

Sledování úbytku laktózy při výrobě a zrání přírodního sýra pomocí HPLC-RI

Bc. Adéla Jarošová

Diplomová práce
2016



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav analýzy a chemie potravin

akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Adéla Jarošová**
Osobní číslo: **T13562**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie potravin**
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Sledování úbytku laktózy při výrobě a zrání přírodního sýra pomocí HPLC-RI**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakterizujte přírodní sýry holandského typu
2. Popište metabolismus laktózy a změny, ke kterým dochází při výrobě a zrání sýrů
3. Charakterizujte možnosti stanovení sacharidů pomocí HPLC-RI v sýrech

II. Praktická část

1. Navrhněte extrakční postup pro analýzu monosacharidů v přírodních sýrech holandského typu
2. Vytvořte přírodní sýr holandského typu s různým obsahem tuku a s rozdílnými sýrařskými kulturami
3. Sledujte změny obsahu laktózy v jednotlivých fázích výroby přírodního sýra holandského typu a v průběhu jeho zrání pomocí HPLC-RI
4. Vyhodnoťte vliv obsahu tuku a vliv různých sýrařských kultur na změny laktózy
5. Získané výsledky statisticky vyhodnoťte a diskutujte s odbornou literaturou

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

McSWEENEY Paul. Biochemistry of cheese ripening. International Journal of Dairy Technology, 2004, 57, 127144. ISSN 1471-0307

LUZ SANS María a Isabel MARTÍNEZ-CASTRO. Recent developments in sample preparation for chromatographic analysis of carbohydrates. Journal of Chromatography A, 2007, 1153, 7489. ISSN 0021-9673

FOX, P.F., T.P. GUINEE, T.M. COGAN a P.L.H. McSWEENEY. Fundamentals of Cheese Science. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000. ISBN 978-0-8342-1260-9

HUI Y.H. Dairy Science and Technology Handbook. New York: John Wiley & Sons, 1993. ISBN 1-56081-078-5

PERIS-TORTAJADA Miguel. HPLC determination of carbohydrates in food. In: NOLLET Leo M.L. a Fidel TOLDRÁ, eds. Food Analysis by HPLC, Third Edition. Boca Raton: CRC Press, 2013, s. 233252. ISBN 978-1-4398-3084-0

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Zuzana Bubelová, Ph.D.

Ústav technologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

20. ledna 2016

Termín odevzdání diplomové práce:

29. dubna 2016

Ve Zlíně dne 20. ledna 2016



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



Ing. Jiří Mlček, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně

.....

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá problematikou laktózy a jejího úbytku v různých krocích výroby a v průběhu zrání přírodních sýrů holandského typu. Byly vyrobeny 4 různé modelové vzorky přírodních sýrů holandského typu o dvou různých tučnostech a za použití 2 sýrařských kultur s odlišným složením. U těchto vzorků byl zkoumán vliv tučnosti sýrů a použití různých sýrařských kultur na změny v obsahu laktózy během výroby a na začátku zrání těchto sýrů. Ke sledování obsahu laktózy byla zvolena metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s refraktometrickou detekcí. Dále byla sledována hodnota pH, titrační kyselost a obsah sušiny.

Aktivní kyselost v průběhu výroby a na počátku zrání sýrů klesala, titrační kyselost naopak stoupala, což odpovídá postupnému okyselování způsobenému odbouráváním laktózy na kyselinu mléčnou, což potvrdily i výsledky stanovení obsahu laktózy, kdy v průběhu výroby a za prvních 48 hodin zrání došlo k úbytku laktózy, až na množství, které je zvolenou metodou nedetekovatelné. Obsah sušiny v sýrech se zvyšoval, což odpovídá odstranění syrovátky lisováním a vysychání sýrů během prokysávání a na počátku zrání. Tučnost sýra průběh fermentace laktózy nijak výrazně neovlivnila. Naproti tomu kultura CHN-22 fermentovala laktózu rychleji, než kultura Flora Danica.

Klíčová slova: laktóza, přírodní sýr holandského typu, sýrařská kultura, tučnost, HPLC- RI

ABSTRACT

This thesis deals with the lactose and its decrease in various stages of production and during maturation of natural Dutch type cheeses. There were produced four different model samples of natural Dutch type cheese with two different fat contents using two cheese cultures with different composition. For these samples, the influence of fat content and cheese cultures on changes in the content of lactose during production and early maturation, was examined. High performance liquid chromatography method with refractive index detection was used to determine the lactose content. Furthermore, pH, titratable acidity and dry matter content were observed.

The active acidity during the production and at the beginning of maturation of cheese decreased. Conversely, titratable acidity increased, corresponding to the gradual acidification caused by the fermentation of lactose, which was confirmed by the results of the determination of lactose: during production and for the first 48 hours of aging the amount of lactose was decreased to an amount which is undetectable by the chosen method. Dry matter content of the cheese increased which corresponds with the removal of the whey by pressing and drying of the cheese during fermentation and early maturation. Fat content of cheeses did not significantly affect the fermentation of lactose. In contrast, CHN-22 culture fermented lactose faster than Flora Danica culture.

Keywords: lactose, natural Dutch type cheese, cheese culture, fat content, HPLC-RI

Děkuji vedoucí práce Ing. Zuzaně Bubelové, Ph. D. za odborné vedení, pomoc, konzultace, cenné rady a připomínky k mé diplomové práci. Mé poděkování dále patří doc. Ing. Vendule Pachlové, Ph. D. a Ing. Ludmile Zálešákové za pomoc při vypracovávání praktické části diplomové práce.

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

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 SÝRY HOLANDSKÉHO TYPU	13
1.1 VÝROBA SÝRŮ HOLANDSKÉHO TYPU	13
1.1.1 Výběr mléka	13
1.1.2 Tepelné ošetření mléka	14
1.1.3 Úprava mléka	14
1.1.4 Sýření mléka.....	15
1.1.5 Zpracování sýřeniny	16
1.1.6 Formování a lisování sýrů	18
1.1.7 Solení.....	18
1.1.8 Zrání	19
2 LAKTÓZA	22
2.1 STRUKTURA A VLASTNOSTI LAKTÓZY	22
2.2 METABOLIZMUS LAKTÓZY	23
2.3 METABOLIZMUS KYSELINY MLÉČNÉ.....	24
3 METODY STANOVENÍ LAKTÓZY	26
3.1 ÚPRAVA VZORKŮ PŘED STANOVENÍM.....	26
3.1.1 Izolace laktózy z mléčných výrobků.....	26
3.1.2 Způsoby čiření extraktů.....	26
3.2 MOŽNOSTI STANOVENÍ LAKTÓZY	27
3.2.1 Stanovení laktózy polarimetricky	27
3.2.2 Stanovení laktózy oxidoredukční titrací.....	28
3.2.3 Stanovení laktózy spektrofotometricky.....	28
3.2.4 Stanovení laktózy gravimetricky.....	29
3.2.5 Stanovení laktózy kolorimetricky	29
3.2.6 Stanovení laktózy enzymaticky.....	29
3.2.7 Stanovení laktózy chromatograficky.....	29
3.2.7.1 Stanovení laktózy plynovou chromatografií.....	29
3.2.7.2 Stanovení laktózy vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.....	30
4 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE	31
II PRAKTICKÁ ČÁST	35
5 CÍL PRÁCE	36
6 MATERIÁL A METODY	37
6.1 MATERIÁL.....	37
6.2 VÝROBA SÝRŮ.....	37
6.2.1 Příprava před výrobou.....	37
6.2.2 Základní ošetření a úprava mléka	38
6.2.3 Sýření mléka a zpracování sýřeniny	38
6.2.4 Solení a balení sýrů	39
6.3 ANALÝZA VZORKŮ	39
7 VÝSLEDKY A DISKUZE	42

7.1	AKTIVNÍ KYSELOST	43
7.2	TITRAČNÍ KYSELOST.....	45
7.3	SUŠINA	46
7.4	LAKTÓZA	48
ZÁVĚR		52
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....		54
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK		60
SEZNAM OBRÁZKŮ		61
SEZNAM TABULEK.....		62

ÚVOD

Přírodní sýry holandského typu, jejichž nejběžnějšími zástupci jsou Eidam a Gouda, tvoří důležitou složku potravy člověka a mají vysokou nutriční hodnotu. Mají vysoký obsah bílkovin, minerálních látek – zejména vápník a vitamínů. Spotřeba sýrů v České republice roste a vyrovnává se spotřebě v Evropské unii, která se pohybuje v průměru okolo 17 kg na osobu ročně. Nejvyšší spotřeby sýrů v Evropské unii dosahuje Řecko a činí 31 kg na osobu ročně.

Laktóza nebo-li mléčný cukr je hlavním sacharidem mléka u všech savců. Jedná se o disacharid, jehož hlavními složkami jsou glukóza a galaktóza, spojené β -(1 \rightarrow 4) glykosidickou vazbou. Během zrání sýrů dochází k fermentaci laktózy prostřednictvím bakterií mléčného kvašení za vzniku kyseliny mléčné, která je prekurzorem pro vznik sensoricky aktivních látek, které dávají sýrům typickou chuť a vůni. Laktóza je štěpena enzymem β -galaktozidázou.

Množství laktózy v sýrech lze stanovit různými metodami, např. lze využít polarimetrii, spektrofotometrii, refraktometrii, chromatografii a různé chemické metody. Spolehlivou metodou pro stanovení laktózy je metoda HPLC za použití refraktometrické detekce.

V teoretické části se diplomová práce zabývá charakteristikou a výrobou sýrů holandského typu, strukturou a metabolismem laktózy. Dále je v práci popsána úprava vzorků před stanovením laktózy a samotné možnosti stanovení laktózy, kde je detailněji popsána metoda HPLC s refraktometrickou detekcí. Praktická část diplomové práce spočívala ve výrobě přírodních sýrů holandského typu o dvou různých tučnostech a za použití dvou různých sýrařských kultur a následném sledování úbytku laktózy v průběhu výroby a zrání těchto sýrů. Cílem práce bylo zkoumat vliv použitých sýrařských kultur a tučnosti sýrů na změny laktózy během výroby a zrání sýrů přírodních sýrů holandského typu.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 SÝRY HOLANDSKÉHO TYPU

Dle vyhlášky Ministerstva zemědělství 77/2003 Sb. v platném znění je sýr definován jako mléčný výrobek vyrobený vysrážením mléčné bílkoviny z mléka působením syřidla nebo jiných vhodných koagulačních činidel, prokysáním a oddělením podílu syrovátky [1].

Přírodní sýry lze rozdělit podle zmíněné vyhlášky dle konzistence ve vztahu k obsahu vody v tukuprosté hmotě sýra na extra tvrdé, tvrdé, polotvrdé, poloměkké a měkké. Podle způsobu srážení mléka lze přírodní sýry rozdělit na sýry sladké srážené syřidlem a sýry kyselé srážené sníženým pH k izoelektrickému bodu [1,2]. Většina sýrů patří mezi sýry sladké, ke kyselým sýrům řadíme např. Olomoucké tvarůžky, případně tvarohy, které v ČR tvoří samostatnou skupinu, zatímco ve světě se řadí mezi kyselé sýry. Vyrábí se také sýry, u kterých se uplatňuje sladké i kyselé srážení.

Podle obsahu tuku v sušině dělíme sýry na vysokotučné (min. 60 % t.v.s.), plnotučné (min. 45 % t.v.s.), polotučné (min. 25 % t.v.s.), nízkotučné (min. 10 % t.v.s.) a odtučněné (méně než 10 % t.v.s.). Dle zrání se přírodní sýry rozdělují do těchto kategorií: sýr nezrající čerstvý, sýr nezrající termizovaný, sýr zrající na povrchu, sýr zrající s mazem na povrchu, sýr zrající v celé hmotě, plísňový sýr s tvorbou charakteristické plísně na povrchu, plísňový sýr s tvorbou charakteristické plísně uvnitř hmoty a dvouplísňový sýr [1].

Sýry holandského typu jsou polotvrdé, případně tvrdé přírodní zrající sýry vyráběné z kravského mléka sladkým srážením pomocí syřidel. Většinou se jedná o sýry s obsahem tuku v sušině okolo 45 %, specifikem českého trhu jsou méně tučné sýry, s obsahem tuku v sušině 30 %, případně i méně [3].

Hlavními zástupci sýrů holandského typu jsou Edam/Eidam a Gouda. Nejznámějším českým zástupcem je Eidamská cihla, případně Eidamský blok [4].

1.1 Výroba sýrů holandského typu

Výroba všech druhů přírodních sýrů zahrnuje obvykle podobné kroky. Modifikací jednotlivých kroků se získá produkt požadovaných vlastností. Pro sýry holandského typu je typické praní sýrového zrna a dohřívání při nízké teplotě [2].

1.1.1 Výběr mléka

Pro výrobu sýrů je důležitá mikrobiologická jakost výchozí suroviny, kravského mléka. Dalším ukazatelem kvality mléka je počet somatických buněk. Mléko nesmí obsahovat

rezidua antibiotik, která inhibují bakteriální kultury. Obsah volných mastných kyselin v mléce způsobuje nežádoucí chuťové vady hotového sýru. Složení sýru je ovlivněno složením mléka použitého na jeho výrobu, zejména obsahem tuku, bílkovin, vápníku a pH mléka [2,5].

1.1.2 Tepelné ošetření mléka

Tepelné ošetření mléka se provádí za účelem zajištění zdravotní nezávadnosti snížením počtu patogenních mikroorganismů a technologicky nežádoucích mikroorganismů, které mohou negativně ovlivňovat výrobní proces a mohou být také původci vad výrobných sýrů. Pasterační záhřev také prodlužuje trvanlivost sýrů. Používá se šetrná pasterace při teplotě 72 °C po dobu 15 s [5]. Vysokou pasterací (85 °C několik sekund) dochází ke zvýšené denaturaci syrovátkových bílkovin, která způsobuje větší vazbu vody, snížení sušiny a zhoršení jakosti sýru. Albumin a globulin zadržují více vody, kterou nelze následnými technologickými operacemi odstranit. Proto nelze použít vysokou pasteraci [3,6,7,8].

K posouzení účinnosti pasterace se používá pasterační efekt PE (%).

$$PE = \frac{CPM_0 - CPM_P}{CPM_0} * 100$$

Kde CPM_0 je počet mikroorganismů před pasterací a CPM_P je počet mikroorganismů po pasteraci. Legislativní předpisy vyžadují, aby mléko bezprostředně po provedení pasterace vykazovalo negativní test na alkalickou fosfatázu [9].

1.1.3 Úprava mléka

Obsah tuku a bílkovin v sýru je dán výrobním protokolem. Jejich vzájemný poměr je regulován standardizací mléka smísením smetany či plnotučného mléka a odstředěného mléka na požadovanou tučnost. Obsah bílkovin se ve mléce zvyšuje pomocí membránových separačních procesů – ultrafiltrací. Během tepelného ošetření se mění rozpustný vápník na nerozpustný. Vápník je důležitý pro průběh koagulační fáze. Jeho nedostatek zhoršuje reologické vlastnosti gelu a způsobuje problémy s odtékáním syrovátky. Obsah vápníku se upravuje přidávkem chloridu vápenatého, který slouží k „obnovení“ syřitelnosti mléka. Hodnota pH mléka se standardizuje přidávkem glukono-delta laktonu [2,5]. Dále se do mléka přidávají bakterie mléčného kvašení, které jsou důležité pro fermentaci laktózy na kyselinu mléčnou a snížení pH. Jako bakterie mléčného kvašení se označuje obsáhlá morfologicky heterogenní skupina fermentujících mikroorganismů, které jsou vybaveny

intracelulárními a extracelulárními enzymy. Z intracelulárních enzymů obsahují zejména peptidázy, lipázy a enzymy katabolizující aminokyseliny. Z extracelulárních enzymů jsou to např. endopeptidázy. Všechny tyto enzymy jsou důležité při zrání sýrů a podílí se na vývoji sensoricky aktivních látek. Bakterie mléčného kvašení se v sýru množí, ale současně dochází k jejich úbytku. Zrání sýrů je ovlivňováno autolýzou buněk bakterií mléčného kvašení uvolněním vnitřního obsahu buňky a aktivních intracelulárních enzymů do prostředí sýra [30]. Bakterie mléčného kvašení se dělí na obligátně homofermentativní (rod *Pediococcus*, *Lactococcus*), obligátně heterofermentativní (*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Lactobacillus brevis*) a fakultativně heterofermentativní (*Lactobacillus casei* subsp. *casei*). Dle optimální teploty lze bakterie mléčného kvašení rozdělit na mezofilní s optimální teplotou 30 °C (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) a termofilní, jejichž optimální teplota růstu je 40 – 52 °C (např. *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus helveticus*) [10,11,12,13,14].

Při výrobě sýrů se do mléka přidává dusičnan draselný, který působí jako ochrana před duřením sýrů, které je způsobeno koliformními bakteriemi a bakteriemi máselného kvašení [3,7].

Pro zlepšení barvy je povoleno přidávat sýrařská barviva jako je annatto, karoten, bixin, norbixin a paprikový extrakt. Musí být dodrženo nejvyšší povolené množství přídavku těchto barviv. [15].

1.1.4 Sýření mléka

Přeměna mléka na sýřeninu spočívá ve dvou základních krocích: acidifikaci a koagulaci. Acidifikace se provádí kyselinou mléčnou, která vzniká fermentací mléčného cukru laktózy prostřednictvím bakterií mléčného kvašení. Snížení pH brání rozvoji nežádoucí mikroflóry a podílí se na také na konzervaci. Důležitým krokem při výrobě všech sýrů je koagulace mléčné bílkoviny kaseinu na gel. Při výrobě sýrů holandského typu dochází ke koagulaci mléčných bílkovin pomocí syřidla. κ -kasein se nachází na povrchu kaseinové micely. Působí jako ochrana ostatních kaseinových frakcí citlivých na přítomnost vápenatých iontů. První fází je koagulace prostřednictvím enzymového štěpení peptidové vazby v κ -kaseinové frakci mezi 105. (fenylalaninem) a 106. aminokyselinou (metioninem) za vzniku hydrofóbního para- κ -kaseinu a hydrofilního glykomakropeptidu [3].

Vzniklý hydrofobní para- κ -kasein zůstává součástí koagulátu. Glykomakropeptid odchází spolu se syrovátkou. Sekundární fází je koagulační fáze, během které se tvoří trojrozměrný gel vyplněný syrovátkou. Již v této fázi dochází k synerezi, což je uvolnění syrovátky způsobené smršťováním koagulátu. Synereze dále pokračuje během zpracování sýřeniny [2].

Terciální fáze může probíhat v průběhu následného zpracování sýřeniny a zrání sýrů. Tato fáze přímo nesouvisí s koagulací. V průběhu terciální fáze vznikají hořké peptidy rozkladem α - a β -kaseinu. Jedná se o nežádoucí působení enzymů syřidla [3,5,16].

Průběh sladkého srážení ovlivňuje zejména teplota mléka, která musí být nad 15 °C, aby sladké srážení proběhlo. Nižší teplota inhibuje sekundární fázi srážení. Srážení také ovlivňuje obsah vápenatých iontů. Jejich rostoucí koncentrace zvyšuje rychlost sladkého srážení. Na rychlost srážení má dále vliv hodnota pH mléka. Jeho mírné snížení, způsobené fermentací laktózy na kyselinu mléčnou bakteriemi mléčného kvašení, urychluje proces srážení [10,16].

Nejdůležitějším syřidlem je enzym chymozin, který se klasicky extrahuje z telecích žaludků. Kvůli nedostatku této suroviny se používají mikrobiální, rostlinné nebo živočišné preparáty s podobným účinkem. Ze syřidel mikrobiálního původu se používají izoláty z plísní *Rhizomucor miehei* a *Cryphoctria parasitica*. Ze syřidel živočišného původu se využívá pepsin, případně v kombinaci s chymozinem. K rostlinným syřidlům patří enzymy z některých rostlin (např. artyčok zeleninový, artyčok kardový, ostropestřec mariánský, ananas pravý a fíkovník) [3,17,18,19].

Syřidlo se přidává ve formě zředěného roztoku, aby bylo možné dobře promíchat syřidlo v celém objemu mléka. Teplota mléka se před jeho přidáním upravuje na 30 – 33 °C. Mléko po zasažení je ponecháno v klidu a dochází k samotnému srážení [3].

1.1.5 Zpracování sýřeniny

Zpracování sýřeniny zahrnuje operace jako je krájení a drobení, míchání, odpouštění syrovátky a praní sýrového zrna. Tyto operace slouží k oddělení potřebného množství syrovátky ze sýřeniny (synereze) a k tvorbě sýrového zrna. Během zpracování sýřeniny dochází k vytužování vytvořeného sýrového zrna [3,20,21].

Mezi faktory, které ovlivňují synerezi, patří pasterační teplota, teplota sýření, obsah bílkovin a velikost zpracovaného sýrařského zrna. Použití vyšších pasteračních teplot zvyšuje stupeň denaturace sérových bílkovin, což způsobuje větší vazbu vody v sýřenině. Vyšší

teplota sýření, vyšší obsah bílkovin a menší velikost sýrařského zrna způsobí rychlejší synerezi. Horší synerezi způsobuje použití vyšších pasteračních teplot, nízká teplota sýření a vyšší obsah tuku [11,22].

První operací je krájení sýřeniny, které se provádí po dosažení optimální tuhosti gelu. Ke krájení se používají kovové rámy vyplněné podélnými a svislými kovovými noži, tzv. sýrařské harfy. První prokrojení musí být provedeno opatrně, aby se zamezilo mechanickému rozbití gelu a uvolnění tzv. sýrového prachu, což jsou drobné částice sýřeniny, které odcházejí spolu se syrovátkou. Je nutné také zabránit slepování a sedimentaci zrna [5,6,7].

Během drobení, což je další zmenšování již pokrájeného zrna, se tvoří zárodky zrn, které se dalším zpracováním zmenšují na požadovanou velikost. K drobení zrna dochází hned poté, co se na řezných plochách sýřeniny objeví syrovátka. Typ vyráběného sýra a jeho požadovaná sušina udává velikost a tuhost sýrového zrna. Při výrobě sýrů holandského typu se zrno zpracovává spíše na menší velikost a větší tuhost [5,6,8,23,24].

Po krájení a drobení následuje míchání, které podporuje další odstraňování syrovátky a tvorbu kompaktnějšího sýrového zrna. V počáteční fázi je zrno křehké, proto se musí míchání provádět šetrně [3,25].

Po získání sýrového zrna požadované velikosti se provádí odpouštění části syrovátky přes síto syrovátkovým potrubím. Odpouštění syrovátky by mělo být rychlé, aby nedocházelo ke slepování sýrového zrna. Objem odpuštěné syrovátky je liší dle typu vyráběného sýra [3].

Po odpuštění požadovaného množství syrovátky následuje vytužování zrna, kdy se sýřenina míchá (u sýrů holandského typu několik desítek minut) a praní sýrového zrna přidavkem teplé vody, která současně snižuje obsah laktózy v zrně a dohřívá jej na teplotu dosoušení. Úpravou koncentrace laktózy se sníží pH na 5,2 až 5,4, jinak by pH klesalo na ještě nižší hodnoty [3].

Zároveň s praním zrna probíhá i dohřívání, což je zvýšení teploty, z teploty sýřící na teplotu dosoušecí, které se provádí za stálého míchání. Dosoušecí teplota se u tzv. nízkodohříváných sýrů (mezi které řadíme sýry holandského typu) pohybuje v rozmezí 36 – 42 °C podle požadované tučnosti sýra. Dohřívání se u sýrů holandského typu provádí přidavkem prací vody o teplotě 60 – 90 °C. Důležitý je tzv. prací poměr – tedy poměr odpuštěné syrovátky a množství přidané prací vody [3].

Dohřívání sýrového zrna zajišťuje rozvoj termofilních mikroorganismů a zvyšuje tuhost sýrového zrna. Prudké dohřívání může způsobit uzavření povrchové vrstvy zrna a tím uzavření většího množství syrovátky zadržené uvnitř sýrového zrna. Doba dosoušení se řídí dle požadované sušiny vyráběného sýra, řádově probíhá desítky minut [23,26].

Po získání sýrového zrna požadovaných vlastností následuje vypouštění. Sýrové zrno se buďto čerpá pomocí speciálních čerpadel do tvořitek nebo se vypouští samospádem. Důležité je, aby bylo zrno ponořeno v syrovátce, nesmí během vypouštění osychat. Vypouštění by mělo být prováděno šetrně [6].

1.1.6 Formování a lisování sýrů

Pro formování se používají plastová nebo kovová tvořítka s perforovaným pláštěm pro odtok syrovátky. Tvořítka jsou buď individuální, nebo bloková [7].

V průběhu formování dochází k intenzivnímu rozvoji bakterií mléčného kvašení, které rozkládají laktózu na kyselinu mléčnou. Během lisování musí být zajištěna stabilní teplota. Pokles teploty zastaví činnost bakterií mléčného kvašení, které se uplatňují v následujících technologických krocích, zejména se podílí na zrání sýrů. Při výrobě tvrdých sýrů není samovolný odtok syrovátky dostatečný, proto se používá mechanické lisování, které zajistí rychlé spojení sýrového zrna a hladký povrch sýra. Vyšší síla zajistí těsnější spojení zrn, větší odvodnění sýrového zrna, pravidelný tvar sýra a vytvoření pevné a uzavřené pokožky na povrchu sýra. Lisovací tlak je postupně zvyšován. Rychlé zvýšení tlaku by způsobilo uzavření povrchu sýra, čímž by se zamezilo dalšímu odtoku syrovátky. Lisování je proces, při kterém dochází k tvarování sýrů. Doba lisování se řídí podle typu a velikosti vyráběného sýra. Používá se tlak 25 – 55 kPa [2,3,6,8,27,28].

1.1.7 Solení

Dalším krokem po lisování je solení. Tento krok je hlavním činitelem, který ovlivňuje vodní aktivitu sýrů a tím růst bakterií. Sůl inhibuje nežádoucí mikroflóru a zpomaluje činnost bakterií mléčného kvašení. Sůl má také vliv na aktivitu enzymů, které řídí biochemické změny v průběhu kysání a zrání sýrů [5]. Solení ovlivňuje organoleptické vlastnosti sýrů a usnadňuje další uvolnění syrovátky způsobené zvýšeným osmotickým tlakem. Dále sůl ovlivňuje konzistenci a povrch sýra [3,5,8,16].

Obsah soli v různých typech sýrů je odlišný. U sýrů holandského typu se množství soli pohybuje v rozmezí 1,5 – 3,0 %. Solení se provádí nejčastěji v solných lázních ponořením sýrů do roztoku NaCl [6]. Používají se solné lázně s obsahem 18 – 22 % NaCl [7,27].

Teplota solení se pohybuje v rozmezí 10 – 15 °C. Doba solení se řídí tvarem, velikostí a požadovaným obsahem soli u hotového sýra. Rychlost solení závisí na koncentračním spádu, který je nejvyšší na začátku procesu. Je nutné monitorovat parametry solné lázně a udržovat je na požadovaných hodnotách. Je důležité upravovat pH a doplňovat úbytek soli. V průběhu solení se uvolňuje teplo, proto je nutné solnou lázeň chladit [2,3,6,8].

Během solení se sůl dostává postupně od povrchu sýra ke středu. Nejvyšší obsah NaCl je v pokožce sýra a v solném prstenci pod povrchem sýra. Nejméně soli se nachází ve středu sýra. V procesu zrání dochází k vyrovnání obsahu soli prostřednictvím difuze a změnou jednotlivých sýrových zrn na celistvou hmotu [6].

Během solení difunduje NaCl do sýrů a ze sýrů do solné lázně difundují rozpustné soli a část syrovátky, čímž se dále upravuje sušina. Solná lázeň musí mít pH odpovídající prokysanému sýru, což je pro tvrdý sýr pH 5,2 [29].

Po nasolení se sýry nechají několik hodin oschnout a následuje balení do obalů. Sýry zrající v celé hmotě se po nasolení ošetřují ochranným plastovým nátěrem, voskem nebo se balí do zracích polopropustných fólií. Povrch sýrů může být ošetřován 2 – 3% solným roztokem nebo lněným olejem. Zrací fólie a nátěry tvoří bariéru, která nepropouští kyslík a vodu a je propustná pro CO₂. Zrací folie zároveň zabraňují činnosti povrchové mikroflóry. Oschnuté a zabalené sýry se přesunují do zracích sklepů [7,27,29].

1.1.8 Zrání

Zrání představuje složitý proces biochemických reakcí, které probíhají v sýrech vlivem mikrobiálních enzymů bakterií mléčného kvašení, enzymů syřidla a sekundární mikroflóry, což jsou mikroorganismy přežívající pasteraci nebo mikroorganismy, které se dostanou do mléka po pasteraci. U sýrů vyráběných ze syrového mléka se uplatňují také původní enzymy mléka – zejména proteinázy a lipázy. Dochází ke změnám v chemickém složení, složité organické molekuly se přeměňují na látky jednodušší. Výsledkem těchto změn je ovlivnění konzistence, chuti, vůně a barvy sýru [2,30,31].

Biochemické procesy, ke kterým dochází v průběhu zrání sýrů lze rozdělit na primární a sekundární reakce. Primární biochemické změny zahrnují glykolýzu, přeměnu laktózy,

lipolýzu a proteolýzu. Produktem těchto reakcí jsou kyselina mléčná, volné aminokyseliny a volné mastné kyseliny. Tyto změny jsou často následně překryty řadou sekundárních katabolických změn sloučenin získaných primárními reakcemi na látky tvořící aroma sýrů [2]. Biochemické změny zahrnují metabolismus zbytkové laktózy, laktátu a citrátu, metabolismus volných mastných kyselin a volných aminokyselin. Řadí se sem dekarboxylace, transaminace, eliminace, desulfurace, deaminace a další. Laktóza je rozkládána zákysovými, případně nezákysovými bakteriemi za vzniku kyseliny mléčné a dalších kyselin snižujících pH sýra. Následkem sníženého pH je potlačen růst nežádoucí mikroflóry [5,7,32].

Zrání sýrů může probíhat dvěma způsoby: anaerobně v celé hmotě sýra nebo aerobně od povrchu dovnitř prostřednictvím povrchové mikroflóry. Většinou probíhají oba typy zrání společně. U sýrů holandského typu převládá anaerobní zrání. Podmínky zrání ovlivňují rychlost zrání, tvorbu kůry a mazu, ztráty hmotnosti a závisí na typu vyráběného sýra. Důležitými parametry pro zrání jsou doba a teplota. Pro sýry holandského typu několik měsíců při teplotě 8 – 14 °C [7].

Jedním z nejdůležitějších dějů probíhajících během zrání sýrů je proteolýza. Pomocí proteináz syřidla a bakterií mléčného kvašení dochází k hydrolýze kaseinů. Proteinázy, např. plazmin, jsou také běžně obsaženy v mléce. Kasein je během proteolýzy rozkládán nejdříve na vysokomolekulární peptidy a později na nízkomolekulární peptidy, které mohou být dále štěpeny až na volné aminokyseliny, které jsou mikrobiálními enzymy rozkládány na sensoricky aktivní látky: aldehydy, alkoholy, aminy, fenoly a karbonylové sloučeniny. Množství volných aminokyselin je ovlivněno délkou zrání, tedy stupněm proteolýzy. Během zrání mohou vznikat i biogenní aminy, které mohou ve vysokém množství představovat zdravotní riziko. U dlouhozrajících sýrů mohou vznikat též hořké peptidy s negativními sensorickými vlastnostmi [11,33,34,35,36].

V průběhu lipolýzy jsou prostřednictvím lipáz štěpeny esterové vazby mezi glycerolem a mastnými kyselinami. Vzniklé volné mastné kyseliny jsou substrátem pro tvorbu řady těkavých látek, jako jsou alkoholy, aldehydy a ketony. Lipolytické enzymy pochází z mléka a bakterií mléčného kvašení. Významným zdrojem lipáz je také sekundární mikroflóra. Rozsáhlá lipolýza je typická pro sýry s plísní v těstě [11,33,34,35,36]. Metabolizmu laktózy a z ní vznikající kyseliny mléčné jsou věnovány kapitoly 2.2 a 2.3.

Během zrání sýrů dochází také k výrazné změně konzistence sýrů, která je jedním ze základních jakostních parametrů. Bobtnání parakaseinu ovlivňuje obsah kyseliny mléčné.

V optimálním množství kyseliny mléčné se tvoří parakasein laktát, který je při pH 5,2 rozpustný v 5% roztoku chloridu sodného. Sodné ionty vytěsní v parakaseinu vápenatém vápenaté ionty a konzistence nasoleného sýru se postupně zvláčňuje. Pokud je přebytek kyseliny mléčné, reakce nenastává, tvoří se nerozpustný bilaktát a dochází k vytěsnění vápníku kyselinou a výsledný sýr má tuhou konzistenci [7].

Mléko obsahuje nízké množství citrátu, přibližně 8 mmol.l^{-1} , jehož větší část odchází do syrovátky. Ve sraženině je zachyceno malé množství citrátu, který je rozkládán citrát pozitivními druhy *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* za tvorby diacetylu, acetátu a acetoinu, které se podílí na výsledných sensorických vlastnostech. Metabolismus citrátu je důležitý zejména u sýrů holandského typu pro tvorbu aroma. Rozkladem citrátu vzniká také oxid uhličitý, který je důležitý pro tvorby malých ok, které jsou pro sýry holandského typu charakteristické. Žádoucí je přítomnost 3 – 5 ok v nákreji [2,5,37].

Za anaerobních podmínek může docházet k rozkladu laktátu na kyselinu máselnou a vodík prostřednictvím *Clostridium* spp., což způsobuje nežádoucí pozdní duření sýrů [2,11,37,38]. Častou vadou je skoré duření, ke kterému dochází zejména na začátku zrání. Tato vada se projevuje tvorbou malých nepravých ok v důsledku tvorby plynu. Nežádoucí oka způsobují houbovitou konzistenci sýra. Původce této vady jsou zejména koliformní bakterie [10,11].

2 LAKTÓZA

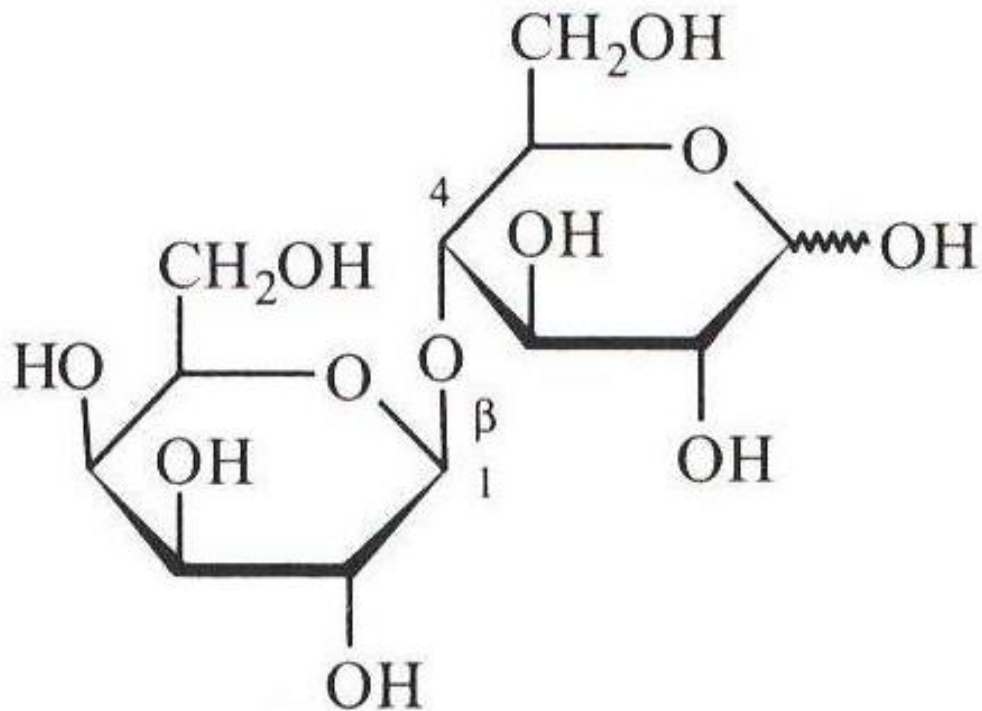
Laktóza je hlavní sacharid mléka u všech savců a je syntetizována pouze v mléčných žlázách savců, proto se nazývá mléčný cukr. Z dalších sacharidů obsahuje mléko stopové množství glukózy, fruktózy, glukózaminu, galaktózaminu, kyseliny neuraminové a neutrální a kyselé oligosacharidy. Obsah laktózy v kravském mléce závisí na plemeni, zdravotním stavu mléčné žlázy, a zejména na fázi laktace. Koncentrace laktózy v kravském mléce se pohybuje okolo 4,8 %. Laktóza a rozpustné ionty, jako jsou Na^+ , K^+ a Cl^- , jsou hlavní sloučeniny ovlivňující osmotický tlak ve mléce. Během mastitidy se zvyšuje obsah NaCl , což vede ke zvýšení osmotického tlaku, které je kompenzováno snížením obsahu laktózy. Laktóza je důležitou složkou nezbytnou při výrobě mléčných produktů, včetně sýrů a je přítomna ve všech výrobcích vyráběných z kravského mléka. Relativní sladivost laktózy dosahuje asi 20 – 40 % sladivosti sacharózy [2,39].

Množství laktózy v sýrech je nižší než v mléce, což je způsobeno odchodem většiny laktózy v průběhu výroby do syrovátky. Zbývající laktóza je přeměňována během zrání na kyselinu mléčnou. Zralé sýry tedy obsahují pouze stopové množství laktózy [29,39].

2.1 Struktura a vlastnosti laktózy

Laktóza je redukující disacharid složený z glukózy a galaktózy, které jsou spojeny β - (1→4) glykosidickou vazbou (vzorec viz Obr. 1). Laktóza se ve vodných roztocích může vyskytovat ve formě α - a β -anomeru. α a β forma laktózy mají odlišnou rozpustnost, tvar, velikost krystalů a sladivost. V molekule laktózy je obsažen asymetrický uhlík, díky kterému je laktóza schopna stáčet rovinu polarizovaného světla [2,5].

Systematický název laktózy je *O*- β -D-galaktopyranosyl-(1→4)-D-glukopyranóza. Stravitelnost laktózy je nízká. Nejstabilnější forma laktózy je monohydrát α -anomeru. V této formě krystalizuje laktóza z vodných roztoků při teplotě do 93,5 °C. Hygroskopický α -anhydrid vzniká při sušení ve vakuu za teploty nad 100 °C. Bezvodý β -anhydrid vzniká krystalizací z vodných roztoků při teplotě vyšší než 93,5 °C. Amorfní hygroskopická směs α - a β -laktózy vzniká rychlým sušením roztoků laktózy, např. při sušení mléka [39].

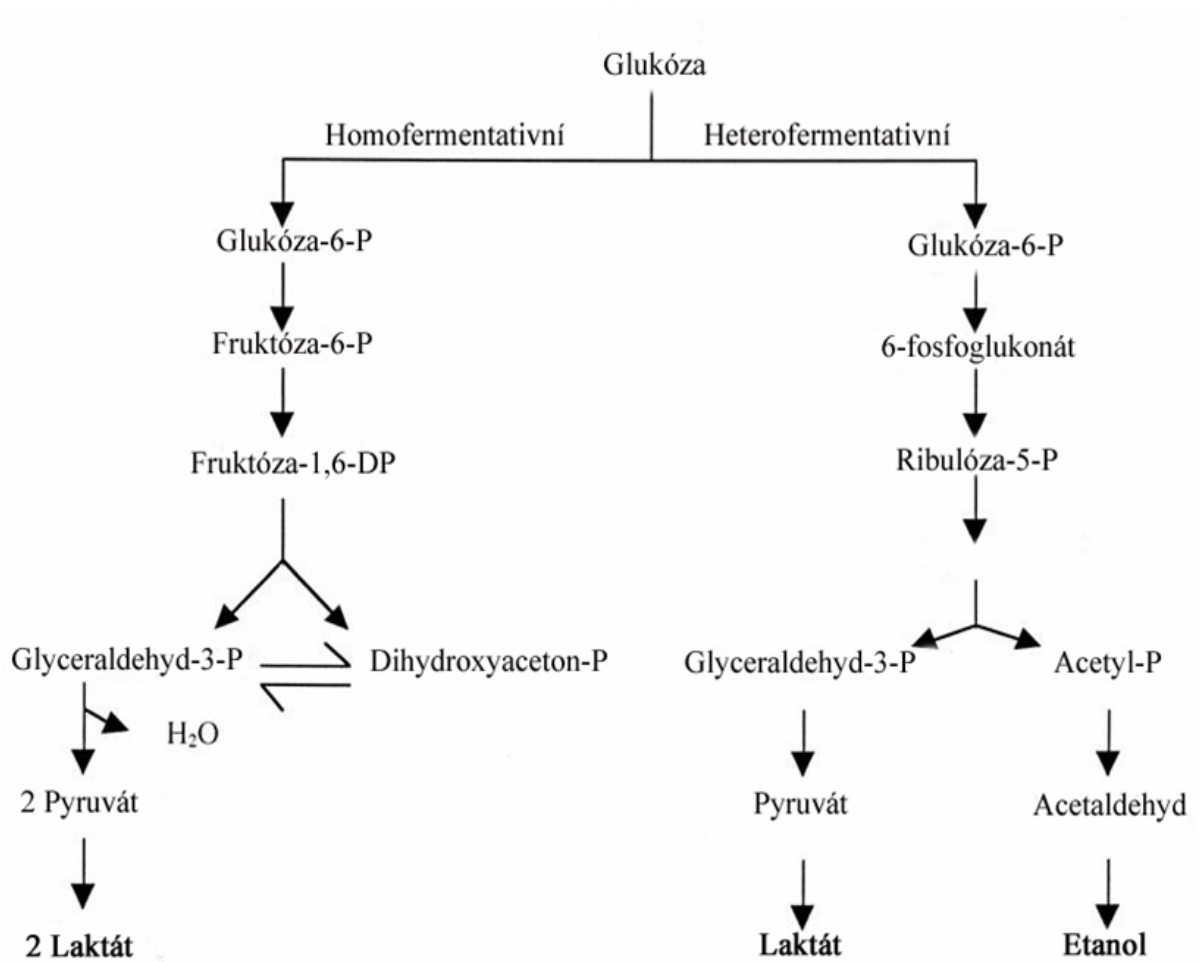


Obr. 1: Laktóza [39]

2.2 Metabolismus laktózy

Základem výroby sýrů je rozklad laktózy na kyselinu mléčnou činností bakterií mléčného kvašení. Běžně k této reakci dochází pomocí startérových kultur již v průběhu přípravy a zpracování sýřeniny či v prvních fázích zrání. Bakterie mléčného kvašení rozkládají laktózu na glukózu a galaktózu pomocí enzymu β -galaktozidázy (nazývaný také laktáza). Galaktóza je následně přeměněna na glukózu. Obsah zbytkové laktózy se během prvních 12 hodin zrání snižuje na nedetekovatelné množství (pod 0,1 %). Rychlost rozkladu zbytkové laktózy je ovlivňována obsahem NaCl v sýřenině [11,40]. Většina laktózy odchází v průběhu technologického zpracování jako laktóza nebo kyselina mléčná do syrovátky. Obsah laktózy v sýřenině na konci výrobního procesu se pohybuje v rozmezí 0,1 – 0,8 % [2,20,33]. Homofermentativním mléčným kvašením je laktóza rozkládána glykolýzou zejména startérovými bakteriemi. Heterofermentativní bakterie neobsahují glykolytické enzymy. Štěpení probíhá cestou fosfoketolázovou. Schéma průběhu glykolýzy prostřednictvím homo- a heterofermentativních bakterií je uvedeno na Obr. 2. Pokud rozklad laktózy

není dokončen pomocí čistých mlékařských kultur, je ukončen prostřednictvím nezákysových bakterií mléčného kvašení [11,38,41].



Obr. 2: Glykolýza prostřednictvím homofermentativních a heterofermentativních bakterií mléčného kvašení [40]

2.3 Metabolismus kyseliny mléčné

Hlavním produktem rozkladu laktózy je pyruvát. Ten je dále přeměněn pomocí NAD-laktátdehydrogenázy mikrobiálního původu na L- nebo D-laktát, případně jejich směs. Rozklad laktózy je rychlý a začíná již při sýření, nejintenzivněji probíhá při formování a lisování a je ukončen max. do 24 hodin od počátku zrání. Okyselením je inhibována nežádoucí mikroflóra, dále má okyselení vliv na zastoupení solí v sýru a texturu sýřeniny.

Dochází k uvolnění vápníku z kaseinu, vzniká mléčnan vápenatý, tvoří se monokalciump-kaseinát, díky kterému se zrna sýřeniny slepují, a vzniká homogenní hmota. Podle druhu sýru může být kyselina mléčná dále rozkládána mnoha cestami na jiné karboxylové kyseliny, které ovlivňují sensorické vlastnosti výsledných sýrů. Jedná se zejména o kyselinu octovou a propionovou vznikající činností *Propionibacterium* spp. Dalšími produkty rozkladu kyseliny mléčné jsou voda, CO₂ a jiné látky, což je ovlivňováno skladbou a charakterem sekundární kvašovací kultury. Pyruvát slouží jako substrát pro tvorbu řady sensoricky aktivních látek jako jsou aceton, acetaldehyd, diacetyl a etanol. Tyto látky vytvářejí máselnou a jogurtovou chuť a vůni. Nezákysové bakterie mléčného kvašení mohou kyselinu mléčnou v sýrech oxidovat na kyselinu octovou a oxid uhličitý. V anaerobních podmínkách může být kyselina mléčná prostřednictvím *Clostridium* spp. rozkládána na kyselinu máselnou a vodík a dochází k nežádoucímu pozdnímu duření sýrů [2,11,38,41].

3 METODY STANOVENÍ LAKTÓZY

3.1 Úprava vzorků před stanovením

Ze vzorků potravin se sacharidy zpravidla izolují pomocí extrakce, což je základní, nejjednodušší separační metoda. Používá se k čištění analytu ze vzorku za použití rozpouštědla. V principu dochází k přechodu složky vyskytující se ve směsi látek v kapalnou nebo tuhou fázi do jiné kapalnou fáze. Extrakční činidla obsahují vodu, chloroform, alkoholy – např. metanol či etanol nebo směsi těchto látek. Za použití vhodného rozpouštědla je extrakce velice účinná separační metoda [42,43,44].

Po extrakci se získá roztok laktózy, který je nutno následně upravit pomocí čiření. Čiření je prováděno za účelem odstranění bílkovin a zátok. K čiření lze používat pouze čiridla, která neadsorbují cukry. Přidáním čiridla k extraktu dojde ke vzniku sraženiny. Následně je pomocí filtrace získán čirý roztok [43,45].

3.1.1 Izolace laktózy z mléčných výrobků

Při izolaci sacharidů destilovanou vodou přechází rozpustné sacharidy do destilované vody. K extrakci se používá destilovaná voda ohřátá na 50 °C. Extrakce probíhá několik minut. Získaný extrakt je dále podroben působení čirících činidel [43,46].

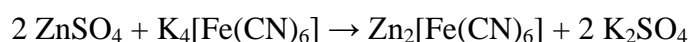
Izolaci sacharidů lze provádět také extrakcí etanolem, za použití jeho 80% roztoku. Extrakce probíhá asi hodinu a provádí se za laboratorní teploty. Získaný extrakt je dále zfiltrován. K nerozpustnému zbytku se přidá další podíl etanolu. Směs se znovu zahřívá ve vroucí vodní lázni s použitím zpětného chladiče. Získaný extrakt je doplněn na určitý objem a poté následuje filtrace. Z přefiltrovaného extraktu je odpařen etanol ve vroucí vodní lázni do sucha. Následuje vysrážení nerozpustných látek rozpuštěním odparkou ve vodě a záhřevem. Tato metoda se používá zejména u vzorků, u kterých mohou vznikat enzymatické změny [43,44,46].

3.1.2 Způsoby čiření extraktů

Čirící činidlo se volí podle použité metody stanovení a druhu analyzovaného vzorku. Jako čiridla se používají látky srážející koloidní látky. Používá se čiření podle Carreze, čiření neutrálním nebo zásaditým octanem olovnatým, čiření podle Herlese, které je založeno na použití zásaditého dusičnanu olovnatého a čiření kyselinou fosfowolframovou. Dále

je možné také využít kyselinu trichloroctovou, hydroxid hlinitý, tanin, aktivní uhlí a kyselinu wolframovou. Je možné využít i čiření pomocí ionexů [43].

Principem Carrezova čiření je vytvoření objemné sraženiny hexakynoželeznanu zinečnatého. Používají se dvě činidla – Carrez I, což je 30 % síran zinečnatý a Carrez II, což je 15 % hexakynoželeznan draselný. 100 ml cukerného roztoku se vyčistí použitím 5 ml činidla Carrez I a 5 ml činidla Carrez II. Tento způsob čiření je vysoce účinný zejména v kyselém prostředí. U alkalických a neutrálních roztoků se musí nejprve provést okyselení použitím mírně zředěné kyseliny octové. Carrezovým čiřením dojde k dokonalému odstranění bílkovin. Slizovité látky se tímto čiřením odstraňují méně. Podstata čiření je vyjádřena v této reakci [43,47]:



3.2 Možnosti stanovení laktózy

Laktózu je možné v mléčných výrobcích stanovit několika metodami. Lze využít polarimetrii, oxidoredukční titraci, spektrofotometrii, chromatografii, gravimetrii. Dále je možno využít kolorimetrické nebo enzymatické stanovení laktózy [52]. Laktózu můžeme také stanovit metodou infračervené spektroskopie ve střední oblasti spektra – MIR nebo metodou infračervené spektroskopie v blízké oblasti spektra – NIR [48].

3.2.1 Stanovení laktózy polarimetricky

Laktóza obsahuje ve své molekule asymetrický neboli chirální uhlík, který nese čtyři odlišné substituenty, a proto patří mezi opticky aktivní látky, které jsou schopny stáčet rovinu polarizovaného světla. Tato vlastnost – optická otáčivost se měří na přístroji polarimetru. Polarimetrické stanovení lze použít pouze na vzorky, které obsahují pouze jednu opticky aktivní látku [49,50,51].

Koncentrace opticky aktivní látky a úhel otočení roviny polarizovaného světla jsou přímo úměrné a lze je vyjádřit vztahem:

$$\alpha = [\alpha]_D^{20} l c,$$

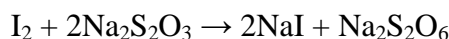
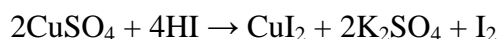
kde α je úhel otočení roviny polarizovaného světla, $[\alpha]_D^{20}$ je měrná otáčivost látky při teplotě 20 °C a vlnové délce dubletu D sodíkové výbojky (589,3 nm), l je tloušťka vrstvy opticky aktivní látky v dm a c je koncentrace měřené látky v jednotkách $\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ [5,50].

Laktóza monohydrát má měrnou otáčivost při teplotě 20 °C +52,6 °C a bezvodá laktóza +55,4 °C. Před polarimetrickým stanovením laktózy musí být ze vzorku mléka nebo mléčného výrobku nejprve odstraněny další složky jako jsou bílkoviny a tuky vysrážením – vyčiřením a následnou filtrací. Čirý filtrát obsahující laktózu je převeden do kyvety a v polarimetru je změřen úhel otočení roviny polarizovaného světla. Koncentrace laktózy ve vzorku je potom vypočítána pomocí výše uvedeného vztahu [2,5,52,53].

3.2.2 Stanovení laktózy oxidoredukční titrací

Laktóza obsahuje v molekule glukózy volný poloacetalový hydroxyl – uhlík C1 mající redukující účinky, díky němuž redukuje oxidační činidla. Při stanovení laktózy se většinou využívá redukce mědi v alkalickém síranu měďnatém – Fehlingovo činidlo nebo redukce chloraminu T. Před stanovením musí být ze vzorku nejprve odstraněny bílkoviny a tuky pomocí vysrážení a filtrace [5].

Alkalický roztok síranu měďnatého laktóza za varu redukuje na oxid měďný. Ten je oddělen filtrací, následuje vysušení a zvažení. Oxidací jednoho molu laktózy (360 g) se získá 1 mol oxidu měďného (143 g). Množství síranu měďnatého, který nepodlehl redukcí, se stanoví jodometricky:



Dnes se dává přednost použití chloraminu T před síranem měďnatým, protože bod ekvivalence při titraci Fehlingova činidla není příliš ostrý [50,54].

3.2.3 Stanovení laktózy spektrofotometricky

Redukční vlastnosti laktózy lze využít k vyredukování kovu, který je následně stanoven pomocí spektrofotometrie. Používá se např. chlorid palladnatý v tzv. paladometrické metodě, kdy oxidoredukční reakce mezi redukujícím cukrem a palladiem běží stechiometricky i kvantitativně (1:1). Stanovení musí nejprve předcházet odstranění tuků a bílkovin. Reakce probíhá za alkalických podmínek. Absorbance se měří při vlnové délce 410 nm. Obsah laktózy ve vzorku se vypočítá pomocí kalibrační křivky [55].

3.2.4 Stanovení laktózy gravimetricky

Gravimetrické stanovení laktózy využívá redukujících vlastností laktózy. Oxid měďný, který vznikl redukcí z Fehlingova činidla, je vysušen a zvážen. Ekvivalentní obsah laktózy k obsahu oxidu měďného je určen z Munson-Walkerových tabulek [53].

3.2.5 Stanovení laktózy kolorimetricky

Kolorimetrické stanovení využívá porovnání intenzity zbarvení roztoku o neznámé koncentraci s intenzitou zbarvení roztoků o známé koncentraci. Jedná se o subjektivní optickou metodu. Laktóza je redukující cukr, který reaguje za varu v silně kyselém prostředí s fenolem a antronem vznikem barevných roztoků. Tato metoda je poměrně citlivá, za předpokladu, že v roztoku není přítomen další redukující cukr. Stanovení musí probíhat za přesně stanovených a kontrolovaných podmínek [5,49,52].

3.2.6 Stanovení laktózy enzymaticky

Existuje několik metod enzymatického stanovení laktózy. Příkladem je Boerhinger-Mannheimova metoda. Laktóza přítomná ve vzorku je nejprve hydrolyzována na glukózu a galaktózu pomocí enzymu β -galaktozidázy za přítomnosti vody. Následuje oxidace D-galaktózy prostřednictvím NAD^+ na kyselinu galaktonovou za přítomnosti β -galaktózdehydrogenázy. NADH se stanoví spektrofotometricky při 340 nm. Obsah laktózy je úměrný množství redukovaného NADH, pokud se provede korekce na původně přítomnou glukózu ve vzorku podle slepé zkoušky.



Jedná se o přesnou a spolehlivou metodu. Vzhledem k použití enzymů tato metoda vyžaduje zvýšenou kontrolu teploty a času [48,53,56].

3.2.7 Stanovení laktózy chromatograficky

Laktózu můžeme stanovit pomocí plynové chromatografie nebo pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

3.2.7.1 Stanovení laktózy plynovou chromatografií

V plynové chromatografii je vzorek dávkován do proudu plynu, pomocí kterého je dále unášen kolonou, která je naplněna stacionární fází. Složky jsou zachycovány na koloně na základě jejich odlišné schopnosti vázat se na stacionární fází. Složky vycházející

z kolony jsou detekovány pomocí detektoru. Použití plynové chromatografie je v případě laktózy složitější. Cukry nejsou těkavé a proto je nutné je před stanovením derivatizovat. Nejčastěji se využívá silylace [48,51].

3.2.7.2 Stanovení laktózy vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií

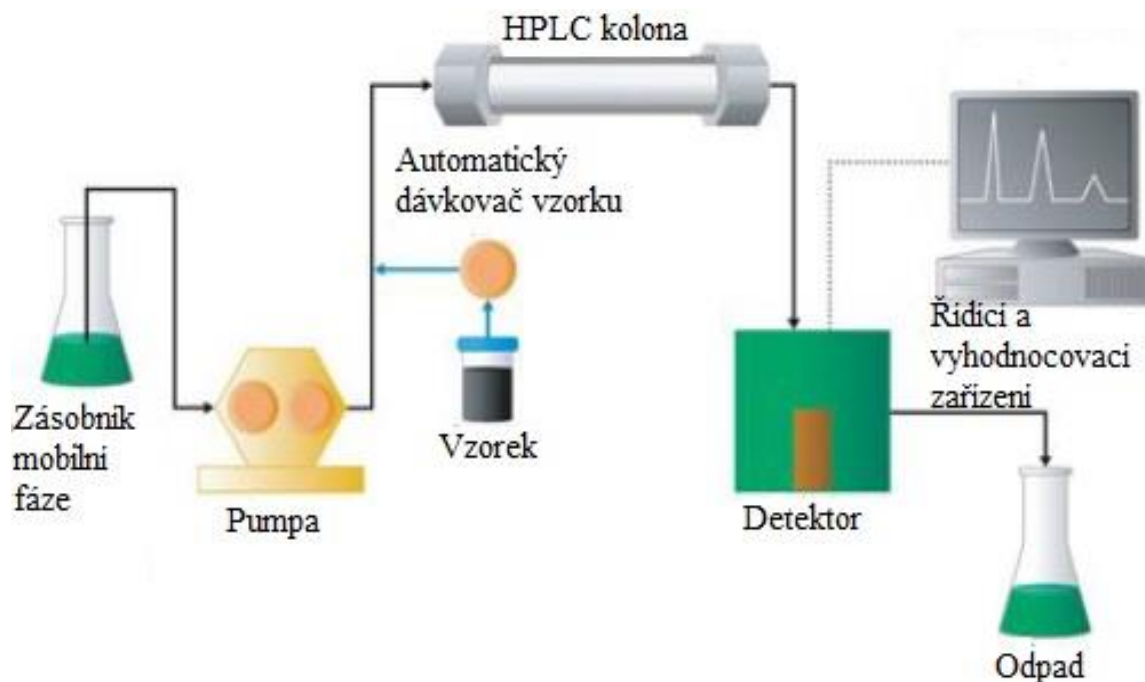
Pro stanovení laktózy ve vzorcích mléka a mléčných výrobcích se dnes běžně využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Nevhodnější kombinací je použití refraktometrického detektoru. Vzorek je nejprve vysrážen pomocí čiridel a poté přefiltrován. Následně je připravený filtrát vstříkovan do kolony obsahující stacionární fázi, která je na bázi silikagelu s kyano- nebo aminoskupinami. Jako mobilní fáze je nejčastěji používá směs acetonitrilu s vodou. Rychlost průtoku mobilní fáze bývá volena $1 - 2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ [57].

Množství laktózy ve vzorku je kvantifikováno porovnáním píků s píky standardů na základě kalibračních přímek a jejich regresních rovnic [52,53,57].

4 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

O separaci složek vzorku v kapalinové chromatografii rozhodují interakce složek vzorku se stacionární fází a použitá mobilní fáze. Analyty jsou během separace rozdělovány mezi mobilní a stacionární fázi. Doba, jakou v jednotlivých fázích analyty stráví, se odvíjí od afinity analytu k těmto fázím [51].

Základem vysokoúčinné kapalinové chromatografie se stalo klasické kolonové provedení. Pro účinnou separaci je zapotřebí použít dostatečně malá zrníčka sorbentu, aby kladla protékající kapalině odpor. A proto je nutné pracovat za vysokého tlaku. V případě HPLC je mobilní fáze do systému přiváděna za pomoci vysokotlakého čerpadla. HPLC je metoda vhodná pro stanovení i velmi malých množství zejména organických analytů v komplikovaných maticích. Kapalinový chromatograf (schéma viz Obr. 3) sestává ze zásobníku mobilní fáze a čerpadla, které slouží k uchování a transportu mobilní fáze, směšovacího zařízení, dávkovacího zařízení (autosampler, manuální dávkovací ventil), kolony, detektoru a vyhodnocovacího zařízení (počítač a software) [51,58,59].



Obr. 3: Schéma kapalinového chromatografu [58]

Jako zásobníky mobilní fáze se nejčastěji používají skleněné nádoby o objemu 0,1 – 2,5 l. Zásobníky jsou opatřeny ryskami a uzavřeny plastovým uzávěrem z inertního plastu. V uzávěru jsou předvrtány otvory pro teflonové hadičky [60].

Kapalina se do kolony čerpá pomocí membránových nebo pístových čerpadel. Častěji jsou používána čerpadla pístová. Hlavním požadavkem na čerpadlo je zajištění konstantního průtoku mobilní fáze (asi 0,1 – 10 ml.min⁻¹). Dobrá čerpadla dosahují průtoku v mikrolitrech až desítkách mililitrů za minutu s menším než 1% kolísáním průtoku za tlaku až 35 MPa [51].

Složení mobilní fáze je v případě izokratické eluce stálé, v případě gradientové eluce je složení mobilní fáze v průběhu separace měněno. Pomocí naprogramovaného směšovacího zařízení za použití zásobníků různých kapalin je možné připravovat směs mobilní fáze se stálým složením nebo prostřednictvím tohoto zařízení lze měnit složení mobilní fáze v průběhu separace [51].

K dávkování vzorku lze použít různé druhy dávkovacího zařízení—může být použito injekční zařízení ovládané ručně či automaticky nebo dávkovací obtokové kohouty. Nejčastěji je používán šesticestný ventil s dávkovací smyčkou [51,58].

Pro většinu analýz se používají kolony vyrobené z nerezové oceli nebo tvrzeného skla. Kolony jsou většinou v podobě rovných trubic naplněných velmi malými částicemi stacionární fáze o velikosti 5 – 10 μm o velkém povrchu. Délka kolon se pohybuje v rozmezí 10 – 50 cm. Poměr průměru a délky bývá 1:20 – 1:100, nejčastější průměr kolon bývá 2 – 6 mm. Pro analytické využití se používají kratší kolony o délce 15 – 25 cm a průměru 4,6 – 5 mm. Průměr prázdné kolony musí být velmi malý, aby ze všech pozic stanovované látky v mobilní fázi bylo blízko k fázi stacionární, což umožní rychlé ustavení rovnováhy. Běžný průtok mobilní fáze je 1 – 2 ml.min⁻¹. Pro rychlé separace se používají kolony o délce 3 cm, které spotřebují méně mobilní fáze, s průtokem 4 ml.min⁻¹. Analytické kolony jsou plněny náplní o průměru 3 – 10 μm, kratší kolony se plní náplní jemnější. Kolony o délce 25 – 50 cm a průměru 1 – 2 mm mají vysokou účinnost a malou spotřebu mobilní fáze, průtok 10 – 100 μl.min⁻¹. K ochraně hlavní kolony před nečistotami a nerozpustnými materiály slouží předkolony. Umísťují se mezi čerpadlo a dávkovací zařízení nebo mezi dávkovací zařízení a analytickou kolonu. Jedná se o krátké kolony naplněné stejným sorbentem jako kolona, které zachycují mechanické nečistoty a látky, ireverzibilně se vážící na kolonu [51,58, 60,61].

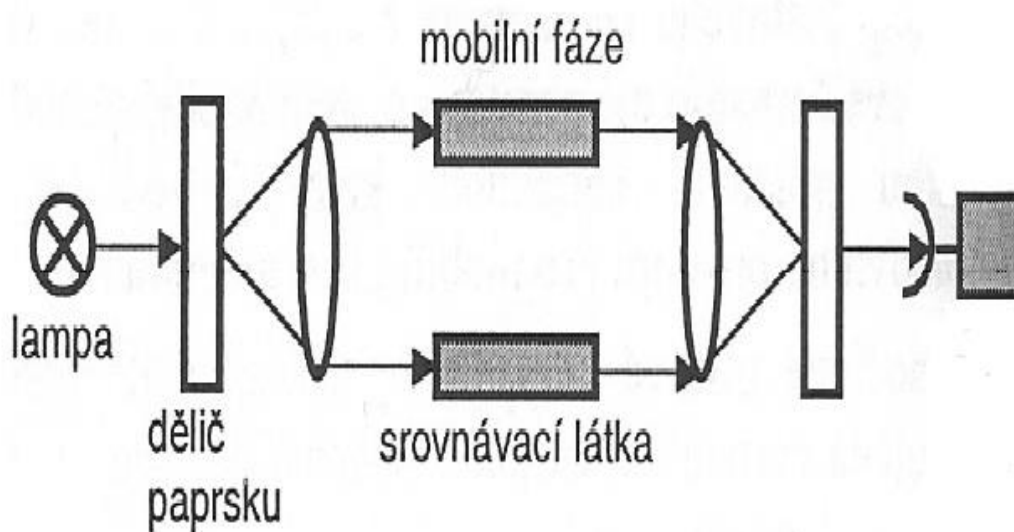
U moderních přístrojů je jejich činnost řízena prostřednictvím počítače, který může řídit dávkování vzorku, rychlost průtoku a složení mobilní fáze, časový průběh gradientu teploty, postkolonovou derivatizaci a zejména záznam a vyhodnocení chromatogramu integrací plochy pod píkem a porovnáním s kalibrační křivkou [59].

Za chromatografickou kolonou se nacházejí detektory, které slouží k záznamu rozdílu v signálu mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze, která obsahuje stanovanou složku. Detektory se rozdělují na destrukční, u kterých dochází ke změně stanované složky, a nedestrukční detektory, u kterých se stanované složky chemicky nemění. Dalším způsobem dělení je rozdělení na hmotnostní a koncentrační detektory. Princip hmotnostních detektorů je v reakci na změnu hmotnostního toku analytu v mobilní fázi vstupující do detektoru. Princip koncentračních detektorů spočívá v reakci na změnu hmotnostní koncentrace analytu v eluentu nezávisle na rychlosti přívodu analytu do detektoru. Pro detekci v HPLC se používají čtyři principy: detekce společné vlastnosti univerzální pro všechny analyty, kam patří RID - refraktometrický detektor, aerosolový detektor nabitých částic a odpařovací detektor rozptylu světla. Dále mohou být detekovány specifické vlastnosti analytu. K těmto detektorům řadíme UV-VIS detektor, fluorescenční, elektrochemický, radioaktivní, vodivostní a chemiluminiscenční detektor. Dalším principem je detekce změn mobilní fáze, kam patří aerosolový detektor nabitých částic, hmotnostní spektrometrie a odpařovací detektor rozptylu světla. Poslední možností jsou spojené techniky, kam patří hmotnostní spektrometrie, infračervený detektor a nukleární magnetická rezonance [59].

Detektory používané v HPLC by měly být citlivé pro stanované látky a málo citlivé na mobilní fázi. Průtočná cela detektoru musí udržet těsnost a vydržet tlak mobilní fáze. Nejvíce se používají optické a elektrochemické detektory. Mezi optické řadíme fotometrický, fluorescenční a refraktometrický detektor. K elektrochemickým detektorům patří voltametrický a vodivostní detektor. Při analýze cukrů je nejvyužívanějším detektorem refraktometrický detektor [51].

Refraktometrický detektor (viz Obr. 4) měří rozdíly mezi indexem lomu proteklé mobilní fáze s analytem a čisté mobilní fáze. Pokud použítá mobilní fáze obsahuje složku vzorku, objeví se výchylka. Detekční limit refraktometrického detektoru je 10^{-7} g.ml⁻¹. Detektor není příliš citlivý, ale má univerzální použití. Při použití refraktometrického detektoru je nutné přísně dodržovat konstantní teplotu [51]. Refraktometrický detektor může být využit pro kvantifikaci různých analytů, zejména se využívá pro detekci sacharidů. Mezi vý-

hody tohoto detektoru patří i možnost aplikace detekce bez výskytu fluorescenčních a chromoforních skupin či dalších specifických vlastností stanovované látky [44,62]. Kvůli velkým změnám indexu lomu mobilní fáze nelze použít refraktometrickou detekci pro mobilní fázi eluce s gradientem [62].



Obr. 4: Schéma refraktometrického detektoru

(interferometrický model) [51]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části této diplomové práce bylo charakterizovat přírodní sýry holandského typu a jejich výrobu, popsat metabolismus laktózy a změny, ke kterým dochází během výroby a zrání sýrů. Dále bylo cílem teoretické části práce popsat možnosti stanovení sacharidů pomocí HPLC s refraktometrickou detekcí v sýrech.

Cílem praktické části této diplomové práce bylo vyrobit 4 různé přírodní sýry holandského typu o dvou různých tučnostech a za použití dvou různých sýrařských kultur s mírně odlišným složením. V těchto vyrobených vzorcích následně stanovit obsah laktózy a vyhodnotit vliv tučnosti a použitých sýrařských kultur na změny laktózy v průběhu výroby a zrání sýrů za použití metody HPLC s refraktometrickou detekcí a statistické vyhodnocení získaných výsledků. U vyrobených vzorků byly sledovány změny aktivní a titrační kyselosti a úbytek laktózy v různých krocích výroby a na začátku zrání sýrů.

6 MATERIÁL A METODY

6.1 Materiál

Základním materiálem bylo mléko z Farmy Kudlov, ze kterého se vyráběly 4 různé šarže sýrů holandského typu. Na výrobu byly použity 2 různé kultury s mírně odlišným složením (Flora Danica a CHN-22) a vyráběly se sýry o 2 různých tučnostech (cca 10 % a 50 % t.v.s.). Obě použité sýrařské kultury byly od výrobce Christian Hansen a jednalo se o mezofilní aromatické kultury produkující aroma a CO₂. Obě kultury výrobce doporučuje pro výrobu sýrů holandského typu a dodává je v lyofilizované podobě. Kultura Flora Danica měla následující složení: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*. Kultura CHN-22 obsahovala tyto mikroorganismy: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*. Kultury se teda lišily v zastoupení leukonostoků.

6.2 Výroba sýrů

6.2.1 Příprava před výrobou

Všechny pracovní pomůcky, které přišly do kontaktu se surovinou, meziproduktem a hotovými sýry (mimo smrštitelné fólie) byly dezinfikovány ponorem před zahájením výroby a v průběhu výroby sýrů. K dezinfekci byl použit přípravek DIVOSAN AKTIV o koncentraci 0,5 % s dobou působení minimálně 15 minut. Všechny pomůcky byly před použitím důkladně opláchnuty pitnou vodou k zamezení přenosu reziduí dezinfekčních látek do produktu. Pomůcky, které byly dezinfikovány pomocí UV-zářením, nebylo nutné oplachovat pitnou vodou. Prostory výroby byly před výrobou přes noc (po dobu 4 hodin) vysvíceny UV-lampou. Se sýry a meziprodukty se manipulovalo v rukavicích. Konve na mléko byly ošetřeny parou pomocí vyvíječe páry, čímž byla zajištěna devitalizace přítomné mikroflóry. Po ošetření byly uzavřeny víkem, aby se zabránilo sekundární kontaminaci.

Parou byly dekontaminovány i vnitřní prostory výrobce a standardizační nádoby. Důkladně byly ošetřeny zejména hůře dostupné části zařízení jako ventily, výpustě a různé nerovnosti.

6.2.2 Základní ošetření a úprava mléka

Nejprve bylo mléko odstředěno pomocí laboratorní odstředivky FT15B. Syrové mléko bylo před odstředěním přehřáto v nádobě s mezipláštěm na teplotu 37 °C. Teplota byla odečítána pomocí vpichového digitálního teploměru. Po odstředění následovala standardizace tučnosti mléka. U sýrů s výslednou tučností cca 10 % t.v.s. bylo mléko standardizováno na 0,5 % tuku a u sýrů s výslednou tučností cca 50 % t.v.s. bylo mléko standardizováno na tučnost 3,5 %. Mléko bylo standardizováno ve standardizační nádobě odvážením suroviny, tj. smetany (o tučnosti 35 %) a odstředěného mléka (o tučnosti 0,05 %). Standardizované mléko bylo pasterováno diskontinuálním způsobem ve výrobníku sýrů při teplotě 65 °C po dobu 30 minut. Následně bylo mléko ochlazen a vytemperováno na inokulační a sýřicí teplotu 32 ± 1 °C.

Poté bylo mléko inokulováno sýračkou kulturou. Bylo naváženo $0,75 \pm 0,05$ g mezofilní koncentrované lyofilizované kultury Flora Danica nebo CHN-22. Navážená kultura byla dokonale rozpuštěna ve 30 ml mléka o teplotě 32 ± 1 °C. K mléku ve výrobníku bylo dále přidáno 17,5 ml nasyceného roztoku CaCl_2 pro podpoření sýření. Směs mléka byla dokonale promíchána a kultura se nechala reaktivovat 20 minut za současného míchání.

6.2.3 Sýření mléka a zpracování sýřeniny

K mléku bylo za stálého míchání přidáno 1 120 μl syřidla Chy-Max M (Chr. Hansen), které bylo ředěno v desetinásobku pitné vody. Směs byla krátce intenzivně promíchána a poté zklidněna pohybem míchadla opačným směrem a ponechána v klidu po dobu 30 minut. Míchadlo i teploměr byly před sýřením z výrobníku vyjmuty, aby nebyla narušena tvorba gelu.

Po 30 minutách sýření byla sýřenina podélně i příčně prokrojena pomocí sýrařské harfy. Pokrájená sýřenina byla ponechána 10 minut v klidu, kdy docházelo k uvolňování syrovátky. Poté byla sýřenina 20 minut opatrně ručně míchána. V průběhu míchání docházelo k drobení a vytužování zrna. Za stálého míchání bylo přes síto odebráno 10 l syrovátky a k sýrařskému zrně bylo velmi pomalu přidáno 7 l vody o teplotě 60 °C tak, aby teplota vzrostla na 37 °C, tedy na teplotu dohřívání sýrařského zrna. Dosoušení probíhalo 30 minut za stálého míchání pomocí míchacího zařízení při maximálním výkonu míchadla.

Sýřenina byla nalévána do předem připravených předlisovacích forem, které byly vyloženy sýrařskými plachetkami. Sýřenina se nechala 30 minut předlisovat a každých 10 minut

byla otáčena kvůli rovnoměrnému odtoku syrovátky. Sýřenina z každé formy byla rozkrájena na 12 stejně velkých kousků, které byly vloženy do lisovacích forem, vyložených sýrařskými plachetkami. Sýřenina byla lisována pomocí lisovacích závaží. Lisování trvalo celkově 90 min. Po každých 30 minutách se zvyšovala hmotnost závaží. Tlak při lisování byl postupně zvyšován z 8,5 kPa na 25,5 kPa. Vylisované sýry byly uloženy do nádob a umístěny přes noc (na dobu 15 hodin) do lednice (6 ± 1 °C) k prokysání.

6.2.4 Solení a balení sýrů

Po prokysání byly sýry soleny v solné lázni o koncentraci 20 % NaCl. Solná lázeň byla připravena ze 4,5 l pitné vody a 1,125 kg soli. Solení probíhalo při laboratorní teplotě (25 ± 1 °C) po dobu 30 minut.

Nasolené sýry byly ošetřeny antimykotickou suspenzí (přípravek DELVOCID XT1). Sýry byly ponořeny do 3 % suspenze na 4 sekundy, tak aby byla ponořena celá plocha sýra. Po ošetření se sýry nechaly 1 hodinu oschnout.

Oschlé sýry byly zabaleny do smršťovací kryovakové fólie pomocí vakuové baličky. Zabalené bloky byly ponořeny do horké vody na 2 sekundy, aby došlo ke smrštění fólie. Označené bloky sýrů byly uloženy ve zrací komoře (12 ± 1 °C).

6.3 Analýza vzorků

Z každé ze 4 výroby bylo odebráno celkem 12 vzorků. Prvním odběrem bylo syrové mléko, následoval odběr standardizovaného mléka, syrovátky a sýra ihned po lisování. Další vzorky sýra byly odebrány po 3, 6, 9, 12 a 15 hodinách prokysávání. Poté byly odebrány vzorky sýra na začátku zrání, a to 12, 24 a 48 hodin po solení. Označení odebraných vzorků je uvedeno v Tab. 1. Schéma odběru vzorků bylo navrženo dle prostudované literatury, později než 48 hodin po začátku zrání je laktóza přítomna pouze v množství, které je zvolenou metodou HPLC-RI nedetekovatelné [11,40].

U každého vzorku byla stanovena hodnota pH, titrační kyselost, obsah sušiny ($n = 3$) a laktózy ($n = 4$). Obsah sušiny byl analyzován z důvodu vyjádření množství laktózy v sušině vzorku. pH bylo měřeno pomocí vpichového pH metru (Eutech). Titrační kyselost byla u vzorků mléka a syrovátky stanovena pomocí automatického titrátoru HI 84529 (HANNA Instruments). U vzorků sýrů se titrační kyselost stanovovala titračně pomocí $0,25 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH na indikátor fenolftalein. Sušina byla stanovena vázkově sušením

při 102 °C do konstantního úbytku hmotnosti s použitím mořského písku jako nasávací hmoty podle ČSN ISO 6731 [63] a ČSN EN ISO 5534 [64].

Tab. 1: označení odebraných vzorků

Číslo vzorku	Vzorek
1	Syrové mléko
2	Standardizované mléko
3	Syrovátka
4	Sýr ihned po lisování
5	Sýr v průběhu prokysávání – 3h
6	Sýr v průběhu prokysávání – 6h
7	Sýr v průběhu prokysávání – 9h
8	Sýr v průběhu prokysávání – 12h
9	Sýr v průběhu prokysávání – 15h
10	Sýr v průběhu zrání – 12h
11	Sýr v průběhu zrání – 24h
12	Sýr v průběhu zrání – 48h

Před vlastním stanovením laktózy byla provedena příprava vzorku, a to odlišně pro mléko, resp. syrovátku a pro sýr.

V případě syrového a standardizovaného mléka a syrovátky bylo odpipetováno 25 ml vzorku do 100 ml odměrné baňky. Ke vzorku bylo přidáno 5 ml činidla Carrez I a vzorek byl lehce promíchán. Poté bylo přidáno 5 ml činidla Carrez II a vzorek byl opět lehce promíchán. Vzorek s činidly se nechal 15 minut srážet za občasného promíchání obsahu v baňce. Po 15 minutách byla odměrná baňka doplněna po rysku destilovanou vodou a obsah byl dobře promíchán. Takto připravený vzorek byl přefiltrován přes papírový filtr KA 5 (pomalá rychlost filtrace) [65].

V případě vzorku sýra byl nejprve sýr homogenizován pomocí mixéru. 25 g vzorku bylo v třecí misce homogenizováno s 30 ml destilované vody o teplotě 50 °C a vzorek byl následně kvantitativně převeden do kádinky. Následovala extrakce laktózy po dobu 30 minut na magnetickém míchadle vyhřívaném na 50 °C. Teplota byla kontrolována vpichovým teploměrem. Po extrakci byl vzorek kvantitativně převeden do 100 ml odměrné baňky. Další postup byl stejný jako u vzorků mléka a syrovátky [65].

Připravené filtráty vzorků byly přefiltrovány přes stříkačkový filtr s velikostí pórů 0,22 µm (Cronus) a u takto připravených vzorků byl stanovován obsah laktózy pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na kapalinovém chromatografu Shimadzu LC-20AD Prominence. Byla použita kvartérní pumpa, pětikanálový degaser DGU-20A_{5R}, autosampler SIL-20AC_{HT} a detekce probíhala na diferenciálním refraktometrickém detektoru RID-20A (vše Shimadzu). K analýze byla použita kolona Agilent Zorbax NH₂ o rozměrech 4,6 x 250 mm x 5 µm), před kterou byl zařazen předkolonový cartridge filtr s velikostí pórů 0,2 µm (Optimize Technologies).

Separace probíhala za izokratické eluce. Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitril – voda v poměru 80:20. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 1,6 ml.min⁻¹. Celková délka jedné analýzy byla 32 minut.

Pro kvantifikaci obsahu laktózy ve vzorcích byla sestrojena kalibrační křivka v koncentračním rozmezí 1 – 10 g.l⁻¹. V těchto rozpětích byla závislost plochy píku na koncentraci sacharidu lineární. Každý bod kalibrační křivky byl proměřen 3x. Z regresní rovnice byl vypočítán obsah laktózy v g.100 g⁻¹ vzorku a přepočítán na obsah sušiny.

Získané výsledky byly podrobeny statistické analýze za použití Studentova t-testu srovnávajícího střední hodnoty dvou nezávislých souborů na hladině významnosti 5 %. Pro statistické hodnocení byl využit program StatK25.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

Charakteristika jednotlivých vyrobených šarží sýrů je uvedena v Tab. 2. Obsah sušiny, tuku v sušině a soli byl stanoven na konci zrání sýrů (po 3 měsících), přičemž tato stanovení nebyla součástí diplomové práce; hodnoty jsou uvedeny jen z důvodu charakteristiky vyrobených sýrů.

Tab. 2: Charakteristika jednotlivých vyrobených sýrů

Označení sýra	Tučnost mléka (%)	Kultura	Sušina (%)	Tuk v sušině (%)	Sůl (%)
S1	3,5	Flora Danica	54,4	50,9	1,9
S2	0,5	Flora Danica	48,7	13,4	2,4
S3	3,5	CHN-22	53,8	51,4	1,9
S4	0,5	CHN-22	47,3	13,4	2,0

Z tabulky je patrné, že sušina sýrů S2 a S4 je nižší než sušina sýrů S1 a S3, což je samozřejmě dáno nižším obsahem tuku, který je součástí sušiny sýrů. Obsahy t.v.s. všech sýrů zhruba odpovídají očekávaným hodnotám, tj. 10 a 50 % t.v.s. Obsah tuku v sušině se může mírně odlišovat z důvodu různých faktorů, zejména způsobu lisování, na kterém je závislý obsah sušiny sýra. Obsah soli se u všech čtyř šarží pohyboval v rozmezí 1,9 – 2,4 %, což jsou běžné hodnoty obsahu NaCl v sýrech holandského typu [12].

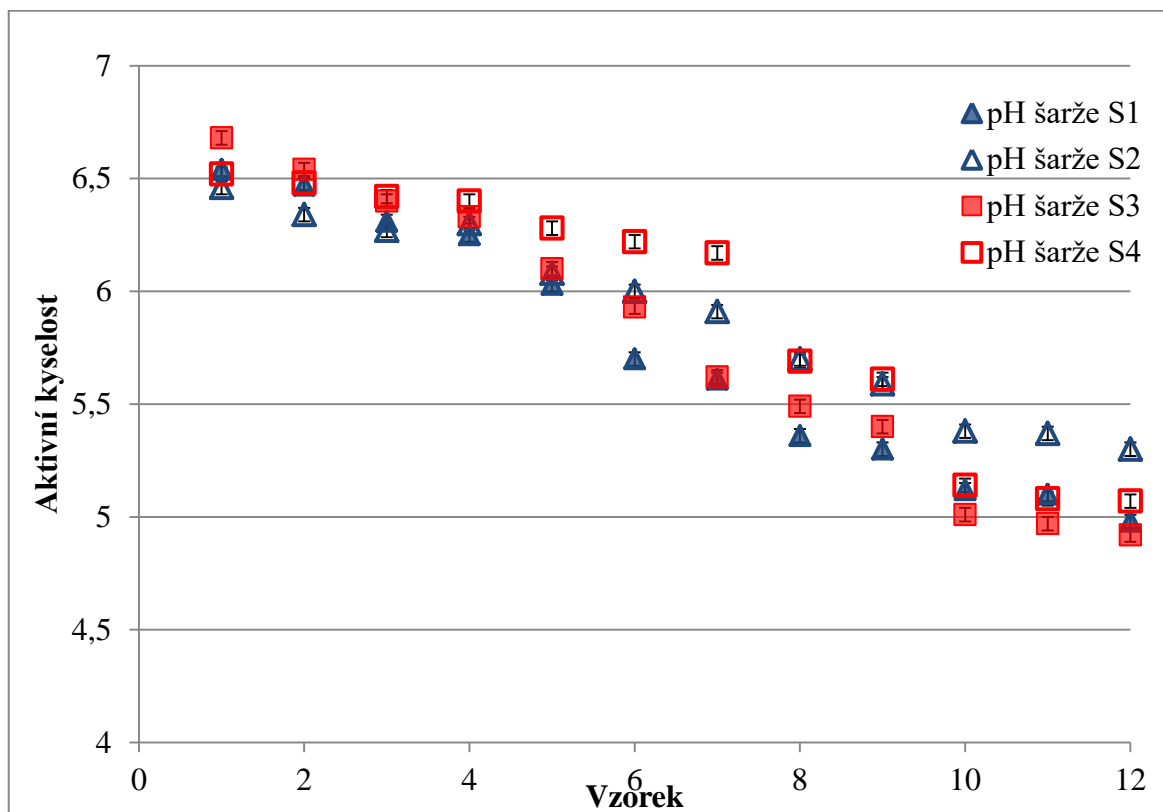
V Tab. 3 jsou uvedeny výtěžnosti jednotlivých vyrobených šarží sýrů. Z výsledků je patrné, že zatímco množství získané syrovátky je pro všechny sýry cca stejné (29,4 – 31 kg), množství sýrů je závislé na výchozí tučnosti mléka, resp. výsledném obsahu t.v.s.. V případě použití odtučněného mléka byly výtěžnosti podstatně nižší než při použití plnotučného mléka, a to o 1,35 – 4,4 kg. Tento fakt souvisí s nižším obsahem tuku a sušiny. Celková množství syrovátky a sýrů byla ovšem pro všechny vyrobené šarže opět srovnatelná (33,8 – 34,1 kg).

Tab. 3: Výtěžnosti vyrobených sýrů

Označení sýra	Množství mléka (kg)	Množství syrovátky (kg)	Množství sýrů (kg)	Syrovátka + sýry (kg)
S1	35	29,65	4,40	34,05
S2	35	30,95	3,00	33,95
S3	35	29,40	4,40	33,80
S4	35	30,90	3,05	33,95

7.1 Aktivní kyselost

Na Obr. 5 jsou porovnány naměřené výsledky hodnot pH u všech 4 vyrobených šarží sýrů.



Obr. 5 : Výsledky aktivní kyselosti

V grafu je vidět klesající trend hodnot aktivní kyselosti, který odpovídá postupnému okyselení prostředí vznikem kyseliny mléčné během fermentace laktózy [11,40].

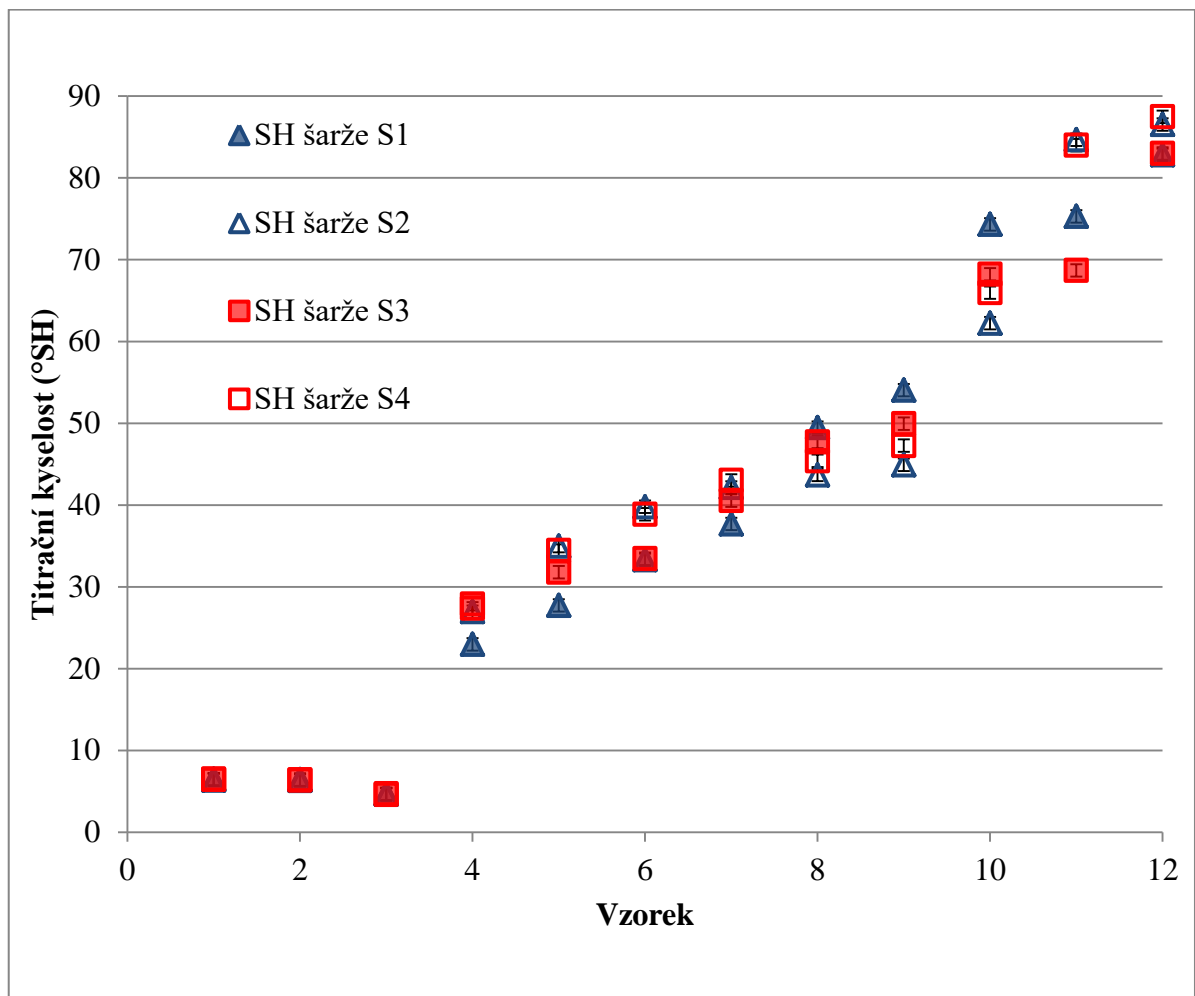
Výchozí hodnota pH mléka se pohybovala v průměru v rozmezí od 6,46 do 6,68 ($P \geq 0,05$), což je běžná hodnota pH syrového mléka [18]. Hodnota pH u syrovátky byla vždy nižší než hodnota pH mléka, jak syrového tak i standardizovaného ($P < 0,05$). Hodnota pH syrovátky se pohybovala v průměru v rozmezí 6,27 – 6,42 ($P \geq 0,05$). V průměru se lišila hodnota pH v syrovátce (vzorek č. 3) o 0,20 na rozdíl od syrového mléka (vzorek č. 1). Běžně se hodnota pH sladké syrovátky pohybuje v průměru okolo 5,9 – 6,4 [66,67], což naše výsledky potvrzují. Nejnižší pokles hodnoty pH mezi vzorkem č. 1 a vzorkem č. 3 byl u šarže S4 a to o 0,10. Naopak nejvyšší pokles aktivní kyselosti mezi těmito vzorky byl u šarže S3 a to o 0,28. Již čerstvě vylisovaný sýr (vzorek č. 4) má statisticky významně nižší pH než výchozí surovina ($P < 0,05$), v průměru o 0,23. Nejnižší pokles pH mezi vzorky č. 1 a č. 4 byl opět u šarže S4 (o 0,12), naopak nejvyšší pokles mezi těmito vzorky byl opět u šarže S3 (o 0,35). Průměrná hodnota pH u čerstvě vylisovaného sýra se pohybovala mezi 6,25 – 6,40 ($P \geq 0,05$).

V průběhu prokysávání došlo k intenzivnímu snížení aktivní kyselosti, které je statisticky významné ($P < 0,05$), průměrně o 0,85 mezi vzorkem č. 4 a vzorkem č. 9. Největší pokles hodnoty pH byl u šarže S1, kdy aktivní kyselost klesla mezi těmito vzorky o 0,95, naopak nejnižší pokles hodnot pH mezi těmito vzorky byl u šarže S2, a to o 0,71. Hodnota pH u vzorku sýra po 15 hodinách prokysávání se pohybovala v průměru v rozmezí 5,30 – 5,61 ($P \geq 0,05$). K poklesu hodnoty pH došlo ještě 12 hodin po solení a to průměrně o 0,31 mezi vzorky č. 9 a č. 10. Průměrná hodnota pH ve vzorku sýra odebraném 12 hodin po solení se pohybovala v rozmezí 5,01 – 5,38. Další pokles aktivní kyselosti už byl jen minimální. Pokles hodnot pH mezi vzorky č. 9. a č. 12 byl statisticky významný ($P < 0,05$). Celkový pokles aktivní kyselosti byl průměrně o 1,48. U šarže S1 je celkový pokles hodnot pH mezi vzorky č. 1 a č. 12 o 1,56, a to z hodnoty 6,54 na 4,98. U šarže S2 se hodnota pH celkově snížila ze všech šarží nejméně, a to z hodnoty 6,46 na 5,30, tedy o 1,16. U šarže S3 je celkový pokles aktivní kyselosti z hodnoty 6,68 na 4,92, tedy o 1,76, který je ze všech šarží největší. U šarže S4 se hodnota pH celkově snížila o 1,45, a to z hodnoty 6,52 na 5,07. Hodnota pH vzorků hotových sýrů odebraných 48 hodin po solení se pohybovala v rozmezí od 4,92 do 5,30 ($P \geq 0,05$), což jsou běžné hodnoty pH pro sýry holandského typu [23]. Ze získaných výsledků je také patrné, že účinek obou použitých kultur

byl obdobný, což může být dáno tím, že obě kultury jsou určeny pro výrobu sýrů holandského typu.

7.2 Titrační kyselost

Na Obr. 6 jsou porovnány naměřené výsledky titrační kyselosti (vyjádřené jako °SH) u všech 4 vyrobených šarží sýrů. V grafu je vidět stoupající trend hodnot titrační kyselosti, který odpovídá postupnému okyselování prostředí vznikem kyseliny mléčné [11,40].



Obr. 6: Výsledky titrační kyselosti

Hodnota titrační kyselosti u výchozí suroviny se pohybovala v rozmezí od 6,37 °SH do 6,50 °SH, což odpovídá hodnotám titrační kyselosti pro normální mléko [70]. Hodnoty byly u všech šarží srovnatelné ($P \geq 0,05$). Hodnota titrační kyselosti u syrovátky (vzorek č. 3) byla vždy nižší než u syrového mléka (vzorek č. 1), v průměru o 1,80 °SH ($P < 0,05$).

Průměrná hodnota titrační kyselosti syrovátky se pohybovala mezi 4,60 °SH až 4,70 °SH. Hodnoty titrační kyselosti se u jednotlivých šarží významně nelišily ($P \geq 0,05$). U čerstvě vylisovaného sýru (vzorek č. 4) hodnota titrační kyselosti statisticky významně vzrostla na rozdíl od výchozí suroviny ($P < 0,05$), v průměru o 19,86 °SH. Nejnižší vzrůst titrační kyselosti byl u šarže S1, a to o 16,6 °SH, naopak nejvyšší vzrůst byl u šarže S3, a to o 21,45 °SH. Hodnota titrační kyselosti u vzorku čerstvě vylisovaného sýra se pohybovala průměrně v rozmezí od 22,97 °SH do 27,38 °SH ($P < 0,05$). Během prokysávání došlo k intenzivnímu nárůstu hodnoty titrační kyselosti. Průměrný nárůst titrační kyselosti mezi vzorky č. 4 a č. 9 je statisticky významný, a byl 22,75 °SH ($P < 0,05$). Nejnižší vzrůst titrační kyselosti mezi těmito vzorky byl u šarže S2 (o 17,96 °SH), naopak nejvíce se titrační kyselost zvýšila mezi těmito vzorky u šarže S1 (o 31,08 °SH). Ve vzorku sýra po 15 hodinách prokysávání se pohybovala hodnota titrační kyselosti v průměru od 44,92 °SH do 54,05 °SH. Mezi vzorkem č. 9 (sýr po 15 hodinách prokysávání) a vzorkem č. 12 (sýr po 48 hodinách v průběhu zrání) se titrační kyselost statisticky významně zvýšila, průměrně o 35,91 °SH ($P < 0,05$), kdy nejnižší vzrůst titrační kyselosti byl u šarže S1 (o 28,77 °SH) a naopak nejvyšší vzrůst titrační kyselosti mezi těmito vzorky byl u šarže S2 (o 41,61 °SH). Hodnota titrační kyselosti u vzorků sýrů odebraných 48 h po solení se pohybovala v průměru od 82,82 °SH do 87,47 °SH. Průměrný celkový nárůst hodnot titrační kyselosti byl o 78,51 °SH. U šarže S1 byl celkový vzrůst nejnižší ze všech šarží, a to 76,45 °SH. U šarže S2 se titrační kyselost celkově zvýšila o 80,06 °SH. V případě šarže S3 byl celkový vzrůst titrační kyselosti o 76,56 °SH. Nejzrůstatnější zvýšení titrační kyselosti bylo u šarže S4, a to o 80,97 °SH. Z naměřených výsledků titrační kyselosti je patrný podobný účinek obou použitých kultur, což potvrzují i získané výsledky aktivní kyselosti (viz Obr. 5).

7.3 Sušina

V Tab. 4 jsou uvedeny stanovené výsledky obsahu sušiny u všech výrob. Průměrná hodnota sušina výchozí suroviny, tedy syrového mléka (vzorek č. 1) se při porovnání všech šarží výrazně nelišila, pohybovala se v rozmezí od 13,33 do 13,97 % ($P \geq 0,05$), což odpovídá běžným hodnotám pro obsah sušiny v mléce, který se pohybuje mezi 12 až 14 % [68]. Sušina mléka standardizovaného na nižší tučnost byla samozřejmě nižší ($P < 0,05$), (průměrně o 2,61 % než sušina mléka standardizovaného na vyšší tučnost, právě z důvodu rozdílu v obsahu tuku, který je součástí sušiny. U syrovátky (vzorek č. 3) se obsah sušiny statisticky významně lišil v porovnání s mlékem, byl téměř o polovinu nižší ($P < 0,05$). Hodnota

sušiny stanovená u syrovátky se pohybovala v průměru v rozmezí od 6,72 do 7,11 % ($P \geq 0,05$). Běžný obsah sušiny v syrovátce se pohybuje v rozmezí 5 – 7 %, čemuž stanovené hodnoty odpovídají [66,67]. Průměrný obsah sušiny u vzorků čerstvě vylisovaných sýrů se pohyboval v rozmezí od 41,29 % do 52,77 % ($P < 0,05$). V průběhu prokysávání došlo k postupnému nárůstu obsahu sušiny vlivem mírného vysychání sýrů. Průměrný nárůst obsahu sušiny mezi vzorky č. 4 a č. 9 byl statisticky významný, zvýšil se o 1,36 % ($P < 0,05$).

Tab. 4: Obsah sušiny v průběhu výroby a zrání sýrů

Vzorek	Sušina (%)			
	S1	S2	S3	S4
1	13,54 ± 0,02	13,48 ± 0,02	13,33 ± 0,04	13,97 ± 0,05
2	12,86 ± 0,05	10,02 ± 0,04	12,90 ± 0,04	10,53 ± 0,03
3	6,97 ± 0,04	6,72 ± 0,04	7,06 ± 0,03	7,11 ± 0,02
4	52,77 ± 0,24	41,29 ± 0,32	50,86 ± 0,06	42,36 ± 0,05
5	52,98 ± 0,51	40,39 ± 0,24	52,05 ± 0,17	43,94 ± 0,07
6	51,43 ± 0,51	43,38 ± 0,09	53,24 ± 0,20	44,38 ± 0,22
7	52,25 ± 0,66	42,33 ± 0,05	52,91 ± 0,08	44,42 ± 0,18
8	52,08 ± 0,20	43,63 ± 0,17	53,60 ± 0,11	44,37 ± 0,26
9	53,71 ± 0,21	42,15 ± 0,03	52,39 ± 0,28	44,48 ± 0,23
10	53,99 ± 0,05	47,70 ± 0,06	54,91 ± 0,07	46,90 ± 0,06
11	54,05 ± 0,02	48,67 ± 0,16	53,50 ± 0,03	46,57 ± 0,09
12	55,21 ± 0,04	46,40 ± 0,08	54,55 ± 0,16	47,03 ± 0,26

K dalšímu mírnému nárůstu obsahu sušiny u vyrobených sýrů došlo po solení sýrů, což je dáno únikem některých složek sušiny do solné lázně. Vlivem zvýšeného osmotického tlaku též dochází k úniku syrovátky. Obsah sušiny u vzorků sýra odebraných

po 15 hodinách prokysávání (vzorek č. 9) byl průměrně v rozmezí od 42,15 % do 53,71 % ($P < 0,05$). Nárůst obsahu sušiny mez vzorky č. 9 a č. 12, tedy v průběhu prvních 48 hodinách zrání, byl statisticky významný ($P < 0,05$). Průměrná hodnota sušiny u vzorků odebraných po 48 hodinách po solení (vzorek č. 12) se pohybovala mezi 46,40 % až 55,21 % ($P < 0,05$), což odpovídá hodnotám sušiny u sýrů, které uvádí zdroj [69]. Mírný nárůst obsahu sušiny v průběhu prvních 48 hodin zrání byl způsoben tím, že kryovakové folie, ve kterých byly sýry zabaleny, jsou polopropustné a během zrání tak dochází k postupnému vysychání sýrů. Obsah sušiny u vzorků šarže S1 a S3 byl vyšší než u vzorků šarže S2 a S4 (průměrně o 10,88 %) ($P < 0,05$), což je dáno vyšším obsahem tuku, který je součástí sušiny, u šarží S1 a S3.

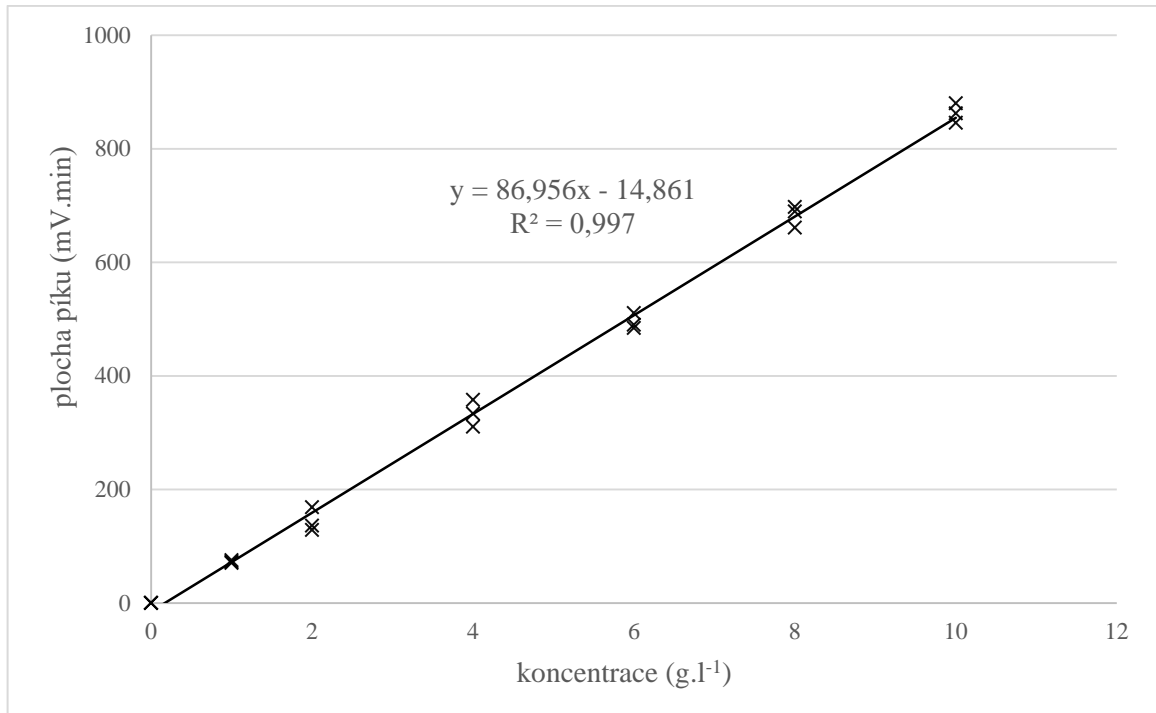
7.4 Laktóza

Tímto experimentem byl sledován vliv různé tučnosti sýrů a různých použitých kultur na úbytek laktózy v průběhu výroby a zrání přírodních sýrů holandského typu. Ke snižování obsahu laktózy dochází prostřednictvím procesu fermentace, kdy se laktóza rozkládá činností bakterií mléčného kvašení na kyselinu mléčnou a další produkty, důležité pro charakteristické sensorické vlastnosti sýrů [2,7,11,40].

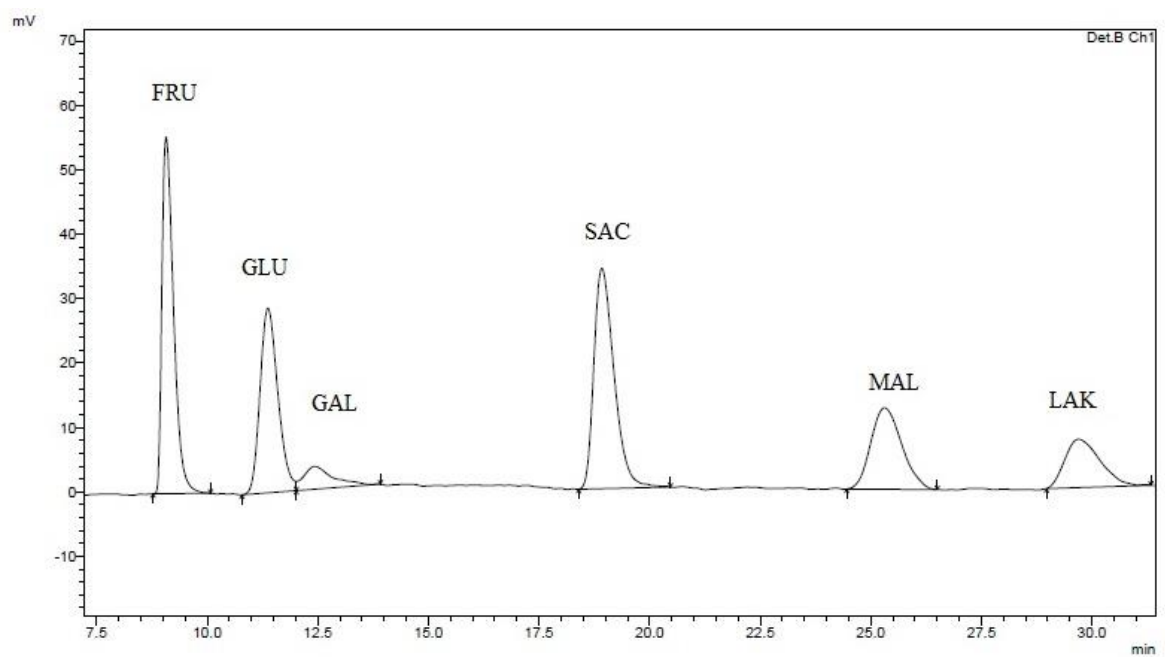
Hodnoty obsahu laktózy byly získány výpočtem pomocí rovnice kalibrační křivky pro laktózu, uvedené na Obr. 7. Kalibrační křivka zobrazuje závislost plochy píků na koncentracích jednotlivých roztoků standardů laktózy. Z kalibrační křivky je patrná mez stanovitelnosti pro laktózu (LOQ – limit of quantification – 1 g.l^{-1}).

Na obr. 8 je zobrazen výřez chromatogramu směsného standardu cukrů o koncentraci jednotlivých sacharidů 10 g.l^{-1} .

V Tab. 5 jsou uvedeny stanovené výsledky obsahu laktózy u jednotlivých šarží. Výsledky jsou uvedeny v hmotnostních % vztažených na obsah sušiny.



Obr. 7: Kalibrační křivka pro laktózu



Obr. 8: Chromatogram směšného standardu

Tab. 5: Obsah laktózy v průběhu výroby a zrání sýrů

Vzorek	Laktóza (% sušiny)			
	S1	S2	S3	S4
1	39,67 ± 1,85	41,27 ± 2,16	41,12 ± 2,07	39,98 ± 1,92
2	41,36 ± 2,07	54,66 ± 2,38	40,88 ± 1,92	53,40 ± 2,51
3	86,52 ± 3,43	87,28 ± 3,50	81,57 ± 3,17	82,59 ± 3,56
4	4,00 ± 0,15	5,70 ± 0,29	3,95 ± 0,16	5,72 ± 0,34
5	3,41 ± 0,08	5,27 ± 0,17	3,58 ± 0,07	3,88 ± 0,09
6	2,96 ± 0,05	3,88 ± 0,09	3,30 ± 0,06	3,55 ± 0,07
7	2,64 ± 0,06	3,16 ± 0,07	3,14 ± 0,06	3,43 ± 0,08
8	2,56 ± 0,07	2,53 ± 0,06	2,72 ± 0,05	2,82 ± 0,06
9	1,55 ± 0,04	1,62 ± 0,03	0,96 ± 0,03	1,14 ± 0,05
10	1,08 ± 0,03	0,80 ± 0,03	NS*	NS
11	NS	NS	NS	NS
12	NS	NS	NS	NS

*NS – nestanovenno (obsah laktózy pod mezí stanovitelnosti)

Ve vzorcích č. 1, tedy v syrovém mléce je obsah laktózy u všech šarží srovnatelný ($P \geq 0,05$). Průměrná hodnota obsahu laktózy v syrovém mléce se pohybovala od 39,67 % do 41,27 % v sušině. Ve vzorku č. 2 je obsah laktózy v mléce standardizovaném na nižší tučnost statisticky významně vyšší (průměrná hodnota u šarže S2 54,66 %, průměrná hodnota u šarže S4 53,40 %), což je způsobeno nižším obsahem sušiny, než u tučnějšího mléka, které má vyšší obsah sušiny (s průměrnou hodnotou obsahu laktózy u šarže S1 41,36 %, průměrná hodnota obsahu laktózy u šarže S3 40,88 %) ($P < 0,05$). Ve vzorku č. 3 (syrovátka), je obsah laktózy srovnatelný v rámci dvojic sýrů S1 – S2 (průměrná hodnota u šarže S1 byla 86,52 %, průměrná hodnota šarže u S2 byla 87,28 %) a S3 – S4 (průměrná hodnota u šarže S3 byla 81,57 %, průměrná hodnota u šarže S4 byla 82,59 %) ($P \geq 0,05$). U sýrů S3 a S4, u kterých byla použita kultura CHN-22, je patrný statisticky

významně nižší obsah laktózy ($P < 0,05$) – je tedy pravděpodobné, že tato kultura fermentovala již v průběhu prvních fází výroby sýrů větší část laktózy, než kultura Flora Danica. U vzorku č. 4 je ve všech šaržích patrný výrazný pokles obsahu laktózy v sušině čerstvě vylisovaného sýra ($P < 0,05$), což odpovídá odchodu největšího podílu laktózy do syrovátky [2,7]. V sýrech S2 a S4 je obsah laktózy statisticky významně vyšší ($P < 0,05$) (průměrná hodnota obsahu laktózy u sýra S2 byla 5,70 %, průměrná hodnota u sýra S4 byla 5,72 %), než u sýrů S1 a S3 (průměrně o 1,74 %) což je opět způsobeno nižší sušinou těchto vzorků sýrů s nižší tučností. U vzorků 5 – 9 lze pozorovat postupný pokles obsahu laktózy v průběhu prokysávání sýrů. Srovnáme-li obsah laktózy na začátku a na konci prokysávání (po 15 hodinách), je rozdíl statisticky významný ($P < 0,05$). Během prokysávání dochází k postupnému smazání rozdílů mezi různě tučnými sýry – na konci prokysávání již rozdíly v obsahu laktózy nejsou tak výrazné (obsah tuku má tedy na obsah laktózy vliv zejména u mléka, a cca v prvních 6 hodinách prokysávání sýrů). V průběhu prokysávání došlo k nejvyššímu poklesu obsahu laktózy u šarže S1, kdy klesla hodnota obsahu laktózy z 3,41 % po 3 hodinách prokysávání na 1,55 po 15 hodinách prokysávání, tedy o 45,5 %, což je téměř o polovinu. U šarže S2 došlo v průběhu prokysávání k poklesu obsahu laktózy z 5,28 % na 1,62 %, tedy o 30,6 %. U šarže S4 se hodnota obsahu laktózy snížila z 3,88 % po 3 hodinách prokysávání na 1,14 % po 15 hodinách prokysávání, tedy o 29,4 %. Nejnižší pokles obsahu laktózy byl u šarže S3, kdy byl obsah laktózy na začátku prokysávání (po 3 hodinách) 3,58 % a po 15 hodinách prokysávání klesl na 0,96 %, tedy o 27,0 %. U vzorku č. 10 (sýr v prvních 12 hodinách zrání) lze konstatovat, že kultura CHN-22 fermentovala laktózu na kyselinu mléčnou o něco rychleji, než Flora Danica – u sýrů S3 a S4 totiž laktóza nebyla detekována již 12 hodin po solení; na rozdíl od sýrů vyrobených s použitím kultury Flora Danica, kde laktóza nebyla detekována až 24 hodin po solení. Rychlejší fermentace kulturou CHN-22 nebyla potvrzena při monitorování změn aktivní a titrační kyselosti (účinek obou kultur byl v tomto ohledu srovnatelný). To může být způsobeno např. fermentací jiných cukrů než laktózy (zejména volné glukózy, galaktózy, fruktózy, aminocukrů, deoxycukrů a fosforečných esterů cukrů), které se v mléce také vyskytují [70], ale které byly pod mezí stanovitelnosti použité metody. Navíc aktivní a titrační kyselost představují sumu všech kyselých reagujících složek mléka, tedy nejen kyseliny mléčné vzniklé fermentací laktózy.

ZÁVĚR

Teoretická část diplomové práce se zabývá přírodními sýry holandského typu, jejich charakterizací a výrobou, dále práce popisuje strukturu a metabolismus laktózy. Teoretická část práce se také věnuje úpravě vzorků před stanovením laktózy a dále práce popisuje možnosti stanovení laktózy, zejména metodu HPLC s refraktometrickou detekcí.

Praktická část diplomové práce je zaměřena na sledování obsahu laktózy v průběhu výroby a na začátku zrání přírodních sýrů holandského typu. Pro sledování změn v obsahu laktózy byly vyrobeny 4 různé modelové vzorky sýrů. Vyrobené vzorky se lišily v tučnosti a v použitých sýrařských kulturách. Pro výrobu vzorků sýrů byl zvolen teoretický obsah tuku v sušině 10 % a 50 % (výchozí tučnost mléka pro výrobu těchto sýrů byla 0,5 a 3,5 %). Sýrařské kultury použité pro výrobu sýrů byly Flora Danica a CHN-22, obě od výrobce Christian Hansen. Kultury se lišily v obsahu leukonostoků.

K analýze byly odebírány vzorky podle zvoleného odběrového schématu, podle prostudované literatury. Ukončení odběru vzorků bylo navrženo správně, což potvrdila praktická část experimentu - u kultury CHN-22 nebyla laktóza detekována již 12 hodin po solení a u kultury Flora Danica nebyla laktóza detekována 24 hodin po solení.

Hodnota pH u výchozí suroviny, tedy u syrového mléka, byla od 6,46 do 6,68. Postupně pH klesalo až na 4,92 až 5,30, což je hodnota pH naměřená u hotových vzorků sýrů po prvních 48 hodinách zrání. Titrační kyselost byla u vzorku syrového mléka zjištěna v rozmezí od 6,37 °SH do 6,50 °SH. Tato hodnota postupně vzrostla až na 82,82 °SH až 87,47 °SH, což je titrační kyselost vzorků sýrů po 48 hodinách zrání. Zjištěné hodnoty aktivní a titrační kyselosti odpovídají postupnému okyselování prostředí, které je způsobeno fermentací laktózy na kyselinu mléčnou. Naměřené hodnoty sušiny se zvyšovaly z 13,33 až 13,97 %, což je obsah sušiny zjištěný u syrového mléka, až na 56,40 % až 55,21 %, což jsou hodnoty obsahu sušiny zjištěné ve vzorcích sýru po prvních 48 hodinách zrání. Nárůst obsahu sušiny je dán odchodem syrovátky při lisování a solení a také vysycháním sýrů během zrání.

Analýzou laktózy byl zjištěn obsah laktózy v sušině u syrového mléka od 39,67 % do 41,27 % v sušině. Z výsledků obsahů laktózy zjištěných v syrovátce, které byly u sýrů vyrobených za použití kultury CHN-22 nižší, lze usuzovat, že kultura CHN-22 fermentovala větší část laktózy již v průběhu začátku výroby, než kultura Flora Danica. Obsah laktózy v průběhu výroby sýrů klesal až na 0,80 až 1,08 % v sýru po prvních 12 hodinách zrání

v případě použití kultury Flora Danica. Při použití kultury CHN-22 byl srovnatelný obsah laktózy (0,96 až 1,14 % v sušině) zjištěn již po 15 hodinách prokysávání sýru. Obsah laktózy byl pod mezí stanovitelnosti použité metody již po 12 hodinách zrání v případě aplikace kultury CHN-22 a po 24 hodinách zrání u kultury Flora Danica.

Závěrem lze tedy říct, že u kultury CHN-22 byla fermentace laktózy na kyselinu mléčnou něco rychlejší, než u kultury Flora Danica. Byl tedy prokázán vliv použité kultury na obsah laktózy v sýrech. Rozdílná tučnost vzorků sýrů snižování obsahu laktózy v průběhu výroby a prvních 48 významně hodinách zrání sýrů neovlivnila.

Na průběh zrání přírodních sýrů holandského typu mají zajisté vliv i jiné faktory, které by bylo zajímavé dále analyzovat.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 77 ze dne 6. března 2003, kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje., v platném znění. *Sbírka zákonů České republiky*, 2003, částka 32. ISSN 1211-1244.
- [2] FOX, P.F., GUINEE, T.P., COGAN, T.M. a McSWEENEY, P.L.H. *Fundamentals of Cheese Science*. Gaithersburg: AspenPublishers, 2000. ISBN 978-0-8342-1260-9.
- [3] KADLEC, P., MELZOCH, K., VOLDŘICH, M. a kolektiv. *Technologie potravin: Co byste měli vědět o výrobě potravin?* 1. vydání. Brno: NOVAPRESS, 2009. ISBN 978-80-7418-051-4.
- [4] IBURG, A. *Lexikon sýrů*. 1.vyd. Praha: Soliter, 2004. ISBN 80-7234-379-3.
- [5] FOX, P. F. a McSWEENEY, P.L.H. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. 1 st ed. New York: Blackie Academic & Professional, 1998. ISBN 978-0-4127-2000-0.
- [6] KOLEKTIV AUTORŮ. *Mlékárenská technologie II. Distanční text*. Zlín:Vzdělávací portál Sdružení CEPAC-Morava Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, 2007.
- [7] KADLEC, P a kolektiv. *Technologie potravin II*. Praha: VŠCHT. 2007. ISBN 80-7080-510-2.
- [8] HRABĚ, J., BUŇKA, F., HOZA, I. a BŘEZINA, P. *Technologie potravin živočišného původu: pro kombinovaná studia*. 1. Vyd. – dotisk. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Academia centrum, 2008. ISBN 978-80-7318-521-3.
- [9] BUŇKA, F., PACHLOVÁ, V., BUŇKOVÁ, L. a ČERNÍKOVÁ, M. *Mlékárenská technologie I*. 1. Vydání. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Academia centrum, 2013. ISBN 978-80-7454-254-1.
- [10] ZADRAŽIL K. *Mlékařství*. Česká zemědělská univerzita v Praze, 2002. ISBN 80-86642-15-1.
- [11] FOX, P.F., McSWEENEY, P.L.H., COGAN T.M. a GUINEE T. P. *Cheese Chemistry, Physic and Microbiology*, 3rd ed. Londýn: Elsevier, 2004. ISBN 978-0-08-062343-9.
- [12] VELÍŠEK, J. a HAJŠLOVÁ, J. *Chemie potravin II*. 3. vyd. Tábor: OSSIS.2009. ISBN 978-80-86659-16-9.
- [13] PAPPAA, E., MASSOURASB, T., SOTIRAKOGLUC, K. a KANDARAKISB, I. Formation of volatile compounds in Teleme cheese manufactured with mesophilic and

thermophilic dairy starters. *Small Ruminant Research*, 2013, 111, 110-119. ISSN 0921-4488

[14] PAPPAA, E.C., KANDARAKISB, I., ANIFANTAKISB, E.M. a ZERFIRIDISC, G.K. Influence of types of milk and culture on the manufacturing practices, composition and sensory characteristics of Teleme cheese during ripening. *Food Control*, 2006, 17, 570-581. ISSN 0956-7135

[15] Vyhláška č. 4 ze dne 3. ledna 2008, kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin, v platném znění. *Sbírka zákonů České republiky*. 2008, částka 3, s. 258-340. ISSN 1211-1244.

[16] FARKYE, N.Y. Cheese Technology. *International Journal of Dairy Technology*. 2004, 57, 2/3, 91 – 98. ISSN 1471-0307.

[17] LAW, B. A., TAMIME, A. *Technology of cheesemaking*. 2. vyd. Malden: Blackwell, 2010. ISBN 978-140-5182-980.

[18] GAJDŮŠEK, S. *Laktologie*. 1. vyd. Brno: MZLU v Brně, 2003. ISBN 80- 7157-657-3.

[19] KOZELKOVÁ, M. a ŠUSTOVÁ, K. *Farmářská výroba sýrů a kysaných mléčných výrobků IX.*: Sborník referátů ze semináře s mezinárodní účastí. Brno, 2012. ISBN 978-80-7375-613-0.

[20] FORMAN, L. *Mlékárenská technologie II*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1994. ISBN 80-7080-214-6.

[21] HRABĚ, J., BŘEZINA, P. a VALÁŠEK, P. *Technologie výroby potravin živočišného původu*. 1. vyd. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2006. ISBN 80-7318-405-2.

[22] ZIMÁK, E. *Technologie pro 4. ročník SPŠ*. Praha: SNTL, 1988.

[23] GRIEGER, C. a kolektiv. *Hygiena mlieka a mliečnych výrobkov*. 1. vyd. Bratislava: Príroda, 1990. ISBN 80-07-00253-7.

[24] EARLY, R. *The Technology of Dairy Products*. 2 vyd. Londýn: Blackie A&P, 1998. ISBN 978-0-7514-0344-2.

[25] CALLEC, CH. *Encyklopedie sýrů*. 1. vyd. Dobřejovice: Rebo Productions CZ, 2002. ISBN 80-7234-225-8.

[26] BYLUND, G.M. *Science Dairy Processing Handbook*. Lund: TetraPak Processing systems, 1995.

- [27] DRDÁK, M., STUDNICKÝ, J., MÓROVÁ, E. a KAROVIČOVÁ, J. *Základy potravinářských technologií*. Bratislava: Malé centrum 1996. ISBN 80-967064-1-1.
- [28] KNĚZ, V. *Výroba sýrů*. 2. vyd. Praha:STNL 1960.
- [29] ŠUSTOVÁ, K. a SÝKORA, V. *Mlékárenské technologie*. 1. vyd. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2013. ISBN 978-80-7375-704-5.
- [30] GAJDŮSEK, S. a KLÍČNÍK, V. *Mlékařství*. Brno: Vysoká škola zemědělská v Brně, 1993. ISBN 80-7157-073-7.
- [31] RIDGWAYOVÁ, J. *Sýry. Průvodce světem sýrů*. 2. vyd. Praha: Fortuna Print, 2004. ISBN 80-7321-108-4.
- [32] PACHLOVÁ, V., WEISEROVÁ, E., ŽALUDEK, M., HLADKÁ, K., KRÁČMAR, S. a BUŇKA, F. Změny vybraných jakostních parametrů u přírodních sýrů v průběhu půlročního zrání/skladování za různých teplot. *Potravinářstvo*, 2010, roč. 4, č. 2, s. 217 – 222. ISSN 1338-0230.
- [33] KAMINARIDES, S., STAMOU, P. a MASSOURAS, T. Changes of Organic Acids, Volatile Aroma Compounds and Sensory Characteristics of Halloumi Cheese Kept in Brine. *Food Chemistry*, 2007, 100, 219-225. ISSN 0308-8146.
- [34] WEIMER, B. C. *Improving the Flavour of Cheese*. Boca Raton: CRC Press, 2007. ISBN 978-0-8493-9158-3.
- [35] LAW, B.A. a TAMIME, A.Y. *Technology of Cheesemaking*. 2. ed. Malden: Blackwell, 2010, ISBN 978-1-4051-8298-0.
- [36] GEORGALA, A., MOSCHOPULOU, E., AKTYPIS, A., MASSOURAS, T., KANDARAKIS, I. a ANIFANTAKIS, E. Evolution of Lipolysis During the Ripening of Traditional Feta Cheese. *Food Chemistry*, 2005, 93, 73 – 80. ISSN 0308-8146.
- [37] McSWEENEY, P.L.H., HAYALOGLU, A.A., O'MAHONY, J.A. a BANSAL, N. Perspectives on Cheese Ripening. *Australian Journal of Dairy Technology*, 2006, č. 61, s. 69 – 77. ISSN 0004-9433.
- [38] BUŇKA, F., PACHLOVÁ, V., BUŇKOVÁ, L. a HRABĚ, J. Změny jakosti v průběhu zrání polotvrdých sýrů. *Mezinárodní konference Sýry – Zlín – 2012*. 1. vyd. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2012. 69 s, ISBN 978-80-7454-231-2.
- [39] VELÍŠEK, J. a HAJŠLOVÁ, J. *Chemie potravin 1*. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-15-2.

- [40] CAPLICE, E. a FITZGERALD, G.F. Food Fermentations: Role of Microorganisms in Food Production and Preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 1999, č. 50. s. 131-149. ISSN 0168-1605.
- [41] JANŠTOVÁ, B., a kolektiv. *Technologie mléka mléčných výrobků*. 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2012. ISBN 978-807305637-7.
- [42] KUBÁŇ, V. a KUBÁŇ, P. *Analýza potravin*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007. ISBN 978-80-7375-036-7.
- [43] DAVÍDEK, J. a kolektiv. *Laboratorní příručka analýzy potravin*. 2. vydání. Praha: SNTL, 1981.
- [44] RAESSLER, M. Sample preparation and current applications of liquid chromatography for the determination of non-structural carbohydrates in plants. *Trends in Analytical Chemistry*. 2011, roč. 30, č. 11, s. 1833-1843. ISSN 0165-9936.
- [45] SANZ, M. a MARTÍNEZ-CASTRO, I. Recent developments in sample preparation for chromatographic analysis of carbohydrates. *Journal of Chromatography A*, 2007, roč. 1153, č. 1-2 s. 74-89. ISSN 0021-9673.
- [46] HÁLKOVÁ, J., RIEGLOVÁ, J. a RUMÍŠKOVÁ, M. *Kvantitativní chemická analýza*. 2. vydání. Újezd u Brna: I. Straka, 2001. ISBN 80-86494-01-2.
- [47] DAVÍDEK J. a VELÍŠEK, J. *Analýza potravin*. Praha: VŠCHT, 1992. ISBN 80-7080-163-8.
- [48] CVAK, Z., PETERKOVÁ, L., ČERNÁ, E. *Chemické a fyzikálně-chemické metody v kontrole jakosti mléka a mlékárenských výrobků*. 1. vyd. Praha: VÚPP, Středisko potravinářských informací, 1992. ISBN 80-85120-36-4
- [49] HOLZBECHER, Z. a CHURÁČEK, J. *Analytická chemie*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1987.
- [50] PATNAIK, P. *Dean's Analytical Chemistry Handbook*. 2. vyd. New York: McGraw Hill, 2004. ISBN 978-0-07-141060-1.
- [51] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- [52] WONG, N. a JENNESS, R. *Fundamentals of Dairy Chemistry*. 3. vyd. Gaithersburg: Aspen Publishers, 1999. ISBN:978-0-8342-1360-9.
- [53] HUI, Y. *Dairy Science and Technology Handbook*. New York: VCH, 1993. 1304 s. ISBN 978-15-6081-078.

- [54] MARSHALL, V. M. E. a MABITT, L. A. The use of single starter organisms for yoghurt manufacture. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 1980, 33, 3, s. 129-130. ISSN 1471-0307.
- [55] PETRUSHEVSKA-TOZI, L. a BAUER-PETROVKA, B. Spectrophotometric Determination of Lactose in Milk with PdCl₂. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1997, 45, s. 2112-2114. ISSN 0021-8561.
- [56] KLEYN, D. H. Determination of lactose by an enzymatic method. *Journal of Dairy Science*. 1985, 68, 10, s. 2791-2798. ISSN 0022-0302.
- [57] DONER, L. W. a HICKS, K. B. Lactose and the sugars of honey and maple: Reactions, properties and analysis. In: LINEBACK, D. R., INGLETT, G. E. (Editors). *Food Carbohydrates*. Westport: AVI Publishing Co., 1982. s. 74-112. ISBN 978-0-8705-5400-1.
- [58] KRÍŽENECKÁ, S. a SYNEK, V. *Základy analytické chemie*. 1. vyd. Ústí nad Labem: Univerzita J.E. Purkyně v Ústí nad Labem, Fakulta životního prostředí, 2014. ISBN 978-80-7414-804-0.
- [59] NOVÁKOVÁ, L. a DOUŠA, M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Praha: Europrint, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [60] CVAČKA, J. *Instrumentace pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii*. Praha: Univerzita Karlova v Praze, 2010.
- [61] BARTUŠEK, M. a PAZOUREK, J. *Základy metod analytické chemie: pro bakalářské studijní programy*. Brno, 2002.
- [62] MOLDOVEANU, C. S. a DAVID, V. *Essentials in modern HPLC Separations*. Waltham: Elsevier, 2013. ISBN 978-0-12-385013-3.
- [63] ČSN ISO 6731: *Mléko, smetana a zahuštěné neslazené mléko – Stanovení obsahu celkové sušiny (Referenční metoda)*. Praha, Český normalizační institut, 1998.
- [64] ČSN EN ISO 5534: *Sýry a tavené sýry. Stanovení obsahu celkové sušiny (Referenční metoda)*. Praha, Český normalizační institut, 1996.
- [65] BORKOVÁ M. a kolektiv. Stanovení laktosy v mléčných materiálech s upraveným obsahem mléčné sušiny metodou HPLC. *Mlékařské listy*, 2013, č. 139, s. 5. ISSN 0139-6986.
- [66] LUKÁŠOVÁ, J. a kolektiv. *Hygiena a technologie mléčných výrobků*. 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2001. ISBN 80-7305-415-9.

- [67] GAJDŮŠEK, S. *Mlékařství II*. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2000. ISBN 80-7157-342-6.
- [68] LUKÁŠOVÁ, J. *Hygienu technologie produkce mléka*. 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 1999. ISBN 80-85114-53-4.
- [69] NECIDOVÁ L. a kolektiv. Fyzikálně-chemická a mikrobiologická analýza biomléčných výrobků. *Mlékařské listy*, 2011, č. 126, s. 11. ISSN 0139-6986.
- [70] NAVRÁTILOVÁ a kolektiv. *Hygienu produkce mléka*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2012. ISBN 978-80-7305-625-4.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

CPM	Celkový počet mikroorganismů.
FRU	Fruktóza
GAL	Galaktóza
GLU	Glukóza
HPLC	High Performance Liquid Chromatography/Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.
LAK	Laktóza
LOQ	Limit of quantification/Mez stanovitelnosti
MAL	Maltóza
MIR	Middle Infrared/Střední infračervená oblast
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NIR	Near Infrared/Blízká infračervená oblast
PE	Pasterační efekt
RID	Refractive index detector/Refraktometrický detektor
SAC	Sacharóza
UV-VIS	Ultraviolet and Visible Spektroskopie/Ultravioletná a viditelná spektroskopie

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Laktóza [39].....	22
Obr. 2: Glykolýza prostřednictvím homofermentativních a heterofermentativních bakterií mléčného kvašení [40]	23
Obr. 3: Schéma kapalinového chromatografu [58].....	30
Obr. 4: Schéma refraktometrického detektoru (interferometrický model) [51]	33
Obr. 5 : Výsledky aktivní kyselosti	42
Obr. 6: Výsledky titrační kyselosti	44
Obr. 7: Kalibrační křivka pro laktózu	48
Obr. 8: Chromatogram směsného standardu.....	48

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Označení odebraných vzorků	39
Tab. 2: Charakteristika jednotlivých vyrobených sýrů	41
Tab. 3: Výtěžnosti vyrobených sýrů	42
Tab. 4: Obsah sušiny v průběhu výroby a zrání sýrů	46
Tab. 5: Obsah laktózy v průběhu výroby a zrání sýrů	49