

# Proteolytická aktivita vybraných zákysových kultur

Bc. Veronika Weiglová

---

Diplomová práce  
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2012/2013

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Veronika Weiglová**  
Osobní číslo: **T11142**  
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin – specializace Technologie mléka a mléčných výrobků**  
Forma studia: **prezenční**  
Téma práce: **Proteolytická aktivita vybraných kyselých kultur**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Stručná charakterizace bakterií mléčného kvašení.
2. Popis, kriteria pro selekci a využití kyselých kultur.
3. Charakterizace procesů zrání se zaměřením na proteolýzu přírodních sýrů a její význam.

### II. Praktická část

1. Vytvoření kysacích křivek použitím komerčních kyselých kultur.
2. Porovnání proteolytické aktivity kyselých kultur inokulovaných do mléka.
3. Srovnání proteolytické aktivity vybraných kyselých kultur v průběhu zrání přírodních sýrů.
4. Vyhodnocení výsledků, diskuze s literaturou a vyvození závěrů.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] FOX, P.F., McSWEENEY, P.L.H., COGAN, T.M. GUINEE, T.P. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology Volume 1 General Aspects. 3rd edition. London: Elsevier Academia Press. 2004. ISBN0-1226-3652-X

[2] FOX, P. F., GUINEE, T.P., COGAN, T.M., McSWEENEY, P.L.H. Fundamentals of cheese science. Gaithersburg: 2000. 638 p. ISBN 0-83-42-1260-9.

[3] BROOME, M.C., LIMSOVTIN, G.K.Y. Starter peptidase activity in maturing cheese. Australian Journal of Dairy Technology. 1998, 53, 79-73.

Vedoucí diplomové práce:

**Ing. Vendula Pachlová, Ph.D.**

Ústav technologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

**16. ledna 2013**

Termín odevzdání diplomové práce:

**2. května 2013**

Ve Zlíně dne 4. února 2013

  
doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
*děkan*



  
doc. Ing. František Buňka, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

## 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 <sup>1)</sup>;
- 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 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup>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 <sup>3)</sup>odst. 2 a 3 mohu užit 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 .....

.....

---

<sup>1)</sup> 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.

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

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

<sup>3)</sup> 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 výtěžku 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 výtěžku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## ABSTRAKT

Diplomová práce je zaměřena na charakterizaci bakterií mléčného kvašení, které jsou v mlékárenském průmyslu používány v podobě čistých mlékařských kultur. Praktická část porovnává kysací a proteolytickou aktivitu vybraných komerčních mezofilních zákysových kultur. Kysací křivky pro jednotlivé zákysové kultury byly sestaveny na základě hodnot aktivní kyselosti naměřených v průběhu 30hodinové inkubace při 25 °C. Intenzivní kysací aktivitou se projevovaly čisté mlékárenské kultury obsahující zástupce, kteří rozkládají laktosu homofermentativním kvašením a zároveň se jedná výhradně o bakterie O-typu (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*). Proteolytická aktivita zákysových kultur byla sledována metodou SDS-PAGE a byla pozorována změna proteinového profilu jak u zákysů tak také v případě vzorků přírodních sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou v průběhu jejich doby zrání (celkem po dobu 3 měsíců). Během prvních dnů zrání (do 28. dne od výroby) docházelo pomocí endopeptidáz ke štěpení peptidových vazeb proteinů na proteiny střední velikosti. S delší dobou zrání vznikaly další hydrolýzou peptidy menších velikostí. Proteinový profil jednotlivých kultur byl srovnán pomocí shlukové analýzy. Dále byla pozorována produkce volných aminokyselin jako markerů zrání a zároveň prekurzorů pro tvorbu biogenních aminů, jejichž obsahy byly také detekovány (opět v případě zákysů i vzorků sýrů).

Klíčová slova: bakterie mléčného kvašení, čisté mlékařské kultury, kysací křivka, proteolytická aktivita, Urea-PAGE, SDS-PAGE, volné aminokyseliny, biogenní aminy.

## **ABSTRACT**

The thesis is focused on the characterization of the lactic acid bacteria which are used in the dairy industry in the form of pure milk cultures. The practical part compares fermented and proteolytic activity of selected commercial fermented mesophilic cultures. Fermented curves for individual fermented cultures were prepared on the basis of the values of active acidity measured during a 30-hour incubation at 25 °C. Pure dairy cultures containing substitutes were displayed by Intensive fermented activity, which breaks down lactose-homofermentative fermentation and at the same time, it is only the O-type bacteria (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*). The proteolytic activity of fermentated cultures was monitored by SDS-PAGE method and observed change of protein's profile as a starter and in the case of samples with lowheating natural cheese curd during the ripening period (total of 3 months). During the first days of ripening (till the 28th day of production) occurred with endopeptidase to cleave peptide bonds of proteins to proteins of medium size. Smaller sized peptides were created by another hydrolysis with ripening after 28 days. The protein profile of each cultures was compared by cluster analysis. Further was observed production of free amino acids as markers of ripening and also precursors for creating Biogenic amines whose contents were also detected (again in the case of the starters and cheese samples).

Keywords: lactic acid bacteria, dairy culture, fermented curve, proteolytic activity, Urea-PAGE, SDS-PAGE, free aminoacids, biogenic amines

### *Poděkování*

Ráda bych zde poděkovala Ing. Vendule Pachlové, Ph.D. za odbornou pomoc, vedení diplomové práce a připomínky při řešení práce. Rovněž nemalý dík bych věnovala také Ing. Ludmile Zálešákové za její ochotu a vstřícný postoj při práci v laboratoři.

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



## OBSAH

ÚVOD.....	10
<b>I TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>11</b>
<b>1 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ.....</b>	<b>12</b>
1.1 TAXONOMIE A CHARAKTERISTIKA BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ.....	12
1.2 VÝZNAM A VYUŽITÍ BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ .....	13
<b>2 ČISTÉ MLÉKÁRENSKÉ KULTURY .....</b>	<b>15</b>
2.1 HISTORICKÝ VÝVOJ ČISTÝCH MLÉKAŘSKÝCH KULTUR .....	15
2.2 ROZDĚLENÍ ČISTÝCH MLÉKAŘSKÝCH KULTUR A JEJICH VLASTNOSTI.....	16
2.3 PŘÍPRAVA A VEDENÍ BAKTERIÁLNÍCH KULTUR KLASICKÝM ZPŮSOBEM.....	21
2.4 KONTROLA JAKOSTI ČISTÝCH MLÉKAŘSKÝCH KULTUR .....	24
2.5 NON-STARTEROVÉ KULTURY.....	24
<b>3 PROCESY PROBÍHAJÍCÍ V PRŮBĚHU ZRÁNÍ SÝRŮ .....</b>	<b>26</b>
3.1 METABOLIZMUS LAKTÓZY, KYSELINY MLÉČNÉ A CITRÁTU .....	26
3.2 LIPOLÝZA A METABOLIZMUS VOLNÝCH MASTNÝCH KYSELIN.....	28
3.3 PROTEOLÝZA.....	29
3.3.1 Metabolizmus volných aminokyselin .....	32
3.3.2 Produkce biogenních aminů .....	32
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>35</b>
<b>4 CÍL PRÁCE .....</b>	<b>36</b>
<b>5 METODIKA .....</b>	<b>37</b>
5.1 SLEDOVÁNÍ KYSACÍ AKTIVITY ZÁKYSOVÝCH KULTUR.....	38
5.2 STANOVENÍ PROTEOLYTICKÉ AKTIVITY ZÁKYSOVÝCH KULTUR .....	39
5.2.1 Metoda SDS-PAGE .....	39
5.2.2 Metoda Urea-PAGE .....	41
5.2.3 Stanovení obsahu volných aminokyselin v zákysech .....	42
5.2.4 Stanovení tvorby biogenních aminů v zákysech a sýrech v závislosti na době skladování .....	43
<b>6 VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>45</b>
6.1 KYSACÍ AKTIVITA VYBRANÝCH ZÁKYSOVÝCH KULTUR .....	45
6.2 PROTEOLYTICKÁ AKTIVITA VYBRANÝCH ZÁKYSOVÝCH KULTUR .....	49
6.2.1 Metoda Urea-PAGE .....	49
6.2.2 Metoda SDS PAGE.....	50
6.3 TVORBA VOLNÝCH AMINOKYSELIN A BIOGENNÍCH AMINŮ VYBRANÝCH ZÁKYSOVÝCH KULTUR/SÝRŮ V PRŮBĚHU ZRÁNÍ.....	75
<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>81</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>82</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>90</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>91</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>94</b>
<b>SEZNAM GRAFŮ .....</b>	<b>95</b>
<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>96</b>

## ÚVOD

Bakterie mléčného kvašení našly velké uplatnění v zemědělsko-potravinářském průmyslu, neboť jejich metabolickou činností vzniklé produkty využíváme při výrobě různých druhů potravin. V převážné většině případů se však jedná o fermentované mléčné výrobky, dále pak masné výrobky, mléčně kvašená zelenina a mnoho dalších produktů potravinářského průmyslu. Bakterie mléčného kvašení patří bezesporu k nejdůležitějším bakteriím využívaných hlavně v mlékárenském průmyslu. Své uplatnění našly při výrobě zakysaných mléčných výrobků, kefírů, jogurtů, zakysaných smetan, acidofilních mlék, tvarohů a sýrů. Vybrané bakterie mléčného kvašení se v mlékárenském průmyslu využívají ve formě čistých mlékařských kultur, které zaručí specifické vlastnosti a stálou jakost výrobkům. Mají-li producenti vyrábět standardní a vysoce kvalitní fermentované mléčné výrobky, sýry a další, je nutné používat starterové kultury s přesně definovanými, předvídatelnými a stabilními vlastnostmi.

Bakterie mléčného kvašení se vyznačují bohatou biochemickou aktivitou. Využívá se jejich fermentačních vlastností při výrobě zakysaných mléčných výrobků, ale také jejich proteolytických schopností pro výrobu různých variant sýrů. Důležitá je právě proteolytická činnost a to nejen z důvodu sensorického. Přeměnou základních složek na jednodušší látky získávají potraviny kromě nových žádoucích sensorických vlastností, také důležitou kvalitu z technologického a dietetického hlediska. Proteolytická aktivita nemusí mít však jen pozitivní vliv. Činností proteolytických enzymů může docházet k natolik rozsáhlé proteolýze, která se může projevit vznikem sensoricky nepříjemných látek (hnilobný zápach, mýdlová chuť), viditelnými změnami na povrchu nebo uvnitř výrobků, produkcí toxických či karcinogenních látek (např. biogenní aminy), které ohrožují zdravotní nezávadnost potravin.

## I. TEORETICKÁ ČÁST

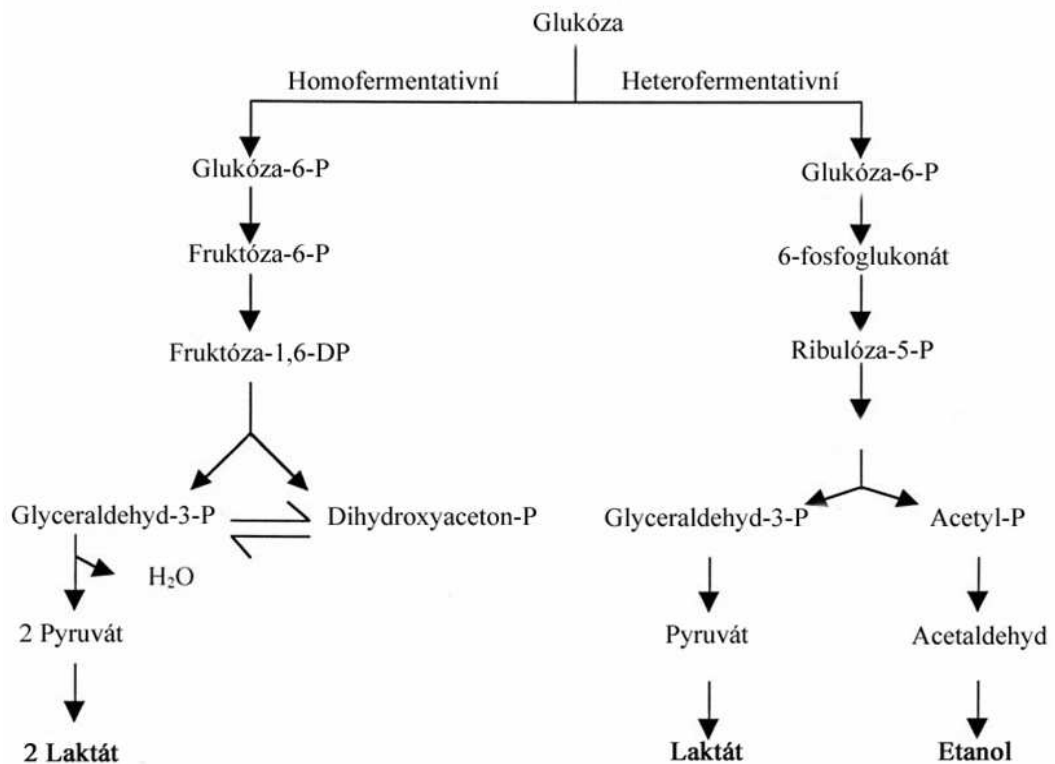
## 1 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ

Bakterie mléčného kvašení (BMK) tvoří velmi rozmanitou skupinu mikroorganismů, která je běžnou součástí našeho každodenního života. Jedná se o velkou skupinu heterogenních bakterií, vyznačující se podobnými vlastnostmi [1, 2]. Vyžadují živné médium bohaté na složité nutriční látky a růstové faktory, jelikož mají omezené biosyntetické schopnosti. Většina druhů se vyznačuje vysokými nároky na přítomnost aminokyselin, vitaminů, růstových látek a minerálních soli v živném médiu [3, 4]. Jsou běžně rozšířené v přírodě, ale jsou i přirozenou součástí lidských nebo živočišných tělních dutin, včetně gastrointestinálního traktu [1, 5]. Bakterie mléčného kvašení jsou přirozenou součástí syrového mléka. Hlavním zdrojem kontaminace syrového mléka BMK je však vnější prostředí (např. vzduch, částičky krmiva a výkalů, nádobí a náradí, které přichází s mlékem do styku). Do skupiny bakterií mléčného kvašení můžeme zahrnout zástupce rodu *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* a *Weissella*. Rod *Bifidobacterium* (větev aktinomycety) je řazen mezi BMK na základě své fenotypické podobnosti [1, 2, 6, 7].

### 1.1 Taxonomie a charakteristika bakterií mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení řadíme mezi grampozitivní, aerotolerantní nebo anaerobní bakterie, katalasa negativní, acidotolerantní a nesporulující tyčinky nebo koky [1, 2, 4, 7]. Hlavním jejich sjednocujícím znakem však zůstává, že všechny produkují kyselinu mléčnou jako konečný produkt procesu fermentace. Jedná se tedy o morfologicky heterogenní skupinu bakterií, která se projevuje fermentací různých živin, především však cukrů za vzniku kyseliny mléčné a dalších látek. Klasifikace bakterií mléčného kvašení v odlišnosti od jiných bakterií je velkou měrou založená na morfologii, způsobu činnosti fermentace glukosy, růstu při odlišných teplotách, produkci kyseliny mléčné, růstu při vysoké koncentraci soli a toleranci vůči kyselému či alkalickému prostředí [1, 6, 8, 9, 10, 11]. Podle poměru a druhu vzniklých produktů během fermentace sacharidů, lze BMK v obecné rovině rozdělit na homofermentativní a heterofermentativní [12]. Konečným produktem homofermentativního kvašení, ne však jediným, je z 90 % kyselina mléčná. Fermentace probíhá po Embden-Meyerhof-Parnasově dráze, známější pod názvem glykolysa (Obrázek 1). Zprvu se sledem reakcí nápadně podobá etanolovému kvašení, avšak v konečné fázi je pyruvát přeměněn na kyselinu mléčnou. Heterofermentativní

kvašení se vyznačuje tím, že vedle kyseliny mléčné vznikají ještě další konečné produkty. Nejčastějšími produkty jsou kyselina octová, ethanol, vodík,  $\text{CO}_2$  a další látky. Hexosy jsou štěpeny po tzv. fosfoketolase dráze (Obrázek 1), neboť většině původců tohoto kvašení chybí základní enzymy glykolytické dráhy (aldolasa a triosafosfátisomerasa) [4, 8, 14, 15, 16].



Obrázek 1: Obecné schéma fermentace glukosy u BMK [13]

Na základě molekulárně-biologických metod existují u rodu *Lactobacillus* ještě jiné druhy kvašení: obligátně homofermentativní laktobacily, obligátně heterofermentativní laktobacily a fakultativně heterofermentativní laktobacily [4].

## 1.2 Význam a využití bakterií mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení našly velké uplatnění v zemědělsko-potravinářském průmyslu, neboť jejich metabolickou činností vzniklé produkty využíváme při výrobě různých druhů potravin. V převážné většině případů se však jedná o fermentované mléčné výrobky, dále pak masné výrobky, mléčně kvašená zelenina a mnoho dalších produktů potravinářského průmyslu. Metabolické produkty BMK se u těchto výrobků podílí na tvorbě různých vlastností vnímatelných lidskými smysly, jako například chuť, vůně či konzistence [17]. Podílí se na prodloužení údržnosti a to jednak tvorbou bakteriocinů

(např. nisin, lactacin B), ale především však vlivem zvýšené kyselosti potraviny způsobené produkcí kyseliny mléčné (biologická konzervace) [8, 17, 18]. Potraviny s dostatečným obsahem životaschopných BMK jsou považovány za probiotika. Principem je osídlení trávicího ústrojí těmito BMK, které následně zlepší jeho funkci a potlačí nežádoucí mikroflóru trávicího ústrojí (např. klostridie), která má prokazatelně nepříznivé účinky na zdraví (např. těžké průjemy, tvorba toxických látek, záněty střev). Dále se mohou podílet na snížení hladiny cholesterolu, snížení rizika nádorových onemocnění tím, že blokuje biologickou aktivitu nežádoucích zástupců střevní mikroflóry, respektive jejich enzymů, při tvorbě dalších karcinogenních látek v trávicím ústrojí. Podobným způsobem mohou zabránit tvorbě různých toxických látek. Tyto organismy zároveň zvyšují stravitelnost mléka, neboť kysané mléčné výrobky jsou často tolerovány i těmi, kteří trpí laktosovou intolerancí. Ve výsledku tak udávají cennou nutriční hodnotu výrobkům [19, 20].

## 2 ČISTÉ MLÉKÁRENSKÉ KULTURY

Původní mikroflóra mléka se vyznačuje značnou proměnlivostí. Vlivem technologického zpracování (chlazení, pasterace) dochází následně k potlačení či inaktivaci větší části zastoupených BMK. Podle typu výrobku se pak používá přídavek čistých mlékařských kultur (ČMK). ČMK obsahují pouze určité již dříve vyizolované mikroorganismy. Historicky byly a i nadále budou některé specifické BMK využívány jako startovací (starterové, zákysové) kultury při výrobě potravin. Čisté mlékařské kultury jsou popisovány jako specifické bakterie mléčného kvašení, které jsou používány k inokulaci mléka a svou metabolickou činností vytváří charakteristické mléčné produkty. Skupinu ČMK tvoří klasické přírodní kultury (Natural Starter Culture), které obsahují směs nedostatečně definovaných mikroorganismů, ale zároveň i „definované“ nebo „selektované“ kultury, které obsahují jeden nebo více identifikovaných a definovaných rodů, druhů, případně kmenů mikroorganismů se známými vlastnostmi. Nejčastěji jsou kultury tvořeny z více mikroorganismů, které jsou ve vzájemné symbiose [14, 21, 22, 23].

Mají-li producenti vyrábět standardní a vysoce kvalitní fermentované mléčné výrobky, sýry a další, je nutné používat starterové kultury s přesně definovanými, předvídatelnými a stabilními vlastnostmi. Díky pasteraci a následnému zaočkování mléka požadovanými kulturami je možné vyrobit široký sortiment nezávislý na původní mikroflóře mléka [24].

### 2.1 Historický vývoj čistých mlékařských kultur

V minulosti, bez nynějších poznatků v oblasti mikrobiologie a výrobní technologie, byla výroba sýrů a zakysaných mléčných výrobků založena pouze na činnosti mikroorganismů, které se do mléka dostaly přirozenou cestou [18]. Toto „využívání“ bylo založeno pouze na dlouhodobých zkušenostech a pozorování účinků mikroorganismů. Proměnlivé složení mikroflóry syrového mléka však vedlo ke značnému kolísání jakosti a snížení trvanlivosti těchto výrobků [25]. V roce 1886 se podařilo kodaňskému profesoru Storchovi izolovat a sestavit smetanový zákys pro výrobu másla [26, 27]. Rok 1886 se tak stal významným pro celou mlékárenskou výrobu. Dalším průkopníkem ČMK byl například Švýcar Freudenrich, který uplatnil používání ČMK při výrobě přírodních sýrů švýcarského typu [26].

V ČSSR to byli především Vladimír Pavlák a Otakar Laxa, kteří se zabývali výrobou a rozmnožováním ČMK. Ke konci 19. století byly v ČSSR jako první čisté mlékárenské

kultury používány dánské kultury (Hansenovy kultury), později i jiné zahraniční kultury. V roce 1949 byl založen vývojový závod generálního ředitelství mlékárenského průmyslu v Praze-Vokovicích (dnes firma Milcom a.s.), který zajišťoval propagaci dovážených zahraničních kultur a jejich následnou expedici do mlékáren v ČSSR. Později došlo k získání vlastních originálních kultur, čímž se mlékárenský průmysl stal nezávislým na zahraničních výrobcích kultur [25, 26].

## 2.2 Rozdělení čistých mlékařských kultur a jejich vlastnosti

Starterové kultury mohou být z mnoha hledisek děleny do různých kategorií. Podle zástupců mohou být kultury rozlišeny na bakteriální, kvasinkové, plísňové nebo smíšené [21, 28]. Na základě druhové a kmenové skladby se kultury dělí na:

- *jednokmenové / monokultury* („single-strain starter“) obsahující jeden definovaný kmen určitého druhu,
- *vícekmenné* („multiple-strain starter“) obsahující různé kmeny jednoho druhu, dále
- *směsné vícekmenné* (multiple-mixed-strain starter“) obsahující různé definované kmeny různých druhů
- *tradiční kultury* („traditional starter / raw mixed-strain starter“) obsahující druhy a kmeny částečně či zcela neznámé [23, 28, 29].

Druhy a kmeny jedné kultury by mezi sebou neměli vykazovat antagonismus a tedy se negativně ovlivňovat, což by mohlo vést k zhoršení parametrů kultury [26]. Naopak žádoucí je metabiosa či symbiosa, které zajišťují vzájemné stimulační působení na růst a biochemickou aktivitu jednotlivých zástupců kultury [10]. Podle optimální teploty růstu mikroorganismů, mohou být startovací kultury rozděleny na mezofilní s optimální teplotou okolo 30 °C a termofilní, jejichž optimální teplota pro růst je mezi 40–50 °C [14, 23]. Mezi mezofilní startéry patří např. rody: *Lactococcus* a *Leuconostoc*. Kmeny těchto rodů jsou součástí smetanové kultury a používají se především k výrobě zakysaných mlék, smetany, zakysaného podmáslí, másla, tvarohů a sýrů. Druhy mezofilní starterové kultury používané ve výrobě:

- O-typ: starterové kultury, které obsahují hlavně BMK (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*). Jejich činností vzniká především kyselina mléčná. Jedná se tak o homofermentativní BMK.
- D-typ: starterové kultury, které obsahují vedle BMK typu O i BMK vytvářející chuťově aktivní látky. Zástupcem je např.: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var.



*diacetylactis*. Tento zástupce produkuje sloučeninu známou jako diacetyl, který je nositelem chuti. Kromě tvorby diacetylu produkuje i oxid uhličitý, který přispívá ke zjemnění chuti.

- L-typ: starterové kultury obsahující vedle BMK typu O i BMK vytvářející chuťově aktivní látky. Jako hlavní aromatvornou BMK je *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. Produkuje diacetyl, kyselinu octovou, acetaldehyd a jiné aromatické sloučeniny, ale méně CO<sub>2</sub> než BMK D-typu.
- LD-typ: starterové kultury, které obsahují kombinaci *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* a *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. Kombinací vzniká jemná směs charakteristické chuti a vůně [14, 23].

K termofilním starterovým kulturám patří rody *Lactobacillus* a *Streptococcus* (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*). První z nich je zodpovědný za fermentaci laktosu na kyselinu mléčnou. *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* pak za chuť výrobku produkcí acetaldehydu. Tyto kultury se uplatňují ve výrobě sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou, jogurtů, měkkých sýrů a tvarohů.

Důležitou vlastností ČMK je také jejich role, kterou sehrávají během výroby produktu. Podle funkce, kterou zajišťují je možné ČMK rozlišit na:

1. starterové – Požadována je funkce technologická, tedy schopnost mikroorganismů přeměňovat substráty (např. sacharidy, bílkoviny, lipidy) na metabolity, které ovlivní výslednou chuť, vůni a konzistenci výrobků. V závislosti na druhu výrobku by měly bakteriální zákysové kultury vykazovat v různé intenzitě následující metabolické přeměny [14, 23, 26, 30]:
  - fermentace sacharidů, která vede ke snížení pH. Při výrobě fermentovaných mléčných výrobků ovlivňuje vzniklá kyselina mléčná chuť, vůni a konzistenci výrobků prostřednictvím svého působení na samotný kasein. Nižší pH při výrobě sýrů zároveň podněcuje činnost enzymů syřidla a redukuje nebo zcela potlačuje růst nežádoucích mikroorganismů,
  - hydrolýza bílkovin a katabolismus aminokyselin, které ovlivňují zejména konzistenci, chuť a vůni přírodních sýrů,
  - lipolýza a uvolnění mastných kyselin, což příznivě ovlivňuje stravitelnost a absorpci mléčného tuku,

- produkce plyných a sensoricky významných sloučenin z různých substrátů (např. z citronanů, laktosy, bílkovin či lipidů),
  - syntéza sloučenin ovlivňující texturu produktů (např. exopolysacharidy)
2. protektivní – jejich funkce souvisí s produkcí antimikrobiálně aktivních metabolitů, jimiž jsou organické kyseliny, diacetyl, CO<sub>2</sub>, peroxid vodíku, bakteriociny, deriváty aminokyselin, které potlačují růst nežádoucích mikroorganismů způsobujících různá onemocnění z potravin,
  3. probiotické – funkce vyplývá z mnoha aktivit chemické, biochemické a mikrobiální povahy, jejichž výsledkem je pozitivní působení na zdravotní stav člověka. Jedná se o produkci speciálně biologicky aktivních látek, jako jsou peptidy s imunostimulační nebo antihyperperzní aktivitou [26, 30].

Mezi další mikrobiologické a technologické požadavky na bakteriální zákysové kultury patří [8, 14]:

- humánní původ, tzn. izolované ze stejného živočišného druhu jako je předpokládán příjemce,
- přesné taxonomické zařazení, podrobná definice a typizace,
- neprodukující toxiny, nepatogenní a geneticky stabilní,
- odolnost na přítomnost bakteriofágů, přiměřená rezistence na antibiotika,
- zachování životaschopnosti po celou dobu výroby a skladování potravin,
- omezená produkce či úplná absence tvorby biogenních aminů,
- druh lipolytických, proteolytických enzymů a jejich dynamika zrání při výrobě přírodních sýrů,
- vitální růstová dynamika a stabilní rovnováha mezi druhy,
- snadná udržitelnost a výroba,
- řízená produkce kyseliny mléčné,
- krátké zpoždění lag fáze a tedy rychlá, okamžitá fermentace,
- vytvoření požadované chuti a textury

Podle účelu jejich použití rozdělujeme kultury (Tabulka 1):

- pro výrobu zakysaných mléčných výrobků: kultura smetanová, jogurtová, acidofilní, keřírová a kultura s probiotickými mikroorganismy (bifidogenní kultura)
- pro výrobu sýrů a tvarohů: kultura smetanová, sýrařská, plísňová, propionová a mazová

Tabulka 1: Základní druhy ČMK dle účelu použití, jejich vlastnosti a zástupci [17, 31, 32].

Druh ČMK	Zástupci	Vlastnosti kultury	Použití kultury
smetanová kultura	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	nejpoužívanější, základní, směsná (kyselinotvorné a aromatvorné druhy MO), mezofilní kultura, možná kombinace s ostatními kulturami	výroba másla ze zakysané smetany, tvarohů, sýrů holandského typu, zakysaných mléčných výrobků, čerstvého sýra,
jogurtová kultura	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	směsná, termofilní a aromatvorná (tvorba acetaldehydu) kultura, mírná proteolytická a lipolytická aktivita,	výroba jogurtů a jogurtových mlék
acidofilní kultura	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus reuteri</i> , <i>Lactobacillus lactis</i> , <i>Bifidobacterium</i> sp., <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium faecium</i>	monokultura, samostatně nepoužívaná, kombinovaná s jinými kulturami, neboť vykazuje ostrou kyselou chuť	výroba zakysaných mléčných výrobků (acidofilní mléko a podmáslí, kysané nápoje, tvarohové krémy)
bifidogenní kultura	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Bifidobacterium adolescentis</i> a <i>Bifidobacterium breve</i>	probiotické účinky	výroba kysaných mléčných výrobků s probiotickými účinky,

sýrařská kultura	<i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> , <i>Lactococcus Laris</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	základem smetanová kultura	výroba polotvrdých a tvrdých sýrů
propionová kultura	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> , <i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	přídavná (sekundární), termofilní kultura, vyšší lipolytická aktivita	uplatňují se při zrání sýrů ementálského typu (tvorba ok v těstě)
mazová kultura	<i>Brevibacterium linens</i> , <i>Kocuria rosea</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Torulopsis candida</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Candida utilis</i> , <i>Geotrichum candidum</i>	směsná kultura (bakterie a kvasinky),	použití při zrání měkkých i polotvrdých sýrů s mazem na povrchu
kefírová kultura	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Kluyveromyces fragilis</i> , <i>Candida kefyr</i>	směsná kultura (bakterie a kvasinky), produkce CO <sub>2</sub> , biacetylu, etanolu, acetaldehydu a acetonu	výrobu kefíru a kefírového mléka, kumysu
plísňová kultura	<i>Penicillium roqueforti</i> , <i>Penicillium camemberti</i> , <i>Penicillium caseicolum</i> , <i>Penicillium nalgiovensis</i> , <i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	výrazná proteolytická a lipolytická aktivita, tvorba methylketonů a VMK, žampionové aroma	výroba sýrů s plísní v těstě a s plísní na povrchu

Jak je možno vidět z tabulky 1, jedna a tatáž kultura může být použita za různých podmínek pro různé účely nebo lze pro zajištění optimálních parametrů výrobku použít kombinace více kultur s různými funkcemi [30]. Samozřejmostí pro vhodné použití kombinací různých kultur je nutné technologii výroby daného produktu optimalizovat tak, aby prostřednictvím mikrobiálních i biochemických změn bylo docíleno požadovaných parametrů.

### 2.3 Příprava a vedení bakteriálních kultur klasickým způsobem

Chceme-li vyrobit kysaný mléčný výrobek nebo přírodní sýr požadovaných vlastností, klademe velký důraz na čistotu a aktivitu zákysové kultury. Nezbytně nutnou podmínkou pro průběh samotného fermentačního procesu je použití mléka (např. plnotučné, odtučněné či obnovené sušené mléko) nebo jiného růstového média (např. tekutá živná půda, kroupy, pečivo) prostého všech inhibičních látek, jako jsou antibiotika nebo bakteriofágy [33]. Proto je důležité klást důraz na jakost ČMK dodávaných výrobcem kultur, na výběr a ošetření mléka, ale i média pro kultivaci, dodržování hygienicko-sanitačních režimů propagační stanice i výroby fermentovaných mléčných výrobků a dodržování odborné úrovně a pracovní kázně personálu [31].

Tepelným ošetřením mléka dochází k vytvoření vhodných podmínek pro rozvoj mikroorganismů zákysové kultury, neboť dochází k:

- usmrcení bakteriofágů,
- eliminaci některých inhibičních látek,
- určitému stupni rozkladu bílkovin,
- vypuzení rozpuštěného kyslíku,
- usmrcení živých mikroorganismů [14].

Pro minimalizaci rizika napadení starterové kultury bakteriofágy a udržení optimálních podmínek pro rozvoj kultury, je dobré mít pro přípravu matečné kultury v mlékárenském závodě oddělenou místnost (propagační místnost) [14]. V této místnosti by se měl udržovat mírný přetlak a měla by být vybavena vzduchovými filtry. Matečná kultura se připravuje do skleněných lahví o objemu 100 ml. Mléko určené k inokulaci je tepelně ošetřeno sterilací v autoklávu. Po sterilaci probíhá vychlazení média na kultivační teplotu a samotná inokulace komerční kulturou. Inokulaci je zapotřebí provádět zcela aseptickým přenosem požadovaného množství bakteriální kultury a to tak, že se do lahve pro přípravu matečné kultury vpraví očkovací dávka pomocí sterilní injekční stříkačky [30]. Každá starterová kultura potřebuje pro své pomnožení a rozvoj požadovaných vlastností optimální

kultivační teplotu, která je udržována po určitou dobu. Délka doby inkubace závisí na použitém typu bakteriální kultury a velikosti inokula. Tento proces trvá 3–20 hod. Bakterie se nyní rychle množí a fermentují přítomnou laktózu za vzniku kyseliny mléčné. V přítomnosti heterofermentativních a aromatvorných bakterií vznikají i četné další látky [14]. Výše inkubační teploty ovlivňuje poměr přítomných bakteriálních rodů, produkci některých metabolitů a průběh pH. Je důležité proto teplotu kontrolovat, aby bylo možné při dosažení požadovaného stupně kyselosti ukončit proces fermentace [30]. Matečních kultur se vede v laboratoři několik a po vyhodnocení se vybírají nejvhodnější kmeny kultur pro provozní použití. Zralá matečná kultura se vychladí a ve vychlazeném stavu ponechá do dalšího přeočkování. V případě oslabení kultury či nedostatečném pomnožení na požadovaný počet, lze kulturu pravidelným přeočkováním oživit (resuscitovat) [25]. Opakovaným přeočkováváním se však zvyšuje riziko kontaminace. Zchlazením matečné kultury je zastaven proces fermentace. Zároveň je zachován vysoký stupeň aktivity kultury [14, 30]. ČMK je možné uchovávat v podobě zchlazené, zmrazené nebo sušené, ale vždy za aseptických podmínek [31].

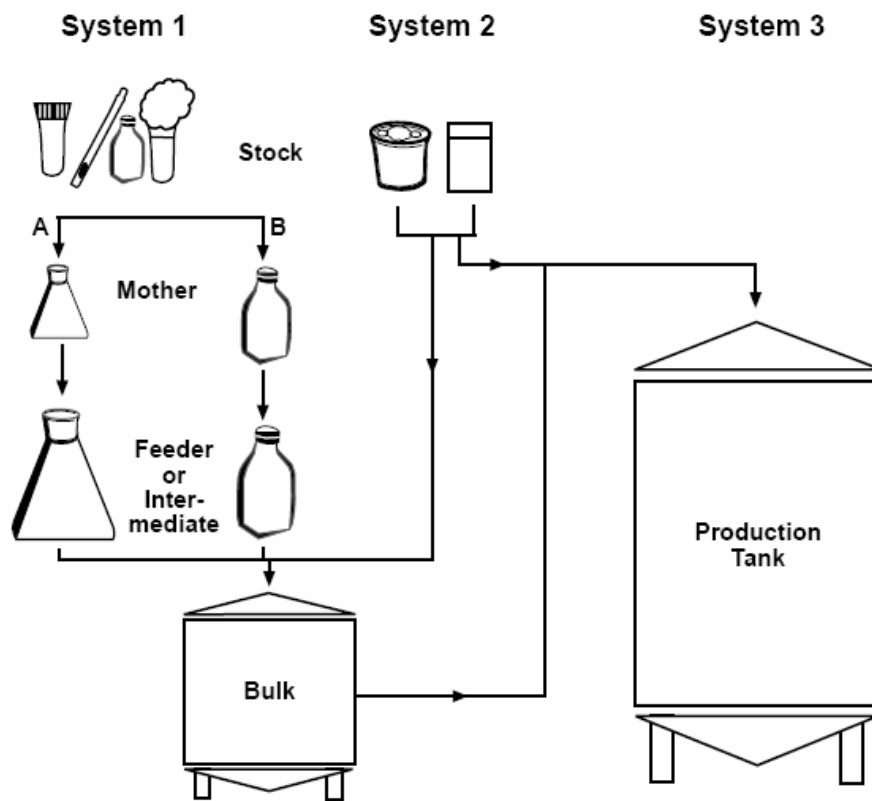
Při vysoké spotřebě se připravuje dále mateční zákys – matečnou kulturou se zaočkuje větší objem mléka [21]. Do kontejneru pro matečný, případně mezioperační zákys a do tanku pro přípravu provozního zákysu se požadovaná dávka inokula dopravuje proudem sterilovaného vzduchu [30]. Pro přípravu matečného a mezioperačního zákysu musí být mléko opět ošetřeno za vyšších teplotních režimů a to již z výše uvedených důvodů (teplotu 90–95 °C s výdrží 30–45 minut). Stejných parametrů pro teplotu a výdrž využijeme i při ošetření mléka pro kultivaci a přípravu provozního zákysu. Pro úspěšné vedení kultur je nezbytné, aby byly povrchy výrobního zařízení dokonale zbavené nežádoucích mikroorganismů a prosté všech zbytků detergentů i dezinfekčních látek [30]. Použití tekuté kultury je náročné na zručnost a zodpovědnost personálu a může snadno dojít ke kontaminaci kultury bakteriofágy. Proto je trend omezovat tekuté kultury a nahrazovat je koncentrovanými hlubokozmrazenými nebo lyofilizovanými kulturami pro přímé zaočkování mléka pro výrobu mlékárenských výrobků [14, 28].

Z důvodu možné kontaminace a také náročnosti přípravy tekutých kultur je možné využití ČMK i v jiných formách [14, 30, 34]:

- 1) tradiční tekutá forma kultury pro inokulaci matečné kultury ( $10^8$  JTK/ml),
- 2) sprejově sušené nebo lyofilizované kultury pro zaočkování matečné kultury ( $10^8 - 10^9$  JTK/g), označované DRI VAC,

- 3) lyofilizované, koncentrované kultury ve formě prášku, pro inokulaci provozního zákysu ( $10^{10} - 10^{11}$  JTK/g), označované REDI SET,
- 4) hlubokozmrazené, koncentrované kultury ve snadno rozpustné formě, pro přímou inokulaci produktu ( $10^{11} - 10^{12}$  JTK/g), označované DVS.

Obrázek 2 znázorňuje 3 možné způsoby přípravy zákysových kultur. Systém 1 umožňuje přípravu matečné kultury za použití tekuté, lyofilizované nebo hlubokozmrazené formy komerční kultury. Matečná kultura se poté používá k inokulaci provozního zákysu. Systém 2 znázorňuje možnost použití lyofilizované nebo hlubokozmrazené kultury pro inokulaci provozního zákysu bez nutnosti přípravy matečné kultury. Systém 3 pak využívá vysoce koncentrovaných hlubokozmrazených nebo lyofilizovaných kultur pro přímou inokulaci produktu.



Obrázek 2: Schéma přípravy zákysových kultur [35].

## 2.4 Kontrola jakosti čistých mlékařských kultur

Máme-li zaručit standardnost a vysokou jakost mlékárenského produktu, je důležité se zaměřit na činitele, které mohou ve výsledku tento produkt ovlivnit. Vedle jakosti zpracovávaného mléka, technického zařízení, výrobních postupů a kvality lidské práce, hraje významnější roli kvalita čistých mlékařských kultur. Jedná se především o jakost matečných a provozních zákysů z nich připravených. Je proto velmi důležité a nezbytné věnovat velkou pozornost samotné přípravě ČMK, ale také i kontrole jakosti. Neznamená to však, že by se kontrolní laboratoř zaměřovala pouze na kontrolu jakosti ČMK. Laboratoř pro výrobu kultur se zaměřuje nejen na jakost použitých surovin a materiálu, ale i na celý výrobní proces jako např. kontrola hygieny a sanitace, čistota vzduchu v provozu, čistota vody a v poslední řadě i samotná osobní hygiena pracovníků. Ve výrobních úsecích, kde by mohlo docházet k rekontaminaci ČMK, se provádí fázová kontrola. Touto kontrolou se zjišťuje mikrobiologická jakost ČMK. Na základě získaných výsledků z mikrobiologického rozboru je možné v daném výrobním úseku zavést nápravná opatření a předejít tak vadám produktů. Mikrobiologické rozborů umožňují zjistit i počet životaschopných bakterií mléčného kvašení, jejich růstovou aktivitu a vitalitu. Nezbytnou informací je i zjištění biochemické aktivity. Především se jedná o kysací aktivitu ČMK, neboť na ní závisí množství přidávaného zákysu k zakysání určitého množství mléka při výrobě jednotlivých druhů zakysaných mléčných výrobků. Využívá se metoda dle Soxhlet-Henkela pro stanovení titrační kyselosti nebo se pomocí pH metru stanoví aktivní kyselost. Senzorické hodnocení zákysových kultur je další, velmi využívanou provozní metodou. Odhalení případných odchylek a nedostatků touto metodou je velmi rychlé a jednoduché. Jednotlivé druhy zákysových kultur se vyznačují svými charakteristickými znaky. Obecnými hodnotícími kritérii mohou být: konzistence, tvorba filmu a jeho výdrž na stěnách nádoby, barva, lomivost, chuť a vůně, tvorba sraženin či uvolňování syrovátky [25, 26].

## 2.5 Non-starterové kultury

Ve výrobě přírodních sýrů se také často setkáme s tzv. non-starterovými bakteriemi mléčného kvašení (NSLAB). Non-starterové bakterie mléčného kvašení jsou náhodné bakterie mléčného kvašení, které mohou kontaminovat sýry. Jako hlavní bakteriální skupiny NSLAB lze považovat non-starterterové laktobacily (např. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*), leukonostoky



(např., *Leuconostoc lactis*, *Leuc. mesenteroides*), pediokoky (např., *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*) a enterokoky (např. *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*) [23, 36]. Zdrojem NSLAB v sýru je pravděpodobně syrové mléko, ale i pasterované, neboť bylo prokázáno, že velmi malé procento NSLAB mohou přežít pasteraci a být zdrojem sekundární mikroflóry. Jedná se tedy o nezákysové kultury. Dalšími zdroji NSLAB může být také prostředí mlékárny, povrch výrobního zařízení či biofilm tvořící se na povrchu zařízení. Lze tedy říct, že se jedná o „kontaminanty“. Na druhou stranu se NSLAB významně podílí na tvorbě sensoricky aktivních látek [18]. Této vlastnosti se může využívat například při zrání sýru. Na producenty je vyvíjen stále větší nátlak ze strany dodržování přísných hygienických a sanitačních režimů, které samozřejmě zvyšují jakost výrobku po stránce zabezpečení zdravotní nezávadnosti potravin, na druhou stranu však také dochází k postupnému snižování až k úplnému vymizení přirozeně se vyskytujících NSLAB ve výrobě. Ztráta NSLAB z prostředí mlékárny však můžeme mít dopad na nedostatečně vyvinutou plnou chuť u zrajících sýrů [36, 37].

Důležitost NSLAB spočívá v jejich ovlivnění jak proteolytických tak i lipolytických procesů při výrobě přírodních sýrů. Četnost a zastoupení NSLAB je více heterogenní u sýrů které jsou vyráběny ze syrového mléka. Růst těchto bakterií v prostředí sýru je velmi rychlý, i když počáteční množství bývá výrazně nižší (za dodržení dobrých hygienických podmínek) ve srovnání se startérovými kulturami. Rychlost vývoje NSLAB však závisí na teplotě zrání. Při poklesu teploty zrání je obecně omezen vývoj mikroflóry sýra, což s sebou přináší současné zpomalení biochemických transformací zapojených do zrání [38].

Některé bakteriální kmeny z NSLAB byly vyizolovány a staly se tak součástí primární startovací kultury (laktokoky, enterokoky) [36]. Začlenění příbuzných kmenů non-starterových laktobacilů (zejména *Lb. casei*, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus rhamnosus*) vede ke zlepšení intenzity chutě, zvýšení aroma a rychlejšímu zrání a může být tedy vhodnou metodou jak překonat ztrátu smyslové kvality sýra [18, 36].

### 3 PROCESY PROBÍHAJÍCÍ V PRŮBĚHU ZRÁNÍ SÝRŮ

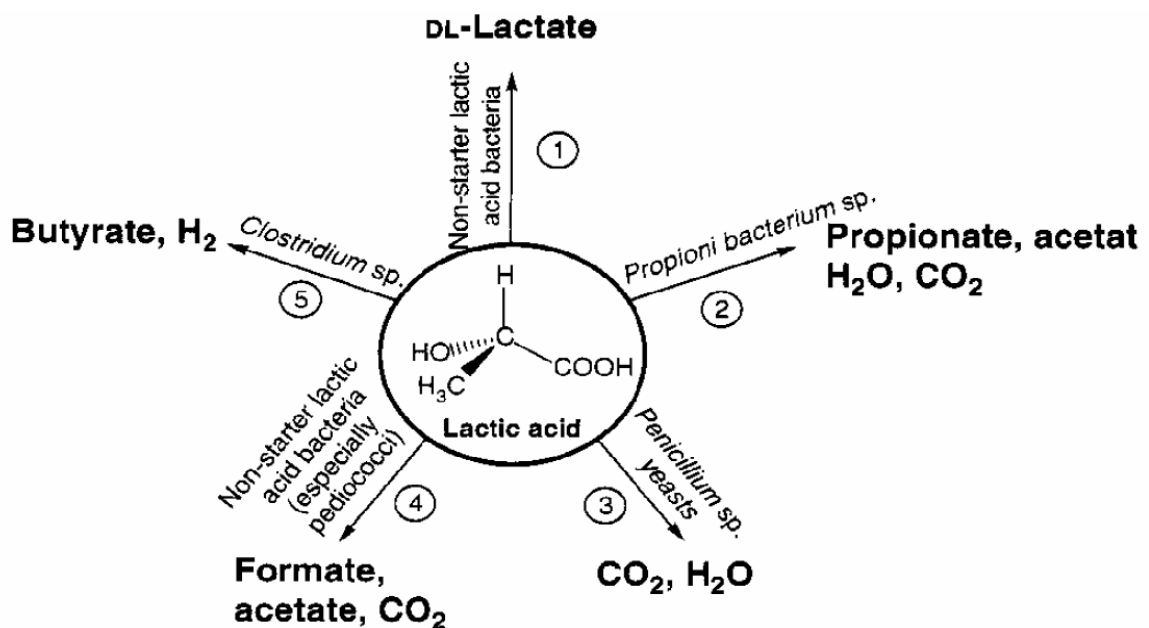
Zrání je složitý mikrobiologický, fyzikální, chemický a biochemický proces [16]. Procesu se účastní enzymatický aparát bakterií zákysových a nezákysových kultur, kvasinek, sekundární mikroflóry, ale také enzymy pocházející ze syřidla, samotného mléka i enzymy uvolněné rozpadem (lyse) bakteriálních buněk [39, 40]. Zráním dochází utváření vzhledu, chutě, vůně a konzistence sýra. Jednotlivé znaky jsou pro každý jednotlivý druh přírodního sýra individuální a charakteristické [16]. Biochemické procesy jsou uskutečňovány ve dvou fázích. V primární fázi dochází k lipolýze, proteolýze a odbourávání zbytkové laktózy (kyseliny mléčné, citrátů). Sekundární fází je pak přeměna aminokyselin a mastných kyselin za vzniku těkavých senzorycky aktivních látek. Jednotlivé probíhající fáze nejsou od sebe striktně časově odděleny a mohou tedy na sebe plynule navazovat, či se vzájemně překrývat [28]. Zrací proces může probíhat anaerobně v celé hmotě nebo aerobně (od povrchu dovnitř hmoty sýra). Oba typy zrání se mohou vzájemně doplňovat. U tvrdých sýrů převládá anaerobní zrání. Na správný průběh zrání má vliv několik faktorů. Mezi ty nejdůležitější patří pH sýrů, koncentrace soli, teplota, relativní vlhkost a doba zrání [39].

Zrací proces je časově zdlouhavý, náročný na udržení vhodných podmínek v jednotlivých zracích sklepech. Zahrnuje značný podíl ruční práce (např. omývání, propichování, obracení) a v neposlední řadě vyžaduje velké skladovací prostory. V mlékárenském průmyslu se tak výroba sýrů stává jednou z finančně nejnákladnějších oblastí. Částečným řešením mohou být nové poznatky v oblasti chemické a genetické modifikace bakteriálních buněk ČMK a doplňkových kultur, izolování exogenních enzymů a pochopení celé dynamiky zracího procesu [23].

#### 3.1 Metabolismus laktózy, kyseliny mléčné a citrátu

V procesu výroby sýrů přechází větší množství laktózy do syrovátky [16]. Je důležité, aby bylo zbytkové množství laktózy zcela rozloženo a nemohlo tak dojít k pomnožení nežádoucí sekundární mikroflóry (plísně – *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. či bakterie – *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Micrococcus* spp.) [23, 36]. K samotnému rozkladu laktózy dochází již v průběhu zpracování sýřeniny. Nejintenzivnější rozklad však probíhá při odkapávání a lisování sýřeniny. Během prvních dnů zracího procesu dojde k úplnému vymizení laktózy. Vzniklá kyselina mléčná reaguje s kaseinem, z něhož vyváže vápník za vzniku mléčnanu vápenatého. Za přítomnosti solného roztoku a vodného prostředí

(v solné lázni) dochází k bobtnání monokalciumpropionátu. Vlivem bobtnání dochází ke slepování sýřeniny za vzniku homogenní hmoty sýru [23]. Podle druhu BMK přítomných v použité kyselé kultuře, přítomnosti NSLAB nebo nežádoucí mikroflóry, může dojít k rozkladu kyseliny mléčné na kyselinu propionovou,  $\text{CO}_2$ , vodu, acetát,  $\text{H}_2$ , butyrát a další látky. Obrázek 3 zachycuje 5 možných cest rozkladu kyseliny mléčné v průběhu zrání přírodních sýrů. První možnou cestou je racemizace kyseliny mléčné, které se účastní NSLAB za vzniku DL-kyseliny mléčné. *Propionibacterium* svou metabolickou aktivitou způsobují rozklad kyseliny mléčné za vzniku kyseliny propionové, acetátu,  $\text{H}_2\text{O}$  a  $\text{CO}_2$ . Třetí cestou je oxidační metabolismus prostřednictvím kvasinek a plísní. Metabolickou aktivitou NSLAB (pediokoků) vzniká rozkladem kyseliny mléčné kyselina mravenčí, acetát a  $\text{CO}_2$ . Poslední cestou je anaerobní metabolismus *Clostridium* sp., kdy rozkladem kyseliny mléčné vzniká kyselina máselná a  $\text{H}_2$ . Činností *Propionibacterium* sp. (*Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* nebo *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*) dochází u sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou (sýry švýcarského typu) k vysoké produkci  $\text{CO}_2$ . V sýřenině nahromaděný oxid uhličitý je pak zodpovědný za tvorbu sýrových ok, která jsou pro tento druh sýra tolik typická [16, 36]. Formování ok závisí na rychlosti a množství vyprodukovaného  $\text{CO}_2$ , počtu a velikosti míst vhodných pro tvorbu ok, tlaku  $\text{CO}_2$ , rychlosti difúze a teplotě sýra. Kyselina mléčná může reagovat například i s rozkladnými produkty bílkovin.

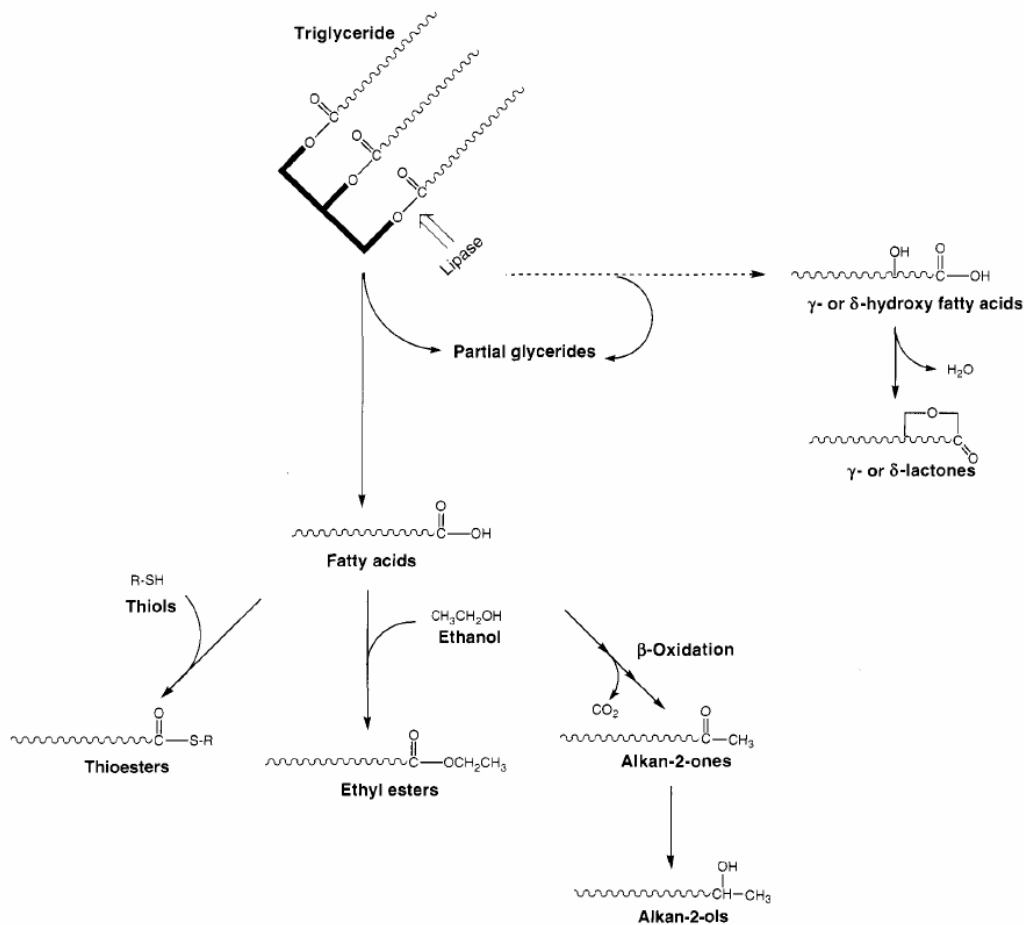


Obrázek 3: Možné způsoby přeměn kyseliny mléčné během zrání [23].

Citrát-pozitivní kmeny laktokoků (např. *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis*) a leuconostoků (např. *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*) metabolizují citrát na CO<sub>2</sub> a důležité chuťové látky. Příčinou malých ok v hmotě sýra holandského typu je právě produkovaný oxid uhličitý [36]. Z chuťových látek je to především diacetyl, který se podílí na chuti těchto sýrů. Některé kmeny NSLAB mají také schopnost metabolizovat citrát. V tomto případě je citrát metabolizován na butanol, kyselinu octovou a diacetyl. V prvních šesti měsících procesu zrání klesne činností NSLAB množství citrátu v syřenině na stopová množství [36].

### 3.2 Lipolýza a metabolismus volných mastných kyselin

Lipidy jsou důležité z hlediska tvorby textury sýra a jejich rozkladné produkty (volné mastné kyseliny, laktony, estery, alkany a sekundární alkoholy) slouží jako prekurzory pro sensoricky aktivní látky (především chuťové). Samotnými nositeli chuťových vlastností a aroma jsou mastné kyseliny s krátkým řetězcem. Jedná se o enzymatickou hydrolyzu triacylglycerolů (TAG) na di- (DAG) či monoacylglyceroly (MAG), popř. až na volné mastné kyseliny. U TAG jsou přednostně hydrolyzovány esterové vazby na pozicích C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub> za vzniku DAG s esterovými vazbami v polohách C<sub>1,2</sub> a C<sub>2,3</sub>. Později dochází k hydrolyze na MAG s esterovou vazbou v poloze C<sub>2</sub> [23]. K lipolýze dochází činností lipáz či esteráz. Lipázy jsou klasifikovány na základě délky hydrolyzovaného řetězce, fyzikálně-chemické povaze substrátu a enzymatické kinetiky [36]. Podle původu se jedná o lipázy endogenní (pochází přímo z mléka – lipoproteinlipáza) nebo exogenní (mikrobiálního původu, ze syřidla – např.: jehněčí abomasa přidávána ve formě syřidlové pasty. Typické pro výrobu italských sýrů - sýr Pecorino [36, 41]). Stupeň lipolýzy závisí na lipolytické aktivitě mikroflóry přidané kyselové kultury. Volné mastné kyseliny mohou dále podléhat β-oxidaci za vzniku methylketonů (alkan-2-on). Tyto methylketony vytváří charakteristickou chuť a aroma u sýrů s plísní v těstě (např. Niva) (Obrázek 4) [16, 36].



Obrázek 4: Možné metabolické cesty rozkladu volných mastných kyselin [16, 23].

### 3.3 Proteolýza

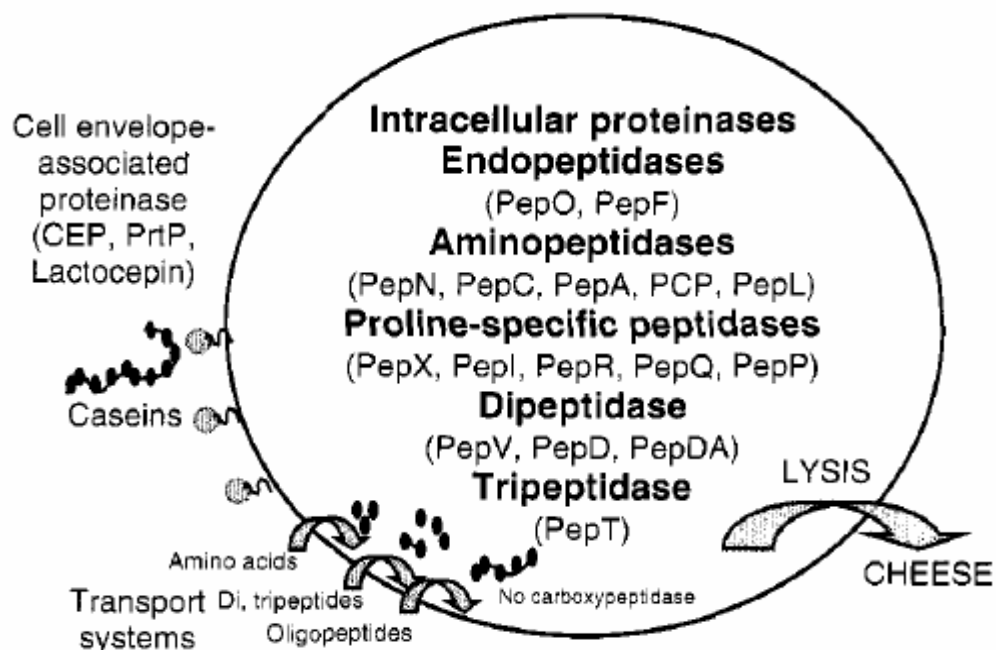
Procesem proteolýzy získává sýr měkčí texturu a vyvíjí se chuťově aktivní látky. Je pravděpodobně nejdůležitější biochemickou fází v procesu zrání většiny sýrů [16, 36, 40]. Měknutí textury je způsobeno hydrolýzou a degradací kaseinové matrice v sýřenině, zvýšením pH a vlivem snížení vodní aktivity v sýřenině, vyvolané zvýšenou vazností vody na nově vzniklé karboxylové a amino skupiny vytvořené v průběhu hydrolýzy [16]. Forma kaseinu ovlivňuje proteolýzu hydrolytickými enzymy syřidla. Degradace kaseinu v rozpustné formě je rychlejší, než kaseinu vázaného v micelách (Ledford et. al.). Míra rozštěpení kaseinů je závislá na druhu sýra, při čemž frakce kaseinu  $\alpha_{S1}$  je však hydrolyzována vždy. Zpočátku jsou kaseiny hydrolyzovány pomocí zbytkové koagulační aktivity syřidla, plasminu a jiných původních proteolytických enzymů na řadu velkých a středně velkých peptidů. U většiny sýrů dochází činností chymozinu v primární fázi proteolýzy, ke štěpení vazeb mezi Phe<sub>23</sub>-Phe<sub>24</sub> frakce  $\alpha_{S1}$  kaseinu [36]. Frakce  $\alpha_{S2}$ -kasein je vůči aktivitě chymozinu odolnější než frakce  $\alpha_{S1}$ -kaseinu [16]. Činností chymozinu

je frakce  $\alpha_{S2}$ -kaseinu omezeně štěpena a to pouze v hydrofobní oblasti molekuly (sekvence 90-120 a 160-207) [16]. Primární produkty proteolýzy jsou dále hydrolyzovány proteinázami a peptidázami primárních starterových kultur, NSLAB a sekundárních starterových kultur na kratší peptidy a aminokyseliny (sekundární proteolýza).

Mezi hlavní rysy proteolytického systému BMK můžeme zahrnout [42]:

1. proteinázy uvolňují velké množství oligopeptidů, ze kterých se vytváří štěpy o 4–8 aminokyselinách,
2. buňky získávají dusík transportem oligopeptidů,
3. většina peptidáz je lokalizována intracelulárně a způsobují kompletní degradaci.

BMK potřebují ze svého prostředí získávat řadu esenciálních aminokyselin (zdroj uhlíku a dusíku), které si nedokáží sami syntetizovat [43]. Proteolýza substrátu a peptidů je proto nezbytným předpokladem k jejich získání a následnému růstu. Proteolytické enzymy se u BMK nachází (v případě rodů *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*) v buněčné stěně, buněčné membráně a cytoplasmě [21]. Jedná se o velký komplex různých druhů specifických proteolytických enzymů, který lze obecně aplikovat i na ostatní duhy BMK (Obrázek 5) [16, 23, 40].



Obrázek 5: Proteolytický systém rodu *Lactococcus* [23].

Při výběru ČMK rozhoduje její mikrobiální zastoupení, neboť každý jednotlivý zástupce BMK se projevuje rozdílnou proteolytickou aktivitou a tedy i různou intenzitou ovlivňuje proces zrání [40]. Např. jogurtová kultura vykazuje vyšší proteolytickou aktivitu enzymů než kultury probiotické. Na druhou stranu se v sýrech mohou vyskytovat enzymy pocházející ze šesti zdrojů [16, 36]:

- syřidlové – enzymatická aktivita závisí na druhu syřidla (chymosinové, pepsinové, enzymy plísní či rostlinné),
- surovinové (z mléka) – např. plasmin vzniklý z neaktivního plasminogenu, lysosym somatických buněk,
- starterové kultury – hlavní zdroj peptidáz. Hydrolyticky štěpí krátké peptidy za vzniku volných aminokyselin,
- non-starterové kultury,
- sekundární starterové kultury – záměrně přidané pro rozvoj chuti a aroma určitého druhu sýra (např. *Penicillium roqueforti* – sýr s modrou plísní v těstě (Niva)),
- exogenní proteinázy a peptidázy – izoláty přidávané záměrně pro svou akceleraci zrání a zesílení intenzity chuti.

Peptidázy, které se podílí na štěpení peptidových vazeb, vykazují značnou specifitu. Množství a typ peptidových vazeb, které může peptidáza štěpit, jsou závislé na aminokyselinovém složení proteinu. Peptidázy můžeme rozdělit podle místa jejich účinku na endopeptidázy a exopeptidázy. Endopeptidázy katalyzují hydrolyzu vazby uvnitř řetězce za vzniku peptidů různé velikosti. Naopak exopeptidázy katalyzují odštěpení pouze koncových aminokyselin z polypeptidového řetězce. Z hlediska struktury katalytického centra můžeme rozlišovat exopeptidázy serinové, cysteinové, aspartátové, metalopeptidázy a dále zatím neklasifikované peptidázy [23, 36].

Stupeň proteolýzy se posuzuje z hlediska rozsahu a hloubky zrání. Rozsah zrání je podíl obsahu rozpustného dusíku k celkovému obsahu dusíku. Hloubka zrání je definována jako podíl obsahu dusíku volných aminokyselin a amoniakálního dusíku k celkovému obsahu dusíku [44].

### 3.3.1 Metabolismus volných aminokyselin

Volné aminokyseliny jsou nezbytným předpokladem pro vývoj chuti sýrů. Vývoj chuti může být přímo úměrný obsahu volných aminokyselin a mohou být považovány za spolehlivý ukazatel procesu zrání. Nositeli sladké chuti jsou např. glycin, serin, threonin, alanin, Pro. Kyselou chuť vykazují histidin, glutamová kyselina, aspartová kyselina a hořké aminokyseliny jsou arginin, metionin, valin, leucin, phenylalanin, tyrosin, isoleucin, tryptofan. Mohou tedy svou přítomností ovlivňovat chuť sýrů. Na druhou stranu jsou aminokyseliny zejména prekurzory pro vývoj řady sensoricky aktivních látek, jako jsou např. aldehydy, alkoholy, aminy, estery aj. [16].

Přestože katabolismus aminokyselin není ještě zcela objasněn, jsou popsány dvě možné cesty rozkladu aminokyselin [40]. První série reakcí je zahájena činností aminotransferasy, která přenáší aminoskupinu na keto kyselinu. Tato transaminace nebo deaminace může probíhat oběma směry. Výsledkem je vznik nové keto kyseliny a aminokyseliny. Podle enzymatické nebo chemické reakce jsou transaminací vzniklé  $\alpha$ -keto kyseliny degradovány na jiné sloučeniny (např. aldehydy, alkoholy). V druhé sérii reakcí dochází k rozkladu aminokyselin činností aminokyselinových lyáz, které štěpí postranní řetězec aminokyseliny. Tyto reakce jsou zvláště důležité pro katabolismus aromatických aminokyselin. Kromě těchto dvou objasněných drah existují i méně probádané dráhy, ve kterých mohou být aminokyseliny katabolizovány. Jedná se dráhy dekarboxylace a vznik aminů. Mnoho vznikajících aminů v sýru vykazují biologickou aktivitu. Často se projevují silným a nepříjemným zápachem. Množství produkovaných aminů v sýru závisí na koncentraci prekurzorů aminokyselin a na mikroflóře sýra [16, 36, 45].

### 3.3.2 Produkce biogenních aminů

Biogenní aminy (BA) jsou reaktivní, nízkomolekulární, bazické, dusíkaté látky produkované bakteriemi vykazující dekarboxylázovou aktivitu [46]. Negativní produkce biogenních aminů je jedním z důležitých kritérií při rozhodování, zda daný kmen BMK může být využit při výrobě sýrů. K nejdůležitějším bakteriálním druhům vykazující dekarboxylázovou aktivitu a tedy produkující biogenní aminy v sýrech řadíme: *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *Streptococcus faecium*, *Propionibacterium* spp., druh *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* a čeleď *Enterobacteriaceae* [47, 48]. Produkce biogenních aminů je vlastnost specifická spíše pro určité kmeny bakterií než vlastnost



typická pro daný druh. Různé kmeny téhož druhu se mohou lišit v produkci biogenních aminů [49]. Nejdůležitějšími zástupci, kteří vykazují dekarboxylázovou aktivitu u sýrů holandského typu jsou právě laktobacily. Dekarboxylázová aktivita je však pro určitý druh i kmen laktobacilů specifická. Množství biogenních aminů je pro různé druhy sýrů odlišné a úzce souvisí s přítomností startérových BMK a NSLAB. Dále obsah biogenních aminů ovlivňuje zejména: doba zrání, aerobní/anaerobní prostředí, teplota zrání, koncentrace NaCl, vodní aktivita a pH sýru [47].

Pro vznik biogenních aminů v potravinách musí být splněny tři základní podmínky [50, 51]:

1. potravina musí obsahovat aminokyseliny,
2. v potravine musí být přítomny mikroorganismy vykazující dekarboxylázovou aktivitu
3. pro růst a množení mikroorganismů musí být vytvořené vhodné podmínky (pH, obsah glukózy, teplota, přítomnost NaCl, NaNO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> a množství přítomných aminů) [47, 48, 52].

Podle chemické struktury rozdělujeme biogenní aminy na: alifatické (diaminy: putrescin, kadaverin, polyaminy: spermidin, spermin a agmatin), aromatické (fenylethylamin a tyramin) a heterocyklické (histamin, tryptamin) [50, 52]. Biogenní aminy vznikají z aminokyselin působením dekarboxyláz, jejichž kofaktorem je pyridoxalfosfát. Dekarboxylace je děj, při kterém se odbourává karboxylová skupina aminokyseliny. Enzym dekarboxyláza z karboxylové skupiny příslušné aminokyseliny odštěpí oxid uhličitý za vzniku bazického aminu. Další možnou cestou vzniku je transaminace aldehydů a ketonů [52].

Biogenní aminy jsou velmi reaktivní látky. Účastní se hlavně enzymatických reakcí za vzniku příslušných derivátů. Při dlouhodobém skladování potravin nebo při skladování za zvýšené teploty, dochází k reakci s triacylglyceroly, jejímž výsledkem je vznik amidů mastných kyselin. Stejně jako další aminosloučeniny i biogenní aminy vstupují do reakcí neenzymového hnědnutí za vzniku příslušných iminů. Iminy vznikají i oxidací biogenních aminů. Reakcí sekundárních aminů s oxidy dusíku mohou vznikat karcinogenní nitrosaminy [52].

V nízkých koncentracích jsou BA přirozenou složkou řady potravin. Některé BA mají důležitou fyziologickou funkci v lidském organismu. Mimo jiné jsou zdrojem dusíku, prekurzory hormonů, působí jako přenašeče v centrálním mozgovém systému. Nicméně

ve vysoké koncentraci, mohou mít toxické účinky, což může vést k patologickým procesům probíhající v lidském těle (bolesti hlavy, křeče, průjemy, zvracení, ovlivnění srdeční činnosti a další) [46, 53, 54]. Vyšší množství BA obsahují fermentované potraviny (kysané zelí, sýry, fermentované masné výrobky, víno, pivo), kde vznikají činností mikroorganismů [50]. Vysoká množství BA vykazují potraviny v pokročilém stupni kažení. Množství biogenních aminů lze tedy snadno využít jako indikátor čerstvosti a kvality potravin [47, 50, 55, 56]. Nařízení komise (ES) č. 2073/2005 stanovuje limity pouze pro histamin a to v produktech rybolovu a u druhů ryb, které by mohly obsahovat větší množství histidinu [57]. Dřívější vyhláška (nyní neplatná) č.298/1997 Sb. stanovovala limity pro histamin v rybách, rybích výrobcích pivu a vínu. Dále to byl tyramin pro sýry tvrdé, měkké, zrající, olomoucké tvarůžky a pro červená vína a vybranou skupinu potravin (skupina A) [58].

## II. PRAKTICKÁ ČÁST

#### 4 CÍL PRÁCE

Cíl práce lze stručně charakterizovat jako sledování biochemické aktivity vybraných zákysových kultur a to prostřednictvím:

- kysací aktivity, resp. rychlosti s jakou příslušná komerční zákysová kultura prokysá inokulované médium (mléko),
- změny proteinového profilu použitím elektroforetické metody v závislosti na inkubaci zákysů a době zrání modelových vzorků přírodních sýrů,
- proteolytické aktivity exopeptidáz zákysových kultur v inkubovaných zákysech a dále v modelových vzorcích přírodních sýrů v průběhu jejich zrání a to detekcí množství volných aminokyselin,
- dekarboxylázové aktivity sledovaných kultur v inkubovaných zákysech a ve vzorcích modelových sýrů v průběhu jejich zrání.

## 5 METODIKA

Biochemická aktivita byla sledována u sedmi vybraných druhů mezofilních zákysových kultur:

- Laktoflora smetanová (Milcom a.s.). Tato kultura je kulturou směšnou, která obsahuje kyselinotvorné a aromatvorné zástupce BMK: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*.
- Delvo LL-50B DSL pro přímou inokulaci (O.K. SERVIS BioPro, s.r.o.). Tato kultura je složena z definovaných kmenů homofermentativních BMK: *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. Jedná se o kulturu typu O.
- Delvo DX-33D DSL (O.K. SERVIS BioPro, s.r.o.). Obsahuje kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Leuconostoc* spp. Kultura typu LD. Kultura vytváří aroma a CO<sub>2</sub>.
- FLORA DANICA a CHN-19 (Chr. Hansen a.s.). Tyto kultury jsou typu LD, charakteristické tvorbou CO<sub>2</sub> a aroma během acidifikace. Obsahují kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* a *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. Jedná se o koncentrovanou kulturu určenou pro výrobu provozních zákyků, bez nutnosti jejich předchozí reaktivace. Jsou ve formě granulátu, který je uchováván při mrazírenských teplotách. Kultura CHN-19 není tak aromatická jako kultura FLORA DANICA.
- Hlubokozmrazené kultury C352a C502 (Chr. Hansen a.s.). Aromatické kultury typu LD. Kultury vytváří aroma a CO<sub>2</sub>, dále nabízí rychlou fermentaci při nízkém očkovacím poměru. Obsahují kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* a *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. Barva kultury špinavě bílá až hnědá. Kultura je ve formě mražených granulí uchovávaných při -80°C.

Pro stanovení proteolytické aktivity zákysových kultur v sýrech a ke stanovení tvorby biogenních aminů v zákysech a sýrech v závislosti na době skladování, byly použity již hotové lyofilizované vzorky sýrů. Tyto vzorky byly vytvořeny v rámci diplomové práce Bc. Heleny Slaninové – „Vliv přísadky biologicky aktivních látek na jakost modelového

systému přírodního sýra“. Jednalo se o sérii 7 výrob sýrů. V každé výrobní sérii byla použita jiná zákysová kultura.

### 5.1 Sledování kysací aktivity zákysových kultur

Testy kysací aktivity byly prováděny pro vybrané mezofilní zákysy za použití výše zmíněných kultur. K získání hotového zákysu byla vypočtena a navážena výrobcem uváděná množství jednotlivých komerčních kultur (Tabulka 2). Samotnému měření aktivní kyselosti předcházela příprava zákysové kultury. Navažování zákysové kultury probíhalo pomocí analytických vah A&D GH-200 EC.

Tabulka 2: Seznam použitých mezofilních mlékařských kultur a jejich dávkování.

mezofilní kultura	forma kultury	dávka na 80 ml [mg]
Laktoflora smetanová (Milcom a.s.)	sušená	800
Delvo LL-50B DSL (O.K. SERVIS BioPro, s.r.o.)	koncentrovaná lyofilizovaná	30
FLORA DANICA (Chr. Hansen a.s.)	koncentrovaná lyofilizovaná	30
CHN-19 (Chr. Hansen a.s.)	koncentrovaná lyofilizovaná	30
Delvo DX-33D DSL (O.K. SERVIS BioPro, s.r.o.)	koncentrovaná lyofilizovaná	30
C502 (Chr. Hansen a.s.)	hluboce mražené granule	10,8
C352 (Chr. Hansen a.s.)	hluboce mražené granule	10,8

Odvážené kultury byly přeneseny do vytemperovaného (inokulační teplota 25 °C) vysoce pasterovaného mléka (Čerstvé polotučné o tučnosti 1,5 %, Olma a.s., Česká republika) ve sterilních širokohrdlých lékovkách se šroubovacím závitem. Po důkladné 20minutové homogenizaci v laboratorní třepačce LT2 byly zákysy přeneseny do inkubátoru (INCULINE zakoupený u firmy BioTech a.s., Praha) vyhřátého na inkubační teplotu 25 °C. Byly zhotoveny vždy dva paralelní zákysy vedle sebe od každé kultury.

Aktivní kyselost zákysových kultur byla měřena pomocí pH-metru (pH Spear Eutech s pevnou vpichovou elektrodou, Eutech instruments, Nizozemsko, Nijker, zakoupený u firmy BioTech a.s.). Hodnota pH je ovlivněna teplotou, proto byla při každém měření tato teplota zjišťována. Teplota se po celou dobu měření neměnila a odpovídala inkubační teplotě (25 °C). Mezi měřeními byla elektroda pH metru ponořena v dezinfekčním

prostředku Aktivit D (BANCHEM s.r.o., Dunajská Streda), aby se zabránilo případné kontaminaci. Před každým jednotlivým měřením byla elektroda opláchnuta vodou pro zamezení přenosu reziduí inhibičních látek z dezinfekčního prostředku. Hodnoty pH byly získávány pro každou jednotlivou zákysovou kulturu v hodinových intervalech a to 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7., 8., 9., 10., 11., 12., 13., 24. a 30. hodinu od inokulace mléka.

## 5.2 Stanovení proteolytické aktivity zákysových kultur

Vzorky zákysů, které sloužily ke stanovení proteolytické aktivity, byly připravovány stejným způsobem, jako tomu bylo v případě sledování kysací aktivity zákysových kultur. V časových intervalech (6 hodin, 24 hodin a 48 hodin) byly zákysy odebírány a zmrazeny v hlubokomrazícím boxu na teplotu  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (MDF-U3286S SANYO, prodejce Schoeller instruments, ČR, Praha) a následně lyofilizovány (ALPHA 1-4 LSC, CHRIST). Po lyofilizaci byly jednotlivé vzorky dezintegrovány a umístěny do označených uzavíratelných zip sáčků. Takto připravené vzorky byly skladovány při mrazírenských teplotách.

### 5.2.1 Metoda SDS-PAGE

Vlastní analýze pomocí SDS-PAGE předcházela příprava vzorků zákysu/sýra (příloha A) a příprava roztoků, ze kterých se připravily separační a koncentrační gely o určité koncentraci. Složení roztoků a gelů pro SDS-PAGE, je uvedeno v příloze (příloha B).

Pro vlastní analýzu byla použita vertikální elektroforetická aparatura (Bio-Rad), která se skládá z vlastní vany, víka, osmi tvarovaných skel v párovém uspořádání, dvou držáků gelů, těsnění a hřebínků. Sestavována byla podle přiloženého návodu výrobce. Tato aparatura může být současně využita pro čtyři gely. Pro separaci proteinů u vzorků sýra byl zvolen 12% separační gel tloušťky 1 mm. Pro separaci proteinů u vzorků zákysových kultur byl zvolen 15% separační gel tloušťky 1 mm. Po řádném promíchání všech komponent gelu, byl vzniklý roztok ihned opatrně (tak aby nedošlo k tvorbě bublin v gelu) nanášen mezi skla za pomoci automatické pipety do maximální výšky asi 3 cm od horního okraje skla. Aby nedošlo k polymeraci gelu na vzduchu a získání hladkého, rovného povrchu gelu, se gel převrstvil malým množstvím vody. Gel polymeroval při laboratorní teplotě asi 30-45 minut. Po uplynutí této doby byla, před tím nanesená voda, odsáta filtračním papírem. V době tuhnutí separačního gelu byl připraven 5% koncentrační gel, kterým se pak převrstvil ztuhlý separační gel. Koncentrační gel byl nanášen až těsně

pod horní hranu skla. Do nalitého roztoku 5% gelu byl opatrně vsunut plastový hřeben pro vytvoření jamek, do kterých se později dávkoval vzorek. Polymerace pak probíhala do druhého dne ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě. Druhý den byly hřebeny z gelů opatrně vyjmuty. Skla byla umístěna do držáků a následovně přenesena do aparatury. Do vany aparatury byl opatrně nalit elektrodový pufr (SDS obsažené v elektrodovém pufru má pěnové vlastnosti) a to tak, aby nedošlo k napěnění a tvorbě vzduchových bublin, kterými by nevedl elektrický proud. Tento elektrodový pufr byl nalit i do prostoru držáků mezi gely tak, aby došlo k převrstvení jamek tímto pufrem, což je důležité pro nanášení vzorků [59].

Vzorky byly nanášeny pomocí automatické pipety a to v množství:

- pro zákysové kultury 8  $\mu$ l,
- pro vzorky sýrů 30  $\mu$ l příslušného ředění (ředění uvedeno v příloze A)

Kromě vzorků proteinů byly nanášeny pomocí automatické pipety dva druhy standardů:

- molekulový hmotnostní standard - Protein Test Mixture 5 for SDS PAGE (Serva, Heidelberg, Německo) s proteiny o definovaných molekulových hmotnostech 29,0; 21,0; 12,5 a 6,5 kDa, v množství 10  $\mu$ l, standard – Casein solution from bovine milk – 5 % (Sigma Aldrich), roztok směsí  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\kappa$  kaseinů s definovanými molekulovými hmotnostmi:  $\alpha_{S1}$  – 22-23,7 kDa,  $\alpha_{S2}$  – 25 kDa,  $\beta$  – 24 kDa,  $\kappa$  – 19 kDa.

Po zaplnění všech jamek vzorky a standardy, byla elektroforetická komora překryta víkem, připojena ke zdroji stejnosměrného proudu a připravena ke spuštění. Jako konstantní veličina byla nastavena hodnota proudu, ostatní veličiny byly nastaveny tak, aby nebyly limitující. Díky odlišným vlastnostem gelu vyžaduje každý gel jiné hodnoty proudu. Pro pohyb proteinů v koncentračním gelu byla nastavena hodnota proudu 35 mA. Jakmile se proteiny dostaly k separačnímu gelu, byla hodnota proudu zvýšena na 40 mA. Z důvodu chlazení byla během celého procesu aparatura (vana, v níž jsou gely umístěny v držácích) ponořena do studené vody s ledem. Množství vody nesmělo být příliš velké, aby nedocházelo k nadnášení aparatury. Separační proces byl zastaven v momentě, kdy čelo elektroforézy vizualizované bromfenolovou modří, doputovalo ke spodní hranici separačního gelu. Separační proces trval zhruba 1,5 hodiny. Po ukončení elektroforézy byly z držáků vytaženy skla, mezi nimiž se nachází gely. Opatrně, tak aby nedošlo k pothání gelu, byla od sebe oddělena jednotlivá skla a odstraněn koncentrační gel



za pomoci skalpelu. Získané separační gely byly fixovány po dobu 30 min. v nádobě s fixačním roztokem. Po fixaci byly gely vyjmuty z fixačního roztoku a vloženy na hodinu do barvicího roztoku, kde došlo k jejich obarvení. Po slití barvicího roztoku byly gely přeneseny do odbarvovacího roztoku. Barvicí roztok je možné používat několikanásobně. Odbarvení gelů pomocí odbarvovacího roztoku probíhalo do druhého dne. Fixace, barvení i odbarvování gelů se provádělo jednotlivě v samostatných miskách [59].

Gely byly druhý den po odbarvení sejmuty digitálním fotoaparátem OLYMPUS VR-310 (Olympus, Japonsko) s objektivem Olympus Lens v režimu MAKRO. Snímky gelů byly analyzovány pomocí programu Bio1D (Vilbert Loumat, France). Po manuálním označení pozic jednotlivých bandů vzorků včetně molekulových standardů byly programem vypočteny hodnoty molekulové hmotnosti proteinových frakcí. Analyzované gely byly dále statisticky vyhodnoceny metodou shlukové analýzy (průměry mezi skupinami, Euklidovské vzdálenosti) v programu Bio1D. Výsledkem byly sestrojené dendrogramy pro jednotlivé zákysové kultury a sýry.

### 5.2.2 Metoda Urea-PAGE

Vlastní analýze pomocí Urea-PAGE předcházela příprava vzorků zákyosu (příloha C) a příprava roztoků, ze kterých se připravují separační a koncentrační gely. Složení roztoků a gelů pro Urea-PAGE, je uvedeno v příloze (příloha C).

Pro vlastní analýzu byla použita stejná vertikální elektroforetická aparatura (Bio-Rad) jako u předešlé metody SDS-PAGE. Celý separační proces a metodika probíhá ve stejném sledu, jako tomu bylo u SDS-PAGE. Rozdíly v metodice oproti SDS-PAGE byly následující:

- Pro zahájení separačního procesu bylo nutné změnit konstantní veličinu (hodnota napětí). Díky odlišným vlastnostem gelu vyžaduje každý gel jiné hodnoty napětí. Pro pohyb proteinů v koncentračním gelu byla nastavena hodnota napětí 280 V. V momentě kdy se proteiny dostaly k separačnímu gelu, byla hodnota napětí zvýšena na 300 V.
- Úprava gelů po separačním procesu. Gel se nechal barvit pomocí barvicího roztoku do druhého dne (přes noc). Odbarvení bylo poté prováděno destilovanou vodou, do doby než došlo k projasnění pozadí.

### 5.2.3 Stanovení obsahu volných aminokyselin v zákysech

Příprava vzorků pro analýzu volných aminokyselin zahrnovala extrakci. Extrakce volných aminokyselin byla provedena podle Pachlové a kol. [60]:

K naváženému lyofilizovanému vzorku (1 g) v 15ml polypropylenové uzavíratelné zkumavce bylo přidáno 10 ml lithno-citrátového pufru. Směs byla smíchána a po dobu 30 minut ponechána třepat na třepačce LT2. Poté proběhlo odstředování pomocí odstředivky EBA 21 (Hettich ZENTRIFUGEN, Germany, Tuttlingen) při 6 000 ot., po dobu 20 min. Supernatant byl slit do 25 ml odměrné baňky. Extrakce pevného zbytku se opakovala za přídavku 7 ml lithno-citrátového pufru ještě dvakrát. Extrakty byly spojeny a odměrná baňka byla doplněna do objemu 25 ml lithno-citrátovým pufrem. Každý lyofilizovaný vzorek zákysové kultury z jednotlivých inkubačních časů byl extrahován souběžně dvakrát. Obsah odměrné baňky byl důkladně promíchán a filtrován do 4 mikrozukmavek eppendorf. Vzorky v eppendorfkových mikrozukmavkách byly posléze odstředěny na odstředivce MIKRO 200R, (Hettich ZENTRIFUGEN, Germany, Tuttlingen) při 10 000 otáček po dobu 45 min.

Získaný supernatant byl před konečnou analýzou filtrován přes stříkačkový filtr s porozitou 0,45 $\mu$ m a poté dávkován do chromatografického systému. Obsah volných aminokyselin byl analyzován pomocí analyzátoru aminokyselin s lithno-citrátovými elučními pufrů a ninydrinovou detekcí (Amino Acid Analyzer AAA 400, Ingos, Praha, Česká Republika). Přístroj pracuje na principu středotlaké kapalinové chromatografie s ionexovou kolonou, ninhydrinovou derivatizací a fotometrickou detekcí. Chromatografická kolona byla naplněna pryskyřicí s negativním nábojem. Chromatogramy byly vyhodnoceny pomocí softwaru Chromulan (Ingos s.r.o.). Stanovovány byly aminokyseliny: kyselina asparagová, treonin, serin, asparagin, kyselina glutamová, glutamin, prolin, glycin, alanin, valin, metionin, cystein, izoleucin, leucin, tyrozin, fenylalanin, lyzin, histidin, arginin, ornitin, citrulin a kyselina  $\gamma$ -aminomáselná [61].

#### 5.2.4 Stanovení tvorby biogenních aminů v zákysech a sýrech v závislosti na době skladování

Vlastní analýze v chromatografickém systému předcházela příprava vzorků:

První fází přípravy vzorků byla jejich extrakce. Extrakce biogenních aminů byla provedena podle Buňkové a kol. [61]. Pro stanovení biogenních aminů byly použity vzorky zrajícího sýra s nízkodohřívanou sýřeninou, které byly vyrobeny v celkem sedmi výrobních sériích (samotná výroba nebyla předmětem této diplomové práce): z každé výrobní série (7 celkem) byly vybrány pouze tři odběrové termíny (1. den, 28. den a 84. den od výroby). Ke stanovení biogenních aminů zákysových kultur byly použity vzorky získané po 6, 24 a 48 hodinách od inokulace. Samotná extrakce probíhala za dodržení stejných podmínek a kroků, jako tomu bylo u přípravy vzorků při stanovení volných aminokyselin (5.2.3 – Stanovení obsahu volných aminokyselin u zákysových kultur, extrakce). Rozdíl byl pouze v použitém extrakčním roztoku (0,6M HClO<sub>4</sub>).

Druhou fází přípravy vzorků byla jejich derivatizace. Do čisté, skleněné, uzavíratelné, derivatizační nádoby bylo automatickou pipetou napipetováno 100 µl vnitřního standardu (1,7-heptandiamin v koncentraci 500 mg/l). K vnitřnímu standardu byl odpipetován 1 ml vzorku. Pro každý vzorek se dělaly tři paralelní stanovení. Následně byl přidán 1,5 ml karbonátového pufru (pH 11,0–11,1) a 2 ml čerstvě připraveného roztoku dansylchloridu (koncentrace 5 g/l v acetonu). Derivatizační nádoby byly umístěny do temna a protřepávány po dobu 20 hodin (třepačku LT2). Následně bylo ke směsi přidáno 200 µl roztoku prolínu (100 mg/ml) a směs byly opět protřepávána po dobu 1 hodiny. Po skončení doby třepání byly přidány 3 ml heptanu a po dobu 3 minut byla směs promíchávána. Během této doby došlo k uvolnění přítomných biogenních aminů do heptanu. Následně se nechala heptanová vrstva ustálit a oddělit od ostatních vrstev. Z této oddělené heptanové vrstvy se odpipetoval 1 ml do vialky a nechal se při 60°C pod proudem dusíku v termobloku EVATERM odpařit. Suchý odparek byl posléze zředěn 1,5 ml acetonitrilu. Takto připravený vzorek se uchovával do doby analýzy při mrazírenských teplotách. Bezprostředně před analýzou byl vzorek přefiltrován přes stříkačkový filtr s porózitou 0,22 µm a poté nadávkován do chromatografického systému [62].

Biogenní aminy byly stanoveny pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC) (binární pumpa LabAlliance, USA, autosampler LabAlliance, USA, kolona Agilent Eclipse Plus C18 RRHD a rozměry 3,0 x 50 mm s termostatem; UV/VIS DAD detektor

( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ); a degaser 1260 Infinity, Agilent Technologies) s předkolonovou derivatizací dansylchloridem. Eluční program je v tab. D2 přílohy D. Standard byl připraven smícháním 9 biogenních aminů: histamine, approx.97%, 2-phenethylamine, tyramine 99% (T), putrescine dihydrochloride, cadaverine, spermidine, spermine, tryptamine a 1,7-diaminoheptan – Sigma – Aldrich v sodno-citrátovém pufru ( $\text{pH} = 2,2$ ) o koncentraci  $500 \text{ nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$  každého biogenního aminu (složení pufru tab. D1, příloha D). Pro výpočet obsahu biogenních aminů byla použita metoda vnitřního standardu (1,7-diaminoheptan). Každá směs byla analyzována minimálně dvakrát.

## 6 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 6.1 Kysací aktivita vybraných zákysových kultur

Kysací aktivita je výsledkem celkové biochemické aktivity použitých zákysových kultur. Sledování aktivity zákysů je důležité z hlediska správného a dostatečného prokysávání sýrů [14]. Existují důvody, proč je důležité znát kysací aktivitu starterových kultur. Prvním z nich je rychlost prokysání, která je důležitou technologickou vlastností a prevencí sekundární kontaminace. Dalším důvodem může být minimalizace kolísání produkce kyseliny mléčné, které zaručí standardnost výrobků, ale i zabránění překysání starterové kultury, což může vést k poškození BMK starterové kultury. Biochemická aktivita takovéto starterové kultury je do značné míry potlačena nebo se vůbec neprojeví [14].

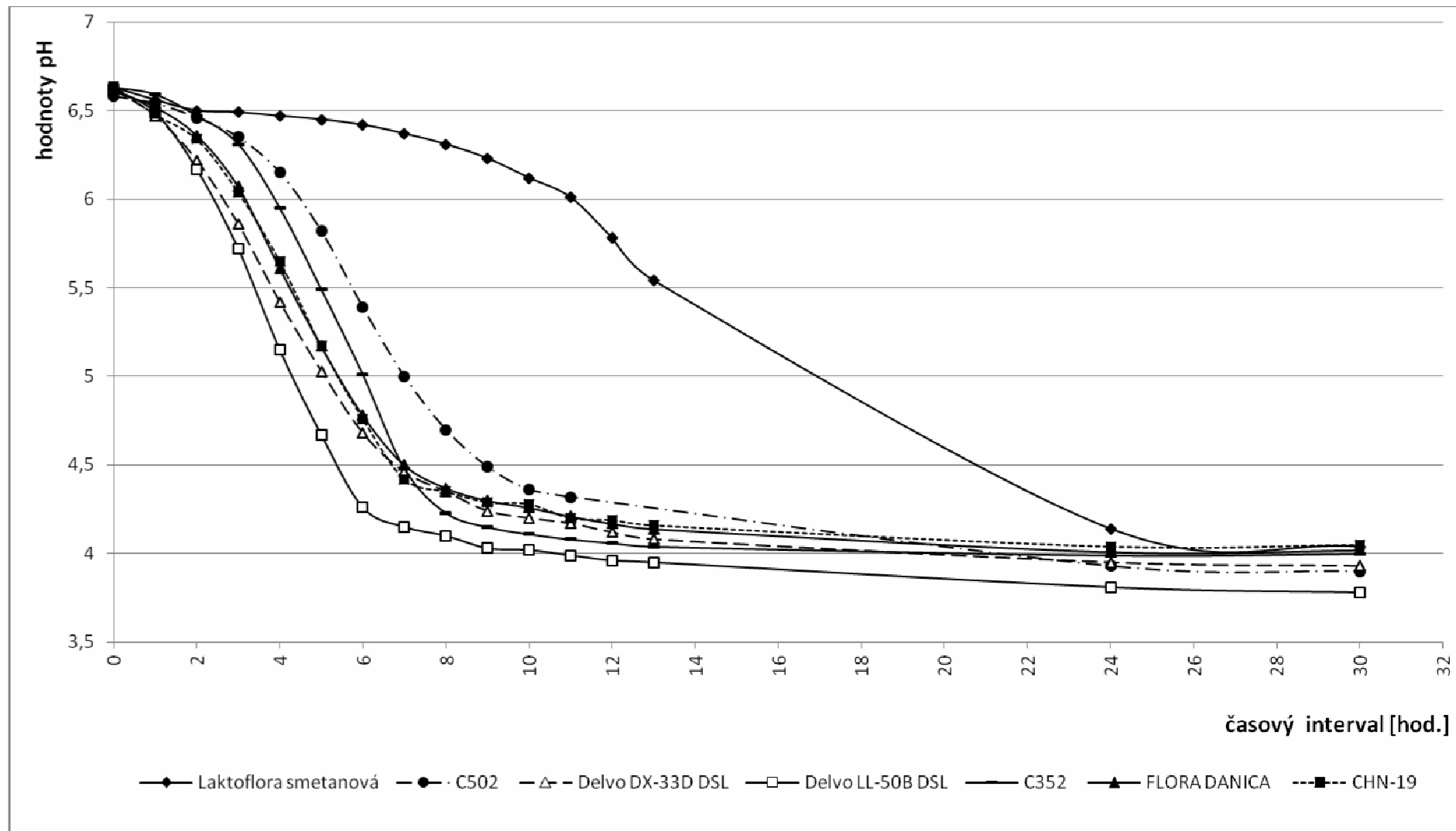
Kysací aktivita byla pozorována u sedmi mezofilních kultur (tabulka 2). Jednotlivé druhy používaných starterových kultur produkují kyselinu mléčnou různou rychlostí. Za směrodatný časový úsek byl zvolen 8 hodinový interval, neboť v tomto časovém intervalu narůstalo dělení BMK a zvyšovala se i intenzita jejich metabolismu. Docházelo k rychlému využívání substrátu a aktivním metabolismem BMK se vytvořilo nejvíce kyseliny mléčné (primární metabolický produkt). Čím více vzniklo kyseliny mléčné, tím rychleji klesla hodnota pH až na požadovanou hodnotu kyselosti zákysu. Při výrobě přírodních sýrů se fermentace ukončuje při hodnotě pH 4,95-4,9 [25, 26]. Čím je doba, za kterou kultura dosáhne této požadované hodnoty pH, kratší, tím má zákysová kultura výraznější kysací aktivitu. Této požadované hodnoty pH bylo dosaženo u většiny zákysových kultur právě v průběhu 8 hodin inkubace. Vyjímkou byla kultura smetanová, která této hodnoty pH dosáhla přibližně mezi 16-18 hodinou inkubace.

Jak je tedy patrné z grafu 1 k nejvyšší produkci kyseliny mléčné došlo v časovém intervalu 0 až 8 hodin. V čase 0 došlo k zaočkování mléka příslušnou zákysovou kulturou. Výchozí hodnota aktivní kyselosti proto odpovídá hodnotě pH, kterou mělo samotné mléko (pH 6,6). U čerstvě nadojeného mléka dosahuje hodnot z rozmezí 6,4-6,8. Mléko má však určitou pufrací schopnost díky přítomnosti bílkovin, fosfátů a citrátů, proto nelze zachytit první stadium rozkladu laktosy jako změnu pH, i když již mohlo dojít k tvorbě určitého množství kyseliny mléčné [28]. V následujících hodinových intervalech docházelo však postupně k více či méně výraznému poklesu aktivní kyselosti v závislosti na použité kultuře. Od 8 hodiny byl zaznamenán u zákysových kultur mírný pokles aktivní kyselosti v důsledku pomalejší produkce kyseliny mléčné, neboť kysací aktivita a intenzita růstu

mikroorganismů byla v této fázi již nepatrná. Příčinou je nízké pH, nahromaděné množství kyseliny mléčné a postupné vyčerpání živin v růstovém médiu, což mohlo vést k inhibici BMK [3]. K silné inhibici fermentace dochází při nižším pH a fermentace se zastavuje při pH nižším než 4,5 [63]. V časovém období od 12 hodin se začalo projevovat, při dosažení hodnoty  $\text{pH} \leq 4,2$ , překysání použitých zákysových kultur. Vyjímkou byla kultura smetanová. K překysání této kultury došlo až po 24 hodinách inkubace. Překysání se projevovalo nadměrnou tvorbou nepříjemného aroma. Postupně docházelo ke změně viskozity s následným oddělováním syrovátky v důsledku kyselého srážení kaseinů. Po uplynutí 12 hodin kultivace byla i nadále sledována kysací aktivita zákysových kultur a to až po dobu 30 hodin inkubace při 25 °C. Jak je tedy patrné z grafu 1 kultura smetanová se svou kysací aktivitou od ostatních zákysových kultur viditelně odlišovala. Jedná se o kulturu základní a mezi přítomnými BMK se uplatňuje symbiotický vztah [25]. Na počátku, stejně jako u ostatních zákysových kultur, docházelo k adaptaci kultury (inkubační stádium) a tedy k nízké tvorbě kyseliny mléčné. Toto stádium, kdy docházelo pouze k nepatrnému množení mikroorganismů, především kyselinotvorných laktokoků, trvalo přibližně po dobu 8 hodin. V časovém intervalu od 8-24 hodin docházelo, ve srovnání s ostatními zákysovémi kulturami, k pozvolnému poklesu aktivní kyselosti (pH 4,2). Příčinou mohla být biochemická (aromatvorná činnost – za tvorby diacetylu) aktivita leukonostoků, která se přidala k biochemické aktivitě laktokoků. Tento symbiotický vztah mohl být i příčinou několikahodinového odstupe kysací aktivity smetanové kultury oproti ostatním zákysovému kulturám [25]. Z grafu 1 tedy vyplynulo, že nejrychlejší kysací aktivitu vykazovala kultura Delvo LL-50B DSL. Jedná se o kulturu typu O, tudíž je kyselina mléčná většinovým produktem jejího metabolismu a k prokysání došlo již během 6 hodin [14, 23]. Kultury C352 a C502 mají stejné složení BMK jako kultury FLORA DANICA a CHN-19. Pravděpodobně se však liší v poměru použitých druhů či kmenů mikroorganismů. Mechanismy přeměny laktosy na kyselinu mléčnou se mohou v rámci druhů či kmenů mikroorganismů značně lišit a odpovídají metabolické dráze rozkladu laktosy (BMK homofermentativní, BMK heterofermentativní) [14]. Kinetika použitých kmenů musí být přizpůsobena podmínkám procesu a vnitřním činitelům v potravinách [63]. Dalším rozdílným parametrem je i forma a způsob použití kultury. Kultury C352 a C502 jsou určeny k přímému zaočkování produktu, neboť se jedná o koncentráty čistých mlékařských kultur nabízející rychlou fermentaci při nízkém očkovacím poměru. Naopak kultury FLORA DANICA a CHN-19 jsou ve formě

Redi Setů, které slouží k inokulaci provozního zákysu [26]. Lze zařadit kultury C352, C502 společně s kulturami FLORA DANICA a CHN-19 ke kulturám s rychlejší prokysávací aktivitou.

Graf 1: Kysací křivky vybraných druhů zákysových kultur v průběhu celého časového intervalu měření (30 hodin), teplota kultivace 25 °C.





## 6.2 Proteolytická aktivita vybraných kyselých kultur

### 6.2.1 Metoda Urea-PAGE

Praktická část byla zahájena optimalizací metody Urea-PAGE. Výhodou urei pro některé aplikace je to, že nemá vliv na vnitřní náboj proteinů a tak separace polypeptidů, které proteiny vytváří, bude na základě velikosti a náboje [64]. Bylo důležité naučit se pracovat s aparaturou, správně připravovat roztoky, vzorky a vlastní gely. Dále bylo důležité zjistit, jak se budou vzorky a standardy v průběhu elektroforézy chovat. Nebude-li nutné vzorky a postup práce vhodně upravovat (modifikací přípravy, ředění, úpravy pH, zvětšením či zmenšením dávkovaného množství, úprava hodnot konstantního napětí, apod.) pro dosažení optimálního výsledku. Prvním zjištěním bylo krátkodobé skladování připravených vzorků při  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu nejdéle 14 dní. Po překročení doby skladování byly vzorky degradovány a bandy byly nezřetelné či vůbec nebyly na elektroforegramu patrné. Pro každou další analýzu byly používány vzorky max. 7 dní staré. Problém stárnutí (degradace) se po delší době objevil i u pufrů používaných pro přípravu gelů, neboť tyto pufrы obsahují ureu. Hlavním problémem při použití urei je nahromadění kyanátových iontů v zásobních roztocích v důsledku chemické izomerace. Kyanátové ionty reagují s aminoskupinami, které tvoří stabilní karbamidové deriváty a tak mění náboj proteinu [64]. Proto byly roztoky a vzorkové pufrы připravovány znovu čerstvé a v průběhu elektroforézy byla aparatura chlazena, neboť tvorba kyanitových iontů se zrychluje s rostoucí teplotou [64]. U vzorkových pufrů, kde je také přítomna urea, by mohl pomoci i přídavek lysinu, který také potlačuje reakci isokyanátu s proteiny [64]. Problém mnohem podstatnější a zásadní, který se z časových důvodů nepodařilo vyřešit, byl způsoben špatným zobrazením zvolených standardů (Protein Test Mixture 5 (Serva, Heidelberg, Německo) a Casein solution from bovine milk – 5 % (Sigma Aldrich)) (obrázky C1 a C2 v příloze C). Pomocí standardů se analyzuje velikost proteinových štěpů vytvořených činnostmi kyselých kultur ve vzorku kyseliny, které za zvolených podmínek nebylo možno detekovat. Kvalita bandů je také závislá na tloušťce gelu. Tenčí gely, například 0,75 mm vykazují lepší výsledky než gely o tloušťce 1,5 mm g [65]. Jednou z možných příčin mohla být právě urea. Nevýhodou urei jako oddělovacího činidla je kombinace velikostí a nábojů frakcí bránících přesnému stanovení molekulární hmotnosti. Použití urei nemusí být natolik výhodné jako SDS, neboť při rozlišování proteinů se nemusí podařit až 50% komplexu proteinové směsi vstoupit do gelu [64]. Mohlo také dojít k degradaci

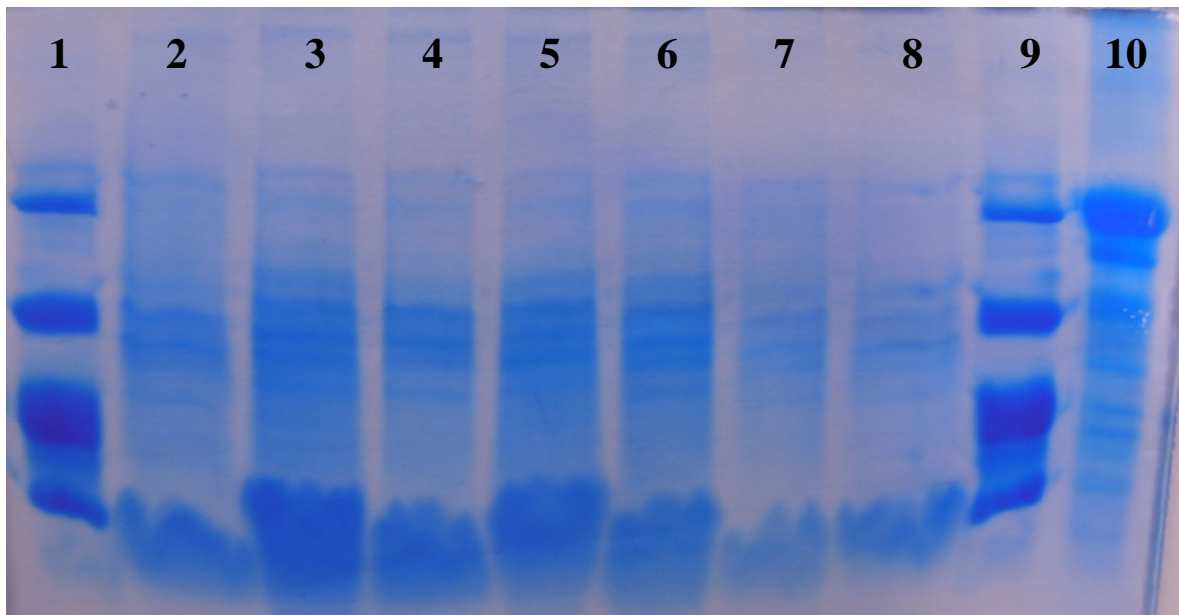
bílkovin ve standardu z důvodu delší doby skladování. Aby byla tato možnost vyloučena, byl objednána zcela nový standard. Výsledek byl však stejný. Důležitou roli může hrát i pufr, protože iontové síly a pH mají vliv na rozpustnost proteinů [66]. Mnoho bílkovin jsou rozpustné při vyšším pH, takže Tris(hydroxymethyl)metylamine je často přidáván za účelem zvýšení tohoto pH. Nicméně, proteiny se liší ve své rozpustnosti v různých hodnotách pH, takže použití různých pufrů může extrahovat různé sady proteinů. Volba pufru a pH roztoku přípravy vzorku může výrazně ovlivnit, které bílkoviny jsou úspěšně solubilizované [66]. Bylo provedeno mnoho pokusů, ale žádný nepřinesl uspokojivý výsledek. Protože se nepodařilo metodu Urea-PAGE optimalizovat během zvoleného časového období, bylo přistoupeno ke stanovení proteinového profilu pomocí optimalizované metody SDS-PAGE.

### 6.2.2 Metoda SDS PAGE

Metodu SDS polyakrylamidové gelové elektroforézy (SDS PAGE) bylo nutné optimalizovat po stránce ředění vzorků tak, aby nedošlo k přetížení elektroforegramu. Přetížení se po obarvení gelů projevovalo výraznými fleky, které zabíraly velkou plochu (obr. E1 v příloze E). Nebylo tedy možné posoudit, zda došlo k úplnému rozdělení všech proteinů. Druhým krokem bylo zjistit jakou koncentraci polyakrylamidového gelu použít. Koncentrace akrylamidu použitého k přípravě gelu závisí na velikostech proteinů, které chceme separovat. Nízká koncentrace se používá k separaci proteinů o vysoké molekulové hmotnosti, zatímco vysoká koncentrace se používá k separaci proteinů o malé molekulové hmotnosti [67]. Byly vyzkoušeny dvě koncentrace akrylamidového gelu (12% a 15%). Po vzájemném porovnání a zhodnocení rozseparování a viditelnosti jednotlivých bandů, byly zvoleny příslušné koncentrace akrylamidového gelu (obr. E2, E3 v příloze E). Pro proteinový profil kyslíkových kultur byla zvolena koncentrace akrylamidového gelu 15%. Ke stanovení proteinového profilu u vzorků sýra pak koncentrace akrylamidového gelu 12%.

### 1. Výsledky stanovení proteinového profilu zákysových kultur

Obrázek 6 zobrazuje reprezentativní gel se sérií vzorků zákysů po 6hodinové inkubační době. Do první a předposlední jamky byl pipetou nanesen standard Protein Test Mixture 5 (Serva, Heidelberg, Německo) o jednotlivých velikostech proteinů 29,0; 21,0; 12,5 a 6,5 kDa. Do poslední jamky byl pipetou nanesen standard Casein solution from bovine milk – 5 % (Sigma Aldrich)s frakcemi  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\kappa$  kaseinů. Poté byly nanášeny jednotlivé vzorky zákysů.



Obrázek 6: Proteinový profil vzorků zákysu po 6hodinové inkubaci získaný metodou SDS-PAGE (15% gel): 1: Protein Test Mixture 5, 2: CHN-19, 3: FLORA DANICA, 4: Delvo LL-50B DSL, 5: Delvo DX-33D DSL, 6: C352, 7: Laktoflora smetanová, 8: C502, 9: Protein Test Mixture 5, 10: Casein solution from bovine milk – 5%.

Po manuálním označení pozic jednotlivých bandů vzorků včetně molekulových standardů byly programem Bio1D vypočteny hodnoty molekulové hmotnosti proteinových frakcí zákysů (Tabulka 3).

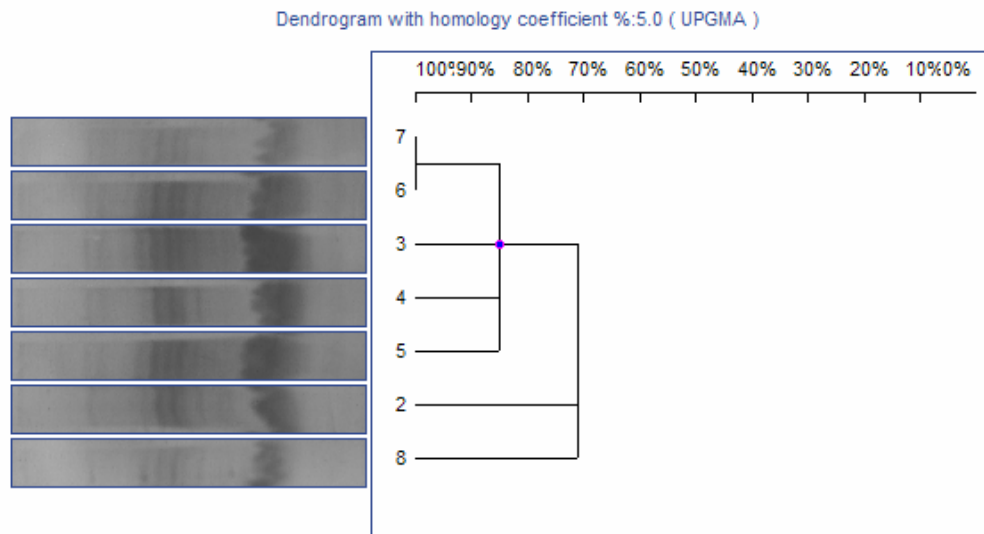
Tabulka 3: Srovnání proteinových profilů jednotlivých zákysů po 6hodinové inkubační době, velikost proteinů v kDa.

CHN-19	FLORA DANICA	Delvo LL-50B DSL	Delvo DX-33D DSL	C352	Laktoflora smetanová	C502
23,20	29,26	29,28	29,55	29,34	22,97	23,22
20,77	26,04	21,40	24,06	23,56	21,07	21,16
18,68	23,95	18,83	21,76	21,49	18,16	18,18
14,09	21,78	17,09	19,35	18,59	16,32	13,92
11,20	19,40	14,44	17,41	16,97	13,74	11,09
	17,53		14,79	14,32		9,68
	15,05					
	12,11					
	10,48					

Z tabulky 3 je zřejmé, že po 6hodinové inkubaci bylo identifikováno u všech druhů zákysů min. 5 proteinů s molekulovou hmotností v rozmezí 9,6 až 29 kDa. Metoda SDS-PAGE, která rozděluje bílkoviny na základě molekulové hmotnosti je velmi účinná pro většinu bílkovin. Jelikož jsou si však čtyři frakce kaseinů velikostně docela podobné, SDS-PAGE nemusí být příliš účinná [68]. Pravděpodobně by došlo k lepší separaci pomocí Urea-PAGE [69].  $\beta$ -kasein se vyznačuje velmi vysokou povrchovou hydrofobností. Dochází tak u něj k navazování značného množství SDS, což má za následek vyšší elektroforetickou pohyblivost než  $\alpha_{S1}$ -kasein, přestože jde o větší molekulu. Na druhou stranu SDS-PAGE je velmi efektivní pro řešení syrovátkových bílkovin [68].

Během prvních 6 hodin inkubace docházelo k prokysání mléka různou rychlostí v závislosti na kysací aktivitě použité kultury. Postupně se snižovalo pH k izoelektrickému bodu kaseinu. Kysací aktivita zákysových kultur tedy v tomto časovém intervalu (6 hodin od inokulace) převažovala nad proteolytickou aktivitou. Zákysová kultura FLORA DANICA má pomalejší kysací aktivitu než kultura Delvo LL-50D DSL. Dosáhla tedy izoelektrického bodu kaseinu později. Na druhou stranu se vyznačovala nejintenzivnější hydrolyzou proteinů během 6 hodin inkubace zákysů. U této kultury bylo identifikováno až 9 proteinů s molekulovou hmotností v rozmezí 10,48 až 29,26 kDa. Vysvětlením

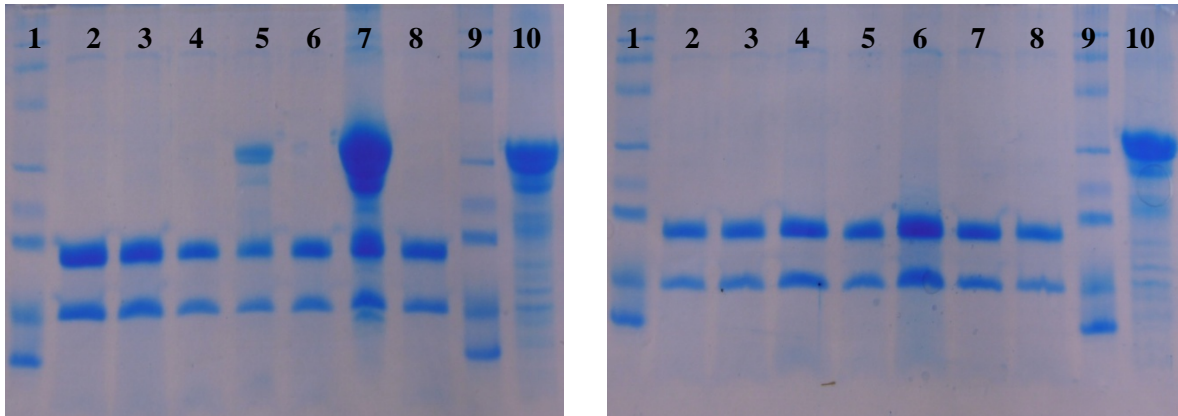
by mohlo být rozdílné zastoupení BMK, jejich vzájemný poměr a druh kmenu, který byl použit. Kultura FLORA DANICA obsahuje kmeny *Lactococcus* sp. stejně jako kultura Delvo LL-50D DSL. Ovšem kultura FLORA DANICA obsahuje i kmen *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. *Lactococcus lactis* je důležitým komponentem těchto starterových kultur a ke svému růstu vyžaduje komplex aminokyselin, které si dokáže, díky svému složitému proteolytickému systému, získat a to hydrolýzou kaseinů. Kaseiny jsou hlavním zdrojem aminokyselin pro *Lactococcus lactis* [70]. Rod *Leuconostoc* nevykazuje proteolytickou aktivitu a kmen, který kultura FLORA DANICA obsahuje, je z leukonostoků nejméně aktivní a nejnáročnější na růstové faktory, vitaminy skupiny B a aminokyseliny [17]. Počáteční růst laktokoků v mléce závisí na obsahu nebílkovinného dusíku. Jakmile je obsah nebílkovinného dusíku vyčerpán, jedna z proteináz pozastaví růst buněk, zatímco degradace kaseinu druhou proteinázou umožňuje další růst buněk, které přesahují množství  $10^9$  KTJ/ml. Tyto bakteriální typy se mohou různými způsoby vzájemně ovlivňovat [71]. U směsných starterových kultur je nutné docílit symbiosy, resp. zajistit vzájemné stimulační působení na růst a biochemickou aktivitu jednotlivých zástupců kultury [10]. U kultury FLORA DANICA šlo pravděpodobně o podporu růstu leukonostoků za použití právě takových kmenů *Lactococcus* sp., které se projevovaly výraznou proteolytickou činností.



Obrázek 7: Dendrogram proteinového profilu zákysů po 6 hodinách inkubace: 2: CHN-19, 3: FLORA DANICA, 4: Delvo LL-50B DSL, 5: Delvo DX-33D DSL, 6: C352, 7: Laktoflora smetanová, 8: C502.

Dendrogram na obrázku 7 vyjadřuje s 5% chybou podobnost kultur s kontrolní kulturou Laktoflora smetanová jako základní kulturou po 6 hodinách inkubace. Svislou čarou jsou spojeny zákysy, které vykazaly blízkost v rámci provedené shlukové analýzy na základě proteinových profilů. V prvních hodinách inkubace se zdála být smetanové kultuře velmi podobná kultura C352. Nejmenší podobnost na kulturu smetanovou vykazovala dvojice kultur CHN-19 a C502. Přesto se po 6 hodinách inkubace neprojevovaly výrazné rozdíly mezi zákysovými kulturami.

Na obrázku 8 (část A) je zobrazen reprezentativní gel se sérií vzorků zákysů po 24hodinové inkubační době. V části B obrázku 8 je zobrazen reprezentativní gel se sérií vzorků zákysů po 48hodinové inkubační době.



Obrázek 8: Proteinový profil vzorků zákysů získaný metodou SDS-PAGE (15% gel): část A po 24hodinové inkubaci, část B po 48hodinové inkubaci: 1: Protein Test Mixture 5, 2: CHN-19, 3: FLORA DANICA, 4: Delvo LL-50B DSL, 5: Delvo DX-33D DSL, 6: C352, 7: Laktoflora smetanová, 8: C502, 9: Protein Test Mixture 5, 10: Casein solution from bovine milk – 5 %.

Z tabulky 4 je zřejmé, že nebyly zaznamenány větší rozdíly mezi proteinovými profily po 24hodinové a 48hodinové inkubační době (vizuálně znázorněno na obrázku 8). Při vzájemném porovnání 24hodinové inkubace s 48hodinovou inkubací lze však shledat rozdíl v proteinovém profilu kultury smetanové a Delvo DX-33D DSL.

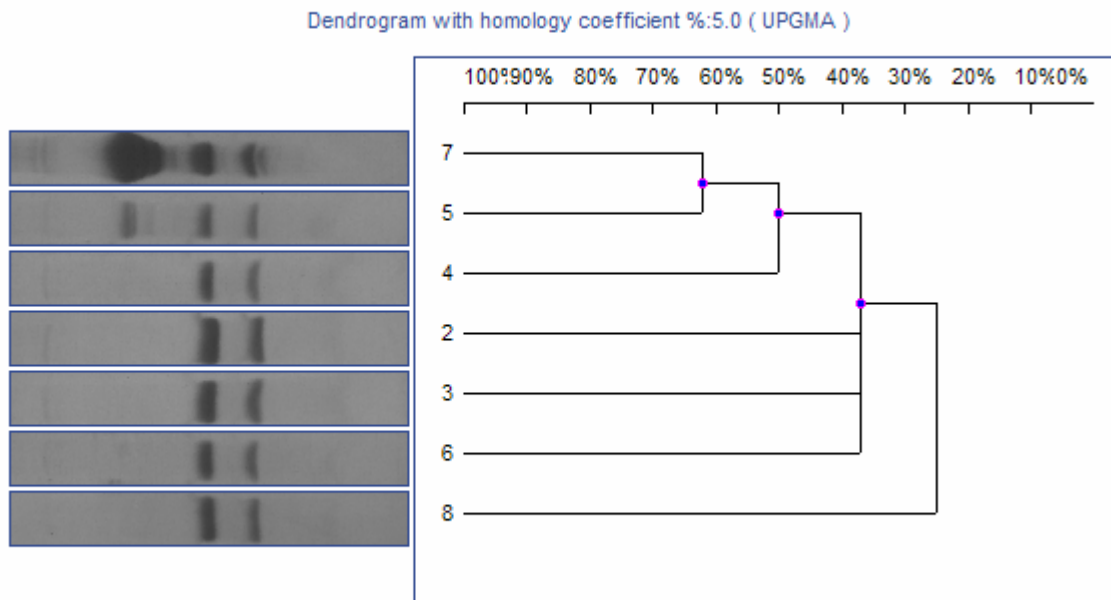
Tabulka 4: Srovnání proteinových profilů jednotlivých zákysů po 24 a 48hodinové inkubaci, velikost proteinů v kDa.

24 hod.						
CHN-19	FLORA DANICA e	Delvo LL-50B DSL	Delvo DX-33D DSL	C352	Laktoflora smetanová	C502
77,95	79,22	97,91	78,96	79,48	102,72	19,46
19,12	19,50	19,65	29,71	19,70	26,52	13,24
12,79	13,24	13,38	27,26	13,70	24,24	
			19,73		19,48	
			13,45		13,89	
					12,21	
48 hod.						
CHN-19	FLORA DANICA	Delvo LL-50B DSL	Delvo DX-33D DSL	C352 e	Laktoflora smetanová	C502
71,65	73,14	78,14	72,14	76,52	74,94	72,89
18,82	18,82	19,15	18,90	19,30	19,11	19,11
12,18	12,39	12,79	12,74	13,41	12,82	12,74

Po 24 a 48hodinové inkubaci byly identifikovány u většiny zákysů pouze 2 proteiny s molekulovou hmotností v rozmezí 12,21 až 29 kDa (proteiny s molekulovou hmotností nad 29 kDa lze pokládat za syrovátkové bílkoviny). Jak vyplývá z grafu 1, zhruba po 6 hodinách inkubace docházelo již vlivem vyššího množství kyseliny mléčné i u zbylých zákysů ke snížení pH na hodnotu izoelektrického bodu kaseinu (pH 4,6). S dalším poklesem pH nově vytvořené částice začaly agregovat ve formě řetězců a svazků s vytvořením sítě gelu. Kyselým srážením tedy vznikla sraženina a postupnou synerezí docházelo k uvolňování značného množství syrovátky. U zákysu s kulturou Laktoflora smetanová, která má pomalou kysací aktivitu a izoelektrického bodu kaseinu bylo dosaženo přibližně při 20 hodinách inkubace, bylo identifikováno po 24 hodinách inkubace 5 proteinů s molekulovou hmotností v rozmezí 12 až 29 kDa. Příčinou mohla být pomalá proteolytická aktivita. Proto lze u zákysu nalézt ještě 5 proteinů s molekulovou hmotností v rozmezí 6,5 až 29 kDa. Dá se předpokládat, že se po 24 hodinách inkubace začala pomalu projevovat proteolytická aktivita, neboť došlo k nepatrnému zmenšení velikosti proteinů s molekulovou hmotností pod 29 kDa jak je patrné z proteinového profilu po 48 hodinách inkubace. Následně by mohlo docházet různou rychlostí (dle proteolytické aktivity zákysové kultury) k štěpení peptidových vazeb sraženiny vzniklé během 24 hodin. Tato domněnka by se měla potvrdit během odběrových dnů (1. den, 14. den, 28. den,

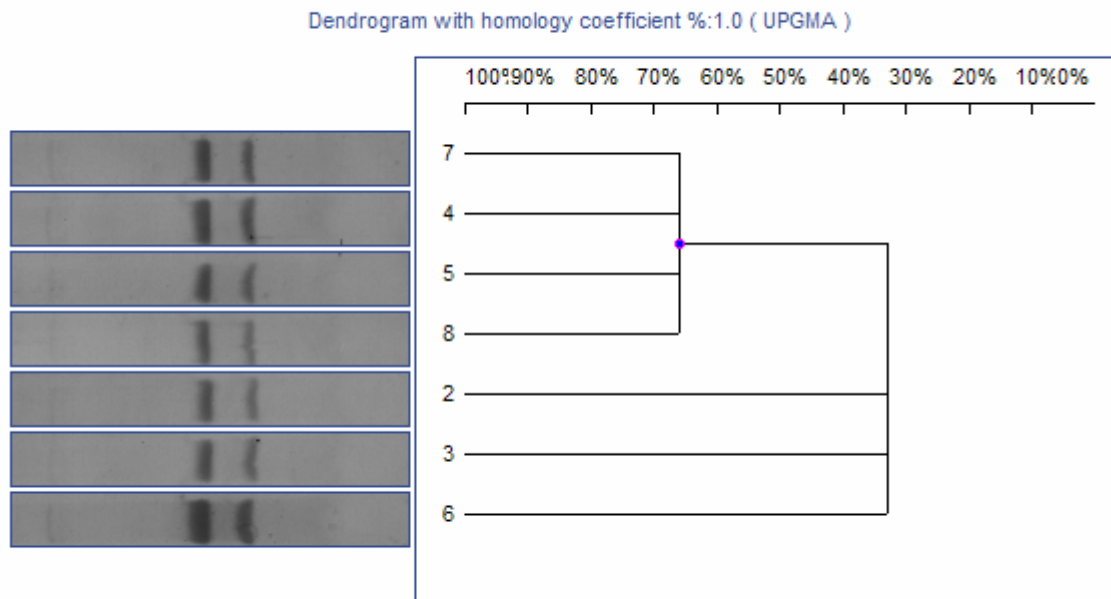


56. den a 84. den) při stanovení proteinových profilů sýrů. S pozdějším dnem odběru by mělo tedy docházet k narůstání počtu proteinových štěpů.



Obrázek 9: Dendrogram proteinového profilu zákysů po 24 hodinách inkubace: 2: CHN-19, 3: FLORA DANICA, 4: Delvo LL-50B DSL, 5: Delvo DX-33D DSL, 6: C352, 7: Laktoflora smetanová, 8: C502.

Dendrogram na obrázku 9 vyjadřuje s 5% chybou podobnost kultur s kontrolní kulturou Laktoflora smetanová jako základní kulturou po 24hodinové inkubaci. Z dendrogramu vyplynulo, že se již kultury značně lišily svými proteinovými profily od kultury smetanové. Podobnost s kulturou smetanovou se pohybovala pod hranicí 65 %. Při porovnání s odběrem po 6 hodinách, kultuře smetanové se podobala více kultura Delvo DX-33D DSL. Kultura FLORA DANICA se podobala spíše kulturám CHN-19 a C352. Nejmenší podobnost v porovnání s odběrem po 6 hodinách inkubace stále zůstala mezi kulturou smetanovou a C502.



Obrázek 10: Dendrogram proteinového profilu zákysů po 48 hodinách inkubace: 2: CHN-19, 3: FLORA DANICA, 4: Delvo LL-50B DSL, 5: Delvo DX-33D DSL, 6: C352, 7: Laktoflora smetanová, 8: C502.

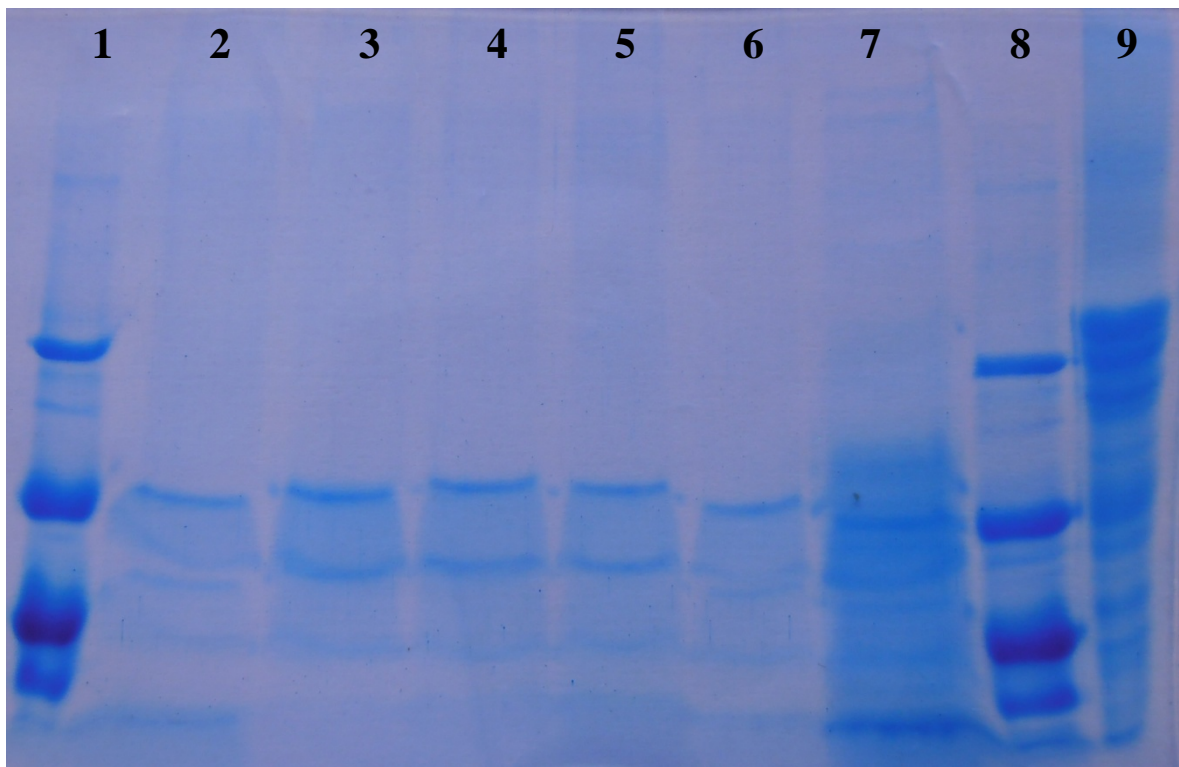
Dendrogram na obrázku 10 vyjadřuje s 1% chybou podobnost kultur s kontrolní kulturou Laktoflora smetanová jako základní kulturou po 48hodinové inkubaci. Byla zvolena 1% chyba, neboť při 5% chybě byly všechny vzorky zákysů vzájemně naprosto totožné. Z dendrogramu vyplynulo, že se zákysy po 48 hodinách inkubace svými proteinovými profily výrazně neliší od proteinových profilů zákysů po 24 hodinách inkubace. Vytvořily se však pouze dva základní shluky. Kultuře smetanové se po 48 hodinách podobaly kultury Delvo LL-50B DSL, Delvo DX-33D DSL a C502. Nejméně se podobaly kultuře smetanové kultury CHN-19, FLORA DANICA a C352. Na druhou stranu je nutné zdůraznit, že prezentovaná rozdílnost kultur byla vyjádřena s minimálním koeficientem podobnosti.

Přestože po 6 hodinách inkubace se zdála být kultuře smetanové velmi podobná kultura C352, po 24 hodinách se rozdílnost mezi těmito kulturami značně prohloubila. Po 48 hodinách inkubace dokonce došlo k vytvoření vzdáleného shluku kultur C352,

CHN-19 a FLORA DANICA, které se svým proteinovým profilem výrazně lišily od smetanové kultury.

## 2. Výsledky stanovení proteinového profilu vzorků sýra v průběhu zrání

Na obrázku 11 je zobrazen reprezentativní gel se vzorky sýrů po 1 dnu zrání. Do první a předposlední jamky byl pipetou nanesen standard Protein Test Mixture 5 for SDS PAGE (Serva, Heidelberg, Německo) o jednotlivých velikostech proteinů 29,0; 21,0; 12,5 a 6,5 kDa. Do poslední jamky byl pipetou nanesen standard Casein solution from bovine milk – 5 % (Sigma Aldrich) s frakcemi  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\kappa$  kaseinů. Poté byly nanášeny jednotlivé vzorky sýrů.

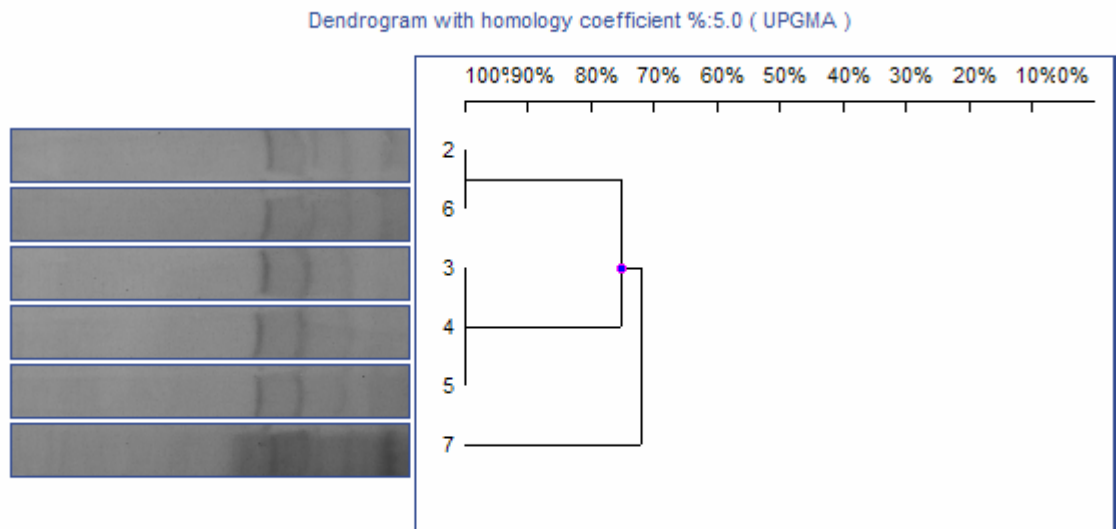


Obrázek 11: Proteinový profil vzorků sýra po 1 dnu zrání získaný metodou SDS-PAGE (12% gel): 1: Protein Test Mixture 5, 2: Delvo LL-50B DSL, 3: FLORA DANICA, 4: CHN-19, 5: Delvo DX-33D DSL, 6: C502, 7: C352, 8: Protein Test Mixture 5, 9: Casein solution from bovine milk – 5 %.

Tabulka 5: Srovnání profilu proteinů jednotlivých vzorků sýra po 1 dnu zrání, velikost proteinů v kDa.

<b>Delvo LL-50B DSL</b>	<b>FLORA DANICA</b>	<b>CHN-19</b>	<b>Delvo DX-33D DSL</b>	<b>C502</b>	<b>C352</b>
21,40	21,89	22,55	22,52	21,71	24,17
17,79	17,20	18,13	18,17	18,00	21,22
16,39	11,06	10,65	11,92	16,58	19,52
11,79				10,89	17,51
					15,83
					11,16

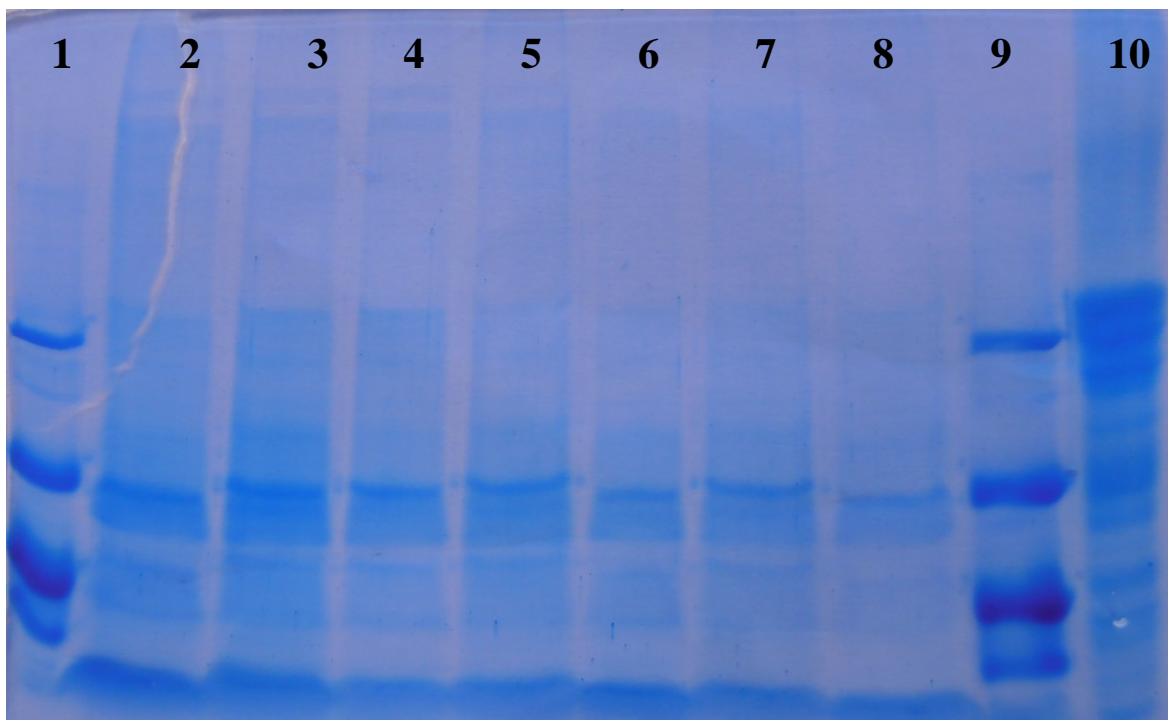
Z tabulky 5 je zřejmé, že po 1 dnu zrání byly identifikovány u všech výrobních sérií sýrů min. 3 proteiny s molekulovou hmotností v rozmezí 10 až 25 kDa. U vzorku sýra, který byl vyroben za použití kultury C352 bylo identifikováno 6 proteinů s molekulovou hmotností v rozmezí 11 až 25 kDa. Dále je patrné, že se zde již nevyskytovaly sérové bílkoviny, které byly vyloučeny ze sýřeniny v syrovátce. Na proteolytickou aktivitu má vliv kromě proteolytických enzymů BMK také řada původních enzymů přirozeně přítomných v mléce (např. plasmin). Dalším hlavním zdrojem proteolytické aktivity je i reziduální koagulační aktivita syřidla použitého pro výrobu sýrů (např. chymosin, pepsin). Zpočátku může být tedy kasein hydrolyzován pomocí zbytkové koagulační aktivity syřidla nebo plasminu [36]. Rozkladu proteinů se v prvním dnu zrání s největší pravděpodobností výrazně neúčastní proteolytická aktivita použitých ČMK. Tento předpoklad potvrzuje i tabulka 4, která uvádí u většiny zákysových kultur po 24hodinové inkubaci přítomnost pouze 2 proteinů o velikosti 12 až 20 kDa. U kultury C352 bylo nejvíce patrné působení proteolytické aktivity plasminu a zbytkové koagulační aktivity syřidla, neboť po 1 dnu zrání bylo identifikováno u této kultury 6 proteinů a po 14 dnech zrání pouze 4 proteiny. Počet proteinů by se měl s delší dobou zrání zvyšovat, neboť se s různou rychlostí (v závislosti na kultuře) začne projevovat proteolytická aktivita ČMK, jak potvrdila tabulka 7.



Obrázek 12: Dendrogram proteinového profilu sýrů po 1 dnu zrání: 2: Delvo LL-50B DSL, 3: FLORA DANICA, 4: CHN-19, 5: Delvo DX-33D DSL, 6: C502, 7: C352.

Dendrogram na obrázku 12 vyjadřuje s 5% chybou vzájemnou podobnost proteinového profilu sýrů po 1 dnu zrání. Z dendrogramu vyplynulo, že se sýry po 1 dnu zrání (tzn. ihned po výrobě) vzájemně moc nelišily svými proteinovými profily. Nejvíce si byly proteolytickou aktivitou podobné kultury Delvo LL-50B DSL a C502. Dále pak kultury FLORA DANICA, CHN-19 a Delvo DX-33D DSL. Kultura C352 vykazovala odlišnou proteolytickou aktivitu oproti kulturám FLORA DANICA, CHN-19 a Delvo DX-33D DSL. Nejmenší podobnost v proteolytické činnosti však vykazovala dvojice kultur Delvo LL-50B DSL a CHN-19, dále pak dvojice Delvo DX-33D DSL a C502.

Na obrázku 13 je zobrazen reprezentativní gel se vzorky sýrů po 14 dnech zrání.



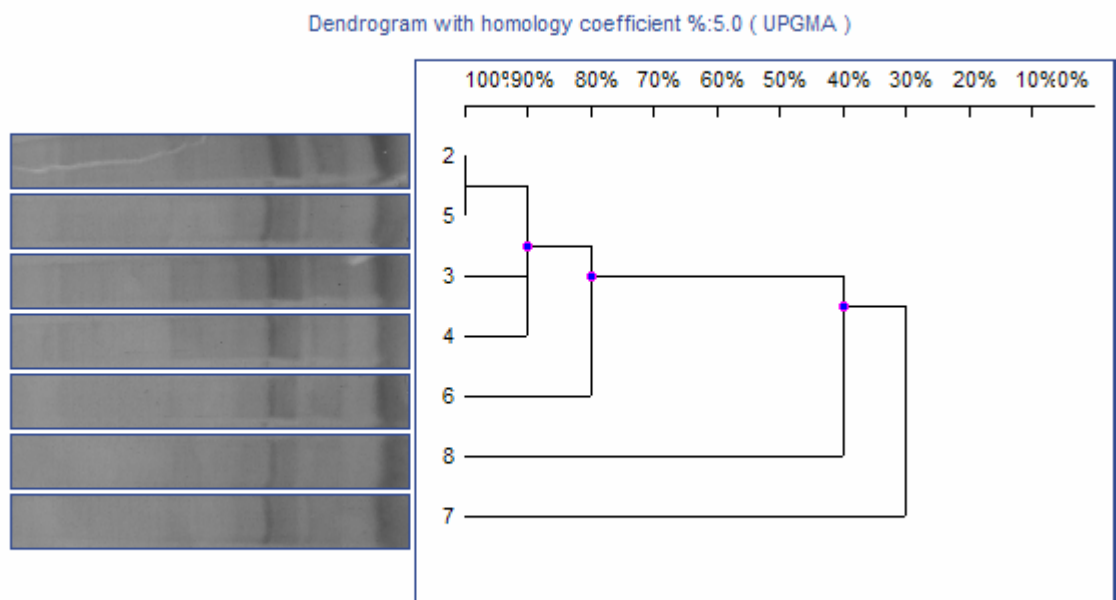
Obrázek 13: Proteinový profil vzorků sýra po 14 dnech zrání získaný metodou SDS-PAGE (12% gel): 1: Protein Test Mixture 5, 2: Laktoflora smetanová, 3: Delvo LL-50B DSL, 4: FLORA DANICA, 5: CHN-19, 6: Delvo DX-33D DSL, 7: C502, 8: C352, 9: Protein Test Mixture 5, 10: Casein solution from bovine milk – 5 %.

Tabulka 6: Srovnání proteinových profilů jednotlivých vzorků sýra po 14 dnech zrání, velikost proteinů v kDa.

Laktoflora smetanová	Delvo LL-50B DSL	FLORA DANICA	CHN-19	Delvo DX-33D DSL	C502	C352
29,06	28,08	28,23	28,67	26,07	21	20,80
27,94	23,90	23,94	27,54	20,80	19,85	19,36
23,62	20,62	20,64	24,27	18,12	18,17	18,15
20,16	19,34	18,98	21,16	14,99	15,78	14,85
17,94	17,58	15,20	19,78	10,69	10,83	
14,29	15,11	9,67	17,75			
9,75	9,40		15,62			
			9,71			

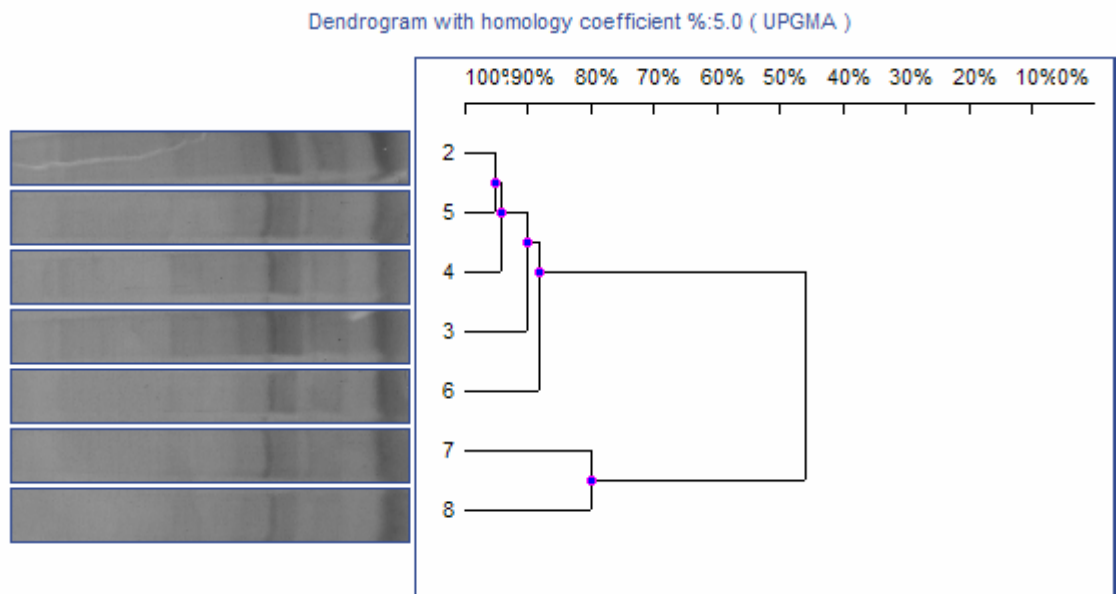
Z tabulky 6 je zřejmé, že po 14 dnech zrání byl identifikován větší počet proteinů s molekulovou hmotností v rozmezí 9 až 29 kDa než tomu bylo po 1 dnu zrání. U sýrů vyrobených pomocí kultur Laktoflora smetanová a Delvo LL-50B DSL bylo

identifikováno 7 proteinů s molekulovou hmotností v rozmezí 9 až 29 kDa. U vzorku sýra, u kterého byla při výrobě použita kultura CHN-19 až 8 proteinů s molekulovou hmotností v rozmezí 9 až 29 kDa. V průběhu 14 dnů od výroby se začala postupně projevovat proteolytická aktivita zákysových kultur. ČMK obsahují na buněčnou stěnu vázané proteiny (CEP, lactocepin, PrtP), které principiálně přispívají ke zrání hydrolýzou středně velkých a krátkých peptidů produkovaných z kaseinů působením chymosinu nebo plasminu [72]. Nejdříve dochází působením proteolytických enzymů k vytváření štěpů o vyšší molekulové hmotnosti, jak dokazuje tabulka 6.



Obrázek 14: Dendrogram podobnosti jednotlivých kultur s kontrolní kulturou Laktoflora smetanová po 14 dnech zrání: 2: Laktoflora smetanová, 3: Delvo LL-50B DSL, 4: FLORA DANICA, 5: CHN-19, 6: Delvo DX-33D DSL, 7: C502, 8: C352.

Dendrogram na obrázku 14 vyjadřuje s 5% chybou podobnost kultur s kontrolní kulturou (Laktoflora smetanová) jako základní kulturou. Kultura smetanové se nejvíce podobala kultura CHN-19. Svou proteolytickou aktivitou ve srovnání s kontrolní kulturou je dále podobná dvojice kultur Delvo LL-50B DSL a FLORA DANICA. Nejmenší podobnost s kulturou smetanovou vykazovaly kultury C352 a C502.



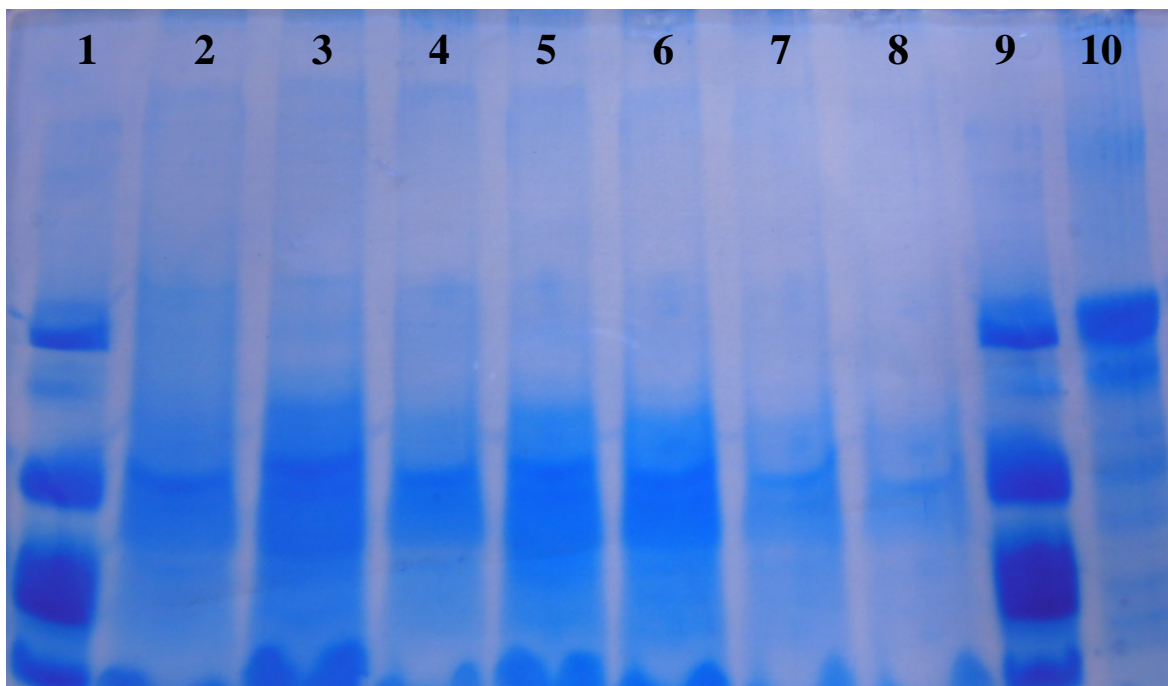
Obrázek 15: Dendrogram proteinového profilu sýrů po 14 dnech zrání:

2: Laktoflora smetanová, 3: Delvo LL-50B DSL, 4: FLORA DANICA, 5: CHN-19,  
6: Delvo DX-33D DSL, 7: C502, 8: C352.

Dendrogram na obrázku 15 vyjadřuje s 5% chybou vzájemnou podobnost proteinového profilu sýru po 14 dnech zrání. Z dendrogramu vyplynulo, že se sýry po 14 dnech zrání začaly lišit svými proteinovými profily oproti sýrům po 1 dnu zrání. Nejviditelnější rozdíl v proteinovém profilu k ostatním vzorkům sýra, vykazují vzorky sýrů, k jejichž výrobě byly použity kultury C502 a C352. Tyto kultury vykazovaly nižší proteolytickou činnost na rozdíl od ostatních kultur, jak je patrné z počtu identifikovaných proteinů v tabulce 7.



Na obrázku 16 je zobrazen reprezentativní gel se vzorky sýrů po 28 dnech zrání.



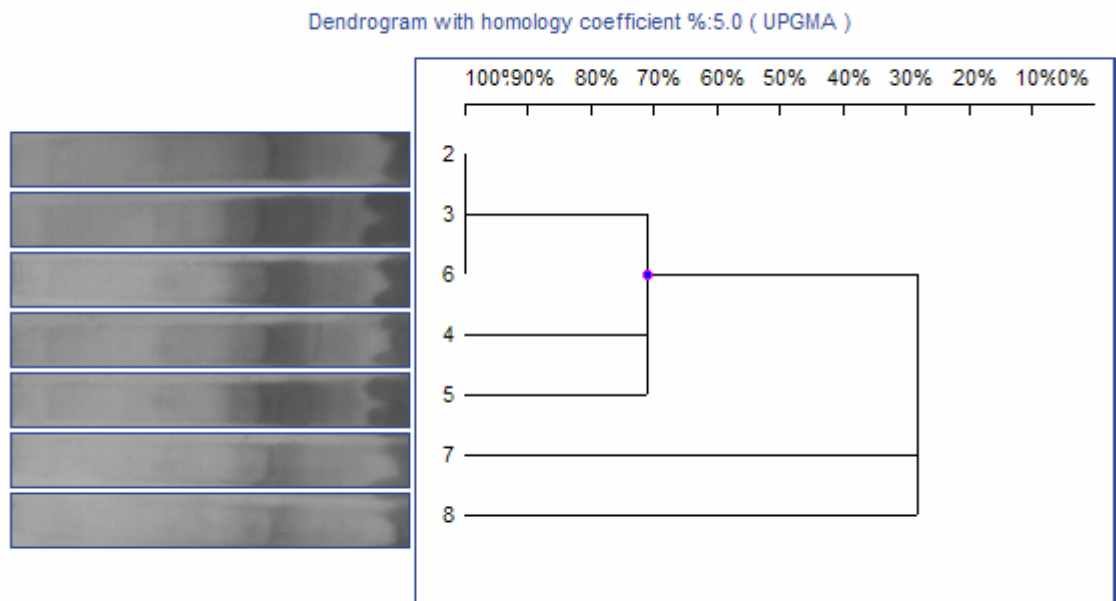
Obrázek 16: Proteinový profil vzorků sýra po 28 dnech zrání získaný metodou SDS-PAGE (12% gel): 1: Protein Test Mixture 5, 2: Laktoflora smetanová, 3: Delvo LL-50B DSL, 4: FLORA DANICA, 5: CHN-19, 6: Delvo DX-33D DSL, 7: C502, 8: C352, 9: Protein Test Mixture 5, 10: Casein solution from bovine milk – 5 %.

Tabulka 7: Srovnání profilu proteinů pro jednotlivé vzorky sýrů po 28 dnech zrání, velikost proteinů v kDa.

Laktoflora smetanová	Delvo LL-50B DSL	FLORA DANICA	CHN-19	Delvo DX-33D DSL	C502	C352
21,45	29,49	25,10	29,17	25,74	24,86	27,54
17,37	27,40	21,69	25,37	23,61	23,68	23,63
15,42	25,62	18,06	24,33	21,78	21,81	21,32
12,76	22,50	15,66	22,24	17,35	20,09	20,13
	16,65		20,70	15,30	15,55	15,17
	14,58		16,74	13,12		
	11,60		11,41	10,27		

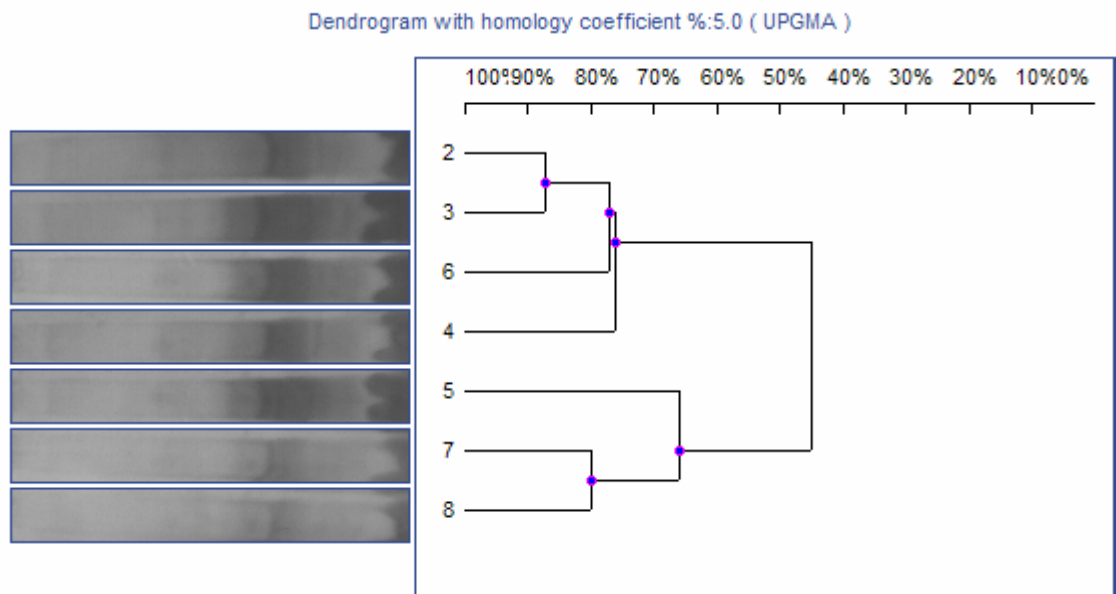
Z tabulky 7 je zřejmé, že po 28 dnech zrání nebyla identifikována výraznější změna v počtu identifikovaných proteinů s molekulovou hmotností v rozmezí 10 až 29 kDa než tomu bylo po 14 dnech zrání. Docházelo však působením proteolytických enzymů k vytváření štěpů o vyšší molekulové hmotnosti, jak dokazuje tabulka 8. Rozsáhlou

proteolytickou aktivitu vykazovaly kultury Delvo LL-50B DSL, CHN-19 a Delvo DX-33D DSL a to na základě počtu identifikovaných proteinů (celkem 7 proteinů) s molekulovou hmotností v rozmezí 10 až 29 kDa. U kultur C352 a C502 se začala proteolytická aktivita výrazněji projevovat až po 28 dnech zrání jak je vidět z tabulky 8 (tedy 56. den zrání).



Obrázek 17: Dendrogram podobnosti jednotlivých kultur s kontrolní kulturou Laktoflora smetanová po 28 dnech zrání: 2: Laktoflora smetanová, 3: Delvo LL-50B DSL, 4: FLORA DANICA, 5: CHN-19, 6: Delvo DX-33D DSL, 7: C502, 8: C 352.

Dendrogram na obrázku 17 vyjadřuje s 5% chybou podobnost jednotlivých kultur s kontrolní kulturou (Laktoflora smetanová) jako základní kulturou po 28 dnech zrání. Smetanové kultuře se podobají proteolytickou aktivitou kultury Delvo LL-50B DSL a Delvo DX-33D DSL. Od smetanové kultury se stále nejvíce odlišují svou proteolytickou aktivitou kultury C502 a C352.



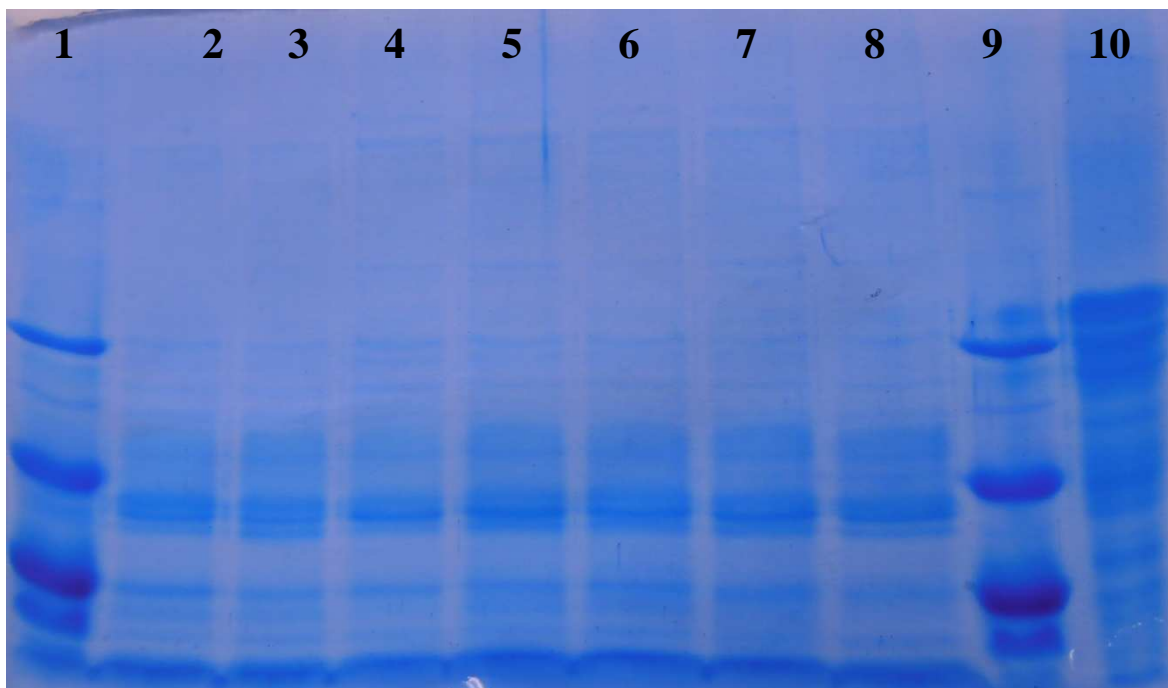
Obrázek 18: Dendrogram proteinového profilu sýrů po 28 dnech zrání:

2: Laktoflora smetanová, 3: Delvo LL-50B DSL, 4: FLORA DANICA, 5: CHN-19,  
6: Delvo DX-33D DSL, 7: C502, 8: C352.

Dendrogram na obrázku 18 vyjadřuje s 5% chybou vzájemnou podobnost proteinového profilu sýrů po 28 dnech zrání. Dendrogram potvrdil, že se sýry výrazně nelišily po 28 dnech zrání svými proteinovými profily od proteinových profilů sýrů po 14 dnech zrání. Na druhou stranu se kultura CHN-19 v tomto okamžiku podobá svou proteolytickou aktivitou spíše kulturám C352 a C502.

Ze shlukové analýzy vzorků sýra byly zatím zjištěny následující skutečnosti. Podobnou proteolytickou aktivitu vykazovaly kultury C352 a C502. Svou proteolytickou aktivitou se po celou dobu zrání naprosto odlišovaly od zbývajících kultur. Mezi 14 a 28 dnem zrání nedošlo k nápadným změnám v proteinovém složení sýrů. Pomalou hydrolyzou však začaly vznikat peptidy s nižší molekulovou hmotností.

Na obrázku 19 je zobrazen reprezentativní gel se vzorky sýrů po 56 dnech zrání.

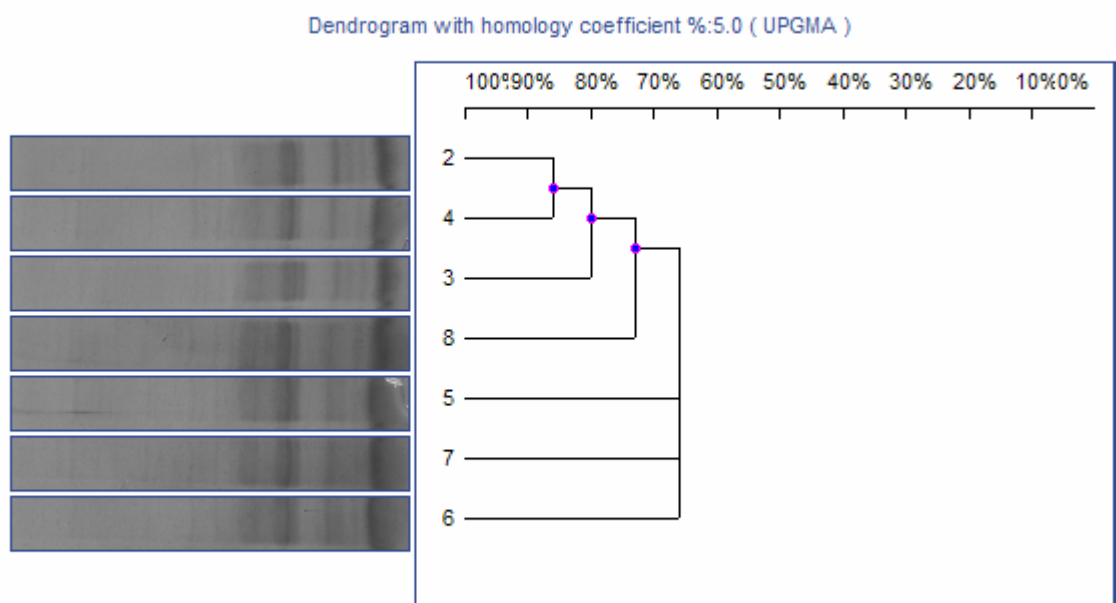


Obrázek 19: Proteinový profil vzorků sýra po 56 dnech zrání získaný metodou SDS-PAGE (12% gel): 1: Protein Test Mixture 5, 2: Laktoflora smetanová, 3: Delvo LL-50B DSL, 4: FLORA DANICA, 5: CHN-19, 6: Delvo DX-33 DSL, 7: C502, 8: C 352, 9: Protein Test Mixture 5, 10: Casein solution from bovine milk – 5 %.

Tabulka 8: Srovnání profilu proteinů jednotlivých vzorků sýra po 56 dnech zrání, velikost proteinů v kDa.

Laktoflora smetanová	Delvo LL-50B DSL	FLORA DANICA	CHN-19	Delvo DX-33D DSL	C502	C352
28,96	28,92	29,09	26,76	29,21	29,36	29,47
27,63	27,71	28,00	25,79	26,85	26,89	26,91
26,33	26,06	26,33	24,50	25,09	25,24	25,20
24,57	24,54	24,69	22,49	24,27	23,88	23,82
23,55	23,44	22,38	20,36	22,56	22,64	22,64
22,17	21,94	19,91	19,44	20,46	20,47	21,50
19,93	19,42	19,07	18,43	19,49	19,49	20,37
19,44	18,61	18,29	13,52	13,92	18,53	19,49
18,63	17,71	16,58	9,91	10,80	13,18	18,61
17,89	11,52	12,62	6,75	6,70	6,55	16,76
11,70	8,21					13,55
8,11						

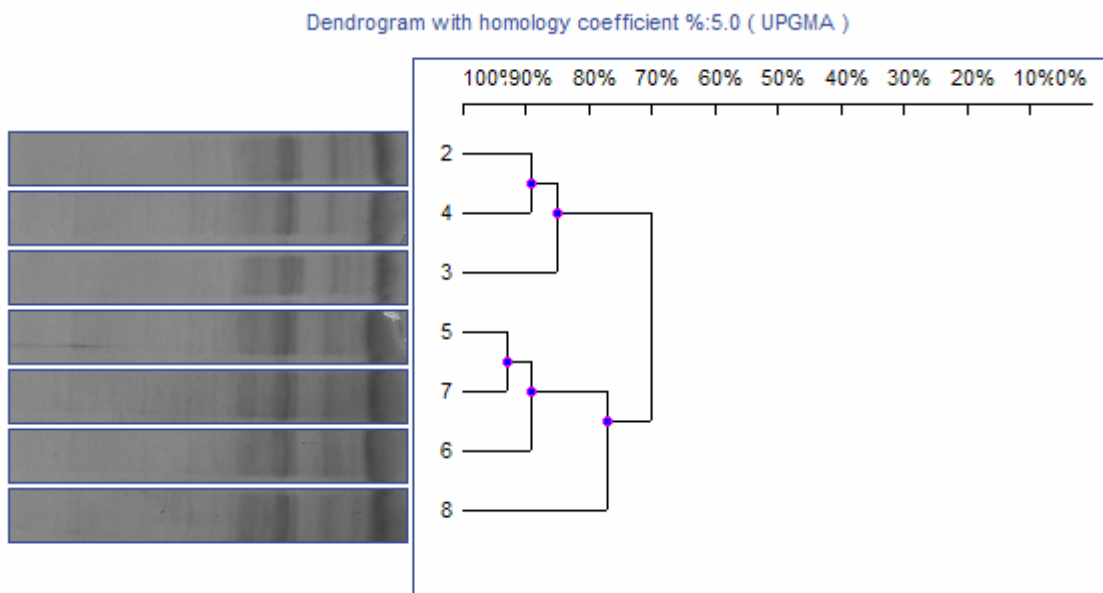
Z tabulky 8 je zřejmé, že po 56 dnech zrání bylo již identifikováno značné množství proteinů s molekulovou hmotností v rozmezí 6,5 až 29 kDa než tomu bylo v porovnání s 28. dnem zrání. U sýrů vyrobených pomocí kultur Delvo LL-50B DSL a C352 bylo identifikováno 11 proteinů s molekulovou hmotností v rozmezí 8 až 29 kDa. U vzorku sýra, u jehož výroby byla použita kultura smetanová, bylo identifikováno až 12 proteinů s molekulovou hmotností v rozmezí 8 až 29 kDa. Velmi podobnou proteolytickou aktivitu vykazují trojice kultur CHN-19, Delvo DX-33D DSL a C502.



Obrázek 20: Dendrogram podobnosti jednotlivých kultur s kontrolní kulturou Laktoflora smetanová po 56 dnech zrání: 2: Laktoflora smetanová, 3: Delvo LL-50B DSL, 4: FLORA DANICA, 5: CHN-19, 6: Delvo DX-33D DSL, 7:C502, 8: C352.

Dendrogram na obrázku 20 vyjadřuje s 5% chybou podobnost jednotlivých kultur s kontrolní kulturou (Laktoflora smetanová) jako základní kulturou. Smetanové kultuře se nejvíce proteolytickou aktivitou podobá kultura FLORA DANICA. Naopak méně podobnou proteolytickou aktivitu ke kultuře smetanové vykazují kultury CHN-19, Delvo DX-33D DSL a C502. Při vzájemném porovnání dendrogramů z 28. a 56. dne zrání, které vyjadřují podobnost jednotlivých kultur s kulturou kontrolní (Laktoflora smetanová),

je zřejmé, že došlo po 56 dnech zrání k přiblížení proteolytických aktivit kultury smetanové.

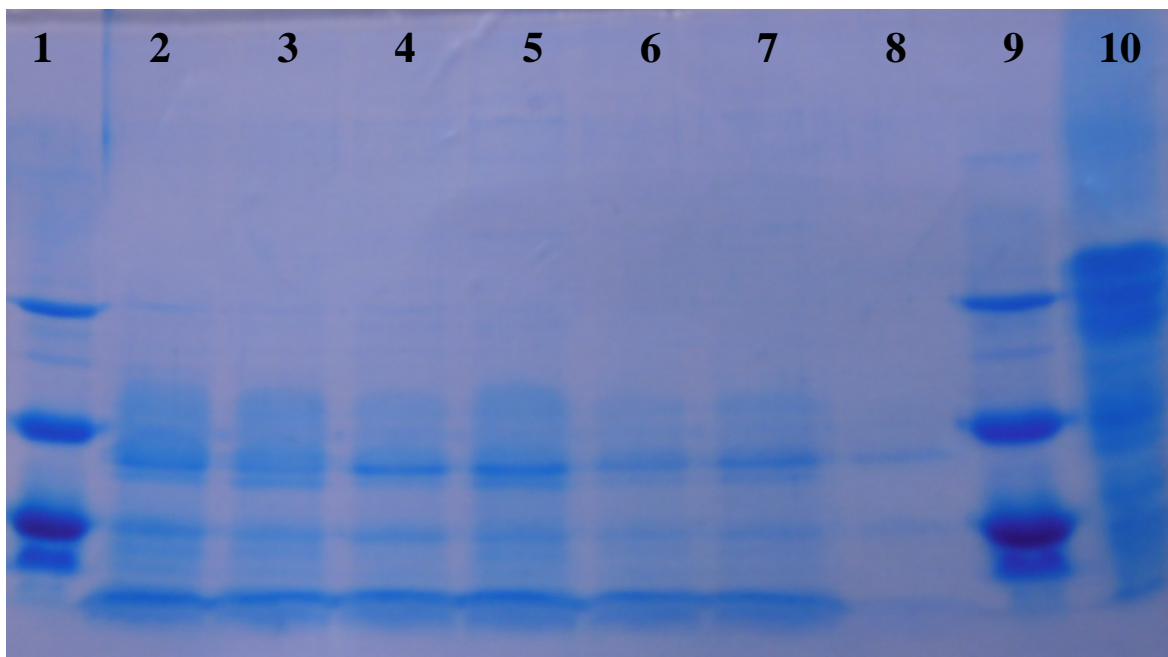


Obrázek 21: Dendrogram proteinového profilu sýrů po 56 dnech zrání:

2: Laktoflora smetanová, 3: Delvo LL-50B DSL, 4: FLORA DANICA, 5: CHN-19,  
6: Delvo DX-33D DSL, 7: C502, 8: C352.

Dendrogram na obrázku 21 vyjadřuje s 5% chybou vzájemnou podobnost proteinového profilu sýru po 56 dnech zrání. Z dendrogramu vyplynulo, že po 56 dnech zrání došlo k potlačení rozdílů v proteolytických aktivitách kultur, neboť vznikly velikostně podobné proteiny (tabulka 9). Modelové vzorky sýrů lze rozdělit na dvě hlavní skupiny. V první skupině jsou sýry, při jejichž výrobě byly použity kultury smetanová, Delvo LL-50B DSL a FLORA DANICA. Ve druhé skupině pak sýry vyrobené pomocí kultur CHN-19, Delvo DX-33D DSL, C502 a C352. Nejvíce jsou si proteolytickou aktivitou podobné kultury CHN-19 a C502.

Na obrázku 22 je zobrazen reprezentativní gel se vzorky sýrů po 84 dnech zrání.

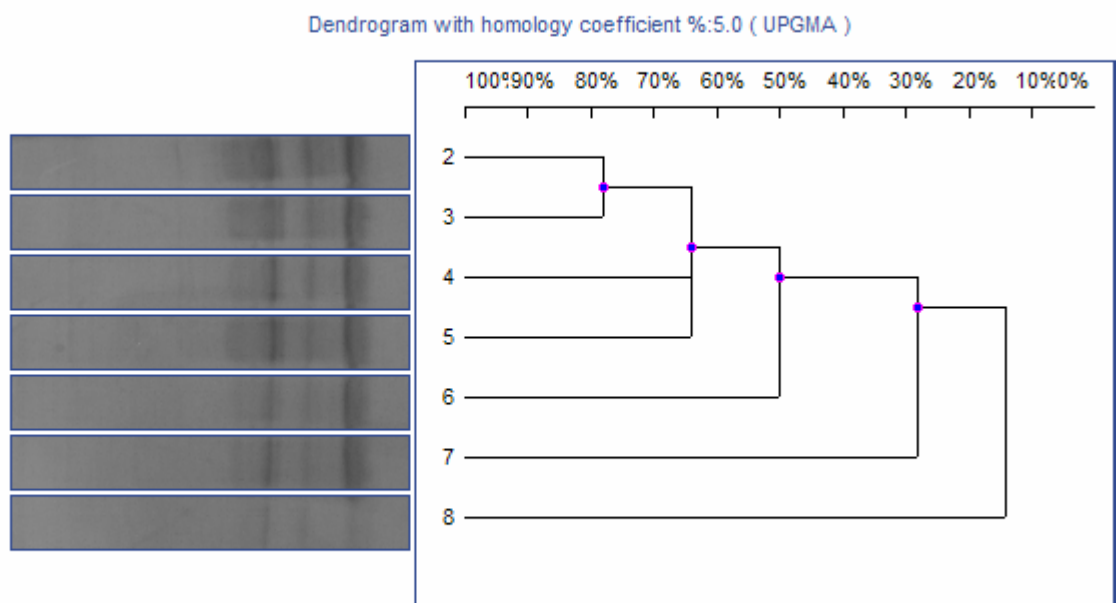


Obrázek 22: Proteinový profil vzorků sýra po 84 dnech zrání získaný metodou SDS-PAGE (12% gel): 1: Protein Test Mixture 5, 2: Laktoflora smetanová, 3: Delvo LL-50B DSL, 4: FLORA DANICA, 5: CHN-19, 6: Delvo DX-33D DSL, 7: C502, 8: C352, 9: Protein Test Mixture 5, 10: Casein solution from bovine milk – 5 %.

Tabulka 9: Srovnání profilu proteinů jednotlivých vzorků sýra po 84 dnech zrání, velikost proteinů v kDa.

Laktoflora smetanová	Delvo LL-50B DSL	FLORA DANICA	CHN-19	Delvo DX-33D DSL	C502	C352
29,00	28,84	28,88	28,71	28,90	22,36	19,70
25,97	27,32	27,79	27,62	22,17	19,37	12,99
25,10	26,50	26,17	23,30	21,15	18,22	
23,75	23,00	23,02	22,13	19,12	12,81	
22,26	22,11	22,05	19,92	18,03	9,35	
20,85	19,45	20,98	18,76	12,50	3,68	
18,87	18,65	19,71	17,63	9,03		
17,86	17,53	18,67	11,61	3,47		
15,71	11,36	17,66	7,94			
12,13	8,44	11,36	3,84			
8,27	4,20	3,63				
4,62	0,03	0,14				
0,14						

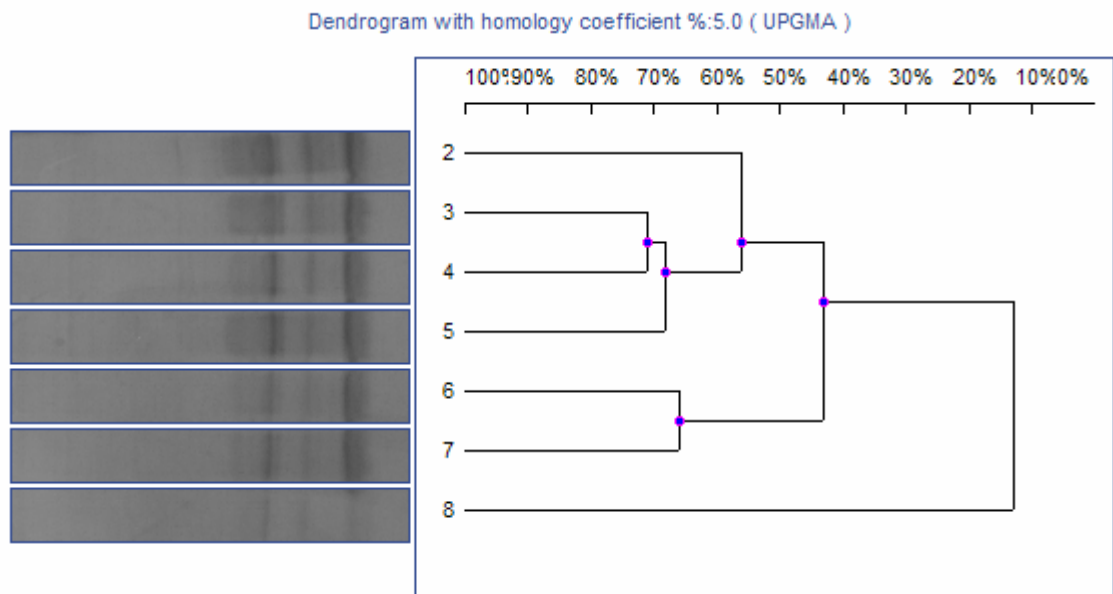
Z tabulky 9 je zřejmý úbytek množství proteinů s molekulovou hmotností v rozmezí 6,5 až 29 kDa oproti 56 dnu zrání. Největší proteolytická aktivita proběhla u sýru vyrobeného za pomoci kultury C352 po 56 dnech zrání. Po 84 dnech zrání byly již identifikovány pouze 2 proteiny s molekulovou hmotností v rozmezí 12 až 20 kDa. U této kultury pravděpodobně došlo ke zpomalení či zastavení proteolytické aktivity. Rozsáhlou proteolytickou aktivitu vykazují kultura Laktoflora smetanová.



Obrázek 23: Dendrogram podobnosti jednotlivých kultur s kontrolní kulturou Laktoflora smetanová po 84 dnech zrání: 2: Laktoflora smetanová, 3: Delvo LL-50B DSL, 4: FLORA DANICA, 5: CHN-19, 6: Delvo DX-33D DSL, 7: C502, 8: C352.

Dendrogram na obrázku 23 vyjadřuje s 5% chybou podobnost jednotlivých kultur s kontrolní kulturou (Laktoflora smetanová) jako základní kulturou. Kultura Delvo LL-50B DSL vykazovala totožnou proteolytickou aktivitu jako kultura smetanová. Naopak nejméně se proteolytickou aktivitou kultury smetanové podobají kultury C352 a C502.





Obrázek 24: Dendrogram proteinového profilu sýrů po 84 dnech zrání:

2: Laktoflora smetanová, 3: Delvo LL-50B DSL, 4: FLORA DANICA, 5: CHN-19,  
6: Delvo DX-33D DSL, 7: C502, 8: C352.

Dendrogram na obrázku 24 vyjadřuje s 5% chybou vzájemnou podobnost proteinového profilu sýrů po 84 dnech zrání. Z dendrogramu vyplynulo, že se sýry po 84 dnech zrání opět značně lišily svými proteinovými profily. Modelové vzorky sýrů lze rozdělit na tři hlavní skupiny. První skupinu tvoří sýry vyrobené za pomoci kultury smetanové, Delvo LL-50B DSL, FLORA DANICA a CHN-19. Ve druhé skupině jsou sýry, k jejichž výrobě byly použity kultury Delvo DX-33D DSL a C502. Nejvíce rozdílnou proteolytickou aktivitou ke kulturám Delvo LL-50B DSL, FLORA DANICA a CHN-19 se projevila kultura C352. U kultury C352 byla nejvyšší proteázová aktivita zaznamenána po 56 dnech zrání a je pravděpodobné, že v tomto období mohlo nastat maximum růstu BMK. Po této době pravděpodobně došlo k postupnému vyčerpání růstových faktorů, potřebných pro rozmnožování a udržení symbiotického vztahu mezi zástupci kyselové kultury, což mohlo mít za následek pokles či zastavení růstu BMK. Toto tvrzení lze podpořit tím, že po 84 dnech zrání klesl počet identifikovaných proteinů. Kultury Delvo DX-33D DSL, FLORA DANICA a CHN-19 vykazovaly proteolytickou aktivitu i po 84 dnech zrání. I přes zdánlivě stejné složení kultury obsahují pravděpodobně BMK

v odlišném poměru a v tomto období pravděpodobně nedošlo k vyčerpání růstových faktorů.

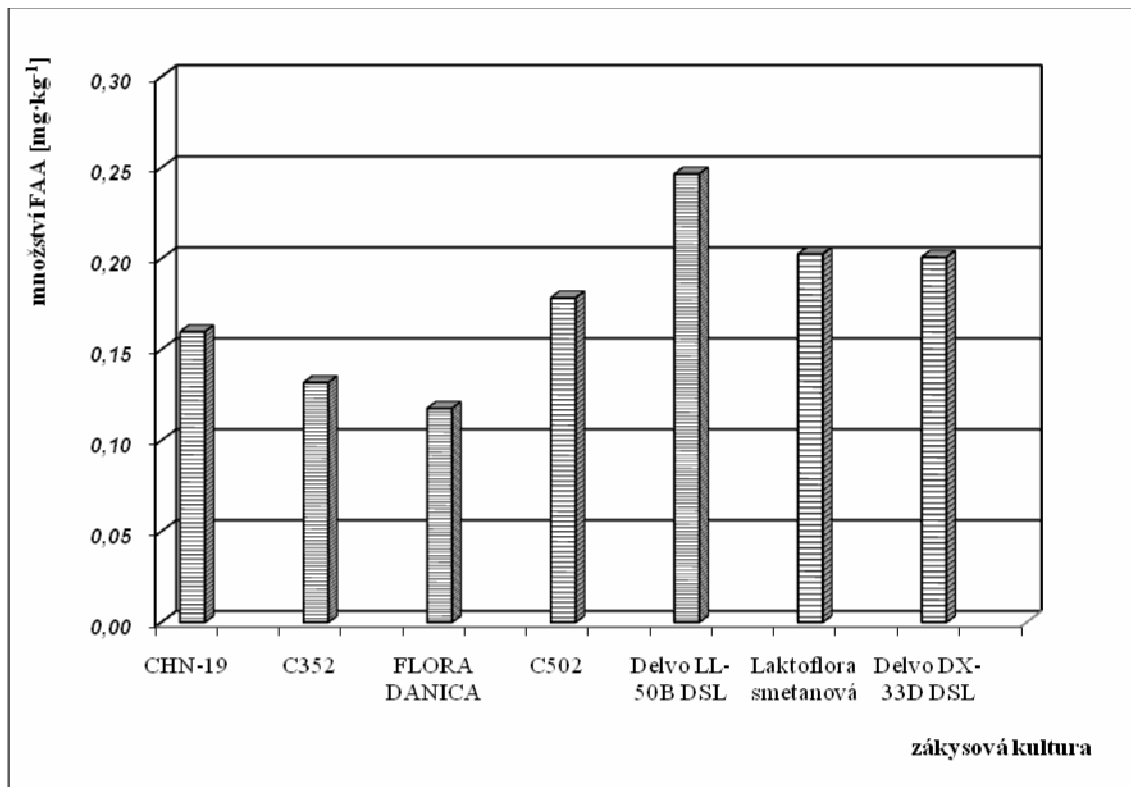
Rozdílnost v proteinových profilech modelových vzorků sýra, byla pravděpodobně způsobena odlišným složením jednotlivých zákysových kultur. Skupina kmenů *Lactococcus lactis* vykazuje v rámci stejného druhu značné rozdíly ve znacích, jako je kysací aktivita nebo činnost proteinázy (proteolytická aktivita) v důsledku rozmanitého proteolytického systému [73]. V rámci mezofilních kultur nebylo známé přesné složení (typizace kmenu), neboť tato informace bývá často tajemstvím výrobců komerčních kultur. Je tedy zřejmé, že při obecně známém složení, které bylo u naprosté většiny mezofilních kultur společné, mohly být příčinnou rozdílů v proteolytické aktivitě právě jednotlivé konkrétní druhy a jejich poměr. Největší proteolytická aktivita proběhla u sýru vyrobeného za pomoci kultury C352 po 56 dnech zrání, neboť po 84 dnech zrání byly u tohoto vzorku sýra identifikovány pouze 2 proteiny s molekulovou hmotností v rozmezí 12 až 20 kDa. Jelikož se kultura C352 po většinu doby zrání podobala kultuře C502, lze tedy kultury C352 a C502 považovat za kultury s výraznou proteolytickou aktivitou mezi 56 a 84 dnem zrání. Ke kulturám s vysokou proteolytickou aktivitou můžeme zařadit i kulturu Delvo DX-33D DSL. K nejvýraznější proteolýze u většiny sýrů docházelo v průběhu 56 dnů zrání. Po 56 dnech zrání docházelo k rozkladu středně velkých peptidů na peptidy s nižší molekulovou hmotností. Ze zákysových kultur vykazovala nejrozsáhlejší proteolytickou aktivitu Laktoflora smetanová. Smetanové kultuře se po celou dobu zrání proteolytickou aktivitou nejvíce podobaly kultury Delvo LL-50B DSL, FLORA DANICA a CHN-19. Aktivita proteolytických enzymů je ovlivňována i řadou dalších faktorů jako např. teplota zrání, pH, vodní aktivita a koncentrace solí [40]. Tyto parametry však nebyly v rámci diplomové práce stanovovány a nelze vyloučit, že nemohla být proteolytická aktivita těmito faktory ovlivněna.

### **6.3 Tvorba volných aminokyselin a biogenních aminů vybraných zákysových kultur/sýrů v průběhu zrání**

Zdrojová data a potřebné výpočty pro sestavení grafů FAA/BA pro jednotlivé zákysové kultury/sýry jsou uvedeny v příloze (příloha F).

U jednotlivých druhů zákysových kultur byla stanovována množství vyprodukovaných volných aminokyselin (FAA) a to po 48hodinové inkubační době (Graf 2). Jak je z grafu 2 patrné, zákysové kultury produkovaly během inkubace zákyků jen velmi malá množství FAA. U zákysových kultur byly identifikovány tyto FAA: Valin, cystein, metionin, cystationin, isoleucin, leucin, tyrosin, phenylalanin, etanolamin, ornitin, lysin, histidin, 1-metyl-histidin, 3-metyl-histidin, arginin a  $\gamma$ -aminomáselná kyselina. Z celkového množství FAA byly největšími poměry zastoupeny tyrosin a lysin. Za vhodných podmínek (kapitola 3.3.2 – Produkce biogenních aminů) slouží aminokyseliny jako prekurzory pro tvorbu biogenních aminů [52]. S největší pravděpodobností mohlo dojít k tomu, že byly FAA spotřebovávány právě na tvorbu těchto biogenních aminů. Z tyrozinu byl dekarboxylací vytvořen tyramin, jak potvrdila posléze identifikovaná množství tyraminu v průběhu 6. hod., 24. hod. a 48. hod. jednotlivými zákysovými kulturami, pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC).

Graf 2: Celkové množství FAA po 48 hodinách inkubace.

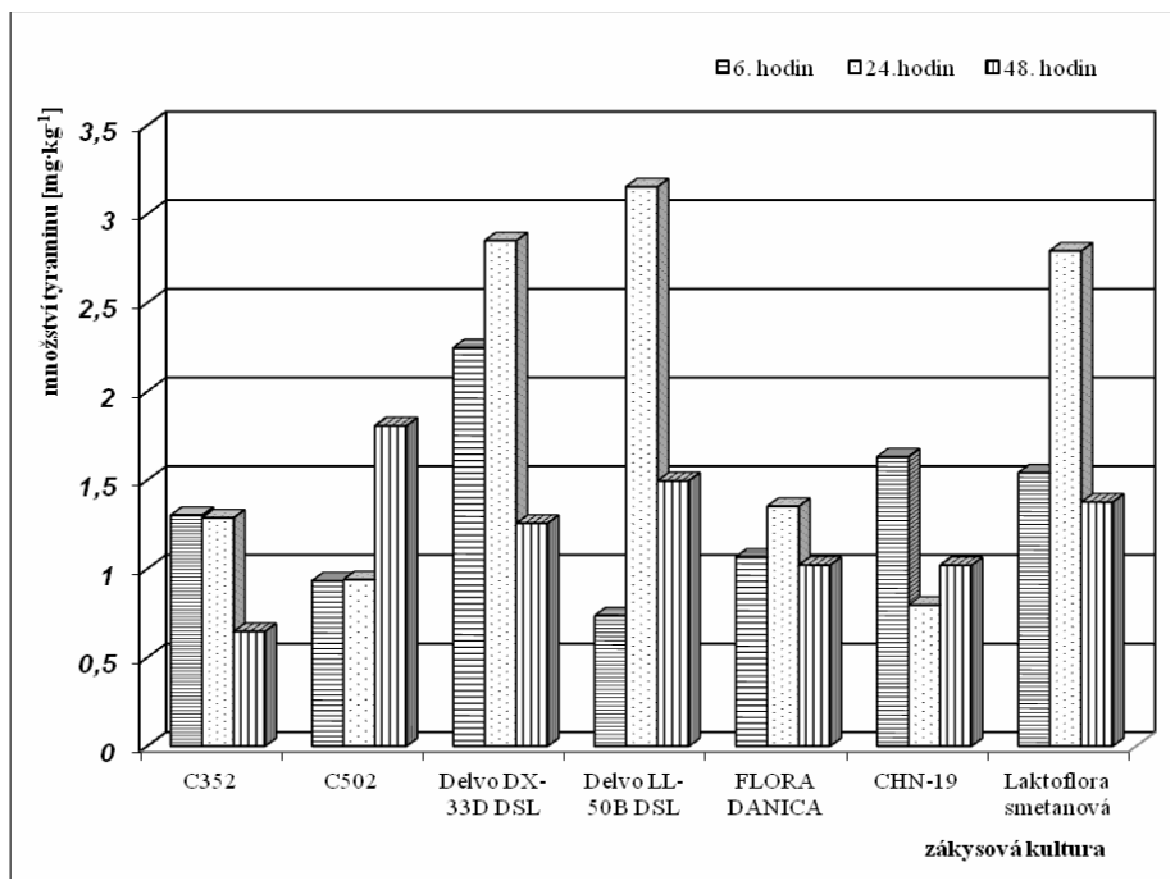


Pomocí metody HPLC byla zjišťována přítomnost biogenních aminů v kyselinových kulturách během jejich inkubační doby (6. hod., 24. hod. a 48. hod.).

Zákysové kultury jako jediný biogenní amin produkovaly tyramin. Pouze 2 kultury produkovaly nepatrné množství phenylethylaminu. Laktoflora smetanová po 48hodinové inkubaci produkovala 0,16 mg·kg<sup>-1</sup> phenylethylaminu a kultura C502 po 6 hodinách inkubace 0,19 mg·kg<sup>-1</sup> phenylethylaminu. Vzhledem k malému množství phenylethylaminu můžeme tedy tento BA zanedbat a tyramin tak považovat za hlavní produkovaný biogenní amin. Množství tyraminu tedy v podstatě odpovídalo celkovému množství biogenních aminů (graf 3). Z grafu 3 lze vypočítat, že množství BA po 24 hodinách inkubace mělo zvyšující se tendenci oproti 6hodinové inkubaci. Ovšem po 48. hodině byl zaznamenán pokles množství tyraminu. Některé bakterie, z nichž některé jsou i druhy LAB, jsou schopny degradovat BA prostřednictvím amino oxidázy [74]. BA mohou být degradovány pomocí oxidativní deaminace katalyzované amino oxidázou (AO) za vzniku aldehydu, amoniaku a peroxidu vodíku. Inhibitory oxidázy (Maos) a diamine oxidázy (DAOs) byly popsány u některých rodů z čeledi *Enterobacteriaceae*. Potenciální úloha mikroorganismů s činností AO se stala v posledních

několika letech středem zájmu. Může se jednat o jeden ze způsobů jak předcházet nebo snížit hromadění BA v potravinářských výrobcích, zejména ve fermentovaných potravinách [75].

Graf 3: Množství tyraminu v průběhu 6. hod., 24. hod. a 48. hod. inkubace jednotlivými zákysovými kulturami.

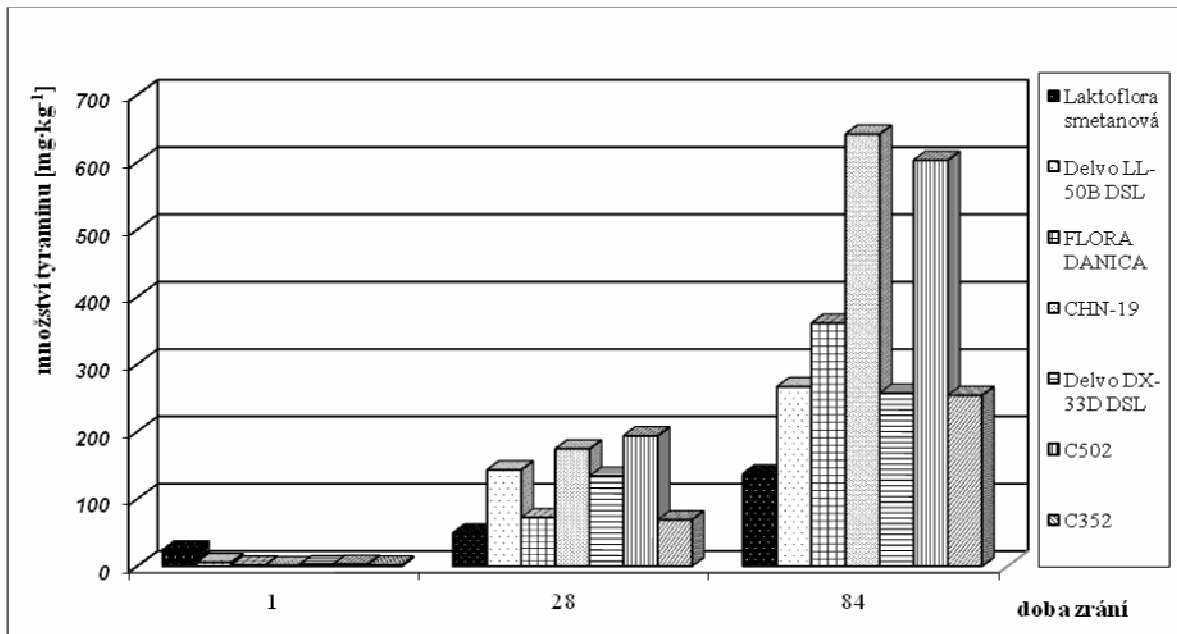


K toxikologicky nejvýznamnějším biogenním aminům patří tyramin, histamin, kadaverin a putrescin [76]. U žádné z testovaných zákysových kultur nebyla metodou HPLC zjištěna produkce kadaverinu a histaminu. Produkce tyraminu a putrescinu, které jsou obvykle v sýrech obsaženy v jednotkách až stovkách mg·kg<sup>-1</sup>, byly zjištěny u všech 7 bakteriálních zákysových kultur v průběhu zrání modelových vzorků přírodních sýrů (graf 4, graf 5). Vedle tyraminu a putrescinu produkovaly bakteriální zákysové kultury i malé množství phenylethylaminu. Putrescin byl identifikován až po 28 dnech zrání na rozdíl od tyraminu, u kterého byla malá množství zaznamenána již po 1. dnu zrání. Během doby zrání sýrů se obsah biogenních aminů zvyšoval [47]. Největší obsah tyraminu a putrescinu

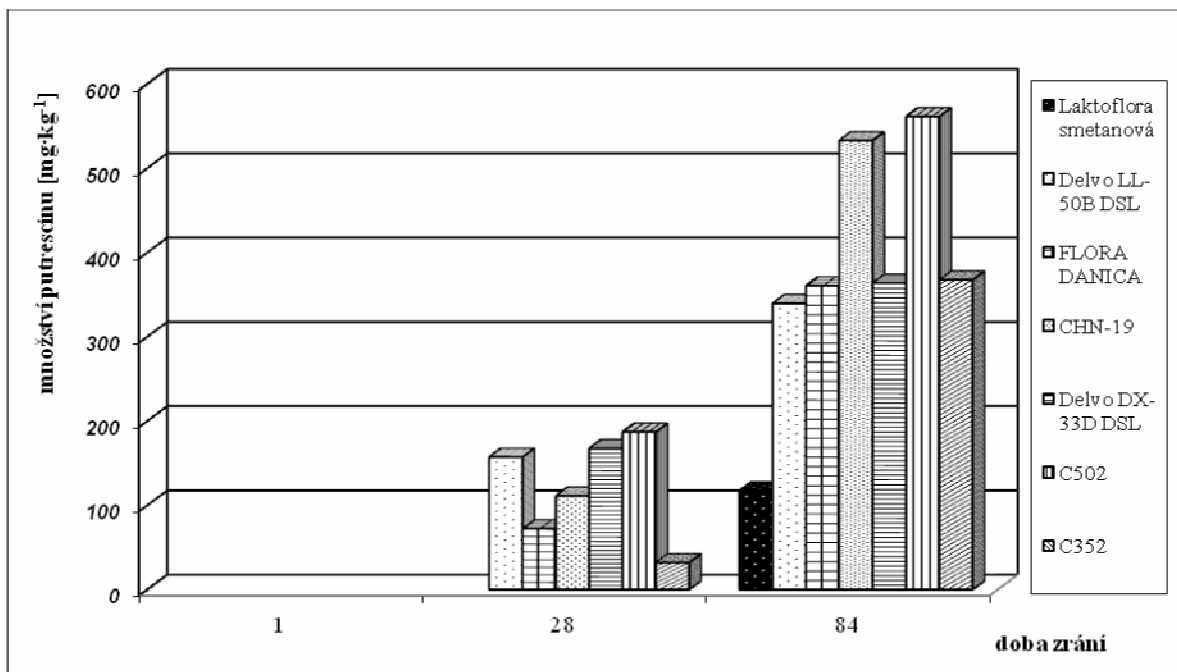
byl zaznamenán po 84 dnech zrání u sýrů vyrobených za pomoci kultur CHN-19 a C502. Zdá se tedy, že ze kyselých kultur produkovaly nejvíce BA kyselé kultury CHN-19 a C502. Při porovnání množství produkovaného tyraminu a putrescinu po 84 dnech zrání, lze vidět, že kyselá kultura produkovaly nepatrně více putrescin. Po 28 dnech zrání však tomu bylo naopak. Kultury produkovaly spíše tyramin. Ve výsledku byl ale vývoj množství putrescinu téměř shodný s vývojem obsahu tyraminu. Nejmenší produkce tyraminu a putrescinu byla zaznamenána u sýru vyrobeného za pomoci smetanové kultury. Laktoflora smetanová se vyznačovala nízkou produkcí BA.

Při výrobě sýrů bylo použito mléko vysoce pasterované. I v takto tepelně ošetřeném mléce se však mohly vyskytovat termofilní mikroorganismy (např.: rod *Enterobacteriaceae*), které mohly přežít pasterační záhřev. Tato skupina mikroorganismů mohla být producentem biogenních aminů. Jelikož kyselá kultura po 48 hodinách inkubace modelových kysů produkovaly velmi malá množství FAA jako prekurzorů BA, je velmi pravděpodobné, že za stanovená vysoká množství putrescinu a tyraminu mohla právě biochemická aktivita případné kontaminující mikroflóry a non-starterových mikroorganismů, které také mohou vykazovat dekarboxylázovou aktivitu a mohou být rovněž součástí přírodních sýrů [77]. Biogenní aminy mohou působit ve vyšších koncentracích toxicky v lidském organismu. Nejvíce prostudovány jsou negativní reakce histaminu a tyraminu na lidský organismus. Je uváděno, že množství 40-100 mg·kg<sup>-1</sup> histaminu vyvolává mírné otravy a za toxické limity histaminu a tyraminu je považována hodnota větší než 100 mg·kg<sup>-1</sup> [56, 78]. Podle Önal (2007) se za toxické množství tyraminu považuje hodnota 1080 mg·kg<sup>-1</sup> [56]. Dnes již neplatná vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 298/1997 Sb. stanovovala povolené množství tyraminu v sýrech tvrdých, měkkých a zrajících 200 mg·kg<sup>-1</sup> [58]. Jelikož však některé potraviny, nejen sýr, mohou obsahovat více biogenních aminů, hraje ve výsledku důležitou roli jejich celkový součet během příjmu potravin. U sýrů by součet tyraminu, histaminu, putrescinu a kadaverinu neměl překročit 900 mg kg<sup>-1</sup> [78]. Jak je patrné z grafu 6, byl tento limit překročen u sýrů, které byly vyrobeny za pomoci kultur FLORA DANICA, CHN-19 a C502. V příloze F je uveden chromatogram ze stanovení BA pro vzorky sýra po 84 dnech zrání, které byly vyrobeny za pomoci kultury C502 (obr. F1).

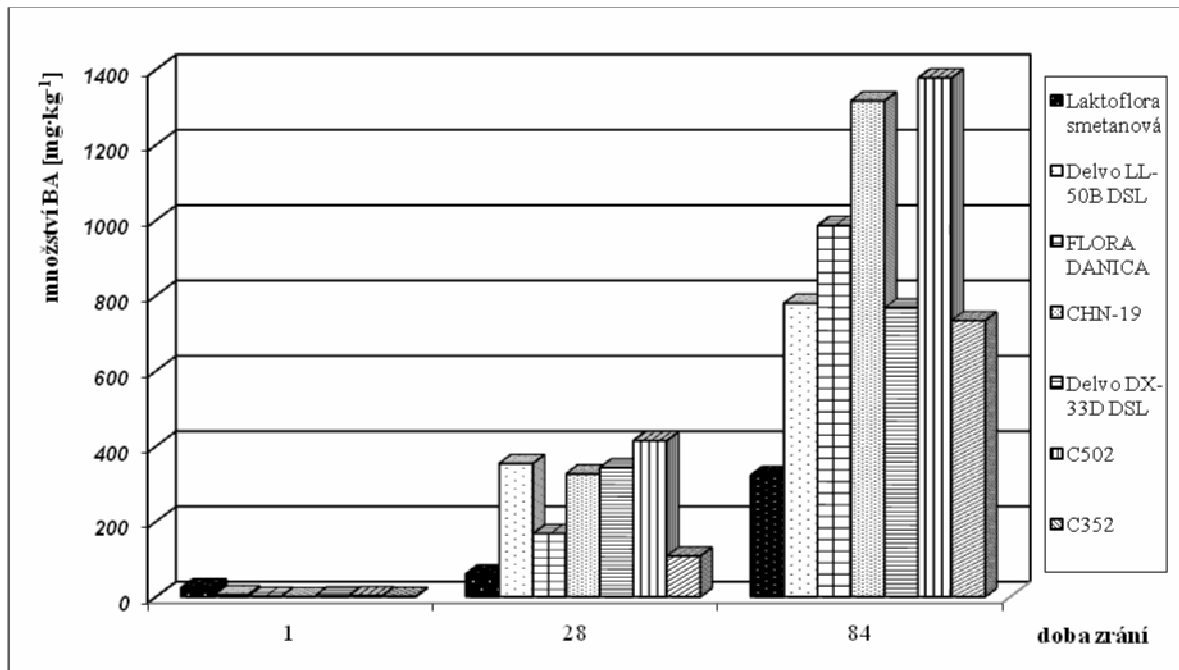
Graf 4: Množství tyraminu pro jednotlivé výrobní série sýrů v průběhu doby zrání (1. den, 28. den a 84. den).



Graf 5: Množství putrescinu pro jednotlivé výrobní série sýrů v průběhu doby zrání (1. den, 28. den a 84. den).



Graf 6: Celkové množství BA pro jednotlivé výrobní série sýrů v průběhu doby zrání (1. den, 28. den a 84. den).





## ZÁVĚR

Laktosa byla v rámci kmenů a druhů BMK obsažených v ČMK fermentována různou rychlostí, odvislou od metabolické dráhy, kterou BMK získávají energii ke svému růstu a rozmnožování. Intenzivní kysací aktivitou se projevovaly čisté mlékárenské kultury obsahující zástupce, kteří rozkládají laktosu homofermentativním kvašením a zároveň se jedná výhradně o bakterie O-typu (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*). Nejrychlejší kysací aktivitu vykazovala kultura Delvo LL-50B DSL. Mléko bylo za pomoci této kultury prokysáno na hodnotu pH 4,9 během 6 hodin. Tato kultura vykazovala bohatou proteolytickou aktivitu. Kultura smetanová naopak vykazovala pozvolný pokles aktivní kyselosti s několikahodinovým odstupem oproti ostatním mezofilním zákysovým kulturám. Laktoflora smetanová se vyznačovala pomalou kysací aktivitou a bohatou proteolytickou aktivitou.

V průběhu 14 dnů od výroby přírodních sýrů se začala postupně projevovat proteolytická aktivita zákysových kultur. Nejvýraznější proteolytickou aktivitou se projevovaly kultury C352 a C502 a to mezi 28. a 84. dnem zrání. Bohatou proteolytickou aktivitu mezofilních zákysových kultur lze pozorovat v 56. dnu od výroby.

Během inkubace modelových zákysů (48 hodin) byla detekována jen velmi malá množství FAA a to bez ohledu na použitou kulturu. Lze předpokládat, že FAA byly pravděpodobně intenzivně dekarboxylovány na příslušné biogenní aminy (zejména na tyramin). V případě modelových vzorků přírodních sýrů byla zaznamenána nejmenší produkce tyraminu a putrescinu u sýru vyrobeného za pomoci smetanové kultury.

Ze sledovaných kultur lze doporučit pro výrobu přírodních sýrů kultury Delvo LL-50B DSL, FLORA DANICA a kulturu smetanovou. Tyto kultury se vyznačovaly poměrně rychlou kysací aktivitou (s výjimkou kultury smetanové) a zároveň i výraznou proteolytickou aktivitou s poměrně nízkou tvorbou tyraminu.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SALMINEN, S., VON WRIGHT, A., OUWEHAND, A. Lactic Acid Bacteria, Microbiological and Functional Aspects. 3. ed, New York, U.S.A. 2004. s. 633. ISBN 0-8247-5332-1.
- [2] HUTKINS, Robert W, Carl A BATT a P PATEL. Microbiology and technology of fermented foods. 1st ed. Ames, Iowa: Blackwell Pub., 2006, xi, 473 p. ISBN 978-081-3800-189.
- [3] ŠILHÁNKOVÁ, L., *Mikrobiologie pro potravináře*, Praha: Academia, 2002. třetí opravené a doplněné vydání. ISBN 80-200-1024-6.
- [4] Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. 4th ed. Editor Sampo Lahtinen. Boca Raton: CRC Press, c2012, xviii, 779 s. ISBN 978-1-4398-3677-4.
- [5] LÓPEZ-DÍAZ, T.M., ALONSO, C., ROMÁN, C., GÁRCIA-LOPÉZ, M. L., MORENO, B. Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. *Food-Microbiology*, 2000, vol. 17, s. 23-32.
- [6] STILES, M., HOLZAPFEL, W. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Mikrobiology*, 1997, vol. 36, s. 1-29.
- [7] KLAENHAMMER, T. R., BARRANGOU, R., BUCK, B. L, AZCARATE-PERIL, M. A., ALTERMANN, E. (2005): Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 393–409.
- [8] ROBINSON, R, Carl A BATT a P PATEL. Encyclopedia of food microbiology. San Diego: Academic Press, c2000, 3 v. ISBN 01222707383.
- [9] GUILLOT, A., GITTON, CH., ANGLADE, P., MISTOU, M. Y. Proteomic analysis of *Lactococcus lactis*, a lactic acid bacterium. *Proteomics*, 2003, vol. 3, s. 337-354.
- [10] LIU S.-Q. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, vol. 83, s. 115-131.
- [11] MONTVILLE, Thomas J a Karl R MATTHEWS. Food microbiology: an introduction. 2nd ed. Washington, DC: ASM Press, c2008, xviii, 428 p. ISBN 15-558-1396-8.
- [12] VODRÁŽKA, Z. Biochemie. 2. opravené vyd. Praha : Academia, 2002. 191 s. ISBN 80-200-0600-1.

- [13] CAPLICE, E., FITZGERALD, G. F. (1999): Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* 50: 131–149.
- [14] HUI, Y. Dairy science and technology handbook. New York, N.Y.: VCH, c1993, 3 v. ISBN 35-272-8162-2.
- [15] ZAUNMÜLLER, T., EICHERT, M., RICHTER, H., UNDEN, G. Variations in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organic acids. *Applied microbiology and biotechnology*, 2006, vol. 72, s. 421-429.
- [16] MCSWEENEY, Paul LH. Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 2004, 57.2 - 3: 127-144.
- [17] GÖRNER, F., VALÍK, L. Aplikovaná mikrobiológia požívateľín. 1. vyd. Bratislava : Malé centrum, TYPOSET, 2004. 528 s. ISBN 80-967064-9-7.
- [18] Frédéric Leroy, Luc De Vuyst, Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry, *Trends in Food Science & Technology*, Volume 15, Issue 2, February 2004, Pages 67-78, ISSN 0924-2244
- [19] BOYLE, R. J., ROBINS-BROWNE, R. M., TANG, M. L. K (2006): Probiotic use in clinical practice: what are the risks? *American Journal of Clinical Nutrition* 83: 1256–64.
- [20] Víš co jíš: Probiotika a prebiotika [online]. [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: [http://www.viscojis.cz/index.php?option=com\\_content&view=article&id=146:probiotika-a-prebiotika&catid=64:onemocneni-zajimavosti&Itemid=66](http://www.viscojis.cz/index.php?option=com_content&view=article&id=146:probiotika-a-prebiotika&catid=64:onemocneni-zajimavosti&Itemid=66)
- [21] GAJDŮŠEK, Stanislav. *Mlékařství II*. 1. vyd. Brno: MZLU, 2002. 142 s. ISBN 80-7157-342-6.
- [22] LUKÁŠOVÁ J., BURDOVÁ O., HOLEC J., LINHARTOVÁ E., VEČEŘEK V., 2001: Hygiena a technologie mléčných výrobků. 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 180 s., ISBN 80-7305-415-9.
- [23] FOX, P.F., MCSWEENEY, P.L.H., COGAN, T.M. GUINEE, T.P. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology Volume 1 General Aspects. 3rd edition. London: Elsevier Academic Press. 2004. ISBN 0-1226-3652-X

- [24] VAŇURA R., 2010: Mlékařské kultury. Databáze online [cit. 2013-02-14]. Dostupné na: <http://www.milcom-as.cz/vum-a-laktoflora/produkty-laktoflora/mlekarske-kultury.html>
- [25] KNĚZ V., MAŠEK, MAXA, TEPLÝ M., 1960: Čisté mlékařské kultury a jejich použití v mlékárenském průmyslu. 2. vyd. Praha: SNTL, 297s.
- [26] HYLMAR, Bohumil, Jana HAVLOVÁ a Vladimír ERBAN. Koncentráty čistých mlékařských kultur. 1. vyd. Praha: Mlékárenský průmysl, 1989, 138 s. ISBN 80-851-2006-2.
- [27] Jörgen J. Leisner, Weeds, heat and pure cultures – On the differential success of new technologies in the Danish and American creamery industries in the 1890s, Food Policy, Volume 30, Issue 4, August 2005, Pages 419-433, ISSN 0306-9192.
- [28] KADLEC, Pavel. Technologie potravin II. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2002. 236 s. ISBN 80-7080-510-2.
- [29] MÄYRÄ-MÄKINEN, A.; BIGRET, M. Industrial Use and Production of Lactic Acid Bacteria. In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. (ed.). Lactic Acid Bacteria - Microbiological and Functional Aspects. New York: CRC Press, 2004, s. 175-198.
- [30] PLOCKOVÁ M., 2009: Zákysové kultury a způsoby jejich aplikace. In KADLEC P., MELZOCH K., VOLDŘICH M., (eds.) a kol. Co byste měli vědět o výrobě potravin? Technologie potravin. 1. vyd. Ostrava: KEY Publishing s.r.o., 536 s., ISBN 978-80-7418-051-4.
- [31] FORMAN L., HUŠEK V., PLOCKOVÁ M., SNÁŠELOVÁ J., ŠTÍPKOVÁ J., 1994: Mlékárenská technologie II. 1. vyd. Praha: VŠCHT Praha, 217 s. ISBN 80-7080-214-6.
- [32] TEPLÝ M., 1984: Čisté mlékařské kultury: výroba, kontrola, použití. 1. vyd. Praha: SNTL, 295 s.
- [33] TAMIME A., 2006: Fermented milks. 1st ed. Oxford: Blackwell Science/STD, 262p. ISBN 06-320-6458-7.
- [34] Zadražil, K.: Mlékařství (přednášky). 1. vyd. Praha: Česká zemědělská univerzita a ISV, 2002. 127 s. ISBN 80-86642-15-1.
- [35] TAMIME, A a R ROBINSON. Yoghurt: science and technology. 2nd ed. Cambridge, England: Woodhead Pub., 1999, xii, 619 p. ISBN 18-557-3399-4.

- [36] WEIMER, Edited by Bart C. Improving the flavour of cheese. Cambridge: Woodhead publ, 2007. ISBN 978-184-5690-076.
- [37] KIERONCZYK, A., S. SKEIE, T. LANGSRUD a M. YVON. Cooperation between *Lactococcus lactis* and Nonstarter *Lactobacilli* in the Formation of Cheese Aroma from Amino Acids.
- [38] M. Briggiler-Marcó, M.L. Capra, A. Quiberoni, G. Vinderola, J.A. Reinheimer, E. Hynes, Nonstarter *Lactobacillus* Strains as Adjunct Cultures for Cheese Making: In Vitro Characterization and Performance in Two Model Cheeses, *Journal of Dairy Science*, Volume 90, Issue 10, October 2007, Pages 4532-4542, ISSN 0022-0302.
- [39] FOX, P. F., GUINEE, T.P., COGAN, T.M., McSWEENEY, P.L.H. *Fundamentals of cheese science*. Gaithersburg: 2000. 638 p. ISBN 0-83-42-1260-9.
- [40] BROOME, M.C., LIMSOWTIN, G.K.Y. Starter peptidase activity in maturing cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*. 1998, 53, 79-73.
- [41] Cagliificio Meridionale Barletta - produzione caglio in pasta [online]. 2011 [cit. 2013-03-20]. Dostupné z: <http://www.cagliomeridionale.it/downloads/lamb.pdf>
- [42] KUNJI, E., R., S., MIREAU, I., HAGRING, A., POOLMAN, B., KONINGS, W., N., The proteolytic systems of lactic acid bacteria, *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 70, 1996
- [43] BESHKOVA, D., M., SIMOVA, E., D., FRENGOVA, G., I., SIMOV, Z., I., ADILOV, E., F., Production of amino acids by yogurt bacteria, *Biotechnology Progress*, vol. 14, 1998
- [44] SOUSA, M.J.; ARDÖ, Y.; McSWEENEY, P.L.H. Advance in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 2001, 11, 327–345.
- [45] SMITH, G., SMITH, B.A., ENGELS, W. J.M. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*. 2005, 29, 591-610.
- [46] SILLA SANTOS, M.H. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 1996, 29, p. 213–231.
- [47] KOMPRDA, T. *Obecná hygiena potravin*. Brno: MZLU, 2004, 145 s. ISBN 978-80-7157-757-7.

- [48] ROGINSKI, H.; FUQUAY, J.W.; FOX, P.F. *Encyclopedia of dairy sciences*. London: Academic press, 2002. ISBN 0-12-227235-8.
- [49] ARENA, M. E., MANCA DE NADRA, M. C., 2001. Biogenic amine production by *Lactobacillus*. In *Journal of Applied Microbiology*, roč. 90, 2001, s. 158-162.
- [50] KAROVIČOVÁ, J., KOHAJDOVÁ, Z. Biogenic amines in food. *Chemical Papers*, 2005, vol. 59, no. 1, p. 70–79.
- [51] SILLLA-SANTOS, M.H. *Fermentation and food safety*. Aspen,: Springer - Verlag, 2001. Chapter 6, Toxic nitrogen compounds produced during processing: Biogenic amines, ethylcarbamides, nitrosamines, p. 119–140. ISBN 0-8342-1843-7.
- [52] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin*. 3rd ed. Tábor: OSSIS, 2009. p. 623. ISBN 978-80-86659-16-9.
- [53] KALAČ, P., KRÍŽEK, M.(2002): Biogenní aminy a polyamidy v potravinách, *Výživa a potraviny* 12 - 13:53-56.
- [54] SANTOS, C.W., SOUZA M.R., CERQUEIRA M.M.O.P., GLÓRIA, M.B.A. Bioactive amines formation in milk by *Lactococcus* in the presence or not of rennet and NaCl at 20 and 32°C. *Food chemistry*, 2003, vol. 84, no. 4, p. 595-606.
- [55] PATTONO, D., GRASSI, M. A., CIVERA, T. Production of biogenic amines by some Eenterobacteriaceae strains isolated from dairy products. *Ital. J. Food Sci*, 2008, Vol. 20, No. 3, p. 411-417.
- [56] ÖNAL, A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*, 2007, no. 103, p. 1475–1486.
- [57] EU. Nařízení komise (ES) 2073/2005. In *Úřední věstník Evropské unie*. 2005, L 338, s. 1-26.
- [58] Česká republika. Vyhláška Ministerstva zdravotnictví, kterou se stanoví chemické požadavky na zdravotní nezávadnost jednotlivých druhů potravin a potravinových surovin, podmínky jejich použití, jejich označování na obalech, požadavky na čistotu a identitu přídatných látek a potravních doplňků a mikrobiologické požadavky na potravní doplňky a látky přídatné. In: 298/1997. 1997.
- [59] REDDY, C. *Methods for general and molecular microbiology*. 3rd ed. Washington, D.C.: ASM Press, c2007, xix, 1069 p. ISBN 15-558-1223-6.
- [60] PACHLOVÁ, V., BUŇKA, F., BUŇKOVÁ, L., WEISEROVÁ, E., BUDINSKÝ, P., ŽALUDEK, M., KRÁČMAR, S. The effect of three different ripening/storage

- conditions on the distribution of selected parameters in individual parts of Dutchtype cheese. *International Journal of Food Science and Technology*, 2011, 46, 101-108.
- [61] BUŇKOVÁ, L.; BUŇKA, F.; HLOBILOVÁ, M.; VAŇÁTKOVÁ, Z.; NOVÁKOVÁ, D.; DRÁB, V. Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. *Eur. Food Research Technology*, 2009, 229, 533-538.
- [62] DADÁKOVÁ, E., KRŽÍZEK, M., PELIKÁNOVÁ, T., Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC), *Food Chemistry*, Volume 116, Issue 1, 1 September 2009, Pages 365-370, ISSN 0308-8146
- [63] Binder, M., Drbohlav, J., Šalaková, A., Nehyba, A., & Sedlařík, V. KYSELINA MLÉČNÁ JAKO POLOPRODUKT K VÝROBĚ POLYLAKTÁTŮ A BIODEGRA-DOVATELNÝCH PLASTŮ. *Am. J. Physiol*, 280, G922-G929.
- [64] National Chung Hsing University: Chapter 2 : Protein Electrophoresis [online]. 2007 [cit. 2013-03-06]. Dostupné z: <http://www.nchu.edu.tw/~giab/giabcs/molecular%20biotechnology/chapter%202.pdf>
- [65] SUMMER, Heike; GRÄMER, René; DRÖGE, Peter. Denaturing urea polyacrylamide gel electrophoresis (Urea PAGE). *Journal of visualized experiments: JoVE*, 2009, 32.
- [66] Bio-Rad Products for Life Since Research and Clinical Diagnostics: Protein Solubilization [online]. [cit. 2013-02-19]. Dostupné z: [http://www.bio-rad.com/evportal/en/BE/evolutionPortal.portal?\\_nfpb=true&\\_pageLabel=SolutionSLandingPage&catID=LUSP3KFD4](http://www.bio-rad.com/evportal/en/BE/evolutionPortal.portal?_nfpb=true&_pageLabel=SolutionSLandingPage&catID=LUSP3KFD4)
- [67] Cheminfo-server chemické sekce: SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS PAGE) [online]. 2009 [cit. 2013-04-02]. Dostupné z: [http://cheminfo.chemi.muni.cz/chem\\_sekce/predmety/C7300/EF/SDSPAGE%20kolecko.pdf](http://cheminfo.chemi.muni.cz/chem_sekce/predmety/C7300/EF/SDSPAGE%20kolecko.pdf)
- [68] EDITED BY ABBY THOMPSON, Mike Boland and Harjinder Singh. *Milk proteins: from expression to food*. [Online-Ausg.]. Amsterdam: Academic Press/Elsevier, 2009. ISBN 978-012-3740-397.

- [69] DUNN, Michael J.; BRADD, Samantha J. Separation and analysis of membrane proteins by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. In: Biomembrane Protocols. Humana Press, 1993. p. 203-210.
- [70] Potravinářstvo: Characterization of Lactococcus strains and their using in dairy technology [online]. 2012 [cit. 2013-04-26]. Dostupné z: <http://www.potravinarstvo.com/journal1/index.php/potravinarstvo/article/viewFile/162/166>
- [71] Picon, A., Nuñez, M. Growth stimulation of a proteinase positive Lactococcus lactis strain by a proteinase negative Lactococcus lactis strain, International Journal of Food Microbiology 119, 308 – 313, 2007.
- [72] Infobanka výzkumu Ministerstva zemědělství: GF3284-Výběr a hodnocení sýrařských kultur z hlediska nových parametrů pro zajištění kvality a zdravotní nezávadnosti tvrdých sýrů [online]. 2008 [cit. 2013-04-21]. Dostupné z: <http://www.mze-vyzkum-infobanka.cz/qf3284-vyber-a-hodnoceni-s.aspx>
- [73] A. Picon, M.A. García-Casado, M. Nuñez, Proteolytic activities, peptide utilization and oligopeptide transport systems of wild Lactococcus lactis strains, International Dairy Journal, Volume 20, Issue 3, March 2010, Pages 156-162, ISSN 0958-6946
- [74] Maria L.N.Enes Dapkevicius, M.J.Robert Nout, Frank M. Rombouts, Jacques H. Houben, Wieke Wymenga, Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms, International Journal of Food Microbiology, Volume 57, Issues 1–2, 10 June 2000, Pages 107-114, ISSN 0168-1605
- [75] Kongkiattikajorn, J. (2013). Potential of Fermented Sausage-Associated Lactic Acid Bacteria to Degrade Biogenic Amines During Storage.
- [76] Burdychová R. (2006): Screening vybraných startovacích bakteriálních kultur napřítomnost DNA sekvencí kódujících dekarboxylázu tyrosinu. Acta univ. Agric. Etsilvic. Mendel. Brun., LIV, No. 5, 7-12
- [77] LADERO, V., SAÑCHEZ-LLANA, E., FERNAÑDEZ, M., ALVAREZ. M. Survival of biogenic amine-producing dairy LAB strains at pasteurisation conditions. *International Journal of Food Science and Technology*, 2011, vol. 46, p. 516-521.



- [78] ANCÍN-AZPILICUETA, C., GONZÁLEZ-MARCO, A., JIMÉNEZ-MORENO, N. Current knowledge about the presence of amines in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2008, vol. 48, no. 3, p. 257–275.
- [79] POT, B., VANDAMME, P., KERSTERS, K., Analysis of electrophoretic whole organism protein fingerprints, 1994, p. 493-522. In: Goodfellow M. and O'Donnel A.G. (ed.), *Modern microbial methods. Chemical methods in procaryotic systematics*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

BMK	Bakterie mléčného kvašení
ČMK	Čisté mlékařské kultur
JTK/ml	Počet jednotek tvořící kolonii na 1 ml
JTK/g	Počet jednotek tvořící kolonii na 1 g
NSLAB	Non-starterové bakterie mléčného kvašení
TAG	Triacylglycerol
DAG	Diacylglycerol
MAG	Monoacylglycerol
BA	Biogenní amin
Urea-PAGE	Polyakrylamidová elektroforéza (PAGE) v přítomnosti urei
SDS-PAGE	Polyakrylamidová elektroforéza (PAGE) v přítomnosti dodecylsíranu sodného (SDS)
FAA	Volné aminokyseliny
HPLC	Vysokotlaká kapalinová chromatografie

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1: Obecné schéma fermentace glukosy u BMK [13] .....	13
Obrázek 2: Schéma přípravy zákysových kultur [35]. .....	23
Obrázek 3: Možné způsoby přeměn kyseliny mléčné během zrání [23]. .....	27
Obrázek 4: Možné metabolické cesty rozkladu volných mastných kyselin [16, 23]. .....	29
Obrázek 5: Proteolytický systém rodu <i>Lactococcus</i> [23]. .....	30
Obrázek 6: Proteinový profil vzorků zákysu po 6hodinové inkubaci získaný metodou SDS-PAGE (15% gel): 1: Protein Test Mixture 5, 2: CHN-19, 3: FLORA DANICA, 4: Delvo LL-50B DSL, 5: Delvo DX-33D DSL, 6: C352, 7: Laktoflora smetanová, 8: C502, 9: Protein Test Mixture 5, 10: Casein solution from bovine milk – 5% .....	51
Obrázek 7: Dendrogram proteinového profilu zákysů po 6 hodinách inkubace: 2: CHN-19, 3: FLORA DANICA, 4: Delvo LL-50B DSL, 5: Delvo DX-33D DSL, 6: C352, 7: Laktoflora smetanová, 8: C502. ....	54
Obrázek 8: Proteinový profil vzorků zákysů získaný metodou SDS-PAGE (15% gel): část A po 24hodinové inkubaci, část B po 48hodinové inkubaci: 1: Protein Test Mixture 5, 2: CHN-19, 3: FLORA DANICA, 4: Delvo LL-50B DSL, 5: Delvo DX-33D DSL, 6: C352, 7: Laktoflora smetanová, 8: C502, 9: Protein Test Mixture 5, 10: Casein solution from bovine milk – 5 % .....	55
Obrázek 9: Dendrogram proteinového profilu zákysů po 24 hodinách inkubace: 2: CHN-19, 3: FLORA DANICA, 4: Delvo LL-50B DSL, 5: Delvo DX-33D DSL, 6: C352, 7: Laktoflora smetanová, 8: C502. ....	57
Obrázek 10: Dendrogram proteinového profilu zákysů po 48 hodinách inkubace: 2: CHN-19, 3: FLORA DANICA, 4: Delvo LL-50B DSL, 5: Delvo DX-33D DSL, 6: C352, 7: Laktoflora smetanová, 8: C502. ....	58
Obrázek 11: Proteinový profil vzorků sýra po 1 dnu zrání získaný metodou SDS-PAGE (12% gel): 1: Protein Test Mixture 5, 2: Delvo LL-50B DSL, 3: FLORA DANICA, 4: CHN-19, 5: Delvo DX-33D DSL, 6: C502, 7: C352, 8: Protein Test Mixture 5, 9: Casein solution from bovine milk – 5 % .....	59
Obrázek 12: Dendrogram proteinového profilu sýrů po 1 dnu zrání: 2: Delvo LL-50B DSL, 3: FLORA DANICA, 4: CHN-19, 5: Delvo DX-33D DSL, 6: C502, 7: C352. ....	61

- Obrázek 13: Proteinový profil vzorků sýra po 14 dnech zrání získaný metodou SDS-PAGE (12% gel): 1: Protein Test Mixture 5, 2: Laktoflora smetanová, 3: Delvo LL-50B DSL, 4: FLORA DANICA, 5: CHN-19, 6: Delvo DX-33D DSL, 7: C502, 8: C352, 9: Protein Test Mixture 5, 10: Casein solution from bovine milk – 5 %..... 62
- Obrázek 14: Dendrogram podobnosti jednotlivých kultur s kontrolní kulturou Laktoflora smetanová po 14 dnech zrání: 2: Laktoflora smetanová, 3: Delvo LL-50B DSL, 4: FLORA DANICA, 5: CHN-19, 6: Delvo DX-33D DSL, 7: C502, 8: C352..... 63
- Obrázek 15: Dendrogram proteinového profilu sýrů po 14 dnech zrání: 2: Laktoflora smetanová, 3: Delvo LL-50B DSL, 4: FLORA DANICA, 5: CHN-19, 6: Delvo DX-33D DSL, 7: C502, 8: C352. .... 64
- Obrázek 16: Proteinový profil vzorků sýra po 28 dnech zrání získaný metodou SDS-PAGE (12% gel): 1: Protein Test Mixture 5, 2: Laktoflora smetanová, 3: Delvo LL-50B DSL, 4: FLORA DANICA, 5: CHN-19, 6: Delvo DX-33D DSL, 7: C502, 8: C352, 9: Protein Test Mixture 5, 10: Casein solution from bovine milk – 5 %..... 65
- Obrázek 17: Dendrogram podobnosti jednotlivých kultur s kontrolní kulturou Laktoflora smetanová po 28 dnech zrání: 2: Laktoflora smetanová, 3: Delvo LL-50B DSL, 4: FLORA DANICA, 5: CHN-19, 6: Delvo DX-33D DSL, 7: C502, 8: C 352..... 66
- Obrázek 18: Dendrogram proteinového profilu sýrů po 28 dnech zrání: 2: Laktoflora smetanová, 3: Delvo LL-50B DSL, 4: FLORA DANICA, 5: CHN-19, 6: Delvo DX-33D DSL, 7: C502, 8: C352. .... 67
- Obrázek 19: Proteinový profil vzorků sýra po 56 dnech zrání získaný metodou SDS-PAGE (12% gel): 1: Protein Test Mixture 5, 2: Laktoflora smetanová, 3: Delvo LL-50B DSL, 4: FLORA DANICA, 5: CHN-19, 6: Delvo DX-33 DSL, 7: C502, 8: C 352, 9: Protein Test Mixture 5, 10: Casein solution from bovine milk – 5 %..... 68
- Obrázek 20: Dendrogram podobnosti jednotlivých kultur s kontrolní kulturou Laktoflora smetanová po 56 dnech zrání: 2: Laktoflora smetanová, 3: Delvo LL-50B DSL, 4: FLORA DANICA, 5: CHN-19, 6: Delvo DX-33D DSL, 7:C502, 8: C352. .... 69

- Obrázek 21: Dendrogram proteinového profilu sýrů po 56 dnech zrání:  
2: Laktoflora smetanová, 3: Delvo LL-50B DSL, 4: FLORA DANICA, 5:  
CHN-19, 6: Delvo DX-33D DSL, 7: C502, 8: C352. .... 70
- Obrázek 22: Proteinový profil vzorků sýra po 84 dnech zrání získaný metodou SDS-  
PAGE (12% gel): 1: Protein Test Mixture 5, 2: Laktoflora smetanová, 3: Delvo  
LL-50B DSL, 4: FLORA DANICA, 5: CHN-19, 6: Delvo DX-33D DSL, 7:  
C502, 8: C352, 9: Protein Test Mixture 5, 10: Casein solution from bovine milk  
– 5 %..... 71
- Obrázek 23: Dendrogram podobnosti jednotlivých kultur s kontrolní kulturou  
Laktoflora smetanová po 84 dnech zrání: 2: Laktoflora smetanová, 3: Delvo  
LL-50B DSL, 4: FLORA DANICA, 5: CHN-19, 6: Delvo DX-33D DSL, 7:  
C502, 8: C352..... 72
- Obrázek 24: Dendrogram proteinového profilu sýrů po 84 dnech zrání:  
2: Laktoflora smetanová, 3: Delvo LL-50B DSL, 4: FLORA DANICA, 5:  
CHN-19, 6: Delvo DX-33D DSL, 7: C502, 8: C352. .... 73

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1: Základní druhy ČMK dle účelu použití, jejich vlastnosti a zástupci [17, 31, 32].....	19
Tabulka 2: Seznam použitých mezofilních mlékařských kultur a jejich dávkování. ....	38
Tabulka 3: Srovnání proteinových profilů jednotlivých zákysů po 6hodinové inkubační době, velikost proteinů v kDa.....	52
Tabulka 4: Srovnání proteinových profilů jednotlivých zákysů po 24 a 48hodinové inkubaci, velikost proteinů v kDa.....	56
Tabulka 5: Srovnání profilu proteinů jednotlivých vzorků sýra po 1 dnu zrání, velikost proteinů v kDa. ....	60
Tabulka 6: Srovnání proteinových profilů jednotlivých vzorků sýra po 14 dnech zrání, velikost proteinů v kDa. ....	62
Tabulka 7: Srovnání profilu proteinů pro jednotlivé vzorky sýrů po 28 dnech zrání, velikost proteinů v kDa. ....	65
Tabulka 8: Srovnání profilu proteinů jednotlivých vzorků sýra po 56 dnech zrání, velikost proteinů v kDa. ....	68
Tabulka 9: Srovnání profilu proteinů jednotlivých vzorků sýra po 84 dnech zrání, velikost proteinů v kDa. ....	71

**SEZNAM GRAFŮ**

Graf 1: Kysací křivky vybraných druhů zákysových kultur v průběhu celého časového intervalu měření (30 hodin), teplota kultivace 25 °C. ....	48
Graf 2: Celkové množství FAA po 48 hodinách inkubace. ....	76
Graf 3: Množství tyraminu v průběhu 6. hod., 24. hod. a 48. hod. inkubace jednotlivými zákysovými kulturami. ....	77
Graf 4: Množství tyraminu pro jednotlivé výrobní série sýrů v průběhu doby zrání (1. den, 28. den a 84. den). ....	79
Graf 5: Množství putrescinu pro jednotlivé výrobní série sýrů v průběhu doby zrání (1. den, 28. den a 84. den). ....	79
Graf 6: Celkové množství BA pro jednotlivé výrobní série sýrů v průběhu doby zrání (1. den, 28. den a 84. den). ....	80

**SEZNAM PŘÍLOH**

PŘÍLOHA A: Příprava vzorků zákysů/sýra pro SDS-PAGE .....	97
PŘÍLOHA B: Složení roztoků a gelů pro SDS-PAGE .....	98
PŘÍLOHA C: Příprava vzorků a složení roztoků, gelů pro Urea-PAGE.....	101
PŘÍLOHA D: Eluční program a složení pufrů při detekci biogenních aminů.....	104
PŘÍLOHA E: Optimalizace metody SDS-PAGE .....	105
PŘÍLOHA F: Zdrojová data pro grafy FAA/BA zákysových kultur/sýrů.....	107



## **PŘÍLOHA A: PŘÍPRAVA VZORKŮ ZÁKYSŮ/SÝRA PRO SDS-PAGE**

Do čisté polypropylenové uzavíratelné zkumavky byl navážen 0,5 g lyofilizovaného vzorku zákysu/sýra. Ke vzorku bylo následně přidáno 4,5 ml deionizované vody (ředění 1:9). Pro důkladnou homogenizaci vzorku byly zkumavky vloženy na 20 minut do třepačky. Poté byly vzorky inkubovány v inkubátoru (INCU-LINE zakoupený u firmy BioTech a.s., Praha) po dobu 4 hodiny při teplotě 35 °C. Následně byly zkumavky vloženy do odstředivky EBA 21, (Hettich ZENTRIFUGEN, Germany, Tuttlingen). Odstředování probíhalo 5 minut při 6 000 ot./min. Z takto upraveného vzorku bylo ze střední části zkumavky (část bez spodní sedimentu a vrchní tukové vrstvy) odpipetováno 100 µl do eppendorfy. K 100 µl tohoto vzorku bylo přidáno 25 µl 20% SDS, 12,5 µl 2-merkaptetanolu (SERVA) a vzorkový pufr v objemu 115 µl. Směs v eppendorfci byla promíchána na Bio Vortex V1, BIOSAN a 10 minut inkubována při teplotě 100 °C. U vzorků sýra navíc proběhlo dodatečné naředění vzorkovým pufrem a to podle následujícího schématu:

- 1. den odběru bez ředění,
- 14. den odběru ředěn 1:1 (inkubovaný vzorek : vzorkový pufr),
- 28. den odběru ředěn 1:2,
- 56. den odběru ředěn 1:3,
- 84. den odběru ředěn 1:4.

Vzorky byly uchovány při mrazírenských teplotách až do vlastní analýzy.

Pro stanovení proteinových profilů vzorků sýra a ke stanovení tvorby biogenních aminů v sýrech v závislosti na době skladování, byly použity již hotové lyofilizované vzorky sýrů. Tyto vzorky byly vytvořeny v rámci diplomové práce Bc. Heleny Slaninové – „Vliv přísady biologicky aktivních látek na jakost modelového systému přírodního sýra“. Hotové lyofilizované vzorky sýrů byly dále upraveny podle již výše zmíněného postupu a používány v rámci mé diplomové práce.

## **PŘÍLOHA B: SLOŽENÍ ROZTOKŮ A GELŮ PRO SDS-PAGE**

### **Roztoky pro SDS-PAGE [79]**

#### Tris pufr pro separační gel, pH 8,8:

Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Duchefa Biochemie) 18,15 g

Deionizovaná voda 50 ml

Pomocí koncentrované HCl (Lach-Ner) upravit pH na hodnotu 8,8 a doplnit deionizovanou vodou do 100 ml. Uchovávat při +4 °C.

#### Tris pufr pro koncentrační gel, pH 6,8:

Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Duchefa Biochemie) 6,0 g

Deionizovaná voda 50 ml

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

#### Elektroforetický (elektrodový) pufr dle Laemliho 10x koncentrovaný (Serva):

Před použitím zředěn deionizovanou vodou v poměru 1:9.

#### 30% roztok akrylamidu; 2,67% C

Akrylamid (SERVA) 29,2 g

N,N'-metylen-bisakrylamid (SERVA) 0,8 g

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

#### Amonium persulfate (SERVA) (persíran)

#### Vzorkový pufr:

(0,062 M Tris-HCl, 5% merkaptoetanol a 10% glycerol)

Tris-HCl (SERVA) 0,0977 g

2-merkaptoetanol (SERVA) 0,5 g

Glycerol (Lach-Ner) 1,0 g

Bromfenolová modř (SERVA) 0,01 g

Upravit pH na hodnotu 6,8 a doplnit deionizovanou vodou do 10 ml.

Fixační roztok (10% kyselina octová, 30% etanol):

Etanol, 96% (Lach-Ner) 30 ml

Kyselina octová (Lach-Ner) 10 ml

Doplnit do 100 ml deionizovanou vodou.

Barvicí roztok:

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

Odbarvovací roztok:

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

Tab. B1: Komponenty pro 12% separační gel ke stanovení proteinů u zákysových kultur.

Látka	objem na přípravu 4 gelů [ml]
30% roztok akrylamidu	13,65
tris pufr, ph 8,8	9,1
deionizovaná voda	12,25
10% SDS (Sigma)	0,35
10% persíran amonný (Sigma)	0,14
N,N,N',N'-tetra-metylendiamin (TEMED, (Sigma)	0,0175

Tab. B2: Komponenty pro 15% separační gel pro stanovení proteinů u vzorků sýra.

látka	objem na přípravu 4 gelů [ml]
30% roztok akrylamidu	22,5
tris pufr, ph 8,8	11,25
deionizovaná voda	10,35
10% SDS (Sigma)	0,45
10% persíran amonný (Sigma)	0,45
N,N,N',N'-tetra-metylendiamin (TEMED, (Sigma)	0,018

Tab. B3: Komponenty pro 5% koncentrační gel pro stanovení proteinů u vzorků z kyselých kultur/sýra.

látka	objem na přípravu 4 gelů [ml]
30% roztok akrylamidu	1,36
tris pufr, ph 6,8	2,0
deionizovaná voda	4,6
10% SDS (Sigma)	0,050
10% persíran amonný (Sigma)	0,050
N,N,N',N'-tetra-metylendiamin (TEMED, (Sigma)	0,010

## **PŘÍLOHA C: PŘÍPRAVA VZORKŮ A SLOŽENÍ ROZTOKŮ, GELŮ PRO UREA-PAGE**

Do mikrozkušavek eppendorf byly postupně naváženy na analytických vahách A&D GH-200 EC lyofilizované vzorky zákysových kultur. Navažované množství se pohybovalo kolem 0,01 g. Navážené vzorky byly poté přelity 1ml vzorkového pufru a inkubovány ve vodní lázni (teplota lázně 50 °C) několik minut. Vzorky byly uchovány při mrazírenských teplotách až do vlastní analýzy. Vzorky bylo možné takto uchovávat pouze po dobu 14 dní.

### Akrylamidový roztok:

40% (w/v) akrylamid v H<sub>2</sub>O. Skladování při + 4°C.

### Pufr pro přípravu koncentračního gelu:

Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Duchefa Biochemie) 0,83 g,

Urea 30 g,

koncentrovaná HCl (Lach-Ner) 440 µl,

Upravit pH na hodnotu 7,6 pomocí 2N HCl.

### Pufr pro přípravu separačního gelu:

Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Duchefa Biochemie) 6,43 g,

Urea 38,57 g,

koncentrovaná HCl (Lach-Ner) 572 µl.

Upravit pH na hodnotu 8,9 pomocí 2N HCl.

### Elektrodový pufr:

Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Duchefa Biochemie) 3 g,

Glycin 14,6 g,

Skldování při + 4°C.

### Vzorkový pufr:

Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Duchefa Biochemie) 0,75 g,

Urea 49 g,

koncentrovaná HCl (Lach-Ner) 400  $\mu$ l,

2-merkaptoetanol (SERVA) 700  $\mu$ l,

Bromfenolová modř (SERVA) 0,15 g.

Barvicí roztok:

roztok brilantové modři 79,2 ml: 1M kyselina sírová 13,5 ml (250 ml) a brilantová modř 0,5g (250 ml)

10M KOH 8,8 ml,

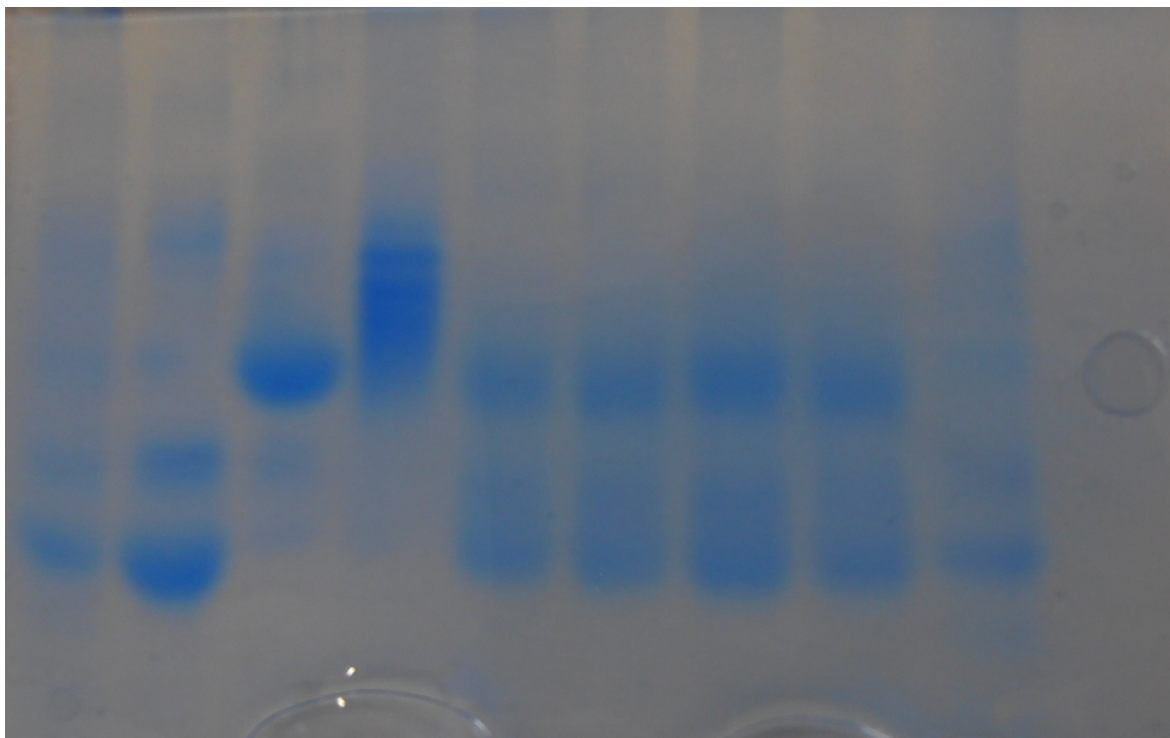
Kyselina trichloroctová 12 g

Tab. C1: Komponenty pro přípravu separačního gelu.

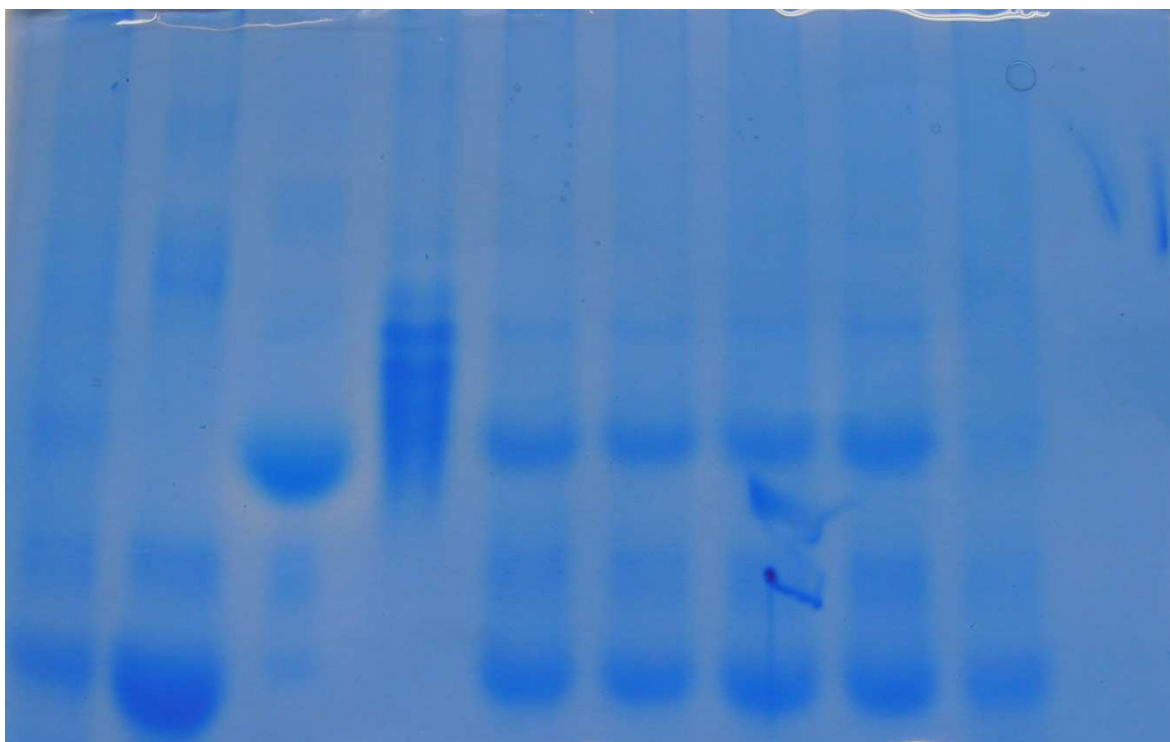
látka	množství na přípravu 4 gelů
40% roztok akrylamidu	9,0 ml
pufr pro přípravu separačního gelu	21,0 ml
N,N'-metylen-bisakrylamid (SERVA)	0,15 g
N,N,N',N'-tetra-metylendiamin (TEMED, (Sigma)	0,015 ml
10% persíran amonný (Sigma)	0,1128 ml

Tab. C2: Komponenty pro přípravu koncentračního gelu.

látka	množství na přípravu 4 gelů
40% roztok akrylamidu	1,2 ml
pufr pro přípravu koncentračního gelu	10,8 ml
N,N'-metylen-bisakrylamid (SERVA)	0,024 g
N,N,N',N'-tetra-metylendiamin (TEMED, (Sigma)	0,006 ml
10% persíran amonný (Sigma)	0,072 ml



Obr. C1: Elektroforegram zázkyšů získaný metodou Urea-PAGE.



Obr. C2: Elektroforegram zázkyšů získaný metodou Urea-PAGE.

**PŘÍLOHA D: ELUČNÍ PROGRAM A SLOŽENÍ PUFRŮ PŘI DETEKCI BIOGENNÍCH AMINŮ**

Tab. D1: Složení sodnocitrátových pufků při detekci biogenních aminů, celkový objem pufku 1 l.

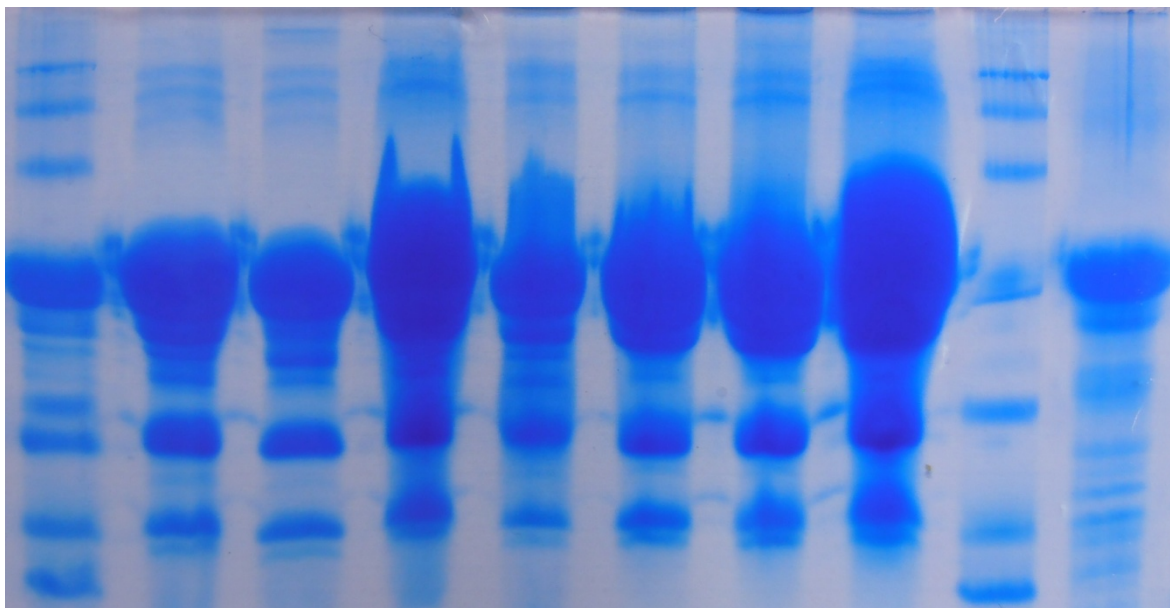
Reagencie	pufr		
	A	B	dávkovací pufr I
Kyselina citronová monohydrát	1,55	14,00	14,00
Citronan sodný dihydrát	21,00	-	-
Chlorid sodný	5,00	-	11,50
Chlorid draselný	-	171,50	-
Bromid draselný	41,65	-	-
Hydroxid draselný	-	10,00	-
Azid sodný	-	-	0,10
Izopropanol [ml]	250,00	-	-
Tiodyglykol [ml]	-	-	5,00

Tab. D2: Eluční program stanovení BA, průtok 0,45ml/min., t= 30 °C

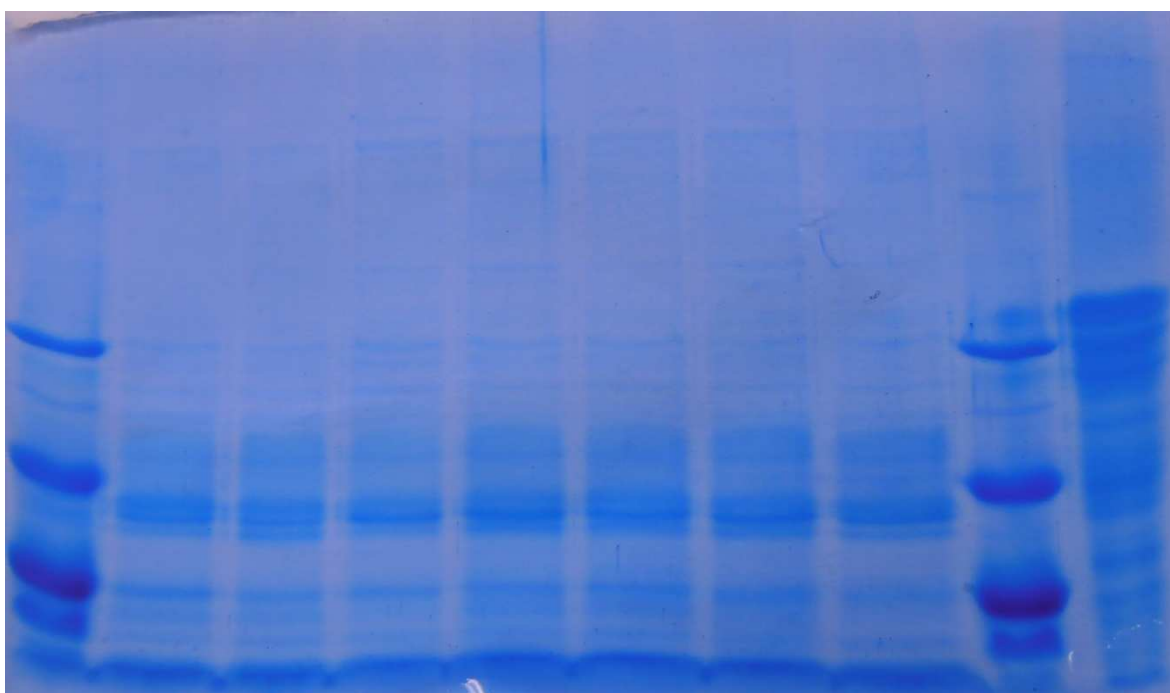
čas [min.]	10% ACN	100% ACN
0	39	61
0,1	39	61
1,4	30	70
3,5	17	83
4	0	100
9,5	0	100
11,5	39	61
15,5	39	61



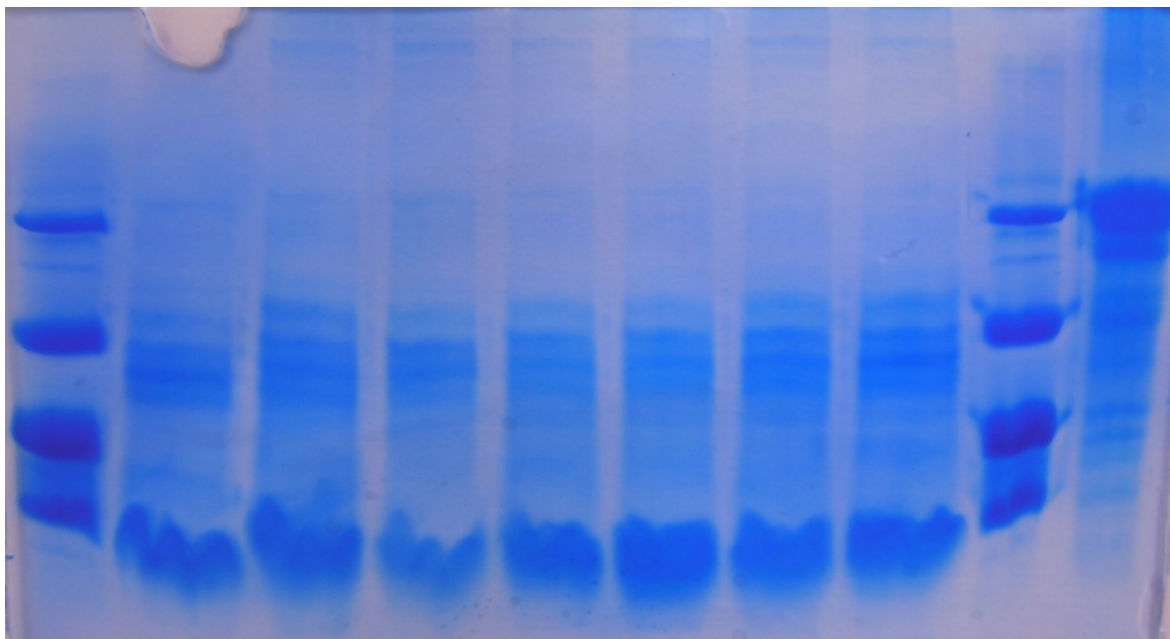
## PŘÍLOHA E: OPTIMALIZACE METODY SDS-PAGE



Obr. E1: Optimalizace ředění vzorků - přetížení vzorků.



Obr. E2: Optimalizace koncentrace akrylamidového gelu – 12% gel.



Obr. E3: Optimalizace koncentrace akrylamidového gelu – 15% gel.

## PŘÍLOHA F: ZDROJOVÁ DATA PRO GRAFY FAA/BA ZÁKYSOVÝCH KULTUR/SÝRŮ

Pomocné výpočty:

sušina:

$$p_s = \frac{(m_2 - m_0) \cdot 100}{m_1 - m_0}$$

kde:

$p_s$  – obsah sušiny [%],

$m_0$  – hmotnost prázdného kelímku [g],

$m_1$  – hmotnost kelímku s navážkou vzorku [g],

$m_2$  – hmotnost kelímku s navážkou vzorku po lyofilizaci [g].

přepočet na mg/kg BA,FAA:

$$\text{mean} \cdot p_s / 100$$

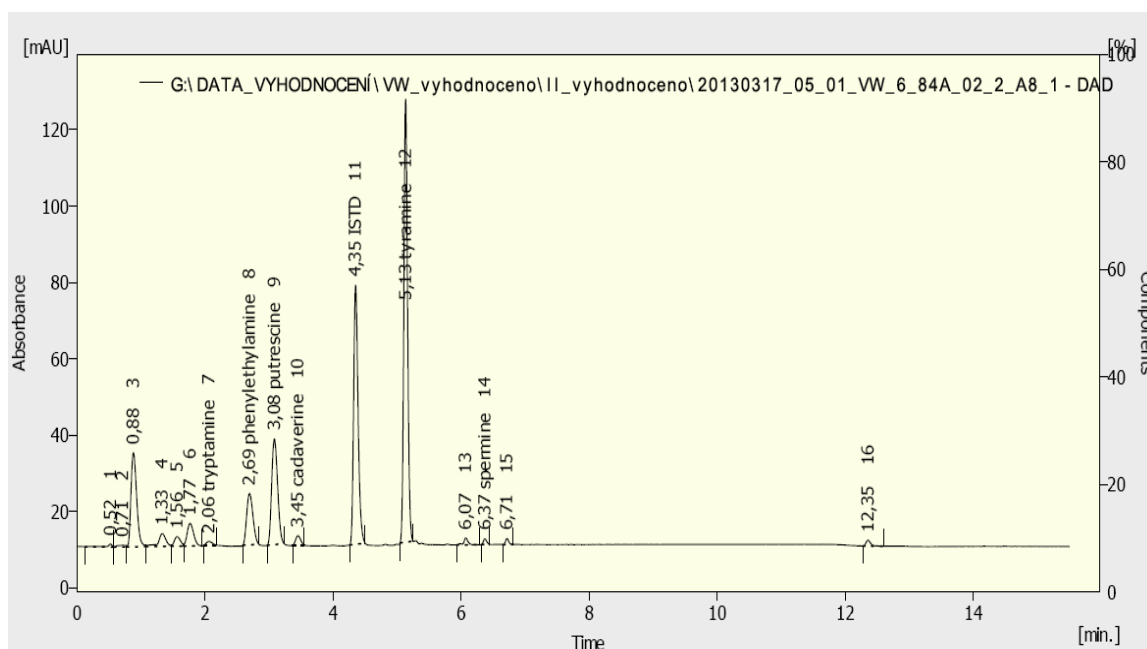
Tab. F1: Zdrojová data pro graf 2, množství FAA zákysových kultur.

zákysová kultura	sušina	mean	[mg·kg <sup>-1</sup> ]
CHN-19	10,76	1,48	0,16
C352	10,78	1,22	0,13
FLORA DANICA	10,77	1,09	0,12
C502	10,74	1,66	0,18
Delvo LL-50B DSL	10,73	2,30	0,25
Laktoflora smetanová	11,63	1,74	0,20
Delvo DX-33D DSL	10,54	1,91	0,20

Tab. F2: Zdrojová data pro graf 3 množství BA pro jednotlivé zákysové kultury.

zákysová kultura	inkubační doba [hod.]	sušina	mean-tyramin	tyramin [mg·kg <sup>-1</sup> ]
C352	6	10,66	12,21	1,30
C502	6	10,70	8,72	0,93
Delvo DX-33D DSL	6	11,11	20,24	2,25
Delvo LL-50B DSL	6	10,99	6,68	0,73
FLORA DANICA	6	10,76	9,93	1,07
CHN-19	6	11,07	14,82	1,63
Laktoflora smetanová	6	11,77	13,10	1,54
C352	24	10,79	11,96	1,29
C502	24	10,74	8,74	0,94
Delvo DX-33D DSL	24	10,68	26,69	2,85
Delvo LL-50B DSL	24	11,02	28,62	3,15
FLORA DANICA	24	10,75	12,57	1,35
CHN-19	24	10,70	7,43	0,79
Laktoflora smetanová	24	11,84	23,57	2,79
C352	48	10,78	5,99	0,65
C502	48	10,74	16,82	1,81
Delvo DX-33D DSL	48	10,54	11,92	1,26
Delvo LL-50B DSL	48	10,73	13,95	1,50
FLORA DANICA	48	10,77	9,48	1,02
CHN-19	48	10,76	9,48	1,02
Laktoflora smetanová	48	11,63	11,83	1,38

Obr. F1: Chromatogram ze stanovení BA u kultury C502 po 84 dnech zrání.



Tab. F3: Zdrojová data pro graf 4, 5, 6, množství BA pro jednotlivé výrobní série sýrů.

výroba/doba zrání	sušina	mean- suma	mean- tyramin	mean- putrescin	BA suma [mg·kg <sup>-1</sup> ]	tyramin [mg·kg <sup>-1</sup> ]	putrescin [mg·kg <sup>-1</sup> ]
1V/1. den	44,26	55,13	55,13		24,40	24,40	
1V/28. den	48,27	126,20	102,26		60,92	49,37	
1V/84. den	48,74	661,99	281,48	240,18	322,67	137,20	117,06
2V/1. den	51,52	10,95	10,94		5,64	5,64	
2V/28. den	52,51	674,24	272,38	299,46	354,06	143,03	157,26
2V/84. den	53,75	1450,64	496,48	631,70	779,64	266,83	339,51
3V/1. den	47,90	3,86	3,86		1,85	1,85	
3V/28. den	49,39	340,92	146,36	146,33	168,39	72,29	72,28
3V/84. den	49,32	1999,79	731,87	730,99	986,41	361,00	360,57
4V/1. den	49,86	1,95	1,95		0,97	0,97	
4V/28. den	53,38	612,87	326,74	208,15	327,14	174,41	111,11
4V/84. den	51,67	2548,93	1242,44	1031,29	1317,08	641,99	532,89
5V/1. den	48,22	4,51	4,51		2,17	2,17	
5V/28. den	50,46	679,88	265,29	332,12	343,04	133,86	167,57
5V/84. den	51,05	1503,22	503,87	712,88	767,33	257,21	363,89
6V/1. den	51,52	5,70	5,70		2,94	2,94	
6V/28. den	55,14	752,57	351,34	339,30	414,94	193,72	187,08
6V/84. den	53,77	2562,88	1121,35	1044,26	1378,05	602,95	561,49
7V/1. den	52,43	3,13	3,13		1,64	1,64	
7V/28. den	55,22	196,78	125,15	58,17	108,65	69,10	32,12
7V/84. den	54,89	1336,65	462,45	669,73	733,69	253,84	367,62