

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Brno, 2018

Adéla Chmelařová



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

STANOVENÍ MASTNÝCH KYSELIN VE VYBRANÉM TYPU SÝRA

ASSESSMENT OF FATTY ACIDS IN SELECTED TYPE OF CHEESE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Adéla Chmelařová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Eva Vítová, Ph.D.

BRNO 2018

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1301/2017
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Adéla Chmelařová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie
Vedoucí práce: **Ing. Eva Vítová, Ph.D.**
Akademický rok: 2017/18

Název bakalářské práce:

Stanovení mastných kyselin ve vybraném typu sýra

Zadání bakalářské práce:

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

Termín odevzdání bakalářské práce: 21.5.2018

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

Adéla Chmelařová
student(ka)

Ing. Eva Vítová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá identifikací a kvantifikací volných a vázaných mastných kyselin v komerčních sýrech s bílou plísní na povrchu, Hermelínu, Kamadetu a Olmínu, metodou plynové chromatografie s plamenovou ionizační detekcí.

V teoretické části je uvedeno stručné rozdělení sýrů, zvláštní pozornost je věnována sýrům plísnovým. V další části se práce zabývá technologií výroby sýrů a charakteristikou lipidů a mastných kyselin. Na závěr jsou popsány možnosti stanovení mastných kyselin, především metoda plynové chromatografie.

Experimentální část se zabývá porovnáním obsahu volných a vázaných mastných kyselin ve vybraných vzorcích sýrů. Pro extrakci lipidů ze vzorku byla vybrána normovaná metoda podle ČSN EN ISO 1735:2005. Mastné kyseliny byly stanoveny jako methylestery, k jejich derivatizaci byla použita kyselá esterifikace pomocí methanolického roztoku bortrifluoridu jako katalyzátoru.

Ve vzorcích bylo celkem stanoveno 21 volných i vázaných mastných kyselin.

KLÍČOVÁ SLOVA

sýry, lipidy, mastné kyseliny, GC-FID

ABSTRACT

This bachelor thesis is focused on identification and quantification of free and bound fatty acids in commercially available white mold cheeses: Hermelín, Kamadet and Olmín, using gas chromatography with flame ionization detection.

Theoretical part of the thesis is dealing with the classification of cheeses with the main attention to white mold cheeses. In a following part cheese production technology is described, lipids and fatty acids are characterised including the possible methods for their assessment, mainly gas chromatography.

Experimental part the contents of free and bound fatty acids in selected samples of white mould cheeses were compared. The method in accordance with ČSN EN ISO 1735:2005 was selected for lipid extraction. Fatty acids were identified as methylesters using acid esterification with methanolic solution of boron trifluoride as a catalyst.

In total 21 free and bound fatty acids were detected in samples.

KEY WORDS

cheese, lipids, fatty acids, GC-FID

CITACE

CHMELAŘOVÁ, A. *Stanovení mastných kyselin ve vybraném typu sýra*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 52 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat paní Ing. Evě Vítové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi věnovala v průběhu psaní této práce. V neposlední řadě chci poděkovat rodině, která mě podporuje po celé studium.

OBSAH

| | | |
|---------|---|----|
| 1 | ÚVOD..... | 8 |
| 2 | TEORETICKÁ ČÁST | 9 |
| 2.1 | Charakteristika sýrů..... | 9 |
| 2.1.1 | Složení sýrů..... | 9 |
| 2.1.1.1 | Bílkoviny | 9 |
| 2.1.1.2 | Mléčný tuk | 10 |
| 2.1.1.3 | Sacharidy | 11 |
| 2.1.1.4 | Vitaminy a minerální látky | 11 |
| 2.1.2 | Rozdělení sýrů..... | 11 |
| 2.1.3 | Přírodní sýry..... | 12 |
| 2.1.3.1 | Kyselé sýry | 12 |
| 2.1.3.2 | Sladké sýry..... | 12 |
| 2.1.4 | Plísňové sýry..... | 13 |
| 2.1.4.1 | Sýry s plísní v těstě | 13 |
| 2.1.4.2 | Sýry s bílou plísní na povrchu | 13 |
| 2.2 | Technologie výroby sladkých sýrů | 13 |
| 2.2.1 | Technologická a mikrobiologická kvalita mléka | 14 |
| 2.2.2 | Úprava mléka před sýřením..... | 14 |
| 2.2.3 | Sýření mléka | 15 |
| 2.2.4 | Zpracování sýřeniny | 15 |
| 2.2.5 | Formování..... | 16 |
| 2.2.6 | Solení..... | 16 |
| 2.2.7 | Zrání a biochemické změny při zrání sýrů | 16 |
| 2.2.7.1 | Přeměna laktosy | 16 |
| 2.2.7.2 | Lipolýza..... | 17 |
| 2.2.7.3 | Proteolýza | 17 |
| 2.2.8 | Balení..... | 17 |
| 2.3 | Lipidy..... | 17 |
| 2.3.1 | Rozdělení lipidů | 18 |
| 2.3.1.1 | Jednoduché lipidy..... | 18 |
| 2.3.1.2 | Triacylglyceroly | 18 |
| 2.3.1.3 | Vosky..... | 19 |

| | | |
|---------|--|----|
| 2.3.1.4 | Složené lipidy..... | 19 |
| 2.3.1.5 | Odvozené lipidy | 19 |
| 2.4 | Mastné kyseliny | 20 |
| 2.4.1 | Rozdělení mastných kyselin | 20 |
| 2.4.1.1 | Nasyčené mastné kyseliny..... | 21 |
| 2.4.1.2 | Nenasycené mastné kyseliny s jednou dvojnou vazbou..... | 21 |
| 2.4.1.3 | Nenasycené mastné kyseliny s několika dvojnými vazbami | 21 |
| 2.4.1.4 | Mastné kyseliny s třemi dvojnými vazbami a s různými substituenty..... | 22 |
| 2.5 | Stanovení mastných kyselin v sýrech plynovou chromatografií | 22 |
| 2.5.1 | Instrumentace plynové chromatografie | 22 |
| 2.5.1.1 | Zdroj nosného plynu..... | 22 |
| 2.5.1.2 | Dávkovač | 22 |
| 2.5.1.3 | Kolona | 23 |
| 2.5.1.4 | Detektor | 23 |
| 2.5.1.5 | Termostat | 23 |
| 2.5.2 | Extrakce a izolace..... | 23 |
| 2.5.3 | Derivatizace a vznik methylesterů mastných kyselin | 24 |
| 2.5.4 | Stanovení mastných kyselin v sýrech vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií 25 | |
| 2.5.5 | Další možnosti stanovení mastných kyselin v sýrech | 25 |
| 3 | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 27 |
| 3.1 | Chemikálie a laboratorní vybavení | 27 |
| 3.1.1 | Laboratorní pomůcky | 27 |
| 3.1.2 | Chemikálie pro extrakci lipidů..... | 27 |
| 3.1.3 | Chemikálie pro přípravu methylesterů mastných kyselin | 27 |
| 3.1.4 | Chemikálie pro stanovení mastných kyselin | 27 |
| 3.1.5 | Laboratorní přístroje..... | 27 |
| 3.1.6 | Plyny pro plynový chromatograf | 27 |
| 3.2 | Pracovní postupy použitých metod | 28 |
| 3.2.1 | Příprava vzorků k analýze | 28 |
| 3.2.2 | Extrakce lipidů ze vzorku sýra (ČSN EN ISO 1735:2005) | 28 |
| 3.2.3 | Kyselá esterifikace s bortrifluoridem jako katalyzátorem – TAG | 28 |
| 3.2.4 | Kyselá esterifikace s bortrifluoridem jako katalyzátorem – VMK | 29 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.3 | Podmínky stanovení methylesterů mastných kyselin metodou GC-FID | 29 |
| 3.4 | Identifikace a kvantifikace mastných kyselin | 29 |
| 3.5 | Analyzované vzorky | 30 |
| 3.6 | Statistické vyhodnocení výsledků | 31 |
| 4 | VÝSLEDKY A DISKUZE | 32 |
| 4.1 | Identifikace a kvantifikace mastných kyselin ve vzorcích sýra | 32 |
| 4.2 | Mastné kyseliny stanovené ve vzorcích sýrů | 33 |
| 4.3 | Srovnání obsahu mastných kyselin ve vzorcích sýra | 38 |
| 4.3.1 | Srovnání celkového obsahu mastných kyselin ve vzorcích sýra | 38 |
| 4.3.2 | Srovnání obsahu vázaných mastných kyselin ve vzorcích sýra | 38 |
| 4.3.3 | Srovnání obsahu volných mastných kyselin ve vzorcích sýra | 40 |
| 5 | ZÁVĚR | 42 |
| 6 | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 43 |
| 7 | SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ | 48 |
| 8 | SEZNAM PŘÍLOH | 49 |
| 9 | PŘÍLOHY | 50 |

1 ÚVOD

Sýry jsou součástí lidské potravy už tisíce let. Původní sýry se vyráběly z teplého mléka, které se samovolně sráželo působením enzymů žaludků zvířat, a vznikl tak tvaroh. Výroba byla během staletí přizpůsobena místním podmínkám, které daly vzniku velké škále sýrů. Nejstarší doložené poznatky pocházejí už z dob antického Říma. Dnešní výroba sýrů zahrnuje moderní metody jako jsou standardizace a pasterace mléka, následné srážení syřidly, formování, lisování a zrání.

Základní surovinou při výrobě je mléko. Obsahuje důležité výživové složky jako jsou bílkoviny, laktosa, minerální látky a mléčný tuk. Mléčný tuk dodává sýrům charakteristickou texturu, jemnou chuť a vůni. Významnou součástí tuků jsou mastné kyseliny. Nejvýznamnější mastné kyseliny mléčného tuku jsou palmitová, stearová a olejová. Typický je vysoký podíl těkavých kyselin máselné, kapronové a kaprylové, které přispívají k charakteristické chuti a vůni mléčného tuku. Různé složení mastných kyselin v mléčných výrobcích vytváří výslednou texturu.

Cílem této bakalářské práce je stanovení volných a vázaných mastných kyselin ve vybraných komerčních vzorcích sýrů s bílou plísní na povrchu: Hermelínu, Kamadetu a Olmínu. K jejich stanovení byla vybrána metoda plynové chromatografie s plamenovou ionizační detekcí.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Charakteristika sýrů

Sýry, jako tradiční produkty, jsou čerstvé nebo prozralé mléčné výrobky získané ze sraženiny (sýřeniny) mléka po oddělení přebytečné syrovátky. Vzniká tak odvodněná hmota zrnitého charakteru, která následnými technologickými úpravami dostává svou charakteristickou chuť, aroma, konzistenci a vysokou výživovou hodnotu [1, 2]. Definice podle standardu FAO/WHO z roku 1963 uvádí, že „Sýr je čerstvý nebo prozralý výrobek vyrobený odpovídajícím odvodněním sraženiny mléka, smetany, odtučněného, částečně odtučněného mléka nebo směsi některých, popř. všech těchto surovin.“ [3].

Hlavním důvodem, proč se začalo mléko zpracovávat na sýry, bylo prodloužení trvanlivosti. Ta je způsobena fermentací laktosy, přidavkem soli a snížením vodní aktivity a pH. Za koagulaci a vznik sraženiny jsou zodpovědná enzymová syřidla (sladké srážení), nebo změna pH do oblasti izoelektrického bodu kaseinu (kyselé srážení). V důsledku srážení se v sýrech zakoncentruje obsah základních složek sušiny mléka jako jsou kaseiny a mléčný tuk. Zbylá syrovátka obsahující vodu, mléčný cukr, syrovátkové bílkoviny a část solí je v průběhu výroby odstraňována. V mlékařství se často využívají kombinace obou typů srážení, díky čemuž mají sýry rozdílné nutriční hodnoty [1–3].

2.1.1 Složení sýrů

Mezi hlavní složky sýrů řadíme bílkoviny, mléčný tuk, vitamíny a minerální látky. Z hlediska složení patří tyto mléčné výrobky k nutričně plnohodnotným potravinám. Hlavní složkou, využitelnou také jako zdroj energie, jsou bílkoviny a mléčný tuk [3].

2.1.1.1 Bílkoviny

Kasein představuje hlavní bílkovinu v mléce, tedy i v sýrech. Obsahuje dostatečné množství esenciálních aminokyselin, převážně lysinu. Vyšší biologickou hodnotu mají však syrovátkové bílkoviny pro svůj obsah cysteinu [4, 5].

V kravském mléce se kaseiny vyskytují ve formě sdružených koloidů neboli kaseinových micel. Tvoří skupinu čtyř genových produktů:

- α_{S1} -kasein – váže silně vápník,
- α_{S2} -kasein – váže silně vápník,
- β -kasein – částečně rozpustný v chladném mléce,
- κ -kasein – stabilizuje kasein proti koagulaci a váže se se syrovátkovým proteinem při zahřívání.

K celistvosti a stabilitě micel přispívá vázaný fosforečnan vápenatý. Principem výroby sýrů je koagulace vlivem enzymatické destabilizace kaseinových micel nebo změna jejich izoelektrického bodu [6].

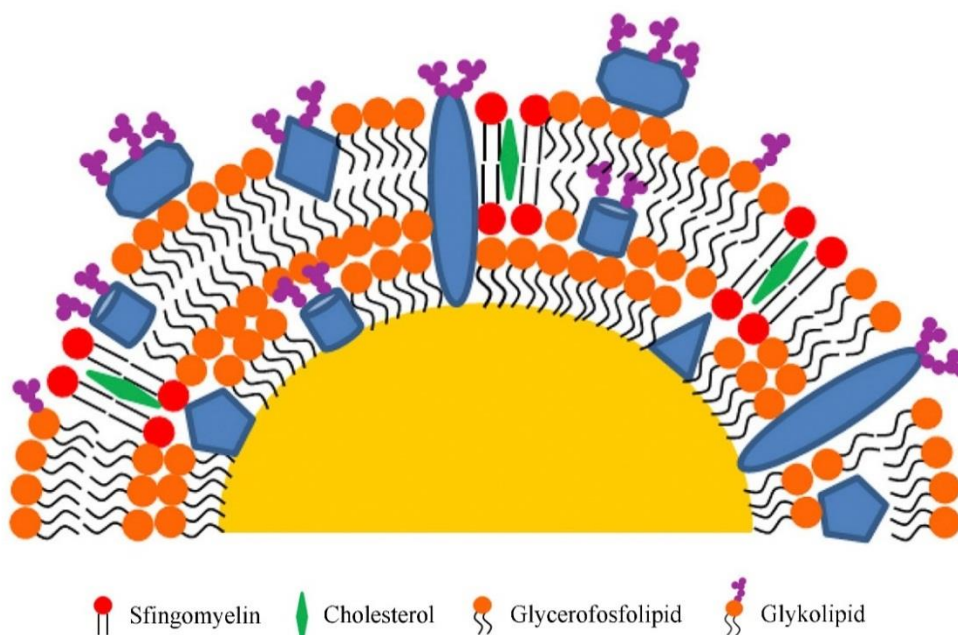
Syrovátkové proteiny představují cca 20 % celkových mléčných bílkovin. Patří sem především β -laktoglobulin, α -laktalbumin, sérový albumin, proteázový pepton a imunoglobuliny. Jsou významné především díky svým výjimečným vlastnostem, mezi které patří rozpustnost ve vodě v širokém rozsahu pH, příznivé nutriční hodnoty a obsah esenciálních

aminokyselin. Díky nízkým nákladům na výrobu a zpracování se syrovátkové proteiny využívají v mnoha odvětvích potravinářského průmyslu [7].

2.1.1.2 Mléčný tuk

Jedná se o nasycený tuk s vysokým obsahem těkavých mastných kyselin jako jsou kyselina máselná, kapronová, kaprylová a kaprinová [4]. Tato nehomogenní látka je tvořena mnoha tukovými složkami a třemi fázemi rozvrstvení. V mléce se vyskytuje ve formě tukových kapiček obsahujících převážně triacylglyceroly. Kapénky tuku jsou stabilizovány komplexní mezivrstvou složenou z lecithinu a proteinů, známou také jako membrána kapénky mléčného tuku [8, 9].

Membrána tukových kuliček má jedinečnou strukturu. Obsahuje vícevrstvé stěny fosfolipidů a bílkovin. Mezi monovrstvou, která je v kontaktu s triacylglycerovým jádrem a vnitřní plochou vnější vrstvy složené z dvojvrstvy lipidů, je umístěna hustá proteinová vrstva (viz Obr. 1). Vnější fosfolipidová dvojvrstva se skládá z glykoproteinů, enzymů, fosfoproteinů a cholesterolu. Mezi hlavní fosfolipidy patří fosfatidylcholin a sfingomyelin [8, 9].



Obr. 1: Struktura membrány kapénky mléčného tuku [9].

Mléčný tuk obsahuje vysoký podíl mastných kyselin s krátkým uhlovodíkovým řetězcem, díky kterému má nízký bod tání podobný teplotě lidského těla, a je tak pro člověka lehce stravitelný [10]. Důležitou roli hraje také jako nosič látek rozpustných v tucích – karotenoidů, vitaminů (A, D, E a K) a těkavých aromatických látek [9].

Podíl tuku v sýrech je uváděn jako obsah tuku v sušině. Nelze ho vztáhnout k celkové hmotnosti sýra, protože během zrání ubývá ztrátou vody jeho hmotnost, nikoliv sušina [5].

2.1.1.3 Sacharidy

V malém množství, ale neméně důležitá, je v sýru zastoupena laktosa neboli mléčný cukr. Tento disacharid je podstatně méně sladký než sacharidy, ze kterých se skládá (galaktosa a glukosa), a proto ani samotné mléko není příliš sladké [4, 5].

Důležitost laktosy spočívá v přeměně na kyselinu mléčnou a další produkty fermentace. Štěpí se na příslušné monosacharidy pouze po hydrolytickém působení laktasy. Následně dochází k fosforylaci, rozštěpení fosforylovaných hexos na dvě triosy a dalším přeměnám až po vznik kyseliny pyrohroznové. Po přijetí vodíku se přemění na kyselinu mléčnou [4, 5, 8].

2.1.1.4 Vitaminy a minerální látky

Velký význam mají i minerální látky, především vápník, jehož obsah je závislý na technologické výrobě jednotlivých druhů sýrů. Čím více působí při zpracování sýřeniny enzymatické srážení, tím vyšší je obsah vápníku ve výrobku. Vápník podporuje kvalitní stavbu kostí a zubů, a podílí se na procesech látkové výměny. U všech typů sýrů jsou obsaženy vitaminy skupiny B. Pouze u tučných sýrů se vyskytují vitaminy rozpustné v tucích A a D [3, 5].

2.1.2 Rozdělení sýrů

Podstatou experimentální části této bakalářské práce bude analýza sýrů s bílou plísní na povrchu. V následujících kapitolách je nejprve uvedeno celkové rozdělení a technologie výroby různých typů sýrů. Zvláštní pozornost je věnována sýrům plísnovým.

Pro rozdělení sýrů neexistuje žádné jednoznačné kritérium a je tak velmi komplikovanou záležitostí. Mnoho druhů můžeme zařadit do jedné či více skupin podle různých kritérií a nelze je tak jednoznačně rozřadit do jedné skupiny [8].

Mezi základní rozdělení sýrů patří dělení podle výše zmíněného typu srážení mléka na:

- sladké,
- kyselé [2].

Obě skupiny se souhrnně označují jako sýry přírodní [2, 10].

Podle druhu použitého mléka se mohou sýry klasifikovat na kravské, ovčí, kozí nebo sýry získané ze syrovátky [2].

Podle sortimentu a použité suroviny se rozlišují sýry:

- přírodní,
- tavené,
- imitace sýrů připravené rekonstitucí složek mléka a mléčných surovin,
- sýry s náhradou mléčného tuku rostlinnými tuky [3].

Přírodní sýry se vyrábějí z mléka a jsou zároveň hlavní surovinou pro výrobu tavených sýrů za použití tavicích solí a vyšších teplot [8].

Podle obsahu sušiny:

- tvrdé,
- měkké [2].

Hlavním rozdílem mezi těmito skupinami je procentuální obsah vody. Tvrdé sýry mohou obsahovat maximálně 45 % vody, naopak měkké sýry minimálně 45 % vody [2].

Podle způsobu zrání rozeznáváme sýry:

- nezrající včetně tvarohů:
 - čerstvé,
 - termizované,
- zrající:
 - od povrchu do vnitřní hmoty sýra (sýry s mazem),
 - převážně v celé hmotě,
- plísňové:
 - s plísní na povrchu a speciality s plísní na povrchu i uvnitř těsta,
 - s plísní uvnitř těsta [1].

2.1.3 Přírodní sýry

Přírodní sýry jsou určeny k přímé konzumaci či jinému užití. Můžeme je popsat jako hotové výrobky, které lze dále zpracovávat na sýry tavené nebo je jinak technologicky upravit. Jedná se o velice různorodou skupinu, která se dělí na dvě hlavní skupiny kyselých a sladkých sýrů, a na mnoho dalších podskupin [10].

2.1.3.1 Kyselé sýry

Označení kyselé sýry získala tato podskupina podle kyselého způsobu srážení bílkovin mléka kyselinou mléčnou a činností mikroorganismů čistých mlékařských kultur. Vyrábějí se z odtučněného mléka, jelikož by jinak mohlo dojít ke vzniku roztékavé konzistence. Během výrobního procesu dojde k vysrážení mléka, vzniku sraženiny a samovolnému odkapání syrovátky. V tomto kroku vzniká jako hlavní meziprodukt tvaroh [10].

Typickým zástupcem kyselých sýrů jsou Olomoucké tvarůžky [2]. Během jejich zrání dochází k oxidaci kyseliny mléčné kvasinkami. Vytvoří se tak méně kyselé prostředí pro mikroorganismy produkující proteolytické enzymy, pomocí kterých štěpí bílkoviny sýra. Kyselé sýry zrají postupně od povrchu dovnitř za stabilní teploty a vysoké vlhkosti vzduchu [10].

2.1.3.2 Sladké sýry

Sladké sýry zaujímají největší postavení v sýrařském průmyslu. Na jejich výrobu je potřeba mléko prvotřídní kvality. Vyrábějí se srážením bílkovin mléka pomocí enzymatických syřidel. Následně jsou přidány kultury mikroorganismů typické pro daný druh sýra. Při srážení syřidlem vzniká tzv. sýřenina s chutí sladkého mléka, jelikož nedošlo k prokysání [2, 10].

Na základě různého zpracování sýřeniny či způsobu zrání lze sladké sýry rozdělit na další podskupiny:

- tvrdé,
- polotvrdé,
- měkké,
- bílé,
- plísňové [10].

Tvrdé sýry se dále dělí na sýry s vysokodohříváním sýřeninou, jako jsou sýry ementálského typu či typu moravský bochník, nebo s nízkodohříváním sýřeninou, kam řadíme sýry

eidamského a čedarového typu. Polotvrdé sýry tvoří mezistupeň mezi sýry tvrdými a měkkými [11].

Při výrobě měkkých sýrů se sýřenina po nakrájení nezahřívá. Lisuje se pouze vlastní vahou a konzistence je měkká. Měkké nezrající sýry se po zformování solí, u měkkých zrajících sýrů dochází naopak k dalším biochemickým procesům během zrání. Řadíme sem například tvarohové a smetanové sýry [12].

Pojmenování bílé sýry vzniklo podle typického bílého zbarvení sýrového těsta, které je místo zrání uloženo do solného nálevu, a obsahuje tak vysoký podíl soli. Patří do skupiny nezrajících sýrů. Hlavním zástupcem jsou měkké bílé sýry Feta či Balkánský sýr [11].

2.1.4 Plísňové sýry

Plísňové sýry jsou podskupinou sladkých sýrů. Liší se především použitím speciálních kultur plísní rodu *Penicillium*. Podílí se na rozkladu základních složek mléka a ovlivňují tak chuť, konzistenci a vzhled sýrů. Podle druhu plísně a způsobu růstu je rozdělujeme na sýry s plísní v těstě a sýry s bílou plísní na povrchu [10].

2.1.4.1 Sýry s plísní v těstě

Hlavní charakteristikou je modrozelené mramorování těsta způsobené plísní *Penicillium roqueforti*. Přidává se do sýrového zrna a svou biochemickou činností vytváří výraznou chuť a aroma. Aby plíseň snáze prorostla celým objemem, sýr se propichuje sadou speciálních jehel. Nejznámějším představitelem je ovčí sýr Roquefort zrající ve sklepech Roquefortu. Dále pak italská Gorgonzola nebo česká Niva [1, 13, 14].

2.1.4.2 Sýry s bílou plísní na povrchu

Jak už z názvu vypovídá, typickým znakem je bílá plíseň na povrchu sýra. Mají vysoký obsah tuku, aby bylo dosaženo jemné, měkké, ale neroztékavé konzistence. Uvnitř se mohou vyskytovat drobné dutinky, houbovitá nebo tuhá konzistence není žádoucí. Mezi hlavní zástupce patří francouzské sýry Camembert nebo De Brie. U nás se vyrábějí pod značkou Hermelín, jelikož se jedná o chráněná označení [10].

Plísňová camembertská kultura (*Penicillium camemberti*) se očkuje přímo do mléka před sýřením, postříkem na povrch sýra nebo je obsažena ve vodě, ve které se sýry namáčí. Vytváří bělavý porost a svou enzymatickou činností dává specifickou žampionovou chuť a aroma [13, 18].

2.2 Technologie výroby sladkých sýrů

Proces výroby sýrů je považován za jednu z nejnáročnějších mlékárenských technologií. Je zapotřebí využít velmi kvalitních surovin pro získání kvalitního produktu. V našich oblastech je základní surovinou kravské mléko, méně často mléko ovčí a kozí. Technologické operace a další výrobní postupy jsou u většiny sýrů obdobné. Odlišnosti konečných výrobků se projevují už nepatrnou změnou v procesu. Výroba zrajících sýrů je časově i technologicky složitější než u sýrů nezrajících [1, 8, 12].

Celý proces začíná příjmem mléka, z něhož je třeba odstranit nečistoty různými technologickými operacemi – filtrací nebo centrifugací. Tato část výroby se nazývá úprava

mléka před sýřením. Následuje přidavek kyselých kultur, syřidla za vzniku sraženiny a její následné zpracování. Nakonec se sladké sýry formují, solí a nechávají se zrát po určitou dobu, při které dochází k různým fyzikálním i biochemickým změnám [1, 8].

2.2.1 Technologická a mikrobiologická kvalita mléka

Nároky na kvalitu zpracovaného mléka mohou být rozdílné. Kyselé sýry nevyžadují mléko takové kvality jako určité druhy jemných sladkých sýrů. Kvalitou mléka rozumíme především jeho syřitelnost a kvasnost určenou chemickým složením, chuťovými a aromatickými vlastnostmi nebo obsahem mikroorganismů [1, 8, 12].

Kvasností mléka nazýváme soubor vlastností, které vytváří vhodné prostředí pro činnost bakterií mléčného kvašení. Vznik pevné sýřeniny se označuje jako syřitelnost mléka. Sýřenina vzniká za pomoci vhodných syřidel se schopností koagulovat mléko v kyselé oblasti. Oba jevy mohou být výrazně ovlivněny chemickým složením mléka – obsahem tuku a kaseinu. Ty ovlivňují obsah tuku v sušině a výslednou výtěžnost sýra [8, 12].

Pro získání nejkvalitnějších sýrů je nutné zajistit i mikrobiologickou kvalitu mléka, které by mělo obsahovat co nejméně termorezistentních a koliformních bakterií. K zajištění zdravotní nezávadnosti mléka se při výrobě využívá pasterace. Přežívají pouze některé termorezistentní druhy bakterií způsobující vady chuti a vůně [8, 12].

2.2.2 Úprava mléka před sýřením

Mechanické nečistoty jsou odstraňovány pomocí filtrace a centrifugace. Mikroflóra mléka a přítomné enzymy jsou ovlivňovány pomocí pasterace, baktofugace či mikrofiltrace. Pasterace mléka zaručuje zdravotní nezávadnost výrobků a je nezbytná v případech, kde mléko nenabývá nejvyšší kvality. V sýrařském průmyslu se využívá zejména šetrné pasterace, aby došlo k co nejmenšímu zhoršení syřitelnosti. Této změně nelze úplně zabránit, a proto se do mléka přidává chlorid nebo mléčnan vápenatý. Dalšími aditivními látkami jsou dusičnan draselný, který zamezuje duření sýrů a přírodní barviva annato či karoten [1, 12].

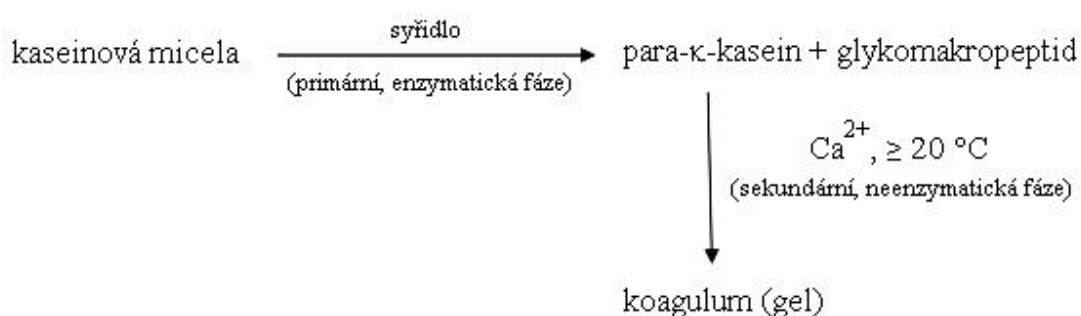
Následuje úprava tučnosti mléka, jelikož každý sýr má charakteristickou hodnotu tuku v sušině. V průběhu pasterace se provádí standardizace mléka, při které se smísí takové podíly odstředěného a tučného mléka, aby konečný výrobek odpovídal příslušným hodnotám tuku v sušině [8].

Dalším důležitým krokem je očkování pasterovaného mléka čistými mlékařskými kulturami, které zajistí správný průběh sýření a zrání. Základní kulturou pro všechny druhy sladkých sýrů je smetanový zákys. U tvrdých sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou se zákys doplňuje ementálskou a propionovou kulturou, při výrobě Čedaru se přidává čedarová kultura. Plísňové sýry využívají kromě smetanového zákysu plísňovou kulturu *Penicillium roqueforti* (sýry s plísní v těstě) nebo kulturu *Penicillium camemberti* (sýry s plísní na povrchu) [14].

V poslední fázi úprav se mléko zahřívá na danou teplotu v sýrařských kotlích a vanách, ve kterých dochází zároveň i k jeho sýření [8].

2.2.3 Sýření mléka

Jak už bylo výše zmíněno, při výrobě přírodních sýrů se uplatňují dva typy srážení. Sladké srážení můžeme rozdělit do tří fází – primární, sekundární a terciární. Podstatou primární (enzymatické) fáze je štěpení peptidové vazby tvořené aminokyselinami ve frakci κ -kasein pomocí enzymů za vzniku para- κ -kaseinu a glykomakropeptidu. Dochází k destabilizaci kaseinových micel, které jsou citlivé na přítomnost vápenatých iontů. Viskozita mléka klesá a vznikají nové micelární útvary spojené hydrofobními vazbami. V sekundární (koagulační) fázi dochází k seskupování parakaseinových micel a k tvorbě gelové struktury za přítomnosti Ca^{2+} iontů. Micely se nejdříve zařadí do řetězců a poté vytvoří trojrozměrnou gelovou síť. Průběh primární a sekundární fáze je zobrazen na Obr. 2. Následuje synerese neboli smršťování gelu za uvolňování syrovátky a utužení sraženiny. Poslední terciární fáze ovlivňuje zrání sýrů proteolytickým působením zbytků syřidla [1, 4].



Obr. 2: Sladké srážení – primární a sekundární fáze [4].

Průběh sýření mléka je ovlivněn množstvím enzymů, vápenatých solí, kyselostí mléka i teplotou procesu. Čím menší chceme obsah sýřeniny v syrovátce, tím kratší musí být doba sýření a naopak. U tvrdých přírodních sýrů se tedy volí značně kratší doba sýření než u sýrů měkkých [8].

2.2.4 Zpracování sýřeniny

Hlavním cílem tohoto procesu je vytvoření sýrových zrn a oddělení syrovátky. Sraženina vzniklá sýřením se krájí ve chvíli, kdy se stává dostatečně tuhou, pevnou a lom sýřeniny vykazuje ostré hrany [1, 8].

Rozkrojením sýřeniny se uvolňuje syrovátka. Sýřenina se opatrně promíchává a krájí v sýrařském kotli tzv. harfou na menší části, aby rychleji ztuhla. Nesmí se však rozbít na sýrový prach, který by se ztrácel spolu se syrovátkou [8].

Mezi další operace patří dohřívání a dosoušení, kterého se využívá u polotvrdých a tvrdých sýrů. Dohříváním se zvýší teplota sýření na dosoušecí teplotu, která se liší podle typu sýra a požadované sušiny. U některých druhů sýrů (gouda, eidam) se můžeme setkat s praním sýrového zrna. Praní způsobí, že se sníží obsah laktosy a dojde pouze k malému poklesu pH [1].

2.2.5 Formování

Sýry, které se dostávají k běžnému spotřebiteli, mají až na výjimky svůj typický tvar a velikost, které získávají formováním do různých tvořítek. Jejich úkolem není pouze dodat sýrovým zrnům požadovaný tvar, ale také je oddělit od syrovátky. Syrovátka může buď pomalu protékat, nebo se odstraňuje lisováním. Samovolné odkapávání způsobuje váha sýřeniny a je nutné sýry pravidelně obracet. Při lisování se využívá dodaného tlaku pro rychlejší odstranění syrovátky. Na rozdíl od volného uvolňování syrovátky, kdy na povrchu vzniká jemná, hladká, celistvá vrstvička, se působením tlaku vytváří pevná, tuhá kůrka [1, 8].

To, jaký způsob využijeme při formování sýrů, je závislé především na jeho typu. Lisování vlastní vahou je typické pro měkké sýry, naopak pro tvrdé a polotvrdé sýry se využívá lisovacích zařízení. Sýrová zrna sýrů tvořících oka nesmějí být v kontaktu se vzduchem, neboť by se zcela nespojila. Obsahují hladké dutinky vzniklé pomocí oxidu uhličitého při zrání. Sýry, které mají uzavřenou strukturu, obsahují nepravidelné a drsné dutinky způsobené mechanickou činností při lisování [1].

2.2.6 Solení

Solení sýrů je důležitý krok ovlivňující celou řadu vlastností. Významně zlepšuje chuť konečného výrobku, zpevňuje texturu, tvar a má vliv na aktivitu enzymů a kultur v poslední fázi výroby. Obsah soli v sýrech je v rozmezí 0,5–2 % [1, 8].

Celý proces je velmi jednoduchý a probíhá dvojím způsobem. Prvním z nich může být solení v solné lázni. Sýry se naloží do solného roztoku na dobu v řádu minut až dnů. Probíhající difúze způsobí přechod soli do těsta a syrovátky do roztoku. Druhý způsob zahrnuje rovnoměrné roztírání a posypávání soli po povrchu sýra. Probíhá postupně, aby se nevytvořila slaná kůrka a několikrát se opakuje [8].

2.2.7 Zrání a biochemické změny při zrání sýrů

Všechny sýry s výjimkou těch, které se konzumují čerstvé, podléhají poslednímu procesu v sýrařské výrobní technologii, a to zrání. Tento pojem zahrnuje všechny biochemické, fyzikální i mikrobiologické procesy měnící strukturu, barvu, konzistenci, a tvořící především typickou chuť a vůni [4].

Rozeznáváme dva typy zrání podle způsobu rozkladu bílkovin. V primárním (anaerobním) zrání se rozkládají bílkoviny velmi pomalu pouze na aminokyseliny a probíhá v celém rozsahu sýra. V sekundárním (aerobním) zrání se štěpí aerobními mikroorganismy rychle na amoniak, oxid uhličitý a vodu. Prochází pomalu od povrchu dovnitř a vytváří charakteristický maz [8].

Vznik charakteristických sensorických vlastností způsobuje přeměna tří základních složek mléka – laktosy, mléčného tuku (lipolýza) a bílkovin (proteolýza). Za všechny procesy jsou zodpovědné enzymy, mezi které řadíme proteolytické enzymy, lipasy štěpící triglyceridy a enzymy rozkládající aminokyseliny a mastné kyseliny včetně jejich derivátů [4].

2.2.7.1 Přeměna laktosy

Laktosa je fermentována při odkapávání syrovátky během formování sýrů neboli při tzv. předběžném zrání. Rychlost prokysání sýřeniny ovlivňuje strukturu a konzistenci čerstvého

sýra. Jedná se o rozkladný proces, při kterém vzniká kyselina mléčná štěpením laktosy bakteriemi mléčného kvašení. Vzniklá kyselina mléčná se vyskytuje volně nebo ve formě mléčnanu vápenatého, který ji opět neutralizuje a udržuje vhodné podmínky pro další působení bakterií. Zároveň se stává substrátem pro vznik kyseliny propionové a octové, oxidu uhličitého či vody. Vzniklý oxid uhličitý je důležitý při výrobě sýrů ementálského typu a vytváří charakteristická oka [1, 8, 13].

2.2.7.2 Lipolýza

Mléčný tuk se přeměňuje převážně u plísňových sýrů díky produkci lipolytických enzymů plísněmi. Při rozkladu lipidů lipasami se uvolňují těkavé mastné kyseliny jako jsou kyselina máselná, kapronová nebo kaprylová. Z nižších mastných kyselin vznikají ketonové látky, zejména methylketony, zodpovědné za výrazné aroma a chuť. Sýry s bílou plísní na povrchu obsahují 5–10 % mastných kyselin ve volné formě. Naopak u sýrů s plísní v těstě je lipolýza rozsáhlejší, obsahují až 25 % volných mastných kyselin [8, 13, 14, 16].

2.2.7.3 Proteolýza

Přídavkem syřidla dochází k postupné hydrolýze bílkovin za vzniku peptidů a aminokyselin. Kasein se rozkládá na parakasein, který se následně proteolyticky štěpí dvojitým způsobem. U tvrdých sýrů se rozkládá α_{S1} -parakasein, u sýrů s plísní na povrchu je degradován β -parakasein [16, 17].

Biochemický rozklad bílkovin můžeme rozdělit do tří fází:

- hydrolytický rozklad parakaseinu na albumosy a peptony;
- rozklad albumos a peptonů na aminokyseliny;
- rozklad aminokyselin na nežádoucí rozkladné produkty – amoniak, oxid uhličitý a vodu [13].

V souvislosti s proteolýzou byly zavedeny pojmy rozsah a hloubka zrání. Rozsah zrání udává poměr dusíku rozpustného ve vodě k celkovému dusíku. Hloubka zrání znamená poměr dusíku aminokyselin a amoniaku k celkovému dusíku. Je významná především u plísňových sýrů. Čím déle sýry zrají, tím je hlubší rozklad bílkovin [13].

2.2.8 Balení

Posledním krokem je balení některých typů sýrů do ochranných fólií. Tvoří ochranu proti kyslíku a vodě, ale zároveň jsou propustné pro oxid uhličitý. Takto připravené sýry zrají v sýrařských klimatizovaných sklepech, kde se automaticky upravuje relativní vlhkost a teplota dle konkrétního druhu [8, 1].

2.3 Lipidy

Pojem lipidy označuje početnou heterogenní skupinu organických látek biologického původu. Mezi nejdůležitější vlastnosti lipidů patří hydrofobicita, tedy nerozpustnost ve vodě. Dále lipofilita neboli dobrá rozpustnost v nepolárních organických rozpouštědlech jako je například chloroform nebo hexan. Tvoří jednu z hlavních zásobáren chemické energie u živočichů a rostlin. Jsou významnou energetickou složkou potravy heterotrofních organismů [18, 19].

2.3.1 Rozdělení lipidů

Lipidy dělíme na jednoduché, složené a odvozené (isoprenoidní). Jednoduché lipidy jsou estery vyšších mastných kyselin a vyšších alkoholů. Řadíme sem zejména triacylglyceroly a vosky. Složené lipidy jsou takové látky, které obsahují kromě těchto základních složek v molekule ještě další polární složku, která jim dodává amfifilní charakter. To znamená, že jedna část molekuly je hydrofobní a druhá hydrofilní. Takovými lipidy jsou fosfoacylglyceroly, glykoacylglyceroly a sfingolipidy, které se dále rozdělují na sfingomyeliny, cerebrosidy a gangliosidy. K odvozené skupině lipidů, které jsou svým chemickým složením terpeny, patří prostaglandiny, steroidy, karotenoidy a lipofilní látky [18, 20].

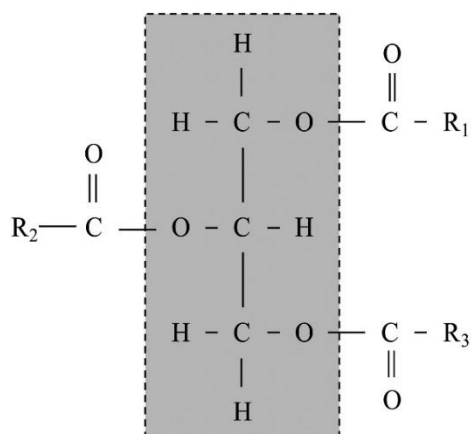
Někdy se mohou lipidy také dělit do dvou skupin na zmýdelnitelné a nezmýdelnitelné. Do zmýdelnitelných lipidů řadíme ty, z nichž lze alkalickou hydrolyzou uvolnit soli mastných kyselin a obsahují acylové zbytky vázané esterovou vazbou. Patří sem především neutrální lipidy, jako jsou triacylglyceroly a polární lipidy na bázi glycerolu nebo sfingosinu. Druhá skupina obsahuje zejména isoprenoidy [21].

2.3.1.1 Jednoduché lipidy

Molekuly lipidů se v buňkách běžně vyskytují jako zásobní tuky a oleje. Označují se jako neutrální látky bez nabitých skupin a jako zcela nepolární. Jelikož společnou složkou jsou mastné kyseliny, rozdíly v chemických vlastnostech a biologických funkcích jsou způsobeny alkoholovou složkou. Většina jednoduchých lipidů se řadí k triacylglycerolům [22, 23].

2.3.1.2 Triacylglyceroly

Triacylglyceroly (TAG) a jejich směsi tvoří základ živočišných a rostlinných tuků a olejů. Z chemického hlediska jsou tyto nepolární a ve vodě nerozpustné sloučeniny tvořeny glycerolem esterifikovaným třemi mastnými kyselinami (viz Obr. 3). Pokud obsahují stejné mastné kyseliny, nazývá se molekula jednoduchý TAG. Složený TAG obsahuje dvě nebo tři různé mastné kyseliny [19, 22].



Obr. 3: Struktura triacylglycerolu; R1, R2, R3 značí navázané mastné kyseliny [24].

Fyzikální vlastnosti jsou ovlivněny charakterem uhlíkového řetězce odpovídajícím mastné kyselině. Obsahují nerozvětvený řetězec převážně se sudým počtem uhlíků. Převládá kyselina palmitová obsahující 16 uhlíků a kyselina stearová se 14 uhlíky v řetězci. Nasycené mastné kyseliny se v molekule TAG mohou spojovat hydrofobními vazbami za vzniku stabilních struktur. Přítomnost nenasycených mastných kyselin snižuje jejich teplotu tání, protože mají *cis* konfiguraci na dvojných vazbách. Ta zafixuje ohyb řetězce a znemožní jeho těsné připojení k sousednímu řetězci. Dochází ke snížení van der Waalsových interakcí, a tím ke snižování bodu tání mastných kyselin a zvyšování tekutosti lipidů se zvyšujícím se počtem dvojných vazeb [19].

2.3.1.3 Vosky

V biochemickém pojetí se jedná o látky, které mají podobné složení a vlastnosti jako včelí vosk. Tyto estery vyšších mastných kyselin a vyšších jednosytných primárních alkoholů vytvářejí tenkou vrstvu pokrývající listy rostlin a ovoce. Jejich hlavní funkcí je ochrana před vodou z vnějšího prostředí [23, 25].

2.3.1.4 Složené lipidy

Složené (komplexní) lipidy se od jednoduchých lipidů odlišují svou složitější chemickou strukturou i biologickým významem. Molekula složeného lipidu má amfipatický charakter, kterým se podobají tenzidům (povrchově aktivním látkám). Je složena z nepolární (hydrofobní) části tvořené mastnou kyselinou a alkoholem, na kterou je navázána její polární (hydrofilní) část, nejčastěji kyselina fosforečná, sacharid nebo dusíkatá báze [18, 20]. Díky svému polárnímu charakteru se molekula lipidů orientuje na rozhraní voda–lipidová fáze tak, že hydrofilní část se orientuje do vodné fáze a hydrofobní do fáze lipidové. To umožňuje tvorbu lipidových dvojvrstev, které jsou základem biologických membrán [25].

Heterolipidy můžeme dělit podle charakteru polární složky na fosfolipidy a glykolipidy. Fosfolipidy ve své struktuře obsahují dva základní typy alkoholů – glycerol a sfingosin. Můžeme je dále rozdělit podle obsahu alkoholové složky na glycerofosfolipidy (glycerol) a sfingofosfolipidy (sfingosin). Glycerofosfolipidy neboli fosfatidy jsou nejhojnějšími fosfolipidy a tvoří hlavní složky biomembrán. Tyto amfifilní molekuly obsahují dva hydrofobní nepolární řetězce zbytků mastných kyselin a hydrofilní polární fosfátovou část. V nízkých koncentracích jsou ve vodě rozpustné, nad určitou koncentraci se shlukují do větších celků zvaných micely. Sfingofosfolipidy obsahují jako základní složku nenasycený aminoalkohol sfingosin. Sfingomyelin, nejrozšířenější typ sfingofosfolipidu, je součástí biologických membrán a myelinového obalu nervových buněk. Jeho tenzidové vlastnosti se uplatňují při správné funkci plic snižováním povrchového napětí vody alveolárních buněk [19, 25].

2.3.1.5 Odvozené lipidy

K odvozeným (isoprenoïdním) lipidům patří steroidy, prostaglandiny, karotenoidy a vitaminy rozpustné v tucích. Nejvýznamnější složkou jsou steroidy, mezi které řadíme cholesterol. Ten je součástí živočišných plazmatických membrán a vyznačuje se pouze slabým amfifilním charakterem. Díky jeho kondenzovaným cyklům zaručuje větší pevnost než membránové

lipidy. Stává se tak látkou určující vlastnosti membrán. Dále do této skupiny můžeme řadit hormony a žlučové kyseliny [20, 25].

2.4 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny (MK), organické karboxylové kyseliny s dlouhými alifatickými uhlovodíkovými řetězci, jsou významnými výživovými složkami lipidů a vyskytují se ve všech druzích lipidů [26, 27]. Hrají důležitou roli v metabolismu. Velké množství volných MK není přítomno samostatně v buňkách, ale vyskytují se jako součást složitějších lipidů. Většina přirozeně se vyskytujících MK má sudý počet uhlíků v řetězci, který se skládá typicky z 12 až 24 uhlíků. Sudý počet uhlíků v řetězci je způsoben biosyntézou z dvouuhlíkatého prekurzoru ve formě kyseliny octové. Ve většině z nich se vyskytuje lineární uhlovodíkový řetězec. Výjimku tvoří MK v bakteriích, které obsahují rozvětvené nebo dokonce cyklické struktury [27, 28].

K pojmenování MK slouží systematické, častěji pak triviální názvy. Pro stručnost a přehlednost se využívají zkrácené zápisy a schématické zkratky struktur MK ve formě N:M. Číslo N udává počet atomů uhlíků v řetězci a číslo M odpovídá počtu dvojných vazeb. Konfiguraci dvojných vazeb charakterizujeme pomocí značky *c* (*cis*) nebo *t* (*trans*). Pokud chceme uvést polohu dvojných vazeb, používá se symbol $\Delta^{a,b,c,d}$. Písmena v horním indexu odpovídají uhlíkovému atomu, u kterého dvojná vazba začíná (karboxylový uhlík je označen jako "1"). Například kyselinu olejovou s jednou dvojnou vazbou pojmenujeme zkráceným zápisem jako 18:1c Δ^9 a kyselinu linolenovou s třemi dvojnými vazbami jako 18:3c $\Delta^{9,12,15}$ [26, 28].

Jiným, alternativním způsobem je odkázání dvojných vazeb na tzv. ω -uhlík (poslední uhlík v řetězci), α -uhlík je uhlík vedle karboxylové skupiny. Tento způsob udává polohu dvojných vazeb od konce řetězce, tedy od poslední methylenové skupiny. Kyselina linolenová je příkladem ω -3 MK s dvojnou vazbou na třetím uhlíku počítaného od posledního ω -uhlíku [27, 28].

MK se vyskytují při fyziologickém pH ve formě aniontu. Díky svému hydrofilnímu náboji a dlouhému hydrofobnímu řetězci se chovají jako amfipatické molekuly. Při rozpouštění ve vodě tvoří na rozhraní voda–vzduch slabé vrstvy. Svou karboxylovou skupinou (hydrofilní) se orientují do vody, naopak uhlovodíkový řetězec (hydrofobní) směřuje do prostředí vzduchu. Pokud jsou MK v kontaktu s vodou, tvoří sférické micely, ve kterých jsou uhlovodíkové řetězce shlukovány uvnitř struktury. V přítomnosti vody a olejovité látky se micely uskupují okolo olejových kapiček a emulgují je, což je principem rozpouštění mastnoty pomocí mýdla [28].

2.4.1 Rozdělení mastných kyselin

Podle přítomnosti dvojných vazeb můžeme rozdělit MK v lipidech na nasycené a nenasycené. Nasycené MK neobsahují žádnou dvojnou vazbu a všechny uhlíky uhlovodíkového řetězce jsou nasyceny vodíkovými atomy. Nenasycené MK můžeme dále rozdělit podle počtu dvojných vazeb na nenasycené MK s jednou dvojnou vazbou (monoenové), MK s několika dvojnými vazbami (polyenové) a poslední skupinou jsou MK s třemi dvojnými vazbami a s různými substituenty [25]. Dalším rozdělením může být třídění do dvou skupin podle počtu atomů uhlíku na nižší MK (méně než 10 atomů uhlíku) a vyšší MK (více než 10, často však nejvíce 24 atomů uhlíku) [27].

2.4.1.1 Nasyčené mastné kyseliny

Nasyčené mastné kyseliny (SAFA – *Saturated fatty acids*) jsou běžně obsaženy v přírodních lipidech s rovným, nerozvětveným řetězcem o sudém počtu uhlíků. Neobsahují žádnou dvojnou vazbu. Nižší MK s krátkým řetězcem jsou obsaženy ve větším množství typicky v mléčném tuku. Jsou snadno stravitelné na rozdíl od vyšších mastných kyselin [26, 28].

Tab. 1: Významné nasyčené mastné kyseliny [26, 29].

| Triviální název | Systematický název | Zkrácený zápis | Hlavní výskyt |
|-----------------|--------------------|----------------|--------------------------|
| máselná | butanová | 4:0 | mléčný tuk |
| kapronová | hexanová | 6:0 | mléčný tuk |
| laurová | dodekanová | 12:0 | kokosový tuk |
| myristová | tetradekanová | 14:0 | kokosový tuk |
| palmitová | hexadekanová | 16:0 | tuhé tuky (máslo, sádlo) |
| stearová | oktadekanová | 18:0 | tuhé tuky (máslo, sádlo) |

2.4.1.2 Nenasycené mastné kyseliny s jednou dvojnou vazbou

Nenasycené mastné kyseliny s jednou dvojnou vazbou (MUFA – *monounsaturated fatty acids*), jednodušeji monoenové, se od sebe liší kromě počtu atomů uhlíku také polohou dvojných vazeb a její prostorovou konfigurací. U přirozených MUFA nalezneme konfiguraci zpravidla *cis*, málokdy pak *trans*, ke které dochází při ztužování tuků (hydrogenaci). Pokud jsou tyto *trans*-kyseliny přijímány v potravě, zabudovávají se do strukturálních lipidů a způsobují nežádoucí účinky. Mezi nejznámější MUFA řadíme kyselinu olejovou, která se vyskytuje v tucích zvířat [26, 28, 29].

Tab. 2: Významné nenasycené mastné kyseliny s jednou dvojnou vazbou [26, 29].

| Triviální název | Systematická název | Zkrácený zápis | Hlavní výskyt |
|-----------------|--------------------|------------------|-----------------------|
| palmitoolejová | hexadec-9-enová | 16:1c Δ^9 | rostlinné oleje |
| olejová | oktadec-9-enová | 18:1c Δ^9 | olivový, řepkový olej |
| elaidová | oktadec-9-enová | 18:1t Δ^9 | rostlinné oleje |

2.4.1.3 Nenasycené mastné kyseliny s několika dvojnými vazbami

Nenasycené mastné kyseliny s více dvojnými vazbami (PUFA – *polyunsaturated fatty acids*), někdy nazývané jako polyenové, se v přírodních lipidech vyskytují velmi zřídka. V podstatném množství pouze několik druhů, například kyselina linolová. Pokud se u PUFA vyskytují konjugované vazby, liší se od MK s izolovanými dvojnými vazbami svou reaktivitou a fyziologickými účinky. Nejvýznamnější MK se třemi dvojnými vazbami je linolenová kyselina (α -linolenová kyselina) a se čtyřmi dvojnými vazbami kyselina arachidonová [26, 29].

Většina MK může být syntetizována v organismu. Existují ale takové, které si organismus syntetizovat nedokáže a mohou být přijímány pouze v potravě. Nazývají se esenciální. Pro člověka je to kyselina linolová a α -linolenová [29].

Důležitou vlastností PUFA je podléhání oxidaci v místě dvojných vazeb. To tvoří hlavní příčinu žluknutí potravin, ke kterému dochází v důsledku působení mnoha faktorů během skladování a zpracování [29].

Tab. 3: Nejvýznamnější nenasyčené mastné kyseliny s několika dvojnými vazbami [26, 29].

| Triviální název | Systematická název | Zkrácený zápis | Hlavní výskyt |
|----------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------|
| linolová | oktadeka-9,12-dienová | 18:2c $\Delta^{9,12}$ | slunečnicový olej |
| α -linolenová | oktadeka-9,12,15-trienová | 18:3c $\Delta^{9,12,15}$ | slunečnicový olej |
| arachidonová | ikosa-5,8,11,14-tetraenová | 20:4c $\Delta^{5,8,11,14}$ | fosfolipidy |

2.4.1.4 Mastné kyseliny s třemi dvojnými vazbami a s různými substituenty

MK se třemi dvojnými vazbami mohou být rozvětvené, cyklické nebo mohou mít navázaný kyslíkaté, sírné nebo dusíkaté funkční skupiny. Obecně je tato skupina MK v potravinářství méně významná. Početně nejhojnější skupinou jsou MK s další kyslíkatou funkční skupinou neboli hydroxykyseliny. Vyskytují v jedlých tucích jako sekundární produkty oxidace [26].

2.5 Stanovení mastných kyselin v sýrech plynovou chromatografií

Podstatou této práce je stanovení obsahu volných a vázaných MK v plísňových sýrech. Volné mastné kyseliny (VMK) jsou obvykle přítomny v sýrech ve velmi malém množství. Přesto hrají důležitou roli v jejich senzoričkových vlastnostech. Tvoří se při rozkladu lipidů a v menší míře i bílkovin během zrání sýrů. V průběhu let bylo navrženo a zdokonaleno mnoho metod ke kvantitativnímu stanovení jednotlivých MK. Mezi nejpoužívanější patří plynová chromatografie (GC) [30].

V této práci se ke stanovení MK v sýrech využívá metoda plynové chromatografie s plamenovou ionizační detekcí (GC-FID – *Gas Chromatography with Flame Ionization Detector*). V následujících kapitolách je popsána instrumentace a princip metody stanovení mastných kyselin.

2.5.1 Instrumentace plynové chromatografie

Principem metody GC je analýza těkavého vzorku v chromatografické koloně, který je unášen proudem plynu (tzv. nosný plyn). Jednotlivé analyty se dělí na základě rozdílných afinit se stacionární fází. Látky vycházející z kolony indikuje detektor, z jehož signálu se určí druh a kvantitativní zastoupení složek [31, 32].

Hlavní části plynového chromatografu jsou blíže popsány v této kapitole. Patří mezi ně zdroj nosného plynu, dávkovač, kolona, detektor, vyhodnocovací zařízení a termostat [31, 32].

2.5.1.1 Zdroj nosného plynu

Úkolem nosného plynu je unášení vzorku kolonou, proto se volí inertní plyn, který neovlivňuje separaci. Zároveň by měl být netoxický a cenově přijatelný kvůli vysoké spotřebě. Hlavními zdroji nosného plynu jsou vodík, dusík, helium nebo argon. Plynový chromatograf používaný v této práci využívá dusík [31, 32].

2.5.1.2 Dávkovač

Kromě zavedení vzorku do proudu nosného plynu zajišťuje injektor odpaření vzorku. Dávkování vzorku na kolonu probíhá nejčastěji injekčními stříkačkami přes septum a využívá se několik metod nástřiku. Nástřik pomocí děliče toku (*split injection*) je vhodný pro

koncentrované roztoky, kde stačí dávkovat malé objemy vzorku. Naopak nástřik bez děliče toku (*splitless injection*), využívaný v této práci, dávkuje velké objemy zředěného vzorku [31].

2.5.1.3 Kolona

Kolony v plynové chromatografii dělíme na náplňové s nosiči pokrytými kapalnou fází, nebo kapilární se stacionární fází na vnitřní stěně. Kapilární kolony využívané v tomto experimentu se vyrábí z taveného křemene, skla nebo plastu obalené polyimidovou vrstvou o délce 30 m. Čím menší má kolona průměr, tím je stacionární fáze užší a účinnost vyšší, naopak kapacita klesá [31].

Volba kolony závisí na polaritě analyzovaného vzorku. Pokud stanovujeme nepolární sloučeniny, používají se nepolární kapilární kolony. V případě polárních a polarizovatelných molekul pak středně polární kolony [31].

2.5.1.4 Detektor

Látky separované v koloně jsou detekovány detektory. Jakmile jimi protéká nosný plyn s analytem, vysílá signál zaznamenávaný v závislosti na čase, který převádí na měřitelnou veličinu. Existuje mnoho druhů detektorů. Mezi nejpoužívanější patří tepelně-vodivostní detektor (TCD – *Thermal Conductivity Detector*) nebo ionizační detektory, kam řadíme plamenově-ionizační detektor (FID – *Flame Ionization Detector*) používaný v této bakalářské práci [31, 32].

Ve FID detektoru prochází zionizovaný plyn plamenem skrze elektrody. V přítomnosti stanovované složky se zvýší ionizace a zvětší se elektrický proud. Jako nosný plyn se využívá dusík, který se před vstupem mísí s vodíkem jako palivem. Detektor je velmi citlivý, především na organické látky (uhlovodíky), které se štěpí na radikály a oxidují se. To způsobí přenos náboje mezi elektrodami a vznik signálu. Citlivost detektoru roste s počtem uhlíkových atomů v molekule [31].

2.5.1.5 Termostat

Pro stanovení vzorku plynovou chromatografií je nutné, aby byl vzorek v plynném stavu po celou dobu analýzy. Je nutné zajistit dostatečně vysokou teplotu dávkovače, kolony i detektoru pomocí termostatu [31].

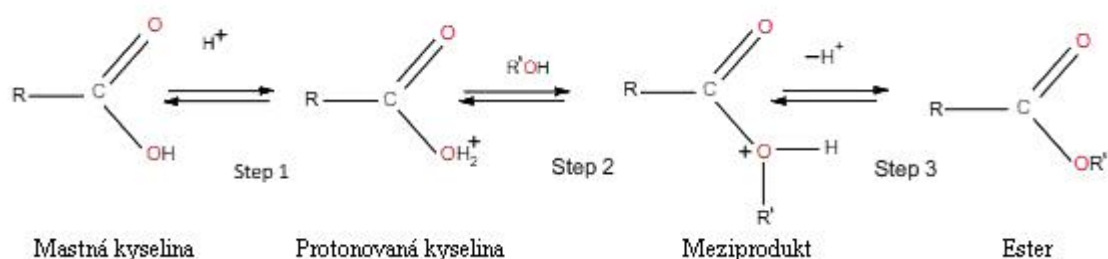
2.5.2 Extrakce a izolace

Samotné identifikaci VMK předcházejí další důležité kroky. Nejprve je nutná extrakce lipidů ze vzorku. Pro extrakci vzorku sýra existuje několik variant. Příkladem může být extrakce sýrové hmoty okyselené kyselinou sírovou pomocí diethyletheru. Metoda není vhodná pro získávání nižších VMK, jelikož dochází ke snižování kvantitativního výsledku při rozdělování mezi organickou a vodnou fází [30].

Dále se získaný lipidový extrakt frakcionuje pro zisk VMK pomocí např. sloupcové chromatografie, která využívá nosiče jako kyselinu křemičitou a hydroxid sodný, silné aniontoměničové pryskyřice nebo oxid křemičitý. Své místo při izolaci si také získal tetramethylamonium hydroxid, který převádí VMK na TMA-mýdla a následně na methylestery mastných kyselin [30].

2.5.3 Derivatizace a vznik methylesterů mastných kyselin

Pokud chceme metodou GC analyzovat vzorek sýra, je zapotřebí ho nejdříve upravit, aby mohl být nanesen na kolonu v plynném skupenství. Většina MK není těkavá a je nutná jejich přeměna na methylestery mastných kyselin (MeMK) neboli derivatizace. Teplota injektoru, kterým se dává vzorek na kolonu, musí být taková, aby došlo k okamžitému odpaření vzorku. Esterifikaci lze provést za bazické nebo kyselé katalýzy. V této práci je použita, vzhledem k možnosti stanovení VMK, kyselá katalyzovaná esterifikační reakce (viz Obr. 4) [33, 34].

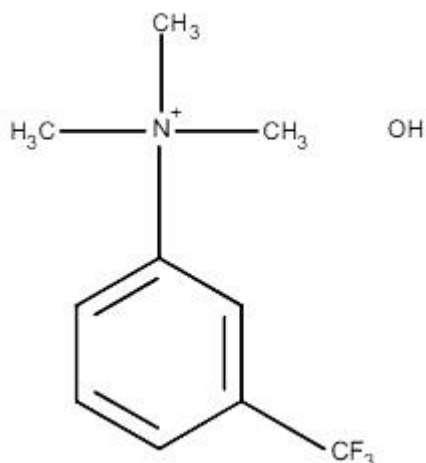


Obr. 4: Kyselá katalyzovaná esterifikace [33].

Převod VMK na MeMK za kyselé katalýzy se provádí použitím methanolu v přítomnosti kyseliny sírové nebo toxického fluoridu boritého jako katalyzátorů. Mechanismus spočívá v protonaci kyseliny methanolem za tvorby meziprojektu, který následně ztrácí proton a vzniká MeMK. Reakce je vratná, ale zároveň je zapotřebí přebytku methanolu a bezvodé prostředí. Voda je silnějším donorem elektronu než methanol a nevznikal by potřebný meziprojekt [33].

Další možností je využití tetramethylamonium hydroxidu jako esterifikačního činidla. Při derivatizaci tvoří amoniové soli karboxylových kyselin, které se při zahřátí rozkládají za vzniku trimethylaminu a MeMK. Bylo prokázáno, že amoniové soli příslušných kyselin se vytvářejí už při pokojové teplotě. Jsou dávkovány na kolonu injektorem při teplotě okolo 365 °C. Dojde k jejich odpaření a vzniku potřebných MeMK. Tato metoda není příliš vhodná ke kvantitativnímu stanovení VMK. Výtěžky MeMK nejsou vždy uspokojivé, ale jsou dostačující pro kvalitativní analýzu VMK [33].

Jako alternativní esterifikační činidlo lze použít také trimethyl(α,α,α -trifluoro-*m*-tolyl)amonium hydroxid poskytující lepší odstupující skupinu pro přípravu MeMK. Jeho velkou výhodou je snížení teploty potřebné pro metylaci v injektoru, ale také nižší alkalický charakter a lepší zisk PUFA [33].



Obrázek 5 Struktura trimethyl(α,α,α -trifluoro-*m*-tolyl)amonium hydroxid [33].

2.5.4 Stanovení mastných kyselin v sýrech vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií

Pro stanovení MK existují různé druhy chromatografických metod. Již zmíněnou GC, která vyniká separační účinností, nelze vždy využít. Je-li potřeba shromáždit frakce eluentů pro další analýzu nebo stanovit tepelně labilní sloučeniny, využívá se vysoko účinné kapalinové chromatografie (HPLC – *High performance liquid chromatography*). Výhodou je nastavení selektivity separace volbou stacionární fáze nebo složením mobilní fáze [32, 36].

Samotná separace probíhá v chromatografické koloně. Mobilní fázi tvoří polární rozpouštědlo ethanol. Je dávkována pomocí čerpadla při stálém průtoku kolonou za působení vyššího tlaku pro dostatečnou rychlost analýzy. Stacionární fázi jsou oktadecylové skupiny navázané na silikagelu [32].

MK se navzájem liší svou velikostí hydrofobních řetězců, proto se k jejich stanovení využívá chromatografie s převrácenými fázemi. Je založená na nepolárních interakcích mezi analytem, mobilní a stacionární fází. Látky s většími molekulami mají větší afinitu ke stacionární fázi, v koloně se drží silněji a jejich retenční časy jsou delší. Látky s vysokou afinitou k mobilní fázi se v koloně zdržují pouze krátkou dobu, takže retenční čas je kratší [32, 36].

Ke stanovení metodou HPLC se využívá aerosolový detektor rozptylu světla (ELSD – *Evaporative Light Scattering*) vhodný pro látky neobsahující chromofory [32, 36].

2.5.5 Další možnosti stanovení mastných kyselin v sýrech

Kolorimetrická metoda měření VMK kyselin v potravinářských výrobcích je vhodná pro rychlou analýzu velkého množství vzorků. MK se stanovují v benzoovém roztoku lipidů za použití barviva Rhodaminu 6G. Činidlo vytváří barevné komplexy extrahovatelné do nepolárního rozpouštědla a stanovují se spektrofotometricky [37, 38].

Kapilární zónovou elektroforézou jsou stanovovány VMK s dlouhými uhlovodíkovými řetězci. V současnosti jsou stanovovány pomocí GC nebo HPLC. Jejich velkou nevýhodou je ale nutnost derivatizace, při které dochází k ředění, kontaminaci a ztrátě vzorku. Nedostatky jsou eliminovány použitím bezvodých médií v kapilární zónové elektroforéze [39, 40].

Spektrofotometrickou metodou lze stanovit MK s několika dvojnými vazbami, které po izomeraci v alkalickém prostředí tvoří konjugované dvojně vazby. Ty poté vytváří charakteristická absorpční spektra v ultrafialové oblasti. Tato metoda slouží pouze ke stanovení přítomnosti konjugovaných MK, ne ke stanovení přesného množství [41].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie a laboratorní vybavení

3.1.1 Laboratorní pomůcky

- Běžné laboratorní sklo
- Automatická mikropipeta
- Struhadlo, nůž, špachtle
- Vialky
- Parafilm PECHIENY PLASTIC PACKAGING

3.1.2 Chemikálie pro extrakci lipidů

- Kyselina chlorovodíková 35 % p.a., Lach:ner, Česká republika
- Ethanol 96 % obj. p.a., AnalaR-NORMAPUR, Francie
- Diethylether p.a., PENTA, Česká republika
- Petrolether p.a., LACHEMA, Česká republika

3.1.3 Chemikálie pro přípravu methylesterů mastných kyselin

- Bortrifluorid methanolický roztok 10 %, SIGMA-ALDRICH, Německo
- Isooktan p.a., SIGMA-ALDRICH, Německo
- Chlorid sodný p.a., PENTA, Česká republika
- Síran sodný bezvodný p.a.
- Destilovaná voda, FCH VUT
- Methanol p. a., Lach:ner, Česká republika
- Hydroxid sodný p. a., ML Chemica, Česká republika

3.1.4 Chemikálie pro stanovení mastných kyselin

- Hexan p. a., Lach:Ner, Česká republika
- Standart methylesterů mastných kyselin, Supelco™ 37 Component FAME Mix

3.1.5 Laboratorní přístroje

- Vodní lázeň se stojanem, Julabo TW 2, Německo
- Analytické váhy GR-202-EC, HELAGO, Itálie
- Topné hnízdo 100 ml, BRNĚNSKÁ DRUTĚVA v.d., Česká republika
- Plynový chromatograf TRACE GC (ThermoQuest S. p. A., Itálie) s plamenově-ionizačním detektorem, splitless injektorem a kapilární kolonou DB-WAX o rozměrech 30 m x 0,32 mm x 0,5 μm
- Vakuová rotační odparka, KIKA WERKE, Německo
- PC – pracovní stanice, POWER PROFIT
- Digestoř
- Sušárna, Memmert
- Lednice

3.1.6 Plyny pro plynový chromatograf

- Vodík 5.0 SIAD v tlakové lahvi s redukčním ventilem
- Dusík 5.0 SIAD v tlakové lahvi s redukčním ventilem

- Vzduch 5.0 SIAD v tlakové lahvi s redukčním ventilem

3.2 Pracovní postupy použitých metod

3.2.1 Příprava vzorků k analýze

Ze vzorku byla odstraněna slabá vrstva povrchové plísně. Sýr byl nejemno nastrouhán na struhadle, promíchán a uchován v prachovnicích. Na analýzu byl navážen 1 g vzorku s přesností na čtyři desetinná místa a kvantitativně převeden do zkumavky pro extrakci.

3.2.2 Extrakce lipidů ze vzorku sýra (ČSN EN ISO 1735:2005)

Příprava vzorku k analýze: odstraní se kůra nebo povrchová vrstva sýra (vzorek sýra je ve formě obvyklé konzumace). Sýr se nastrouhá na jemném struhadle a uchovává se v uzavřené prachovnici až do doby analýzy (nejlépe tentýž den). Před analýzou se sýr promíchá, do zkumavky se naváží 1 g s přesností na čtyři desetinná místa, přidá se 5 ml kyseliny chlorovodíkové a směs se nechá zahřívat ve vodní lázni při 80 °C až do úplného rozpuštění sýra (změna barvy roztoku na tmavě fialovou, cca 10 min.), následně se směs ochladí pod tekoucí vodou. Po ochlazení se směs pomocí 5 ml ethanolu kvantitativně převede do dělicí nálevky. Ke směsi se postupně přidá 9 ml diethyletheru a 9 ml petroletheru, po každém přidavku se směs mírně promíchá a protřepe po dobu 1 min. Poté se nechá odstát (při laboratorní teplotě cca 22 °C; minimálně 30 min), dokud není horní fáze čirá a zřetelně oddělená od vodné fáze – první extrakce. Po této době se horní fáze odebere pipetou do vysušené a předem zvážené destilační baňky s kulatým dnem (100 ml). Následně se provede druhá a třetí extrakce obdobným postupem, ale s polovičním množstvím rozpouštědel (4,5 ml diethyletheru a 4,5 ml petroletheru). Všechny tři extrakty se spojí a rozpouštědlo se odpaří na vakuové rotační odparce při teplotě do 40 °C. Množství tuku se zjistí gravimetricky – zvážením vyextrahovaného tuku na analytických váhách s přesností na 0,000 1 g a odečtením hmotnosti čisté destilační baňky.

3.2.3 Kyselá esterifikace s bortrifluoridem jako katalyzátorem – TAG

Do destilační baňky se kvantitativně převede veškerý vyextrahovaný tuk. Přidají se 4 ml methanolického roztoku hydroxidu sodného ($c = 0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) a varný kamínek. K baňce se připojí zpětný chladič, vloží se do topného hnízda a obsah baňky se vaří pod zpětným chladičem, dokud nevymizí kapičky tuku. Každých cca 30 sekund je potřeba baňku jemnými krouživými pohyby promíchat, jinak se na stěně baňky tvoří pevný kroužek hydroxidu sodného. Tento krok obvykle trvá 5 až 10 minut. Poté se do vroucí směsi přes zpětný chladič přidá 5 ml methanolického roztoku bortrifluoridu a pokračuje se ve varu (celková doba od začátku varu 30 min). Poté se do vroucí směsi přes horní konec chladiče přidají 3 ml isooktanu, destilační baňka se vyjme z topného hnízda a var se zastaví. Ihned, bez jakéhokoli chlazení, se přidá do směsi 20 ml nasyceného vodného roztoku chloridu sodného, baňka se uzavře a protřepe 15 sekund. Poté se přidá větší množství nasyceného vodného roztoku chloridu sodného tak, aby hladina kapaliny dosáhla hrdla baňky a šlo rozeznat rozhraní dvou fází. Baňka se pro oddělení fází nechá 5 minut odstát. Z horní isooktanové vrstvy se odeberou 2 ml do 4 ml vialky. Přidá se malé množství bezvodého síranu sodného, aby se odstranily stopy vlhkosti. Z takto připraveného roztoku se odebere 1 ml do vialky k analýze na plynovém chromatografu.

Příprava methanolického roztoku hydroxidu sodného ($c = 0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$)

Za mírného zahřívání ve vodní lázni byly rozpuštěny 2 g hydroxidu sodného ve 100 ml methanolu. Takto připravený roztok bylo možné uchovávat v lednici nejdéle 3 měsíce.

3.2.4 Kyselá esterifikace s bortrifluoridem jako katalyzátorem – VMK

Do destilační baňky s kulatým dnem (50 ml) se kvantitativně převede veškerý vyextrahovaný tuk. Přidá se varný kamínek, 5 ml methanolického roztoku bortrifluoridu a směs se přivede k varu. Po 3 minutách se do vroucí směsi přes horní konec chladiče přidají 3 ml isooktanu, destilační baňka se vyjme z topného hnízda a var se zastaví. Ihned, bez jakéhokoli chlazení, se přidá do směsi 20 ml nasyceného vodného roztoku chloridu sodného, baňka se uzavře a protřepe 15 sekund. Poté se přidá větší množství nasyceného vodného roztoku chloridu sodného tak, aby hladina kapaliny dosáhla hrdla baňky a šlo rozeznat rozhraní dvou fází. Baňka se pro oddělení fází nechá 5 minut odstát. Z horní isooktanové vrstvy se odeberou 2 ml do 4 ml vialky. Přidá se malé množství bezvodého síranu sodného, aby se odstranily stopy vlhkosti. Z takto připraveného roztoku se odebere 1 ml do vialky k analýze na plynovém chromatografu.

3.3 Podmínky stanovení methylesterů mastných kyselin metodou GC-FID

- Plynový chromatograf TRACE GC (ThermoQuest S. p. A, Itálie)
- Autosampler AI/AS 3000
- Kapilární kolona DB-WAX o rozměrech 30 m x 0,32 mm x 0,5 μm)

Vstup:

- Teplota injektoru: 250 °C
- Dávkování: autosampler bez děliče toku (splitless) 1 μl , ventil uzavřen 1 min

Nosný plyn:

- Průtok dusíku 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$

Detektor FID (plamenově-ionizační):

- Teplota detektoru: 250 °C
- Průtok vzduchu: 350 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$
- Průtok vodíku: 35 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$
- Make-up dusíku: 30 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$

Teplotní program:

- 50 °C 1 min, vzestupný gradient 25 °C $\cdot\text{min}^{-1}$ do 200 °C s výdrží 0 min, vzestupný gradient 3 °C $\cdot\text{min}^{-1}$ do 230 °C s výdrží 30 min
- Celková doba analýzy: 47 min

3.4 Identifikace a kvantifikace mastných kyselin

MK byly stanoveny po převedení na MeMK. Jejich retenční časy byly srovnávány s retenčními časy standardů MeMK a pomocí plochy píků jednotlivých MeMK byla vypočtena jejich koncentrace podle vztahu (1):

$$c_{MeMK} = \frac{c_s \cdot P_{MeMK}}{P_s} \quad (1)$$

kde c_{MeMK} označuje koncentraci MeMK v extraktu [$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$], P_{MeMK} plochu píku v MeMK v extraktu [$\text{mV}\cdot\text{s}$], c_s koncentraci standardu [$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$] a P_s plochu píku standardu [$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$].

Koncentrace MeMK byla přepočtena na koncentraci MK podle následujícího vztahu (2):

$$c_{MK} = \frac{c_{MeMK} \cdot Mr_{MK}}{Mr_{MeMK}} \quad (2)$$

kde c_{MK} udává koncentraci MK v extraktu [$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$], c_{MeMK} koncentraci MeMK v extraktu [$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$], Mr_{MK} představuje molární hmotnost MK [$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$] a Mr_{MeMK} molární hmotnost MeMK [$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$].

Následně byla přepočtena koncentrace MK na původní objem v baňce podle vztahu (3):

$$m_{MK} = c_{MK} \cdot V \quad (3)$$

kde m_{MK} vyjadřuje celkovou hmotnost MK v baňce [mg], c_{MK} vypočtenou koncentraci MK v extraktu [$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$] a V vyjadřuje objem isooktanu přidaného při esterifikaci.

Koncentrace MK v tuku byla vypočtena podle vztahu (4):

$$c_{tuk} = \frac{m_{MK}}{m_{tuk}} \quad (4)$$

kde c_{tuk} udává koncentraci MK v tuku [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$], m_{MK} vyjadřuje celkovou hmotnost MK v baňce [mg] a m_{tuk} hmotnost vyextrahovaného tuku ze vzorku [g].

3.5 Analyzované vzorky

Pro experimentální část této práce byly použity komerčně dostupné sýry s bílou plísní na povrchu: Hermelín Originál od firmy Savencia Fromage & Dairy Czech Republic, Kamadet vyrobený firmou Madeta a Olmín od společnosti Olma.

Specifikace jednotlivých vzorků a základní výživové hodnoty uvedené na obalu jsou shrnuty v Tab. 4.

Tab. 4: Specifikace jednotlivých vzorků a základní výživové hodnoty.

| Vzorek | Hermelín | Kamadet | Olmín |
|----------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Sušina | 48,0 % | min. 50,0 % | 42,0 % |
| Tuk v sušině | 55,0 % | 48,0 % | 48,0 % |
| Použitá plíseň | <i>Penicillium candidum</i> | <i>Penicillium candidum</i> | <i>Penicillium candidum</i> |
| Tuky | 28,0 g | 27,0 g | 21,0 g |
| Sacharidy | 2,0 g | 1,1 g | 1,0 g |
| Bílkoviny | 18,0 g | 21,0 g | 15,0 g |
| Sůl | 2,0 g | 2,0 g | 1,40 g |

3.6 Statistické vyhodnocení výsledků

Výsledky byly vyhodnoceny pomocí MS Excel 2016. Každý vzorek byl změřen zvlášť pro volné a vázané mastné kyseliny, pro každou možnost dvakrát ($n = 2$).

Byl vypočítán aritmetický průměr, směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka. Zastoupení mastných kyselin je vyjádřené po přepočtu v $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ tuku.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato bakalářská práce je součástí rozsáhlejší studie zaměřené na komplexní charakterizaci sýrů s bílou plísní na povrchu. Hlavním cílem je identifikace a kvantifikace volných a vázaných MK ve třech vybraných vzorcích sýrů. Pro tento experiment byly vybrány sýry českého původu, vyrobené z kravského mléka, běžně dostupné v tržní síti: Kamadet, Hermelín a Olmín.

Při stanovení MK, volných i vázaných, je nutné nejprve tuk vyextrahovat ze vzorku. V této práci byla použita klasická extrakce směsí rozpouštědel (kombinace nepolárního diethyletheru a petroletheru) podle normované metody ČSN EN ISO 1735:2005. Lipidy, které se přirozeně vyskytují v mléčném tuku, jsou vázány s dalšími makromolekulami jako jsou bílkoviny a sacharidy, nebo s cizorodými látkami. Tyto vazby nejsou obvykle příliš pevné, ale mohou se vyskytovat i pevnější kovalentní interakce. Pro vyšší účinnost extrakce vázaných tuků v matici je vzorek podroben kyselé nebo bazické hydrolyze. V této práci je použita kyselé hydrolyza pomocí kyseliny chlorovodíkové [42].

Většina MK nepatří mezi těkavé sloučeniny. Aby mohly být stanoveny metodou plynové chromatografie, je nutná jejich derivatizace za vzniku příslušných MeMK. V této práci byla použita kyselá katalyzovaná esterifikace za přítomnosti bortrifluoridu jako katalyzátoru, přičemž volné i vázané mastné kyseliny byly esterifikovány přímo za podmínek uvedených v kapitolách 3.2.3 a 3.2.4 [33].

4.1 Identifikace a kvantifikace mastných kyselin ve vzorcích sýra

Identifikace a kvantifikace mastných kyselin ve vzorcích byla provedena na základě porovnání retenčních časů MEMK s retenčními časy příslušných standardů a srovnáním ploch píků se standardy o známé koncentraci. Hlavní charakteristiky standardů, jako jsou retenční čas, plocha píků a koncentrace, jsou uvedeny v Tab. 5.

Tab. 5: Standardy methylesterů mastných kyselin pro identifikaci a kvantifikaci.

| Mastná kyselina | Zkratka | t_R [min] | c_s [mg·ml ⁻¹] | Plocha píku [mV·s] |
|----------------------|----------|----------------|---------------------------------|-----------------------|
| kapronová | C6:0 | 5,74 | 0,04 | 2 767 172 |
| kaprylová | C8:0 | 6,87 | 0,04 | 3 310 175 |
| kaprinová | C10:0 | 8,01 | 0,04 | 3 760 655 |
| undekánová | C11:0 | 8,64 | 0,02 | 1 968 818 |
| laurová | C12:0 | 9,37 | 0,04 | 4 302 041 |
| tridekánová | C13:0 | 10,20 | 0,02 | 2 181 950 |
| myristová | C14:0 | 11,19 | 0,04 | 4 575 751 |
| myristoolejová | C14:1n9c | 11,67 | 0,02 | 2 214 617 |
| pentadekánová | C15:0 | 12,35 | 0,02 | 2 288 453 |
| cis-10-pentadecenová | C15:1 | 12,92 | 0,02 | 2 262 521 |
| palmitová | C16:0 | 13,72 | 0,06 | 7 158 423 |
| palmitoolejová | C16:1n9c | 14,19 | 0,02 | 2 322 445 |

t_R – retenční čas standardu, c_s – koncentrace standardu

Tab. 5: Pokračování – standardy methylesterů mastných kyselin pro identifikaci a kvantifikaci.

| Mastná kyselina | Zkratka | t_R [min] | c_s [mg·ml ⁻¹] | Plocha píku [mV·s] |
|-------------------------------------|----------|----------------|---------------------------------|-----------------------|
| heptadekanová | C17:0 | 15,25 | 0,02 | 1 589 265 |
| cis-10-heptadecenová | C17:1 | 15,79 | 0,02 | 2 356 498 |
| stearová | C18:0 | 16,99 | 0,04 | 4 825 867 |
| olejová | C18:1n9c | 17,47 | 0,04 | 7 231 723 |
| linolová | C18:2n6c | 18,46 | 0,02 | 4 293 902 |
| gama-linolenová | C18:3n6 | 19,21 | 0,02 | 2 200 645 |
| linolenová | C18:3n3 | 20,02 | 0,02 | 2 177 651 |
| arachová | C20:0 | 21,56 | 0,04 | 4 870 180 |
| cis-11-eicosenová | C20:1 | 22,30 | 0,02 | 2 405 373 |
| cis-11,14-eicosadienová | C20:2 | 23,93 | 0,02 | 2 275 580 |
| heneicosanová | C21:0 | 24,80 | 0,02 | 2 396 746 |
| cis-8,11,14-eicosatrienová | C20:3n6 | 25,02 | 0,02 | 2 033 416 |
| cis-11,14,17-eicosatrienová | C20:3n3 | 25,99 | 0,02 | 2 092 644 |
| arachidonová | C20:4n6 | 26,47 | 0,02 | 1 697 510 |
| behenová | C22:0 | 28,96 | 0,04 | 6 480 041 |
| eruková | C22:1n9 | 30,16 | 0,02 | 2 374 777 |
| cis-13,16-docosadienová | C22:2 | 32,90 | 0,02 | 2 031 932 |
| trikosanová | C23:0 | 34,29 | 0,02 | 2 228 815 |
| lignocerová | C24:0 | 41,21 | 0,04 | 4 166 992 |
| nervonová | C24:1 | 43,29 | 0,02 | 1 937 341 |
| cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenová | C22:6n3 | 43,79 | 0,02 | 1 553 663 |

t_R – retenční čas standardu, c_s – koncentrace standardu

4.2 Mastné kyseliny stanovené ve vzorcích sýrů

V této kapitole jsou uvedeny všechny identifikované MK vázané (pro zjednodušení označované TAG) a VMK v jednotlivých vzorcích sýra (Tab. 6–8). Koncentrace MK je uvedena jako aritmetický průměr ze dvou měření v mg·g⁻¹ tuku. Dále byla vypočtena pro každou MK směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka (RSD), která udává míru přesnosti dvou paralelních měření. RSD se pohybovala v rozmezí pro TAG 0,1–31,9 % a pro VMK 0,52–2,4 %; u většiny MK byla RSD < 10 %, menší přesnosti dosahovaly výsledky většinou u MK s vyšším počtem uhlíků (> 16 C).

Ve vzorcích sýrů bylo celkem identifikováno 21 různých MK.

V Hermelínu bylo přítomno 21 MK vázaných o koncentraci 523,38 ± 0,27 mg·g⁻¹ a 21 VMK o koncentraci 64,02 ± 0,08 mg·g⁻¹ uvedených v Tab. 6.

Ve vzorku Kamadetu bylo nalezeno 20 MK vázaných o celkovém obsahu $500,80 \pm 0,45 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ a 19 VMK o obsahu $43,87 \pm 0,12 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ uvedených v Tab. 7.

V Olmínu bylo identifikováno 21 MK vázaných o obsahu $490,83 \pm 0,43 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ a 21 VMK o obsahu $88,18 \pm 0,18 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ Tab. 8.

Ukázka získaných chromatogramů je uvedena v Příl. 1–3.

Tab. 6: Mastné kyseliny identifikované v sýru Hermelín (v mg·g⁻¹ tuku).

| HERMELÍN | | | | | | |
|------------------|--------------------------------|---------------------------------|------------|--------------------------------|---------------------------------|------------|
| Mastná kyselina | TAG | | | FFA | | |
| | x [mg·g ⁻¹ tuku] | SD [mg·g ⁻¹ tuku] | RSD [%] | x [mg·g ⁻¹ tuku] | SD [mg·g ⁻¹ tuku] | RSD [%] |
| kapronová | 15,29 | 0,41 | 2,7 | 2,79 | 0,20 | 7,1 |
| kaprylová | 8,72 | 0,13 | 1,5 | 1,93 | 0,22 | 11,6 |
| kaprinová | 24,17 | 0,36 | 1,5 | 0,05 | 0,00 | 8,9 |
| undekanová | 0,68 | 0,03 | 3,9 | 0,10 | 0,00 | 1,2 |
| laurová | 23,72 | 0,51 | 2,2 | 3,55 | 0,11 | 3,1 |
| tridekanová | 1,04 | 0,03 | 2,5 | 0,14 | 0,00 | 3,4 |
| myristová | 73,62 | 1,28 | 1,7 | 9,73 | 0,04 | 0,5 |
| myristoolejová | 0,78 | 0,02 | 3,2 | 0,78 | 0,01 | 1,8 |
| pentadekanová | 8,75 | 0,09 | 1,0 | 1,19 | 0,01 | 1,0 |
| pentadecenová | 1,72 | 0,05 | 2,7 | 0,20 | 0,00 | 1,5 |
| palmitová | 192,15 | 1,76 | 0,9 | 24,18 | 0,48 | 2,0 |
| palmitoolejová | 11,72 | 0,28 | 2,4 | 1,68 | 0,01 | 0,8 |
| heptadekanová | 5,63 | 0,19 | 3,4 | 0,68 | 0,01 | 2,2 |
| heptadecenová | 1,85 | 0,11 | 6,0 | 0,24 | 0,00 | 1,9 |
| stearová | 53,38 | 0,10 | 0,2 | 5,38 | 0,26 | 4,8 |
| olejová | 87,61 | 0,10 | 0,1 | 9,84 | 0,23 | 2,4 |
| linolová | 8,02 | 0,04 | 0,5 | 0,89 | 0,06 | 6,3 |
| gama-linolenová | 0,26 | 0,00 | 0,6 | 0,04 | 0,01 | 14,7 |
| linolenová | 3,51 | 0,07 | 1,9 | 0,57 | 0,05 | 9,2 |
| arachová | 0,78 | 0,01 | 1,3 | 0,07 | 0,00 | 2,2 |
| eicosatrienová 3 | 0,84 | 0,01 | 0,8 | 0,10 | 0,00 | 3,49 |

TAG – vázané mastné kyseliny; FFA – volné mastné kyseliny

Tab. 7: Mastné kyseliny identifikované v sýru Kamadet (v mg·g⁻¹ tuku).

| KAMADET | | | | | | |
|-----------------|--------------------------------|---------------------------------|------------|--------------------------------|---------------------------------|------------|
| Mastná kyselina | TAG | | | FFA | | |
| | x [mg·g ⁻¹ tuku] | SD [mg·g ⁻¹ tuku] | RSD [%] | x [mg·g ⁻¹ tuku] | SD [mg·g ⁻¹ tuku] | RSD [%] |
| kapronová | 16,18 | 0,51 | 3,1 | 1,81 | 0,05 | 2,8 |
| kaprylová | 9,87 | 0,33 | 3,3 | 0,95 | 0,03 | 3,0 |
| kaprinová | 21,90 | 0,30 | 1,4 | 2,03 | 0,06 | 3,2 |
| undekánová | 0,73 | 0,01 | 2,0 | 0,08 | 0,01 | 8,0 |
| laurová | 24,11 | 0,05 | 0,2 | 2,28 | 0,11 | 5,0 |
| tridekánová | 1,05 | 0,00 | 0,4 | 0,10 | 0,00 | 4,4 |
| myristová | 69,59 | 1,81 | 2,6 | 6,40 | 0,34 | 5,4 |
| myristoolejová | 1,09 | 0,12 | 11,3 | 0,47 | 0,02 | 4,4 |
| pentadekánová | 8,77 | 0,05 | 0,6 | 0,79 | 0,04 | 5,2 |
| pentadecenová | 1,51 | 0,03 | 1,8 | 0,12 | 0,01 | 5,2 |
| palmitová | 171,88 | 1,34 | 0,8 | 16,42 | 0,92 | 5,6 |
| palmitoolejová | 12,10 | 0,27 | 2,3 | 1,11 | 0,04 | 3,8 |
| heptadekánová | 6,65 | 0,98 | 14,7 | 0,43 | 0,04 | 8,9 |
| heptadecenová | 0,02 | 0,00 | 11,1 | 0,15 | 0,00 | 1,4 |
| stearová | 54,61 | 0,51 | 0,9 | 3,56 | 0,25 | 7,1 |
| olejová | 89,94 | 1,21 | 1,3 | 6,17 | 0,36 | 5,8 |
| linolová | 6,82 | 0,81 | 11,9 | 0,62 | 0,02 | 2,6 |
| gama-linolenová | 0,24 | 0,01 | 2,2 | 0,04 | 0,00 | 13,0 |
| linolenová | 2,89 | 0,54 | 18,7 | 0,34 | 0,02 | 4,9 |
| arachová | 0,85 | 0,12 | 13,9 | - | - | - |

TAG – vázané mastné kyseliny; FFA – volné mastné kyseliny

Tab. 8: Mastné kyseliny identifikované v sýru Olmín (v mg·g⁻¹ tuku).

| OLMÍN | | | | | | |
|------------------|--------------------------------|---------------------------------|------------|--------------------------------|---------------------------------|------------|
| Mastná kyselina | TAG | | | FFA | | |
| | x [mg·g ⁻¹ tuku] | SD [mg·g ⁻¹ tuku] | RSD [%] | x [mg·g ⁻¹ tuku] | SD [mg·g ⁻¹ tuku] | RSD [%] |
| kapronová | 16,55 | 0,26 | 1,5 | 3,11 | 0,06 | 2,1 |
| kaprylová | 10,52 | 0,37 | 3,5 | 1,84 | 0,03 | 1,6 |
| kaprinová | 23,31 | 0,12 | 0,5 | 3,98 | 0,03 | 0,8 |
| undekanová | 0,85 | 0,07 | 8,2 | 0,14 | 0,01 | 3,6 |
| laurová | 24,56 | 0,36 | 1,5 | 4,53 | 0,03 | 0,7 |
| tridekanová | 0,96 | 0,00 | 0,4 | 0,18 | 0,00 | 1,8 |
| myristová | 68,83 | 0,14 | 0,2 | 12,27 | 0,38 | 3,1 |
| myristoolejová | 0,88 | 0,03 | 3,4 | 0,86 | 0,07 | 7,8 |
| pentadekanová | 8,34 | 0,03 | 0,4 | 1,52 | 0,06 | 4,0 |
| pentadecenová | 1,51 | 0,01 | 0,3 | 0,31 | 0,00 | 1,3 |
| palmitová | 176,28 | 0,25 | 0,1 | 31,65 | 1,13 | 3,6 |
| palmitoolejová | 9,76 | 1,45 | 14,9 | 2,25 | 0,05 | 2,1 |
| heptadekanová | 10,05 | 1,68 | 16,7 | 0,85 | 0,06 | 7,3 |
| heptadecenová | 1,69 | 0,01 | 0,5 | 0,36 | 0,02 | 4,8 |
| stearová | 49,46 | 0,43 | 0,9 | 6,92 | 0,69 | 10,0 |
| olejová | 77,62 | 2,05 | 2,6 | 14,81 | 0,96 | 6,5 |
| linolová | 6,31 | 1,11 | 17,5 | 1,78 | 0,22 | 12,3 |
| gama-linolenová | 0,20 | 0,00 | 1,9 | 0,04 | 0,00 | 12,7 |
| linolenová | 1,54 | 0,39 | 25,3 | 0,53 | 0,01 | 1,9 |
| arachová | 0,83 | 0,12 | 14,8 | 0,09 | 0,02 | 22,4 |
| eicosatrienová 3 | 0,80 | 0,13 | 16,3 | 0,15 | 0,00 | 1,3 |

TAG – vázané mastné kyseliny; FFA – volné mastné kyseliny

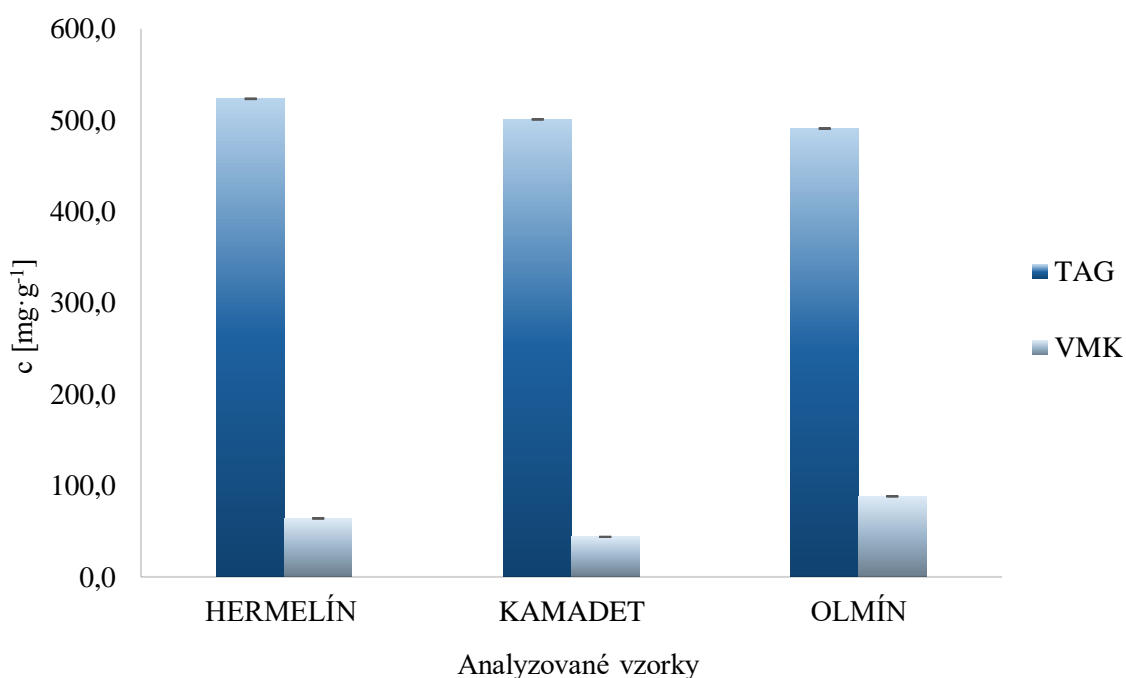
4.3 Srovnání obsahu mastných kyselin ve vzorcích sýra

Jelikož byly vybrány stejné typy sýrů, které jsou navíc pouze z české produkce, lze předpokládat obdobné složení MK, s mírnými odchylkami v závislosti na obsahu tuku a na stupni prozrání.

4.3.1 Srovnání celkového obsahu mastných kyselin ve vzorcích sýra

Pro přesnější charakterizaci vzorků byl v rámci této bakalářské práce stanoven vždy zvlášť obsah MK vázaných v TAG a VMK. V této kapitole budou srovnány celkové obsahy MK ve všech vzorcích – Hermelínu, Kamadetu a Olmínu.

V grafu uvedeném níže na Obr. 6 jsou uvedeny celkové koncentrace MK vázaných v TAG a VMK. Podle očekávání mezi vzorky nejsou výrazné rozdíly, obsah VMK je několikanásobně nižší než obsah vázaných MK. Analyzované sýry mají srovnatelný obsah tuku uvedený dříve v Tab. 4, obdobný technologický proces výroby a všechny jsou vyrobeny z pasterovaného kravského mléka. Za těchto podmínek můžeme předpokládat podobný obsah i složení vázaných MK. Lze také očekávat podobný průběh lipolýzy při zrání, tudíž i vznik obdobného množství VMK. U Olmínu lze pozorovat nepatrně větší zastoupení VMK, což by mohlo svědčit o větší prozrálости vzorku.



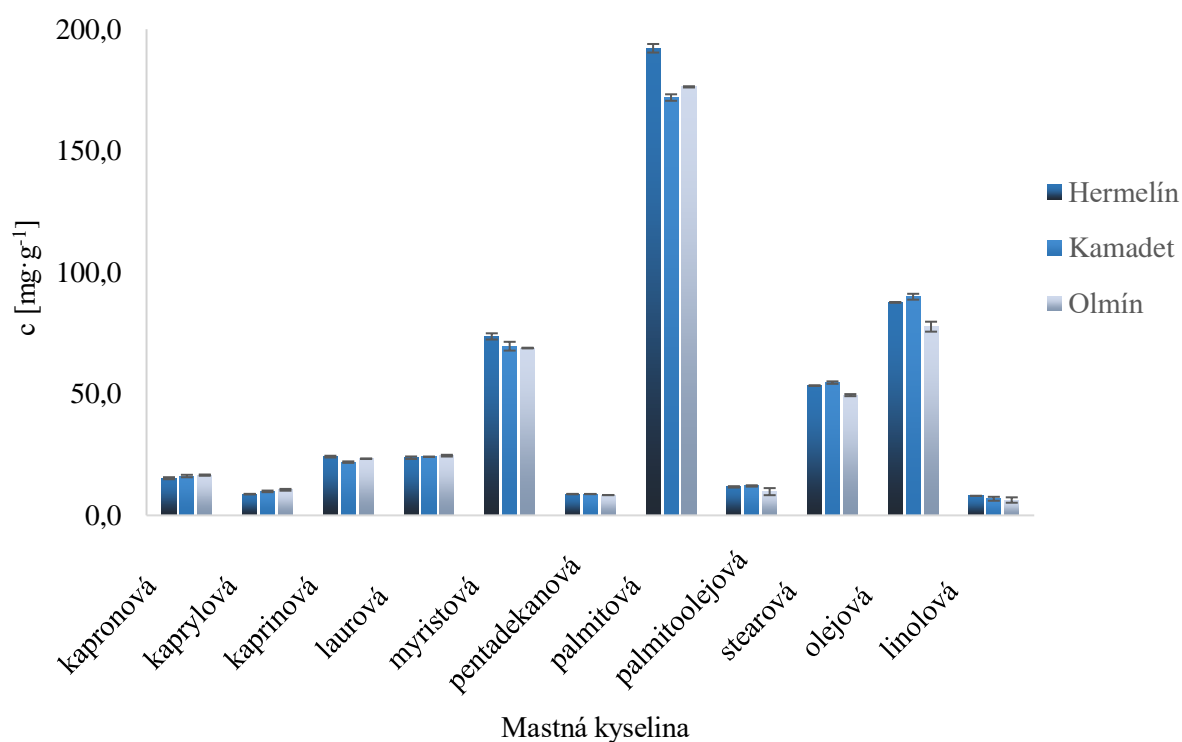
Obr. 6: Celkový obsah vázaných/volných mastných kyselin ve vzorcích (v $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ tuku).

4.3.2 Srovnání obsahu jednotlivých vázaných mastných kyselin ve vzorcích sýra

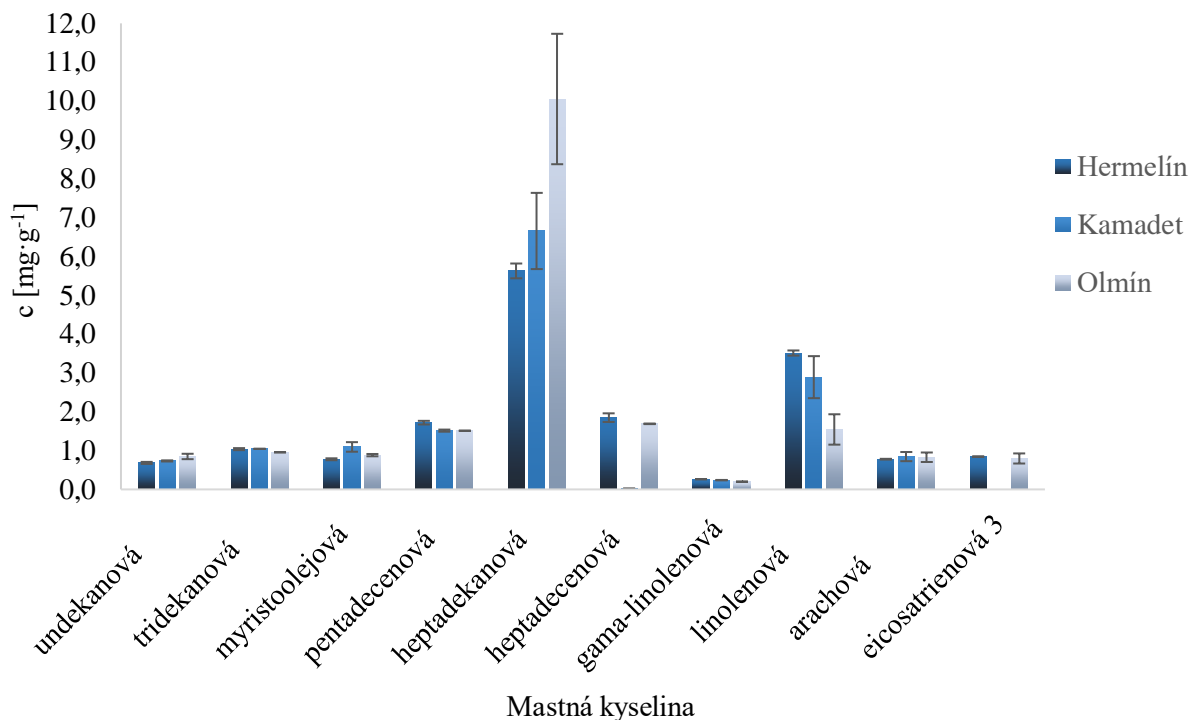
Srovnání jednotlivých vázaných MK identifikovaných ve vzorcích sýrů je uvedeno v grafech na Obr. 7a–7b. Vzhledem k rozdílným koncentracím jednotlivých MK jsou rozděleny do dvou grafů pro lepší porovnání podle jejich kvantitativního zastoupení.

Výsledky odpovídají znalostem o složení mléčného tuku, který obsahuje MK s krátkým a středním uhlovodíkovým řetězcem. Mezi nejvíce zastoupené SAFA mléčného tuku patří kyseliny palmitová, stearová, myristová. MUFA jsou zastoupeny především kyselinou olejovou a PUFA kyselinou linolovou [26].

Zastoupení a obsah jednotlivých vázaných MK ve vzorcích byl až na výjimky velmi podobný. Pouze kyselina heptadekanová se vyskytovala v rozdílných koncentracích, nejvíce v Olmínu. Kyselina heptadecenová se téměř nevyskytovala v Kamadetu. Kvantitativně nejvíce zastoupené byly ve všech vzorcích kyseliny palmitová, olejová, myristová a stearová. Nejnižších koncentrací dosahovaly méně významné MK s vyšším počtem uhlíků, jako jsou kyseliny gama-linolenová, arachová, undekanová nebo *cis*-11,14,17-eicosatrienová.



Obr. 7a: Obsah jednotlivých vázaných mastných kyselin ve vzorcích (v mg·g⁻¹ tuku).



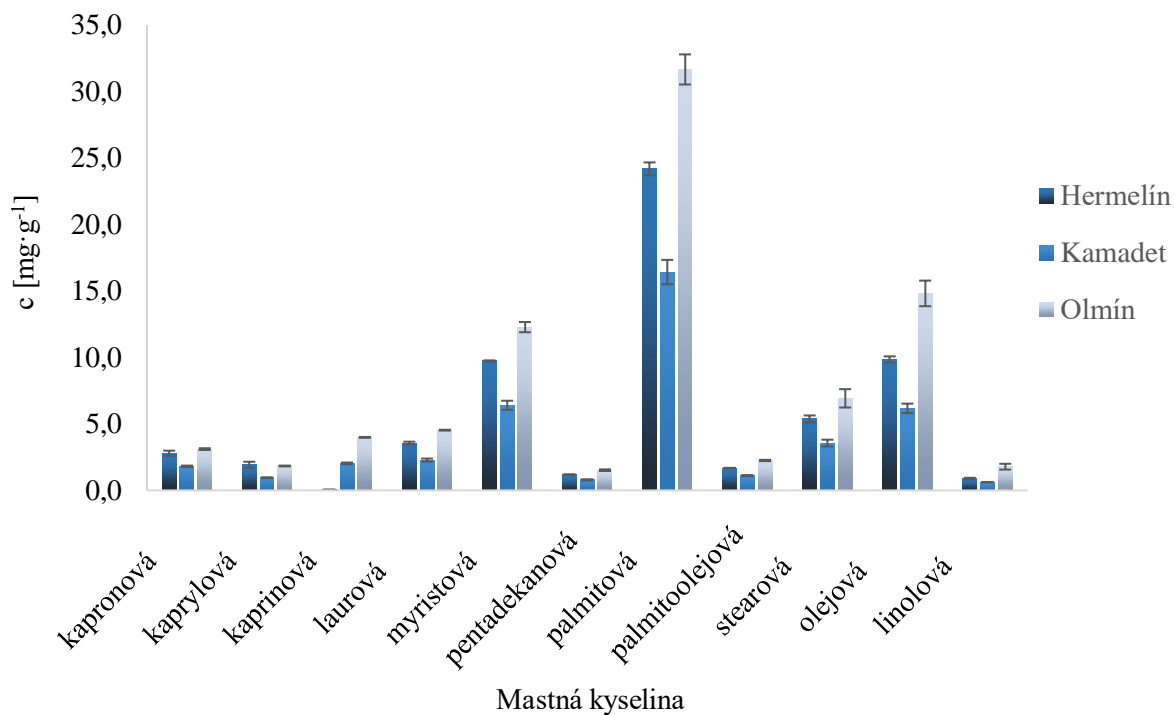
Obr. 7b: Obsah jednotlivých vázaných mastných kyselin ve vzorcích (v mg·g⁻¹ tuku).

4.3.3 Srovnání obsahu jednotlivých volných mastných kyselin ve vzorcích sýra

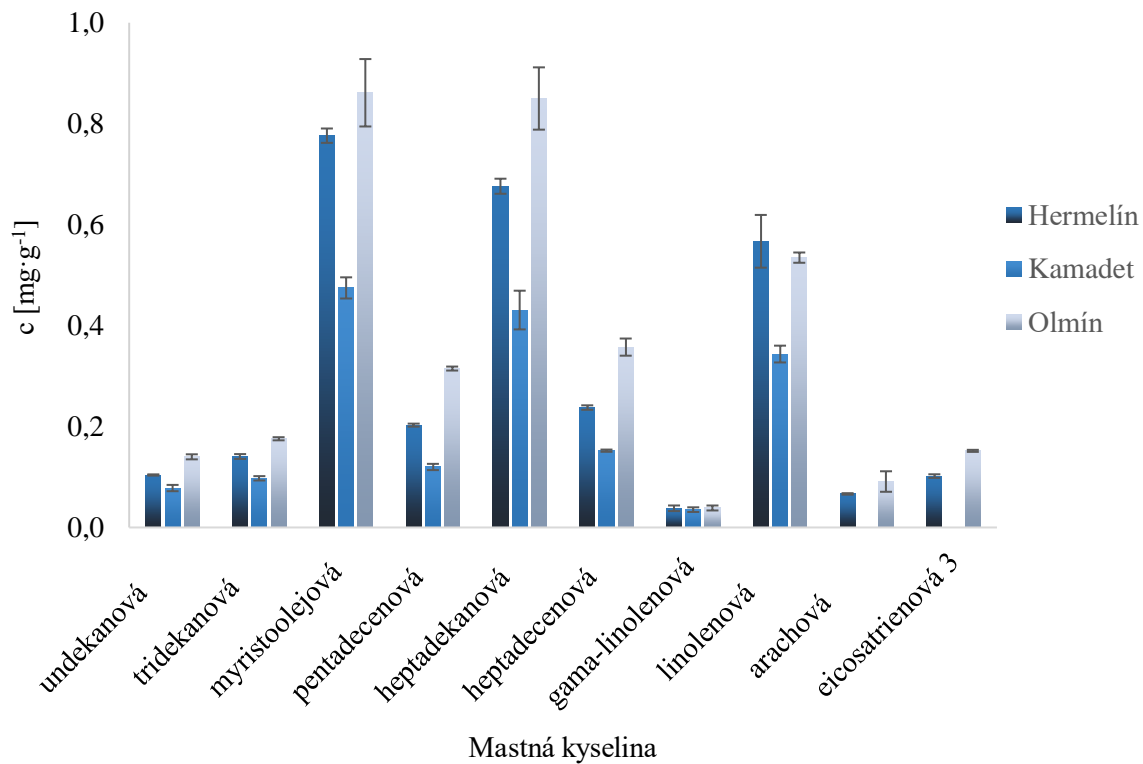
Vznik VMK hydrolyzou z triglyceridů je jednou z nejzásadnějších reakcí při zrání plísňových sýrů. Mléčný tuk se podílí nejen na vytvoření textury, ale také na sýrové chuti a aroma. Vznikají vysoké koncentrace MK s krátkými a středně dlouhými řetězci (C4–C12). Tyto mají nízký práh vnímání a přispívají přímo k výslednému aroma sýrů. MK s dlouhým řetězcem mají vysoký práh vnímání a neovlivňují sensorické vlastnosti [43].

VMK tedy hrají v sýrech důležitou roli, a proto byly v rámci této bakalářské práce pozorovány zvlášť. Graf zobrazený na Obr. 8a–8b porovnává obsah VMK ve vzorcích sýrů. Vzhledem k různým koncentracím jsou opět rozděleny do dvou grafů pro lepší přehlednost podle jejich kvantitativního zastoupení.

Zastoupení VMK bylo obdobné jako v případě vázaných MK, nicméně rozdíly mezi vzorky jsou poněkud odlišné než v případě vázaných MK. Olmín obsahoval nejvíce identifikovaných MK, naopak Kamadet nejméně. Jak již bylo zmíněno, vysoký obsah VMK u sýra Olmín by mohl svědčit o větší prozrálosti, Kamadet je naopak prozrálý nejméně a může být méně sensoricky výrazný.



Obr. 8a: Obsah jednotlivých volných mastných kyselin ve vzorcích (v mg·g⁻¹ tuku).



Obr. 8b: Obsah jednotlivých volných mastných kyselin ve vzorcích (v mg·g⁻¹ tuku).

5 ZÁVĚR

Hlavním cílem této bakalářské práce byla identifikace a kvantifikace VMK a vázaných MK ve vzorcích sýrů s bílou plísní na povrchu. Pro tento experiment byly vybrány tři vzorky komerčních sýrů běžně dostupných v obchodní síti: Hermelín, Kamadet a Olmín.

Mastné kyseliny jsou základní složkou lipidů a mohou se vyskytovat ve formě volné nebo vázané. Pro extrakci lipidů ze vzorků byla použita extrakce směsí rozpouštědel (kombinace nepolárního diethyletheru a petroletheru) podle normované metody ČSN EN ISO 1735:2005. Mastné kyseliny byly následně derivatizovány na methylestery pomocí kyseliny katalyzované esterifikace za přítomnosti bortrifluoridu jako katalyzátoru. Těkavě methylestery byly stanoveny pomocí plynové chromatografie s plamenovou ionizační detekcí.

Ve vybraných vzorcích bylo celkem stanoveno 21 VMK i vázaných MK.

Analyzované sýry jsou stejného typu, české produkce, vyrobené z pasterovaného kravského mléka a stejnými technologickými postupy. Můžeme tak předpokládat pouze nepatrné rozdíly ve složení a obsahu MK. Celkový obsah VMK a vázaných MK ve vzorcích je obdobný, pouze obsah VMK je několikanásobně nižší než obsah vázaných MK. Obecně obsah VMK v sýrech tvoří < 1 % z celkových lipidů, u plísňových sýrů díky výraznější lipolýze může být mírně vyšší. Ve vzorku Olmínu bylo vyšší zastoupení VMK, které lze přisuzovat větší prozrálosti vzorku.

Obsah jednotlivých vázaných MK ve vzorcích byl opět podobný. Nejvíce zastoupené byly kyselina palmitová, olejová, myristová a stearová, nejméně pak MK s vyšším počtem uhlíků jako kyseliny gama-linolenová, arachová, undekanová a *cis*-11,14,17-eicosatrienová. Jelikož obsah tuku je v sýrech srovnatelný, odpovídají výsledky znalostem o složení mléčného tuku, který obsahuje MK s krátkým a středním uhlovodíkovým řetězcem. Výjimku v kvantitativním zastoupení tvořila kyselina heptadekanová, která se vyskytovala v rozdílných koncentracích, nejvíce v Olmínu a kyselina heptadecenová s minimálním obsahem v Kamadetu.

Významnější rozdíly v obsahu MK mezi jednotlivými vzorky byly zaznamenány u VMK. Nejvíce identifikovaných MK obsahoval Olmín, nejméně Kamadet. Vysoký obsah MK byl pravděpodobně způsoben větší prozrálostí sýru, tedy hlubší lipolýzou. O tom svědčí i celkový obsah VMK, který byl u Olmínu nejvyšší.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 1 KADLEC, Pavel, Karel MELZOCH a Michal VOLDŘICH. *Co byste měli vědět o výrobě potravin?: technologie potravin*. Ostrava: Key Publishing, 2009. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-051-4.
- 2 ČEPIČKA, Jaroslav. *Obecná potravinářská technologie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1995. ISBN 80-7080-239-1.
- 3 ZADRAŽIL, Karel. *Mlékařství: (přednášky)*. Praha: ISV, 2002. Živočišná výroba (Česká zemědělská univerzita). ISBN 80-86642-15-1.
- 4 JANŠTOVÁ, Bohumíra. *Technologie mléka a mléčných výrobků*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2012. ISBN 978-80-7305-635-3.
- 5 IBURG, Anne. *Lexikon sýrů: výroba, původ, druhy, chuť*. Čestlice: Rebo Productions CZ, 2004. ISBN 80-7234-379-3.
- 6 HUPPERTZ, T., P.F. FOX a A.L. KELLY. The caseins: Structure, stability, and functionality. *Proteins in Food Processing* [online]. Elsevier, 2018, 2018, s. 49-92 [cit. 2018-04-29]. DOI: 10.1016/B978-0-08-100722-8.00004-8. ISBN 9780081007228. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081007228000048>
- 7 KILARA, A. a M.N. VAGHELA. Whey proteins. *Proteins in Food Processing*[online]. Elsevier, 2018, 2018, s. 93-126 [cit. 2018-05-14]. DOI: 10.1016/B978-0-08-100722-8.00005-X. ISBN 9780081007228. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978008100722800005X>
- 8 ŠEBELA, František, Bohumil DUŠEK a Jiří PAVEL. *Mlékařství*. Vyd.1. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1964
- 9 SINGH, Harjinder a Sophie GALLIER. Nature's complex emulsion: The fat globules of milk. *Food Hydrocolloids* [online]. 2017, **68**, 81-89 [cit. 2018-04-29]. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2016.10.011. ISSN 0268005X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X16305410>
- 10 PAVELKA, Antonín. *Mléčné výrobky pro vaše zdraví*. Brno: Litera, 1996. ISBN 80-85763-09-5.
- 11 DRDÁK, Milan. *Základy potravinářských technologií: spracovania rastlinných a živočíšnych surovín, cereálne a fermentačné technológie uchovávanie, hygiena a ekológia potravín*. Bratislava: Malé Centrum, 1996, 512 s. ISBN 80-967-0641-1.

- 12 KAMENÍK, Josef, Bohumíra JANŠTOVÁ a Alena SALÁKOVÁ. *Technologie a hygiena potravin živočišného původu*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-722-0.
- 13 KNĚZ, Václav. *Výroba sýrů: určeno technikům a předním dělníkům v podnicích mlékárenského průmyslu a jako učební pomůcka studentům na průmyslové škole mlékárenské a v závodních školách práce*. 2., dopl. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1960. Řada potravinářské literatury.
- 14 DOLEŽÁLEK, Jiří. *Mikrobiologie mlékárenského a tukařského průmyslu: vysokoškolská učebnice pro studium potravinářské technologie*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1962. Řada potravinářské literatury.
- 15 VLKOVÁ, Eva, Vojtěch RADA a Jiří KILLER. *Potravinářská mikrobiologie*. 2. vyd. V Praze: Česká zemědělská univerzita, 2009. ISBN 978-80-213-1988-2.
- 16 MCSWEENEY, Paul L.H. SOUHRN PŘEDNÁŠKY O ZRÁNÍ PŘÍRODNÍCH SÝRŮ přednesený dne 5. září 2013 na Fakultě technologické Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně. In: *Mlékařské listy* [online]. 141. 2013 [cit. 2018-03-25]. ISSN 1212-950X. Dostupné z: http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2013/141_vix.pdf
- 17 DOLEŽÁLEK, Jiří. *Biochemie a technologie plísňových sýrů*. Praha: Ústřední výzkumný ústav potravinářského průmyslu, 1967.
- 18 ŠÍPAL, Zdeněk. *Biochemie*. [1. vyd.]. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1992. ISBN 80-04-21736-2.
- 19 VOET, Donald a Judith G. VOET. *Biochemie*. Přeložil Arnošt KOTYK. Praha: Victoria, 1995. ISBN 80-85605-44-9.
- 20 KLOUDA, Pavel. *Základy biochemie*. 2., přeprac. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2005. ISBN 80-86369-11-0. Dostupné také z: <http://www.digitalniknihovna.cz/mzk/uuid/uuid:77200700-e3cc-11e6-8010-005056827e51>
- 21 KODÍČEK, Milan, Olga VALENTOVÁ a Radovan HYNEK. *Biochemie: chemický pohled na biologický svět*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2015. ISBN 978-80-7080-927-3.
- 22 GARRETT, R. a Charles M. GRISHAM. *Biochemistry*. 5th ed. Belmont, CA: Brooks/Cole, Cengage Learning, 2013. ISBN 978-1-133-10629-6.
- 23 OCHS, Raymond S. *Biochemistry*. Burlington, MA: Jones & Bartlett Learning, c2014. ISBN 978-1-4496-6137-3.

- 24 INNIS, Sheila M. Dietary Triacylglycerol Structure and Its Role in Infant Nutrition. *Advances in Nutrition* [online]. 2011, 2(3), 275-283 [cit. 2018-01-28]. DOI: 10.3945/an.111.000448. ISSN 2156-5376. Dostupné z: <https://academic.oup.com/advances/article/2/3/275/4591488>
- 25 *Lékařská chemie a biochemie: celostátní vysokoškolská učebnice pro studium lékařských fakult v ČSFR, studijní obor všeobecné lékařství, dětské lékařství a hygiena*. [1.,] učebnice. Praha: Avicenum, 1991. Učebnice pro lékařské fakulty. ISBN 80-201-0114-4.
- 26 VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-17-6.
- 27 ODSTRČIL, Jaroslav. *Biochemie*. Vyd. 2., upr. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2005. ISBN 80-7013-425-9. Dostupné také z: <http://www.digitalniknihovna.cz/mzk/uuid/uuid:cabb5600-38d2-11e4-8e0d-005056827e51>
- 28 MATHEWS, Christopher K. *Biochemistry*. 4th ed. Toronto: Pearson, c2013. ISBN 978-0-13-800464-4.
- 29 DOSTÁL, Jiří. *Biochemie: pro posluchače bakalářských oborů*. Brno: Masarykova univerzita, 2009. ISBN 978-80-210-5020-4.
- 30 DE JONG, Catrienus a Herman T. BADINGS. Determination of free fatty acids in milk and cheese procedures for extraction, clean up, and capillary gas chromatographic analysis. *Journal of High Resolution Chromatography* [online]. 1990, 13(2), 94-98 [cit. 2018-01-28]. DOI: 10.1002/jhrc.1240130204. ISSN 0935-6304. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jhrc.1240130204>
- 31 KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Třetí, upravené vydání. Ostrava: Pavel Klouda – nakladatelství Pavko, 2016. ISBN 978-80-86369-22-8.
- 32 ČÁSLAVSKÝ, Josef a Jiří Georg Kamil ŠEVČÍK. *Analýza organických látek: učební text projektu "Příprava kurzů a učebních textů v oboru vzorkování a chemické analýzy": modul K02-2014*. Český Těšín: 2 THETA, 2014. Analytical standards and equipment. ISBN 978-80-260-7085-6.
- 33 MANNION, David T, Ambrose FUREY a Kieran N KILCAWLEY. Free fatty acids quantification in dairy products. *Society of Dairy Technology* [online]. 2016, 2016(69) [cit. 2018-01-28]. DOI: 10.1111/1471-0307.12301. ISSN 1471-0307. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1471-0307.12301/pdf>

- 34 KISELEV, Andrej Vladimirovič a Jakov Ivanovič JAŠIN. *Adsorpční plynová a kapalinová chromatografie*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1988. Moderní metody v chemické laboratoři.
- 35 JUÁREZ, M., M. A. DE LA FUENTE a J. FONTECHA. Improved gas chromatographic method for the determination of the individual free fatty acids in cheese using a capillary column and a PTV injector. *Chromatographia* [online]. 1992, 33(7-8), 351-355 [cit. 2018-01-28]. DOI: 10.1007/BF02275917. ISSN 0009-5893. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02275917>
- 36 BRAVI, Elisabetta, Giuseppe PERRETTI a Luigi MONTANARI. Fatty acids by high-performance liquid chromatography and evaporative light-scattering detector. *Journal of Chromatography A* [online]. 2006, 1134(1-2), 210-214 [cit. 2018-01-28]. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.09.007. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967306017225>
- 37 CHAKRABARTY, M. M., D. BHATTACHARYYA a M. K. KUNDU. A simple photometric method for microdetermination of fatty acids in lipids. *Journal of the American Oil Chemists' Society* [online]. 1969, 46(9), 473-475 [cit. 2018-01-28]. DOI: 10.1007/BF02544370. ISSN 0003021X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1007/BF02544370>
- 38 MACKENZIE, ROBERT D., THOMAS R. BLOHM, EDWARD M AUXIER a ANDREW C. LUTHER. Rapid colorimetric micromethod for free fatty acids. *The Journal of Lipid Research* [online]. 1967, (8), 589-597 [cit. 2018-01-28]. ISSN 1539-7262. Dostupné z: <http://www.jlr.org/content/8/6/589.full.pdf+html>
- 39 DE OLIVEIRA, Marcone A. L., Brenda L. S. PORTO, Carina DE A. BASTOS, et al. Analysis of amino acids, proteins, carbohydrates and lipids in food by capillary electromigration methods: a review. *Analytical Methods* [online]. 2016, 8(18), 3649-3680 [cit. 2018-04-29]. DOI: 10.1039/C5AY02736E. ISSN 1759-9660. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5AY02736E>
- 40 BASS, Arnošt, NOHÁČ, Luboš, ed. *Přehled moderních metod analytiky mastných kyselin a glyceridů*. Praha: Průmyslové vydavatelství, 1950. Knižnice průmyslu výživy.
- 41 CORONGIU, Francesco P. a Sebastiano BANNI. [30] Detection of conjugated dienes by second derivative ultraviolet spectrophotometry. *Oxygen Radicals in Biological Systems Part C* [online]. Elsevier, 1994, 1994, s. 303-310 [cit. 2018-04-29]. *Methods in Enzymology*. DOI: 10.1016/S0076-6879(94)33033-6. ISBN 9780121821340. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687994330336>

- 42 SIKORSKI, Zdzisław E. a Anna KOŁAKOWSKA. *Chemical and functional properties of food lipids*. Boca Raton, Fla.: CRC Press, c2003. ISBN 1587161052.
- 43 CURIONI, P.M.G. a J.O. BOSSET. Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *International Dairy Journal*[online]. 2002, **12**(12), 959-984 [cit. 2018-05-14]. DOI: 10.1016/S0958-6946(02)00124-3. ISSN 09586946. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694602001243>

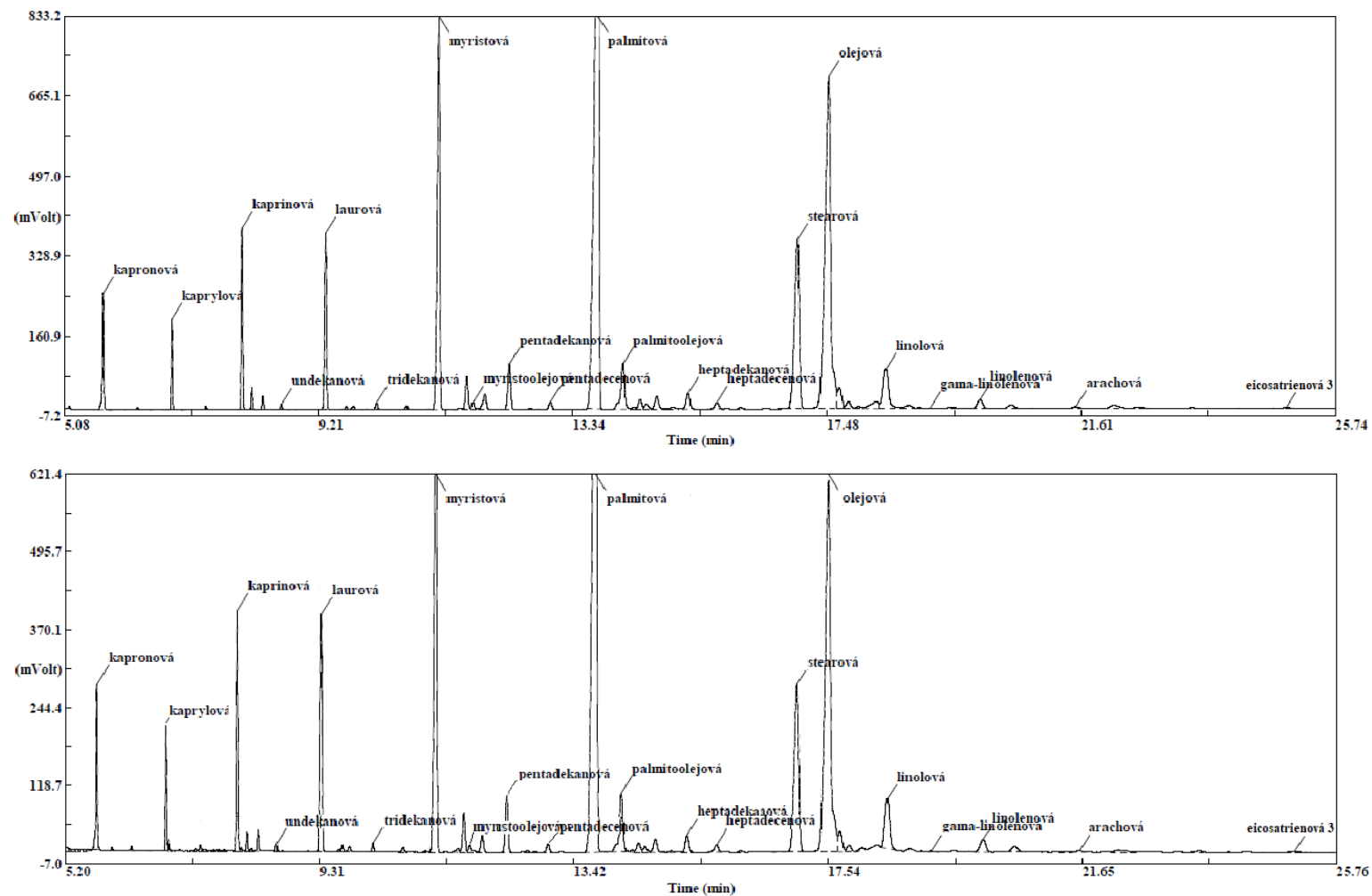
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

| | |
|--------|---|
| MK | mastné kyseliny |
| SAFA | nasycené mastné kyseliny |
| MUFA | mono-nenasycené mastné kyseliny |
| PUFA | poly-nenasycené mastné kyseliny |
| TAG | triacylglyceroly |
| VMK | volné mastné kyseliny |
| MEMK | methylestery mastných kyselin |
| FID | plamenový ionizační detektor |
| GC | plynová chromatografie |
| GC-FID | plynová chromatografie s plamenovou ionizační detekcí |
| ELSD | aerosolový detektor rozptylu světla |

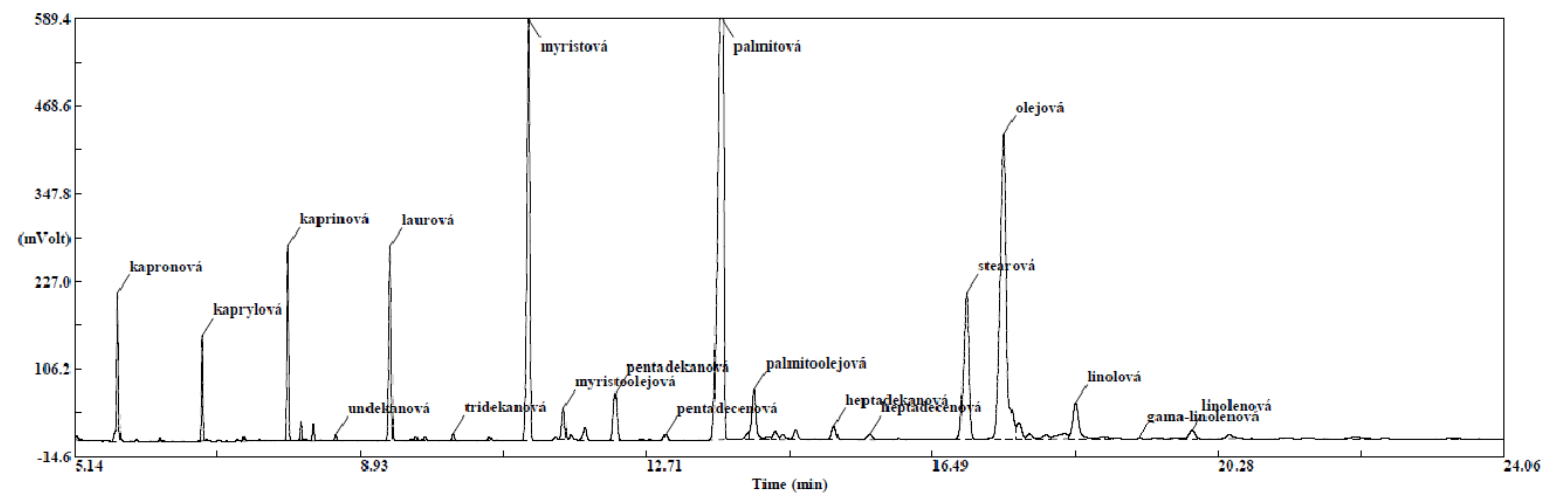
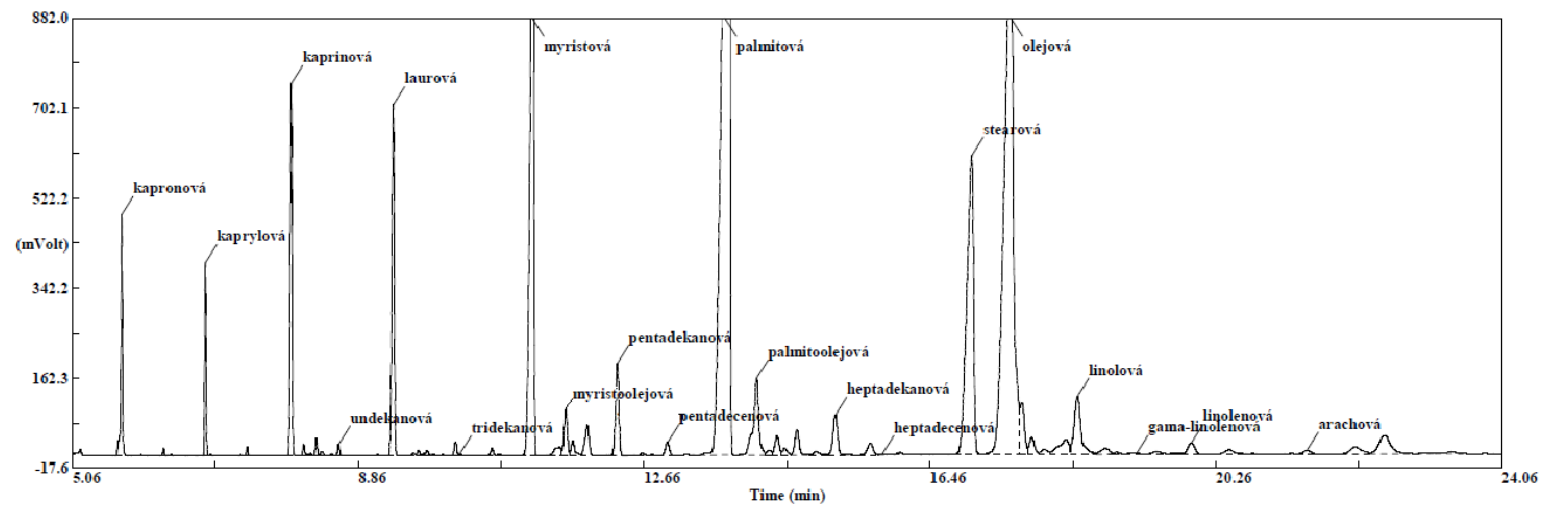
8 SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha 1 Chromatogram vázaných mastných kyselin (nahore) a volných mastných kyselin (dole) ve vzorku Hermelínu
- Příloha 2 Chromatogram vázaných mastných kyselin (nahore) a volných mastných kyselin (dole) ve vzorku Kamadetu
- Příloha 3 Chromatogram vázaných mastných kyselin (nahore) a volných mastných kyselin (dole) ve vzorku Olmínu

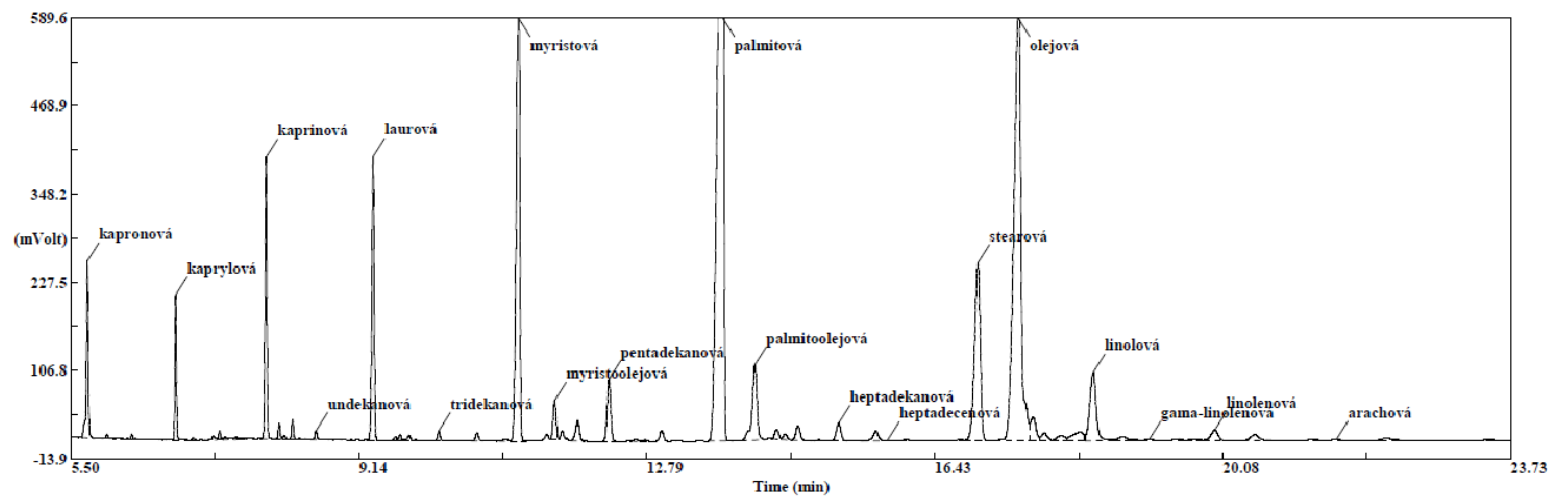
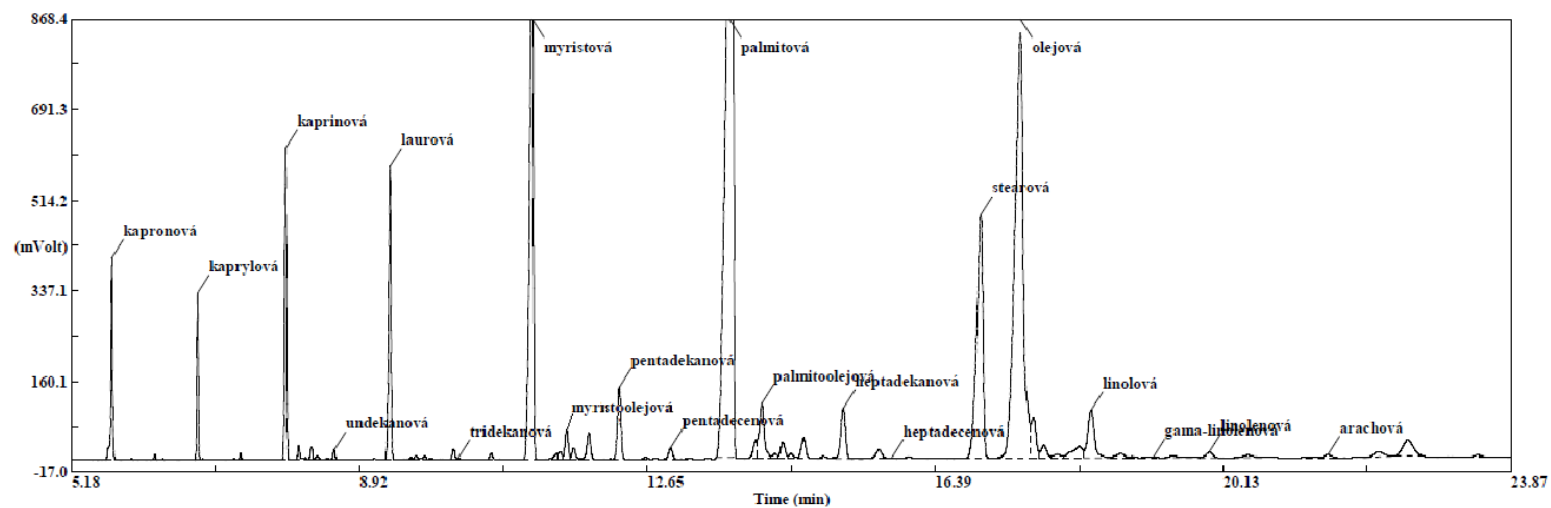
9 PŘÍLOHY



Příl. 1 Chromatogram vázaných mastných kyselin (nahore) a volných mastných kyselin (dole) ve vzorku Hermelínu



Příl. 2 Chromatogram vázaných mastných kyselin (nahore) a volných mastných kyselin (dole) ve vzorku Kamadetu



Příl. 3 Chromatogram vázaných mastných kyselin (nahore) a volných mastných kyselin (dole) ve vzorku Olminu