/cs/sprava-mlecnych-kvot?year=-1&lyt=w3zpravy&ino=1&page=4&isarchiv=true>
- [4] SVAZ CHOVATELŮ OVCÍ A KOZ. Výsledky kontroly užitkovosti koz za rok 2018. In: *Svaz chovatelů ovcí a koz Česká republika* [online]. Praha, 2019 [cit. 2019-04-14]. Dostupné z: https://www.schok.cz/sites/default/files/KU_2018.pdf
- [5] JOSROVÁ, Lenka. *Situační a výhledová zpráva: Ovce a kozy*. Praha: Ministerstvo zemědělství České republiky, 2018. ISBN 978-80-7434-424-4.
- [6] HÖKL, Jan a Mirko ŠTĚPÁNEK. *Hygiena mléka: učebnice pro veterinární fakulty Vysoké školy zemědělské*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1956.
- [7] ČERVENĚ, Jozef a Ivan PREKOPP. *Základy technológie mlieka a mliečnych výrobkov*. Bratislava: Slovenské vydavateľstvo technickej literatúry, 1958.
- [8] URBAN, František. *Chov dojeného skotu: [reprodukce, odchov, management, technologie, výživa]*. Praha: Apros, 1997. ISBN 80-901-1007-X.
- [9] NAVRÁTILOVÁ, Pavlína, Bohumíra JANŠTOVÁ a Hana PŘIDALOVÁ. *Hygiena produkce mléka*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2012. ISBN 978-80-7305-625-4.
- [10] ORAVCOVÁ, Valéria. *Hygiena získavania a ošetrovania mlieka v provýrobe*. Bratislava: Ústav zdravotnej výchovy Bratislava, 1968.
- [11] JANŠTOVÁ, Bohumíra a Pavlína NAVRÁTILOVÁ. *Produkce mléka a technologie mléčných výrobků*. Brno: VFU Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-712-1.
- [12] GAJDŮŠEK, Stanislav a Vladimír KLÍČNÍK. *Mlékařství II*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 1998. ISBN 80-715-7342-6.
- [13] KADLEC, Pavel. *Technologie potravin*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. ISBN 80-708-0510-2.
- [14] MARSILI R.: *Techniques for analysing food aroma*. 1.vyd. vNew Yorku, USA: Marcel Dekker, 1997, 383 s.
- [15] GAJDŮŠEK, Stanislav. *Laktologie*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003. ISBN 80-715-7657-3.
- [16] HOLEC, Josef. *Hygiena a technologie mléka a mléčných výrobků*. 2., přeprac. vyd. Praha: SPN, 1989. ISBN 80-851-1460-7.
- [17] ŠÍPALOVÁ, M. a S. KRÁČMAR. Aroma active compounds in milk from goat fed basil (*Ocimum basilicum*). *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* [online]. 1105, (3), 171-177 [cit. 2017-03-08]. ISSN 1211-8516.

- [18] JOVANOVIČOVÁ, Ana. Základní fytochemický výzkum některých taxonů oddělení Eumycota s ohledem na studium antioxidační aktivity. Hradec Králové, 2007. Diplomová práce.
- [19] STEVENSON, Tom. Wine aromas and flavours. In: Wine-pages [online]. 2003 [cit. 2017-03-09]. Dostupné z: <http://wine-pages.com/columnist-articles/wine-tastes-and-flavours/>.
- [20] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [21] LUKÁŠOVÁ, Jindra. *Hygiena a technologie produkce mléka*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 1999. ISBN 80-851-1453-4.
- [22] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [23] YANG, C.J., W. DING, L.J. MA a R. JIA. Discrimination and characterization of different intensities of goaty flavor in goat milk by means of an electronic nose. *Journal of Dairy Science* [online]. Elsevier, 1501, 98(1), 55-67 [cit. 2017-03-08]. DOI: 10.3168/jds.2014-8512. ISSN 0022-0302.
- [24] MORGAN, François a Patrice GABORIT. The typical flavour of goat milk products: technological aspects. *International Journal of Dairy Technology* [online]. Oxford, UK: Blackwell Science, 0102n. 1., 54(1), 38-40 [cit. 2017-03-09]. DOI: 10.1046/j.1471-0307.2001.00006.x. ISSN 1364-727X.
- [25] EKNAES, M. a S. SKEIE. Effect of different level of roughage availability and contrast levels of concentrate supplementation on flavour of goat milk. *Small ruminant research* [online]. 2006, 66, 32-43 [cit. 2017-03-08]. ISSN 0921-4488.
- [26] GAJDUŠEK, Stanislav a Vladimír KLÍČNÍK. *Mlékařství*. Brno: ediční středisko VŠZ, 1985.
- [27] JANŠTOVÁ, Bohumíra, Lenka VORLOVÁ a Pavlína NAVRÁTILOVÁ. *Technologie mléka a mléčných výrobků*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2012. ISBN 978-80-7305-637-7.
- [28] PRÍBELA, Alexander. *Analýza potravin: cvičenie*. 2. vyd. Bratislava: Slovenská vysoká škola technická, 1988.
- [29] POKORNÝ, Jan a Jiří DAVÍDEK. *Analýza potravin: část B - Senzorická analýza*. Praha: VŠCHT, 1986.
- [30] INGR, Ivo, Jan POKORNÝ a Helena VALENTOVÁ. *Senzorická analýza potravin*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 1997. ISBN 80-715-7283-7.
- [31] JAROŠOVÁ, Alžběta. *Senzorické hodnocení potravin*. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2001. ISBN 80-715-7539-9.
- [32] ČSN ISO 8589: *Senzorická analýza - obecné pokyny pro uspořádání senzorického pracoviště*. 2008.
- [33] POKORNÝ, Jan, Zdeňka PANOVSÁ a Helena VALENTOVÁ. *Senzorická analýza potravin*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1998. ISBN 80-708-0329-0.
- [34] POKORNÝ, Jan, Helena VALENTOVÁ a František PUDIL. *Senzorická analýza potravin: laboratorní cvičení*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1997. ISBN 80-708-0278-2.

- [35] SPITZER, Gerhard. *Hygiena a technologie potravin: učební text pro střední zemědělské technické školy oboru veterinárního*. 2. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1964. Živočišná výroba (Státní zemědělské nakladatelství).
- [36] PAWLISZYN J.: *Solid phase microextraction –theory and practise*. Wiley –VCH, 1997, 247 s. ISBN 0 –471 –19034 –9.
- [37] PAWLISZYN J., PAWLISZYN B., PAWLISZYNM.: *Solid phase microextraction*. Journal -The chemical educator, 2005, str. 1-7, Dostupné z <http://www.springerlink.com/content/h72xx3624q122085/>
- [38] HOLADOVÁ K.: *Aplikační možnosti SPME při analýze potravin a prostředí*. Sborník příspěvků ze XIV. semináře s mezinárodní účastí –Kontaminanty a další rizikové látky v potravinách a ekosystémech, 2001, 109s.
- [39] CONDURSOC., VERZERA A., ROMEO V., ZIINO M., CONTEF.: Solid-phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry analysis of dairy product volatiles for the determination of shelflife. *International dairy journal*. 2008, 18, pp. 819 - 825.
- [40] Katalog firmy Sigma –Aldrich: *Mikroextrakce na tuhou fázi –teorie a optimalizace podmínek*. Dostupné z: http://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:mfxWXoR316YJ:www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma-Aldrich/General_Information/11.pdf+mikroextrakce+tuhou+f
- [41] VOLKA K. a kolektiv: *Analytická chemie II*. vyd. vPraze: VŠCHT, 1995, 236 s. ISBN 80 –7080 –227 –8.
- [42] RIDDELOVÁ K.: *Plynová chromatografie*. VŠCHT Praha. Str. 1-11, dostupné z: www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/gc/GC.pdf
- [43] YOUNG, O.A., R.B. GUPTA a S. SADOOGHY-SARABY. Effects of Cyclodextrins on the Flavor of Goat Milk and Its Yogurt. *Journal of Food Science*. 2012, 77(2), S122-S127. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2011.02557.x. ISSN 00221147. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2011.02557.x>
- [44] SIEFARTH, Caroline a Andrea BUETTNER. The Aroma of Goat Milk: Seasonal Effects and Changes through Heat Treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014, 62(49), 11805-11817. DOI: 10.1021/jf5040724. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf5040724>
- [45] MORGAN, Francois a Patrice GABORIT. The typical flavour of goat milk products: technological aspects. *International Journal of Dairy Technology*. 2001, 54(1).
- [46] SKJEVDAL, Trygve. *Flavour of goat's milk: A review of studies on the sources of its variations*. 1979(6), 397-405.
- [47] INGLINGSTAD, R.A., S. SKEIE, G.E. VEGARUD, T.G., Y. CHILLIARD a . *Journal of Dairy Science*. 2017, 100(9). DOI: 10.3168/jds.2016-12383. ISSN 00220302. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030217306550>
- [48] KÜHN, Janina, Conor M. DELAHUNTY, Thérèse CONSIDINE a Harjinder SINGH. In-mouth flavour release from milk proteins. *International Dairy Journal*. 2009, 19(5), 307-313. DOI: 10.1016/j.idairyj.2008.12.002. ISSN 09586946. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694608002240>
- [49] *PubChem* [online]. [cit. 2019-05-04]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

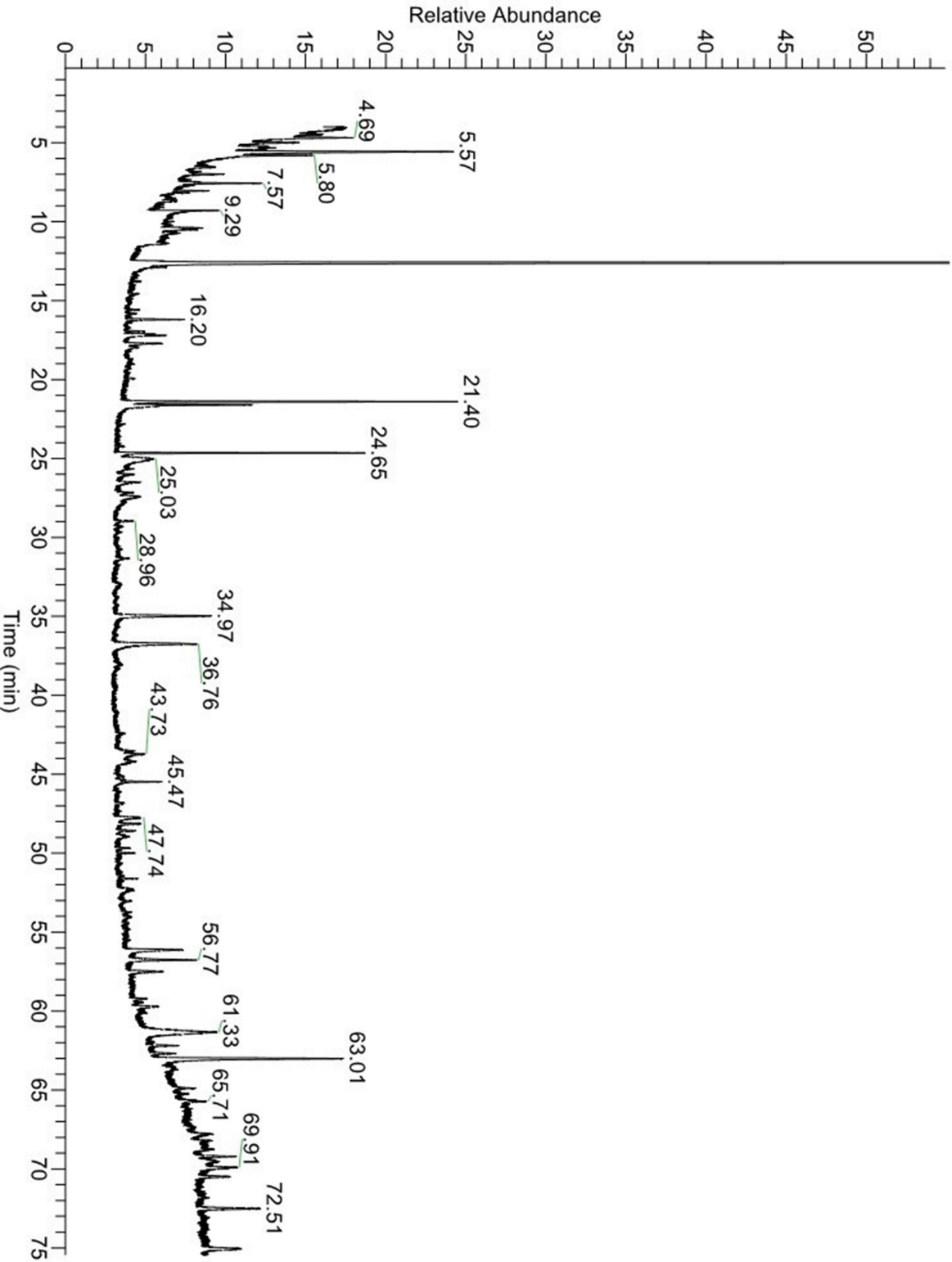
7 SEZNAM ZKRATEK

ČR	Česká republika
KU	kontrola užítkovosti
HS	extrakce headspace
SPME	mikroextrakce pevnou fází
GC	plynová chromatografie
MS	hmotnostní spektrometrie

8 PŘÍLOHY

- Příloha 1 Chromatogram aromaticky aktivních látek ve vzorku KoSu
- Příloha 2 Chromatogram aromaticky aktivních látek ve vzorku KrSuPln

Příloha 1: Chromatogram aromaticky aktivních látek ve vzorku koziho mléka KoSu; označení vzorku viz tabulka 11



Příloha 2: Chromatogram aromaticky aktivních látek ve vzorku koziho mléka KrSuPln; označení vzorku viz tabulka 11

