Proteolytické mikroorganizmy a jejich význam v potravinářském průmyslu

Nikola Žouželková

Bakalářská práce
2010

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie a mikrobiologie potravin
akademický rok: 2009/2010

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	**Nikola ŽOUŽELKOVÁ**
Osobní číslo:	**T07878**
Studijní program:	**B 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor:	**Chemie a technologie potravin**
Téma práce:	**Proteolytické mikroorganizmy a jejich význam v potravinářském průmyslu**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. **Charakteristika proteolytických mikroorganizmů.**
2. **Uplatnění proteolytických mikroorganizmů v potravinářském průmyslu.**
3. **Nežádoucí činnost proteolytických mikroorganizmů v potravinářském průmyslu.**
4. **Metody stanovení proteolytických mikroorganizmů.**

Rozsah bakalářské práce: 37 stran

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] BLACKBURN, W. Food spoilage microorganisms, Woodhead Publishing Limited, Cambridge 2006.
[2] ŠILHÁNKOVÁ, L. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology, 3. vydání, Praha 2002.
[3] FARKYE et al. Proteolysis and flavor development in Cheddar cheese made exclusively with single strain proteinase-positive or proteinase-negative starters, Journal of Dairy Science, 1989.
[4] ICMSF Microorganisms in Foods, second edition, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2005.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Zuzana Vaňátková**
Ústav technologie a mikrobiologie potravin

Datum zadání bakalářské práce: **11. února 2010**

Termín odevzdání bakalářské práce: **31. května 2010**

Ve Zlíně dne 15. dubna 2010

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan

L.S.

UNIVERZITA TOMÁŠE BATI VE ZLÍNĚ
Fakulta technologická

doc. Ing. Jan Hrabě, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Nikola Žouželková Obor: CHTP

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 Zlíně 20.5.2010 .....

.....

[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 nevýdělečně 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 vzdělávacího 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.

ABSTRAKT

Cílem této práce bylo charakterizovat proteolytické mikroorganismy z hlediska pozitivního účinku týkajícího se využití v potravinářství a přeměn látek v přírodě. Proteolytické mikroorganismy byly také popsány z hlediska negativního účinku, který se týká hnilobných procesů potravin za vzniku toxických či karcinogenních produktů dusíkaté povahy. Dále jsou v této práci uvedeny základní metody stanovení proteolytických mikroorganismů plotnovými metodami.

Klíčová slova: proteolytické mikroorganismy, sýry, fermentované výrobky, metody stanovení proteolytických mikroorganismů

ABSTRACT

The aim of this study was to characterise the proteolytic microorganisms in terms of positive effect regarding utilisation in food-processing industry as well as the transformation of substances in nature. The proteolytic microorganisms was also described in terms of negative effect that is concerned in the putrescible processes of foodstuff resulting in formation of toxic and carcinogenic products of nitrogenous nature. Furthermore, the study includes the basic methods of proteolytic microorganisms determination by cultivation methods.

Keywords: proteolytic microorganisms, cheese, fermented products, methods of proteolytic microorganisms assessment

Poděkování

Chtěla bych poděkovat Ing. Zuzaně Vaňátkové za odborné vedení a cenné připomínky, které mi poskytovala v průběhu vypracování bakalářské práce.

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

OBSAH

ÚVOD **10**

1 PROTEOLYTICKÉ MIKROORGANISMY, JEJICH CHARAKTERISTIKA, VÝSKYT, MECHANISMUS **11**

1.1 MECHANISMUS 11

1.2 VÝSKYT 12

2 PROTEOLYTICKÉ MIKROORGANISMY A JEJICH VÝZNAM V MLÉČNÝCH VÝROBCÍCH **13**

2.1 PROTEOLYTICKÉ BAKTERIE VYSKYTUJÍCÍ SE PŘIROZENĚ V SYROVÉM MLÉCE A ZPŮSOBUJÍCÍ JEHO KAŽENÍ 13

2.2 VYUŽITÍ PROTEOLYTICKÝCH MIKROORGANISMŮ PRO VÝROBU SÝRŮ ZRAJÍCÍCH POD MAZEM 14

2.3 PLÍSŇOVÉ KULTURY POUŽÍVANÉ PŘI VÝROBĚ SÝRŮ 15

2.3.1 Charakteristika používaných plísňových kultur 15

2.4 PŘÍDAVEK PROTEOLYTICKÝCH MIKROORGANISMŮ DO PROBIOTICKÝCH VÝROBKŮ 16

2.5 *GEOTRICHUM CANDIDUM* V SÝRECH 16

2.6 VÝZNAM RODU *LACTOBACILLUS PARACASEI* JAKO PŘÍDAVEK DO TVAROHU PRO VÝROBU SÝRŮ Z OVČÍHO MLÉKA 17

2.7 KULTURY PRO SÝRY S NÍZKODOHŘÍVANOU SÝŘENINOU 18

3 VYUŽITÍ A VLIV PROTEOLYTICKÝCH MIKROORGANISMŮ V MASNÉM PRŮMYSLU **20**

3.1 PROTEOLÝZA MASA 20

3.1.1 Základní formy kažení masa 20

Povrchové osliznutí masa 21

Zvláštní formy kažení masa 21

3.2 POSTMORTÁLNÍ ZMĚNY MASA 22

3.3 ZRÁNÍ ZVĚŘINY 22

3.4 PROTEOLYTICKÁ AKTIVITA BĚHEM KONTROLOVANÉHO ZRÁNÍ U FERMENTOVANÝCH VEPŘOVÝCH VÝROBKŮ 22

3.5 ÚČINEK STARTOVACÍCH KULTUR NA PROTEOLYTICKÉ ZMĚNY A OBSAH AMINOKYSELIN VE FERMENTOVANÝCH KLOBÁSKÁCH 24

3.6 BUDU – FERMENTOVANÉ VÝROBKY Z MOŘSKÝCH RYB 25

4 VYUŽITÍ PROTEOLYTICKÝCH MIKROORGANISMŮ VE VÝROBCÍCH ROSTLINNÉHO PŮVODU **27**

4.1 PROTEOLYTICKÁ AKTIVITA DRUHU *OENOCOCCUS OENI* ZA VZNIKU AMINOKYSELIN VE VÍNĚ 27
4.2 VÝZNAM PROTEOLYTICKÝCH MIKROORGANISMŮ PŘI VÝROBĚ BEZLEPKOVÝCH POTRAVIN 27
4.2.1 Zlepšení senzorické jakosti u celozrnného chleba s vysokým podílem vlákniny 28
5 METODY STANOVENÍ PROTEOLYTICKÝCH MIKROORGANISMŮ 29
5.1 HYDROLÝZA KASEINU 29
5.1.1 Postup při stanovování proteolytické aktivity 29
5.1.2 Závěr 29
5.2 HYDROLÝZA ŽELATINY 30
5.2.1 Postup při stanovování proteolytické aktivity 30
5.2.2 Závěr 30
ZÁVĚR 32
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 34
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK 37
SEZNAM OBRÁZKŮ 38
SEZNAM TABULEK 39

ÚVOD

Proteolytické mikroorganismy, se kterými je člověk denně ve styku, jsou významné nejen v přírodě při rozkladných procesech, ale také v potravinářských technologiích. V potravinářství se využívalo proteolytických účinků mikroorganismů již od pradávna, aniž byla známa jejich podstata. Většinou k příznivým rozkladným procesům potravin bílkovinné povahy přispěla náhoda a lidská vynalézavost a experimentovatelnost. Spousta takových potravin je využívána dodnes díky své bohaté nutriční a senzorické hodnotě. Stravitelnost a výtěžnost takto mikrobiálně narušených potravin je většinou mnohem vyšší než v původních potravinách. Problematikou protelolytických mikroorganismů se zabývá hodně studií, díky nimž jsou vylepšovány technologie a kombinace mikroorganismů k získání kvalitních, zdravotně nezávadných a chutných potravin. Chutnost a rozmanitost je v dnešní době důležitý aspekt pro svou konkurenceschopnost, jelikož se na český trh dostávají různé rozmanité produkty ze zahraničí.

Činnost proteolytických mikroorganismů je známa nejen v mlékárenském průmyslu, kde se používají čisté kultury pro výrobu různých variant sýrů, ale konzumace výrobků s přidanými mikroorganismy je příznivá i z dietetického hlediska. V masném průmyslu je využíváno proteolytických schopností mikroorganismů z důvodu senzorického, ale i technologického, jelikož u různých typů masných fermentovaných tepelně neupravovaných výrobků zde proteolytická činnost slouží i jako konzervační proces. Proteolytické mikroorganismy jsou využívány i v potravinách rostlinného původu, kde svou činností přeměňují základní složky surovin a tím mohou být prospěšné u konečných potravin pro lidi s určitými intolerancemi. Také přeměnou základních složek na jednodušší mohou potraviny získávat nové žádoucí senzorické vlastnosti.

Ovšem není znám pouze pozitivní účinek proteolytických mikroorganismů. Tyto mikroorganismy jsou nazývány hnilobnými právě pro svou schopnost rozkládání bílkovin v potravinách při výrobě, skladování a distribuci. Potraviny napadené proteolytickými mikroorganismy z prostředí, jako primární či sekundární kontaminace, zhoršují nejen senzorické vlastnosti hnilobným zápachem a viditelnými změnami na povrchu nebo uvnitř výrobků, ale vznikající produkty ohrožují zdravotní nezávadnost vznikem toxických či karcinogenních látek.

1 PROTEOLYTICKÉ MIKROORGANISMY, JEJICH CHARAKTERISTIKA, VÝSKYT, MECHANISMUS

Proteolytické mikroorganismy, vyskytující se běžně v prostředí, jsou významné pro svou schopnost hydrolyzovat bílkoviny. Tuto schopnost zajišťují proteolytické enzymy, které katalyzují chemické reakce uskutečňující se v bílkovinné složce substrátu za vzniku metabolických produktů, které ovlivňují vlastnosti kontaminovaného nebo zaočkovaného materiálu [1].

1.1 Mechanismus

Pro svou metabolickou činnost jsou proteolytické mikroorganismy označované jako hnilobné. Látky vzniklé proteolytickou činností negativně ovlivňují senzorické vlastnosti potravin, tedy převážně chuť a zápach. Taktéž zmíněné látky zapříčiňují vznik odlišných chemických vazeb v základní molekule bílkovinného dusíku, což může vést při konzumaci až k ohrožení zdravotního stavu spotřebitelů. Hniloba se tedy týká bílkovin, jejichž přirozenou součástí jsou aminokyseliny, které během proteolytického procesu prochází dekarboxylací za vzniku toxických látek, tzv. biogenních aminů. Pokud se tyto biogenní aminy vyskytnou v potravině a jsou zkonzumovány, poté jsou v organismu zapojeny do metabolismu, kde jsou *aminooxidasami* dehydrogenovány na iminy, ze kterých se po hydrogenaci tvoří amoniak a aldehydy, což jsou látky, které lehce podléhají dalším reakcím za vzniku nebezpečných karboxylových kyselin, které mohou být dále metabolizovány citrátovým cyklem. Během procesu hydrogenace za vzniku amoniaku a aldehydů, dochází také k alkalizaci prostředí, jelikož se při rozkladu složek substrátu zvyšuje pH do zásadité oblasti. V potravinářství při postupném rozkladu bílkovinných substrátů může dojít také ke vzniku sirovodíku, sirných aminokyselin, indolu a amoniaku, což jsou látky silně zapáchající a tedy signalizující mikrobiální napadení [1, 2].

Ovšem proteolytické mikroorganismy nemají pro potravinářství pouze negativní vliv, ale jsou využívány stále častěji, kdy se při řízené kultivaci dají získat senzoricky i nutričně kvalitní potraviny [2].

1.2 Výskyt

Proteolytická schopnost se přirozeně vyskytuje u mikroorganismů v přírodě, které zabezpečují rozklad organických materiálů a tím zajišťují koloběh živin. Proto tuto vlastnost mají běžně se vyskytující mikroorganismy, tedy bakterie, kvasinky a plísně (Tab. 1). Tyto mikroorganismy jsou přizpůsobeny podle toho, v jakém prostředí se přirozeně vyskytují. Mikroorganismy můžeme tedy rozdělit na skupiny podle jejich optimální teploty růstu na psychrotrofní, mezofilní i termofilní nebo dle jejich vztahu ke kyslíku na aerobní, fakultativně anaerobní či anaerobní. Právě pro svou schopnost rozkládat bílkovinné materiály se proteolytické mikroorganismy vyskytují hojně na potravinách. Činnost daných mikroorganismů je omezena nebo až inhibována kyselým prostředím. Z toho vyplývá, že potraviny, kde již byly sacharidy využity kyselinotvornými mikroorganismy, či jejich výrobní postup prochází mléčným kvašením, jsou přirozeně chráněny před nárůstem proteolytických mikroorganismů [2].

Tab. 1. Zástupci proteolytických mikroorganismů [1, 2, 3, 5, 6, 10, 11, 16].

Plísně	**Bakterie**	**Kvasinky**
Penicillium camemberti	*Proteus vulgaris*	*Debaromyces hansenii*
Penicillium citrinum	*Serratia marcescens*	
Penicillium chrysogenum	*Alcaligenes faecalis*	
Aspergillus	*Pseudomonas fluorescens*	
Scopulariopsis brevicaulis	*Pseudomonas aeroginosa*	
Mucor mucedo	*Pseudomomnas putida*	
	Pseudomonas fragi	
	Bacillus subtilis	
	Clostridium putrefaciens	
	Clostridium sporogenes	
	Streptococcus	
	Staphylococcus	
	Kurthia	
	Brevibacterium linens	
	Lactobacillus casei	
	Clostridium botulinum	
	Clostridium sporogenes	
	Clostridium histolyticum	
	Enterococcus faecalis	
	Bifidobacterium	
	Moraxella	
	Actinobacter	
	Flavobacterium	

2 PROTEOLYTICKÉ MIKROORGANISMY A JEJICH VÝZNAM V MLÉČNÝCH VÝROBCÍCH

Proteolytické mikroorganismy mají v mlékárenství velký význam, neboť se přidávají k surovinám za účelem získání výrobků typických vlastností. V potravinářství se samozřejmě pracuje s čistými kulturami, které zaručují specifické vlastnosti, rychlé zjištění mutace plazmidy a eliminaci fágů výměnou kmene, při dodržení optimálních podmínek a práci s nimi [3]. Další důležitá funkce čistých kultur spočívá v dieteticko-léčebných účincích mléčných nápojů a výrobků získaných zakysáním sladkého mléka ušlechtilými čistými kulturami bakterií mléčného kvašení s proteolytickými vlastnostmi za vzniku kaseinu. Mléčná bílkovina (kasein) je jemně vyvločkována, a tím zajištěna lepší stravitelnost a resorpce v organismu. Proteolytické bakterie se stanovují na základě jejich proteolytické schopnosti vůči želatině nebo koagulovanému séru. V mlékárenství se jako substrát používá kasein. Při posuzování výsledků s příslušnou bílkovinou je důležité rozlišení mírné proteolýzy, způsobené čistými mlékárenskými kulturami, od silnější proteolýzy způsobené jinými bakteriemi. V případě mírné proteolýzy se po převrstvení misek s koloniemi 1% HCl, 1% taninem nebo 1% roztokem chloridu rtuťnatého zóny hydrolýzy okolo kolonií opět zakalí, pokud se jedná o silnější proteolýzu způsobenou jinými bakteriemi, tak zóny hydrolýzy zůstanou čiré [4].

2.1 Proteolytické bakterie vyskytující se přirozeně v syrovém mléce a způsobující jeho kažení

V syrovém mléce se přirozeně vyskytují psychrofilní bakterie rodu *Pseudomonas*. Tento rod zahrnuje především druhy *Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas putida, Pseudomonas fragi* a *Pseudomonas aeruginosa.* Některé z uvedených druhů bakterií mohou produkovat lipolytické a proteolytické enzymy. Tyto enzymy přežívají vysoké teploty pasterizace a zhoršují kvalitu produktu během skladování, čímž negativně ovlivňují dobu trvanlivosti. Bakteriální lipasy mohou způsobit v mléce žluknutí, zatuchlý nebo květinový zápach a proteasy zapříčiňují srážení či gelovitost mléka. Proto je důležité zabránit i případné kontaminaci psychrofilními bakteriemi rodu *Pseudomonas*. Tuto sekundární kontaminaci lze ovlivnit důkladnou sanitací, používáním čistého vybavení prosté mikroorganismů při dojení a manipulací s mlékem a udržovat čistotu prostředí kravínu. Další nežádoucí mikroorga-

nismy vyskytující se v mléce a způsobující proteolýzu jsou termorezistentní sporotvorné mikroorganismy. Mezi tyto odolné bakterie přežívající vysoký záhřev díky tvorbě endospor patří *Bacillus a Clostridium*. Tyto rody jsou v potravinářství kontrolovány z důvodu možného nebezpečí pro lidské zdraví [5].

2.2 Využití proteolytických mikroorganismů pro výrobu sýrů zrajících pod mazem

Potravinářsky významné kultury z hlediska proteolytických vlastností slouží k výrobě sýrů zrajících pod mazem. Tyto proteolytické kultury tvoří maz za aerobních podmínek na povrchu, což patří mezi typický znak pro tento druh sýrů [3]. Mezi sýry patřící do skupiny zrajících pod mazem patří např.: tvarůžky, romadúr, kmínový sýr, pivní sýr, limburský sýr a jiné [6]. Mezi důležité požadavky při práci patří dodržovat hygienu na vysoké úrovni z důvodu možné kontaminace, která by mohla způsobit znehodnocení sýrů důsledkem narušení rovnováhy zaočkované mikroflóry. U tohoto druhu sýrů se tedy přidává kromě základní mesofilní mlékařské kultury i mazová kultura, která obsahuje rody bakterií a kvasinek známé pro svou proteolytickou aktivitu. Tato mazová kultura je složena z druhů [3]:

- *Brevibacterium linens,*
- *Micrococcus roseus,*
- *Torulopsis candida,*
- *Kluyveromyces lactis,*
- *Candida utilis*.

Velice aktivní proteolytický rod *Brevibacterium linens* se využívá při výrobě tvarůžků (Obr. 1). Tato bakterie se účastní zrání a je schopna růst pouze na odkyseleném povrchu sýrů. Proto se dále při zrání využívá kombinace *B. linens* s kvasinkami. Kvasinky v přítomnosti vzdušného kyslíku oxidují organické kyseliny, hlavně tedy kyselinu mléčnou a octovou, čímž dochází k odkyselení povrchu sýrů a tím usnadnění růstu *B. linens*. Přítomné proteolytické kvasinky jsou taktéž zdrojem vitaminů skupiny B, které podporují růst ostatních bakterií účastnících se zrání. *B. linens* se využívá díky přítomnosti extracelulárních enzymů, které se zapojují do procesu zrání. Spolu s mikrokoky vytváří *B. linens* rozkladem bílkovin typické aroma a chuť. Navíc tvoří *B. linens* žlutý pigment. Musí být

ovšem zajištěny vhodné podmínky pro zrání, kam patří vysoká relativní vlhkost vzduchu a vhodná teplota [3]. Přítomné proteolytické kvasinky jsou taktéž zdrojem vitaminů skupiny B, které přispívají pro růst ostatních bakterií účastnících se zrání [3].

Obr. 1. Sýr zrající pod mazem [7].

2.3 Plísňové kultury používané při výrobě sýrů

Proteolytických účinků plísňových kultur se využívá i při výrobě sladkých a kyselých sýrů, které způsobují mikrobiologické, fyzikální a chemické změny bílkovin a mléčného tuku. Vhodně zvolené kultury rostoucí na povrchu, uvnitř těsta nebo kombinací obou možností (Obr. 2) vytváří požadované vlastnosti pro vznik typických štěpných produktů a metabolitů způsobujících charakteristické senzorické a reologické vlastnosti [3].

2.3.1 Charakteristika používaných plísňových kultur

Penicillium roqueforti je využíván pro výrobu sýrů s plísní v těstě. Tato plíseň má proteolytické a lipolytické vlastnosti, snáší vysoké koncentrace solí v prostředí a je poměrně málo náročná na kyslík, proto roste dobře v dutinách sýrů s plísní v těstě. Na médiích tvoří po vysporulování modrozelený sametový povlak. Mezi nejznámější produkty využívající této technologie je u nás Niva, rokfór francouzského původu, gorgonzola italského typu nebo stilton anglického původu [1].

Penicillium camemberti se používá k výrobě sýrů s plísní na povrchu. Kultura má značnou proteolytickou aktivitu. Tato plíseň je náročná na přístup kyslíku, proto roste na povrchu, kde při aerobním zrání přítomné enzymy prostupují z povrchu do nitra sýrů. Při zrání do-

chází k tvorbě typických senzorických vlastností jako je chuť a aroma. Mezi původní druhy patří camembert a brie, u nás se jedná o Hermelín, Encián, Plesnivec a další [3].

Obr. 2. Sýr s plísní uvnitř těsta a plísní na povrchu [8].

2.4 Přídavek proteolytických mikroorganismů do probiotických výrobků

Z provedených studií bylo prokázáno, že jogurty s probiotickou kulturou a přídavkem proteolytického a taktéž probiotického druhu *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* byly zfermentovány v nejkratším čase. Navíc se u zmíněných jogurtů zlepšila pevnost, která ovšem neměla vliv na jejich viskozitu. Díky přídavku startovací kultury *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* se zlepšila i životaschopnost probiotických bakterií [9].

Proteolytické mikroorganismy produkují enzymy peptidasy a proteinasy, které hydrolyzují mléčnou bílkovinu a umožňují vznik volných aminokyselin prospívajících růstu buňky [9].

2.5 *Geotrichum candidum* v sýrech

Geotrichum candidum, druh velice rozmanitý jak genotypově, tak fenotypově není zařazen striktně ani mezi kvasinky nebo plísně, ale tvoří přechod mezi těmito dvěma skupinami. *G. candidum* patří mezi běžné saprofyty, ale rod je znám i při využívání odpadních produktů ze zpracování tučných ryb a tučných mléčných výrobků. Zde je využívána lipolytická

vlastnost tohoto rodu. Dále *G. candidum* provází kandidy při vaginálních mykózách a nebo je příčinou bronchopneumoniích a dermatomykóz [10].

Tento druh je pro mlékárenský průmysl velice zajímavý, neboť je důležitý při dozrávání sýrů. Právě při zrání dochází k rozkladu bílkovin činností enzymů, které naruší strukturu bílkovin, což ovlivňuje konzistenci výrobku. Při proteolýze také dochází k vytváření chuťové složky a aroma. Reologických vlastností získaných rozkladem bílkovin činností proteolytických enzymů, se využívá při technologii výroby polotvrdých a měkkých sýrů. Vznik aromatických složek je typický pro sýr typu Brie a nebo tradiční Camembert. *Geotrichum candidum* přispívá ke snížení produkce diacetylu, který vytváří typické máslové aroma. Právě při zrání ale může tento rod ovlivňovat i růst mikroorganismů jak vhodných tak škodlivých pro výrobu [10].

Studium *G. candidum* bylo uskutečněno u sterilní sýřeniny, tedy bez obsahu mléčných bakterií. Výsledky byly zjišťovány po 7 dnech kultivace při 25°C. Chuť byla mírně sýrovitá, plísňovitá, páchnoucí po hnilobě, kyselá, kvasnicová, ale celkový dojem byl pozitivní a žádoucí [10].

2.6 Význam rodu *Lactobacillus paracasei* jako přídavek do tvarohu pro výrobu sýrů z ovčího mléka

Proteolytické mikroorganismy používané při výrobě sýrů z ovčího mléka mají důležitou funkci právě při zrání, jelikož zabezpečují rozklad bílkovin za vzniku důležitých chuťových, vonných látek a také látek ovlivňujících charakteristickou texturu sýru. Proteolýza je zde zprostředkována bakteriemi startovacích kultur produkujících enzymy, doplňkovými kulturami a jejich enzymy, původními mléčnými enzymy a enzymy náhodných kultur vyskytujících se v surovině. V mléce se dominantně vyskytuje rod *Lactococcus* a méně rod *Lactobacillus*. Proto se k výrobě sýrů mohou používat rody izolované přímo z mléka, kterými se pak zaočkovává pasterované mléko. Při výrobě sýrů typu Čedar je ovšem zastoupení zmíněných rodů opačné, tedy v převaze jsou laktobacily, které byly použity pro následující studium. Předmětem studia bylo zjistit proteolytické vlastnosti nativních kmenů *Lactobacillus casei, Lb. paracasei, Lb. curvatus* a *Lb. plantarum*. Mezi nejúčinnější z hlediska proteolýzy byl zařazen *Lactobalillus paracasei*, který splňoval 3 základní faktory:

1) schopnost produkovat kyselinu mléčnou,

2) stálost druhu do pokročilého stadia zrání,
3) izolace kultury přímo z mléka.

Kultura *Lactobalillus paracasei* dokázala svou činností z bílkovin uvolnit aminokyseliny glutamin, asparagin, leucin a prolin. Závěrem byla pro své vlastnosti uznána jako nejvhodnější pro výrobu sýrů z ovčího mléka [11].

2.7 Kultury pro sýry s nízkodohřívanou sýřeninou

U sýru holandského typu (Obr. 3) je základem mesofilní kultura, také mohou být případně použity speciální mesofilní kultury. Základní mesofilní kulturu tvoří kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *lactis, Lactococcus lactis* subsp. *cremoris, Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, který zapříčiňuje tvorbu hrachovitých ok. Mezi nověji využívané bakterie patří i laktobacily *Lb. casei* nebo *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* vyznačující se výraznou proteolytickou aktivitou umožňující rychlejší zrání sýrů tohoto typu. Na reologické vlastnosti sýru má podle starší literatury vliv typický kmen *Lc. lactis* subsp. *cremoris* biovar *holandicus*, který při nižších teplotách produkuje sliz a tím vytváří požadovanou strukturu těsta sýru. Speciálním typem mesofilních kultur je známá čedarová kultura. Tato kultura je význačná svou vysokou tolerancí vůči soli až do 6,5 %. Mezi další požadované vlastnosti patří termorezistence a vyšší optimální teplota (37 °C) pro proteolytickou aktivitu. Uvedené vlastnosti udělují zmíněným bakteriím optimální možnost fermentace mleté a solené sýřeniny. Základní čedarová kultura je tvořena *Lc. lactis* subsp. *lactis* a *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, pro urychlení proteolýzy se přidává termofilní homofermentativní *Lb. helveticus*, popř. *Enterococcus durans* [3].

Obr. 3. Sýr s *nízkodohřívanou sýřeninou holandského typu* [12].

3 VYUŽITÍ A VLIV PROTEOLYTICKÝCH MIKROORGANISMŮ V MASNÉM PRŮMYSLU

3.1 Proteolýza masa

Proteolýza patří mezi postmortální změny v mase, která probíhá současně s autolýzou od okamžiku poražení zvířete. Ovšem na rozdíl od autolýzy má opačnou dynamiku, jelikož s ubýváním aktivity nativních enzymů proteolýza nabývá na intenzitě. Svalovina po pořážce je téměř sterilní, ale může dojít k sekundární kontaminaci proteolytickými mikroorganismy a jimi produkovanými enzymy, které se do svaloviny dostávají postupně. Zpočátku tento proces probíhá latentně, tedy bez vnějších projevů, jelikož ve fázi rigor mortis a na počátku zrání se pohybuje pH v oblasti kyselé, přesněji pod hodnotou pH 6. Počet mikroorganismů se v této kyselé oblasti výrazně nezvyšuje. Počáteční počet mikroorganismů je ovlivněn hygienickou úrovní porážení a jatečného zpracování zvířat, bourání a chlazení masa. Ovšem stále probíhající autolytický proces zajišťující odbourávání kyseliny mléčné na oxid uhličitý a vodu zajišťuje snížení kyselosti až do neutrální oblasti. Právě odbouráním kyseliny mléčné se umožní pomnožení mikroorganismů, které mohou dosahovat až počtu 10^7 až 10^8 mikroorganismů na $1cm^2$ povrchu masa. Tento masivní nárůst mikroorganismů lze zaznamenat senzorickými změnami, jelikož může docházet ke změně barvy masa, osliznutí povrchu a typickým hnilobným zápachem. Okamžik první registrace hnilobných změn označujeme jako index hniloby I_H, což značí rozmezí mezi poživatelností a upotřebitelností. Skutečný počátek a průběh kažení je ovšem velmi variabilní, jelikož se odvíjí od více faktorů. Mezi nejvýznamnější faktory patří aktuální míra kontaminace a podmínky uchování masa. Také závisí na účinných bariérách kažení masa, kam patří nízká vodní aktivita, hodnota redox potenciálu a hodnoty pH, která může působit bakteriostaticky či inhibičně. Na účinku snížení pH masa na bázi kyseliny mléčné jsou založeny preparáty ke zvýšení údržnosti [13].

3.1.1 Základní formy kažení masa

Ke kažení masa může dojít, pokud maso ztratí svou ochrannou bariéru. Tato ochranná bariéra je porušena degeradací kyseliny mléčné, dostatečně velkým povrchem masa a vhodnou teplotou prostředí pro mikrobiální kontaminaci. Kažení masa má na sebe navazující fáze [13].

Povrchové osliznutí masa

U povrchového osliznutí masa dochází k masivnímu pomnožení obecné mikroflóry na povrchu. Mikrobiální proteolytické nebo lipolytické enzymy rozkládají složky masa na pestrou řadu degradačních produktů, které vytvoří tenkou povrchovou vrstvu slizu s šedohnědým barevným odstínem a typickým hnilobným zápachem, za což jsou odpovědné konečné degradační produkty bílkovin. Jedná se tedy o amoniak, aminy, merkaptany a sirovodík. V počátku této fáze lze zabránit rozšíření mikroorganismů omytím vodou s obsahem organické kyseliny, v praxi je nejastěji používaná kyselina octová. Kyselé prostředí inaktivuje produkty proteolýzy a pokud je tepelně ihned zpracováno, je vhodné ke spotřebě [13].

Povrchová hniloba

Povrchová hniloba je vlastně pokračováním povrchového osliznutí masa, pokud nebylo včas ošetřeno. Povrchová mikroflóra již proniká do hloubky masa a enzymy způsobujÍ rozklad bílkovin [13].

Hluboká hniloba masa

Jedná se o napadení a zkažení celých anatomických nebo technologických kusů. Opět je kažení zapříčiněno proteolytickými mikroorganismy, mohou se objevit nejen bakterie, ale i plísně s proteolytickými enzymy. V dnešní době tento druh hniloby není příliš častý. Hluboké hniloby masa se vyskytují obvykle jako ložiskové hniloby nebo kažení masa od kosti [13].

Zvláštní formy kažení masa

Zapaření masa je odlišnou formou kažení, jelikož zde dochází ke splynutí autolýzy a mikrobiální proteolýzy masa. K tomuto problému dochází nedostatečným vychlazením jatečně opracovaných těl poražených v čase nepříliš vzdáleném od porážky. U zapařeného masa dochází k rychlé degradaci kyseliny mléčné, vzniku kyslého zápachu a vysoké koncentraci oxidu uhličitého [13].

3.2 Postmortální změny masa

Zrání masa prochází i fází postmortálních změn. V tomto období se postupně uvolňuje ztuhlost svalu, zlepšuje se vaznost, mírně roste pH a zlepšují se organoleptické vlastnosti. To vše úzce souvisí s fragmentací bílkovin, která je způsobená zejména proteolýzou myofibrilárních bílkovin. Uplatňují se při tom vlastní proteasy svalové tkáně, ale i proteasy mikrobiální. Doba zrání závisí na teplotě, ale i na množství proteolytických enzymů. Pro proteolytické štěpení se používá některých rostlinných nebo mikrobiálních proteas, mezi nejpoužívanější patří *papain* a *ficin*, které se získávají z tropických rostlin. Tyto proteasy bývají označovány jako zkřehčovače [14]. Rostlinné proteasy využívali ke zkřehčování masa již Aztékové, kteří balili maso do listů některých rostlin [15].

3.3 Zrání zvěřiny

Zvěřina je vhodná ke konzumaci teprve po dostatečném odležení, které probíhá tak, že části nebo celá zvířata se nechají zrát 3 – 10 dní, starší maso se dokonce nechávalo zrát v mořidle. Zrání probíhá za anaerobních podmínek při teplotě 0 °C, uchovává se tak dlouho čerstvé bez hnilobného aromatu za vzniku specifické příchutě a aroma, které jsou označovány jako „haut gout“ a jsou považovány za jakostní znak dobře uzrálé zvěřiny. Takto uzrálá zvěřina ovšem může obsahovat nežádoucí a zdraví nebezpečné produkty mikrobiálního rozkladu částečné hniloby, která je způsobená proteolytickými mikroorganismy [14].

3.4 Proteolytická aktivita během kontrolovaného zrání u fermentovaných vepřových výrobků

Trvanlivá fermentovaná masa, jako jsou fermentované šunky a syrové šunky představují výrobky z kusového masa, které jsou konzervovány sušením a solením. Hotové výrobky se nemusejí uchovávat za chladírenských teplot a konzumují se bez potřeby tepelné úpravy [13]. Během zrání dochází u masných produktů k hydrolýze proteinů, která je způsobena endogenní mikrobiální hydrolytickou aktivitou. Baterie, plísně a kvasinky z polosuchých a suchých fermentovaných klobás produkují proteasy štěpící proteiny na peptidy a volné aminokyseliny. Nicméně příspěvek proteolytických mikroorganismů v konzervování sušením celých vepřových kusů zůstává nejasný. Proteolýza uvnitř sušené šunky endogenními enzymy neprobíhala kvůli nízkým mikrobiálním počtům v hlubokých tkáních [16]. Pozi-

tivní vliv byl zjištěn při zvýšení aminokyselin ve svalech během zrání, které dopomohlo proteolýze a tím i konzervaci sušením za přídavku NaCl. Díky zvýšení volných aminokyselin a přídavku soli dochází ke snížení vodní aktivity a tím i zvýšení údržnosti výrobku [13]. Na povrchu zrajících vzorků šunky (Obr. 4), patřily plísně a kvasinky mezi převládající mikroflóru. Byly tedy studovány vybrané rody *Penicillium chrysogenum* a *Debaromyces hanseni,* zda-li mají požadovanou proteolytickou schopnost a dají se využívat jako startovací kultury pro masné nasolené produkty. Hlavně pro studium příspěvků startovacích kultur ke konzervování sušením celých vepřových kusů, kde bylo nezbytné používat sterilní vzorek jako kontrolu. Byla provedena následná analýza týkající se bílkovin a nebílkovinných dusíkatých sloučenin prokazující účinek proteolytických mikroorganismů testovaných masných produktů. Změny byly studované pomocí SDS-PAGE u cytoplasmy svalových tkání a myofibrilárních proteinů, kapilární zónové elektroforézy (CZE) nízké iontové síly rozpustných dusíkatých směsí a HPLC volných aminokyselin. Většina volných aminokyselin byla pozorována právě u vzorků, kde byl zaočkován rod *Penicillium chrysogenum,* čímž byla zapříčiněna výrazná změna chuti zralého produktu nejen aminokyselinami, ale i z nich vznikajících těkavých kyselin. Vznik aminokyselin je velmi důležitý u masných výrobků, jako například sušenou šunku, která zraje několik měsíců. Právě zavedením rodu *P. chrysogenum*, který podporuje hydrolýzu myofibrilárních bílkovin na peptidy a aminokyseliny a tím se podílí nejen na vzniku struktury a chuti, ale přispívá i ke zkrácení doby zrání. Navíc zvyšuje rozpustnost dusičnanových solí. Oproti kvasinkové kultuře *D. hansenii,* která neprokazovala takto vysokou proteolytickou aktivitu [16].

Obr. 4. Prosciutto di parma – zrací sklep [17].

3.5 Účinek startovacích kultur na proteolytické změny a obsah aminokyselin ve fermentovaných klobáskách

Fermentované masné výrobky patří mezi tradiční výrobky s dlouholetou historií a velkou gastronomickou hodnotou (Obr. 5). Tento typ fermentovaných masných výrobků je nejrozšířenější a u spotřebitelů nejoblíbenější v Evropě, je znám také ve všech částech světa. Konzervace je zajištěna jednak fermentací s použitím startovacích kultur a jednak sušením a nasolováním. Tato tradiční technologie byla známa ještě dříve než byly provedeny studie. Všechny změny probíhající během zrání jsou ovlivněny především zrajícími podmínkami, kvalitou masa a použitými přísadami, které pak vytváří konečné senzorické vlastnosti. Charakteristickou vůni, chuť a strukturu výrobku zajišťují degradační produkty proteolýzy a lipolýzy, tedy aminokyseliny, peptidy a masné kyseliny. Aktivita startovací kultury je závislá na hygienické kvalitě použité suroviny. Obecně známým faktem je vliv volných aminokyselin uvolněných pomocí startovacích kultur na chuť a vůni. Zvláště degradace valinu, leucinu a isoleucinu na methylové rozvětvené aldehydy, kyseliny a alkoholy jsou spojeny s uzrálou vůní fermentovaných výrobků.

Z tohoto důvodu byly studovány změny po přídavku exogenních proteas z hlediska zvýšení proteolytické aktivity, urychlení zrání a rozvoje chutě v sušených fermentovaných klobásách. Hlavním cílem této studie bylo zkoumání účinků komerčních startovacích kultur u fermentovaných klobásek. Během fermentace klobásek se startovací kulturou byly pozorovány charakteristické proteolytické změny. Vysoká proteolytická aktivita byla pozorována u kultur složených z druhů *Lactobacillus sakei* a *Staphylococcus carnosus; Pediococcus pentosaceus* a *Staphylococcus xylosus*. Tyto kultury byly naočkované během zpracování díla, mírné zvýšení proteolytické aktivity bylo pozorováno i při uskladnění obou těchto klobás. Ve fermentovaných klobásách byl během zrání pozorován intenzivní rozklad sarkoplazmatických i myofibrilárních bílkovin. Obsah volných aminokyselin na počátku fermentace byl porovnáván s obsahem volných aminokyselin na konci zracího procesu a byly pozorovány velké rozdíly, které mohou být přisuzovány právě účinkům startovací kultury s intenzivní proteolytickou aktvitou [18].

Obr.5. Fermentovaný tepelně neupravený Lovecký salám [19].

3.6 BUDU – fermentované výrobky z mořských ryb

Budu patří k nejznámějším produktům z mořských ryb v Jižním Thajsku. Jedná se o tradiční směs ryb a kuchyňské soli v poměru 3:1. Přirozená fermentace probíhá od 140 do 200 dnů. Rybí produkt je hydrolyzován spojením rybích a mikrobiálních proteas. Fermentace závisí na výběru mikroorganismů z prostředí pro své specifické fyzikální a chemické parametry. Předpokládá se, že všechny složky odpovědné za chuť a aroma fermentovaných ryb jsou produkované proteolytickými mikroorganismy ve všech stupních fer-

mentace. V nálevu bylo nalezeno 11 druhů bakterií, 1 kvasinka a 3 vlaknité plísně. Kombinace proteolytického enzymu *papainu* s čistou kulturou *Brevibacterium linens* typu C a *Micrococcus* sp. zajišťuje nejen zrychlenou fermentaci, ale také řízené složení aminokyselin ve finálním produktu. Z těchto fermentovaných rybích produktů bylo izolováno 8 různých druhů *Bacillus* a jejich proteolytická aktivita byla prokázána po 18 hodninách kultivace při 35 °C. Z těchto byly 4 izolované druhy přiměny k proteasové aktivitě při optimálním pH 7 – 8 a optimální teplotě 55 °C. Po záhřevu na 55 °C po dobu 20 minut udrželo původní aktivitu pouze 40 % proteas. Teplota 65 °C již inaktivovala všechny přítomné enzymy [20].

4 VYUŽITÍ PROTEOLYTICKÝCH MIKROORGANISMŮ VE VÝROBCÍCH ROSTLINNÉHO PŮVODU

4.1 Proteolytická aktivita druhu *Oenococcus oeni* za vzniku aminokyselin ve víně

Byl zkoumán proteolytický účinek bakterie *Oenococcus oeni* na proteiny a peptidy obsažené ve víně. Tento mikroorganismus, dříve známý jako *Leuconostoc oeni*, byl izolován z argentinského vína. Pro daný výzkum bylo zvoleno červené víno Cabernet sauvignon. U bílého vína byla totiž prokázána vyšší koncentrace bílkovin, avšak specifická aktivita proteas druhu *Oenococcus oeni* vyžaduje nižší koncentraci bílkovin. Množství bílkovin ve víně je závislé na druhu hroznu, ze kterého je víno vyráběno. Ve víně je obsažená i mléčná mikroflóra, která může dosáhnout rovnocených výsledků jako kvasinky. Právě bakteriemi produkované esterasy, lipasy a proteasy mohou hrát důležitou smyslovou roli ve víně podstupujícím malolaktické kvašení. *Oenococcus oeni* je obecně mikroorganismus spojený s malolaktickým kvašením během vinného zpracování. Malolaktické kvašení probíhá ve víně po alkoholickém kvašení, kdy je vyčerpaný substrát z asimilovatelných dusíkatých směsí. Vznikající aminokyseliny, mezi které patří arginin, leucin a alanin, zastávají důležitou funkci pro růst *O. oeni*. Dále byly HPLC analýzou zjištěny ve velkém množství kyselina glutamová a prolin. Byly prokázány i další aminokyseliny, které ovlivňují chuť. Z toho vyplývá, že rod *O. oeni* vykazoval ve víně svou proteolytickou aktivitu za vzniku jednotlivých aminokyselin, které se ve víně před působením proteas nevyskytovaly [21].

4.2 Význam proteolytických mikroorganismů při výrobě bezlepkových potravin

Celiakie patří mezi celoživotní onemocnění, které je charakterizováno trvalou intolerancí lepku za vzniku zánětlivých změn na sliznici tenkého střeva, kdy dochází k abnormálním imunitním reakcím na lepek nebo jeho štěpy. Na sliznici pak dochází k cytotoxicitě z důvodu tvorby protilátek, které vyvolají zánětlivý proces. Zlepšení nastává při bezlepkové dietě. Vzhledem k tomu, že tímto onemocněním trpí v České republice asi 40 000

až 50 000 lidí, musí se hledat nové způsoby výroby obilných bezlepkových výrobků, nejvíce tedy pečiva [22].

Použití laktobacilů při výrobě obilných výrobků má význam nejen pro zlepšení chuti, struktury výrobku, zajištění stability pečených výrobků, ale především pro dietetické účinky daných bakterií. Velice prospěšnou vlastností laktobacilů je degradace lepku, čímž se výrobek stane vhodným i pro osoby s celiakií. Při kvašení dochází k hydrolýze obilných makromolekul, jako jsou proteiny a polysacharidy [23].

Laktobacily byly studovány pro svou schopnost degradovat lepek. V průběhu degradace pšeničných a žitných proteinů (kvašení), dochází ke změně prostředí na kyselé, což ovlivňuje chuť a strukturu finálního výrobku . Touto kyselou chutí je typický chléb. Okyselením a snížením disulfidových můstků v lepku působením heterofermentativních lactobacilů se zvětší aktivita obilných proteas. Proteolýza pomocí laktobacilů byla navržena jako vhodný způsob technologie při výrobě bezlepkových produktů pro osoby nemocné celiakií [23].

Další velice důležitý význam laktobacilů je zlepšování senzorické jakosti u celozrnných produktů a produktů bohatých na vlákninu. Laktobacily mohou také aktivně zpomalit stravitelnost škrobu, která vede k nízkému glykemickému indexu, čímž dochází k pomalejšímu využití glukosy obsažené v potravě při trávení [23].

4.2.1 Zlepšení senzorické jakosti u celozrnného chleba s vysokým podílem vlákniny

Konzumace celozrnných výrobků nejen chrání před kardiovaskulárním onemocněním, ale také slouží jako prevence před onemocněním diabetes mellitus II. typu. Ve starověku byly běžně používány fermentační mikroorganismy při zpracování mouky. Vnější vrstvy obilky jsou bohaté na vlákninu, minerály, vitaminy, enzymy a fytochemikálie. Zlomky otrub jsou proto využívány fermentujícími bakteriemi za vzniku žádoucích produktů [23].

5 METODY STANOVENÍ PROTEOLYTICKÝCH MIKROORGANISMŮ

Pro průkaz proteolytických mikroorganismů je často využíváno jejich extracelulární aktivity, která vytvoří specifické změny na médiu [24].

5.1 Hydrolýza kaseinu

Kasein je protein složený z aminokyselin propojených peptidickými vazbami, které jsou extracelulárními enzymy (proteasami) štepeny na nižší jednotky, čili peptidy, dipeptidy a aminokyseliny. Vzniklé hydrolyzované formy jsou poté lehce transportovatelné do buněk [24].

Pro stanovení proteolytických bakterií na agarové půdě s přídavkem mléka je potřeba kultura stará maximálně 24 hodin [24]. Tato agarová živná půda je složena z glukosy, tryptonu a kvasničného etraktu s přídavkem sušeného odstředěného mléka. Jedná se o neselektivní agarové médium, jehož energetickým zdrojem je glukosa. Agarové médium obsahuje enzymatický kaseinový hydrolyzát a kvasničný autolyzát obsahující dusík, uhlík, minerální látky a vitaminy, které jsou potřebné pro růst mikroorganismů. Médium neobsahuje žádné indikátory, ani inhibitory [25].

5.1.1 Postup při stanovování proteolytické aktivity

a) Zkoumaná kultura se naočkuje na Petriho misky s půdou obsahující mléko.

b) Stejným způsobem se naočkuje kontrolní mikroorganismus, např. *Bacillus subtilis*.

c) Obě misky se kultivují při 37 °C po dobu 48 hodin [24].

5.1.2 Závěr

Při hydrolýze kaseinu mléka je pozorována zóna projasnění v okolí kolonií, která dokazuje aktivitu proteolitických mikroorganismů (Obr. 6) [24].

Obr. 6. Precipitace u agaru s přídavkem mléka [26].

5.2 Hydrolýza želatiny

Hydrolýzou kolagenu vzniká želatina, která je tzv. amorfním proteinem. Želatina i kolagen mají stejné chemické složení, rozdíl spočívá ve fyzikální struktuře molekuly, jelikož rozpuštěním želatiny ve vodě vzniká gel. Při průkazu proteolytické aktivity extracelulárních enzymů se využívá ztekucování želatiny. Při hydrolýze dochází ke vzniku aminokyselin a tudíž je želatina tekutá i při nízkých teplotách.

Pro stanovení proteolytických bakterií na půdě s masopeptonovým bujónem obsahujícím želatinu v koncentraci 0,4 % je potřeba kultura stará maximálně 24 hodin [24].

5.2.1 Postup při stanovování proteolytické aktivity

a) Kultura se zaočkuje jednak na Petriho misku s půdou obsahující masopeptonový bujón a želatinu a dále do zkumavky s toutéž půdou vpichem.

b) Stejným způsobem se zaočkuje kontrolní mikroorganismus *Bacillus subtilis*.

c) Obě misky i zkumavky se kultivují při 37 °C po dobu 48 hodin [24] .

5.2.2 Závěr

Po inkubaci je nutno na misku nalít roztok kyseliny octové nebo roztok chloridu rtuťnatého. V případě rozložení želatiny se objeví kolem kolonií vyjasněné zóny. V místech, kde je želatina beze změny bude půda zakalena, jelikož roztok činidla způsobí precipitaci želatiny

v médiu. Důležité je po inkubaci zchladit zkumavky minimálně na 4 hodiny v lázni nebo chladničce, jelikož želatina je při teplotě vyšší než 25°C tekutá i bez hydrolýzy a ztekucování by nebylo možno pozorovat [24].

ZÁVĚR

Proteolytické mikroorganismy mají důležitou funkci při výrobě potravin. Díky přídavku čistých kultur při výrobě potravin se dosahuje vysokých senzorických a nutričních parametrů. V mlékárenství jsou proteolytické mikroorganismy využívány pro výrobu fermentovaných mléčných výrobků vyznačujících se významnými dieteticko-léčebnými účinky. Tyto dieteticko-léčebné účinky spočívají v natrávení bílkovin, při kterém je kasein vyvločkován a poté lépe stravitelný. Dalším velice významným využitím proteolytických mikroorganismů v mlékárenském průmyslu je výroba různých typů sýrů. Tyto sýry získávají zráním s proteolytickou kulturou své typické senzorické vlastnosti. Důležité je ovšem zmínit, že právě při zrání dochází ke vzniku jednodušších složek, které jsou lépe stravitelné v organismu člověka, kdy pak dochází nejen ke změně nutričních faktorů, ale i k navýšení biologických hodnot. Na druhou stranu se v syrovém mléce přirozeně vyskytují psychrofilní bakterie rodu *Pseudomonas*, které mohou přežívat vysoké teploty pasterizace a zhoršovat kvalitu produktu během skladování, čímž mohou i negativně ovlivnit dobu trvanlivosti. V mléce se mohou vyskytovat i termorezistentní sporotvorné mikroorganismy způsobující proteolýzu. Mezi tyto odolné bakterie přežívající vysoký záhřev díky tvorbě endospor patří *Bacillus a Clostridium*. Tyto rody jsou v potravinářství kontrolovány z důvodu možného ohrožení lidského zdraví.

Proteolýza masa patří mezi postmortální změny probíhající v mase po porážce zvířete. Tento proteolytický proces probíhá po odbourání kyseliny mléčné, jelikož dochází ke zvýšení pH do oblasti mírně alkalické, čímž se umožní pomnožení mikroorganismů. Masivní nárůst mikroorganismů lze zaznamenat senzorickými změnami, jelikož může docházet ke změně barvy masa, osliznutí povrchu a typickým hnilobným zápachem. Částečnou proteolýzou za anaerobních podmínek je typické zrání masa zvěřiny, kde vznikají jednak specifické chuťové a aromatické látky, ale může zde docházet i ke vzniku zdraví nebezpečných produktů.

V masném průmyslu při výrobě fermentovaných výrobků byly vybrány rody *Penicillium chrysogenum* a *Debaromyces hanseni,* pro svou požadovanou proteolytickou aktivitu. Mezi hlavní kritéria při výběru vhodných startovacích kultur patří i příspěvek ke konzervování sušením celých vepřových kusů, za vzniku aromatických aminokyselin a nebílkovinných dusíkatých sloučenin Jako další specialita, známá především v Japonsku, je fermentovaná

pochoutka z ryb zvaná BUDU, kde je opět využíváno proteolytických schopností bakterií uvolnit aminokyseliny z bílkovin a zajistit tak specifickou chuť.

Schopnosti proteolytických mikroorganismů je využíváno i při výrobě červeného vína. Rod *Oenococcus oeni* je schopen ve víně vykazovat svou proteolytickou aktivitu za vzniku jednotlivých aminokyselin, které se ve víně před působením proteas nevyskytovaly a tvoří pak žádoucí chuťové složky. Žádoucí vlastnosti jsou dále využívány při výrobě bezlepkového pečiva, kdy působením proteas dochází k degradaci lepku za vzniku jednodušších aminokyselin, které již netvoří alergie či intolerance.

Ke zjištění proteolytických mikroorganismů ve vzorku se používají plotnové metody založené na hydrolýze bílkovin za vzniku zón projasnění. Jedná se o metody jednoduché, které lze aplikovat i v podmínkách laboratoře mikrobiologie na FT UTB ve Zlíně.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] KLABAN, V. *Svět mikrobů : Malý mikrobiologický slovník*. 1. Hradec Králové : Gaudeamus, 1999. 393 s. ISBN 80-7041-639-4.

[2] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. Praha 2 : Academie věd České republiky, 2002. 363 s. ISBN 80-200-1024-6.

[3] *Potravinářská mikrobiologie I: Mikroorganizmy v potravinářství* [online]. Vyd. 1. [s.l.] : [s.n.], 2007 [cit. 2010-04-12]. Dostupné z WWW: <www.cepac.cz>.

[4] NEDOPILOVÁ, R. *Použití čistých mlékárenských kultur při výrobě zakysaných výrobků* [online]. [s.l.], 2008. 53 s. Bakalářská práce. UTB

[5] BLACKBURN, C. W. *Food spoilage microorganisms*. [s.l.] : CRC Press, 2006. 712 s. ISBN 0849391563.

[6] BOCKELMANN, W. et al. Cultures for the ripening of smear cheeses. *International Dairy Journal*. 2005, 15. ISSN 0958-6946.

[7] *Maggi.cz* [online].Nestlé Česko, 2008 [cit. 2010-05-25]. Olomoucké tvarůžky. Dostupné z WWW: <http://www.maggi.cz/Magazin/Ceska-kuchyne/Olomoucke-tvaruzky.aspx>.

[8] BITTOVÁ, M. *Ženy.cz* [online]. 2009 [cit. 2010-05-25]. Přátelské i nepřátelské plísňové sýry. Dostupné z WWW: <http://www.zeny.cz/magazin/zdravi/pratelske-i-nepratelske-plisnove-syry.aspx>. ISSN 1801–6111.

[9] SHIHATA, A., SHAH, N.P. Influence of addition of proteolytic strains of Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus to commercial ABT starter cultures on texture of yoghurt, exopolysaccharide production and survival of bacteria.*International Dairy Journal* [online]. 2002, no. 12 [cit. 2010-04-12]. Dostupný z WWW: <www.elsevier.com/locate/idairyj>. ISSN 0958-6946.

[10] BOUTROU, R., GUE´GUEN, M. Interests in Geotrichum candidum for cheese technology. *Food Microbiology*. 2004, no. 20 ISSN 0168-1605.

[11] THOMAS, Terence D., PRITCHARD, G. G. Proteolytic enzymes of dairy starter cultures. *FEMS Microbiology Letters* . 1987, 46. ISSN 0378-1097.

[12] *CHEESY Kladno* [online]. 2008 [cit. 2010-05-25]. Gouda. Dostupné z WWW: <http://www.cheesykladno.cz/index.php?list=interestings&item=gouda>.

[13] STEINHAUSER, L. et al. *Hygiena a technologie masa*. 1995. Brno : LAST, 1995. 643 s. ISBN 80-900260-4-4.

[14] PIPEK, P. *Technologie masa I.*. 4. Praha : 1995. 334 s. ISBN 80-7080.

[15] HECHT, H., *Fleischwirtschaft*, 67, 1987, s.534

[16] MIGUEL, A., ASENSIO, A. M. et al. Proteolytic activity of Penicillium chrysogenum and Debaryomyces hansenii during controlled ripening of pork loins. *Meat Science*. 2002, 62, s. 1-9. ISSN 0309-1740

[17] *ITALIAN FOOD LOVERS* [online]. 2008 [cit. 2010-05-25]. A Gastronomic VIP Tour to Emilia-Romagna: Part 3 Artisan Producers, a Medieval Castle and the Ferrari Museum. Dostupné z WWW: <http://www.italian-food-lovers.com/uploads/prosciutto-di-parma-product.gif>

[18] PUREVDORJ, N.-O., MARCOS, J. A. A. et al. The effect of starter cultures on proteolytic changes and amino acid content in fermented sausages. *Food Chemistry*. 2009, 119, s. 1-7. ISSN 0308-8146

[19] *KMOTR.cz* [online]. 2005 [cit. 2010-05-25]. Lovecký salám VB. Dostupné z WWW: <http://www.masna.cz/produkt-detail.php?s=12&name=Loveck%FD-sal%E1m-VB>.

[20] CHOORIT, W., PRASERTSAN, P. Characterization of proteases produced by newly isolated and identified proteolytic microorganisms from fermented fish (Budu). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1992, 8. ISSN 1573-0972.

[21] MANCA de NADRA, M.C. et al. A proteolytic e¡ect of Oenococcus oeni on the nitrogenous macromolecular fraction of red wine. *FEMS Microbiology Letters*. 1999, 174. ISSN 90-90176683-7.

[22] LUKÁŠ, K., et al. *Gastroenterologie a hepatologie pro zdravotní sestry* [online]. první. Praha 7 : Grada Publishing a.s., 2005 [cit. 2010-04-28]. Dostupné z WWW: <http://books.google.cz>. ISBN 80-247-1283-0.

[23] FLANDER, L., POUTANEN , K., KATINA, K. Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective. *Food Microbiology*. 2009, 26. ISSN 0740-0020.

[24] BURDYCHOVÁ, R., SLÁDKOVÁ, P. *Mikrobiologická analýza potravin*. Vyd. 1. Brno : Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2007. 218 s. ISBN 978-80-7375-116-6.

[25] *AGRO-LA, spol. s.r.o.* [online]. 2008 [cit. 2010-05-24]. Živné půdy pro mikrobiologii. Dostupné z WWW: <http://www.agrola.cz/zivne-pudy.html>.

[26] *Københavns universitet* [online]. 2000 [cit. 2010-05-25]. Casein Hydrolysis. Dostupné z WWW: <http://www.microbiologyatlas.kvl.dk>.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

SDS–PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného, je technika k separaci proteinů na základě jejich elektroforetické pohyblivosti
CZE	Kapilární zónová elektroforéza
HPLC	Vysoce účinná kapalinová chromatografie

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Sýr zrající pod mazem.……13

Obr. 2. Sýr s plísní uvnitř a plísní na povrchu.……...……. 14

Obr. 3. Sýr s nízkodohřívanou sýřeninou holandského typu.……...17

Obr. 4. Prostciutto di parma–zrací sklep……. 22

Obr. 5. Fermentovaný tepelně neupravený Lovecký salám ……23

Obr. 6. Precipitace u agaru s přídavkem mléka……...….. .28

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Zástupci proteolytických mikroorganismů …….10