Změna proteinového profilu přírodních sýrů eidamského typu v průběhu zrání za různých teplotních podmínek

Bc. Renata Michálková

Diplomová práce
2011

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav biochemie a analýzy potravin
akademický rok: 2010/2011

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

Jméno a příjmení:	**Bc. Renata MICHÁLKOVÁ**
Osobní číslo:	**T090262**
Studijní program:	**N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor:	**Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**
Téma práce:	**Změna proteinového profilu přírodních sýrů eidamského typu v průběhu zrání za různých teplotních podmínek**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

- Popište technologii výroby sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou.
- Zabývejte se mikrobiologickými a biochemickými reakcemi probíhajícími v sýrech během jejich zrání.

II. Praktická část

- Sledujte proteinový profil v průběhu zrání sýrů za různých teplotních podmínek metodou SDS-PAGE.
- Výsledky statisticky vyhodnoťte.
- Na základě teoretické části a výsledků praktické části formulujte závěry a doporučení.

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.
[2] FOX, P.F., McSWEENEY, P.L.H., COGAN, T.M., GUINEE, T.P., Cheese ? Chemistry, Physics and Microbiology. Elsevier Academic Press, London, 2004.
[3] GAJDŮŠEK, S., Mlékařství II, Brno: Skriptum MZLU, 1998.
[4] McSWEENEY, P.L.H., Biochemistry of Cheese Ripening, International Journal of Dairy Technology, Vol.57, no.2/3 May/August, 2004.

Vedoucí diplomové práce: **MUDr. Pavel Budinský, Ph.D.**
Ústav biochemie a analýzy potravin

Datum zadání diplomové práce: **25. února 2011**

Termín odevzdání diplomové práce: **20. května 2011**

Ve Zlíně dne 21. března 2011

L.S.

UNIVERZITA TOMÁŠE BATI VE ZLÍNĚ
Fakulta technologická

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan

doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.
ředitel ústavu

ABSTRAKT

Tato práce je zaměřena na proteinový profil sýrů eidamského typu v průběhu zrání za různých teplotních podmínek metodou SDS-PAGE.

Teoretická část práce je věnována technologii výroby sýrů eidamského typu a biochemickým procesům probíhajícím v průběhu zrání těchto sýrů.

V praktické části byly provedeny dva experimenty simulující zrání sýrů eidamského typu za odlišných skladovacích podmínek – v lednici (simulující předčasné vyskladnění) a v temperované komoře (akcelerace zrání). Proteinové profily takto skladovaných sýrů byly srovnány s proteinovým profilem těchto sýrů skladovaných ve zracím sklepě.

Z výsledků experimentu bylo zjištěno, že rozdílné teplotní podmínky mají výrazný vliv na průběh změn během zrání sýrů. Čím dříve je sýr vyskladněn ze zracího sklepa, tím probíhá proteolýza pomaleji. Při uskladnění sýra eidamského typu v temperované komoře je možné proces zrání urychlit.

Klíčová slova: eidam, SDS-PAGE, zrání sýrů, proteolýza

ABSTRACT

The thesis deals with the protein profile of Dutch-type cheese during ripening under different temperature conditions using SDS-PAGE.

The theoretical part focuses on production technology of Dutch-type cheese and biochemical processes during the cheese ripening.

The practical part is divided into two experiments to simulate Dutch-type cheese ripening under different storage conditions – in the refrigerator (simulating early removal from the ripening cellar) and in the tempered chamber (accelerated ripening). Protein profiles of cheeses stored that way were compared with protein profiles of the same type of cheeses stored in the ripening cellar.

The results of experiments showed that different temperature conditions have significant impact on changes during cheese ripening. The sooner the cheese is taken from the ripening cellar, the slower the proteolysis is. Storage of Dutch-type cheese in the tempered chamber can accelerate the ripening process.

Keywords: Dutch-type cheese, SDS-PAGE, ripening, proteolysis

Tímto děkuji vedoucímu své diplomové práce MUDr. Pavlu Budinskému, Ph.D. za odborné vedení, ochotu a poskytnutí cenných rad k mé diplomové práci. Mé díky patří také doc. Ing. Františku Buňkovi, Ph.D. za konzultace poskytované v průběhu zpracovávání mé diplomové práce a doc. 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.

Prohlašuji, že jsem na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautorka.

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

Ve Zlíně

.....

Podpis diplomanta

Příjmení a jméno: MICHÁLKOVÁ RENATA Obor: CHTP – THEVP

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 16.5.2011

Renata Michálková

[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.

OBSAH

ABSTRAKT **4**

ÚVOD **10**

1 PŘÍRODNÍ SÝRY **12**

1.1 Rozdělení sýrů 12

1.2 Technologie výroby sladkých sýrů 14

1.2.1 Tepelné ošetření mléka 14
1.2.2 Úprava mléka před zpracováním 15
1.2.3 Sýření mléka 17
1.2.4 Zpracování sýřeniny 18
1.2.5 Formování sýřeniny 20
1.2.6 Solení 20

1.3 Zrání 21

1.3.1 Fáze zrání 21
1.3.2 Podmínky zrání 22
1.3.3 Urychlení zrání sýrů 23

2 BIOCHEMIE ZRÁNÍ SÝRŮ **25**

2.1 Metabolizmus laktózy 25

2.2 Metabolizmus kyseliny mléčné 26

2.3 Metabolizmus citrátu 27

2.4 Proteolýza a metabolizmus volných aminokyselin 27

2.5 Lipolýza a metabolizmus volných mastných kyselin 32

3 CÍL PRÁCE **36**

4 MATERIÁL A METODY **37**

4.1 Rozdělení experimentů 37

4.2 Experiment I 37

4.3 Experiment II 38

4.4 Stanovení proteinového profilu metodou SDS-PAGE 38

4.5 Hodnocení gelů 41

5 VÝSLEDKY A DISKUZE **42**

5.1 Výsledky experimentu I 42

5.1.1 Výsledky stanovení proteinového profilu vzorků sýrů 42
5.1.2 Statistické vyhodnocení proteinového profilu ve vzorcích sýrů 46

5.2 Výsledky experimentu II 52

5.2.1 Výsledky stanovení proteinového profilu vzorků sýrů 52
5.2.2 Statistické vyhodnocení proteinového profilu ve vzorcích sýrů 55

5.3 Diskuze 59

ZÁVĚR.....61
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....62
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....66
SEZNAM OBRÁZKŮ.....67
SEZNAM TABULEK.....69
SEZNAM PŘÍLOH.....70

ÚVOD

Sýry jsou nedílnou součástí našeho jídelníčku. Kdy vznikl první sýr, se asi nikdy přesně nedozvíme, ale první zmínky o sýru se objevují už ve 3. století před naším letopočtem. Výrobu sýrů ovlivnilo několik faktorů, a to chov zvířat produkujících mléko, zjištění, že se mléko ponechané v klidu může za určitých podmínek samovolně srážet, objev syřidla a nutnost konzervace mléka a tím prodloužení jeho údržnosti.

Sýrařství dobře zhodnocuje mléko jako surovinu, bohatě rozšiřuje sortiment mléčných výrobků a chuťově značně obohacuje lidský jídelníček. V posledních letech byl zaznamenán výrazný nárůst ve spotřebě sýrů, což je způsobeno zejména snadnou manipulací se sýrem (možností jeho zabalení), větším využíváním sýrů v oblasti stravovacích služeb a dostupností různých speciálních sýrů. Spotřeba sýrů je ukazatelem růstu životní úrovně.

Je velmi složité říci, kolik druhů sýrů v současné době známe. Sýry se od sebe liší především svými senzorickými vlastnostmi z důvodu různorodosti suroviny, odlišnosti použité technologie a regionálních zvyků. Každý spotřebitel má možnost zvolit si sýr ze široké nabídky výrobků přesně podle svého gusta a potřeb.

Tato práce je zaměřena na změnu proteinového profilu sýrů eidamského typu v průběhu zrání za různých teplotních podmínek metodou SDS-PAGE.

Teoretická část práce je věnována technologii výroby sýrů eidamského typu a biochemickým procesům probíhajícím v průběhu zrání těchto sýrů.

Praktická část je rozdělena na dva experimenty. U prvního z nich byly zkoumány rozdíly mezi vzorky sýrů eidamského typu uloženými ve zracím sklepě po celou dobu experimentu a vzorky stejného typu sýrů přeloženými po 23 dnech zrání do lednice z důvodu simulace předčasného vyskladnění. U druhého experimentu byly srovnávány vzorky sýrů eidamského typu uložené ve zracím sklepě a vzorky přeložené po 4 dnech zrání do temperované komory z důvodu akcelerace zrání.

Ve výsledkové části jsou uvedeny výsledky stanovení proteinového profilu vzorků sýrů metodou SDS-PAGE a statistické vyhodnocení proteinového profilu ve vzorcích sýrů metodou shlukové analýzy v programu Unistat, a to u obou experimentů.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 PŘÍRODNÍ SÝRY

Sýr lze z dnešního pohledu sjednocené evropské legislativy definovat jako mléčný výrobek vyrobený vysrážením mléčné bílkoviny z mléka působením syřidla nebo jiných vhodných koagulačních činidel, prokysáním a oddělením podílu syrovátky [36, 50]. Principem je tedy oddělení určitého podílu syrovátky ze sraženiny mléka stanovené tučnosti [23].

Z nutričního hlediska jsou sýry plnohodnotnými výrobky obsahující všechny esenciální aminokyseliny v množství a poměru vhodném pro výživu člověka. Zdrojem využitelné energie jsou bílkoviny a snadno stravitelný mléčný tuk [18, 23].

Hlavním důvodem zpracování mléka na sýry je především prodloužení trvanlivosti. Toto prodloužení je zapříčiněno fermentací laktózy na kyselinu mléčnou, dále snížením vodní aktivity a pH [18, 25].

1.1 Rozdělení sýrů

Sýry je možné dělit podle řady hledisek.

- Podle použité suroviny na:

1. přírodní sýry, tj. klasické sýry, vyráběné přímo z mléka,
2. tavené sýry, které jsou vyráběny dalším zpracováním přírodních sýrů,
3. výrobky, ve kterých je mléčný tuk nahrazen rostlinnými tuky,
4. imitace sýrů, které jsou připravovány rekonstitucí jednotlivých složek mléka.

- Podle obsahu vody v tukuprosté hmotě sýra na:

1. extra tvrdé (obsah vody je nejvýše 47 %),
2. tvrdé (obsah vody 47 – 54,9 %),
3. polotvrdé (55 – 61,9 %),
4. poloměkké (62 – 68 %),
5. měkké (více než 68 %).

Obsah vody v tukuprosté hmotě sýra lze vypočítat dle vzorce:

$$voda\ v\ tukuprosté\ hmotě\ sýra = \frac{g\ vody}{100 - g\ tuku} \cdot 100$$

- Podle způsobu srážení mléka na:

1. kyselé sýry – při výrobě se uplatňuje pouze kyselé srážení. Do této skupiny patří průmyslový tvaroh a z něj vyráběné Olomoucké tvarůžky,

2. sladké sýry – při srážení mléka se uplatňuje jen působení syřidla. Srážení je relativně rychlé a prokysávání působením mikroorganismů probíhá proto převážně až při dalším zpracování sýřeniny (patří sem polotvrdé a tvrdé sýry),

3. sýry se smíšeným srážením mléka s vlivem kyseliny mléčné a syřidlem. Do této skupiny patří některé měkké sýry a měkké tvarohy.

- Podle způsobu zrání na:

1. nezrající sýry (čerstvý, termizovaný),
2. sýry zrající na povrchu, s mazem na povrchu nebo v celé hmotě,
3. sýry zrající (plísňové) s tvorbou charakteristické plísně na povrchu, s tvorbou charakteristické plísně uvnitř hmoty.

- Podle obsahu tuku v sušině na:

1. vysokotučné (více než 60 % včetně),
2. plnotučné (více než 45 % včetně),
3. polotučné (více než 25 % včetně),
4. nízkotučné (více než 10 % včetně),
5. odtučněné (méně než 10 %).

- Podle technologie výroby (systematiky sýrů) na:

<u>1. přírodní:</u>

a) sýry sladkého sýrařství

- čerstvé sýry – sýry, u kterých neprobíhá zrání (např. smetanový sýr),
- měkké sýry - sýry rozdělené do dalších podskupin podle použité čisté kultury, která je nositelem především senzorických vlastností, většinou jsou nelisované, mohou být zrající nebo nezrající,
- bílé sýry – sýry nezrající díky vysokému obsahu NaCl, uchovávané v solném roztoku,
- pařené sýry – v průběhu technologie se sýry „paří“, čímž získává finální výrobek fibrilární (vláknitou) strukturu,
- polotvrdé a tvrdé sýry – zvýšené sušiny se docílí vyšší teplotou zpracování zrna, než byla teplota sýření:

• sýry s nízkodohřívanou sýřeninou (sýry eidamského typu – Eidamská cihla, sýry s hnětenou sýřeninou, sýry s mletou sýřeninou – Čedar),
• sýry s vysokodohřívanou sýřeninou tvořící oka (sýry ementálského typu – např. Primátor),
• sýry s vysokodohřívanou sýřeninou netvořící oka (sýry parmazánského typu – např. Grand Moravia),
• sýry s vysokohohřívanou mletou sýřeninou (sýry čedarového typu).
b) sýry kyselého sýrařství

2) upravované:

- tavené, sušené [22, 23, 36, 50].

1.2 Technologie výroby sladkých sýrů

Výchozí surovinou pro výrobu kvalitního sýra je kvalitní mléko bez cizích příchutí a pachů, s nízkým obsahem somatických buněk a mikroorganizmů a bez antibiotik. Složení mléka, které je ovlivněno plemenem krávy, ročním obdobím a fází laktace, nemocemi a genetikou, ovlivňuje výnosnost, kvalitu a funkční vlastnosti sýra [14]. Kvalita syrového mléka je základním předpokladem výroby sýrů standardní kvality, a to nejen z pohledu fyzikálně chemických parametrů, ale hlavně z pohledu senzorických vlastností finálního produktu [36].

Vliv na složení sýra a výtěžnost výroby má zejména chemické složení mléka.

Velmi důležité jsou také vlastnosti mléka, především:

- syřitelnost mléka – schopnost mléka srážet se syřidlem,
- kysací schopnost mléka – významná vlastnost mléka pro růst čistých mlékařských kultur (ČMK),
- mikrobiální čistota.

Mezi základní technologické operace při výrobě těchto sýrů patří tepelné ošetření mléka, úprava mléka před zpracováním, sýření mléka, zpracování sýřeniny, formování sýřeniny, solení a zrání sýrů [18, 23]. Celkové schéma výroby sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou je uvedeno v příloze P 1.

1.2.1 Tepelné ošetření mléka

Tepelné ošetření mléka má zajistit zdravotní nezávadnost mléka a zničit podstatnou část technologicky nežádoucí mikroflóry mléka, včetně nativních a mikrobiálních enzymů,

které mohou negativně ovlivnit vlastnosti finálního produktu [36].

V České republice jsou sýry vyráběny zejména z pasterovaného mléka, i když legislativa EU umožňuje i výrobu sýrů z mléka nepasterovaného. V tomto posledně jmenovaném případě se obvykle požaduje doba zrání delší jak 2 měsíce [36]. Pro výrobu sýrů se používá šetrná pasterace. Pasterací se rozumí tepelné ošetření mléka a mléčných výrobků zahřátím mléka na teplotu nejméně 71,7 °C po dobu nejméně 15 sekund nebo jinou kombinací času a teploty za účelem dosažení rovnocenného účinku [14, 22, 23, 36, 50]. Pro sýry s nízkodohřívanou sýřeninou je možné použít teploty 72 – 75 °C. Se zvyšující se pasterační teplotou dochází ke zvýšené denaturaci sérových bílkovin, které se váží prostřednictvím své thiolové skupiny na κ-kasein. Tím se zhorší přístup enzymů ke κ-kaseinu, sérové bílkoviny neodchází do syrovátky, ale zůstávají v sýřenině. Zvyšuje se sice výtěžnost, ale následně i vazba vody. Může tedy dojít ke snižování sušiny sýrů a ke zhoršení jejich jakosti [6, 36].

1.2.2 Úprava mléka před zpracováním

Mléko je před zpracováním standardizováno úpravou obsahu sušiny a tuku (procenta tuku v sušině).

V některých případech (sýry s plísní v těstě) je možné provést homogenizaci mléčného tuku – smetany, která se následně při standardizaci přidává do mléka. Homogenizace má vliv na dokonalé rozptýlení mléčného tuku, čímž se sníží jeho ztráty do syrovátky, ale zároveň se zvyšuje styčná plocha s lipázami a tuk se stává přístupnější pro lipolytické enzymy [36]. Mléko ani smetana pro výrobu sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou se nehomogenizují, došlo by k rozbití kaseinových micel, mléko by se rychleji srazilo, ale kvalita sýřeniny by byla horší.

V průběhu pasterace přejdou rozpustné formy vápenatých solí ve větší míře do forem nerozpustných [6].

$$4\ CaHPO_4 \rightarrow Ca_3(PO_4)_2 + Ca(H_2PO_4)_2$$

Proto je k obnovení syřitelnosti do mléka přidáván rozpustný vápník, nejčastěji ve formě chloridu vápenatého. Obvyklý přídavek činí 20 g (10 – 40 ml nasyceného roztoku) chloridu vápenatého na 100 l mléka. Při vyšší dávce dochází k hořknutí sýrů [18, 23, 25, 36]. Chlorid vápenatý hraje roli ve druhé fázi koagulace mléka, gelovatění. Nedostatek Ca^{2+} se projevuje špatnými reologickými vlastnostmi vzniklého gelu, zejména jeho pevností a homogenitou, čímž je také ovlivněna zpracovatelnost sýřeniny a jakost konečného

výrobku. Nastávají problémy s uvolňováním syrovátky v dalších fázích technologie [36].

Činností plynotvorných mikroorganizmů, které vlivem heterofermentativního rozkladu mléčného cukru produkují vodík, vznikají v sýru nežádoucí dutinky. U polotvrdých a tvrdých sýrů se z důvodu předcházení tzv. skorému a pozdnímu duření přidávají do sýrů dusičnany (v množství 3 – 30 g/100 l mléka) nebo vzhledem k zdravotním aspektům dusičnanů stále častěji jiné preparáty na bázi nisinu nebo lysozymu [14, 36, 45].

Do úprav mléka před zpracováním zahrnujeme i standardizaci obsahu bílkovin, která se provádí za použití membránových technologií s cílem odstranit bakterie a bakteriální spory z mléka [14, 17, 36, 45].

Dále se do sýrů mohou přidávat barviva z důvodu jednotné intenzivnější barvy u některých druhů sýrů (např. u čedaru) nebo k barvení povrchu (např. Zlato) [14, 17, 36]. U sýrů se využívá zejména barvivo annato (E 160 b) dodávající sýrům jasnou žluto-oranžovou barvu. Je to přírodní barvivo extrahované ze semen stromu *Bixa orellana*. Obsahuje dva pigmenty – bixin a norbixin, které řadíme mezi karotenoidy [1].

Tepelným ošetřením mléka dochází ke zničení nejen „škodlivé“, ale i „užitečné“ mikroflóry, která má nezastupitelný technologický význam, proto je nutné znovu osídlit mléko „kulturními“ mikroorganismy. Přídavek ČMK do mléka před sýřením je nutnou podmínkou zdárného technologického procesu [23, 36].

Používají se primární a sekundární kultury.

Primární kultury, respektive základní kultury, zajišťují prokysání mléka i sýrů a uvolňují enzymy, které se podílejí na tvorbě chuti a vůně v průběhu zrání sýrů. Tyto kultury svou biochemickou aktivitu zahajují před koagulací mléka. Patří sem především bakterie rodů *Lactococcus, Lactobacillus* a *Streptococcus*.

Sekundární kultury (doplňkové) jsou používány k vytvoření typických senzorických znaků u daného druhu sýra. Mezi tyto kultury patří například:

- tvrdé a polotvrdé sýry – *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei,*
- sýry ementálského typu – *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii, Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii,*
- sýry s mazem na povrchu – *Brevibacterium linens,*

- sýry s bílou plísní na povrchu - *Penicillium camemberti, Penicillium caseicolum, Penicillium candidum*

- sýry s modrou plísní v těstě – *Penicillium roqueforti* [6, 17, 18, 23].

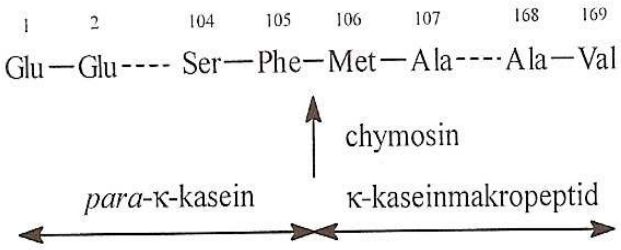
1.2.3 Sýření mléka

Ke srážení mléka může dojít pomocí kyseliny mléčné (při pH mléka 4,2 – 4,6 odpovídajícímu izoelektrickému bodu kaseinu) nebo působením syřidlového enzymu vhodným spolupůsobením ČMK produkujících kyselinu mléčnou (pH 6,2 – 6,5) [12, 23]. Dále se budu věnovat pouze sladkému srážení mléka, k němuž dochází působením syřidla.

Důležité je zvolit správné množství syřidla potřebného k zasýření požadovaného množství mléka. U tvrdých a polotvrdých sýrů se volí vyšší množství syřidla než u sýrů měkkých, tak, aby sýření proběhlo za 30 – 35 minut při teplotě 31 – 32 °C [6, 36].

Účinek syřidla spočívá v působení proteolytických enzymů na kasein. Tento proces probíhá v několika fázích:

- primární fáze – je charakterizována přeměnami, které destabilizují původní uspořádání frakcí kaseinu. K této destabilizaci dochází specifickou hydrolýzou κ-kaseinu (mezi 105. a 106. aminokyselinou) působením syřidlových enzymů, čímž je narušen ochranný hydrofilní obal kaseinové micely,



Obr. 1. Hydrolýza κ-kaseinu chymosinem [48]

- sekundární fáze – probíhá koagulace destabilizovaného kaseinu za vzniku trojrozměrného gelu. Podmínkou koagulace jsou volné ionty vápníku (nutnost přídavku chloridu vápenatého) a vhodná teplota (nad 15 °C, při teplotách nad 55 °C však syřidlo denaturuje),

- terciární fáze – může k ní docházet při delším působení syřidla. Probíhá pomalu a je nežádoucí z důvodu rizika vzniku hořkých peptidů [14, 18, 36].

1.2.4 Zpracování sýřeniny

Účelem zpracování sýřeniny je docílit správné velikosti sýrového zrna, zajistit potřebný stupeň odstranění syrovátky a docílit dalších požadovaných vlastností – např. kyselosti, zbytkového obsahu laktózy, slepitelnosti.

Doba vhodná pro začátek zpracování sýřeniny je, když síly kohezní (soudržnost) převládnou nad adhezními (přilnavost). Tento okamžik se zjistí pokusně – ostrý lasturovitý lom gelu [36]. Zpracování sýřeniny je proces, který se skládá z několika po sobě jdoucích operací. Mezi tyto operace většinou patří: krájení sýřeniny, drobení, vytužování, dohřívání a dosoušení.

Krájení sýřeniny je prováděno mechanicky systémem vodorovných a svislých nožů a ocelových strun uložených v rámech – tzv. harfy. Krájením dochází ke snadnějšímu odloučení syrovátky ze sýřeniny, která obsahuje především vodu a laktózu. Oproti tomu sýřenina obsahuje vysráženou mléčnou bílkovinu a tuk. První prokrojení sýřeniny musí být velmi opatrné (3 až 5 otáček za minutu po dobu 2 až 3 minut), aby nedocházelo k mechanickému rozbíjení a uvolňování velmi malých částic, které odchází do syrovátky – tzv. sýrařský prach [4, 36].

Další zmenšování velikosti částic se nazývá drobení. Oproti krájení se používá vyšší frekvence otáčení harf (12 až 15 otáček za minutu). Vznikajícím částicím se říká sýrařské zrno. Jeho velikost je závislá na druhu sýra a z toho vyplývající požadované sušiny. Sýřenina se zpracovává na různou finální velikost zrna: vlašský ořech, lískový ořech, hrách, obilka [12, 36]. U tvrdých a polotvrdých sýrů se sýřenina zpracovává na menší zrno s menším obsahem vody.

Krájením sýřeniny a drobením je podpořena syneréze – proces odstraňování syrovátky ze sýřeniny [4]. Dochází ke smšťování sýřeniny a nárůstu počtu vazeb mezi kaseinovými frakcemi za současného uvolňování syrovátky. Proces syneréze je podpořen koncentrací Ca^{2+}, zvýšením teploty, snížením pH a samozřejmě časem. Vyšší množství tuku v sýru zpomaluje synerézi, zatímco vyšší obsah bílkovin (až do určitého množství) ji urychluje, při vysokých koncentracích bílkovin je gel příliš pevný a syneréze neprobíhá [17, 18, 22].

Dále následuje vytužování sýřeniny. Zrno je v neustálém pohybu (míchá se), probíhá další syneréze, roste pevnost pokožky, postupně se zmenšuje velikost a zvyšuje tuhost zrna. Doba vytužování a intenzita míchání se značně liší u jednotlivých skupin sýrů (u tvrdých sýrů trvá až 45 minut) [36].

Dohřívání je postupné zvyšování teploty probíhající za stálého míchání. Cílem této operace je další odvod syrovátky ze zrna, zmenšení jeho velikosti, úprava jeho požadovaných vlastností a zvýšení biochemické aktivity enzymů přítomné mikroflóry.

Výše dohřívací teploty závisí na druhu sýra:

- nízkodohřívané sýry – obvykle 38 – 42 °C
- vysokodohřívané sýry – obvykle 48 – 56 °C

Vyšší teploty umožní vyrobit jemné malé zrno s vyšší sušinou.

Vlastní dohřívání je možné provést dvěmi způsoby:

- pomalým přímým přídavkem technologické vody o teplotě 60 – 90 ºC, většinou po předchozím odpuštění části syrovátky (odpuštění 20 – 30 % syrovátky a její nahrazení 50 – 70 % technologické vody, poměr odpuštěné syrovátky a množství vody se nazývá prací poměr). Přídavkem technologické vody dochází ke snížení koncentrace všech složek, především však laktózy, výsledkem je jemnější a méně výrazná chuť. Optimální rychlost přihřívání je 2 ºC za 3 minuty, vysoká rychlost může mít za následek uzavření kapilární vody pod pokožkou zrna. Tento způsob je typický pro sýry holandského typu, u kterých není kladen požadavek na tvorbu ok (vzniká pouze malý počet ok).

- pomalým nepřímým ohřevem mezipláštěm výrobníku (sýrařské vany). Zrno se většinou nepere. Dosažením hraniční teploty 45 ºC se inaktivují mezofilní mikroorganizmy a vytváří se optimální podmínky pro kultury termofilní. Tento způsob je typický pro sýry ementálského typu, u kterých je žádoucí tvorba ok. V sýřenině zůstává poměrně velké množství laktózy, z níž vzniká kyselina mléčná a následně oxid uhličitý, který způsobuje vznik ok [36].

Syneréze je dále podpořena mechanickým zpracováním sýřeniny při dohřívání a dosoušení [18, 36]. Dosoušení je míchání sýřeniny v syrovátce po dosažení konečné teploty. Účelem dosoušení je kromě zvyšování sušiny zrna také ovlivnění probíhajícího prokysávání, které rovněž upravuje konzistenci a jakost vyráběných sýrů. Čím vyšší je požadovaná sušina, tím delší je doba dosoušení. U nízkodohřívaných sýrů je tato doba 20 až 30 minut, u vysoko-dohřívaných 30 až 60 minut. I když je tato doba stanovena technologickým postupem, je její ukončení většinou dáno subjektivním posouzením – zrno stisknuté v dlani se spojí do tvaru válce, který se mírným tlakem rozpadá opět na jednotlivá zrna.

Po dosažení požadovaných vlastností zrna nastává vypouštění zrna. Tato operace by měla být co nejšetrnější. Vypouštění se provádí buď samospádem do níže položených tvořítek nebo se čerpá speciálními čerpadly [36].

1.2.5 Formování sýřeniny

Formování sýrů odpovídá požadovanému typu a tvaru sýra [23]. Během tvarování probíhají mechanické procesy (např. uvolňování syrovátky, slepování zrn, vytváření pokožky) a pokračují i přeměny biochemického charakteru (např. prokysávání) [25, 36].

Formování se provádí ve speciálních tvořítkách vyráběných převážně z plastu nebo kovu v různých tvarech a velikostech [18, 23, 36]. K dobrému odvodu syrovátky jsou opatřeny perforací. Do tvořítek se sýřenina nalévá buď společně se syrovátkou, nebo po odtoku syrovátky mimo tvořítka se sýřenina promíchá nebo se pokrájí a plní do tvořítek [23]. Zrno přitom nesmí oschnout.

Lisování sýrů je zařazeno do procesu při výrobě polotvrdých a tvrdých sýrů. Je prováděno pomocí tlaku za účelem rychlejšího odvádění syrovátky. Počáteční tlak se volí nižší z důvodu zamezení tvorby silné kůrky bránící dalšímu odtoku syrovátky. Velmi důležitým parametrem je také rovnoměrnost tlaku. Doba lisování trvá obvykle 2 až 4 hodiny [12, 25, 36].

1.2.6 Solení

Další technologickou operací během výroby sýrů je jejich solení. Sůl je hlavním faktorem ovlivňujícím vodní aktivitu sýrů, má velký vliv na růst a přežití bakterií a aktivitu enzymů v sýru, tím ovlivňuje a kontroluje biochemii zrání a průběh kysaní sýrů [5, 18]. Solení dodává sýrům příjemnou slanou chuť, zlepšuje konzistenci, umožňuje další odchod syrovátky (podporuje synerézi), zpevňuje povrch sýra, potlačuje činnost nežádoucí mikroflóry, ovlivňuje další průběh zrání, zastavuje nebo brzdí mléčné kvašení [12, 14, 18, 23, 36].

Koncentrace soli se pohybuje od 1,5 % u čerstvých sýrů, střední obsah soli mají sýry s nízkodohřívanou a vysokodohřívanou sýřeninou (1,5 – 3 %), vyšší obsah soli mají sýry s plísní v těstě, velmi vysoký obsah soli má skupina sýrů zrajících v solném nálevu (nad 6 %), nejvíce soli (asi 7 – 8 %) má sýr Domiati [18, 36].

V dnešní době je nejpoužívanějším způsobem solení sýrů solení v solné lázni [23, 36]. Sůl do sýrů proniká ponořením sýra do roztoku NaCl definovaných parametrů (koncentrace,

pH, teplota). Vlivem difúze pronikají na povrch přes pokožku sýra a drobnými kanálky mezi slepenými zrny látky z roztoku. Rychlost tohoto procesu je závislá na koncentračím spádu, který je na začátku solení nejvyšší. V opačném směru ze sýra uniká zbytek laktózy, kyselina mléčná a další rozpustné látky. Proto je důležité udržovat parametry cirkulující solné lázně v požadovaném rozmezí (doplňovat úbytek soli, upravovat pH, filtrovat od úlomků a vzhledem k tomu, že dochází k uvolňování tepla, i solnou lázeň chladit). Sůl prostupuje od povrchu do středu sýra. Nejvíce NaCl je tedy obsaženo v pokožce a hmotě pod povrchem sýra – tzv. solný prstenec. Pod ním jsou pásma s nižším obsahem soli (solné a výměnné pásmo). K vyrovnání obsahu soli dochází obvykle až v průběhu zrání a po přeměně jednotlivých sýrařských zrn v celistvou hmotu [36].

Parametry solné lázně jsou rozdílné pro jednotlivé druhy sýrů. Koncentrace NaCl se pohybuje v rozmezí 18 – 22 %, pH v rozmezí 4,8 – 5,4, teplota 12 – 22 ºC a doba od 30 minut do 3 až 5 dnů (obecně platí, že s růstem hmotnosti sýra se doba prodlužuje). Existuje dvoutepelný způsob solení, při kterém první solná lázeň s nižší koncentrací soli a vyšší teplotou umožňuje dostatečné prokysání sýrů a druhá solná lázeň s vyšší koncentrací soli a nižší teplotou pak vlastní prosolení sýrů. Dnes se však používá spíše jednotepelný způsob solení s využitím jedné solné lázně [6, 23, 36].

Po vysolení se sýry ponechají 1 až 2 dny oschnout [23]. Následně se balí do expedičních, respektive zracích obalů, případně se povrch ošetří (např. voskuje) a sýry zrají bez dalšího obalu. Následuje vložení do zracích polic, palet nebo nověji do zracích beden, které umožňují vysoký stupeň mechanizace při manipulaci se sýry během zrání (pravidelné otáčení, rovnoměrný tvar, stejné klimatické podmínky) [36].

1.3 Zrání

Zrání lze definovat jako veškeré biochemické a mikrobiologické procesy probíhající v sýrech působením mikrobiálních enzymů, případně syřidlových enzymů. Zrání ovlivňuje především vzhled, chuť, vůni a konzistenci sýra [23].

V této kapitole jsou popsány obecné principy, biochemii zrání je věnována kapitola 2.

1.3.1 Fáze zrání

Biochemické procesy, které v průběhu zrání v sýrech probíhají, mohou být rozděleny do tří základních fází, které nejsou od sebe nijak výrazně odděleny, ale naopak na sebe plynule navazují nebo se navzájem překrývají.

1. primární fáze: V této fázi dochází k rozkladu laktózy bakteriemi mléčného kvašení zejména za vzniku kyseliny mléčné. Rozklad laktózy nastává již v průběhu zpracování sýřeniny, během odkapávání a lisování sýrů je nejintenzivnější. K úplnému vymizení laktózy u tvrdých sýrů dochází již během prvních dní zracího procesu. Během tohoto procesu je vytvářena kyselina mléčná, která uvolňuje z kaseinu vápník za vzniku mléčnanu vápenatého. Z kaseinu vzniká monokalciumkaseinát, který bobtná ve vodě a v roztoku NaCl, čímž dojde ke slepování sýřeniny a vzniku homogenní struktury sýrů.

2. sekundární fáze: Dochází ke snížení kyselosti sýra mikrobiologickým rozkladem kyseliny mléčné na kyselinu octovou (případně propionovou), oxid uhličitý a vodu, případně na další sloučeniny. Také dochází k vazbě kyseliny mléčné na rozkladné produkty bílkovin, popřípadě na jiné látky. Podle typu sýra dochází k mikrobiologickému rozkladu kyseliny mléčné buď anaerobně v celé hmotě (typické pro polotvrdé a tvrdé sýry, z vytvořeného CO_2 se tvoří typická oka) nebo aerobně (od povrchu dovnitř mikroflórou povrchu sýra).

3. terciární fáze: Probíhá proteolýza bílkovin, a to anaerobně v celé hmotě nebo aerobně od povrchu dovnitř [23, 25, 36].

Peptidy produkované činností zbytkového koagulantu a plazminu jsou často bez chuti nebo mají hořkou chuť a nepřispívají přímo k typické chuti sýra. Nicméně, směs kratších peptidů a aminokyselin přímo ovlivňuje chuť sýra a jeho pocit v ústech. Volné aminokyseliny mohou být dále katabolizovány na senzoricky aktivní látky, které jsou specifické pro každý sýr a jsou závislé na typech enzymů a mikroorganismů (zejména nezákysových bakterií mléčného kvašení, NSLAB) přítomných v sýrech [14].

K vyjádření rozkladu bílkovin se používají pojmy rozsah a hloubka zrání. Rozsah zrání je podíl ve vodě rozpustných dusíkatých látek, albumóz a peptonů. Rozsah zrání je značný u měkkých sýrů. Hloubkou zrání rozumíme množství aminokyselin a produktů jejich rozkladu k celkovému dusíku. Hloubka zrání je značná u tvrdých sýrů [23, 36].

1.3.2 Podmínky zrání

Zrání sýrů probíhá ve zracích sklepech, tedy v prostorech s vhodnými podmínkami pro zrání daného druhu sýra. Během zrání se sýry ošetřují (umývání, obracení, propichování sýrů). Některé sýry zrají v obalech, které slouží i jako expediční obal, nebo pod nátěrem. Tím se snižuje pracnost při ošetřování a také ztráty během zrání [23, 25].

Teplota ovlivňuje zásadním způsobem průběh a také intenzitu biochemických přeměn [36]. Na počátku zrání je teplota vyšší a při dozrávání nižší. Sýry s nízkodohřívanou sýřeninou zrají v tzv. zracích sklepech, ve kterých probíhá proteolýza, teplota sklepu se u těchto sýrů udržuje mezi 8 – 14 °C.

Relativní vlhkost vzduchu je závislá na teplotě zracího sklepu. U měkkých sýrů zrajících pod mazem nebo zrajících s plísní v těstě je vyžadována relativní vlhkost vzduchu značně vysoká, a to 90 – 95 %, u tvrdých sýrů 80 – 90 %. Pokud sýry zrají ve zracích fóliích nebo pod speciálními nátěry, pohybuje se vlhkost v rozmezí 60 – 80 % [36].

Doba zrání sýrů se pohybuje od 24 hodin (čerstvé sýry solené), po dobu několika dnů (sýry zrající pod mazem), týdnů (sýry zrající s plísní v těstě), měsíců (sýry eidamského a ementálského typu) až po dobu několika let (Parmazán). Eidamská cihla zraje ve zracích sklepech optimálně 2 – 3 měsíce [18, 22, 23].

V dnešní době se setkáváme často s tím, že sýry jsou předčasně vyskladňovány a distribuovány k zákazníkovi, i když proces zrání ještě nebyl zdaleka ukončen. Největší vliv na to mají samozřejmě ekonomické důvody.

1.3.3 Urychlení zrání sýrů

Vzhledem k tomu, že zrání sýrů, a to zejména těch s nízkou vlhkostí, je velmi pomalý proces, je jejich skladování a uchovávání ve zracích sklepech v řízené atmosféře značně nákladné. Zrání je také nepředvídatelné a obtížně kontrolovatelné. Proto vznikly nové technologie snižující čas a náklady na skladování a zrání sýrů při zachování nebo zlepšení charakteristické chuti a textury.

Hlavní technologické postupy používané k urychlení zrání sýrů jsou:

1. Zvýšení teploty zrání (zejména u sýra Čedar), který obvykle zraje při 6 – 8 °C. Sýry s nízkodohřívanou sýřeninou zrají při teplotě mezi 12 – 14 °C, teplotu zrání se nedoporučuje zvyšovat nad 20 °C.

2. Přídavek exogenních enzymů, obvykle proteináz nebo peptidáz. Tento způsob se používá pouze u sýrů modifikovaných enzymaticky, které mají vysokou vlhkost a používají se jako přísady do tavených sýrů, sýrových pomazánek nebo jako sýrová ochucovadla.

3. Použití ČMK (např. s oslabenou buněčnou stěnou, zmrazené šokem nebo rychle zahřáté), které snadno podléhají lýzi a tím dochází k rychlejšímu vylití a využití intracelulárních enzymů.

4. Přídavek NSLAB, zejména mezofilních laktobacilů, získaných komerčně nebo ze sýrů z předcházející výroby.

5. Geneticky modifikované ČMK, které zvyšují proteolytickou aktivitu nebo aktivitu enzymů narušujících buněčnou stěnu.

6. Vysokotlaké zpracování, kdy dochází k prasknutí buněk a uvolnění enzymů důležitých pro zrání sýrů [14, 17, 18, 45].

7. Přídavek aminokyselin do sýřeniny, čímž dochází k urychlení proteolýzy (zejména fáze rozkladu krátkých peptidů na aminokyseliny) a rozvoje senzoricky aktivních látek.

8. Enzymaticky modifikované sýry, kdy je do sýřeniny nebo do čerstvě vyrobeného sýra přidána směs enzymů v podobě prášku nebo pasty, po stanovené době inkubace dochází k pasteraci a tím k ukončení mikrobiologických a enzymatických reakcí [17, 20].

Urychlení zrání sýrů se neustále zkoumá, protože zatím nejsou známy všechny informace o reakcích ovlivňujících chuť, ani o všech biochemických a mikrobiologických procesech probíhajících při zrání sýrů.

2 BIOCHEMIE ZRÁNÍ SÝRŮ

Biochemické změny, které nastávají v průběhu zrání sýrů, mohou být rozděleny na primární reakce, ke kterým patří metabolizmus zbytkové laktózy, kyseliny mléčné a citrátu, proteolýza a lipolýza. Po těchto primárních reakcích následují sekundární biochemické reakce, které jsou velmi důležité pro vznik mnoha těkavých aromatických látek. Zahrnují metabolizmus mastných kyselin a volných aminokyselin [30].

Zbytková laktóza je v počátečních fázích zrání rychle metabolizována na kyselinu mléčnou, která je důležitým prekurzorem pro řadu reakcí [30]. Proteolýzu je možné považovat za nejsložitější biochemickou reakci, která nastane v průběhu zrání [18, 30]. Je katalyzována enzymy ze zbytkového koagulantu, mléka (zejména plazmin) a proteináz i peptidáz bakterií mléčného kvašení, u některých druhů i jinými mikroorganizmy přítomnými v sýru nebo na jeho povrchu. Lipolýza v sýru je katalyzována lipázami z různých zdrojů, zejména mikroflóry mléka a sýrů. Při sekundárních reakcích dochází ke vzniku těkavých aromatických látek, které mohou produkovat senzoricky aktivní látky z mastných kyselin a aminokyselin [30].

2.1 Metabolizmus laktózy

Protože sýr je fermentovaný mléčný výrobek, klíčovým faktorem jeho výroby je metabolizmus laktózy na kyselinu mléčnou prostřednictvím vybraných ČMK. Rychlost a rozsah okyselení závisí na výchozí textuře a pH sýřeniny. Hodnota pH ovlivňuje texturu sýřeniny a má přímý vliv na rozpustnost kaseinů. Bylo zjištěno, že sýry s vyšším pH jsou jemnější než sýry kyselejší. pH také ovlivňuje texturu a chuť sýrů nepřímo ovlivňováním aktivity enzymů důležitých pro zrání [30].

Většina laktózy z mléka odchází v syrovátce jako laktóza nebo kyselina mléčná. Nicméně, na konci výrobního procesu zůstává v sýřenině určitá nízká koncentrace laktózy (0,8 – 1,0 %) [18, 30, 45]. Kompletní fermentace laktózy v sýru je důležitá k zabránění rozvoje kontaminující mikroflóry. Zbytková laktóza je během počátečního stádia zrání rychle metabolizována na kyselinu L-mléčnou, rychlost přeměny je do značné míry určována teplotou sýřeniny a množstvím soli v sýřenině [17, 18, 30, 42]. V případě, že metabolizmus laktózy není kompletní pomocí ČMK, následuje metabolizmus laktózy pomocí NSLAB. Při vysokém počtu NSLAB vzniká značné množství kyseliny D-mléčné [30].

U druhů sýrů vyrobených za použití *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* a *Lactobacillus* spp. je metabolizmus laktózy složitější než v sýrech, ve kterých je používán *Lactococcus*. U těchto sýrů je sýřenina zahřívána na 52 až 55 °C, což je teplota vyšší než teplota růstu pro obě složky startéru. Jakmile se sýřenina ochladí, *Streptococcus*, který je teplotně tolerantnější, začíná růst a využívat laktózu za vzniku kyseliny L-mléčné, galaktóza se hromadí v sýřenině. Když se sýřenina dostatečně ochladí, roste *Lactobacillus* spp. Je-li kmen *Lactobacillus* galaktóza-pozitivní, metabolizuje galaktózu za vzniku kyseliny DL-mléčné, je-li galaktóza-negativní, galaktóza se hromadí v sýřenině a může se podílet zejména při zahřívání u sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou na Maillardově reakci, což je nežádoucí [17, 18, 45].

2.2 Metabolizmus kyseliny mléčné

Kyselina mléčná vzniklá z laktózy má velký význam v průběhu zrání sýrů u všech typů sýrů. Má vliv na chuť sýrů, zejména nezrajících, u kterých nejsou vyvinuty ostatní chuťové látky [17]. Kyselina D-mléčná může vznikat přímo z laktózy, a to pomocí ČMK, NSLAB nebo racemizací kyseliny L-mléčné. Rychlost racemizace kyseliny L-mléčné závisí na skladbě NSLAB mikroflóry. Například pediokoky racemizují kyselinu mléčnou rychleji než laktobacily a racemizace také probíhá rychleji u sýrů vyrobených ze syrového mléka než u sýrů vyrobených z pasterovaného mléka [30, 32].

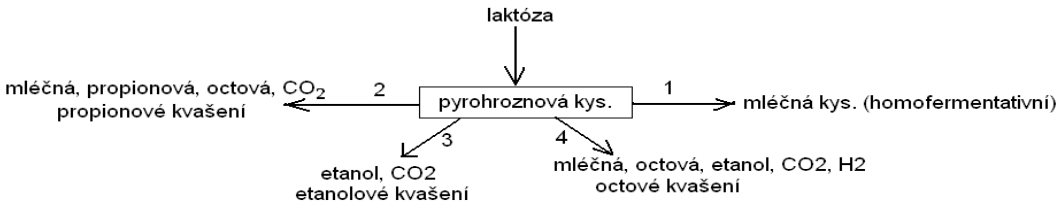
Kyselina mléčná může být v sýrech oxidována pomocí ČMK na produkty, mezi které patří i kyselina octová, kyselina mravenčí, etanol a oxid uhličitý [21, 30]. Nicméně, rozsah této reakce v sýrech závisí na množství NSLAB a dostupnosti kyslíku, jež se určuje podle velikosti sýra a propustnosti kyslíku balícím materiálem. Z tohoto důvodu dochází u sýrů zabalených v plastové fólii k oxidaci kyseliny mléčné pomocí ČMK ve velmi omezené míře [30].

Anaerobní metabolizmus kyseliny mléčné prostřednictvím *Clostridium tyrobutyricum* na kyselinu máselnou a vodík má za následek vadu známou jako pozdní duření. Z důvodu produkce vodíku vznikají v sýru v průběhu zrání trhliny, kyselina mléčná zase způsobuje nepříjemnou pachuť sýra. Zabránit se tomu dá snížením počtu spor v mléce (správná hygiena, inhibice klíčení spor používáním lysozymu a dusičnanů, baktofugace nebo mikrofiltrace) [30, 31].

Metabolizmus kyseliny mléčné má při výrobě sýrů velký význam.

U sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou se při výrobě do mléka nebo přímo do zrací nádrže přidá malé množství *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* nebo *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*, které v průběhu zrání v teple rostou a metabolizují kyselinu mléčnou na kyselinu propionovou, kyselinu octovou, oxid uhličitý a vodu. První dvě sloučeniny přispívají k chuti sýra, CO_2 migruje sýřeninou, až dosáhne bodu nasycenosti a začne se hromadit. Formace ok závisí na rychlosti a množství vyprodukovaného CO_2, počtu a velikosti míst vhodných pro tvorbu ok, tlaku CO_2, rychlosti difúze a textuře a teplotě sýra [30, 45].

Metabolizmus laktátu je je také velmi důležitý při zrání sýrů s plísní na povrchu [17, 30].



Obr. 2. Metabolizmus laktózy [48]

2.3 Metabolizmus citrátu

Citrát je metabolizován citrát-pozitivními kmeny laktokoků, mezi které patří *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis,* je také metabolizován kmeny *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris.* Produkty metabolizmu jsou oxid uhličitý, který je zodpovědný za malá oka nacházející se u sýrů holandského typu, a důležité chuťové látky, zejména diacetyl, které přispívají k chuti těchto sýrů. Citrát může být také metabolizován pomocí některých kmenů NSLAB na butanol, kyselinu octovou a diacetyl. Množství citrátu v sýřenině klesá během prvních šesti měsíců zrání činností NSLAB na stopové koncentrace [17, 30].

2.4 Proteolýza a metabolizmus volných aminokyselin

Ze všech tří biochemických dějů probíhajících během zrání sýrů je proteolýza nejkomplexnější [17, 18, 30]. Proteolýza přispívá zejména k měknutí textury sýrů během zrání v důsledku hydrolýzy kaseinové matrice v sýřenině a snížení hodnoty aktivity vody (a_w) sýřeniny (v důsledku změny ve vazbě vody, kdy v průběhu hydrolýzy byly vytvořeny nové karboxylové kyseliny a aminoskupiny). Proteolýza má také přímý vliv na chuť sýrů prostřednictvím produkce krátkých peptidů a aminokyselin, z nichž některé jsou chuťově aktivní. Usnadňují uvolňování senzoricky aktivních látek z matrice sýra a poskytují volné

aminokyseliny. Za určitých okolností může vzniknout nadměrné množství hydrofobních peptidů, což může vést ke vzniku hořké chuti, ale ve vhodné koncentraci a při správném vyvážení s ostatními sloučeninami přispívají tyto peptidy k příjemné chuti sýra [17, 30].

Proteinázy a peptidázy, které katalyzují proteolýzu v průběhu zrání sýrů pocházejí z šesti primárních zdrojů: zbytková aktivita syřidla, nativní enzymy mléka, primární a sekundární bakterie mléčného kvašení (např. *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii, Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*, *Penicillium roqueforti, Penicillium camemberti* a celková grampozitivní bakteriální mikroflóra na povrchu sýrů zrajících pod mazem), NSLAB a v určitých případech i exogenní proteinázy nebo peptidázy přidávané do mléka nebo sýřeniny z důvodu urychlení zrání. Významným zdrojem proteolytických enzymů v mnoha druzích sýrů je zbytková aktivita syřidla, nejčastěji chymosinu, který zůstává v sýřenině i po odtoku syrovátky. Až 30 % syřidla přidaného do mléka zůstává v sýřenině aktivní v závislosti na faktorech jako je typ enzymu, teplota při srážení a pH při odtoku syrovátky [30, 49].

V roztoku chymosin štěpí β-kasein na sedmi místech, z nichž mnohé se nacházejí v blízkosti hydrofobního karboxylového konce β-kaseinu, což může vést ke vzniku krátkých hydrofobních peptidů, které mohou být hořké. I když je β-kasein v roztoku snadno hydrolyzován chymosinem, v sýrech je vůči chymosinu odolný a je hydrolyzován pomalu (asi 50 % za 6 měsíců). Ke štěpení dochází na vazbách Lys_{28} - Lys_{29}, Lys_{105} - His/Gln_{106} a Lys_{107} - Glu_{108} za vzniku γ_1, γ_2- a γ_3-kaseinů a odpovídajících proteoso-peptonů (PP5, PP8 pomalé a PP8 rychlé) [17, 18, 30].

Hlavním místem působení chymosinu na α_{S1}-kasein je vazba Phe_{23} - Phe_{24}, což vede k produkci krátkých peptidů, které jsou ihned hydrolyzovány startérovými proteinázami. Chymosin štěpí α_{S1}-kasein i na řadě jiných míst, zejména Leu_{101} - Lys_{102}, v menší míře Phe_{32} - Gly_{33}, Leu_{98} - Lys_{99} a Leu_{109} - Glu_{110} [17, 18, 30, 31, 35].

α_{S2}-kasein je vůči aktivitě chymosinu odolnější než α_{S1}-kasein, místa štěpení α_{S2}-kaseinu jsou omezena pouze na hydrofobní oblasti molekuly. Přestože para-κ-kasein obsahuje několik míst, která by mohl chymosin štěpit, doposud štěpení nebylo zjištěno, ať v roztoku nebo v sýru [17, 18, 30, 31, 34].

Mléko samo o sobě je významným zdrojem proteolytických enzymů. Hlavní nativní proteinázou v mléce je plazmin, což je proteináza mající původ v krvi, optimálně aktivní při pH 7,5 a teplotě 37 °C. Fyziologická úloha plazminu v krvi spočívá v degradaci

sraženin fibrinu. Proto musí být aktivita plazminu v krvi pod přísnou kontrolou. Vzniká tedy z neaktivního prekurzoru, plazminogenu, který je aktivován působením aktivátorů plazminogenu. V mléce jsou plazmin, plazminogen a aktivátory plazminogenu převážně spojeny s kaseinovými micelami a zůstávají v sýřenině, zatímco inhibitory plazminu a aktivátorů plazminogenu odcházejí do syrovátky [16, 17, 30, 49].

Plazmin degraduje kaseiny v následujícím pořadí: β-kasein ≈ α_{S2}-kasein > α_{S1}-kasein. κ-kasein je vůči plazminu odolný. α_{S2}-kasein je na činnost plazminu velmi citlivý, což způsobuje vymizení tohoto proteinu v průběhu zrání sýrů. Ke štěpení α_{S2}-kaseinu v roztoku dochází na osmi místech za vzniku 14 peptidů, z nichž tři mohou být hořké [30, 34].

Aktivitu plazminu může ovlivnit také pasterace. Plazmin a plazminogen nejsou ničeny šetrnou pasterací ani teplotami při dohřívání sýrů. Může docházet dokonce ke zvýšení aktivity plazminu, protože vlivem pasterace dochází k inaktivaci inhibitorů aktivátorů plazminogenu. To je nejvíce patrné u sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou [16, 30, 49].

Mléko obsahuje i další původní proteinázy pocházející z leukocytů somatických buněk, nejvíce prozkoumaný je katepsin D. Specifičnost katepsinu D na kaseiny je velmi podobná chymosinu, z tohoto důvodu je obtížné posoudit jeho roli při zrání sýrů koagulovaných pomocí syřidla. Nicméně, přínos ke zrání sýrů vyráběných kyselým sražením mléka bez přidání syřidla, je také omezený [16, 17, 30].

Bakterie mléčného kvašení obsahují intracelulární a extracelulární peptidázy, které jsou velmi důležité pro konečnou fázi proteolýzy v průběhu zrání sýrů a konečné uvolnění volných aminokyselin jako substrátů pro katabolické reakce. ČMK, které jsou používány jako primární kultura při výrobě sýrů (např. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*), obsahují velké množství peptidáz [17, 18, 30]:

1. Endopeptidázy – jsou schopné štěpit peptidy uvnitř molekuly

- oligoendopeptidázy – tři typy: PepO, PepF (monomerní metalloendopeptidázy) a PepE (thiolendopeptidáza)

2. Exopeptidázy – jsou schopné štěpit peptidy na začátku nebo konci molekuly

- aminopeptidázy: PepN (monomerní metalloendopeptidáza), PepA (multimerní metallo-aminopeptidáza), PepC (multimerní thiolaminopeptidáza), PepG (cysteinaminopeptidáza) a další,

- imidopeptidáza: PepI - štěpí molekulu prolinu, která je na počátku molekuly,

- pyrolidon karboxylyl peptidáza: PCP,
- dipeptidyl aminopeptidáza: PepX

3. Dipeptidázy – PepV, PepL, PepR (prolináza) a PepQ (prolidáza)

4. Tripeptidáza – PepT.

Aktivita a stabilita těchto peptidáz v sýru není jednoznačná, ale alespoň některé jsou aktivní, což dokazuje přítomnost poměrně vysoké koncentrace některých peptidů a aminokyselin v sýru [17].

Proteolýza v sýrech, u nichž se využívá při výrobě a zrání sekundární mikroflóra, je často ovlivněna enzymy těchto sekundárních mikroorganismů. Nejdůkladněji jsou prozkoumány enzymy *Brevibacterium linens*. Tento organismus produkuje kromě řady intracelulárních enzymů i extracelulární proteinázy a aminopeptidázy [30].

Model proteolýzy u mnoha druhů sýrů lze shrnout takto: kaseiny jsou nejprve hydrolyzovány zbytkovým syřidlem, které je zadrženo v sýřenině, a plazminem, popř. i jinými původními proteolytickými enzymy, na řadu velkých a středně velkých peptidů, které jsou následně hydrolyzovány proteinázami a peptidázami ČMK a NSLAB, popř. i sekundární mikroflórou, na kratší peptidy a aminokyseliny [17, 30]. Nicméně, model a rozsah proteolýzy se u jednotlivých druhů sýrů značně liší. Tyto rozdíly jsou způsobeny odlišnostmi v průběhu výroby sýrů (zejména výší dohřívací teploty) a také průběhem zrání (zrací dobou, obsahem vlhkosti, zbytkovou aktivitou syřidla, aktivací plazminogenu na plazmin, popř. vznikem sekundární mikroflóry) [30].

Metabolizmus volných aminokyselin zahrnuje dekarboxylaci, deaminaci, transaminaci, desulfuraci a hydrolýzu vedlejších řetězců aminokyselin za vzniku nepřeberného množství sloučenin, jako jsou karboxylové kyseliny, aminy, amoniak, aldehydy, alkoholy, thioly a další sloučeniny síry, fenoly, oxid uhličitý a jiné. Mnohé z nich jsou významné senzoricky aktivní látky [9, 10, 11, 17, 18, 33, 46]. Aminokyseliny mohou také reagovat s karbonyly Maillardovou reakcí a Streckerovým rozkladem za vzniku velmi rozmanitých senzoricky aktivních látek [18].

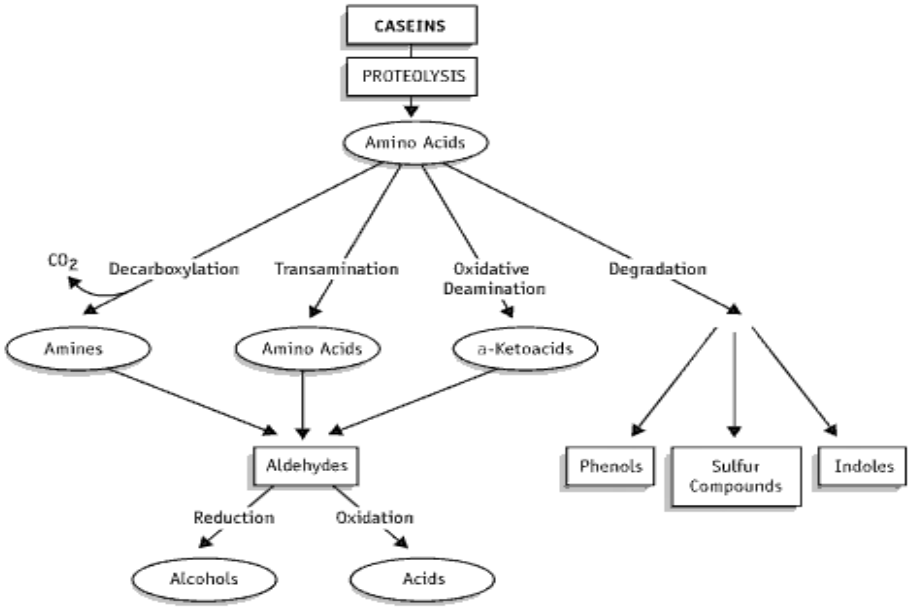
Dekarboxylace je přeměna aminokyseliny na odpovídající amin, odchází přitom oxid uhličitý. Mnoho vznikajících aminů v sýru je biologicky aktivních, často vykazují silný a nepříjemný zápach. Množství produkovaných aminů v sýru závisí na koncentraci prekurzorů aminokyselin a na mikroflóře sýra, která může být ovlivněna faktory, jako jsou

teplota zrání, pH a koncentrace soli. Touto cestou mohou vznikat i biogenní aminy, které jsou toxickými zplodinami metabolizmu aminokyselin [11, 17, 30]. Mezi tyto biogenní aminy patří histidin, kadaverin, tyramin a putrescin. V nízkých koncentracích jsou biogenní aminy přirozenou složkou řady potravin. Ve vyšších množstvích se vyskytují ve fermentovaných potravinách (kysané zelí, sýry, fermentované masné výrobky, víno, pivo), kde vznikají činností mikroorganizmů. Množství biogenních aminů lze využít jako indikátor čerstvosti. Česká a evropská legislativa stanovuje limity pro potraviny, které by mohly znamenat největší riziko (např. limit pro tyramin v sýrech) [3].

Deaminací aminokyselin vznikají činností aminotransferázy odpovídající α-ketokyseliny a amoniak. α-ketokyseliny, zejména ty, vzniklé z aromatických aminokyselin, mohou být chemicky rozštěpeny na důležité chuťové a aromatické sloučeniny. Dále mohou být α-ketokyseliny redukovány na odpovídající hydroxykyselinu, dekarboxylovány na odpovídající aldehydy nebo oxidačně dekarboxylovány na karboxylové kyseliny. Posledně zmiňované však nemají v sýrech velký význam. Amoniak přispívá k tvorbě chuti u některých druhů sýrů. Amoniak také může vznikat oxidační deaminací aminů za vzniku aldehydů. Činnost aminotransferázy byla stanovena jako činitel limitující rychlost produkce těkavých sloučenin v průběhu zrání sýrů [10, 17, 30].

Transaminací vznikají činností transaminázy další aminokyseliny. Aldehydy vznikající výše zmíněnými procesy mohou být poté oxidovány na kyseliny nebo redukovány na odpovídající alkoholy činností dehydrogenáz, popř. oxidáz.

Velmi významné z hlediska tvorby aroma sýrů jsou těkavé sirné sloučeniny. Mezi tyto sloučeniny patří sulfan, methanthiol, dimethylsulfid, dimethyldisulfid, methional a thioestery [17, 30].



Obr. 3. Vznik senzoricky aktivních látek [4]

2.5 Lipolýza a metabolizmus volných mastných kyselin

Lipidy v potravinách podléhají hydrolytické a oxidační degradaci. Nicméně, v sýrech je rozsah oxidačních změn velmi limitován vzhledem k nízkému oxidačně-redukčnímu potenciálu (okolo -250 mV). Triacylglyceroly ve všech typech sýrů podléhají hydrolýze činností původních, endogenních nebo exogenních lipáz. Výsledkem činnosti lipáz je uvolnění mastných kyselin z triacylglycerolů obsažených v mléčném tuku. Tyto mastné kyseliny s krátkým řetězcem do značné míry přispívají k chuti sýrů [9, 10, 30, 33].

Lipázy pochází přímo z mléka, z přidaného syřidla nebo mohou mít původ v mikroflóře sýra (tzv. mikrobiální lipázy). Mléko obsahuje účinnou nativní lipázu – lipoproteinlipázu (LPL). Fyziologická role tohoto enzymu spočívá v metabolizmu triacylglycerolů, které se dostávají do mléka z krve. Za optimálních podmínek je úroveň LPL v mléce dostatečná, aby způsobila uvolnění dostatečného množství mastných kyselin, což způsobí žluklou chuť mléka. Neděje se tak běžně, neboť mléčný tuk je chráněn proti činnosti LPL lipoproteinovou membránou a okolo 90 % LPL je spojeno s kaseinovými micelami. Pokud je tato membrána mechanicky porušena, např. homogenizací, může rychle proběhnout výrazná lipolýza. LPL se přednostně podílí na hydrolýze triacylglycerolů, které obsahují mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem (C_6 – C_{12}), zejména na pozicích 1 a 3 [9, 10, 17, 30]. Činnost LPL je nejvíce patrná u sýrů vyrobených ze syrového mléka, pasterací jsou enzymy z větší části inaktivovány, i když k úplné inaktivaci tohoto enzymu je nezbytná teplota 78 °C působící po dobu alespoň 10 sekund [30]. Protože je LPL převážně spojena

s kaseinovými micelami, zůstává v sýřenině.

Úroveň lipolýzy v sýrech, ve kterých se vyvinula sekundární mikroflóra, je často spojována s lipolytickou schopností přidaných kultur. Sýry s plísní v těstě procházejí během zrání velmi rozsáhlou lipolýzou, může být rozštěpeno až 25 % všech mastných kyselin. Hlavní lipáza u tohoto sýra je vytvořena za pomoci *Penicillium roqueforti*, v mnohem menší míře za příspěvku původních mléčných lipáz a lipáz ČMK a NSLAB. Volné mastné kyseliny přímo přispívají k chuti sýrů s modrou plísní v těstě, navíc procházejí i částečnou β-oxidací na alkan-2-ony (methylketony) katabolickou aktivitou plísně. Alkan-2-ony způsobují charakteristickou pikantní chuť těchto sýrů. Za anaerobních podmínek mohou být některé alkan-2-ony rozloženy na odpovídající sekundární alkoholy, které způsobují nepříjemné cizí chutě [9, 10, 18, 30].

Lactococcus spp. a *Lactobacillus* spp. vykazují nižší úroveň lipolytické aktivity. Nicméně, z důvodu nepřítomnosti silných lipolytických látek a poměrně dlouhé zrání sýrů, jsou lipázy a esterázy laktokoků a laktobacilů, pokud jsou přítomny v dostatečném množství, hlavními lipolytickými činiteli v sýrech s nízkodohřívanou sýřeninou vyráběných z pasterovaného mléka [17].

Mastné kyseliny s krátkým řetězcem přispívají k tvorbě aroma sýrů přímo. Volné mastné kyseliny (FFA) přispívají k tvorbě aroma také nepřímo tím, že fungují jako prekurzory pro tvorbu těkavých aromatických sloučenin prostřednictvím komplexu reakcí označovaných souhrnně jako metabolizmus volných mastných kyselin [30].

Estery se nacházejí v mnoha typech sýrů a vznikají reakcí FFA s alkoholem. Etanol je limitujícím reaktantem v produkci esterů, tento alkohol je sekundárním produktem při fermentaci laktózy nebo při katabolizmu aminokyselin. Z tohoto důvodu esterům dominuje ethylester. Mezi další estery, které se v sýrech nacházejí, patří methylester, propylester a butylester. Thioestery jsou sloučeniny vznikající reakcí FFA se sirnými sloučeninami (obvykle s methanthiolem) [9, 10, 30].

Laktony jsou cyklické sloučeniny vznikající intramolekulární esterifikací hydroxykyselin, jejichž dehydratací vzniká cyklická struktura. α-laktony a β-laktony jsou velmi reaktivní, zatímco γ-laktony a δ-laktony jsou poměrně stálé a vyskytují se v sýrech. Laktony jsou silně aromatické a podílí se na celkové chuti sýrů. Produkce laktonů v sýrech v průběhu zrání je limitována hladinou obsahu jejich prekurzorů – hydroxykyselin. Mléčná žláza má δ-oxidační systém pro katabolizmus mastných kyselin, takže oxidace v mléčné žláze je

zřejmě hlavním zdrojem prekurzorů laktonů. Množství produkce laktonů závisí na krmivu, ročním období, fázi laktace a chovu. Hydroxykyseliny mohou vznikat i redukcí ketonů. Laktony mohou vznikat i jiným způsobem než uvolněním hydroxykyselin z triacylglycerolu. Dodekalaktony mohou vznikat z nenasycených mastných kyselin s dlouhým řetězcem činností *P. roqueforti*, hydroxykyseliny mohou vznikat činností lipoxygenáz a dalších enzymů [30].

Metabolizmus FFA je významný zejména u sýrů s modrou plísní. Koncentrace laktonů u těchto sýrů je vyšší, pravděpodobně z důvodu rozsáhlé lipolýzy, která zde probíhá. FFA reagují za vzniku 2-methylketonů (alkan-2-onů). Množství produkce methylketonů závisí na několika faktorech, mezi které patří zejména teplota, fyziologický stav plísně a koncentrace prekurzorů FFA. I když bylo v sýru identifikováno 11 methylketonů, mezi ty nejčastější patří pentan-2-on, heptan-2-on a nonan-2-on. Methylketony mohou být redukovány činností enzymů *P. roqueforti* na odpovídající sekundární alkoholy [9, 17, 30, 33].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo zjistit změnu proteinového profilu přírodních sýrů eidamského typu v průběhu zrání za různých teplotních podmínek.

Pro dosažení cílů bylo třeba:

- Popsat technologii výroby sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou.
- Zabývat se mikrobiologickými a biochemickými reakcemi probíhajícími v sýrech během jejich zrání.

Pro zpracování praktické části diplomové práce bylo nutno naplnit tyto dílčí cíle:

- Sledovat proteinový profil v průběhu zrání sýrů za různých teplotních podmínek metodou SDS-PAGE.
- Výsledky statisticky vyhodnotit.
- Na základě teoretické části a výsledků praktické části formulovat závěry a doporučení.

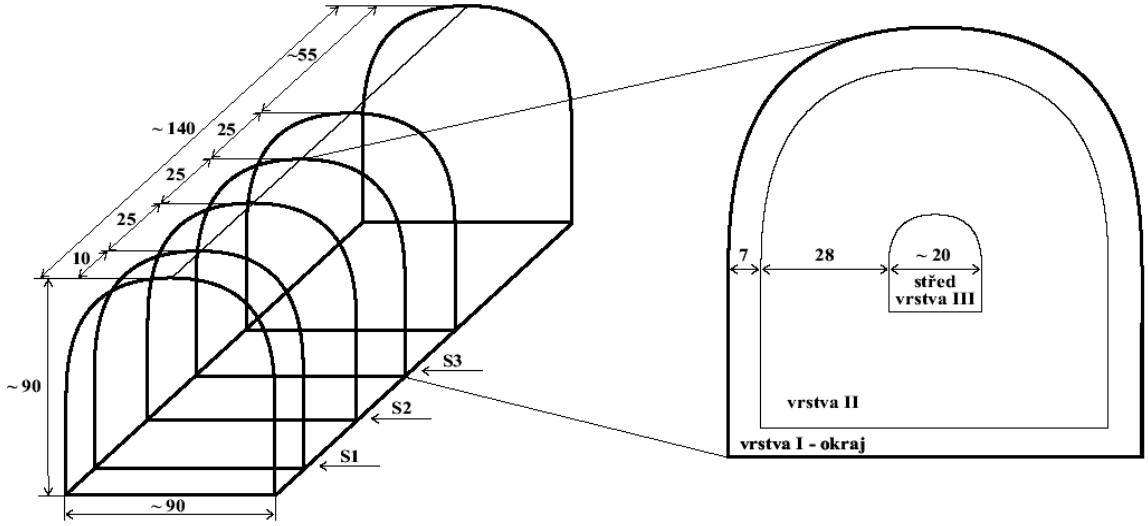
4 MATERIÁL A METODY

4.1 Rozdělení experimentů

V praktické části byly provedeny dva experimenty simulující zrání sýrů eidamského typu za odlišných skladovacích podmínek. Proteinové profily sýrů skladovaných v lednici a v temperované komoře byly srovnávány s proteinovým profilem těchto sýrů skladovaných ve zracím sklepě.

4.2 Experiment I

Ve spolupráci s výrobcem přírodních sýrů byl založen zrací pokus se sýrem s nízkodohřívanou sýřeninou (eidamského typu) o obsahu tuku v sušině 30 %. Z dané šarže bylo odebráno 42 cihel. Cihly (1,33 ± 0,05 kg) byly po uzavření do cryovacového obalu uloženy do zracího sklepa s teplotou 10 ± 2 °C. Po 23 dnech (od počátku výroby) bylo 14 cihel z každé šarže přemístěno ze sklepu do lednice (5 ± 1 °C), kde probíhalo další skladování. Zbylá část cihel z každé šarže (kontrolní vzorky) zůstala po celou dobu pokusu ve zracím sklepě (celkem 126 dnů). Odběry vzorků ze sklepa (a později i z lednice) byly realizovány v 0., 3., 6., 10., 13., 27., 34., 41., 55., 69., 83., 97., 115. a 126. dnu od počátku výroby (v den 0 byly sýry vyrobeny, vylisovány a uloženy do solné lázně, v den 2 byly sýry vyjmuty ze solné lázně, zabaleny do cryovacového obalu a uloženy do zracího sklepu). Z každé cihly byl nejprve odkrojen 10 mm plát a následně byly odebrány 3 pláty (tloušťka 25 mm) označené S1, S2 a S3, které byly dále rozděleny na 3 vrstvy: vrstvu I - 7 mm, vrstvu II - 28 mm a vrstvu III, kterou tvořil střed sýra o rozměrech přibližně 20 x 20 mm. Byla provedena analýza všech tří plátů (S1, S2 a S3) a dvou vrstev (I a III). Od 41. dne po výrobě byla provedena jak anylýza vzorků uchovávaných ve zracím sklepě (označení S), tak vzorků uložených v lednici (označení L). Nákres vzorkování je uveden na obrázku 4. Po odběru byly vzorky nastrouhány a lyofilizovány z důvodu dalšího uchovávání.



Obr. 4. Schematické znázornění odběru tří plátů a jeho rozdělení na tři vrstvy (rozměry jsou uvedeny v mm) [40]

4.3 Experiment II

U druhého experimentu bylo od stejného výrobce (Eidamská cihla, 30 % tuku v sušině) z jedné šarže odebráno 24 cihel (1,38 ± 0,12 kg) a uloženo do zracího sklepu na 10 ± 2 °C. Čtvrtý den po výrobě bylo 10 cihel z dané šarže přesunuto do temperované komory (16 ± 2 °C) pro akceleraci zrání. Zbývající sýry zrály při teplotě 10 ± 2 °C a sloužily pro srovnání jako kontrolní vzorky. Odběry vzorků ze zracího sklepa byly realizovány v 1., 3., 7., 14., 42., 70. a 126. dni od počátku výroby. U experimentu II byla provedena opět anylýza tří plátů označených S1, S2 a S3 ve dvou vrstvách: vrstva I a vrstva III. Analýza byla provedena ve dnech: 1, 3, 7, 14, 42, 70 a 126. Od 7. dne po výrobě byla provedena jak anylýza vzorků uchovávaných ve zracím sklepě (označení S), tak vzorků přemístěných do temperované komory (označení A). Vzorkování (rozdělení na pláty, resp. vrstvy) bylo shodné s předchozím experimentem. Po odběru byly vzorky nastrouhány a lyofilizovány z důvodu dalšího uchovávání.

4.4 Stanovení proteinového profilu metodou SDS-PAGE

Pro vlastní stanovení bylo třeba vzorek upravit k analýze. Do čisté zkumavky byl navážen 1 g vzorku sýra, do kterého byly následně přidány 3 ml deionizované vody. Poté byly vzorky inkubovány v termostatu (inkubátoru) po dobu 4 hodiny při teplotě 40 °C. Následně byly zkumavky vloženy do centrifugy a centrifugovány 5 minut při 6 000 ot./min. Z takto upraveného vzorku bylo odpipetováno 100 µl vzorku z prostřední části zkumavky (bez tuku z horní části a sedliny ze spodní části) do eppendorfky. Ke vzorku pak bylo přidáno

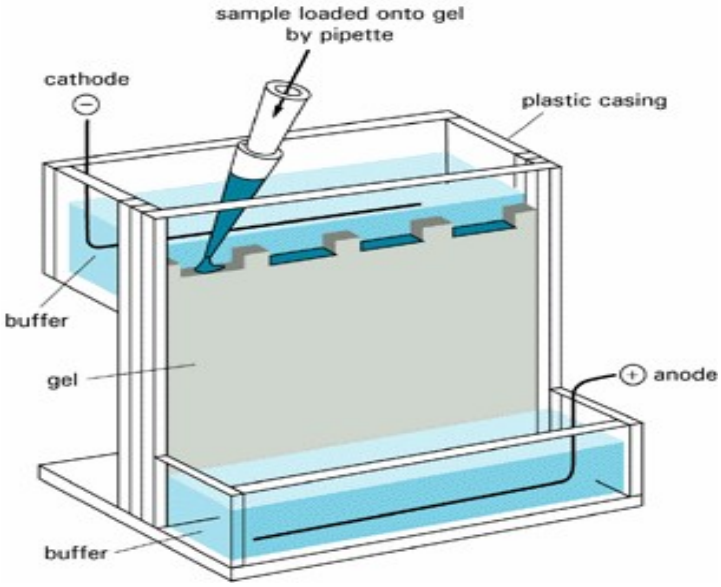
25 µl 20% SDS, 12,5 µl merkaptoetanolu a vzorkový pufr v objemu 115 µl. Směs v eppendorfce byla promíchána a 10 minut inkubována. Vzorky byly uchovány při mrazírenských teplotách až do vlastní analýzy.

Pro vlastní analýzu byla použita vertikální elektroforetická aparatura (Bio-Rad). Tato aparatura slouží pro dva gely současně. Složení roztoků a gelů pro SDS-PAGE je uvedeno v příloze P 3.

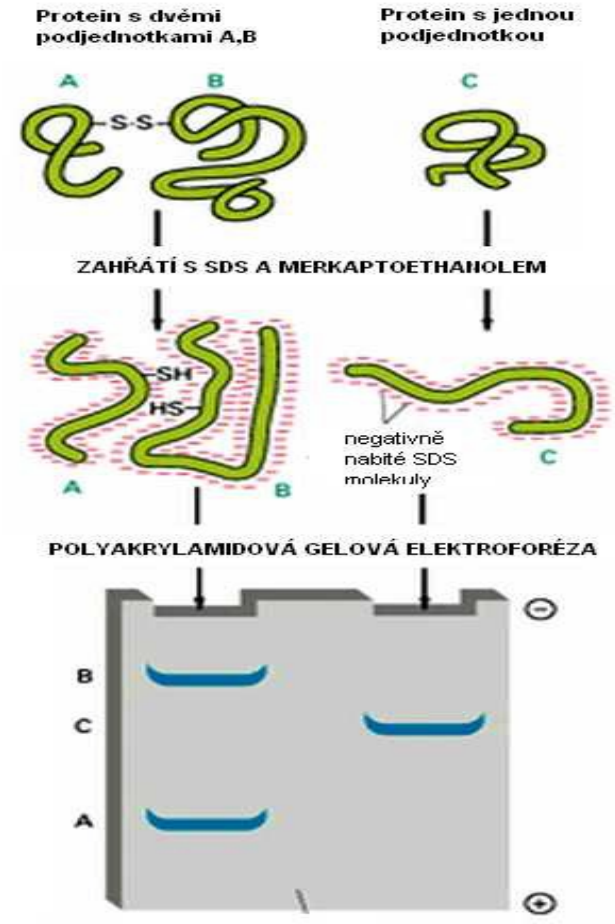
Pro separaci byl zvolen 17% separační gel. Po promíchání všech komponent pro 17% gel byl roztok ihned aplikován pomocí pipety mezi skla do takové výšky, aby od horního okraje skla byl volný prostor asi 3 cm a aby nedošlo ke vzniku bublin. Pro zamezení polymerace na vzduchu a získání hladkého povrchu se gel převrstvil malým množstvím vody. Gel polymeroval při pokojové teplotě asi 60 minut. Po této době byla voda pro zabránění polymerace na vzduchu vylita (odsáta filtračním papírem) a byl připraven 5% koncentrační gel, kterým se pak převrstvil ztuhlý separační gel. Koncentrační gel se aplikoval až těsně pod horní hranu skla. Do nalitého roztoku 5% gelu byl opatrně vsunut plastový hřeben pro vytvoření jamek, z prostoru hřebene bylo nutno odstranit všechny vzduchové bubliny. Polymerace pak probíhala do druhého dne ve vlhké komůrce při pokojové teplotě.

Druhý den byl z gelu hřeben opatrně vyjmut. Skla byla přenesena do aparatury a do spodního prostoru aparatury byl nalit elektrodový pufr, ten byl také nalit do horní části vany tak, aby došlo k převrstvení jamek tímto pufrem, což je důležité pro nanášení vzorků. Vzorky byly nanášeny pomocí pipety v množství 20 µl, kromě vzorků proteinů byl nanášen pomocí pipety i molekulový hmotnostní standard v množství 7,5 µl. Po zaplnění všech jamek vzorky a standardem byla aparatura připravená ke spuštění. Díky svým vlastnostem vyžaduje každý gel odlišné podmínky. Pro putování proteinů v koncentračním gelu byla nastavena hodnota proudu 40 mA. Jakmile proteiny doputovaly k separačnímu gelu, byla hodnota proudu zvýšena na 60 mA. Když čelo elektroforézy doputovalo ke spodní hranici separačního gelu, elektroforéza byla ukončena. Elektroforéza trvala asi 1,5 hodiny. Poté byla od sebe opatrně oddělena skla, mezi kterými se nacházel gel, následně se odstranil koncentrační gel. Separační gel byl fixován ve fixačním roztoku po dobu 30 minut. Po odstranění fixačního roztoku byl gel opláchnut destilovanou vodou. Následně byl barven pomocí barvícího roztoku alespoň 1 hodinu, po odstranění barvícího roztoku byl gel opět opláchnut destilovanou vodou. Barvící roztok je možné používat několikanásobně. Odbarvení gelu pomocí odbarvovacího roztoku probíhalo do druhého dne. Fixace, barvení

i odbarvování gelů se provádělo jednotlivě v samostatných miskách. Složení fixačního, barvícího i odbarvovacího roztoku je uvedeno v příloze P 3.



Obr. 5. Nanášení vzorků na gel [39]



Obr. 6. Princip SDS-PAGE separace [44]

4.5 Hodnocení gelů

Gely byly sejmuty digitálním fotoaparátem Olympus Camedia C-4000 ZOOM (Olympus, Japonsko) s objektivem Pentax C31204 (Japonsko) v režimu MAKRO.

Následně byly snímky gelů analyzovány pomocí programu Bio-1D.

Byly použity 3 molekulové standardy – Protein Test Mixture 5 (výrobce SERVA) s definovanými molekulovými hmotnostmi proteinů 29; 21; 12,5 a 6,5 kDa, druhý použitý molekulový standard – SERVA Unstained SDS PAGE Protein Marker (výrobce SERVA) s definovanými molekulovými hmotnostmi proteinů 67; 45; 29; 21; 14,3 a 6,5 kDa a třetí standard – Protein Marker Broad Range (výrobce New England BioLabs) s definovanými molekulovými hmotnostmi proteinů 66,4; 42,7; 34,6; 27; 20; 14,3 a 6,5 kDa.

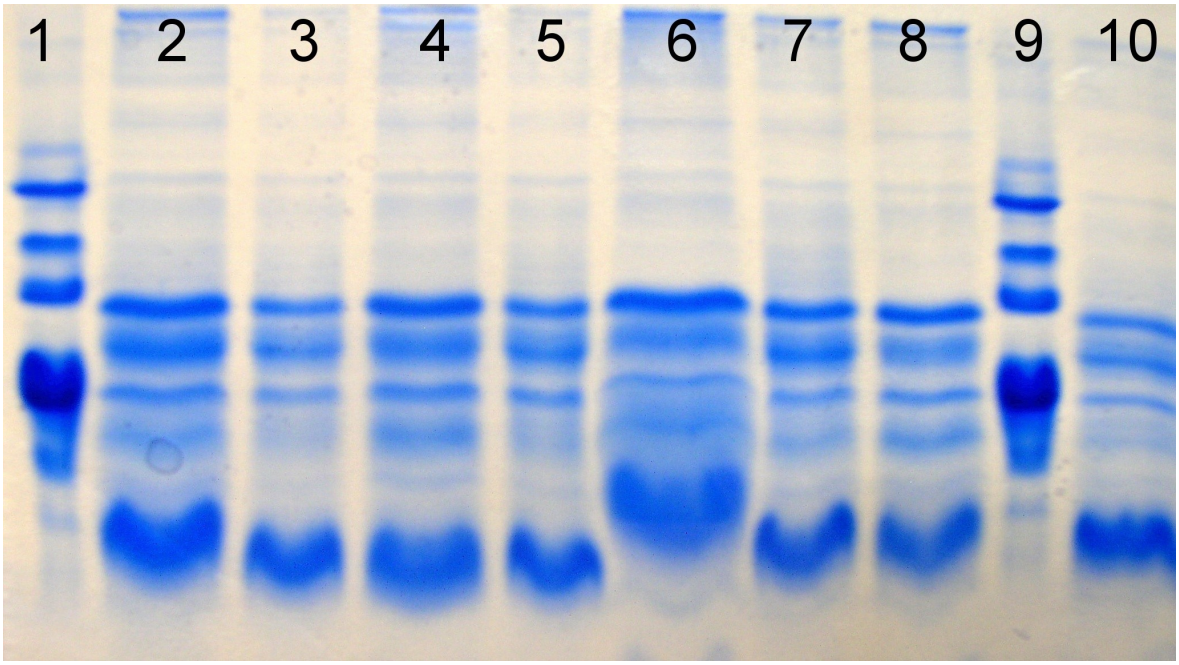
Po označení pozic jednotlivých bandů vzorků včetně molekulového standardu byly programem Bio-1D vypočteny hodnoty molekulových hmotností proteinových frakcí. Značení proteinů bylo provedeno manuálně a správnost označení daného proužku byla potvrzena přítomností píku v denzitometrické křivce dané dráhy.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Výsledky experimentu I

5.1.1 Výsledky stanovení proteinového profilu vzorků sýrů

Na obrázku 7 je zobrazen reprezentativní gel se sérií vzorků experimentu I, jedná se o vzorky uchované ve zracím sklepě jen po dobu několika dní. Do první a předposlední jamky byl pipetou nanesen standard o jednotlivých velikostech proteinů 6,5; 14,3; 21; 29; 45 a 67 kDa. Poté byly nanášeny vzorky. První číslo značí den zrání, S teplotu zrání (zrací sklep, 10 ± 2 °C), další číslo je označení plátu a vrstvy. Stejným způsobem byly naneseny všechny ostatní vzorky.



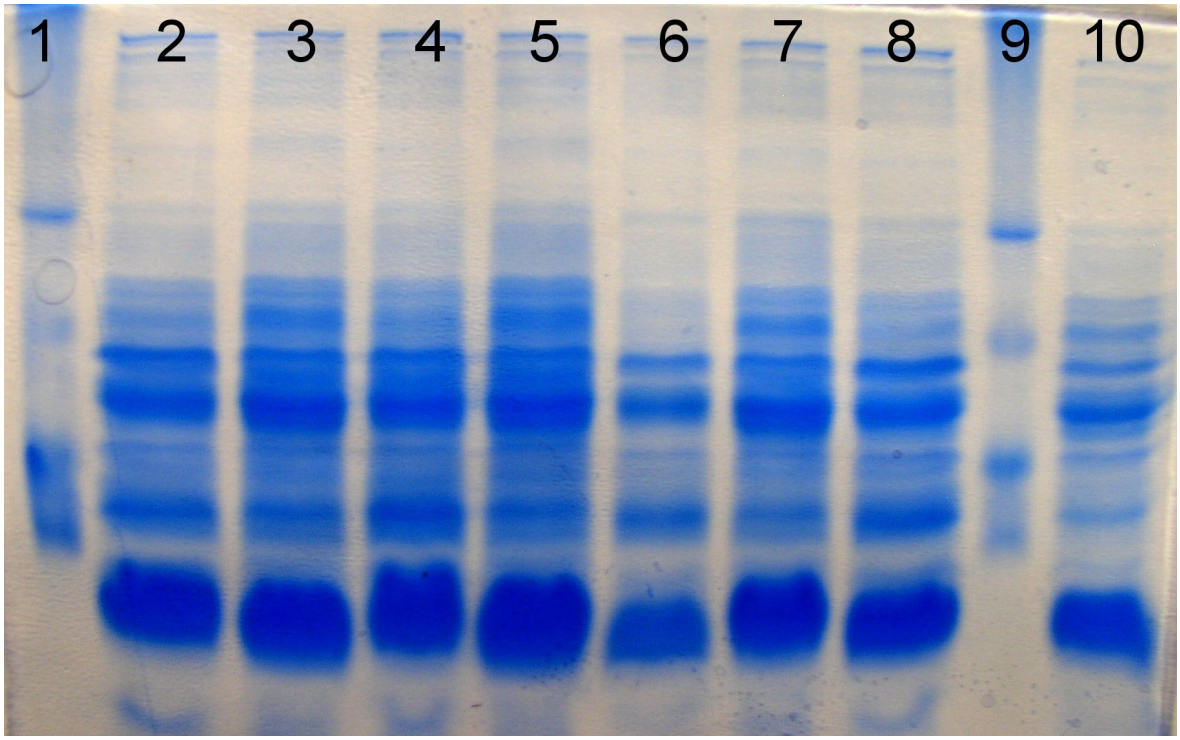
Obr. 7. Proteinový profil vzorků sýrů získaných metodou SDS-PAGE: ***1:*** *molekulový hmotnostní standard,* ***2:*** *10S21,* ***3:*** *10S23,* ***4:*** *10S31,* ***5:*** *10S33,* ***6:*** *13S11,* ***7:*** *13S13,* ***8:*** *13S21,* ***9:*** *molekulový hmotnostní standard,* ***10:*** *13S23*

Tab. 1. Srovnání profilu proteinů v jednotlivých dnech zrání, velikost proteinů v kDa

10S21	10S23	10S31	10S33	13S11	13S13	13S21	13S23
28,66	28,77	28,58	28,51	29,26	28,24	28,05	27,62
25,56	25,65	25,56	25,47	26,71	25,29	25,65	24,78
21,87	21,68	22,04	21,38	23,22	21,5	21,5	21,13
16,22	15,99	16,68	16,14	17,8	15,69	16,07	15,84
10,09	10,01	10,62	9,4	6,65	9,09	9,63	10,93

Z tabulky 1 je zřejmé, že u všech vzorků sýrů bylo identifikováno 5 proteinů s molekulovou hmotností v rozmezí 6,65 až 29,26 kDa.

Na obrázku 8 je opět zobrazen gel se sérií vzorků z experimentu I, tyto vzorky reprezentují 69. den zrání a jsou zde jak vzorky uložené ve zracím sklepě, tak vzorky, které byly přesunuty ve 23. dni zrání do lednice. Do první a předposlední jamky byl pipetou nanesen standard o jednotlivých velikostech proteinů 6,5; 12,5; 21 a 29 kDa. Poté byly nanášeny vzorky. První číslo značí den zrání, S a L teplotu zrání, další číslo je označení plátu a vrstvy.



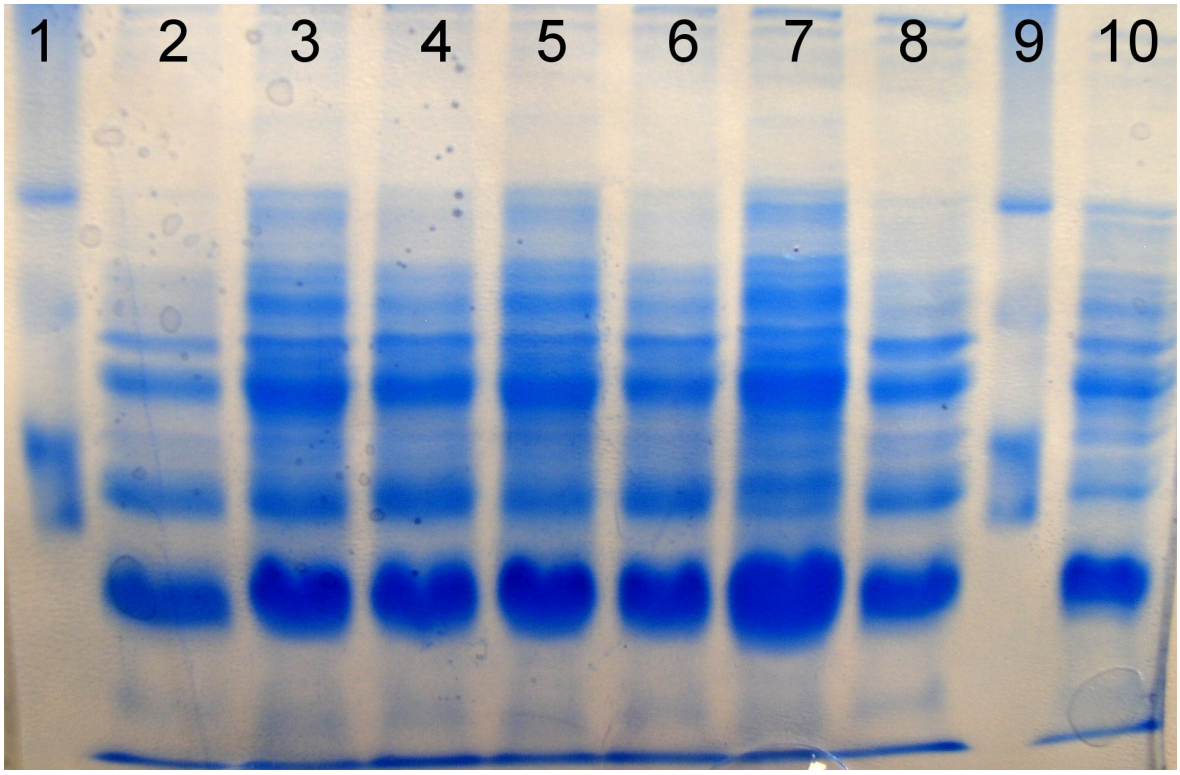
Obr. 8. Proteinový profil vzorků sýrů získaných metodou SDS-PAGE: ***1:*** *molekulový hmotnostní standard,* ***2:*** *69S21,* ***3:*** *69S23,* ***4:*** *69S31,* ***5:*** *69S33,* ***6:*** *69L11,* ***7:*** *69L13,* ***8:*** *69L21,* ***9:*** *molekulový hmotnostní standard,* ***10:*** *69L23*

Tab. 2. Srovnání profilu proteinů v jednotlivých dnech zrání, velikost proteinů v kDa

69S21	**69S23**	**69S31**	**69S33**	**69L11**	**69L13**	**69L21**	**69L23**
30,96	31,06	31,01	30,82	30,03	29,93	29,69	29,34
25,44	28,85	28,59	28,59	23,76	27,92	23,71	23,51
24,54	25,29	25,34	24,89	19,44	24,29	21,63	21,22
22,61	24,39	24,2	22,7	16,54	21,95	19,27	19,15
20,08	22,56	22,19	19,87	13,4	19,61	16,08	16,24
16,7	19,95	20,08	18,23	8,32	16,28	13,21	14,71
14,08	18,4	18,44	16,37		13,35	8,43	13,21
12,88	16,49	16,45	14,04		12,4		8,6
9,14	13,9	13,59	11,81		8,76		4,27
	8,71	11,2	9,03				
		8,76					

Z tabulky 2 vyplývá, že u těchto vzorků sýrů bylo identifikováno 6 – 11 proteinů s molekulovou hmotností v rozmezí 4,27 až 31,06 kDa. U vzorků sýrů uložených ve zracím sklepě bylo jednou zjištěno 9 proteinů, dvakrát 10 proteinů a jednou 11 proteinů (v rozmezí 8,76 až 31,01 kDa). U vzorků uložených v lednici je počet identifikovaných proteinů nižší: jednou bylo zjištěno pouze 6 proteinů, jednou 7 proteinů a dvakrát 9 proteinů.

Na obrázku 9 je zobrazen gel se sérií vzorků reprezentujích 97. den zrání a jsou zde jak vzorky uložené ve zracím sklepě, tak vzorky uložené v lednici. Do první a předposlední jamky byl pipetou nanesen standard o jednotlivých velikostech proteinů 6,5; 12,5; 21 a 29 kDa. Poté byly nanášeny vzorky.



Obr. 9. Proteinový profil vzorků sýrů získaných metodou SDS-PAGE: ***1:*** *molekulový hmotnostní standard,* ***2:*** *97S11,* ***3:*** *97S13,* ***4:*** *97S21,* ***5:*** *97S23,* ***6:*** *97S31,* ***7:*** *97S33,* ***8:*** *97L11,* ***9:*** *molekulový hmotnostní standard,* ***10:*** *97L13*

Tab. 3. Srovnání profilu proteinů v jednotlivých dnech zrání, velikost proteinů v kDa

97S11	**97S13**	**97S21**	**97S23**	**97S31**	**97S33**	**97L11**	**97L13**
29,78	29,91	30,04	29,91	29,65	30,17	29,13	28,59
28,15	28,68	28,54	28,22	28	28,86	23,63	25,29
26,34	26,27	24,36	24,41	24,1	25,16	21,59	23,67
23,84	24,28	21,84	22,28	21,75	23,93	19,52	21,59
21,84	21,84	19,78	19,63	19,56	22,28	16,75	19,41
19,45	19,52	16,79	16,71	18,13	20,04	13,2	15,21
16,98	18,26	14,13	15,2	16,71	18,78	11,7	13,5
14,99	16,44	13,64	13,35	13,11	17,06	7,79	12,05
13,2	13,01	11,27	12,62	10,58	14,29		8,46
11,78	11,47	8,16	7,24	7,42	13,25		
7,91	7,36				11,98		
					8,94		

Z tabulky 3 vyplývá, že u těchto vzorků sýrů bylo identifikováno 7 – 12 proteinů s molekulovou hmotností v rozmezí 7,24 až 30,17 kDa. U vzorků sýrů uložených ve zracím sklepě bylo třikrát zjištěno 10 proteinů, dvakrát 11 proteinů a jednou 12 proteinů (v rozmezí 8,94

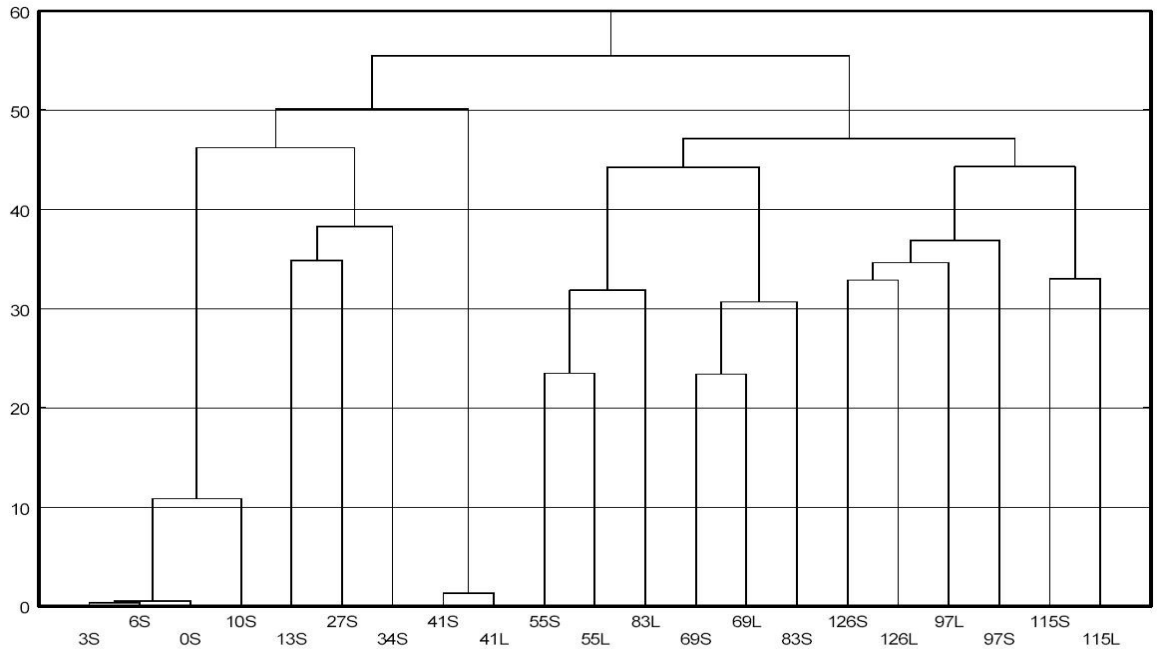
až 30,17 kDa). U vzorků uložených v lednici je počet identifikovaných proteinů nižší: jednou bylo zjištěno 8 a jednou 9 proteinů.

Z uvedených hodnot v tabulkách 1 – 3 vyplývá, že s rostoucí hodnotou dne zrání roste počet identifikovaných proteinů. Nejvíce proteinů bylo zjištěno v 97. dni zrání u plátu 3 a vrstvy III u vzorku uloženého ve zracím sklepě (viz výše). Dále jsme z tabulek 2 a 3 schopni rozeznat rozdíl mezi vzorky uloženými ve zracím sklepě a vzorky, které byly přesunuty do lednice, tzn., že byly předčasně vyskladněny a zrací proces nebyl dokončen. Rozdíly mezi jednotlivými pláty nebo vrstvami nejsou z těchto výsledků experimentu patrné.

5.1.2 Statistické vyhodnocení proteinového profilu ve vzorcích sýrů

Statistické vyhodnocení bylo provedeno v programu Unistat. Proteinové profily vzorků sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou získané metodou SDS-PAGE byly rozděleny do 4 skupin z důvodu velkého množství získaných dat a z důvodu jednoznačnějšího statistického vyhodnocení pomocí tzv. shlukové analýzy. Výsledkem této analýzy jsou tzv. dendrogramy.

1. Proteinový profil středů (vrstev III) třetích plátů (S3) všech analyzovaných vzorků.
2. Proteinový profil vzorků uložených ve zracím sklepě od počátku výroby do 34. dne zrání ve všech 3 plátech (S1, S2 i S3) a dvou vrstvách (vrstvy I a III).
3. Proteinový profil vzorků uložených ve zracím sklepě od 41. dne zrání do 126. dne zrání ve všech 3 plátech a dvou vrstvách.
4. Proteinový profil vzorků uložených v lednici od 41. dne zrání do 126. dne zrání ve všech 3 plátech a dvou vrstvách.



*Obr. 10. Dendrogram vyjadřující výsledky shlukové analýzy proteinového profilu středů (vrstev III) třetích plátů (S3) všech analyzovaných vzorků sýrů (na ose **x** jsou vyznačeny vzorky, na ose **y** vzdálenost)*

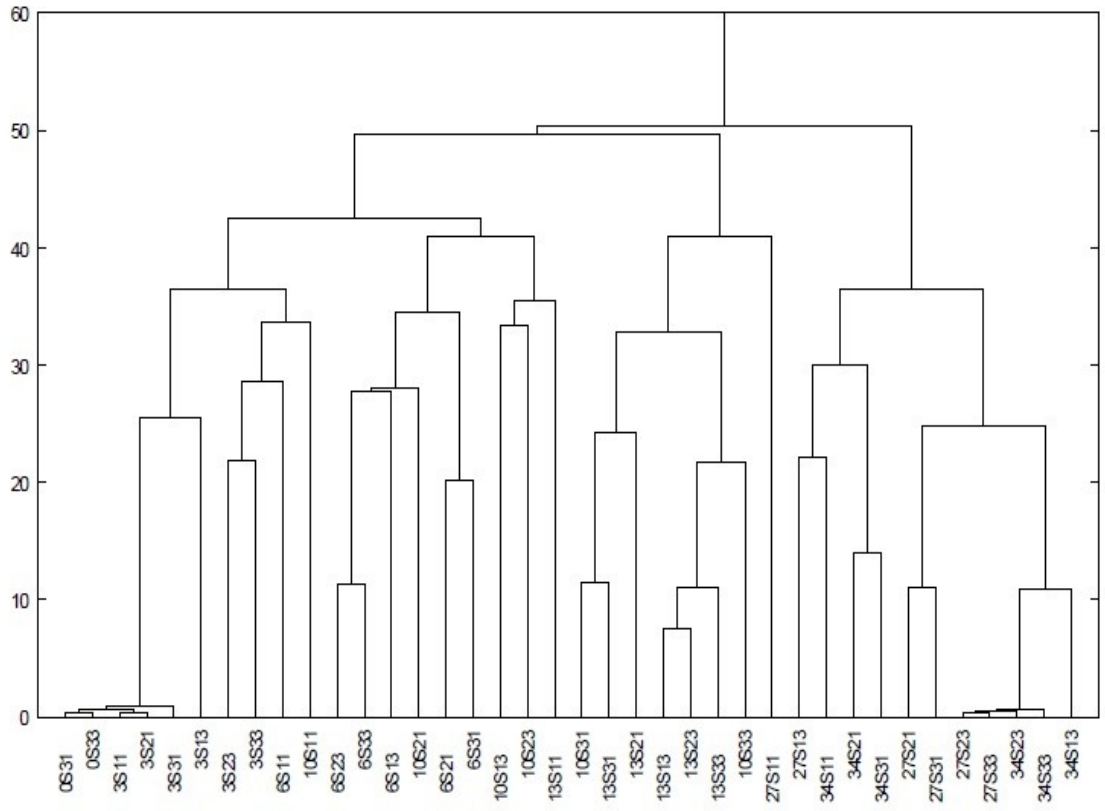
Z dendrogramu na obrázku 10 jsou patrné tři samostatné shluky. Jednotlivý shluk představuje vzorky sýrů, jejichž proteinové profily jsou si podobné či blízké.

Proteinové profily sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou ve 3. a v 6. dni po výrobě jsou téměř totožné, neliší se ani od proteinového profilu těchto sýrů ihned po výrobě (ve dni 0). Podobné jsou i vzorky sýrů 10 dnů po výrobě. Dá se tedy říci, že pokud se jedná o středy plátů sýrů, do 10. dne zrání probíhají biochemické změny ve všech plátech sýra podobně a také proteinové profily jsou si velmi podobné. Ve 13. dni po výrobě se proteinový profil sýrů mění a odlišuje se i od vzorků sýrů odebraných 27. i 34. den po výrobě. I z proteinových profilů vzorků těchto sýrů metodou SDS-PAGE je patrný nárůst množství proteinů, zejména těch s nižší molekulovou hmotností. Ve 13. dni po výrobě bylo identifikováno v průměru 5 proteinů, ve 34. dni už bylo identifikováno v průměru 7 proteinů. S předchozími vzorky jsou příbuzné i vzorky sýrů 41 dnů po výrobě. Proteinový profil vzorků sýrů 41 dnů po výrobě uložených ve zracím sklepě je velmi podobný proteinovému profilu vzorků sýrů 41 dnů po výrobě uložených v lednici.

K výraznějším změnám mezi sýry uloženými ve zracím sklepě a v lednici dochází, jak je patrné z dendrogramu, už v 55. dni po výrobě. Proteinové profily těchto sýrů se už od sebe

poněkud odlišují. Stejně lze hodnotit i vzorky v 69. dni po výrobě. Z předcházející analýzy proteinových profilů vzorků těchto sýrů metodou SDS-PAGE (viz výše) je patrné, že u sýrů uložených ve zracím sklepě bylo identifikováno větší množství proteinů než u sýrů uložených v lednici. Dochází zde tedy k intenzivnějším biochemickým změnám, které souvisí s průběhem zrání sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou. Příbuzné se vzorky sýrů 55 dnů po výrobě jsou vzorky sýrů 83 dnů po výrobě, které byly skladovány v lednici. Se vzorky sýrů 69 dnů po výrobě jsou příbuzné vzorky sýrů 83 dnů po výrobě, které byly skladovány ve zracím sklepě.

Ještě výraznější rozdíl v proteinovém profilu se objevuje u vzorků sýrů uložených ve zracím sklepě a v lednici 115 dnů po výrobě a 126 dnů po výrobě. Příbuzné se vzorky sýrů 126 dnů po výrobě jsou i vzorky sýrů 97 dnů po výrobě skladované v lednici, méně příbuzné pak jsou tyto vzorky se vzorky sýrů 97 dnů po výrobě, které byly skladovány ve zracím sklepě.



Obr. 11. Dendrogram vyjadřující výsledky shlukové analýzy proteinového profilu vzorků uložených ve zracím sklepě od počátku výroby do 34. dne zrání ve všech 3 plátech (S1, S2 i S3) a dvou vrstvách (vrstvy I a III)

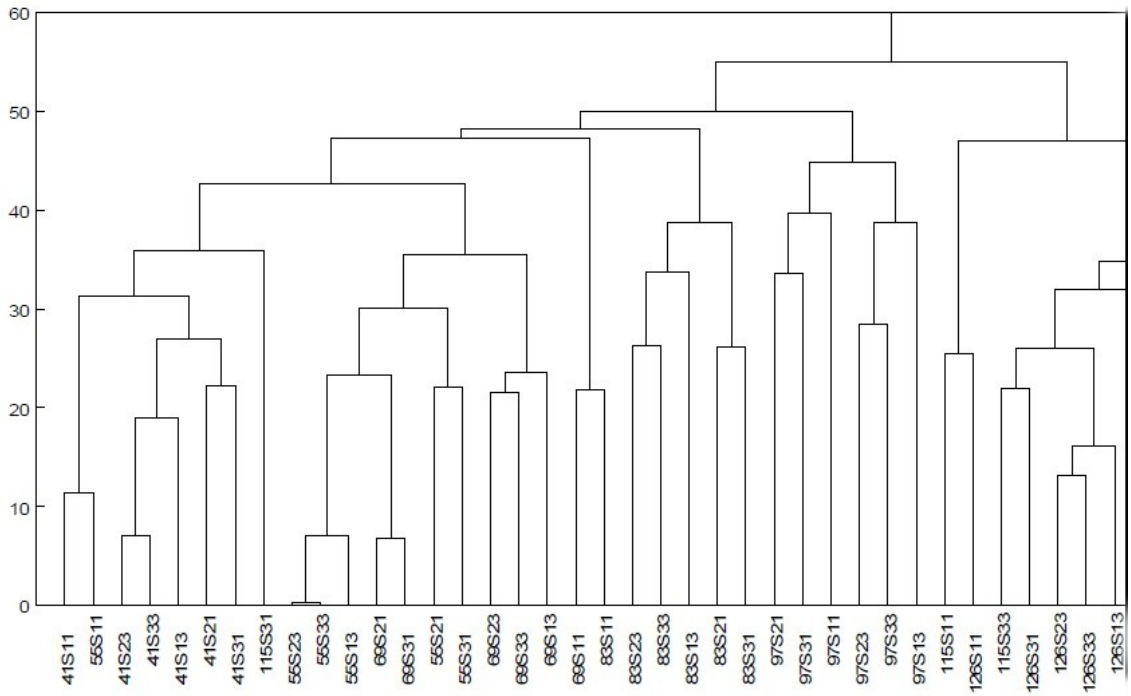
Z dendrogramu na obrázku 11 jsou patrny 4 hlavní shluky.

Proteinový profil všech vzorků odebraných ihned po výrobě (den 0) a vzorků všech plátů vrstvy I odebraných po 3 dnech zrání lze považovat za totožný. Podobný je i vzorek sýra 3 dny po výrobě u 1. plátu vrstvy III, tedy plátu, který je odebrán ze vzdálenosti 10 mm z okraje Eidamské cihly. Příbuzné s předchozími vzorky jsou i zbývající vzorky 3. dne zrání (3S23 a 3S33) a dále vzorky 6. a 10. dne zrání 1. plátu vrstvy I. Z toho je patrné, že v raném stupni zrání probíhá hydrolýza proteinů v povrchových vrstvách sýra pomaleji.

U druhého shluku jsou si nejvíce podobné vzorky sýrů 6 dnů po výrobě u plátů S2 a S3 vrstvy III, mírně se od těchto vzorků odlišuje vzorek stejného dne zrání a stejné vrstvy plátu S1 (tedy vzorek 6S13) a vzorek 10S21. Příbuzné s předchozími vzorky jsou i vzorky 6. dne zrání plátů S2 a S3 povrchové vrstvy I. Do tohoto shluku patří také, i když jsou už poněkud odlišné od předchozích, vzorky sýrů 10 dnů po výrobě plátů S1 a S2 vnitřní vrstvy III a vzorek sýra 13S11.

Další shluk je tvořen vzorky 10 dnů po výrobě třetích plátů obou vrstev I a III a vzorky 13 dnů po výrobě. Z tohoto shluku, stejně jako ze dvou předchozích, je patrná výraznější hydrolýza proteinů u plátu 2 a 3 než u plátu 1 a u vrstvy III než u vrstvy I.

U posledního shluku je viditelný v podstatě totožný proteinový profil vzorků 27. a 34. dne zrání plátů S2 a S3 vnitřní vrstvy III. Velmi podobný je i vzorek 34S13. V příbuznosti s těmito vzorky jsou vzorky 27. dne zrání plátů S2 a S3 povrchové vrstvy I, které jsou si navzájem značně blízké svým proteinovým profilem. Příbuzné s předchozími vzorky jsou a ke stejnému shluku patří i vzorky 27 a 34 dnů po výrobě plátu S1 vrstev I a III a vzorky 34 dnů po výrobě plátů S2 a S3 vrstvy I.



Obr. 12. Dendrogram vyjadřující výsledky shlukové analýzy proteinového profilu vzorků uložených ve zracím sklepě od 41. dne zrání do 126. dne zrání ve všech 3 plátech a dvou vrstvách

Z dendrogramu na obrázku 12 je patrno sedm shluků.

V prvním shluku mají nejvíce shodné proteinové profily vzorky 41S23 a 41S33, dalšími podobnými vzorky v tomto shluku jsou vzorky 41S11 a 55S11. Z toho je zřejmé, že v povrchových vrstvách, popř. ve vrstvách blíže k povrchu, probíhají biochemické procesy pomaleji než uvnitř sýra. Dále do tohoto shluku spadají a příbuzné s předchozími vzorky, co se proteinových profilů týká, jsou zbývající vzorky 41. dne zrání.

U dalšího shluku je viditelná totožnost proteinového profilu vzorků 55 dnů po výrobě plátů S2 a S3 vrstvy III. Tuto totožnost nebo příbuznost jsme u předchozích shluků v kratší době po výrobě (např. dny 34 a 41) již několikrát zaznamenali. Velmi podobný profil má i vzorek 55. dne zrání plátu S1 vrstvy III. Velmi podobné v tomto shluku jsou i vzorky 69S21 a 69S31. Dále ke shluku patří zbývající vzorky 55. dne zrání a vzorky 69. dne zrání všech plátů vrstvy III.

Samostatný shluk tvoří vzorek 69S11 a 83S11.

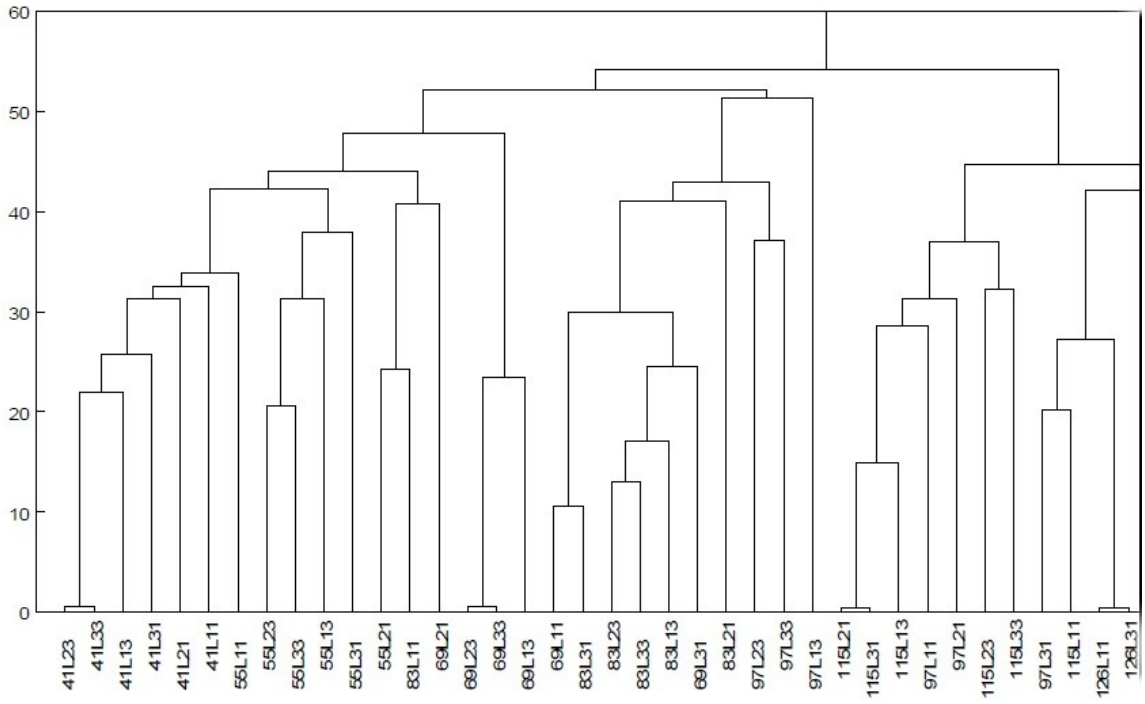
Čtvrtý shluk je tvořen vzorky 83. dne zrání, zřetelná příbuznost je mezi vrstvami III různých plátů a také mezi vrstvami I různých plátů. Vnitřní a povrchová vrstva sýrů se 83 dnů po výrobě v proteinovém profilu odlišují, i když patří do stejného shluku.

Následující shluk je tvořen vzorky 97. dne zrání. Opět jsou si podobné vrstvy I a vrstvy III

u jednotlivých plátů, jak tomu bylo u čtvrtého shluku, rozdíly mezi proteinovým profilem vnitřní a vnější vrstvy sýrů jsou však značnější.

Šestý, samostatný shluk, tvoří vzorky 115S11 a 126S11. Z toho je patrná jistá podobnost mezi vzorky prvního plátu první vrstvy, která se už objevila u vzorků v dřívějších dnech po výrobě (např. podobnost u dnů 41 a 55, 69 a 83).

Sedmý shluk tvoří zbývající vzorky 115. a 126. dne zrání. Je zde opět zřejmá podobnost mezi vrstvami I a vrstvami III jednotlivých plátů a také skutečnost, že při zrání uvnitř sýra dochází k výraznějším biochemickým změnám a změnám v proteinovém profilu než na povrchu sýra – příbuznost mezi vzorkem 115 dnů po výrobě plátu 3 vrstvy III a vzorkem 126 dnů po výrobě stejného plátu vrstvy I.



Obr. 13. Dendrogram vyjadřující výsledky shlukové analýzy proteinového profilu vzorků uložených v lednici od 41. dne zrání do 126. dne zrání ve všech 3 plátech a dvou vrstvách

Z tohoto dendrogramu jsou patrné 3 hlavní shluky.

U prvního shluku jsou téměř totožné vzorky 41. dne zrání plátů S2 a S3 vrstvy III (tedy vzorek 41L23 se vzorkem 41L33) a u 69. dne zrání vzorek 69L23 se vzorkem 69L33. V příbuznosti s nimi jsou i vzorek 41L13 u 41. dne zrání a vzorek 69L13 u 69. dne zrání. Z toho vyplývá podobný proteinový profil vrstvy III jednotlivých plátů v jednotlivých dnech zrání. V 55. dni zrání jsou rozdíly mezi vzorky plátů S2 a S3 vrstvy III větší, ale jsou stále podobné. Příbuzné, co se proteinových profilů týká, jsou v podstatě všechny vzorky sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou 41. dne zrání uložené v lednici, rozdíly mezi vrstvami I

a III nejsou zásadní. Do tohoto shluku patří i zbývající vzorky sýrů 55 dnů po výrobě a dále vzorky 69L21 a 83L11.

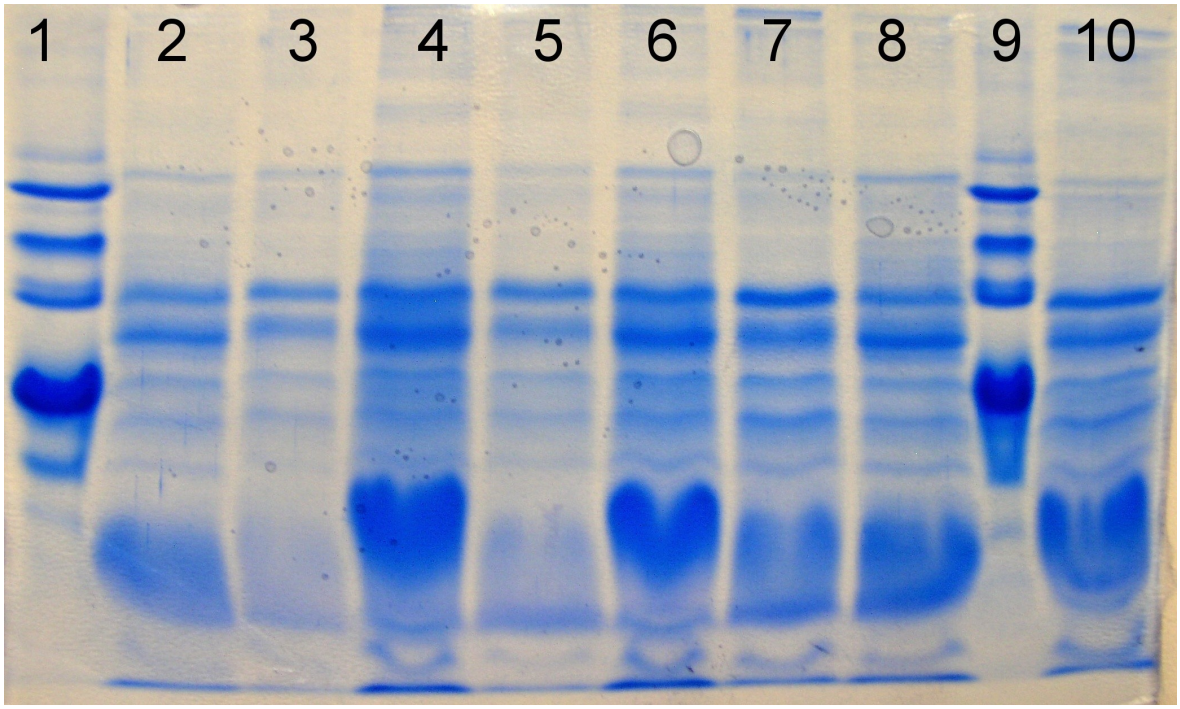
V dalším shluku jsou si nejvíce podobné vzorky 69L11 a 83L31 Dále jsou si podobné vzorky 83. dne zrání plátů S2 a S3 vrstvy III, příbuzný s těmito vzorky je i vzorek 83. dne zrání plátu S1 stejné vnitřní vrstvy a vzorek 69. dne zrání plátu S3 vrstvy I. Tato skutečnost ukazuje na opačný jev než u sýrů zrajících ve zracím sklepě, a to rychleji probíhající hydrolýzu proteinů na povrchu než uvnitř sýrů. Ve středu sýra uloženého v lednici tedy neprobíhají během zrání tak intenzivní biochemické procesy jako u sýra uloženého ve zracím sklepě a proces zrání středové části je zpomalen. V 97. dni zrání jsou rozdíly mezi jednotlivými pláty vrstvy III výraznější.

U třetího shluku jsou téměř totožné vzorky 115. dne zrání plátů S2 a S3 vrstvy I (tedy vzorek 115L21 se vzorkem 115L31) a vzorky 126. dne zrání plátů S1 a S3 vrstvy I (tedy vzorek 126L11 se vzorkem 126L31). Podobnost je mezi vzorky 97L31 a 115L11 a mezi vzorky 115L23 a 115L33. Ke shluku patří i zbývající vzorky 115. a 126. dne zrání.

5.2 Výsledky experimentu II

5.2.1 Výsledky stanovení proteinového profilu vzorků sýrů

Na obrázku 14 je zobrazen gel se sérií vzorků experimentu II, tyto vzorky reprezentují 7. den zrání a jsou zde jak vzorky uložené ve zracím sklepě, tak vzorky, které byly přesunuty ve 4. dni zrání do temperované komory. Do první a předposlední jamky byl pipetou nanesen standard o jednotlivých velikostech proteinů 6,5; 14,3; 21; 29; 45 a 67 kDa. Poté byly nanášeny vzorky. První číslo značí den zrání, S a A teplotu zrání, další číslo je označení plátu a vrstvy.



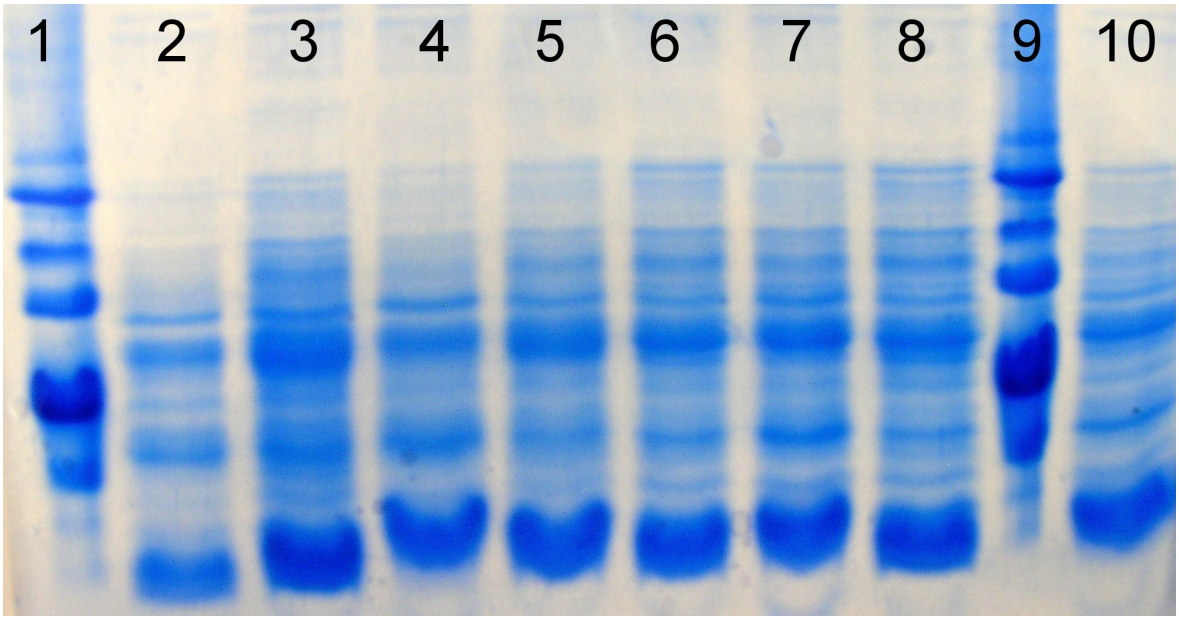
Obr. 14. Proteinový profil vzorků sýrů získaných metodou SDS-PAGE: 1: molekulový hmotnostní standard, 2: 7S23, 3: 7S31, 4: 7S33, 5: 7A11, 6: 7A13, 7: 7A21, 8: 7A23, 9: molekulový hmotnostní standard, 10: 7A31

Tab. 4. Srovnání profilu proteinů v jednotlivých dnech zrání, velikost proteinů v kDa

7S23	**7S31**	**7S33**	**7A11**	**7A13**	**7A21**	**7A23**	**7A31**
30,19	30,44	30,06	30,7	29,94	29,46	29,46	29
25,82	26,36	25,82	26,61	25,82	25,87	25,43	25,58
24,36	22,85	22,81	22,39	22,39	22,03	22,03	22,12
22,03	19,35	19,53	19,48	19,35	19,13	18,9	20,39
18,85	14,87	15,91	15,34	15,34	14,23	14,37	18,76
14,66				3,58			14,52

Z tabulky 4 vyplývá, že u těchto vzorků sýrů bylo identifikováno 5 – 6 proteinů s molekulovou hmotností v rozmezí 3,58 až 30,7 kDa. U vzorků sýrů uložených ve zracím sklepě bylo jednou zjištěno 6 proteinů a dvakrát 5 proteinů. U vzorků uložených v temperované komoře bylo zjištěno dvakrát 6 proteinů a třikrát 5 proteinů. Množství identifikovaných proteinů v 7. dni zrání u vzorků uložených ve zracím sklepě je stejné se vzorky přemístěnými do temperované komory.

Na obrázku 15 je zobrazen gel se sérií vzorků reprezentujích 70. den zrání. Do první a předposlední jamky byl pipetou nanesen standard o jednotlivých velikostech proteinů 6,5; 14,3; 21; 29; 45 a 67 kDa.



Obr. 15. Proteinový profil vzorků sýrů získaných metodou SDS-PAGE: 1: molekulový hmotnostní standard, 2: 70A23, 3: 70A31, 4: 70A33, 5: 70S11, 6: 70S13, 7: 70S21, 8: 70S23, 9: molekulový hmotnostní standard, 10: 70S31

Tab. 5. Srovnání profilu proteinů v jednotlivých dnech zrání, velikost proteinů v kDa

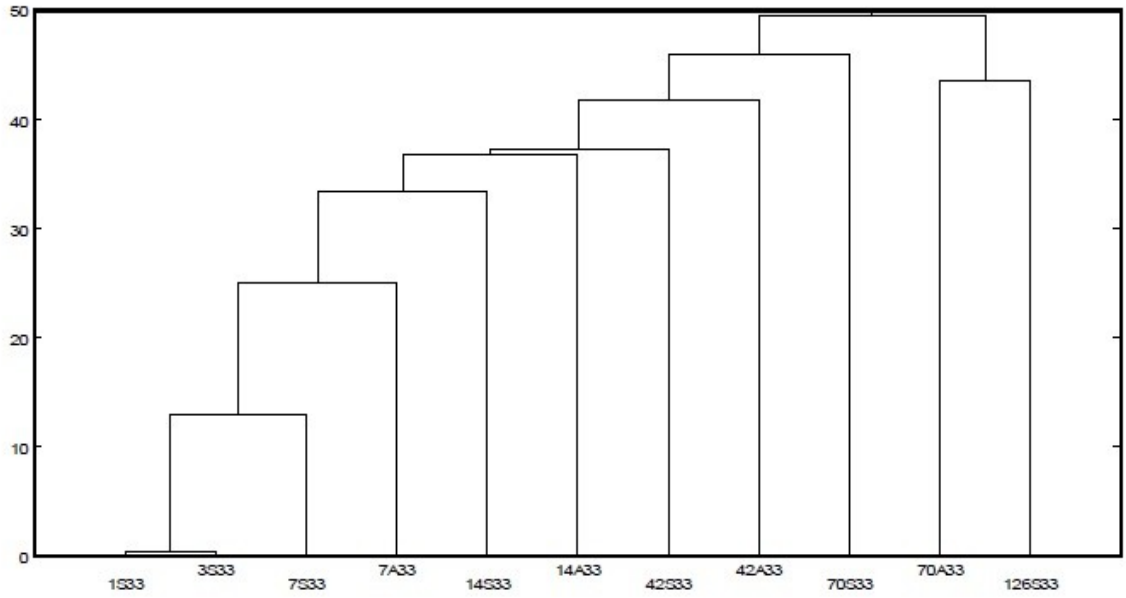
70A23	**70A31**	**70A33**	**70S11**	**70S13**	**70S21**	**70S23**	**70S31**
28,37	28,74	30,55	30,42	31,47	31,47	31,47	27,11
26,82	26,7	28,5	28,42	28,83	28,79	28,9	25,2
25,03	25,14	26,33	25,81	26,28	26,44	26,54	23,29
20,85	21,2	22,29	22,59	22,29	22,59	22,39	21,2
18,42	18,93	20,61	20,51	18,05	18,26	18,31	19,44
15,88	16,39	17,67	17,67	12,66	13,3	13,3	15,49
11,29	5,8	12,5	4,48	4,4	7,26	4,4	8,1
5,62		5,8					

U těchto vzorků sýrů bylo identifikováno 7 – 8 proteinů s molekulovou hmotností v rozmezí 4,4 až 31,47 kDa. U vzorků sýrů uložených ve zracím sklepě bylo v pěti případech zjištěno shodně 7 proteinů. U vzorků uložených v temperované komoře bylo zjištěno jednou 7 proteinů a dvakrát 8 proteinů. Množství identifikovaných proteinů v 70. dni zrání u vzorků uložených ve zracím sklepě je mírně nižší než u vzorků uložených v temperované komoře.

5.2.2 Statistické vyhodnocení proteinového profilu ve vzorcích sýrů

Výsledky proteinového profilu vzorků sýrů experimentu II byly rozděleny do 3 skupin.

1. Proteinový profil středů (vrstev III) třetích plátů (S3) všech analyzovaných vzorků.
2. Proteinový profil všech vzorků uložených ve zracím sklepě ve všech 3 plátech (S1, S2 i S3) a dvou vrstvách (vrstvy I a III).
3. Proteinový profil všech vzorků uložených v temperované komoře ve všech 3 plátech a dvou vrstvách.

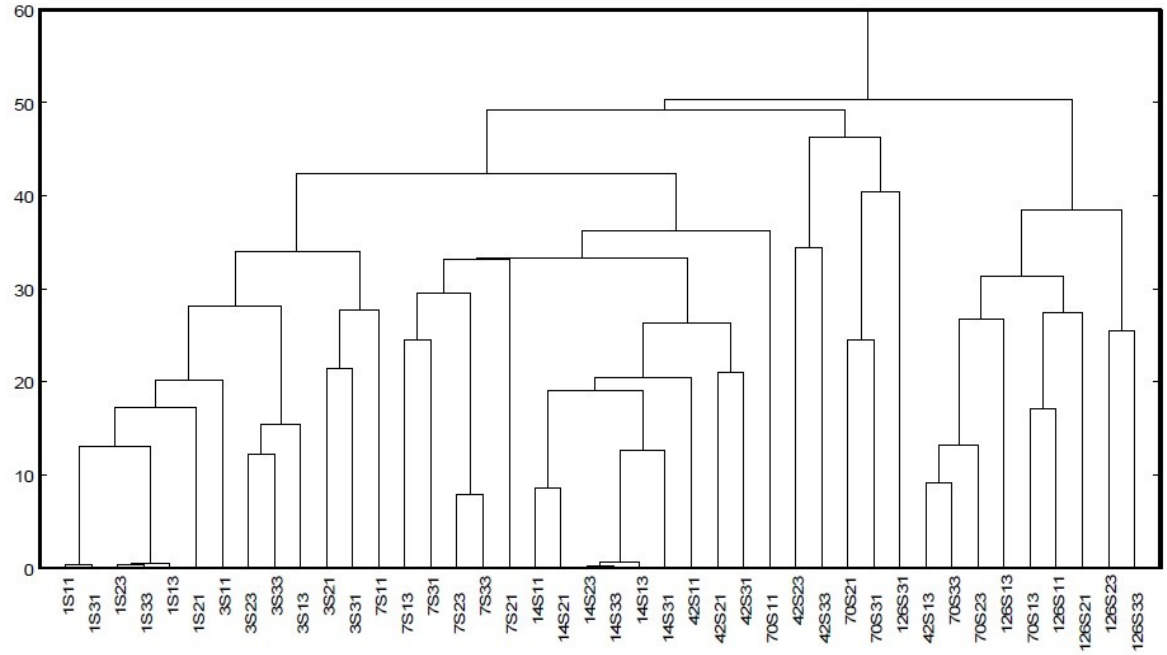


Obr. 16. Dendrogram vyjadřující výsledky shlukové analýzy proteinového profilu středů (vrstev III) třetích plátů (S3) všech analyzovaných vzorků sýrů

Z dendrogramu na obrázku 16 je patrný pouze jeden shluk.

Proteinové profily sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou v 1. a v 3. dni po výrobě jsou téměř totožné, výrazně se neliší ani od proteinového profilu těchto sýrů 7 dnů po výrobě uložených ve zracím sklepě. Podstatně více se od proteinového profilu těchto vzorků odlišuje už vzorek 7 dnů po výrobě, který byl přeložen do temperované komory. Dá se tedy říci, že pokud se jedná o středy plátů sýrů, do 3. dne po výrobě jsou probíhající biochemické změny ve všech plátech sýra podobné a také proteinové profily jsou si velmi podobné. 7 dnů po výrobě jsou už patrné menší změny mezi vzorky uloženými ve zracím sklepě a vzorky uloženými v temperované komoře, u nichž pravděpodobně dochází

k intenzivnějším biochemickým změnám v průběhu zrání. Dále jsou si nejbližší, co se proteinového profilu týká, vzorek 14. dne zrání zrající v temperované komoře (14A33) se vzorkem 42. dne zrání zrajícím ve zracím sklepě (42S33) a vzorek 70A33 se vzorkem 126S33. Z toho lze usuzovat, že u vzorků sýrů uložených v temperované komoře probíhá proces zrání rychleji než u vzorků sýrů uložených ve zracím sklepě.



Obr. 17. Dendrogram vyjadřující výsledky shlukové analýzy proteinového profilu všech vzorků uložených ve zracím sklepě ve všech 3 plátech (S1, S2 i S3) a dvou vrstvách (vrstvy I a III)

Z dendrogramu na obrázku 17 jsou patrné 4 shluky.

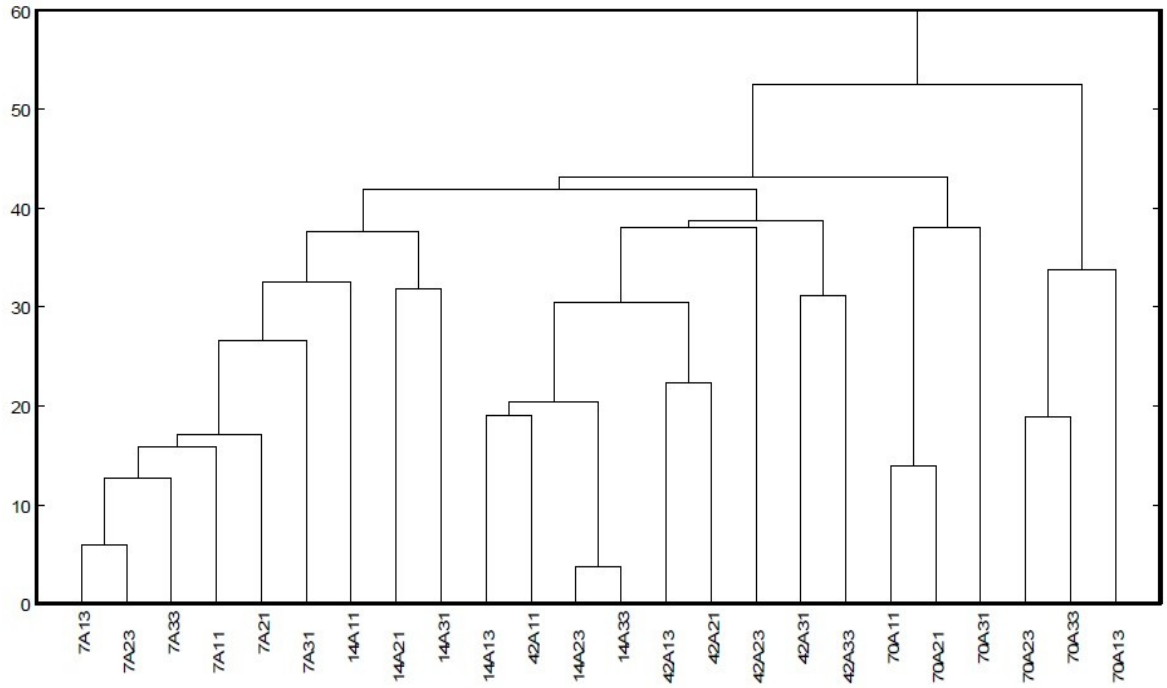
Do prvního shluku patří všechny vzorky sýrů 1 a 3 dny po výrobě a vzorek 7 dnů po výrobě prvního plátu první vrstvy. V podstatě totožné jsou vzorky 1S11 a 1S31 a dále vzorky všech tří plátů (S1, S2 a S3) vrstvy III . Povrchová vrstva I a středová vrstva III se od sebe navzájem mírně odlišují. Co se týče 3. dne zrání, opět jsou si vzorky všech tří plátů vrstvy III podobné, první plát se mírně odlišuje. Méně podobné proteinové profily mají vzorky 3S21 a 3S31, příbuzný s těmito vzorky je i vzorek 7. dne zrání 7S11.

Ve druhém shluku mají totožný proteinový profil vzorky 14. dne zrání všech tří plátů vrstvy III. Podobný těmto vzorkům je i vzorek 14. dne zrání plátu S3 vrstvy I. Dále jsou si podobné vzorek 7S23 se vzorkem 7S33 a vzorek 14S11 se vzorkem 14S21. Proteinové profily všech vzorků 14. dne zrání uložených ve zracím sklepě jsou podobné proteinovému

profilu vzorku 42. dne zrání plátu S1 první vrstvy, v příbuznosti s těmito vzorky jsou také vzorky 42S21 a 42S31. Dále k tomuto shluku patří vzorek 70. dne zrání plátu S1 vrstvy I (70S11). Z těchto skutečností vyplývá, že v povrchových vrstvách, popř. ve vrstvách blíže k povrchu, probíhají biochemické procesy pomaleji než uvnitř sýra, jak jsme zaznamenali i u experimentu I.

Ke třetímu shluku patří vzorky 42S23 a 42233, 70S21 a 70S31, příbuzný s těmito vzorky je a k tomuto shluku patří i vzorek 126S31.

U posledního shluku mají nejvíce podobný proteinový profil vzorky 42S13 a 70S33, v příbuznosti s těmito vzorky je i vzorek 70S23, odlišnější proteinový profil od těchto vzorků má vzorek 126S13. Dále jsou si podobné vzorky 70. dne zrání plátu S1 vrstvy III se vzorkem 126. dne zrání plátu S1 vrstvy I, v příbuznosti s těmito vzorky je také vzorek 126. dne zrání plátu S2 vrstvy I. Ke čtvrtému shluku patří i vzorky 126S23 a 126S33, které jsou si také podobné, co se proteinového profilu týká.



Obr. 18. Dendrogram vyjadřující výsledky shlukové analýzy proteinového profilu všech vzorků uložených v temperované komoře ve všech 3 plátech a dvou vrstvách

Z dendrogramu na obrázku 18 jsou patrné 4 shluky.

K prvnímu shluku patří všechny vzorky sýrů 7 dnů po výrobě, nejpodobnější proteinový profil mají vzorky 7A13 a 7A23, dále k tomuto shluku patří vzorky sýrů 14 dnů po výrobě

všech plátů vrstvy I. Z tohoto shluku je patrná výraznější hydrolýza proteinů vrstvy III než u vrstvy I.

K dalšímu shluku patří zbývající vzorky sýrů 14 dnů po výrobě, tedy vzorky všech plátů vrstvy III, nejpodobnější proteinový profil mají vzorky 14A23 a 14A33. Dále ke shluku patří všechny vzorky sýrů 42. dne zrání. Podobný proteinový profil mají vzorek 14A13 se vzorkem 42A11 a vzorek 42A13 se vzorkem 42A21.

Ke třetímu shluku patří vzorky 70. dne zrání všech plátů vrstvy I, shodnější proteinový profil mají vzorky 70A11 a 70A21.

Ke čtvrtému shluku patří vzorky 70. dne zrání všech plátů vrstvy III, shodnější proteinový profil mají vzorky 70A23 a 70A33. Z posledních dvou shluků vyplývá podobnost mezi jednotlivými pláty vrstvy I a vrstvy III. Vzorky sýrů 70. dne zrání vrstvy I jsou si navzájem podobné, stejně jako vzorky sýrů 70. dne zrání vrstvy III. Co se týče plátů, objevuje se zde rozdíl v proteinovém profilu, zejména mezi plátem S1 a S3.

5.3 Diskuze

Cílem této diplomové práce bylo zjistit změnu proteinového profilu přírodních sýrů eidamského typu v průběhu zrání za různých teplotních podmínek metodou SDS-PAGE.

Byly provedeny dva experimenty. U prvního z nich byly zkoumány rozdíly mezi vzorky sýrů eidamského typu uloženými ve zracím sklepě (10 ± 2 °C) po celou dobu experimentu a vzorky stejného typu sýrů přeloženými po 23 dnech zrání do lednice (5 ± 1 °C) z důvodu simulace předčasného vyskladnění. U druhého experimentu byly srovnávány vzorky sýrů eidamského typu uložené ve zracím sklepě se vzorky přeloženými po 4 dnech zrání do temperované komory (16 ± 2 °C) z důvodu akcelerace zrání.

U přírodních sýrů eidamského typu uložených ve zracím sklepě se předpokládalo větší rozpětí profilu proteinů než u stejného typu sýrů přeložených po 23 dnech zrání do lednice. U sýrů skladovaných v lednici se předpokládal zpomalený proces zrání z důvodu působení nízké teploty. Tyto předpoklady byly potvrzeny pokusem.

V proteinovém profilu přírodních sýrů eidamského typu se vyskytují i proteiny s molekulovými hmotnostmi nad 26 kDa, což může být způsobeno zbytky proteinů syrovátky, které ve skutečnosti všechny neodejdou, popř. mikroorganismy (mikrobiálními proteiny) přítomnými v sýru.

Při statistickém vyhodnocení experimentu I byly proteinové profily získané metodou SDS-PAGE nejprve rozděleny na 4 skupiny a poté každá skupina byla zvlášť vyhodnocena metodou shlukové analýzy. Co se týká středů (tedy vrstvy III) jednotlivých plátů sýrů, do 10. dne zrání zde probíhají biochemické změny podobně a také proteinové profily jsou si velmi podobné. V následujících dnech zrání se proteinové profily začaly od sebe odlišovat a bylo zjištěno, že u sýrů uložených ve zracím sklepě došlo k intenzivnějším biochemickým změnám než u sýrů uložených v lednici. Tyto výsledky potvrzují, že pro správný průběh proteolýzy je zapotřebí optimálních teplotních podmínek. Dále byly také srovnávány jednotlivé pláty a vrstvy v jednotlivých dnech zrání. U sýrů uložených po celou dobu experimentu ve zracím sklepě byla prokázána výraznější hydrolýza proteinů u plátů 2 a 3 než u plátu 1 a u vrstvy III než u vrstvy I, z čehož vyplývá skutečnost, že v raném stupni zrání probíhá hydrolýza proteinů na povrchu sýra pomaleji. Dochází k tomu pravděpodobně proto, že sůl na povrchu sýra brzdí aktivitu mikroorganismů. U sýrů uložených v lednici se objevuje opačný jev než u sýrů zrajících ve zracím sklepě, a to rychlejší hydrolýza proteinů povrchové vrstvy sýrů než vnitřní vrstvy sýrů. Ve střední části sýra uloženého v lednici tedy neprobíhají během zrání tak intenzivní biochemické procesy jako u sýra uloženého ve zracím sklepě a proces zrání středové části je zpomalen.

U druhého experimentu bylo metodou SDS-PAGE prokázáno mírně zvětšené rozpětí proteinového profilu u sýrů přemístěných do temperované místnosti než u stejného typu sýrů skladovaných ve zracím sklepě, to však až v pokročilejší době zrání.

Při statistickém vyhodnocení experimentu II byly proteinové profily získané metodou SDS-PAGE rozděleny na 3 skupiny, získali jsme tedy 3 dendrogramy. Pokud se jedná o středy plátů sýrů, do 3. dne po výrobě jsou probíhající biochemické změny ve všech plátech podobné a také proteinové profily jsou si velmi podobné. 7 dnů po výrobě jsou už patrné menší změny mezi vzorky uloženými ve zracím sklepě a vzorky uloženými v temperované komoře, z čehož lze usuzovat, že u vzorků uložených při vyšší teplotě dochází v průběhu zrání k intenzivnějším biochemickým změnám. Co se týče srovnání jednotlivých plátů a vrstev, v povrchových vrstvách, popř. ve vrstvách blíže k povrchu, probíhají biochemické procesy pomaleji než uvnitř sýra, jak jsme zaznamenali i u experimentu I. Výraznější hydrolýza proteinů byla zaznamenána u vrstvy III než u vrstvy I. Stejných výsledků bylo dosaženo jak u vzorků skladovaných ve zracím sklepě, tak u vzorků uložených v temperované komoře.

ZÁVĚR

Tato diplomová práce byla zaměřena na změnu proteinového profilu přírodních sýrů eidamského typu v průběhu zrání za různých teplotních podmínek.

V teoretické části byla popsána technologie výroby těchto druhů sýrů a biochemické reakce probíhající v těchto sýrech během zrání.

V praktické části bylo na základě výsledků proteinového profilu přírodních sýrů eidamského typu v průběhu zrání za různých teplotních podmínek zjištěno několik skutečností:

- Proteolýza probíhala výrazněji ve vzorcích, které byly po celou dobu zracího pokusu skladovány ve zracím sklepě. Naopak, méně intenzivně probíhala proteolýza u vzorků, které byly po 23 dnech ze zracího sklepu vyskladněny a dále skladovány za teplot 5 ± 2 °C v lednici.
- U vzorků sýrů zrajících ve zracím sklepě probíhala proteolýza v raném stupni zrání pomaleji v povrchové části než ve vnitřní části sýra. U sýrů uložených v lednici se objevil opačný jev, a to rychlejší hydrolýza proteinů povrchové vrstvy v počátcích zrání.
- Proteolýza u vzorků sýrů skladovaných za teplot 16 ± 2 °C v temperované komoře probíhala intenzivněji, než u vzorků skladovaných ve zracím sklepě. Proteolýza u těchto vzorků byla v počátcích zrání výraznější ve vnitřní části sýra než v části povrchové.
- Teplotní podmínky při zracích procesech výrazně ovlivňovaly proteolytické procesy probíhající u přírodních sýrů eidamského typu.

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

- Dodržovat doporučenou dobu zrání.
- Pokud by byly sýry z ekonomických důvodů vyskladněny dříve, měly by být do technologického procesu při výrobě těchto sýrů zařazeny prostředky používané k urychlení zrání.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] Annato [online]. [cit:2011-04-17]. Dostupný z WWW: http://www.oroverde.cz/?id=7&strid=achiote-annato.

[2] BEJBLOVÁ, M. Změny proteinů v průběhu zrání měkkých sýrů s plísní na povrchu. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2010. 93 s.

[3] Biogenní aminy [online]. [cit:2011-04-17]. Dostupný z WWW: http://www.agronavigator.cz/az/vis.aspx?id=76472.

[4] BROWN, A.C. Understanding food: principles and preparation. Thomson Wadsworth, 2008. 655 s. ISBN 978-0-495-10745-3.

[5] BŘEZINA, P., KOMÁR, A., HRABĚ, J. Technologie, zbožíznalství a hygiena potravin 2. část. Vyd. 1. Vyškov: Vysoká vojenská škola pozemního vojska ve Vyškově, 2001. 177 s. ISBN 80-7231-079-8.

[6] BUŇKA, F. Ústní sdělení. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2010.

[7] BUŇKA, F., HRABĚ, J., VOSPĚL, B. Senzorická analýza potravin I. Vyd. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2008. 145 s. ISBN 978-80-7318-628-9.

[8] BUŇKOVÁ, L. Návody k laboratorním cvičením z molekulární biologie – Elektrolýza proteinů (SDS-PAGE). Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2010.

[9] COLLINS, Y.F., McSWEENEY, P.L.H., WILKINSON, M.G. Lipolysis and catabolism of fatty acids in cheese, *In Cheese*: *Chemistry, Physics and Microbiology.* Vol.1: General Aspects, 3rd ed. 373 – 389 s, 2004.

[10] COLLINS, Y.F., McSWEENEY, P.L.H., WILKINSON, M.G. Lipolysis and free fatty acid catabolism, *In cheese: a review of current knowlege, International Dairy Journal.* 13. 841 – 866 s, 2003.

[11] CURTIN, A.C., McSWEENEY, P.L.H. Catabolism of amino acids in cheese during ripening, *In Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology.* Vol 1: General Aspects, 3rd ed. 435 – 454 s, 2004.

[12] EARLY, R. The technology of dairy products. 2nd ed. London: Blackie A&P, 1998. 452 s. ISBN 0-7514-0344-X.

[13] EVERETT, D.W. Microstructure of natural cheeses, *Food Supply Chain Management.* Blackwell Publishing Limited. 170 – 209 s, 2007.

[14] FARKYE, N.Y. Cheese technology, *International Journal of Dairy Technology.* Vol. 57, no. 2/3. 91 – 98 s, 2004.

[15] FERNÁNDEZ, M., ZÚNIGA, M. Amino acid catabolic pathways of lactic acid bacteria, *Critical Reviews in Microbiology.* 32. 155 – 183 s, 2006.

[16] FOX, P. L. et al. Cheese: chemistry, physics and microbiology. Vol. 1*,* 3rd ed. 361 – 371 s, 2004.

[17] FOX, P.F., GUINEE, T.P., COGAN, T.M., McSWEENEY, P.L.H. Fundamentals of cheese science. Maryland: An Aspen Publication, 2000. 559 s. ISBN 0-8342-1260-9.

[18] FOX, P.F., McSWEENEY, P.L.H. Dairy chemistry and biochemistry. 1st ed. Blackie A&P, 1998. 463 s. ISBN 0-412-72000-0.

[19] FOX, P.F., McSWEENEY, P.L.H. Proteolysis in cheese during ripening, *Food Reviews International.* 12. 457 – 509 s, 1996.

[20] FOX, P.F., WALLACE, J.M., MORGAN, S. Acceleration of cheese ripening, *Antonie von Leeuwenhoek.* 70. 271 – 297 s, 1996.

[21] FOX, P.F., LUCEY, J.A, COGAN, T.M. Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening, *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 1990.

[22] GAJDŮŠEK, S. Mlékařství II. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 1998. 135 s. ISBN 80-7157-342-6.

[23] HRABĚ, J., BŘEZINA, P., VALÁŠEK, P. Technologie výroby potravin živočišného původu. Vyd. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2006. 180 s. ISBN 80-7318-405-2.

[24] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D., Potravinářská biochemie I. Vyd. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2005. 168 s. ISBN 80-7318-295-5.

[25] KADLEC, P. et al. Technologie potravin II. Vyd. 1. Praha 6: Vysoká škola chemicko – technologická v Praze. Vydavatelství VŠCHT v Praze, 2002 (dotisk 2007). 236 s. ISBN 80-7080-510-2.

[26] KLOUDA, P. Moderní analytické metody. Vyd. 2. Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.

[27] KUBÁŇ, V., KUBÁŇ, P. Analýza potravin. Vyd. 1. Brno: Mendelova zemědělská

a lesnická univerzita v Brně, 2007. 203 s. ISBN 978-80-7375-036-7.

[28] LAW, J., HAANDRIKMAN, A. Proteolytic enzyme of lactic acid bacteria, *International Dairy Journal.* 7. 1 – 11 s, 1997.

[29] LUCEY, J.A., JOHNSON, M.E., HORNE, D.S. Perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese, *Journal of Dairy Science.* Vol 86. 2004.

[30] McSWEENEY, P.L.H. Biochemistry of cheese ripening, *International Journal of Dairy Technology.* Vol. 57, no. 2/3. 127 – 144 s, 2004.

[31] McSWEENEY, P.L.H. Biochemistry of cheese ripening: introduction and overview, *In Cheese*: *Chemistry, Physics and Microbiology.* Vol 1: General Aspects, 3rd ed. 347 – 360 s, 2004.

[32] McSWEENEY, P.L.H, FOX, P.F. Metabolism of residual lactose of lactate and citrate, *In Cheese*: *Chemistry, Physics and Microbiology.* Vol 1: General aspects, 3rd ed. 2004.

[33] McSWEENEY, P.L.H, SOUSA, M.J. Biochemical pathway for the production of flavor compounds in cheese during ripening, *Le Lait.* 80. 293 – 324 s, 2000.

[34] McSWEENEY, P.L.H., OLSON, N.F., FOX, P.F. Proteolysis of bovine α_{S2}-casein by chymosin, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung.* 119. 429 – 432 s, 1994.

[35] McSWEENEY, P.L.H., OLSON, N.F., FOX, P.F. Proteolytic specifity of chymosin on bovine α_{S1}-casein, *Journal of Dairy Research.* 60. 401 – 412 s, 1993.

[36] Mlékárenská technologie II [online]. [cit:2011-02-25]. Dostupný z WWW: http://utb.cepac.cz/Screens/ContentProvider.aspx/_XN58PfnmmUhGWHSU_TRgcIKsS5Sq285BVJXOV6Bg1/M0029_mlekarenska_technologie%5Cdistancni_text_II%5CM0029_mlekarenska_technologie_distancni_text_II.pdf.

[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] PACHLOVÁ, V. Studium proteinového profilu vybraných mléčných produktů. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2010. 87 s.

[40] PACHLOVÁ, V., BUŇKA, F., NENUTILOVÁ, L. Texture properties of Dutch-type cheese as a function of its location and ripening, *International Journal of Food Properties.*

[41] PACHLOVÁ, V., BUŇKA, F., BUŇKOVÁ, L., WEISEROVÁ, E., HLADKÁ, K., VOJTÍŠKOVÁ, P., KRÁČMAR, S. Vliv průběhu zrání na obsah vybraných složek v přírodním sýru eidamského typu, *Potravinárstvo.* 3. 1. 33 – 36 s, 2009.

[42] PARENTE, E., COGAN, T.M.: Starter cultures: general aspects, *In Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology.* Vol. 1: General aspects, 2004.

[43] PAVELKA, A. Mléčné výrobky pro vaše zdraví. Vyd. 1. Brno: Littera, 1996. 105 s. ISBN 80-85763-09-5.

[44] SDS-PAGE [online]. [cit:2010-05-23]. Dostupný z WWW: http://cheminfo.chemi.muni.cz/chem_sekce/predmety/C7300/EF/SDSPAGE %20kolecko.pdf.

[45] SMIT, G. Dairy processing: improving quality. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2003. 546 s. ISBN 1-85573-676-4.

[46] SMIT, G., SMIT, B.A., ENGELS, W.J.M. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products, *FEMS Microbiology Reviews.* Vol. 29, 3rd ed. 591 – 610 s, 2005.

[47] TAMIME, A.Y. Milk processing and quality management, *Society of Dairy Technology.* 1st ed. Blackwell Publishing Limited, 2009. 637 s. ISBN 978-1-4051-4530-5.

[48] VELÍŠEK, J. Chemie potravin 3. Vyd. 2. Tábor: OSSIS, 2002. 368 s. ISBN 80-86659-02-X.

[49] UPADHYAY, V.K. et al. Proteolysis in cheese during ripening, *In Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology.* Vol.1: General Aspect, 3rd ed. 391 – 434 s, 2004.

[50] Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 77/2003 Sb., v platném znění.

[51] WEISEROVÁ, E. Změny distribuce dusíkatých látek v průběhu zrání eidamských sýrů. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2009. 111 s.

[52] YADA R. Y. Proteins in food processing. 1st ed. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2004. 689 s. ISBN 1-85573-837-6.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ČMK	čisté mlékařské kultury
FFA	volné mastné kyseliny
Gln	glutamin
Glu	glutamin
His	histamin
Leu	leucin
LPL	lipoproteinlipáza
Lys	lysin
NSLAB	nezákysové bakterie mléčného kvašení
Phe	fenylalanin
PP	proteoso-pepton
SDS	sodium dodecyl sulfát
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfát polyakrylamidová gelová elektroforéza
TEMED	N,N,N´,N´-tetramethylendiamin

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Hydrolýza κ-kaseinu chymosinem 17
Obr. 2. Metabolizmus laktózy 27
Obr. 3. Vznik senzoricky aktivních látek 32
Obr. 4. Schematické znázornění odběru tří plátů (S1, S2 a S3) a jeho rozdělení na 3 vrstvy (rozměry jsou uvedeny v mm) 38
Obr. 5. Nanášení vzorků na gel 40
Obr. 6. Princip SDS-PAGE separace 40
Obr. 7. Proteinový profil vzorků sýrů získaných metodou SDS-PAGE: 1: molekulový hmotnostní standard, 2: 10S21, 3: 10S23, 4: 10S31, 5: 10S33, 6: 13S11, 7: 13S13, 8: 13S21, 9: molekulový hmotnostní standard, 10: 13S23 42
Obr. 8. Proteinový profil vzorků sýrů získaných metodou SDS-PAGE*:* 1: molekulový hmotnostní standard, 2: 69S21, 3: 69S23, 4: 69S31, 5: 69S33, 6: 69L11, 7: 69L13, 8: 69L21, 9: molekulový hmotnostní standard, 10: 69L23 43
Obr. 9. Proteinový profil vzorků sýrů získaných metodou SDS-PAGE: 1: molekulový hmotnostní standard, 2: 97S11, 3: 97S13, 4: 97S21, 5: 97S23, 6: 97S31, 7: 97S33, 8: 97L11, 9: molekulový hmotnostní standard, 10: 97L13 45
Obr. 10. Dendrogram vyjadřující výsledky shlukové analýzy proteinového profilu středů (vrstev III) třetích plátů (S3) všech analyzovaných vzorků sýrů (na ose x jsou vyznačeny vzorky, na ose y vzdálenost) 47
Obr. 11. Dendrogram vyjadřující výsledky shlukové analýzy proteinového profilu vzorků uložených ve zracím sklepě od počátku výroby do 34. dne zrání ve všech 3 plátech (S1, S2 i S3) a dvou vrstvách (vrstvy I a III) 48
Obr. 12. Dendrogram vyjadřující výsledky shlukové analýzy proteinového profilu vzorků uložených ve zracím sklepě od 41. dne zrání do 126. dne zrání ve všech 3 plátech a dvou vrstvách 50
Obr. 13. Dendrogram vyjadřující výsledky shlukové analýzy proteinového profilu vzorků uložených v lednici od 41. dne zrání do 126. dne zrání ve všech 3 plátech a dvou vrstvách 51

Obr. 14. Proteinový profil vzorků sýrů získaných metodou SDS-PAGE: 1: molekulový hmotnostní standard, 2: 7S23, 3: 7S31, 4: 7S33, 5: 7A11, 6: 7A13, 7: 7A21, 8: 7A23, 9: molekulový hmotnostní standard, 10: 7A31 53

Obr. 15. Proteinový profil vzorků sýrů získaných metodou SDS-PAGE: 1: molekulový hmotnostní standard, 2: 70A23, 3: 70A31, 4: 70A33, 5: 70S11, 6: 70S13, 7: 70S21, 8: 70S23, 9: molekulový hmotnostní standard, 10: 70S31 54

Obr. 16. Dendrogram vyjadřující výsledky shlukové analýzy proteinového profilu středů (vrstev III) třetích plátů (S3) všech analyzovaných vzorků sýrů 55

Obr. 17. Dendrogram vyjadřující výsledky shlukové analýzy proteinového profilu všech vzorků uložených ve zracím sklepě ve všech 3 plátech (S1, S2 i S3) a dvou vrstvách (vrstvy I a III) 56

Obr. 18. Dendrogram vyjadřující výsledky shlukové analýzy proteinového profilu všech vzorků uložených v temperované komoře ve všech 3 plátech a dvou vrstvách 57

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Srovnání profilu proteinů v jednotlivých dnech zrání, velikost proteinů v kDa 42
Tab. 2. Srovnání profilu proteinů v jednotlivých dnech zrání, velikost proteinů v kDa 44
Tab. 3. Srovnání profilu proteinů v jednotlivých dnech zrání, velikost proteinů v kDa 45
Tab. 4. Srovnání profilu proteinů v jednotlivých dnech zrání, velikost proteinů v kDa 53
Tab. 5. Srovnání profilu proteinů v jednotlivých dnech zrání, velikost proteinů v kDa 54

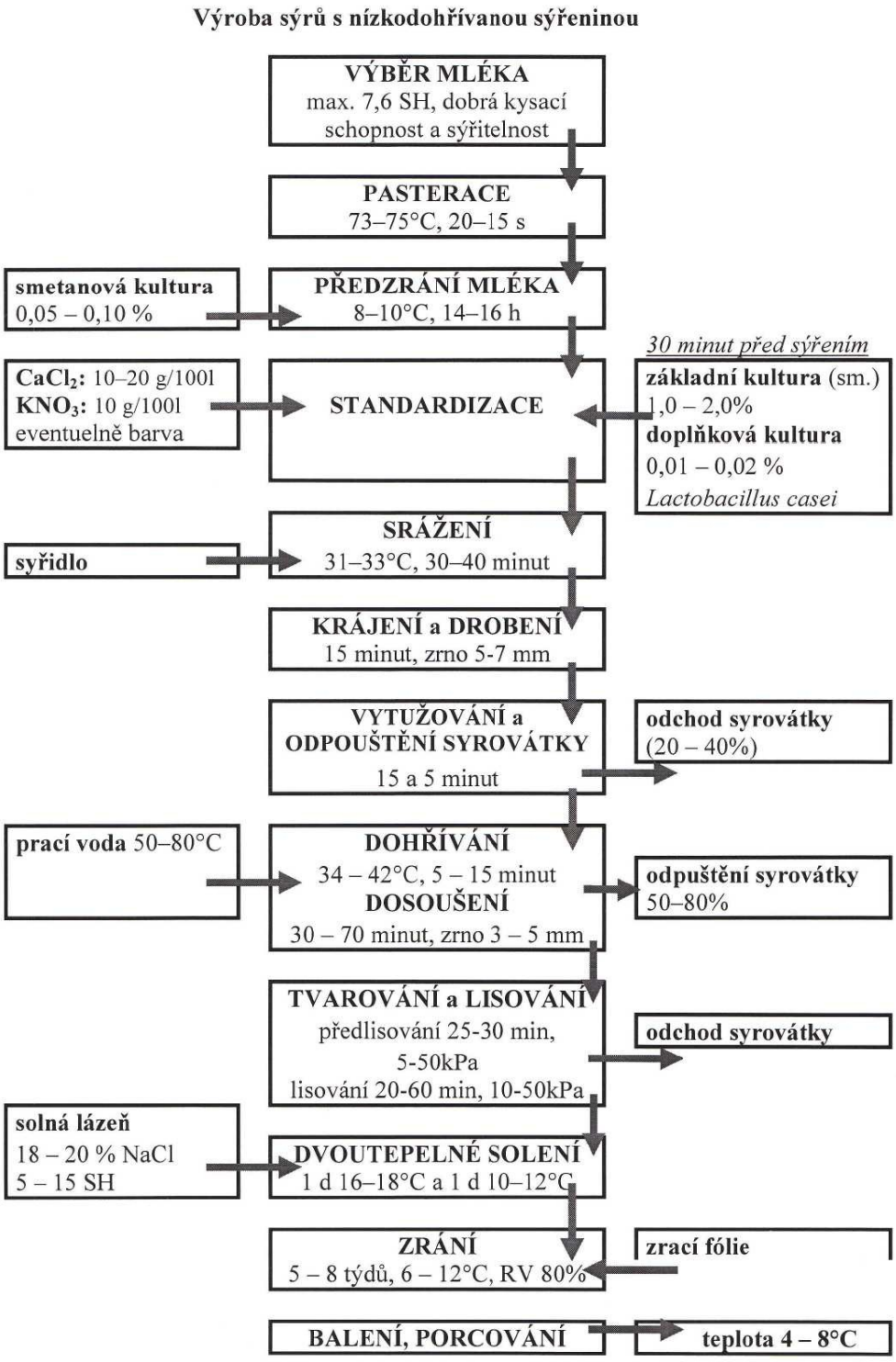
SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P 1: Schéma výroby sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou

Příloha P 2: Popis metody SDS-PAGE

Příloha P 3: Roztoky a gely použité pro SDS-PAGE

PŘÍLOHA P 1: SCHÉMA VÝROBY SÝRŮ S NÍZKODOHŘÍVANOU SÝŘENINOU



PŘÍLOHA P 2: POPIS METODY SDS-PAGE

SDS-PAGE (sodium dodecylsulfát polyakrylamidová gelová elektroforéza) je separační metoda užívaná v biochemii, imunologii, mikrobiologii a molekulární biologii ke stanovení proteinů na základě jejich velikosti, tedy i odlišné molekulové hmotnosti. Zahřátím vzorku za denaturačních a redukčních podmínek dochází k jeho denaturaci a navázání molekul SDS (dodecylsulfátu sodného), který udělí proteinu vysoký záporný náboj přímo úměrný jeho hmotnosti. Je to dáno tím, že SDS se váže na proteiny v poměru 1,4 g SDS na 1 g bílkoviny. K této změně může dojít až po rozštěpení disulfidických můstků v molekule proteinu, což zajišťuje např. merkaptoetanol. Po nanesení vzorku (proteinu) na gel a umístění gelu do elektrického pole dochází k migraci proteinů ke kladné elektrodě (anodě). Během této migrace jsou proteiny separovány na principu molekulového síta v polyakrylamidovém gelu. 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. Jako porézní matrice slouží polyakrylamidový gel, který se připravuje kopolymerací akrylamidu a N,N´-methylen-bisakrylamidu. Polymerací monomerů akrylamidu vznikají lineární řetězce, které jsou propojeny bisakrylamidovými můstky do trojrozměrné sítě. Poměr koncentrací akrylamidu a bisakrylamidu použitých k přípravě gelu závisí na velikostech proteinů, které chceme separovat. Nízká koncentrace akrylamidu se používá k separaci proteinů o vysoké molekulové hmotnosti, zatímco vysoká koncentrace se používá k separaci proteinů o malé molekulové hmotnosti. 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 následné vizualizaci separovaných proteinů v gelu se dá určit jejich relativní molekulová hmotnost srovnáním délky migrace se standardem o známé molekulové hmotnosti.

PŘÍLOHA P 3: ROZTOKY A GELY POUŽITÉ PRO SDS-PAGE

Tris pufr pro separační gel (pH 8,8)

Tris (Sigma) 18,15 g

Deionizovaná voda 50 ml

Pomocí koncentrované HCl (Sigma) 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 (Sigma) 6,0 g

Deionizovaná voda 50 ml

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

Elektrodový pufr

El. pufr dle Laemliho (SERVA) 100 ml

Deionizovaná voda 900 ml

Elektrodový pufr dle Laemliho 10x koncentrovaný (SERVA) před použitím doplnit deionizovanou vodou do požadovaného objemu v poměru 1:9.

30% roztok akrylamidu

Akrylamid 29,2 g

N,N´-methylen-bisakrylamid 0,8 g

Doplnit do 100 ml deionizovanou vodou. Uchovávat při 4 °C v tmavé láhvi. Obě látky jsou toxické, při přípravě roztoku je nutno použít rukavice.

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.trichloroctová

Kyselina trichloroctová 50 g

Deionizovaná voda 100 ml

Rozpustit a doplnit deionizovanou vodou do 1 l.

Barvící roztok

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

0,25% Coomassie Blue R-250 1,25 g

Metanol 250 ml

Kyselina octová 50 ml

Doplnit deionizovanou vodou do 500 ml.

Odbarvovací roztok

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

Metanol 250 ml

Kyselina octová 100 ml

Doplnit deionizovanou vodou do 1 l.

Příprava gelů

	17% separační gel	5% koncentrační gel
30% roztok akrylamidu	14,25 ml	2,04 ml
Tris pufr	6,25 ml (pH 8,8)	3 ml (pH 6,8)
Deionizovaná voda	4 ml	6,9 ml
10% SDS	250 μl	120 μl
10% persíran amonný	250 μl	60 μl
N,N,N´,N´-tetrametylendiamin (TEMED)	10 μl	15 μl

Gely byly připravovány čerstvé před každou aplikací mezi skla, separační gel byl připravován v množství 25,01 ml, koncentrační gel v množství 12,135 ml. Jako poslední byl aplikován roztok akrylamidu a TEMED.

Při pH koncentračního gelu 6,8 mají ionty obsažené v gelu nízkou mobilitu. Na rozdíl od toho, při pH separačního gelu 8,8 je mobilita iontů v gelu vysoká. Protože systémem protéká konstantní proud, musí dle Ohmova zákona být odpor koncentračního gelu vyšší než odpor separačního gelu. Při dostatečně odlišné koncentraci pufru v koncentračním a separačním gelu bude napětí v koncentračním gelu dostatečně vyšší než napětí v separačním gelu, aby kompenzovalo rozdíl v mobilitách iontů. V systému je poté mobilita separovaných proteinů následující: $m_{konc.\ gel} <$ proteiny $< m_{sep.\ gel}$. Díky této své mobilitě se separované proteiny na rozhraní gelů zkoncentrují a seřadí dle svých mobilit. Důležité je, aby koncentrační gel obsahoval nízkou koncentraci polyakrylamidu a nebránil tak proteinům v pohybu.