

Změny proteinů v průběhu zrání měkkých sýrů s plísní na povrchu

Bc. Martina Bejblová

Diplomová práce
2010

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav biochemie a analýzy potravin

akademický rok: 2009/2010

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Martina BEJBLOVÁ**
Osobní číslo: **T08785**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Změny proteinů v průběhu zrání měkkých sýrů
s plísní na povrchu**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Stručně charakterizujte mléko jako základní surovinu a technologii výroby sýrů s plísní na povrchu
2. Zabývejte se biochemickými reakce probíhajícími v sýrech během jejich zrání
3. Charakterizujte biochemickou aktivitu plísní *Penicillium camemberti* a *Penicillium nalgiovense*

II. Praktická část

1. Analyzujte modelové vzorky s vybranými kmeny *P. camemberti* a *P. nalgiovense* v průběhu jejich zrání
2. Sledujte obsah volných aminokyselin a proteinový profil metodou SDS-PAGE

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

1. FOX, P.F., GUINEE, T.P., COGAN, T.M., McSWEENEY, P.L.H., *Fundamentals of Cheese Science*. AN ASPEN PUBLICATION, Maryland, 2000. 559 s.
2. FOX, P.F., McSWEENEY, P.L.H., *Dairy chemistry and biochemistry*. Ireland 1998. 463 s.
3. JAY, J.M., *Modern food microbiology*. Sixth Edition. Nevada 2000. 637 s.
4. KNĚŽ, V. *Výroba sýrů*. 2.vyd. Praha: SNTL, 1960. 377 s.

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. František Buňka, Ph.D.

Ústav technologie a mikrobiologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

4. ledna 2010

Termín odevzdání diplomové práce:

19. května 2010

Ve Zlíně dne 8. dubna 2010



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
ředitel ústavu

ABSTRAKT

Tato práce byla zaměřena na sledování změn obsahu volných aminokyselin v průběhu zrání měkkých sýrů s plísní na povrchu. Sledoval se obsah volných aminokyselin pomocí automatického analyzátoru aminokyselin – AAA400 a proteinový profil metodou SDS-PAGE. Analyzovány byly modelové vzorky s vybranými kmeny *P. nalgiovensis* a *P. camemberti* v průběhu jejich zrání. Vzorky naočkované *P.camemberti* sloužily jako srovnávací standardy. Teoretická část práce je věnována stručnému popisu základních složek mléka jako hlavní suroviny pro výrobu sýrů. Dále zde byly popsány obecné rysy technologie výroby sýrů s plísní na povrchu a biochemické reakce probíhající v sýrech během jejich zrání. Je zde také popsána biochemická aktivita plísní *Penicillium camemberti* a *Penicillium nalgiovensis*. Na základě teoretické části a výsledků praktické části byli vybráni zástupci *P.nalgiovensis*, jejichž proteolytická aktivita byla podobná s aktivitou *P. camemberti*.

Klíčová slova: *P.camemberti*, *P.nalgiovensis*, SDS-PAGE, aminokyselina

ABSTRACT

The work thesis deals with changes of free amino acids content during ripening of soft cheese covered by white mould. Free amino acids content analyzed using Amino Acid Analyzer – AAA 400 and protein profile was observed using SDS-PAGE. Model samples with selected strains of *P.nalgiovensis* and *P.camemberti* were observed during ripening period. Products with *P.camemberti* were control samples. Theoretic part is focused on short characterization of component of milk as a raw material for cheeses production. Moreover, general properties of soft cheese covered by white mould were mentioned and biochemical reaction during the ripening in cheeses were describe. Biochemical activity of mould *Penicillium nalgiovensis* and *Penicillium camemberti* is also described. Samples of *P.nalgiovensis* whose proteolytic activity was similar to activity of *P.camemberti* were chosen.

Keywords: *P.camemberti*, *P.nalgiovensis*, SDS-PAGE, amino acid

Tímto děkuji vedoucímu své diplomové práce doc. Ing. Františku Buňkovi, Ph.D. za odborné vedení, ochotu a poskytnutí cenných rad k mé diplomové práci. Mé díky patří také RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za ochotu a pomoc s vyhodnocováním praktické části. Dále bych ráda poděkovala Bc. Ludmile Zálešákové, Dis. za užitečné rady při konání mé praktické části. V neposlední řadě bych ráda poděkovala Ing. Josefu Mrázkovi za poskytnutí vzorků sýrů potřebných pro mou práci a sdělení doplňujících informací o výrobě těchto sýrů.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně15.5.2010.....

.....*Bejblová*.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 MLÉKO - ZÁKLADNÍ SUROVINA	12
1.1 BÍLKOVINY MLÉKA.....	12
1.2 OSTATNÍ SLOŽKY MLÉKA	14
1.3 VLASTNOSTI SYROVÉHO MLÉKA.....	16
2 STRUČNÁ HISTORIE SÝRAŘSTVÍ	18
3 TECHNOLOGIE VÝROBY SÝRA S PLÍSNÍ NA POVRCHU	19
3.1 PŘEHLED SÝRŮ S PLÍSNÍ NA POVRCHU	19
3.2 OBECNÁ TECHNOLOGIE VÝROBY SÝRA S PLÍSNÍ NA POVRCHU	22
4 BIOCHEMICKÉ REAKCE PROBÍHAJÍCÍ V SÝRECH BĚHEM JEJICH ZRÁNÍ	26
4.1 ROZKLAD LAKTOSY A JEJICH METABOLITŮ.....	26
4.2 ROZKLAD BÍLKOVIN	27
4.3 ZMĚNY MLÉČNÉHO TUKU	31
5 VLASTNOSTI <i>PENICILLIUM NALGIOVENSIS</i> A <i>PENICILLIUM CAMEMBERTI</i>	32
5.1 NALŽOVSKÝ SÝR.....	32
5.2 <i>PENICILLIUM NALGIOVENSIS</i> A JEHO VLASTNOSTI	33
5.3 <i>PENICILLIUM CAMEMBERTI</i> A JEHO VLASTNOSTI.....	34
II METODIKA PRÁCE	37
6 CÍL PRÁCE	38
7 POPIS EXPERIMENTU	39
8 STANOVENÍ OBSAHU VOLNÝCH AMINOKYSELIN	41
9 PROTEINOVÝ PROFIL (SDS-PAGE)	42
10 METODY VYHODNOCENÍ	44
10.1 REGRESNÍ A KORELAČNÍ ANALÝZA.....	44
10.2 SHLUKOVÁ ANALÝZA	45
III VÝSLEDKY A DISKUZE	46
11 VÝSLEDKY	47
11.1 VÝVOJ OBSAHU VŠECH VOLNÝCH AMK V ČASE	47
11.2 VÝVOJ JEDNOTLIVÝCH FAA V ČASE	48
11.2.1 Vzorek č.1	48
11.2.2 Vzorek č. 2	50

11.2.3	Vzorek č. 3	51
11.2.4	Vzorek č. 4	53
11.2.5	Vzorek č. 5	55
11.2.6	Vzorek č. 6	57
11.2.7	Vzorek č. 7	59
11.2.8	Vzorek č. 8	61
11.2.9	Vzorek č. 9	63
11.2.10	Vzorek č. 10	65
11.3	KORELAČNÍ ANALÝZA ZÁVISLOSTI VÝVOJE JEDNOTLIVÝCH FAA	67
11.4	VÝSLEDKY SDS-PAGE	70
DISKUZE	73
ZÁVĚR	76
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	77
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	83
SEZNAM OBRÁZKŮ	84
SEZNAM TABULEK	86
SEZNAM PŘÍLOH	87

ÚVOD

Mléčné výrobky jsou dnes nedílnou součástí našeho jídelníčku. Zatímco v dávných dobách to bylo pouze mléko, které doplňovalo základní stravu, později se díky empirickým zkušenostem, novým objevům a nutnosti konzervace rozvinul i mlékárenský průmysl, který zpracovával mléko na různé produkty. Tyto produkty pak mohly být využívány buď jako vedlejší nebo hlavní část pokrmů. Nedílnou součástí mlékárenského průmyslu dnes tvoří i měkké sýry s plísní na povrchu. Jejich sortiment je velice rozmanitý, přesto se odborníci snaží hledat stále nové variace těchto sýrů.

Tato práce je zaměřena na sledování změn obsahu volných aminokyselin a proteinového profilu v průběhu zrání měkkých sýrů s plísní na povrchu. Výsledky této diplomové práce mohou přispět k oživení historicky známé výroby Nalžovského sýra za použití tradiční plísňové kultury *Penicillium nalgiovensis*, čímž by mohlo dojít k rozšíření dnešního sortimentu sýrů s plísní na povrchu.

Teoretická část práce je věnována stručnému popisu základních složek mléka jako hlavní suroviny pro výrobu sýrů. Dále zde byly popsány obecné rysy technologie výroby sýrů s plísní na povrchu a stručně charakterizovány biochemické reakce probíhající v sýrech během jejich zrání. Je zde také stručně popsána biochemická aktivita plísní *Penicillium camemberti* a *Penicillium nalgiovensis*. *P.camemberti* je ušlechtilá plíseň, využívaná běžně pro výrobu měkkých sýrů s plísní na povrchu.

Praktická část zahrnuje metodiku, kde je uveden přehled kultur použitých na jednotlivých vzorcích (8 kmenů *P.nalgiovensis* a 2 kmeny *P.camemberti*), dále pak metoda stanovení volných aminokyselin a postup, kterým byl sledován proteinový profil. Vzorky naočkované *P.camemberti* sloužily jako srovnávací standardy, s nimiž se porovnávaly vzorky naočkované kmeny *P.nalgiovensis*. Stručně je zde popsán způsob vyhodnocení výsledků stanovení. Ve výsledkové části jsou uvedeny výsledky regresní a korelační analýzy stanovení celkového obsahu volných aminokyselin ve vzorcích a také výsledky proteinového profilu.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 MLÉKO - ZÁKLADNÍ SUROVINA

Mléko je komplexní zdroj živin včetně bílkovin, sacharidů, lipidů, vitaminů a minerálních látek. Je to nenahraditelný zdroj těchto látek pro kojence, ale i důležitá součást stravy pro dospívající, dospělé, staré a nemocné lidi. Mlékem se nazývá tekutý sekret mléčné žlázy savců. Kravské mléko obsahuje průměrně 88 % vody a 12 % sušiny. [11, 17]

1.1 Bílkoviny mléka

Bílkoviny tvoří základní součásti buněčných struktur, mezibuněčných tkání, hormonů a enzymů. Živý organismus je přijímá v potravě ve formě živočišných nebo rostlinných bílkovin, trvale přestavuje jejich strukturu a obnovuje je. Minimální denní potřeba proteinů je u dospělého člověka asi 0,5 až 0,6 g plnohodnotného proteinu na jeden kilogram tělesné hmotnosti. Optimální potřeba je o něco vyšší, protože ne všechny aminokyseliny jsou vždy přítomny v optimálním množství a poměru. Nejčastěji se proto doporučuje příjem dle [39] 1,0 – 1,3 g.kg⁻¹. [16, 39, 41]

Dusíkaté látky jsou nejkomplexnější složkou mléka, určují základní fyzikálně-chemické vlastnosti mléka a spoluurčují nutriční hodnotu mléka. Dusíkaté látky se dělí na čisté bílkoviny a nebílkovinné dusíkaté látky. Čisté bílkoviny dále dělíme na kasein a syrovátkové bílkoviny, neboli bílkoviny mléčného séra. Mezi ostatní dusíkaté látky patří močovina, amoniak, kreatin, kyselina močová, lipoproteiny, enzymy a další. Obsah bílkovin v mléce kolísá dle [41] v rozmezí 2,8 – 3,5 %, většinou však kolísá od 3,1 % do 3,4 %. Závisí zejména na plemenu dojnic a jejich zdravotním stavu. Méně je ovlivňován způsobem krmení.

Kaseiny obvykle tvoří asi 80 % všech mléčných bílkovin. Stejně jako většina proteinů obsahují kaseiny všechny esenciální aminokyseliny. Z hlediska jejich kvantitativního zastoupení je zvláště cenný pro vysoký obsah lysinu a nepolárních aminokyselin (prolin, valin, leucin, isoleucin, fenylalanin, tyrosin). V deficitu se nachází sirné aminokyseliny, dominantní aminokyselinou je glutamová kyselina, jejíž obsah je dle [19] více než 22 %.

Kasein není tvořen pouze jedním typem molekul, ale existuje řada různých variant, které se od sebe liší chemickou strukturou a vlastnostmi.

Mezi frakce kaseinu řadíme α_{S1} -kasein, jehož obsah v mléce je přibližně 12 – 15 g.l⁻¹, což je asi 40 % kaseinu. Obsahuje 199 aminokyselin o molekulové hmotnosti 23,6 kDa. V ře-

těžci obsahuje 17 prolinových zbytků, které jsou rovnoměrně distribuovány a také 8 fosfoserinových zbytků, které způsobují hydrofilnost řetězce v polohách 43 až 80. Tato frakce kaseinu tvoří i s malou koncentrací vápenatých iontů nerozpustnou sůl. Isoelektrický bod α_{S1} -kaseinu je při pH 4,92 – 5,35.

Další frakcí je α_{S2} -kasein. Jeho obsah je 3 – 4 g.l⁻¹, což představuje asi 10 % kaseinu. Obsahuje 207 aminokyselin o molekulové hmotnosti 25,5 kDa. Prolinových zbytků obsahuje 10 a tyto jsou nerovnoměrně distribuovány. Fosfoserinových zbytků je 11. Tato frakce není tak citlivá na přítomnost vápenatých iontů jako α_{S1} -kasein.

Obsah β -kaseinu v mléce je 9 – 11 g.l⁻¹, což je asi 35 % kaseinu. Je složen z 209 aminokyselin o molekulové hmotnosti 24,0 kDa. Isoelektrický bod je při pH 5,20 – 5,85. Obsahuje 35 prolinových zbytků a 5 fosfoserinových zbytků. Kyselina fosforečná je lokalizována v polohách 1 až 20. S vápenatými ionty tvoří rozpustné soli při teplotách pod 1 °C, při vyšších teplotách tvoří nerozpustnou sůl. Působením proteolytických enzymů (zejména plasminu) jsou odštěpovány γ -kaseiny, kterých je 3 – 10 %. Dle obsahu zbytků aminokyselin z β -kaseinu rozdělujeme γ -kaseiny na γ_1 -kaseiny (zbytek 29 – 209 AMK, molekulová hmotnost 20,5 kDa), proteoso-peptony (zbytek 1 – 28 AMK), γ_2 -kaseiny (zbytek 106 – 209 AMK, molekulová hmotnost 11,8 kDa) a γ_3 -kaseiny (108 – 209 AMK, molekulová hmotnost 11,6 kDa).

V neposlední řadě existuje varianta kaseinu zvaná κ -kasein. Zastoupení této frakce je 2 – 4 g.l⁻¹, což představuje asi 12 % kaseinu. Obsahuje 169 aminokyselin o molekulové hmotnosti 19,0 kDa. Isoelektrický bod je při pH 5,37. Obsahuje 20 prolinových zbytků a pouze jednu fosfoserinovou skupinu, což má za následek malou citlivost k vápenatým iontům, s nimiž tvoří rozpustné soli. Tím, že se κ -kasein nachází v povrchové vrstvě micely a navíc není citlivý na vápenaté ionty, tak plní funkci ochranného koloidu, tedy stabilizuje ostatní frakce kaseinu. Velký význam nabývá κ -kasein při sladkém srážení. Působením proteolytických enzymů se štěpí mezi 105 a 106 aminokyselinou, tedy mezi fenylalaninem a methioninem. Takto hydrolyzovaný κ -kasein není schopen plnit funkci ochranného koloidu, což má za následek vznik sýřeniny. Při tomto štěpení vznikají dvě frakce κ -kaseinu. Para- κ -kasein (zbytek obsahující 1 – 105 AMK) je hydrofobní a zůstává tedy s ostatními vysráženými frakcemi a κ -kaseinmakropeptid (zbytek obsahující 106 – 169 AMK) je hydrofilní a odchází do syrovátky.

Sérové bílkoviny se nachází v mléce v množství cca 20 % čistých bílkovin. Jsou termolabilní, což znamená, že při tepelném ošetření mléka nad 60 – 70 °C, na rozdíl od kaseinu, denaturují.

Zastoupen je α -laktalbumin, který tvoří asi 25 % sérových proteinů. Obsahuje 162 aminokyselin o molekulové hmotnosti 18 kDa. Isoelektrický od je při pH 5,35 – 5,41. Je velmi termolabilní.

β -laktoglobulin tvoří asi 50 % sérových proteinů, řetězec obsahuje 123 aminokyselin o molekulové hmotnosti 14 kDa. Isoelektrický bod je při pH 4,2 – 4,5.

Sérumalbumin je složen z 582 aminokyselin a jeho molekulová hmotnost je 66 kDa. Zvýšené hladiny tohoto proteinu je možné sledovat u dojnic se zánětlivým onemocněním.

Imunoglobuliny jsou minoritní vysokomolekulární globulární glykoproteiny zajišťující přenos imunity z matky na mládě. U zdravých dojnic je koncentrace velmi nízká, vysoký obsah je typický pro kolostrum.

Proteoso-peptony jsou nízkomolekulární proteiny obsahující fosfor. Molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 4 – 41 kDa. [10, 17, 19, 36, 39, 49]

1.2 Ostatní složky mléka

Tuk je v mléce dispergován ve formě tukových kuliček, nepolární triacylglyceroly (99 % mléčného tuku) jsou obklopeny vrstvou povrchově aktivních látek, především fosfolipidů a membránových lipoproteinů. V přirozeném pH mléka nesou membránové bílkoviny negativní náboj a hydratační obal, který zabraňuje spojování tukových kuliček a slévání mléčného tuku. Lipidy obsahují především nasycené mastné kyseliny (až 75 %) zejména kyselinu myristovou, palmitovou a stearovou. V menší míře zde najdeme také nenasycené mastné kyseliny z nichž je dominantní kyselina olejová. Složení mléčného tuku a tím i jeho vlastnosti se mění. Změny jsou do značné míry závislé na složení krmiva pro dojnice, které toto mléko produkují. Při zeleném krmení a pastvě, tedy v letních měsících, je mléčný tuk měkčí, vláčňejší, roztíratelnější. V zimě je tomu naopak. Obdobně se mění i barva mléčného tuku. V létě obsahuje mléčný tuk více karotenů, takže má žlutější barvu než v zimě, kdy je karotenů v krmění dojnic a tím i v mléce méně. Mléčný tuk má vysokou schopnost pohlcovat a zachovávat si různé pachy ze svého okolí, což může někdy výrazně ovlivnit chuť a

vůni mléčného výrobku. Průměrný obsah tuku v syrovém kravském mléce se v současné době pohybuje dle [41] v rozmezí 3,9 – 4,2 %.

Mléčný cukr - laktosa je disacharid tvořený D-glukosou a D-galaktosou spojené β (1→4) glykosidickou vazbou. Laktosa se tvoří v mléčné žláze, dodává mléku nasládlou chuť a je zdrojem energie. Přestože sladivost laktosy je výrazně nižší než u sacharosy má laktosa stejný energetický obsah jako jiné cukry. Laktosa je substrátem pro rozvoj řady bakterií, kterému je zapotřebí na jedné straně zabránit, v případě fermentovaných mléčných výrobků a sýrů je ovšem využití laktosy bakteriemi mléčného kvašení základním technologickým procesem. Obsah laktosy je poměrně stabilní, kolísá dle [41] v rozmezí od 4,6 % do 4,9 %, nižší hodnoty se vyskytují pouze u dojnic postižených zánětem vemene. Kromě laktosy se v mléce vyskytuje v malém množství glukosa, galaktosa, N-acetylneuraminová kyselina, N-acetyl-D-glukosamin, N-acetyl-D-galaktosamin a další.

Minerální látky jsou přítomny v různé formě (v roztoku, v koloidní formě, vázány na složky mléka). Významné jsou z hlediska výživy, udržení acidobazických a osmotických rovnováh v mléce, aktivují některé enzymy. Z technologického hlediska je nejvýznamnější obsah a formy vápníku v mléce, protože aktivita Ca^{2+} významně ovlivňuje koloidní stabilitu kaseinu, tedy jednak termostabilitu mléka a jednak sladké srážení mléka a vlastnosti sýřeniny při výrobě sýrů. Obsah minerálních látek v syrovém mléce se pohybuje dle [41] v rozmezí 0,7 – 0,8 %. Zastoupení jednotlivých prvků (oxidů, solí) v popelovinách syrového kravského mléka je uvedeno v následující tabulce [41]. Mateřské mléko obsahuje minerálních látek méně, přibližně jednu třetinu.

Tab.1 – Složení popelovin kravského mléka v g na 100 g mléka [41]

Sloučenina	K ₂ O	Na ₂ O	CaO	MgO	Fe ₂ O ₃	Cl	P ₂ O ₅	SO ₃
Obsah [g/100g]	0,178	0,097	0,167	0,023	0,002	0,137	0,191	0,003

Mléko je prakticky jediný zdroj vitaminů pro sající mláďata. Vitaminy skupiny A, D a E jsou rozpuštěny v mléčném tuku, vitaminy skupiny B a vitamin C pak v plazmě mléka. Obsah vitaminů v mléce a mléčných výrobcích kolísá podle původu mléka a způsobu krmení dojnic a také v návaznosti na použité technologie při zpracování mléka na mléčné výrobky. Zejména vitaminy rozpustné v mléčném tuku jsou z pohledu výživy velmi významné. Obsah vitaminu C je z výživového hlediska prakticky zanedbatelný, proto nelze

mléčné výrobky zahrnovat do významnějších zdrojů tohoto vitamínu. Význam ale nabývá jako antioxidant, protože chrání foláty před oxidací.

V mléce je značné množství enzymů. Některé jsou syntetizovány v mléčné žláze, jiné přechází z krve dojnice a některé se mohou dostat do mléka z kontaminující mikroflory. Významné enzymy jsou laktoperoxidasy, lipasy, fosfatasy, proteasy, amylasy, lysozym.

V mléce se nachází také hormony. Jedná se o produkty žláz s vnitřní sekrecí. Katalyzují a řídí metabolické pochody v organismu. [17, 19, 27, 35, 41]

1.3 Vlastnosti syrového mléka

Specifická hmotnost mléka se obvykle pohybuje v rozmezí 1,028 – 1,032 g.cm⁻³ [14]. Závisí na obsahu základních složek. S rostoucím obsahem tuku se snižuje a s rostoucím obsahem bílkovin, laktosy a minerálních látek se zvyšuje. Výrazná změna specifické hmotnosti může ukazovat na přídavek vody, zhoršení zdravotního stavu dojníc, či různé dietetické poruchy.

Bod mrznutí mléka je relativně konstantní. Předepsaná hodnota je $\leq - 0,520$ °C [14]. Pokles ve srovnání s vodou způsobuje zejména obsah laktosy a rozpuštěné soli.

U mléka a mléčných výrobků se kyselost vyjadřuje jako titrační a aktivní.

Titrační kyselost vyjadřuje spotřebu 0,25 mol.l⁻¹ NaOH potřebného k neutralizaci kyselých reagujících látek v 100 ml vzorku na indikátor fenolftalein. V ČR se považuje za normální stav rozmezí 6,2 – 7,8 °SH [14]. Může mírně kolísat a to u jedné dojnice v různých dnech. Ke konci laktace bývá nižší. Kyselost mléka je podmíněna přítomností bílkovin, fosfátů, citrátů a CO₂, proto mírné zvýšení ihned po nadojení není důsledek přítomnosti kyseliny mléčné.

Aktivní kyselost je záporně dekadický logaritmus oxoniových iontů. U čerstvě nadojeného mléka je pH obecně 6,4 – 6,8 [14]. Stanovení pH u čerstvě nadojeného mléka nemusí však být vždy nejlepším měřítkem hodnocení mléka. Mléko má puфраční schopnost, čili schopnost eliminovat vliv malých přídavek kyselin nebo zásad na pH. Proto prostřednictvím pH nedetekujeme první stadia rozkladu laktosy na kyselinu a titrační kyselost je tedy vhodnějším ukazatelem čerstvosti mléka. Bez puфраční schopnosti mléka by většina mikroorganismů odumřela, protože nemusí snášet vysokou aktuální kyselost.

Kysací schopnost mléka je schopnost tvorby kyseliny mléčné z laktosy a to bakteriemi mléčného kvašení. Bakterie mléčného kvašení jsou velmi citlivé na vnější podmínky. Růst těchto bakterií může být inhibován přirozenými inhibitory jako imunoglobuliny, lysozymem a další. V mléce se mohou vyskytovat také cizorodé inhibiční látky jako rezidua čisticích a dezinfekčních prostředků, rezidua chemických přípravků z krmiv, rezidua ochranných prostředků rostlin a rezidua veterinárních léčiv. Mléko obsahující rezidua inhibičních látek je nutné vyřadit ze zpracování.

Syřitelnost je schopnost mléka srážet se syřidlem a tvořit sýřeninu požadovaných vlastností. Je základní kritérium jakosti mléka pro sýrařskou technologii. Syřitelnost ovlivňuje obsah kaseinu, zastoupení frakcí, obsah a formy vápníku a fosforu, pH mléka, teplota a jiné.

Termostabilita mléka je schopnost mléka, resp. kaseinu, zachovat si své původní koloidní vlastnosti při působení vysokých teplot. Udává se jako čas potřebný k dosažení počátku koagulace při určité teplotě. Termostabilita mléka závisí na celé řadě faktorů, které vyplývají jak z chemického složení mléka, tak z podmínek zpracování mléka. Rozhodujícím faktorem je aktivní kyselost mléka. Obvykle má mléko optimální termostabilitu při pH 6,5 – 6,6 [27]. Pod touto hodnotou termostabilita prudce klesá a při pH 6,2 mléko koaguluje již při 70 – 80 °C. Mléko s dobrou termostabilitou koaguluje při 140 °C po více než 20 minut [27].

Mléko má malé povrchové napětí. Jedná se o energii potřebnou k vytvoření co nejmenšího povrchu kapaliny. U mléka při 20 °C činí cca $47 \cdot 10^{-3} \text{ N} \cdot \text{m}^{-1}$. Chlazením povrchové napětí klesá. Tím, že má mléko malé povrchové napětí, snadněji proniká do skulin a pórů a je obtížné jej vytěsnit, proto se používají alkalické prostředky s relativně vyšším povrchovým napětím.

Mezi základní sensorické vlastnosti mléka patří zejména chuť. Chuť mléka je mírně nasládlá, což je způsobeno laktosou. Chuť ovlivňuje také obsah tuku a fosfolipidů. Mléko nemá žádnou zvláštní výraznou vůni, snadno přijímá cizí pachy z prostředí, proto je nutno důsledně dodržovat hygienu při získávání a manipulaci s mlékem. Barva mléka je neprůhledně bílá v důsledku tukových kuliček a micelárního kaseinu. Intenzita slabě krémového odstínu je dána obsahem karotenoidů a riboflavinu. Samotný riboflavin dává nazelenalou barvu, což je charakteristické pro syrovátku. Konzistence mléka je dána vysokým obsahem vody. [14, 27, 36, 37, 38]

2 STRUČNÁ HISTORIE SÝRAŘSTVÍ

Sýr je obecný název pro skupinu mléčných výrobků produkovaných po celém světě ve velké rozmanitosti vůní, chutí i struktury. Nikdo vlastně doopravdy neví, kdy a kde byl sýr poprvé vyroben. Pravděpodobně byla výroba sýrů zavedena v různých oblastech současně. Víme, že ovce zdomácněly asi před dvanácti tisíci lety a krávy se chovaly už ve starověkém Egyptě. Je možné předpokládat, že sýr následoval brzy poté, co se tato zvířata začala chovat pro mléko.

Mléko se skladovalo v kožených vacích, v hliněných nebo dřevěných nádobách. Protože bylo obtížné udržet tyto nádoby čisté, mléko rychle kyslo a vzniklé tvarohy měly velmi omezenou trvanlivost. Bylo pravděpodobně také zjištěno, že trvanlivost tvarohů by mohla být prodloužena sušením či přidávkem soli (například Feta sýr, dnes rozšířený hlavně na Balkánu a Blízkém východu, kde je teplota okolí relativně vysoká).

Použití syřidla pro srážení mléka bez kysnutí znamenalo ve výrobě sýrů veliký krok kupředu. Bylo pozorováno, že žaludky mladých zabíjených zvířat savců často obsahovaly tvarohy, zvláště když byla zvířata kojena krátce před zabíjením. Za dob Římanů se v Evropě přidaly k používání syřidla formovací a lisovací techniky a základní proces výroby sýrů byl v podstatě stejný jako dnes.

Římští vojáci dostávali pravidelný příděl sýra spolu s ostatními poživatinami, jako byl chleba, víno a sůl. Šíření různých variant sýrů bylo tedy prostřednictvím pohybu římských armád, migrace národů skrz Evropu po pádu Římské říše a meziklášterní pohyb mnichů. Sýr byl velmi důležitý během postních dní, kdy bylo zakázáno jíst maso. Jednotlivé řády a církevní instituce vyráběly mnoho různých druhů sýrů, snad aby zpestřily svou často jednotvárnou dietu. Celá řada dnes velmi známých sýrů byla v minulosti spojována s nějakým klášterem. Je to například Wensleydale nebo Pont l'Éveque. Od pozdního středověku až do konce devatenáctého století se výroba sýrů v řadě evropských zemí postupně charakteristickým způsobem rozvíjela. Tvrdé sýry převažovaly v horách ve Švýcarsku a na zvlněných pláních v Británii, zatímco měkké sýry se staly specialitou Francie.

S rozvojem obchodu a růstem populace se sýr stal vysoce žádanou a ekonomicky důležitou komoditou. [10, 44]

3 TECHNOLOGIE VÝROBY SÝRA S PLÍSNÍ NA POVRCHU

V následujících kapitolách je uveden přehled vybraných sýrů s plísní na povrchu, které lze najít na evropském trhu a obecné rysy technologie výroby těchto sýrů.

3.1 Přehled sýrů s plísní na povrchu

Tato kapitola je zaměřena na stručnou charakteristiku některých sýrů s plísní na povrchu, které jsou vyráběny téměř po celém světě. Jak vyplývá z textu, většina uvedených sýrů pochází z Francie.

Bavorský modrý (Bavorsko, Německo) – tento velmi oblíbený sýr je moderní kříženec. Kombinuje bílou písňovou kůru camembertu s modrými žilkami gorgonzoly. A nejznámější značka nese skutečně jméno obou sýrů, Cambozola. U nás se lze setkat s obdobou tohoto sýra pod názvem Vltavín.

Bonchester (Skotsko) – tento měkký výrazný sýr je jedním z mála britských sýrů, který si získal certifikát označení původu v Evropské unii (PDO - Protected Designation of Origin). Vyrábí se jako malé, nízké, oblé kotouče s bílou kůrou, na níž se někdy tvoří nepřilíš četné skvrnky. Zralý sýr má máslové aroma jako kondenzované mléko a příchut' v ústech doznívá po sladké smetaně. Jinou variantou tohoto sýra je tzv. Teviotdale, který se vyrábí lisováním čtyř sýrů Bonchester dohromady.

Brie (Severozápadní Francie) – je jeden z mnoha francouzských sýrů. Brie je region ležící na jihovýchod od Paříže, kde se vyrábí mnoho druhů sýra s plísní na povrchu. Existuje obvyčejný sýr brie, který není chráněný a smí se vyrábět všude. Dnes se jako pravé uznávají pouze sýry *Brie z Meaux* a *Brie z Melunu*. Oba byly vždy chráněny francouzskými zákony na ochranu původu (nyní PDO). Vyzrálý Brie de Melun se nazývá *Brie de Melun Affine*, velmi mladý se pak nazývá *Brie de Melun Frais*. *Dunbarra* je Irský měkký sýr s bílou kůrou a krémovou konzistencí. Je tužší a méně výrazný než sýr Brie. *Somerset Brie* je ušlechtilá anglická verze sýra Brie. *Vermont Farmhouse Brie* je vyráběn z mléka pasterovaného tak citlivě, že výsledný sýr má chuť i vůni jako sýr vyráběný z neošetřeného mléka. *Grape Vine Ash Brie* je zvláštní tím, že sýřenina je pokryta vinným popelem a nechá se zrát, dokud bílá plíseň neproroste popel.

Camembert de Normandie (Severozápadní Francie) – je jeden z nejslavnějších sýrů na světě. Nejlepší sýry se dosud vyrábějí ručně z nepasterovaného mléka na farmách

v původní oblasti Normandie a jsou chráněné francouzskými zákony (French appellation Controllée, nyní PDO) na ochranu značky. Varianty nabízejí např. *Cooleeney Farmhouse*, což je sýr camembertového typu, který má polotekuté sýrové těsto a silnou žampionovou příchuť. Je tučnější a vláčnější než Camembert. *Vermont Farmhouse Camembert* se vyrábí z mléka velmi pomalu a šetrně pasterovaného, což nemění chuť mléka.

Hermelín – dnes známý jako značka českého plísňového sýra, tedy jednoho z mnoha potomků svého francouzského vzoru. Značka Camembert je patentově chráněná, proto se hledal obchodní název použitelný u nás. Ing. Josef Hojdar, pozdější ředitel Madety, navrhl název Hermelín, a to s ohledem na podobnost bílého porostu sýra s královským hermelínovým pláštěm z bílých hranostajů. K tomuto pojmenování došlo někdy v letech 1944 – 1945 a nový název byl patentově přihlášen 9.2.1946. V rejstříku Úřadu pro průmyslové vlastnictví je dnes registrováno 10 zápisů na ochrannou značku Hermelín. První zápis značky Hermelín pochází z roku 1993, později byla ochrana zahrnuta také na „SEDLČANSKÝ HERMELÍN“ a další alternativy, např. Clasic, Premium, smetanový. Další výrobce sýra Pribina s.r.o. Příbyslav využívá zapsanou ochrannou známku „Hermelín –KRÁL SÝRŮ“. Vlastníkem všech těchto značek je francouzská společnost BONGRAIN S.A, jejíž součástí se v době privatizace českého mlékárenství staly obě současné české výrobní Hermelínu, tedy jak Povltavské mlékárny a.s. Sedlčany, tak Pribina s.r.o. Příbyslav.

Kamadet – patří ve své třídě ke špičce na našem trhu. Bělavě hebký zvenku, smetanově krémový uvnitř. V ČR jej vyrábí společnost MADETA a.s. [18]

Chabichou du Poitou (Střední Francie) – je sýr vyrobený z kozího mléka. Poněkud hrubá kůra mladého sýra je pokryta bílou nebo šedomodrou písni. Verze chráněná známkou PDO se dělá ručně z nepasterovaného mléka na farmách v Poitou, ale dnes je i ve Francii vzácností. Další verze jsou známé jako *Cabrichou*, *Chabi* nebo *Cabrichiu*. Všechny verze mají typické kozí aroma. Chuť se pohybuje od jemné a sladké až k výrazněji ořechové a pikantní u starších sýrů.

Chaource (Severovýchodní Francie) – je měkký sýr z oblasti Champagne. Je nesmírně lahodný ve všech stádiích zrání a velmi dobře se k němu hodí slavné víno z téže oblasti. Vyrábí se z plnotučného kravského mléka. Chaource má tenkou bílou kůru, která se během zrání někdy pokryje červenými tečkami, zatímco vnitřek zůstane krásně bílý a jemný.

Chèvre (Francie) – je obecný název pro francouzské kozí sýry, které jsou k dostání v určité oblasti nebo jen u jednoho farmáře. Mohou mít tvar koule, válečku, zátky, komolého kužele, srdce, zvonku, mohou být také hladké nebo pokryté popelem či pepřem. Snadno se roztírá. Chuť je obvykle velmi jemná a mírně slaná. Některé varianty: *Charollais, Gedi, Mine-Gabhar, Perroche, Vulscombe* atd.

Coulommiers (Střední Francie) – je historicky považován za předka sýru Brie a Camembert. Sýr má na povrchu bílý plísňový výkvět, povrch je často nerovnoměrný, a jak zraje, tvoří se na něm hnědé skvrny. Mladý sýr má slabě žampionové aroma a jemnou, lahodnou chuť. Variantou tohoto sýra je tzv. *Sharpham*.

Explorateur (Střední Francie) – byl jedním z prvních sýrů, které se začaly vyrábět po klasifikaci velmi tučných sýrů. Tento sýr má více než 75 % tuku. Toho se dosáhne přidáním velkého množství smetany do mléka před srážením.

Gaperon (Střední Francie) – je zvláštní a velmi chutný sýr z Auvergne, který se kdysi vyráběl na bázi podmáslí. Nyní se jako základ používá kravské mléko. Během výroby se do sýřeniny přidává pepř a česnek, díky čemuž se sýr po čtyřech týdnech zrání stává kořeněným a pikantním.

Vacherin Mont d'Or (Severovýchodní Francie) – má bílou plíseň, která dozrává do světle hnědorůžové a krabí se na povrchu sýra jako vlny. Těsto mladého sýra je velmi světlé s poněkud zelenkavým nádechem a spoustou malých kavern. Zvláštností je, že se vyrábí ze zimního nepasterovaného mléka.

Neufchatel (Normandie) – jedná se o měkký sýr s ušlechtilou bílou plísní na povrchu, vyráběný z kravského mléka, buď syrového nebo i pasterovaného. Při výrobě probíhá velmi dlouhé srážení po dobu asi 24 hodin, a po zformování a lehkém zalisování zraje sýr asi 10 dnů, zatímco se na povrchu vytváří překrásně bílé hermelínový porost plísně. V plné zralosti však bývá až tak za 3 týdny. Pro sýr je typické, že po rozkrojení je vždy uprostřed patrné ještě neproзраlé tvarohové jádro, zatímco po obvodu je již jemná a kompaktně slitá sýrová hmota. Sýr se formuje do několika možných tvarů nejúžasnější jsou tvary malého či velkého srdce (100 nebo 200 g).

[5, 23, 31, 32, 44, 52]

3.2 Obecná technologie výroby sýra s plísní na povrchu

Sýry s plísní na povrchu jsou obecně měkké varianty charakterizované růstem bílé plísně *Penicillium camemberti* na povrchu sýra. Povrchová flora je často komplexnější, zvláště v sýrech vyrobených ze syrového mléka tradičními technologiemi. Mnoho sýrů s plísní na povrchu má původ ve Francii (viz předchozí kapitola). [10]

Obecné schéma výroby sýra s plísní na povrchu je uvedené v příloze I.

Výběr mléka je rozhodujícím činitelem při zvyšování a zkvalitňování výroby sýrů. Mléko určené pro výrobu sýrů musí kromě všeobecných požadavků splňovat další kritéria jako dobrá syřitelnost a kysací aktivita, která je mírou schopnosti mléka poskytnout kulturní mikroflóře vhodné prostředí pro její rozvoj. Dalším kritériem je mikrobiologická čistota. Mléko získané za špatných hygienických podmínek obsahuje běžně 10^6 i více mikroorganismů v 1 ml. Tato virulentní mikroflóra spotřebuje vitaminy i jiné biogenní látky, kterých se pak nedostává pro pomnožování mikroorganismů sýrařských kultur. Titrační kyselost mléka by neměla překročit hodnotu 7,6 °SH. Chemické složení mléka má zásadní význam pro výtěžnost výroby a složení sýra. Poměr tuku a kaseinu je rozhodující pro výsledný obsah tuku v sušině.

Ošetřením mléka se rozumí jeho vyčištění, pasterace a vychlazení. Mléko se vesměs čistí odstřediváním za použití odstředivek. Pasterace zajišťuje zdravotní nezávadnost sýrů. Pro výrobu sýrů s plísní na povrchu se používá šetrné pasterace s teplotou 73 - 75 °C po dobu 15 – 20 sekund. Vyšší pasterační záhřevy jsou nevhodné, protože se zvyšující se teplotou dochází ke zvýšené denaturaci sérových bílkovin, které neodchází do syrovátky. Zvyšuje se výtěžnost, ale následně i vazba vody. Může tedy dojít ke snižování sušiny sýrů a ke zhoršení jejich jakosti.

Předzrání mléka zajišťuje příznivé předpoklady pro standardizaci výroby a jakosti výrobku. Předzrání mléka probíhá za přídavku smetanové kultury a to v množství 0,05 – 0,10 % při teplotě 8 – 10 °C po dobu 14 – 16 hodin.

Každý druh sýra má předepsaný obsah sušiny, tuku, resp. tuku v sušině, proto se v průběhu tepelného ošetření provádí také **standardizace mléka**. Pro získání normální sraženiny je třeba obnovit v mléce přirozený obsah rozpustných vápenatých solí, které v důsledku pasterace přešly do své nerozpustné formy. Proto se do mléka přidává CaCl_2 v množství 10 – 20 g na 100 l. Přídavek chloridu vápenatého zlepšuje syřitelnost a zvyšuje pevnost vznik-

lého gelu. Při vysoké dávce ovšem dochází k hořknutí sýrů. Dále se pro standardizaci přidává smetanová kultura v množství 2,00 – 2,50 %. Po standardizaci se mléko zahřeje na teplotu 31 – 33 °C, přidá se syřidlo a plísňová kultura a směs se důkladně promíchá, uvede rychle do klidu a nechá srážet při stálé teplotě po dobu 30 – 35 minut. Syřidlo se přidává ve formě zředěného roztoku. Syřidlo je proteolytický enzym, který za přítomnosti vápenatých solí způsobuje koagulaci čerstvého mléka beze změn jeho kyselosti. Tento enzym působí na koloidy kaseinu, nepůsobí však na sérové bílkoviny, které pak zůstávají v syrovátce. Často se jedná o enzym chymosin (dříve označovaný též rennin), který je vyráběn extrakcí ze žaludků ze sajících telat. Chymosin patří do skupiny enzymů zvaných proteasy, jejichž společným rysem je schopnost hydrolyzovat peptidové vazby bílkovinných substrátů. Je syntetizován ve formě inaktivního prekurzoru, je dosti termolabilní a v určité oblasti pH (3,5 – 4,5) velmi citlivý na autodigesci, čímž se rychle inaktivuje. Vzhledem k tomu, že je všeobecná tendence vykrmovat telata do vyšší hmotnosti, čímž se kvalita chymosinu zhoršuje, byly snahy nahradit klasické syřidlo mikrobiálními enzymy. Hlavními producenty mikrobiálních syřidel jsou geneticky modifikované mikroorganismy *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus* a *Cryphonectria parasitica*. Geneticky modifikované byly také kmeny *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, a *Trichoderma reesei*. Enzymatické vlastnosti mikrobiálních enzymů jsou téměř nerozeznatelné od enzymatických vlastností chymosinu.

Vzhledem k nízkým cenám a propracovaným způsobům použití při výrobě určitých typů sýrů se staly mikrobiální proteasy trvalou položkou na trhu syřidlových enzymů. Komerčně jsou prodávány např. preparáty „Maxiren“ z *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* produkováný firmou Gist Brocades (Nizozemí), „Chimogen“ z *Aspergillus niger* produkováný firmou Christian Hansen (Dánsko) a „Chymax“ z *Escherichia coli* vyvinutý firmou Pfizer (Spojené státy) a nabízený firmou Christian Hansen. [10, 55]

Srážení mléka je fyzikálně chemický děj, při němž se záměrným působením na koloidy kaseinu změní polydisperzní systém mléka ze solu v gel. Koagulace a srážení kaseinu začíná působením syřidlových enzymů, které štěpí vazby mezi fenylalaninem a methioninem v peptidovém řetězci povrchové vrstvy κ -kaseinu (viz kapitola 1.1). Toto štěpení se obvykle označuje jako primární nebo destabilizační fáze (enzymová), která probíhá i při teplotách pod 10 °C. V sekundární fázi dochází ke koagulaci destabilizovaných micel, která je

však podmíněna přítomností volných vápenatých iontů. Vápenaté ionty se vážou na zbytky kyseliny fosforečné, volné karboxylové skupiny a fosfoserinové zbytky kaseinu. Tím se sníží negativní náboj micely. Destabilizované micely následkem Brownova pohybu agregují a vytvářejí polymerní síť, která je základem gelu sýřeniny. Tvorba sraženiny je doprovázena vznikem vodíkových a disulfidických vazeb. V terciární fázi pak dochází k pomalé hydrolyze všech kaseinových frakcí. Průběh této třetí fáze má být omezen na co nejnižší míru. Konec srážení se určuje subjektivně obvykle rozlomením sýřeniny, která má mít lasturovitý lom, hrany na místě lomu má mít ostré a nemá se lepit na prsty.

Srážení měkkých sýrů se dříve provádělo v sýrařských vanách, v dnešní době nahrazených výkonnějším zařízením – výrobníky sýřeniny. Při výrobě měkkých sýrů se vyžaduje velmi šetrná manipulace se sýřeninou.

Teprve **zpracováním sýřeniny** na požadované sýrové zrno a opětovným spojením sýrového zrna získáme hotový čerstvý sýr, u něhož se během této operace uvolnil potřebný objem syrovátky a proběhlo prokysání mléčného cukru na kyselinu mléčnou. Krájení, přetahování a míchání sýřeniny by nemělo trvat déle než 15 minut, protože u měkkých sýrů se požaduje zrno větších rozměrů. Tyto kroky jsou prováděny mechanickým systémem vodorovných a svislých nožů.

Každý druh sýra má svou standardní velikost a tvar. **Tvarování sýrů** s plísní na povrchu zahrnuje odkapávání, prokysávání a obracení pro rovnoměrný povrch. Tyto operace probíhají při teplotách 18 – 22 °C po dobu 5 – 6 hodin. Při odkapávání syrovátka samovolně odtéká a jediným zatížením je vlastní hmotnost sýřeniny ve tvořítku. Obracení má za následek rovnoměrné odkapávání syrovátky a požadovaný pravidelný tvar.

Solení sýrů je nezbytná operace všech druhů tvarovaných a zrajících sýrů. Solení zpevňuje povrch sýra, reguluje obsah vody v těstě sýra, což má návaznost na konzistenci těsta a mikroflóru, průběh kysání a zrání. Sýr zrající s plísní na povrchu se solí v tzv. solné lázni s obsahem soli 20 – 22 % a kyselostí 5 – 20 °SH. Solení probíhá při teplotě 16 – 18 °C po dobu 60 – 70 minut. Po solení se sýry mohou očkovat výtrusy plísní.

Zrání lze definovat jako veškeré biochemické procesy probíhající v sýrech působením mikrobiálních enzymů, případně syřidlových enzymů. Zrání sýrů ovlivňuje vzhled, chuť, vůni a konzistenci. Během zrání podléhají největším změnám laktosa a mléčné bílkoviny, u některých sýrů také tuk. Sýry s plísní na povrchu zrají ve zracích sklepech na nerezových

zracích roštech. Při výrobě tohoto typu sýra je nutné postupně upravit podmínky zrání. Nejdříve sýr zraje 1 – 3 dny při teplotách 16 – 20 °C a relativní vlhkosti 80 – 85 %. Poté zraje 6 – 10 dní při teplotách 12 – 18 °C a relativní vlhkosti 95 %. Sýry je nutno během zrání obden obracet. Zrání sýrů je popsáno v následující kapitole.

Balení je konečnou fází celého technologického postupu. Zralé sýry se musí ihned zabalit a po celou dobu distribuce skladovat při nízkých teplotách kolem 4 – 8 °C. [10, 17, 27, 29, 30, 55, 56, 59]

4 BIOCHEMICKÉ REAKCE PROBÍHAJÍCÍ V SÝRECH BĚHEM JEJICH ZRÁNÍ

S výjimkou nezrajících sýrů, které se konzumují v čerstvém stavu, procházejí všechny procesem zrání. Zrání představuje komplexní souhrn změn způsobených syřidlovými enzymy (zejména u sýrů ze syrového mléka), enzymatickou činností kultur a působením enzymů po lýze jejich buněk, případně činností nezákysových kultur, při kterých sýr získává typický vzhled, konzistenci, chuť, vůni a složení. Primárními reakcemi zodpovídajícími za texturální změny a vznik aromatických složek jsou glykolýza, proteolýza a lipolýza.

Biochemické procesy probíhající v sýrech je možné rozdělit do tří základních fází, které na sebe plynule navazují. Zrání sýrů probíhá ve zrácích sklepích. Optimální podmínky teploty a relativní vlhkosti jsou závislé na typu sýra. Během zrání se sýry ošetřují (umývání, obracení, propichování sýrů apod). Některé sýry zrají v obalech, které slouží i jako expediční obal, nebo pod nátěrem. Snižuje se pracnost při ošetřování a také ztráty během zrání. Doba zrání sýrů se pohybuje od 24 hodin (čerstvé sýry solené), po dobu několika dnů (Romadur, Hermelín), týdnů (Niva) až měsíců (Pivní sýr, Ementál, Čedar). [27, 29, 59]

4.1 Rozklad laktosy a jejich metabolitů

K rozkladu laktosy dochází v primární fázi zrání bakteriemi mléčného kvašení za vzniku kyseliny mléčné. Mléko začíná kysnout brzy po přidání zákysů, aktivita mikroorganismů dosahuje vrcholu asi za 4 až 5 hodin po zakysání. Hlavní rozklad laktosy nastává v průběhu formování sýrů, během odkapávání a lisování sýrů je nejintenzivnější. Pokud není dokysávání dokončeno při lisování, sýry se ukládají po vyjmutí z tvořitek na police do temperované místnosti k dokysání, které bývá ukončeno do 20 – 24 hodin. Teoreticky je možné dokysání i v průběhu solení v solné lázni, která má ale vyšší teplotu. Při zpracování sýřeniny odchází část laktosy se syrovátkou. V uzavřené sýrové hmotě se v závislosti na synerezi zrna zadrží asi 1,5 až 3,0 % laktosy (počítáno na hmotu sýra), z níž se vytvoří asi 2,0 % kyseliny mléčné. Hodnota pH po 24 hodinách od začátku výroby má rozhodující význam pro další průběh zrání a výslednou jakost výrobku. Podle druhu sýra činí pH těsta 5,3 až 5,0. K úplnému vymizení laktosy dochází u tvrdých sýrů v prvních dnech zrání. U měkkých sýrů, kde je zadrženo více syrovátky, se vytvoří více kyseliny mléčné, proto je sýřenina málo pružná a má tvarohovitou konzistenci. Kysáním klesá obsah vápníku v parakaseinovém komplexu, až v konečné fázi vzniká kalcium parakaseinát, snadno roz-

pustný a bobtnající působením NaCl obsaženého v solné lázni. To má za následek, že se jednotlivá zrna navzájem spojují a vytvářejí jednotou plastickou hmotu. Kyselina mléčná ovlivňuje zastoupení solí v sýrech. Obsah kyseliny mléčné a jejích solí je během zrání snižován bakteriemi a enzymy, které se účastní dalšího zrání sýrů. Vznikají tak jiné kyseliny (např. propionová) a její soli, pH sýra se zvyšuje na 5,5 až 6 a vytváří se příznivé podmínky pro rozklad bílkovin. Malé množství volné kyseliny mléčné však v sýru zůstává a dává mu typickou mléčně nakyslou příchut' a zároveň částečně zabraňuje hnilobnému rozkladu bílkovin. V kyselém prostředí se mění některé nerozpustné soli na rozpustné a z nich část odchází se syrovátkou při zpracování sýřeniny. Čím více sýřenina tedy prokysává, tím méně minerálních látek v sýru zůstane. Proto také kyselé sýry obsahují méně solí než sýry sladkého sýrařství. Při zrání sýru se zbývající soli mění a přemísťují. Část vápníku se váže na nízkomolekulární mastné kyseliny a vzniklé soli ovlivňují sýr chuťově. Přidaný NaCl se během zrání rozptýlí do celé hmoty a jeho ionty reagují se složkami sýra. Vlivem odpařování vody z povrchu sýra bývá koncentrace soli na povrchu vždy největší. Povrchová mikroflóra měkkých sýrů vytváří mírně alkalickou reakci, čímž se mění na povrchu rozpustné soli na nerozpustné.

V sekundární fázi dochází ke snížení kyselosti sýra jednak vazbou kyseliny mléčné a jednak jejím mikrobiologickým rozkladem na kyselinu propionovou (případně octovou), oxid uhličitý a vodu, případně i další sloučeniny nebo její vazbou na rozkladné produkty bílkovin. Podle typu sýra dochází k mikrobiologickému rozkladu kyseliny mléčné buď v celé hmotě a nebo aerobně od povrchu dovnitř mikroflórou na povrchu sýra.

[17, 27, 57]

4.2 Rozklad bílkovin

Proteolýza je nejkompexnější, nejproměnlivější a nejdůležitější primární biochemický děj, který se vyskytuje ve všech sýrech během jejich zrání. Konečné produkty rozkladu jsou u každého druhu sýra jiné a ovlivňují jeho charakteristické vlastnosti. Proteolýza a enzymy zodpovědný za tento proces byly důsledně zkoumány až v posledních dvou desetiletích. Proteolýza přispívá ke změně struktury sýrů během zrání díky hydrolýze kaseinové matice v sýřenině a vlivem snížení vodní aktivity sýřeniny v důsledku změn vazby vody, kdy jsou v průběhu hydrolýzy tvořeny nové karboxylové kyseliny a aminoskupiny. Proteolýza má přímý vliv na chuť díky tvorby krátkých peptidů a aminokyselin, z nichž některé se podíle-

jí na chuti (často hořké) a pravděpodobně poskytují volné aminokyseliny, které jsou substrátem pro řadu katabolických reakcí, které vytváří mnoho chuťových sloučenin (viz dále). Proteinasy a peptidasy, které katalyzují proteolýzu v sýrech během zrání, vznikají ze šesti primárních zdrojů, tedy ze zbytkové aktivity syřidla, mléka, startérové kultury bakterií mléčného kvašení, nonstartérové kultury bakterií mléčného kvašení, sekundární kultury (např. *Propionibacterium freudenraichii* ve Švýcarském sýru, *Penicillium roqueforti* v plísňovém sýru, *Penicillium camemberti* v sýru camembertského typu) a v jistých případech exogenní proteinasy či peptidasy přidané do mléka či sýřeniny proto, aby urychlily zrání.

Významnější zdroj proteolytických enzymů v mnoha druzích sýrů je zbytkové syřidlo, často chymosin, který zůstává v sýřenině po odtoku syrovátky. Až 30 % syřidlové aktivity zůstává aktivní v sýřenině v závislosti na faktorech jako je typ enzymu, teplota při srážení a pH při odtoku syrovátky. Specifita chymosinu na všechny druhy kaseinů je již dobře známa. V roztoku chymosin štěpí β -kasein v sedmi místech, většina z nich je umístěna blízko hydrofobního C-konce β -kaseinu a rozštěpení těchto míst může mít za následek produkci krátkých hydrofobních peptidů, které jsou hořké. Tato chuť se může projevit i ve zralém sýru při použití nadměrných dávek syřidla. Primární místo aktivity chymosinu na α_{S1} -kaseinu je mezi fenylalaninem v poloze 23 a fenylalaninem v poloze 24, což má za následek tvorbu krátkých peptidů, které jsou ihned hydrolyzovány startérovými proteinasami. Chymosin štěpí α_{S1} -kasein i v mnoha jiných místech, zvláště mezi leucinem v poloze 101 a lysinem v poloze 102. Tato hydrolyza probíhá v mnoha sýrech během zrání.

Více odolný než α_{S1} -kasein vůči hydrolyze chymosinem je α_{S2} -kasein, protože místa štěpení jsou omezena na hydrofobní oblast molekuly. Ačkoli para- κ -kasein má několik potenciálních míst štěpení chymosinem, tak doposud nebyla prokázána hydrolyza v roztoku či v sýrech. Toto je pravděpodobně způsobeno relativně vysokou úrovní sekundární struktury v κ -kaseinu ve srovnání s jinými kaseiny.

Mléko samo o sobě je důležitým zdrojem proteolytických enzymů. Hlavní původní proteinasa v mléce je plasmin, který je stejně jako trypsin má původ v krvi a optimální aktivitu při pH cca 7,5 a teplotě 37 °C. Fyziologická role plasminu v krvi je v degradaci sraženin fibrinu během srážení krve. Z toho důvodu aktivita plasminu v krvi musí být pod kontrolou, proto je produkován v neaktivní formě jako plasminogen. Aktivace plasminogenu se děje pomocí aktivátorů plasminogenu (PAs). Inhibitory plasminu a PAs jsou také součástí

tohoto systému a všechny se také nachází v mléce. V mléce je plasmin, plasminogen a PAs spojen s kaseinovou micelou, zatímco inhibitory plasminu a PAs se nachází v mléčném séru a tak dochází k jejich úbytku při odtoku syrovátky. Specifita plasminu je omezená pouze na peptidové vazby typu Lys-X, v menší míře Arg-X, proto plasmin degraduje kaseiny v pořadí β -kasein \approx α_{S2} -kasein $>$ α_{S1} -kasein; na κ -kasein tato proteinasa nepůsobí. Účinky plasminu na β -kasein, α_{S1} -kasein a α_{S2} -kasein jsou známy, ale jeho nejdůležitější substrát v sýru je β -kasein, který plasmin hydrolyzuje ve třech místech (Lys₂₈-Lys₂₉, Lys₁₀₅-His₁₀₆ a Lys₁₀₇-Glu₁₀₈), čímž vzniknou kratší řetězce, γ_1 -kasein (β -kasein f29–209), γ_2 -kasein (β -kasein f106-209), γ_3 -kasein (β -kasein f108-209), proteoso-pepton PP8F (β -kasein f1-28), PP8S (β -kasein f29-105 a f29-107) a PP5 (β -kasein f1-105 a f 1-107). α_{S2} -kasein je na aktivitu plasminu citlivý a je pravděpodobné, že je to důsledek vymizení tohoto proteinu při zrání sýrů. Aktivita plasminu má největší význam u sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou, protože plasmin je relativně termostabilní (i při teplotách kolem 55 °C). Aktivace plasminogenu na plasmin je pak tedy možná, protože inhibitory PAs a plasminu jsou při vyšších teplotách málo odolné. Plasmin je také velmi důležitý u plísňových sýrů, ve kterých se při zrání zvyšuje pH, čímž se posunuje pH optimální pro chymosin směrem k plasminu.

Mléko obsahuje také jiné původní proteinasy, které vznikají z leukocytů tělových buněk. Tyto buňky obsahují mnoho proteinas včetně proteinových syntetas B, D, G, H, L a elasta-su. Nicméně jen přítomnost proteinových syntetas B a D byla v mléce prokázána, ačkoli je vysoce pravděpodobné, že se tam nachází i jiné původní enzymy tělových buněk.

Bakterie mléčného kvašení vyžadují řadu volných aminokyselin, proto mají komplexní proteolytický systém, který uvolňuje aminokyseliny nezbytné pro jejich růst z proteinů v jejich prostředí. Bakterie mléčného kvašení obsahují vnitrobuněčné peptidas, které jsou velmi důležité pro konečnou fázi proteolýzy v sýru během zrání a konečné uvolnění volných aminokyselin jako substrátu pro katabolické reakce. Bakterie mléčného kvašení jsou auxotrofní pro řadu aminokyselin, musí tedy přeměnit jejich sloučeniny z prostředí, z toho důvodu obsahují velké množství peptidas. Bakterie mléčného kvašení produkují tři typy oligoendopeptidas: PepO a PepF (monomerní metalloendopeptidas s molekulovými hmotnostmi cca 70 kDa, liší se v aktivitě na různých substrátech), PepE (je podmíněná thiolendopeptidasa). Bakterie mléčného kvašení produkují i řadu aminopeptidas: PepN

(monomerní metalloaminopeptidasa), PepC (multimerní thiolaminopeptidasa), PepG (cysteinaminopeptidasa) a jiné (např. PepA, PepL, leucylaminopeptidasa aj.).

Kaseiny jsou bohaté na aminokyselinu prolin. Díky jeho jedinečné cyklické struktuře jsou potřebné speciální peptidasy k tomu, aby hydrolyzovaly peptidy obsahující prolin. Bakterie mléčného kvašení mají tyto speciální enzymy ve velkém množství, což jim umožňuje využívat plně kaseiny jako růstové substráty.

Ačkoli enzymy startérových a nstartérových bakterií mléčného kvašení přispívají ke zrání téměř všech sýrů, proteolýza v sýrech, ve kterých je sekundární mikroflóra, je často velmi ovlivněna enzymy z této sekundární mikroflóry. *Propionibacterium sp.* produkuje enzymy slabě hydrolyzující peptidy s dlouhými řetězci, ale silně hydrolyzující peptidy s krátkými řetězci.

Proces proteolýzy v různých typech sýrů může být shrnutý následně: kaseiny jsou hydrolyzovány zpočátku zbytkovým syřidlem a plasminem na různě velké peptidy, které jsou následně hydrolyzovány proteinasami a peptidasami startérových a nstartérových bakterií mléčného kvašení, či jinou sekundární mikroflórou na kratší peptidy a aminokyseliny. Proces a rozsah proteolýzy je rozdílný v různých typech sýrů vlivem rozdílných výrobních postupů (zvláště teplota) a vlivem parametrů sýra (obsah vody, délka zrání, aktivita zbytkového syřidla, aktivace plasminogenu na plasmin a možný růst vysoce proteolytické sekundární mikroflóry).

Proces proteolýzy je velmi proměnný a je v podstatě jedinečný ke každému druhu sýra. Rozdíly v obsahu rozpustného dusíku jsou dány rozdíly mezi obsahem vody v sýru, teplotou a pH, délkou zrání, teplotou dohřívání a pH při odkapávání; peptidy v této frakci jsou produkovány hlavně aktivitou chymosinu a částečně množstvím plasminu. Krátká doba zrání (cca. 3 týdny) a rozsáhlá denaturace chymosinu vlivem vysoké teploty má za následek malé množství rozpustného dusíku, zatímco rozsáhlá proteolýza je charakteristická pro plísňové sýry a sýry zrající pod mazem vlivem aktivity chymosinu, plasminu a proteinasami z jejich charakteristické sekundární mikroflóry.

K vyjádření rozkladu bílkovin se používají výrazy rozsah a hloubka zrání. Pod pojmem rozsah zrání rozumíme podíl ve vodě rozpustných dusíkatých látek ku celkovému dusíku a je značný u měkkých sýrů. Hloubkou zrání rozumíme množství aminokyselin a produktů jejich rozkladu ku celkovému dusíku. Hloubka zrání je značná u tvrdých sýrů. U plísňo-

vých sýrů probíhá zároveň s velkým rozsahem i značná hloubka proteolýzy bílkovin. [12, 13, 15, 54, 57, 59]

4.3 Změny mléčného tuku

Rozklad tuku v sýrech je nepatrný a u většiny sýrů obvykle nežádoucí. Přesto jsou produkty rozkladu mléčného tuku charakteristické pro některé druhy sýrů (zejména sýrů s plísní v těstě). Děje se tak především hydrolytickou nebo oxidační cestou působením naočkovaných plísní. Na rozkladu tuku se podílejí enzymy zvané lipasy různého původu. Nativní lipasy se podílejí na rozkladu jen při použití syrového mléka (tedy při výrobě brynzý), v menší míře se mohou vyskytovat v mléce jen velmi krátkodobě pasterovaného. Větší význam nabývají tedy mikrobiální lipasy z naočkovaných kultur. Výsledkem činností lipas je uvolnění mastných kyselin v průběhu zrání sýrů. Mastné kyseliny mají přímý podíl na aróma sýrů. Mimo to jsou také významnými prekurzory pro produkci různých karbonylových sloučenin, především methylketonů, které se podílejí na chuti a aróma sýrů. Nežádoucí rozklad tuku mohou vyvolávat lipasy kontaminujících mikroorganismů rodu *Alcaligenes*, *Proteus* a *Bacillus*, hlavně však plísně rodu *Aspergillus*, *Oospora* a *Mucor*. Tento rozklad se projevuje plesnivou chutí a zatuchlým zápachem. Další chuťovou vadou může být zmýdelnění mléčného tuku, které se vyskytuje u čerstvých a přezrálých tučných sýrů. [15, 54, 57, 59]

5 VLASTNOSTI *PENICILLIUM NALGIOVENSIS* A *PENICILLIUM CAMEMBERTI*

V této kapitole je popsána historie využití plísně *Penicillium nalgiovensis* především ve vztahu k výrobě tradičního českého Nalžovského sýra, biochemické vlastnosti této plísně i využití nejen v mlékárenském průmyslu. Dále je zde uvedena plíseň *Penicillium camemberti* a její biochemické vlastnosti. Popsán je i vztah *P. camemberti* ke koncentraci kyslíku a oxidu uhličitého a také inhibiční efekt této plísně na možné kontaminanty sýra.

5.1 Nalžovský sýr

Tento již téměř zapomenutý původní český sýr by mohl být dnes jistě skutečnou raritou v našich obchodech. Jedná se totiž o sýr velmi blízký Camembertu, nebo u nás Hermelínu, jehož povrchová plíseň není sněhově bílá, ale naopak jemně narůžovělá až červená. Toto zbarvení má na svědomí plíseň *Penicillium nalgiovensis*. Výrobu tohoto zajímavého sýra zavedl Čeněk Charousek v roce 1897 na statcích Taaffeových v Nalžovech na Šumavě nedaleko Sušice. První český profesor mlékárenství dr. Otakar Laxa uvádí ve své učebnici sýrařství z r. 1924 tento výrobní postup [58]:

"Čerstvě nadojené mléko se nejprve poněkud ochladí, posýří a vzniklá syřenina poté nalévá do tvořítek vyložených sáčky. Po 12 hodinách se sáčky vyjmou, přenesou do solovny, kde se sýr na povrchu solí. Osolený sýr se dává do sklepa (18-19°C), kde jsou rozšířeny ušlechtilé plísně. Sýr dostává na povrchu nejprve bílý porost, který později červená, a ve vysokém stáří sýra až zezelená. Zrání trvá asi 14-21 dní. Sýr představuje koláčky 10-11 cm v průměru, 2-3 cm výšky a váží 200g."



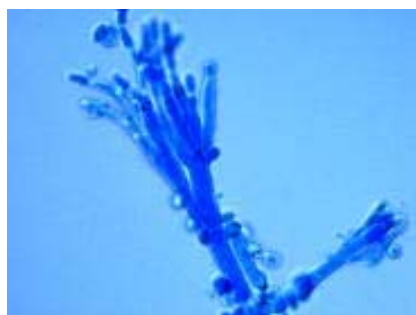
Obr. 1 – Etiketa Nalžovského smetanového sýra[58]

Historické prameny uvádějí, že v roce 1897 bylo vyrobeno 148.708 kusů tohoto sýra, v roce 1914 však již 522.518 kusů.

Ještě počátkem šedesátých let minulého století popisuje výrobu Nalžovského sýra další významný český profesor mlékárenství Jiří Doležálek, který se sám věnoval studiu ušlechtilé plísně *Penicillium nalgiovensis*, pod jejímž zráním sýr získával svůj specifický vzhled a buket. Profesor Jiří Doležálek dokonce hledal onu plíseň na statcích v Nalžovských horách, ale již neúspěšně. Tato specifická plíseň se z přirozeného prostředí tehdejší manufaktury zcela vytratila. Pro své studium tedy uvedenou plíseň získal ze sbírek ušlechtilých kultur ve Francii a USA, realizoval mnoho mikrobiologických a biochemických zkoušek, pro obnovení tehdejší slavné sýrařské výroby to však již nestačilo. [58]

5.2 *Penicillium nalgiovensis* a jeho vlastnosti

V současných publikacích ji můžeme najít pod názvem *Penicillium nalgiovense*. Kmen *Penicillium nalgiovensis* (Obr.2) byl určený a uložený do světové sbírky mikromycet v roce 1932 profesorem Laxou. Ověřilo se, že testovaný kmen je schopný růst dle [25] v rozmezí pH od 2,0 do 8,5, nejlépe při 6,5 – 7,0. Dle [25] nefermentuje glukosu, fruktosu, maltosu, ani laktosu, pigmentace kolonií je závislá na kultivačním médiu. Obsahuje enzymy s velmi vysokou proteolytickou i lipolytickou aktivitou.



Obr. 2 - *Penicillium nalgiovensis* elektronovým mikroskopem [43]

O sýrech porostlých touto plísní nejsou téměř žádné známky, proto je následující text zaměřen na masné výrobky, kde je využití této plísně podrobněji popsáno.

P.nalgiovensis je dominantní druh, pokrývající fermentované sušené masné výrobky. Fermentované masné výrobky jsou produkty vyrobeny obecně se sníženým obsahem vody. Suché či Italské typy salámů obsahují dle [24] 30 – 40 % vody, obecně nebývají uzené či tepelně zpracované a jsou užívány obvykle bez tepelné úpravy. Při jejich výrobě je směs

plněná do obalů. Zrání je různé, nicméně doba zrání se může zkrátit vlivem přidavku starterových kultur, které značně přispívají do charakteristické vůně a chuti. Plísňová kultura dává salámům typický bělavý vzhled a chrání salámy před nakažením jinými plísněmi či možná bakteriemi.

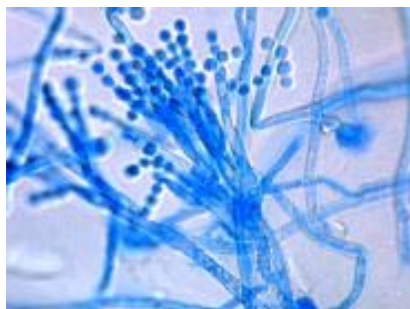
Dle [25] další výzkumy upozornili na to, že některé kmeny této kultury jsou za určitých podmínek *in vitro* producenty penicilinu, podobně jako kmen *Penicillium chrysogenum* a další druhy penicilií. Ukázalo se však, že kmeny *Penicillium nalgiovensis*, které jsou schopné produkce penicilinu, nejsou pravděpodobně schopny jej produkovat na masných substrátech.

Právě proto, že se *P. nalgiovensis* jeví jako poměrně významný potravinářsky využívaný kmen, jeho správné taxonomické zařazení je stále předmětem výzkumu a dohadů. V monografii Pitta z r. 1972 nacházíme *P. nalgiovensis* uvedené jen jako synonymum pro *Penicillium jensenii* ZALESKI, ale v Ramizerově monografii o peniciliích z r. 1982 je *P. nalgiovensis* uvedené jako samostatný druh. Co se týče patogenity těchto kmenů, nebylo doposud zjištěno, že by kmeny *Penicillium nalgiovensis* byly patogenní nebo podmíněně patogenní pro člověka. Ze všech podkladů se dá tedy usoudit, že povrchové použití startovacích kultur *Penicillium nalgiovensis* má výhodu v tom, že zabraňuje spontánnímu plesnivění trvanlivých masných výrobků, kdy může být výrobek nekontrolovatelně kontaminovaný různými toxickými metabolity mikroskopických vláknitých hub. [2, 3, 9, 20, 22, 24, 25, 33, 40, 43, 48]

5.3 *Penicillium camemberti* a jeho vlastnosti

K výrobě plísňové kultury používané k výrobě sýrů s plísňovým povrchovým porostem slouží hlavně kmeny *Penicillium camemberti* a *Penicillium caseicolum*. Tyto plísně, kromě bakteriálních kultur, zajišťují svou lipolytickou a proteolytickou činností správný průběh zrání sýrů camembertského typu. Působením produkovaných enzymů přispívají ke vzniku požadovaných chuťových a aromatických látek charakteristických pro tuto skupinu sýrů.

Kultura *Penicillium camemberti* tvoří na sladovém agaru při teplotě 18 – 23 °C za 7 dní kolonie velikosti 2 – 3 cm. Kolonie jsou vlnité, převážně bílé, ve starších kulturách nepatrně našedlé. Vůně plísně je žampionová, částečně zatuchlá, připomínající bramborové slupky. *Penicillium camemberti* se vyznačuje dobrou lipolytickou aktivitou. Silnou proteolytickou činností rozkládá mléčnou bílkovinu a to až na aminokyseliny a amoniak. [24, 53]



Obr. 3 - *Penicillium camemberti* elektronovým mikroskopem [42]

Ve vztahu ke kyslíku a oxidu uhličitého bylo zjištěno, že podhoubí *P. camemberti* se zvětšuje, je-li ve zrací komoře koncentrace CO₂ do 2 %. Při koncentraci CO₂ vyšší než 4 % byla zjištěna porucha rovnováhy ve prospěch kvasinek *Geotrichum candidum*. Relativní vlhkost vzduchu má také vliv na *P. camemberti*. Při vyšší relativní vlhkosti vzduchu než 95 % se *P. camemberti* špatně vyvíjí a mycelium může být hnědé. Pokud je relativní vlhkost vzduchu významně malá, pak dochází k nadměrné ztrátě vody a výsledný sýr je suchý. Atmosferické složení zrací komory hraje tedy významnou roli při výrobě sýra camembertského typu ve smyslu celkových změn zracího procesu kvůli jeho účinků na fyziologii mikroorganismů. [34]

Také byl zjištěn inhibiční efekt *Penicillium camemberti* na možné kontaminanty sýra (např. *Cladosporium herbanum*, *P. roqueforti*, *P. caseifulvum* a *P. commune*). Čistý *P. camemberti* má největší inhibiční účinek na *C. herbanum*. Interakční mechanismus *C. herbanum* není ovlivněn volbou kmene *P. camemberti* zatímco druhy kontaminujících penicilií jsou velmi citlivé na volbu kmene *P. camemberti*. Přítomnost *Geotrichum candidum* ve směsných kulturách ukazuje snížení inhibičního účinku *P. camemberti*. [6]

Cílem jedné ze studií bylo charakterizovat účinky zrání na vývoj typicky hořké chuti camembertského sýra. Chuť sýra je jednou z nejdůležitějších organoleptických vlastností sýra. Hořkost sýra obecně vyplývá z hromadění abnormálně vysoké koncentrace hydrofobních peptidů uvolněných během rozpadu bílkovin kaseinu. V této studii bylo zjištěno, že *P. camemberti* se nejvíce podílí na vzniku hořké chuti, která je ale částečně snižována účinkem *Geotrichum candidum*. [7]

Další studie se zabývala možností zlepšit vybrané biochemické a smyslové vlastnosti sušených fermentovaných salámů vlivem povrchního očkovaní *Penicillium camemberti*. Růst této plísně na povrchu salámů měl za následek intenzivní proteolýzu a lipolýzu, která způsobila zvýšení koncentrace volných aminokyselin, volných mastných kyselin a těkavých

látek. Mnoho z nich jsou zodpovědné za tzv. zralou chuť. Vývoj mycelia na povrchu salámů také chrání lipidy před oxidací. Sensorická analýza povrchově naočkovaných salámů ukázala jasné zlepšení ve vůni a chuti, a proto v celkové kvalitě salámů. Tento druh je tedy navrhován jako potenciální starterová kultura pro sušené fermentované salámy. [4, 53]

II. METODIKA PRÁCE

6 CÍL PRÁCE

Cílem této práce je vybrat vhodné kmeny *Penicillium nalgiovensis* s proteolytickou aktivitou podobnou kmenům *Penicillium camemberti*. *P.camemberti* je ušlechtilá plíseň běžně využívaná pro výrobu měkkých sýrů s plísní na povrchu. Vzorky naočkované *P.camemberti* sloužily v této diplomové práci jako srovnávací standardy, s nimiž se porovnávaly vzorky naočkované kmeny *P.nalgiovensis*.

Pro dosažení cílů bylo potřeba v teoretické části:

- Stručně charakterizovat mléko jako základní surovinu
- Popsat obecné rysy technologie výroby sýrů s plísní na povrchu
- Zabývat se biochemickými reakcemi probíhajícími v sýrech během jejich zrání
- Charakterizovat biochemickou aktivitu plísní *Penicillium camemberti* a *Penicillium nalgiovensis*

V praktické části bylo nutné zaměřit se na tyto dílčí cíle:

- Analyzovat modelové vzorky s vybranými kmeny *P. camemberti* a *P. nalgiovensis* v průběhu jejich zrání
- Sledovat obsah volných aminokyselin
- Sledovat proteinový profil metodou SDS-PAGE
- Na základě teoretické části a výsledků praktické části vyvodit závěry, které by vedly k výběru kmenů *P.nalgiovensis* s proteolytickou aktivitou podobnou kmenům *P.camemberti*.

7 POPIS EXPERIMENTU

Sýry s plísní na povrchu byly vyrobeny ve školním poloproduktu Střední průmyslové školy Mlékárenské v Kroměříži. Výroba těchto sýrů nebyla předmětem této diplomové práce. Vyrobené sýry byly naočkovány plísňovými kulturami různých kmenů *Penicillium nalgiovensis* a *Penicillium camemberti*. Takto připravené vzorky byly uskladněny a po určité době zrání odebírány k vlastnímu stanovení obsahu volných aminokyselin a ke sledování změn proteinů metodou SDS-PAGE. Nejdříve byla provedena analýza vzorku sýra bez naočkování výtrusy plísní. Po naočkování byla provedena analýza vzorků v různých stupních zralosti a to konkrétně po 6, 14, 21, 34 a 48 dnech. Teplota při zrání sýrů byla nastavena na 15 °C pro prvních 14 dní a poté byla snížena na 6 °C.

Postup praktické výroby sýra s plísní na povrchu je možné schématicky shlédnout v příloze II.

Použité plísňové kultury:

Vzorky č.1 - 3 byly naočkovány kulturami firmy Christian Hansen používanými na masné výrobky:

Vzorek č. 1 – *Penicillium nalgiovensis* M-EK 4

Vzorek č. 2 – *Penicillium nalgiovensis* M-EK 6

Vzorek č. 3 – *Penicillium nalgiovensis* M-EK 72

Vzorky č. 4 - 8 byly naočkovány kulturami ze Sbírký kultur mlékárenských mikroorganismů Laktoflora[®]:

Vzorek č. 4 – *Penicillium nalgiovensis* CCDM 321

Vzorek č. 5 – *Penicillium nalgiovensis* CCDM 322

Vzorek č. 6 – *Penicillium nalgiovensis* CCDM 324

Vzorek č. 7 – *Penicillium nalgiovensis* CCDM 328

Vzorek č. 8 – *Penicillium nalgiovensis* CCDM 329

Vzorky č. 9 a 10 byly naočkovány kulturami ze Sbírký kultur mlékárenských mikroorganismů Laktoflora[®] získanými ze sýrů camembertského typu.

Vzorek č. 9 – *Penicillium camemberti* CCDM 797

Vzorek č. 10 – *Penicillium camemberti* CCDM 799

Kmeny *P.camemberti* jsou běžně využívány pro výrobu měkkých sýrů s plísní na povrchu.

Vzorky naočkované kmeny *P. camemberti* sloužili tedy jako srovnávací standardy, s nimiž se porovnávaly vzorky naočkované kmeny *P. nalgiovensis*.

8 STANOVENÍ OBSAHU VOLNÝCH AMINOKYSELIN

Pro stanovení obsahu volných aminokyselin byl do zkumavek navážen 1 g zhomogenizovaného vzorku. K němu bylo přidáno 3 ml dávkovacího pufru. Takto připravené zkumavky byly umístěny na třepačku (BIOSAN Multibio 3D) po dobu 1 hodiny pro důkladnou extrakci aminokyselin ze vzorku. Poté byly zkumavky umístěny do odstředivky, kde se po nechaly při teplotě 20 °C a otáčkách 4 500 ot. \cdot min⁻¹. po dobu 30 minut. Poté byla kapalná fáze oddělena paralelně do dvou eppendorfových zkumavek a takto umístěna do lednice do druhého dne. Druhý den následovalo odstředění při 4 °C a 10 000 ot. \cdot min⁻¹. po dobu 45 minut. Následně byly vzorky filtrovány přes nylonové filtry o porozitě 0,45 μ l do čisté eppendorfové zkumavky. Takto upravený a zfiltrovaný vzorek byl použit k vlastní analýze. Analýza byla prováděna na analyzátoru aminokyselin AAA 400. Tento přístroj pracuje na principu středotlaké iontově-výměnné kapalinové chromatografii s ninhydrinovou derivatizací a spektrofotometrickou detekcí. Přístroj dodává firma Ingos s.r.o.



Obr. 4 – AAA 400 [1]

Automatický analyzátor aminokyselin je určen pro stanovení aminokyselin v hydrolyzátech bílkovin, peptidů, pro stanovení volných aminokyselin ve fyziologických roztocích a extraktech a pro stanovení biogenních aminů. Všechny procesy přístroje včetně vyhodnocení výsledků a tvorby protokolů řídí program CHROMuLAN dodávaný s přístrojem. [1]

9 PROTEINOVÝ PROFIL (SDS-PAGE)

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného je separační technika užívaná v biochemii, imunologii, mikrobiologii a molekulární biologii k separaci proteinů na základě jejich elektroforetické pohyblivosti. Ta závisí na délce polypeptidového řetězce, molekulární hmotnosti, stupni denaturace proteinu, posttranslační modifikaci a dalších faktorech. Vzorek proteinu, který má být analyzován, je nejdříve smíchán s SDS, který protein denaturuje. Denaturované proteiny jsou vloženy do jamek polyakrylamidového gelu, které jsou vyplněny vhodným pufrům. Následně je do gelu vpuštěn elektrický proud, díky kterému záporně nabitě proteiny migrují skrz gel směrem k anodě. Na základě jejich velikosti se každý protein pohybuje skrz gel rozdílnou rychlostí. Menší proteiny pronikají póry gelu snadněji než větší, které musí odolávat většímu odporu. Po nějakém čase jsou proteiny na základě své molekulové hmotnosti rozděleny. Následně je možné aplikovat Coomassie blue, látku, která se na proteiny naváže a posléze je po odbarvení zviditelní. Po odbarvení se dá pak lehce zjistit molekulární hmotnost proteinu porovnáním s tzv. markerem, což je protein známé molekulární hmotnosti.

Pro vlastní stanovení bylo třeba vzorek upravit k analýze. Do čistého sáčku bylo naváženo 5 g vzorku sýra, který byl následně homogenizován s 20 ml neionizované vody po dobu 3 minut ve stomacheru. Poté byly vzorky inkubovány v termostatu 1 hodinu při teplotě 40 °C. Poté byl vzorek promíchán a rozdělen do dvou eppendorfových zkumavek. Tyto zkumavky byly vloženy do centrifugy (HERMLE Z 300 K) a byly centrifugovány 30 minut při 4 °C a 10 000 ot. \cdot min⁻¹. Z takto upraveného vzorku byl následně odstraněn tuk. Pro vlastní analýzu byla připravena směs 250 μ l upraveného vzorku, 25 μ l 2-merkptoethanolu, 50 μ l 20% SDS a 175 μ l vzorkovacího pufru. Směs v eppendorfci byla promíchána a 10 minut povařena při 100 °C v suchém blokovém termostatu Bio-TDB-100. Vzorky byly uchovány při mrazírenských teplotách až do vlastní analýzy.

Pro vlastní analýzu byla použita vertikální elektroforetická aparatura (Bio-Rad) viz Příloha III. Tato aparatura slouží pro dva gely současně. Složení roztoků a gelů pro SDS-PAGE je uvedeno v příloze IV.

Pro separaci byl zvolen 15% separační gel. Po promíchání všech komponent pro 15% gel byl roztok ihned aplikován pomocí pasterovy automatické pipety mezi skla do výšky tak, aby od vrchní hrany skla byl volný prostor cca 5 cm. Pro zamezení polymerace na vzduchu se gel převrstvil malým množstvím vody. Gel polymeroval při pokojové teplotě asi 45 mi-

nut. Po této době byla voda pro zabránění polymerace na vzduchu vylita a byl připraven tzv. 5% koncentrační gel, kterým se pak převrstvil separační gel. Do nalitého roztoku 5% gelu byl vsunut plastový hřeben pro vytvoření jamek. Polymerace pak probíhala do druhého dne, kdy již bylo možné aplikovat vzorky.

Druhý den byl z gelu hřeben vyjmut. Skla byla přenesena do aparatury a do horní vany byl nalit elektrodový pufr tak, aby byly vzniklé jamky naplněny tímto puftrem, což bylo důležité pro nanášení vzorků. Vzorky byly nanášeny pomocí automatické pipety. Po zaplnění všech jamek různými vzorky byla aparatura připravená ke spuštění. Pro putování proteinů v koncentračním gelu byla nastavena hodnota proudu 75 mA. Jakmile proteiny doputovaly k separačnímu gelu, byla hodnota proudu zvýšena na 95 mA. Elektroforéza byla ukončena, až proteiny doputovaly ke spodní části separačního gelu. Elektroforéza trvala asi 4 hodiny. Poté byly gely uvolněny ze skel, odstranil se koncentrační gel. Separační gel byl fixován ve fixačním roztoku po dobu 30 minut. Následně byl barven pomocí barvicího roztoku 1 hodinu. Odbarvení gelu pomocí odbarvovacího roztoku probíhalo do druhého dne. Složení fixačního, barvicího i odbarvovacího roztoku je uvedeno v příloze IV. [26, 28, 46, 57]

10 METODY VYHODNOCENÍ

10.1 Regresní a korelační analýza

Úkolem regresní a korelační analýzy je hledání, zkoumání a hodnocení souvislostí (závislostí) mezi dvěma a více statistickými znaky. Cílem tohoto zkoumání je hlubší vniknutí do podstaty sledovaných jevů a procesů určité oblasti, a tím i přiblížení k tzv. příčinným souvislostem. Příčinnou souvislostí mezi např. dvěma jevy se rozumí situace, kdy existence určitého jevu souvisí s existencí jiného jevu. Pro potřeby regresní a korelační analýzy bývá vhodné rozlišit jednostranné a vzájemné souvislosti. Jednostrannými závislostmi se zabývá regresní analýza. Jde o situaci, kdy proti sobě stojí nezávisle proměnné v úloze „příčiny“ a závisle proměnná v úloze „následku“. Snahou je odpovědět na otázky, které se týkají formy změn. Vzájemnými (většinou lineárními) závislostmi se zabývá tzv. korelační analýza. V korelační analýze se klade důraz více na tzv. intenzitu vzájemného vztahu než na zkoumání veličin ve směru příčiny – následek. Z výpočetních i interpretačních hledisek však dochází k značnému prolínání obou přístupů a statistická literatura nebývá při odlišování metod regresní a korelační analýzy jednotná. Souhrnem lze říci, že hlavní úkoly regresní a korelační analýzy při zkoumání statistických závislostí se týkají průběhu závislosti a její intenzity.

Základní metodou regresní analýzy je grafická metoda, kdy je průběh závislosti znázorněn ve formě bodového diagramu, ve kterém každá dvojice pozorování x a y tvoří jeden bod tohoto grafu. Podle průběhu bodového grafu je pak možné rozhodnout, jaký typ konkrétní regresní funkce by byl pro popis sledované závislosti nejvhodnější. Pro výpočet parametrů lineární regrese byla použita metoda nejmenších čtverců, která slouží k nalezení takového řešení, aby součet druhých mocnin chyb nalezeného řešení byl minimální, zjednodušeně, aby součet čtverců odchylek byl co nejmenší. Síla závislosti byla měřena pomocí koeficientu korelace. V případě funkční závislosti nabývá hodnoty 1, v případě nezávislosti hodnoty nula. Čím více se koeficient korelace blíží jedné, tím se považuje daná závislost za silnější, a tedy dobře vystiženou regresní funkcí, čím více se bude blížit nule, tím je daná závislost slabší a regresní funkce méně výstižná.

Výsledky byly také podrobeny korelační analýze, kde těsnost závislosti byla měřena pomocí Spearmanova koeficientu pořadové korelace pro malý počet dat. Koeficient korelace pořadových čísel může nabývat hodnot $\langle -1; 1 \rangle$. V diplomové práci byla sledována význam-

nost závislosti vývoje jednotlivých aminokyselin. Sledoval se vztah mezi závislostí vývoje leucinu a ostatních AMK. Leucin je dle [15] charakteristickou AMK sýrů, jelikož jako volný vzniká při zrání sýrů činností bakterií. [47]

10.2 Shluková analýza

Shluková analýza je vícerozměrná statistická metoda, která se používá ke klasifikaci objektů. Cílem shlukové analýzy je v dané množině objektů nalézt její podmnožiny (shluky objektů) tak, aby si členové shluku byli navzájem podobní, ale nebyli si příliš podobní s objekty mimo tento shluk. Shlukovací metody lze rozdělit podle cílů, k nimž směřují, na hierarchické a nehierarchické. Pro vyhodnocení SDS-PAGE byla použita metoda hierarchického shlukování. Hierarchické shlukování je systém navzájem různých, neprázdných podmnožin množiny, v němž se průnikem každých dvou podmnožin je buď jedna z nich nebo prázdná množina a v němž existuje alespoň jedna dvojice podmnožin, jejichž průnikem je jedna z nich. Průběh celého procesu shlukování se obvykle znázorňuje ve formě tzv.dendrogramu. Dendrogram je binární strom znázorňující hierarchické shlukování. Každý uzel tohoto stromu představuje shluk. Horizontální řezy dendrogramem jsou rozklady ze shlukovací sekvence. Vertikální směr v dendrogramu představuje „vzdálenost mezi shluky (rozklady). [50]

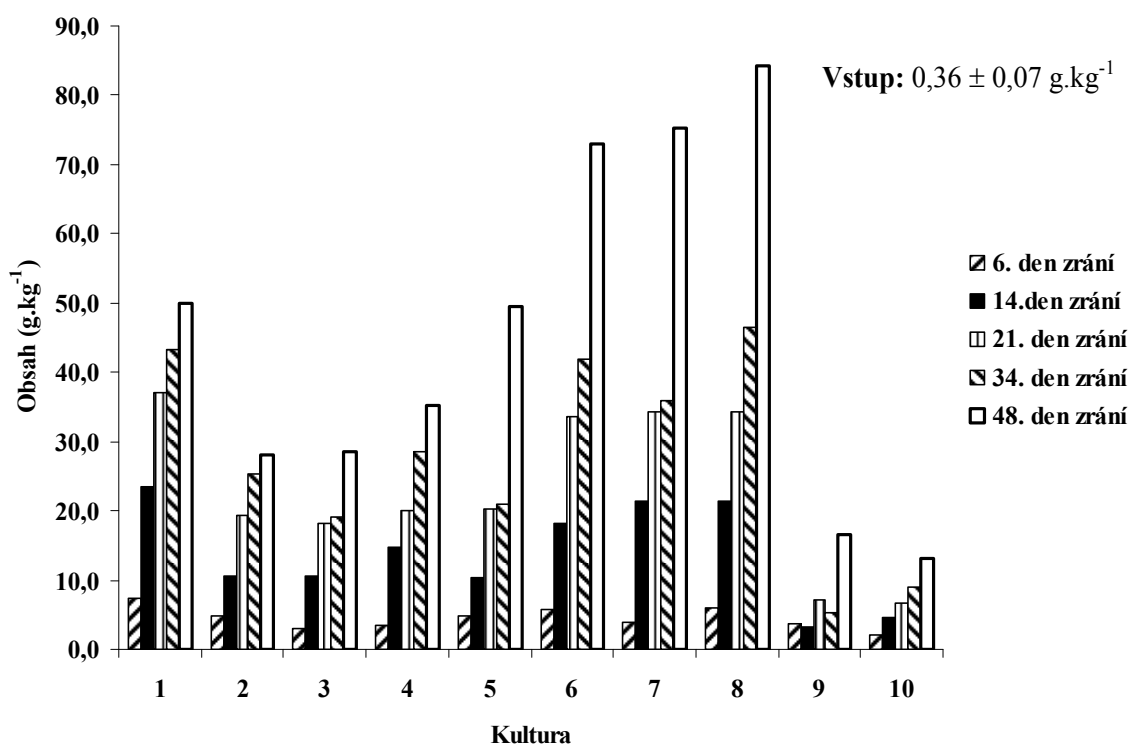
III. VÝSLEDKY A DISKUZE

11 VÝSLEDKY

11.1 Vývoj obsahu všech volných AMK v čase

Byl sledován vývoj FAA u jednotlivých vzorků v průběhu 48 dnů zrání. Sýry zrály prvních 14 dní při teplotě 15 °C a poté byla teplota snížena na 6 °C až do konce zrání. Na následujícím obrázku je možné shlédnout grafické vyjádření vývoje součtu obsahů všech volných aminokyselin (FAA) v průběhu 48 dnů zrání pro všech 10 kultur. Na ose x jsou vyznačeny všechny kultury použité při očkování. Jednotlivé sloupce odpovídají počtu dní zrání. Sloupce A odpovídají době zrání 6 dní, sloupce B odpovídají době zrání 14 dní, sloupce C odpovídají době zrání 21 dní, sloupce D odpovídají době zrání 34 dní a sloupce E odpovídají době zrání 48 dní. Osa y představuje množství všech FAA obsažených v sýrech. Vstup značí součet obsahů FAA v sýrech před očkováním.

Obr. 5 – Grafické vyjádření vývoje součtu obsahů všech FAA pro všechny kultury



Z grafického znázornění vývoje součtu obsahů všech FAA pro všechny kultury je možné usoudit následující:

- nejmenší obsah FAA se nachází u sýrů před vlastním očkováním,

- největší obsah FAA se nachází u vzorků, které byly analyzovány po 48 dnech zrání,
- kmeny plísní *P.nalgiovensis* mají obecně větší proteolytickou aktivitu než kmeny plísní *P.camemberti*,
- z kmenů *P.nalgiovensis* mají nejmenší proteolytickou aktivitu *P.nalgiovensis* M-EK 6 (vzorek č. 2), *P.nalgiovensis* M-EK 72 (vzorek č. 3) a *P.nalgiovensis* CCDM 321 (vzorek č. 4),

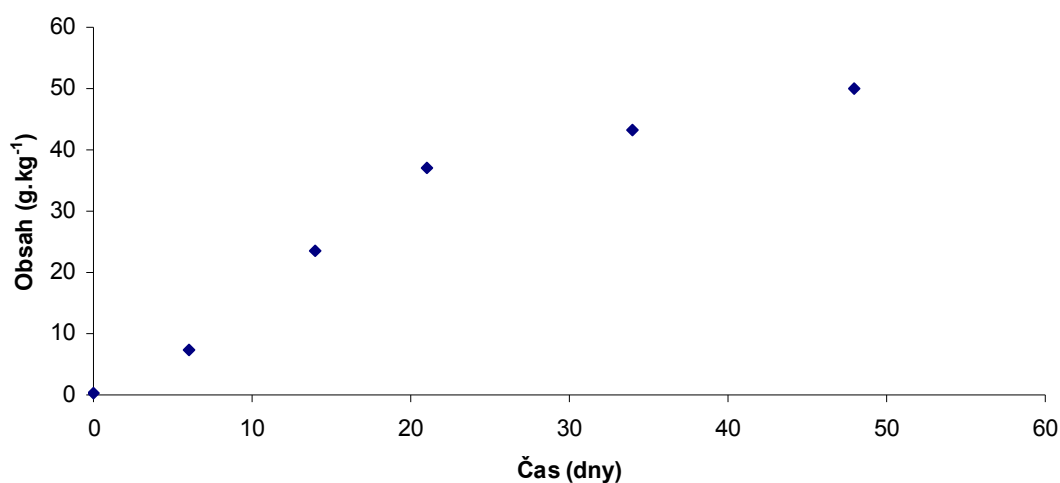
11.2 Vývoj jednotlivých FAA v čase

V grafech je možné shlédnout vývoj obsahu všech FAA pro jednotlivé vzorky v čase. Dále jsou znázorněny vývoje obsahů volného leucinu jako charakteristické AMK v čase pro jednotlivé vzorky. [8]. V tabulkách je znázorněna rovnice regrese a také hodnota korelačního koeficientu závislosti množství FAA na čase pro jednotlivé vzorky.

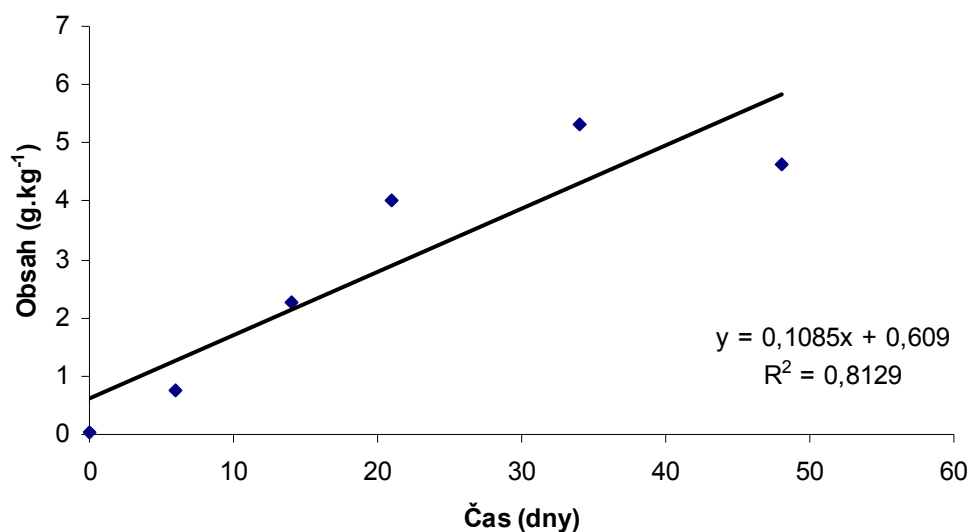
11.2.1 Vzorek č.1

Na grafu 2 je možné shlédnout vývoj obsahu součtu FAA v čase pro vzorek č.1 naočkovaný kulturou *P.nalgiovensis* M-EK 4. Graf 3 vyjadřuje vývoj obsahu volného leucinu v čase pro vzorek č.1. V tabulce 2 je možné shlédnout rovnice regrese a hodnoty korelačních koeficientů závislosti množství jednotlivých FAA na čase pro vzorek č.1

Obr. 6 – Grafické znázornění vývoje obsahu součtu FAA v čase pro vzorek č. 1



Obr. 7 - Grafické znázornění vývoje obsahu volného leucinu v čase pro vzorek č. 1



Tab. 2 – Rovnice regrese a hodnota korelačního koeficientu závislosti množství FAA na čase pro vzorek č. 1

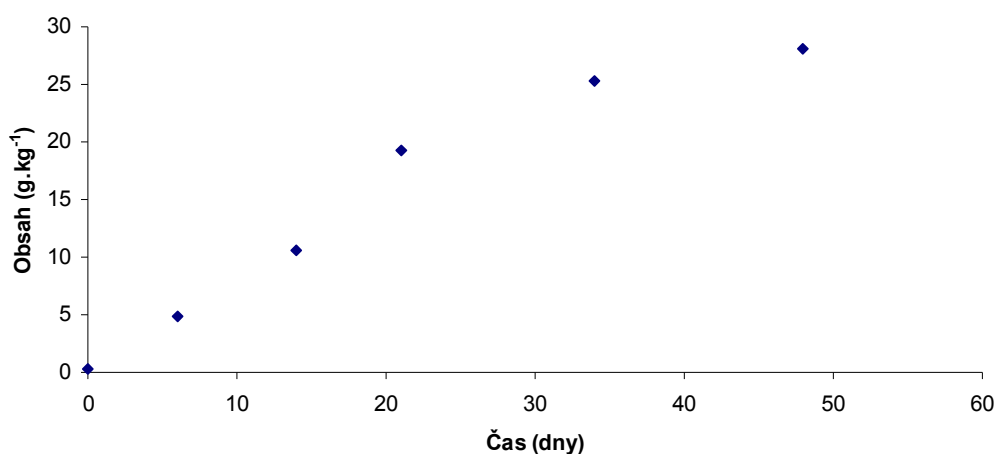
AMK	Rovnice regrese	Korelační koeficient
Cystein	$y = 0,005x + 0,0044$	0,9999
Kyselina asparagová	$y = 0,0656x + 0,0283$	0,9715
Threonin	$y = 0,0425x + 0,1154$	0,9197
Serin	$y = 0,0469x + 0,0143$	0,9326
Asparagin	$y = 0,0123x + 0,1503$	0,8725
Kyselina glutamová	$y = 0,1493x + 0,7706$	0,9309
Glutamin	$y = 0,0461x - 0,1599$	0,8664
Prolin	$y = 0,0525x - 0,134$	0,9097
Glycin	$y = 0,0209x + 0,0636$	0,9150
Alanin	$y = 0,0302x + 0,0747$	0,9821
Citrulin	$y = 0,0057x - 0,0096$	0,8341
Valin	$y = 0,067x + 0,2618$	0,9305
Methionin	$y = 0,0644x + 1,5612$	0,6002
Isoleucin	$y = 0,0581x + 0,1454$	0,9089
Leucin	$y = 0,1085x + 0,609$	0,9016
Tyrosin	$y = 0,0428x + 0,2757$	0,9073
Fenylalanin	$y = 0,0606x + 0,2928$	0,9018
Arginin	$y = 0,0154x + 0,4161$	0,7127
Ornithin	$y = 0,0017x + 0,1175$	0,4613
Lysin	$y = 0,1002x + 0,7869$	0,9058
Histidin	$y = 0,0262x + 0,2229$	0,8764
Kyselina γ -aminomáselná	$y = -0,0002x + 0,1278$	0,0424
Kyselina cysteová	$y = 0,0144x + 0,4305$	0,6234
Etanolamin	$y = 0,0016x + 0,0168$	0,6434

S výjimkou kyseliny cysteové, methioninu, kyseliny γ -aminomáselné, ornithinu a etanolaminu je možné soudit, že závislost obsahu FAA na době zrání je vysoká. Nejvyšší závislost vykazoval cystein. Nejnižší závislost vykazovala kyselina γ -aminomáselná, což poukazuje na možnost působení jiných faktorů na obsah této aminokyseliny, než je doba zrání.

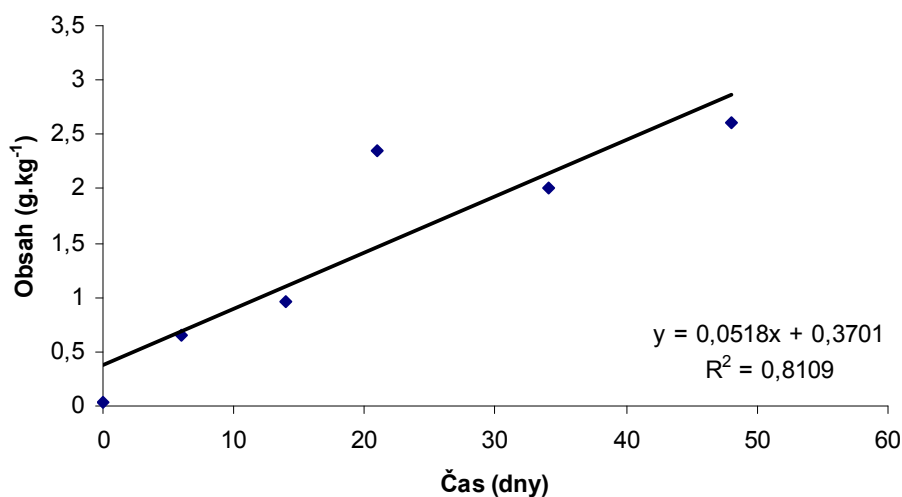
11.2.2 Vzorek č. 2

Vzorek č. 2 byl naočkovaný kulturou *P.nalgiovensis* M-EK 6. Na grafu 4 je znázorněn vývoj obsahu součtu FAA v čase pro vzorek č.2. Graf 3 vyjadřuje vývoj obsahu volného leucinu v čase pro vzorek č.2. V tabulce 3 je možné shlédnout rovnice regrese a hodnoty korelačních koeficientů závislosti množství jednotlivých FAA na čase pro vzorek č.2

Obr. 8 – Grafické znázornění vývoje obsahu součtu FAA v čase pro vzorek č. 2



Obr. 9 – Grafické znázornění vývoje obsahu volného leucinu pro vzorek č. 2



Tab. 3 – Rovnice regrese a hodnota korelačního koeficientu závislosti množství FAA na čase pro vzorek č. 2

AMK	Rovnice regrese	Korelační koeficient
Cystein *		
Kyselina asparagová	$y = 0,0315x + 0,0325$	0,8947
Threonin	$y = 0,0223x + 0,0372$	0,9137
Serin	$y = 0,0219x + 0,0234$	0,9120
Asparagin	$y = 0,0106x + 0,0863$	0,3551
Kyselina glutamová	$y = 0,0839x + 0,2402$	0,9785
Glutamin	$y = 0,0305x - 0,0138$	0,8706
Prolin	$y = 0,0209x - 0,022$	0,9769
Glycin	$y = 0,011x + 0,0514$	0,8501
Alanin	$y = 0,017x + 0,0527$	0,9645
Citrulin	$y = 0,0034x + 0,0179$	0,8798
Valin	$y = 0,0322x + 0,1983$	0,9169
Methionin	$y = 0,0652x + 0,0941$	0,9493
Isoleucin	$y = 0,0301x + 0,0764$	0,8878
Leucin	$y = 0,0518x + 0,3701$	0,9005
Tyrosin	$y = 0,0279x + 0,1673$	0,9010
Fenylalanin	$y = 0,0333x + 0,1897$	0,9289
Arginin	$y = 0,0128x + 0,1691$	0,9050
Ornithin	$y = 0,0013x + 0,0817$	0,5702
Lysin	$y = 0,0601x + 0,4622$	0,9173
Histidin	$y = 0,0159x + 0,0786$	0,9387
Kyselina γ -aminomáselná	$y = 8E-05x + 0,08$	0,0283
Kyselina cysteová	$y = 0,0126x + 0,2349$	0,7715
Etanolamin	$y = 0,0006x + 0,0018$	0,9999

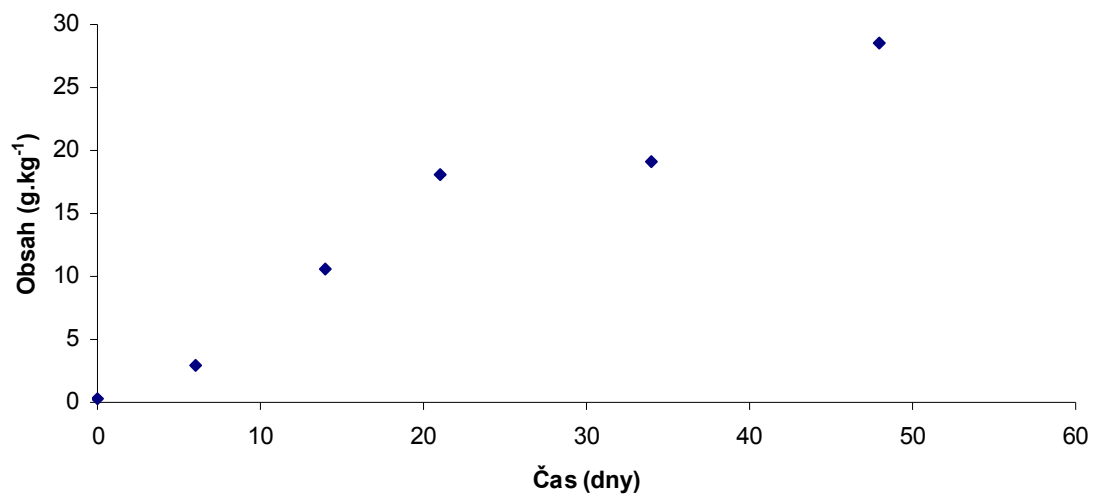
* rovnice regrese a hodnota korelačního koeficientu nebyla určena

S výjimkou asparaginu, kyseliny γ -aminomáselné a ornithinu je těsnost závislosti obsahu FAA na době zrání vysoká, tzn. obsah aminokyselin se s prodlužující délkou zrání zvyšoval. Cystein byl stanoven pouze u vstupní suroviny, proto nebyla určena rovnice regrese a hodnota korelačního koeficientu pro tuto aminokyselinu. Nejvyšší těsnost závislosti obsahu FAA na době zrání je sledována u etanolaminu. Nejnižší těsnost je sledována u γ -aminomáselné kyseliny, u které je předpokládán vliv jiných činitelů na obsah této aminokyseliny, než je doba zrání.

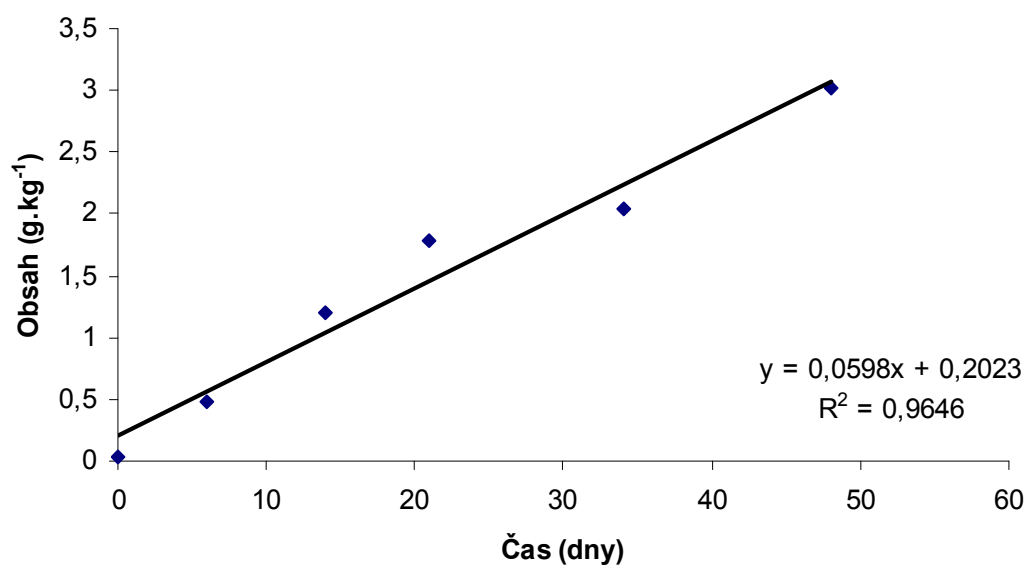
11.2.3 Vzorek č. 3

Na grafu 6 je možné shlédnout vývoj obsahu součtu FAA v čase pro vzorek č.3 naočkovaný kulturou *P.nalgiovensis* M-EK 72. Graf 7 vyjadřuje vývoj obsahu volného leucinu v čase pro vzorek č.3. V tabulce 4 je možné shlédnout rovnice regrese a hodnoty korelačních koeficientů závislosti množství jednotlivých FAA na čase pro vzorek č.3.

Obr. 10 – Grafické znázornění vývoje obsahu součtu FAA v čase pro vzorek č. 3



Obr. 11 – Grafické znázornění vývoje obsahu volného leucinu v čase pro vzorek č. 3



Tab. 4 – Rovnice regrese a hodnota korelačního koeficientu závislosti množství FAA na čase pro vzorek č. 3

AMK	Rovnice regrese	Korelační koeficient
Cystein *		
Kyselina asparagová	$0,0347x - 0,0794$	0,9631
Threonin	$y = 0,0226x - 0,0192$	0,9741
Serin	$y = 0,0238x - 0,0295$	0,9814
Asparagin	$y = -0,0014x + 0,2233$	0,1562
Kyselina glutamová	$y = 0,0895x - 0,0236$	0,9786
Glutamin	$y = 0,0076x + 0,1614$	0,4534
Prolin	$y = 0,0133x - 0,0673$	0,7836
Glycin	$y = 0,0164x - 0,0127$	0,9930
Alanin	$y = 0,0143x + 0,0016$	0,9514
Citrulin	$y = 0,0028x + 0,0111$	0,8728
Valin	$y = 0,0339x + 0,0134$	0,9554
Methionin	$y = 0,0536x + 0,3664$	0,7125
Isoleucin	$y = 0,0354x - 0,0193$	0,9882
Leucin	$y = 0,0598x + 0,2023$	0,9821
Tyrosin	$y = 0,015x + 0,294$	0,6672
Fenylalanin	$y = 0,0349x + 0,1261$	0,9690
Arginin	$y = 0,0086x + 0,1987$	0,7574
Ornithin	$y = 0,0051x + 0,0212$	0,9879
Lysin	$y = 0,0666x + 0,2013$	0,9647
Histidin	$y = 0,0188x + 0,0217$	0,9958
Kyselina γ -aminomáselná	$y = 0,0008x + 0,0673$	0,2939
Kyselina cysteová	$y = 0,0097x + 0,2071$	0,7215
Etanolamin	$y = 0,0008x + 0,0012$	0,9962

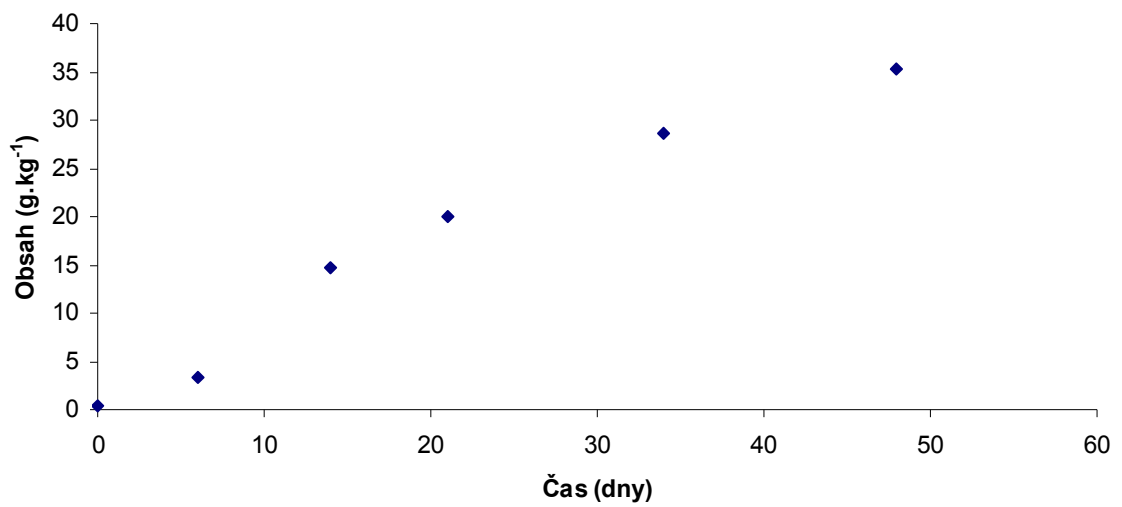
* rovnice regrese a hodnota korelačního koeficientu nebyla určena

U asparaginu, glutaminu, tyrosinu a kyseliny γ -aminomáselné je těsnost závislosti obsahu FAA na době zrání nižší, než u ostatních aminokyselin, je tedy vhodné se domnívat, že na obsah zmíněných aminokyselin nemá velký vliv doba zrání, ale že zde působí i jiní činitelé, kteří se významněji podílí na obsahu těchto aminokyselin. Cystein byl stanoven pouze u vstupní suroviny, nebyla tedy u této aminokyseliny vyjádřena rovnice regrese a hodnota korelačního koeficientu. Nejvyšší závislost obsahu FAA na době zrání je možné sledovat u ethanolaminu, nejnižší u asparaginu.

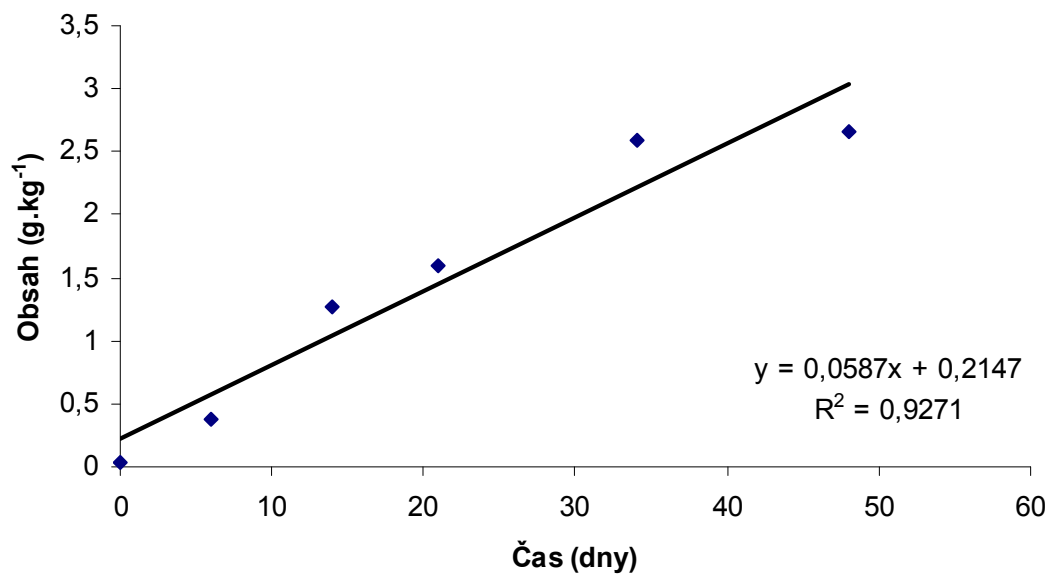
11.2.4 Vzorek č. 4

Vzorek č.4 byl naočkovaný kulturou *P.nalgiovensis* CCDM 321. Na grafu 8 je znázorněn vývoj obsahu součtu FAA v čase pro vzorek č.4. Graf 9 vyjadřuje vývoj obsahu volného leucinu v čase pro vzorek č.4. V tabulce 5 je možné shlédnout rovnice regrese a hodnoty korelačních koeficientů závislosti množství jednotlivých FAA na čase pro vzorek č.4.

Obr. 12 – Grafické znázornění vývoje obsahu součtu FAA v čase pro vzorek č. 4



Obr. 13 – Grafické znázornění vývoje obsahu volného leucinu v čase pro vzorek č. 4



Tab. 5 – Rovnice regrese a hodnota korelačního koeficientu závislosti množství FAA na čase pro vzorek č. 4

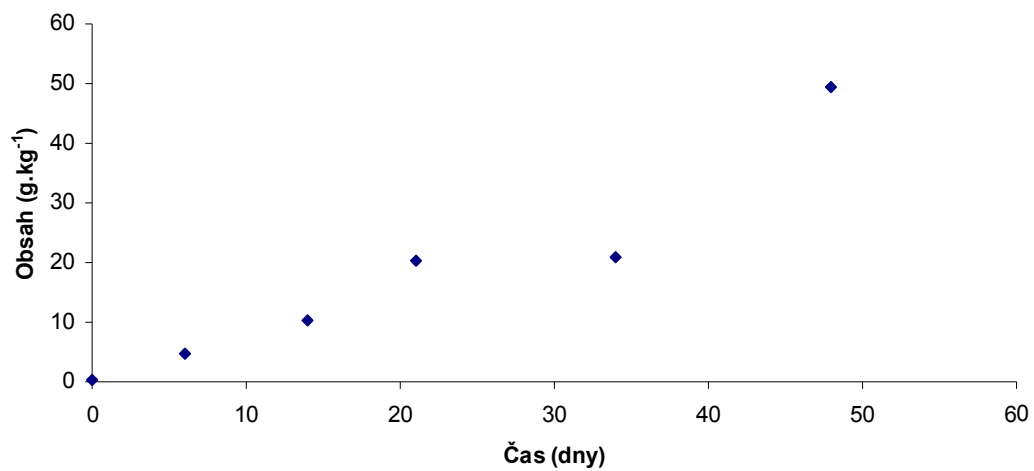
AMK	Rovnice regrese	Korelační koeficient
Cystein	$y = 0,0154x + 0,0044$	0,9999
Kyselina asparagová	$y = 0,0542x - 0,016$	0,9477
Threonin	$y = 0,0256x + 0,073$	0,9345
Serin	$y = 0,0349x - 0,0756$	0,9932
Asparagin	$y = 0,0032x + 0,0117$	0,6783
Kyselina glutamová	$y = 0,1471x + 0,1385$	0,9789
Glutamin	$y = 0,0098x + 0,0218$	0,9616
Prolin	$y = 0,0114x - 0,0351$	0,9392
Glycin	$y = 0,0155x + 0,0492$	0,9026
Alanin	$y = 0,0155x + 0,0212$	0,9925
Citrulin	$y = 0,0037x + 0,0169$	0,7305
Valin	$y = 0,0373x + 0,0264$	0,9925
Methionin	$y = 0,0352x + 0,6017$	0,6958
Isoleucin	$y = 0,0434x + 0,0052$	0,9780
Leucin	$y = 0,0587x + 0,2147$	0,9629
Tyrosin	$y = 0,0313x + 0,0656$	0,9749
Fenylalanin	$y = 0,0415x + 0,1679$	0,9456
Arginin	$y = 0,0169x + 0,1237$	0,9331
Ornithin	$y = 0,0066x + 0,092$	0,6063
Lysin	$y = 0,1056x + 0,1143$	0,9775
Histidin	$y = 0,0245x + 0,158$	0,9052
Kyselina γ -aminomáselná	$y = 0,0012x + 0,0538$	0,4410
Kyselina cysteová	$y = 0,0149x + 0,1352$	0,8791
Etanolamin	$y = 0,0013x + 0,0027$	0,9966

S výjimkou asparaginu, methioninu, kyseliny γ -aminomáselné a ornithinu je možné soudit, že závislost obsahu FAA na době zrání je vysoká. Nejvyšší závislost vykazoval cystein. Nejmenší závislost měla kyselina γ -aminomáselná, což poukazuje na možnost působení jiných faktorů na obsah této aminokyseliny, než je doba zrání.

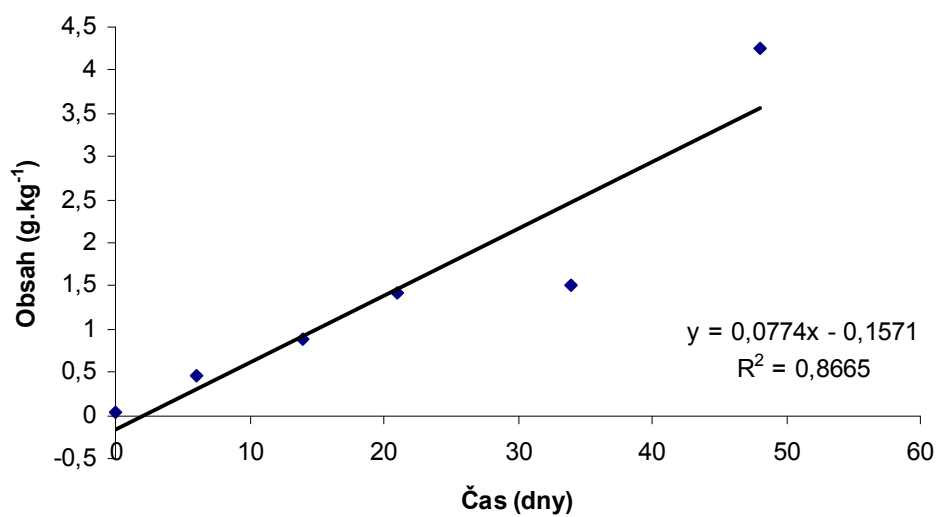
11.2.5 Vzorek č. 5

Na grafu 10 je znázorněn vývoj obsahu součtu FAA v čase pro vzorek č.5. Tento vzorek byl naočkovaný kulturou *P.nalgiovensis* CCDM 322. Graf 11 vyjadřuje vývoj obsahu volného leucinu v čase pro vzorek č.5. V tabulce 6 je možné shlédnout rovnice regrese a hodnoty korelačních koeficientů závislosti množství jednotlivých FAA na čase pro vzorek č.5.

Obr. 14 – Grafické znázornění vývoje obsahu součtu FAA v čase pro vzorek č. 5



Obr. 15 – Grafické znázornění vývoje obsahu volného leucinu v čase pro vzorek č. 5



Tab. 6 – Rovnice regrese a hodnota korelačního koeficientu závislosti množství FAA na čase pro vzorek č. 5

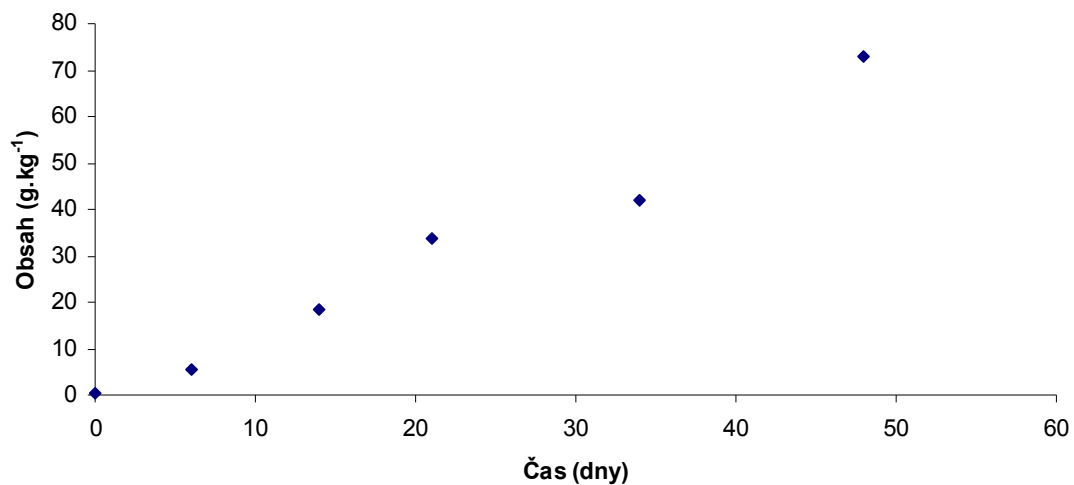
AMK	Rovnice regrese	Korelační koeficient
Cystein	$y = 0,0076x + 0,0044$	0,9999
Kyselina asparagová	$y = 0,0723x - 0,3169$	0,9412
Threonin	$y = 0,0355x - 0,1074$	0,9616
Serin	$y = 0,0289x - 0,0797$	0,9791
Asparagin	$y = 0,0152x - 0,2577$	0,8118
Kyselina glutamová	$y = 0,2014x - 0,6749$	0,9584
Glutamin	$y = 0,0148x - 0,0315$	0,7997
Prolin	$y = 0,0107x - 0,0262$	0,8699
Glycin	$y = 0,0203x - 0,0477$	0,9690
Alanin	$y = 0,0199x - 0,0405$	0,8984
Citrulin	$y = 0,006x - 0,0195$	0,9048
Valin	$y = 0,0478x - 0,2217$	0,9437
Methionin	$y = 0,0643x - 0,0476$	0,7446
Isoleucin	$y = 0,0501x - 0,1543$	0,9646
Leucin	$y = 0,0774x - 0,1571$	0,9309
Tyrosin	$y = 0,0233x + 0,1258$	0,9625
Fenylalanin	$y = 0,0596x - 0,1247$	0,9680
Arginin	$y = 0,0105x + 0,2025$	0,8280
Ornithin	$y = 0,0139x - 0,0431$	0,8311
Lysin	$y = 0,1175x + 0,0559$	0,9806
Histidin	$y = 0,0356x + 0,0018$	0,9746
Kyselina γ -aminomáselná	$y = -0,0003x + 0,0863$	0,1054
Kyselina cysteová	$y = 0,0177x + 0,0738$	0,8971
Etanolamin	$y = 0,0016x - 0,0048$	0,8935

Kromě γ -aminomáselné kyseliny byla těsnost závislosti obsahu FAA na době zrání vysoká, lze tedy říci, že obsah aminokyselin u vzorku naočkovaného kulturou č. 5 roste s prodlužující se dobou zrání. Nejvyšší těsnost závislosti byla u cysteinu.

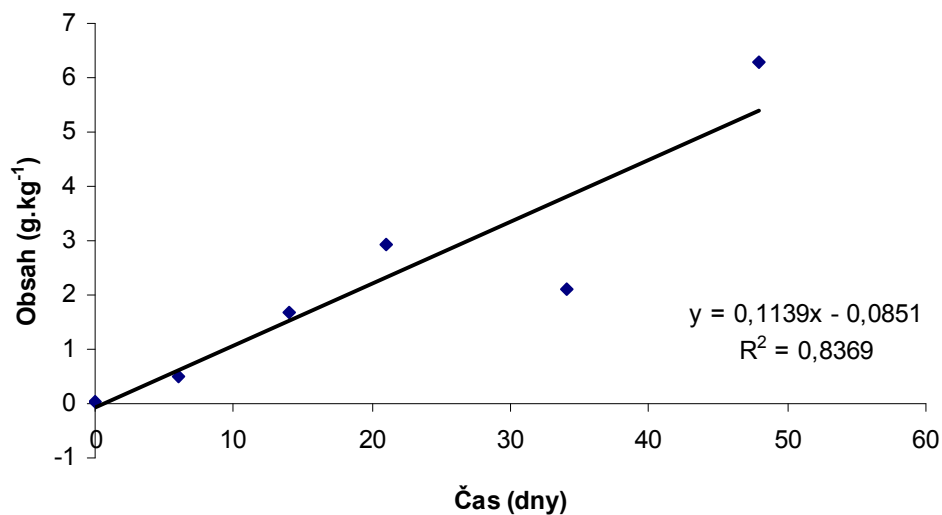
11.2.6 Vzorek č. 6

Na grafu 12 je možné shlédnout vývoj obsahu součtu FAA v čase pro vzorek č.6 naočkovaný kulturou *P.nalgiovensis* CCDM 324. Graf 13 vyjadřuje vývoj obsahu volného leucinu v čase pro vzorek č.6. V tabulce 7 je možné shlédnout rovnice regrese a hodnoty korelačních koeficientů závislosti množství jednotlivých FAA na čase pro vzorek č.6.

Obr. 16 – Grafické znázornění vývoje obsahu součtu FAA v čase pro vzorek č. 6



Obr. 17 – Grafické znázornění vývoje obsahu volného leucinu v čase pro vzorek č. 6



Tab. 7 – Rovnice regrese a hodnota korelačního koeficientu závislosti množství FAA na čase pro vzorek č. 6

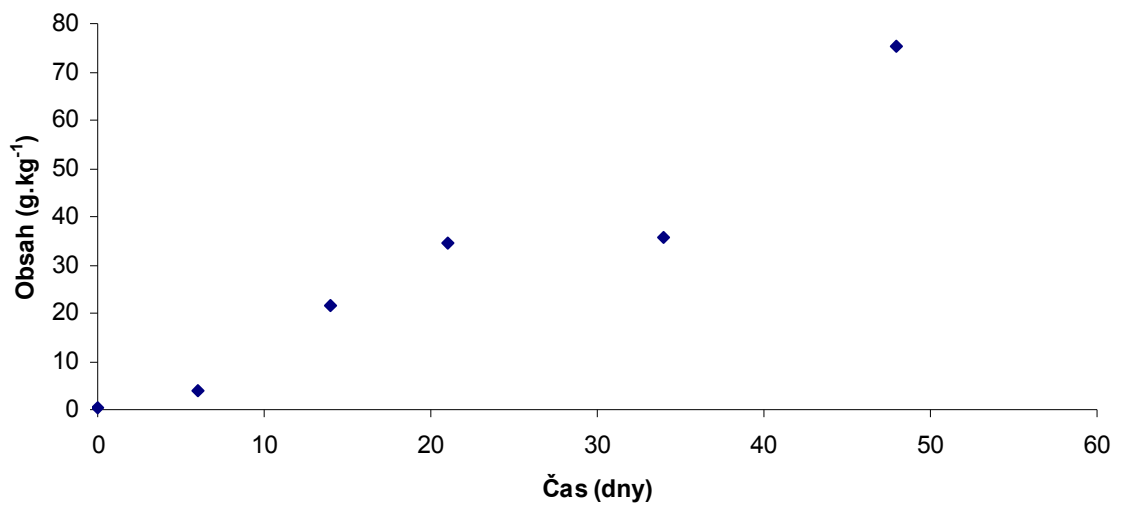
AMK	Rovnice regrese	Korelační koeficient
Cystein	$y = 0,0184x + 0,0044$	0,9999
Kyselina asparagová	$y = 0,1041x - 0,2886$	0,9848
Threonin	$y = 0,0575x - 0,093$	0,9906
Serin	$y = 0,0467x - 0,066$	0,9910
Asparagin	$y = 0,0213x - 0,1863$	0,9638
Kyselina glutamová	$y = 0,3006x - 0,6321$	0,9948
Glutamin	$y = 0,014x + 0,0846$	0,8781
Prolin	$y = 0,0491x - 0,368$	0,8540
Glycin	$y = 0,0289x - 0,0037$	0,9746
Alanin	$y = 0,035x - 0,0416$	0,9923
Citrulin	$y = 0,0079x - 0,0208$	0,9758
Valin	$y = 0,0866x - 0,3302$	0,9661
Methionin	$y = 0,1018x + 0,1006$	0,7312
Isoleucin	$y = 0,0942x - 0,2841$	0,9895
Leucin	$y = 0,1139x - 0,0851$	0,9148
Tyrosin	$y = 0,0454x - 0,0078$	0,9856
Fenylalanin	$y = 0,0871x - 0,0723$	0,9907
Arginin	$y = 0,0251x + 0,2034$	0,9401
Ornithin	$y = 0,014x + 0,0616$	0,7712
Lysin	$y = 0,1634x + 0,1834$	0,9989
Histidin	$y = 0,0494x + 0,0959$	0,9846
Kyselina γ -aminomáselná	$y = 0,0013x + 0,1055$	0,3396
Kyselina cysteová	$y = 0,0278x + 0,0818$	0,9907
Etanolamin	$y = 0,0033x - 0,0079$	0,9404

Těsnost závislosti obsahu na době zrání je vysoká s výjimkou γ -aminomáselné kyseliny, u které je tedy možné předpokládat působení jiných faktorů na její obsah mimo dobu zrání. Nejvyšší těsnost závislosti obsahu FAA na době zrání je u cysteinu.

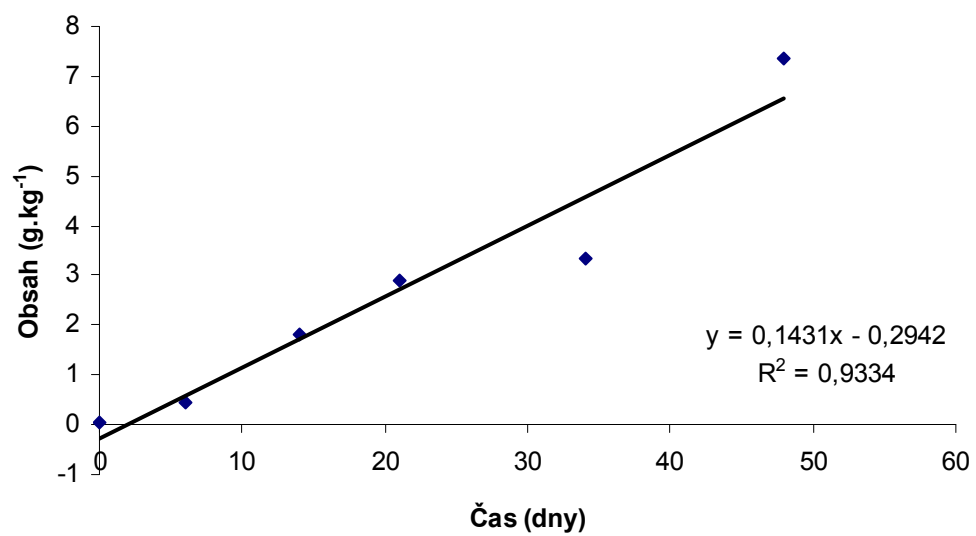
11.2.7 Vzorek č. 7

Vzorek č.7 byl naočkovaný kulturou *P.nalgiovensis* CCDM 328. Na grafu 14 je znázorněn vývoj obsahu součtu FAA v čase pro vzorek č.7. Graf 15 vyjadřuje vývoj obsahu volného leucinu v čase pro vzorek č.7. V tabulce 8 je možné shlédnout rovnice regrese a hodnoty korelačních koeficientů závislosti množství jednotlivých FAA na čase pro vzorek č.7.

Obr. 18 – Grafické znázornění vývoje obsahu součtu FAA v čase pro vzorek č. 7



Obr. 19 – Grafické znázornění vývoje obsahu volného leucinu v čase pro vzorek č. 7



Tab. 8 – Rovnice regrese a hodnota korelačního koeficientu závislosti množství FAA na čase pro vzorek č. 7

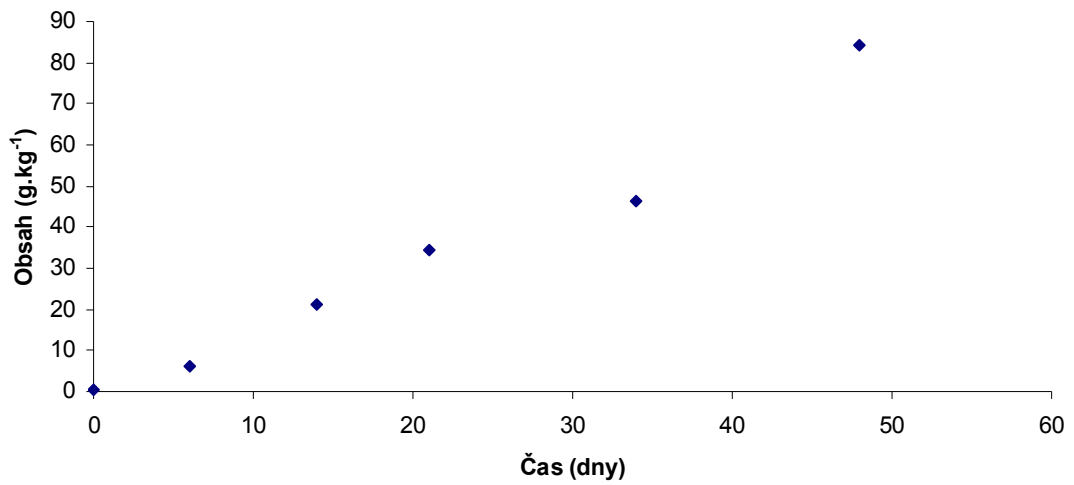
AMK	Rovnice regrese	Korelační koeficient
Cystein	$y = 0,0168x + 0,0044$	0,9999
Kyselina asparagová	$y = 0,1008x - 0,3521$	0,9833
Threonin	$y = 0,0643x - 0,1788$	0,9534
Serin	$y = 0,0648x - 0,3112$	0,9464
Asparagin	$y = 0,0112x + 0,1286$	0,7675
Kyselina glutamová	$y = 0,2145x + 0,2417$	0,9593
Glutamin	$y = 0,0295x - 0,0966$	0,8238
Prolin	$y = 0,0484x - 0,3638$	0,9208
Glycin	$y = 0,0387x - 0,0764$	0,9880
Alanin	$y = 0,0451x - 0,1602$	0,9801
Citrulin	$y = 0,0086x - 0,0265$	0,9690
Valin	$y = 0,0983x - 0,7075$	0,9502
Methionin	$y = 0,1229x - 0,1922$	0,7660
Isoleucin	$y = 0,0875x - 0,2338$	0,9624
Leucin	$y = 0,1431x - 0,2942$	0,9661
Tyrosin	$y = 0,0443x + 0,0944$	0,9435
Fenylalanin	$y = 0,0888x - 0,0968$	0,9704
Arginin	$y = 0,031x + 0,1496$	0,8550
Ornithin	$y = 0,0162x + 0,0256$	0,9413
Lysin	$y = 0,1331x + 0,4922$	0,9427
Histidin	$y = 0,0543x + 0,0087$	0,9655
Kyselina γ -aminomáselná	$y = 0,0014x + 0,0855$	0,4326
Kyselina cysteová	$y = 0,0208x + 0,1743$	0,8931
Etanolamin	$y = 0,0025x - 0,0007$	0,9926

Kromě γ -aminomáselné kyseliny byla těsnost závislosti obsahu FAA na době zrání vysoká, lze tedy říci, že obsah aminokyselin u vzorku naočkovaného kulturou č. 7 roste s prodlužující se dobou zrání. Nejvyšší těsnost závislosti obsahu FAA na čase lze sledovat u cysteinu.

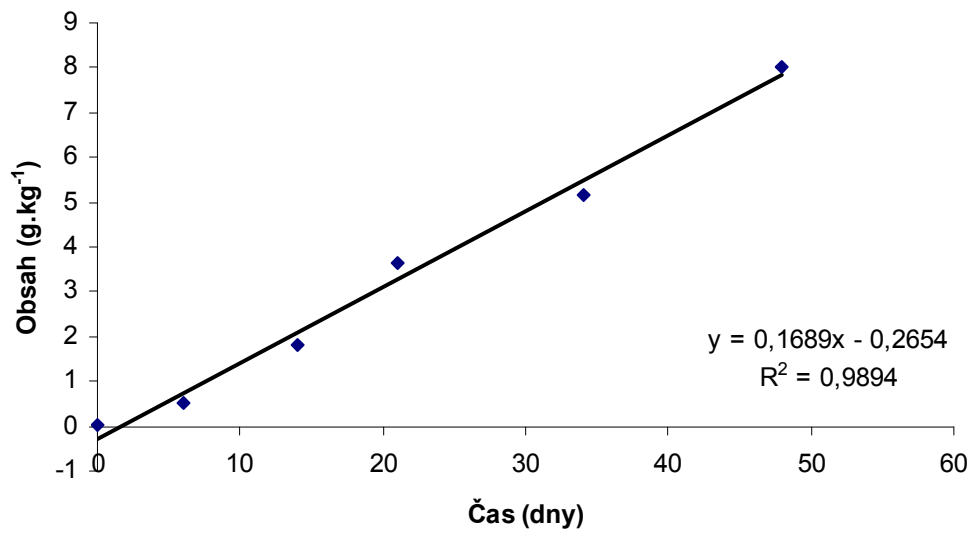
11.2.8 Vzorek č. 8

Na grafu 16 je znázorněn vývoj obsahu součtu FAA v čase pro vzorek č.8. Tento vzorek byl naočkovaný kulturou *P.nalgiovensis* CCDM 329. Graf 17 vyjadřuje vývoj obsahu volného leucinu v čase pro vzorek č.8. V tabulce 9 je možné shlédnout rovnice regrese a hodnoty korelačních koeficientů závislosti množství jednotlivých FAA na čase pro vzorek č.8.

Obr. 20 – Grafické znázornění vývoje obsahu součtu FAA v čase pro vzorek č. 8



Obr. 21 – Grafické znázornění vývoje obsahu volného leucinu v čase pro vzorek č. 8



Tab. 9 – Rovnice regrese a hodnota korelačního koeficientu závislosti množství FAA na čase pro vzorek č. 8

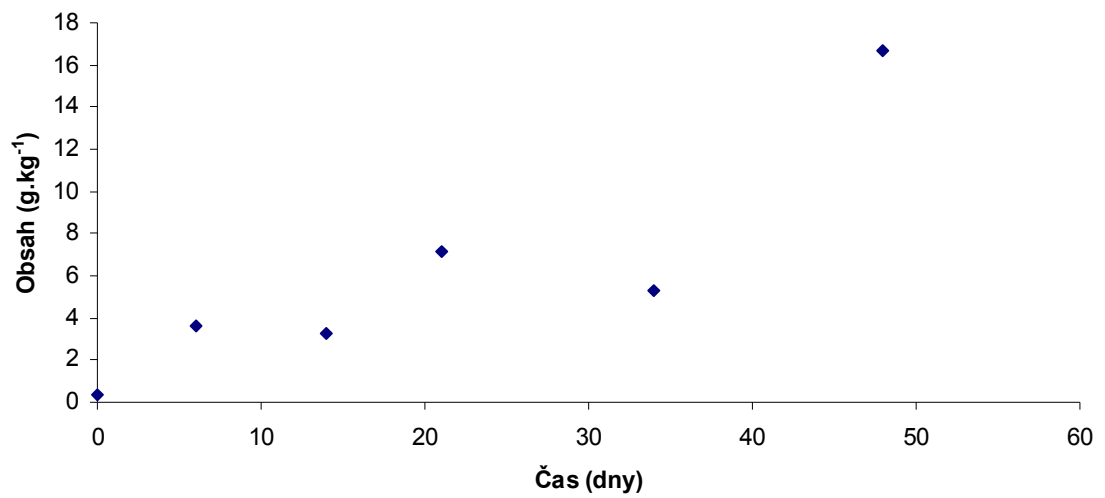
AMK	Rovnice regrese	Korelační koeficient
Cystein	$y = 0,0113x + 0,0044$	0,9999
Kyselina asparagová	$y = 0,1098x - 0,3545$	0,9839
Threonin	$y = 0,064x - 0,1104$	0,9932
Serin	$y = 0,0714x - 0,2721$	0,9847
Asparagin	$y = 0,0251x - 0,2701$	0,8494
Kyselina glutamová	$y = 0,265x - 0,5872$	0,9658
Glutamin	$y = 0,0475x - 0,1653$	0,8705
Prolin	$y = 0,0792x - 0,5325$	0,9366
Glycin	$y = 0,0349x - 0,0543$	0,9880
Alanin	$y = 0,0484x - 0,137$	0,9875
Citrulin	$y = 0,007x - 0,0316$	0,8620
Valin	$y = 0,1162x - 0,5112$	0,9979
Methionin	$y = 0,1248x + 0,139$	0,7996
Isoleucin	$y = 0,0927x - 0,1964$	0,9962
Leucin	$y = 0,1689x - 0,2654$	0,9947
Tyrosin	$y = 0,0519x + 0,0385$	0,9335
Fenylalanin	$y = 0,0969x - 0,0557$	0,9910
Arginin	$y = 0,0351x + 0,2263$	0,9596
Ornithin	$y = 0,0049x + 0,0725$	0,9167
Lysin	$y = 0,1663x + 0,1444$	0,9970
Histidin	$y = 0,0438x + 0,0759$	0,9847
Kyselina γ -aminomáselná	$y = 0,0008x + 0,1225$	0,1918
Kyselina cysteová	$y = 0,0398x + 0,0102$	0,9591
Etanolamin	$y = 0,0022x + 0,0022$	0,9997

V porovnání s ostatními lze sledovat u γ -aminomáselné kyseliny velmi malou těsnost závislosti obsahu FAA na době zrání. Z této malé závislosti vyplývá, že na obsah této aminokyseliny působí ve větší míře jiní činitelé, než je doba zrání. Nejvyšší těsnost závislosti obsahu FAA na době zrání je u cysteinu.

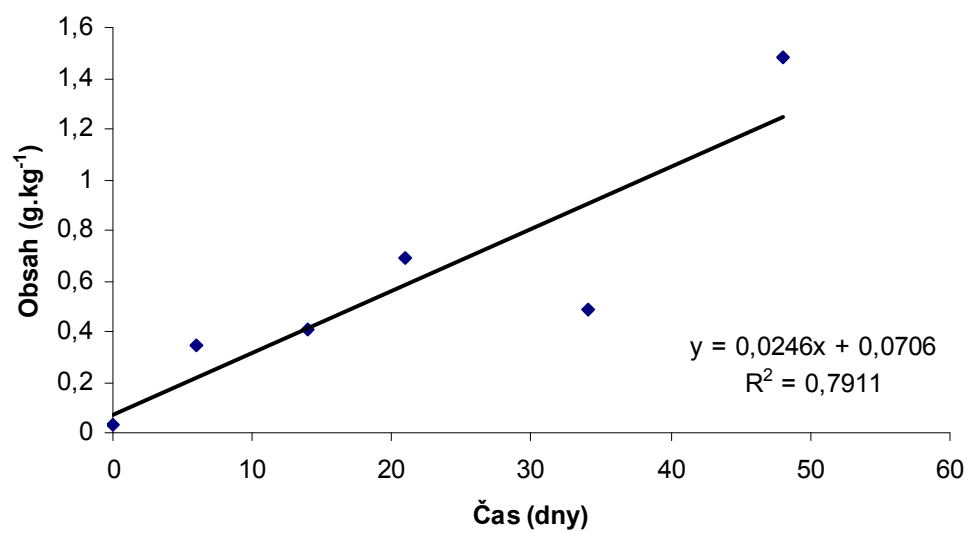
11.2.9 Vzorek č. 9

Na grafu 18 je možné shlédnout vývoj obsahu součtu FAA v čase pro vzorek č.9 naočkovaný kulturou *P.camemberti* CCDM 797. Graf 19 vyjadřuje vývoj obsahu volného leucinu v čase pro vzorek č.9. V tabulce 10 je možné shlédnout rovnice regrese a hodnoty korelačních koeficientů závislosti množství jednotlivých FAA na čase pro vzorek č.9.

Obr. 22 – Grafické znázornění vývoje obsahu součtu FAA v čase pro vzorek č. 9



Obr. 23 – Grafické znázornění vývoje obsahu volného leucinu v čase pro vzorek č. 9



Tab. 10 – Rovnice regrese a hodnota korelačního koeficientu závislosti množství FAA na čase pro vzorek č. 9

AMK	Rovnice regrese	Korelační koeficient
Cystein	$y = 0,001x + 0,0044$	0,9999
Kyselina asparagová	$y = 0,0236x - 0,0671$	0,8892
Threonin	$y = 0,0054x + 0,0149$	0,9367
Serin	$y = 0,0096x - 0,0175$	0,9290
Asparagin *		
Kyselina glutamová	$y = 0,0564x - 0,2131$	0,8932
Glutamin	$y = 0,0141x + 0,1582$	0,6598
Prolin	$y = 0,0225x - 0,1375$	0,8753
Glycin	$y = 0,0071x - 0,0236$	0,8959
Alanin	$y = 0,0053x + 0,03$	0,8490
Citrulin	$y = 0,0032x - 0,0162$	0,8941
Valin	$y = 0,0191x - 0,0661$	0,8720
Methionin	$y = 0,0167x + 0,1202$	0,6098
Isoleucin	$y = 0,0149x - 0,0542$	0,9071
Leucin	$y = 0,0246x + 0,0706$	0,8894
Tyrosin	$y = 0,0017x + 0,1018$	0,3689
Fenylalanin	$y = 0,013x + 0,0372$	0,9435
Arginin	$y = -0,0018x + 0,1529$	0,3256
Ornithin	$y = 0,0047x + 0,0057$	0,9221
Lysin	$y = 0,0273x + 0,1053$	0,8793
Histidin	$y = 0,0078x + 0,0356$	0,8534
Kyselina γ -aminomáselná	$y = -0,0008x + 0,0788$	0,2161
Kyselina cysteová	$y = 0,0035x + 0,1063$	0,5787
Etanolamin	$y = 0,0002x + 0,0009$	0,8971

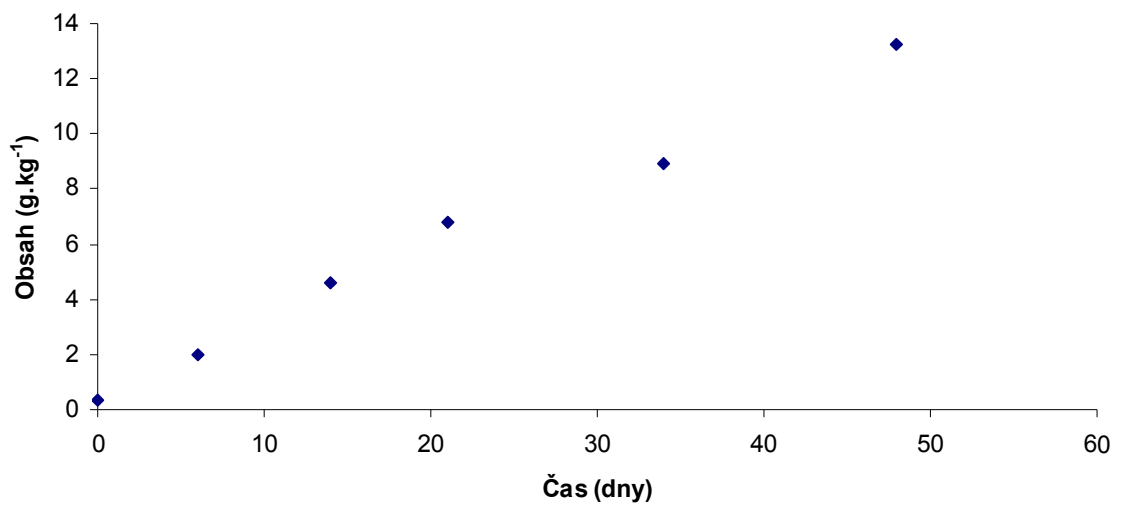
* rovnice regrese a hodnota korelačního koeficientu nebyla určena

Těsnost závislosti obsahu FAA na době zrání je vysoká, výjimku tvoří kyselina cysteová, glutamin, methionin, kyselina γ -aminomáselná a arginin, u nichž se předpokládá vliv jiných činitelů na jejich množství, než je doba zrání. U asparaginu nebyla vyjádřena rovnice regrese ani hodnota korelačního koeficientu, jelikož tato aminokyselina byla stanovena pouze po 34 dnech zrání. Nejvyšší těsnost závislosti obsahu FAA na době zrání je možné sledovat u cysteinu. Nejnižší těsnost závislosti obsahu FAA na době zrání byla u kyseliny γ -aminomáselné.

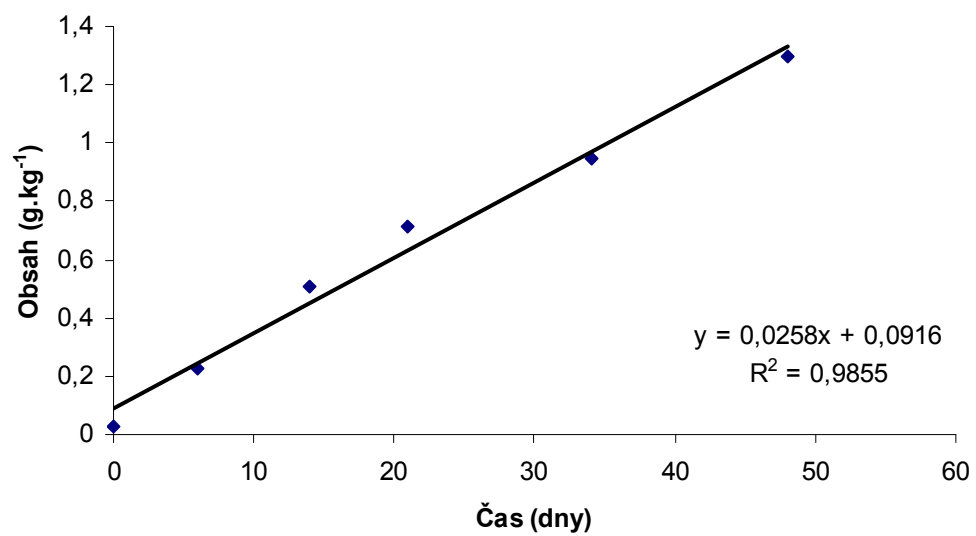
11.2.10 Vzorek č. 10

Vzorek č. 2 byl naočkovaný kulturou *P.camemberti* CCDM 799. Na grafu 20 je znázorněn vývoj obsahu součtu FAA v čase pro vzorek č.10. Graf 21 vyjadřuje vývoj obsahu volného leucinu v čase pro vzorek č.10. V tabulce 11 je možné shlédnout rovnice regrese a hodnoty korelačních koeficientů závislosti množství jednotlivých FAA na čase pro vzorek č.10.

Obr. 24 – Grafické znázornění vývoje obsahu součtu FAA v čase pro vzorek č. 10



Obr. 25 – Grafické znázornění vývoje obsahu volného leucinu v čase pro vzorek č. 10



Tab. 11 – Rovnice regrese a hodnota korelačního koeficientu závislosti množství FAA na čase pro vzorek č. 10

AMK	Rovnice regrese	Korelační koeficient
Cystein	$y = 0,0014x + 0,0044$	0,9999
Kyselina asparagová	$y = 0,0195x - 0,0182$	0,9908
Threonin	$y = 0,0059x - 0,0029$	0,9702
Serin	$y = 0,0089x - 0,0222$	0,9853
Asparagin *		
Kyselina glutamová	$y = 0,0386x - 0,0416$	0,9844
Glutamin	$y = 0,0273x + 0,0964$	0,8304
Prolin	$y = 0,0157x - 0,0502$	0,9732
Glycin	$y = 0,0056x - 0,0125$	0,9888
Alanin	$y = 0,0052x + 0,0312$	0,9556
Citrulin	$y = 0,0034x - 0,0099$	0,9611
Valin	$y = 0,0161x - 0,0087$	0,9971
Methionin	$y = 0,0099x + 0,2682$	0,5404
Isoleucin	$y = 0,0124x - 0,0217$	0,9914
Leucin	$y = 0,0258x + 0,0916$	0,9927
Tyrosin	$y = 0,0031x + 0,0731$	0,7061
Fenylalanin	$y = 0,0126x + 0,0574$	0,9962
Arginin	$y = 0,0023x + 0,0835$	0,4459
Ornithin	$y = 0,0041x + 0,0501$	0,7259
Lysin	$y = 0,027x + 0,1143$	0,9839
Histidin	$y = 0,0068x + 0,0262$	0,9847
Kyselina γ -aminomáselná	$y = 0,0004x + 0,0327$	0,3354
Kyselina cysteová	$y = 0,0043x + 0,1123$	0,6581
Etanolamin	$y = 0,0005x - 0,0007$	0,8694

* rovnice regrese a hodnota korelačního koeficientu nebyla určena

Až na kyselinu cysteovou, methionin, kyselinu γ -aminomáselnou a arginin je těsnost závislosti obsahu FAA na době zrání vysoká, což znamená, že obsah těchto aminokyselin roste s prodlužující se dobou zrání. Asparagin nebyl stanoven, nebyla tedy vyjádřena rovnice regrese ani hodnota korelačního koeficientu pro tuto aminokyselinu. Nejvyšší těsnost závislosti obsahu FAA na době zrání lze sledovat u cysteinu, nejnižší u kyseliny γ -aminomáselné.

11.3 Korelační analýza závislosti vývoje jednotlivých FAA

Pomocí korelační analýzy byla sledována vzájemná závislost vývoje obsahu jednotlivých FAA u vzorků 1 – 10 po dobu zrání 48 dní. Byla sledována významnost korelace mezi leucinem a ostatními aminokyselinami v jednotlivých vzorcích.

Vzorky č. 1 a 2 vykazovaly naprosto stejné výsledky korelační analýzy, proto jsou tyto výsledky uvedeny současně. Na 0,1% hladině významnosti byla pozitivní korelace leucinu

s asparaginem, isoleucinem a histidinem. Na 1% hladině významnosti byla pozitivní korelace zjištěna mezi leucinem a threoninem, serinem, kyselinou glutamovou, glycinem, alaninem, valinem, fenylalaninem, lysinem a argininem; korelační koeficient byl 0,9429. Na 5% hladině významnosti byla pozitivní korelace mezi leucinem a kyselinou asparagovou, prolinem, citrulinem, methioninem a tyrosinem (korelační koeficienty byly v rozmezí $\langle 0,7590; 0,8286 \rangle$) Nevýznamná korelace byla zjištěna u vzorku č. 1 mezi leucinem a cysteinem a to na hladině významnosti větší než 5 % s korelačním koeficientem $-0,6547$. U vzorku č. 2 leucin nekoreloval s cysteinem.

Na 0,1% hladině významnosti byla u vzorku č. 3 pozitivní korelace zjištěna mezi leucinem a kyselinou asparagovou, threoninem, kyselinou glutamovou, glycinem, isoleucinem, fenylalaninem, ornithinem, lysinem a histidinem. Pozitivní korelace na hladině významnosti 1 % s korelačními koeficienty v rozmezí $\langle 0,8857; 0,9429 \rangle$ byla mezi leucinem a serinem, alaninem, citrulinem, valinem a argininem. Asparagin a methionin vykazovaly pozitivní korelaci s leucinem na hladině významnosti 5 % s korelačními koeficienty v rozmezí $\langle 0,7590; 0,8286 \rangle$. Korelace mezi leucinem a cysteinem nebyla u tohoto vzorku prokázána.

Vzorek č. 4 vykazoval následující statistické významnosti: na 0,1% hladině významnosti byla pozitivní korelace mezi leucinem a serinem, kyselinou glutamovou, valinem, isoleucinem, tyrosinem, fenylalaninem, alalinem a lysinem. Na 1% hladině významnosti byla pozitivní korelace mezi leucinem a kys.cysteovou, asparaginem, threoninem, prolinem, glycinem, citrulinem, histidinem a argininem s korelačními koeficienty v rozmezí $\langle 0,8857; 0,9429 \rangle$. Na 5% hladině významnosti byla pozitivní korelace mezi leucinem a asparaginem, glutaminem, methioninem a ornithinem s korelačními koeficienty v rozmezí $\langle 0,8286; 0,8804 \rangle$. Nevýznamná korelace byla zjištěna mezi leucinem a cysteinem na hladině významnosti vyšší než 5 % s korelačním koeficientem $-0,0676$.

U vzorku č. 5 byla na 0,1% hladině významnosti pozitivní korelace mezi leucinem a threoninem, serinem, kyselinou glutamovou, glycinem, alaninem, valinem, isoleucinem, tyrosinem, fenylalaninem, lysinem a histidinem. Na hladině významnosti 1 % s korelačními koeficienty v rozmezí $\langle 0,8857; 0,9429 \rangle$ byla zjištěna pozitivní korelace mezi leucinem a prolinem, kyselinou asparagovou, citrulinem, ornithinem a argininem. Na hladině významnosti 5 % s korelačními koeficienty v rozmezí $\langle 0,8286; 0,8804 \rangle$ byla pozitivní korelace mezi

leucinem a kyseliny cysteové a asparaginu. Nevýznamná korelace byla zjištěna mezi leucinem a cysteinem s korelačním koeficientem $-0,0676$.

Vzorek č. 6 vykazoval pozitivní korelaci na hladině významnosti 0,1 % mezi leucinem a ornithinem. Na 1% hladině významnosti byla pozitivní korelace mezi leucinem a kyselinou cysteovou, kyselinou asparagovou, threoninem, serinem, kyselinou glutamovou, prolinem, glycinem, alaninem, citrulinem, valinem, methioninem, isoleucinem, tyrosinem, fenylalaninem, lysinem a histidinem s korelačními koeficienty v rozmezí $\langle 0,8857; 0,9429 \rangle$. Pozitivní korelace mezi leucinem a asparaginem, glutaminem a argininem byla zjištěna na 5% hladině významnosti s korelačními koeficienty v rozmezí $\langle 0,8286; 0,8804 \rangle$. Nevýznamná byla korelace na hladině významnosti vyšší než 5 % mezi leucinem a kyselinou γ -aminomáselnou a cysteinem s korelačními koeficienty v rozmezí $\langle -0,0857; -0,3043 \rangle$.

U vzorku č. 7 byla 0,1% hladině významnosti pozitivní korelace mezi leucinem a kyselinou asparagovou, threoninem, serinem, glycinem, alaninem, valinem, isoleucinem, fenylalaninem, ornithinem a histidinem. Další pozitivní korelace na hladině významnosti 1 % byla mezi leucinem a kyselinou glutamovou, prolinem, citrulinem, tyrosinem a lysinem s korelačním koeficientem 0,9429. Korelace na 5% hladině významnosti byla mezi leucinem a kyselinou cysteovou, asparaginem, glutaminem, methioninem a argininem s korelačními koeficienty v rozmezí $\langle 0,7714; 0,8804 \rangle$. Nevýznamná korelace na hladině významnosti vyšší než 5 % byla zjištěna mezi leucinem a cysteinem s korelačním koeficientem $-0,0676$.

Vzorek č. 8 vykazoval tyto statistické významnosti: na 0,1% hladině významnosti byla pozitivní korelace mezi leucinem a kyselinou cysteovou, kyselinou asparagovou, threoninem, serinem, kyselinou glutamovou, glycinem, alaninem, citrulinem, valinem, isoleucinem, fenylalaninem, lysinem a histidinem. Na hladině významnosti 1 % byla pozitivní korelace mezi leucinem a prolinem, tyrosinem, ornithinem a argininem s korelačním koeficientem 0,9429. Pozitivní korelace na hladině významnosti 5 % byla zjištěna mezi leucinem a asparaginem, glutaminem a methioninem s korelačními koeficienty v rozmezí $\langle 0,7714; 0,8804 \rangle$. Nevýznamná korelace na hladině významnosti vyšší než 5 % byla mezi leucinem a cysteinem s korelačním koeficientem $-0,0676$.

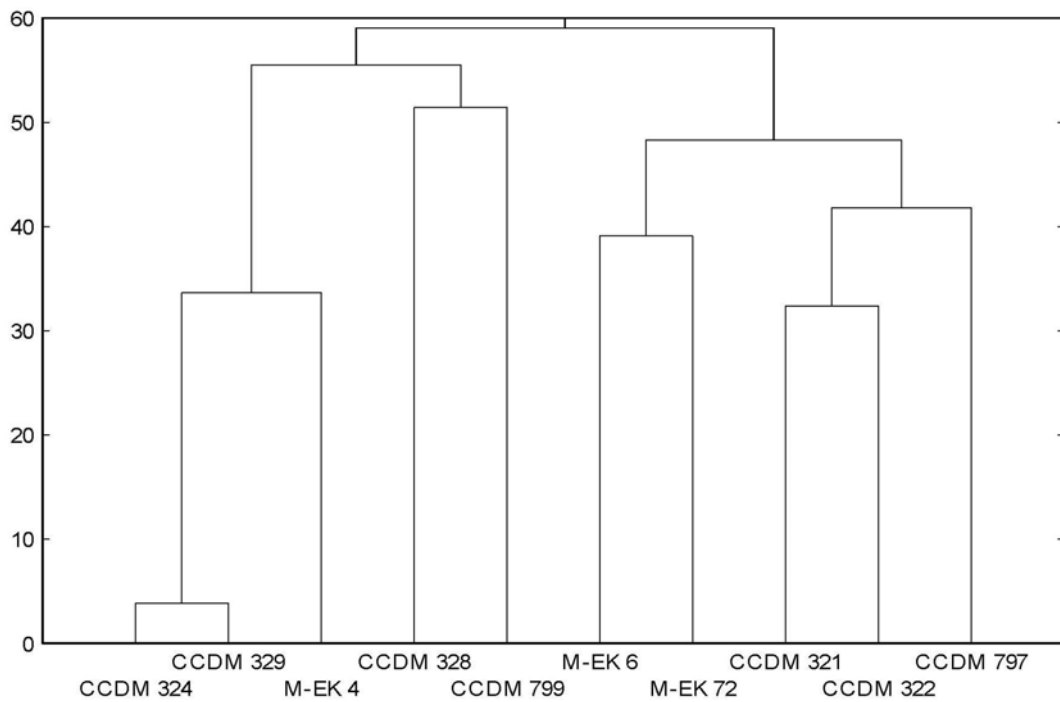
Vzorek č. 9 měl pozitivní korelace na hladině významnosti 0,1 % byla mezi leucinem a kyselinou glutamovou a fenylalaninem. Na hladině významnosti 1 % byla pozitivní kore-

lace mezi leucinem a threoninem, serinem, prolinem, glycinem, valinem, isoleucinem a lysinem s korelačními koeficienty v rozmezí $\langle 0,8857; 0,9429 \rangle$. Na 5% hladině významnosti byla pozitivní korelace mezi leucinem a kyselinou cysteovou, glutaminem, alaninem, citrulinem, methioninem, tyrosinem, ornithinem a histidinem s korelačními koeficienty v rozmezí $\langle 0,7714; 0,8286 \rangle$. Nevýznamná korelace na hladině významnosti vyšší než 5 % byla zjištěna mezi leucinem a cysteinem s korelačním koeficientem $-0,3043$. U tohoto vzorku leucin nekoreloval s asparginem.

Na hladině významnosti 0,1 % byla u vzorku č. 10 pozitivní korelace mezi leucinem a glycinem, alaninem, valinem, isoleucinem, fenylalaninem a lysinem. Na 1% hladině významnosti byla pozitivní korelace mezi leucinem a threoninem, serinem, kyselinou glutamovou, prolinem, citrulinem a histidinem s korelačními koeficienty v rozmezí $\langle 0,8857; 0,9429 \rangle$. Na 5% hladině významnosti byla pozitivní korelace mezi leucinem a kyselinou cysteovou, glutaminem, methioninem a ornithinem s korelačními koeficienty v rozmezí $\langle 0,7714; 0,8286 \rangle$. Negativní korelace na hladině významnosti vyšší než 5 % byla zjištěna mezi leucinem a cysteinem s korelačním koeficientem $-0,0676$. U tohoto vzorku leucin nekoreloval s asparginem.

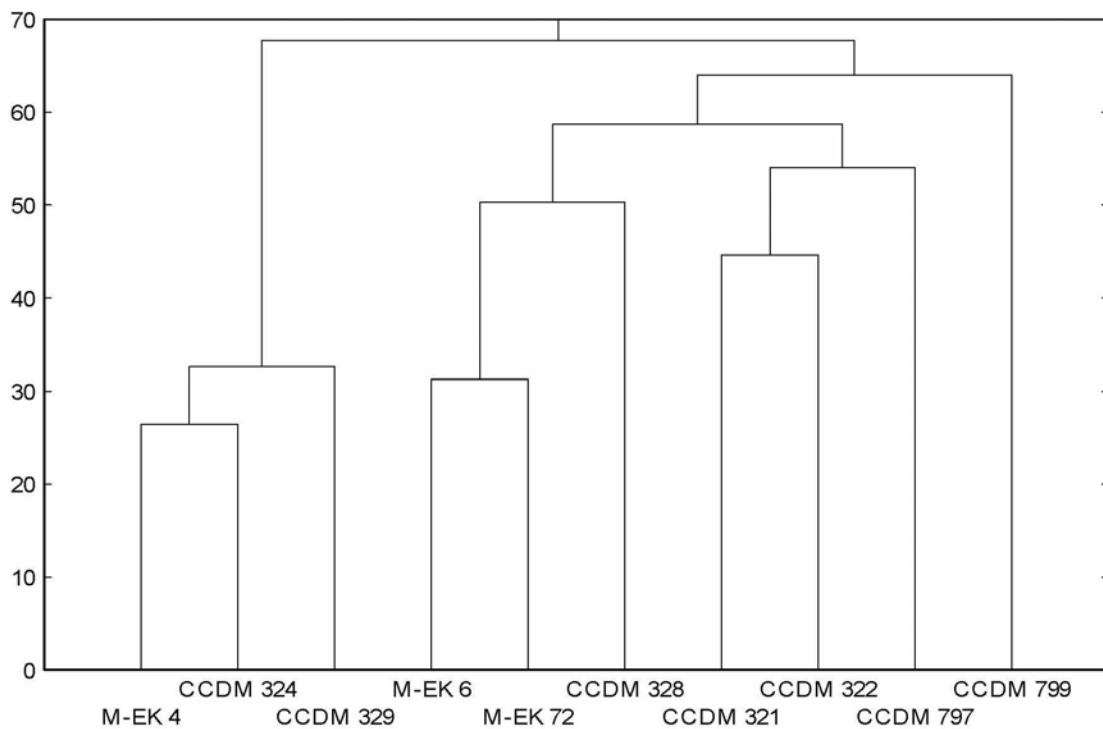
11.4 VÝSLEDKY SDS-PAGE

U vzorků byla provedena polyakrylamidová elektroforéza. Tato metoda slouží pro separaci molekul proteinů na základě jejich elektroforetické pohyblivosti, která je závislá na různých faktorech jako délka polypeptidového řetězce, molekulová hmotnost a další. Touto metodou lze v použitém uspořádání zachytit proteiny o molekulové hmotnosti 3 kDa a vyšší. Pro vyhodnocení SDS-PAGE byla použita metoda hierarchického shlukování, jejímž výsledkem jsou tzv. dendogramy. Na dendogramech jsou seskupeny vzorky podle příbuznosti. První dendogram (Obr.26) znázorňuje shluky vzorků 1 – 10 po 6 dnech zrání. Na druhém dendogramu (Obr.27) jsou vyobrazeny shluky vzorků po 34 dnech zrání.



Při shlukové analýze vzorků po 6 dnech zrání se vytvořily dva základní shluky. První shluk je tvořen vzorky naočkované *P.nalgiovensis* M-EK 4, *P.nalgiovensis* CCDM 324 a *P.nalgiovensis* CCDM 329, lze tedy předpokládat podobnost proteinového profilu těchto vzorků. Další podobnost proteinového profilu lze sledovat u vzorků (druhý shluk) naočkovaných *P.nalgiovensis* M-EK 6, *P.nalgiovensis* M-EK 72, *P.nalgiovensis* CCDM 321, *P.nalgiovensis* CCDM 322 a *P.camemberti* CCDM 797. Vzorky naočkované kulturami *P.nalgiovensis* CCDM 328 a *P.camemberti* CCDM 799 mají proteinové složení poněkud odlišné, od všech ostatních vzorků.

Obr. 27 – Výsledky shlukové analýzy po 34 dnech zrání



Při shlukové analýze vzorků po 34 dnech zrání se vytvořily tři základní shluky. První shluk je tvořen vzorky naočkovanými kmeny *P.nalgiovensis* M-EK 4, *P.nalgiovensis* CCDM 324 a *P.nalgiovensis* CCDM 329, lze tedy předpokládat podobnost proteinového profilu těchto vzorků. Druhý shluk tvoří vzorky naočkované kmeny *P.nalgiovensis* M-EK 6, *P.nalgiovensis* M-EK 72 a *P.nalgiovensis* CCDM 328. Třetí shluk tvoří vzorky naočkované *P.nalgiovensis* CCDM 321, *P.nalgiovensis* CCDM 322 a *P.camemberti* CCDM 797. Vzorek naočkovaný kmenem *P.camemberti* CCDM 799 tvořil samostatný shluk a tedy jeho proteinové složení se od ostatních vzorků značně lišilo.

DISKUZE

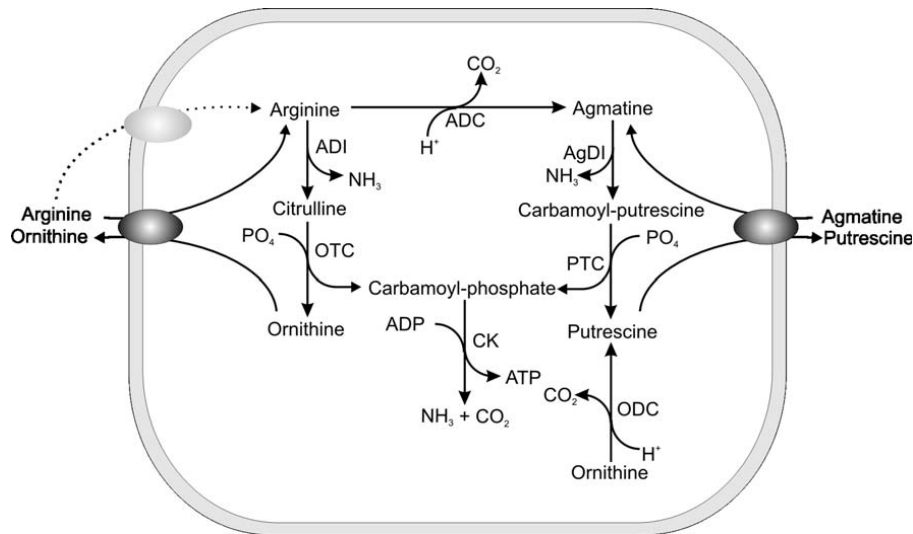
Jednotlivé vzorky sýrů byly naočkované kmeny plísní *P.nalgiovensis* a *P.camemberti*. Vzorky naočkované *P.camemberti* sloužily jako srovnávací standardy, s nimiž se porovnávaly vzorky naočkované s kmeny *P.nalgiovensis*. U všech vzorků byl sledován vývoj obsahu volných aminokyselin (FAA) v průběhu zrání, který vypovídá o aktivitě exopeptidas, jež štěpí proteiny, respektive peptidy od konce řetězců zejména za vzniku volných aminokyselin. U výsledků stanovení obsahu FAA byla provedena jejich regresní a korelační analýza. Dále byly proteiny vzorků separovány pomocí polyakrylamidové elektroforézy. Touto metodou lze zachytit proteiny o různé molekulové hmotnosti, což může vypovídat o aktivitě endoproteas. Přítomné endoproteasy štěpí molekuly proteinů uvnitř jejich řetězce, což má za následek vznik proteinů o různých délkách řetězců a tedy i o různých molekulových hmotnostech. Výsledky proteinového profilu byly podrobeny shlukové analýze, na základě které byly vytvořeny dendogramy.

Z grafického znázornění vývoje součtu obsahů všech FAA pro všechny kultury (viz Obr. 5) po 48 dnech zrání vyplývá, že z kmenů *P.nalgiovensis* má nejmenší proteolytickou aktivitu exopeptidas *P.nalgiovensis* M-EK 6 (vzorek č. 2), *P.nalgiovensis* M-EK 72 (vzorek č. 3) a *P.nalgiovensis* CCDM 321 (vzorek č. 4). Z celkového vývoje jednotlivých FAA v čase pro vzorky naočkované kmeny *P.nalgiovensis* je možné říci, že malou těsnost závislosti obsahu FAA na době zrání vykazovala zejména kyselina γ -aminomáselná. Vývoj obsahu této aminokyseliny je tedy pravděpodobně ovlivněn také jinými faktory než je pouze proteolytická aktivita exopeptidas v průběhu zrání. U vzorků č. 1, 2 a 4 lze sledovat malou těsnost závislosti obsahu FAA na době zrání u ornithinu a u vzorků č. 2, 3 a 4 také u asparaginu. Vývoj obsahu těchto aminokyselin je tedy ovlivněn kromě proteolytické aktivity exopeptidas rovněž jinými faktory. Z korelační analýzy obsahu volného leucinu a ostatních volných aminokyselin vyplynulo, že obsah volného leucinu nevýznamně koreloval s obsahem volného cysteinu. Shlukovou analýzou vzorků naočkovaných kmeny *P.nalgiovensis* bylo zjištěno, že vzorky naočkované *P.nalgiovensis* M-EK 4, *P.nalgiovensis* CCDM 324 a *P.nalgiovensis* CCDM 329 mají podobný proteinový profil, a to jak po 6 dnech zrání, tak i po 34 dnech zrání. Podobný proteinový profil po 6 i 34 dnech zrání mají také následující vzorky: dvojice tvořena *P.nalgiovensis* M-EK 6 a *P.nalgiovensis* M-EK 72 a dvojice tvořena *P.nalgiovensis* CCDM 321 a *P.nalgiovensis* CCDM 322. Vzorek naočkovaný kmenem *P.nalgiovensis* CCDM 328 vykazoval po 6

dnech zrání odlišný proteinový profil od ostatních kmenů *P.nalgiovensis*, ale po 34 dnech zrání měl tento vzorek podobný proteinový profil jako dvojice vzorků naočkovaných *P.nalgiovensis* M-EK 6 a *P.nalgiovensis* M-EK 72.

Při srovnání vzorků naočkovaných kmeny *P.nalgiovensis* a *P.camemberti* lze z grafického znázornění vývoje součtu obsahů všech FAA (viz Obr. 5) usoudit, že kmeny plísní *P.nalgiovensis* mají obecně větší proteolytickou aktivitu exopeptidas než kmeny plísní *P.camemberti*. Vzorky naočkované kmeny *P.nalgiovensis* M-EK 6, *P.nalgiovensis* M-EK 72, *P.nalgiovensis* CCDM 321 a *P.nalgiovensis* CCDM 322 mají podobnou proteolytickou aktivitu exopeptidas se srovnávacími standardy (vzorky naočkované *P.camemberti*). Srovnáme-li vývoj obsahu volných aminokyselin v 34. dnu, pak kmeny *P.nalgiovensis* M-EK 72 a *P.nalgiovensis* CCDM 322 mají podobnou proteolytickou aktivitu se srovnávacími kmeny *P.camemberti* CCDM 797 a *P.camemberti* CCDM 799. Posuzování v 34. dnu je akceptovatelné, neboť 30-ti denní trvanlivost má také sýr Kamadet [18], který lze považovat za podobný výrobek.

Vzorky č. 9 a 10, které jsou naočkované *Penicillium camemberti*, se v porovnání se všemi ostatními vzorky s *P.nalgiovensis* vyznačují malou těsností závislosti obsahu argininu na době zrání. Vývoj obsahu této aminokyseliny je tedy s největší pravděpodobností ovlivněn jinými činiteli, než je doba zrání. Arginin se může účastnit dvou základních sledů reakcí: (i) buď může být mikroorganismy využívám pro syntézu nových aminokyselin (např. transaminací), resp. peptidů a proteinů; (ii) a nebo může pro některé mikroorganizmy sloužit jako zdroj energie (viz Obr. 4). V tomto sledu reakcí nejprve z argininu pomocí arginin-deiminasy odštěpen amoniak za vzniku citrulinu, který je následně činností ornithin-karbamoyl-transferasy přeměněn na ornithin a karbamoylfosfát. Karbamoylfosfát je karbamát-kinasou metabolizován za vzniku amoniaku, oxidu uhličitého a adenosintrifosfátu (jako zdroje energie). [8, 15, 54]



Obr. 28 – Degradace argininu BMK[8]

Při shlukové analýze vzorků sýrů byly zjištěny následující skutečnosti. Podobnou proteolytickou činnost endoproteas po 6 i 34 dnech zrání vykazovaly vzorky naočkované kmeny *P.nalgiovensis* M-EK 4, *P.nalgiovensis* CCDM 324 a *P.nalgiovensis* CCDM 329. Další podobnost proteinového profilu endoproteas vykazují vzorky naočkované kmeny *P.nalgiovensis* CCDM 321, *P.nalgiovensis* CCDM 322 a *P.camemberti* CCDM 797. Tato podobnost proteinového profilu endoproteas je významnější, jelikož v této práci byla snaha ze získaných kmenů *P.nalgiovensis* vybrat kmeny s proteolytickou činností podobnou proteolytické činnosti *P.camemberti* jako kmenu, běžně využívaného k výrobě měkkých sýrů s plísní na povrchu.

Na základě výsledků této práce, tedy jak z celkového vývoje FAA v sýrech, tak z proteinového profilu lze soudit, že kmeny *P.nalgiovensis* CCDM 321 a *P.nalgiovensis* CCDM 322 působí ve vztahu s BMK podobně, jako srovnávací kmen *P.camemberti* CCDM 797. Je však třeba zmínit, že proteolytická činnost v analyzovaných vzorcích však zahrnuje nejen proteolytickou činnost plísní, ale také proteolytickou činnost BMK. Rozdíly ve výsledcích jednotlivých vzorků mohou být způsobeny také vzájemnými vztahy jednotlivých kmenů plísní s bakteriemi mléčného kvašení.

ZÁVĚR

Tato diplomová práce byla zaměřena na sledování změn obsahu volných aminokyselin a proteinového profilu v průběhu zrání měkkých sýrů s plísní na povrchu jako odrazu aktivity exopeptidas a endoproteas.

Záměrem této diplomové práce bylo vybrat zástupce *P.nalgiovensis*, jejichž proteolytická aktivita je podobná s proteolytickou aktivitou *P.camemberti* za účelem přispění k oživení historicky známé výroby Nalžovského sýra, k jehož výrobě byly využívány kultury *Penicillium nalgiovensis*. Dále je možné vybrané kmeny plísní využít k rozšíření mléčných výrobků o novou výrobovou skupinu.

Na základě výsledků diplomové práce bylo zjištěno:

- v průběhu zrání sýrů 48 dní docházelo k nárůstu obsahu FAA,
- kmeny plísní *P.nalgiovensis* mají obecně větší proteolytickou aktivitu než kmeny plísní *P.camemberti*,
- z kmenů *P.nalgiovensis* mají nejmenší proteolytickou aktivitu exopeptidas *P.nalgiovensis* M-EK 6, *P.nalgiovensis* M-EK 72 a *P.nalgiovensis* CCDM 321,
- podobnou proteolytickou činnost endoproteas *P.nalgiovensis* s *P.camemberti* dle shlukové analýzy vykazovaly vzorky naočkované *P.nalgiovensis* CCDM 321, *P.nalgiovensis* CCDM 322.

Dle těchto skutečností lze doporučit kmen *P.nalgiovensis* CCDM 321 jako optimální (na základě posuzovaných parametrů) variantu. Tento kmen by mohl být v budoucnu využit k oživení výše zmiňované výroby Nalžovského sýra, resp. by mohl být využit za účelem rozšíření mléčných výrobků o novou výrobovou skupinu.

Na základě této diplomové práce je možné učinit následující návrhy a doporučení:

- provést další experimenty s vybraným kmenem *P.nalgiovensis* CCDM 321 s cílem optimalizovat praktickou výrobu,
- zaměřit se na hlubší monitoring proteolytické popř. lipolytické aktivity ve výrobcích vybraných,
- zaměřit se také na senzorickou jakost vyrobených sýrů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Analyzátor aminokyselin AAA 400 [online][cit. 5.2.2010] Dostupné z: <http://www.instruments.ingos.cz/pristroj-detail.php?id=analyzator-aminokyselin-aaa-400>
- [2] ANDERSEN, S.J., FRISVAD, J.C., *Penicillin production by Penicillium nalgiovense*. Letters in Applied Microbiology 1994, 19, 486-488
- [3] ASEFA, D.T., GJERDE, R.O., SIDHU, M.S., LANGSRUD, S., KURE, C.F., NESBAKKEN, T., SKAAR, I., *Moulds contaminants on Norwegian dry-cured meat products*. International Journal of Food Microbiology 128 (2009) 435-439
- [4] BRUNA, J.M., HIERRO, E.M., DE LA HOZ, L., MOTTRAM, D.S., FERNÁNDEZ, M., ORDÓNEZ, J.A., Changes on selected biochemical and sensory parameters as affected by the superficial inoculation of *Penicillium camemberti* on dry fermented sausages. International Journal of Food Microbiology 85 (2003) 111-125
- [5] CALLEC, CH. *Encyklopedie sýrů*. 1.vyd. Nizozemsko: Rebo International, b.v., 2001. 256 s
- [6] DECKER, M., NIELSEN, P.V., The inhibitory effect of *Penicillium camemberti* and *Geotrichum candidum* on the associated fungi of white mould cheese. International Journal of Food Microbiology. 104 (2005) 51-60
- [7] ENGEL, E., NICKLAUS, S., SEPTIER, C., SALLES, C., LE QUÉRÉ, J.L., *Evolution of the Taste of a Bitter Camembert Cheese during Ripening: Characterization of a Matrix Effect*. Journal Agriculture of Food Chemistry, 2001, 49, 2930-2939
- [8] FERNÁNDEZ, M., ZÚNIGA, M., *Amino Acid Catabolic Pathways of Lactic Acid Bacteria*. Critical Reviews in Microbiology, 32:155-183, 2006
- [9] FIERRO, F., LAICH, F., GARCÍA-RICO, R.O., MARTÍN, J.F. High efficiency transformation of *Penicillium nalgiovense* with integrative and autonomously replicating plasmids. International Journal of Food Microbiology 90 (2004) 237 – 348
- [10] FOX, P.F., GUINEE, T.P., COGAN, T.M., McSWEENEY, P.L.H., *Fundamentals of Cheese Science*. AN ASPEN PUBLICATION, Maryland, 2000. 559 s. ISBN 0-8342-1260-9

- [11] FOX, P.F., McSWEENEY, P.L.H., *Dairy chemistry and biochemistry*. Ireland 1998. 463 s. ISBN 0 412 72000 0.
- [12] FOX, P.F., McSWEENEY, P.L.H.: Proteolysis in cheese during ripening, *Food Reviews International*, 12, 457 – 509 s., 1996
- [13] FOX, P.F., WALLACE, J.M., MORGAN, S.,: *Acceleration of cheese ripening*, *Antonie von Leeuwenhoek*, 70, 271 – 297s., 1996
- [14] GAJDŮŠEK, S. *Laktologie*, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003
- [15] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D., *Potravinářská biochemie I*. 1.vyd. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2005. 168 s. ISBN 80-7318-295-5
- [16] HOZA, I., VELICHOVÁ, H., *Fyziologie výživy*. 1.vyd. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2005. 102 s.
- [17] HRABĚ, J., BŘEZINA, P., VALÁŠEK, P., *Technologie výroby potravin živočišného původu*. 1. vyd. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2006. 180 s. ISBN 80-7318-405-2
- [18] Charakteristika sýrů Madety a.s. [on-line] [cit. 15.4.2010] Dostupné z: http://www.madeta.cz/assets/files/Skola_syru/6.5.charakteristika_syru_madety_plisnove_syry.pdf
- [19] Chemie mléka – studium chemie mléka [online][cit. 2.2.2010] Dostupné z: http://www.vscht.cz/tmt/studium/chemie_mleka/
- [20] IACUMÍN, L., CHIESA, L., BOSCOLO, D., MANZANO, M., CANTONI, C., ORLIC, S., COMI, G., *Moulds and ochratoxin A on surfaces of artisanal and industrial dry sausages*. *Food Microbiology* 26 (2009) 65-70
- [21] Interní informace firmy Christian Hansen. Ústní sdělení.
- [22] JACOBSEN, T., HINRICHSEN, L., Bioformation of flavour by *Penicillium candidum*, *P. nalgiovense* and *Geotrichum candidum* on glucose, peptone, maize oil and meat extract. *Food Chemistry*, Vol. 60, No. 3, pp. 409-416, 1997
- [23] JAVORSKÝ, J., *Historie Mlékařského družstva tábořského – Madety od založení do r.1960*. [on-line] [cit. 31.3.2010] Dostupné z: http://is.muni.cz/th/136228/pedf_m/Historie_Madety.pdf

- [24] JAY, J.M., *Modern food microbiology*. Sixth Edition. Nevada 2000. 637 s. ISBN 0-8342-1671-X
- [25] JESENSKÁ, Z. *Penicillium nalgiovense* Laxa [online]. 5.9.2003 [cit. 4.2.2010]. Dostupné na www.chpr.szu.cz/zpravy/P199/Priloha99.htm
- [26] JOVANOVIĆ, S., BARAC, M., MACEJ, O., VUCIĆ, T., LACNJEVAC, C., SDS-PAGE Analysis of Soluble Proteins in Reconstituted Milk Exposed to Different Heat Treatments. 2007, 7, 371 – 383.
- [27] KADLEC, P., a kol. *Technologie potravin II*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2007. 236 s. ISBN 80-7080-510-2
- [28] KLOUDA, P., *Moderní analytické metody*. 2005. 132 s. ISBN 80-86369-07-2
- [29] KNĚZ, V. *Výroba sýrů*. 2.vyd. Praha: SNTL, 1960. 377 s.
- [30] KNĚZ, V., SEDLÁČKOVÁ, H. *Sýry a příprava sýrových pokrmů*. 1.vyd. Praha: SNTL, 1991. 331 s.
- [31] KOPÁČEK, J., LIKLER, L., ŠTEMBERK, J., *Camembert z Normandie a Sedlčanský Hermelín*, Potravinářská Revue, 1/2007
- [32] KOPÁČEK, J., Putování za sýry – Evropské sýry s chráněným označením, Potravinářská Revue, 6/2009
- [33] LAICH, F., FIERRO, F., CARDOZA, R.E., MARTIN, J.F. Organization of the Gene Cluster for Biosynthesis of Penicillin in *Penicillium nalgiovense* and Antibiotic Production in Cured Dry Sausages. American Society for Microbiology 1999. Applied and Environmental Microbiology, 1999, p. 1236-1240
- [34] LECLERCQ-PERLAT, M.-N., PICQUE, D., RIAHL, H., CORRIEU, G., *Microbiological and Biochemical Aspects of Camembert-Type Cheeses Depend on Atmospheric Composition in the Ripening Chamber*. American Dairy Sciences Association, 2006. Journal Dairy Science. 89:3260-3273
- [35] LUND, B.M., BAIRD-PARKER, T.C., GOULD, G.W., *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Maryland 2000. ISBN 0-8342-1323-0
- [36] MILK COMPOSITION. [on-line] [cit. 4.2.2010] Dostupné z: <http://www.milkfacts.info/>

- [37] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) 853/2004 ze dne 29.4.2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu.
- [38] Nařízení Komise (ES) 1662/2006 ze dne 6.11.2006, kterým se mění nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) 853/2004 ze dne 29.4.2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu.
- [39] PÁNEK, J., POKORNÝ, J., DOSTALOVÁ, J. *Základy výživy a výživová politika*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2002, 219 s. ISBN 80-7080-468-8.
- [40] PAPAGIANNI, M., PAPAMICHAEL, E.M. Modeling growth, substrate consumption and product formation of *Penicillium nalgiovense* grown on meat simulation medium in submerged batch culture. Society for Industrial Microbiology 2006. Journal Industrial Microbiology Biotechnology (2007) 34:225-231
- [41] PAVELKA, A., *Mléčné výrobky pro vaše zdraví*. 1.vyd. Brno 1996. 105 s. ISBN 80-85763-09-5
- [42] *Penicillium camemberti* [online][cit. 4.2.2010] Dostupné z: http://images.google.cz/imgres?imgurl=http://www.schimmel-schimmelpilze.de/images/penicillium-camemberti-600.jpg&imgrefurl=http://www.schimmel-schimmelpilze.de/penicillium-commune.html&usq=__xRzpyBW7vdm7hbcr4jium8vp0O0=&h=137&w=185&sz=8&hl=cs&start=3&um=1&tbnid=dNgmErhpAVnq-M:&tbnh=76&tbnw=102&prev=/images%3Fq%3DPenicillium%2Bcamemberti%26hl%3Dcs%26client%3Dfirefox-a%26rls%3Dorg.mozilla:cs:official%26sa%3DG%26um%3D1
- [43] *Penicillium nalgiovensis* [online][cit. 4.2.2010] Dostupné z: http://images.google.cz/imgres?imgurl=http://schimmel-schimmelpilze.de/images/penicillium-digitatum-02_600x.jpg&imgrefurl=http://schimmel-schimmelpilze.de/penicillium-digitatum.html&usq=__JPU0NKmAW9bVX3nViJHpfmqyh0=&h=137&w=185&sz=4&hl=cs&start=14&um=1&tbnid=8Hs5wGjMwvJihM:&tbnh=76&tbnw=102&prev=/i

mages%3Fq%3DPenicillium%2Bnalgiovense%26hl%3Dcs%26client%3Dfirefox-a%26rls%3Dorg.mozilla:cs:official%26sa%3DN%26um%3D1

- [44] RIDGWAYOVÁ, J. *Průvodce světem sýrů. Sýry*. 1.vyd. Praha: FORTUNA PRINT, 2001.
- [45] Roztoky a gely použité pro SDS-PAGE. Ústní sdělení.
- [46] SDS-PAGE. [on-line] [cit. 4.2.2010] Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/SDS-PAGE>
- [47] SEGER, J., *Statistické metody pro ekonomy průmyslu*. Praha: SNTL/ALFA, 1988. První vydání. 548 s. ISBN 04-313-88
- [48] SELGAS, M.D., CASAS, C., TOLEDO, V.M., GRACÍA, M.L., *Effect of selected mould strains of lipolysis in dry fermented sausages*. Eur Food Res Technology (1999) 209:360-365
- [49] SHALICHEV, J., TANEV, G., *Isolation, Purification, end Determination of Some Chemical and Physicochemical Characteristics of Sheep Alphas-Casein*. Journal of Dairy Science, Vol.56, NO.2. Institute of Animal Breeding, Department of Milk Biology
- [50] Shluková analýza [on-line] [cit. 5.4.2010] Dostupné z: <http://staff.utia.cas.cz/nagy/skola/Projekty/Classification/ShlukovaAnalyza.pdf>
- [51] STANĚK, K., *Vliv plísní Penicillium nalgiovensis na přírodní sýry*. Bakalářská práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně 2009
- [52] *Sýry – Druhy a recepty*. 1.vyd. Ikar v Praze 2006. Autor neznámý. 288 s. ISBN 80-249-0756-9
- [53] TEPLÝ, M., ČERMÍNOVÁ, N., DĚDEK, M., HYLMAR, B., PETERKOVÁ, L., POKORNÁ, L., URNEROVÁ, M., *Čisté mlékařské kultury. Výroba, kontrola, použití*. 1.vyd. Praha 1984, SNTL – nakladatelství technické literatury.295 s.
- [54] VODRÁŽKA, Z., *Biochemie 2*. 1. vyd. Praha 1992: Československá akademie věd za účasti VŠCHT Praha. 136 s. ISBN 80-200-0441-6
- [55] VODRÁŽKA, Z., RAUCH, P., KÁŠ, J., *Enzymologie*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 1991, 245 s. ISBN 80-7080-124-7

- [56] VRANÍK, E. *Strojnictví pro 4. ročník SPŠ mlékárenské*. 1.vyd. Praha: SNTL, 1984. 147 s.
- [57] WEISEROVÁ, E., *Změny distribuce dusíkatých látek v průběhu zrání eidamských sýrů*. Diplomová práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně 2009
- [58] ZAPOMENUTÉ SÝRY. [on-line] [cit. 28.2.2010] Dostupné z: <http://www.laktoscollection.cz/view.php?navez=zapomenute-syry&cislocclanku=2009080009>
- [59] ZIMÁK, E. *Technologie pro 4. ročník SPŠ studijního oboru zpracování mléka*. 1.vyd. Praha: SNTL, 1988. 362 s.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AAA	Automatický analyzátor aminokyselin
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulfát polyakrylamidová gelová elektroforéza
AMK	Aminokyselina
PDO	Protected Designation of Origin
FAA	Volné aminokyseliny

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1 – Etiketa Nalžovského smetanového sýra</i>	<i>32</i>
<i>Obr. 2 – Penicillium nalgiovensis elektronovým mikroskopem.....</i>	<i>33</i>
<i>Obr. 3 – Penicillium camemberti elektronovým mikroskopem</i>	<i>35</i>
<i>Obr. 4 – AAA 400</i>	<i>41</i>
<i>Obr. 5 - Grafické vyjádření vývoje součtu obsahů všech FAA pro všechny kultury.....</i>	<i>47</i>
<i>Obr. 6 - Grafické znázornění vývoje obsahu součtu FAA v čase pro vzorek č. 1</i>	<i>48</i>
<i>Obr. 7 - Grafické znázornění vývoje obsahu volného leucinu v čase pro vzorek č. 1</i>	<i>49</i>
<i>Obr. 8 – Grafické znázornění vývoje obsahu součtu FAA v čase pro vzorek č. 2.....</i>	<i>50</i>
<i>Obr. 9 – Grafické znázornění vývoje obsahu volného leucinu pro vzorek č. 2.....</i>	<i>50</i>
<i>Obr. 10 – Grafické znázornění vývoje obsahu součtu FAA v čase pro vzorek č. 3.....</i>	<i>52</i>
<i>Obr. 11 – Grafické znázornění vývoje obsahu volného leucinu v čase pro vzorek č. 3.....</i>	<i>52</i>
<i>Obr. 12 – Grafické znázornění vývoje obsahu součtu FAA v čase pro vzorek č. 4.....</i>	<i>54</i>
<i>Obr. 13 – Grafické znázornění vývoje obsahu volného leucinu v čase pro vzorek č. 4.....</i>	<i>54</i>
<i>Obr. 14 – Grafické znázornění vývoje obsahu součtu FAA v čase pro vzorek č. 5.....</i>	<i>56</i>
<i>Obr. 15 – Grafické znázornění vývoje obsahu volného leucinu v čase pro vzorek č. 5.....</i>	<i>56</i>
<i>Obr. 16 – Grafické znázornění vývoje obsahu součtu FAA v čase pro vzorek č. 6.....</i>	<i>58</i>
<i>Obr. 17 – Grafické znázornění vývoje obsahu volného leucinu v čase pro vzorek č. 6.....</i>	<i>58</i>
<i>Obr. 18 – Grafické znázornění vývoje obsahu součtu FAA v čase pro vzorek č. 7.....</i>	<i>60</i>
<i>Obr. 19 – Grafické znázornění vývoje obsahu volného leucinu v čase pro vzorek č. 7....</i>	<i>60</i>
<i>Obr. 20 – Grafické znázornění vývoje obsahu součtu FAA v čase pro vzorek č. 8.....</i>	<i>62</i>
<i>Obr. 21 – Grafické znázornění vývoje obsahu volného leucinu v čase pro vzorek č. 8....</i>	<i>62</i>
<i>Obr. 22 – Grafické znázornění vývoje obsahu součtu FAA v čase pro vzorek č. 9.....</i>	<i>64</i>
<i>Obr. 23 – Grafické znázornění vývoje obsahu volného leucinu v čase pro vzorek č. 9....</i>	<i>64</i>

<i>Obr. 24 – Grafické znázornění vývoje obsahu součtu FAA v čase pro vzorek č. 10.....</i>	<i>66</i>
<i>Obr. 25 – Grafické znázornění vývoje obsahu volného leucinu v čase pro vzorek č. 10...66</i>	<i>66</i>
<i>Obr. 26 – Výsledky shlukové analýzy po 6 dnech zrání.....</i>	<i>71</i>
<i>Obr. 27 – Výsledky shlukové analýzy po 34 dnech zrání.....</i>	<i>72</i>
<i>Obr. 28 – Degradace argininu BMK.....</i>	<i>75</i>

SEZNAM TABULEK

<i>Tab.1 – Složení popelovin kravského mléka v g na 100 g mléka.....</i>	<i>15</i>
<i>Tab. 2 – Rovnice regrese a hodnota korelačního koeficientu závislosti množství FAA na čase pro vzorek č. 1.....</i>	<i>49</i>
<i>Tab. 3 – Rovnice regrese a hodnota korelačního koeficientu závislosti množství FAA na čase pro vzorek č. 2.....</i>	<i>51</i>
<i>Tab. 4 – Rovnice regrese a hodnota korelačního koeficientu závislosti množství FAA na čase pro vzorek č. 3.....</i>	<i>53</i>
<i>Tab. 5 – Rovnice regrese a hodnota korelačního koeficientu závislosti množství FAA na čase pro vzorek č. 4.....</i>	<i>55</i>
<i>Tab. 6 – Rovnice regrese a hodnota korelačního koeficientu závislosti množství FAA na čase pro vzorek č. 5.....</i>	<i>57</i>
<i>Tab. 7 – Rovnice regrese a hodnota korelačního koeficientu závislosti množství FAA na čase pro vzorek č. 6.....</i>	<i>59</i>
<i>Tab. 8 – Rovnice regrese a hodnota korelačního koeficientu závislosti množství FAA na čase pro vzorek č. 7.....</i>	<i>61</i>
<i>Tab. 9 – Rovnice regrese a hodnota korelačního koeficientu závislosti množství FAA na čase pro vzorek č. 8.....</i>	<i>63</i>
<i>Tab. 10 – Rovnice regrese a hodnota korelačního koeficientu závislosti množství FAA na čase pro vzorek č. 9.....</i>	<i>65</i>
<i>Tab. 11 – Rovnice regrese a hodnota korelačního koeficientu závislosti množství FAA na čase pro vzorek č. 10.....</i>	<i>67</i>

SEZNAM PŘÍLOH

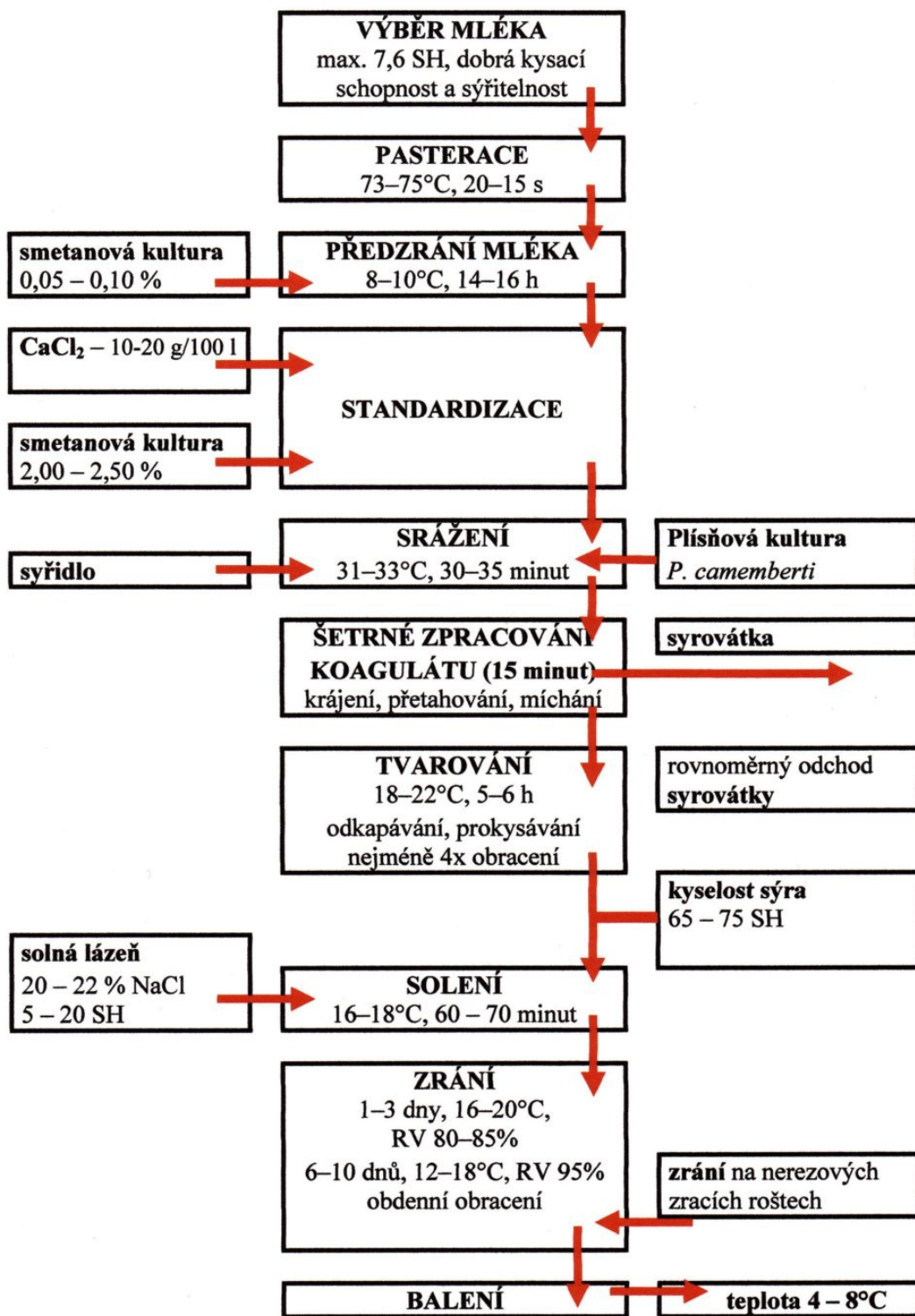
PI Schéma obecné výroby sýra s plísní na povrchu

PII Praktická výroba sýra s plísní na povrchu

PIII Vertikální elektroforetická aparatura

PIV Roztoky a gely použité pro SDS-PAGE

PŘÍLOHA P I: SCHÉMA OBECNÉ VÝROBY SÝRA S PLÍSNÍ NA POVRCHU



PŘÍLOHA PII: PRAKTICKÁ VÝROBA SÝRA S PLÍSNÍ NA POVRCHU

Praktickou výrobu sýrů s plísní na povrchu provedl Bc. Karel Staněk v rámci své bakalářské práce odkud je převzat i následující postup: [51]

Suroviny a jejich množství použité k výrobě měkkého sýra:

- Plnotučné pasterované mléko 20 l (dodáno mlékárnou Kromilk s.r.o.)
- Smetanový zákys 800 ml (4 %) (dodáno mlékárnou Kromilk s.r.o., výrobce Chr. Hansen A/S, Hoersholm, DK)
- Chlorid vápenatý 6 ml (0,03 %) (výrobce ESCO - European Salt Company GmbH & Co. KG, Hannover)
- Syřidlo (enzym rennin) 2 ml (0,009 %) (FROMASE 750 TL (750 IMCU/ml) od firmy O.K. SERVIS BioPro s.r.o., Praha)

Smetanový zákys byl připraven v mlékárně Kromilk s.r.o. pomocí lyofylizované kultury pro přímé očkování, určené pro přípravu provozního zákysu CH-N 19. Kultura CH-N 19 patří mezi tzv. mezofilní LD-kultury s vyšší fermentací citrátu a tvorbou plynu (tedy kultury aromatické). Při podrobnější klasifikaci byla zařazena jako kultura s velkou tvorbou plynu (zbytkový obsah citrátů 1,5 – 0,5 mg/g po 8 hodinách kultivace) a střední produkcí kyseliny mléčné (pH 5,10 – 5,55 při 6 hodinovém testu aktivity).

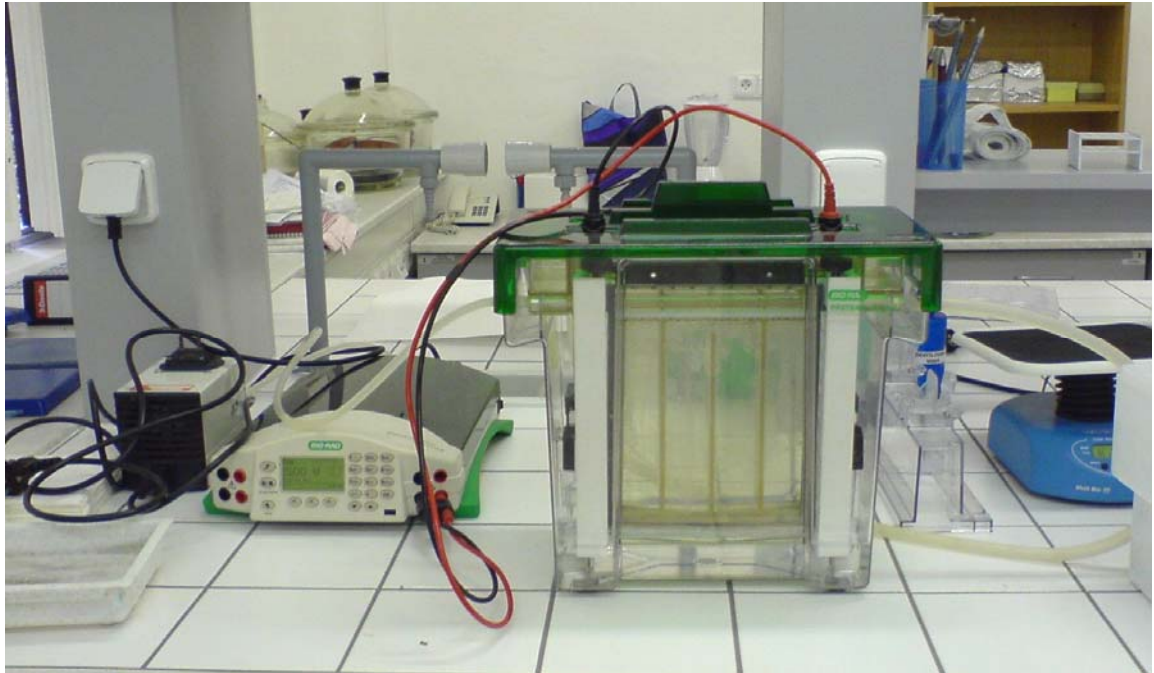
LD-kultury jsou podle interního materiálu složeny z následujících mikroorganismů:

- *Lactococcus lactis subsp. lactis*
- *Lactococcus lactis subsp. cremoris*
- *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis*
- *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris* [21]

Mléko bylo přelito do sýrašské vany. Přidal se smetanový zákys a chlorid vápenatý. Po důkladném promíchání a zahřátí na cca. 32 °C se nechalo v klidu předkysat po dobu 30 minut. Po dosažení titrační kyselosti 6 SH se mléko zasýřilo přidávkem syřidla. Srážení mléka trvalo 35 minut. Poté se vzniklá sraženina opatrně prokrojila sýrašským nožem a následně rozkrájela. Poté se sýřenina nechala v klidu po dobu asi 10 minut pro dokonalejší tvorbu sýrového zrna a podporu synereze. Následně bylo provedeno přetahování sýřeniny

a její nalévání do forem na čerstvé smetanové sýry. Sýry se nechaly odkapat a pro lepší uvolňování syrovátky byly formy obráceny a to po 10, 30 a 60 minutách. Sýry se následně nechaly prokysat do druhého dne. Další den byla dosažena titrační kyselost cca 94 SH. Sýry byly vyňaty z forem a rozkrájeny na pravidelné hranoly o hmotnosti cca 65 g. Následně byly vloženy na 20 minut do solné lázně o teplotě 18 °C a koncentraci soli 20 %. Solná lázeň byla připravena z 8 litrů pitné vody a 2 kg soli. Na dno solné lázně byly umístěny kovové rošty z důvodu zamezení průniku nerozpuštěných krystalků usazené soli do sýrů. Po nasolení se sýry nechaly oschnout. Následující den byly aplikovány suspenze spor na povrch sýrů. Z kultur byla vytvořena suspenze obsahující fyziologický roztok a danou kulturu. Suspenze byla převedena do Petriho misek, kde byly následně nořeny sýry, čímž bylo zajištěno pokrytí celého povrchu sýra suspenzí spor dané kultury. Zrání sýrů probíhalo ve zracím boxu. První dva týdny byla teplota nastavena na 15 °C a následně snížena na 6 °C. [51]

PŘÍLOHA PIII: VERTIKÁLNÍ ELEKTROFORETICKÁ APARATURA



PŘÍLOHA PIV: ROZTOKY A GELY POUŽITÉ PRO SDS-PAGE [45]

Tris pufr pro separační gel (pH 8,8)

Tris 18,15 g

Deionizovaná voda 50 ml

Pomocí koncentrované HCl upravit pH na hodnotu 8,8 a doplnit deionizovanou vodou do 100 ml. Uchovávat při teplotě 4 °C.

Tris pufr pro koncentrační gel (pH 6,8)

Tris 6,0 g

Deionizovaná voda 50 ml

Pomocí koncentrované HCl upravit pH na hodnotu 6,8 a doplnit deionizovanou vodou do 100 ml. Uchovávat při teplotě 4 °C.

Elektrodový pufr

Tris 12,0 g

Glycin 57,6 g

SDS 4,0 g

Doplnit deionizovanou vodou do 4 l a popř. upravit hodnotu pH na 8,3 – 8,6

30% roztok akrylamidu

Akrylamid 29,2 g

N,N'-metylen-bisakrylamid 0,8 g

Doplnit do 100 ml deionizovanou vodou. Uchovávat při 4 °C v tmavé láhvi.

Vzorkový pufr – 0,062 M Tris HCl, 5% merkaptoetanol, 10% glycerol

Tris-HCl 0,0977 g

Merkaptoetanol 0,5 g

Glycerol 1,0 g

Bromfenolová modř 0,01 g

Upravit pH na 6,8 a doplnit deionizovanou vodou do 100 ml.

Fixační roztok – 10% kys.octová, 30% etanol

96% etanol 30 ml

Kys.octová 10 ml

Doplnit do 100 ml deionizovanou vodou.

Barvicí roztok

0,25% Coomassie Blue R-250 v 50% (v/v) metanolu a 10% (v/v) kyselině octové

Odbarvovací roztok

25% (v/v) metanol a 10% (v/v) kyselina octová

Coomassie brilliant blue G-250 (Bradford, 1976)

Coomassie brilliant blue 0,1 g

96% etanol 50 ml

85% kyselina fosforečná 100 ml

Doplnit do 1000 ml deionizovanou vodou. Uchovávat při 4 °C v tmavé láhvi.

Příprava gelů

	15% separační gel	5% koncentrační gel
30% akrylamid	31,5 ml	3,4 ml
Tris pufr	15,75 ml (pH 8,8)	5 ml (pH 6,8)
Deionizovaná voda	14,49 ml	11,5 ml
10% SDS (Sigma)	630 µl	200 µl
10% persíran amonný	630 µl	100 µl
TEMED (Sigma)	25,2 µl	25 µl