

# **Analýza proteinového profilu u vybraných mléčných výrobků**

Ludmila Marcoňová

---

Bakalářská práce  
2023



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav chemie

Akademický rok: 2022/2023

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Ludmila Marchoňová  
Osobní číslo: T20639  
Studijní program: B0721A210002 Technologie a hodnocení potravin  
Specializace: Chemie a analýza potravin  
Forma studia: Prezenční  
Téma práce: Analýza proteinového profilu u vybraných mléčných výrobků

## Zásady pro vypracování

### I. Teoretická část

Charakteristika proteinů a peptidů přítomných v mléčných produktech

Složení a výroba vybraných mléčných produktů

Možnosti stanovení proteinů

### II. Praktická část

Zavedení metodiky a optimalizace elektroforetických metod pro stanovení proteinů ve vybraných mléčných produktech

Příprava vzorků a stanovení proteinového profilu

Zpracování výsledků a formulace závěrů práce

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

Seznam doporučené literatury:

1. Del Nobile, M.A., Chillo, S., Falcone, P.M., Laverse, J., Pati, S., Baiano, A. Textural changes of Canestrello Pugliese cheese measured during storage. *Journal of Food Science*. 2007, 83, 621-628.
2. Sharma, N., Sharma, R., Rajput Y.S., Mann, B., Singh R., Gandhi, K. Separation methods for milk proteins on polyacrylamide gel electrophoresis: Critical analysis and options for better resolution. *International Dairy Journal*. 2021, 114, 104920.
3. Sousa, M.J., Ardo, Y., McSweeney, P.L.H. Advance in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*. 2001, 11, 327-345.

Ve doci bakalářské práce: **Mgr. Lucie Klementová**  
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce: **31. prosince 2022**

Termín odevzdání bakalářské práce: **19. května 2023**

L.S.

---

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

---

**doc. Ing. Michal Rouchal, Ph.D.**  
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 28. února 2023

## PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji 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;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užit své dílo – 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);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a vědeckým účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem 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.

**Prohlašuji,**

- že jsem na bakalářské práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....  
podpis studenta

## **ABSTRAKT**

Proteiny jsou nepostradatelnou součástí ve výživě člověka. Byla provedena analýza proteinového profilu tří šarží sýrů v průběhu jejich výroby a zrání. K analýze byly použity dvě šarže sýrů vyrobených v technologických laboratořích a jedna šarže sýrů vyrobená v domácích podmínkách. K vytvoření proteinových profilů byla použita metoda SDS-PAGE. Na základě analýzy byla potvrzena degradace proteinů, zejména kaseinů, na menší proteiny a peptidy při vzniku sýřeniny a v průběhu zrání sýru.

Jednotlivé šarže se významně nelišily i přesto, že u sýrů z laboratoří šlo o polotvrdé sýry, zatímco u sýrů z domácích podmínek šlo o měkké čerstvé sýry. Největší rozdíl vykazovala šarže sýrů vyrobených v domácích podmínkách, kde byly pozorovány navíc proteiny o molekulové hmotnosti přibližně 12 kDa, které se v ostatních šaržích nevyskytovaly.

Klíčová slova: protein, sýr, mléko, SDS-PAGE

## **ABSTRACT**

Proteins are an indispensable component in human nutrition. An analysis of the protein profile of three batches of cheeses during their production and maturation was carried out. Two batches of cheese produced in technological laboratories and one batch of cheese produced in domestic conditions were used for the analysis. The SDS-PAGE method was used to generate protein profiles. The analysis confirmed the degradation of proteins, in especially caseins, into smaller proteins and peptides during curd formation and during cheese maturation.

The individual batches did not differ significantly, even though the laboratory cheeses were semi-hard cheeses, whereas the domestic cheeses were soft fresh cheeses. The largest difference was observed in the batch of cheese produced under home conditions, where extra proteins with a molecular weight of approximately 12 kDa were observed, which were not present in the other batches.

Keywords: protein, cheese, milk, SDS-PAGE

Tímto bych velmi ráda poděkovala Mgr. Lucii Klementové za odborné vedení této bakalářské práce, cenné rady a připomínky při vypracování. Další poděkování patří Ústavu ochrany životního prostředí za poskytnutí prostoru pro provedení praktické části této bakalářské práce a Ing. Vendule Kůrové a Mgr. Richardu Adámkovi, Ph.D. za poskytnutí sýrů k analýze.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>10</b>
<b>1 PROTEINY</b> .....	<b>11</b>
1.1 FUNKCE A VLASTNOSTI PROTEINŮ .....	12
1.2 STRUKTURA PROTEINŮ .....	13
1.2.1 Primární struktura.....	13
1.2.2 Sekundární struktura .....	14
1.2.3 Terciální struktura .....	15
1.2.4 Kvartérní struktura .....	16
<b>2 PROTEINY V MLÉČNÝCH PRODUKTECH</b> .....	<b>17</b>
2.1 MLÉKO .....	17
2.2 SÝR .....	20
2.2.1 Složení sýrů .....	20
2.2.2 Technologie výroby sýrů.....	21
<b>3 METODY STANOVENÍ BÍLKOVIN</b> .....	<b>23</b>
3.1 STANOVENÍ BIURETOVOU METODOU .....	23
3.3 STANOVENÍ METODOU BRADFORDOVÉ.....	23
3.4 STANOVENÍ METODOU DLE KJELDAHLA .....	24
3.5 ELEKTROFORETICKÉ METODY .....	25
3.5.1 Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu .....	25
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>27</b>
<b>4 CÍL PRÁCE</b> .....	<b>28</b>
<b>5 METODIKA PRÁCE</b> .....	<b>29</b>
5.1 ROZTOKY PRO SDS-PAGE .....	29
5.2 VZORKY .....	30
5.2.1 Zpracování vzorků čerstvého mléka a syrovátky .....	31
5.2.2 Zpracování vzorků sýru a sýřeniny .....	31
5.4 ELEKTROFORÉZA.....	32
5.4.1 Sestavení aparatury .....	32
5.4.2 Příprava gelu .....	32
5.4.3 Úprava vzorků před elektroforézou .....	33
5.4.4 Nanesení vzorku na gel a vlastní elektroforéza.....	34
5.5.1 Barvení gelu pomocí Coomassie Brilliant Blue .....	34
5.5.2 Barvení gelu stříbrem .....	34
<b>6 VÝSLEDKY</b> .....	<b>36</b>
6.1 STANOVENÍ KONCENTRACE PROTEINŮ METODOU BRADFORDOVÉ.....	36
6.2 OPTIMALIZACE PŘÍPRAVY STANDARDŮ A VZORKŮ .....	37

6.3	VÝSLEDKY STANOVENÍ PROTEINOVÉHO PROFILU V PRŮBĚHU VÝROBY A ZRÁNÍ SÝRŮ .....	39
<b>7</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>45</b>
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>47</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>48</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>51</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>52</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>53</b>



## ÚVOD

Proteiny jsou základní složkou potravy a jejich příjem je pro organismus velice důležitý. Hrají klíčovou roli v regulaci příjmu potravy prostřednictvím sytosti související s termogenezí vyvolanou dietou. Jsou důležité pro regulaci tělesné hmotnosti svým vlivem na termogenezi a složení těla. [1]

Proteiny obsažené v potravinách mohou být živočišného či rostlinného původu. Živočišné proteiny jsou většinou plnohodnotné, což znamená, že obsahují esenciální aminokyseliny v dostatečném množství. Jejich biologická hodnota se pohybuje okolo 95 %. [2]

Stavebními kameny jsou aminokyseliny, které splňují několik životně důležitých funkcí. Zajišťují strukturu a funkci tkání z hlediska podpůrných struktur, enzymů a mediátorového působení. Některé z aminokyselin splňují funkci důležitých modulátorů v tkáních, bílkoviny a polypeptidy jsou složkami imunitních reakcí, dále plní funkci substrátů přenášejících a uchovávajících informace a zajišťování koordinace mezi orgánovými funkcemi. Jde o rozsáhlý a spolehlivý zdroj energie i v situaci, kdy zisk energie ze sacharidů a lipidů není dostačující. [3]

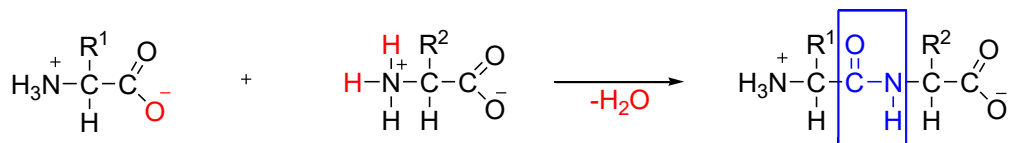
Výroba sýra zahrnuje destabilizaci kaseinové micely v mléce enzymatickou hydrolýzou  $\kappa$ -kaseinové vrstvy, okyselením na izoelektrický bod kaseinu nebo kombinací snížení pH a vysoké teploty. Za vhodných podmínek podléhají destabilizované micely agregaci za vzniku gelu, který je dehydratován na sýřeninu. Následně v průběhu zrání sýrů dochází k degradaci kaseinů na jednodušší peptidy až aminokyseliny, čímž se zvyšuje jejich stravitelnost. [4]

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

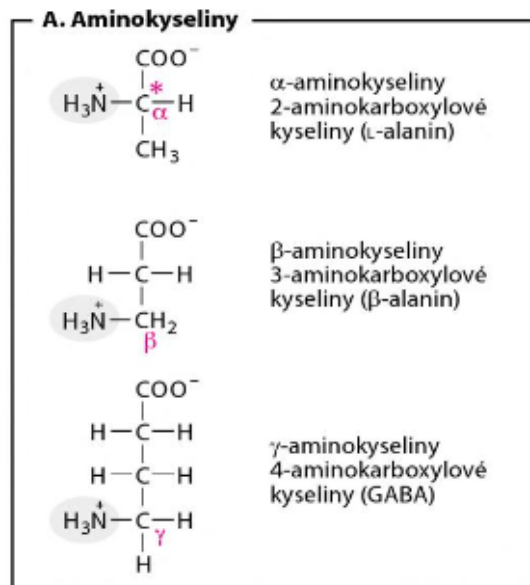
## 1 PROTEINY

Proteiny neboli bílkoviny jsou biopolymery, které plní základní funkce živých organismů. Základní stavební jednotkou proteinů jsou aminokyseliny, které jsou propojeny do polypeptidového řetězce peptidovou vazbou zobrazenou na Obrázku 1. Podle pozice aminoskupiny rozlišujeme  $\alpha$ -aminokyseliny (většina přirozeně se vyskytujících),  $\beta$ -aminokyseliny ( $\beta$ -alanin) a  $\gamma$ -aminokyseliny (GABA) znázorněné na Obrázku 2. Geneticky je kódováno 20 proteinogenních aminokyselin, které se přirozeně vyskytují jako L-aminokyseliny. Podle druhu postranního řetězce se aminokyseliny dělí na:

- S alifatickým řetězcem (glycin, alanin, valin, leucin, izoleucin)
- Kyselé (kyselina asparagová, kyselina glutamová)
- Basické (arginin, lysin)
- Neutrální (serin, threonin, asparagin, glutamin)
- Aromatické a s  $-OH$  skupinou (histidin, fenylalanin, tyrosin, tryptofan)
- Sírné (methionin, cystein)
- Iminokyseliny (prolin). [5]



Obrázek 1: Vznik peptidové vazby [6]



Obrázek 2: Dělení aminokyselin podle polohy aminoskupiny [5]

Kondenzací do 10 aminokyselin se vzniklé látky označují jako oligopeptidy, do 100 aminokyselin poté jako polypeptidy. Kondenzací více jak 100 aminokyselin vznikají látky označující se jako proteiny (bílkoviny). Proteiny se dále dělí na jednoduché obsahující pouze aminokyseliny, a složené, obsahující navíc nebílkovinnou složku. Mezi složené proteiny patří např. fosfoproteiny, v nichž je esterově vázána kyselina fosforečná a patří sem například kasein nebo fosvitin. Dalšími zástupci jsou chromoproteiny obsahující nějaký pigment (hemoglobin, hemocyanin), metaloproteiny obsahující iont kovu, který je buď přenášen, nebo se uskládá (transferin, ferritin), nukleoproteiny obsahující nukleovou kyselinu (histony v buněčných jádrech), glykoproteiny obsahující glykosidově vázaný sacharid (kolagen) a lipoproteiny obsahující lipidovou složku (LDL, HDL). [6]

## 1.1 Funkce a vlastnosti proteinů

Proteiny plní řadu nejrůznějších funkcí v organismu. Některé z nich jsou stavebním materiálem a takové proteiny se nazývají strukturní. Další skupinou jsou enzymy, které mají katalytickou funkci. Mezi další funkce proteinů patří například regulační (hormony), obranná (imunoglobulin), zásobní (kasein, ovalbumin), transportní (hemoglobin, transferin) nebo kontraktilní (zajišťující pohyb – aktin, myosin).

Bílkoviny se svými vlastnostmi vzájemně liší. Některé z nich jsou rozpustné ve vodě (například albuminy – v čisté vodě, globuliny – ve zředěných roztocích solí), které mají většinou globulární (kulatý) tvar. Tento tvar je dán svinutím polypeptidového řetězce

do klubička tak, že hydrofobní nepolární skupiny jsou svinuty do středu globule, zatímco hydrofilní polární skupiny k povrchu globule. Naproti tomu bílkoviny nerozpustné ve vodě se vyznačují fibrilárním (neboli vláknitým) tvarem jako například aktin nebo myosin [7].

Jednotlivé proteiny jsou náchylné na změnu teploty, pH nebo polaritu prostředí. Rozrušení struktury bílkoviny neboli denaturace má za následek dočasnou nebo úplnou ztrátu její funkce. Denaturace je změna sekundární, terciální a kvartérní struktury, při které dojde k narušení slabých vazebných interakcí a k rozvolnění polypeptidového řetězce. Je způsobena fyzikálními nebo chemickými vlivy (pH, teplota, změna polaritu prostředí) a může se projevit například ztrátou biologické aktivity, případně snížením rozpustnosti. Narušení struktury bílkoviny může být nevratné, ale i vratné způsobenou vlivem denaturačního činidla. Při odstranění denaturačního činidla (např. močoviny) dochází následně k renaturaci, při které se molekula bílkoviny vrátí do původního nativního stavu a obnově biologické aktivity. [8]

## 1.2 Struktura proteinů

Pořadí aminokyselin v bílkovině je dáno genetickou informací. Některé aminokyseliny se v polypeptidovém řetězci mohou několikrát po sobě opakovat, jiné mohou být zastoupeny vícekrát než ostatní a další nemusí být zastoupeny vůbec. Jádrem struktury peptidů a bílkovin je páteř peptidového řetězce, v níž se stále opakuje uspořádání –CO-NH-C $\alpha$ -. Na C $\alpha$ -atomy této páteře oddělující jednotlivé peptidové vazby, jsou navázány postranní řetězce jednotlivých aminokyselin lišící se druhem a vlastnostmi. Pro charakterizaci proteinů je důležitá především znalost zastoupení jednotlivých aminokyselin. V řadě případů je však nezbytná také znalost detailnější struktury proteinů.

Rozeznávají se 4 úrovně struktury:

- a) primární
- b) sekundární
- c) terciální
- d) kvarterní. [8]

### 1.2.1 Primární struktura

Primární struktura bílkovin je dána pořadím jednotlivých aminokyselin v řetězci bílkoviny. Podmiňuje vlastnosti bílkovin a struktura rovněž předurčuje vyšší stupeň

organizace prostorového uspořádání molekuly. Aminokyseliny jsou do polypeptidového řetězce řazeny na základě genetického kódu. [9] Genetická informace je uložena v DNA (deoxyribonukleová kyselina) a transkripcí se přepisuje do mRNA (mediátorová ribonukleová kyselina). Během následné translace, která probíhá na buněčných organelách zvaných ribozomy, je mRNA využita jako šablona pro překlad genetické informace do sekvence aminokyselin. [10] Ribozomy jsou složeny ze dvou podjednotek, menší a větší. Obsahují ribozomální RNA (rRNA) a proteiny. Mezi podjednotky ribozomu se při translaci napojuje mRNA nesoucí genetickou informaci, na kterou na základě komplementarity nasedá tRNA (transferová RNA) nesoucí příslušnou aminokyselinu a tím dochází k vzniku polypeptidového řetězce. [11]

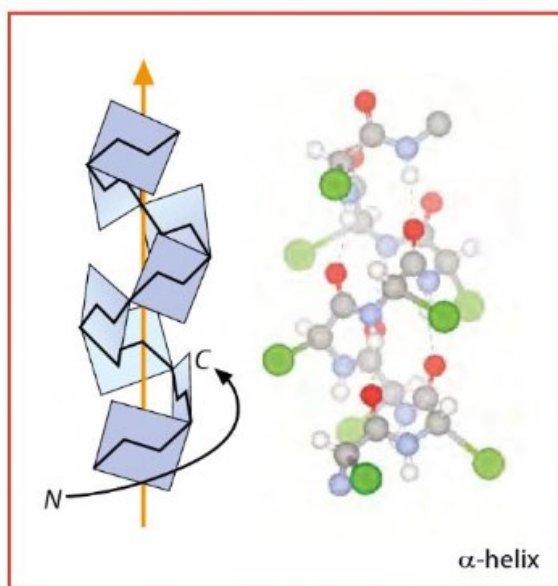
### 1.2.2 Sekundární struktura

Sekundární struktura vypovídá o geometrickém uspořádání polypeptidického řetězce. Polypeptidové řetězce jsou schopny vytvářet různé typy struktur, což vyplývá z rozložení atomů nebo skupin atomů obsažených v postranních řetězcích, které jsou schopny tvořit nekovalentní interakce s atomy téhož polypeptidového řetězce nebo jiných. Mezi nekovalentní interakce patří iontová vazba mezi aminoskupinou a karboxylovou skupinou. Dále vodíková vazba, která vzniká buď mezi CO-skupinou jedné peptidové vazby a NH-skupinou jiné peptidové vazby ve stejném polypeptidovém řetězci nebo mezi různými polypeptidovými řetězci, nebo mezi hydroxylovou skupinou v postranním řetězci a karboxylovou skupinou jiné aminokyseliny. Polární skupiny postranních řetězců aminokyselin reagují s vodou reakcí zvanou hydratace. Hydrofobní interakce vznikají mezi hydrofobními skupinami. Nositeli jsou nepolární části molekul s malou afinitou k vodě projevující tendenci k asociaci, a tím dochází k vzrůstu entropie v důsledku změn v uspořádání molekul vody obklopující nepolární skupiny. [9]

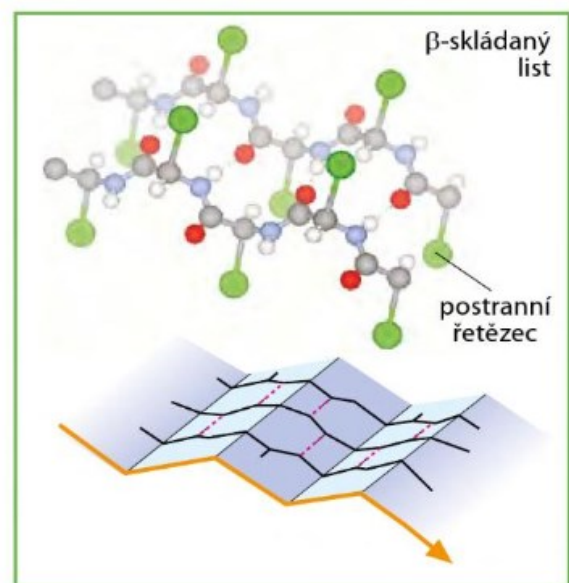
Proces vytváření sekundární struktury se nazývá sbalování (folding) proteinu. Probíhá již během syntézy na ribozomu, kdy vlivem nekovalentních interakcí dochází ke sbalování proteinu do uvedených struktur. Jednotlivé části bílkoviny mohou mít strukturu skládaného listu ( $\beta$ -skládaný list), či pravotočivé šroubovice ( $\alpha$ -helix). U  $\alpha$ -helix dochází ke vzniku vodíkových vazeb mezi CO- a NH-skupinami peptidových vazeb stočeného polypeptidového řetězce. Na každý závit šroubovice připadají v průměru dvě vodíkové vazby, které jsou uspořádané paralelně s osou šroubovice. Stabilita šroubovice roste s počtem vodíkových vazeb. Na jeden její závit připadá 3,6 zbytku aminokyselin.  $\alpha$ -helix si lze představit jako válec, ze kterého směrem ven trčí postranní řetězce, což je patrné

na Obrázku 3(A). Druhým typem sekundární struktury je  $\beta$ -skládaný list. Úseky nataženého polypeptidového řetězce o pěti až deseti aminokyselinách jsou položeny vedle sebe a spojeny vodíkovými vazbami mezi CO- a NH-skupinami peptidových vazeb, což lze pozorovat na Obrázku 3 (B). Postranní řetězce aminokyselin vyčnívají kolmo k rovině listu. Do této struktury se může poskládat jeden nebo více polypeptidových řetězců.  $\beta$ -struktura se schematicky vyznačuje plochou šipkou, zatímco  $\alpha$ -helix válečkem. [12]

(A)



(B)



Obrázek 3: Sekundární struktura –  $\alpha$ -helix (A),  $\beta$ -skládaný list (B) [5]

### 1.2.3 Terciální struktura

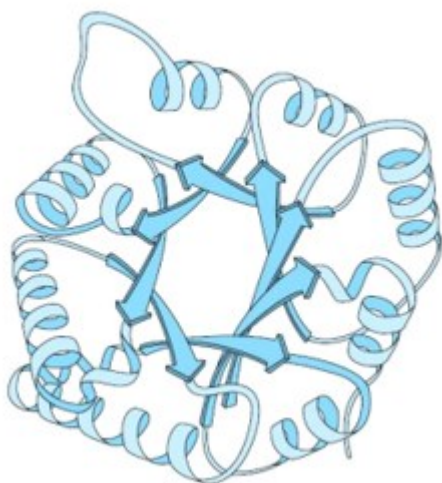
Terciální struktura, která je znázorněna na Obrázku 4 (A), je dána uspořádáním skládaného listu či pravotočivé šroubovice do konečného prostorového tvaru molekuly bílkoviny. Tato struktura může být buď fibrilární, ve které převažují uspořádané segmenty typu  $\alpha$ -šroubovice nebo  $\beta$ -struktury či globulární, ve které se střídají uspořádané  $\alpha$ -šroubovice a  $\beta$ -struktury s ostatními částmi proteinu tak, že vytvoří kompaktní klubko kulovitěho tvaru. Kromě vodíkových vazeb se na této struktuře podílejí i iontové vazby, disulfidické vazby nebo Van der Waalsovy síly. Spojením různých polypeptidových řetězců vodíkovými vazbami vznikají fibrilární (vláknité) proteiny. Jsou-li však těmito vazbami vázány části téhož řetězce, má protein globulární strukturu. Významnou roli zde uplatňují

především nekovalentní interakce postranních řetězců aminokyselin a jejich charakter. Každá postranní skupina se snaží zaujmout energeticky co nejvýhodnější prostorové uspořádání. [13]

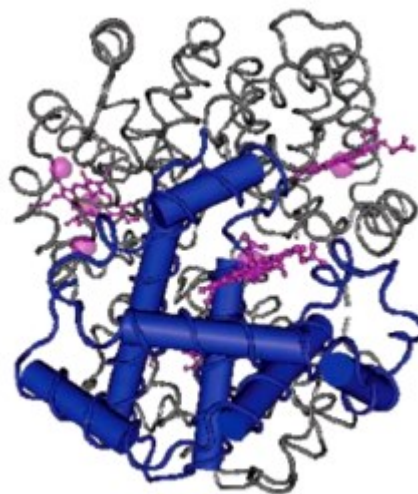
#### 1.2.4 Kvartérní struktura

Kvartérní struktura zobrazená na Obrázku 4 (B) vypovídá o možném vzájemném prostorovém uspořádání podjednotek. Jde o oligomerní proteiny složené z několika podjednotek (protomerů). Jeden protomer představuje polypeptidový řetězec. Tyto protomery samy o sobě mnohdy nejsou biologicky aktivní. Mohou snadno disociovat (štěpit se) a zpětně se spojovat - tyto reakce jsou vratné a rovnovážné. Síly podílející se na kvartérní struktuře mají nekovalentní charakter. [14]

(A)



(B)



Obrázek 4: Terciární struktura (A) [11], kvartérní struktura (B) [15]



## 2 PROTEINY V MLÉČNÝCH PRODUKTECH

### 2.1 Mléko

Mlékem se podle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1308/2013 rozumí výhradně běžná tekutina vylučovaná mléčnou žlázou získaná z jednoho nebo více dojení bez toho, aby se do ní cokoli přidávalo nebo z ní odebíralo. [16]

V mléce je obsažena především voda, dále pak laktosa, tuky, bílkoviny, minerální látky, vitaminy a některé enzymy. Přibližný obsah jednotlivých složek je zaznamenán v Tabulce 1. [17]

Tabulka 1: Přibližné složení mléka [17]

Látka	Obsah [%]
Voda	87
Laktosa	4,6
Tuky	4
Bílkoviny	3,25
Minerální látky	0,65
Kyseliny (citronová, mravenčí, octová, mléčná)	0,18

Bílkoviny tvoří velmi významnou součást mléčné sušiny. Jsou v mléce jemně rozptýleny a tvoří tak pravý koloidní roztok. Jejich obsah v mléce závisí především na plemenu dojnic a na jejich zdravotním stavu. Největší podíl bílkovin kravského mléka je tvořen kaseinem, který představuje 80 – 90 % všech mléčných bílkovin. Kasein je komplex fosfoproteinů, který lze vysrážet snížením pH na 4,6 při teplotě okolo 20 °C nebo použitím vhodného syřidla. [18]

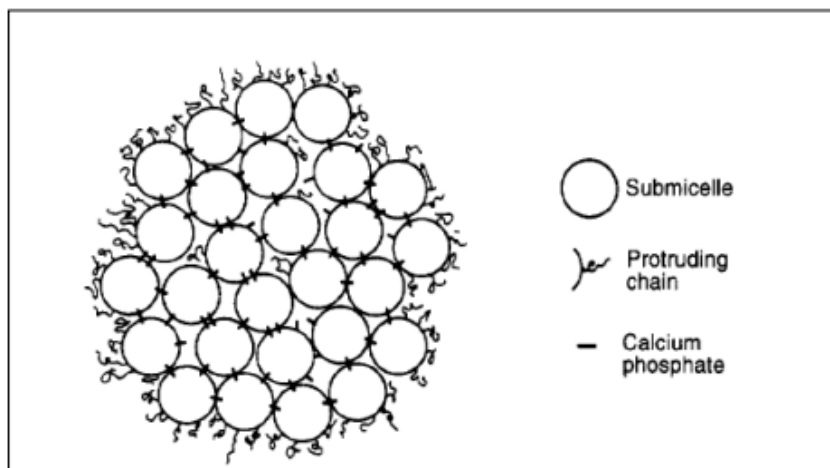
Mléko skotu obsahuje čtyři různé frakce kaseinu, a to konkrétně  $\alpha_{S1}$ -kasein,  $\alpha_{S2}$ -kasein,  $\beta$ -kasein a  $\kappa$ -kasein.  $\alpha_{S1}$ -kasein obsahuje nejvíce fosforu a je hlavní složkou kaseinové frakce.  $\alpha_{S1}$ -kasein je velice citlivý na přítomnost vápenatých iontů a tvoří s nimi nerozpustnou sůl. Jeho primární struktura je tvořena 199 aminokyselinami, zatímco

u  $\alpha_{S2}$ -kaseinu 207 aminokyselinami.  $\beta$ -kasein tvoří s vápenatými ionty také nerozpustnou sůl, ale pouze při teplotách vyšších než 1 °C. Jeho primární struktura obsahuje 209 aminokyselin.  $\kappa$ -kasein je glykoprotein, který slouží především jako stabilizátor  $\alpha_S$ -kaseinu a  $\beta$ -kaseinu v přítomnosti iontů vápníku, v jejichž přítomnosti tvoří rozpustné soli. Jeho primární struktura obsahuje 169 aminokyselin. Molekulové hmotnosti jednotlivých frakcí jsou uvedeny v Tabulce 2. [19]

Tabulka 2: Molekulová hmotnost frakcí kaseinu [19]

<b>Bílkoviny</b>	<b>Molekulová hmotnost [Da]</b>
$\alpha_{S1}$ -kasein	23 614
$\alpha_{S2}$ -kasein	25 230
$\beta$ -kasein	23 983
$\kappa$ -kasein	19 007

Kvůli vysokému obsahu prolinu mají kaseiny konformačně volné terciální struktury a jsou tak velmi stabilní vůči tepelné denaturaci. Kaseiny jsou v mléce agregovány do kaseinových micel. V jejich středu se nachází molekuly  $\alpha_{S1}$ -kaseinu,  $\alpha_{S2}$ -kaseinu a  $\beta$ -kaseinu, jejichž povrch pokrývá a stabilizuje  $\kappa$ -kasein. Struktura micel je zobrazena na Obrázku 5. Tyto koloidní částice jsou složeny z přibližně 94 % bílkoviny a 6 % koloidního kalcium fosfátu, který obsahuje ionty vápníku, hořčíku, fosfáty a citráty. Micela má kulovitý tvar a je značně hydratována, protože váže 2 – 2,5 g vody na 1 g bílkoviny. Je schopná rozptylovat světlo, což zapříčiňuje bílou barvu mléka. [20]



Obrázek 5: Kaseinová micela [21]

Dalšími proteiny v mléce jsou syrovátkové proteiny. Jsou obsaženy v mléčném séru a jejich funkce v lidském organismu spočívá ve tvorbě imunitního systému jedince. Snadno denaturují při zahřátí a dokáží tak zadržovat vodu ve své struktuře. Na rozdíl od kaseinových frakcí netvoří micely a nejsou náchylné ke změně pH. [22]

Mezi zástupce syrovátkových proteinů řadíme  $\beta$ -laktoglobulin,  $\alpha$ -laktalbumin, sérum albumin a imunoglobulin.  $\beta$ -laktoglobulin je malý globulární protein, jehož funkcí je přenos retinolu (provitaminu A). Tvoří nejvyšší obsah syrovátkových bílkovin v kravském mléce. Dalším proteinem je hovězí sérový albumin, který se do mléka dostává pravděpodobně z cév z mléčné žlázy a je totožný s krevním sérovým albuminem. Jde o důležitý přenašeč různých látek (iontů  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , mastných kyselin, bilirubinu, vitamínu C a některých exogenních látek).  $\alpha$ -laktalbumin je malý kyselý metaloprotein, který se účastní tvorby laktosy. Molekulové hmotnosti syrovátkových proteinů jsou uvedeny v Tabulce 3. [17]

Tabulka 3: Molekulové hmotnosti syrovátkových proteinů [22]

Bílkoviny	Molekulová hmotnost [Da]
$\alpha$ -laktalbumin	14 200
$\beta$ -laktoglobulin	18 400
sérum albumin	10 000 – 15 000
imunoglobuliny	70 000 <

## 2.2 Sýr

Sýrem se podle vyhlášky č. 397/2016 Sb. rozumí mléčný výrobek vyrobený vysrážením mléčné bílkoviny z mléka působením syřidla nebo jiných vhodných koagulačních činidel, oddělením podílu syrovátky a následným prokysáním nebo zráním. Za syrovátku je považován mléčný výrobek vznikající jako vedlejší produkt při výrobě sýrů (včetně tvarohů, potravinářských kaseinů a mléčné složky uvolňované po fermentaci při výrobě jiných mléčných výrobků jako jogurtů nebo mléčných dezertů).

Sýry jsou rozděleny na několik typů:

- a) Jako čerstvý sýr se považuje nezrající sýr, včetně nezrajících sýrů termizovaných.
- b) Jako zrající sýr lze označit sýr, u kterého došlo díky prokysání k dalším biochemickým a fyzikálním procesům. Zrající sýry se dále dělí na zrající na povrchu, zrající s mazem na povrchu a zrající v celé hmotě.
- c) Plísňový sýr je definován umělým dodáním dané kultivované ušlechtilé plísně do syrového základu. Plísňové sýry se dále dělí na dvouplísňové, s plísní na povrchu a s plísní uvnitř hmoty sýra.
- d) Jako tavený sýr lze označit sýr po tepelné úpravě tavením.
- e) Jako pařený sýr se považuje prokysaný sýr následně ošetřený horkou vodou, horkou párou, horkým mlékem nebo horkou smetanou.
- f) Jako syrovátkový sýr lze označit mléčný výrobek, který se získal vysrážením syrovátky nebo směsi syrovátky s mlékem. [23]

### 2.2.1 Složení sýrů

Z hlediska výživy jsou sýry bohatým zdrojem velmi hodnotných bílkovin, jejichž obsah se v hotových produktech pohybuje okolo 4 až 40 %. V sýrech jsou obsaženy všechny esenciální aminokyseliny pro lidskou výživu, které si tělo nedokáže samo syntetizovat. Proteiny v sýru jsou významné svou stravitelností, která šplhá až k 95 %. V průběhu zrání sýrů dochází k tvorbě kratších řetězců peptidů a aminokyselin. [24]

Tuk tvoří 20 – 30 % sušiny. Jsou zde mononenasycené i polynenasycené mastné kyseliny. V mléčném tuku jsou obsaženy taky trans-mastné kyseliny. Sýry obsahují také vitamíny a minerální látky. Vápník je jedním z nejvýznamnějších minerálů, který se nachází především v tvrdých a polotvrdých sýrech, které obsahují třetinu až polovinu denního příjmu

vápníku. Dalšími minerálními látkami obsaženými ve významných množstvích jsou fosfor, zinek a hořčík a vitamíny především A, B2, B6 a B12. [25]

Základem vzniku sýru je přidání mléčných kultur. Jde zejména o startovací mléčné bakterie, které přeměňují laktózu na kyselinu mléčnou. Mezi hlavní bakterie mléčného kvašení patří *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*. Je možné přidat i další mikroorganismy za účelem vytvoření organoleptických a biochemických změn v průběhu zrání na sýru nebo uvnitř sýru. [26]

### 2.2.2 Technologie výroby sýrů

Jedním z důvodů, proč se mléko začalo zpracovávat na sýry, je jejich dlouhodobější trvanlivost. Zvýšení trvanlivosti je způsobeno především fermentací laktózy na kyselinu mléčnou, dále pak snížením vodní aktivity a hodnoty pH společně s přidávkem soli.

Výroba sýru probíhá v několika krocích. Nejprve je mléko nutné ošetřit. Provádí se filtrace, následné zchlazení a pasterace, která se liší na základě různých druhů sýru. Pro sýry ementálského typu se uplatňuje rozmezí teplot 71 – 74 °C po dobu 16 s, pro nízkodohříváné sýry 75 – 78 °C a pro tvarohy, měkké a tvrdé sýry teplota 74 – 78 °C. Nejčastěji se používá tzv. šetrná pasterace, která se provádí při teplotě 72 °C po dobu 15 – 30 s. Vyšší teploty se používají málokdy, jelikož může docházet ke zhoršování vlastností mléka jako je například sýřitelnost či nekvalitní oddělování syrovátky. Pasterace je zodpovědná za zdravotní nezávadnost sýrů, protože díky ní dochází k odstranění mikroorganismů, které by mohly způsobit vady u zrajících sýrů. K odstranění mikroorganismů se využívá také baktofugace nebo mikrofiltrace. Principem baktofugace je odstranění mikroorganismů odstředivými silami. U mikrofiltrace se využívá průtok membránou s póry o velikosti kolem 0,5 μm. V průběhu tepelného ošetření se provádí standardizace mléka, při kterém dochází ke smíchání smetany a odstředěného mléka v takovém poměru, aby bylo dosaženo požadované tučnosti mléka. Následná homogenizace slouží ke zmenšení tukových kuliček představujících dispergovaný mléčný tuk. Využívá se pro výrobu některých čerstvých sýrů, u zrajících se většinou neprovádí. [27]

Dalším krokem výroby sýru je koagulace neboli srážení kaseinu. Rozlišují se dva typy srážení kaseinu. Kyselé srážení probíhá snížením pH na hodnotu izoelektrického bodu díky bakteriím mléčného kvašení a je využíváno u některých nezralých sýrů, především u tvarohů nebo jogurtů. Druhým typem je sladké (enzymatické) srážení, při kterém se používá ke koagulaci syřidlo. Hlavní částí syřidla je enzym chymosin. Spolu se syřidlem jsou přidány vhodné kultury, které se podílejí na úpravě pH. V důsledku působení syřidla

dochází ke srážení kaseinové frakce a vzniká tak sýřenina. V první fázi probíhá hydrolyza  $\kappa$ -kaseinu na para- $\kappa$ -kasein, čímž micely kaseinu přichází o svou kompatibilitu. Ve druhé fázi dochází k sjednocení micel kaseinu z důvodu snížení náboje. Důležitá je přítomnost vápenatých iontů, které je nutno dodat ve formě chloridu vápenatého. Vzniklá sýřenina se následně zpracovává na vhodnou velikost zrna pomocí krájení, drobení a někdy přihřívání za neustálého míchání. Následně se směs přemístí do formovacího zařízení, kde dochází k získání tvaru a prvotního obsahu sušiny. [28, 29]

Následující proces je solení sýrů, díky kterému dojde ke zlepšení chuti, povrchu sýru a konzistenci těsta. Mezi sýrem a solným roztokem dochází k osmóze a difúzi, v jejichž důsledku se usměřňuje množství vody v sýru. Chlorid sodný (kuchyňská sůl) přechází dovnitř sýru, zatímco syrovátka vychází ven. Proces solení probíhá různou dobu v závislosti na druhu sýru. Solení zlepšuje stravitelnost bílkovin a je důležitým konzervačním činidlem. Posledním procesem výroby sýru je zrání. Zrání je souhrn přeměn v sýru, které způsobily syřidlové enzymy a činnost kultur, a jeho cílem je dosažení požadovaného průběhu mléčného kvašení. Při zrání se rozkládají bílkoviny na jednodušší složky, jako jsou polypeptidy, peptidy a aminokyseliny. Aminokyseliny mohou při nesprávném zrání degradovat na nevhodné až nebezpečné látky (amoniak, močovina, kyselina máselná, biogenní aminy atd.) Během zrání dochází rovněž k degradaci mléčného tuku na mastné kyseliny. [30]

### 3 METODY STANOVENÍ BÍLKOVIN

Stanovení bílkovin se provádí pomocí různých metod založených na analytických principech, které určí obsah bílkovin přímo nebo nepřímo. Obsah bílkovin stanovených přímo se vypočítá na základě analýzy aminokyselinových postranních řetězců. Nepřímé stanovení bílkovin se například provádí stanovením obsahu dusíku a následným přepočtem na obsah bílkovin, popřípadě pomocí chemických reakcí s funkčními skupinami proteinu. U některých z metod je potřeba provést nejprve extrakci bílkovin, což může vést k nepřesnostem při stanovení. [31]

#### 3.1 Stanovení Biuretovou metodou

Biuretová metoda spočívá v reakci měďnatých solí s imidovými skupinami peptidových vazeb za vzniku červeno-fialového zbarvení komplexu. Charakteristické zbarvení komplexu je způsobeno vazbou jednoho atomu mědi na čtyři atomy dusíku v silně alkalickém roztoku. Při kyselém pH by docházelo k navázání atomů mědi na atomy kyslíku z karboxylových funkčních skupin, přičemž by nevznikalo červeno-fialové zbarvení. Navázání barviva na protein způsobí posun absorpčního maxima z 540 až 550 nm na 560 až 570 nm. Rychlost vývoje barvy je z počátku rychlá a po 5 minutách dosáhne absorbance téměř své hodnoty. Reakci lze provádět při pokojové teplotě. Se zvyšující se teplotou mírně roste rychlost zbarvení. [32]

#### 3.2 Stanovení metodou dle Lowryho

Lowryho metoda je založena na Biuretové metodě, která využívá chelataci měďnatého iontu pomocí imidových skupin peptidové vazby polypeptidů v silně alkalickém prostředí. Vzniká tak červeno-fialový komplex. Při reakci s Folin-Ciocalteauovým činidlem dochází ke vzniku modrého komplexu v důsledku redukce kyselin fosfomolybdenové a fosfowolframové obsažených v činidle. Metoda je citlivá na pH, které je nutné udržet v rozmezí 10,0 – 10,5. [33, 34]

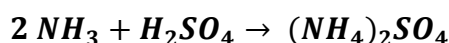
#### 3.3 Stanovení metodou Bradfordové

Metoda popisuje způsob stanovení proteinů, která spočívá v navázání barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 na protein. Coomassie Brilliant Blue G-250 se vyskytuje ve dvou různých barevných formách. Červená forma se po navázání barviva na protein změní na modrou. Za změnu barvy jsou zodpovědné převážně některé bazické

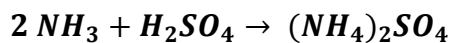
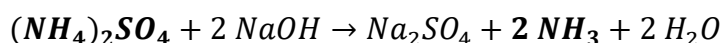
aminokyseliny v polypeptidovém řetězci (lysin, arginin, histidin). Navázání barviva na protein způsobí posun absorpčního maxima z 465 na 595 nm, a proto se sleduje zvýšení absorpce právě při maximální vlnové délce 595 nm. Jde o velmi rychlou metodu, při které dojde k navázání barviva již během několika minut a komplex zůstává v roztoku rozptýlen relativně dlouhou dobu (přibližně 1 hodina). [35]

### 3.4 Stanovení metodou dle Kjeldahla

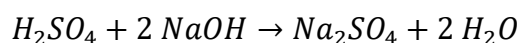
Metoda dle Kjeldahla je nejčastější metodou, která se využívá při stanovení bílkovin v potravinách. Nejprve dochází k mineralizaci za použití koncentrované kyseliny sírové za teploty varu kyseliny, a dojde tak k převedení dusíku, který byl vázán ve formě aminoskupiny nebo iminoskupiny, na síran amonný, což je znázorněno rovnicemi:



Po přidání 30% roztoku NaOH dojde k uvolnění amoniaku ze síranu amonného, který se přehání vodní parou v destilační aparatuře (Parnas Wagner). Amoniak se vydestiluje přes chladič do předlohy obsahující známé množství odměrného roztoku kyseliny sírové, jak je znázorněno následujícími chemickými reakcemi:



Následuje titrace přebytku kyseliny sírové odměrným roztokem hydroxidu sodného za použití indikátoru Tashiro nebo methylčerveň a dochází ke vzniku síranu sodného dle rovnice:



Obsah dusíku se vypočte z množství spotřebované kyseliny sírové. Následně se převede na obsah tzv. hrubé bílkoviny vynásobením příslušným faktorem. Jednotlivé faktory se liší na základě druhu potraviny. [36]



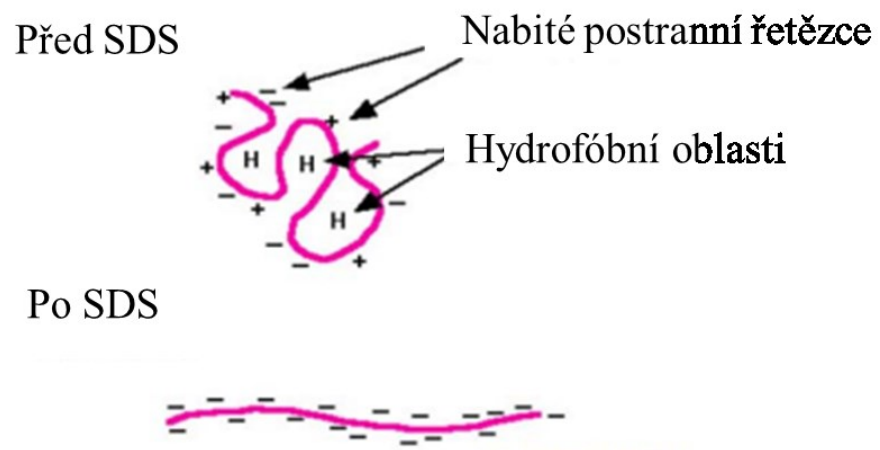
### 3.5 Elektroforetické metody

V posledních dvou desetiletí zaujala elektroforéza přední místo mezi moderními fyzikálně-chemickými metodami. Jde o relativně jednoduchý, rychlý a vysoce citlivý nástroj pro studium vlastností proteinů. Separace proteinů elektroforézou je založena na skutečnosti, že nabitě molekuly budou migrovat matricí při aplikaci stejnosměrného elektrického pole, které poskytují ponořené elektrody. Směs látek je dělena na základě různé pohyblivosti iontů jednotlivých složek směsi. Většina látek ve vodných roztocích přechází změnou pH na elektricky nabitě částice. [37]

#### 3.5.1 Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu

Polyakrylamidový gel slouží především k separaci větších makromolekul, například proteinů. Existuje mnoho elektroforetických metod na polyakrylamidovém gelu k řešení různých problémů, ale žádná z nich není univerzálně použitelná kvůli rozmanitosti proteinů a různým experimentálním cílům. Některé z metod obsahují látky způsobující denaturaci proteinů, a proto je nelze využít k analýze nativních proteinů a proteinů, jejichž biologickou aktivitu je nutné zachovat. Velmi důležitou vlastností gelu je jeho poréznost. Velikost pórů v gelu se řídí především celkovým množstvím použitého akrylamidu na jednotku objemu a stupně zesítnění. [37]

Jedním z typů je sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Jedná se o elektroforetickou metodu používající se k separaci proteinů na základě molekulové hmotnosti. Separace probíhá v polyakrylamidovém gelu s použitím denaturačního činidla SDS (sodium dodecyl sulfát). Proteiny jsou separovány na základě jejich velikosti. Denaturační činidlo SDS porušuje kvartérní, terciární a sekundární struktury a uděluje jednotný záporný náboj všem molekulám proteinů, které díky tomu poté v gelu migrují ke kladně nabitě elektrodě (anodě). Udělení jednotného záporného náboje je viditelné na Obrázku 6. SDS nedokáže redukovat disulfidické vazby, a proto se do nanášecího roztoku přidává redukční činidlo ditiotritol (DTT) nebo  $\beta$ -merkapt ethanol ( $\beta$ ME). Po následné vizualizaci separovaných proteinů v gelu se dá určit jejich relativní molekulová hmotnost srovnáním vzdálenosti od startu migrace daného proteinu se směsí standardů o známé molekulové hmotnosti. [38]



Obrázek 6: Udělení jednotného záporného náboje pomocí denaturačního činidla sodium dodecyl sulfátu (SDS) [39]

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 4 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce bylo analyzovat proteinový profil u vybraných mléčných výrobků, konkrétně u sýrů. K naplnění tohoto cíle bylo potřeba nejprve zpracovat literární rešerši, která charakterizuje složení mléka, technologický postup výroby sýru, proteiny a peptidy v mléce a sýrech a metody analýzy proteinů.

K vypracování praktické části bakalářské práce bylo třeba naplnit tyto dílčí cíle:

- sběr vzorků v průběhu výroby a následně sběr vzorků sýrů v průběhu zrání,
- zavést a zoptimalizovat elektroforetickou metodu SDS-PAGE,
- vytvořit proteinové profily výroby 3 šarží sýrů,
- na základě získaných výsledků formulovat závěr o změnách probíhajících v průběhu výroby a zrání sýrů.

## 5 METODIKA PRÁCE

### 5.1 Roztoky pro SDS-PAGE

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

Akrylamid	73 g
N,N'-methylenbisakrylamid	2 g
Deionizovaná voda	125 ml

Doplnit do 250 ml deionizovanou vodou. Uchovávat při 4 °C v tmavé láhvi.

#### Pufř do zaostřovacího/stacking gelu

Tris (SERVA)	6 g
Deionizovaná voda	80 ml

Upravit pH na 6,8 pomocí HCl a doplnit deionizovanou vodou na 100 ml. Uchovávat při 4 °C.

#### Pufř do dělicího/running gelu

Tris (SERVA)	36,33 g
Deionizovaná voda	150 ml

Upravit pH na 8,8 pomocí HCl a doplnit deionizovanou vodou na 200 ml. Uchovávat při 4 °C.

#### Vzorkový pufř s merkaptoetanolem

Tris (SERVA)	0,0977 g
Merkaptoetanol	0,5 g
Glycerol	1,0 g
Bromfenolová modř (SERVA)	0,01 g

Upravit pH pomocí HCl na hodnotu 6,8 a doplnit deionizovanou vodou do 10 ml. Uchovávat při 4 °C.

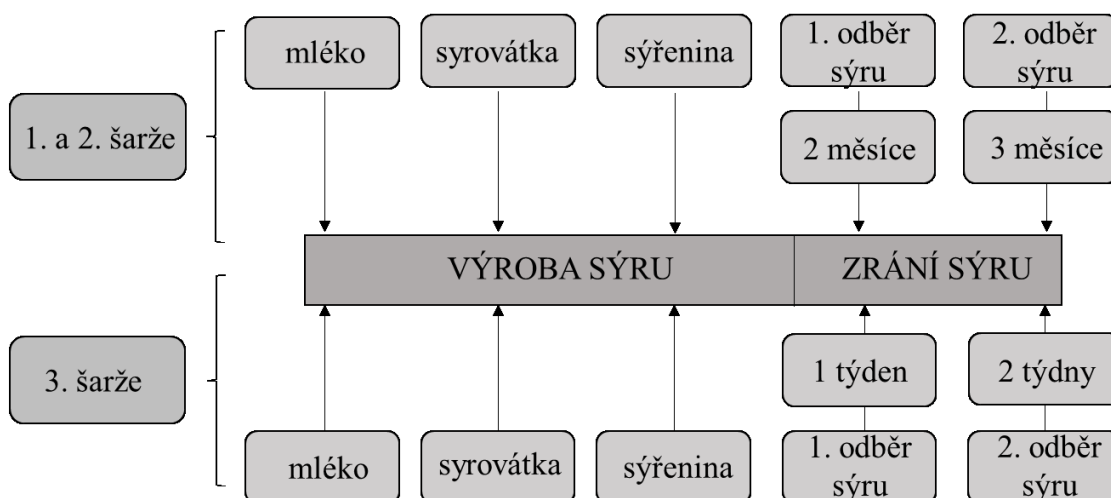
### Zásobní roztok Coomasie Brilliant Blue

Coomasie Brilliant Blue G-250	50 mg
95 % methanol	25 ml
85% kyselina fosforečná	50 ml

## 5.2 Vzorčky

K analýze byly použity celkem 3 šarže sýrů. První dvě šarže sýrů byly poskytnuty Ústavem technologie potravin (dále označovány 1. a 2. šarže). Jedná se o přírodní polotvrdý lisovaný sýr s nízkodohřívanou sýřeninou. Poslední šarže sýrů byla vyrobena v domácích podmínkách a jednalo se o čerstvý měkký sýr (dále označována 3. šarže).

V průběhu výroby byly sbírány vzorky mléka, syrovátky a sýřeniny pro každou šarži. Následně byly provedeny dva odběry vzorku sýrů v průběhu zrání. U sýrů vyrobených v technologických laboratořích byl vzorek odebrán po dvou a třech měsících, u sýrů vyrobených v domácích podmínkách po jednom a dvou týdnech. Sběr vzorků je schematicky znázorněn na Obrázku 7.



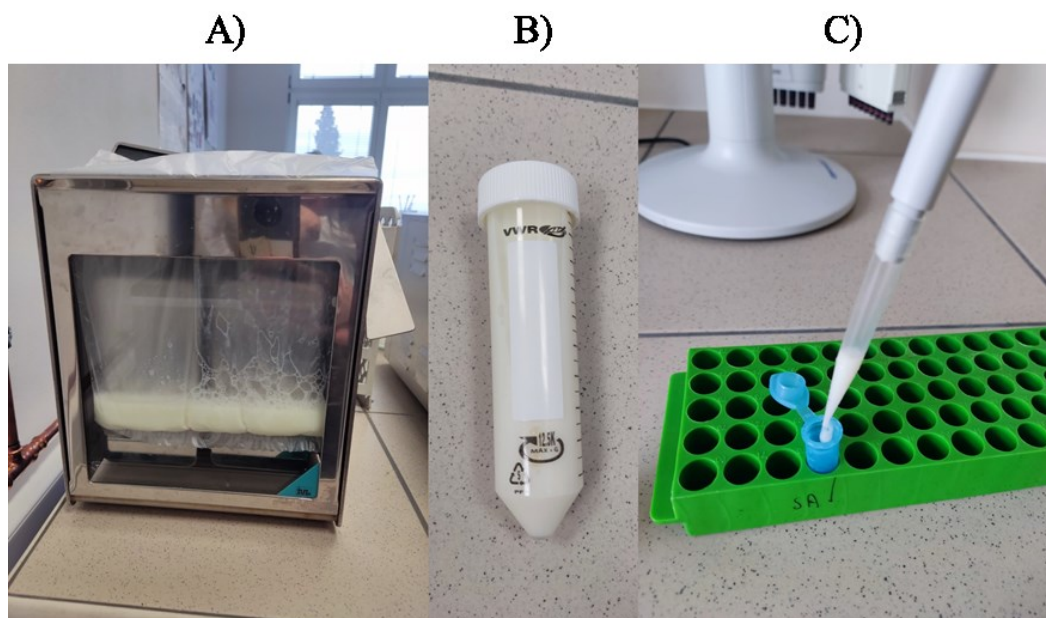
Obrázek 7: Schéma sběru vzorků

### 5.2.1 Zpracování vzorků čerstvého mléka a syrovátky

Vzorek čerstvého mléka a syrovátky byl inkubován po dobu 1 hodiny při 40 °C. Následně byla vytemperována centrifuga na 4 °C a vzorek odstředěn 30 minut (HERMLE Z 300 K) při 3000x g. Poté byl odebrán tuk lžičkou a supernatant ze zkumavky byl rozpipetován po 1 ml do mikrozkušavek a uchovávám při -80 °C. Vzorky mléka a syrovátky byly poté zředěny před samotnou elektroforézou na základě zjištěné koncentrace proteinů (viz 5.3. stanovení koncentrace proteinů metodou Bradfordové) tak, aby výsledné bandy v gelu byly co nejostřejší.

### 5.2.2 Zpracování vzorků sýru a sýřeniny

Vzorky sýru a sýřeniny byly připraveny stejným způsobem jako vzorky mléka a syrovátky s tím rozdílem, že nejprve bylo naváženo 10 g sýru nebo sýřeniny a následně homogenizováno se 40 ml deionizované vody ve stomacheru (IUL) po dobu 5 minut. Poté byl odebrán tuk lžičkou a supernatant ze zkumavky byl rozpipetován po 1 ml do mikrozkušavek a uchovávám při -80 °C. Postup je znázorněn na Obrázku 8.



Obrázek 8: Postup zpracování vzorků – homogenizace (A), odstranění tuku (B), rozpipetování (C)

### 5.3 Stanovení koncentrace proteinů metodou Bradfordové

Ke zjištění koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích byla provedena metoda dle Bradfordové.

Na mikrotitrační destičku bylo napipetováno 45  $\mu\text{l}$  deionizované vody, 5  $\mu\text{l}$  vzorku nebo hovězí sérový albumin a 200  $\mu\text{l}$  Bradfordova činidla. Takto připravené roztoky se nechaly inkubovat po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Poté byla měřena absorbance při vlnové délce 595 nm.

Koncentrace hovězího sérového albuminu pro kalibrační křivku byly: 0 mg/mol, 0,025 mg/mol, 0,05 mg/mol, 0,1 mg/mol, 0,2 mg/mol, 0,4 mg/mol, 0,6 mg/mol, 0,8 mg/mol, 1,0 mg/mol.

### 5.4 Elektroforéza

#### 5.4.1 Sestavení aparatury

Vertikální elektroforetická aparatura (Mini-PROTEAN, Tetra Cell) pro čtyři gely, skládající se z tanku, víka s napájecími kabely, sestavy elektrod a tvarovaných skel byla sestavena podle návodu přiloženého výrobcem.

#### 5.4.2 Příprava gelu

Pro analýzu byl zvolen gel skládající se z 15% dělicího gelu a 5% zaostřovacího gelu o tloušťce 1 mm. Nejprve byl vytvořen 15% dělicí gel smícháním roztoků uvedených v Tabulce 4:

Tabulka 4: Roztoky k přípravě dělicího gelu

Roztok	Objem [ $\mu\text{l}$ , ml]
30% roztok akrylamidu	11,25 ml
Tris pufr, pH 8,8	5,63 ml
Deionizovaná voda	5,18 ml
10% SDS (Serva)	225 $\mu\text{l}$
10% persíran amonný (Serva)	225 $\mu\text{l}$
N,N,N',N'-tetra-metylendiamin (TEMED, [Serva])	10 $\mu\text{l}$



Uvedené množství odpovídá výrobě dvou gelů. 10% roztok persíranu amonného byl namíchán vždy čerstvý před každou elektroforézou a spolu s roztokem TEMEDu byl přidán jako poslední. Následně byl roztok důkladně promíchán a pipetován mezi dvě skla do výšky přibližně 1,5 cm pod horní okraj skla. Následně byl gel přelit roztokem isopropylalkoholu, aby došlo k vyhlazení povrchu. Takto připravený gel byl ponechán 40 minut při pokojové teplotě k tuhnutí. Následně byl izopropylalkohol slit a povrch gelu byl opatrně opláchnut destilovanou vodou a vysušen filtračním papírem. Poté byl připraven 5% zaostřovací gel smícháním roztoků uvedených v Tabulce 5:

Tabulka 5: Roztoky k přípravě zaostřovacího gelu

Roztok	Objem [μl, ml]
30% roztok akrylamidu	1,36 ml
Tris pufr, pH 8,8	2,0 ml
Deionizovaná voda	4,6 ml
10% SDS (Serva)	80 μl
10% persíran amonný (Serva)	40 μl
N,N,N',N'-tetra-metylendiamin (TEMED, [Serva])	10 μl

Výsledný roztok byl opět důkladně rozmíchán a pipetován na zpolymerizovaný dělicí gel až po horní okraj skla a mezi skla vložen hřebínek tak, aby se v gelu nenacházely bubliny a gel se nechal opět zatuhnout. Takto připravený gel byl zabalen do mokré papírové utěrky a skladován při 4 °C do druhého dne.

#### 5.4.3 Úprava vzorků před elektroforézou

Před elektroforézou byly vzorky z jednotlivých sběrů upraveny dvěma způsoby:

- 325 μl vzorku bylo odpipetováno do mikrozkušavky, do které bylo přidáno 25 μl merkptoethanolu, 50 μl 20% SDS a 100 μl 10x Loading Buffer (Takara).
- 375 μl vzorku bylo odpipetováno do mikrozkušavky, do které bylo přidáno 25 μl merkptoethanolu, 50 μl 20% SDS a 50 μl 10x Loading Buffer.

Vzorek byl povařen při 97,5 °C po dobu 10 minut v suchém blokovém termostatu (Biosan).

#### 5.4.4 Nanesení vzorku na gel a vlastní elektroforéza

Z gelu byl odejmut hřebínek a gel byl vložen do elektroforetické aparatury podle návodu. Mezi skla s gely byl nalit elektrodový pufr tak, aby byly naplněny všechny jamky v gelu a následně byl dolit elektrodový pufr do tanku aparatury po rysku. Jamky byly několikrát promyty elektrodovým puffrem pomocí nanášecích špiček tak, aby v nich nezůstal neopolymerizovaný akrylamid. Následně bylo pomocí pipety s nanášecí špičkou naneseno 5  $\mu$ l vzorku na jamku. Do první jamky bylo naneseno 14  $\mu$ l komerčního markeru Protein Marker Broad Range (Thermo Fisher) a do druhé jamky 7  $\mu$ l markeru Protein Test Mixture 5 for SDS PAGE (Serva).

Po nanesení vzorků byla aparatura uzavřena víkem a připojena ke zdroji stejnosměrného proudu (Major Science). Pro oba gely bylo zvoleno napětí 120 V a elektroforéza probíhala přibližně 2,5 hodiny při 4 °C. Elektroforéza byla ukončena po doputování čela ke spodní hranici dělicího gelu. Zaostřovací gel byl odstraněn a dělicí gel byl následně barven dvěma metodami.

### 5.5 Vizualizace proteinů

Gely byly po skončení elektroforézy barveny dvěma metodami – pomocí Coomassie Brilliant Blue G-250 a pomocí dusičnanu stříbrného. K barvení byly použity zakoupené komerční kity (ROTI Blue quick a ROTI Black P [Carl Roth]).

#### 5.5.1 Barvení gelu pomocí Coomassie Brilliant Blue

Po odstranění zaostřovacího gelu a vyjmutí dělicího gelu ze skla byl gel ponořen do roztoku Coomassie Brilliant Blue G-250 (ROTI Blue quick) do plastové misky a umístěn na třepačku (Heidolph Titramax 100) po dobu 30 min. Následně byl obarvený gel opláchnut destilovanou vodou.

#### 5.5.2 Barvení gelu stříbrem

Barvení stříbrem je citlivější metoda, díky níž bylo možné pozorovat i menší separované peptidy na polyakrylamidovém gelu. Barvení bylo provedeno pomocí komerčního kitu a podle návodu od výrobce (ROTI Black P):

1. Nejprve byl gel vložen do fixačního roztoku: 20 ml methanol+12 ml kyselina octová+50  $\mu$ l roztoku z tuby D (obsahující formaldehyd) po dobu 1 hod při 4 °C.

2. Následovala příprava dalších roztoků přidáním:
  - 1 ml destilované vody do tuby A (obsahující thiosíran sodný)
  - 20  $\mu\text{l}$  z tuby A (obsahující thiosíran sodný) do tuby C (prázdná zkumavka) a 480  $\mu\text{l}$  destilované vody
  - 1 ml destilované vody do tuby B (obsahující dusičnan stříbrný)
  - 3 g z tuby E (obsahující uhličitan sodný) do 20 ml destilované vody.
3. Gel byl poté třepán 3x10 min v roztoku 80 ml methanolu a 320 ml destilované vody.
4. Dále byl gel vložen do roztoku vytvořeného smícháním obsahu tuby A (obsahující thiosíran sodný) a 100 ml destilované vody po dobu 1 min.
5. Poté opláchnut 3x20 s ve 100 ml destilované vody.
6. Následně byl gel vložen po dobu 40 min do impregnačního roztoku: obsah tuby B (obsahující dusičnan stříbrný) + 100 ml destilované vody + 75  $\mu\text{l}$  roztoku z tuby D (obsahující formaldehyd).
7. Gel byl opláchnut 2x20 s ve 100 ml destilované vody.
8. Po opláchnutí byl vložen do roztoku složeného z 20 ml roztoku E (obsahující uhličitan sodný), 80 ml destilované vody, obsah tuby C a 75  $\mu\text{l}$  roztoku z tuby D (obsahující formaldehyd) na dobu do vybarvení proteinů.
9. Po vybarvení byl gel opět opláchnut 2x20 s ve 100 ml destilované vody.
10. Dále byl gel vložen do roztoku složeného z 60 ml methanolu, 36 ml kyseliny octové a 204 ml destilované vody na 2x30 s a 10 min po 100 ml roztoku.
11. Nakonec byl gel vložen na 20 min do 100 ml roztoku připraveného v bodě 3.

## 6 VÝSLEDKY

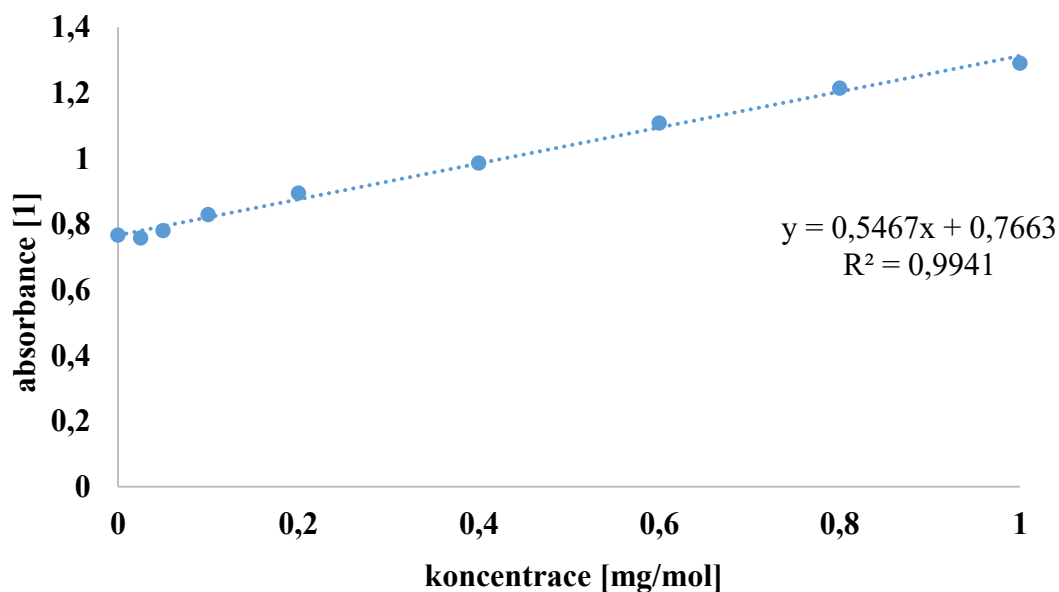
### 6.1 Stanovení koncentrace proteinů metodou Bradfordové

Koncentrace proteinů u vzorků byla provedena metoda dle Bradfordové a zjištěna na základě kalibrační křivky. Na základě zjištěných koncentrací byly následně ředěny vzorky mléka a syrovátky a v rámci optimalizace byla upravována množství vzorků aplikovaných na gel.

Byla vytvořena kalibrační řada hovězího sérového albuminu o známých koncentracích. Na základě získaných hodnot absorbance byla vytvořena kalibrační křivka graficky viditelná na Obrázku 9. Po dosazení do rovnice kalibrační křivky byly následně dopočítány koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích. Hodnoty kalibrační řady a získané absorbance jsou uvedeny v Tabulce 6.

Tabulka 6: Kalibrační řada a hodnoty absorbance

Koncentrace [mg/mol]	0	0,025	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Absorbance [1]	0,767	0,758	0,781	0,829	0,896	0,987	1,109	1,215	1,291



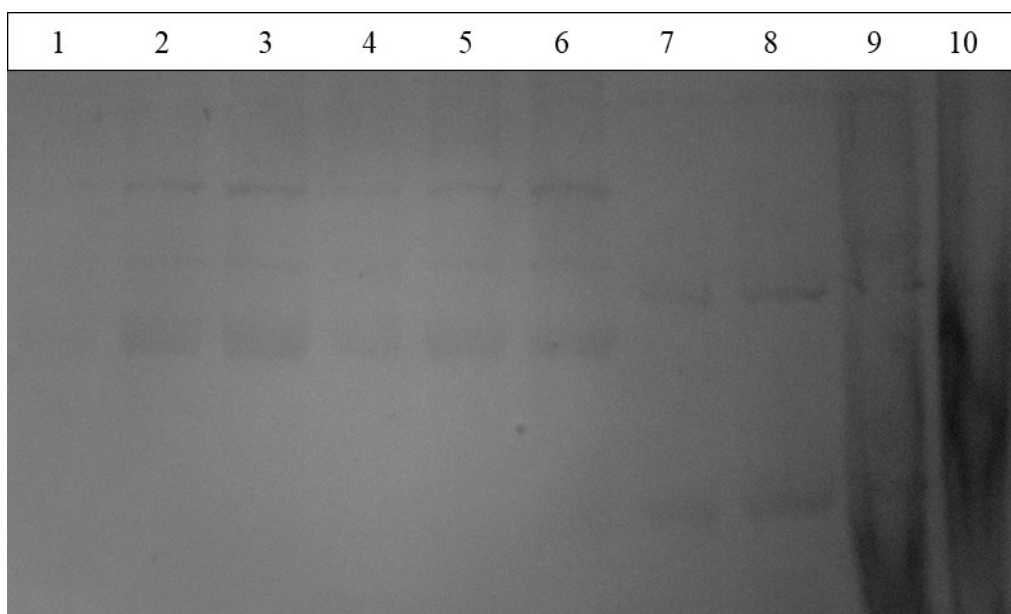
Obrázek 9: Kalibrační křivka

## 6.2 Optimalizace přípravy standardů a vzorků

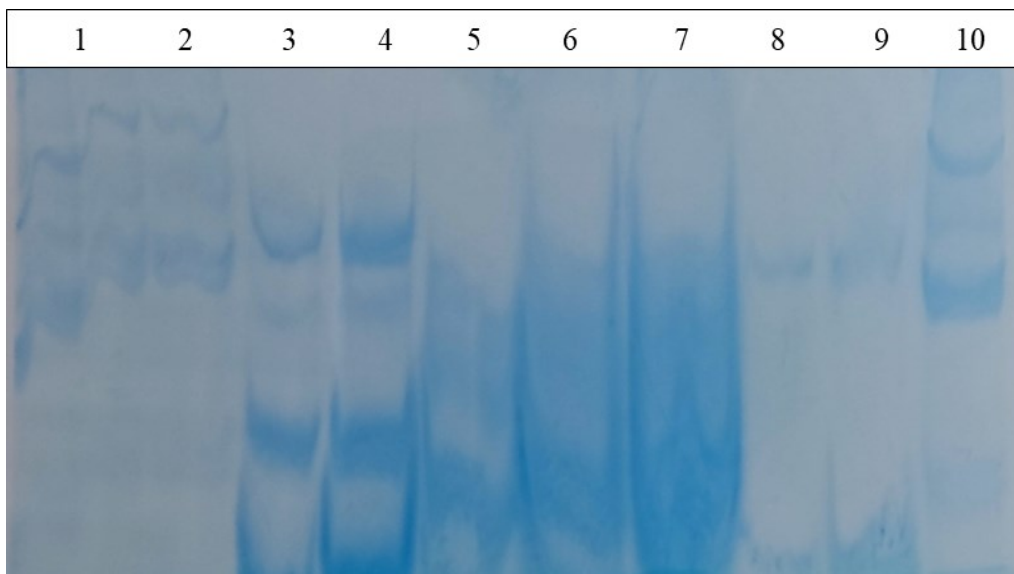
V rámci optimalizace a pro účely předložené bakalářské práce byly zkoumány 3 komerční markery: Protein Marker Broad Range (dále označovaný M1), Protein Test Mixture 5 for SDS-PAGE (dále označovaný M2) a Color Marker Ultra-low Range (dále označovaný M3). Komerční marker M2 byl namíchán (0,001 g markeru M2 + 650  $\mu$ l 60 mM tris HCl pufr (pH 6,8) + 50  $\mu$ l merkaptoethanolu + 100  $\mu$ l 20% SDS + 200  $\mu$ l Loading Buffer). Komerční marker M3 byl vytvořen tak, že nejprve byl připraven roztok 325  $\mu$ l 60 mM tris HCl pufru (pH 6,8) + 25  $\mu$ l merkaptoethanolu + 50  $\mu$ l 20% SDS + 100  $\mu$ l Loading Buffer, ze kterého bylo následně odpipetováno 95  $\mu$ l roztoku k 5  $\mu$ l markeru M3. Marker M1 nebylo potřeba míchat. Bylo zkoumáno nanesení různých množství jednotlivých markerů (Obrázek 10, 11 a 12) a poté i vzorků sýra a mléka (Obrázek 11, 12 a 13) na gel.

Dále bylo zkoumáno použití gelu se zaostřovacím gelem a bez zaostřovacího gelu, jejichž výsledky jsou uvedeny na Obrázku 11 a 12. K další analýze byl použit gel se zaostřovacím gelem, aby bylo dosaženo co nejostřejších bandů.

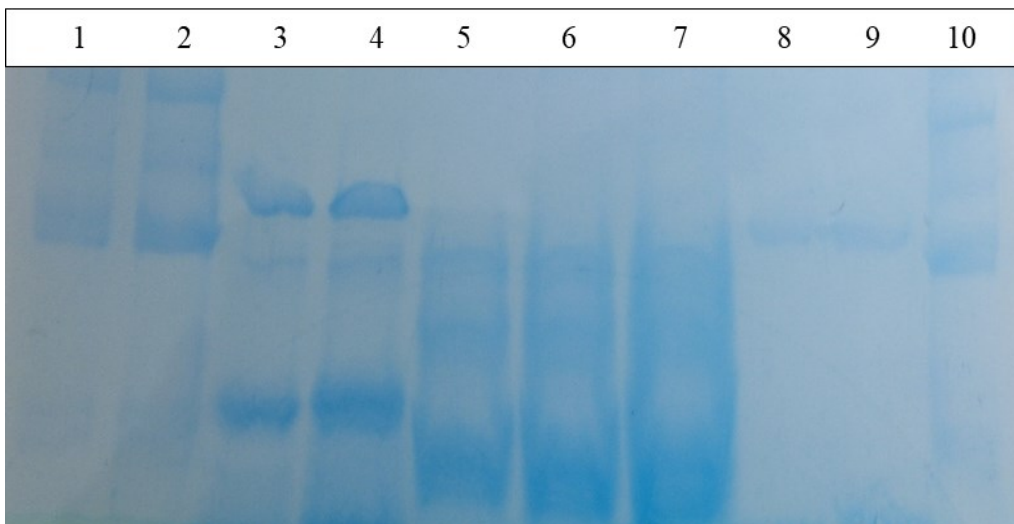
Na základě získaných výsledků pro následující analýzu byly zvoleny markery M1 a M2 v koncentracích M1 14  $\mu$ l na gel a M2 7  $\mu$ l na gel. Vzorky pro stanovení proteinového profilu byly poté připraveny způsobem (a) uvedeným v kapitole 4.2. a na gel nanášeny v koncentraci 5  $\mu$ l na gel.



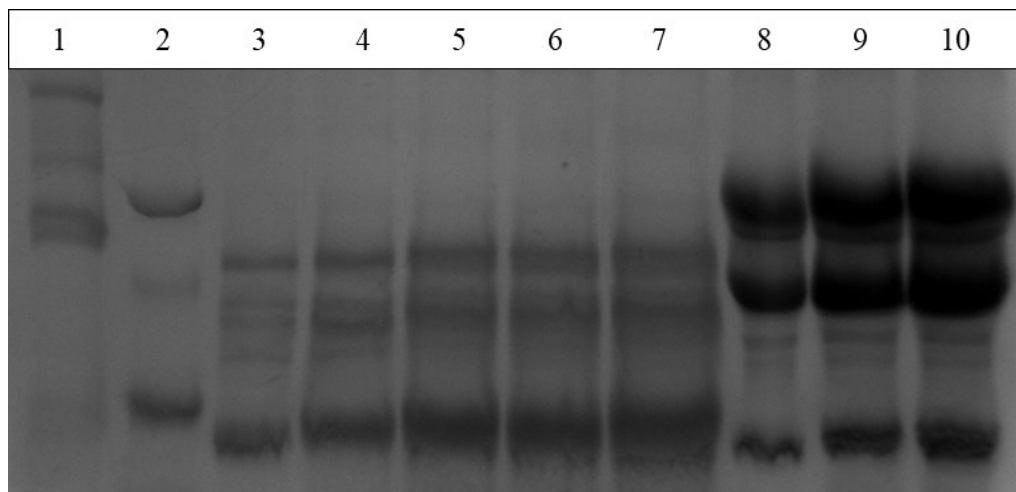
Obrázek 10: SDS-PAGE různých druhů markerů (15% gel) barveno pomocí Coomassie Brilliant Blue G-250: 1: M1 (7  $\mu$ l), 2: M1 (14  $\mu$ l), 3: M1 (20  $\mu$ l), 4: M1 (7  $\mu$ l), 5: M1 (14  $\mu$ l), 6: M1 (20  $\mu$ l), 7: M2 (5  $\mu$ l), 8: M2 (10  $\mu$ l), 9: M2 (20  $\mu$ l), 10: M2 (40  $\mu$ l)



Obrázek 11: SDS-PAGE různých druhů markerů a vzorku sýra 1. šarže (15% gel bez zaostřovacího gelu) barveno pomocí Coomassie Brilliant Blue G-250: 1: M1 (14  $\mu$ l), 2: M1 (20  $\mu$ l), 3: M2 (7  $\mu$ l), 4: M2 (14  $\mu$ l), 5: sýr 1. šarže 1. odběr připraven způsobem (a) (15  $\mu$ l), 6: sýr 1. šarže 1. odběr připraven způsobem (a) (20  $\mu$ l), 7: sýr 1. šarže 1. odběr připraven způsobem (a) (30  $\mu$ l), 8: M3 (5  $\mu$ l), 9: M3 (10  $\mu$ l), 10: M1 (20  $\mu$ l)



Obrázek 12: SDS-PAGE různých druhů markerů a vzorku sýra 1. šarže (15% gel se zaostřovacím gelem) barveno pomocí Coomassie Brilliant Blue G-250: 1: M1 (14  $\mu$ l), 2: M1 (20  $\mu$ l), 3: M2 (7  $\mu$ l), 4: M2 (14  $\mu$ l), 5: sýr 1. šarže 1. odběr připraven způsobem (a) (15  $\mu$ l), 6: sýr 1. šarže 1. odběr připraven způsobem (a) (20  $\mu$ l), 7: sýr 1. šarže 1. odběr připraven způsobem (a) (30  $\mu$ l), 8: M3 (5  $\mu$ l), 9: M3 (10  $\mu$ l), 10: M1 (20  $\mu$ l)



Obrázek 13: SDS-PAGE vzorku sýra a mléka 1. šarže (15% gel) barveno pomocí Coomassie Brilliant Blue G-250: 1: M1 (14 µl), 2: M2 (7 µl), 3: sýr 1. šarže 1. odběr připraven způsobem (a) (5 µl), 4: sýr 1. šarže 1. odběr připraven způsobem (a) (10 µl), 5: sýr 1. šarže 1. odběr připraven způsobem (a) (15 µl), 6: sýr 1. šarže 1. odběr připraven způsobem (b) (15 µl), 7: sýr 1. šarže 1. odběr připraven způsobem (b) (20 µl), 8: mléko 1. šarže připraveno způsobem (a) 8x ředěné (5 µl), 9: mléko 1. šarže připraveno způsobem (a) 8x ředěné (10 µl), 10: mléko 1. šarže připraveno způsobem (a) 8x ředěné (15 µl)

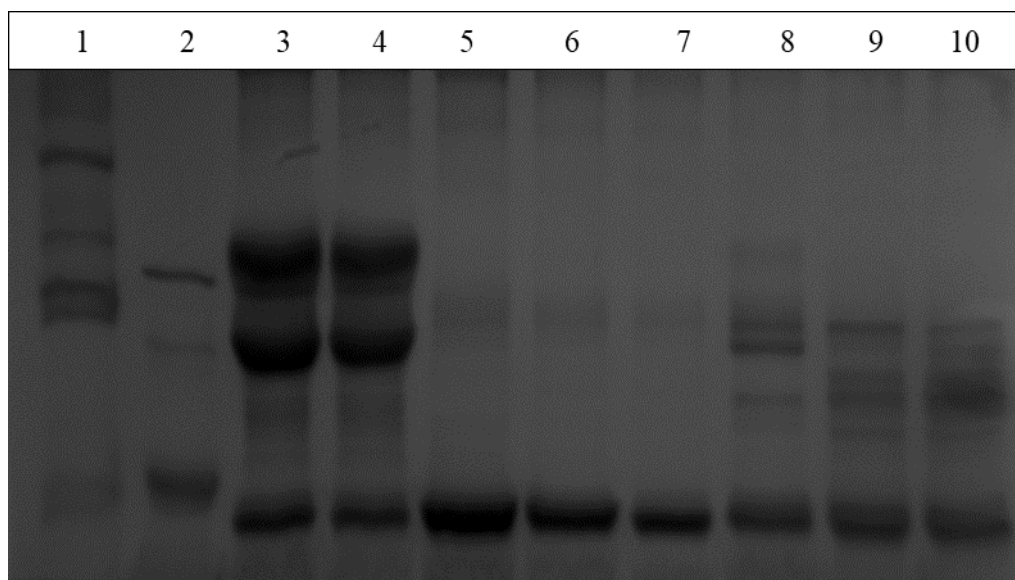
### 6.3 Výsledky stanovení proteinového profilu v průběhu výroby a zrání sýrů

Hlavním cílem bakalářské práce bylo vytvořit proteinový profil výroby a zrání sýru. Byly k tomu použity tři šarže sýrů. 1. a 2. šarže byly vyrobeny v technologických laboratořích za stejného technologického postupu, ale jinými studenty a z jiné šarže mléka. 3. šarže sýrů byla vyrobena v domácích podmínkách.

Na gel byly postupně nanášeny vzorky výroby sýru v takovém pořadí, jak byly postupně sbírány. Do první jamky bylo naneseno 14 µl markeru M1, dále 7 µl markeru M2 a následně 5 µl vzorku v pořadí mléko, syrovátka, sýřenina a dva odběry sýrů v průběhu zrání, přičemž na základě zjištění příliš velké koncentrace proteinů v mléce a syrovátce byly tyto dva vzorky naneseny ve dvou různých koncentracích. Pro vizualizaci proteinů byly použity dvě metody barvení, a to barvení pomocí Coomassie Brilliant Blue G-250 a barvení stříbrem.

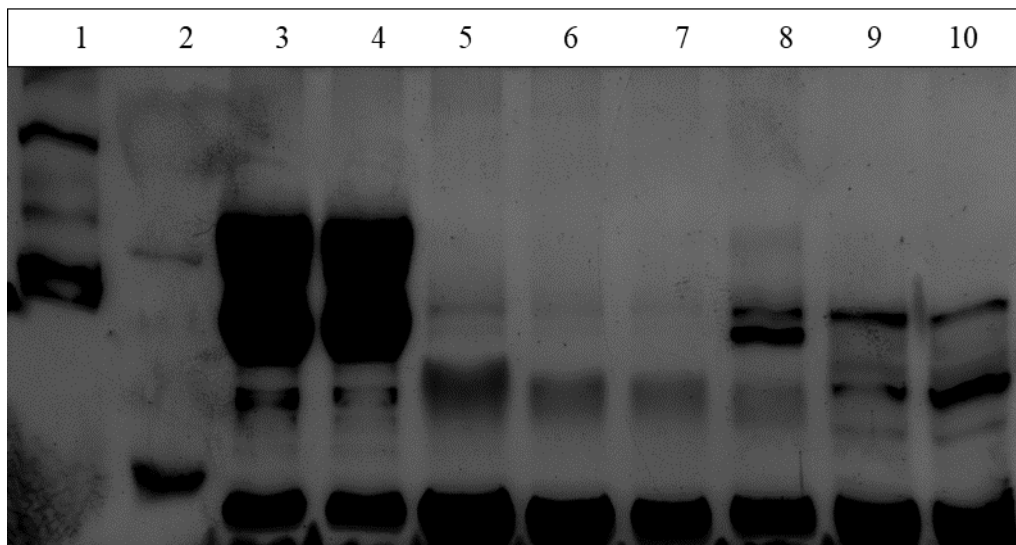
U vzorků výroby sýru 1. šarže byl vyroben proteinový profil zobrazený na Obrázku 14 a 15. Porovnáním se standardy o přesně známé molekulové hmotnosti byly přiřazeny molekulové hmotnosti jednotlivých oddělených proteinů a následně bylo určeno,

o jaký protein se s největší pravděpodobností jedná. Ve vzorku mléka byly pozorovány proteiny o molekulových hmotnostech přibližně 29 kDa a 22 kDa a jedná se pravděpodobně o frakce kaseinu. Dále  $\kappa$ -kasein o molekulové hmotnosti 20 kDa,  $\beta$ -laktoglobulin či sérový albumin o molekulových hmotnostech okolo 18 kDa a sérový albumin či  $\alpha$ -laktalbumin o molekulových hmotnostech přibližně 10 kDa. Největší množství představovaly frakce kaseinu a sérového albuminu. Ve vzorku syrovátky bylo zaznamenáno výrazně menší množství frakcí kaseinu o molekulové hmotnosti přibližně 22 kDa a naopak značně větší množství  $\beta$ -laktoglobulinu o molekulové hmotnosti 18 kDa a značné množství sérového albuminu či  $\alpha$ -laktalbuminu o molekulové hmotnosti 10 kDa. Ve vzorku sýřeniny je patrné větší množství frakcí kaseinu, které je však zároveň výrazně menší než u vzorku mléka. Dále byly pozorovány proteiny o molekulové hmotnosti přibližně 18 kDa, a jedná se pravděpodobně o  $\beta$ -laktoglobulin nebo již degradované proteiny z kaseinu. Opět byly pozorovány proteiny sérového albuminu či  $\alpha$ -laktalbuminu o molekulové hmotnosti 10 kDa. V následných vzorcích sýru odebraných v průběhu zrání byla viditelná degradace kaseinů na proteiny či peptidy o menších molekulových hmotnostech. Opět byl zaznamenán protein o molekulové hmotnosti okolo 10 kDa a jeho množství je srovnatelné s ostatními vzorky. Mezi vzorky sýrů odebraných po dvou a třech měsících zrání nejsou patrné žádné rozdíly.



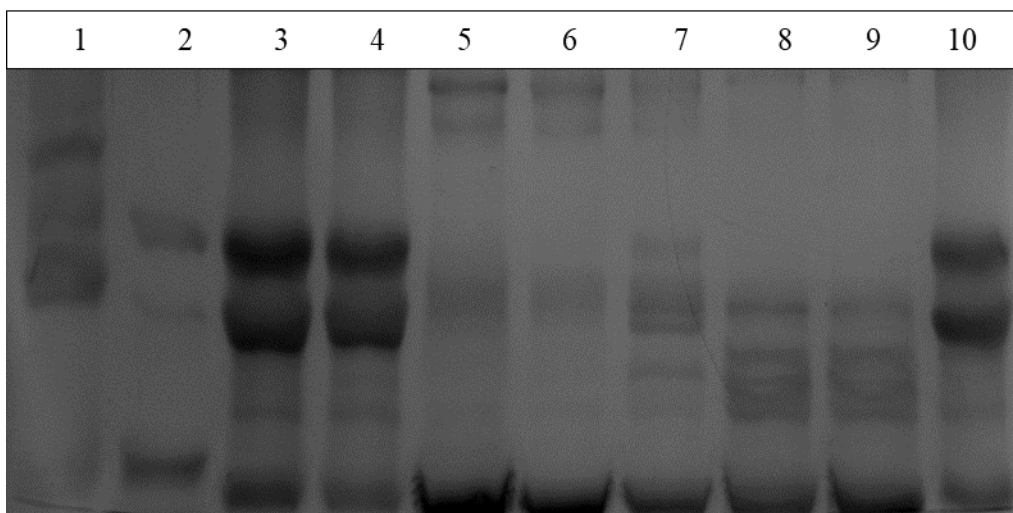
Obrázek 14: Proteinový profil výroby sýru 1. šarže metodou SDS-PAGE (15% gel) barvený pomocí Coomassie Brilliant Blue G-250: 1: M1 (14  $\mu$ l), 2: M2 (7  $\mu$ l), 3: mléko 8x ředěné (5  $\mu$ l), 4: mléko 10x ředěné (5  $\mu$ l), 5: syrovátka 2x ředěná (5  $\mu$ l), 6: syrovátka 4x ředěná (5  $\mu$ l), 7: syrovátka 6x ředěná (5  $\mu$ l), 8: sýřenina (5  $\mu$ l), 9: sýr 1. odběr (5  $\mu$ l), 10: sýr 2. odběr (5  $\mu$ l)



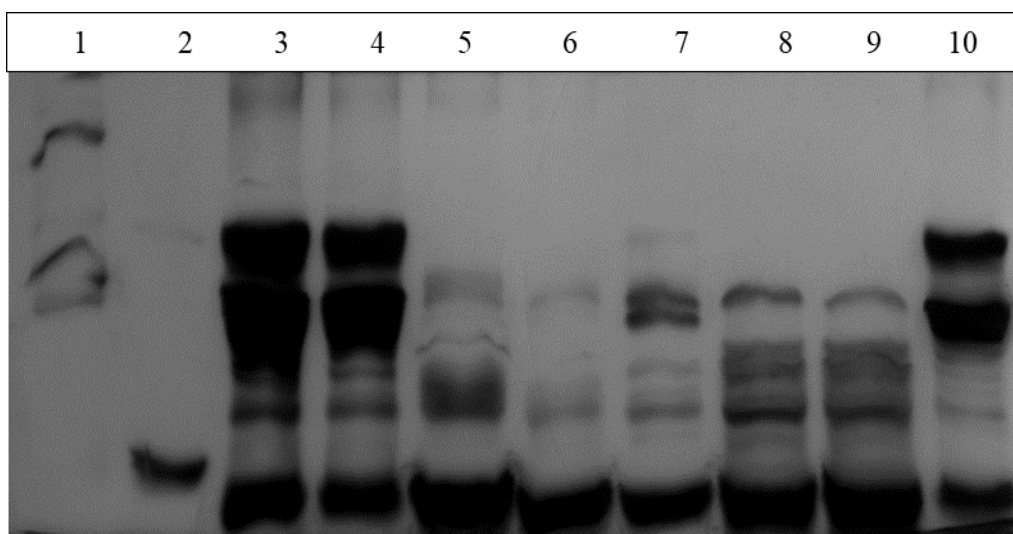


Obrázek 15: Proteinový profil výroby sýru 1. šarže metodou SDS-PAGE (15% gel) barvený pomocí dusičnanu stříbrného: 1: M1 (14  $\mu$ l), 2: M2 (7  $\mu$ l), 3: mléko 8x ředěné (5  $\mu$ l), 4: mléko 10x ředěné (5  $\mu$ l), 5: syrovátka 2x ředěná (5  $\mu$ l), 6: syrovátka 4x ředěná (5  $\mu$ l), 7: syrovátka 6x ředěná (5  $\mu$ l), 8: sýřenina (5  $\mu$ l), 9: sýr 1. odběr (5  $\mu$ l), 10: sýr 2. odběr (5  $\mu$ l)

Proteinový profil sýrů 2. šarže je uvedený na Obrázku 16 a 17. Jak je patrné, získaný profil je velice podobný 1. šarže. Rozdíl je patrný ve vzorku syrovátky, která obsahuje větší množství kaseinových frakcí. Ve vzorku sýřeniny bylo pozorováno několik proteinů o molekulových hmotnostech 20 – 15 kDa, což vypovídá o degradaci kaseinů. U vzorků sýru odebraných po dvou a třech měsících zrání je patrná degradace kaseinů na jednodušší proteiny nebo peptidy, které se pohybují o molekulové hmotnosti 20 – 10 kDa. Degradace je mnohem výraznější než u vzorku sýřeniny, ale mezi odběry po dvou a třech měsících se proteinový profil téměř nelišil.

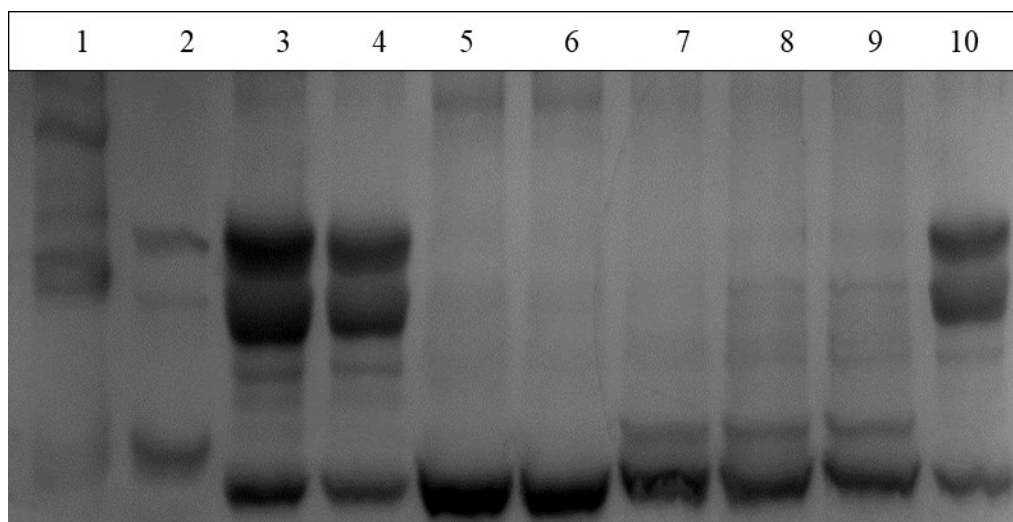


Obrázek 16: Proteinový profil výroby sýru 2. šarže metodou SDS-PAGE (15% gel) barvený metodou Coomassie Brilliant Blue G-250: 1: M1 (14  $\mu$ l), 2: M2 (7  $\mu$ l), 3: mléko 10x ředěné (5  $\mu$ l), 4: mléko 15x ředěné (5  $\mu$ l), 5: syrovátka 2x ředěná (5  $\mu$ l), 6: syrovátka 4x ředěná (5  $\mu$ l), 7: sýřenina (5  $\mu$ l), 8: sýr 1. odběr (5  $\mu$ l), 9: sýr 2. odběr (5  $\mu$ l), 10: mléko 20x ředěné (5  $\mu$ l)

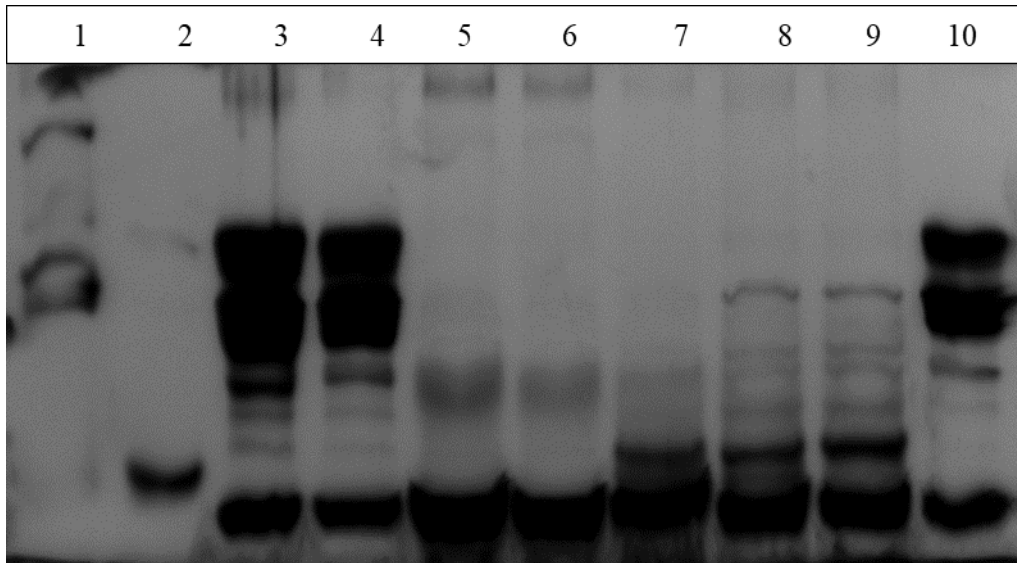


Obrázek 17: Proteinový profil výroby sýru 2. šarže metodou SDS-PAGE (15% gel) barvený pomocí dusičnanu stříbrného: 1: M1 (14  $\mu$ l), 2: M2 (7  $\mu$ l), 3: mléko 10x ředěné (5  $\mu$ l), 4: mléko 15x ředěné (5  $\mu$ l), 5: syrovátka 2x ředěná (5  $\mu$ l), 6: syrovátka 4x ředěná (5  $\mu$ l), 7: sýřenina (5  $\mu$ l), 8: sýr 1. odběr (5  $\mu$ l), 9: sýr 2. odběr (5  $\mu$ l), 10: mléko 20x ředěné (5  $\mu$ l)

U vzorků sýrů 3. šarže zobrazených na Obrázku 18 a 19 byly zaznamenány podle očekávání některé rozdíly od předchozích dvou šarží. U vzorku mléka byl na rozdíl od předchozích šarží pozorován protein o molekulové hmotnosti přibližně 12 kDa. Může se jednat o některý ze syrovátkových proteinů například sérový albumin či  $\alpha$ -laktalbumin. Ve vzorku syrovátky se vyskytoval značný obsah proteinů o molekulové hmotnosti přibližně 70 kDa a 65 kDa, a pravděpodobně se jednalo o imunoglobuliny. U vzorku sýřeniny nebyly téměř patrné frakce kaseinů, ale velmi výrazně zde byly pozorovány na rozdíl od předchozích šarží proteiny o molekulové hmotnosti přibližně 12 kDa, stejně jako u mléka. Stejně proteiny byly pozorovány i u obou odběrů sýrů v průběhu zrání. U sýřeniny i obou odběrů sýrů po jednom a dvou týdnech zrání je značně viditelná degradace na jednodušší proteiny či peptidy a vzorky odebrané v průběhu zrání se stejně jako u předchozích výrazně nelišily. Při použití metody barvení stříbrem lze pozorovat i menší proteiny a peptidy, jelikož jde o citlivější metodu než barvení pomocí Coomassie Brilliant Blue G-250. Na Obrázku 19 je patrný protein u vzorků sýru o molekulové hmotnosti přibližně 14 kDa, který při použití Coomassie Brilliant Blue G-250 nebyl pozorován.



Obrázek 18: Proteinový profil výroby sýru 3. šarže metodou SDS-PAGE (15% gel) barvený metodou Coomassie Brilliant Blue G-250: 1: M1 (14  $\mu$ l), 2: M2 (7  $\mu$ l), 3: mléko 10x ředěné (5  $\mu$ l), 4: mléko 15x ředěné (5  $\mu$ l), 5: syrovátka 2x ředěná (5  $\mu$ l), 6: syrovátka 4x ředěná (5  $\mu$ l), 7: sýřenina (5  $\mu$ l), 8: sýr 1. odběr (5  $\mu$ l), 9: sýr 2. odběr (5  $\mu$ l), 10: mléko 20x ředěné (5  $\mu$ l)



Obrázek 19: Proteinový profil výroby sýru 3. šarže metodou SDS-PAGE (15% gel) barvený pomocí dusičnanu stříbrného: 1: M1 (14  $\mu$ l), 2: M2 (7  $\mu$ l), 3: mléko 10x ředěné (5  $\mu$ l), 4: mléko 15x ředěné (5  $\mu$ l), 5: syrovátka 2x ředěná (5  $\mu$ l), 6: syrovátka 4x ředěná (5  $\mu$ l), 7: sýřenina (5  $\mu$ l), 8: sýr 1. odběr (5  $\mu$ l), 9: sýr 2. odběr (5  $\mu$ l), 10: mléko 20x ředěné (5  $\mu$ l)

## 7 DISKUZE

Pomocí elektroforetické metody SDS-PAGE byly vytvořeny a následně analyzovány proteinové profily výroby a zrání sýrů tří šarží. Jednalo se o dvě šarže polotvrdých sýrů s nízkodohřivanou sýřeninou a jedna šarže čerstvých měkkých sýrů. V průběhu výroby a během zrání sýrů byly sbírány vzorky, které byly následně zpracovány, aby mohly být naneseny na gel. Konkrétně se jednalo o mléko, syrovátku, sýřeninu a dva odběry sýru v průběhu zrání. Byly vytvořeny proteinové profily všech tří šarží, a získané výsledky byly porovnány se standardy o přesně známých molekulových hmotnostech.

Na základě výsledků byla zjištěna přítomnost proteinů v rozsahu molekulových hmotností 2 – 212 kDa. Jednotlivé šarže jevíly značnou podobnost. Drobné odlišnosti byly pravděpodobně způsobeny odlišným složením mléka jednotlivých šarží, a tím i vyrobených sýrů a také rozdílnou výrobou sýrů. U všech šarží je patrná degradace kaseinů z mléka na jednodušší proteiny a peptidy především při výrobě sýřeniny a prvním odběrem sýru v průběhu zrání. U druhého odběru sýru v průběhu zrání již nebyly pozorovány žádné další změny oproti prvnímu odběru sýru. Třetí šarže sýrů (vyrobených v domácích podmínkách) se od předchozích dvou lišila o něco více, jelikož v mléce byl pozorován protein o molekulové hmotnosti přibližně 12 kDa, který u předchozích šarží viditelný nebyl. Tento protein byl zaznamenán stejně ve všech vzorcích třetí šarže, což vypovídá o tom, že u něj pravděpodobně nedocházelo k degradaci. U všech šarží byla pozorována degradace především kaseinů na jednodušší proteiny či peptidy, která byla nejvýraznější při vzniku syrovátky a při prvním odběru sýru v průběhu zrání. Existuje několik studií zkoumající proteinový profil v sýrech. Například ve studii [40], která se zabývá zkoumáním sensorických a chemických vlastností mexického sýru Chihuahua, byla zjištěna proteolýza v průběhu zrání sýru. Rovněž byly v této studii identifikovány kaseiny v mléce v rozmezí molekulových hmotností 25 – 40 kDa, jejichž množství bylo po 8 týdnech zrání výrazně menší. Ve všech vzorcích syrovátky byl nejvíce zastoupen protein  $\beta$ -laktoglobulin, zatímco ve vzorcích mléka byly nejvíce zastoupeny kaseinové frakce, což potvrzují i jiné studie [41] a [42]. Předmětem výzkumu studie [41] bylo oddělení a kvantifikace šesti hlavních bílkovin ( $\alpha_{S1}$ -kasein,  $\alpha_{S2}$ -kasein,  $\beta$ -kasein,  $\kappa$ -kasein,  $\alpha$ -laktalbumin,  $\beta$ -laktoglobulin) kravského mléka a jejich genetických variant. Studie [42] se zaměřovala na porovnání metod SDS-PAGE a Harland-Ashworthového postupu, pomocí kterých detekovala kaseiny a syrovátkové proteiny v mléce a syrovátkových koncentrátech. Také v této studii [42] bylo popisováno neobvyklé chování kaseinů v prostředí dodecylsulfátu sodného v důsledku, kterého se

molekulová hmotnost kaseinů pohybuje okolo 30 kDa, což je v souladu s výsledky této práce. Na základě výzkumu [43] zabývajícího se zkoumáním technologických charakteristik kvality mléka holštýnských krav a vlivu zdraví vemene na kvalitu mléka lze potvrdit malé rozdíly ve výskytu proteinů mezi různými šaržemi mlék. Tyto rozdíly jsou způsobeny především v důsledku zdraví krávy, které má vliv především na množství imunoglobulinů. Příčinou dalších odlišností může být rovněž plemeno skotu. Podle výzkumu [44] dochází k degradaci proteinů od C- nebo N- koncových oblastí proteinových molekul a enzymy odpovědné za tyto štěpné procesy by mohly být plazmin, elastáza, katepsin G, katepsin B a katepsin D. Studie se dále zabývala analýzou změn proteinového profilu mléčných bílkovin při výrobě sýru a tím, jak tyto změny mohou ovlivnit výtěžnost sýru. Studie [45] byla zaměřena na proteolýzu a celkovou antioxidační kapacitu bílkovin bílého slaného sýra připraveného z přehřátého kravského mléka. Byly sledovány specifické proteolytické změny, které byly důsledkem vysokého obsahu syrovátkových proteinů začleněných do gelové matrice. Ve studii bylo zjištěno, že po delší době zrání již nedochází k výraznějším změnám proteinového profilu sýrů, což je v souladu s touto prací.

## ZÁVĚR

Cílem práce bylo vytvořit a analyzovat proteinový profil u vybraných mléčných výrobců, konkrétně u sýrů. Na základě vzájemného porovnání jednotlivých šarží byly zkoumány rozdíly při výrobě a zrání sýrů.

Ze získaných výsledků vyplývají následující závěry:

- Byla zoptimalizována metodika pro stanovení proteinového profilu pomocí SDS-PAGE.
- Byla provedena vizualizace proteinů pomocí dvou metod – barvení pomocí Coomassie Brilliant Blue G-250 a stříbrem.
- Byla potvrzena větší citlivost při barvení stříbrem.
- Byl získán proteinový profil u všech studovaných v rozsahu molekulových hmotností 2 – 212 kDa.
- Jednotlivé proteinové profily u šarží sýrů jevíly značnou podobnost, kdy drobné odlišnosti byly pravděpodobně způsobeny odlišným složením mléka jednotlivých šarží, a tím i vyrobených sýrů.
- U všech šarží sýrů byla pozorována degradace především kaseinů na jednodušší proteiny či peptidy, která byla nejvýraznější při vzniku sýřeniny a při prvním odběru sýru v průběhu zrání.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] LUHOVYY, L. B., AKHAVAN, T., ANDERSON, H. Whey Proteins in the Regulation of Food Intake and Satiety. *Journal of the American College of Nutrition*. [online]. September 2007, vol. 26, iss. 6, s. 704 – 712. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/07315724.2007.10719651>
- [2] HOLEČEK, M. Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin. 1. vydání. Praha. Grada publishing, a.s., 2006. ISBN 80-247-1562-7.
- [3] HROMÁDKA, R., HYŠPLER, R., TICHÁ, A., ZADÁK, Z. Proteiny a aminokyseliny - zdroje energie a funkční mediátory. *Nutrition news*. [online]. August 2016, vol. 2, s. 6-12. ISSN 2694-7226. Dostupné z: <https://www.worldmednet.cz/wp-content/uploads/2019/07/1409-Nutrition-News-02-2016-online.pdf#page=5>
- [4] GUINEE, T. P. *Protein in Cheese and Cheese Products: Structure-Function Relationships*. [online]. McSweeney, P., O'Mahony, J. (eds) Advanced Dairy Chemistry. Springer, 2016, New York. ISBN 978-1-4939-2800-2. Dostupné z: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2800-2\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2800-2_14)
- [5] KOOLMAN, J., RÖHM, K. *Barevný atlas biochemie.*, Praha: Grada publishing., 2012. ISBN 978-80-247-2977-0.
- [6] KODÍČEK, M., VALENTOVÁ, O., HYNEK, R., *Biochemie*. 2. vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2018. 23s
- [7] STRAUB, F. B., *Biochemie*. Nakladatelství Československé akademie věd, 1962. 46s
- [8] ŠÍCHO, V., VODRÁŽKA, Z., KRÁLOVÁ, B. *Potravinářská biochemie*. 2. vydání. Praha: SNTL – Nakladatelství technické literatury, 1981. 360s
- [9] NEČAS, O. *Obecná biologie pro lékařské fakulty*. 3. vyd. Jinočany: H & H, 2000, 554 s. ISBN 80-86022-46-3.
- [10] SAUERT, M., TEMMEL, H., MOLL, I. Heterogeneity of the translational machinery: Variations on a common theme. *Biochimie*, [online]. July 2015, vol. 114, s. 39–47. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.12.011>
- [11] MURRAY, R. K., GRANNER, D. K., MAYES, P. A., RODWELL, V. W.: *Harper's Illustrated Biochemistry*. 27. vydání. New York (NY): McGraw-Hill Medical, 2006. ISBN 0071461973.
- [12] ALBERTS, B., BRAY, D., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vydání. Espero Publishing, 2005. ISBN 80-902906-2-0.
- [13] VOET, D., VOETOVÁ, J. G. *Biochemie*. 1. české vydání. Praha: Victoria Publishing, 1995, 1325 s. ISBN 80-85605-44-9.
- [14] ROSYPAL, S., *Úvod do molekulární biologie*. 2. vydání. Brno, 1997. 15s
- [15] PEVSNER, J. *Bioinformatics and Functional Genomics*. 2. vydání. 2009. ISBN 0470085851. [16] NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (EU) č. 1308/2013 ze dne 17. prosince 2013. 2013. Úřední věstník evropské unie, 2013.
- [17] POKORNÁ, Š. *Vliv nevhodných rozpouštědel a iontů na strukturu a stabilitu alfa-laktalbuminu*. Praha, 2008. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie. Vedoucí diplomové práce Doc. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.



- [18] PAVELKA, A. *Mléčné výrobky pro vaše zdraví*. 1. vydání. Brno: Littera, 1996. 105s. ISBN 80-85763-09-5.
- [19] SMIT, G. *Dairy Processing – Improving Quality*. 1. vydání. Cambridge: Woodhead Publishing, 2003. 546s. ISBN 1-85573-676-4.
- [20] YADA, R. Y. *Proteins in Food Processing*. 1. vydání. Woodhead Publishing, 2004, 728 s. ISBN 978-1-85573-723-5.
- [21] FOX, P., MCSWEENEY, P. L. H. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. London: Blackie Academica Professional, 1998.
- [22] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin*. 1. vydání. Tábor: OSSIS, 1999. 328 s. ISBN 8090239137.
- [23] ČESKO. Vyhláška č. 397/2016 ze dne 2. prosince 2016 o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. In: . *Sbírka zákonů České republiky*. 2016, částka 162. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2016-397#cast1>
- [24] ŠUSTOVÁ, K. Nutriční aspekty konzumace sýrů. *Mlékařské listy*. [online]. October 2018, vol. 29, s. 24 – 30. Dostupné z: [http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2018/170-171/veda\\_170\\_s.24-30.pdf](http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2018/170-171/veda_170_s.24-30.pdf)
- [25] WALTHER, B. Cheese in nutrition and health. *Dairy Science and Technology* [online]. 2008, vol. 88, s. 389-405. ISSN 19585586. Dostupné z: <https://doi.org/10.1051/dst:2008012>
- [26] MCSWEENEY, Paul. *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. 4. vydání. Boston, MA: Elsevier, 2017. ISBN 978-0-12-417012-4.
- [27] KADLEC, P., MELZUCH, K., VOLDŘICH, M. *Přehled tradičních potravinářských výrob: Technologie potravin*. 1. vydání. Ostrava: Key Publishing, 2012. ISBN: 978-8-7418-145-0.
- [28] FORMAN, L. *Mlékárenská technologie II*. 2. vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1996, s. 42-151. ISBN 80-7080-250-2.
- [29] ČEPIČKA, J. *Obecná potravinářská technologie*. 1. vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1995. ISBN 80-7080-239-1.
- [30] LAVINGROVÁ, V. *Technologie výroby sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou*. Brno, 2015. Bakalářská práce. Mendelova univerzita, Agronomická fakulta, Ústav technologie potravin. Vedoucí bakalářské práce Ing. Táňa Lužová, Ph.D.
- [31] MAEHRE, H. K., DALHEIM, L., EDVINSEN, G. K., ELVEVOLL, E. O., JENSEN, I. Protein Determination—Method Matters. *Foods*. [online]. January 2018, vol. 7. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2304-8158/7/1/5>
- [32] LUBRAN, M. The Measurement of Total Serum Proteins by the Biuret Method. *Annals of clinical and laboratory science*. [online]. March 1978, vol. 8, s. 106-110. Dostupné z: <http://www.annclinlabsci.org/content/8/2/106.full.pdf+html>
- [33] HARTREE, E. F. Determination of Protein: A Modification of the Lowry Method That Gives a Linear Photometric Response. *Analytical biochemistry*. [online]. August 1972, vol. 48, s. 422-427.
- [34] ARSON, E., HOWLETT, B., JAGENDORF, A. Artificial reductant enhancement of the Lowry method for protein determination. *Analytical biochemistry*. [online]. June 1986, vol. 155, s. 243-248.

- [35] BRATFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. [online]. May 1976, vol. 72, s. 248-254.
- [36] HÁLKOVÁ, J., RUMÍŠKOVÁ, M., RIEGLOVÁ, J. *Analýza potravin*. 1. vydání. Újezd u Brna: RNDr. Ivan Straka, 2000. 102 s. ISBN 80-902775-3-5.
- [37] HAMES, B. D. *Gel Electrophoresis of proteins*. 3. vydání. Oxford University: Oxford University Press, 1998. ISBN 0-19-963641-9.
- [38] BRUNELLE, J. L., GREEN, R. Chapter Twelve - One-dimensional SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (1D SDS-PAGE). *Methods in Enzymology*. [online]. March 2014, vol. 541, s. 151 – 159.
- [39] SUVRA, R., VIKASH, K. A Practical Approach on SDS PAGE for Separation of Protein. *International Journal of Science and Research*. [online]. August 2014, vol. 3, s. 955 – 960. ISSN 2319-7064.
- [40] MOUSHUMI, P., NUÑEZ, A., HEKKEN, D. L., RENYE, J. A. Sensory and protein profiles of Mexican Chihuahua cheese. *Journal of Food Science and Technology*. [online]. November 2014, vol. 51, s. 3432 – 3438.
- [41] BOBE, G., BEITZ, D. C., FREEMAN, A. E., LINDBERG, G. L. Separation and Quantification of Bovine Milk Proteins by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.* [online]. January 1998, vol. 46, s. 458 – 463.
- [42] BASCH, J., DOUGLAS, F. W., PROCINO, L. G., HOLSINGER, V. H., FARREL, H. M. Quantitation of Caseins and Whey Proteins of Processed Milks and Whey Protein Concentrates, Application of Gel Electrophoresis, and Comparison with Harland-Ashworth Procedure. *Journal of Dairy Science*. [online]. January 1985, vol. 68, s. 23 – 31.
- [43] CECCHINATO, A., BOBBO, T., RUEGG, P. L., GALLO, L., BITTANTE, G., PEGOLO, S. Genetic variation in serum protein pattern and blood  $\beta$ -hydroxybutyrate and their relationships with udder health traits, protein profile, and cheese-making properties in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. [online]. December 2018, vol. 101, s. 11108 – 11119.
- [44] WEDHOLM, A. *Variation in Milk Protein Composition and its Importance for the Quality of Cheese Milk*. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences, Department of Food Science, 2008. Doctoral thesis. ISSN 1652-6880.
- [45] Barać, M., Smiljanić, M., Žilić, S., Pešić, M., Stanojević, S., Vasić, M., Vučić, T. Protein profiles and total antioxidant capacity of water soluble and insoluble protein fractions of white cow cheese at different stage of ripening. *Mljekarstvo*. [online]. May 2016, vol. 66, s. 187 – 197.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

$\beta$ ME	$\beta$ -merkapt ethanol
DDT	Ditiotreitol
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
GABA	$\gamma$ -aminomáselná kyselina
HDL	High density lipoprotein
LDL	Low density lipoprotein
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
rRNA	Ribozomální ribonukleová kyselina
SDS	Sodium dodecyl sulfát
SDS-PAGE	Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu s dodecyl sulfátem sodným
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transferová ribonukleová kyselina

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1: Vznik peptidové vazby [6] .....	11
Obrázek 2: Dělení aminokyselin podle polohy aminoskupiny [5] .....	12
Obrázek 3: Sekundární struktura – $\alpha$ -helix (A), $\beta$ -skládaný list (B) [5] .....	15
Obrázek 4: Terciární struktura (A) [11], kvartérní struktura (B) [15] .....	16
Obrázek 5: Kaseinová micela [21] .....	19
Obrázek 6: Udělení jednotného záporného náboje pomocí denaturačního činidla sodium dodecyl sulfátu (SDS) [39] .....	26
Obrázek 7: Schéma sběru vzorků .....	30
Obrázek 8: Postup zpracování vzorků – homogenizace (A), odstranění tuku (B), rozpipetování (C) .....	31
Obrázek 9: Kalibrační křivka .....	36
Obrázek 10: SDS-PAGE různých druhů markerů (15% gel) barveno pomocí Coomassie Brilliant Blue G-250 .....	37
Obrázek 11: SDS-PAGE různých druhů markerů a vzorku sýra 1. šarže (15% gel bez zaostřovacího gelu) barveno pomocí Coomassie Brilliant Blue G-250 .....	38
Obrázek 12: SDS-PAGE různých druhů markerů a vzorku sýra 1. šarže (15% gel se zaostřovacím gelem) barveno pomocí Coomassie Brilliant Blue G-250 .....	38
Obrázek 13: SDS-PAGE vzorku sýra a mléka 1. šarže (15% gel) barveno pomocí Coomassie Brilliant Blue G-250 .....	39
Obrázek 14: Proteinový profil výroby sýru 1. šarže metodou SDS-PAGE (15% gel) barvený pomocí Coomassie Brilliant Blue G-250 .....	40
Obrázek 15: Proteinový profil výroby sýru 1. šarže metodou SDS-PAGE (15% gel) barvený pomocí dusičnanu stříbrného .....	41
Obrázek 16: Proteinový profil výroby sýru 2. šarže metodou SDS-PAGE (15% gel) barvený metodou Coomassie Brilliant Blue G-250 .....	42
Obrázek 17: Proteinový profil výroby sýru 2. šarže metodou SDS-PAGE (15% gel) barvený pomocí dusičnanu stříbrného .....	42
Obrázek 18: Proteinový profil výroby sýru 3. šarže metodou SDS-PAGE (15% gel) barvený metodou Coomassie Brilliant Blue G-250 .....	43
Obrázek 19: Proteinový profil výroby sýru 3. šarže metodou SDS-PAGE (15% gel) barvený pomocí dusičnanu stříbrného .....	44

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1: Přibližné složení mléka [17] .....	17
Tabulka 2: Molekulová hmotnost frakcí kaseinu [19].....	18
Tabulka 3: Molekulové hmotnosti syrovátkových proteinů [22] .....	19
Tabulka 4: Roztoky k přípravě dělicího gelu.....	32
Tabulka 5: Roztoky k přípravě zaostřovacího gelu .....	33
Tabulka 6: Kalibrační řada a hodnoty absorbance.....	36