

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a bezpečnosti potravin



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

Analýza fortifikovaných čerstvých sýrů pomocí HPLC

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Zuzana Beránková

**Obor studia: Kvalita potravin a zpracování zemědělských
produktů**

Vedoucí práce: Ing. Veronika Legarová, Ph.D.

Konzultant: Ing. Soňa Formánková Herman

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Analýza fortifikovaných čerstvých sýrů pomocí HPLC" 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: 20. 4. 2024

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí práce Ing. Veronice Legarové, Ph.D. za ochotu, trpělivost, cenné odborné rady při vypracování této diplomové práce a konzultantce Ing. Soně Formánkové Hermann za připomínky a věnovaný čas při zpracování praktické části diplomové práce.

Velké poděkování patří mému příteli a rodině za podporu během celého mého studia.

Analýza fortifikovaných čerstvých sýrů pomocí HPLC

Souhrn

Mléčné výrobky jsou základní potravinou pro miliardy lidí na celém světě. Sýry jsou kvalitním zdrojem bílkovin, tuků a minerálních látek a jejich roční spotřeba je přes 20 milionů tun. Globální poptávka po sýrech navíc stále roste. Mezi oblíbené kategorie sýrů řadíme čerstvé sýry, které se vyznačují jemnou chutí, měkkou konzistencí, nižším obsahem sušiny a zároveň vyšším obsahem mléčného cukru – laktózy. Spolu s rostoucí poptávkou po mléčných výrobcích přibývá lidí, kteří vyhledávají bezlaktózové varianty těchto výrobků. Důvodem je především nestravitelnost laktózy označovaná jako laktázová intolerance, která je v neevropské dospělé populaci velmi rozšířená. Výskyt lidí s laktózovou intolerancí se v různých částech světa liší, globální průměr je ale více než 70 %.

Důležitou složkou sýrů je mléčný tuk, který je tvořen převážně z nasycených mastných kyselin (MK). Ty ovšem přispívají ke zvýšenému riziku vzniku kardiovaskulárních onemocnění. Trendem posledních let je proto snaha zlepšit nutriční hodnotu těchto oblíbených potravin a předcházet tak rozvoji civilizačních onemocnění.

Fortifikace je definována jako řízené zvyšování obsahu živin v potravinách které zlepšuje jejich výživovou hodnotu. u sýrů se fortifikace zaměřuje především na nahrazení mléčného tuku oleji s vhodnějším složením mastných kyselin. Mezi nejvhodnější rostlinné oleje z nutričního i senzorického pohledu řadíme arašídový, řepkový a sezamový.

V čerstvých sýrech je přirozeně vyšší obsah laktózy než v sýrech zrajících, kde dochází k jejímu štěpení bakteriemi mléčného kvašení během procesu zrání. Pro rozštěpení laktózy na glukózu a galaktózu v bezlaktózových výrobcích je při výrobě přidáván enzym laktáza.

Teoretická část této diplomové práce se zabývá charakteristikou mléka, sýrů, technologií výroby čerstvých sýrů a metodami analýzy cukrů a organických kyselin.

Cílem práce bylo analyzovat cukry a organické kyseliny v čerstvých fortifikovaných sýrech v laktózové a bezlaktózové verzi pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a sledování změn koncentrace laktózy po přidání enzymu laktázy. Pro samotnou analýzu byla využita metoda HPLC s refraktometrickým detektorem pro analýzu cukrů a detektor diodového pole pro analýzu organických kyselin.

V praktické části bylo vyrobeno a analyzováno 13 sýrů v laktózové a 16 sýrů v bezlaktózové verzi, které byly připraveny přidáním 1 g enzymu laktázy na 1 litr mléka. Část těchto sýrů byla při výrobě fortifikována přísadkou rostlinných olejů o vhodném poměru MK, případně přísadkou mandlové moučky a proteinu. Pro vyhodnocení byly mezi sebou porovnávány sýry v laktózové a bezlaktózové verzi. Kromě koncentrace cukrů byly analyzovány i obsahy organických kyselin, a to kyseliny mléčné a octové.

Z výsledků vyplývá, že přidání enzymu laktázy v daném množství efektivně vede ke snížení obsahu laktózy. Nárůst glukózy a galaktózy odpovídal trendem poklesu koncentrace laktózy. v případě organických kyselin byla nejvyšší koncentrace kyseliny mléčné, která vzniká při mléčném kvašení. v případě organických kyselin nebyla pozorována statisticky významná závislost na fortifikaci. Výsledky byly porovnány s dostupnou literaturou.

Klíčová slova: fortifikované sýry, čerstvé sýry, HPLC, mléčný cukr, organické kyseliny

HPLC analysis of fortified fresh cheeses

Summary

Dairy products are a staple food for billions of people around the world. Cheese is a high quality source of protein, fat and minerals, and over 20 million tonnes are consumed annually. Moreover, global demand for cheese continues to grow. One of the most popular categories of cheese is fresh cheese, which is characterised by its mild taste, soft texture, lower dry matter content and higher lactose content. Along with the growing demand for dairy products, more and more people are seeking lactose-free variants of these products, mainly due to the indigestibility of lactose, known as lactase intolerance, which is widespread in the non-European adult population. The prevalence of people with lactose intolerance varies in different parts of the world, but the global average is more than 70%.

An important component of cheese is milk fat, which is mainly made up of saturated fatty acids (FAs). However, these contribute to an increased risk of cardiovascular disease. The trend in recent years has therefore been to improve the nutritional value of these popular foods in order to prevent the development of civilisation diseases.

Fortification is defined as the controlled increase in the nutrient content of foods that improves their nutritional value. For cheese, fortification focuses primarily on replacing milk fat with oils with a more appropriate fatty acid composition. The most suitable vegetable oils from a nutritional and sensory point of view are peanut, rapeseed and sesame.

Fresh cheeses naturally contain a higher lactose content than ripened cheeses, which are broken down by lactic acid bacteria during the ripening process. The lactase enzyme is added during production to break down lactose into glucose and galactose in lactose-free products.

The theoretical part of this thesis deals with the characteristics of milk, cheese, technology of fresh cheese production and methods of analysis of sugars and organic acids.

The aim of the thesis was to analyse sugars and organic acids in fresh fortified cheeses in lactose and lactose-free versions using high performance liquid chromatography (HPLC) and to monitor changes in lactose concentration after the addition of lactase enzyme. For the analysis itself, an HPLC method with a refractometric detector was used for the analysis of sugars and a diode array detector for the analysis of organic acids.

In the practical part, 14 lactose and 15 lactose-free cheeses were produced and analyzed by adding 1 g of lactase enzyme per 1 liter of milk. Some of these cheeses were fortified during production by the addition of vegetable oils at the appropriate MK ratio, or by the addition of almond meal and protein. Lactose and lactose-free versions of the cheese were compared with each other for evaluation. In addition to the concentration of sugars, the organic acid contents, namely lactic and acetic acid, were analysed.

The results show that the addition of lactase enzyme in a given amount effectively leads to a reduction in lactose content. The increase in glucose and galactose corresponded to the trend of decrease in lactose concentration. In the case of organic acids, the highest concentration was lactic acid, which is formed during lactic acid fermentation. In the case of organic acids, no statistically significant dependence on fortification was observed. The results were compared with the available literature.

Keywords: fortified cheeses, fresh cheeses, HPLC, milk sugars, organic acids

Obsah

1 Úvod	7
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	8
3 Literární rešerše	9
3.1 Mléko.....	9
3.1.1 Cukry	9
3.1.2 Bílkoviny	10
3.1.3 Tuky.....	11
3.1.4 Soli, vitamíny a pH.....	12
3.2 Sýry a jejich dělení.....	14
3.2.1 Čerstvé sýry	15
3.2.2 Bezlaktózové sýry a laktózová intolerance.....	15
3.2.3 Fortifikace sýrů.....	16
3.3 Technologie výroby čerstvých sýrů	18
3.3.1 Úprava mléka.....	19
3.3.2 Inokulace startovacími kulturami	19
3.3.3 Sýření.....	19
3.3.4 Zpracování sýřeniny	20
3.3.5 Formování.....	20
3.4 Metody analýzy cukrů a organických kyselin	20
3.4.1 Infračervená spektrometrie	21
3.4.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	22
4 Metodika	25
4.1 Výroba čerstvých sýrů	25
4.1.1 Použitý materiál a chemikálie.....	25
4.1.2 Použité přístroje	27
4.1.3 Postup výroby	27
4.2 Analýza organických kyselin a cukrů	28
4.2.1 Použité chemikálie.....	28
4.2.2 Použité přístroje	28
4.2.3 Příprava vzorků pro HPLC	29
4.2.4 Stanovení obsahu organických kyselin a cukrů.....	29
5 Výsledky.....	30
6 Diskuze	38
7 Závěr	41
8 Literatura.....	42
9 Seznam tabulek a obrázků	46
10 Seznam použitých zkratk a symbolů	47

1 Úvod

Mléko a sýry z něj vyráběné jsou velkou skupinou potravin, která hraje nezastupitelnou roli v jídelníčku lidí po celém světě. Jen v Evropské unii se ročně zkonsumuje přes 9 milionu tun sýrů (OECD et Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2023).

Tato práce je zaměřena na čerstvé sýry vyrobené z kravského mléka, které jsou velmi oblíbené pro svou jemnou chuť a texturu. u čerstvých sýrů chybí fáze zrání, díky čemuž mají odlišný chuťový a nutriční profil ve srovnání se zrajícími sýry. Analýza složení těchto sýrů je důležitá při vývoji nových druhů těchto sýrů.

Významnou složkou sýrů, která je po bílkovinách nejzastoupenější, jsou tuky. Mléčný tuk je až ze 70 % složen z nasycených mastných kyselin. Ty jsou z nutričního hlediska problematické a mohou přispívat ke vzniku kardiovaskulárních onemocnění. Možným řešením nevhodného poměru nasycených a nenasycených mastných kyselin v mléce je fortifikace rostlinnými oleji bohatými na nenasycené mastné kyseliny, čímž se zlepší nutriční profil výrobku (Picciotti et al., 2022).

Hlavním sacharidem v mléce je laktóza. Zatímco u zrajících sýrů je její obsah vlivem fermentace nízký, u čerstvých sýrů je díky absenci procesu zrání vysoký. Laktóza ovlivňuje sýr hlavně po nutriční a senzorické stránce. u člověka je stravitelnost laktózy závislá na přítomnosti enzymu laktázy v tenkém střevě. s rostoucím věkem se ale množství tohoto enzymu snižuje, což vede k laktózové intoleranci. To je stav, kdy člověk není schopen laktózu efektivně trávit a její přítomnost v potravinách mu působí zažívací obtíže, jako je například nadýmání. Z tohoto důvodu roste poptávka po bezlaktózových alternativách mléčných výrobků (Costa et al., 2019)

Další složkou sýrů jsou organické kyseliny. Ty vznikají primárně během fermentace a procesu zrání a mají velký vliv na chuť a trvanlivost sýra. Nejvíce je v sýrech zastoupena mléčná kyselina, která vzniká při štěpení laktózy a glukózy bakteriemi mléčného kvašení (Mullin et Emmons, 1997).

Experimentální část této práce je zaměřena na stanovení obsahu laktózy, glukózy, galaktózy a vybraných organických kyselin v laktózových a bezlaktózových verzích čerstvých fortifikovaných sýrů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem diplomové práce je stanovení koncentrace mléčných cukrů a organických kyselin v čerstvých sýrech fortifikovaných rostlinnými oleji pomocí kapalinové chromatografie.

Hypotéza: Přidání laktázy při výrobě bezlaktózových sýrů vede ke snížení obsahu laktózy v porovnání s čerstvými sýry obsahujícími laktózu

3 Literární rešerše

3.1 Mléko

Mléko je velmi komplexní produkt složený ze čtyř hlavních komponent (makrosložek) – vody, tuku, bílkovin a laktózy – mléčného cukru. Kromě toho ale obsahuje také další sloučeniny, ať už se jedná o vitamíny, anorganické a organické ionty nebo enzymy (Kanwar et al., 2009). Přestože řada méně zastoupených složek mléka je z výživového i sensorického hlediska velmi důležitá, technologické vlastnosti mléka jsou určovány především jeho makrosložkami a některými nízkomolekulárními látkami, zejména vápníkem, fosforečnany, citráty a hodnotou pH.

Na kvalitu jakéhokoli sýra má zásadní vliv právě kvalita mléka, ze kterého je vyroben, a to z mikrobiologických, biochemických, sensorických a dalších hledisek. Během výroby sýrů je mléko odstředěno a následně upraveno tak, aby se docílilo definovaného složení pro výrobu sýru.

Tabulka 1 – Průměrné složení kravského mléka (Lindmark Månsson, 2008)

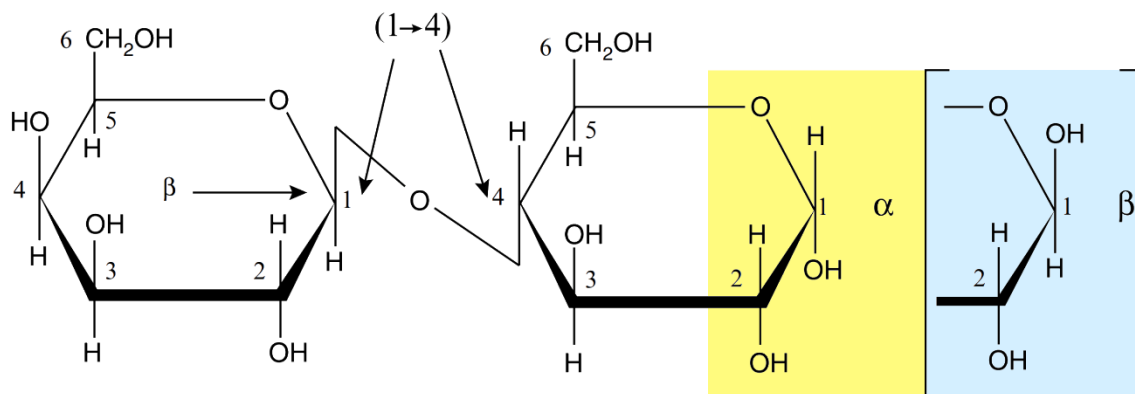
Voda	Laktóza	Bílkoviny	Tuky	Minerální látky
87 %	4,7 %	3,4 %	4,2 %	0,8 %

Přesné složení mléka mezi plemeny skotu se liší, stejně jako se mění jeho jednotlivé složky podle období laktace nebo složení krmiva. Tato skutečnost má významný vliv na složení vyráběných sýrů. Výtěžnost sýrů pak závisí primárně na množství bílkoviny kaseinu a tucích. Během výroby sýrů je část vody oddělena pryč jako syrovátka, která sebou odnáší ve vodě rozpustné složky, jako jsou minerální látky, část proteinů a většinu laktózy (Patrick F. Fox et al., 2017).

V následující části jsou podrobně rozebrány jednotlivé složky mléka a jejich vliv na výrobu a vlastnosti sýrů.

3.1.1 Cukry

Hlavním sacharidem v kravském mléce je laktóza, která tvoří průměrně 4,7 % jeho hmotnosti (Costa et al., 2019). Zatímco mateřské mléko obsahuje velké množství oligosacharidů, kravské mléko je obsahuje pouze ve stopových množstvích (Urashima et al., 2013). Tyto oligosacharidy nejsou stravitelné a chovají se jako rozpustná vláknina. v lidském organismu slouží jako prebiotika a mají pozitivní vliv na střevní mikroflóru (Chauhan et al., 2023).



Obrázek 1 – Vzorec laktózy, vlevo galaktóza, vpravo glukóza (žlutě α , modře β)
s 1-4glykosidickou vazbou (upraveno z Alzoubi et al., 2021)

Chemicky je laktóza disacharid složený ze dvou různých jednotek – glukózy a galaktózy. Tyto dvě cukerné podjednotky jsou spojeny glykosidickou vazbou. Zatímco galaktóza se vždy vyskytuje ve své β -formě, glukóza může být jak α (37 %), tak i β (63 %). Procenta v závorkách udávají stav rovnováhy, kdy se konformace glukózy se může volně měnit (Schaafsma, 2008). Laktóza je dobře rozpustná ve vodě a její rozpustnost roste s teplotou. Je důležité poznamenat, že uvedené hodnoty v tabulce jsou pro ideální poměr α : β izomerům. β laktóza je mnohem rozpustnější (50 g/100 ml) než její α konformace (7 g/100 ml).

Tabulka 2 – Rozpustnost laktózy ve vodě (Choszcz et al., 2019)

Teplota [°C]	20	30	40	50
Rozpustnost [g/g]	0,16	0,2	0,25	0,31

Během fermentace mléčných výrobků dochází k rozkladu laktózy bakteriemi mléčného kvašení na glukózu a galaktózu, které jsou zčásti dále bakteriemi přeměněny na kyselinu mléčnou. Právě díky fermentaci je obsah laktózy ve fermentovaných mléčných výrobcích přirozeně nízký. u lidí je laktóza štěpena v tenkém střevě enzymaticky po dobu kojení. u části světové populace (v případě evropské u většiny) se nejspíše díky mutaci genu schopnost tenkého střeva produkovat laktázu udržela i v dospělosti (Deng et al., 2015).

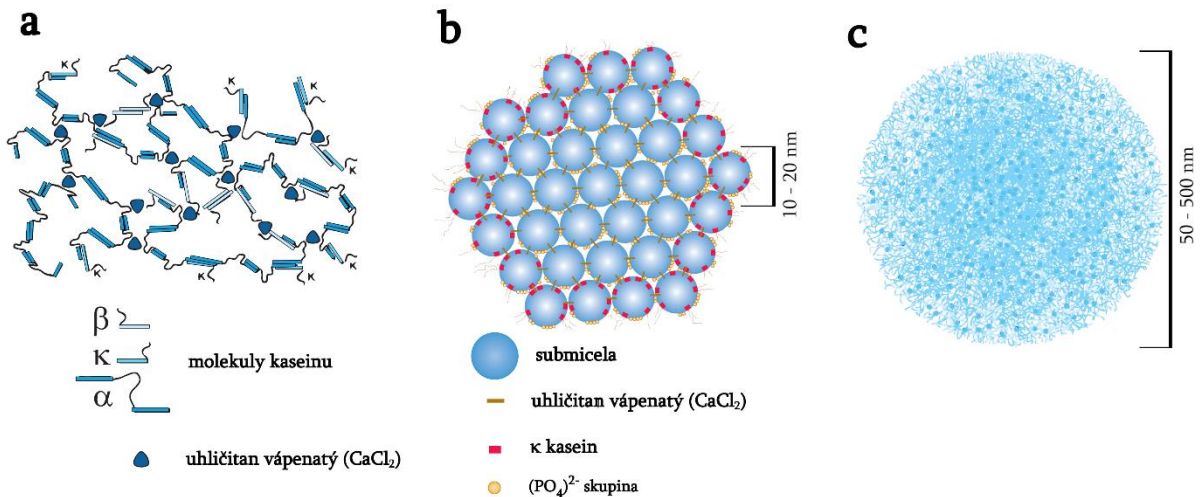
Laktóza má mírně sladkou chuť a nízký glykemický index 46–65. Její trávení probíhá pomalu a nezpůsobuje výrazné kolísání krevního cukru. Důvodem takto nízké hodnoty je omezená vstřebatelnost laktózy ve střevě. Její nestrávená část se chová jako rozpustná vláknina a pomáhá vstřebávání vápníku a hořčíku ve střevě (Schaafsma, 2008).

3.1.2 Bílkoviny

Kravské mléko obsahuje asi 3,2–3,5 % bílkovin, které můžeme rozdělit na dvě hlavní skupiny, kaseinové a syrovátkové bílkoviny. Hlavní rozdíl mezi nimi je jejich rozpustnost. Při pH 4,6 a 20 °C jsou kaseinové molekuly nerozpustné a vysráží se z vodného roztoku, zatímco

syrovátkové proteiny zůstanou rozpuštěné a odchází z velké části při výrobě sýra pryč (Pereira, 2014).

Kaseiny tvoří asi 80 % obsahu bílkovin a v mléce se setkáme s jejich čtyřmi druhy (α , β , γ a κ). Jedná se o fosfoproteiny a v organismu slouží jako zdroj fosforu a vápníku. Kaseinové micely mají průměr až půl mikrometru a každá micela se skládá z jednotek známých jako submicely, které jsou spojovány koloidním fosforečnanem vápenatým.



Obrázek 2 – Kasein (a - molekuly kaseinu, b - model submicel, c - kaseinová micela)

(upraveno z Bylund, 2015)

Syrovátkové bílkoviny tvoří asi 20 % obsahu bílkovin a jsou souborem několika proteinů, jako β -laktoglobulinu, α -laktalbuminu, sérového albuminu, imunoglobulinů a dalších. Jsou velmi dobře stravitelné a rychle se absorbují v trávicím systému, na rozdíl od kaseinových molekul ale nejsou tepelně stabilní (Sadiq et al., 2021).

Kromě kaseinů a syrovátkových proteinů obsahuje kravské mléko minoritní proteiny, různé růstové faktory a peptidy s biologickou aktivitou. Ty mají různé fyziologické role jako imunostimulační, antihypertenzní, antibakteriální nebo antivirové účinky a napomáhají také vstřebávání vápníku v tenkém střevě (Davoodi et al., 2016; Patrick F. Fox et al., 2017).

3.1.3 Tuky

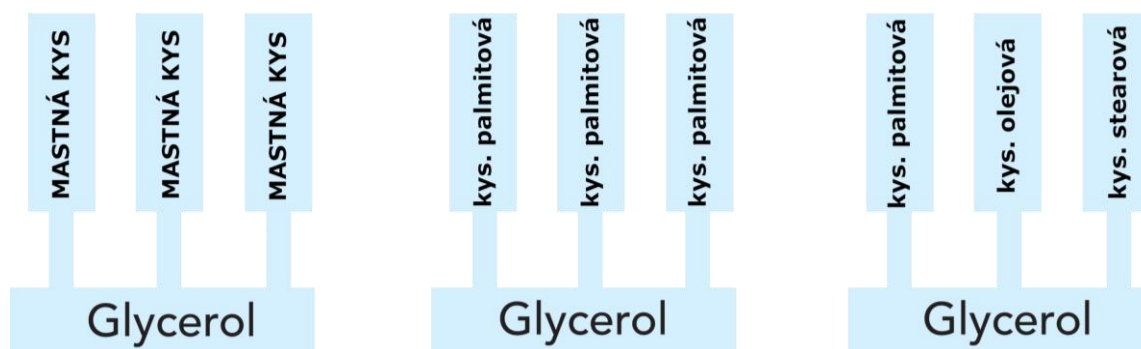
Tuky jsou po vodě druhou nejvíce zastoupenou složkou mléka a jeho nedílnou součástí při výrobě sýrů. Mléčný tuk dává sýrům jejich chuť, texturu a podle typu sýra tvoří velkou část sušiny.

Obsah tuku se velmi liší podle plemena krav. Mléko jerseykého skotu se vyznačuje nejvyšším obsahem tuku (6–7 %) a mléko holštýnského skotu nejnižším (3,4–4,2). V České republice tvořilo v roce 2022 většinu krav (60 %) právě Holštýnské plemeno, které doplňuje České strakaté plemeno (30 %). To má tučnost mléka podobnou holštýnskému (Syrůček et al., 2023).

Tabulka 3 – Zastoupení mastných kyselin v kravském mléce (Marth et Steele, 2001)

NASYCENÉ MK			65–70 %		NENASYCENÉ MK		30–35 %	
kys. myristová	kys. palmitová	kys. stearová			kys. olejová	kys. linoleová		
9,1–11,9 %	23,6–31,4 %	10,4–14,6 %			14,9–22,0 %	1,2–1,7 %		

Mléčný tuk je složen převážně z triglyceridů, ale najdeme v něm také mono– a di–glyceridy, fosfolipidy a steroly (cholesterol, lanosterol). Kromě toho obsahuje v tucích rozpustné vitamíny a sloučeniny ovlivňujících chuť. Každý triacylglycerol může být složen z různých navázaných mastných kyselin, nasycených i nenasycených. Podle studií bylo v kravském mléce identifikováno přes 400 druhů mastných kyselin ve stopovém množství (Lindmark Månsson, 2008). Část sloučenin, jako například rostlinné steroly (sitosterol nebo brassicasterol) se do mléka dostává přímo z potravy (Martini et al., 2023).



Obrázek 3 – Schematické znázornění triacylglycerolů (vytvořeno podle Bylund, 2015)

Tuk v mléce tvoří emulzi tukových kuliček, které jsou ohraničeny membránou. Zatímco objem kuličky tvoří triacylglyceroly, membrána je složená z fosfolipidů a mnoha membránových proteinů. Důvod tohoto uspořádání je dvojitý. Tukový (lipofilní) střed umožňuje rozpouštět vitamíny rozpustné v tucích a mastné kyseliny, zatímco fosfolipidová membrána (hydrofilní) je zorientována tak, aby zabránila shlukování tukových kuliček a umožnila jejich rozpustnost v jinak vodném prostředí. Protože mají tukové kuličky menší hustotu než voda, dochází k jejich usazování na hladině mléka (Pereira, 2014).

Nasycené mastné kyseliny představují 70 % všech mastných kyselin v kravském mléce. Kvantitativně nejdůležitější jsou kyselina palmitová C16:0 (32 %), kyselina myristová C14:0 (11 %), kyselina stearová C18:0 (10 %) a další. Z nenasycených mastných kyselin (asi 30 %) jsou nejvíce zastoupeny kyselina olejová C18:1 n-7 (16 %) a kyselina vakcenová C18:1 n-7 (4 %). Za zmínku stojí také mastné kyseliny s krátkým řetězcem. Ty mají po jejich uvolnění z triacylglycerolů působením lipáz velmi výrazné chutě a vůně, které jsou v mléce nebo másle nežádoucí. Naproti tomu jsou charakteristické pro některé typy zrajících sýrů (Schwendel et al., 2015).

3.1.4 Soli, vitamíny a pH

Významnou složkou mléka jsou minerální látky ve formě solí. Ty se v kravském mléce vyskytují jako fosforečnany, chloridy, citráty a další. Kationty těchto solí jsou nejčastěji sodík,

draslík, vápník a hořčík. Jejich množství můžeme stanovit pomocí obsahu sušiny, ve které tvoří 0,7–0,8 % hmotnosti (P. McSweeney, 2017).

Množství iontů se v průběhu laktace mění. Kolostrum (první mléko) obsahuje vysokou koncentraci solí, což mu dává nahořklou chuť a není využíváno pro lidskou spotřebu. Příkladem je množství chloridu sodného, které je velmi vysoké v prvních dnech laktace, ale následně strmě klesá (P. F. Fox et al., 2015).

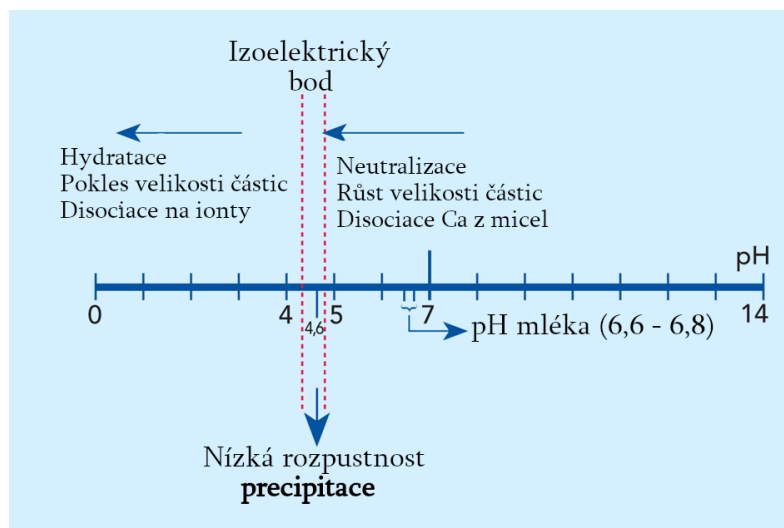
Tabulka 4 – Obsah vybraných solí a iontů v kravském mléce (P. F. Fox et al., 2015)

Koncentrace	Vápník	Hořčík	Sodík	Draslík	Fosforečnany	Chloridy	Citráty
[mg/l]	1000-1250	100-150	450-600	1400-1600	1700-1850	1000-1200	1800-2000
Koncentrace	Železo	Zinek	Měď	Křemík	Mangan	Jód	
[μg/l]	300-600	2000-6000	100-600	750-7000	20-50	260	

Minerální složení mléka ovlivňuje jeho fyzikálně-chemické vlastnosti. Minerální látky mají vliv na uspořádání mléčných bílkovin, stabilitu mléčných lipidů a aktivitu enzymů. Právě poslední bod, aktivita enzymů, ovlivňuje stravitelnost mléka, jeho trvanlivost a vhodnost pro další zpracování na mléčné výrobky. Na většinu makroprvků nemá složení krmné dávky velký vliv. Přesto i malé změny poměru obsahu vápníku, fosforu a kyseliny citrónové způsobené složením krmné dávky hrají významnou roli během výroby sýrů (Cashman, 2011).

Mléko obsahuje množství vitamínů rozpustných v tucích, především A ($\pm 450 \mu\text{g/l}$) a E ($\pm 1500 \mu\text{g/l}$) (Plozza et al., 2012). Z vitamínů rozpustných ve vodě stojí za zmínku vitamín B2 ($\pm 1800 \mu\text{g/l}$). Mléko obsahuje i další vitamíny jako C a D, ale jejich koncentrace nejsou výživově významné (Kanno et al., 1991).

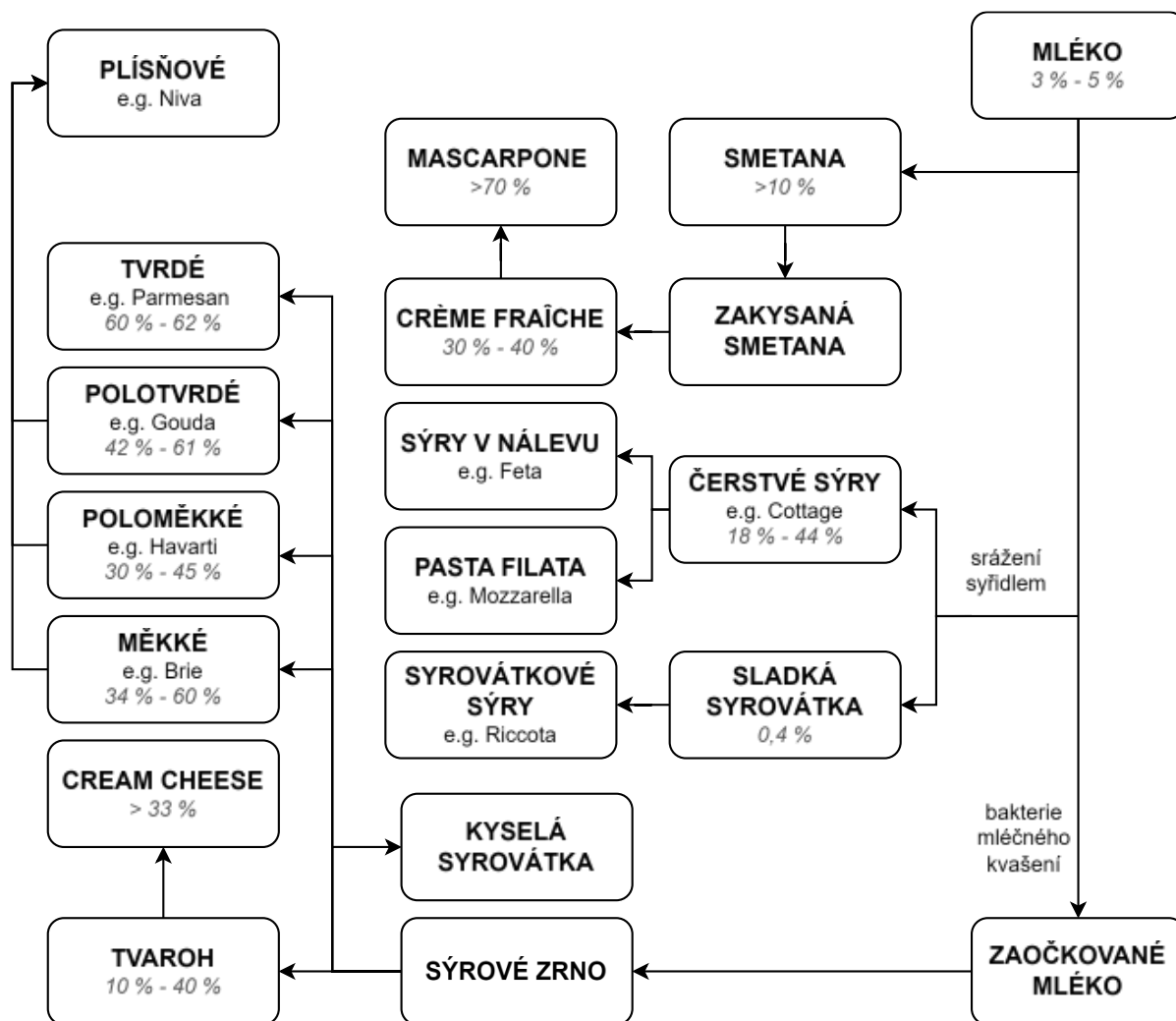
Další důležitou vlastností při výrobě sýrů je pH mléka, které se obvykle pohybuje mezi 6,5–7,2 a závisí na období laktace krávy. Jeho výše ovlivňuje rozpustnost a stabilitu mléčných bílkovin, zejména kaseinů, které jsou citlivé na změny pH a sráží se z mléka při $\text{pH} < 4,6$. Během výroby sýrů pH klesá díky bakteriím mléčného kvašení, které produkují kyselinu mléčnou rozkladem laktózy, díky přidání syřidla, nebo kombinací obojího. Nižší pH vede ke zvýšenému vylučování syrovátky, a tím vyššímu obsahu sušiny v sýru. Výsledkem je, že sýry s nižším pH mívají sušší a drobivější strukturu. Mléko obsahuje také řadu dalších prvků, které jsou pro lidský organismus nezbytné a přispívají tak k výživové hodnotě mléka (P. McSweeney, 2017).



Obrázek 4 – Vliv pH při výrobě sýrů (upraveno z Bylund, 2015)

3.2 Sýry a jejich dělení

Sýry jsou velmi široká skupina produktů. Počátky jejich výroby se odhadují v oblasti střední a východní Evropy až 5000 let před naším letopočtem. Sýry vznikly jako ideální způsob uchování mléka, které se rychle kazí, v době před nástupem chlazení. Dnes existuje přes 1800 druhů sýrů od měkkých termizovaných čerstvých sýrů až po zrající nebo plísňové sýry. Jednotlivé sýry můžeme dělit podle mnoha kritérií například druh mléka, struktura, použité syřidlo, obsah sušiny, doba zrání a mnoho dalších. Protože výčet jednotlivých typů sýrů je nad rámec této práce, zaměříme se v dále v textu na čerstvé sýry z kravského mléka – jejich složky, výrobu, možnosti fortifikace a analýzy (Patrick F. Fox et al., 2017; P. McSweeney, 2017).



Obrázek 5 – Přehled druhů sýrů (upraveno z P. L. H. McSweeney et al., 2017)

3.2.1 Čerstvé sýry

Čerstvé sýry jsou jednou z mnoha kategorií sýrů. Po fázi výroby nezrají a jsou určeny k okamžité spotřebě. Vyznačují se jemnou chutí a aromatem, protože tyto vlastnosti se vyvíjí ve fázi zrání, která zde chybí. Jejich složení je charakteristické velkým množstvím vody, které obsahují až 60–70 %, a také přítomností laktózy (Patrick F. Fox et al., 2017).

3.2.2 Bezlaktózové sýry a laktózová intolerance

Zatímco u zrajících sýrů je díky procesu zrání obsah laktózy přirozeně nízký, v případě čerstvých sýrů je z důvodu absence této fáze výroby vysoký. Tento mléčný cukr není přímo stravitelný a nejprve dochází k jeho štěpení enzymem laktázou (β -galaktosidázou) v tenkém střevě na jednoduché sacharidy D-glukózu a D-galaktózu, které jsou přímo stravitelné (Costa et al., 2019). Nejvyšší produkce tohoto enzymu je v kojeneckém věku, ale u většiny lidí a ostatních savců aktivita laktázy po odstavení klesá. u některých dospělých jedinců aktivita laktázy přetrvává a umožňuje jim trávit laktózu po celý život, což je vlastnost známá jako perzistence laktázy. Nedostatečná produkce laktázy může být způsobena přirozeným úbytkem

její produkce s přibývajícím věkem, ale také jako následek gastroenterologických problémů nebo vrozená (Schaafsma, 2008).

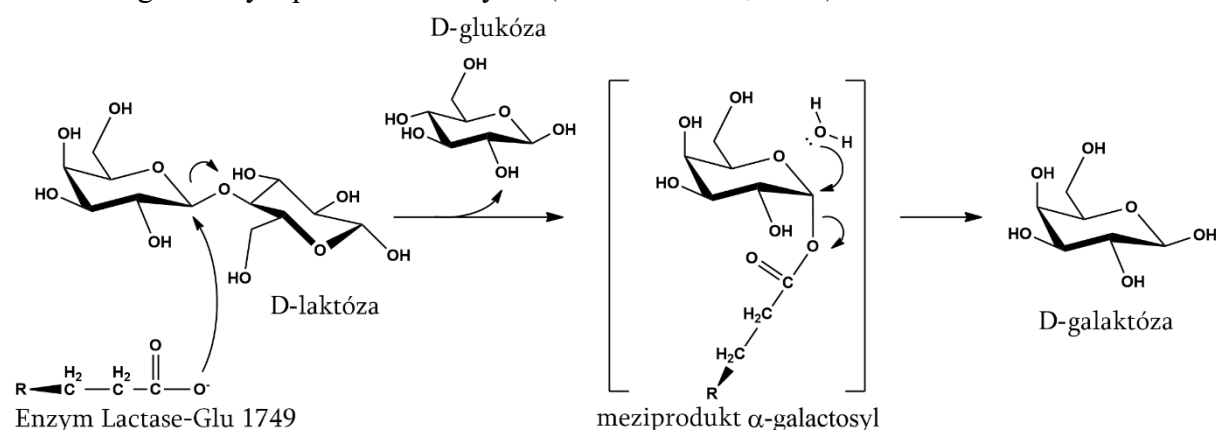
Nedostatek laktázy se u lidí projevuje jako laktózová intolerance. Její výskyt v různých populacích světa se pohybuje od méně než 5 % do téměř 100 %. Nerozštěpená laktóza je v tlustém střevě spotřebována bakteriemi, které ji přeměňují na kyselinu mléčnou, vodík, oxid uhličitý a metan. Kyselina mléčná dráždí stěnu střeva, vodík je vydechován plicemi, methan a oxid uhličitý způsobují nadýmání. Vhodným opatřením k potlačení nepříjemných klinických projevů této metabolické poruchy je omezení laktózy ve stravě. (Deng et al., 2015).

Z těchto důvodů je roste i poptávka a po čerstvých sýrech se sníženým obsahem laktózy a zcela bez obsahu laktózy. Toho můžeme při výrobě docílit přidáním enzymu laktázy, která rozštěpí laktózu na jednoduché cukry. (Dekker et al., 2019)

Princip funkce laktázy

Z chemického hlediska štěpí laktáza glykosidickou vazbu obsaženou v laktóze $\beta(1\rightarrow4)$. Laktóza se nejprve váže na aktivní místo laktázy a vytváří komplex laktáza-laktóza. (P. McSweeney, 2017)

Vznik tohoto enzym-substrátového komplexu je doprovázen štěpením glykosidické vazby prostřednictvím adice protonu na glykosidický kyslík. To vede k odštěpení glukózy a tvorbě meziprojektu L-galaktosylu. Následuje hydrolýza vazby mezi laktázou a galaktózou a volnění galaktózy a původního enzymu (P. F. Fox et al., 2015).



Obrázek 6 – Princip štěpení laktózy enzymem laktázou (přeloženo z P. L. H. McSweeney et al., 2017)

Substrátová specifita laktázy je velmi vysoká a je dána její strukturou, která je uzpůsobena selektivnímu rozpoznávání a katalýze laktózy. Maximum její enzymatické aktivity je v mírně kyselém prostředí ($\text{pH} \pm 6$) a při teplotě kolem $37\text{ }^\circ\text{C}$ (Matthews et al., 2005).

3.2.3 Fortifikace sýrů

Fortifikace sýrů je proces, při kterém záměrně přidáváme živiny nebo jiné složky do sýra za účelem zlepšení jeho výživových hodnot. v případě sýrů se nejčastěji zaměřujeme na změnu poměru mastných kyselin (MK), zvýšení obsahu minerální látek, proteinů či zařazení

probiotik pro lepší trávení. ve Spojených státech je velmi častá fortifikace mléčných výrobků vitamínem D. v neposlední řadě můžeme fortifikaci využít pro zlepšení sensorických vlastností sýra (Picciotti et al., 2022; Villamil et al., 2021).

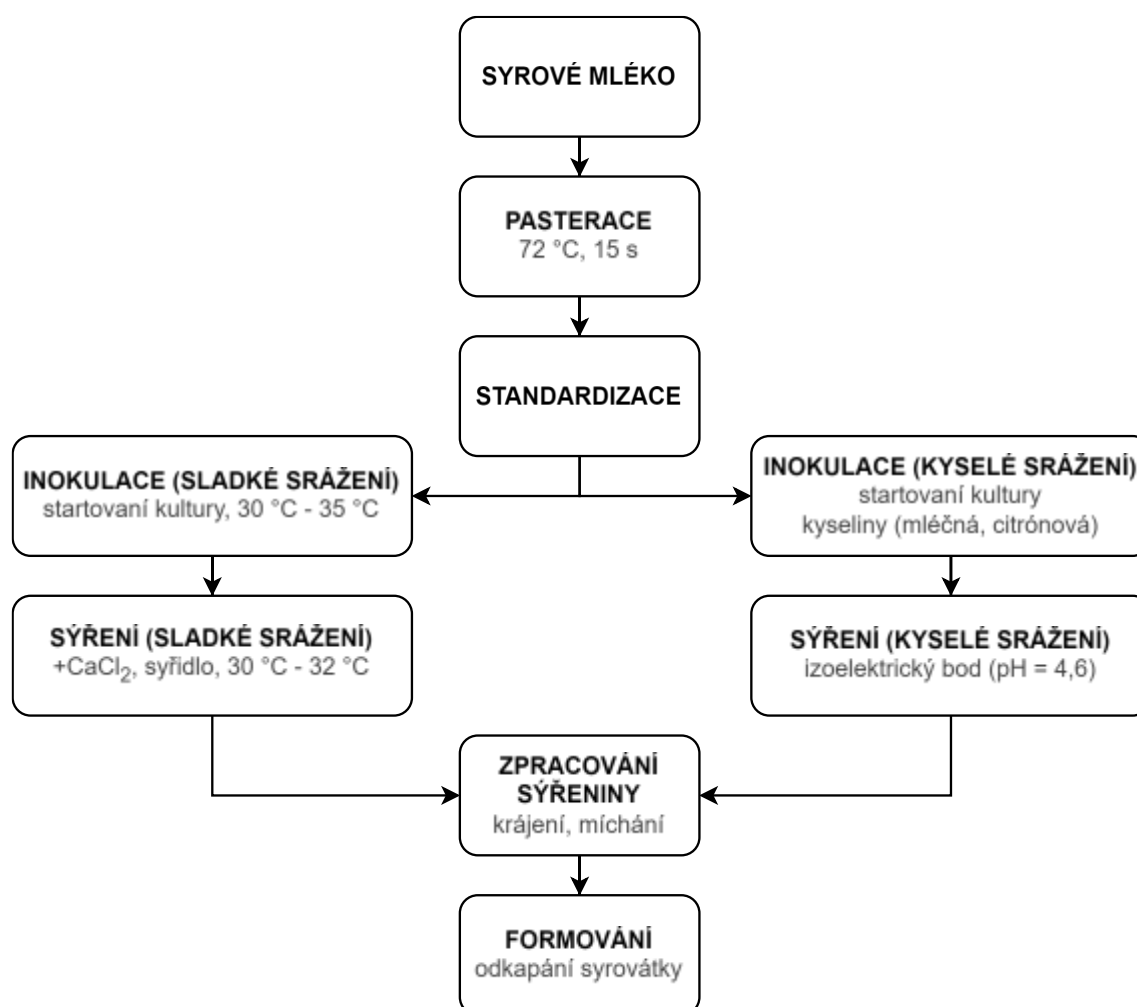
Jak již bylo zmíněno, kravské mléko je bohaté na nasycené mastné kyseliny ($\pm 70\%$). Nasycené tuky jsou spojovány se zvýšenou hladinou LDL (lipoproteinů s nízkou hustotou) cholesterolu, často označovaného jako „špatný“ cholesterol. Nadměrná konzumace nasycených MK je spojována se zvýšeným rizikem kardiovaskulárních onemocnění. Z výživového hlediska je poměr nasycených a nenasycených mastných kyselin v mléce nežádoucí. Pro zlepšení poměru MK jsou do sýrů při výrobě přidávány některé rostlinné oleje, které mají poměr nasycených a nenasycených MK vhodnější. Rostlinné oleje jsou bohatými zdroji nenasycených mastných kyselin, včetně mononenasycených a polynenasycených mastných kyselin. Mezi ně patří omega-3 a omega-6 mastné kyseliny, které jsou známé svými příznivými účinky na zdraví. Dalším důvodem pro fortifikaci bývá zvýšení obsahu bílkovin v sýru (Villamil et al., 2021).

Tabulka 5 – Přehled rostlinných olejů (upraveno z U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE)

NÁZEV	PODÍL NENASYCENÝCH MK	VLASTNOSTI
Řepkový	92 %	60-65 % MUFA 28-35 % PUFA lehká chuť slabé zbarvení
Slunečnicový	88 %	63 % MUFA 21 % PUFA neutrální chuť slabé zbarvení
Kukuřičný	87 %	27 % MUFA 55 % PUFA neutrální chuť žluté syté zbarvení
Lněný	91 %	50-60 % ALA 12-18 % PUFA oříšková chuť žluté zbarvení
Olivový	87 %	55-83 % MUFA 4-20 % PUFA výrazná chuť *barva dle odrůdy
Arašídový	81 %	46-48 % MUFA 32-34 % PUFA lehká chuť nažloutlý
Sezamový	82 %	40 % MUFA 42 % PUFA oříšková chuť světle hnědý
Sacha Inchi	až 93 %	80 % MUFA různé PUFA zemitá chuť jantarová barva
Kakaové máslo		33-35 % MUFA čokoládová chuť světle žlutý
Mléčný tuk	32 %	25 % MUFA 2,5 % PUFA -

ALA— α -linolenová kyselina, MUFA—mononenasycené mastné kyseliny,
PUFA – polynenasycené mastné kyseliny

3.3 Technologie výroby čerstvých sýrů



Obrázek 7 – Obecný diagram výroby čerstvých sýrů (vytvořeno autorem)

Technologie výroby čerstvých sýrů zahrnuje dva základní přístupy: výrobu pomocí sladkého srážení a výrobu založenou na kyselém srážení. Tyto metody se liší způsobem, jakým dochází ke koagulaci kaseinových micel. Až 75 % sýrů je vyráběno pomocí sladkého srážení za použití syřidla (Chambers et al., 2010).

Výroba sladkým srážením využívá syřidlo, které způsobuje koagulaci kaseinových micel. Syřidlo působí na bílkoviny v mléce tak, že dochází k jejich shlukování a vzniku pevné sraženiny, ze které se následně formuje sýr. Tato metoda umožňuje výrobu sýrů s různými texturami v závislosti na množství použitého syřidla, tepelném ošetření a délce doby srážení. (Kadlec et al., 2012)

Při výrobě kyselým srážením se mléko okyselí až na hodnotu jeho izoelektrického bodu (pH ~ 4,6). Snížení pH se dosahuje přidáním kyseliny (například citronové) nebo fermentací pomocí bakterií mléčného kvašení, které produkují kyselinu mléčnou. Okyselení vede k agregaci kaseinových micel a vzniku tvarohové hmoty, ze které se poté formují sýry. Tato metoda je často používána pro výrobu měkkých a vláčných čerstvých sýrů, jako je například cottage cheese (P. McSweeney, 2017).

3.3.1 Úprava mléka

Před zahájením vlastní výroby sýra je mléko podrobena řadě přípravných kroků. Různé druhy sýrů se vyznačují charakteristickým obsahem tuku v sušině. v závislosti na požadovaném množství tuku a kaseinu se složení mléka upravuje procesem standardizace. Ta zahrnuje jeho úpravu přidáním nebo odebráním mléčného tuku, přidáním kaseinu nebo sušeného mléka. Tento proces je klíčový pro dosažení požadovaných charakteristik a kvality sýrů (Patrick F. Fox et al., 2017).

Pasterace

V České republice musí mléko určené k přímé spotřebě nebo dalšímu zpracování projít tepelnou úpravou, aby byla zajištěna jeho bezpečnost, prodloužila se trvanlivost a vytvořily se vhodné podmínky pro výrobu mléčných výrobků. v ostatních státech Evropy se výroba sýrů z nepasterovaného mléka zachovala. Sýry z nepasterizovaného mléka jsou například Roquefort, Parmigiano Reggiano nebo Ementál. Výroba sýrů z nepasterizovaného mléka dodává těmto sýrům jedinečnou chuť (Michlová et al., 2012).

Pro výrobu sýrů se používá převážně pasterace při teplotě 72 °C po dobu minimálně 15 sekund (vysoká teplota, krátká doba), případně dlouhodobá pasterace, při které se mléko zahřívá na 63 °C po dobu 30 minut. Tento typ úpravy syrového mléka se nazývá šetrná pasterace (Patrick F. Fox et al., 2017).

Pasterace účinně eliminuje patogenní mikroorganismy a zabíjí vybrané sporotvorné mikroorganismy, včetně bakterie *Listeria monocytogenes*, která představuje významné biologické riziko při výrobě sýrů. Po pasteraci a standardizaci mléka následuje zchlazení na teplotu předkysání. (Melo et al., 2015)

3.3.2 Inokulace startovacími kulturami

Startovací kultury jsou různé druhy ušlechtilých bakterií mléčného kvašení. Jejich přídavek je nezbytný pro správný průběh celého technologického procesu výroby fermentovaných výrobků. Odstartují proces fermentace vedoucí k požadovaným změnám produktu, jako je změna struktury mléka, chuti a aroma. Hlavní funkcí bakterií mléčného kvašení je fermentace laktózy na kyselinu mléčnou (Beresford et al., 2001).

Pro výrobu čerstvých sýrů jsou využívány především mezofilní kultury, které mají optimum růstu mezi 20–35 °C. Mezi zástupce mezofilních bakteriálních kultur patří *Lactococcus lactis subsp. lactis* a *Lactococcus lactis subsp. cremoris* (Marth et Steele, 2001).

3.3.3 Sýření

V případě sladkého sražení jsou k inokulovanému mléku přidány proteolytické enzymy, označované jako syřidla. Po přidávku syřidla precipitují mléčné bílkoviny na sraženinu, která se dále zpracovává. Pro lepší sražení a zvýšení výtěžnosti sýrů je nezbytný přídavek chloridu vápenatého (Kadlec et al., 2012).

Proces sýření probíhá při teplotách, mezi 30–32 °C, kdy je aktivita enzymů nejvyšší. Přidání syřidla spolu s chloridem vápenatým a startovací kulturou obvykle vede ke snížení pH mléka, což je klíčové pro vytvoření kvalitní sraženiny (Kadlec et al., 2012).

Samotné sýření má tři fáze. v první fázi dochází k narušení ochranného obalu kaseinových micel. v sekundární fázi dochází ke koagulaci micel díky přítomnosti vápenatých iontů. To vede k vytvoření sraženiny. Během třetí fáze se štěpí bílkoviny na kratší peptidy (Tunick, 2014).

V případě kyselého srážení se k sýření nevyužívá syřidlo a srážení probíhá snížením pH, například přidáním kyseliny citrónové. Proces srážení má zásadní vliv na texturu finálního sýra (Kadlec et al., 2012; Tunick, 2014).

3.3.4 Zpracování sýřeniny

Zpracování sýřeniny a její oddělení od syrovátky začíná krájením sýrového zrna. Technika krájení a velikost nakrájeného zrna má vliv na konečný obsah syrovátky, a tím konzistenci, vlhkost a texturu sýra. Cílem tohoto kroku je rovnoměrné odstranění syrovátky, případně další operace předcházející formování. Mezi ty řadíme praní sýrového zrna, při kterém klesá obsah laktózy, dohřívání pro zvýšení obsahu sušiny a podobně. Tyto další operace jsou specifické pro daný typ sýra (Patrick F. Fox et al., 2017; Kadlec et al., 2012).

3.3.5 Formování

Finálním krokem výroby je formování, ke kterému se přistupuje po dosažení vhodné velikosti sýrového zrna. To se umístí do perforovaných forem, které umožňují vytékání přebytečné syrovátky. Čerstvé sýry se nechávají formovat vlastní vahou a po čase dochází k jejich otočení, aby se docílilo homogenní struktury (Kadlec et al., 2012).

V případě slaných sýrů může proběhnout nasolení formovaného sýra, a to jak přímo, tak ponořením do solné lázně (Patrick F. Fox et al., 2017; Kadlec et al., 2012).

3.4 Metody analýzy cukrů a organických kyselin

Z pohledu analýzy je mléko, stejně jako výrobky z něj, velmi komplexní směs látek. Jeho analýza proto zahrnuje řadu metod pro určení jeho kvalitativního složení (jaké látky obsahuje) i kvantitativního složení (v jakém množství jsou látky zastoupeny) (Nollet et Toldrá, 2010).

Stanovení laktózy v mléce bylo historicky prováděno pomocí gravimetrických, polarimetrických a kolorimetrických metod. Tyto tradiční metody jsou ale časově náročné a neumožňují přesně rozlišit jednotlivé sacharidy. v dnešní době je pro rychlou analýzu mléka nejčastěji využívána metoda infračervené spektrometrie, která umožňuje okamžitou souběžnou detekci cukrů, tuků, bílkovin a řady organických sloučenin. Kromě analýzy základních cukrů, jako je laktóza, glukóza a galaktóza, můžeme v mléce sledovat také ostatní cukry jako je fruktóza, která se může vyskytovat vlivem fortifikace (Nollet et Toldrá, 2010).

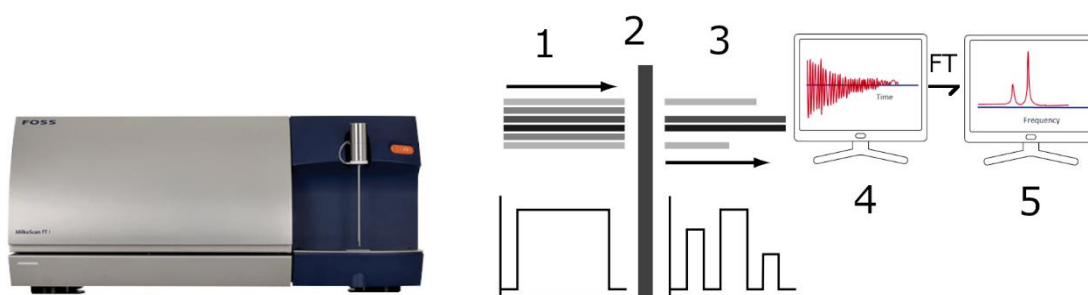
V případě stanovení cukrů a organických kyselin v sýrech je využívána řada metod od jednoduchých kolorimetrických titračních metod pro celkovou aciditu, až po složité instrumentální metody schopné měřit více látek ve vzorku najednou s vysokou přesností. Pro analýzu sýrů se dnes využívají různé instrumentální techniky, jako například plynová chromatografie (GC) nebo vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) v kombinaci

s vhodným detektorem, kapilární elektroforéza (CE) nebo infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR). Pro detekci stopových látek a specifických kontaminantů existují speciální techniky, jako je nukleární magnetická rezonance. Jedná se ovšem o nákladnou metodu s vysokými nároky na přípravu vzorku. Z tohoto důvodu není pro běžné analýzy využívána (Nollet et Toldrá, 2010).

3.4.1 Infračervená spektrometrie

Tato metoda analýzy v konfiguraci s Fourierovou transformací (FTIR) poskytuje podrobné informace o molekulární struktuře a složení vzorků. Výhodou je možnost souběžné kvantitativní analýzy tuků, bílkovin, cukrů a dalších IČ aktivních látek v mléce s vysokou přesností (Colthup et al., 1990).

Princip FTIR spočívá v interakci infračerveného (IČ) záření s molekulami ve vzorku, což vede k jejich vibračním a rotačním přechodům. Každá chemická vazba a funkční skupina v molekule má specifické vibrační frekvence. Každá z těchto vibrací se vyskytuje na jiné frekvenci, která je jedinečná pro chemickou vazbu a sloučeninu. Když IČ záření prochází vzorkem, některé vlnové délky jsou absorbovány molekulami, zatímco jiné procházejí vzorkem beze změny. Absorpce IR záření závisí na molekulární struktuře a je charakteristická pro různé chemické skupiny. Takto prošlé záření je detekováno na interferometru spolu s původním zářením a jejich rozdíl je vyhodnocen jako signál. Vzniklý interferogram je následně pomocí Fourierovy transformace převeden na spektrum, ve kterém můžeme vyhodnotit měřené látky, jak je znázorněno na obrázku č. 8 (Nollet et Toldrá, 2010).



Obrázek 8 – Schéma metody FT IR a přístroj Milkoscan FT1 (upraveno z Bruker[®], FOSS[®])

1 – vstupní infračervené záření, 2 – analyzovaný vzorek, 3 – transmisní spektrum záření, 4 – výstupní signál z detektoru, 5 – Fourierova transformace signálu

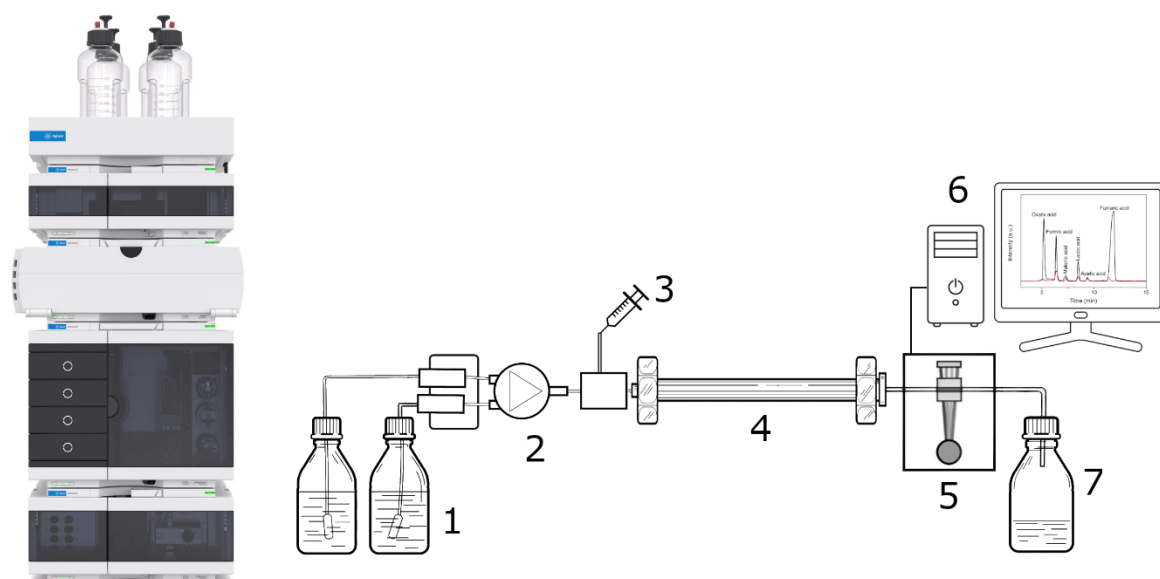
Díky schopnosti FTIR analyzovat vzorky bez potřeby rozsáhlé předúpravy je tato technika ideální pro průmyslové aplikace. Mezi její další výhody patří relativně nízké ceny instrumentace a vysoké rychlosti měření. Příkladem jsou přístroje Milkoscan FT3 (FOSS, Dánsko), MPA II Dairy (Bruker, Německo), Lactoscope (PerkinElmer, Velká Británie).

3.4.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie v uspořádání vysokoúčinné kapalinové chromatografie HPLC je často využívanou metodou pro separaci látek. Protože je HPLC stejně jako ostatní chromatografické metody pouze separační metodou, která rozdělí jednotlivé složky v čase podle jejich retence na koloně, je nutné pro jejich vyhodnocení použít vhodný detektor. Na rozdíl od jiných chromatografických metod jako GC nevyžaduje předúpravu vzorku derivatizací, což je v průmyslu velká výhoda. Separace látek probíhá díky rozdílným fyzikálně chemickým vlastnostem separovaných látek, mobilní fáze a materiálu kolony (Mullin et Emmons, 1997; Nováková et Douša, 2013; Zeppa et al., 2001).

Schéma systému HPLC

Chromatografický systém se zjednodušeně skládá ze zásobníků mobilní fáze, systému odplynění, gradientního ventilu, vysokotlaké pumpy, dávkovače vzorku, kolony, detektorů a nádoby na odpad. Zatímco nádoby na mobilní fáze a odpad jsou mimo přístroj, ostatní komponenty jsou uzavřeny a dávkování vzorků probíhá v moderních přístrojích automaticky pomocí autosampleru. Kolona je pro vyšší účinnost uzavřena v temperované komoře a je během separace zahřívána. Během separace dochází nejdříve k nasátí mobilní fáze ze zásobních lahví a promytí kolony. Pumpy tlačí mobilní fázi kolonou při definovaném průtoku a je zkoumán tzv. mrtvý čas kolony. Následně dochází k dávkování vzorku a jeho zachytu na koloně, kde jsou jednotlivé složky vzorku separovány (Nollet et Toldrá, 2010).



Obrázek 9 – Schéma metody HPLC a přístroj Agilent 1260 Infinity 2 (upraveno z Agilent®)

1 – zásobníky mobilní fáze, 2 – systém odplyňovače, směšovacího ventilu a vysokotlaké pumpy, 3 – dávkovač vzorku, 4 – chromatografická kolona, 5 – detektor, 6 – vyhodnocení záznamu, 7 – nádoba na odpad

Detektory

Výběr detektoru závisí na analyzované skupině látek, požadované citlivosti a specifčnosti. Pro cukry v sýrech jsou běžně používány detektory RID a ELSD pro jejich schopnost detekovat laktózu a další sacharidy, které neabsorbují UV záření. UV a DAD detektor je vhodný pro analýzu sloučenin s vysokou absorpcí v UV oblasti, jako jsou například jednoduché organické kyseliny. Pokud je to pro analýzu nutné, je možné umístit sériově více detektorů (Nollet et Toldrá, 2010).

Refraktometrický detektor (RID) je citlivý na změny indexu lomu látek vystupujících z kolony. Laktóza má oproti vodě velký index lomu, a proto je často analyzována tímto detektorem. ve srovnání s jinými detektory má refraktometrický detektor nízkou citlivost.

Ultrafialový detektor (UV) je vhodný pro detekci látek, které absorbují UV světlo. Cukry obecně UV světlo výrazně neabsorbují, je proto vhodný pro detekci jiných složek, jako jsou některé organické kyseliny, aminokyseliny, vitaminy a další. Jeho uspořádání umožňuje měřit i barevné látky, v takovém případě jej označujeme jako UV/VIS (Nováková et Douša, 2013).

Detektor s odpařovacím rozptylem světla (ELSD) je univerzální a může detekovat jakoukoli sloučeninu, která je méně těkavá než mobilní fáze. ELSD je proto vhodný pro detekci netěkavých sloučenin, které neabsorbují UV záření, jako jsou cukry a lipidy v sýrech. Během analýzy se eluent vycházející z kolony rozprašuje, následně se odpaří mobilní fáze a měří se rozptyl světla způsobený pouze netěkavými sloučeninami. Díky tomu je jeho citlivost vyšší než u klasického refraktometrického detektoru (Nováková et Douša, 2013).

Detektor s diodovým polem (DAD) má široké využití pro analýzu látek s charakteristickou absorpcí v oblasti VIS a UV. Umožňuje provádět kvalifikaci i kvantifikaci dat zároveň. Diodové pole umožňuje souběžný záznam dat ze širokého rozpětí vlnových délek a jejich odpovídajících intenzit. Tento detektor má vysokou selektivitu a velmi dobrou senzitivitu. Z těchto důvodů je dnes hojně používán pro rutinní analýzy směsí látek ve velmi krátkém čase (Nováková et Douša, 2013).

Z ostatních detektorů stojí za zmínku fluorescenční detektor, který má velmi vysokou citlivost a používá se pro sloučeniny a jejich deriváty schopné fluorescence. Při analýze sýrů může být fluorescenční detekce použita pro některé vitaminy a aromatické sloučeniny. v průmyslových aplikacích je také často využíván detektor diodového pole, který je obdobou UV/VIS detektoru (Nollet et Toldrá, 2013; Nováková et Douša, 2013).

Uspořádání fází a složení kolon

Volba stacionární a mobilní fáze hraje důležitou roli pro efektivní separaci směsi látek. Pevná fáze v koloně se nazývá stacionární a rozpouštědlo, které nese vzorek kolonou, se nazývá mobilní fáze. Dva základní způsoby uspořádání, normální fáze a reverzní fáze, závisí na polaritě jednotlivých fází (Nollet et Toldrá, 2013).

Při normální fázi (NP) je stacionární fáze v koloně polární. Obvykle se kolona skládá z oxidu křemičitého nebo oxidu hlinitého. Mobilní fáze je nepolární, například hexan nebo chloroform. Během separace polárnější sloučeniny ve vzorku ulpívají na polární stacionární fázi, a proto se z kolony vylučují pomaleji než méně polární sloučeniny (Nollet et Toldrá, 2013).

Reverzní fáze (RP) funguje na opačném principu. Stacionární fáze je nepolární, nejčastěji tvořená částicemi oxidu křemičitého s povrchově navázanými nepolárními skupinami, jako je alkylová skupina s přímým řetězcem (C8; C18). Mobilní fáze je relativně polární, nejčastěji pouze voda nebo směs vody a organických rozpouštědel, jako je methanol nebo acetonitril. Během separace mají méně polární sloučeniny vyšší afinitu k nepolární stacionární fázi, a proto se vylučují pomaleji než sloučeniny polárnější. Díky možnosti kombinovat polární vodu s méně polárními rozpouštědly je dnes RP využívána častěji než normální fáze (Nollet et Toldrá, 2013).

Izokratický a gradientní režim

Složení mobilní fáze se může během separace měnit s cílem zlepšit rozlišení jednotlivých separovaných složek. Pokud se složení mobilní fáze během separace nemění, hovoříme o izokratickém režimu. Ten je vhodný pro svou jednoduchost a reprodukovatelnost. Navíc je jeho použití nutné v případě refraktometrického detektoru (Fanali et al., 2013).

Gradientní režim, kdy se v průběhu separace mění složení mobilní fáze, vyniká svojí rychlostí a vyšší citlivostí u složitých směsí. Díky postupné změně polarity umožňuje separovat látky, které by se jinak uvolňovaly z kolony ve stejném retenčním čase (Fanali et al., 2013; Nollet et Toldrá, 2013).

4 Metodika

Praktická část této práce byla zaměřena na výrobu fortifikovaných čerstvých sýrů v laktóзовé a bezlaktóзовé verzi. Cílem analýzy bylo stanovit obsah laktózy, glukózy a galaktózy v klasické a bezlaktóзовé verzi sýrů. u obou typů sýrů byl také studován obsah jednoduchých organických kyselin, a to kyseliny mléčné, octové a citronové. Pro analýzu byla využita vysokoúčinná kapalinová chromatografie s DAD detektorem pro stanovení organických kyselin a RID detektorem pro stanovení cukrů. Získaná data byla statisticky zpracována metodou korelační analýzy v programu Statistica 14 a graficky zobrazena pomocí programu OriginPro10.

4.1 Výroba čerstvých sýrů

Pro výrobu čerstvých sýrů bylo použito mléko z farmy Struhy, která se nachází nedaleko Písku v Jihočeském kraji. Farma chová skot plemene Brown Swiss (Švýcarský hnědý skot) v ekologickém režimu (BIO). Výroba sýrů proběhla sedmkrát od září do prosince roku 2023. v prvních šesti výroбах byly vyrobeny tři druhy sýrů v laktóзовé verzi a tři druhy ve verzi bezlaktóзовé. v sedmé výrobě byly vyrobeny čtyři druhy sýrů v laktóзовé verzi a čtyři druhy ve verzi bezlaktóзовé. u fortifikovaných sýrů byla pro zlepšení nutričních hodnot část mléčného tuku (20 %) nahrazena různými rostlinnými oleji s vhodným poměrem nasycených mastných kyselin. Do výrob číslo 5 a 6 byla navíc přidána i mandlová moučka (5 %) a do poslední výroby (č. 7) byl přidán mandlový protein (5 %) pro zvýšení množství bílkovin a úpravu chuťového profilu sýru. Je vhodné poznamenat, že mandlová moučka je výrobcí nesprávně označována jako mouka, přestože mouka je dle platné legislativy (vyhláška č. 18/2020 Sb.) pouze mlýnský obilný výrobek získaný mletím obilného zrna, pseudoobilovin nebo rýže.

Pro porovnání byl při každé ze sedmi výrob vyroben také jeden laktóзовý a jeden bezlaktóзовý sýr bez použití fortifikace olejem či proteinem.

4.1.1 Použitý materiál a chemikálie

- Mikrobiální syřidlo 220TL BF (Formase, Česká republika)
- Chlorid vápenatý potravinářský 35 % (Česká republika)
- Lyofilizovaná mezofilní kultura CHN-11 (CHR Hansen, Dánsko)
- Enzym laktáza Maxilact LGi 5000 (DSM, Nizozemí)
- Arašídový olej (Rinnovare, Indie)
- Sezamový olej (Vital Country, Česká republika)
- Olej sacha inchi (Oro Verde, Česká republika)
- BIO Kakaové máslo (Grizly, Česká republika)
- Mandlová moučka (Grizly, Česká republika)
- Mandlový protein (Grizly, Česká republika)

Tabulka 6 - Přehled vyráběných sýrů

Číslo výroby	Kód sýru	Typ sýru	Fortifikace
1	DLACS_16	laktózový sýr bez fortifikace	-
	DNLACS_16	bezlaktózový sýr bez fortifikace	-
	DILACS_20_16	fortifikovaný laktózový sýr	arašídový olej 20 %
	DINLACS_20_16	fortifikovaný bezlaktózový sýr	arašídový olej 20 %
2	DLACS_17	laktózový sýr bez fortifikace	-
	DNLACS_17	bezlaktózový sýr bez fortifikace	-
	DILACS_20_17	fortifikovaný laktózový sýr	sezamový olej 20 %
	DINLACS_20_17	fortifikovaný bezlaktózový sýr	sezamový olej 20 %
3	DLACS_18	laktózový sýr bez fortifikace	-
	DNLACS_18	bezlaktózový sýr bez fortifikace	-
	DILACS_20_18	fortifikovaný laktózový sýr	sacha inchi 20 %
	DINLACS_20_18	fortifikovaný bezlaktózový sýr	sacha inchi 20 %
4	DLACS_19	laktózový sýr bez fortifikace	-
	DNLACS_19	bezlaktózový sýr bez fortifikace	-
	DILACS_20_19	fortifikovaný laktózový sýr	kakaové máslo 20 %
	DINLACS_20_19	fortifikovaný bezlaktózový sýr	kakaové máslo 20 %
5	DLACS_20	laktózový sýr bez fortifikace	-
	DNLACS_20	bezlaktózový sýr bez fortifikace	-
	DBLACS_5_20	fortifikovaný laktózový sýr	mandlová moučka 5 %
	DBNLACS_5_20	fortifikovaný bezlaktózový sýr	mandlová moučka 5 %
6	DLACS_21	laktózový sýr bez fortifikace	-
	DNLACS_21	bezlaktózový sýr bez fortifikace	-
	DBLACS_5_21	fortifikovaný laktózový sýr	mandlová moučka 5 %
	DBNLACS_5_21	fortifikovaný bezlaktózový sýr	mandlová moučka 5 %
7	DLACS_22	laktózový sýr bez fortifikace	-
	DBLACS_3_22	fortifikovaný laktózový sýr	mandlový protein 3 %
	DBNLACS_3_22	fortifikovaný bezlaktózový sýr	mandlový protein 3 %
	DBILACS_20_3_22	fortifikovaný laktózový sýr	arašídový olej 20 %
	DBINLACS_20_3_22	fortifikovaný bezlaktózový sýr	mandlový protein 3 %

4.1.2 Použité přístroje

- Komorový termostat (Memmert, Německo)
- Milkoscan FT 120 (FOSS, Dánsko)
- Elektrická talířová odstředivka na mléko MS-100-18 (Motor Sich, Ukrajina)

4.1.3 Postup výroby

Při všech sedmi výroбах bylo pro výrobu použito čerstvé syrové kravské mléko (D_SM). Obsah tuku a dalších základních složek ve výchozím mléce byl stanoven pomocí Milkoscanu FT 120. Průměrný obsah tuku v mléce byl $4,1 \pm 0,2$ % a obsah laktózy $4,73 \pm 0,05$ %.

Objem mléka pro výrobu byl přibližně 1 litr na jeden sýr. v případě fortifikovaných sýrů byl potřebný objem mléka větší, a to díky ztrátám během procesu centrifugace a následné standardizace. v prvních šesti výroбах bylo pro použito celkem 7 litrů syrového mléka, ze kterých bylo připraveno 6 litrů standardizovaného mléka obohaceného olejem pro výrobu šesti sýrů. v sedmé výrobě bylo vyrobeno 8 sýrů z 9 litrů syrového mléka.

Mléko pro výrobu obou typů sýrů (fortifikovaných i nefortifikovaných) bylo nejprve tepelně ošetřeno šetrnou pasterací při 72 °C po dobu 15 sekund, následně ve studené lázni ochlazen na 37 °C. Takto připravené mléko bylo rozděleno při každé výrobě na dvě části.

Pro výrobu čerstvého sýra bez fortifikace olejem či proteinem v laktózové (D_LACS) a bezlaktózové (D_NLACS) verzi byly při všech výroбах použity 2 litry výchozího pasterovaného mléka. Toto množství bylo následně rozděleno po 1 litru a umístěno do nádob pro výrobu sýru. Do mléka určeného k výrobě bezlaktózových verzí sýrů byl pomocí automatické pipety přidán 1 ml enzymu laktázy. Pro kvantitativní reakci bylo mléko vloženo do termostatu vytemperovaného na 35 °C po dobu 90 minut.

Ze zbývajících množství výchozího pasterovaného mléka byla pro výrobu fortifikovaných sýrů nejprve při každé výrobě na elektrické odstředivce odseparována smetana. Po odstředění se zbytkový tuk v odstředěném mléce pohyboval v rozmezí $0,08 \pm 0,05$ %.

Následně bylo pomocí hmotnostní bilance vypočítáno přesné množství smetany a odstředěného mléka pro výrobu fortifikovaných vzorků. Z celkového definovaného množství mléčného tuku (4 %) bylo nahrazeno 20 % rostlinným olejem s vhodnějším poměrem nasycených a nenasycených mastných kyselin. Množství přidaného oleje bylo přepočítáno na celkovém množství tuků ve 100 g oleje. Z důvodu homogenizace byla směs smetany a oleje zahřáta na 35 °C. Po spojení obou tukových složek bylo přimícháno vypočtené množství odstředěného mléka. Vznikly tak 4 litry, v sedmé výrobě 6 litrů, olejem fortifikovaného mléka s celkovou tučností 4 %, z níž bylo 20 % nahrazeno olejem. Ověření výsledné tučnosti mléka (D_ILACM) bylo provedeno pomocí Milkoscanu FT 120.

Standardizované mléko pro výrobu fortifikovaných vzorků bylo následně rozděleno po 1 litru do nádob určených pro výrobu sýru. Do mléka určeného k výrobě bezlaktózových verzí sýrů byl pomocí automatické pipety přidán 1 ml enzymu laktázy. Pro kvantitativní reakci bylo mléko vloženo do termostatu vytemperovaného na 35 °C po dobu 90 minut.

Následující postup výroby byl u všech sýrů v podstatě stejný. Při výrobě 5, 6 a 7 byla navíc přidána mandlová moučka (5,6) nebo mandlový protein (7). Nejprve byly vzorky mléka v nádobách určených pro výrobu sýru zaočkovány 0,3 g lyofilizované mezofilní kultury CHN 11, která byla důkladně rozmíchána. Zaočkované mléko bylo temperováno v termostatu na 35 °C po dobu 30 minut.

Následně bylo pro vysrážení mléka použito mikrobiální syřidlo (sladké srážení) a pro zvýšení výtěžnosti přidán chlorid vápenatý. Ke vzorkům bylo automatickou pipetou přidáno 0,5 ml mikrobiálního syřidla 220TL BF a 0,5 ml chloridu vápenatého (CaCl₂). Mléko bylo důkladně promícháno a temperováno na 35 °C po 60 minut. Po 60 minutách byla u vzniklé sýřeniny pozorována lomivá struktura sýrového zrna.

Následovalo krájení sýřeniny na kostky o velikosti cca 2 cm a opětovné temperování při 35 °C po dobu 15 minut. Poté bylo provedeno druhé krájení sýrového zrna na drobnější kostičky o velikosti cca 0,5 cm pro lepší uvolnění syrovátky a poslední temperace (35 °C) po dobu 10 minut.

V dalším kroku byla sýřenina nalita do forem na sýry, ze kterých vykapala přebytečná syrovátka. Po 20 minutách byl sýr otočen. Sýry byly ponechány v lednici při 4 °C do druhého dne pro lepší odloučení zbytkové syrovátky.

Druhý den byly ze všech sýrů nožem odebrány reprezentativní vzorky pro následné analýzy (cca 40 g) pomocí náhodného statického vzorkování. Tyto vzorky byly homogenizovány a uloženy do mrazničky v laboratoři FAPPZ při teplotě -18 °C do doby dalšího zpracování.

4.2 Analýza organických kyselin a cukrů

Příprava a analýza vzorků probíhala v lednu až březnu roku 2024. Analyzovány byly vždy dva sýry z každé výroby, a to v laktózosvé a bezlaktózosvé verzi. Každý vzorek byl připraven a analyzován ve dvou opakováních. Celkem bylo analyzováno 7 výrob.

Pro stanovení obsahu laktózy byl do vybraných sýrů (D_NLACS, D_NILACS) přidán enzym laktáza a následně pomocí HPLC stanoven pokles obsahu laktózy a nárůst obsahu glukózy a galaktózy.

4.2.1 Použité chemikálie

- Demineralizovaná voda
- Carrez I: trihydrát hexakynoželezitanu(II) draselného (ferrokyanid draselný) (K₄[Fe(CN)₆]·3 H₂O), koncentrace: 15 g/100 ml (Sigma-Aldrich, Německo)
- Carrez II: heptahydrát síranu zinečnatého (ZnSO₄·7 H₂O), koncentrace: 30 g/100 ml (Sigma-Aldrich, Německo)
- 98% kyselina sírová (H₂SO₄) (Honeywell, USA)

4.2.2 Použité přístroje

- HPLC 1260 Infinity II LC System (Agilent, USA)

- Kolona AminexR HPX-87H, 300 x 7,8 mm (Bio-Rad, USA)
- Stolní centrifuga Universal 320 (Hettich, Německo)
- Analytické váhy Kern EW 620 (Kern, VB)

4.2.3 Příprava vzorků pro HPLC

Vzorky sýrů pro analýzu byly pozvolna rozmrazeny ve vodní lázni. Následně bylo do 15 ml kónických zkumavek na analytických vahách odváženo 1 g $\pm 0,01$ g sýru. K naváženému vzorku bylo automatickou pipetou postupně napipetováno 0,3 ml Carrezova roztoku I, 0,3 ml Carrezova roztoku II a doplněno do 10 ml demineralizovanou vodou. Vzorek byl důkladně promíchán za vzniku gelu/sraženiny, která značila vysrážení tuků a bílkovin. Takto připravený vzorek byl odstředěn na centrifuze Universal 320 při 13000 ot/min. po dobu 12 minut. 1 ml odděleného supernatantu byl pomocí injekční stříkačky) přefiltrován přes injekční filtr (0,45 μm PTFE, J.T.Baker, VWR) do 2 ml vialky. Takto připravené vzorky byly následně analyzovány pomocí HPLC.

4.2.4 Stanovení obsahu organických kyselin a cukrů

Připravené vzorky byly analyzovány vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na přístroji Agilent 1260 Infinity II s reverzní fází a dvěma sériově zapojenými detektory. Refraktometrický detektor (RI) byl použit pro stanovení cukrů, UV detektor pro stanovení organických kyselin. Pro analýzu vzorků byla použita kolona AminexR HPX-87H, 300 x 7,8 mm (Bio-Rad) a metoda s izokratickou elucí. Mobilní fází byla demineralizovaná voda s kyselinou sírovou o koncentraci 0,005 M pro úpravu pH.

Tabulka 7 - Parametry přístroje Agilent a použité metody

Parametr	Nastavené hodnoty
Objem nástřiku	20 μl
Průtok mobilní fáze	0,6 ml/min
Složení mobilní fáze	H ₂ O, (0,005 M H ₂ SO ₄)
Typ kolony	AminexR HPX-87H, 300 x 7,8 mm
Teplota kolony	65 °C
Detektor	RID, DAD
Vlnová délka	210 nm

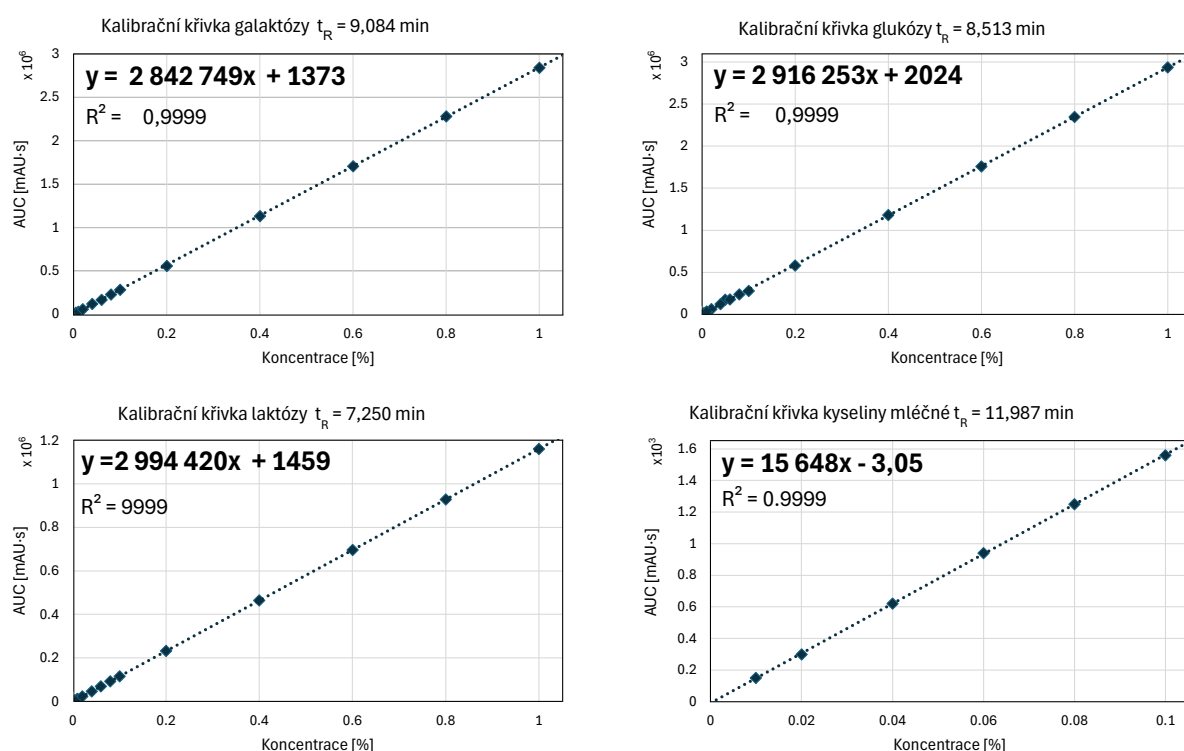
5 Výsledky

Vyrobené sýry byly analyzovány pomocí HPLC se zaměřením na koncentraci laktózy, glukózy, galaktózy, kyseliny mléčné, kyseliny octové a kyseliny citrónové. Syrové mléko bylo před zahájením výroby promícháno a analyzováno na přístroji Milkoscan FT 120. Pro jednotlivé výroby sýrů bylo použito mléko se složením uvedeným v tabulce níže.

Tabulka 8 – Složení vstupního mléka pro jednotlivé výroby sýrů z přístroje Milkoscan FT 120

Číslo výroby	Kód mléka	Tuk [%]	Bílkoviny [%]	Kasein [%]	Laktóza [%]	Sušina [%]	TPS [%]
1	DSM_16	4,54	3,43	2,64	4,67	13,34	8,96
2	DSM_17	3,97	3,49	2,70	4,75	12,88	9,06
3	DSM_18	4,35	3,57	2,82	4,77	13,43	9,10
4	DSM_19	3,95	3,42	2,68	4,74	12,77	8,88
5	DSM_20	3,87	3,61	2,84	4,84	13,14	9,32
6	DSM_21	3,91	3,57	2,79	4,70	12,87	9,07
7	DSM_22	4,23	3,49	2,74	4,69	13,07	8,90

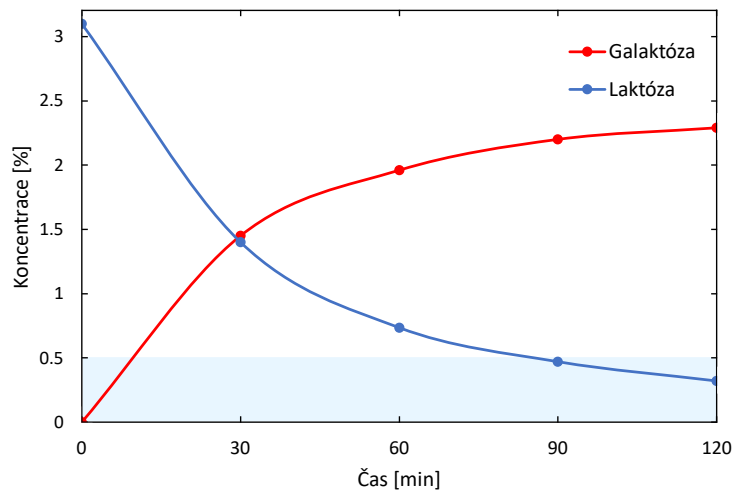
Pro vyhodnocení naměřených dat pomocí HPLC byl použit program Agilent OpenLAB Data Analysis, pomocí kterého byly zjištěny retenční časy, plochy a výšky píků analytů. Obsah glukózy a galaktózy byl stanoven pomocí kalibrační přímky získané analýzou standardu.



Obrázek 10 – Kalibrační křivky pro stanovení glukózy, galaktózy, laktózy a kyseliny mléčné

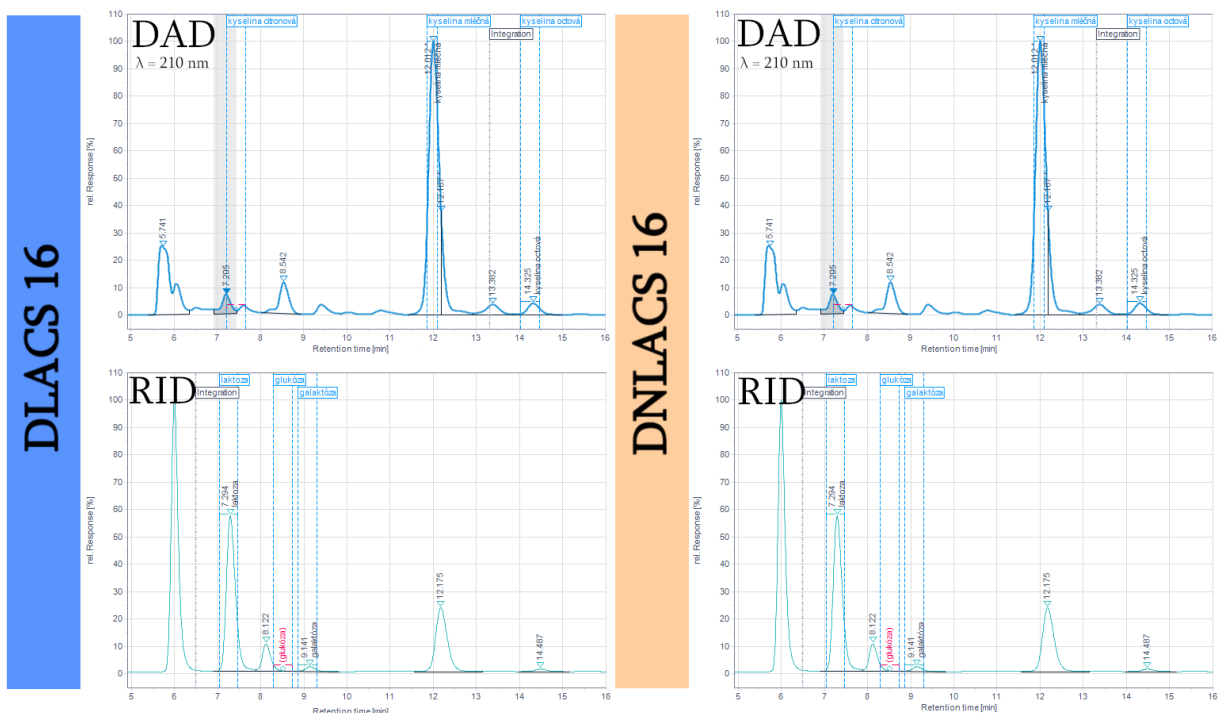
Pro vyhodnocení aktivity enzymu laktázy a určení doby potřebné pro rozštěpení laktózy pod hodnotu 0,5 % byla vytvořena křivka závislosti koncentrace laktózy a galaktózy na čase od

přidání enzymu laktázy. Galaktóza byla zvolena jako vhodnější ukazatel, protože její hodnoty vykazovaly menší odchylky. na základě výsledného grafu bylo určeno, že čas dostatečný pro rozštěpení laktózy je 90 minut.



Obrázek 11 – Křivka účinnosti štěpení laktózy laktázou

Každý vzorek sýru byl měřen ve dvou opakováních souběžně pomocí DAD a RID detektoru. Získaný signál je znázorněn na obrázku číslo 12. Pro kvantitativní analýzu byly jednotlivé píky zintegrovány a s pomocí kalibrační křivky vypočítány procentuální zastoupení jednotlivých analytů. v tabulce 9 je vždy uvedena průměrná hodnota provedených měření.



Obrázek 12 – Záznam chromatogramu pro laktózový a bezlaktózový sýr s DAD a RID detektorem

Tabulka 9 – Výsledky kapalinové chromatografie vzorků vyrobených sýrů

Typ sýru	Kód sýru	Laktóza [%]	Glukóza [%]	Galaktóza [%]	Kyselina octová [%]	Kyselina mléčná [%]
sýry laktóзовé nefortifikované	DLACS_16	1,695	-	-	-	1,130
	DLACS_17	1,755	-	0,050	0,080	1,155
	DLACS_18	2,640	-	-	0,070	0,440
	DLACS_19	1,685	-	0,050	0,075	1,185
	DLACS_20	1,715	-	0,050	0,080	0,940
	DLACS_21	1,370	-	0,040	-	0,770
	DLACS_22	1,285	-	0,035	0,050	0,825
	průměr	1,810	-	0,048	0,076	0,921
sýry laktóзовé fortifikované	DILACS_20_16	1,250	-	0,055	0,05	0,730
	DILACS_20_17	1,430	-	0,030	-	0,670
	DILACS_20_18	1,470	-	-	-	0,600
	DILACS_20_19	1,295	-	0,060	-	0,905
	DBLACS_5_20	0,670	0,020	0,325	0,165	1,270
	DBLACS_5_21	1,590	-	0,125	0,085	0,885
	DBLACS_3_22	1,765	-	0,095	0,075	1,005
	DBILACS_20_3_22	1,960	-	0,095	0,070	1,065
průměr	1,458	-	0,140	0,099	0,955	
sýry bezlaktóзовé nefortifikované	DNLACS_16	0,045	0,440	1,520	0,075	1,150
	DNLACS_17	0,060	0,570	1,420	-	1,080
	DNLACS_18	0,035	0,770	1,780	0,070	0,985
	DNLACS_19	0,090	0,280	1,140	0,070	0,895
	DNLACS_20	0,085	0,220	1,225	0,130	1,055
	DNLACS_21	0,050	0,670	1,335	0,040	0,630
	průměr	0,061	0,492	1,403	0,077	0,966
sýry bezlaktóзовé fortifikované	DINLACS_20_16	0,055	0,680	1,470	-	0,815
	DINLACS_20_17	0,075	0,690	1,550	-	0,860
	DINLACS_20_18	0,050	0,970	1,425	-	0,450
	DINLACS_20_19	0,075	0,50	1,320	0,055	0,830
	DBNLACS_5_20	0,085	-	1,195	0,150	1,345
	DBNLACS_5_21	0,110	0,655	1,605	0,140	0,940
	DBNLACS_3_22	0,120	0,345	1,580	0,080	1,205
	DBINLACS_20_3_22	0,130	0,710	1,660	0,080	0,945
průměr	0,095	0,636	1,464	0,101	0,953	

Laktóza

Pro ověření hypotézy této práce, a to že koncentrace laktózy v bezlaktózových sýrech je menší než koncentrace v laktózových sýrech, byla statisticky vyhodnocována její koncentrace a koncentrace jejích strukturních složek mezi laktózovými a bezlaktózovými sýry. Před samotným T-testem byla provedena základní popisná statistika jednotlivých skupin a ověřena normalita dat a jejich rozdílů v rámci párů.

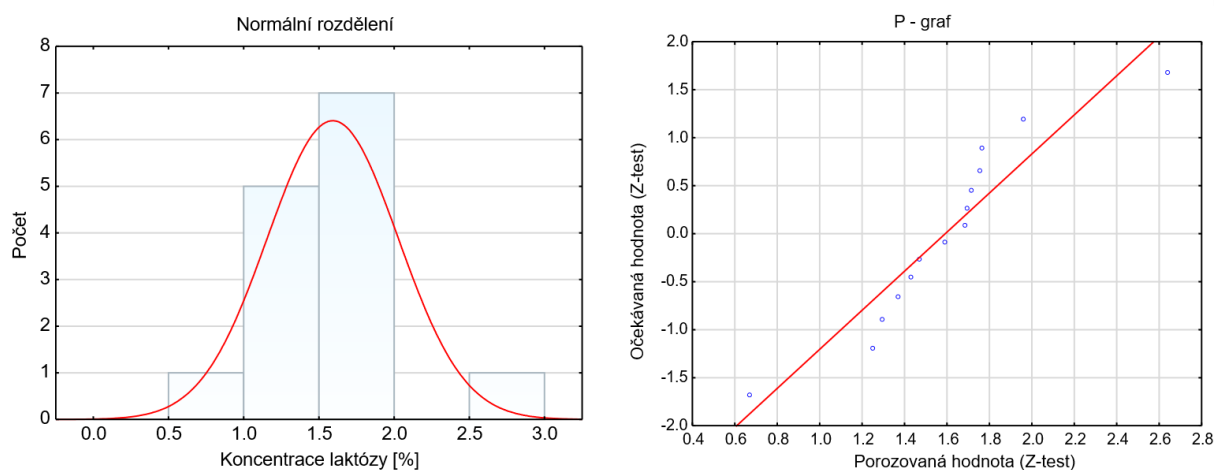
Tabulka 10 – Koncentrace laktózy a účinnost laktázy

	Kód sýrů	Koncentrace laktózy		Účinnost
		Laktózový sýr [%]	Bezlaktózový sýr [%]	štěpení laktózy [%]
NEFORTIFIKOVANÉ	D(N)LACS_16	1,695	0,045	97,3
	D(N)LACS_17	1,755	0,060	96,6
	D(N)LACS_18	2,640^{*a}	0,035	98,7
	D(N)LACS_19	1,685	0,090	94,7
	D(N)LACS_20	1,715	0,085	95,0
	D(N)LACS_21	1,370	0,050	96,4
FORTIFIKOVANÉ	D(N)ILACS_20_16	1,250	0,055	95,6
	D(N)ILACS_20_17	1,430	0,075	94,8
	D(N)ILACS_20_18	1,470	0,050	96,6
	D(N)ILACS_20_19	1,295	0,075	94,2
	D(N)BLACS_5_20	0,670^{*a}	0,085	87,3
	D(N)BLACS_5_21	1,590	0,110	93,1
	D(N)BLACS_3_22	1,765	0,120	93,2
	D(N)BILACS_20_3_22	1,960	0,130	93,4
	*průměr+SD	1,592±0.436	0,076±0.029	

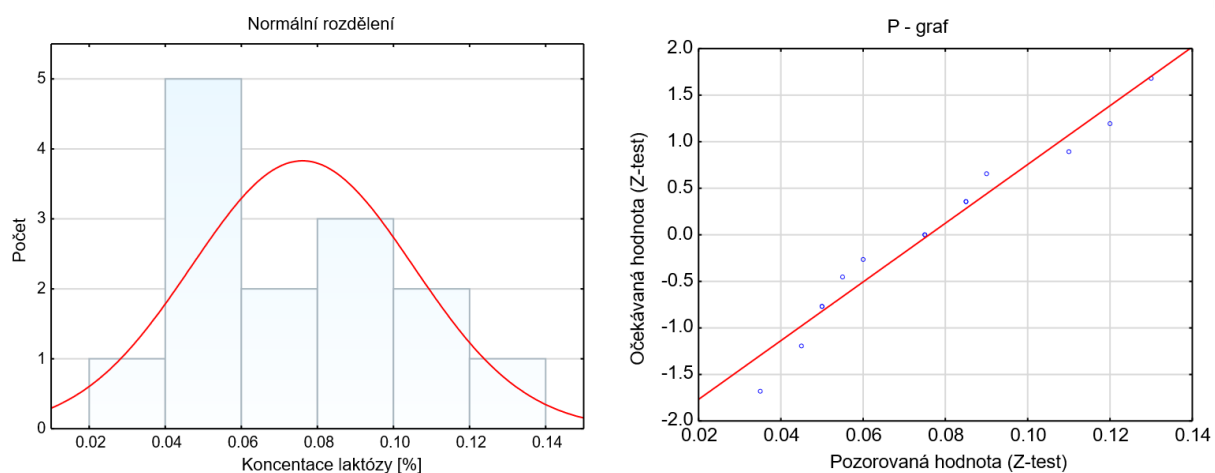
*a) výsledek vybočuje z průměrné hodnoty, ostatní sýry ze stejné výroby ale tuto anomálii nevykazují

Pro ověření normality dat byly vyneseny histogramy na obrázku 11 se znázorněním normálního (Gaussova) rozdělení a z důvodu malého množství dat také P – graf znázorňující normalizovaná data a jejich očekávané rozdělení pomocí Z-testu. Z těchto grafů je vidět, že data mají normální rozdělení, a je tedy možné provést párový T-test. Přestože podmínkou T - testu je normalita rozdílů dat, koncentrace laktózy u bezlaktózových sýrů je natolik malá, že jako kritérium je ekvivalentní rozdělení koncentrace laktózy u laktózových sýrů.

Laktóзовé sýry



Bezlaktóзовé sýry



Obrázek 13 – Histogramy a Z-testy normality dat – koncentrace laktózy

Při pohledu na rozložení dat jsou patrné dvě odlehlé hodnoty koncentrace laktózy, a to u sýru DLACS_18 (2,64 %) a u sýru DBLACS_5_20 (0,67). v prvním případě je koncentrace laktózy velmi vysoká v porovnání nejen s ostatními laktóзовými sýry, ale hlavně s fortifikovanou verzí laktóзовého sýra ze stejné výroby. Z tohoto důvodu lze očekávat, že se jedná o chybný údaj. u sýru DBLACS_5_20 byla naopak koncentrace laktózy velmi nízká a také neodpovídá nefortifikovanému sýru ze stejné výroby. v tomto případě může být chyba způsobena nedopatřením a kontaminací mléka laktázou.

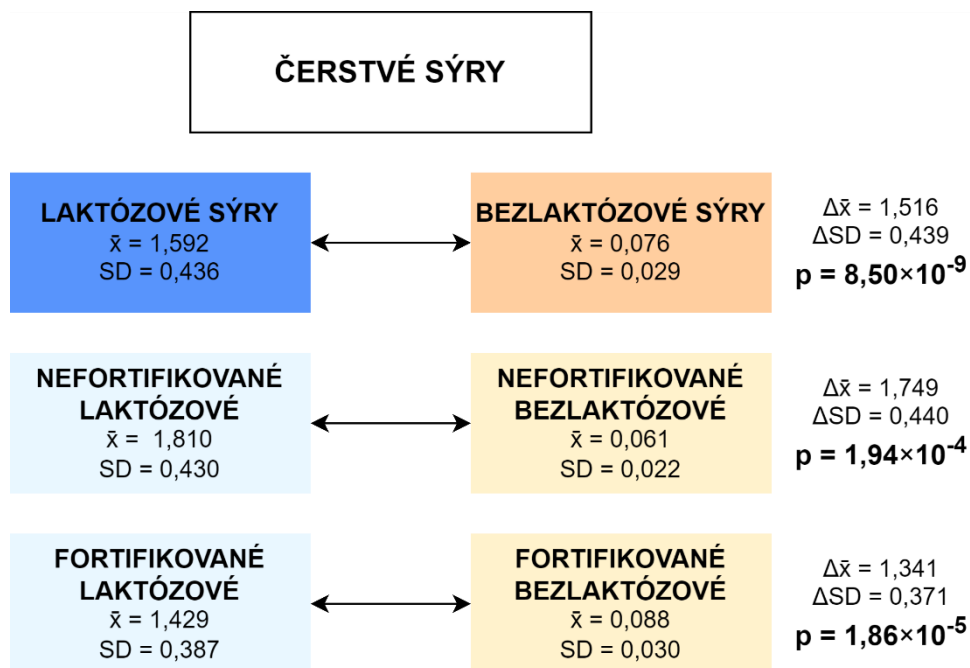
Přestože jsou tyto hodnoty velmi vzdálené od průměrné hodnoty, nejsme schopni s jistotou říct, zda jsou chybné, nebo ne. Proto byly také zahrnuty do statistického vyhodnocení pomocí párového T-testu. Je vhodné poznamenat, že jejich případné nezahrnutí by nemělo na výsledek T-testu vliv.

V tabulkách 9 a 10 je jasně viditelná přeměna laktózy v bezlaktóзовých sýrech na monosacharidy glukózu a galaktózu. Při porovnání účinnosti této přeměny byly v tabulce 10 párově porovnávány laktóзовé a bezlaktóзовé verze sýrů. Průměrná účinnost přeměny laktózy

byla přes 95 %, což je velmi uspokojivá hodnota. Nárůst monosacharidů způsobil také větší sladkost bezlaktózových sýrů.

Pro vyhodnocení obsahu cukrů u jednotlivých výrob byl použit párový T test koncentrace laktózy. Nejprve byl proveden mezi všemi laktózovými a bezlaktózovými sýry, následně i samostatně pro fortifikované a nefortifikované varianty. Jeho výsledky jsou zobrazeny na obrázku 13.

Hladina významnosti α byla stanovena jako 0,01. Jedná se o pravděpodobnost zamítnutí nulové hypotézy v případě, že je pravdivá. Hodnota $\alpha = 0,01$ znamená, že můžeme s jistotou na 99 % vyvrátit nebo potvrdit zkoumanou hypotézu.



Obrázek 14 – Vyhodnocení T-testu pro koncentraci laktózy

Nulová hypotéza (H0): Neexistuje statisticky významný rozdíl v průměrných koncentracích laktózy mezi sýry s laktózou a bez laktózy.

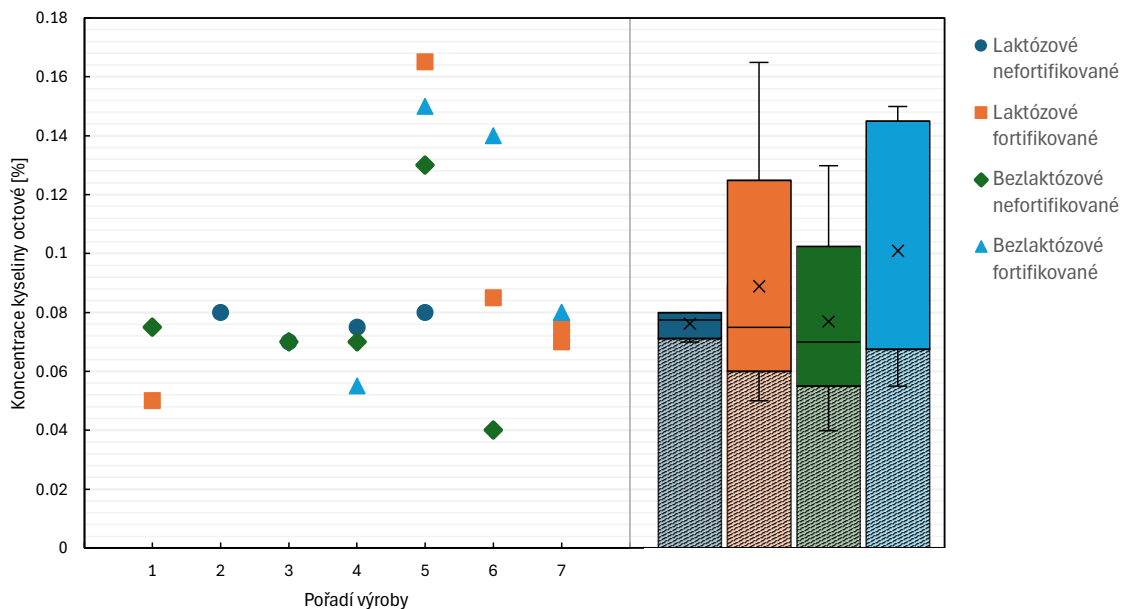
Alternativní hypotéza (H1): Existuje statisticky významný rozdíl v průměrných koncentracích laktózy mezi laktózovými a bezlaktózovými sýry.

Získaná hodnota statistické signifikance $p < 0,01$, a proto zamítáme nulovou hypotézu. na hladině významnosti 99 % je statisticky významný rozdíl v koncentraci laktózy mezi laktózovou a bezlaktózovou verzí sýra u všech porovnávaných skupin.

Samostatné vyhodnocení koncentrace jednotlivých monosacharidů není vhodné z důvodu jejich další přeměny na kyselinu mléčnou, a tím jejich nižší než očekávané koncentrace. Její růst ale trendem odpovídá poklesu laktózy při porovnání laktózových a bezlaktózových variant sýrů.

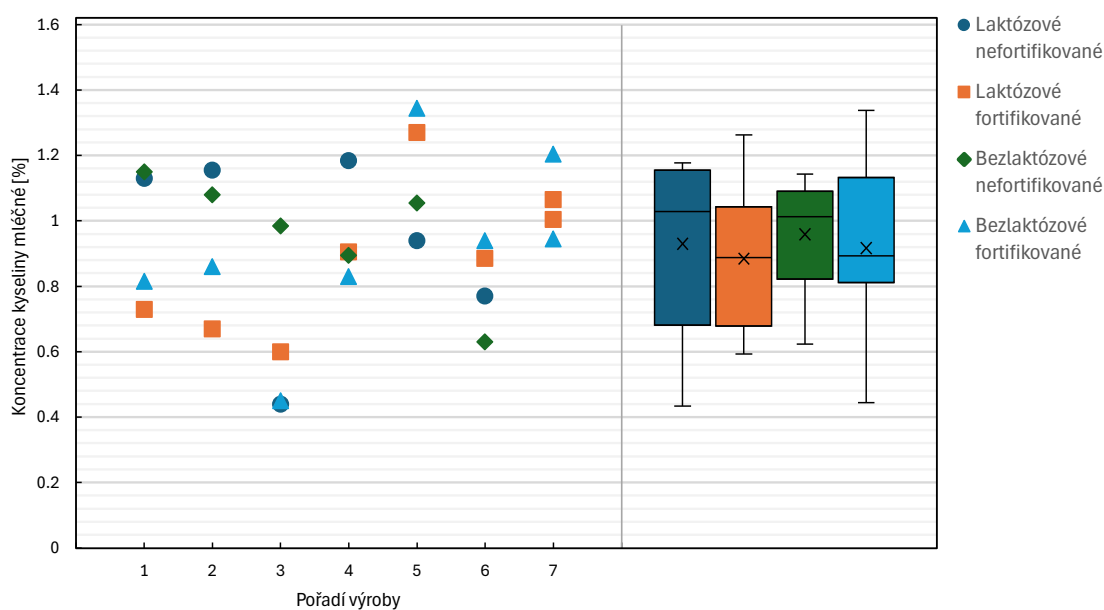
Organické kyseliny

Naměřené hodnoty koncentrace kyseliny octové a mléčné byly vyneseny do grafů v závislosti na pořadí výroby sýrů a také jejich typu (fortifikované/nefortifikované a laktózosvé/bezlaktózosvé).



Obrázek 15 – Deskriptivní statistika koncentrace kyseliny octové

Koncentrace kyseliny octové byla průměrně $0,085 \pm 0,034$ %. u devíti výrob byla její koncentrace pod mezí stanovitelnosti, což je znázorněno šrafováním v krabicovém grafu. Jak je z grafu patrné, všechny kategorie byly vzájemně porovnatelné a žádná nevykazovala výrazné odchylky od průměru.



Obrázek 16 – Deskriptivní statistika koncentrace kyseliny mléčné

Koncentrace kyseliny mléčné byla změřena u všech vzorků a její průměrná hodnota byla $0,923 \pm 0,230$ %. Ani zde nebyly pozorovány významné odchylky od průměru pro jednotlivé skupiny sýrů. v porovnání s vyzrálými sýry je její koncentrace nižší, protože vzniká během fermentačního procesu, a ten je u čerstvých sýrů krátký. Pro srovnání, například u sýru čedar je koncentrace kyseliny mléčné až 5 %.

Koncentrace kyseliny citronové se nepodařila u většiny vzorků sýrů naměřit a můžeme tedy předpokládat, že byla pod mezí stanovitelnosti. Z naměřených dat můžeme tedy pouze vyhodnotit, že její koncentrace je u sýrů menší než 0,03 %.

6 Diskuze

Čerstvé sýry jsou velmi oblíbeným mléčným výrobkem, který je konzumován na celém světě. Obsahují ale přirozeně vysoké množství laktózy, která je pro velkou část populace nestravitelná (Dekker et al., 2019). Přestože ve střední Evropě je schopnost trávit laktózu běžná i v dospělém věku, v jiných částech světa je laktózová intolerace velmi častá. Typickým příkladem může být jihovýchodní Asie, kde až 90 % dospělých vykazuje intoleranci na laktózu (Goh et al., 2018; Nguyen Bao et al., 2018). Naproti tomu v severní Evropě dokáže většina populace laktózu trávit. v České republice trpí laktózovou intolerancí pouze mezi 6–12 % populace (Hubáček et al., 2017).

V kontextu globální konzumace sýrů trpí určitou formou laktózové intolerance až 70% populace, a tak se do popředí dostávají bezlaktózové varianty sýrů, které jsou přijatelné pro širokou populaci. Nízké koncentrace laktózy lze u sýrů dosáhnout přirozeně během procesu zrání (6 měsíců +) nebo přidáním enzymu laktázy během výroby. Celosvětová konzumace bezlaktózových sýrů se každoročně zvyšuje průměrně o 8,5 %, což je více než celkový růst trhu se sýry (Shahbandeh, 2024). Sýry vyráběné v této práci jsou součástí projektu Vývoj zdravotně prospěšných výrobků na bázi čerstvých sýrů adaptovaných pro trh ve Vietnamu a v České republice. Z toho důvodu byly sýry vyráběny jak v klasické laktózové, tak i v bezlaktózové verzi přidáním enzymu laktázy. Motivací pro tuto práci byla prevalence laktózové intolerance ve vietnamské populaci, která má v České republice silné zastoupení.

Hlavním cílem práce bylo potvrzení účinnosti enzymu laktázy přidávaného do mléka při výrobě bezlaktózového sýru, a to v koncentraci 1g laktázy na 1 L mléka s inkubační dobou 90 minut. Toto množství odpovídá studii Pulinas et al. 2017 (1,1 g/L). na začátku práce byla stanovena hypotéza, že sýry s přídavkem laktázy (bezlaktózové) obsahují menší množství laktózy než čerstvé sýry připravené klasickou metodou výroby bez přidání enzymu laktázy do mléka.

Pro statistické vyhodnocení rozdílu koncentrace sacharidů v laktózových a bezlaktózových sýrech byl využit párový T test s hodnotou významnosti $\alpha = 0,01$ a normalita rozdělení dat byla ověřena pomocí histogramu a z-testu. Pomocí této statistické metody s velmi striktně nastavenou hodnotou statistické signifikance můžeme naši hypotézu potvrdit nebo vyvrátit s jistotou na 99 %. Vypočítaná p – hodnota (signifikace) byla při porovnávání všech vyrobených laktózových a bezlaktózových sýrů velmi nízká, přesně 8×10^{-8} . Díky tomu můžeme říci, že mezi laktózovými a bezlaktózovými sýry je statisticky významný rozdíl. Průměrná hodnota obsahu laktózy v laktózových sýrech byla 1,6 %, v bezlaktózových sýrech 0,08 %. Tato zjištění byla v souladu s literaturou (Ahmed et al., 2023). Závěr statistického vyhodnocení potvrzuje, že přidání laktázy vede prokazatelně ke snížení obsahu laktózy v bezlaktózových sýrech, které jsou díky velmi nízké koncentraci laktózy vhodné i pro konzumenty s laktózovou intolerancí.

Z pohledu cukrů je také vhodné zmínit rozdíl mezi koncentrací glukózy a galaktózy u bezlaktózových sýrů. Přestože během štěpení laktózy vzniká glukóza a galaktóza v poměru 1:1, glukóza je bakteriemi mléčného kvašení preferována, a pokud se nachází v mléce, je štěpena přednostně na kyselinu mléčnou. Pokud štěpíme laktózu pomocí enzymu laktázy a následně přidáme bakterie mléčného kvašení, dojde rovnou k přednostnímu spotřebování glukózy a změně poměru mezi glukózou a galaktózou. Při vyhodnocování efektivity enzymu

laktázy je proto vhodnější sledovat koncentraci galaktózy jako je zobrazeno na obrázku č. 11 (Alm, 1982). Celkový úbytek laktózy v analyzovaných sýrech dle analýzy odpovídal trendem růstu koncentrace monosacharidů s přihlédnutím k jejich spotřebovávání v ostatních výše popsáných procesech.

V případě bezlaktózových sýrů je také vhodné zmínit sensorické změny v důsledku štěpení laktózy na její strukturní podjednotky. Nejpozorovanější změnou udávanou v literatuře je změna sladkosti. Štěpení laktózy o relativní sladivost 16-20 na glukózu a galaktózu o relativní sladivost 80 a 70 vede ke zdatelně sladší chuti sýrů (Cincotta et al., 2021). Tyto závěry jsou potvrzeny v další práci zpracovávané v rámci tohoto projektu zaměřené na sensorické vlastnosti vyrobených sýrů.

Sýry vyráběné z mléka mají nevhodný poměr nasycených a nenasycených mastných kyselin, proto je konzumace těchto tučných typů sýrů ve vyváženém jídelníčku doporučována pouze v omezeném množství (Lindmark Månsson, 2008). Jednou z možností zlepšení nutričních vlastností čerstvých sýrů je nahrazení části mléčného tuku rostlinnými oleji o vhodnějším poměru mastných kyselin. Tento proces označujeme jako fortifikaci. Mezi vhodné oleje pro fortifikaci řadíme například řepkový, arašídový nebo sezamový (Picciotti et al., 2022). Některé práce se dokonce zaměřovaly na přidávání rybího oleje (Ye et al., 2009). Stejně tak můžeme zvýšit množství proteinů například přidáním mandlového proteinu nebo mandlové moučky (Gamlath et al., 2023). Úpravy nutričních hodnot sýrů přísadkami sekundárních ingrediencí ale mohou mít i negativní dopad na sensorické a technologické vlastnosti sýra. Taková změna je spotřebitelem špatně přijímána, k čemuž došlo například při přísadce rybího oleje, jako je uvedeno ve výše zmíněné studii. Je proto nutné zvolit jak vhodnou ingredienci, tak její množství, aby změny sensorických a technologických vlastností sýra byly pro spotřebitele přijatelné. V ideálním případě může fortifikace vést dokonce ke zlepšení těchto parametrů.

Dalšími sledovanými parametry v této práci bylo sledování koncentrace organických kyselin, a to kyseliny citronové, kyseliny mléčné a kyseliny octové. Přítomnost a koncentrace organických kyselin hraje zásadní roli v sensorických vlastnostech a je důležitá i z pohledu konzervace sýrů. Podle provedené analýzy byla koncentrace kyseliny citronové v námi vyrobených sýrech pod detekčním limitem <0,03 %. To by mohlo naznačovat minimální roli kyseliny citronové v chuťovém profilu čerstvých sýrů ve srovnání s tradičnějšími druhy sýrů, kde se je kyselina citronová používána jako regulátor pH nebo zvýrazňovač chuti. Její koncentrace v námi vyrobených sýrech je tak dána výchozím složením mléka, které dle literatury obsahuje průměrně $0,133 \pm 0,02$ % kyseliny mléčné (Yusa et al., 1969).

V případě kyseliny octové bylo celkem 9 sýrů pod mezí stanovitelnosti, a proto u nich není její koncentrace uvedena. Při statistickém vyhodnocení změřených sýrů bez započítání nulových hodnot získáme průměrnou koncentraci kyseliny octové 0,085 %, což odpovídá práci Mullin a Emmons (0,0825 %). Kyselina octová významně přispívá k chuťovému profilu čerstvých sýrů. Její koncentrace v sýrech spolu s těkavými mastnými kyselinami produkovanými během fermentace má velký vliv na chuť čerstvých sýrů (Urbach, 1995). Kyselina octová vzniká v mléce jako produkt mikrobiálního metabolismu a její proměnlivá přítomnost by mohla souviset s počátečním mikrobiálním zatížením mléka.

Kyselina mléčná vykazovala dle předpokladu nejvyšší koncentraci mezi měřenými organickými kyselinami, a to v průměru $0,92 \pm 0,23$ %. Tato koncentrace odpovídá hodnotám

uvedeným v literatuře, $1,18 \pm 0,12$ % (Mullin et Emmons, 1997) nebo $1,29 \pm 0,10$ % (Guneser, 2022) a odráží rozsah fermentace. Vzhledem k významu kyseliny mléčné na texturu a chuť čerstvých sýrů je její stabilní hodnota vhodným ukazatelem úspěšnosti fermentace, a tím i konzistence výrobku.

Při analytickém vyhodnocení nebyla zjištěna žádná závislost mezi koncentrací organických kyselin a fortifikací sýrů ani mezi koncentrací organických kyselin a přidavkem enzymu laktázy. To naznačuje, že hlavní faktory ovlivňující koncentraci kyselin jsou pravděpodobně dány pouze výchozím složením mléka a procesem výroby sýrů, nikoliv procesem fortifikace. V případě organických kyselin se nepodařilo prokázat závislost mezi jejich koncentrací a fortifikací sýrů. Z tohoto důvodu jsou v této práci uvedeny pouze jejich základní popisné statistické údaje.

Přítomnost a koncentrace organických kyselin jako jsou kyselina citronová, octová a mléčná, hraje zásadní roli v sensorických vlastnostech a je důležitá i pro konzervaci sýrů. Pro další studie je důležitým závěrem, že jejich obsah není výrazně ovlivněn provedenými procesy fortifikace. Konzument tak nebude vnímat výrazný rozdíl v chuti ovlivněný těmito kyselinami. Další zkoumání interakcí mezi fortifikačními složkami a mikrobiálními a enzymatickými procesy by mohlo pomoci při navrhování vhodných složek pro fortifikaci sýrů, které by byly nutričně vhodné a také sensoricky přijatelné pro spotřebitele. Důležitý je ale také technologický aspekt výroby, kdy fortifikace musí být slučitelná s průmyslovou výrobou.

7 Závěr

Tato diplomová práce se věnovala analýze fortifikovaných čerstvých sýrů z kravského mléka v laktózosé a bezlaktózosé verzi se zaměřením na obsah sacharidů a organických kyselin. V teoretické části jsou podrobně popsány jednotlivé složky mléka, proces výroby čerstvého sýra a základy instrumentálních metod vhodných pro analýzu těchto mléčných výrobků.

V experimentální části byly analyzovány sýry připravené v rámci projektu Vývoj zdravotně prospěšných výrobků na bázi čerstvých sýrů adaptovaných pro trh ve Vietnamu a v České republice. Pro výrobu bylo využito syrové mléko z farmy Struhy. Obsah jednotlivých složek mléka byl stanoven pomocí Milkoscanu FT 120. Celkem bylo během 7 výrob připraveno 29 sýrů, z čehož 13 bylo nefortifikovaných a 16 bylo fortifikovaných rostlinnými oleji nebo proteiny. Všechny sýry byly připravovány v páru jako laktózosé a bezlaktózosé verze.

Tyto sýry byly analyzovány pomocí metody HPLC, obsah sacharidů byl detekován za využití refraktometrického detektoru a obsah organických kyselin byl detekován detektorem diodového pole. Naměřená data byla vyhodnocena pomocí programů OpenLab a Statistica 14. Pro analýzu obsahu laktózy byl použit párový T-test s hladinou významnosti 0,01. V případě organických kyselin byla provedena pouze deskriptivní statistika.

Z provedených analýz bylo potvrzeno, že obsah laktózy u bezlaktózosých sýrů, ke kterým byl během výroby přidán enzym laktáza, byl statisticky významně nižší než u sýrů laktózosých. Průměrný obsah laktózy u laktózosých sýrů byl $1,592 \pm 0,436$ % a u bezlaktózosých $0,076 \pm 0,029$ %. Mezi fortifikovanými a nefortifikovanými sýry nebyl pozorován rozdíl. Koncentrace laktózy u většiny bezlaktózosých sýrů byla nízká, a jsou proto vhodné ke konzumaci i pro lidi s laktózosou intolerancí. Nárůst koncentrace monosacharidů glukózy a galaktózy u bezlaktózosých sýrů odpovídal množství rozštěpené laktózy.

Zjištěné koncentrace organických kyselin octové a mléčné nebyly závislé na fortifikaci ani přidavku enzymu laktázy a odpovídaly údajům v literatuře. Kyselina octová byla zastoupena průměrně z $0,085 \pm 0,034$ % a kyselina mléčná $0,923 \pm 0,230$ %. Koncentrace kyseliny citrónové byla u většiny sýrů pod mezí stanovitelnosti, a to $<0,03$ %.

Výsledky těchto analýz ukazují, že přidané množství enzymu laktázy v připravených bezlaktózosých sýrech bylo dostatečné a efektivně vedlo ke snížení obsahu laktózy. Takto připravené sýry jsou vhodné i pro konzumenty s laktózosou intolerancí. Další výzkum vyrobených sýrů se v rámci zmíněného projektu zaměřuje na stanovení obsahu mastných kyselin v kontextu vlivu fortifikace a přidání laktázy na sensorické vlastnosti sýrů. Výsledky těchto studií budou zahrnuty v dalších pracích souvisejících s tímto projektem.

8 Literatura

- Ahmed, M. E., Hammam, A. R. A., Ali, A. E., Alsaleem, K. A., Elfaruk, M. S., Kamel, D. G., Moneeb, A. H. M. 2023. Measurement of carbohydrates and organic acids in varieties of cheese using high-performance liquid chromatography. *Food Science & Nutrition*. 11 (5). 2081–2085. doi: 10.1002/fsn3.2438.
- Alm, L. 1982. Effect of Fermentation on Lactose, Glucose, and Galactose Content in Milk and Suitability of Fermented Milk Products for Lactose Intolerant Individuals. *Journal of Dairy Science*. 65 (3). 346–352. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(82)82198-X.
- Alzoubi, T., Martin, G. P., Barlow, D. J., Royall, P. G. 2021. Stability of α -lactose monohydrate: The discovery of dehydration triggered solid-state epimerization. *International Journal of Pharmaceutics*. 604 . 120715. doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120715.
- Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L., Cogan, T. M. 2001. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*. 11 (4–7). 259–274. doi: 10.1016/S0958-6946(01)00056-5.
- Bylund, G. 2015. *Dairy processing handbook*. 3rd ed., revision 1. Lund. Tetra Pak Processing Systems AB. ISBN: 978-91-7611-132-1.
- Cashman, K. D. 2011. Milk Salts | Trace Elements, Nutritional Significance. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. s. 933–940. Elsevier. ISBN: 978-0-12-374407-4.
- Cincotta, F., Conurso, C., Tripodi, G., Merlino, M., Prestia, O., Stanton, C., Verzera, A. 2021. Comparison of lactose free and traditional mozzarella cheese during shelf-life by aroma compounds and sensory analysis. *LWT*. 140 . 110845. doi: 10.1016/j.lwt.2020.110845.
- Colthup, N. B., Daly, L. H., Wiberley, S. E. 1990. *Introduction to infrared and Raman spectroscopy*. 3rd ed. Boston. Academic Press. ISBN: 978-0-12-182554-6.
- Costa, A., Lopez-Villalobos, N., Sneddon, N. W., Shalloo, L., Franzoi, M., De Marchi, M., Penasa, M. 2019. Invited review: Milk lactose—Current status and future challenges in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 102 (7). 5883–5898. doi: 10.3168/jds.2018-15955.
- Davoodi, S. H., Shahbazi, R., Esmaeili, S., Sohrabvandi, S., Mortazavian, A., Jazayeri, S., Taslimi, A. 2016. *Health-Related Aspects of Milk Proteins*. .
- Dekker, P., Koenders, D., Bruins, M. 2019. Lactose-Free Dairy Products: Market Developments, Production, Nutrition and Health Benefits. *Nutrients*. 11 (3). 551. doi: 10.3390/nu11030551.
- Deng, Y., Misselwitz, B., Dai, N., Fox, M. 2015. Lactose Intolerance in Adults: Biological Mechanism and Dietary Management. *Nutrients*. 7 (9). 8020–8035. doi: 10.3390/nu7095380.
- Fanali, S., Haddad, P. R., Lloyd, D., Poole, C. F., Schoenmakers, P. J. (Ed.) 2013. *Liquid chromatography. Fundamentals and instrumentation / [edited by] Salvatore Fanali, Paul R. Haddad, Colin F. Poole, Peter Schoenmakers, David Lloyd*. Amsterdam. Elsevier. p. 504. ISBN: 978-0-12-415807-8.
- Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H., O'Mahony, J. A. 2015. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Cham. Springer International Publishing. ISBN: 978-3-319-14891-5.

- Fox, Patrick F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., McSweeney, P. L. H. 2017. *Fundamentals of Cheese Science*. Boston, MA. Springer US. ISBN: 978-1-4899-7679-6.
- Gamlath, C. J., Lo, K. Y., Leong, T. S. H., Ashokkumar, M., Martin, G. J. O. 2023. Protein fortification of model cheese matrices using whey protein-enriched double emulsions. *Food Hydrocolloids*. 135 . 108209. doi: 10.1016/j.foodhyd.2022.108209.
- Goh, L., Mohd Said, R., Goh, K. 2018. Lactase deficiency and lactose intolerance in a multiracial Asian population in Malaysia. *JGH Open*. 2 (6). 307–310. doi: 10.1002/jgh3.12089.
- Guneser, O. 2022. Characterization of Quark-like probiotic cheese produced from a mixture of buffalo milk and cow milk. *Mljekarstvo*. 72 (3). 172–188. doi: 10.15567/mljekarstvo.2022.0306.
- Hubáček, J. A., Adámková, V., Šedová, L., Olišarová, V., Adámek, V., Tóthová, V. 2017. Frequency of adult type-associated lactase persistence LCT-13910C/T genotypes in the Czech/Slav and Czech Roma/Gypsy populations. *Genetics and Molecular Biology*. 40 (2). 450–452. doi: 10.1590/1678-4685-gmb-2016-0071.
- Chambers, D. H., Esteve, E., Retiveau, A. 2010. EFFECT OF MILK PASTEURIZATION ON FLAVOR PROPERTIES OF SEVEN COMMERCIALY AVAILABLE FRENCH CHEESE TYPES. *Journal of Sensory Studies*. 25 (4). 494–511. doi: 10.1111/j.1745-459X.2010.00282.x.
- Chauhan, D. D. A. P., Deepak, D., Chauhan, S. 2023. Cow Milk Oligosaccharides and Their Relevance to Infant Nutrition. In: *IECN 2023*. s. 19. MDPI.
- Choszcz, C., Held, C., Eder, C., Sadowski, G., Briesen, H. 2019. Measurement and Modeling of Lactose Solubility in Aqueous Electrolyte Solutions. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 58 (45). 20797–20805. doi: 10.1021/acs.iecr.9b04031.
- Kadlec, P., Melzoch, K., Voldřich, M. 2012. *Přehled tradičních potravinářských výrob: technologie potravin*. 1. vyd. Ostrava. Key Publishing. ISBN: 978-80-7418-145-0.
- Kanno, C., Kanehara, N., Shirafuji, K., Tanji, R., Imai, T. 1991. Binding form of vitamin B2 in bovine milk: Its concentration, distribution and binding linkage. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 37 (1). 15–27. doi: 10.3177/jnsv.37.15.
- Kanwar, J., Kanwar, R., Sun, X., Punj, V., Matta, H., Morley, S., Parratt, A., Puri, M., Sehgal, R. 2009. Molecular and Biotechnological Advances in Milk Proteins in Relation to Human Health. *Current Protein & Peptide Science*. 10 (4). 308–338. doi: 10.2174/138920309788922234.
- Lindmark Månsson, H. 2008. Fatty acids in bovine milk fat. *Food & Nutrition Research*. 52 (1). 1821. doi: 10.3402/fnr.v52i0.1821.
- Marth, E. H., Steele, J. L. (Ed.) 2001. *Applied dairy microbiology*. 2nd ed., rev.expanded. New York. M. Dekker. p. 744. ISBN: 978-0-8247-0536-7.
- Martini, M., Altomonte, I., Sodi, I., Vasylieva, Y., Salari, F. 2023. Sterol, tocopherol, and bioactive fatty acid differences between conventional, high-quality, and organic cow milk. *Journal of Dairy Science*. 106 (12). 8239–8248. doi: 10.3168/jds.2023-23378.
- Matthews, S. B., Waud, J. P., Roberts, A. G., Campbell, A. K. 2005. Systemic lactose intolerance: a new perspective on an old problem. *Postgraduate Medical Journal*. 81 (953). 167–173. doi: 10.1136/pgmj.2004.025551.

- McSweeney, P. 2017. *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. Boston, MA. Elsevier. ISBN: 978-0-12-417012-4.
- McSweeney, P. L. H., Ottogalli, G., Fox, P. F. 2017. Diversity and Classification of Cheese Varieties: An Overview. In: *Cheese*. s. 781–808. Elsevier. ISBN: 978-0-12-417012-4.
- Melo, J., Andrew, P. W., Faleiro, M. L. 2015. *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses. *Food Research International*. 67 . 75–90. doi: 10.1016/j.foodres.2014.10.031.
- Michlová, T., Hejtmánková, A., Pivec, V., Dragounová, H., Elich, O. 2012. Vliv pasterace a zmražení na obsah vitamínů v mléce. *Mlékařské Listy*. 135 (1). V–IX.
- Mullin, W. J., Emmons, D. B. 1997. Determination of organic acids and sugars in cheese, milk and whey by high performance liquid chromatography. *Food Research International*. 30 (2). 147–151. doi: 10.1016/S0963-9969(97)00026-4.
- Nguyen Bao, K., Sandjaja, S., Poh, B., Rojroongwasinkul, N., Huu, C., Sumedi, E., Aini, J., Senaprom, S., Deurenberg, P., Bragt, M., Khouw, I., on behalf of the SEANUTS Study Group 2018. The Consumption of Dairy and Its Association with Nutritional Status in the South East Asian Nutrition Surveys (SEANUTS). *Nutrients*. 10 (6). 759. doi: 10.3390/nu10060759.
- Nollet, L. M. L., Toldrá, F. 2010. *Handbook of dairy foods analysis*. Boca Raton (Fla.). CRC press. ISBN: 978-1-4200-4631-1.
- Nollet, L. M. L., Toldrá, F. (Ed.) 2013. *Food analysis by HPLC*. 3rd ed. Boca Raton, FL. CRC Press. p. 1062. ISBN: 978-1-4398-3084-0.
- Nováková, L., Douša, M. 2013. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 1. vyd. Praha [i.e. Hradec Králové], [Klatovy]. Lucie Nováková ; Michal Douša. ISBN: 978-80-260-4243-3.
- OECD, Food and Agriculture Organization of the United Nations 2023. *OECD-FAO Agricultural Outlook 2023-2032*. Chapter 6 - Meat. OECD. ISBN: 978-92-64-61933-3.
- Pereira, P. C. 2014. Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition*. 30 (6). 619–627. doi: 10.1016/j.nut.2013.10.011.
- Picciotti, U., Massaro, A., Galiano, A., Garganese, F. 2022. Cheese Fortification: Review and Possible Improvements. *Food Reviews International*. 38 (sup1). 474–500. doi: 10.1080/87559129.2021.1874411.
- Plozza, T., Craige Trenerry, V., Caridi, D. 2012. The simultaneous determination of vitamins A, E and β -carotene in bovine milk by high performance liquid chromatography–ion trap mass spectrometry (HPLC–MSn). *Food Chemistry*. 134 (1). 559–563. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.02.121.
- Pulinas, L., Spanu, C., Idda, I., Ibba, I., Nieddu, G., Viridis, S., Scarano, C., Piras, F., Spano, N., Sanna, G., De Santis, E. P. L. 2017. Production of farmstead lactose-free Pecorino di Osilo and ricotta cheeses from sheep's milk. *Italian Journal of Food Safety*. 6 (1). doi: 10.4081/ijfs.2017.6353.
- Sadiq, U., Gill, H., Chandrapala, J. 2021. Casein Micelles as an Emerging Delivery System for Bioactive Food Components. *Foods*. 10 (8). 1965. doi: 10.3390/foods10081965.
- Shahbandeh, M. 2024. , leden 10 Global cheese market - statistics & facts. . Statista. Získáno z <https://www.statista.com/topics/6586/global-cheese-market/#topicOverview>

- Schaafsma, G. 2008. Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. *International Dairy Journal*. 18 (5). 458–465. doi: 10.1016/j.idairyj.2007.11.013.
- Schwendel, B. H., Morel, P. C. H., Wester, T. J., Tavendale, M. H., Deadman, C., Fong, B., Shadbolt, N. M., Thatcher, A., Otter, D. E. 2015. Fatty acid profile differs between organic and conventionally produced cow milk independent of season or milking time. *Journal of Dairy Science*. 98 (3). 1411–1425. doi: 10.3168/jds.2014-8322.
- Syrůček, J., Lipovský, D., Sládek, M. 2023. Ročenka chov skotu v České republice. . ČSCHMS. Získáno z https://cmsch.sprinx.com/cmsch/media/Rocenky/Skot/48rocenka_chovu_skotu_2022.pdf
- Tunick, M. 2014. *The science of cheese*. Oxford. Oxford Univ. Press. p. 281. ISBN: 978-0-19-992230-7.
- Urashima, T., Taufik, E., Fukuda, K., Asakuma, S. 2013. Recent Advances in Studies on Milk Oligosaccharides of Cows and Other Domestic Farm Animals. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 77 (3). 455–466. doi: 10.1271/bbb.120810.
- Urbach, G. 1995. Contribution of lactic acid bacteria to flavour compound formation in dairy products. *International Dairy Journal*. 5 (8). 877–903. doi: 10.1016/0958-6946(95)00037-2.
- Villamil, R.-A., Guzmán, M.-P., Ojeda-Arredondo, M., Cortés, L. Y., Gil Archila, E., Giraldo, A., Mondragón, A.-I. 2021. Cheese fortification through the incorporation of UFA-rich sources: A review of recent (2010-2020) evidence. *Heliyon*. 7 (1). e05785. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e05785.
- Ye, A., Cui, J., Taneja, A., Zhu, X., Singh, H. 2009. Evaluation of processed cheese fortified with fish oil emulsion. *Food Research International*. 42 (8). 1093–1098. doi: 10.1016/j.foodres.2009.05.006.
- Yusa K., Ando K., Onodera Y. 1969. Citric acid content of cow's milk. *Nihon Chikusan Gakkaiho*. 40 (1). 32–36. doi: 10.2508/chikusan.40.32.
- Zeppa, G., Conterno, L., Gerbi, V. 2001. Determination of Organic Acids, Sugars, Diacetyl, and Acetoin in Cheese by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49 (6). 2722–2726. doi: 10.1021/jf0009403.

9 Seznam tabulek a obrázků

Obrázek 1 – Vzorec laktózy, vlevo galaktóza, vpravo glukóza	10
Obrázek 2 – Kasein.....	11
Obrázek 3 – Schematické znázornění triacylglycerolů	12
Obrázek 4 – Vliv pH při výrobě sýrů	14
Obrázek 5 – Přehled druhů sýrů	15
Obrázek 6 – Princip štěpení laktózy enzymem laktázou	16
Obrázek 7 – Obecný diagram výroby čerstvých sýrů.....	18
Obrázek 8 – Schéma metody FT IR a přístroj Milkoscan FT.....	21
Obrázek 9 – Schéma metody HPLC a přístroj Agilent 1260 Infinity 2.....	22
Obrázek 10 – Kalibrační křivky pro stanovení glukózy, galaktózy, laktózy a kys. mléčné.....	30
Obrázek 11 – Křivka účinnosti štěpení laktózy laktázou	31
Obrázek 12 – Záznam chromatogramu pro laktózový a bezlaktózový sýr s DAD a RID.....	31
Obrázek 13 – Histogramy a Z-testy normality dat – koncentrace laktózy	34
Obrázek 14 – Vyhodnocení T-testu pro koncentraci laktózy	35
Obrázek 15 – Deskriptivní statistika koncentrace kyseliny octové	36
Obrázek 16 – Deskriptivní statistika koncentrace kyseliny mléčné	36
Tabulka 1 – Průměrné složení kravského mléka	9
Tabulka 2 – Rozpustnost laktózy ve vodě	10
Tabulka 3 – Zastoupení mastných kyselin v kravském mléce	12
Tabulka 4 – Obsah vybraných solí a iontů v kravském mléce	13
Tabulka 5 – Přehled rostlinných olejů	17
Tabulka 6 - Přehled vyráběných sýrů	26
Tabulka 7 - Parametry přístroje Agilent a použité metody.....	29
Tabulka 8 – Složení vstupního mléka pro jednotlivé výroby sýrů z Milkoscanu FT 120.....	30
Tabulka 9 – Výsledky kapalinové chromatografie vzorků vyrobených sýrů	32
Tabulka 10 – Koncentrace laktózy a účinnost laktázy	33

10 Seznam použitých zkratek a symbolů

ALA	α -linolenová kyselina
CE	kapilární elektroforéza
DAD	detektor diodového pole
ELSD	odpařovací detektor rozptylu světla
FAPPZ	fakulta agrobiologie potravinových a přírodních zdrojů
FTIR	infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IČ	infračervené záření
LDL	lipoprotein s nízkou hustotou
MF	mobilní fáze
MK	mastné kyseliny
MUFA	mononenasyčené mastné kyseliny
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny
RID	refraktometrický detektor
SD	směrodatná odchylka
SF	stacionární fáze
TPS	tukuprostá sušina
UV-VIS	ultra fialové a viditelné spektrum