

Studium proteinového profilu vybraných mléčných produktů

Bc. Vendula Pachlová

Diplomová práce
2008



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav potravinářského inženýrství

akademický rok: 2007/2008

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Vendula PACHLOVÁ**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Studium proteinového profilu vybraných mléčných produktů**

Zásady pro vypracování:

1. V teoretické části zpracujte literární rešerši týkající se charakteristiky proteinů a peptidů vyskytující se v mléce a sýrech.
2. Stručně popište složení a výrobu tavených sýrů.
3. V praktické části nejprve zavedte a optimalizujte metodiku pro stanovení proteinů s využitím elektroforézy.
4. Následně stanovte proteinový profil tavených sýrů, tavených sýrů skladovaných za odlišných podmínek a zralého a nezralého mléka (mleziva) krav.
5. Na základě teoretické části a výsledků praktické části formulujte závěry o vlivu sterilace a skladování na proteinový profil tavených sýrů.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

VELÍŠEK, J. Chemie potravin 1. 1. vydání. Tábor: OSSIS, 1999. 328s. ISBN 80-902391-3-7

WALKER, M. J. The protein protocols. 2nd ed. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2002. ISBN 0-89603-940-4

YADA R. Y. Protein in food processing. 1st ed. Cambridge: Wood Publishing Limited, 2004. ISBN 1 85573 837 6

HAMES, B. D., RICKWOOD, D. Gel electrophoresis of proteins. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 1990. 0-19-963074-7

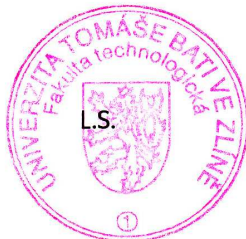
Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Leona Buňková, Ph.D.**
Ústav potravinářského inženýrství

Datum zadání diplomové práce: **21. listopadu 2007**

Termín odevzdání diplomové práce: **31. května 2008**

Ve Zlíně dne 2. května 2008

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



v.z.

prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
vedoucí katedry

ABSTRAKT

Mléčné proteiny jsou důležitou složkou ve výživě člověka. Proteinový profil byl zjišťován ve čtyřech souborech vzorků: nesterilovaných a sterilovaných tavených sýrech, v tavených sýrech skladovaných za odlišných podmínek po dobu dvou let, v zralém a nezralém kravském mléce (mlezivě) a v sušeném mléce. Pro studium proteinů byla zvolena metoda SDS-PAGE.

U sterilovaných tavených sýrů byla prokázána hydrolýza proteinů o molekulové hmotnosti vyšší než 20 kDa. Na intenzitu hydrolýzy měl vliv jak použitý sterilační režim, tak i obsah laktózy v sušině. Podobně tomu bylo i u tavených sýrů skladovaných za odlišných podmínek.

Proteinový profil nezralého mléka (mleziva) se v prvních dvou dnech výrazně lišil od ostatních vzorků. Odlišnost byla vykazována v oblasti o vysoké molekulové hmotnosti.

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

ABSTRACT

Milk proteins are priority in human sustenance. Protein profile was determined in four groups of sample: non-sterilized and sterilized processed cheeses, processed cheeses warehoused at different conditions two years, milk and colostrum and creamer. Proteins were analyzed by SDS-PAGE.

Protein hydrolysis proved in sterilized processed cheese with molecular weight greater than 20 kDa. Process mode and concentration of lactose affected intensity of hydrolysis. Temperature of environment influenced processed cheese warehoused at different conditions too.

Protein profile of colostrum distinguished from other samples at first two day. Diversity was at high molecular weight.

Keywords: protein, milk, sterilized processed chees, SDS-PAGE

Ráda bych tímto poděkovala Mgr. Leoně Buňkové, Ph.D. za odborné vedení při zpracování této diplomové práce, za cenné rady a připomínky. Dále bych také ráda poděkovala Ing. Františku Buňkovi, Ph.D. za pomoc s vyhodnocením výsledků.

Prohlašuji, že jsem na bakalářské/diplomové práci pracoval(a) samostatně a použitou literaturu jsem citoval(a). V případě publikace výsledků, je-li to uvolněno na základě licenční smlouvy, budu uveden(a) jako spoluautor(ka).

Ve Zlíně 16. května 2008

.....

Podpis diplomanta

OBSAH

ÚVOD	8
I TEORETICKÁ ČÁST	9
1 PROTEINY	10
1.1 STRUKTURA PROTEINŮ	10
1.1.1 Primární struktura.....	11
1.1.2 Sekundární struktura	11
1.1.3 Terciární a kvarterní struktura.....	13
1.2 SLOŽENÍ MLÉKA	15
1.3 TAVENÉ SÝRY.....	17
1.4 MLÉČNÉ PROTEINY	18
1.4.1 Kasein.....	19
1.4.2 Syrovátkové bílkoviny	22
1.5 ELEKTRICKÉ VLASTNOSTI PROTEINŮ.....	23
1.5.1 Amfoterní povaha bílkovin	24
1.5.2 Elektrická dvojvrstva a elektrický potenciál	25
2 STANOVENÍ BÍLKOVIN	27
2.1 METODY STANOVENÍ HRUBÉ BÍLKOVINY	27
2.1.1 Metody odměrné analýzy	27
2.1.2 Spektrofotometrické metody	30
2.2 IZOLACE A ČIŠTĚNÍ BÍLKOVIN	32
2.3 SEPARAČNÍ METODY DĚLENÍ BÍLKOVIN.....	33
2.3.1 Chromatografie.....	33
2.3.1.1 Chromatografie na měničích iontů (IEC).....	34
2.3.1.2 Chromatofokusace (CF).....	35
2.3.1.3 Gelová (vyučovací) chromatografie (GPC)	35
2.3.1.4 Afinitní chromatografie	36
2.3.1.5 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	36
2.3.2 Elektroforéza	37
2.3.2.1 Kapilární elektroforéza (CE).....	38
2.3.2.2 Gelová elektroforéza.....	39
II PRAKTICKÁ ČÁST	42
3 CÍLE PRÁCE	43
4 SDS-PAGE	44
4.1 ROZTOKY PRO SDS-PAGE	44
4.2 VZORKY	46
4.2.1 Tavené sýry sterilované.....	46
4.2.2 Tavené sýry skladované	47
4.2.3 Nezralé mléko (mlezivo).....	48
4.2.4 Sušené mléko	48

4.3	OPTIMALIZACE PŘÍPRAVY VZORKŮ PRO SDS-PAGE.....	49
4.4	PŘÍPRAVA VZORKŮ TAVENÝCH SÝRŮ A MLÉKA PRO SDS-PAGE.....	52
4.5	PŘÍPRAVA VZORKŮ NEZRALÉHO A SUŠENÉHO MLÉKA	52
4.6	SESTAVENÍ APARATURY PRO ELEKTROFORÉZU A PŘÍPRAVA GELŮ	53
4.7	NANÁŠENÍ VZORKŮ A VLASTNÍ ELEKTROFORÉZA.....	54
4.8	HODNOCENÍ GELŮ	56
5	VÝSLEDKY	58
5.1	OPTIMALIZACE PŘÍPRAVY VZORKŮ PRO SDS-PAGE.....	58
5.2	VÝSLEDKY STANOVENÍ PROTEINOVÉHO PROFILU STERILOVANÝCH A NESTERILOVANÝCH TAVENÝCH SÝRŮ	59
5.2.1	Statistické vyhodnocení profilu proteinů ve sterilovaných a nesterilovaných sýrech	64
5.3	VÝSLEDKY PROTEINOVÉHO PROFILU SKLADOVANÝCH TAVENÝCH SÝRŮ	65
5.3.1	Statistické vyhodnocení skladovaných sýrů	67
5.4	PROTEINOVÝ PROFIL NEZRALÉHO MLÉKA (MLEZIVA).....	69
5.5	PROTEINOVÝ PROFIL VZORKŮ SUŠENÉHO MLÉKA.....	72
6	DISKUZE	74
	ZÁVĚR	76
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	77
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	84
	SEZNAM OBRÁZKŮ	85
	SEZNAM TABULEK.....	87

ÚVOD

Bílkoviny patří vedle sacharidů a lipidů mezi tři základní složky potravy, z nichž lidský organismus získává potřebné látky a energii pro duševní i fyzickou činnost, pro zajištění všech dějů, které v organismu probíhají [1]. Jsou součástí všech buněk organismu a musí být neustále obnovovány. Jsou výjimečné v tom, že jako jediná z hlavních živin obsahují ve svých molekulách dusík a síru. Z toho vyplývá, že je tělo nemůže vytvořit z ostatních živin [2]. Význam proteinů je nezastupitelný, neboť poskytují základní materiál pro růst a vývoj živé hmoty, pro zachování a stálou obnovu veškerých tělesných struktur. Zúčastňují se tvorby hormonů, enzymů, barviv (zejména krevního barviva - hemoglobinu) a mají podíl na tvorbě složek trávicích šťáv. Zvyšují látkovou výměnu organismu tím, že velkou část své energetické hodnoty spotřebují na svou vlastní přeměnu tzv. specificko - dynamický účinek. Pomáhají udržovat stálý osmotický tlak ve vnitřním prostředí a tím i rovnováhu vody v organismu; mají přepravní (transportní) funkci při přenosu některých látek (např. tuků); jsou zdrojem imunobiologických látek, které chrání organismus před infekcemi a v neposlední řadě pomáhají udržovat správnou chemickou reakci ve vnitřním prostředí [1].

Proteiny v potravinách jsou živočišného nebo rostlinného původu. Většina živočišných bílkovin (maso, mléko, vejce) obsahuje v dostatečném zastoupení všechny esenciální aminokyseliny a tyto bílkoviny se označují jako bílkoviny první kategorie (biologická hodnota okolo 95 %) [3].

Studium mléčných bílkovin má za sebou již stoletou historii. Bílkoviny mléka se rozdělují do dvou skupin, které se liší chováním v kyselém prostředí (při pH 4,6), či srážením v přítomnosti syřidla. Nesyřitelné bílkoviny (20 %), které zůstávají v syrovátce jsou albuminy a globuliny. Pro výrobu sýra je nejdůležitější kasein (80 %) [4].

Výroba sýrů je nejstarším odvětvím zpracování mléka. Patří mezi technologicky nejnáročnější. V principu se jedná o koncentraci mléčných bílkovin, které společně s tukem a minerálními látkami jsou nejpodstatnějšími složkami sušiny sýrů [5].

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 PROTEINY

Bílkoviny jsou vysokomolekulární látky (biopolymery) o relativní molekulové hmotnosti vyšší než asi 10 000. Jejich základem jsou molekuly aminokyselin, které jsou propojeny do polypeptidového řetězce vzájemnou peptidovou vazbou $-\text{CO}-\text{NH}-$ [6].

Kromě peptidových vazeb se na vytváření struktury proteinů podílejí ještě jiné vazby, zejména disulfidové ($-\text{S}-\text{S}-$), esterové a amidové (vazby umožňující spojení serinu, threoninu, argininu nebo lysinu prostřednictvím kyseliny fosforečné) [7].

Látky téhož typu, které však obsahují menší počet vázaných aminokyselin, méně než 100, respektive mající menší relativní molekulovou hmotnost než 10 000, označujeme jako peptidy. Podle počtu vázaných aminokyselin to mohou být dipeptidy, tripeptidy, tetrapeptidy atd. Peptidy obsahující vázané aminokyseliny do celkového počtu deset nazýváme oligopeptidy. Peptidy mající více než 10 aminokyselin označujeme souhrně jako polypeptidy. Hranice mezi polypeptidy a bílkovinami (tedy při počtu asi 100 vázaných aminokyselin) není ovšem ostrá [6]. Podstatný znak odlišující bílkoviny od polypeptidů je však kvalitativní: řetězce každé bílkoviny zaujímají z mnoha prostorově možných konformací jen zcela určité, definované a charakteristické prostorové uspořádání, stabilizované převážně nekovalentními interakcemi mezi úseky řetězce. Toto charakteristické uspořádání se označuje jako nativní konformace. Nativní konformace bývají značně kompaktní a do jisté míry stabilní. Jejich hlavní rysy nejsou omezeny na tuhé skupenství, zůstávají zachovány i v roztoku. Nativní konformace se vytváří v průběhu biosyntézy skládáním polypeptidového řetězce, proces se označuje jako sbalování. Předpokládá se, že v sekvenci aminokyselinových zbytků je obsažena kompletní informace o specifické nativní konformaci, a že sbalování probíhá spontánně [8].

1.1 Struktura proteinů

Jádrem struktury peptidů a bílkovin je páteř peptidového řetězce, v níž se stále opakují uspořádání $-\text{CO}-\text{NH}-\text{C}_\alpha-$. Na C_α -atomy této páteře, oddělující jednotlivé peptidové vazby, jsou pak navázány postranní řetězce jednotlivých aminokyselin, které podle struktury mají buď hydrofobní, nebo hydrofilní charakter [6]. Pro charakterizaci proteinů je z hlediska potravinářské praxe a výživy člověka většinou dostačující informace o celkovém složení

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 [9].

1.1.1 Primární struktura

Molekuly biopolymeru jsou vybudovány na principu spojování velkého počtu jednodušších molekul v řetězce, což umožňuje vznik obrovského množství různých druhů molekul. V proteinech se přirozeně vyskytuje 21 různých aminokyselin [10], jejich různým seřazením se může vytvořit $20! = 2,4 \cdot 10^{18}$ permutací. Při několika stech až tisících molekul aminokyselin seřazených v molekule bílkoviny roste počet možností prakticky do nekonečna. Rozmanitost bílkovin je určena sledem jejich jednotlivých stavebních jednotek při zachování stejného typu spojení [11].

Pořadí aminokyselin v polypeptidovém řetězci představuje tzv. primární strukturu proteinu. Tato primární struktura obsahuje veškerou informaci nutnou pro vytvoření 3D struktury [12].

Téměř všechny aminokyseliny, které vytvářejí přirozené proteiny mají L-formu. Písmeno L- znamená, že aminoskupina je nalevo (L-left side) ve Fisherově projekci sloučeniny. Jediná aminokyselina, která není v L-formě je glycin. Tato aminokyselina má místo vedlejšího řetězce atom vodíku. Proto C_{α} atom této aminokyseliny není chirální (tzn. aminokyselina nevytváří stereoisomery) [13].

1.1.2 Sekundární struktura

Polypeptidové řetězce nativních proteinů mají v různých částech řetězce určitou sekundární strukturu, tzn. určité prostorové uspořádání (konformaci), které je dáno jejich primární strukturou (sekvencí aminokyselin) a fixováno nevazebnými interakcemi funkčních skupin aminiokyselin. Aminokyseliny s hydrofobním řetězcem se uplatňují v hydrofobních interakcích, aminokyseliny s elektrickým nábojem v postraním řetězci (kyselé a bazické hydrofilní aminokyseliny) se podílejí na elektrostatických interakcích, ostatní hydrofilní a

amfifilní aminokyseliny mohou tvořit vodíkové vazby prostřednictvím svých funkčních skupin [7].

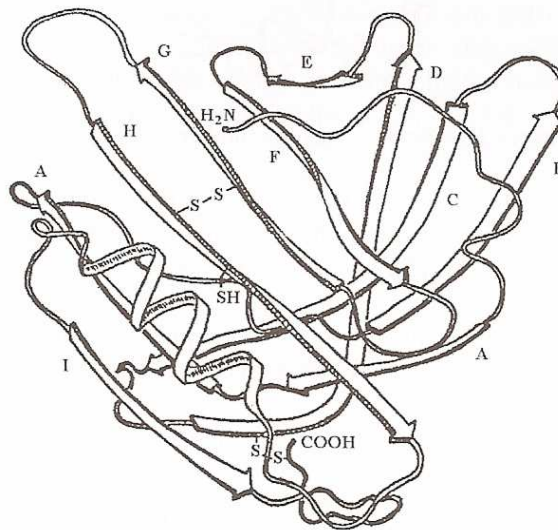
V proteinech se běžně vyskytují tři typy sekundární struktury: α -helixy, beta listy a ohyby. Uspořádání, která nemohou být klasifikována ani jedním z těchto tří základních typů sekundární struktury se označují jako tzv. struktury náhodného klubka [13].

Nejvýznamnější prvky sekundární struktury jsou helikální struktury vzniklé stočením řetězce, resp. jeho části, kolem atomu C_α do šroubovice čili helixu [7]. α -helix si lze představit jako úzký válec, po jeho ploše sestupují ve šroubovici plošky peptidových vazeb. V místech, kde se jejich roviny protínají, odstupují z C_α postranní řetězce aminokyselinových zbytků R. Protože na jeden závit (otáčku) připadá 3,6 zbytků aminokyselin, na 5 úplných závitů připadá 18 zbytků a 19. zbytek odstupuje z válce ve stejné poloze jako první, posunut jen o 5 závitů dále. Postranní řetězce vytvářejí jakýsi obal pro tuto sekundární strukturu. Poměrně často bývají v globulárních bílkovinách na jedné straně šroubovice vedlejší řetězce polární, na opačné nepolární. V prolinových zbytcích je znemožněna volná rotace podle vazby N- C_α , prolin v aminokyselinové sekvenci přerušuje („zlomí“) pravidelnou α -helikální strukturu nebo ji ukončuje. Na koncích α -helikální segmentů nebo na koncích polypeptidových řetězců se někdy nacházejí podobné šroubovicové sekundární struktury – těsnější helix 3_{10} nebo vplnější helix 4_{16} (π -helix) [8].

Dalšími běžnými sekundárními strukturami proteinů jsou β -struktury (tzv. skládaný list nebo také β -hřeben) [7]. Jsou časté v sekvencích s vysokým obsahem glycinu, alaninu a větvených aminokyselin jak globulárních tak některých fibrilárních bílkovin. Hlavní řetězec β -struktury je značně, ne však zcela natažen (formálně jej lze popsat jako šroubovici se dvěma zbytky na závit). Roviny peptidových vazeb se v řetězci střídavě sklánějí nahoru a dolů tak, jako kdyby řetězec probíhal po povrchu skládaného listu papíru. V místech, v nichž se roviny protínají, z C_α odstupují střídavě směrem vzhůru a dolů postranní řetězce. Mezi atomy jediného segmentu řetězce s β -strukturou proto nemohou vznikat vodíkové vazby. Obvykle je řetězec stabilizován tím, že vodíkové vazby se vytvoří mezi atomy dvou nebo více segmentů s β -strukturou, které probíhají antiparalelně, méně často paralelně [8], jak je uvedeno na obrázku 1.

Některé proteiny se skládají pouze z jednoho polypeptidového řetězce [13]. Jiné proteiny se skládají ze dvou a nebo více polypeptidových řetězců. U takových bílkovin se hovoří o kvarterní struktuře a rozumí se tím struktura oligomeru, který je asociátem určitého počtu řetězců vzájemně vázaných specifickými interakcemi. Názvem protomer se označuje jednotlivý polypeptidový řetězec, termínu podjednotka se užívá k označení funkční části oligomerní bílkoviny (složené z jednoho nebo více polypeptidových řetězců). Kvarterní struktura je obecným strukturním rysem bílkovin, neboť ji nalzáme u řady enzymů, respiračních bílkovin, strukturních bílkovin aj. Ve většině případů jsou polypeptidické řetězce v oligomerních bílkovinách spolu vázány výhradně nekovalentními vazbami. Narozdíl od sekundární a terciální struktury, které jsou fixovány vnitřetězcovými vazbami, je kvarterní struktura držena vazbami meziřetězcovými. Na jejich tvorbě se většinou podílejí větší oblasti polypeptidových řetězců [11].

Struktura podjednotky (monomeru) globulárního proteinu, β -laktoglobulinu kravského mléka, je znázorněna na obr. 1. Tento protein (s relativní molekulovou hmotností 18 kDa) se v mléce a obecně v prostředí o pH 5-7,5 vyskytuje jako dimer, v prostředí o pH 3,5-5 jako oktamer a v prostředí o pH < 3,5 jako monomer.



Obrázek 2 Struktura β -laktoglobulinu kravského mléka [7].

Polypeptidová kostra je složena z 9 vláken skládaného listu (jsou označeny šipkami směřujícími k C-konci molekuly), která tvoří v prostoru válcovitou strukturu známou pod anglickým názvem β -barrel [7].

Souhrnný přehled tzv. vedlejších vazeb a nevazebných interakcí stabilizující sekundární, terciární a kvarterní strukturu bílkovin uvádí tabulka 1.

Tabulka 1 Přehled vedlejších vazeb a nevazebných interakcí stabilizující strukturu bílkovin [8].

Vazba / Interakce	Strukturní význam
Kovalentní	disulfidové můstky mezi cysteinovými zbytky stabilizují terciární strukturu, příčné můstky jsou významné v kolagenu a elastinu
Vodíkové	stabilizují nativní konformaci: mezi atomy peptidových vazeb stabilizují sekundární strukturu segmentů hlavního řetězce, mezi polárními skupinami postranních řetězců stabilizují terciární a kvartérní strukturu
Elektrostatické	mezi kyselými a bazickými skupinami postranních řetězců na povrchu terciární struktury, fixace koncových karboxylů a aminoskupin, stabilizace kvarterní struktury
van der Waalsovy	mezi postranními řetězci značně přispívají k vytvoření kompaktní terciární struktury
Hydrofobní	mezi nepolárními postranními řetězci stabilizují terciární případně kvarterní strukturu, patrně rozhodují při sbalování řetězce do nativní konformace

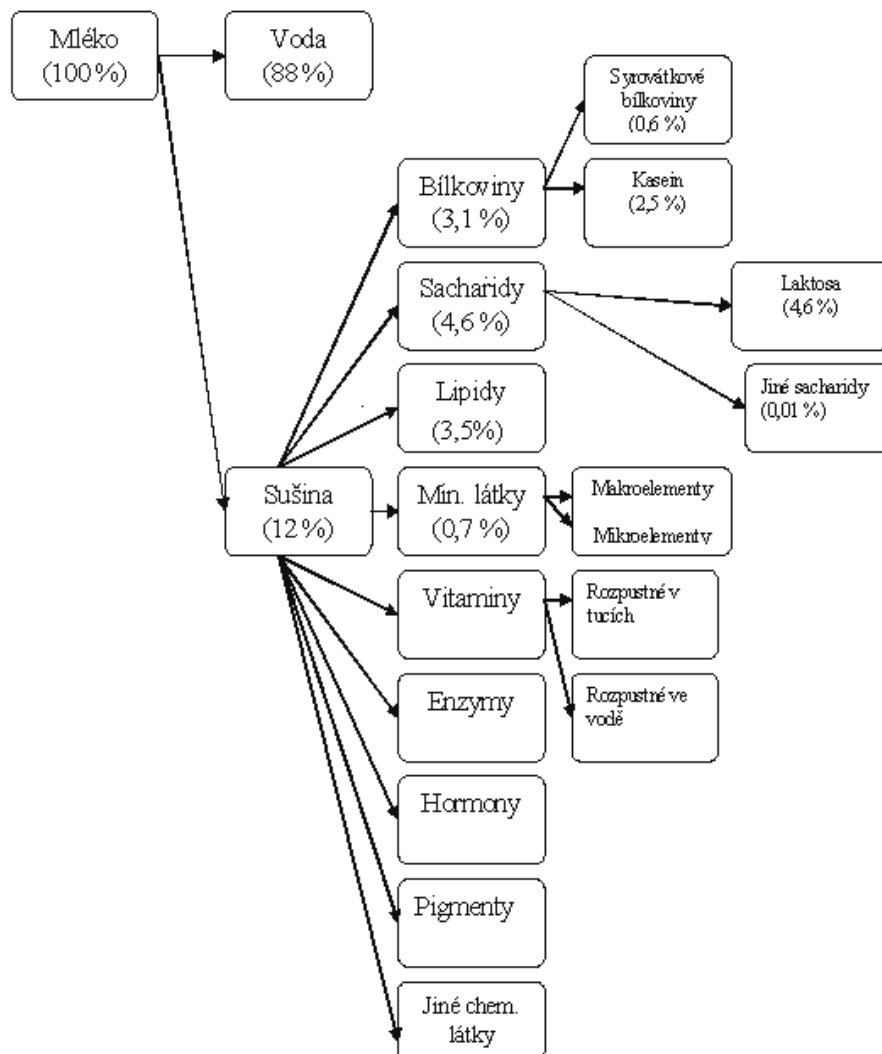
1.2 Složení mléka

Mléko je velmi komplikovaný disperzní systém, ve kterém kaseinové molekuly tvoří micelární disperze, globulární bílkoviny syrovátky koloidní disperze, tuk, přítomný

ve formě tukových kapek (mléčných mikrosomů), tvoří emulzi, částice lipoproteinů koloidní suspenzi, nízkomolekulární látky tvoří pravý roztok [7].

Základní složkou mléka je voda, jejíž obsah se podle druhu mléka (původu) pohybuje v poměrně širokých mezích. V kravském mléce bývá 87-91% vody [7].

Sušina kravského mléka u zdravých dojnic zřídka klesá pod 12 %, množství tuku nebývá menší než 3,0 % a tukuprostá sušina by neměla klesnout pod hodnotu 8,5 %. Mezi jednotlivými složkami mléka existují určité zákonité vztahy, např. mezi obsahem sušiny, obsahem tuku a měrnou hmotností. Na základě obsahu sušiny, tukuprosté sušiny a tuku v sušině lze usuzovat na porušení mléka přidávkem vody nebo sebráním tuku. Podle obsahu laktosy a některých minerálních látek pak lze usuzovat na mléko od nemocných dojnic [9]. Průměrné složení kravského mléka je vyjádřeno na obrázku 3.



Obrázek 3 Průměrné složení kravského mléka (hm%) [14].

Chemické složení mléka ovlivňují nejrůznější činitele, z nichž nejdůležitější jsou:

- plemeno a individualita dojnice,
- fyziologické faktory (stádium laktace, zdravotní stav),
- výživové faktory (druh krmiva, jeho jakost, vzájemný poměr),
- činitele týkající se prostředí (půdní a hygienické podmínky, klima, roční období) [15].

1.3 Tavené sýry

Tavené sýry jsou vyráběny zahříváním směsi různých druhů přírodních sýrů (v různém stupni prozrálosti) s tavícími solemi za částečného podtlaku a stálého míchání, až je dosažena homogenní hmota požadovaných vlastností. V podmínkách České republiky definuje vyhláška Ministerstva zemědělství č. 77/2003 Sb. (v platném znění) tavený sýr jako sýr, který byl tepelně upraven za přídavku tavících solí.

Suroviny pro výrobu tavených sýrů:

- *přírodní sýry* – tvoří základní surovinu pro výrobu tavených sýrů. Dobře vyzrálé přírodní sýry jsou nositelem plnosti chuti, výrazného a vyrovnaného aroma. Výběr druhu a stádium prozrání sýru závisí na požadované konzistenci a chuti výsledného produktu. Pro výrobu lze používat i přírodní sýry s mechanickými vadami, které nelze uvádět na trh k přímému odběru spotřebitele. V České republice se pro výrobu používá zejména Eidamská cihla a Eidamský blok o různém obsahu tuku v sušině, dále Moravský blok a Primátor.
- *tvaroh* – zvyšuje obsah tuku prosté sušiny. Přidává se také do surovinových směsí s velmi zralými přírodními sýry za účelem dodání kaseinu, u kterého neproběhly rozsáhlé hydrolyzační procesy (ovlivnění stability a konzistence taveného sýra).
- *máslo, smetana* – zvyšují obsah tuku, zjemnění výrobku.
- *pitná voda* – pro úpravu sušiny.
- *přísady ovlivňující chuť a barvu* – masová složka, zelenina, žampiony apod.
- *tavicí soli* – upravují prostředí v tavené směsi tak, aby přítomné proteiny (zejména kaseiny) mohly iplatnit své přirozené vlastnosti emulgátorů.

- *mléčné koncentráty* – nahrazují část základní suroviny (přírodních sýrů). Patří sem zejména sušená syrovátka, sušené odstředěné mléko, kasein a kaseináty apod. Hlavním cílem těchto náhrad je snížení nákladů a tím i prodejní ceny.

Z technologických důvodů se dnes přidávají i různé přídatné látky na bázi polysacharidů, například ke zlepšení vaznosti vody, ovlivnění konzistence apod. Mnohdy jsou tyto přídatné látky nutné právě při realizaci náhrad tradičních surovin [16].

1.4 Mléčné proteiny

Asi 95 % dusíku v mléce je ve formě proteinů. Mléčné proteiny tvoří komplikovanou směs, ze které jsou jednotlivé čisté složky obtížně separovány [17]. Podle chemických a fyzikálních vlastností bílkoviny mléka dělíme na kasein (lépe kaseiny, protože i vlastní kasein mléka má několik frakcí), albuminy a globuliny. Všechny tyto bílkoviny jsou v mléce jemně rozptýlené, tvoří pravý koloidní roztok [5]. Procentuální zastoupení jednotlivých proteinů, izoelektrický bod a jejich molekulová hmotnost jsou uvedeny v tabulce 2.

Všechny bílkoviny mléka jsou polymorfni a bylo u nich doposud popsáno více než 30 genetických variant, lišících se sekvencí aminokyselin v důsledku substituce nebo delece aminokyselin v proteinovém řetězci. Jejich heterogenitu navíc stupňuje o-fosforylace a o-glykosylace κ -kaseinu a částečná proteolýza plasmidem. Ne všechny známé genetické varianty byly prokázány u plemen skotu [18].

Obsah bílkovin v mléce kolísá v menším rozpětí, než obsah tuku. Může se pohybovat v rozmezí 2,8 - 3,5 %, většinou však kolísá od 3,1 do 3,4 %. Závisí zejména na plemenu dojnic a jejím zdravotním stavu. V mléčných výrobcích není obsah bílkovin standardizován [14].

U kravského mléka je největší podíl bílkovin tvořen kaseinem. Kasein představuje 80 – 90 % bílkovin mléka. Je charakterizován tím, že je ho možno z mléka vysrážet zvýšením kyselosti při nízkých teplotách (pH 4,6 při 20 °C) [9], nebo za použití syřidlových enzymů, kdy ostatní bílkoviny mléka se tímto způsobem vysrážet nedají. Kasein tvoří základ sýrů a tvarohů [7].

Tabulka 2 Obsah proteinů v kravském mléce a jejich fyzikální vlastnosti [19].

Protein	Zastoupení v mléku [%]	Celková koncentrace v mléku [mg/l]	Izoelektrický bod	Molekulová hmotnost[kDa]
Kaseinová frakce	~80	30		
α -kasein	45-55	15	4,1	23
κ -kasein	8-15	10	4,1	19
β -kasein	25-35	3,5	4,5	24
γ -kasein	3-7	1,2	5,8-6,0	--
Syrovátková frakce	~20	6-7		
α -laktoalbumin	2-5	1,2	5,1	14
β -laktoglobulin	7-12	3,2	5,3	18
sérový albumin	0,7-1,3	0,4	4,7	68
laktoferin	0,2-0,8	0,2	7,8	80
Immunoglobuliny				
IgG1	1-2	0,6	--	160
IgG2	0,2-0,5	0,12	--	160

1.4.1 Kasein

Samotné mléko je výrazně chudší na bílkoviny než mléčné výrobky. To je hlavně dáno vysokým podílem vody v mléce. Vysoký obsah bílkovin v sýrech je také způsoben základní surovinou na výrobu sýru - vysráženým kaseinem [14].

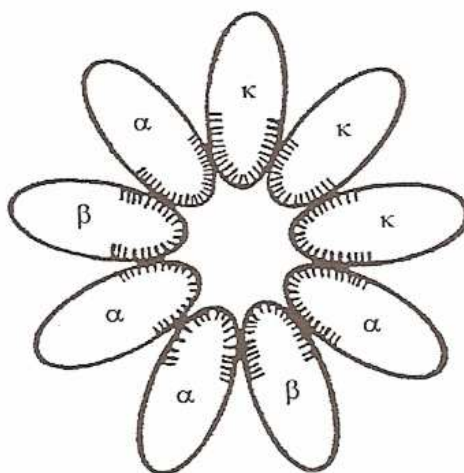
Frakce kaseinu jsou syntetizovány v ribozomech endoplazmatického retikula buněk mléčné žlázy a transportovány do Golgiho aparátu, kde jsou fosforylovány (fosfor je vázán hlavně esterickou vazbou přes hydroxylovou skupinu serinu a threoninu) [18].

Hlavní složkou kaseinové frakce mléka jsou α_s -kaseiny. V kravském mléce se vykytuje α_{s1} -kasein a α_{s2} -kasein (oba ve čtyřech genetických variantách A, B, C a D lišící se primární strukturou, nejobvyklejší variantou je varianta B) [7].

Kaseiny se v mléce nenacházejí ve formě monomerů, ale jsou agregovány do micel a kaseinových komplexů. Polární části molekul kaseinů, tzn. fosfoserinové zbytky molekul α_s -kaseinů a β -kaseinů a threoninový zbytek s vázanými oligosacharidy v molekule

κ -kaseinů, integrují s vápenatými ionty a vodou. Micela kravského mléka obsahuje asi 20 000 molekul kaseinů z toho kaseiny tvoří asi 93 %, vápenaté ionty asi 3 %, anorganický (volný) fosfát rovněž asi 3 %, 2 % fosfátu je vázáno jako fosfoserin a do 0,5 % je sodných, draselných a hořečnatých iontů [20].

Kaseiny β - a γ - při teplotě okolo 20°C snadno asociují do polymerních struktur, naopak při teplotách nižších než 8°C zpětně disociují na monomery. K agregaci molekul α_s -, β - a κ -kaseinů do sférických částic zvaných micely dochází při teplotách vyšších než 5°C. Molekuly α_s -, β - a κ -kaseinů jsou uspořádány nejprve do tzv. submicel tvaru rotačního elipsoidu po 25-30 molekulách znázorněných na obrázku 4 [7].

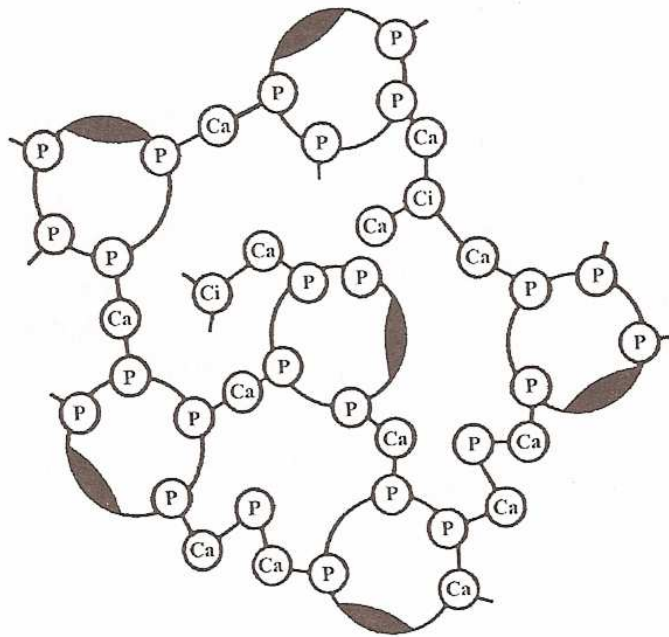


Obrázek 4 Příčný řez typickou submicelou (čárově jsou vyznačeny hydrofobní části molekul) [7].

Jednotlivé submicely se vzájemně spojují do micel prostřednictvím fosfátových (fosfoserinových) skupin α_s -kaseinů a β -kaseinů (κ -kasein nemá v molekule vazebnou oblast) a vápenatých iontů buď přímo, nebo prostřednictvím volných fosfátů a citrátů [7]. Vzájemné spojení submicel je zobrazeno na obrázku 5.

Povrchová vrstva kaseinové micely, tenká 5-10 nm, je bohatá na κ -kasein, který svojí hydrofilní povahou a záporným nábojem stabilizuje ostatní hydrofobní frakce kaseinu proti vysrážení Ca^{2+} ionty. Jádro je tvořeno převážně hydrofobními frakcemi α - a β -kaseinu a vápenatými a fosforečnatými ionty [18].

Průměr vzniklých micel se pohybuje mezi 50-300 nm, nejvíce bývá micel o průměru 150 nm. Jejich velikost závisí na obsahu α_s -kaseinu a κ -kaseinu. Nejmenší částice obsahují asi 50 % α_s -kaseinu a 15 % κ -kaseinu, zatímco největší částice obsahují kolem 42 % α -kaseinu, 26 % κ -kaseinu a obsah β -kaseinu je zhruba 30 %. Počet micel bývá asi $1 \cdot 10^{12}$ v 1 ml mléka [7].



Obrázek 5 Vzájemné spojení submicel prostřednictvím fosfátů (P), vápenatých iontů (Ca) a citrátů (Ci); plně je vyznačena nevazebná oblast s molekulami κ -kaseinu [7].

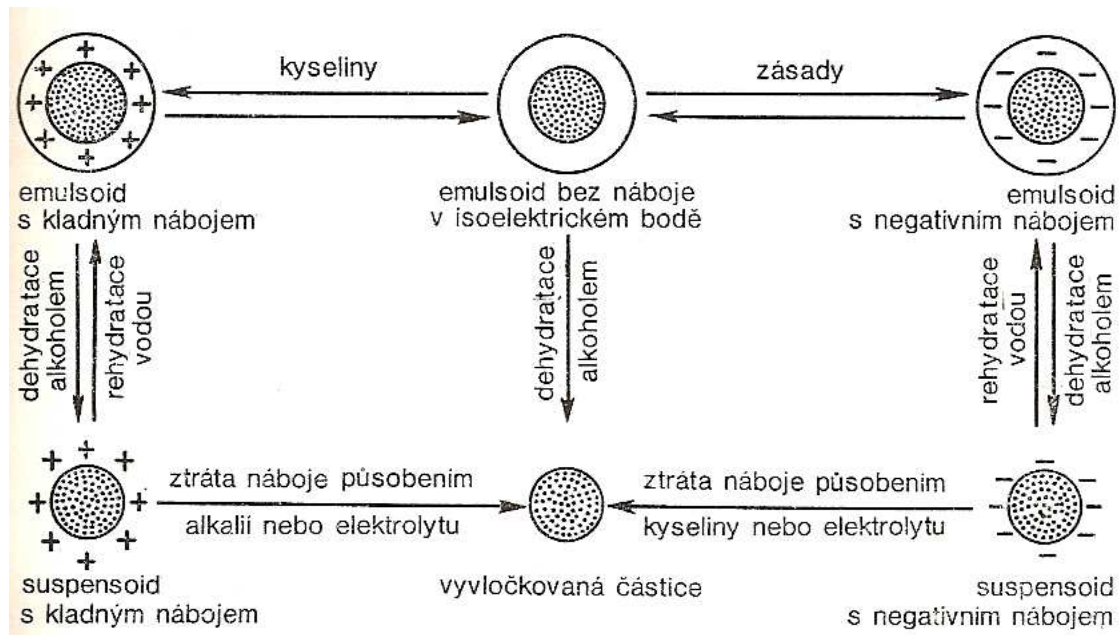
Většina molekul κ -kaseinu je glykosylována, α_s -kasein a β -kasein jsou fosfoproteiny, které mají fosfátovou skupinu esterifikovanou serinem. V přítomnosti vápníku se α_s -kasein a β -kasein vysrážejí, κ -kasein jako jediný se v přítomnosti vápenatých iontů nevysráží. κ -kasein je nicméně snadno atakovatelný chymosinem, který jej štěpí na dvě části (para- κ -kasein a glykomakropeptid), čímž κ -kasein ztrácí své ochranné vlastnosti. Hydrolýza κ -kaseinu chymosinem je znázorněna na obrázku 6. Následkem hydrolýzy veškerý kasein precipituje v přítomnosti vápníku. Tato reakce je základem srážení mléka při výrobě sýrů [7].

Minoritními, ale biologicky významnými proteiny mléka jsou vysokomolekulární globulární glykoproteiny imunoglobuliny s účinností protilátek. Dalším specifickým proteinem je makroglobulin, který způsobuje shlukování tukových globulí v syrovém mléce. To má za následek vznik větších částic až posléze vrstvu smetany na povrchu mléka [7].

1.5 Elektrické vlastnosti proteinů

Bílkoviny tvoří koloidní roztoky již pouhým rozpuštěním ve vhodném dispergujícím prostředí. Bílkovinné koloidy existují ve vodném prostředí ve formě dispersoidu o relativně velkých částicích (o průměru 10^{-7} až 10^{-5} cm, tj. 1-100 nm). Jsou ionizované a proto obklopené orientovanými molekulami vody (solvatační obal). Odstraněním solvatačního pláště (např. odvodněním methanolem, event. vysolení) má za následek tendenci ke shlukování částic. V této fázi je shlukování reverzibilní, tzn. po zrušení účinku solí, event. methanolu, zředěním vzniká opět koloidní roztok. Porušení elektrické dvojvrstvy způsobí koagulaci (obrázek 7) [23].

Solvatační obal pak způsobuje jejich relativní stabilitu nutnou pro jejich funkci v živých systémech. Hydratační obal se skládá ze dvou vrstev molekul vody. První velmi těsně přiléhá k povrchu částice a druhá je již volněji připoutána k první a tvoří plynulý přechod do rozpouštědla [11]. Všechna voda, pevně i méně pevně vázaná, má některé charakteristiky, jimiž se liší od čistého rozpouštědla. Velmi hrubé odhady uvádějí, že se množství této vody pohybuje kolem 0,3 g H₂O/g bílkoviny, což opět velmi zhruba odpovídá vrstvě o tloušťce jedné molekuly vody po celém povrchu molekuly bílkoviny. Monomolekulární vrstva vody kolem bílkoviny je kompaktně a stabilně organizovaná, takže například nejeví termální přechod, ani když je okolní voda ochlazená na desítky stupňů pod nulou Celsiovy stupnice [24].



Obrázek 7 Grafické znázornění koloidních vlastností bílkovinných roztoků [23].

1.5.1 Amfoterní povaha bílkovin

Stejně jako aminokyseliny mají i bílkoviny jako celek amfoterní vlastnosti, vyplývající z přítomnosti disociovaných kyselých a zásaditých skupin. V kyselém roztoku se bílkoviny chovají jako slabé zásady, tvoří ionty, které mají kladný náboj a v elektrickém poli putují ke katodě. V roztoku zásaditěm se chovají jako slabé kyseliny, tvoří záporně nabitě ionty a putují k anodě. V izoelektrickém bodě je bílkovina elektricky neutrální, neputuje k žádnému pólu; izoelektrický bod je u různých bílkovin rozdílný a charakteristický. Bílkoviny, u nichž počet zásaditých funkčních skupin převyšuje počet funkčních skupin kyselých (např. histony), mají izoelektrický bod při pH vyšším než 7. Bílkoviny, u nichž počet skupin kyselých je větší než počet skupin zásaditých (např. fosfoproteiny), mají izoelektrický bod při pH nižším než 7.

Amfoterní chování bílkovin, které je důsledkem velmi rozdílného pK (pH disociující skupiny) jednotlivých disociovaných skupin, vysvětluje jejich pufrací schopnost, která se pohybuje v širokém rozmezí pH 2-13. Bílkoviny tak představují jeden z důležitých systémů, podílející se významnou měrou na udržování acidobazické rovnováhy v organismu [23].

1.5.2 Elektrická dvojvrstva a elektrický potenciál

Bílkoviny mají v roztocích na svém povrchu elektrické náboje, vzniklé interakcí disociovatelných kyselých a bazických skupin s protony (lyofilní koloidy). Ve styku s roztokem nabitý povrch přitahuje ionty opačného znaménka (tzv. protionty), jejichž náboj neutralizuje náboj povrchu a vzniká tak útvar složený ze dvou vrstev opačně nabitých, připomínající kondenzátor – elektrická dvojvrstva. Vnitřní část dvojvrstvy je označována jako vnitřní vrstva nebo nabitý povrch. Ten přitahuje opačně nabité ionty z roztoku, které tak vytvoří druhou vrstvu o stejné plošné hustotě náboje, ale s opačným znaménkem (iontová atmosféra). Pokud by mezi náboji částice a protionty existovaly pouze přitažlivé elektrostatické síly, měla by dvojvrstva kompaktní charakter. Proti tomu však působí molekulový tepelný pohyb, který má snahu ionty v roztoku rovnoměrně rozptýlit. Výsledkem je, že iontová atmosféra diferencuje na dvě složky (vrstvy). Vnitřní je tenká, pevně přiléhá k povrchu částice a spolu s ní se také pohybuje. Vnější má difúzní charakter a plynule přechází do roztoku [11, 25].

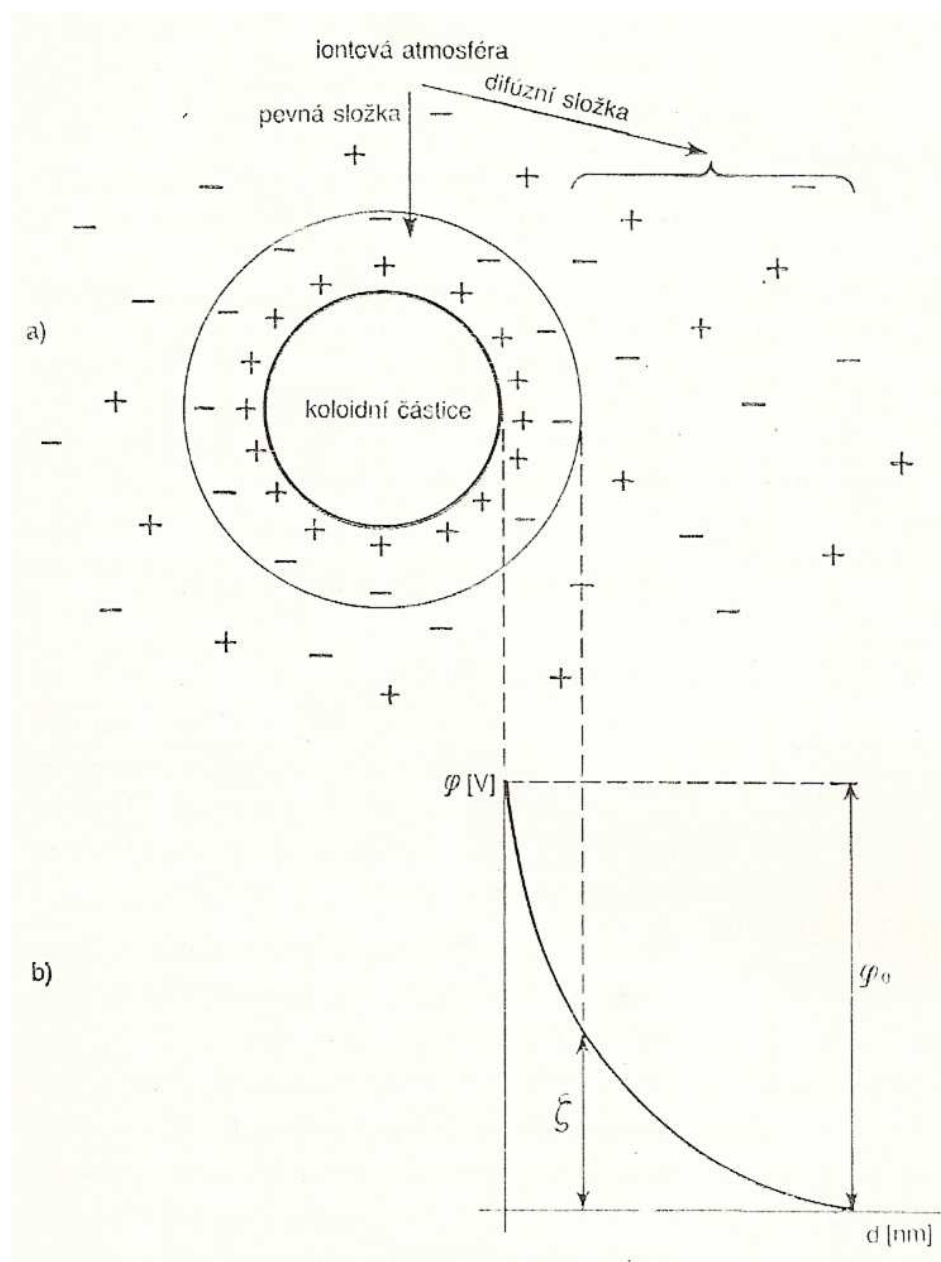
Mezi povrchem koloidní částice a roztokem se pak vlivem různé hustoty nábojů vytváří potenciálový rozdíl φ , jehož velikost lze určit z Nerstovy rovnice

$$\varphi = \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln \frac{c_1}{c_2} \quad [\text{V}] \quad [11].$$

Kde R je plynová konstanta, T je absolutní teplota, F je Faradayova konstanta, z nábojové číslo iontů společných pro povrch částic a vnitřek roztoku, c_1 , c_2 jsou koncentrace (přesněji aktivity) těchto iontů ($c_1 > c_2$). Závislost potenciálu φ na vzdálenosti od povrchu částic je nelineární, což je zobrazeno na obrázku 8.

Potenciál na tzv. pohybovém rozhraní, tj. na rozhraní mezi přilínající vrstvou a ostatní kapalinou, se nazývá elektrokinetický nebo ζ -potenciál (zeta-potenciál), není to tedy celkový potenciál povrchu vůči kapalně fázi. Na rozdíl od elektrochemického potenciálu, který je dán termodynamickými vlastnostmi objemových fází, je ζ -potenciál funkcí uspořádání fázového rozhraní. Znaménko ζ -potenciálu je opačné než znaménko iontů vnější vrstvy elektrické dvojvrstvy. Nebývá vyšší než 100 mV; je značně ovlivňován

přídavkem elektrolytů a to i v malých koncentracích [25]. Podílí se zejména na stabilitě koloidních soustav a uplatňuje se při elektrokinetických dějích [11].



Obrázek 8 Elektrická dvojvrstva (a) a vznik elektrického potenciálu (b) [11].

Naboj bílkovin lze využít při různých modifikacích fixačních biotechnologií. Příkladem může být vzájemná adsorbce lineárních polykationtů a negativně nabitých proteinů na pevném substrátě [26].

2 STANOVENÍ BÍLKOVIN

Metody stanovení bílkovin lze rozdělit do dvou základních skupin. První skupina je vhodná pro stanovení bílkovin ve směsi s jinými složkami potravin, druhá skupina metod je vhodná pro stanovení bílkovin v čistých bílkovinných preparátech. V analýze potravin jsou častější metody první skupiny, které mají být rychlé, spolehlivé a mají zaručovat dostatečnou reprodukovatelnost výsledků. Druhá skupina metod je ve většině případů časově náročnější a vyžaduje speciální zařízení [27].

Pro prvou analytickou orientaci o obsahu bílkovin v potravinách je postačující stanovení celkového obsahu dusíku, vyjádřeného tzv. hrubou bílkovinou. Hodnoty hrubé bílkoviny v sobě zahrnují i jiné dusíkaté látky nebílkovinné povahy a neříkají nic o nutriční hodnotě analyzovaného vzorku. Určitým zpřesněním je stanovení tzv. čisté bílkoviny. Tyto metody eliminují přítomnost nízkomolekulárních nebílkovinných dusíkatých látek ve vzorku. Podstatně hlubší obraz o nutriční hodnotě bílkoviny analyzovaného vzorku poskytne její aminokyselinové složení. Analyzovaná bílkovina se hydrolyzuje a uvolněné aminokyseliny se rozdělí některou z dělicích technik, nejčastěji chromatograficky na ionexech.

V některých případech je rovněž vhodné sledovat izolaci bílkovinných frakcí. K tomuto účelu našly uplatnění různé typy elektroforetických metod. Stejných postupů lze rovněž použít ke sledování změn bílkovinných frakcí během různých technologických operací [28].

2.1 Metody stanovení hrubé bílkoviny

Metody stanovení hrubé bílkoviny lze zjednodušeně rozdělit na dvě skupiny a to na metody odměrné analýzy a metody spektrofotometrické [29].

2.1.1 Metody odměrné analýzy

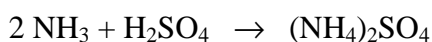
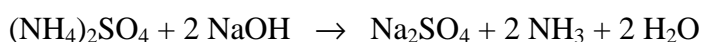
a) Metoda podle Kjeldahla

Ke stanovení bílkovin v potravinách a potravinářských surovinách se nejčastěji používá metody založené na stanovení množství přítomného dusíku podle Kjeldahla. Organická látka se mineralizuje koncentrovanou kyselinou sírovou při teplotě varu kyseliny. Rozklad se urychluje zvýšením teploty varu (např. síranem draselným) a vhodným katalyzátorem, např. oxidem měďnatým, síranem měďnatým, rtuť, peroxidem vodíku, selenem. Dusík,

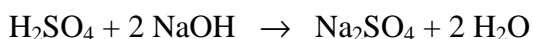
který byl v bílkovinách nebo aminokyselinách ve formě aminoskupiny i iminoskupiny, se mineralizací převede na síran amonný.



Ze síranu amonného se potom uvolní amoniak 30% roztokem NaOH a přehání se vodní párou v Parnas-Wagnerově destilačním přístroji do předlohy se známým nadbytečným množstvím odměrného roztoku kyseliny sírové.



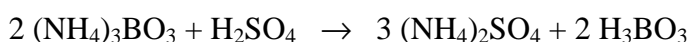
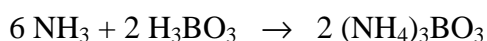
Přebytek této kyseliny se pak titruje odměrným roztokem hydroxidu sodného na indikátor methylčerveň nebo Tashiro.



Z množství spotřebované kyseliny sírové se vypočte obsah dusíku (1ml 0,05 mol.l⁻¹ H₂SO₄ odpovídá 1,4 mg dusíku) a výsledek se vyjádří na 100 g vzorku. Obsah dusíku se přepočte na obsah tzv. hrubé bílkoviny vynásobením faktorem 6,25. Jelikož je obsah dusíku v bílkovinách podle původu různý, byly vedle uvedeného univerzálního faktoru navrženy pro některé další potraviny odlišné faktory (obiloviny, mouka, chléb a těstoviny 5,70; sušené mléko 6,38; ořechy 5,30). Pokud není obsah dusíku příliš nízký, má metoda univerzální použití pro běžné potraviny a potravinářské suroviny [27,28].

b) Metoda podle Winklera

Z mineralizátu bílkovinného materiálu, připraveného podle Kjeldahla, se amoniak, uvolněný ze síranu amonného koncentrovaným roztokem NaOH, predestiluje s vodní parou v destilačním přístroji do roztoku kyseliny trihydrogenborité. Vzniklý boritan amonný se stanoví titračně odměrným roztokem kyseliny sírové nebo chlorovodíkové na indikátor methylčerveň.



Z množství spotřebované kyseliny se vypočítá obsah dusíku (např. 1ml 0,01 mol.l⁻¹ HCl odpovídá 0,14mg dusíku). Výsledek se přepočítá na navážku a vynásobením faktorem 6,25 se určí procento hrubé bílkoviny v analyzovaném materiálu. Metoda se využívá při stanovení bílkovin v mase a masných výrobcích [27].

c) Metoda podle Conwaye

Vzorek se zmineralizuje podle Kjeldahla. Roztok amonné soli ve vnějším prostoru Conwayovy nádoby se zalkalizuje nasyceným roztokem K₂CO₃ nebo 50% KOH. Uvolněný amoniak se absorbuje v roztoku kyseliny borité umístěné ve vnitřním prostoru nádoby. Obsah dusíku se vypočítá podle spotřeby 0,01 mol.l⁻¹ HCl při titraci do červeného zbarvení (1ml 0,01 mol.l⁻¹ roztoku HCl odpovídá 0,14 mg dusíku). Metoda je vhodná pro stanovení malých množství bílkovin v potravinářském materiálu [28].

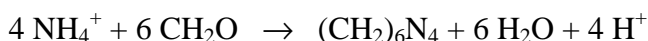
d) Steineggerova metoda

Po neutralizaci vzorku odměrným roztokem NaOH na fenolftalein se přidávkem formaldehydu blokuje působnost volných skupin -NH₂. Po promíchání se provede opakovaná titrace odměrným roztokem 0,25 mol.l⁻¹ NaOH. Druhá spotřeba je tzv. aldehydové číslo (1 ml roztoku NaOH = 1 aldehydové číslo = 0,0758 g bílkovinného dusíku). Metoda se například používá pro stanovení bílkovin v mléce. Pro přepočet

na obsah bílkovin se použije korekční součinitel 6,38. Výsledek dělený hustotou mléka udává obsah bílkovin v procentech [27].

e) Hanušova metoda

Metoda je založena na reakci amonných iontů, vzniklých po mineralizaci podle Kjeldahla, s přebytkem formaldehydu za vzniku vodíkových iontů.



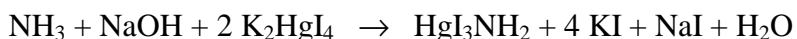
Uvolněné vodíkové ionty se titrují odměrným roztokem NaOH na indikátor fenolftalein. Hexamethylentetramin, který při reakci vzniká, je velmi slabou zásadou a nemá vliv na barevnou změnu indikátoru [27].

2.1.2 Spektrofotometrické metody

Spektroskopické metody jsou založeny na absorpci záření roztokem vzorku. Absorbance se zvětšuje s obsahem molekul. Toto zvětšení je ekvivalentní energii absorbovaného světla a je dáno zákony kvantové mechaniky [30].

a) Stanovení Nesslerovým činidlem

Dusík vázaný v bílkovinách se mineralizací s kyselinou sírovou (katalyzátor H_2O_2) převede na amonnou sůl, která se stanoví spektrofotometricky po reakci s Nesslerovým činidlem v alkalickém prostředí.



Intenzita zbarvení se měří na spektrofotometru při vlnové délce 450 nm proti vodě. Obsah dusíku se odečte z kalibrační křivky a přepočte na navážku. Vynásobením faktorem 6,25 se

získá obsah hrubé bílkoviny. Metoda je použitelná pro stanovení bílkovin v potravinářských materiálech s menším obsahem dusíku [27, 28]

b) Stanovení biuretovou reakcí

Po odstranění nízkomolekulárních sloučenin odstředěním s kyselinou trichloroctovou se k sedimentu přidá biuretovo činidlo. V alkalickém prostředí vznikají modré komplexní sloučeniny mědi, jejichž barevná intenzita je úměrná koncentraci bílkovin (absorbance vynásobená faktorem 17 udává miligramy bílkoviny ve vzorku). Zbarvení se proměřuje při 546 nm proti slepému vzorku. Metoda je méně citlivá. Je však rychlá (není nutná mineralizace), proto se jí používá k orientačnímu stanovení bílkovin [27, 28].

c) Stanovení oranží G

Bílkoviny vážou z purpurového roztoku barvivo oranž G, z jehož úbytku zjištěného spektrofotometricky proměřením intenzity zbarvení roztoku při 480 nm se na základě empiricky zjištěného vztahu určí jejich množství ve vzorku. Metoda je vhodná pro rychlé stanovení bílkovin v některých rostlinných materiálech (obiloviny, luštěniny, olejnin, mouka), z živočišných materiálů nalezla uplatnění pro stanovení bílkovin v mléce [27, 28].

d) Stanovení v UV oblasti

Ke stanovení bílkovin se využívá absorbance některých aminokyselin (tryptofan, tyrosin, fenylalanin) v ultrafialovém světle. Roztok bílkovin se zředí fyziologickým roztokem a peptidové vazby se proměří při 180-220 nm; aromatické a heterocyklické aminokyseliny při 280 nm. Metoda je rychlá, snadno proveditelná a vhodná pro sledování průběhu separace bílkovin technikou sloupcové chromatografie. Není však univerzální a pro některé bílkoviny je nelze použít [31].

2.2 Izolace a čištění bílkovin

Vzhledem ke stále rostoucímu používání bílkovin v praxi je jejich izolace z přirozeného materiálu velmi důležitou operací. Získání bílkoviny v dostatečně čisté a nativní formě je komplikovanou záležitostí. Bílkoviny totiž netvoří v orgánech, tkáních a tělesných tekutinách jednoduché směsi, ale jsou součástí více nebo méně organizovaných nadmolekulových struktur a navíc řada bílkovin má velmi podobné vlastnosti. Mnohé jsou dokonce polymorfní (izobílkoviny) a některé tvoří až velké populace individuů úzce příbuzných vlastností (např. sérové imunoglobuliny) [32].

Obvykle je třeba volit řadu purifikačních postupů, abychom danou bílkovinu mohli k dalšímu studiu použít. Hlavní obtíže při izolaci bílkovin jsou nízká koncentrace ve výchozím materiálu, nestálost a vysoká citlivost k jakémukoliv postupu. Proto je bezpodmínečně nutné, aby souběžně s frakcionací bílkovin byl sledován i stupeň čistoty vhodnou analytickou metodou [23].

Prvním krokem je získání vhodného výchozího biologického materiálu. Zdrojem některých bílkovin jsou tělní tekutiny (krev, mléko), které můžeme získat odběrem. Jsou-li výchozím materiálem orgány zabitých zvířat, musíme čerstvý orgán rozmělnit. Vzniklou buněčnou drť pak extrahujeme vodou nebo vodnými roztoky a extrakt oddělíme odstředěním. Pro získání průmyslově používaných bílkovin (zejména enzymů) ve větším měřítku se vychází převážně z mikrobiálních zdrojů, protože je lze v poměrně krátké době namnožit v jakémkoli požadovaném množství. Bílkoviny z namnožených mikroorganismů lze získat izolací z kultivačního media nebo z extraktu desintegrovaných buněk.

V tělních tekutinách a buněčných extraktech je ovšem žádaná bílkovina vesměs přítomna ve složité směsi. K jejímu dělení (separaci a frakcionaci) můžeme použít širokou škálu metod chemických a fyzikálních. Jejich volba se řídí řadou hledisek: obsahem žádané bílkoviny (zda je hlavní nebo minoritní složkou směsi), jejím charakterem (zda je rozpustná, nerozpustná, stabilní, labilní apod.), účelem, jemuž má sloužit (různé nároky na čistotu aj.), měřítkem, v němž má být bílkovina vyráběna (náročnější techniky nemusí být pro velké objemy výroby použitelné) a ekonomikou výroby [32].

K izolaci rozpustných bílkovin, např. z mléka a tkáňových tekutin, se nejčastěji používá srážecích reakcí za podmínek, které nevedou k ireverzibilním dějům. K srážení bílkovin se nejčastěji používá roztoků síranů amonného, sodného, hořečnatého, z organických

rozpouštědel pak ethanolu, dioxanu a diethyletheru. Různou koncentrací použitého srážedla dochází rovněž k frakcionaci bílkovin. Takto izolované bílkoviny lze po zředění roztoků vodou, tj. snížením koncentrace srážecího činidla, převést opět do rozpustné formy [28]. Dalším z velmi běžných způsobů izolace bílkovin je převedení pH roztoku do izoelektrického bodu pI [33].

Další frakcionace lze dosáhnout i odstředěním při různých hodnotách g, tj. na základě jejich různé molekulové hmotnosti. Izolované bílkoviny lze blíže charakterizovat chromatografickými, elektroforetickými a jinými metodami [34].

2.3 Separační metody dělení bílkovin

Klasické metody využívají rozdílů bílkovin v rozpustnosti (frakcionace vysolováním, srážením v izoelektrickém bodě), ve stabilitě vůči denaturačním činidlům (zahříváním, extrémní hodnoty pH, srážení těžkými kovy nebo kyselinami, jako je trichloroctová apod.) a ve velikosti a tvaru molekuly (centrifugace, dialýza, ultrafiltrace). Klasické metody nejsou selektivní, jsou zdlouhavé a málo účinné [33].

Moderní chromatografické a elektroforetické metody jsou selektivní, podstatně účinnější a šetrnější. Využívají rozdílů ve velikosti molekul (gelová chromatografie), v náboji (chromatografie na iontoměničích, elektroforéza v gelech, izotachoforéza) a v izoelektrických bodech (chromatofokusace a izoelektrická fokusace) a využívají specifických interakcí (afinitní chromatografie) [33].

2.3.1 Chromatografie

Zdálo by se, že nejpříjemnější by bylo třídít chromatografické procesy podle toho, které síly se podílejí na distribučním procesu. Toto nejlogičtější uspořádání však není možné, protože značná část chromatografických separací využívá současně dvou a více separačních principů. Protože chromatografie je separační technika, která využívá dělení látek mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je mobilní a druhá stacionární, vychází třídění chromatografických metod z tohoto základu [35]. Primární je rozdělení na plynovou a kapalinovou chromatografii, podle toho, v jakém skupenství se nachází mobilní fáze a další rozlišení je podle skupenství stacionární fáze, jak ukazuje tabulka 3.

V kapalinové chromatografii existuje další třídění podle formy umístění sorbentu – na chromatografii sloupcovou (CC) a chromatografii v plošném uspořádání (FBC), která zahrnuje dnes již překonanou chromatografii na papíru (PC) a dále chromatografii na tenké vrstvě. Toto třídění není založeno na rozdílných separačních principech a má význam jen jako zdůraznění konkrétní pracovní techniky [36].

Tabulka 3 Přehled nejdůležitějších chromatografických technik [36].

Fáze mobilní	Fáze stacionární	Chromatografická technika	Užívaný symbol
plyn (plynová chromatografie)	kapalina	plynová rozdělovací chromatografie	GLC
	tuhá látka	plynová adsorpční chromatografie	GSC
kapalina (kapalinová chromatografie)	kapalina	kapalinová rozdělovací chromatografie	LLC
		gelová permeační adsorpční chromatografie	GPC
	tuhá látka	kapalinová adsorpční chromatografie	LSC
		iontově výměnná chromatografie	IEC

Pro stanovení bílkovin se mohou využívat určité typy chromatografických metod:

- a) Chromatografie na iontoměničích (IEC – ion exchange chromatography),
- b) Chromatofokusace (FC – chromatofocusing),
- c) Gelová (permeační) chromatografie (GPC – gel permeation chromatography)
- d) Afinitní chromatografie (affinity chromatography),
- e) Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC – high performance (pressure) liquid chromatography) [33].

2.3.1.1 Chromatografie na měničích iontů (IEC)

Chromatografii na měničích iontů (iontově výměnnou, ionexovou) můžeme definovat jako vratnou výměnu iontů mezi mobilní vodnou fází a fází stacionární, kterou tvoří kovalentě vázané ionogenní skupiny sorbentu. Dělení látek je způsobeno rozdílem ve velikosti

náboje. Ten závisí na oxidačním čísle iontu a na disociační konstantě ionogenních skupiny. Disociační konstanta je ovlivněna pH prostředí [36].

Výběr vhodného ionexu pro chromatografii bílkovin závisí na stabilitě bílkoviny a především na jejím izoelektrickém bodě pI . Při tomto pH je bílkovina jako celek elektroneutrální, na ionexu se nebude prakticky zachytávat. Optimální sorpce nastává při pH, které se liší od pI o 1 pH jednotku. Přinižším pH má bílkovina kladný náboj a váže se na katex, při vyšším naopak [33].

2.3.1.2 *Chromatofokusace (CF)*

Chromatofokusace je preparativní metoda s vysokým rozlišením pro dělení bílkovin podle jejich izoelektrického bodu. Je založena na použití speciálních anexů (polybuffer exchangers PBE) a speciálních amfoterních pufrů (polybuffer pharmalyt), které mohou vytvářet lineární gradient pH v koloně. Vzorek se aplikuje na horní část kolony a je vyvíjen pufrům o nižším pH, než je startovní. Jak eluent postupuje, titruje funkční skupiny iontoměníče a automaticky vytváří gradient pH. Bílkoviny se pohybují v koloně v zónách různou rychlostí dokud nedosáhnou oblasti pH rovné jejich pI .

Fokusační efekt způsobí, že bílkoviny jsou eluovány ve velice zaostřených zónách (šíře píku 0,004 pH). Kromě toho je chromatofokusace velice jednoduchá a má vysokou kapacitu. Na běžných kolonách (1 cm x 20-30 cm) je možno dělit 200-300 mg bílkovin o pH v rozsahu 4-11 [33].

2.3.1.3 *Gelová (vylučovací) chromatografie (GPC)*

Metoda je založena na rozdělování látky mezi pohyblivou část eluentu (v prostoru mezi zrny) a nepohyblivou část eluentu (vyplňující póry zrn). Podle teorie stérické exkluze má náplň takovou strukturu, že část pórů není přístupná velkým molekulám vzorku. Velikost molekuly souvisí s molekulovou hmotností, ale lépe ji vystihuje hydrodynamický průměr molekuly. Pro největší molekuly nejsou póry přístupné vůbec a tyto molekuly zůstávají v prostoru mezi částicemi náplně. Eluční objem těchto molekul je potom roven mrtvému objemu kolony V_0 . Naopak pro dostatečně malé molekuly jsou snadno přístupné veškeré prostory v pórech nebo v síťovité struktúře gelu a tyto molekuly jsou eluovány objemem, který je ekvivalentní celkovému objemu eluentu v koloně, tj. mrtvému objemu kolony V_0 a objemu eluentu v pórech zrn a v gelové matici V_i [36].

Frakcionace směsí látek s blízkou relativní molekulovou hmotností je komplikovanější případ gelové chromatografie. Hlavním problémem je zde výběr vhodného gelu (dělené látky musí být v frakcionačním rozmezí). Příkladem průmyslové frakcionace je výroba mléka s nízkým obsahem laktosy [37].

2.3.1.4 Afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie (bioafinitní či biospecifická afinitní) je způsob izolace aktivních látek, který využívá jejich schopnosti specificky a reverzibilně vytvářet komplexy s určitými látkami nazývanými afinant či afinitní ligand. Ligand je kovalentně vázán na pevný nosič (sorbent) a tvoří tzv. afinitní sorbent. Afinitním sorbentem plníme sloupec. Proléváme-li jím roztok obsahující příslušný apoenzym, zadrží se apoenzym na sloupci (interakce apoenzym-koenzym). Ostatní látky protékají. Apoenzym se uvolní ze sloupce zvětšením iontové síly. Tak lze apoenzym zkoncentrovat až 170x [33, 38].

Vymývání zachycené látky (bílkoviny) provádíme nejčastěji změnou pH roztoku, teploty nebo iontové síly [33].

2.3.1.5 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je nejdokonalejší variantou kolonové kapalinové chromatografie. Má vysokou účinnost a rozšíření, je vhodná pro vysoce citlivou analýzu i pro preparaci. Jejími dalšími přednostmi jsou velká rychlost a značná reprodukovatelnost [35].

Základním kritériem pro výběr vhodné metody je rozpustnost vzorku ve standardních rozpouštědlech tvořící mobilní fázi jednotlivých druhů HPLC. Dalším kritériem je struktura vzorku, labilita, velikost molekul, chiralita aj.

HPLC využívá především chemicky vázaných fází. Uvádí se, že se nyní více než 70 % všech analýz kapalinové chromatografie provádí na obrácené fázi, která je mimořádně vhodná pro dělení látek biologického původu rozpustných ve vodných roztocích (složky nukleových kyselin, bílkovin, glykosidy, prostaglandiny aj.). Nejčastěji se používá oktadecylsilikagel (ODS), protože umožňuje dělit látky s širokým spektrem polarit [33].

2.3.2 Elektroforéza

Paralelně s chromatografickými se vyvíjely i metody elektroforetické. Elektroforéza (z řeckého nesený elektrinou) využívá pohybu částic s elektrickou dvojrůstvou [39] ve stejnosměrném elektrickém poli. Směs látek se při ní dělí podle různé pohyblivosti iontů na oddělené zóny jednotlivých složek směsí. Pohyblivost iontů závisí na velikosti náboje, velikosti a tvaru molekuly, na povaze nosičů, elektrolytu aj. U amfoterních iontů, jako jsou bílkoviny, velikost náboje závisí na pH [41], vzhledem k tomu, že bílkoviny mohou existovat (v závislosti na pH a na hodnotě svého izoelektrického bodu pI) minimálně ve třech nábojových formách. V podstatě můžeme většinu látek ve vodném prostředí převést změnou pH na nabitě částice nejčastěji disociací nebo adsorpcí iontů nebo tvorbou ionogenních komplexů [33].

Pohyb elektricky nabitých částic ovlivňuje několik faktorů. Na kulovitou částici, nesoucí náboj q (C) v elektrickém poli o intenzitě E ($V\ m^{-1}$) působí síla F daná výrazem

$$F_1 = q \cdot E \quad [33].$$

Proti ní působí síla vnitřního tření daná Stokesovým zákonem

$$F_2 = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v \quad [40],$$

kde v je rychlost ($m\ s^{-1}$), r poloměr částice, η viskozita.

Z podmínky rovnováhy ($F_1 = F_2$) můžeme vypočítat rychlost pohybu částice

$$v = \frac{q \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad [33].$$

V praxi se však místo rychlosti používá více pohyblivost μ , což je rychlost částice při jednotkové intenzitě elektrického pole (gradientu napětí)

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{q}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad (m^2\ s^{-1}\ V^{-1}) \quad [33].$$

Z výrazu je patrné, že rychlost je přímo úměrná síle pole a nepřímo viskozitě. Ta je silně ovlivněna teplotou [33]. Rychlost závisí také na tvaru a velikosti nabitě částice [41]. Pohyblivost je veličina charakterizující polohu rozdělené látky na elektroforeogramu. Uvedené výrazy platí pro velmi zředěné roztoky. V koncentrovaných roztocích se uplatňují některé nežádoucí jevy, které komplikují situaci:

- a) Kolem centrálního iontu se vytvoří iontový obal z iontů opačně nabitých. Tak se značně snižuje pohyblivost. Vliv elektrolytu vyjadřuje iontová síla I [42].
- b) Elektrolýza: působením stejnosměrného proudu se elektrolyt v okolí elektrod rozkládá. Tím se postupně mění i pH v tomto prostoru – u katody roste, u anody klesá. Proto se pufr v elektrodovém prostoru buď kontinuálně vyměňuje, nebo se účinnými přepážkami (diafragma) mezi elektrodovým a separačním prostorem zabraňuje konvekci, resp. difúzi.
- c) Elektroosmóza: Její podstatou je transport vody hydratovanými ionty od jedné elektrody k druhé podél rozhraní kapalně a pevné fáze. Smysl proudění závisí na povaze rozhraní, kvalitě pevné fáze a složení elektrolytu. Elektroosmotický tok ovlivňuje pohyb všech částic, tedy i neutrálních. Při určování pohyblivosti elektricky migrujících částic je nutné provést korekci. Ta se dělá právě pomocí zdánlivého elektroforetického pohybu neutrálních částic.
- d) Jouleovo teplo Q , které vzniká průchodem elektrického proudu elektrolytem je další problém elektroforézy. Uvolněné teplo může způsobit změnu viskozity, a tím pohyblivosti, odpařování, změnu vodivosti a konečně denaturaci labilních látek. Proto jsou elektroforetická zařízení, pracující s vyšším napětím, vybavena účinným chlazením [33].

Elektroforetické metody můžeme dělit podle několika hledisek – např. podle děleného množství na analytické a preparativní a ty dále na laboratorní či průmyslové nebo podle typu na jednorázové a kontinuální. Často se uplatňuje dělení podle použitého napětí. Vysokonapěťová elektroforéza ($U > 1000 \text{ V}$) se používá více pro dělení nízkomolekulárních látek. Je nutné chlazení. Nízkonapěťová ($U \sim 220 \text{ V}$) se používá pro vysokomolekulární látky. Zde se také doporučuje chlazení vzhledem k jejich teplotní labilitě [33].

2.3.2.1 Kapilární elektroforéza (CE)

Zvláštním způsobem elektroforézy je tzv. kapilární elektroforéza, která využívá elektrokinetických principů elektroforézy a elektroosmózy k separaci látek uvnitř křemenné kapiláry. Tomuto způsobu elektroforézy se říká vysokoučinná kapilární elektroforéza

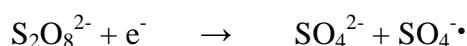
(HPCE) a provádí se několika způsoby - jako volná elektroforéza, gelová elektroforéza, ale i jako izoelektrická fokusace [43].

Kapilární elektroforéza je moderní analytická metoda, která umožňuje rychlou a účinnou separaci velmi různorodého spektra látek současně při velmi malém objemu vzorku. Separace je založena na odlišnosti elektroforetických mobilit iontů v elektroforetickém médiu uvnitř kapiláry. Spektrum použití je velice široké, od separace proteinů, peptidů, mapování a sekvencování DNA, rozlišení organických a anorganických iontů až po analýzu neurotransmiterů v jedné buňce. Oproti klasické gelové elektroforéze nabízí kapilární elektroforéza jak zvýšení výkonu, tak přesnější a kvalitnější výsledky. Navíc lze celý proces zautomatizovat a přímo propojit s výpočetní technikou [44].

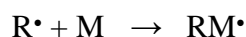
2.3.2.2 Gelová elektroforéza

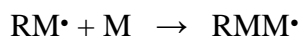
Gelová elektroforéza je jednou z nejúčinnějších a nejvýkonnějších separačních technik, které se v současné době používají při výzkumu bílkovin [45]. Pro získání dobrých výsledků má obrovskou důležitost kvalita činidel a pufrů používaných pro přípravu gelu, neboť ovlivňují jeho propustnost a dále také vizualizaci detekovaných látek [46].

Velmi účinného dělení dosáhneme použitím různých gelů jako nosiče. Pak se látky mohou dělit nejen podle svého náboje, ale i podle velikosti a tvaru molekul. V současné době se pro dělení složitých bílkovinných směsí většinou používají gely polyakrylamidové. Připravují se přímo v elektroforetické aparatuře polymerací akrylamidu a N,N'-methylenbisakrylamidu (bis-akrylamid) [33]. Polymerace akrylamidu je iniciována přidávkem persíranu amonného a N,N,N',N'-tetramethylendiaminu (TEMED). TEMED katalyzuje rozložení persíranu na volný radikál.

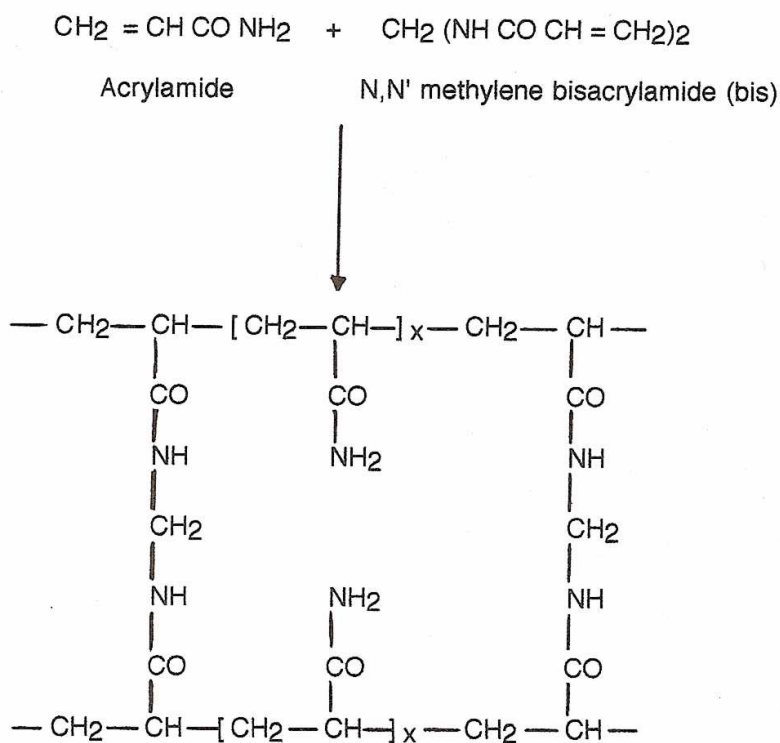


Jestliže označíme tento radikál jako R^{\cdot} a M jako monomer akrylamidové molekuly můžeme polymeraci napsat takto:





Polymerací monomerů akrylamidu vznikají lineární řetězce, které jsou propojeny bisakrylamidovými můstky do trojrozměrné sítě. Na poměru mezi akrylamidem a bisakrylamidem závisí velikost pórů gelu a tím i rozsah molekulových hmotností, v němž se bude uplatňovat tzv. síťovací efekt (obrázek 9) [31].



Obrázek 9 Polymerace akrylamidu [31].

Změnou poměru složek se získají gely s různým stupněm zesíťování, a tím i velikosti pórů. Tyto gely mají řadu předností: mají dobré mechanické vlastnosti, umožňující vysoké rozlišení, jsou transparentní, vzhledem k malé afinitě k barvivům se dělené látky snadno barevně detegují a elektroosmotivkový efekt je téměř zanedbatelný. Proto se používají v kvalitativní i kvantitativní analýze biopolymerů (bílkovin, nukleových kyselin, polypeptidů a jejich degradačních produktů) a také k preparaci [33].

SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfát polyakrylamidová gelová elektroforéza)

Většina proteinů váže SDS ve stejném poměru, asi 1,4 g SDS na 1 g proteinu, což odpovídá zhruba jedné molekule SDS na dva aminokyselinové zbytky [47]. Vysoký negativní náboj navázaného SDS překrývá vlastní náboj proteinu a výsledné komplexy SDS – bílkovina pak mají shodné poměry počtu nábojů na jednotku hmoty a podobný tvar [33]. Následkem toho se při SDS–PAGE proteiny dělí na principu „molekulového síta“, tzn. jejich pohyblivost klesá se stoupající molekulovou hmotností.

Vzorek se nanáší na úzkou vrstvu řidšího (velkoporézního) „zaostřovacího“ gelu. Zde se bílkoviny koncentrují do úzkého proužku před vlastním dělením ve spodním, koncentrovanějším gelu. Při této metodě se kombinují tři dělicí principy – zaostřování v systému elektrolytů (analogicky izotachoforéze), v dalším stupni zónová elektroforéza s gelovou chromatografií (molekulárním síťovým efektem). Dělení je velmi ostré, avšak je nutné, aby makromolekuly měly stejné znaménko náboje. Tomu se napomáhá přidavkem tenzidu SDS (dodecylsulfát sodný), který se pevně váže k proteinům a mění jejich tvar do válcovité podoby [33]. K této změně může dojít až po rozštěpení bisulfidických můstků v molekule proteinu, což zajišťuje např. merkaptoetanol. K dokonalému navázání SDS je nutné vystavit vzorky vysoké teplotě [48].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 CÍLE PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo zjistit vliv sterilačního záhřevu a změny probíhajících během skladování při zadaných skladovacích podmínkách po dobu 24 měsíců na proteinový profil tavených sýrů.

Pro dosažení cílů bylo třeba:

- zpracovat literární rešerži týkající se charakteristiky proteinů a peptidů vyskytující se v mléce a sýrech.
- stručně popsat elektrické vlastnosti proteinů a metody dělení proteinů.

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

- zavést a optimalizovat metodiku pro stanovení proteinů v mléce a mléčných výrobcích s využitím elektroforézy.
- stanovit proteinový profil sterilovaných tavených sýrů a tavených sýrů skladovaných za odlišných podmínek, technologicky neupraveného kravského mléka a mléka sušeného.
- na základě teoretické části a výsledků praktické části formulovat závěry o vlivu sterilace a skladování na proteinový profil tavených sýrů.

4 SDS-PAGE

4.1 Roztoky pro SDS-PAGE

Tris pufr pro separační gel, pH 8,8 [49]

Tris (SERVA) 18,15 g

Deionizovaná voda 50 ml

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

Tris pufr pro koncentrační gel, pH 6,8 [49]

Tris (SERVA) 6,0 g

Deionizovaná voda 50 ml

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

30% roztok akrylamidu ; 2,67% C [49]

Akrylamid (SERVA) 29,2 g

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

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

Vzorkový pufr [49]

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

Tris-HCl (SERVA) 0,0977 g

Merkptoetanol (SERVA) 0,5 g

Glycerol (Lach-Ner) 1,0 g

Bromfenolová modř (SERVA) 0,01 g

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

Elektrodový pufr dle Laemliho 10x koncentrovaný (SERVA)

- před použitím zředěn deionizovanou vodou v poměru 1:9

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

Etanol, 96% (Lach-Ner) 30 ml

Kyselina octová (Lach-Ner) 10 ml

Doplnit do 100 ml deionizovanou vodou.

Roztoky pro barvení stříbrem [50]

40% etanol, 10% kyselina octová

Etanol, 96% (Lach-Ner) 41.6 ml

Kyselina octová (Lach-Ner) 10 ml

Deionizovaná voda do 100 ml

2,5% uhličitan sodný v 0,02% formaldehydu

Uhličitan sodný, bezvodý (Lach-Ner) 3,75 g

Formaldehyd, 37% (Lach-Ner) 75 µl

Deionizovaná voda do 150 ml

0,05% glutaraldehyd, 0,01% formaldehyd, 40% etanol

Etanol, 96% (Lach-Ner) 41.6 ml

Glutaraldehyd, 25% (Sigma) 0,2 ml

Formaldehyd, 37% (Lach-Ner) 25 µl

Deionizovaná voda do 100 ml

0,5% Farmerův zeslabovač

Ferrikyanid draselný (Lach-Ner) 150 mg

Thiosíran sodný (Lach-Ner) 300 mg

Uhličitan sodný, bezvodý (Lach-Ner) 50 mg

Deionizovaná voda do 100 ml

4.2 Vzorky

4.2.1 Tavené sýry sterilované

Pro účely experimentu byly vyrobeny tavené sýry (obsah sušiny 38 % w/w, obsah tuku v sušině 50 % w/w) s přidavkem laktózy (0,5; 1,0; 1,5 a 2,0 % w/w ve finálním produktu). Získán byl rovněž tavený sýr bez přidavku laktózy. Surovinová směs zahrnovala: Eidamskou cihlu, máslo, vodu a komerční tavicí soli. Tavené sýry byly vyrobeny na laboratorním zařízení Vorwerk Thermomix TM 21 [51]. Obsah laktózy byl korigován přidavky vody a másla pro zachování konstantního obsahu sušiny a tuku v sušině. Tavicí teplota byla 90 °C a celkový čas přípravy vzorku byl 10 minut. Vyrobena tavenina byla plněna do 75 g obalů z taženého hliníku uzavřených přivařitelným hliníkovým víčkem. Malá část vaniček z každé výroby byla zchlazena během 3 – 4 hodin na 6 ± 2 °C (tzv. „nesterilované tavené sýry“), zatímco zbytek byl rozdělen na 4 části, které byly následně podrobeny čtyřem různým sterilačním zahřevům (tzv. „sterilované tavené sýry“). Pro sterilaci byl použit diskontinuální průmyslový autokláv SVV2AKV (Pacovské strojírna, Slovenská republika). Aplikovány byly následující sterilační režimy: 100 °C 100 minut (A), 115 °C 32 minut (B), 120 °C 10 minut (C) a 125 °C 3,17 minut (D). Všechny kombinace byly vybrány tak, aby bylo dosaženo konstantní *F*-hodnoty ($F=7,78$). Doba do dosažení sterilační teploty a doba chlazení byly prakticky stejné u všech 4 sterilačních režimů. Celkově bylo vyrobeno 25 variant vzorků: 4 skupiny lišící se kombinací sterilační teploty a doby jejího působení (A – D) a 1 skupina nesterilovaných tavených sýrů. Každá

skupina obsahovala výrobek bez obsahu laktózy a dále 4 výrobky s obsahem laktózy (0,5; 1,0; 1,5 a 2,0 % w/w). Každá varianta byla vyrobena třikrát [52].

4.2.2 Tavené sýry skladované

V další části diplomové práce byl sledován vliv účinku skladování na proteinový profil sterilovaných tavených sýrů při konkrétních skladovacích podmínkách a délce skladování. Experiment byl proveden na dvou šaržích tavených sýrů (označení $j = \text{I, II}$). Obě šarže byly vyrobeny za stejných podmínek. Pro výrobu tavených sýrů (40% w/w sušiny a 45% w/w tuku v sušině) byla použita směs přírodních sýrů, máslo, voda, tavicí soli a sušená syrovátka (0,5% w/w). Tavicí teplota byla 92°C. Tavenina byla plněna do 75 gramových vaniček z taženého hliníku s přivařitelným hliníkovým víčkem. Po naplnění a přivaření hliníkových víček byly nesterilované tavené sýry odděleny a označeny podle níže uvedeného klíče. Ostatní nesterilované vzorky byly následně podrobeny termosterilaci při 117°C po dobu 20 minut a vysterilované vzorky byly zchlazeny na 25°C [53].

Nesterilované vzorky (N) byly skladovány při teplotě $6 \pm 2^\circ\text{C}$.

Sterilované vzorky (S) po 24 hodinách od výroby byly rozděleny a uloženy při 4 teplotách:

- L – v lednici $6 \pm 2^\circ\text{C}$
 - Lm – v mrazničce $-15 \pm 2^\circ\text{C}$
 - S – při laboratorní teplotě $23 \pm 2^\circ\text{C}$
 - T – v termostatu při $40 \pm 2^\circ\text{C}$
-
- Byla provedena hodnocení proteinového profilu dvou šarží tavených sýrů s označením **I** a **II**, a to po dvouletém skladování při příslušných teplotách.

Pro názornost je uveden příklad označení vzorku SLIIIm – jedná se o vzorek sterilovaného sýra řady II skladovaného v mrazničce při teplotě $-15 \pm 2^\circ\text{C}$.

4.2.3 Nezralé mléko (mlezivo)

Vzorky pro analýzu proteinů nezralého mléka byly získány v podniku Salix Morava a.s. Horní Moštěnice. Živočišná výroba tohoto podniku je zaměřena na chov mléčného skotu a prasat.

Náhodně vybrané dojnice na 2., popř. 3. laktaci, u kterých byl proveden odběr vzorků, byly krmeny stejnou krmnou dávkou.

Vzorky kravského mleziva a mléka byly odebrány 1., 2., 3., 5., 7. a 30. den po otelení u 7 náhodně vybraných dojnic v období od 8.7.2007 do 17.8.2007 a v této době nevykazovalo žádné z těchto zvířat onemocnění.

Mléko bylo nadojeno do větší nádoby, ze které se poté odebral vzorek o objemu 45 ml do připravené umělohmotné zkumavky. Před odběrem vzorku do zkumavky bylo mléko homogenizováno. Po odebrání vzorku byla zkumavka označena štítkem. Na štítku bylo zaznamenáno číslo dojnice a den odběru mléka po otelení. Takto odebraný vzorek byl co nejrychleji zamrazen na teplotu $-19\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po transportu v chladícím boxu byl vzorek hluboce zamrazen na teplotu $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ a takto byl uchováván až do samotné analýzy [54].

4.2.4 Sušené mléko

Účelem experimentu bylo zjistit vliv různých technik výroby sušeného mléka na jeho proteinový profil. Bylo vybráno osm vzorků sušeného plnotučného mléka, pro jehož přípravu bylo použito válcové sušení a dva vzorky sprejově sušeného odtučněného mléka.

Vzorky plnotučného mléka byly následující: B1 26,25% tuku v sušině (tvs.); B2 25,5% tvs.; B3 26,5% tvs.; B4 26,5% tvs.; D 26,5% tvs.; E 26,5% tvs.; L 25,5% tvs. Vzorky odtučněného mléka sprejově sušeného byly FR1 a FR2 [55].

4.3 Optimalizace přípravy vzorků pro SDS-PAGE

Pro stanovení proteinového profilu bylo experimentálně vyzkoušeno několik typů přípravy vzorků. Byly připraveny dva základní vzorky:

Vzorek I.:

- 10 g vzorku taveného sýra bylo zhomogenizováno se 40 ml deionizované vody po dobu 5 minut,
- vzorek byl odstředěn při 3000x g po 30 minut při 4°C,
- ze vzorku byl odstraněn tuk.

Vzorek II.: . Bütikofer a kol. [56]; Park a Jin [57]

- 10 g vzorku taveného sýra bylo zhomogenizováno se 40 ml deionizované vody po dobu 5 minut,
- vzorek byl inkubován 1 hodinu při 40°C,
- centrifugace při 3000x g po dobu 30 minut za teploty 4°C,
- ze vzorku byl odstraněn tuk.

Takto připravené vzorky I a II sloužily jako základ pro přípravu metodiky pro analýzu proteinového profilu tavených sýrů. Každý takto připravený vzorek (I a II) byl použit s určitými modifikacemi metody dle následujících autorů:

A. Restani a kol. [58], Elagamy [59]

- ke vzorkům byl přidán vzorkový pufr v poměru 1:1,
- vzorky byly zahřáty na 100 °C po dobu 5 minut.

B. Park a Jin [57]

- ke 500 µl vzorku bylo přidáno 950 µl vzorkového pufru a 50 µl merkaptoetanolu,
- vzorek byl zahřát na 100 °C po dobu 5 minut.

C. Mayer [60]

- ke 750 μ l vzorku bylo přidáno 750 μ l 0,05M TAE (tris-acetátový pufr, pH 7,5) s 3% SDS, 0,1% merkptoetanolem a bromfenolovou modří,
- vzorek byl povařen 10 minut při 100 °C,
- po ochlazení byl přidán 5% merkptoetanol

D. O'Reilly a kol. [61, 62]

- ke 500 μ l vzorku bylo přidáno 1 ml vzorkového pufru,
- vzorek byl inkubován 30 minut při 37 °C,
- vzorek byl zahřát na 100 °C po 5 minut.

E. Etanolvý extrakt – Bütikofer a kol. [56]

- pH vzorku bylo upraveno na 5,5 pomocí 1M HCl,
- ke vzorku byl přidán 96% etanol,
- směs byla inkubována 1 hodinu při 25°C,
- proteiny byly opětovně rozpuštěny přidáním 1M NaOH,
- etanol se nechal odpařit do druhého dne,
- poté byl přidán vzorkový pufr v poměru 1:1,
- vzorek byl zahřát na 100 °C po 5 minut

F. Carbonaro a kol. [63]

- ke 20 ml vzorku bylo přidáno 1 ml 10% CH₃COOH,
- vzorek byl inkubován 10 minut při 37 °C,
- ke vzorku byl přidán 1 ml 1M CH₃COONa,
- vzorek byl doplněn do 25 ml deionizovanou vodou,
- centrifugací byl odstraněn supernatant,

- k sedimentu bylo přidáno stejné množství deionizované vody a byl rozpuštěn přídavkem 1M NaOH,
 - vzorek byl resuspendován v denaturačním pufru v poměru 1:1,
 - vzorek zahřát na 100 °C po 5 minut
- G. Precipitace proteinů při pH 4,6(G1) [64], při pH 4,3 (G2) [65,66] a při pH 4,4 (G3) [56]
- vzorek syra byl po homogenizaci precipitován, pH bylo upraveno na příslušnou hodnotu přidáním 1M HCl,
 - vzorky byly inkubovány 30 minut při 30°C,
 - centrifugací byl odstraněn supernatant,
 - ke vzorku bylo přidáno stejné množství deionizované vody a proteiny byly rozpuštěny přídavkem 1M NaOH,
 - ke vzorku byl přidán vzorkový pufr v poměru 1:1,
 - vzorek byl zahřát na 100 °C po 5 minut.
- H. Park a Jin [57]
- 0,1 g vzorku bylo resuspendováno v 5 ml deionizované vody,
 - ke vzorku bylo přidáno 1,5 ml 5M NaOH a vzorek byl míchán na magnetické míchačce při 50 °C,
 - vzorek byl odstředěn při 3000x g po dobu 30 minut (4 °C)
 - ze vzorku byl odstraněn tuk a vzorek byl resuspendován v deionizované vodě,
 - vzorek byl smíchán se vzorkovým pufrům v poměru 1:1 spolu s 50 µl merkptoetanolu,
 - vzorek byl zahřát na 100 °C po dobu 5 minut.

J. Coisson a kol. [67]

- 5 g vzorku bylo rozpuštěno v 10 ml Tris-glycin pufru (0,01M Tris-glycin pufr; pH 8,3; 6M urea)
- vzorek byl míchán 2 hodiny za teploty 25 °C,
- po odstředění byl ze vzorku odstraněn tuk,
- ke vzorku byl přidán vzorkový pufr v poměru 1:1 a vzorek byl zahřát na 100 °C po dobu 5 minut.

4.4 Příprava vzorků tavených sýrů a mléka pro SDS-PAGE

Vzorky byly připraveny dle metody podle Bütikofer a kol. [56] s určitými modifikacemi. Tavené sýry byly naváženy v množství 10 g a následně byly homogenizovány se 40 ml deionizované vody ve stomacheru po dobu 5 minut. Po důkladné homogenizaci byly vzorky inkubovány při 40 °C po dobu 1 hodiny. Dále byly vzorky centrifugovány 30 minut (HERMLE Z 300 K) při 3000x g. Centrifuga byla vytemperovaná na 4 °C. Z vychlazeného vzorku byl odstraněn tuk.

Z takto připraveného vzorku bylo odpipetováno 250 µl suspenze do ependorfkové zkumavky, ke které bylo přidáno 25 µl 2-merkaptóetanolu, 50 µl 20% SDS a 175 µl vzorkového pufru. Promíchané vzorky byly povařeny po dobu 10 minut na suchém blokovém termostatu Bio TDB-100. Vzorky byly uchovávány za chladírenské teploty.

4.5 Příprava vzorků nezralého a sušeného mléka

Vzorky proteinů nezralého mléka pro SDS-PAGE byly připraveny stejným způsobem jako vzorky tavených sýrů (kap. 4.4) s vynecháním 1. fáze homogenizace ve stomacheru. Vzorky mleziva odebraného 1. a 2. den musely být ještě zředěny deionizovanou vodou a to tak, že vzorky 1. dne byly ředěny v poměru 1:4 a vzorky 2. dne 1:1.

4.6 Sestavení aparatury pro elektroforézu a příprava gelů

Vertikální elektroforetická aparatura (Owl Separation Systems, Inc., USA) pro dva gely, která se skládá z vlastní vany, víka, dvou tvarovaných skel v párovém uspořádání, teflonového těsnění a hřebínku, byla sestavena podle přiloženého návodu. Použitá aparatura byla chlazená vodou.

Pro separaci byl zvolen 15 a 17% separační gel tloušťky 1 mm. Pro přípravu gelu byly smíchány následující roztoky:

15% gel:

30% roztok akrylamidu	11,25 ml
Tris pufr, pH 8,8	5,63 ml
Deionizovaná voda	5,18 ml
10% SDS (Serva)	225 μ l
10% persíran amonný (Serva)	225 μ l
<i>N,N,N',N'</i> -tetra-metylendiamin (TEMED, [Serva])	10 μ l

17% gel:

30% roztok akrylamidu	14,17 ml
Tris pufr, pH 8,8	6,25 ml
Deionizovaná voda	4,08 ml
10% SDS (Serva)	225 μ l
10% persíran amonný (Serva)	225 μ l
<i>N,N,N',N'</i> -tetra-metylendiamin (TEMED, [Serva])	10 μ l

Roztok persíranu amonného byl připraven čerstvý před každou elektroforézou. Po přidání persíranu amonného a TEMEDu byl roztok dobře promíchán a ihned aplikován pomocí pasturovy pipety mezi skla do výšky cca 15 cm tak, aby nedošlo ke vzniku bublin. Pro získání hladkého povrchu a zamezení polymerace na vzduchu byl gel přelit

1 ml vodou nasyceného izobutanolu (Lach-Ner). Polymerace probíhala při pokojové teplotě. Po 45 minutách byla vrstva izobutanolu slita a povrch gelu byl opláchnut destilovanou vodou. Zbytky vody byly vysušeny filtračním papírem a byl aplikován 5% koncentrační gel, který byl smíchán z následujících roztoků [49].

30% roztok akrylamidu	1,36 ml
Tris pufr, pH 6,8	2,0 ml
Deionizovaná voda	4,6 ml
10% SDS	80 μ l
10% persíran amonný	40 μ l
TEMED	10 μ l

Po důkladném promíchání všech komponent byl roztok naléván na ztuhlý separační gel až těsně pod horní hranu skla. Poté byl opatrně vsunut plastový hřeben tak, aby byly z jeho prostoru odstraněny všechny vzduchové bubliny. Takto připravený gel i se stojanem se vložil do vlhké komůrky a nechal polymerovat do druhého dne při pokojové teplotě.

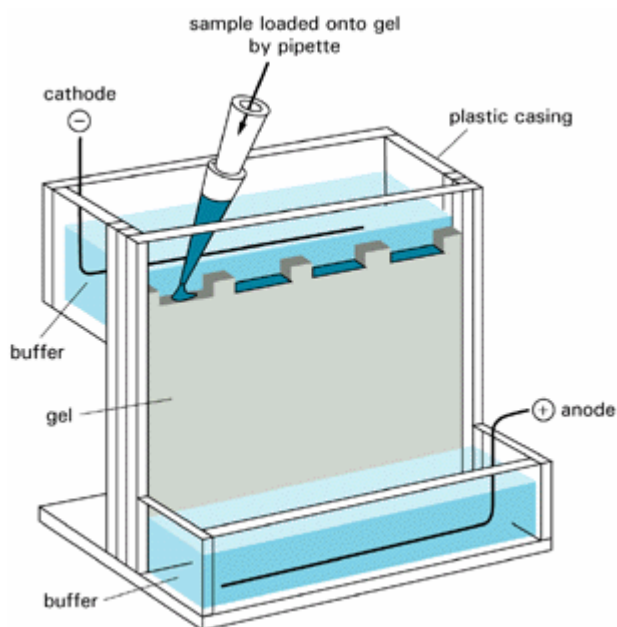
Elektroforetická aparatura umožňuje elektroforézu dvou gelů současně. Množství obou gelů je pak nutné připravit v dvojnásobném objemu.

4.7 Nanášení vzorků a vlastní elektroforéza

Z gelu byl opatrně vyjmut hřebínek. Do spodního prostoru aparatury byl nalit elektroodový pufr. Bylo zapnuto chlazení a skla byla upevněna tak, aby byly eliminovány bubliny ve spodní části gelu. Do horní části vany byl nalit elektroodový pufr, tak aby došlo k převrstvení jamek pro nanášení vzorků.

Vzorky byly nanášeny pomocí automatické pipety (obrázek 10). Objem nanášených vzorků se lišil podle koncentrace proteinů. Byl volen tak, aby výsledný obraz byl co nejostřejší. Rozmezí se pohybovalo v hodnotách 5 až 30 μ l. Kromě vzorků proteinů byl nanášen i molekulový hmotnostní standard (Serva).

Po nanesení vzorků byla elektroforetická komora překryta víkem a připojena ke zdroji stejnosměrného proudu (Programovatelný zdroj k elektroforéze MP-500P, Major Science). Jako konstantní veličina byla nastavena hodnota proudu, ostatní veličiny byly nastaveny tak, aby nebyly limitující. Díky svým vlastnostem vyžadoval každý gel odlišné podmínky. Pro koncentrační gel byla hodnota proudu nastavena na 25 mA (v případě, že běžely dva gely současně na hodnotu 35 mA). Jakmile doputovalo čelo elektroforézy vizualizované bromfenolovou modří k rozhraní koncentračního a separačního gelu (asi po 90 min.), byla hodnota proudu nastavena na 40 mA (pro dva gely na hodnotu 50 mA). Po doputování čela elektroforézy ke spodní hranici separačního gelu byl dělicí proces ukončen.



Obrázek 10 Nanášení vzorků na gel [47].

Elektroforéza trvala asi 5,5 hod. Po jejím skončení byl z gelu odstraněn koncentrační gel a takto upravený dělicí gel byl fixován 10 min. fixačním roztokem. Po fixaci se gely barvily.

Barvení gelů

Gely s fixovanými proteiny byly barveny dusičnanem stříbrným se zkráceným fixačním časem dle Kirkeby a kol. [50].

1. 40% etanol, 10% kyselina octová

10 min.

2. 0,05% glutaraldehyd, 0,01% formaldehyd, 40% etanol	5 min
3. 96% etanol	20 min
4. destilovaná voda	20 min.
5. 0,5 % Farmerův zeslabovač	2,5 min.
6. destilovaná voda	3 x 10 min.
7. 0,1% dusičnan stříbrný (Sigma)	20 min
8. opláchnout gel destilovanou vodou	
9. 2,5% uhličitan sodný	5 min
10. opláchnout gel destilovanou vodou	
11. 2,5% uhličitan sodný, 0,02% formaldehyd	3 x 2,5 min.
12. opláchnout gel destilovanou vodou	
13. 1% kyselina octová	5 min.
14. opláchnout gel destilovanou vodou	

Každý gel se barví samostatně v misce. Misky byly potom umístěny na třepačce (BIOSAN Multibio 3D) a roztoky byly odsávány pomocí vakuové pumpy KNF, typ N86KN.18 (KNF Laboport Neuberger, SRN). Obarvené gely byly uchovávány při +4 °C v destilované vodě.

4.8 Hodnocení gelů

Gely byly snímány digitální fotoaparátem Olympus Camedia C-4000 ZOOM (Olympus, Japonsko) s objektivem Pentax C31204 (Japonsko) v automatickém režimu.

Snímky gelů byly analyzovány pomocí programu UltraQuant (Ultra.Lum, USA). Molekulové hmotnosti proteinových frakcí byly vypočteny programem UltraQuant. Byly použity dva molekulové standardy Protein Test Mixture 5 (SERVA) s proteiny a definovaných molekulových hmotnostech 29; 21; 12,5 a 6,5 kDa a Protein Marker, Broad Range (BioLabs) s definovanou molekulovou hmotností v kDa: 212; 158; 116; 97,2; 66,4; 55,6; 42,7; 34,6; 27; 20; 14,3; 6,5; 3,4; a 2,3. Analyzované gely byly statisticky

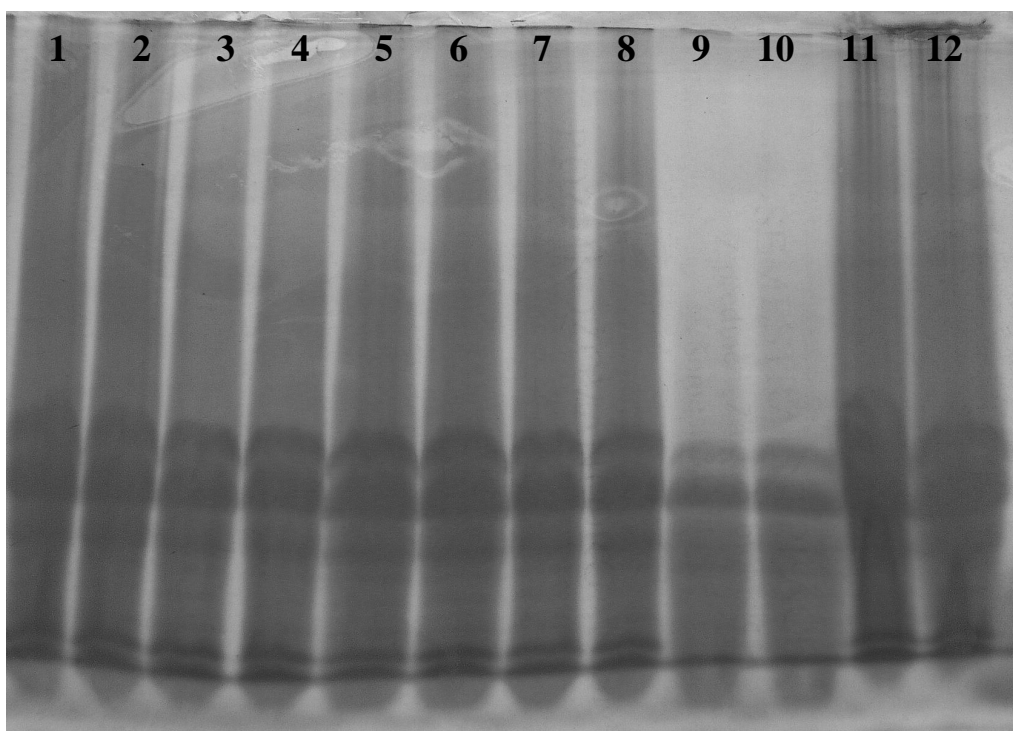
vyhodnoceny metodou shlukové analýzy (průměry mezi skupinami, Euklidovské vzdálenosti) v programu Unistat, verze 5.5.

5 VÝSLEDKY

5.1 Optimalizace přípravy vzorků pro SDS-PAGE

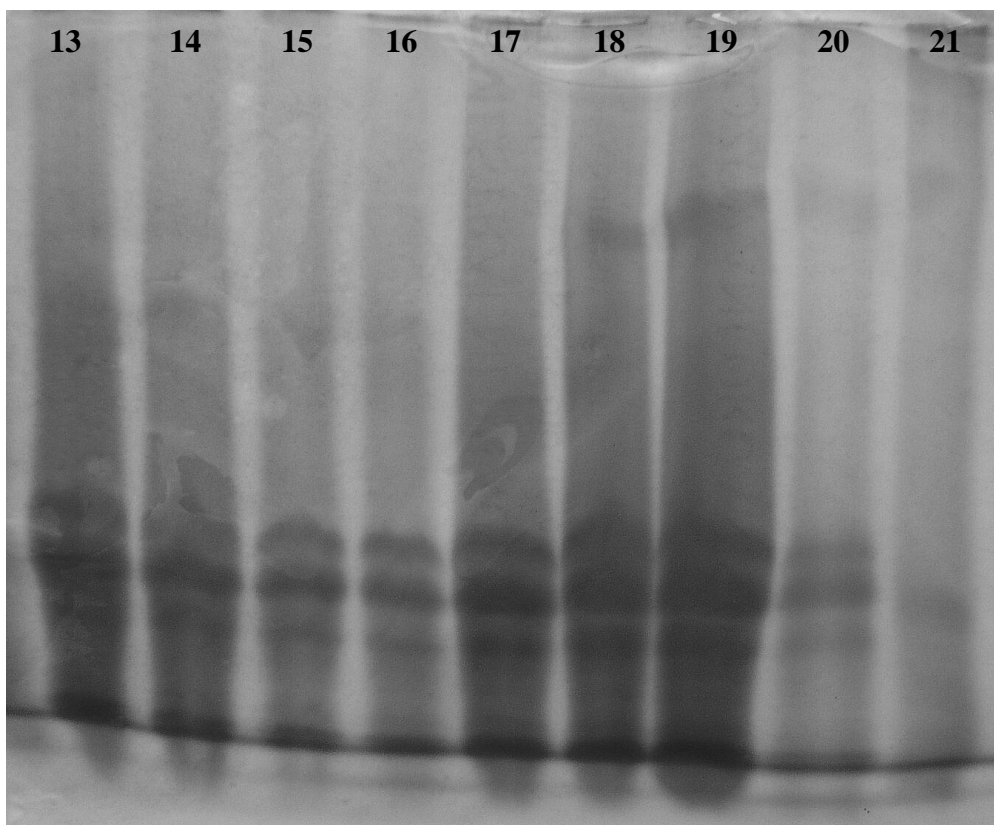
Pro elektroforézu byla nutná optimalizace přípravy vzorků. Jako primární izolát byl použit tavený sýr, z kterého byly nachystány dvě série I a II. Z každé série byly připraveny jednotlivé vzorky, které byly zpracovány podle výše uvedené metodiky s využitím modifikací různých metod (viz. kap. 4.3). Poté byly všechny vzorky otestovány za stejných podmínek paralelně vedle sebe na gelech se stejnou pórovitostí.

Na obrázcích 11 a 12 je zřetelné, že všechny metody jsou si ve výsledku podobné. Při vyhodnocení nebyly zaznamenány větší rozdíly. Pouze u metod IE a IIE, které byly připraveny pomocí etanolového extraktu dle Bütikofer a kol. [56] vidíme, že koncentrace proteinů je poněkud nižší. To je způsobeno extrakcí pouze proteinů rozpustných v etanolu.



Obrázek 11 SDS-PAGE (15% gel) analyzovaných vzorků taveného sýra připravených dle různých metod: **1: IA, 2: IIA, 3: IB, 4: IIB, 5: IC, 6: IIC, 7: ID, 8: IID, 9: IE, 10: IIE, 11: IF, 12: IIF** Označení jednotlivých vzorků koresponduje s popisem metodiky v kap. 4.3.

Pro usnadnění metodiky byla vybrána kombinace metod dle Bütikofer a kol. [56] a Park a Jin [57] s modifikací dle Restani a kol. [58] a Elagamy [59], která je ze všech nejméně náročná na čas i použité chemikálie.

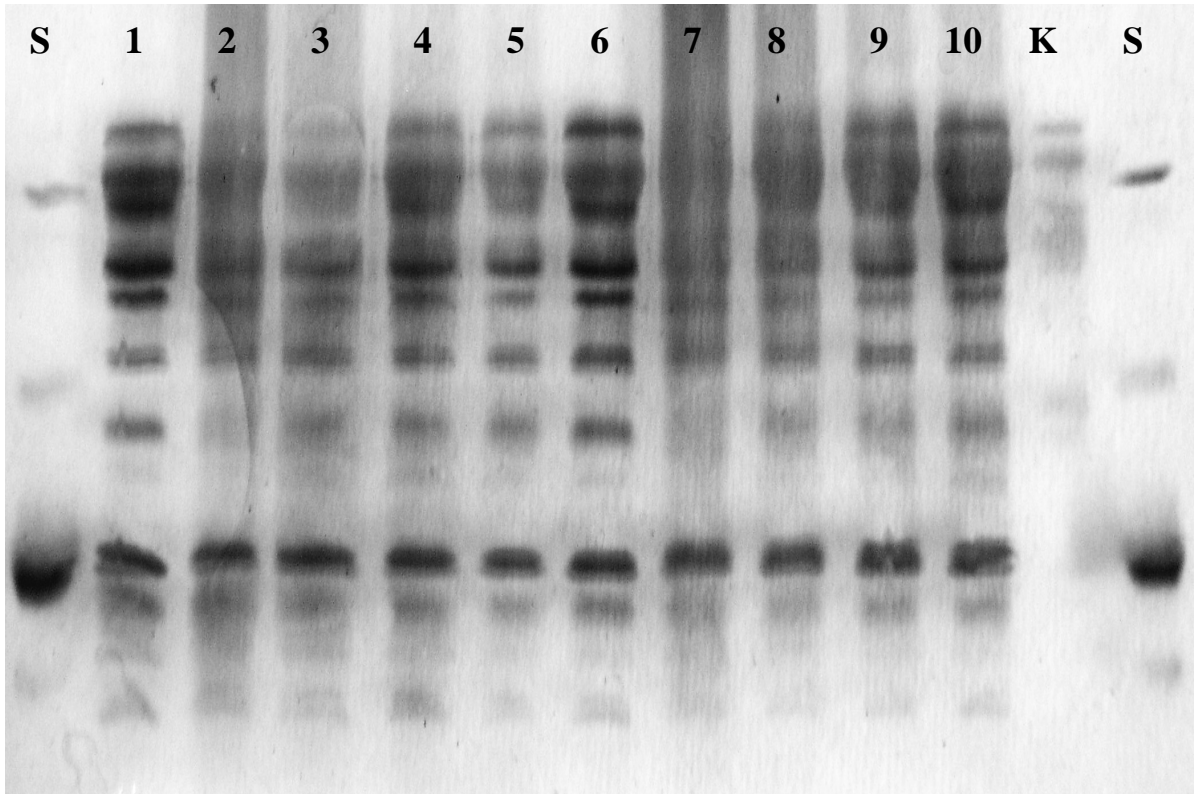


Obrázek 12 SDS-PAGE (15% gel) analyzovaných vzorků zaveného sýra připravených dle různých metod: **13: IG1, 14: IIG1, 15: IG2, 16: IIG2, 17: IG3, 18: IIG3I, 19: IJ, 20: IH, 21: IIH**. Označení jednotlivých vzorků koresponduje s popisem metodiky v kap. 4.3.

5.2 Výsledky stanovení proteinového profilu sterilovaných a nesterilovaných tavených sýrů

Elektroforetické stanovení bylo provedeno u sterilovaných i nesterilovaných tavených sýrů s odlišným obsahem laktózy, který se pohyboval v rozpětí od 0 až do 2 % w/w ve finalním produktu. Sterilační režimy byly voleny tak, aby se dosáhlo účinné F-hodnoty 7,78. Na obrázku 13 je zobrazen reprezentativní gel se serií vzorků s obsahem laktózy 0,5 % a

1,5 % w/w ve finálním produktu. Do první jamky byl nanesen standard o jednotlivých velikostech proteinů 6,50, 12,50, 21,00 a 29 kDa. Poté byly nanášeny vzorky s obsahem laktózy 0,5 % w/w od nesterilovaného až po vzorek sterilovaný pomocí nejvyššího záhřevu (A=100°C; B=115°C; C=120°C a D=125°C). Stejně tak byly pipetovány i vzorky s obsahem laktózy 1,5 % w/w. Do předposlední jamky byl nanesen kasein (směs frakcí) a do poslední jamky opět standard.



Obrázek 13 Proteinový profil vzorků sterilovaných tavených sýrů získaných metodou SDS-PAGE (15% gel): **S**: molekulový hmotnostní standard, **1**: Nst 0.5%L, **2**: A 0.5%L, **3**: B 0.5%L, **4**: C 0.5%L, **5**: Nst 1.5%L, **6**: A 1.5%L, **7**: B 1.5%L, **8**: C 1.5%L, **9**: D 1.5%L, **10**: D 1.5%L, **K**: kasein (směs frakcí kaseinu)

Po normalizaci gelů prostřednictvím molekulového hmotnostního standardu a kaseinu byly pomocí vyznačených pozic molekulového standardu vypočteny programem UltraQuant velikosti jednotlivých proteinů (tabulky 4-6). Značení proteinů bylo provedeno manuálně a správnost označení daného proužku byla potvrzena přítomností píku v denzitometrické křivce dané dráhy.

Z tabulky 4 je zřejmé že u nesterilovaných tavených sýrů s obsahem laktózy od 0 až po 2,0% w/w bylo v rozmezí 3,4 až 29,1 kDa identifikováno 19 proteinů. Sterilované tavené sýry při teplotě 100 °C a s obsahem laktózy 0% w/w ukazovaly 15 proteinů s molekulovou hmotností 3,6 - 29,0 kDa, s obsahem laktózy 0,5; 1 a 1,5% w/w 12 proteinů (3,5 - 29,2 kDa) a s obsahem laktózy 2% w/w 11 proteinů s molekulovou hmotností 3,6 - 29,3 kDa.

Tabulka 4 Srovnání profilu proteinů ve nesterilovaných a sterilovaných tavených sýrech při teplotě 100 °C velikost proteinů v kDa

N 0% L	N 0,5% L	N 1,0% L	N 1,5% L	N 2,0% L	A 0% L	A 0,5% L	A 1% L	A 1,5% L	A 2,0% L
29,117	29,118	29,090	29,162	29,091	29,088	29,236	29,165	29,237	29,332
28,450	28,245	28,479	28,277	28,271	25,698	25,570	25,287	25,544	25,388
27,861	27,574	27,591	27,560	27,685	24,545	24,441	24,454	24,370	24,758
27,106	26,770	26,805	26,755	27,046	23,366	22,529	22,742	22,365	22,810
25,839	25,807	25,662	25,497	25,336	22,114	21,089	20,723	21,178	20,833
24,738	24,501	24,400	24,444	24,198	21,167	17,876	17,824	18,406	18,251
23,535	23,080	23,302	23,170	23,085	18,635	16,030	16,062	15,857	16,576
22,601	22,309	22,069	22,319	21,831	17,041	11,360	11,205	11,726	11,481
21,155	21,180	21,089	21,149	20,707	15,203	9,184	9,070	9,144	9,090
18,761	18,251	18,085	18,326	18,043	11,682	7,314	7,310	7,234	7,557
17,031	16,125	16,224	15,810	16,581	9,533	4,774	4,653	4,671	3,642
15,408	15,188	15,264	15,108	14,854	8,648	3,531	3,859	3,531	
11,541	11,566	11,490	11,704	11,029	6,260				
9,559	9,570	9,275	9,588	9,286	4,695				
8,682	8,776	8,364	8,764	8,473	3,639				
7,234	7,051	7,054	7,234	7,337					
6,208	6,173	6,213	6,261	6,090					
4,970	4,994	4,779	4,812	4,162					
3,930	3,706	3,891	3,489	3,485					

Poslední série sterilovaných vzorků za teploty 125°C je znázorněna v tabulce 6. U sýrů s nulovou koncentrací laktózy bylo identifikováno 14 proteinů s molekulovou hmotností 3,5 až 29,2 kDa. Vzorky s obsahem laktózy od 0,5 až po 1,5% w/w vykazovaly stejný počet proteinů a to 12 (3,5 - 29,2). U posledního vzorku byla koncentrace laktózy 2% w/w a bylo v něm zaznamenáno 11 proteinů s molekulovou hmotností 3,6 až 29,4 kDa.

Tabulka 6 Srovnání profilu proteinů ve sterilovaných tavených sýrech při teplotě 125°C velikost proteinů v kDa

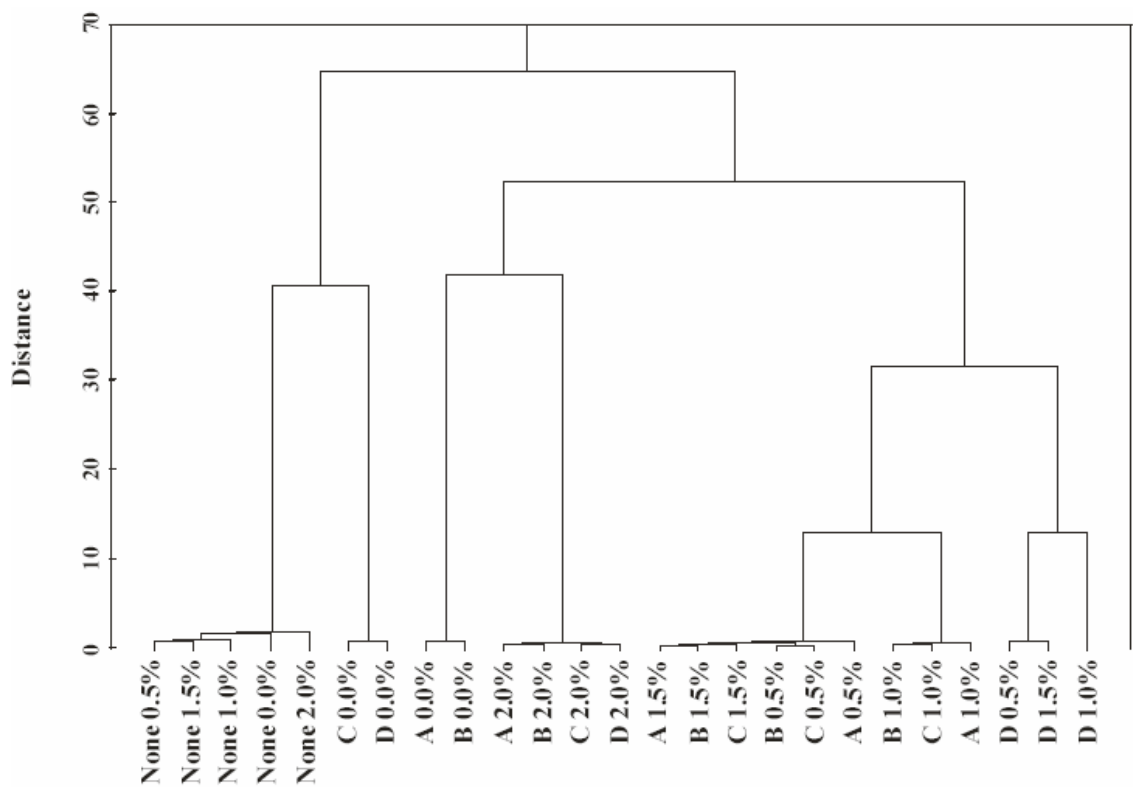
D 0% L	D 0,5% L	D 1,0% L	D 1,5% L	D 2,0% L
29,182	29,177	29,226	29,193	29,420
28,389	25,389	25,199	25,363	25,514
25,675	24,277	24,365	24,295	24,487
24,313	22,606	22,693	22,456	23,040
23,111	21,134	20,552	21,195	20,809
21,895	18,139	17,657	18,312	18,388
20,834	15,826	16,025	15,922	16,599
18,209	11,725	11,154	11,950	11,430
16,507	8,983	8,939	9,146	9,038
14,893	7,277	7,057	7,027	7,806
10,993	4,812	4,770	4,445	3,648
8,654	3,489	3,859	3,591	
6,085				
3,553				

Z tabulek 4, 5 a 6 je patrné, že se všechny proteiny pohybovaly v oblasti molekulové hmotnosti od 3 až po 29 kDa. Prakticky všechny vzorky s nulovým obsahem laktózy vykazovaly větší množství proteinů než tomu bylo u ostatních vzorků s přidavkem laktózy. Naopak u všech výrobků s 2% w/w laktózy bylo identifikováno menší množství proteinů než vzorcích ze stejných sérií s nižším obsahem laktózy. Vliv sterilační teploty neměl

na štěpení až takový vliv jako délka sterilace. Čím byla použita delší doba záhřevu, tím více byly proteiny degradovány.

5.2.1 Statistické vyhodnocení profilu proteinů ve sterilovaných a nesterilovaných sýrech

Proteinové profily nesterilovaných a sterilovaných tavených sýrů získané metodou SDS-PAGE byly statisticky analyzovány pomocí klastrové analýzy, jejíž výsledky (dendrogram) jsou uvedeny na obrázku 14. Nesterilované tavené sýry vytvořily samostatný shluk, výrazně oddělený od všech vzorků, které byly ošetřeny sterilací.



Obrázek 14 Výsledky shlukové analýzy proteinového profilu sledovaných tavených sýrů: A – 110°C 100 minut, B – 115°C 32 minut, C – 120°C 10 minut a D – 125°C 3,17 minut, None – nesterilované tavené sýry. Obsah laktózy je vyjádřen v procentech (w/w).

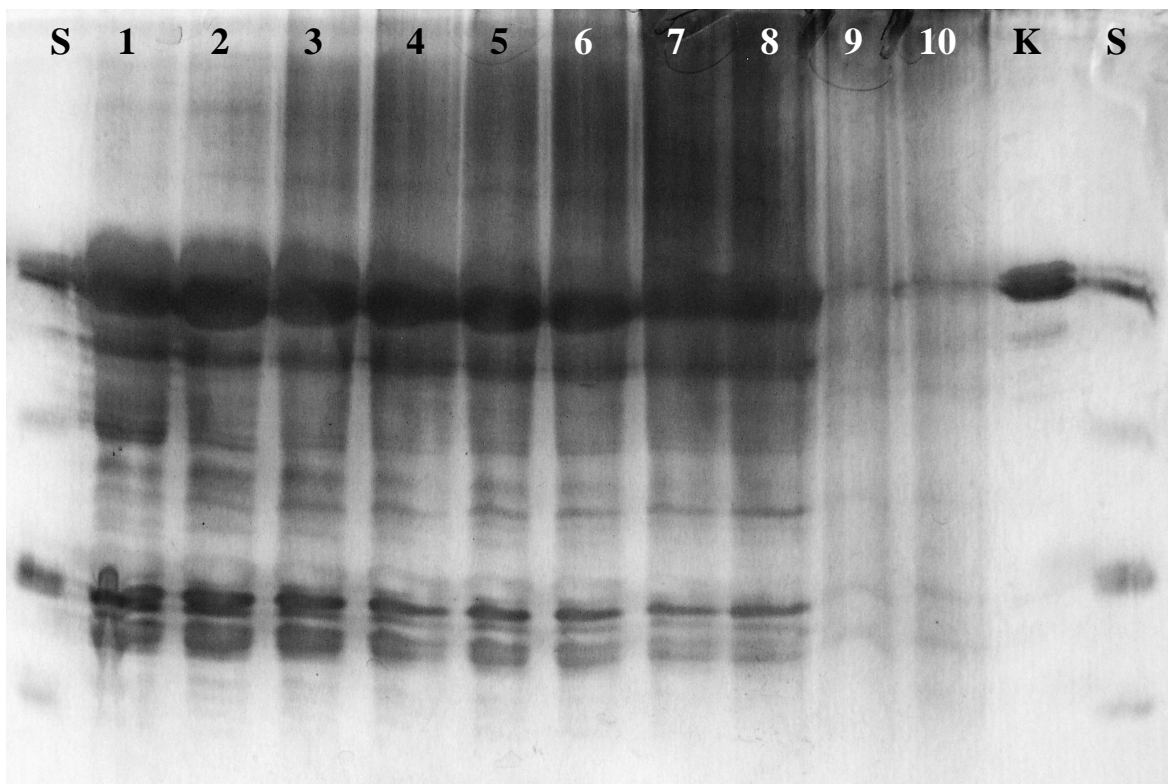
Proteinový profil sledovaných tavených sýrů byl významně ovlivněn jak použitým sterilačním režimem (A–D), tak i obsahem laktózy (obrázek 14). Tavené sýry bez přídavku laktózy, na které byly aplikovány sterilační režimy 120 °C 10 minut (C) a 125 °C 3,17 minut (D), měly ze všech sterilovaných produktů proteinový profil nejbližší k proteinovým profilům nesterilovaných výrobků. Naopak pokud byly aplikovány přídavky laktózy, pak se proteinové profily výrobků sterilovaných režimy 120 °C 10 minut (C) a 125 °C 3,17 minut (D) blížily více k proteinovým profilům tavených sýrů ošetřeným režimy 100 °C 100 minut (A) a 115 °C 32 minut (B) než k proteinovým profilům nesterilovaných produktů. Obecně však je možné na základě získaných výsledků říci, že se snižující se sterilační teplotou (a adekvátním prodlužováním jejího trvání pro zachování konstantního smrtícího účinku) docházelo k rozsáhlejší hydrolyze přítomných proteinů, což dokládají zejména slábnoucí proužky u proteinů s vyšší molekulovou hmotností (zejména sterilační režimy A a B ve srovnání s nesterilovanými výrobky a sterilačními režimy 120 °C 10 minut (C) a 125 °C 3,17 minut (D)). Na rozsáhlé proteolytické změny u vzorků ošetřených sterilačním režimem A pravděpodobně ukazuje i částečně rozmazaný charakter bandů (obr. 13) odpovídající proteinům s vyšší molekulovou hmotností (>20kDa).

5.3 Výsledky proteinového profilu skladovaných tavených sýrů

Polyakrylamidová elektroforéza byla provedena u sterilovaných i nesterilovaných tavených sýrů skladovaných za daných podmínek (laboratorní teplota $23 \pm 2^\circ\text{C}$, lednice $6 \pm 2^\circ\text{C}$, termostat $40 \pm 2^\circ\text{C}$) po dobu dvou let. Na obrázku 15 je zobrazen gel se všemi zkoumanými vzorky. Do první a poslední jamky byl pipetován standard o molekulové hmotnosti 6,50, 12,50, 21,00 a 29 kDa. Poté byly nanášeny vzorky tavených sýrů obou serií: nesterilovaných (NI a NII), vzorky sterilovaných skladovaných v lednici (SLI a SLII), sterilovaných sýrů skladovaných v mrazničce (SLIm a SLIIm), sterilovaných skladovaných při laboratorní teplotě (SSI a SSII) a sterilovaných skladovaných v termostatu (STI a STII).

V tabulce 7 jsou uvedeny zjištěné proteinové profily nesterilovaných i sterilovaných tavených sýrů skladovaných za odlišných podmínek. Je zřejmé, že nejvariabilnější počet proteinů byl zaznamenán u vzorků nesterilovaných. U těchto vzorků bylo zjištěno 21 proteinů o molekulové hmotnosti od 3,7 do 27,6 kDa.

Proteiny sterilovaných tavených sýrů skladovaných v lednici byly více degradované než proteiny vzorků nesterilovaných. Jejich počet byl detekován na 17 (3,7 - 28 kDa). Skladování při chladírenské a mrazírenské teplotě se na profilu proteinů těchto výrobků neprojevalo.



Obrázek 15 Proteinový profil vzorků tavených sýrů skladovaných při různých teplotách po dobu 2 let získaných metodou SDS-PAGE (15% gel): **S:** molekulový hmotnostní standard, **1:** N I, **2:** N II, **3:** SL I, **4:** SL II, **5:** SL Im, **6:** SL IIm, **7:** SS I, **8:** SS II, **9:** ST I, **10:** ST II.

U vzorků sterilovaných tavených sýrů skladovaných za laboratorní teploty bylo identifikováno 13 proteinů s molekulovou hmotností pohybující se v rozmezí 3,9 až 28,2 kDa.

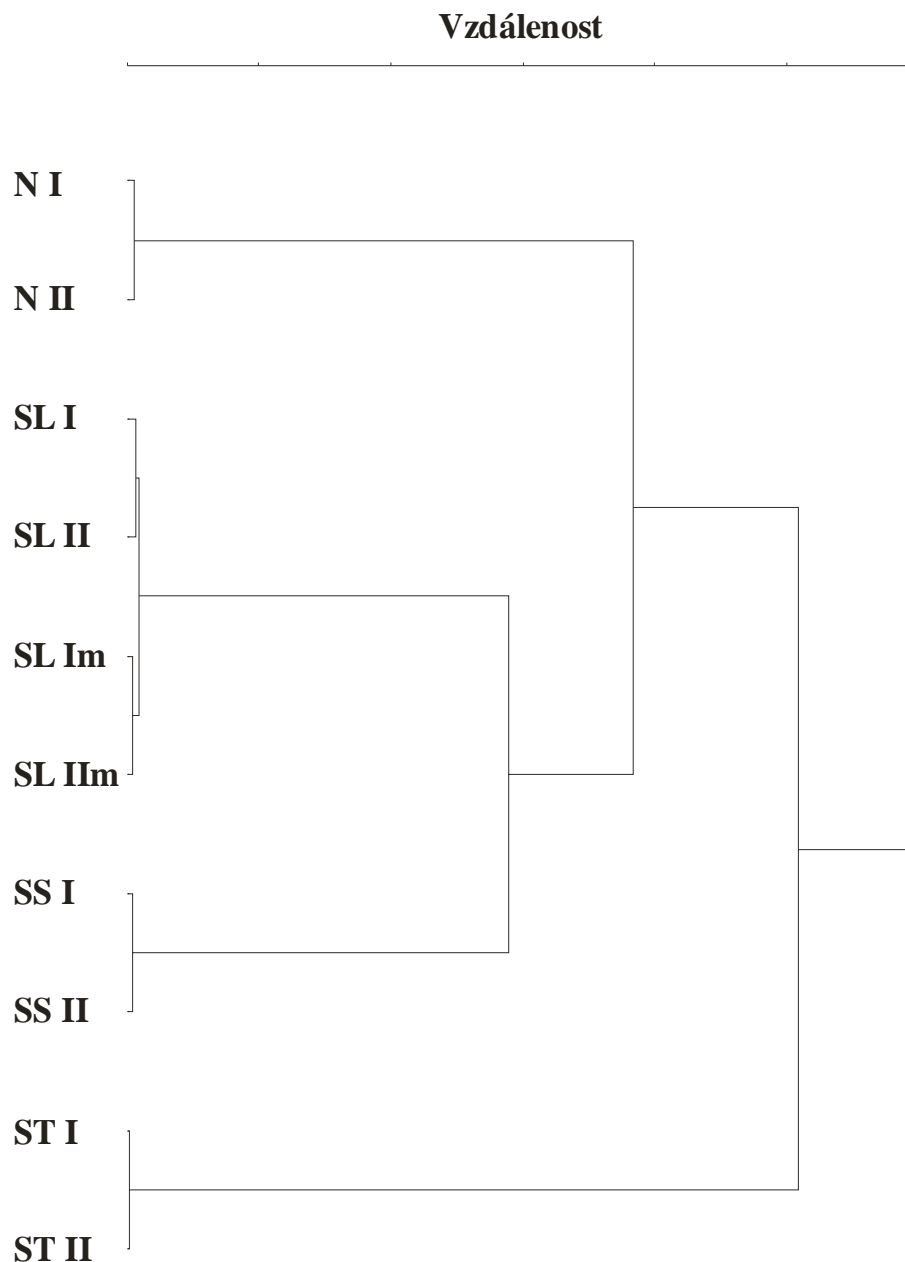
Nejvíce degradovány byly vzorky sterilovaných tavených sýrů skladovaných při zátěžové teplotě v termostatu při $40 \pm 2^\circ\text{C}$. Jejich počet byl stanoven na pouhých 5. Z toho lze usuzovat, že největší vliv na degradaci má teplota skladování. Tyto vzorky byly již pouhým okem odlišné od jiných vzorků a to tím, že byly hnědooranžově zbarveny.

Tabulka 7 Proteinový profil tavených sýrů skladovaných za odlišných podmínek [kDa].

N I	N II	SL I	SL II	SL I 2r	SLII 2r	SS I	SS II	ST I	ST II
27,561	27,603	27,772	27,942	27,984	27,984	28,196	28,196	28,407	28,577
25,529	25,698	24,217	24,175	24,005	24,090	24,217	24,344	25,360	25,487
24,767	24,429	20,295	20,337	20,585	20,751	20,627	20,585	23,286	23,074
23,709	23,413	19,673	19,715	19,88	20,046	19,839	19,88	11,962	11,921
22,354	22,228	18,18	18,015	17,766	17,849	16,439	16,48	9,5621	9,4793
20,917	20,876	16,563	16,398	16,356	16,439	12,459	12,417		
20,088	20,129	15,983	15,734	15,734	15,776	11,631	11,631		
18,637	18,471	15,071	14,739	14,739	14,739	10,886	10,845		
17,351	17,434	12,169	12,417	12,169	12,21	9,5207	9,6448		
16,771	16,688	11,507	11,466	11,466	11,507	8,8172	8,8172		
15,776	15,817	10,803	10,679	10,514	10,679	7,5759	7,8241		
15,195	15,112	9,769	9,7276	9,3966	9,3552	5,9207	6,0862		
12,707	12,459	9,1483	8,9828	8,9000	8,8586	3,9345	3,9345		
12,086	11,962	7,369	7,369	7,4517	7,5345				
11,548	11,672	6,4586	6,3345	6,5000	6,5828				
11,134	10,928	5,5483	5,631	5,7552	5,7966				
10,348	10,266	3,6862	3,9345	3,9345	4,0172				
9,5621	9,5207								
7,5345	7,4517								
6,5828	6,6241								
3,7276	3,8931								

5.3.1 Statistické vyhodnocení skladovaných sýrů

Proteinové profily skladovaných tavených sýrů byly statisticky analyzovány stejnou metodou, která byla použita u sterilovaných a nesterilovaných tavených sýrů a jejich dendogram je zobrazen na obrázku 16.



Obrázek 16 Výsledky shlukové analýzy proteinového profilu skladovaných tavených sýrů: N – nesterilované, SL – sterilované skladované v lednici při teplotě $6 \pm 2^\circ\text{C}$, SLm – sterilované skladované v mrazničce při teplotě $-15 \pm 2^\circ\text{C}$, SS – sterilované skladované při laboratorní teplotě $23 \pm 2^\circ\text{C}$, ST – sterilované skladované v termostatu při teplotě $40 \pm 2^\circ\text{C}$.

Nesterilované tavené sýry vytvořily samostatný shluk, výrazně oddělený od všech vzorků, které byly ošetřeny sterilací. Sterilační režim způsobil rozpad některých proteinů s molekulovou hmotností nad 20 kDa přítomných v nesterilovaných sýrech.

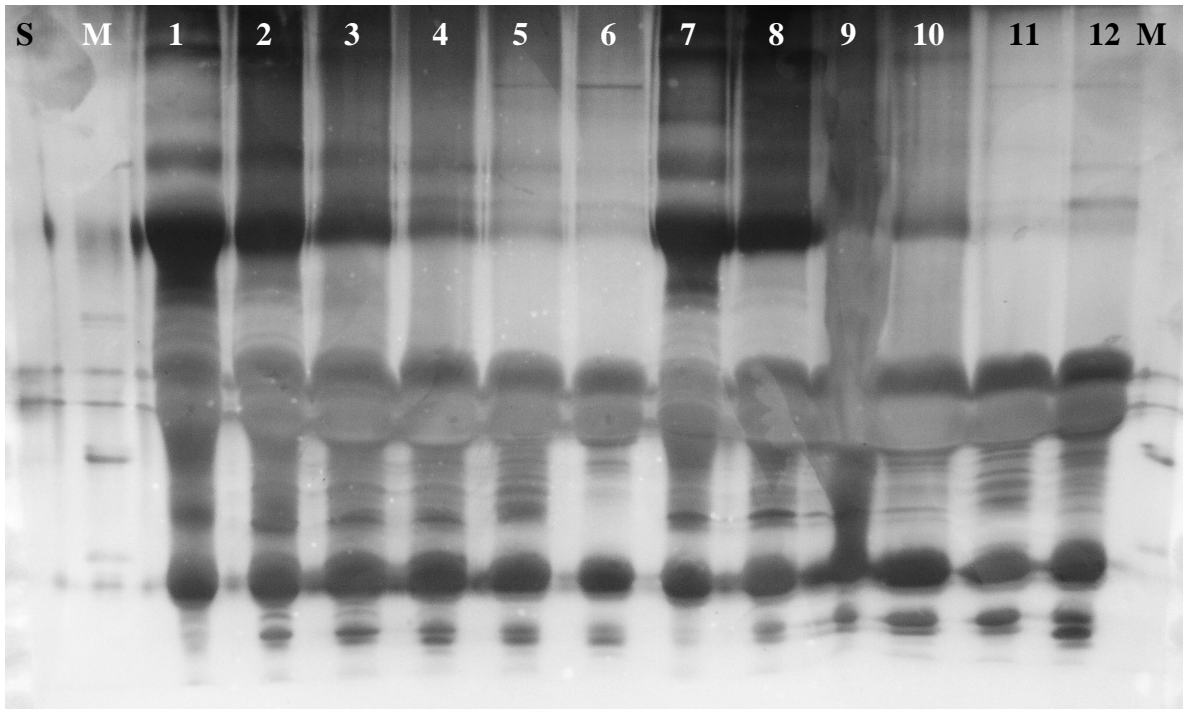
Proteinový profil sterilovaných tavených sýrů skladovaných v lednici při teplotě $6 \pm 2^\circ\text{C}$ byl nejbližší příbuzný k proteinovému profilu v nesterilovaných produktech. V podobné příbuznosti byly i sterilované sýry skladované v mrazničce po dobu dvou let. Můžeme tedy tvrdit, že i tak dlouhá délka skladování v lednici výrazně neovlivnila proteinový profil výrobků. V blízké příbuznosti se sterilovanými sýry skladovanými v lednici byly i sterilované sýry uchovávané při laboratorní teplotě. Naopak pokud byla skladovací teplota $40 \pm 2^\circ\text{C}$, pak se proteinové profily těchto produktů výrazně odlišovaly od profilů nesterilovaných tavených sýrů, což způsobila značná degradace proteinů s vysokou molekulovou hmotností.

Obecně je možné na základě získaných výsledků říci, že se zvyšující se skladovací teplotou docházelo k rozsáhlejší hydrolyze přítomných proteinů, což dokládají zejména slabé proužky u vzorků skladovaných v termostatu.

5.4 Proteinový profil nezralého mléka (mleziva)

Pro účely experimentu byl stanoven proteinový profil nezralého mléka (mleziva) odebraného 1., 2., 3., 5., 7. a 30. den po otelení u 7 náhodně vybraných dojnic v období od 8.7.2007 do 17.8.2007. Na obrázku 17 je zachycen výsledný gel se vzorky mleziva a mléka dvou krav. Do první jamky byl pipetován standard Protein Test Mixture 5 (SERVA), do druhé standard Protein Marker (BioLabs), poté byly nanášeny vzorky mléka a mleziva jednotlivých od prvního dne po otelení až po 30. den a do poslední jamky byl napipetován opět standard Protein Marker (BioLabs).

Na obrázku 17 je patrné postupné snižování koncentrace proteinů, což dokazují slábnoucí proužky. Je nutné podotknout, že vzorky z 1. a 2. dne musely být pro svou hustotu zředěny deionizovanou vodou a to tak, že vzorek z 1. dne v poměru 1:4 a vzorek z 2. dne 1:1. Kvantitativně se tedy nejvíce lišily od ostatních dnů.



Obrázek 17 Proteinový profil vzorků nezralého mléka získaných metodou SDS-PAGE: **S:** molekulový standard; **M:** protein marker; **1:** A1; **2:**A2; **3:** A3; **4:** A4; **5:** A5; **6:** A6; **7:**D1; **8:** D2; **9:** D3; **10:** D4; **11:** D5; **12:** D6; **M:** protein marker

V tabulce 8 jsou zobrazeny proteinové profily nezralého mléka dvou náhodně vybraných krav (A a D). Profil proteinů těchto krav se mírně liší v prvních zachycených frakcích o vysoké molekulové hmotnosti, což může být způsobeno individualitou každé krávy a její tvorbou imunoglobulinů. Z obrázku 17 je viditelné první hlavní zastoupení proteinů v oblasti 21 až 29 kDa, které ukazuje na kaseinové frakce. V tomto rozmezí se koncentrace v průběhu sledované laktace nemění.

Zvláštní byla rozdílnost v množství identifikovaných proteinů mezi jednotlivými krávami. Kráva A vykazovala daleko rozdílnější proteinový profil ve 30. dnu odběru (15 proteinů v rozmezí 7,4 až 144,6 kDa) než tomu bylo u krávy D, u které bylo identifikováno 23 proteinů v rozmezí 9,0 až 157,3 kDa (tab. 8).

Vzorky byly odebrány v následujícím pořadí po porodu: A1 – 1. den; A2 – 2. den; A3 – 3. den; A4 – 5. den; A5 – 7. den a A6 – 30. den. Mlezivo a mléko krávy D bylo odebráno stejným způsobem jako u první krávy.

Tabulka 8 Molární hmotnosti proteinů kravského mléka v závislosti na době po otelení [kDa]

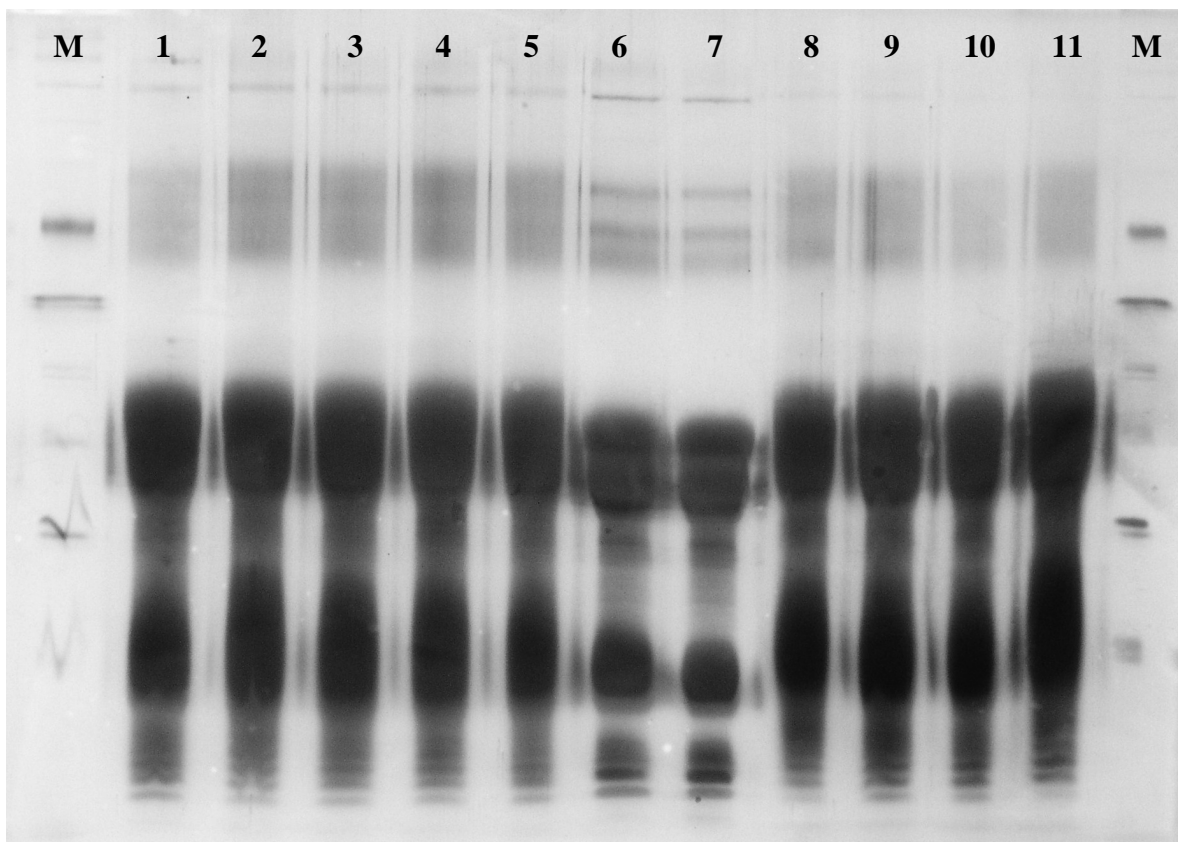
A1	A2	A3	A4	A5	A6	D1	D2	D3	D4	D5	D6
204,85	212,92	209,69	209,69	209,69	144,58	157,74	157,74	156,96	167,47	156,65	157,32
161,41	160,62	158,52	161,75	153,15	113,58	146,25	132,82	134,37	137,85	144,58	143,50
118,51	119,68	118,9	115,25	144,34	93,54	115,62	116,57	118,51	110,15	113,04	115,44
109,47	107,13	103,44	103	115,44	82,03	106,45	106,45	103,86	96,46	101,05	105,09
96,46	96,76	95,86	96,95	94,99	44,89	94,02	94,50	98,31	81,54	96,21	96,21
72,06	82,03	83,99	80,72	80,07	41,41	79,76	82,70	83,30	42,47	83,90	83,10
65,23	72,25	45,23	44,82	44,37	34,29	65,15	76,63	71,66	37,34	75,87	45,25
58,09	45,44	36,24	34,19	35,16	32,03	61,59	65,76	42,16	33,57	44,07	38,22
49,69	36,46	33,54	32,74	33,01	27,07	47,07	43,83	37,28	32,60	37,34	34,80
45,90	33,32	32,68	26,58	27,28	19,48	42,77	37,21	34,11	30,67	33,09	31,90
35,59	28,95	27,42	22,39	24,59	11,63	37,42	34,51	30,76	29,97	30,52	30,75
33,97	25,60	24,06	19,27	23,04	10,65	34,16	32,17	29,37	27,33	29,70	29,49
29,10	22,22	23,01	18,21	21,70	9,11	31,62	30,34	27,03	21,66	28,00	27,45
26,28	20,19	20,09	14,61	19,27	8,68	29,94	29,10	24,33	19,38	26,22	25,91
19,99	16,91	18,07	12,53	15,52	7,41	28,84	25,43	21,73	18,32	23,01	21,79
18,79	15,32	14,40	10,76	13,90		25,36	23,34	18,22	14,72	21,43	19,04
15,62	14,20	12,34	9,17	11,71		23,46	18,59	16,58	13,83	20,08	18,79
11,76	12,04	10,15	8,80	10,65		18,40	17,11	15,91	12,32	18,36	14,93
10,86	10,07	9,11	7,72	9,17		17,93	16,13	13,48	11,42	15,27	13,63
8,02	9,02	8,40	5,18	8,68		15,79	14,51	12,17	9,43	13,50	12,47
	8,02	5,18		7,41		13,53	13,99	11,71		12,74	11,54
	5,18			5,18		12,46	12,47	9,69		11,67	9,30
						11,32	11,28			9,56	8,99
						9,88	9,62			8,89	
							8,74				

5.5 Proteinový profil vzorků sušeného mléka

Elektroforetické stanovení bylo provedeno i u vzorků sušeného mléka, které bylo vyrobeno dvěma různými metodami a to válcovým a sprejovým sušením. V tabulce 9 je uveden obsah tuku v sušině v jednotlivých vzorcích válcově sušeného mléka [54].

Tabulka 9 Obsah tuku ve válcově sušeném mléce [%]

Vzorek	A	B1	B2	B3	B4	D	E	F	L
obsah tuku [%]	25	26,25	25,5	26,5	26,5	26,5	26,5	26,5	25,5



Obrázek 18 SDS-PAGE analyzovaných vzorků sušeného mléka: **M**: Protein Marker; **1**: A; **2**: D; **3**: E; **4**: F; **5**: L; **6**: FR1; **7**: FR2; **8**: B1; **9**: B2; **10**: B3; **11**: B4; **M**: Protein Marker

Na obrázku 18 vidíme polyakrylamidový gel se vzorky, které byly nanášeny následovně: do první jamky standard Protein Test Mixture 5 (SERVA), do druhé jamky Protein Marker (BioLabs), dále byly nanášeny vzorky v pořadí A, D, E, F, L, FR1, FR2, B1, B2, B3, B4 a do poslední jamky byl opět pipetován Protein Marker (BioLabs).

Z obrázku 18 je zřetelné, že všechny vzorky, které byly připraveny válcovým sušením, měly proteiny degradované. Naproti tomu u vzorků, které byly vyrobeny sprejovým sušením, zůstaly jednotlivé proteinové frakce zachovány.

6 DISKUZE

Mléko a mléčné bílkoviny mají ve stravování člověka klíčové postavení. Obsahují téměř všechny živiny, které jsou potřebné pro růst, vývoj a činnost lidského organismu. Ve výživě člověka hrají významnou roli mléčné bílkoviny, neboť jejich nutriční hodnota se blíží jedné. Z tohoto pohledu se laktalbumin jeví jako vhodný, protože jeho aminokyselinové složení je optimální [68].

Cílem diplomové práce bylo studovat proteinový profil ve vybraných skupinách výrobků. Byly zvoleny tyto soubory produktů: sterilované a nesterilované tavené sýry, tavené sýry skladované za odlišných podmínek po dobu dvou let, nezralé mléko (mlezivo) a sušené mléko vyrobené dvěma rozdílnými způsoby (válcovým a sprejovým sušením).

U nesterilovaných tavených sýrů se předem předpokládalo větší rozpětí profilu proteinů než u sýrů sterilovaných z důvodů působení vysoké teploty, což také bylo potvrzeno pokusem. Při statistickém vyhodocení vytvořily nesterilované tavené sýry samostatnou skupinu, výrazně oddělenou od všech vzorků, které byly ošetřeny sterilací. Nejbližší příbuznost k nesterilovaným taveným sýrům vykazovaly sýry sterilované při vyšších teplotách a kratším čase s nulovým obsahem laktózy. Pokud však byl k těmto výrobkům dodán přídatek laktózy, pak se jejich proteinový profil blížil k profilu ostatních sterilovaných sýrů. Na základě experimentu můžeme tvrdit, že intenzitu hydrolýzy proteinů ovlivňuje nejen šetrná sterilace, ale i obsah laktózy.

Odlišné teploty při skladování tavených sýrů měly obdobný účinek jako tomu bylo u sterilace. Při použití chladírenských a mrazírenských teplot byla hydrolýza proteinů pomalá a nejméně se tyto produkty lišily od nesterilovaných tavených sýrů. Skladování při laboratorní teplotě též výrazně neovlivnilo soubor proteinů. Naopak tomu však bylo při simulaci extrémních podmínek, kde se teplota prostředí pohybovala okolo 40 °C. Zde byla degradace proteinů natolik značná, že bylo vyizolováno pouhých pět frakcí proteinů, což je vzhledem ke kontrolnímu nesterilovanému vzorku markantní rozdíl (detekce 21 proteinů). Analýza tedy potvrdila patrné barevné změny na vzorcích uchovávaných v termostatu při vysokých teplotách.

Zkoumáním nezralého mléka byla zjištěna odlišnost v koncentracích proteinů získaných z mleziva a ze vzorků zralejšího mléka. Obsah proteinů v prvních dvou dnech laktace byl daleko vyšší než u ostatních vzorků. V těchto vzorcích byly přítomny i proteiny o vysoké

molekulové hmotnosti (imunoglobuliny), jak je zřejmé ztmavých proužků v oblasti o vyšší molekulové hmotnosti (obr. 17). Důvod lze přikládat ke zvýšené tvorbě ochranných látek (imunoglobulinů) pro čerstvě narozené tele. Obsah kaseinových frakcí byl ve sledovaném období vyrovnaný a nevykazoval zjevné kolísání. Avšak během studia proteinového profilu byly zjištěny odchylky mezi jednotlivými kravami a to v počtu identifikovaných proteinů. Při dalším studiu by bylo proto výhodné sledovat změnu proteinového profilu mezi jednotlivými kravami během laktace a vliv na množství proteinů při sběru mléka do tanků.

Použitá technologie při výrobě sušeného mléka měla také výrazný vliv na proteinový profil produktů. Při použití klasického způsobu sušení ve válcové sušárně byla zjištěna rozsáhlá degradace všech proteinů. U těchto vzorků nebylo možné použitou metodou identifikovat konkrétní proteiny, protože byly slity v jeden souvislý pruh (obr.18). Naopak použitím šetrnějšího sprejového sušení nebyla hydrolýza proteinů až tak výrazná a proto lze konstatovat, že je z tohoto aspektu výhodnější.

Ze závěrů práce můžeme konstatovat, že proteinový profil jednotlivých výrobků se více či méně lišil v závislosti na okolních vlivech. Přestože se předpokládal jednoznačný vliv teploty na intenzitu hydrolýzy proteinů, byl překvapující účinek přítomné laktózy. Spolu s teplotou byl rozhodující i čas působení na vzorek. Při použití krátkých dob spolu s vysokými teplotami bylo ovlivnění profilu proteinů výrobku menší (sterilační režimy s krátkou dobou výdrže, sprejově sušené mléko) než tomu bylo za nižších teplot ale po delší čas (dlouhé sterilační režimy, skladování za extrémních podmínek).

ZÁVĚR

Studiem proteinového profilu různých mléčných produktů byl zjištěn rozdíl mezi danými výrobky. Jednotlivé závěry lze shrnout do několika bodů:

1. intenzitu hydrolyzy proteinů v sterilovaných tavených sýrech ovlivňuje zejména doba záhřevu a dále obsah laktózy v produktu. Čím byl použit šetrnější sterilizační režim spolu s nulovou koncentrací laktózy, tím víc se profil proteinů blížil ke kontrolnímu nesterilovanému vzorku.
2. teplota skladování má přímý vliv na degradaci proteinů ve sterilovaných sýrech. Sýry uchovávané za chladírenských a mrazírenských teplot se nejvíce podobaly nesterilovaným sýrům – vykazovaly tudíž nejmenší hydrolyzu proteinů. Naopak proteinový profil sýrů skladovaných za extrémních podmínek byl do té míry degradovaný, že bylo u těchto vzorků vizualizováno pouze 5 proteinů.
3. Mlezivo se od zralého mléka lišilo převážně v prvních dvou dnech a to v oblasti proteinů o vysoké molekulové hmotnosti.
4. Technologie sušení mléka má jednoznačný vliv na proteinový profil mléka, u sprejově sušeného mléka bylo detekováno více proteinů než u mléka sušeného válcovou technologií.

Metodou SDS-PAGE a použitými standardy bylo možné identifikovat proteiny o molekulových hmotnostech od 2 až po 212 kDa. Pro dané stanovení to bylo dostačující, neboť se nepředpokládalo odlišnější rozpětí mléčných proteinů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ŠIMONČIČ, R., KRUŽLIAK, P. *Výživa odborná učebnice pro kuchaře a číšníky*. 5. vydání. Praha: Merkur, 1995. 132s. ISBN 80-7032-710-3
- [2] Bílkoviny – základ [online]. [cit. 2008-2-19]. Dostupný z WWW: <http://www.vseosportu.unas.cz/bilkoviny.php>
- [3] HOLEČEK, M. *Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin*. 1. vydání. Praha. Grada publishing, a.s., 2006. ISBN 80-247-1562-7
- [4] Šlechtíme na kappa-kasein: Investice pro budoucnost [online]. [cit. 2008-2-19]. Dostupný z WWW: http://old.naturalgenetics.cz/Soubory/kasein/Kappa%20kasein_katalog2004.pdf
- [5] PAVELKA, A. *Mléčné výrobky pro vaše zdraví*. 1. vydání. Brno: Littera, 1996. 105s. ISBN 80-85763-09-5
- [6] ŠÍCHO, V., VODRÁŽKA, Z., KRÁLOVÁ, B. *Potravinářská biochemie*. 2. vydání. Praha: SNTL – Nakladatelství technické literatury, 1981. 360s.
- [7] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin* 1. 1. vydání. Tábor: OSSIS, 1999. 328s. ISBN 80-902391-3-7
- [8] DOSTÁL, J., KAPLAN, P. a kol. *Lékařská chemie II*. 1. vydání. Brno. Masarykova univerzita v Brně, 2003. ISBN 80-210-2731-2
- [9] YADA R. Y. *Protein in food processing*. 1st ed. Cambridge: Wood Publishing Limited, 2004. ISBN 1 85573 837 6
- [10] ROSYPAL, S. *Úvod do molekulární biologie*, I. díl, 2. vydání. Brno, 1999. 300 stran. ISBN 80-902562-0-1
- [11] HRAZDIRA, I. a kol. *Biofyzika učebnice pro lékařské fakulty*. 2. přepracované vydání. Praha. Avicenum, 1990. 320s. ISBN 80-201-0046-6
- [12] KALOUS, V., PAVLÍČEK, Z. *Biofyzikální chemie*. 1. vydání. Praha. SNTL, 1980.
- [13] Struktura proteinů a funkce enzymů [online]. [cit. 2008-2-20]. Dostupný z WWW: <http://www.otevrenaveda.cz/ov/users/Image/default/C1Kurzy/Chemie/28obsil.pdf>

- [14] BŘEZINA, P., KOMÁR, A., HRABĚ, J. *Technologie, zbožížnalství a hygiena potravin 2. část*. 1. vydání. Vyškov: VVŠ PV, 2001. 177s. ISBN 80-7231-079-8
- [15] BŘEZINA, P., PLOCKOVÁ, M. *Mikrobiologie mléka a tuků*. 1. vydání. Praha. VŠCHT Praha, 1988.
- [16] BUŇKA, František, HRABĚ, Jan. Tavené sýry. *Potravinářská revue*. 2006, roč. , č. 4, str. 13-16.
- [17] WALSTRA, P., GEURTS, T. J., NOOMEN, A., JELLEMA, A., van BOEKEL, M. A. J. S. *Dairy technology: principles of milk properties and processes*. 1. vydání. New York: Dekker, 1999. ISBN 0-8247-0228-X
- [18] GAJDUŠEK, S. *Mlékarenství II*. 1. vydání. MZLU, Brno, 2000. ISBN 80-7157-3426 [18] DAVÍDEK, J. a kol. *Laboratorní příručka analýzy potravin*. 1. vydání. Praha: SNTL/ALFA, 1981. 718s.
- [19] Alergie na kravské mléko [online]. [cit. 2008-2-21]. Dostupný z WWW:
<http://www.klupal.cz/pyly/pages/lekari/kojeni/clanek.php>
- [20] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D. *Potravinářská biochemie I*. 1. vydání. Zlín: UTB ve Zlíně, 2005. 168s. ISBN 80-7318-295-5
- [21] GAJDUŠEK, S., KLÍČNÍK, V. *Mlékařství*. 2. vydání. MZLU, Brno, 1993. ISBN 80-7157-073-7
- [22] FARRELL, H. M. et al. 2004. *Nomenclature of the protein of cows ' milk – Six revision*. *J Dairy Sci*. 87: 1641-1674
- [23] ŠANTAVÝ, F. a kol. *Biochemie učebnice pro lékařské fakulty*. 1. vydání. Praha. Avicenum, 1975. 672s.
- [24] KODÍČEK, M., KARPENKO, V. *Biofyzikální chemie*. 2. vydání. Praha. Academia, 2002. ISBN 80-200-0791-1 [25] ČŮTA, F. a kol. *Instrumentální analýza*. 1. vydání. Praha. SNTL, 1986.
- [25] BARTOVSKÁ, L., ŠIŠKOVÁ, M. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. 5. vydání. Praha. VŠCHT Praha, 2005. ISBN 80-7080-579-X

- [26] LVOV, Y. *Protein Architecture interfacing molecular assemblies and immobilization biotechnology*. 1. vydání. New York. Marcel Dekker, Inc., 2000. ISBN 0-8247-8236-4
- [27] HÁLKOVÁ, J., RUMÍŠKOVÁ, M., RIEGLOVÁ, J. *Analýza potravin*. 1. vydání. Újezd u Brna: RNDr. Ivan Straka, 2000. 102s
- [28] DAVÍDEK, J. a kol. *Laboratorní příručka analýzy potravin*. 1. vydání. Praha: SNTL/ALFA, 1981. 718s.
- [29] PACHLOVÁ, V. *Stanovení celkového obsahu dusíkatých látek v potravinách*. Zlín. UTB ve Zlíně, 2006.
- [30] ZEIDAN, H. M., DASHEK, W. V. *Experimental approaches in biochemistry and molecular biology*. Times Mirror Higher Education Group, Inc., 1996. ISBN 0-697-16735-6
- [31] WALKER, M. J. *The protein protocols*. 2nd ed. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2002. ISBN 0-89603-940-4
- [32] VODRÁŽKA, Z. *Biochemie*. 2. opravené vydání. Praha. Academia, 2002. ISBN 80-200-0600-1
- [33] PROSSER, V. a kol. *Experimentální metody biofyziky*. 1. vydání. Praha. Academia, 1989. ISBN 80-200-0059-3
- [34] BALEY, J. L. *Techniques in protein chemistry*. 3. vydání. Elsevier Publishing Co., amsterodam, London, New York, 1973.
- [35] SALAŠ, J. a kol. *Analytická chemie*. 1. vydání. Martin. Vydavatel'stvo Osveta, 1988.
- [36] ČŮTA, F. a kol. *Instrumentální analýza*. 1. vydání. Praha. SNTL, 1986.
- [37] DEAN, J. A. *Chemické dělicí metody*. 1. vydání. Praha. SNTL, 1974.
- [38] LOWEC, C. R., DEAN, P. D. G. *Afinitní chromatografie*. 1. vydání. Praha. SNTL, 1979.
- [39] Elektroforéza [online]. [cit. 2008-4-7]. Dostupný z WWW:
http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/elektroforeza.html

- [40] CITP v analýze potravin [online]. [cit. 2008-4-14]. Dostupný z WWW: http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/cze/cze_itp.pdf
- [41] Elektroforéza: Dělení bílkovin pomocí diskontinuální elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (PAGE) [online]. [cit. 2008-4-14]. Dostupný z WWW: http://fch.upol.cz/skripta/zfcm/elfa/elfa_teorie.htm
- [42] Modely elektrické dvojvrstvy [online]. [cit. 2008-4-14]. Dostupný z WWW: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es001/hesla/modely_elektricke_dvojvrstvy.html
- [43] Elektroforéza: kapilární elektroforéza [online]. [cit. 2008-4-14]. Dostupný z WWW: <http://sweb.cz/biochemie/x/metody/elektroforeza.htm#princip>
- [44] Vysokovýkonná kapilární elektroforéza (HPCE) [online]. [cit. 2008-4-14]. Dostupný z WWW: http://home.zf.jcu.cz/public/departments/lamb/kap_elfo.html
- [45] FADILOGLU, S., AKPINAR, K., SOZLEMEZ, Z. Identification of milk from goat, ewe and cow in their mixtures by polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Food Quality* **19**. 1996, 391-393.
- [46] Elektroforéza [online]. [cit. 2008-4-16]. Dostupný z WWW: http://www.merck-chemicals.com/chemdat/cs_CZ/Merck-International-Site/EUR/ViewRootCategories-Start
- [47] SDS-PAGE [online]. [cit. 2008-4-17]. Dostupný z WWW: <http://en.wikipedia.org/wiki/SDS-PAGE>
- [48] HAMES, B. D., RICKWOOD, D. *Gel electrophoresis of proteins*. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 1990. 0-19-963074-7
- [49] POT B., VANDAMME P. and KERSTERS K. (1994). Analysis of electrophoretic whole-organism protein fingerprints, p. 493-522. *In: Goodfellow M. and O'Donnel A.G. (ed.), Modern microbial methods. Chemical methods in procaryotic systematics*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England.

- [50] KIRKEBY, S., MOE, D. and BOG-HANSEN T.C. (1993). The silver staining procedure of sodium dodecyl sulfate gels may be accelerated by shortening fixation time. *Electrophoresis* **14**: 51-55.
- [51] BUŇKA, F., PAVLÍNEK, V., HRABĚ, J., ROP, O., JANIŠ, R., & krejčí, J. Effect of 1-monoglycerides on viscoelastic properties of processed cheeses. *International Journal of Food Properties*. 2007, 10, 819–828.
- [52] BUŇKA František, LAZÁRKOVÁ Zuzana, BUŇKOVÁ Leona, HOLÁŇ Felix, KRÁČMAR Stanislav, Hrabě Jan. Vliv rozdílného sterilačního záhřevu s konstantním smrtícím účinkem na jakosttavených sýrů. *Sborník přednášek k semináři Mléko a sýry 2008*, VŠCHT Praha, 2008, v tisku.
- [53] VLČKOVÁ, O. *Studium změn jakosti sterilovaných tavených sýrů během skladování*. Zlín. UTB ve Zlíně, 2007.
- [54] ŠÍPALOVÁ, M. *Bílkovinný komplex kravského mléka v prvních dnech po porodu*. Zlín. UTB ve Zlíně, 2008. v tisku.
- [55] OKÉNKOVA, E. ústní sdělení, UTB ve Zlíně, 2008.
- [56] BÜTIKOFER U., RÜEGG M. and ARDÖ Y. Determination of nitrogen fractions in cheese: evaluation of a collaborative study. *LWT*, 1993, 26: 271-275. [58] CARBONARO M., BONOMI F., IAMETTI S. et al. Aggregation of proteins in whey from raw and heat-processed milk: formation of soluble macroaggregates and nutritional consequences. *LWT*, 1998, 31: 522-529.
- [57] PARK Y.W. and JIN Y.K. Proteolytic patterns of Cacciotta and Monterey Jack hard goat milk cheeses as evaluated by SDS-PAGE and densitometric analyses. *Small Ruminant Research*. 1998, 28: 263-272. [60] VELOSO A.C.A., TEIXEIRA N. and FERREIRA I.M.P.L.V.O. Separation and quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid chromatography and urea-polyacrylamide gel electrophoresis. Detection of milk adulterations. *Journal of Chromatography A*, 2002, 697: 209-218.
- [58] RESTANI P., GAIASCHI A., PLEBANI A. et al. Cross-reactivity between milk proteins from different animal species. *Clinical and Experimental Allergy*, 1999, 29: 997-1004.

- [59] ELAGAMY E.I. Effect of heat treatment on camel milk proteins with respect to antimicrobial factors: a comparison with cows' and buffalo milk proteins. *Food Chemistry*, 2000, 68: 227-232.
- [60] MAYER H.K. Bitterness in processed cheese caused by an overdose of a specific emulsifying agent? *International Dairy Journal*, 2001, 11: 533-542. [64] POT B., VANDAMME P. and KERSTERS K. (1994). Analysis of electrophoretic whole-organism protein fingerprints, p. 493-522. In: Goodfellow M. and O'Donnell A.G. (ed.), *Modern microbial methods. Chemical methods in prokaryotic systematics*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England.
- [61] O'REILLY C.E., O'CONNOR P.M., MURPHY P.M. et al. The effect of exposure to pressure of 50 MPa on Cheddar cheese ripening. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2000, 1: 109-117.
- [62] O'REILLY C.E., O'CONNOR P.M., MURPHY P.M. et al. Effects of high-pressure treatment on viability and autolysis of starter bacteria and proteolysis in Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 2002, 12: 915-922.
- [63] CARBONARO M., BONOMI F., IAMETTI S. et al. Aggregation of proteins in whey from raw and heat-processed milk: formation of soluble macroaggregates and nutritional consequences. *LWT*, 1998, 31: 522-529. [67] MAROUNEK, M., BŘEZINA, P., ŠIMŮNEK, J. *Fyziologie a hygiena výživy*. 2. vydání. Vyškov: VVŠ PV, 2003. 148s. ISBN 80-7231-106-9
- [64] OCHIRKHUYANG B., CHOBERT J-M., DALGALARRONDO M. et al. Characterization of whey proteins from Mongolian yak, khainak, and bactrian camel. *Journal of Food Biochemistry*, 1998, 22: 105-124.
- [65] VELOSO A.C.A., TEIXEIRA N. and FERREIRA I.M.P.L.V.O. Separation and quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid chromatography and urea-polyacrylamide gel electrophoresis. Detection of milk adulterations. *Journal of Chromatography A*, 2002, 697: 209-218.
- [66] VELOSO A.C.A., TEIXEIRA N., PERES A.M. et al. Evaluation of cheese authenticity and proteolysis by HPLC and urea-polyacrylamide gel electrophoresis. *Food Chemistry*, 2004, 87: 289-295.

-
- [67] COÏSSON J.D., TRAVAGLIA F., PIANA G. et al. *Euterpe oleracea* juice as a functional pigment for jogurt. *Food Research International*, 2005, 38: 893-897.
- [68] MAROUNEK, M., BŘEZINA, P., ŠIMŮNEK, J. *Fyziologie a hygiena výživy*. 2. vydání. Vyškov: VVŠ PV, 2003. 148s. ISBN 80-7231-106-9

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

CC	sloupcová chromatografie
CE	kapilární elektroforéza
FBC	chromatografie v plošném uspořádání
FC	chromatofokusace
GLC	plynová rozdělovací chromatografie
GPC	gelová permeační adsorpční chromatografie
GSC	plynová adsorpční chromatografie
HPCE	vysokoučinná kapilární elektroforéza
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
IEC	iontově výměná chromatografie
LLC	kapalinová rozdělovací chromatografie
LSC	kapalinová adsorpční chromatografie
PC	papírová chromatografie
ODS	oktadecylsilikagel
SDS	sodium dodecyl sulfát
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfát polyakrylamidová gelová elektroforéza
TAE	trisacetátový pufř
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylendiamin

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 19 Stabilizace řetězce s β -strukturou pomocí antiparalelního a paralelního skládaného listu	13
Obr. 20 Struktura β -laktoglobulinu kravského mléka	14
Obr. 21 Průměrné složení kravského mléka (hm%)	16
Obr. 22 Příčný řez typickou submicelou (čárově jsou vyznačeny hydrofobní části molekul)	20
Obr. 23 Vzájemné spojení submicel prostřednictvím fosfátů (P), vápenatých iontů (Ca) a citrátů (Ci)	21
Obr. 24 Hydrolýza κ -kaseinu chymosinem	22
Obr. 25 Grafické znázornění koloidních vlastností bílkovinných roztoků	24
Obr. 26 Elektrická dvojvrstva (a) a vznik elektrického potenciálu (b)	26
Obr. 27 Polymerace akrylamidu	40
Obr. 28 Nanášení vzorků na gel	55
Obr. 29 SDS-PAGE (15% gel) analyzovaných vzorků taveného sýra připravených dle různých metod	58
Obr. 30 SDS-PAGE (15% gel) analyzovaných vzorků zaveného sýra připravených dle různých metod	59
Obr. 31 Proteinový profil vzorků sterilovaných tavených sýrů získaných metodou SDS-PAGE (15% gel)	60
Obr. 32 Výsledky shlukové analýzy proteinového profilu sledovaných tavených sýrů	64
Obr. 33 Proteinový profil vzorků tavených sýrů skladovaných při různých teplotách po dobu 2 let získaných metodou SDS-PAGE (15% gel)	66
Obr. 34 Výsledky shlukové analýzy proteinového profilu skladovaných tavených sýrů	68
Obr. 35 Proteinový profil vzorků nezralého mléka získaných metodou SDS-PAGE	70

Obr. 36 SDS-PAGE analyzovaných vzorků sušeného mléka72

SEZNAM TABULEK

Tab. 10 Přehled vedlejších vazeb a nevazebných interakcí stabilizující strukturu bílkovin	15
Tab. 11 Obsah proteinů v kravském mléce a jejich fyzikální vlastnosti	19
Tab. 12 Přehled nejdůležitějších chromatografických technik	34
Tab. 13 Srovnání profilu proteinů ve nesterilovaných a sterilovaných tavených sýrech při teplotě 100 °C velikost proteinů v kDa	61
Tab. 14 Srovnání profilu proteinů ve sterilovaných tavených sýrech při teplotě 115 a 120°C velikost proteinů v kDa	62
Tab. 15 Srovnání profilu proteinů ve sterilovaných tavených sýrech při teplotě 125°C velikost proteinů v kDa	63
Tab. 16 Proteinový profil tavených sýrů skladovaných za odlišných podmínek [kDa]	67
Tab. 17 Molární hmotnosti proteinů kravského mléka v závislosti na době po otelení [kDa]	71
Tab. 18 Obsah tuku ve válcově sušeném mléce [%]	72