

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Katedra analytické chemie

Vliv přidavku pokrutin z bobulí révy vinné na antioxidační vlastnosti taveného
sýra

Marie Kudrnáčová

Diplomová práce

2018

University of Pardubice

Faculty of Chemical Technology

Department of Analytical Chemistry

The effect of grape pomace on antioxidant properties of processed cheese

Marie Kudrnáčová

Thesis

2018

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Marie Kudrnáčová**
Osobní číslo: **C16610**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Název tématu: **Vliv přídavku pokrutin z bobulí révy vinné na antioxidační vlastnosti taveného sýra**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Stručně a výstižně popište výrobu taveného sýra, jeho nutriční složení a význam pro zdraví člověka.
2. Vypracujte rešerši s využitím zahraničních odborných periodik se zaměřením na obohacování sýrů za účelem zvýšení jejich biologické a nutriční hodnoty.
3. V rámci experimentu zjistěte, jak ovlivňuje přídavek pokrutin z bobulí vinné révy antioxidační vlastnosti taveného sýra.
4. Výsledky statisticky vyhodnoťte a diskutujte svá zjištění s dostupnou literaturou.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Libor Červenka, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **Ing. Tomáš Hájek, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **20. února 2018**

Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 11. 5. 2018

Marie Kudrnáčová

PODĚKOVÁNÍ:

Ráda bych tímto poděkovala vedoucímu své diplomové práce doc. Ing. Liborovi Červenkovi, Ph.D. za vynaložený čas pro realizaci experimentu a cenné rady ohledně zpracování diplomové práce, a Ústavu technologie potravin Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně za poskytnutí vzorků tavených sýrů. Poděkování patří také mé rodině a přátelům, kteří mě podporovali při vytváření této práce a v průběhu celého studia.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá studií antioxidační aktivity tavených sýrů po přidavku pokrutin hroznů révy vinné. V teoretické části je popsán výrobní proces tavených sýrů a hlavní složky mléka, mající antioxidační aktivitu. Teoretická část pojednává také o pokrutinách hroznů a jejich antioxidační aktivitě. V neposlední řadě jsou popsány principy jednotlivých metod stanovení. Praktická část vystihuje proces výroby vzorků tavených sýrů a zpracování pokrutin. Podrobně se zabývá stanovením antioxidační aktivity obohacených vzorků sýrů metodou DPPH, ABTS, stanovením redukční síly, schopnosti vychytávat peroxid vodíku a stanovením celkového obsahu fenolických látek a celkového obsahu flavonoidů, a také identifikací hlavních funkčních skupin přítomných složek ve vzorcích pomocí infračervené spektroskopie.

KLÍČOVÁ SLOVA

Tavený sýr, pokrutiny hroznů, antioxidační aktivita, infračervená spektroskopie

TITLE

The effect of grape pomace on antioxidant properties of processed cheese

ANNOTATION

This thesis examines the antioxidant activity of processed cheese after the addition of grape pomace. In the theoretical part the production process of processed cheese and main components of milk are described focusing on its antioxidant activity. The theoretical part examines also grape pomace and its antioxidant activity. Last but not least, the principles of individual methods of determination are described. The practical part describes the process of production of processed cheese samples and processing of grape pomace. It deals with the determination of the antioxidant activity of enriched samples by DPPH and ABTS assays, reducing power, hydrogen peroxide scavenging assay and determination of the total phenolic and flavonoid contents. The main functional groups present in the samples were assessed by means of infrared spectroscopy.

KEYWORDS

Processed cheese, grape pomace, antioxidant activity, infrared spectroscopy

OBSAH

0	ÚVOD.....	14
1	TEORETICKÁ ČÁST.....	15
1.1	Sýry.....	15
1.2	Tavené sýry a jejich výroba.....	15
1.2.1	Vliv tavicího procesu na strukturu sýru.....	16
1.3	Mléko a jeho antioxidační vlastnosti.....	17
1.3.1	Zpracování mléka na sýry.....	18
1.4	Sýry s přidanou hodnotou.....	19
1.5	Réva vinná.....	21
1.5.1	Pěstování a morfologie.....	21
1.5.2	Obsah fenolických látek.....	21
1.5.3	Pokrutiny.....	22
1.6	Použité analytické metody.....	25
1.6.1	Spektrofotometrie.....	25
1.6.2	Infračervená spektroskopie.....	26
1.6.3	Stanovení celkové antioxidační aktivity.....	27
1.6.4	Celkový obsah fenolických látek.....	29
1.6.5	Celkový obsah flavonoidů.....	30
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	31
2.1	Přístroje.....	31
2.2	Chemikálie.....	32
2.3	Analyzované vzorky.....	33
2.3.1	Pokrutiny hroznů révy vinné.....	33
2.3.2	Tavené sýry.....	33
2.4	Postupy metod analýzy.....	37
2.4.1	Stanovení obsahu sušiny.....	37

2.4.2	Příprava extraktů vzorků.....	37
2.4.3	Spektrofotometrická analýza	38
2.4.4	Infračervená spektroskopie	42
2.4.5	Statistické zpracování	42
3	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	43
3.1	Zpracování vzorků	43
3.1.1	Extrakce	45
3.1.2	Stanovení obsahu sušiny.....	46
3.2	Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH.....	47
3.3	Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS.....	49
3.4	Stanovení redukční síly	52
3.5	Stanovení schopnosti vylučovat peroxid vodíku.....	53
3.6	Stanovení celkového obsahu fenolických látek	55
3.7	Stanovení celkového obsahu flavonoidů.....	57
3.8	Infračervená spektroskopie	59
4	ZÁVĚR.....	63
5	POUŽITÁ LITERATURA	64
6	SEZNAM PŘÍLOH	71

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1	Schéma výměny vápenatých iontů za sodné během tavení	16
Obrázek 2	Přehled látek, obsažených v mléce a v syrovátce	19
Obrázek 3	Obecné struktury flavonolů, flavanolů a fenolových kyselin	23
Obrázek 4	Schéma spektrofotometru	25
Obrázek 5	Průchod monochromatického záření vzorkem.....	25
Obrázek 6	Instrumentace infračervené spektroskopie.....	27
Obrázek 7	Michelsonův interferometr.....	27
Obrázek 8	Schéma reakce DDPH radikálu s antioxidantem	28
Obrázek 9	Schéma principu metody ABTS	28
Obrázek 10	Schéma principu vychytávání peroxidu vodíku antioxidantem.....	29
Obrázek 11	Součástky tavicího zařízení.....	35
Obrázek 12	Tavicí zařízení.....	35
Obrázek 13	Další potřebná příslušenství	36
Obrázek 14	Sestavené tavicí zařízení	36
Obrázek 15	Pokrutiny hroznů.....	43
Obrázek 16	Vzorky tavených sýrů: kontrolní sýr a sýry s přídavkem surových pokrutin	44
Obrázek 17	Vzorky tavených sýrů: sýry s přídavkem sušených pokrutin	44
Obrázek 18	Vzorky tavených sýrů: sýry s přídavkem lyofilizovaných pokrutin.....	45
Obrázek 19	Infračervená spektra vzorků tavených sýrů po lyofilizaci	60
Obrázek 20	Infračervená spektra pokrutin hroznů	62

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Funkce mléčných bílkovin	17
Tabulka 2 Obsah koloidních a rozpustných složek v kravském mléku.....	19
Tabulka 3 Obsah nejdůležitějších flavonoidních a neflavonoidních látek v hroznech révy vinné.....	22
Tabulka 4 Obsah nejdůležitějších flavan-3-olů, flavonolů a flavonolových glykosidů v semenech a slupce odrůdy Ryzlink rýnský	24
Tabulka 5 Obsah fenolových kyselin v semenech a slupce odrůdy Merzling	25
Tabulka 6 Surovinová skladba vyrobených sýrů.....	34
Tabulka 7 Frakcionace sušených pokrutin hroznů	43
Tabulka 8 Teplota extraktů během jejich přípravy.....	45
Tabulka 9 Obsah sušiny pro vzorky pokrutin.....	46
Tabulka 10 Obsah sušiny pro vzorky tavených sýrů.....	47
Tabulka 11 Antioxidační aktivita sýrů s přidavkem sušených a lyofilizovaných pokrutin stanovená metodou DPPH	48
Tabulka 12 Antioxidační aktivita sýrů s přidavkem surových pokrutin stanovená metodou DPPH	48
Tabulka 13 Antioxidační aktivita pokrutin hroznů stanovená metodou DPPH	48
Tabulka 14 Antioxidační aktivita sýrů s přidavkem sušených a lyofilizovaných pokrutin stanovená metodou ABTS	50
Tabulka 15 Antioxidační aktivita sýrů s přidavkem surových pokrutin stanovená metodou ABTS	50
Tabulka 16 Antioxidační aktivita pokrutin hroznů stanovená metodou ABTS	51
Tabulka 17 Redukční síla sýrů s přidavkem sušených a lyofilizovaných pokrutin	52
Tabulka 18 Redukční síla sýrů s přidavkem surových pokrutin	52
Tabulka 19 Redukční síla pokrutin hroznů	53
Tabulka 20 Schopnost sýrů s přidavkem sušených a lyofilizovaných pokrutin vychytávat peroxid vodíku	54
Tabulka 21 Schopnost sýrů s přidavkem surových pokrutin vychytávat peroxid vodíku.....	54
Tabulka 22 Schopnost pokrutin hroznů vychytávat peroxid vodíku.....	54
Tabulka 23 Celkový obsah fenolických látek sýrů s přidavkem sušených a lyofilizovaných pokrutin.....	56
Tabulka 24 Celkový obsah fenolických látek sýrů s přidavkem surových pokrutin.....	56

Tabulka 25 Celkový obsah fenolických látek pokrutin hroznů.....	56
Tabulka 26 Celkový obsah flavonoidů sýrů s přídavkem sušených a lyofilizovaných pokrutin	58
Tabulka 27 Celkový obsah flavonoidů sýrů s přídavkem surových pokrutin.....	58
Tabulka 28 Celkový obsah flavonoidů pokrutin hroznů	58
Tabulka 29 Identifikace absorpčních pásu spekter vzorků tavených sýrů	61
Tabulka 30 Identifikace absorpčních pásu spekter vzorků pokrutin.....	62

SEZNAM ZKRATEK

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzotiazolin-6-sulfonová kyselina)
ABTS ^{·+}	2,2'-azino-bis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát), kation-radikál
CoQ10	Koenzym Q10
DPPH	1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl
ET	Electron transfer (přenos elektronu)
FC	Folin-Ciocalteu
HAT	Hydrogen atom transfer (přenos atomu vodíku)
TFC	Total flavonoid content (celkový obsah flavonoidů)
TPC	Total phenolic content (celkový obsah fenolických látek)
Trolox	Kyselina 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2- karboxylová

0 ÚVOD

V posledních letech vzrostl zájem spotřebitelů o funkční potraviny, které jsou nutričně bohaté a mohou přispívat ke zlepšení zdraví a v prevenci různých nemocí. Mezi tyto potraviny se řadí i mléčné výrobky. Zpracování mléka na sýry je důležité především pro prodloužení trvanlivosti. Nicméně přidavkem bioaktivních molekul při výrobě sýru dochází ke ztrátě syrovátky a tím i dalších významných látek.

Pokrutiny hroznů tvoří hlavní vedlejší produkt výroby vína, což představuje asi 20–30 % hmotnosti hroznů. Tradičně se používají jako krmivo nebo hnojivo. Odhaduje se, že ročně je vyprodukováno až 9 milionů tun pokrutin, což představuje velké zatížení pro životní prostředí. Avšak pokrutiny jsou bohaté na fenolické sloučeniny, zejména flavonoidy, fenolové kyseliny a stilbeny, z nichž mnohé se ukázaly být důležité pro své antioxidační účinky a v prevenci vzniku závažných onemocnění. Díky těmto vlastnostem existuje možnost využití pokrutin jako složka funkčních potravin.

Cílem této práce bylo obohatit tavené sýry o pokrutiny hroznů a stanovit, zda má přídavek pokrutin vliv na zvýšení antioxidační aktivity sýru. Pro posouzení vlivu přídavku byla aplikována stanovení antioxidační aktivity metodami DPPH, ABTS, stanovení redukční síly, schopnosti vychytávat peroxidu vodíku a celkový obsah fenolických látek a flavonoidů. Důležité funkční skupiny přítomných složek byly stanoveny pomocí infračervené spektroskopie.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Sýry

Sýry jsou obecně definovány jako čerstvé nebo prozřálé výrobky získané oddělením tekutiny (syrovátky) po koagulaci mléka s různou tučností. Sýry v sobě tedy koncentrují složky sušiny mléka, především kasein a mléčný tuk. Do syrovátky přechází větší část vody, laktózy, bílkovin syrovátky a část solí. Ke koagulaci dochází působením enzymů nebo v důsledku změny pH do oblasti blízké izoelektrickému bodu kaseinu. Hlavním důvodem zpracování mléka na sýry je prodloužení trvanlivosti, přičemž v sýrech jsou zachovány nutričně nejvyšší složky mléka. Výroba sýru se skládá z řady kroků a biochemických procesů.

Rozdělení sýrů:

- Přírodní sýry, které se dělí dle způsobu zrání na:
 - Sýry nezrající včetně tvarohu
 - Čerstvé
 - Termizované
 - Sýry zrající
 - Převážně od povrchu do vnitřní hmoty sýra (sýry s mazem)
 - Převážně v celé hmotě (anaerobně)
 - Plísňové sýry
 - S plísní na povrchu a s plísní na povrchu i uvnitř těsta
 - S plísní uvnitř těsta
- Tavené sýry, které lze definovat jako tepelně ošetřené produkty založené na různých typech sýrů v rozdílném stupni zralosti a na přidávku tavicích solí (*Kadlec, et al., 2012*).

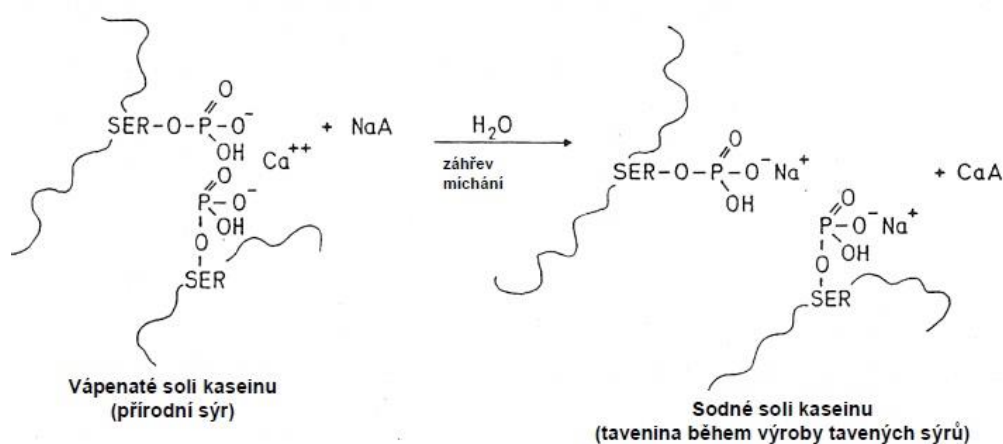
1.2 Tavené sýry a jejich výroba

Základní surovinou pro výrobu tavených sýrů je přírodní sýr. Pro výrobu lze použít i přírodní sýr s některými vadami. Jedná se o vady zdravotně nezávadné, především mechanické (deformace) nebo vady způsobené odchýlnými analytickými hodnotami (obsah sušiny nebo tuku).

Dalšími surovinami pro výrobu tavených sýrů jsou máslo, přidávané za účelem zvýšení obsahu tuku v sušině, voda, která obsah sušiny snižuje, různé sušené suroviny (sušené mléko, sušená syrovátka, sušené podmáslo), přidávané za účelem snížení nákladu na surovinovou skladbu a nátavek, což je tavený sýr, u kterého již proběhlo tepelné ošetření za přítomnosti tavicích solí. Nátavek se do surovinové skladby dostává záměrným přídavkem či jako zbytek

taveniny z předchozí výroby. V případě ochucených tavených sýrů jsou součástí surovinové skladby také složky dodávající chuť a barvu – například kápie, kakaová složka apod.

Pokud by takováto surovinová skladba byla zahřívána, došlo by k rozdělení na tři fáze - vysráženou bílkovinu na dně, vodní fázi ve střední vrstvě a oddělený volný tuk na povrchu. Úspěšnou výrobu tavených sýrů, a tedy dosažení homogenní struktury směsi umožňuje použití tavicích solí. Tavicí soli v průběhu tavení zajišťují výměnu vápenatých iontů v tavenině za ionty sodné - nerozpustné vápenaté soli kaseinu se tedy přemění na rozpustnější soli sodné (Obrázek 1). Působením tavicích solí dochází k rozptýlení bílkovin, emulgaci tuku, navázání vody a nárůstu pH (5,0–6,0). Jako tavicí soli se nejčastěji používají soli s vícemocným aniontem (fosforečnany, polyfosforečnany, citronany) a jednomocným kationtem (především sodík). Vlivem přídavku tavicích solí dochází ke zhoršení původně příznivého poměru fosforu a vápníku a k vysokému obsahu sodíku v tavených sýrech, a je tedy oproti přírodním sýrům méně nutričně hodnotný.



Obrázek 1 Schéma výměny vápenatých iontů za sodné během tavení (Buňka, 2017)

Vlastní tavení probíhá v tavičkách za vakua. Tavičky mají parou vyhříváný plášť i přímý vstřík páry a nůž, zajišťující intenzivní míchání. Během tavení je možný přídavek vody. Teplota tavení se pohybuje v rozmezí 80–95 °C, po dobu 4–15 minut (Buňka, 2017; Kadlec, et al., 2012).

1.2.1 Vliv tavicího procesu na strukturu sýru

Tavený sýr se připravuje smícháním přírodních sýrů, tavicích solí, vody a dalších přísad, zahřátím, dokud se směs neroztaví a následným mícháním směsi v reakční nádobě. Nejdůležitější částí procesu je zahřívání, kdy se v konkrétním čase vytvoří homogenní hmota (emulgační proces). Emulgační proces zajišťuje sýru požadované vlastnosti, kterými jsou viskozita a mechanické vlastnosti. Proces, během kterého se vytváří finální struktura sýru,

probíhající po určitou dobu, se nazývá krémování. Krémování může být také vyvoláno chlazením a skladováním a zásadně se při něm mění kaseinová síť. Při výrobě taveného sýra má krémování vliv na velikost mléčných tukových globulí a kaseinovou síť, čímž ovlivňuje viskozitu roztaveného sýru a pevnost finálního produktu (Fu & Nakamura, 2017).

1.3 Mléko a jeho antioxidační vlastnosti

V současné době je velkým trendem zlepšování kvality života, a roste tak poptávka po potravinách nejen s vysokou výživovou hodnotou, ale také příznivým vlivem na zdraví. Tyto potraviny se nazývají funkční potraviny. Jedním ze způsobů, jak takové potraviny působí na lidské tělo, je prostřednictvím bioaktivních peptidů. Bioaktivní peptidy jsou definovány jako specifické fragmenty bílkovin, které mají pozitivní vliv na tělesné funkce a v konečném důsledku tak mohou ovlivnit zdraví člověka. Proteiny jsou bohatým zdrojem biologicky aktivních peptidů, avšak v rámci struktury proteinu jsou tyto peptidy neaktivní a mohou být uvolňovány hydrolýzou enzymy různého původu (Pepe, et al., 2016; Timón, et al., 2012). Během trávení potraviny jsou bioaktivní peptidy strukturně podobné například hormonům a v organismu tak mohou navodit různé agonistické a antagonistické interakce (Wang, et al., 2015). Peptidy, pocházející z mléčných proteinů působí příznivě na zdraví z několika hledisek, které shrnuje Tabulka 1.

Tabulka 1 Funkce mléčných bílkovin (Egger & Ménard, 2017)

Protein	Funkce
α -kasein	Opioid, vazba minerálů
β -kasein	Snížení krevního tlaku, vazba minerálů, protirakovinotvorný
κ -kasein	Snížení krevního tlaku, protizánětlivý
α -laktalbumin	Opioid, protizánětlivý
β -laktoglobulin	Protizánětlivý, anxiolytický, hypocholesterolemický
laktoferrin	Protirakovinotvorný, antimikrobiální, imunomodulační

. Mléčné bílkoviny jsou považovány za důležitý zdroj bioaktivních peptidů, které se uvolňují během zpracování nebo při trávení mléka (Fialho, et al., 2018). Mléko patří k nejzajímavějším a nejslibnějším potravinám, které by dokázaly nahradit chemikálie, léčiva a doplňky stravy, vzhledem k obsahu široké škály molekul s potencionální antioxidační aktivitou. Všechny jeho antioxidační složky jsou účinné v prevenci peroxidace lipidů a k zachování kvality mléka (Zulueta, et al., 2009).

Obsah kaseinu v mléce představuje asi 80 % celkového obsahu mléčných bílkovin. Hlavní frakce kaseinu jsou α_{s1} -kasein, α_{s2} -kasein, β -kasein, κ -kasein, a jejich přibližný podíl se odhaduje na 45 %, 12 %, 35 % a 8 %. Kasein společně s fosforečnanem vápenatým tvoří stabilní kaseinové micely (Everett & Auty, 2008; Garrido & Borges, 2013; Huppertz, et al., 2018; St-Gelais & Haché, 2005; Zulueta, et al., 2009).

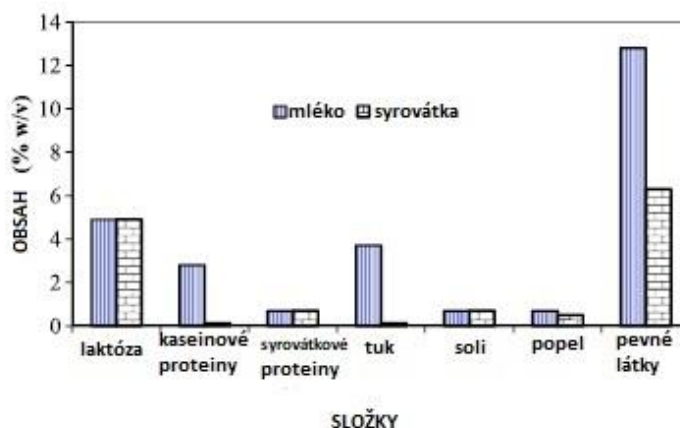
Antioxidační aktivita mléka je přiřazována nejen mléčnému kaseinu a syrovátkovým proteinům (β -laktoglobulin, α -laktalbumin, laktoferrin (Egger & Ménard, 2017; Ma, et al., 2018)), mléko také obsahuje stopy nízkomolekulárních thiolů, askorbátu, tokoferolu, retinolu a karotenoidů, které rovněž vykazují antioxidační aktivitu (Niero, et al., 2017). Celkový obsah antioxidantů se pak liší u odstředěného a plnotučného mléka. Důsledkem odstředění dochází k částečnému úbytku lipofilních antioxidantů (například retinol, tokoferol, karotenoidy) (Alenisan, et al., 2017).

1.3.1 Zpracování mléka na sýry

Při zpracování mléka vzniká velké množství tekutého odpadu tzv. syrovátky. Syrovátka je kapalná část vznikající jako vedlejší produkt během výroby sýru nebo během koagulace kaseinu. Výroba sýru je proces, při kterém mléčné složky přítomné jako koloidní částice (kasein a fosforečnan vápenatý) a emulze (tuk) tvoří síť, zatímco rozpustné složky (syrovátkové bílkoviny, laktóza a minerály) zůstávají v syrovátce (Tabulka 2). Asi 50 % pevných látek, obsažených původně v mléku, je přítomno v syrovátce (Obrázek 2). Syrovátka získaná při výrobě sýru tvoří 70–90 % původního objemu mléka a její produkce celosvětově stále narůstá. Aktuálně se její produkce odhaduje na přibližně 180–190 milionů tun ročně. Syrovátka se využívá k výživě zvířat, nicméně představuje vysokou organickou zátěž pro životní prostředí z důvodu přítomnosti zbytkových mléčných živin (laktóza, bílkoviny, lipidy, vitamíny). Zároveň díky vysokému obsahu těchto živin je syrovátka považována za potenciální zdroj pro výrobu potravin s přidanou hodnotou (Yadav, et al., 2015; Masotti, et al., 2017).

Tabulka 2 Obsah koloidních a rozpustných složek v kravském mléku (O'Kennedy, 2011)

Složka	Koloidní	Rozpustné
Tuk (%)	4,0–4,4	
Kasein (%)	2,5–2,8	
Syrovátkové proteiny (%)		0,5–0,6
Laktóza (%)		4,4–4,6
Vápník (mg/100 ml)	80	40
Hořčík (mg/100 ml)	3	8
Draslík (mg/100 ml)		150
Sodík (mg/100 ml)		50
Chlorid (mg/100 ml)		100
Fosfor (mg/100 ml)	45	45
Citrát (mg/100 ml)	15	170



Obrázek 2 Přehled látek obsažených v mléce a v syrovátce (Yadav, et al., 2015)

1.4 Sýry s přidanou hodnotou

Lipidy (oleje a tuky) jsou nestabilní látky, které jsou schopné autooxidace, což je nezvratný proces, vedoucí ke žluknutí, zhoršení chuti a snížení výživové hodnoty potraviny. Oxidace lipidů je hlavní příčinou degradace potraviny při skladování. Za účelem zpomalení procesu oxidace mohou být do potravin přidávány antioxidanty. Hlavní syntetické antioxidanty používané pro tyto účely jsou: BHA, BHT, PG a TBHQ. Nicméně dle studií mají tyto látky negativní účinek na zdraví. Syntetické antioxidanty jsou tedy nahrazovány rostlinnými materiály (Marinho, et al., 2015).

V posledních desetiletích vzrostl zájem spotřebitelů o funkční potraviny, které jsou nutričně bohaté a mohou přispívat ke zlepšení zdraví a v prevenci různých nemocí. Mezi tyto potraviny patří i mléčné výrobky jako například sýry, bohaté na lipofilní bioaktivní látky. Nicméně přidáním bioaktivních molekul při výrobě sýru dochází ke ztrátě syrovátky a tím i dalších významných látek: 50 % fosfolipidů, 60 % vitamínu D a 95 % enzymů, odpovědných za zrání sýra. Mnoho lipofilních bioaktivních látek jako jsou ω -3 mastné kyseliny, karotenoidy a CoQ10 jsou proto přidávány do sýrů ve formě emulzí především pro zvýšení retence a stability aktivních látek rozpustných v tucích. Obohacení sýru o ω -3 mastné kyseliny vede k náchylnosti potraviny ke žluknutí a oxidačním procesům. Inhibice peroxidace lipidů může být dosažena přidáním vhodných antioxidantů jako je vitamin A, α -tokoferol, karotenoidy, atd. Vitamíny s antioxidačními vlastnostmi také působí v prevenci různých chorob jako je rakovina, kardiovaskulární choroby, oční choroby, atd. (*Stratulat, et al., 2014*)

Inovaci v odvětví výroby sýrů představuje přidání rostlinných extraktů. Přidání extraktu z borovicových jehlic snižuje oxidační účinek a hladinu volných mastných kyselin v sýru, a navíc zvyšuje jeho sensorické vlastnosti. Výtažek z květu Omanu britského zvyšuje v sýru celkový obsah bílkovin, fenolických látek, obsah popela a snižuje pH a obsah lipidů ve srovnání se sýrem stejného typu bez přídavku. Další skupinu rostlinných přísad představuje koření a bylinné extrakty (skořice, oregano, hřebíček, slupky granátového jablka a semena hroznů révy vinné), jejichž extrakty inhibují peroxidaci lipidů v sýru a vykazují také antimikrobiální účinky. Z toho je patrné, že vysoký potenciál ke zvýšení stability sýru má nejen plnohodnotné koření (hřebíček, oregano, skořice), ale i vedlejší produkty (slupky granátového jablka, semena hroznů) (*Granato, et al., 2018*).

1.5 Réva vinná

1.5.1 Pěstování a morfologie

Pěstování révy vinné (rod *Vitis*) se dělí na produkci stolních odrůd, určených k přímé spotřebě, a moštových odrůd, určených k výrobě révových vín. Základem úspěšného pěstování révy vinné jsou vhodné klimatické a geologické podmínky. Pro většinu odrůd je optimální oblast růstu v místech s průměrnou roční teplotou 11–16 °C. Proto mezi vinařské velmoci patří země jako Itálie, Francie, Argentina nebo Chile. V České republice se vinná réva pěstuje ve dvou vinařských oblastech: vinařská oblast Morava a vinařská oblast Čechy (*Kadlec, et al., 2012*).

Morfologicky se hrozny révy vinné skládají z třapin se stopkami a z bobule, složené z dužiny, semen a slupky. Třapiny se stopkami obsahují chuťově nepříznivé polyfenoly, semena jsou bohatá na třísloviny a lipidy, slupky hroznů mají vysoký obsah fenolických látek..

Bobule hroznů obsahují především vodu, sacharidy (převážně glukózu a fruktózu) a organické kyseliny (vinná, jablečná, citronová), ale také fenolové látky (fenolové kyseliny, flavonoly, antokyany a třísloviny), dusíkaté látky (aminokyseliny, peptidy, bílkoviny, amonné soli, aminy a dusičnany), a další (*Kadlec, et al., 2012*).

1.5.2 Obsah fenolických látek

Rostlinné fenolické látky představují jednu z nejpčetnějších skupin přírodních produktů. Hrají velkou roli v prevenci kardiovaskulárních poruch a vzniku rakoviny. Z chemického hlediska je struktura fenolických látek charakterizována benzenovým jádrem s jednou nebo více hydroxylovými skupinami.

Fenolické látky přítomné v hroznech mají širokou škálu struktur od jednoduchých až po polymerní sloučeniny. Na základě jejich struktury jsou rozděleny na neflavonoidní látky (kyselina hydroxybenzoová, kyselina hydroxyskořicová a jejich deriváty a stilbeny) a flavonoidy (antokyany, flavanoly a flavonoly). Zástupce flavonoidních a neflavonoidních látek v hroznech révy vinné shrnuje Tabulka 3. V hroznech se fenolické látky vyskytují jako antokyany, flavan-3-oly, flavonoly, stilbeny a fenolové kyseliny především ve slupkách, jako flavan-3-oly a kyselina gallová v semenech a jako deriváty kyseliny vinné ve šťávě (*Ivanova, et al., 2011; Katalinic, et al., 2010; Luo, et al., 2016; Mildner-Szkudlarz, et al., 2012; Shahidi & Zhong, 1999*).

Zdravotně nejvýznamnější skupinu fenolických látek představují stilbeny a z nich potom zejména resveratrol. Je prokázáno, že stolní odrůdy hroznů obsahují mnohem vyšší koncentraci resveratrolu než odrůdy moštové. Zároveň jsou odrůdy s červenými a modrými bobulemi

bohatší na resveratrol než odrůdy s bílými bobulemi (Pavloušek, 2017). Vysoký obsah antokyanů je pak také typický hlavně pro odrůdy s červenými a modrými bobulemi (Burešová & Pavloušek, 2015).

Tabulka 3 Obsah nejdůležitějších flavonoidních a neflavonoidních látek v hroznech révy vinné (Burešová & Pavloušek, 2015)

Neflavonoidní fenolové látky	Hydroxybenzoové kyseliny	kyselina gallová, protokatechová
	Hydroxyskořicové kyseliny	kyselina kaftarová, koutarová, fertarová
	Stilbeny	<i>trans</i> a <i>cis</i> -resveratrol
Flavonoidní fenolové látky	Antokyany	
	Flavan-3-oly	katechin, epikatechin
	Flavonoly	kvercetin, kaempferol

1.5.3 Pokrutiny

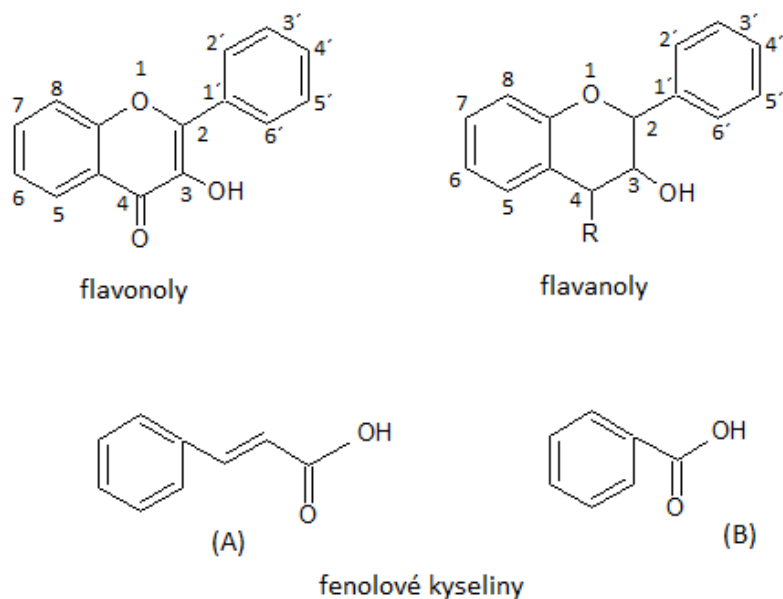
Pokrutiny hroznů tvoří hlavní vedlejší produkt výroby vína, což představuje asi 20–30 % hmotnosti hroznů. Tradičně se používají jako krmivo nebo hnojivo. Odhaduje se, že ročně je vyprodukováno až 9 milionů tun pokrutin, což představuje velké zatížení pro životní prostředí. Avšak pokrutiny jsou bohaté na fenolické sloučeniny, zejména flavonoidy, fenolové kyseliny a stilbeny, z nichž mnohé se ukázaly být prospěšné lidskému zdraví. Fenolické sloučeniny přítomné v pokrutinách jsou skupina sekundárních metabolitů hroznů. Tyto sloučeniny dávají vínu nejen barvu a hořkost, ale jsou důležité pro své antioxidační účinky a také k prevenci vzniku rakoviny a kardiovaskulárních onemocnění. Díky těmto vlastnostem existuje široká možnost využití pokrutin v kosmetice, jako složka funkčních potravin, přírodní barvivo nebo konzervační látka v potravinách, a především jako náhrada syntetických léčiv (Ferri, et al., 2017; Martins, et al., 2016; Sánchez-Alonso, et al., 2008).

Pokrutiny se převážně skládají ze slupky, semen a stopek s různým složením, závislým na odrůdě révy vinné a způsobu pěstování. V hroznech jsou fenolické látky přítomny především v pevných částech (slupka, semena, stopka) a jsou velmi strukturně rozmanité od jednoduchých molekul až po polymery. Obecně platí, že slupky hroznů jsou bohatým zdrojem antokyanů, fenolových kyselin, flavanolů a flavonolových glykosidů, zatímco semena jsou bohatá především na flavanoly. Studie také poukazují na fakt, že antokyany jsou v podstatě přítomné pouze ve slupkách červených odrůd hroznů (Jara-Palacios, et al., 2014; Kammerer, et al., 2004).

Studie jsou věnovány především obsahu fenolických látek v pokrutinách červených hroznů, jelikož vlivem různého výrobního procesu obsahují červená vína více fenolických látek (Ferri, et al., 2017; Mendes, et al., 2013). Během výrobního procesu si bílé odrůdy hroznů zachovávají téměř všechny své fenolické látky na rozdíl od hroznů odrůd červených, kdy během alkoholového kvašení dochází k úbytku koncentrace polyfenolů. Proto jsou pokrutiny z bílých hroznů zajímavějším a užitečnějším zdrojem polyfenolů (Luo, et al., 2016).

1.5.3.1 Pokrutiny bílých hroznů révy vinné

K nejhojněji zastoupeným fenolickým látkám obsažených v pokrutinách bílých hroznů, tvořenými slupkami a semeny, patří flavanoly (katechin, epikatechin), flavonolové glykosidy a fenolové kyseliny (Luo, et al., 2017). Všechny tyto fenolické sloučeniny jsou studovány pro své antioxidační, protinádorové a antimikrobiální vlastnosti. Především pak antioxidační vlastnosti souvisí s přítomností hydroxylové skupiny, která dává molekule vlastnosti redukčního činidla a donoru vodíku (Heleno, et al., 2015).



Obrázek 3 Obecné struktury flavonolů, flavanolů a fenolových kyselin (A) hydroxyskočicové kyseliny (B) hydroxybenzoové kyseliny

Flavanoly a flavonoly

Flavanoly jsou typické pro přítomnost nasyceného uhlíkového řetězce mezi atomy uhlíku C2 a C3, hydroxylovou skupinou na uhlíku C3 a také nepřítomností karbonylové skupiny na uhlíku C4 (Obrázek 3). V přírodě se nejčastěji vyskytují jako flavan-3-oly. Nejrozšířenějšími flavan-3-oly jsou katechin a epikatechin, přítomné ve slupce, ale především v semenech hroznů (Garrido, et al., 2013).

Flavonoly představují podtřídu flavonoidů, mající různé odstíny od bílé po žlutou. Jsou charakterizovány přítomností dvojnás vazby mezi uhlíky C2 a C3 a také hydroxylovou skupinou na uhlíku C3 (Obrázek 3). V rostlinných tkáních se flavonoly vyskytují nejčastěji jako glykosidy, což platí i pro pokrutiny hroznů, kde jsou nejběžnějšími zástupci glykosidy kvercetin a kaempferol (*Garrido, et al., 2013; Makris, et al., 2006*).

V Tabulce 4 je shrnutí obsahu flavan-3-olů, flavonolů a flavonolových glykosidů v semenech a slupce odrůdy Ryzlink rýnský (*Kammerer, et al., 2004*).

Tabulka 4 Obsah nejdůležitějších flavan-3-olů, flavonolů a flavonolových glykosidů v semenech a slupce odrůdy Ryzlink rýnský (*Kammerer, et al., 2004*)

Složka	slupka	semena
	obsah (mg/kg sušiny)	
katechin	226,7	790,2
epikatechin	134,6	674,5
kvercetin	nd*	nd*
kvercetin 3- <i>O</i> -glukuronid	509,9	38,0
kaempferol	nd*	nd*
kaempferol 3- <i>O</i> -glukosid	247,6	20,0

* nedetekováno

Fenolové kyseliny

Fenolové kyseliny se dělí do dvou hlavních skupin – hydroxybenzoové a hydroxyskořicové kyseliny, které jsou odvozené od nefenolových kyselin skořicové a benzoové. Chemicky mají tyto sloučeniny alespoň jeden aromatický kruh, přičemž alespoň jeden vodík je substituován hydroxylovou skupinou (Obrázek 3) (*Heleno, et al., 2015*). Hydroxybenzoové kyseliny jsou obsaženy především v semenech hroznů (kyselina gallová a protokatechová), zatímco kyseliny hydroxyskořicové (kyselina kaftarová, fertarová a koutarová) především ve slupce (*Kammerer, et al., 2004*).

V Tabulce 5 je shrnutí obsahu fenolových kyselin v semenech a slupce odrůdy Merzling (*Kammerer, et al., 2004*).

Tabulka 5 Obsah fenolových kyselin v semenech a slupce odrůdy Merzling (Kammerer, et al., 2004)

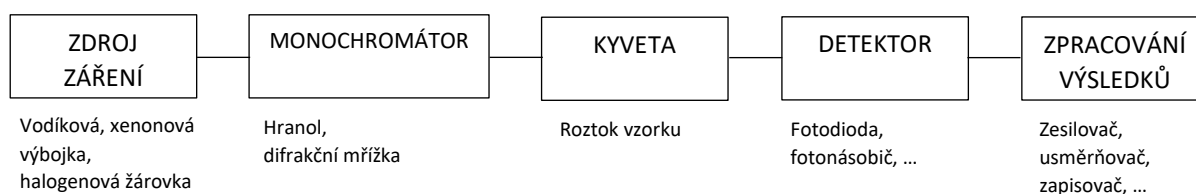
Kyselina	slupka	semena
	obsah (mg/kg sušiny)	
gallová	15,0	106,5
protokatechová	42,8	102,8
kaftarová	61,0	9,3
p-hydroxybenzoová	31,1	13,8
koutarová	54,5	30,2
fertarová	17,3	3,0

1.6 Použité analytické metody

1.6.1 Spektrofotometrie

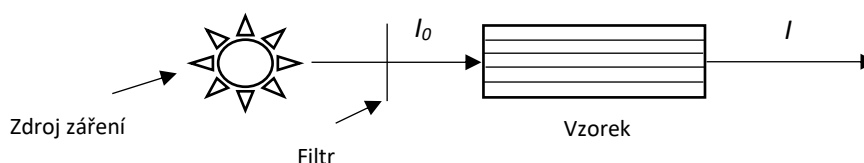
Spektrofotometrie je instrumentální technika založená na měření absorpce elektromagnetického záření v ultrafialové (UV, 200–380 nm), viditelné (VIS, 380–780 nm) a blízké infračervené oblasti.

Výsledkem změn energetických stavů elektronů v molekule v důsledku absorpce v UV-VIS oblasti jsou elektronická spektra. Změny závisí na pravděpodobnosti přechodu elektronu mezi jednotlivými energetickými stavy molekuly. Pozice jednotlivých absorpčních pásem zaznamenaných v elektronických spektrech závisí na energii absorbovaného záření (Marczenko & Balcerzak, 2000). Schéma instrumentace spektrofotometru je na Obrázku 4.



Obrázek 4 Schéma spektrofotometru (Marczenko & Balcerzak, 2000)

Při průchodu monochromatického záření roztokem (záření o jedné vlnové délce), je část intenzity toho záření roztokem absorbována a část jím prochází (Obrázek 5).



Obrázek 5 Průchod monochromatického záření vzorkem (Chauhan, 2008)

Poměr intenzit záření prošlého roztokem (I) a dopadajícího záření (I_0) se nazývá transmittance (T) (rovnice 1). Absorbance (A) se následně získá přepočtem z transmittance (rovnice 2).

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (1)$$

$$A = \log \frac{1}{T} \quad (2)$$

Vztah mezi koncentrací sloučeniny a mírou absorpce záření je založen na dvou jednoduchých zákonech. Lambertův zákon říká, že záření absorbované roztokem je přímo úměrné délce absorpční vrstvy. Podle Beerova zákona je množství absorbovaného záření přímo úměrné koncentraci absorbující látky v roztoku. Spojením těchto zákonů získáme tzv. Lambert-Beerův zákon (rovnice 3).

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (3)$$

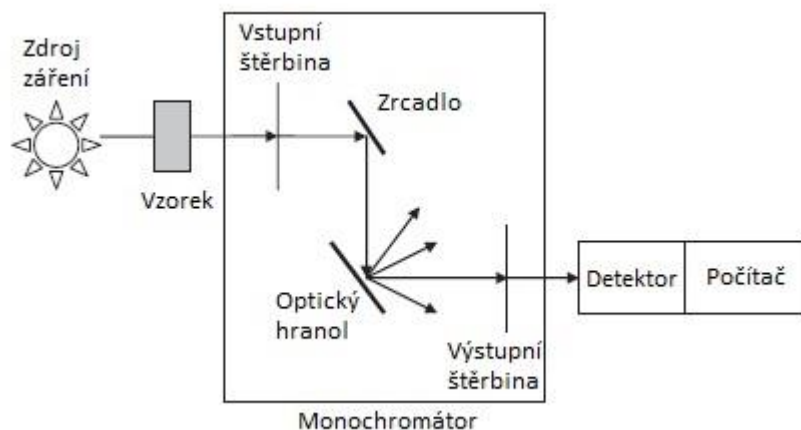
kde ε je molární absorpční koeficient, c je molární koncentrace roztoku a l je délka absorpční vrstvy (Chauhan, 2008).

1.6.2 Infračervená spektroskopie

Infračervená spektroskopie se dělí do tří oblastí dle vlnových délek: blízká infračervená oblast, střední infračervená oblast a vzdálená infračervená oblast. Rozsah infračervené oblasti se pohybuje v rozmezí vlnových délek 0,75–25 μm (mezi vlnočty 13000–10 cm^{-1}). Nejčastěji se měření infračerveného spektra provádí v oblasti střední infračervené oblasti s vlnočty 4000–400 cm^{-1} .

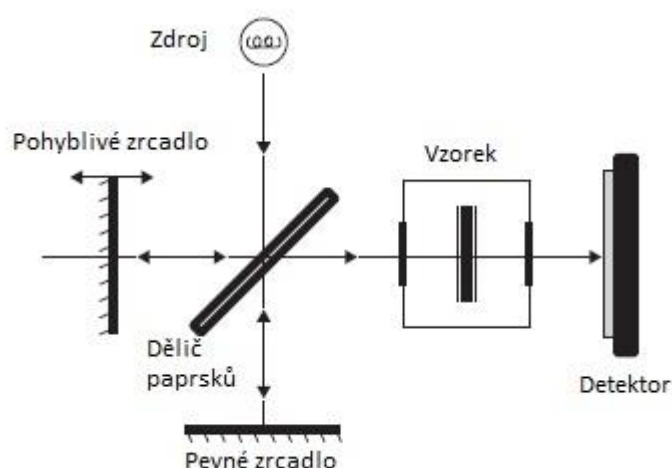
Infračervená spektroskopie je technika založená na rotačně-vibračních přechodech atomů molekul při průchodu infračerveného záření testovaným vzorkem. Energie, která se projeví ve spektru jako absorpční pás, odpovídá frekvenci vibrace určité části molekuly vzorku. V oblasti infračervené spektroskopie lze detekovat funkční skupiny C-H, O-H, N-H, CO a další.

Pro snímání infračervených spekter se používají dvě základní metody: transmisní, kdy je záření měřeno po průchodu vzorkem, a reflexní, kdy je sledováno záření odražené od vzorku (Lin, et al., 2009).



Obrázek 6 Instrumentace infračervené spektroskopie (Lin, et al., 2009)

Infračervené spektrometry (Obrázek 6) jsou často doplněny o Michelsonův interferometr (Obrázek 7), jedná se tedy o spektrometry s Fourierovou transformací. Interferometr je optické zřízení, které umožňuje řízené generování interferogramů (Subramanian & Rodriguez-Saona, 2009).



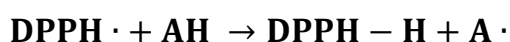
Obrázek 7 Michelsonův interferometr (Subramanian & Rodriguez-Saona, 2009)

1.6.3 Stanovení celkové antioxidační aktivity

Antioxidanty hrají důležitou roli v ochraně potravin tím, že brání oxidačním procesům a přispívají k podpoře zdraví prostřednictvím doplňků stravy či jako součást funkčních potravin. Antioxidační aktivita může být sledována řadou různých testů s různými mechanismy. K nejběžnějším mechanismům patří přenos atomu vodíku (HAT, hydrogen atom transfer), přenos elektronu (ET, electron transfer), redukční síla, chelace kovů, a mnoho dalších. (Shahidi & Zhong, 2015)

1.6.3.1 Metoda DPPH

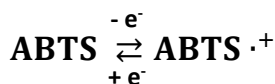
Molekula 1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl (DPPH·) je stabilní volný radikál v důsledku přítomnosti nepárového delokalizovaného elektronu, který molekule poskytuje tmavě fialové zbarvení. V roztoku s ethanolem či methanolem silně absorbuje při vlnové délce okolo 517 nm. Pokud dojde ke smísení roztoku radikálu DPPH se substrátem, který je schopen darovat atom vodíku, dochází ke vzniku redukované formy DPPH-H a tím ke ztrátě fialového zbarvení (Obrázek 8). Za účelem vyhodnocení antioxidační aktivity ve smyslu vychytávání volného radikálu testovanými vzorky, je sledována změna optické hustoty DPPH radikálu (Alam, et al., 2013).



Obrázek 8 Schéma reakce DPPH radikálu s antioxidantem (Alam, et al., 2013)

1.6.3.2 Metoda ABTS

Molekula radikálového kationtu (2,2'-azino-bis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)) neboli ABTS·⁺ je generována oxidací ABTS (2,2'-azino-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonová kyselina)) peroxodisíranem draselným za vzniku zeleného zbarvení s absorpčním maximem při 734 nm. Přídavkem antioxidantu ke kationt-radikálu ABTS·⁺ dochází po určitém časovém intervalu k jeho redukci na ABTS a následně i k jeho odbarvení (Obrázek 9). Míra odbarvení závisí na antioxidační aktivitě a koncentraci testovaného vzorku a lze ji stanovit spektrofotometricky při vlnové délce 734 nm (Kitts, 2005; Childs & Bardsley, 1975; Paulová, et al., 2004).

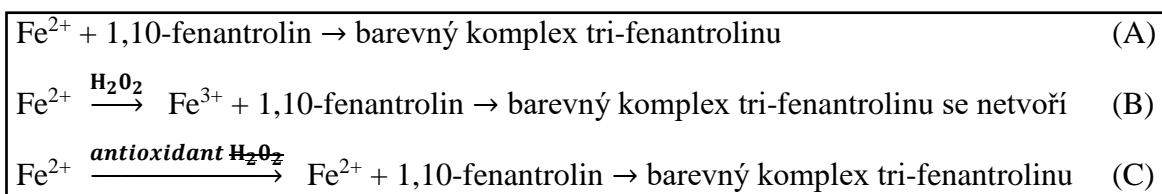


Obrázek 9 Schéma principu metody ABTS (Childs & Bardsley, 1975)

1.6.3.3 Schopnost antioxidantu vychytávat peroxid vodíku

Test je založen na reakci železnatého iontu s 1,10-fenantrolinem (Obrázek 10, A), kdy je vytvořen červeno-oranžový komplex tri-fenantrolinu, absorbující při 508–510 nm. Pokud je do zkumavky přidán peroxid vodíku před přidavkem 1,10-fenantrolinu (Obrázek 10, B), veškeré železnaté ionty jsou peroxidem vodíku oxidovány na železité ionty, které nejsou schopny tvořit červeno-oranžový komplex s 1,10-fenantrolinem a tím pádem je zřejmé ostré snížení absorbance při 510 nm. Princip metody tedy spočívá v přidavku antioxidantu do zkumavky s železnatými ionty před přidavkem známého množství peroxidu vodíku (Obrázek 10, C). Pokud je antioxidant dostatečně silný na vychytání veškerého přidaného peroxidu vodíku, nedochází k oxidaci železnatého iontu na železité a tím pádem se po přidavku

1,10-fenantrolinu vytvoří červeno-oranžový komplex, který se následně detekuje. Naopak pokud antioxidant není dostatečně silný k vychytání přítomného peroxidu vodíku, pak se železnaté ionty zoxidují na železité, které nejsou schopny tvořit barevný komplex s 1,10-fenantrolinem. Tvorba červeno-oranžového komplexu železnato-trifenantrolinového komplexu je úměrná koncentraci antioxidantu a jeho schopnosti vychytávat peroxid vodíku (Mukhopadhyay, et al., 2016).



Obrázek 10 Schéma principu vychytávání peroxidu vodíku antioxidantem (Mukhopadhyay, et al., 2016)

1.6.3.4 Redukční síla antioxidantu

Metoda je založena na principu nárůstu absorbance reakční směsi. Dochází ke změně původně žluté barvy roztoku na různé odstíny modré a zelené v závislosti na redukčních schopnostech dané látky. Přítomnost redukčních činidel (tj. antioxidantů) způsobuje přeměnu hexakvanoželezitanu draselného (Fe^{3+}) na hexakvanoželeznatan draselný (Fe^{2+}), který reaguje s chloridem železitým za vzniku železito-železnatého komplexu. Množství vzniklého železito-železnatého komplexu je monitorováno měřením tvorby Berlínské modři při 700 nm. Nárůst absorbance tedy znamená vyšší schopnost antioxidantu redukovat hexakvanoželezitan draselný (Alam, et al., 2013; Ferreira, et al., 2007; Jayanthi & Lalitha, 2011; Tantary, et al., 2017).

1.6.4 Celkový obsah fenolických látek

Metoda zjištění celkového obsahu fenolických látek (TPC) se stanovuje nejčastěji spektrofotometricky za použití Folin-Ciocalteu (FC) činidla. Podstatou metody je redukce FC činidla fenolickými látkami v alkalickém prostředí. FC činidlo obsahuje komplexy fosfomolybdenové a fosfowolframové kyseliny, které jsou redukovány za vzniku modrého zbarvení s absorpčním maximem při 765 nm. Konkrétně dochází k redukci molybdenového iontu (Mo^{6+}) na molybdeničný (Mo^{5+}) přijetím elektronu z fenolického antioxidantu. Výsledky TPC jsou vyjadřovány nejčastěji jako ekvivalent kyseliny gallové, nicméně příležitostně je lze vyjádřit i jako ekvivalenty katechinu, kyseliny kávové, kyseliny chlorogenové nebo kyseliny ferulové (Zhong & Shahidi, 2015).

1.6.5 Celkový obsah flavonoidů

Pro stanovení celkového obsahu flavonoidů (TFC) je nejběžněji používaná metoda založená na tvorbě komplexu Al^{3+} -flavonoid. Existuje několik variant této metody lišící se v přidavku různých činidel. V literatuře jsou popsány metody, kdy dochází ke tvorbě komplexu Al^{3+} -flavonoid v přítomnosti kyselin či octanu, v přítomnosti dusitanu sodného v alkalickém prostředí či bez přidavku činidel.

Konkrétně je metoda založena na přidavku chloridu hlinitého k antioxidantu, čímž vznikají žlutě zbarvené komplexy s absorpčním maximem při vlnové délce 415 nm, které lze změřit spektrofotometricky. Metodou ovšem nelze stanovit obsah všech flavonoidů, nýbrž jen části této skupiny – flavonů a flavonolů (*Denni & Mammen, 2012; Pekal & Pyrzynska, 2014*).

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Přístroje

Tavicí zařízení

Výroba tavených sýrů byla provedena v laboratorních podmínkách na výrobním zařízení s plášťovým ohřevem Stephan UMC-5 (Stephan Food Processing Machinery, Hameln, Německo).

Spektrofotometry

Pro měření antioxidační aktivity vzorků byly použity spektrofotometry Beckman DU 530 (Beckman Coulter, Inc., Brea, USA) a Thermo Helios Delta VIS Spectrometer (White Bear Lake, Minnesota, USA), kyvety PS Semi-micro (BrandTech, Německo).

Infračervený spektrofotometr

Infračervený spektrofotometr s Fourierovou transformací Nicolet iS50 FT-IR (Nicolet CZ, Praha, ČR) – jednopaprskový spektrofotometr pracující na principu Michelsonova interferometru, vybaven integrovaným ATR modulem.

Další přístroje

Analytické váhy KERN ABT 220-4 M	(Kern & Sohn, Balingen, Německo)
Laboratorní váhy KERN 440-35N	(Kern & Sohn, Balingen, Německo)
Automatické pipety	(Eppendorf Czech & Slovakia s.r.o.)
Běžné laboratorní nádobí	
Stříkačkové filtry PTFE (0,45 µm)	(Labicon s. r. o., Olomouc, ČR)
Ultrazvuková lázeň Sonorex RK 31	(Bandelin Electronic, Berlín, Německo)
Laboratorní pec Apex AX 120	(Carbolite, Sheffield, Spojené království)
Horkovzdušný sterilizátor HS 62 A	(Chrirana, Brno, ČR)
Vodní lázeň WB 22 + víko L4	(Memmert, Schwabach, Německo)
Centrifuga NF 400	(NÜVE, Ankara, Turecko)
Centrifuga UNIVERSAL 320	(Hettich, Tuttlingen, Německo)
Analyzátor vlhkosti KERN MLB 50-3	(Kern & Sohn, Balingen, Německo)
Olejová lázeň	(ThermoFisher, Newington, USA)
Lyofilizátor CoolSafe 110-4	(Trigon Plus s.r.o., Čestlice, ČR)
Bezdotykový IR teploměr 830-T1	(Testo, Lenzkirch, Německo)

2.2 Chemikálie

Methanol $\geq 99,9\%$	(Honeywell, Morristown, USA)
ABTS tablety (10 mg)	(Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
(2,2'-azino-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonová kyselina)	
Peroxodisíran draselný $\geq 99\%$	(Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
DPPH radikál	(Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
(1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl)	
Trolox	(Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
(kyselina 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2- karboxylová)	
Etanol 96%	(J. T. Baker, Deventer, Holandsko)
Činidlo Folin-Ciocalteua	(Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
Uhličitán sodný	(J. T. Baker, Deventer, Holandsko)
Destilovaná voda	(Univerzita Pardubice, Pardubice, ČR)
Kyselina gallová	(Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
Hexakvanoželezitan draselný	(Lachema, Chemapol, Brno, ČR)
Kyselina trichloroctová	(Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
Chlorid železitý	(Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
Síran amonno-železnatý $\geq 99\%$	(Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
1,10-fenantrolin	(Lachema, Chemapol, Brno, ČR)
Peroxid vodíku 30%, technický	(Kittfort Praha, s.r.o., Neratovice, ČR)
Redestilovaná voda	(Milli-Q systém, Millipore, Francie)
Chlorid hlinitý	(Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
Octan draselný	(PENTA s.r.o, Praha, ČR)
Kvercetin hydrát $\geq 95\%$	(Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
Hydroxid sodný	(PENTA, s.r.o, Praha, ČR)
Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát	(PENTA, s.r.o, Praha, ČR)
Kyselina chlorovodíková 35%	(PENTA, s.r.o, Praha, ČR)
Kyselina sírová 96%	(Lach-ner, s.r.o, Neratovice, ČR)

2.3 Analyzované vzorky

2.3.1 Pokrutiny hroznů révy vinné

K provedeným analýzám byly použity pokrutiny hroznů révy vinné odrůdy Müller Thurgau, produkované na viniční trati Prostřední Hory ve vinařském městě Bzenec. Producentem je malovinař pan Ing. Pekárek.

2.3.1.1 Zpracování pokrutin

V případě našeho stanovení byly jako pokrutiny pro analýzu využity pouze slupky hroznů. Přítomné stopky a semena byly odstraněny pomocí nerezového síta s velikostí ok 5×5 mm a takto odseparované slupky byly rozděleny na tři podíly.

První podíl pokrutin byl zachován v surovém stavu a skladován při teplotě -20 °C. Druhý podíl pokrutin byl vysušen při teplotě 46 °C po dobu 24 hodin. Následně byly pokrutiny rozemlety (5000 rpm, 10 sekund) a prosety přes kuchyňské síto. Distribuce částic byla zjištěna postupným prosíváním přes analytická síta s velikostí ok 600, 250, 160 a 56 µm. Třetí podíl pokrutin byl lyofilizován při teplotě -40 °C za tlaku 0,12 mbar po dobu 48 hodin. Sušené a lyofilizované pokrutiny byly skladovány při 4 °C. Takto připravené surové, sušené a lyofilizované pokrutiny byly použity k obohacení tavených sýrů. Zároveň byl každý typ pokrutin uchován pro další analýzy.

2.3.2 Tavené sýry

K provedeným analýzám byly použity vzorky sýrů, obohacené o pokrutiny hroznů v různém stavu – surové, lyofilizované a sušené a kontrolní sýr bez obsahu pokrutin, které byly vyrobeny ve spolupráci s Ústavem technologie potravin Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně.

2.3.2.1 Výroba vzorků tavených sýrů

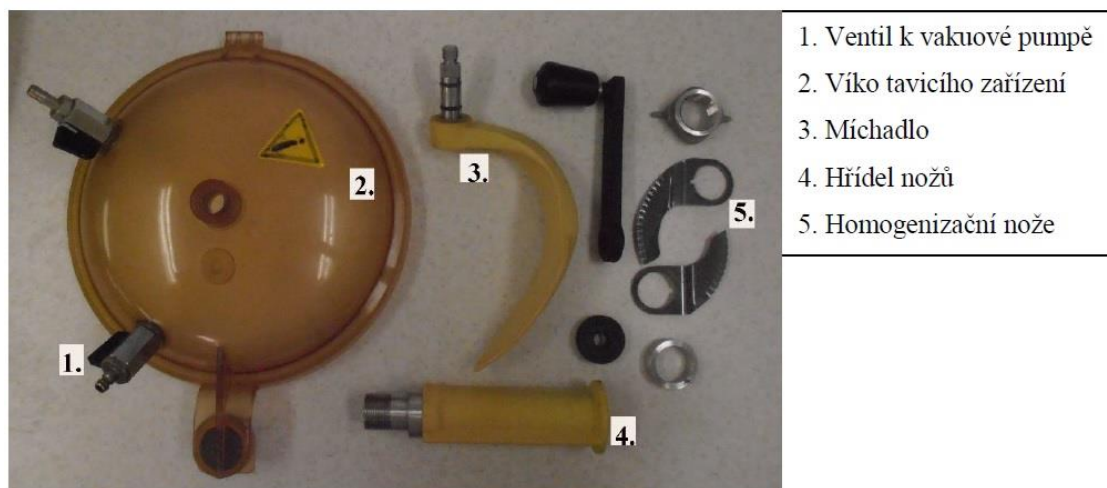
Postup výroby sýru byl převzat z diplomové práce Ing. Jakuba Přikryla (*Přikryl, 2017*), jehož sýry byly stejným způsobem vytvořeny na Ústavu technologie potravin Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně. Bylo vyrobeno 7 typů vzorků tavených sýrů lišících se typem a množstvím přidávaných pokrutin. Do vzorků tavených sýrů byly přidány lyofilizované a sušené pokrutiny v množství 1,0 a 2,0 % (hm.), a také surové pokrutiny hroznů v množství 2,5 a 5,0 % (hm.). Procentuální přídavek pokrutin byl zvolen dle doporučení technologů. Dále byly vyrobeny kontrolní vzorky tavených sýrů bez přídavku pokrutin. Surovinová skladba jednotlivých taveb vzorků je popsána v Tabulce 6. U vyrobených vzorků tavených sýrů byly vypočteny následující parametry: 37 % sušiny, 18,5 % tuku a 50 % tuku v sušině.

Tabulka 6 Surovinová skladba vyrobených sýrů

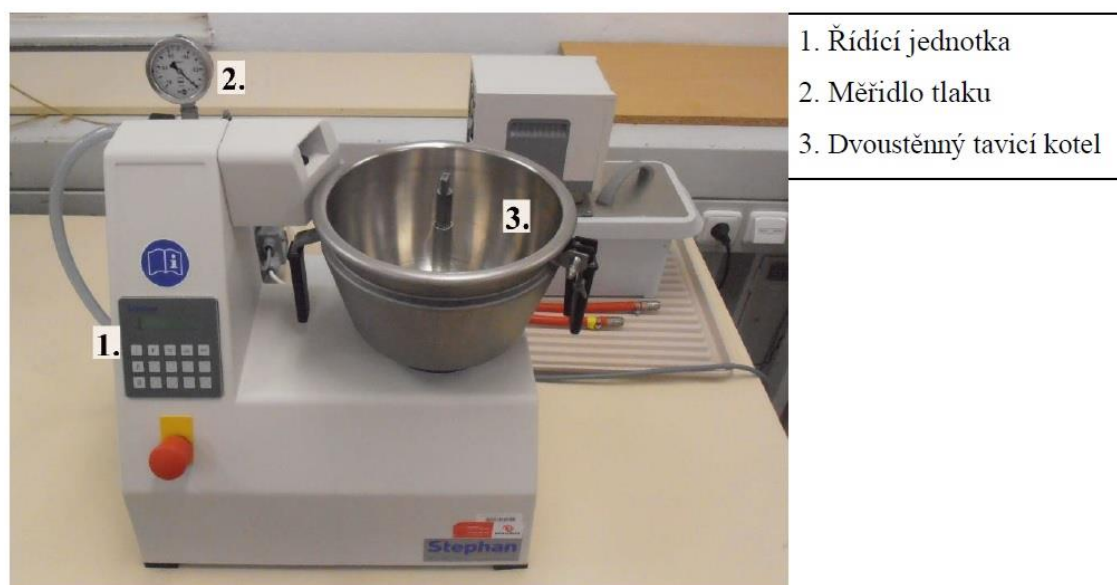
Surovina	Výrobce	Sušina	Obsah tuku v sušině	Typ sýru				
				Kontrola	Se surovými pokrutinami		S lyofilizovanými pokrutinami	
					Se sušenými pokrutinami	S lyofilizovanými pokrutinami		
Obsah (g/100 g)	Obsah (g/100 g)	Obsah jednotlivých surovin (g)						
Eidamská cihla 30%	Kromilk, PLC, Kroměříž, ČR	50	30	450	450	450	450	
Máslo čerstvé	Madeta PLC, České Budějovice, ČR	84	98	145	147	147	147	
Pitná voda	-	-	-	385	390	390	390	
Tavicí soli*	Fosfa PLC, Břeclav-Poštorná, ČR	> 95	-	28	28	28	28	
Surové pokrutiny	Ing. Pekárek, Bzenec, ČR	-	-	/	26	52	/	
Sušené pokrutiny	Ing. Pekárek, Bzenec, ČR	-	-	/	/	10	20	
Lyofilizované pokrutiny	Ing. Pekárek, Bzenec, ČR	-	-	/	/	/	10	20

*Složení tavicích solí: hydrogenfosforečnan sodný (39 %), dihydrogenfosforečnan sodný (18 %), difosforečnan sodný (21 %) a POLY 68 (21 %)

Prvním krokem výroby tavených sýrů bylo zpracování jednotlivých surovin. Eidamská cihla byla nakrájena na drobné kostky pro zjednodušení vážení suroviny a zlepšení homogenizace se zbytkem surovin během tavby. Byly naváženy jednotlivé suroviny s přesností na 1 g, pokrutiny a tavicí soli s přesností na 0,01 g. Dále bylo sestaveno tavicí zařízení z jednotlivých částí (Obrázek 11 a 12).



Obrázek 11 Součástky tavicího zařízení (Přikryl, 2017)

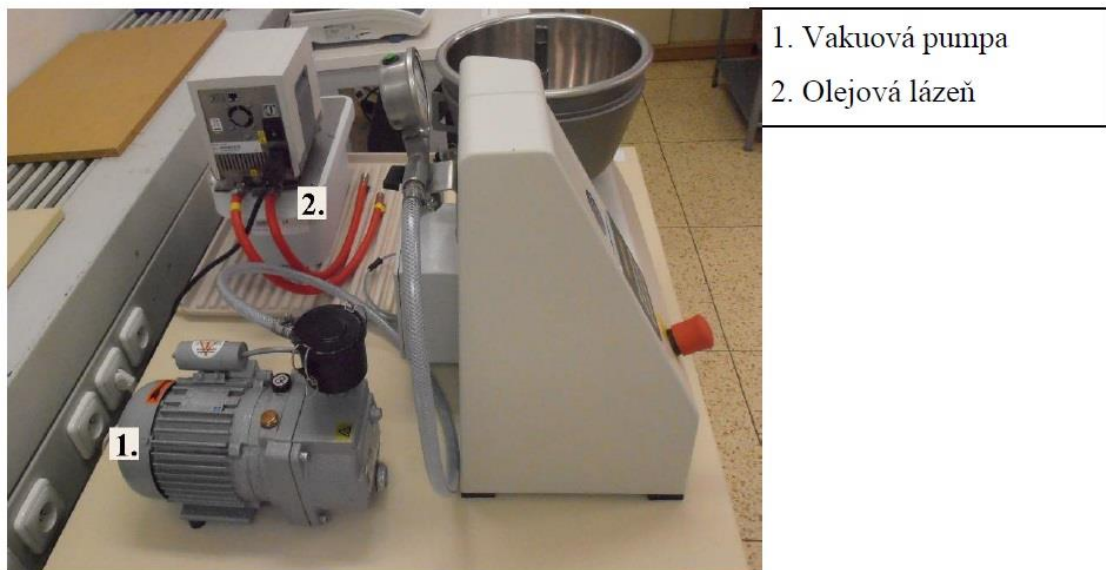


Obrázek 12 Tavicí zařízení (Přikryl, 2017)

Dále byla připravena vakuová pumpa pro získání nízkého tlaku v tavicím kotli a olejová lázeň, která zprostředkovává ohřev dvoustěnného kotle na požadovanou tavicí teplotu (Obrázek 13).

Do tavicího kotle byla přenesena Eidamská cihla, čerstvé máslo, tavicí soli a pokrutiny. Tavicí kotel byl uzavřen víkem a směs byla rozemleta homogenizačními noži po dobu

15 sekund. K zhomogenizované směsi byla přidána pitná voda a tavicí kotel byl znovu uzavřen víkem, byl odsát vzduch vakuovou pumpou, připojeny hadice od olejové lázně a teplotní čidlo pro snímání teploty v tavicím kotli. Zařízení bylo zcela připraveno k tavení (Obrázek 14).



Obrázek 13 Další potřebná příslušenství (Přikryl, 2017)



Obrázek 14 Sestavené tavicí zařízení (Přikryl, 2017)

Po připojení hadic z olejové lázně byl otevřen uzávěr hadic a směs surovin se začala zahřívat na tavicí teplotu. Teplota tavby byla nastavena na 90 °C. Během tavení byla směs nepřetržitě homogenizována pomalým ručním mícháním. Po dosažení tavicí teploty byla směs tavena při dané teplotě po dobu 13 minut. Po uběhnutí doby tavení byly uzavřeny a odpojeny veškeré

hadice, odstraněno a očištěno víko. Teplý tavený sýr byl převeden do předem připravených plastových misek a hliníkové víčko bylo na misku zažehleno domácí žehličkou. Jednotlivé misky tavených sýrů byly posléze zchlazeny v klimatizované místnosti. Pro usnadnění extrakce byly jednotlivé vzorky sýrů rozetřeny na pečicí papír do vrstvy o tloušťce cca 1 mm a ploše 100 cm² a skladovány při -20 °C pro následné analýzy.

2.4 Postupy metod analýzy

2.4.1 Stanovení obsahu sušiny

Stanovení obsahu sušiny bylo provedeno pro surové, sušené i lyofilizované pokrutiny, a také pro všechny druhy vyrobených tavených sýrů.

V případě pokrutin hroznů byla sušina stanovena na analyzátoru vlhkosti. Na hliníkovou misku byly naváženy přibližně 3–4 g vzorku. Analyzátor vysušil vzorek do konstantní hmotnosti, a tak stanovil obsah sušiny ve vzorcích pokrutin.

Obsah sušiny vzorků tavených sýrů byl stanoven následujícím způsobem: do připravené váženky s tyčinkou a vyžíhaným mořským pískem (105 °C, 1,5 hodiny) bylo naváženo 3–5 g vzorku sýru. Tyčinkou byl písek se sýrem promícháván, dokud se nevytvořila homogenní směs. Váženka se vzorkem byla umístěna do sušárny a vzorek byl sušen do konstantní hmotnosti (105 °C, 3 hodiny). Po vychladnutí v exsikátoru na laboratorní teplotu byla váženka se vzorkem a tyčinkou zvážena.

Obsah vody W (% m/m) ve vzorku byl vypočten dle rovnice (4):

$$W = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100 \quad (4)$$

m_1 ...hmotnost váženky pouze s pískem a tyčinkou, m_2 ...hmotnost váženky s pískem, tyčinkou a vzorkem před sušením, m_3 ...hmotnost váženky s pískem, tyčinkou a vzorkem po sušení

Obsah sušiny S (% m/m) je dán rovnicí (5):

$$S = 100 - W \quad (5)$$

2.4.2 Příprava extraktů vzorků

1. Extrakční metoda

Před každou provedenou analýzou byly připraveny čerstvé extrakty vzorků tavených sýrů dle následujícího postupu, který již ve své diplomové práci aplikoval Ing. Jakub Příkryl (*Příkryl, 2017*) pro tavené sýry s podobnou surovinovou skladbou. Do čisté vialky s víčkem byl navážen přibližně 1 g zmrazeného vzorku. Ke vzorku bylo přidáno 10 ml 50% methanolu a vialka byla umístěna do ultrazvukové lázně po dobu 30 minut. Supernatant (3000 rpm,

10 minut) byl následně přefiltrován přes stříkačkový filtr s velikostí pórů 0,45 µm. Stejným způsobem byly připraveny extrakty pokrutin hroznů.

2. Extrakční metoda

Pro vzorky sýrů byla využita metoda, kdy dochází k postupné precipitaci a odstranění proteinů, které mohly způsobit kalnost extraktu (*Khalifa, et al., 2017*). Metoda byla lehce modifikována a provedena následujícím způsobem: do vialky s víčkem byl navážen přibližně 1 g zmrazeného vzorku. Ke vzorku bylo přidáno 10 ml 50% methanolu a vialka byla umístěna do ultrazvukové lázně po dobu 30 minut. Extrakce každého vzorku byla zhotovena ve třech navážkách a supernatanty byly slity do jedné centrifugační zkumavky. Spojené supernatanty byly odstředěny (5000 rpm, 15 minut) a následně kapalina odebrána do nové centrifugační zkumavky. Kapalina byla okyselena 0,1 M HCl na pH 4,0, přičemž došlo k vysrážení proteinů. Okyselený extrakt byl tedy znovu odstředěn (5000 rpm, 15 minut), supernatant odebrán do nové centrifugační zkumavky a pomocí 0,1 M NaOH zneutralizován. Zneutralizováním se v kapalině opět vytvořila sraženina a extrakt byl tedy odstředěn (5000 rpm, 10 minut). Centrifugací byl oddělen zbytkový precipitát proteinů a tím získán čirý extrakt, který byl následně uložen (5 °C, 24 h).

2.4.3 **Spektrofotometrická analýza**

Pro stanovení antioxidační aktivity vzorků tavených sýrů a pokrutin hroznů byly využity metody založené na principu spektrofotometrie. Pomocí spektrofotometrie byla stanovena celková antioxidační aktivita metodami DPPH, ABTS, schopnost vychytávat peroxid vodíku a redukční síla antioxidantu. Dále byl stanoven celkový obsah fenolických látek (TPC) a celkový obsah flavonoidů (TFC).

Optimální doby inkubace pro metody DPPH, ABTS a TPC byly převzaty z diplomové práce Ing. Jakuba Příkryla (*Příkryl, 2017*), kde byla provedena optimalizace na vzorcích taveného sýra s podobnou surovinovou skladbou.

2.4.3.1 **Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH**

Kalibrační roztoky troloxu

Navážením 0,1 g standardu troloxu do 100 ml odměrné baňky a doplněním methanolem po rysku byl připraven zásobní roztok troloxu o koncentraci 1000 µg/ml. Z takto připraveného zásobního roztoku byly ředěním připraveny kalibrační roztoky v rozmezí koncentrací 0,35–50 µg/ml.

Pro stanovení bylo nejprve potřeba připravit methanolický roztok radikálu DPPH, navážením 12,5 mg činidla do 500 ml odměrné baňky a doplněním methanolem po rysku.

Do zkumavky s víčkem bylo pipetováno 5 ml roztoku radikálu DPPH a přidáno 500 μ l čistého, případně ředěného extraktu vzorku nebo kalibračního roztoku troloxu o určité koncentraci. Roztok byl ponechán 20 minut v temnu při laboratorní teplotě a následně změřen úbytek absorbance při vlnové délce 517 nm. Stejným způsobem byl připraven a proměřen slepý pokus, který místo extraktu obsahoval čisté extrakční činidlo. Úbytek absorbance byl následně přepočítán na procento inhibice roztoku (rovnice 6) a pomocí kalibrační závislosti na ekvivalentní množství troloxu.

$$\text{Inhibice (\%)} = \frac{A_{sl} - A_{vz}}{A_{sl}} \times 100 \quad (6)$$

A_{sl}absorbance slepého pokusu, A_{vz}absorbance vzorku

2.4.3.2 Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS

Kalibrační roztoky troloxu

Navážením 0,1 g standardu troloxu do 100 ml odměrné baňky a doplněním methanolem po rysku byl připraven zásobní roztok troloxu o koncentraci 1000 μ g/ml. Z takto připraveného zásobního roztoku byly ředěním připraveny kalibrační roztoky v rozmezí koncentrací 1,5–40 μ g/ml.

Pro stanovení byl nejprve potřeba připravit roztok kationt-radikálu ABTS \cdot^+ . Ve vialce s víčkem byla v 5 ml destilované vody rozpuštěna tableta ABTS (10 mg) a následně bylo k roztoku přidáno 100 μ l 0,064 M peroxidisíranu draselného. Takto připravená směs se nechala při laboratorní teplotě reagovat 12–16 hodin. Po uplynutém čase bylo odpipetováno 2,5 ml roztoku do 100 ml odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou po rysku.

Do zkumavky s víčkem byly pipetovány 3 ml roztoku kationt-radikálu ABTS \cdot^+ a přidáno 500 μ l čistého, případně ředěného extraktu vzorku nebo kalibračního roztoku troloxu o určité koncentraci. Roztok byl ponechán 50 minut v temnu při laboratorní teplotě a následně změřen úbytek absorbance při vlnové délce 734 nm. Stejným způsobem byl připraven a proměřen slepý pokus, který místo extraktu obsahoval čisté extrakční činidlo. Úbytek absorbance byl následně přepočítán na procento inhibice roztoku (rovnice 6) a pomocí kalibrační závislosti na ekvivalentní množství troloxu.

2.4.3.3 Stanovení schopnosti antioxidantu vychytávat peroxid vodíku

Pro stanovení bylo nejprve potřeba připravit zásobní roztoky použitých reagensů. Pro přípravu 1 mM roztoku síranu amonno-železnatého bylo naváženo 40 mg činidla do 100 ml odměrné baňky a doplněno 95 ml redestilované vody. Zbýlých 5 ml pro doplnění po rysku představovala 0,005 M kyselina sírová. Dále byl připraven 5 mM roztok peroxidu vodíku, pipetováním 28,3 μ l 30% peroxidu vodíku do 50 ml odměrné baňky a doplněním redestilovanou vodou po rysku (nutný vždy čerstvý roztok). Poslední potřebnou připravenou reagensí byl 1 mM roztok 1,10-fenantrolinu.

Optimalizovaný postup byl převzat z práce *Mukhopadhyay, et al., 2016*. Do zkumavky s víčkem bylo pipetováno postupně 250 μ l 1 mM okyseleného roztoku síranu amonno-železnatého, 1,5 ml extraktu a 62,5 μ l 5 mM roztoku peroxidu vodíku. Roztok byl ponechán 5 minut v temnu při laboratorní teplotě a následně byl přidán 1,5 ml 1 mM roztoku 1,10-fenantrolinu. Roztok byl opět umístěn do temna při laboratorní teplotě po dobu 10 minut a následně změřen nárůst absorbance reakční směsi při vlnové délce 510 nm. Stejným způsobem byl proměřen slepý pokus, který ale obsahoval pouze roztok síranu amonno-železnatého, čisté extrakční činidlo a roztok 1,10-fenantrolinu. Nárůst absorbance byl následně přepočítán na procento vychytaného peroxidu vodíku (rovnice 7).

$$\% \text{ vychytaného } \text{H}_2\text{O}_2 = \frac{A_{vz}}{A_{sl}} \times 100 \quad (7)$$

A_{sl} ...absorbance slepého pokusu, A_{vz} ...absorbance vzorku

2.4.3.4 Stanovení redukční síly

Optimalizovaný postup byl převzat z práce *Pavithra & Vadivukkarasi, 2015*. Pro stanovení byl do zkumavky s víčkem pipetován 1 ml extraktu, 2,5 ml 1% hexakyanoželezitanu draselného a 2,5 ml 0,2 M fosfátového pufru (pH 7,4). Reakční směs byla inkubována ve vodní lázni vyhřáté na 50 °C po dobu 30 minut. Následným přidavkem 2,5 ml 10% kyseliny trichloroctové se na dně zkumavky vytvořila sraženina a reakční směs byla odstředěna (3000 rpm, 10 minut). Po centrifugaci bylo ze zkumavky odebráno vrchních 2,5 ml do nové zkumavky a přidáno 2,5 ml destilované vody. Ke směsi bylo dále pipetováno 0,5 ml 0,1% chloridu železitého a následně byl změřen nárůst absorbance reakční směsi při vlnové délce 700 nm. Stejným způsobem byl proměřen slepý pokus, který místo extraktu obsahoval čisté extrakční činidlo. Redukční síla antioxidantu byla vyjádřena pouze pomocí optické denzity po odečtení slepého pokusu (rovnice 8).

$$A_{700} = A_{vz} - A_{sl} \quad (8)$$

A_{sl} ...absorbance slepého pokusu, A_{vz} ...absorbance vzorku

2.4.3.5 Stanovení celkového obsahu fenolických látek

Kalibrační roztoky kyseliny gallové

Navážením 0,02 g standardu kyseliny gallové do 50 ml odměrné baňky a doplněním methanolem po rysku byl připraven zásobní roztok kyseliny gallové o koncentraci 400 µg/ml. Z takto připraveného zásobního roztoku byly ředěním připraveny kalibrační roztoky v rozmezí koncentrací 2–80 µg/ml.

Do zkumavky s víčkem byl pipetován 1 ml čistého, případně ředěného extraktu nebo kalibračního roztoku kyseliny gallové o určité koncentraci. Déle byl přidán 1 ml 96% ethanolu, 5 ml destilované vody a 0,5 ml FC činidla. Takto připravený roztok byl ponechán 5 minut v klidu při laboratorní teplotě. Po uplynulém čase byl ke směsi přidán 1 ml 5% roztoku uhličitanu sodného. Roztok byl ponechán 70 minut v temnu při laboratorní teplotě a následně změřen nárůst absorpance při vlnové délce 765 nm. Stejným způsobem byl připraven a proměřen slepý pokus, který místo extraktu obsahoval čisté extrakční činidlo. Koncentrace fenolických látek ve vzorku byla stanovena pomocí kalibrační řady s kyselinou gallovou.

2.4.3.6 Stanovení celkového obsahu flavonoidů

Kalibrační roztoky kvercetinu

Navážením 26,6 mg hydrátu kvercetinu do 25 ml odměrné baňky a doplněním methanolem po rysku byl připraven zásobní roztok kvercetinu o koncentraci 1000 µg/ml. Z takto připraveného zásobního roztoku byly ředěním připraveny kalibrační roztoky v rozmezí koncentrací 1–150 µg/ml.

Optimalizovaný postup byl převzat z práce *Denni & Mammen, 2012*. Pro stanovení bylo do zkumavky s víčkem pipetováno 0,5 ml extraktu nebo kalibračního roztoku kvercetinu o určité koncentraci. Déle byl přidán 1,5 ml 96% ethanolu, 0,1 ml 10% chloridu hlinitého, 0,1 ml 1 M octanu draselného a 2,8 ml destilované vody. Takto připravený roztok byl ponechán 45 minut v temnu při laboratorní teplotě a následně změřen nárůst absorpance při vlnové délce 415 nm. Stejným způsobem byl připraven a proměřen slepý pokus, který místo extraktu obsahoval čisté extrakční činidlo. Koncentrace flavonoidů ve vzorku byla stanovena pomocí kalibrační řady s kvercetinem.

2.4.4 Infračervená spektroskopie

Metodou infračervené spektroskopie byla změřena spektra surových, lyofilizovaných i sušených pokrutin hroznů a také spektra všech zmražených vzorků tavených sýrů. Vzorky sýrů byly také lyofilizovány (5 hPa, -110 °C). Následně tedy mohla být porovnána spektra vzorků sýrů před a po lyofilizaci.

Podmínky snímání spekter

Metoda iS50 ATR Lab.

Oblast snímání spektra: 4000–400 cm⁻¹

Rozlišení: 4 cm⁻¹

Počet skenů: 25

Pro snímání spekter vzorků byla využita reflexní technika měření. K proměření byl použit ATR modul, na nějž byly jednotlivé vzorky postupně přikládány a proměřeny proti vzduchu. Mezi jednotlivými vzorky byl ATR modul vždy důkladně očištěn chloroformem.

2.4.5 Statistické zpracování

Pro každý vzorek byly zhotoveny dva extrakty, přičemž analýza každého extraktu byla opakována 2× (N=4). Výsledky stanovení byly udány jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka. Tukeyův test pro párové porovnání výsledků byl vypočítán na hladině pravděpodobnosti p=0,05 (OriginPro 9.0.0, OriginLab Corporation, MA, USA).

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Zpracování vzorků

Pokrutiny hroznů byly zpracovány dle postupu popsaného v kapitole 2.3.1.1. Výsledný vzhled jednotlivých pokrutin ukazuje Obrázek 15. Pokrutiny sušené pomocí lyofilizace byly světlejší ve srovnání se pokrutinami sušenými při teplotě 46 °C.

Pokrutiny sušené při teplotě 46 °C byly prosety přes analytická síta s různou velikostí ok. Frakcionaci dle velikosti částic vzorku shrnuje Tabulka 7. V prášku použitém pro obohacení taveného sýra dominují částice s rozsahem velikostí 250–600 µm.



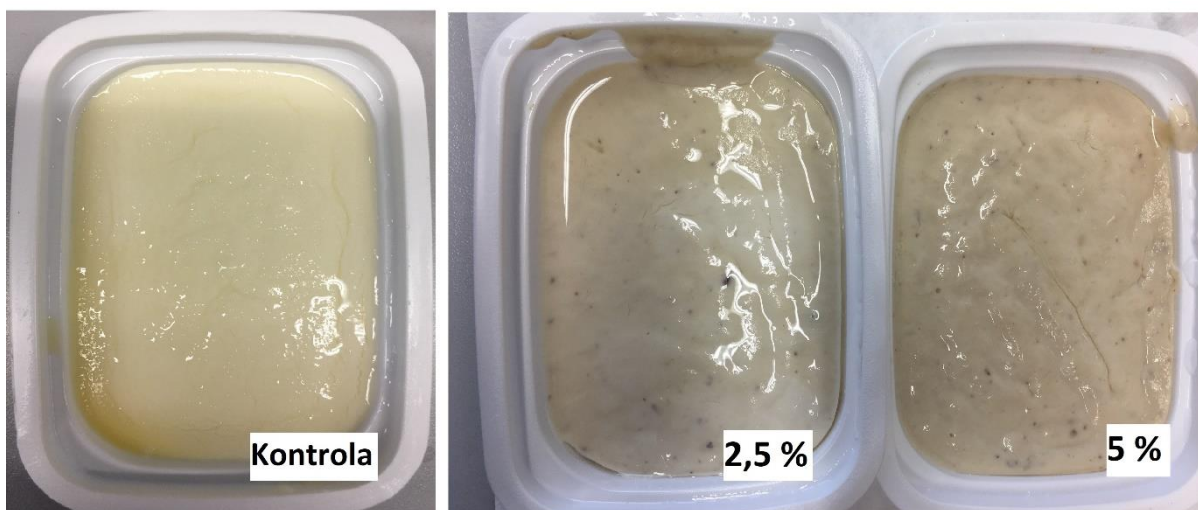
Obrázek 15 Pokrutiny hroznů, zleva: surové, sušené, lyofilizované

Tabulka 7 Frakcionace sušených pokrutin hroznů

Velikost částic (µm)	% podílu vzorku
Větší než 600	10,7
600–250	63,7
250–160	21,6
160–56	1,6

zbylých 2,4 % představují ztráty

Vzorky tavených sýrů byly zhotoveny dle postupu popsaného v kapitole 2.3.2.1. Kontrolní sýr byl zbarven lehce do žluta (Obrázek 16), sýry s přísadky měly různé odstíny hnědé a obsahovaly stopy pokrutin (Obrázek 16, 17, 18). Odstín hnědé a stupeň obsahu pokrutin se s rostoucím přísadkem pokrutin zvyšoval. Pro usnadnění extrakce byly jednotlivé vzorky sýrů rozetřeny na pečicí papír do vrstvy o tloušťce cca 1 mm a ploše 100 cm² a skladovány při -20 °C pro následné analýzy.



Obrázek 16 Vzorky tavených sýrů: kontrolní sýr a sýry s přidavkem surových pokrutin



Obrázek 17 Vzorky tavených sýrů: sýry s přidavkem sušených pokrutin



Obrázek 18 Vzorky tavených sýrů: sýry s přidavkem lyofilizovaných pokrutin

3.1.1 Extrakce

1. Extrakční metoda

Extrakce 50% methanolem byla provedena pro všechny vzorky tavených sýrů i pokrutin. Extrakty pokrutin byly zbarveny žlutě až oranžově. Extrakty kontrolního sýru a sýrů s pokrutinami byly bezbarvé. V mnoha případech ale docházelo k tomu, že ani po přefiltrování nebyl extrakt sýru zcela čirý. Proto byla využita metoda extrakce s užitím 50% methanolu a následným okyselením.

2. Extrakční metoda

Pro vzorky sýrů byla využita metoda, kdy dochází k postupné precipitaci a odstranění proteinů, které způsobují kalnost extraktu (*Khalifa, et al., 2017*). Po provedení postupu, popsaném v kapitole 2.4.2, byly získány čiré extrakty. Extrakty sýrů s přidavkem 2,0 % (hm.) sušených a 2,0 % (hm.) lyofilizovaných pokrutin a sýry s přidavkem 5,0 % (hm.) surových pokrutin byly zbarveny žlutě, ostatní extrakty byly bezbarvé.

Při přípravě extraktů v ultrazvukové lázni byla v intervalu 5ti minut měřena teplota bezdotykovým teploměrem. Průměrné hodnoty ze 4 měřených vzorků shrnuje Tabulka 8. Z výsledků je patrné, že během 30 minut extrakce docházelo ke zvyšování teploty.

Tabulka 8 Teplota extraktů během jejich přípravy

Čas (min)	Teplota (°C)
0	16,3
5	17,6
10	20,7
15	23,4
20	26,7
25	29,4
30	31,1

3.1.2 Stanovení obsahu sušiny

Pro vzorky jednotlivých druhů pokrutin byl stanoven obsah sušiny pomocí analyzátoru vlhkosti. Každý vzorek byl analyzován celkem 3×. Průměrné hodnoty obsahu sušiny shrnuje Tabulka 9. Z výsledků je patrné, že lyofilizací i sušením při 46 °C bylo dosaženo podobného obsahu sušiny.

Tabulka 9 Obsah sušiny pro vzorky pokrutin

Typ pokrutin	% sušiny
Sušené	94,5
Lyofilizované	94,1
Surové	28,5

Obsah sušiny pro vzorky sýrů byl stanoven dle postupu pospaného v kapitole 2.4.1. Každý vzorek byl analyzován celkem 3×. Průměrné hodnoty obsahu sušiny sýrů shrnuje Tabulka 10. Obsah sušiny vyrobených sýrů se pohyboval v rozmezí 37,0–41,0 %. Pomocí párového Wilcoxonova znaménkového testu bylo zjištěno, že žádný z přísad pokrutin hroznového vína nezměnil významně sušinu vzorku ve srovnání s kontrolním vzorkem (bez přísady pokrutin).

Tabulka 10 Obsah sušiny pro vzorky tavených sýrů

Typ sýru	% sušiny
Kontrolní sýr	36,8
Sýr s přídavkem 1,0 % sušených pokrutin	39,5
Sýr s přídavkem 2,0 % sušených pokrutin	41,0
Sýr s přídavkem 1,0 % lyofilizovaných pokrutin	38,7
Sýr s přídavkem 2,0 % lyofilizovaných pokrutin	39,6
Sýr s přídavkem 2,5 % surových pokrutin	37,1
Sýr s přídavkem 5,0 % surových pokrutin	38,0

3.2 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH

Antioxidační aktivita byla metodou DPPH stanovena pro extrakty vzorků tavených sýrů, jejichž zhotovení je popsáno v kapitole 2.4.2. Pro vzorky pokrutin byla aplikována pouze extrakční metoda 1, jelikož nedocházelo k zakalení extraktu. Před stanovením bylo potřeba naředit extrakty pokrutin. Extrakty sušených a lyofilizovaných pokrutin byly ředěny 100×, extrakty surových pokrutin ředěny nebyly. Pro samotné stanovení byl aplikován postup popsáný v kapitole 2.4.3.1. Pro každý vzorek sýru a pokrutin byly zhotoveny dva extrakty, přičemž analýza každého extraktu byla opakována 2×. Z naměřených dat přepočtených na procenta inhibice byla pomocí kalibrační řady troloxu (Příloha 1) vyjádřena celková antioxidační aktivita ve vzorku a výsledek udán jako µg troloxu na ml extraktu. V Tabulce 11 a 12 jsou zaznamenány hodnoty antioxidační aktivity pro kontrolní vzorek sýru, pro vzorky sýrů obohacené o pokrutiny hroznů a také hodnoty antioxidační aktivity samotných pokrutin (Tabulka 13).

Tabulka 11 Antioxidační aktivita sýrů s přidavkem sušených a lyofilizovaných pokrutin stanovená metodou DPPH

Extrakční metoda	Kontrolní sýr	Obohacené sýry			
		1,0 % (hm.) sušených pokrutin	2,0 % (hm.) sušených pokrutin	1,0 % (hm.) lyofil. pokrutin	2,0 % (hm.) lyofil. pokrutin
μg troloxu/ml					
1	<m.d.**	9,71 ± 2,65 ^b	11,36 ± 2,41 ^b	10,02 ± 2,37 ^b	35,22 ± 4,91 ^c
2	7,71 ± 0,54 ^a	12,85 ± 0,21 ^b	-*	18,81 ± 0,36 ^c	-*

* nelze stanovit

** pod mezí detekce metody

Extrakční metoda 1: extrakce 50% methanolem bez dalších úprav

Extrakční metoda 2: extrakce 50% methanolem s následným okyselením a neutralizací

Různá písmena označují statisticky významný rozdíl v hodnotách uvedených v řádcích.

Průměrné hodnoty ± standardní odchylka (N=4)

Tabulka 12 Antioxidační aktivita sýrů s přidavkem surových pokrutin stanovená metodou DPPH

Extrakční metoda	Kontrolní sýr	Obohacené sýry	
		2,5 % (hm.) surových pokrutin	5,0 % (hm.) surových pokrutin
μg troloxu /ml			
1	<m.d.**	13,67 ± 2,07 ^b	26,89 ± 1,09 ^c
2	7,71 ± 0,54 ^a	11,34 ± 1,24 ^b	-*

* nelze stanovit

** pod mezí detekce metody

Extrakční metoda 1: extrakce 50% methanolem bez dalších úprav

Extrakční metoda 2: extrakce 50% methanolem s následným okyselením a neutralizací

Různá písmena označují statisticky významný rozdíl v hodnotách uvedených v řádcích.

Průměrné hodnoty ± standardní odchylka (N=4)

Tabulka 13 Antioxidační aktivita pokrutin hroznů stanovená metodou DPPH

Extrakční metoda	Sušené pokrutiny	Lyofilizované pokrutiny	Surové pokrutiny
	μg troloxu/ml		
1	3964 ± 175 ^b	5517 ± 183 ^c	30,18 ± 1,11 ^a

Extrakční metoda 1: extrakce 50% methanolem bez dalších úprav

Různá písmena označují statisticky významný rozdíl v hodnotách uvedených v řádcích.

Průměrné hodnoty ± standardní odchylka (N=4)

Z výsledků je patrné, že vhodnější ke stanovení celkové antioxidační aktivity metodou DPPH pro vzorky tavených sýrů je užití extrakce 50% methanolem bez dalších úprav (extrakční metoda 1). Antioxidační aktivita kontrolního sýru je téměř nulová, což lze vysvětlit tím, že test DPPH není citlivý ke stanovení antioxidační aktivity peptidů a aminokyselin (Zheng, et al., 2015). Postupným přidavkem jednotlivých druhů pokrutin v různých koncentracích pak dochází k nárůstu antioxidační aktivity sýru. Nárůst antioxidační aktivity v obohacených vzorcích sýrů oproti kontrole je pozorovatelný s přidavkem 1,0 % a 2,0 % (hm.) sušených a 1,0 % (hm.) lyofilizovaných pokrutin. Významnější nárůst je patrný s přidavkem 2,0 % (hm.) lyofilizovaných pokrutin. V případě přidavku surových pokrutin je zřejmý postupný nárůst oproti kontrolnímu sýru v koncentraci 2,5 i 5,0 % (hm.) surových pokrutin.

Užitím 50% methanolu s následným okyselením (extrakční metoda 2) nebylo možné získat všechny potřebné výsledky a tak vliv přidavku porovnat, nárůst antioxidační aktivity s přidavkem pokrutin je ale také patrný. V důsledku fialového zbarvení roztoku DPPH radikálu a žlutým zbarvením některých extraktů (sýr s přidavkem 2,0 % (hm.) lyofilizovaných a sušených pokrutin a sýr s přidavkem 5,0 % (hm.) surových pokrutin) nebylo možné tyto extrakty spektrofotometricky proměřit. Výsledná reakční směs se zbarvovala hnědě a ani po naředění nebylo možné extrakty detekovat.

Extrakty samotných pokrutin hroznů vykazují vysokou antioxidační aktivitu, a to především v sušené a lyofilizované podobě. Důvodem, proč je oproti pokrutinám v surovém stavu koncentrace tak vysoká je ten, že sušení má významný vliv na stabilitu a složení přirozeně se vyskytujících antioxidantů (Ferri, et al., 2017). Lyofilizací dochází ke ztrátě především těkavých látek z pokrutin, ale fenolické látky mající v pokrutinách největší podíl na antioxidační aktivitě zůstávají přítomny (de Torres, et al., 2015). Dalším důvodem je obsah sušiny. Pokrutiny v sušeném a lyofilizovaném stavu obsahují až 94 % sušiny, zatímco pokrutiny v surovém stavu pouze okolo 28 % sušiny. Sušení a lyofilizace tedy představují vhodné zpracování, pokud chceme dosáhnout co nejvyššího výtěžku extrakce.

3.3 Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS

Antioxidační aktivita byla metodou ABTS stanovena pro extrakty vzorků tavených sýrů, jejichž zhotovení je popsáno v kapitole 2.4.2. Před analýzou byly extrakty všech sýrů zhotovené extrakční metodou 1 ředěny 10×. Extrakty vzorků sýrů s přidavkem 2,0 % (hm.) sušených pokrutin, 2,0 % (hm.) lyofilizovaných pokrutin a 5,0 % (hm.) surových pokrutin připravené extrakční metodou 2 byly ředěny 10×. Pro vzorky pokrutin byla aplikována pouze extrakční metoda 1, jelikož nedocházelo k zakalení extraktu. Před stanovením bylo potřeba naředit

extrakty pokrutin. Extrakty sušených pokrutin byly ředěny 100×, lyofilizovaných pokrutin 500×, surové pokrutiny byly ředěny 10×. Pro samotné stanovení byl aplikován postup popsáný v kapitole 2.4.3.2. Pro každý vzorek sýru a pokrutin byly zhotoveny dva extrakty, přičemž analýza každého extraktu byla opakována 2×. Z naměřených dat, přepočtených na procenta inhibice byla pomocí kalibrační řady troloxu (Příloha 2) vyjádřena celková antioxidační aktivita ve vzorku a výsledek udán jako µg troloxu na ml extraktu. V Tabulce 14 a 15 jsou zaznamenány hodnoty antioxidační aktivity u kontrolního vzorku sýru, pro vzorky sýrů obohacené o pokrutiny hroznů a také hodnoty antioxidační aktivity samotných pokrutin (Tabulka 16).

Tabulka 14 Antioxidační aktivita sýrů s přidavkem sušených a lyofilizovaných pokrutin stanovená metodou ABTS

Extrakční metoda	Kontrolní sýr	Obohacené sýry			
		1,0 % (hm.) sušených pokrutin	2,0 % (hm.) sušených pokrutin	1,0 % (hm.) lyofil. pokrutin	2,0 % (hm.) lyofil. pokrutin
		µg troloxu/ml extraktu			
1	279,4 ± 57,9 ^b	278,6 ± 14,9 ^b	139,1 ± 9,80 ^a	142,9 ± 6,54 ^a	144,1 ± 22,9 ^a
2	3,25 ± 2,62 ^a	12,39 ± 1,70 ^{ab}	213,9 ± 13,5 ^c	27,89 ± 1,06 ^b	264,8 ± 11,3 ^d

Extrakční metoda 1: extrakce 50% methanolem bez dalších úprav

Extrakční metoda 2: extrakce 50% methanolem s následným okyselením a neutralizací

Různá písmena označují statisticky významný rozdíl v hodnotách uvedených v řádcích.

Průměrné hodnoty ± standardní odchylka (N=4)

Tabulka 15 Antioxidační aktivita sýrů s přidavkem surových pokrutin stanovená metodou ABTS

Extrakční metoda	Kontrolní sýr	Obohacené sýry	
		2,5 % (hm.) surových pokrutin	5,0 % (hm.) surových pokrutin
		µg troloxu/ml extraktu	
1	279,4 ± 57,9 ^a	257,8 ± 25,8 ^a	245,2 ± 14,5 ^a
2	3,25 ± 2,62 ^a	19,16 ± 1,29 ^a	248,0 ± 12,9 ^b

Extrakční metoda 1: extrakce 50% methanolem bez dalších úprav

Extrakční metoda 2: extrakce 50% methanolem s následným okyselením a neutralizací

Různá písmena označují statisticky významný rozdíl v hodnotách uvedených v řádcích.

Průměrné hodnoty ± standardní odchylka (N=4)

Tabulka 16 Antioxidační aktivita pokrutin hroznů stanovená metodou ABTS

Extrakční metoda	Sušené pokrutiny	Lyofilizované pokrutiny	Surové pokrutiny
	µg troloxu/ml extraktu		
1	5504 ± 154 ^b	13479 ± 1516 ^c	143,4 ± 17,2 ^a

Extrakční metoda 1: extrakce 50% methanolem bez dalších úprav

Různá písmena označují statisticky významný rozdíl v hodnotách uvedených v řádcích.

Průměrné hodnoty ± standardní odchylka (N=4)

Dle výsledků je na první pohled zřejmé, že užití extrakce 50% methanolem bez dalších úprav (extrakční metoda 1) není vhodné pro stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS v sýrech. Je očividné, že s nárůstem přídavku pokrutin v sušeném, lyofilizovaném i surovém stavu dochází ke snížení antioxidační aktivity nebo se antioxidační aktivita vůči kontrolnímu sýru nemění. Důvodem mohou být nespecifické reakce $\text{ABTS}^{\cdot+}$ s thioley a proteiny (Schaich, et al., 2015). Využitím extrakce 50% methanolem s následnou úpravou okyselením (extrakční metoda 2) dochází pravděpodobně k vysrážení těchto sloučenin, nespecifické reakce jsou tak potlačeny a je vidět postupný nárůst antioxidační aktivity sýrů s přídavkem pokrutin oproti sýru kontrolnímu. Vysoký nárůst antioxidační aktivity (až 10× vyšší) je viditelný především u sýrů s přídavkem 2,0 % (hm.) sušených a lyofilizovaných pokrutin a s přídavkem 5,0 % (hm.) surových pokrutin.

Extrakt samotných pokrutin hroznů vykazují vysoké hodnoty antioxidační aktivity, a to především v sušené, a hlavně v lyofilizované podobě stejně jako v případě předchozího stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH (kapitola 3.2).

V porovnání se stanovením celkové antioxidační aktivity metodou DPPH (kapitola 3.2) jsou koncentrace stanovené metodou ABTS výrazně vyšší. Při použití testu DPPH ke stanovení celkové antioxidační aktivity aminokyselin, proteinů či peptidů je velmi důležitým aspektem pH reakční směsi, přičemž DPPH radikál je stabilní při pH v rozmezí hodnot 5,0–6,5. V případě nevhodně zvoleného pH dochází k deprotonaci vzniklé formy DPPH-H (Zheng, et al., 2015), což by mohlo mít vliv i v případě našeho stanovení. Důvodem může být ale i fakt, že $\text{ABTS}^{\cdot+}$ lze solubilizovat ve vodném i organickém prostředí, zatímco DPPH radikál pouze v prostředí organickém (především alkoholovém), a tím v případě stanovení metodou DPPH dochází k omezení stanovení hydrofilních antioxidantů (Arnao, 2000).

3.4 Stanovení redukční síly

Redukční síla antioxidantů přítomných ve vzorcích byla stanovena pro extrakty vzorků sýrů, jejichž zhotovení je popsáno v kapitole 2.4.2. Pro vzorky pokrutin byla aplikována pouze extrakční metoda 1, jelikož nedocházelo k zakalení extraktu. Pro samotné stanovení byl aplikován postup popsáný v kapitole 2.4.3.4. Pro každý vzorek sýru a pokrutin byly zhotoveny dva extrakty, přičemž analýza každého extraktu byla opakována 2×. Z naměřených absorbancí byla vyjádřena redukční síla antioxidantu (rovnice 8) přítomného ve vzorku a výsledek udán jako optická denzita při vlnové délce 700 nm. V Tabulce 17 a 18 jsou zaznamenány absorbance při vlnové délce 700 nm po odečtení slepého pokusu u kontrolního vzorku sýru, pro vzorky sýrů obohacené o pokrutiny hroznů a také hodnoty pro samotné pokrutiny (Tabulka 19).

Tabulka 17 Redukční síla sýrů s přidavkem sušených a lyofilizovaných pokrutin

Extrakční metoda	Kontrolní sýr	Obohacené sýry			
		1,0 % (hm.) sušených pokrutin	2,0 % (hm.) sušených pokrutin	1,0 % (hm.) lyofil. pokrutin	2,0 % (hm.) lyofil. pokrutin
		-			
1	0,07 ± 0,01 ^a	0,17 ± 0,02 ^b	0,21 ± 0,03 ^c	0,16 ± 0,01 ^b	0,19 ± 0,02 ^{bc}
2	0,01 ± 0,01 ^a	0,07 ± 0,01 ^b	0,19 ± 0,02 ^c	0,08 ± 0,01 ^b	0,24 ± 0,01 ^d

Extrakční metoda 1: extrakce 50% methanolem bez dalších úprav

Extrakční metoda 2: extrakce 50% methanolem s následným okyselením a neutralizací

Různá písmena označují statisticky významný rozdíl v hodnotách uvedených v řádcích.

Průměrné hodnoty ± standardní odchylka (N=4)

Tabulka 18 Redukční síla sýrů s přidavkem surových pokrutin

Extrakční metoda	Kontrolní sýr	Obohacené sýry	
		2,5 % (hm.) surových pokrutin	5,0 % (hm.) surových pokrutin
		-	
1	0,07 ± 0,01 ^a	0,18 ± 0,03 ^b	0,28 ± 0,01 ^c
2	0,01 ± 0,01 ^a	0,06 ± 0,01 ^b	0,13 ± 0,01 ^c

Extrakční metoda 1: extrakce 50% methanolem bez dalších úprav

Extrakční metoda 2: extrakce 50% methanolem s následným okyselením a neutralizací

Různá písmena označují statisticky významný rozdíl v hodnotách uvedených v řádcích.

Průměrné hodnoty ± standardní odchylka (N=4)

Tabulka 19 Redukční síla pokrutin hroznů

Extrakční metoda	Sušené pokrutiny	Lyofilizované pokrutiny	Surové pokrutiny
1	1,08 ± 0,01 ^b	1,08 ± 0,01 ^b	0,59 ± 0,01 ^a

Extrakční metoda 1: extrakce 50% methanolem bez dalších úprav

Různá písmena označují statisticky významný rozdíl v hodnotách uvedených v řádcích.

Průměrné hodnoty ± standardní odchylka (N=4)

Z výsledků je zřejmé, že s rostoucí koncentrací přidaných pokrutin do sýrů roste i schopnost antioxidantů přítomných v připravených extraktech redukovat železité ionty v reakční směsi na železnaté. Se zvýšenou absorbancí vzrůstá i intenzita zbarvení monitorované Berlínské modři. Rostoucí trend je patrný především pro extrakty zhotovené extrakční metodou 2, kdy jsou rozdíly mezi koncentracemi přidaných pokrutin a také v porovnání s kontrolním sýrem dobře znatelné. Zároveň jsou ale hodnoty získané extrakční metodou 2 nižší než výsledky získané po extrakci 50% methanolem bez dalších úprav (extrakční metoda 1). Redukční síla přímo souvisí se štěpením peptidů, které určují schopnost vzorku darovat elektrony nebo protony. Důvod nižších hodnot může být tedy takový, že, extrakcí 50% methanolem s následným okyselením (extrakční metoda 2) došlo k vysrážení a odstranění proteinů, což jsou látky, které by byly schopné dodat atom vodíku, a tím redukovat železité ionty na železnaté (*Liu, et al., 2018*).

V případě stanovení redukční síly antioxidantů přítomných v samotných pokrutinách hroznů, se opět potvrdila skutečnost, že sušením a lyofilizací nedochází ke ztrátě prospěšných látek a představují vhodné zpracování pokrutiny pro co nejúčinnější vyextrahování látek majících antioxidační účinky. Oproti pokrutinám v surovém stavu jsou hodnoty schopnosti redukce pro pokrutiny v sušeném a lyofilizovaném stavu téměř dvojnásobné.

3.5 Stanovení schopnosti vychytávat peroxid vodíku

Schopnost antioxidantů přítomných ve vzorku vychytávat peroxid vodíku byla stanovena pro extrakty vzorků tavených sýrů a pokrutin zhotovených pouze extrakční metodou 2, jejíž provedení je popsáno v kapitole 2.4.2. Pro samotné stanovení byl aplikován postup popsáný v kapitole 2.4.3.3. Pro každý vzorek sýru a pokrutin byly zhotoveny dva extrakty, přičemž analýza každého extraktu byla opakována 2×. Z naměřených dat bylo pomocí slepého pokusu vyjádřeno, kolik peroxidu vodíku bylo daným typem vzorku vychytáno a výsledek udán procenta vychyteného peroxidu vodíku. V Tabulce 20 a 21 jsou zaznamenány procenta vychyteného peroxidu vodíku u kontrolního vzorku sýru, pro vzorky sýrů obohacené o pokrutiny hroznů a také hodnoty pro samotné pokrutiny (Tabulka 22).

Tabulka 20 Schopnost sýrů s přidavkem sušených a lyofilizovaných pokrutin vychytávat peroxid vodíku

		Obohacené sýry			
Extrakční metoda	Kontrolní sýr	1,0 % (hm.) sušených pokrutin	2,0 % (hm.) sušených pokrutin	1,0 % (hm.) lyofil. pokrutin	2,0 % (hm.) lyofil. pokrutin
		% vychytaného H ₂ O ₂			
1	-*	-*	-*	-*	-*
2	6,32 ± 2,44 ^a	12,87 ± 4,83 ^a	24,80 ± 1,07 ^b	22,14 ± 1,77 ^b	33,53 ± 0,59 ^c

*nestanoveno

Extrakční metoda 1: extrakce 50% methanolem bez dalších úprav

Extrakční metoda 2: extrakce 50% methanolem s následným okyslením a neutralizací

Různá písmena označují statisticky významný rozdíl v hodnotách uvedených v řádcích.

Průměrné hodnoty ± standardní odchylka (N=4)

Tabulka 21 Schopnost sýrů s přidavkem surových pokrutin vychytávat peroxid vodíku

		Obohacené sýry	
Extrakční metoda	Kontrolní sýr	2,5 % (hm.) surových pokrutin	5,0 % (hm.) surových pokrutin
		% vychytaného H ₂ O ₂	
1	-*	-*	-*
2	6,32 ± 2,44 ^a	21,21 ± 3,33 ^b	27,37 ± 1,07 ^b

*nestanoveno

Extrakční metoda 1: extrakce 50% methanolem bez dalších úprav

Extrakční metoda 2: extrakce 50% methanolem s následným okyslením a neutralizací

Různá písmena označují statisticky významný rozdíl v hodnotách uvedených v řádcích.

Průměrné hodnoty ± standardní odchylka (N=4)

Tabulka 22 Schopnost pokrutin hroznů vychytávat peroxid vodíku

Extrakční metoda	Sušené pokrutiny	Lyofilizované pokrutiny	Surové pokrutiny
	% vychytaného H ₂ O ₂		
1	53,86 ± 1,09 ^b	58,95 ± 1,16 ^c	32,69 ± 1,07 ^a

Extrakční metoda 1: extrakce 50% methanolem bez dalších úprav

Různá písmena označují statisticky významný rozdíl v hodnotách uvedených v řádcích.

Průměrné hodnoty ± standardní odchylka (N=4)

Extrakty vzorků sýrů byly zhotovené pouze extrakční metodou 2, tedy s 50% methanolem a následným okyselením, jelikož extrakty připravené s 50% methanolem bez dalších úprav (extrakční metoda 1) i po přidavku reagensů pro stanovení byly zakalené a hodnoty absorbancí tak díky zákalu nadhodnocené.

Z výsledků stanovení schopnosti antioxidantů přítomných ve vzorku vychytávat peroxid vodíku je patrné, že s postupným nárůstem přidavku pokrutin do sýru roste i schopnost peroxid vodíku vychytávat. Oproti kontrolnímu sýru je zřejmý nárůst s přidavkem 2,0 % (hm.) sušených pokrutin, pokrutiny lyofilizované v sýru zvyšují schopnost peroxid vodíku vychytat již v přidavku 1,0 % (hm.). Přídavek pokrutin v lyofilizovaném stavu do sýru je tedy účinnější, což potvrzují i výsledky stanovení schopnosti vychytávat peroxid vodíku pro samotné pokrutiny. Pro pokrutiny surové platí, že jejich přidavek do taveného zvyšuje schopnost vychytávat peroxid vodíku, ale rozdíl mezi 2,5 a 5,0% přidavkem není statisticky významný.

3.6 Stanovení celkového obsahu fenolických látek

Celkový obsah fenolických látek byl stanoven pro extrakty vzorků tavených sýrů, jejichž zhotovení je popsáno v kapitole 2.4.2. Pro vzorky pokrutin byla aplikována pouze extrakční metoda 1, jelikož nedocházelo k zakalení extraktu. Před stanovením bylo potřeba naředit extrakty pokrutin. Sušené a lyofilizované pokrutiny byly ředěny 100×, surové pokrutiny ředěny nebyly. Pro samotné stanovení byl aplikován postup popsáný v kapitole 2.4.3.5. Pro každý vzorek sýru a pokrutin byly zhotoveny dva extrakty, přičemž analýza každého extraktu byla opakována 2×. Z naměřených dat byl pomocí kalibrační řady kyseliny gallové (Příloha 3) vyjádřen obsah fenolických látek ve vzorku a výsledek udán jako μg kyseliny gallové na ml extraktu. V Tabulce 23 a 24 jsou zaznamenány hodnoty celkového obsahu fenolických látek u kontrolního vzorku sýru, pro vzorky sýrů obohacené o pokrutiny hroznů a také hodnoty obsahu fenolických látek samotných pokrutin (Tabulka 25).

Tabulka 23 Celkový obsah fenolických látek sýrů s přidavkem sušených a lyofilizovaných pokrutin

		Obohacené sýry			
Extrakční metoda	Kontrolní sýr	1,0 % (hm.) sušených pokrutin	2,0 % (hm.) sušených pokrutin	1,0 % (hm.) lyofil. pokrutin	2,0 % (hm.) lyofil. pokrutin
		μg kyseliny gallové/ml extraktu			
1	44,17 ± 4,82 ^b	51,07 ± 6,24 ^b	21,54 ± 6,25 ^a	23,04 ± 9,21 ^a	26,31 ± 1,71 ^a
2	4,64 ± 0,35 ^a	6,82 ± 0,34 ^a	19,35 ± 1,59 ^b	7,22 ± 0,41 ^a	21,53 ± 1,43 ^b

Extrakční metoda 1: extrakce 50% methanolem bez dalších úprav

Extrakční metoda 2: extrakce 50% methanolem s následným okyselením a neutralizací

Různá písmena označují statisticky významný rozdíl v hodnotách uvedených v řádcích.

Průměrné hodnoty ± standardní odchylka (N=4)

Tabulka 24 Celkový obsah fenolických látek sýrů s přidavkem surových pokrutin

		Obohacené sýry	
Extrakční metoda	Kontrolní sýr	2,5 % (hm.) surových pokrutin	5,0 % (hm.) surových pokrutin
		μg kyseliny gallové/ml extraktu	
1	44,17 ± 4,82 ^a	52,54 ± 6,57 ^a	43,67 ± 15,5 ^a
2	4,64 ± 0,35 ^a	11,35 ± 0,67 ^b	30,60 ± 1,13 ^c

Extrakční metoda 1: extrakce 50% methanolem bez dalších úprav

Extrakční metoda 2: extrakce 50% methanolem s následným okyselením a neutralizací

Různá písmena označují statisticky významný rozdíl v hodnotách uvedených v řádcích.

Průměrné hodnoty ± standardní odchylka (N=4)

Tabulka 25 Celkový obsah fenolických látek pokrutin hroznů

Extrakční metoda	Sušené pokrutiny	Lyofilizované pokrutiny	Surové pokrutiny
	μg kyseliny gallové/ml extraktu		
1	980,7 ± 78,8 ^b	2034 ± 82,5 ^c	37,17 ± 1,28 ^a

Extrakční metoda 1: extrakce 50% methanolem bez dalších úprav

Různá písmena označují statisticky významný rozdíl v hodnotách uvedených v řádcích.

Průměrné hodnoty ± standardní odchylka (N=4)

Z výsledků je zřejmé, že použití extrakční metody s 50% methanolem bez dalších úprav (extrakční metoda 1) sice poskytuje vyšší stanovené koncentrace oproti výsledkům získaných po extrakci s použitím 50% methanolu a následným okyselením (extrakční metoda 2), ale obsah fenolických látek v jednotlivých vzorcích se statisticky významně neliší a také hodnoty směrodatných odchylek jsou velmi vysoké. Tyto velké rozptyly jsou způsobeny tím, že extrakty sýrů byly v různém stupni zakalené. Naměřené hodnoty absorbancí se tedy výrazně lišily dle stupně zakalení původního extraktu. Důvodem vyššího stanoveného obsahu fenolických látek může být fakt, že některé aminokyseliny (tyrosinové zbytky) a cukerné složky (oligosacharidy a laktóza) přítomné v mléčných výrobcích mohou interferovat s činidlem FC, a tak být měřeny jako obsah fenolických látek (*Rashidinejad, et al., 2015*). Užitím extrakce do 50% methanolu s následným okyselením, kdy dochází k vysrážení bílkovin a dalších složek, mohou být tyto rušivé složky eliminovány a tím tedy stanoveny nižší, ale skutečné koncentrace fenolických látek.

Zaměříme-li se tedy na výsledky získané extrakcí vzorků do 50% methanolu s následnou úpravou okyselením (extrakční metoda 2), pak je zřejmé, že statisticky významný nárůst koncentrace fenolických látek v obohacených vzorcích sýrů oproti kontrole je pozorovatelný až s přidavkem 2,0 % (hm.) sušených a 2,0 % (hm.) lyofilizovaných pokrutin, přičemž ke zvýšení obsahu fenolických látek v sýru přispívají ve stejné míře. V případě přidavku surových pokrutin je zřejmý nárůst oproti kontrolnímu sýru v koncentraci 2,5 i 5,0 % (hm.) surových pokrutin.

Extrakty samotných pokrutin hroznů vykazují vysoký obsah fenolických látek, a to především v sušené, a hlavně v lyofilizované podobě stejně jako v případě předchozích stanovení antioxidační aktivity.

3.7 Stanovení celkového obsahu flavonoidů

Celkový obsah flavonoidů byl stanoven pro extrakty vzorků tavených sýrů, jejichž zhotovení je popsáno v kapitole 2.4.2. Pro vzorky pokrutin byla aplikována pouze extrakční metoda 1, jelikož nedocházelo k zakalení extraktu. Pro samotné stanovení byl aplikován postup popsáný v kapitole 2.4.3.6. Pro každý vzorek sýru a pokrutin byly zhotoveny dva extrakty, přičemž analýza každého extraktu byla opakována 2×. Z naměřených dat byl pomocí kalibrační řady kvercetinu (Příloha 4) vyjádřen obsah flavonoidů ve vzorku a výsledek udán jako µg kvercetinu na ml extraktu. V Tabulce 26 a 27 jsou zaznamenány hodnoty celkového obsahu flavonoidů u kontrolního vzorku sýru, pro vzorky sýrů obohacené o pokrutiny hroznů a také hodnoty obsahu flavonoidů samotných pokrutin (Tabulka 28).

Tabulka 26 Celkový obsah flavonoidů sýrů s přidavkem sušených a lyofilizovaných pokrutin

Extrakční metoda	Kontrolní sýr	Obohacené sýry			
		1,0 % (hm.) sušených pokrutin	2,0 % (hm.) sušených pokrutin	1,0 % (hm.) lyofil. pokrutin	2,0 % (hm.) lyofil. pokrutin
μg kvercetinu/ml extraktu					
1	-*	-*	-*	-*	-*
2	8,69 ± 1,61 ^a	14,66 ± 0,68 ^{bcd}	17,34 ± 0,63 ^{cd}	11,32 ± 1,76 ^{ab}	17,49 ± 0,80 ^d

* nedetekováno

Extrakční metoda 1: extrakce 50% methanolem bez dalších úprav

Extrakční metoda 2: extrakce 50% methanolem s následným okyselením a neutralizací

Různá písmena označují statisticky významný rozdíl v hodnotách uvedených v řádcích.

Průměrné hodnoty ± standardní odchylka (N=4)

Tabulka 27 Celkový obsah flavonoidů sýrů s přidavkem surových pokrutin

Extrakční metoda	Kontrolní sýr	Obohacené sýry	
		2,5 % (hm.) surových pokrutin	5,0 % (hm.) surových pokrutin
μg kvercetinu/ml extraktu			
1	-*	-*	-*
2	8,69 ± 1,61 ^a	14,56 ± 0,93 ^a	31,67 ± 3,81 ^b

* nedetekováno

Extrakční metoda 1: extrakce 50% methanolem bez dalších úprav

Extrakční metoda 2: extrakce 50% methanolem s následným okyselením a neutralizací

Různá písmena označují statisticky významný rozdíl v hodnotách uvedených v řádcích.

Průměrné hodnoty ± standardní odchylka (N=4)

Tabulka 28 Celkový obsah flavonoidů pokrutin hroznů

Extrakční metoda	Sušené pokrutiny	Lyofilizované pokrutiny	Surové pokrutiny
	μg kvercetinu/ml extraktu		
1	72,87 ± 0,47 ^c	52,68 ± 1,31 ^b	3,57 ± 0,65 ^a

Extrakční metoda 1: extrakce 50% methanolem bez dalších úprav

Různá písmena označují statisticky významný rozdíl v hodnotách uvedených v řádcích.

Průměrné hodnoty ± standardní odchylka (N=4)

Stanovení celkového obsahu flavonoidů bylo provedeno pro extrakty sýrů, zhotovené extrakcí 50% methanolem (extrakční metoda 1) i metodou s následným okyselením (extrakční metoda 2). Extrakty připravené bez okyselení nevykazovaly žádný nárůst absorbance oproti slepému pokus. Flavonoidy jsou silné antioxidanty, ale je známo, že se váží na proteiny. Pokud tedy dojde k interakci flavonoidu s mléčnou bílkovinou, pravděpodobně nedochází k nárůstu antioxidační aktivity, ale naopak část antioxidační aktivity může být touto interakcí maskována. Do jaké míry dochází k maskování, záleží na typu proteinu i flavonoidu (*Arts, et al., 2002*). Obsah flavonoidů byl měřitelný pouze pro extrakty připravené s 50% methanolem s následným okyselením. Pravděpodobně tak došlo k vysrážení bílkovin, maskujících přítomné flavonoidy. Hodnoty se však příliš statisticky neliší a oproti kontrolnímu sýru je významný nárůst obsahu flavonoidů patrný až s přidavkem 2,0 % (hm.) sušených a lyofilizovaných pokrutin, nejvyšší nárůst pak s přidavkem 5,0 % (hm.) surových pokrutin.

Výsledky stanovení obsahu flavonoidů pro vzorky pokrutin potvrzují fakt, že lyofilizace a sušení pokrutin je vhodné pro zachování a dostatečné vyextrahování důležitých složek, které se ve pokrutinách přirozeně vyskytují, jak již bylo popsáno v předchozích výsledcích antioxidačních stanovení (kapitola 3.2).

Stanovení obsahu flavonoidů provedené metodou, při které vzniká komplex Al^{3+} -flavonoid, lze stanovit pouze dvě podtřídy flavonoidů – flavony a flavonoly. Pokrutiny hroznů přirozeně obsahují flavonoly, je tedy zřejmé, že metodou byl stanoven pouze obsah této podtřídy (*Denni & Mammen, 2012; Pekal & Pyrzynska, 2014*).

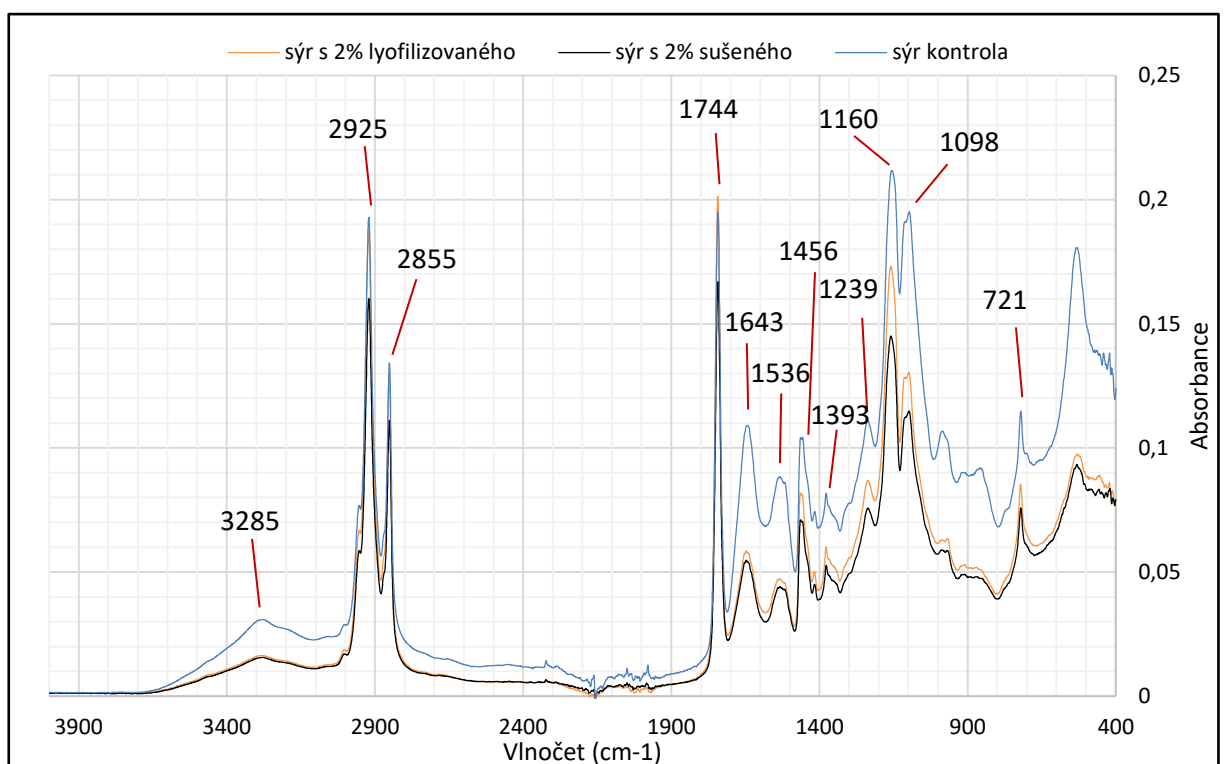
3.8 Infračervená spektroskopie

Pomocí infračervené spektroskopie byly proměřeny vzorky sýrů, a to jak v původním vyrobeném stavu, tak po jejich lyofilizaci. Analýze byl podroben kontrolní sýr a sýry s obsahem 2,0 % (hm.) sušených a lyofilizovaných pokrutin.

Obrázek 19 představuje infračervené spektrum sýrů po lyofilizaci, na kterém jsou vyznačeny absorpční pásy, podrobně vypsáné a identifikované v Tabulce 29. Pro identifikaci hlavních přítomných funkčních skupin je důležitá především oblast s vlnočty 4000–1500 cm^{-1} . Významný absorpční pás s vlnočtem 3285 cm^{-1} představují volné OH skupiny, patřící především přítomné vodě. Důležité pásy jsou také v oblasti vlnočtů 2925 a 2855 cm^{-1} , identifikované jako symetrické a asymetrické vibrace methylenové skupiny. V neposlední řadě je třeba zmínit pás s vlnočtem 1744 cm^{-1} (karbonylová skupina) a především pásy s vlnočty 1643 a 1536 cm^{-1} (Amid I a Amid II), typické pro infračervené spektrum proteinů. Identifikované funkční skupiny ve spektru jsou přiřazovány hlavně lipidům a proteinům, ale

i dalším složkám přítomným v sýrech. Ze spekter je zřejmé, že absorpční pásy kontrolního sýru a sýrů s přísadky jsou stejné, liší se pouze absorpčním maximem. Přídavek pokrutin do sýrů tedy není dostatečně vysoký na to, aby byly ve spektru zaznamenány změny oproti sýru kontrolnímu.

Ve spektru sýrů před lyofilizací (Příloha 5) je zřejmá dominantnost pásu při vlnočtu 3285 cm^{-1} , který má absorpční maximum $10\times$ vyšší než stejný pás ve spektru sýrů lyofilizovaných, a naopak je patrné velké snížení absorbance pásů, které jsou na infračerveném spektru lyofilizovaných sýrů dominantní. Lyofilizací totiž dochází k vysušení vzorku, a tedy odstranění vody, která ve spektru způsobila dominantnost pásu při vlnočtu 3285 cm^{-1} .

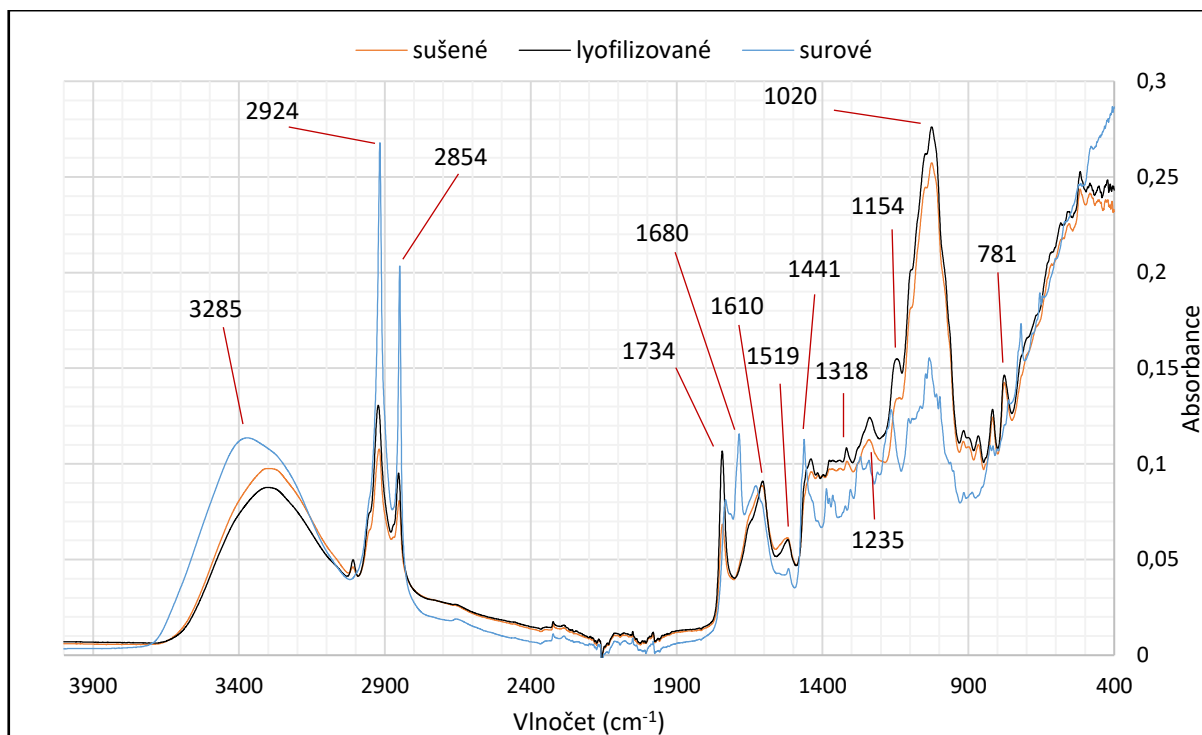


Obrázek 19 Infračervená spektra vzorků tavených sýrů po lyofilizaci

Tabulka 29 Identifikace absorpčních pásů spekter vzorků tavených sýrů (*Stratulat, et al., 2014*)

Vlnočet (cm ⁻¹)	Typ vibrace	Funkční skupina, složka
3285	$\nu(\text{O-H})$	OH skupina (složky sýru)
2925	$\nu(\text{CH}_2)$ asymetrické	Methylenové skupiny (proteiny, lipidy)
2855	$\nu(\text{CH}_2)$ symetrické	Methylenové skupiny (proteiny, lipidy)
1744	$\nu(\text{C=O})$	Karbonylová skupina (mastné kyseliny, proteiny)
1643	Amid I	Proteiny
1536	Amid II	Proteiny
1456–1393	$\delta(\text{C-H})$	Methylenové skupiny (proteiny, lipidy)
1239	$\nu(\text{C-O}), \nu(\text{P-O})$	C-O skupina, asymetrický fosfát (lipidy, lecitin)
1160	$\delta(\text{C-O})$	C-O skupina (estery)
1098	$\delta(\text{O-H})$	OH skupina (složky sýru)
721	$\nu(\text{CH}_2)$	Methylenové skupiny (mastné kyseliny)

Infračervená spektroskopie byla využita také pro získání spekter vzorků pokrutin v sušeném, lyofilizovaném a surovém stavu (Obrázek 20). Absorpční pásy jsou podrobně vypsány a identifikované v Tabulce 30. Stejně jako pro vzorky sýrů byl také ve spektrech pokrutin hroznů zaznamenán absorpční pás s vlnočtem 3285 cm⁻¹ představující volné OH skupiny a také pásy v oblasti vlnočtů 2925 a 2855 cm⁻¹, identifikované jako symetrické a asymetrické vibrace methylenové skupiny. Dalšími důležitými pásy ve spektru jsou pak také pásy s vlnočty 1734 cm⁻¹ (karbonylová skupina) a 1020 cm⁻¹ (skupina C-O). Tyto a další identifikované funkční skupiny jsou přiřazovány především polysacharidům, pektinům, fenolům, lipidům ale i dalším složkám přítomným v pokrutinách hroznů. Je zřejmé, že absorpční pásy jsou v hodnotách vlnočtů shodné pro sušené, lyofilizované i surové pokrutiny. Rozdíly jsou patrné pouze v absorpčních maximech některých pásů. V oblasti vlnočtu 1680 cm⁻¹ je ale přítomný absorpční pás, typický pouze pro pokrutiny v surovém stavu. Tento pás by mohl být přiřazen absorbované vodě (*Fasoli, et al., 2016*). Lyofilizací a sušením dochází k odstranění velkého podílu vody a je tedy logické, že tento pás obsahuje pouze spektrum surových pokrutin.



Obrázek 20 Infračervená spektra pokrutin hroznů

Tabulka 30 Identifikace absorpčních pásů spekter vzorků pokrutin
(Fasoli, et al., 2016, Nogales-Bueno, et al., 2017)

Vlnočť (cm ⁻¹)	Typ vibrace	Funkční skupina, složka
3285	v(O-H)	OH skupina (polysacharidy, ligniny)
2924	v(CH ₂) asymetrické	Methylenové skupiny (ligniny, lipidy)
2854	v(CH ₂) symetrické	Methylenové skupiny (ligniny, lipidy)
1734	v(C=O)	Karbonylová skupina (polyestery, ligniny, pektiny)
1680	H-O-H	Absorbovaná voda
1610	v(COO ⁻), v(C=C) _{aromát}	Pektiny, fenoly
1519	v(C-C) _{aromát}	Fenoly
1441	v(C-C) _{aromát}	Fenoly
1318	δ(CH ₂)	Methylenové skupiny (polysacharidy, pektiny)
1235	v(C-O), δ(O-H)	C-O a OH skupiny (polysacharidy, ligniny, pektiny)
1154	v(C-H) _{aromát}	Methylenové skupiny (fenoly)
1020	v(C-O), v(C-C)	Polysacharidy, pektiny
781	δ(CH ₂)	Methylenové skupiny (fenoly)

4 ZÁVĚR

Úkolem diplomové práce bylo stanovit u vyrobených vzorků tavených sýrů s přidavkem pokrutin hroznů révy vinné v sušeném, lyofilizovaném a surovém stavu antioxidační aktivitu metodami DPPH, ABTS, redukční sílu, schopnost vychytávat peroxid vodíku, celkový obsah fenolických látek a celkový obsah flavonoidů, v neposlední řadě také určit hlavní funkční skupiny složek přítomných ve vzorcích pomocí infračervené spektroskopie a vyhodnotit vliv přídatku na tyto stanovené parametry vzorků.

Vzorky tavených sýrů byly vyrobeny ve spolupráci s Ústavem technologie potravin Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně vedeným panem doc. Ing. Františkem Buňkou, Ph.D. Vzorky sýrů byly obohaceny o sušené a lyofilizované pokrutiny v koncentraci 1,0 a 2,0 % (hm.) a surové pokrutiny v koncentraci 2,5 a 5,0 % (hm.). Za stejných podmínek byly vyrobeny také kontrolní vzorky taveného sýra bez jakéhokoliv přídatku. Extrakty obohacených sýrů i sýru kontrolního byly zhotoveny dvěma metodami – extrakcí 50% methanolem bez dalších úprav a extrakcí 50% methanolem s následným okyselením a neutralizací. S výjimkou stanovení metodou DPPH, kdy je pro stanovení velmi důležité pH, je vhodnější extrakční metoda s použitím 50% methanolu s následným okyselením a neutralizací.

Dle výsledků stanovení byl prokázán nárůst antioxidační aktivity obohacených tavených sýrů oproti sýru kontrolnímu. Míra nárůstu pro každý typ přídatku se však v jednotlivých metodách stanovení liší. Obecně však platí, že přídatky 2,0 % (hm.) sušených, 2,0 % (hm.) lyofilizovaných a 5,0 % (hm.) surových pokrutin do taveného sýru ve všech metodách stanovení zvyšují antioxidační vlastnosti taveného sýra oproti sýru kontrolnímu. Z infračervených spekter je zřejmé, že absorpční pásy kontrolního sýru a sýrů s přídatky jsou stejné, liší se pouze absorpčním maximem.

Obohacování tavených sýrů pokrutinami hroznového vína je jedna z možností, jak kombinovat příjem kvalitních mléčných bílkovin s příjmem polyfenolických látek s antioxidačními účinky a jak také účinně využít odpad vznikající při výrobě bílého vína.

5 POUŽITÁ LITERATURA

Alam, M. N., Bristi, N. J. & Rafiquzzaman, M., 2013. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, Vol. 21, pp. 143 - 152.

Alenisan, M. A., Alqattan, H. H., Tolbah, L. S. & Shori, A. B., 2017. Antioxidant properties of dairy products fortified with natural additives: A review. *Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences*, Vol. 24, pp. 101 - 106.

Arnao, M. B., 2000. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science & Technology*, Vol. 11, pp. 419 - 421.

Arts, M. J. T. J., Haenen, G. R. M. M., Wilms, L. C., Beetstra, S. A. J. N., Heijnen, C. M. G., Voss, H. P. & Bast, A., 2002. Interactions between flavonoids and proteins: Effect on the total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 50, pp. 1184 - 1187.

Buňka, F., 2017. *Tavené sýry a faktory ovlivňující jejich konzistenci*. Vysoké učení technické v Brně, nakladatelství VUTIUM. ISBN: 978-80-214-5460-6.

Burešová, P. & Pavloušek, P., 2015. *Vše, co byste měli vědět o víně...a nemáte se koho zeptat*. Grada Publishing, a.s. ISBN: 978-80-247-4351-6.

de Torres, C., Schumacher, R., Alañón, M. E., Pérez-Coello, M. S. & Díaz-Maroto, M. C., 2015. Freeze-dried grape skins by-products to enhance the quality of white wines from neutral grape varieties. *Food Research International*, Vol. 69, pp. 97 - 105.

Denni, M. & Mammen, D., 2012. A critical evaluation on the reliability of two aluminum chloride chelation methods for quantification of flavonoids. *Food Chemistry*, Vol. 135, pp. 1365 - 1368.

Egger, L. & Ménard, O., 2017. Update on bioactive peptides after milk and cheese digestion. *Food Science*, Vol. 14, pp. 116 - 121.

Everett, D. W. & Auty, M. A. E., 2008. Cheese structure and current methods of analysis. *International Dairy Journal*, Vol. 18, pp. 759 - 773.

Fasoli, M., Dell'Anna, R., Dal Santo, S., Balestrini, R., Sanson, A., Pezzotti, M., Monti, F. & Zenoni, S., 2016. Pectins, hemicelluloses and celluloses show specific dynamics in the internal

and external surfaces of grape berry skin during ripening. *Plant and Cell Physiology* Vol. 57, pp. 1332 - 1349.

Ferreira, I. C. F. R., Baptista, P., Vilas-Boas, M. & Barros, L., 2007. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chemistry*, Vol. 100, pp. 1511 - 1516.

Ferri, M., Rondini, G., Calabretta, M. M., Michelini, E., Vallini, V., Fava, F., Roda, A., Minnucci, G. & Tassoni, A., 2017. White grape pomace extracts, obtained by a sequential enzymatic plus ethanol-based extraction, exert antioxidant, anti-tyrosinase and anti-inflammatory activities. *New Biotechnology*, Vol. 39, pp. 51 - 58.

Fialho, T. L., Carrijo, L. C., Magalhães Júnior, M. J., Baracat-Pereira, M. C., Hilsdorf Piccoli, R. & de Abreu, L., 2018. Extraction and identification of antimicrobial peptides from the Canastra artisanal minas cheese. *Food Research International*, Vol. 107, pp. 406 - 413.

Fu, W. & Nakamura, T., 2017. Effects of starches on the mechanical properties and microstructure of processed cheeses with different types of casein network structures. *Food Hydrocolloids*, Vol. 79, pp. 587 - 595.

Garrido, J. & Borges, F., 2013. Wine and grape polyphenols - A chemical perspective. *Food Research International*, Vol. 54, pp. 1844 - 1858.

Granato, D., Santos, J. S., Salem, R. D. S., Mortazavian, A. M., Rocha, R. S. & Cruz, A. G., 2018. Effects of herbal extracts on quality traits of yogurts, cheeses, fermented milks, and ice creams: a technological perspective. *Food Science*, Vol. 19, pp. 1 - 7.

Heleno, S. A., Martins, A., Queiroz, M. J. R. P. & Ferreira, I. C. F. R., 2015. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chemistry*, Vol. 173, pp. 501 - 513.

Huppertz, T, Fox, P. F., & Kelly, A. L., 2018. The caseins: Structure, stability, and functionality. *Proteins in Food Processing (Second Edition)*, pp. 49 - 92. ISBN: 978-0-08-100722-8.

Chauhan, B. S., 2008. *Principles of Biochemistry and Biophysics*. Laxmi Publications. ISBN: 9788131803226.

Childs, R. E. & Bardsley, W. G., 1975. The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen. *Biochem. J.*, Vol. 145, pp. 93 - 103.

- Ivanova, V., Stefova, M., Vojnoski, B., Dörnyei, Á., Márk, L., Dimovska, V., Stafilov, T. & Kilár, F., 2011. Identification of polyphenolic compounds in red and white grape varieties grown in R. Macedonia and changes of their content during ripening. *Food Research International*, Vol. 44, pp. 2851 - 2860.
- Jara-Palacios, M. J., Hernanz, D., Escudero-Gilete, M. L. & Heredia, F. J., 2014. Antioxidant potential of white grape pomaces: Phenolic composition and antioxidant capacity measured by spectrophotometric and cyclic voltammetry methods. *Food Research International*, Vol. 66, pp. 150 - 157.
- Jayanthi, P. & Lalitha, P., 2011. Reducing power of the solvent extracts of *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Vol. 3, pp. 126 - 128.
- Kadlec, P., Melzoch, K., Voldřich, M., a kolektiv, 2012. *Technologie potravin - Přehled tradičních potravinářských výroby*. Ostrava: KEY Publishing s.r.o. ISBN: 978-80-7418-145-0.
- Kammerer, D., Claus, A., Carle, R. & Schieber, A., 2004. Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 52, pp. 4360 - 4367.
- Katalinic, V., Možina, S. S., Skroza, D., Generalic, I., Abramović, H., Miloš, M., Ljubenković, I., Piskemik, S., Pezo, I., Terpinč, P. & Boban, M., 2010. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chemistry*, Vol. 119, pp. 715 - 723.
- Kitts, D. D., 2005. Antioxidant properties of casein-phosphopeptides. *Trends in Food Science & Technology*, Vol. 16, pp. 549 - 554.
- Khalifa, S. A., Omar, A. A. & Mohamed, A. H., 2017. The effect of substituting milk fat by peanut oil on the quality of white soft cheese. *International Journal of Dairy Science*, Vol. 12, pp. 28 - 40.
- Lin, M., Rasco, B. A., Cavinato, A. G. & Al-Holy, M., 2009. Infrared (IR) spectroscopy - Near-infrared spectroscopy and Mid-infrared spectroscopy. *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*, pp. 119 - 143. ISBN: 978-0-12-374136-3.

- Liu, L., Qu, X., Xia, Q., Wang, H., Chen, P., Li, X. & Wang, L., 2018. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* on the antioxidant activity of Cheddar cheese during ripening and under simulated gastrointestinal digestion. *LWT - Food Science and Technology*.
- Lu, Y. & Foo, L. Y., 1999. The polyphenol constituents of grape pomace. *Food Chemistry*, Vol. 65, pp. 1 - 8.
- Luo, L., Cui, Y., Zhang, S., Li, L., Li, Y., Zhou, P. & Sun, B., 2016. Preparative separation of grape skin polyphenols by high-speed counter-current chromatography. *Food Chemistry*, Vol. 212, pp. 712 - 721.
- Luo, L., Cui, Y., Zhang, S., Li, L., Suo, H. & Sun, B., 2017. Detailed phenolic composition of Vidal grape pomace by ultrahighperformance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, Vol. 1068 - 1069, pp. 201 - 209.
- Ma, S., Wang, C. & Guo, M., 2018. Changes in structure and antioxidant activity of β -lactoglobulin by ultrasound and enzymatic treatment. *Ultrasonics - Sonochemistry*, Vol. 43, pp. 227 - 236.
- Makris, D. P., Kallithraka, S. & Kefalas, P., 2006. Flavonols in grapes, grape products and wines: Burden, profile and influential parameters. *Journal of Food Composition and Analysis*, Vol. 19, pp. 396 - 404.
- Marczenko, Z. & Balcerzak, M., 2000. *Separation, Preconcentration and Spectrophotometry in Inorganic Analysis*. Elsevier Science B. V. ISBN: 978-0-444-50524-8.
- Marinho, M. T., dos Santos Bersot, L., Nogueira, A., Denck Colman, T. A. & Schnitzler, E., 2015. Antioxidant effect of dehydrated rosemary leaves in ripened semi-hard cheese: A study using coupled TG-DSC-FTIR (EGA). *LWT - Food Science and Technology*, Vol. 63, pp. 1023 - 1028.
- Martins, I. M., Roberto, B. S., Blumberg, J. B., Oliver Chen, C. Y. & Macedo, G. A., 2016. Enzymatic biotransformation of polyphenolics increases antioxidant activity of red and white grape pomace. *Food Research International*, Vol. 89, pp. 533 - 539.
- Masotti, F., Cattaneo, S., Stuknyté, M. & De Noni, I., 2017. Integrated utilization of grape skins from white grape pomaces. *Industrial Crops and Products*, Vol. 49, pp. 286 - 291.

- Mendes, J. A. S., Xavier, A. M. R. B., Evtuguin, D. V. & Lopes, L. P. C., 2013. Technological tools to include whey proteins in cheese: Current status and perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, Vol. 64, pp. 102 - 114.
- Mildner-Szkudlarz, S., Bajerska, J., Zawirska-Wojtasiak, R. & Górecka, D., 2013. White grape pomace as a source of dietary fibre and polyphenols and its effect on physical and nutraceutical characteristics of wheat biscuits. *Journal of the science of food and agriculture*, Vol. 93, pp. 389 - 395.
- Mukhopadhyay, D., Dasgupta, P., Roy, D. S., Palchoudhuri, S., Chatterjee, I., Ali, S. & Dastidar, S. G., 2016. A Sensitive In vitro Spectrophotometric Hydrogen peroxide scavenging assay using 1,10-Phenanthroline. *Free Radicals and Antioxidants*, Vol. 6, pp. 124 - 132.
- Niero, G., Penasa, M., Currò, S., Masi, A., Trentin, A. R., Cassandro, M. & De Merchi, M., 2017. Development and validation of a near infrared spectrophotometric method to determine total antioxidant activity of milk. *Food Chemistry*, Vol. 220, pp. 371 - 376.
- Nogales-Bueno, J., Baca-Bocanegra, B., Rooney, A., Hernández-Hierro, J. M., Byrne, H. J. & Heredia, F. J., 2017. Study of phenolic extractability in grape seeds by means of ATR-FTIR and Raman spectroscopy. *Food Chemistry*, Vol. 232, pp. 602 - 609.
- O'Kennedy, B. T., 2011. Caseins. *Handbook of Food Proteins*, pp. 13 - 29. ISBN: 978-1-84569-758-7.
- Pavithra, K. & Vadivukkarasi, S., 2015. Evaluation of free radical scavenging activity of various extracts of leaves from *Kedrostis foetidissima* (Jacq.) Cogn.. *Food Science and Human Wellness*, Vol. 4, pp. 42 - 46.
- Pavloušek, P., 2017. *Pěstujeme stolní odrůdy révy vinné*. Grada Publishing, a.s. ISBN: 978-80-271-0240-2.
- Paulová, H., Bochořáková, H. & Táborská, E., 2004. Metody stnovení antioxidační aktivity přírodních látek *in vitro*. *Chemické listy*, Vol. 98, pp. 174 - 179.
- Pekal, A. & Pyrzynska, K., 2014. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. *Food Anal. Methods*, Vol. 7, pp. 1776 - 1782.
- Pepe, G., Sommella, E., Ventre, G., Scala, M. C., Adesso, S., Ostacolo, C., Marzocco, S., Novellino, E. & Campiglia, P., 2016. Antioxidant peptides released from gastrointestinal

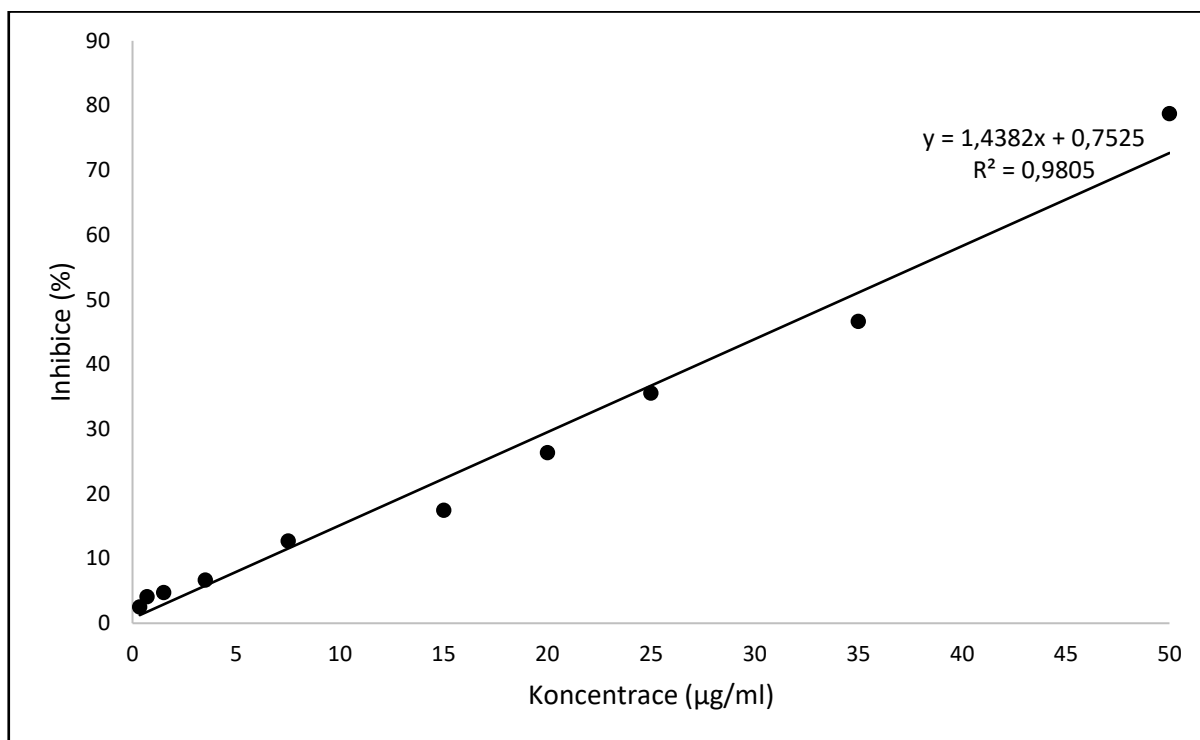
- digestion of “Stracchino” soft cheese: Characterization, in vitro intestinal protection and bioavailability. *Journal of functional foods*, Vol. 26, pp. 494 - 505.
- Přikryl, J., 2017. Tavený sýr jako funkční potravina. *Diplomová práce*. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Libor Červenka, Ph.D.
- Rashidinejad, A., Birch, E. J., Sun-Waterhouse, D. & Everett, D. W., 2015. Total phenolic content and antioxidant properties of hard low-fat cheese fortified with catechin as affected by in vitro gastrointestinal digestion. *LWT - Food Science and Technology*, Vol. 62, pp. 393 - 399.
- Sánchez-Alonso, I., Jiménez-Escrig, A., Saura-Calixto, F. & Borderías, A. J., 2008. Antioxidant protection of white grape pomace on restructured fish products during frozen storage. *LWT - Food Science and Technology*, Vol. 41, pp. 42 - 50.
- Shahidi, F. & Zhong, Y., 2015. Measurement of antioxidant activity. *Journal of functional foods*, Vol. 18, pp. 757 - 781.
- Schaich, K. M., Tian, X. & Xie, J., 2015. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of functional foods*, Vol. 14, pp. 111 - 125.
- St-Gelais, D. & Haché, S., 2005. Effect of β -casein concentration in cheese milk on rennet coagulation properties, cheese composition and cheese ripening. *Food Research International*, Vol. 38, pp. 523 - 531.
- Stratulat, I., Britten, M., Salmieri, S., Fustier, P., St-Gelais, D., Champagne, C. P. & Lacroix, M., 2014. Enrichment of cheese with bioactive lipophilic compounds. *Journal of functional foods*, Vol. 6, pp. 48 - 59.
- Subramanian, A. & Rodriguez-Saona, L., 2009. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*, pp. 287 - 333. ISBN: 978-0-12-374136-3.
- Tantary, S., Masood, A., Bhat, A. H., Dar, K. B., Zargar, M. A. & Ganle, S. A., 2017. In vitro antioxidant and RBC membrane stabilization activity of *Euphorbia wallichii*. *Free Radicals and Antioxidants*, Vol. 7, pp. 13 - 22.
- Timón, M. L., Parra, V., Otte, J., Broncano, J. M. & Petró, M. J., 2012. Identification of radical scavenging peptides (<3 kDa) from Burgos-type cheese. *LWT - Food Science and Technology*, Vol. 57, pp. 359 - 365.

- Wang, Ch., Wang, B. & Li, B., 2015. Bioavailability of peptides from casein hydrolysate in vitro: Amino acid compositions of peptides affect the antioxidant efficacy and resistance to intestinal peptidases. *Food Research International*, Vol. 81, pp. 188 - 196.
- Wang, T., Li, Q. & Bi, K., 2018. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 13, pp. 12 - 23.
- Yadav, J. S. S., Yan, S., Pilli, S., Kumar, L., Tyagi, R. D. & Surampalli, R. Y., 2015. Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnology Advances*, Vol. 33, pp. 756 - 774.
- Zheng, Y., Lin, L., Su, G., Zhao, Q. & Zhao, M., 2015. Pitfalls of using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay to assess the radical scavenging activity of peptides: Its susceptibility to interference and low reactivity towards peptides. *Food Research International*, Vol. 76, pp. 359 - 365.
- Zhong, Y. & Shahidi, F., 2015. Methods for the assessment of antioxidant activity in foods. *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*, pp. 287 - 333. ISBN: 978-1-78242-089-7.
- Zulueta, A., Maurizi, A., Frígola, A., Esteve, M. J., Coli, R. & Burini, G., 2009. Antioxidant capacity of cow milk, whey and deproteinized milk. *International Dairy Journal*, Vol. 19, pp. 380 - 385.

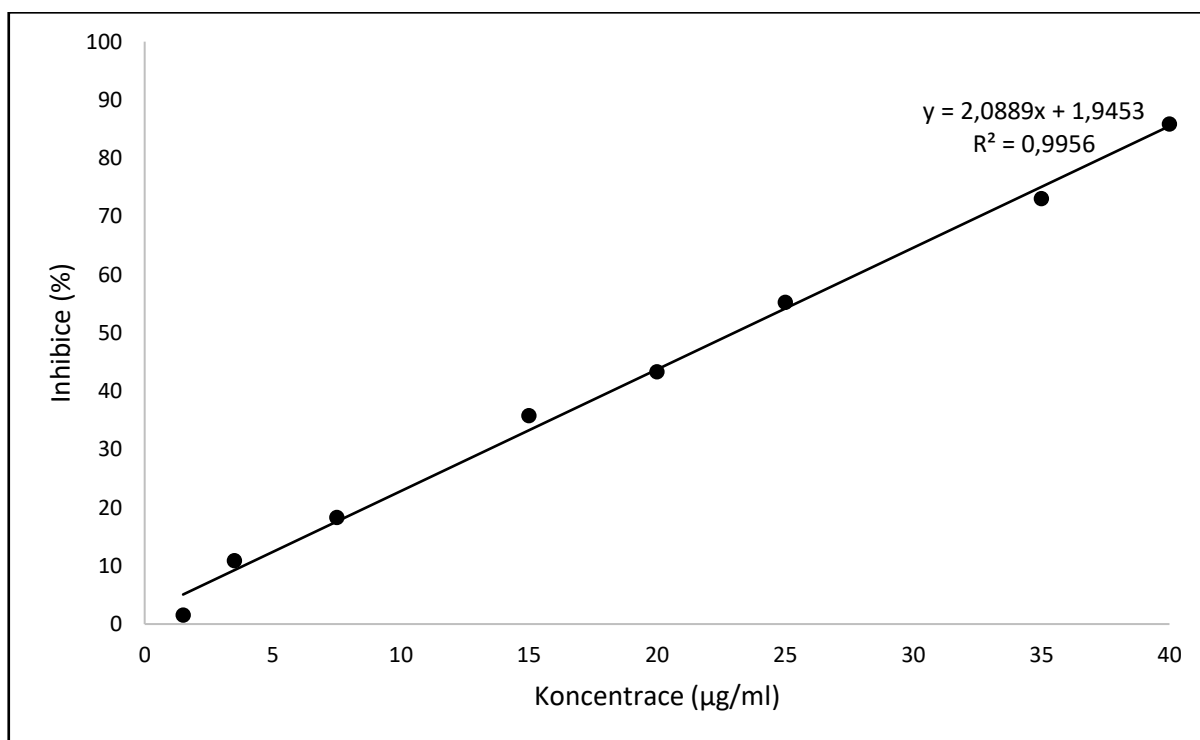
6 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 Kalibrační křivka troloxu pro stanovení celkové antioxidační aktivity metodou DPPH	72
Příloha 2 Kalibrační křivka troloxu pro stanovení celkové antioxidační aktivity metodou ABTS	72
Příloha 3 Kalibrační křivka kyseliny gallové pro stanovení celkového obsahu fenolických látek.....	73
Příloha 4 Kalibrační křivka kvercetinu pro stanovení celkového obsahu flavonoidů	73
Příloha 5 Infračervená spektra tavených sýrů před lyofilizací	74

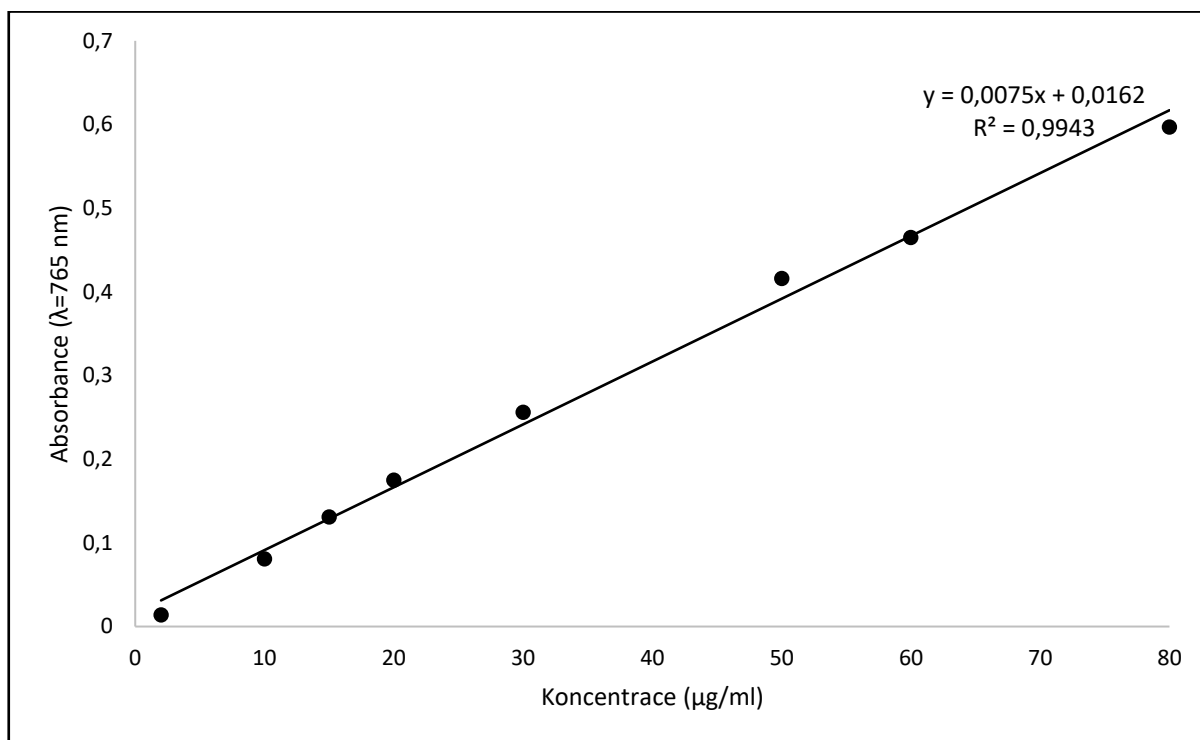
Příloha 1 Kalibrační křivka troloxu pro stanovení celkové antioxidační aktivity metodou DPPH



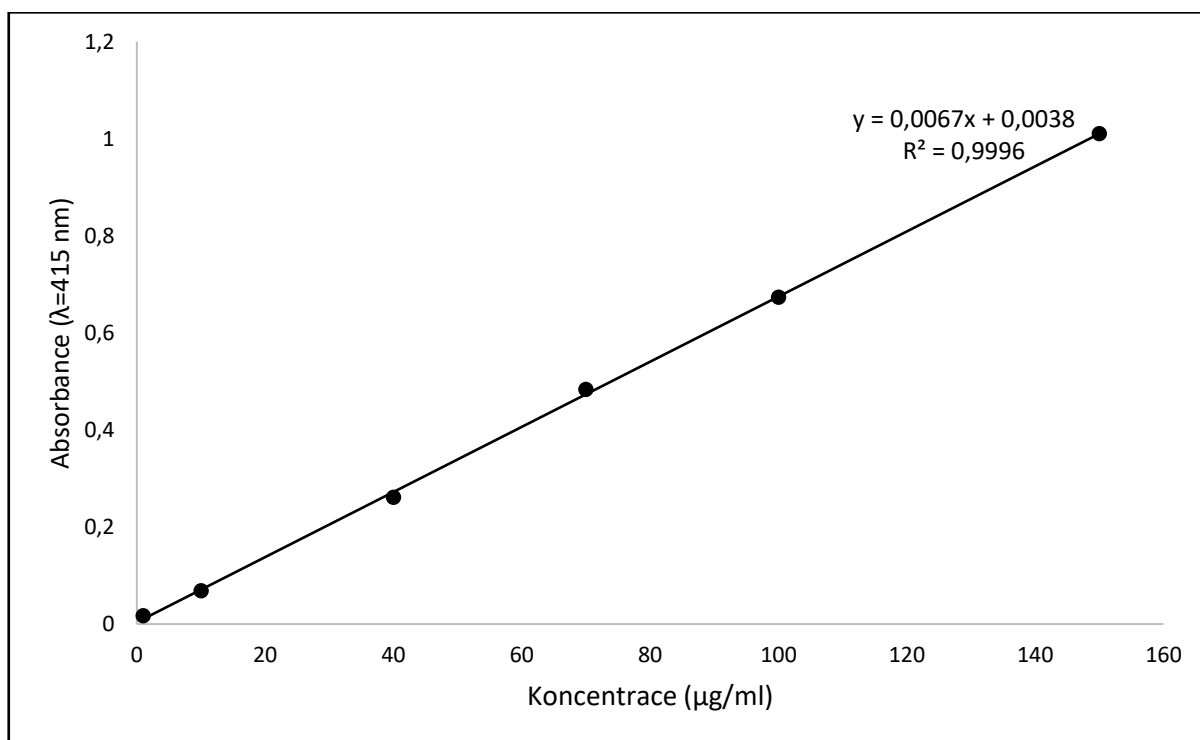
Příloha 2 Kalibrační křivka troloxu pro stanovení celkové antioxidační aktivity metodou ABTS



Příloha 3 Kalibrační křivka kyseliny gallové pro stanovení celkového obsahu fenolických látek



Příloha 4 Kalibrační křivka kvercetinu pro stanovení celkového obsahu flavonoidů



Příloha 5 Infračervená spektra tavených sýrů před lyofilizací

