

# **Vliv doby kyselého hydrolýzy na stanovení obsahu aminokyselin v analyzovaných vzorcích kaseinu a modelových tavených sýrech**

Alena Veličková

---

Bakalářská práce  
2008



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav potravinářského inženýrství

akademický rok: 2007/2008

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Alena VELIČKOVÁ**

Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Vliv doby kyselé hydrolýzy na obsah aminokyselin v analyzovaných vzorcích kaseinu a modelových tavených sýrech**

Zásady pro vypracování:

1. Zpracujte literární rešerši, jejíž součástí bude problematika stanovení obsahu aminokyselin ve vzorcích potravin.
2. Stručně také charakterizujte výrobu tavených sýrů.
3. V praktické části provedte výrobu modelových tavených sýrů s různým obsahem tuku při konstantním obsahu sušiny.
4. S modelovými tavenými sýry a s kaseinem (jako modelovou bílkovinou) provedte experiment, kde budete sledovat závislost stanoveného obsahu aminokyselin na době kyselé hydrolýzy.
5. Statisticky vyhodnocená data komentujte a diskutujte s literárními údaji.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

**Fountoulakis, M., & Lahm, H.W. (1998). Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. Journal of Chromatography**

**Salo-Väänänen, P.P., & Koivistoinen, P.E. (1996). Determination of proteins in foods: comparison of net protein and crude protein (N\*6.25) values**

**Weiss, M., Manneberg, M., Juranville, J.F., Lahm, H.W., & Fountoulakis, M. (1998). Effect of the hydrolysis methods on the determination of the amino acid composition of proteins**

**Darragh, A.J, Garrick, D.J., Moughan, P.J., & Hendriks, W.H. (1996). Correction for amino acid loss during acid hydrolysis of purified protein.**

Vedoucí bakalářské práce:

**Ing. František Buňka, Ph.D.**

Ústav potravinářského inženýrství

Datum zadání bakalářské práce:

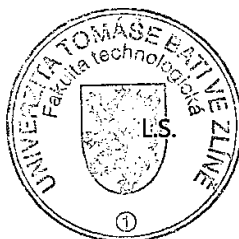
**21. listopadu 2007**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**31. května 2008**

Ve Zlíně dne 12. května 2008

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.  
*děkan*



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.  
*vedoucí katedry*

## **ABSTRAKT**

V této práci bylo sledováno 15 aminokyselin (asparagová kyselina, threonin, serin, glutamová kyselina, prolin, glycin, alanin, valin, isoleucin, leucin, fenylalanin, tyrozin, histidin, lysin a arginin) v kaseinu kravského mléka a v modelových tavených sýrech s 30, 45 a 60 % w/w tuku v sušině. Sledován byl vliv různého obsahu tuku na hydrolyzační křivky a hodnotu korekčních koeficientů pro stanovované aminokyseliny. Hydrolyzační křivky byly sestrojeny pomocí nelineární regrese za použití 13 hydrolyzačních intervalů (v rozsahu 0 - 144 hodin). Pomocí iontově-výměnné chromatografie byl v automatickém analyzátoru AAA 400 stanoven obsah aminokyselin. Na základě hydrolyzačních křivek byly vypočteny korekční faktory pro sledované aminokyseliny s cílem zvýšit přesnost a spolehlivost stanovení aminokyselin.

S rostoucím obsahem tuku ve vzorcích byl pozorován růst korekčních faktorů pro většinu sledovaných aminokyselin. Nejvyšší korekční faktory byly stanoveny pro serin, threonin a tyrozin u modelových vzorků tavených sýrů s nejvyšším obsahem tuku v sušině.

**Klíčová slova:** aminokyselina, kasein, kyselá hydrolyza, hydrolyzační křivka, korekční faktory, ztráta

## **ABSTRACT**

Fifteen amino acids (aspartic acid, threonine, serine, glutamic acid, proline, glycine, alanine, valine, isoleucine, leucine, phenylalanine, tyrosine, histidine, lysine and arginine) were determined in bovine casein and in model processed cheese with 30, 45 and 60 % w/w fat in dry matter. It was observed influence of fat-content on hydrolysis curve and value of correction factors. Hydrolysis curves were provided by nonlinear regression using 13 hydrolysis intervals (at intervals 0 - 144 h). Amino acids were separated and determined by using ion-exchange chromatography onto an Amino Acid Analyser AAA400. According to hydrolysis curves were calculated correction factors for amino acids with the aim of higher accuracy of amino acids determination. With growing content of fat in the samples was determined higher correction factors.

The higher correction factors were determined for serine, threonine and tyrosine in model processed cheese with the highest content of fat in dry matter.

**Keywords:** amino acid, casein, acid hydrolysis, hydrolysis curve, correction factors, loss

## Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Františku Buňkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky při zpracování mé bakalářské práce.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem na bakalářské práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautorka.

Ve Zlíně 29.5.2008

.....

Podpis bakaláře

# OBSAH

ÚVOD.....	7
<b>I</b> <b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>8</b>
<b>1</b> <b>AMINOKYSELINY</b> .....	<b>9</b>
1.1    URČENÍ AMINOKYSELIN V PROTEINU .....	9
1.2    HYDROLÝZA AMINOKYSELIN.....	9
1.2.1    Kyselá hydrolyza.....	10
1.2.2    Použití mikrovlnného ohřevu .....	11
1.2.3    Alkalická hydrolyza .....	11
1.2.4    Enzymatická hydrolyza .....	12
1.3    STANOVENÍ CYSTEINU A METIONINU .....	12
1.4    DETEKCE A KVANTIFIKACE AMINOKYSELIN .....	12
<b>2</b> <b>BÍLKOVINY KRAVSKÉHO MLÉKA</b> .....	<b>14</b>
<b>3</b> <b>TAVENÉ SÝRY</b> .....	<b>16</b>
3.1    CHARAKTERISTIKA TAVENÝCH SÝRŮ .....	16
3.2    ZÁKLADNÍ PRINCIPY VÝROBY TAVENÝCH SÝRŮ .....	17
3.3    HYDROLÝZA TAVENÝCH SÝRŮ .....	18
<b>II</b> <b>PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>20</b>
<b>4</b> <b>CÍL PRÁCE</b> .....	<b>21</b>
<b>5</b> <b>METODIKA PRÁCE</b> .....	<b>22</b>
5.1    POPIS EXPERIMENTU .....	22
5.2    VÝROBA TAVENÝCH SÝRŮ.....	22
5.3    KYSELÁ HYDROLÝZA .....	22
5.4    SEPARACE .....	23
5.5    ANALÝZA DAT.....	23
<b>6</b> <b>VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>26</b>
6.1    SROVNÁNÍ MODELŮ KRAVSKÉHO KASEINU A TAVENÝCH SÝRŮ .....	27
<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>39</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>40</b>

## ÚVOD

Tato práce popisuje možnosti stanovení aminokyselin v potravinách, vliv doby hydrolyzy na stanovení obsahu aminokyselin v kaseinu a vliv obsahu tuku v tavených sýrech na stanovení aminokyselin.

V teoretické části jsou stručně popsány základní hydrolyzační metody – kyselá, zásaditá a enzymatická hydrolyza, možnosti jejich použití a dále metody detekce a kvantifikace aminokyselin (zejména HPLC a iontoměničová chromatografie).

V praktické části byly vyrobeny tavené sýry s různým obsahem tuku v sušině. Ze základní mléčné bílkoviny – kaseinu a tavených sýrů byly kyselou hydrolyzou uvolněny aminokyseliny a následně detekovány iontově-výměnnou chromatografií. Na základě hydrolyzy byly stanoveny hydrolyzační křivky pro jednotlivé aminokyseliny a určen vliv obsahu tuku na hydrolyzu.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**



## 1 AMINOKYSELINY

Aminokyseliny se v potravinách vyskytují buď jako volné (asi 1 %) nebo vázané v proteinech a peptidech. Dále se mohou spojovat do derivátů s nejrůznějšími substráty jako např. sacharidy, lipidy ap. Všechny tyto aminokyseliny lze po vhodné úpravě vzorku analyzovat chromatografickými metodami. Kromě výstavby bílkovin slouží aminokyseliny jako neurotransmitery, přenašeče signálu. Určení obsahu aminokyselin je důležité nejen pro biochemické účely, ale také pro mikrobiologii, potravinářství i farmacii. [1, 27]

### 1.1 Určení aminokyselin v proteinu

Určení celkového obsahu aminokyselin v potravinách zahrnuje 2 kroky: hydrolýza polymeru (protein nebo peptid) pro uvolnění aminokyselin a dále jejich detekci (prováděná různými způsoby) a kvantifikaci. Analýza aminokyselin je také důležitá pro stanovení enantiomerů aminokyselin. Kvantifikace skutečné hodnoty aminokyselin v proteinu (před hydrolýzou) je důležitá pro farmaceutické a potravinářské účely, zejména pro vývoj léčiv a potravních doplňků. Stanovení aminokyselin v potravinách dnes souvisí i s moderním trendem zdravé výživy. Určení skladby a obsahu aminokyselin však hraje důležitou roli i při biochemických, mikrobiologických, klinických a diagnostických studiích [27].

### 1.2 Hydrolýza aminokyselin

Samotná hydrolýza je nejvíce problematickou a kritickou částí celé analýzy. Její pečlivé provedení je hlavní předpoklad pro zdařenou analýzu. Účelem hydrolyzačních metod je kvantitativní uvolnění všech aminokyselin. Volba hydrolyzační metody závisí na účelu prováděné analýzy, často je však volen kompromis mezi několika hydrolyzačními metodami. Průběh hydrolýzy ovlivňuje několik faktorů: teplota, čas, hydrolyzační činidla, další příměsi. Pro správný průběh hydrolýzy je nezbytná optimální kombinace těchto faktorů a musí být brán ohled zejména na méně stabilní aminokyseliny. Změna podmínek při hydrolýze je vždy kompromisem mezi provedením reakce a zachováním reakčních produktů [1]. Stále ale neexistuje optimální metoda hydrolýzy, kterou bychom dokázali uvolnit všechny aminokyseliny, aniž by docházelo k jejich ztrátám.

Jelikož bylo dokázáno, že je hydrolýza hlavním zdrojem nepřesností při analýze, je dnes používána již celá řada automatických přístrojů, které mají zajistit přesnější kontrolu podmínek při hydrolýze [2]. Pro dosažení akceptovatelné přesnosti by měla být podle [8] závis-

lost obsahu aminokyselin na čase hydrolyzy modelována: (1) s použitím nejméně 10 hydrolyzačních intervalů; (2) nejméně s 1 – 2 hydrolyzačními intervaly většími než 100 hodin; (3) s maximem hydrolyzačních intervalů předcházejících maximu na hydrolyzační křivce (maximum výtěžku). Hydrolyzu vázaných aminokyselin lze obecně provést třemi způsoby: kyselou, alkalickou, enzymatickou [2].

### 1.2.1 Kyselá hydrolyza

Pro kyselou hydrolyzu bylo vyzkoušeno množství kyselin, např. kyselina chlorovodíková (HCl), metansulfonová kyselina, p-toluensulfonová kyselina, a sulfonová kyselina. Již několik desetiletí je pro kyselou hydrolyzu v potravinářství a krmivářství nejběžněji používána HCl ( $c = 6 \text{ mol.l}^{-1}$ ), které je vzorek vystaven při teplotě okolo  $110 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 20-24 hodin bez přítomnosti vzduchu. Hlavní přednost hydrolyzy pomocí HCl je, že ji můžeme použít v obou fázích – plynné (vhodné např. jako pokračování elektroforetických metod) i kapalně. Standartní je doba 20 – 24 hodin, avšak vede k nepřesnému stanovení obsahu některých aminokyselin [3].

Při kyselé hydrolyze probíhají procesy uvolňování a destrukce některých aminokyselin současně. Sirné aminokyseliny (cystein, metionin) jsou kyselou hydrolyzou částečně nebo kompletně destruovány. Tryptofan je destruován kompletně. Podle [4] činí při 24hodinové hydrolyze HCl ztráty u serinu a threoninu 5 - 10%. Částečné ztráty byly zjištěny také u tyrozinu, který je citlivý na přítomnost nečistot. Asparagin a glutamin jsou kyselou hydrolyzou HCl konvertovány na kyselinu asparagovou a glutamovou [3]. Největší ztráty byly zjištěny u cysteové kyseliny a serinu. Jako ochranná činidla, mající snížit ztráty aminokyselin během hydrolyzy, bývají využívány např. fenol, thioglykolová kyselina, merkaptoetanol, indol a tryptamin, které se přidávají ve velmi malém množství k analyzovanému vzorku bezprostředně před hydrolyzou.

Například hydrolyza  $6 \text{ mol.l}^{-1}$  HCl při  $145 \text{ }^\circ\text{C}$ , doba působení 4 hodiny, ukazuje obdobné výsledky jako hydrolyza  $6 \text{ mol.l}^{-1}$  HCl při  $110 \text{ }^\circ\text{C}$ , doba působení 24 hodin [2]. Méně se uplatňuje použití kyseliny methansulfonové. Výhodami je, kromě určení dalších aminokyselin, také možnost stanovení tryptofanu a metionin sulfoxidu (produkt oxidace metioninu). Není to těkavá látka, čili není snadné ji odpařit, ale je třeba ji odstranit jiným způsobem, např. srážením.

Pořadí aminokyselin v polypeptidovém řetězci je rozhodující pro výsledek hydrolyzy. Některé vazby mezi alifatickými zbytky aminokyselin jako isoleucin-isoleucin, valin-valin, isoleucin-valin, jsou částečně rezistentní vůči hydrolyze do 24 hodin (rozštěpí se jich 50-70%). Pokud chceme dosáhnout úplného rozštěpení těchto vazeb, je nutno vystavit vzorek působení teploty 110 °C v časovém intervalu 92 – 120 h. Znamená to ale ještě větší ztrátu méně stabilních aminokyselin [4]. Řešením může být modelování uvolňování a degradace jednotlivých aminokyselin pomocí nelineární regresní analýzy obsahu aminokyselin v jednotlivých hydrolyzačních intervalech. Pro dosažení přijatelné přesnosti je vhodné pro jednotlivé aminokyseliny určit hydrolyzační křivky a korekční faktory. Avšak korekční faktory pro mléčný kasein nebyly v literatuře nalezeny. Korekční faktory lze stanovit pro standardní dobu hydrolyzy:

- a) extrapolací obsahu aminokyselin v čase 0 [5]
- b) s použitím maxima na hydrolyzační křivce [6]

### 1.2.2 Použití mikrovlnného ohřevu

Jako náhrada klasického ohřevu byla studována i hydrolyza za použití mikrovlnného ohřevu, kdy dochází díky vyzařování energie k ohřevu až na 180 °C. Přenos energie se uskutečňuje na základě polarizace a nedochází ke srážkám molekul. Výhodou mikrovlnného ohřevu je zejména podstatné zkrácení doby hydrolyzy z několika hodin na pár minut [7]. Pro kapalnou fázi je to obvykle 1-30 minut a pro plynnou 20 – 45 minut. Výsledky jsou obdobné jako u běžné hydrolyzy.

### 1.2.3 Alkalická hydrolyza

Při kyselá hydrolyze je tryptofan degradován vlivem přítomnosti kyseliny chlorovodíkové. Přistupuje se proto k alkalická hydrolyze, jež je používána prakticky výhradně pro stanovení tryptofanu, který je v alkalických podmínkách poměrně stabilní. U alkalické hydrolyzy je hlavní nevýhodou této metody částečná nebo úplná destrukce serinu, threoninu, argininu, a cysteinu. Jiné aminokyseliny jsou racemizovány, což může mít také vliv na výsledek hydrolyzy. Pro alkalickou hydrolyzu se využívá nejčastěji NaOH, KOH, LiOH nebo Ba(OH)<sub>2</sub> [5]. Autoři Kráčmar et al. [20] doporučují pro stanovení tryptofanu LiOH ( $c = 4,0 - 4,2 \text{ mol.l}^{-1}$ ), při jehož použití bylo ve srovnání s Ba(OH)<sub>2</sub> dosaženo lepších výsledků a jednoduššího po-

stupu. Alkalická hydrolýza se provádí ve skleněné ampuli, kde je vzorek zalit LiOH ( $c = 4,2 \text{ mol.l}^{-1}$ ) a probulán  $\text{N}_2$ . Hydrolýza probíhá 7 hodin při teplotě  $145 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Tryptofan je esenciální aminokyselina nezbytná pro správné fungování mozku a nervových regulačních mechanismů. Důležitá je přítomnost tryptofanu v potravě, neboť právě z něj je syntetizován serotonin. Jeho koncentrace je přímo ovlivňována příjmem tryptofanu v potravě.

#### **1.2.4 Enzymatická hydrolýza**

Enzymatická hydrolýza představuje mnohem mírnější podmínky než kyselá i alkalická hydrolýza. Její hlavní předností je, že umožňuje stanovení asparaginu a glutaminu, jež vykazují během chemické hydrolýzy ztráty. Není moc často aplikována v praxi, problémem může být nekompletnost analýzy, kterou způsobuje specifita proteáz a také délka těchto reakcí [9,10].

### **1.3 Stanovení cysteinu a metioninu**

Aminokyseliny cystein a metionin nemohou být s dostatečnou přesností určeny z kyselého hydrolyzátu. Příčinou je jejich částečná destrukce během hydrolýzy HCl. Proto se přistupuje k oxidativně-kyselému způsobu stanovení. Přítomný cystein a metionin je nejprve oxidován (zpravidla pomocí směsi kyseliny mravenčí a peroxidu vodíku v poměru 1:9) na kyselinu cysteovou a metionin sulfon, které jsou již při následné kyselé hydrolýze mnohem stabilnější. Při tomto způsobu však dochází ke značným ztrátám aminokyselin, jako jsou fenylalanin, tyrozin, serin a threonin. Proto se kyselý a oxidativně-kyselý způsob hydrolýzy provádějí souběžně.

### **1.4 Detekce a kvantifikace aminokyselin**

Dalším krokem stanovení aminokyselin v proteinu je způsob provedení druhé části analýzy – detekce a kvantifikace. Aminokyseliny uvolněné z proteinů a peptidů lze stanovit mnoha chromatografickými i elektromigračními metodami, z nichž se některé vyvinuly speciálně pro detekci aminokyselin. Před detekcí se zpravidla aminokyseliny derivatizují. K nejvíc rozšířeným a nejpoužívanějším technikám patří iontově-výměnná chromatografie a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography) vybavená zejména UV/VIS nebo fluoresčními detektory, které využívají post- kolonovou derivatizaci

nebo před-kolonovou derivatizaci aminokyselin. Post-kolonová derivatizace zahrnuje oddělení aminokyselin pomocí ionto-měníčové kolony, následuje reakce s chromoforem za vzniku barevných komplexů. U před-kolonového systému dochází nejprve k derivatizaci v hydrolyzátu a poté jsou deriváty odděleny na reverzní fázi v HPLC koloně. Nevýhodou HPLC metod je zejména nižší mez stanovitelnosti a náročná a poměrně drahá příprava vzorků, zejména experimentálně náročná předkolonová derivatizace volných aminokyselin. K nejčastějším post – kolonovým derivatizačním činidlům patří ninhydrin a o-ftthalaldehyde (OPA). Standartně se využívá ninhydrin, jehož výhodou jsou široké možnosti použití, spolehlivost a možnost stanovení mnoha aminokyselin. OPA ve spojení s fluorescenční detekcí je používán pro svou vysokou citlivost, nevýhodou je menší stabilita vzniklých derivátů. Při předkolonové derivatizaci jsou aminokyseliny derivatizovány před vstupem do kolony a separovány na základě reverzní fáze HPLC kolony. U předkolonových technik je nejčastěji jako činidlo využíván fenylisothiokyanát (PTC) [1, 21].

Byla vyvinuta řada nových metod, jež zrychlovaly a rozšiřovaly analýzu. Ale vzhledem k tomu, že moderní metody ukázaly řadu nedostatků, zůstává klasické stanovení aminokyselin nejběžnější a nejvýznamnější metodou. Jako další metody detekce aminokyselin lze uvést hmotnostní spektrometrii a plynovou chromatografii. Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická metoda, která využívá separace urychlených ionizovaných částic (iontů) ve vakuu, a to podle jejich hmotnosti při jejich průchodu magnetickými a elektrickými poli. Metoda byla vyvinuta počátkem 20. století a původně byla využívána zvláště v exaktních vědách, mj. byly pomocí této metody objeveny stabilní izotopy prvků [11].

Plynová chromatografie - základem je nepřetržitě ustalování rovnováhy dělené látky mezi pohyblivou a stacionární fází. Každá molekula dělené látky nepřetržitě přechází z pohybující se plynné fáze (nosného plynu) na povrch adsorbentu nebo do filmu kapaliny a zase zpět do plynné fáze. Nepřetržitý proces lze lépe popsat rozdělením na elementární procesy - úseky, kde předpokládáme dosažení úplné rovnováhy mezi fázemi. Existují zmínky o použití této metody při analýze aminokyselin po příslušné derivatizaci [12].

## 2 BÍLKOVINY KRAVSKÉHO MLÉKA

Bílkoviny v kravském mléce můžeme rozdělit na kaseinové (cca 80%) a nekaseinové (syrovátkové) bílkoviny (cca 20%). Nutriční a biologická hodnota mléka se však s různými technologickými postupy snižuje. Kasein je komplex frakcí fosfolipidů. Základními frakcemi jsou  $\alpha_{S1}$ ,  $\alpha_{S2}$ ,  $\beta$ , jsou velmi citlivé na obsah vápníku v mléce. Kaseinové frakce jsou v mléce vázány do velkých koloidních útvarů – kaseinových micel morušovitého tvaru o průměru 30 – 300 nm, které jsou složeny ze submicel o průměru 10 – 12 nm. Spojení frakcí v micely je reverzibilní, velikost micel je závislá na obsahu  $\text{Ca}^{2+}$ , s jehož úbytkem se micely zřetelně zmenšují. Obě frakce  $\alpha_s$  jsou hydrofobní a velmi citlivé na přítomnost  $\text{Ca}^{2+}$  a sráží se jím,  $\beta$ -kasein je výrazněji hydrofobní a rovněž citlivý na vápník. Všechny uvedené frakce díky vysokému obsahu prolinu, cystinu a cysteinu, které se účastní příčných vazeb mezi řetězci, dávají kaseinu odolnost vůči teplotám nad 100 °C [22].

Proti vysrážení chrání tyto frakce  $\kappa$  – kasein, jenž má na rozdíl od ostatních frakcí odlišné vlastnosti- je hydrofilní, má ve své molekule vázanou cukernou složku a nejméně fosforu a proti  $\text{Ca}^{2+}$  je odolný. Je rozmístěn především v povrchové vrstvě submicel a chrání tak bílkovinu před koagulací. Lze jej rozštěpit působením enzymu chymosin, čímž  $\kappa$  – kasein ztrácí svůj ochranný vliv na ostatní frakce, a ty se vysráží ve formě vápenatých solí. Toho se využívá při výrobě sýrů. Při výrobě přírodních sýrů dochází působením enzymu renin v přítomnosti vápenatých iontů k agregaci frakcí kaseinu za vzniku gelu. Při této operaci odchází nekaseinové bílkoviny a  $\kappa$ -kaseinmakropeptid (štěpný produkt  $\kappa$ -kaseinu vzniklý v důsledku působení reninu) do syrovátky a nestávají se tak součástí přírodních sýrů [13, 15]. Podstatná část vápníku je v mléce vázána na kasein. Z mléka je možno jej vysrážet:

- a) okyselením při pH 4,6 a teplotě 20 ° C (např. přidáním etanolu)
- b) působením enzymu renin (chymozin)

Bylo zjištěno, že kaseinové micely obsahují kromě frakcí kaseinu a vázaného vápníku i hořčík, citráty a fosfáty [14].

Kaseinové micely jsou obklopeny vrstvou hydratační vody, do které jsou orientovány hydrofilní části bílkovinných řetězců včetně disociovaných karboxylových skupin. Do této vrstvy jsou přitahovány kladně nabití ionty vápníku, a tak vzniká elektrická dvojvrstva, která tvoří ochranný obal kaseinové micely a udržuje ji v koloidním stavu [22].

Obrázek 1 Kaseinová micela [28]

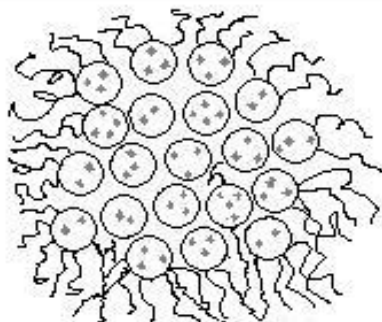


Figure 2. Casein Micelle

- submicelle
- ◆ calcium phosphate
- ~ k-casein peptide chain

## 3 TAVENÉ SÝRY

### 3.1 Charakteristika tavených sýrů

Tavené sýry jsou nejmladší skupinou sýrů, kterou můžeme zařadit do současného trendu „convenience food“. Hlavní surovinou pro výrobu těchto sýrů jsou přírodní sýry (nejčastěji Eidamská cihla, Eidamský blok o různém obsahu tuku v sušině, Moravský bochník). Předpokládá se, že ve srovnání s přírodními sýry mají sýry tavené poněkud nižší výživovou hodnotu, což je způsobeno použitím zvýšené teploty při tavení a přidáním tavicích solí, které jsou nezbytné pro homogenitu výrobku. Při výrobě tavených sýrů je použito teploty 75–100° C a emulgujících činidel (tavicích solí). Jako tavicí soli se v praxi nejčastěji používají fosforečnany, polyfosforečnany, někdy citrany (obsah 2–3% w/w surovinové skladby), jejich použití závisí především na druhu sýra, stupni prozrálosti atd. Tavené sýry jsou výrobky různorodé ve svém složení, například v obsahu tuku v sušině (TVS), který se prakticky může pohybovat od 30 do 70 % w/w TVS [19]. Podle obsahu tuku v sušině se dělí (dle Vyhlášky Ministerstva zemědělství č. 77/2003 Sb.): vysokotučné tavené sýry (obsah tuku v sušině nad 60 % hmotnostních), nízkotučné tavené sýry (s obsahem tuku v sušině do 30 % hmotnostních). Dle odborné literatury lze tavené sýry ještě rozdělit na: plnotučné (s obsahem tuku v sušině cca 45 až 60 % hmotnostních) a polotučné (s obsahem tuku v sušině cca 30 – 45 % hmotnostních).

Konzistence tavených sýrů je dnes považována za jeden z nejdůležitějších sensorických znaků. Je závislá zejména na složení směsi surovin, způsobu zpracování taveniny, rychlosti chlazení, délce skladování a na skladovacích podmínkách. Do směsi surovin se kromě přírodních sýrů a tavicích solí mohou používat také další přísady jako tvaroh (ke zvýšení tukuprosté sušiny a zvýšení pH), máslo (ke zvýšení obsahu tuku), pitná voda, v některých případech tzv. krém (již utavený sýr – pro dosažení jemnější a stabilnější konzistence). Lze také použít přísad ovlivňujících chuť a barvu – šunka, žampiony, zeleniny apod. [25]. Dále je konzistence ovlivňována působením faktorů jako jsou stupeň prozrálosti suroviny, poměr obsahu sušiny a tuku v sušině, hodnota pH (aktivní kyselosti) taveného sýra, obsah vápenatých iontů, způsob zpracování taveniny, rychlost chlazení, konkrétní skladba tavicích solí. Všechny tyto faktory působí jako komplex, proto se musí brát v úvahu jejich vzájemný vztah.



V současné době lze vytvořit tavené sýry se sníženým obsahem základní suroviny - přírodního sýra. Jedná se o náhradu přírodního sýru různými mléčnými koncentráty – např. sušená syrovátka, sušené odstředěné mléko, sušený jogurt apod. Hlavním cílem těchto náhrad je snížení nákladů na výrobu suroviny, což ale může mít negativní vliv na jakost výsledného taveného sýra. Náhrady přírodního sýra lze uskutečnit také např. kaseináty (sodné, vápenaté), bílkovinou jiného než mléčného původu, rostlinnými oleji, látkami určenými k aromatizaci aj. Jedná se o tzv. „analogy tavených sýrů“. Hlavní výhoda spočívá opět ve snížení nákladů na suroviny, neboť relativně dražší mléčná bílkovina a tuk mohou být nahrazeny levnějšími rostlinnými zdroji. Tyto analogy se používají především v kuchyních a provozovnách fast food a obliba roste také u spotřebitelů preferujících především nižší cenu, nižší obsah tuku, kde převažuje podíl nasycených mastných kyselin a nižší obsah cholesterolu [23, 24].

### **3.2 Základní principy výroby tavených sýrů**

Přírodní sýry představují složitý polydisperzní systém, ve kterém se kromě minoritních látek (soli, kyseliny, zbytky laktosy aj.) nacházejí především bílkoviny, tuk a voda. Pokud by došlo ke záhřevu směsi přírodních sýrů bez přítomnosti tavicích solí, nedošlo by ke vytvoření souvislé homogenní struktury (schéma výroby tavených sýrů – obrázek 2).

Tavicí soli brání při výrobě tavených sýrů destrukci membrán pokrývajících tukové kuličky, čímž zabraňují jejich spojování do větších formací a také brání agregaci bílkovin za vyšší teploty, což by vedlo ke vzniku nehomogenní hmoty (oddělil by se tuk, kasein, voda). Kaseiny slouží v tavených sýrech jako emulgátory, v přírodních sýrech je však tato jejich schopnost potlačena. Tavicí soli se v tavených sýrech často označují jako emulgátory, ale v pravém slova smyslu nejde o emulgátory jako povrchově aktivní látky. Pojmenování „emulgující činidla“ lépe vystihuje jejich skutečnou úlohu při procesu tavení. Jejich hlavní úlohou je odštěpit vápník navázaný na kasein a vyměnit jej za sodík. Především upravují prostředí tak, aby kaseiny mohly uplatnit své přirozené vlastnosti emulgátorů. Dále přispívají k rozpouštění a rozptýlení proteinů, hydratují bílkoviny, napomáhají k emulgaci tuku a jeho stabilizaci, ovlivňují a stabilizují pH, přispívají ke zformování struktury po ochlazení. Samy soli se během tavení navazují na bílkoviny (esterově na hydroxylovou skupinu serinu nebo přes vápenaté ionty, a to na karboxylové skupiny). Následně vytvořená hmota je tvoře-

na spoustou vazeb, např. vodíkovými můstky, hydrofobními interakcemi, vápníkovými a sulfidický fosfátovými můstky.

Během procesu tavení (dlouhodobé působení teploty a mechanické míchání) se přes vápenaté ionty začínají navazovat polyvalentní ionty, čímž se zvyšuje jejich hydrofobní charakter. Následným vázáním vody se zvyšuje viskozita taveniny zapříčiňující tzv. krémování [23]. Při procesu tavení dojde také ke zmenšení nebo rozptýlení tukových kuliček. Přestože mléčný tuk není pro průběh krémování zásadně nezbytný, je důležitou složkou tavených sýrů, která ovlivní například roztíratelnost. Při krémování jsou klíčovými procesy hydratace proteinu a emulgace tuku, jejichž intenzita je podmíněna vlastnostmi použitých tavicích solí.

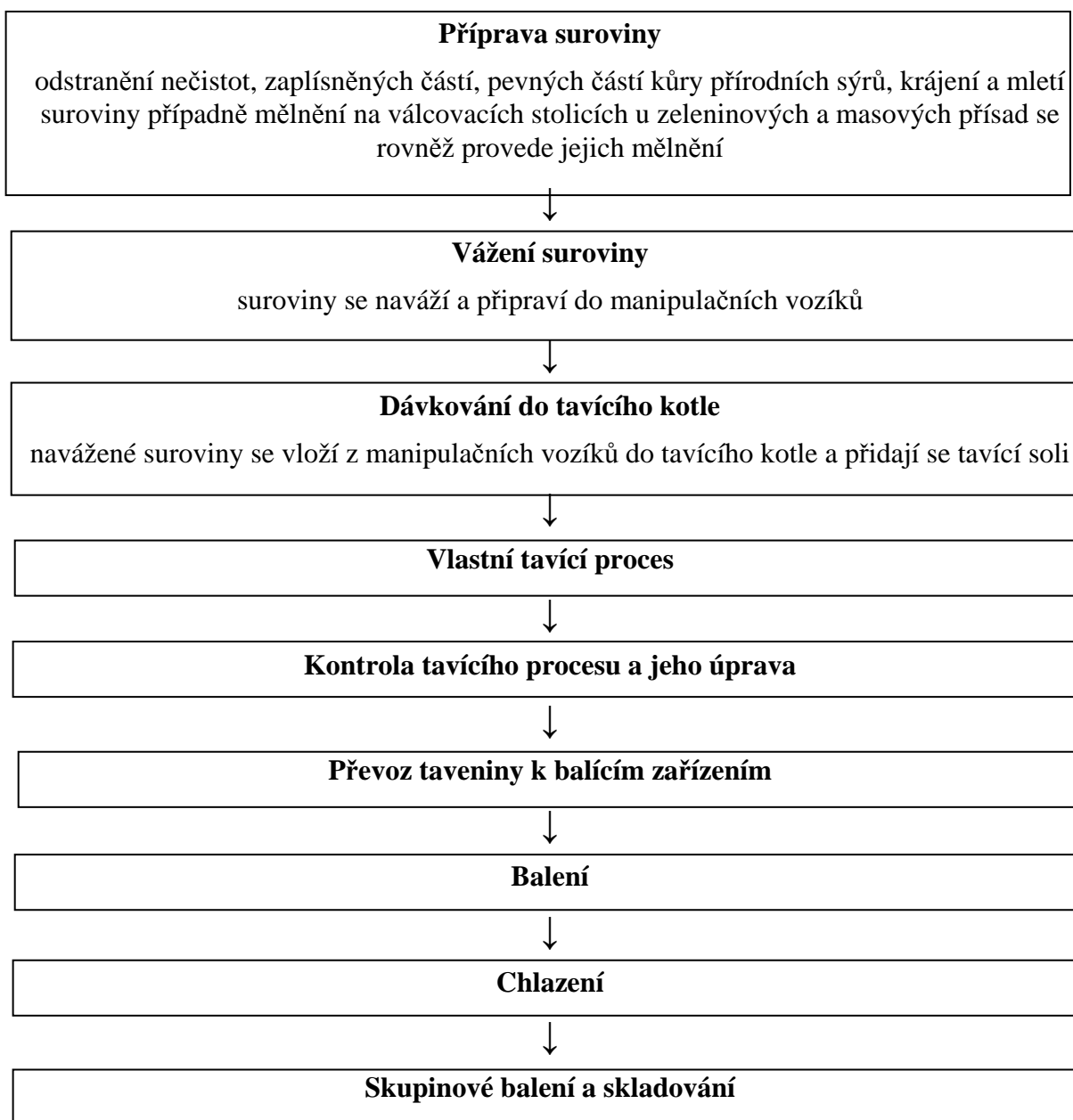
Další důležitý faktor při výrobě tavených sýrů je pH. Optimum se předpokládá v rozmezí 5,7 až 6,0. Při nižším pH (5,0 až 5,2), které se blíží isoelektrickému bodu kaseinu, je možné pozorovat vyšší počet interakcí mezi proteiny vedoucí až k jejich agregaci. Tavený sýr s takovým pH je pak drobný. Naopak při vyšším pH (6,5 až 6,7) dochází ke snížení elektrostatických interakcí, protože roste záporný náboj přítomných proteinů, což je příčinou jejich odpuzování.

### **3.3 Hydrolýza tavených sýrů**

Tavené sýry jsou výrobky s velkou variabilitou v chemickém složení. Přítomnost tuků, sacharidů, popř. jiných látek může ovlivnit výsledek hydrolýzy proteinů, resp. ztrátu aminokyselin při kyselé hydrolýze. Obsah aminokyselin se v tavených sýrech běžně stanovuje. Existuje však domněnka, že obsah aminokyselin může souviset s obsahem tuku [10, 1, 4].

Podle [5] je třeba pro stanovení uspokojivé přesnosti určit hydrolyzační křivky a korekční faktory pro jednotlivé proteiny. Korekční faktory pro kaseinové bílkoviny kravského mléka však nebyly v dostupné literatuře publikovány.

Obrázek 2 Schéma výroby tavicích sýrů



## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 4 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo:

- prostřednictvím nelineární regrese modelovat závislost obsahu aminokyselin na době kyselé hydrolýzy u kaseinu získaného z kravského mléka
- studovat vliv obsahu tuku na hydrolýzu kaseinových bílkovin v modelových vzorcích tavených sýrů s 30, 45 a 60 % tuku v sušině
- na základě hydrolyzačních křivek vypočítat korekční faktory pro jednotlivé aminokyseliny pro kasein v kravském mléce a pro kasein v tavených sýrech s 30, 45 a 60 % tuku v sušině.

## 5 METODIKA PRÁCE

### 5.1 Popis experimentu

Byly vyrobeny modelové tavené sýry s různým obsahem tuku. Kravský kasein byl získán od Sigma Aldrich, Inc., St. Louis, USA. Byly provedeny hydrolýzy těchto vzorků, které sloužily k vytvoření hydrolyzačních křivek a k určení vlivu obsahu tuku na hydrolýzu.

### 5.2 Výroba tavených sýrů

Byly připraveny 3 modelové typy tavených sýrů – s 30, 45 a 60 % w/w TVS (všechny s 40 % w/w sušiny). Tavené sýry byly vyrobeny pomocí mixeru s ohřevem Vorwerk Thermomix TM 21 (Vorwerk & Co. Thermomix; GmbH, Wuppertal, Německo). Stejné zařízení bylo použito například v práci Lee et al. [26]. Jako základní suroviny byl použit: (1) Eidamský blok – holandský typ sýra s 30 % w/w TVS a 50 % w/w TVS, 8. týdenní zralost; (2) máslo s 82 % w/w tuku a 84 % w/w sušiny; (3) voda; (4) komerční tavicí soli (sodné soli fosfátů a polyfosfátů – JOHA, Benckiser-Knapsack, Ladenburg, Německo). Množství použitých surovin pro jednotlivé tavené sýry jsou znázorněny v tabulce 1. Přírodní sýry byly pro všechny tavené sýry použity z jedné dávky. Teplota během tavení byla udržována mezi 85 a 86 °C a čas výroby byl 16 až 18 minut. Horká tavenina byla vlita do 100 g polystyrenové misky s přivařitelným víčkem a po uzavření uskladněna při  $6 \pm 2$  °C. Celková hmotnost tavených sýrů byla asi 700 – 800 g v jedné dávce. Každý tavený sýr byl vyroben stejným způsobem dvakrát (celkem 6 šarží o 3 různých tučnostech). Tavené sýry byly analyzovány po 21 dnů skladování při  $6 \pm 2$  °C.

### 5.3 Kyselá hydrolýza

Byla hydrolyzována modelová bílkovina – kasein (20-25 mg) a tři modelové typy tavených sýrů: s 30, 45 a 60 % w/w tuku v sušině (100 – 120 mg). Přesně zvážené množství vzorku bylo zalito 15 ml HCl ( $6 \text{ mol.l}^{-1}$ ) a následně byl probubláno argonem po dobu 1 minuty (pro vytěsnění kyslíku z lahvičky). Uzavřená lahvička byla umístěna do termobloku, kde byla vystavena působení teploty 110 °C po dobu 0, 1, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 48, 72, 96, 120 a 144 hodin. Další 2 vzorky s hydrolyzačními časy 21 a 70 hodin byly použity pro vyhodnocení hydrolýzy nelineární regresí. Pro kontrolu byl tento postup opakován třikrát v různých dnech. Po ukončení hydrolýzy byla lahvička se vzorkem ochlazena pod 20 °C a vzorek byl

kvantitativně převeden do odpařovací baňky. Poté byla HCl odpařena a zbytek byl rozředěn dávkovacím pufrům 2,2 do 25ml odměrných baněk. Směs byla filtrována přes filtr (0,45 $\mu$ m) a následně vložena v ampulkách do analyzátoru.

## 5.4 Separace

Následně byla provedena detekce a kvantifikace pomocí iontově-výměnné chromatografie. 100  $\mu$ l hydrolyzátu v dávkovacím pufru bylo vpraveno do analyzátoru aminokyselin AAA400 opatřeného kolonou (370 $\times$ 3.7 mm, naplněná ionexem Ostion LG ANG – Ingos, Praha), post-kolonovou derivatizací ninhydrinovým činidlem a spektrofotometrickou detekcí (440 nm pro prolin a 570 nm pro ostatní aminokyseliny). Aminokyseliny byly z kolony eluovány podle programu (složení sodno-citranových pufrů je uvedeno v tabulce 2): 0-5 min. pufr A; 5-32 min. pufr B; 32-44 min. pufr C; 44-73 min. pufr D. Potom byla kolona regenerována působením 0,2 mol.l<sup>-1</sup> NaOH po dobu 10 minut a stabilizována dalších 12 minut pufrům A. Teplota kolony byla nastavena na 60 ° C (po dobu 0-60 min. a 90-102 min.) a na 74 ° C (60-90 min.). Použití a složení pufrů a příprava ninhydrinových činidel je doporučeno výrobcem. Standard 15 stanovovaných aminokyselin byl získán z Ingos, Praha.

Jak již bylo zmíněno v teoretické části, cystein, metionin a tryptofan jsou při kyselé hydrolyze částečně anebo zcela destruovány, a proto nebyly vzaty do tohoto experimentu.

## 5.5 Analýza dat

Závislost obsahu volných aminokyselin ( $B$ ) na době hydrolyzy ( $t$ ) ve vzorcích kravského kaseinu a tavených sýrů byla popsána pomocí funkce:

$$B(t) = \frac{A_0 h}{h-l} \cdot (e^{-lt} - e^{-ht}) + \varepsilon \quad (1)$$

kde:

$B(t)$  vyjadřuje obsah volných aminokyselin ( $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) v čase  $t$  (h);

$A_0$  je obsah aminokyselin v proteinu před hydrolyzou ( $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),

$h$  je poměr, v němž jsou vázané aminokyseliny hydrolyzovány do volné a měřitelné formy,

$l$  je poměr, v němž jsou aminokyseliny degradovány,

$\varepsilon$  je náhodná složka [8].

Odhad parametrů  $A_0$ ,  $h$  a  $l$  byl proveden nelineární regresní analýzou pro omezující podmínky  $A_0 \geq 0$ ,  $h \geq 0$  a  $l \geq 0$ . Využita byla Marquardt-Levenburg metoda aplikovaná ve statistickém softwaru Unistat 5.5. Odhadnuté parametry byly doplněny jejich směrodatnými odchylkami. Pro vytvoření regresní křivky byly použity hydrolyzační časy 0, 1, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 48, 72, 96, 120 a 144 hodin

Kvalita navržených modelů byla hodnocena pomocí korelačního koeficientu ( $r$ ). Dále byly, na základě odhadnutých parametrů ( $A_0$ ,  $h$  a  $l$ ), vypočteny hodnoty obsahu sledovaných aminokyselin pro  $t = 21$  a  $70$  a srovnány se skutečně naměřenými obsahy aminokyselin v hydrolyzačních časech 21 a 70 hodin (použit byl jednovýběrový Studentův t-test).

(Regresní analýza byla provedena ve spolupráci s Katedrou ekonometrie Univerzity obrany v Brně).

*Tabulka 1. Základní suroviny (g) pro výrobu modelových tavených sýrů s 30, 45 a 60 %w/w FDM*

Základní suroviny	Typy tavených sýrů (% w/w) TVS		
	30	45	60
Eidamský blok – sýr	520	440	300
Máslo	5	90	165
Voda	155	230	280
Emulgující činidla	14	14	14
Celkové množství	694	774	759



Tabulka 2 Použité sodno-citrátové pufrы pro celkový objem 1 l.

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
Thiodiglykol (ml)	2.50	2.50	2.50	0	5.00

## 6 VÝSLEDKY A DISKUZE

V praktické části byl jako bílkovina pozorován kasein. Byla sledována závislost výskytu obsahu aminokyselin v jednotlivých hydrolyzačních časech. Odhadnuté hodnoty regresních parametrů ( $A_0$ ,  $h$  a  $l$ ) včetně jejich směrodatných odchylek pro stanovované aminokyseliny v kaseinu získaném z kravského mléka a tavených sýrech s 30, 45 a 60 % w/w TVS jsou uvedeny v tabulkách 4-6. Průběh závislosti obsahu aminokyselin na době hydrolyzy je pro kravský kasein graficky znázorněn na obr. 1-5. V nulovém intervalu nebyla zjištěna přítomnost sledovaných kyselin u žádného testovaného vzorku, což je ve shodě s výsledky popsanými [6]. Obecně lze říci, že k největšímu uvolňování aminokyselin docházelo v intervalu hydrolyzy 10 až 20 hodin. Avšak výjimkami byly aminokyseliny valin a isoleucin, kde k maximum jejich uvolňování docházelo až po 20 hodinách hydrolyzy, což je doloženo i nízkými hodnotami rychlosti uvolňování  $h$  (Tab. 6) ve vztahu k ostatním aminokyselinám. I v literárních zdrojích bylo popsána obtížná hydrolyzovatelnost valinu a isoleucinu [7, 8].

Citlivost aminokyselin threoninu, serinu a tyrozinu a jejich ztráty při náročných podmínkách kyselé hydrolyzy popsali v dalších studiích [8]. Zvláštnosti vykazuje především histidin, jenž má ve srovnání s ostatními aminokyselinami netypický průběh hydrolyzační křivky.

Korelační koeficienty hydrolyzačních křivek (kromě histidinu) se pro kasein pohybovaly v rozmezí 0,9600-0,9867, pro tavené sýry s 30% TVS 0,9565-0,9904, pro tavené sýry s 45% TVS 0,9649-0,9912 a pro tavené sýry 60% TVS 0,9300-0,9887. Kontrola správnosti konstrukce regresního modelu byla provedena při srovnání koncentrace aminokyselin vypočtených z odhadnutých křivek s koncentrací kaseinu chromatograficky stanoveného. Při srovnání hodnot obsahu aminokyselin vypočtených z odhadnutých hydrolyzačních křivek pro 21. hodinu s koncentrací chromatograficky stanovenou v kaseinu, byla u všech testovaných aminokyselin (kromě histidinu) zjištěna nevýznamná odchylka (96-103%, vyjádřeno jako poměr z hydrolyzační křivky odhadnuté a skutečně naměřené hodnoty obsahu aminokyseliny v procentech). Pro 70. hodinu bylo dosaženo obdobné přesnosti (95-107%). Oba parametry (korelační koeficienty a poměry odhadnutých a skutečně naměřených hodnot) vypovídají o vhodně navrženém regresním modelu.

Tabulka 7 obsahuje přehled korekčních faktorů pro jednotlivé aminokyseliny a analyzovaných vzorcích modelového kaseinu a tavených sýrů. U kravského kaseinu se korekční faktory pohybovaly pro většinu aminokyselin kolem 1,00. Výjimku tvořily threonin, alanin a tyrozin, kde byla hodnota korekčního faktoru 1,03. U serinu byl korekční faktor nejvyšší –

1,14. U tavených sýrů byly vypočteny korekční faktory pro vzorky s 30 % w/w TVS v intervalu 1,00-1,04 (kromě serinu), pro vzorek s 45 % w/w TVS v intervalu 1,00-1,05 (kromě threoninu, tyrozinu a serinu) a pro vzorky s 60 % w/w TVS v intervalu 1,0-1,09 (kromě threoninu, tyrozinu a serinu). Vyšší korekční faktory byly stanoveny zejména pro aminokyseliny citlivé k hydrolyzačním podmínkám, jako threonin, serin, tyrozin, což již bylo popsáno [9, 8]. Lze srovnat korekční faktory s údaji publikovanými dříve [6], z čehož vyplynulo, že námi zjištěné hodnoty jsou pro většinu aminokyselin mírně nižší. Tento fakt mohl být zapříčiněn prakticky nulovým obsahem sacharidů v hydrolyzovaném vzorku kaseinu. Absence sacharidů může být také pravděpodobná příčina dobré hydrolyzovatelnosti a také relativně nízkých korekčních faktorů pro valin, isoleucin, které se v mnohých studiích pohybují okolo 1,10-1,20 [8, 6].

Z tabulky 7 vyplývá, že pro většinu aminokyselin se korekční faktory zvyšují nárůstem obsahu tuku ve vzorku. U threonin, serinu, glutamové kyseliny, tyrozinu, fenylalaninu a argininu je tento nárůst hodnot korekčních faktorů úměrný rychlosti uvolňování aminokyselin na hydrolyzační křivce.

### **6.1 Srovnání modelů kravského kaseinu a tavených sýrů**

Srovnání obsahu aminokyselin před hydrolyzou (tabulka 4) u jednotlivých typů analyzovaných vzorků (kravský kasein a tavené sýry s 3 různými obsahy TVS) bylo zjištěno, že tyto hodnoty klesají v závislosti na obsahu hrubých bílkovin (pro tavené sýry tabulka 3).

Hodnoty ztrát při hydrolyze (tabulka.5) jsou u všech typů tavených sýrů vyšší než u kaseinu pro alanin, valin, isoleucin, leucin a fenylalanin. Naopak pro serin, glutamovou kyselinu a prolin jsou ztráty při hydrolyze vyšší pro kravský kasein než pro všechny tavené sýry. Žádná jednoznačná závislost ztrát při hydrolyze na obsahu tuku u tavených sýrů nebyla prokázána.

Na druhé straně obsah tuku výrazně ovlivnil hodnoty ztrát při hydrolyze pro některé aminokyseliny (tabulka 6). S rostoucím obsahem tuku se ve vzorcích zvyšovaly hodnoty ztrát pro kyselinu asparagovou, threonin, serin, glutamovou kyselinu, prolin, tyrozin, fenylalanin a arginin. Tavené sýry s 45 a 60 % w/w TVS tak vykazovala vyšší hodnoty ztrát jak ve vztahu ke vzorkům s 30 % w/w TVS tak i ke kravskému kaseinu. U glycinu, alaninu, valinu, isoleucin, leucinu a lysinu nebyly hodnoty ztrát ovlivněny obsahem tuku ve vzorcích.

Vysvětlením vyšších hodnot ztrát u vzorků s vyšším obsahem tuku mohou být reakce sekundárních produktů oxidace lipidů s proteiny, resp. volnými aminokyselinami [17].

S rostoucím obsahem tuku lze očekávat jeho rozsáhlejší oxidaci, vyšší obsah sekundárních produktů oxidace lipidů a tím intenzivnější reakce s aminokyselinami. Tyto reakce mohou ovlivnit stanovení aminokyselin méně stabilních při hydrolyzačních podmínkách jako threonin, serin, tyrozin a částečně i arginin. Podle [18] mohou volné hydroxylové skupiny glycerolu zapříčinit interakce s asparagin a glutamin a ovlivnit tak jejich stanovení.

*Tabulka 3. Výsledky základní analýzy (pH, obsah sušiny, obsah tuku, obsah celkových bílkovin, obsah popela) tavených sýrů s 30, 45 a 60 % w/w TVS<sup>+</sup>*

Ukazatel	Typy tavených sýrů (% w/w) TVS		
	30	45	60
Obsah sušiny (% w/w)	41.87 ± 0.27 <sup>a</sup>	41.86 ± 0.30 <sup>a</sup>	41.85 ± 0.13 <sup>a</sup>
Obsah tuku (% w/w)	13,75 ± 0,65 <sup>a</sup>	19,50 ± 0,61 <sup>b</sup>	26,38 ± 0,48 <sup>a</sup>
Popel (% w/w)	5.38 ± 0.06 <sup>a</sup>	4.35 ± 0.03 <sup>b</sup>	3.50 ± 0.01 <sup>c</sup>
Celkové bílkoviny (% w/w)	21.37 ± 0.45 <sup>a</sup>	16.23 ± 0.41 <sup>b</sup>	11.54 ± 0.16 <sup>c</sup>
pH	5.87 ± 0.02 <sup>a</sup>	5.85 ± 0.04 <sup>a</sup>	5.90 ± 0.03 <sup>a</sup>

<sup>+</sup> Výsledky jsou uváděny ± směrodatní odchylka. Hodnoty v řádku, které nemají stejné písmeno v horním indexu se statisticky liší ( $P < 0.05$ ).

Tabulka 4. Obsah aminokyselin v kravském kaseinu a v tavených sýrech s 30, 45 a 60% TVS (pro časy předchozích hydrolyz) zjištěný nelineární regresí

Aminokyseliny	Zjištěný obsah aminokyselin (g/kg) <sup>+</sup>			
	kasein	typy tavených sýrů (% w/w TVS)		
		30	45	60
Asparagová k.	61.79 ± 0.34	14.11 ± 0.07	10.89 ± 0.08	7.88 ± 0.06
Threonin	38.75 ± 0.38	8.10 ± 0.06	6.55 ± 0.07	4.88 ± 0.06
Serin	47.79 ± 0.34	11.79 ± 0.11	9.28 ± 0.13	6.06 ± 0.08
Glutamová k.	184.16 ± 1.31	42.75 ± 0.32	34.55 ± 0.32	24.02 ± 0.33
Prolin	104.60 ± 0.79	23.87 ± 0.12	19.21 ± 0.18	13.43 ± 0.13
Glycin	15.43 ± 0.07	3.61 ± 0.02	2.73 ± 0.01	1.90 ± 0.01
Alanin	24.84 ± 0.16	5.62 ± 0.05	4.05 ± 0.02	2.79 ± 0.01
Valin	56.29 ± 0.70	12.78 ± 0.22	9.33 ± 0.10	6.67 ± 0.06
Isoleucin	41.93 ± 0.46	9.33 ± 0.10	6.91 ± 0.06	4.89 ± 0.04
Leucin	71.95 ± 0.33	17.28 ± 0.10	12.96 ± 0.06	9.17 ± 0.06
Tyrosin	47.47 ± 0.31	10.78 ± 0.14	8.36 ± 0.08	5.89 ± 0.06
Fenylalanin	40.40 ± 0.22	9.66 ± 0.07	7.36 ± 0.05	5.20 ± 0.03
Histidin	24.60 ± 0.30	6.21 ± 0.09	4.60 ± 0.07	3.21 ± 0.04
Lysin	61.97 ± 0.41	15.26 ± 0.11	11.38 ± 0.06	8.03 ± 0.04
Arginin	34.35 ± 0.21	7.73 ± 0.07	5.93 ± 0.05	4.16 ± 0.03

<sup>+</sup> znázorněna hodnota  $A_0 \pm$  směrodatná odchylka získaná nelineární regresí

Tabulka 5. Rychlost uvolňování aminokyselin při hydrolýze ( $h$ ) pro aminokyseliny v kravském kaseinu a v tavených sýrech s 30, 45 a 60 % w/w TVS zjištěné nelineární regresí

Amino- kyseliny	Zjištěný obsah aminokyselin <sup>+</sup>			
	kasein	typy tavených sýrů (% w/w) TVS		
		30	45	60
Asparagová k.	1.8218 ± 0.0901	1.8174 ± 0.0573	1.8487 ± 0.0930	1.6811 ± 0.0943
Threonin	0.8515 ± 0.0472	0.7219 ± 0.0248	0.8824 ± 0.0456	0.7752 ± 0.0453
Serin	1.2167 ± 0.0515	1.0256 ± 0.0457	0.8287 ± 0.0511	0.9439 ± 0.0615
Glutamová k.	1.5674 ± 0.0908	1.2810 ± 0.0586	1.2577 ± 0.0628	1.3037 ± 0.1104
Prolin	1.4316 ± 0.0825	1.3203 ± 0.0369	1.3094 ± 0.0649	1.1659 ± 0.0597
Glycin	1.9159 ± 0.0800	1.9363 ± 0.0647	1.9642 ± 0.0670	1.7844 ± 0.0745
Alanin	1.7668 ± 0.0982	1.8862 ± 0.1105	2.0710 ± 0.0708	1.9067 ± 0.0764
Valin	0.4107 ± 0.0205	0.4839 ± 0.0253	0.5651 ± 0.0254	0.4635 ± 0.0231
Isoleucin	0.3770 ± 0.0169	0.3896 ± 0.0166	0.4609 ± 0.0192	0.4102 ± 0.0198
Leucin	1.3939 ± 0.0442	1.4268 ± 0.0500	1.5548 ± 0.0453	1.5065 ± 0.0701
Tyrosin	1.0891 ± 0.0421	1.0997 ± 0.0803	0.8505 ± 0.0417	1.2973 ± 0.0825
Fenylalanin	1.0544 ± 0.0349	1.1898 ± 0.0497	1.0613 ± 0.0445	1.5979 ± 0.0658
Histidin	112.60	4610.2	4823.6	9.79·10 <sup>15</sup>
Lysin	0.9795 ± 0.0383	0.9466 ± 0.0420	1.0878 ± 0.0281	1.0027 ± 0.0354
Arginin	0.9154 ± 0.0307	0.7571 ± 0.0342	0.8985 ± 0.0311	0.9294 ± 0.0433

<sup>+</sup> znázorněna hodnota  $h$  ± směrodatná odchylka získaná nelineární regresí

<sup>++</sup> směrodatná odchylka pro histidin nebyla vypočítána pomocí software.

Tabulka 6. Ztráty aminokyselin (l) v kravském kaseinu a tavených sýrech s 30, 45 a 60 % w/w TVS zjištěné nelineární regresí

Amino- kyseliny	Zjištěné ztráty aminokyselin <sup>+</sup>			
	kasein	typy tavených sýrů (% w/w) TVS		
		30	45	60
Asparagová k.	0.0001 ± 0.0001	0.0000 ± 0.0001	0.0002 ± 0.0001	0.0007 ± 0.0001
Threonin	0.0019 ± 0.0002	0.0015 ± 0.0002	0.0023 ± 0.0002	0.0058 ± 0.0003
Serin	0.0054 ± 0.0002	0.0054 ± 0.0003	0.0075 ± 0.0004	0.0068 ± 0.0003
Glutamová k.	0.0000 ± 0.0001	0.0001 ± 0.0000	0.0004 ± 0.0002	0.0012 ± 0.0002
Prolin	0.0001 ± 0.0001	0.0000 ± 0.0001	0.0009 ± 0.0002	0.0013 ± 0.0002
Glycin	0.0000 ± 0.0002	0.0000 ± 0.0000	0.0001 ± 0.0001	0.0001 ± 0.0001
Alanin	0.0000 ± 0.0000	0.0001 ± 0.0001	0.0001 ± 0.0001	0.0000 ± 0.0000
Valin	0.0000 ± 0.0002	0.0000 ± 0.0002	0.0000 ± 0.0002	0.0000 ± 0.0001
Isoleucin	0.0000 ± 0.0002	0.0000 ± 0.0001	0.0000 ± 0.0001	0.0000 ± 0.0001
Leucin	0.0000 ± 0.0001	0.0000 ± 0.0002	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0002
Tyrosin	0.0022 ± 0.0001	0.0033 ± 0.0004	0.0048 ± 0.0002	0.0063 ± 0.0003
Fenylalanin	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0001	0.0001 ± 0.0001	0.0003 ± 0.0001
Histidin	0.0000 ± 0.0001	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0002	0.0000 ± 0.0000
Lysin	0.0000 ± 0.0002	0.0000 ± 0.0001	0.0000 ± 0.0001	0.0001 ± 0.0001
Arginin	0.0000 ± 0.0000	0.0005 ± 0.0001	0.0010 ± 0.0001	0.0017 ± 0.0002

<sup>+</sup> znázorněna hodnota  $l \pm$  směrodatná odchylka získaná nelineární regresí

Tabulka 7. Korekční faktory pro obsah aminokyselin (zjištěné jako vyjádření  $A_0$ -hodnoty z nelineární regrese jako podíl výtěžku chemické analýzy za 24 h.) v kravském kaseinu a v tavených sýrech s 30, 45 a 60 % w/w TVS

Aminokyseliny	KOREKČNÍ FAKTORY			
	kasein	typy tavených sýrů (% w/w) TVS		
		30	45	60
Asparagová k.	1.00	1.00	1.05	1.02
Threonin	1.03	1.04	1.08	1.18
Serin	1.14	1.17	1.15	1.19
Glutamová k.	1.00	1.00	1.00	1.04
Prolin	1.00	1.01	1.00	1.09
Glycin	1.00	1.00	1.01	1.02
Alanin	1.03	1.01	1.04	1.02
Valin	1.00	1.00	1.00	1.00
Isoleucin	1.00	1.00	1.00	1.00
Leucin	1.00	1.00	1.00	1.00
Tyrosin	1.03	1.04	1.14	1.14
Fenylalanin	1.00	1.00	1.00	1.02
Histidin	1.01	1.07	1.07	1.08
Lysin	1.00	1.00	1.00	1.02
Arginin	1.00	1.00	1.01	1.05

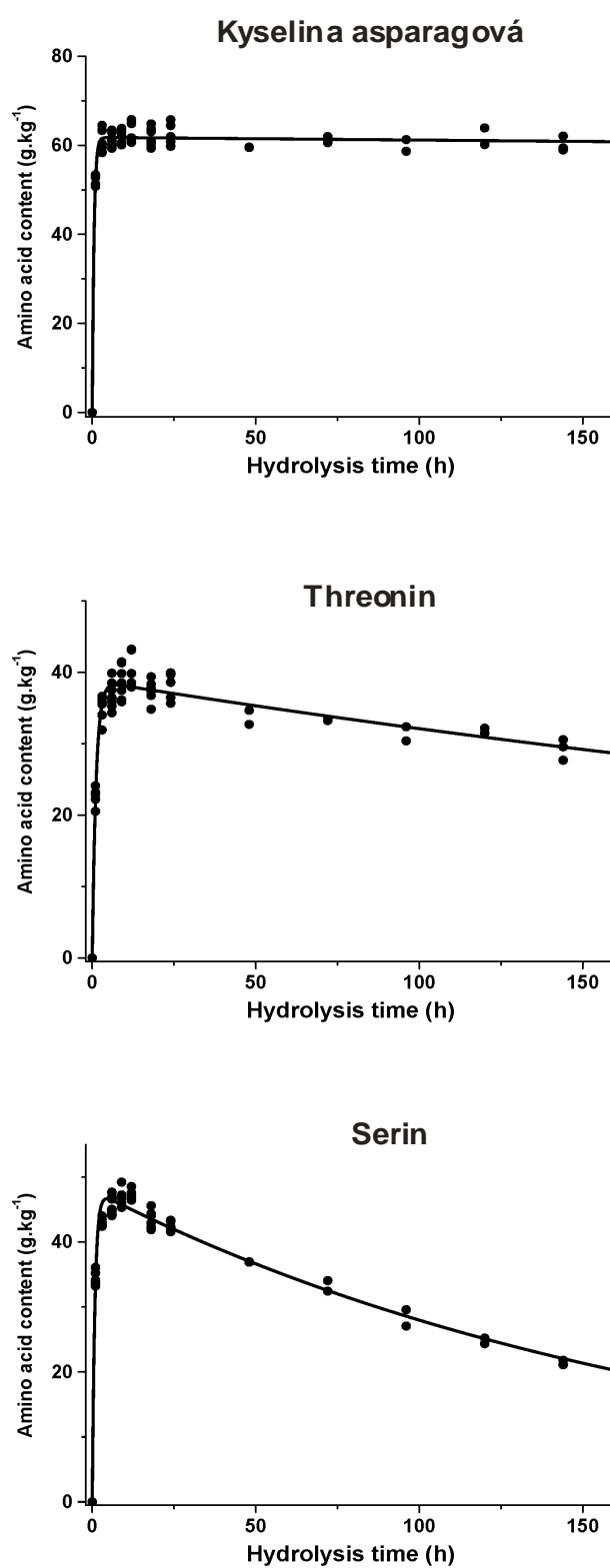


## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Kaseinová micela [28] .....	15
Obrázek 2 Schéma výroby tavicích sýrů.....	19

## SEZNAM TABULEK

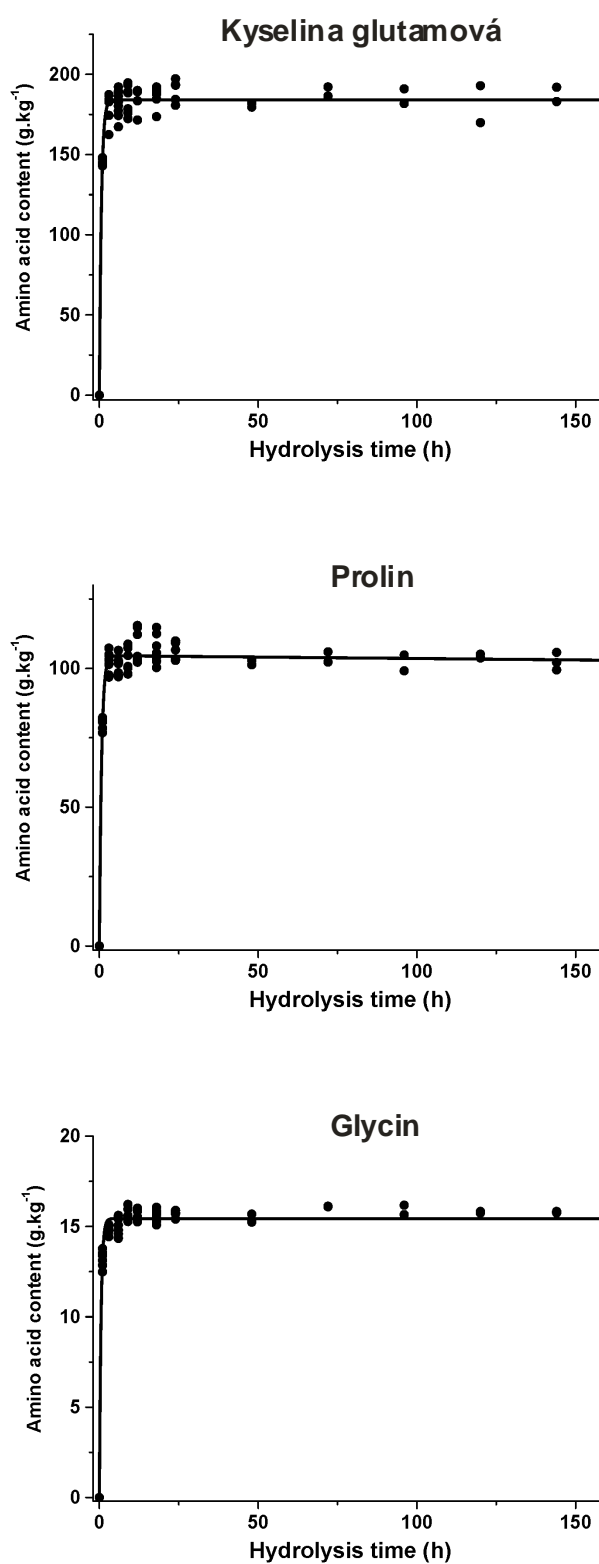
Tabulka 1. Základní suroviny (g) pro výrobu modelových tavených sýrů s 30, 45 a 60 % w/w FDM .....	24
Tabulka 2 Použité sodno-citrátové pufrý pro celkový objem 1 l.....	25
Tabulka 3. Výsledky základní analýzy (pH, obsah sušiny, obsah tuku, obsah celkových bílkovin, obsah popela) tavených sýrů s 30, 45 a 60 % w/w TVS <sup>+</sup> .....	28
Tabulka 4. Obsah aminokyselin v kravském kaseinu a v tavených sýrech s 30, 45 a 60% TVS (pro časy předchozích hydrolyz) zjištěný nelineární regresí .....	29
Tabulka 5. Rychlost uvolňování aminokyselin při hydrolyze (h) pro aminokyseliny v kravském kaseinu a v tavených sýrech s 30, 45 a 60 % w/w TVS zjištěné nelineární regresí .....	30
Tabulka 6. Ztráty aminokyselin (l) v kravském kaseinu a tavených sýrech s 30, 45 a 60 % w/w TVS zjištěné nelineární regresí .....	31
Tabulka 7. Korekční faktory pro obsah aminokyselin (zjištěné jako vyjádření A <sub>0</sub> -hodnoty z nelineární regrese jako podíl výtěžku chemické analýzy za 24 h.) v kravském kaseinu a v tavených sýrech s 30, 45 a 60 % w/w TVS.....	32



0

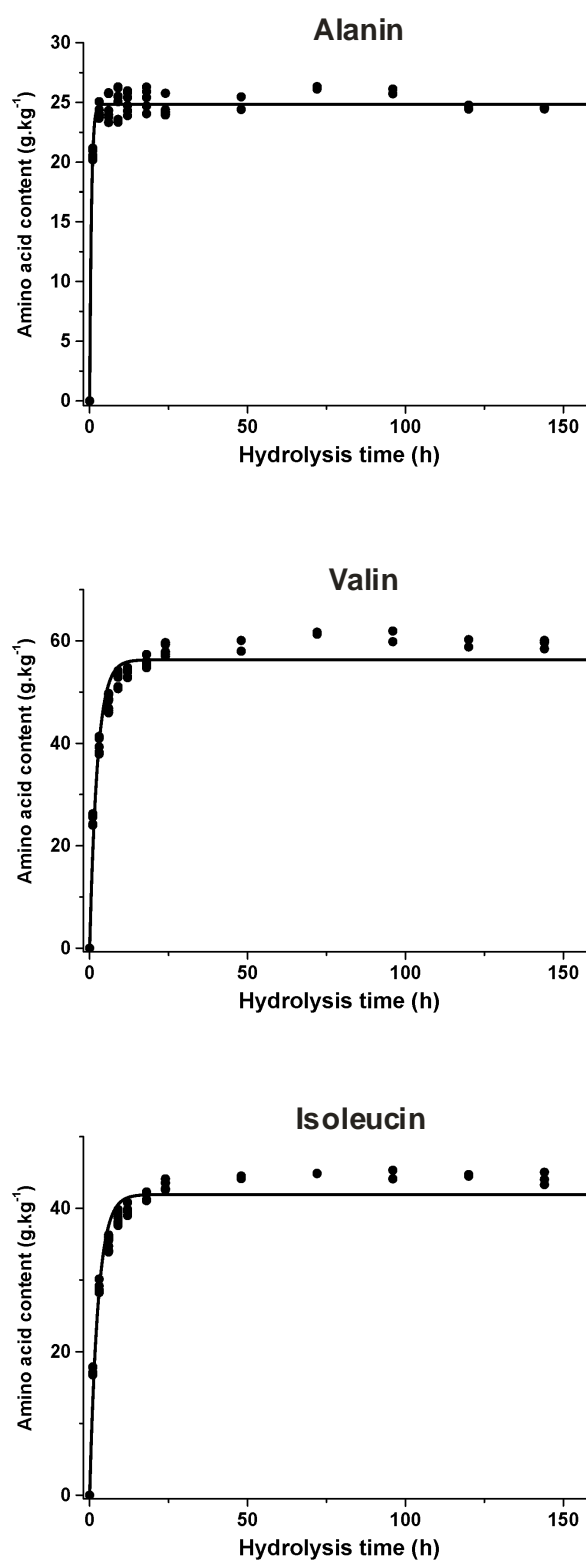
Obr. 1

Hydrolyzační křivky (závislost obsahu aminokyseliny na době kyselé hydrolyzy) pro kyselinu asparagovou, threonin a serin



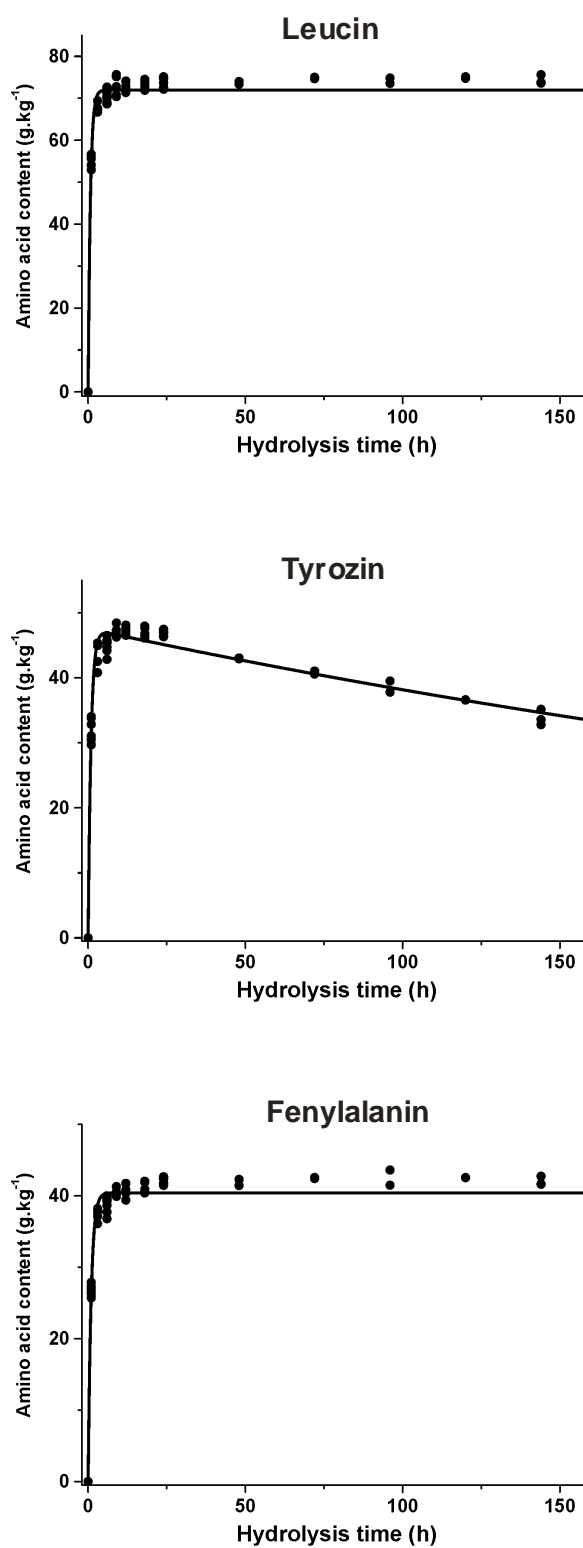
Obr. 2

Hydrolyzační křivky (závislost obsahu aminokyseliny na době kyselé hydrolyzy) pro kyselinu glutamovou, prolin a glycin



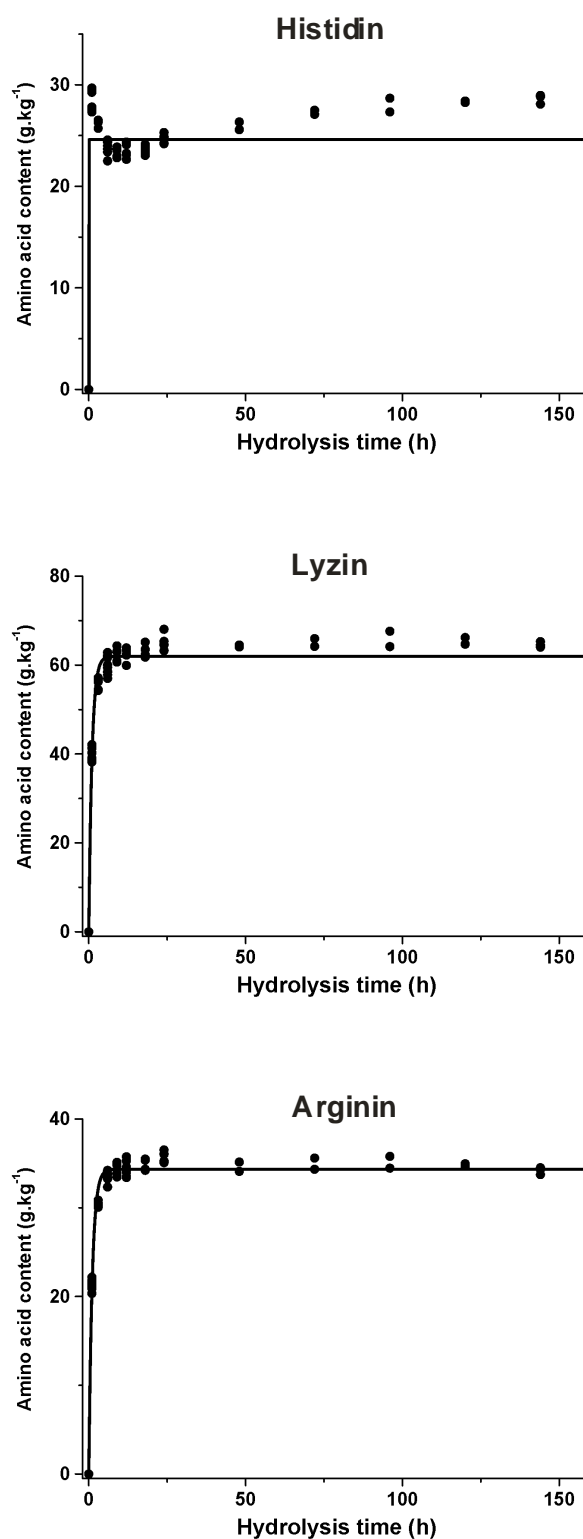
Obr. 3

Hydrolyzační křivky (závislost obsahu aminokyseliny na době kyselé hydrolýzy) pro alanin, valin a isoleucin



Obr. 4

Hydrolyzační křivky (závislost obsahu aminokyseliny na době kyselé hydrolyzy) pro leucin, tyrozin a fenylalanin



Obr. 5

Hydrolyzační křivky (závislost obsahu aminokyseliny na době kyselé hydrolýzy) pro histidin, lyzin a arginin

## ZÁVĚR

V práci byly za pomoci kyselé hydrolýzy s HCl a 13 hydrolyzačních časů vytvořeno 15 hydrolyzačních křivek pro sledované aminokyseliny (asparagová kyselina, threonin, serin, glutamová kyselina, prolin, glycin, alanin, valin, isoleucin, leucin, tyrozin, fenylalanin, histidin, lysin a arginin) pro kasein získaný z kravského mléka a pro tavené sýry s 30, 45 a 60 % w/w tuku v sušině. Na základě zkonstruovaných hydrolyzačních křivek byly vypočteny korekční faktory pro standardní dobu hydrolýzy 24 hodin, byly sledovány ztráty některých aminokyselin vzniklé během kyselé hydrolýzy. Korekční faktory se pohybovaly u většiny aminokyselin v intervalu 1,00 – 1,03 pro kravský kasein, pouze serin přesáhl tuto hodnotu ve větší míře 1,14. Dále bylo pozorováno, že se zvýšeným obsahem tuku docházelo s tavených sýrech ke zvýšení korekčních faktorů a tedy k nárůstu ztrát aminokyselin. Bylo potvrzeno, že pro přesné a akceptovatelné stanovení obsahu aminokyselin v potravinách je třeba stanovit pro každou matici hydrolyzační křivky pro dané proteiny, které zohledňují i přítomnost dalších sloučenin.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [10] Fountoulakis, M., & Lahm, H.W. (1998). Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. *Journal of Chromatography A*, 826, 109-134
- [2] Gehrke C.W, & Zumwalt R.W. (1987). Symposium on chromatography of amino-acids – 99th annual international meeting of AOAC. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 70, 146-147.
- [3] Salo-Väänänen, P.P., & Koivistoinen, P.E. (1996). Determination of proteins in foods: comparison of net protein and crude protein (N×6.25) values. *Food Chemistry*, 57, 27-31.
- [4] Nair, B.M., Öste, R., Asp, N.G., & Dahlquit, A. (1976). Enzymatic hydrolysis of food protein for amino acid analysis, I. Solubilization of the protein. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 24, 386-389.
- [5] Darragh, A.J., & Moughan, P.J. (2005). The effect of hydrolysis time on amino acid analysis. *Journal of AOAC International*, 88, 888-893.
- [6] Albin, D.M., Wubben, J.E., & Gabert, V.M. (2000). Effect of hydrolysis time on the determination of amino acids in samples of soybean products with ion-exchange chromatography of precolumn derivatization with phenyl isothiocyanate. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 1684-1691.
- [7] Weiss, M., Manneberg, M., Juranville, J.F., Lahm, H.W., & Fountoulakis, M. (1998). Effect of the hydrolysis methods on the determination of the amino acid composition of proteins. *Journal of Chromatography A*, 795, 263-275.
- [8] Darragh, A.J, Garrick, D.J., Moughan, P.J., & Hendriks, W.H. (1996). Correction for amino acid loss during acid hydrolysis of purified protein. *Analytical biochemistry*, 236, 199-207
- [9] Baxter, J.H., Lai, C.S., Phillips, R.R., Dowlati, L., Chio, J.J., Luebbbers, S.T., Dimler, S.R., & Johns, P.W. (2007). Direct determination of methionine sulfoxide in milk proteins by enzyme hydrolysis/high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, doi: 10.1016/j.chroma.2007.04.035-in press.
- [10] Ravindran, G., & Bryden, W.L. (2005). Tryptofan determination in proteins and feedstuffs by ion exchange chromatography. *Food Chemistry*, 89, 309-314.

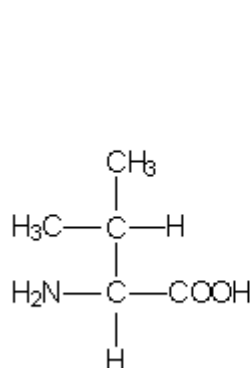


- [11] <http://www.veda.cz/article.do?articleId=13256>
- [12] [http://www.vscht.cz/ktk/www\\_324/laboratory/OborI/GC.pdf](http://www.vscht.cz/ktk/www_324/laboratory/OborI/GC.pdf)
- [13] Ginger M.R., Grigor, M.R., (1999). Comparative aspects of milk caseins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 124, 133-145
- [14] GAJDŮŠEK, S. *Laktologie*. 1.vyd. Brno: MZLU, 2003. 84s
- [15] Fox P.F., & McSweeney, P.L.H. (1998). *Dairy chemistry and biochemistry*. Blackie Academic & Professional.
- [16] Buňka, F., & Hrabě, J. (2006). Tavené sýry. *Potravinářská revue*, 3, 16-19.
- [17] Friedman, M.(1996b). Food Browning and Its prevention: An Overview. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 4, 631 – 653.
- [18] Juranville, J.F., Poschl, B., Oesterhelt, G., Schonfeld, H.J. & Fountoulakis, M. (1998). Glycerol affects the quantification of aspartate and glutamate in acid hydrolyzed proteins. *Amino acids*, 15, 253 – 262.
- [19] Guinee, T.P., Carić, M., & Kaláb, M. (2004). Pasteurized processed cheese and substitute/imitation cheese products. In: P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, & T.P. Cogan, *Cheese: Chemistry, physics and mikrobiology*. Volume 2: Major cheese groups (pp.349-394). London and New York: Elsevier Applied Science.
- [20] Kráčmar, S., Liška, I. (2002). Současný stav ve využití kukuřice. *Krmivářství*, 1, 40
- [21] <http://sweb.cz/HPLC/>
- [22] [http://utb.cepac.cz/Screens/ContentProvider.aspx/IxcDYgOsT03kv1CU6gvfjrFL-VXP\\_gNXwTxxVO4gI1/M0029\\_mlekarenska\\_technologie/distančni\\_text/M0029\\_mlekarenska\\_technologiedistančni\\_text.pdf](http://utb.cepac.cz/Screens/ContentProvider.aspx/IxcDYgOsT03kv1CU6gvfjrFL-VXP_gNXwTxxVO4gI1/M0029_mlekarenska_technologie/distančni_text/M0029_mlekarenska_technologiedistančni_text.pdf)
- [23] Carić, M., Kaláb, M., Processed cheese products. In Fox, P.F.(ed) *Cheese: Chemistry, Physics and Mikrobiology*. Volume 2. Major Cheese Groups, 2. ed. Elsevier Applied Science, London and New York, 1997, 467-505.
- [24] Bachmann, H.P. Cheese analogues: a review. *Int.Dairy J.* 11, 2001, 505-515
- [25] Gajdůšek, S. *Mlékařství II*. 1. vyd. Brno: MZLU, 1998. 142 s.

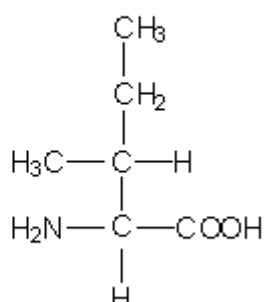
[26] Lee, Anema, S., & Klostermeyer, H. (2004). The influence of moisture content on the rheological properties of processed cheese spreads. *International Journal of Food Science and Technology*, 39, 763-771

[27] Hoza I., Kramářová D., *Potravinářská biochemie I.* 1.vyd., UTB ve Zlíně, 2005.168 s.

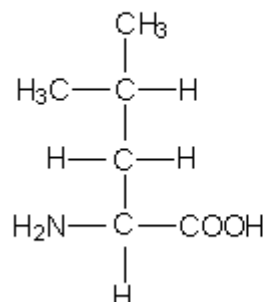
[28] <http://www.milkfacts.info/Structures/casein.JPG>

**PŘÍLOHA P I: VZORCE AMINOKYSELIN [27]**

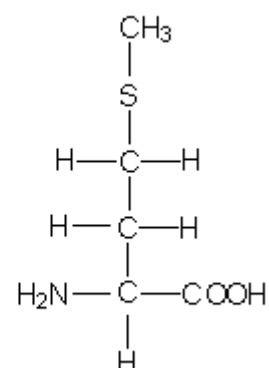
valin



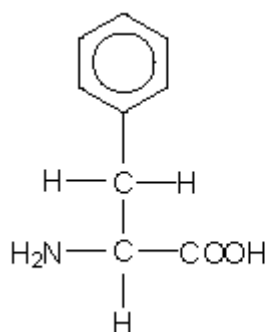
isoleucin



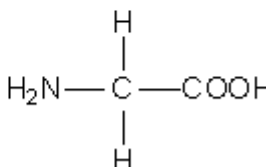
leucin



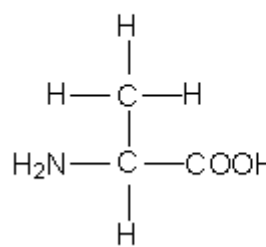
methionin



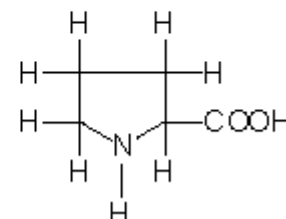
fenylalanin



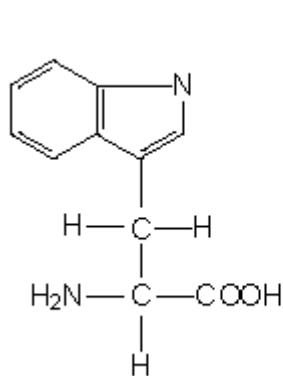
glycin



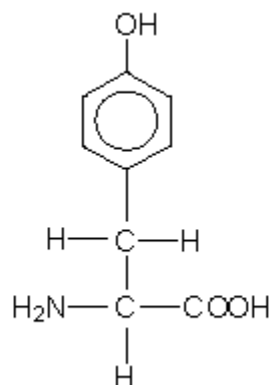
alanin



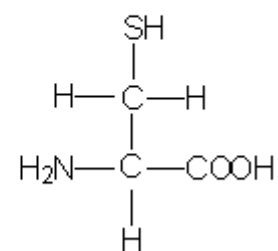
prolin



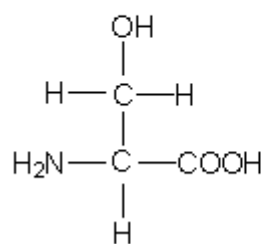
tryptofan



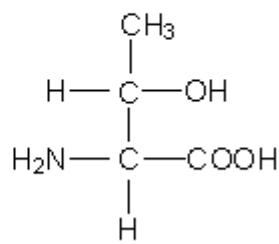
tyrosin



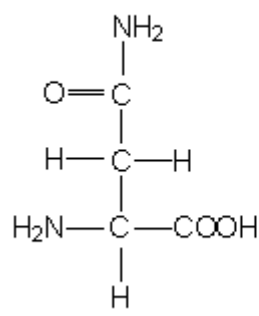
cystein



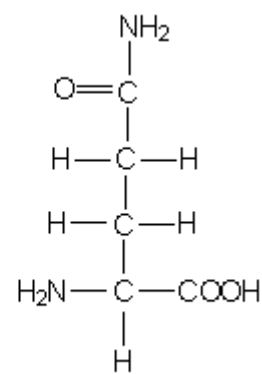
serin



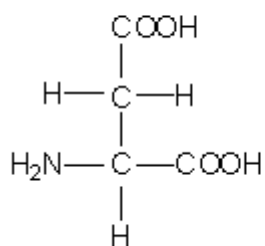
threonin



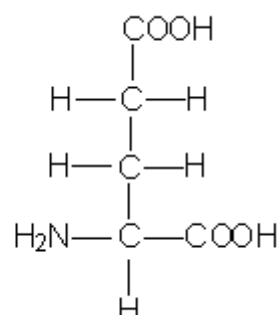
asparagin



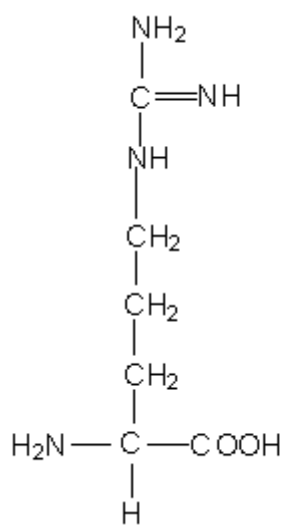
glutamin



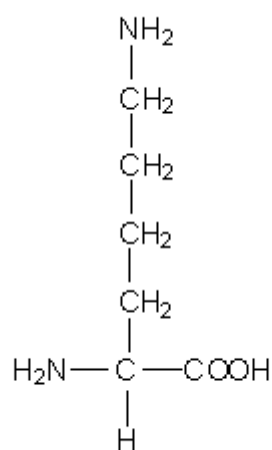
kyselina asparagová



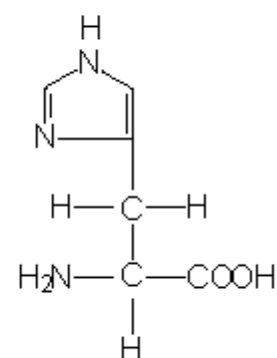
kyselina glutamová



arginin



lysin



histidin