



EVROPSKÁ UNIE  
Evropské strukturální a investiční fondy  
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



# Úvod do biotechnologií

---

*Mgr. Martina Bučková, Ph.D.*  
*Ing. Jana Šenkýřová, Ph.D.*

*„Tento výstup lze užít v souladu s licenčními podmínkami Creative Commons BY 4.0 International  
(<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode>).“*



## Obsah

<b>Obsah</b>	<b>2</b>
<b>Úvod</b>	<b>4</b>
<b>1 Seznámení s chromatografií</b>	<b>5</b>
1.1 Papírová chromatografie práškových potravinářských barviv	6
1.1.1 Materiál a pomůcky	6
1.1.2 Pracovní postup	7
1.1.3 Vyhodnocení experimentu	7
1.2 Papírová chromatografie barviv v polevách cukrovinek	9
1.2.1 Materiál a pomůcky	9
1.2.2 Pracovní postup	9
1.2.3 Vyhodnocení experimentu	10
1.3 Papírová chromatografie barviv přirozeně obsažených v zelenině	10
1.3.1 Materiál a pomůcky	11
1.3.2 Pracovní postup	11
1.3.3 Vyhodnocení experimentu	11
1.4 Papírová chromatografie barevných popisovačů	12
1.4.1 Materiál a pomůcky	12
1.4.2 Pracovní postup	13
1.4.3 Vyhodnocení experimentu	14
1.5 Odhalení dobarvování nápoje syntetickým barvivem	15
1.5.1 Materiál a pomůcky	15
1.5.2 Pracovní postup	15
1.5.3 Vyhodnocení experimentu	15
1.6 Kontrolní otázky a úkoly	16
<b>2 Mléko je kouzelná potravina</b>	<b>17</b>
2.1 Zjištění hustoty neznámých vzorků mléka	17
2.1.1 Materiál a pomůcky	18
2.1.2 Pracovní postup	18
2.1.3 Vyhodnocení experimentu	19
2.2 Hodnocení složení mléka pomocí automatického analyzátoru	20
2.2.1 Materiál a pomůcky	20
2.2.2 Pracovní postup	20
2.2.3 Vyhodnocení experimentu	21
2.3 Vliv kyselosti mléka na jeho termostabilitu	22
2.3.1 Stanovení aktivní kyselosti mléka	22
2.3.2 Stanovení kyselosti mléka alizarolem	24
2.4 Stanovení alkoholové stability mléka	26
2.4.1 Alkoholový test	26
2.4.2 Alkoholové číslo	28
2.5 Povrchové napětí mléka	29
2.5.1 Materiál a pomůcky	29
2.5.2 Pracovní postup	29
2.5.3 Vyhodnocení experimentu	30
2.6 Izolace kaseinu z mléka	30
2.6.1 Materiál a pomůcky	31
2.6.2 Pracovní postup	31
2.6.3 Vyhodnocení experimentu	32
<b>3 Kvasinky</b>	<b>33</b>
3.1 Jak vypadá kvásek pod mikroskopem	33

3.1.1	<i>Materiál a pomůcky</i> .....	33
3.1.2	<i>Pracovní postup</i> .....	33
3.1.3	<i>Vyhodnocení experimentu</i> .....	36
3.2	Osmotické jevy u kvasinek.....	36
3.2.1	<i>Materiál a pomůcky</i> .....	36
3.2.2	<i>Pracovní postup</i> .....	37
3.2.3	<i>Vyhodnocení experimentu</i> .....	37
3.3	Vitální test kvasinek.....	38
3.3.1	<i>Materiál a pomůcky</i> .....	38
3.3.2	<i>Pracovní postup</i> .....	38
3.3.3	<i>Vyhodnocení experimentu</i> .....	39
3.4	Teplotní optimum pro různá kypřidla .....	40
3.4.1	<i>Materiál a pomůcky</i> .....	40
3.4.2	<i>Pracovní postup</i> .....	41
3.4.3	<i>Vyhodnocení experimentu</i> .....	42
<b>Literatura</b> .....		<b>43</b>
<b>Symboly a zkratky</b> .....		<b>45</b>
<b>Seznam obrázků</b> .....		<b>46</b>
<b>Seznam tabulek</b> .....		<b>47</b>

## Úvod

Laboratorní cvičení v předmětu Úvod do biotechnologií rozšiřuje učivo probírané na přednáškách a seminářích. Na jednoduchých experimentech jsou studenti seznámeni se základními ději a principy, které jsou součástí biotechnologických procesů, nebo se jedná o metody, které jsou používány jako kontrolní prvky při analýze vstupních surovin, kontrolu tvorby meziproduktů a izolaci produktů celého procesu.

Jednotlivé úlohy obsahují vždy jednoduchý úvod do problematiky, popis postupu a návrh vyhodnocení experimentu. Závěr každé kapitoly tvoří několik doplňujících otázek, jejichž cílem je si zopakovat a upevnit některé důležité pojmy a souvislosti. Hlavním záměrem tohoto cvičení je nejenom nahlédnout pod pokličku biotechnologických procesů a odpovědět si na otázky s tím související, ale také diskuze dané problematiky a nalezení otázek nových, na které pak budou studenti nacházet odpovědi průběžně v dalších předmětech vyšších ročníků studia.

## 1 Seznámení s chromatografií

Chromatografické metody jsou techniky, které jsou nedílnou součástí biotechnologických systémů, kde jsou používány zejména v počátečních fázích pro kontrolu vstupních surovin a pro izolaci a purifikaci produktů ve finálních fázích technologického procesu.

Principem chromatografické separace je rozdělení složek testovaného vzorku mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze, tzv. stacionární a mobilní fázi. Podle typu stacionární nebo mobilní fáze je pak chromatografie označovaná, např. plynová chromatografie, papírová chromatografie, tenkovrstvá chromatografie apod. Stacionární fáze je nepohyblivá část chromatografické aparatury a může to být sloupec gelu, papír nebo tenká vrstva silikagelu. Geometrické uspořádání stacionární fáze může být buď plošné (dvourozměrné) nebo v podobě kolon. Tato stacionární fáze je omývána mobilní fází, která unáší separované složky a může se jednat o kapaliny nebo plyn. Rychlost pohybu analytu tímto systémem je dána jeho afinitou ke stacionární a mobilní fázi. Čím vyšší afinitu má analyt ke stacionární fázi, tím je jeho pohyb chromatografickou kolonou pomalejší. A naopak, čím má vyšší afinitu k mobilní fázi, tím putuje rychleji. (Kadlec et al., 2013)

Objev chromatografických metod je přisuzován ruskému botanikovi M. S. Cvětovi, který v roce 1903 provedl dělení listových barviv na sloupci uhličitanu vápenatého, kdy mobilní fází byla směs organických rozpouštědel. Od té doby bylo navrženo a je používáno mnoho různých chromatografických uspořádání, ze kterých lze zmínit např. plynovou chromatografii, kapalinovou chromatografii, iontově-výměnnou nebo gelovou permeační chromatografii, a která jsou vybírána podle povahy sledovaného analytu v testovaném vzorku.

V současnosti mají chromatografické techniky klíčovou pozici při kvalitativním i kvantitativním určování cílových analytů nejen v klasické analytické chemii, ale také v celé řadě tradičních i moderních vědních disciplín a průmyslových aplikací, včetně analýzy složek životního prostředí, farmaceutických a biomedicínských aplikací a také v potravinářství. (Sobotníková et al., 2010)

Využití chromatografie pro potravinářské aplikace zahrnuje celou řadu analytů v rozličných potravinářských maticích. Ať už se jedná o základní složky potravin a jejich stavební jednotky, jako jsou např. bílkoviny a jednotlivé aminokyseliny, nebo lipidické části a jednotlivé typy mastných kyselin, ale také stanovení vitaminů, umělých sladidel, konzervačních látek, aromat, barviv, polyfenolických sloučenin a dalších složek potravin a nápojů, které je nutné sledovat a vyhodnocovat pro optimální sestavení potravinářských výrobků, nebo také pro stanovení kontaminantů, které jsou z pohledu bezpečnosti potravin a nápojů ve výrobcích nežádoucí.

Mezi základní plošné chromatografické uspořádání patří papírová a tenkovrstvá chromatografie. Ačkoliv je dnes papírová chromatografie často nahrazována

chromatografií na tenké vrstvě, pro základní seznámení s principem chromatografické separace bude v laboratorních úlohách použita papírová chromatografie. Na chromatogramu je vyhodnocována vzdálenost od startu, kterou jednotlivé analyty urazí ve srovnání se vzdáleností, kterou během stejného času urazí samotná mobilní fáze. Linii, kam doputuje v daném čase mobilní fáze, říkáme čelo mobilní fáze. Pro číselné vyjádření se používá tzv. retenční faktor  $R_f$ , který je definován jako poměr dráhy uražené analytem a dráhy uražené čelem mobilní fáze. (Štulík et al., 2005)

### 1.1 Papírová chromatografie práškových potravinářských barviv

Barevnost výrobku je často jedním z hlavních kritérií, které hrají roli při výběru výrobku zákazníkem. Potravinářská barviva jsou do potravin a nápojů přidávána z důvodu dosažení požadované barvy a také sytosti barvy, která mohla být vlivem technologického zpracování či skladování surovin pozměněna, příp. je žádoucí připravit výrobek v různých barevných variantách. Barviva přidávaná do potravin označujeme jako potravinářské přídatné látky (běžně se používá označení potravinářská aditiva). Tyto látky jsou označovány E-kódy a jejich použití ve výrobě potravin upravuje příslušná legislativa (Nařízení Evropského parlamentu a rady č. 1333/2008 o potravinářských přídatných látkách. 2008). Může se jednat o látky přírodního nebo syntetického původu a pro dosažení výsledného barevného odstínu výrobku jsou často vzájemně kombinovány. Pomocí papírové chromatografie je možné od sebe oddělit jednotlivé složky tvořící výsledný barevný efekt.

V první úloze si vyzkoušíte chování potravinářských barev na chromatografickém papíře a možnost odhalení jednotlivých složek v případě vícesložkových barev pomocí jednoduché chromatografické sestavy. Výsledný chromatogram se pokusíte vyhodnotit pomocí retenčního faktoru.

#### 1.1.1 Materiál a pomůcky

- vzorky potravinářských barviv v prášku (žlutá, červená, modrá a zelená),
- vzorky barev v kádinkách A-D (A – fialová, B – oranžová, C – zelená, D – hnědá),
- 5% vodný roztok NaCl,
- destilovaná voda,
- arch filtračního papíru,
- kapátko/pipeta,
- 4x malá kádinka 25 ml pro rozpuštění práškových barev,
- 2x velká kádinka 600 ml s hodinovým sklem na přikrytí,
- tužka, pravítko, nůžky, kancelářská sešívačka.

### 1.1.2 Pracovní postup

- a) Z archu filtračního papíru si vystříhnete dva obdélníky tak velké, aby bylo možné každý z nich po stočení do ruličky postavit do velké kádinky a přikrýt hodinovým sklem (cca 30x15 cm). Vhodnost velikosti obdélníků ověřte vložením do prázdných 600 ml kádinek. Podél delší strany obdélníků narýsujte tužkou startovní čáru přibližně 2 cm od spodního okraje.
- b) Do malých kádinek si připravte roztoky práškových potravinářských barev – žlutou, červenou, modrou a zelenou (špetku barevného prášku rozpustíte v cca 1-2 ml destilované vody). Pomocí kapátka naneste malou kapku každé barvy na startovní linii ve vzdálenosti cca 1 cm od sebe tak, aby se skvrny vzájemně nepromísily. Dále naneste malou kapku již připravených barev v kádinkách A, B, C a D (barvy fialová, oranžová, zelená, a hnědá). Přesně totéž proveďte s druhým obdélníkem filtračního papíru. Barevné skvrny nechte zaschnout volně na vzduchu a tužkou si na papíry poznačte, kam jste umístili vzorky A-D.
- c) Do jedné velké kádinky nalejte destilovanou vodu tak, aby hladina dosahovala cca 1 cm ode dna. Jeden chromatografický papír stočte a sešijte na obou stranách tak, aby vznikla rulička, kterou můžete postavit do kádinky. Je důležité, aby se papír nikde nedotýkal stěn kádinky, a aby hladina kapaliny v nádobce nedosahovala k barevným skvrnám na startovní linii, protože by došlo k rozpuštění barevných skvrn do mobilní fáze a následnému rozmytí rozpuštěných barev po celém chromatogramu.
- d) Do druhé kádinky nalejte 5% vodný roztok NaCl a obdobným způsobem vložte druhý filtrační papír s nanesenými vzorky.
- e) Obě kádinky přikryjte hodinovým sklem a nechte vyvíjet chromatogram. Pozorujte, jak mobilní fáze vzlíná chromatografickým papírem a unáší s sebou barevné skvrny, které začnou putovat od startovní linie ve směru pohybu mobilní fáze.
- f) Jakmile čelo mobilní fáze doputuje cca 2 cm od horního okraje filtračního papíru, pokus ukončete. Chromatogram z kádinky vyjměte, opatrně ruličku rozviňte a tužkou si zaznačte čelo mobilní fáze. Ponechte na vzduchu uschnout.

### 1.1.3 Vyhodnocení experimentu

1. Pohledem zhodnoťte kvalitu jednotlivých skvrn a vyberte mobilní fázi, která bude pro vyhodnocení chromatogramu vhodnější. Zvolte takový chromatogram, kde je možné stanovit střed skvrny.
2. Na vybraném chromatogramu vyhodnoťte retenční faktory všech jednosložkových barev a запиšte do tabulky 1. Retenční faktor ( $R_f$ ) vypočítejte tak, že pravítkem změříte vzdálenost startovní linie a čela kolony ( $a$ /mm) a vzdálenost startovní linie a středu jednotlivých barevných skvrn ( $b$ /mm). Z poměru těchto vzdáleností vypočítejte retenční faktor jednotlivých barevných

skvrn:  $R_f = b / a$ . Hodnoty retenčního faktoru se budou pohybovat v rozmezí 0–1.

3. Vypočítejte hodnoty retenčních faktorů také pro všechny barevné složky vzorků A-D a výsledky také запиšte do tabulky 1.

Testovaná barva	a (mm)	b (mm)	R <sub>f</sub>
Žlutá			
Červená			
Modrá			
Zelená			
<b>A – fialová:</b> 1. složka 2. složka			
<b>B – oranžová:</b> 1. složka 2. složka			
<b>C – zelená:</b> .... ....			
<b>D – hnědá:</b> ....			

Tabulka 1 Vyhodnocení složení potravinářských barev

4. Je možné na základě tohoto experimentu upřesnit původ vzorků A, B, C a D, tzn. zjistit, z jakých barevných složek byl vzorek vyroben? Porovnejte hodnoty retenčních faktorů v tabulce a formulujte své zjištění:
5. Z chromatogramu vyhodnoťte, která z testovaných barev má **nejvyšší** afinitu k mobilní fázi:
6. Z chromatogramu vyhodnoťte, která z testovaných barev má **nejnižší** afinitu k mobilní fázi?



## 1.2 Papírová chromatografie barviv v polevách cukrovinek

Potravinářské polevy i nápoje jsou často dobarvovány tak, aby byl výsledný efekt atraktivnější pro zákazníka. Velkou roli hraje barevnost také u dětských konzumentů, a proto se výrobci snaží používat pestré a syté barvy u sladkostí a nápojů, které jsou určeny především pro děti. Současně je snahou výrobců také reflektovat požadavky rodičů dětí, které směřují k používání přírodních zdrojů potravinářských přídatných látek. Proto jsou k barvení cukrovinek používány extrakty např. z různých druhů zeleniny nebo ze zelených řas.

V této úloze pomocí papírové chromatografie vyzkoušíte, zda jsou barvy v cukrovinkách jednosložkové, nebo bylo použito více složek, a zda je možné je od sebe za daných podmínek odseparovat.

### 1.2.1 Materiál a pomůcky

- barevné cukrovinky dvou různých značek,
- filtrační papír (kruhové výseče),
- velké Petriho misky,
- 5% vodný roztok NaCl,
- destilovaná voda,
- tužka, nůžky, kružítko.

### 1.2.2 Pracovní postup

- a) Na kruhový filtrační papír o velikosti Petriho misky si ve vzdálenosti cca 1 cm od středu kruhu kružítkem nebo tužkou naznačte kružnici (startovní linie). Uprostřed filtračního papíru vystříhněte malý otvor pro knot, který vyrobíte poskládáním nebo stočením proužku filtračního papíru. Knot protáhněte otvorem ve středu kruhu. Měl by být dlouhý tak, aby po položení filtračního papíru na Petriho misku knot dosahoval na dno a byl ponořen v roztoku. Horní konec knotu by neměl výrazně vyčnívat nad úroveň misky, aby bylo možné misku přikrýt jinou Petriho miskou. Připravte si 4 takové sestavy.
- b) Do dvou Petriho misek nalejte roztok NaCl a do dvou misek destilovanou vodu do výšky cca 1 cm ode dna tak, aby po položení filtračního papíru na horní okraj misky nedošlo k promáčení filtračního papíru, ale voda/roztok se dostal na filtrační papír pouze vztlínáním přes ponořený knot.
- c) Na každou čtvrtinu filtračního papíru položte na vyznačený start jeden vzorek a poté filtrační papír se 4 vzorky cukrovinek různých barev položte na Petriho misku a druhou miskou ji přikryjte. Takto připravte misky, které budou obsahovat různě zbarvené vzorky cukrovinek vždy jedné značky a každou ponechte vyvíjet jednou v prostředí destilované vody a podruhé v roztoku NaCl.
- d) Petriho misky přikryjte víkem a nechte roztok vztlínat knotem na filtrační papír až do vzdálenosti 1 cm od okraje kruhového filtračního papíru.

- e) Poté filtrační papíry vyjměte a nechte uschnout. Získali jste 4 chromatogramy, které můžete vyhodnotit.

### 1.2.3 Vyhodnocení experimentu

1. Vzájemně mezi sebou porovnejte příslušné chromatogramy a vyberte vhodnější mobilní fázi pro jednotlivé značky cukrovinek. Výsledné barvy zaznamenejte do tabulky 2.
2. Z obalů testovaných cukrovinek zjistěte, jaká barviva byla použita pro přípravu barevných polí a porovnejte s příslušným chromatogramem. Byla v případě stejných barev u různých značek použita stejná barviva?

Barva cukrovinky	Separované barevné složky u cukrovinek	Separované barevné složky u cukrovinek
	.....	.....

Tabulka 2 Záznam separace barevných složek u cukrovinkových polí

### 1.3 Papírová chromatografie barviv přirozeně obsažených v zelenině

Rostliny obsahují barviva, která kromě toho, že mají v rostlině důležité metabolické funkce, tak také udávají výslednou barvu rostlin a jejich částí, kterou jsme schopni vnímat zrakem. Výsledná barva je často tvořena směsí různých barviv, jejichž podíl se v rostlinných pletivech během života rostliny obvykle mění (např. žloutnutí listů, reakce na intenzitu osvětlení apod.). Jedná se nejčastěji o látky ze skupiny chlorofylů, karotenů, xantofylů a anthokyanů. Tato barviva jsou často používána k barvení potravin, i když ve srovnání se syntetickými barvivy vykazují nižší sytost, stálost a stabilitu barevného odstínu. (Velíšek & Hajšlová, 2009)

V laboratorní úloze se pokusíte rozdělit přírodní barviva na jednotlivé složky na základě využití chromatografické separace.

### 1.3.1 Materiál a pomůcky

- vybrané druhy zeleniny, zelená řasa, příp. koření,
- etanol,
- 50% roztok etanolu,
- uhličitán vápenatý  $\text{CaCO}_3$ ,
- mořský písek,
- třecí miska,
- filtrační papír,
- nálevka,
- filtrační kruh, stojan,
- malé kádinky,
- velká kádinka 600 ml s hodinovým sklem na přikrytí,
- kapátko/pipeta,
- nůž, prkýnko, laboratorní lžička,
- tužka, nůžky, kancelářská sešívačka.

### 1.3.2 Pracovní postup

- a) Připravte si chromatografickou aparaturu podle popisu v kap. 1.1.2.
- b) Připravte etanolické extrakty barviv z dostupné zeleniny, zelené řasy, příp. koření: Zeleninu nejprve nožem nakrájejte na malé kousky, které přenesete do třecí misky. Zelenou řasu a koření vložte do třecí misky. Přidejte na špičku nože uhličitán vápenatý, malou lžičku praného písku a etanol a pomocí tloučku rozetřete na kaši. Tuto kašovitou hmotu s malým přídavkem etanolu přefiltrujte přes filtrační papír do kádinky.
- c) Z takto připravených extraktů naneste kapátkem malé kapky jednotlivých vzorků na startovní linii připraveného chromatografického papíru ve vzdálenosti cca 1 cm od sebe a nechte na vzduchu zaschnout. Je důležité označit si vzorky na chromatogramu tužkou.
- d) Papír stočte do ruličky, na koncích sešijte kancelářskou sešívačkou a vložte do kádinky, ve které je 50% roztok etanolu do výšky cca 1 cm ode dna, tak, aby hladina dosahovala těsně pod nanesené skvrny vzorků. Kádinku přikryjte hodinovým sklem a nechte mobilní fázi vzlínat chromatografickým papírem.
- e) Experiment ukončete v okamžiku, kdy čelo mobilní fáze doputuje cca 2 cm od horního okraje chromatografického papíru. Chromatogram z kádinky vyjměte, opatrně ruličku rozviňte a tužkou si zaznačte čelo mobilní fáze. Nechte na vzduchu uschnout.

### 1.3.3 Vyhodnocení experimentu

Pozorujte a do tabulky 3 запиšte, zda a jak se rozdělila barviva obsažená v jednotlivých extraktech. Chlorofyl má zelenou barvu, a dokonce je možné rozlišit chlorofyl a, který je zelený, chlorofyl b, jehož barva je modrozelená, a jejich

rozkladné produkty feofytiny, které mají barvu olivově hnědou, příp. šedou. Karotenoidy mají oranžovou barvu a xantofyly žlutou. (Velíšek & Hajšlová, 2009)

Vzorek	Popis skvrn

Tabulka 3 Popis separace přírodních barviv

#### 1.4 Papírová chromatografie barevných popisovačů

Obdobný princip chromatografické separace jednotlivých složek lze uplatnit na jakákoliv barviva, která jsou používána v různých výrobcích. Výhodou barev je to, že pokud se v použité mobilní fázi rozpouští, je jejich poloha na chromatogramu dobře viditelná. Ale je potřeba si uvědomit, že stejným způsobem je možné pracovat i s nebarevnými látkami, které je nutné po separaci na chromatogramu zvýraznit či zviditelnit, tzv. vizualizovat zóny, např. pomocí fluorescenčních indikátorů. (Štulík et al., 2005)

V následující úloze se dále budete věnovat složení barev, ale tentokrát v barevných popisovačích. Ověříte, jestli jsou barvy barevných popisovačů jednosložkové, nebo jsou složeny z více složek. Vyberte si barvy, které jsou pro vás z pohledu separace složek zajímavé, např. růžová, fialová, tmavě modrá, hnědá, šedá nebo černá. Navíc vyzkoušíte jiný typ stacionární fáze, kterou bude bílá školní křída.

##### 1.4.1 Materiál a pomůcky

- barevné popisovače obyčejné a lihové,
- filtrační papír – kruhové výseče,

- bílá školní křída,
- 50% roztok etanolu,
- destilovaná voda,
- Petriho misky,
- 2x velká kádinka 600 ml s hodinovým sklem na přikrytí kádinky,
- nůžky, obyčejná tužka, pravítko, kružítko.

#### 1.4.2 Pracovní postup

- a)** Připravte si chromatografickou sestavu ve čtyřech Petriho miskách tak, jak je popsáno v postupu 1.2.2. Na dva chromatografické papíry naneste na startovní linii vždy po 4 různých barvách obyčejných fixů, na dva další naneste 4 barvy lihových popisovačů. Na okraj papíru je vhodné si tužkou poznačit vybrané barvy, především v těch případech, kde předpokládáte rozdělení barevných skvrn.
- b)** Do dvou Petriho misek nalejte destilovanou vodu a do dvou dalších misek 50% roztok etanolu, vždy do výšky max. 1 cm ode dna tak, aby po položení filtračního papíru na horní okraj misky nedošlo k promáčení filtračního papíru, ale voda/ roztok etanolu se dostal na filtrační papír pouze vztlínáním přes ponořený knot.
- c)** Filtrační papíry s nanesenými vzorky položte na Petriho misky naplněné mobilní fází tak, aby se každý typ fixů nechal rozmývat vždy vodou a roztokem etanolu. Misky přikryjte a pozorujte, současně měřte čas, za který mobilní fáze doputuje na konec chromatogramu.
- d)** Jakmile se mobilní fáze dostane cca 1 cm od vnějšího okraje filtračního papíru, experiment ukončete, zaznamenejte si čas a papír nechte vyschnout.
- e)** Obdobný experiment proveďte v prostorovém uspořádání tak, že místo filtračního papíru použijete bílou školní křídu. Na každý hranolek křídy tužkou naznačte startovní linii cca 2 cm od spodního okraje ze všech čtyř stran. Na tento start naneste 4 různé barvy popisovačů (1. křída – obyčejné fixy a 2. křída lihové fixy). Po nanesení vzorků umístěte obě křídy současně do velké kádinky, která je naplněna destilovanou vodou. Křídy do kádinky postavte tak, aby se nikde nedotýkaly stěn kádinky, a přikryjte hodinovým sklem. Pozorujte a všimněte si rychlosti, jakou putuje mobilní fáze křídou (opět měříte čas od startu experimentu po jeho ukončení) a tuto rychlost porovnejte s papírovou chromatografií.
- f)** Postup z bodu e) zopakujte s tím rozdílem, že křídy s nanesenými vzorky vložíte do kádinky s 50% roztokem etanolu. Zaznamenejte čas trvání experimentu.

### 1.4.3 Vyhodnocení experimentu

1. Zaznamenejte složení barevných skvrn do tabulky 4. Zajímavé jsou barvy růžová, fialová, tmavě modrá, hnědá, šedá, černá. Překvapila vás některá z barev svým složením?

Obyčejné popisovače	Popis skvrn
Lihové popisovače	Popis skvrn

Tabulka 4 Popis separace barev fixů

2. Porovnejte vhodnost použitých mobilních fází:

Pro obyčejné fixy je vhodnější mobilní fáze .....

Pro lihové popisovače je vhodnější mobilní fáze .....

3. Zapište a porovnejte rychlost, kterou putovala mobilní fáze papírem a křídou.

- filtrační papír – destilovaná voda:
- filtrační papír – 50% roztok etanolu:
- bílá křída – destilovaná voda:
- bílá křída – 50% roztok etanolu:

Své pozorování zdůvodněte:

4. Porovnejte účinnost dělení skvrn na filtračním papíru a na bílé křídě:

### 1.5 Odhalení dobarvování nápoje syntetickým barvivem

Potravinářská barviva je možné podle chemického složení a původu rozdělit na tři základní skupiny: barviva přírodní, syntetická barviva identická s přírodními a syntetická barviva (Velíšek & Hajšlová, 2009). Současně s rostoucím povědomím široké veřejnosti o možných nežádoucích účincích některých syntetických přídatných látek, včetně syntetických barviv, jsou dnes velmi aktuální požadavky některých konzumentů na používání výhradně přírodních barviv v potravinách a nápojích. Např. žluté nápoje se dříve barvily syntetickým potravinářským barvivem tartrazinem (E 102), které se běžně prodává pod označením „Žlutá citronová“. Podle současné platné legislativy ale všechny potraviny obsahující tartrazin musí mít na obalu uvedenu informaci o tom, že „může nepříznivě ovlivňovat činnost a pozornost dětí“ (Nařízení Evropského parlamentu a rady č. 1333/2008 o potravinářských přídatných látkách. 2008). Z toho důvodu jsou dnes žluté nápoje barvené především pomocí karotenů nebo riboflavinu. O tom, zda byla potravina dobarvena pomocí jiného než na obalu uvedeného barviva, je možné se přesvědčit mimo jiné také pomocí chromatografie.

Na základě zkušeností z předchozích experimentů se pokuste s pomocí chromatografické separace navrhnout a zrealizovat experiment, pomocí kterého by bylo možné zjistit, zda jsou předložené neznámé vzorky nápojů dobarveny tartrazinem.

#### 1.5.1 Materiál a pomůcky

- vzorky neznámých nápojů A, B, C a D.
- K dispozici máte veškeré vybavení, roztoky a materiály, které jste použili v předchozích chromatografických úlohách.
- Navíc je možné použít další materiál a pomůcky podle potřeby a po dohodě s vyučujícím.
- Ujistěte se, že máte opravdu vše, co pro přípravu chromatogramu potřebujete.

#### 1.5.2 Pracovní postup

Navrhněte a stručně si zaznamenejte pracovní postup.

- a) Navrhněte vhodnou stacionární a mobilní fázi.
- b) Navrhněte typ uspořádání chromatografické sestavy.
- c) Popište, jaké všechny vzorky je nutné na chromatogram nanést.

#### 1.5.3 Vyhodnocení experimentu

Na základě vyhodnocení chromatogramu označte, které vzorky předložených nápojů obsahují tartrazin. Své tvrzení doložte popsáním chromatogramem.

Tartrazin byl obsažen ve vzorcích: .....

## 1.6 Kontrolní otázky a úkoly

1. K jednotlivým definicím přiřaďte odpovídající klíčová slova:

*chromatogram, stacionární fáze, mobilní fáze, afinita, retenční faktor, čelo mobilní fáze*

- neboli eluent, unáší analyty podél celé chromatografické kolony/plochy.  
.....
- záznam průběhu chromatografické separace jednotlivých analytů.  
.....
- poměr dráhy uražené analytem a dráhy uražené čelem mobilní fáze.  
.....
- fáze chromatografické sestavy, která je imobilizovaná či zakotvená, a která způsobuje zpomalování pohybu některých separovaných složek.  
.....
- vzdálenost od startu, kam během daného času doputuje mobilní fáze.  
.....
- přitažlivost, ochota se slučovat.  
.....

2. Vypište typy stacionárních fází, které jste v experimentu použili:

3. Vypište typy mobilních fází, které jste v experimentu použili:

4. Co všechno ovlivňuje rychlost pohybu barevných skvrn po chromatografickém papíře, příp. po školní křídě?

5. S jakými typy chromatografických technik jste se během svého předchozího studia na střední škole setkali? Nebo jste o nějakých typech chromatografií slyšeli? Viděli jste použití chromatografické separace ve filmu?

6. Zopakujte si jednotlivé fáze výrobního biotechnologického procesu. Do kterých fází tohoto procesu je možné chromatografické techniky zařadit?

7. Zamyslete se nad tím, které faktory při technologickém zpracování a skladování potravin mohou mít vliv na degradaci přirozeně se vyskytujících barviv.

Jakým způsobem je možné tyto faktory eliminovat?



## 2 Mléko je kouzelná potravin

S mlékem se setkáváme od útlého dětství. Nejprve obvykle s mateřským mlékem, kdy poprvé a naprosto instinktivně oceňujeme tuto „kouzelnou potravinu“, která nám zajišťuje energii a veškeré nutriční složky nezbytné pro růst a vývoj v prvních dnech, týdnech a měsících našeho života. Posléze se setkáváme především s mlékem kravským, jehož konzumace nám ve většině případů vydrží po celý život, ať už se jedná o mléko jako takové, nebo o mléčné výrobky typu jogurtů, tvarohu, různých druhů sýrů, másla a smetany, koktejlů, zmrzliny nebo třeba i doplňků stravy s obsahem syrovátkových proteinů. To vše přijímáme naprosto samozřejmě a rádi si pochutnáváme např. na krupici s máslem a skořicí, aniž bychom žasli nad tím, že mléko projde varem, a přesto u něj nepozorujeme žádné významné změny v konzistenci, na rozdíl třeba od vaječného bílku, který při stejné teplotě velmi rychle změní svou podobu. To, že je mléko svými vlastnostmi v mnoha směrech výjimečné, si uvědomíme až v případě, kdy začneme přemýšlet nad tím, co vše s mlékem můžeme provádět a jak velkou škálu výrobků nám konzumentům mlékárenské technologie poskytují.

Celé kouzlo mléka je dáno jeho složením a formou těchto složek. Kravské mléko obsahuje v průměru 86,0 – 88,0 % vody, 3,5 – 5,5 % tuku, 4,5 – 5,0 % laktózy a 3,1 – 3,8 % dusíkatých látek, které představují majoritně bílkoviny. (Buňka et al., 2013) Všechny tyto složky vytváří společně tzv. polydisperzní systém. Co to znamená? Mléčný tuk je v mléku přítomen ve formě emulze, kterou tvoří tukové kuličky, jež jsou obklopeny vrstvou fosfolipidů a lipoproteinů. Kasein – hlavní bílkovina mléka, je přítomna ve formě koloidní disperze v tzv. mléčném séru. Toto mléčné sérum je tvořeno koloidním roztokem sérových bílkovin a pravým roztokem laktózy, minerálních látek a dalších složek rozpuštěných ve vodné fázi. (Kadlec et al., 2012) Díky tomuto složení a uspořádání složek bílkoviny mléka odolávají působení vnějších denaturačních vlivů (změny teploty, pH, přítomnost organických rozpouštědel atd.) ve vyšším rozsahu, než je tomu u řady jiných bílkovin, např. bílkovin vaječného bílku nebo masa.

V následujících úlohách alespoň částečně rozšíříte své povědomí o mléce. Přestože využijete pouze jednoduché laboratorní operace jako je vážení, přesné odměřování objemů, zahřívání, měření teplot nebo stanovení hodnot pH, získáte informace o složení a vlastnostech mléka.

### 2.1 Zjištění hustoty neznámých vzorků mléka

Hustota  $\rho$  je fyzikální veličina, která je definována jako hmotnost na jednotku objemu a obvykle je vyjadřována v jednotkách  $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$  nebo  $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ . Hustota mléka je veličina, která je ovlivněna hustotou jeho tří majoritních složek, a to množstvím vody, tuku a tukuprosté sušiny, kterou tvoří bílkoviny, laktóza a soli. Čerstvě

nadojené mléko vykazuje obvykle hustotu v rozmezí 1027,7 – 1032,0 kg·m<sup>-3</sup> a hustota jednotlivých složek mléka je uvedena v tabulce 5. Obecně platí, že hustota mléka klesá s rostoucím podílem tuku a s klesajícím obsahem sušiny. Proto může být měření hustoty použito pro nepřímé zjištění obsahu sušiny v mléce a také pro odhalení falšování mléka nepovoleným přídatkem vody. (Snášelová et al., 2009)

Složka mléka	Hustota $\rho$ (kg·m <sup>-3</sup> )
Voda	998,2
Tuk	918,0
Bílkoviny	1400,0
Laktóza	1780,0
Ostatní sloučeniny	1850,0

Tabulka 5 Hustota složek mléka (Snášelová et al., 2009)

Měření hustoty mléka je důležitým technologickým parametrem. In-line měření hustoty mléka je používáno pro kontrolu průběhu technologického procesu např. pro stanovení sušiny při zahušťování mléka nebo pro standardizaci mléka při výrobě sýrů. Hodnota hustoty se získává vážením (pyknometricky), nebo sledováním míry ponoření kalibrovaných předmětů do kapaliny (hustoměrů, laktometrů). (Snášelová et al., 2009)

V laboratorní úloze stanovíte hustotu neznámých vzorků mléka pyknometricky. Pyknometr je skleněná nádoba, která je kalibrována na udaný objem po uzavření pyknometru zátkou.

#### 2.1.1 Materiál a pomůcky

- vzorky mléka označené písmeny A, B, C a D,
- kádinky,
- 10 ml pyknometry,
- pipety,
- analytické váhy,
- digitální teploměr,
- vodní lázeň,
- kalkulačka.

#### 2.1.2 Pracovní postup

- a) Než začnete pracovat se vzorky je nutné mléko nejprve zahřát ve vodní lázni na 40-45 °C po dobu několika minut, aby došlo k roztání tuku ve vzorku, a poté ochladit na teplotu 20 °C.
- b) Prázdný a suchý pyknometr zvažte. Pozor: pyknometr je nutné vážit se zátkou. Předem zvážený pyknometr naplňte pipetou vzorkem mléka až po okraj, uzavřete zátkou a přebytečné množství vzorku vysušte. Pyknometr naplněný

vzorkem mléka zvažte a obě hmotnosti zapište do tabulky 6. Opakujte se všemi vzorky A-D. Snažte se pracovat co nejpřesněji.

- c) Pro všechny vzorky vypočítejte hodnotu hustoty a tyto výsledky také zapište do tabulky 6.

Vzorek mléka	V vzorku (cm <sup>3</sup> )	m vzorku (g)	m prázdného pyknometru (g)	m pyknometru se vzorkem (g)	$\rho$ (g·cm <sup>-3</sup> )
A					
B					
C					
D					

Tabulka 6 Výpočet hustoty vzorků mléka

### 2.1.3 Vyhodnocení experimentu

1. Uveďte, podle jakého vzorce jste počítali hodnotu hustoty?
2. Na základě výsledků v tabulce seřadte neznámé vzorky podle pravděpodobného obsahu tuku sestupně.
3. Své zjištění porovnejte s výsledky autorů J. Snášelová, M. Motyčková a V. Zikán, které publikovali v článku „Hustota mléka a smetany v závislosti na teplotě a obsahu tuku“ (Snášelová et al., 2009).

## 2.2 Hodnocení složení mléka pomocí automatického analyzátoru

Pro rychlou kontrolu vstupních surovin nebo pro průběžnou kontrolu technologického procesu, příp. pro výstupní kontrolu, jsou často používány automatické analyzátory, které umožňují získání výsledků v krátkém čase a s minimálními požadavky na úpravu vzorku před vlastním měřením. V mlékárenství se můžeme setkat s různými automatickými analyzátory, které umožňují získat velmi rychle a jednoduše informace o základním složení mléka. Tato zařízení se používají nejen v laboratořích a mlékárenských provozech, ale pro jednoduchost obsluhy jsou vhodné pro kontrolu mléka i na farmách nebo u menších zpracovatelů mléka.

Automatický analyzátor MilcoScope Julie C5 Automatic poskytuje informace o obsahu základních složek mléka, jako je obsah tuku, bílkovin a laktózy, zobrazuje také hodnotu tukuprosté sušiny, hustoty, přidané vody a solí. Své závěry, ke kterým jste došli na základě pyknometrického měření hustoty neznámých vzorků mléka v úloze 2.1, zkontrolujte pomocí automatického analyzátoru a výsledky následně ověřte také porovnáním informací na obalu výrobků.

### 2.2.1 Materiál a pomůcky

- vzorky mléka A-D z předchozího experimentu,
- vysokorychlostní analyzátor mléka MilkoScope Julie C5,
- malé kádinky,
- destilovaná voda.

### 2.2.2 Pracovní postup

- a) Seznamte se s přístrojem MilkoScope Julie C5, přečtěte si návod k obsluze.
- b) Jednotlivé vzorky mléka A-D přelejte do malých kádinek zhruba do 2/3 objemu a pečlivě si je označte.
- c) Přístroj zapněte stisknutím tlačítka POWER. Na displeji se nejprve zobrazí informace o přístroji (typ softwaru a výrobní číslo). Poté přístroj přejde do módu stabilizace teploty, během kterého se na displeji zobrazí „MilkoScope Julie C5 ... Stabilizing temp“ (proces trvá cca 3-4 minuty). Jakmile je přístroj připraven k měření, ozve se zvukový signál a na obrazovce se objeví „OK“.
- d) Přístroj obsahuje továrně vložené kalibrace, a proto není nutné přístroj znovu kalibrovat.
- e) Vzorek v kádince jemně promíchejte krouživým pohybem. Odkloňte spodní konec nerezového nástavce pro nasátí vzorku, umístěte pod něj kádinku se vzorkem a poté sklopte nástavec i s kádinkou zpět do svislé polohy.
- f) Jakmile je nástavec ponořen do mléka a sklopen zpět do svislé polohy, ozve se během 1-2 sekund zvukový signál, po kterém dojde k načerpání vzorku do měřicí cely a automaticky se spustí měření.

- g) Po ukončení měření se opět ozve zvukový signál a na displeji se zobrazí hodnoty všech analyzovaných složek. Jednotlivé složky jsou zobrazeny pod písmeny F – tuk, D – hustota (ve °Den), L – laktóza, S – tukuprostá sušina, P – bílkovina, W – přidaná voda. Potřebné údaje zapište do tabulky 7.
- h) Nyní je možné odklopením nerezového nástavce vyměnit měřený vzorek a provést další analýzu. Na displeji zůstanou naměřené výsledky vždy až do doby, než je spuštěna další analýza. Proměřte všechny vzorky a výsledky zapište do tabulky 7.

Vzorek mléka	Tuk (%)	Bílkoviny (%)	Laktóza (%)	Hustota (°Den)
A				
B				
C				
D				

Tabulka 7 Data z automatického analyzátoru

### 2.2.3 Vyhodnocení experimentu

1. Výsledky v tabulce 7 mezi sebou porovnejte a určete, který vzorek odpovídá plnotučnému, polotučnému a odtučněnému mléku. Odpovídající vzorek zakroužkujte.

**plnotučné mléko:** vzorek A–B–C–D

**polotučné mléko:** vzorek A–B–C–D

**odtučněné mléko:** vzorek A–B–C–D

2. Odpovídá toto vyhodnocení pořadí, které jste vytvořili v kap. 2.1.3?
3. O jaký výrobek se jedná v případě vzorku, u kterého si nejste jisti s přiřazením v otázce 1?
4. Vyzvedněte si u vedoucího cvičení obaly od analyzovaných vzorků a porovnejte údaje na obalu výrobku se svým zjištěním.

### 2.3 Vliv kyselosti mléka na jeho termostabilitu

Termostabilita je velice důležitým parametrem při hodnocení kvality syrového mléka, a to zejména z hlediska tepelných záhřevů, kterým je mléko vystaveno během jeho procesního zpracování (např. vysokopasterované mléko, mléko ošetřené UHT-záhřevem a zahuštěné mléčné výrobky). (Šustová, 2015)

K předpovědi stability bílkovin slouží primárně test termostability, který vyjádří dobu schopnosti bílkovin odolávat záhřevu v olejové lázni při teplotách 120–140 °C až do sražení (rozpoznatelné tvorby prvních vloček bílkovin (Hanuš et al., 2016)

V důsledku tepelného záhřevu může být narušena tepelná stabilita mléka (TSM), Mléko s poškozenou TSM může snadněji podléhat agregaci přítomných bílkovin, a to již v průběhu tepelného záhřevu nebo během skladování. Obvyklým projevem narušení je vytváření viditelných agregátů – „vloček“ usazených na dně výrobku. Mezi faktory ovlivňující tepelnou stabilitu mléka jsou např. – koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$  (snižují TSM), fosforečnany a citronany (zvyšují TSM), hodnota pH, koncentrace a vzájemné poměry jednotlivých frakcí bílkovin mléka, předchozí technologické operace (např. homogenizace, zahuštění, přídavek jiných látek), rozsah proteolytických změn bílkovin. (Buňka, Pachlová, Buňková, & Černíková, 2013; Chramostová, Vrzáková, Němečková, & Čurda, 2014)

U mléka rozlišujeme titrační a aktivní kyselost, které patří mezi fyzikálně-chemické vlastnosti mléka. Stanovení pH má význam při výrobě fermentovaných mléčných výrobků a v sýrařství, u čerstvého mléka se uplatňuje při diagnostice mastitid mléčné žlázy.

Mléko vykazuje tzv. puфраční schopnost, tedy do určité míry dokáže vyrovnávat hodnoty pH. Aktivní kyselost mléka je ovlivněna přítomností a formou proteinů, solí kyseliny mléčné, fosfátů, koloidního kalcium-fosfátu, citrátů a uhličitanů, které se řadí do puфраčního systému mléka. Hodnota pH mléka se pohybuje mezi 6,5–6,7. Se vzrůstající teplotou a výskytem mastitid hodnota pH roste. Změny pH jsou patrné také během laktace. (Navrátilová et al., 2012)

#### 2.3.1 Stanovení aktivní kyselosti mléka

Hodnota pH mléka je ovlivněna přítomností a koncentrací kyselin, změnami koncentrace minerálních látek, jejich vzájemnými poměry a formami, ve kterých se v mléce vyskytují (rozpuštěné, nerozpuštěné a vázané na ostatní složky). (Buňka, Pachlová, Buňková, & Černíková, 2013)

##### 2.3.1.1 Materiál a pomůcky

- vzorky mléka,
- kádinky,
- teploměr,
- pH metr.

**2.3.1.2 Pracovní postup**

- a) Odeberte si z předložených vzorků mléka dostatečné množství do kádinky. Vzorky si dobře označte.
- b) Změřte teploměrem teplotu vzorků a všechny vzorky vytemperujte na  $20 \pm 1$  °C.
- c) Následně zjistěte hodnotu pH mléka pomocí pH metru. Před použitím pH metru je třeba jej kalibrovat pomocí pufrů pro pH 7 a poté pH 4 dle návodu. Elektrodu pH metru ponořte do vzorku cca 4 cm. Je nezbytné před měřením odstranit krytku z elektrody. Hodnota pH se odečítá po ustálení hodnoty na displeji pH metru. Po každém měření je třeba omýt elektrodu destilovanou vodou. Každý vzorek mléka změřte třikrát (označení pH<sub>1</sub> až pH<sub>3</sub>) a vypočítejte průměrnou hodnotu. Výsledky měření zapište do tabulky 8.

Vzorek mléka	pH 1	pH 2	pH 3	pH průměr

Tabulka 8 Hodnoty pH mléka

**2.3.1.3 Vyhodnocení experimentu**

1. Na základě zjištěných hodnot pH mléka zkuste odhadnout, které mléko bude vhodné pro tepelné ošetření a následné technologické zpracování.
2. Co je pufrační schopnost mléka?
3. Čím mohou být způsobeny změny pH mléka?

### 2.3.2 Stanovení kyselosti mléka alizarolem

Mléko se smísí s etanolovým (68% obj.) roztokem alizarolu (alizarinu) v poměru 1:1 a vyhodnotí se zbarvení a případné vyvločkování bílkovin dle Morresovy tabulky (tab. 9, obr. 1). Kyselost se vyjádří ve stupních SH. (Černá & Mergl, 1971; Indra & Mizera, 1992)

Barva	Kyselost SH hodnoty	Tvorba vloček	Vyhodnocení
Fialově růžová (vřesová)	7	Žádná	Čerstvé mléko
Světle růžová	8	Žádné nebo velmi jemné	Počínající kysání
Hnědorůžová (barva pleti)	9	Tvorba jemných vloček	Slabé kysání
Žlutohnědá	12	Velmi husté vločkování	Velmi silné kysání
Červenohnědá	8,5	Vločkovité srážení	Mírné mléčné kysání a současná peptonizace
Hnědá	9,5	Velmi husté vločkovité srážení	Silné kysání a peptonizace, sráží se varem v krátkém čase

Tabulka 9 Morresova tabulka (upraveno dle Indra & Mizera, 1992)

#### 2.3.2.1 Materiál a pomůcky

- vzorky mléka,
- zkumavky,
- pipeta/ odměrný válec,
- alizarolový roztok.

#### 2.3.2.2 Pracovní postup

- Připravte si počet zkumavek dle počtu vzorků zkoušeného mléka nebo dle pokynů vyučujícího a řádně si je označte.
- Odměřte 3 ml (popřípadě po konzultaci s vyučujícím i více) mléka a přidejte stejný objem alizarolového roztoku (poměr 1:1).
- Zkumavky zajistěte zátkami a protřepejte.
- Dle vzniklého zbarvení a případné změny skupenství vyhodnoťte hodnotu celkové kyselosti (SH) dle Morresovy tabulky (tabulka 9). Zjištěné výsledky zapište do tabulky 10.









Vzorek mléka	Reakce s alizarinem	SH	Vyhodnocení

Tabulka 10 Výsledky alizarolové zkoušky

### 2.3.2.3 Vyhodnocení experimentu

1. Porovnejte výsledky pokusu s barevnou škálou na obrázku 1.

	Kyselost 7 °SH	<ul style="list-style-type: none"> <li>- normální čerstvé mléko</li> <li>- žádné tvoření vloček</li> <li>- barva kvetoucího růžového jetele nebo vřesu</li> </ul>
	Kyselost 8 °SH	<ul style="list-style-type: none"> <li>- počínající mléčné kysání</li> <li>- žádné nebo velmi jemné vločky</li> <li>- barva světle růžová</li> </ul>
	Kyselost 9 °SH	<ul style="list-style-type: none"> <li>- slabé mléčné kysání</li> <li>- tvoření jemných vloček</li> <li>- barva pleťová až světle hnědočervená</li> </ul>
	Kyselost 12 °SH	<ul style="list-style-type: none"> <li>- velmi silné mléčné kysání, sráží se při varu</li> <li>- velmi husté vločkovité srážení</li> <li>- barva žlutá až žlutohnědá</li> </ul>
	Mléko od nemocných krav	<ul style="list-style-type: none"> <li>- mléko od dojnic se zánětem vemene</li> <li>- alkalické mléko</li> <li>- barva tmavofialová</li> </ul>
	Kyselost 8,5 °SH	<ul style="list-style-type: none"> <li>- mléko s mléčným kysáním a počínající peptonizací (bakteriální tvorba syřidlového enzymu)</li> <li>- vločkovité srážení</li> <li>- barva hnědočervená</li> </ul>

Obrázek 1 Zjišťování kyselosti mléka dle Morrese (upraveno dle ČSN 57 0530)

2. Jaké jsou fyzikálně-chemické vlastnosti mléka?
3. Potvrdily se výsledky u testovaných vzorků mléka všemi způsoby zjišťování kyselosti mléka?
4. Jaký je rozdíl mezi aktivní a titrační kyselostí mléka?

## 2.4 Stanovení alkoholové stability mléka

Alkoholová stabilita (AS, nebo alkoholové číslo) mléka je výsledek informující o odolnosti mléčných bílkovin proti vysrážení tepelným namáháním a její dobrá hodnota je důležitou podmínkou při UHT ošetření, vysoké pasteraci mléka a výrobě kondenzovaných mlék. (Hanuš et al., 2016) Alkoholová stabilita je dána minimální procentickou koncentrací etanolu, který po přidavku k mléku způsobí jeho koagulaci. Mléko, koagulující při nižší koncentraci etanolu, je méně stabilní i při záhřevu. Vyjadřuje se jako alkoholový test nebo alkoholové číslo. (Šustová, 2015)

### 2.4.1 Alkoholový test

Alkoholový test je jednoduchá metoda na hodnocení porušení tepelné stability mléka. Jde o schopnost mléka (mléčných bílkovin) se vysrážet v přítomnosti etanolu. Nestálost bílkovin v přítomnosti alkoholu je zdůvodňována postupnou ztrátou hydratačního obalu bílkovin a vysrážení koloidního fosforečnanu vápenatého. Stabilita mléka souvisí také s hodnotou pH. Výsledek je důležitý například při výrobě různých likérů, kde se přidává mléko. V případě pozitivního výsledku lze usuzovat na porušenost mléka a jeho nevhodnost pro některé výrobky (např. UHT nebo zahuštěná mléka). (Buňka, Pachlová, Buňková, & Černíková, 2013)

#### 2.4.1.1 Materiál a pomůcky

- vzorky mléka,
- roztoky etanolu v různých koncentracích,
- zkumavky,
- pipety/ odměrný válec.

**2.4.1.2 Pracovní postup**

- a) Připravte si počet zkumavek dle počtu vzorků zkoušeného mléka nebo dle pokynů vyučujícího a řádně si je označte.
- b) Odměřte 5 ml (popřípadě po konzultaci s vyučujícím i více) mléka a přidejte stejný objem roztoku etanolu.
- c) Zkumavky zajistěte zátkami a protřepejte.
- d) Sledujte změny ihned po protřepání (0 min) a poté nechte odstát vzorek po dobu 5 minut a opět zjistěte průběh změn. Výsledky pozorování vyhodnoťte dle níže uvedeného hodnocení testu a запиšte do tabulky 11. (Při nedostatečné reakci se může provést tzv. dvojitý test, tj. přidají se 2 díly etanolu – po konzultaci s vyučujícím).

**Hodnocení alkoholového testu:**

- nesraženo
- + jemné vločky
- ++ hrubší vločky
- +++ hrubé vločky, případně i vysrážená bílkovina a uvolněná syrovátka

Vzorek mléka	70%		75%		80%	
	0 min	5 min	0 min	5 min	0 min	5 min

Tabulka 11 Výsledky alkoholového testu

**2.4.1.3 Vyhodnocení experimentu**

- Lze na základě reakce mléka s etanolem posoudit kvalitu mléka?
- Jak se projeví koncentrace etanolu a doba působení na výsledek testu?
- Který vzorek mléka je nevhodný pro další zpracování?
- Porovnejte výsledky alkoholového testu a stanovení kyselosti mléka pro jednotlivé vzorky. Jsou vzorky vykazující nejnižší stabilitu v alkoholovém testu také vzorky s nejnižším pH?

### 2.4.2 Alkoholové číslo

Alkoholové číslo představuje jednu z modifikací alkoholové testu. Často vyjadřuje schopnost bílkovin mléka odolat srážení přidavkem alkoholu (96 %), kdy je vyjádřen spotřebou alkoholu v ml na zřetelné sražení bílkovin 5 ml (případně 10 ml) mléka. Stanovení alkoholového čísla je doporučováno pro rozlišení rozdílů mezi mléky s různou stabilitou, kde je mechanismus účinku působení alkoholu podobnější jako působení vysoké teploty.

Běžné hodnoty alkoholového čísla jsou  $5,4 \pm 1,22$  ml. (Hanuš et al., 2016; Šustová, 2015)

#### 2.4.2.1 Materiál a pomůcky

- vzorky mléka,
- neutralizovaný etanol 96%,
- kádinky/baňky,
- byreta,
- pipety/ odměrný válec.

#### 2.4.2.2 Pracovní postup

- a) Do předem označených baněk odměřte 5 ml vzorku mléka.
- b) Postupně přidávejte z byrety neutralizovaný 96 % etanol (po 0,5 ml).
- c) Po každém přidavku vzorek důkladně zamíchejte a kontrolujte vznik sraženiny. Při vytvoření jemných vloček zapište spotřebu alkoholu jako tzv. alkoholové číslo do tabulky 12.

Vzorek mléka	Spotřeba etanolu (ml)

Tabulka 12 Výsledky alkoholového čísla

#### 2.4.2.3 Vyhodnocení experimentu

1. Porovnejte výsledky alkoholového čísla s výsledky alkoholového testu.
2. K jakým reakcím dochází při přidavku etanolu do mléka?

## 2.5 Povrchové napětí mléka

Povrchové napětí ( $\sigma$ ) je obecně úměrné energii potřebné k vytvoření co nejmenšího povrchu kapaliny. Povrchové částice kapaliny jsou přitahovány dovnitř. Tak vzniká povrchová síla, popisovaná pomocí povrchového napětí. Definice této veličiny je dána vztahem:

$$\sigma = \frac{F}{l} = \frac{W}{S}$$

kde  $F$  – síla [N],  $l$  – délka [m],  $W$  – práce [J],  $S$  – plocha [m<sup>2</sup>]. Jedná se tedy o sílu vztaženou na jednotku délky (řez povrchu kapaliny). Jiná definice popisuje povrchové napětí jako práci vnějších sil potřebná k zvětšení plochy v poměru k vztažené ploše. Jednotkou povrchového napětí v soustavě SI je N·m<sup>-1</sup> resp. J·m<sup>-2</sup>. Povrchové napětí závisí především na druhu kapaliny a teplotě (s rostoucí teplotou klesá), a v malé míře na tlaku. Metody měření povrchového napětí jsou např.: metoda odtrhávací (pomocí tenziometru), metoda kapilární elevace nebo metoda kapková. (Walstra, c2003; “Mechanika: Povrchové napětí a kapilarita”, 2018)

Povrchové napětí mléka má technologický význam a je nižší než povrchové napětí vody a je způsobeno především přítomností bílkovin a fosfolipidů. Nejnižší hodnotu povrchového napětí má mléko ochlazené na teplotu 0-10 °C a to 0,045-0,048 N·m<sup>-1</sup> pro mléko, voda má hodnotu povrchového napětí 0,072 N·m<sup>-1</sup>. (Buňka, Pachlová, Buňková, & Černíková, 2013)

### 2.5.1 Materiál a pomůcky

- vzorky mléka (odtučněné, polotučné, plnotučné, kondenzované, smetana),
- potravinářská barviva (rozpuštěná ve vodě),
- kapátko,
- saponát,
- špejle,
- hluboké talíře.

### 2.5.2 Pracovní postup

- a) Do hlubokého talíře nalijte vzorek mléka tak, aby bylo dostatečně pokryté celé dno, popřípadě do výšky hladiny 1-2 cm.
- b) Na mléko pomocí kapátka naneste kapky různých potravinářských barviv dle vlastního uvážení. Naberte na konec špejle jar a kápněte jej doprostřed talíře.
- c) Sledujte a popište změny do tabulky 13. Jaké jsou rozdíly u jednotlivých vzorků. **Poznámka:** K vybranému vzorku mléka vyzkoušejte přídavek cukru, nechte zcela rozpustit a proveďte pokus s barvami. Reakci srovnajte se vzorkem mléka bez přídavku cukru.

Vzorek mléka	Popis reakce

Tabulka 13 Výsledky povrchového napětí mléka

### 2.5.3 Vyhodnocení experimentu

1. Co způsobuje rozvrstvení barev na povrchu mléka po dotyku kapky saponátu?
2. Jak si vysvětlujete změny vyvolané přidavkem cukru k mléku?

## 2.6 Izolace kaseinu z mléka

Kasein je hlavní bílkovina mléka, kterou lze vysrážet působením syřidla (tzv. sladké srážení) nebo pomocí kyselin (tzv. kyselé srážení). Princip srážení spočívá v rozrušení kaseinové micely. Kyselé srážení způsobují kyseliny, které jsou produkovány bakteriemi mléčného kvašení (výroba jogurtů, tvarohů) nebo záměrný přídavek kyselin (výroba „kyselého“ kaseinu). Sladké srážení se využívá při výrobě většiny sýrů.

Pro izolaci kaseinu se využívá princip kyselého srážení. Podstata je ve snížení hodnoty pH mléka do izoelektrického bodu (4,6), kdy dojde k oddělení kaseinu ve formě sraženiny a její následné filtrace. (Káš, Kodíček, & Valentová, 2005)

Kasein se využívá např. jako složka při výrobě tavených sýrů, slouží jako součást bílkovinných přípravků pro výživu sportovců. Mimo potravinářství se také kaseináty využívají pro výrobu lepidel, návnad pro ryby či jedlých folií aplikovaných na potraviny proti jejich vysychání, ztrátě aroma nebo jako ochrana před žluknutím. („Kasein“, 2019)

### 2.6.1 Materiál a pomůcky

- vzorky mléka (odstředěné, polotučné, plnotučné),
- pipeta,
- nálevka,
- filtrační papíry,
- kádinky,
- váhy,
- 1M roztok HCl (10%),
- kyselina octová,
- etanol,
- pH metr
- magnetické míchadlo.

### 2.6.2 Pracovní postup

- Do předem označené kádinky nalijte 20 ml vzorku mléka. Zjistěte hmotnost vzorku mléka a запиšte do tabulky 14. Do kádinky vložte magnetické míchadlo a umístěte na elektromagnetickou míchačku. Nastavte otáčky míchadla tak, aby se vzorek rovnoměrně promíchal.
- Přidávejte po kapkách roztok kyseliny chlorovodíkové (případně kyseliny octové – dle pokynů vyučujícího). Přídavkem začne vznikat objemná klkovitá sraženina kaseinu.
- Pokračujte v dávkování roztoku kyseliny až do hodnoty pH 4,6 (hodnotu změřte pH metrem). Spotřebu kyseliny v izoeletrickém bodě запиšte do tabulky 15. Pokus zopakujte třikrát a vypočítejte průměrnou spotřebu kyseliny na vzorek mléka ( $\overline{V_k}$ ).
- Vzniklou sraženinu kaseinu odfiltrujte, promyjte na filtru vodou a etanolem a poté nechte vysušit. Vysušený vzorek kaseinu zvažte ( $M_k$ ). Vypočítejte výtěžnost kaseinu v procentech ( $K$ ) (tab. 14)

Vzorek mléka	Hmotnost mléka (g)				Hmotnost kaseinu (g)				Výtěžnost kaseinu (%)			
	$m_1$	$m_2$	$m_3$	$\bar{m}$	$M_{k1}$	$M_{k2}$	$M_{k3}$	$\overline{M_k}$	$K_1$	$K_2$	$K_3$	$\bar{K}$

Tabulka 14 Výtěžnost kaseinu

Vzorek mléka	Spotřeba kyseliny (ml)			
	V <sub>k1</sub>	V <sub>k2</sub>	V <sub>k3</sub>	$\overline{V_k}$

Tabulka 15 Spotřeba kyseliny pro izolaci kaseinu

### 2.6.3 Vyhodnocení experimentu

1. Co je izoelektrický bod bílkoviny?
2. Co by se stalo, kdybychom k vysušenému kaseinu přidali formaldehyd a zahřáli?
3. Na co se ještě kasein používá, kromě potravinářských účelů?



### 3 Kvasinky

Kvasinky jsou eukaryotní heterotrofní organismy, které patří mezi houby. Od ostatních eukaryot se liší především tvorbou silné a pevné buněčné stěny. Jako zdroj uhlíku a energie slouží kvasinkám hlavně sacharidy, které mohou "zpracovat" aerobní respirací či kvašením. Využití kvasinek je velmi rozmanité. Nezastupitelný význam mají v potravinářském průmyslu zejména při výrobě pekařského a krmného droždí, piva, vína a lihu. Moderní biotechnologie využívají kvasinky pro produkci nejrůznějších látek (vitamíny, enzymy, antibiotika, aminokyseliny, bílkoviny). Tyto kvasinky mohou být geneticky upravovány tak, aby získaly nové a lepší vlastnosti a syntetizovaly požadované látky. Díky relativně snadnému zacházení (isolace mutantů, přenos genů, kultivace atd.) a znalosti genomu jsou kvasinky vhodným modelovým organismem pro studium fyziologických a metabolických pochodů i genetiky eukaryot. Mimo to ale některé rody kvasinek patří mezi patogeny, které jsou významné zejména pro jedince s oslabenou imunitou. (Kopecká, Matoulková and Němec, 2012)

#### 3.1 Jak vypadá kvásek pod mikroskopem

Kvásek je základ pro pečení chleba a jedná se o směs mouky a vody. Používá se ke kypření těsta, ale složením se liší od klasického pekařského droždí. Je to směs přirozeně se vyskytujících mikroorganismů (bakterie a kvasinky) pocházející z obalových vrstev zrna a vzduchu. Důležitou součástí kvásku je mouka. Druh mouky lze identifikovat podle tvaru škrobových zrn.

##### 3.1.1 Materiál a pomůcky

- mouka (různé druhy dle pokynů vyučujícího),
- malé kádinky,
- Petriho miska, hodinové sklo,
- navažovací lžička,
- teploměr se stojanem a držákem,
- termostat,
- plastové kapátko,
- univerzální indikátorový pH papírek,
- mikroskop,
- krycí a podložní sklo.

##### 3.1.2 Pracovní postup

- a) Každá pracovní skupina připraví tolik vzorků mouky, tak aby byl proveden pokus u všech předložených mouk, popřípadě se bude řídit pokyny vyučujícího. U vybraných druhů mouky odvažte 5 g od každého vzorku do kádinky, přidejte 40 ml destilované vody a dobře promíchejte. Kádinky si dobře označte (např. písmeny, číslem, symbolem). Pomocí indikátorového

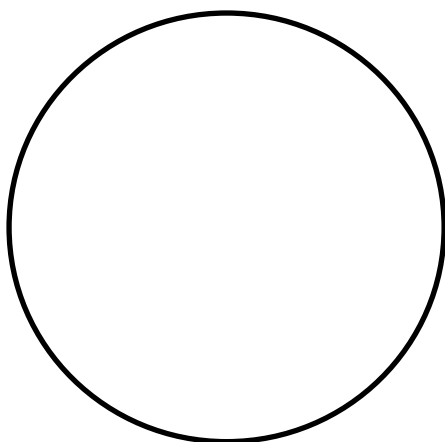
- papírku odhadněte u každého vzorku pH. Hodnotu pH zapište do tabulky 16.
- b)** Ze suspenze odeberte kapku vzorku pomocí plastového kapátka na podložní sklíčko, přikryjte krycím sklem, tak aby nebyly přítomné vzduchové bubliny, a pozorujte pod mikroskopem. Zakreslete výsledek pozorování u 3 vybraných vzorků mouky do kruhových výsečí „před inkubací“ (obrázek 2).
  - c)** Kádinku se suspenzí přikryjte Petriho miskou nebo hodinovým sklem a vložte do termostatu vytemperovaného na 30 °C. Zaznamenejte čas začátku inkubace. Nechte kultivovat při 30 °C, kultivaci ukončete cca půl hodiny před koncem cvičení. Zapište čas konce inkubace a celkovou dobu pokusu.
  - d)** Po ukončení inkubace vyjměte kádinky z lázně a popište vizuálně pozorované změny ve všech kádinkách do tabulky 16. Všímejte si změn objemu, přítomnost bublin a barevných odlišností. Následně pomocí indikátorového papírku změřte pH vzorků po inkubaci a opět zaznamenejte do tabulky 16.
  - e)** Poté odeberte kapku startujícího kvásku u 3 vybraných vzorků na podložní sklíčko, opatrně přikryjte krycím sklem a pozorujte pod mikroskopem. Pozorování opět zakreslete do kruhové výseče obrázku 2 „po inkubaci“.

Čas zahájení inkubace ..... Čas ukončení inkubace.....  
 Celková doba inkubace vzorku při 30 °C .....

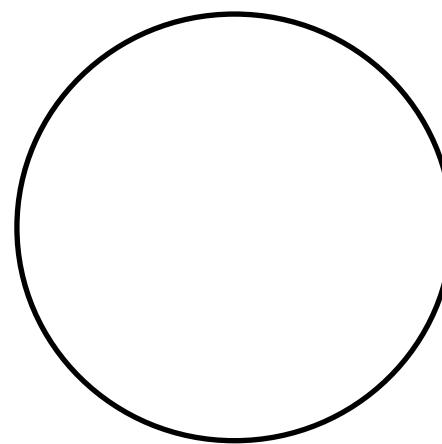
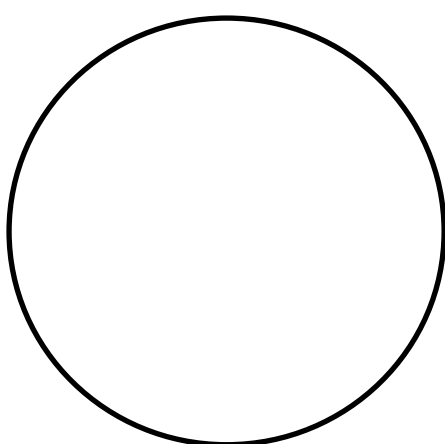
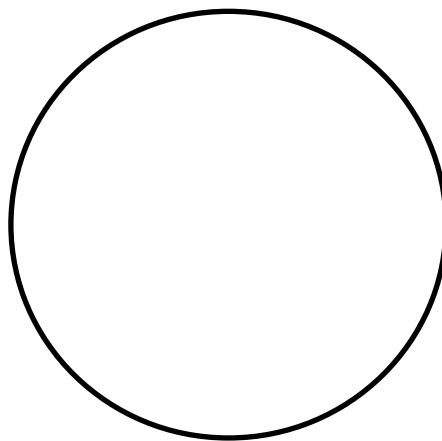
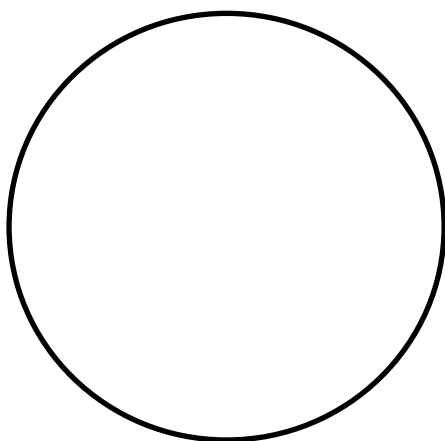
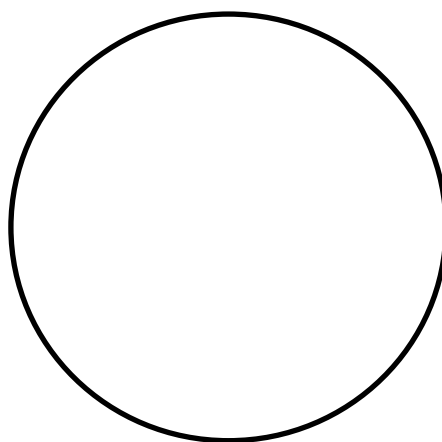
Vzorek mouky	pH před inkubací	pH po inkubaci	Makroskopické změny po inkubaci

Tabulka 16 Hodnoty pH mouky a viditelné změny po inkubaci

PŘED INKUBACÍ



PO INKUBACI



Obrázek 2 Mikroskopie kvásku

### 3.1.3 Vyhodnocení experimentu

1. Jak se změní hodnota pH během pokusu, čím je změna způsobena?
2. Vysvětlete, jaký vliv má změna pH na výslednou chuť a trvanlivost pečiva.
3. Jaký vzorek mouky je dle pokusu na výrobu kvásku nejvhodnější?

## 3.2 Osmotické jevy u kvasinek

Osmotické jevy jsou založeny na polopropustnosti (semipermeabilitě) plazmatických membrán pro molekuly vody. Látky ve vodě obsažené již membránou neprocházejí. Rozdíly v koncentraci se řeší přesunem vody až do rovnovážného stavu. Roztok, který buňku obklopuje, může být izotonický, hypertonický nebo hypotonický. V hypertonickém prostředí dochází k odnímání vody z buňky a buňka se smršťuje (tzv. plazmolýza). V hypotonickém prostředí je koncentrace látek nižší než v buňce a dochází k nasávání vody buňkou (extrémní stav je tzv. plazmoptýza). Izotonický roztok má stejný osmotický tlak jako tekutý obsah buňky a neprobíhají žádné osmotické děje. ("Osmotické jevy v buňce", 2014)

Kvasinky jsou poměrně odolné organismy. Mezi faktory ovlivňující život kvasinek patří obsah živin, odolnost vůči kyselému prostředí a vyššímu osmotickému tlaku. Při optimálních podmínkách jsou schopny rozmnožování (nepohlavní – pučení, pohlavní pomocí spor).

### 3.2.1 Materiál a pomůcky

- pekařské droždí,
- cukr krystal,
- cukr moučka,
- sůl,
- kyselina citronová,
- jedlá soda,
- Petriho misky jako podložky,
- navažovací lžička,
- hodinky.

### 3.2.2 Pracovní postup

- a) Před samotným praktickým provedením pokusu odhadněte, v jakém pořadí bude docházet ke ztekucení droždí nejrychleji, zda v přítomnosti krystalového cukru, mletého cukru, soli, kyseliny citronové nebo jedlé sody. Svůj odhad pořadí (1. – nejrychleji až 5. nejpomaleji) zapište do tabulky 16.
- b) Nadrolte na 5 Petriho misek přibližně stejné množství čerstvého pekařského droždí stejného výrobce.
- c) Na droždí aplikujte jednotlivě rovnoměrně shodné množství soli, cukru krystal, mletého cukru, kyseliny citronové a jedlé sody. Dávku přísady odměřte navažovací lžičkou, tak aby byla u všech stejná.
- d) Po aplikaci přísady stopujte čas, kdy dojde ke ztekucení droždí na jednotlivých Petriho miskách, a výsledný čas zapište do tabulky 17.

Přísada	Odhadované pořadí	Čas do ztekucení (min.)	Zjištěné pořadí
Sůl			
Cukr krystal			
Cukr moučka			
Kyselina citronová			
Jedlá soda			

Tabulka 17 Osmotické jevy u kvasinek

### 3.2.3 Vyhodnocení experimentu

1. Jaký je rozdíl mezi hypertonickým a hypotonickým prostředím a jak působí na buňky kvasinek?
2. Vysvětlete pojmy:
  - Plazmolýza:
  - Deplazmolýza:
  - Plazmoptýza:

### 3.3 Vitální test kvasinek

Vitální test (barvení nativního preparátu) slouží ke zjištění okamžitého stavu populace sledovaných buněk. Je založen na propustnosti membrány mrtvých buněk. Cytoplazmatická membrána mrtvých buněk není semipermeabilní, barvivo se dostává dovnitř. Živé buňky se naopak průniku barviva „brání“; barvivo nepropustí nebo ho odbourají. K barvení mrtvých buněk v prostředí buněk živých se využívá netoxických barviv (např. roztok metylenové modři). Výhodou testu je rychlost, nízká spotřeba materiálu oproti plotnové metodě a možnost rozlišení poměru živých a mrtvých buněk. Nevýhodou je, že sledované buňky nelze dále kultivovat.

Vitální test se využívá v praxi při kontrole životaschopnosti mikroorganismů během technologických procesů. Sleduje se jejich odpověď (změna počtu či poměru) na přídavek či úbytek různých látek či na probíhající fyzikální proces. Z výsledků testu vitality lze okamžitě rozhodovat o zasažení do technologického procesu během kultivace buněk. (Kopecká & Rotková, 2017)

#### 3.3.1 Materiál a pomůcky

- vzorky pekařského droždí (*Saccharomyces cerevisiae*),
- zkumavky,
- stojan na zkumavky,
- podložní a krycí skla,
- plastová kapátka,
- methylenová modř,
- mikroskop,
- filtrační papír,
- plynový kahan.

#### Vzorky pekařského droždí:

- sušené lyofilizované droždí
- čerstvé droždí
- vzorky droždí skladovány za rozdílných tepelných podmínek (laboratorní teplota, chladírenská, mrazírenská)

#### 3.3.2 Pracovní postup

- a) Z každého vzorku pekařských kvasnic připravte ve zkumavce se sterilní destilovanou vodou velmi řídkou suspenzi (jen opaleskující).
- b) Přeneste suspenzi kvasinek pomocí kapátka na podložní sklíčko a přikápněte kapátkem malou kapku methylenové modři.

- c) Ihned přikryjte krycím sklem, tak aby nebyla v preparátu vzduchová bublina. Pokud se zdá preparát málo zbarven, lze k hraně krycího skla přikapávat barvivo, přičemž jej z druhé strany lze odsávat proužkem filtračního papíru.
- d) Spočítejte v 5 zorných polích počet živých a mrtvých buněk a výsledek zapište do tabulky 18.
- e) POZOR! Pracujte rychle, celková doba barvení by měla trvat jen 3 minuty. Přesáhne-li 5 minut, barvivo působí toxicky a všechny buňky budou sytě modré.
- f) Připravte ze stejné suspenze kvasinek ještě jeden preparát. Mikroorganismy v nátěru zafixujte v plameni poněkud déle, aby došlo k úhynu buněk (pozitivní kontrola).
- g) Barvení preparátu a pozorování pod mikroskopem je totožné jako v předchozím případě.

Vzorek droždí	Aktivní preparát		Fixní preparát
	Živé buňky	Mrtvé buňky	

Tabulka 18 Vitální test kvasinek

### 3.3.3 Vyhodnocení experimentu

1. U každého vzorku droždí vyhodnoťte podíl živých kvasinek v procentech.

2. Jaký je princip vitální testu?
3. Měl vliv jiné formy droždí na vitalitu kvasinek?
4. Jak se projevil jiný způsob skladování u droždí stejného typu?

### 3.4 Teplotní optimum pro různá kypřidla

Kypřidla se používají prakticky pro všechny druhy pečiva. Kypření způsobuje kypřící plyn oxid uhličitý, který může vznikat různými způsoby dle použitého kypřidla. Dle typu vzniku plynu rozlišujeme kypření biologické (pomocí fermentačních procesů kvasinek), chemické (reakce hydrogenuhličitanu amonného, sodného či draselného a regulátorů kyselosti – kypřící prášek) a mechanické (vzduch). (Burešová & Lorencová, 2013)

Každý typ kypřidla má svoje optimální podmínky působení, proto při jejich nesplnění dostaneme výrobek nedostatečného objemu a nevyhovujícího tvaru. Jedním z důležitých faktorů je teplota.

#### 3.4.1 Materiál a pomůcky

- pšeničná mouka,
- sušené pekařské droždí,
- kypřící prášek do pečiva běžný,
- kypřící prášek do pečiva bezfosfátový,
- jedlá soda,
- 2 vodní lázně,
- kádinky (100ml),
- zkumavky,
- stojan na zkumavky,
- odměrný válec (50 ml),
- váhy,
- navažovací lžička,
- 2x teploměr se stojanem a držákem pro kontrolu teploty vodní lázně/termostat,
- hodinky.



### 3.4.2 Pracovní postup

- a) Do kádinek (dle počtu vzorků kypřidla) odvažte po 5 g pšeničné mouky a **dobře označte** dle použitého kypřidla. Nadávkujte po 0,2 g od každého typu kypřidla (např. sušené pekařské droždí, kypřicí prášek, kypřicí prášek bezfosfatový, jedlá soda) do kádinek dle označení. Promíchejte.
- b) Do všech kádinek přilejte 40 ml destilované vody a rychle promíchejte.
- c) Pro každou suspenzi kypřidla si připravte 3 zkumavky, které **dobře označíte** dle typu kypřidla.
- d) Z každé suspenze odlejte cca 5 ml do **předem označených** zkumavek dle typu kypřidla (5 cm ode dna). Jednu zkumavku nechte stát ve stojanu na pracovním stole (poznamenejte laboratorní teplotu do tabulky 19), druhou zkumavku umístěte ve vodní lázni vyhřáté na 30 °C a třetí zkumavku vložte do vodní lázně vyhřáté na 50 °C.
- e) Po dobu následujících 15 minut pozorujte a zapište změny intenzity kypřícího procesu ve zkumavkách. Pozorování zapište do tabulky 19. Navrhnete optimální teplotu kypřícího procesu pro jednotlivá kypřidla.

Kypřidlo	Laboratorní teplota .....	30 °C	50 °C	Optimální teplota

Tabulka 19 Osmotické jevy u kvasinek

### 3.4.3 Vyhodnocení experimentu

1. Vypište pro použitá kypřidla princip tvorby kypřícího plynu:
  - Droždí –
  - Kypřicí prášek –
  - Kypřicí prášek bezfosfátový –
  - Jedlá soda –
  
2. Přiřaďte jednotlivé druhy pečiva k použitým typům kypřidel: chléb, piškoty, bábovka, oplatek, krekry, vánočka, rohlík, perník, croissant, plněné buchty
  - Droždí –
  - Kypřicí prášek –
  - Bílkový sníh –
  - Jedlá soda -

## Literatura

Buňka, F., Pachlová, V., Buňková, L., & Černíková, M. (2013). *Mlékárenská technologie I*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, Fakulta technologická.

Burešová, I., & Lorencová, E. (2013). *Výroba potravin rostlinného původu: zpracování obilovin*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.

ČSN 570530 *Metody zkoušení mléka a tekutých mléčných výrobků*. (1972) (3rd ed.). Praha: Český normalizační institut.

Černá, E., & Mergl, M. (1971). *Laboratorní kontrolní metody v mlékařství* (1st ed.). Praha: SNTL.

Hanuš, O. et al. (2016). *Certifikovaná metodika R01416 CM 30: Předpověď úrovně termostability syrového kravského mléka pro výběr suroviny ke zpracování na kondenzované mléko podle faktorů prvovýroby*. (1st ed.). Praha: VÚM.

Chramostová, J., Vrzáková, Z., Němečková, I., & Čurda, L. (2014). Termostabilita mléka a faktory, které ji ovlivňují. *Mlékařské Listy*, 6(146), 14-17.

Indra, Z. & Mizera, J. (1992). *Chemické kontrolní metody pro obor zpracování mléka* (1st ed.). Praha: Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy ČR.

Kadlec, P., Melzoch, K., Voldřich, M., et al. (2012). *Technologie potravin – Přehled tradičních potravinářských výrob*. Ostrava: VŠCHT v Praze, KEY Publishing s.r.o.

Kadlec, P., Melzoch, K., Voldřich, M., et al. (2013). *Technologie potravin – Procesy a zařízení v potravinářství a biotechnologiích*. Ostrava: VŠCHT v Praze, KEY Publishing s.r.o.

Kasein [Online]. (2018). [www.bezpecnostpotravin.cz](http://www.bezpecnostpotravin.cz). Praha: Ministerstvo zemědělství. Dostupné z <https://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/92329.aspx>

Káš, J., Kodíček, M., & Valentová, O. (2005). *Laboratorní techniky biochemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická.

Klouda, P. (2003). *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda.

Kopecká, J., Matoulková, D., & Němec, M. (2012). Yeast and its uses. *Kvasný Průmysl*, 58(11), 326-335. Dostupné z <https://doi.org/10.18832/kp2012029>

Kopecká, J. & Rotková, G. (2017). *Skripta ke cvičení z obecné mikrobiologie, cytologie a morfologie bakterií* [Online] (1st ed.). Brno: Masarykova univerzita. Dostupné z <http://is.muni.cz/elportal/?id=1383503>

Mechanika: Povrchové napětí a kapilarita [Online]. (2018). [kof.zcu.cz](http://kof.zcu.cz). Dostupné z <https://kof.zcu.cz/vusc/pg/termo09/mechanics/v/v2.htm>

Nařízení Evropského parlamentu a rady (ES) č. 1333/2008 ze dne 16. prosince 2008 o potravinářských přídatných látkách. (Úř. věst. L 354/16, 31.12.2008)

Navrátilová, P., Králová (Dračková), M., Janštová, B., Přidalová, H., Cupáková, Š., & Vorlová, L. (2012). *Hygiena produkce mléka*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno.

Osmotické jevy v buňce [Online]. (2014). In *Mendelova univerzita v Brně*. Brno: MZLU v Brně. Dostupné z [http://webMlék2.mendelu.cz/af\\_211\\_multitext/obecna\\_botanika/texty-cytologie-osmoticke\\_jevy.html](http://webMlék2.mendelu.cz/af_211_multitext/obecna_botanika/texty-cytologie-osmoticke_jevy.html)

Snášelová, J., Motyčková, M., & Zikán, V. (2009). Hustota mléka a smetany v závislosti na teplotě a obsahu tuku. *Mlékařské listy* 113/114, 18-21.

Sobotníková, J., Bosáková, Z., Čabala, R., Coufal, P., Pacáková, V., & Štulík, K. (2010). Historie, současnost a perspektivy analytických separačních metod na katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. *Chem. Listy* 104, 1226-1231.

Štulík, K., et al. (2005). *Analytické separační metody*. Praha: Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství Karolinum.

Šustová, K. (2015). *Mlékárenské technologie: (návody do cvičení)*. Brno: Mendelova univerzita v Brně.

Velíšek, J., & Hajšlová, J. (2009). *Chemie potravin II*. Tábor: Osis.

Walstra, P. (c2003). *Physical chemistry of foods* (1st ed.). New York: Marcel Dekker.

**Symbole a zkratky**

a	vzdálenost startovní linie a čela kolony [mm]
AS	alkoholová stabilita
b	vzdálenost startovní linie a středu jednotlivých barevných skvrn [mm]
F	síla [N]
K	výtěžnost kaseinu [%]
$\bar{K}$	průměrná výtěžnost kaseinu [%]
l	délka [m]
m	hmotnost [g]
$\bar{m}$	průměrná hmotnost [g]
Mk	hmotnost izolovaného kaseinu [g]
$\overline{Mk}$	průměrná hmotnost izolovaného kaseinu [g]
Rf	retenční faktor
$\rho$	hustota
S	plocha [m <sup>2</sup> ]
$\sigma$	povrchové napětí [N·m <sup>-1</sup> ]; [J·m <sup>-2</sup> ]
UHT	Ultra high temperature, vysoko tepelně ošetřené mléko
V	objem [cm <sup>3</sup> ],
Vk	spotřeba kyseliny [ml]
$\overline{Vk}$	průměrná spotřeba kyseliny [ml]
W	práce [J]

## Seznam obrázků

<i>Obrázek 1 Zjišťování kyselosti mléka dle Morrese (upraveno dle ČSN 57 0530)</i>	25
<i>Obrázek 2 Mikroskopie kvásku</i>	35

## Seznam tabulek

Tabulka 1 Vyhodnocení složení potravinářských barev	8
Tabulka 2 Záznam separace barevných složek u cukrovinkových polev	10
Tabulka 3 Popis separace přírodních barviv	12
Tabulka 4 Popis separace barev fixů	14
Tabulka 5 Hustota složek mléka (Snášelová et al., 2009)	18
Tabulka 6 Výpočet hustoty vzorků mléka	19
Tabulka 7 Data z automatického analyzátoru	21
Tabulka 8 Hodnoty pH mléka	23
Tabulka 9 Morresova tabulka (upraveno dle Indra & Mizera, 1992)	24
Tabulka 10 Výsledky alizarolové zkoušky	25
Tabulka 11 Výsledky alkoholového testu	27
Tabulka 12 Výsledky alkoholového čísla	28
Tabulka 13 Výsledky povrchového napětí mléka	30
Tabulka 14 Výtěžnost kaseinu	31
Tabulka 15 Spotřeba kyseliny pro izolaci kaseinu	32
Tabulka 16 Hodnoty pH mouky a viditelné změny po inkubaci	34
Tabulka 17 Osmotické jevy u kvasinek	37
Tabulka 18 Vitální test kvasinek	39
Tabulka 19 Osmotické jevy u kvasinek	41