

# **Stanovení obsahu tuku v mléku a v mléčných výrobcích s využitím Ramanovy spektroskopie**

Bc. Marcela Pavlíková

---

Diplomová práce  
2016



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2015/2016

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Marcela Pavlíková**  
Osobní číslo: **T13451**  
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie potravin**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Stanovení obsahu tuku v mléku a v mléčných výrobcích s využitím Ramanovy spektroskopie**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Mléčný tuk a jeho obsah v mléku a mléčných výrobcích.
2. Přehled metod používaných pro stanovení mléčného tuku.
3. Použití Ramanovy spektroskopie pro stanovení mléčného tuku.

### II. Praktická část

1. Návrh a příprava vzorků s rostoucím podílem tuku.
2. Naměření Ramanovských spekter.
3. Vyhodnocení spekter a diskuze výsledků.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

- [1] ROGINSKI, Hubert. Encyclopedia of Dairy Sciences. Amsterdam: Academic Press, 2003, 2095 s. ISBN 0-12-227238-2. [2] SIKORSKI, Zdzisław Edmund a Anna KOŁAKOWSKA. Chemical, biological, and functional aspects of food lipids. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2011, 497 s. ISBN 978-1-4398-0237-3. [3] FOX P. F., McSWEENEY P.L.H. Dairy Chemistry and Biochemistry. Blackie Academic and Professional, 1998, 478 p. [4] EL-ABASSY, R.M., P.J. ERAVUCHIRA, P. DONFACK, B. VON DER KAMMER a A. MATERNY. Fast determination of milk fat content using Raman spectroscopy. Vibrational Spectroscopy. 2011, vol. 56, issue 1, s. 3-8. [5] Journal of raman spectroscopy. Chichester: John Wiley and sons, 1973-. ISSN 1097-4555.

Vedoucí diplomové práce:

**Mgr. Martina Bučková, Ph.D.**

Ústav technologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

**2. února 2016**

Termín odevzdání diplomové práce:

**20. dubna 2016**

Ve Zlíně dne 2. února 2016



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.  
*děkan*



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.  
*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 <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 5. 5. 2016

*Marcela Pavlíková*

---

<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 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.

<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, 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).

<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 přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## ABSTRAKT

Cílem diplomové práce bylo stanovit obsah tuku v mléku a mléčných výrobcích pomocí Ramanovy spektroskopie. Byla získána Ramanova spektra vzorků mléka s různým obsahem tuku a konstantním obsahem bílkovin. Ve spektrech byly vyhledány píky odpovídající vibraci vazeb mléčného tuku. Pro vybrané charakteristické vlnočty pak byl stanoven vliv obsahu tuku ve vzorku na hodnotu relativní intenzity. Jako referenční metoda pro kvantifikaci tuku ve vzorcích bylo použito gravimetrické stanovení podle Röse – Gottlieba a doplňkově také acidobutyrometrické stanovení podle Gerbera. Na základě naměřených dat byly vytvořeny kalibrační křivky, které je možné použít za určité podmínky pro zjišťování obsahu mléčného tuku pomocí Ramanovy spektroskopie. Výhodou takového stanovení je rychlost, bezkontaktnost, eliminace použití reagentů a rozpouštědel.

Klíčová slova: mléčný tuk, Ramanova spektroskopie, Röse – Gottlieb, Gerber

## ABSTRACT

The aim of the thesis was to determinate the fat content in milk and dairy products using Raman spectroscopy. There were obtained Raman spectra of milk samples with different fat contents and constant protein content. In those spectra there were searched peaks corresponding with vibration of milk fat bonds. Then there was determinated the effect of a milk content in samples on the value of relative intensity for selected characteristic wave number. As a reference method for quantifying fat content in samples there was used gravimetric determination according to Röse – Gottlieb and in addition there was also used acid – butyrometric method according to Gerber. On the basis of measured data there were made a calibration curves, which can be used under certain condition for the detection of milk fat using Raman spectroscopy. The advantage of such determination is speed, non – contact, elimination of the use of reagents and solvents.

Keywords: milk fat, Raman spectroscopy, Röse – Gottlieb, Gerber

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce Mgr. Martině Bučkové, Ph.D. za odborné rady, cenné informace, připomínky a velkou trpělivost při zpracování této práce.

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

# OBSAH

ÚVOD.....	10
<b>I</b> <b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1</b> <b>MLÉČNÝ TUK A JEHO OBSAH V MLÉKU A MLÉČNÝCH VÝROBCÍCH</b> .....	<b>12</b>
1.1 <b>KOMPONENTY MLÉČNÉHO TUKU</b> .....	12
1.1.1    Mastné kyseliny.....	12
1.1.2    Triacylglyceroly.....	14
1.1.3    Diacylglyceroly, monoacylglyceroly .....	15
1.1.4    Steroly .....	15
1.1.5    Složené lipidy.....	15
1.1.6    Karotenoidy.....	16
1.1.7    Vitaminy.....	16
1.1.8    Aromatické sloučeniny.....	17
1.2    TUKOVÁ KULIČKA .....	18
1.3    INTRAVITÁLNÍ VLIVY OVLIVŇUJÍCÍ MLÉČNÝ TUK .....	20
1.4    NUTRIČNÍ HODNOCENÍ MLÉČNÉHO TUKU .....	21
1.5    MLÉČNÝ TUK V POTRAVINÁCH .....	23
<b>2</b> <b>METODY STANOVENÍ MLÉČNÉHO TUKU</b> .....	<b>25</b>
2.1    GRAVIMETRICKÉ STANOVENÍ PODLE RÖSE – GOTTLIEBA .....	25
2.2    ACIDOBUTYROMETRICKÉ STANOVENÍ PODLE GERBERA .....	26
2.3    TURBIDIMETRICKÉ METODY .....	27
2.4    INFRAČERVENÁ SPEKTROSKOPIE.....	28
<b>3</b> <b>POUŽITÍ RAMANOVY SPEKTROSKOPIE PRO STANOVENÍ MLÉČNÉHO TUKU</b> .....	<b>30</b>
3.1    RAMANOVA SPEKTROSKOPIE .....	30
3.1.1    Vibrace molekul .....	32
3.1.1.1    Vibrace dvouatomové molekuly .....	32
3.1.1.2    Vibrace víceatomových molekul .....	33
3.2    RAMANOVA SPEKTRA .....	34
3.3    ZESÍLENÍ RAMANOVA SIGNÁLU .....	35
3.3.1    Rezonanční Ramanova spektroskopie (RRS) .....	35
3.3.2    Povrchově zesílená Ramanova spektroskopie (SERS) .....	36
3.4    VÝHODY A NEVÝHODY RAMANOVY SPEKTROSKOPIE .....	36
3.5    STANOVENÍ MLÉČNÉHO TUKU POMOCÍ RAMANOVY SPEKTROSKOPIE.....	37
<b>II</b> <b>PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>42</b>
<b>4</b> <b>CÍL PRÁCE</b> .....	<b>43</b>
<b>5</b> <b>MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>44</b>



5.1	POUŽITÉ MATERIÁLY A CHEMIKÁLIE .....	44
5.2	POUŽITÉ PŘÍSTROJE .....	45
5.3	CHARAKTERISTIKA VZORKU .....	45
5.4	PŘÍPRAVA VZORKŮ .....	46
5.5	POUŽITÉ METODY .....	46
5.5.1	Ramanova spektroskopie.....	46
5.5.2	Gravimetrické stanovení podle Röse – Gottlieba.....	48
5.5.3	Acidobutyrometrické stanovení podle Gerbera.....	49
5.5.4	Stanovení obsahu bílkovin .....	49
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>51</b>
6.1	STANOVENÍ MLÉČNÉHO TUKU PODLE RÖSE – GOTTLIEBA.....	51
6.2	STANOVENÍ MLÉČNÉHO TUKU PODLE GERBERA.....	52
6.3	STANOVENÍ MLÉČNÉHO TUKU VE SMETANĚ .....	52
6.4	STANOVENÍ OBSAHU BÍLKOVIN.....	53
6.5	STANOVENÍ MLÉČNÉHO TUKU POMOCÍ RAMANOVY SPEKTROSKOPIE.....	54
6.6	SOUHRNNÁ DISKUSE.....	64
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>67</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>68</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>74</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>75</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>77</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>78</b>

## ÚVOD

Mléko a mléčné výrobky jsou součástí lidské stravy již od nepaměti. V současné době produkce mléka je z převážné části tvořena kravským mlékem, minoritní podíl zaujímají mléka kozí, ovčí nebo kobyly. Tato důležitá složka lidské výživy je tvořena vodou, bílkoviny, sacharidy, vitaminy, a nejcennější a energeticky nejbohatší složkou mléčným tukem.

Mléčný tuk je nejproměnlivější složkou mléka. Jeho obsah se pohybuje u kravského mléka v rozmezí 3,5 – 5 % a je závislý na celé řadě faktorů např. plemeni, krmivu nebo ročním období. Složitá struktura mléčného tuku je tvořena 98 % z triacylglycerolů, zbylou část tvoří di- a monoacylglyceroly, fosfolipidy, steroly, vitaminy a aromatické látky. Mléčný tuk je zdrojem esenciálních mastných kyselin zejména kyseliny linolové a důležitým zdrojem vitaminů rozpustných v tucích (A, D, E, K). Mléčným výrobkům dodává charakteristickou chuť a reologické vlastnosti.

Chemické složení mléka je v mlékárenském průmyslu důležitým faktorem. Získat spolehlivé informace o množství tuků, bílkovin a sacharidů je stěžejním indikátorem kvality mléka. Standartní techniky používané ke zjišťování těchto ukazatelů jsou dosti časově náročné, proto jsou mnohdy hledány rychlejší časově nenáročnější metody, které by zjistily i více přítomných komponentů najednou. K analýze potravin je možné použít metodu Ramanovy spektroskopie, která rychle poskytuje příslušné informace na základě charakteristických Ramanových spekter.

Teoretická část diplomové práce je zaměřena na charakteristiku jednotlivých komponent mléčného tuku. Následně je popsán přehled běžně používaných metod pro jeho stanovení a aplikace Ramanovy spektroskopie na zjištění obsahu mléčného tuku.

V praktické části práce byl stanoven mléčný tuk běžnými laboratorními metodami a pomocí Ramanovy spektroskopie byla naměřena spektra různých vzorků mléka, u kterých byly vyhodnoceny hlavní píky odpovídající mléčnému tuku. Na základě zjištěných dat bylo pro šest sledovaných piků vytvořeno šest kalibračních křivek, ze kterých je možné za určitých podmínek zjistit množství mléčného tuku.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

# 1 MLÉČNÝ TUK A JEHO OBSAH V MLÉKU A MLÉČNÝCH VÝROBCÍCH

Mléko je řazeno mezi základní potraviny, jehož hlavním cílem je zajistit nutriční potřeby pro růst a zdraví novorozeného mláděte. Z fyzikálního hlediska se jedná o složitý koloidní systém, ve kterém jsou kuličky mléčného tuku suspendovány do vodného prostředí obsahující laktózu, řadu bílkovin, minerální látky a ve vodě rozpustné vitamíny [1,2].

Chemické složení a struktura mléčného tuku je jedna z nejkomplicovanějších, kterou mezi potravinářskými tuky můžeme nalézt. U jednotlivých druhů savců se koncentrace lipidů v mléce značně liší a může se pohybovat v intervalu od 2 – 50 %. V této práci bude mléko bráno jako mléko kravské, ve kterém je obsah tuku přítomen v rozmezí 3,5 – 5 % [3,4].

## 1.1 Komponenty mléčného tuku

### 1.1.1 Mastné kyseliny

V mléčném tuku se mastné kyseliny vyskytují jako součást acylglycerolů (tri-, di-, mono-), fosfolipidů, glykolipidů a v menší míře se můžou vyskytovat i ve formě volné. V čerstvém mléce byly zaznamenány pouze nízké koncentrace volných mastných kyselin. Vzhledem k činnosti lipoproteinové nebo bakteriální lipázy se může obsah volných mastných kyselin zvýšit v průběhu skladování a to z 0,1 % až na 1,0 %. Takto vysoké koncentrace mohou vést až k žluklé chuti mléka, technologickým problémům při zpracování nebo k tvorbě sensorických vad u mléčných výrobků. Profil volných mastných kyselin v čerstvě odebraném mléce se liší od profilu mastných kyselin, které jsou esterifikované na triacylglyceroly, což poukazuje na pravděpodobný produkt lipolýzy [5,6,7,8].

Mastné kyseliny obsažené v mléčném tuku jsou syntetizovány v mléčné žláze nebo z plazmatických lipidů. Jestliže jsou mastné kyseliny syntetizovány v mléčné žláze, tzv. *de novo*, dojde ke vzniku mastných kyselin se sudým počtem a s délkou řetězce od 4 – 14 atomů uhlíku, a k tvorbě části mastných kyselin s 16 atomy uhlíku. Kratší řetězce jsou syntetizovány z acetátu a částečně z  $\beta$  – hydroxybutyrátu, který je produkován fermentací sacharidů v bachoru. Druhým zdrojem mastných kyselin jsou plazmatické lipidy, které pocházejí převážně ze stravy zvířete a z lipolýzy triacylglycerolů tukové tkáně. Lipidy obsa-

žené ve stravě zvířete ovlivňují podíl C16:0, C18:0, C18:1 a velmi malý vliv mají na C18:2 a C18:3 [3,5,9].

Bylo identifikováno až 400 různých mastných kyselin, avšak převážná většina z nich je přítomna ve stopovém množství. Pouze 16 mastných kyselin se nachází v koncentracích rovných nebo přesahujících 1 % [6,8].

Z celkového obsahu mastných kyselin, který činí 90 % (w/w), připadá přibližně 70 % na nasycené mastné kyseliny, jejichž nevětvený řetězec se liší v délce od 4 – 18 atomů uhlíku. Z kvantitativního hlediska je nejdůležitější kyselina palmitová (C16:0), jež představuje přibližně 30 %, zatímco myristová (C14:0) a stearová (C18:0) kyselina je obsažena každá v množství od 10 – 12 %. Zastoupení mastných kyselin s krátkým řetězcem je poměrně vysoké. Množství kyseliny máselné (C4:0) činí v ročním průměru přibližně 4,4 % a kyseliny kapronové (C6:0) zhruba 2,4 %. Mléko je jedním z mála přírodních zdrojů poskytující mastné kyseliny se 4 – 12 atomy uhlíku. Mezi výhody vyššího obsahu mastných kyselin s krátkými a středně dlouhými řetězci patří jednoznačně lehká stravitelnost mléčného tuku. Snižují také bod tání triacylglycerolů, a tím pomáhají udržovat mléčný tuk v kapalné formě při fyziologických teplotách [3,5,6,9].

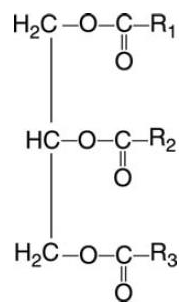
Hlavním zástupcem mononenasycených mastných kyselin je kyselina olejová (C18:1), která představuje množství 17 – 25 %. Do obsahu mononenasycených mastných kyselin přispívá do jisté míry i myristolejová (C14:1) a to 1 % a palmitolejová kyselina (C16:1) až 1,5 %. Za zmínku stojí i kyselina vakcenová (C18:1 t-11), jež se řadí mezi *trans* nenasycené mastné kyseliny, které vznikají v batoru přežvýkavců biohydrogenací polynenasycených mastných kyselin [5,6,10].

Polynenasycené mastné kyseliny tvoří přibližně 2,3 % z celkového obsahu mastných kyselin. Mezi představitele této skupiny mastných kyselin patří kyselina linolová (C18:2) a  $\alpha$ -linolenová (C18:3), které tvoří mléčný tuk v množství 1,6 a 0,7 %. Dalším zástupcem je konjugovaná kyselina linolová (CLA), o kterou se v poslední době výrazně zvýšil zájem v důsledku pozitivních účinků na lidské zdraví. Pod touto bioaktivní složkou mléčného tuku se skrývá skupina přirozeně se vyskytujících mastných kyselin s 18 atomy uhlíku a konjugovaným systémem dvojných vazeb. Jedná se o směs až 28 polohových a geometrických izomerů kyseliny linolové. Převládajícím izomerem v mléčném tuku je *cis* – 9,

*trans* – 11 CLA, známá i jako kyselina rumenová, která představuje přibližně 75 – 90 % z celkového množství CLA [5,8,11].

### 1.1.2 Triacylglyceroly

Nepolární molekuly triacylglycerolu (TAG) jsou tvořené z páteře glycerolu, na kterou jsou esterifikovány tři molekuly mastné kyseliny (viz Obrázek 1). Umístění mastných kyselin není zcela náhodné, ale je dáno specifíčitostí enzymů podílejících se na biosyntéze. Nedávné studie poukazují na to že, se přednostně interesterifikují máselná a kapronová kyselina na pozici sn-3. Laurová a myristová kyselina na pozici sn-2, zatímco palmitová se přednostně začleňuje na polohu sn-1 a sn-2. Dále je prokázáno, že stearová se esterifikuje v pozici sn-1 a olejová kyselina na pozice sn-1 a sn-3 [3,5].



Obrázek 1: Molekula triacylglycerolu [5]

Z kvalitativního hlediska se jedná o nejdůležitější složku mléčného tuku, která představuje až 98 % z celkového obsahu lipidů. Jejich vysoký podíl do značné míry určuje vlastnosti mléčného tuku jako např. hustotu nebo bod tání. Kombinací různých mastných kyselin, dosahující délky řetězce od 4 do 18 atomů uhlíku, je možné získat až několik tisíc kombinací TAG. Jednotlivé kombinace mastných kyselin se liší molekulovou hmotností a stupněm nasycení, nicméně většina těchto kombinací je v mléčném tuku přítomna s největší pravděpodobností pouze ve stopovém množství [5,6].

### 1.1.3 Diacylglyceroly, monoacylglyceroly

Čerstvé mléko ihned po nadojení obsahuje jen malé množství diacylglycerolů (DAG) a monoacylglycerolů (MAG), což naznačuje, že se jedná o meziprodukty při syntéze TAG. Při skladování může být jejich obsah zvýšen tím, že jsou TAG podrobeny enzymatické hydrolyze mléčnými nebo bakteriálními lipázami. Díky volné hydroxylové skupině jsou DAG mírně polární s malou povrchovou aktivitou. V porovnání s DAG, lze MAG považovat za relativně polární molekuly, protože obsahují mastné kyseliny s dlouhým řetězcem, které jsou amfifilní a tím i povrchově aktivní, zatímco ty s krátkým řetězcem jsou jen částečně rozpustné ve vodě [3,5,12].

### 1.1.4 Steroly

Mezi hlavní zástupce sterolů je řazen cholesterol, který představuje až 95 % všech sterolů v mléčném tuku. Převážná většina cholesterolu se vyskytuje ve volné formě, zlomek části je pak esterifikován. Jeho nepolární charakter umožňuje vazbu s fosfolipidy, proto můžeme malou část najít v membráně tukových kuliček. Cholesterol je důležitou biologickou sloučeninou, která je součástí buněčných membrán, hraje roli při regulaci lipidů a bílkovin. V neposlední řadě slouží jako prekursor pro řadu hormonů. Za zmínku stojí i ergosterol prekursor vitamínu D2 [5,7,12].

### 1.1.5 Složené lipidy

Ačkoliv fosfolipidy zaujímají v mléčném tuku pouze 1 % z celkového obsahu, hrají v něm významnou roli. Jsou nedílnou součástí membrány tukových kuliček a dalších membránových materiálů vyskytujících se v mléce. Amfifilní charakter fosfolipidů umožňuje molekulám stabilizaci emulze olej – voda, což vysvětluje jejich přítomnost v membránách [4,5,6].

Glycerofosfolipidy jsou složeny z glycerolu, na jehož molekulu jsou v polohách sn-1 a sn-2 esterifikovány dvě molekuly mastné kyseliny. Na pozici třetího hydroxyly je vázán fosfátový zbytek s různou organickou skupinou (cholin, serin, ethanolamin aj.). Mezi hlavní zástupce glycerofosfolipidů patří fosfatidylcholin z 35 %, fosfatidyletanolamin z 30 %, fosfatidylinositol z 5 % a fosfatidylserin 3 %. Mastné kyseliny ve fosfolipidové frakci obsahují více nenasycených mastných kyselin a méně nasycených než v molekulách TAG. Nenasycené mastné kyseliny jsou zastoupeny především kyselinami s 18, 20 a 22 atomy

uhlíku. Vzhledem k umístění většího počtu nenasycených mastných kyselin podléhají glycerofosfolipidy častěji oxidaci [5,6,7,13].

Pro molekuly sfingolipidů je charakteristická sfingoidní báze s dlouhým řetězcem (12 – 22 atomů uhlíku) alifatických aminů, obsahující dvě nebo tři hydroxylové skupiny. V mléčném tuku se tato sfingoidní báze nazývá sfingosin a obsahuje 18 atomů uhlíku, dvě hydroxylové skupiny a jednu dvojnou vazbu. Když aminoskupina sfingosinu tvoří amidovou vazbu s karboxylem mastné kyseliny, vznikne ceramid – základní molekula sfingolipidů. Nejvýznamnější představitel sfingolipidů je sfingomyelin obsažen v mléčném tuku z 25 %. Na ceramid bývá zpravidla vázána fosfátová skupina za vzniku sfingofosfolipidů. V případě, kdy se na ceramid naváže cukerná složka, lze hovořit o glykolipidech. Naváže-li se hexóza (glukóza, galaktóza), jedná se o cerebrosidy. V případě vazby oligosacharidu s kyselinou sialovou na ceramid vzniká poslední skupina tzv. gangliosidy [5,13].

### 1.1.6 Karotenoidy

Karotenoidy představují vysoce nenasycené uhlovodíky, ve kterých je přítomna řada konjugovaných vazeb, které absorbují světlo při vlnové délce 450 nm. Z 95 % jsou zastoupeny  $\beta$  – karotenem. Jeho koncentrace se v mléčném tuku značně liší a dosahuje hodnot v rozmezí 2,5 – 8,0  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  tuku. Toto široké rozpětí je ovlivněné stravou a plemenem zvířete. Čerstvá pastvina je mnohem bohatší na karotenoidy než seno nebo siláž, v důsledku oxidace. Karotenoidy jsou zodpovědné za typické zbarvení mléka, nebo charakteristickou barvu kolostra [3,4,5].

### 1.1.7 Vitaminy

V mléce jsou přítomny vitaminy rozpustné v tucích (A, D, E, K). Mléčný tuk je považován za hlavní zdroj vitamínu A, ale chudý zdroj vitaminů D, E, K. Vitamin A existuje ve dvou formách a to jako vitamin A (retinol a retinyl ester) a provitamin A ( $\beta$  – karoten). Tokoferoly působí jako antioxidanty, reagují s volnými radikály a tím chrání nenasycené mastné kyseliny a  $\beta$  – karoten před oxidací. Zdroje vitamínu A a D jsou k dispozici pouze v potravinách živočišného původu [4,5].

Vitaminy rozpustné v tucích nejsou ovlivněny při technologických operacích, tepelným zpracováním ani při expozici světla [3].



### 1.1.8 Aromatické sloučeniny

K celkové chuti a vůni mléka přispívá velké množství sloučenin. Bylo identifikováno na 120 těkavých sloučenin, i když převážná většina z nich jsou ve stopovém množství. Nevhodným skladováním mléka se jejich koncentrace zvyšuje, což může vést až k nežádoucí tvorbě pachutí [3].

Za použití kapalinové chromatografie byly identifikovány těkavé sloučeniny zahrnující ketony, aldehydy, sloučeniny síry, mastné kyseliny, terpeny a uhlovodíky. V nízkých koncentracích jsou ketony přítomny v čerstvém mléce, avšak převážná většina z nich je vytvořena tepelným ošetřením, kdy dochází k  $\beta$  – oxidaci nasycených mastných kyselin s následnou dekarboxylací nebo dekarboxylací  $\beta$  – ketokyselin. Sloučeniny síry jako je např. sirovodík, methanthiol, sirouhlík, dimethyl sulfid, dimethyl disulfid, dimethyl trisulfid vznikají působením tepla ze sulfhydrylových skupin pocházejících ze syrovátkových proteinů, především  $\beta$  – laktoglobulinu. Tyto sloučeniny jsou po tepelném záhřevu odpovědné za vařivou chuť mléka. Dimethyl sulfid v syrovém mléce může pocházet z krmiva, zatímco po tepelném ošetření je pravděpodobně utvořen z methioninu. Dimethyl sulfid má velmi nízký práh detekce a již velmi malé rozdíly v koncentraci můžou změnit celkové aroma mléka [5,14].

Z triacylglycerolů jsou esterifikovány 4 – a 5 – hydroxykyseliny, které působí jako prekursory pro vznik  $\gamma$  – laktonů a  $\delta$  – laktonů. Část těchto hydroxykyselin přejde na laktony spontánním přesmykem při pokojové teplotě, zbylá část je převedena při tepelném záhřevu. Laktony jsou zodpovědné za sladkou a ovocnou chuť mléka. Značná část aromatických sloučenin patří mezi aldehydy, které jsou oxidačními produkty mastných kyselin vyznačující se pronikavou chutí. Alifatické aldehydy pochází z oxidace nenasycených mastných kyselin. V čerstvém mléce jsou ve velmi nízké koncentraci. Mírnou oxidací mastných kyselin může být zvýšen obsah aldehydů na úroveň, kde mohou smyslově přispět k chuti mléka. Obecně platí, že aldehydy jsou zdrojem oxidovaných chutí. Z terpenů je zastoupený limonen, který pochází z rostlinné stravy zvířete. K výrazné chuti mléčného tuku kromě zmíněných sloučenin přispívá diacetyl, fenol, kresol a skatol [5,14].

Charakteristická chuť másla je vytvořena komplexem sloučenin tvořených z methyl ketonů, diacetylu, mastných kyselin a laktonů [3].

Chuť mléka je závislá na intenzitě tepelného záhřevu, který podporuje tvorbu aromatických sloučenin, jako jsou aldehydy, methyl ketony a sloučeniny síry [14].

## 1.2 Tuková kulička

Mléčný tuk je vylučován v unikátní struktuře mléčných tukových kuliček o velikosti 0,1 – 20  $\mu\text{m}$  s průměrnou hodnotou kolem 4  $\mu\text{m}$ . Velikost tukové globule a do jisté míry i složení bývá ovlivněno intravitálními vlivy, které budou probrány v kapitole 1.3 Intravitální vlivy ovlivňující mléčný tuk [15].

Základem pro tukovou kuličku je jádro složené z triacylglycerolů, které jsou syntetizovány uvnitř hrubého endoplazmatického retikula epiteliálních buněk mléčné žlázy. Následně jsou TAG hromaděny v cytoplasmě, ve formě mikro kapiček, které jsou pokryty membránou skládající se z komplexu polárních lipidů a proteinů pocházejících rovněž z endoplazmatického retikula. Tyto mikro kapičky se v cytoplasmě spojují do tzv. cytoplasmatických tukových kapek dosahujících různých velikostí. Poté doposud neobjasněným mechanismem přechází do apikálního konce sekrečních buněk s následným vyloučením z epiteliální buňky. Během sekrece dojde k potažení kapek vnější plazmatickou membránou [15,16,17,18].

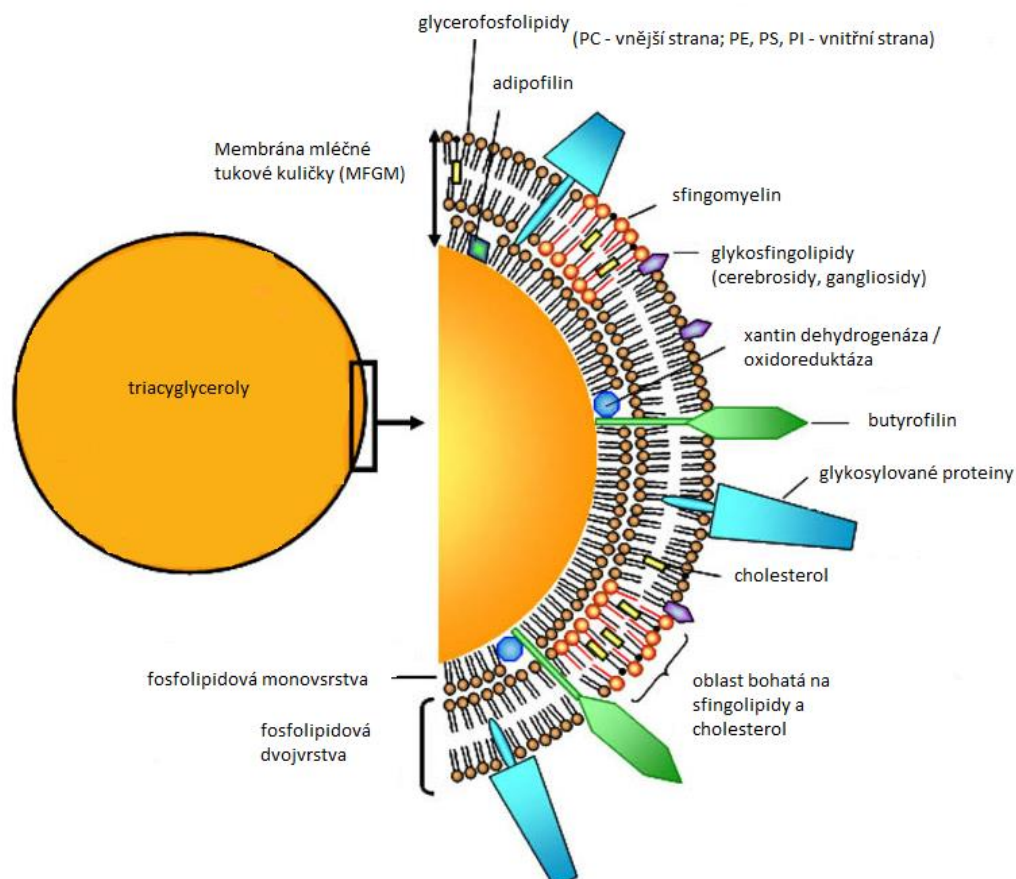
Obal tukové kuličky je tvořen lipofilní vrstvou fosfolipidů, jejichž nepolární řetězce jsou orientovány směrem do tukové kuličky a polární – hydrofilní část molekuly je orientována směrem k vodné fázi mléka. Hydrofilní povrch membrány udržuje tuk v emulgovaném stavu [7,12,19].

Membrána mléčné tukové kuličky (MFGM) o tloušťce 10 – 15 nm je organizována do třívrstvé struktury. První membrána tzv. vnitřní, je jednovrstvá, složená z fosfolipidů a proteinů pocházejících z drsného endoplazmatického retikula. Druhá vnější membrána je dvouvrstvá, odvozená z apikální plazmatické membrány epiteliálních buněk, v níž jsou obsaženy glykosylované a neglykosylované proteiny, glycerofosfolipidy, sfingolipidy, enzymy, cholesterol a další minoritní složky. Mezi vnitřní a vnější membránou je elektronově hustý materiál bohatý na bílkoviny [1,16,20].

Hmotnost membrány se odhaduje na 2 – 6 % z celkové hmotnosti mléčné tukové kuličky. MFGM se skládá z komplexní směsi glykoproteinů, glycerofosfolipidů, sfingolipidů, glykolipidů, TAG, sterolů, enzymů, a dalších minoritních složek. Z glycerofosfolipidů obsaže-

ných v membráně jsou hlavními zástupci fosfatidylcholin, fosfatidylethanolamin, fosfatidylinositol a fosfatidylserin. Nejvýznamnějším sfingolipidem obsaženým v membráně je sfingomyelin. Proteinová část je tvořena xantin oxidázou, butyrofilinem a silně glykosylovanými glykoproteiny mucinu [1,4,16,20].

Na obrázku 2 je schematicky znázorněn model mléčné tukové kuličky, který byl navrhnutý za použití konfokální laserové skenovací mikroskopie. Páteří membrány mléčné tukové kuličky je třívrstevná struktura fosfolipidů. Fosfatidylcholin (PC), sfingomyelin a glykosfingolipidy jsou umístěny převážně na vnější straně membrány, zatímco neutrální lipidy jako např. fosfatidylethanolamin (PE), fosfatidylserin (PS) a fosfatidylinositol (PI) jsou soustředěny na vnitřním povrchu membrány [6,20].



Obrázek 2: Schématické znázornění struktury mléčné tukové kuličky [20]

Kompozice mléčné tukové kuličky může být změněna např. vlivem fyziologických, chemických, enzymatických nebo mechanických faktorů. Mezi mechanické faktory se řadí některé technologické operaci při zpracování mléka kupříkladu chlazení, homogenizace

nebo sušení. Z fyziologických faktorů má značný vliv krmivo, které ovlivňuje složení mastných kyselin a tudíž i fosfolipidy [1,16].

Biologická membrána tukových kuliček zajišťuje jejich neporušitelnost a fyzikální stabilitu před chemickými a lipolytickými reakcemi. Díky zápornému elektrostatickému náboji jsou tukové kuličky chráněny před splnutím ve velké útvary [12,19].

### 1.3 Intravitální vlivy ovlivňující mléčný tuk

Koncentrace lipidů v kravském mléce se pohybuje v rozmezí 3,5 – 5 %, avšak konkrétní obsah závisí na celé řadě faktorů, jako jsou např. genetické faktory, strava, fáze laktace, věk nebo zdraví zvířete [4,8].

Obsah tuku a profil mastných kyselin se značně liší mezi plemeny. Vědecky bylo prokázáno, že u plemen s mléčnou užitkovostí poskytuje nejvyšší obsah tuku plemeno Holštýn, Jersey a Guernsey. Skutečné průměry se liší podle ročního období a také zemí původu. Například mléčný tuk pocházející z plemene Jersey má vyšší podíl krátkých a středně dlouhých řetězců mastných kyselin a nižší podíl C16:0 a C18:1, než mléčný tuk produkováný plemenem Holštýn [6,8,9].

Další významným vlivem je stupeň laktace. Zvláště mléko získané 2 – 3 dny po porodu tzv. mlezivo či kolostrum, má velmi odlišné složení. Podíl mastných kyselin s krátkým řetězcem je na začátku laktace nízký a vzrůstá po 8 – 12 týdnech. Mírný nárůst při kojení byl zaznamenán u C16:0. Mastné kyseliny s 18 atomy uhlíku vykazují opačný průběh, tedy dochází k nárůstu. Tyto změny mohou být vysvětlovány v důsledku změny rovnováhy mezi mastnými kyselinami, *de novo* syntézou v mléčné žláze, procesem metabolismu v batoru eventuálně mobilizací tělesného tuku [5,6,8].

Produkce mléka souvisí se zdravotním stavem zvířete. Libovolné narušení fyziologické rovnováhy se obvykle projeví ve změnách složení mléka a jeho vlastnostech. Takovým onemocněním může být například mastitida – zánět mléčné žlázy, přičemž dochází ke zvýšení obsahu somatických buněk. Výrazný vliv mohou mít i metabolické poruchy trávení v předžaludcích. Obsah tuku se při podvýživě může snížit až o 15 %, přičemž dochází ke snížení koncentrace mastných kyselin s krátkým řetězcem. V případě překrmování se obsah mléčného tuku zvyšuje jen nepatrně [7,12].

Dalším významným faktorem, který ovlivňuje obsah a složení mléčného tuku je krmivo. Kvalita a skladba krmné dávky má vliv na zastoupení mastných kyselin. Při krmení čerstvou pastvou se podstatně zvyšuje obsah mastných kyselin s 18 atomy uhlíku, zatímco obsah C16:0, C14:0 a C12:0 klesá. Nejmenší vliv sezonního krmiva byl zaznamenán u mastných kyselin s krátkými řetězci [6,7].

#### 1.4 Nutriční hodnocení mléčného tuku

Mléčný tuk je lehce stravitelný díky vysokému podílu mastných kyselin s krátkými řetězci (C4:0, C6:0, C8:0), které jsou v koncových polohách TAG přednostně hydrolyzovány žaludečnými lipázami a následně jsou převedeny pomocí krevních kapilár rovnou do jater k  $\beta$  – oxidaci mastných kyselin. Tudíž nemají tendenci tvořit tukové tkáně a mají minimální vliv na koncentraci cholesterolu v plazmě. I v případě kyseliny stearové (C18:0) nebyl prokázán vliv na zvýšení cholesterolu v krvi. Zatímco přítomnost kyselin laurové (C12:0), myristové (C14:0), a palmitové (C16:0) způsobilo zvýšení LDL a HDL cholesterolu. Vysoké obsahy nasycených mastných kyselin vedou ke zvýšení hladiny cholesterolu v krvi, což je považováno za rizikový faktor ischemické choroby srdeční [3,6,8,10].

U kyseliny kaprylové a kaprinové (C8:0 a C10:0) se projevila protivirová aktivita a u samotné kyseliny kaprylové bylo hlášeno, že způsobuje pomalejší růst nádorů. U kyseliny laurové (C12:0) byla zjištěna možná protivirová a antibakteriální funkce a může působit jako prostředek proti zubnímu plaku, čímž zabraňuje tvorbě zubního kazu [10].

Mléčný tuk je dále bohatý na kyselinu olejovou (C18:1), která má pozitivní vliv na lidské zdraví z důvodu snižování koncentrace LDL cholesterolu a krevního tlaku. Nahrazením nasycených mastných kyselin za mononenasycené by vedlo ke snížení rizika ischemické choroby srdeční [6,10].

Kyselina linolová (C18:2) a linolenová (C18:3), jakož to primární polyenové mastné kyseliny v mléce jsou nezbytné pro lidský metabolismus. Kyselina linolenová rovněž snižuje hladinu LDL cholesterolu. Tyto mastné kyseliny mohou být převedeny na mastné kyseliny s 20 atomy uhlíku, tzn. arachidonovou (C20:4) a eikosapentaenovou (C20:5) kyselinu. Eikosapentaenová kyselina může být ještě dále syntetizována na eikosanoidy – metabolicky velmi aktivní sloučeniny. Polynenasycené mastné kyseliny mohou ovlivnit přenos signálu a genovou expresi [3,10].

Mléčný tuk přežvýkavců je nejbohatším přírodním zdrojem konjugované kyseliny linolové. Její obsah je ovlivněn hlavně typem krmiva podle sezonního období. V zimě může být obsah CLA až 2 krát nižší než v létě. CLA je součástí mléčných výrobků, přičemž některé z nich mohou obsahovat vyšší úroveň CLA z důvodu technologického zpracování, při kterém může dojít k oxidaci kyseliny linolové volnými radikály s následnou redukcí [10]. Nejvíce zastoupeným izomerem CLA jak již bylo řečeno v kapitole 1.1.1 je *cis* – 9, *trans* – 11 CLA, kyselina rumenová, která může přispět ke zlepšení stavu cholesterolu v plazmě. Výsledky řady studií prokazují potenciální roli rumenové kyseliny jako přirozenou funkční složku potravin s antikarcinogenními a antiaterogenními účinky. Některé studie poukazují na to, že po přidavku směsi CLA izomerů dojde k ovlivnění plazmatických lipidů [10,11].

Mléko a mléčné výrobky jsou bohatým zdrojem fosfolipidů, které vykazují vysokou nutriční hodnotu. U převažujícího sfingomyelinu bylo prokázáno, že hraje důležitou roli v transmembránových přenosech a v buněčných regulacích přes jeho biologicky aktivní metabolity (ceramid a sfingosin) [6, 21].

Kyselina máselná je silnou protinádorovou složkou. Ta inhibuje růst buněk a indikuje diferenciaci v širokém spektru nádorových buněčných linií. Hraje roli v prevenci proti rakovině a je známá jako modulátor genové funkce. Mléčné lipidy kravského mléka obsahují etherové lipidy, které mají taktéž silnou protinádorovou aktivitu již ve velmi nízkých koncentracích [10,21].

V kapitole 1.1.7 bylo řečeno, že mléčný tuk je nositelem vitaminů rozpustných v tucích a to A, D, E a K. Vitamin A je v mléčném tuku reprezentován jako retinol a hlavně jako jeho provitamin,  $\beta$  – karoten, který je z mléčného tuku snadněji absorbován než z jakýchkoliv jiných potravin. Vitamin A je významný v celé řadě fyziologických funkcí, např. je důležitý pro správnou funkci zraku, imunitního systému, optimálního růstu kostí a formování zubní skloviny. Jeho přítomnost zajišťuje normální funkci reprodukčního systému [10,21].

Příjem vitaminu E je spojen se sníženým rizikem rakoviny a ischemické choroby srdeční, dokáže stimulovat T – buňky (druh bílých krvinek), což vede ke zvýšení imunitního obranného systému [10].

Ze závěrů dosavadních studií lze konstatovat, že mléčný tuk obsahuje řadu pozitivních bioaktivních látek a to konjugovanou kyselinu linolovou, kyselinu máselnou, sfingomyelin, etherové sloučeniny a v neposlední řadě je důležitým zdrojem esenciálních mastných kysel-

lin. Tyto skutečnosti poukazují na možnost, že výhody konzumace mléčného tuku převažují nad případnými nedostatky některých složek [3].

## 1.5 Mléčný tuk v potravinách

Vyhláška č. 77/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje, definuje mléko a mléčné výrobky příp. jejich stanovený obsah tuku. Vyhláškou jsou definovány tyto produkty:

- Smetana – tekutý ošetřený mléčný výrobek s obsahem tuku nejméně 10 % hmotnostních ve formě emulze získaný fyzikální separací z mléka (viz Tabulka 1).

Tabulka 1: Tekutá smetana – požadavky na obsah mléčného tuku

Druh výrobku	Obsah tuku [% hmot.]
Smetana	více než 10,0 včetně
Smetana ke šlehání	více než 30,0 včetně
Smetana vysokotučná	více než 35,0 včetně

- Jogurt - kysaný mléčný výrobek získaný kysáním mléka, smetany, podmásli nebo jejich směsi pomocí mikroorganismů.
- Kysaný mléčný výrobek – mléčný výrobek získaný kysáním mléka, smetany, podmásli nebo jejich směsi za použití mikroorganismů, tepelně neošetřený po kysacím procesu. Požadavky na obsah mléčného tuku v kysaných mléčných výrobcích jsou uvedeny v Tabulce 2.
- Sušené mléko nebo sušená smetana – mléčný výrobek v prášku získaný sušením mléka plnotučného, odtučněného nebo částečně odtučněného nebo smetany příp. jejich směsi s obsahem vody nejvýše 5 % hmotnostních.
- Sýr – mléčný výrobek získaný vysrážením mléčné bílkoviny z mléka působením syřidla nebo jiných vhodných koagulačních činidel, prokysáním a oddělením podílu syrovátky.
- Máslo – mléčný výrobek obsahující výhradně mléčný tuk ve formě emulze vody v tuku [22].

Tabulka 2: Kysané mléčné výrobky – požadavky na obsah mléčného tuku

<b>Druh výrobku</b>	<b>Obsah tuku [% hmot.]</b>
Kysaná smetana	více než 10,0 včetně
Kysané mléko včetně jogurtového	více než 0,5
Kysané mléko odtučněné	méně než 0,5 včetně
Podmáslí	méně než 1,5 včetně
Jogurt bílý smetanový	více než 10,0 včetně
Jogurt bílý	více než 3,0 včetně
Jogurt bílý se sníženým obsahem tuku	méně než 3,0
Jogurt bílý nízkotučný nebo odtučněný	méně než 0,5 včetně

Jedinečné vlastnosti mléčného tuku přispívají ke vzhledu, textuře a chuti mléčných výrobků. Všestranné vlastnosti mléčného tuku mohou u potravin ovlivňovat např. tvorbu disperze, emulgaci, pevnost nebo měkkost výsledné potraviny. Z toho vyplývá, že mléčný tuk může ovlivnit reologické vlastnosti výsledné potraviny [3].



## 2 METODY STANOVENÍ MLÉČNÉHO TUKU

### 2.1 Gravimetrické stanovení podle Röse – Gottlieba

Metoda podle Röse – Gottlieba je brána jako metoda rozhodčí pro standardní stanovení mléčného tuku. Princip této metody spočívá v rozpuštění bílkoviny pomocí amoniaku a za přídavku etanolu dojde k narušení emulze mléčného tuku. Směsí ethyléteru a petroléteru je tuk vyextrahován a po odstranění rozpouštědel je stanoven vázkově [23].

Do Mojonnierova extrakčního přístroje (viz Obrázek 3) se diferenčně naváží 10 – 11 g mléka s přesností na 0,0002 g, přidá se 1,4 ml 25 % amoniaku a dobře se vzniklý roztok promíchá. Poté se přidá 10 ml 96 % etanolu a roztok se znovu důkladně promíchá. Ke směsi se přidá 25 ml ethyléteru, po uzavření přístroje zátkou je směs znovu promíchána. Nato se přidá 25 ml petroléteru a vzniklá směs se opět promíchá. Přístroj se ponechá v klidu jednu hodinu pro oddělení vrstev. Vzniklá horní éterová vrstva s přítomným tukem se převede do extrakční baňky, která byla sušena po dobu jedné hodiny při  $102 \pm 2$  °C. Po převedení se opakuje extrakce za použití stejných rozpouštědel. Pro třetí extrakci se použijí rozpouštědla v množství 15 ml. Směs rozpouštědel se z baňky oddestiluje a poté se vyextrahovaný tuk suší při teplotě  $102 \pm 2$  °C. Stejným způsobem se provede slepý pokus s 10 ml vody [23].



Obrázek 3: Mojonnierův extrakční přístroj [25]

Výpočet pro zjištění obsahu tuku v procentech [23]:

$$x = \frac{[(b_1 - b) - (c_1 - c)]}{a} \cdot 100$$

kde a ... navážená hmotnost mléka [g]

b<sub>1</sub> ... hmotnost baňky + vyextrahovaný tuk [g]

b ... hmotnost baňky po odstranění vyextrahovaného tuku [g]

c<sub>1</sub> ... hmotnost baňky po provedení slepého pokusu [g]

c ... hmotnost baňky po provedení slepého pokusu a extrakci příp. zbytku petrol-etheru [g]

## 2.2 Acidobutyrometrické stanovení podle Gerbera

Stanovení podle Gerbera se používá jako provozní metoda, která spočívá v rozpuštění bílkovin působením kyseliny sírové za přídavku amylalkoholu.

Do butyrometru (viz Obrázek 4) se automatickou byretou odměří 10 ml 90 % kyseliny sírové ( $\rho = 1,817 \pm 0,003 \text{ g.cm}^{-3}$ ) a mléčnou pipetou 11 ml vytemperovaného mléka na  $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Mléko se opatrně navrství na kyselinu sírovou tak, aby nedošlo k jejich smísení. Nakonec se přidá 1 ml amylalkoholu ( $\rho = 0,808 - 0,818 \text{ g.cm}^{-3}$ ). Poté se butyrometr zazátkuje a prudce se promíchává, dokud nejsou rozpuštěny veškeré bílkoviny mléka. Po protřepání se butyrometr vloží do odstředivky tak, aby odstředivka byla rovnoměrně zatížená, a odstředí se čtyři minuty při plném počtu otáček. Po odstředění se butyrometry vloží do lázně o teplotě  $65 \text{ }^\circ\text{C}$ . Po uplynutí 3 – 5 minut je butyrometr připraven na odečtení obsahu mléčného tuku [23,24].

Obsah tuku stanovený acidobutyrometrickou metodou v 11 ml mléka (x) se převede na obsah tuku v g/100 g mléka (y) podle vzorce [23]:

$$y = \frac{x + 0,04}{1,04}$$



Obrázek 4: Butyrometr na mléko [25]

### 2.3 Turbidimetrické metody

Principem této metody je měření rozptýleného světla, které odráží mléčné tukové kuličky a kaseinové micely. Rušení kaseinových bílkovin se eliminuje přidávkem chelatačního činidla např. ethylendiamintetraoctovou kyselinou. Kromě přítomných bílkovin může ovlivňovat rozptyl světla i velikost tukových kuliček ta je ovšem minimalizována homogenizací vzorku. Míra rozptylu světla je přímo úměrná počtu tukových globulí a tedy přímo úměrná obsahu tuku. Zákal vzorku se měří při průchodu paprsku o určité vlnové délce přes vzorek do detektoru, kde je zaznamenáván stupeň rozptylu [5].

Jako multifunkční nástroj pro provádění této analýzy byl vyvinut přístroj Milko tester (viz Obrázek 5), který je vhodný pro rutinní analýzu mléka. Pro zajištění přesných výsledků je přístroj nutný kalibrovat pomocí referenčních metod – stanovení podle podle Röse – Gottlieba či acidobutyrometrické stanovení podle Gerbera. Pokud je přístroj správně kalibrován poskytuje výsledky s přesností na 0,05 % tuku. Přístroj kromě tuků umožňuje stanovit obsah bílkovin, sacharidů nebo některé vlastnosti jako např. hustotu nebo bod mrznutí [5].



Obrázek 5: Milkotester [26]

## 2.4 Infračervená spektroskopie

Podstata analýzy mléka pomocí spektroskopických metod spočívá v tom, že většina funkčních skupin absorbuje infračervené záření v určitých vlnových délkách, které poskytují v infračerveném spektru absorpční pásy vedoucí k následné identifikaci sloučenin. Analýza mléčného tuku je založena na absorpci infračerveného záření – CH skupinami mastných kyselin, které absorbují záření při vlnové délce  $3,48\ \mu\text{m}$  a karbonylové skupiny vázány v esterové vazbě absorbují při  $5,42\ \mu\text{m}$ . Naměřené hodnoty při absorpci – CH skupin by měly korelovat s naměřenými hodnotami gravimetrické referenční metody podle Röse – Gottlieba. Mléko pro infračervenou analýzu by mělo být homogenizováno, aby se předcházelo rozptylu infračerveného záření. Přístroje pro infračervenou analýzu musí být pravidelně kalibrovány podle referenčních metod jako je stanovení podle Röse – Gottlieba či stanovení podle Gerbera [5,27].

Infračervené spektrometry (viz Obrázek 6) se dnes běžně používají na výrobních linkách pro stanovení nejen koncentrace tuků, ale i bílkovin a laktózy. Velkoobjemové automatizované přístroje zvládnou analýzu 100 – 500 vzorků za hodinu. Součástí zařízení jsou homogenizátory pro snížení velikosti tukových kuliček pod  $1\ \mu\text{m}$ , aby se zabránilo rozptylu světla. Kromě mléka se infračervená spektroskopie používá k analýze mléčných výrobků např. zmrzlin, jogurtů nebo kojeneckých výživ. Spektroskopické techniky mají velkou výhodu oproti ostatním technikám, protože vzorky nevyžadují extrakci ani žádnou jinou složitou přípravu [27,28].



Obrázek 6: Infračervený spektrofotometr [29]

### 3 POUŽITÍ RAMANOVY SPEKTROSKOPIE PRO STANOVENÍ MLÉČNÉHO TUKU

#### 3.1 Ramanova spektroskopie

Ramanova spektroskopie je metodou molekulové vibrační spektroskopie, jejíž historie sahá do roku 1928, kdy tento jev poprvé experimentálně prokázal sir Chandrasekhara Venkata Raman. Ve skutečnosti byl Ramanův jev popsán již o pět let dříve rakouským fyzikem Smekalem [30].

K samotnému experimentu C. V. Raman použil sluneční světlo jako zdroj záření pro detekci kapalného  $\text{CHCl}_3$ . Za svůj přínos v oblasti fyziky obdržel v roce 1930 Nobelovu cenu. Pokrok ve vývoji Ramanovy spektroskopie přišel až s rozvojem přístrojového vybavení včetně laserových zdrojů a detekčních systémů [31,32].



Obrázek 7: C. V. Raman [33]

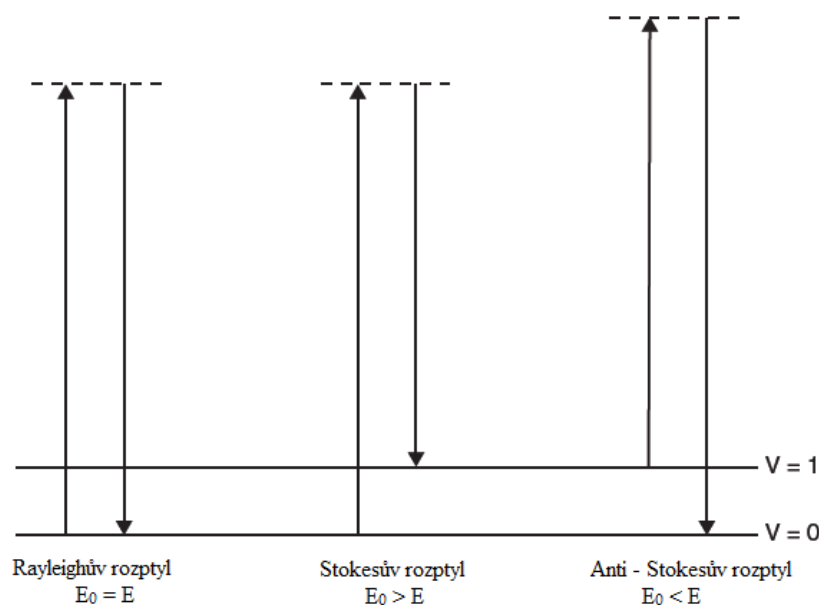
Spektroskopické metody využívají přechodů mezi energetickými hladinami látky, které jsou indukované elektromagnetickým zářením o různé vlnové délce  $\lambda$ , energii  $E$  a frekvenci  $\nu$ . Frekvence ( $\nu$ ) elektromagnetického záření je spojena s přechodem mezi dvěma energetickými hladinami ( $\Delta E$ ) a je dána vztahem [34]:

$$\Delta E = h \cdot \nu$$

Kde  $h$  je Planckova konstanta

Ramanova spektroskopie je metoda, která využívá vzorkem rozptýleného monochromatického záření, jež může pocházet ze spektra blízké ultrafialové, viditelné nebo blízké infračervené oblasti. Při interakci monochromatického záření s molekulou dojde k rozptylu světla, který může být pružný nebo nepružný. Pružný rozptyl elektromagnetického záření má stejnou frekvenci a tedy i stejnou energii jako dopadající záření. Tento jev je známý jako Rayleighův rozptyl. Nepružný rozptyl je doprovázen posunem frekvence fotonů v důsledku excitace nebo deaktivace molekulárních vibrací, ve kterých foton může pojmout část energie nebo ji část ztratit. Jestliže dopadající záření má vyšší energii než rozptýlené záření dochází k tzv. anti – Stokesově rozptylu, v případě, že dopadající záření má nižší energii, jedná se o tzv. Stokesův rozptyl [34,35].

Anti – Stokesův rozptyl je méně intenzivnější, než Stokesův, protože jen malé množství molekul se nachází při pokojové teplotě ve vyšší vibrační hladině. Proto intenzita Anti – Stokesových linií v oblasti spektra je menší než ve Stokesově oblasti [36,37].



Obrázek 8: Rozptyly světla [32]

Ramanův rozptyl molekul způsobuje přechody mezi rotačními a vibračními stavy, které vedou ke změně polarizovatelnosti funkčních skupin, což způsobuje, že jsou molekuly aktivní v Ramanově spektru. Nepochárny skupiny jako je např.  $C = C$ ,  $C - C$  a  $S - S$  poskytují intenzivní pásy v Ramanově spektru. Valenční  $O - H$  vibrace vykazuje velmi slabý Rama-

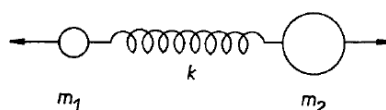
nův rozptyl, protože – OH vazba je jen slabě polarizovatelná. Z tohoto důvodu se polární molekula vody v Ramanově spektru neprojeví. A proto je Ramanova spektroskopie vhodná ke studiu biologických systémů včetně potravin, které obsahují vysoké množství vody [30,37,38,39].

### 3.1.1 Vibrace molekul

Molekulární spektroskopie je složitější a zahrnuje rotační, vibrační a elektronické přechody [34].

#### 3.1.1.1 Vibrace dvouatomové molekuly

Vibraci dvouatomové molekuly si můžeme představit na jednoduchém mechanickém modelu, ve kterém jsou dva body o hmotnosti  $m_1$  a  $m_2$  spojené pružinou (viz Obrázek 9) [36]:



Obrázek 9: Vibrace dvouatomové molekuly [36]

Jakmile se pružina stáhne a vzápětí uvolní dojde k vibraci bodů, které vykonávají harmonický pohyb. Jakákoliv dvojice vázaných atomů v molekule vykazuje přirozené kmitání a vibraci při určité frekvenci, pro kterou platí rovnice odvozená od Hookova zákona [36,37]:

$$v = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

Kde  $k$  ... je silová konstanta [ $\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$ ]

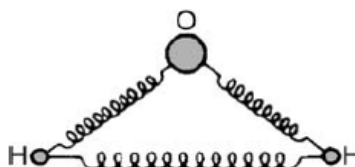
$\mu$  ... redukovaná hmotnost vibrující atomů [kg]

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$$



### 3.1.1.2 Vibrace víceatomových molekul

Vibrační pohyb víceatomové molekuly si můžeme představit jako mechanický model, který je složen z množiny hmotných bodů o různých hmotnostech. Tyto hmotné body jsou propojeny pružinami, které představují síly, jenž mezi jednotlivými body působí. Na obrázku 10 je vidět, jak by vypadal mechanický model pro molekulu vody [40].



Obrázek 10: Mechanický model pro molekulu vody [40]

Při pohledu na tento jednoduchý model je zřejmé, že pokud bude jeden z hmotných bodů ovlivněn, je velmi pravděpodobné, že celá molekula projde velmi komplikovanými pohyby tzv. Lissajousovy pohyby, které se skládají z ohýbání úhlů a protahování vazeb [40].

V molekulách mohou nastat vibrace vnitřní molekulární vazby nebo mezi molekulami molekulární vibrace. Většina těchto vibrací vede k posunu Ramanových pásů ve spektru blízké infračervené oblasti, která je pak charakteristická pro určité skupiny. Počet vibračních skupin je odvozen od počtu atomů v molekule a také závisí na tvaru molekuly [32,36].

Základním charakteristickým rysem jednotlivých vazeb v molekule jsou vibrace. Vibrace (viz Obrázek 11) můžeme rozdělit [41]:

→ valenční – dochází ke změně délky vazby

➤ valenční vibrace může být:

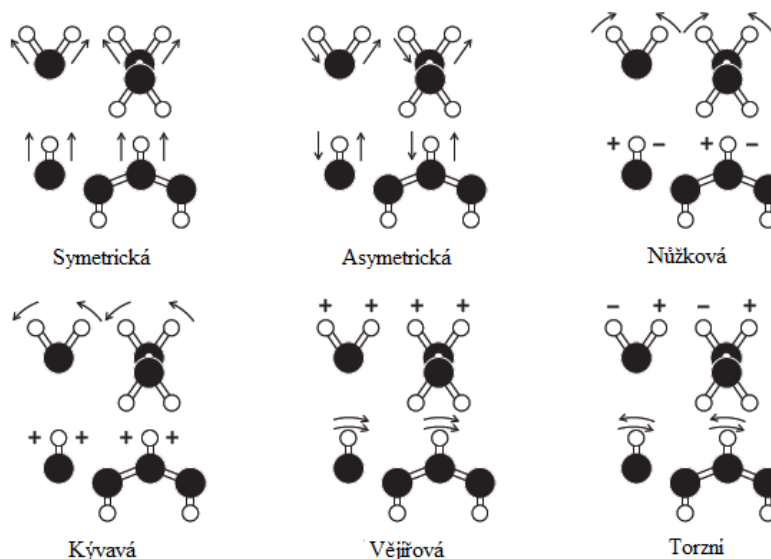
- symetrická – vazby vibrují souhlasně
- asymetrická – vazby vibrují proti sobě

→ deformační – dochází ke změně vazebných úhlů

➤ deformační vibrace můžou být:

- rovinné – probíhají v rovině molekuly

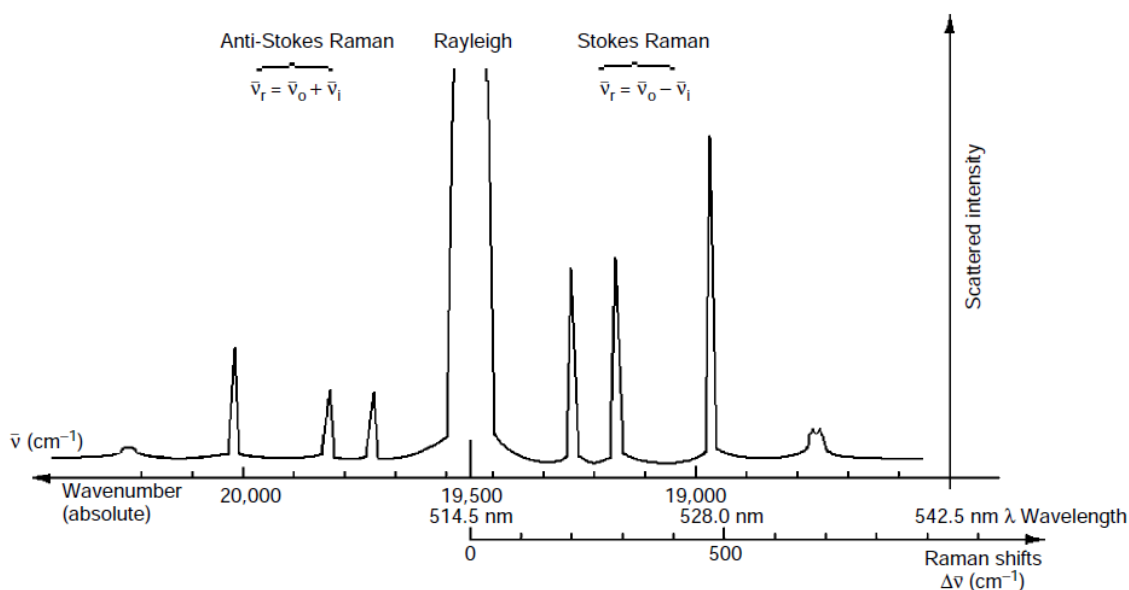
- mimorovinné – probíhají mimo rovinu molekuly



Obrázek 11: Základní vibrace CH<sub>2</sub> vazby [32]

### 3.2 Ramanova spektra

Ramanovo spektrum (viz Obrázek 12) je získáno ozářením vzorku laserovým paprskem o určité frekvenci  $\nu_0$  a intenzita rozptýleného záření je pak změřena jako frekvence  $\nu_i$ . Většina z elasticky rozptýleného záření je odfiltrována a zbylé neelastické tvoří spektrum. Výsledné spektrum je složeno z mnohem slabších pásů, které jsou na nižší frekvenci  $\nu_0 - \nu_i$  interpretovány jako Stokesovy pásy. Posun frekvence  $\nu_0 - \nu_i$  je nezávislý na původním záření  $\nu_0$  a odpovídá vibrační frekvenci molekuly ve vzorku. Ve spektru se můžou projevit i slabší pásy o frekvenci  $\nu_0 + \nu_i$  označované jako anti – Stokesovy pásy. Tyto pásy jsou však pozorovány jen velmi zřídka vzhledem k jejich velmi nízké intenzitě [27].



Obrázek 12: Schematické znázornění Ramanova spektra [27]

Pásky pozorované ve spektrech představují vibrační charakteristiky chemických vazeb a funkčních skupin, kterými jsou tvořeny zkoumané vzorky. Ramanovo spektrum zaznamenává Ramanův posun, který může být v rozsahu  $4000 - 5 \text{ cm}^{-1}$ . Oblast v rozmezí  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$  je aktivní především pro vibrace organických molekul, zbylá oblast  $400 - 5 \text{ cm}^{-1}$  je typická pro vibrace oxidů kovů, které jsou důležité např. pro průmysl nátěrových hmot [32,35,42].

### 3.3 Zesílení Ramanova signálu

Intenzita Ramanova signálu je poměrně slabá, proto bylo vypracováno několik technik pro jeho zesílení [32].

#### 3.3.1 Rezonanční Ramanova spektroskopie (RRS)

Intenzita molekuly může být výrazně zvýšena použitím laseru, jehož frekvence záření se téměř shoduje s frekvencí elektronického přechodu molekul. V průběhu procesu se elektron dostane do excitovaného elektronového stavu, po kterém následuje uvolnění na vibrační úroveň základního elektronického stavu. Hlavní výhodou tohoto zesílení je zvýšená citlivost pro specifické molekuly. Na druhou stranu to může mít i nevýhodu v tom, že je

výsledné spektrum zaměřeno na konkrétní molekuly a slabší rozptyly ve směsi nemusí být detekované [32,34].

### 3.3.2 Povrchově zesílená Ramanova spektroskopie (SERS)

Jedná se o techniku při které je Ramanův signál molekuly posílen tím, že je molekula vzorku adsorbována na určitý substrát. Výběr substrátu je důležitý pro zajištění maximálního SERS účinku, většinou jsou používány ušlechtilé kovy jako např. zlato nebo stříbro. Na zesílení účinku se podílejí dva mechanismy a to elektromagnetický a chemický. V chemickém mechanismu dochází ke zvýšení polarizovatelnosti molekul díky silné interakci se zdrsňeným povrchem kovu. Elektromagnetický mechanismus je závislý na specifických vlastnostech substrátu (velikost, tvar, materiál, drsnost), které určují rezonanční frekvenci elektronů v kovovém substrátu. Na kovový substrát dopadá elektromagnetické záření o stejné frekvenci a tím dojde ke zvýšení elektrického pole. Substráty pro SERS se většinou připravují před provedením analýzy z důvodu jejich rychlé degradace. Typickým substrátem je kov ve formě koloidních částic, který je získán redukcí kovových solí za kontrolovaných podmínek. Druhou variantou přípravy je tzv. naprašování, což je příprava substrátu pomocí laserové ablace. Třetí možností jak vytvořit drsný kovový povrch je založený na elektrochemickém procesu, který převede elektrodu několika oxidačně – redukčními procesy na SERS substrát. Výhodou použití SERS je posílení Ramanova signálu, avšak tato metoda má i své nevýhody. Jednou z nevýhod je příprava substrátu, která je kritickým bodem pro získání dobrého SERS spektra. K přípravě musí být použity čisté chemikálie, pokud by byly přítomné kontaminující látky, mohly by změnit vlastnosti vyrobeného povrchu nebo ovlivnit výsledné spektrum vlastním signálem. Získaná SERS spektra se většinou nedají srovnávat se standardními Ramanovými spektry, z důvodu zesíleného signálu, což vede ke složitému přiřazování spektrálních pásů [32,43].

## 3.4 Výhody a nevýhody Ramanovy spektroskopie

Ramanova spektroskopie nevyžaduje téměř žádnou přípravu vzorku a tím se řadí mezi časově nenáročnou metody. Ramanovo spektrum je získáno během pár sekund na rozdíl od standardních technik. Měření se nesespecifikuje na určitou oblast charakteristickou pro jednu složku, ale je možné změřit více složek najednou. Metoda umožňuje posuzovat širokou škálu vzorků, různých povah od pevného, kapalného až po plynné skupenství. Analýza nevyžaduje použití chemických činidel a tím nevzniká žádný odpad, a nevzniká tak mož-

nost ohrožení zdraví pracovníka provádějící rozbor a znečištění životního prostředí. Při měření nedochází ke kontaktu se vzorkem, z čehož vyplývá, že se jedná o bezkontaktní a nedestruktivní metodu. V důsledku použití nižších vlnových délek má Ramanova spektroskopie potenciál lepšího prostorového rozlišení a tím i možnost konfokality tzn. zaměřit se na různé roviny pod povrchem vzorku. Například je možné změřit potravinu v obalovém materiálu, aniž by došlo k poškození vnitřní atmosféry, a získat tak čisté spektrum měřené potraviny. Díky slabému Ramanovu rozptylu je možné měřit potraviny s vysokým obsahem vody, aniž by docházelo k rušení ve výsledném spektru [44,45].

I přesto, že Ramanova spektroskopie poskytuje velké množství výhod, přináší i několik nevýhod. Jedním z nich je fluorescence, která je doprovodným jevem u většiny laserových technik. Řešením je použití blízkého infračerveného laseru s excitací při 1064 nm, nebo použití metod se zvýšeným Ramanovým signálem a to RRS nebo SERS, které byly popsány v kapitole 3.3. Další nevýhodou je používání výkonných laserů, které mohou produkovaným teplem změnit nebo dokonce zničit měřený vzorek. Použití intenzivních UV laserů, může vyvolat fotochemickou degradaci vzorku [30,39].

### **3.5 Stanovení mléčného tuku pomocí Ramanovy spektroskopie**

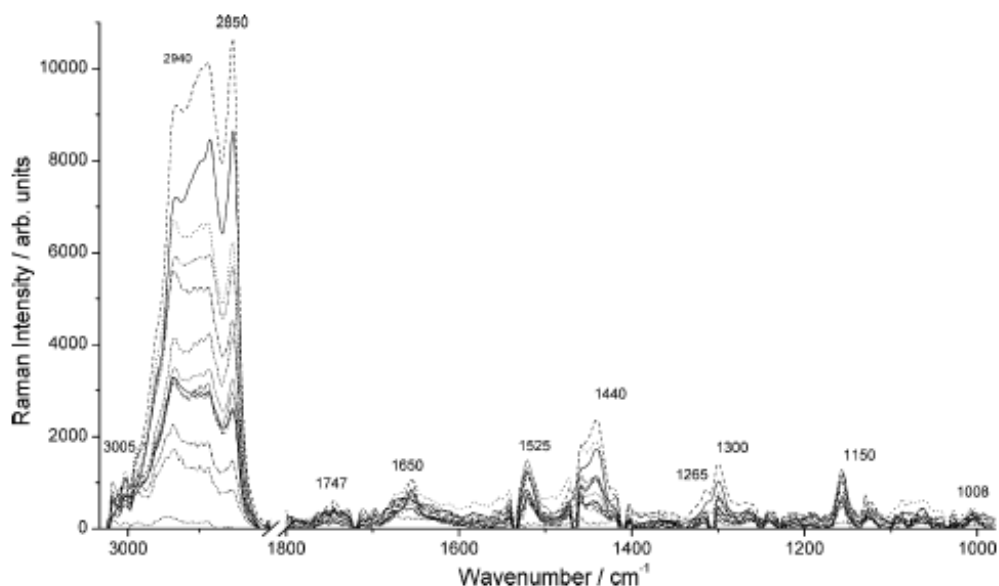
Ramanova spektroskopie byla v posledních letech rozšířena i do odvětví analýzy potravin, avšak pro analytická stanovení v mlékárenském průmyslu není zatím zcela běžně využívána. Složení mléka je v mlékárenském průmyslu velmi důležitý faktor. Informace o obsahu tuku, bílkovin a sacharidů musí být spolehlivé, protože tyto komponenty jsou indikátory kvality mléka. Vzhledem k tomu, že mléko je z velké části složeno z vody, která poskytuje slabý Ramanův rozptyl, jak bylo popsáno v kapitole 3.1, díky tomu by tato metoda mohla být vhodná pro stanovení mléčného tuku. Výsledný Ramanův rozptyl poskytuje přístup k vibračním „otiskům prstů“ přítomných molekul a tím tak umožňuje získat cenné informace o jejich vlastnostech a struktuře [45,46].

K výrazným vrcholům pozorovaným v Ramanově spektru mléka je možné z dříve publikovaných studií přidělit známé pásy o určitých vlnočtech typické pro bílkoviny, sacharidy nebo tuk. Vzhledem k tomu, že membránu tukových kuliček spolu s lipidy tvoří i bílkoviny, je možné že ve výsledném spektru dojde k překrytí některých lipidových pásů, bílkovinnými pásy [46,47].

Region pásů v rozmezí  $1700 - 1000 \text{ cm}^{-1}$  je smíšený, ve kterém jsou obsaženy vibrační pásy mastných kyselin, proteinů a polysacharidů (např.  $\text{C} = \text{O}$  valenční vazba z amidové I skupiny,  $\text{C} = \text{C}$  valenční vazba,  $\text{N} - \text{H}$  ohýbaná vazba z amidové II. skupiny). Oblast v rozmezí  $1200 - 800 \text{ cm}^{-1}$  je typická pro polysacharidy, nicméně i píky o nižších vlnočtech  $355$  a  $455 \text{ cm}^{-1}$  jsou charakteristické pro laktózu [38,47].

Pomocí Ramanovy spektroskopie je možné rozpoznat většinu chemických vazeb v bílkovinách, které jsou tvořeny amidovými skupinami, které se vyskytují v devíti základních módech. Vibrační módy aminokyselinových řetězců  $\text{S} - \text{S}$ ,  $\text{S} - \text{H}$  skupiny obsažené v cysteinu, cystinu, v aromatických jádrech tryptofanu, tyrosinu nebo fenylalaninu. Tyto skupiny mohou být detekovatelné v oblasti  $500 - 550 \text{ cm}^{-1}$  a  $2550 - 2580 \text{ cm}^{-1}$ . Pás v oblasti  $830 - 850 \text{ cm}^{-1}$  je typický pro tyrosin, dalším významným pásem o vlnočtu  $1006 \text{ cm}^{-1}$  je fenylalanin. Vibrace na vlnočtu  $860 - 920 \text{ cm}^{-1}$  může zahrnovat až tři vazby  $\nu(\text{C} - \text{C})$ ,  $\nu(\text{C} - \text{O})$  a  $\text{CH}_3$  ohýbanou, tyto vazby jsou součástí aminokyselin. Pík  $3060 \text{ cm}^{-1}$  je přisuzován vazbě  $\nu(\text{N} - \text{H})$  [38,47,48].

V Ramanově spektru jsou pozorovány charakteristické pásy lipidů, které se vztahují k přítomnosti uhlovodíkového řetězce. Spektrum lipidů je možné rozdělit do třech oblastí o vlnočtu:  $1500 - 1400 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1300 - 1250 \text{ cm}^{-1}$  a  $1200 - 1050 \text{ cm}^{-1}$ . Pásy o vlnočtu  $1500 - 1400 \text{ cm}^{-1}$  jsou charakteristické pro nůžkovou a torzní vibraci  $\text{CH}_2$  a  $\text{CH}_3$ , pásy o vlnočtu  $1200 - 1050 \text{ cm}^{-1}$  jsou přičítány valenční  $\text{C} - \text{C}$  vibraci. Kromě těchto zmíněných pásů je velmi intenzivní skupina pásů ve vyšším rozsahu vlnového čísla a to  $3100 - 2800 \text{ cm}^{-1}$ , které lze přiřadit valenční vibraci  $\text{C} - \text{H}$  [49].



Obrázek 13: Ramanovo spektrum mléka s různou koncentrací tuku [45]

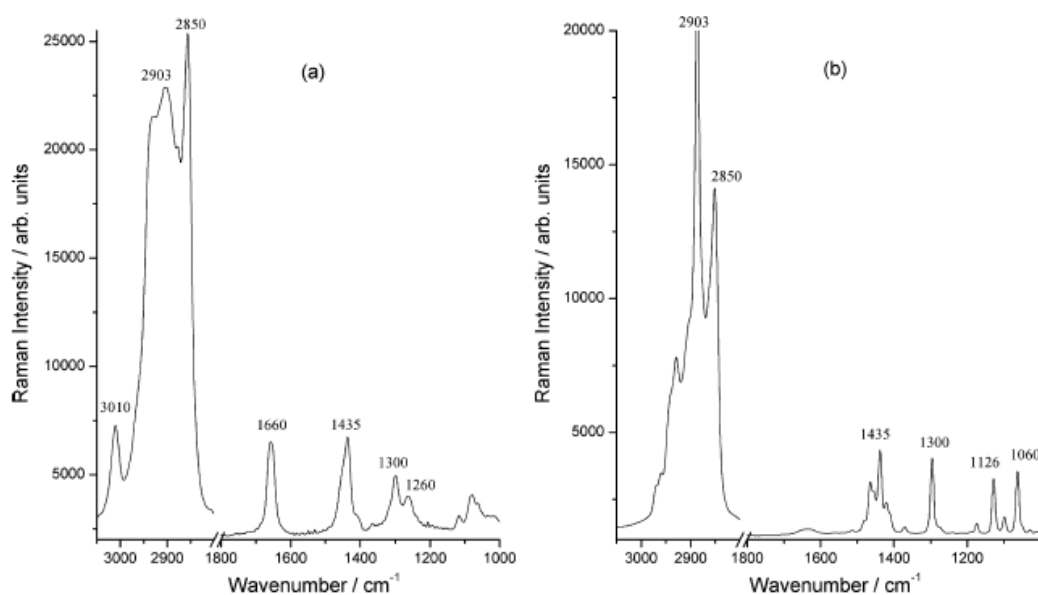
Na obrázku 13 je zobrazeno naměřené Ramanovo spektrum mléka s různými koncentracemi mléčného tuku. Nejvyšší naměřená intenzita odpovídá mléčnému tuku o koncentraci 4,0 % a nejnižší náleží koncentraci 0,3 % [45].

Výrazné vrcholy jsou vidět při vlnočtu  $1650\text{ cm}^{-1}$  což odpovídá  $\nu(\text{C}=\text{C})$  valenční *cis* dvojně vazbě pocházející z  $\text{RHC}=\text{CHR}$ .,  $1440\text{ cm}^{-1}$   $\delta(\text{C}-\text{H})$  nůžková vazba z  $-\text{CH}_2$  obsažená v nasycených mastných kyselinách,  $1265\text{ cm}^{-1}$   $\delta(\text{C}-\text{H})$  ohýbaná vibrace pocházející z *cis* dvojně vazby  $\text{R}-\text{CH}=\text{CH}-\text{R}$ ,  $1083\text{ cm}^{-1}$  ohýbaná  $\text{CH}_3$  vibrace,  $1300\text{ cm}^{-1}$   $(\text{C}-\text{H})$  kroutivá vibrace vazby  $-\text{CH}_2$  která je charakteristická nízkým stupněm nasycení. Vibrace o vlnočtu  $1747\text{ cm}^{-1}$   $\nu(\text{C}=\text{O})$  valenční vibrace z vazby  $\text{RC}=\text{OOR}$ . Tři pásy okolo  $1008\text{ cm}^{-1}$  (ohýbaná vibrace z  $\text{C}-\text{CH}_3$ ,  $1150\text{ cm}^{-1}$   $\nu(\text{C}-\text{C})$  a pás při vlnočtu  $1525\text{ cm}^{-1}$  jsou připisovány karotenoidům, které jsou přítomny pouze ve stopových množstvích, ale hrají důležitou roli jako antioxidanty jak bylo uvedeno v kapitole 1.1.6. Nejvýraznější píky o vlnočtech  $2850\text{ cm}^{-1}$  a  $2940\text{ cm}^{-1}$  jsou charakteristické pro symetrické a asymetrické valenční vibrace  $\nu(\text{C}-\text{H})$ . Pás o vlnočtu  $2940\text{ cm}^{-1}$  reprezentuje asymetrickou valenční vibraci  $\text{H}-\text{C}$ , a pás o vlnočtu  $2850\text{ cm}^{-1}$  charakterizuje symetrickou valenční vibrace  $\text{H}-\text{C}$ . Pás o vlnočtu  $3005\text{ cm}^{-1}$  je typická nůžková vibrace skupiny  $=\text{C}-\text{H}$  [44, 45,46].

Pás o vlnočtu  $845 - 895 \text{ cm}^{-1}$  je poměrně široký vzhledem k tomu že se v něm překrývají různé polární skupiny komplexní směsi fosfolipidů. Pík o vlnočtu  $860 \text{ cm}^{-1}$  byl přiřazen kyselině fosfatidové a vibrace o vlnočtu  $875 \text{ cm}^{-1}$  cholinu [46].

Rozptyly intenzit o vlnočtu  $2856, 1748, 1437 \text{ cm}^{-1}$  vykazují vysokou korelaci s obsahem mastných kyselin [48].

Při stanovení mléčného tuku je důležitý pík o vlnočtu  $1650 \text{ cm}^{-1}$ , který odpovídá valenční *cis* dvojně vazbě. Tato vibrace odpovídá kyselině olejové, která tvoří mléčný tuk až z 29 %. Další výrazný pík je u vrcholu  $1440 \text{ cm}^{-1}$ , kterému je přiřazena nůžková vibrace  $\text{CH}_2$  a pod tímto píkem můžeme hledat např. kyselinu palmitovou, stearovou i již zmíněnou kyselinu olejovou. Na obrázku 14 je uvedeno Ramanovo spektrum čisté kyseliny olejové a palmitové. Pík o vlnočtu  $1747 \text{ cm}^{-1}$  je charakteristický pro vazbu esterovou  $\text{C} = \text{O}$ , která je součástí všech triacylglycerolů zastoupených v mléčném tuku z 98 % [45].



Obrázek 14: Ramanovo spektrum kyseliny olejové (a), kyseliny palmitové (b) [45]

Pás při vlnočtu  $1650 \text{ cm}^{-1}$  je specifický pro konjugovanou linolovou kyselinu. Při experimentálních měření byl tento pás pozorován na vlnočtu  $1658 \text{ cm}^{-1}$ , který přísluší dvěma *cis* izomerům této mastné kyseliny. Pás v blízkosti  $1670 \text{ cm}^{-1}$  odpovídá *trans* izomerům a  $1654 \text{ cm}^{-1}$  připadá na *cis* izomery konjugované kyseliny linolové, většinou se tyto dva pásy



překrývají a tvoří jeden pík v této oblasti o vlnočtu  $1658\text{ cm}^{-1}$ , který je typický pro kyselinu linolovou, vibrace odpovídá dvěma nenasyceným vazbám ( $C_9 = C_{10}$  a  $C_{12} = C_{13}$ ) [11].

Z doposud naměřených Ramanovských spekter čistých lipidů je patrné, že oblast o vlnočtu  $400 - 1800\text{ cm}^{-1}$  je vhodnější pro identifikaci lipidů než oblast  $2700 - 3500\text{ cm}^{-1}$ , která obsahuje silně překrývající se široké Ramanovy pásy valenčních vibrací CH, NH a OH skupiny [46].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 4 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo stanovit obsah tuku ve vzorcích mléka s rostoucím podílem tuku pomocí Ramanovy spektroskopie. Pro vyhodnocení naměřených spekter bylo nutné stanovit tučnost vzorků konvenčními laboratorními metodami, a to metodou extrakční a butyrometrickou.

Cíle práce lze rozdělit na dvě hlavní části:

Teoretická část:

- Charakterizovat mléčný tuk a jeho obsah v mléku a mléčných výrobcích
- Vytvořit přehled používaných metod pro stanovení mléčného tuku
- Popsat princip Ramanovy spektroskopie a její použití pro stanovení mléčného tuku

Praktická část:

- Navrhnout a připravit vzorky s rostoucím podílem tuku
- Naměřit Ramanova spektra připravených vzorků
- Stanovit obsah tuku ve vzorcích gravimetrickou a acidobutyrometrickou metodou
- Ověřit ve vzorcích množství bílkovin resp. fenylalaninu
- Vyhodnotit spektra a diskutovat výsledky

## 5 MATERIÁL A METODY

### 5.1 Použité materiály a chemikálie

- Odtučněné mléko – K – Classic, vyrobeno pro Kaufland, ČR
- Polotučné mléko – K – Classic, vyrobeno pro Kaufland, ČR
- Plnotučné mléko - K – Classic, vyrobeno pro Kaufland, ČR
- Smetana – K – Classic, vyrobeno pro Kaufland, ČR
- Amoniak – IPL, Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod
- Etanol – Tereos TTD, a.s., Lihovar Kojetín
- Diethyléter – Lach – Ner, s.r.o., Neratovice
- Petroléter – Lach – Ner, s.r.o., Neratovice
- Kyselina sírová – Lach – Ner, s.r.o., Neratovice
- Amylalkohol – PENTA s.r.o., Ing. Petr Švec, Praha
- HCl – p.a. ZMBD Chemik s.r.o.
- Citronová kyselina – Lach – Ner, s.r.o., Neratovice
- Citran sodný – p.a. ZMBD Chemik s.r.o.
- Chlorid sodný – p.a. ZMBD Chemik s.r.o.
- Kyselina boritá – p.a. ZMBD Chemik s.r.o.
- Azid sodný – p.a. ZMBD Chemik s.r.o.
- Hydroxid sodný – p.a. ZMBD Chemik s.r.o.
- Thioglykol – p.a. ZMBD Chemik s.r.o.
- Nindhydrin – p.a. ZMBD Chemik s.r.o.
- Methylcellosolv – p.a. ZMBD Chemik s.r.o.
- Hydrintantin – p.a. ZMBD Chemik s.r.o.
- Acetátový pufr – p.a. ZMBD Chemik s.r.o.

## 5.2 Použité přístroje

- Analytické váhy A&D GH – 200 EC
- Mojonnierův baňkový extraktor
- Vakuová rotační odparka LABOROTA 4010 DIGITAL
- Sušárna VENTICELL, BMT Brněnská Medicínská Technika a.s.
- Butyrometr podle ČSN 25 7631
- Pipeta 11 ml na mléko – ČSN 70 4121
- Odstředivka na tukoměry GERBER INSTRUMENTS MICRO II
- Vodní lázeň FUNKE GERBER – WD436D
- Automatický analyzátor aminokyselin AAA 400, Ingos, Praha
- Termoblok EVATERM
- Ramanův spektrometr Renishaw in Via Basis
- Laboratorní sklo

## 5.3 Charakteristika vzorku

Pro přípravu modelových vzorků bylo použito mléko a smetana ze stejného sortimentu, které před plněním do spotřebitelských obalů prošly technologickým procesem homogenizace a UHT ošetřením. V obchodní síti bylo zakoupeno odstředěné, polotučné, plnotučné mléko a smetana. Na obalech jednotlivých výrobků byly výrobcem udány informace o výživových hodnotách (viz Tabulka 3).

Tabulka 3: Přehled výživových hodnot u jednotlivých výrobků

Výrobek	Obsah tuku [%]	Z toho mastné kyseliny [%]	Bílkoviny [%]	Sacharidy [%]
	ve 100 ml			
Odstředěné mléko	0,5	0,3	3,3	4,9
Polotučné mléko	1,5	0,9	3,3	4,9
Plnotučné mléko	3,5	2,0	3,3	4,4
Smetana	10,0	5,9	3,3	4,3

## 5.4 Příprava vzorků

Na základě informací poskytnutých výrobcem byla vytvořena řada vzorků s rostoucím obsahem tuku, která byla připravena smícháním odstředěného, polotučného a plnotučného mléka. Předpokládaná koncentrační řada měla obsahovat koncentrace od 0,5 – 3,5 % obsahu tuku s kroky po 0,5 %. Avšak po proměření vzorků metodou podle Röse – Gottlieba, která v této práci slouží jako referenční, bylo zjištěno, že odstředěné mléko má ve skutečnosti jinou koncentraci, než bylo uvedeno na obale výrobku. Naměřené koncentrace jsou uvedeny v kapitole 6.1 a 6.2. V tabulce 4 jsou uvedeny předpokládané a skutečné koncentrace vzorků.

Pro gravimetrické a acidobutyrometrické stanovení mléčného tuku byly vzorky před samotným stanovením vytemperovány na 40 °C a poté rychle zchlazeny na 20 °C.

Tabulka 4: Koncentrace mléčného tuku u jednotlivých vzorků

Předpokládaný obsah mléčného tuku [%]	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	10,0
Skutečný obsah mléčného tuku [%]	0,1	0,8	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	10,0

Vzorky určené pro měření na Ramanově spektrometru byly měřeny ve dvou formách - přímo v kapalném vzorku mléka, tzn. bez jakékoliv předúpravy, a ve formě vysušené kapky. Jednotlivé vzorky byly nadávkovány ve formě kapek na hliníkovou destičku a při laboratorní teplotě byly sušeny do druhého dne.

## 5.5 Použité metody

### 5.5.1 Ramanova spektroskopie

K samotnému měření byl použit Ramanův spektrometr Renishaw in Via Basis (viz Obrázek 15), jehož součástí je i mikroskop Leica. K přístroji je připojen počítač se softwarem WIRE 3.0 pomocí, kterého je přístroj ovládán. Software zaznamenává naměřená data a následně poskytuje nástroje pro úpravu a vyhodnocování jednotlivých spekter.



Obrázek 15: Ramanův spektrometr

### Postup měření

Před začátkem měření bylo nejprve nutné zapnout přístroj a vyčkat přibližně 30 minut. Mezitím byl spuštěn počítač s programem WIRE 3.0. Po uplynutí požadované doby byla provedena kalibrace přístroje měřením křemíkové destičky. Jakmile byl přístroj připraven, bylo možné přejít k nastavení parametrů. Přístroj umožňuje volit tyto parametry:

- Laser – diodový – měřící v blízké infračervené oblasti při 785 nm
  - argonový – měřící při 514 nm
- Optická mřížka – 1200 l/mm
- Volitelný spektrální rozsah měření:
  - Static scan – rozsah měření 300 – 500  $\text{cm}^{-1}$
  - Extend scan – rozsah měření 300 – 1800  $\text{cm}^{-1}$
- Expoziční čas – doba, po kterou je detektor vystaven Ramanově signálu
- Akumulace – jedná se o počet opakování, který pomocí několika kratších měření vytvoří spektrum s výhodnějším poměrem signál/šum
- Objektiv – zvětšení pomocí objektivu vede k získání lepšího signálu

- mikroskop Leica disponuje objektivy pro 5x, 20x a 50x násobné zvětšení
- Výkon laseru – je procento maximálního výkonu laseru, který je použit pro měření, vyšší výkon poskytne lepší poměr signálu k šumu, ale může způsobit zničení vzorku v závislosti na čase expozice

Vzorek byl umístěn na hliníkovou podložku a vložen pod mikroskop. Povrch vzorku byl zaostřen a poté následovalo měření. Pro nalezení optimálního nastavení měření bylo nutné měnit čas expozice, počet akumulací a výkon laseru tak, aby byly získány co nejvýraznější spektra, tzn. takové kde je optimální poměr signál šum a spektrum není překryto fluorescencí vzorku, což u biologických materiálů často způsobuje použití argonového laseru.

Veškerá spektra vzorků v této práci byla naměřena za těchto podmínek:

- Zdroj světla – NIR laser 785 nm
- Výkon laseru – 100 %
- Použitý objektiv – 50x násobné zvětšení
- Spektrální rozsah – 300 – 1800  $\text{cm}^{-1}$
- Čas expozice – 10s
- Počet akumulací – 3

### 5.5.2 Gravimetrické stanovení podle Röse – Gottlieba

Postup stanovení podle této referenční metody byl popsán v teoretické části práce v kapitole 2.1.

Do Mojonnierova extrakčního přístroje bylo diferenčně odváženo 10 – 11 g mléka s přesností na 4 desetinná místa, poté byly přidány 2 ml 25 % amoniaku a vzniklá směs byla promíchána. Pak bylo přidáno 10 ml 96 % etanolu a opět důkladně promícháno. Poté následoval přídavek 25 ml diethyléteru a uzavření přístroje zátkou a mírné protřepání. Po jedno – minutovém protřepání bylo přidáno 25 ml petroléteru a opět byla směs mírně protřepána. Následně byl přístroj ponechán v klidu po dobu třiceti minut (viz Obrázek 16). Po oddělení vrstev byla horní éterová vrstva s přítomným tukem převedena do předem vysušené extrakční baňky. Poté následovala druhá a třetí extrakce stejným způsobem pouze s 15 ml diethyléteru a 15 ml petroléteru. Poté byla směs rozpouštědel ze vzorku odstraněna



pomocí vakuové odparky. Vzorek byl po vysušení při teplotě  $102 \pm 2$  °C zvážen. Stejným způsobem byl proveden slepý pokus, kde místo mléka byla použita voda.



Obrázek 16: Extrakce mléčného tuku

### 5.5.3 Acidobutyrometrické stanovení podle Gerbera

Postup stanovení této provozní metody byl podrobně popsán v teoretické části práce v kapitole 2.2.

Do butyrometru bylo pomocí automatické byrety nadávkováno 10 ml 90 % kyseliny sírové, poté bylo mléčnou pipetou odměřeno 11 ml mléka, které bylo opatrně navrstveno na kyselinu sírovou. Nakonec byl přidán 1 ml amylalkoholu. Butyrometr byl zazátkován a prudce protřepán. Poté byl vložen do odstředivky při 1000 ot./min. na 15 minut. Po odstředění byl butyrometr vložen do vytemperované lázně o teplotě 65 °C a po uplynutí 10 minut byl odečten obsah mléčného tuku.

### 5.5.4 Stanovení obsahu bílkovin

V potravinách se aminokyseliny vyskytují ve vázané nebo volné formě. Vázané aminokyseliny jsou ze struktury potravin uvolněny kyselou hydrolyzou. Během tohoto procesu jsou sírné aminokyseliny a tryptofan částečně nebo zcela zničeny. Pro vyhodnocování Ramonových spekter vzorků mléka v této práci není důležitý obsah cysteinu, methioninu ani tryptofanu. Proto před hydrolyzou nebylo nutné provádět oxidaci pro zachování těchto aminokyselin. Získané aminokyseliny byly detekovány pomocí iontově – výměnné kapalinové chromatografie na automatickém analyzátoru aminokyselin AAA 400 za použití postkolo-

nové ninhydrinové derivatizace a spektrofotometrické detekce (440 nm pro prolin a 570 nm pro ostatní aminokyseliny) [50].

50 mg vzorku bylo s přesností na 4 desetinná místa odváženo do vialky za přídavku 15 ml  $6 \text{ mol.l}^{-1}$  HCl. Pro vytěsnění přítomného vzduchu ze vzorku byl použit argon po dobu 1 minuty. Poté byly vzorky umístěny do termobloku, na dobu 23 hodin, který byl vyhříván na teplotu  $117 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Po ukončení hydrolyzy byla ze vzorku odpařena kyselina chlorovodíková a zbylá část byla zředěna pufrům v 25 ml odměrné baňce. Vytvořená směs byla filtrována přes 0,45 mm filtr. Uvolněné aminokyseliny byly stanoveny za použití iontově – výměnné chromatografie. Vzniklý hydrolyzát byl v množství 100  $\mu\text{l}$  vstříkovan do automatického analyzátoru aminokyselin AAA 400 vybaveného kolonou (370 x 3,7 mm, naplněná ionexem Ostion LG ANG – Ingos, Praha) s postkolonovou ninhydrinovou derivatizací a spektrofotometrickou detekcí (při 440 nm pro aminokyselinu prolin a 570 nm pro ostatní aminokyseliny). Následně byly aminokyseliny eluovány z kolony podle programu: 0 – 5 min pufr A, 5 – 32 min pufr B, 32 – 44 min pufr C, 44 – 75 min pufr D. Složení sodno – citrátových pufrů je uvedeno v tabulce 3. Poté byla kolona regenerována  $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$  roztokem NaOH po dobu 10 minut a stabilizována dalších 17 minut pufrům A. Teplota kolony byla nastavena na  $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (po dobu 0 – 60 min a 90 – 120 min) a na  $74 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (60 – 90 min).

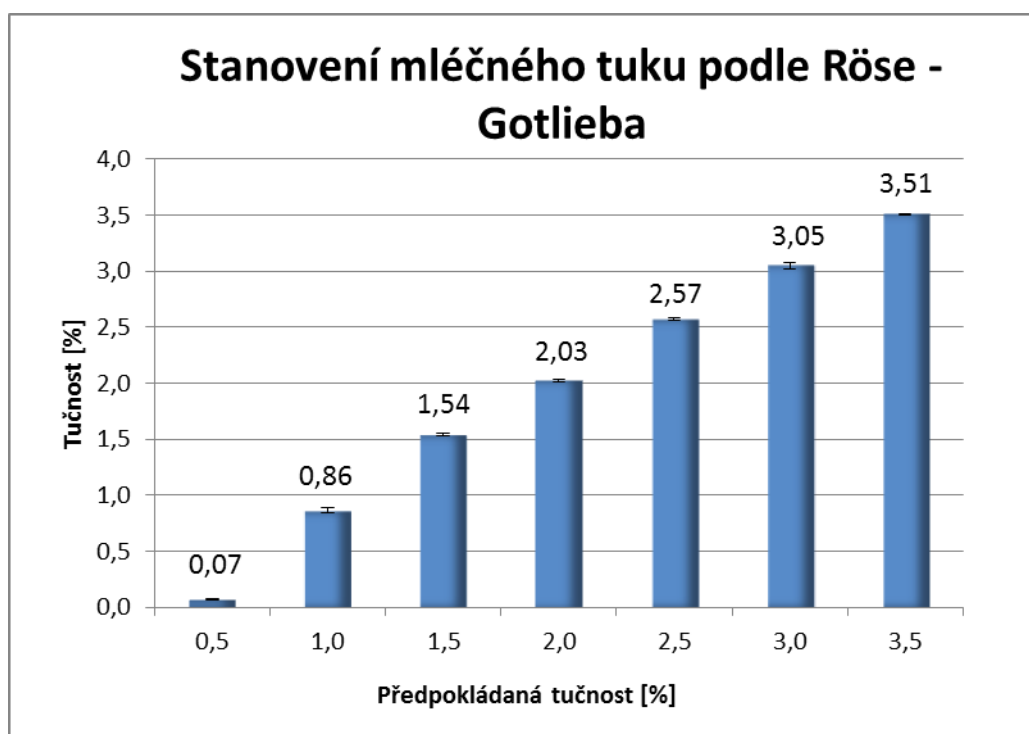
Tabulka 5: Složení [g] použitých sodno – citrátových pufrů na celkový objem 11

Chemikálie	Pufr				
	A	B	C	D	dávkovací pufr
Citronová kyselina - monohydrát	11,11	10,00	7,53	0	14,00
Citran sodný - dihydrát	4,04	5,60	9,06	19,60	0
Chlorid sodný	9,29	8,36	18,00	52,60	11,50
Kyselina boritá	0	0	0	2,05	0
Azid sodný	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Hydroxid sodný	0	0	0	0,50	0
Thioglykol [ml]	2,50	2,50	2,50	0	5,00

## 6 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 6.1 Stanovení mléčného tuku podle Röse – Gottlieba

Pro každou koncentraci z koncentrační řady bylo provedeno celkem šest extrakcí. Na základě naměřených hodnot byla vždy jedna odlehlá hodnota měření vyřazena pomocí Dixonova testu pro vyloučení extrémních hodnot u neznámého rozdělení, který je vhodný pro soubory s malým počtem hodnot. Naměřené hodnoty byly vyneseny do grafu (viz Obrázek 17).

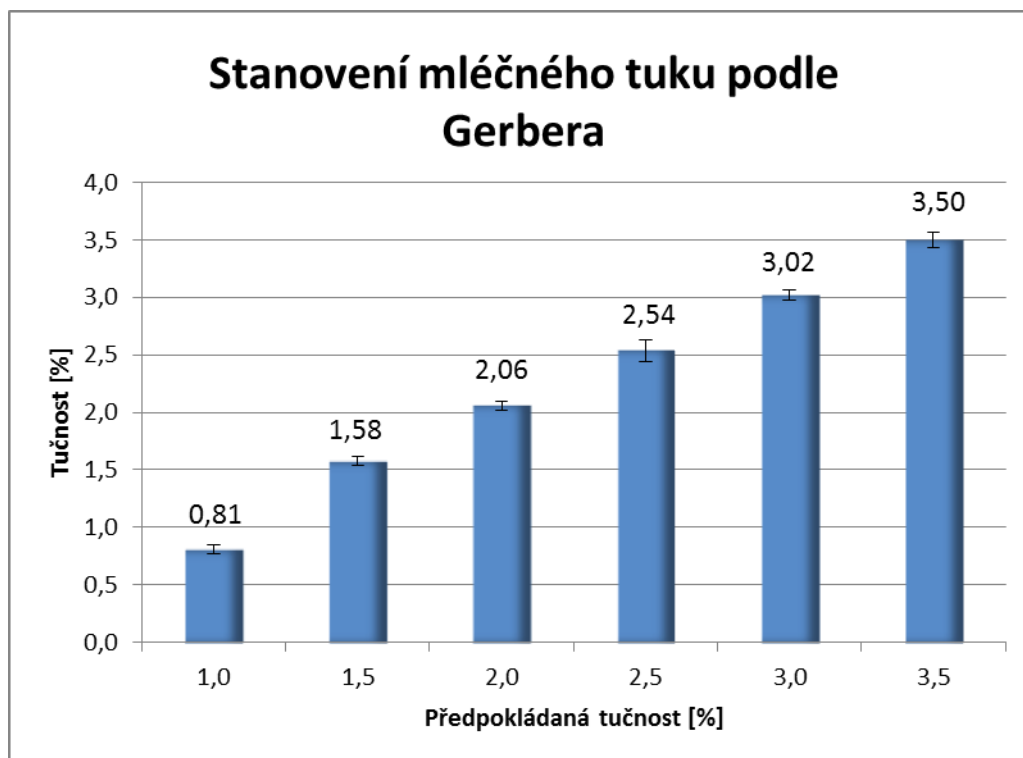


Obrázek 17: Naměřené hodnoty mléčného tuku podle Röse – Gottlieba

Předpokládaná koncentrační řada měla obsahovat koncentrace mléčného tuku od 0,5 – 3,5 % s kroky po 0,5 %. Po proměření jednotlivých vzorků metodou podle Röse - Gottlieba byl zjištěn skutečný obsah tuku u odtučněného mléka, které obsahovalo pouze 0,1 % tuku, což ovlivnilo obsah tuku v prvním a druhém vzorku. Vzhledem k tomu, že se tato metoda používá jako referenční, budou tyto hodnoty používány pro další vyhodnocování jako hodnoty určující skutečný obsah tuku ve vzorcích (viz Tabulka 4 – kapitola 5.2).

## 6.2 Stanovení mléčného tuku podle Gerbera

Stanovení acidobutyrometrickou metodou podle Gerbera bylo provedeno celkem čtyřikrát pro každou koncentraci z koncentrační řady. Naměřené hodnoty u jednotlivých koncentrací byly vyneseny do grafu (viz Obrázek 18).



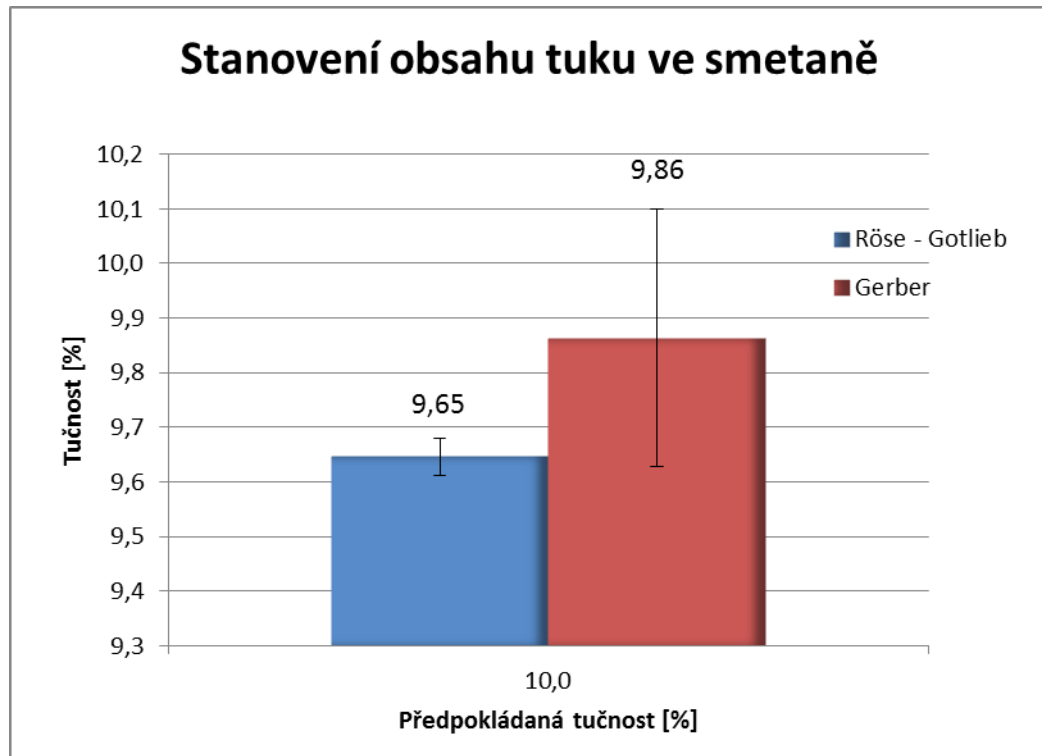
Obrázek 18: Naměřené hodnoty mléčného tuku podle Gerbera

Koncentraci 0,1 % mléčného tuku se acidobutyrometrickou metodou nepodařilo naměřit, pravděpodobně z důvodu velmi nízkého obsahu tuku. Tyto naměřené hodnoty mléčného tuku budou pro následující vyhodnocování také používány, ale jen jako doplňkové.

## 6.3 Stanovení mléčného tuku ve smetaně

Dalším měřeným vzorkem byla smetana s výrobcem deklarovanou tučností 10 % a obsahem bílkovin 3,3 %. Smetana byla pro měření vybrána jako mléčný výrobek s obsahem jednotlivých složek, které se nejvíce blíží vzorkům mléka a současně obsahuje vyšší množství mléčného tuku. Obsah tuku ve smetaně byl stanoven metodou podle Röse – Gottlieba a získaná hodnota odpovídala  $9,65 \pm 0,03$  % obsahu tuku ve vzorku. Metodou podle Gerbera

bylo stanoveno  $9,86 \pm 0,24$  % tuku ve vzorku. Naměřené hodnoty byly vyneseny do grafu (viz Obrázek 19).



Obrázek 19: Stanovení mléčného tuku ve smetaně

#### 6.4 Stanovení obsahu bílkovin

Obsah bílkovin resp. fenylalaninu byl stanoven pomocí iontově – výměnné kapalinové chromatografie (viz kapitola 5.3.4). V tabulce 6 je uveden obsah fenylalaninu, který byl naměřen ve vzorcích mléka a smetany, ze kterých byly získány jednotlivé vzorky s různým obsahem mléčného tuku. U odstředěného mléka bylo naměřeno  $1,44 \pm 0,013$  g.kg<sup>-1</sup>, v polotučném mléce  $1,42 \pm 0,015$  g.kg<sup>-1</sup> a v plnotučném mléce  $1,45 \pm 0,019$  g.kg<sup>-1</sup> fenylalaninu. Posledním zkoumaným vzorkem na obsah bílkovin byla smetana, ve které bylo zjištěno  $1,42 \pm 0,013$  g.kg<sup>-1</sup> fenylalaninu. Naměřené hodnoty se liší jen nepatrně, proto lze brát obsah fenylalaninu za konstantní.

Tabulka 6: Obsah fenylalaninu ve vzorcích mléka a smetany

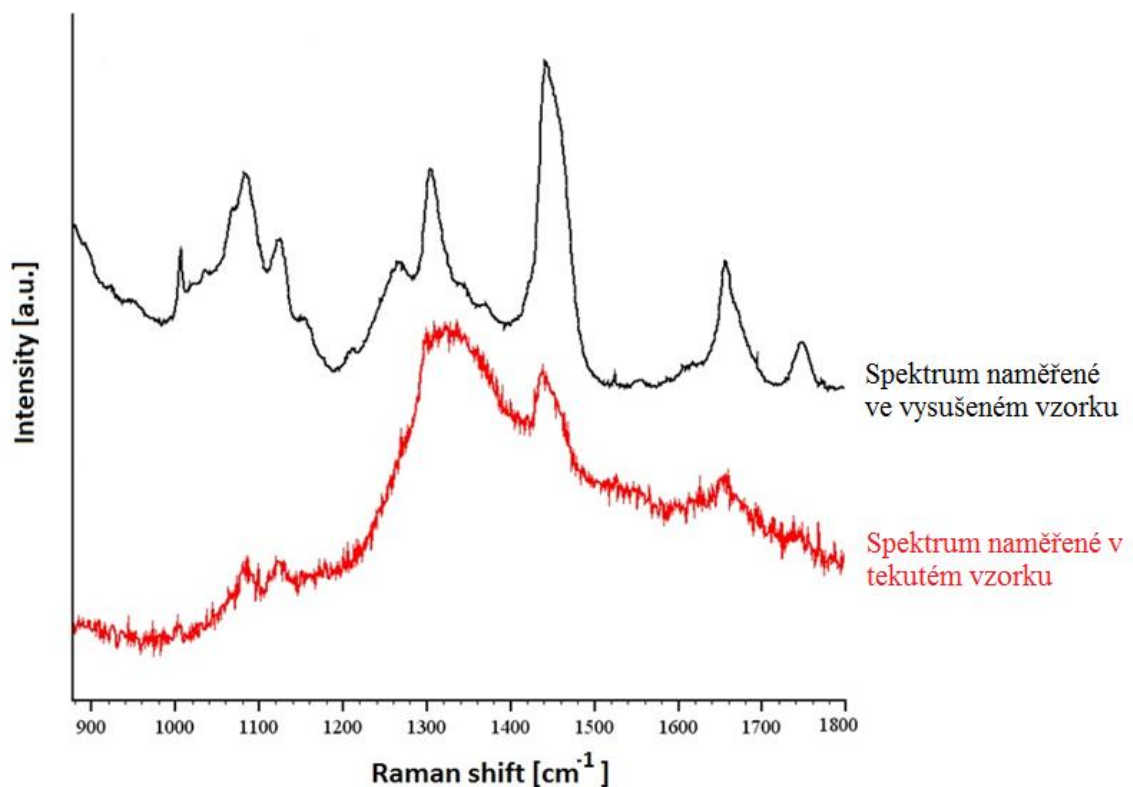
Vzorek	Fenylalanin [g.kg <sup>-1</sup> ]
Odstředěné mléko	1,44 ± 0,013
Polotučné mléko	1,42 ± 0,015
Plnotučné mléko	1,45 ± 0,019
Smetana	1,42 ± 0,013

## 6.5 Stanovení mléčného tuku pomocí Ramanovy spektroskopie

Měření probíhalo podle stanovených parametrů, které jsou uvedeny v kapitole 5.3.1. Software WIRE 3.0 obsahuje nejen nástroje pro ovládání přístroje, ale i nástroje určené pro zpracování a vyhodnocování naměřených spekter. Základním nástrojem, který byl použit, je tzv. korekce základních linií. V Ramanově spektru může vzorek vykazovat mírnou fluorescenci nebo tepelné pozadí způsobené zářením. Jestliže je dostatek Ramanova signálu na horní části šikmého pozadí základní linie mohou být odečteny, čímž se získá spektrum s plochou základní linií.

Nejprve byly jednotlivé koncentrace vzorků měřeny bez jakékoliv předúpravy ve své původní – tekuté podobě. Avšak vzniklá Ramanova spektra byla nečitelná, vykazovala vysokou míru zašumění a jednotlivé píky by nešlo odečíst. Na obrázku 20 je zobrazeno naměřené Ramanovo spektrum s koncentrací mléčného tuku 3,5 %. Červeně zobrazené spektrum bylo naměřeno ve vzorku v jeho původní tekuté podobě. Fluorescence se projevovala u všech naměřených vzorků. V příloze P I je uvedeno spektrum mléka o koncentraci 0,1 % tuku, které bylo měřeno ve vzorku v jeho tekuté a poté ve vysušené podobě. Z toho důvodu byl vzorek dále měřen ve formě vysušené kapky (viz kapitola 5.2) a za těchto podmínek bylo získáno spektrum s jasně ohraničenými píky, které je zobrazeno černě.

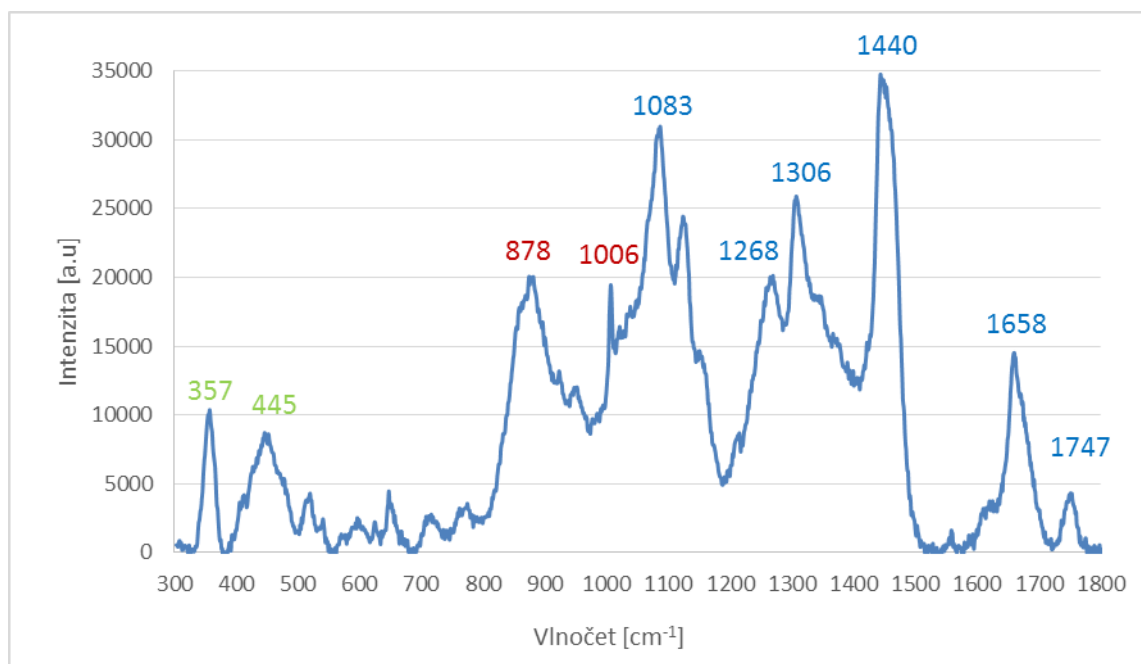
Podmínky měření byly stejné pro všechny vzorky, ať už se jednalo o vzorky v tekuté nebo vysušené podobě. Přítomné zašumění spektra bylo pravděpodobně způsobeno přítomnou vodou, i když voda má slabý Ramanův rozptyl a neměla by ovlivňovat výsledné spektrum. Na základě tohoto zjištění všechna další měření probíhala ve vysušených vzorcích.



Obrázek 20: Spektrum mléka s koncentrací mléčného tuku 3,5 %

Ramanovo spektrum bylo získáno pro všechny vzorky s rozdílnou koncentrací mléčného tuku. Na obrázku 21 je interpretováno spektrum mléka s koncentrací mléčného tuku 3,0 %, zbylá spektra jsou uvedena v příloze P II, protože jsou jen velmi malé rozdíly mezi spektry jednotlivých vzorků.

Ve spektru jsou zvýrazněny vrcholy, které odpovídají některým základním složkám mléka. Pro mléčný cukr – laktózu jsou typické dva výrazné vrcholy a to vrchol o vlnočtu  $357 \text{ cm}^{-1}$  a  $445 \text{ cm}^{-1}$ . Bílkoviny mléka se podařilo identifikovat při vrcholu  $878 \text{ cm}^{-1}$ , který odpovídá aminokyselině tryptofan a vrchol  $1006 \text{ cm}^{-1}$  je typický pro aminokyselinu fenylalanin [38,47].



Obrázek 21: Ramanovo spektrum mléka s koncentrací mléčného tuku 3,0 %

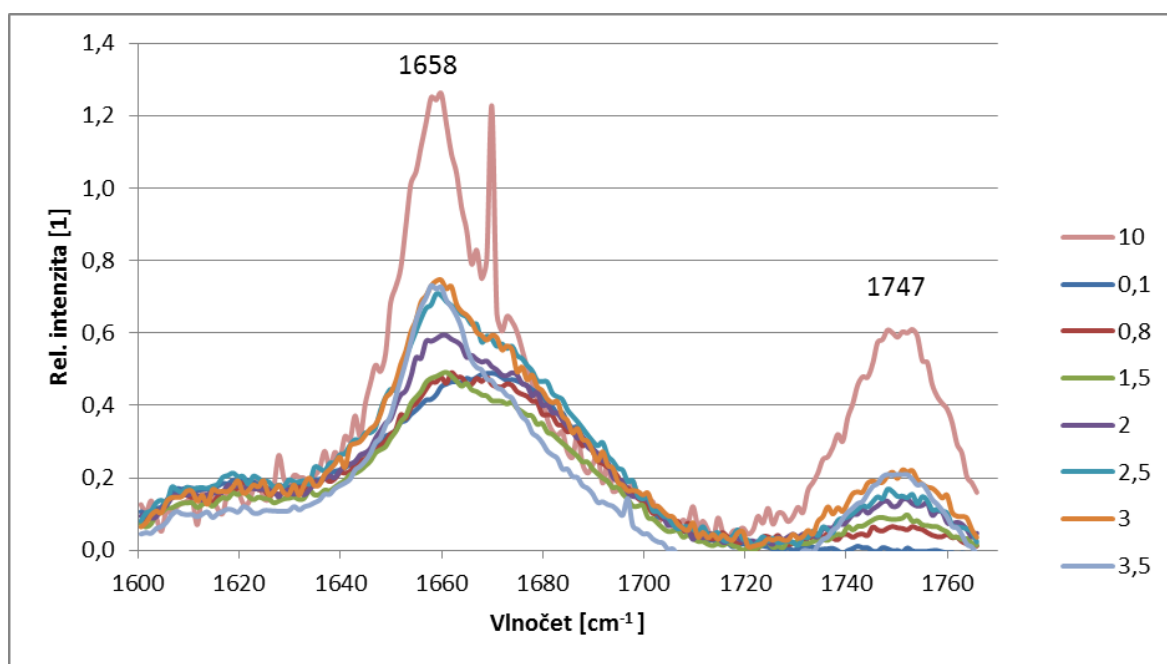
Pro účely měření budou důležité vrcholy identifikující mléčný tuk, které byly experimentálně naměřeny při vlnočtech  $1083\text{ cm}^{-1}$ ,  $1268\text{ cm}^{-1}$ ,  $1306\text{ cm}^{-1}$ ,  $1440\text{ cm}^{-1}$ ,  $1658\text{ cm}^{-1}$  a  $1747\text{ cm}^{-1}$  [45,51].

Výrazný vrchol při vlnočtu  $1083\text{ cm}^{-1}$  odpovídá ohýbané vibraci  $\text{CH}_3$  vazby, vibrace při vlnočtu  $1268\text{ cm}^{-1}$  náleží ohýbané vibraci  $\text{C} - \text{H}$  vazby pocházející z *cis* dvojně vazby  $\text{R} - \text{CH} = \text{CH} - \text{R}$ . Pík výrazný o vlnočtu  $1306\text{ cm}^{-1}$  je typický pro kroutivou vibraci  $\text{C} - \text{H}$  pocházející z vazby  $\text{CH}_2$ . Ramanův signál při vlnočtu  $1440\text{ cm}^{-1}$  odpovídá nůžkové vibraci vazby  $-\text{CH}_2-$ , která je obsažená v nasycených mastných kyselinách. Další výrazný pík se nachází na vlnočtu  $1658\text{ cm}^{-1}$  jenž je typický pro valenční vibraci  $\text{C} = \text{C}$  *cis* dvojně vazby pocházející z  $\text{RHC} = \text{CHR}$ . Posledním studovaným píkem identifikující mléčný tuk je pík o vlnočtu  $1747\text{ cm}^{-1}$ , který odpovídá valenční  $\text{C} = \text{O}$  vibraci z vazby  $\text{RC} = \text{OOR}$ . Zbylé píky jsou identifikovány v teoretické části práce v kapitole 3.5 [45,46].

Pro vyhodnocení naměřených spekter bylo použito tzv. normování. Intenzity bodů ve spektru byly vztaženy na intenzitu píku při vlnočtu  $1006\text{ cm}^{-1}$ , který odpovídá fenylalaninu, čímž byla získána relativní intenzita. Na pík fenylalanin je možné vztáhnout jednotlivé body ve spektru jen tehdy, jestliže byl prokázán konstantní obsah fenylalaninu ve všech porovnávaných vzorcích. Naměřené hodnoty fenylalaninu jsou uvedeny v kapitole 6.4. In-

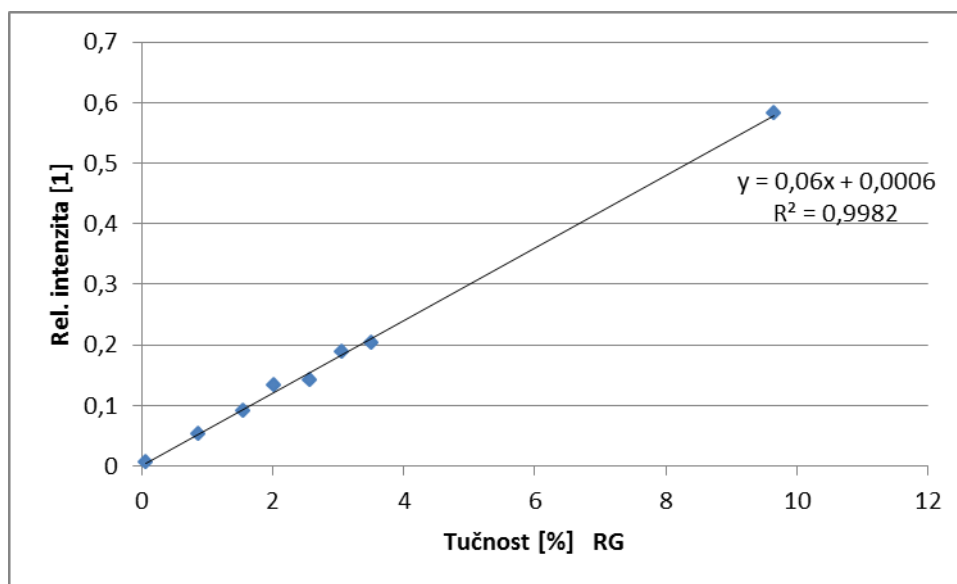


tenzita píku  $1006\text{ cm}^{-1}$  byla položena rovno jedné a všechny ostatní body ve spektru byly upraveny vůči této hodnotě, čímž se získala relativní intenzita. Následně byla relativní intenzita vynesena do grafu v závislosti na naměřené tučnosti, která byla stanovena buď referenční metodou podle Röse – Gottlieba nebo acidobutyrometrickou metodou podle Gerbera. Na obrázcích 22, 25 a 26 jsou znázorněny jednotlivé nárůsty relativní intenzity s rostoucím podílem tuku ve vzorku u píků charakteristických pro mléčný tuk.



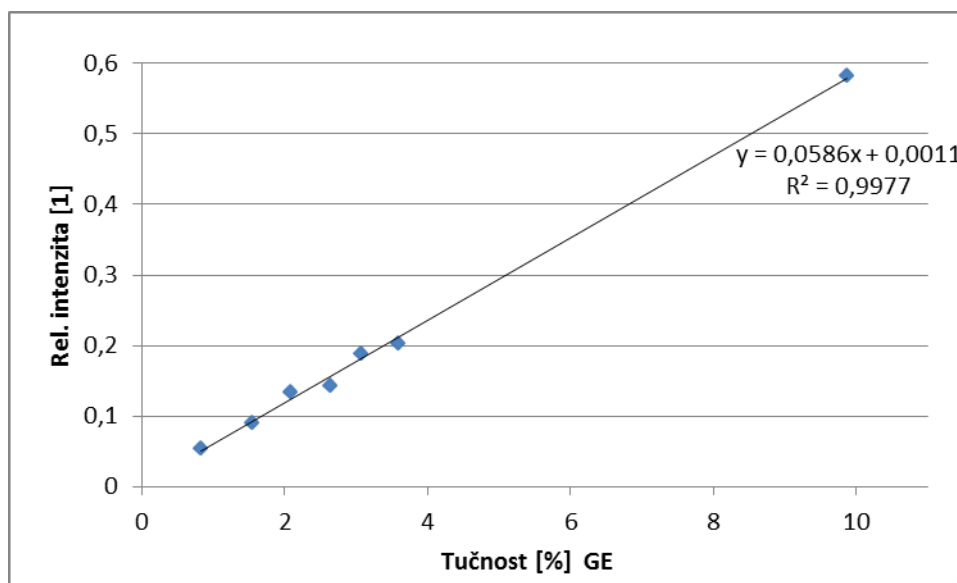
Obrázek 22: Nárůst relativní intenzity při vlnočtu  $1658\text{ cm}^{-1}$  a  $1747\text{ cm}^{-1}$

Pík při vlnočtu  $1747\text{ cm}^{-1}$  odpovídá vibraci vazby  $\text{C} = \text{O}$ , která se podílí na esterové vazbě mezi mastnou kyselinou a glycerolem v molekule TAG [45]. Intenzita této vibrace tedy odpovídá obsahu TAG ve vzorku a měla by korelovat s obsahem mléčného tuku ve vzorku. Tento pík je ve spektrech dobře viditelný a z obrázku 22 lze také zaznamenat nárůst normované intenzity současně s rostoucím obsahem tuku ve vzorku. Tyto hodnoty lze vynést do grafu v závislosti na obsahu mléčného tuku stanoveného referenční metodou podle Röse – Gottlieba (viz Obrázek 23). Proložení souboru naměřených dat přímkou lineární regrese byla získána rovnice přímky s korelačním koeficientem  $R^2$ . Z grafu lze vyčíst velmi dobrou korelaci z korelačního koeficientu, který nabývá hodnotu  $R^2 = 0,9982$ . Mezi naměřenými hodnotami je přímá závislost.



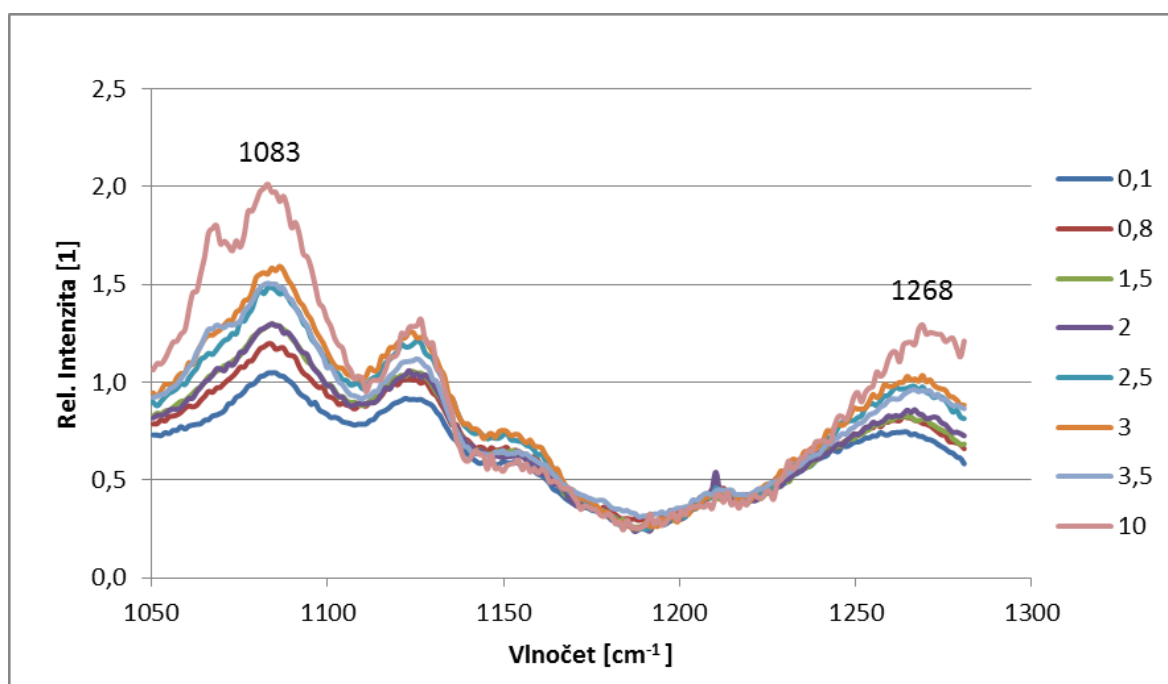
Obrázek 23: Graf závislosti relativní intenzity pro pík 1747 cm<sup>-1</sup> na tučnosti stanovené referenční metodou

Relativní intenzitu lze také korelovat s obsahem tuku zjištěného podle Gerbera. Na obrázku 24 je vynesena relativní intenzita v závislosti na obsahu mléčného tuku stanoveného dle Gerbera. Zjištěná korelace je opět velmi silná mezi naměřenými hodnotami, kterou vystihuje korelační koeficient s hodnotou  $R^2 = 0,9977$ .



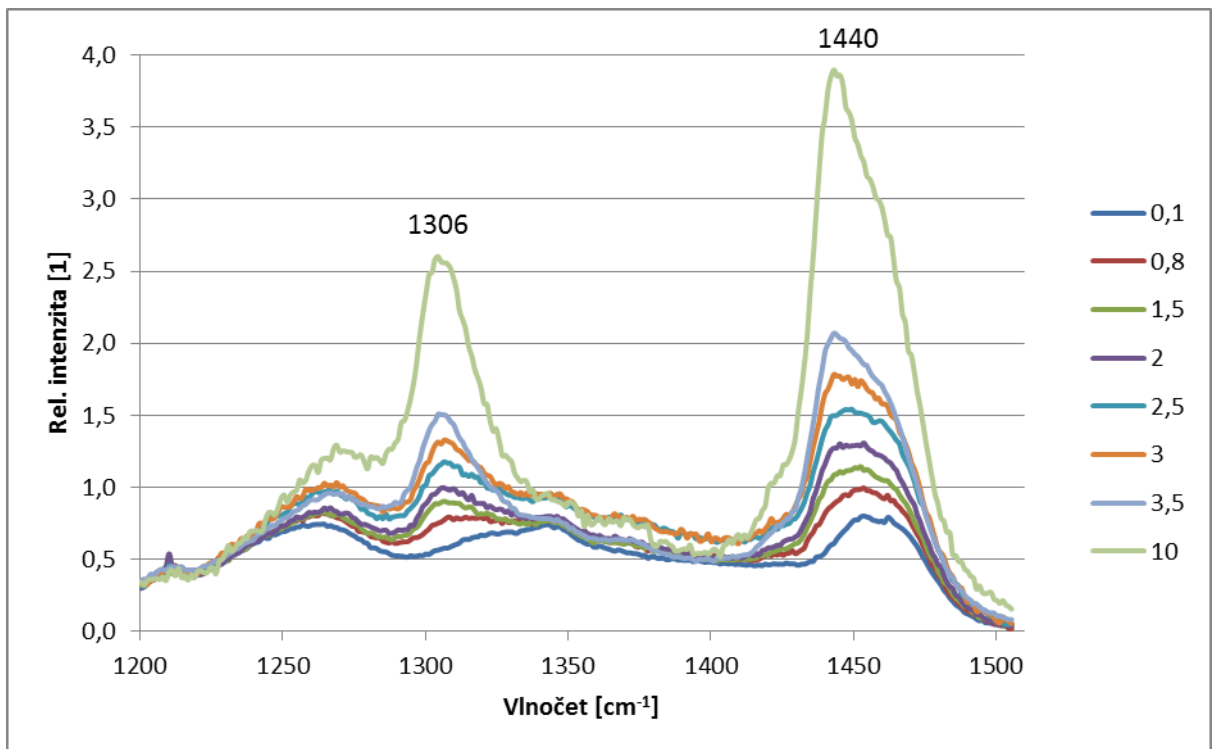
Obrázek 24: Graf závislosti relativní intenzity pro pík 1747 cm<sup>-1</sup> na tučnosti stanovené acidobutyrometrickou metodou

Stejným způsobem lze hodnotit také další píky, které odpovídají vibračním vazeb v molekule mléčného tuku. Na obrázku 22 je zobrazen další dominantní pík při vlnočtu  $1658\text{ cm}^{-1}$ . Tento pík odpovídá vibraci *cis* dvojné vazby  $\text{C} = \text{C}$ , která je charakteristická pro obsah nenasyčených mastných kyselin v molekule TAG. Dalším píkem odpovídající obsahu nenasyčených mastných kyselin je pík při vlnočtu  $1268\text{ cm}^{-1}$  [45]. Narůstající intenzita těchto píků v souvislosti s rostoucím obsahem tuku ve vzorcích je zřetelně patrná na zobrazení normovaných spekter na obrázcích 22 a 25.



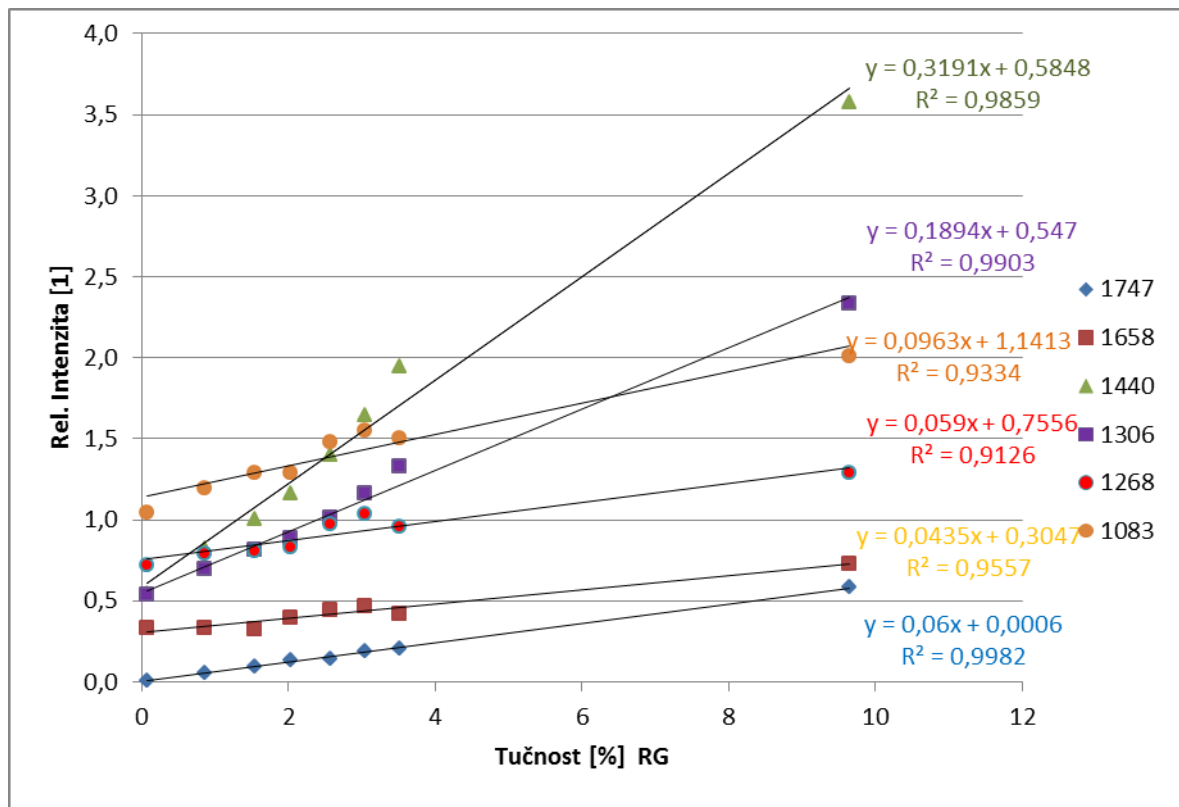
Obrázek 25: Nárůst relativní intenzity při vlnočtu  $1083\text{ cm}^{-1}$  a  $1268\text{ cm}^{-1}$

Pík o vlnočtu  $1440\text{ cm}^{-1}$  reprezentuje vibraci vazby  $-\text{CH}_2-$ , která odpovídá obsahu nasyčených mastných kyselin v molekule TAG, kterých je v mléčném tuku převaha (viz kapitola 1.1.1) [45]. Vliv obsahu tuku na intenzitu Ramanova signálu lze vyčíst z obrázku 26. Další pík výrazný při vrcholu  $1083\text{ cm}^{-1}$  je typický pro vibraci vazby  $\text{CH}_3$ . Jeho nárůst relativní intenzity lze sledovat na obrázku 25. Poslední výrazný pík ve spektru je při vlnočtu  $1306\text{ cm}^{-1}$ , který odpovídá vibraci  $\text{CH}_2$ . Tyto vibrace jsou typické pro nasycené mastné kyseliny. Nárůst relativní intenzity je patrný z obrázku 26 [45,51].



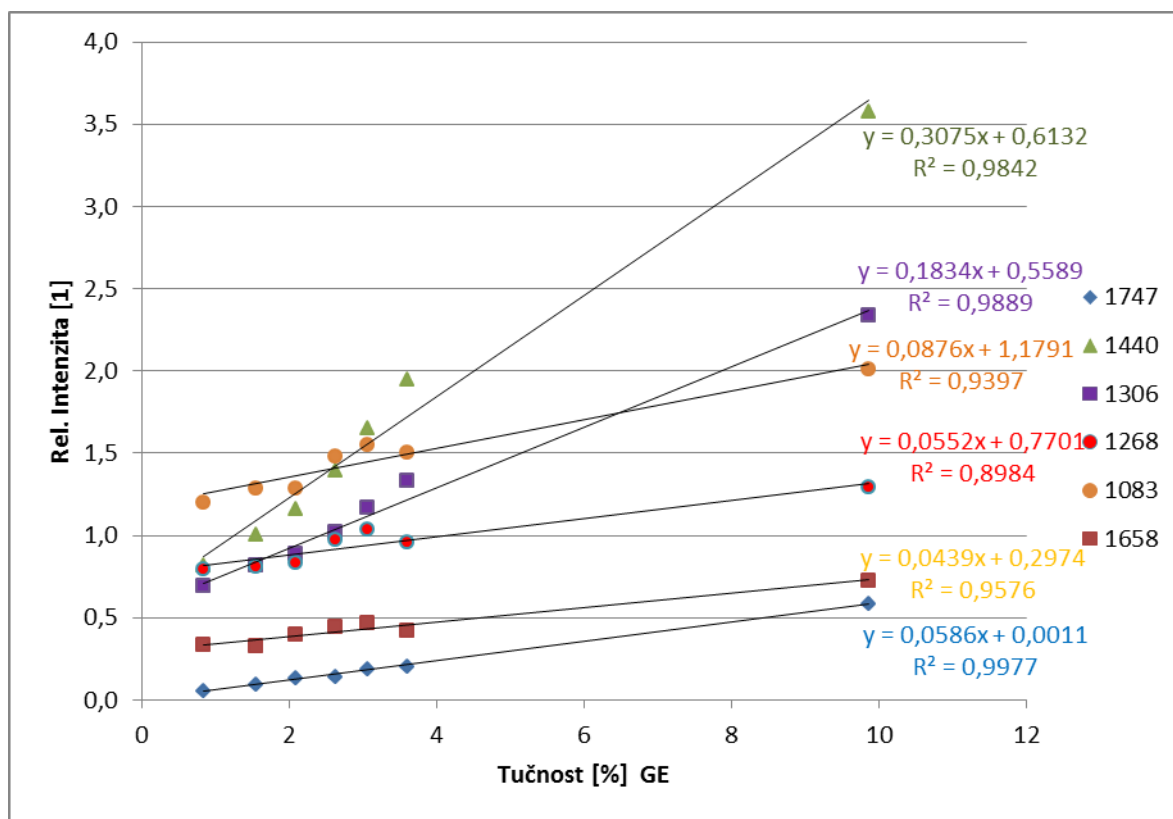
Obrázek 26: Nárůst relativní intenzity při vlnočtu 1306 cm<sup>-1</sup> a 1440 cm<sup>-1</sup>

Vynesením normovaných intenzit zmiňovaných dominantních píků v závislosti na stanovené tučnosti podle Röse – Gottlieba (viz Obrázek 27) a na stanovené tučnosti podle Gerbera (viz Obrázek 28) byly získány po proložení souboru naměřených dat přímkou lineární regrese rovnice přímky a korelační koeficienty.



Obrázek 27: Graf závislosti relativní intenzity na tučnosti stanovené referenční metodou

Z obrázku 27 je patrné, že nejlépe vystihuje nárůst normované intenzity v souvislosti s rostoucím obsahem tuku pík 1747 cm<sup>-1</sup>, jehož korelační koeficient je nejvyšší a to  $R^2 = 0,9982$ . Tento pík se jeví jako nejlepší a nejvhodnější pro posuzování obsahu tuku ve vzorku. Druhý nejlépe vystihující korelační koeficient patřil píku o vlnočtu 1306 cm<sup>-1</sup>, jehož hodnota byla  $R^2 = 0,9903$ . Vysoký korelační koeficient byl i u píku 1440 cm<sup>-1</sup>, a to  $R^2 = 0,9859$ . Korelační koeficient u píku 1658 cm<sup>-1</sup> byl  $R^2 = 0,9334$ , a u píku 1268 cm<sup>-1</sup> byl  $R^2 = 0,9126$ . Pro pík 1083 cm<sup>-1</sup> byl korelační koeficient  $R^2 = 0,9334$ . I když jsou poslední tři zmíněné korelační koeficienty stále vysoké, pro zjišťování obsahu tuku se jeví jako méně vhodné.



Obrázek 28: Graf závislosti relativní intenzity na tučnosti stanovené acidobutyrometrickou metodou

Na obrázku 28 je zobrazen graf závislosti normované intenzity na stanovené tučnosti podle Gerbera. Z obrázku je patrné, že nejlépe vystihujícím píkem je pík  $1747\text{ cm}^{-1}$ , jehož korelační koeficient dosahuje hodnoty  $R^2 = 0,9977$ . I u metody stanovení podle Gerbera se tento pík jeví jako nejlepší a tudíž i nejvhodnější pro zjišťování obsahu mléčného tuku. Druhým nejvyšším korelačním koeficientem disponuje pík o vlnočtu  $1306\text{ cm}^{-1}$  a to  $R^2 = 0,9889$ . Další vysoký korelační koeficient  $R^2 = 0,9842$  je u píku  $1440\text{ cm}^{-1}$ . Pro pík o vlnočtu  $1658\text{ cm}^{-1}$  je koeficient  $R^2 = 0,9576$ . Píku  $1083\text{ cm}^{-1}$  je přiřazen korelační koeficient  $R^2 = 0,9397$ . Posledním a pro stanovování mléčného tuku nejméně vhodným píkem je pík o vlnočtu  $1268\text{ cm}^{-1}$ , jehož korelační koeficient dosahuje hodnoty pouze  $R^2 = 0,8984$ .

U rovnice přímek byly testovány významnosti parametru pomocí statistického programu gretl, který zpracoval z naměřených dat p – hodnotu. Pomocí p – hodnoty lze snadno vyhodnotit stanovené hypotézy, přičemž pokud je p hodnota vyšší než zvolené riziko pak se nulová hypotéza nezamítá na hladině zvoleného rizika. Pokud je menší, než zvolená hladi-

na rizika pak je nulová hypotéza zamítnuta. Lze tedy otestovat významnost parametru v získané rovnici pomocí následující hypotézy.

$$H_0: b = 0 \quad ; \quad H_1: b \neq 0$$

Nulová hypotéza říká, bude-li koeficient roven 0, znamená to, že koeficient není v modelu významný. Naproti tomu alternativní hypotéza říká, je-li koeficient významný, bude různý od nuly. P – hodnota je nejmenší hladina, na které zamítáme nulovou hypotézu. U testu byla zvolena hladina významnosti 5 %. Pokud bude p – hodnota nižší než 5 % tak je zamítnutá nulová hypotéza ve prospěch alternativní.

Tabulka 7: Rovnice přímky závisle proměnných s p – hodnotou koeficientu proměnné x

Závisle proměnná pík o vlnótu	Rovnice přímky	p – hodnota
1747	$y = 0,05999x + 0,0006062$	1,81E-09
1658	$y = 0,04349x + 0,3047$	2,77E-05
1440	$y = 0,3191x + 0,5848$	8,79E-07
1306	$y = 0,1894x + 0,5470$	2,84E-07
1083	$y = 0,09629x + 1,1413$	9,48E-05
1268	$y = 0,05902x + 0,7556$	2,00E-04

V tabulce 7 a 8 jsou uvedeny rovnice přímky k jednotlivým závisle proměnným, což je vždy příslušný pík o určitém vlnótu a p – hodnotou koeficientu proměnné x. Hodnoty v tabulce 7 byly stanoveny pro závislost relativní intenzity na tučnosti stanovené podle Röse – Gottlieba. Výsledné p – hodnoty jsou ve všech případech nižší než 0,05. Proto lze říci, že parametry u proměnné x jsou statisticky významné na zvolené hladině významnosti 5 %.

Tabulka 8: Rovnice přímky závisle proměnných s p – hodnotou koeficientu proměnné x

Závisle proměnná pík o vlnótu	Rovnice přímky	p – hodnota
1747	$y = 0,05865x + 0,001137$	9,09E-08
1658	$y = 0,04386x + 0,2974$	1,00E-04
1440	$y = 3075x + 0,6132$	1,07E-05
1306	$y = 0,1834x + 0,5589$	4,47E-06
1083	$y = 0,08765x + 1,1791$	3,00E-04
1268	$y = 0,05523x + 0,7701$	1,20E-03

Hodnoty uvedené v tabulce 8 byly stanoveny pro závislost relativní intenzity na tučnosti stanovené podle Gerbera. Výsledné p – hodnoty jsou ve všech případech nižší než 0,05.

Lze tedy říci, že parametry u proměnné  $x$  jsou statisticky významné na zvolené hladině významnosti 5 %.

## 6.6 Souhrnná diskuse

Cílem praktické části práce bylo stanovit obsah mléčného tuku v připravené koncentrační řadě mléka a smetany. Nejprve byly jednotlivé vzorky mléka a smetany podrobeny stanovení mléčného tuku pomocí standartních technik, které se běžně využívají pro zjištění obsahu mléčného tuku. Referenční metoda stanovení podle Röse – Gottlieba se ukázala jako efektivnější metoda než stanovení acidobutyrometrické podle Gerbera. Na obrázku 17 a 18 jsou znázorněny jednotlivé grafy s výsledky stanovení mléčného tuku těmito metodami. Potencionální velikost chyby znázorňují chybové úsečky, které jsou v případě referenční metody v menším datovém rozpětí než u provozní metody.

Stanovení mléčného tuku podle Röse - Gottlieba se ukázalo jako přesnější metoda, co se týče samotného stanovení, avšak svou časovou náročností a požadavky na větší množství chemikálií a tím i většího množství vznikajícího odpadu není tato metoda vhodná pro průmyslové stanovení mléčného tuku.

Ramanova spektroskopie se v mlékárenském průmyslu běžně nepoužívá na rozdíl od jiných vibračních spektroskopických technik jako např. infračervená a blízká infračervená spektroskopie. Získaná spektra infračervenou spektroskopií trpí rušením přítomné vody ve vzorcích, která silně absorbuje infračervené záření. Bez použití speciálních přístrojů k infračervenému spektrometru by nebylo možné používat tuto metodu pro stanovení vzorků s vysokým obsahem vody.

Ramanova spektroskopie je vhodná pro měření vzorků s vysokým obsahem vody, neboť voda má slabý Ramanův rozptyl a je ve spektru takřka „neviditelná“. Z důvodu slabého Ramanova rozptylu, který poskytuje molekula vody, byly nejprve jednotlivé vzorky z koncentrační řady stanoveny v tekuté podobě. Vzniklé Ramanovo spektrum mléka, které je uvedeno na obrázku 20, vykazovalo vysokou míru zašumění, jednotlivé píky byly nečitelné a nebylo by možné odečíst vrcholy na základě vizuálního posouzení. Z toho důvodu byly vzorky mléka a smetany nadávkovány ve formě kapek na hliníkovou destičku a byly ponechány na vzduchu při laboratorní teplotě do druhého dne. Ve srovnání s jinými jedlými tuky je mléčný tuk poměrně odolný vůči oxidaci z důvodu nižšího obsahu polynenasý-



cených mastných kyselin a přítomných přírodních antioxidantů jako je  $\alpha$  – tokoferol nebo  $\beta$  – karoten [6].

Důvodem pořízení lepšího Ramanova spektra ve vysušených vzorcích mohlo být odstraněním přítomné vody, která jak již bylo zmíněno, by sice neměla ovlivňovat výsledné spektrum, ale i tím, že vysušením došlo k získání vysoce koncentrovaných vzorků a přítomná hliníková destička, na které byly jednotlivé vzorky nadávkovány, mohla zvýšit Ramanův signál odrazem od hladkého povrchu [45].

Spektrální rozsah měření se pohyboval v rozmezí o vlnočtu  $300 - 1800 \text{ cm}^{-1}$  i když v dostupných literaturách jsou uváděny intenzivní skupiny pásů ve vyšším rozsahu vlnočtu a to  $3100 - 2800 \text{ cm}^{-1}$ . Tyto vrcholy obsahují silně překrývající se široké Ramanovy pásy valenčních vibrací CH, NH a OH skupin a proto je oblast  $400 - 1800 \text{ cm}^{-1}$  vhodnější pro identifikaci lipidů [46].

V získaných Ramanových spektrech byly odečteny výrazné vrcholy a ty byly postupně normovány na fenylalaninový pík o vlnočtu  $1006 \text{ cm}^{-1}$  (viz kapitola 6.3). Normováním byla zjištěna relativní intenzita, která byla vynesena do grafu v závislosti na zjištěné tučnosti standartními metodami.

Trend korelující s obsahem tuku ve vzorku se podařilo prokázat u vrcholů o vlnočtech  $1083 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1268 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1306 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1440 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1658 \text{ cm}^{-1}$  a  $1747 \text{ cm}^{-1}$ . Podle Thiago O. Mendes *et al.* [51] byly identifikovány stejné spektrální vrcholy. Ve zmíněné literatuře byla použita metoda parciálních nejmenších čtverců pro identifikování vrcholů, které se mění v závislosti na obsahu mléčného tuku.

Chemická struktura mléčného tuku může být charakterizována esterovou vazbou  $\text{C} = \text{O}$ , jenž je součástí všech triacylglycerolů, které jsou součástí mléčného tuku z 98 %. Pro tuto vazbu je charakteristický pík při vlnočtu  $1747 \text{ cm}^{-1}$ . Pro pík identifikující mléčný tuk byla sestrojena kalibrační křivka, na základě které je možné odečítat obsah tuku. Zjištění obsahu tuku je podmíněno konstantním obsahem fenylalaninu respektive bílkovin. Tato kalibrační křivka může být použita pouze u mléka, které obsahuje stejné množství fenylalaninu. Pokud je obsah fenylalaninu jiný než u vzorků, které byly použity pro sestrojení kalibrační křivky, pak už by byla zjištěná tučnost s chybou.

Tučnost pomocí Ramanovy spektroskopie by se dala takto kontrolovat v případě, kdyby byl stále stejný zdroj mléka a kolísání bílkoviny v mléku by bylo zanedbatelné. Průměrný ob-

sah bílkovin v mléce se pohybuje okolo 3,3 %. Koncentrace bílkovin se mění v závislosti na ročním období, plemeni a jiných faktorech jen mírně [52]. Nejvýraznějším vlivem, který ovlivňuje obsah bílkovin je laktace. S dobou laktace vykazuje obsah bílkovin rostoucí tendenci [53].

## ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na stanovení obsahu mléčného tuku v mléku a mléčných výrobcích s využitím Ramanovy spektroskopie. Měření bylo získáno Ramanova spektra pro jednotlivé koncentrace mléka s obsahem tuku v rozmezí 0,1 – 3,5 %. Ve spektrech byly identifikovány píky odpovídající vibračním vazeb typické pro mléčný tuk. Byly hodnoceny píky při vlnočtech  $1083\text{ cm}^{-1}$ ,  $1268\text{ cm}^{-1}$ ,  $1306\text{ cm}^{-1}$ ,  $1440\text{ cm}^{-1}$ ,  $1658\text{ cm}^{-1}$  a  $1747\text{ cm}^{-1}$ . Nejvýznamnější korelace byla nalezena u vlnočtu  $1747\text{ cm}^{-1}$ ,  $1440\text{ cm}^{-1}$  a  $1306\text{ cm}^{-1}$ . Pík  $1747\text{ cm}^{-1}$  odpovídá vibraci C = O vazby, která se podílí na esterové vazbě mezi mastnou kyselinou a glycerolem v molekule triacylglycerolu. Nárůst intenzity Ramanova signálu při vlnočtu  $1440\text{ cm}^{-1}$  je typická pro nůžkovou – CH<sub>2</sub> – vazby a pík při vlnočtu  $1306\text{ cm}^{-1}$  náleží vibraci C – H. Tyto dva dominantní pásy při vlnočtu  $1306\text{ cm}^{-1}$  a  $1440\text{ cm}^{-1}$  odpovídají obsahu nasycených mastných kyselin v molekule TAG, které v mléce převažují. Pro charakteristické píky byl stanoven vliv obsahu tuku ve vzorku na hodnotu relativní intenzity, která byla vynesena do grafu závislosti relativní intenzity na tučnosti stanovené běžnými laboratorními metodami. Po proložení naměřených dat byly stanoveny kalibrační křivky, které je možné použít pro zjišťování obsahu mléčného tuku. Tyto kalibrační křivky je možné použít pouze tehdy, známe-li obsah fenylalaninu resp. bílkovin. V případě, že by u kontrolovaného mléka bylo kolísání obsahu bílkoviny, resp. fenylalaninu zanedbatelné, mohla by se tato metoda používat pro průmyslové zjišťování mléčného tuku.

Hlavní výhodou této metody je rychlost, žádná nebo jen malá příprava vzorku a v kombinaci s vzorkovací stanicí by mohla být vhodná pro průmyslové stanovení mléčného tuku popř. jiných komponent mléka.

Ramanova spektroskopie má potenciál nahradit klasické metody používané ke stanovení obsahu mléčného tuku, avšak v tomto případě musí být tyto metody zachovány pro kalibraci.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] LOPEZ, Christelle, Valérie BRIARD-BION, Olivia MÉNARD, Eric BEAUCHER, Florence ROUSSEAU, Jacques FAUQUANT, Nadine LECONTE a Benoit ROBERT. Fat globules selected from whole milk according to their size: Different compositions and structure of the biomembrane, revealing sphingomyelin-rich domains. *Food Chemistry*. 2011, 125(2), 355-368. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.09.005. ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814610010733>
- [2] WILLIAMS, Christine a Judith BUTTRISS. *Improving the fat content of foods* [online]. [Online-Ausg.]. Boca Raton, Fla. [u.a.]: CRC Press, 2006 [cit. 2016-04-19]. ISBN 978-084-9392-085.
- [3] SIKORSKI, Zdzisław E a Anna KOŁAKOWSKA. *Chemical, biological, and functional aspects of food lipids*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, Taylor, c2011. ISBN 978-143-9802-373.
- [4] FOX, P a P MCSWEENEY. *Dairy chemistry and biochemistry* [online]. 1st ed. New York: Blackie Academic, 1998 [cit. 2016-04-15]. ISBN 04-127-2000-0.
- [5] ROGINSKI, Hubert, John W FUQUAY a P FOX. *Encyclopedia of dairy sciences*. New York: Academic Press, c2003. ISBN 01-222-7235-8.
- [6] SIKORSKI, Zdzisław E a Anna KOŁAKOWSKA. *Chemical and functional properties of food lipids* [online]. Boca Raton, Fla: CRC Press, 2003 [cit. 2016-04-19]. ISBN 978-142-0031-997.
- [7] GAJDŮŠEK, Stanislav. *Laktologie*. Vyd. 1. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003. ISBN 80-715-7657-3.
- [8] PARK, Young W a George F HAENLEIN. *Milk and dairy products in human nutrition: production, composition, and health* [online]. Chichester, West Sussex, UK: John Wiley, 2013 [cit. 2016-04-15]. ISBN 978-047-0674-185.
- [9] MÅNSSON, Helena Lindmark. Fatty acids in bovine milk fat. *Food* [online]. 2008, 52, - [cit. 2016-04-15]. DOI: 10.3402/fnr.v52i0.1821. ISSN 1654-661x. Dostupné z: <http://www.foodandnutritionresearch.net/index.php/fnr/article/view/1821>
- [10] HAUG, Anna, Arne T HØSTMARK a Odd M HARSTAD. Bovine milk in human nutrition – a review. *Lipids in Health and Disease* [online]. 6(1), 25- [cit. 2016-04-15].

DOI: 10.1186/1476-511X-6-25. ISSN 1476511x. Dostupné z:  
<http://www.lipidworld.com/content/6/1/25>

[11] MEURENS, Marc, Vincent BAETEN, Shou He YAN, Eric MIGNOLET a Yvan LARONDELLE. Determination of the Conjugated Linoleic Acids in Cow's Milk Fat by Fourier Transform Raman Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2005, 53(15), 5831-5835 [cit. 2016-04-15]. DOI: 10.1021/jf0480795. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0480795>

[12] PIETER WALSTRA, Jan T. *Dairy science and technology* [online]. 2nd ed. Boca Raton: Taylor, 2006 [cit. 2016-04-15]. ISBN 978-142-0028-010.

[13] ROMBAUT, Roeland a Koen DEWETTINCK. Properties, analysis and purification of milk polar lipids. *International Dairy Journal* [online]. 2006, 16(11), 1362-1373 [cit. 2016-04-15]. DOI: 10.1016/j.idairyj.2006.06.011. ISSN 09586946. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694606001555>

[14] PEREDA, J., D.P. JARAMILLO, J.M. QUEVEDO, V. FERRAGUT, B. GUAMIS a A.J. TRUJILLO. Characterization of volatile compounds in ultra-high-pressure homogenized milk. *International Dairy Journal* [online]. 2008,18(8), 826-834 [cit. 2016-04-15]. DOI: 10.1016/j.idairyj.2007.12.002. ISSN 09586946. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694607002476>

[15] LOPEZ, Christelle, D.P. JARAMILLO, J.M. QUEVEDO, V. FERRAGUT, B. GUAMIS a A.J. TRUJILLO. Milk fat globules enveloped by their biological membrane: Unique colloidal assemblies with a specific composition and structure. *Current Opinion in Colloid* [online]. 2011, 16(5), 391-404 [cit. 2016-04-15]. DOI: 10.1016/j.cocis.2011.05.007. ISSN 13590294. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S135902941100077X>

[16] SMITHERS, Geoffrey W a Mary Ann AUGUSTIN. *Advances in dairy ingredients* [online]. Ames, Iowa: John Wiley, 2013 [cit. 2016-04-15]. ISBN 978-111-8448-205.

[17] SINGH, Harjinder. The milk fat globule membrane—A biophysical system for food applications. *Current Opinion in Colloid* [online]. 2006, 11(2-3), 154-163 [cit. 2016-04-15]. DOI: 10.1016/j.cocis.2005.11.002. ISSN 13590294. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359029405001202>

- [18] HEID, Hans W. a Thomas W. KEENAN. Intracellular origin and secretion of milk fat globules. *Current Opinion in Colloid* [online]. 2006, 11(2-3), 154-163 [cit. 2016-04-15]. DOI: 10.1016/j.ejcb.2004.12.002. ISBN 10.1016/j.ejcb.2004.12.002. ISSN 13590294. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0171933504000433>
- [19] RAJAH., Kanes K. *Fats in food technology*. Sheffield: Sheffield Acad. Press [u.a.], 2002. ISBN 08-493-9784-7.
- [20] LOPEZ, Christelle, Marie-Noëlle MADEC a Rafael JIMENEZ-FLORES. Lipid rafts in the bovine milk fat globule membrane revealed by the lateral segregation of phospholipids and heterogeneous distribution of glycoproteins. *Food Chemistry* [online]. 2010, 120(1), 22-33 [cit. 2016-04-15]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.09.065. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881460901125X>
- [21] PARODI, Peter W. Milk fat in human nutrition. *Australian Journal of Dairy Technology*, 2004, 59.1: 3.
- [22] ČESKO. Vyhláška č. 77/2003 Sb. ze dne 6. března 2003, kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. In: Sbíрка zákonů. 2003, částka 32, s. 2488 – 2516. Dostupný také z: <http://aplikace.mvcr.cz/sbirka-zakonu/>
- [23] ČSN 57 0530. A Metody zkoušení mléka a tekutých mléčných výrobků. Praha: Úřad pro normalizaci a měření, 1974. Třídící znak 570530.
- [24] INDRA, Z., MIZERA, J. Chemické kontrolní metody pro obor zpracování mléka. 1992. Učebnice pro střední průmyslové školy potravinářské.
- [25] <http://www.wenk-labtec.com/> [cit. 2016-04-15]
- [26] [http://www.milkotester.com/milk\\_analyzer\\_pro\\_touch.html](http://www.milkotester.com/milk_analyzer_pro_touch.html) [cit. 2016-04-15]
- [27] ISMAIL, Ashraf, Robert COCCIARDI, Pedro ALVAREZ a Jacqueline SEDMAN. *Infrared and Raman Spectroscopy in Food Science* [online]. [cit. 2016-04-15]. DOI: 10.1201/b15995-48. Dostupné z: <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/b15995-48>
- [28] ÖTLEŞ, Semih (ed.). *Methods of analysis of food components and additives* [online]. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, c2012 [cit. 2016-04-15]. Chemical and functional properties of food components series. ISBN 978-1-4398-1552-6.

[29] <http://www.nicoletcz.cz/nicolet-is10/> [cit. 2016-04-15]

[30] HOWELL, Nazlin, Guangtao MENG a Eunice LI-CHAN. Investigation of Protein-Lipid Interactions by Vibrational Spectroscopy. *Lipid Analysis and Lipidomics* [online]. AOCS Publishing, 2006, 355 [cit. 2016-04-15]. DOI: 10.1201/9781439822425.ch16. ISBN 978-1-893997-85-1. Dostupné z: <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9781439822425.ch16>

[31] SIGNORELL, Ruth a Jonathan P REID. *Fundamentals and applications in aerosol spectroscopy* [online]. Boca Raton, FL: CRC Press, c2011 [cit. 2016-04-15]. ISBN 978-142-0085-617.

[32] VANDENABEELE, Peter. *Practical Raman spectroscopy: an introduction* [online]. The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, United Kingdom: Wiley, 2013 [cit. 2016-04-19]. ISBN 978-047-0683-187.

[33] <http://www.famousscintists.org/c-v-raman/> [cit. 2016-04-15]

[34] BARBARA H. STUART. *Analytical techniques in materials conservation* [online]. Chichester, England: John Wiley, 2007 [cit. 2016-04-19]. ISBN 978-047-0060-520.

[35] ARGYRI, Anthoula A.; PANAGOUD, Efsthios Z.; NYCHAS, George–John. Monitoring Microbial Spoilage of Foods by Vibrational Spectroscopy (FT-IR & Raman). *Novel Food Preservation and Microbial Assessment Techniques*, 2014, 386.

[36] KOVÁČ, Štefan; ILAVSKÝ, Dušan; LEŠKO, Ján. Metódy kontroly technologických procesov. Spektrálne metódy v organickej chémii a technológii. Alfa, 1987.

[37] SAHU, Jatindra Kumar; WANG, Wenbo; PALIWAL, J. Vibrational Spectroscopy for Food Processing. In: *Introduction to Advanced Food Process Engineering*. CRC Press, 2014, p. 483-520.

[38] LI-CHAN, E.C.Y. The applications of Raman spectroscopy in food science. *Trends in Food Science* [online]. 1996, 7(11), 361-370 [cit. 2016-04-19]. DOI: 10.1016/S0924-2244(96)10037-6. ISSN 09242244. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224496100376>

[39] THYGESEN, Lisbeth G., Mette Marie LØKKE, Elisabeth MICKLANDER a Søren B. ENGELSEN. Vibrational microspectroscopy of food. Raman vs. FT-IR. *Trends in Food Science* [online]. 2003, 14(1-2), 50-57 [cit. 2016-04-19]. DOI: 10.1016/S0924-

- 2244(02)00243-1. ISSN 09242244. Dostupné z:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224402002431>
- [40] HOLLAS, J. *Modern spectroscopy* [online]. 4th ed. Hoboken, N.J.: John Wiley, c2004 [cit. 2016-04-19]. ISBN 04-708-4416-7.
- [41] LÁZNIČKOVÁ, Alice a Vladimír KUBÍČEK. *Základy fyzikální chemie: vybrané kapitoly pro posluchače Farmaceutické fakulty* [online]. 3. vyd. V Praze: Karolinum, 2014 [cit. 2016-04-19]. ISBN 978-80-246-2791-5.
- [42] ADAR, Fran. Analytical Vibrational Spectroscopy – NIR, IR, and Raman. *Spectroscopy*. 2011, vol.26, no. 10 s. 14-22. ISSN:0887-6703.
- [43] HAYNES, Christy L., Adam D. MCFARLAND a Richard P. Van DUYNE. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Analytical Chemistry* [online]. 2005, **77**(17), 338 A-346 A [cit. 2016-04-19]. DOI: 10.1021/ac053456d. ISSN 0003-2700. Dostupné z:  
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac053456d>
- [44] ALMEIDA, Mariana R., Kamila de S. OLIVEIRA, Rodrigo STEPHANI a Luiz Fernando C. DE OLIVEIRA. Fourier-transform Raman analysis of milk powder: a potential method for rapid quality screening. *Journal of Raman Spectroscopy* [online]. 2011, 42(7), 1548-1552 [cit. 2016-04-19]. DOI: 10.1002/jrs.2893. ISSN 03770486. Dostupné z:  
<http://doi.wiley.com/10.1002/jrs.2893>
- [45] EL-ABASSY, R.M., P.J. ERAVUCHIRA, P. DONFACK, B. VON DER KAMMER a A. MATERNY. Fast determination of milk fat content using Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* [online]. 2011, 56(1), 3-8 [cit. 2016-04-19]. DOI: 10.1016/j.vibspec.2010.07.001. ISSN 09242031. Dostupné z:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924203110001086>
- [46] GALLIER, Sophie, Keith C. GORDON, Rafael JIMÉNEZ-FLORES, David W. EVERETT a A. MATERNY. Composition of bovine milk fat globules by confocal Raman microscopy. *International Dairy Journal*[online]. 2011, 21(6), 402-412 [cit. 2016-04-19]. DOI: 10.1016/j.idairyj.2011.01.008. ISSN 09586946. Dostupné z:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694611000264>
- [47] MCGOVERIN, C.M., A.S.S. CLARK, S.E. HOLROYD, K.C. GORDON a A. MATERNY. Raman spectroscopic quantification of milk powder constituents. *Analytica*



*Chimica Acta* [online]. 2010, 673(1), 26-32 [cit. 2016-04-19]. DOI: 10.1016/j.aca.2010.05.014. ISSN 00032670. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267010006070>

[48] MOROS, J., S. GARRIGUES, M. DE LA GUARDIA, K.C. GORDON a A. MATERNY. Evaluation of nutritional parameters in infant formulas and powdered milk by Raman spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*[online]. 2007, 593(1), 30-38 [cit. 2016-04-19]. DOI: 10.1016/j.aca.2007.04.036. ISSN 00032670. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267007007866>

[49] CZAMARA, K., K. MAJZNER, M. Z. PACIA, K. KOCHAN, A. KACZOR a M. BARANSKA. Raman spectroscopy of lipids: a review. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2007, 593(1), 30-38 [cit. 2016-04-19]. DOI: 10.1002/jrs.4607. ISBN 10.1002/jrs.4607. ISSN 00032670. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jrs.4607>

[50] BUŇKA, František, Oldřich KRÍŽ, Alena VELIČKOVÁ, Leona BUŇKOVÁ a Stanislav KRÁČMAR. Effect of acid hydrolysis time on amino acid determination in casein and processed cheeses with different fat content. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. 2009, 22(3), 224-232 [cit. 2016-04-21]. DOI: 10.1016/j.jfca.2008.10.023. ISSN 08891575. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889157509000337>

[51] MENDES, Thiago O., Georgia M. A. JUNQUEIRA, Brenda L. S. PORTO, Charles D. BRITO, Fernando SATO, Marccone A. L. DE OLIVEIRA, Virgilio ANJOS a Maria J. V. BELL. Vibrational spectroscopy for milk fat quantification: line shape analysis of the Raman and infrared spectra. *Journal of Raman Spectroscopy*[online]. 2016, , n/a-n/a [cit. 2016-04-23]. DOI: 10.1002/jrs.4878. ISSN 03770486. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jrs.4878>

[52] CHRAMOSTOVÁ, Jana, Zuzana VRZÁKOVÁ a et al. Termostabilita mléka a faktory, které ji ovlivňují. *Mlékařské listy* [online]. 2014(146) [cit. 2016-04-24].

[53] ČEJNA, V. a G. CHLÁDEK. ROZDÍLY V ZÁKLADNÍCH PARAMETRECH MLÉKA MEZI DOJNICEMI HOLŠTÝNSKÉHO A MONTBELIARDSKÉHO PLEMENE [online]. [cit. 2016-04-24]. Dostupné z: [http://web2.mendelu.cz/af\\_291\\_mendelnet/mendelnet2005/articles/zoo/cejna.pdf](http://web2.mendelu.cz/af_291_mendelnet/mendelnet2005/articles/zoo/cejna.pdf)

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

TAG	Triacylglycerol
DAG	Diacylglycerol
MAG	Monoacylglycerol
MFGM	Membrána mléčné tukové kuličky
PC	Fosfatidylcholin
PE	Fosfatidyletanolamin
PS	Fosfatidylserin
PI	Fosfatidylinositol
CLA	Konjugovaná kyselina linolová
UHT	Ultra – high temperature (vysokoteplotní úprava)
RRS	Rezonanční Ramanova spektroskopie
SERS	Povrchově zesílená Ramanova spektroskopie

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1: Molekula triacylglycerolu [5].....	14
Obrázek 2: Schématické znázornění struktury mléčné tukové kuličky [20].....	19
Obrázek 3: Mojonnierův extrakční přístroj [25].....	25
Obrázek 4: Butyrometr na mléko [25].....	27
Obrázek 5: Milkotester [26].....	28
Obrázek 6: Infračervený spektrofotometr [29] .....	29
Obrázek 7: C. V. Raman [33] .....	30
Obrázek 8: Rozptyly světla [32] .....	31
Obrázek 9: Vibrace dvouatomové molekuly [36].....	32
Obrázek 10: Mechanický model pro molekulu vody [40] .....	33
Obrázek 11: Základní vibrace CH <sub>2</sub> vazby [32].....	34
Obrázek 12: Schematické znázornění Ramanova spektra [27].....	35
Obrázek 13: Ramanovo spektrum mléka s různou koncentrací tuku [45].....	39
Obrázek 14: Ramanovo spektrum kyseliny olejové (a), kyseliny palmitové (b) [45] .....	40
Obrázek 15: Ramanův spektrometr .....	47
Obrázek 16: Extrakce mléčného tuku .....	49
Obrázek 17: Naměřené hodnoty mléčného tuku podle Röse – Gottlieba.....	51
Obrázek 18: Naměřené hodnoty mléčného tuku podle Gerbera .....	52
Obrázek 19: Stanovení mléčného tuku ve smetaně .....	53
Obrázek 20: Spektrum mléka s koncentrací mléčného tuku 3,5 % .....	55
Obrázek 21: Ramanovo spektrum mléka s koncentrací mléčného tuku 3,0 %.....	56
Obrázek 22: Nárůst relativní intenzity při vlnočtu 1658 cm <sup>-1</sup> a 1747 cm <sup>-1</sup> .....	57
Obrázek 23: Graf závislosti relativní intenzity pro pík 1747 cm <sup>-1</sup> na tučnosti stanovené referenční metodou .....	58
Obrázek 24: Graf závislosti relativní intenzity pro pík 1747 cm <sup>-1</sup> na tučnosti stanovené acidobutyrometrickou metodou .....	58
Obrázek 25: Nárůst relativní intenzity při vlnočtu 1083 cm <sup>-1</sup> a 1268 cm <sup>-1</sup> .....	59
Obrázek 26: Nárůst relativní intenzity při vlnočtu 1306 cm <sup>-1</sup> a 1440 cm <sup>-1</sup> .....	60
Obrázek 27: Graf závislosti relativní intenzity na tučnosti stanovené referenční metodou .....	61

---

Obrázek 28: Graf závislosti relativní intenzity na tučnosti stanovené acidobutyrometrickou metodou.....	62
---	----

**SEZNAM TABULEK**

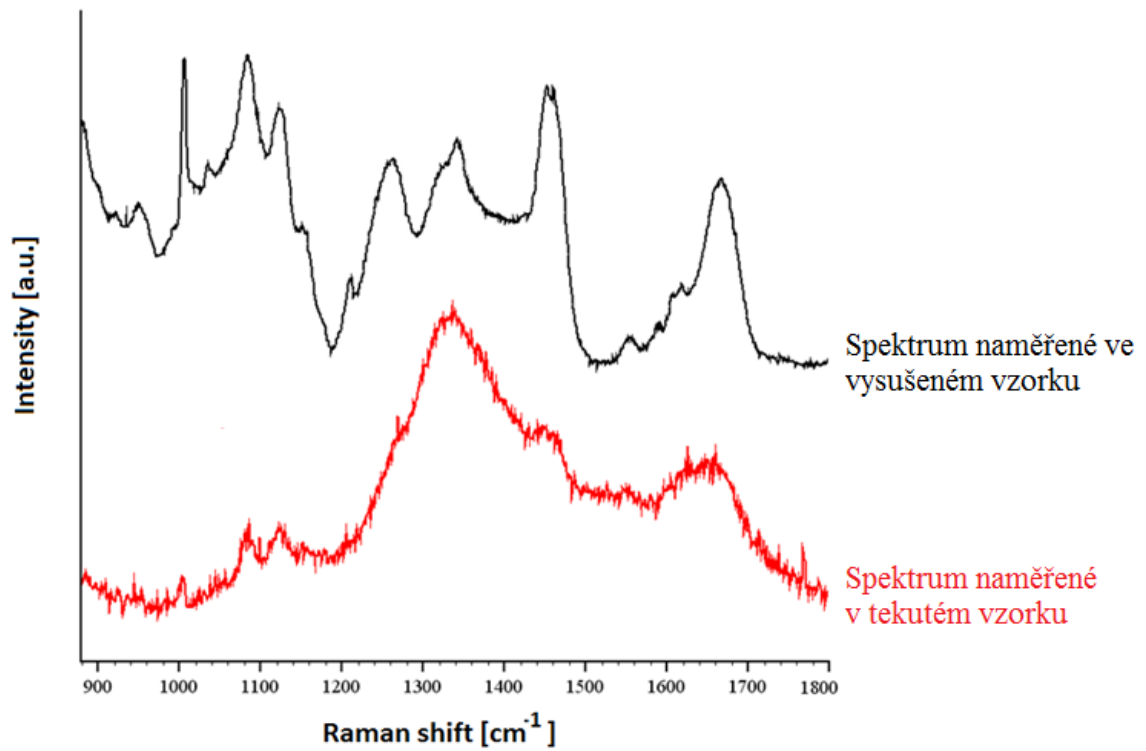
Tabulka 1: Tekutá smetana – požadavky na obsah mléčného tuku .....	23
Tabulka 2: Kysané mléčné výrobky – požadavky na obsah mléčného tuku .....	24
Tabulka 3: Přehled výživových hodnot u jednotlivých výrobků .....	45
Tabulka 4: Koncentrace mléčného tuku u jednotlivých vzorků .....	46
Tabulka 5: Složení [g] použitých sodno – citrátových pufrů na celkový objem 1l .....	50
Tabulka 6: Obsah fenylalaninu ve vzorcích mléka a smetany .....	54
Tabulka 7: Rovnice přímky závisle proměnných $s$ $p$ – hodnotou koeficientu proměnné $x$ .....	63
Tabulka 8: Rovnice přímky závisle proměnných $s$ $p$ – hodnotou koeficientu proměnné $x$ .....	63

## SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: Ramanovo spektrum mléka o koncentraci 0,1 % tuku

Příloha P II: Naměřená Ramanova spektra pro jednotlivé koncentrace mléčného tuku

## PŘÍLOHA P I: RAMANOVO SPEKTRUM MLÉKA O KONCENTRACI 0,1 % TUKU



## PŘÍLOHA P II: NAMĚŘENÁ RAMANOVA SPEKTRA PRO JEDNOTLIVÉ KONCENTRACE MLÉČNÉHO TUKU





