

Studium degradace kaseinového komplexu pomocí gelové permeační chromatografie

Bc. Lenka Čtvrtníčková

Diplomová práce
2011



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav biochemie a analýzy potravin

akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lenka ČTVRTNÍČKOVÁ**
Osobní číslo: **T090212**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Studium degradace kaseinového komplexu pomocí gelové permeační chromatografie**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Vypracování literární rešerže na zadané téma.
2. Seznámení se s metodikou GPC, případně SDS-PAGE.

II. Praktická část

1. Studium degradace kaseinového komplexu na přístroji PL-GPC 50 (suroviny před a suroviny po napaření, finálního výrobku pařeného sýru).
2. Vyhodnocení získaných experimentálních dat.



Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

- [1] PROVDER, T. **Size exclusion chromatography : methodology and characterization of polymers and related materials**, Washington : American Chemical Society, 1984.
- [2] DETERMANN, H. **Gelová chromatografie**, Praha : Academia, 1972.
- [3] BYLUND, G. **Dairy processing handbook**, Tetra Pak Processing Systems AB, 1995.
- [4] HRABĚ, J., BŘEZINA, P., VALÁŠEK, P., **Technologie výroby potravin živočišného původu**, Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2008.

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Zdeněk Smékal

Ústav biochemie a analýzy potravin

Datum zadání diplomové práce:

25. února 2011

Termín odevzdání diplomové práce:

20. května 2011

Ve Zlíně dne 21. března 2011



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně

.....

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá studiem degradace kaseinového komplexu při procesu paření u vzorků sýřenin před pařením, sýřenin po paření a finálních výrobků – sýrů Mozzarella a Jadel. Pro účely experimentu byla použita gelová permeační chromatografie s refraktometrickou a viskozitní detekcí.

Klíčová slova: kasein, pařené sýry, gelová permeační chromatografie

ABSTRACT

This master thesis deals with a study of degradation of casein complex during a steaming process with rennet samples before steaming, rennet samples after steaming and final products – Mozzarella and Jadel cheese. For the purposes of an experiment gel permeation chromatography (GPC) with refractometric and viscometric detection has been used.

Keywords: casein, steamed cheese, gel permeation chromatography

Ráda bych tímto poděkovala RNDr. Zdeňku Smékalovi za odborné vedení, doc. Ing. Františku Buňkovi za připomínky v průběhu zpracování diplomové práce a Natálii Onipchenko za pomoc v laboratoři při měření vzorků.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a uvedla jsem v seznamu literatury všechny použité literární a odborné zdroje.

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

Ve Zlíně dne.....

.....

podpis

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 MLÉKO	13
2 SLOŽENÍ KRAVSKÉHO MLÉKA	14
2.1 DUSÍKATÉ LÁTKY	14
2.1.1 Kasein.....	16
2.1.2 Syrovátkové bílkoviny	21
3 TECHNOLOGICKY VÝZNAMNÉ VLASTNOSTI MLÉKA	23
3.1 KYSACÍ SCHOPNOST	23
3.2 SYŘITELNOST	23
3.3 TERMOSTABILITA	24
4 MLÉKO JAKO ZÁKLADNÍ SUROVINA K VÝROBĚ SÝRŮ	25
4.1 POŽADAVKY NA MLÉKO PRO VÝROBU SÝRŮ	25
5 TECHNOLOGIE VÝROBY PAŘENÝCH SÝRŮ	27
5.1 TEPelné ošetření mléka	27
5.2 ÚPRAVA MLÉKA PŘED SÝŘENÍM	28
5.3 SÝŘENÍ MLÉKA	29
5.4 ZPRACOVÁNÍ SÝŘENINY	30
5.4.1 Krájení.....	30
5.4.2 Drobení.....	30
5.5 VYMÍCHÁVÁNÍ	31
5.6 VYPOUŠTĚNÍ.....	31
5.6.1 Odkapávání a vyklápění	32
5.7 PAŘENÍ.....	32
5.8 SOLENÍ SÝRŮ	33
5.9 SUŠENÍ	34
5.10 ZRÁNÍ SÝRŮ.....	34
5.10.1 Změny bílkovin v průběhu zrání	35
6 OBECNÁ TEORIE CHROMATOGRFIE	37
7 GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRFIE	38
8 STŘEDNÍ MOLÁRNÍ HMOTNOST	41
9 KOLONY	43
9.1 MATERIÁL KOLON	43
9.2 NÁPLNĚ KOLON	43
9.2.1 Dextranové gely	44

9.2.2	Polyakrylamidové gely	44
9.2.3	Agarosové gely	45
9.2.4	Polystyrénové gely	45
9.3	ÚČINNOST KOLONY	46
10	DETEKTORY	47
10.1	REFRAKTOMETRY	48
10.2	VISKOZITNÍ DETEKTOR	49
11	KALIBRACE.....	51
11.1	PŘÍMÁ KALIBRACE.....	51
11.2	UNIVERZÁLNÍ KALIBRACE	52
12	MOBILNÍ FÁZE PRO GPC	54
12.1	TYPY „NON – SIZE EXCLUSION“ EFEKTŮ	55
II	PRAKTICKÁ ČÁST	57
13	POUŽITÉ MATERIÁLY A CHEMIKÁLIE	58
13.1	POUŽITÉ VZORKY	58
13.2	CHEMIKÁLIE PRO GPC ANALÝZU	58
14	POUŽITÉ METODY	59
14.1	GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRFIE	59
14.1.1	Přístroj	59
14.1.2	Kalibrace GPC kolony.....	59
14.1.3	Příprava vzorků pro GPC	59
15	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	60
	ZÁVĚR	71
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	73
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	80
	SEZNAM OBRÁZKŮ	83
	SEZNAM TABULEK.....	84

ÚVOD

Kasein je jednou z nejdůležitějších bílkovin mléka, syntetizovanou výhradně jako produkt mléčné žlázy. Představuje komplex frakcí fosfoproteinů, u nichž je známa i aminokyselinová skladba a struktura. Základními frakcemi kaseinu jsou α_{s1} -, α_{s2} -, β - a κ -kasein. Jejich molekulová hmotnost se pohybuje od 19,0 do 26,0 kDa. V mléce jsou přítomny ve formě koloidní disperze - vlivem hydrofobních sil se seskupuje přibližně 20 molekul do tzv. sub-micel (12 – 15 nm), ty pak dále agregují za účasti fosforečnanů a citrátů vápenatých do micel o velikosti 30 – 300 nm. Spojení frakcí v micely je reverzibilní, velikost micel je závislá na obsahu Ca^{2+} , s jeho úbytkem se micely znatelně zmenšují. Na povrchu micely se nachází hydrofilní polární struktury (tzn. fosfoserinové zbytky α - a β -kaseinů a threoninový zbytek s vázanými oligosacharidy v molekule κ -kaseinu), které nesou solvátový, hydratační vodný obal s celkově záporným nábojem. Ten při nativní rovnováze brání spojení kaseinových micel a dovnitř micely se orientují hydrofobní části bílkovin. Pro zpracování mléka je důležitá koloidní stabilita kaseinu, jež je ovlivňována celou řadou faktorů, včetně procesů při zpracování mléka.

Mezi pařené sýry patří sýry zahrnuté ve skupině měkkých nebo tvrdých sýrů. Charakteristickým znakem pařených sýrů je mírně prokysaná sýřenina s pH od 5,0 do 5,2. Při procesu paření dochází vlivem vysoké pařicí teploty působící na sýr k denuraci bílkovin a k určitým změnám reologických vlastností, díky tomu se sýřenina stává elastickou, pružnou a tažnou.

Gelová permeační chromatografie (GPC) je typem kapalinové chromatografie, která se principiálně odlišuje od chromatografie adsorpční a rozdělovací. Separační proces je založen na rozdělení molekul podle jejich velikosti, přesněji podle jejich hydrodynamického objemu. Nejčastěji se využívá při stanovení molárních hmotností a distribuce molárních hmotností biopolymerů a syntetických polymerů, v rozmezí molárních hmotností od 10^2 do 10^7 g/mol.

Diplomová práce je zaměřena na studium degradace kaseinového komplexu při procesu paření u vzorků sýřenin před pařením, sýřenin po paření a finálních výrobků – sýrů Mozzarella a Jadel. U zmíněných vzorků bylo sledováno, zda při procesu paření dochází ke změnám molární hmotnosti kaseinového komplexu. Za tímto účelem byla použita metoda GPC s refraktometrickou a viskozitní detekcí. Cílem práce bylo i zjištění, do jaké míry je tato metoda vhodná ke studiu degradace kaseinového komplexu, a zároveň byla navržena doporučení pro vhodnější optimalizaci podmínek metody.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 MLÉKO

Mlékem se nazývá tekutý sekret mléčné žlázy savců určený k prvotní výživě jejich mláďat [1, 2]. Mléko je komplexní potravinou obsahující všechny nutričně významné látky a společně s mléčnými výrobky má ve výživě člověka jednu z nejdůležitějších úloh, především jako významný zdroj vápníku [2, 3].

Všechna hospodářská zvířata chovaná pro mléko mají mléčné žlázy uloženy ve zvláštním útvaru – vemenu, to se rozděluje na čtyři čtvrtky, které si zachovávají fyziologickou samostatnost.

Sekrety mléčné žlázy můžeme rozdělit na dvě základní skupiny – mléka nezralá a mléka zralá. Mléko nezralé – mlezivo (kolostrum) je vylučováno mléčnou žlázou na konci gravidity krátce před porodem (předběžné mlezivo) a hned po porodu (mlezivo pravé). Předběžné i pravé mlezivo jsou viskózní kapaliny, světle až oranžově nahnědlé barvy, slané chuti. Jsou bohaté na bílkoviny, především imunoglobuliny, které jsou nositelem výživové a imunologické hodnoty mleziva. Mlezivo se pro průmyslovou výrobu nevyužívá. Přejít z mleziva ve zralé mléko trvá průměrně 7 - 10 dní po porodu.

Podle vzájemného poměru kaseinové a albuminové části bílkovin rozlišujeme u zralých mlék dvě skupiny: mléka albuminová, kam patří kromě kobyliho, oslího, psího, kočičího, sviňského i mléko mateřské, a mléka kaseinová (kravské, kozí, ovčí, velbloudí) [1, 4, 5].

Pro průmyslové zpracování a lidskou výživu se využívá především mléko kravské - asi kolem 85 % celosvětově, v mnohem menší míře pak také mléko buvolí, kozí a ovčí [2].

Výrobou mléka, jeho zpracováním a distribucí se zabývá aplikovaná věda laktologie (mlékařství) [4].

2 SLOŽENÍ KRAVSKÉHO MLÉKA

Tato diplomová práce se zabývá především bílkovinami, proto budou z celkového složení mléka zmíněny pouze dusíkaté látky.

Syrové mléko je definováno v Kodexu Alimentarius jako polydisperzní velmi složitý systém tvořený vodou a pevnými složkami [6]. Mléčný tuk je přítomen ve formě emulze v tzv. **mléčné plazmě**. Hlavní mléčná bílkovina, kasein, je přítomna ve formě koloidní disperze v tzv. **mléčném séru**, které obsahuje koloidní roztok sérových bílkovin a pravý roztok laktózy, minerálních látek a dalších složek [7].

Mléko obsahuje průměrně 87 - 88 hm. % vody, která se v něm vyskytuje jednak volná, jednak vázaná na koloidy a dále i chemicky vázaná. Volná voda tvoří převážnou většinu mléka. Složky mléka, např. laktóza, minerální látky, kyseliny apod., jsou v ní rozpuštěny. Hydratační voda je voda vázaná na koloidy, která tvoří obaly na povrchu jejich částic. Chemicky vázaná voda se nazývá krystalická. Sušina zahrnuje všechny látky zbylé po vysušení. Sušina mléka je průměrně 12 - 13 hm. %, tvoří ji mléčný tuk a doprovodné látky, bílkoviny a nebílkovinné dusíkaté látky, mléčný cukr – laktóza a ostatní sacharidy, vitaminy, minerální látky, enzymy, hormony, plyny. Čerstvě nadojené mléko obsahuje průměrně asi 8 obj. % plynů. Převážná část je oxid uhličitý (5 - 7 obj. %). Část plynů se do mléka dostává až po styku se vzduchem (hlavně dusík a kyslík) [8].

2.1 Dusíkaté látky

Dusíkaté látky mléka tvoří nejkompexnější složku mléka a také určují jeho základní fyzikální a chemické vlastnosti. Některé z nich kromě nutriční hodnoty mají vysoce významné biologické funkce (imunoglobuliny, laktoferin, enzymy aj.).

Z veškerého dusíku v mléce je v bílkovinách obsaženo v ideálním případě pouze 93 - 95 % a zbývajících 5 - 7 % je obsaženo v nebílkovinných dusíkatých látkách. Proto se tato hodnota označuje jako **hrubá bílkovina** a obsah skutečných – **čistých bílkovin** je tedy nejméně o těchto 5 - 7 % nižší [9].

Základní rozdělení dusíkatých látek mléka:

- **Kasein** – komplex fosfoproteinů, které jsou syntetizovány mléčnou žlázou a tvoří v mléce přežvýkavců převážnou část bílkovin.
- **Syrovátkové bílkoviny** (bílkoviny mléčného séra, sérové bílkoviny) – jsou globulární bílkoviny, vyskytující se v mléce ve formě koloidního roztoku.
- **Proteoso-peptony** – jsou tepelně stabilní fosfoproteiny, rozpustné při pH 4,6. Tvoří 2 - 6 % z čistých bílkovin.
- **Ostatní bílkoviny mléka** – jde o řadu minoritních látek bílkovinné povahy (enzymů, lipoproteinů apod).
- **Nebílkovinné dusíkaté látky** – jedná se o látky zůstávající v roztocích po vysrážení bílkovin mléka. Vedle volných aminokyselin je to především kyselina močová, kreatin, nukleotidy, vitaminy skupiny B, amoniak, močovina apod. Jejich koncentrace se v mléce pohybuje v rozmezí od 250 do 300 mg dusíku v 1 litru mléka.

Hrubá bílkovina (3,2 - 3,6 %) celk. N x 6,38	Čistá bílkovina (3,0 - 3,3 %) 93 - 95 % celk. N	Kasein (2,4 - 2,6 %) 76 - 86 % z č. bílkovin	α-kasein	42%
		Syrovátkové bílkoviny (0,5 - 0,7 %) 14 - 24 % z č. bílkovin	β-kasein	25%
	Nebílkovinné dusíkaté látky (25 - 35 mg/100 g) 5 - 7 % celk. N		κ-kasein	9%
		γ-kasein	4%	
			α-laktalbumin	4%
			β-laktoglobulin	9%
			sérum albumin	1%
			imunoglobuliny	2%
			proteoso-peptony	4%
			močovina (20 - 30 mg/100 g)	50%
			amoniak, kreatin, kys.močová atd.	50%

Obr.1: Rozdělení a zastoupení základních dusíkatých látek kravského mléka [9].

Obsah bílkovin v mléce je ovlivněn mnoha faktory, jako např. stádiem laktace, které je nejvýznamnějším faktorem, zdravotním stavem dojnice, výživou a krmením dojnice, plemennou příslušností, genetickými polymorfními frakcemi [2, 6, 9].

Všechny bílkoviny mléka patří mezi globulární bílkoviny (tzv. sféroproteiny), které se nacházejí v útvarech kulovitého nebo oválného tvaru a ve vodě tvoří koloidní roztoky. Struktura bílkovin je dosti složitá a relativně labilní. Působením vnějších fyzikálních, chemických i biochemických faktorů se může měnit a bílkovina denaturovat.

Primární struktura je dána pořadím čili sekvencí aminokyselinových zbytků v řetězcích. Na jednom konci řetězce je vždy volná $-NH_2$ skupina, na druhém skupina $-COOH$. Boční řetězce a skupiny umožňují příčné spojení více řetězců.

Sekundární strukturou mléčných bílkovin se rozumí prostorové uspořádání atomů (konformace) v hlavním polypeptidovém řetězci do dvojité šroubovice nebo podobných útvarů a její fixace prostřednictvím vodíkových a disulfidových můstků.

Výše popsané dvoušroubovice se vzájemně stáčí do kulovitých útvarů, jakýchsi klubíček, fixují své polární i nepolární řetězce svými funkčními skupinami. Shlukují se a vytvářejí **terciární strukturní útvary** – submicely.

Pokud se tyto terciární útvary shlukují, spojují a vytvářejí větší skupinu – micelu, mluvíme o **kvartérní struktuře** bílkovin. Spojení submicel v micelu je poměrně volné a působením vnějších vlivů se snadno rozpadá nebo naopak [10, 11, 12].

2.1.1 Kasein

Kasein je jednou z nejdůležitějších bílkovin mléka, syntetizovanou výhradně jako produkt mléčné žlázy [10, 13]. V mléce je přítomen ve formě koloidních částic, které obsahují kromě proteinů i značné množství vápníku a fosforu, v nepatrné míře také hořčičk a citráty. Fosfor je vázán na kasein v množství 0,7 - 0,9 % ve formě kyseliny fosforečné, jenž je estericky vázaná na serin a threonin. Kasein se v čerstvém mléce váže na vápník. Mluvíme tedy o tom, že kasein je přítomen jako komplex kaseinátu vápenatého (95 %) a fosforečnanu vápenatého (5 %). Z mléka ho můžeme vysrážet okyselením při pH 4,6 a teplotě 20 °C [10, 14]. Kasein totiž patří mezi hydrofobní bílkoviny, což je příčinou jeho izoelektrického srážení z mléka po ztrátě vnějšího náboje a solvatačního vodního obalu [6].

Kaseiny se rozdělují na základě jejich primární struktury (sekvence aminokyselin) do 4 základních frakcí: α_1 , α_2 , β a κ , a ty mají celou řadu genetických variant, které se od sebe liší chemickou strukturou a vlastnostmi [15, 16, 17]. V kravském mléce je jejich zastoupe-

ní α_1 (12 - 15 %), α_2 (3 - 4 %), β (9 - 11 %) a κ (2 - 4 %) [16]. Změny ve strukturách kaseinů jsou důsledkem posttranslačních modifikací nebo genetického polymorfizmu [15, 18].

Bylo zjištěno, že všechny kaseiny vykazují tzv. mikroheterogenitu, která vzniká z pěti příčin:

1. Variabilita ve stupni fosforylace
2. Disulfidické vazby
3. Hydrolýza plazminem
4. Variace ve stupni glykosylace
5. Genetický polymorfizmus [18].

Charakteristika základních frakcí kaseinu

α_1 -kasein je hlavní složkou kaseinové frakce mléka. Tvoří ho jedna velká a jedna malá část a obě tyto části mají stejnou sekvenci AMK (aminokyselin). Je známo 6 genetických variant (A, B, C, D, E a F), z nichž varianta B až z 90 % u většiny plemen převažuje. Primární struktura α_1 varianty B je složena ze 199 AMK o molekulové hmotnosti 23,6 kDa. Obsahuje 8 fosfoserinových zbytků lokalizovaných v polohách 43 - 80, díky nimž je tato část molekuly polární. V polohách 100 - 199 jsou situovány nepolární postranní řetězce aminokyselin. V přítomnosti vápenatých iontů tvoří nerozpustnou vápenatou sůl. Za fragmenty α_1 -kaseinu se považuje λ -kasein, vzniklý štěpením plazminu (alkalický mléčný enzym) [11, 15, 19, 20, 21].

α_2 -kasein má primární strukturu složenou z 207 AMK o molekulové hmotnosti 25,2 kDa a obsahuje 11 fosfoserinových zbytků. Jsou známy 4 genetické varianty A, B, C a D. Na rozdíl od α_1 -kaseinu není tak citlivý k přítomnosti vápenatých iontů [15, 19, 21].

β -kasein je nejvíce hydrofobní. V primární struktuře obsahuje 209 AMK o molekulové hmotnosti 24,0 kDa a 5 fosfoserinových zbytků v poloze 1 - 40. Nepolární postranní řetězce aminokyselin jsou lokalizovány v polohách 136 - 209. Je známo 7 genetických variant.

Při teplotách 1 °C a nižších poskytuje s vápenatými ionty rozpustnou sůl, při vyšších teplotách sůl nerozpustnou. Degradací β -kaseinu plazminem vznikají γ -kaseiny. Odštěpením zbytku s aminokyselinami 1 - 28 vznikne γ_1 -kasein (zbytek 29 - 209, s molekulovou hmotností 20,5 kDa) a proteoso-pepton značený jako PP8F, γ_2 -kasein (zbytek 106 - 209, s molekulovou hmotností 11,8 kDa) vzniká odštěpením řetězce 1 - 105 a γ_3 -kasein (zbytek 108 - 209, s molekulovou hmotností 11,6 kDa) odštěpením řetězce 1 - 107 [9, 10, 11, 15, 21].

κ -kasein se skládá z hlavní bezcukerné složky a minimálně šesti malých složek. Vyskytuje se jako směs polymerů spojených intermolekulárními disulfidickými můstky. Je známo 7 genetických variant, z nichž varianta A u většiny plemen převládá. Primární struktura hlavní složky κ -kaseinu se skládá ze 169 AMK o molekulové hmotnosti 19,0 kDa a 1 fosfoserinového zbytku. Jako jediný z výše uvedených kaseinů je glykosylován. Kromě fosforu jsou v kaseinu přítomny také sacharidy a to D-galaktopyranóza, *N*-acetyl-D-galaktosamin a *N*-acetylneuraminová kyselina. Prostřednictvím *N*-acetyl-D-galaktosaminu jsou cukry na protein vázány glykosidickou vazbou. S vápenatými ionty tvoří κ -kasein rozpustné soli stabilizující α s- a β -kaseiny v přítomnosti iontů vápníku. Je rozmístěn především v povrchové vrstvě submicel a chrání tak bílkovinu před koagulací [6, 9, 10, 15, 21].

Všechny uvedené frakce kaseinu díky vysokému obsahu prolinu, cystinu a cysteinu, které se účastní příčných vazeb mezi řetězci, dávají kaseinu odolnost vůči teplotám nad 100 °C [10].

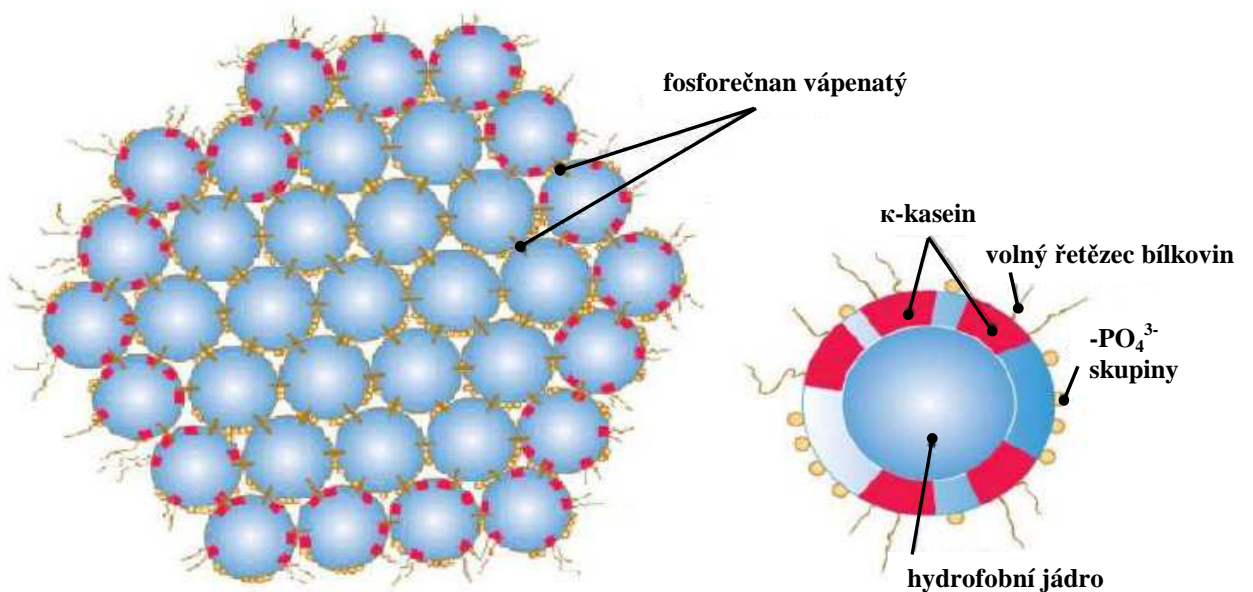
Struktura kaseinové micely

Kaseiny nejsou v mléce ve formě monomerů, ale jsou agregovány do kaseinových komplexů - micel. Nejprve jsou molekuly α s-, β - a κ -kaseinů uspořádány do submicel tvaru rotačního elipsoidu po 25 - 30 molekulách. Jednotlivé submicely se vzájemně spojují do micel při teplotách nad 5 °C prostřednictvím fosfátových (fosfoserinových) skupin α s- a β -kaseinů a vápenatých iontů buď přímo, nebo prostřednictvím volných fosfátů a citrátů. Spojení frakcí v micely je reverzibilní, velikost micel je závislá na obsahu Ca^{2+} , s jeho úbytkem se micely zřetelně zmenšují. Na povrchu micely se nachází hydrofilní polární

struktury (tzn. fosfoserinové zbytky α - a β -kaseinů a threoninový zbytek s vázanými oligosacharidy v molekule κ -kaseinu), které nesou solvátový, hydratační vodný obal s celkově záporným nábojem, který při nativní rovnováze brání spojení kaseinových micel a dovnitř micely se orientují hydrofobní části bílkovin.

Kaseinové micely jsou morušovitěho tvaru o průměru 30 - 300 nm a obsahující asi 20 000 molekul kaseinů o složení:

- 93 % kaseinů,
- 3 % vápenatých iontů,
- 3 % anorganického (volného) fosfátu,
- 2 % fosfátu vázaného jako fosfoserin,
- 0,4 % citrátu,
- 0,5 % sodných, draselných a hořečnatých iontů [6, 10, 14, 19].



Obr.2: Schéma kaseinové micely a detail submicely [10].

Funkční vlastnosti kaseinů

Kaseinové produkty vykazují široký rozsah funkčních vlastností, díky kterým je možné je využívat jako potravinové přísady. K základním funkčním vlastnostem patří emulgace tuku, stabilita pěny a posilování textury potravinových produktů.

Rozpustnost je důležitým předpokladem pro většinu dalších funkčních vlastností a je důležitá pro mnoho aplikací kaseinu. Kasein je nerozpustný v rozsahu pH 4,0 - 5,0, ale vysoce rozpustný při pH vyšším než 5,5. Je rozpustný i při pH nižším než 3,5, ale při této hodnotě je více viskózní než při neutrálním pH.

Prakticky pro všechny komerční aplikace jsou kaseiny před použitím rozpuštěny v alkalickém prostředí, např. syřidlový kasein je nerozpustný ve vodě při pH 7, ale může být rozpuštěn zvyšováním pH nad 9,5 přidávkem NaOH.

Tepelná stabilita je důležitá vlastnost kaseinátů v polévkách, omáčkách, smetanách do kávy a jiných nutričních produktech. Sodné, draselné a amonné kaseináty jsou vysoce tepelně stabilní. Kaseinát vápenatý má mnohem nižší tepelnou stabilitu než kaseinát sodný.

Koagulace a tvorba gelu jsou žádoucí u mléčných výrobků a dezertů, ale nežádoucí u mnoha dalších aplikací kaseinu, např. smetany do kávy, polévek, omáček, nápojů a nutričních nebo léčivých přípravků. Tvorba kyselého nebo syřidlového gelu v mléce, je způsobena vytvořením terciární struktury kaseinové sítě. Obecně kaseináty postrádají stabilitu v kyselém prostředí, ale kvalitní kaseinát sodný může být použit jako hlavní složka smetany do kávy, u které je požadována stabilita ve středně kyselém prostředí.

Absorpce vody je u kaseinových produktů nejdůležitější v aplikacích, jako je pekařství a výroba cereálních produktů, při výrobě těstovin, masa nebo náhražek sýrů.

Viskozita je důležitou vlastností pro mnoho tekutých výrobků, jako jsou polévky, šťávy a omáčky, kde je zahušťování požadovanou funkční vlastností. Vytváření textury je zejména

důležité u polotekutých výrobků, např. u náhražek sýrů, vytlačovaných sladkostí a cukrovinek. Flexibilní povaha kaseinových molekul, které mají uspořádanou sekundární nebo terciární strukturu díky vysokému obsahu prolinu, dává jejich roztokům mnohem vyšší viskozitu, než je tomu v případě normálních globulárních proteinů.

Emulzifikace tuků nebo olejů je důležitá funkční vlastnost téměř všech aplikací kaseinů a kaseinátů, jako jsou smetany do kávy, šlehané cukrovinky, náhražky sýrů, polévky, omáčky a masné produkty. Schopnost proteinů poskytovat stabilitu závisí na schopnosti kaseinu bránit se proti sloučení. Pro srovnání emulzifikačních vlastností byla použita široká škála parametrů, např. emulzifikační kapacita, index emulzifikační aktivity a další.

Tvorba pěny je důležitou vlastností kaseinátů pro aplikace, jako jsou šlehané cukrovinky a dezerty v podobě např. šlehané pěny. Důležitými vlastnostmi pro posouzení tvorby pěny jsou zpravidla objem pěny a stabilita pěny. Tvorba pěny závisí na koncentraci proteinů, iontovém prostředí a na přítomnosti dalších složek, jako jsou cukry a tuky [22].

2.1.2 Syrovátkové bílkoviny

Syrovátkové bílkoviny tvoří asi 1/5 z obsahu čistých bílkovin (přibližně 17 - 20 %). Získáme je po vysrážení kaseinu při pH 4,6. V syrovátkových bílkovinách mléka se nachází α -laktalbumin (tvoří asi 25 %) a β -laktoglobulin (nad 50 %), což jsou složením snad nejvhodnější bílkoviny vůbec. Obsah všech nepostradatelných aminokyselin je s výjimkou methioninu vyšší než v kaseinu. Velmi cenný je vysoký obsah cystinu a tryptofanu, na který je kasein chudý [5, 9].

β -laktoglobulin je tvořen řetězcem 162 aminokyselin s relativní molekulovou hmotností 18,3 kDa a izoelektrickým bodem $pI = 5,35 - 5,41$. Tvoří hlavní podíl bílkovin mleziva, avšak zralé kravské mléko ho obsahuje jen asi 0,1 %. Je nerozpustný ve vodě, avšak rozpustný ve slabých roztocích solí (jako je tomu v mléce). Při zvýšené teplotě ve slabě kyselém prostředí dochází k jeho denuraci i k dosti rychlému srážení.

α -laktalbumin je stejně jako β -laktoglobulin syntetizován v mléčné žláze. Jeho řetězec je tvořen 123 aminokyselinami s relativní molekulovou hmotností 14,2 kDa a izoelektrickým bodem pI = 4,20 – 4,50. Neobsahuje fosfor a je rozpustný ve vodě, slabých zásadách a kyselinách, popřípadě ve zředěných roztocích solí. Je zjišťován v každém mléce, které obsahuje laktózu, protože je nezbytný pro její syntézu, má významnou biologickou funkci jako součást některých enzymů a sekvence aminokyselinového řetězce je u něj stejná, kromě aktivního centra, jako u lysozymu [9, 13, 23, 24].

Imunoglobuliny jsou minoritní vysokomolekulární globulární glykoproteiny mléka s účinností protilátek. Zajišťují přenos imunity z matky na mládě, a proto jsou ve zvýšené koncentraci v kolostru (až 1,2 %). Relativní koncentrace imunoglobulinů v mléce je u zdravých zvířat nízká a odlišná od koncentrace v krvi nebo jiných vnějších sekretech. V mléce se nacházejí 4 z 5 tříd imunoglobulinů známých u savců, a to IgG₁, IgG₂, IgM a IgA [6, 9].

3 TECHNOLOGICKY VÝZNAMNÉ VLASTNOSTI MLÉKA

Mléko má kromě sensorických vlastností (chuť, vůně, barva, konzistence) a základních fyzikálních a chemických vlastností (specifická hmotnost, bod mrznutí, kyselost – titrační a aktivní, povrchové napětí apod.) také technologické vlastnosti, které jsou důležité z hlediska zpracovatelnosti na jednotlivé druhy mlékařských výrobků. Nejvýznamnějšími technologickými vlastnostmi mléka jsou kysací schopnost, syřitelnost a tepelná stabilita [9, 25].

3.1 Kysací schopnost

Bakterie mléčného kysání jsou na rozdíl od většiny mikroorganismů mimořádně citlivé na vnější podmínky. Proto hraje důležitou roli při zpracování mléka na kysané mléčné výrobky, tvarohy a sýry jakost a složení mléka jako živného prostředí. Kysací schopnost je rozhodujícím kritériem, zda v mléce bude zajištěn dobrý růst přidaných čistých mlékařských kultur potřebných pro zdárný průběh všech mikrobiologických procesů. Výrazný inhibiční efekt způsobují především cizorodé inhibiční látky, jako jsou antibiotika, čistící a desinfekční prostředky, konzervační látky, povrchově aktivní látky, ale také silná oxidační činidla. Bakteriostaticky až baktericidně však působí i přirozené látky obranného systému mléčné žlázy, a to jak imunoglobuliny a leukocyty, tak i další nesespecifické antimikrobiální látky. Zhoršené prokysávání mléka však může být způsobeno i změněným složením mléka v důsledku zdravotních a metabolických poruch nebo dlouhodobého a hlubokého chlazení mléka. V mléce se proto zjišťuje jak přítomnost inhibičních látek, tak i kysací schopnost [9, 25].

3.2 Syřitelnost

Syřitelnost je schopnost mléka srážet se syřidlem a tvořit sýřeninu požadovaných vlastností. Proces srážení mléka syřidlem probíhá ve dvou fázích. V **primární fázi** dochází pouze k limitní proteolýze κ -kaseinu, v **sekundární fázi** ke koagulaci frakcí kaseinu za přítomnosti vápenatých iontů. Syřitelnost je ovlivněna celou řadou faktorů souvisejících s chemickým složením mléka a variabilitou jeho složek. Nejvýznamnější faktory jsou obsah kaseinu a zastoupení jeho frakcí, velikost a stav kaseinových micel, obsah a formy vápníku a fosforu v mléce, zejména rovnováha kalcium kaseinátového – kalcium fosfáto-

vého komplexu, případně i další minerální látky, pH mléka a pochopitelně teplota. Při změnách složení mléka v závislosti na stádiu laktace, v důsledku nevhodné výživy, případně v závislosti na metabolických poruchách a zejména při zánětech mléčné žlázy se zhoršuje syřitelnost a tvoří se málo kompaktní křehká sraženina. Syřitelnost je také značně ovlivněna dobou a teplotou skladování mléka a stejně jako se zhoršuje kysací schopnost, se zhoršuje syřitelnost a tvoří se málo kompaktní křehká sýřenina [9].

3.3 Termostabilita

Jedná se o schopnost mléka, resp. kaseinu, zachovat si své původní koloidní vlastnosti při působení vysokých teplot. Udává se jako čas potřebný k dosažení počátku koagulace při určité teplotě, obvykle 140 nebo 120 °C podle předpokládaného tepelného ošetření. Za těchto podmínek nenastává denaturace kaseinu, ale v důsledku kombinovaného účinku Ca^{2+} a chemických reakcí mezi funkčními skupinami aminokyselin agregují kaseinové micely. Termostabilita mléka proto závisí na celé řadě faktorů ovlivňujících koloidní stabilitu kaseinu, ty vyplývají jak z chemického složení mléka, a tedy prvovýrobních faktorů, tak z podmínek zpracování mléka. Rozhodujícím faktorem je aktivní kyselost mléka. Obvykle má mléko optimální termostabilitu při pH 6,5 – 6,6; pod touto hodnotou termostabilita prudce klesá a při pH pod 6,2 mléko koaguluje již při 70 – 80 °C. Mléko s dobrou termostabilitou koaguluje při 140 °C po více než 20 min [7].

4 MLÉKO JAKO ZÁKLADNÍ SUROVINA K VÝROBĚ SÝRŮ

Jakost mléka je určena celkovým chemickým složením mléka a jeho fyzikálními, mikrobiálními a hygienickými vlastnostmi. Podle způsobu zpracování a využití mléka se mění i význam těchto vlastností. Proto požadavky na jakost mléka jako suroviny pro mlékárenský průmysl nejsou vždy stejné. Závisí na speciálních požadavcích, které se kladou na mléko podle toho, na jaké výrobky má být zpracováno. Tyto požadavky jsou jiné u mléka určeného k technickému zpracování (např. na kasein) a jiné u mléka určeného k výrobě tvrdých sýrů apod. Jsou však určité znaky jakosti, které musí mít každé mléko, dodávané jako surovina pro mlékárenský průmysl, bez ohledu na způsob jeho dalšího zpracování. Speciálními znaky, které rozhodují o vhodnosti mléka k výrobě jednotlivých druhů sýrů, jsou *syřitelnost* mléka, tj. schopnost mléka k sýření a vytváření pevné sýřeniny, a *kvasnost* mléka, tj. schopnost mléka být vhodným prostředím pro rozmnožování a činnost užitečných mikroorganismů, především bakterií mléčného kvašení, a to jak v mléce, tak i v čerstvé sýřenině [26].

4.1 Požadavky na mléko pro výrobu sýrů

Mléko jako průmyslová surovina se musí získávat nepřetržitým, pravidelným a dokonalým vydojováním mléčných žláz zdravých, dobře živých dojnic. Nesmí se k němu nic přidat ani z něho odebrat. Musí mít nezměněnou barvu, vzhled, vůni a chuť. V mléce, i v mléce zdravých, dobře živých dojnic, probíhají značné změny ve složení. Tyto změny závisí na laktanční době a místě produkce.

Největší změny nastávají v obsahu tuku a bílkovin, nejmenší u mléčného cukru a popelovin. Proto nás při výrobě sýrů z hlediska chemického složení zajímá obsah bílkovin, zvláště pak obsah kaseinu, neboť na jeho obsahu a na tučnosti zpracovávaného mléka závisí výtěžnost sýrů. Čím tučnější je mléko, tím vyšší je obsah bílkovin v mléce a tím méně mléka se spotřebuje k výrobě 1 kg sýra. Kromě obsahu tuku a bílkovin mají pro výrobu sýrů zvláštní význam rozpustné vápenaté soli, které mají příznivý vliv na syřitelnost, vlastnosti sýřeniny a na konzistenci sýrů. Kromě doby laktace působí na obsah vápníku v mléce především krmivo. V krmivu závisí obsah vápníku na složení půdy [27, 28].

Fyzikální vlastnosti mléka těsně souvisí s jeho chemickým složením, takže všechny vlivy, především krmivo a zdravotní stav dojnice, které pozměňují složení mléka, mění i jeho fyzikální vlastnosti (hustota, písčitost apod.). Mléko s pozměněnými fyzikálními vlastnostmi se nesmí použít k výrobě sýrů [28].

Mikrobiologická čistota mléka pro výrobu sýrů by také měla být co nejlepší. Rozhodující není jen nízký celkový počet zárodků, ale zejména nepřítomnost bakterií máselného kvašení, hnilobných a plynotvorných bakterií. Na mikrobiologické čistotě mléka se významně podílí hygiena získávání a ošetřování mléka [25].

5 TECHNOLOGIE VÝROBY PAŘENÝCH SÝRŮ

Mezi pařené sýry patří sýry zahrnuté ve skupině měkkých nebo tvrdých sýrů, vzhledem ke speciálnímu zpracování sýřeniny se obvykle uvádějí samostatně. Pro pařené sýry se natolik rozšířil název Pasta Filata, který má původ v Itálii, že se používá jako mezinárodní označení pro skupinu pařených sýrů.

Pařené sýry pochází původně z Itálie, Řecka, Turecka a východní Evropy. Pro tradiční výrobu se používá mléko ovčí, buvolí, kozí a kravské. Některé tyto sýry se řadí k měkkým nebo poloměkkým sýrům a konzumují se čerstvé nebo po krátké době zrání (např. čerstvá Mozzarella, Scamorza). Jiné se řadí k tvrdým nebo polotvrdým zrajícím sýrům, které před konzumací prochází procesem zrání (např. Caciocavallo, Kaškaval, Provolone) [29].

Nejvýznamnějším zástupcem pařených sýrů je Mozzarella. Průmyslově vyráběná Mozzarella nemá tak výraznou chuť jako jiné druhy sýrů, nelze ji používat jako stolní sýr a servírovat ji jako chuťovku. Ideální použití má pro přípravu pizzy, při pečení se výborně rozpéká, nevytváří tvrdou kůrku, ale naopak typickou táhlovitost sýrového posypu [30, 31, 32].

Charakteristickým znakem pařených sýrů je mírně prokysaná sýřenina s pH od 5,0 do 5,2. Následným zpracováním v horké vodě se stává plastickou, což umožňuje rozmanité tvarování sýrů. Polotovar pro výrobu pařených sýrů se vyrábí stejně jako tvrdé, nízko dohřívané sýry [5].

5.1 Tepelné ošetření mléka

Podle technologických postupů se všechny druhy sýrů vyrábí výhradně z pasterovaného mléka. Pasterací se rozumí zahřev mléka či smetany na teploty pod 100 °C, při kterém dochází k usmrcení převážné části vegetativních forem mikroorganismů a přitom jen k minimálním chemickým změnám suroviny projevujícím se změnou chuti či nutriční hodnoty. Základní cíle pasterace jsou: **zajištění zdravotní nezávadnosti** mléka a **zvýšení trvanlivosti výrobku**. Zvýšení trvanlivosti mléka pasterací není určeno jen zvolenými pod-

mínkami záhřevu, ale také rozsahem kontaminace suroviny a charakterem kontaminujících mikroorganismů [3, 7].

Pro výrobu Mozzarely se nejběžněji používá pasterační teplota 72 °C po dobu 15 sekund, ale je možné používat i teploty vyšší. Se zvyšující se pasterační teplotou dochází ke zvýšené denaturaci sérových bílkovin, které neodchází do sýřeniny. Zvyšuje se výtěžnost, ale následně i vazba vody, a může tedy dojít ke snižování sušiny sýrů a ke zhoršení jejich jakosti (albumin a globulin zadržují větší podíl vody, která se již následnými technologickými zásahy bez újmy na jakosti sýra nedá odstranit) [5, 33].

Po pasteraci se pasterované mléko plní do sýrašských kádí, kde se upravuje jeho složení před sýřením [34].

5.2 Úprava mléka před sýřením

Úpravou mléka před sýřením se rozumí úprava složení mléka a úprava mikrobiálního života v mléce. Úprava složení mléka se týká především úpravy tučnosti mléka, aby se dosáhlo standardního obsahu tuku v sušině sýra, a úpravy obsahu rozpustných vápenatých solí po pasteraci, nejčastěji přidavkem chloridu vápenatého, aby se zlepšila syřitelnost mléka, která je pasterací zhoršena v důsledku změny v poměru koloidní a rozpustné formy vápníku. Pokud by se v pasterovaném mléce neupravil obsah rozpustných vápenatých solí přidavkem chloridu vápenatého, získala by se více méně měkká houbovitá sýřenina, ze které by se špatně tvořilo zrno a konzistence sýrů po zformování by byla vadná. Tím, že chlorid vápenatý zlepšuje konzistenci a pevnost sýřeniny, zlepšuje také výtěžnost. Při zpracovávání sýřeniny se totiž netvoří tolik sýrového prachu, takže syrovátka obsahuje nižší procento tuku a bílkovin. Dále se může do pasterovaného mléka přidávat dusičnan draselný, který má zabránit předčasnému duření sýrů, vyvolanému plynotvornými koliformními bakteriemi, popř. bakteriemi máselného kvašení. Mikrobiální život v mléce se upravuje přidáním speciálních mikrobiálních čistých kultur v různých dávkách podle druhu vyráběných sýrů. Upravuje se také teplota mléka na požadovanou hodnotu, která je u většiny sýrů v rozmezí 30 – 35 °C [2, 4, 25, 28].

Pro výrobu Mozzarely na pizzu se užívá pasterované mléko s přibližně 1,8 % tuku. Mozzarella s vyšším obsahem tuku kolem 3,6 % se konzumuje jako stolní sýr [30].

Po naplnění kádí pasterovaným mlékem se mléko zahřeje na teplotu syření (kolem 30 – 33 °C) a důkladně promíchá se startovacími kulturami. Tradičními startovacími kulturami u Mozzarely jsou termofilní (1 - 2 %, optimální teplota 40 – 45 °C) např. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus* při výrobě pizza sýrů. Často se *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* nahrazuje *Lactobacillus helveticus*, který má schopnost zamezit hnědnutí sýru během pečení. Je možné Mozzarellu jako pizza sýr vyrábět i z mezofilních startovacích kultur (optimální teplota 20 – 30 °C), užívaných při výrobě Čedaru (např. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* [7, 29, 30, 34, 35]).

U startovacích kultur se požaduje technologická funkce, která je spojena se schopností mikroorganismů přeměňovat substráty, např. sacharidy, bílkoviny a lipidy na metabolity, které ovlivňují výslednou chuť, vůni a konzistenci výrobků [2].

Po prokysání se k mléku přidává syřidlo a zahájí se proces syření [34].

5.3 Syření mléka

Působením syřidlového enzymu chymosinu na mléko se molekula kaseinu rozkládá na dvě molekuly parakaseinu a vzniká požadovaná tuhá syřenina, která je základem výroby sladkých sýrů. Chymosin je aktivní složkou syřidla. Klasické syřidlo se získává extrakcí telecích žaludků. Vzhledem k omezeným zdrojům této suroviny se používají další enzymové preparáty živočišného, mikrobiálního nebo rostlinného původu s obdobným působením. K živočišným syřidlům patří pepsinové syřidlo, které se často využívá ve směsi s chymosinovým syřidlem. Z mikrobiálních syřidel se využívají preparáty izolované z plísní *Cryphonectria parasitica* a *Rhizomucor miehei*.

Při srážení mléka syřidlem dochází k enzymovému štěpení specifické peptidové vazby mezi 105. a 106. aminokyselinou (fenylalaninem – methioninem) v kaseinové frakci κ . Vzniká tak hydrofobní para- κ -kasein a hydrofilní κ -kaseinmakropeptid. Syření probíhá ve třech fázích. V **primární fázi** dochází k působení syřidla na κ -kasein. Koagulaci destabilizovaného kaseinu označujeme jako **fázi sekundární**. Nezbytnou podmínkou koagulace není jen teplota vyšší než 6 °C, přítomnost Ca^{2+} iontů, ale i koncentrace a aktivita enzymů. **Terci-**

ární fáze působení syřidla na kasein již nesouvisí s koagulací, ale s proteolytickým působením syřidla v průběhu zrání [2, 26, 33].

Pro výrobu Mozzarely se používají různá komerčně vyráběná syřidla, která se dávkuje ve formě zředěného roztoku, tak aby dávkou syřidla bylo dosaženo požadované tuhosti sýřeniny za 30 - 45 minut v klidu. V průběhu sýření by se měla stále udržovat teplota sýření (30 – 33 °C). Po sýření vzniká sýřenina, která se zpracovává [7, 34, 36].

5.4 Zpracování sýřeniny

Účelem zpracování sýřeniny je připravit sýřeninu o požadované velikosti částic, vlastnostech a obsahu vody, resp. syrovátky. Ve vytvořeném bílkovinném gelu – sýřenině je vázáno značné množství vody, kterou je nutno odstranit. Zpracování sýřeniny zahrnuje řadu operací podle jednotlivých typů sýrů zajišťujících tvorbu sýrového zrna vhodného pro následné formování [37].

5.4.1 Krájení

Zpracování sýřeniny začíná jejím **krájením**. Tato operace se provádí pomocí sýrařských harf. Sýřenina se krájí po dobu 15 minut zabudovanými harfami ve směru krájení a použití bočních lišt v kolmé poloze k obvodu výrobníku, které se nastaví po odlepení sýřeniny od stěn. Způsob krájení a otáčky harf musí být voleny tak, aby bylo docíleno co nejvyrovnanějšího zrna s co největším podílem zrna požadované velikosti 8 - 14 mm. Přitom je důležité, aby požadované velikosti zrna bylo dosaženo mezi 6. – 9. minutou krájení. Dosáhne se tak nejvyššího procenta sýrového prachu a tučnost syrovátky je nejnižší [38].

5.4.2 Drobení

Dalším krokem zmenšování pokrájené sýřeniny je **drobení**. Provádí se opět pomocí harf při vyšší frekvenci otáčení. I zde je velmi důležité zvolit správnou frekvenci otáčení harf. Pokud se harfy otáčejí příliš rychle, zrno se tříští nebo třepí a vzniká tak již zmiňovaný sýrařský prach. Drobení musí být přesně načasováno, pokud je drobení opožděné, zrno má příliš tuhou pokožku. Stejnoseměrnost (stejná velikost) zrna je základní podmínkou pro konzistenci sýra [37].

5.5 Vymíchávání

Vymíchávání je technologický úkon, při němž dochází k nejvýraznějším technologickým kysacím pochodům zpracované syřeniny.

Po skončeném krájení se sníží otáčky harf na nejnižší, případně nulovou hodnotu, provede se reverse a směs se uklidní. Jakmile se zrno již nepohybuje a syrovátka se v povrchové vrstvě dostatečně vyčeřila, začne se ihned s odpouštěním syrovátky.

Odpouštění syrovátky včetně příslušné manipulace, musí být co nejrychlejší a nemá trvat déle než 5 minut od zastavení harf. Se syrovátkou odchází i ve vodě rozpustné látky včetně laktózy, syrovátkové bílkoviny, soli, peptidů a dalších nebílkovinných dusíkatých látek.

Po skončení odpouštění syrovátky je nutné směs syrovátky se sedlým zrnem dokonale rozmíchat, míchání začíná krájením. S ohledem na dobu odpouštění syrovátky se míchání provádí zvýšenými otáčkami míchadel při 15 – 16 ot./min., a to po dobu asi 3 min. Před začátkem míchání je možno provést krátkou reverzi krájením při nízkých otáčkách pro hrubé rozrušení sednuté vrstvy zrna. Jakmile se zrno na výrobníku od sebe dokonale oddělilo a směs je prostá jakýchkoli zbytků shluků, sníží se otáčky na 12 – 13 otáček za minutu a směs se stanovenou dobu vymíchává. Doba vymíchávání je stanovena od 10 do 25 minut. Do doby vymíchávání je zahrnuto i vlastní odpouštění syrovátky. Po vymíchávání nastává operace vypouštění [38].

5.6 Vypouštění

Při napouštění směsi zrna do lisovací vany je třeba dbát určitých zásad:

- počet otáček se upraví na 10 za minutu,
- vypouštění směsi musí být provedeno v co nejkratší možné době,
- směs zrna je třeba neustále rozhrnovat po celé ploše vany, aby nedošlo k jejímu sesednutí a pak k dodatečnému nahrnutí zrna,
- zrno v lisovací vaně musí být po zalisování stále zaplaveno syrovátkou,
- syrovátka nesmí během napouštění přetékat přes okraj bočnic, aby nedocházelo k úniku zrna do spodního prostoru a tím ke zbytečné ztrátě,

- při skončené manipulaci je nutno hladinu syrovátky snížit a přibližně udržovat v takové výši, aby bylo možno přes její slabou průhlednou vrstvu sledovat a kontrolovat správné urovnání zrna [38].

5.6.1 Odkapávání a vyklápění

Odkapáváním se rozumí uvolňování syrovátky bez použití tlaku. Nejdříve sýřenina volně odkapává přibližně 30 minut, pak se vytahuje z lisovacích van na odkapní stojany. Na těchto stojanech odkapává a prokysává do druhého dne.

Druhý den ráno se vylisovaná a prokysaná sýřenina krájí na kousky o požadované velikosti a vyklápí do přepravních vozíků, na kterých se převezí ihned k pařicímu stroji (pařičce) [5, 37, 38].

5.7 Paření

Nakrájené kousky sýřeniny padají do perforovaného bubnu, ponořeného do horké vody, kde sýřenina změkne a zvláční. Teplota pařicí vody u Mozzarely je 36 – 43 °C, u jiných druhů pařených sýrů se teplota pařicí vody pohybuje kolem 85 – 90 °C. Do pařicí vody je možné přidat stanovené množství soli, čímž se sýry částečně vysolí. Z pařicího bubnu postupuje sýřenina do hnětacích šneků, kde se hněte a vytahuje, dokud nedosáhne žádoucí táhlovitosti těsta [5, 34].

Při procesu paření dochází vlivem vysoké pařicí teploty, která na sýr působí, k denuraci bílkovin a k určitým změnám reologických vlastností.

Denaturace souvisí s prostorovým uspořádáním bílkovin. Působením fyzikálních a chemických vlivů (záření, zahřátí nad 50 °C, působení solí kyselin a alkálií) se rozrušují částečně nebo i úplně nevazebné interakce, které stabilizují terciární a sekundární strukturu. Aniž by se jakkoli porušila kovalentní struktura bílkoviny (peptidové vazby v primární struktuře), bílkovina ztrácí své specifické biologické vlastnosti. Za určitých podmínek může být denaturace vratná, a to po odstranění denaturačního vlivu. Biopolymer opět zaujme svou nativní konformaci. Většinou je však denaturace nevratná [39, 40].

U sýřeniny pařením dochází k určitým změnám její struktury. Sýřenina se stává elastickou, pružnou a tažnou. Pokud je použita příliš vysoká pařicí teplota, ze suroviny se stane blátivá

hmota, kterou nelze tvarovat. Naopak pokud je použita příliš nízká pařící teplota, sýřenina není dostatečně propařena, tudíž nelze vytvarovat hotový výrobek. Málo propařená sýřenina je tuhá a při pokusu o vytvarování se trhá [41].

5.8 Solení sýrů

Solení je důležitý technologický zákrok. Obsah soli zlepšuje charakteristické vlastnosti určitého druhu sýra, především chuť, konzistenci, reguluje odtok syrovátky a tím obsah vody v sýru. Zpomalením až zastavením rozmnožování a činnosti bakterií mléčného kvašení lze usměrnit průběh kysání, jakož i zastavit vývoj nežádoucích mikroorganismů v sýrech během zrání. Po vysolení musí mít sýr optimální obsah soli, při němž jsou jeho jednotlivé vlastnosti a charakteristické znaky co nejlepší. Optimální obsah soli souvisí s obsahem tuku v sýru, čím je sýr tučnější, tím může být obsah soli nižší. Nejčastěji probíhá *solení v solné lázni*, do které se sýry ponořují, to umožňuje mechanizaci solení a spotřeba soli je malá. Další možností je *solení sýrů do těsta* (Čedar, Gorgonzola) anebo tzv. "*na sucho*" (u Fety, Nivy), kdy se roztírá sůl na povrchu sýra. Volba způsobu solení závisí na druhu sýra a jeho požadavku na solení. U některých druhů se jednotlivé způsoby solení kombinují a vzájemně doplňují [3, 26, 28, 42].

U Mozzarely se sůl přidává přímo do sýřeniny před vytahováním, během vytahování, mezi hnětením a vytahováním nebo tradičním způsobem vysolováním [35,43]. Doba zadržení hmoty v solné lázni a koncentrace solné lázně je klíčovým parametrem ovlivňujícím celkovou absorpci soli a ztráty vlhkosti během vysolování [35]. Neustálým průtokem solné lázně se zamezí nerovnoměrnému rozložení soli v sýru [44]. Až na několik málo výjimek se obsah soli u Mozzarely pohybuje kolem 0,5 - 2 % [43].

Sýr by měl do solné lázně vstupovat po krátké době zchlazení, ale při takovém chlazení není sýr úplně zchlazený a ve středu sýra je teplota vyšší, než je teplota zchlazené části, a k celkovému zchlazení dochází až při vysolování [35].

Mozzarella jako pizza sýr se řadí k čerstvým pařeným sýrům, které nepodléhají zrácím procesům a konzumují se čerstvé, bezprostředně po výrobě. U těchto sýrů nenastávají kromě

mléčného kvašení žádné podstatné změny bílkovin. U jiných druhů pařených sýrů proces zrání probíhá po jejich výrobě a během skladování [4, 33, 45].

5.9 Sušení

Osušení trvá 1 - 2 dny, pak se vychladnuté a osušené sýry balí do expedičních obalů [4].

5.10 Zrání sýrů

Zrání probíhá ve zracích sklepech, kde je nutné udržovat optimální teplotu a relativní vlhkost dle druhů sýrů [42].

Zrání je složitý enzymový proces, během kterého sýr získává svou charakteristickou vůni, chuť, vzhled a konzistenci. Je vyvolaný hlavně bakteriemi mléčného kvašení a proteolytickými vlastnostmi syřidla. Zráním se jednotlivé složky čerstvého sýra mění. Především jde o enzymové odbourávání laktózy a bílkovin, někdy také tuku. Podle uplatnění mikroflóry a průběhu proteolýzy se rozlišuje zrání primární (anaerobní) a zrání sekundární (aerobní).

Primární zrání probíhá pomalu a rovnoměrně v celé hmotě, za nepřístupu vzduchu, hlavně působením enzymů BMK. Ty se silně pomnožují při odkapávání a lisování. Do 24 hodin rozloží téměř veškerou laktózu převážně na kyselinu mléčnou. Během několika dalších dnů jich však 95 % i více hyne, hlavně v důsledku solení, a jejich endoenzymy pak štěpí bílkoviny až na aminokyseliny. Takto zrají hlavně tvrdé sýry, Brynza, Niva aj.

Sekundární zrání probíhá rychle od povrchu, za přístupu vzduchu. Při zrání se uplatňují aerobní proteolytické mikroorganismy, které vytvářejí na povrchu sýra maz. Jejich enzymy difundují dovnitř těsta a zde štěpí bílkoviny, někdy až na amoniak, oxid uhličitý a vodu. Vysoká relativní vlhkost vzduchu a ošetřování sýrů roztokem soli podporují tvorbu mazu. Také u těchto sýrů se nejdříve uplatňuje primární zrání rozložením laktózy. Poměrně velký obsah vody v těstě a aktivní povrchová mikroflóra však způsobí, že převládne zrání od povrchu. Některé sýry zrají současně oběma způsoby (Niva) [37, 42].

Mezi faktory ovlivňujícími proces zrání patří:

- skladovací teplota a vlhkost – s rostoucí vlhkostí a stoupající skladovací teplotou se rychlost proteolýzy zvyšuje,
- chemické složení sýřeniny – obsah tuku, AMK, mastných kyselin a dalších produktů enzymatické činnosti,
- zbytková mikroflóra sýřeniny – především startovací kultury [30,46].

Zrání sýrů ovlivňují uvedené proteolytické enzymy:

- 1) enzymy syřidla - pepsin, chymosin, bakteriální syřidla, proteinázy,
- 2) nativní enzymy obsažené v mléce – plasmin,
- 3) startovací kultury a enzymy uvolněné z rozpadlých buněk,
- 4) sekundární kultury – propionové, mazové, plísňové,
- 5) exogenní enzymy – proteinázy, peptidázy a lipázy za účelem urychlení zrání sýrů [30].

5.10.1 Změny bílkovin v průběhu zrání

Proteolýza (rozklad bílkovin) probíhá vždy v kyselém prostředí. Konečné produkty rozkladu jsou u každého druhu sýra jiné a ovlivňují jeho charakteristické vlastnosti. Rozkladem bílkovin se zmenšuje kyselost sýra, vytrácí se hořká chuť a vznikají pro daný druh sýra typické organoleptické vlastnosti: chuť, vůně, plastičnost těsta.

Biochemický rozklad bílkovin může postupovat v několika etapách:

1. rozklad parakaseinu a kaseinu na albumózy a peptony – působí enzym proteáza,
2. rozklad albumóz a peptonů na polypeptidy – působí enzym aminopolypeptidáza,
3. rozklad polypeptidů na dipeptidy – působí enzym polypeptidáza,
4. rozklad dipeptidů na aminokyseliny – působí enzym dipeptidáza,
5. rozklad aminokyselin na amoniak, těkavé kyseliny, sirovodík, oxid uhličitý a aminy – působí enzymy amidázy, desaminázy nebo dekarboxylázy.

U tvrdých sýrů, které zrají hlavně činností proteolytických enzymů BMK, převládají z rozkladných produktů AMK nad albumózami a peptony. Amoniak vzniká jen v malém množství. U sýrů měkkých, které zrají vlivem povrchové mikroflóry a jejich proteolytických enzymů, převládají albumózy a peptony nad AMK [37, 45].

6 OBECNÁ TEORIE CHROMATOGRAFIE

Chromatografie je separační metoda, při které se oddělují složky obsažené ve vzorku [47]. Prostřednictvím chromatografie je možné získat kvalitativní i kvantitativní informace, tzn. kromě určení složení směsi lze stanovit i koncentraci jednotlivých složek [48]. Podstatou chromatografie je, že se vzorek vnáší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze, a to mezi fázi stacionární (nepohyblivou) a fázi mobilní (pohyblivou).

Vzorek umístíme na začátek stacionární fáze. Pohybem mobilní fáze přes stacionární fázi je vzorek touto soustavou unášen. Složky vzorku mohou být stacionární fází zachycovány, a proto se při pohybu zdržují. Více se zdržují složky, které jsou stacionární fází poutány silněji. Tím se postupně složky od sebe separují a na konec stacionární fáze se dostávají dříve složky méně zadržované [47].

Mobilní fáze se v chromatografickém systému pohybuje, podle jejího skupenství můžeme chromatografické metody rozdělit na *kapalinovou chromatografii*, kde je mobilní fází kapalina, a na *plynovou chromatografii*, je-li mobilní fází plyn.

Stacionární fáze se v chromatografickém systému nepohybuje. Stacionární fáze může být pevná látka nebo film kapaliny zakotvený na pevné látce. Podle jejího uspořádání rozdělujeme chromatografické metody na *kolonovou (sloupcovou) chromatografii* – stacionární fáze je umístěna v trubici. *Papírovou chromatografii* – stacionární fáze je součástí chromatografického papíru. *Tenkovrstvou chromatografii* - stacionární fáze je umístěna na pevném plochém podkladu (např. skleněné desce nebo hliníkové fólii) [47].

Podle povahy děje se rozdělují chromatografické metody na *rozdělovací chromatografii* - o separaci rozhoduje různá rozpustnost složek vzorku ve stacionární fází (kapalina) a mobilní fází (kapalina nebo plyn). *Adsorpční* - o separaci rozhoduje různá schopnost složek poutat se na povrch stacionární fáze (tuhá látka). *Iontově-výměnnou* - o separaci rozhodují různě velké elektrostatické přitažlivé síly mezi funkčními skupinami stacionární fáze (iontoměnič) a ionty vzorku. *Gelovou* - složky se separují podle velikosti na pórovité stacionární fází (gelu) - menší molekuly vzorku se v pórech gelu zdržují déle (molekulově síťový efekt). *Afinitní* - stacionární fáze je schopna vázat ze vzorku právě určité složky, ke kterým má úzce selektivní vztah – afinitu [49].

7 GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRRAFIE

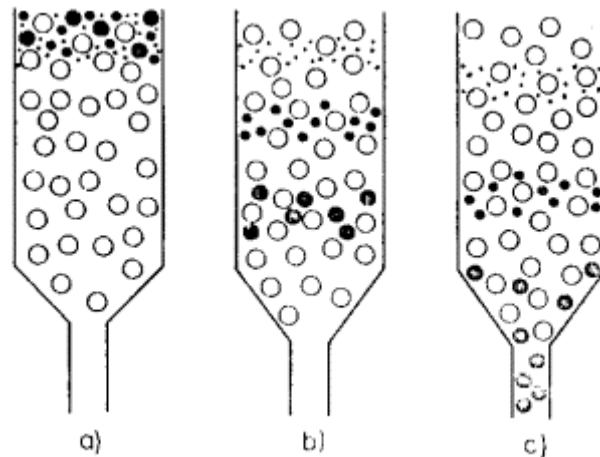
Gelová permeační chromatografie (starší název pro Sterickou exkluzní chromatografii (anglicky Size-exclusion Chromatography) SEC) je typem kapalinové chromatografie, která se principiálně odlišuje od chromatografie adsorpční a rozdělovací [50].

Původně se tato metoda používala ke stanovení molární hmotnosti a její distribuce u biologických a syntetických polymerů. Dnes lze tuto techniku využít i pro čištění a analýzu čistoty proteinů, studium jejich interakcí, ať už vzájemných, nebo s jinými molekulami, dále pro stanovení chemické heterogenity kopolymerů, stanovení stupně větvení a stejně tak pro sledování průběhu polymerace, degradace a agregace. Nejčastější použití metody GPC je, že umožňuje stanovení molární hmotnosti a její distribuce, v rozmezí molárních hmotností od 10^2 do 10^7 g/mol, a to v relativně krátké době, s dostatečnou přesností a spolehlivostí [51].

Separací proces metody GPC závisí na velikosti molekuly, přesněji na jejím hydrodynamickém objemu, a je kontrolován entropicky. Při analýze prochází směs rozpuštěných látek ve vhodném rozpouštědle kolonou naplněnou gelem s porézními částicemi o různé velikosti pórů (stacionární fáze). Póry i prostory mezi zrny gelové náplně jsou vyplněny rozpouštědlem (mobilní fází). Zředěný roztok vzorku se nanese na vstup do kolony a postupně se vymývá mobilní fází [51, 52]. Tím nastává rozdělování látek mezi pohyblivou část mobilní fáze nacházející se mezi jednotlivými zrny gelu (intersticiální objem mezi zrny gelu V_0), a nepohyblivou část mobilní fáze, nacházející se uvnitř pórů gelu (celkový objem pórů gelu V_p). Při průchodu kolonou jsou molekuly zdržovány v důsledku svého pronikání (permeace) do rozpouštědlem naplněných pórů. Malé molekuly pronikají do pórů gelu hlouběji, a mají tudíž vyšší hodnoty retenčních objemů než větší molekuly, které do pórů gelu nemohou proniknout, a jsou tak unášeny mobilní fází. Za předpokladu, že interakce molekul analytů se stacionární fází nenastává, je vzorek separován nebo frakcionován podle velikosti molekul a tento děj je popsán jako stanovení distribuce molekulárních hmotností směsi [47, 52].

Průměrné molární hmotnosti analyzovaných (reálných) vzorků se mohou odečítat ze sestavené kalibrační křivky. Kalibrační křivku lze získat analýzou série standardů. Pro vodné systémy jsou jedním z vhodných standardů vzorky polysacharidů o známé molární hmot-

nosti. Kalibrační křivka vyjadřuje vztah mezi logaritmem molární hmotnosti a retenčním objemem. Tento vztah použijeme k sestrojení kalibrační křivky [53].



Obr.3: Separace vzorku procházejícího chromatografickou kolonou [54].

Celkový objem naplněné kolony V_T je součtem celkového objemu pórů V_p , objemu zaujímaného maticí gelu V_m a intersticiálního objemu mezi zrny gelu V_0 [55]:

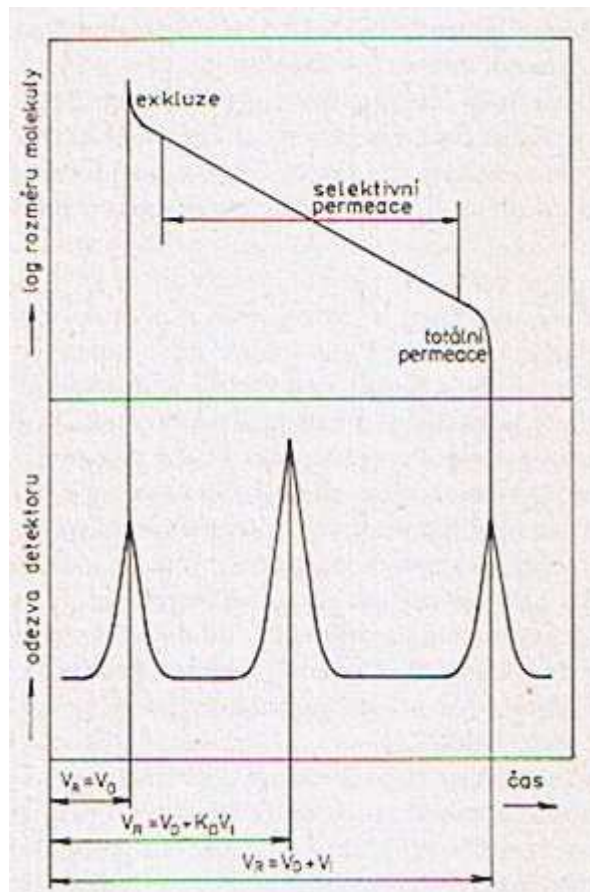
$$V_T = V_p + V_m + V_0 \quad (1)$$

Retenční objem V_R monodisperzní látky o určité molekulové hmotnosti je určen dostupností části objemu jednotlivých pórů a distribucí rozměrů pórů celého systému. Retenční objem V_R v gelové chromatografii je popsán rovnicí:

$$V_R = V_0 + K_D \cdot V_p \quad (2)$$

kde K_D je distribuční konstanta, která může nabývat hodnot menších než 1. Tato konstanta je nezávislá na délce gelového sloupce a závisí pouze na velikosti a tvaru pórů v gelových částicích [56]. Jsou-li molekuly tak velké, že póry zrn jsou pro ně nepřístupné, potom je $K_D = 0$ a tato limitní velikost molekul vyjádřená např. jako molekulová hmotnost je označována jako vylučovací limit gelu. Všechny větší molekuly se potom nacházejí v oblasti, která se označuje jako totální exkluze. Pro látky s menším rozměrem molekuly (s menší molekulovou hmotností), než je vylučovací limit, je přístupna alespoň část pórů náplně a jsou-li

molekuly dostatečně malé, jsou pro ně přístupny veškeré póry a $K_D = 1$. Tuto spodní hranici pracovní oblasti gelu, označovanou též jako totální permeace, nelze tak přesně určit jako vylučovací limit. Každý porézní materiál má totiž určitou distribuci pórů a určité procento mikropórů, které jsou přístupné jen velmi malým molekulám [50]. Eluční objem jakékoliv látky se tedy musí pohybovat v intervalu od V_0 do $V_0 + V_p$ [56].



Obr.4: Závislost elučního objemu na rozměrech molekuly, popř. na relativní molekulové hmotnosti [56].

8 STŘEDNÍ MOLÁRNÍ HMOTNOST

Střední molární hmotnost je pojem zavedený u vysokomolekulárních látek vzhledem k jejich polydisperzitě.

Molární hmotnost vysokomolekulárních sloučenin je důležitou konstantou, sloužící k jejich charakterizaci. Je v přímém vztahu k rozměrům molekul, především k jejich délce, která dále určuje mechanické vlastnosti těchto látek.

Ke stanovení velikosti nebo hmotnosti částic v disperzních systémech se většinou měří některá vlastnost souboru velkého počtu částic (měření kinetických, optických nebo reologických vlastností) spíše než hodnota této vlastnosti pro jednotlivé částice. Ze změřené vlastnosti pak výpočtem získáme průměrnou hodnotu příslušného parametru (hmotnosti, objemu). U polydisperzních systémů mají takto získané veličiny charakter statistických průměrů různého druhu podle povahy použité metody měření.

Střední molární hmotnost stanovená měřením určité fyzikální veličiny je rovna molární hmotnosti myšleného monodisperzního systému, v němž by měřená veličina nabyla stejné hodnoty.

Jestliže se střední molární hmotnost stanovuje metodami, které měří veličiny přímo úměrné hmotnosti nebo objemu částic (sedimentační rovnováha, rozptyl světla), je výsledkem **hmotnostní průměr molárních hmotností** \overline{M}_w definovaný rovnicí

$$\overline{M}_w = \frac{\sum (w_i \cdot M_i)}{\sum w_i} = \sum (W_i \cdot M_i) = \frac{\sum c_i \cdot M_i^2}{\sum c_i \cdot M_i}, \quad (7)$$

kde m_i je hmotnost frakce i , M_i molární hmotnost frakce i , $W_i = m_i/\sum m_i$ je hmotnostní zlomek frakce i , $w_i = m_i/V$ je hmotnostní koncentrace frakce i a $c_i = n_i/V = w_i/M_i$.

Pomocí metod, které měří veličiny úměrné počtu makromolekul v polymeru, tzv. koligativní vlastnosti, se stanovuje **početní (číselný) průměr molárních hmotností** \overline{M}_n . Mezi tyto metody patří osmometrie, ebullioskopie nebo kryoskopie. Číselný průměr molárních hmotností je daný vztahem

$$\overline{M}_n = \frac{\sum (N_i \cdot M_i)}{\sum N_i} = \frac{\sum c_i \cdot M_i}{\sum c_i} = \sum (x_i \cdot M_i), \quad (8)$$

kde N_i je počet částic i -tého druhu, $x_i = N_i / \sum N_i$ je molární zlomek frakce i .

Číselný průměr molární hmotnosti není vždy vhodný k posouzení závislosti mezi vlastnostmi polymeru na jeho molární hmotnosti, protože mnohé vlastnosti polymerů nezávisí ani tak na počtu částic s určitou molární hmotností, ale spíše na jejich hmotnostním podílu. Potom je vhodnější použít hmotnostní průměr molárních hmotností \overline{M}_w .

Početní průměr molární hmotnosti je vždy menší než hmotnostní průměr molární hmotnosti ($\overline{M}_n < \overline{M}_w$). Pro monodisperzní systém však platí rovnost ($\overline{M}_n = \overline{M}_w$). U hodnoty \overline{M}_n se více uplatňují nízké frakce, které obsahují relativně velký počet částic, kdežto u hodnoty \overline{M}_w se naopak nejvíce uplatňují těžší podíly.

Kvantitativní zastoupení makromolekul jednotlivých molárních hmotností, které se v daném polymeru vyskytují, udává distribuční křivka. Pro jednoduchý odhad šířky distribuce polymeru poslouží rovněž **index polydispersity**, který je definován vztahem

$$PD = \frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n} \quad (9)$$

[57, 58, 59].

9 KOLONY

9.1 Materiál kolon

Účelná konstrukce chromatografických kolon je velice důležitá zejména vzhledem k reprodukovatelnosti výsledků dělení [60]. Jako konstrukční materiál kolon se na počátku vývoje GPC téměř výhradně používalo sklo. Sklo je díky svým vlastnostem chemicky i tepelně dostatečně odolné a inertní, což je důležité především při separaci biologických materiálů, které mohou denaturovat při styku s kovy. Průhlednost skla umožňuje vizuálně sledovat postup plnění kolony a stav gelového lůžka v průběhu jejího používání (usazování, vznik dutin, aj.). Nevýhodou skla (jako konstrukčního materiálu) jsou jeho mechanické vlastnosti, tj. citlivost na pnutí, nárazy a vibrace, a také malá odolnost vůči tlaku. V současné době je nejpoužívanějším konstrukčním materiálem na stavbu kolon nerezová ocel, někdy se používá také titan a nikl. Povrch kolon je možné pokrýt sklem.

Kolony mají nejčastěji tvar rovné válcovité trubice [61]. Kolony používané u GPC mají průměr až 8 mm a délku v desítkách centimetrů. Pracuje se s nižšími tlaky než v rozdělovací a adsorpční HPLC [47].

9.2 Náplně kolon

Pro gelovou chromatografii se jako náplně kolon používají gely, ale ne každý gel je vhodným materiálem [60]. Proto jsou pro separaci látek rozhodující charakteristiky pórů použitých gelů, tj. jejich rozměry, tvar, množství a relativní objem [56]. Velikost pórů v gelu musí být zcela přesně měnitelná, aby ji bylo možno přizpůsobit potřebám příslušného dělení. Látka vytvářející gel dle možnosti nesmí obsahovat skupiny schopné ionizace a měla by mít v použitých rozpouštědlech pokud možno nepatrnou afinitu k rozdělovaným látkám, aby se tyto látky mohly volně pohybovat tak, jak jim dovoluje velikost jejich molekul. Zejména v organických rozpouštědlech často pozorujeme značnou afinitu rozpuštěných látek ke gelové fázi. Volbou vhodných elučních činidel lze tomuto často dobře zabránit. Velikost zrn gelu má být podle možnosti malá, aby mohla rychle nastat difúzní rovnováha. Přitom nesmějí být gelové částice příliš měkké, jinak by se ve sloupci deformovaly a tím by zabránily rozumné rychlosti proudění v gelové náplni.

V zásadě se používá dvou způsobů přípravy gelů pro gelovou chromatografii: Buď vycházíme z rozpuštěných makromolekul a učiníme je nerozpustnými reakcí s bifunkčními činidly, anebo rozpustíme směs vhodných monofunkčních a bifunkčních monomerů a provedeme kopolymeraci. V obou případech vzniká gel, jehož poréznost závisí jak na celkové koncentraci, tak i na množství bifunkčního činidla [60].

9.2.1 Dextranové gely

Nejrozšířenějším komerčně dostupným dextranovým gelem je Sephadex, připravovaný zesíťováním dextranu epichlorhydrinem v alkalickém prostředí. Bakteriálním působením bakterie *Leuconostoc mesenteroides* na sacharosu získáme polysacharid dextran. Díky svému vysokému obsahu hydroxylových skupin se stává rozpustným ve vodě.

Sephadex je stálý vůči louhům a slabým kyselinám. Jen silné minerální kyseliny vedou časem k hydrolýze glykosidických vazeb. Je však třeba vyhýbat se silným oxidačním činidlům, jež po delším působení rozrušují dextran a mohlo by dojít ke vzniku karboxylových skupin, které by gelu dávaly vlastnosti měniče iontů [60, 62].

Typy komerčních dextranových gelů Sephadex:

- Sephadex G-10 a G-15 s malými póry jsou vhodné k dělení nízkomolekulárních látek (peptidy, aminokyseliny, koenzymy)
- Sephadex G-25 a G-50 pro odsolování roztoků proteinů
- Sephadex G-75, G-100, G-150 a G-200 se dodávají pro separace proteinů do velikosti molární hmotnosti $M \sim 600\,000$ g/mol
- matrice řady LH (hydroxypropylované) jsou určeny pro práci v nepříliš hydrofobních prostředích (ethanol či chloroform)
- Sephadex LH 20 lze použít na dělení triacylglycerolů, mastných kyselin a steroidních hormonů [62].

9.2.2 Polyakrylamidové gely

Polyakrylamidové gely se připravují kopolymerací reaktivní dvojné vazby amidu kyseliny akrylové, přičemž vzniká rozpustný polyakrylamid, a bifunkčního akrylamidu, například

N,N'-methylen-bisakrylamidu, přičemž vznikne nerozpustný gel [60].

Typy komerčních polyakrylamidových gelů:

- Bio-Gel P-2 (P-4, -6, -10, -30, -60, -100, -150, -200 a -300) [62].

9.2.3 Agarosové gely

Agarosové gely se připravují z lineárního polysacharidu agarosu, která se získává purifikací agaru z mořských řas. Zpracováním agaru se odstraní nabitě polysacharidy, zahřátý roztok elektroneutrální agarosu po ochlazení spontánně tvoří gel. Zesíťování (“cross-linking”) agarosu se provádí reakcí s 2,3-dibrompropanolem v alkalickém prostředí, případně reakcí s epichlorhydrinem, čímž dosáhneme větší mechanické odolnosti matrice. Velikost pórů je ovlivněna podílem agarosu [62].

Typy komerčních agarosových gelů:

- Sepharose 2B, 4B, 6B
- Sepharose CL-2B, CL-4B, CL-6B (“cross-linked”)
- Sepharose 6, 12
- Bio-Gel A 0.5 m (1.5 m, 5 m, 15 m a 50 m) [62].

9.2.4 Polystyrénové gely

Mezi polystyrénové gely patří kopolymer styrenu a divinylbenzenu komerčně nazývaný Styragel. Náplně jsou vhodné pro separaci polymerů rozpuštěných ve středně polárních až polárních organických rozpouštědlech. Použití tohoto typu gelů pro analýzu polymerů v organických rozpouštědlech je značně rozšířené [63].

Výrobci charakterizují gel hodnotou tzv. *vylučovacího limitu*, tj. hodnotou relativní molekulové hmotnosti, při které začíná frakcionační rozsah gelu. Původní materiály byly velice choulostivé na tlak, moderní gely snesou již vyšší tlaky [64].

9.3 Účinnost kolony

Účinnost kolony charakterizuje její schopnost separovat složky směsi. Čím je kolona účinnější, tím lépe dokáže od sebe složky směsi oddělit. Mírou účinnosti kolony je *počet teoretických pater* n . Teoretické patro je pomyslná část kolony, ve které dochází k ustavení rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází, tato délka se nazývá *výškový ekvivalent teoretického patra* H . Pro kolonu o délce L pak platí:

$$H = \frac{L}{n} \quad (10)$$

Kolona je tím účinnější, čím má více teoretických pater a čím menší výškový ekvivalent teoretického patra. Počet pater lze určit z šířky píku Y_V a jeho retenčního objemu V_R :

$$n = 16 \left[\frac{V_R}{Y_V} \right]^2 \quad (11)$$

[64, 65].

10 DETEKTORY

Detektory mají za úkol detekovat v mobilní fázi přítomnost rozpuštěných látek a zaznamenávat detekci do výsledných chromatogramů, které opouštějí chromatografickou kolonu. Od detektoru se vyžaduje *rychlá odezva, velká citlivost a stabilita základního (nulového) signálu*.

V chromatografii se vžil trojí způsob klasifikace detektorů, z nichž každý má pro kvantitativní analýzu určité opodstatnění.

1. Podle časové závislosti odezvy:

Integrální detektory poskytují odezvu úměrnou celkovému množství látky prošlé detektorem od začátku až do daného okamžiku.

Diferenciální detektory dávají odezvu odpovídající okamžité koncentraci detekované složky v detektoru.

2. Podle toho, zda dochází nebo nedochází při detekci k chemickým změnám detekované látky:

Nedestrukční detektor – látka prochází detektorem bez toho, aby se chemicky změnila.

Destrukční detektor – látka se při detekci ireverzibilně změní.

3. Podle toho, zda reagují na změnu hmotnostní koncentrace složky nebo na změnu hmotnostního toku detekované složky:

Koncentrační detektory reagují na změnu hmotnostní koncentrace složky v eluentu dm/dV nezávisle na přívodu složky do detektoru.

Hmotnostní detektory naproti tomu reagují na změnu hmotnostního toku detekované složky dm/dt do detektoru.

Z analytického hlediska je výhodné brát v úvahu kombinaci všech tří klasifikací detektorů [56, 66].

Jelikož je praktická část diplomové práce zaměřena na GPC s refraktometrickou a viskozitní detekcí, budou následující kapitoly věnovány jejich popisu.

10.1 Refraktometry

Refraktometry jsou přístroje určené pro měření indexu lomu látek, nejčastěji kapalin [67]. Index lomu je fyzikální konstanta, která ve spojení s dalšími daty slouží k identifikaci látek a k posouzení jejich čistoty [65].

Refraktory jsou nejpoužívanějšími detektory v gelové permeační chromatografii. Detekují všechny látky, jejichž index lomu se dostatečně liší od indexu lomu mobilní fáze. Problémy při použití refraktometru způsobuje závislost indexu lomu na teplotě a tlaku.

Principem refraktometru je měření změn indexu lomu eluátu v závislosti na koncentraci solutu. Pro zvýšení citlivosti měření a omezení rušivých vlivů jsou refraktometry konstruovány v diferenčním vyhotovení, kde se porovnává index lomu eluátu s indexem lomu eluentu.

U komerčně dostupných detektorů se pro měření indexu lomu používají čtyři principy:

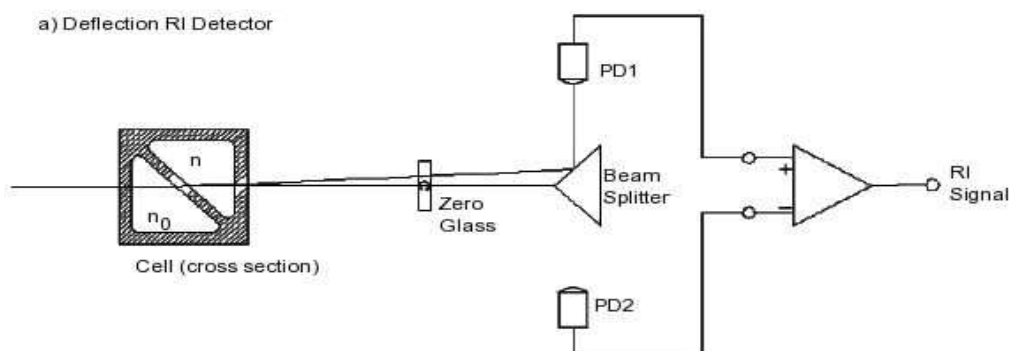
- *Deflexní refraktometry* využívají lom světelných paprsků při průchodu přes rozhraní látek s rozdílnou optickou hustotou, popsany Snellovým zákonem.
- *Reflexní refraktometry* jsou založené na Fresnelově zákoně odrazu světla.

Detekovatelnost reflexních a deflexních refraktometrů dosahuje 10^{-7} až $5 \cdot 10^{-8}$ jednotek indexu lomu.

- *Refraktometry založené na Christiansenově jevu*. Prochází-li světlo kyvetou naplněnou malými částicemi se stejným indexem lomu, jako má kapalina v kyvetě, jeho intenzita poklesne jen málo. Pokud se však index lomu eluátu změní, lomy a rozptyl světla na rozhraních kapalina-částice vzrostou a intenzita světla poklesne. Změny intenzity světla jsou úměrné změně indexu lomu eluátu.

Zajímavou skupinu refraktometrů představují interferometry.

- *Interferometry*, ve kterých koherentní paprsky světla procházejí srovnávací a měřicí kyvetou. Přítomnost solutu v měřicí kyvetě způsobuje změnu efektivní optické dráhy paprsku. Tato dráha se měří interferometrem [61].



Obr.5: RI detektor [68]

10.2 Viskozitní detektor

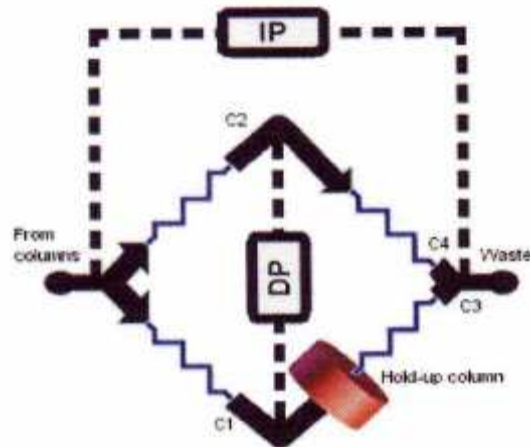
Pro on-line měření viskozit v GPC systému se nejčastěji používá viskozitního detektoru tvořeného čtyřmi kapilárami, které jsou sestaveny do „můstku“ analogického „Wheatstoneovu“ můstku. Proudí-li tímto systémem pouze čisté rozpouštědlo s viskozitou η_0 , je diferenciální tlak (differential pressure DP) v můstku nulový $\Delta P = 0$, protože každá ze čtyř kapilár obsahuje pouze čisté rozpouštědlo. Začne-li můstkem proudit polymerní roztok, který je eluován z GPC kolony, vstupuje tento roztok do kapilár C1, C2 a C4, zatímco v kapiláře C3 zůstává, vzhledem k přítomnosti zásobníku („hold-up column“) stále čisté rozpouštědlo. Zvýšení viskozity v kapilárách C1, C2 a C4 ve srovnání s viskozitou čistého rozpouštědla v kapiláře C3 způsobí tlakovou nerovnováhu v můstku, která je měřena tlakovým snímačem. Vstupní tlak (inlet pressure IP) a diferenciální tlak jsou přímo úměrné specifické viskozitě polymerního roztoku. Specifická viskozita polymerního roztoku je potom určena rovnicí

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = \frac{4\Delta P}{P_{in} - 2\Delta P} \quad (12).$$

Vzhledem k tomu, že měřené koncentrace polymerních roztoků jsou velmi nízké, je možno přímo stanovit limitní viskozitní číslo, bez nutnosti extrapolace k nulové koncentraci, jak je tomu běžně u klasických viskozitních měření

$$\frac{\eta_{sp}}{c} \Big|_{c \rightarrow 0} = [\eta] \quad (13).$$

Spojení refraktometrického a viskozitního detektoru poskytuje přesné stanovení molární hmotnosti pro všechny typy polymerů, na které lze aplikovat univerzální kalibraci. Z viskozitních měření lze získat i cenné informace o stupni větvení, které nejsou při měření se samotným refraktometrickým detektorem dostupné [59].



Obr.6: Viskozitní detektor [59]

11 KALIBRACE

Pro stanovení molárních hmotností polymerů není GPC „metodou absolutní“. Aby bylo možné určit správné hodnoty molární hmotnosti sledovaného polymeru, je třeba před vlastním měřením chromatografický systém, konkrétně kolonu, kalibrovat. Tedy stanovit závislost mezi retenčním objemem (časem) a molární hmotností vzorků. Pro GPC systémy se využívá buď tzv. univerzální kalibrace, nebo přímá kalibrace pomocí kalibračních standardů s „úzkou“ distribucí molárních hmotností [51].

11.1 Přímá kalibrace

Přímá kalibrace využívá řadu polymerních standardů s úzkou distribucí ($\overline{M}_w / \overline{M}_n \leq 1,1$) a přesně definovanou molární hmotností, které pokrývají co nejširší oblast molárních hmotností, aby bylo možné s dostatečnou přesností položit $\overline{M}_n \approx \overline{M}_w \approx M_{GPC}$, kde M_{GPC} je molární hmotnost odpovídající elučnímu objemu maxima chromatogramu.

Pro vlastní kalibraci se změří chromatogramy řady standardů a sestrojí se kalibrační křivka, která určuje vztah mezi retenčním objemem (časem) každého ze standardů a jeho známou molární hmotností ($\log M$ vs V_R). Ta potom umožňuje výpočet molární hmotnosti a distribuce studovaného polymeru.

Měření vlastní kalibrace se provádí za stejných podmínek, které budou používány při analýzách neznámých vzorků. Doporučuje se pracovat s nejnižší možnou koncentrací kalibračních standardů, aby se omezil vliv koncentrační závislosti retenčních objemů. Retenční objemy V_R jednotlivých frakcí se potom vynesou proti logaritmu M a získaným bodovým polem se proloží hladká křivka. Aby se dosáhlo pokrytí co nejširší oblasti molárních hmotností, je možné spojit do série několik kolon (nejčastěji 2 nebo 3) naplněných částicemi gelu s různým rozměrem pórů. Je účelné zvolit takovou kombinaci kolon, aby kalibrační křivka byla v co nejširším intervalu retenčních objemů lineární. V tomto případě je možné kalibrační závislost popsat vztahem

$$\text{Log } M = A - B \cdot V_R \quad (14)$$

a informace o jejím průběhu je dána parametry A a B .

Pokud se nepodaří dosáhnout linearitu v celém požadovaném rozsahu M , je třeba zpracovat údaje regresní analýzou [51, 61].

11.2 Univerzální kalibrace

Pojem univerzální kalibrace byl zaveden v roce 1967 Benoitem a jeho spolupracovníky, kteří prokázali, že retenční objemy polymerů různého chemického složení a struktury sledují jednu křivku, jsou-li vyneseny v souřadnicích $\log([\eta] \cdot M)$ vs retenční objem V_R , kde $[\eta]$ je limitní viskozitní číslo a M je hmotnostní průměr molární hmotnosti polymeru (obr. 7). Bylo dokázáno, že součin $[\eta] \cdot M$ je úměrný hydrodynamickému objemu polymerního klubka. Prostřednictvím rovnice $[\eta]_{ST} \cdot M_{ST} = [\eta]_P \cdot M_P$ umožňuje univerzální kalibrace vytvoření jednoduchého vztahu mezi kalibračním standardem (ST) a analyzovaným polymerem (P). Vztah mezi limitním viskozitním číslem a molární hmotností polymeru popisuje Mark-Houwinkova rovnice

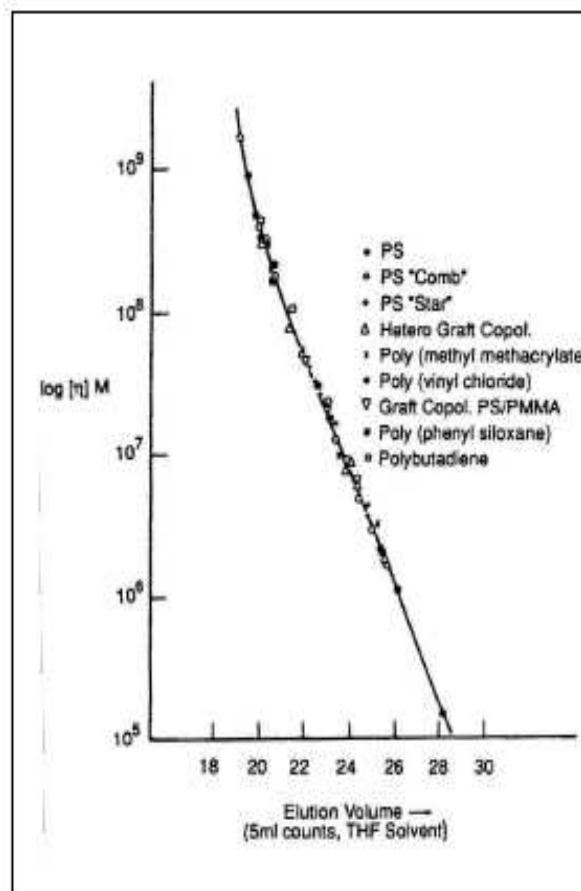
$$[\eta] = K \cdot M^a, \quad (15)$$

kde K , a jsou konstanty charakteristické pro daný polymer za daných podmínek (teplota a rozpouštědlo použité pro jeho rozpuštění). Hodnoty K , a lze tabelovat a jejich použití v GPC softwaru umožňuje výpočet „správné hodnoty molární hmotnosti“ studovaného polymeru.

Pomocí moderních GPC systémů, které umožňují on-line spojení viskozitního a koncentračního detektoru (např. diferenciálního refraktometru), je možno přímo stanovit molární hmotnost pro každou frakci, která je eluována z kolony. Diferenciální refraktometr jako koncentrační detektor poskytuje pro každou frakci koncentraci c_i a viskozimetrický detektor poskytuje součin $[\eta]_i \cdot c_i$. Vydělením signálu z viskozimetrického detektoru signálem z detektoru koncentračního lze získat hodnotu limitního viskozitního čísla $[\eta]_i$ každé polymerní frakce vycházející z kolony. Jelikož je známa hodnota limitního viskozitního čísla i retenční čas této každé frakce, lze použít křivku univerzální kalibrace a získat pro každou tuto frakci molární hmotnost M .

Platnost konceptu univerzální kalibrace byla prakticky ověřena na řadě typů polymerů, především pro polymery, které v roztoku zaujímají tvar statistického klubka. Existují však

výjimky, kdy např. polymery tvořící v roztoku tyčinky nebo tuhé koule křivce univerzální kalibrace nevyhovují [51, 63, 69].



Obr.7: Křivka univerzální kalibrace [63].

12 MOBILNÍ FÁZE PRO GPC

Vhodnou mobilní fází pro konkrétní analýzu volíme mezi nevodnou a vodnou mobilní fází.

Jako nevodné mobilní fáze jsou nejčastěji využívány THF, chlorované uhlovodíky (chloroform, methylenchlorid, dichlorethan, atd.), aromatické uhlovodíky (benzen, toluen, *o*-dichlorbenzen a trichlorbenzen), dioxan a methylethylketon, které jsou s PS gelem kompatibilní.

Pro vodnou GPC se velmi často využívají jako mobilní fáze voda, vodné roztoky neutrálních anorganických solí, jako jsou chlorid sodný, chlorid draselný, a tlumivé roztoky (např. fosfátový pufr). Tlumivé roztoky obvykle obsahují směs dvojice slabých kyselin a soli slabé kyseliny, slabých bází a soli slabé báze, nebo vícesytnou kyselinu či zásaditou sůl. Vodné roztoky s pH mimo rozmezí hodnot 2 - 8 používají náplně kolon založené na oxidu křemičitém [52].

Stanovení molární hmotnosti a distribuce molárních hmotností pomocí GPC u polymerů rozpustných ve vodných rozpouštědlech je často spojeno s těžkostmi, protože se zde setkáváme s „non – size exclusion“ efektem, který ruší separaci makromolekul podle jejich velikosti. GPC je technika založená na separaci molekul podle velikosti částice, které eluují se stejným retenčním objemem, musí mít stejnou velikost makromolekuly, aby bylo možné stanovit molární hmotnost sledovaného polymeru za pomoci kalibrační křivky sestavené z polymerních standardů, které se liší od analyzovaného vzorku. Navíc se explicitně předpokládá, že částice, které eluují z kolony dříve, mají větší molární hmotnost jako částice s delším retenčním časem. U GPC ve vodné fázi se však poměrně často setkáváme s nežádoucími „non-size exclusion“ efekty, které výše uvedené zásady separace ruší. K nežádoucím „non – size exclusion“ efektům řadíme intermolekulární elektrostatické interakce mezi analyzovanou látkou a náplní kolony (např. výměna iontů), intramolekulární elektrostatické interakce mezi analyzovanou látkou a náplní kolony (např. tvorba vodíkových můstků) a adsorpci. Volbou vhodného rozpouštědla lze tyto vlivy potlačit [59].

12.1 Typy „non – size exclusion“ efektů

a) Iontová výměna

Polymerní náplně a náplně kolon na bázi oxidu křemičitého obsahují na svém povrchu zbytkové silanoly nebo karboxylové skupiny. Tyto skupiny jsou aniontové a chovají se jako kationtová výměnná místa. Kationtové polyelektrolyty jsou adsorbovány iontovou výměnou a aniontové polyelektrolyty jsou exkludovány z pórů náplně kolony elektrostatickými odpuzivými silami (iontová exkluze).

Iontová výměna mezi aniontovou náplní a kationtovými polyelektrolyty je entalpickou interakcí (ΔH je negativní) a projevuje se buď tak, že u analyzované látky k žádné eluci nedochází, nebo k eluci dochází až po vymytí celkového objemu mobilní fáze z kolony. Metody eliminující efekty iontové výměny jsou:

- snížení pH mobilní fáze pod 4, což potlačí disociaci silanolu a karboxylových skupin,
- přidavek elektrolytu v množství 0,05 – 0,6 M do mobilní fáze,
- přidavek směsi (kationtová směs pro aniontové náplně), která tvoří konkurenci polymer-nímu vzorku [52].

b) Iontová exkluze

Iontová exkluze je entalpickou interakcí a ΔH je pozitivní.

Iontová exkluze může být eliminována:

- snížením pH mobilní fáze pod 4,
- přidavkem elektrolytu v množství 0,01 – 0,02 M do mobilní fáze [52].

c) Iontová inkluze

Iontová inkluze je způsobena ustavením Donnanovy membránové rovnováhy. Aby mezi částicemi v pórech a částicemi v intersticiálním objemu došlo k ustavení elektroneutality, je polymer tlačěn do náplně kolony (iontová inkluze), čímž dojde ke zmenšení rozdílu chemických potenciálů. Následkem toho se může eluce polyelektrolytů zpomalit. Metodami eliminujícími efekty iontové inkluze jsou:

- přidavek elektrolytu do mobilní fáze,
- použití kolony s menšími póry náplně,
- použití UV detektoru [52].

d) Intramolekulární elektrostatické interakce

Kvůli pevně vázaným nábojům polyelektrolytů způsobují elektrostatické odpudivé síly mezi sousedícími iontovými místy roztažení polymerního řetězce a zvýšení jeho hydrodynamického objemu. Přidáním elektrolytu do rozpouštědla se omezí působení těchto elektrostatických sil a dosáhne se smrštění polymeru [52].

e) Adsorpce

Jsou známy 3 mechanismy, kterými může být solut adsorbován na povrch náplně kolony: iontová výměna (viz. bod (a)), vodíkové vazby a hydrofobní interakce. Vodíkové vazby mohou být eliminovány přidavkem guanidinu nebo močoviny do mobilní fáze. Hydrofobní interakce je interakcí mezi hydrofobními částmi solutu a náplní. Jejich eliminace lze dosáhnout snížením iontové síly přidavkem surfaktantu nebo organické látky (alkohol, glykol) do mobilní fáze [52].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

13 POUŽITÉ MATERIÁLY A CHEMIKÁLIE

13.1 Použité vzorky

Pro experimentální práci byly použity vzorky pařených sýrů, které byly získány z firem v Bystřici pod Hostýnem, Blatnici pod Sv. Antonínkem a Polné. Jedná se o vzorky sýřenin před pařením, sýřenin po paření a finálních výrobků – sýrů Jadel, Mozzarella a finálních výrobků sýru Koliba a polotvrdého sýru Gouda s nízkodohřívanou sýřeninou, který se běžně neřadí mezi pařené sýry.

Vzorky byly získány v průběhu výroby:

- před fází paření se získá sýřenina před pařením
- po paření ve vodě o teplotě 70 – 80 °C se získá sýřenina po paření
- po osušení nasolené sýřeniny se získá finální výrobek

13.2 Chemikálie pro GPC analýzu

Na přípravu mobilní fáze byly použity chemikálie:

- deionizovaná voda
- azid sodný (NaN_3) - Lachema n.p., Brno

Na přípravu vzorků byly použity chemikálie:

- octan sodný ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$) – Lachema s. p., Brno

14 POUŽITÉ METODY

14.1 Gelová permeační chromatografie

14.1.1 Přístroj

Molární hmotnost a distribuce molárních hmotností byly stanoveny metodou gelové permeační chromatografie na přístroji PL – GPC 50 s viskozitní a refraktometrickou detekcí (Polymer Laboratories Ltd). K analýzám byla použita série kolon sestávající se z jedné kolony TSK GMPWXL (Tosoh Bioscience) a jedné kolony Ultrahydrogel 250 (Waters). Stanovení byla provedena při teplotě 30 °C za použití objemu nástřikové smyčky 100 µl při průtokové rychlosti mobilní fáze 0,8 ml.min⁻¹. Data byla zpracována pomocí programu Cirrus GPC Multi Detector Software (Polymer Laboratories Ltd) [70].

14.1.2 Kalibrace GPC kolony

GPC kolony byly kalibrovány univerzální kalibrací, která byla vytvořena za použití pullulanových standardů (polysacharidů) s úzkou distribucí molárních hmotností v rozmezí molárních hmotností 180 - 788 000 g.mol⁻¹ (Polymer Laboratories Ltd).

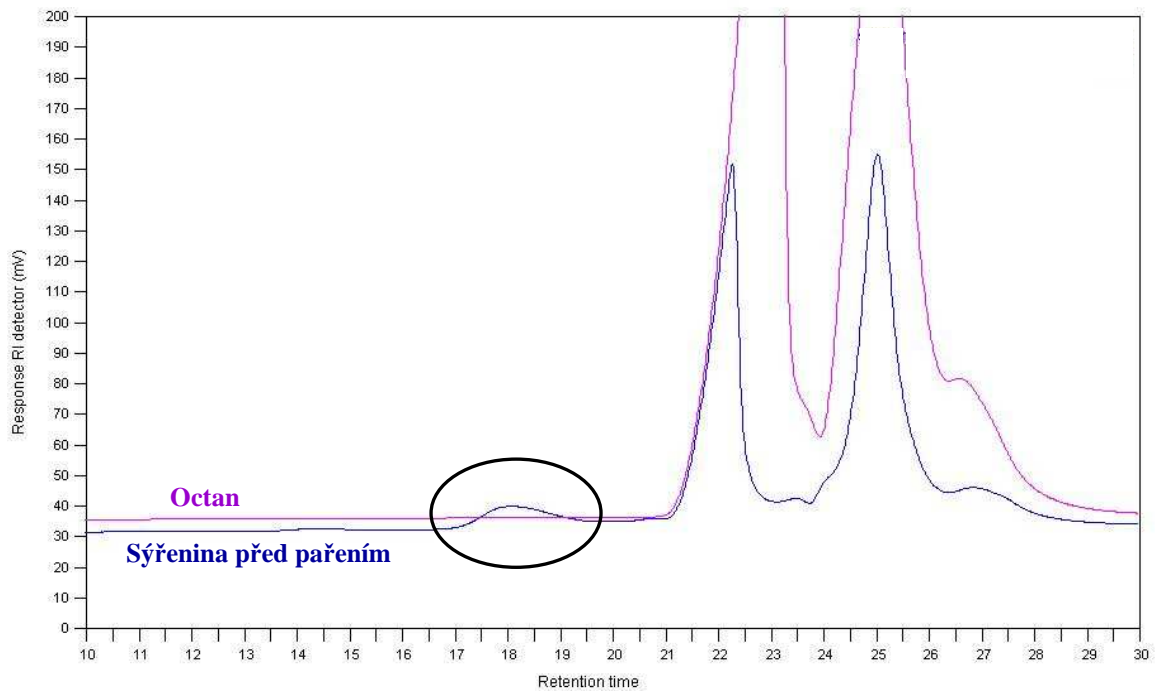
14.1.3 Příprava vzorků pro GPC

Vzorky pro chromatografickou analýzu byly připraveny rozetřením (cca 0,1 g, aspoň 5 minut) sýřeniny/sýru v třecí misce. Dokonale rozetřený vzorek byl rozpouštěn v 5 ml 1 M octanu sodného a pak přelit do kádinky. Obsah v kádince byl za stálého míchání zahříván ve vodné lázni do teploty 60 °C. Po částečném rozpuštění kaseinů vznikl slabě opaleskující roztok, který byl po vychladnutí zfiltrován přes jemný navlhčený filtrační papír. Filtrát v baňce o objemu 5 ml se doplní po rysku mobilní fází (0,2 % azid sodný s deionizovanou vodou). Část vzorku pro GPC analýzu byla přefiltrována přes stříkačkový filtr Chromafil PP/PET s velikostí pórů 0,45 µm. Pro reprodukovatelnost výsledků byla všechna měření provedena dvakrát.

15 VÝSLEDKY A DISKUZE

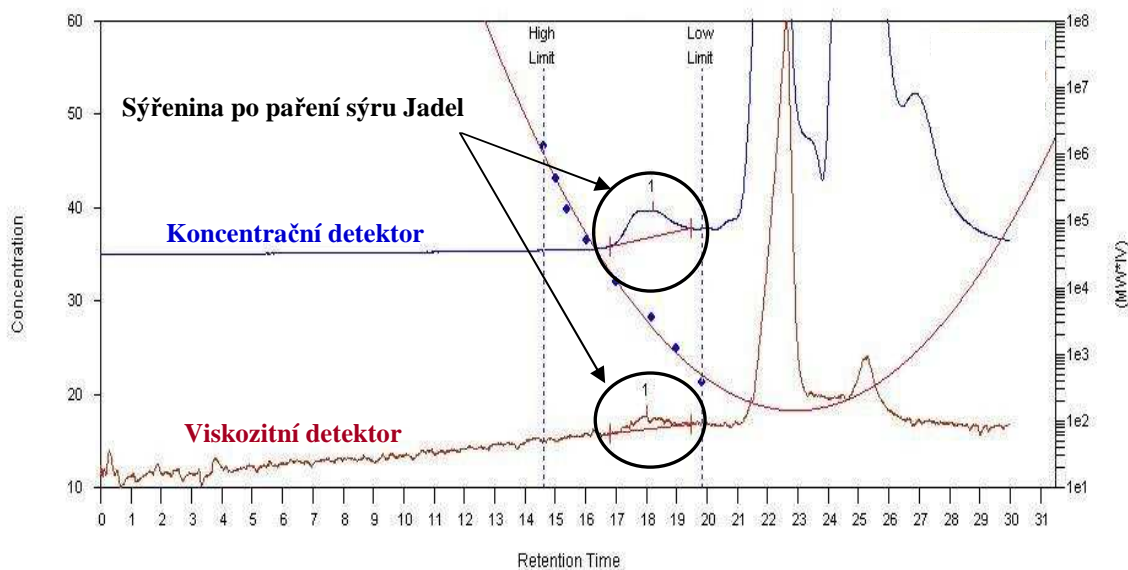
Molární hmotnost kaseinů se pohybuje, v závislosti na jejich typu, v rozmezí od 19 000 do 26 000 g/mol [6]. Z hodnot uvedených v tabulkách 1 – 3, které shrnují výsledky GPC analýzy, je vidět, že naměřené hodnoty hmotnostního a číselného průměru molárních hmotností vzorků se od této hodnoty značně liší a je nutno je brát pouze jako hodnoty relativní. Jedním z možných důvodů je skutečnost, že pro kalibraci GPC byly použity pullulanové standardy a nelze ani zanedbat možný vliv použité mobilní fáze, která se liší od mobilní fáze uváděné v publikacích.

Z chromatogramů vyhodnocených pomocí univerzální kalibrace byly získány středy molárních hmotností. Numerické hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností \overline{M}_w , číselného průměru molárních hmotností \overline{M}_n a indexu polydisperzity PD měřených vzorků jsou uvedeny v tabulkách 1 – 3. Pro ilustraci je uveden na Obr. 9 chromatogram sýřenininy po paření sýru Jadel s jeho popisem. Obr. 10, 12 a 14 znázorňují porovnání diferenciálních distribučních křivek analyzovaných vzorků získaných ze sýrů Mozzarella a Jadel v různých fázích výroby a vzorků extrahovaných z finálních výrobků: Mozzarella, Jadel, Koliba a Gouda. Porovnání průběhu analýzy vzorků získaných ze sýru Mozzarella znázorňuje Obr. 11, ze sýru Jadel Obr. 13 a vzorky finálních výrobků: Mozzarella, Jadel, Koliba a Gouda Obr. 15. Aby nedošlo k záměně píku měřeného vzorku a píku octanu sodného, bylo provedeno porovnání chromatogramů z koncentračního detektoru, které je znázorněno na Obr. 8.



Obr.8: Grafické znázornění porovnání měřeného vzorku a octanu sodného v průběhu analýzy

Na Obr. 8 je znázorněna závislost odezvy koncentračního detektoru na retenčním čase pro vzorek sýřeniny před pařením. Z obrázku je zřejmé, že retenční čas analyzovaného vzorku se pohybuje v rozmezí 17. - 19. minuty, zatím co retenční čas píku octanu sodného je výrazně delší a oba píky lze od sebe dobře rozlišit. Z tohoto lze rovněž předpokládat, že retenční časy všech analyzovaných vzorků sýrů se budou pohybovat přibližně v tomto rozmezí. Retenční čas píku octanu sodného se nachází v rozmezí 21. - 23. minuty a píku nízkomolekulárního, který se objevuje na všech chromatogramech, v rozmezí 24. - 28. minuty.



Obr.9: Chromatogram sýřeniny po paření sýru Jadel

Na Obr. 9 je znázorněn signál koncentračního a viskozitního detektoru s kalibrační křivkou, která byla sestrojena z pullulanových standardů. Na chromatogramu je patrné, že pík vzorku na signálu viskozitního detektoru je méně výrazný.

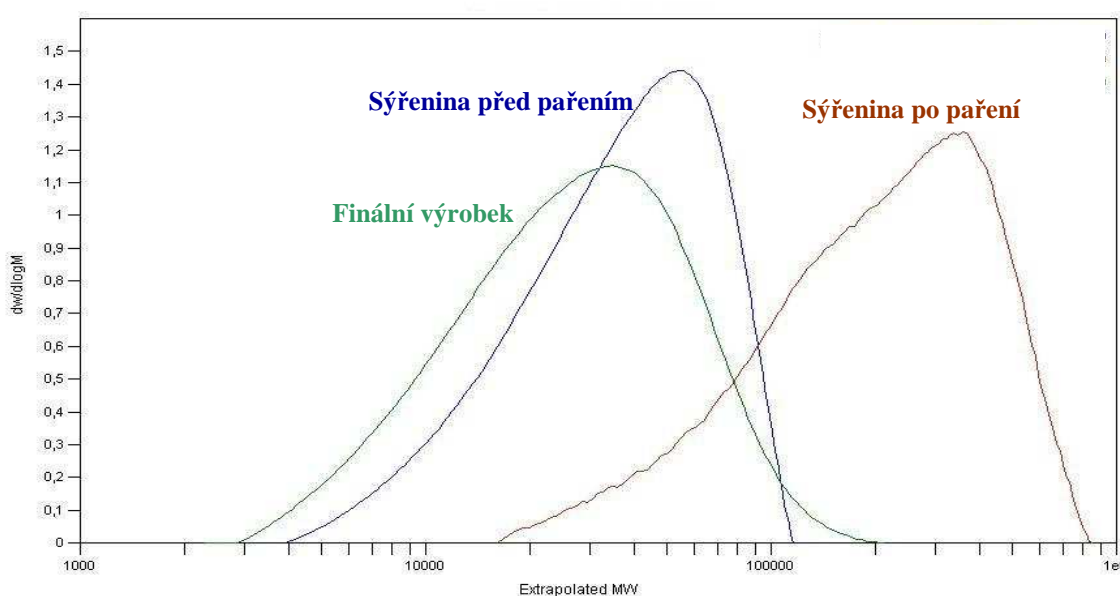
Tabulka 1: Hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností \overline{M}_w , číselného průměru molárních hmotností \overline{M}_n a indexu polydisperzity PD měřených vzorků extraktů Mozzarella.

Vzorky	\overline{M}_n [g·mol ⁻¹]	\overline{M}_w [g·mol ⁻¹]	PD = $\frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n}$
sýřenina před pařením	27 000	42 000	1,5
sýřenina po paření	138 000	250 000	1,8
finální výrobek bez nálevu	19 000	34 000	1,8

U vzorků sýřeniny před pařením a finálního výrobku sýru Mozzarella je z naměřených hodnot \overline{M}_w patrné, že vlivem působení pářící vody o teplotě 70 - 80 °C došlo k poklesu molární hmotnosti finálního výrobku. Vzorek sýřeniny po paření má hodnoty \overline{M}_w podstatně

vyšší, což mohlo být způsobeno nedostatečným rozpouštěním (dispergací) nebo zahříváním při přípravě vzorku, kdy nedošlo k dostatečnému uvolnění jednotlivých kaseinových bílkovin, které jsou v matici sýru spojeny vápenatými můstky.

Pro jednoduchý odhad šířky distribuce polymeru slouží index polydisperzity, který u vzorků extrahovaných z Mozzarely leží v rozmezí hodnot 1,5 až 1,8, což ukazuje na úzkou distribuci molárních hmotností sledovaných polymerů. Kromě indexu polydisperzity umožňuje metoda GPC také grafické znázornění šířky distribuce polymeru, sestavením distribuční křivky. Distribuční křivka udává kvantitativní zastoupení makromolekul jednotlivých molárních hmotností, které se v daném polymeru vyskytují.

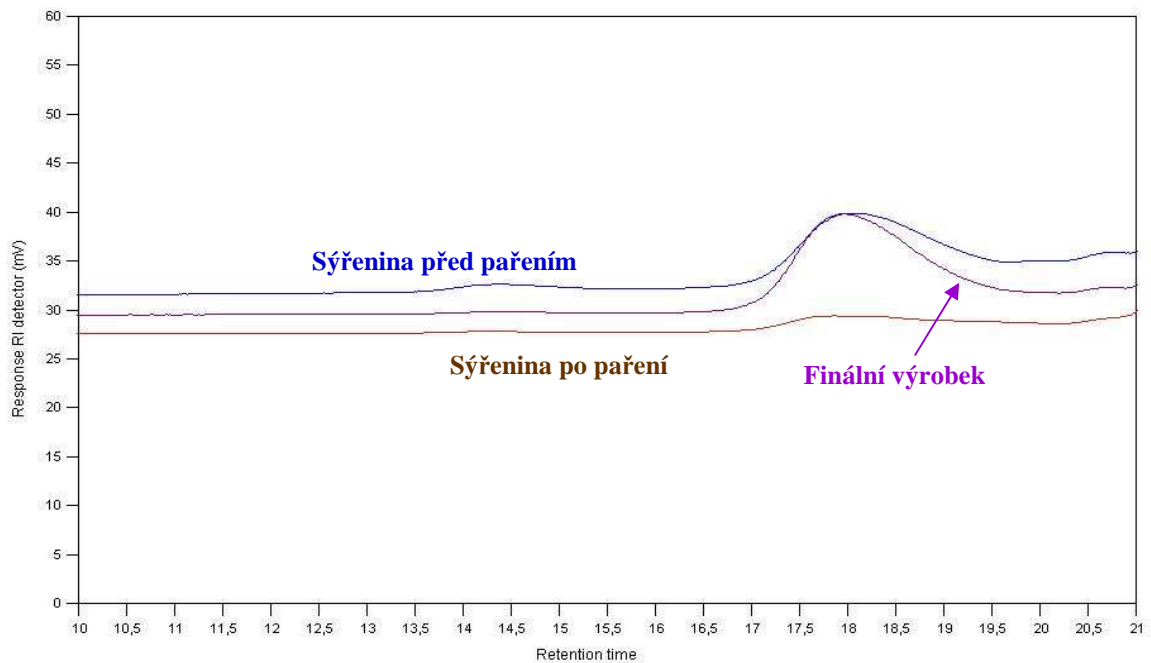


Obr.10: Grafické znázornění diferenciálních distribučních křivek analyzovaných vzorků získaných ze sýru Mozzarella v různých fázích výroby: (sýřenina před pařením:

$\overline{M}_w = 42\ 000$, sýřenina po paření: $\overline{M}_w = 250\ 000$, finální výrobek: $\overline{M}_w = 34\ 000$)

Z Obr. 10 je patrné, že diferenciální distribuční křivky vzorků získaných kaseinů z Mozzarely vykazují monomodální tvary píků, odpovídající stanoveným hodnotám molárních hmotností. U extraktu z finálního výrobku došlo působením pařicího procesu ke snížení molární hmotnosti v porovnání se situací před pařením, o čemž svědčí posun diferenciální distribuční křivky do oblasti s nižšími molárními hmotnostmi. Naopak u sýřeniny po paření se diferenciální distribuční křivka posunula do oblasti s vyššími molárními hmotnostmi.

Nárůst molární hmotnosti by mohl být způsoben pochody probíhajícími během pařícího procesu, kdy paření může zapříčinit dodatečnou agregaci kaseinového komplexu, což může vést → horší rozpustnost → horší izolace → vyšší zjištěné molární hmotnosti.



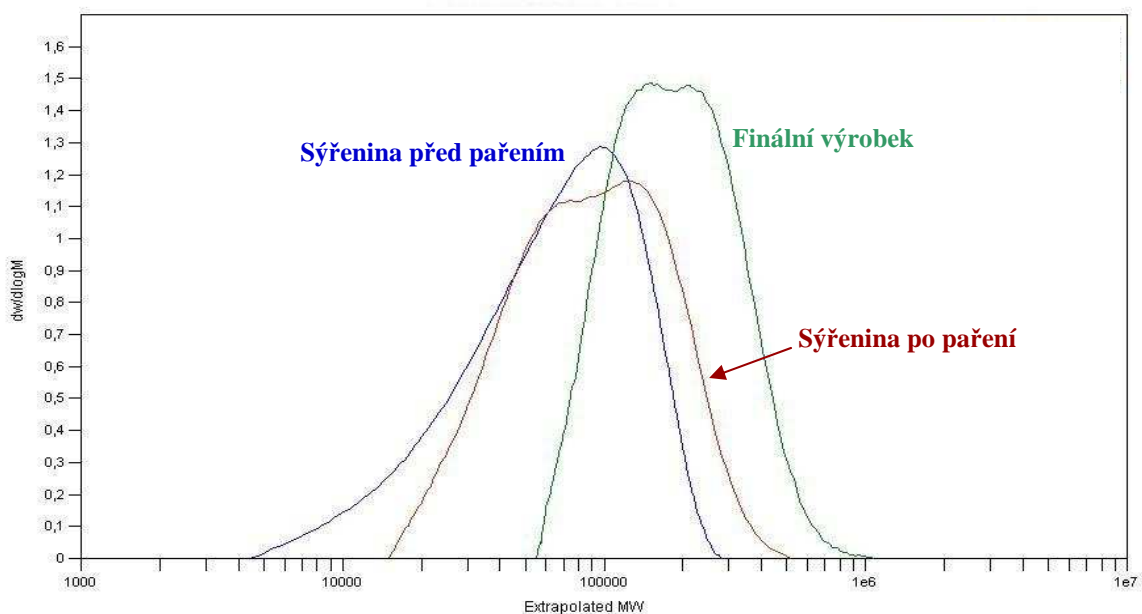
Obr.11: Porovnání průběhu analýzy vzorků Mozzarely, signál koncentračního detektoru

Obr. 11 ukazuje, že retenční časy vzorků Mozzarely se pohybují i přes různé hodnoty \overline{M}_w v rozmezí 17. - 19,5 minuty. U těchto vzorků nastává začátek eluce vzorků v přibližně stejném čase.

Tabulka 2: Hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností \overline{M}_w , číselného průměru molárních hmotností \overline{M}_n a indexu polydisperzity PD měřených vzorků extraktů Jadelu.

Vzorky	\overline{M}_n [g·mol ⁻¹]	\overline{M}_w [g·mol ⁻¹]	$PD = \frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n}$
sýřenina před pařením	43 000	78 000	1,8
sýřenina po paření	69 000	108 000	1,6
finální výrobek bez soli	161 000	211 000	1,3

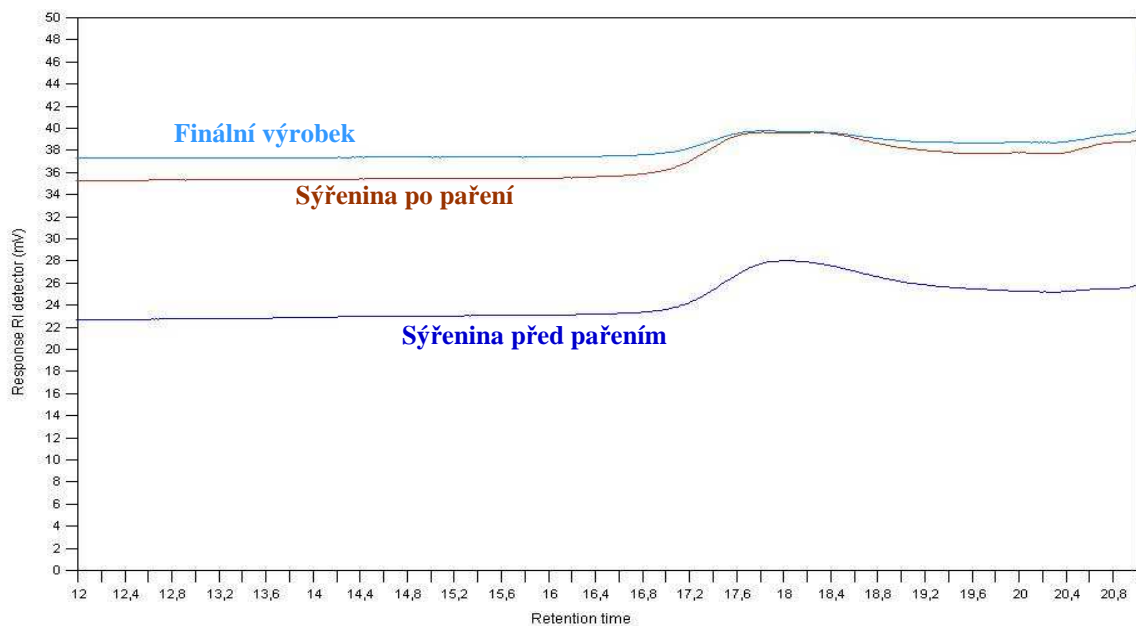
U vzorků sýřeniny po paření a finálního výrobku sýru Jadel je z naměřených hodnot \overline{M}_w zřejmé, že hodnoty \overline{M}_w neklesají, jak by se předpokládalo při působení pářící vody o dané teplotě, ale naopak stoupají. U vzorku sýřeniny po paření sýru Jadel zřejmě nedošlo jako u předchozího vzorku sýřeniny po paření sýru Mozzarella k dostatečnému uvolnění jednotlivých kaseinových bílkovin, které jsou v matici sýru spojeny vápenatými můstky. Index polydisperzity u vzorků extrahovaných z Jadelu leží v rozmezí hodnot 1,3 až 1,8, což ukazuje na úzkou distribuci molárních hmotností sledovaných polymerů.



Obr.12: Grafické znázornění diferenciálních distribučních křivek analyzovaných vzorků získaných ze sýru Jadel (sýřenina před pařením: $\overline{M}_w = 78\,000$, sýřenina po paření: $\overline{M}_w = 108\,000$, finální výrobek: $\overline{M}_w = 211\,000$)

Na Obr. 12 jsou znázorněny diferenciální distribuční křivky analyzovaných vzorků získaných kaseinů ze sýru Jadel, ze kterých je patrné, že diferenciální distribuční křivka vzorku ze sýřeniny před pařením má tvar píku monomodální, kdežto distribuce sýřeniny po paření a finálního výrobku mají tvar částečně separovaného píku s náznakem bimodální distribuce, což poukazuje na výskyt dvou populací makromolekul s rozdílnou molární hmotností. U vzorků sýřeniny po paření a finálního výrobku bylo zjištěno během procesu výroby postupné zvýšení molární hmotnosti, což mohlo být způsobeno nedostatečným rozpouštěním

(dispergací) nebo zahříváním při přípravě vzorku, kdy nedošlo k dostatečnému uvolnění jednotlivých kaseinových bílkovin, které jsou v matrici sýru spojeny vápenatými můstky, jak znázorňuje posun diferenciálních distribučních křivek těchto vzorků do oblasti s vyššími molárními hmotnostmi. Nárůst molární hmotnosti by mohl být způsoben pochody probíhajícími během pařicího procesu, kdy paření může zapříčinit dodatečnou agregaci kaseinového komplexu, což může vést → horší rozpustnost → horší izolace → vyšší zjištěné molární hmotnosti.

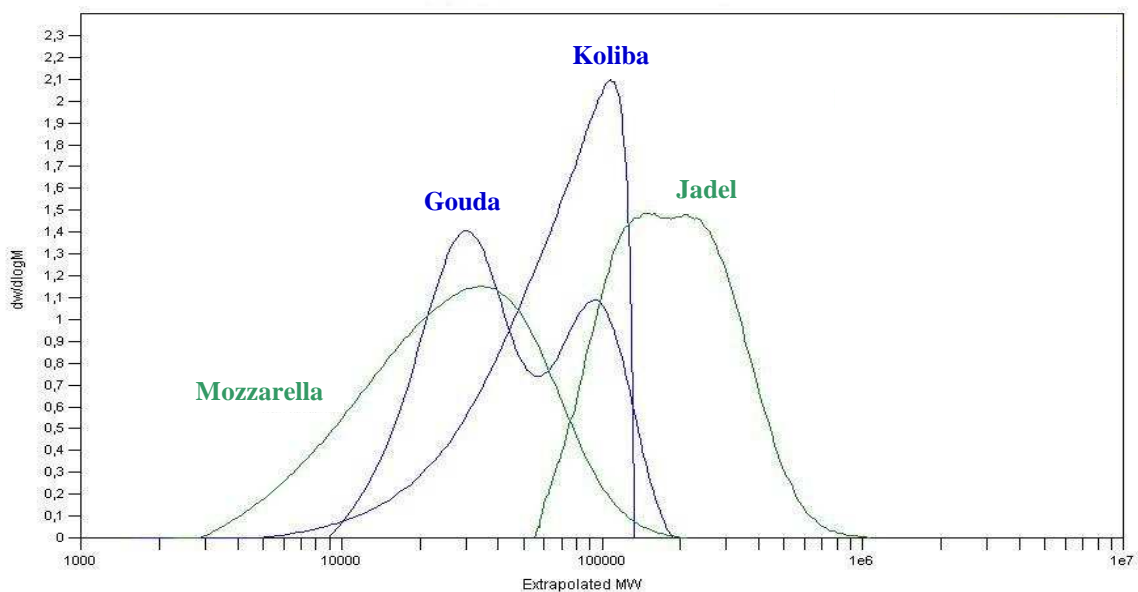


Obr.13: Porovnání průběhu analýzy vzorků získaných ze sýru Jadel, signál koncentračního detektoru

Z Obr. 13 vyplývá, že retenční časy vzorků sýřeniny před pařením, sýřeniny po paření a finálního výrobku sýru Jadel stejně jako u vzorků sýřeniny před pařením, sýřeniny po paření a finálního výrobku sýru Mozzarella leží v rozmezí 16,8 - 19,5 minuty.

Tabulka 3: Hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností \overline{M}_w , číselného průměru molárních hmotností \overline{M}_n a indexu polydisperzity PD měřených vzorků Koliby a Goudy.

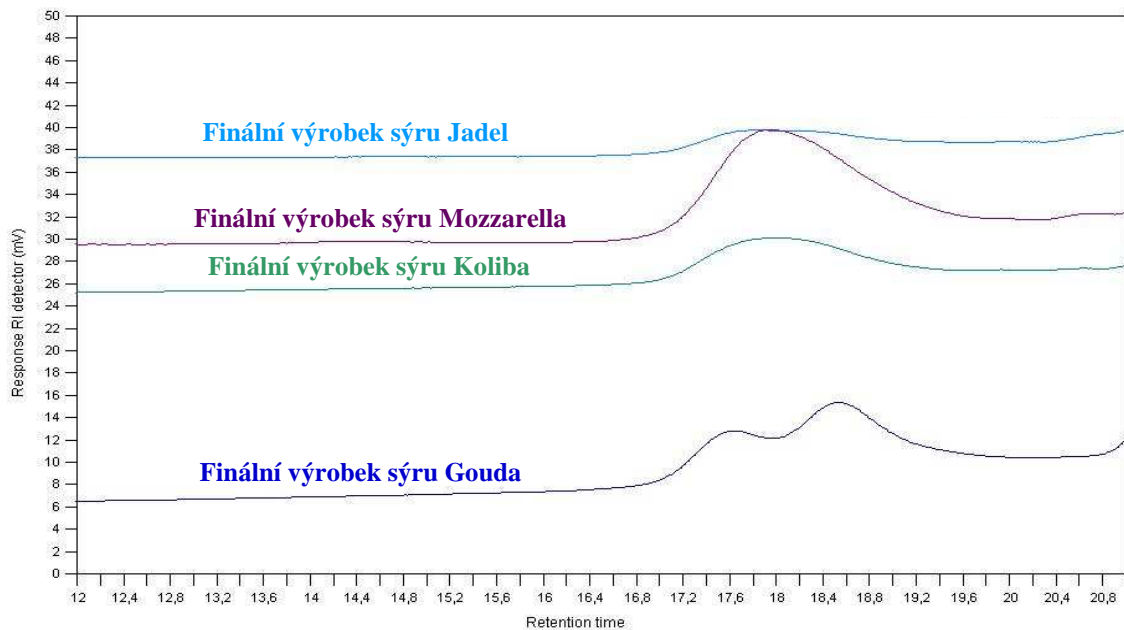
Vzorky	\overline{M}_n [g·mol ⁻¹]	\overline{M}_w [g·mol ⁻¹]	$PD = \frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n}$
Koliba - finální výrobek	49 000	70 000	1,4
Gouda - finální výrobek	35 000	54 000	1,5



Obr.14: Grafické znázornění diferenciálních distribučních křivek vzorků extrahovaných z finálních výrobků: Mozzarella, Jadel, Koliba a Gouda (Mozzarella: $\overline{M}_w = 34\ 000$, Jadel: $\overline{M}_w = 211\ 000$, Koliba: $\overline{M}_w = 70\ 000$, Gouda: $\overline{M}_w = 54\ 000$)

Na Obr. 14 jsou porovnány diferenciální distribuční křivky vzorků získaných z finálních výrobků Mozzarely, Jadelu, Koliby a Goudy. Je z nich patrné, že diferenciální distribuční křivky získané analýzou vzorků Mozzarely a Koliby jsou monomodální, kdežto diferenciální distribuční křivka ze sýru Jadel je částečně separovaná s mírným náznakem bimodality a distribuce extraktu z Goudy vykazuje jasný bimodální charakter. Bimodální tvar píku naznačuje, že v daném vzorku se vyskytují dvě významné populace makromolekul

s rozdílnou molární hmotností. Maxima píků finálních výrobků se pohybují v retenčních časech od 17,86 minuty do 18,53 minuty.



Obr.15: Porovnání průběhu analýzy vzorků získaných z finálních výrobků Mozzarellly, Jadelu, Koliby a Goudy, signál koncentračním detektorem

Z porovnání průběhu analýzy vzorků finálních výrobků na Obr. 15 je patrné, že retenční časy vzorků se pohybují v rozmezí 16,8 - 19,5 minuty, i přesto, že se jedná o různé finální výrobky.

K přístrojovému vybavení, které bylo v době analýzy k dispozici, je třeba poznamenat, že se především jednalo o univerzální chromatografickou kolonu, která není speciálně určena pro analýzu proteinů, a rovněž experimentálně zvolená mobilní fáze se lišila od mobilních fází uváděných v publikacích. Vzhledem k této skutečnosti nelze tedy s jistotou říci, k jak velké degradaci kaseinového komplexu při procesu paření dochází. Prezentované výsledky však představují určitou indikaci o průběhu procesu a výchozí bod pro další experimentální práci, která je navržena níže.

Z naměřených hodnot \overline{M}_w analyzovaných vzorků extrahovaných z Mozzarely je možné usuzovat na určitý vliv působení pařícího procesu na degradaci kaseinového komplexu. U vzorků z Jadelu, to tak průkazné nebylo, což mohlo být ovlivněno, jak už bylo výše uvedeno, nedostatečným extrakčním postupem.

Metoda GPC je založena na principu separace molekul podle velikosti částic, přičemž se předpokládá, že interakce molekul analyzovaného vzorku a povrchu náplně v koloně bude minimální. U vodné fáze se často setkáváme s „non – size exclusion“ efekty, jak už bylo uvedeno v kapitole 12.

V publikaci [71] se uvádí, že u všech typů kolon lze pozorovat ve větší či menší míře hydrofobní a elektrostatické interakce. Hydrofobní a elektrostatický efekt způsobí zadržování vzorku prostřednictvím interakce s náplní kolony a výsledný pík, který se z kolony eluuje, je širší, případně retenční čas je delší. Tyto interakce narušují chromatografickou separaci a neumožňují správné stanovení molární hmotnosti.

Z provedeného experimentu se dají vyvodit příslušná doporučení pro vhodnější postup přípravy vzorku, volby mobilní fáze a přístrojového vybavení. Tato doporučení budou vycházet rovněž z údajů uvedených v publikacích [72, 73, 74, 75].

V publikaci [72] je postup přípravy extraktu ze sýru založen na smíchání vzorku s vodou v poměru 1:3, který se následně homogenizuje pomocí homogenizátoru Ultra – Turrax T25 po dobu 2 minut. Po homogenizaci byl homogenizovaný vzorek zahříván 1 hodinu při teplotě 40 °C a pH bylo upraveno na 4,4 – 4,6. Výsledná suspenze se centrifugovala po dobu 30 minut při teplotě 5 °C a 4 800 otáčkách za minutu. Svrchní vrstva obsahující lipidy byla odstraněna a zbytek supernatantu se použil pro analýzu. V pracovním postupu přípravy vzorku v této diplomové práci nebyl tuk úplně odstraněn.

Z publikací [73, 74, 75] je možné vycházet při návrhu alternativního složení mobilní fáze, přístrojového vybavení, především typu zvolené kolony pro separaci vzorku a následného použití vhodnějších standardů pro kalibraci kolony. Pro experimentální část diplomové

práce byly použity dvě kolony, a to kolona TSK GMPWXL a kolona Ultrahydrogel 250. Volba těchto kolon mohla hrát určitou roli při separaci vzorku obsahujícího kaseiny. Optimální nebyla ani volba pullulanových standardů s úzkou distribucí molárních hmotností pro kalibraci kolony.

Vhodnějšími typy kolon pro separaci proteinů jsou podle zmíněných publikací kolony TSK GEL typu SW např. TSK G2000SWXL nebo TSK G3000SW. Mobilní fáze v případě těchto kolon byly složeny z 0,5 M fosfátového pufru o pH 6,8 a 1 M síranu sodného nebo jiná mobilní fáze byla složena z 5 mM pufru octanu amonového o pH 6,5 upraveného kyselinou octovou. Na kalibraci kolony byly použity standardy proteinů: karbonátanhydráza, α -laktalbumin, inzulín B, bombezin, neurotenzin, β -kazomorfin a tryptofan.

Z těchto uvedených doporučení by výsledky analýzy mohly být lépe průkazné, že k degradaci kaseinového komplexu při procesu paření dochází a v jakém rozsahu. Průkaznější by i mohlo být sledování degradace kaseinového komplexu v průběhu zrání sýrů, který probíhá v podstatně větším rozsahu než u procesu paření.

ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývala sledováním změn molárních hmotností a distribuce molárních hmotností kaseinového komplexu u vzorků sýřenin před pařením, sýřenin po paření a finálních výrobků – sýrů Mozzarella a Jadel s využitím metody gelové permeační chromatografie.

Teoretická část práce je zaměřena na popis mléka, jeho složení a nejvýznamnější technologické vlastnosti. Složení mléka je především zaměřeno na popis kaseinů, funkčních vlastností kaseinových produktů a syrovátkových bílkovin. Velkou kapitolu zaujímá technologie výroby pařených sýrů, kde je krok po kroku rozebrána jejich výroba. Závěr teoretické části je věnován metodě gelové permeační chromatografii, která byla použita v experimentální části diplomové práce.

Experimentální část diplomové práce je zaměřena na diskuzi a hodnocení výsledků hmotnostních průměrů molárních hmotností \overline{M}_w , indexu polydisperzity PD a průběhu diferenciálních distribučních křivek získaných pro jednotlivé vzorky sýřeniny před pařením, sýřeniny po paření a finálního výrobku Mozzarely a Jadelu metodou GPC.

Z výsledků diskutovaných v experimentální části je možné učinit následující závěry:

- k degradaci kaseinového komplexu při procesu paření i přes termostabilitu kaseinu dochází, ale nelze přesně říci, v jakém rozsahu. Snížení molárních hmotností bylo sledováno pouze u vzorků Mozzarely, a to u sýřeniny před pařením a finálního výrobku. U vzorků Jadelu toto nelze potvrdit, jelikož nedošlo k uvolnění kaseinů,
- při použití experimentálně zvolené mobilní fáze, typu kolon a standardů byla na závěr diskuze sestavena doporučení vhodnější pro další zkoumání degradace kaseinového komplexu při procesu paření.

I když v experimentální části diplomové práce nebylo s přesností stanoveno, k jak velkému rozsahu degradace kaseinového komplexu při procesu paření dochází, i tak je možné říci,

že k největším změnám bude docházet až při procesu zrání sýrů působením proteolytických enzymů produkovaných mikroorganismy.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ČEPIČKA, J. *Obecná potravinářská technologie*, 1. vydání, Praha: VŠCHT, 1995, ISBN 8070802391.
- [2] KADLEC, P.; MELZUCH, K.; VOLDŘICH, M. *Co byste měli vědět o výrobě potravin? : technologie potravin*, 1. vydání, Ostrava: Key Publishing, 2010, ISBN 978-80-7418-051-4.
- [3] DRDÁK, M. *Základy potravinářských technologií : spracovanie rastlinných a živočišných surovín. Cereálne a fermentačné technológie. Uchovávanie, hygiena a ekológia potravin*, 1. vydání, Bratislava: Malé centrum, 1996, ISBN 8096706411.
- [4] HRABĚ, J.; BŘEZINA, P.; VALÁŠEK, P. *Technologie výroby potravin živočišného původu : bakalářský směr*, 1. vydání, Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2006, ISBN 8073184052.
- [5] BŘEZINA, P., KOMÁR, A., HRABĚ, J. *Technologie, zbožiznalství a hygiena potravin*, Vyškov, 2001.
- [6] ZADRAŽIL, K. *Mlékařství : (přednášky)*, 1. vydání, Praha: Česká zemědělská univerzita, Agronomická fakulta, 2002, ISBN 80-86642-15-1.
- [7] KADLEC, P. a kol. *Technologie potravin II*, 1. vydání, Praha: VŠCHT, 2007, ISBN 80-7080-510-2.
- [8] BŘEZINA, P., JELÍNEK, J. *Chemie a technologie mléka*, Praha: 1990.
- [9] GAJDUŠEK, S. *Laktologie*, 1. vydání, Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003, ISBN 80-7157-657-3.
- [10] *Mlékárenská technologie* [online], dostupné na: www.cepac.cz, e-learningové materiály (23. 3. 2011)
- [11] HOZA, I.; KRAMÁŘOVÁ, D.; BUDINSKÝ, P. *Potravinářská biochemie I. : pro studenty kombinované formy studia*, 1. vydání, Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2006, ISBN 80-7318-495-8.
- [12] MIŠURCOVÁ, L. *Základy biologie*, 1. vydání, Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2006, ISBN 8073184346.

- [13] ŠEBELA, F., DUŠEK, B., PAVEL, J. *Mlékařství*, Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1964.
- [14] *Casein products* [online], dostupné na:
<http://nzic.org.nz/ChemProcesses/dairy/3E.pdf> (15. 4. 2011)
- [15] EIGEL, W. N. ET AL. *Nomenclature of Proteins of Cow's Milk: Fifth Revision*, Journal of Dairy Science, Vol 67, No 8, 1984, p. 1599–1631.
- [16] VERMA V., HANCOCK O W., CATCHMARK M J. *The role of casein in supporting the operation of surface bound kinesin*, Journal of Biological Engineering, 2008
- [17] *Kasein* [online], dostupné na: <http://www.agronavigator.cz/az/vis.aspx?id=92329> (15. 4. 2011)
- [18] Fox, P. F.; McSweeney, P. L. H. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. 1st edit., London: Blackie Academic & Professional, 1998, ISBN 0-412-72000-0.
- [19] VELÍŠEK J., HAJŠLOVÁ J. *Chemie potravin I*, OSSIS, 3. vydání, 2009, ISBN 978-80-86659-15-2.
- [20] GOFF H. D., HILL A. R. *Chemistry and Physics*, In HUI, Y.H., *Dairy Science and Technology Handbook*, Vol 1: Principles and Properties, Blackwell Publishing, 1993, p. 1–30, ISBN 1-56081-078-5.
- [21] FOX P. F., KELLY A. L. *The caseins*, In YADA R. Y. *Proteins in food processing, Part I: Sources of proteins*, Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, 2004, p. 27–71, ISBN 1 85573 837 6.
- [22] MUNRO P. A. *Caseins, Functional Properties and Food Uses*, Elsevier Science Ltd., 2002, p. 1909-1912.
- [23] HAMPL, B. *Přehled potravinářského a kvasného průmyslu : vysokoškolská učebnice*, 1. vydání, Praha: SNTL, 1962.
- [24] *Milk Proteins* [online], dostupné na:
<http://class.fst.ohio-state.edu/FST822/lecturesab/Milk2.htm> (22. 9. 2010)
- [25] SIMEONOVÁ, J.; GAJDŮŠEK, S.; INGR, I. *Zpracování a zbožiznalství živočišných produktů*, 1. vydání, Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003, ISBN 80-7157-708-1.

- [26] KNĚŽ, V., ČERNÁ, M., SÁGA, P., SUCHOMEL, J., TORŠ, J., TRENDÁ, O., TVRDÍK, J. *Mlékárenská příručka*, Praha: SNTL, 1974.
- [27] KADLEC, I., ŠULC, J. *Suroviny a materiály mlékárenského průmyslu pro 1. ročník SOU*, Praha: SNTL, 1984.
- [28] KNĚŽ, V. *Výroba sýrů*, Praha: SNTL, 1960.
- [29] KINDSTEDT, P., CARIĆ, M., MILANOVIĆ, S. *Pasta – Filata Cheese*, In FOX, P. F., McSWEENEY, P. L., COGAN, M.T., GUINEE, T. P. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 3rd edit., vol. 2: *Major Cheese Groups*, Elsevier, 2004. p. 251-279, ISBN 0-1226-3653-8.
- [30] FOX, P. F., McSWEENEY, P. L.H., COGAN, M.T., GUINEE, T. P. *Principal Families of Cheese, Fundamentals of Cheese Science*, Springer – Verlag, 2000, p. 388-428. ISBN 978-0-8342-1260-2.
- [31] CALLEC, CH. *Encyklopedie sýrů*, 1. vydání, Rebo Productions, 2002, ISBN 80-7234-225-8.
- [32] *Charakteristika sýrů Madeta* [online], dostupné na: http://www.madeta.cz/assets/files/Skola_syru/6.charakteristika_syru_madeta_syry_tvrde_polotvrde.pdf (21. 3. 2011)
- [33] GUNASEKARAN, S., AK, M.M. *Cheese Rheology and Texture*, CRC Press LLC. 2003, p. 512. ISBN 1-58716-021-8.
- [34] *Pasta Filata Efficiency line solutions* [online], dostupné na: http://www.tetrapak.com/Document%20Bank/Food_categories/PD10331en_Tetra_Tebel_Pasta_Filata.pdf (15. 4. 2011)
- [35] KINDSTEDT, P.S., HILLIER, A.J., MAYES J.J. *Technology, Biochemistry and Functionality of Pasta Filata/Pizza Cheese*, In LAW, B.A., TAMIME, A.Y. *Technology of Cheesemaking*, 2nd edition, Blackwell Publishing, 2010, p. 330-359, ISBN 978-1-4051-8298-0.
- [36] KINDSTEDT, P. S. *Effect of manufacturing factors, composition, and proteolysis on the functional characteristics of Mozzarella cheese*, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol. 33, 1993, p. 167–187.

- [37] ZIMÁK, E. *Technologie pro 4. ročník střední průmyslové školy studijního oboru zpracování mléka*, 1. vydání, Praha: SNTL, 1988.
- [38] TIŠLOVÁ, A. *Technologie a výroba pařených sýrů*, Bakalářská práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2009.
- [39] DOSTÁL J. *Lékařská chemie II*, 2. vydání, MU v Brně, 2005, ISBN 80-210-3789-X.
- [40] *Biochemické pojmy : výkladový slovník* [online], dostupné na:
http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=denaturace (28. 4. 2011)
- [41] VOSTARKOVÁ, M. *Vliv fyzikálních parametrů na jakost pařených sýrů*, Diplomová práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2009.
- [42] *Technologie výroby sýrů* [online], dostupné na:
http://www.madeta.cz/assets/files/Skola_syru/4.technologie_vyroby_syru.pdf
(21. 3. 2011)
- [43] BYLUND, G. *Dairy Processing Handbook*, Tetra Pak Processing Systems, Lund, Sweden, 1995.
- [44] WENDORFF, W., JOHNSON, M. *Care and maintenance of salt brines*, *Proceedings of the 28th Annual Marschall Italian Cheese Seminar*, Madison, 1991, p. 63–69.
- [45] DOLEŽÁLEK, J. *Mikrobiologie mlékárenského a tukařského průmyslu*, 1. vydání, Praha : SNTL, 1962.
- [46] FEENEY, E.P., FOX, P.F., GUINEE, T.P. *Effect of ripening temperature on the quality of low moisture Mozzarella cheese*, 1: Composition and proteolysis, *Lait*. 2001, Vol. 81, p. 463–474.
- [47] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*, 2. upravené a doplněné vydání, Ostrava : Pavel Klouda, 2003, ISBN 80-86369-07-2.
- [48] KRÁLOVÁ, B.; RAUCH, P. *Bioanalytické metody*, 2. vydání, Praha: VŠCHT, 1995, ISBN 8070802340.
- [49] PAVLÍNEK, V. *Učební texty k předmětu: Kontrolní a zkušební metody*, UTB ve Zlíně, 2009

- [50] POPL, M.; KUBÁT, J. *Separace látek*, 3. přepracované vydání, Praha: SNTL, 1986.
- [51] KAŠPÁRKOVÁ, V. *Charakterizace polymerních roztoků a částicových soustav: teze habilitační práce*, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2010, ISBN 978-80-7318-970-9.
- [52] MORI, S.; BARTH, H. G. *Size exclusion chromatography*, Berlin: Springer, 1999, ISBN 3-540-65635-9.
- [53] CROMPTON, T. R. *Polymer Reference Book*, Smithers Rapra Technology, 2006, ISBN 978-1-85957-526-0.
- [54] *Gelová permeační chromatografie* [online], dostupné na:
http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/cd_ds4/hypertext/AJAZG.htm (3. 11. 2011)
- [55] JANČA, J. *Liquid chromatography – Size Exclusion*, Elsevier, 2005, p. 1-10.
- [56] CHURÁČEK, J. *Analytická separace látek*, 1. vydání, Praha: SNTL, 1990, ISBN 8003005698.
- [57] ŠIMEK, L.; HRNČIŘÍK, J. *Fyzikální chemie II : (koloidní a makromolekulární systémy)*, 3. vydání, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2005, ISBN 80-7318-325-0.
- [58] NOVÁK, J. *Fyzikální chemie II*, 1. vydání, Praha: VŠCHT, 2001, ISBN 807080436X.
- [59] PECHÁČKOVÁ, M. *Charakterizace hydrolyzátů kolagenu pomocí gelové permeační chromatografie s refraktometrickou a viskozitní detekcí*, Diplomová práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2008
- [60] DETERMANN, H. *Gelová chromatografie*, 1. vydání, Praha: Academia, 1972.
- [61] BEREK, D., KUBÍN, M., MARCINKA, K., DRESSLER, M. *Gelová chromatografie*, Bratislava: VEDA, 1983.
- [62] *Chromatografické metody (kapalinová chromatografie)* [online], dostupné na:
<http://www.molbio.upol.cz/stranky/vyuka/BAM/Chromatografie.pdf> (3. 11. 2010)
- [63] STOJASPAL, R. *Aplikace gelové permeační chromatografie pro charakterizaci biopolymerů*, Bakalářská práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2007.

- [64] KADLEC, P. *Procesy potravinářských a biochemických výrob*, 1. vydání, Praha: VŠCHT, 2003, ISBN 80-7080-527-7.
- [65] OPEKAR, F. *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*, 1. vydání, Praha: Karolinum, 2003, ISBN 8024605538.
- [66] PATNAIK, P. *Dean's Analytical Chemistry Handbook*, 2. vydání, McGraw-Hill, 2004, ISBN 978-1-60119-260-8.
- [67] MORNSTEIN, V., HRAZDIRA I. *Lékařská biofyzika a přístrojová technika*, NEPTUN, 2001, ISBN 80-902896-1-4.
- [68] *GPC Theory: Refractive Index Detectors* [online], dostupné na: http://www.malvern.com/LabEng/technology/gel_permeation_chromatography_theory/refractive_index_detector_gpc_theory.htm (28. 4. 2011)
- [69] TRATHNIGG, B. *Size-exclusion Chromatography of Polymers*, In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley and Sons Ltd, p. 8008-8034.
- [70] KAŠPÁRKOVÁ, V., KOLOMAZNÍK, K., BURKETOVÁ, L., SASEK, V., ŠIMEK, L. *Characterization of low-molecular weight collagen hydrolysates prepared by combination of enzymatic and acid hydrolysis*, In *The Journal of the american leather chemists association*, Vol. 104, 2009, p. 46-51.
- [71] RICKER, R. D., SANDOVAL, L. A., JUSTICE, J. D., GEISER, F. O. *J. Chromatogr. A*, 1995, Vol. 691, p. 67.
- [72] VERDINI, R. A., ZORRILLA, S. E., RUBIOLO, A. C. *Characterisation of soft cheese proteolysis by RP-HPLC analysis of its nitrogenous fractions. Effect of ripening time and sampling zone*, *International Dairy Journal*, 2003, p. 1-10.
- [73] DIMENNA, G. P., SEGALL, H. J. *High-Performannce Gel-Permeation Chromatography of Bovine Skim Milk Proteins*, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, Vol. 4, 1981, p. 639-649.
- [74] LEMIEUX, L., AMIOT, J., PIOT, J. M., GUILLOCHON, D. *Separation of a casein hydrolyzate by HPSEC with a new mobile phase and characterization of peptides by FABMS*, *Analytica Chimica Acta*, Vol. 352, 1997, p. 399-409.

- [75] FUJINARI, E. M., MANES, J. D. *Determination of molecular-mass distribution of food-grade protein hydrolyzates by size-exclusion chromatography and chemiluminescent nitrogen detection*, Journal of Chromatography A, Vol. 763, 1997, p. 323-329.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AMK	Aminokyseliny
a	Konstanta pro Mark – Houwinkovu rovnici
BMK	Bakterie mléčného kvašení
Ca ²⁺	Vápenaté ionty
c	Koncentrace
c _i	Molární koncentrace frakce i
-COOH	Karboxylová skupina
DP	Diferenciální tlak
GPC	Gelová permeační chromatografie
H	Výškový ekvivalent teoretického patra
HPLC	High Performance Liquid Chromatography Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ΔH	Entalpie
IP	Vstupní tlak
K	Konstanta pro Mark – Houwinkovu rovnici
K _D	Distribuční konstanta
L	Délka kolony
M	Molární hmotnost
M _{GPC}	Molární hmotnost odpovídající elučnímu objemu maxima chromatogramu
M _i	Molární hmotnost frakce i
m _i	Hmotnost frakce i
M _P	Molární hmotnost polymeru
M _{ST}	Molární hmotnost standardu
n	Počet teoretických pater

NaN_3	Azid sodný
NaOH	Hydroxid sodný
$-\text{NH}_2$	Aminoskupina
N_i	Počet částic i-tého druhu
PD	Index polydisperzity
pI	Izoelektrický bod
PS	Polystyren
ΔP	Diferenciální tlak
SEC	Size-exclusion Chromatography Sterická exkluzní chromatografie
THF	Tetrahydrofuran
V_0	Intersticiální objem mezi zrny gelu
V_m	Objem matrice gelu
V_p	Celkový objem pórů gelu
V_R	Retenční objem
V_T	Celkový objem naplněné kolony
W_i	Hmotnostní zlomek frakce i
w_i	Hmotnostní koncentrace frakce i
x_i	Molární zlomek frakce i
Y_V	Šířka píku
η_0	Viskozita čistého rozpouštědla
η_{sp}	Specifická viskozita
$[\eta]$	Limitní viskozitní číslo
$[\eta]_i$	Limitní viskozitní číslo frakce i
$[\eta]_P$	Limitní viskozitní číslo polymeru

$[\eta]_{ST}$	Limitní viskozitní číslo standardu
\overline{M}_n	Číselný průměr molárních hmotností
\overline{M}_w	Hmotnostní průměr molárních hmotností

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr.1: Rozdělení a zastoupení základních dusíkatých látek kravského mléka [9].....	15
Obr.2: Schéma kaseinové micely a detail submicely [10].....	19
Obr.3: Separace vzorku procházejícího chromatografickou kolonou [54].....	39
Obr.4: Závislost elučního objemu na rozměrech molekuly, popř. na relativní molekulové hmotnosti [56].	40
Obr.5: RI detektor [68]	49
Obr.6: Viskozitní detektor [59].....	50
Obr.7: Křivka univerzální kalibrace [63].....	53
Obr.8: Grafické znázornění porovnání měřeného vzorku a octanu sodného v průběhu analýzy.....	61
Obr.9: Chromatogram sýřeniny po paření sýru Jadel	62
Obr.10: Grafické znázornění diferenciálních distribučních křivek analyzovaných vzorků získaných ze sýru Mozzarella v různých fázích výroby: (sýřenina před pařením: $\overline{M}_w = 42\ 000$, sýřenina po paření: $\overline{M}_w = 250\ 000$, finální výrobek: $\overline{M}_w = 34\ 000$)	63
Obr.11: Porovnání průběhu analýzy vzorků Mozzarely, signál koncentračního detektoru	64
Obr.12: Grafické znázornění diferenciálních distribučních křivek analyzovaných vzorků získaných ze sýru Jadel (sýřenina před pařením: $\overline{M}_w = 78\ 000$, sýřenina po paření: $\overline{M}_w = 108\ 000$, finální výrobek: $\overline{M}_w = 211\ 000$).....	65
Obr.13: Porovnání průběhu analýzy vzorků získaných ze sýru Jadel, signál koncentračního detektoru	66
Obr.14: Grafické znázornění diferenciálních distribučních křivek vzorků extrahovaných z finálních výrobků: Mozzarella, Jadel, Koliba a Gouda (Mozzarella: $\overline{M}_w = 34\ 000$, Jadel: $\overline{M}_w = 211\ 000$, Koliba: $\overline{M}_w = 70\ 000$, Gouda: $\overline{M}_w = 54\ 000$)	67
Obr.15: Porovnání průběhu analýzy vzorků získaných z finálních výrobků Mozzarely, Jadelu, Koliby a Goudy, signál koncentračním detektoru.....	68

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností \overline{M}_w , číselného průměru molárních hmotností \overline{M}_n a indexu polydisperzity PD měřených vzorků extraktů Mozzarely.....	62
Tabulka 2: Hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností \overline{M}_w , číselného průměru molárních hmotností \overline{M}_n a indexu polydisperzity PD měřených vzorků extraktů Jadelu.....	64
Tabulka 3: Hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností \overline{M}_w , číselného průměru molárních hmotností \overline{M}_n a indexu polydisperzity PD měřených vzorků Koliby a Goudy.	67