

Srážení mléka při výrobě přírodních sýrů

Daniela Hrančíková

Bakalářská práce
2018



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie potravin
akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Daniela Hrančíková
Osobní číslo: T15066
Studijní program: B2901 Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Chemie a technologie potravin – specializace Technologie mléka a mléčných výrobků
Forma studia: kombinovaná
Téma práce: Srážení mléka při výrobě přírodních sýrů

Zásady pro vypracování:

1. Stručně rozdělte sýry podle typu srážení.
2. Charakterizujte mléčné bílkoviny a principy jejich srážení.
3. Specifikujte koagulační činidla podle jejich původu. Popište principy jejich výroby a podmínky použití během výroby sýrů.
4. Popište faktory ovlivňující srážení mléčných bílkovin. Charakterizujte vliv koagulačního činidla a způsobu srážení na výsledný produkt.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] FOX, P. F. Cheese: chemistry, physics, and microbiology. 3rd ed. London: Elsevier, 2004. ISBN 0122636538.

[2] LAW, Barry A a A TAMIME. Technology of cheesemaking. 2nd ed. Malden, MA: Blackwell, 2010, xxv, 482 p. ISBN 9781405182980.

[3] JACOB, MANDY, DORIS JAROS a HARALD ROHM. Recent advances in milk clotting enzymes. International Journal of Dairy Technology. 2011, 64(1), 14-33

[4] KUMAR, A., S. GROVER, J. SHARMA a V. K. BATISH. Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. Critical Reviews in Biotechnology. 2010, 30(4), 243-258

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Ing. Vendula Pachlová, Ph.D.

Ústav technologie potravin

Datum zadání bakalářské práce:

2. února 2018

Termín odevzdání bakalářské práce:

3. května 2018

Ve Zlíně dne 2. února 2018



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



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

Příjmení a jméno: Daniela Hrančíková

Obor: Chemie a technologie potravin – specializace Technologie mléka a mléčných výrobků

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 20.4.2018

.....
Hrančíková

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá srážením mléčných bílkovin při výrobě přírodních sýrů. Obsahuje stručný popis jednotlivých typů koagulačních činidel a jejich rozdělení podle původu (živočišné, rostlinné, mikrobiální), jsou zde popsány také základní informace o rekombinantním chymosinu. Součástí práce je také popis faktorů ovlivňující srážení.

Klíčová slova: srážení, chymosin, kaseiny, sýry, výroba sýrů

ABSTRACT

The bachelor thesis deals with the coagulation of milk proteins during cheesemaking. There also described types of coagulants divided by origin (animal, plant, microbial), there are also information about recombinant chymosin. It contains a brief description of factors acting during coagulation.

Keywords: coagulation, chymosin, casein, cheese, cheesemaking

Děkuji své vedoucí bakalářské práce, doc. Ing. Vendule Pachlové, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady, diskuse a připomínky během zpracování mé bakalářské práce.

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

Ve Zlíně

Podpis studenta

OBSAH

| | |
|---|-----------|
| ÚVOD | 8 |
| 1 PŘÍRODNÍ SÝRY | 9 |
| 1.1 TECHNOLOGICKÉ OPERACE PŘI VÝROBĚ SÝRŮ..... | 9 |
| 1.2 KLASIFIKACE SÝRŮ | 10 |
| 2 MLÉČNÉ BÍLKOVINY A PRINCIPY JEJICH SRÁŽENÍ | 13 |
| 2.1 KASEINY | 13 |
| 2.2 PRINCIPY SRÁŽENÍ..... | 17 |
| 2.2.1 Kyselá srážení | 17 |
| 2.2.2 Enzymatické srážení..... | 18 |
| 3 KOAGULAČNÍ ČINIDLA | 23 |
| 3.1 SYŘIDLA A ENZYMY ŽIVOČIŠNÉHO PŮVODU | 23 |
| 3.2 ROSTLINNÉ KOAGULANTY | 26 |
| 3.3 MIKROBIÁLNÍ KOAGULAČNÍ ČINIDLA | 27 |
| 3.4 REKOMBINANTNÍ CHYLOSIN | 28 |
| 3.5 ANALÝZA SÝŘÍČÍ AKTIVITY ENZYMŮ..... | 30 |
| 4 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ SRÁŽENÍ MLÉČNÝCH BÍLKOVIN PŘI ENZYMATICKÉM SRÁŽENÍ | 32 |
| 4.1.1 Vlastnosti použitého mléka | 32 |
| 4.1.2 Přídavek aditiv do mléka..... | 33 |
| 4.1.3 Vliv teploty..... | 34 |
| 4.1.4 Vliv použitých starterových kultur, vliv pH | 34 |
| ZÁVĚR | 37 |
| SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 38 |
| SEZNAM OBRÁZKŮ | 41 |
| SEZNAM TABULEK | 42 |

ÚVOD

Kočovné kmeny z jižní Asie a Středního východu při přípravách na dlouhé cesty mléko nalévaly do kožených vaků vyrobených ze žaludků mladých domácích zvířat. Vaky byly zavěšeny na hřbety koní a mléko se vlivem enzymů ze zvířecích žaludků, natřásání za jízdy a slunečních paprsků, které dodávaly teplo, přeměnilo v bledou, nakyslou tekutinu (syrovátku), ve které plavaly shluky bílé sraženiny – sýřeniny. Sýřenina byla považována za velmi vhodný doplněk stravy a tekutá syrovátka sloužila jako prostředek pro uhašení žízně.

(1)

Později se začaly využívat sušené kravské žaludky a enzymy z nich získané. Tyto enzymy poskytují lepší kontrolu nad výrobou sýrů. V důsledku nárůstu produkce sýru bylo nutno najít další zdroje koagulantů s vhodnými specifickými vlastnostmi: vysoká koagulační aktivita při pH a teplotě, které jsou vhodné pro výrobu sýrů; dostačující termostabilita a zároveň možnost inaktivace aktivního koagulantu. Mnoho proteáz, které koagulují mléko, však tyto požadavky nesplňuje. Nárůst celosvětové produkce sýrů způsobil vznik velkého množství studií zabývajících se mléčnými koagulanty. (2) Cílem práce bylo popsat využití vhodných koagulantů pro výrobu přírodních sýrů a faktory, které ovlivňují vznik sýřeniny a její vlastnosti.

1 PŘÍRODNÍ SÝRY

Mléko je sekret mléčné žlázy savců určený k prvotní výživě jejich mláďat. Jedná se proto o komplexní potravinu obsahující všechny nutričně významné látky. (3) Mléko některých zvířat, především kravské, buvolí, kozí a ovčí je používáno pro lidskou výživu jako takové, nebo ve formě mléčných produktů. (4)

Sýr je vyhláškou č. 397/2016 Sb. definován jako: „mléčný výrobek vyrobený vysrážením mléčné bílkoviny z mléka působením syřidla nebo jiných vhodných koagulačních činidel, oddělením podílu syrovátky a následným prokysáním nebo zráním“. (5)

1.1 Technologické operace při výrobě sýrů.

Při příjmu mléka jsou nejdříve odstraněny mechanické nečistoty filtrací nebo centrifugací. Poté následují další operace zahrnující úpravu mléka před sýřením, vlastní sýření, zpracování sýřeniny a zrání. (3)

U mléka se provádí řada operací, které vedou ke snížení počtu mikroorganismů i jejich spor. Pasterace mléka zajišťuje zdravotní nezávadnost sýrů. Pro výrobu se nejčastěji používá šetrná pasterace, obvykle záhřev na 74 °C po dobu 15 vteřin. Vyšší pasterační záhřevy mohou být problematické, protože se zhoršuje syřitelnost mléka a oddělování syrovátky. (7) Pomocí procesů baktofugace a mikrofiltrace lze z mléka odstranit také mikroorganismy, které nejsou běžnými pasteračními zákroky inaktivovány a mohly by způsobit vady zejména u zrajících sýrů. Baktofugace využívá k odstranění bakterií a spor odstředivou sílu, při mikrofiltraci mléko protéká membránou s póry o velikosti 1 μm.

Každý sýr je charakterizován určitou hodnotou tuku v sušině, proto se v návaznosti na tepelného ošetření provádí také standardizace tučnosti mléka. Homogenizace mléčného tuku se u zrajících sýrů zpravidla neprovádí. Do sýrašského mléka se přidává chlorid vápenatý, který zlepšuje syřitelnost a zvyšuje pevnost vzniklého gelu. Je možné aplikovat dusičnan draselný, který omezuje duření sýrů, způsobené činností koliformních bakterií. (3)

Přídavek kyselých kultur bakterií mléčného kvašení je nezbytným předpokladem výroby všech tvarohů i sýrů. Bakterie upravují kyselost mléka, pomáhají fermentaci laktózy a účastní se proteolytické a lipolytické aktivity v průběhu zrání, což utváří sensorické vlastnosti. Výrazný je také jejich vliv na texturu a konzistenci.

Klíčovou operací při výrobě sýrů je koagulace mléčných bílkovin. (8) Kasein se z mléka sráží jednak při sníženém pH na hodnotu blízkou izoelektrickému bodu, jednak působením

enzymů. V prvním případě mluvíme o tzv. kyselém srážení, které se uplatňuje jen u několika sýrů, především u tvarohů. (3) Ve druhém případě jde o tzv. enzymatické srážení, kdy se využívá enzym chymosin, případně jiný enzym s podobnou koagulační aktivitou. V přítomnosti Ca^{2+} iontů pak dochází ke koagulaci kaseinu. (8) Proces srážení vede ke vzniku souvislého proteinového gelu, který je pak zpracováván. Základní fáze zpracování jsou krájení, míchání, dohřívání, dosoušení, praní a formování sýrového zrna.

Dalším krokem je solení, které má vliv nejen na výslednou chuť, ale ovlivňuje aktivitu kultur a enzymů při zrání sýrů. Sůl zvyšuje osmotický tlak v prostoru mezi zrny a působením na bílkoviny zvyšuje množství uvolněné syrovátky. Solením se také zpevní povrch sýrů.

Proces zrání představuje komplexní souhrn změn, kdy sýr získává typický vzhled, konzistenci, chuť, vůni a složení. (3) Délka zrání zrajících sýrů se pohybuje od několika dní (mozzarella) až po několik let (Parmigiano-Reggiano). V průběhu zrání se vyvíjí chuťové i texturní vlastnosti jednotlivých druhů sýrů. Dochází k řadě biochemickým reakcím jako například k rozložení laktózy, uvolnění mastných kyselin z triacylglycerolů a degradaci kaseinové matrice za vzniku peptidů a volných aminokyselin. Finální produkty proteolýzy a lipolýzy dále podstupují změny, které přispívají k chuti a vůni produktu. (10)

Tradičně většina syřidlem srážených sýrů patří mezi zrající, naopak kysele srážené sýry jsou konzumovány čerstvé. I zde jsou známy „výjimky“ jako např. Olomoucké tvarůžky. (9)

1.2 Klasifikace sýrů

Sýry jsou podle vyhlášky číslo 379/2016 Sb. klasifikovány podle řady kritérií jako obsah tuku v sušině, obsahu vody v tukuprosté hmotě sýra nebo konzistence ve vztahu k obsahu vody v tukuprosté hmotě sýra. Rozdělení podle výše uvedených parametrů je uvedeno v Tabulkách 1, 2 a 3.

Tabulka 1: Klasifikace přírodních sýrů podle obsahu tuku v sušině (5)

| Sýr | Tuk v sušině* [% hmotnostní] |
|-------------|------------------------------|
| Vysokotučný | nejméně 60,0 |
| Plnotučný | nejméně 45,0 |
| Polotučný | nejméně 25,0 |
| Nízkotučný | nejméně 10,0 |
| Odtučněný | méně než 10,0 |

* Obsah tuku v sušině v procentech hmotnostních se stanoví podle následujícího vzorce:

$$\% \text{ hmotnostní tuku v sušině} = \frac{\text{hmotnost tuku [g]}}{100 - \text{hmotnost vody [g]}} \times 100$$

Tabulka 2: Klasifikace přírodních sýrů podle konzistence ve vztahu k obsahu vody v tukuprosté hmotě sýra (5)

| Sýr | % VVTPH* (= voda v tukuprosté hmotě sýra) |
|-------------|---|
| Extra tvrdý | nejvíce 47,0 |
| Tvrdý | 47,0 až 54,9 |
| Polotvrdý | 55,0 až 61,9 |
| Poloměkký | 62,0 až nejvíce 68,0 |
| Měkký | více než 68,0 |

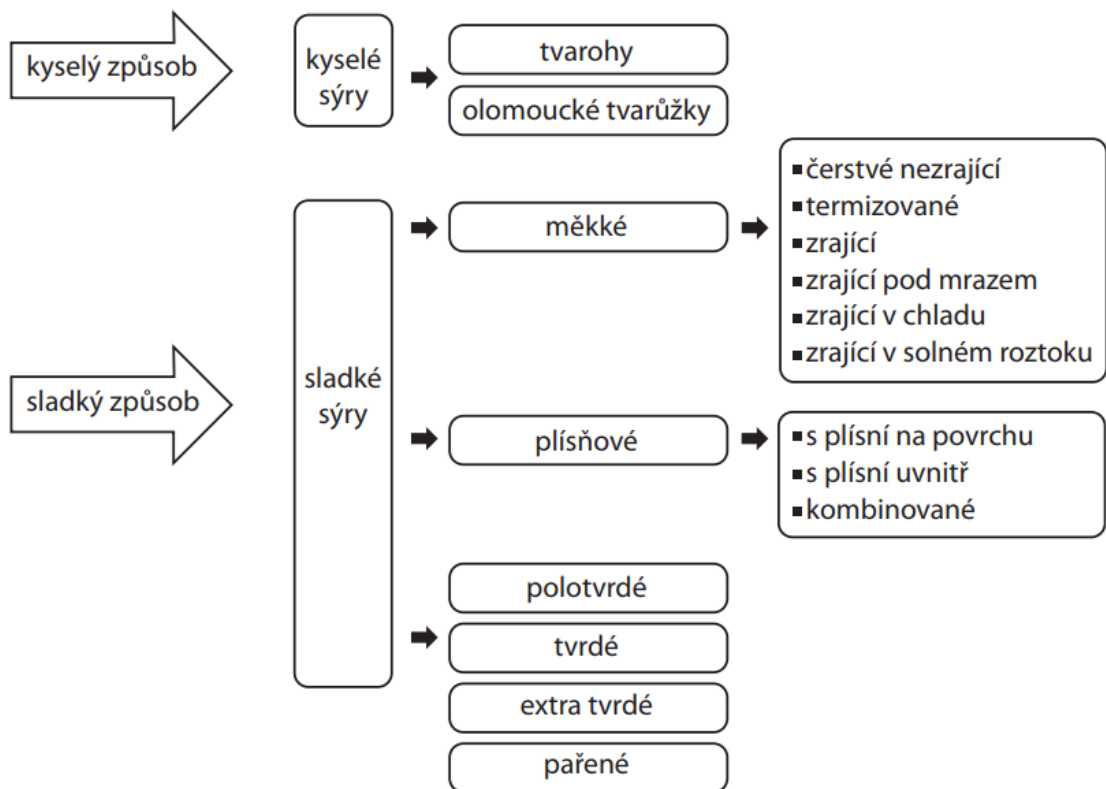
* VVTPH = voda v tukuprosté hmotě sýra, která se stanoví podle následujícího vzorce:

$$\text{VVTPH} = \frac{\text{hmotnost vody v [g]}}{100 - \text{hmotnost tuku [g]}} \times 100$$

Tabulka 3: Klasifikace přírodních sýrů podle zrání (5)

| Sýr | Charakteristika |
|---------------------|----------------------------|
| Sýr čerstvý | nezrající |
| | termizovaný |
| Sýr zrající | na povrchu |
| | s mazem na povrchu |
| | v celé hmotě |
| z toho plísňový sýr | s plísní na povrchu |
| | s plísní uvnitř hmoty sýra |
| | dvouplísňový |

Sýry lze také rozdělit z technologického hlediska podle způsobu srážení. Srážení mléka může nastat pomocí kyseliny, syřidla či jiného enzymatického koagulačního činidla, nebo jejich kombinací. Kysele srážené sýry představují kolem 25 % celkové produkce sýrů a jsou převážně čerstvé. (11) Sýry vysrážené pomocí koagulačního činidla představují asi 75 % celkové produkce sýrů a zahrnují téměř všechny zrající sýry. (11) Toto rozdělení je znázorněno na Obrázku č. 1.



Obrázek 1: Rozdělení sýrů z technologického hlediska (12)

2 MLÉČNÉ BÍLKOVINY A PRINCIPY JEJICH SRÁŽENÍ

Složení mléka se liší v závislosti na mnoha faktorů, mezi které nepochybně patří původ mléka. Průměrné složení mlék různých živočišných druhů je uvedeno v Tabulce 4.

Tabulka 4: Zastoupení komponent mléka u vybraných živočišných druhů v procentech (12)
(13)

| Druh mléka | Bílkoviny | Kaseiny | Popel | Tuk | Laktóza | Sušina |
|------------|-----------|---------|---------|---------|---------|--------|
| Kravske | 3,2-3,8 | 2,4-2,7 | 0,7 | 4,1-4,3 | 4,6 | 12,5 |
| Buvolí | 4,8-4,9 | 3,4-3,7 | 0,8 | 7,0-7,6 | 4,83 | 18 |
| Kozí | 2,6-3,7 | 2,1-2,9 | 0,8 | 3,0-5,2 | 4,7 | 12,0 |
| Ovčí | 4,9-6,1 | 4,5-4,8 | 0,9-1,0 | 6,3-8,2 | 5,0 | 18,2 |

Kravske mléko obsahuje 87-88 % vody. Mléko je velmi komplikovaný disperzní systém, ve kterém kaseinové bílkoviny tvoří micelární disperze, globulární bílkoviny syrovátky koloidní disperze. Tuk přítomný ve formě tukových kapek tvoří emulzi a nízkomolekulární látky (laktóza a jiné sacharidy, minerální látky, ve vodě rozpustné vitamíny) tvoří pravý roztok. (14)

2.1 Kaseiny

Kaseiny jsou fosfoproteiny a tvoří kolem 80 % proteinů kravského mléka. (15) Kravske mléko obsahuje čtyři odlišné frakce, které se značí α_{s1} -, α_{s2} -, β - a κ -kaseiny. (11)

α_{s1} -kaseiny tvoří 44-55 % všech kaseinů v mléce a představují přibližně 80 % všech α_s -kaseinů. (16) α_{s1} -kaseiny (molekulová hmotnost 23,6 kDa) obsahují osm fosfoserinových zbytků lokalizovaných převážně v polohách 43-80, díky nimž je tato část molekuly polární. Nepochární postranní řetězce aminokyselin jsou situovány v polohách 100-199. (14) Přítomnost polárních a nepolárních částí předurčuje vlastnosti kaseinů jako emulgátorů. Polární oblasti interagují s vodnou fází, zatímco hydrofobní oblasti se váží na lipidy. Proteiny touto cestou stabilizují tukové částice v roztoku nebo v polotuhých matricích. (18) V přítomnosti Ca^{2+} iontů tvoří α_{s1} -kasein nerozpustnou vápenatou sůl. (14)

α_{s2} -kasein tvoří 9-10 % celkových kaseinů v kravském mléce a představují přibližně 20 % všech α_s -kaseinů. Primární sekvence pro α_{s2} -kaseiny varianty obsahuje 207 aminokyselin s průměrnou molekulovou hmotností 25,1 kDa. (16) α_{s2} -kaseiny vážou vápník silněji a citlivěji se sráží pomocí Ca^{2+} ve srovnání s α_{s1} -kaseiny. α_{s2} -kaseiny mohou být vysráženy ve 2 mM Ca^{2+} při pH 7, zatímco srážení α_{s1} -kaseinů vyžaduje 6mM Ca^{2+} . α_{s2} -kaseiny se samy spojují při neutrálním pH v přítomnosti Ca^{2+} . (17)

β -kasein představuje přibližně 25-35 % všech kaseinů v kravském mléce. Obsahuje 209 aminokyselin s molekulovou hmotností 24,0 kDa. β -kaseiny se sráží v přítomnosti Ca^{2+} , přičemž záleží silně na teplotě. β -kaseiny jsou kompletně rozpustné v přítomnosti Ca^{2+} při nízké teplotě (0-5 °C). (16) Při 30 °C se 80 % β -kaseinů sráží v 8-10 mM Ca^{2+} . (17) Řadí se stejně jako α_s -kaseiny mezi fosfoproteiny, neboť obsahují pět fosfoserinových zbytků (v poloze 1-40), nepolární řetězce aminokyselin jsou soustředěny v polohách 136-209. (14)

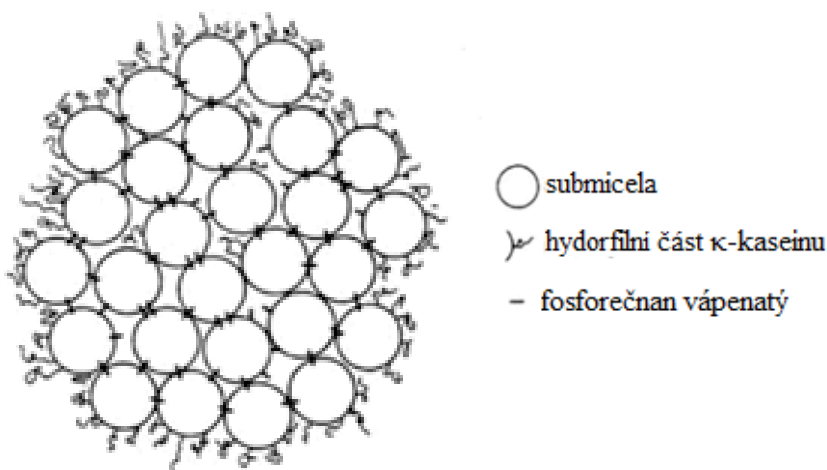
γ -kaseiny jsou považovány za produkty degradace β -kaseinů proteolytickými enzymy mléka. (14) γ -kasein reprezentuje kolem 5 % kaseinů. (16) Odštěpením segmentu v polohách aminokyselin 1-28. aminokyselinou vznikne γ_1 -kasein (s molekulovou hmotností 20,5 kDa), γ_2 -kasein (s molekulovou hmotností 11,8 kDa) vzniká odštěpením segmentu v polohách aminokyselin 1-105 a γ_3 -kasein (s molekulovou hmotností 11,6 kDa) odštěpením segmentu v polohách aminokyselin 1-107. (14) Zbytkové části β -kaseinu (po odštěpení γ -kaseinů) se označují jako proteózo-peptony.

κ -kasein obsahuje v genetické variantě B 169 aminokyselin a má molekulovou hmotnost 19,0 kDa. (16) Molekuly se vyskytují jako trimery a vyšší oligomery spojené vzájemně disulfidovými vazbami. Na rozdíl od předchozích kaseinů jsou v molekulách κ -kaseinů sacharidy D-galaktopyranosa, N-acetyl-D-galaktosamin a N-acetylneuraminová kyselina. Tyto sacharidy dávají molekule κ -kaseinu částečně hydrofilní charakter. Hlavní složkou κ -kaseinů je rozvětvený tetrasacharid, v menším množství se vyskytují κ -kaseiny s vázaným rozvětveným trisacharidem (18,5 %), s lineárním trisacharidem (18,4 %), disacharidem (6,3 %). Cukry jsou na protein vázány glykosidovou vazbou prostřednictvím N-acetyl- β -D-galaktosaminu. S Ca^{2+} ionty tvoří κ -kaseiny rozpustné soli, což umožňuje stabilizaci

Většina kaseinových frakcí (až 95 %) se v mléce nenachází ve formě volných řetězců, ale ve formě kaseinových micel. Kaseinová micela obsahuje obvykle kolem 94 % proteinů a 6 % nízkomolekulárních látek (zejména koloidní fosforečnan vápenatý, citronany a některé další ionty). Micely jsou vysoce hydratované, vážou kolem 2 g H_2O na 1 g proteinu. Pomocí

elektronové mikroskopie bylo zjištěno, že kaseinové micely jsou převážně kulovitěho tvaru s průměrem od 50 do 500 nm a molekulovou hmotností $1,3 \cdot 10^6$ kDa (hydratovaný stav). (17)
(18)

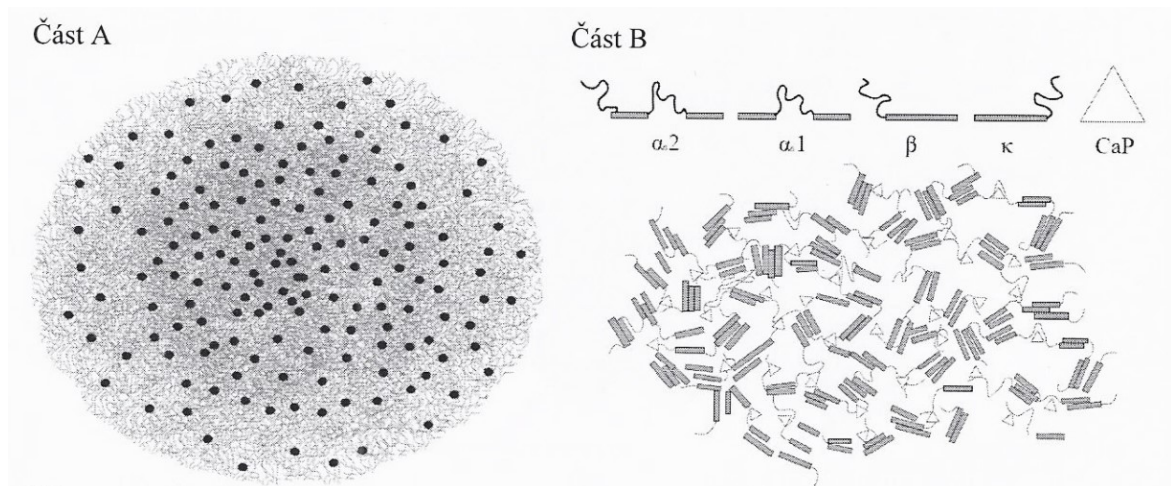
Existuje řada modelů popisující strukturu kaseinové micely. První model, který vytvořili Walstra a Jennes (15), popisuje kaseinové micely složené z menších proteinových podjednotek, které se nazývají submicely. Tento model je znázorněn na Obrázku č. 2. Submicely mají průměrně 10 až 15 nm a jsou spojeny hydrofobními interakcemi a pomocí koloidního fosforečnanu vápenatého. (15) Obsah jednotlivých kaseinů není v micelách rovnoměrně rozmístěn. Za předpokladu přítomnosti Ca^{2+} iontů jsou α_s -kaseiny a β -kaseiny převážně nerozpustné ve vodě, zatímco κ -kasein je ve vodě převážně rozpustný. To způsobuje zvýšený obsah κ -kaseinu ve vnější vrstvě micel, naopak uvnitř micely je obsah nižší. Hydrofilní část κ -kaseinu, obsahující sacharidovou jednotku, vystupuje z vnější strany micely, dává jí „vláskovou strukturu“, která micelu stabilizuje. (18)



Obrázek 2: Model kaseinové micely (15)

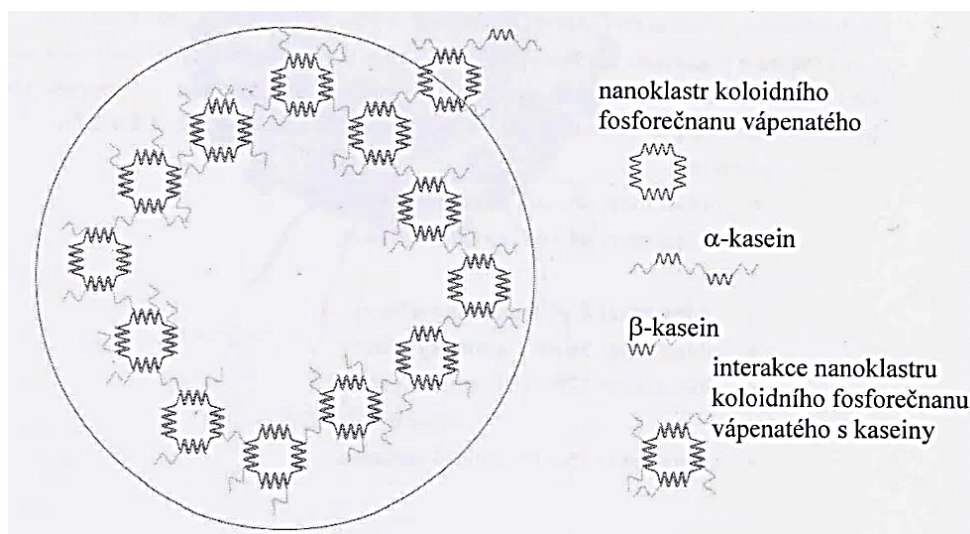
V poslední době je využíván i Holtův model kaseinové micely, který neuvažuje prvotní tvorbu submicel a teprve následnou tvorbu kaseinových micel. Holtův model pracuje s myšlenkou, že se kaseinové frakce spojují přímo do kaseinových micel na základě různých interakcí, kde převažující roli hrají opět hydrofobní interakce (mezi hydrofobními segmenty jednotlivých kaseinových frakcí) a dále nanoklastry koloidního fosforečnanu vápenatého, který interaguje s tzv. fosfoserinovými klastry α_{S1} - a α_{S2} - a β -kaseinu. Za fosfoserinové klastry jsou považovány ty části výše uvedených kaseinů, které obsahují „blízko sebe“ více než jednu jednotku fosfoserinu. (19)

Na Obrázku č. 3 je schématické znázornění kaseinové micely dle Holtova modelu – část A: celkový pohled (černými tečkami jsou znázorněny klastry koloidního fosforečnanu vápenatého interagujícího s fosfoserinovými klastry), část B: detail struktury (rovné úseky představují hydrofobní segmenty, zprohýbané úseky představují hydrofilní segmenty α_{S1} -, α_{S2} - a β -kaseinu a κ -kaseinu, trojúhelník představuje koloidní fosforečnan vápenatý).



Obrázek 3: Znázornění micely popsané dle Holta: část A: pohled na kaseinovou micelu, část B: detail struktury kaseinové micely (22)

Na následujícím Obrázku č. 4 jsou znázorněny interakce mezi fosfoserinovými klastry α_{S1} -, α_{S2} - a β -kaseinu a nanoklasterů koloidního fosforečnanu vápenatého dle Holtova modelu kaseinové micely. Hydrofilní části kaseinu jsou značeny světlejší vlnovkou a hydrofobní segmenty tmavší vlnovkou. (19)



Obrázek 4: Schématické znázornění interakce mezi kaseiny a nanoklasterů koloidního fosforečnanu vápenatého dle Holtova modelu (23)

2.2 Principy srážení

2.2.1 Kyselé srážení

Hodnota pH čerstvého mléka je 6,5 - 6,75. Sníží-li se pH např. vlivem vzniklé kyseliny mléčné, na hodnotu pH 4,6, kaseiny se sráží za současného oddělení syrovátky. K okyselení může docházet spontánní činností kontaminujících mikroorganismů při skladování mléka, anebo činností kulturních mikroorganismů používaných v mlékárenském průmyslu. (14) Mezi produkty vyráběné kyselým srážením patří tvarohy, kyselé sýry zrající pod mazem a ostatní výrobky, jako jsou smetanové krémy, termizované tvarohové krémy nebo čerstvé tvarohové sýry, jako je např. krémový sýr – gervais. (3)

Stabilita kaseinovým micel mléka je dána jejich negativním nábojem v přirozeném pH mléka a stérickou vrstvou zajištěnou vláskovou strukturou. Různé typy interakcí jsou zodpovědné za celistvost micel. Jde o interakce mezi proteinovými molekulami, mezi které patří elektrostatické, hydrofobní a vodíkové interakce. Tyto interakce se pravděpodobně podílejí na tvorbě strukturních vlastností kaseinových gelů vzniklých kyselým srážením mléka.

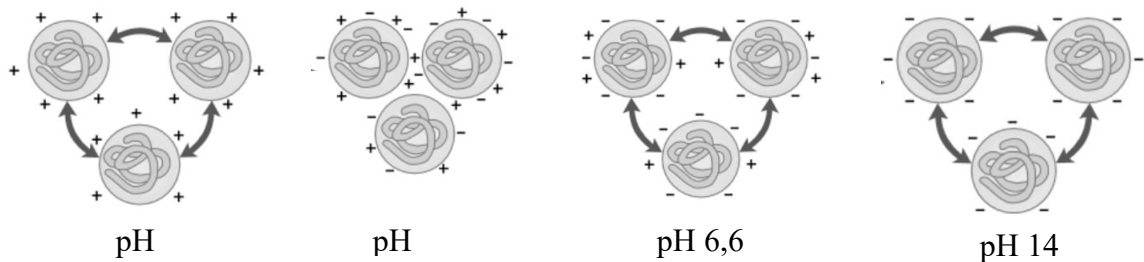
Z hlediska výroby sýrů jsou důležité tři oblasti pH. Snížení pH z původní hodnoty 6,6 na 6,0 způsobuje snížení negativního náboje hydratačního obalu kaseinových micel, což vede ke snížení elektrostatického odpuzování. Pouze relativně malé množství koloidního fosforečnanu vápenatého je rozpuštěno při pH kolem 6, takže strukturní rysy micely jsou relativně nezměněny.

Další snižování pH k hodnotě 5,0 způsobuje snížení negativního nabití hydratačního obalu, čímž se také snižuje elektrostatická odpudivost. Vlášková struktura na povrchu micely snižuje svoje nabití. To vede ke snížení elektrostatické odpudivosti i stérické stability.

Při snížení pH na hodnotu menší než 5,0 negativní náboj na kaseinové mícely klesá s přiblížením izoelektrického bodu a dochází k výraznému snížení elektrostatického odpuzování, které zvýší hydrofobní interakce. (11)

Působením elektrostatických interakcí při pH přibližně 4,6 dojde ke srážení kaseinových micel za vzniku gelu (ve skutečnosti jde o širší interval hodnot pH, kdy k těmto reakcím dochází – prakticky při pH 5,0 až 4,2). Na Obrázku č. 5 je znázorněno přiblížení micel při pH 4,6, kdy je hodnota nábojů přibližně stejná. Výše popsané interakce je možné očekávat při teplotě nad 20 °C. Nižší teploty proces kyselého srážení zpomalují. Naopak vyšší teploty způsobují zrychlení procesu srážení. Při teplotách okolo 40 °C však již může dojít ke vzniku

drobné a gumovité konzistence vzniklého koagulátu. Při kyselém srážení dochází vlivem navázaného β -laktoglobulinu na κ -kasein ke zpomalení procesu. (18)

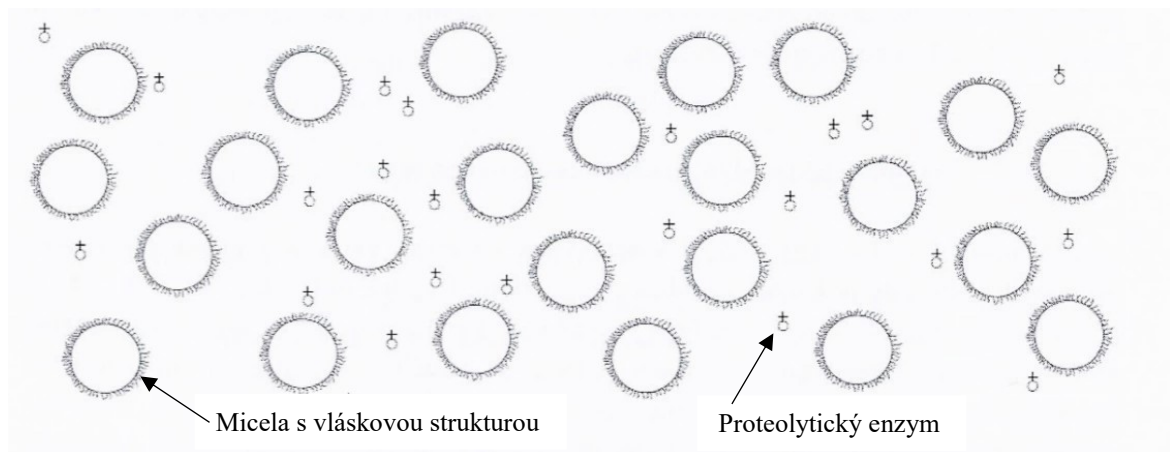


Obrázek 5: Náboj hydratačního obalu kaseinu při různých pH (21)

2.2.2 Enzymatické srážení

Při výrobě většiny typů sýrů jako Cheddar, Ementál aj. dochází působením bakterií k oxidaci mléka. V této fázi se přidává proteolytický enzym, koagulant. Přídavek je znázorněn na Obrázku č. 6. (14)

Enzymy jsou biokatalyzátory, které mají strukturu biopolymeru. Všechny metabolické reakce jsou katalyzované enzymy. Enzym vykazuje substrátovou specifitu a specifitu účinku, což znamená, že vždy katalyzuje přeměnu určité skupiny substrátu a jen určitý typ reakce. (23) Proteolýza je děj, při němž dojde k rozpadu bílkovin a peptidů na menší peptidy nebo aminokyseliny v místě peptidové vazby proteolytickými enzymy nebo peptidázami. (11)

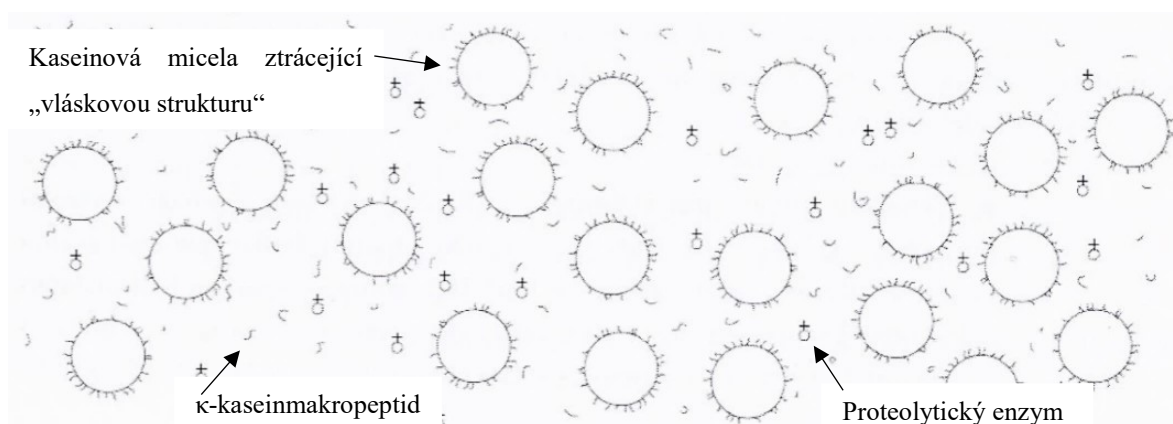


Obrázek 6: Přídavek koagulantu do mléka (11)

V průběhu sýření mléka proteolytické enzymy **hydrolyzují molekuly κ -kaseinu**, kdy se odělí rozpustné κ -kaseinmakropeptidy, čímž se z velké části odstraní vlásky a výrazně se snižuje steric a electrostatic stabilization, which prevents micelles from approaching. The hydrolysis process is generally independent of the amount of Ca^{2+} ions present. The action of the enzyme leads to the specific hydrolysis of κ -casein almost exclusively at a certain peptide bond (most often between the 105th and 106th amino acid) and the κ -casein molecule is cleaved into para- κ -casein and κ -casein macropeptide.

The resulting para- κ -casein (fraction 1 to 105 amino acids) contains the hydrophobic part of the κ -casein molecule. It remains part of casein micelles, but unlike native κ -casein, it no longer has a protective function and, in the presence of Ca^{2+} ions, leads to the precipitation of other casein fractions and the formation of a three-dimensional protein network (gel).

The remaining part of the molecule is κ -casein macropeptide (fraction 106 to 169 amino acids). It contains the hydrophilic part of the κ -casein molecule with attached oligosaccharides, and therefore passes into whey. (14) The hydrolysis process is shown in Figure 7, where the loss of the hairy structure is visible – the cleavage of κ -casein macropeptide.



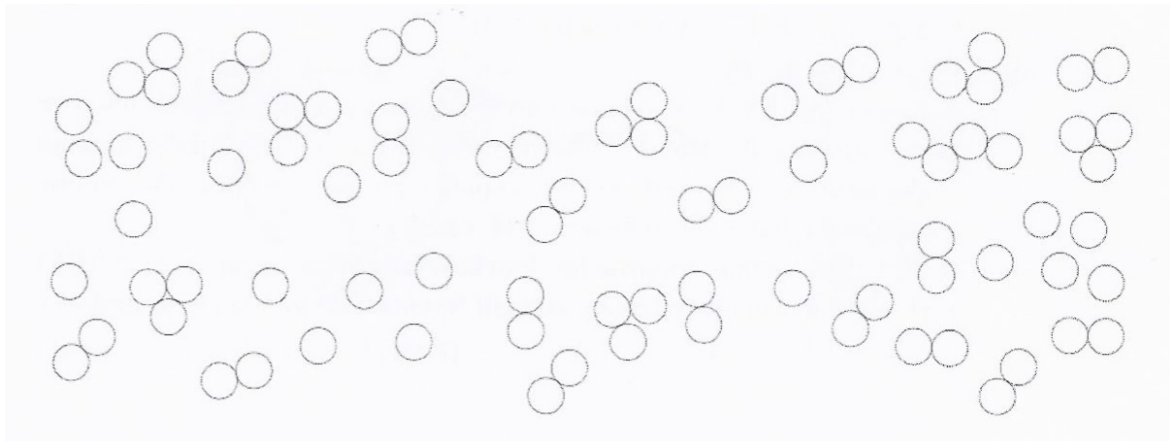
Obrázek 7: Hydrolytické štěpení κ -kaseinu (11)

V průběhu sýření mléka proteolytické enzymy hydrolyzují molekuly κ -kaseinu, kdy se odělí rozpustné κ -kaseinmakropeptidy, čímž se z velké části odstraní vlásky a výrazně se snižuje steric a electrostatic stabilization, which prevents micelles from approaching. After the cleavage of κ -casein, the micelles can in this phase closely approach for the subsequent observation of **flocculation** – the formation of networks. This phenomenon is shown in Figure 8. For the joining of micelles, the presence of free Ca^{2+} ions is necessary, which bind to phosphoserine residues of caseins and thus enable the formation of networks.

Segmenty κ -kaseinmakropepidu jsou odstraňovány jeden po druhém. Proto se pravděpodobnost kontaktu a flokulace micel výrazně zvyšuje v případě, kdy je většinový podíl κ -kaseinu hydrolyzován.

Pokud je hydrolyzováno méně než 70 %, flokulace je prakticky nulová, alespoň při normální hodnotě pH a 30 °C. Pokud je pH sníženo, enzymatická reakce probíhá mnohem rychleji a navíc flokulace začne při nižším množství hydrolyzovaného κ -kaseinu. Předpokládá se, že molekula chymosinu často vytváří "holý" (částečně nebo zcela) povrch micely a až následně se se od micely oddělí a pokračuje se svou aktivitou na další micely. Na takovém „holém“ místě je micela schopna reagovat s druhou micelou s podobně obnaženým povrchem. Obecně lze říci, že při nižším pH začíná flokulace ve stádiu, kdy bylo hydrolyzováno méně κ -kaseinu.

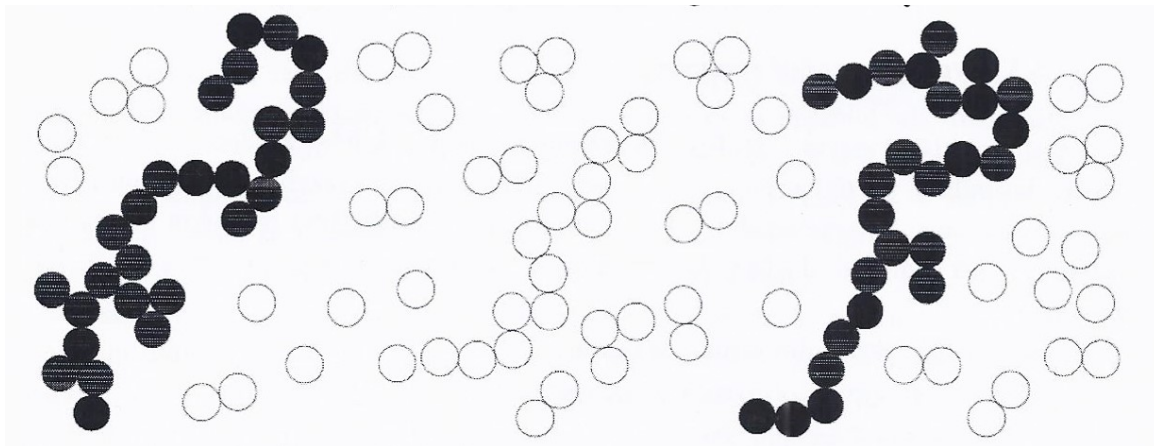
Reaktivita micely se zvyšuje s koncentrací Ca^{2+} , snižuje s přítomností NaCl a výrazně zvyšuje s teplotou, zejména od 15 do 30 °C, při teplotě nad 50 °C se míra flokulace stává nezávislou na teplotě. (11)



Obrázek 8: Flokulace (11)

Po uplynutí času flokulace dochází ke **tvorbě gelu**. Mikroskopicky lze pozorovat, že se tvoří agregáty, které jsou nejprve nepravidelné. Tyto agregáty se následně spojují a vytvářejí celistvou síť. Tvorba gelové struktury je znázorněna na Obrázku č. 9.

Základním požadavkem pro tvorbu gelu je dostatečně silná přitažlivost mezi micelami. Slabé interakce dovolují částicím se spojovat a rozpojovat, dokud nenajdou polohu, kdy se mohou spojit se sousedními částicemi a vytvořit kompaktní agregát. Jakmile je přitažlivost dostatečně velká, částice se agregují a rozvětvená struktura může prostupovat celým systémem za předpokladu, že kinetika agregace je rychlejší než sedimentace vzniklých agregátů. (11)

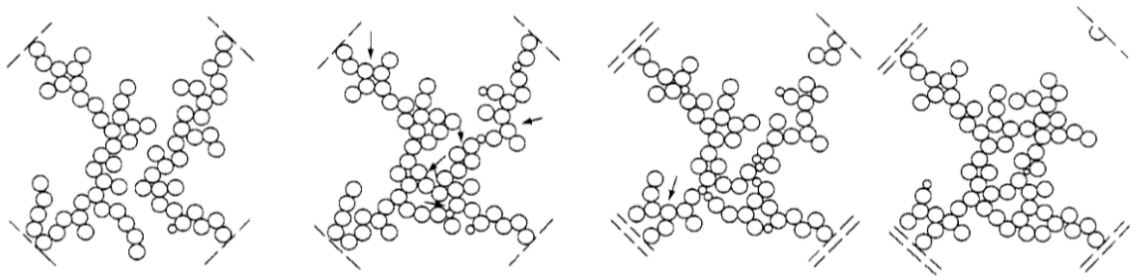


Obrázek 9: spojování jednotlivých útvarů do souvislé gelovité struktury (11)

Gely vytvořené enzymatickou koagulací mléka mohou vykazovat synerezi. **Synereze** je děj, kdy se z gelu vylučuje syrovátka. Jedná se o proces znásobování vzájemných vazeb mezi proteiny, které tvoří trojrozměrnou síť (znázorněno na Obrázku č.10. (21) Gely mohou být stabilní po dobu několika hodin v případě, že jsou ponechány v klidu. Naopak synereze je podporována krájením, mícháním, produkcí kyselin a zvýšenou dohřívací teplotou. Výroba sýra může být považována za dehydratační proces a synereze je hlavní částí procesu, kdy je odebráno nejvíce vody v průběhu výroby sýra. (15) Syřidlem srážené mléko může ztratit od dvou třetin svého objemu až do 90 %, nebo i více v případě, že se uplatní lisování sýrů. Pochopení a kvantitativní popis synereze mléka a podmínek procesu jsou důležité při zavádění nových metod nebo kroků v procesu výroby sýra.

Míru synereze ovlivňuje způsob zpracování, potřebný čas i ztráty tuku a bílkovin do syrovátky. Intenzita synereze ovlivňuje velikost zrna, a také jeho schopnost se spojovat při tvarování nebo lisování. Po vylisování sýra může stále probíhat synereze a tím dojde k další ztrátě hmotnosti. (21)

Prostřednictvím podpoření synereze je možné kontrolovat obsah vody ve výsledném produktu, čímž se od sebe odlišují jednotlivé druhy sýra (konzistencí, resp. kritériem obsahu vody v tukuprosté hmotě sýra). Většina vody obsažené v mléčném gelu není přímo navázána na proteiny, ale je zachycená v síťové struktuře. V průběhu smršťování gelu tak dochází k jejímu vypuzení. (15)



Obrázek 10: Schéma znásobování vazeb mezi kaseinovými bílkovinami (11)

3 KOAGULAČNÍ ČINIDLA

Mnoho extracelulárních proteolytických enzymů má podobné vlastnosti jako chymosin a je možné je použít pro výrobu sýrů. Syřidla a další mléčné koagulanty živočišného, rostlinného a mikrobiálního původu se mohou lišit podle jejich specifity účinku a enzymatických vlastností. (25) Dnes je nejpoužívanější rekombinantní chymosin, u kterého se pro výrobu využívá genetického inženýrství. Základním požadavkem pro výběr vhodného syřidla je jeho bezpečnost a nepřítomnost nežádoucích složek, které by mohly negativně ovlivnit koagulační aktivitu.

Využití nových zdrojů má mnoho důvodů. Mezi hlavní patří ekonomické důsledky. Je snaha o vytvoření mléčného koagulantu, který by zvyšoval výtěžky, zlepšoval kvalitu výsledného výrobku a snižoval koagulační náklady. Nesmíme opomenout další požadavky jako jsou Kosher, Halal nebo ekologické certifikace. Důležitá je také stabilita koagulantu při pH a teplotě používané pro výrobu sýra. Výhodou nových zdrojů může být také delší trvanlivost a snadné použití koagulantu. (21)

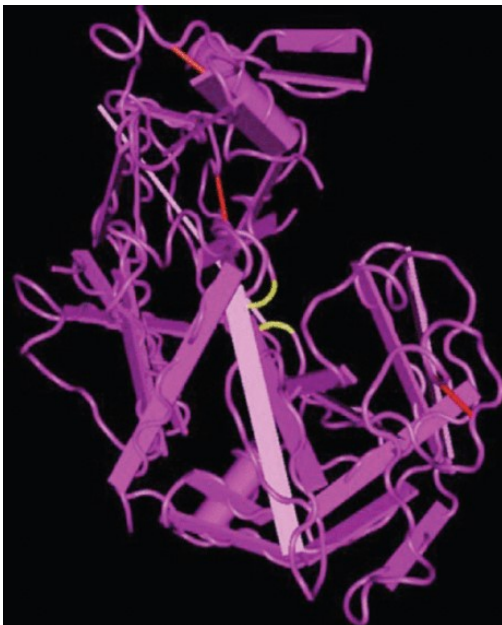
Zvýšení čistoty enzymů může být provedeno pomocí řady metod. Primární metody přečištění chymosinu nebo jiných enzymů srážejících mléko obecně zahrnují srážení síranem amonným, sloupcovou chromatografií, gelovou filtrací, ale i afinitní chromatografií. (25)

Aktivitu koagulačních enzymů lze popsat pomocí mezinárodních jednotek ICMU (International Milk Clotting Units), pomocí kterých lze vyjádřit celkovou sýřicí aktivitu. Pro stanovení aktivity se používá standardizované obnovené nízkotučné mléko jako substrát (12 g komerčně dostupného sušeného mléka, 100 ml 0,01 M CaCl₂, pH 6,5, inkubováno 30 minut při 30 °C), kdy se k 20 ml substrátu přidá 1 ml enzymu. Sýřicí aktivita mléka byla definována jako množství enzymu potřebného pro koagulaci 10 ml substrátu při 32 °C za 100 sekund. V praxi se používají metody srovnávací, kdy se výsledky porovnávají se standardy enzymů. (26)

3.1 Syřidla a enzymy živočišného původu

Syřidlo je využíváno při výrobě tradičních sýrů. Jde o extrakt ze čtvrtého žaludku (slez) mladých přežvýkavců, především telat. (2) Jde o směs enzymů chymosinu a pepsinu. Telecí syřidlo má vysoký obsah chymosinu, který je vlastním enzymem pro koagulaci kravského mléka. (21) Chymosin (EC 3.4.23.4.) je proteáza, která specificky štěpí vazbu mezi 105. a

106. aminokyselinou κ -kaseinu. Prostorové uspořádání molekuly je znázorněno na Obrázku č. 11, kde disulfidové můstky mají červenou barvu a aktivní místa enzymu jsou označeny žlutou barvou. (27) Enzym vykazuje vysokou aktivitu při pH 4,8 až 6 a teplotě 30 až 40 °C. (28) Poměr obsahu chymosinu a pepsinu závisí na věku, ve kterém bylo zvíře poraženo, a na jeho výživě. (2) Syřidlo získané z dospělých krav má přibližně pětkrát vyšší obsah pepsinu. Vysoký obsah pepsinu v kravském syřidle dává produktu vysokou citlivou na pH a dochází k nespecifické hydrolyze κ -kaseinu, což může vést k nižším výtěžkům v důsledku ztráty kaseinu odchodem do syrovátky. (21) Pepsin (E.C. 3.4.23.1) vykazuje optimální aktivitu při pH 1,8 až 2,2 a teplotě 40 až 60 °C. (28) Porovnání sýřicí a proteolytické aktivity těchto enzymů je znázorněno v Tabulce č. 5.



Obrázek 11: Prostorová struktura chymosinu

V minulosti si výrobce sýrů sám extrahoval enzym z vyčištěných a vysušených žaludů namočením do syrovátky. Dodnes se tato metoda využívá, ale jde pouze o tradiční výrobky lokálního charakteru. Příkladem může být tradiční výroba sýru Feta, kdy jsou využívány sušené a solené jehněčí nebo kozí žaludky.

V moderní výrobě sýra se žaludky zmrazí ihned po porážce zvířat, poté procházejí operacemi: mletí, extrakce enzymů, aktivace proenzymů kyselým pH, neutralizace, vyčištění a zahuštění. Existuje také ultrazvuková extrakce, která udržuje vyšší aktivitu než běžné extrakty. Metoda umožňuje rychlejší přenos enzymu a zvýšení výtěžku enzymu.

Telecí chymosin existuje ve dvou alelických formách, které se liší pouze jednou aminokyselinou v poloze 254 (asparagin u chymosinu A a glycin u chymosinu B). Chymosin A (molekulová hmotnost 35,71 kDa) vykazuje vyšší enzymatickou aktivitu než chymosin B (molekulová hmotnost 35,65 kDa), ale podléhá snadněji autokatalytické degradaci. (2) Některé výzkumy popisují chymosin C za produkt degradace chymosinu A. (29) Jiné studie ukázaly, že tato forma je geneticky odlišná a je produktem jiné alely. (30) Chymosin C má přibližně o 20 % vyšší aktivitu srážení než chymosin B, což chymosinu C dává velký potenciál pro použití při výrobě sýra. (2)

Enzym získaný z buvolích žaludků má podobnou strukturu jako telecí enzym. (25) Má molekulovou hmotnost 36,20 kDa, a maximální srážecí aktivitu při 30 °C a pH 5,5. Vyznačuje se také výrazně vyšší termostabilitou než telecí syřidlo. (2)

Intenzita srážení při použití velbloudího syřidla roste s klesajícím pH, stejně jako u telecího syřidla. Optimální aktivita srážení je při teplotě 50 °C. Proteolytická aktivita velbloudího syřidla je výraznější než aktivita buvolího syřidla. Molekulární hmotnost velbloudího chymosinu je 35,10 kDa. (22)

Syřidlo získané z ovčích mláďat má molekulovou hmotnost přibližně 36,70 kDa, a vliv CaCl_2 je srovnatelný s telecím chymosinem, stejně jako citlivost na pH, nicméně telecí syřidlo ukazuje mírně vyšší závislost na teplotě. Jehněčí syřidlo obsahuje lipolytické enzymy, které iniciují tvorbu volných mastných kyselin, čímž vytváří charakteristické ostré aroma. (2)

V následující Tabulce č. 5 je porovnání jednotlivých druhů syřidel. V druhém sloupci je procentuální porovnání sýřící aktivity vztažené k sýřící aktivitě (specifická proteolýza κ -kaseinu mezi 105. a 106. aminokyselinou) telecího chymosinu. Ve třetím sloupci je procentuální porovnání proteolytické aktivity (nespecifická proteolýza kaseinů) vztažené k proteolytické aktivitě prasečího pepsinu, který je charakteristický vysokou proteolytickou aktivitou. Jako substrát byl použito kravské mléko s pH 6,6. (32)

Tabulka 5: Porovnání vlastností syřidel různých druhů zvířat (32)

| Enzym | Sýřicí aktivita | Proteolytická aktivita |
|--------------------|-----------------|------------------------|
| Telecí chymosin | 100 | 25 |
| Ovčí chymosin | 95 | 30 |
| Prasečí chymosin | 25 | 3 |
| Prasečí pepsin | 25 | 100 |
| Velbloudí chymosin | 170 | 25 |

3.2 Rostlinné koagulanty

Rostlinné proteázy štěpí bílkoviny rychleji než živočišné, které pochází ze slezu. Rovněž koagulační aktivita rostlinných syřidel je vyšší oproti živočišným. Využití rostlinných syřidel není po světě rozšířeno, a to z důvodu časté hořké chutě, která vzniká v důsledku akumulace hořkých peptidů. Tato hořkost je velký problém zejména při výrobě sýrů, které vznikají z mléka s mezofilními kulturami. Tento problém se většinou řeší využitím kombinace rostlinného syřidla s živočišným. (33)

Koagulanty mohou být získávány z rostlin jako například bodlák, artyčok, kopřivy, světlice barvířska, meloun, fíkové listy nebo slunečnicová semínka. Obecně platí, že rostlinné syřidlo je zřídka používáno pro komerční výrobu, přestože se v některých oblastech používají rostlinné koagulanty jako primární zdroj. (32) Rostlinné enzymy se získávají jako vodné výluhy rostlin. Extrakty *Cynara cardunculus* jsou využívány pro výrobu tradičních ovčích produktů ve Španělsku jejich příklady jsou sýry Queso Serra a Serpa. (25) Sýry vyrobené rostlinnými koagulanty mají často více hořkou chuť. (32) *Cynara cardunculus* je odrůda bodláku (Obrazek č. 12), která se vyskytuje hlavně v suchých kamenitých oblastech Portugalska. Proteázy této rostliny, kardosin A a B, jsou podobné chymosinu a pepsinu jejich specifitou, kdy štěpí vazbu mezi 105. a 106. aminokyselinou. (25)



Obrázek 12: *Cynara cardunculus* (33)

3.3 Mikrobiální koagulační činidla

K výrobě mikrobiálního koagulantu lze použít plísně, kvasinky i bakterie. Nejznámější mikrobiální syřidla pro výrobu sýrů jsou plísňového původu. Většina bakteriálních proteáz, které sráží mléko, jsou nevhodné hlavně z důvodu jejich vysoké proteolytické aktivity.

Důležité je především využití mikrobiálních koagulačních enzymů plísní. Plísně produkující proteázy, které jsou schopny štěpit κ -kasein, mohou být izolovány z různých zdrojů. Tři druhy, jmenovitě *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus* a *Cryphonectria parasitica*, jsou používány pro výrobu ve velkém měřítku.

Proteáza produkovaná *R. miehei* (40,5 kDa, optimální koagulační aktivita při pH 5,6) obsahuje jednoduchý polypeptidový řetězec, který je velmi podobný chymosinu v jeho prostorové struktuře. Tato proteáza je nejběžněji používaný mikrobiální koagulant pro výrobu sýra a je komerčně dostupný v různých úrovních čistoty. (2)

Enzymy získané pomocí *Cryphonectria parasitica* se vyznačují tím, že mají výbornou proteolytickou aktivitu a pomocí těchto enzymů je velmi dobře formována sýřenina. Obecně nejsou příliš závislé na teplotě a pH a proto jsou vhodné pro výrobu sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou, jako např. ementál. (25) Zvláštností této skupiny jsou proteinázy produkované *Cryphonectria Prarsilitica*, které štěpí vazbu mezi 104. a 105. aminokyselinou. (11)

Enzymy produkované plísněmi mohou být produkovány ve vodném prostředí, ale i na pevném médiu. Jako jediná složka růstového média se obvykle používají otruby, ale jako zdroj uhlíku může být použita i glukóza. Nejlepší výsledky byly zaznamenány pro *Rhizomucor miehei* a *Rhizomucor pusillus*. (2)

3.4 Rekombinantní chymosin

S rostoucí produkcí sýrů bylo nezbytné najít další způsob získávání chymosinu, který by bylo možno produkovat ve větším množství. Přírodní zdroje často nevyhovují požadavkům na kvantitu a kvalitu. S vývojem technologie využívající rekombinaci DNA byl gen chymosinu naklonován do mikroorganismů, což umožnilo fermentační výrobu chymosinu. (17) Chymosin produkovaný fermentací je na trhu již od roku 1990. (25) Takto vyrobený chymosin je nyní široce používán v mnoha zemích a poskytuje výborné výsledky. (23) Produktem je chymosin identický s živočišným chymosinem získaným extrakcí ze žaludku zvířat. Jde především o chymosin B, který je dnes považován za výborný koagulační enzym proti kterému jsou ostatní enzymy srovnávány. (25) V současnosti se předpokládá celosvětové použití rekombinantního chymosinu okolo 70 - 80 % světového trhu. (14)

Nařízení (ES) č. 1829/2003 o geneticky modifikovaných potravinách a krmivech osvobozuje celou řadu výrobků od povinnosti označování. Zejména enzymy produkované geneticky modifikovanými mikroorganismy, které se používají jako pomocné látky při zpracování. Sýr vyrobený za použití chymosinového enzymu získaného z geneticky modifikovaného organismu nevyžaduje značení. EU navíc přijala nařízení a stanovila hranici 0,9 % pro náhodnou a technicky nevyhnutelnou přítomnost geneticky modifikovaných organismů, pod kterou nevyžadují označování. (36)

Rekombinantní chymosin má mnoho výhod, mezi které patří předvídatelné koagulační vlastnosti, Kosher certifikace a přijatelnost pro vegetariány. Hlavní důvodem jeho širokého rozšíření je vysoký výtěžek v porovnání s telecím syřidlem, které obsahuje 10-20 % pepsinu, což vede k vyšším ztrátám peptidů v syrovátce v důsledku terciální fáze srážení.

Je mnoho cest přenosu genu pro tvorbu enzymu na hostitelský organismus. Společný postup pro expresi eukaryotického genu do prokaryotické buňky zahrnuje izolaci celé RNA a mRNA, která kóduje enzym, kde mRNA je reverzní transkriptázou převedena do cDNA formy, ze které jsou introny vystříhány a následně naklonovány do vhodného hostitele. (25)

Nejčastěji používané hostitelské mikroorganismy jsou *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis*, *Saccaromyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* nebo *Trichoderma reesii*. (14)

Nejvíce používaný *Aspergillus niger* při produkci chymosinu je *Aspergillus niger* var *awamori*. Koagulanty produkované plísní *Aspergillus* mají velkou historii použití v potravinářství a je schopný produkovat velké množství různých proteinů. To znamená, že *Aspergillus* tvoří kromě chymosinu další sekundární enzymy, proto musí být po fermentaci purifikován. Prochymosin je produkován spolu s glukooamylázou a je automaticky převeden na aktivní chymosin, což znamená, že není nutný další aktivační krok. Po kultivaci je *Aspergillus* usmrcen kyselinou. Chymosin je pak získáván odstředěním, filtrací a purifikací pomocí chromatografie. (21)

Kvasinky byly zkoumány jako hostitele z hlediska vylučování a produkci mnoha průmyslově významných proteinů, ekonomické nenáročnosti spojené s fermentací kvasinek, stejně jako pro lepší porozumění fyziologii a genetice tohoto organismu. (25) *Kluyveromyces lactis* je kvasinka, která je svými vlastnostmi velmi podobná *Saccharomyces cerevisiae*. Bylo zjištěno, že chymosin může být produkován v tomto hostiteli s dobrými výtěžky tohoto média. Chymosinový gen se vloží do chromozomu *K. lactis*. Kvasinky se pěstují fed-batch fermentací, kdy jsou pěstovány diskontinuálním způsobem s postupným přidáváním živin. Po fermentaci se kvasinky usmrtí přidáním kyseliny benzoové a chymosin se izoluje filtrací. (24)

Kluyveromyces marxianus var. *lactis* mají sklon produkovat sekundární enzymy, ale jejich množství je nižší než u *Aspergillus* spp. Hlavní enzym je prochymosin, které potřebuje být aktivován a je podroben procesu obnovy, ale nejde o skutečnou purifikaci. (21)

Expres chymosinu do bakterie *E.coli* bývala dříve jednou z nejvíce používaných metod. *E.coli* jako hostitelský organismus je schopen rychlého růstu při vysokém osmotickém tlaku na ekonomicky výhodném substrátu, je dobře geneticky prozkoumán a reaguje na velké množství mutagenních činitelů. (25) Výhodou je, že nemá žádné vedlejší proteolytické účinky. *E.coli* nevykládá proteiny, ale většinu ukládá jako intracelulární inkluzní tělíska. Ty lze snadno izolovat od bakterií centrifugací. Inkluzní tělísko obsahuje téměř jenom prochymosin. Poté je bakterie inaktivována kyselinou. V tomto stádiu je enzym přítomen jako neaktivní prochymosin, který může být rozpuštěn, aktivován a následně purifikován pomocí iontově-výměnné chromatografie. (21) Ve velkém měřítku průmyslové fermentace

jsou preferovány geneticky modifikované kultury především kvůli nižším výrobním nákladům.

V rámci genetického inženýrství je možné využívat také rostliny. V těchto rostlinách se enzym akumuluje přibližně v obsahu 0,5 % z celkových proteinů v semenech a je izolován navázáním na pryskyřici. Existuje mnoho metod, které byly popsány pro rostliny např. druhy kukuřice a slunečnice.

Gen pro tvorbu chymosinu může být přenesen z jelenů, buvolů, ovce, koz, velbloudů (2) Poslední výzkumy vložily gen pro tvorbu velbloudího chymosinu (*Camelus dromedarius*) do *Aspergillus niger*. Vlastnosti fermentací produkovaného velbloudího chymosinu byly porovnány s telecím chymosinem. Při použití velbloudího syřidla došlo v průběhu zrání k nižší proteolýze, toho může být využito v případech, kdy existuje sklon k hořkosti. Sýry vyrobené pomocí tohoto syřidla měly velmi dobré sensorické vlastnosti. (34)

3.5 Analýza sýřící aktivity enzymů

Aktivita srážení mléka tj. schopnost specifické hydrolýzy κ -kaseinu je nejdůležitější vlastností enzymů používaných pro výrobu sýrů. Využívá se několik analytických metod pro její měření. (2)

Tradiční metodou pro zjištění koagulační aktivity je Soxhletova metoda. (11) Tato metoda se stále využívá v tradiční výrobě, představuje běžnou metodu pro stanovení celkové srážecí aktivity mléka při výrobě syřidla. Srážecí schopnost je vyjadřována v Soxhletových jednotkách a vztahuje se k objemu syrového mléka, které může být vysráženo jednotkou enzymu za 40 minut při 35 °C. Vzhledem k různému složení syrového mléka a jeho omezené dostupnosti bylo nutné hledat jiné postupy srovnávání. Tyto postupy byly popsány v ISO (International Organization for Standardization) nebo IDF (International Dairy Federation) normách. V principu se jedná o čas potřebný ke srážení mléka pomocí zkoumaného koagulačního činidla porovnáván s časy, kdy jsou použita standardní koagulační činidla. Jako substrát se používá standardizované rekonstituované odstředěné mléko, které má hodnotu pH 6,5. Měření je prováděno při teplotě mléka 35 °C. (2)

V důsledku dlouhé analýzy a přítomnosti subjektivního činitele při vyhodnocení, bylo provedeno několik pokusů o vytvoření metod, které by mohly být vyhodnocovány objektivním způsobem. Koagulace může být zaznamenávána blízkou infračervenou spektroskopií, která dává výsledky odpovídající formaci gelu.

Další metoda využívá měření pomocí rotační reologie. Byla popsána viskozita $7,24 \pm 0,45$ mPa·s, která odpovídá koagulačnímu času IDF standardů při standardních hodnotách pH, teploty a koncentraci chloridu vápenatého. Byly také popsány metody založené na měření pomocí digitální světelné mikroskopie. (11)

Telecí syřidlo vyžaduje i jiný typ rozboru z důvodu přítomnosti dalšího enzymu. U telecího syřidla musí být známé relativní množství chymosinu a pepsinu, protože se jedná o značný rozdíl v hydrolytické aktivitě v podmínkách srážení mléka. Metoda IDF 110B popisuje chromatografickou separaci enzymových směsí a postup jak vyjádřit procenta pepsinu a chymosinu. (2)

4 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ SRÁŽENÍ MLÉČNÝCH BÍLKOVIN PŘI ENZYMATICKÉM SRÁŽENÍ

Srážení mléka je základním krokem při výrobě sýrů. Výtěžek a reologické vlastnosti produktu jsou silně ovlivňovány koagulačním procesem. Faktory jako enzymová koncentrace, teplota, pH a koncentrace Ca^{2+} iontů ovlivňují srážení. Koagulace mléka kombinuje počáteční enzymatické hydrolytické reakce a následnou agregaci, která již na enzymu nezávisí. (25)

4.1.1 Vlastnosti použitého mléka

Mléko různých krav může mít rozdílnou koagulační aktivitu. Rozdíly mohou být způsobené genetickým polymorfismem, stejně jako obsahem vápníku a hodnotou pH. Nízká mikrobiální kvalita a vysoký obsah somatických buněk může způsobit nežádoucí koagulační vlastnosti mléka. Zajímavostí je, že nepasterizované mléko může být špatně koagulovatelné při použití koagulačních činidel získaných pomocí *Rhizopus miehei* v důsledku přítomnosti aktivních protilátek inhibující tyto enzymy.

Skladování mléka při nízkých teplotách zvyšuje koagulační čas a může způsobit vznik slabšího zrna a větší ztrátu tuku a proteinů do syrovátky. Toto je převážně způsobeno zvýšenou degradací kaseinu pomocí proteolytických enzymů z psychrotrofních mikroorganismů.

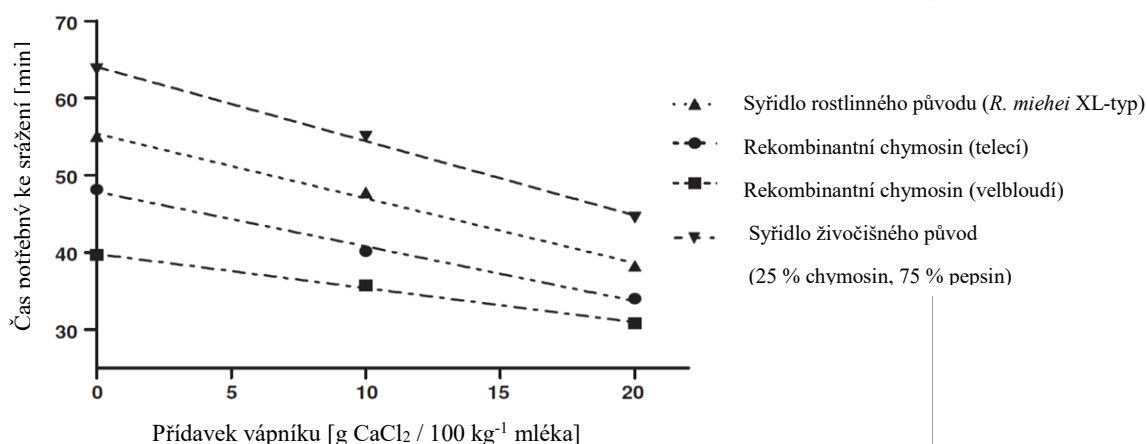
Před vlastní výrobou může být provedena standardizace obsahu proteinů a tuku. Vyrovnávají se tak rozdíly ve složení mléka v různých ročních obdobích. Složení může být ovlivněno přidávkem koncentrovaného mléka, sušeného mléka, nebo mléčnými bílkovinnými produkty. Vysoká hladina tuku má tendenci vytvořit měkčí sýřeninu. Narůstající množství kaseinu obvykle výrazně neovlivňuje čas srážení, ale vede k rychlejšímu zpevnění gelu. Obecně by se neměl zvyšovat obsah bílkovin v mléce více než 1,5krát. Při vyšším přidávku by bylo obtížné řídit pevnost gelu při krájení, což může vést ke ztrátě tuku v důsledku jeho odchodu do syrovátky. Doplnění mléka mléčnými bílkovinami obsahující značné množství denaturovaných bílkovin obvykle negativně ovlivňuje koagulaci. Pokud je rostlinný olej používán jako náhražka tuku a zároveň je do procesu zařazena homogenizace, dochází ke zhoršení veškerých koagulačních vlastností. (21)

Tepelné ošetření je běžnou praxí v mlékárenském průmyslu. Zahřátí mléka závažně narušuje agregaci micel, což je přičítáno vázáním denaturovaných syrovátkových proteinů do kaseinové micely a tepelně indukovanou přeměnou hydrogenfosforečnanu vápenatého, který je v kyselém prostředí rozpustný, na fosforečnan vápenatý nebo dihydrogenfosforečnan vápenatý, které jsou v kyselém prostředí nerozpustné. Způsobuje to snížení obsahu dostupného vápníku důležitého pro koagulaci. Při záhřevu mléka nad 75 °C dochází k interakci kaseinu a syrovátkových proteinů. Dochází k tvorbě komplexu κ -kaseinu s denaturovaným β -laktoglobulinem, což prodlužuje koagulační čas a snižuje výtěžnost. Tepelně indukované změny způsobené navázáním sérových bílkovin nepříznivě mění účinek syřidla. Sýr produkováný z mléka ošetřeného vysokou teplotou má měkkou strukturu a většinou nežádoucí organoleptické vlastnosti. Sýřenina obsahuje vysoké procento vody a má špatnou pružnost. (27)

Obsah tuku v mléce má velký vliv na texturu a senzorycké vlastnosti mléčných produktů. Tukové kuličky mohou narušit strukturu sítě kaseinů a tím vytvoří měkčí strukturu sýrů. Homogenizace vede k pomalejší tvorbě sýřeniny a synerezi, což vede k vyššímu obsahu vody v konečném produktu. (21)

4.1.2 Přídavek aditiv do mléka

Přídavkem chloridu vápenatého do mléka se snižuje pH, urychluje koagulační čas a formování sýřeniny. Při typické výrobě sýrů se přidává před koagulací 0-20 g chloridu vápenatého na 100 kilogramů. Přidání chloridu vápenatého může zmírnit nepříznivý vliv skladování za studena a teplem zhoršené koagulační schopnosti. Další látka, která může být přidávána do mléka je chlorid sodný. Přídavek chloridu sodného do 0,5 g na 100 g zvyšuje rychlost formace gelu, naopak při vyšším množství se dosáhne opačného efektu, kdy s množstvím přidaného chloridu sodného roste čas potřebný ke srážení. (21) Na Obrázku č. 13 je znázorněna lineárně klesající závislost pro různá koagulační činidla.



Obrázek 13: Graf závislosti koagulačního času na přídavku chloridu vápenatého pro různá koagulační činidla (21)

4.1.3 Vliv teploty

Bylo zjištěno, že různé teploty mléka ovlivňují rychlost agregace. Rychlost tvorby koagula narůstá od 20 do 40 až 42 °C, ale při vyšších teplotách se koagulační proces zpomaluje. (25)

Míra hydrolyzy, agregace a synereze narůstá s narůstající teplotou, dokud nejsou enzymy teplotou inaktivovány. Optimální teplota pro formaci sýřeniny při pH 6,4 se pohybuje kolem 34 až 38 °C pro většinu komerčních syřidel. V praxi se obvykle používá teplota mezi 30 až 35 °C pro dosažení kontroly nad pevností sýřeniny při krájení, tato teplota je vhodná také pro růst starterových kultur. (21)

4.1.4 Vliv použitých starterových kultur, vliv pH

Starterové kultury jsou velmi důležitý faktor při výrobě sýrů. Jsou používány dva typy kultur při výrobě sýrů. Mezofilní kultury s teplotním optimem mezi 20 a 40 °C a termofilní kultury, které mají teplotní optimum nad 40 °C. Nejčastěji používané kultury jsou směsné kultury, které obsahují více kmenů stejného, častěji však odlišného druhu nebo dokonce rodu.

Starterové kultury mají zásadní význam pro výrobu sýrů z důvodu:

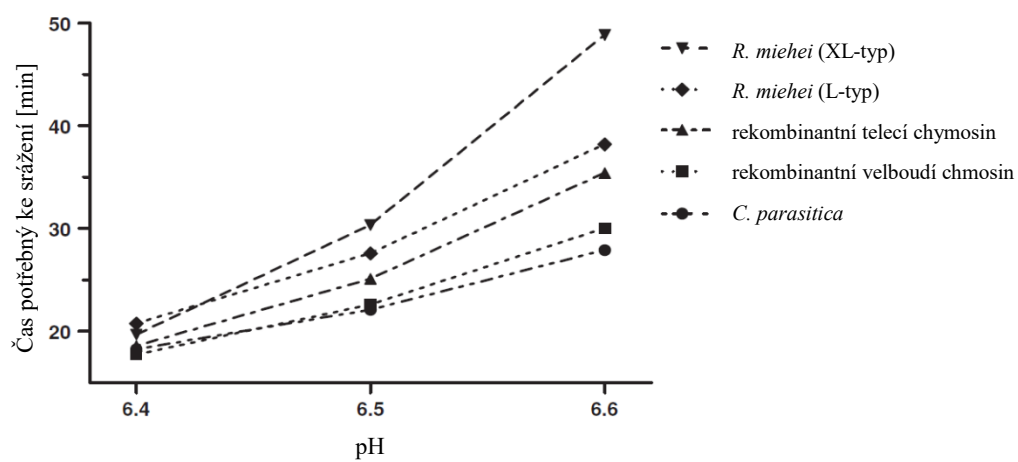
- Produkce kyseliny mléčné.
- Schopnosti rozkladu bílkovin.
- Případné produkce CO₂.

Hlavním úkolem kultury je snížení pH v důsledku produkce kyseliny mléčné. Při koagulaci mléka jsou bakteriální buňky zachyceny v koagulu. Následně se podílí na procesech zrání sýrů.

Starterové kultury se přidávají do mléka většinou v podobně zákysu při teplotě cca 30 °C. A to ze dvou důvodů. Pro dosažení dobré a rovnoměrné distribuce bakterií a také, aby bakterie měly čas na přizpůsobení novému médiu. Doba potřebná k zahájení růstu je přibližně 30 až 60 minut. Množství potřebných starterových kultur se liší podle druhu vyráběného sýra. Při výrobě by se mělo zabránit zašlehávání vzduchu z důvodu možného následného ovlivnění kvality koagula, kdy může dojít ke ztrátě kaseinu v syrovátce. (18)

Hodnota pH má velký vliv na koagulaci a vlastnosti sýřeniny, snížení pH aktivitou startérových kultur zvyšuje rychlost hydrolýzy κ -kaseinu a následující agregaci kaseinových micel. Při snížení pH a zvýšení teploty mléka oproti obvyklým podmínkám sýření (pH 6,6, 31 °C) koagulace nastává při nižším stupni hydrolýzy kaseinu. Mírné snížení pH (například na hodnotu pH 6,4) vede k mírné solubilizaci vápníku z kaseinových micel, což vede k rychlejší formaci a získání pevnější sýřeniny. Nicméně vyšší stupeň solubilizace vápníku vede k rozsáhlé demineralizaci kaseinových micel, což se projeví vznikem slabší a pružnější sýřeniny. U některých měkkých sýrů je nutný krok rozsáhlé demineralizace před přidáním koagulantu, aby se dosáhlo požadované struktury a těla zralého sýra. (21)

Doba potřebná pro koagulaci výrazně závisí na pH. Snížení pH mléka z 7,0 na 5,2 způsobuje snížení koagulačního času. Optimální pH pro koagulaci kaseinu je 5,1-5,3, snížení pH pod hodnotu 5,0 již není efektivní. Závislost na Obrázku č. 14 ukazuje rozdíl koagulačních časů při pH 6,4 až 6,6, kdy koagulační čas při pH 6,4 je výrazně nižší u všech zkoumaných koagulačních činidel. (25)



Obrázek 14: Graf závislosti koagulačního času na pH pro různá koagulační činidla (21)

ZÁVĚR

Práce je zaměřena na srážení bílkovin při výrobě sýrů. Nejpoužívanější koagulační činidla současnosti jsou vyráběna s využitím genetického inženýrství. Geny pro tvorbu koagulačních činidel jsou získávány nejčastěji z krav a jsou přenášeny do hostitelského organismu. Jako hostitelský organismus mohou být používány mikroorganismy nebo rostliny. Nejnovější výzkumy popisují velmi dobré výsledky při přenesení velbloudího genu (*Camelus dromedarius*) do *Aspergillus niger*. Výhodou použití takto produkovaného chymosinu je vysoká koagulační aktivita, dosažení nižší proteolýzy v průběhu zrání a velmi dobrých senzorických vlastností.

Klasické syřidlo a mikrobiální enzymy spolu s rostlinnými koagulanty jsou dnes využívány převážně při výrobě tradičních sýrů. Tyto koagulanty jsou používány z důvodu tvorby charakteristické chutě a vůni těchto výrobků.

Kromě druhu použitého koagulantu může být proces koagulace ovlivněn dalšími faktory. Mléko použité pro výrobu sýrů může mít řadu rozdílů, které mohou být ovlivněny geneticky, ale i výživou dojnice. Například ovčí mléko obsahuje výrazně vyšší obsah kaseinu a tuku, čímž poskytuje téměř dvakrát vyšší výtěžek s porovnáním s kravským mlékem. Důležité jsou také procesy předcházející vlastní výrobě. Skladování při nízkých teplotách obecně nepřispívá ke zlepšení koagulačních vlastností. Technologové také kladou velký důraz na standardizaci obsahu mléčných bílkovin a tuku v mléce používané pro vlastní výrobu, stejně jako přídavek aditiv. Vyšší tepelný záhřev je přijatelný pouze u měkkých sýrů, neboť se tvoří sýřenina s vysokým obsahem vody.

Mezi podmínky ovlivňující proces koagulace patří dále teplota a pH. Rychlost tvorby koagula narůstá od 20 do 40 až 42 °C, ale při vyšších teplotách se koagulační proces zpomaluje. Optimální teplota pro formaci sýřeniny při pH 6,4 se pohybuje kolem 34 až 38 °C pro většinu komerčních syřidel. V praxi se obvykle používá teplota mezi 30 až 35 °C pro podpoření růstu starterových bakterií. Bakterie především upravují kyselost mléka. Snížení pH mléka z 6,6 na 5,2 způsobuje snížení koagulačního času.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. CALLEC, C. *Encyklopedie sýrů*. Čestlice : Rebo Productions, 2003. ISBN 80-7234-225-8, 256 s.
2. JACOB., M. Recent advances in milk clotting enzymes . *International Journal of Dairy Technology*. 2011, Sv. 64, 1.
3. KADLEC, P. *Technologie potravin - Přehled tradičních potravinářských výrob*. Praha : Key publishing, 2012. ISB-978_80_7481-145-0, 280-283 s.
4. WALSTRA, P. *Dairy Science and Technology, Second Edition*. London : Taylor and Francis Group, 2006. 13-978-0-8247-2763-5, 140-141 s.
5. Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 397/2016 Sb., o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražení krémy a jedlé tuky a oleje.
6. WEIMER, B. *Improving the flavour of cheese*. Cambridge : CRC Press, 2007. 6 s., ISBN 978-1-84569-305-3.
7. SLUKOVÁ, M. *Výroba potravin a nutriční hodnota*. Praha : VŠCHT Praha, 2016. 145 - 147 s. ISBN 978-80-7080-947-1.
8. WEIMER, B. *Improving the flavour of cheese*. Cambridge : CRC Press, 2007. ISBN 978-0-8493-9158-3, 59 s.
9. ROBINSON, K. R. *Encyclopedia of food microbiology*. London : Academic press, 2000. Sv. 2. 382 s. ISBN 0-12-227070-3.
10. FOX, P. F. *Cheese: chemistry, physics, and microbiology*. 3rd ed. London : Elsevier, 2004. ISBN 0122636538. 48-52, 57, 73, 100, 617 s.
11. OBERMAIER, O. *Jak poznáme kvalitu? Sýry a tvarohy*. Praha : Česká technologická platforma pro potraviny, 2013. ISBN 978-80-905096-6-5, 7 s.
12. GRIFFITHS, M. *Improving the safety and quality of milk*. Boston : CRC Press, 2010. ISBN-978-1-84569.806-5 434 s.
13. JENSEN, R. *Hanbook of milk composition*. London : Academic Press, 1995. ISBN 0-12-384430-4, 830 s.
14. VELÍŠEK, J. a J HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. 3. vyd. Tábor : OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-17-6. 43-44 s.

15. BOLAND, M., SINGH, H. a A. THOMPSON. *Milk proteins - From Expression to Food, 2nd Edition*. London : Elsevier, 2014. ISBN 978-0-12-405171-3. 141-142 s.
16. UNSTULON, Z. *Applied Food Protein Chemistry*. Oxford : John Wiley & Sons, 2015. ISBN 978-1-119-94449-2, 429-434 s.
17. G., SMIT. *Dairy processing*. Cambridge : CRC Press, 2003. ISBN: 0-8493-1758-4, 188 s.
18. FOX, P.F. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Cork : Springer International Publishing Switzerland, 2015. ISBN 978-3-319-14891-5, 175-179 s.
19. BUŇKA, F. *Mlékárenská technologie I*. Zlín : Univerzita Tomáše Bati ve Zlín, 2013. ISBN 978-80-7454-254-1, 42-43 s.
20. BEYUND, G. *Dairy processing handbook*. New York : Tetra Pak Processing, 2003. ISBN 9176111326, 24 s.
21. FOX, P. F. *Advances Dairy Chemistry, Volume 2*. New York : Kluwer Academic, 2003. ISBN: 0306472716, 1346 s.
22. HORNE, D. Casein micelle structure: Model and muddles. *Current Opinion in Colloids and Interface science*. 9, 2006, 223-235 s.
23. KODÍČEK, M. *Biochemické pojmy - výkladový slovník*. Praha : Databáze online [cit. 2018-04-04]. Dostupné na: http://147.33.74.135/knihy/uid_es-002_v1/hesla/enzymy.html, 2004.
24. BARRY, A. *Technology of cheesemaking, Second edition*. Westmorland : Blackwell publishing, 2010. ISBN: 978-1-405-18298, 98-102,106, 112,116, 125 s.
25. KUMAR, A. Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2010, Sv. 30, 4, 243-258 s.
26. SLAMANI, R. Purification and characterisation of milk-clotting and caseinolytic activities of pepsin isolated from adult sheep abomasa. *International Journal of Dairy Technology*. 2018.
27. ESKIN, N.A. *Biochemistry of Foods 3rd Edition*. San Diego : Elsevier, 2013. ISBN: 978-0-12-242352-9, 328, 544 s.
28. SCHMITH, J. *Food Additives Data Book*. Oxford : John Wiley and Sons, 2003. ISBN: 0-632-06395, 454 s.

29. RAMPILI, M. HPLC analysis of rennet enzymes and fermentation-produced chymosin. *Scienza e Technica Lattiero-Casearia*. 43, 1992, 387-401 S.
30. LILLA, S. Validation of recombinant and bovine chymosin by mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, Sv. 53, 5230–5238 S.
31. YOUNG, W. *Handobook of Milk of Non-bovine Mammals*. místo neznámé : John Wiley & Sond, 2017. ISBN 9781119110316, 459 s..
32. FOX, P.F. *Cheese - Chemisry, Physic and Microbiology*. 4th ed, London : Elsevier, 2017. ISBN: 978-0-12-417012-4, 94, 99 s.
33. TEJADA, L. Proteolysis in goats' milk cheese made with calf rennet and plant coagulant. *International Dairy Journal*. 18, 2008, Sv. 2.
34. DOHETRTY, S. Botanical Skretches and Oter Stouries. [Online] 2013. [Citace: 25. březen 2018.] <http://botanicalsketches.blogspot.cz/p/gallery.html>.
35. BANSAL, N. Stability of recombinant chamel (*Camelus dromedarius*) chymosin as a couagulant for Cheddar cheese, *International Dairy Journal*. *International Dairy Journal*. 2009, Sv. 19, 9.
36. Nařízení (ES) č. 1829/2003 o geneticky modifikovaných potravinách a krmivech.
37. LACHANCE, M. Current status of *Kluyveromyces* systematics. *FEMS Yeast Research*. 7, 2007, Sv. 5, 642-645 s.
38. NAJERA, A. Effects of pH, temperature, CaCl₂ and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk: a multifactorial study. *Food Chemistry*. 80, 2003, Sv. 3, 345-352 S.

SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|---|----|
| Obrázek 1: Rozdělení sýrů z technologického hlediska (12) | 12 |
| Obrázek 2: Model kaseinové micely (15)..... | 15 |
| Obrázek 3: Znázornění micely popsané dle Holta: část A: pohled na kaseinovou micelu, část B: detail struktury kaseinové micely (22) | 16 |
| Obrázek 4: Schématické znázornění interakce mezi kaseiny a nanoklastry koloidního fosforečnanu vápenatého dle Holtova modelu (23) | 16 |
| Obrázek 5: Náboj hydratačního obalu kaseinu při různých pH (21) | 18 |
| Obrázek 6: Přídavek koagulantu do mléka (11) | 18 |
| Obrázek 7: Hydrolytické štěpení κ -kaseinu (11) | 19 |
| Obrázek 8: Flokulace (11) | 20 |
| Obrázek 9: spojování jednotlivých útvarů do souvislé gelovité struktury (11)..... | 21 |
| Obrázek 10: Schéma znásobování vazeb mezi kaseinovými bílkovinami (11)..... | 22 |
| Obrázek 11: Prostorová struktura chymosinu..... | 24 |
| Obrázek 12: <i>Cynara cardunculus</i> (33) | 27 |
| Obrázek 13: Graf závislosti koagulačního času na přídavku chloridu vápenatého pro různá koagulační činidla (21) | 34 |
| Obrázek 14: Graf závislosti koagulačního času na pH pro různá koagulační činidla (21) | 36 |

SEZNAM TABULEK

| | |
|--|----|
| Tabulka 1: Klasifikace přírodních sýrů podle obsahu tuku v sušině (5) | 10 |
| Tabulka 2: Klasifikace přírodních sýrů podle konzistence ve vztahu k obsahu vody v tukuprosté hmotě sýra (5) | 11 |
| Tabulka 3: Klasifikace přírodních sýrů podle zrání (5)..... | 11 |
| Tabulka 4: Zastoupení komponent mléka u vybraných živočišných druhů v procentech (12) (13) | 13 |
| Tabulka 5: Porovnání vlastností syřidel různých druhů zvířat (32)..... | 26 |