

Lipolytická aktivita potravinářsky významných mikroskopických hub

Bc. Andrea Bednaříková

Diplomová práce
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky
akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Andrea Bednaříková**
Osobní číslo: **T13397**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie tuků, detergentů a kosmetiky**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Lipolytická aktivita potravinářsky významných
mikroskopických hub**

Zásady pro vypracování:

Teoretická část

1. Lipolytická aktivita mikroorganismů.
2. Lipolytické kvasinky a plísňe významné v potravinářském průmyslu a jejich význam pro výrobu, vlastnosti a bezpečnost potravin.

Praktická část

1. Kultivace mikroorganismů v živných médiích a vzorcích mléka obsahujících acylglyceroly.
2. Sledování lipolytické aktivity mikroorganismů pomocí stanovení volných mastných kyselin ve vzorcích plynovou chromatografií.
3. Srovnání a vyhodnocení lipolytické aktivity vybraných potravinářsky významných mikroskopických hub.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Doporučená literatura

1. **BATT, C. A., TORTORELLO, M.** Encyclopedia of Food Microbiology. 2nd Edition. Academic Press, 2014.
2. **HANDLEY, A. J., ADLARD, E. R.** Gas chromatographic techniques and applications. Sheffield Academic Press, Ltd., 2001.
3. **GUNSTONE, F. D.** The Chemistry of Oils and Fats. Sources, Composition, Properties and Uses. Blackwell Publishing, 2004. ISBN 1-4051-1626-9
4. **O'BRIEN, RICHARD D.** Fat and Oils : Formulating and Processing for Applications (3rd Edition). CRC Press, 2009. ISBN 978-1-4200-6166-6.

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Iva Hauerlandová, Ph.D.

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce:

20. ledna 2015

Termín odevzdání diplomové práce:

18. května 2015

Ve Zlíně dne 20. ledna 2015


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




Ing. Martina Černeková, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: BEDNÁŘKOVÁ ANDREA

Obor: ITDK

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 18. 5. 2015

Bednářková

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jim 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 přihlídá k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Práce se zabývá problematikou stanovení lipolytické aktivity mikroorganismů v mléčném tuku. Nejprve jsou charakterizovány tuky a oleje, dále lipolytická aktivita mikroorganismů a metody stanovení lipolytické aktivity.

Cílem práce bylo stanovit lipolytickou aktivitu plísní a kvasinek využívaných při výrobě potravin a kontaminantů v mléčných výrobcích plynovou chromatografií. Metodika byla založena na stanovení volných mastných kyselin pomocí dvojího způsobu přípravy vzorků. Dle získaných výsledků není takto navržená metoda vhodná pro stanovení lipolytické aktivity mikroorganismů. Proto byla v závěru práce formulována doporučení pro další optimalizaci této metody.

Klíčová slova: lipolytická aktivita, mikrobiální lipázy, volné mastné kyseliny

ABSTRACT

The thesis deals with lipolytic activity of microorganisms in milk fat. At first, oils and fats are characterised, then the lipolytic activity of microorganisms and methods of determination are reviewed.

The aim of the thesis was gas chromatographic determination of the lipolytic activity micromycetes with significance in the food industry and contaminants in milk products. The method was based determination of free fatty acids via comparison of two methods of sample preparation. Results showed that this method is not suitable for determination of lipolytic activity. Optimization of the procedure is necessary.

Keywords: lipolytic activity, microbial lipases, free fatty acids

Ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce RNDr. Ivě Hauerlandové, Ph.D. za cenné rady a ochotu při zpracování mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat mé rodině za podporu během studia.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné. Dále prohlašuji, že všechny použité literární zdroje byly citovány.

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST.....	11
1 TUKY A OLEJE	12
1.1 SLOŽENÍ TUKŮ A OLEJŮ	13
1.1.1 Nasycené mastné kyseliny	13
1.1.2 Nenasycené mastné kyseliny.....	14
1.1.2.1 Konjugovaná kyselina linolová	14
1.1.3 Minoritní složky přírodních tuků a olejů	15
1.2 CHARAKTERISTIKA MLÉČNÉHO TUKU.....	15
2 VÝZNAM MIKROORGANISMŮ V MLÉCE A MLÉČNÝCH VÝROBCÍCH	18
2.1 LIPOLYTICKÁ AKTIVITA MIKROORGANISMŮ V MLÉČNÝCH VÝROBCÍCH.....	22
2.1.1 Sýry	24
2.1.2 Významné plísně v mléčných výrobcích	27
2.1.2.1 Rod Penicillium	27
2.1.2.2 Rod Aspergillus	29
2.1.3 Významné kvasinky v mléčných výrobcích	30
2.1.3.1 Rod Candida	31
2.1.3.2 Rod Saccharomyces.....	32
3 STANOVENÍ LIPOLYTICKÉ AKTIVITY MIKROORGANISMŮ	33
3.1 PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE	34
3.1.1 Příprava vzorků	34
3.1.1.1 Extrakce mléčného tuku.....	35
3.1.1.2 Příprava methylesterů mastných kyselin	35
3.1.2 Plynový chromatograf.....	36
3.1.3 Získávání dat	38
II PRAKTICKÁ ČÁST	39
4 METODY A METARIÁL	40
4.1 STANOVENÍ LIPOLYTICKÉ AKTIVITY MIKROSKOPICKÝCH HUB KULTIVACÍ NA SPIRIT BLUE AGARU	40
4.1.1 Použité mikroorganismy	40
4.1.2 Pomůcky a materiál	40
4.1.3 Postup práce	41
4.1.3.1 Příprava zásobních kultur	41
4.1.3.2 Příprava fyziologického roztoku.....	41
4.1.3.3 Příprava inokula pro stanovení lipolytické aktivity	41
4.1.3.4 Příprava kultivačního média pro hodnocení lipolytické aktivity plísní a kvasinek	41
4.1.3.5 Kultivace mikroorganismů na Spirit Blue Agar	42
4.1.4 Výsledky a diskuze	42
4.1.5 Závěr	43
4.2 STANOVENÍ LIPOLYTICKÉ AKTIVITY MIKROSKOPICKÝCH HUB PLYNOVOU CHROMATOGRAFIÍ	44
4.2.1 Použité mikroorganismy	44

4.2.2	Chemikálie a materiál	45
4.2.3	Pomůcky.....	45
4.2.4	Pracovní postup	46
4.2.4.1	Sledování růstu a množení mikroorganismů ve smetaně	46
4.2.4.2	Příprava vzorků pro stanovení lipolytické aktivity.....	46
4.2.4.3	Extrakce mléčného tuku.....	47
4.2.4.4	Příprava methylesterů mastných kyselin	47
4.2.4.5	Plynová chromatografie.....	48
4.2.5	Výsledky a diskuze	49
4.2.5.1	Vyhodnocení zastoupení mastných kyselin ve vzorku smetany.....	50
4.2.5.2	Vyhodnocení zastoupení mastných kyselin ve vzorcích připravených bazicky katalyzovanou esterifikací	52
4.2.5.3	Vyhodnocení zastoupení mastných kyselin ve vzorcích připravených kysele katalyzovanou esterifikací	54
4.2.5.4	Srovnání zastoupení mastných kyselin ve vzorku smetany s plísní <i>Penicillium camemberti</i>	56
4.2.5.5	Srovnání mastných kyselin ve vzorku smetany s kvasinkou <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	57
4.2.5.6	Kvantitativní analýza kyseliny palmitové ve vzorcích	58
4.2.6	Závěr a doporučení.....	59
	ZÁVĚR	62
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	63
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	74
	SEZNAM OBRÁZKŮ	75
	SEZNAM TABULEK.....	76

ÚVOD

Tato práce se zabývá stanovením obsahu volných mastných kyselin ve vzorku mléčného tuku extrahovaného ze smetany. Mléčný tuk je složen zejména z triacylglycerolů, jeho přesné složení je však odlišné u různých vzorků. Tuky v potravinách mohou působením enzymů nebo jiných činitelů podléhat žádoucím nebo nežádoucím změnám. Působením enzymů dochází k částečnému rozkladu tuků na parciální acylglyceroly a volné mastné kyseliny, nebo k úplnému rozkladu na glycerol a volné mastné kyseliny. Volné mastné kyseliny dodávají potravinám specifické sensorické vlastnosti. Jejich přítomnost v některých potravinách je tedy žádoucí a je zajišťována mikrobiálními lipázami. Tyto enzymy mohou být produkovány bakteriemi, ale také mikroskopickými houbami.

Cílem této práce je hodnocení lipolytické aktivity potravinářsky významných mikroskopických hub, tedy plísní (vláknitých hub) a kvasinek. V teoretické části je zahrnuta charakteristika potravinářsky významných druhů plísní a kvasinek, ale také plísní a kvasinek, které působí jako kontaminanty a mohou přispět ke znehodnocení potravin. Mezi mikroorganismy podílejícími se na formování sensorických vlastností potravin patří například plísně *Penicillium camemberti* a *Penicillium roqueforti*, naopak toxinogenní *Aspergillus niger* je významným kontaminantem. Z kvasinek je pro výrobu potravin využívána *Saccharomyces cereviae*, zástupcem kvasinek kontaminujících potraviny může být *Candida albicans*.

Praktická část této práce se zabývá analýzou vzorku mléčného tuku pomocí plynové chromatografie. Kultivací výše uvedených mikroorganismů ve smetaně by mělo dojít k rozkladu triacylglycerolů na parciální acylglyceroly a volné mastné kyseliny působením mikrobiálních lipáz. Cílem práce bylo ověřit metodu hodnocení lipolytické aktivity mikroorganismů stanovením obsahu volných mastných kyselin. To je založeno na využití dvou metod převedení mastných kyselin ve vzorku na methylestery stanovitelné plynovou chromatografií. Jedna z metod by měla esterifikovat pouze mastné kyseliny vázané, druhou metodou by měly být na methylestery převedeny jak vázané, tak i volné mastné kyseliny. Volné mastné kyseliny ve vzorku extrahovaného tuku lze analyzovat a vyhodnotit jak kvalitativně, tak i kvantitativně na základě retenčního času a plochy elučních křivek na chromatogramu.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 TUKY A OLEJE

Tuky a oleje jsou surovinami pro výrobu pokrmových tuků a olejů, margarínů a podobných výrobků. Jsou užitečné díky svým unikátním vlastnostem – chuti, roztíratelnosti a textuře. Hrají také důležitou roli v lidské výživě. Tuky a oleje jsou nejbohatším zdrojem energie ze tří základních složek potravy – sacharidů, proteinů a lipidů, kromě toho obsahují vitaminy rozpustné v tucích a esenciální mastné kyseliny. Přirozeně se vyskytují v mnoha různých zdrojích, mohou být živočišného nebo rostlinného původu. Všechny jedlé tuky jsou nerozpustné ve vodě a skládají se z esterů glycerolu a mastných kyselin. [1, s. 1] Jsou také ve významném množství obsaženy v mléčných výrobcích, mase, drůbeži, rybách, ořechách, rostlinných semenech a některých dalších potravinách. [2, s. 1, 41]

Chemické a fyzikální vlastnosti tuků a olejů jsou do značné míry dány obsahem a pozicí mastných kyselin v molekule triacylglycerolu. Z chemického hlediska jsou všechny tuky a oleje estery glycerolu a mastných kyselin, přesto se fyzikální vlastnosti přírodních tuků a olejů mohou značně lišit podle obsahu mastných kyselin a individuální struktury. Běžně jsou tuky označovány jako triacylglyceroly nebo triglyceridy, protože molekula glycerolu má tři hydroxylové skupiny, na které mohou být navázány mastné kyseliny. Mastné kyseliny se liší délkou řetězce, množstvím a pozicí dvojných vazeb a pozicí mastné kyseliny v molekule triacylglycerolu. Variace těchto vlastností jsou zodpovědné za rozdíly ve vlastnostech tuků a olejů. Triacylglyceroly se třemi identickými mastnými kyselinami se označují jako jednoduché, naopak triacylglyceroly obsahující různé mastné kyseliny se nazývají smíšené. Zastoupení mastných kyselin v přírodních tucích je odlišné v závislosti na původu tuku, tedy na rostlinném či živočišném druhu, ze kterého lze daný tuk získat. Rozdíly lze dokonce nalézt i u tuků pocházejících ze stejného rostlinného či živočišného druhu. [1, s. 7, 8]

Tuky a oleje tvoří důležitou skupinu lipidů, liší se navzájem tím, zda jsou tuhé nebo kapalné při pokojové teplotě. Pojem lipidy zahrnuje heterogenní skupinu přírodních látek, kterým je společná nerozpustnost ve vodě a dobrá rozpustnost v nepolárních organických rozpouštědlech. Mezi lipidy lze tedy zahrnout triacylglyceroly, diacylglyceroly, monoacylglyceroly, volné mastné kyseliny, ale také fosfolipidy, steroly a estery sterolů, tokoferoly, triterpeny, uhlovodíky a vitaminy rozpustnými v tucích. [4, s. 1,2]

1.1 Složení tuků a olejů

Jak už bylo řečeno, tuky se skládají z glycerolu a mastných kyselin. Podle délky řetězce rozlišujeme mastné kyseliny s krátkým, středně dlouhým a dlouhým řetězcem. Dále se mastné kyseliny liší přítomností dvojných vazeb. Mastné kyseliny obsahující pouze jednoduché vazby se označují jako nasycené, zatímco mastné kyseliny s dvojnými vazbami, případně trojnými vazbami, jako nenasycené. Součástí mastných kyselin mohou být také alicyklický nebo cyklický řetězec a polární funkční skupiny. [1, s. 265] Mastné kyseliny, které nejsou vázány ke glycerolu, se označují jako volné mastné kyseliny. V potravinách jsou zastoupeny zejména mastné kyseliny vázané k molekule glycerolu. Vysoké množství volných mastných kyselin se nachází v nerafinovaných olejích. Mezi běžné mastné kyseliny obsažené v tucích a olejích patří kyselina butanová, laurová, palmitová, stearová, olejo-
vá a linolová. [2, s. 6]

1.1.1 Nasycené mastné kyseliny

Nasycené mastné kyseliny obsahují pouze jednoduché vazby v uhlovodíkovém řetězci. Délka řetězce nasycených mastných kyselin se obvykle pohybuje mezi 4 až 24 atomy uhlíku. V rostlinných olejích se vyskytují mastné kyseliny s délkou řetězce mezi 4 až 24 atomy uhlíku, zatímco v živočišných tucích můžeme nalézt mastné kyseliny s 15 až 17 atomy uhlíku v řetězci. Délka uhlovodíkového řetězce tedy může vypovídat i o původu tuků a olejů. Kromě některých výjimek je řetězec lineární. Nasycené mastné kyseliny jsou oproti nenasyceným méně reaktivní a mají vyšší bod tání při stejné délce řetězce. Bod tání závisí na stupni nasycení a délce řetězce. [1, s. 265, 267]

Mastné kyseliny s krátkým řetězcem obsahují 2 až 6 atomů uhlíku v řetězci. Hovězí mléko obsahuje kolem 4 % kyseliny butanové, která přispívá k chuti másla. V mléčném tuku jsou také obsaženy mastné kyseliny hexanová, oktanová a dekanová. Mastné kyseliny s krátkým řetězcem jsou kapalné při pokojové teplotě a snadno se odpařují při vyšších teplotách. [1, s. 267]

Mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem mají 8 až 12 atomů uhlíku v řetězci. Metabolismus těchto kyselin je srovnatelný s metabolismem kyselin s dlouhým uhlovodíkovým řetězcem, nicméně na rozdíl od kyselin s dlouhým uhlovodíkovým řetězcem se předpokládá, že nebudou tuky obsahující kyseliny se středním řetězcem ukládány v těle, ale odbourány játry v podobě energie. [1, s. 267]

Nasyčené mastné kyseliny se 14 až 24 atomy uhlíku v řetězci se řadí mezi mastné kyseliny s dlouhým řetězcem. Mastné kyseliny obsahující více jak 18 atomů uhlíku se zřídka vyskytují jako hlavní složka tuků a olejů. [1, s. 268]

1.1.2 Nenasycené mastné kyseliny

V uhlovodíkovém řetězci nenasycených mastných kyselin jsou přítomny dvojně vazby. Podle počtu dvojných vazeb rozlišujeme mononenasyčené mastné kyseliny obsahující jednu dvojnou vazbu a polynenasycené mastné kyseliny se dvěma a více dvojnými vazbami. S přítomností dvojně vazby souvisí polohová a prostorová izomerie. Polohová izomerie určuje polohu dvojně vazby v uhlovodíkovém řetězci, prostorová izomerie charakterizuje chování řetězců oddělených dvojnou vazbou. Pro většinu nenasycených mastných kyselin je typická *cis*- konfigurace, kdy jsou obě části řetězce na stejné straně roviny dvojně vazby, naopak u *trans*- konfigurace jsou části řetězce na opačné straně roviny dvojně vazby. Přítomnost dvojných vazeb zvyšuje reaktivitu mastných kyselin, zvyšující se množství dvojných vazeb vede ke snížení bodu tání. [1, s. 269]

1.1.2.1 Konjugovaná kyselina linolová

V poslední době je předmětem značného zájmu výzkumných pracovišť i laické veřejnosti konjugovaná kyselina linolová (CLA). Jedná se o směs geometrických izomerů kyseliny linolové (C 18:2) s konjugovanými dvojnými vazbami. Tyto izomery mají dvojně vazby v konjugované poloze, což znamená, že nejsou odděleny methylenovou skupinou, jako je tomu u ostatních mastných kyselin se dvěma i více dvojnými vazbami. Dvojně vazby mohou mít konfiguraci *cis*- i *trans*-. Největším zdrojem CLA je mléčný tuk, mezi další zdroje patří některé rostliny a mořské organizmy, hovězí, skopové a vepřové maso. V olejích se nachází pouze minimální množství. CLA může být připravena organickou syntézou, mikrobiální fermentací, enzymatickou izomerizací nebo pomocí genetického inženýrství. Obsah CLA lze zvýšit tepelnou úpravou především mléčných produktů. Izomerům CLA jsou často připisovány účinky spojené se snížením rizika obezity, vzniku rakoviny, onemocnění srdce, dále také pozitivní vliv na imunitní systém jedince, mineralizaci kostí a redukci tělesného tuku. Počáteční euforii z řady pozoruhodných účinků však vystřídalo jisté vystřízlivění, protože klinické pokusy vesměs nepotvrdily výsledky pokusů na zvířatech. Příčinou však mohou být metodické problémy spojené s klinickými pokusy [1, s. 274, 275] [[5, s. 1, 3, 32]

1.1.3 Minoritní složky přírodních tuků a olejů

Primární složky přírodních tuků a olejů zastupují triacylglyceroly, ale přírodní tuky a oleje mohou obsahovat různá množství minoritních složek. Mnoho z nich je ovlivněno chemickými a fyzikálními vlastnostmi. Minoritní složky tuků a olejů jsou nežádoucí, proto je nutné je při výrobě jedlých tuků odstranit. Mezi minoritní složky olejů se řadí nezmýdelnitelné frakce – fosfolipidy, tokoferoly, steroly, pryskyřice, uhlovodíky, pesticidy, proteiny a další. [1 s. 8]

1.2 Charakteristika mléčného tuku

Lipidy v hovězím mléce jsou tvořeny zejména triacylglyceroly (~98,3 %), dále diacylglyceroly (0,3 %), monoacylglyceroly (0,03 %), volnými mastnými kyselinami (0,1 %), fosfolipidy (0,8 %) a steroly (0,3 %). Přítomno je i stopové množství vitaminů a chuťových složek rozpustných v tucích a β -karotenu. Díky vysokému obsahu v mléčném tuku, triacylglyceroly přímo ovlivňují vlastnosti mléka. Mléčný tuk může obsahovat různé kombinace triacylglycerolů lišících se molekulovou hmotností, stupněm nenasycenosti a počtem uhlíkových atomů. Rozmanitost triacylglycerolů je dána značným počtem nasycených i nenasycených mastných kyselin, které se mohou vázat na hydroxylové skupiny v molekule glycerolu. V mléčném tuku jsou přítomny zejména nasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem a v menší míře také mastné kyseliny se středním a krátkým řetězcem. V mléčném tuku může být detekován značný počet různých mastných kyselin, avšak pouze 15 z nich je přítomno ve významném množství (Tab. 1). Tyto mastné kyseliny tvoří v mléčném tuku 95 % celkového obsahu mastných kyselin. [6, s. 428]

Tab. 1: Mastné kyseliny přítomné v mléčném tuku [6, s. 429]

	Název kyseliny	Složení		
		Typické zastoupení		Rozsah hm. %
		hm. %	mol. %	
4:0	Máselná	3,9	10,1	3,1-4,4
6:0	Kapronová	2,5	4,9	1,8-2,7
8:0	Kaprilová	1,5	2,4	1,0-1,7
10:0	Kaprinová	3,2	4,3	2,2-3,8
12:0	Laurová	3,6	4,1	2,6-4,2
14:0	Myristová	11,1	11,1	9,1-11,9
14:1	Myristolejová	0,8	0,8	0,5-1,1
15:0	Pentadekanová	1,2	1,1	0,9-1,4
16:0	Palmitová	27,9	24,9	23,6-31,4
16:1	Palmitolejová	1,5	1,4	1,4-2,0
18:0	Stearová	12,2	9,8	10,4-14,6
18:1	Olejová	17,2	13,9	14,9-22,0
18:2	Linolová	1,4	1,1	1,2-1,7
18:3	α -linolenová	1,0	0,8	0,9-1,2

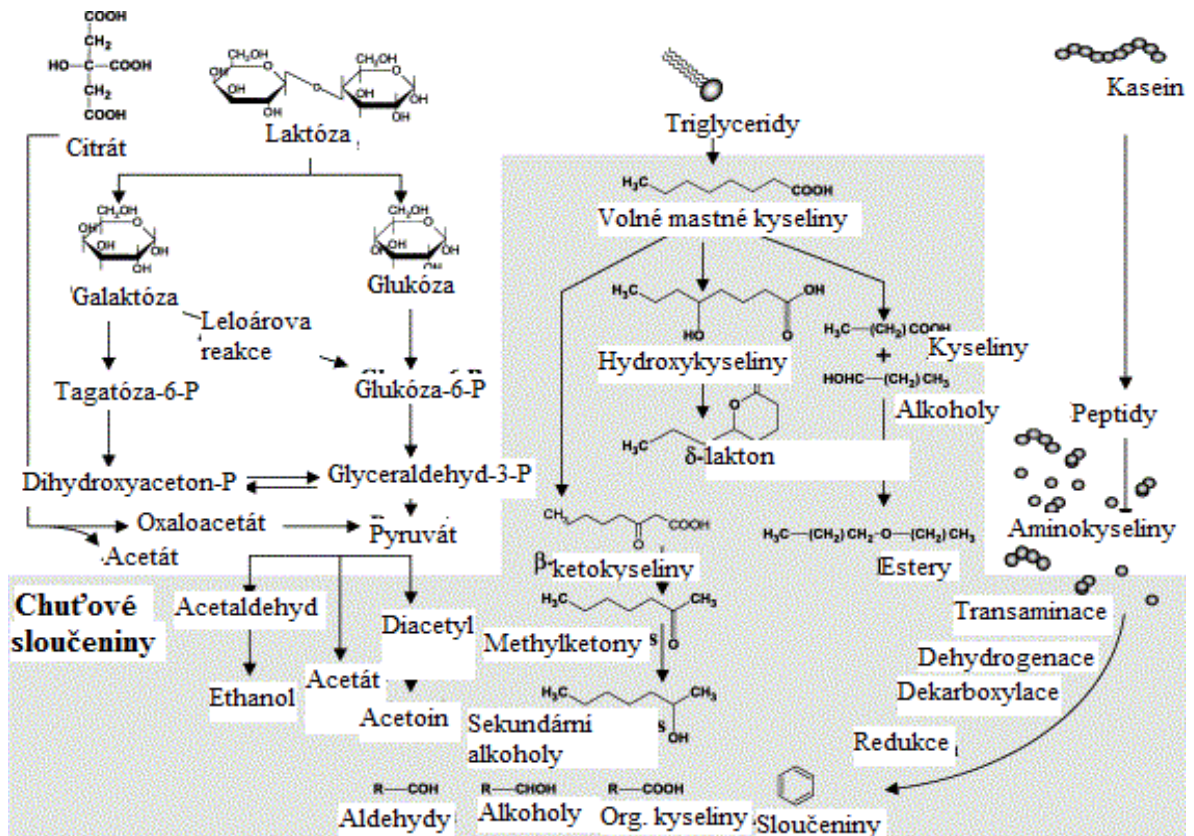
Mastné kyseliny představují přibližně 90 hmotnostních % mléčného tuku. Jsou zde vázány v acylglycerolech, fosfolipidech, glykolipidech nebo esterech chlesterolu, ale mohou se vyskytovat i ve volné formě. Mléčný tuk obsahuje oproti jiným tukům relativně vysokou koncentraci mastných kyselin s krátkým řetězcem, z nasycených kyselin s delším řetězcem převažuje kyselina palmitová, stearová a myristová. Z monoenoových mastných kyselin je v mléčném tuku široce zastoupena kyselina olejová a mléčný tuk obsahuje také některé *trans* izomery monoenoových mastných kyselin. Polyenoové kyseliny zahrnují v mléčném tuku hlavně linolovou a α -linolenovou kyselinu a jejich geometrické izomery. Krátké mastné kyseliny jsou rozpustné ve vodě a mohou být přítomny v disociované formě v závislosti na pH vodné fáze mléčných výrobků. [7, s. 267, 268, 274] Mléčný tuk obsahuje více mastných kyselin než jiné tuky živočišného nebo rostlinného původu. Tuk kravského mléka může obsahovat více než 400 různých mastných kyselin. Většina těchto kyselin je přítomna ve velmi malém množství, ale některé z těchto minoritních kyselin jsou velmi důležité a spolu s dalšími sloučeninami (například laktony), vytváří unikátní chuť mléčných výrobků. Největší vliv na zastoupení mastných kyselin v mléce má krmení hovězího dobytka. Běžně obsahuje kravské mléko kolem 3,7 % tuku. Mléčný tuk je dostupný ve dvou formách: bezvodý máselný tuk a máselný olej. Bezvodý máselný tuk je oddělený přímo z mléka nebo ze smetany, máselný olej je mléčný tuk vyrobený odstraněním vody z másla. Máslo obsahuje minimálně 80 % mléčného tuku. [1, s. 58] [8]

Mléčný tuk je ve formě kuliček obklopených membránou, která působí jako přírodní bariéra izolující lipolytické enzymy od tuku. Při porušení fyzikálními vlivy (například při homogenizaci), se zvyšuje lipolýza. [9, s. 4546] Volné mastné kyseliny se objevují již v čerstvém mléce a lipolýzou se jejich množství zvyšuje. Mastné kyseliny s krátkým řetězcem jsou rozpuštěné v plazmě, zatímco mastné kyseliny s dlouhým řetězcem v tuku. Ostatní mastné kyseliny jsou rozloženy mezi těmito dvěma frakcemi v mezifázovém rozhraní voda-olej. [10, s. 56, 57]

2 VÝZNAM MIKROORGANIZMŮ V MLÉCE A MLÉČNÝCH VÝROBCÍCH

Složky mléka prochází mnoha biochemickými změnami, z nichž mnohé jsou výsledkem metabolismu mikroorganismů. Viskozita mléka je relativně nízká, hodnota pH se pohybuje kolem 6,7. Vodní aktivita je vysoká, hodnota vodní aktivity dosahuje 0,993. Žádná z těchto vlastností nebrání růstu mikroorganismů v mléce. Pro celou řadu mikroorganismů je mléko téměř ideálním substrátem o vysokém obsahu živin. [10, s. 7]

V podstatě lze rozlišovat tři typy degradativních změn způsobených mikroorganismy a ovlivňujících chuť mléka a mléčných výrobků. Jedná se o lipolýzu a metabolismus triacylglycerolů, proteolýzu kaseinu a oxidaci kyseliny mléčné. [11, s. 168] Schéma uvedených reakcí je zachyceno na obrázku 1. Metabolity jednotlivých reakcí jsou aromatické a chuťové sloučeniny, které dodávají potravinám specifické vlastnosti. Volné mastné kyseliny jsou nejdříve oxidovány na β -ketoacylkoenzym A, který následně působením thiolázy přechází na β -ketokyselinu a ta je rychle dekarboxylována β -ketoacyldekarboxylázou za vzniku methylketonu obsahujícím o jeden uhlík méně než předchozí mastná kyselina. Methylketony mohou být dále redukovány na sekundární alkoholy, například heptan-2-ol. Mastné kyseliny mohou být katabolizovány některými mikroorganismy peroxisomálním β -oxidačním systémem na hydroxykyseliny. Hydroxylované mastné kyseliny mohou být také vytvořeny z nenasycených mastných kyselin působením mikrobiální hydratázy nebo lipoxygenázy. Jsou přímými prekurzory laktonů, velmi důležitou skupinou chuťových sloučenin. Transformace hydroxylovaných kyselin na laktony může být způsobena mikroorganismy nebo změnou pH. [12, s. 67]

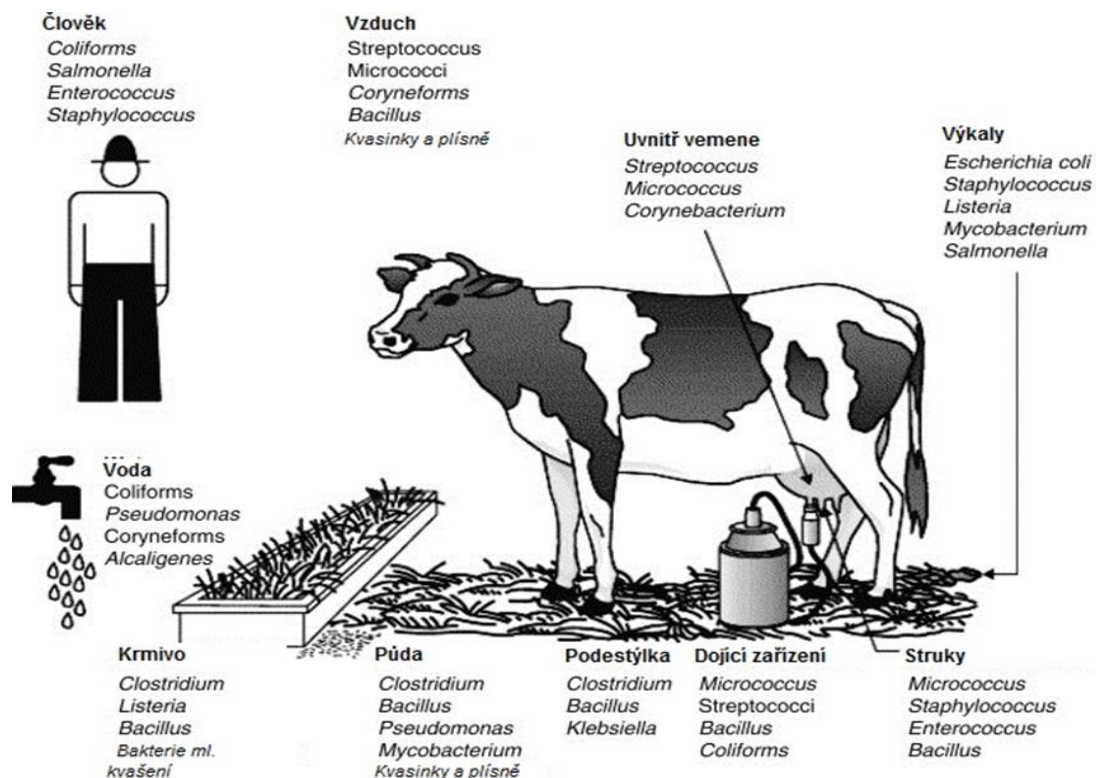


Obr. 1: Schéma vzniku chuťových sloučenin [13]

Mléko je dobrým prostředím pro růst mikroorganismů díky neutrálnímu pH, komplexu biochemických složek a vysoké vodní aktivitě. [14 s. 447] Mléčný tuk je navíc dobrým zdrojem živin a energie nejen pro savce, ale také pro mikroorganismy. Proto se v mléce přirozeně vyskytuje široké spektrum mikroorganismů zahrnující gramnegativní a grampozitivní bakterie, plísně i kvasinky. Při dojení mléka musí být dodržovány hygienické podmínky, aby nedošlo ke znehodnocení mléka mikroorganismy přítomnými ve struku nebo na jeho povrchu. Mezi mikroorganismy kontaminující mléko a mléčné výrobky patří i plísně, například plísně rodu *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium*. [15 s. 39]

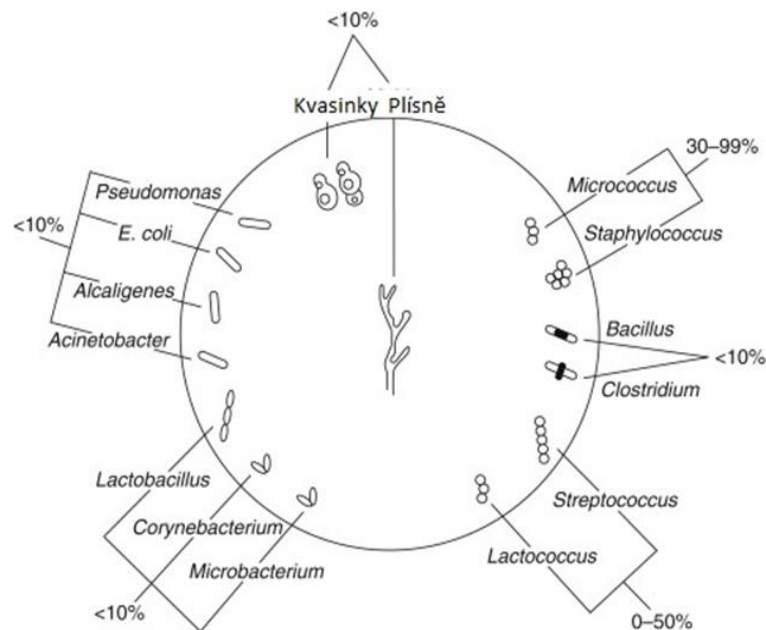
Původ mikroorganismů je různý. Mikroorganismy přítomné v čerstvém mléku pochází z těla dojnice, nebo se mohou dostat do mléka při dojení, skladování nebo z transportního zařízení a okolního prostředí. Čerstvé mléko obsahuje určité látky působící inhibičně na mikroorganismy. Tato inhibiční schopnost není však natolik silná, aby mléko chránila před další kontaminací. Za několik hodin mizí. Množství mikroorganismů v mléce se pohybuje řádově 10^3 CFU/ml v čerstvě nadojeném mléce zdravých dojnic. Výrazně jiný charakter má mléko získané od nemocných krav, hlavně od zvířat postižených mastitidou. Onemoc-

nění vede k tomu, že mléko obsahuje vysoká kvanta patogenních mikroorganismů, dosahujících hodnot až 10^7 CFU/ml. Bývají to *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Pseudomonas aeruginosa* a koliformní mikroorganismy, někdy i salmonely. Mléko nesmí obsahovat patogenní mikroorganismy. Druhy mikroorganismů, které mohou být přítomny v mléce, a jejich zdroje zachycuje obr. 2. [14, s. 447] [[16]



Obr. 2: Možné zdroje mikroorganismů kontaminujících mléko [14, s. 448]

Mikroorganismy přítomné v mléce mohou být rozděleny do tří skupin: na mikroorganismy využívající se při výrobě fermentovaných mléčných výrobků, mikroorganismy způsobující znehodnocení potravin, živočišné patogeny a producenty toxinů. Z obr. 2 je patrné, že v mléce jsou zastoupeny bakterie a to jak gramnegativní, tak grampozitivní, sporotvorné a bakterie mléčného kvašení, ale také plísňe a kvasinky. [14, s. 447]



Obr. 3: Zastoupení mikroorganismů běžně přítomných v mléku [14, s. 449]

Na výrobě fermentovaných mléčných výrobků, například jogurtů a sýrů, se podílí různé druhy mikroorganismů s cílem metabolizovat laktózu, laktát a citrát za vzniku aromatických sloučenin nebo oxidu uhličitého, vytvořit požadovanou chuť a texturu potravin. [26] Důležitými mikroorganismy při výrobě fermentovaných mléčných výrobků jsou bakterie, plísňe a kvasinky produkující kyselinu mléčnou. Téměř všechny typy fermentovaných mléčných výrobků, jako sýr, jogurt a kefir jsou založeny na aktivitě bakterií mléčného kvašení. Bakterie mléčného kvašení se využívají jako startérové kultury a jsou tedy primárními mikroorganismy potřebnými k výrobě fermentovaných mléčných výrobků. Jako startérové kultury ve fermentovaných mléčných výrobcích se uplatňují zejména rody *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* a *Lactobacillus*. [18, s. 39]

Startérové kultury jsou tedy vybrané mikroorganismy záměrně přidané do mléka s cílem vyvolat a provádět požadovanou fermentaci s definovanými vlastnostmi při výrobě fermentovaných mléčných výrobků. Hrají důležitou roli ve vývoji chuti a textury. Většina fermentovaných mléčných výrobků obsahuje 2 až 4 kmeny bakterií mléčného kvašení produkující chuťové látky. V některých výrobcích se fermentace účastní také plísňe a kvasinky. Díky produkci kyseliny mléčné se startérové kultury podílí na inhibici nežádoucích mikroorganismů, které nejsou schopny odolávat nízkému pH. Kromě toho mají startérové kultury i další funkce a to proteolytickou a lipolytickou aktivitu vedoucí k tvorbě chuťových a aromatických látek. [27, s. 39, 40] [18, s. 39]

Chuť je základním kritériem spojeným s kvalitou potravin. Vyplývá z komplexní směsi aromatických sloučenin, které zahrnují netěkavé a těkavé sloučeniny. [19, s. 751] Chuťové a aromatické sloučeniny v potravinách lze rozdělit do tří skupin: primární, sekundární a nežádoucí. Primární aromata jsou produkována zejména enzymaticky katalyzovanými reakcemi v syrových potravinách, sekundární aromata vznikají termálními reakcemi při výrobě a jsou také výsledkem mikrobiální aktivity při fermentaci. Nežádoucí aromatické a chuťové látky zahrnují sloučeniny různého původu, které zhoršují přirozenou chuť potravin.

Enzymy mohou být produkovány mikroorganismy záměrně přidanými během výrobního procesu s cílem tvorby požadovaného aroma a chuti potravin. Mohou být také přítomny v surovinách jako důsledek činnosti mikroorganismů. Přestože mikroorganismy jsou inhibovány tepelným zpracováním, enzymy zůstávají aktivní. [20, s. 125] Mikroorganismy jsou schopny produkovat hydrolytické enzymy, jako jsou proteázy, peptidázy, lipázy, glukonázy, amylázy a další. Enzymatické reakce jsou velmi důležité u zrajících masných výrobků a sýrů. Substrátová specifita enzymů se značně liší mezi jednotlivými druhy a kmeny mikroorganismů, což je dáno rozmanitostí startérových kultur. Rozmanitost chuťových metabolitů jako diacetyl, acetaldehyd, acetát a formát také značně přispívá k rozmanitosti využívaných mikrobiálních kultur. [21, s. 15]

2.1 Lipolytická aktivita mikroorganismů v mléčných výrobcích

Při lipolýze triacylglycerolů, dochází ke vzniku volných mastných kyselin a parciálních glycerolů, monoacylglycerolů a diacylglycerolů. Tato reakce je obvykle způsobena přítomností lipolytických enzymů. [20, s. 125] Lipolytické enzymy zahrnují esterázy a lipázy, které mají rozdílné vlastnosti a specifitu. Esterázy hydrolyzují estery s délkou řetězce mezi dvěma až osmi atomy uhlíku, zatímco lipázy hydrolyzují řetězce s minimálně deseti atomy uhlíku. [22, s. 85] Esterázy jsou aktivní ve vodných roztocích, zatímco lipázy jsou aktivnější na rozhraní vodné a olejové fáze. Specifita lipolytických enzymů je řízena třemi faktory: molekulárními vlastnostmi enzymů, složením substrátu a faktory ovlivňujícími vazbu enzymu k substrátu. [23, s. 260]

Hydrolyzou mléčných triacylglycerolů mohou vznikat mastné kyseliny podílející se na tvorbě jak žádoucí, tak i nežádoucí chuti mléčných výrobků. Mastné kyseliny s krátkým

řetězcem, jako kyselina butanová, kapronová (C6), a kaprylová (C8) dávají ostrou a kyselou chuť. Mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem, jako kaprinová (C10) a laurová mají tendenci rozšiřovat mýdlovou chuť, zatímco mastné kyseliny s dlouhým řetězcem, jako myristová, palmitová a stearová přispívají k chuti málo. Mimoto volné mastné kyseliny nejsou jenom hlavními chuťovými složkami v mléčných produktech, ale také prekurzory pro jiné relativně intenzivní chuťové složky, jako acetoacetát, β -ketokyseliny, methylketony, estery a laktony. Nenasycené mastné kyseliny, které vznikají během lipolýzy jsou citlivé na oxidaci a vznik aldehydů a ketonů, které vedou k nežádoucím chutím popisovaným jako lojovitá nebo kovová. Mezi jiné nežádoucí chutě patří žluklá, hořká, nečistá, mýdlová a svíravá v mléku a mléčných výrobcích. [24, s. 268]

Problémy způsobené lipolytickou aktivitou mikroorganismů v potravinách mohou být různé v závislosti na charakteru přítomného tuku. Některé volné mastné kyseliny jsou z hlediska chuti výsledného produktu přijatelnější, než jiné. Například kyselina butanová (máselná), která je součástí mléčného tuku, i při nízkých koncentracích poskytuje příjemnou máslovou chuť. S rostoucí koncentrací přechází chuť přes mléčnou po sýrovou a je žádoucí pouze u některých druhů výrobků. Sýrové příchutě nejsou žádoucí například v cukrovinkách. Reakce na jednotlivé chutě jsou individuální a značně se liší. Další mastná kyselina, jejíž vyšší obsah je problematický, je kyselina laurová. Kyselina laurová je součástí kokosového nebo palmojádrového oleje. Pokud lipáza působí na triacylglycerol obsahující kyselinu laurovou, vznikne volná kyselina laurová, která dodává výrobku mýdlovou chuť.

[20, s. 125]

Z hlediska tvorby aromatických sloučenin je významná i oxidace mastných kyselin vzniklých lipolýzou. Ty mohou být transformovány na methylketony a hydroxykyseliny, které mohou konvertovat na laktony. Vznik volných mastných kyselin v potravinách je významný především v mléčných výrobcích. V mléčných výrobcích, zejména sýrech, většinou nedochází k oxidaci lipidů, kvůli přítomnosti antioxidantů a nízkému redoxnímu potenciálu. Naopak je pro vytvoření chuťových sloučenin klíčová enzymatická hydrolýza (lipolýza) triacylglycerolů na parciální estery a volné mastné kyseliny. [22, s. 7, 85]

Mezi faktory, které ovlivňují lipolytickou aktivitu, lze zahrnout například charakter tuku, složení potravin a přístup kyslíku. Pozice, ve které jsou mastné kyseliny připojeny k molekule triacylglycerolu a struktura mastných kyselin, také ovlivňují lipázovou specifitu mikroorganismů. Produkce a aktivita lipáz, které by mohly vést ke zhoršení kvality po-

travin, může být inhibována přítomností mastných kyselin, lipidů, sacharidů a proteinů v médiu. Náchylnost různých triacylglycerolů k lipolýze závisí mimo jiné na velikosti částic emulgovaných tuků. [25, s. 134]

Mikrobiální lipázy se uplatňují nejen při výrobě potravin, ale využívají se také v mnoha jiných aplikacích zahrnujících organické syntézy, biokonverze, výrobu detergentů, v papírenském a oleochemickém průmyslu, kosmetice a medicíně. Většina komerčně významných lipáz je produkována mikroskopickými houbami rodu *Candida*, nebo druhy *Aspergillus niger*, *Rhizomucor meiehei* a *Rhizopus arrhizus*. [26, s. 186]

2.1.1 Sýry

Sýr je mléčný výrobek získaný nejčastěji z kravského, ovčího nebo kozího mléka koagulací kaseinu. Jedná se o velmi výživnou potravinu s širokým rozsahem chuťových a texturních vlastností. [16, s. 42] S výjimkou čerstvých sýrů textury tvarohu a sýrů s obsahem soli, jsou tvarované a lisované ve formách před skladováním a zráním. [12, s. 61] Sloučeniny, které přispívají k chuti sýrů, jsou přidány nebo produkovány během výroby, případně formované jako důsledek mnoha biochemických změn během zrání sýrů. Při tvorbě aromatických sloučenin hraje významnou roli lipolýza mléčného tuku. [27, s. 123]

Chuť čerstvých sýrů, které jsou konzumovány ihned po výrobě, je výsledkem činnosti startérových bakterií a je tvořena především diacetyly, případně acetaldehydy. Chuť zrajících sýrů je výsledkem interakce startérových bakterií, mléčných enzymů, enzymů syřidla, lipáz a sekundární flórou. [28, s. 79] Během zrání sýrů, se objevuje velké množství chuťových složek jako výsledek biochemického procesu, který zahrnuje proteolytickou a lipolytickou degradaci složek mléka. [9, s. 4545] Mastné kyseliny s krátkým a středně dlouhým řetězcem mají relativně nízké prahy vnímání, a proto nejvíce přispívají k chuti. [29] Mastné kyseliny jsou prekurzory mnoha chuťových vlastností produkovaných biochemickými reakcemi. Estery, které mají ovocnou příchut', jsou tvořeny přímou esterifikací nebo alkoholýzou. Esterifikace je tvorba esteru z alkoholu a karboxylové kyseliny, alkoholýza je produkce esteru z alkoholu a acylglycerolu nebo alkoholu a acyl-CoA. Methylketony jsou tvořeny enzymatickou oxidací volných mastných kyselin na β -ketokyseliny a jejich následné dekarboxylace na methylketony. Aldehydy jsou produkovány katabolizmem mastných kyselin nebo aminokyselin dekarboxylací nebo deaminací. Aldehydy jsou přechodné sloučeniny a neakumulují se v sýrech, protože jsou rychle přeměněny na alkoholy nebo příslušné kyseliny. [18, s. 153, 154]

Množství volných mastných kyselin nahromaděných v průběhu zrání je považována za celkovou míru lipolýzy a je velmi variabilní v závislosti na druhu sýru, použitých bakteriích mléčného kvašení a sekundárních kulturách, typu syřidla, době zrání, výrobní technologii a jiných faktorech. [9, s. 4545] Volné mastné kyseliny jsou důležitými aromatickými sloučeninami ve většině sýrů, kde přispívají ke štiplavé, mýdlově zatuchlé až voskovité, sýrové chuti a chuti s ovocnými tóny. Vyplývají z částečné hydrolyzy esterové vazby mezi mastnými kyselinami a glycerolem pomocí lipolytických esteráz. [19, s. 751]

Ve vývoji vyváženého aroma a chuti hrají významnou roli především mikroorganismy. Sýry obsahují komplexní mikroflóru zahrnující bakterie, plísňe a kvasinky. Mikroflóru je možné rozdělit do dvou skupin: startérové kultury a sekundární kultury. Obě skupiny přispívají k tvorbě aroma, chuti a textury. [18, s. 113] V mlékárenském průmyslu se startérové kultury dělí do dvou skupin: nedefinované a definované. Nedefinované startérové kultury jsou směs neznámého počtu typů bakterií mléčného kvašení. Tyto směsi kmenů se vyvíjí z kultur, které produkují dobrou kvalitu sýrů. Běžně se využívají mezofilní startérové kultury. [30, s. 92]

Startérové kultury zajišťují okyselení, tedy snížení pH, sekundární mikroflóra hraje významnou roli při zrání sýrů a tvorbě požadované chuti. Mezi běžné startérové kultury patří: *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* a *Lactobacillus delbrueckii*. [15, s. 43] Jako startérové nebo sekundární kultury se mohou uplatňovat také plísňe. Hlavní role plísni je zvýšit chuť, aroma a upravit tělo a strukturu sýru. Ve zrajících sýrech se rozvíjí sekundární mikroflóra jak uvnitř, tak na povrchu sýru. [31, s. 50] Plísňe jsou známé zejména jako producenti enzymů s vysokou lipolytickou aktivitou. Některé plísňe jsou také známí producenti různých aromatických látek, z nichž nejvýznamnější jsou alkoholy a organické kyseliny. [32]

Některé druhy sekundární mikroflóry mohou být považovány za škodlivé a zhoršují kvalitu sýrů, ale většinu lze považovat za prospěšné. Jejich kombinací a asociací s bakteriemi mléčného kvašení, jejich enzymy a enzymy přirozeně se vyskytující v syrovém mléce zajišťují požadované vlastnosti sýrů. Produkují charakteristické chuťové složky a texturu typickou pro určitý druh sýru. Sekundární flóra zahrnuje kvasinky, plísňe a bakterie. Jsou využívány k lepší kontrole průběhu zrání a snížení rizika znehodnocení. [31, s. 50] Mikroorganismy jsou využívány při výrobě sýrů na podporu rozvoje kyseliny během výroby a také tvoří texturní a chuťové vlastnosti. Produkce kyseliny během výroby sýrů vede k vytvoření gelu z mléčného kaseinu. Vývoj kyseliny v celém procesu výroby sýru podporuje

koncentraci syřidla a vyloučení vlhkosti synerezí. Růst nežádoucích a patogenních bakterií je potlačen snížením pH. Rozsah vývoje kyseliny ovlivňuje texturní vlastnosti a také poskytuje správné podmínky prostředí, které umožňuje vývoj chuťových látek. Mikroorganismy, jejichž hlavní úlohou není produkce kyselin, jsou využívány k vývoji chuťových látek a texturních vlastností sýrů. [31, s. 93]

Hydrolyza triacylglycerolů na volné mastné kyseliny, mono- a diacylglyceroly způsobená lipázami je běžně uváděná jako lipolýza. Spontánní lipolýzou v mléku a sýrech mohou vznikat nežádoucí nebo nevýrazné chutě. Proto je nežádoucí u všech sýrů, dokonce i u těch, kde je výrobní proces navržen tak, aby podporoval hydrolyzu přidavkem exogenních lipáz a lipolytických kultur. Lipolýza v syrovém mléku je mnohdy způsobena účinkem přirozeně se vyskytující lipoproteinové lipázy. Lipoproteinová lipáza je v podstatě úplně inaktivována působením konvenčního pasteračního záhřevu, proto málo přispívá k lipolýze v mléku a sýrech, nejsou-li tukové kuličky v mléku poškozeny. V případě poškození tukových kuliček by došlo ke kontaktu lipázy s mléčným tukem a tedy k lipolýze. [33, s. 1989, 1990] Její lipolytický účinek proto hraje významnou roli ve vývoji příchutí v sýrech z čerstvého mléka. [28] Mléčná lipáza je přítomna v sýrech v různém množství, které je dáno teplotou a dobou tepelného ošetření, a přispívá k degradaci triglyceridů zvláště během časného stadia zrání sýrů. [34, s. 160] Aktivita lipolytických enzymů a fyzikálně chemický stav tukové frakce v matrici sýru je tedy primárně zodpovědný za rozsah lipolýzy. [9, s. 4546] Lipolytické enzymy přítomné v sýru mohou pocházet z mléka, syřidla, startérových kultur, non-startérových LAB a exogenních enzymatických přípravků. [29] Hlavními zdroji esteráz v sýru jsou mikroorganismy. [19, s. 751] Lipolýza je důležitá zejména v modrých sýrech, kde produkuje charakteristické aromatické sloučeniny, hlavně methylketony, které jsou měřítkem kvality. Lipolýzu v sýrech způsobují zejména lipázy plísňových startérových kultur rodu *Penicillium*, ale pozitivní efekt při produkci aromatických složek mají také kvasinky, které mohou být přítomny v sýrech. [34, s. 159] Kvasinky přispívají k vytvoření typického aroma a textury sýrů svou schopností štěpit laktózu, proteiny, lipidy a některé organické kyseliny. Na druhou stranu působí v mnoha druzích sýrů jako kontaminanty. [35, s. 55]

Kvalita sýru je ovlivněna druhem mléka, výrobní technologií a komplexními změnami v průběhu zrání, způsobenými původními mléčnými enzymy, startérovými kulturami, a sekundární mikroflórou. [36, s. 595] Mikrobiální znehodnocení sýrů může být způsobeno jak bakteriemi, tak plísněmi nebo kvasinkami, ale typ znehodnocení závisí hodně na cha-

rakteristice individuálních druhů sýrů. [37, s. 67, 68] Ke znehodnocení sýrů, dochází méně než ke znehodnocení mléka, díky nízkému pH, nízké vodní aktivitě odstraněním syrovátky a rozpuštění soli ve zbývající vlhkosti. [38, s. 336] Výsledkem mohou být vizuální i organoleptické defekty, buď na povrchu, nebo uvnitř sýru. [37, s. 67, 68] Růst plísní a kvasinek je následovaný růstem proteolytických a lipolytických bakterií, které tvoří tvarohovitou konzistenci, produkují plyny a rozvíjí charakteristické pachy hniloby. [38, s. 336] Znehodnocení plísněmi je obvykle nepříjemné a některé druhy plísní mohou dokonce produkovat mykotoxiny. Mezi plísně, které se běžně podílí na znehodnocení sýrů, patří *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Alternaria*. [37, s. 67, 68]

2.1.2 Významné plísně v mléčných výrobcích

Taxonomie plísní je primárně založena na jejich morfologii a růstu na odlišných médiích. K růstu plísně upřednostňují substrát tvořený sacharidy, ale mohou také růst na médiích bohatých na bílkoviny, ve kterých využívají jako zdroj uhlíku aminokyseliny. [32] Mezi plísně, které se využívají při výrobě mléčných výrobků, zejména sýrů, patří především plísně rodu *Penicillium*. Stejně jako bakterie a kvasinky, také plísně se podílí na vývoji chuti a textury mléčných výrobků. Plísně, které kolonizují povrch fermentovaných mléčných produktů, mají převážně oxidační aktivitu a schopnost metabolizovat kyselinu mléčnou. [12, s. 168] V mléce mohou být přítomny také plísně způsobující znehodnocení potravin nebo některé patogenní plísně. Patogenní plísně v mléce mohou způsobovat infekce nebo produkovat toxiny. Mnoho různých druhů plísní, například plísně rodu *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium* produkují v mléce a mléčných výrobcích mykotoxiny. Mykotoxiny jsou akutně toxické, karcinogenní, mutagenní, teratogenní, apod. [14, s. 447, 451] Ke kontaminaci mykotoxiny může dojít náhodným výskytem a růstem plísní v mléčných výrobcích, nebo také nekontrolovaným růstem plísní zajišťujících fermentaci, čemuž lze předejít dodržováním správné výrobní praxe. [39, s. 986]

2.1.2.1 Rod *Penicillium*

Při výrobě sýrů se nejčastěji využívají *Penicillium camemberti* a *Penicillium roqueforti*. Na základě barvy a charakteristiky růstu, rozlišujeme bílé a modré plísně. Bílé plísně, známé jako *Penicillium camemberti*, rostou na povrchu sýrů. Modré plísně, *Penicillium roqueforti*, rostou uvnitř sýrů. Mezi charakteristické rysy plísněných sýrů patří rozsáhlá proteolytická a lipolytická aktivita. Tyto biochemické děje v konečném důsledku vedou k tvorbě prekurzorů pro typické chuťové složky sýrů. Klíčovou roli mají methylketony. Mezi množ-

stvím vytvořených volných mastných kyselin a methylketonů existuje pozitivní korelace. Dalšími typickými sloučeninami jsou sekundární alkoholy, estery nebo aldehydy. Aroma je doplněno sloučeninami získanými proteolýzou. [30, s. 102, 103]

Penicillium roqueforti a *Penicillium camemberti* mohou být považovány za hlavní činitele při lipolýze mléčného tuku, jež je součástí plísňových sýrů. Využití těchto plísní k výrobě sýrů má bohatou historii, jako startérové kultury se začaly využívat na začátku 19. století. *Penicillium roqueforti* se používá jako sekundární startérová kultura při výrobě sýrů s modrou plísní, ale mohou se také spontánně vyskytovat v mnoha potravinách a v některých typech sýrů mohou dokonce působit jako kontaminy. *P. roqueforti* roste i při vysoké koncentraci NaCl a nízké koncentraci kyslíku. Poměrně vysoká koncentrace CO₂ je vhodná pro výrobu sýrů s modrou plísní. U různých komerčních kmenů *P. roqueforti* jsou velké rozdíly v proteolytické a lipolytické aktivitě. Lipolytické enzymy zajišťují charakteristickou chuť sýrů s modrou plísní produkcí vysoké koncentrace methylketonů. [21, s. 39]

Penicillium camemberti se používá jako startérová kultura k výrobě Camembertu a podobných typů povrchově zrajících sýrů. Využití *P. camemberti* je vysoce omezené, slouží zejména k výrobě sýrů, zřídka se nachází u jiných potravin nebo v přírodě. Růst na povrchu sýrů je umožněn díky vysoké toleranci k NaCl. *P. camemberti* spotřebovává laktózu a kyselinu mléčnou na povrchu sýru, čímž dochází k nárůstu pH. [21, s. 39] Vzrůst pH se projeví ve vzhledu a textuře sýru. [32] Po vyčerpání laktátu nastává degradace kaseinu pomocí proteinázy, výsledkem je další vzrůst pH a uvolnění amoniaku. Kromě zmíněné proteolytické aktivity, také produkuje lipázy, které se podílí na tvorbě aroma. [21, s. 39]

Penicillium roqueforti poskytuje dva typy lipáz, jedna z lipáz je aktivní při pH 7,5-8, pro druhou lipázu je optimální pH 9-9,5. Lipáza s nižším optimálním pH produkuje kyselinu kapronovou, zatímco lipáza s vyšším pH produkuje kyselinu butanovou. *Penicillium camemberti*, produkuje extracelulární lipázu, jejíž optimální pH je 9 při 35 °C. Volné mastné kyseliny jsou prekurzory mnoha důležitých chutí a aromatických složek, jako methylketony, estery, alkany a sekundární alkoholy. Methylketony jsou nejdůležitější složkou chutí sýrů s modrou plísní, v nichž jsou zastoupeny ve vysoké koncentraci. Mohou být produkovány různými druhy rodu *Penicillium* a dokonce sporami. [40, s. 376] Methylketony nemusí být získávány pouze z volných mastných kyselin, ale také z ketokyselin přirozeně se vyskytujícími v nízké koncentraci v mléčném tuku nebo oxidací mononenasyčených volných mastných kyselin. Spory *P. roqueforti* mohou oxidovat mastné kyseliny obsahující 4 až 12 atomů uhlíku. Produkce methylketonů v sýrech je ovlivněna teplotou, pH, fyziologickým

stavem plísni a koncentrací volných mastných kyselin. [40, s. 377] Methylketony mohou být částečně redukovány na alkan-2-oly, které jsou také důležitou součástí chuti modrých sýrů. Těkavé sloučeniny charakterizující chuť zrajících sýrů s plísní na povrchu jsou utvářeny startérovými bakteriemi, plísněmi rodu *Penicillium* a kvasinkami štěpícími laktát. Okt-1-en-3-ol poskytuje charakteristickou houbovou chuť v Camembertu a překrývá chuť methylketonů v modrých sýrech. [28, s. 80]

Mikroflóra na povrchu plísňových sýrů je obzvláště složitá v případě sýrů vyrobených ze syrového mléka a podstupuje značné změny v průběhu zrání. Na začátku procesu výroby sýrů se v podstatě skládá z laktokoků použitých jako startérová kultura. Druhý den se začne v kyselém prostředí rozvíjet mikroflóra složená z kvasinek a *Geotrichum candidum* a porůstá povrch sýru. Pátý nebo šestý den se objevují spory *Penicillium camemberti*. Porost plísni je hustý a nadýchaný, během dalších dnů postupně pokrývá povrch sýru. Povrch sýru je zcela pokrytý porostem plísni osmý až desátý den zrání. Růst *Penicillium camemberti* je doprovázen prudkým zvýšením pH, který umožňuje rozvoj bakteriální flóry citlivé na kyselost povrchu. [12, s. 193]

2.1.2.2 Rod *Aspergillus*

Rod *Aspergillus* zahrnuje široké množství druhů, které osidlují nejrůznější typy prostředí. *Aspergillus oryzae* je zdrojem mnoha enzymů a je využíván k produkci fermentovaných potravin, které mají své místo v lidské výživě. *Aspergillus flavus* je oportunně patogenní, běžná půdní plíseň převážně saprofytická, roste na odumřelých rostlinných tkáních v půdě. Mezi sekundární metabolity patří aflatoxiny, aflatrem, aflavinin, kyselina kojová, aspergillová, paspalinin a jiné metabolity představující zdravotní riziko. [41, s. 81, 78] *Aspergillus flavus* může kontaminovat mnoho druhů potravin, včetně masných výrobků, mléka a sýrů. [42, s. 786] Mezi plísně rodu *Aspergillus* produkující lipázy patří také *Aspergillus niger* s velmi silnou lipolytickou aktivitou a širokou substrátovou specifikou. [43, s. 487]

Plísně rodu *Aspergillus* mohou produkovat nízkou koncentraci mykotoxinů nebo jiných toxických metabolitů během výroby, distribuce a skladování. Celkově může být výskyt plísni akceptovatelný nebo neakceptovatelný v závislosti na tom, kdy, kde a proč plísně rostou. Růstu nežádoucích plísni může být zabráněno dodržováním hygieny, čistotou výrobního prostředí a zařízení, přidavkem konzervantů a ochranným obalem. [44, s. 780] Přímé kontaminaci mykotoxiny způsobené cíleným nebo náhodným výskytem plísni v potravinách lze tedy předejít dodržováním správné výrobní praxe. [45, s. 986]

Mykotoxiny jsou sekundární metabolity produkované plísněmi. Mezi mykotoxinogenní plísně vyskytující se v potravinách patří plísně rodu *Aspergillus*, *Fusarium* a *Penicillium*. Mykotoxiny, které mají největší význam v potravinách a krmivech, jsou aflatoxiny produkované zejména *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* a *Aspergillus nominus*, nejčastěji Aflatoxin M₁ a M₂, monohydroxylované deriváty aflatoxinu B₁ a aflatoxin B₂ tvořené a vylučované v mléku savců. Aflatoxin M₁ se může nacházet v mnoha produktech zahrnující dětskou výživu, sušené mléko, sýry a jogurty. [45, s. 141]

2.1.3 Významné kvasinky v mléčných výrobcích

Ve fermentovaných výrobcích se kvasinky účastní buď řízené fermentace pomocí známých kultur, nebo spontánní fermentace, kdy zdrojem kvasinek může být čerstvé mléko, výrobní zařízení nebo okolní prostředí. Jako startérové kultury se většinou používají jednotlivé kmeny k iniciaci procesu fermentace a následně k optimální produkci aroma. [21, s. 32] Kvasinky se dále uplatňují jako sekundární kultury v mnoha sýrech za účelem podpory růstu jiných mikroorganismů, nebo k redukci výskytu nežádoucích plísní rodu *Aspergillus*, *Mucor* nebo *Penicillium*. Kvasinky přispívají k lipolýze, nejvyšší lipázovou aktivitu vykazuje *Yarrowia lipolytica*. Produkují aromatické sloučeniny, etanol, aldehydy, estery a degradují aminokyseliny na amoniak. Dalšími metabolickými pochody vznikají alkoholy, estery, methylketony a karbonylové sloučeniny. [40, s. 191, 192]

Mnoho druhů kvasinek roste za aerobních a anaerobních podmínek. Zdrojem uhlíku jsou primárně sacharidy, které dále štěpí na alkoholy a oxid uhličitý, estery, organické kyseliny, aldehydy a ketony. Nejlépe popsáním druhem kvasinek podílejících se na fermentaci potravin a nápojů je *Saccharomyces cerevisiae*. [21, s. 32]

Vliv kvasinek na mléčné produkty může být prospěšný nebo škodlivý. Některé druhy hrají významnou roli v produkci fermentovaných mléčných produktů a sýrů. Vytváří specifické aromatické látky, například etanol a oxid uhličitý v kefiru a kumysu, a přispívají k růstu bakteriálních startérových kultur na povrchu zrajících měkkých a polotvrdých sýrů. Nicméně růst kvasinek je v mnoha případech nežádoucí v mléce a mléčných produktech. Mezi negativní aspekty přítomnosti kvasinek v mléčných produktech patří silný růst kvasinek v sýrech, který je příčinou vzniku nežádoucích příchutí jako je například příchut' alkoholická, zemitá, zatuchlá, pikantní, žluklá, sladká a další. [46, s. 744, 750]

Role kvasinek jako mikroorganismů způsobujících kažení mléčných produktů je spojena s jejich výživovými požadavky, enzymatickou aktivitou a schopností růst za nízkých tep-

lot, nízkého pH, nízké vodní aktivity a vysoké koncentraci soli. Kvasinky mohou kontaminovat mléčné výrobky, což dokazuje například studie Tudora a Boarda (1993). Běžnými kontaminanty pasterizovaného mléka jsou *Candida diffluens* a *Candida famata*. *Rhodotorula glutinis* a *Rhodotorula rubra* jsou částečně spojeny s produkty založenými na mléčném tuku. *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*, *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* a *Saccharomyces cerevisiae* se pojí se sýry. V jogurtech jsou důležitými kontaminanty *Candida famata*, *Candida krusei* a *Candida lusitanae*. [47, s. 758, 759]

2.1.3.1 Rod *Candida*

Kvasinky rodu *Candida* se hojně vyskytují v přírodě i uměle vytvořeném prostředí. Odolávají vlhkosti, vysoké koncentraci organických kyselin a etanolu, nízkým i vysokým teplotám, vysoké koncentraci soli a cukru. Buňky různého tvaru rostou v krémově až žlutě zbarvených koloniích. Některé druhy jsou využívány k produkci různých biotechnologicky významných sloučenin, například vyšších alkoholů, organických kyselin, esterů, diacetylu, aldehydů, ketonů, kyselin a glycerolu. Proto se enzymy těchto kvasinek uplatňují při syntéze aromatických sloučenin. Lipáza *Candida rugosa* se používá k hydrolýze mléčného tuku. Kolonizuje různé druhy prostředí, výskyt je spojen zejména s rostlinami, hnilými vegetací, stonky rostlin a půdou. *Candida* stejně jako jiné kvasinky dominuje, pokud je bakteriálnímu kažení bráněno okyselením, vysokou koncentrací soli a cukru. Zhoršuje kvalitu potravin (zápach, biofilm, změna textury, produkce plynu) a tím může napomáhat dalšímu rozvoji kontaminující bakteriální i plísňové mikroflóry. [41, s. 367, 368, 371]

Yarrowia lipolytica (*Candida lipolytica*) se běžně nachází v masných výrobcích, například párcích, a v mléčných výrobcích, zejména sýrech, kde vytváří specifickou texturu a příchuť. [48, s. 374] Je nepatogenní a obecně považovaná za bezpečnou, ale přesto může způsobit znehodnocení potravin, některé kmeny mohou produkovat hnědý pigment melanin katabolýzou tyrozinu, což se projeví změnou barvy na povrchu sýrů. V potravinách produkuje aromatické sloučeniny, organické kyseliny, polyalkoholy, emulgátory a povrchově aktivní látky. *Yarrowia lipolytica* dobře snáší přítomnost solí, nízké teploty, kyselé i zásadité pH. Produkuje několik typů lipáz a esteráz, nejvíce tedy přispívá k lipolytické činnosti spojené s procesem zrání sýrů. Lipolytická aktivita je silná i při nízkých teplotách. Tvoří tedy velké množství volných mastných kyselin: propionová, máselná, myristová, palmitová, stearová a olejová. Některé z těchto volných mastných kyselin jsou odpovědné za sen-

zorické vlastnosti. [49, s. 1-3] Přestože se *Yarrowia lipolytica* používá k produkci aromatických a chuťových složek sýrů, v některých sýrech může produkovat nežádoucí aroma, například 2-phenylethanol, amoniak, sloučeniny síry a volné mastné kyseliny. [41, s. 376]

Některé druhy rodu *Candida* způsobují znehodnocení mléka a mléčných výrobků, díky schopnosti štěpit kasein a tuk, růst v širokém rozmezí teplot, fermentovat laktózu a sacharózu. Tvoří sliz na povrchu sýrů, v jogurtech mohou způsobovat kvasnicovou a hořkou příchut'. Hlavními druhy způsobujícími znehodnocení sýrů jsou *Candida famata*, a mezi druhy způsobující znehodnocení jogurtů patří *Candida famata*, *Candida versatilis* a *Candida lusitanae*. [14, s. 454]

2.1.3.2 Rod *Saccharomyces*

Saccharomyces cerevisiae patří mezi nejpoužívanější fermentující mikroorganismy. Je nejčastěji využívána při výrobě pečiva nebo sladu, pro fermentaci vína, jako aditivum potravin a krmiv a také jako kultura pro tvorbu vyvážené chuti v mléčných a masných výrobcích. [21, s. 10] Rod *Saccharomyces* zahrnuje kvasinky se schopností silné anaerobní nebo semianaerobní fermentace cukrů za produkce etanolu a oxidu uhličitého. *Saccharomyces cerevisiae* můžeme nalézt na povrchu plísňových zrajících sýrů. Metabolizuje hexózy, kyselinu mléčnou a jiné organické kyseliny. Optimální pH růstu se pohybuje mezi 4,5-6,5. Kyslík je důležitý k udržování životaschopnosti, ale přežívá i za mikroaerofilních podmínek. [18, s. 456] Může přispívat k tvorbě chuti během zrání sýrů interakcí se startérovými kulturami *Penicillium roqueforti*, čímž podporuje proteolýzu a lipolýzu. [47, s. 59] *Saccharomyces cerevisiae* podporuje růst *Penicillium roqueforti*, ovlivňuje tvorbu aroma a vykazuje jistou proteolytickou aktivitu. [21, s. 37]

Znehodnocení mléka a mléčných výrobků se projevuje výskytem nežádoucích příchutí a pachů, změnami v textuře a vzhledu. *Sacharomyces cerevisiae* způsobuje také znehodnocení slazených a kyselých mléčných výrobků, například produkcí těkavých sloučenin v ovocných jogurtech. [14, s. 452, 454]

3 STANOVENÍ LIPOLYTICKÉ AKTIVITY MIKROORGANISMŮ

Ke stanovení lipolytické aktivity mikroorganismů slouží mnoho metod, například spektrofotometrie, chromatografie, turbidimetrie, titrační metody a měření povrchového napětí. Při analýze lipidů se uplatňují zejména chromatografické metody, obvykle ke kvantifikaci izolovaných volných mastných kyselin z přírodních triacylglycerolů, jejich parciálních esterů nebo smíšených tuků. Výhodou chromatografických metod je jejich citlivost, všestrannost a nízká cena. [6, s. 432, 440] Metody k měření lipolýzy v mléce a mléčných výrobcích jsou založeny na stanovení volných mastných kyselin získaných lipolytickou aktivitou mikroorganismů produkujících lipázy, nebo přímo měřením lipolytické aktivity. Dostupné jsou i rychlé kvalitativní testy založené na průkazu přítomnosti lipolytických enzymů. [50, s. 153]

Hlavním problémem při měření lipolytické aktivity v mléce, nebo mléčných výrobcích je v podstatě přítomnost vysoké hladiny tuků, kravské mléko obsahuje 37 – 41 g/l tuku. Pro analýzu není vhodné využít přímé spektrofotometrie, protože produkty lipolýzy – volné mastné kyseliny a diacylglyceroly, případně monoacylglyceroly jsou spektrálně nezřetelné. Přesto je mnoho metod založených na přímém měření jednotlivých produktů; některé metody jsou založeny na měření fyzikálně chemických změn indukovaných během reakce. Jiné metody vyžadují speciálně upravené substráty. [6, s. 432]

Pro sledování lipolytické aktivity mikroorganismů *in vitro* je klíčové použití stabilních reprodukovatelných emulzí obsahujících substrát lipolytických enzymů. Ke stabilizaci emulze je obvykle nutný přídavek surfaktantů, jejichž efekt se značně snižuje s časem. Proto je také doporučováno použití čerstvě připravených emulzí. Pro přípravu standardních emulzí by s jednotlivými složkami mělo být manipulováno za obdobných teplotních podmínek a jednotlivé složky ani konečné emulze by neměly být vystaveny teplotám mimo rozsah 20 až 50 °C. I relativně malé rozdíly v postupu přípravy emulze mohou mít vliv na výsledek testu, například na dostupnost substrátu pro lipolytické enzymy. [6, s. 432]

3.1 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie je analytická separační metoda založená na principu oddělování složek vzorku na základě jejich afinity ke stacionární fázi. Jedná se o metodu kvalitativní a kvantitativní analýzy vzorku. [51, s. 10] Vzorky mohou být plynné, kapalné nebo pevné látky a mohou tvořit směsi obsahující široké spektrum chemických sloučenin. [52, s. 3] Pokud je vzorkem plyn, je začleněn do proudu inertního plynu – mobilní fáze, neboli nosného plynu – unášejí vzorek kolonou, v níž je obsažena stacionární fáze. Vzorek kapalného charakteru je nejdříve zahříván a jeho páry jsou následně unášeny mobilní fází kolonou. V koloně jsou složky vzorků děleny selektivní interakcí mezi stacionární a mobilní fází. Složky vzorku dosáhnou výstupu z kolony v rozdílném čase. Doba, po kterou jednotlivé složky vzorku setrvávají v koloně, se nazývá retenční čas a je za daných podmínek charakteristickým rysem jednotlivých analytů, zatímco výška nebo plocha jednotlivých píků je úměrná množství analytu. [53, s. 1]

Plynová chromatografie je nejpoužívanější metoda v analytické chemii, její oblíbenost a použitelnost je vysoká především díky bezproblémové rozlišovací schopnosti pro blízké příbuzné těkavé látky a díky vysoké senzitivitě a selektivitě zajišťované mnoha různými detektory. Plynová chromatografie je velmi přesná, a proto se běžně využívá při rutinních analýzách. [54, s. 1] Například při analýze tuků je běžně využívanou metodou ke kvantifikaci triacylglycerolů, diacylglycerolů, monoacylglycerolů a extrahovaných volných mastných kyselin, díky své univerzálnosti, citlivosti a relativně nízké ceně. [6, s. 440]

3.1.1 Příprava vzorků

Vzorky jsou často příliš zředěné nebo složené z mnoha látek, které mohou znesnadňovat analýzu pomocí kapilární plynové chromatografie. Aby bylo dosaženo požadovaných výsledků, musí být vzorky před zahájením analýzy upraveny extrakcí, frakcionací, apod. Příprava vzorků je časově náročná a vzorky mohou být kontaminovány nebo jinak znehodnoceny. Získání reprezentativního vzorku a jeho správné skladování je důležitá součást každé analýzy. [55, s. 3] První krok k identifikaci aromatických sloučenin musí být separace těkavých látek, obvykle ve formě, ve které mohou být podrobeny plynové chromatografii. [9, s. 253] Při analýze tuků, respektive mastných kyselin plynovou chromatografií, je prvním krokem analýzy extrakce založená na separaci tuku pomocí systému rozpouštědel, nebo separace prováděná bez použití rozpouštědel. Následně je nutné mastné kyseliny převést na methylestery metodami uvedenými níže v podkapitole.

3.1.1.1 *Extrakce mléčného tuku*

Před samotnou analýzou se provádí extrakce lipidů standardními metodami. Extrakce probíhá v systému rozpouštědel isopropanol-petroleum ether nebo ethylalkohol-diethylether, případně jinými postupy izolující tuk z produktu. [56, s. 725] Často bývá prvním krokem před provedením extrakce mléčného tuku rozrušení proteinové membrány tukových kuliček beze změny oxidačního stavu tuku. [58, s. 852] Extrakce mléčného tuku organickými rozpouštědly, následovaná transesterifikací pro vytvoření methylesterů a plynovou chromatografií představuje klasickou analýzu mastných kyselin. Metoda Hara a Radin (1978) používá směs hexanu a izopropanolu. Tato několika stupňová metoda je vhodná pro malé množství vzorků, tedy doba analýzy a zařízení umožňuje zpracovat desítky vzorků denně. Pro zpracování vyššího množství vzorků se používá centrifugační separace tuku. [57, s. 3785] Folch a Bligh & Dyerova metoda je založena na extrakci tuku z potravin pomocí systému rozpouštědel chloroform-methanol 2:1. Nevýhodou této metody je časová náročnost. Standardní extrakční metoda (IDF Standard 1D) zahrnuje systém rozpouštědel složený z diethyletheru a petroletheru, a následně silnou alkalickou mineralizaci v kombinaci se zahřevem pro rozpuštění tukového a proteinového komplexu.

Pro rutinní analýzy, například pro stanovení obsahu tuku v mléce, jsou využívány především dvě rozpouštědla, diethylether a petrolether. Postup pro extrakci mléčného tuku využívající tato rozpouštědla je součástí české technické normy ČSN EN ISO 1211 Mléko – stanovení obsahu tuku – Vážková metoda (Referenční metoda).

Existuje i celá řada dalších extrakčních metod, avšak ty jsou velmi často časově náročné, vyžadují specifické vybavení nebo v některých případech škodlivá rozpouštědla. Nejsou tedy vhodné pro rutinní aplikace. [56, s. 852] Absolutní obsah volných mastných kyselin v tuku se extrakcí obvykle nezíská. [59, s. 725] Směs získaná extrakcí se skládá z různých skupin lipidů o rozdílné polaritě: triacylglyceroly, fosfolipidy, volné mastné kyseliny, steroly a další. Při použití petroletheru jsou extrahovány pouze nepolární lipidy. Získané lipidy jsou dále převedeny na methylestery mastných kyselin. [60, s. 285]

3.1.1.2 *Příprava methylesterů mastných kyselin*

Mastné kyseliny obsažené v tukovém extraktu jsou obvykle transformovány na methylestery a stanoveny plynovou chromatografií. Methylestery mastných kyselin mohou být připraveny několika stupňovou metodou zahrnující extrakci tuku s následnou transmethylací, nebo přímou methylací. Přímá methylace má mnoho výhod oproti metodám založeným na

extrakci, jako například malé množství vzorku a nízká spotřeba rozpouštědel. [59, s. 315] V literatuře je popsáno mnoho různých postupů pro přípravu methylesterů, z nichž nejvíce používanými jsou následující: methylace katalyzovaná kyselinami a zásadami, methylace fluoridem boritým, nebo také methylace s diazomethanem. První z těchto metod je vhodnější než ostatní z důvodu použití méně agresivních reakčních činidel. [60, s. 286] Dále se také pro přípravu methylesterů mastných kyselin z živočišných i rostlinných tuků používají: alkalicky katalyzovaná transmethylace, nebo alternativní postupy kyseliny katalyzované transmethylace glyceridů.

Použitím alkalicky katalyzované transmethylace, nedojde k vytvoření methylesterů volných mastných kyselin přítomných v tuku. Touto metodou lze tedy vytvořit methylestery pouze z mastných kyselin vázaných v molekule triglyceridů. Alkalicky katalyzovaná transmethylace se tedy používá v případě olejů, které nebyly upravovány frakcionací ani rafinací. Přítomnost volných mastných kyselin by způsobovala problémy při analýze plynovou chromatografií v identifikaci methylesterů na výsledném chromatogramu. [60, s. 1, 2]

Naopak methylace katalyzovaná kyselinami a zásadami je vhodná pro přípravu methylesterů jak z vázaných, tak i volných mastných kyselin. Výběr metody tedy závisí na obsahu volných mastných kyselin v analyzovaném tuku. Alkalickou transmethylací dojde k zmýdelnění volných mastných kyselin a následnou acidickou transmethylací jsou vzniklá mýdla převedena na methylestery. Methylace fluoridem boritým se používá pouze ve výjimečných případech kvůli toxicitě fluoridu boritého. Získané methylestery jsou dále analyzovány pomocí plynové nebo kapalinové chromatografie, případně chromatografie na tenké vrstvě nebo infračervené spektrofotometrie. [61, s. 2]

3.1.2 Plynový chromatograf

Prvním krokem vlastní analýzy je dávkování vzorků. Vzorky jsou dávkovány injekčními stříkačkami nebo automatickými dávkovači, přičemž rozlišujeme několik způsobů dávkování. [51, s. 12, 13] Nástřík do kolony je základní metodou u náplňových kolon. [61, s. 11] Kapilární kolony pojmou omezenou kapacitu vzorku a průtoková rychlost nosného plynu je nízká, dávkování vzorku je obtížnější než v případě náplňových kolon. Nástřík s děličem toku může být použit hlavně pro extrémně malé šířky píků při vysoké kapacitě separace a pro vzorky ve formě zředěných roztoků, detekovatelnost je omezena malou částí vzorku v koloně. Příliš se nepoužívá u méně těkavých sloučenin. Techniky nástříku bez děliče toku

byly vymyšleny k překonání některých nedostatků nástřiku s děličem toku pro analýzu směsi zředěných roztoků přeměnou velkých objemů vzorků v koloně. Průtok plynu přes dávkovač bez děliče toku je relativně pomalý a vzorky setrvávají v koloně dlouhou dobu. Odpařovací vstřikovač s programovatelnou teplotou je univerzálnější, má malou termální hmotnost umožňující rychlé ohřívání a chlazení. Pokroky v kolonové technologii umožňují vývoj studeného vstřikování vzorků do kolony, kde jsou vzorky smíchány s nosným plynem ve vstupu do kolony a následně se odpařují. Pro udržení vzorků v plynném stavu po celou dobu analýzy slouží termostat, který udržuje dostatečně vysokou teplotu (teplotu pod bodem varu analytu) dávkovače kolony a detektoru. [61, s. 12, 13] Množství dávkovaného vzorku, většinou 1 – 2 μl , závisí na typu použité kolony. [62, s. 76]

Kolona je nejdůležitější částí chromatografu, protože právě v koloně probíhá samotné dělení směsi na jednotlivé složky. V koloně je umístěna stacionární fáze, v níž jsou zadržovány jednotlivé složky směsi procházející kolonou v proudu nosného plynu. V plynové chromatografii je možnost použít náplňové nebo kapilární kolony založena na jejich síle separace, protože u náplňových kolon je širší výběr stacionárních fází, ale je limitována počtem teoretických pater. Kapilární kolony založené na adsorpci umožňují separaci složek s velmi nízkým bodem varu. [63, s. 17] Využití kapilárních kolon převažuje díky jejich lepšímu chromatografickému rozlišení. [61, s. 12] Pokud nejsou vzorky po nástřiku do kolony zadržovány stacionární fází, setrvávají v koloně po dobu ekvivalentní průchodu mobilní fáze kolonou. To odpovídá objemu, který zaujímá mobilní fáze v koloně děleného průtoku a shoduje se s časem, který rozpuštěné látky stráví v mobilní fázi, nezávisle na celkovém retenčním čase rozpuštěné látky. Složky jsou od sebe odděleny poutáním ke stacionární fázi. [63, s. 4]

Nosným plynem může být vodík, dusík, argon nebo helium. Použití jednotlivých plynů závisí na vlastnostech vzorku a inertním chování plynu vůči jeho složkám. Při výběru nosného plynu je důležitá netoxicity, bezpečnost práce a nízká cena, navíc také druh kolony a detektoru. Průtok nosného plynu zařízením může být buď stálý, nebo se může podle potřeby měnit pomocí regulačního zařízení. Součástí chromatografu také může být čistící zařízení, které odstraňuje nečistoty a nežádoucí plyny, zejména kyslík. [51, s. 11]

Oddělené složky jsou po průchodu kolonou zaznamenány detektorem signalizujícím přítomnost látek. Signál detektoru je dále zpracováván vyhodnocovacím zařízením, jehož výstupem je chromatografická křivka (chromatogram). Detektory jsou založeny na plynových ionizačních procesech, dále optických, elektrochemických a spektroskopických de-

tekčních principech. Propojení moderních detektorů s kolonami obvykle není obtížné s výjimkou rychlé plynové chromatografie, kde objem detektoru a rychlost získání dat, omezuje použití některých detektorů. Plamenový ionizační detektor má malý objem hlavy, má vysokou citlivost pro téměř všechny sloučeniny obsahující uhlík. Ostatní detektory byly vyvinuty v reakci na potřebu detekce selektivních prvků nebo struktur a umožňují analýzu cílových sloučenin o nízké koncentraci ve vzorku. [61, s. 13, 14]

3.1.3 Získávání dat

Výstupem z chromatogramu je graf obsahující tzv. píky, neboli eluční křivky, které slouží ke kvantitativní analýze vzorků. Při vyhodnocování se uplatňuje jak výška a šířka píku, tak plocha píku. Dřívější orientační měření výšky a šířky píku pro výpočet jeho plochy, nepřesné zejména pro úzké píky, bylo nahrazeno zařízeními s možností zaznamenat chromatogram současně se zpracováním výsledků, okamžitě generovat výsledky popsány v tabulkách s mnoha informacemi, zahrnující výpočet plochy píku. [61, s. 14] Někdy se můžeme setkat s dělením píků. Dělení píků způsobují stejné složky objevující se jako dva píky. Tento problém je výsledkem dvojitého nástřiku vzorků, způsobeného přítomností roztoku na vnější straně jehly, nespojitým tlakem pístu, nebo změnou tlaku v průběhu nástřiku. První dva problémy lze snadno vyřešit stíráním jehly a nástřikem kontinuálním pohybem, zatímco řešení problému se změnou tlaku může být obtížné. Dělení píků není časté, ale čas od času se objeví. [62, s. 84]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 METODY A METARIÁL

4.1 Stanovení lipolytické aktivity mikroskopických hub kultivací na Spirit Blue agaru

Pro stanovení lipolytické aktivity mikroorganismů lze využít test založený na kultivaci mikroorganismů na Petriho miskách se Spirit Blue agarem. Mikroorganismy s vysokou lipolytickou aktivitou produkují lipázy štěpící triacylglyceroly v agaru na parciální acylglyceroly a volné mastné kyseliny. Pozitivní výsledek je dán změnou barvy agaru, která je způsobena snížením pH vytvořenými volnými mastnými kyselinami.

4.1.1 Použité mikroorganismy

Použité mikroorganismy byly získány ze sbírky mikroorganismů Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí Fakulty technologické Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně. Jednalo se o kvasinky a plísně druhů *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Penicillium camemberti*, *Penicillium candidum*, *Penicillium roqueforti*, *Penicillium vulpinum*, *Rhizopus* sp. a *Saccharomyces cerevisiae*.

4.1.2 Pomůcky a materiál

Autokláv Varioklav H+P, Německo

Automatická mikropipeta Biohit a Nichipet

Denzilameter, Emo Brno, EU

Digitální váhy, OHAUS, Švýcarsko

Laboratorní pomůcky (kádinka, lžička, odměrný válec skleněné lahve, sterilní Petriho misky, sterilní zkumavky, sterilní klíčky a hokejky, sterilní špičky na mikropipety)

Magnetické míchadlo MM2A, Česká republika

Plynový kahan

Vortex Heidolph REAX top, Německo

Kultivační média

Spirit Blue Agar (Himedia)

Saboroud Dextrose Agar (Himedia)

4.1.3 Postup práce

4.1.3.1 Příprava zásobních kultur

Prvním krokem bylo oživení zmrazených kultur kultivací na miskách se Saboroud Dextrose Agarom vhodným pro kultivaci plísní a kvasinek. Zaočkované misky byly kultivovány při laboratorní teplotě po dobu 7 dnů.

Připraveny byly kultury mikroorganismů *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Mucor* sp., *Penicillium camemberti*, *Penicillium candidum*, *Penicillium roqueforti*, *Penicillium vulpinum*, *Rhizopus* a *Saccharomyces cerevisiae*. Zmrazené kultury byly očkovány vpichem (plísně) nebo křížovým roztěrem (kvasinky) na misky s kultivačním médiem.

Pro přípravu kultivačního média bylo naváženo 26 g Saboroud Dextrose Agarů do skleněné lahve a rozpuštěno ve 400 ml destilované vody. Následně bylo připravené kultivační médium sterilizováno v autoklávu při teplotě 120 °C po dobu 15 minut.

4.1.3.2 Příprava fyziologického roztoku

Fyziologický roztok byl připraven navážením 3,6 g NaCl, rozpuštěním ve 400 ml destilované vody a sterilací v autoklávu při teplotě 120 °C po dobu 15 minut.

4.1.3.3 Příprava inokula pro stanovení lipolytické aktivity

Zásobní kultury byly přeneseny do připraveného sterilního fyziologického roztoku ve zkumavkách. Suspenze byla promíchána pomocí vortexu. Množství zásobní kultury odpovídající zákalu o hodnotě 1 McFarlandovy stupnice bylo stanoveno denzilametrem.

4.1.3.4 Příprava kultivačního média pro hodnocení lipolytické aktivity plísní a kvasinek

Pro hodnocení lipolytické aktivity byl použit SBA (Spirit Blue Agar), ke kterému je nutné přidat substrát pro lipolýzu. Vhodným substrátem je dle doporučení výrobce emulze připravená z olivového oleje a Tweenu 80.

Spirit Blue agar pro hodnocení lipolytické aktivity mikroorganismů byl připraven následovně:

Bylo naváženo 12,9 g agarů a rozpuštěno ve 400 ml destilované vody. Následně byl roztok agarů sterilizován v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Substrát pro lipolýzu byl připraven rozpuštěním 0,09 ml Tween 80 v 36 ml destilované vody při zahřívání. Dále bylo přidáno 9 ml olivového oleje za současného míchání, aby došlo ke vzniku emulze.

Po ochlazení sterilního Spirit Blue Agarů na teplotu 50 °C byl přidán substrát pro lipolýzu. Výsledná emulze byla nalita na Petriho misky.

4.1.3.5 Kultivace mikroorganismů na Spirit Blue Agarů

Připravený Spirit Blue Agar byl zaočkován testovanými mikroorganismy, v případě plísní byl agar očkovan vpichem. Zaočkované misky byly kultivovány po dobu 7 dnů, během nichž byl pozorován růst kultur a změny indikující jejich lipolytickou aktivitu.

Spirit Blue je barvivo, které působí jako indikátor lipolýzy. Lipázová činidla jsou zdroje tuků, jako například bavlníková mouka, smetana, olivový olej, apod. Připravené základní médium je modrý, čirý až mírně opalizující gel. Po přidavku lipázového substrátu se v Petriho miskách vytvoří levandulově zbarvený, slabě opalizující gel. Štěpením tuků lipolyticky aktivními mikroorganismy dochází k uvolňování mastných kyselin, což vede ke snížení pH. Snížením pH dojde ke změně zbarvení Spirit Blue Agarů nebo vytvoření zón kolem kolonií mikroorganismů. Hodnota pH připraveného agarů se pohybuje mezi 6,6 - 7.

4.1.4 Výsledky a diskuze

Pro orientační stanovení lipolytické aktivity vybraných mikroorganismů byla zvolena kultivace na Spirit Blue Agarů s přidavkem lipolytického substrátu.

Z testovaných mikroorganismů vykazovaly výraznou lipolytickou aktivitu pouze druhy *Aspergillus niger* a *Penicillium camemberti*. Tyto mikroorganismy byly vyhodnoceny jako lipáza pozitivní na základě změny barvy Spirit Blue Agarů z bledě modré na výraznou tmavě modrou barvu. U ostatních testovaných mikroorganismů nebyly pozorovány výrazné barevné změny a test byl vyhodnocen jako negativní.

Navzdory negativnímu výsledku při kultivaci na Spirit Blue Agarů, lze konstatovat, že je u těchto mikroorganismů lipolytická aktivita známá a uplatňuje se v potravinářském průmyslu. Například *Penicillium camemberti* a *Penicillium roqueforti* jsou běžně využívány při výrobě potravin, zejména sýrů, kde svou lipolytickou aktivitou zajišťují tvorbu chuťových a aromatických složek během zrání.

Testovány byly dále také mikroorganismy *Penicillium candidum*, *Penicillium vulpinum*, *Rhizopus*, *Saccharomyces cerevisiae* a *Candida albicans*. U těchto mikroorganismů se také nepodařilo prokázat lipolytickou aktivitu kultivací na Spirit Blue Agarů, ačkoliv některé z těchto mikroorganismů jsou známé svou lipolytickou aktivitou. Po 7 denní kultivaci při

laboratorní teplotě byl na miskách patrný růst uvedených mikroorganismů, avšak byla zde absence zón kolem kolonií nebo změna barvy agarů.

4.1.5 Závěr

Lipolytickou aktivitu se podařilo prokázat pouze u plísní *Aspergillus niger* a *Penicillium camemberti*. U plísní a kvasinek *Penicillium vulpinum*, *Penicillium candidum*, *Penicillium roqueforti*, *Rhizopus*, *Saccharomyces cerevisiae* a *Candida albicans* byl patrný pouze růst na miskách se Spirit Blue agarem, na základě vizuálního hodnocení však nebylo možné prokázat pozitivní lipolytickou aktivitu. Tento test však lze označit spíše za orientační a metoda není příliš citlivá. Problematická může být i dostupnost tukového substrátu, vzhledem k tomu, že je potřebné zabudování olejové složky do vodného roztoku.

Pomocí kultivačního testu nelze vyvodit jak silná je lipolytická aktivita ani její bližší charakteristika. Toto orientační stanovení bylo provedeno jako předběžný test, na základě kterého byly pro sledování lipolytické aktivity s využitím plynové chromatografie, zvoleny plísně *Aspergillus niger* a *Penicillium camemberti*.

Pro další testování byl zvolen také druh *Penicillium roqueforti*, u nějž se nepodařilo prokázat lipolytickou aktivitu kultivací na SBA agaru, ale jeho lipolytická aktivita je známá tyto plísně se běžně využívají při výrobě potravin, zejména sýrů.

Kromě plísní byly dále testovány i kvasinky. *Saccharomyces cerevisiae* byla zvolena na základě uplatnění v potravinářském průmyslu. *Candida albicans* byla zvolena jako zástupce mikroorganismů, které mohou kontaminovat potraviny a způsobit jejich znehodnocení.

4.2 Stanovení lipolytické aktivity mikroskopických hub plynovou chromatografií

Mikroorganismy produkující lipázy jsou schopny štěpit triacylglyceroly na volné mastné kyseliny a parciální acylglyceroly. Množství volných mastných kyselin ve vzorku tuku vypovídá o síle lipolytické aktivity mikroorganismů a může být stanoveno plynovou chromatografií. Plynová chromatografie slouží ke kvantitativní a kvalitativní analýze vzorku a je tedy možné pomocí plynové chromatografie určit zastoupení jednotlivých mastných kyselin a jejich množství ve vzorku.

Lipolytická aktivita vybraných mikroskopických hub byla testována ve vzorcích smetany, která sloužila jednak jako médium pro kultivaci mikroorganismů a tuk obsažený ve smetaně zároveň představoval substrát pro lipolytické enzymy. V první fázi bylo nutné optimalizovat proces extrakce tuku ze vzorku. Nejprve bylo pracováno se vzorky mléka, avšak kvůli nízkému obsahu tuku v mléce a značné spotřebě rozpouštědel pro získání dostatečného množství tuku pro následnou přípravu methylesterů, byla jako médium zvolena smetana ke šlehání s 33 % tuku.

V teoretické části práce jsou zmiňovány různé metody přípravy methylesterů. Východiskem pro stanovení lipolytické aktivity byl předpoklad, že při zásaditě katalyzované esterifikaci by mělo dojít k esterifikaci vázaných mastných kyselin, zatímco volné mastné kyseliny by tímto způsobem neměly být převedeny na methylestery. Kyselina katalyzovaná esterifikace by naopak měla umožnit vznik methylesterů jak z vázaných mastných kyselin, tak i z mastných kyselin volných [64]. Pokud by tedy vzorky extrahovaného tuku byly podrobeny oběma metodám přípravy methylesterů, mohla by následná analýza plynovou chromatografií umožnit detekovat lipolýzu, během které jsou vázané mastné kyseliny uvolňovány.

4.2.1 Použité mikroorganismy

Použité mikroorganismy byly získány ze sbírky mikroorganismů Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí Fakulty technologické Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně. Pracováno bylo se zástupci mikroskopických vláknitých hub (plísní) druhů *Aspergillus niger*, *Penicillium camemberti* a *Penicillium roqueforti*, a kvasinkami *Candida albicans* a *Saccharomyces cerevisiae*.

4.2.2 Chemikálie a materiál

Amoniak vodný roztok 25 – 29 % p.a., Penta

Chloramphenicol Yeast Glucose Agar, Himedia

Destilovaná voda

Diethylether, Penta

Ethylalkohol

Heptan, SIGMA – ALDRICH

Hexan, Penta

Hydroxid draselný, mikroChem

Chlorid sodný, Penta

Kyselina sírová, Petr Lukeš

Methylalkohol, Penta

Petrolether, Petr Lukeš

Síran sodný bezvodý, Penta

Smetana ke šlehání Olma 33 % tuku

4.2.3 Pomůcky

Automatická mikropipeta PhysioCare concept eppendorf research plus

Digitální váhy Kern, Německo

Chromatograf Shimadzu GC - 14A, Japonsko

Mikrostříkačka Hamilton, Rumunsko

Laboratorní sklo a pomůcky (dělicí nálevky, filtrační papír, chladič, kádinky, nálevky, odměrné baňky 5, 10, 100, 200 ml, pipety 2, 5, 10 a 25 ml, plastové zkumavky, teploměr, varná baňka, varné kamínky)

Lednice Samsung

Magnetické míchadlo Lavat Chotutice, Česká republika

Sušárna ULM 400

Topné hnízdo LTHS 100 a THS 100, Česká republika

Vakuová odparka Heidolph Hei-Vap Advantage

Varič Eta 2107

4.2.4 Pracovní postup

4.2.4.1 Sledování růstu a množení mikroorganismů ve smetaně

Na základě první fáze praktické části práce bylo zvoleno pět různých mikroskopických hub: plísní *Aspergillus niger*, *Penicillium camemberti*, *Penicillium roqueforti* a kvasinek *Candida albicans* a *Saccharomyces cerevisiae*. Dalším krokem bylo ověření schopnosti růstu a množení těchto mikroorganismů ve vzorcích smetany s obsahem tuku 33 %. Sledován byl také průběh růstu těchto kultur v čase.

Pro hodnocení růstových schopností ve vzorku smetany byla připravena inokula jednotlivých mikroorganismů přenesením kultur do fyziologického roztoku. Po promíchání pomocí vortexu byla suspenze měřena denzimetrem a upravována zvyšováním koncentrace nebo ředěním do dosažení hodnoty zákalu 1 McFarlandovy stupnice. Následně bylo 100 µl této suspenzní kultury pipetováno do 5 ml smetany. Takto zaočkované vzorky byly kultivovány po dobu 7 dnů při laboratorní teplotě. V průběhu kultivace bylo po každých 24 hodinách odebíráno 100 µl vzorku a očkováno na Petriho misky s Chloramphenicol Yeast Glucose agarem. Kultivace probíhala při laboratorní teplotě.

U všech testovaných mikroorganismů byla kultivačně prokázána schopnost růstu a množení v prostředí smetany. Dostačený růst vykazovaly kultury po 4 dnech kultivace. Mléko, respektive smetana je díky vysokému množství vody a obsahu živin dobrým médiem pro růst mikroorganismů, zvláště plísní, které jsou vysoce přizpůsobivé okolnímu prostředí a jsou schopny růstu i za nepříznivých podmínek. Zvláště dobře se ve vzorcích smetany daří plísním rodu *Penicillium*. Pro další práci s vzorky určenými ke stanovení mastných kyselin plynovou chromatografií byla proto zvolena délka inkubace vzorku po zaočkování na 4 dny.

4.2.4.2 Příprava vzorků pro stanovení lipolytické aktivity

Prvním krokem přípravy vzorků pro stanovení mastných kyseliny plynovou chromatografií byla příprava suspenzní kultury očkováním zásobní kultury plísní *Aspergillus niger*, *Penicillium camemberti*, *Penicillium roqueforti* a kvasinek *Candida albicans* a *Saccharomyces*

cerevisiae do připraveného fyziologického roztoku. Do 50 ml sterilních plastových zkumavek bylo převedeno 30 ml smetany. Vzorek byl následně zaočkován 600 µl připravené suspenzní kultury a kultivován po dobu 4 dnů při laboratorní teplotě. Po uplynutí 4 dnů byl ze vzorku extrahován mléčný tuk.

4.2.4.3 Extrakce mléčného tuku

Bylo odváženo 10 g vzorku a vytemperováno na teplotu 38 °C. Dále byl vzorek přenesen do dělicí nálevky s přidavkem 2 ml amoniaku, 10 ml ethanolu a 25 ml diethyletheru. Následně byla směs promíchávána po dobu 1 minuty. K promíchanému vzorku bylo přidáno 25 ml petroletheru a směs byla opět promíchávána po dobu 1,5 minuty. Následně byl vzorek v dělicí nálevce ponechán při laboratorní teplotě po dobu 30 minut, během této doby došlo k oddělení fází vzorku. Po uplynutí této doby byla zakalená část vypuštěna do kádinky, naopak čirá část byla vypuštěna do varné baňky a odpařena na vakuové odparce. Zakalená část byla převedena do dělicí nálevky s přidavkem 5 ml ethanolu, 15 ml diethyletheru a po důkladném promíchání 15 ml petroletheru. Směs byla promíchána po dobu 1,5 minuty a ponechána 30 minut při laboratorní teplotě pro rozdělení fází. Po odpaření obou podílů zbyl ve varné baňce pouze extrahovaný tuk, který byl umístěn do sušárny, kde byl ponechán do druhého dne při teplotě 50 – 60 °C. [65]

4.2.4.4 Příprava methylesterů mastných kyselin

Pro přípravu methylesterů mastných kyselin byl připraven 1 M methanolickeý roztok KOH navážením 0,2805 g KOH do odměrné baňky o objemu 5 ml a rozpuštěním v methanolu. Dále byl připraven 20% roztok NaCl do odměrné baňky o objemu 100 ml navážením 20 g NaCl. Methylestery mastných kyselin byly připraveny dvěma metodami – zásaditě katalyzovanou esterifikací a kysele katalyzovanou esterifikací.

Při přípravě methylesterů zásaditě katalyzovanou esterifikací byl navážen 1 g extrahovaného tuku do varné baňky. Následně bylo přidáno 10 ml methanolu a 0,25 ml 1 M methanolickeého roztoku KOH. Směs byla zahřívána pod zpětným chladičem po dobu 30 minut. Po ukončení varu byla baňka ochlazena a její obsah převeden do dělicí nálevky. Dále byla baňka promyta 5 ml hexanu a roztok byl opět převeden do dělicí nálevky spolu s 10 ml 20% NaCl. Obsah dělicí nálevky byl řádně protřepán, vodná fáze byla oddělena do další dělicí nálevky a smíchána s 2,5 ml hexanu. Obsah byl opět protřepán a oba hexanové podíly byly spojeny a promyty 7,5 ml 20% roztoku NaCl. Hexanová fáze byla vysušena přes

bezvodý síran sodný a převedena do odměrné baňky o objemu 5 ml. Zásaditě katalyzovaná esterifikace slouží ke stanovení mastných kyselin vázaných ve formě acylglycerolů.

Pro přípravu methylesterů kyselce katalyzovanou esterifikací bylo naváženo 0,5 g extrahovaného tuku. Toto množství vzorku bylo následně smícháno s 15 ml methanolu a 0,25 ml koncentrované kyseliny sírové. Směs byla zahřívána pod zpětným chladičem po dobu 45 minut. Methylestery mastných kyselin byly dále izolovány postupem shodným se zásaditě katalyzovanou esterifikací uvedeným výše. Kyselce katalyzovanou esterifikací dojde k vytvoření methylesterů jak vázaných, tak i volných mastných kyselin. [64] Takto připravené vzorky byly následně analyzovány pomocí plynové chromatografie.

4.2.4.5 Plynová chromatografie

Pro analýzu chromatografickou analýzu vzorků byl použit plynový chromatograf Shimadzu GC-14A s plamenově-ionizačním detektorem (FID, Flame Ionization Detector). Při analýze byla použita kolona DB-wax, 30m x 0,25 mm x 0,25 μm . K vyhodnocení sloužil software CSW-32.

Podmínky pro analýzu byly nastaveny následovně:

- Teplota nástřiku (INJ) 225 °C;
- teplota detektoru (DET) 230 °C;
- teplota kolony (COL), kde byl programován gradient:
 - COL INIT TEMP 110;
 - COL INIT TIME 3,0;
 - COL PROG RATE 15;
 - COL FINAL TEMP 220;
 - COL FINAL TIME 10.
- tlak plynů:
 - dusík jako nosný plyn, který určuje průtok kolonou 2,5 kg/cm²;
 - dusík pro oplachování 0,5 kg/cm²;
 - vzduch 0,3 – 0,5 kg/cm²;
 - vodík 0,5 kg/cm².

Do injektoru byly pomocí mikrostřičky Hamilton dávkovány 2 μl jednotlivých vzorků nebo standardů. Po nástřiku vzorků byla spuštěna vlastní analýza. Pro každý vzorek byly provedeny minimálně tři nástřiky.

Výsledkem každé analýzy byl chromatogram, byly zaznamenávány hodnoty ploch a výšek píků a jejich retenční časy. Retenční časy byly porovnávány s hodnotami retenčních časů methyesterů mastných kyselin standardu a mastné kyseliny vzorku byly identifikovány. Jako standard byl použit SUPELCOTM 37 Component FAME Mix. Hodnoty retenčních časů methyesterů mastných kyselin standardu jsou uvedeny v tabulce 2.

Tab. 2: Retenční časy pro methylestery MK ve standardu SUPELCOTM 37 Component FAME Mix

Číslo píku	Retenční čas	MK	Číslo píku	Retenční čas	MK
1	-	Máselná	14	10,20	Heptadekanová
2	1,32	Kapronová	15	10,39	Heptadecenová
3	2,24	Kaprylová	16	10,90	Stearová
4	4,31	Kaprinová	17	11,10	Olejová
5	5,36	Undekanová	18	11,50	Linolová, linoelajdová
6	6,33	Laurová	19	11,80	Gama-linolenová
7	7,20	Tridekanová	20	12,40	Alfa-linolenová
8	8,04	Kristová	21	12,80	Arachová
9	8,34	Myristolejová	22	13,06	Eikosanová
10	8,8	Pentadekanová	23	13,71	Eikosadienová
11	9,1	Pentadecenová	24	14,13	Eikosatrienová, heneikosanová
12	9,52	Palmitová	25	14,55	Eikosatrienová cis 11, 14, 17
13	9,72	palmitolejová	26	14,73	Arachidonová

4.2.5 Výsledky a diskuze

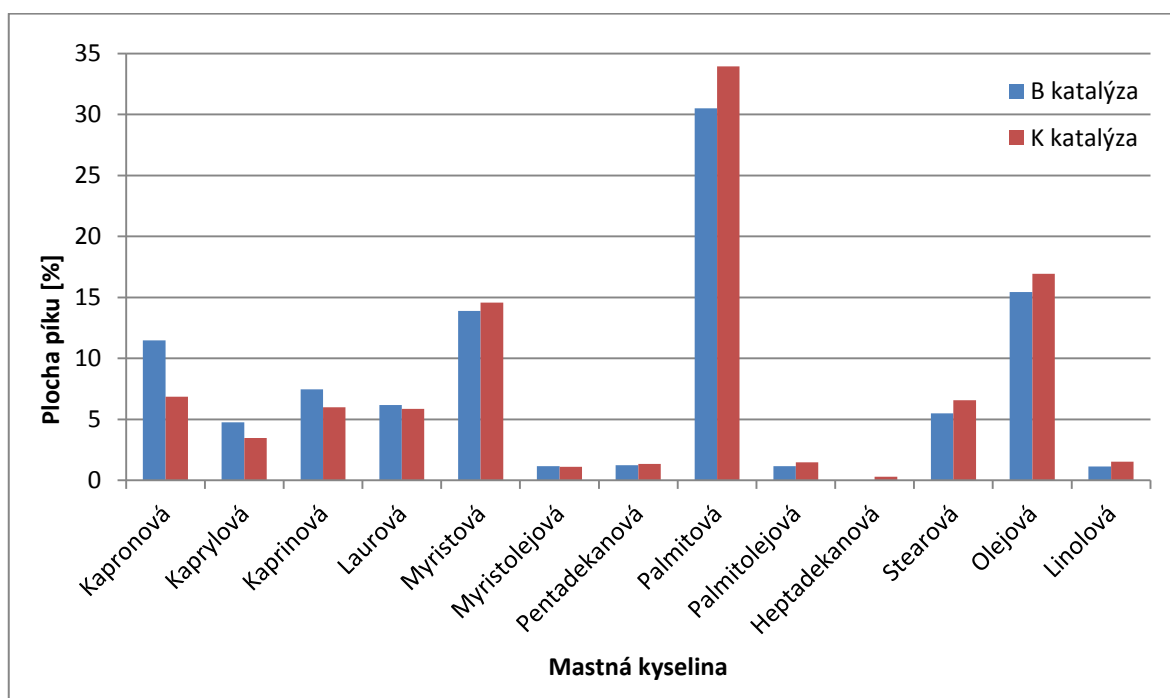
Prvními analyzovanými vzorky byly vzorky methyesterů mastných kyselin získaných ba-zicky a kyselou katalyzovanou esterifikací mléčného tuku z nezaočkované smetany.

Byla provedena kvalitativní analýza vzorků na základě srovnání získaných retenčních časů jednotlivých píků vzorku smetany a retenčních časů pro jednotlivé mastné kyseliny standardu. Ve vzorcích nezaočkované smetany bylo identifikováno 13 různých mastných kyselin. Z chromatogramů byla získána také plocha a výška elučních křivek a procentuální zastoupení jednotlivých mastných kyselin ve vzorku.

Každý vzorek byl analyzován minimálně pomocí tří opakovaných nástřiků a z takto získaných výsledků byly vypočteny průměrné hodnoty plochy jednotlivých píků a směrodatné odchylky.

Vzorky tuku extrahovaného ze smetany byly podrobeny dvojímu postupu přípravy methylesterů mastných kyselin. Bylo tedy sledováno, zda se výsledky chromatografických analýz u těchto dvou typů vzorků od sebe vzájemně liší.

4.2.5.1 Vyhodnocení zastoupení mastných kyselin ve vzorku smetany



Obr. 4: Zastoupení mastných kyselin ve vzorku smetany

Graf na obr. 4 zachycuje srovnání procentuálního zastoupení mastných kyselin ve vzorku smetany upraveném bazicky a kyselou katalyzovanou esterifikací. Kvalitativní zastoupení mastných kyselin je u vzorku připraveného bazicky a kyselou katalyzovanou esterifikací

odlišné. Vzorek methylesterů připravený kysele katalyzovanou esterifikací obsahuje navíc kyselinu heptadecenovou, která není přítomna ve vzorku methylesterů připravených bazicky katalyzovanou esterifikací, zastoupení této kyseliny ve vzorku je však velice nízké. Mastné kyseliny běžně se vyskytující v mléčném tuku jsou uvedeny v tab. 1 (strana 16). Přítomnost většiny těchto kyselin byla ve vzorku prokázána. V našich vzorcích nebyla detekována kyselina máselná, jedná se však o mastnou kyselinu s krátkým řetězcem, u které může být problematická příprava methylesterů a její obsah v mléčném tuku je poměrně nízký, pohybuje se v rozsahu 3,1-4,4 % [6, s. 429]. Shodně s literárními zdroji však byl v mléčném tuku potvrzen vysoký obsah kyseliny palmitové, olejové, a myristové. Je třeba říci, že mléčný tuk je složitý systém a jeho složení není přesně definováno. Přehled mastných kyselin běžně přítomných v mléčném tuku zpracovaný na základě různých studií se může lišit.

Pokud jde o srovnání výsledků pro bazickou a kyselou katalýzu esterifikace mastných kyselin, lze konstatovat, že procentuální zastoupení jednotlivých kyselin stanovených v těchto vzorcích se mírně liší. Při kyselé katalýze bylo zjištěno vyšší procentuální zastoupení kyseliny palmitové, palmitolejové, stearové, olejové a linolové, tedy kyselin s delším uhlíkovým řetězcem. Nižší zastoupení měly u kyselé katalýzy kyseliny s kratším řetězcem.

Podle normy ISO 12966-2:2011 dojde kysele katalyzovanou esterifikací k vytvoření methylesterů jak z vázaných, tak i volných mastných kyselin, zatímco při bazické katalýze jsou esterifikovány pouze kyseliny vázané. V mléčném tuku představují triacylglyceroly přibližně 98 %, zbylý podíl připadá na monoacylglyceroly a diacylglyceroly, volné mastné kyseliny, steroly a fosfolipidy. Ve vzorku nezaočkované smetany by tedy obsah volných mastných kyselin měl být velmi nízký a procentuální zastoupení jednotlivých kyselin u vzorků získaných kyselou i bazickou esterifikací by tedy mělo být přibližně stejné.

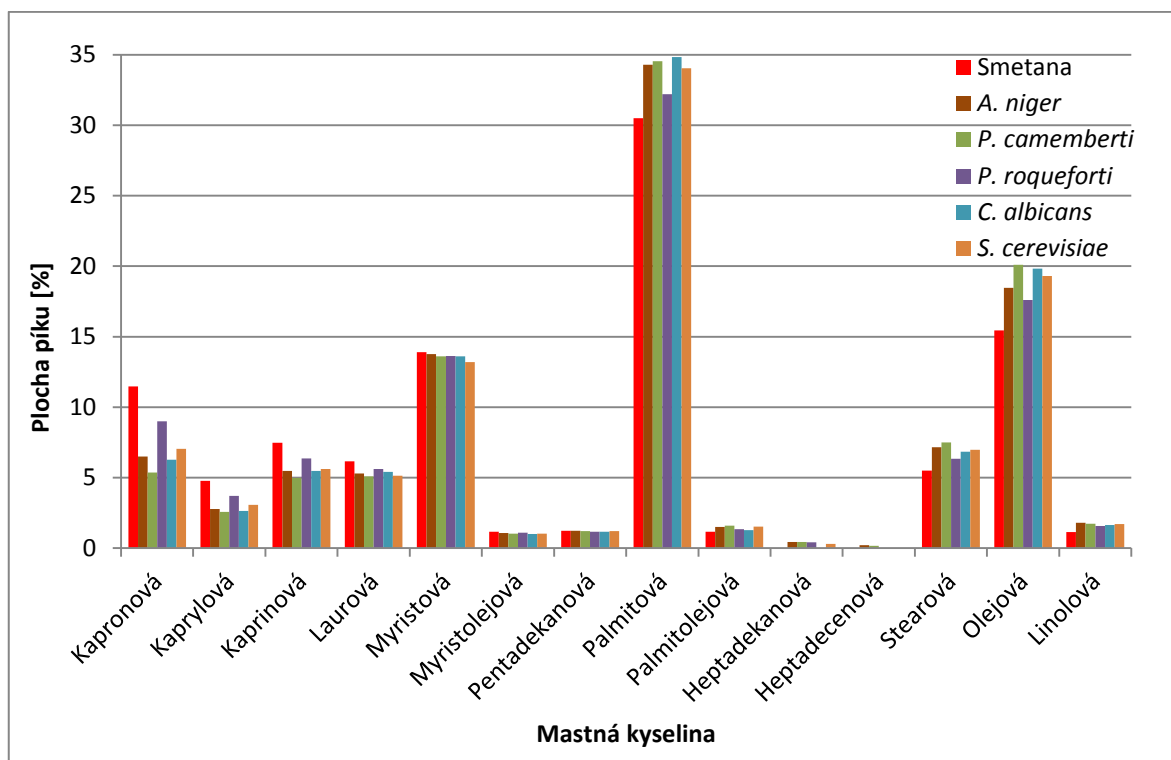
Jak již ale bylo zmíněno výše, jisté rozdíly v zastoupení kyselin přece jen pozorovány byly. Zdá se, že množství vytvořených methylesterů při kysele a bazicky katalyzované esterifikaci, může být ovlivněno charakterem a chemickou strukturou mastné kyseliny, zejména pak délkou řetězce. Množství mastných kyselin $C_4 - C_{12}$ je vyšší u vzorků připravených bazicky katalyzovanou esterifikací a tento způsob přípravy methylesterů bude pro mastné kyseliny s kratším řetězcem pravděpodobně vhodnější než esterifikace katalyzovaná kysele.

V další fázi experimentální práce bylo sledováno zastoupení mastných kyselin ve vzorcích smetany zaočkované mikroorganismy, které jsou schopny produkovat lipolytické enzymy. V těchto vzorcích lze předpokládat, že díky růstu a množení mikroorganismů a produkci lipolytických enzymů, bude docházet k hydrolýze esterových vazeb v přítomném tuku za současného uvolňování volných mastných kyselin. Bylo také sledováno, zda se zastoupení mastných kyselin ve vzorcích zaočkovaných různými druhy plísní a kvasinek vzájemně liší.

V dalším textu jsou uvedeny nejprve výsledky pro vzorky připravené bazickou katalýzou, dále pak pro vzorky připravené kyselou katalýzou a poté je na vybraném mikroorganismu provedeno srovnání výsledků odlišně připravených vzorků.

4.2.5.2 Vyhodnocení zastoupení mastných kyselin ve vzorcích připravených bazicky katalyzovanou esterifikací

Ze vzorků smetany zaočkované plísněmi a kvasinkami byl po čtyřech dnech inkubace extrahován tuk a z tohoto extraktu byly připraveny methylestery pomocí zásaditě katalyzované esterifikace. U zaočkovaných vzorků by mělo dojít ke zvýšení množství volných mastných kyselin uvolněných z triacylglycerolů působením mikrobiálních lipáz. Analyzovány byly vzorky zaočkované plísněmi *Aspergillus niger*, *Penicillium camemberti* a *Penicillium roqueforti* a také vzorky očkované kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae* a *Candida albicans*. Procentuální zastoupení jednotlivých mastných kyselin přítomných ve vzorcích zaočkovaných mikroorganismy a upravených bazicky katalyzovanou esterifikací jsou graficky znázorněny na obr. 5.



Obr. 5: Zastoupení mastných kyselin ve vzorcích připravených bazicky katalyzovanou esterifikací

Z grafu na obrázku 5 je patrné, že zastoupení mastných kyselin se u testovaných vzorků liší. Téměř shodné hodnoty u vzorků nezaočkované smetany a všech vzorků zaočkovaných různými mikroorganismy byly zjištěny například u kyseliny myristové, myristolejové nebo pentadekanové. Výraznější rozdíly v procentuálním zastoupení lze nalézt u kyseliny palmitové, olejové a kapronové. Ve vzorcích smetany s plísní *Aspergillus niger* a *Penicillium camemberti* je ve velmi malém množství přítomna kyselina heptadecenová. Naopak kyselina heptadekanová není přítomna pouze ve vzorku smetany bez přídavku mikrobiální kultury a ve vzorku smetany s přídavkem *Candida albicans*. Ostatní mastné kyseliny byly obsaženy ve všech testovaných vzorcích.

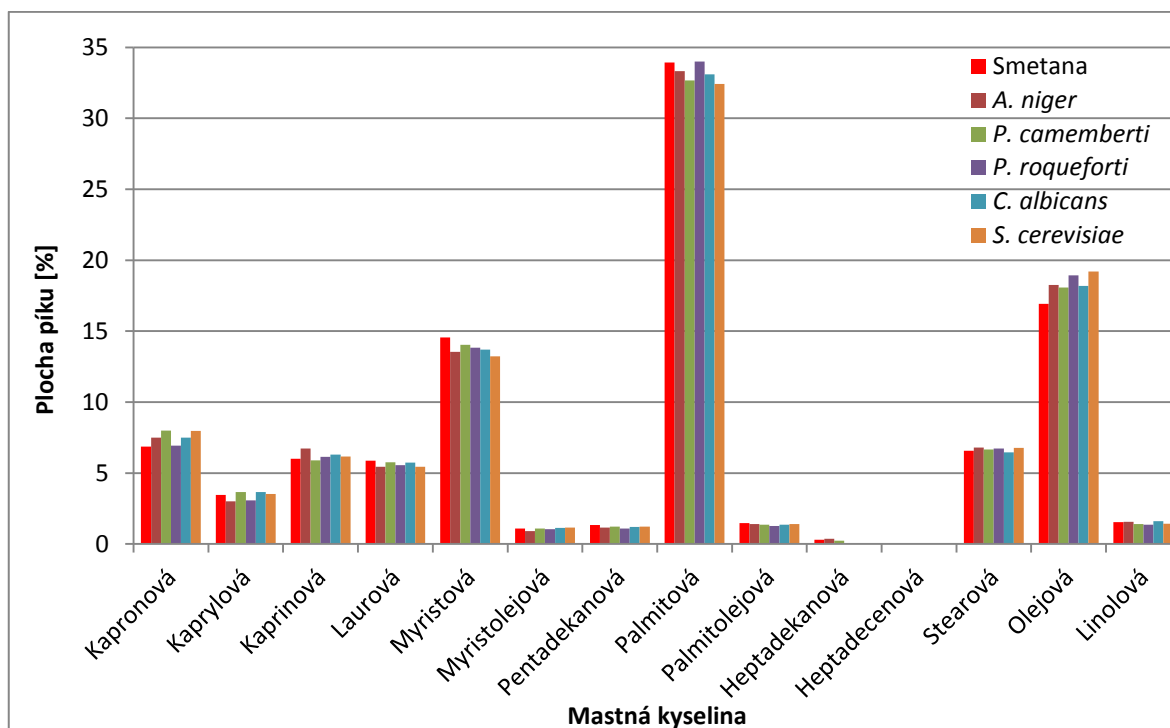
U kyselin s kratším uhlíkovým řetězcem je jejich zastoupení v nezaočkované smetaně vyšší ve srovnání se zastoupením těchto kyselin ve vzorcích smetany zaočkované mikroorganismy. Příkladem mohou být výsledky získané pro kyselinu kapronovou, v čisté smetaně je její obsah ($11,47 \pm 0,90$ %), ve smetaně zaočkované *A. niger* je to pouze ($6,50 \pm 1,56$ %), pro vzorek s *P. camemberti* je to ($5,37 \pm 0,49$ %), ve vzorku s *P. roqueforti* ($9,00 \pm 0,78$ %), pro *C. albicans* ($6,27 \pm 0,47$ %) a pro *S. cerevisiae* ($7,97 \pm 1,24$ %).

Naopak mastné kyseliny s delším řetězcem, jako je kyselina palmitová, stearová a olejová, jsou ve vzorcích s mikroorganismy více zastoupeny ve srovnání s vzorkem nezaočkované smetany.

Rozdíl v množství vázaných mastných kyselin ve vzorcích může být ovlivněn specifitou enzymů jednotlivých mikroorganismů, které mohou například štěpit mastné kyseliny vázané na krajní OH skupiny glycerolu snáze než ty vázané na OH skupinu prostřední. Aktivita enzymu může být různá pro kyseliny o různé délce a chemické struktuře řetězce.

4.2.5.3 Vyhodnocení zastoupení mastných kyselin ve vzorcích připravených kyselé katalyzovanou esterifikací

Vzorky smetany zaočkované mikroorganismy byly po inkubaci dále zpracovány, byl extrahován tuk a byly připraveny methylestery získaného mléčného tuku. Na rozdíl od výsledků uvedených v předchozí podkapitole, byla však v případě těchto vzorků provedena esterifikace katalyzovaná kyselé. Získané výsledky jsou graficky zpracovány obdobně jako v případě vzorků upravených bazicky katalyzované esterifikace a jsou uvedeny na obrázku 6. Na rozdíl od bazické katalýzy byly u kyselé katalýzy rozdíly v zastoupení jednotlivých mastných kyselin menší. Při srovnání zaočkovaných vzorků a vzorku čisté smetany lze vidět, že rozdíly v profilu mastných kyselin jsou minimální a plochy píků jednotlivých kyselin jsou velmi podobné.



Obr. 6: Zastoupení mastných kyselin ve vzorcích připravených kyselé katalyzovanou esterifikací

Dalo by se říci, že u všech vzorků je stejné množství kyseliny myristolejové, pentadekanové, palmitolejové a linolové. Zastoupení mastných kyselin ve vzorcích zaočkovaných kvasinkami a plísněmi je srovnatelné. Nejvíce je ve vzorku obsažena kyselina palmitová, stejně jako u vzorků připravených bazicky katalyzovanou esterifikací. Na druhou stranu vzorky připravené kyselé katalyzovanou esterifikací neobsahují kyselinu heptadecenovou. Kyselina heptadekanová se vyskytuje pouze u vzorků smetany bez přídavku mikroorganismů, dále smetany zaočkované plísněmi *Aspergillus niger* a *Penicillium camemberti*.

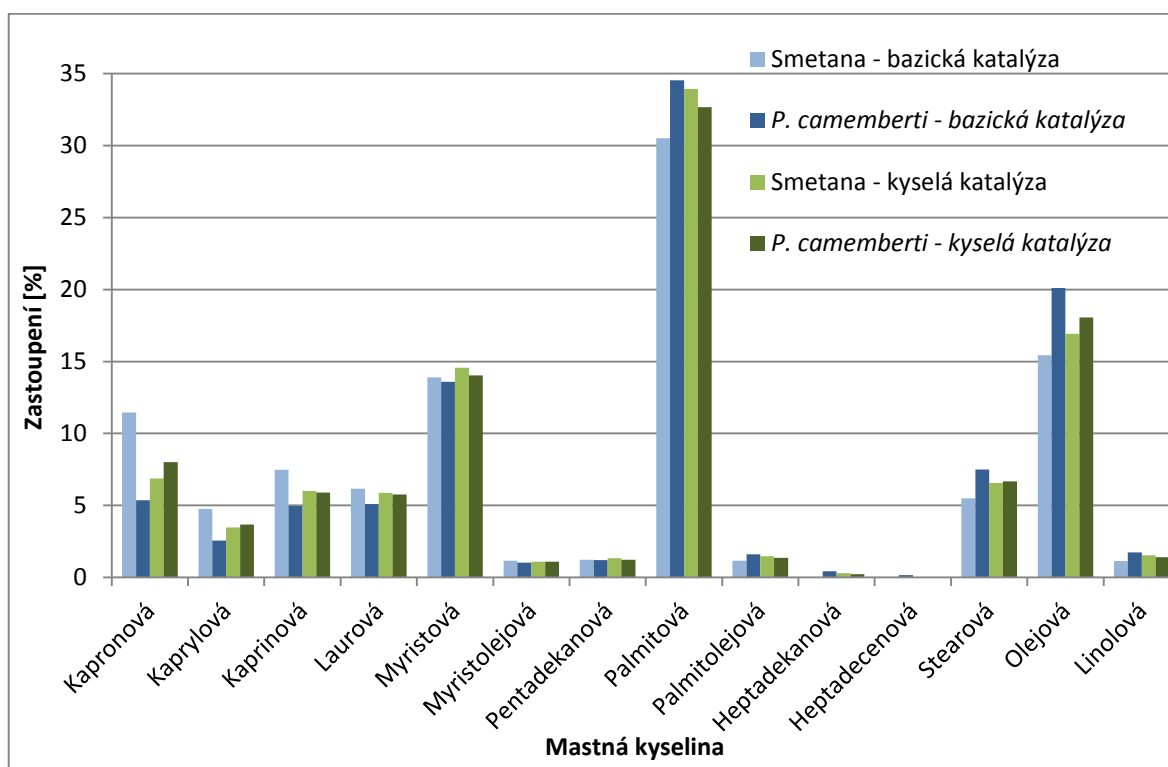
Při kyselé katalyzované esterifikaci by měly být vytvořeny methylestery vázaných ale i volných mastných kyselin. Při lipolýze by došlo ke snížení obsahu vázaných mastných kyselin za současného zvýšení obsahu kyselin volných. Vzhledem k tomu, že metoda dokáže připravit methylestery a tedy i stanovit plynovou chromatografií kyseliny volné i vázané, neměl by teoreticky být rozdíl v zastoupení jednotlivých kyselin u vzorku čisté smetany a vzorku zaočkovaného mikroorganizmy. Tento předpoklad byl získanými výsledky potvrzen.

Doposud byly porovnávány mezi sebou pouze vzorky získané jedním postupem přípravy methylesterů, tedy buď vzorky získané za katalýzy kyselé, nebo bazické. V další fázi však

bylo třeba provést srovnání profilu mastných kyselin u vzorků získaných rozdílným postupem přípravy methylesterů.

4.2.5.4 Srovnání zastoupení mastných kyselin ve vzorku smetany s plísní *Penicillium camemberti*

Na obrázku 7 je graficky znázorněno zastoupení mastných kyselin ve vzorku nezaočkované smetany získaném bazickou katalýzou, vzorku nezaočkované smetany získaném kyselou katalýzou, dále ve vzorku smetany zaočkované plísní *P. camemberti* a připraveném bazickou katalýzou a ve vzorku smetany s *P. camemberti* připraveném kyselou katalýzou.



Obr. 7: Zastoupení mastných kyselin ve vzorku smetany s plísní *P. camemberti*

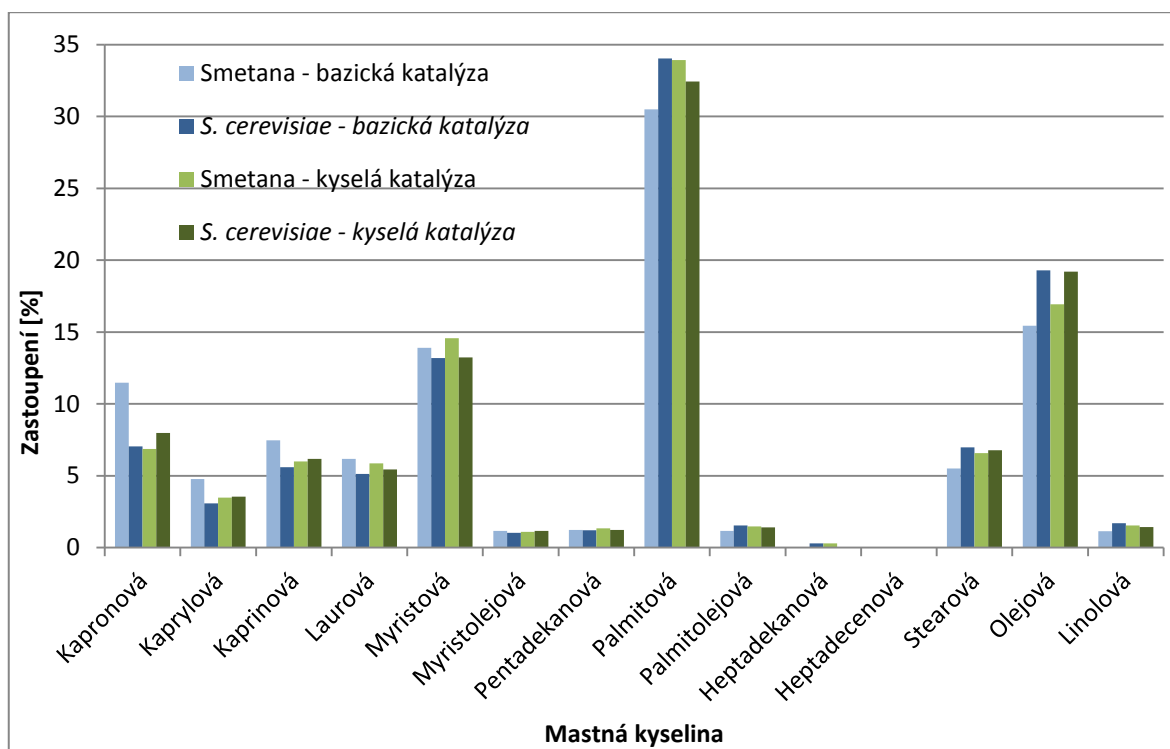
Obecně lze říci, že rozdíly v profilu mastných kyselin mezi těmito čtyřmi vzorky jsou malé, procentuální zastoupení jednotlivých kyselin se liší maximálně v jednotkách procent. Z grafu také není patrný žádný výraznější trend kromě toho, že při bazické katalýze dochází po kultivaci s mikroorganizmem k poklesu obsahu kyselin s kratším řetězcem ve prospěch vyššího zastoupení mastných kyselin s větší délkou uhlíkového řetězce.

Rozdílem v zastoupení mastných kyselin mezi vzorkem smetany bez mikroorganismů a zaočkovaným vzorkem je přítomnost kyseliny heptadecenové ve vzorku zaočkovaném plísní *Penicillium camemberti* a připraveném bazicky katalyzovanou esterifikací.

4.2.5.5 Srovnání mastných kyselin ve vzorku smetany s kvasinkou *Saccharomyces cerevisiae*

Srovnáním methylesterů připravených bazicky i kyselou katalyzovanou esterifikací vzorku smetany bez přídavku mikrobiální kultury se vzorkem smetany s přídavkem kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (obr. 8) bylo zjištěno, že kyselina heptadekanová se vyskytuje ve vzorku smetany připraveném kyselou katalyzovanou esterifikací a naopak ve vzorku zaočkovaném kvasinkou *Saccharomyces cerevisiae* se vyskytuje ve vzorku připraveném bazicky katalyzovanou esterifikací. Kyselina heptadekanová se v těchto vzorcích nenachází. Porovnáním vzorků s kvasinkami bylo zjištěno, že vzorky zaočkované kvasinkou *Candida albicans* neobsahují kyselinu heptadekanovou, ani heptadecenovou.

Podobně jako při srovnání s *P. camemberti* (obr. 7), ani u vzorků s kvasinkou *S. cerevisiae* nelze říci, že by se zastoupení mastných kyselin ve vzorcích výrazněji lišilo.



Obr. 8: Srovnání mastných kyselin ve vzorku smetany s kvasinkou *S. cerevisiae*

4.2.5.6 *Kvantitativní analýza kyseliny palmitové ve vzorcích*

V první fázi experimentální části práce byla provedena kvalitativní analýza připravených vzorků s cílem zjistit, zda se vzorky liší přítomností a především procentuálním zastoupením jednotlivých mastných kyselin. Změny v procentuálním zastoupení vypovídají o změně vzájemných poměrů množství jednotlivých detekovaných kyselin, avšak nelze hovořit přímo o změně množství vázané či volné formy konkrétní kyseliny. K tomu je potřebné provést kvantitativní analýzu jednotlivých vzorků.

Lipolýza by měla za následek snížení koncentrace methylesterů vázaných mastných kyselin, které lze připravit za podmínek bazické katalýzy. Zároveň by se ale zvýšila koncentrace methylesterů volných mastných kyselin, které lze připravit kyselé katalyzovanou esterifikací. Kyselá katalýza však vede k esterifikaci volných i vázaných mastných kyselin. Koncentrace volných mastných kyselin by byla zjištěna z rozdílu mezi koncentrací zjištěnou ve vzorku získaném kyselou katalýzou (volné + vázané) a koncentrací ve vzorku připraveném za bazické katalýzy (pouze vázané).

V první části práce bylo zjištěno, že vzorky jsou poměrně komplexní a obsahují 13 různých mastných kyselin. Pro jednodušší hodnocení byla kvantitativní analýza provedena pro konkrétní mastnou kyselinu. U všech vzorků výrazně převažuje kyselina palmitová, proto byla provedena kvantitativní analýza právě kyseliny palmitové pomocí metody kalibrační přímky. Pro vytvoření kalibrační přímky byly připraveny roztoky methylesteru kyseliny palmitové o koncentraci 1000 g/l, 500 g/l, 250 g/l, 125 g/l, 62,5 g/l.

Methylester kyseliny palmitové byl připraven kyselé katalyzovanou esterifikací a následně ředěn hexanem na požadované koncentrace. Kalibrační přímka vyjadřovala závislost plochy píku (mV/s) na koncentraci kyseliny palmitové. Z rovnice kalibrační přímky byla vypočtena koncentrace kyseliny palmitové ve vzorcích čisté smetany a smetany zaočkované jednotlivými mikroorganismy při bazické i kyselé katalýze esterifikace. Dále byla vypočtena koncentrace kyseliny palmitové ve volné formě (rozdíl koncentrací mezi stejným vzorkem připraveným bazickou a kyselou katalýzou).

Tímto způsobem bylo zjištěno, že ve všech vzorcích připravených kyselou katalýzou byla koncentrace kyseliny palmitové vyšší než ve stejných vzorcích získaných katalýzou bazickou. Tato skutečnost odpovídá předpokladu, že koncentrace získaná kyselou katalýzou představuje koncentraci kyseliny palmitové volné i vázané.

U zaočkovaných vzorků by měl být obsah volné kyseliny palmitové vyšší než u čisté smetany, pokud by došlo k lipolýze. Koncentrace volné kyseliny palmitové se ve vzorku s plísní *A. niger* zvýšila o 5,3 % oproti koncentraci v nezaočkované smetaně. U plísní rodu *Penicillium* bylo pozorováno zvýšení o 2,2 % (*Penicillium roqueforti*) a 9,3 % (*P. camemberti*). U obou testovaných kvasinek se koncentrace volné kyseliny zvýšila přibližně o 2 %.

Lze tedy konstatovat, že u všech vzorků s přidavkem mikrobiální kultury byla koncentrace volné kyseliny palmitové vyšší v porovnání se vzorkem smetany bez přidavku mikrobiální kultury. Tyto výsledky naznačují, že ve vzorcích smetany mohlo docházet ke štěpení přítomného tuku lipolytickými enzymy mikroorganismů. Bylo by však třeba výsledky ověřit dalšími testy a provést kvantitativní analýzu pro všechny mastné kyseliny přítomné ve vzorku.

4.2.6 Závěr a doporučení

Vzorky smetany zaočkované jednotlivými mikroorganismy byly vzájemně srovnány a porovnány se vzorkem smetany, do něhož nebyly přidány mikrobiální kultury. Výsledky byly hodnoceny kvalitativně a pro jednu z přítomných mastných kyselin i kvantitativně. Z kvalitativního hlediska bylo zjištěno, že zastoupení jednotlivých mastných kyselin ve vzorcích je odlišné. Vzorky se liší například obsahem kyseliny heptadekanové a heptadecenové, ty jsou však ve vzorcích přítomny ve velice malém množství. Ve všech vzorcích byla dominující a nejvíce zastoupenou mastnou kyselinou kyselina palmitová.

Bylo také zjištěno, že rozdíly v profilu mastných kyselin mezi vzorky zaočkovanými a nezaočkovanými, připravenými bazickou či kyselou katalýzou, jsou malé, procentuální zastoupení jednotlivých kyselin se liší maximálně v jednotkách procent. Zdá se ale, že při bazické katalýze dochází po kultivaci s mikroorganismem k poklesu obsahu kyselin s kratším řetězcem ve prospěch vyššího zastoupení mastných kyselin s větší délkou uhlíkového řetězce.

V další fázi byla provedena i kvantitativní analýza, pro zjednodušení pouze pro jednu z přítomných mastných kyselin, kyselinu palmitovou. U všech vzorků s přidavkem mikrobiální kultury byla koncentrace volné kyseliny palmitové vyšší v porovnání se vzorkem smetany bez přidavku mikrobiální kultury. Tyto výsledky naznačují, že ve vzorcích smetany mohlo docházet ke štěpení přítomného tuku lipolytickými enzymy mikroorganismů. Bylo by však třeba výsledky ověřit dalšími testy a provést kvantitativní analýzu pro všechny mastné kyseliny přítomné ve vzorku.

Pokud bychom vzali výsledky jako celek a nesledovali pouze dílčí části experimentů, lze konstatovat, že získaných výsledků nelze vyvodit zcela jednoznačný závěr, respektive nelze s jistotou připisovat změny v zastoupení mastných kyselin lipolytické aktivitě. Některé změny mohou být způsobeny spíše chemickou povahou vzorků. Zdá se, že množství vytvořených methylesterů při kysele a bazicky katalyzované esterifikaci, může být ovlivněno charakterem a chemickou strukturou mastné kyseliny, zejména pak délkou řetězce. Množství mastných kyselin $C_4 - C_{12}$ je vyšší u vzorků připravených bazicky katalyzovanou esterifikací a tento způsob přípravy methylesterů bude pro mastné kyseliny s kratším řetězcem pravděpodobně vhodnější než esterifikace katalyzovaná kysele.

Z těchto důvodů by bylo třeba celý postup blíže prostudovat a upravit. Metodika použitá v práci by tedy měla být dále optimalizována pro jednotlivé kroky, tedy pro extrakci tuku ze smetany, přípravu methylesterů a analýzu plynovou chromatografií.

Výtěžnost tuku při extrakci by mohla být ovlivněna stářím smetany a jejím skladováním, případně postupem provedení extrakce a dalšími faktory. Řešením by mohlo být zvolení jiného postupu extrakce nebo metody pro izolaci mléčného tuku. Problémem při analýze vzorku smetany by mohla být přítomnost tuku ve formě tukových kuliček. Porušením ochranné bariéry tukových kuliček by mohlo dojít k lepšímu kontaktu mikroorganismů s tukem a tedy k vyššímu množství volných mastných kyselin, případně vyšší výtěžnosti extrahovaného tuku.

Pro přípravu methylesterů mastných kyselin existuje řada metod. Podle normy ISO 12966-2:2011 lze pro přípravu methylesterů mastných kyselin využít čtyři různé metody a to: rychlá metoda bazicky katalyzovaná, obecná metoda bazicky nebo kysele katalyzovaná, transmethylace pomocí fluoridu boritého a alternativní kysele katalyzované transmethylace. Lepších výsledků by mohlo být dosaženo při nahrazení rychlé metody obecnou, nebo využitím transmethylace pomocí fluoridu boritého, případně zvolením kromě zmíněné ISO normy i odlišného postupu přípravy methylesterů uváděného v literatuře. Dalším krokem je analýza vzorků pomocí plynového chromatografu, která je v případě bez automatického dávkování zatížena chybou lidského faktoru. Možností odstranění chyby je využití chromatografu s automatickým dávkovačem. Otázkou je také optimální uchovávání vzorků, případně teplota, při níž jsou vzorky analyzovány. Špatným skladováním připravených methylesterů může dojít k vypadávání mastných kyselin z roztoku, vzorky se stanou nestandardními a výsledky budou zatíženy chybou. Tyto nedostatky by se daly eliminovat, pokud by byly problémy identifikovány a popsány.

Velmi zajímavým pokračováním práce by byl vývoj kultivačního média, v němž je znám charakter tukové fáze. Takové médium by mělo narozdíl od vzorku smetany definované složení acylglycerolů, které obsahují známé množství určitých mastných kyselin. Z výsledků analýzy takového kultivačního média by šlo posuzovat lipolytickou aktivitu a charakter mikrobiálních lipáz lépe než ve vzorcích s nedefinovaným složením tuků. Bylo by možné sledovat jaké mastné kyseliny a v jakých polohách jsou odštěpovány přednostně. Problémem přípravy kultivačního média je začlenění tuků do vodné fáze, nezbytným krokem při přípravě je emulgace s vhodným emulgátorem. Důležité je zvolit vhodný postup emulgace a emulgátor s vlastnostmi pro vytvoření požadované emulze. Aby nedošlo k rozpadu emulze a oddělení fází, je třeba dodat optimální množství energie, intenzity a doby působení při homogenizaci a také množství emulgátoru pro stabilizaci dispergované fáze. K přípravě emulze je možné použít nepřeborné množství homogenizačních zařízení. Při volbě homogenizačního zařízení se zohledňuje povaha výchozích surovin, objem, který má být homogenizován, požadované velikosti částic a další. Pro vytvoření kultivačního média lze využít některý z vysokorychlostních homogenizérů, běžně využívaných v laboratoři pro homogenizaci olejových a vodných složek.

ZÁVĚR

Hodnocení lipolytické aktivity bylo provedeno ve vzorcích smetany. Fermentované mléčné výrobky, zejména sýry, jsou skupinou potravin, na jejichž výrobě se podílí mikroorganismy, z důvodu tvorby sensorických vlastností působením lipáz.

Byla provedena kultivace vybraných mikroorganismů na Spirit Blue agaru s přídavkem lipolytického substrátu. Lipolytickou aktivitu při tomto testu vykazovaly druhy *Aspergillus niger* a *Penicillium camemberti*. Test však lze považovat pouze za orientační.

Pro další analýzu plynovou chromatografií byly zvoleny druhy pozitivní při kultivačním testu a navíc i další zástupci plísní a kvasinek běžně využívaných v potravinářství a zástupci plísní a kvasinek působících jako kontaminanty.

Lipolytická aktivita byla sledována ve vzorcích smetany zaočkované příslušnými mikroorganismy. Metodika zahrnovala zaočkování a inkubaci vzorků smetany, extrakci tuku ze vzorků, přípravu methylesterů mastných kyselin z extraktu a následně kvalitativní a částečnou kvantitativní analýzu připravených vzorků pomocí plynové chromatografie.

Ze získaných výsledků nelze jednoznačně určit, jestli daný mikroorganismus má, nebo nemá lipolytickou aktivitu. Dle získaných výsledků není takto navržená metoda vhodná pro stanovení lipolytické aktivity mikroorganismů. Proto byla v závěru práce formulována doporučení pro další vývoj, ověření a optimalizaci této metody.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] O'BRIEN, Richard D. *Fats and oils formulating and processing for applications: technology, utilization, and nutrition* [online]. 3rd ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2009, xi, 339 p. [cit. 2015-02-19]. ISBN 978-142-0061-673. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=3wpHj3mvra8C&printsec=frontcover&dq=Fats+and+Oils:+Formulating+and+Processing+for+Applications,+Third+Edition&hl=cs&sa=X&ei=a6XIVO-RBaj-ygPuooCQDg&ved=0CCAQ6AEwAA#v=onepage&q=Fats>

[2] LAWSON, Harry W. *Food oils and fats: technology, utilization, and nutrition* [online]. New York: Chapman, 1995, xi, 339 p. [cit. 2015-02-19]. ISBN 04-129-8841-0. Dostupné z:

<https://books.google.cz/books?id=UsSz2cFcyk0C&printsec=frontcover&dq=Food+oils+and+fats:+technology,+utilization,+and+nutrition&hl=cs&sa=X&ei=gpTIVOezJOPXyQPMtICYDA&ved=0CCAQ6AEwAA#v=onepage&q=Food%20oils%20and%20fats%3A%20technology%2C%20utilization%2C%20and%20nutrition&f=false>

[3] GUNSTONE, Frank D. *The chemistry of oils and fats sources, composition, properties and uses: technology, utilization, and nutrition* [online]. 3rd ed. Oxford: Blackwell, 2004, xi, 339 p. [cit. 2015-02-19]. ISBN 978-140-5150-026. Dostupné z:

<https://books.google.cz/books?id=KYFU7heybnwC&printsec=frontcover&dq=The+chemistry+of+oils+and+fats+sources,+composition,+properties+and+uses&hl=cs&sa=X&ei=H6blVKNHobfywORI4DgAQ&ved=0CB8Q6AEwAA#v=onepage&q=The%20chemistry%20of%20oils%20and%20fats%20sources%2C%20composition%2C%20properties%20and%20uses&f=false>

[4] GURR, M. I., HARWOOD, J. L., FRAYN, K. N. *Lipid Biochemistry: An Introduction* [online]. 5th ed. John Wiley & Sons, 2008, 336 p. [cit. 2015-05-17] ISBN 9781405172707. Dostupné z:

<https://books.google.cz/books?id=wRIkoQaCEIsC&pg=PA169&dq=GURR,+M.+I.,+HARWOOD,+J.+L.,+FRAYN,+K.+N.+Lipid+Biochemistry:+An+Introduction.&hl=cs&sa=X&ei=S4ZYVYy8F-Ot7Abv94PQCQ&ved=0CDwQ6AEwBA#v=onepage&q=GURR%2C%20M.%20I.%2C%20HARWOOD%2C%20J.%20L.%2C%20FRAYN%2C%20K.%20N.%20Lipid%20Biochemistry%3A%20An%20Introduction.&f=false>

- [5] MAROUNEK, M. Konjugovaná kyselina linolová v živočišných produktech: souvislost s výživou zvířat a zdravím lidí [online]. Praha 2007. [cit. 2015-05-17] Dostupné z: <http://www.vuzv.cz/sites/Marounek%20CLA%282%29.pdf>
- [6] NOLLET, Leo M a Fidel TOLDRÁ. *Handbook of dairy foods analysis* [online]. Boca Raton, FL: CRC Press, 2010, xviii, 900 p. [cit. 2015-02-23]. ISBN 14-200-4631-4. Dostupné z: <http://books.google.cz/books?id=UPEGQsTbjQYC&pg=PA432&dq=lipolytic+activity&hl=cs&sa=X&ei=jy7jU4SFMyo7Qakq4DYCw&ved=0CDUQ6AEwAw#v=onepage&q=lipolytic%20activity&f=false>
- [7] ZEGARSKA, Zofia. Milk Lipids. [online]. In: Zdzislaw E . Sikorski and Anna Kolakowska. *Chemical and Functional Properties of Food Lipids*. CRC Press 2002 [cit. 2015-03-19]. DOI: 10.1201/9781420031997.ch13. Dostupné z: <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9781420031997.ch13>
- [8] JENSEN Robert G. The Composition of Bovine Milk Lipids: January 1995 to December 2000. *Journal of Dairy Science* [online] 2002 Vol. 85, Issue 2, p. 295 – 350 [cit. 2015-05-17]. ISSN: 0022-0302. Dostupné z: <http://ovidsp.tx.ovid.com.proxy.k.utb.cz/sp-3.15.1b/ovidweb.cgi?&S=PFNIFPBBIODDHKFGNCKKPGFBHABPAA00&Complete+Reference=S.sh.18|1|1>
- [9] VÉLEZ, M.A., M.C. PEROTTI, I.V. WOLF, E.R. HYNES a C.A. ZALAZAR. Influence of milk pretreatment on production of free fatty acids and volatile compounds in hard cheeses: Heat treatment and mechanical agitation. *Journal of Dairy Science* [online]. 2010, vol. 93, issue 10, s. 4545-4554 [cit. 2015-03-02]. DOI: 10.3168/jds.2010-3352. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030210004856>
- [10] WALSTRA, P. *Dairy technology principles of milk properties and processes* [online]. New York: Marcel Dekker, 1999 [cit. 2015-03-02]. ISBN 978-082-4746-414. Dostupné z: http://www.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=zdn2bMRhZc4C&oi=fnd&pg=PP1&dq=The+flavour+of+milk+and+dairy+products&ots=Hez4AKR-oM&sig=ao_K5ufmijbWyivgoHER5KtglWI&redir_esc=y#v=onepage&q=The%20flavour%20of%20milk%20and%20dairy%20products&f=false
- [11] LAW, B.A. *Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk* [online]. 2nd ed. Burlington: Blackie Academic, 1997 [cit. 2015-03-18]. ISBN 07-514-0346-6. Dostupné z: http://www.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=zdn2bMRhZc4C&oi=fnd&pg=PP1&dq=The+flavour+of+milk+and+dairy+products&ots=Hez4AKR-oM&sig=ao_K5ufmijbWyivgoHER5KtglWI&redir_esc=y#v=onepage&q=The%20flavour%20of%20milk%20and%20dairy%20products&f=false

z:<https://books.google.cz/books?id=wsDkBwAAQBAJ&pg=PA50&dq=Microbiology+and+biochemistry+of+cheese+and+fermented+milk&hl=cs&sa=X&ei=mt1HVergD8WTsAG4jYCADQ&ved=0CCAQ6AEwAA#v=onepage&q=Microbiology%20and%20biochemistry%20of%20cheese%20and%20fermented%20milk&f=false>

[12] EDITORS, Bhavbhuti M a E EVRANUZ. *Fermentation effects on food properties* [online]. Boca Raton: Taylor, 2012, xvi, 798 p. [cit. 2015-03-18]. ISBN 978-143-9853-351. Dostupné z: <http://www.crcnetbase.com.proxy.k.utb.cz/isbn/978-1-4398-5334-4>

[13] MARILLEY, L. Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology* [online]. Elsevier, 2004-01-15, vol. 90, issue 2, s. 139-159 [cit. 2015-03-12]. DOI: 10.1016/S0168-1605(03)00304-0. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160503003040>

[14] HASSAN, A.N. a J.F. FRANK. MICROORGANISMS ASSOCIATED WITH MILK. *Encyclopedia of Dairy Sciences* [online]. Elsevier, 2011, s. 447 [cit. 2015-02-16]. DOI: 10.1016/B978-0-12-374407-4.00309-5. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123744074003095>

[15] EDITOR-IN-CHIEF, Moselio Schaechter. *Encyclopedia of microbiology* [online]. 3rd ed. S.l.: Elsevier, 2009 [cit. 2015-02-02]. ISBN 01-237-3944-6. Dostupné z: https://books.google.cz/books?id=rLhdW5YzuO4C&printsec=frontcover&dq=Encyclopedia+of+microbiology+Moselio+Schaechter&hl=cs&sa=X&ei=GeBHVY_MFMOysQG-8IHAYag&ved=0CB8Q6AEwAA#v=onepage&q=Encyclopedia%20of%20microbiology%20Moselio%20Schaechter&f=false

[16] Potravinářská mikrobiologie III. Distanční text.

[17] CHAMBA, J a E JAMET. Contribution to the safety assessment of technological microflora found in fermented dairy products. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2008-09-01, vol. 126, issue 3, s. 263-266. [cit. 2015-05-12] DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160507004308>

[18] ÖZER, Barbaros a Gulsun AKDEMIR-EVRENDILEK. *Dairy microbiology and biochemistry: recent developments* [online]. S.l.: Apple Academic Press Inc, 2014, pages cm [cit. 2015-02-10]. ISBN 978-148-2235-029. Dostupné z: [google.cz/books?id=bZ5BBAAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=Dairy+microbiology+and+](https://books.google.cz/books?id=bZ5BBAAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=Dairy+microbiology+and+)

biochemis-

try:+recent+developments&hl=cs&sa=X&ei=GN9HVdvgHoWZsAGFvoHACQ&ved=0CB8Q6AEwAA#v=onepage&q=Dairy microbiology and biochemistry%3A recent developments&f=false

[19] ABEIJON MUKDSI, M. C., H. FALENTIN, M.-B. MAILLARD, V. CHUAT, R. B. MEDINA, S. PARAYRE a A. THIERRY. The Secreted Esterase of *Propionibacterium freudenreichii* Has a Major Role in Cheese Lipolysis [online]. *Applied and Environmental Microbiology*. 2014-01-02, vol. 80, issue 2, s. 751-756. [cit. 2015-05-12] DOI: 10.1128/AEM.03640-13. Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.03640-13>

[20] TALBOT, Geoff. Science and Technology of Enrobed and Filled Chocolate, Confectionery and Bakery Products. [online]. Woodhead Publishing 2009 [cit. 2015-02-19]. ISBN 978-1-84-569643-6. Dostupné z: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpSTEFCCB1/science-technology-enrobed>

[21] Edited by Y.H. Hui ... [et al]. Handbook of food and beverage fermentation technology [online]. New York: Marcel Dekker, 2005. [cit. 2015-05-17] ISBN 08-247-5122-1. Dostupné z: https://books.google.cz/books?id=uV2Oi0g_TB4C&printsec=frontcover&dq=handbook+of+food+and+beverage+fermentation+technology&hl=cs&sa=X&ei=6ioJVc7bJMneao_1gtgC&ved=0CB8Q6AEwAA#v=onepage&q=handbook%20of%20food%20and%20beverage%20fermentation%20technology&f=false

[22] JELEN, Henryk. *Food flavors: chemical, sensory and technological properties* [online]. Boca Raton: CRC Press/Taylor, 2012, xii, 492 p. [cit. 2015-03-02]. ISBN 9781439814918. Dostupné z: https://books.google.cz/books?id=LPKQuJLzn5MC&pg=PA86&dq=lipolytic+activity+of+molds&hl=cs&sa=X&ei=RBr0VLeTJ5flap-6gIgN&redir_esc=y#v=onepage&q=lipolytic%20activity%20of%20molds&f=false

[23] CHEN, L., R.M. DANIEL a T. COOLBEAR. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *International Dairy Journal* [online]. 2003, vol. 13, issue 4, s. 255-275 [cit. 2015-03-10]. DOI: 10.1016/S0958-6946(02)00171-1. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694602001711>

[24] IONITA, Ana, M. MOSCOVICI, Cristina POPA, A. VAMANU, O. POPA a Laura DINU. Screening of yeast and fungal strains for lipolytic potential and determination of

some biochemical properties of microbial lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* [online]. 1997, vol. 3, 1-4, s. 147-151 [cit. 2015-03-05]. DOI: 10.1016/S1381-1177(96)00044-6. Dostupné z:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1381117796000446>

[25] KRAFT, Allen A. *Psychrotrophic bacteria in foods: disease and spoilage* [online]. Boca Raton: CRC Press, c1992, 274 p. [cit. 2015-02-23]. ISBN 08-493-4872-2. Dostupné z:

<https://books.google.cz/books?id=pczoPJMYNoQC&pg=PA134&dq=lipolytic+activity&hl=cs&sa=X&ei=gNrqVPytMoXwoATgioL4Dg&ved=0CCgQ6AEwAQ#v=onepage&q=lipolytic%20activity&f=false>

[26] KAPTUROWSKA, Agata Urszula, Izabela Agnieszka STOLARZEWICZ, Jolanta KRZYCZKOWSKA a Ewa BIAŁECKA-FLORJAŃCZYK. Studies on the lipolytic activity of sonicated enzymes from *Yarrowia lipolytica*. *Ultrasonics Sonochemistry* [online]. 2012, vol. 19, issue 1, s. 186-191 [cit. 2015-03-17]. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2011.06.015. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1350417711001374>

[27] MCSWEENEY, P L H. The flavour of milk and dairy products: III. Cheese. *International Journal of Dairy Technology* [online]. 1997, vol. 50, issue 4, s. 123-128 [cit. 2015-03-01]. DOI: 10.1111/j.1471-0307.1997.tb01752.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1471-0307.1997.tb01752.x>

[28] URBACH, G. The flavour of milk and dairy products: II. Cheese. *International Journal of Dairy Technology* [online]. 1997, vol. 50, issue 3, s. 79-89 [cit. 2015-03-01]. DOI: 10.1111/j.1471-0307.1997.tb01743.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1471-0307.1997.tb01743.x>

[29] NEVIANI, Erasmo, Cinzia CAGGIA a Randazzo CINZIA LUCIA. *Cheese ripening: quality, safety and health aspects* [online]. Hauppauge, NY: Nova Science Publishers, Inc., 2013, p. cm. [cit. 2015-05-12] ISBN 978-162-4170-324. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=o1CeMQEACAAJ&dq=Cheese+ripening:+quality,+safety+and+health+aspects&hl=cs&sa=X&ei=Ag9JVeLXIMWBU-qPgegI&ved=0CCAQ6AEwAA>

[30] WOUTERS, Jan T.M, Eman H.E AYAD, Jeroen HUGENHOLTZ a Gerrit SMIT. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*. 2002,

vol. 12, 2-3, s. 91-109. [cit. 2015-05-12] DOI: 10.1016/S0958-6946(01)00151-0. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694601001510>

[31] EARLY, Ed. by Ralph. *The technology of dairy products* [online]. 2. ed. London [u.a.]: Blackie Acad. Professional, 1998. [2015-05-12] ISBN 07-514-0344-X.

Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=BuR28Y-S4SMC&printsec=frontcover&dq=The+technology+of+dairy+products&hl=cs&sa=X&ei=jQ9JVZiUOMzzUvmMgFA&ved=0CCkQ6AEwAA#v=onepage&q=The%20technology%20of%20dairy%20products&f=false>

[32] ARORA, Dilip K, K MUKERJI a Elmer H MARTH. *Foods and feeds* [online]. New York, N.Y.: M. Dekker, c1991, x, 621 p. [2015-05-12] ISBN 08-247-8491-X. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=u4PShkRejw0C&printsec=frontcover&dq=Foods+and+feeds&hl=cs&sa=X&ei=NhFJVbqvO4fSUyi0gPgC&ved=0CCAQ6AEwAA#v=onepage&q=Foods%20and%20feeds&f=false>

[33] LAW, Barry A. a A. Y. TAMIME. *Technology of Cheesemaking: Society of Dairy Technology series* [online]. 2. vyd. John Wiley & Sons, 2011. [2015-05-12] ISBN 9781444347890. Dostupné z:

<https://books.google.cz/books?id=Turm77IMxnUC&printsec=frontcover&dq=Technology+of+Cheesemaking:+Society+of+Dairy+Technology+series&hl=cs&sa=X&ei=1RFJVdrxJ8PaUcO5gFg&ved=0CCAQ6AEwAA#v=onepage&q=Technology%20of%20Cheesemaking%3A%20Society%20of%20Dairy%20Technology%20series&f=false>

[34] LARSEN, Mette Dines a Karina JENSEN. The effects of environmental conditions on the lipolytic activity of strains of *Penicillium roqueforti*. *International Journal of Food Microbiology*. 1999, vol. 46, issue 2, s. 159-166. [2015-05-12] DOI: 10.1016/S0168-1605(98)00191-3. Dostupné z:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160598001913>

[35] YALÇIN, Seda Karasu, Sule Senses ERGÜL a Z. Yeşim ÖZBAŞ. PEYNİR MİKROFLORASINDAKİ MAYALARIN ÖNEMİ. *GIDA / The Journal of FOOD* [online]. 2011, vol. 36, issue 1, s. 55-62 [cit. 2014-12-29]. Dostupné z: <http://www.cabi.org.proxy.k.utb.cz/cabdirect/FullTextPDF/2011/20113090091.pdf>

[36] ÇAKMAKCI, Songul, Ali A HAYALOĞLU, Elif DAGDEMİR, Bulent CETİN, Mustafa GURSES, Deren TAHMAS-KAHYAĞLU a A. THIERRY. Effects of *Penicillium roqueforti* and whey cheese on gross composition, microbiology and proteolysis of

mould-ripened Civil cheese during ripening. *International Journal of Dairy Technology*. 2014, vol. 67, issue 4, s. 594-603. [2015-05-12] DOI: 10.1111/1471-0307.12156. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/1471-0307.12156>

[37] FERNANDES, Rhea. *Microbiology handbook*. Cambridge: Leatherhead Pub., and Royal Society of Chemistry, 2009, xiii, 173 p. ISBN 19-052-2462-1.

[38] ADAMS, M a M MOSS. *Food microbiology*. 3rd ed. Cambridge, UK: RSC Publishing, 2008, xiv, 463 p. ISBN 08-540-4284-9.

[39] PRANDINI, A., G. TANSINI, S. SIGOLO, L. FILIPPI, M. LAPORTA a G. PIVA. On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2009, vol. 47, issue 5, s. 984-991 [cit. 2015-02-15]. DOI: 10.1016/j.fct.2007.10.005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691507004668>

[40] FOX, Patrick F., Paul L. H. MCSWEENEY, Timothy M. COGAN a Timothy P. GUINEE. *Cheese, chemistry, physics and microbiology* [online]. 3rd ed. Burlington: Elsevier, 2004 [cit. 2015-02-13]. ISBN 978-008-0500-935.

Dostupné z:

http://books.google.cz/books?id=a95C5Nza5_EC&pg=PA376&dq=lipolytic+activity&hl=cs&sa=X&ei=XYMRVJPrLKXMygOmxoAQ&ved=0CEMQ6AEwBQ#v=onepage&q=lipolytic%20activity&f=false

[41] BATT, Carl A. *Encyclopedia of food microbiology*. 2nd edition. 2014. ISBN 01-238-4733-8.

[42] DOBSON, A.D.W. Yeasts and Molds | *Aspergillus flavus*. *Encyclopedia of Dairy Sciences* [online]. Elsevier, 2011, s. 785 [cit. 2015-02-05]. DOI: 10.1016/B978-0-12-374407-4.00367-8. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123744074003678>

[43] SARIYAR, Leyla, Dilek HEPERKAN, D.V. GOKHALE, A. VAMANU, O. POPA a Laura DINU. The role of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* in the hydrolysis of hazelnut fat. *International Journal of Food Science and Technology* [online]. 2003, vol. 38, issue 4, s. 487-492 [cit. 2015-03-05]. DOI: 10.1046/j.1365-2621.2003.00702.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2621.2003.00702.x>

- [44] SØRHAUG, T. Yeasts and Molds | Spoilage Molds in Dairy Products. *Encyclopedia of Dairy Sciences* [online]. Elsevier, 2011, s. 780 [cit. 2015-02-11]. DOI: 10.1016/B978-0-12-374407-4.00366-6. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123744074003666>
- [45] PRANDINI, A., G. TANSINI, S. SIGOLO, L. FILIPPI, M. LAPORTA a G. PIVA. On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2009, vol. 47, issue 5, s. 984-991 [cit. 2015-02-15]. DOI: 10.1016/j.fct.2007.10.005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691507004668>
- [46] BÜCHL, N.R. a H. SEILER. YEASTS AND MOLDS | Yeasts in Milk and Dairy Products. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences* [online]. Elsevier, 2011, s. 744 [cit. 2015-02-08]. ISBN 9780123744074. DOI: 10.1016/B978-0-12-374407-4.00498-2. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123744074004982>
- [47] JAKOBSEN, Mogens a Judy NARVHUS. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *International Dairy Journal* [online]. 1996, vol. 6, 8-9, s. 755-768 [cit. 2015-02-15]. DOI: 10.1016/0958-6946(95)00071-2. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0958694695000712>
- [48] SUTHERLAND, J.B., C. CORNELISON a S.A. CROW. CANDIDA | *Yarrowia lipolytica* (*Candida lipolytica*). *Encyclopedia of Food Microbiology* [online]. Elsevier, 2014, s. 374 [cit. 2015-02-09]. DOI: 10.1016/B978-0-12-384730-0.00056-2. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123847300000562>
- [49] ZINJARDE, Smita S. Food-related applications of *Yarrowia lipolytica*. *Food Chemistry* [online]. 2014, vol. 152, s. 1-10 [cit. 2015-02-09]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.11.117. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814613018050>
- [50] DEETH, H. C a V. TOUCH. Methods for detecting lipase activity in milk and milk products. *The Australian journal of dairy technology / Australian Society of Dairy Technology* [online]. 2000, vol. 55, 3, s. 153-168 [cit. 2015-03-10]. ISSN 0004-9433. Dostupné z: <http://ovidsp.tx.ovid.com.proxy.k.utb.cz/sp-3.14.0b/ovidweb.cgi>
- [51] KLOUDA, Pavel. Moderní analytické metody. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 132 s. ISBN 80-863-6907-2

- [52] SCOTT, Raymond P. *Techniques and practice of chromatography* [online]. New York: M. Dekker, 1995, xii, 395 p. Chromatographic science, v. 70. [cit. 2015-05-12] ISBN 08-247-9460-5. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=h2xtsFd6y7MC&printsec=frontcover&dq=techniques+and+practice+of+chromatography&hl=cs&sa=X&ei=RlhSVbioAceUsAGlrYGwCg&ved=0CCgQ6AEwAA#v=onepage&q=techniques%20and%20practice%20of%20chromatography&f=false>
- [53] ETTRE, Bruno Kolb and Leslie S. *Static Headspace-Gas Chromatography Theory and Practice* [online]. 2nd ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2006. [cit. 2015-05-12] ISBN 9780471914563. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=nGPmpb4VvEgC&printsec=frontcover&dq=Static+Headspace-Gas+Chromatography+Theory+and+Practice&hl=cs&sa=X&ei=v1ISVZ3aAoyuswHKz4GQCA&ved=0CC4Q6AEwAA#v=onepage&q=Static%20Headspace-Gas%20Chromatography%20Theory%20and%20Practice&f=false>
- [54] STUART, Brian. *Gas chromatography* [online]. Cambridge, U.K.: Royal Society of Chemistry, 2003, viii, 36 p. [cit. 2015-03-16]. ISBN 08-540-4478-7. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=wVkz6Lei2dYc&printsec=frontcover&dq=gas+chromatography&hl=cs&sa=X&ei=zZQGvdWgEJPqaOPBgbgP&sqi=2&ved=0CFUQ6AEwBQ#v=onepage&q=gas%20chromatography&f=false>
- [55] EDITED BY ALAN J. HANDLEY, Alan J. Edward R. *Gas chromatographic techniques and applications* [online]. Boca Raton, FL: CRC Press, 2000. [cit. 2015-05-12] ISBN 08-493-0514-4. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=FNhFBhwgeqUC&printsec=frontcover&dq=editions:9of8A7g670gC&hl=cs&sa=X&ei=ymFSVdLzNIG7sQGdtoHwBg&ved=0CB8Q6AEwAA#v=onepage&q&f=false>
- [56] DEETH, H.C. Milk Lipids | Lipolysis and Hydrolytic Rancidity. *Encyclopedia of Dairy Sciences* [online]. Elsevier, 2011, vol. 16, issue 6, s. 721 [cit. 2015-03-12]. DOI: 10.1016/B978-0-12-374407-4.00343-5. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123744074003435>
- [57] STEFANOV, I., B. VLAEMINCK a V. FIEVEZ. A novel procedure for routine milk fat extraction based on dichloromethane. *Journal of Food Composition and Analysis* [onli-

ne]. 2010, vol. 23, issue 8, s. 852-855 [cit. 2015-03-15]. DOI: 10.1016/j.jfca.2010.03.016.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889157510001626>

[58] FENG, S., A.L. LOCK a P.C. GARNSWORTHY. Technical Note: A Rapid Lipid Separation Method for Determining Fatty Acid Composition of Milk. *Journal of Dairy Science* [online]. 2004, vol. 87, issue 11, s. 3785-3788 [cit. 2015-03-15]. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73517-1. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030204735171>

[59] PETROVIĆ, Marinko, Nataša KEZIĆ a Vesna BOLANČA. Optimization of the GC method for routine analysis of the fatty acid profile in several food samples. *Food Chemistry* [online]. 2010, vol. 122, issue 1, s. 285-291 [cit. 2015-03-10]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.02.018. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814610001822>

[60] TRIGUEROS, Lorena, Esther SENDRA a P.C. GARNSWORTHY. Fatty acid and conjugated linoleic acid (CLA) content in fermented milks as assessed by direct methylation: A Rapid Lipid Separation Method for Determining Fatty Acid Composition of Milk. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2015, vol. 60, issue 1, s. 315-319 [cit. 2015-03-15]. DOI: 10.1016/j.lwt.2014.09.053. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643814006094>

[61] POOLE, Colin F. *Gas chromatography* [online]. 1st ed. Amsterdam: Elsevier, 2012. [cit. 2015-05-12] ISBN 01-238-5540-3. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=O77061hwfd4C&printsec=frontcover&dq=gas+chromatography&hl=cs&sa=X&ei=IO00VZ2tKYHzsgHNkYGYCw&ved=0CC0Q6AEwAA#v=onepage&q=gas%20chromatography&f=false>

[62] POPPITI, James A. *Practical techniques for laboratory analysis* [online]. Boca Raton: Lewis Publishers, 1994, 188 p. [cit. 2015-05-12] ISBN 0873713613. Dostupné z: https://books.google.cz/books?id=XMW6JsJrLK4C&printsec=frontcover&dq=Practical+techniques+for+laboratory+analysis&hl=cs&sa=X&ei=TGtSVd_gBMA6swHEg4DICw&ved=0CCAQ6AEwAA#v=onepage&q=Practical%20techniques%20for%20laboratory%20analysis&f=false

[63] BRUNER, Fabrizio. *Gas chromatographic environmental analysis: principles, techniques, instrumentation* [online]. New York: VCH, 233 s. [cit. 2015-05-12] ISBN 15-608-1011-4. Dostupné z:

//books.google.cz/books?id=QVagjKBAqR8C&printsec=frontcover&dq=Gas+chromatographic+environmental+analysis:+principles,+techniques,+instrumentation&hl=cs&sa=X&ei=w2xSVaaDAYqesAH6ygE&ved=0CCIQ6AEwAA#v=onepage&q=Gas chromatographic environmental analysis%3A principles%2C techniques%2C instrumentation&f=false

[64] ISO 12966-2:2011. *Animal and vegetable fats and oils -- Gas chromatography of fatty acid methyl esters -- Part 2: Preparation of methyl esters of fatty acids*. 1. vyd.

[65] ČSN EN ISO 1211. *Mléko – stanovení obsahu tuku – Vážková metoda (Referenční metoda)*.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

CFU/ml	Množství životaschopných buněk v 1 ml vzorku (Colony Forming Units)
CLA	Konjugovaná kyselina linolová (Conjugated Linoleic Acid)
KOH	Hydroxid draselný
LAB	Bakterie mléčného kvašení (Lactic Acid Bacteria)
MK	Mastná kyselina
NaCl	Chlorid sodný
SBA	Spirit Blue agar
Tween 80	Neionický tenzid

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1: Schéma vzniku chuťových sloučenin [13]</i>	19
<i>Obr. 2: Možné zdroje mikroorganismů kontaminujících mléko [14, s. 448]</i>	20
<i>Obr. 3: Zastoupení mikroorganismů běžně přítomných v mléku [14, s. 449].....</i>	21
<i>Obr. 4: Zastoupení mastných kyselin ve vzorku smetany</i>	50
<i>Obr. 5: Zastoupení mastných kyselin ve vzorcích připravených bazicky katalyzovanou esterifikací</i>	53
<i>Obr. 6: Zastoupení mastných kyselin ve vzorcích připravených kysele katalyzovanou esterifikací</i>	55
<i>Obr. 7: Zastoupení mastných kyselin ve vzorku smetany s plísní <i>P. camemberti</i>.....</i>	56
<i>Obr. 8: Srovnání mastných kyselin ve vzorku smetany s kvasinkou <i>S. cerevisiae</i></i>	57

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1: Mastné kyseliny přítomné v mléčném tuku [6, s. 429].....</i>	<i>16</i>
<i>Tab. 2: Retenční časy pro methylestery MK ve standardu SUPELCOTM 37 Component FAME Mix.....</i>	<i>49</i>

