

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STANOVENÍ MASTNÝCH KYSELIN V SÝRECH

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

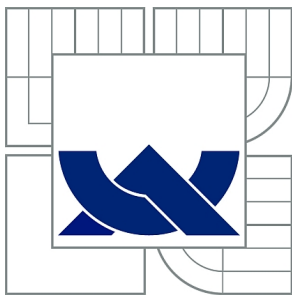
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

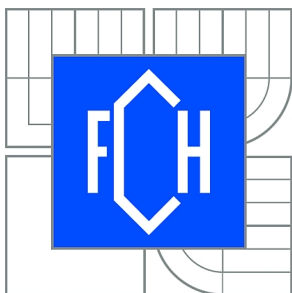
VERONIKA RAJNOCHOVÁ

BRNO 2015



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STANOVENÍ MASTNÝCH KYSELIN V SÝRECH

THE ASSESSMENT OF FATTY ACIDS IN CHEESES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

VERONIKA RAJNOCHOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. EVA VÍTOVÁ, Ph.D.

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0898/2014	Akademický rok: 2014/2015
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Veronika Rajnochová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie (2901R021)	
Vedoucí práce	Ing. Eva Vítová, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název bakalářské práce:

Stanovení mastných kyselin v sýrech

Zadání bakalářské práce:

1. Zpracujte literární přehled dané problematiky:
 - stručná charakteristika vybraných typů sýrů
 - lipidy – charakteristika, rozdělení, vlastnosti; lipidy v sýrech
 - mastné kyseliny – charakteristika, rozdělení, vlastnosti; mastné kyseliny v sýrech
 - možnosti stanovení mastných kyselin v sýrech
2. Pomocí metody GC-FID identifikujte a kvantifikujte mastné kyseliny ve vzorcích vybraných typů sýrů
3. Porovnejte obsah mastných kyselin v jednotlivých vzorcích

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2015

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Veronika Rajnochová
Student(ka)

Ing. Eva Vítová, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá stanovením mastných kyselin v přírodních sýrech eidamského typu.

V teoretické části práce jsou stručně charakterizovány přírodní sýry eidamského typu, hlavní pozornost je věnována lipidům, mastným kyselinám a možnostem jejich stanovení plynovou chromatografií.

V experimentální části byl stanoven obsah mastných kyselin v modelových vzorcích přírodních sýrů eidamského typu vyrobených na Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně. Pro extrakci lipidů ze vzorků byla zvolena metoda podle ČSN EN ISO 1735, pro esterifikaci mastných kyselin metoda podle ČSN EN ISO 5509 s použitím methanolového roztoku hydroxidu draselného. Vzniklé methylestery byly stanoveny pomocí plynové chromatografie s FID detekcí.

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the determination of fatty acids in natural Edam cheese.

The theoretical part briefly characterizes the natural Edam cheese, main attention is paid to lipids, fatty acids and the possibility of their determination by gas chromatography.

In the experimental part the content of fatty acids in the model samples of natural Edam cheese produced at Tomas Bata University in Zlín was determined. The method according to ISO 1735 was chosen for extraction of lipids from the samples, the method according to ISO 5509 using methanol solution of potassium hydroxide was chosen for the esterification of fatty acids. The resulting methyl esters were determined by gas chromatography with FID detection.

KLÍČOVÁ SLOVA

Přírodní sýry, lipidy, mastné kyseliny, plynová chromatografie

KEY WORDS

Natural cheese, lipids, fatty acid, gas chromatography

RAJNOCHOVÁ, V. *Stanovení mastných kyselin v sýrech*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 47 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Eva Vítová, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité literární zdroje jsem odcitovala správně a úplně. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využívána ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych poděkovala paní Ing. Evě Vítové, Ph.D. a slečně Martině Mahdalové za ochotu, laskavost, trpělivost, odborné i cenné rady, které mi usnadnily vypracování této bakalářské práce. Také bych chtěla poděkovat své rodině za skvělé zázemí a velkou podporu.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1	Sýrařství	8
2.1.1	Historie sýrů	8
2.1.2	Obecná výroba sýrů.....	9
2.1.3	Rozdělení sýrů.....	9
2.1.4	Technologie výroby eidamských sýrů.....	11
2.2	Lipidy obecně.....	12
2.2.1	Klasifikace lipidů	13
2.3	Mastné kyseliny.....	14
2.3.1	Nasycené mastné kyseliny.....	14
2.3.2	Nenasycené mastné kyseliny s jednou dvojnou vazbou.....	15
2.3.3	Mastné kyseliny se dvěma a více dvojnými vazbami.....	15
2.4	Plynová chromatografie	15
2.4.1	Princip plynové chromatografie	15
2.4.2	Instrumentace plynové chromatografie	15
2.4.3	Jednotlivé části plynového chromatografu.....	16
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	19
3.1	Chemikálie a laboratorní vybavení.....	19
3.1.1	Chemikálie.....	19
3.1.2	Plyny.....	19
3.1.3	Přístroje	19
3.1.4	Pomůcky	19
3.2	Analyzované vzorky.....	20
3.3	Pracovní postupy	21
3.3.1	Příprava vzorků k analýze	21
3.3.2	Extrakce lipidů podle ČSN EN ISO 1735	21
3.3.3	Příprava methylesterů mastných kyselin - Metoda podle ČSN EN ISO 5509	21

3.4	Stanovení methylesterů mastných kyselin metodou GC-FID	22
3.5	Identifikace a kvantifikace mastných kyselin ve vzorcích	22
3.6	Statistické zpracování výsledků	23
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	24
4.1	Identifikace a kvantifikace mastných kyselin ve vzorcích	25
4.1	Srovnání obsahu mastných kyselin ve vzorcích.....	26
4.1.1	Srovnání skupin nasycených, mono- a polynenasycených mastných kyselin.....	29
4.1.2	Srovnání obsahu jednotlivých mastných kyselin ve vzorcích	30
4.1.3	Vliv pasteračního zahřevu na obsah mastných kyselin ve vzorcích.....	38
5	ZÁVĚR.....	40
6	LITERATURA.....	41
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	43
8	SEZNAM PŘÍLOH	44

1 ÚVOD

Eidam, nejpůvodnější tvrdý sýr v české republice. Eidam je holandský sýr, který své jméno získal po městě Edam. V České republice se uchytil v éře reálného socialismu, jelikož v té době bylo velmi těžké koupit jiný druh sýra. Češi si tento sýr přizpůsobili a snížili jeho obsah tuku, vzhledem k tomu že v té době byl na českém trhu významný nedostatek tuku. Díky tomu vznikla spotřebitelská a technologická poptávka na výrobu eidamského sýru s nižším obsahem tuku. Klasický eidamský sýr obsahuje 45 % tuku v sušině, odtučněný eidamský sýr obsahuje 30 % tuku v sušině a nízkotučný eidamský sýr obsahuje 20 % tuku v sušině.

Tuky tvoří významnou součást sýru eidamského typu a sýrů obecně, jsou nositelem chuti a vůně, z nutričního hlediska je pak důležitý obsah a složení přítomných mastných kyselin.

Cílem této práce bylo stanovení obsahu mastných kyselin v přírodních sýrech eidamského typu. Pro extrakci lipidů ze vzorků byla v této práci vybrána metoda podle ČSN EN ISO 1735, pro esterifikaci mastných kyselin metoda podle ČSN EN ISO 5509 s použitím methanolového roztoku hydroxidu draselného. Mastné kyseliny byly stanoveny plynovou chromatografií s FID detekcí.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Sýrařství

2.1.1 Historie sýrů

Nejrozšířenější teorie uvádí, že výrobu prvních sýrů náhodně objevili kočovníci jižní Asie a Středního východu. Bojovníci lili čerstvé mléko do kožených vaků, které zavěšovali na své koně, aby mohli během boje a dlouhých jízd utišit žízeň. Po čase zjistili, že tekuté mléko se změnilo ve světlou, lehce nakyslou tekutinu, ve které plavaly husté chuchvalce bílé sýřeniny. Kožené vaky se v té době vyráběly z žaludků mladých zvířat, které pravděpodobně ještě obsahovaly zbytky srážecích enzymů. Pevnou a hutnou sýřeninu považovali kočovníci za vhodný doplněk stravy a tekutou syrovátku zase za prostředek k uhašení žízně [1,2].

Podle archeologických výzkumů se nejstarší nálezy datují do doby asi 6000 let př. n. l. Sumerové uchovávali sýr již zhruba 4000 let př. n. l.. V mytologických příbězích starých Řeků lze rovněž nalézt zmínky o sýru. V Bibli se o tomto produktu píše jako o vítaném zdroji potravy a o daru. Malby na stěnách různých staveb svědčí o znalosti výroby sýra ve starém Egyptě [2].

Základy výroby dnešních evropských sýrů položili staří Římané. Díky obrovským domům s mnoha místnostmi mohli ovlivňovat jednotlivé fáze zrání sýrů. Významné faktory, které daly vzniknout velké rozmanitosti druhů a chutí, byly vlhkost, teplo a průvan, stejně jako kouř z kamen, omývání sýrů a přidávání bylinek. K výrobě sýra používali nejrozličnější druhy mléka – nejdůležitější bylo mléko ovčí, kravské a kozí, ale zpracovávalo se také mléko kobyl a oslic [1,2].

Mnoho sýrů, tak jak je známe dnes, se začalo připravovat ve středověku a raném novověku. V Itálii vznikla roku 879 Gorgonzola, v roce 1200 sýr Grana a v roce 1579 Parmezán. Francouzi dlouho znali sýry jako Roquefort (vznikl v roce 1070) a Cantal, který si oblíbili již Římané. Nizozemské sýry se staly oblíbenými proto, že při zrání ztrácely málo vlhkosti, a tedy i málo hmotnosti. Obchod s nimi tak koncem středověku a v raném novověku dosáhl velkého rozkvětu (například sýr Gouda vznikl roku 1697). Rovněž švýcarské sýry, hlavně Ementál, našly rychle své odběratele [1,2].

Evropské renesanční šlechtické a královské dvory považovaly konzumaci sýra za nezdravou a barbarskou. Tímto se poddaní naštěstí neřídili, díky tomu mniši kvalitu sýra neustále vylepšovali a vynalézali nové druhy sýrů. V Anglii se v 16. století stal pojmem sýr čedar (Cheddar) a v 17. století Gloucester. O sýru Stilton pochází první zmínka až z roku 1785. Po sýru Brie se ve Francii proslavil také Camembert (od roku 1791) [1,2].

Velká průmyslová revoluce ovlivnila i výrobu sýrů. Stále více drobných sedláků přestávalo vyrábět sýr samo, své mléko dodávali do nově zakládaných družstev. Družstva se rychlým tempem modernizovala a mlékárenský průmysl stále narůstal. K většímu nárůstu industrializace mlékárenské výroby došlo po 2. světové válce s rozvojem velkoměst [1].

Moderní mlékárenskou výrobu nejvíce ovlivnil objev Louise Pasteura a jeho spolupracovníka Mečnikova. Ti objevili vliv mikroorganismů na kvasné procesy, a to i u sýrů. Přestože se Pasteur

zkoumáním sýrů nezabýval přímo, byl po něm pojmenován proces krátkého zahřátí mléka na 65-72°C, kterým se eliminují veškeré bakterie, jež jsou zdraví škodlivé. Po pasteraci se pak do mléka přidává čistá kultura bakterií mléčného kysání, aby se proces obnovil [1].

2.1.2 Obecná výroba sýrů

Sýry se vyrábí úplným nebo částečným vysrážením bílkovin z ošetřeného mléka přidáním mlékárenských kultur, syřidla nebo jiných koagulačních činidel či kyseliny mléčné. Vzniká syřenina, která se krájí, míchá a následně plní do forem, ve kterých prokysává a odkapává. Vedlejším produktem odkapu je syrovátka. Po dostatečném prokysání a odkapání se sýry vyklápí z forem, solí a skladují ve zracích sklepích. Po skončení zrání se sýry balí a chladí [2,3].

2.1.3 Rozdělení sýrů

Sýr je bílkovinný koncentrát získaný z mléka, který se vyrábí okyselením nebo enzymovým srážením za pomoci působení mikroorganismů. Sýr vzniká odstraněním vody ze sraženiny, následně podléhá chemickým a fyzikálním změnám účinkem přítomné mikroflóry. Jak chemické tak i fyzikální změny působí na chuťové změny a prodlužují trvanlivost v porovnání s čerstvým mlékem. Bílkovinnou složkou sýra je kasein, který se sráží při syření [4].

Se syrovátkou se ze syroviny odstraňuje převážná část laktosy, ve vodě rozpustných vitamínů a minerálních látek, stejně tak ve vodě rozpustné syrovátkové bílkoviny. Činností mikroorganismů vzniká velký počet produktů látkové přeměny, které dodávají každému sýru jeho charakteristickou chuť [4].

Sýry dělíme podle několika kritérií:

Dělení podle typu mléka

Sýry se dělí na sýry vyrobené z kravského, kozího a ovčího mléka. Dále se rozlišují na sýry vyrobené z pasterizovaného nebo nepasterizovaného mléka [1].

Dělení podle typu srážení

- Sladké sýry – při jejich výrobě se mléko sráží účinkem syřidla.
- Sladkokyselé sýry
- Kyselé sýry (tvarohové sýry) – při jejich výrobě se mléko sráží zejména účinkem kyseliny mléčné, která se tvoří po dobu mléčného kvašení [6].

Dělení podle způsobu zrání

Způsob zrání závisí na druhu použité mikroflóry, přístupu kyslíku, mechanickém zpracování syroviny, množství přidané soli, teplotě a vlhkosti prostředí po dobu zrání.

- Měkké sýry – typické je aerobní zrání probíhající od povrchu směrem dovnitř sýra v důsledku činnosti vhodných plísní a bakterií.
- Tvrdé sýry – charakteristické je anaerobní zrání, zejména působením bakterií mléčného kvašení [6].

Dělení podle tvrdosti

Dělení podle tvrdosti vychází z poměru mezi sušinou a vodou. Čím méně vody sýr obsahuje, tím je tvrdší a sušší.

- Čerstvé sýry – jedná se o sýry s vysokým obsahem vody, které jsou určeny k rychlé konzumaci bez dalšího zrání. Například čerstvý sýr, tvaroh, fromage frais, cream cheese aj.
- Měkké sýry - tyto sýry prošly krátkým obdobím zrání. Jsou smetanové a mazlavé. Například: Camembert, Brie, Neufchatel.
- Polotvrdé sýry - sýry se vyznačují hutnou strukturou, ale i přesto je lze ještě snadno krájet. Při lehkém stlačení jsou pružné. Například: Gouda, Edam.
- Tvrdé sýry – jde o robustní sýry s tvrdou sýřeninou, kterou nelze často nakrájet, aniž by došlo k rozdrobení sýra. Většina těchto sýrů se proto prodává také v nastrouhané nebo namleté formě. Například: Parmezán, Čedar, Ementál [1].

Dělení podle obsahu tuku

Pro rozdělení podle obsahu tuku se používá výpočet. Nejprve se změří obsah tuku v sušině. Procento vody je u mnoha sýrů známé.

- smetanové (50 až 55 %)
- plnotučné (45%)
- tučné (40%)
- třičtvrtětučné (30%)
- polotučné (20%)
- čtvrttučné (10%)
- nízkotučné (méně než 10%)

Čím více tuku sýry obsahují, tím jemnější je jejich chuť a konzistence sýrového těsta [6].

Dělení podle délky zrání

Toto dělení je typické především pro nizozemské sýry. Sýr po vyjmutí ze slané lázně při výrobě je stále ještě měkký a nemá výraznou chuť, proto se jeho konzistence zvyšuje zráním. Zrání má vliv také na jeho chuť. Délka doby zrání se označuje různými přívlastky:

- mladý sýr (jong kaas) doba zrání 4 týdny
- mladý uleželý sýr (jong belegen) doba zrání 6-8 týdnů

- uleželý sýr (belegen) doba zrání 8-12 týdnů
- pikantně uleželý sýr (pikant belegen) doba zrání 4-6 měsíců
- extra uleželý sýr (extra belegen) doba zrání 7-8 měsíců
- starý sýr (oud kaas) doba zrání 10-12 měsíců
- přestálý sýr (overjārig kaas) doba zrání déle než 1 rok [1]

2.1.4 Technologie výroby eidamských sýrů

Vzhledem k tomu, že v experimentální části této práce jsou analyzovány sýry eidamského typu, je v této kapitole stručně popsán technologický postup jejich výroby. Sýry eidamského typu se vyrábí z nízkodohřívané sýřeniny.

Po příjmu mléka se případné mechanické nečistoty odstraní filtrací nebo centrifugací. Další operací je standardizace mléka na požadovanou tučnost. Následně se mléko pasteruje [7]. Pasterace zajišťuje zdravotní nezávadnost sýrů. Pro výrobu sýrů eidamského typu se používá šetrná krátkodobá pasterace při teplotě 75 °C po dobu 30 sekund [4,7].

Po pasteraci se mléko baktofuguje při 8 000 až 10 000 g. Baktofugace umožňuje účinně odstranit sporotvorné bakterie odstředivou silou [4,8].

Nyní se do sýrařského mléka přidávají zákysové kultury, syřidlo a další aditiva. Zákysové kultury upravují kyselost mléka před sýřením, způsobují fermentaci laktosy a tvorbu kyseliny mléčné během koagulace a zpracování sraženiny. Jsou odpovědné za snížení pH, které má do jisté míry i konzervační účinek a brání rozvoji nežádoucích mikroorganismů, podílí se na koagulaci a podporuje odkapávání sýřeniny. Dále zákysové kultury uplatňují proteolytické a lipolytické aktivity v průběhu zrání, vytváří senzorické vlastnosti, mají vliv na texturu a konzistenci. Do eidamských sýrů se přidává mezofilní (smetanová) kultura. Jedná se o mezofilní streptokoky mléčného kvašení rodu *Lactococcus* a *Leuconostoc*. Do těchto rodů patří například kmeny *Leuconostoc cremoris*, *Leuconostoc lactis* *Lactococcus lactis* [4,7]. Přídavek chloridu vápenatého zlepšuje sýřitelnost a zvyšuje pevnost vzniklého gelu. Přídavek dusičnanu draselného snižuje duření sýrů, které je způsobeno činností koliformních bakterií a bakterií máselného kvašení. Při výrobě sýrů eidamského typu se zpravidla používá barvení mléka barvivem *anato* (extrakt z keře *Bixa orellana*) [7].

Po přidavku všech výše zmíněných látek do mléka se přechází k základnímu procesu při výrobě sýrů a to ke koagulaci mléka. U eidamských sýrů se mléko koaguluje syřidlem (tzv. sladké srážení). Koagulace je založena na enzymovém štěpení specifické peptidové vazby mezi aminokyselinami fenyلالaninem a methioninem v kaseinové frakci κ . Vzniká tak hydrofobní para- κ -kasein a hydrofilní glykomakropeptid. κ -Kasein je soustředěn na povrchu kaseinové micely a chrání ostatní kaseinové frakce, které jsou citlivé na srážení vápenatými ionty. Působení syřidla na κ -kasein se označuje jako primární (enzymová) fáze sýření. V sekundární fázi dochází k tvorbě gelu, označuje se proto také jako fáze koagulační. Důležitou podmínkou pro vytvoření gelu je teplota vyšší než 6 °C a přítomnost

vápenatých iontů. Terciární fáze působení syřidla na kasein již nesouvisí s koagulací, ale s proteolytickým působením syřidla v průběhu zrání [7]. Aktivní složkou syřidla je enzym chymozin. Klasické syřidlo je extrakt, který se získává z telecích žaludků, v dnešní době se však spíše používají náhradní syřidla mikrobiálního původu [4,8].

Po koagulaci se přechází k dalšímu procesu, kterým je zpracování sraženiny, to se zahajuje krájením gelu, který dosáhl požadované tuhosti. Krájení trvá přibližně 20 minut a vzniká při něm sýrové zrno o velikosti 3 až 15 mm. Po krájení se zrno míchá v uvolněné syrovátce. Po promíchání se provádí praní sýrového zrna, při kterém se snižuje obsah laktosy, současně se sýřenina dohřívá, protože k praní se používá teplá voda. Obvykle se nejprve odpustí 35 % syrovátky a přidá se 50 – 80 % jejího objemu vody teplé 50 – 60 °C. Přídavek takto teplé vody ohřívá zrno na teplotu 36 – 37 °C, což je požadovaná teplota pro dohřívání a dosoušení [7].

Dalším procesem výroby sýra je formování. Formování začíná oddělením syrovátky od sýrového zrna. Sýřenina shromážděná na dně kotle (vany) se po odčerpání téměř veškeré syrovátky plní do forem. Formování trvá několik hodin, během této doby nastává intenzivní rozvoj bakterií mléčného kvašení, čímž se laktosa rozkládá na kyselinu mléčnou. Při formování eidamského sýra syrovátka neodkape dostatečně, proto se sýry musí lisovat v sýrařských lisech. Aby se struktura na povrchu velmi nezpevněla, lisovací tlak se zvyšuje postupně. Lisovací tlak je 50 až 400 kPa a trvá 1 až 20 hodin podle typu lisovacího zařízení [4].

Po lisování se sýry solí. Solení nejen přispívá ke konečné požadované chuti sýra, ale také reguluje růst mikroorganismů. Sýry eidamského typu se ponořují do 18 -20 % roztoku chloridu sodného na 48 hodin [4,8]. Nasolené sýry se nechávají 1 až 2 dny oschnout, potom se balí do zracích fólií, které jsou nepropustné pro vodu a kyslík, propustné pro CO₂. Po zabalení se sýry nechávají zrát ve zracích sklepích 2 měsíce. Teplota se pohybuje mezi 8 – 10 °C. Během zrání dochází ke změnám, které jsou způsobeny mikrobiologickými a enzymovými vlivy. Díky těmto změnám získává sýr specifickou vůni, chuť i vzhled [4, 7].

2.2 Lipidy obecně

Lipidy patří k významným složkám potravin a ve výživě člověka tvoří jednu z hlavních živin nezbytnou pro zdraví a vývoj organismu. Přesto nepředstavují jednotně definovanou skupinu sloučenin, protože hlavním kritériem zařazení sloučenin do této skupiny bývá jejich hydrofobnost a nikoli jejich chemické vlastnosti [9].

Ze strukturního hlediska jsou lipidy estery mastných kyselin a alkoholů. Jejich společným prvkem je hydrofobní charakter. Lipidy jsou tedy rozpustné v nepolárních rozpouštědlech (chloroform, benzen), ale nerozpustné v rozpouštědlech polárních (voda) [11].

Lipidy se obvykle definují jako přírodní sloučeniny obsahující esterově vázané mastné kyseliny o více než třech atomech uhlíku v molekule. Této definici užívají většinou pracovníci biologicky zaměřeni a

hlavně lékaři. Jako složky aromatu potravin se však běžně vyskytují ethylestery a vyšší estery mastných kyselin se 4 – 12 atomy uhlíku, které přesto k lipidům neřadíme. V potravinách se často nacházejí také sloučeniny mastných kyselin vzniklé průmyslovou činností nebo jinými lidskými aktivitami (např. estery cukrů a cukerných alkoholů s vyššími mastnými kyselinami), které nejsou přírodními látkami, ale přesto se v běžné praxi zařazují k lipidům [9].

Většinou se v praxi za lipidy považují také netěkavé lipofilní sloučeniny, které v přírodních i průmyslových produktech doprovázejí vlastní lipidy. Nazývají se proto doprovodné látky lipidů. Jejich chemická struktura je ale odlišná a často ani vázané mastné kyseliny neobsahují. Do této skupiny doprovodných látek lipidů náleží velké množství sloučenin, jako jsou různé terpenoidy (např. steroly) a karotenoidy. Doprovodnými látkami lipidů jsou dále lipofilní vitamíny a barviva, přírodní antioxidanty a jiné lipofilní sloučeniny [9].

2.2.1 Klasifikace lipidů

Podle chemického složení se lipidy třídí do tří hlavních skupin.

2.2.1.1 Homolipidy

Homolipidy jsou sloučeniny mastných kyselin a alkoholů. Dále se dělí podle struktury vázaného alkoholu. Patří sem acylglyceroly a vosky [9].

Acylglyceroly jsou estery mastných kyselin s glycerolem. Vyskytují se ve formě tuků, s vyšším obsahem nasycených mastných kyselin a olejů, kde převažují nenasycené mastné kyseliny. Nejčastěji jde o směsi různých triacylglycerolů, ovšem zřídka se vyskytují i mono- a diacylglyceroly. Ty vznikají zejména jako produkty hydrolýzy triacylglycerolů, činností enzymu lipasy. Při hydrolýze triacylglycerolů tedy vznikají volné mastné kyseliny a glycerol. Konzumace acylglycerolů by měla být co nejmenší. Ve stravě by měly převažovat nenasycené mastné kyseliny nad nasycenými, tudíž rostlinné oleje nebo emulgované tuky nad živočišnými (sádlem) [11].

Vosky jsou tuhé estery vyšších mastných kyselin a vyšších primárních alkoholů. Zaujímají hlavně funkci ochrannou. Proto se u rostlin vosky vyskytují na vnějších částech, jako jsou listy a stonky. U živočichů vosky pokrývají kůži a srst a včely je používají na výrobu plástve, do které ukládají med [11,12].

2.2.1.2 Heterolipidy

Heterolipidy jsou lipidy, které obsahují kromě mastných kyselin a alkoholu ještě další kovalentně vázané sloučeniny, například kyselina fosforečná je vázána ve fosfolipidech nebo D-galaktosa v některých glykolipidech [9].

Mezi nejrozšířenější heterolipidy patří fosfolipidy, které v hydrofilní části obsahují kyselinu fosforečnou buď ve formě esteru, nebo diesteru. V přírodě je lze najít v biomembránách. Mezi nejznámější fosfolipidy patří glycerofosfolipidy a sfingofosfolipidy [10,12].

2.2.1.3 Komplexní lipidy

V komplexních lipidech jsou přítomny jak homolipidy, tak i heterolipidy, ale kromě kovalentních vazeb jsou některé složky vázány různými fyzikálními vazbami, např. vodíkovými nebo hydrofobními interakcemi [9].

Určitá potíž je se zařazením volných mastných kyselin, protože neobsahují vázaný alkoholový zbytek. Přesto se všeobecně považují za lipidy a asi by měly tvořit samostatnou skupinu. Často se také spolu se svými solemi, které se nazývají mýdla, do samostatné skupiny zařazují.

Uvedené třídění je praktické pro základní výzkum chemie nebo biochemie lipidů. V praxi se však tohoto systému příliš mnoho neužívá. Nejčastěji se setkáme s celkem nelogickým označením neutrální lipidy a polární lipidy. K neutrálním lipidům se řadí estery glycerolu, steroly a jejich estery, ale také volné mastné kyseliny, ačkoliv nejsou neutrální. Polární lipidy zahrnují fosfolipidy a také mnohé další heterolipidy, mnohdy ani neobsahující fosfor a někdy ani mastné kyseliny. S touto klasifikací lipidů se obvykle setkáváme u biologicky orientovaných odborníků. Tento systém třídění je založen hlavně na chování sloučenin při chromatografickém dělení. V technologické a potravinářské praxi se termín lipidy běžně neužívá a mnozí tento pojem ani neznají. Rozeznávají se jen tuky, oleje, mastné kyseliny, vosky a lecitin, neboť pouze tyto složky mají průmyslový význam [9].

2.3 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny (MK) jsou nejdůležitější a z hlediska výživy nejvýznamnější složkou lipidů. V přírodě bylo dosud nalezeno kolem 100 mastných kyselin. Podle názvosloví užívaného v organické chemii se jako mastné kyseliny označují karboxylové kyseliny s alifatickým uhlovodíkovým řetězcem, ale tato definice se úplně nekryje s mastnými kyselinami přítomnými v lipidech. Některé mastné kyseliny podle definice užívané organickými chemiky nejsou přítomny v přírodních lipidech, i když se mohou vyskytovat v průmyslových tukových výrobcích. Naopak některé mastné kyseliny vázané v lipidech jsou alicyklické nebo dokonce aromatické sloučeniny [9,12,13].

2.3.1 Nasycené mastné kyseliny

Nasycené mastné kyseliny jsou běžnou složkou přírodních lipidů. Nechemici jim někdy podle angličtiny říkají saturevané. Obsahují 4 až 60 atomů uhlíku a zpravidla rovný, nerozvětvený řetězec, nejčastěji o sudém počtu atomů uhlíku. Kyseliny s více než 10 až 12 atomy uhlíku se v buňkách ve volné formě většinou nevyskytují- z důvodu vysoké povrchové aktivity. V lipidech potravin jsou hlavními kyselinami většinou palmitová a stearová. Mastné kyseliny se sudým počtem atomů uhlíku

jsou v malém množství doprovázeny kyselinami s lichým počtem atomu uhlíku v molekule, zejména pentadekanovou a heptadekanovou [9,12,13].

2.3.2 Nenasycené mastné kyseliny s jednou dvojnou vazbou

Nenasycené mastné kyseliny s jednou dvojnou vazbou se stručněji nazývají monoenové kyseliny. Navzájem se liší podle počtu atomů uhlíku, polohy dvojné vazby a její prostorové konfigurace [9].

2.3.3 Mastné kyseliny se dvěma a více dvojnými vazbami

Mastné kyseliny se dvěma dvojnými vazbami se nazývají dienové a ve výživě jsou velmi důležité. V přírodních lipidech se jich vyskytuje v podstatném množství mnohem méně než monoenových kyselin, i když by jich teoreticky mohlo být daleko více. Počet přirozeně se vyskytujících mastných kyselin se třemi dvojnými vazbami je značně menší než by odpovídalo možnostem isomerie. Mastné kyseliny se čtyřmi, pěti a šesti dvojnými vazbami v molekule se vyskytují vzácně [9].

2.4 Plynová chromatografie

Pro stanovení mastných kyselin v této práci byla použita plynová chromatografie (GC), proto je v této kapitole stručně zmíněn její princip, teoretické základy a instrumentace.

V systému chromatografických metod zaujímá plynová chromatografie velice významné místo. V průběhu let se stala jednou z nejrozšířenějších metod analytické chemie. Nesmírný rozvoj a rozšíření plynové chromatografie je dán skutečností, že jde o metodu jednoduchou, citlivou, s vysokou separační účinností a rozsáhlými aplikačními možnostmi [16,20].

2.4.1 Princip plynové chromatografie

Principem této separační metody je rovnovážná distribuce složek mezi dvě fáze: plynnou – mobilní a kapalnou nebo tuhou – stacionární. Složky jsou vždy separovány v plynné fázi. Pokud má být vzorek analyzován metodou plynové chromatografie (GC), musí být všechny složky vzorku vypařeny definovaným způsobem. V praxi to znamená, že GC je vhodná především pro organické látky s bodem varu asi do 400 °C. Podmínkou je, aby se látky při vypařování nerozkládaly. Teplota 400 °C představuje horní teplotní limit většiny běžných plynových chromatografů. Plynová chromatografie je vhodná i pro stanovení anorganických sloučenin, ale pouze těch, které splňují podmínku těkavosti. V některých případech lze analyzovat i látky netěkavé, když tyto látky převedeme na těkavější deriváty [14,21,22].

2.4.2 Instrumentace plynové chromatografie

Mezi hlavní části plynového chromatografu patří [17]:

- zásobník mobilní fáze
- regulátor tlaku a průtoku plynné fáze
- dávkovací zařízení
- kolona
- termostat
- detektor
- vyhodnocovací zařízení

2.4.3 Jednotlivé části plynového chromatografu

Nejdůležitější částí chromatografického postupu jsou děje probíhající na koloně. Z tohoto hlediska definujeme GC jako fyzikálně chemickou metodu separace látek ze směsi, založenou na distribuci mezi dvě heterogenní fáze. Jedna z těchto fází je vždy nepohyblivá (stacionární), realizovaná sorpčně aktivní látkou, druhá, pohyblivá (mobilní), je realizovaná plynem. Interakce mezi molekulou plynu, resp. páry, a stacionární fází je dána určitým druhem intermolekulárních sil (adsorpcí, rozpouštěním) a difúzí [16,23].

2.4.3.1 Nosný plyn

Mobilní fázi představuje v plynové chromatografii nosný plyn. Jeho úkolem je transportovat složky vzorku kolonou. Volbu nosného plynu ovlivňuje druh detektoru a kolony, dále účinnost, čistota, reaktivita a cena plynu. Mezi běžně používané nosné plyny patří vodík, dusík, helium a argon, jejich zdrojem bývají nejčastěji tlakové láhve. Všechny tyto plyny je potřeba zbavovat vodních par a dalších nečistot. Sušení plynů se nejčastěji provádí molekulovými síty [15,16,17].

2.4.3.2 Regulační zařízení

Regulační systém je zařízení, pomocí něž zajišťujeme definovanou průtokovou rychlost nosného plynu. Na tomto parametru jsou závislé funkce některých detektorů i samotná chromatografická separace. Pro kvalitní práci je bezpodmínečně nutné udržovat konstantní průtok nosného plynu [16,17].

Úkolem injektoru je zavedení daného vzorku do proudu nosného plynu. Hlavním požadavkem na dávkovací systém je zajištění odpaření (zplynění) vzorku v co nejkratším čase. Pro maximální využití účinnosti kolony je také důležité, aby byla dávka dávkována v malém množství. Nástřik kapalných vzorků je prováděn pomocí injekčních stříkaček. Pro plynné vzorky jsou použity plynotěsníci injekční mikrostříkačky [15,16].

2.4.3.3 Typy kolon

V plynové chromatografii jsou používány dva základní typy kolon: náplňové a kapilární. Volba správné kolony a vhodné stacionární fáze je základním požadavkem pro účinně fungující plynovou chromatografickou separaci [16,17]. Náplňové kolony byly hojně využívány v dřívějších letech. V současné době jsou používány pro preparativní účely a k separaci nízkovroucích plynů. Principem náplňové kolony je sorbent nebo nosič pokrytý stacionární fází [17]. Vzhledem k vyšší účinnosti se v dnešní době spíše používají kolony kapilární. Kapilární kolony jsou otevřené kapiláry, kde funkci nosiče zastávají vnitřní stěny kapiláry, které jsou pokryty kapalnou stacionární fází. Zvýšení obsahu stacionární fáze je možné dosáhnout úpravou vnitřních stěn naleptáním, čímž se zvětší několikanásobně vnitřní povrch kapiláry. Potom je možné zakotvit větší množství kapalné fáze a na takto upravenou kolonu dávkovat větší množství vzorku. Kapilární kolony se zhotovují z taveného křemene, jehož povrch je potažen vrstvičkou polyamidu, která dává koloně pružnost a odstraňuje křehkost křemene. Méně často se kapilární kolony zhotovují ze skla, neboť jsou křehké a lámou se [15,16].

Podle způsobu uložení stacionární fáze v kapilární koloně se rozlišuje několik typů kapilárních kolon. WCOT (Wall-Coated Open Tubular) je kolona s tenkým filmem stacionární fáze nanesené přímo na vnitřní stěně kapiláry. Dalším typem kolony je SCOT (Support-Coated Open Tubular), kde je stacionární fáze zachycena na povrchu pevného nosiče na vnitřní stěně kolony. PLOT kolony (Porous-Layer Open Tubular) jsou posledním typem kolon, u kterých je na vnitřním povrchu kapiláry vrstva pevného aktivního sorbentu [14,15].

2.4.3.4 Termostat

Aby vzorek zůstal v plynném stavu, je zapotřebí v injektoru, koloně a detektoru udržet vysokou teplotu. K tomuto účelu slouží termostat [15].

2.4.3.5 Detektor

Úkolem detektoru je poskytnout rozdílné signály při průchodu samotného nosného plynu a při průchodu nosného plynu obsahujícího eluovanou složku. Charakteristikou dobrého detektoru je dobrá stabilita signálu, velká citlivost a dostatečně rychlá reakce na změnu složení procházejícího eluentu [14]. Snad nejrozšířenějším druhem detektoru je plamenově ionizační detektor (tzv. FID, Flame Ionization Detector). Principem tohoto detektoru je ionizace molekul plynu v kyslíkovodíkovém plameni, který hoří mezi dvěma elektrodami. V přítomnosti vzorku se zvýší ionizace a detektorem následně probíhá proud úměrný koncentraci sloučeniny v nosném plynu. Jedná se o velmi citlivý detektor s vynikající stabilitou signálu a detekčními limity v pikogramech analytu. Používá se především pro detekci organických látek [15,17].

2.4.3.6 Vyhodnocovací zařízení

Ve vyhodnocovacím zařízení dochází ke zpracování dat z detektoru. Výsledkem je chromatogram - grafické znázornění signálu z detektoru. Chromatogram slouží k získání parametrů, jako jsou retenční časy, plochy a výšky píků, které slouží k vyhodnocení měření [15].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie a laboratorní vybavení

3.1.1 Chemikálie

- Diethylether p.a., Lach-Ner, Neratovice
- Petrolether p.a., Lach-Ner, Neratovice
- Ethylalkohol 96 %, Lach-Ner, Neratovice
- Hexan p.a., Lach-Ner, Neratovice
- Hydroxid draselný p.a., Lach-Ner, Neratovice
- Isooktan p.a., Lach-Ner, Neratovice
- Kyselina chlorovodíková p.a., PENTA, Chrudim
- Standardy: Methyl-linoleát, Methyl-linolenát, Methyl-arachidát, SIGMA-ALDRICH, Německo
- Směsný standard methylesterů mastných kyselin - FAME mix 37, SIGMA-ALDRICH, Německo
- Destilovaná voda

3.1.2 Plyny

- Dusík 5.0 SIAD v tlakové lahvi s redukčním ventilem a kovovou membránou
- Vodík 5.5 SIAD v tlakové lahvi s redukčním ventilem
- Vzduch 5.0 SIAD v tlakové lahvi s redukčním ventilem pro kyslík

3.1.3 Přístroje

- Plynový chromatograf TRACE GC (ThermoQuest S.p.A., Itálie) s plamenově ionizačním detektorem, split/splitless injektorem a kapilární kolonou DB-23 s výstupem na PC
- Počítač PC, Intel Pentium Procesor
- Analytické digitální váhy HELAGO, GR-202-EC, Itálie
- Vakuová rotační odparka
- Chladnička s mrazničkou AMICA, model AD 250

3.1.4 Pomůcky

- Mikropipety BIOHIT 1000, 200, 100 µl
- Vialky s kaučuk-teflonovými septy a šroubovacími uzávěry, plastové Eppendorfovy mikrozkuhavky

- Běžné laboratorní sklo

3.2 Analyzované vzorky

V experimentální části bakalářské práce byly analyzovány modelové vzorky přírodních sýrů eidamského typu, které byly vyrobeny standardním technologickým postupem během února 2015 na Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně.

Stručný popis procesu výroby: pro výrobu sýrů bylo použito odstředěné syrové mléko (obsah tuku přibližně 0,1 %), které bylo následně standardizováno na tučnost 3,5 %. Standardizované mléko bylo podrobeno diskontinuální pasteraci přímo ve výrobníku sýrů při zvolených teplotních režimech. Pomocí řídicí jednotky byl regulován záhřev, výdrž pasterační teploty a chlazení na sýřicí teplotu.

Standardizované mléko bylo následně vytemperováno na sýřicí teplotu 32 ± 1 °C, inokulováno sýrašskou kulturou (mezofilní koncentrovaná lyofilizovaná kultura Christian Hansen), po přidavku nasyceného roztoku CaCl_2 se mléko se dokonale promíchalo a kultura se nechala 20 minut reaktivovat za současného míchání. Poté bylo do mléka přidáno syřidlo, směs se krátce intenzivně promíchala a byla ponechána v klidu po dobu 30 minut. Po 30 minutách srážení se sýřenina prokrojila pomocí sýrašské harfy jak podélně, tak i příčně. Pokrájená sýřenina se ponechala 10 minut v klidu, následně se velmi opatrně ručně míchala po dobu 20 minut, poté se za stálého míchání přes síto odebrala část syrovátky (do 30 % původního objemu mléka) a k sýrašskému zrnu se velmi pomalu přidávala voda (do 70 % objemu odebrané syrovátky) o teplotě 60 °C tak, aby teplota systému vzrostla na 37 °C (dohřívání sýrašského zrna). Dohřívání syrového zrna bylo pozvolné a trvalo několik minut, dosoušení probíhalo za stálého ručního míchání 30 minut. Další krok zahrnoval formování a lisování sýřeniny. Sýřenina se slila do předem připravených forem vyložených sýrašskými plachetkami. Ve formách se nechala předlisovat 20 minut, přičemž po 10 minutách byla sýřenina otočena k rovnoměrnému odtoku syrovátky. Předlisovaná sýřenina se nakrájela na 12 rovnoměrně velkých kusů, které se vložily do lisovacích forem opět vyložených plachetkou. Sýřenina se lisovala pomocí lisovacích závaží podle zvoleného režimu. Sýry se ihned po vylisování solily v solném roztoku o koncentraci 20 % (w/v) po dobu 5 hodin. Vylisované sýry se na závěr ošetřily antimykotickou suspenzí (přípravek Delvocid), následně se nechaly oschnout 1 hodinu a balily se do obalového materiálu (smrštitelná fólie). Hotové sýry se nechaly zrát při teplotě 10 °C po dobu 2 měsíců.

Celkem byly vyrobeny tři série vzorků, které se lišily teplotou a dobou pasteračního záhřevu.

Označení vzorků:

vzorek A - pasterační záhřev 65 °C/30 min

vzorek B - pasterační záhřev 80 °C/30 s

vzorek C - pasterační záhřev 74 °C/30 s

První vzorky byly odebrány 48 hodin po zabalení, okamžitě zmrazeny ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$) a uchovávány až do doby analýzy max. jeden měsíc).

3.3 Pracovní postupy

3.3.1 Příprava vzorků k analýze

Před analýzou byly vzorky ponechány přes noc rozmrazit při laboratorní teplotě, z různých míst vzorku byla odebrána reprezentativní část, nasekána nožem na drobné kousky a promíchána. Z tohoto vzorku byl navážen 1 g s přesností na 0,0001 g a kvantitativně převeden do zkumavky k extrakci.

3.3.2 Extrakce lipidů podle ČSN EN ISO 1735

K připravenému vzorku bylo přidáno 5 ml HCl. Směs se nechala zahřívát ve vodní lázni při $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do úplného rozpuštění sýru (cca 15 min), následně byla směs ochlazená tekoucí vodou. Poté bylo přidáno 5 ml ethanolu a směs byla kvantitativně převedena do dělicí nálevky. Ke směsi bylo postupně přidáno 8,4 ml diethyletheru a 8,4 ml hexanu a po každém přidavku byla směs mírně promíchána a třepána po dobu 1 min. Směs se nechala 30 min odstát pro oddělení fází (při laboratorní teplotě cca $22\text{ }^{\circ}\text{C}$) – první extrakce. Po této době byla horní fáze přesunuta do předem zvážené baňky. Následně byla provedena druhá a třetí extrakce, vždy s přidavkem 4,2 ml diethyletheru a 4,2 ml hexanu a odstáním směsi po dobu 30 min do oddělení fází. Všechny tři extrakty byly spojeny a rozpouštědlo bylo odpařeno na vakuové rotační odparce při teplotě do $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Množství vyextrahovaného tuku bylo zjištěno gravimetricky – zvážením na analytických vahách s přesností na 0,0001 g a odečtením váhy čisté extrakční baňky.

3.3.3 Příprava methylesterů mastných kyselin - Metoda podle ČSN EN ISO 5509

Vyextrahovaný tuk byl pomocí 1 ml hexanu kvantitativně převeden do plastových Eppendorfových mikrozkušavek. Z nich byl poté automatickou pipetou odebrán potřebný objem (viz rovnice 1) do vialky s pryžovým uzávěrem. Obsah vialky byl za přidavku 5 ml isooktanu a 0,5 ml methanolického roztoku KOH ($c = 2\text{ mol.l}^{-1}$) dokonale rozpuštěn. Vialka byla po dobu 8 minut dobře protřepávána a poté se nechala 6 min stát až do oddělení dvou vrstev. Po této době byl z horní isooktanové vrstvy odebrán 1 ml ke GC-FID analýze.

Výpočet 1: objem extraktu, potřebný k odebrání, pro získání cílové koncentrace tuku 10 mg.ml^{-1}

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2 \quad (1)$$

Kde:

c_1 koncentrace vyextrahovaného tuku [mg.ml^{-1}]

V_1 objem extraktu potřebný k odebrání [ml]

c_2 cílová koncentrace [tj. 10 mg.ml^{-1}]

V₂ objem isooktanu [5 ml]

3.4 Stanovení methylesterů mastných kyselin metodou GC-FID

- Plynový chromatograf TRACE GC (ThermoQuest S.p.A., Itálie)
- Plamenově ionizační detektor (FID), 250 °C, průtok vodíku 35 ml.min⁻¹, průtok vzduchu 350 ml.min⁻¹, make-up dusíku 30 ml.min⁻¹
- Dávkování: autosampler bez děliče toku (1 µl), ventil uzavřen po dobu 5 min
- Teplota injektoru: 250 °C
- Nosný plyn: dusík s průtokem 0,5 ml.min⁻¹
- Kapilární kolona: DB-23 o rozměrech 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm
- Teplotním program: 60 °C, 10 min, vzestupný gradient 12 °C/min do 200 °C s výdrží 10 min, vzestupný gradient 5 °C/min do 220 °C s výdrží 15 min, vzestupný gradient 10 °C/min do 240 °C s výdrží 7 min
- Celková doba analýzy: 60 minut

3.5 Identifikace a kvantifikace mastných kyselin ve vzorcích

Mastné kyseliny byly stanoveny po převedení na methylestery (viz kap. 3.3.3) (tzv. FAME, Fatty Acid Methyl Esters). Identifikace jednotlivých FAME v reálných vzorcích byla provedena na základě srovnání retenčních časů identických standardů. Kvantifikace vybraných mastných kyselin byla provedena výpočtem jejich koncentrace (c_{FAME}) z ploch píků FAME ve vzorku (P_{FAME}) a známé koncentrace (c_s) a ploch píků (P_s) standardů. Potřebné parametry standardů byly převzaty z práce Pruknerové [24].

Výpočet:

$$c_{\text{FAME}} = \frac{c_s \cdot P}{P_s} \text{ [mg.ml}^{-1}\text{]} \quad (2)$$

Vypočtené množství methylesterů mastných kyselin (c_{FAME}) bylo přepočteno na obsah MK (dle rovnice 3). Přepočet FAME na MK:

$$c_{\text{MK}} = \frac{c_{\text{FAME}} \cdot Mr_{\text{MK}}}{Mr_{\text{FAME}}} \quad (3)$$

Kde:

c_{MK} koncentrace MK ve vzorku [mg.ml⁻¹]

c_{FAME} koncentrace FAME ve vzorku [mg.ml⁻¹]

Mr_{MK} molární hmotnost MK [g.mol⁻¹]

Mr_{FAME} molární hmotnost FAME [g.mol⁻¹]

Přepočet obsahu MK na 1 g tuku: $c_{MK} \cdot 100$ [mg.g⁻¹ tuku] (4)

Přepočet obsahu MK na 1 g sýra: $c_{MK} \cdot 100 \cdot m$ [mg.g⁻¹ sýra] (5)

kde:

m hmotnost vyextrahovaného tuku [g]

3.6 Statistické zpracování výsledků

Data byla zpracována a vyhodnocena pomocí programu MS Excel 2007. Každý vzorek byl změřen dvakrát, výsledky jsou vyjádřeny v mg.g⁻¹ tuku a/nebo v mg.g⁻¹ sýra, ve tvaru aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (n=2).

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato práce je součástí rozsáhlé studie, která se bude zabývat komplexní charakterizací lipidů vevzorcích přírodních sýrů eidamského typu. Práce bude spočívat ve stanovení volných a vázaných mastných kyselin a některých dalších parametrů souvisejících s obsahem a složením lipidů ve vzorcích. Modelové vzorky budou vyráběny ve spolupráci s Ústavem technologie potravin na technologické fakultě Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně. Po celou dobu jejich výroby, od syrového mléka jako základní suroviny až po konečný výrobek, včetně 2 měsíců zrání za standardních podmínek, budou v pravidelných intervalech odebírány vzorky, které budou podrobeny analýzám. Cílem je sledovat změny vybraných parametrů v průběhu technologického procesu výroby sýra.

Tato bakalářská práce je zaměřena na stanovení celkového obsahu mastných kyselin. Pro izolaci lipidů byla použita extrakce podle ČSN EN ISO 1735; jde o klasický způsob za použití organických rozpouštědel. Pro esterifikaci mastných kyselin metoda podle ČSN EN ISO 5509 s použitím methanolového roztoku hydroxidu draselného. Mastné kyseliny byly identifikovány a kvantifikovány pomocí standardů plynovou chromatografií s FID detekcí. Přesný postup a podmínky stanovení byly převzaty z diplomové práce Pruknerové [24].

V rámci této práce byly proměřeny 3 vzorky sýrů eidamského typu. Sýry byly analyzovány okamžitě po výrobě, přesněji řečeno po uplynutí 48 hodin od jejich výroby. Účelem zde bylo zachytit počáteční fázi zrání. Jednotlivé vzorky se od sebe liší použitým pasteračním záhřevem (teplota vs. doba), hlavním cílem tedy bylo posoudit vliv pasteračního záhřevu na obsah jednotlivých mastných kyselin.

Lipidy (mastné kyseliny) mají tendenci podléhat oxidaci, jejíž příčinou bývá světlo a přítomnost kyslíku, ale také vyšší teplota; primárním reakčním produktem jsou hydroperoxidy mastných kyselin. Hydroperoxidy jsou velmi nestálé a dále reagují za tvorby většího počtu látek, tzv. sekundárních produktů oxidace lipidů. S oxidací je tedy spojený vznik nežádoucích látek nebo nežádoucí změna samotné mastné kyseliny. Při oxidaci dochází např. k posunům nebo změně polohy dvojné vazby, ke změně délky molekuly, mohou vznikat různé oxidační produkty, např. trans-mastné kyseliny, aldehydy, ketony, cyklické peroxidy, epoxykyseliny, hydroxykyseliny, oxokyseliny, uhlovodíky ap. [9]

K oxidaci jsou nejvíce náchylné nenasycené mastné kyseliny, zejména linolová a linolenová, které se oxidují vzdušným kyslíkem už při běžných teplotách. Monoenové MK (olejová) se za teploty místnosti oxidují jen velmi pomalu, dienové (linolová) asi 10x rychleji a trienové (linolenová) 20x rychleji. Tyto vztahy platí při teplotě kolem 20°C, při teplotě nad 100°C je již mezi jednotlivými MK jen malý rozdíl. Za vyšších teplot odpovídajících teplotám pečení, smažení a pražení dochází také k oxidaci nasycených mastných kyselin [9].

4.1 Identifikace a kvantifikace mastných kyselin ve vzorcích

Identifikace mastných kyselin ve vzorcích byla provedena na základě srovnání retenčních časů FAME vzorků s retenčními časy identických standardů, kvantifikace srovnáním ploch píků se standardy o známé koncentraci. Hlavní charakteristiky standardů jsou uvedeny v Tabulce 4.1.

Tabulka 4.1: Přehled standardů použitých k identifikaci a kvantifikaci mastných kyselin

Mastná kyselina	symbol	Tr [min]	c [mg.ml ⁻¹]	plocha píku [mV · s]
másečná	C4:0	14,564	0,04	1468312
kapronová	C6:0	18,256	0,04	2400501
kaprylová	C8:0	21,622	0,04	3557380
kaprinová	C10:0	24,111	0,04	3061648
undekanová	C11:0	25,201	0,02	1350435
laurová	C12:0	26,364	0,04	2315169
tridekanová	C13:0	27,57	0,02	999383
myristová	C14:0	28,992	0,04	1666563
myristolejová	C14:1 n9c	29,701	0,02	830174
pentadekanová	C15:0	30,627	0,02	722222
cis-10-pentadecenová	C15:1	31,552	0,02	713495
palmitová	C16:0	32,659	0,06	2158637
palmitolejová	C16:1 n9c	33,369	0,02	668278
heptadekanová	C17:0	34,658	0,02	573988
cis-10-heptadecenová	C17:1	35,444	0,02	614572
stearová	C18:0	36,823	0,04	1258918
elaidová	C18:1 n9t	37,275	0,02	648736
olejová	C18:1 n9c	37,583	0,04	1360754
linolelaidová	C18:2 n6t	38,103	0,02	520610
linolová	C18:2 n6c	38,895	0,02	607511
gama-linolenová	C18:3 n6	39,744	0,02	499286
linolenová	C18:3 n3	40,648	0,02	489830
arachová	C20:0	42,305	0,04	1067799
cis-11-eicosenová	C20:1	43,208	0,02	518246
cis-11,14-eicosadienová	C20:2	45,154	0,02	480540
heneicosanová	C21:0	45,765	0,02	498451
cis-8,11,14-eicosatrienová	C20:3 n6	46,448	0,02	438082
arachidonová	C20:4 n6	47,287	0,02	420071
cis-11,14,17-eicosatrienová	C20:3 n3	47,823	0,02	466524
cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenová	C20:5 n3	50,08	0,02	956606
behenová	C22:0	50,27	0,04	367333

Tabulka 4.1 pokračování: Přehled standardů použitých k identifikaci a kvantifikaci mastných kyselin

Mastná kyselina	symbol	Tr [min]	c [mg.ml ⁻¹]	plocha píku [mV · s]
eruková	C22:1 n9	51,36	0,02	474533
cis-13,16-docosadienová	C22:2	53,183	0,02	450170
tricosanová	C23:0	53,513	0,02	492037
lignocerová	C24:0	57,176	0,04	991745
cis-4,7,10,13,16,19-docosaheptaenová	C22:6 n3	58,308	0,02	452122
nervonová	C24:1	58,513	0,02	277490

4.1 Srovnání obsahu mastných kyselin ve vzorcích

Celkem bylo ve vzorcích sýrů identifikováno 34 mastných kyselin. V Tabulkách 4.2 a 4.3 je uveden přehled a obsah mastných kyselin identifikovaných v jednotlivých vzorcích (pro lepší přehlednost jsou uvedeny hodnoty jednotlivých kyselin v mg.g⁻¹ tuku i po přepočtu na mg.g⁻¹ sýra).

Mléčný tuk je charakteristický přítomností především mastných kyselin s krátkými až středně dlouhými řetězci (4-16 C). Mezi nejdůležitější mastné kyseliny mléčného tuku patří nasycené MK (Saturated Fatty Acids - SFA)(máselná, kapronová, kaprylová, kaprinová, laurová, myristová, palmitová, stearová), které tvoří cca 60-70 % všech MK, v menší míře jsou zde zastoupeny mononenasycené MK (Monounsaturated Fatty Acids - MUFA)(26–42 %), z nichž nejvýznamnější je kyselina olejová. Polynenasycené MK (Polyunsaturated Fatty Acids PUFA)(linolová, linolenová, arachidonová) tvoří velmi nízký podíl (2–6 %) [25].

Tabulka 4.2: Obsah mastných kyselin identifikovaných v sýrech (mg · g⁻¹ tuku)

Mastná kyselina	c [mg · g ⁻¹ tuku]		
	vzorek A	vzorek B	vzorek C
máselná	1,18 ± 0,35	-	1,11 ± 0,00
kapronová	10,73 ± 0,58	15,56 ± 0,45	14,10 ± 1,50
kaprylová	5,38 ± 0,05	8,32 ± 0,08	8,35 ± 0,25
kaprinová	18,04 ± 0,30	20,07 ± 0,18	20,80 ± 0,91
undekanová	0,87 ± 0,03	0,88 ± 0,00	0,94 ± 0,07
laurová	26,22 ± 0,49	25,91 ± 0,94	27,57 ± 1,60
tridekanová	1,43 ± 0,02	1,37 ± 0,07	1,47 ± 0,11
myristová	102,16 ± 0,25	90,92 ± 6,39	96,43 ± 5,31
myristolejová	11,42 ± 0,11	9,84 ± 1,33	10,41 ± 1,23
pentadekanová	16,18 ± 0,40	14,23 ± 1,11	14,96 ± 0,62
cis-10-pentadecenová	2,53 ± 0,12	2,07 ± 0,19	1,14 ± 0,93
palmitová	337,92 ± 12,45	280,43 ± 27,05	258,36 ± 27,97

Tabulka 4.2 pokračování: Obsah mastných kyselin identifikovaných v sýrech ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ tuku)

	c [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ tuku]		
Mastná kyselina	vzorek A	vzorek B	vzorek C
palmitoolejová	$1,71 \pm 0,01$	$1,53 \pm 0,03$	$19,70 \pm 0,44$
heptadekanová	$4,54 \pm 3,99$	$7,91 \pm 0,82$	$8,61 \pm 0,55$
cis-10-heptadecenová	$4,22 \pm 0,16$	$3,72 \pm 0,38$	$3,92 \pm 0,19$
stearová	$84,21 \pm 7,01$	$72,83 \pm 5,71$	$78,21 \pm 5,54$
elaidová	-	-	$81,23 \pm 0,00$
olejová	$229,23 \pm 7,37$	$179,22 \pm 27,15$	$222,30 \pm 32,63$
linolelaidová	$4,30 \pm 0,20$	$2,43 \pm 1,45$	$5,36 \pm 4,28$
linolová	$53,45 \pm 26,82$	$27,50 \pm 10,31$	$80,49 \pm 36,36$
gama-linolenová	$40,12 \pm 0,00$	$0,35 \pm 0,09$	$0,30 \pm 0,08$
linolenová	$1,84 \pm 0,35$	$4,83 \pm 0,93$	$5,52 \pm 0,36$
arachová	$2,29 \pm 1,45$	$1,18 \pm 0,26$	$1,06 \pm 0,59$
cis-11-eicosenová	$0,27 \pm 0,02$	$0,90 \pm 0,17$	$6,61 \pm 5,62$
cis-11,14-eicosadienová	$1,55 \pm 0,37$	-	-
heneicosanová	-	-	$0,21 \pm 0,00$
cis-8,11,14-eicosatrienová	$1,17 \pm 0,00$	$1,02 \pm 0,11$	$1,06 \pm 0,00$
arachidonová	$1,85 \pm 0,07$	$1,58 \pm 0,16$	$1,62 \pm 0,00$
cis-11,14,17-eicosatrienová	-	-	$1,43 \pm 0,00$
cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenová	$0,50 \pm 0,00$	$0,27 \pm 0,00$	$0,29 \pm 0,00$
behenová	$4,71 \pm 0,00$	$0,78 \pm 0,00$	$0,92 \pm 0,00$
eruková	$0,46 \pm 0,00$	-	$2,19 \pm 0,00$
trikosanová	$0,25 \pm 0,03$	-	-
lignocerová	$0,59 \pm 0,27$	$0,37 \pm 0,00$	$0,61 \pm 0,28$
cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenová	-	-	$0,24 \pm 0,00$
nervonová	$2,47 \pm 0,00$	-	-

Tabulka 4.3: Obsah mastných kyselin identifikovaných v sýrech ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ sýra)

	c [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ sýra]		
Mastná kyselina	vzorek A	vzorek B	vzorek C
máselná	$0,40 \pm 0,10$	-	$0,28 \pm 0,00$
kapronová	$3,66 \pm 0,06$	$3,31 \pm 0,07$	$3,62 \pm 0,40$
kaprylová	$1,84 \pm 0,09$	$1,77 \pm 0,00$	$2,15 \pm 0,07$
kaprinová	$6,17 \pm 0,33$	$4,27 \pm 0,07$	$5,34 \pm 0,26$
undekanová	$0,30 \pm 0,00$	$0,19 \pm 0,00$	$0,24 \pm 0,02$
laurová	$8,97 \pm 0,50$	$5,51 \pm 0,24$	$7,08 \pm 0,45$
tridekanová	$0,49 \pm 0,02$	$0,29 \pm 0,02$	$0,38 \pm 0,03$

Tabulka 4.3 pokračování: Obsah mastných kyselin identifikovaných v sýrech ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ sýra)

Mastná kyselina	c [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ sýra]		
	vzorek A	vzorek B	vzorek C
myristová	$34,91 \pm 1,20$	$19,36 \pm 1,49$	$24,77 \pm 1,49$
myristoolejová	$3,90 \pm 0,11$	$2,10 \pm 0,30$	$2,68 \pm 0,33$
pentadekanová	$5,52 \pm 0,07$	$3,03 \pm 0,26$	$3,84 \pm 0,18$
cis-10-pentadecenová	$0,86 \pm 0,01$	$0,44 \pm 0,04$	$0,29 \pm 0,24$
palmitová	$115,33 \pm 0,01$	$59,71 \pm 6,15$	$66,31 \pm 6,85$
palmitoolejová	$0,59 \pm 0,02$	$0,33 \pm 0,01$	$5,06 \pm 0,14$
heptadekanová	$1,60 \pm 1,42$	$1,68 \pm 0,19$	$2,21 \pm 0,15$
cis-10-heptadecenová	$1,44 \pm 0,00$	$0,79 \pm 0,09$	$1,01 \pm 0,05$
stearová	$28,69 \pm 1,34$	$15,51 \pm 1,32$	$20,09 \pm 1,52$
elaidová	-	-	$20,97 \pm 0,00$
olejová	$78,43 \pm 5,40$	$38,18 \pm 6,03$	$57,13 \pm 8,67$
linolelaidová	$1,47 \pm 0,01$	$0,52 \pm 0,31$	$1,38 \pm 1,11$
linolová	$18,60 \pm 9,84$	$5,87 \pm 2,23$	$20,72 \pm 9,44$
gama-linolenová	$0,11 \pm 0,00$	$0,07 \pm 0,02$	$0,08 \pm 0,02$
linolenová	$0,63 \pm 0,14$	$1,03 \pm 0,21$	$1,42 \pm 0,10$
arachová	$0,80 \pm 0,52$	$0,25 \pm 0,06$	$0,27 \pm 0,15$
cis-11-eicosenová	$0,09 \pm 0,01$	$0,19 \pm 0,04$	$1,69 \pm 1,43$
cis-11,14-eicosadienová	$0,52 \pm 0,11$	-	-
heneicosanová	-	-	$0,05 \pm 0,00$
cis-8,11,14-eicosatrienová	$0,42 \pm 0,00$	$0,22 \pm 0,02$	$0,27 \pm 0,00$
arachidonová	$0,63 \pm 0,00$	$0,34 \pm 0,04$	$0,41 \pm 0,00$
cis-11,14,17-eicosatrienová	-	-	$0,37 \pm 0,00$
cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenová	$0,18 \pm 0,00$	$0,06 \pm 0,00$	$0,07 \pm 0,00$
behenová	$1,67 \pm 0,00$	$0,16 \pm 0,00$	$0,24 \pm 0,64$
eruková	$0,16 \pm 0,00$	-	$0,56 \pm 0,00$
trikosanová	$0,09 \pm 0,01$	-	-
lignocerová	$0,21 \pm 0,10$	$0,08 \pm 0,00$	$0,16 \pm 0,07$
cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenová	-	-	$0,06 \pm 0,00$
nervonová	$0,88 \pm 0,00$	-	-

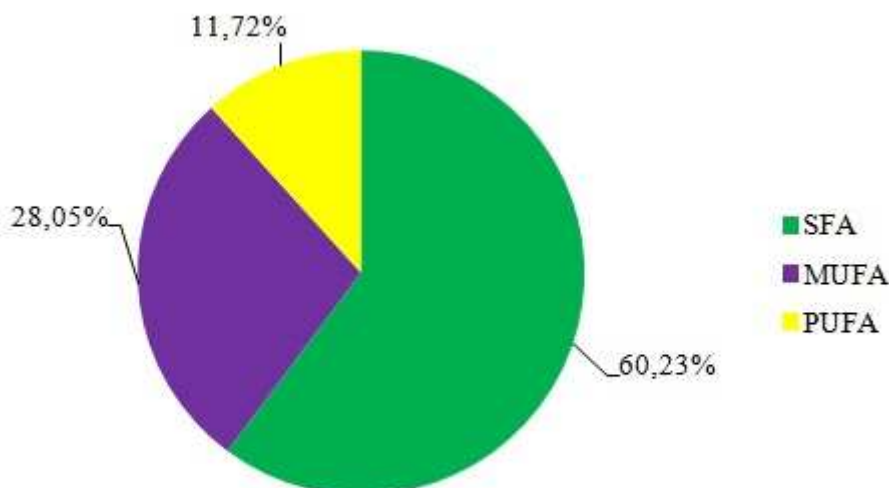
Mezi vzorky byly nalezeny výrazné rozdíly jak v počtu identifikovaných kyselin, tak i v jejich koncentraci. Vzhledem k tomu, že pro výrobu všech vzorků byla použita stejná surovina (syrové mléko), rozdíly je třeba přičítat aplikaci různých pasteračních záhřevů, které se lišily teplotou i dobou záhřevu.

4.1.1 Srovnání skupin nasycených, mono- a polynenasycených mastných kyselin

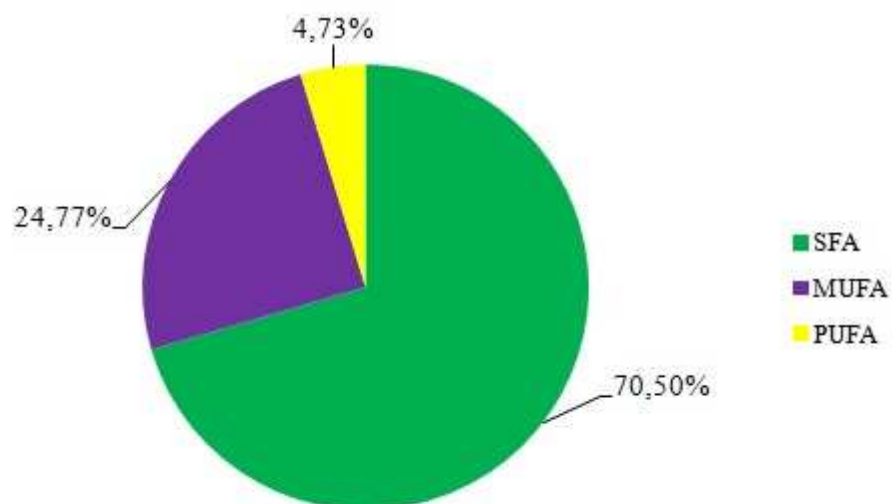
V Grafech 4.1-4.3 je uvedeno procentuální srovnání jednotlivých skupin mastných kyselin (SFA, MUFA, PUFA). Jejich obsah odpovídá výše zmíněným poznatkům o složení mléčného tuku, ve všech vzorcích je nejvíce SFA, potom MUFA a nejméně PUFA [25].

Nejvíce SFA se nacházelo ve vzorku B, nejméně ve vzorku C (dokonce méně než literaturou uváděné rozmezí 60-70 %)[25]; nejvíce MUFA ve vzorku C, nejméně ve vzorku B (také méně než literaturou uváděné rozmezí 26–42 %)[25]; ve vzorcích A a C byl nalezen vysoký podíl PUFA, výrazně víc než literaturou uváděné rozmezí (2–6 %)[25].

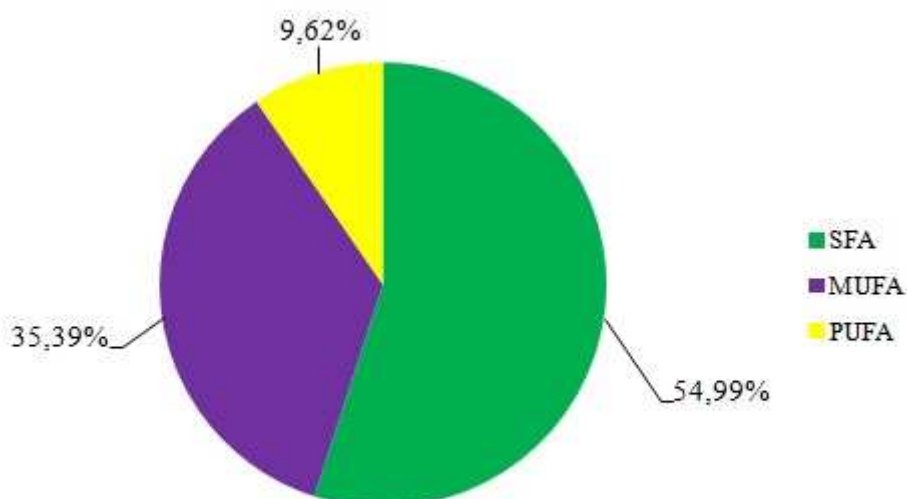
Vzorek B je tedy charakterizován vysokým obsahem SFA a nízkým obsahem MUFA a především PUFA. Složení vzorků A a C je podobné, vzorek A obsahuje mírně vyšší obsah SFA a nižší obsah MUFA.



Graf 4.1: Procentuální zastoupení jednotlivých skupin mastných kyselin (SFA, MUFA, PUFA) ve vzorku A (65 °C/30 min)



Graf 4.2: Procentuální zastoupení jednotlivých skupin mastných kyselin (SFA, MUFA, PUFA) ve vzorku B (80 °C/30 s)

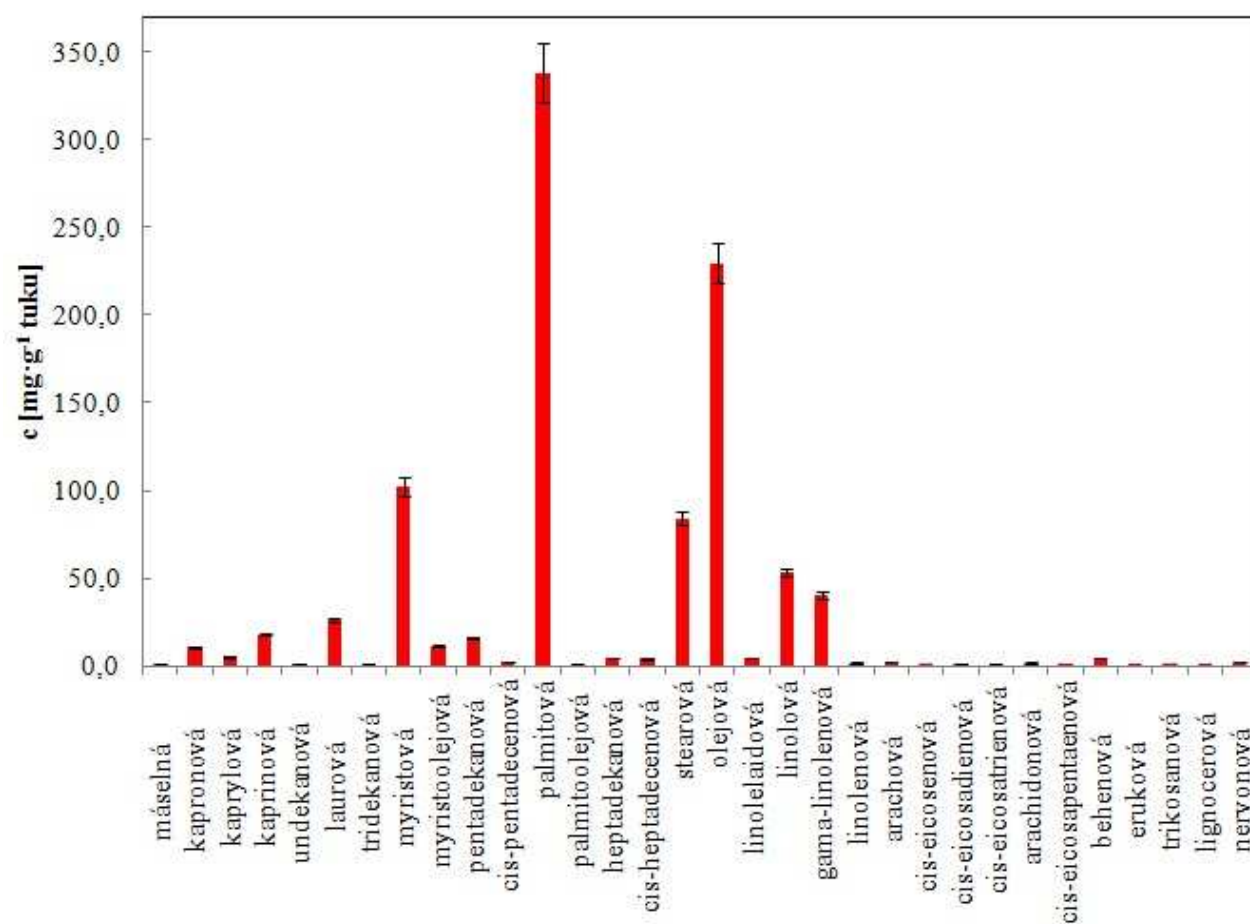


Graf 4.3: Procentuální zastoupení jednotlivých skupin mastných kyselin (SFA, MUFA, PUFA) ve vzorku C (74 °C/30 s)

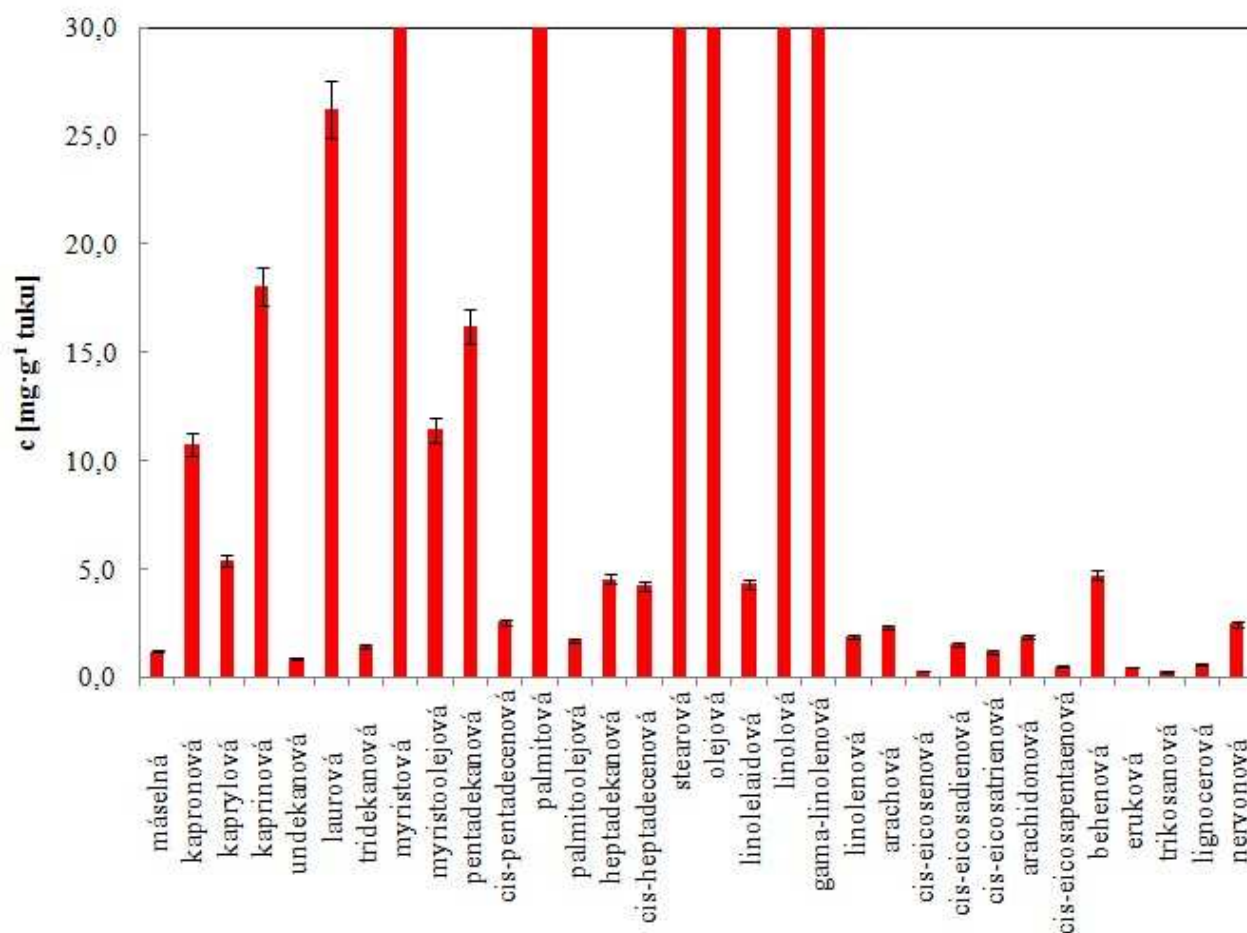
4.1.2 Srovnání obsahu jednotlivých mastných kyselin ve vzorcích

V grafech 4.4 – 4.6 je uvedeno srovnání obsahu všech identifikovaných MK v jednotlivých vzorcích. Vzhledem k poměrně velkým rozdílům v obsahu jednotlivých MK je každý graf rozdělený na dvě části, v horní a) je uveden celkový rozsah stupnice, ve spodní b) výběr pro lepší rozlišení MK přítomných v nižší koncentraci.

V grafech 4.7-4.9 jsou potom srovnány vzorky mezi sebou.

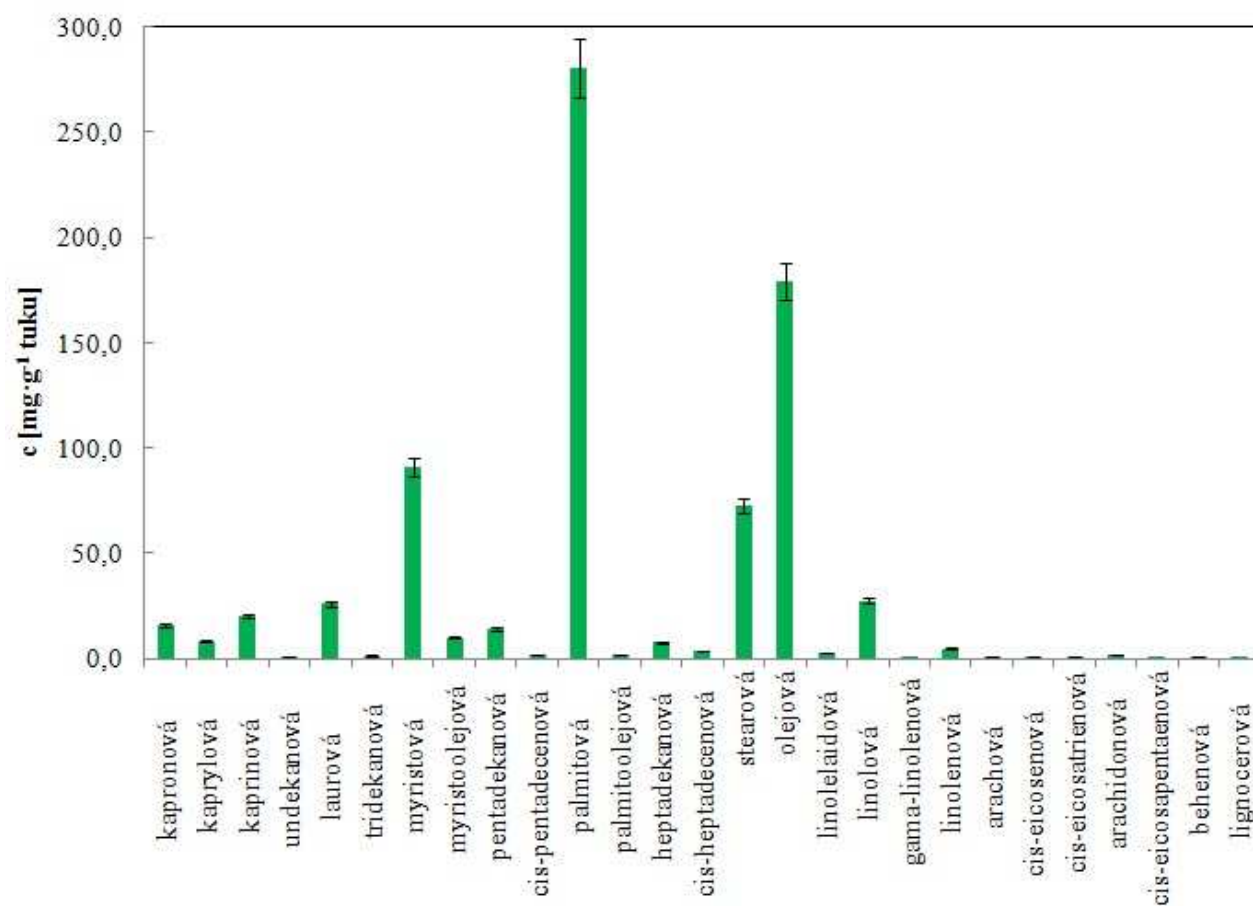


Graf 4.4a: Obsah mastných kyselin ve vzorku A (pasterační záhřev 65 °C/30 min)

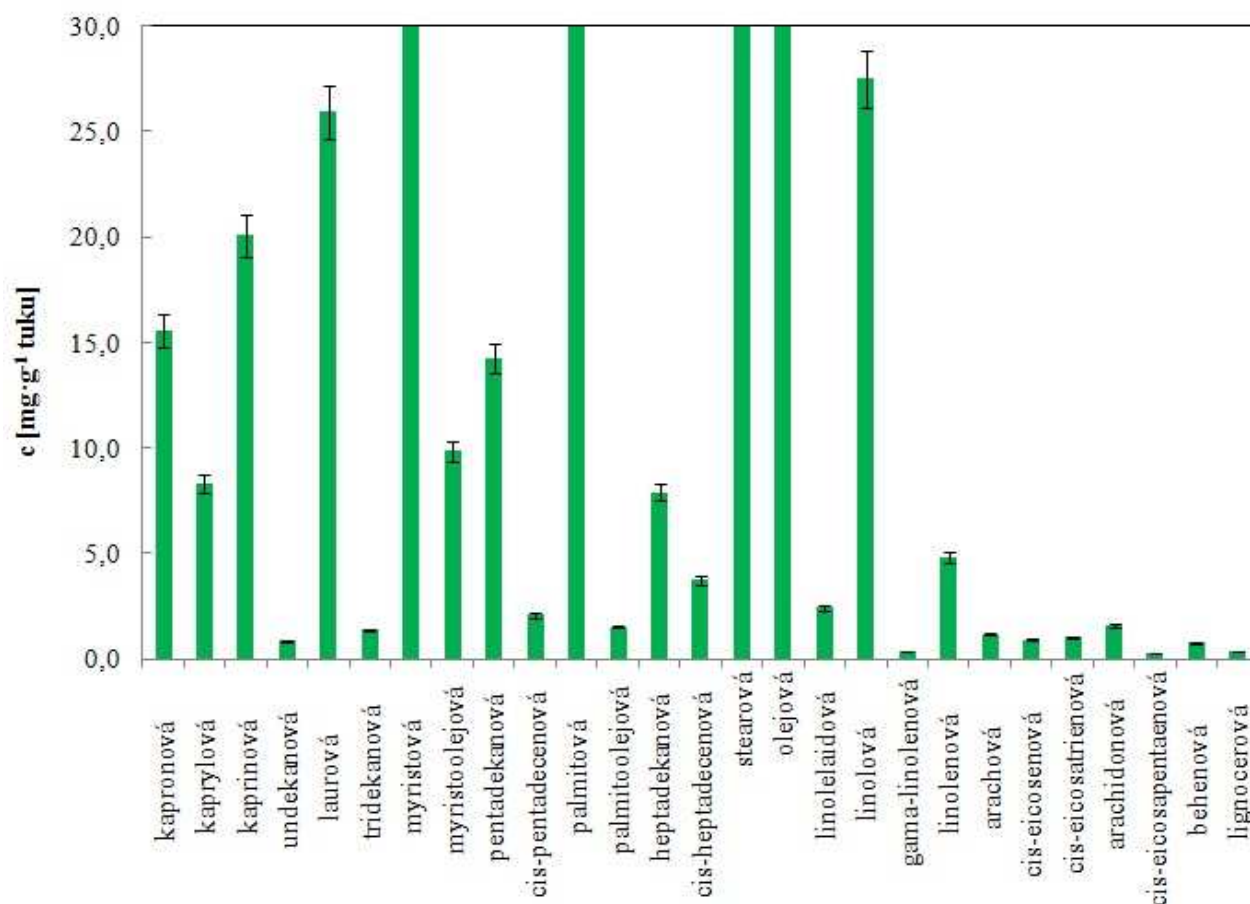


Graf 4.4b: Obsah mastných kyselin ve vzorku A (pasterační záhřev 65 °C/30 min); rozsah stupnice do 30 mg • g⁻¹ tuku

Ve vzorku A (pasterační záhřev 65 °C/30 min) bylo identifikováno celkem 32 mastných kyselin. Jak je patrné z grafu 4.4 z kvantitativního hlediska byly nejvýznamnější kyseliny myristová, palmitová, stearová a olejová, z polynenasycených pak linolová a gama-linolenová.

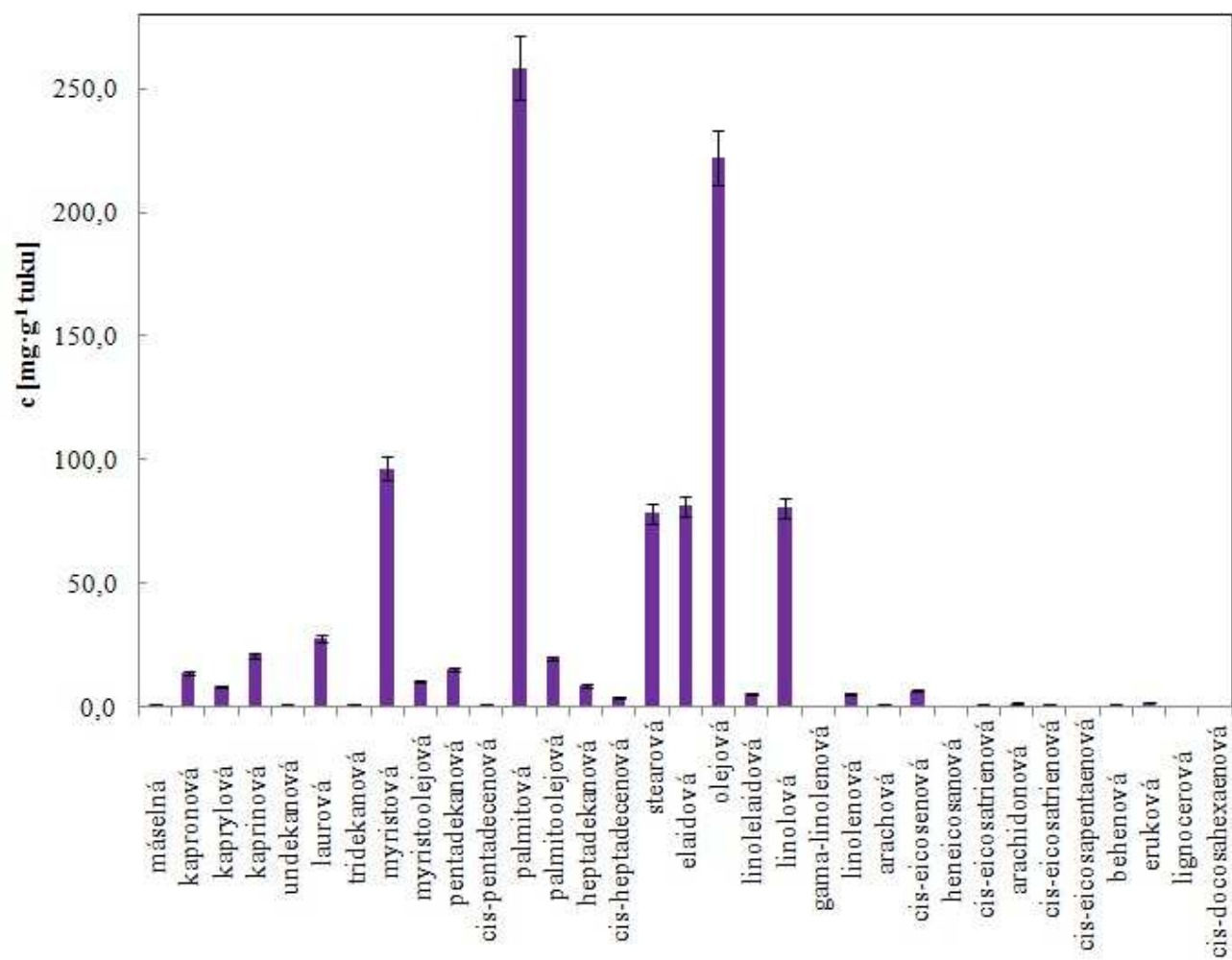


Graf 4.5a: Obsah mastných kyselin ve vzorku B (pasterační záhřev 80 °C/30 s)

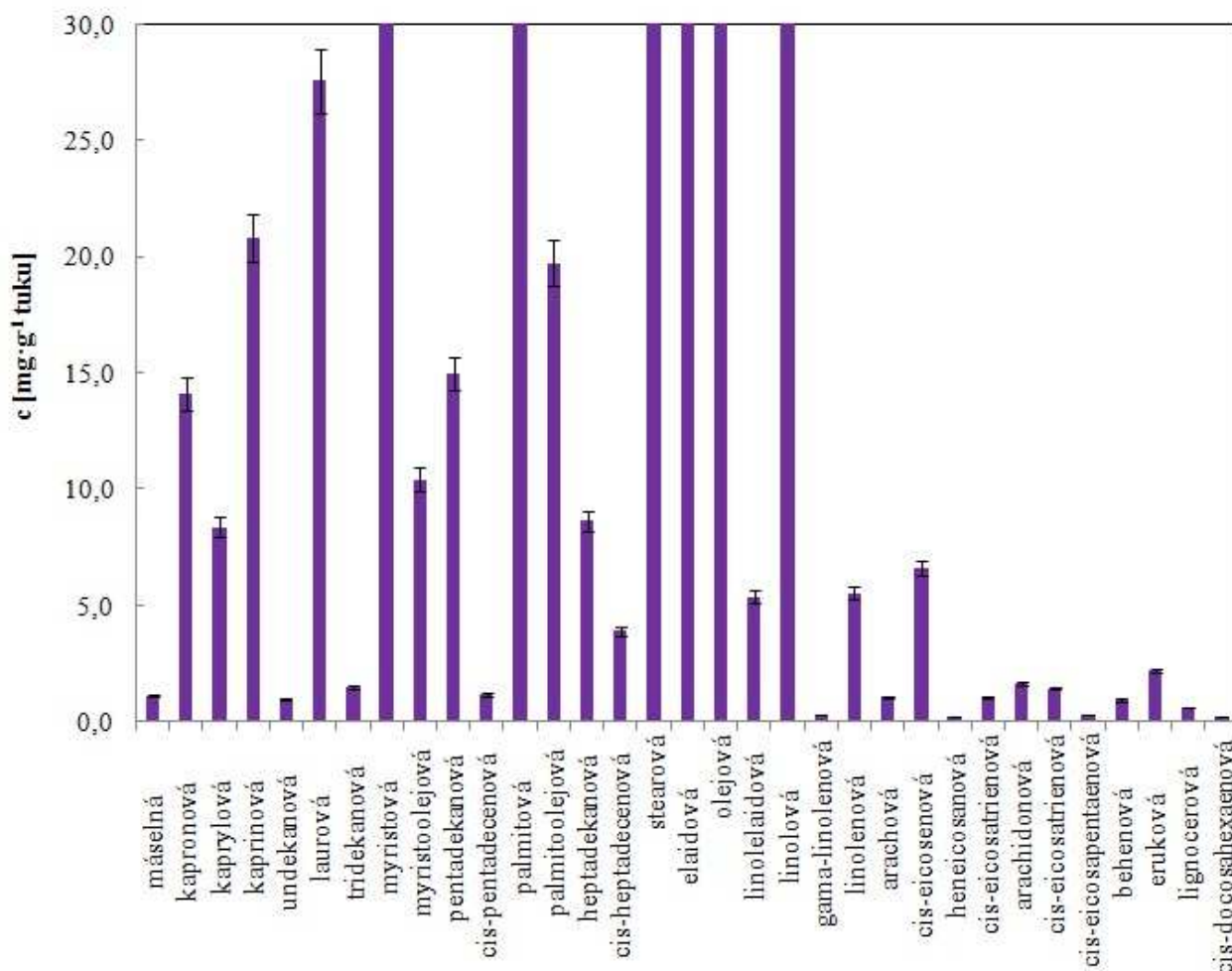


Graf 4.5b: Obsah mastných kyselin ve vzorku B (pasterační záhřev 80 °C/30 s); rozsah stupnice do 30 mg • g⁻¹ tuku

Ve vzorku B (pasterační záhřev 80 °C/30 s) bylo identifikováno celkem 27 mastných kyselin. Zde výrazně převažuje obsah kyseliny palmitové (viz graf 4.5), ve vysokých koncentracích se nachází také kyselina myristová, stearová a olejová, z polynenasycených pak linolová.



Graf 4.6a: Obsah mastných kyselin ve vzorku C (pasterační záhřev 74 °C/30 s)



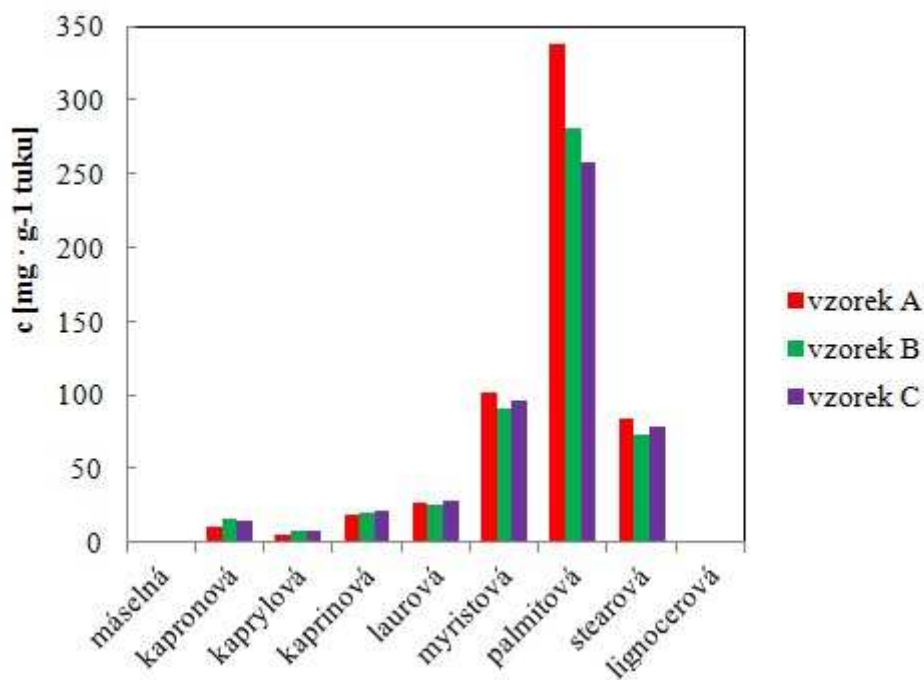
Graf 4.6b: Obsah mastných kyselin ve vzorku C (pasterační záhřev 74 °C/30 s); rozsah stupnice do 30 mg · g⁻¹ tuku

Ve vzorku C (pasterační záhřev 74 °C/30 s) bylo identifikováno celkem 33 mastných kyselin. Zde je kvantitativně nejvýznamnější kyselina palmitová a olejová, ve vysoké koncentraci se nachází i kyselina myristová, stearová, nenasycená elaidová (viz graf 4.6) a z polynenasycených opět linolová.

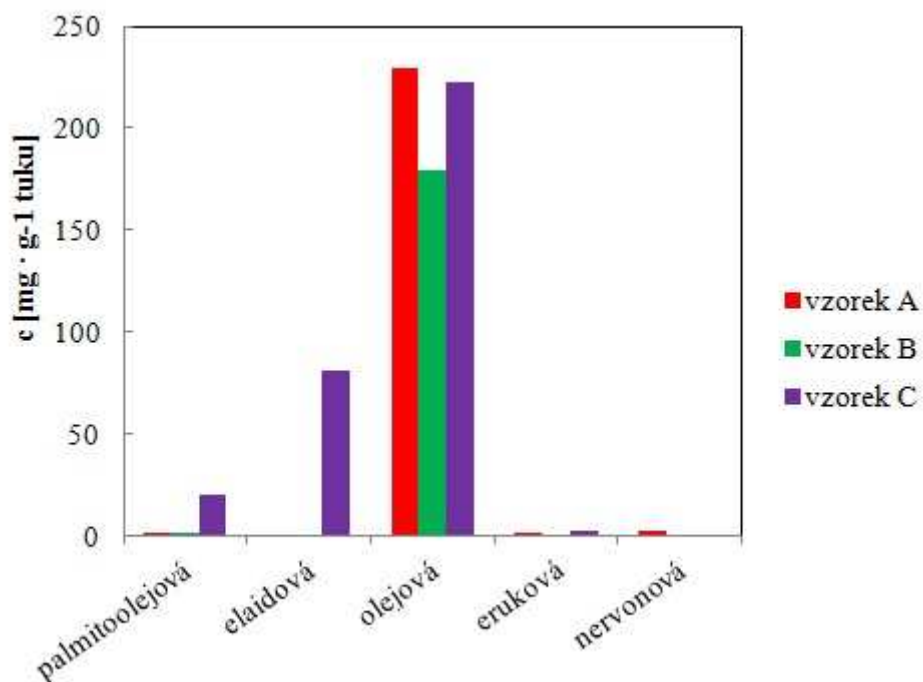
Složení MK ve všech třech vzorcích odpovídá výše zmíněným poznatkům o složení mléčného tuku [25], ve všech vzorcích převládají vysoké koncentrace nejdůležitějších mastných kyselin mléčného tuku: nasycené se středně dlouhým řetězcem (14-18 C) myristová, palmitová a stearová, z nenasycených je nejvýznamnější kyselina olejová; v mírně nižších koncentracích se pak nacházejí nasycené MK s krátkým řetězcem (6-12 C) kapronová, kaprylová, kaprinová a laurová. Obsah kyseliny máselné je poměrně nízký, to však může být způsobeno její poměrně obtížnou identifikací a především kvantifikací, poněvadž eluuje velmi blízko píku rozpouštědla. Z polynenasycených MK je ve všech vzorcích nejvíce kyseliny linolové. Obsah většiny ostatních MK se pohyboval pod 5 mg·g⁻¹ tuku, polynenasycených dokonce pod 1mg·g⁻¹ tuku. Pokud srovnáme vzorky mezi sebou, nejvíce MK bylo identifikováno ve vzorku C (33), nejméně ve vzorku B (27). V grafech 4.7-4.9 je pak uvedeno

srovnání obsahu MK identifikovaných ve všech vzorcích, pro lepší přehlednost jsou opět rozděleny na SFA, MUFA a PUFA a srovnány v samostatných grafech.

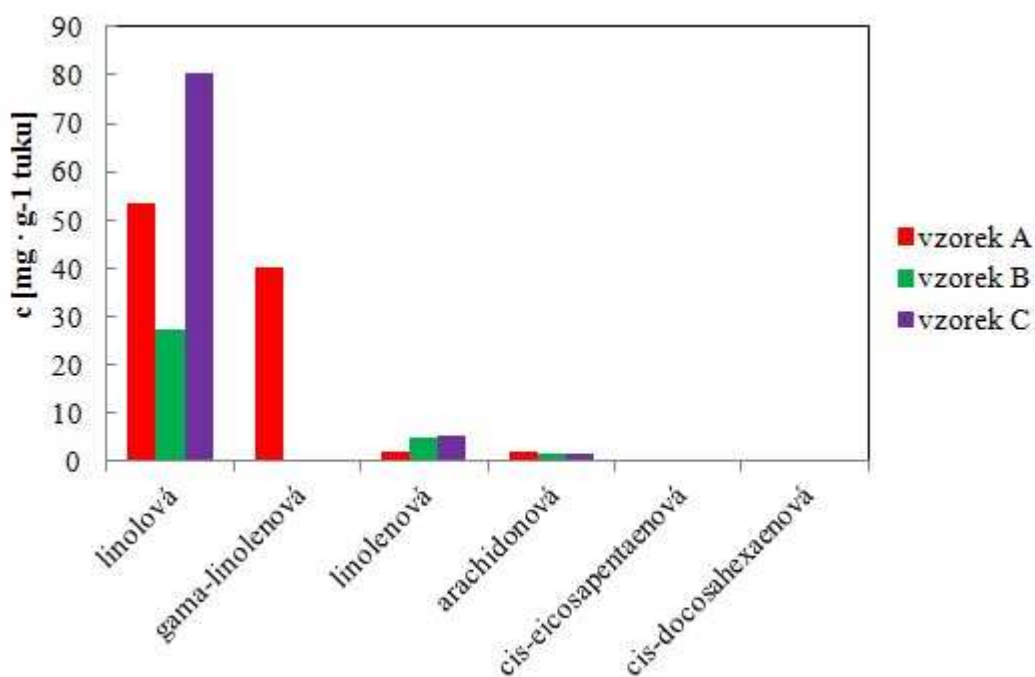
Ve většině případů je nejnižší obsah jednotlivých MK ve vzorku B, zvláště v případě kyselin patřících mezi MUFA a PUFA. U vzorků A a C výsledky nejsou zcela jednoznačné, pokud vezmeme v úvahu kvantitativně nejvýznamnější MK lze tvrdit, že ve vzorku A je jich více než ve vzorku C.



Graf 4.7: Srovnání obsahu nasycených mastných kyselin (SFA) ve vzorcích A, B a C



Graf 4.8: Srovnání obsahu mononenasycených mastných kyselin (MUFA) ve vzorcích A, B a C



Graf 4.9: Srovnání obsahu polynenasycených mastných kyselin (PUFA) ve vzorcích A, B a C

4.1.3 Vliv pasteračního záhřevu na obsah mastných kyselin ve vzorcích

Pokud vezmeme v úvahu použité pasterační zákroky, výsledky zhruba odpovídají očekávání. Aplikovaný pasterační záhřev významným způsobem ovlivňuje složení MK ve vzorku vyrobeného sýra.

Z výsledků srovnání skupin SFA, MUFA a PUFA (grafy 4.1 – 4.3) vyplývá, že vyšší pasterační záhřev (80 °C/30 s) poškozuje více nenasycené MK, především PUFA, které velmi snadno podléhají oxidaci. Toto zjištění je v souladu s dostupnou literaturou [9]. Delší doba pasterace (65 °C/30 min), i když při nízké teplotě, poškozuje hlavně MUFA, SFA a PUFA kupodivu méně.

Obdobné trendy lze vypořádat i při srovnání jednotlivých MK (grafy 4.7 – 4.9), ve většině případů je nejnižší obsah jednotlivých MK ve vzorku pasterovaném na vyšší teplotu (80 °C/30 s). Pokud vezmeme v úvahu kvantitativně nejvýznamnější MK, nízká pasterační teplota, i když aplikovaná poměrně dlouhou dobu (65 °C/30 min), obsah MK významně nesnižuje.

Při výrobě sýrů se v praxi nejčastěji používá krátkodobá šetrná pasterace, kdy se mléko zahřeje na teplotu 72–74 °C po dobu 20–40 s [4,7], u sýrů typu eidam se aplikují teploty 74–78 °C [7]. Tomu nejlépe odpovídá vzorek C (pasterační záhřev 74 °C 30 s), nicméně jeho složení MK bylo podobné jako u vzorku A (pasterovaný 65 °C/30 min), zvláště co se týká kvantitativně nejvýznamnějších MK.

5 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývá stanovením mastných kyselin v přírodních sýrech eidamského typu. Modelové vzorky byly vyrobeny ve spolupráci s Ústavem technologie potravin na technologické fakultě Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně standardním technologickým postupem. Práce zahrnuje výsledky měření sýrů okamžitě (resp. 48 hodin) po výrobě, tedy počátek zrání. Celkem byly analyzovány tři vzorky sýrů, které se od sebe lišily teplotou a dobou pasteračního zahřevu mléka, z něhož byly vyrobeny (65 °C 30 min; 74 °C 30 s; 80 °C 30 s).

Pro extrakci lipidů ze vzorků byla použita klasická extrakce směsí diethyletheru a hexanu podle ČSN EN ISO 1735; pro esterifikaci mastných kyselin metoda podle ČSN EN ISO 5509 s použitím methanolového roztoku hydroxidu draselného. Vzniklé methylestery byly stanoveny pomocí plynové chromatografie s FID detekcí. Použitá metoda je jednoduchá, přiměřeně rychlá, vyžaduje minimální množství vzorku a rozpouštědel.

Celkem bylo ve vzorcích sýrů identifikováno 34 mastných kyselin. V nejvyšších koncentracích byly nalezeny nasycené kyseliny myristová, palmitová a stearová, z nenasycených kyselina olejová; v mírně nižších koncentracích se pak nacházely kyseliny kapronová, kaprylová, kaprinová a laurová. Všechny tyto jsou považovány za významnou složku mléčného tuku. Polynenasycené kyseliny tvoří velmi nízký podíl v mléčném tuku, ve všech vzorcích však byl nalezen poměrně vysoký obsah kyseliny linolové.

Mezi vzorky byly nalezeny rozdíly jak v počtu identifikovaných mastných kyselin, tak v jejich obsahu, z čehož vyplývá, že aplikovaný pasterační zahřev významným způsobem ovlivňuje složení mastných kyselin ve vzorku vyrobeného sýra.

Podle literatury vyšší pasterační zahřev poškozuje více nenasycené mastné kyseliny, především ty s vyšším počtem dvojných vazeb, které velmi snadno podléhají oxidaci. Vzorek B (aplikován nejvyšší zahřev 80 °C 30 s) je skutečně charakterizován vysokým obsahem nasycených, ale nízkým obsahem mono- a polynenasycených mastných kyselin.

Vzorek sýra C byl vyroben z mléka pasterovaného krátkou dobu a při nižší teplotě (74 °C 30 s). Tato tzv. šetrná pasterace se v praxi používá nejčastěji, nicméně jeho složení mastných kyselin bylo podobné jako u vzorku A (pasterovaný 65 °C/30 min), zvláště co se týká kvantitativně nejvýznamnějších kyselin. Delší doba pasterace tedy pravděpodobně obsah mastných kyselin významněji neovlivňuje.

Tato práce je však pilotní studií problematiky a jedná se o první výsledky, ze kterých nelze vyvozovat jednoznačné závěry. Vzorky budou podrobeny dalšímu rozboru po 2 měsících zrání (v rámci navazující diplomové práce), po této době budou rozdíly mezi vzorky více markantní a bude možné je lépe posoudit.

6 LITERATURA

- [1] CHEESY: Obchod nejen se sýrem. [online]. [citováno 7. 4. 2015]. Dostupné z: <http://www.mujsyr.cz/>
- [2] POVLTAVSKÉ MLÉKÁRNY, [online], [citováno 7. 4. 2015], dostupné z: <http://www.povltavskemlekarny.cz/historie.html>
- [3] BEL: Bel sýry Česko a.s. [online]. [citováno 7. 4. 2015]. Dostupné z: <http://www.belsyry.cz/faqs>
- [4] DRDÁK, M., STUDNICKÝ, J., MÓROVÁ, E., KAROVIČOVÁ, J.: *Základy potravinářských technologií*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 1996. 512s. ISBN 80967064-1-1
- [5] GAJDŮŠEK, S. *Mlékařství II*. 1. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 1998. 135 s. ISBN 80-7157-342-6.
- [6] VACOVÁ, Terézia. *Mlieko a mliečne prípravky vo výžive*. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1986, 215 s. ISBN 302 05 126.
- [7] KADLEC, Pavel, Karel MELZUCH a Michal VOLDŘICH. *Přehled tradičních potravinářských výrob: technologie potravin*. Vyd. 1. Ostrava, 2012, 569 s. ISBN 978-80-7418-145-0.
- [8] Mléko a mléčné výrobky: Eidam. 2014. [online]. [citováno 1. 5. 2015]. Dostupné z: <https://www.stream.cz/jidlo-s-r-o/10004051-mleko-a-mlecne-vyroby-4-eidam>
- [9] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, xxii, 580 s. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [10] ZEHNÁLEK, Josef. *Biochemie 2*. Vyd. 1. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003, 200 s. ISBN 978-80-7157-716-4.
- [11] DOSTÁL, Jiří, Hana PAULOVÁ, Jiří SLANINA a Eva TÁBORSKÁ. *Biochemie: pro posluchače bakalářských oborů*. 1. vyd. Brno: Galén, 2009, 158 s. ISBN 978-80-2105020-4.
- [12] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie 2: Živý systém jako chemický stroj*. 1. vyd. Praha: Academia, 1992, 136 s. ISBN 80-200-0441-6.
- [13] Fatty acid. [online]. 2008 [cit. 2014-03-10]. Dostupné z WWW: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/202621/fatty-acid>
- [14] VOLKA, Karel. *Analytická chemie II*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1995, 236 s. ISBN 807080-227-8.
- [15] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [16] SMOLKOVÁ Eva, FELTL Ladislav. *Analýza látek v plynném stavu*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1991, ISBN 80-03-00604-X.
- [17] SOMMER, L. *Základy analytické chemie 2*. 1. vyd. Brno: VUTIUM, 2000. 347 s. ISBN 80-214-1742-0.
- [18] ČSN EN ISO 1735 (57 1007): Sýry a tavené sýrové výrobky – Stanovení obsahu tuku – Vážková metoda (Referenční metoda). Praha: Český normalizační institut, 1997, 16 s.

- [19] ČSN EN ISO 5509 (588767): Živočišné a rostlinné tuky a oleje – Příprava methylesterů mastných kyselin. Praha: Český normalizační institut, 2001, 40 s.
- [20] GUTNIKOV, G. *Fatty Acids Profiles of Lipid Samples*. Journal of Chromatography B. 1995, vol. 671, pp. 71–89. ISSN 1570-0232.
- [21] SEPPÄNEN-LAAKSO, T., Laakso, I., Hiltunen, R. *Analysis of Fatty Acids by Gas Chromatography and its Relevance to Research on Health and Nutrition*. Analytica Chimica Acta. 2002, vol. 465, pp. 39–62.
- [22] EDER, K. *Gas Chromatographic Analysis of Fatty Acid Methyl Esters*. Journal of Chromatography B. 1995, vol. 671, pp. 113–131. ISSN 1570-0232.
- [23] MYHER, J. J., KUKSIS, A. *General Strategies in Chromatographic Analysis of Lipids*. Journal of Chromatography B. 1995, vol. 671, pp. 3–33. ISSN 1570-0232.
- [24] PRUKNEROVÁ, K. *Stanovení mastných kyselin v tavených sýrech*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 80 s. Vedoucí diplomové práce: Ing. Eva Vítová, Ph.D.
- [25] ROGINSKI, H. *Encyclopedia of Dairy science*. Londýn: Academic Press, 2003. 2799 s. ISBN 0-12-227235-8.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

FID – plamenově ionizační detektor

GC – plynová chromatografie

WCOT – kolona s tenkým filmem stacionární fáze nanesené přímo na vnitřní stěně kapiláry

SCOT – kolona se stacionární fází zachycenou na povrchu pevného nosiče na vnitřní stěně kapiláry

PLOT – kapiláry, jejichž vnitřním povrchem je vrstva pevného aktivního sorbentu

FAME – methylestery mastných kyselin

MK – mastné kyseliny

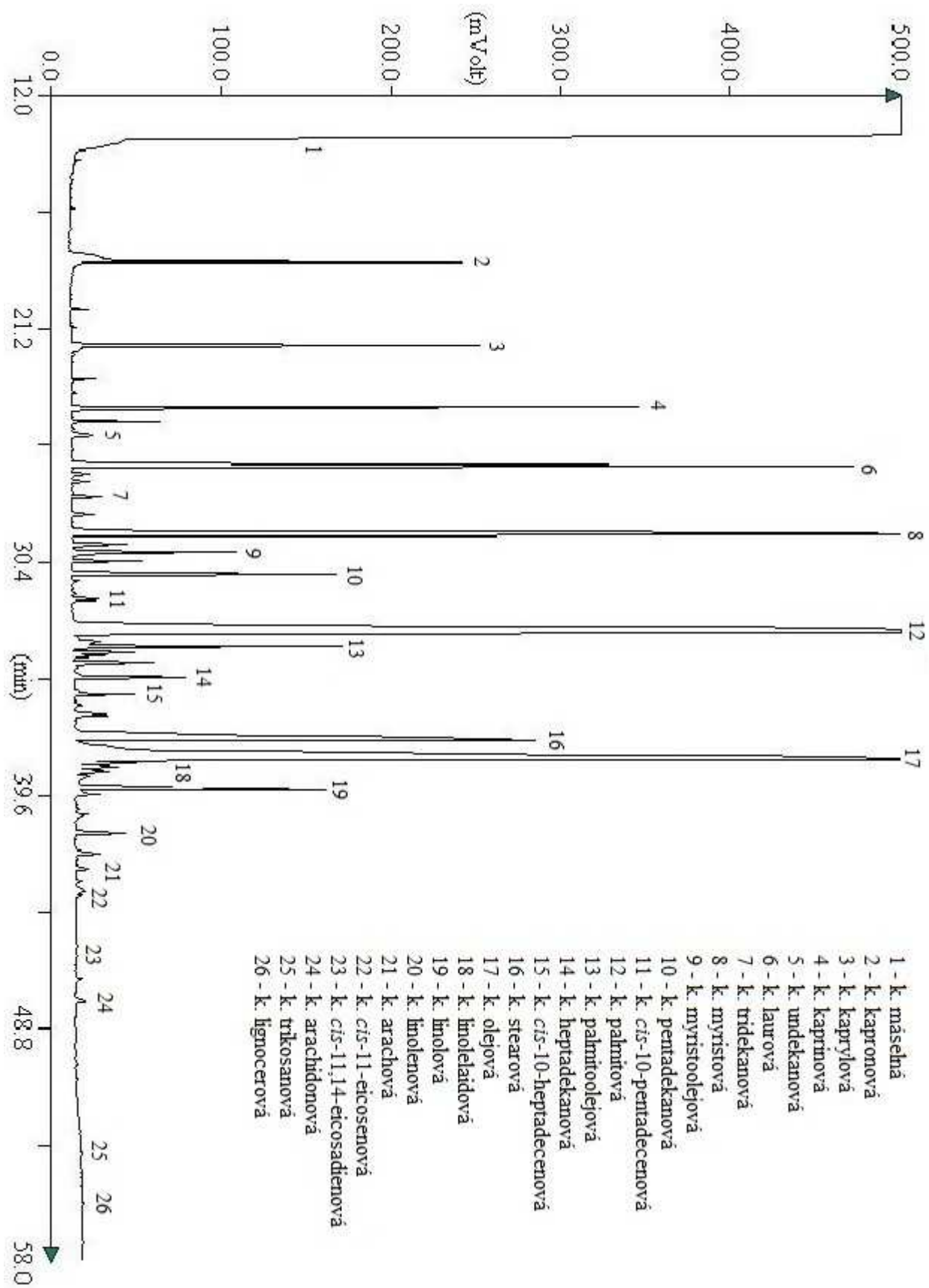
SFA – nasycené mastné kyseliny

MUFA – mononenasycené mastné kyseliny

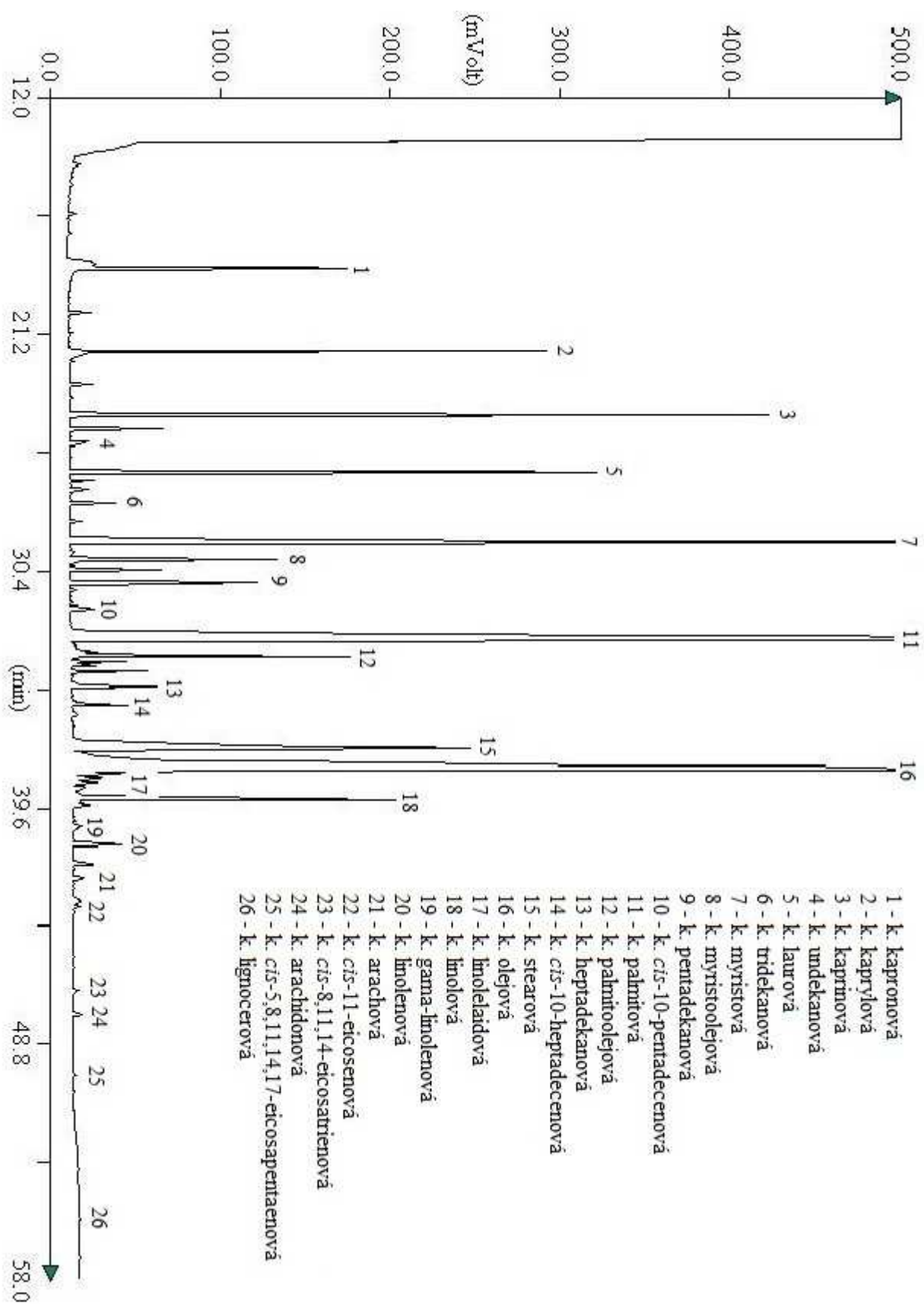
PUFA – polynenasycené mastné kyseliny

8 SEZNAM PŘÍLOH

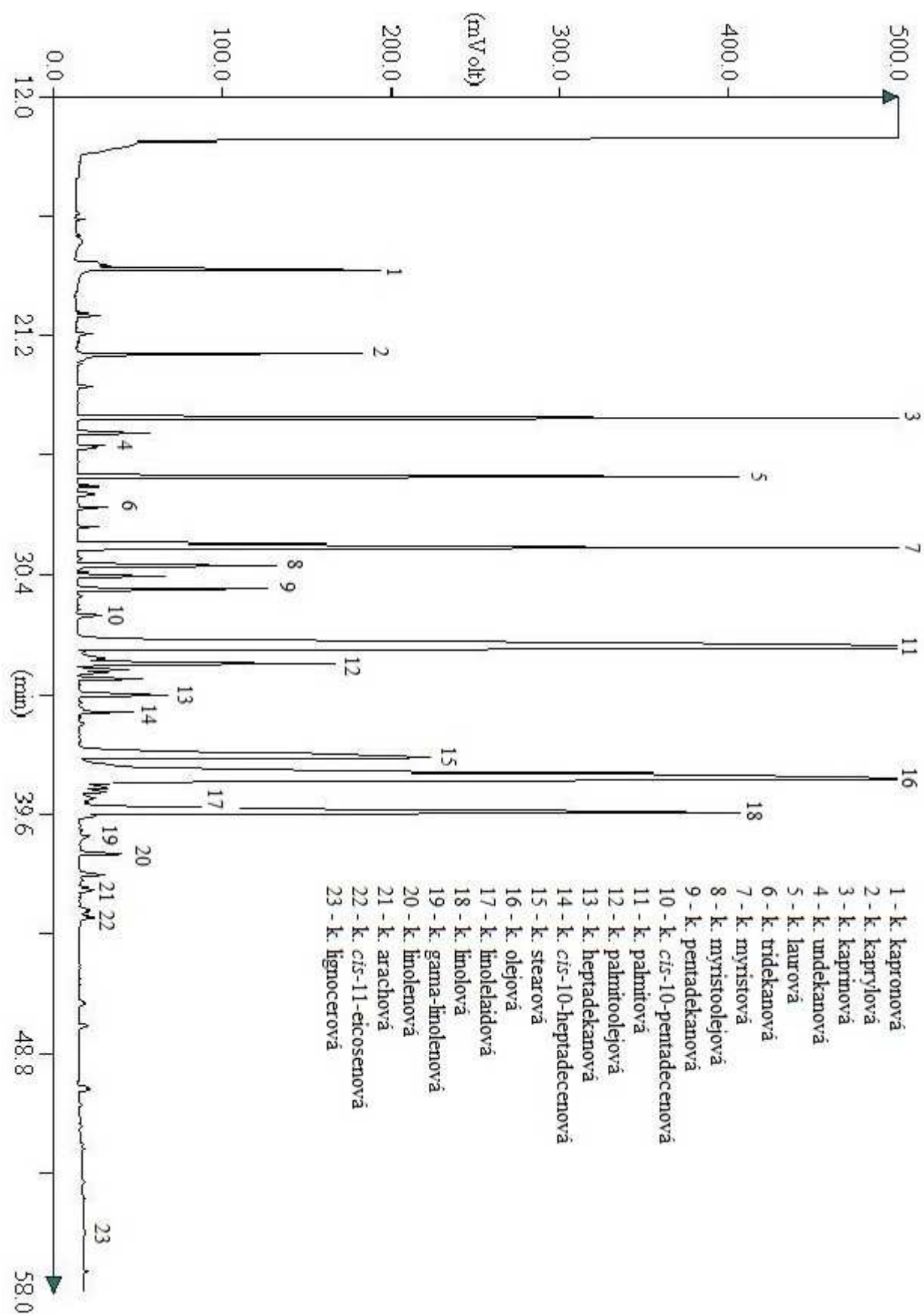
- | | |
|-----------|--|
| Příloha 1 | Ukázka chromatogramu vzorku A (pasterační záhřev 65 °C/30 min) |
| Příloha 2 | Ukázka chromatogramu vzorku B (pasterační záhřev 80 °C/30 s) |
| Příloha 3 | Ukázka chromatogramu vzorku C (pasterační záhřev 74 °C/30 s) |



Příloha 1: Ukázka chromatogramu vzorku A (pasterační záhřev 65 °C/30 min)



Příloha 2: Ukázka chromatogramu vzorku B (pasterační záhřev 80 °C/30 s)



Příloha 3: Ukázka chromatogramu vzorku C (pasterační záhřev 74 °C/30 s)