

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality zemědělských produktů



Validace využitelnosti standardizovaného statického in vitro trávicího modelu pro mléčné matrice s ohledem na proteasovou a lipasovou aktivitu

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Markéta Pedlíková

Vedoucí práce: Ing. Miroslava Potůčková

© 2015 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Validace využitelnosti standardizovaného statického in vitro trávicího modelu pro mléčné matrice s ohledem na proteasovou a lipasovou aktivitu" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 10. 4. 2015

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala mé vedoucí diplomové práce Ing. Miroslavě Potůčkové za odborné vedení, cenné rady a trpělivost při zpracovávání této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat panu Ing. Ivu Doskočilovi za zapůjčení laboratoře a všech přístrojů. V neposlední řadě také děkuji zaměstnancům obilné laboratoře za asistenci při stanovení dusíkatých látek.

Validace využitelnosti standardizovaného statického in vitro trávícího modelu pro mléčné matrice s ohledem na proteasovou a lipasovou aktivitu

Souhrn

Cílem diplomové práce byla validace využitelnosti standardizovaného statického in vitro trávícího modelu pro mléčné matrice s ohledem na proteasovou a lipasovou aktivitu.

Mezi základní procesy lidského trávení patří výměny energie a látek, mechanické a chemické zpracování potravy a také resorpce a transport rozložených živin do krevního a mízního oběhu. Jednotlivé fáze trávícího systému probíhají v ústech, v žaludku a dále v tenkém a tlustém střevě.

Pojem „in vitro trávení“ znamená doslova „trávení ve zkumavce“, účelem in vitro trávících modelů je navodit uměle trávící procesy napodobením in vivo fyziologických podmínek. Mezi kladné aspekty in vitro trávících procesů patří rychlost, finanční a pracovní nenáročnost. Hlavní nevýhodou je neporovnatelnost výsledků mezi jednotlivými trávícími modely kvůli různým druhům enzymů, jejich aktivitě a koncentraci, dobou trávení a hodnotou pH během trávících procesů a koncentraci solí.

V praktické části byla provedena simulace trávícího procesu 20 mléčných matric v aktuálním modelu standardizovaného statického in vitro trávícího traktu skupiny Infogest Working Group. Tato skupina pracuje v oblasti trávení s cílem sjednotit podmínky pro simulované trávení potravy.

Proteasová a lipasová aktivita tohoto modelu byla stanovena pomocí obsahu kaseinu a volných mastných kyselin nativních substrátů a jejich trávenin. Byl hodnocen vliv na stupeň degradace kaseinových proteinů a volných mastných kyselin.

Bylo zjištěno, že mléčná bílkovina kasein je v simulovaném gastrointestinálním traktu zpracována velmi rychle. S výjimkou mléka sterilovaného v obalu a sýrů došlo během procesu k její úplné degradaci. Rozdíly v proteolytické aktivitě při trávení jednotlivých mléčných matric nebyly statisticky významné na $P(\alpha) = 0,05$. Stejně tak nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly na $P(\alpha) = 0,05$ v lipasové aktivitě během trávení analyzovaných substrátů, ačkoliv nejvyšší množství volných mastných kyselin vznikalo při gastrointestinální hydrolyze syrového a pasterovaného kravského mléka.

Klíčová slova: in vitro trávení, mléčné výrobky, kasein, volné mastné kyseliny

Suitability validation of standardised static in vitro digestion method for dairy matrix considering to protease and lipase activity

Summary

The aim of the thesis was suitability validation of a standardized static in vitro gastrointestinal model for the dairy matrix considering protease and lipase activity.

The basic processes of human digestion include the exchange of energy and materials, mechanical and chemical processing of food and absorption and transport of nutrients into the blood and lymphatic circulation. Phases of the digestive system are in the mouth, the stomach and the small and large intestine.

The term "in vitro digestion" literally means "digestion in glass". The purpose of the in vitro digestion model is artificially simulating digestion processes in vivo physiological conditions. The positive aspects of in vitro digestion processes are speed, financial and work modesty. The main disadvantage is non-comparability of results between digestive models for different types of enzymes, their activity and concentration, digestion time and pH during the digestive processes and salt concentration.

In the practical part was simulated digestive process of 20 dairy matrix in the current model of standardized static in vitro gastrointestinal tract of Infogest Working Group. This group harmonizing the conditions for the simulated digestion of food.

The protease and the lipase activity of this model was determined using casein content and free fatty acids and their native substrates chyme. It was evaluated the effect of the degree of degradation of casein protein and free fatty acids.

It has been found that the milk protein casein in simulated gastrointestinal tract processed very quickly. With the exception of sterilized milk and cheese in the package occur during the process to its complete degradation. Differences in the proteolytic and lipase activity of the digestion of each dairy matrix were not statistically significant at $P(\alpha) = 0,05$. The highest amount of free fatty acids was originated in the gastrointestinal hydrolysis of raw and pasteurized bovine milk.

Keywords: in vitro digestion, dairy products, casein, free fatty acids

Obsah

1 Úvod	1
2 Cíl práce	2
2.1 Hypotéza	2
3 Literární rešerše	3
3.1 Lidské trávení	3
3.1.1 Orální trávení.....	4
3.1.2 Gastrické trávení.....	4
3.1.3 Trávení v tenkém střevě.....	5
3.1.4 Trávení v tlustém střevě.....	6
3.2. In vitro metody trávení	6
3.2.1 Standardizovaný statický in vitro model trávicího traktu Infogest.....	7
3.3 In vivo metody trávení	8
3.3.1 Sledování peptidů během in vivo trávení.....	9
3.4 Gastrointestinální chování potravin	9
3.4.1 Charakterizace průchodu a růstu mikroorganismů v trávicím traktu	9
3.4.2 Trávení mléčných bílkovin.....	12
3.4.2.1 Vliv fyzikálně-chemických vlastností mléčných bílkovin.....	13
3.4.2.2 Vliv tepelného ošetření na trávení mléčných bílkovin.....	13
3.4.2.3 Vliv trávení na alergenicitu	15
3.4.2.4 Vliv trávení na biologickou aktivitu	16
3.4.2.5 Vliv komplexace na trávení mléčných bílkovin.....	17
3.4.2.6 Interakce mléčných proteinů a sacharidů v průběhu trávení.....	19
3.4.2.7 Změny v dostupnosti biologicky aktivních látek při průchodu trávicím traktem..	19
4 Experimentální část	21
4.1 Materiály, chemikálie, přístroje a zařízení	21
4.1.1 Materiály	21
4.1.2 Chemikálie	21
4.1.3 Přístroje a zařízení	23
4.2 Metody	23
4.2.1 Hydrolýza mléčných matric	23
4.2.2 Analytické metody.....	25
4.2.2.1 Stanovení obsahu kaseinu u tekutých a polotekutých mléčných matric a trávenin	25
4.2.2.2 Stanovení obsahu kaseinu u tuhých mléčných matric	26
4.2.2.3 Kalibrace stanovení obsahu kaseinu u trávenin.....	27

4.2.2.4 Stanovení obsahu volných mastných kyselin u tekutých a polotekutých mléčných matric a trávenin	28
4.2.2.5 Stanovení obsahu volných mastných kyselin u tuhých mléčných matric	29
4.2.2.6 Kalibrace stanovení obsahu VMK trávenin	31
4.2.3 Statistické metody	32
5 Výsledky	33
5.1 Stanovení vlivu mléčné matrice na proteasovou aktivitu	33
5.1.1 Stanovení vlivu druhu mléka na proteasovou aktivitu	34
5.1.2 Stanovení vlivu obsahu tuku mléčných matric na proteasovou aktivitu	36
5.1.3 Stanovení vlivu tepelného ošetření mléčné matrice na proteasovou aktivitu	37
5.1.4 Stanovení vlivu fermentace a typu mléčných kultur na proteasovou aktivitu	39
5.1.5 Stanovení vlivu délky zrání sýrů na proteasovou aktivitu	40
5.1.6 Stanovení vlivu druhu sušeného mléčného výrobku na proteasovou aktivitu	42
5.2. Stanovení vlivu mléčné matrice na lipasovou aktivitu	42
5.2.1 Stanovení vlivu druhu mléka na lipasovou aktivitu	43
5.2.2 Stanovení vlivu obsahu tuku mléčné matrice na lipasovou aktivitu	45
5.2.3 Stanovení vlivu tepelného ošetření mléčné matrice na lipasovou aktivitu	46
5.2.4 Stanovení vlivu fermentace a typu mléčných matric na lipasovou aktivitu	48
5.2.5 Stanovení vlivu délky zrání sýrů na lipasovou aktivitu	49
5.2.6 Stanovení vlivu druhu sušeného mléčného výrobku na lipasovou aktivitu	51
6 Diskuse	53
7 Závěr	55
8 Seznam literatury	57
9 Seznam použitých zkratk	61
10 Přílohy	62
10.1 Seznam příloh	62

1 Úvod

Pojem „in vitro“ znamená „ve zkumavce“ nebo také doslova „ve skle“ a vztahuje se k experimentům užívajícím například různé typy izolovaných orgánů, tkání, buněk a enzymů v umělých podmínkách laboratoře. Výhodou je eliminace zvířecího modelu a tím snížení počtu usmrcovaných laboratorních zvířat (především pro testy toxicity). Testování in vitro je oproti in vivo metodám méně finančně nákladné, umožňuje rychlejší získání výsledků a možnost detailně měřit a hodnotit metabolismus tkání z různých živočišných druhů. Naopak problematická může být špatná reprodukovatelnost některých výsledků in vitro metod, jelikož určité systémy nejsou v umělém prostředí funkční (v in vitro systému ztrácí funkci např. některé tkáně se specifickou aktivitou) (Brimer, 2011; Lipscomb and Poet, 2008).

Simulované in vitro gastrointestinální trávení je široce využíváno v mnoha oblastech potravinářství a nutriční vědy. Bylo navrženo několik různých modelů trávení, které často bránily možnost porovnat výsledky z různých výzkumných týmů. Enzymy z různých zdrojů (z prasat, králíků nebo lidského původu) se totiž liší ve své aktivitě a charakterizaci. Také rozdíly v pH a stanoveném trávicím času, přítomnost fosfolipidů, žaludeční lipasy a trávicích emulgátorů mění aktivitu enzymů a tedy průběh procesu (Minekus et al., 2014).

Toto byl důvod pro vznik standardizovaného statistického in vitro trávícího modelu skupiny Infogest Working Group na základě mezinárodní spolupráce. Tento model se snaží synchronizovat a harmonizovat postup co nejvíce se blížící realitě, a zároveň se pokouší vytvořit standardizovaný postup, díky němuž budou výsledky výzkumů v této oblasti vzájemně srovnatelné a reprodukovatelné.

2 Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo v teoretické části zpracování literární rešerše shrnující současné poznatky o gastrointestinálním chování potravin, respektive mléka a mléčných výrobků, které jsou studovány pomocí in vitro metod simulujících trávicí procesy.

V praktické části byla provedena validace mezinárodního konsensu statického in vitro modelu trávicího traktu Infogest Working Group pro použití k simulaci trávení mléka a mléčných výrobků.

2.1 Hypotéza

Pokles obsahu kaseinu a nárůst obsahu volných mastných kyselin po hydrolýze mléčné matrice trávicím traktem je závislý na druhu a složení mléčné matrice.

3 Literární rešerše

3.1 Lidské trávení

Lidské gastrointestinální trávení proteinů a lipidů je složitý soubor mechanických, fyzikálně-chemických a fyziologických pochodů. Trávení ovlivňuje mnoho faktorů, jako je například typ potravy (skupenství), pH, sekrece enzymů, peristaltické pohyby, vyprazdňování žaludku a doba trvání trávení (Devle et al., 2014). Základními funkcemi trávicího systému jsou procesy výměny látek a energie, mechanické a chemické zpracování potravy a resorpce a transport rozložených živin do krevního a mízního oběhu. Energie je oxidacemi uvolňována z živin. Podstatou oxidací je přenos elektronů z oxidované látky na látku redukovanou. Organismus má možnost získávat energii rozštěpením některých vysoce energetických organických vazeb (Dylevský, 2013).

Zpracování potravy nazýváme trávením. Trávení má mechanickou a chemickou složku. Mechanické rozmělnění přijaté potravy zajišťují zuby a jazyk. Smrštěním svalů patra, hltanu a jazyka je sousto (asi 5 g či 5 ml) odděleno, posunuto do hltanu a polknuto. Jícnem je pak dále transportováno do žaludku. Mechanické zpracování pokračuje promícháním již polotekuté potravy v žaludku. Pohyby žaludku a střev je trávenina nejen dokonale promíchána s trávicími šťávami, ale je také pomalu posunována trávicím systémem a trávena. Nestrávené, případně nestravitelné zbytky potravy jsou zahuštěny, zformovány a odstraněny stolicí. Chemickou stránku trávení charakterizuje především produkce šťáv žlázami trávicího systému. Trávicí šťávy obsahují kromě vody i látky bílkovinné povahy (enzymy), které jsou schopny štěpit bílkoviny, cukry a tuky. Vyměšování šťáv navozují některé látky obsažené přímo v potravě, ale rozhodující úlohu má reflexní tvorba šťáv vyvolaná drážděním příslušných čidel (Dylevský, 2013).

Neoddělitelnou součástí trávicích pochodů je vstřebávání rozštěpených látek, které probíhá v různých úsecích trávicí trubice, různým mechanismem a různou rychlostí. Mechanismem resorpcí je aktivní vstřebávání a pasivní resorpce. Rychlost vstřebávání určuje především vlastní rychlost trávení, která je závislá na množství a na složení potravy. Tukové látky jsou tráveny a vstřebávány až 12 h. Regulačním faktorem je i množství vyměšované trávicí šťávy a stupeň prokrvení trávicí trubice (Dylevský, 2013).

3.1.1 Orální trávení

První fáze trávení probíhá v ústech. Ústní dutina je prostor oddělený patrem od dutiny nosní, a rty a tvářemi ohraničený zvenčí. Spodinu ústní dutiny tvoří jazyk, připojený svaly k dolní čelisti. Komunikaci s vnějškem zprostředkuje ústní štěrbina a vzadu komunikuje ústní dutina s hltanem (Dylevský, 2013). Textura pevné potravin je významně modulována žvýkáním za přítomnosti slin. Potraviny se po rozžvýkání lépe polykají. Žvýkání je ovlivněno celou řadou faktorů, jako je složení a objem potravin, síla žvýkání, stav zubů, ale i stupeň hladu. Žvýkání má ideálně trvat 2 min. Za tuto dobu je potravina adekvátně rozmělněna a smíchána se slinami, které jsou komplexem vodnatých tekutin (Minekus et al., 2014). Sliny jsou produkovány slinnými žlázami, které jsou buď rozptýleny v podslizničním vazivu tváří, patra a předsíně ústní dutiny, nebo tvoří objemné párové žlázy uložené mimo dutinu ústní. Největší slinnou žlázou je žláza příušní, mezi další pak patří podčelistní a podjazyková a drobné slinné žlázy rozptýlené ve sliznici ústní dutiny. Hlavní součástí slin je voda, která tvoří 99 %. Organických látek je ve slinách na 0,7 %. Jde především o hlenovitou bílkovinu mucin, který dodává slinám vazkost a lepivost, a o enzym ptyalin (amylasa). Ptyalin štěpí škroby na jednoduché cukry. Obsah neústrojných látek je ve zhruba 0,3 %. Jedná se o vápenaté, sodné, draselné a fosforečné soli, které se mimo jiné podílejí na vzniku zubního kamene. Dalšími složkami jsou glukóza a dusíkaté produkty jako močovina, dále imunoglobulin A (IgA), lysozym a laktoferin. Denní tvorba slin představuje 1,0–1,5 l. Sliny obalují a slepují rozmělněnou potravu a zvlhčováním ústní dutiny zabraňují poranění sliznice ostrými a suchými úlomky jídla. Jejich tvorba a vylučování je především řízena nervovými a humorálními podněty vznikajícími drážděním chuťových a čichových čidel ústní a nosní dutiny. Potrava postupuje po rozmělnění dál trávicím traktem hltanem a jícnem do žaludku (Dylevský, 2013; Minekus, 2014).

3.1.2 Gastrické trávení

Druhá fáze trávení probíhá v žaludku při relativně nízkém pH kolem hodnot 1–3 (Guerra et al., 2012). Žaludek je plochý vakovitý oddíl trávicí trubice. Potrava se zde shromažďuje v hrubě rozmělněném stavu. Plnění žaludku je postupné. Polykaná sousta se vrství podél stěn, jež se postupně rozvíjí. Žaludek dospělého člověka tak pojme 1–2 l rozmělněné potravy. Žaludeční svalstvo vykonává pomalé rytmické stahy (2–4 za min), kterými se obsah promíchává a dále rozmělnjuje. Hybnost svalstva je ovlivňována náplní

žaludku. Z živin nejvíce tlumí žaludeční stahy tuky, méně bílkoviny a nejméně sacharidy. Potrava zůstává v žaludku různě dlouho. Tekutiny jím pouze protékají, ale na tuky bohatá strava zde setrvává 5–7 h a potrava obsahující převážně cukry již za 3–4 h. Chemická funkce tohoto orgánu je umožněna mechanickou úpravou stravy a zajištěna produkcí žaludeční šťávy. Žaludeční šťáva je produkována žlázkami žaludeční sliznice. Její denní množství závisí na množství přijímané potravy, ale v průměru se tvoří asi 1,5–2,0 l za 24 h. Žaludeční šťáva je čirá, bezbarvá a silně kyselá tekutina, která obsahuje kyselinu chlorovodíkovou (HCl), pepsin, chymozin, žaludeční lipasu a mucin. Více než 99 % tvoří voda. HCl okyseluje obsah žaludku, působí na bobtnání vaziva (bílkovin) přijatého v potravě a aktivuje pepsin. Dále usmrcuje choroboplodné zárodky a dezinfikuje tak žaludeční obsah. Ničí i kvasinky a zabraňuje proto kvašení žaludečního obsahu. Pepsin je enzym zahajující štěpení bílkovin na jednodušší bílkovinné složky rozpustné ve vodě. Chymosin proteolyticky sráží kaseinové bílkoviny. Tyto proteiny jsou pak snáze štěpitelné a déle setrvávají v žaludku. Žaludeční lipasa štěpí tuky na glycerol a mastné kyseliny, avšak její účinnost je nepatrná. Mucin je produkt hlenových žaludečních žlázek povlékajících povrch žaludeční sliznice, kterou tak chrání před natrávením HCl. Řízení sekrece žaludeční šťávy je neurohumorální. Nervové řízení je vyvoláno stejnými podněty, jaké například vyvolávají tvorbu slin. Reflexní fáze tvorby žaludeční šťávy trvá asi 1,5–2,0 h. Chemická fáze tvorby navazuje na nervovou fázi. Dochází k ní tak, že různé látky uvolňované z potravy dráždí žaludeční sliznici, ve které se vytváří a uvolňuje do krve gastrin. Krví je gastrin opět přiváděn do stěny žaludku, kde vyvolává tvorbu žaludeční šťávy (Dylevský, 2013).

3.1.3 Trávení v tenkém střevě

Třetí fáze trávení probíhá v tenkém střevě, což je 3–5 m dlouhá trubice zprohýbaná do kliček. Jednotlivé úseky tenkého střeva jako je duodenum, jejunum a ileum v sebe plynule přecházejí. Velké množství žláz, uložených ve sliznici všech úseků tenkého střeva, produkuje střevní šťávu obsahující řadu enzymů a množství hlenovité tekutiny chránící stěnu střeva před účinkem žaludeční HCl. Většina enzymů působících v duodenu je původem z pankreatické šťávy. V duodenu je účinkem žluči emulgován tuk, který může být pouze poté aktivně štěpen pankreatickými lipasami. Vlastní střevní šťáva produkovaná střevními žlázkami obsahuje enzymy štěpící bílkoviny na aminokyseliny, lipasy rozkládající tuky na glycerol a mastné kyseliny a dále amylasy rozkládající cukernaté látky na nejjednodušší snadno vstřebatelné cukry (Dylevský, 2013). Trávení proteinů závisí na proteolytickém účinku mnoha lidských

specifických proteas, například trypsinu, chymotrypsinu, elastasy, karboxypeptidasy a aminopeptidasy. Jejich izoenzymy a inhibitory jsou také vylučovány do gastrointestinálního traktu. Kaseiny jsou metabolizovány pomalu, což je způsobeno pravděpodobně tím, že koagulace kaseinových bílkovin v kyselém prostředí žaludku způsobuje zpoždění žaludečního vyprazdňování. Hlavní protein kravského mléka, β -laktoglobulin, je považován za rychle metabolizovanou bílkovinu, i když je prokázána odolnost vůči štěpení pepsinem v žaludku. U zdravých osob je přibližně 95 % lipidů z potravy stráveno a absorbováno (Devle, et al., 2014). Střevní šťávy prakticky dokončují štěpení bílkovin, sacharidů a lipidů, tvoří se v množství 1–3 l denně. Jejich produkce je řízena reflexně (Dylevský, 2013). K trávení zde dochází při pH 6,5–8 (Devle et al., 2014).

3.1.4 Trávení v tlustém střevě

Posledním oddílem trávicí trubice je tlusté střevo. Zde se shromažďují nestrávené zbytky potravy a obsah střeva je zde zahuštěn. Trávenina pobývá v tlustém střevě 8–12 h. Probíhá tu zejména vstřebávání vody, některých minerálních látek a cukrů. K zahuštěnému obsahu je přidán hlen, který slepuje nestrávené zbytky potravy. Ty se účinkem kvasných a hnilobných bakterií žijících na střevní sliznici zkvašují, zbytky bílkovin podléhají hnití. Bakterie kvasí cukry a tuky za vzniku kyselin, alkoholu a různých plynů. Zahuštěná potrava jde v podobě stolice konečným z těla ven (Dylevský, 2013).

3.2 In vitro metody trávení

In vitro metody umělých trávicích procesů jsou široce používány ke studiu gastrointestinálního chování potravin nebo léčiv. Přestože lidské nutriční studie jsou stále považovány za "zlatý standard" pro řešení otázek souvisejících se stravou, metody in vitro mají tu výhodu, že jsou rychlejší, levnější, méně náročné na pracovní sílu a nemají etická omezení. To umožňuje analyzovat relativně velký počet vzorků, které mohou být měřeny současně i pro účely monitoringu. Reprodukovatelnost, výběr kontrolovaných podmínek a snadné vzorkování v místě zájmu jsou velmi vhodné pro mechanické studie (Minekus et al., 2014).

Simulované způsoby trávení obvykle zahrnují ústní, žaludeční fáze a procesy probíhající v tenkém tlustém střevě. Tyto metody se snaží napodobit fyziologické podmínky

in vivo, s ohledem na přítomnost trávicích enzymů a jejich koncentrace, pH, dobu trávení a koncentrace solí. Některé počítačové sofistikované modely, jako je například model gastrointestinálního traktu Dutch TNO a TIM-1, umožňují simulaci dynamických aspektů trávení, například pohyb strávených jídel, koncentrace variabilních enzymů a změny pH v průběhu času. Nicméně většina modelů popsaných v literatuře jsou statické. U nich jsou používány konstantní poměry enzymů, solí, žlučový kyselin a podobně (Minekus et al., 2014).

Simulátor TIM-1 je složen ze 4 přihrádek, které zastupují žaludek, dvanáctník, tenké střevo a kyčelník. Přihrádky jsou vzájemně propojeny peristaltickými čerpadly s ventily (Jedidi et al., 2014).

Statické modely lidského trávení byly použity k řešení různorodých vědeckých otázek, jako stravitelnost a biotransformace živin, účinek léčiv a vliv mykotoxinů. Tyto statické modely gastrointestinálního trávení byly také použity pro studium uvolňování stopových prvků a sekundárních rostlinných sloučenin včetně karotenoidů a polyfenolů. Ačkoliv je mnoho z nich odvozeno ze stejných pilotních studií, existuje významná odchylka v používání parametrů in vitro trávení mezi jednotlivými modely. To bohužel brání možnosti porovnat výsledky různých výzkumných skupin a vyvodit obecné závěry. Zatímco změny některých parametrů mohou mít omezený dopad na uvolňování matice nebo stravitelnosti některých látek, jiné změny mohou proces ovlivnit výrazněji, např. dají vzniknout novým metabolitům. Enzymová aktivita je také měněna podle pH a koncentrace solí, jako je vápník. Použité žaludeční pH se obvykle pohybuje od 2,2 až pH 4,2 (Minekus et al., 2014).

3.2.1 Standardizovaný statický in vitro model trávicího traktu Infogest

Skupina Infogest je mezinárodní síť sestavená z více než 200 vědců ze 32 zemí světa, kteří pracují v oblasti trávení. Jedním z jejich cílů je sjednotit podmínky pro simulované trávení potravy a najít shodu, pokud je to možné, pro model trávení (Minekus et al., 2014).

Trávení je u standardizovaného statického in vitro modelu trávicího traktu rozděleno do tří fází: orální, žaludeční a střevní fáze (respektive trávení v tenkém střevě). Orální fáze může být provedena dvěma způsoby. Buď je žvýkání pevné stravy během orální fáze simulováno mletím vhodného množství potravin za použití běžně dostupného ručního či elektrického mlýnku na maso. U tohoto způsobu je nutné přidat simulované slinné šťávy napomáhající k vytvoření pastovité konzistence a α -amylasu. Doporučená doba kontaktu vzorků potravy s enzymem je 2 min při 37 °C, což vyžaduje příslušnou teplotu všech

složek. Druhý způsob probíhá v ústech „vlastnoručním“ mělněním vzorku žvýkáním po dobu 2 min, kdy je sousto potravy promícháno se slinami. U tekutých vzorků lze orální fázi vynechat (Minekus et al., 2014).

Během žaludeční fáze jsou vzorky potravy smíchány se simulovanými žaludečními šťávami a 0,3 M chloridem vápenatým. Po přidání těchto roztoků je nutné ověřit a upravit pH pomocí 1 M HCl na hodnotu 3,0. Dále je přidán enzym pepsin destilovaná voda na ředění roztoku simulujícímu žaludeční šťávy. Použití žaludečních lipas není doporučováno, jelikož v současné době nejsou na trhu k dispozici. Doba trávení je cca 2 h při teplotě 37 °C. V průběhu trávení může být nutné znovu upravit hodnotu pH pomocí 1 M HCl. Dostatečné míchání při trávení je realizováno například tím, že reakční nádoby jsou umístěny do protřepávacího inkubátoru, či vodní lázni s integrovaným šejkrem nebo cyklonu v temperované místnosti. V typovém příkladu je na 10 ml vzorku přidáváno 7,5 ml simulovaných žaludečních šťáv, 5 µl CaCl₂, 0,008 g pepsinu a objem je doplněn destilovanou vodou na hodnotu 20 ml (Minekus et al., 2014).

Během střevní fáze jsou ke vzorku přidávány simulované střevní šťávy, pankreatin, žluč a CaCl₂. Množství přidaného pankreatinu je založeno na aktivitě trypsinu. Žlučové soli jsou přidávány do konečné koncentrace 10 mM ve finální směsi. Vzorky jsou ponechány v klidu 5 minut a poté je pH upraveno pomocí 1 M NaOH na hodnotu 7. Dále je objem doplněn destilovanou vodou. Doporučená doba střevního trávení je 2 h při teplotě 37 °C za stálého míchání. V typovém příkladu je na 20 ml vzorku přidáno 11 ml simulovaných střevních šťáv, 0,638 g pankreatinu, 0,352 g žluči, 40 µl CaCl₂ a objem je destilovanou vodou doplněn na 40 ml (Minekus et al., 2014).

Konzervace vzorků je závislá na fázi odběru, a je třeba pečlivě zvážit metody konzervace pro jednotlivé navazující analýzy. Enzymovou aktivitu lze inhibovat zamražením na - 20 °C nebo přidávkem inhibitoru proteasy (Minekus et al., 2014).

3.3 In vivo metody trávení

Pojem „in vivo“ doslovně znamená „v živém“ a vztahuje se k experimentům pozorovaným přímo v přirozených podmínkách, např. v orgánech, pletivech nebo buňkách, respektive v celých živých organismech. In vivo modely umožňují oproti in vitro experimentům lépe přiblížit experimentální podmínky komplexnímu stavu organismu, tedy podmínkám, v nichž dochází k patologickým procesům, které není možno dostatečně

simulovat v podmínkách in vitro. In vivo pokusy tudíž poskytují relativně věrohodnější výsledky, jsou však experimentálně a ekonomicky značně náročné. V in vivo studiích se využívá široká škála organismů, mezi nejpoužívanější patří hád'átko obecné (*Caenorhabditis elegans*), průsvitná embrya a kukly octomilky (*Drosophila*) a samozřejmě myš domácí (*Mus musculus*) (Kovaříková a kol., 2014).

3.3.1 Sledování peptidů během in vivo trávení

Studie Barbé et al. (2014) byla zaměřena na analýzu mléčných peptidů uvolněných v gastrointestinálním traktu zakrslých prasat a stanovení účinku struktury matrice na lumen střeva při in vivo trávení. 6 mléčných matric podobného složení bylo podáno 4 osmnáctiměsíčním prasnicím. Vzorky střevních obsahů byly odebírány po dobu 5 h a analyzovány hmotnostní spektrometrií (Barbé et al., 2014).

Bylo zjištěno, že kaseiny byly rychle hydrolyzovány, zcela zmizely již po 20 min trávení. β -laktoglobulin byl odolnější a degradoval až za 2 h a 45 min po příjmu mléčných matric. Celkem bylo identifikováno 16 458 peptidů. Struktura mléčných výrobků měla jen malý vliv na umístění míst štěpení proteinových sekvencí, avšak silně ovlivnila typ a počet identifikovaných peptidů. Například při trávení sýřených substrátů bylo identifikováno až třikrát méně peptidů než u ostatních mléčných matric. To bylo přičítáno větší míře zředění trávicími sekrety spojeným s delším žaludečním zadržením syřidlových gelů. Lze shrnout, že struktura mléčných matric silně ovlivňuje kinetiku trávení bílkovin in vivo více než mechanismus proteolýzy (Barbé et al., 2014).

3.4 Gastrointestinální chování potravin

3.4.1 Charakterizace průchodu a růstu mikroorganismů v trávicím traktu

Adouard et al. (2015) se zaměřili na přežití mikroorganismů, jež jsou součástí mlékařských kultur při průchodu in vitro trávicím traktem. V tomto pokusu bylo izolováno 36 mikroorganismů (21 bakterií, 12 kvasinek a 3 plísně) získaných z mléčných matric, zejména ze sýru s povrchovou plísní (*Penicillium camemberti*). Jako referenční kmeny byly použity *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Escherichia coli* Nissle 1917 a *Saccharomyces boulardii* (Adouard et al., 2015).

Před samotným trávením byly všechny kmeny kultivovány do stejné fáze růstu. 1 ml pozdně stacionární fáze mikrobiálních kultur byl následně přidán do 9 ml buď žaludeční, nebo střevní šťávy. Hodnota pH byla zkontrolována po inokulaci šťáv a v případě potřeby upravena buď na hodnotu pH 3 u žaludečního trávení a pH 6,5 u střevního trávení. Příslušné inkubační časy byly 1 h pro žaludeční simulaci a 2 h pro střevní simulaci za teploty 37 °C a mírného protřepávání. Kmeny byly počítány na odpovídajících agarrech na bázi média před a po fázi gastrointestinálního trávení (Adouard et al., 2015).

Bylo zjištěno, že referenční kmeny přežily žaludeční trávení, ale byly usmrceny během střevní fáze. Zástupci *Yarrowia lipolytica* a *Geotrichum candidum* vykázaly výrazný pokles životaschopnosti během obou procesů trávení, avšak nejcitlivější byly kmeny *Arthrobacter arilaitensis*, *Corynebacterium casei*, *Kluyveromyces lactis* clib 683 a *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis*. Kmeny *Hafnia alvei* a *Staphylococcus equorum* byly silně odolné vůči stresu způsobenému oběma fázemi trávení. Zástupci *Brevibacterium aurantiacum* a *Staphylococcus equorum* byli poměrně odolní vůči střevní fázi (Adouard et al., 2015).

Ve studii Jedidi et al. (2014) byl zkoumán vliv trávení mastných kyselin mléčného původu růst probiotických bakterií. Vzorky mléka byly získány od krav, jež byly krmeny potravou obsahující přísávek 4 % světlicového oleje po dobu jednoho měsíce (experimentální skupina) a od dojníc, které byly krmeny stejnou dobu shodnou krmnou dávkou bez přísávku světlicového oleje (kontrolní skupina). Odebrané mléko bylo standardizováno na obsah tuku 1 a 3,2 % hm. Použitými probiotickými kmeny byly *Lactobacillus rhamnosus* LGG (Valio, Finsko), *Lactobacillus rhamnosus* R0011 (Institut Rosell–Lallemand, Kanada), *Bifidobacterium longum* R0175 (Institut Rosell–Lallemand, Kanada) a *Bifidobacterium laris* BB12 (Christian Hansen, Dánsko) (Jedidi et al., 2014).

Gastrointestinální in vitro trávení bylo provedeno v simulátoru TIM–1. Teplota během trávicího procesu byla 37 °C, pH jednotlivých sekcí bylo 2,0, 6,5, 6,8 a 7,2. V žaludeční fázi byl k substrátu dávkován pepsin rychlostí 0,25 ml/min a lipasy rychlostí 0,13 ml/min. V střevní fázi byly pak vstříkovány 4 % žluči a 7 % pankreatické šťávy. Celková doba procesu trvala 6 h. Po jeho skončení byly enzymy inhibovány zamražením (Jedidi et al., 2014).

Mastné kyseliny byly ze vzorků extrahovány toluenem pomocí metody Bligh a Dyer a dále byly analyzovány pomocí plynové chromatografie (Jedidi et al., 2014).

Jako růstové médium pro probiotika byly použity izoláty mastných kyselin z trávenin. Tyto izoláty byly tepelně ošetřeny při teplotě 63 °C po dobu 30 min, zchlazeny na 37 °C a zaočkovány probiotickými bakteriemi v množství 10⁶ KTJ na 1 ml. Po 180 min inkubace bylo růstové médium přeneseno na MRS agar. Kolonie byly počítány po 48 h anaerobní inkubace při 37 °C (Jedidi et al., 2014).

Bylo zjištěno, že celkový zbytkový obsah mastných kyselin u mléka s 3,2 % hm. tuku byl po trávení větší než u mléka s obsahem tuku 1 % hm. U méně tučné matrice byly mastné kyseliny s krátkým řetězcem zcela hydrolyzovány během gastrointestinální hydrolyzy. Štěpení mastných kyselin je také ovlivněn jejich formou. Kyselina linolová byla např. méně hydrolyzovaná než konjugovaná forma. Tráveniny mastných kyselin experimentální i kontrolní skupiny zvířat snižovaly počty životaschopných bakterií *Lactobacillus rhamnosus* po pouhých 15 min kontaktu, ačkoliv *Bifidobacterium* sp. zůstával stabilní. Růst probiotik na izolátech mastných kyselin hydrolyzovaných v trávicím traktu se tedy může lišit v závislosti na bakteriálním druhu a kmeni (Jedidi et al., 2014).

V pokusu Ricciardiho et al. (2014) byla hodnocena mikroflóra vzorků sýru Pecorino di Carmasciano po průchodu statickým in vitro modelem napodobujícím gastrointestinální trakt. Cílem experimentu byl výběr bakterií mléčného kvašení, jež jsou schopny přežít toto prostředí a zůstat metabolicky aktivní (Ricciardi et al., 2014).

Během technologického procesu bylo odebráno celkem 120 vzorků sýru v továrně v Itálii. Nejprve bylo odebráno 6 vzorků mléčné suroviny v různých fázích výroby, dále vzorek sýru po naložení do solného láku, čerstvý sýr po 10 dnech od výroby a sýry po 1, 3, 12 a 18 měsících zrání. Všechny vzorky byly uchovávány v ledu během přenosu do laboratoře a analyzovány během 4 h (Ricciardi et al., 2014).

Vzorky byly tráveny v modelu napodobujícím horní část gastrointestinálního traktu. Nejprve byly suspendovány (v poměru 1:1, hmotnost:objem) v roztoku simulujícím sliny (16,2 g/l NaCl, 2,2 g/l KCl, 0,2 g/l CaCl₂ a 1,2 g/l NaHCO₃, lysozym 100 ppm, pH 6,9) rychlostí přídávku 6 ml/min během homogenizace v mixéru po dobu 5 min při konstantní teplotě 37 °C. 30 ml suspenze bylo následně centrifugováno po dobu 5 min a vzniklé pelety byly zředěny v poměru 3: 5 s umělými žaludečními tekutinami skládajícími se z roztoků jež jsou uvedeny výše s přídávkem 0,3 % hm. vepřového pepsinu (Sigma, Itálie, aktivita 3300 U/ mg proteinu). Poté bylo pH upraveno na hodnotu 2,5 pomocí 5 M HCl. Po 120 min inkubace při teplotě 37 °C, bylo simulováno trávení v tenkém střevě. Vzorky byly opět

odstředěny a získané pelety byly zředěny v poměru 1:4 při pH 7,2 za použití umělých střevních šťáv skládajících se z 6,4 g/l NaHCO₃, 0,2 g/l KCl, 1,3 g/l NaCl, 0,5 % hm. žlučových solí a 0,1% hm. pankreatinu. Vzorke byly inkubovány po dobu 120 min při teplotě 37 °C. Po každém gastrointestinálním procesu byly odebrány vzorky stanoveny počty mikroorganismů na MRS agaru po 48 h anaerobní inkubaci při teplotě 37 °C (Ricciardi et al., 2014).

Po průchodu trávicího traktu bylo zjištěno nejvíc přeživších mikroorganismů u mléčné suroviny tepelně ošetřené při 37 °C, mikroorganismy byly ale obecně velice citlivé na simulované trávení. U mléčných surovin ošetřených záhřevem při 60 °C byl zaznamenán výrazný nárůst tolerance k simulovanému trávení. Bylo prokázáno, že předchozí expozice životaschopných buněk na subletální hladiny daného stresového faktoru může vyvolat do určité míry přizpůsobení a ochranu proti následné expozici danému faktoru. U vzorku sýru odebraného po naložení do solného láku byla mikroflóra během trávení stabilní. U vzorku čerstvého sýra odebraného 10 dnů od výroby a sýru zrajícího jeden měsíc byl pozorován nejvyšší pokles mikroflóry při střevním trávení. U vzorků sýrů s delší dobou zrání byl pak zaznamenán počáteční pokles mikroflóry během žaludeční fáze trávení, avšak na konci štěpení byl počet mikroorganismů naopak vyšší ve srovnání s původní hodnotou. Stejný trend byl pozorován u vzorku sýru s dobou zrání 18 měsíců. 63 kmenů, které přežily simulované gastrointestinální trávení, bylo dále hodnoceno. Autoři shrnuli, že přežití mikroorganismů je specifické pro daný kmen a je pravděpodobně silně ovlivněno experimentálními podmínkami. Bylo zjištěno, že přirozená mikroflóra čerstvého sýru Pecorino di Carmasciano může poskytnout při jeho požívání stejné množství životaschopných mikroorganismů jako probiotický nápoj, ačkoliv nelze předpokládat, že tyto mikroorganismy mají stejně příznivé účinky (Ricciardi et al., 2014).

3.4.2 Trávení mléčných bílkovin

Různými aspekty in vitro trávení mléčných bílkovin se zabývá řada studií. Některé experimenty zkoumají např. vliv vlastností a tepelné ošetření mléčných proteinů na průběh trávení, vliv trávení mléčných bílkovin na alergenicitu a na biologickou aktivitu, či vliv komplectace na trávení mléčných bílkovin.

3.4.2.1 Vliv fyzikálně-chemických vlastností mléčných bílkovin

Studie Zhang and Vardhanabhuti (2014) se zabývala hlavně vlivem koncentrace a pH na zpracování syrovátkových bílkovin během žaludečního in vitro trávení.

Jako substrát byl použit syrovátkový proteinový izolát obsahující 95,4 % syrovátkových bílkovin a 2,1 % popelovin. Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním různého množství sušeného izobátu v destilované vodě za stálého míchání po dobu 2 h a byl skladován přes noc při teplotě 4 °C kvůli dostatečné hydrataci proteinů (Zhang and Vardhanabhuti, 2014).

Před enzymatickou hydrolýzou byly zásobní roztoky vytemperovány na reakční teplotu zředěny na 3 % hm. sušiny destilovanou vodou. Simulovaná žaludeční tekutina (SGF) se skládala z 0,034 M NaCl a pH bylo upraveno na 1,2 pomocí HCl. Pepsinový roztok byl připraven čerstvý pro každý test rozpuštěním pepsinu v 5 ml SGF a mícháním po dobu 5 min. Před použitím byl chlazen ledem. Žaludeční fáze probíhala při teplotě 37 °C za stálého třepání při 95 rpm. Enzym byl inaktivován pomocí 70 μ l NaOH po 0,5, 2, 5, 10, 20, 30, 60 a 120 min. Vliv procesu na syrovátkové bílkoviny byl analyzován pomocí elektroforézy (Zhang and Vardhanabhuti, 2014).

Agregáty proteinů syrovátky byly vytvořeny zahříváním roztoků izolátu při různých koncentracích proteinu a pH, což vedlo k tvorbě matric odlišnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Bylo zjištěno, že při neutrálním pH vyšší koncentraci bílkovin docházelo k tvorbě velkých agregátů s vysokým obsahem kovalentních vazeb. Ty pak vykazovaly pomalejší rychlost degradace během trávení ve srovnání s agregáty vytvořenými při nízkých koncentracích proteinů. Bylo také pozorováno, že hodnota pH je významný faktor, který ovlivňuje chování matric během trávení. Vzorky vytvořené při hodnotě pH vyšší než hodnota π byly více náchylné k žaludečnímu trávení než agregáty s nižší hodnotou pH. Matrice vytvořené při pH 4,0 byly úplně rozštěpeny během prvních 30 min trávení. Bylo tedy prokázáno, že struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti proteinových agregátů významně ovlivňují chování během trávení, což může potencionálně vést k rozdílům v jejich účinku na sytost a tím celkový energetický příjem (Zhang and Vardhanabhuti, 2014).

3.4.2.2 Vliv tepelného ošetření na trávení mléčných bílkovin

Tepelné ošetření syrového mléka je běžně používáno v mlékárenském průmyslu. Obvykle je mléko zahříváno a ochlazeno mnohokrát během mlékárenského zpracování. Pinto

et al. (2014) zkoumali účinek tepelného ošetření (90 °C až po 24 h) a následného trávení na dvou modelových proteinech, β - laktoglobulinu (β -LG) a β -kaseinu (β -CN), v přítomnosti glukózy. Agregace proteinů a jejich trávení v simulovaném gastrointestinálním traktu byly monitorovány za použití elektroforézy na polyakrylamidovém gelu, extruzní chromatografie a transmisní elektronové mikroskopie (Pinto et al., 2014).

Glykosylace bílkovin byla provedena reakcí s glukózou ve vodném prostředí. Substráty byly zahřívány při teplotě 90 °C po dobu 24 h. Vzorky byly postupně odebírány během procesu a ihned zchlazeny v ledové vodní lázni. Simulované gastrointestinální trávení bylo provedeno ve dvou krocích při teplotě 37 °C. Žaludeční fáze trvala 60 min. Na jejím začátku byl přidán vepřový pepsin (aktivita 3800 U/mg proteinu). Gastrické trávení bylo zastaveno zvýšením pH na hodnotu 6,5 pomocí 100 mM NaOH. Během střevní fáze byl přidán hovězí α -chymotrypsin (aktivita 52,6 U/mg proteinu) a dále 4 mM taurocholát sodný. Střevní trávení bylo zastaveno přidáním inhibitoru trypsin–chymotrypsinu (Pinto et al., 2014).

Ve studii bylo zjištěno, že tvorba tepelných agregátů byla rychlejší u β -CN než u β -LG. Ve srovnání s kontrolními vzorky glykosylace zpomalovala kinetiku agregace β -LG. Dále bylo zjištěno, že velikost agregátů β -CN rostla s dobou ohřevu bez ohledu na předchozí glykosylaci. Při trávení nativních bílkovin nebyl β -LG významně štěpen, ačkoliv byl hydrolyzován velmi rychle (zcela zmizel již po 20 minutové inkubaci s pepsinem). Tepelné ošetření zvýšilo účinek trávení β -CN, byl degradován již po 5 min a β -LG byl kompletně štěpen po 40 min žaludeční fáze. Naopak glykosylace zvýšila odolnost proteinů, jež byly stále přítomny i na konci gastrointestinálního trávení (Pinto et al., 2014).

In vitro gastrointestinální trávením mléčných matric se zabýval mimo jiné i Rinaldi et al. (2014) u pasterovaného mléka, sterilovaného mléka a u neochuceného jogurtu s rozmíchaným koagulátem. Pasterované mléko obsahovalo 1 g /100 ml mléčného tuku a 3,6 g /100 ml proteinu. Sterilované mléko obsahovalo 1 g/100 ml tuku a 3,2 g/100 ml bílkovin. Jogurt obsahoval 2,5 g/100 g tuku a 4 g/100 g bílkovin (Rinaldi et al., 2014).

Pro přípravu simulovaných trávicích tekutin byla použita činidla KCl, NaCl, CaCl₂, NH₄Cl, MgCl₂, HCl, NaHCO₃, NaH₂PO₄, KH₂PO₄, NaSO₄, KSCN, monohydrát glukózy, kyseliny glukuronové a kyseliny močové, žlučový extrakt a extrakt mucinu z vepřového žaludku (typ III), hovězí syrový albumin (čistota 98 g/100 g) a hydrochlorid glukosaminu. Všechny potřebné enzymy byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (Sigma–Aldrich, USA),

jednalo se o enzymy vepřová α -amylasa typu VI-B (28 U/mg pevné fáze škrobu jako substrát), vepřový pepsin (471,305 U/mg pevné fáze hemoglobinu jako substrát), vepřový pankreatin (specifikace 8 USP) a vepřové lipasy typu II (30,90 U/mg proteinu za použití triacetinu jako substrátu) (Rinaldi et al., 2014).

Trávicí proces byl zahájen vytemperováním mléčných matric (9 g) na 37 °C ve vodní lázni, přidavkem 6 ml slin a promícháním. Během žaludeční fáze bylo přidáno 6 ml žaludečních tekutin a směs byla míchána po 15 min v případě mléka nebo po 30 min v případě jogurtu. Poté byly znovu přidány žaludeční šťávy. Celková doba trávení vzorků v gastrické fázi byla 60 min při 30 °C. Střevní fáze byla zahájena přidáním hydrogenuhličitanu (2 ml), žluči (6 ml) a střevní šťávy (12 ml). Směs pak byla míchána po dobu 60 min při 30 °C. Vzorky trávenin byly postupně odebírány po 2, 5, 15 a 30 min pro mléka a po 5, 15, 30 a 60 minutách pro jogurt během žaludeční fáze a po 5, 10, 30 a 60 min během střevní fáze trávení obou typů matric (Rinaldi et al., 2014).

V této práci bylo prokázáno, že zpracování, zejména tepelné ošetření, mělo větší vliv na trávení mléčných bílkovin než struktura matrice. Kaseiny a syrovátkové bílkoviny byly snadněji degradovány u sterilovaného mléka než u pasterovaného, u obou vzorků pak docházelo k nejintenzivnějšímu štěpení během žaludeční fáze. To naznačuje, že sterilační ošetření mléka zvyšuje náchylnost proteinů vůči pepsinu. Degradace proteinů u jogurtu byla stejná jako u sterilovaného mléka. Během žaludeční fáze bylo uvolněno méně mastných kyselin než během střevní fáze trávení u obou vzorků mlék. U jogurtu byl obsah volných mastných kyselin o něco vyšší než u vzorků mlék během žaludečního trávení. Konečný obsah volných mastných kyselin byl nejvyšší u sterilovaného mléka (Rinaldi et al., 2014).

3.4.2.3 Vliv trávení na alergenicitu

Cílem studie Benedé et al. (2014) bylo poskytnout imunologickou charakterizaci trávení výrobků z kravského mléka. Tato práce byla zaměřena na určení epitopů IgE alergenního syrovátkového proteinu β -laktoglobulinu (β -LG) po in vitro trávení s použitím lidských (HF) nebo simulovaných zaživacích tekutin (SF). Alergenicitu štěpů β -LG byla vyhodnocena metodou ELISA používaných protilátky 6 pacientů alergických na mléčné bílkoviny. Produkty reakcí byly identifikovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (Benedé et al., 2014).

Žaludeční trávení bylo provedeno při pH 2,0 po dobu 60 min a 37 °C účinkem prasečího pepsinu (182 U/mg β -LG). Střevní štěpení probíhalo 30 min pH 6,5 a při 37 °C za přítomnosti prasečí pankreatické lipasy (24,7 U/mg β -LG) a žlučové soli. Střevní trávení bylo zastaveno pomocí inhibitoru trypsin-chymotrypsinu (Benedé et al., 2014).

Bylo zjištěno, že alergenicitá mléčné matrice byla postupně snížena během trávení. K největšímu poklesu došlo během žaludeční fáze, avšak na konci střevní fáze nebyl pozorován žádný zbytkový protein (Benedé et al., 2014).

3.4.2.4 Vliv trávení na biologickou aktivitu

Ve studii Fu et al. (2015) byl použit simulovaný statický in vitro gastrointestinální model trávení ke zkoumání biologické dostupnosti kurkuminoidů v závislosti na typu nosiče (Fu et al., 2015).

Jako zdroj těchto látek byl použit přípravek Bio-kurkumin (Arjuna Natural Extracts Limited, Indie) se 70 % obsahem kurkuminoidů. Jako základní nosič byl vybráno sušené podmásli (Warrnambool Cheese and Butter Factory, Austrálie), jež obsahovalo 32,5 % hm. bílkovin, 8,4 % hm. tuku, 50,1 % hm. laktózy a 2,9 % hm. vlhkosti (Fu et al., 2015).

Sušené podmásli bylo obnoveno smícháním s destilovanou vodou. Hydratace bílkovin probíhala po dobu 30 min za teploty 45 °C ve vodní lázni. 100 mg přípravku Bio-kurkumin (Arjuna Natural Extracts Limited, Indie) bylo rozpuštěno v 10 ml etanolu za použití ultrazvuku. 2 ml tohoto roztoku byly následně smíchány s 98 ml připraveného podmásli nebo fosfátového pufru (5 mM) (Fu et al., 2015).

Roztok simulovaných žaludečních šťáv (SGF) byl připraven z NaCl ($2 \pm 0,01$ g) a 7 ml HCl (37 %, w/V) rozpuštěných v 800 ml destilované vody. Hodnota pH SGF byla upravena na 1,2 pomocí 1 M NaOH. Připravené vzorky byly smíchány s 5 ml roztoku SGF a pepsinem (6,4 mg/ml). Žaludeční štěpení bylo provedeno v třepací vodní lázni při teplotě 37 °C a 100 rpm po dobu 2 h. Žaludeční fáze byla zastavena úpravou pH na hodnotu 6,8. Roztok simulovaných střevních šťáv (SIF) byl připraven pomocí 0,4 M NaCl a 15 mM CaCl₂. Hodnota pH byla upravena na $6,80 \pm 0,05$ pomocí 1 M NaOH nebo 1 M HCl. K vzorkům prošlým gastrickou fází bylo přidáno 3,2 ml SIF, různé množství žlučového extraktu (0, 12 a 188 mg/ml) a 1,8 ml pankreatinu (10 mg/ml). Střevní štěpení bylo opět realizováno v třepací vodní lázni při teplotě 37 °C a 100 rpm po dobu 3 h. In vitro trávení

bylo zastaveno ochlazením vzorků v ledové vodě. Obsahy kurkuminoidů v trávěninách byly analyzovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (Fu et al., 2015).

Fu et al. zaznamenali, že u kurkuminoidů v fosfátovém pufru se biologická dostupnost zvýšila na 18,7 %. Ještě vyšší (o 5–8 %) pak byla v případě použití podmásli. Lze tedy říci, že dostupnost těchto biologicky aktivních látek při přechodu statickým in vitro trávicím traktem byla ovlivněna nosičem a mléčná matrice (podmásli) fungovala jako dobrý nosič kurkuminoidů. Biologickou dostupnost kurkuminoidů také výrazně zvyšovalo množství použitých žlučových kyselin (Fu et al., 2015).

He et al. (2015) zkoumali účinky simulovaného trávení na mléčný nápoj ochucený ovocnou šťávou. Studie byla zaměřena na charakterizaci antioxidační aktivity jeho složek především syrovátkové bílkoviny, kyseliny chlorogenové a katechinu (He et al., 2015).

Simulované trávení probíhalo za hodnot pH 3,7 (gastrické fáze) a 6,8 (střevní fáze). Vzorky byly inaktivovány tepelným ošetřením při 63 °C po dobu 30 min. Po tepelném ošetření byly trávěnininy ochlazeny na pokojovou teplotu a antioxidační aktivita byla analyzována spektrofotometricky (He et al., 2015).

Bylo pozorováno, že během simulovaného žaludečního trávení probíhala hydrolyza zkoumaných látek méně intenzivně než během střevní fáze. Z výsledků této studie vyplynulo, že antioxidační potenciál byl ovlivněn koncentrací syrovátkových proteinů, typem fenolové složky a tepelným ošetřením. Antioxidační aktivita byla také významně ovlivněna interakcí s ostatními složkami nápoje, uplatňoval se zde např. synergický účinek a maskování (He et al., 2015).

3.4.2.5 Vliv komplexace na trávení mléčných bílkovin

Studie Peréze et al. (2014) mléčných bílkovin, jež je zaměřena na charakterizaci trávení nanokomplexů, byla provedena za účelem racionálního využití potravin pro zlepšení lidského zdraví a prevenci nemocí. Mléčné proteiny jsou vhodnou matricí pro vývoj funkčních složek potravin, protože jsou široce konzumovány a bylo prokázáno, že jsou potenciálně dobrými nosiči pro bioaktivní složky jako jsou vitamíny a nutriční doplňky. Práce charakterizovala interakci mezi β -laktoglobulinem a kyselinou listovou (FA) při různých vzájemných poměrech vzniklých komplexů a jejich funkční důsledky, pokud jde o koloidní chování a stravitelnost vzniklých komplexů (Peréz et al., 2014).

Pokus byl proveden na prášku (Biopure b-Ig, Davisco Foods International, USA, s obsahem 97,8 % hm. bílkovin, 93,6 % hm. β -LG, 0,3 % hm. tuku a 1,8 % hm. popelovin). Simulované žaludeční tekutiny in vitro statického trávicího traktu obsahovaly KCl, KH_2PO_4 , NaHCO_3 , MgCl_2 , NH_4Cl a močoviny. Simulovaná střevní kapalina se skládala z KCl, KH_2PO_4 , NaHCO_3 , NaCl, MgCl_2 a močovinu. Proteino-vitaminové komplexy byly připraveny z koncentrátů β -LG a FA, které byly každý zvlášť rozpuštěny v destilované vodě za stálého míchání při pokojové teplotě. Vzniklé roztoky byly poté přefiltrovány a nechány se odstát po 24 h při 4 °C, aby se dosáhlo úplné hydratace molekul. Následně bylo upraveno pH na hodnotu 7,0 pomocí 1 M HCl nebo 1 M NaOH. β -LG/FA nanokomplexy byly vyrobeny smícháním odpovídajícího množství koncentrovaných roztoků při pH 7,0 (Peréz et al., 2014). Gastrická fáze probíhala při teplotě 37 °C za stálého míchání při 250 rpm 1 h při pH 1,5-4,5 (0,5 M HCl) a poté 1 h při pH na hodnotě 6,25 (1M NH_4HCO_3). 20 ml vzorku bylo rozpuštěno v 39 ml simulované žaludeční tekutině (SGF) a poté bylo pH upraveno na hodnotu 4,5. Hned na začátku žaludečního trávení byl přidán 1 ml roztoku pepsinu (71 mg/ml, předem rozpuštěného v SGF při pH 4,5) 15 ml 2 M CaCl_2 k dosažení konečné koncentrace 1000 U pepsinu na ml SGF a 0,2 mM CaCl_2 . V návaznosti na 1 h gastrické fáze, bylo pH zvýšeno na 6,25 (1 M NH_4HCO_3) a k analytu bylo přidáno 0,5 ml pankreatinového roztoku (80 mg/ml, předem rozpuštěný v simulovaných střevních šťávách při pH 7) k dosažení koncentrace 100 U (na základě aktivity proteasy) na 1 ml. Po 30 min střevní fáze byly přidány 2 ml glykodeoxycholátu a 1 ml taurocholové kyseliny. Vzorky byly odebírány po 30 s, 30 a 60 min během obou procesů trávení a rychle neutralizovány úpravou pH na hodnotu 7 pomocí 1 M NH_4HCO_3 (Peréz et al., 2014).

Charakteristika interakcí mezi β -LG a FA byla pozorována změnou entalpie vyplývající z jejich spojení za použití izotermického titračního kalorimetru. Pro studium morfologických vlastností β -LG/FA komplexů byla použita mikroskopická analýza (Peréz et al., 2014).

Výsledky ukázaly, že čistý β -LG byl špatně degradován v průběhu simulovaného žaludečního trávení, ale během střevní fáze došlo k jeho rychlému rozkladu. Srovnání mezi proteolýzou čistého β -LG a komplexu β -LG/FA neprokázalo žádné výrazné. Experimenty dále zaznamenaly rozdíly u rozkladných produktů vzorků čistého β -LG oproti komplexu β -LG/FA (Peréz et al., 2014).

3.4.2.6 Interakce mléčných proteinů a sacharidů v průběhu trávení

Ve studii Morrella et al. (2015) byly zkoumány vlastnosti jogurtů se zvýšeným obsahem bílkovin a s přísadkou fyzikálně modifikovaného škrobu před a po ošetření slinami. K přípravě jogurtů bylo použito odstředěné mléko (Central Lechera Asturiana, Španělsko), fyzikálně modifikovaný škrob (Univar Ibérica, Španělsko), izolované syrovátkové bílkoviny (El Prat de Llobregat, Španělsko), lyofilizované mléčné kultury (Genesis Laboratories Ltd., Bulharsko), aspartam a acesulfam K (EPSA Aditivos Alimentarios, Španělsko) a destilovaná voda. Tukoprostá sušina vzorků byla navýšena odstředěným mlékem, syrovátkovými bílkoviny nebo modifikovaným škrobem (Morrell et al., 2015).

Simulovaný roztok slin byl připraven z NaHCO_3 (5,208 g/l), $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (1,369 g/l), NaCl (0,877 g/l), KCl (0,477 g/l), $\text{Ca Cl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (0,441 g/l), vepřového mucinu (2,16 /l), α -amylasy z vepřového pankreatu (8,70 g/l) a dvakrát destilované vody. Poměr simulovaných slin ku vzorku byl 1 : 4. Pro charakterizaci tuku a viskoelastických vlastností vzorků byly použity reologické testy před a po orální fázi trávení (Morrell et al., 2015).

Bylo zaznamenáno, že nejvíce viskózní byl vzorek s přidaným odstředěným mlékem. Všechny jogurty s přidaným škrobem byly krémovější než jejich alternativy škrob neobsahující. Krémovitost těchto vzorků byla pravděpodobně způsobena přítomností a interakcemi škrobových granulí v proteinové síti. Po in vitro perorálním trávení bylo zjištěno, že změny ve viskozitě jogurtů jsou nejspíš vyvolány tendencí se shlukovat. Přítomnost zachovaných škrobových granulí pak ukázala, že tyto granule nebyly štěpeny slinami (Morrell et al., 2015).

3.4.2.7 Změny v dostupnosti biologicky aktivních látek při průchodu trávicím traktem

Interaktivita u mléčných proteinů byla zkoumána na pasterovaném kravském mléku s obsahem 0,1 % tuku, bílkovin 3,4 % a 4,6 % laktózy, oproti pasterovanému kravskému mléku s obsahem 3,5 % tuku, 3,3 % bílkovin a 4,4 % laktózy. Lidské trávicí enzymy potřebné k tomuto pokusu byly získány z lidských žaludečních a střevních šťáv od 3 zdravých dobrovolníků (Devle et al., 2014).

Modifikovaný statický ex vivo trávicí proces byl proveden ve dvou krocích. Prvním krokem bylo žaludeční a druhým střevní trávení. První fáze probíhala s postupnou redukcí pH z hodnoty 6,7 na hodnotu 5 po dobu 20 min pomocí 4M HCl. Poté byly přidány žaludeční enzymy a pH bylo opět sníženo pomocí 4 M HCl na hodnotu pH 2,5. Celková

doba gastrické periody trvala 40 min. Střevní fáze probíhala za přidání střevních enzymů při pH 7 (upraveno 6 M NaOH) a trvala 120 min při konstantní teplotě 37 °C. Vzorky byly poté zamrazeny (Devle et al., 2014).

Bílkoviny byly analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie, lipidy pomocí plynové chromatografie (Devle et al., 2014).

Devle et al. (2014) zaznamenali, že u plnotučného a odstředěného mléka byly kaseiny téměř strávené již po 40 min žaludeční fáze. β -LG zůstal neporušený u plnotučného mléka po obou procesech, tedy po celkové době trávení 160 min. U odstředěného mléka se však začal štěpit již po 60 min střevní fáze. Jeho degradace byla tedy významně ovlivněna obsahem tuku. Obsah lipidů klesl v plnotučném mléce o 37 %. Během trávení rostl obsah volných mastných kyselin a to nejvíce během jeho střevní fáze (Devle et al., 2014).

Účelem studie Li and McClements (2014) bylo objasnění vlivu u typu povrchově aktivních látek na chování tukové emulze pomocí simulovaného střevního modelu lipolýzy. Jako tukové fáze byly použity kapinky kukuřičného oleje, jež byl nejprve upraven membránovou homogenizací. Emulze typu olej/voda byla vyrobena smícháním tukové fáze s vodnou za přítomnosti povrchově aktivních látek (alginát sodný, roztok chitosanu, nebo β -LG. Vyrobene emulze byly skladovány při pokojové teplotě přes noc (Li and McClements, 2014).

Vzorky byly před trávicím procesem naředěny na 0,4 % hm. obsahu tuku. In vitro statické trávení bylo provedeno při teplotě 37 °C smícháním vzorků, fosfátového pufru a simulovaných střevních tekutin. V reakční nádobě bylo udržováno pH na hodnotě 7,0 pomocí automatického přídavku 50 mM roztoku NaOH. Lipolytické štěpení bylo sledováno pomocí měření uvolňování volných mastných kyselin ze vzorků (Li and McClements, 2014).

Autoři pozorovali, že velikost tukové kapičky a tím i rychlost lipolýsy závisí na použití a typu surfaktantu. U neionických povrchově aktivních látek docházelo k rychlejší adsorpci na mezifázi rychleji a snižování účinnějšímu mezifázového napětí (Li and McClements, 2014).

4 Experimentální část

4.1 Materiály, chemikálie, přístroje a zařízení

4.1.1 Materiály

Jako mléčné matrice byly použity mléka a mléčné výrobky běžně dostupné v tržní síti České republiky, nebo materiály poskytnuté výzkumným pracovištěm Katedrou kvality zemědělských produktů České zemědělské univerzity (ČZU) v Praze.

Tabulka 1: Seznam použitých mléčných matric

Vzorek	Produkt ¹	Výrobce/prodávající	Trvanlivost
1	syrové mléko	Farma Hole, ČR	3 dny
2	syrové kozí mléko	ČZU	neuveďeno
3	syrové mateřské mléko	ČZU	neuveďeno
4	pasterované mléko, 3,5 % hm. tuku	K-Classic, ČR	6.6.2014
5	pasterované kozí mléko, 2,7% hm. tuku	Biofarma DoRa, ČR	2.6.2014
6	pasterované ovčí mléko, 3,5 % hm. tuku	Kozí farma Pěňčín, ČR	2.6.2014
7	UHT mléko, 0,5 % hm. tuku	K-Classic, ČR	15.11.2014
8	UHT mléko, 1,5 % hm. tuku	K-Classic, ČR	3.2.2014
9	UHT mléko, 3,5 % hm. tuku	K-Classic, ČR	9.10.2014
10	mléko sterilované v obalu, 7,5 % hm. tuku	Mlékárna Hlinsko, ČR	7.12.2014
11	sušené mléko, 26 % hm. tuku	Bohemilk, ČR	17.9.2014
12	pasterovaná smetana, 33 % hm. tuku	Mlékárna Polná, ČR	5.7.2014
13	zakysaná smetana, 18 % hm. tuku	Madeta, ČR	9.8.2014
14	bílý jogurt, 2,7 % hm. tuku	Olma, ČR	28.9.2014
15	acidofilní mléko, 3,5 % hm. tuku	RAJO, ČR	11.6.2014
16	kefir, 3,5% hm. tuku	Biovavřinec, ČR	7.6.2014
17	kysané podmásli, 1 % tuku	Moravia Lacto, ČR	12.7.2014
18	eidamský sýr, 40 % hm. tuku v sušině (tvs), zralost 1 měsíc	K-Classic, ČR	24.7.2014
19	eidamský sýr, 40 % hm. tvs, zralost 5 měsíců	IMCO, ČR	neuveďeno
20	sušená syrovátka, 1,5 % hm. tuku	Simandl, ČR	7.2.2015

¹ Pokud není jinak specifikováno, jedná se o produkt z kravského mléka

4.1.2 Chemikálie

Byly použity chemikálie o čistotě p.a. Seznam použitých chemikálií je uveden níže:

CaCl₂ * H₂O (Penta, ČR)
CH₃COOH (Lach-ner, ČR)
Citrát trisodný (Penta, ČR)
Fenolftalein (Lach-ner, ČR)
HCl (Lach-ner, ČR)
H₂O₂ (Lach-ner, ČR)
H₂SO₄ (Lach-ner, ČR)
Isopropylalkohol (Penta, ČR)
Kaseinát sodný (Penta, ČR)
KCl (Lach-ner, ČR)
KH₂PO₄ (Penta, ČR)
KOH (Lach-ner, ČR)
Kyselina stearová (Penta, ČR)
MgCl₂ * H₂O (Penta, ČR)
NaCl (Lach-ner, ČR)
NaHCO₃ (Lach-ner, ČR)
NaOH (Lach-ner, ČR)
Na₂SO₄ (Penta, ČR)
(NH₄)₂CO₃ (Penta, ČR)
Octan sodný (Penta, ČR)
Petrolether (Lach-ner, ČR)

Seznam použitých enzymů:

Vepřový pepsin, aktivita 2 000 U/ml (Sigma–Aldrich, USA)
Pankreatin, aktivita 100 U/ml (Sigma–Aldrich, USA)
Žluč, koncentrace 10 mM (Sigma–Aldrich, USA)

4.1.3 Přístroje a zařízení

Bylo použito standardní přístrojové vybavení analytické laboratoře. Speciální přístroje jsou uvedeny níže:

Destilační jednotka Kjeltex Auto Distillation 2 200 (FOSS TECATOR, Dánsko)

MilcoScan FT 120 (FOSS, Dánsko)

Mineralizační blok TerMin20 D40 (SKA-TEC, Česká republika)

Soxtec systém HT6 Sox 414 (Gerhardt, Německo)

4.2 Metody

4.2.1 Hydrolýza mléčných matric

Hydrolýza mléčných matric byla provedena postupem uvedeným v nejnovější publikované verzi standardizovaného statického in vitro trávicího modelu Infogest Working Group (Minekus et al., 2014). Trávení mělo 3 fáze (orální, žaludeční a střevní). Před samotnou hydrolýzou byly připraveny simulované trávicí šťávy podle tabulky 2 níže.

Tabulka 2: Příprava simulovaných šťáv trávicího traktu SGF a SIF

Chemikálie	Zásobní roztok		SGF	SIF
	<i>c</i> [g/l]	<i>c</i> [mol/l]	<i>c</i> [mmol/l]	<i>c</i> [mmol/l]
KCl	37,3	0,5	6,9	6,8
KH ₂ PO ₄	68,0	0,5	0,9	0,8
NaHCO ₃	84,0	1,0	25,0	85,0
NaCl	117,0	2,0	47,2	38,4
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	30,5	0,2	0,1	0,3
(NH ₄) ₂ CO ₃	48,0	0,5	0,5	-

Sušené a zahuštěné matrice byly obnoveny a naředěny dle požadavků experimentu destilovanou vodou, sušené mléko na 10 % hm. sušiny a sušená syrovátka na 7 % hm. sušiny (nativní koncentrace). Tekuté a polotekuté vzorky orální fázi neprocházely, před gastrickým

trávením byly pouze homogenizovány promícháním. Tuhé vzorky byly mělněny v ústech po dobu 2 min, kde byly zároveň promíchány se slinami.

Do 60 ml plastových zkumavek se šroubovacím uzávěrem bylo napipetováno 10 ml homogenizovaných mléčných matric. Ke vzorkům bylo přidáno 7,5 ml SGF a 5 μ l CaCl_2 o koncentraci 0,3 mol/l (Penta, ČR). Obsah zkumavek byl homogenizován při 500 rpm míchadlem Vitrum M32 (Elisabeth Pharmacon, ČR). Dále byla provedena úprava pH směsi pomocí roztoků NaOH o koncentraci 1 mol/l (Lach-ner, ČR) nebo HCl o koncentraci 6 mol/l (Lach-ner, ČR) na hodnotu 3,0. Do zkumavek bylo následně odváženo pomocí analytických vah Mettler AE 200 (Mettler Toledo Švýcarsko) 0,008 g pepsinu (Sigma–Aldrich, USA) a objem zkumavky byl doplněn destilovanou vodou na 20 ml, obsah zkumavky byl opět homogenizován při 500 rpm míchadlem Vitrum M32 (Elisabeth Pharmacon, ČR). Žaludeční fáze trávení mléčných matric probíhala v temperované místnosti při 37 °C po dobu 2 h za stálého míchání (200 rpm) v třepačce Stuart CB 162 (Stuart, UK).

Po skončení gastrické fáze bylo k obsahu zkumavek přidáno 11 ml SIF, 0,638 g pankreatinu (Sigma–Aldrich, USA) a 0,352 g žluči (Sigma–Aldrich, USA) taktéž navážených na analytických vahách Mettler AE 200 (Mettler Toledo, Švýcarsko). Dále bylo přidáno 40 μ l CaCl_2 o koncentraci 0,3 mol/l (Penta, ČR), vzorky byly zhomogenizovány při 500 rpm míchadlem Vitrum M32 (Elisabeth Pharmacon, ČR) a ponechány 5 min v klidu. Následovala úprava pH směsi pomocí roztoků NaOH o koncentraci 1 mol/l (Lach-ner, ČR) nebo HCl o koncentraci 6 mol/l (Lach-ner, ČR) na hodnotu 7,0. Obsahy zkumavek byly doplněny destilovanou vodou na 40 ml a následně byly znovu zhomogenizovány při 500 rpm míchadlem Vitrum M32 (Elisabeth Pharmacon, ČR). Střevní fáze probíhala v temperované místnosti při 37 °C po dobu 2 h za stálého míchání při 200 rpm v třepačce Stuart CB 162 (Stuart, UK). Vzniklé tráveniny byly zmrazeny na teplotu –20 °C kvůli inaktivaci enzymů.

4.2.2 Analytické metody

4.2.2.1 Stanovení obsahu kaseinu u tekutých a polotekutých mléčných matric a trávenin

Obsah kaseinu (CN) u tekutých a polotekutých mléčných matric a trávenin byl zanalyzován metodou infračervené spektroskopie na přístroji MilcoScan FT 120 (FOSS, Dánsko). Tento přístroj je určen k analýze složení syrového mléka a mléčných výrobků. Analýza vzorků je založena na měření absorpce infračerveného záření při specifických vlnových délkách pro každou stanovovanou složku. Měřicí jednotkou je FTIR interferometr, který za dobu kratší než 1 s naskenuje a proměří celé infračervené spektrum (ČSN 570530, 1076; FOSS, 2002). Přístroj byl pro toto stanovení kalibrován pomocí Kjeldahlovy metody stanovení CN (ČSN ISO 17997 – 2, 2006), a byl před každým měřením vynulován a vyčištěn. Měření proběhlo v modulu Improved milk pomocí softwaru FT 120 (FOSS, Dánsko). Všechny substráty byly před vlastním stanovením vytemperovány na 40 °C ve vodní lázni Medingen W12 (Medingen GmbH, Německo). Sušené mléčné výrobky (sušené mléko a sušená syrovátka) byly naředěny destilovanou vodou na 10 a 7 % roztok a obsah kaseinu byl následně přepočten na původní obsah sušiny. Polotekuté nehydrolyzované vzorky (zakysané mléčné matrice) byly před analýzou naředěny nehydrolyzovaným odstředěným UHT mlékem (K – Classic, ČR) v poměru 1:1. Obsah kaseinu u těchto substrátů byl vypočten pomocí vzorce (1):

$$CN = (x - \frac{1}{2} y) * 2 \quad (1)$$

CN.....obsah kaseinu [%]

x.....obsah kaseinu zředěného polotuhého nehydrolyzovaného vzorku [% hm.]

y.....obsah kaseinu nehydrolyzovaného odstředěného UHT mléka [% hm.]

Zmražené hydrolyzované vzorky mléčných matric byly nejprve rozmrazeny a zhomogenizovány míchadlem Vitrum M32 (Elisabeth Pharmacon, ČR). Následovala jejich temperance na 40 °C ve vodní lázni Medingen W12 (Medingen GmbH, Německo) a analýza na přístroji MilcoScan FT 120 (FOSS, Dánsko) programem Improved milk. Obsah

CN u hydrolyzátů byl vypočten z rovnice kalibrační křivky (viz kapitola 4.2.2.3). Od každého vzorku bylo provedeno 6 paralelních měření.

4.2.2.2 Stanovení obsahu kaseinu u tuhých mléčných matric

Stanovení obsahu kaseinů u nehydrolyzovaných sýrů bylo provedeno pomocí frakcí dusíku a Kjeldahlovou metodou (ČSN ISO 17997–2). Do kádinek bylo naváženo na analytických vahách Mettler AE 200 (Mettler Toledo, Švýcarsko) 15 g nastrouhaného sýru (m_1) a 75 g citrátu trisodného (Penta, ČR) (m_2). Směs byla homogenizována po dobu 10 min pomocí kuchyňského mixeru Moulinex–clic and mix (Moulinex, Francie). 60 g takto vzniklé citrátové disperze (m_3) bylo odváženo do odměrné baňky (o objemu 200 ml) na analytických vahách Mettler AE 200 (Mettler Toledo, Švýcarsko) a doplněno destilovanou vodou po rysku baňky (V). Pro stanovení frakce rozpustné při pH 4,5 bylo odpipetováno 80 ml vzniklého citrátového roztoku, který byl temperován po dobu 5 min ve vodní lázni Electronic balance 11VA (A&D Company, Japonsko) při teplotě 10–12 °C. K němu bylo byretou přidáno 11,3 ml HCl (Lachener, ČR) o koncentraci 6 mol/l a za intenzivního míchání byla směs vytemperována na 20 °C. Poté byl objem doplněn na 100 ml destilovanou vodou (Černá a Cvak, 1986). Ke stanovení obsahu dusíku Kjeldahlovou metodou bylo odpipetováno 5 ml směsi.

Princip Kjeldahlizace je založen na oxidační mineralizaci látek varem s koncentrovanou H_2SO_4 a H_2O_2 za přítomnosti katalyzátorů. Minerální dusík přechází na amoniak, který je stanoven acidometrickou titrací. 5 ml směsi z předešlé analyzační metody bylo zváženo v kádinkách (m_4). Tato směs byla následně zředěna 75 ml destilované vody a dále byl přidán 1 ml 10 % CH_3COOH (Lach-ner, ČR) a vše bylo promícháno tyčinkou. Po 10 min odpočinku byl přidán 1 ml roztoku 34,02 g trihydrátu octanu sodného (Penta, ČR), objem směsi byl doplněn na 100 ml destilovanou vodou a vše bylo opět promícháno. Po 15 min stání byly vzorky zfiltrány přes filtrační papír o střední hustotě (390) předem smočeným promývacím roztokem, který byl složen z 6 ml 10 % CH_3COOH (Lach-ner, ČR) a 14 ml roztoku 34,02 g trihydrátu octanu sodného (Penta, ČR) doplněného destilovanou vodou na objem 100 ml s úpravou pH na hodnotu 4,8. Pomocí promývacího roztoku byla sraženina kvantitativně převedena na filtrační papír a třikrát promyta 10 ml promývacího roztoku. Vzorky v digesčních trubicích byly smíchány s 20 ml H_2SO_4 (Lach-ner, ČR) o koncentraci 0,2 mol/l, se 2 tabletami katalyzátoru (FOSS, Dánsko) a 10 ml koncentrovaného H_2O_2 (Lach:ner, ČR). Metoda Kjeldahlizace se skládala ze 3 stupňů: mineralizace, destilace

a titrace. Mineralizace byla provedena v digesčních trubicích mineralizačním blokem TerMin20 D40 (SKA – TEC, ČR). Destilace zmineralizovaného materiálu proběhla v automatické destilační jednotce Kjeltec Auto Distillation 2 200 (FOSS TECATOR, Dánsko), poté byly vzorky titrovány pomocí H₂SO₄ (Lach-ner, ČR) o koncentraci 2 M do změny zbarvení. Současně byl proveden slepý pokus, ve kterém proběhlo stanovení pozadí použitých chemikálií a katalyzátorů (ČSN ISO 17997–2). Od každého sýru byla provedena 2 paralelní stanovení jednotlivých frakcí. Obsah CN byl vypočten podle vzorce (2):

$$CN = \frac{1,4007 * b * c * (m_1 + m_2) * V - N_{FP} * m_{FP}}{m_1 * m_3 * m_4} * 6,38 * 2 \quad (2)$$

CN.....obsah kaseinu [% hm.]

b.....spotřeba odměrného roztoku H₂SO₄ po odečtu slepé zkoušky [ml]

c.....koncentrace odměrného roztoku H₂SO₄ [mol/l]

*m*₁.....navážka rozstrouhaného sýru u stanovení frakcí dusíku v sýru [g]

*m*₂.....navážka citrátu trisodného u stanovení frakcí dusíku v sýru [g]

*m*₃.....hmotnost citrátové disperze u stanovení frakcí dusíku v sýru [g]

*m*₄.....navážka u Kjeldahlizace [g]

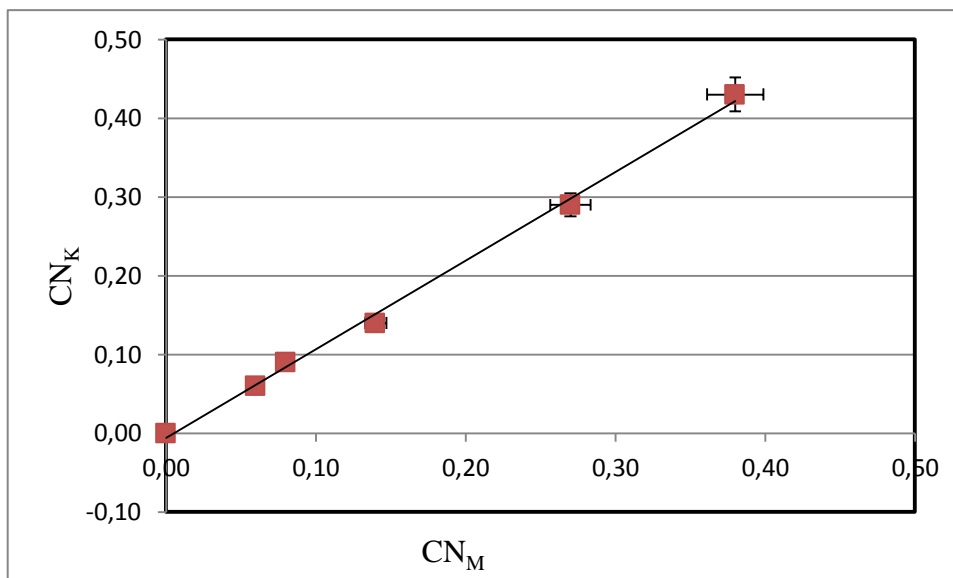
V.....objem stanovení frakcí dusíku v sýru [ml]

*N*_{FP}.....obsah dusíku ve filtračním papíru [% hm.]

*m*_{FP}.....hmotnost filtračního papíru [g]

4.2.2.3 Kalibrace stanovení obsahu kaseinu u trávenin

Kalibrace obsahu CN u hydrolyzovaných mléčných matric byla provedena pomocí hydrolyzátu UHT odstředěného mléka (K-Classic, ČR) s různými koncentracemi kaseinátu sodného (Penta, ČR). Sada kalibračních vzorků byla proměřena metodou infračervené spektroskopie na přístroji MilcoScan FT 120 (FOSS, Dánsko) v programu Improved milk (viz kapitola 4.2.2.1) a pomocí Kjeldahlovy metody stanovení CN (viz kapitola 4.2.2.2). Použité koncentrace byly 0; 0,01; 0,10; 0,25; 0,50 a 1,00 % hm. kaseinátu sodného (Penta, ČR). Stanovení bylo provedeno pro každý vzorek dvakrát. Kalibrační křivka je uvedena na obrázku 1.



Obrázek 1: Kalibrační křivka pro stanovení CN u trávenin metodou infračervené spektroskopie

Rovnice kalibrační přímky byla: $CN_M = 0,0057 + 0,8869 CN_K$, při $R = 0,9$ (3)

CN_Kobsah kaseinu stanovený pomocí Kjeldahlovy metody [% hm.]

CN_Mobsah kaseinu stanovený pomocí infračervené spektroskopie [% hm.]

Výsledky jsou zobrazeny jako aritmetický průměr ze dvou měření \pm rozptyl.

4.2.2.4 Stanovení obsahu volných mastných kyselin u tekutých a polotekutých mléčných matric a trávenin

Obsah volných mastných kyselin (VMK) u tekutých a polotekutých mléčných matric a trávenin byl zanalyzován metodou infračervené spektroskopie na přístroji MilcoScan FT 120 (FOSS, Dánsko), který byl pro toto stanovení kalibrován titrací tuků pomocí pH elektrody. Polotekuté nehydrolyzované vzorky (zakysané mléčné matrice) byly před analýzou naředěny nehydrolyzovaným odstředěným UHT mlékem (K–Classic, ČR) v poměru 1:1. Analýza probíhala stejným způsobem, jaký je popsán v kapitole 4.2.2.1. Obsah VMK u hydrolyzátů byl vypočten z rovnice kalibrační křivky (viz kapitola 4.2.2.6). Pro každý vzorek bylo provedeno 6 paralelních měření.

Obsah volných mastných kyselin u zakysaných mléčných substrátů byl vypočten pomocí vzorce (4):

$$VMK = (x - \frac{1}{2} y) * 2 \quad (4)$$

VMK.....obsah VMK polotuhého nehydrolyzovaného vzorku [mmol/10 l]

x.....obsah VMK zředěného polotuhého nehydrolyzovaného vzorku [mmol/10 l]

y.....obsah VMK nehydrolyzovaného odstředěného UHT mléka [mmol/10 l]

4.2.2.5 Stanovení obsahu volných mastných kyselin u tuhých mléčných matric

Obsahu VMK u tuhých mléčných výrobků (u sýrů) byl stanoven po vyextrahování tuku ze vzorků dle Soxhleta (ČSN 57 0530) metodou BDI (Černá a Cvak, 1886).

Rozstrouhaný sýr byl rozmělněn v hmoždíři spolu s bezvodným síranem sodným (Penta, ČR) v poměru sýr : Na₂SO₄ 5 : 3, kde 1 odpovídal 1,4 g, což bylo odváženo na analytických vahách Mettler AE 200 (Mettler Toledo, Švýcarsko). Do extrakčních patron bylo s analytickou přesností naváženo 7 g směsi na analytických vahách Mettler AE 200 (Mettler Toledo, Švýcarsko). Do extrakčních kelímků byly dány dva varné kamínky, extrakční patrony byly utěsněny vatou a upevněny do stojánku na patrony, který byl umístěn do extrakčního kelímku. Do aparatury byl přidán petroletherem (Penta, ČR) tak, aby se jeho hladina nedotýkala patrony. Takto připravené extrakční kelímky byly umístěny do extrakční jednotky systému Soxtec Sox 414 (Gerhardt, Německo) přehřáté na 70 °C. Po skončení extrakce byly extrakční kelímky sušeny v elektrické sušárně G-100/200 (KBC, Polsko) při teplotě 103–105 °C do konstantní hmotnosti (ČSN 57 0530). Od každého sýru byla provedena 2 paralelní měření. Obsah tuku byl vypočten podle vzorce (5):

$$w_t = \frac{m_{\text{extraktu}}}{m_{\text{roztoku}}} * 100 \quad (5)$$

w_t.....obsah tuku [% hm.]

m_{extraktu}.....hmotnost extraktu vysušeného do konstantní hmotnosti [g]

m_{roztoku}.....hmotnost navážky vzorku [g]

Obsah VMK vzorků byl následně stanoven extrakčně-titrační metodou BDI. Principem této metody je extrakce mléčného tuku ve směsi isopropylalkoholu (propanolu) a petroletheru v kyselém prostředí. Při extrakci přechází volné mastné kyseliny spolu s částí přítomné kyseliny mléčné do nevodné fáze. V alikvotním podílu rozpouštědla jsou pak titrovány odměrným roztokem KOH veškeré přítomné kyseliny (Černá a Cvak, 1986).

ml tuku získaného ze sýrů extrakcí dle Soxhleta byly odpipetovány do válečku se zábrusem. K tuku bylo přidáno 10 ml BDI činidla, které bylo namícháno z isopropylalkoholu (Penta, ČR), petroletheru (Lach-ner, ČR) a kyseliny sírové (Lach-ner, ČR) o koncentraci 2 mol/l smíchané v poměru objemů 40: 10: 1. Dále bylo přidáno 6 ml petroletheru (Lach-ner) a 4 ml destilované vody. Válečky se směsí byly zavřeny zátkami a intenzivně protřepávány po dobu 15–30 s. Poté byly ponechány v klidu 10 min do oddělení vrstev. Z horní hydrofobní vrstvy bylo odpipetováno 5 ml do připravené titrační baňky a po přidání 6 kapek indikátoru fenolftaleinu (Lach-ner, ČR) o koncentraci 1 % byl obsah baňky titrován odměrným roztokem KOH (Lach-ner, ČR) o koncentraci 0,02 mol/l do růžové barvy. Stejně byl proveden i slepý pokus s destilovanou vodou, u něhož bylo současně ve válečku zjištěno přesné množství oddělené horní vrstvy fáze rozpouštědla v ml, které pak bylo dosazeno při výpočtu do vzorce (Černá a Cvak, 1986). Od každého sýru byly provedeny 2 paralelní stanovení obsahu VMK. Výpočet volných mastných kyselin byl proveden dle vzorce (6):

$$n_{VMK} = \frac{(a-b) * c * 10^5}{a * P * t} \quad (6)$$

$$P = \frac{\text{odpipetované množství vzorku [ml]}}{\text{oddělený podíl, odečtený u horní vrstvy u slepého pokusu [ml]}}$$

n_{VMK}obsah volných mastných kyselin ve vzorku [mmol/10 l]

aspotřeba odměrného roztoku KOH při titraci vzorku [ml]

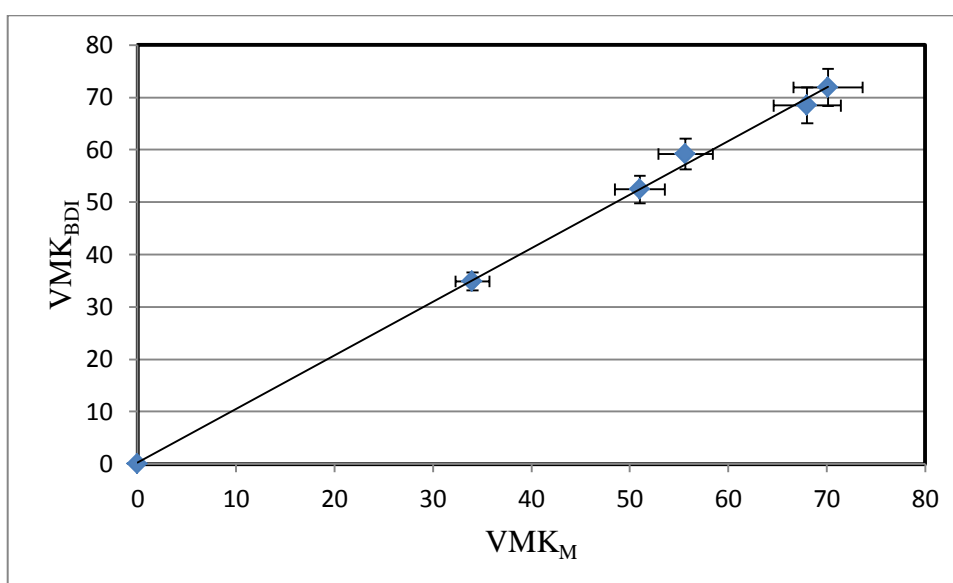
bspotřeba odměrného roztoku KOH při titraci slepého pokusu [ml]

ckoncentrace odměrného roztoku KOH [mmol/10 l]

tobsah tuku ve výrobku [% hm.]

4.2.2.6 Kalibrace stanovení obsahu VMK trávenin

Kalibrace obsahu volných mastných kyselin u hydrolyzovaných mléčných matric byla provedena pomocí hydrolyzátu UHT odstředěného mléka (K-Classic, ČR) s různými koncentracemi kyseliny stearové (Penta, ČR). Sda kalibračních vzorků byla proměřena metodou infračervené spektroskopie na přístroji MilcoScan FT 120 (FOSS, Dánsko) v programu Improved milk (viz kapitola 4.2.2.3) a pomocí BDI metody (viz kapitola 4.2.2.3). Použité koncentrace kyseliny stearové (Penta, ČR) byly 20, 40, 60, 80 a 100 mol/l. Stanovení bylo provedeno pro každý vzorek dvakrát. Kalibrační křivka je uvedena na obrázku 2.



Obrázek 2: Kalibrační křivka pro stanovení VMK trávenin metodou infračervené spektroskopie

Rovnice kalibrační přímky byla: $VMK_M = 24,6684 + 0,7756 VMK_{BDI}$, při $R = 0,9$ (7)

VMK_{BDI}obsah volných mastných kyselin stanovený metodou BDI [mmol/10 l]

VMK_Mobsah VMK stanovený metodou infračervené spektroskopie [mmol/10 l]

Výsledky jsou znázorněny ve formě aritmetického průměru ze dvou měření \pm rozptyl.

4.2.3 Statistické metody

Pro účely provedení statistické analýzy byly vzorky mléčných matric rozděleny do skupin, které jsou uvedeny níže:

Skupina 1: syrové kravské mléko, syrové kozí mléko, syrové mateřské mléko, pasterované kravské mléko s obsahem tuku 3,5 % hm., pasterované kozí mléko s obsahem tuku 2,7 % hm., pasterované ovčí mléko s obsahem tuku 3,5 % hm. U této skupiny byl zkoumán vliv druhu mléka na trávení.

Skupina 2: UHT mléko s obsahem tuku 0,5 % hm., 1,5 % hm. a 3,5 % hm. U této skupiny byl zkoumán vliv obsahu tuku na jeho trávení.

Skupina 3: syrové nestandardizované kravské mléko, pasterované kravské mléko s obsahem tuku 3,5 % hm., UHT mléko s obsahem tuku 3,5 % hm., mléko sterilované v obalu s obsahem tuku 3,5 % hm., sušené mléko s obsahem tuku 3,5 % hm., U této skupiny byl zkoumán vliv tepelného záhřevu na trávení matrice.

Skupina 4: pasterovaná smetana s obsahem tuku 33 % hm., zakysaná smetana s obsahem tuku 18 % hm., bílý jogurt s obsahem tuku 2,5 % hm., acidofilní mléko s obsahem tuku 3,5 % hm., kefír s obsahem tuku 3,5 % hm. a kysané podmáslí s obsahem tuku 1 % hm. U této skupiny byl zkoumán vliv fermentace a typu kultury na trávení výrobků.

Skupina 5: eidamský sýr se 40 % hm. tvs a zralostí 1 měsíc, eidamský sýr se 40 % hm. tvs a zralostí 5 měsíců. Zde byl zkoumán vliv délky zrání sýrů na jejich trávení.

Skupina 6: sušené mléko s obsahem tuku 3,5 % hm. a sušená syrovátka s obsahem tuku 1,5 % hm. U této skupiny byl zkoumán vliv druhu sušeného mléčného výrobku na jeho trávení.

V rámci skupin byly provedeny jednotlivé statistické výpočty a analýzy rozptylů jak pro obsahy kaseinu, tak i pro obsahy volných mastných kyselin.

U souborů získaných dat byly vypočteny aritmetické průměry, směrodatné odchylky, hladiny intervalu spolehlivosti a rozptyly pomocí softwaru Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft, USA). Analýza rozptylu, pomocí které byla vyvrácena či přijmuta stanovená hypotéza, byla propočítána pomocí softwaru STATISTICA 12 (Statsoft, USA) na hladině významnosti $P(\alpha) = 0,05$. Pro všechny analýzy rozptylu platily tyto 2 podmínky:

1. H_0 = mezi vzorky není statisticky významný rozdíl v průběhu trávení bílkovin a tuků
2. H_A = mezi vzorky je statisticky významný rozdíl v průběhu trávení bílkovin a tuků (mléčná matrice má vliv na proteasovou a lipasovou aktivitu)

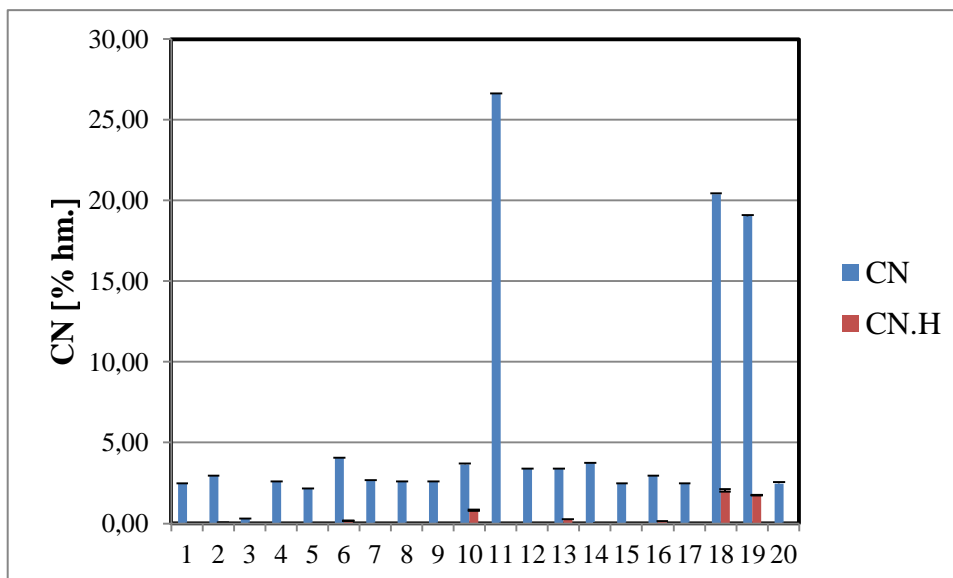
5 Výsledky

5.1 Stanovení vlivu mléčné matrice na proteasovou aktivitu

Stanovení vlivu mléčné matrice na proteasovou aktivitu, respektive na stupeň degradace CN, při využití standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group bylo provedeno u následujících substrátů: tekutých (syrové kravské, kozí a mateřské mléko, pasterované kravské, kozí a ovčí mléko o různých tučnostech, UHT kravské mléko nízkotučné, polotučné a plnotučné, zahuštěné plnotučné kravské mléko sterilované v obalu, pasterovaná smetana ke šlehání z kravského mléka), sušených (sušené plnotučné kravské mléko a sladká syrovátka z kravského mléka), polotekutých (zakysaná smetana, bílý jogurt, acidofilní mléko, kefir a kysané podmásli z kravského mléka) a 2 tuhých (eidamský sýr z kravského mléka o různých stupních zralosti).

Obsah kaseinu u tekutých a polotekutých mléčných výrobků a jejich trávenin byl stanoven pomocí metody infračervené spektroskopie na přístroji MilcoScan FT 120 (FOSS, Dánsko). U tuhých mléčných matric byl obsah CN stanoven Kjeldahlovou metodou a u jejich hydrolyzátů metodou infračervené spektroskopie na přístroji MilcoScan FT 120 (FOSS, Dánsko).

Souhrnné výsledky změn obsahu kaseinu jednotlivých vzorků po průchodu modelem gastrointestinálního traktu jsou uvedeny na obrázku 3.



Obrázek 3: Vliv mléčné matrice na proteasovou aktivitu standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group

CN.....obsah CN ve vzorku před trávením [% hm.]

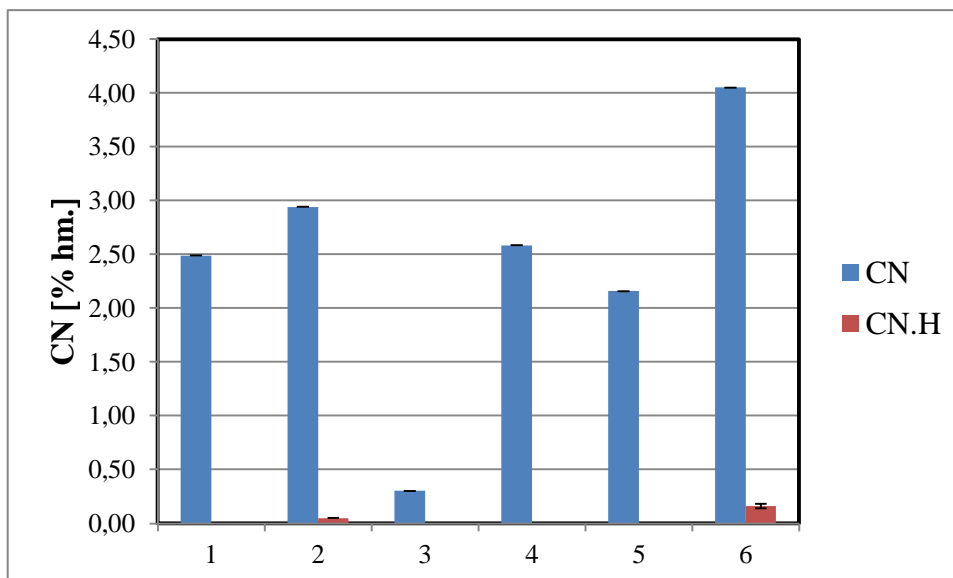
CN.H.....obsah CN v trávenině vzorku [% hm.]

Výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr z 6 paralelních stanovení \pm rozptyl.

Z obrázku 3 je patrné, že nejvyšší obsahy CN byly zaznamenány u matric s nejvyšší sušinou. Vzhledem k míře poklesu obsahu CN po průchodu simulovaným trávicím traktem lze říci, že tato mléčná bílkovina je velmi dobře štěpena a proteasová aktivita je vysoká. Nejobtížněji byl degradován kasein u vzorků sýrů.

5.1.1 Stanovení vlivu druhu mléka na proteasovou aktivitu

Vliv druhu mléka na proteasovou aktivitu, respektive na stupeň degradace CN, při využití standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group bylo provedeno u následujících substrátů: kravského, kozího a mateřského mléka. Mléko kravské a kozí bylo k dispozici v syrové a pasterované variantě, mléko ovčí v pasterovaném a mateřské v syrovém stavu. Výsledky jsou graficky znázorněny na obrázku 4. V tabulce 3 je uvedena příslušná analýza rozptylu.



Obrázek 4: Vliv druhu mléčné matrice na proteasovou aktivitu standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group

CN.....obsah CN ve vzorku před trávením [% hm.]

CN.H.....obsah CN v trávenině vzorku [% hm.]

Výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr z 6 paralelních stanovení \pm rozptyl.

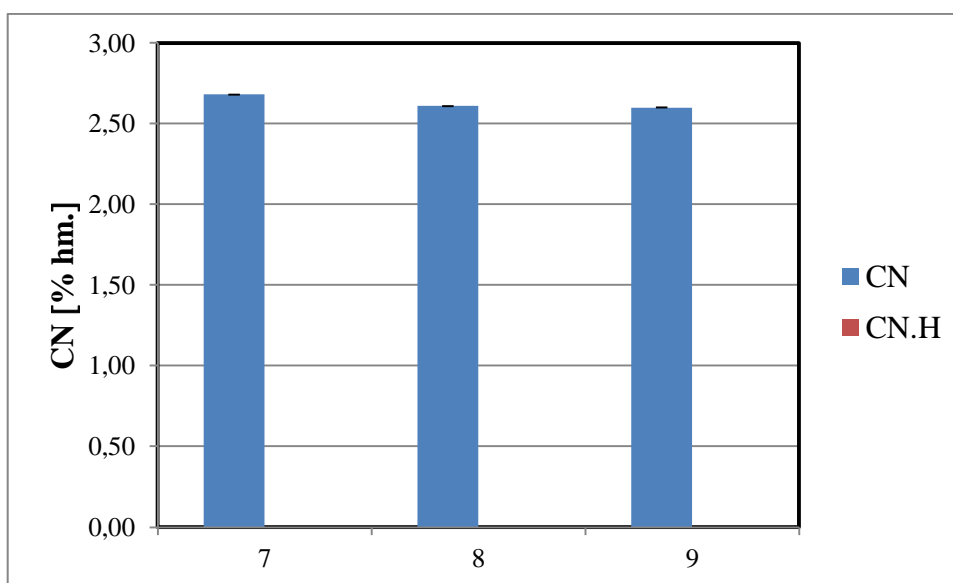
Tabulka 3: Statistická analýza rozptylu vlivu druhu mléka na proteasovou aktivitu standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group, $P(\alpha) = 0,05$

Efekt	Stupně volnosti	<i>F</i>	<i>p</i>
Absolutní člen	1	21,397	0,001
Skupina	1	20,558	0,001
Chyba	10	-	-
Výsledek	$p < p(\alpha)$		

Z obrázku 4 je patrné, že druh mléčných matric neměl vliv na proteasovou aktivitu. Nejhůře byl kasein degradován u pasterovaného ovčího mléka a u syrového mléka. U ostatních matric došlo k jeho úplnému rozštěpení. Rozdíl mezi vzorky však přesto nebyl statisticky významný na zvolené hladině významnosti (viz tabulka 3).

5.1.2 Stanovení vlivu obsahu tuku mléčných matric na proteasovou aktivitu

Vliv obsahu tuku mléčných matric na proteasovou aktivitu, respektive na stupeň degradace kaseinu, při využití standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group bylo provedeno u následujících substrátů: UHT kravské mléko nízkotučné, polotučné a plnotučné. Výsledky jsou graficky znázorněny na obrázku 5. V tabulce 4 je uvedena příslušná analýza rozptylu.



Obrázek 5: Vliv obsahu tuku mléčné matrice na proteasovou aktivitu standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group

CN.....obsah CN ve vzorku před trávením [% hm.]

CN.H.....obsah CN v trávenině vzorku [% hm.]

Výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr z 6 paralelních stanovení \pm rozptyl.

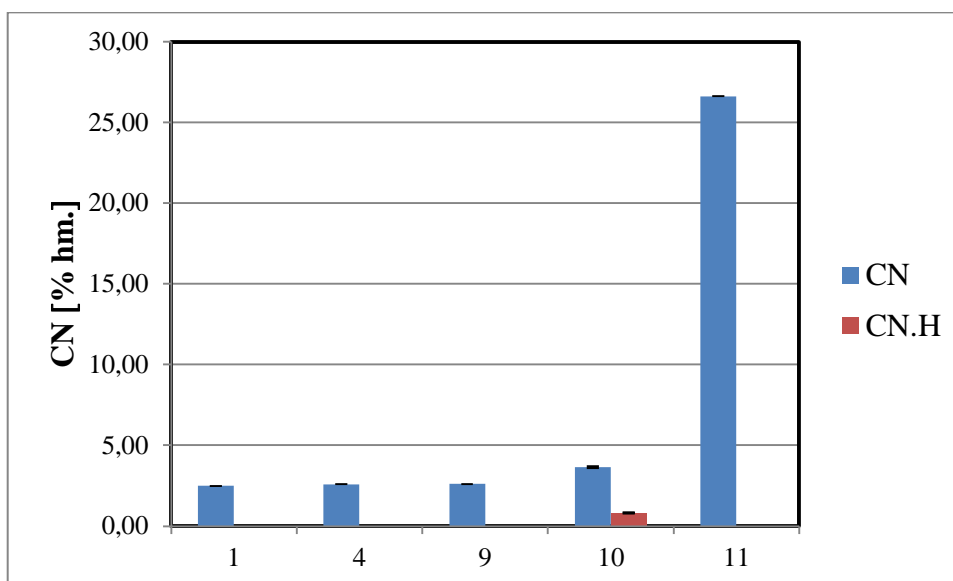
Tabulka 4: Statistická analýza rozptylu vlivu obsahu tuku mléka na proteasovou aktivitu standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group, $P(\alpha) = 0,05$

Efekt	Stupně volnosti	<i>F</i>	<i>p</i>
Absolutní člen	1	192,000	0,000
Skupina	1	192,000	0,000
Chyba	4	-	-
Výsledek	$p < p(\alpha)$		

Z obrázku 5 je patrné, že obsah tuku neměl vliv na proteasovou aktivitu, neboť byl u všech vzorků CN v průběhu trávení zcela degradován. Rozdíl mezi jednotlivými tráveninami nebyl na zvolené hladině pravděpodobnosti statisticky významný (viz tabulka 4).

5.1.3 Stanovení vlivu tepelného ošetření mléčné matrice na proteasovou aktivitu

Vliv tepelného ošetření mléčné matrice na proteasovou aktivitu, respektive na stupeň degradace kaseinu, při využití standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group bylo provedeno u následujících substrátů: syrové a pasterované kravské mléko, UHT kravské mléko plnotučné, zahuštěné plnotučné kravské mléko sterilované v obalu a sušené kravské mléko plnotučné. Výsledky jsou graficky znázorněny na obrázku 6. V tabulce 5 je uvedena příslušná analýza rozptylu.



Obrázek 6: Vliv tepelného ošetření mléčné matrice na proteasovou aktivitu standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group

CN.....obsah CN ve vzorku před trávením [% hm.]

CN.H.....obsah CN v trávenině vzorku [% hm.]

Výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr z 6 paralelních stanovení \pm rozptyl.

Tabulka 5: Statistická analýza rozptylu vlivu tepelného ošetření mléka na proteasovou aktivitu standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group, $P(\alpha) = 0,05$

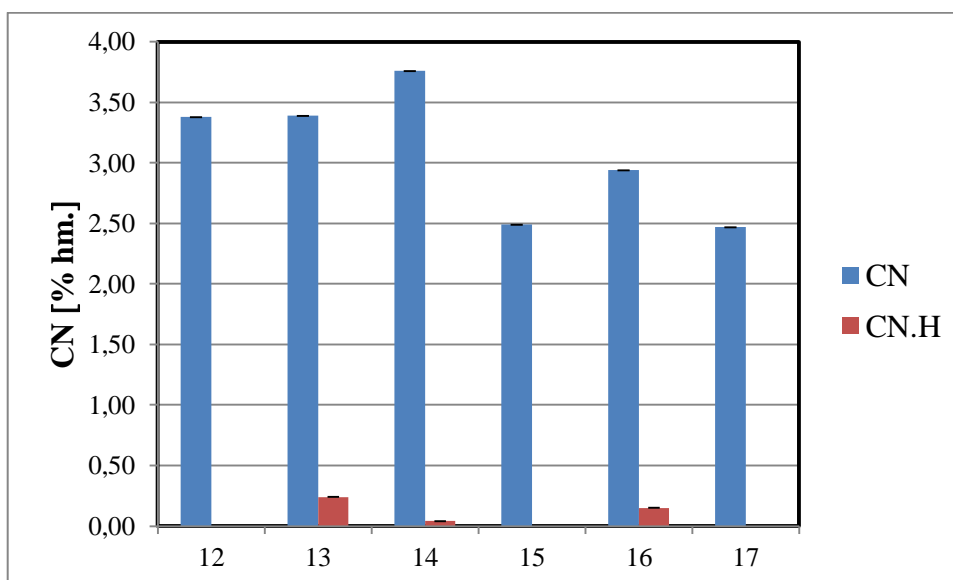
Efekt	Stupně volnosti	<i>F</i>	<i>p</i>
Absolutní člen	1	13,760	0,006
Skupina	1	12,558	0,008
Chyba	8	-	-
Výsledek	$p < p(\alpha)$		

Z výsledků znázorněných na obrázku 6, je patrné že nejpomaleji byl CN degradován u mléka ošetřeného sterilací v obalu. U ostatních členů skupiny byl pak rozštěpen během

simulace trávení kompletně. Nalezené rozdíly však nejsou statisticky průkazné na zvolené hladině pravděpodobnosti (viz tabulka 5).

5.1.4 Stanovení vlivu fermentace a typu mléčných kultur na proteasovou aktivitu

Vliv fermentace a typu mléčných matric na proteasovou aktivitu, respektive na stupeň degradace kaseinu, při využití standardizovaného statického in vitro trávícího modelu skupiny Infogest Working Group bylo provedeno u následujících substrátů: pasterovaná smetana, zakysaná smetana, bílý jogurt, acidofilní mléko, kefir a kysané podmásli z kravského mléka. Výsledky jsou graficky znázorněny na obrázku 7. V tabulce 6 je uvedena příslušná analýza rozptylu.



Obrázek 7: Vliv fermentace a typu použité kultury mléčné matrice na proteasovou aktivitu standardizovaného statického in vitro trávícího modelu skupiny Infogest Working Group

CN.....obsah CN ve vzorku před trávením [% hm.]

CN.H.....obsah CN v trávenině vzorku [% hm.]

Výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr z 6 paralelních stanovení \pm rozptyl.

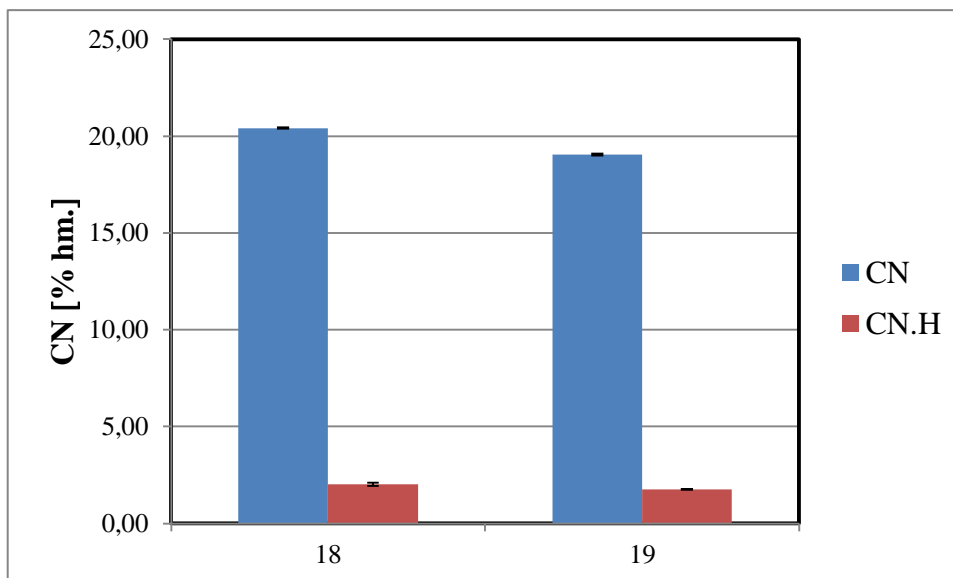
Tabulka 6: Statistická analýza rozptylu vlivu fermentace a typu použité kultury na proteasovou aktivitu standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group, $P(\alpha) = 0,05$

Efekt	Stupně volnosti	<i>F</i>	<i>p</i>
Absolutní člen	1	362,945	0,000
Skupina	1	355,839	0,000
Chyba	10	-	-
Výsledek	$p < p(\alpha)$		

Na obrázku 7 lze vidět, že CN byl při průchodu simulovaným gastrointestinálním traktem zcela rozštěpen s výjimkou zakysané smetany, bílého jogurtu a kefiru. V případě zakysané smetany byla degradace CN nejobtížnější. Nalezené rozdíly však nebyly statisticky významné na zvolené hladině pravděpodobnosti (viz tabulka 6).

5.1.5 Stanovení vlivu délky zrání sýrů na proteasovou aktivitu

Vliv délky zrání sýrů na proteasovou aktivitu, respektive na stupeň degradace kaseinu, při využití standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group bylo provedeno u následujících substrátů: 2 eidamské sýry z kravského mléka (40 % hm. tvs) o zralosti 1 a 5 měsíců. Výsledky jsou graficky znázorněny na obrázku 8. V tabulce 7 je uvedena příslušná analýza rozptylu.



Obrázek 8: Vliv délky zrání sýrů na proteasovou aktivitu standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group

CN.....obsah CN ve vzorku před trávením [% hm.]

CN.H.....obsah CN v trávenině vzorku [% hm.]

Výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr z 6 paralelních stanovení \pm rozptyl.

Tabulka 7: Statistická analýza rozptylu vlivu délky zrání sýrů na proteasovou aktivitu standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group, $P(\alpha) = 0,05$

Efekt	Stupně volnosti	<i>F</i>	<i>p</i>
Absolutní člen	1	1533,247	0,001
Skupina	1	1081,571	0,001
Chyba	2	-	-
Výsledek	$p < p(\alpha)$		

Na obrázku 8 lze vidět, že s rostoucí délkou zrání eidamského sýru klesal obsah kaseinu před i po gastrointestinální proteolyse. Nalezené rozdíly však nebyly statisticky významné na zvolené hladině významnosti (viz tabulka 7).

5.1.6 Stanovení vlivu druhu sušeného mléčného výrobku na proteasovou aktivitu

Vliv druhu sušeného mléčného výrobku na proteasovou aktivitu, respektive na stupeň degradace kaseinu při využití standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group bylo provedeno u následujících substrátů: sušené kravské mléko plnotučné a sušená sladká syrovátka (1,5 % hm. tuku).

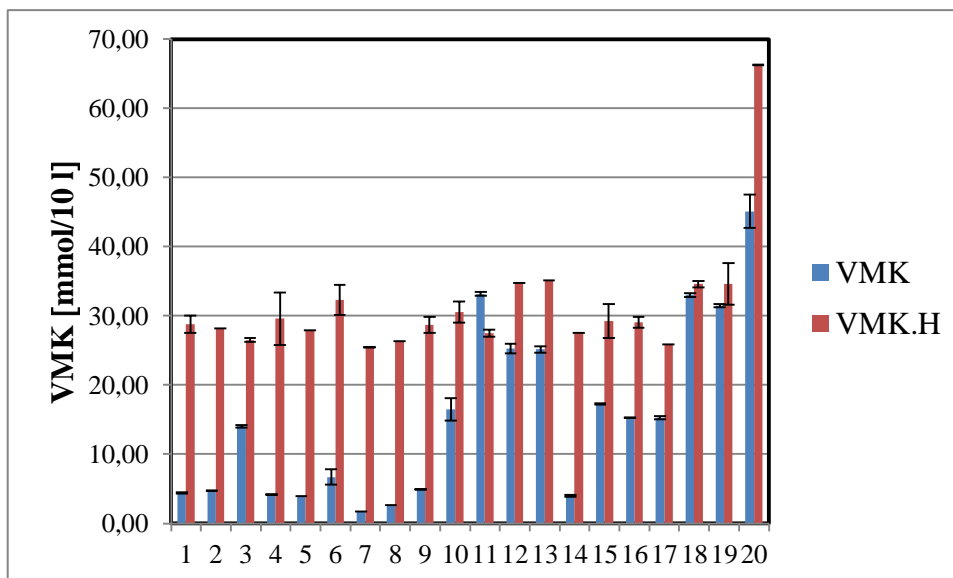
Stanovení vlivu druhu mléčného výrobku na proteasovou aktivitu, respektive stupeň degradace kaseinu při průchodu standardizovaným statickým in vitro trávicím modelem skupiny Infogest Working Group nebylo provedeno z důvodu absence CN v matici sladké kravské syrovátky.

5.2 Stanovení vlivu mléčné matrice na lipasovou aktivitu

Stanovení vlivu mléčné matrice na lipasovou aktivitu, respektive na stupeň zvýšení obsahu volných mastných kyselin, při využití standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group bylo provedeno u následujících substrátů: tekutých (syrové kravské, kozí a mateřské mléko, pasterované kravské, kozí a ovčí mléko o různých tučnostech, UHT kravské mléko nízkotučné, polotučné a plnotučné, zahuštěné plnotučné kravské mléko sterilované v obalu, pasterovaná smetana ke šlehání z kravského mléka), sušených (sušené plnotučné kravské mléko a sladká syrovátka z kravského mléka), polotekutých (zakysaná smetana, bílý jogurt, acidofilní mléko, kefir a kysané podmáslí z kravského mléka) a 2 tuhých (eidamský sýr z kravského mléka o různých stupních zralosti).

Obsah VMK u tekutých a polotekutých mléčných výrobků a jejich trávenin byl stanoven pomocí metody infračervené spektroskopie na přístroji MilcoScan FT 120 (FOSS, Dánsko). U tuhých mléčných matric byl obsah volných mastných kyselin stanoven pomocí BDI metody a u jejich hydrolyzátů metodou infračervené spektroskopie na přístroji MilcoScan FT 120 (FOSS, Dánsko).

Souhrnné výsledky změn obsahu VMK jednotlivých vzorků po průchodu modelem gastrointestinálního traktu jsou uvedeny na obrázku 9.



Obrázek 9: Vliv mléčné matrice na lipasovou aktivitu standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group

VMK.....obsah VMK ve vzorku před trávením [mmol/10 l]

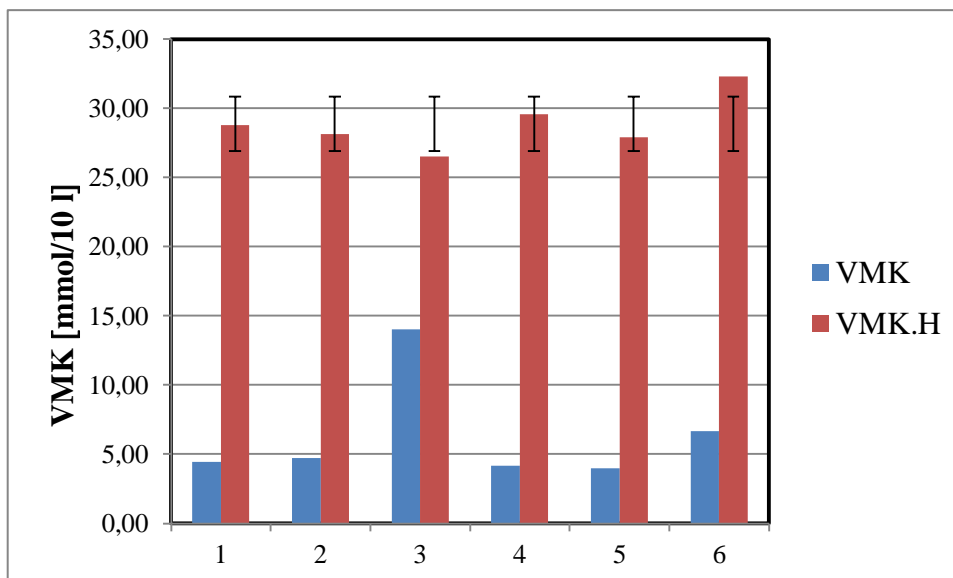
VMK.H.....obsah VMK v trávenině vzorku [mmol/10 l]

Výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr z 6 paralelních stanovení \pm rozptyl.

Z obrázku 9 je patrné, že nejvyšší obsah volných mastných kyselin před i po průchodu simulovaným gastrointestinálním traktem byl nalezen u sušené sladké kravské syrovátky. Nejnižší množství VMK před i po lipolyse obsahovalo nízkotučné UHT kravské mléko, tedy výrobek s nejnižším množstvím tuku. Opačné výsledky, tedy vyšší obsah VMK v nativním vzorku než v jeho trávenině byl zaznamenán u sušeného plnotučného mléka.

5.2.1 Stanovení vlivu druhu mléka na lipasovou aktivitu

Vliv druhu mléka na lipasovou aktivitu, respektive na stupeň zvýšení obsahu volných mastných kyselin, při využití standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group bylo provedeno u následujících substrátů: kravského, koziho a mateřského mléka. Mléko kravské a kozí bylo k dispozici v syrové a pasterované variantě, mléko ovčí v pasterovaném a mateřské v syrovém stavu. Výsledky jsou graficky znázorněny na obrázku 10. V tabulce 8 je uvedena příslušná analýza rozptylu.



Obrázek 10: Vliv druhu mléka na lipasovou aktivitu standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group

VMK.....obsah VMK ve vzorku před trávením [mmol/10 l]

VMK.H.....obsah VMK v trávenině vzorku [mmol/10 l]

Výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr z 6 paralelních stanovení ± rozptyl.

Tabulka 8: Statistická analýza rozptylu vlivu druhu mléka na lipasovou aktivitu standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group, $P(\alpha) = 0,05$

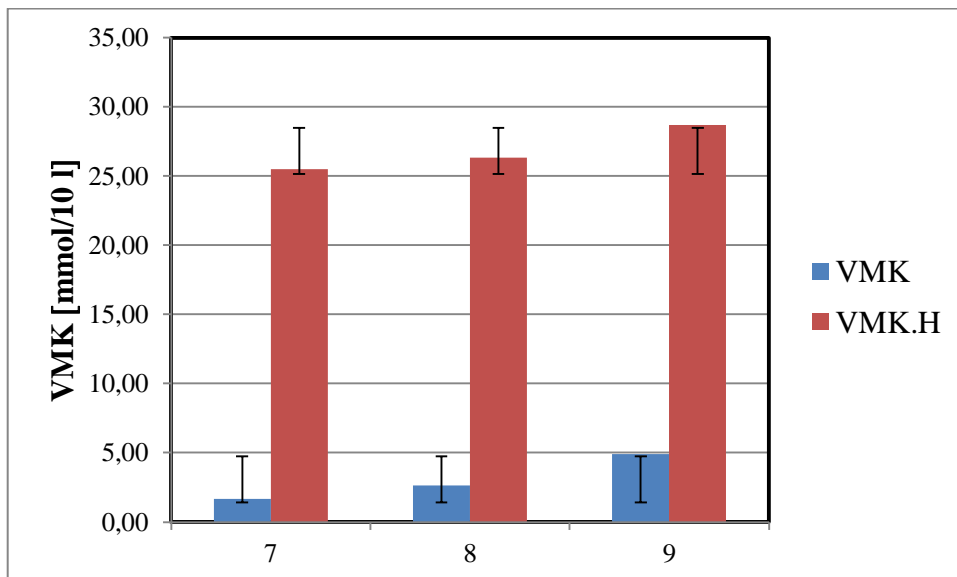
Efekt	Stupně volnosti	<i>F</i>	<i>p</i>
Absolutní člen	1	856,461	0,000
Skupina	1	526,169	0,000
Chyba	10	-	-
Výsledek	$p < p(\alpha)$		

Z obrázku 10 je patrné, že nejméně VMK obsahoval vzorek pasterovaného kozího mléka a nejvíce syrové kravské mléko. Nejintenzivnější lipasová aktivita byla zaznamenána u pasterovaného ovčího mléka. Vzhledem k tomu, že ovčí mléko před simulací trávení neobsahovalo nejvyšší podíl volných mastných kyselin, lze říci, že intenzita procesu

je ovlivněna typem substrátu. Pozorované rozdíly mezi vzorky nebyly však statisticky významné na zvolené hladině pravděpodobnosti (viz tabulka 8).

5.2.2 Stanovení vlivu obsahu tuku mléčné matrice na lipasovou aktivitu

Vliv obsahu tuku mléčných matric na lipasovou aktivitu, respektive na stupeň zvýšení obsahu VMK, při využití standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group bylo provedeno u následujících substrátů: UHT kravské mléko nízkotučné, polotučné a plnotučné. Výsledky jsou graficky znázorněny na obrázku 11. V tabulce 9 je uvedena příslušná analýza rozptylu.



Obrázek 11: Vliv obsahu tuku mléčné matrice na lipasovou aktivitu standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group

VMK.....obsah VMK ve vzorku před trávením [mmol/10 l]

VMK.H.....obsah VMK v trávenině vzorku [mmol/10 l]

Výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr z 6 paralelních stanovení ± rozptyl.

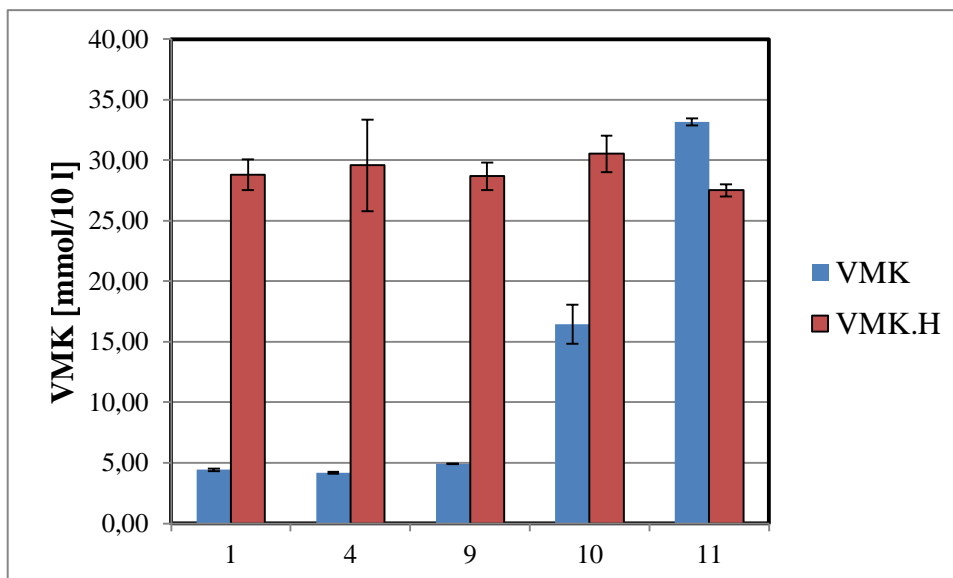
Tabulka 9: Statistická analýza rozptylu vlivu obsahu tuku na lipasovou aktivitu standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group, $P(\alpha) = 0,05$

Efekt	Stupně volnosti	<i>F</i>	<i>p</i>
Absolutní člen	1	263,163	0,000
Skupina	1	81,356	0,000
Chyba	4	-	-
Výsledek	$p < p(\alpha)$		

Z výsledků uvedených na obrázku 11 lze vidět stoupající trend obsahu volných mastných kyselin s rostoucím obsahem tuku jak u nativních vzorků, tak i u jejich trávenin. Obsah tuku tedy ovlivňoval množství generovaných VMK v průběhu simulovaného gastrointestinálního trávení, avšak tento vliv nebyl statisticky významný na zvolené hladině pravděpodobnosti (viz tabulka 9).

5.2.3 Stanovení vlivu tepelného ošetření mléčné matrice na lipasovou aktivitu

Vliv tepelného ošetření mléčné matrice na lipasovou aktivitu, respektive na stupeň zvýšení obsahu volných mastných kyselin, při využití standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group bylo provedeno u následujících substrátů: syrové a pasterované kravské mléko, UHT kravské mléko plnotučné, zahuštěné plnotučné kravské mléko sterilované v obalu a sušené kravské mléko plnotučné. Výsledky jsou graficky znázorněny na obrázku 12. V tabulce 10 je uvedena příslušná analýza rozptylu.



Obrázek 12: Vliv tepelného ošetření mléčné matrice na lipasovou aktivitu standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group

VMK.....obsah VMK ve vzorku před trávením [mmol/10 l]

VMK.H.....obsah VMK v trávenině vzorku [mmol/10 l]

Výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr z 6 paralelních stanovení \pm rozptyl.

Tabulka 10: Statistická analýza rozptylu vlivu tepelného ošetření na lipasovou aktivitu standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group, $P(\alpha) = 0,05$

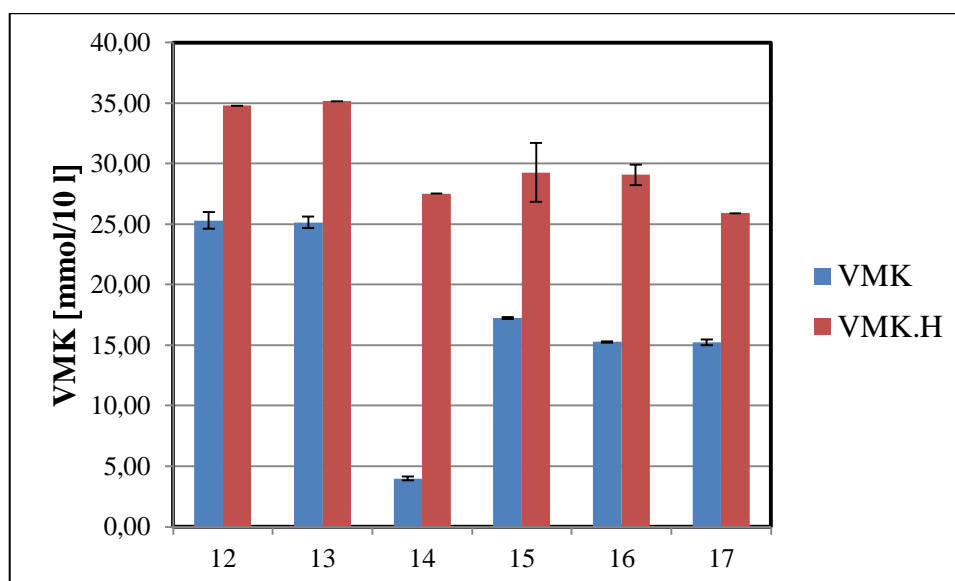
Efekt	Stupně volnosti	<i>F</i>	<i>p</i>
Absolutní člen	1	328,632	0,000
Skupina	1	122,834	0,000
Chyba	8	-	-
Výsledek	$p < p(\alpha)$		

Na obrázku 12 jsou uvedeny výsledky stanovení obsahu volných mastných kyselin u mléčných matric se shodným obsahem tuku, které byly ošetřeny různým tepelným záhřevem. Je zde vidět, že obsah VMK před a po lipolyse je srovnatelný pro vzorky syrového a pasterovaného kravského mléka. S rostoucím stupněm tepelného ošetření (pasterace < UHT

< sterilace v obalu < sušení) roste i obsah VMK před, nikoliv však po simulovaném trávení. Nejvyšší nárůst VMK po lipolyse byl zaznamenán u pasterovaného kravského mléka. Lze říci, že s rostoucím stupněm tepelného ošetření klesá lipasová aktivita standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group. Pozorované změny v průběhu procesu však nebyly statisticky významné na zvolené hladině pravděpodobnosti (viz tabulka 10).

5.2.4 Stanovení vlivu fermentace a typu mléčných matric na lipasovou aktivitu

Vliv fermentace a typu mléčných matric na lipasovou aktivitu, respektive na stupeň zvýšení VMK, při využití standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group bylo provedeno u následujících substrátů: pasterovaná smetana, zakysaná smetana, bílý jogurt, acidofilní mléko, kefir a kysané podmáslí z kravského mléka. Výsledky jsou graficky znázorněny na obrázku 13. V tabulce 11 je uvedena příslušná analýza rozptylu.



Obrázek 13: Vliv fermentace a typu použité kultury mléčné matrice na lipasovou aktivitu standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group

VMK.....obsah VMK ve vzorku před trávením [mmol/10 l]

VMK.H.....obsah VMK v trávenině vzorku [mmol/10 l]

Výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr z 6 paralelních stanovení \pm rozptyl.

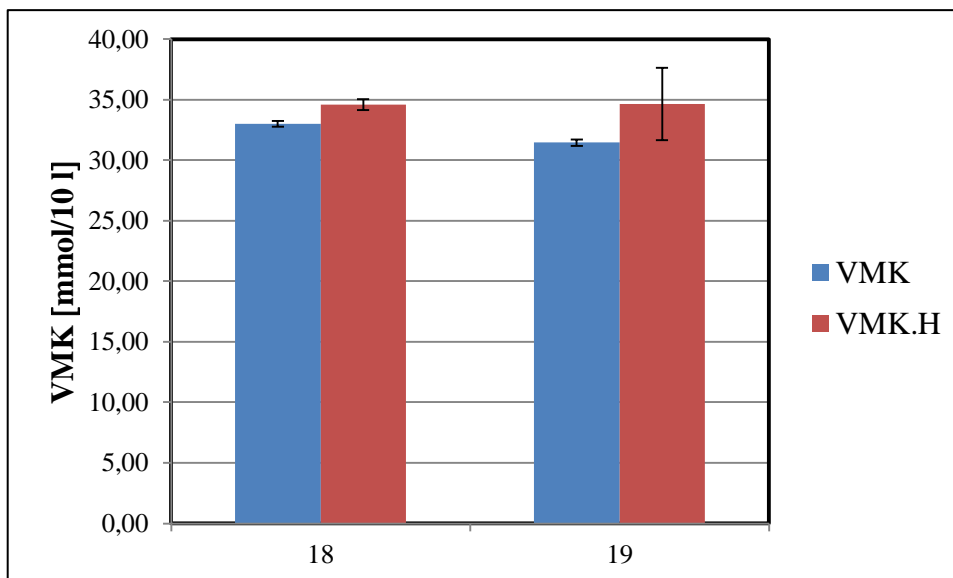
Tabulka 11: Statistická analýza rozptylu vlivu fermentace a typu použité kultury na lipasovou aktivitu standardizovaného statického in vitro trávícího modelu skupiny Infogest Working Group, $P(\alpha) = 0,05$

Efekt	Stupně volnosti	<i>F</i>	<i>p</i>
Absolutní člen	1	662,183	0,000
Skupina	1	82,297	0,000
Chyba	10	-	-
Výsledek	$p < p(\alpha)$		

Z obrázku 13 je patrné, že nejvyšší obsah VMK byl zaznamenán před i po procesu gastrointestinální lipolysy u sladké a zakysané smetany, tedy substrátů s nejvyšším obsahem tuku. Nejnižší nativní množství volných mastných kyselin bylo stanoveno u jogurtu. Zde byla také zaznamenána nejvyšší lipasová aktivita po průchodu standardizovaným statickým in vitro trávícím modelem skupiny Infogest Working Group. Nalezené rozdíly však nebyly statisticky významné na zvolené hladině významnosti (viz tabulka 11).

5.2.5 Stanovení vlivu délky zrání sýrů na lipasovou aktivitu

Vliv délky zrání sýrů na lipasovou aktivitu, respektive na stupeň zvýšení volných mastných kyselin, při využití standardizovaného statického in vitro trávícího modelu skupiny Infogest Working Group bylo provedeno u následujících substrátů: 2 eidamské sýry z kravského mléka (40 % hm. tvs) o zralosti 1 a 5 měsíců. Výsledky jsou graficky znázorněny na obrázku 14. V tabulce 12 je uvedena příslušná analýza rozptylu.



Obrázek 14: Vliv délky zrání sýrů na lipasovou aktivitu standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group

VMK.....obsah VMK ve vzorku před trávením [mmol/10 l]

VMK.H.....obsah VMK v trávenině vzorku [mmol/10 l]

Výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr z 6 paralelních stanovení \pm rozptyl.

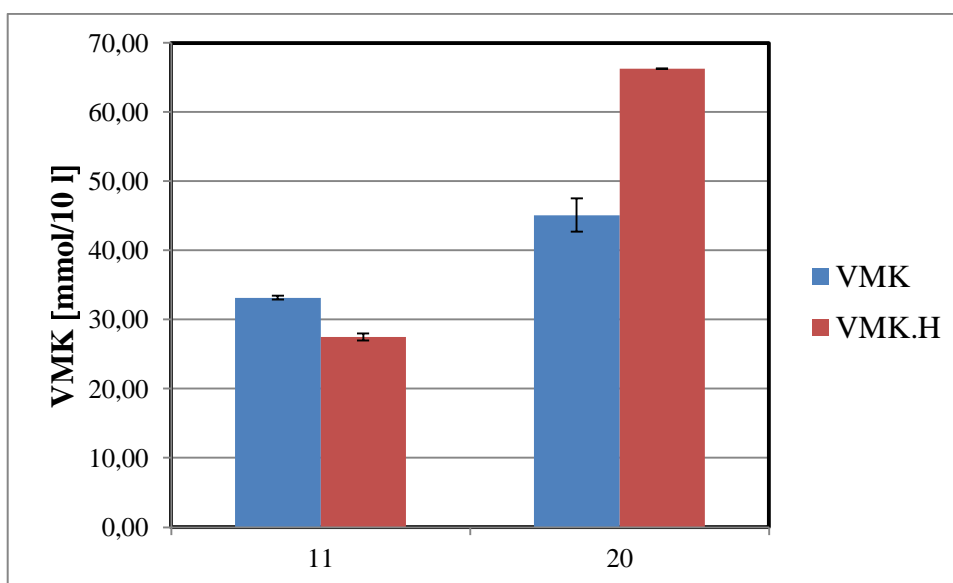
Tabulka 12: Statistická analýza rozptylu vlivu zrání sýrů na lipasovou aktivitu standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group, $P(\alpha) = 0,05$

Efekt	Stupně volnosti	<i>F</i>	<i>p</i>
Absolutní člen	1	11268,910	0,000
Skupina	1	1037,76	0,000
Chyba	2	-	-
Výsledek	$p < p(\alpha)$		

Z výsledků uvedených na obrázku 14 je patrné, že obsah volných mastných kyselin před a po průchodu sýru o různém stupni zralosti simulovaným gastrointestinálním trávením je téměř srovnatelný. Mezi jednotlivými vzorky nebyl nalezen statisticky významný rozdíl na zvolené hladině pravděpodobnosti (viz tabulka 12).

5.2.6 Stanovení vlivu druhu sušeného mléčného výrobku na lipasovou aktivitu

Vliv druhu sušeného mléčného výrobku na lipasovou aktivitu, respektive na stupeň zvýšení obsahu VMK při využití standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group bylo provedeno u následujících substrátů: sušené kravské mléko plnotučné a sušená sladká syrovátka (1,5 % hm. tuku).



Obrázek 15: Vliv druhu sušeného mléčného výrobku na lipasovou aktivitu standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group

VMK.....obsah VMK ve vzorku před trávením [mmol/10 l]

VMK.H.....obsah VMK v trávenině vzorku [mmol/10 l]

Výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr z 6 paralelních stanovení \pm rozptyl.

Tabulka 13: Statistická analýza rozptylu vlivu druhu sušeného mléčného výrobku na lipasovou aktivitu standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group, $P(\alpha) = 0,05$

Efekt	Stupně volnosti	<i>F</i>	<i>p</i>
Absolutní člen	1	9,839	0,000
Skupina	1	2,492	0,000
Chyba	2	-	-
Výsledek	$p < p(\alpha)$		

Na obrázku 15 jsou zobrazeny výsledky stanovení obsahu volných mastných kyselin v rámci různých sušených mléčných matric, respektive sušeného plnotučného kravského mléka a sušené sladké kravské syrovátky. Vyšší obsah VMK a vyšší lipasová aktivita byla zaznamenána v případě sladké syrovátky. Rozdíl mezi vzorky však nebyl statisticky významný na zvolené hladině pravděpodobnosti (viz tabulka 13).

6 Diskuse

K simulaci trávení v této diplomové práci byl použit nejnovější model standardizovaného statického in vitro trávicího traktu skupiny Infogest Working Group. Tento model ještě nebyl v žádné dosud publikované studii použit, tudíž jsou získané výsledky jen obtížně porovnatelné s ostatními studiemi na toto téma a lze z nich těžko vyvozovat obecné závěry (Minekus et al., 2014).

Z výsledků experimentální práce vyplývá, že u nativních mléčných matric roste obsah kaseinu s množstvím sušiny, respektive tukuprosté sušiny a obsah volných mastných kyselin roste s obsahem tuku v rámci výrobků ze stejného druhu mléka.

Při sledování rychlosti degradace CN při průchodu standardizovaným statickým in vitro trávicím modelem skupiny Infogest Working Group, tedy proteolytické aktivity modelu, bylo zjištěno, že je tato mléčná bílkovina velmi dobře stravitelná ve všech typech mléčných matric. Tyto výsledky jsou v souladu se závěry řady dalších studií.

Dle většiny autorů je kasein téměř zcela degradován již během žaludeční fáze enzymem pepsinem (Barbé et al. 2014; Benedé et al., 2014; Devle et al., 2014; Dupont et al., 2010 a, b; Gallier et al., 2012, Kopf-Bolanž et al., 2012; Pinto et al., 2014). V mnoha pokusech bylo zjištěno, že jsou kaseiny z mléčných matric rychle hydrolyzovány během trávení (Barbé et al.; Benedé et al., 2014).

Při sledování vlivu druhu mléka, tučnosti, tepelného ošetření, fermentace a typu použité mlékařské kultury a délky zrání sýrů na proteasovou aktivitu použitého modelu gastrointestinálního traktu nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi matricemi na zvolené hladině pravděpodobnosti. V případě studia vlivu tepelného ošetření byla zaznamenána nižší (ačkoliv statisticky nevýznamně) degradace CN u mléka sterilovaného v obalu, což lze vysvětlit vznikem většího množství agregátů mléčných proteinů během tohoto typu záhřevu, který způsobuje největší změny v mléčné matrici (Zhang and Vardhanabhuti, 2014).

V pokusu provedeném v rámci této diplomové práce byly sice obsahy kaseinů analyzovány pouze před a po trávení, ale konečný výsledek byl stejný, jelikož se obsahy kaseinů po hydrolyzách také snižovaly.

Při hodnocení rychlosti vzniku volných mastných kyselin při průchodu analytů standardizovaným statickým in vitro trávicím modelem skupiny Infogest Working Group,

tedy lipolytické aktivity modelu, bylo pozorováno, že množství VMK roste u nativních i protrávených matric se zvyšujícím obsahem tuku. U nativních mléčných substrátů bylo zjištěno, že v souladu s literaturou mateřské mléko obsahuje více VMK než ostatní analyzované druhy (kravské, kozí a ovčí syroví mléko). Vyšší podíl VMK byl také nalezen u fermentovaných mléčných výrobků, sýrů a sladké syrovátky, což lze vysvětlit způsobem výroby těchto produktů a aktivitou mikrobiálních a syřidlových lipas (Walstra et al., 2006).

Při průchodu analyzovaných mléčných matric gastrointestinálním standardizovaným statickým in vitro trávicím modelem skupiny Infogest Working Group došlo k nárůstu obsahu VMK. Toto zjištění je v souladu se závěry Devle et al. (2014), kteří nejvyšší nárůst VMK pozorovali během střevního trávení.

Zaznamenaný pokles množství VMK v trávenině sušeného plnotučného mléka oproti nativnímu substrátu dosud nikde nebyl publikován a bude vyžadovat opakovanou verifikaci.

Nejvyšší lipolytická aktivita u skupiny mléčných matric charakterizujících vliv tepelného ošetření však byla stanovena u syrového a pasterovaného kravského mléka. To může být vysvětleno nižší tvorbou komplexů mléčné bílkoviny, jež vznikají během tepelného ošetření a snižují přístupnost lipolytických enzymů (Walstra et al., 2006).

Během sledování druhu mléka, tučnosti, tepelného ošetření, fermentace a typu použité kultury, délky zrání sýrů a typu sušeného substrátu na lipasovou aktivitu použitého standardizovaného statického in vitro trávicího traktu skupiny Infogest Working Group nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými mléčnými matricemi na zvolené hladině pravděpodobnosti.

7 Závěr

Cílem diplomové práce bylo validovat proteasovou a lipasovou aktivitu ve vzorcích různých mléčných matric po použití standardizovaného statického in vitro trávícího modelu skupiny Infogest Working Group. Mléčné matrice byly pomocí tohoto modelu hydrolyzovány.

Jako mléčné matrice byly použity: syrové kravské, kozí a mateřské mléko, pasterované kravské plnotučné mléko, kozí (2,7 % hm. tuku) a ovčí (3,5 % hm. tuku) mléko, UHT kravské mléko nízkotučné, polotučné a plnotučné, zahuštěné plnotučné kravské mléko sterilované v obalu, pasterovaná smetana ke šlehání z kravského mléka (33 % hm. tuku), sušené plnotučné kravské mléko a sušená sladká syrovátka z kravského mléka (1,5 % hm. tuku), zakysaná smetana (18 % hm. tuku), bílý jogurt (2,7 % hm. tuku), acidofilní mléko (3,5 % hm. tuku), kefir (3,5 % hm. tuku) a kysané podmásli (1 % hm. tuku) z kravského mléka a eidamský sýr z kravského mléka (40 % hm. tvs) o různých stupních zralosti.

Proteasová a lipasová aktivita byla validována s ohledem na druh mléka, tučnost, tepelné ošetření, fermentaci a typ použité mlékařské kultury, délky zrání sýrů a typu sušeného substrátu. U nativních substrátů a jejich trávenin byl stanoven obsah CN a VMK, čímž byla charakterizována proteasová a lipasová aktivita.

V souladu s dostupnou literaturou bylo zjištěno, že CN je použitým gastrointestinálním modelem tráven velmi dobře. U většiny mléčných matric byl během procesu zcela degradován. Výjimkou bylo mléko sterilované v obalu a sýry eidamského typu, kde byl zaznamenán zbytkový obsah kaseinu. U těchto matric by bylo pravděpodobně vhodné prodloužit gastrickou fázi trávení, jak se tomu děje při procesu in vivo, jež byl popsán například ve studii (Barbé et al., 2014).

Všechny zaznamenané rozdíly v proteasové aktivitě při trávení jednotlivých substrátů však byly statisticky nevýznamné na hladině pravděpodobnosti $P(\alpha) = 0,05$.

Obsah VMK se zvýšil po trávení všech analyzovaných výrobků. Výjimku tvořilo sušené plnotučné kravské mléko, jehož trávení si vyžádá opakovanou verifikaci.

Nejvyšší lipolytická aktivita byla zaznamenána u syrového a pasterovaného kravského mléka pravděpodobně kvůli absenci bránění přístupnosti substrátu. Všechny zaznamenané rozdíly v lipasové aktivitě při trávení jednotlivých mléčných matric však byly statisticky nevýznamné na hladině pravděpodobnosti $P(\alpha) = 0,05$.

Závěrem lze říci, že standardizovaný statický in vitro model trávicího traktu skupiny Infogest Working Group je vhodný pro použití k simulaci trávení mléčných matric. Hypotéza, že pokles kaseinu a nárůst volných mastných kyselin po hydrolyze mléčné matrice simulovaným gastrointestinálním traktem je závislá na druhu a složení mléčné matrice nebyla potvrzena na zvolené hladině pravděpodobnosti $P(\alpha) = 0,05$. Všechny analyzované mléčné matrice byly stejně dobře degradovatelné použitými proteolytickými a lipolytickými enzymy. K získání přesnějších výsledků by však bylo potřeba harmonizovat a validovat jednotlivé trávicí fáze na konkrétní typ matrice pomocí in vivo metod.

8 Seznam literatury

Adouard, N., Foligné, B., Dewulf, J., Bouix, M., Picque, D., Bonnarme, P. 2015. In vitro characterization of the digestive stress response and immunomodulatory properties of microorganisms isolated from smear-ripened cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 197. 98–107.

Barbé, F., Le Feunteun, S., Rémond, D., Ménard, O., Jardin, J., Henry, G., Laroche, B., Dupont, D. 2014. Tracking the in vivo release of bioactive peptides in the gut during digestion: Mass spectrometry peptidomic characterization of effluents collected in the gut of dairy matrix fed mini-pigs. *Food Research International*. 63. 147–156.

Benedé, S., López-Expósito, I., Giménez, G., Grishina, G., Bardina, L., Sampson H. A., Molina E., López-Fandino, R. 2014. In vitro digestibility of bovine β -casein with simulated and human oral and gastrointestinal fluids. Identification and IgE-reactivity of the resultant peptides. *Food Chemistry*. 143 (1). 514–521.

Brimer, L. 2011. *Chemical Food Safety*. CABI. Wallingford., 296 p. ISBN: 978-1-84593-676-1

Černá, E., Cvak, Z. 1986. *Analytické metody pro mléko a mlékárenské výrobky*. Středisko technických informací potravinářského průmyslu Výzkumného ústavu potravinářského průmyslu. Praha. 439 s.

ČSN 570530. *Metody zkoušení mléka a tekutých mléčných výrobků*. 1974. Československý normalizační institut. Praha. 2 s.

ČSN ISO 17997 - 2. *Mléko: stanovení obsahu kaseinového dusíku*. 2006. Český normalizační institut. Praha. 2 s.

Devle, H., Ulleberg, E.K., Naess-Andresen, C. F., Rukke, E.-O., Vedarud, G., Ekeberg, D. 2014. Reciprocal interacting effects of proteins and lipids during ex vivo digestion of bovine milk. *International Dairy Journal*. 36 (1). 6–13.

Dupont, D., Mandalari, G., Molle, D., Jardin, J., Le´onill, J., Faulks, R. M. 2010 a. Comparative resistance of food proteins to adult and infant in vitro digestion models. *Molecular Nutrition and Food Research*. 54. 767–780.

Dupont, D., Mandalari, G., Mollé, D., Jardin, J., Rolet-Répécaud, O., Duboz, G. 2010 b. Food processing increases casein resistance to simulated infant digestion. *Molecular Nutrition and Food Research*. 54. 1677–1689.

Dylevský, I. 2013. *Základy funkční anatomie člověka*. České vysoké učení technické. Praha. 215 s.

FOSS. 2002. *FOSS Electric Application Guide*. Hilleroed. 130 p.

Fu, S., Augustin, M. A., Shen, Z., Ng, K., Sanguansri, L., Ajlouni, S. 2015. Bioaccessibility of curcuminoids in buttermilk in gastrointestinal digestion models. *Food Chemistry*. 179. 52–59.

Gallier, S., Ye, A., Singh, H. 2012. Structural changes in bovine milk fat globules during ex vivo digestion. *Journal of Dairy Science*. 95. 3579-3592.

Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S., Alric, M. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trend in biotechnology*. 30 (1). 59 –600.

He, Z., Yuan, B., Zeng, M., Tao, G., Chen, J. 2015. Effect of simulated processing on the antioxidant capacity and in vitro protein digestion of fruit juice–milk beverage model systems. *Food Chemistry*. 175. 457–464.

Jedidi, H., Champagne, C. P., Raymond, Y., Farnworth, E., Van Calsteren, M. – R., Chouinard, P. Y., Fliss, Y. 2014. Effect of milk enriched with conjugated linoleic acid and digested in a simulator (TIM–1) on the viability of probiotic bacteria. *International Dairy Journal*. 37 (1). 20–25.

Kopf-Bolanz, K. A., Schwander, F., Gijs, M., Vergères, G., Portmann, R., Egger, L. 2012. Validation of an ex vivo digestive system for studying macronutrient decomposition in humans. *Journal of Nutrition*. 142. 245-250.

Kovaříková, P., Michalová, E., Knopfová, L., Bouchal, P. 2014. Metody studia buněčné migrace a invazivity nádorových buněk. *Klin Onkol*. 27 (1). 22-27.

Lipscomb, J. C., Poet, T. S. 2008. In vitro measurements of metabolism for application in pharmacokinetic modeling. *Pharmacology & Therapeutics*. 118 (1). 82-103.

Li, Y., McClements, D. J. 2014. Influence of cosurfactant on the behavior of structured emulsions under simulated intestinal lipolysis conditions. *Food Hydrocolloids*. 40. 96-103.

Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Boulieu, C., Carrière, F., Boutrou, C., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Macke, A., Marze, S., McClements, D. J., Ménard, O., Recio, I., Santos, C. N., Singh, R. P., Vegarud, G. E., Wickham, M. S. J., Weitschies, W., Brodtkorp, A. 2014. A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food and Function*. 5 (6). 1113–1124.

Morrell, P., Hernando, I., Llorca, E., Fiszman, S. 2015. Yogurts with an increased protein content and physically modified starch: rheological, structural, oral digestion and sensory properties related to enhanced satiating capacity. *Food Research International*. 70. 64–73.

Peréz, O. E., David-Birman, T., Kesselman, E., Levi-Tal, S., Lesmes, U. 2014. Milk protein-vitamin interactions: Formation of β -lactoglobulin/folic acid nano-complexes and their impact on in vitro gastro-duodenal proteolysis. *Food Hydrocolloids*. 38. 40-47.

Pinto, M. S., Léonil, J., Henry, G., Cauty, Ch., Carvalho, A., Bouhallab, S. 2014. Heating and glycation of β -lactoglobulin and β -casein: Aggregation and in vitro digestion. *Food Research International*. 55. 70–76.

Ricciardi, A., Blaiotta, G., Di Cerbo, A., Succi, M., Aponte, M. 2014. Behaviour of lactic acid bacteria populations in Pecorino di Carmasciano cheese samples submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract: Evaluation by means of a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology*. 179. 64-71.

Rinaldi, L., Gauthier, S. F., Britten, M., Turgeon, S. L. 2014. In vitro gastrointestinal digestion of liquid and semi-liquid dairy matrixes. *LWT Food Science and Technology*. 57 (1). 99-105.

Walstra, P., Wouters, J. T. M., Geurts, T. J. 2006. *Dairy science and technology*. Taylor & Francis Group. New York. 782 s.

Zhang, S., Vardhanabhuti, B. 2014. Effect of initial protein concentration and pH on in vitro gastric digestion of heated whey proteins. *Food Chemistry*. 145. 473–480.

9 Seznam použitých zkratek

β -LG- β laktoglobulin

CN-nativní kasein

CN.H-hydrolyzovaný kasein

F-vypočítaná hodnota analýzy variace ANOVA

SGF-simulované žaludeční šťávy

SIF-simulované intestinální šťávy

VMK-nativní volné mastné kyseliny

VMK.H-hydrolyzované volné mastné kyseliny

10 Přílohy

10.1 Seznam příloh

Příloha 1: Obsah CN před a po trávení mléčných matric pomocí standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group pro skupinu 1

Příloha 2: Obsah CN před a po trávení mléčných matric pomocí standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group pro skupinu 2

Příloha 3: Obsah CN před a po trávení mléčných matric pomocí standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group pro skupinu 3

Příloha 4: Obsah CN před a po trávení mléčných matric pomocí standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group pro skupinu 4

Příloha 5: Obsah CN před a po trávení mléčných matric pomocí standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group pro skupinu 5

Příloha 6: Obsah VMK před a po trávení mléčných matric pomocí standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group pro skupinu 1

Příloha 7: Obsah VMK před a po trávení mléčných matric pomocí standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group pro skupinu 2

Příloha 8: Obsah VMK před a po trávení mléčných matric pomocí standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group pro skupinu 3

Příloha 9: Obsah VMK před a po trávení mléčných matric pomocí standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group pro skupinu 4

Příloha 10: Obsah VMK před a po trávení mléčných matric pomocí standardizovaného statického in vitro trávícího modelu skupiny Infogest Working Group pro skupinu 5

Příloha 11: Obsah VMK před a po trávení mléčných matric pomocí standardizovaného statického in vitro trávícího modelu skupiny Infogest Working Group pro skupinu 6

Příloha 1: Obsah CN před a po trávení mléčných matric pomocí standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group pro skupinu 1

Výsledky jsou aritmetickým průměrem 6 paralelních stanovení

Vzorek		CN [% hm.]	s [% hm.]	α (0,05) [% hm.]	Rozptyl
1	N	2,49	0,00	0,00	0,00
	H	0,00	0,00	0,00	0,00
2	N	2,94	0,00	0,00	0,00
	H	0,05	0,01	0,01	0,00
3	N	0,30	0,00	0,00	0,00
	H	0,00	0,00	0,00	0,00
4	N	2,59	0,01	0,01	0,00
	H	0,00	0,00	0,00	0,00
5	N	2,16	0,01	0,01	0,00
	H	0,00	0,00	0,00	0,00
6	N	4,05	0,02	0,02	0,00
	H	0,16	0,12	0,12	0,02

N.....nativní substrát

H.....trávenina

Příloha 2: Obsah CN před a po trávení mléčných matric pomocí standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group pro skupinu 2

Výsledky jsou aritmetickým průměrem 6 paralelních stanovení

Vzorek		CN [% hm.]	s [% hm.]	α (0,05) [% hm.]	Rozptyl
7	N	2,68	0,01	0,01	0,00
	H	0,00	0,00	0,00	0,00
8	N	2,61	0,01	0,01	0,00
	H	0,00	0,00	0,00	0,00
9	N	2,60	0,01	0,01	0,00
	H	0,00	0,00	0,00	0,00

N.....nativní substrát

H.....trávenina

Příloha 3: Obsah CN před a po trávení mléčných matric pomocí standardizovaného statického in vitro trávícího modelu skupiny Infogest Working Group pro skupinu 3

Výsledky jsou aritmetickým průměrem 6 paralelních stanovení

Vzorek		CN [% hm.]	s [% hm.]	α (0,05) [% hm.]	Rozptyl
1	N	2,49	0,00	0,00	0,00
	H	0,00	0,00	0,00	0,00
4	N	2,59	0,01	0,01	0,00
	H	0,00	0,00	0,00	0,00
9	N	2,60	0,01	0,01	0,00
	H	0,00	0,00	0,00	0,00
10	N	3,66	0,22	0,22	0,05
	H	0,80	0,21	0,21	0,04
11	N	26,63	0,05	0,05	0,00
	H	0,00	0,00	0,00	0,00

N.....nativní substrát

H.....trávenina

Příloha 4: Obsah CN před a po trávení mléčných matric pomocí standardizovaného statického in vitro trávícího modelu skupiny Infogest Working Group pro skupinu 4

Výsledky jsou aritmetickým průměrem 6 paralelních stanovení

Vzorek		CN [% hm.]	s [% hm.]	α (0,05) [% hm.]	Rozptyl
12	N	3,38	0,01	0,01	0,00
	H	0,00	0,00	0,00	0,00
13	N	3,39	0,02	0,02	0,00
	H	0,24	0,01	0,01	0,00
14	N	3,76	0,03	0,03	0,00
	H	0,07	0,01	0,01	0,00
15	N	2,49	0,02	0,02	0,00
	H	0,00	0,00	0,00	0,00
16	N	2,94	0,02	0,02	0,00
	H	0,15	0,04	0,04	0,00
17	N	2,47	0,01	0,01	0,00
	H	0,00	0,00	0,00	0,00

N.....nativní substrát

H.....trávenina

Příloha 5: Obsah CN před a po trávení mléčných matric pomocí standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group pro skupinu 5

Výsledky jsou aritmetickým průměrem 6 paralelních stanovení

Vzorek		CN [% hm.]	s [% hm.]	α (0,05) [% hm.]	Rozptyl
18	N	20,41	0,19	0,26	0,04
	H	2,03	0,29	0,28	0,08
19	N	19,04	0,22	0,30	0,05
	H	1,74	0,15	0,15	0,02

N.....nativní substrát

H.....trávenina

Příloha 6: Obsah VMK před a po trávení mléčných matric pomocí standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group pro skupinu 1

Výsledky jsou aritmetickým průměrem 6 paralelních stanovení

Vzorek		VMK [mmol/10 l]	s [mmol/10 l]	α (0,05) [mmol/10 l]	Rozptyl
1	N	4,43	0,31	0,30	0,10
	H	28,80	1,12	1,10	1,25
2	N	4,73	0,14	0,14	0,02
	H	28,16	0,04	0,04	0,00
3	N	14,03	0,45	0,44	0,20
	H	26,52	0,53	0,52	0,28
4	N	4,17	0,28	0,27	0,08
	H	29,58	1,94	1,90	3,77
5	N	3,96	0,02	0,02	0,00
	H	27,91	0,06	0,06	0,00
6	N	6,67	1,05	1,03	1,11
	H	32,30	1,47	1,71	2,16

N.....nativní substrát

H.....trávenina

Příloha 7: Obsah VMK před a po trávení mléčných matric pomocí standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group pro skupinu 2

Výsledky jsou aritmetickým průměrem 6 paralelních stanovení

Vzorek		VMK [mmol/10 l]	s [mmol/10 l]	α (0,05) [mmol/10 l]	Rozptyl
7	N	1,67	0,04	0,04	0,00
	H	25,49	0,21	0,21	0,04
8	N	2,65	0,03	0,03	0,00
	H	26,32	0,04	0,04	0,00
9	N	4,91	0,19	0,19	0,04
	H	28,68	1,06	1,04	1,13

N.....nativní substrát

H.....trávenina

Příloha 8: Obsah VMK před a po trávení mléčných matric pomocí standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group pro skupinu 3

Výsledky jsou aritmetickým průměrem 6 paralelních stanovení

Vzorek		VMK [mmol/10 l]	s [mmol/10 l]	α (0,05) [mmol/10 l]	Rozptyl
1	N	4,43	0,31	0,30	0,10
	H	28,80	1,12	1,10	1,25
4	N	4,17	0,28	0,27	0,08
	H	29,58	1,94	1,90	3,77
9	N	4,91	0,19	0,19	0,04
	H	28,68	1,06	1,04	1,13
10	N	16,46	1,27	1,24	1,62
	H	30,53	1,23	1,21	1,52
11	N	33,18	0,53	0,52	0,28
	H	27,28	0,70	0,69	0,50

N.....nativní substrát

H.....trávenina

Příloha 9: Obsah VMK před a po trávení mléčných matric pomocí standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group pro skupinu 4

Výsledky jsou aritmetickým průměrem 6 paralelních stanovení

Vzorek		VMK [mmol/10 l]	s [mmol/10 l]	α (0,05) [mmol/10 l]	Rozptyl
12	N	25,31	0,83	0,81	0,69
	H	34,80	0,06	0,06	0,00
13	N	25,14	0,69	0,68	0,48
	H	35,16	0,04	0,04	0,00
14	N	3,99	0,38	0,37	0,14
	H	27,53	0,04	0,04	0,00
15	N	17,24	0,28	0,27	0,08
	H	29,27	1,56	1,53	2,44
16	N	15,27	0,27	0,26	0,07
	H	29,07	0,91	0,89	0,83
17	N	15,25	0,48	0,47	0,23
	H	25,91	0,05	0,05	0,00

N.....nativní substrát

H.....trávenina

Příloha 10: Obsah VMK před a po trávení mléčných matric pomocí standardizovaného statického in vitro trávicího modelu skupiny Infogest Working Group pro skupinu 5

Výsledky jsou aritmetickým průměrem 6 paralelních stanovení

Vzorek		VMK [mmol/10 l]	s [mmol/10 l]	α (0,05) [mmol/10 l]	Rozptyl
18	N	33,02	0,50	0,49	0,25
	H	34,60	0,68	0,67	0,46
19	N	31,45	0,49	0,48	0,24
	H	34,64	1,73	1,70	2,98

N.....nativní substrát

H.....trávenina

Příloha 11: Obsah VMK před a po trávení mléčných matric pomocí standardizovaného statického in vitro trávícího modelu skupiny Infogest Working Group pro skupinu 6

Výsledky jsou aritmetickým průměrem 6 paralelních stanovení

Vzorek		VMK [mmol/10 l]	s [mmol/10 l]	α (0,05) [mmol/10 l]	Rozptyl
11	N	33,18	0,53	0,52	0,28
	H	27,28	0,70	0,69	0,50
20	N	45,10	1,55	1,52	2,41
	H	40,56	0,20	0,20	0,04

N.....nativní substrát

H.....trávenina