



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

CHARAKTERIZACE LIPIDŮ V ČERSTVÝCH SÝRECH

CHARACTERIZATION OF LIPIDS IN FRESH CHEESES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Veronika Vaňková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1702/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Veronika Vaňková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie
Vedoucí práce: **doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Charakterizace lipidů v čerstvých sýrech

Zadání bakalářské práce:

1. Zpracujte literární přehled dané problematiky:
 - čerstvé sýry – charakteristika, složení a vlastnosti, technologie výroby
 - mastné kyseliny v čerstvých sýrech
 - plynová chromatografie s plameno-ionizační detekcí (GC–FID) – princip, popis, instrumentace
2. Identifikujte a kvantifikujte volné a vázané mastné kyseliny ve vzorcích čerstvých sýrů.
3. Zjištěné výsledky porovnejte s dosud publikovanými znalostmi o složení mastných kyselin v čerstvých sýrech.

Termín odevzdání bakalářské práce: 30.7.2021:

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

Veronika Vaňková
student(ka)

doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá stanovením mastných kyselin ve vzorcích čerstvých sýrů bez/s přidavkem rostlinných extraktů (rýmovník, echinacea), vyrobených v laboratorních podmínkách na FCH VUT v Brně.

Teoretická část je věnována obecné charakterizaci lipidů a mastných kyselin (MK). V další části práce je rozebíraná charakterizace, rozdělení a způsoby výroby sýrů se zaměřením hlavně na sýry čerstvé, kterými se tato práce zabývá. Závěr teoretické části je věnován plynové chromatografii, jako metodě stanovení mastných kyselin ve vzorcích sýrů.

V experimentální části byl stanoven obsah mastných kyselin ve vzorcích čerstvých sýrů. Pro extrakci lipidů ze vzorků sýrů byla použita metoda dle ČSN EN ISO 1735, pro přípravu methylesterů mastných kyselin byla použita kyselá esterifikace s bortrifluoridem jako katalyzátorem. Vlastní stanovení methylesterů mastných kyselin bylo provedeno pomocí plynové chromatografie s plameno-ionizačním detektorem (GC-FID).

Celkově bylo ve všech vzorcích identifikováno 14 mastných kyselin ve formě vázané a volné. Ve všech vzorcích převažovaly kyseliny myristová, palmitová, stearová a olejová, což je v souladu se znalostmi o složení mléčného tuku.

Ze získaných výsledků vyplývá, že i přes nepatrné rozdíly v obsahu jednotlivých MK, přidavek extraktů nemá výrazný vliv na složení MK v čerstvých sýrech.

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the determination of fatty acids in samples of fresh cheeses with or without the addition of plant extracts (rhyme, echinacea), produced in laboratory conditions at FCH BUT.

The theoretical part of the thesis focuses on the general characterization of lipids and fatty acids. The next part discusses the characterization, division, and methods of cheese production, focusing mainly on fresh cheeses. The end of the work is devoted to gas chromatography as a method for the determination of fatty acids in cheese samples.

The experimental part aimed to determine the content of fatty acids in the samples of fresh cheese. For the extraction of lipids from cheese samples, the choice of the method was according to ČSN EN ISO 1735. Acid esterification with boron trifluoride as a catalyst was used for the preparation of fatty acid methyl esters. The determination of fatty acid methyl esters was performed by gas chromatography with a flame ionization detector (FID).

A total of 14 fatty acids were identified in all samples in a bound and free form. Myristic, palmitic, stearic and oleic acids predominated in all samples, which is in agreement with the knowledge of the composition of milk fat.

The obtained results show, that even due to slight differences in the content of individual fatty acids, the addition of extracts does not affect the composition of fatty acids in fresh cheeses.

KLÍČOVÁ SLOVA

čerstvé sýry, mastné kyseliny, GC-FID

KEY WORDS

fresh cheese, fatty acids, GC-FID

CITACE

VAŇKOVÁ, Veronika. *Charakterizace lipidů v čerstvých sýrech* [online]. Brno, 2021 [cit. 2021-07-30]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131315>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Eva Vítová.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

Podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala paní Ing. Evě Vítové, Ph.D. za možnosti vypracovat práci pod jejím vedením, za její cenné i odborné rady, ochotu, trpělivost a čas, který mi při psaní této práce věnovala. Dále bych chtěla poděkovat studentům, se kterými jsme v laboratoři spolupracovali, a hlavně také mé rodině a přátelům za jejich velkou podporu.

Obsah

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Lipidy.....	8
2.1.1	Rozdělení lipidů	8
2.2	Mastné kyseliny	8
2.2.1	Rozdělení mastných kyselin.....	8
2.3	Složení mléčného tuku.....	9
2.4	Sýry.....	9
2.4.1	Výroba sýrů (historie)	9
2.4.2	Výroba sýru (současnost)	10
2.4.3	Dělení sýrů	10
2.5	Čerstvé sýry	11
2.5.1	Výroba čerstvých sýrů.....	11
2.6	Plynová chromatografie.....	12
2.6.1	Princip plynové chromatografie	12
2.6.2	Instrumentace plynové chromatografie	13
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	16
3.1	Použité laboratorní vybavení a chemikálie.....	16
3.1.1	Laboratorní přístroje.....	16
3.1.2	Laboratorní pomůcky	16
3.1.3	Chemikálie pro extrakci lipidů	16
3.1.4	Chemikálie pro kyselou esterifikaci	16
3.1.5	Plyny pro plynový chromatograf.....	16
3.2	Analyzované vzorky	17
3.2.1	Výroba vzorků sýru	17
3.3	Použité metody a pracovní postupy	17
3.3.1	Extrakce lipidů ze vzorku sýru dle ČSN EN ISO 1735	17
3.3.2	Kyselá esterifikace s bortrifluoridem jako katalyzátorem (TAG).....	18
3.3.3	Příprava methanolického roztoku NaOH ($c = 0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$).....	18
3.3.4	Kyselá esterifikace s bortrifluoridem jako katalyzátorem (VMK).....	18
3.4	Podmínky stanovení methylesterů mastných kyselin	19
3.5	Identifikace a kvantifikace mastných kyselin.....	20
3.6	Statistické vyhodnocení výsledků	21
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	22

4.1	Identifikace a kvantifikace MK ve vzorcích.....	22
4.2	Porovnání složení MK v čerstvých sýrech	23
5	ZÁVĚR	26
6	POUŽITÁ LITERATURA	27
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	29

1 ÚVOD

Počátky sýrů a jejich výroba spadá do dávné historie. První psaný recept na výrobu pochází ze 14. století, ale zmínky o výrobě sýrů v České republice pochází už z 10. století. Poté, s rozvojem obchodu, se sýr stal velice žádanou potravinou. Veliký zlom v jeho výrobě nastal v 19. století, kdy byl vynalezen pasterační proces a výroba sýru se dočkala veliké obměny. Tou byl přechod z neošetřeného mléka používaného pro výrobu, které obsahovalo škodlivé mikroorganismy, na mléko pasterované.

Sýry jsou díky svému bohatému složení považovány za nejcennější potraviny. Obsahují plnohodnotné bílkoviny, vysoký obsah minerálních látek (vápník, fosfor), vitaminy a stopové prvky. V sýrech je obsažen vysoký obsah vápníku, který se nezbytný pro stavbu zubů a kostí.

Čerstvý sýr se řadí mezi sýry nezrající, ve výjimečných případech zrající několik dní. Nejlépe by měl být však konzumován ihned po výrobě. Díky jejich nepotřebě zrání je tento typ sýrů velice dobře stravitelný. Výroba čerstvých sýrů je jednoduchá, ukončuje se již prokysáním sýřeniny či vysolením.

Cílem této práce byla charakterizace lipidů ve vzorcích čerstvých sýrů připravených na FCH VUT v Brně. Lipidy ze vzorků byly v této práci extrahovány za pomoci metody dle ČSN EN ISO 1735, pro přípravu methylesterů mastných kyselin byla použita esterifikace, kde byl bortrifluorid jako katalyzátor. Mastné kyseliny byly stanoveny a charakterizovány pomocí plynového chromatografu s plameno-ionizačním detektorem.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Lipidy

Z chemického hlediska jsou lipidy estery vyšších mastných kyselin a alkoholů nebo jejich derivátů. Důležitou součástí lipidů jsou tedy mastné kyseliny (MK), které jsou založeny na struktuře glycerolu. Lipidy jsou látky ve vodě nerozpustné, ale dobře rozpustné jsou v organických rozpouštědlech (chloroform, ether, benzen, methanol aj.). Lipidy tvoří jednu z hlavních zásobáren energie. U živočichů ve formě podkožního tuku, u semen a plodů rostlin ve formě (rostlinných) olejů. Lipidy mají v organismech také funkci ochrannou (schopnost izolační), regulační (steroidní hormony a vitaminy A, D, E, K, aj.) a strukturní (součást biologických membrán) [1, 2, 3].

2.1.1 Rozdělení lipidů

Základní dělení lipidů je na jednoduché a složené. Mezi jednoduché lipidy patří acylglyceroly (estery glycerolu a mastných kyselin), sfingolipidy, vosky (estery vyšších mastných kyselin a vyšších jednosytných primárních alkoholů), isoprenoidy (steroidy, terpeny aj.) a volné mastné kyseliny (VMK), včetně jejich solí. Mezi složené lipidy, někdy také nazývané lipoidy, se řadí např. fosfolipidy, lipoproteiny a glykolipidy.

Někdy se lze také setkat s dělením lipidů na zmýdelnitelné a nezmýdelnitelné. Do zmýdelnitelných se řadí lipidy, ze kterých lze alkalickou hydrolýzou uvolnit soli MK, obsahují acylové zbytky vázané amidovou či esterovou vazbou. Do této skupiny patří především neutrální lipidy, triacylglyceroly (TAG) a polární lipidy na bázi glycerolu či sfingosinu. Mezi nezmýdelnitelné se řadí isoprenoidy [1, 2, 5].

2.2 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny (MK) jsou karboxylové kyseliny, obsahující dlouhé uhlovodíkové řetězce. Volně v přírodě jsou velice vzácně, častěji se vyskytují v esterifikované formě jako hlavní složka lipidů. Většina MK je tvořena sudým počtem uhlíkových atomů, protože jsou biosyntetizovány spojením C_2 jednotek. Rostliny a živočichové syntetizují tedy MK převážně se sudým počtem uhlíku, nasycené nebo nenasycené a téměř vždy nerozvětvené. V mikroorganismech se ale lze setkat i s mastnými kyselinami s nerozvětveným řetězcem s lichým počtem uhlíků. Identifikováno bylo více než 1 000 druhů. Jako vyšší MK se označují takové, které obsahují více než deset uhlíkových atomů [2, 4, 6].

2.2.1 Rozdělení mastných kyselin

Základní rozdělení MK je podle přítomnosti dvojných vazeb na nasycené a nenasycené. Se stupněm nenasycenosti se pak mění fyzikální vlastnosti MK [2,4].

2.2.1.1 Nasycené MK

U těchto MK se nevyskytuje dvojná ani trojná vazba. Jedná se o velice ohebné molekuly s velkým počtem konformací, což je zapříčiněno volnou rotací kolem všech vazeb C-C. Bod tání u těchto látek roste se zvyšující se molekulovou hmotností. Jsou chemicky velmi stálé a mění se teprve při dlouhodobém zahřevu nebo za vysokých teplot. Mezi nejrozšířenější zástupce patří kyselina máselná, kapronová, laurová, myristová, palmitová a stearová [2, 4]. Mezi potraviny s vysokým obsahem nasycených MK patří i sýry [7].

2.2.1.2 Nenasycené MK

V těchto MK se vyskytují dvojné vazby. V případě několikanásobně nenasycených MK obsahuje MK dvě a více dvojných vazeb. Vazba trojná se v MK vyskytuje velice zřídka. V přirozených nenasycených MK se vyskytují dvojné vazby vždy v cis konfiguraci. Se stupněm nenasycenosti se snižuje bod tání a tekutost lipidů se se stupněm nenasycenosti MK zvyšuje. Lidský organismus si nedokáže sám vytvořit nenasycené MK a musí je tedy přijímat v potravě. Zde patří mezi nejrozšířenější zástupce kyselina olejová, linolová a linolenová [2, 4].

2.3 Složení mléčného tuku

Mléko obsahuje cca 3,5–5 % hm. tuku. Základní složky mléčného tuku tvoří triacylglyceroly (cca 98 % hm.), diacylglyceroly, monoacylglyceroly, fosfolipidy, volné mastné kyseliny, steroly a jejich estery a v tučích rozpustné vitaminy [7, 8].

Mléčný tuk jako tuk živočišný má vysoký obsah cholesterolu, nasycených MK (myristová, palmitová a stearová) i nenasycených MK (kyselina olejová). Pro mléčný tuk je typický i vysoký podíl nízkomolekulárních MK (máselná, kapronová, kaprylová), které přispívají k charakteristické chuti a vůni mléčného tuku [7].

2.4 Sýry

Vzhledem k zaměření této práce je v následujících kapitolách stručně uvedena charakterizace, rozdělení a způsob výroby sýrů. Hlavní pozornost je pak věnována sýrům čerstvým, které byly analyzovány v experimentální části práce.

Sýry jsou svým složením považovány za nejcennější potraviny. Obsahují plnohodnotné bílkoviny, vysoký obsah minerálních látek jako je vápník a fosfor, vitaminy a stopové prvky. Obsah vápníku, který je nezbytný pro stavbu kostí a zubů, je v sýrech velice vysoký. Jeho vstřebávání ovlivňují aminokyseliny (AMK), vitamin D a kyselina mléčná. Sýry jsou také dobrým zdrojem vitaminu A či B₂ [9, 10]. Hlavními složkami sýru jsou bílkoviny a tuk. Ten obsahuje nasycené i nenasycené mastné kyseliny. Obsah tuku v sýru se stanovuje na základě suché váhy (neobsahující vodu) – obsah tuku v sušině [11].

2.4.1 Výroba sýrů (historie)

Není přesně známo kdy a kde byl poprvé sýr vyroben. První psaný recept pro výrobu sýru pochází z roku 1390 [9]. Pravděpodobně jako celá řada vynálezů byla i výroba sýru zavedena na více místech současně.

Zpočátku kvůli špatným skladovacím podmínkám mléko rychle kyslo. Oddělování syrovátky od sraženého mléka probíhalo za vzniku sýru čerstvého, je tedy dosti možné, že právě takto se vyrobil první sýr. Od pozdního středověku až do konce 19. století se v řadě evropských zemí výroba sýru rozvíjela. Tvrdé sýry převažovaly ve Švýcarsku, sýry měkčí se staly specialitou Francouzů. S rozvojem obchodu se sýr stal žádanou potravinou. Začalo se s ním obchodovat nejen mezi oblastmi, ale také v zahraničí.

V počátcích byly sýry vyráběny z neošetřeného mléka, které obsahovalo mikroorganismy, ale v 50. letech 19. století byl Louisem Pasteurem, francouzským mikrobiologem, vynalezen pasterizační proces a výroba sýru se změnila. Mikroorganismy v nepasterovaném mléce při nedostatečné pečlivosti kazily kvalitu sýru a také mohlo docházet k infekci konzumenta. S příchodem pasterace byla započata výroba sýru ve velkém.

První zmínky o výrobě sýrů v České republice pocházejí z 10. století. Nejslavnější pověst mají olomoucké tvarůžky, které se jako jediný sýr domácího původu udržel až dodnes [12, 13].

2.4.2 Výroba sýru (současnost)

Základní surovinou pro výrobu sýrů je plnotučné nebo odstředěné mléko, smetana nebo podmáslí.

Obecný technologický postup zahrnuje několik základních operací [14]:

- úprava mléka,
- sýření a srážení mléka,
- zpracování sýřeniny na zrno (drobení, míchání, dosoušení aj.),
- tvarování sýrů (lisováním, odkapáváním, formováním),
- solení sýru,
- zrání sýru.

Princip výroby všech sýrů je v zásadě stejný. Existuje nekonečné množství variací. Právě při výrobě přichází na řadu umění a dovednosti sýrařů, díky kterým vzniká celá řada sýrů. První část procesu je sběr a příprava mléka, následuje výroba sýřeniny a závěrem probíhá zahušťování, krájení, tvarování a vysolování. Poté se sýr ponechává zrát. Každý krok při výrobě je velice důležitý, jak už pro vznik kvalitního sýru, tak také rozhoduje o tom, jaký sýr vznikne. Například způsob zasolování určuje, jak bude sýr zrát a krájení sýřeniny zase ovlivňuje jeho strukturu.

Výroba sýru je ve výsledku tak složitý proces, že klidně i dva sýry vyráběné ze stejné várky mléka, které prošly stejným procesem výroby, mohou chutnat odlišně [13, 14].

2.4.3 Dělení sýrů

Dle způsobů srážení mléka a dalšího technologického postupu jsou sýry rozdělovány do tří hlavních skupin:

- sýry kyselé (tvarohové),
- sýry sladké (sýřené),
- sýry tavené.

Kyselé sýry jsou považovány za nejstarší vyráběné sýry. Sem se řadí i některé čerstvé tvarohové sýry, které jsou vyráběny z měkkého tvarohu, vyrobeného za malého přídavku syřidla.

Sladké sýry vznikaly později. Dnes k nim řadíme většinu druhů sýrů. U všech neprobíhá jen čisté enzymové srážení syřidlem za vzniku sýřeniny, ale působí také vytvářející se kyselina mléčná, která ovlivňuje charakter vzniklé sraženiny.

Kyselé a sladké sýry jsou označovány za tzv. sýry přírodní, které slouží jako základní surovina pro výrobu sýrů tavených. Ty se vyrábí z přírodních sýrů za přítomnosti dalších přísad, tavících solí (emulgačních prostředků) při vyšších teplotách [14, 15].

Další možnosti dělení sýrů:

Podle obsahu tuku v sušině (TVS):

- vysokotučné (více než 60 % TVS),
- smetanové (50–55 % TVS),

- plnotučné (45 % TVS),
- tučné (40 % TVS),
- polotučné (20 % TVS),
- nízkotučné (10 % TVS),
- odtučněné (méně než 10 % TVS).

Podle obsahu sušiny se dělí sladké sýry na:

- měkké (obsah vody nad 45 %, obsah sušiny max. 55 %),
- tvrdé (obsah vody max. 45 %, obsah sušina nad 55 %).

Podle použité suroviny:

- přírodní,
- tavené.

Dělení sladkých sýrů:

- čerstvé (krémový sýr, smetanový sýr, Cottage, Lučina),
- měkké zrající (Romadur),
- plísňové (Hermelín, Niva),
- polotvrdé a tvrdé s nízkodohřívanou sýřeninou (Eidam, Čedar),
- tvrdé s vysokodohřívanou sýřeninou (Ementál, Parmazán),
- pařená (Mozzarella, korbačík, parenica),
- krémový (tvarohový) uztálý (Bryza).

2.5 Čerstvé sýry

Jedná se o měkké nezrající sýry, které jsou konzumovány v čerstvém stavu v co nejkratším čase po výrobě. Současná česká legislativa, vyhláška č. 274/2019 Sb., definuje čerstvý sýr jako nezrající sýr, včetně nezrajících sýrů termizovaných, Z hlediska technologie jsou rozlišovány dva základní postupy srážení, krátkodobé a dlouhodobé [12].

U krátkodobého je srážení způsobeno převážně působením syřidla. Sýry se tvarují už při odlučování syrovátky a následně probíhá prokysání. Doba uchovávání čerstvého sýru je udávána v řádech několika desítek hodin (2 dny) při teplotě skladování do 10 °C. Nejlepší je ale zkonsumovat čerstvé sýry ihned [11].

Technologie dlouhodobého srážení se téměř shoduje s výrobou tvarohů, který může být dokonce použit jako polotovár pro výrobu, proto také existuje označení jako čerstvé tvarohové sýry. U nás jsou touto technologií vyráběny sýry krémové (Gervais). Do Evropy se z Ameriky dostal také speciální druh čerstvého sýra nazývaný Cottage. Tento sýr je poněkud tužší konzistence [11].

Čerstvé sýry mají lehkou stravitelnost. Výroba je ukončena již prokysáním sýřeniny či vysolením. Konzumovány jsou čerstvé, bez zrání, takže si zachovávají svoji čistou, typickou mléčnou a mírně nakyslou chuť [12].

2.5.1 Výroba čerstvých sýrů

Čerstvé sýry (tvarohový sýr, Feta, Mascarpone, smetanový sýr aj.) jsou považovány buď za nezrající vůbec, nebo ve výjimečných případech jen pár dní. Některé sýry mohou být formovány nebo lisovány, jiné jsou baleny do beček či kameninových nádob [11]. Výrobní

proces je ukončen vysrážením mléka a odloučením potřebného podílu syrovátky. Následně je vysolen a zabalen [16, 17].

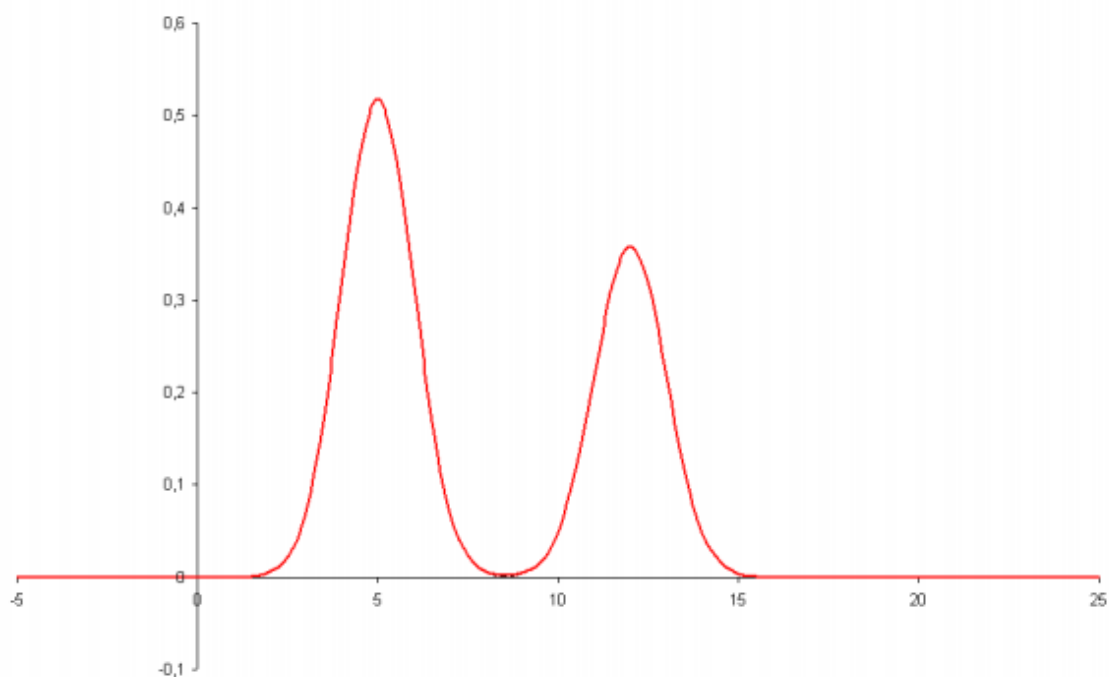
2.6 Plynová chromatografie

V současnosti je pro stanovení MK v sýrech nejvhodnější metodou plynová chromatografie s plameno-ionizační detekcí (GC-FID). Plynová chromatografie (GC) je považována za jednu z nejstarších a nejčastěji používaných separačních analytických metod [18]. Metoda je založená na rozdělování složek mezi pohyblivou (mobilní) a nepohyblivou (stacionární) fází. Za pohyblivou fází je považován inertní plyn a za nepohyblivou kapalina (chromatografie plyn – kapalina). Tento proces byl jako vědecká metoda poprvé použit na počátku 20. století. První pokusy chromatografie provedl rus Michail Cvět, který je považován za vynálezce postupu chromatografie. Metody GC jsou citlivé, rychlé, jednoduché a poskytují údaje jak kvalitativní, tak kvantitativní i s menším počtem vzorků [19, 20, 21].

2.6.1 Princip plynové chromatografie

V GC se nejčastěji používá pro vnášení vzorku po jednorázovém nástřiku na kolonu eluční technika. Separace jednotlivých složek je prováděna na základě rozdílných interakcí se stacionární fází a postupně jsou eluovány (vymývány) inertním nosným plynem. K transportu látek kolonou je využíván nosný plyn. Složky, které vychází z kolony, jsou postupně indikovány detektorem, jehož signál odpovídá koncentraci v nosném plynu. Separace je prováděna při konstantní nebo proměnlivé teplotě s časem (izokratická nebo gradientová eluce) [20, 22].

Výstupem měření je chromatogram, na němž jsou jednotlivé složky směsi zastoupeny tzv. chromatografickými píky, jejichž poloha závisí na čase. V ideálním případě by píky měly mít tvar Gaussové křivky (Obrázek 1). Následně lze ze získaných píků určit kvalitativní a kvantitativní zastoupení složek analyzované směsi [22].



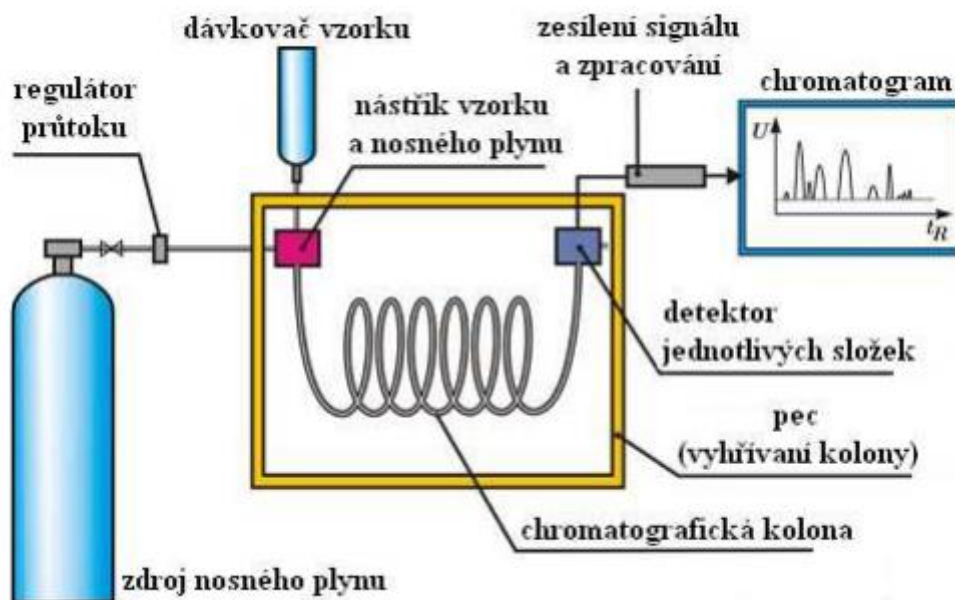
Obrázek 1: Ideální průběh chromatografických píků [23]

Plynová chromatografie má široké využití v mnoha odvětvích. Obecně lze říci, že GC se využívá všude tam, kde jde o dělení látek, které se za určitých podmínek mohou převést bez rozkladu v plyn či páru [20].

2.6.2 Instrumentace plynové chromatografie

Plynový chromatograf je složen z následujících částí [22]:

- Zdroj nosného plynu
- Zařízení pro regulaci a měření nosného plynu
- Dávkoř vřorku (injektor)
- Chromatografická kolona
- Termostat
- Detektor
- Vyhodnocovací zařízení



Obrázek 2: Schéma plynového chromatografu [24]

2.6.2.1 Nosný plyn (mobilní fáze)

V GC se jako mobilní fáze používá inertní plyn, který transportuje kolonou složky vzorku. Jako nosný plyn se nejčastěji používá dusík, vodík, helium, argon či oxid uhličitý. Jako zdroj se používají tlakové lahve nebo generátory. Lepšího dělení lze dosáhnout s plyny větší molekulové hmotnosti (dusík), protože dochází k slabší difúzi analyzované látky. Plyny s menší hustotou mají větší tepelnou vodivost, která způsobuje zvýšenou citlivost detektoru. Na rychlosti nosného plynu závisí účinnost kolony. Eluční objem je důležitá hodnota pro identifikaci analyzované látky, proto je nutné udržovat průtok nosného plynu konstantní [20, 22].

2.6.2.2 *Dávkovač vzorku (injektor)*

Pomocí injektoru probíhá dávkování analyzovaného vzorku na počátek kolony, převedení vzorku do plynného stavu a jeho vnesení do proudu nosného plynu. Dávkování může být prováděno jak ručně, tak automatickými dávkovači. Vzorek může být dávkován dvěma technikami, buď nad ústí kolony umístěné na konci injektoru nebo přímo na kolonu. První způsob je využíván především u náplňových kolon, druhý v případě kolon kapilárních [22].

2.6.2.3 *Kolony (stacionární fáze)*

V koloně dochází k rozdělování vzorků na jednotlivé frakce. Kolony pro GC existují, jak je již výše uvedeno, dvě – náplňové a kapilární.

Náplňové kolony jsou vyráběny z kovu (měď, hliník, nikl či nerezová ocel) nebo skleněné trubice. Vnitřní průměr těchto kolon je 2–6 mm a délka 1–5 m. Tyto kolony jsou plněny absorbenty na bázi aktivního uhlí a silikagelu případně molekulovými sítě.

Kapilární kolony jsou skleněné, křemenné, plastové (polyamidy, polyestery, teflon) nebo kovové (nerezová ocel, hliník, nikl, měď) kapiláry. Jejich vnitřní průměr je 100–700 μm a délka se pohybuje v rozmezí 15–100 m. Vnitřní stěny kapilár jsou povlečeny stacionární fází, případně jsou kapiláry naplněny stacionární fází v celém svém objemu [22]. Hlavním požadavkem na chromatografickou kolonu je její dlouhá životnost. Ta je určená těkavostí rozpouštědla a také teplotou kolony [25].

2.6.2.4 *Termostat kolon*

Termostatem je udržována konstantní teplota kolony, případně injektoru. Jeho činností je tvorba teplotního programu pro gradientovou eluci. U termostatu je vyžadována teplotní stabilita uvnitř termostatu, možnost změny teploty a teplotní rozsah do 450 °C. Optimální teplota kolony je závislá na bodu varu jednotlivých složek a požadovaném rozlišení [22].

2.6.2.5 *Detektory*

Na počátku jejich vývoje nebylo vůbec jasné, zda bude nějaká konstrukce vyhovovat, protože požadavky na ni byly vysoké. Hlavním z požadavků je vysoká citlivost a stabilita, která je spojena s maximální rychlostí odezvy na změnu složení plynu opouštějícího kolonu [26].

Detektory jsou tedy zařízení, která reagují na změny složení protékající mobilní fáze a převádí je na elektricky měřitelné veličiny. Umožňují identifikaci a kvantifikaci složky. Mezi základní posuzované vlastnosti detektorů patří citlivost, šum produkovaného signálu, odezva, nejmenší detekovatelná koncentrace či hmotnostní průtok, lineární dynamický rozsah a efektivní doba odezvy [22].

V GC se používá mnoho typů detektorů, jako například [22, 27]:

- Plameno-ionizační (FID – Flame ionization detector)
- Detektor elektronového záchytu (ECD – Electron capture detector)
- Hmotnostně spektrometrický detektor (MS – Mass spectrometric detector)
- Tepelně vodivostní (TCD – Thermal conductivity detector)
- Termoinizační detektor (TID – Thermionic ionization detector)
- Plamenový fotometrický detektor (FPD – Flame photometric detector)

Pro stanovení MK ve vzorcích čerstvých sýrů byl v této práci použit plynový chromatograf s plameno-ionizačním detektorem (GC-FID – Gas chromatography with Flame ionization detector).

Plameno-ionizační detektor (FID) patří mezi nejčastěji používané detektory. Slouží jako univerzální detektor pro detekci organických sloučenin. Analyt unášený nosným plynem z chromatografické kolony je spalován ve vodíko-vzduchovém plameni, který hoří mezi dvěma elektrodami. Elektrická vodivost plamene je velmi citlivá na přítomnost par [22, 27].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité laboratorní vybavení a chemikálie

3.1.1 Laboratorní přístroje

- Analytické váhy GR-202-2-EC, HELAGO, Itálie
- Vodní lázeň, Julabo TW 2, Německo
- Topné hnízdo 100 ml, Brněnská Drutěva
- Vakuová rotační odparka, KIKA®-WERKE, Německo
- Lednice a mrazák
- Plynový chromatograf TRACE GC 2000 (ThermoQuest Italia S. p. A., Itálie) s plameno-ionizačním detektorem a DB 23 kapilární kolonou
- Počítač
- Digestoř
- Souprava pro výrobu čerstvého sýru, Tescoma

3.1.2 Laboratorní pomůcky

- Běžné laboratorní sklo (zkumavky, kádinky, dělicí nálevky aj.)
- Nůž, struhadlo, špachtle, hrnec (5 l), cedník, mísa
- Vialky (2 a 4 ml)
- Automatické mikropipety (100–1000 µl)
- Teploměr

3.1.3 Chemikálie pro extrakci lipidů

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

3.1.4 Chemikálie pro kyselou esterifikaci

- Methanolický roztok hydroxidu sodného ($c = 0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$)
- Bortrifluorid methanolický roztok 10%, Sigma-Aldrich, Německo
- Isooktan p.a., Lach:ner, Česká republika
- Chlorid sodný p.a., Lach:ner, Česká republika
- Síran sodný bezvodý p.a., Lach:ner, Česká republika
- Směsný standard methylesterů MK (C14-C24), Restek, PA, USA
- Metylbutyrát, metylkapronát, metylkaprylát, metylkaprinát, metyllaurát, Merck, Česká republika

3.1.5 Plyny pro plynový chromatograf

- Vzduch 5.0, SIAD v tlakové bombě s redukčním ventilem
- Dusík 5.0, SIAD v tlakové bombě s redukčním ventilem
- Vodík 5.5, SIAD v tlakové bombě s redukčním ventilem

3.2 Analyzované vzorky

V experimentální části práce byly analyzovány modelové vzorky čerstvých sýrů, vyrobené na FCH VUT v Brně v laboratorních podmínkách. Výroba vycházela ze standardního technologického postupu pro výrobu čerstvých kyselých sýrů (viz dále). Celkem byly vyrobeny 3 typy vzorků. První byl standardní čerstvý sýr (ST), druhý čerstvý sýr s přidavkem extraktu z rýmovníka (R) a třetí s přidavkem extraktu z echinacey (E). Z každého typu byly vyrobeny 2 ks sýru.

3.2.1 Výroba vzorků sýru

Na výrobu jednoho čerstvého sýru byla potřeba souprava pro výrobu sýrů, hrnec (5 l), cedník, mísa a teploměr, 2 l plnotučného mléka (min. 3%), ocet a sůl.

Za občasného míchání, aby nedošlo k připálení, bylo mléko v hrnci ohřáto na teplotu 92°C, vmíchalo se 50 ml octa, který posloužil jako srážedlo. Obsah se lehce promíchal a hrnec se ponechal odstaven po dobu 30 min.

Vysrážený obsah hrnce se scedil, zachycená sraženina se nechala na síti okapat a ochutla se lžičkou soli. Následně byla forma na sýr vyložena plátnem a okapaná sraženina na něj byla přemístěna. Sýr byl ponechán lisovat po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Závěrem se dal vychladit do lednice. Vyrobený sýr (Obrázek 3) byl vyjmut z formy a skladován v lednici až do doby analýzy. Před analýzou byl vzorek nastrouhán na jemném struhadle.



Obrázek 3: Vyrobený čerstvý sýr (s přidavkem extraktu echinacey)

3.3 Použité metody a pracovní postupy

3.3.1 Extrakce lipidů ze vzorku sýru dle ČSN EN ISO 1735

Do zkumavky se navázil 1 g čerstvého sýru s přesností na čtyři desetinná místa, přidalo se 5 ml kyseliny chlorovodíkové a směs se ponechala zahřívát ve vodní lázni přibližně 10 minut za

občasného promíchávání při teplotě 80 °C do úplného rozpuštění sýru a následného zbarvení směsi do fialova. Vzniklá směs byla ochlazena proudem vody.

Po ochlazení byla směs kvantitativně převedena pomocí 5 ml ethanolu do dělicí nálevky. Přidalo se 9 ml diethyletheru a 9 ml petroletheru. Po každém přidavku se směs mírně promíchala a protřepala po dobu 1 minuty. Poté byla dělicí nálevka ponechána odstát při laboratorní teplotě po dobu 30 min, aby došlo ke zřetelnému oddělení fází. Horní fáze oddělená od fáze vodné byla opatrně odebrána pipetou do suché a předem zvážené destilační baňky s kulatým dnem o objemu 50 ml. Následně byla obdobným způsobem provedena druhá a třetí extrakce, ale pouze s polovičním objemem rozpouštědel (4,5 ml diethyletheru a 4,5 ml petroletheru).

Následně po všech třech extrakcích byly extrakty spojeny a rozpouštědlo bylo odpařeno na vakuové rotační odparce při teplotě do 40 °C. Závěrem byl vyextrahovaný tuk zvážen na analytických vahách s přesností na 4 desetinná místa. Takto získaný tuk byl podroben esterifikací.

3.3.2 Kyselá esterifikace s bortrifluoridem jako katalyzátorem (TAG)

Do destilační baňky s vyextrahovaným tukem byly přidány 4 ml methanolického roztoku hydroxidu sodného ($c = 0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) a skleněné varné kuličky. Baňka se vložila do topného hnízda, připojil se zpětný chladič a zahájil se ohřev do vymizení kapiček tuku (5–10 minut). Každých 30 sekund byla baňka krouživými pohyby promíchávaná, aby nedošlo k vytvoření pevného kroužku hydroxidu sodného na stěnách baňky.

Po rozpuštění tuku se do vroucí směsi přes zpětný chladič přidalo 5 ml methanolického roztoku bortrifluoridu a pokračovalo se ve varu (od počátku varu 30 minut). Poté se do vroucí směsi přidaly, opět přes chladič, 3 ml isooktanu. Následně byla baňka vytažena z topného hnízda a var se zastavil. Ihned se do směsi přidalo 20 ml nasyceného vodného roztoku chloridu sodného, baňka se uzavřela a protřepala. Poté byla baňka doplněna roztokem chloridu sodného až po její hrdlo, aby došlo k rozeznání dvou fází. Baňka se pro viditelné oddělení fází nechala 5 minut odstát.

Z horní isooktanové vrstvy byly odebrány 2 ml do 4 ml vialky. Aby došlo k odstranění stopy vlhkosti, přidalo se malé množství bezvodého síranu sodného. Z takto připraveného roztoku byl závěrem odebrán 1 ml do vialky k analýze na plynovém chromatografu.

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

Do 100 ml odměrné baňky byly naváženy 2 g hydroxidu sodného. Ten se za mírného ohřevu ve vodní lázni rozpustil ve 100 ml methanolu. Takto připravený roztok se může v lednici skladovat po dobu maximálně 3 měsíců.

3.3.4 Kyselá esterifikace s bortrifluoridem jako katalyzátorem (VMK)

Postup se oproti esterifikaci TAG mírně liší. V prvním kroku se vynechal přidavek methanolického roztoku hydroxidu sodného. Do baňky s varnými kuličkami a s připojeným zpětným chladičem se rovnou napipetovalo 5 ml methanolického roztoku bortrifluoridu a směs se přivedla k varu. Po přesně 3 minutách se do vroucí směsi přes chladič přidaly 3 ml isooktanu. Destilační baňka se vyjmula z topného hnízda a var byl ukončen.

Stejně jako u předchozího případu se do směsi ihned přidalo 20 ml nasyceného vodného roztoku chloridu sodného a směs byla promíchána. Poté byla baňka doplněna až po hrdlo

nasyceným vodným roztokem chloridu sodného a následně se ponechala 5 minut odstát, aby došlo ke zřetelnému oddělení fází. Z horní isooktanové vrstvy byly odebrány 2 ml do 4 ml vialky a přidalo se malé množství bezvodého síranu sodného k odstranění stop vlhkosti. Z připraveného roztoku byl odebrán 1 ml do vialky k analýze na plynovém chromatografu.

3.4 Podmínky stanovení methylesterů mastných kyselin

- Plynový chromatograf TRACE GC 2000 (ThermoQuest Italia S. p. A.) (Obrázek 2)
- Autosampler AI/AS 3000 (Obrázek 2)
- Nosný plyn: dusík, průtok $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$
- Kapilární kolona DB-WAX ($30 \text{ m} \times 0,32 \text{ mm} \times 0,5 \mu\text{m}$)
- Vstup:
 - Teplota injektoru: $250 \text{ }^{\circ}\text{C}$
 - Doba bezděličového dávkování: 5 min
 - Dávkování: autosampler bez děliče toku $1 \mu\text{l}$
- Teplotní program:
 - $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 min.
 - Vzestupný gradient $25 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ do $200 \text{ }^{\circ}\text{C}$ s výdrží 0 min.
 - Vzestupný gradient $3 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ do $230 \text{ }^{\circ}\text{C}$ s výdrží 30 min.
- Plameno-ionizační detektor (FID):
 - Teplota detektoru: $250 \text{ }^{\circ}\text{C}$
 - Průtok vodíku: $35 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$
 - Průtok vzduchu: $350 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$
 - Make-up dusíku: $30 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$



Obrázek 4: Plynový chromatograf s autosamplerem [28]

3.5 Identifikace a kvantifikace mastných kyselin

Mastné kyseliny ve vzorcích čerstvých sýrů byly stanoveny jako methylestery (MEMK) plynovou chromatografií. Identifikace MEMK byla provedena na základě porovnání retenčních časů identických standardů a jejich kvantifikace byla stanovena výpočtem koncentrace (c_{MEMK}) ze známé koncentrace standardů (c_s), ploch píků ve vzorku (P_{MEMK}) a ploch píků standardů (P_s). Potřebné parametry standardů jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1: Přehled standardů a molárních hmotností MEMK a MK

	Mastná kyselina (triviální název)	Retenční čas (min)	Koncentrace c_s (mg·ml ⁻¹)	Plocha píku P_s (mV·s)	Mr_{MEMK} (g·mol ⁻¹)	Mr_{MK} (g·mol ⁻¹)
C4:0	Máselná	4,373	0,1	3073915	102,133	88,106
C6:0	Kapronová	5,669	0,1	3472798	130,187	116,16
C8:0	Kaprylová	6,853	0,1	3196676	158,241	144,214
C10:0	Kaprinová	8,003	0,1	3395017	186,295	172,268
C12:0	Laurová	9,352	0,1	2873110	214,349	200,322
C14:0	Myristová	11,119	0,1	1225992	242,403	228,376
C16:0	Palmitová	13,569	0,4	3730560	270,457	256,43
C18:0	Stearová	16,833	0,3	2179371	298,511	284,484
C18:1	Olejová	17,298	4,5	33592447	296,495	282,468
C18:2	Linolová	18,200	1,5	11131918	294,479	280,452
C18:3n3	Linolenová	19,739	0,3	2163208	292,463	278,436
C20:0	Arachová	21,305	0,3	1923943	326,565	312,538
C22:0	Behenová	28,757	0,3	1722493	354,619	340,592
C22:1	Eruková	29,833	2,0	12034470	352,603	338,576
C24:0	Lignocerová	41,261	0,3	806041	382,673	368,646

Výpočty:

- Koncentrace methylesteru mastné kyseliny (c_{MEMK}) v extraktu (ve vialce)

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

- c_{MEMK} – koncentrace MEMK v extraktu (mg·ml⁻¹)
- P_{MEMK} – plocha píku MEMK v extraktu (mV·s)
- c_s – koncentrace standardu (mg·ml⁻¹)
- P_s – plocha píku standardu (mV·s)

- Přepočet koncentrace methylesterů mastných kyselin na koncentraci mastných kyselin

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

- c_{MK} – koncentrace MK v extraktu (mg·ml⁻¹)
- c_{MEMK} – koncentrace MEMK v extraktu (mg·ml⁻¹)

- Mr_{MK} – molární hmotnost MK ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)
- Mr_{MEMK} – molární hmotnost MEMK ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)
- Množství MK v původním objemu v baňce

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

- m_{MK} – celková hmotnost MK v baňce (mg)
- c_{MK} – koncentrace MK v extraktu ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)
- V – objem isooktanu (3 ml)
- Koncentrace MK v sýru ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)

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

- $c_{sýr}$ – koncentrace MK ve vzorku ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
- m_{MK} – celková hmotnost MK v baňce (mg)
- $m_{sýr}$ – navážka vzorku sýru (g)

3.6 Statistické vyhodnocení výsledků

Všechna naměřená data byla zpracována a vyhodnocena pomocí programu Microsoft Excel. Měření bylo provedeno zvlášť pro volné a vázané MK, každá analýza byla provedena dvakrát ($n = 2$). Výsledky koncentrace MK jsou vyjádřené v $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ sýra ve tvaru aritmetického průměru a opakovatelnost je vyjádřena formou relativní směrodatné odchylky (RSD) (průměr $\pm$ směrodatná odchylka)

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato práce je částí rozsáhlé studie, která se bude zabývat výrobou a charakterizací modelových vzorků čerstvých sýrů s přidavkem extraktů bylin. Pro tuto práci byl použit extrakt z rýmovníku a echinacey, vyrobený v laboratorních podmínkách. Celkem byly analyzovány tři typy sýrů – standardní čerstvý sýr (ST), čerstvý sýr s přidavkem rýmovníku (R) a s přidavkem echinacey (E). Hlavním záměrem bylo zjistit, zda bude mít přidavek rostlinných olejů vliv na složení MK v sýrech.

4.1 Identifikace a kvantifikace MK ve vzorcích

MK byly stanoveny jako methylestery metodou GC-FID. Identifikace MK ve vzorcích čerstvých sýrů byla provedena na základě porovnání retenčních časů vzorků se standardy a kvantifikace na základě porovnání plochy píků standardů o známé koncentraci. Ve všech vzorcích byly sledovány zvláště vázané a volné mastné kyseliny. Přehled identifikovaných vázaných MK je uveden v Tabulce 2, přehled VMK v Tabulce 3. Výsledky jsou vyjádřeny v $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ sýru.

Celkem bylo ve vzorcích sýrů identifikováno 14 MK ve formě vázané i volné.

Tabulka 2: Obsah vázaných mastných kyselin ve vzorcích sýrů

	Název	ST	R	E
		$c \text{ (mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ sýru)}$	$c \text{ (mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ sýru)}$	$c \text{ (mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ sýru)}$
C4:0	másečná	$0,29 \pm 0,32$	$1,14 \pm 0,12$	$0,87 \pm 0,11$
C6:0	kapronová	$0,47 \pm 0,13$	$1,03 \pm 0,10$	$1,02 \pm 0,09$
C8:0	kaprylová	$0,36 \pm 0,09$	$0,94 \pm 0,19$	$0,89 \pm 0,16$
C10:0	kaprinová	$0,83 \pm 0,19$	$1,14 \pm 0,06$	$1,18 \pm 0,08$
C12:0	laurová	$1,09 \pm 0,20$	$1,01 \pm 0,14$	$1,88 \pm 0,21$
C14:0	myristová	$7,13 \pm 1,03$	$9,21 \pm 1,05$	$8,15 \pm 1,01$
C16:0	palmitová	$23,13 \pm 2,72$	$31,18 \pm 2,89$	$18,14 \pm 1,64$
C18:0	stearová	$8,01 \pm 1,10$	$10,02 \pm 1,01$	$11,19 \pm 1,18$
C18:1	olejová	$17,44 \pm 2,36$	$20,33 \pm 2,44$	$19,05 \pm 2,21$
C18:2	linolová	$2,00 \pm 0,29$	$1,69 \pm 0,19$	$2,03 \pm 0,31$
C18:3n3	linolenová	$0,46 \pm 0,04$	$0,33 \pm 0,03$	$0,87 \pm 0,03$
C20:0	arachová	$0,12 \pm 0,02$	$0,10 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01$
C22:0	behenová	$0,01 \pm 0,02$	st.*	st.*

Tabulka 3: Obsah volných mastných kyselin ve vzorcích sýrů

	Název	ST	R	E
		c (mg·g ⁻¹ sýru)	c (mg·g ⁻¹ sýru)	c (mg·g ⁻¹ sýru)
C4:0	máselná	0,02 ± 0,02	0,04 ± 0,02	0,03 ± 0,01
C6:0	kapronová	0,05 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01
C8:0	kaprylová	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,04 ± 0,01
C10:0	kaprinová	0,10 ± 0,03	0,09 ± 0,03	0,11 ± 0,02
C12:0	laurová	0,15 ± 0,03	0,13 ± 0,03	0,16 ± 0,02
C14:0	myristová	1,00 ± 0,18	1,21 ± 0,09	1,04 ± 0,12
C16:0	palmitová	3,24 ± 0,39	2,68 ± 0,22	3,99 ± 0,26
C18:0	stearová	1,08 ± 0,17	1,14 ± 0,18	1,22 ± 0,21
C18:1	olejová	2,91 ± 0,49	3,26 ± 0,60	2,03 ± 0,18
C18:2	linolová	0,34 ± 0,02	0,64 ± 0,02	0,81 ± 0,03
C18:3n3	linolenová	0,08 ± 0,00	0,32 ± 0,00	0,19 ± 0,00
C20:0	arachová	0,01 ± 0,00	st.*	st.*
C22:1	eruková	st.*	st.*	st.*

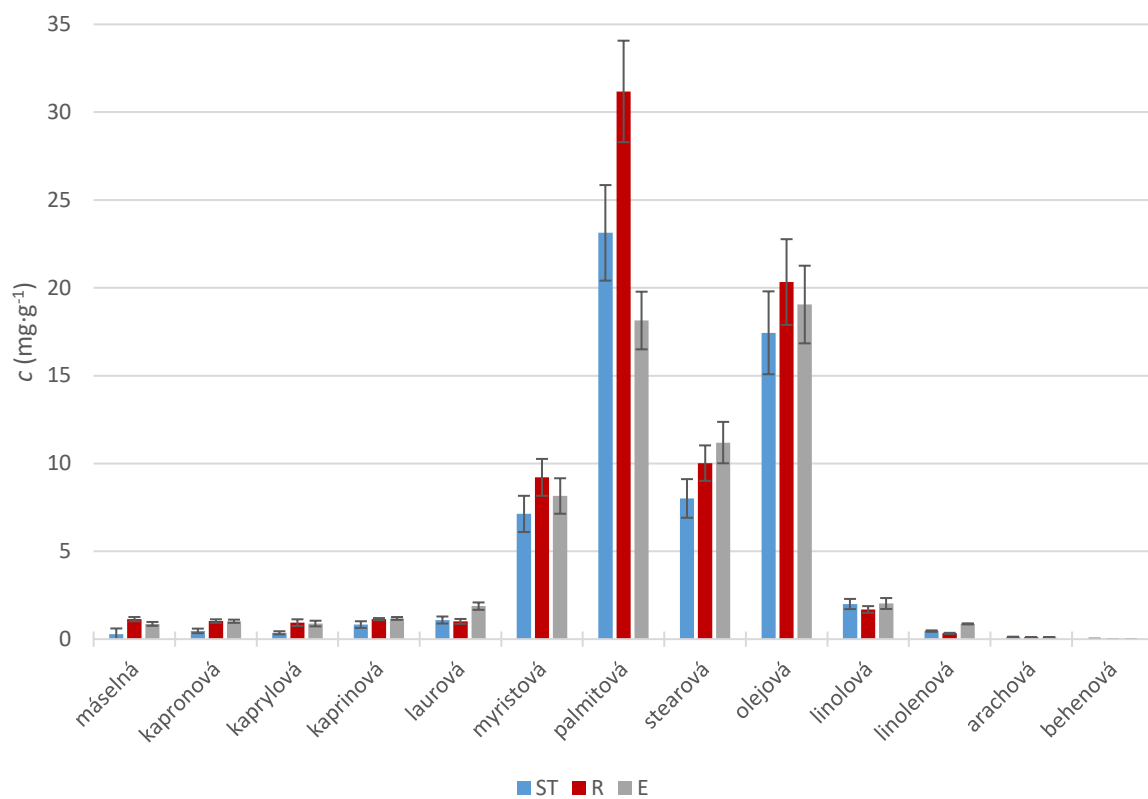
*výskyt pouze stopového množství

4.2 Porovnání složení MK v čerstvých sýrech

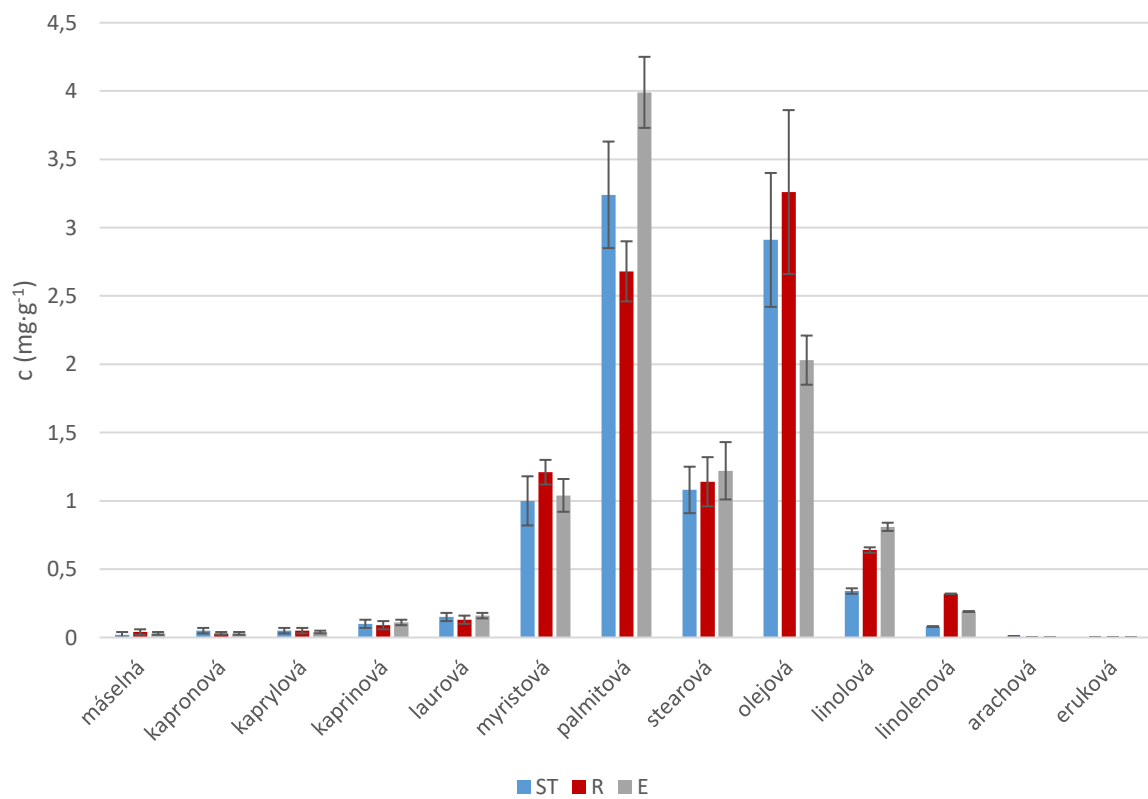
V grafech na Obrázku 5 a 6 je uvedeno srovnání obsahu identifikovaných MK ve všech třech vzorcích sýrů. Vzhledem k tomu, že všechny sýry byly vyrobeny ze stejné suroviny (plnotučné mléko) stejným způsobem, lišily se pouze přidavkem extraktu, lze předpokládat, že složení MK bude přibližně stejné. Z grafů jsou patrné sice mírné rozdíly v obsahu jednotlivých MK, ty však lze přičíst nestandardnosti výroby.

Z hlediska kvantitativního ve všech vzorcích jednoznačně převažovaly kyseliny myristová, palmitová, stearová a olejová.

Co se týče obsahu VMK, většina vzniká procesem zrání sýrů jako produkt lipolýzy, v menší míře katabolismem aminokyselin a fermentací laktózy. Vzhledem k tomu, že se jedná o sýry čerstvé (nezrající), dá se předpokládat velmi nízký obsah VMK (Obrázek 6); jejich celkový obsah ve vzorcích byl < 10 mg·g⁻¹ sýru.



Obrázek 5: Porovnání obsahu vázaných mastných kyselin ve vzorcích sýrů



Obrázek 6: Porovnání obsahu volných mastných kyselin ve vzorcích sýrů

V rámci provedené rešerše nebyla nalezena publikace zabývající se stanovením MK v čerstvých sýrech, lze však říci, že výsledky jsou v souladu se znalostmi o složení MK v mléce (sýrech) [7, 8] (viz. kapitola. 2.3).

5 ZÁVĚR

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo stanovit obsah mastných kyselin ve vzorcích čerstvých sýrů. Modelové vzory byly vyrobeny na FCH VUT v Brně v laboratorních podmínkách. Celkem byly vyrobeny 3 typy vzorků stejným postupem – čerstvý sýr s přídavkem extraktu z rýmovníku, čerstvý sýr s přídavkem extraktu z echinacey a tentýž sýr bez přídavku extraktu (standard).

Pro extrakci lipidů ze vzorků čerstvých sýrů byla použita extrakce směsí diethyletheru a petroletheru podle ČSN EN ISO 1735. Esterifikace mastných kyselin byla provedena s bortrifluoridem jako katalyzátorem. Vzniklé methylestery byly identifikovány a kvalifikovány pomocí plynové chromatografie s plameno-ionizačním detektorem. Tato metoda je přiměřeně rychlá, jednoduchá a vyžaduje minimální množství vzorků.

Celkem bylo ve všech vzorcích identifikováno 14 mastných kyselin ve formě vázané i volné. Nejvíce MK bylo indentifikováno ve vzorku standardu – 13 vázaných a 12 volných, ve vzorcích s rýmovníkem i echinaceou bylo 12 vázaných a 11 volných mastných kyselin. Ve všech vzorcích převažovaly kyselina myristová, pamitová, stearová a olejová, což je v souladu se znalostmi o složení mléčného tuku.

Mezi vzorky byly nalezeny mírné rozdíly v obsahu jednotlivých MK, nicméně lze tvrdit, že přídavek bylinných extraktů nemá výrazný vliv na složení MK v čerstvých sýrech.

6 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] MUSIL, Jan a Olga NOVÁKOVÁ. *Biochemie v obrazech a schématech*. 2., zcela přeprac. vyd. Praha: Avicenum, 1989, s. 69.
- [2] KODÍČEK, Milan, Olga VALENTOVÁ a Radovan HYNEK. *Biochemie: chemický pohled na biologický svět*. 2. přepracované vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2018, s. 147-148. ISBN 9788075920133.
- [3] DOMÍNGUEZ-AVILA, J. Abraham a Gustavo A. GONZÁLEZ-AGUILAR. *Lipids. Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables* [online]. Elsevier, 2019, 2019, s. 273-292 [cit. 2021-7-25]. ISBN 9780128132784. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-813278-4.00013-0
- [4] VOET, Donald a Judith G. VOET. *Biochemie*. Praha: Victoria Publishing, 1995, s. 297. ISBN 8085605449.
- [5] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996., s. 63-64. ISBN 80-200-0600-1.
- [6] *Encyclopedia of Life Sciences* [online]. Chichester: John Wiley, 2001 [cit. 2021-7-25]. ISBN 0470016175.
- [7] Collins, Y.F., McSweeney, P.L.H., Wilkinson, M.G. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: A review of current knowledge. *International Dairy Journal*. 2003, vol. 13, no. 11, pp. 841–866. ISSN 0958-6946. DOI: 10.1016/S0958-6946(03)00109-2.
- [8] FOX, Patrick F., Timothy P. GUINEE, Timothy M. COGAN a Paul L. H. MCSWEENEY. *Fundamentals of Cheese Science*. 2017. DOI: 10.1007/978-1-4899-7681-9.
- [9] DUFEK, Oldřich. *Sýry v kuchyni*. Ilustroval Vladimír HAVELKA. Praha: SZN, 1989. Sbírka ekonomických a encyklopedických publikací (SZN), s. 7-12. ISBN 8020900160.
- [10] KNĚŽ, Václav a Zdeněk ŽÁČEK, SEDLÁČKOVÁ, Hana, ed. *Sýry a příprava sýrových pokrmů*. Praha: SNTL, 1991 [v tir. spr.] 1992, s. 5. ISBN 8003004616.]
- [11] RIDGWAY, Judy. *Sýry: průvodce světem sýrů*. Praha: Fortuna Print, 2001, s. 36-49. ISBN 8086144658.
- [12] RIDGWAY, Judy. *Sýry: průvodce světem sýrů*. Praha: Fortuna Print, 2001, s. 8-9. ISBN 8086144658.]
- [13] RIDGWAY, Judy. *Sýry: průvodce světem sýrů*. Praha: Fortuna Print, 2001, s. 23-24. ISBN 8086144658.]
- [14] KNĚŽ, Václav a Zdeněk ŽÁČEK, SEDLÁČKOVÁ, Hana, ed. *Sýry a příprava sýrových pokrmů*. Praha: SNTL, 1991 [v tir. spr.] 1992, s. 20-24. ISBN 8003004616.]
- [15] GAJDŮŠEK, Stanislav. *Mlékařství II*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 1998. ISBN 80-715-7342-6.

- [16] PAVELKA, Antonín. *Mléčné výrobky pro vaše zdraví*. Brno: Litera, 1996, s. 72-73. ISBN 8085763095.
- [17] KNĚZ, Václav a Zdeněk ŽÁČEK, SEDLÁČKOVÁ, Hana, ed. *Sýry a příprava sýrových pokrmů*. Praha: SNTL, 1991 [v tir. spr.] 1992, s. 47. ISBN 8003004616.]
- [18] PĚKNICOVÁ, Markéta a Dagmar KRUCINOVÁ. *Analýza organických látek: sborník přednášek z kurzu*. Český Těšín: 2 THETA, 1999. ISBN 80-902432-9-0.
- [19] MIKEŠ, Otakar. *Příručka laboratorních chromatografických metod*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1961. s. 14-15.
- [20] MIKEŠ, Otakar. *Příručka laboratorních chromatografických metod*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1961. s. 317-332.
- [21] PURNELL, Howard. *Plynová chromatografie*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1966. Moderní metody v chemické laboratoři, s. 11-14.
- [22] SOMMER, Lumír. *Základy analytické chemie*. Brno: VUTIUM, 2000, s. 197-204. ISBN 80-214-1742-0.
- [23] Rt 5 12. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2006, 3 September 2006 [cit. 2021-07-25]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Rt_5_12.png
- [24] OPLETAL, Lubomír, DRAŠAR, Pavel. *Fytochemické metody: 1. Izolace obsahových látek*. 1994. vyd. Praha: [s.n.], 1994. 142 s. ISBN 80-7066-912-8.]
- [25] PURNELL, Howard. *Plynová chromatografie*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1966. Moderní metody v chemické laboratoři, s. 344.
- [26] PURNELL, Howard. *Plynová chromatografie*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1966. Moderní metody v chemické laboratoři, s. 278.
- [27] SHELLIE, R.A. Gas Chromatography. *Encyclopedia of Forensic Sciences* [online]. Elsevier, 2013, 2013, s. 579-585 [cit. 2021-7-28]. ISBN 9780123821669. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-382165-2.00245-2
- [28] MITRA, M. Stanovení mastných kyselin v tavených sýrech. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 38 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Eva Vítová, Ph.D..

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AMK	Aminokyseliny
FID	Plameno-ionizačním detektor
GC	Plynový chromatograf
MEMK	Methylestery mastných kyselin
MK	Mastné kyseliny
RSD	Směrodatná odchylka
TAG	Triacylglyceroly
TVS	Tuk v sušině
VMK	Volné mastné kyseliny