

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2018

Daniela Hrančíková

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Sýry a jejich antioxidační vlastnosti

Daniela Hrančíková

Bakalářská práce  
2018

University of Pardubice  
Faculty of Chemical Technology

Cheese and its antioxidant properties

Daniela Hrančíková

Bachelor work

2018

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

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Daniela Hrančíková**  
Osobní číslo: **C15146**  
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**  
Název tématu: **Sýry a jejich antioxidační vlastnosti**  
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. Popište stručně principy výroby zrajících sýrů a jejich nutriční/chemické složení.
2. Ve své rešerši se zaměřte na možné antioxidační vlastnosti přírodních sýrů, jejich příčinami a uveďte také přehled nejčastěji použitých metod měření antioxidačních vlastností. Použijte mezinárodní odborné časopisy a knihy.
3. V experimentu využijte některého ze stabilních radikálů ke stanovení antioxidačních vlastností zrajících sýrů. Výsledky kriticky zhodnoťte a porovnejte s dostupnou literaturou.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího práce.**

Vedoucí bakalářské práce:

**doc. Ing. Libor Červenka, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce:

**20. února 2018**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**4. července 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 vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byl jsem seznámen 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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 20.6. 2018

---

Daniela Hrančíková

Děkuji svému vedoucí bakalářské práce, doc. Ing. Liboru Červenkovi, Ph.D., za odborné vedení v průběhu experimentu, cenné rady, diskuse a připomínky během zpracování mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat doc. Ing. Martinu Adamovi, Ph.D. za pomoc při vypracování experimentu. Poděkování ovšem patří i mé rodině a přátelům, kteří mě podporovali při vytváření této práce a v průběhu celého studia.

## **ANOTACE**

Tato bakalářská práce je věnována antioxidačním vlastnostem sýrů. Teoretická část obsahuje stručný popis technologií, složení a dělení sýrů. Dále jsou zde popsány antioxidační vlastnosti mléka a sýrů. V praktické části byly analyzovány vzorky sýru gouda v průběhu zrání. U těchto extraktů těchto vzorků byla stanovena schopnost vychytávat  $H_2O_2$ , obsah fenolických látek antioxidační aktivita pomocí metod DPPH a ABTS.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Sýr, gouda, antioxidační aktivita, radikál

## **TITLE**

Cheese and its antioxidant properties

## **ANNOTATION**

Thesis deals with antioxidant properties of cheese. The theoretical part describes technology, composition and types of cheese. There is also information about antioxidant properties of milk and cheese. In the practical part, samples of gouda cheese were analyzed at different stages of ripening. Furthermore, the total content of phenolic substances, ability to scavenge  $H_2O_2$  and antioxidant activity by means of DPPH and ABTS radical scavenging assays were determined.

## **KEYWORDS**

Cheese, gouda, antioxidant activity, radical



# Obsah

Úvod.....	13
1 Přírodní sýry .....	14
1.1 Technologické operace při výrobě sýrů .....	14
1.2 Nutriční a chemické složení sýrů .....	16
1.3 Klasifikace sýrů.....	16
1.4 Antioxidační vlastnosti přírodních sýrů.....	18
1.5 Oxidační reakce.....	18
1.5.1 Autooxidace vzdušným kyslíkem.....	18
1.5.2 Fotooxidace.....	20
1.5.3 Oxidace katalyzovaná kovy .....	20
1.5.4 Inhibitory oxidace .....	21
1.6 Antioxidanty.....	21
1.7 Oxidační procesy probíhající v mléce a sýrech.....	23
1.8 Antioxidační vlastnosti mléka a sýrů .....	24
1.8.1 Lipofilní antioxidanty .....	24
1.8.2 Hydrofilní antioxidanty.....	27
2 Experimentální část .....	29
2.1 Metoda DPPH .....	29
2.2 Stanovení schopnosti antioxidantu vylučovat H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	30
2.3 Metoda ABST .....	30
2.4 Stanovení obsahu fenolických látek - metoda podle Folin-Ciocalteua.....	31
2.5 IČ spektrometrie.....	31
3 Výsledky a diskuse .....	32
3.1 Vzorky.....	32
3.2 Příprava extraktu: .....	32
3.3 Spektrofotometrická analýza.....	33

3.3.1	Příprava kalibračních roztoků standardů .....	33
3.3.2	Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH .....	33
3.3.3	Stanovení schopnosti antioxidantu vychytávat peroxid vodíku .....	34
3.3.4	Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS .....	34
3.3.5	Stanovení celkového obsahu fenolických látek .....	35
3.4	IČ spektrometrie .....	35
4	Výsledky a diskuse .....	36
4.1	Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH .....	36
4.2	Stanovení schopnosti antioxidantu vychytávat peroxid vodíku .....	38
4.3	Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS .....	39
4.4	Stanovení celkového obsahu fenolických látek .....	41
4.5	IČ spektrometrie .....	44
5	Závěr .....	47
6	Seznam literatury .....	48

## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Vliv přidavku antioxidantu na průběh antioxidační reakce (10).....	23
Obrázek 2: trans-10, cis-12 konjugovaná kyselina linolová (18).....	24
Obrázek 3: $\alpha$ -tokoferol (20).....	25
Obrázek 4: $\beta$ -karoten (22).....	26
Obrázek 5: Vitamín D3, cholekalciferol (23).....	27
Obrázek 6: Chemická struktura Troloxu (9).....	29
Obrázek 7: Reakce probíhají u metody DPPH (9).....	29
Obrázek 8: Reakce probíhající u metody ABST (9).....	30
Obrázek 9: Optimalizace metody DPPH při vlnové délce 517 nm .....	36
Obrázek 10: Kalibrační křivka Troloxu (DPPH).....	36
Obrázek 11: Antioxidační kapacita (DPPH) vodných extraktů sýrů gouda .....	37
Obrázek 12: Antioxidační kapacita (DPPH) methanolových extraktů (50 % v/v) sýrů gouda .....	37
Obrázek 13: Stanovení schopnosti vodných extraktů sýrů gouda vychytávat $H_2O_2$ .....	38
Obrázek 14: Stanovení schopnosti methanolových extraktů (50 %, v/v) sýrů gouda vychytávat $H_2O_2$ .....	39
Obrázek 15: Optimalizace metody ABTS při vlnové délce 734 nm .....	39
Obrázek 16: Kalibrační křivka Troloxu (ABTS).....	40
Obrázek 17: Antioxidační kapacita (ABTS) vodných extraktů sýrů gouda .....	40
Obrázek 18: Antioxidační kapacita (ABTS) methanolových extrakt (50 %, v/v) sýrů gouda .....	41
Obrázek 19: Optimalizace stanovení obsahu fenolických látek při vlnové délce 765 nm .....	42
Obrázek 20: Fenolické látky – kalibrace, kyselina gallová .....	42
Obrázek 21: Obsah fenolických látek ve vodných extraktech sýrů gouda.....	43
Obrázek 22: Obsah fenolických látek v methanolových extraktech (50 %, v/v) sýrů gouda.....	43
Obrázek 23: IČ spektrum vzorku sýra gouda po 86 dnech zrání.....	44
Obrázek 24: IČ spektrum vody .....	45
Obrázek 25: IČ spektrum vzorků sýru gouda v různém stupni zralosti.....	45

Tabulka 1: Průměrné hodnoty složení kravského mléka (7) .....	16
Tabulka 2: Klasifikace přírodních sýrů podle obsahu tuku v sušině (3) .....	17
Tabulka 3: Klasifikace přírodních sýrů podle konzistence ve vztahu k obsahu vody v tukuprosté hmotě sýra (3) .....	17
Tabulka 4: Klasifikace přírodních sýrů podle zrání (3) .....	17
Tabulka č 5: Průměrné výživové hodnoty ve 100 g vzorku, údaj z obalu výrobku .....	32
Tabulka 6: Vlnočty sledovaných oblastí IČ spektra (29) .....	46

## Úvod

V posledních desetiletích se zvyšuje množství poznatků a úroveň znalostí o úloze volných radikálů při oxidačním stresu u živých organismů. Volné radikály, které vznikají v buňkách, mají řadu fyziologických funkcí (např. účast v protizánětlivých reakcích, v procesu fagocytózy). V současnosti se jim věnuje velká pozornost a sleduje se jejich negativní působení na organismus při radě onemocnění. Jde především o kyslíkové a dusíkové radikály. Tyto radikály působí na biologicky významné sloučeniny, především lipidy, bílkoviny a významné sloučeniny, především jejich strukturu a tím modifikují jejich funkci.

Jednou z možností, jak organismus chránit před vlivem volných radikálů je působením antioxidantů. Podle ji klasické definice jsou antioxidanty molekuly, které – jsou-li přítomny v malých koncentracích ve srovnání s látkami, jež by měli chránit. Mohou zabraňovat nebo omezovat oxidační destrukci těchto látek (1).

Antioxidanty mohou být definovány jako látky, které když jsou přítomny v potravinách, oddalují, kontrolují, nebo inhibují oxidaci. Oxidační stabilita mléka a mléčných produktů je důležitá pro mlékárenský průmysl. Oxidační procesy v mléce mohou vytvořit pachů nebo zhoršení nutriční kvality. Na druhou stranu mlékárenské produkty mohou mít příznivý vliv pro konzumenta vlivem antioxidačních vlastností. Mléko a mléčné výrobky obsahují řadu lipofilních i hydrofilních antioxidantů. Hlavní antioxidanty v mléčném tuku jsou konjugovaná kyselina linoleová, vitamín A, vitamín E a  $\beta$ -karoten. Naopak hydrofilní antioxidanty v mléce jsou především peptidy vznikající v průběhu zrání a enzymy přítomné ve velkém množství (2).

Cílem této bakalářské práce je popsat příčiny antioxidačních vlastností sýrů a také experimentálně změřit vliv doby zrání sýra na jeho antioxidační kapacitu.

# 1 Přírodní sýry

Sýr je vyhláškou č. 379/2016 Sb. definován jako mléčný výrobek vyrobený vysrážením mléčné bílkoviny z mléka působením syřidla nebo jiných vhodných koagulačních činidel, oddělením podílu syrovátky a následným prokysáním nebo zráním (3).

Sýry představují tradiční produkty, které člověk poznal již před 8000 lety. Jsou to čerstvé nebo prozřelé výrobky získané oddělením syrovátky po koagulaci mléka s různou tučností. Sýry tedy v sobě koncentrují základní složky sušiny mléka. Do syrovátky přechází většina vody, laktózy, bílkoviny syrovátky a částečně soli. Na výrobu jednoho kilogramu sýra je potřeba kolem deseti litrů mléka.

Jedním z důvodů, proč se mléko začalo zpracovávat na sýry, je jejich delší trvanlivost. Prodloužení trvanlivosti spočívá ve fermentaci laktózy především na kyselinu mléčnou, snížení vodní aktivity a pH, přispívá též nízký redoxní potenciál a přídavek soli (4).

## 1.1 Technologické operace při výrobě sýrů

Při příjmu mléka jsou nejdříve odstraněny mechanické nečistoty filtrací nebo centrifugací. Poté následují další operace zahrnující úpravu mléka před sýřením, vlastní sýření, zpracování sýřeniny a zrání (4).

U mléka se provádí řada operací, které vedou ke snížení počtu mikroorganismů i jejich spor. Pasterace mléka zajišťuje zdravotní nezávadnost sýrů. Pro výrobu se nejčastěji používá šetrná pasterace, obvykle záhřev na 74 °C po dobu 15 vteřin. Vyšší pasterační záhřevy mohou být problematické, protože se zhoršuje syřitelnost mléka a oddělování syrovátky (5). Pomocí procesů baktofugace a mikrofiltrace lze z mléka odstranit také mikroorganismy, které nejsou běžnými pasteračními zákroky inaktivovány a mohly by způsobit vady zejména u zrajících sýrů. Baktofugace využívá k odstranění bakterií a spor odstředivou sílu, při mikrofiltraci mléko protéká membránou s póry o velikosti přibližně 0,5 μm.

Každý sýr je charakterizován určitou hodnotou tuku v sušině, proto se v návaznosti na tepelného ošetření provádí také standardizace tučnosti mléka. Homogenizace mléčného tuku se u zrajících sýrů zpravidla neprovádí. Do sýrašského mléka se přidává chlorid vápenatý, který zlepšuje syřitelnost a zvyšuje pevnost vzniklého gelu. Je možné aplikovat dusičnan draselný, který omezuje duření sýrů, způsobené činností koliformních bakterií (4).

Přídavek kyselých kultur bakterií mléčného kvašení je nezbytným předpokladem výroby všech tvarohů i sýrů. Bakterie upravují kyselost mléka, pomáhají fermentaci laktózy a účastní se proteolytické a lipolytické aktivity v průběhu zrání, což utváří sensorické vlastnosti. Výrazný je také jejich vliv na texturu a konzistenci.

Klíčovou operací při výrobě sýrů je koagulace mléčných bílkovin (5). Kasein se z mléka sráží jednak při sníženém pH na hodnotu blízkou izoelektrickému bodu, jednak působením enzymů. V prvním případě mluvíme o tzv. kyselém srážení, které se uplatňuje jen u několika sýrů, především u tvarohů (4). Ve druhém případě jde o tzv. enzymatické srážení, kdy se využívá enzym chymosin, případně jiný enzym s podobnou koagulační aktivitou. V přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  iontů pak dochází ke koagulaci kaseinu (5). Proces srážení vede ke vzniku sýrového zrna, kdy se od něj oddělí syrovátka a dále se zpracovává. Základní fáze zpracování jsou krájení, míchání, dohřívání, dosoušení, praní a formování sýrového zrna.

Dalším krokem je solení, které má vliv nejen na výslednou chuť, ale ovlivňuje aktivitu kultur a enzymů při zrání sýrů. Sůl zvyšuje osmotický tlak v prostoru mezi zrny a působením na bílkoviny zvyšuje množství uvolněné syrovátky. Solením se také zpevní povrch sýrů.

Proces zrání představuje komplexní souhrn změn, kdy sýr získává typický vzhled, konzistenci, chuť, vůni a složení (4). Délka zrání zrajících sýrů se pohybuje od několika dní (mozzarella) až po několik let (Parmigiano-Reggiano). V průběhu zrání se vyvíjí chuťové i texturní vlastnosti jednotlivých druhů sýrů. Dochází k řadě biochemickým reakcím jako například k rozložení laktózy, uvolnění mastných kyselin z triacylglycerolů a degradaci kaseinové matrice za vzniku peptidů a volných aminokyselin. Finální produkty proteolýzy a lipolýzy dále podstupují změny, které přispívají k chuti a vůni produktu (6).

## 1.2 Nutriční a chemické složení sýrů

Sýry se nejčastěji vyrábějí z mléka kravského, kozího, ovčího, buvolího a jiné. Typické složení kravského mléka je uvedeno v tabulce 1. Chemické složení (obsah kaseinu a tuku především) mléka určují vlastnosti sýru (7).

Tabulka 1: Průměrné hodnoty složení kravského mléka (7)

složka	průměrné procentuální zastoupení složky [%]
voda	87,3
laktóza	4,7
tuk	3,9
kaseinové proteiny	3,4
sůl	0,7

Kravské mléko obsahuje přibližně 3,5-4,5 % (hmotnostních) lipidů, z čehož přibližně 97-98 % tvoří triacylglyceroly. Triacylglyceroly jsou sloučeniny obsahující trojsytný alkohol, na který jsou excentricky navázány tři mastné kyseliny. Poměr nasycených, mononenasycených a polynenasycených mastných kyselin činí v kravském mléce lze zapsat ve tvaru 1,00 : 0,35 : 0,07 (8).

Energetickou hodnotu sýrů podstatným způsobem ovlivňuje standardizace obsahu tuku. Je možné standardizovat i obsah bílkovin pomocí ultrafiltrace nebo přidávkem koncentráту bílkovin. Eliminuje se tak sezónní variabilita obsahu bílkovin v mléce.

V průběhu zpracování je oddělena syrovátka. Tato operace výrazně mění složení a nutriční charakteristiku produktu. Surovátkou je odváděna velká část vody a laktózy a také do ní přechází syrovátkové bílkoviny. V různém množství přecházejí do syrovátky také vitamíny: 40-70 % vitamínu B<sub>12</sub>, 55-75 % vitamínu B<sub>6</sub> a kyseliny pantothenové, 70-80 % riboflavinu a biotinu, 80-90 % thiaminu, kyseliny nikotinové, listové a askorbové (5).

## 1.3 Klasifikace sýrů

Klasifikace sýrů podle vyhlášky číslo 379/2016 sbírky klasifikuje sýry podle řady kritérií, příklady kritérií jsou obsah tuku v sušině (Tabulka 2), konzistence ve vztahu k obsahu vody v tukuprosté hmotě sýra (Tabulka 3) nebo způsobům zrání sýra (Tabulka 4).



Tabulka 2: Klasifikace přírodních sýrů podle obsahu tuku v sušině (3)

Sýr	Tuk v sušině [% hmotnostní] *
Vysokotučný	nejméně 60,0
Plnotučný	nejméně 45,0
Polotučný	nejméně 25,0
Nízkotučný	nejméně 10,0
Odtučněný	méně než 10,0

\* Obsah tuku v sušině v procentech hmotnostních se stanoví podle následujícího vzorce [Rovnice 1]:

$$\% \text{ hmotností tuku v sušině} = \frac{\text{hmotnost tuku [g]}}{100 - \text{hmotnost vody [g]}} \times 100 \quad [1]$$

Tabulka 3: Klasifikace přírodních sýrů podle konzistence ve vztahu k obsahu vody v tukuprosté hmotě sýra (3)

Sýr	% VVTPH* (= voda v tukuprosté hmotě sýra)
Extra tvrdý	nejvíce 47,0
Tvrdý	47,0 až 54,9
Polotvrdý	55,0 až 61,9
Poloměkký	62,0 až nejvíce 68,0
Měkký	více než 68,0

\* VVTPH = voda v tukuprosté hmotě sýra, která se stanoví podle následujícího vzorce [Rovnice 2]:

$$\text{VVTPH} = \frac{\text{hmotnost vody v [g]}}{100 - \text{hmotnost tuku [g]}} \times 100 \quad [2]$$

Tabulka 4: Klasifikace přírodních sýrů podle zrání (3)

Sýr	Charakteristika
Sýr čerstvý	nezrající
	termizovaný
Sýr zrající	na povrchu
	s mazem na povrchu
	v celé hmotě
z toho Plísňový sýr	s plísní na povrchu
	s plísní uvnitř hmoty sýra
	dvouplísňový

## 1.4 Antioxidační vlastnosti přírodních sýrů

Antioxidanty v potravinách hrají důležitou roli v potravinářském průmyslu díky své schopnosti neutralizovat volné radikály. Mohou mít také preventivní charakter (9). Neutralizují volné radikály tím, že přejdou do formy volného radikálu, který je však stálý a není schopen pokračovat v řetězové reakci (10).

Z chemického pohledu se volné radikály vztahují na jakoukoliv molekulu s nepárovým elektronem ve vnější elektronové vrstvě. Právě tato konfigurace je zodpovědná za vysokou reaktivitu těchto sloučenin. Přítomnost takto vysoce reaktivních volných radikálů v biologických systémech je přímo spojena s oxidačním poškozením, které vedou k závažným fyziologickým problémům. Volné radikály, které se nejčastěji vyskytují v živých systémech, jsou reaktivní formy kyslíku (superoxidové radikály, hydroxylové radikály) a reaktivní sloučeniny dusíku (9).

## 1.5 Oxidační reakce

Oxidační reakce jsou hlavní příčinou zhoršení kvality potravin, které vedou k degradaci a odmítnutí produktu zákazníkem. Oxidace může způsobovat nepříznivé aroma a žluklou chuť, změnu anebo ztrátu barvy. Další důležitý faktorem je schopnost oxidačních produktů vyvolat zdravotní rizika. Lipidová oxidace také může snižovat nutriční hodnotu potraviny (11). V potravinách může probíhat několik typů oxidačních reakcí lipidů jako například autooxidace vzdušným kyslíkem, oxidace singletovým kyslíkem a oxidace těžkými kovy ve vyšší valenci (10).

Primárními produkty oxidace lipidů jsou hydroperoxydy, které jsou nestabilní a dále se rozkládají různé sekundární produkty. Sekundárními produkty oxidace jsou alkany, alkeny, aldehydy, ketony, alkoholy a estery (12).

### 1.5.1 Autooxidace vzdušným kyslíkem

Autooxidace mastných kyselin je nejběžnějším typem oxidační reakce za podmínek přicházejících v úvahu při zpracování nebo skladování potravin. Při běžných teplotách se vzdušným kyslíkem oxidují pouze nenasycené kyseliny, kdy je odštěpení vodíku poměrně snadné. Především jde o vodík z methylenové skupiny sousedící s dvojnou vazbou. Štěpení vazby C-H v nasyčeném uhlovodíkovém řetězci vyžaduje značnou energii, proto při běžné teplotě nepřichází v úvahu. Autooxidace uhlovodíkového řetězce mastných kyselin a také jiných uhlovodíků je radikálová řetězcová reakce probíhající ve třech stupních (10).

První stupeň zahrnuje vznik volného vodíkového radikálu (atom vodíku, H•) a volného radikálu mastné kyseliny (R•), které vznikají štěpením kovalentní vazby C-H uhlovodíkového řetězce (10). Reakci lze popsat následující rovnicí [Rovnice 3]:



Tyto radikály mohou reagovat s dalšími složkami potravin (11). energii potřebnou ke štěpení vazby může molekula mastných kyselin získat z různých zdrojů, například o energii tepelnou, ozáření ultrafialovým nebo radioaktivním zářením nebo viditelným světlem.

Vzniklý volný radikál mastné kyseliny (R•) je velmi reaktivní, takže se snadno sloučí s molekulou kyslíku, která je vlastně biradikálem. Tím vznikne peroxylový radikál (ROO•). Reakce je popsána následující rovnicí [Rovnice 4].

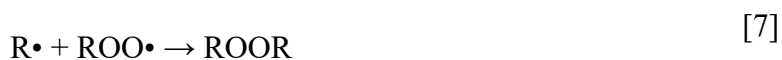


Peroxylový radikál je opět velmi reaktivní, takže odštěpí atom vodíku z další molekuly nenasyčené mastné kyseliny. Vznikne hydroperoxid (ROOH) a další volný radikál mastné kyseliny (R•) [Rovnice 5].



Reakce [2,3] představují propagační stupeň. Tyto reakce se mohou proběhnout jednou, nebo se mohou mnohokrát opakovat. Byly pozorovány radikálové reakce o více než tisíci člancích, proto autooxidaci lze popsat jako řetězovou reakci. Reakce volného radikálu mastné kyseliny s kyslíkem je mnohem rychlejší než reakce peroxylového radikálu s uhlovodíkovým řetězcem lipidu. Peroxylový radikál reaguje s molekulou lipidu poměrně pomalu, a tato reakce proto určuje rychlost autooxidace.

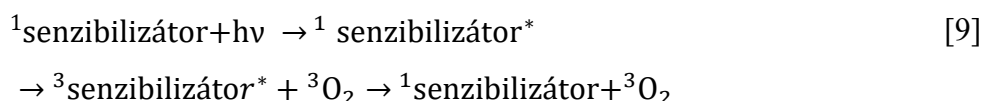
Třetí stupeň autooxidační reakce nastává v momentu, kdy je koncentrace volných radikálů v reakčním systému dostatečně vysoká. Dva volné radikály spolu reagují za vzniku neradikálního, poměrně stabilního produktu a tím řetěz ukončí. Terminační reakce lze zapsat pomocí následujících rovnic [Rovnice 6-8].



Za omezeného přístupu kyslíku, kdy rychlost autooxidace závisí na jeho parciálním tlaku, jsou hlavními radikály v systému radikály mastné kyseliny ( $R\bullet$ ) a hlavní terminační reakcí je jejich rekombinace. Za dostatečného přístupu kyslíku rychlost reakce na jeho parciálním tlaku nezávisí. Vzniká tak více peroxylových radikálů ( $ROO\bullet$ ), hlavními terminačními reakcemi jsou rekombinace radikálů mastných kyselin s peroxylovými radikály a vzájemné rekombinace peroxylových radikálů (10).

### 1.5.2 Fotooxidace

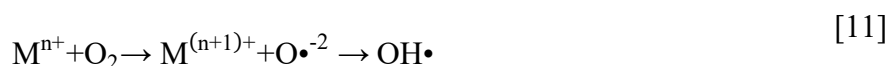
Fotooxidace zahrnuje přímou reakci světlem aktivovaného singletového kyslíku s nenasycenými mastnými kyselinami a následnou tvorbu hydroperoxidů [Rovnice 9]. V nejstabilnější tripletové struktuře není kyslík velmi reaktivní s nenasycenými složkami. Fotosenzibilní autooxidace tak zahrnuje reakci dvojně vazby a singletového kyslíku produkovaného světlem v přítomnosti senzibilizátorů jako například chlorofyl, erytrosin. Oxidace pomocí singletovým kyslíkem se liší od autooxidace v tom, že nejde o radikálovou řetězovou reakci.



### 1.5.3 Oxidace katalyzovaná kovy

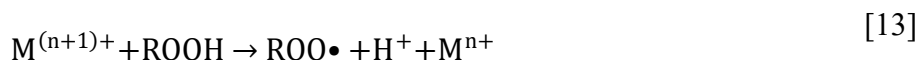
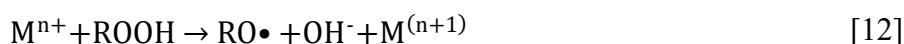
Mnoho přírodních olejů obsahuje kovy jako kobalt, železo, hořčík a měď, které mají přechodovou valenci tzn. redukují se přijetím jednoho elektronu. Mají značné prooxidační vlastnosti při lipidické oxidační reakci (11).

Kovy jsou ve své vyšší valenci  $M^{(n+1)+}$  iniciátory autooxidační reakce. Kovy mohou iniciovat oxidaci mastných kyselin reakcí s kyslíkem. Vzniklý aniont superoxidového radikálu ( $O\bullet^{-2}$ ) může produkovat ztrátou elektronu singletový kyslík [Rovnice 10] nebo může reakcí s protonem vytvořit peroxylový radikál, který je iniciátorem řetězové reakce [Rovnice 11].



Malá skupina hydroperoxidů je vyrobena kovy s přechodovou valencí může způsobit rozklad dříve vytvořených hydroperoxidů pomocí nepárových elektronů (11).

Některé kovy (Fe, Cu a Ni) katalyzují ve své nižší valenci rozklad hydroperoxidů na alkoxylové radikály. Tím přecházejí do své vyšší valence a ve vyšší valenci katalyzují zase rozklad hydroperoxidů na peroxylové radikály a přecházejí do nižší valence [Rovnice 12,13] (13).



Vzniklé alkoxylové (RO•) a peroxylové (ROO•) radikály zvyšují rychlost autooxidační reakce v propagační a iniciační fázi (10).

#### 1.5.4 Inhibitory oxidace

Prevenčí lze minimalizovat nebo zpomalit oxidační reakce lipidů. Mezi preventivní opatření patří minimalizace přítomnosti kyslíku a katalytických kovů nebo snížení účinnosti těchto faktorů (11). Jako inhibitory oxidace označujeme všechny látky, které snižují rychlost oxidace bez ohledu na mechanismus jejich působení. Tyto látky lze zařadit mezi antioxidanty. Patří k nim chelatotvorné látky a sloučeniny rozkládající hydroperoxy neradikálovou cestou. Také látky stabilizující hydroperoxy mohou snižovat reakční rychlost, protože brzdí tvorbu volných radikálů (10).

#### 1.6 Antioxidanty

Antioxidanty mohou být definovány jako látky, které když jsou přítomny v potravinách, oddalují, kontrolují, nebo inhibují oxidaci. V organismu antioxidanty snižují riziko degenerativních onemocnění vznikající z oxidačního stresu.

Mnoho složek se může chovat jako antioxidanty a není jenom jedna cesta, jak je rozdělit. Antioxidanty mohou být klasifikovány podle zdroje, funkce, mechanismu reakce nebo také chemické struktury.

Podle zdroje můžeme antioxidanty rozdělit na přírodní, syntetické a syntetické, které jsou identické s přírodními. Přírodní antioxidanty jsou přirozenou součástí většiny rostlin. Jejich příklady jsou polyfenoly, karotenoidy, kyselina askorbová a tokoferoly. Syntetické antioxidanty jsou chemicky syntetizovány, ale musí podrobeny toxikologickému rozboru, aby mohli být použity pro lidskou výživu. Tyto antioxidanty mohou být produkovány ve stejné molekulární podobě stejně jako antioxidanty produkovány přírodní cestou, nebo mohou být vyrobeny jako deriváty těchto sloučenin. Deriváty jsou na identické s přírodními přeměněny až po požití. Příkladem je kyselina askorbová a její soli (11).

Podle mechanismu, můžeme antioxidanty dělit na primární a sekundární. Primární antioxidanty jsou sloučeniny, které mohou darovat atom vodíku nebo elektron za účelem přerušit řetězovou reakci volných radikálů volných radikálů, jde o tzv. vychytávače volných radikálů (FRS = free radical scavengers). Darováním atomu vodíku nebo elektronu se oxidovaný antioxidant stane radikálem (FRS•). Tento radikál má mnohem menší energii a stane se nepoužitelným pro pokračování řetězové reakce. Fenolové antioxidanty stejně jako kyselina gallová, tokoferoly nebo karnosová kyselina fungují jako primární antioxidanty (14). Dále je znázorněna reakce FRS s alkoxylovým a peroxylovým radikálem [Rovnice 14].



Chemické vlastnosti FRS včetně energie vodíkové vazby, rezonance delokalizací, schopnost oxidace, stejně jako energie konečného radikálu, mají vliv na antioxidační aktivitu FRS•. Antioxidační radikály jsou stabilizovány delokalizací nespárovaných elektronů kolem fenolového kruhu do stabilní formy stabilizující rezonanční hybrid a konečnou účast v terminační reakci končící u neradikálních dimerů. [Rovnice 15]

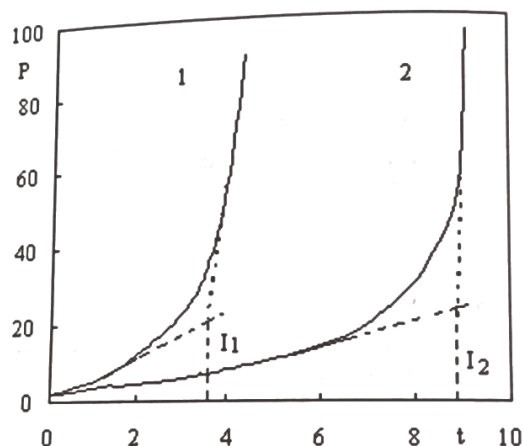


Toto znamená, že každý FRS je možný inaktivovat nejméně dva radikály, první je inaktivován reakcí FRS s peroxylovým radikálem a druhý když FRS• začnou terminační reakci s jiným peroxylovým radikálem (13).

Druhou skupinu tvoří sekundární antioxidanty, označované také jako preventivní antioxidanty. Jde o sloučeniny, které nepřerušují radikálovou řetězovou reakci, ale působí preventivně proti vzniku radikálních sloučenin. Jejich funkce spočívá ve zpomalení lipidových oxidačních reakcí mnoha mechanismy. Mezi dva nejdůležitější typy patří kovové cheláty a látky schopné přeměňovat hydroperoxydy na neradikálové produkty. Lze tak předejít reakci hydroperoxidů s kovy, kdy se tvoří hydroxylové a alkoxylové radikály, které by mohly odebrat vodík z lipidů a generovat radikály a rozšířit tak propagační řetězec. Proto je důležité hydroperoxydy odstranit (14). Příklady chelátů prooxidující kovové ionty může být ethylendiamintetraoctová kyselina nebo kyselina citronová. Mezi sekundární patří také ty, které deaktivují reaktivní kyslík, jejich příkladem je  $\beta$ -karoten (11).

Úloha antioxidantu tedy spočívá ve zkrácení autooxidačního řetězce a zvýšení rychlosti terminačních reakcí. Při reakci se antioxidant spotřebovává. Když je všechn antioxidant spotřebován, začne autooxidace probíhat tak, jako by žádné antioxidanty nebyly přítomny.

Antioxidanty tedy nemohou úplně zastavit autooxidační reakci, jen ji zpomalit, v ideálním případě až na rychlost iniciační reakce.



Obrázek 1: Vliv přidavku antioxidantu na průběh antioxidační reakce (10)

Na Obrázku č.1 je znázorněn průběh reakce bez antioxidantu (křivka 1) a v jeho přítomnosti (křivka 2). Jde o závislost množství hydroperoxidů mastných kyselin na čase. Je zřejmé, že antioxidanty prodlouží indukční periodu ( $I_1, I_2$ ), ale nemají vliv na rychlost následující rychlé oxidace. Poměr délky indukční periody inhibované a neinhibované reakce se nazývá protekční faktor. Nejčastěji se vyjadřuje v % zvýšení stability (10).

### 1.7 Oxidační procesy probíhající v mléce a sýrech

Oxidační stabilita mléka a mléčných produktů je důležitá pro mlékárenský průmysl. Oxidační procesy v mléce mohou vytvořit pachů nebo zhoršení nutriční kvality. Na druhou stranu mlékárenské produkty mohou mít příznivý vliv pro konzumenta vlivem antioxidačních vlastností (15).

V mléce podléhají oxidaci nenasycené mastné kyseliny, glycerofosolipidy a triacylglyceroly. Triacylglyceroly se v mléce téměř nevyskytují ve volné formě, ale jsou uspořádány do tzv. tukových kuliček. Jedem mililitr mléka obsahuje obvykle až  $10^{10}$  tukových kuliček. Tato jemná emulze představuje povrch tukových kuliček přibližně na  $0,10 \text{ m}^2$  v jednom ml mléka (8). Mají velký povrch, což usnadňuje jejich oxidaci. Oxidační produkty jsou velmi důležité z hlediska jejich toxicity. Kromě toho peroxylové radikály, generované v průběhu lipidické oxidace, ničí karotenoidy a vitamíny rozpustné v tucích a způsobují jejich nutriční ztrátu (16).

Oxidace mléka se obvykle vyvíjí třemi mechanismy: světlem indukované, indukované kovy a spontánní. Výrobky balené v polyethylenu jsou hlavní příčinou světlem indukované oxidace.

Kovově indukovaná oxidovaná příchut' se vyvíjí v přítomnosti přirozeně se vyskytujících kovů v mléce. Měď může přímo reagovat s tripletovým kyslíkem a fenolovými sloučeninami, kdy se tvoří reaktivní formy kyslíku a hrají hlavní roli při dalším kroku autooxidace. Vznik spontánně oxidované chuti nebyl v mléce identifikován, ale jeho výskyt byl spojen s genetickou predispozicí a souběžnou přítomností polynenasycených mastných kyselin a vysokými hladinami mědi v mléce (17).

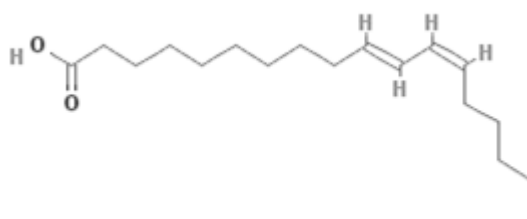
## 1.8 Antioxidační vlastnosti mléka a sýrů

Mléčné antioxidanty, ať už lipofilní nebo hydrofilní, ovlivňují oxidační a antioxidační rovnováhu v lidském těle. Lipofilní antioxidanty se vyznačují vysokou tepelnou stabilitou a jsou aktivní ve všech mléčných výrobcích. Lipofilní i hydrofilní antioxidanty interagují v procesu deaktivace reaktivních sloučenin kyslíku a konečných produktů peroxidace lipidů.

### 1.8.1 Lipofilní antioxidanty

Hlavní antioxidanty v mléčném tuku jsou konjugovaná kyselina linoleová, vitamín A, vitamín E a  $\beta$ -karoten. Dalšími složky s antioxidačními vlastnostmi jsou vitamín D3 a fosfolipidy.

Nejvíce aktivní antioxidant v mléčném tuku je **konjugovaná kyselina linolová** (CLA conjugated linoleic acid), která je charakteristická konjugovanými dvojnými vazbami. CLA se vyskytuje ve 28 polohových a geometických izomerech, které se liší polohou dvojných vazeb a konfigurací cis a trans izomerů. Izomery s vysokou biologickou aktivitou zahrnují cis-10, trans-11 a trans-10, cis-12 CLA - struktura tohoto izomeru je znázorněna na Obrázku č.2.

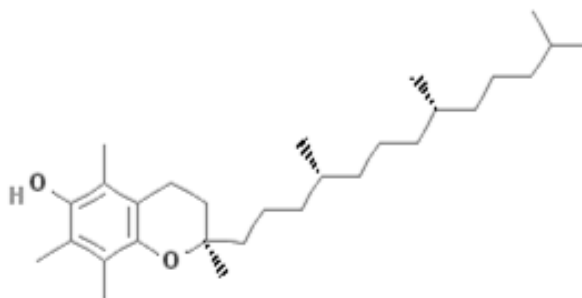


Obrázek 2: trans-10, cis-12 konjugovaná kyselina linolová (18)

Množství CLA se může u mléčných výrobků se může zvýšit v důsledku technologických procesů jako například záhřev, aerace a mikrobiální fermentace (2). Práce zabývající se zkoumáním množství CLA v průběhu zrání sýrů (19) potvrdila nárůst množství CLA izomerů cis, trans-isomery (10,12), Trans, trans-isomery (12,14; 11,13; 10,12; 9,11), a trans, trans-isomery (8,10; 7,9) v průběhu zrání v období šesti měsíců.



Mléko není bohatým zdrojem **vitamínu E** (0,3–0,83 µg na g tuku), přičemž máslo má již vyšší obsah vitamínu E (18–35 µg na g tuku). Vitamin E se nachází v membránách tukových globulí. V průběhu skladování obsah vitamínu E klesá. Obsah vitamínu E v mléce je určován složením krmiva dojnice. Mléko od krav, které mají pastevní potravu mají mnohem vyšší obsah vitamínu E, než když jsou krmeny obvyklým krmivem používaným ve stájích. Mléko obsahuje pouze  $\alpha$ -tokoferol, který má nejvyšší antioxidační kapacitu z tokoferolů. Struktura molekuly  $\alpha$ -tokoferolu je znázorněna na Obrázku č. 3.



Obrázek 3:  $\alpha$ -tokoferol (20)

Hlavní biologická funkce vitamínu E v lidském těle je prevence oxidace membran lipidů a lipoproteinů přítomných v plazmě a vychytávání volných nebo peroxylových radikálů. Vitamin E také zvyšuje aktivitu antioxidačních enzymů (peroxidáza, transferáza, glutathion reduktáza). Během peroxidace lipidů (v biologických membránách a lipoproteinech) interaguje  $\alpha$ -tokoferol (TOH) s peroxidovými zbytky za vzniku relativně nereaktivních a stabilních tokoferolových radikálů [Rovnice 16]. Tokoferolový radikál (TO•) může interagovat s jinými volnými radikály nebo se může vázat na peroxidové radikály a tím ukončit tak radikálovou reakci (2).

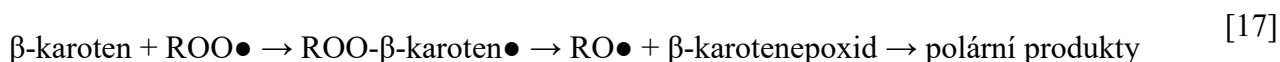


Každý tokoferol je schopný neutralizovat dva peroxylové radikály v důsledku těchto reakcí. Radikál TO• je relativně stabilní, a reaguje rychle s LOO• a pomalu s LH. Kromě zachycení tvorby hydroperoxidu se ukázalo, že tokoferoly stabilizují vzniklé hydroperoxy a zabraňují jejich rozkladu na sekundární oxidační produkty (11).

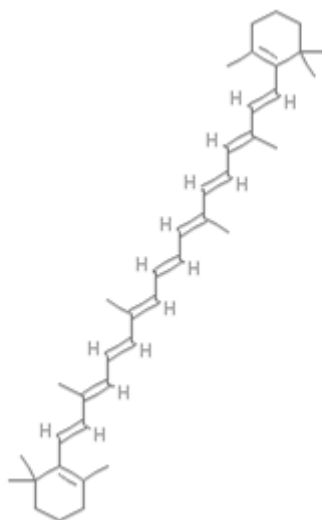
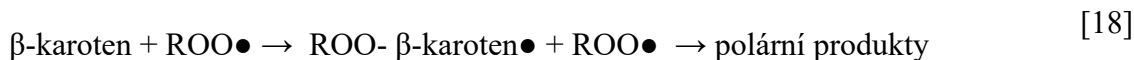
Mléčné produkty jsou bohatým zdrojem karotenoidu a biologicky dostupného **vitamínu A**. Nejvyšší obsah vitamínu A (0,150–1,5 mg/100 g) byl nalezen ve zrajících sýrech a másle. Prekurzory vitamínu a jsou karotenoidy obsažené v krmivu, zejména  $\beta$ -karoten, který je znázorněn na obrázku č. 4.

Retinol a retinolová kyselina jsou hlavními biologicky aktivními formami vitamínu A. Retinol má příznivé účinky na regeneraci kůže, gastrointestinální, reprodukční a respirační systém. Retinolová kyselina stimuluje imunitní systém a pomáhá k tvorbě bílých krvinek (2).

Při autooxidaci mastných kyselin vzniká jako jeden z vysoce reaktivních produktů hydroperoxidový radikál ROO●, který je zachycen konjugovaným systémem β-karotenu za vzniku rezonancí stabilizovaného systému, kde se rozštěpí na alkoxylové radikály a stabilizuje se jako epoxid, karbonylová sloučeniny a další [Reakce 17].



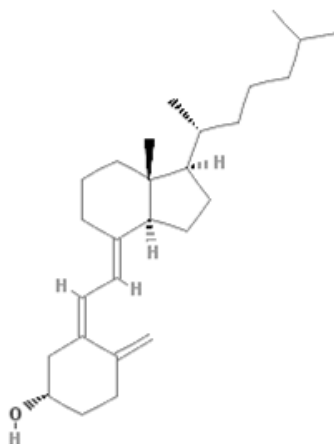
Hlavními polárními produkty této reakce jsou epoxidy, neaktivní izomery β-karotenu a ketony, které bývají významnými aromatickými složkami potravin. V přítomnosti malého množství kyslíku je β-karoten účinnější, kdy stabilizovaný systém reaguje s dalším hydroperoxyem za vzniku produktů, které tvoří aromatické látky potravin [Reakce 18] (21).



Obrázek 4: β-karoten (22)

Stejně jako α-tokoferol, β-karoten a retinol, **vitamín D3** [Obrázek 5] je součástí neenzymatického antioxidačního systému mléka. Nejvíce aktivní forma vitamínu D3 je 1,25-dihydroxycholecalciferol, který má antioxidační účinky a působí inhibičně na peroxidaci lipidů. Obsah vitamínu D3 v kravském mléce je nízký (méně než 0,002 mg/100 mléka) a je vyšší v létě než v zimě. Mléčný tuk oobsazený v másle nebo zrajícím sýru je mnohem důležitějším zdrojem vitamínu D3 ve stravě. V lidském těle je vitamín D3 zodpovědný především za regulaci

rovnováhy vápníku a fosforu. Působí také preventivně proti vznku sklerózy a revmatické artritidě.



Obrázek 5: Vitamín D3, cholecalciferol (23)

Téměř veškerý tuk obsažený v mléce je uzvařen v tukových micelách jejichž membrány obsahují **fosfolipidy**, glykosfingolipidy, cholesterol a proteiny. Mléčné fosfolipidy zahrnují fosfatidylcholin (licitin), fosfatidylethanolamin, sfingomyelin, fosfatidylserin a další. Fosfolipidy obsahují ztateně vyšší množství nenasycených mastných kyselin než triglyceridy, což hraje důležitou roli v metabolických procesech v buňkách a orgánech. Fosfolipidy obsahující polynenasycené mastné kyseliny a jsou schopny vázat kationty, proto mohou působit jako antioxidanty, které chrání gastrointestinální sliznici, mozek, játra a ledviny před toxickými účinky kyslíkových radikálů (2).

### 1.8.2 Hydrofilní antioxidanty

V mléce hydrofilní antioxidanty tvoří skupiny dusíkatých sloučenin, jako jsou kaseinové frakce, syrovátkové frakce, syrovátkové bílkoviny, bioaktivní peptidy, sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností a kyselina močová. Další důležitou skupinou antioxidačních sloučenin jsou enzymy, které neutralizují volné radikály v mléce, včetně superoxid dismutázy (SOD), katalázy (CAT), laktoperoxidázy (LPx) a glutathionperoxidázy (GSHPx). Tyto enzymy tvoří synergický systém, který zvyšuje antioxidační potenciál mléka.

**Proteiny** (kaseinové frakce a syrovátkové proteiny) a **peptidy** uvolňované proteolytickými enzymy mají antioxidační vlastnosti. Proteolýza je nejsložitější ze všech primárních reakcí v průběhu zrání sýra. Výsledkem proteolýzy je velká skupina velkých ve vodě nerozpustných a středně velkých ve vodě rozpustných peptidů, které jsou později hydrolyzovány na menší peptidy a aminokyseliny. Tyto peptidy přispívají k vývoji chuti a struktury ve zralém sýru, ale

také vykazují podstatnou bioreaktivitu. Byly identifikovány skupiny mléčných peptidů zodpovědné za antioxidační aktivitu. Tyto antioxidační peptidy hrají základní úlohu při udržování antioxidačních obranných systémů tím, že brání tvorbě volných radikálů nebo vychytávají volné radikály aktivních druhů kyslíku, které indukují oxidační poškození biomolekul a způsobují stárnutí, rakovinu, srdeční onemocnění, mrtvice a arterosklerózy.

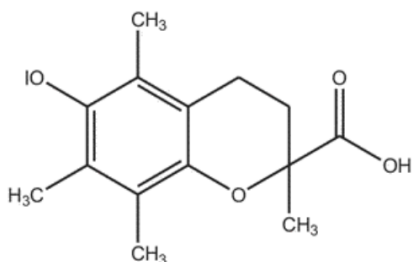
Přesný mechanismus antioxidační aktivity peptidů zatím nebyl popsán, některé studie předpokládají, že fungují jako inhibitory lipidické peroxidace, vychytávače volných radikálů a chelatační činidla tranzitních kovových iontů. Také je známo, že antioxidační vlastnosti jsou závislé na struktuře, hydrofobicitě a složení aminokyselinových zbytků a jejich molekulové hmotnosti (24). Vybrané sekvence  $\beta$ -kaseinu (169-176 a 33-48) inhibují oxidaci kyseliny olejové. Proteolýza ovlivňuje schopnost kaseinu inhibovat peroxidaci lipidů. Bez ohledu na koncentraci vykazují hydrolyzáty kaseinu antioxidační aktivitu v důsledku vyššího obsahu aminokyselin s antioxidačními vlastnostmi, včetně histidinu, prolinu, lysinu a tyrosinu. Volné radikály jsou deaktivované peptidy obsahujícími hydrofobní aminokyseliny (prolin, histidin, tyrosin a tryptofan) a vybrané volné aminokyseliny (tyrosin, cystein). Tyrosin a fenylalanin redukuje množství volných radikálů dodáním vodíkových iontů. Histidin poskytuje antioxidační efekt chelatací kovového iontu, absorbuje aktivní kyslík a vychytává volné radikály. Kasein a jeho fragmenty s fosforylovaným serinem (SerP-SerP-SerP-Glu-Glu) jsou vysoce schopné chelatovat kationty vápníku, železa a zinku.

Mezi **enzymy** obsažené v mléce, které vychytávají volné radikály, patří superoxiddismutáza, která přeměňuje superoxidové radikály na peroxid vodíku, který má antimikrobiální vlastnosti. Kataláza je jedním z nejaktivnějších mléčných enzymů, kdy rozkládá peroxid vodíku na vodu a kyslík. Většina enzymů je vázána na membráně tukových kuliček. Dále jsou v mléce obsaženy enzymy laktoperoxidáza a glutathion peroxidáza (2). Většina enzymů přítomných v čerstvém mléce se vlivem pasterace deaktivuje a v sýrech již nepůsobí. Na zrání sýrů se naopak podílejí enzymy syřidla (chymosin, pepsin), nativní enzymy v mléce (plazmin, katepsin D, proteinázy somatických buněk), enzymy startovacích kultur a enzymy jejich odumřelých buněk, enzymy sekundárních kultur, enzymy nesharbatovacích čili nahodilých bakterií a někdy i exogenní enzymy přidávané k urychlení zrání (4).

## 2 Experimentální část

Látky s antioxidačními účinky mají rozdílné chemické vlastnosti. Některé z nich mají hydrofilní charakter, přičemž většina je rozpustná v tucích. Vzhledem k velkému množství antioxidačních cest je výhodnější měřit celkovou antioxidační kapacitu potravin.

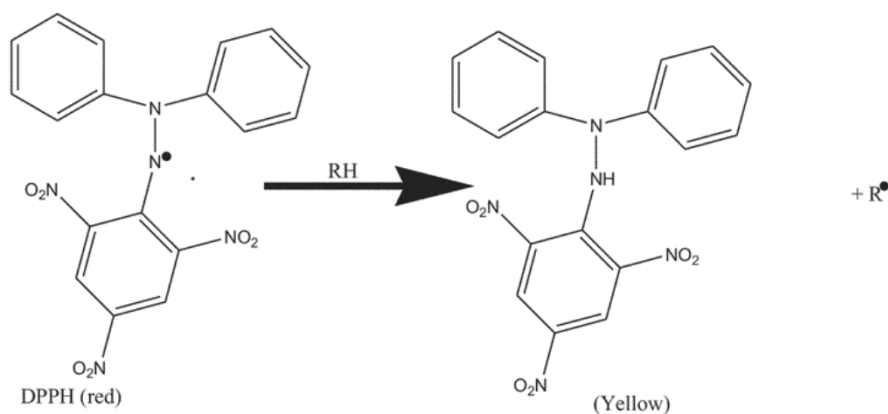
Rozsah antioxidační kapacity může být zjišťován pomocí standardu Trolox. Chemický název je 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina [Obrázek 6], jde o derivát tokoferolu a bývá využíván pro biologické a biochemické analýzy. Trolox se používá u metod DPPH nebo ABST metody jako standardní látka (9).



Obrázek 6: Chemická struktura Troloxu (9)

### 2.1 Metoda DPPH

Tento test je založen na zachycení volného radikálu pomocí volného radikálu DPPH (1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl). DPPH je stabilní volný radikál červené barvy, který má absorpční maximum při 515 nm. Jsou-li volné radikály vychytávány antiradikální sloučeninou, DPPH změní barvu na žlutou, což způsobí úbytek absorbance. DPPH radikál má volný elektron, který vyvolá silné absorpční maximum při 515 nm. Ve chvíli, kde je volný elektron spárovaný s jiným elektronem z antioxidantu, dohází ke snížení absorbance. Změna barvy má stechiometrický vztah k počtu zachycených elektronů (9). Probíhající reakce je znázorněna na obrázku č. 7.



Obrázek 7: Reakce probíhají u metody DPPH (9)

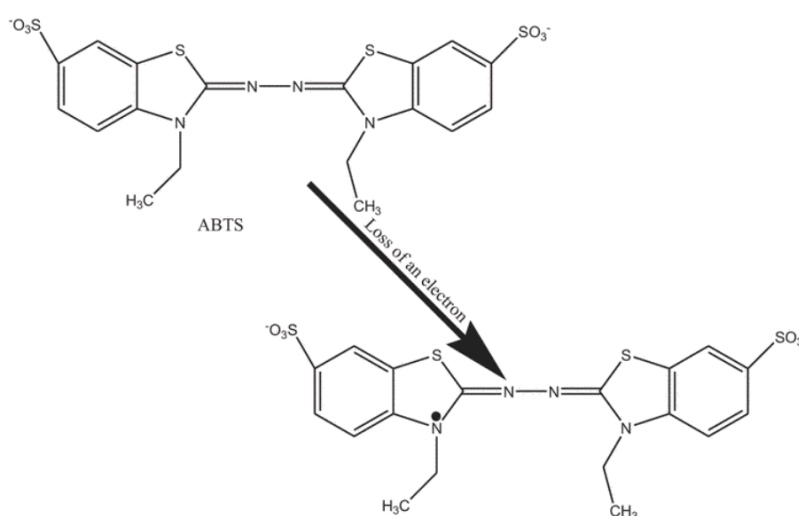
## 2.2 Stanovení schopnosti antioxidantu vychytávat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Metoda je založen na schopnosti fenolických látek redukovat Fe<sup>3+</sup> na Fe<sup>2+</sup>. Reakce se provádí při pH 3,6 aby byla udržována rozpustnost kovu, takže reakce při nízkém pH snižuje ionizační potenciál, který řídí vodíkový atom a zvyšuje redoxní potenciál, které je dominantním reakčním mechanismem. Redukci Fe<sup>3+</sup> na Fe<sup>2+</sup> probíhající v přítomnosti 1,10-fenantrolinu je spojena s tvorbou barevného Fe<sup>3+</sup> komplexu (absorpční maximum 510 nm). Metoda FRAP je jednoduchá, rychlá. Existuje také levné provedení pomocí poloautomatických nebo automatizovaných metod (25).

## 2.3 Metoda ABST

Metoda ABST je jednou z nerozšířenějších metod pro měření antioxidační aktivity. Je založena na odbarvování ABST radikálového kationtu (2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonová kyseliny)). Test je založen na schopnosti antioxidantů inhibovat oxidační reakce ABST. Samotný test zahrnuje oxidaci ABST na produkt ABST<sup>+</sup>, který má intenzivně zbarvený radikálový kation dusíku. Reakce je znázorněna na obrázku č. 8. Absorpční maximum produktu je 734 nm.

Většina potravinových výtažků je velmi barevná, u této metody využíváme toho, že většina látek neabsorbuje při 734 nm. Výhodou ABST je to, že poskytuje kumulativní účinek všech antioxidantů, které jsou přítomny ve vzorku, což nám umožňuje získat užitečnější informace, které mohou být vyhodnoceny než při měření jednotlivých antioxidantů. Tuto metodu je možné použít pro látky ve vodě rozpustné i nerozpustné (9).



Obrázek 8: Reakce probíhající u metody ABST (9)

## 2.4 Stanovení obsahu fenolických látek - metoda podle Folin-Ciocalteua

Folin-Ciocalteuova metoda je používaná pro zjišťování celkového obsahu fenolických látek, což je dalším důležitým parametrem celkové antioxidační kapacity. Tato metoda byla původně používána pro stanovení tyrosinu, aminokyselin s fenolovou skupinou v proteinech později byla upravena pro analýzu antioxidantů v potravinách.

Tato metoda je založena na redukci Folin-Ciocalteuova činidla, které tvoří kyselý komplex fosforečnanu molybdenového a wolframového. Redukovaná forma komplexu má modrou barvu, která má absorpční maximum při 765 nm. Na molybdenovém centru komplexu dochází k redukci  $\text{Mo}^{6+} \rightarrow \text{Mo}^{5+}$  tím, že přijme elektron z fenolického antioxidantu. Výsledky bývají vyjadřovány jako ekvivalent kyseliny gallové, která je obecně přijímána jako standard.

Metoda má mnoho výhod, včetně jednoduchosti, reprodukovatelnosti a robustnosti, na druhou stranu jde metodu citlivost na pH, teplotu a reakční čas. Proto je důležitý výběr reakčních podmínek pro dosažení správných výsledků. Nefenolické redukční látky, jejich příkladem jsou redukující cukry a některé aminokyseliny, mohou ovlivnit výsledky, tudíž je nutné snížit jejich obsah (11).

## 2.5 IČ spektrometrie

Principem metody je absorpce infračerveného záření při průchodu vzorkem, při níž dochází ke změnám rotačně vibračních energetických stavů molekuly v závislosti na změnách dipólového momentu molekuly. Infračervená spektroskopie je analytická technika určená především pro identifikaci a strukturní charakterizaci organických sloučenin a anorganických látek. Tato technika měří pohlcení infračerveného záření o různé vlnové délce analyzovaným materiálem. Infračerveným zářením je elektromagnetické záření v rozsahu vlnových délek 0,78–1000 mm, což odpovídá rozsahu vlnočtům  $12800\text{--}10\text{ cm}^{-1}$ . Analyzované vzorky mohou být velmi malé. Celá oblast bývá rozdělena na: blízkou ( $13000\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ ), střední ( $4000\text{--}200\text{ cm}^{-1}$ ) a vzdálenou infračervenou oblast ( $200\text{--}10\text{ cm}^{-1}$ ) (28).

## 3 Výsledky a diskuse

### 3.1 Vzorčky

Sýry *Kromík minigouda* (výrobce Kromilk a.s., Česká republika) byly použity pro analýzu antioxidačních vlastností. Jde o přírodní polotvrdé sýry typu gouda, které byly vyrobeny z pasterovaného mléka, u kterých byl deklarován obsah sušiny byl minimálně 56 %, obsah tuku v sušině minimálně 45 %. V Tabulce č. 5 jsou znázorněny průměrné výživové hodnoty tohoto výrobku. Bylo použito pět vzorků sýra a to po 9, 52, 65, 80 a 86 dnech zrání.

Tabulka 5: Průměrné výživové hodnoty ve 100 g vzorku, údaj z obalu výrobku

<b>Průměrné výživové hodnoty ve 100 g výrobku</b>	
Energetická hodnota [kJ/kcal]	1331 / 318
Tuky [g]	24,3
z toho nasycené mastné kyseliny [g]	16,0
Sacharidy [g]	1,0
z toho cukry [g]	1,0
Bílkoviny [g]	24,4
Sůl [g]	2,0

### 3.2 Příprava extraktu:

Do čtyřech skleněných uzavíratelných zkumavek bylo naváženo 1 g nejmenno nastrohaného vzorku sýra. Do prvních dvou zkumavek bylo přidáno 10 ml destilované vody. Do dalších dvou zkumavek bylo přidáno 10 ml 50% methanolu. Zkumavky byly uzavřeny a byla provedena extrakce v ultrazvuku po dobu 30 minut. Zkumavky byly dále odstředěny na odstředivce při 5000 ot./min po dobu 5 minut (Universal 320, Hettich, Tuttlingen, Německo). Poté bylo provedeno další odstředění při 6000 ot./min po dobu 5 minut (Ministar Silverline, VWR International, Stříbrná Skalice, Česká Republika). Stejným způsobem byly zpracovány ostatní vzorky. Vodné extrakty byly dále přefiltrovány přes filtry s póry o průměru 0,45 μm (polyethersulfon, Milcom, Olomouc, Česká Republika).



### 3.3 Spektrofotometrická analýza

Extrakty vzorků byly analyzovány čtyřmi spektrofotometrickými metodami. Byly použity metody DPPH, ABST, Folin-Ciocalteu a metoda, kdy se zjišťuje schopnost antioxidantu vychytávat peroxid vodíku. K měření jsem použila spektrofotometr výrobce Beckman Coulter (DU 530, Brea, USA), a plastové kyvety s optickou délkou 1 cm.

#### 3.3.1 Příprava kalibračních roztoků standardů

##### Kalibrační roztok kyseliny gallové

Byl připraven zásobní roztok kyseliny gallové o koncentraci 400 µg/ml navážením 0,02 g standardu kyseliny gallové do 50 ml odměrné baňky, která byla doplněna methanolem po rysku. Ze zásobního roztoku byly ředěním připraveny kalibrační roztoky v rozsahu koncentrací od 2 do 50 µg/ml.

##### Kalibrační roztok Trolox

Nejdříve byl připraven zásobní roztok Trolox o koncentraci 100 µg/ml, bylo naváženo 0,01 g standardu Troloxu do 100 ml odměrné baňky, která byla doplněna methanolem po rysku. Dále byly z tohoto zásobního roztoku připraveny kalibrační roztoky příslušným ředěním od 0,1 po 10 µg/ml.

#### 3.3.2 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH

Byl připraven roztok radikálu DPPH navážením 12,5 mg standardu do 500 ml odměrné baňky, která byla doplněna methanolem po rysku. Do zkumavky s víčkem bylo převedeno 5 ml methanolického roztoku DPPH radikálu a bylo přidáno 500 µl extraktu vzorku nebo kalibračního roztoku Troloxu o určité koncentraci. Byla provedena optimalizace metody, kdy byly proměřeny změny absorbance v průběhu 45 minut v intervalech 2 minut.

Při smíchání extraktu a činidla byl pozorován zákal, který byl odstraněn dalším odstředěním při 6000 ot/min. Poté byl změřen úbytek absorbance (míra odbarvení roztoku) při vlnové délce 517 nm. Souběžně s každým stanovením byl proveden slepý pokus, kde místo extraktu vzorku bylo přidáno čisté extrakční činidlo. Stanovený úbytek absorbance byl přepočítán na procenta inhibice roztoku a pomocí kalibrační závislosti na ekvivalentní množství Troloxu [Rovnice 19] (1).

$$\text{inhibice [\%]} = \frac{A_{bl} - A_{vz}}{A_{bl}} \times 100$$

$A_{bl}$  ..... Absorbance slepého vzorku

$A_{vz}$  ..... Absorbance vzorku

### 3.3.3 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 rýsku představovala 0,005 M kyselina sírová. Dále byl připraven 5 mM roztok peroxidu vodíku, pipetován 28,3  $\mu$ l 30% peroxidu vodíku do 50 ml odměrné baňky a doplněním redestilovanou vodou po rýsku. Poslední potřebnou reagensů byl 1 mM roztok 1,10-fenantrolinu.

Do zkumavky s víčkem bylo pipetováno postupně 250  $\mu$ l 1 mM okyseleného roztoku síranu amonno-železnatého, 1,5 ml extraktu a 62,5  $\mu$ l mM roztoku peroxidu vodíku. Roztok byl ponechán 5 minut v temnu při laboratorní teplotě a následně byl přidán 1,5 ml 1 mM 1,10-fenantrolinu. Roztok byl umístěn do temna při laboratorní teplotě a následně byl přidán 1,5 ml 1 mM 1,10-fentrolinu. Roztok byl ponechán 20 minut v temnu bez přístupu vzduchu. Následně byl změřen nárůst absorbance reakční směs při vlnové délce 510 nm. Stejným způsobem byl proměřen slepý pokus, který obsahoval pouze roztok síranu amonno-železnatého, čisté extrakční činidlo a roztok 1,10-fenantrolinu. Nárůst absorbance byl následně přepočítán na procento vychytaného vodíku [Rovnice 21] (1).

$$\% \text{ vychytaného H}_2\text{O}_2 = \frac{A_{vz}}{A_{sl}} \times 100 \quad [21]$$

$A_{vz}$  ..... Absorbance vzorku

$A_{sl}$  ..... Absorbance slepého pokusu

### 3.3.4 Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS

Byl připraven roztok radikálu  $\text{ABTS}^+$  reakcí soli ABTS s peroxodisíranem draselným. Příprava tohoto roztoku spočívala v rozpuštění 10 mg ABTS v 5 ml destilované vody, následně bylo k roztoku přidáno 100  $\mu$ l 0,064 mol/l roztoku peroxodisíranu draselného. Tato směs reagovala při laboratorní teplotě po dobu 12 – 16 hodin, po uplynutí této doby bylo odpipetováno 2,5 ml roztoku do 100 ml odměrné baňky, která byla doplněna destilovanou vodou po rýsku.

Pro stanovení byly pipetovány 3 ml roztoku  $\text{ABTS}^+$  do zkumavky s víčkem a přidáno 500  $\mu$ l naředěného extraktu vzorku nebo kalibračního roztoku Troloxu o určité koncentraci. Byla

provedena optimalizace metody, kdy byly proměřeny změny absorbance v průběhu 45 minut v intervalech 2 minut.

Po uplynutí tohoto času byl sledován úbytek absorbance při vlnové délce 734 nm. Souběžně s každým stanovením byl proveden slepý pokus, kde místo extraktu vzorku bylo přidáno čisté extrakční činidlo. Stanový úbytek absorbance byl přepočítán na procenta inhibice vzorku a pomocí kalibrační závislosti na ekvivalentním množství Troloxu (1).

$$\text{inhibice [\%]} = \frac{A_{\text{bl}} - A_{\text{vz}}}{A_{\text{bl}}} \times 100 \quad [22]$$

$A_{\text{bl}}$  ..... Absorbance blanku (slepého pokusu)

$A_{\text{vz}}$  ..... Absorbance vzorku

### 3.3.5 Stanovení celkového obsahu fenolických látek

Do zkumavky s víčkem byl pipetován 1 ml extraktu. Dále byl přidán 1 ml 96% ethanolu, 5 ml destilované vody a 0,5 ml činidla FC. Takto připravený roztok byl ponechán 5 minut v klidu. Po uplynulém čase stání byl přidán 1 ml 5% roztoku  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . U methanolového extraktu (50 %, v/v) byl pozorován zákal, který byl odstraněn dalším odstředěním při 6000 ot/min.

Byla provedena optimalizace metody, kdy byly proměřeny změny absorbance v průběhu 45 minut v intervalech 2 minut. Byl zvolen časový interval 20 minut [Obrázek 19]. Po této době byla změřena absorbance při 765 nm. Stejným způsobem byl proměřen slepý pokus, které místo 1 ml extraktu obsahoval 1 ml extrakčního činidla. Koncentrace fenolických látek byla stanovena pomocí řady s kyselinou gallovou (1).

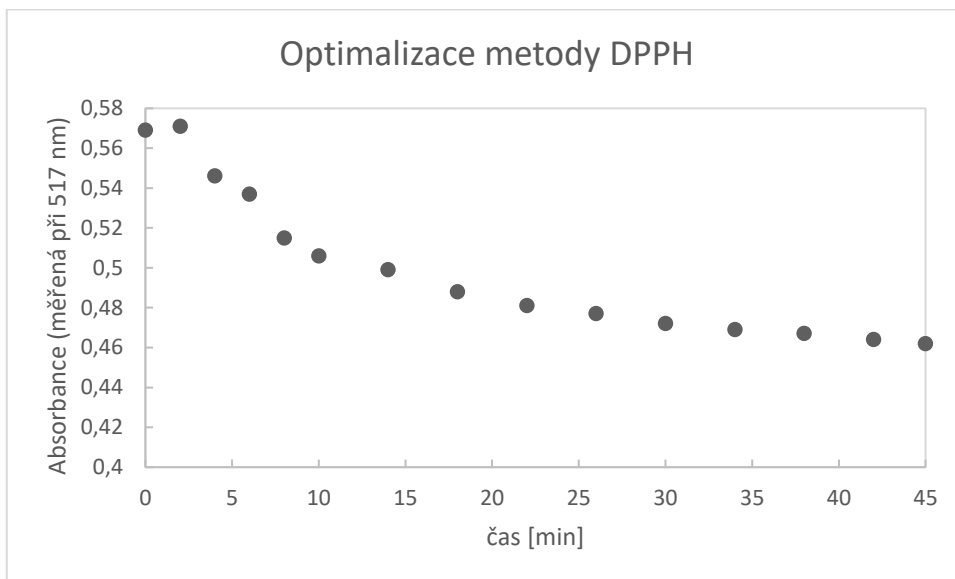
## 3.4 IČ spektrometrie

Infračervená spektra byla zaznamenávána v rozmezí  $4000\text{--}150\text{ cm}^{-1}$  s rozlišením  $4\text{ cm}^{-1}$  na přístroji Nicolet IS50 FT-IR (výrobce Nicolet CZ Praha) vybaveného ATR senzory. Vzorek byl vytemperován na  $20\text{ }^\circ\text{C}$ . Plátek sýra byl pokládán a přitlačen na krystal. Bylo provedeno 32 snímků spekter ze kterých byl vytvořen průměr. Před každým měřením bylo zaznamenáno spektrum pozadí, které se následně „odečetlo“.

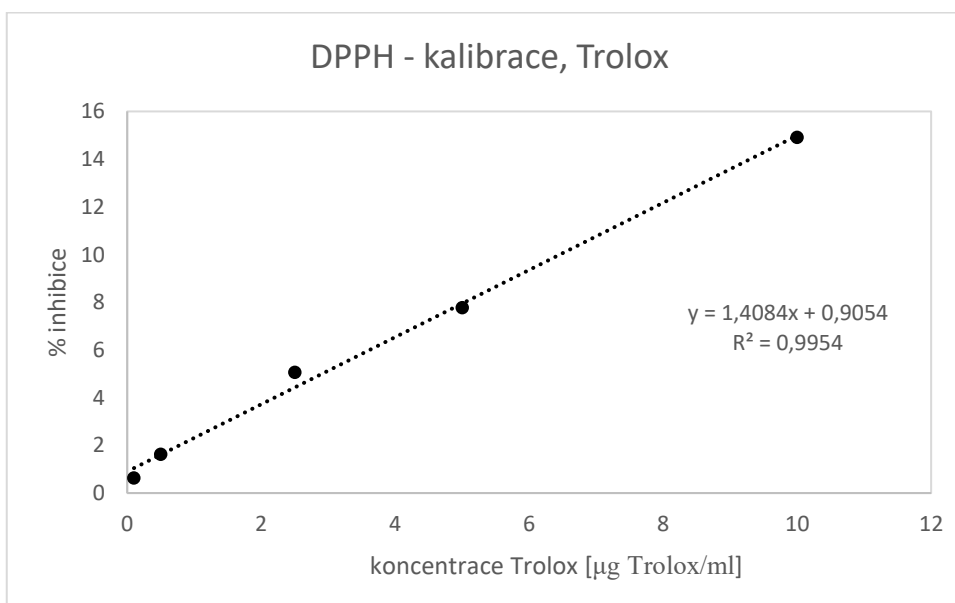
## 4 Výsledky a diskuse

### 4.1 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH

Z grafu závislosti absorbance vzorku na reakční době [Obrázek 9] byla vyhodnocena reakční doba 20 minut jako optimální pro měření. Po této době byla změna absorbance malá. Tyto podmínky byly zvoleny pro analýzu veškerých extraktů a k sestavení kalibrační křivky. Pro optimalizaci byl použit vodný extrakt syru zrajícího 9 dní.

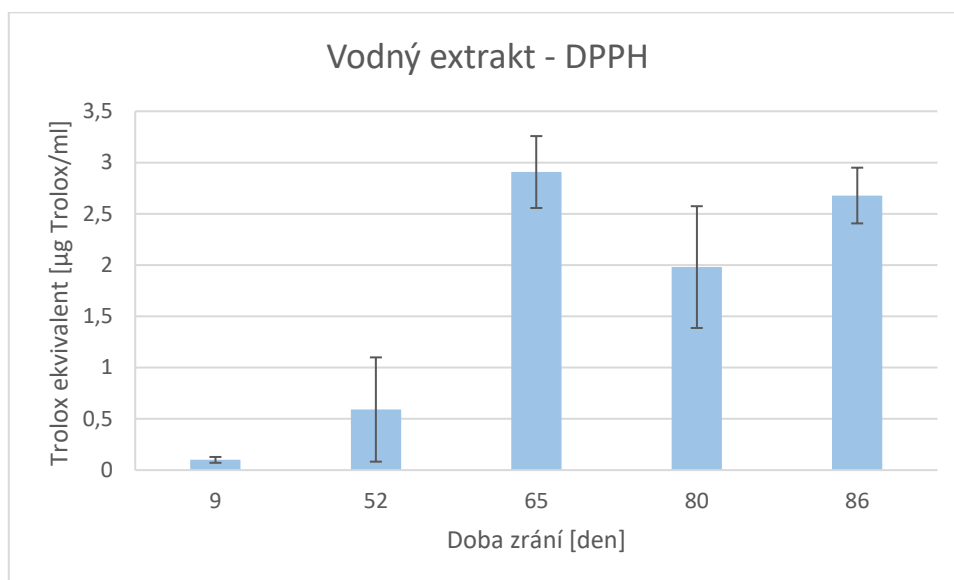


Obrázek 9: Optimalizace metody DPPH při vlnové délce 517 nm

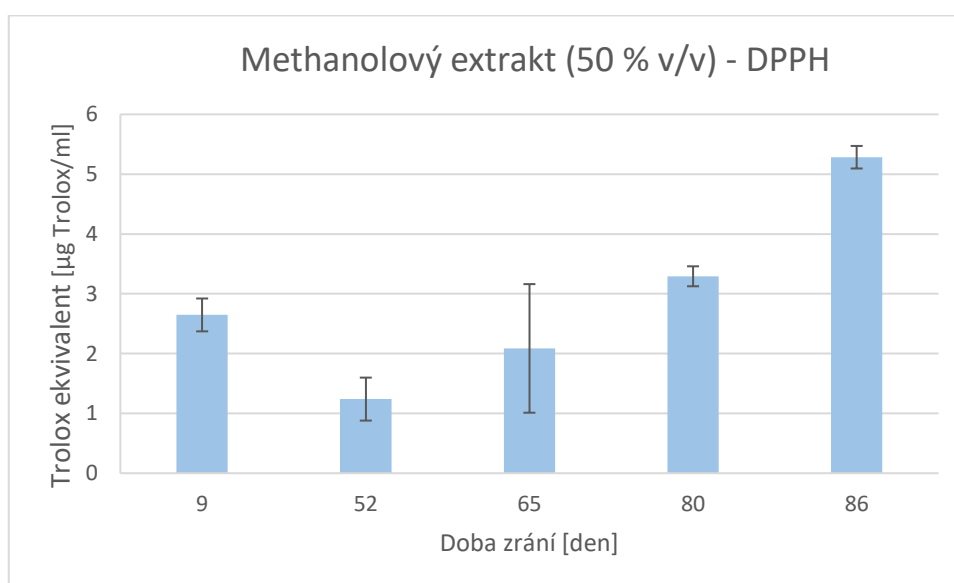


Obrázek 10: Kalibrační křivka Troloxu (DPPH)

Pro porovnání aktivit extraktů byly hodnoty vyjádřeny jako ekvivalentní množství Troloxu. Proto byly inhibice převedeny na odpovídající množství  $\mu\text{g}$  Trolox na 1 ml extraktu. Kalibrační křivka byla sestavena pomocí sedmi kalibračních bodů v rozmezí koncentrací 0,1 až 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , [Obrázek 10] každý bod kalibrace byl změřen 3x. Analýza extraktů byla opakována 3x.



Obrázek 11: Antioxidační kapacita (DPPH) vodných extraktů sýrů gouda



Obrázek 12: Antioxidační kapacita (DPPH) methanolvých extraktů (50 % v/v) sýrů gouda

Vodné i methanolvé extrakty (50 %, v/v) vykazovaly při měření metodou DPPH nízké hodnoty antioxidační aktivity, která se v průběhu zrání mírně měnila. Závislost antioxidační aktivity vodného extraktu vyjádřené v jednotkách Trolox [ $\mu\text{g}$  Trolox/ml] na době zrání je znázorněna na obrázku 11. Aktivita vodného extraktu se pohybovala v intervalu od 0,04 do 2,9  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Závislost antioxidační aktivity methanolvého extraktu (50 %, v/v) vyjádřené

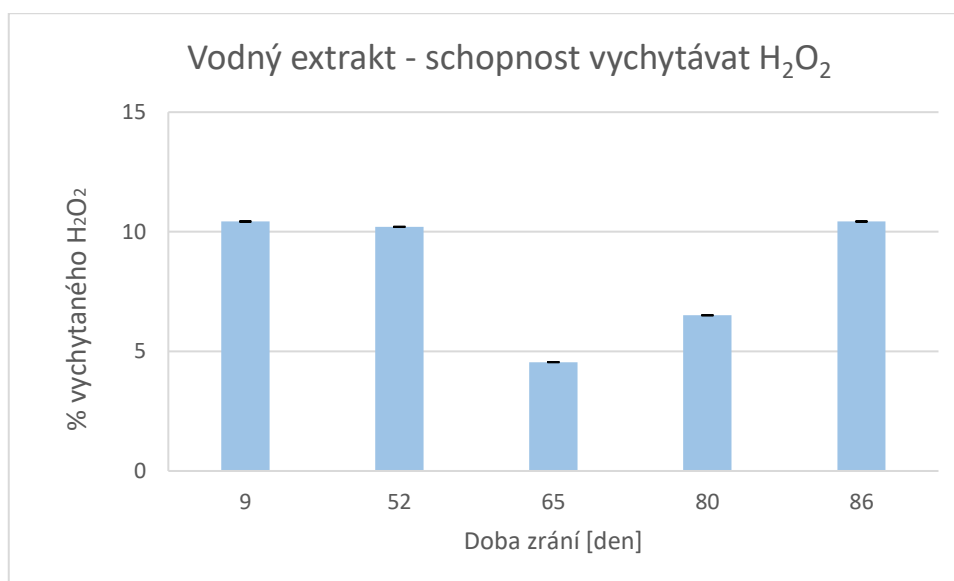
v jednotkách Trolox [ $\mu\text{g Trolox/ml}$ ] na době zrání je znázorněna na obrázku 12. Aktivita methanolového roztoku se pohybovala v intervalu od 1,6 do 4,4  $\mu\text{g/ml}$ .

Rozdílné výsledky mezi extrakty mohou být způsobeny rozdílnou rozpustností peptidů ve vodném a methanolovém roztoku. A také rozdílnou interakcí vodného a methanolového extraktu (50 %, v/v) s činidlem DPPH. Článek napsaný Floegel A. (27), který řeší problematiku této metody, používá methanolový extrakt (50 %, v/v) v kombinaci s tímto činidlem.

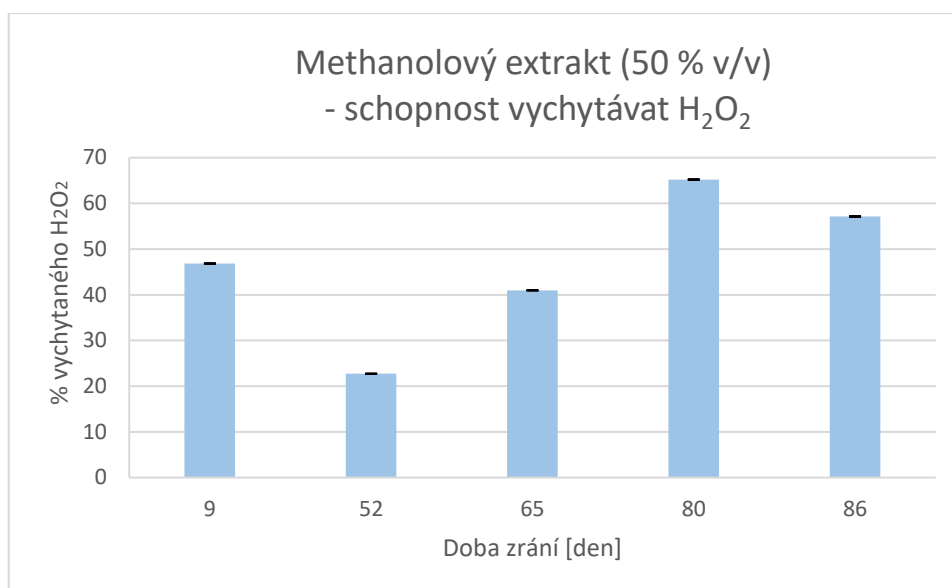
Získané výsledky metodou DPPH jsou odlišné od výsledků práce Gupta P. (28), který provedl rozbor sýru čedar a v pozorovaném období (9 až 86 dní zrání sýra) zjistil nárůst antioxidační aktivity.

#### 4.2 Stanovení schopnosti antioxidantu vychytávat peroxid vodíku

Při stanovení schopnosti extraktů vychytávat  $\text{H}_2\text{O}_2$  vodné extrakty vykazovaly jen mírné rozdíly. Touto metodou nelze stanovit obsah antioxidačních peptidů, jejichž obsah narůstá v průběhu zrání.



Obrázek 13: Stanovení schopnosti vodných extraktů sýrů gouda vychytávat  $\text{H}_2\text{O}_2$

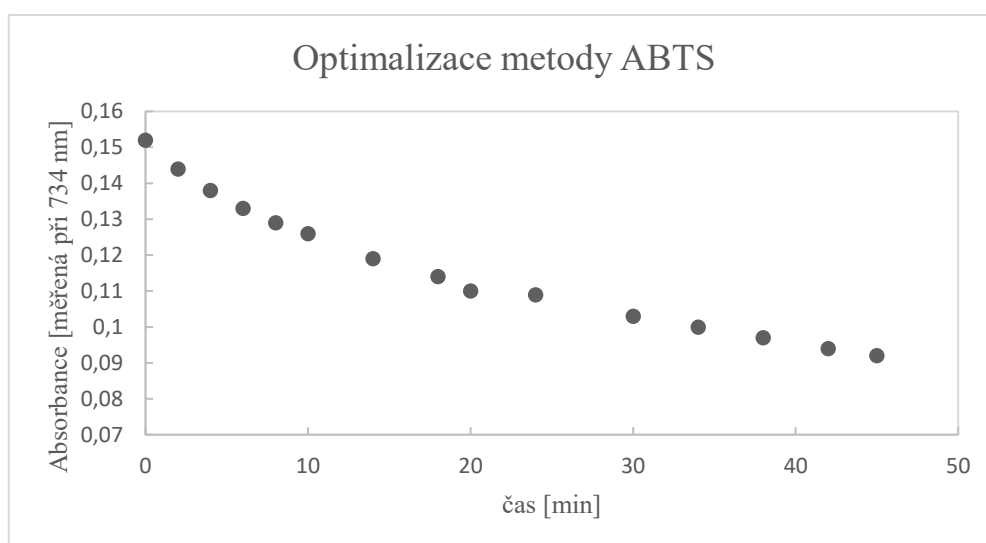


Obrázek 14: Stanovení schopnosti methanolových extraktů (50 %, v/v) sýrů gouda vychytávat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

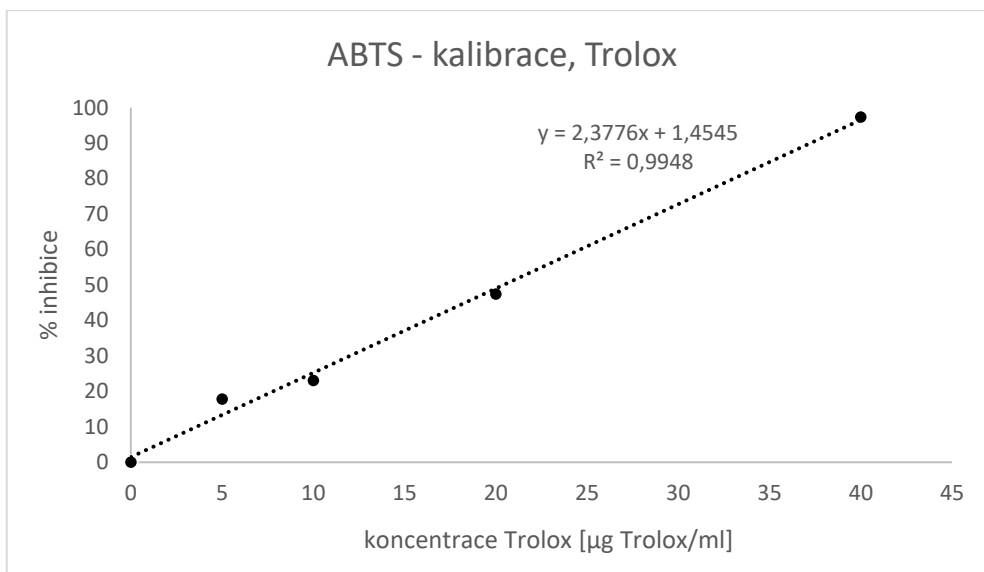
Procenta vychytaného H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vodným extraktem sýru gouda se pohybovaly od 4,5 do 10,4 % vychytaného H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [Obrázek 13]. Při rozboru methanolových extraktů (50 %, v/v) byl po smíchání extraktů s činidlem pozorovaný zákal, který způsobil vyšší absorpci a tím i vyšší výsledky % vychytaného H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. [Obrázek 14].

### 4.3 Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS

Z grafu závislosti absorbance vzorku na reakční době [Obrázek 15] byl vyhodnocena reakční doba 20 minut jako optimální pro měření. Po této době byla změna absorbance malá. Pro optimalizaci byl použit vodný extrakt sýru zrajícího 9 dní. Tyto podmínky byly zvoleny pro analýzu veškerých extraktů a k sestavení kalibrační křivky.

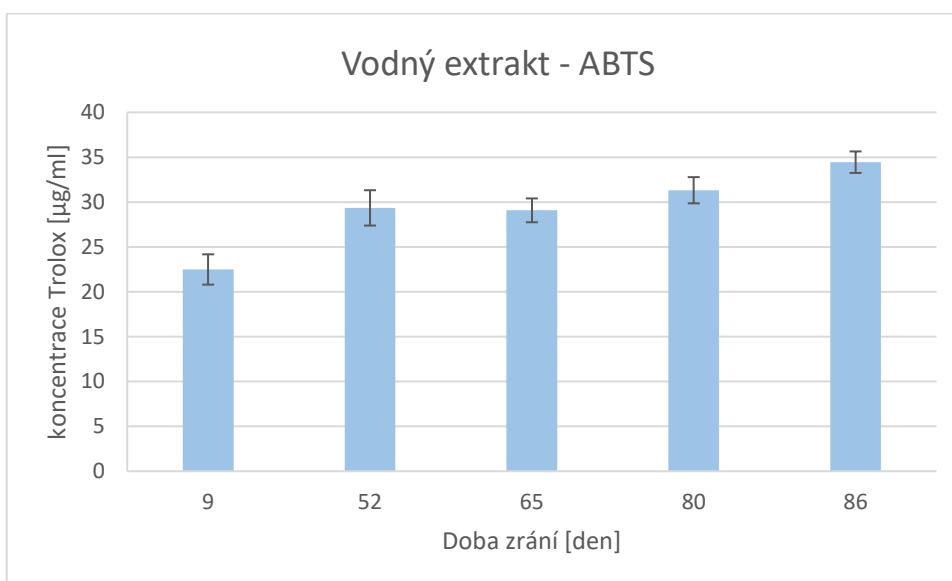


Obrázek 15: Optimalizace metody ABTS při vlnové délce 734 nm



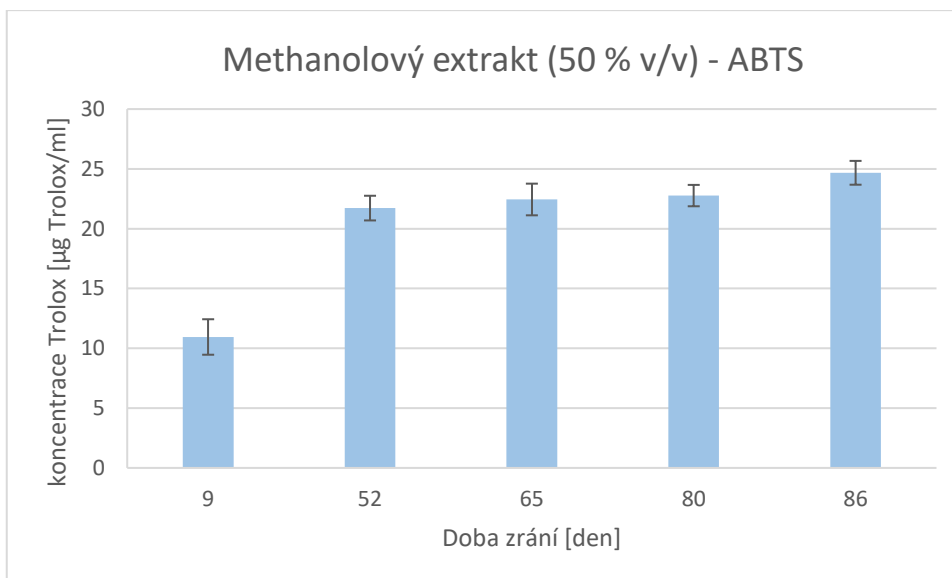
Obrázek 16: Kalibrační křivka Troloxu (ABTS)

Pro porovnání aktivit extraktů byly hodnoty vyjádřeny jako ekvivalentní množství Troloxu. Proto byly inhibice převedeny na odpovídající množství  $\mu\text{g Trolox}$  na 1 ml extraktu. Kalibrační křivka byla sestavena pomocí pěti kalibračních bodů v rozmezí koncentrací 0,1 až 40  $\mu\text{g/ml}$  [Obrázek 16], každý bod kalibrace byl změřen 3x. Analýza extraktů byla opakována 3x.



Obrázek 17: Antioxidační kapacita (ABTS) vodných extraktů sýrů gouda





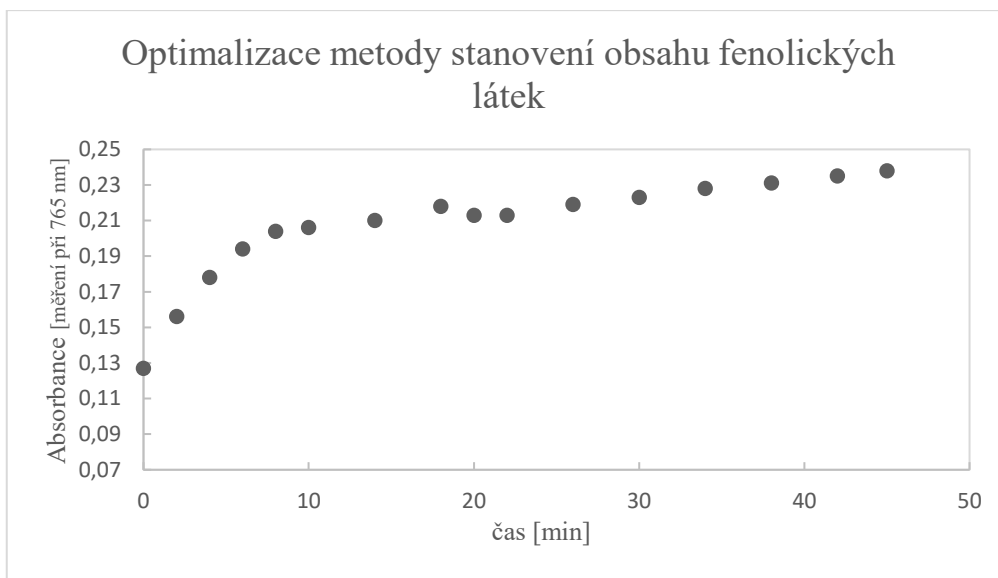
Obrázek 18: Antioxidační kapacita (ABTS) methanolvých extrakt (50 %, v/v) sýrů gouda

Vodné i methanolvé extrakty (50 %, v/v) vykazovaly při měření metodou ABTS vykazovaly nárůst antioxidační aktivity mezi jednotlivými extrakty. Závislost antioxidační aktivity vodného extraktu vyjádřené v jednotkách Trolox [ $\mu\text{g Trolox/ml}$ ] na době zrání je znázorněna na obrázku 17. Aktivita vodného extraktu se pohybovala v intervalu od 24,7 do 35,4  $\mu\text{g/ml}$ . Závislost antioxidační aktivity methanolvého extraktu (50 %, v/v) vyjádřené v jednotkách Trolox [ $\mu\text{g Trolox/ml}$ ] na době zrání je znázorněna na obrázku 18. Aktivita methanolvého extraktu (50 %, v/v) se pohybovala v intervalu od 14,3 do 26,6  $\mu\text{g/ml}$ .

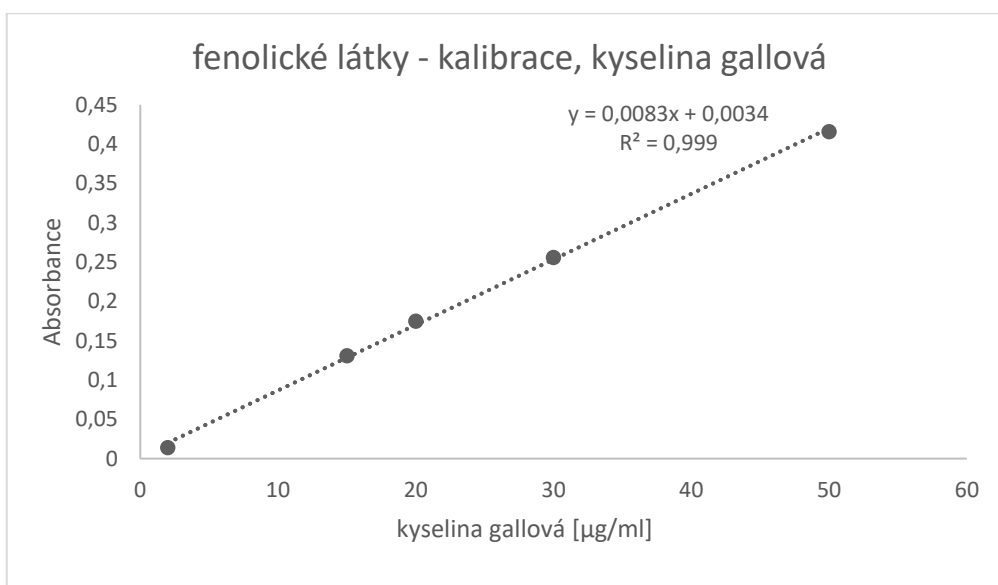
Rozdílné výsledky mezi extrakty mohou být způsobeny rozdílnou rozpustností peptidů ve Článek napsaný Floegel A. (27), který řeší problematiku této metody, používá vodný extrakt v kombinaci s tímto činidlem. Získané výsledky, stejně jako výsledky práce Gupta P. (28), který provedl rozbor sýru čedar, potvrdily nárůst antioxidační aktivity metodou ABTS v pozorovaném období 9-86 dnů zrání.

#### 4.4 Stanovení celkového obsahu fenolických látek

Z grafu závislosti [Obrázek 19] absorbance vzorku na reakční době [Obrázek 15] byla vyhodnocena reakční doba 20 minut jako optimální pro měření. Po této době byla změna absorbance malá. Pro optimalizaci byl použit vodný extrakt sýru zrajícího 52 dní. Tyto podmínky byly zvoleny pro analýzu veškerých extraktů a k sestavení kalibrační křivky.

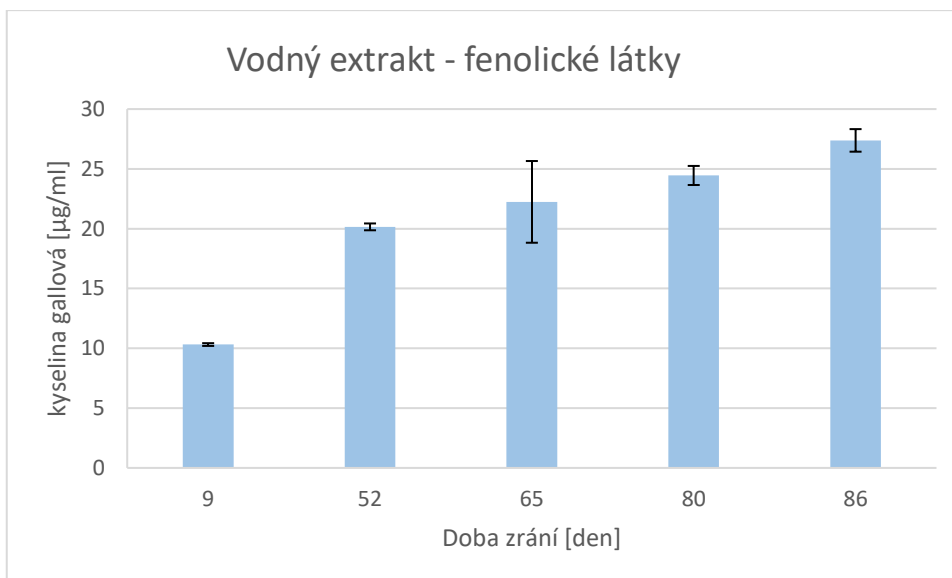


Obrázek 19: Optimalizace stanovení obsahu fenolických látek při vlnové délce 765 nm

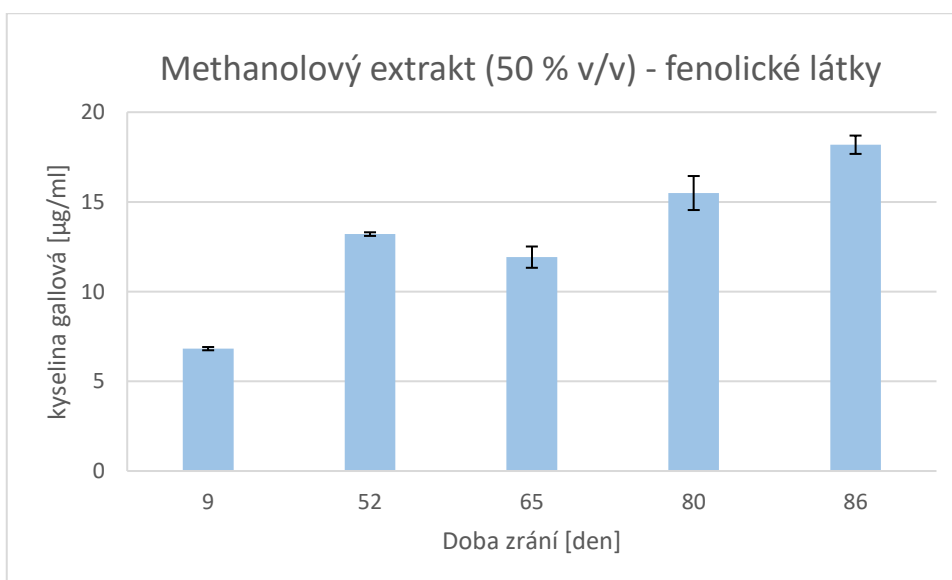


Obrázek 20: Fenolické látky – kalibrace, kyselina gallová

Pro porovnání celkového obsahu fenolických látek byly hodnoty vyjádřeny jako ekvivalentní množství kyseliny gallové. Absorbance byly převedeny na odpovídající množství µg kyseliny gallové na 1 ml extraktu. Kalibrační křivka byla sestavena pomocí pěti kalibračních bodů v rozmezí koncentrací 2 až 60 µg/ml, [Obrázek 20] každý bod kalibrace byl změřen 3x. Analýza extraktů byla opakována 3x.



Obrázek 21: Obsah fenolických látek ve vodných extraktech sýrů gouda



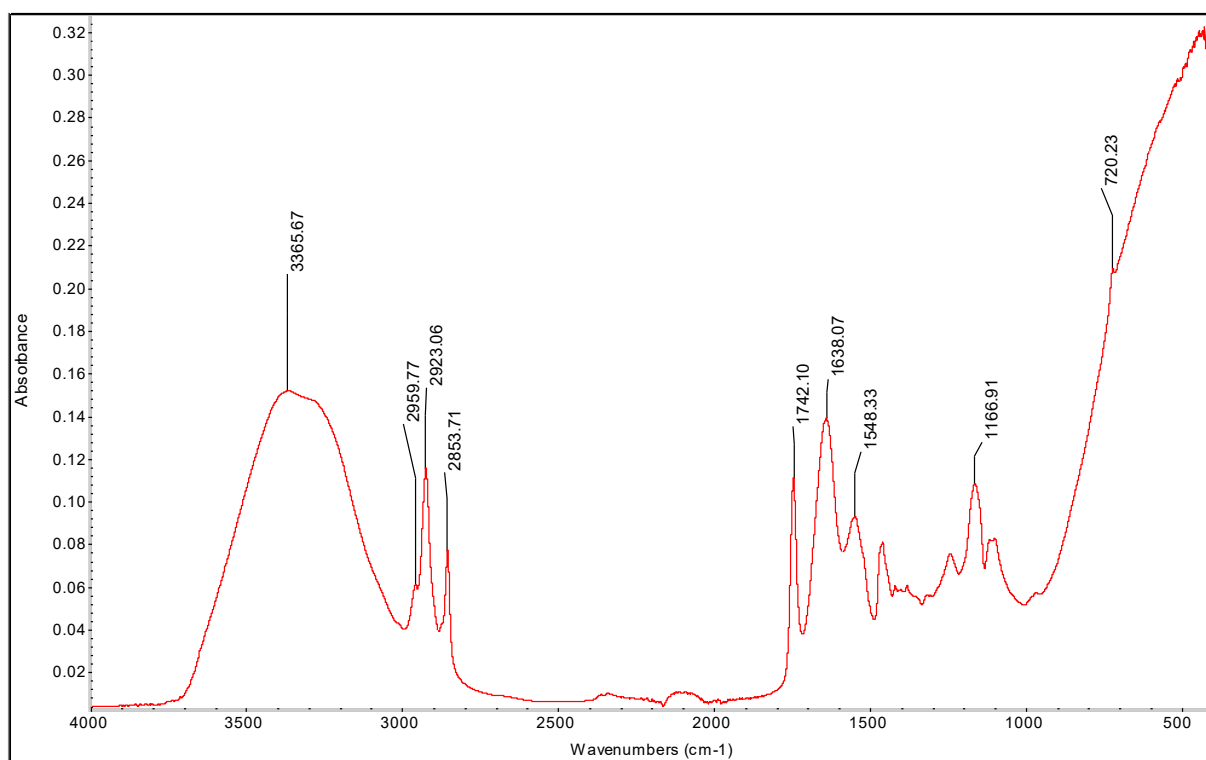
Obrázek 22: Obsah fenolických látek v methanolvých extraktech (50 %, v/v) sýrů gouda

Vodné i methanolvé extrakty (50 %, v/v) vykazovaly nárůst obsahu fenolických látek mezi jednotlivými extrakty. Závislost obsahu fenolických látek vyjádřeného jako množství kyseliny gallové [µg kyseliny gallové/ml] na době zrání je znázorněna na obrázku 21. Obsah fenolických látek ve vodném extraktu se pohyboval v rozmezí 10,2 do 20,0 µg/ml. Závislost antioxidační aktivity methanolvého extraktu (50 %, v/v) vyjádřeného jako množství kyseliny gallové [µg kyseliny gallové/ml] na době zrání je znázorněna na obrázku 22. Obsah fenolických látek v methanolvém extraktu (50 %, v/v) se pohybovala v intervalu od 6,8 do 18,1 µg/ml.

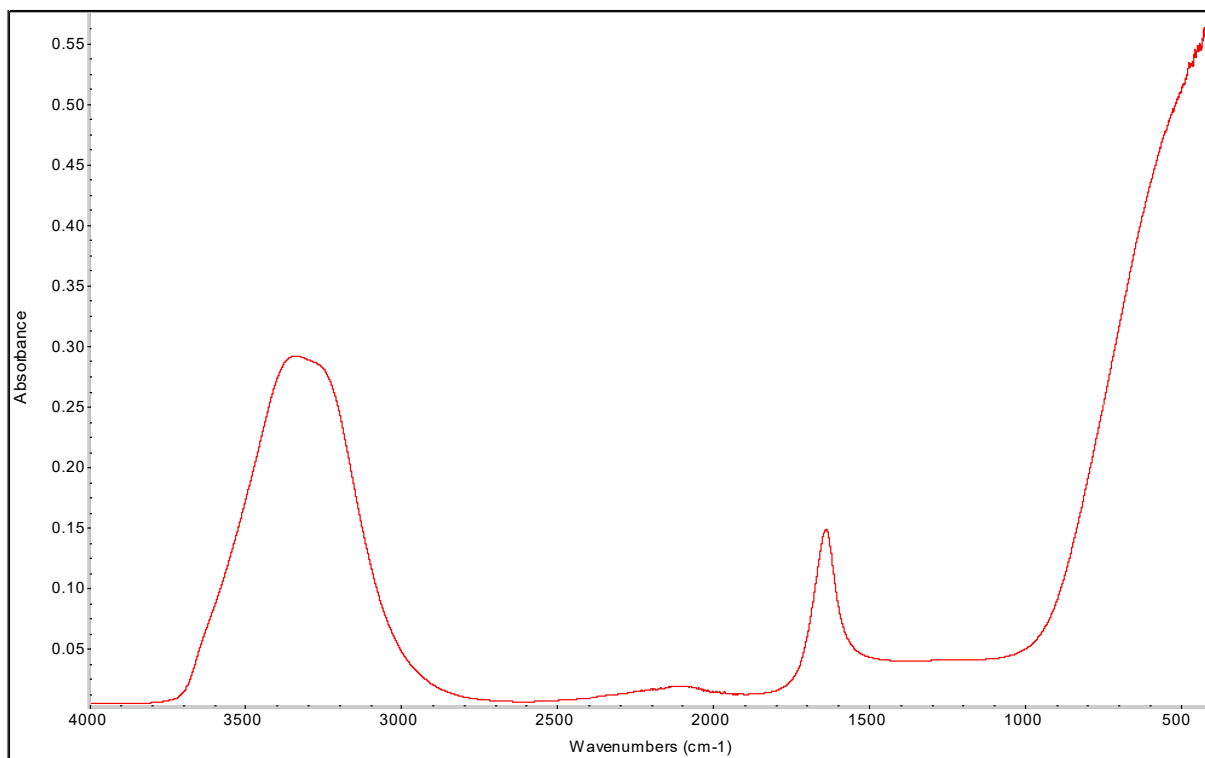
Obsah fenolických látek v mléce a mléčných výrobcích může být rozdílný z důvodu rozdílného složení krmiva dojnic, ale nepředpokládá se jejich nárůst jejich obsahu v průběhu zrání sýra. Získané výsledky jsou pravděpodobně ovlivněny nefenolickými redukčními látkami, jejich příklady jsou redukční cukry a některé aminokyseliny. Rozdílné výsledky mezi extrakty mohou být způsobeny rozdílnou extrakcí fenolických látek do vodného a methanolového roztoku, nebo také rozdílnou reakcí s Folin-Cicalteuovým činidlem.

## 4.5 IČ spektrometrie

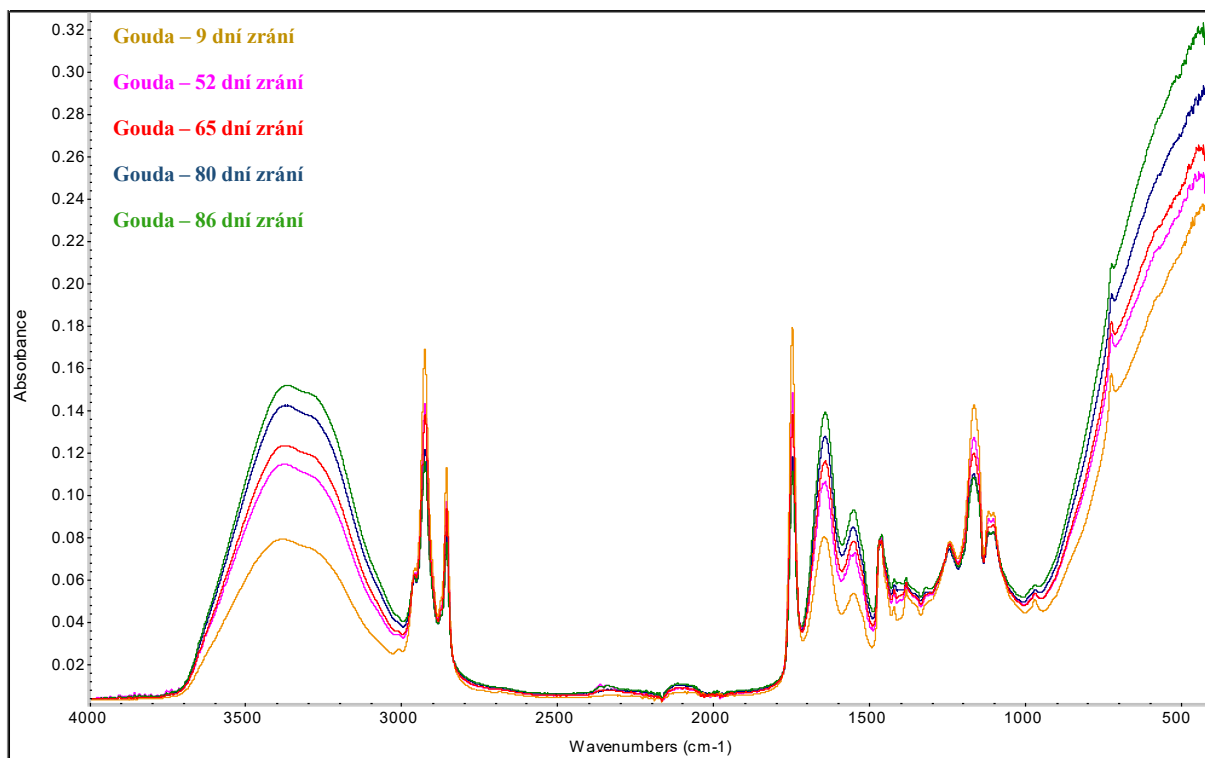
Bylo zaznamenáno spektrum sýra zrajícího 86 dní a byly označeny vlnové délky charakteristických absorpčních pásů [Obrázek 23]. Bylo zaznamenáno IČ spektrum vody [Obrázek 24]. Nakonec byly zaznamenány spektra sýrů zrajících 9, 52, 65, 80 a 86 dní, tyto spektra byly zaznamenány do jednoho grafu [Obrázek 25].



Obrázek 23: IČ spektrum vzorku sýra gouda po 86 dnech zrání



Obrázek 24: IČ spektrum vody



Obrázek 25: IČ spektrum vzorků sýru gouda v různém stupni zralosti

Tabulka 6: Vlnočty sledovaných oblastí IČ spektra (29)

Sledovaná oblast	Vlnočet [ $\text{cm}^{-1}$ ]
Amidová oblast II	1570-1535
Amidová oblast I	1690-1620
CH <sub>2</sub>	2920
CH <sub>3</sub>	2954
Peptidy rozpustné ve vodě	1700-1330

Byla sledována proteolýza v průběhu zrání sýra. Výrazné změny byly pozorovány v amidové oblasti I ( $1570\text{-}1535\text{ cm}^{-1}$ ) a amidové oblasti II ( $1690\text{-}1620\text{ cm}^{-1}$ ), kde byl pozorován nárůst intenzity absorpčního pásu.

Absorpční pás v amidové oblasti I odpovídá změnám kaseinové struktury a proteinové agregace. Naopak u absorpčních pásů u funkčních skupin CH<sub>3</sub> ( $2954\text{ cm}^{-1}$ ) a CH<sub>2</sub> ( $2920\text{ cm}^{-1}$ ) byl pozorován pokles absorpčních pásů.

## 5 Závěr

Úkolem bakalářské práce bylo u vodných extraktů a methanolových extraktů (50% v/v) vzorků sýru gouda stanovit antioxidační kapacitu, celkový obsah fenolických látek a stanovit schopnost extraktu vychytávat  $H_2O_2$ . Získané výsledky porovnat s dobou zrání původního vzorku a zhodnotit jejich průběh.

Sýry *Kromík minigouda* (výrobce Kromilk a.s., Česká republika) byly použity pro analýzu antioxidačních vlastností. Jde o přírodní polotvrdé sýry typu gouda. Bylo použito pět vzorků sýrů, které zrály 9, 52, 65, 80 a 86 dní. Extrakty byly připraveny navážením 1 g nejmenno nastrouhaného vzorku sýra do 10 ml destilované vody (vodné extrakty), také do 10 ml 50% methanolu (methanolové extrakty 50% v/v). Extrakce byla provedena v ultrazvuku. Extrakty byly dále upraveny odstředěním.

Byla provedena analýza obsahu fenolických látek, kdy vodné i methanolové extrakty (50 %, v/v) vykazovaly nárůst obsahu fenolických látek mezi jednotlivými extrakty lišícími se délkou zrání původního vzorku. Pro porovnání celkového obsahu fenolických látek byly hodnoty vyjádřeny jako ekvivalentní množství kyseliny gallové.

Byla provedena analýza antioxidační kapacity extraktů sýrů. Vodné i methanolové extrakty (50 %, v/v) vykazovaly při měření metodou DPPH nízké hodnoty antioxidační aktivity, která se v průběhu zrání jen mírně měnila a dosahovala nízkých hodnot. Při měření metodou ABTS vodné i methanolové extrakty (50 %, v/v) vykazovaly nárůst antioxidační aktivity mezi jednotlivými extrakty. Pro porovnání aktivit extraktů byly u obou metod hodnoty vyjádřeny jako ekvivalentní množství Troloxu.

Při stanovení schopnosti extraktů vychytávat  $H_2O_2$  vodné extrakty vykazovaly jen mírné rozdíly. Touto metodou nelze stanovit antioxidační působení peptidů, jejichž obsah se v průběhu zrání výrazně liší. Rozdílné výsledky mezi extrakty mohou být způsobeny rozdílnou extrakcí látek do vodného a methanolového roztoku, nebo také rozdílnou reakcí s použitými činidly.

V poslední části práce byly proměřeny vzorky sýrů gouda pomocí IČ, kdy byly porovnávány absorpční pásy jednotlivých vzorků. Byly pozorovány proteolytické změny v průběhu zrání sýrů.

## 6 Seznam literatury

1. PAULOVÁ, H., BOCHOŘÍKOVÁ, H., TÁBORSKÁ, E. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy*. 98, 2004, Sv. 4, 174-179 s.
2. GRAZYNA, C., HANNA, C., AMBROZIAK, A. Natural antioxidants in milk and dairy products. *International Journal of Dairy Technology*. 70, 2017, Sv. 2, 166-174 s.
3. ČESKO. Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 397/2016 Sb., o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražení krémy a jedlé tuky a oleje.
4. KADLEC, P., MELZOCH, K., VOLDŘICH, M. *Přehled tradičních potravinářských výrob: technologie potravin*. Ostrava : Key Publishing, 2012. 279-289 s., ISBN 978-80-7418-145-0.
5. SLUKOVÁ, M. *Výroba potravin a nutriční hodnota*. Praha : VŠCHT Praha, 2016. 145 - 147 s. ISBN 978-80-7080-947-1.
6. WEIMER, B. *Improving the flavour of cheese*. Cambridge : CRC Press, 2007. 6 s., ISBN 978-1-84569-305-3.
7. ROBINSON, K. R., RICHARD, K. *Encyklopedia of Food Microbiology*. London : Academic press, 2000. Sv. 2. 382 s. ISBN 0-12-227070-3.
8. BUŇKA, F., PACHLOVÁ, V. *Mlékárenská technologie I*. Zlín : Univezita Tomáše Bati ve Zlín, 2013. 57.58 s., ISBN 978-80-7454-254-1.
9. MSAGATI, A., TITUS A.M. *Chemistry of Food Additives and Preservation*. Oxford : Wiley-Blackwell, 2013. 1-2, 15-18 s., ISBN 978-1-118-27414-9.
10. VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J. *Chemie potravin I, 3. vydání*. Tábor : Osis, 2009. 158-160, 183-184 s. ,ISBN 978-80-86659-15-2.
11. SHAHIDI, F. *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*. Cambridge : Elsevier, 2015. 1,2,134,262,304 s., ISBN: 978-1-7842-097-2.
12. G, GIBBSON. *Food science and Technology Bulletin - Functional Food*. Reading : IFIS, 2009. 61 s.,ISBN 978-0-86014-189-1.
13. YOLDIZ, F. *Advances in food biochemistry*. Boca Raron : CRC Press, 2010. 384-387 s., ISBN 978-0-8493-7499-9.



14. DECKER, E. *Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications*. Cambridge : Woodhead Publishing Limited, 2010. 251, 277 s., ISBN 9787-0-85709-044-7.
15. REVILLA, I. GONZÁLES-MARTIN, M.I., BLANCO-LOPÉZ, M.A. Antioxidant capacity of different cheeses: Affecting factors and prediction by near infrared spectroscopy. *Journal of Dairy Science*. 99, 2016, Sv. 7, 5074, ISSN: 0022-0302.
16. HERNANDEZ, M., KAMAL-ELDIN, A. *Processing and Nutrition of Fats and Oils*. OXFORD : John Wiley & Sons, 2013. 166 s., ISBN 978-0-8138-2767.
17. GUTIERREZ, M. BOYLSTON, T.D., CLARK, S. Effects of Pro-Oxidants and Antioxidants on the Total Antioxidant Capacity and Lipid Oxidation Products of Milk During Refrigerated Storage. *Journal of Food Science*. 83, 2018, Sv. 2, 275-283 s.
18. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=5282800, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5282800> [cit. 5.5. 2018].
19. KUMAR, V., SHARMA, V. Effect of ripening on total conjugated linoleic acid and its isomer in buffalo Cheddar cheese. *International Journal of Dairy Technology*. 59, 2006, Sv. 4, 1021-1026 s.
20. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=14985, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/14985> [cit 6.5. 2018].
21. VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J. *Chemie potravin 2*. Tábor : Osis, 1999. ISBN 80-902391-5-2.
22. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=5280489, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280489> [cit 5.5. 2018].
23. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=5280795, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280795> [cit 4.5. 2018].
24. SHANMUGAM, P., KAPILA, S., SONFACK, T., KAPILA, R. Antioxidative peptide derived from enzymatic digestion of buffalo casein. *International Dairy Journal*. 2015, Sv. 42, 1-5 s. .
25. MUKHOPADHYAY, D., DAGUPTA, P., PALCHOUDHURI, S. CHATTERJEE, I. A Sensitive In vitro Spectrophotometric Hydrogen Peroxide Scavenging Assay using 1,10-Phenanthroline. *Free Radicals and Antioxidants*. 6, 2016, Sv. 1, 124-132 s.

26. V., KRÁL. *Analytická chemie (2. díl)*. Praha : VŠCHT, 2016. 97 s.,  
ISBN 978-80-7080-951-8.
27. FLOEGEL, A., KIM, D., CHUNG, S.J. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in poplar. *Journal of Food Composition and Analysis*. 24, 2011, Sv. 7, 1043-1048 s.
28. GUPTA, A., MANN, B., KUMAR, R. Antioxidant activity of Cheddar cheeses at different stages of ripening. *Dairy Chemistry Division*. 62, 2009, Sv. 3, 339-344s.
29. MARTIN, S.T., E. PICQUEU, R. COSINO-RAMINEA a G. CORRIEU. Middle infrared spectroscopy characterization of ripening stages of Camembert-type cheeses. *International Dairy Journal*. 17, 2017, Sv. 7, 835-845 s.
30. PREEDY, V. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. Londýn : Elsevier, 2010. 627 s., ISBN: 978-0-12-374420-3.