

# **Metody izolace a detekce mléčných proteinů**

## **Methods of isolation and detection milk proteins**

Filip Škrobák

---

Bakalářská práce  
2012

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav analýzy a chemie potravin

akademický rok: 2011/2012

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Filip ŠKROBÁK

Osobní číslo: T09331

Studijní program: B 2901 Chemie a technologie potravin

Studijní obor: Technologie a řízení v gastronomii

Téma práce: Metody izolace a detekce mléčných proteinů

Zásady pro vypracování:

1. Mléko všeobecně.
2. Chemické složení kravského mléka.
3. Izolace mléčných proteinů.
4. Metody chromatografického dělení mléčných proteinů.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

1. THOMPSON, A. BOLAND, M. SINGH, H. Milk Proteins: From Expression to Food, Academic Press 2008
2. PHILIPS, G. O. WILLIAMS, P. A. Handbook of Hydrocolloids, 2nd Edition, Woodhead Publishing 2009
3. DAVÍDEK, J. a kol. Laboratorní příručka analýzy potravin, SNTL, Praha 1977
4. BŘEZINA, P. JELÍNEK, J. Chemie a technologie mléka, I. část, Praha: MON 1990

Vedoucí bakalářské práce:

**Ing. Věra Halabalová, Ph.D.**

Ústav fyziky a mater. inženýrství

Datum zadání bakalářské práce:

**6. ledna 2012**

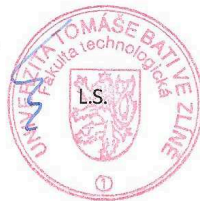
Termín odevzdání bakalářské práce:

**21. května 2012**

Ve Zlíně dne 15. února 2012



doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
*děkan*



doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: Filip Škrobák

Obor: CHTP – KM

## 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<sup>1)</sup>;
- 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<sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60<sup>3)</sup> 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<sup>3)</sup> 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: 15.5.2012

*Škrobák*

<sup>1)</sup> 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 nevdělečně 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.

<sup>2)</sup> 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, užíje-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě díla vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> 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 přihlídí k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

Tímto bych chtěl poděkovat Ing. Věře Halabalové Ph.D. za cenné rady, připomínky a ochotu pomoci při vypracovávání této práce. Další poděkování patří mým rodičům a to především mé matce za to, že mi umožnila studovat na vysoké škole.

Prohlašuji, že jsem na bakalářské/diplomové práci pracoval(a) samostatně a použitou literaturu jsem citoval(a). V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uveden(a) jako spoluautor(ka).

Ve Zlíně: 15.5.2012

.....*Škrolák*.....

Podpis studenta

## **ABSTRAKT**

Tato bakalářská práce pojednává o jednom z hlavních potravinářských artiklů a to o mléku. Jednou z nejcennějších složek mléka jsou bílkoviny. Jsou velmi potřebné pro mnohé technologické postupy, popřípadě se používají jako výživové preparáty. Jejich použití přivádí mnoho provozů do problému jak vhodně izolovat a poté detekovat vybranou část proteinu. V této práci jsou popsány nejpoužívanější metody izolace a detekce v průmyslové sféře. Detekce je zaměřena na spolehlivé chromatografické metody.

Klíčová slova: Mléko, Proteiny, Mléčné proteiny, Izolace, Chromatografie

## **ABSTRACT**

This thesis deals with one of the main food items milk. One of the most valuable constituents of milk are proteins. They are very necessary for many technological processes, or are used as nutritional preparations. Their use brings many plants into the problem of how to properly insulate and then detect a selected part of the protein. Below in this paper are described the most common methods for the isolation and detection in the food sector. The detection is focused on reliable chromatographic methods.

Keywords: Milk, Proteins, Milk proteins, Isolations, Chromatography

Poděkování, motto a čestné prohlášení, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická, nahraná do IS/STAG jsou totožné ve znění:

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



# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>11</b>
<b>1 MLÉKO VŠEOBECNĚ</b> .....	<b>12</b>
1.1 CHARAKTERISTIKA MLÉKA.....	12
1.2 VYUŽITÍ MLÉKA V POTRAVINÁŘSTVÍ.....	13
1.2.1 Pasterace a sterilace.....	13
1.2.2 Odstředění.....	14
1.2.3 Homogenizace.....	14
1.2.4 Výrobky z mléka.....	14
1.3 MLÉKO VE VÝŽIVĚ ČLOVĚKA.....	15
1.3.1 Alergie na mléčné výrobky.....	16
<b>2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ KRAVSKÉHO MLÉKA</b> .....	<b>17</b>
2.1 CHARAKTERISTIKA KRAVSKÉHO MLÉKA.....	17
2.2 DUSÍKATÉ LÁTKY.....	17
2.2.1 Aminokyseliny, peptidy, bílkoviny.....	18
2.2.2 Kasein a jeho vlastnosti.....	20
2.2.3 Syrovátkové proteiny.....	22
<b>3 IZOLACE MLÉČNÝCH PROTEINŮ</b> .....	<b>24</b>
3.1 PŘÍPRAVA KASEINU A SÉROVÝCH PROTEINŮ.....	24
3.1.1 Kyselé srážení kaseinů (pomocí anorganických kyselin).....	24
3.1.2 Kyselé srážení kaseinů (pomocí organických kyselin).....	24
3.1.3 Vysolování kaseinu pomocí síranových solí.....	25
3.1.4 Vysolování kaseinu pomocí NaCl.....	25
3.1.5 Centrifugace.....	25
3.1.6 Centrifugace s přídavkem CaCl <sub>2</sub> .....	26
3.1.7 Ultrafiltrace.....	26
3.1.8 Kryoseparace.....	26
3.1.9 Gelová filtrace (gelová permeační chromatografie).....	27
3.2 FRAKCIONACE KASEINŮ.....	27
3.3 FRAKCIONACE SÉROVÝCH PROTEINŮ.....	28
<b>4 METODY CHROMATOGRAFICKÉHO DĚLENÍ MLÉČNÝCH PROTEINŮ</b> .....	<b>29</b>
4.1 CHROMATOGRAFIE OBECNĚ.....	29
4.2 VYUŽITÍ CHROMATOGRAFICKÝCH METOD PRO CHARAKTERIZACI MLÉČNÝCH PROTEINŮ.....	30
4.2.1 Kapalinová chromatografie (LC).....	30
4.2.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (RP – HPLC).....	31
4.2.3 Kapalinová adsorpční chromatografie (LSC).....	31
4.2.4 Iontoměničová chromatografie (IEC).....	32
4.2.5 Gelová permeační chromatografie (GPC).....	34
4.2.6 Papírová chromatografie (PC).....	35
<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>37</b>

<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>38</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>40</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>41</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>42</b>

## ÚVOD

Mléko je produktem mléčných žláz, savců ženského rodu. [1] Prvotně slouží k výživě novorozence. Existuje přes 4000 druhů mléka. [5] Získává se od domestikovaných zvířat. Člověk mléko používá již po několik set tisíc let. Nejstarší záznamy o jeho využívání lidmi sahají až 8000 let př. n. l. Především to bylo mléko koz a ovcí. Samozřejmě jeho produkce v tehdejší době byla poměrně malá, ale zaujímala dosti podstatné místo ve stravě. [1]

V dnešní době se produkce mléka na světě pohybuje kolem 600 milionů tun ročně, z toho 85 % připadá na kravské mléko, 11 % tvoří buvolí, 2 % ovčí a kozí. Existují i jiné druhy např. velbloudí, oslí, ale jejich zastoupení je opravdu mizivé. V Evropě se zpracovává asi 200 milionů tun mléka za rok. [1]

Všechny druhy jsou si v základním složení podobné, liší se pouze v drobnostech. V současnosti je to jedna z hlavních složek lidské výživy. Obsahuje plnohodnotné bílkoviny, tuky a mléčný cukr což jsou základní látky pro získání energie organismu. Dále pak obsahuje vitaminy, hormony, enzymy a vodu. [1,5]

Mléko spadá svým složením do koloidních systémů, jež je tvořen hlavně kaseinem, sérovými proteiny, tukovými kuličkami a dalšími minoritními komponentami. [2]

V potravinářství, ale ne jen tam, mají význam především bílkoviny a to kaseiny, které vhodnými způsoby dokážeme vysrážet. [1] Tato vlastnost se uplatňuje zejména u výroby jogurtů, sýrů a tvarohů. Pro izolaci bílkovin z mléka se nejčastěji používají metody, založené na poklesu pH k izoelektrickému bodu kaseinu. Získání sérových proteinů navazuje na předchozí postup oddělení kaseinů. [3,5] Další způsoby jsou založené na změně koncentrace roztoku, velikosti molekul proteinu a bodu tuhnutí. [5]

Pro dělení mléčných proteinů se používají chromatografické metody. Velmi spolehlivé jsou: iontoměničová chromatografie, založená na výměně iontů, vysokoúčinná kapalinová, gelová a adsorpční chromatografie, založené na dělení proteinů podle velikosti. Mezi méně spolehlivé, spíše pro detekci přítomnosti proteinu, se používá papírová chromatografie. [6]

# 1 MLÉKO VŠEOBECNĚ

## 1.1 Charakteristika mléka

Mléko je tekutina bílé až žlutobílé barvy typické vůně a chuti. Patří mezi potraviny živočišného původu. Dnes je známo více než 4000 druhů mléka. Z toho pouze 180 z nich bylo chemicky analyzováno a jen u 50 se tyto zjištěné hodnoty dají považovat za důvěryhodné. Ostatní analýzy nebyly provedeny ve stejné fázi laktace, z tohoto důvodu je nelze brát za seriózní. [1,4,5] Není proto překvapivé, že nejlépe prověřená mléka jsou ta, která denně spotřebováváme – kravské, kozí a ovčí. Mateřské mléko je taktéž dobře známo. [6]

Laktace je období tvorby mléka v mléčné žláze. Během ní se mléko mění. Bezprostředně před porodem je to tzv. **předběžné mlezivo**. Po porodu je vylučováno **pravé mlezivo**. Mlezivo se od mléka zásadně liší je viskózní, lepkavé a světle hnědé barvy oproti typické bílé až žluté a mírně slané chuti. Novorozenci dodává hlavně energii, imunitní látky a tak se stává základním kamenem jeho imunity. Mlezivo spadá pod mléko **nezralé**. Po přibližně 5 – 6 dnech po porodu přechází mlezivo na pravé mléko. Kaseinová a albuminová mléka jsou již **zralá**. [3,7]

**Tab. 1. Obecné složení mléka** [4]

Složka	Obsah (hm. %)
Voda	86 – 88
Tuky	3 – 4,5
Bílkoviny	2,8 – 3,2
Sacharidy	4,7 – 4,8
Ostatní látky	1,6

Všechny druhy mléka jsou si v základním složení podobné. Obsahují vodu, tuky, bílkoviny, sacharidy a ostatní látky, liší se však v jejich zastoupení, které závisí na druhu zvířete a na sezóně, kdy bylo mléko vyprodukováno. Složky mléka můžeme rozdělit na **původní**, které vznikly během syntézy mléka v mléčné žláze. A **nepůvodní**, které se do mléka dostaly jinými cestami a to cizorodé látky (antibiotika, pesticidy, atd.). Za původní složky mléka se považují voda, laktóza neboli mléčný cukr, tuky a bílkoviny. V podstatně menším podí-

lu, avšak neméně důležité zde taktéž patří minerální látky, doprovodné látky lipidů a ostatní látky (plyny, vitaminy a další). [1,4]

Pro dělení mléka je základním kritériem obsah bílkovin. A z tohoto hlediska je dělíme na mléka kaseinová a albuminová. **Kaseinová mléka** jsou ta, ve kterých převažuje obsah kaseinů přes 75 % na 25 % sérových proteinů. Tento typ je tvořen především přežvýkavci a spadá zde mléko kravské, kozí, ovčí a buvolí. **Albuminová mléka** nemají obsah bílkovin obrácený ve prospěch sérových proteinů, ale albuminy jsou ve větším zastoupení. Jsou produkována především masožravci, všežravci a býložravci např. mléko mateřské a kobyli. [3,5]

**Tab. 2. Složení zralého mléka, některých druhů, v hm. % obsahu složek [6]**

	Sušina	Tuky	Bílkoviny	Laktosa	Popeloviny
<b>Mateřské</b>	12,2	3,8	1,0	7,0	0,2
<b>Kobyli</b>	11,2	1,9	2,5	6,2	0,5
<b>Kravské</b>	12,7	3,7	3,4	4,8	0,7
<b>Ovčí</b>	19,3	7,4	4,5	4,8	1,0
<b>Kozí</b>	18,8	4,5	2,9	4,1	0,8

*pozn. Obsah jednotlivých složek může kolísat.*

## 1.2 Využití mléka v potravinářství

Čerstvé mléko je hlavní surovinou pro všechny mlékárenské výrobky. Většina mlékárenských výrobků se řadí mezi funkční potraviny. Funkční potravina má příznivý účinek na lidské zdraví. Požadavky na mléko, které vstupuje do výroby, jsou přísné. Neměli by obsahovat nepůvodní složky mléka, a když tak jen v přípustných normách. [8]

Ihned po nadojení je mléko kontrolováno. V bazénech se změní hustota, kontroluje barva, vůně, čerstvě nadojené mléko se nechutná. Po převozu do mlékárny jsou odebrány vzorky a odeslány na celkový rozbor. Po úspěšné kontrole prochází **předběžnou úpravou**. Zde spadá několik operací a to pasterace, sterilace, odstředění a homogenizace. [5,8]

### 1.2.1 Pasterace a sterilace

Díky vysokému obsahu vody a živin je mléko dokonalým živným médiem pro mikroorganismy. Pasterace a sterilace zajišťují zničení především patogenních mikroorganismů (např. *Listeria monocytogenes*) a tím dávají mléku zdravotní nezávadnost. Pasterace pou-

žívá teploty do 100 °C po dobu několika sekund až minut. Sterilizace používá teploty nad 100 °C. [5,9]

Pasteraci dělíme na **nízkou, šetrnou a vysokou**. Nízká pasterace neboli termizace probíhá při teplotě kolem 60 °C po dobu 15s. Po ukončení je fosfatázový test pozitivní. Šetrná pasterace spočívá v použití teploty 74 °C po dobu 30 sekund. Konečným důkazem je fosfatázový test negativní a peroxydázový pozitivní. Vysoká pasterace při 85 °C po několik sekund. Fosfatázový a peroxydázový test je negativní. Zničí se jí vegetativní formy mikroorganismů. [5,8,9]

Sterilizace probíhá při 135 až 140 °C po 1 sekundu a dojde ke zničení všech forem mikroorganismů. [8]

### 1.2.2 Odstředění

Odstředění neboli centrifugace slouží pro oddělení smetany od mléka. Používají se centrifugy 3000g po dobu 30 minut. Výsledkem je odstředěné mléko o tučnosti 0,03 – 0,05 % a smetana o tučnosti 40 %. [1,5]

### 1.2.3 Homogenizace

Tuk je v mléce rozptýlen ve formě tukových kuliček o velikosti 0,1 až 20 µm. Po určité době dochází k postupnému spojování tuku a vystávání na povrch, což je pro konzumenta nežádoucí jev. Mléko v homogenizátoru je protlačováno úzkým otvorem při tlaku 20 až 25 MPa. Dochází ke zmenšení kuliček tuku a tím ke zvýšení stability mléka. [6,8]

### 1.2.4 Výrobky z mléka

Několik stovek produktů se rozčleňuje do těchto skupin: tekuté mléko (40 %), sýr (35 %), sušené mléko (15 %), koncentrované mléko (2 %), máslo (30 %) a mnohé další produkty, zmrzlina, krémy (ice cream, šlehané tvarohové krémy), proteinové koncentráty a laktóza. Výše uvedené hodnoty nedávají dohromady 100 %. Jednotlivé zastoupení produktů je totiž proměnné.[1]

Tab. 3. Princip výroby jednotlivých produktů [6]

Proces oddělení	Hlavní produkt	Vedlejší produkty
<b>Centrifugace</b>	Smetana  Odstředěné mléko	Máslo, smetana s požadovaným obsahem tuku  Prášky, kaseiny, sýry, proteinové koncentráty, Laktóza
<b>Zahuštění – tepelná koagulace, ultrafiltrace, enzymatické srážení (syřidla)</b>	Sýr  Kasein  Sérové proteiny	Existuje přibližně 1400 druhů sýrů  Koncentrát kaseinu  Různé produkty koncentrátů
<b>Kyselé srážení</b>	Sýry  Kyselý kasein  Sérové proteiny	Čerstvý sýr, sýrové výrobky  Doplňky potravin, chemický průmysl  Různé produkty koncentrátu, využití samostatných frakcí, doplňky stravy
<b>Fermentace</b>		Fermentované produkty, jogurty, acidofilní mléka atd.

### 1.3 Mléko ve výživě člověka

S mlékem se člověk setkává od samého počátku narození. Prvotní účel je výživa novorozence, ale není důležitý jen pro něj. Ve stravě dospívajících dětí a starších lidí, je také nepostradatelné. Mléko spadá svým obsahem látek do plnohodnotných potravin. Mléčné bílkoviny obsahují všech osm esenciálních aminokyselin. V tuku jsou obsaženy vitaminy lipofilního charakteru – A, D. Ve vodě se nachází vitaminy hydrofilní – B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> (PP) a C. Mimo jiné obsahuje mléko i minerální látky. Nejvýznamnější z nich je vápník.[4]

Tab. 4. Výživová hodnota mléka a mléčných výrobků (v g na 100g výrobku) [10]

Výrobek	Energie		Bílkoviny	Tuky	Sacharidy
	kJ	kcal			
<b>Mléko nízkotučné</b>	144	34	3,27	0,50	4,80
<b>Mléko polotučné</b>	190	45	3,27	1,50	4,70
<b>Mléko plnotučné</b>	270	65	3,27	3,50	4,75
<b>Smetana ke šlehání</b>	1330	318	2,36	33,00	2,98
<b>Kysaná smetana</b>	670	160	2,76	15,00	3,27
<b>Máslo (stolní)</b>	3100	741	0,75	82,50	0,80
<b>Pomazánkové máslo</b>	1500	360	3,82	33,50	6,27
<b>Jogurt bílý</b>	363	87	6,30	3,20	8,10
<b>Eidam 30%</b>	1100	263	28,80	15,90	1,20
<b>Eidam 45%</b>	1440	344	28,00	25,60	1,20

### 1.3.1 Alergie na mléčné výrobky

Mléčný cukr a mléčná bílkovina jsou spjaty s intolerancí neboli nesnášenlivostí. Alergie na mléčnou bílkovinu se projevuje nejčastěji atopickým ekzémem. Mohou se projevit průjemy a zvracení. Alergie na mléčnou bílkovinu je méně častá než **laktózová intolerance**. Nesnášenlivost laktózy je typická pro obyvatele Afriky, Číny a Japonska. V trávicím traktu chybí enzym  $\beta$  – galaktosidáza. Tento enzym je vylučován v tenkém střevě. Množství enzymu se snižuje s věkem a u některých jedinců postupem času zcela vymizí. Disacharid laktóza není rozložena na monosacharidy. Ke štěpení dochází až v tlustém střevě a to bakteriemi. Při rozkladu vzniká plyn a další látky, což způsobuje plynatost a průjemy. [1,6]

Pro lidi postižené jakoukoli z výše uvedených alergií existují vhodné náhrady. Sojové mléko je ideální pro lidi trpící jak laktózovou intolerancí, tak i alergií na mléčnou bílkovinu. Kyselé sýry se hodí pro člověka trpícího laktózovou intolerancí, protože při jeho výrobě dochází k poklesu pH přeměnou laktózy na kyselinu mléčnou. [1,6]



## 2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ KRAVSKÉHO MLÉKA

### 2.1 Charakteristika kravského mléka

Kravské mléko je v dnešní době jedním z nejpoužívanějších, o čemž svědčí fakt, že tvoří přibližně 85 % celosvětové produkce. Ročně je produkováno přibližně 510 mil. tun kravského mléka. Vzhledem ke svému složení se dá kravské mléko považovat za plnohodnotnou potravinu. Laktační doba dojnice je 305 dní. Převažující proteiny jsou kaseiny, a proto ho řadíme mezi zástupce kaseinových mlék. [1,3]

**Specifická hmotnost mléka** 1,026 – 1,036 g/cm<sup>3</sup>. **Bod tuhnutí mléka** -0,540 až -0,570°C. **Kyselost mléka** udává schopnost mléka vyrovnávat pH do rozmezí 6,5 – 6,7. Lze ji udávat jako aktivní nebo titrační. Další důležitou vlastností je tzv. **kysací schopnost mléka**. Jde o proces, při němž je laktóza přeměněna metabolismem bakterií na kyselinu mléčnou a způsobuje pokles pH a srážení kaseinů. Tento proces bohužel negativně ovlivňují nepůvodní složky mléka např. antibiotika. Mohou úplně potlačit rozvoj bakterií mléčného kvašení a tím zpomalit nebo zcela zastavit výrobní postup mnoha produktů. [5,6]

Celkové složení mléka se během roku mění a může kolísat. Obsah vody se pohybuje kolem 87,5 % , celková sušina 12,5 %. Mléčný tuk, je tvořen estery glycerolu a mastných kyselin a doprovodnými látkami lipidů, 3,5 – 4,5 %. Další významnou složkou je laktóza 4,6 %. Dále pak popeloviny 0,7 %. [3,5] Průměrné kravské mléko obsahuje 3,5% bílkovin. Jsou tradičně děleny do dvou skupin kaseiny (80 %) a sérové proteiny (20 %). [2]

**Polydisperzní systém mléka** je rozložen do tří fází. Laktóza, vitaminy, organické a anorganické soli, hydrofilní vitaminy a další látky jsou rozpuštěny ve vodě, jakožto pravý roztok. V této směsi jsou dispergovány kaseiny a syrovátkové proteiny. Tuk se v mléce vyskytuje ve formě emulze jako olej ve vodě. [6]

### 2.2 Dusíkaté látky

V potravinách nalezneme několik forem vázaného dusíku ať už v organické či anorganické formě. Organický dusík je jedním ze základních kamenů veškerých tkání ať masa živočichů či pletiva rostlin i některých tekutin vyprodukovaných organismem. Anorganický dusík se do potravin dostává ve formě exogenních látek. Např. ovoce a zelenina jsou hnojeny dusitanovými hnojivy, maso je prosolováno, za účelem zvýšení údržnosti, tak zvanými rychlosolami na bázi dusičnanů. V mléce se dusík vyskytuje ve formě aminokyselin, pepti-

dů a bílkovin a nebílkovinném dusíku. Exogenní dusík se v mléčných výrobcích někdy vyskytuje jako konzervační činidlo a to dusičnan draselný. [11,12]

### 2.2.1 Aminokyseliny, peptidy, bílkoviny

V přírodě existuje přibližně 700 různých aminokyselin. Jedná se o sloučeniny, které ve své molekule obsahují jak aminoskupinu ( $-NH_2$ ), tak i karboxylovou ( $-COOH$ ). Aminokyseliny jsou opticky aktivní látky, stáčí rovinu polarizovaného světla a to buď doprava (D – isomery) nebo doleva (L – isomery). Podle polohy  $-NH_2$  skupiny rozlišujeme  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - a další isomery. V přírodě máme řadu 20 základních kódovaných aminokyselin. Každá aminokyselina má svůj tří písmenný kód pro zjednodušení. [11]

U aminokyselin rozlišujeme **esenciální** (Valin, Leucin, Izoleucin, Treonin, Metionin, Lysin, Fenyloalanin a Tryptofan) pro organismus potřebné látky, které si tělo nedokáže vytvořit samo, a když tak pouze v malém množství. **Semiesenciální** (Arginin a Histidin) významné pro vývoj dětí anebo **neesenciální** tzv. běžné aminokyseliny (Glycin, Alanin, Serin, Cystein, Asparagová kys., Asparagin, Glutamová kys., Glutamin, Tyrosin, Prolin). Kódované aminokyseliny jsou zabudovávány do polypeptidového řetězce při syntéze proteinů neboli proteosyntéze. Další dělení aminokyselin je na základě vlastnosti postranního řetězce. **Zásadité aminokyseliny** mají více než jednu skupinu  $-NH_2$ . Mezi zásadité aminokyseliny řadíme: histidin, arginin, tyrosin a lysin. **Kyselé aminokyseliny** ve své molekule mají buď dvě skupiny  $-COOH$  (Asparagová kys. a Glutamová kys.), nebo jednu  $-COOH$  a  $-SH$  skupinu (Cystein). **Neutrální aminokyseliny** (např. Glycin, Alanin a další) mají navenek neutrální náboj. [11,12]

Důležitou vlastností aminokyselin je **izoelektrický bod**. Je to stav kdy v určitém pH aminokyselina nabývá nulový náboj a **tím přestává být v roztoku rozpustná**. Při dosažení pH v oblasti izoelektrického bodu bílkoviny dochází k denaturaci a vytvoří se sraženina. [11]

V potravinách se vyskytují především L – formy aminokyselin. Rozlišujeme volnou a vázanou formu. Volné aminokyseliny se v přírodě vyskytují jen velmi zřídka. Spíše můžeme nalézt vázané aminokyseliny a podle počtu monomerů je rozlišujeme a to takto: 2 – 10 jednotek **peptidy**, 11 – 100 **polypeptidy** a 100 - tisíce **bílkoviny**. V těchto řetězcích popřípadě cyklech jsou spojeny jednotlivé aminokyseliny **peptidovou vazbou** ( $R-CO-NH-R$ ).

Lineární peptidy mají počáteční  $-NH_2$  a na druhé straně koncovou skupinu  $-COOH$ . Mohou se vyskytovat i jiné vazby: esterové, vodíkové, disulfidové. [11,12]

**Peptidy** v potravinách najdeme především jako produkty syntézy proteinů a hydrolýzy bílkovin. Většinou jsou složky enzymů. Jeden ze známějších je tripeptid glutation. V peptidech se vyskytují pouze peptidové vazby. [11] V mléce se peptidy nevyskytují, až po hydrolýze  $\beta$  – kaseinu vzniká glykomakropeptid (GMP). [2]

**Bílkoviny** jsou biopolymery aminokyselin. Vznik bílkovin neboli proteinů je proteosyntézou. Kdy jsou jednotlivé aminokyseliny spojeny pomocí peptidových vazeb do dlouhých řetězců. Dělení bílkovin je dáno jejich funkcí, známe strukturní, obranné, katalytické, zásobní, transportní, pohybové, senzorické, regulační a výživové. V potravinách se vyskytují ve formě nativní. Další formy jsou: denaturované a chemicky upravené (modifikované). Nativní a denaturované se používají pro výživové účely a modifikované jsou aditivní látky. Nativní proteiny mají zachovány všechny své biologické funkce. Denaturované prošly procesem denaturace, kdy se např. pomocí teploty dosahuje změny prostorového uspořádání řetězců a tím bílkovina ztrácí své biologické účinky. Modifikované proteiny jsou upraveny chemickými činidly k potlačení nebo naopak zesílení dané vlastnosti, tohoto se hojně používá v potravinářství např. tvorba pevné pěny nebo gelu. [11,12]

U bílkovin posuzujeme jejich výživovou hodnotu, ta je dána podle obsahu esenciálních aminokyselin. Plnohodnotné bílkoviny obsahují všechny esenciální aminokyseliny, např. proteiny vajec a mléka. Téměř plnohodnotné některé aminokyseliny jsou nedostatkové (proteiny cereálií) a neplnohodnotné některé aminokyseliny zcela chybí (proteiny pojivových tkání). [11]

Struktura bílkovin je popsána pomocí obsahu nebílkovinné složky, je-li přítomna. Jednoduché proteiny jsou složeny pouze z aminokyselin. Složené jsou v potravinách častější než jednoduché. Mají ve svém řetězci nebílkovinnou část. Dělíme je na nukleoproteiny (DNA), lipoproteiny (např. LDL), glykoproteiny ( $\kappa$ -kasein), **fosfoproteiny** ( $\alpha, \beta$  -kaseiny), chromoproteiny (hemoglobin) a metaloproteiny (ferritin). [2,12]

Rozpustnost bílkovin je dána obsahem polárních a nepolárních skupin. Globulární bílkoviny ve tvaru koule mají polární skupiny jako obal a jsou rozpustné ve vodě a mohou být dispergovány v roztoku (např. albuminy a globuliny). Fibrilární neboli vláknité proteiny jsou dlouhé řetězce, prakticky nerozpustné (kolagen, keratin a elastin). [11]

**Albuminy** jsou neutrální bílkoviny rozpustné ve vodě, jež jsou schopny denaturovat vlivem zvýšené teploty (laktalbumin). **Globuliny** jsou slabě kyselé bílkoviny rozpustné ve vodě a také vlivem teploty denaturují (laktoglobulin). [2,11]

Uspořádání aminokyselin v řetězci je popsáno pomocí primární struktury, která udává pořadí aminokyselin. Sekundární struktura ( $\alpha$ -helix a  $\beta$ -list) zde už se uplatňují i jiné vazby než peptidové např. vodíkové můstky. Tuto strukturu utváří funkční skupiny aminokyselin. Terciární a kvartérní struktura postranní řetězce spolu reagují kovalentními i nekovalentními vazbami a vznikají esterové vazby, disulfidické můstky a udávají konečný tvar bílkovin. Denurací se mění pouze sekundární, terciární a kvartérní struktura. Primární struktura aminokyselin se denurací nemění. [11,12]

### 2.2.2 Kasein a jeho vlastnosti

Kaseiny v kravském mléce tvoří 80% proteinů. Jsou tvořeny během syntézy mléka v mléčné žláze pomocí proteosyntézy, a proto se nevyskytují nikde jinde v přírodě. Z výživového hlediska jsou to plnohodnotné bílkoviny. Svým složením se řadí mezi fosfoproteiny, které mají ve své molekule esterově vázanou kyselinu fosforečnou. Fosfor je nejčastěji vázán na serin, protože ten obsahuje volnou -OH skupinu, která se účastní esterifikace a vzniká fosfo - serin. [2,6]

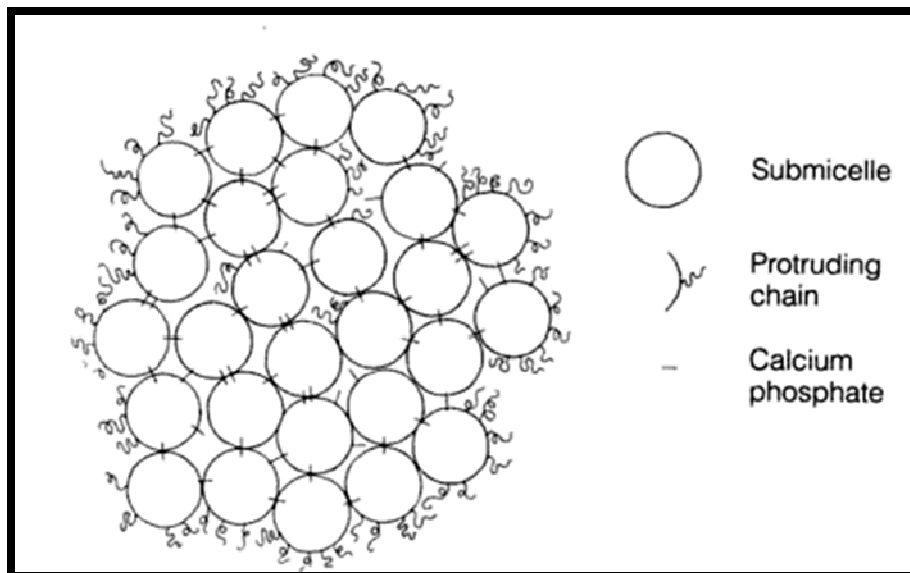
Kaseiny jsou velmi heterogenní skupinou proteinů. Existuje ve čtyřech frakcích a to  $\alpha_{s1}$  - kasein,  $\alpha_{s2}$  - kasein,  $\beta$  - kasein,  $\kappa$  - kasein a jako derivát vzniklý hydrolýzou  $\beta$  - kaseinů,  $\gamma$  - kasein. Obsah  $\gamma$  - kaseinu v mléce je minimální jeho zastoupení se zvyšuje, až po hydrolýze  $\beta$  - kaseinu. [2,6]

**Tab. 5. Rozložení frakcí kaseinů a sérových proteinů v kravském mléce [2]**

Skupina proteinů	složka	Koncentrace (g/l)
<b>Kaseiny</b>	$\alpha_{s1}$ - kasein	9-15
	$\alpha_{s2}$ - kasein	9-11
	$\beta$ - kasein	3-4
	$\kappa$ - kasein	3-4
<b>Sérové proteiny</b>	$\beta$ - laktoglobulin	2-4
	$\alpha$ - laktalbumin	0,6-1,8

Kaseiny jsou velmi stálé proteiny díky micelám, ve které se uzavírají. Hydrofilní části řetězce se otáčejí směrem do vodného prostředí a hydrofobní části se uskupují uvnitř – tato micela je poté volně dispergována v mléce. Typickou vlastností kaseinů je termostabilita. Kaseiny nepodléhají denaturaci při teplotě 100 °C po dobu 24 hodin, nebo 140 °C po dobu 20 minut. [6] Fosfor navázaný v molekule kaseinu, umožňuje pojmout velké množství vápníku a tím zvyšuje jeho nutriční hodnotu.  $\alpha_{s1}$ -kasein je velmi citlivý na přítomnost vápníku. Vápník dokáže tvořit mezi molekulami  $\alpha_{s1}$ -kaseinu příčné můstky a tím dochází k rozrušení micely. Obsahují celkem malé procento sirmých aminokyselin, ale v dostatečné míře je zastupují syrovátkové proteiny. [2,6]

**Obr. 1. Kaseinová micela [7]**



Submicelle – jednotka kaseinu,

Calcium phosphate – vazba spojující jednotlivé jednotky kaseinu.

Hydrolýzou kaseinu pomocí enzymů, nejčastěji chymosinem se mění jeho vlastnosti. Micela je v takovémto případě narušena - tím se snižuje rozpustnost a kasein se z mléka sráží, což je využíváno při výrobě sladkých sýrů. Takto získané proteiny jsou používány jako výživové doplňky. Při hydrolýze kaseinů dochází k rozkladu na kaseinovou frakci ( $\gamma$ -kasein) a glykomakropeptid, který odchází do syrovátky. Izoelektrický bod kaseinu je  $pI$  4,6. [2,6]

Tab. 6. Obsah esenciálních aminokyselin ve frakcích kaseinu [2,6]

Aminokyseliny	$\alpha_{s1}$ -kasein	$\alpha_{s2}$ -kasein	$\beta$ -kasein	$\kappa$ -kasein	$\gamma_1$ -kasein	$\gamma_2$ -kasein	$\gamma_3$ -kasein
Valin	11	14	19	11	17	10	10
Leucin	17	13	22	8	19	14	14
Izoleucin	11	11	10	13	7	3	3
Treonin	5	15	9	14	8	4	4
Metionin	5	4	6	2	6	4	4
Tryptofan	2	2	1	1	1	1	1
Lysin	14	24	11	9	10	4	3
Fenylalanin	8	6	9	4	9	5	5
Všechny AMK	199	207	209	169	181	104	102
Počet fosfátových zbytků	8	10-13	5	1	1-5	1-5	1-5
Relativní molekulová hmotnost	23612	25228	23980	19005	20520	11822	11557

pozn. Obsah AMK určený pomocí IEC po hydrolýze bílkovin.

### 2.2.3 Syrovátkové proteiny

Frakce sérových proteinů je také velmi heterogenní. Obsahuje  $\beta$ -laktoglobulin,  $\alpha$ -laktalbumin, albumin krevního séra, imunoglobuliny, glykomakropeptid po hydrolýze  $\beta$ -kaseinů, další minoritní zástupce a řadu enzymů. Nejsledovanějšími proteiny, z technologického hlediska, jsou  $\beta$ -laktoglobulin a  $\alpha$ -laktalbumin. Oproti kaseinům, sérové proteiny netvoří micely. Mají globulární strukturu, což vykazuje hydrofilní povahu. V roztoku hůře disociují, a proto jsou více odolné vůči změně pH. Termostabilita sérových proteinů je velmi nízká. Kaseiny dokážou snést vysoké teploty delší dobu, než sérové proteiny. Denaturované sérové proteiny dokážou zabránit vytvoření tukové vrstvy v mléce. Koncentráty sérových proteinů jsou určeny pro zvláštní výživu sportovců. Z výživového hlediska se jedná o plnohodnotné bílkoviny. [2]

**$\beta$ -laktoglobulin** je známo jeho několik genetických variací. Tvoří asi 50 % proteinů syrovátka. Obsahuje pět cysteinů, 4 z nich jsou mezi sebou spojeny disulfidickými můstky a má jednu -SH skupinu volnou. Při zahřátí je tato volná skupina schopna reagovat s kasei-

nem a laktalbuminem. Svým složením spadá do globulárních proteinů. Izelektrický bod laktoglobulinu je  $p_I$  5,35 - 5,41. [2,6,11]

**$\alpha$  -laktalbumin** má také několik genetických variací v malém zastoupení se vyskytuje s navázaným cukrem pomocí glykosidové vazby. Tvoří asi 30 % proteinů syrovátek Je to metaloprotein, který ve své molekule váže vápník. Má čtyři disulfidické vazby a několik vápenatých můstků. Tyto vazby určují uspořádání nativního laktalbuminu. V organismu je součástí enzymů. Izelektrický bod laktalbuminu je  $p_I$  4,2 - 4,5. [2,6,11]

Dalšími zástupci sérových proteinů v minoritním zastoupení jsou imunoglobuliny a sérum albumin. [2,6]

**Tab. 7. Obsah esenciálních aminokyselin v hlavních sérových proteinech [2,6]**

Aminokyseliny	$\beta$ -laktoglobulin	$\alpha$ -laktalbumin
<b>Valin</b>	10	6
<b>Leucin</b>	22	13
<b>Izoleucin</b>	10	8
<b>Treonin</b>	8	7
<b>Metionin</b>	4	1
<b>Tryptofan</b>	2	4
<b>Lysin</b>	15	12
<b>Fenylalanin</b>	4	4
<b>Všechny AMK</b>	162	123
<b>Počet fosfátových zbytků</b>	0	0
<b>Relativní molekulová hmotnost</b>	18362	14174

*pozn. Obsah AMK určený pomocí IEC po hydrolýze bílkovin.*

### 3 IZOLACE MLÉČNÝCH PROTEINŮ

#### 3.1 Příprava kaseinu a sérových proteinů

Pro oddělení celkového kaseinu se používá odstředěné mléko. Přítomnost tuků by negativně ovlivnila separační proces. Mléko se centrifugací (2000 – 3000g) odstředí při teplotě 2 °C po dobu 20 minut a používá se pro všechny další metody s výjimkou kyselého srážení kaseinů pomocí organických kyselin. [1,3,6]

##### 3.1.1 Kyselé srážení kaseinů (pomocí anorganických kyselin)

**Princip metody:** Kaseinové frakce jsou z odstředěného mléka získány pomocí kyselého srážení - úpravou pH na hodnotu izoelektrického bodu a následným oddělením. [3]

**Postup:** 100 ml mléka se vytemperuje na laboratorní teplotu. Pomalu za stálého míchání se přidá 4,5ml 1N roztoku kyseliny chlorovodíkové (HCl), tak aby pH pokleslo během 40 minut na hodnotu izoelektrického bodu  $p_I$  4,6. Míchání probíhá ještě následujících 30 minut. Vzniklá sraženina kaseinu se buď odstředí centrifugací, nebo klasickou filtrací. Následně se dekantuje vodou. Pokud se s kaseinem nepracuje dále je zamrazen lyofilizací na teplotu – 20 °C. [3]

Postup lze obměnit a místo kyseliny chlorovodíkové se použije kyselina sírová (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Při použití kyseliny sírové nelze použít sérové proteiny pro další úpravu na výživové doplňky. [3]

**Konečný produkt:** Kyselé srážený kasein pro další průmyslové zpracování. Odstředěná tekutina, filtrát okyselené sérové proteiny. [3]

##### 3.1.2 Kyselé srážení kaseinů (pomocí organických kyselin)

**Princip metody:** Pomocí bakterií mléčného kvašení, v mléce z laktózy vzniká kyselina mléčná, která způsobuje pokles hladiny pH k izoelektrickému bodu. Tento postup je použit hlavně při výrobě kyselých sýrů a tvarohu. [1,6]

**Postup:** Do neodstředěného mléka je přidána startovací kultura mikroorganismů. Při mírně zvýšené teplotě, nazývána též kultivační teplota, dochází k přeměně laktózy na kyselinu mléčnou. A tím k poklesu pH a vzniku sraženiny kaseinů, které je následně oddělena pomocí filtrace nebo centrifugace. [1,6]

**Konečný produkt:** Kyselé srážený sýr, sérové proteiny v syrovátce. [1,6]



### 3.1.3 Vysolování kaseinu pomocí síranových solí

**Princip metody:** Přídavkem síranové soli lze docílit srážení kaseinu, avšak výsledkem není pouze čistá sraženina kaseinu, ale i částečně sražený imunoglobulin. Tato metoda se používá jako kontrola pro sušené bílkovinné koncentráty kaseinů. [1,6]

**Postup:** Do 100ml odstředěného mléka se přidá v přebytku (4,5-5ml) např.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  nebo  $\text{MgSO}_4$  o koncentraci 260 g/l. Tímto přídavkem se docílí srážení veškerého kaseinu v mléce včetně imunoglobulinu. Výsledná sraženina je přefiltrována a poté dekantována vodou. [1,6]

**Konečný produkt:** Koncentrát kaseinu včetně sraženého imunoglobulinu. Sérové proteiny se zbytkem solí, které nelze použít pro výživové doplňky. [1,6]

### 3.1.4 Vysolování kaseinu pomocí NaCl

**Princip metody:** Obdobná metoda jako u vysolování pomocí síranových solí. Tato metoda je komerčně používaná pro stanovení obsahu kaseinu v koncentrátech. [1,6]

**Postup:** Do 100 ml zahřátého mléka na 37 °C se přidá roztok 50 % NaCl v přebytku, tak aby se přestala tvořit sraženina. Získaná sraženina se filtruje a dekantuje vodou. [1,6]

**Konečný produkt:** Koncentrát kaseinu včetně částečně sraženého imunoglobulinu. Sérové proteiny, které lze použít pro výživové doplňky. [1,6]

### 3.1.5 Centrifugace

**Princip metody:** Kaseinové micely jsou jedny z větších agregátů v mléce, a tudíž je jde oddělit pomocí vhodné odstředivé síly a za zvýšené teploty. Používá se odstředěné mléko, ale není problém použít i klasické mléko, jelikož tukové částice jsou větší a z roztoku by se oddělily dříve. Takto získané kaseiny se používají pro výživové doplňky. [6]

**Postup:** Odstředěné mléko je přivedeno do odstředivky při 100 000g po dobu 1 hodiny. Pro centrifugaci kaseinu je lepší zvýšit teplotu na 30 – 37 °C, protože lépe sedimentuje za zvýšené teploty. Takto získaný produkt není nijak pozměněn, je zachována struktura micely a proto může být opět dispergován do roztoku. [6]

**Konečný produkt:** Koncentrát micelárního kaseinu a sérové proteiny v odstředěné tekutině. [6]

### 3.1.6 Centrifugace s přidavkem $\text{CaCl}_2$

**Princip metody:** Po přidavku  $\text{CaCl}_2$  se naruší struktura micel a dochází k uvolnění kaseinových jednotek. Při zahřátí dochází i ke koagulaci sérových proteinů a tak získáváme sraženinu všech bílkovin. Zahříváme pouze při nutnosti získat celkový obsah bílkovin v mléce. [1,6]

**Postup:** K mléku se přidá roztok 0,2 M  $\text{CaCl}_2$  v poměru 9:1. Takto upravené mléko již není třeba podrobovat sedimentaci 1 hodinu, ale stačí středně rychlá centrifugace při 50 000g po dobu 30 minut. Když se mléko zahřeje na teplotu kolem 90 °C po dobu 10 minut tak se z mléka vysráží i sérové proteiny. [1,6]

**Konečný produkt:** Sůl kaseinát vápenatý, a sérové proteiny v roztoku syrovátky. Po zahřátí sraženina kaseinů a sérových proteinů. [1,6]

### 3.1.7 Ultrafiltrace

**Princip metody:** Pomocí filtrace na vhodném filtru je možné z mléka získat všechny bílkoviny současně. Dalším rozpuštěním proteinů a následnou filtrací lze získat kasein a čisté sérové proteiny. Tato metoda je používána v mnoha výrobních postupech, pro výrobu koncentrovaných mléčných bílkovin. [6,16]

**Postup:** Mléko se přivádí na sklokeramický filtr a dochází k dělení proteinů. Následnou dispergací získaných proteinů a filtrací dochází k rozdělení na kasein (filtrační koláč) a sérové proteiny (filtrát). Proces si každá společnost upravuje dle svého následného výrobního postupu. [6]

**Konečný produkt:** Mikrobiálně čisté kaseiny a sérové proteiny. [6,16]

### 3.1.8 Kryoseparace

**Princip metody:** Kasein v micelární formě je destabilizován pomocí chladu. Dochází ke srážení a následnému oddělení. [6]

**Postup:** Do chladicího tanku dáme mléko a snížíme teplotu na -10 °C, vytvoří se sraženina kaseinu, ta se odfiltruje a následně ošetří lyofilizací. [6]

**Konečný produkt:** Lyofilizovaný kasein. [6]

### 3.1.9 Gelová filtrace (gelová permeační chromatografie)

**Princip metody:** Filtrace mléka přes gel o různé hustotě (Shepadex). Rozdělení proteinů na základě molekulové hmotnosti. Metoda je velmi nákladná a proto se v průmyslu moc nepoužívá. [6]

**Postup:** Mléko je přivedeno do chromatografické kolony, kde prochází porézním gelem. Gel není v celé své šíři stejné hustoty. Díky tomuto se proteiny a laktóza dělí a to podle klesající molekulové hmotnosti. Po ukončení izolace se jednotlivé frakce rozpustí ve vodě, odfiltrují a následně vysolí pomocí síranu amonného - nebo se lyofilizují.

**Konečný produkt:** Jednotlivé frakce kaseinů a sérových proteinů. [6]

## 3.2 Frakcionace kaseinů

**Princip metody:** Frakcionace kaseinů se provádí po kyselém srážení proteinů popsaném v kapitole 3.1.1. Následnými reakcemi a fyzikálními úpravami dostáváme frakce albuminů a globulinů.

**Postup izolace  $\kappa$ -kaseinu:** 350g sraženiny kaseinu se rozpustí v 1 litru 6,6 M roztoku močoviny. Poté se přidá 200ml 7 N kyseliny sírové ( $H_2SO_4$ ) a 2l vody. Změří se pH, popřípadě upraví na hodnotu 1,3 -1,5 pomocí kyseliny sírové. V roztoku se začne tvořit sraženina  $\alpha_s$ -,  $\beta$  -kaseinu. Po dvou hodinách se roztok přefiltruje přes filtrační papír whatman 1. Do filtrátu se přidá roztok síranu amonného o koncentraci 132g/l. Vzniklá sraženina se izoluje odstředěním. Rozpustí se ve vodě a pH se upraví pomocí hydroxidu sodného na pH 7,5. Dialyzuje se proti vodě. Poté se zmrazí lyofilizací. Opět rozpustí ve vodě na 1 obj. % roztok. Přidají se 2 objemové díly etanolu, roztok se promíchá a přidává se 1 M roztok octanu amonného, dokud se tvoří sraženina. Vzniklá sraženina se ještě dvakrát stejně upraví, tzn. rozpustí se ve vodě, upravíme pH a vysráží se. Po opětovném vysrážení se sraženina rozpustí, dialyzuje proti vodě a výsledný  $\kappa$  -kasein se vysuší lyofilizací. [3]

**Postup izolace  $\alpha_s$  -,  $\beta$  - kaseinu:** Sraženina  $\alpha_s$  -,  $\beta$  -kaseinu získaná viz. výše, se promyje směsí roztoku 6,6 M močoviny: 7 N kyseliny sírové: vody (v poměru 10:2:20), tímto se odstraní zbytky  $\kappa$  -kaseinu. Sraženina se nechá usadit v roztoku 5 M močoviny (250ml na 10g sraženiny) a pak se přefiltruje, promyje vodou a tímto se odstraní zbytky močoviny. Výsledným produktem je  $\alpha_s$  -kasein. Supernatant vzniklý po sedimentaci  $\alpha_s$  -kaseinu se zředí vodou, zahřeje na 40 - 50  $^{\circ}C$  a pH se upraví na 4,6. Vzniklý produkt  $\beta$  -kasein se dekantuje vodou a suší se lyofilizací. [3]

### 3.3 Frakcionace sérových proteinů

**Princip metody:** Po kyselém srážení popsaném v kapitole 3.1.1 se  $\beta$ -laktoglobulin a  $\alpha$ -laktalbumin izolují ze syrovátek (filtrátu).

**Postup izolace  $\alpha$ -laktalbuminu:** K syrovátce se přidá kyselina trichloroctová o koncentraci 34,2 g/l a nechá se stát přes noc. Vzniklá sraženina se odstředí. Následně se rozpustí v 1 M roztoku amoniaku (úprava roztoku na pH 7). Pak se přidá 1 M kyselina chlorovodíková, tak aby se pH snížilo na 3,5, vzniklá sraženina se oddělí odstředěním. Rozpuštěním sraženiny ve vodě a přidávkem síranu amonného, ve stejném množství jako kyseliny chlorovodíkové, vznikne sraženina, která se nechá stát přes noc. Odstředěním se zbavíme sraženiny a pracujeme dále se supernatantem. Upravíme pH na hodnotu 4, získaná sraženina se lyofilizuje a získáme frakci  $\alpha$ -laktalbuminu. [3]

**Postup izolace  $\beta$ -laktoglobulinu:** Po srážení  $\alpha$ -laktalbuminu kyselinou trichloroctovou, se pracuje se vzniklým supernatantem. Lyofilizovaný produkt se rozpustí ve vodě, upravíme na pH 6. Do roztoku se přidá pevný síran amonný (dokud se tvoří sraženina), vzniklá sraženina (zbytky laktalbuminu a  $\kappa$ -kaseinu) se odstředí a do supernatantu se opět přidá síran amonný (stejně množství jako předtím) a roztok se nechá stát přes noc. Vzniklá sraženina se přefiltruje, dekantuje vodou a následně lyofilizuje. [3]

## 4 METODY CHROMATOGRAFICKÉHO DĚLENÍ MLÉČNÝCH PROTEINŮ

### 4.1 Chromatografie obecně

V roce 1903 ruský botanik Michail Tswett popsal dělení pigmentů rostlinných barviv z roztoku přes pevné sorbenty. Tuto metodu pojmenoval chromatografie (z řečtiny chroma-barva, grapein-psát). [12]

Chromatografie patří mezi nejdůležitější dělicí a detekční metody. V každém druhu chromatografického dělení se vzorek rozpustí, buď to do kapalně, nebo plynné fáze. Tyto rozpuštěné látky představují mobilní fázi, která prochází při dělení kolonou. Stacionární fáze může být kapalná nebo pevná a právě na ni se sorbuje vzorek z mobilní fáze. [12] Sorbce jednotlivých složek vzorku zpomaluje jejich průchod kolonou a dochází k jejich dělení. **Retenční čas** je měřená veličina a udává, za jak dlouho vzorek projde kolonou. Chromatografie může být opakována několikrát za sebou, dokud nedojde dokonalému rozdělení všech složek vzorku. Po rozdělení složek následuje vyhodnocení, které je většinou vyneseno v grafu ve formě **píku**. [3,12] Podle povahy dělených složek rozlišujeme pojmy: **Separace**: Dělené látky mají rozdílné molekulové hmotnosti. **Frakcionace**: Látky se v molekulové hmotnosti liší pouze minimálně (mléčné proteiny). [3]

Metody chromatografie jsou děleny podle povahy mobilní a stacionární fáze. **Papírová chromatografie**: mobilní fáze -vyvíjecí roztok, stacionární fáze fixována na papír. **Plynová chromatografie**: mobilní fáze -plyn, stacionární fáze -kapalina nebo pevná látka. **Kapalinová chromatografie**: většinou soustava dvou kapalin. **Iontoměničová chromatografie**: stacionární fáze -iontoměniče, mobilní fáze -kapalina. **Gelová chromatografie**: stacionární fáze -gel, mobilní fáze -kapalina. [3,14]

Po rozdělení následuje detekce získaných frakcí vzorku. K tomuto účelu slouží **detektory** připojené na chromatografickou kolonu. Detektor využívá obecné nebo specifické vlastnosti mobilní fáze, díky tomuto se rozdělují detektory na obecné nebo selektivní. Nejčastěji používané detektory jsou: UV, VIS, které jsou založeny na měření vlnové délky prošlého záření. MS hmotnostní spektrometrie nejpoužívanější a taktéž nejcitlivější detektor pracuje na principu výměny iontů. FID plamenný ionizační detektor, spalováním vzorku dochází ke vzniku elektrického náboje. Síla tohoto náboje je detekována a zaznamenávána do křivky. [3,12]

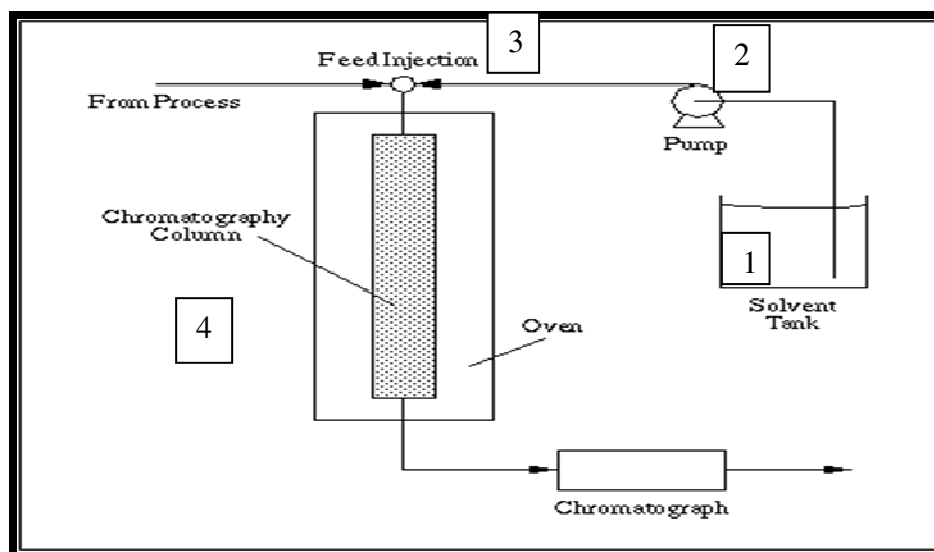
## 4.2 Využití chromatografických metod pro charakterizaci mléčných proteinů

### 4.2.1 Kapalinová chromatografie (LC)

Nejpoužívanější metodou pro stanovení proteinů je kapalinová chromatografie. Tento druh chromatografie je velmi rozvětvená oblast analýzy. Pomocí LC metod je možno detekovat látky, které nemají dobrou termolabilitu, protože se pracuje při laboratorní teplotě. Délka kolony se pohybuje v rozmezí od několika cm – do 1,5 m, což závisí na povaze dělené látky. Obecně mobilní fáze prochází chromatografickou kolonou přes stacionární fázi. Během průchodu kapaliny se složky ze vzorku sorbují na povrch stacionární fáze a následně se jejich doba průchodem kolonou prodlužuje (tzv. retenční čas). Vyhodnocení je pomocí chromatogramu, na kterém jsou znázorněny píky. [12,15]

Na Obr. 2 je znázorněno obecné schéma chromatografické aparatury. Před chromatografickou kolonou je dávkovač (1) a čerpadlo (2), které během dělicího procesu udržuje v pohybu mobilní fázi. Rychlost mobilní fáze by neměla přesáhnout 10ml za minutu. Dále je součástí aparatury nástřiková smyčka vzorku (3) (injektor). Vlastní kolona (4) je naplněna stacionární fází. Kolona je připojena k detektoru, na kterém je zaznamenávána odezva. Získaná data jsou poté vyhodnocována pomocí počítače. [12]

**Obr. 2. Schéma chromatografické aparatury [14]**



#### 4.2.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (RP – HPLC)

Jednou ze spolehlivých metod při dělení mléčných proteinů je RP – HPLC. Oproti klasické HPLC je stacionární fáze nepolární a je vázána na mikročástičky silika gelu, nejčastěji se jedná o nepolární uhlovodíky (oktadekan), popřípadě kyano – deriváty. Při této metodě je důležitou součástí kolony vysokotlaká pumpa, protože náplň kolony tvoří mikročástice silikagelu. [20]

**Mobilní fáze:** Nejčastěji používáme vodu, metanol, acetonitril anebo jejich směsi. Poměr vybíráme s ohledem na stanovovanou složku, protože by mohl ovlivnit samotnou analýzu vzorku. [20]

**Příprava vzorku proteinů:** Rozpuštěním vzorku proteinů, popřípadě odstředěného mléka v mobilní fázi. [3]

**Vlastní stanovení:** Vzorek prochází kolonou a po jejím průchodu se jednotlivé frakce detekují na UV (při vlnové délce 280 nm) nebo MS detektoru. [20]

#### 4.2.3 Kapalinová adsorpční chromatografie (LSC)

Dalším typem kapalinové chromatografie je kapalinová adsorpční chromatografie. Lze ji použít pro dělení smíšených proteinů. Princip je založen na rozdílné afinitě vzorku ke stacionární fázi a vytvoření monovrstvy na povrchu adsorbentu. Průběh adsorpce lze popsat pomocí Langmuirovy izotermy, protože při nízkých koncentracích vzorku je lineární. [15] Oddělení smíšených proteinů je postaveno na jejich izoelektrickém bodu. V našem případě stačí okyselit vzorek na pH 4,6. Kaseiny jsou při této hodnotě pH v roztoku nerozpustné. [7,15] Sraženina se zachytí na začátku kolony a přes kolonu projdou pouze sérové proteiny. Této metody se používá při kontrole výživových doplňků, zda obsah uvedených bílkovin je pravdivý. [6]

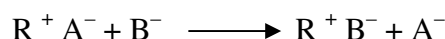
**Vzorek mléčných proteinů:** Odstředěné mléko zbavené anorganických solí, nebo kyselé sražené proteiny, výživové doplňky pro sportovce. Vzorek se rozpouští v mobilní fázi, kterou bývá hexan, diethylether a voda. [15,18]

**Vlastní stanovení:** Kolona je naplněna hydroxyapatitem, celulosou nebo silikagelem. Při průchodu mobilní fáze kolonou se sorbují proteiny na povrch adsorbentu. Po vytvoření monovrstvy (adsorpci všech proteinů) nastává desorpce pomocí pufrů a následná detekce na UV (při vlnové délce 280 nm) nebo MS detektoru. [15]

**Vyhodnocení:** Jako u předešlých metod pomocí grafu, poté porovnání se standardy.

#### 4.2.4 Iontoměničová chromatografie (IEC)

Nejúčinnější chromatografickou metodou pro dělení proteinů je iontoměničová chromatografie, která patří pod kapalinovou chromatografii. Je založena na principu výměny iontů mezi stacionární a mobilní fází. Vzorek se váže na povrch katexu nebo anexu a část stacionární fáze přechází do mobilní, aby se zachovala rovnováha.



$R^+A^-$  –představují stacionární fázi ve formě anexu,  $B^-$  je vzorek bílkoviny. Při průchodu kolonou se bílkovina naváže na povrch stacionární fáze a část anexu přejde do mobilní fáze (výměna iontů). Následným průchodem pufru nebo roztoku o klesající koncentraci, dochází k uvolnění bílkoviny. Po oddělení z povrchu anexu jsou bílkoviny detekovány na detektoru. Díky této metodě se již během minulého století podařilo rozdělit všechny kódované aminokyseliny. Dokonalá účinnost této frakcionační techniky spočívá ve vlastnosti bílkovin chovat se jako zásada nebo kyselina podle hodnoty pH. [12,14]

**Tab. 8. Přehled iontoměničů pro dělení proteinů [12]**

Název iontoměniče	Typ	Reakční skupina	Frakcionace proteinů
<b>DEAD – Celulóza</b>	Slabě zásaditý	Diethylaminoethyl	slabě kyselé a neutrální
<b>CM – Celulóza</b>	Slabě kyselý	Karboxymethyl	slabě zásadité a neutrální
<b>P – Celulóza</b>	Silně kyselý	Fosfátová skupina	silně zásadité
<b>Bio – Rex 70</b>	Slabě kyselý – na bázi polystyrenu	Karboxylová skupina	zásadité, primární a sekundární aminy
<b>DEAD – Shepadex</b>	Slabě zásaditý – zesíťovaný dextran	Diethylaminoethyl	gelová filtrace a frakcionace kyselých a neutrálních
<b>SP – Sheparose</b>	Silně kyselý - zesíťovaný agarózový gel	Methylsulfan	gelová filtrace a frakcionace zásaditých



Nejčastěji používaným iontoměničem je CM – celulóza. Jedná se o slabě kyselý katex. Vzorek bílkovin je do kolony přiváděn za vysoké hodnoty pH ve formě kationtů. [15]

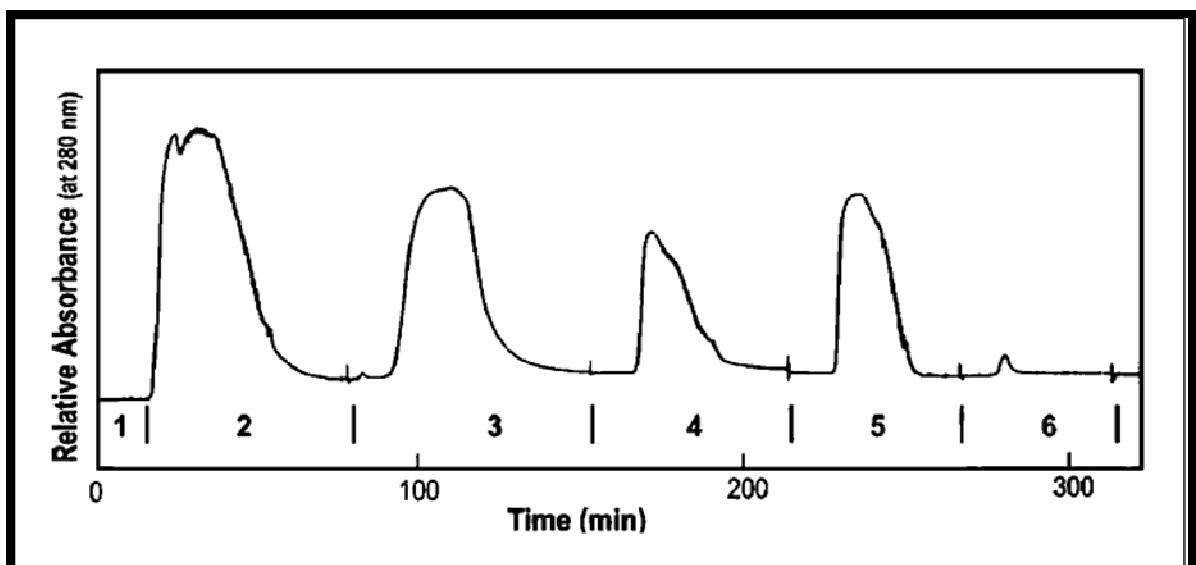
**Mobilní fáze:** Pro tento typ chromatografie volíme polární rozpouštědlo metanol, diethylether, vodu nebo jejich vhodnou kombinaci podle povahy vzorku. Popřípadě volíme roztoky komerčních pufrů. [12]

**Vzorek mléčných proteinů:** Odstředěné mléko, popřípadě kyselě sražené proteiny.

**Vlastní stanovení:** Vzorek bílkovin je přiveden do kolony (o délce 50-100cm), kde proběhne iontová výměna. Dochází k frakcionaci vzorku kaseinů. Po rozdělení nastává vymytí frakcí z povrchu stacionární fáze, k tomuto účelu slouží 0,08M, 0,2M, 0,3M NaCl. Detekce probíhá na UV detektoru, spektrofotometricky po reakci s ninhydrinem, nebo pomocí MS detektoru. Po oddělení frakcí je kolona vyčištěna promytím 2M NaCl. [16]

**Vyhodnocení:** Jednotlivé frakce kaseinu jsou pomocí detektoru rozděleny do píků na chromatogramu.

**Obr. 3. Graf frakcionace kaseinu v odstředěném mléce [16]**



pozn. Detekce frakcí kaseinu pomocí UV detektoru. 2. nebílkovinné složky + sérové proteiny a  $\gamma$ -kasein, 3.  $\kappa$ -kasein, 4.  $\beta$ -kasein a 5.  $\alpha_s$ -kasein.

#### 4.2.5 Gelová permeační chromatografie (GPC)

Gelová permeační chromatografie je zvláštní druh kapalinové chromatografie a v dělení proteinů se používá jako druhá nejčastější metoda. Kolona je ze skla, popřípadě inertních materiálů, kovy by mohly způsobit vysrážení proteinů. Vnitřní náplň kolony tvoří pórovitý gel. Nejčastěji k tomuto účelu využíváme gel Shepadex. [12] Jde o gel tvořený pomocí dextranů, svým složením je selektivní pro dělení bílkovin. Náhradou tohoto gelu mohou být i univerzální náplně Porasil, Spherosil a nebo skelný materiál Bio-Glass. [18]

V popisu jednotlivých gelů je uvedeno kolik g vody jsou schopny pojmout. Tato vlastnost napomáhá sorpci vzorku. [3]

**Tab. 9. Dva nepoužívanější typy gelů pro stanovení proteinů mléka [12]**

Název	Typ	Rozsah detekce (kD)
Shepadex G -100	dextran	4 -150
Sephacryl S -100	zesíťovaný dextran	1 -100

**Mobilní fáze:** Volba vhodné mobilní fáze je důležitá při každém stanovení. Hlavním požadavkem je inertní chování vůči stanovované složce a gelu. Nevhodně zvolená kapalina by mohla negativně ovlivnit separační proces. [18] Při stanovení bílkovin mléka je nutné dávat pozor, aby nedošlo k denuraci nebo rozkladu proteinů, proto se volí polární organická rozpouštědla. Nejčastěji metanol, diethylether, voda anebo jejich směsi. [13] U kaseinů se musí dbát na to, aby hodnota pH mobilní fáze byla mimo izoelektrický bod kaseinů. Vysrážení kaseinů v chromatografické koloně by zastavilo celou frakcionaci a znemožnilo použití gelu pro další stanovení. [3]

**Vzorek mléčných proteinů:** Odstředěné mléko se zahustí, odstraní se balastní látky (tuky, anorganické a organické soli), ale není to podmínkou. Mléčné proteiny většinou lyofilizované, popřípadě kysele sražené se rozpustí ve vodě. [3] Touto metodou lze 100% rozdělit sérové proteiny. V tomto případě je vzorek oproštěn od kaseinů pomocí libovolné srážecí metody a následně rozpuštěn v mobilní fázi. [19]

**Vlastní stanovení:** Vzorek je dávkován přes injektor do chromatografické kolony. Větší molekuly kolonou prochází rychleji, protože se špatně sorbují do gelu. Menší molekuly se sorbují dovnitř gelu a proto se eluují déle. Po průchodu mobilní fáze kolonou prochází řada

roztoků (komerční pufrů) a jednotlivě vymývají látky zachycené na gelu. Po průchodu jsou jednotlivé frakce detekovány pomocí MS, UV (při vlnové délce 280 nm) detektoru. [18]

**Vyhodnocení:** Rozdělení frakcí kaseinů popřípadě sérových proteinů je pomocí UV, nebo na MS detektoru. Získané hodnoty se porovnávají se standardy. Kaseiny vychází z kolony podle snižující se molekulové hmotnosti v pořadí:  $\alpha_{s2}$  -,  $\alpha_{s1}$  -,  $\beta$  - a  $\kappa$  -kasein. [15] V případě sérových proteinů vychází v pořadí:  $\beta$ -laktoglobulin a  $\alpha$ -laktalbumin. Tato analýza se používá jak ke kvalitativnímu tak i kvantitativnímu stanovení. [19]

#### 4.2.6 Papírová chromatografie (PC)

Papírová chromatografie je metoda, při níž je vzorek poután na stacionární fázi a to papír. Pro tento druh detekce se používá několik druhů stacionární fáze, nejznámější je papír Whatman 1. Speciálním druhem papíru je skelný, který musí být impregnován roztokem pufru, silikagelem a jinými látkami. Mobilní fázi v tomto případě tvoří vyvíjecí médium, jehož volba záleží na povaze detekované látky. [3]

Příprava vzorku pro papírovou chromatografii je velmi složitá. Potravinářské materiály jsou značně heterogenní a tím pádem je velmi složité stanovit přesný postup přípravy analytu. Nejprve se musí zamezit rušivým reakcím balastních látek (bílkovin, lipidů). Bílkoviny se dají vysrážet pomocí trichloroctové kyseliny nebo taninem. Lipidy se vyextrahují pomocí lipofilních rozpouštědel. Odstranění anorganických solí se provádí na ionexech nebo elektrolyticky. Výhodou této metody je relativní jednoduchost manipulace. Nevýhodou poměrně dlouhý čas vyvíjení. [3]

**Vzorek mléčných proteinů:** Vzorek pro stanovení musíme zkoncentrovat, protože při stanovení se pracuje s velmi malým množstvím. Odstředěné mléko musíme zbavit laktózy organických a anorganických solí.

Vzorek čistých proteinů se rozpouští ve vodě, popřípadě v polárním rozpouštědle metanolu nebo butanolu. [3]

**Vlastní stanovení:** Na chromatografický papír se nakreslí, nejčastěji tužkou, startovací čára. Zde je nanesen vzorek mikropipetou (1-20  $\mu$ l). Optimální velikost skvrny naneseného vzorku je 5-10 mm. Papír je následně vložen do vyvíjecí kolony. Pro tento účel složí buď sestupné, nebo vzestupné vyvíjecí komory. Pro stanovení mléčných proteinů se používá „technika několikanásobného vyvíjení“. Všechny druhy kaseinů jsou ve svém složení podobné, a proto mají téměř stejný retardační faktor. Tato technika spočívá ve vyjmutí papíru

z vyvíjecí komory, jeho vysušení a opětovném vložení. Vyvíjecí směs je tvořená vodou: butanolem: kyselinou octovou. [3]

**Vyhodnocení:** Po rozdělení všech frakcí můžeme vyhodnocovat pomocí dvou způsobů. Spektrofotometricky (při vlnové délce 280 nm) po reakci s ninhydrinem vzniká barevný komplex. Změřená absorbance se porovná s kalibrační křivkou standardu. Druhým možným způsobem je stanovení pomocí standardu, kdy se nechá projít kolonou jako vzorek. Po reakci s ninhydrinem neměříme absorbanci, nýbrž porovnáваме velikost a umístění skvrn. [3]

Stanovení pomocí papírové chromatografie se v praxi pro bílkoviny moc nevyužívá. Výsledky jsou spíše pro potvrzení přítomnosti, nelze je tedy považovat za 100%. Obdobným způsobem pracuje i tenkovrstvá chromatografie TLC. [3]

## ZÁVĚR

Tato práce se zabývá studiem mléka, protože slouží několik tisíc let nejen pro výživu lidí, ale je také výchozí surovinou pro výrobu řady jiných mléčných výrobků. Nejvýznamnější v našich podmínkách je mléko kravské, ale i kozí a ovčí. Každý druh mléka je odlišný svým složením a závisí také na ročním období, případně době laktace. Protože mléko obsahuje velmi hodnotné bílkoviny pro stravování člověka, je velmi důležité znát jak tyto látky vyextrahovat a stanovit jejich kvalitu i kvantitu pomocí chromatografických metod.

V práci jsou navrženy postupy izolace bílkovin, které se používají v mnoha průmyslových odvětvích a to kyselé srážení, vysolování pomocí solí kyselin, centrifugace, ultrafiltrace, kryoseparace a GPC. Je popsána pouze podstata vybrané metody, protože každá společnost si ji upravuje podle svých potřeb a podmínek provozu.

Byla provedena souhrnná literární rešerše, jaké chromatografické metody lze k vyhodnocení použít. Nečastěji používanou metodou je iontoměničová chromatografie. Mezi účinné a spolehlivé metody se dále řadí vysokoúčinná kapalinová, gelová permeační a kapalinová adsorpční chromatografie. Pro detekci proteinů ve vzorku se používá papírová chromatografie.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] THOMPSON, A.; BOLAND, M.; SINGH, H. Milk Proteins: From Expression to Food. Academic Press. 2008.
- [2] PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P.A. Handbook of Hydrocolloids (2nd Edition). Woodhead Publishing. 2009.
- [3] DAVÍDEK, J. Laboratorní příručka analýzy potravin. Praha. Nakladatelství technické literatury. 1977.
- [4] BŘEZINA, P.; JELÍNEK, J. Chemie a technologie mléka. I. Část. Praha: MON. 1990.
- [5] HRABĚ, J.; GÁL, R.; BUŇKA, F.; ROP, O.; RŮŽIČKOVÁ, J. Základy zbožíznalství potravin. Universita Tomáše Bati ve Zlíně. Academica centrum. 2011.
- [6] FOX, P. ed.; MCSWEENEY, P.L.H. Dairy Chemistry and Biochemistry. London: Blackie Academic & Professional, 1998.
- [7] VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. Milk and Milk Products: Technology, Chemistry and Microbiology. An Aspen publication. 2001. ISBN 0-8342-1955-7
- [8] TEPLÝ, M.; MAYER, A.; SOKOLOV, A. Technologie mléčných výrobků. Vyd.1. Praha. SNTL. 1981.
- [9] Bezpečnost potravin [online] Dostupný na WWW:  
< <http://www.agronavigator.cz/az/vis.aspx?id=76688> >
- [10] Nutriční hodnota mléčných výrobku společnost Madeta [online]  
Dostupný na WWW: < [www.zh.cz/diabetes/files/Madeta.doc](http://www.zh.cz/diabetes/files/Madeta.doc) >
- [11] VELÍŠEK, J. Chemie potravin 1. Vyd. 1. Tábor: OSSIS, 1999. 328 s. ISBN 8090239137.
- [12] VOET, D.; VOET, J. Biochemistry 4th edition. s. 135-146, 2011.
- [13] TOWLER, G.; SINNOTT, R. Separation of Fluids. Chapter 16 n.p.: 2013. ISBN:9780080966595.
- [14] Basic Chromatography [online] Dostupný na WWW:  
< <http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/CHROMO/chromoper.html> >

- [15] SUROVTSEV, V. I.; BORZENKOV, V. M.; DETUSHEV, K. V. Adsorption Chromatography of Proteins. *Biochemistry*. 2009, vol. 74. ISSN:0006-2979.
- [16] TURHAN, K. N.; BARBANO, D. M.; ETZEL, M. R. Fractionation of Caseins by Anion-exchange Chromatography Using Food-grade Buffers. *Journal of Food Science*, 2003, Vol.68(5), Pp.1578-1583. 2003, vol. 68, no. 5 s. 1578-1583. ISSN:0022-1147.
- [17] ROBERT A.; MEYERS R. A. *Encyclopedia of Physical Science and Technology*, 3rd Edition. Publisher: Academic Press. s. 153-175. ISBN: 0122274105
- [18] *VSCHT – přednášky analytické chemie* [online.] Dostupný na WWW:  
< <http://www.vscht.cz/anl/matejka/ACH2-03-sepa2.pdf> >
- [19] LIANG, M.; CHEN, VVYT.; CHEN, HL.; CHEN, WL. A Simple and Direct Isolation of Whey Components from Raw Milk by Gel Filtration Chromatography and Structural Characterization by Fourier Transform Raman Spectroscopy. *Talanta*, 2006, Vol.69 (5), Pp.1269-1277. 2006, vol. 69, no. 5 s. 1269-1277. ISSN:0039-9140.
- [20] LUTTER, P.; LUTTER M.; PARISOD, V.; WEYMUTH, H. Development and Validation of a Method for the Quantification of Milk Proteins in Food Products Based on Liquid Chromatography with Mass Spectrometric Detection.(SPECIAL GUEST EDITOR SECTION) (Report). *Journal of AOAC International*, July-August, 2011, Vol.94 (4), P.1043(17). 2011, vol. 94. ISSN:1060-3271.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

AMK	Aminokyselina/y
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
FID	Plamenově ionizační detektor
GMP	Glykomakropeptid
GPC	Gelová permeační chromatografie
HPLC-RP	Vysokoučinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi
IEC	Iontově měničová chromatografie
LC	Kapalinová chromatografie
LDL	Lipoproteiny krevního séra o nízké hustotě
LSC	Kapalinová adsorpční chromatografie
MS	Hmotnostní detektor
PC	Papírová chromatografie
TLC	Tenkovrstvá chromatografie
UV	Detektor ultrafialového světla (záření)
VIS	Detektor viditelného světla (záření)



**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obr. 1. Kaseinová micela.....	22
Obr. 2. Schéma chromatografické aparatury.....	30
Obr. 3. Graf frakcionace kaseinu v odstředěném mléce.....	33

**SEZNAM TABULEK**

Tab. 1. Obecné složení mléka.....	12
Tab. 2. Složení zralého mléka, některých druhů, v hm. % obsahu složek.....	13
Tab. 3. Princip výroby jednotlivých produktů.....	15
Tab. 4. Výživová hodnota mléka a mléčných výrobků (v g na 100g výrobku).....	16
Tab. 5. Rozložení frakcí kaseinů a sérových proteinů v kravském mléce.....	20
Tab. 6. Obsah esenciálních aminokyselin ve frakcích kaseinů.....	21
Tab. 7. Obsah esenciálních aminokyselin v hlavních sérových proteinech.....	23
Tab. 8. Přehled iontoměníčů pro dělení proteinů.....	32
Tab. 9. Dva nejpoužívanější typy gelů pro stanovení proteinů mléka.....	34