

STANOVENÍ VITAMINŮ SKUPINY B A STRAVITELNOSTI SÝRŮ METODOU IN VITRO

Bayanmunkh Altangerel¹, Zultsetseg Sengee¹, Daniela Kramářová¹, Otakar Rop², Jan Hrabě²

¹ Ústav biochemie a analýzy potravin, ² Ústav technologie a mikrobiologie potravin, Fakulta technologická, UTB ve Zlíně, Nám. T.G.Masaryka 275, 762 72 Zlín, kramarova@ft.utb.cz

Determination of B-group vitamins and in vitro digestibility of cheeses

Abstrakt

Cílem naší studie bylo stanovit vitaminy skupiny B ve vybraných sýrech konzumovaných v ČR a stanovit jejich stravitelnost organické hmoty (OMD) a sušiny (DMD) metodou *in vitro*. Pro stanovení nikotinamidu, kyseliny pantothenové a pyridoxinu byla použita metoda HPLC s využitím enzymatické hydrolyzy pro jejich izolaci. Kvantitativního výsledku bylo dosaženo při inkubaci vzorku s enzymem *clara-dia*stázou při 30 °C po dobu 20 hodin. Chromatografická separace byla provedena na koloně Supelcosil LC8 (150 x 4,6 mm; 5 µm) s mobilní fází složenou z fosfátového pufru a methanolu v poměru 90:10. Pro stanovení stravitelnosti byla využita gravimetrická metoda za podmínek *in vitro*, s využitím kombinované hydrolyzy *pepsinem* a *pankreatinem*. Výsledky ukazují, že sýry vyrobené či běžně konzumované v ČR jsou dobře stravitelné a v porovnání se zahraničními sýry obsahují mnohdy i vyšší obsah stanovovaných vitaminů.

Klíčová slova: nikotinamid, kyselina pantothenová, pyridoxin, sýry, stravitelnost

Abstract

Water soluble vitamins, *in vitro* organic matter (OMD) and dry matter digestibility (DMD) values were determined in various different Czech cheeses. Different hydrolysis conditions and enzymes were used to release these vitamins from their complex form. The best data in enzymatic digestion were obtained by incubating the sample with 1% *clara-dia*stase at 30 °C for 20 hours. The separation was performed on a reversed-phase Supelcosil LC8 column (15 cm x 4.6 mm, 5 µm) with phosphate-methanol (90:10, v/v, pH 7.0) as mobile phase. An enzymatic method was applied for the evaluation of OMD and DMD in cheese. *In vitro* OMD and DMD digestibility was proved by using two enzymatic digestions, *pepsin* and *pancreatin*. Results demonstrated that, examined Czech cheeses contained even higher value of water soluble vitamins and are good digestible for human dietary.

Úvod

Sýry jsou velmi důležitou součástí lidské výživy. Jsou pro nás zdrojem proteinů, lipidů, minerálních látek (hlavně vápníku), vitaminů apod. Z lipofilních vitaminů se v sýrech vyskytují převážně vitaminy skupiny D a E, z hydrofilních vitaminů potom thiamin (B₁), riboflavin (B₂), nikotinamid (B₃), pyridoxin (B₆), biotin, kyselina listová (B₉) a kobalamin (B₁₂)⁽¹⁾. Obsah vitaminů v sýru závisí na mnoha aspektech, např. druhu sýra, technologickém procesu jeho výroby, sezónním výkyvu výživy dojníc atd.⁽²⁾. Obsah lipofilních vitaminů je ovlivněn i samotnou tučností sýra⁽³⁾. V průběhu výroby sýrů se ztrácejí převážně ve vodě rozpustné vitaminy, laktóza, minerální látky, ve vodě rozpustné proteiny či peptidy, menší množství lipidů, které jsou součástí uvolňující se syrovátky. Na tento fakt by měl být brán zřetel i při samotných výrobních technologiích, které mohou využívat daných mikroorganismů, plísňových či kvasinkových kultur, enzymů apod., které pak lépe využívají látky strhávané společně se syrovátkou⁽⁴⁾.

Pro stanovení vitaminů B v mléčných výrobcích se užívá technika RP-HPLC (Vysokoučinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi)⁽⁵⁾. Bylo již publikováno mnoho studií pro stanovení v tuku rozpustných vitaminů v sýrech^(1,6), bohužel skupina vitaminů B je zatím mírně opomíjena. Li⁽⁷⁾ ve své publikaci dokládá, že nejlepší cestou pro izolaci a uvolnění vitaminů B v sýrech je enzymatická hydrolyza v kombinaci s kyselou hydrolyzou, nejlépe v prostředí kyseliny chlorovodíkové.

Nutriční význam sýrů také závisí na jejich dobré stravitelnosti. Ta je jistě závislá na jeho chemickém složení, hlavně na kombinaci a vzájemném poměru jednotlivých nutrientů měnících se v závislosti na výrobní technologii, skladování a zrání sýra. Stanovení stravitelnosti potravin může být provedena v podmínkách *in vivo* nebo *in vitro* (tato technika je více dostupná, snadněji realizovatelná a cenově přístupná). V oblasti stravitelnosti potravin *in vitro* byly aplikovány již mnohé techniky pro stanovení stravitelnosti organické hmoty (OMD - Organic Matter Digestibility) a sušiny (DMD - Dry Matter Digestibility), jejichž výsledky jsou uváděny nejčastěji v %. V naší studii byla provedena kombinovaná hydrolyza *pepsinem* - simulace fyziologických podmínek v žaludku a *pankreatinem* - simulace fyziologických podmínek v tenkém střevu. Druhý zmiňovaný enzym představoval směs *amylázy*, *proteázy* a *lipázy*⁽⁸⁾, přičemž průběh hydrolyzy je ovlivněn pH, použitým enzymem, dobou inkubace, teplotou apod.⁽⁸⁾.

Cílem naší studie bylo stanovit vybrané vitaminy skupiny B (nikotinamid, kyselinu pantothenovou a pyridoxin) v běžně konzumovaných a v převážně většině i v ČR vyráběných sýrech a tyto hodnoty porovnat se sýry jiných zemí v rámci stejného začlenění sýrů do příslušných skupin. Dále si práce kladla za cíl stanovit stravitelnost sušiny a organické hmoty vybraných sýrů gravimetricky technikou *in vitro* postupem kombinované hydrolyzy *pepsinem* a *pankreatinem*.

Metody a materiál

Vzorky sýrů byly zakoupeny v obchodní síti Zlínského regionu v České republice. Pro analýzu vitaminů skupiny B bylo zakoupeno dvanáct různých druhů sýrů, z nich pro stanovení stravitelnosti bylo poté vybráno osm vzorků. Sýry byly před analýzou skladovány v temnu v lednici při kontrolované teplotě 5 °C po dobu 24 až 48 hodin. Pro naši studii byly zakoupeny následující sýry: Lučina, Gervais, Liptov, Balkánský sýr, Jadel, Bystřický tvaroh, Vltavín, Hermelín, Niva, Eidam (30 % t. v s.), Goldenburg a Pivní sýr. Všechny vzorky sýrů, které byly analyzovány v této studii, měly datum minimální trvanlivosti uvedenou výrobcem kratší než 1 týden v době zakoupení výrobku. Každý výrobek byl zakoupen v příslušných maloobchodních baleních po třech kusech.

Stanovení vitaminů B pomocí HPLC

Pro stanovení nikotinamidu, kyseliny pantothenové a pyridoxinu metodou HPLC byl použit kapalinový chromatograf Hewlett Packard Series 1100 (Hewlett-Packard GmbH., Waldbronn, Germany) s binární pumpou a UV/VIS detektorem (HP 1100 Diode Array Detector). Byla použita metoda kapalinové chromatografie na reverzní fázi s kolonou Supelcosil LC 8 (150 x 4.6 mm; 5 µm, Sigma-Aldrich, Německo).

K sestrojení kalibračních přímků byly nejprve připraveny zásobní roztoky standardů nikotinamidu, kyseliny pantothenové a pyridoxinu o koncentraci 40 µg.ml⁻¹. Ty byly skladovány v lednici při teplotě 5 °C nejdéle 24 hodin. Z nich byla připravena kalibrační řada roztoků o koncentraci 1 - 6 µg.ml⁻¹, tyto byly postupně proměřeny za stejných chromatografických podmínek jako vzorky sýrů. Kalibrační křivka byla sestrojena jako závislost plochy píku (mAU.s) na koncentraci vitaminů (µg.ml⁻¹).

Vzorky sýrů byly nejprve homogenizovány v mixéru po dobu nejméně 5 minut. Poté byl metodou kvartace odebrán vzorek, ze kterého bylo naváženo vždy po 12 g pro každou analýzu. Každý sýr tak byl analyzován 5x. Navážka vzorku byla kvantitativně převedena do tmavé Erlenmayerovy baňky a do ní byl přidán 1% roztok enzymatického preparátu *clara-diastázy* o pH 6,0. Vzorek sýru byl s enzymatickým preparátem dokonale promíchán a umístěn do třepací vodní lázně po dobu 20 hodin při 25 °C. Po ochlazení na laboratorní teplotu byl vzorek srážen 80% kyselinou trichloroctovou a roztoky Carrez I a Carrez II a zbytek po rýsku byl doplněn redestilovanou vodou. Vzorek byl přefiltrován přes papírový filtr a poté přes nylonový filtr s velikostí pórů 0,45 µm. Takto připravený vzorek byl umístěn do tmavé vialky a dávkován do HPLC.

Chromatografická separace složek vzorku byla provedena za následujících podmínek: objem vstříkovací smyčky byl 20 µl, byla použita kolona Supelcosil LC 8 (150 x 4.6 mm; 5 µm), termostat kolony byl nastaven po celou dobu analýzy na 25 °C. Jako mobilní fáze byl použit methanol:KH₂PO₄ v poměru 10:90, pH fosfátového pufru mobilní fáze bylo upraveno na 7,0 pomocí 0,1 mol.dm⁻³

NaOH. Po celou dobu analýzy byla zvolena izokratická eluce s průtokem mobilní fáze 1 ml.min⁻¹ a dobou analýzy 30 min. Detekce kyseliny pantothenové probíhala při 204 nm, nikotinamidu a pyridoxinu při 220 nm.

Stanovení stravitelnosti metodou in vitro

Samotnému stanovení stravitelnosti předchází stanovení sušiny a popela. Sušina sýrů byla stanovena dle ČSN EN ISO 5534. Stanovení popela bylo provedeno spálením vzorku v muflové peci při 550 °C po dobu 5,5 hod.

Vzorky sýrů byly před samotnou analýzou důkladně pomlety a rozetřeny ve třecí misce. Sáčky F57 byly vyprány v acetonu a zváženy s přesností na 0,0001 g (m₁). Poté bylo vždy od každého sýru naváženo 0,25 g, tato navážka byla zatavena do sáčku (m₂). Sáčky byly umístěny do inkubačních lahví s enzymatickým preparátem *pepsinu* v 0,1 mol.dm⁻³ HCl. Enzymatická hydrolyza probíhala v inkubátoru Daisy při 40 °C po dobu 6 hodin. Poté byly sáčky vyjmuty a dány do fosfátového pufru (KH₂PO₄ a Na₂HPO₄ · 12 H₂O, pH 7,45) s *pankreatinem*. Enzymatická hydrolyza probíhala opět v inkubátoru Daisy při 40 °C po dobu 24 hodin. Po inkubaci byly sáčky vyjmuty z lahví, důkladně propláchnuty destilovanou vodou a umístěny do sušárny na 24 hodin při 105 °C. Poté byly sáčky vyjmuty, dány do exikátoru a zváženy (m₃). Nakonec byly sáčky spáleny v muflové peci při 550 °C po dobu 5,5 hodiny. Popel byl poté zvážen (m₄). Stravitelnost sušiny (DMD) a organické hmoty (OMD) byla vypočítána pomocí následujících vzorců s využitím MS Excel⁽⁸⁾.

$$1) \text{ DMD} = 100 - \frac{100 \times \text{DMR}}{m_2 \times \text{DM}}$$

$$2) \text{ OMD} = 100 - \frac{(\text{DMR} - m_4)}{m_2 \times \text{DM} \times \text{OM}} \times 100$$

$$3) \text{ DMR} = m_3 - m_{1c1}$$

$$4) \text{ DM} = \frac{\text{DW} \times \text{ms}}{100}$$

$$5) \text{ AR} = m_4 - m_{1c2}$$

$$6) \text{ OM} = \frac{\text{DW} - \text{A}}{100}$$

DMD - stravitelnost sušiny (%), OMD - stravitelnost organické hmoty (%), DMR - hmotnost vzorku bez sáčku po inkubaci a vysušení (g), DM - obsah sušiny ve vzorku (g), DW - sušina vzorku (%), AR - hmotnost popela vzorku bez sáčku (g), OM - obsah organické hmoty v sušině vzorku (g), A - obsah popela (g), ms - hmotnost vzorku na stanovení sušiny (g), c₁ a c₂ - korekce na sáček po inkubaci a po spálení (g), m₁, m₂, m₃ a m₄ - popsáno v metodice.

Výsledky a diskuse

Kalibrační křivky byly sestrojeny s využitím standardů nikotinamidu, kyseliny pantothenové a pyridoxinu. Vitamin B₆ (pyridoxin) byl stanoven jako suma všech jeho forem, tj.

Tab. 1 Výsledky měření kalibračních křivek s regresní rovnicí pro kvantitativní stanovení nikotinamidu, kyseliny pantothenové a pyridoxinu

Vitaminy	Rovnice kalibrační křivky		Korelační koeficient
	204 nm	220 nm	
Nikotinamid	-	$y = 86,974 - 10,297$	0,9988
Kyselina pantothenová	$y = 17,784x + 9,9612$	-	0,9998
Pyridoxin	-	$y = 50,11x - 2,4187$	0,9998

- nebylo vyhodnocováno

Tab. 2 Výsledky stanovení obsahu nikotinamidu, kyseliny pantothenové a pyridoxinu v sýrech

Sýr	Vitamin [mg.100 g ⁻¹] ± S.D.		
	Nikotinamid	Kyselina pantothenová	Pyridoxin
Lučina	0,025±0,002	1,113±0,048	0,045±0,011
Gervais	-	1,263±0,022	0,132±0,009
Bystřický tvaroh	1,557±0,022	0,596±0,030	0,062±0,022
Eidam, 30%	0,050±0,013	0,523±0,012	0,077±0,014
Goldenburg	0,032±0,036	0,426±0,016	0,056±0,009
Hermelín	0,755±0,044	0,460±0,018	0,140±0,037
Niva	0,992±0,036	2,112±0,066	0,129±0,026
Vltavín	1,148±0,025	1,940±0,077	0,311±0,012
Pivní sýr	0,036±0,006	0,770±0,022	0,134±0,024
Polooštiepok	0,091±0,022	0,546±0,019	0,031±0,002
Balkánský sýr	-	0,018±0,008	0,006±0,003
Jadel	0,081±0,013	0,307±0,046	0,012±0,001

- nedetekováno, S.D. - směrodatná odchylka

pyridoxinu, pyridoxalu a pyridoxaminu. Výsledky regresních rovnic kalibračních křivek s příslušnými korelačními koeficienty pro jednotlivé standardy jsou uvedeny v tabulce 1. Pro kvantitativní stanovení vitamínu B₃ a B₆ byla zvolena vlnová délka 220 nm, pro stanovení vitamínu B₅ pak 204 nm. Vzorky sýrů pak byly proměřeny za stejných chromatografických podmínek jako standardy. Z jednotlivých regresních rovnic byly vypočítány koncentrace vitamínů v analyzovaných vzorcích sýrů. Výsledky stanovení obsahu jednotlivých vitamínů ve vybraných sýrech jsou uvedeny v tabulce 2. Obsah vitamínu B₃ se pohyboval mezi 0,025 až 1,557 mg.100 g⁻¹ čerstvé hmoty. Nejvyšší obsah vitamínu B₃ byl naměřen ve vzorku Bystřického tvarohu. Jedná se o sýr vyráběný kyselým srážením kravského mléka, kdy po odchodu syrovátky se tento balí a expeduje, nepodléhá klasickému zrání. Nejnižší obsah vitamínu B₃ byl naměřen v termizovaném sýru Lučina, a to 0,025 mg.100 g⁻¹. V sýrech Gervais a Balkánském sýru obsah vitamínu B₃

nebyl stanoven, protože byl pod hladinou chromatografické detekce, která byla pro nikotinamid pod 0,05 µg.ml⁻¹. Z naměřených výsledků vyplývá, že vyšší množství vitamínu B₃ obecně obsahují sýry plísňové, Hermelín (0,755 mg.100 g⁻¹), Niva (0,992 mg.100 g⁻¹) a Vltavín (1,148 mg.100 g⁻¹). Získané výsledky obsahu vitamínu B₃ se do jisté míry shodují s hodnotami uváděnými v literatuře pro danou skupinu či typy sýrů. Např. Combs⁽⁹⁾ uvádí, že obsah vitamínu B₃ v plísňovém sýru Brie je 0,38 mg.100 g⁻¹, v Camembertu pak dokonce 0,63 mg.100 g⁻¹. V plísňových sýrech vyrobených v českých mlékárnách byl obsah vitamínu B₃ zjištěn skoro dvojnásobný. Co do obsahu kyseliny pantothenové nejvyšší hodnota byla naměřena v plísňovém sýru Niva, a to 2,112 mg.100 g⁻¹. Naopak nejnižší množství vitamínu B₅ bylo naměřeno v Balkánském sýru, pouze 0,018 mg.100 g⁻¹. Vysoké množství vitamínu B₅ bylo ještě naměřeno v dvouplísňovém sýru Vltavín, kde se jeho množství blížilo hodnotě 2 mg.100 g⁻¹. Combs⁽⁹⁾ ve své knize uvádí obsah vitamínu B₅ ve vybraných 23 druzích běžných sýrů v rozmezí od 0,064 do 1,364 mg.100 g⁻¹, přičemž nejvyšší obsah uvádí v sýru Camembert, který je typově srovnatelný se sýrem Hermelín. Pokud porovnáme výsledky stanovení vitamínu B₅ v sýrech s jinými autory, můžeme konstatovat, že v sýrech vyrobených v České republice je opět o něco vyšší obsah tohoto vitamínu⁽¹⁰⁾. Obsah pyridoxinu v porovnání s nikotinamidem a kyselinou pantothenovou byl nižší, což je v souladu s již publikovanými údaji^(9,10). Nejvyšší množství vitamínu B₆ obsahoval dvouplísňový sýr Vltavín (0,311 mg.100 g⁻¹), dále pak sýr s bílou plísní na povrchu Hermelín (0,140 mg.100 g⁻¹) a Pivní sýr (0,134 mg.100 g⁻¹). Naproti tomu v balkánském sýru byl obsah vitamínu B₆ pouze 0,006 mg.100 g⁻¹, což je na samé hranici detekce pro kvantitativní stanovení tohoto vitamínu za daných chromatografických podmínek. Combs⁽⁹⁾ ve své knize uvádí obsah vitamínu B₆ v sýrech v rozmezí 0,020 až 0,424 mg.100 g⁻¹. Zde je nutno konstatovat, že v sýrech vyrobených v mlékárnách na území České republiky byl zjištěn obsah vitamínu B₆ nižší, než udává literatura^(9,10). Obecně obsah vitamínů, ať už hydrofilních či lipofilních, je závislý na: výživě dojnice a plemenu, jejím způsobu ustájení, ročním období, tepelném ošetření mléka, technologickém postupu při výrobě sýra, množství odebrané/odchozí syrovátky, v níž jsou vitaminy sk. B rozpustné, podmínkách při balení a expedici sýrů, jejich dalším skladování a dozrávání apod. (6).

Tab. 3 Výsledky stanovení sušiny a popele pro následné stanovení stravitelnosti metodou *in vitro*

Sýr ± S.D.	Goldenburg	Niva	Lučina	Vltavín	Hermelín	Gervais	Eidam	Tvaroh
Sušina (%)	60,0±0,21	52,1±0,32	40,2±0,10	54,05±0,22	46,2±0,10	36,5±0,12	52,0±0,15	25,0±0,12
Popel (%)	4,2±0,10	4,6±0,24	1,9±0,20	3,35±0,12	3,4±0,20	1,3±0,14	3,9±0,22	1,6±0,14

S.D. - směrodatná odchylka

Tab. 4 Výsledky stanovení stravitelnosti sýrů *in vitro* vyjádřené jako stravitelnost sušiny (DMD) a organické hmoty (OMD)

Sýr ± S.D.	Goldenburg	Niva	Lučina	Vltavín	Hermelín	Gervais	Eidam	Tvaroh
DMD (%)	98,6±0,32	99,7±0,02	99,54±0,28	98,5±0,74	98,0±0,20	99,8±0,16	99,8±0,17	99,3±0,27
OMD (%)	99,4±0,22	99,9±0,02	99,9±0,02	99,4±0,50	99,3±0,16	100,0±0,06	99,9±0,04	99,9±0,05

S.D. - směrodatná odchylka

Pro *in vitro* modelaci stravitelnosti sýrů bylo použito kombinované enzymatické hydrolyzy *pepsinem* a *pankreatinem*. Zároveň s analýzou stravitelnosti byla stanovena hodnota sušiny a obsah popele v % (8,11). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3. Výsledky stravitelnosti jsou uvedeny v tabulce 4, v hodnotách stravitelnosti sušiny (DMD) a organické hmoty (OMD) vyjádřené opět v %. Pro měření stravitelnosti bylo vybráno osm zástupců sýrů, které reprezentují nejběžnější konzumované typy sýrů v České republice: Goldenburg, Eidam, Niva, Lučina, Vltavín, Hermelín, Gervais a Tvaroh. Pro gravimetrické stanovení stravitelnosti sýrů v zaživacím traktu způsobem *in vitro* pomocí kombinované hydrolyzy *pepsinem* a *pankreatinem* bylo obecně potvrzeno, že sýry jsou pro lidský organizmus dobře stravitelné. Při kombinované enzymatické hydrolyze byla stravitelnost všech sýrů prakticky 100%. Je nutno připomenout, že všechny analyzované sýry byly skladovány před vlastní analýzou jen dva dny a doba jejich min. trvanlivosti nebyla delší než 1 týden. Stravitelnost závisí i na stupni zralosti sýra. Pokud bychom chtěli porovnat stravitelnost sýrů s jinými potravinami, museli bychom dodržet stejné podmínky metodiky. Nicméně, spousta autorů se ve svých studiích zabývá stravitelností různých druhů potravin^(12,13). Například Abdel-Aal⁽¹¹⁾ ve své studii analyzuje stravitelnost proteinů pekárenských výrobků z pšenice špaldy, kdy udává hodnoty stravitelnosti v rozsahu od 36 do 66 %, Mokrane⁽¹⁴⁾ udává stravitelnost čiroku *pepsinem* do 65 %, jsou studovány vlivy tepelných úprav na stravitelnost luštěnin, dále pak na rýži s rozdílným obsahem amylózy apod.⁽¹⁵⁾, kdy se hodnoty stravitelnosti škrobu a proteinů rýže pohybují v rozmezí 25 až 75 %.

Závěr

V této práci byly použity dvě analytické metody. První metodou byla RP-HPLC, kterou byly stanoveny jednotlivé vitaminy skupiny B v sýrech, které byly vyrobeny na území České republiky nebo jsou zde často konzumovány. K izolaci vitaminů bylo použito enzymatické hydrolyzy pomocí směsného enzymatického preparátu *clara-díastázy*. Obsah vitamínu B₃ a B₅ byl skoro dvojnásobně vyšší než je uváděno v literatuře, naopak obsah vitamínu B₆ byl nižší (9,10). Dále byla technikou *in-vitro* zjišťována stravitelnost sýrů pomocí gravimetrické analýzy v inkubátoru Daisy. Výsledky stravitelnosti byly vyjádřeny v hodnotách stravitelnosti sušiny (DMD) a organické hmoty vzorku (OMD). Ke zjištění stravitelnosti bylo využito enzymatické hydrolyzy vzorků *pepsinem* a *pankreatinem*. Bylo zjištěno, že stravitelnost sýrů je až 100%.

Literatura

- HERRERO-BARBUDO, M.C., GRANADO-LORENCIO, F., BLANCO-NAVARRO, I., OLMEDILLA-ALONSO, B. (2005). Retinol, α - and γ -tocopherol and carotenoids in natural and vitamin A- and E-fortified dairy products commercialized in Spain. *International Dairy Journal*, 15, p. 521-526.
- LUCAS, A., ROCK, E., CHAMBA, J.F., VERDIER-METZ, I., BRACHET, P., COULON, J.B. (2006). Respective effects of milk composition and the cheese-making process on cheese compositional variability in components of nutritional interest. *Laït*, 86, p. 21-41.
- KOSSEVA, M.R., PANESAR, P.S., KAUR, G., KENNEDY, J.F. (2009). Use of immobilized biocatalysts in the processing of cheese whey. *International Journal of Biological Macromolecules*, 45, p. 437-447.
- WOOLLARD, D.C., INDYK, H.E., CHRISTIANSEN, S.K. (2000). The analysis of pantothenic acid in milk and infant formulas by HPLC. *Food Chemistry*, 69, p. 201-208.
- UBALDI, A., SERVENTI, P., DELBONO, G. (2006). Determination of vitamin E levels in aged cheeses. *Ann. Fac. Medic. Vet. di Parma*, 26, p. 137-144.
- LI, H.B., CHEN, F. (2001). Simultaneous determination of nine water-soluble vitamins in pharmaceutical preparations by high-performance liquid chromatography with diode array detection. *Journal of Separation Science*, 24, p. 271-274.
- MÍŠURCOVÁ, L. Nové nutriční aspekty a využití mořských a sladkovodních řas ve Výživě člověka, Dizertační práce, UTB ve Zlíně, 2008.
- COMBS, G.F. (1992) *The Vitamins - Fundamental aspect in nutrition and health*, California: Academic Press, USA, ISBN 0-12-183492-1.
- U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE, AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE. (2010). *USDA National Nutrient Database for Standard Reference*, Release 22. Nutrient data laboratory home page: <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>.
- ABDEL-AAL, E.S.M. (2008) Effect of baking on protein digestibility of organic spelt products determined by two *in vitro* digestion methods. *LWT*, 41, p. 1282-1288.
- SHIM, S.M., CHOI, M.H., PARK, S.H., GU, Y.U., OH, J.M., KIM, S., KIM, H.Y., KIM, G.H., LEE, Y. (2010) Assessing the digestibility of genetically modified soybean: Physiologically based *in vitro* digestion and fermentation model. *Food Research International*, 43, p. 40-45.
- SANTÉ-LHOUELLIER, V., ENGEL, E., AUBRY, L., GATELLIER, P. (2008) Effect of animal (lamb) diet and meat storage on myofibrillar protein oxidation and *in vitro* digestibility. *Meat Science*, 79, p. 777-783.
- MOKRANE, H., AMOURA, H., BELHANECH-BENSEMRA, N., COURTIN, CH.M., DELCOUR, J.A., NADJEMI, B. (2010) Assessment of Algerian sorghum protein quality (*Sorghum bicolor* L. Moench) using amino acid analysis and *in vitro* pepsin digestibility. *Food Chemistry*, 121, p. 919-923.
- SAGUM, R., ARCOT, J. (2000) Effect of domestic processing methods on the starch, non-starch polysaccharides and *in vitro* starch and protein digestibility of three varieties of rice with varying levels of amylase. *Food Chemistry*, 70, p. 107-111.

Přijato do tisku 11. 6. 2010

Lektorováno 7. 7. 2010