

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BRNO 2017

MICHAELA OSTŘANSKÁ

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav technologie potravin



Enzymy v mléce
Bakalářská práce

Vedoucí práce:
doc. Ing. Květoslava Šustová, Ph.D.

Vypracovala:
Michaela Ošťanská

Brno 2017

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: *Enzymy v mléce* vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše

V Brně dne:.....

.....

podpis

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji paní prof. Ing. Květoslavě Šustové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a pomoc, kterou mi poskytla při hledání příslušné literatury. Děkuji také svým blízkým, kteří mě ve studiu a při zpracování bakalářské práce podporovali.

ABSTRAKT

Bakalářská práce je čistě teoretická, zabývá se enzymy v mléce. Cílem práce bylo přinést souhrnný přehled nejnovějších poznatků o enzymech vyskytujících se v mléce. V práci jsou relativně podrobně popsány jednotlivé enzymy, jejich vlastnosti, funkce, stabilita při zpracování a vliv na kvalitu mléka. Je konstatováno, že některé enzymy jsou zajímavé pro svou prospěšnou funkci v mléce (např. laktoperoxidáza), další zase pro detekci stupně tepelného ošetření (např. alkalické fosfatáza) a jiné pro vliv na kvalitu mléčných výrobků. Dále, že v mléce se enzymy vyskytují buď přirozeného, nebo mikrobiálního původu. Část práce se zaměřuje na možnosti praktického využití enzymů v mléce, jako například určení mastitidy na základě zvýšeného množství enzymů v mléce, rozlišení mlék od jednotlivých savců, rozlišení zralého mléka od mleziva a jiné.

Klíčová slova: Enzymy, mléko, somatické buňky, detekce mastitidy

ABSTRACT

The Bachelor thesis enzymes in milk gives information about enzymes found in milk and handles the topic theoretically. The aim of this paper is to sum up the latest findings regarding the enzymes in milk. The thesis contains more or less detailed characteristics of each enzyme. The characteristics include information about the properties of enzymes, their functions, the stability during the processing and their impact on the quality of milk. It is stated that some enzymes are interesting for its beneficial functions in milk (e.g. lactoperoxidase), some enzymes for their ability to detect the degree of the heat treatment (e.g. alkaline phosphatase) and some of them for the impact on the quality of dairy products. The thesis specifies if the enzymes occur in milk naturally or if they are of microbial origin. Other part of the paper focuses on the practical use of enzymes in milk, such as the identification of mastitis based on the increased number of enzymes in milk, the distinguishing between milks of various mammals or the distinction of mature milk and colostrum etc.

Key words: Enzymes, milk, somatic cells, detection mastitis

Obsah

1	ÚVOD.....	8
2	CÍL PRÁCE.....	9
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
3.1	ENZYMY.....	10
3.1.1	Struktura enzymů.....	10
3.1.2	Činnost enzymů	11
3.1.3	Názvosloví a klasifikace enzymů	11
3.1.4	Vlivy působící na enzymatickou aktivitu	12
3.2	ROZDĚLENÍ ENZYMŮ V MLÉČE.....	14
3.2.1	Oxidoreduktázy.....	17
3.2.1.1	Laktoperoxidáza	17
3.2.1.2	Kataláza	19
3.2.1.3	Xantinoxidáza.....	20
3.2.1.4	Laktát dehydrogenáza.....	22
3.2.2	Hydrolázy.....	24
3.2.2.1	Lipázy	24
3.2.2.2	Fosfatázy.....	27
3.2.2.3	Alkalická fosfatáza	27
3.2.2.4	Kyselá fosfatáza.....	30
3.2.2.5	Proteázy	31
3.2.2.6	Plazmin	32
3.2.2.7	Katepsin D	34
3.2.2.8	Amyláza.....	35
3.2.2.9	Lysozym	36
4	ZÁVĚR.....	38
5	PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY	40

1 ÚVOD

První zmínky o enzimech v mléce se objevily v práci J. B. Sumnera z roku 1926. Od tohoto roku se začaly enzymy studovat a jsou stále aktivní oblasti výzkumu. V mléce byl prokázán vysoký počet enzymů, vyznačující se vysokou specifíčností. Enzymy jsou bílkovinné složky mléka savců, které řadíme mezi biokatalyzátory. V kravském mléce od zdravých dojníc bylo detekováno až 60 nativních enzymů. Jejich vylučování je ovlivněno řadou faktorů, např. typem zvířete, věkem dojnice, počtem laktací, stádiem laktace, výživovým stavem a zdravotním stavem mléčné žlázy.

V mléce se enzymy dělí dle původu na endogenní a exogenní. Endogenní neboli nativní, jsou přirozenou složkou mléka. Na rozdíl od exogenních enzymů vznikají vlivem mikrobiální činnosti a to z přirozené nebo kontaminující mikroflóry. Mimo to řadíme do exogenních enzymů i enzymy, které byly do mléka přidány během technologického zpracování.

Mléko není homogenní roztok enzymů. Enzymy jsou navázané na jednotlivé složky v mléce. Většina enzymů je vázána na povrchových vrstvách tukových kuliček, tyto enzymy ve větší míře přecházejí do smetany a výrobků z ní. Jiné jsou vázané na bílkovinné složky mléka a při srážení zůstávají v sýrenině.

Zjišťování přítomnosti a aktivity enzymů lze prakticky využít k rozlišení mléka od jednotlivých savců, k odlišení zralého mléka od mleziva, k diagnostice zdravotního stavu mléčné žlázy, ke zjišťování hygieny získávání a ošetření mléka a ke kontrole provedení tepelného ošetření mléka.

2 CÍL PRÁCE

Cílem bakalářské práce bylo na základě studia odborné a vědecké literatury zpracovat a utřídit s důrazem na nejnovější poznatky o enzymech vyskytujících se v mléce a zaměřením na jejich původ v mléce a jejich enzymatickou aktivitu při zvýšeném počtu somatických buněk. Dílčím cílem práce bylo charakterizovat faktory ovlivňující aktivitu enzymů v mléce.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 ENZYMY

Enzymy jsou bílkoviny, které mají schopnost katalyzovat chemické reakce, zařazujeme je do skupiny biokatalyzátorů. Enzymy urychlují chemické reakce a řídí většinu biochemických reakcí v živých organizmech. Množství enzymů se odhaduje na miliardy, je známo, že i nejjednodušší buňka obsahuje přes 3000 enzymů. Věda zabývající se enzymy se nazývá enzymologie (Vodrážka et al., 1998).

3.1.1 Struktura enzymů

Jak již bylo řečeno, enzymy jsou bílkovinné povahy. Pokud je enzym tvořen pouze bílkovinou, označujeme jej jako jednosložkový nebo také jednoduchý. Jestliže se tam nachází i nebílkovinná složka, tak je enzym označován jako dvousložkový nebo také složený. V takovém případě se bílkovinná část označuje jako apoenzym a nebílkovinná část jako kofaktor. Celý složený enzym je pak holoenzym (Kouda, 2013).

Kofaktory jsou nutné pro funkci enzymu, bez kofaktoru nemá daný enzym žádnou aktivitu. Kofaktorem může být kovový iont nebo organická molekula. Hlavní funkci kofaktoru je přenos skupin, atomů nebo elektronů během biochemických reakcí katalyzovaných enzymem. Pokud je kofaktor pevně vázán na bílkovinnou část enzymu kovalentní vazbou tak vytváří stabilní strukturu nazývanou prostetická skupina. Kofaktor, který je vázán pouze slabě a může se oddělit, je označován jako koenzym (Kouda, 2013).

Na povrchu enzymu se nachází aktivní místo, na které se váže substrát a kofaktor, probíhá tam samotná biochemická reakce. Aktivní místo je tvořeno aminokyselinovými zbytky, které vážou reaktivní část molekuly substrátu. Tyto zbytky aminokyselin se přímo podílejí na tvorbě a štěpení vazeb (Vodrážka et al., 1998).

3.1.2 Činnost enzymů

V aktivním místě dochází k navázání substrátu na enzym. Vytváří se labilní komplex enzym-substrát, tento komplex v následujícím kroku se rozpadá na produkt reakce a enzym. Enzym zůstává nezměněný a může vstoupit do další reakce. Přeměnu můžeme popsat obecným schématem (Šípál et al., 1992; Kolář et al., 2004):



enzym + substrát \leftrightarrow komplex \rightarrow produkty + enzym

Enzymy urychlují dosažení rovnováhy mezi výchozími látkami (substráty) a produkty tím, že snižují aktivační energii potřebnou k tomu, aby reakce proběhla. Enzym se nemění ani nespotřebovává, ale energie potřebná k přeměně substrátu na produkt je několikanásobně nižší, než energie, kterou by bylo zapotřebí dodat na tu samou reakci bez účasti enzymu (Šípál et al., 1992).

3.1.3 Názvosloví a klasifikace enzymů

V počátečních studiích byly enzymy pojmenovány celkem náhodně triviálními názvy, převážně s koncovkou – in. Dodnes se používá označení (např. trypsin, pepsin, chymosin). Později se začala přidávat koncovka – áza a název byl tvořen dle substrátu, jehož přeměnu katalyzoval (např. amyláza, lipáza), nebo dle typu katalyzované reakce (např. hydroláza, oxidáza). S narůstajícím počtem objevených enzymů a neustálými záměnami se přistoupilo k účelnému třídění a na jednotnou nomenklaturu. V roce 1961 se Mezinárodní unie biochemie (UIB) rozhodla zavést systémové rozdělení a z něho vyplývající systémové názvy enzymů (Murray, 2012; Vodrážka et al., 1998).

Podle typu katalyzované reakce se enzymy rozdělují do šesti hlavních tříd. Nejdůležitější a nejvíce zastoupenou skupinou v mléce jsou hydrolázy a oxidoreduktázy (Vodrážka et al., 1991).

- Oxidoreduktázy (dehydrogenázy)

Jedná se o nejpočetnější třídu enzymů, která katalyzuje oxidačně-redoxní systémy. Oxidoredukční děj probíhá přenosem vodíků nebo elektronů, případně obojí ze substrátu (donoru) na jinou látku (akceptor). Příkladem je laktát dehydrogenáza (Vodrážka et al., 1991).

- Hydrolázy

Štěpí hydrolytické vazby (peptidové, amidové, esterové a jiné), při nichž se uvolňuje voda. Hydrolázy jsou taktéž početnou skupinou enzymů, převážně povahy jednoduchých bílkovin. Podle typu štěpených vazeb se dělí na podtřídy (Vodrážka et al., 1991). V mlékárenském průmyslu nejdůležitější proteázy hydrolyzují peptidické vazby bílkovin. Mezi nejdůležitější proteázy řadíme pepsin a chymozin (Gajdůšek and Klíčnick, 1993).

- Transferázy (kinázy)

Tato skupina enzymů, realizuje přenos funkčních skupin ($-\text{CH}_3$, $-\text{NH}_2$ apod.) v aktivované formě z donoru na akceptor. Podle charakteru přenášených skupin se rozdělují na podskupiny. Transferázy vytvářejí četnou skupinu enzymů (Vodrážka et al., 1991).

- Lyasy (systázy)

Lyasy katalyzují nehydrolytické štěpení a vznik vazeb (např. $\text{C}-\text{C}$, $\text{C}-\text{O}$, $\text{C}-\text{N}$). Bez použití dalšího reaktantu tyto enzymy odštěpují nebo vnášejí do substrátů malé molekuly (Vodrážka et al., 1991).

- Isomerasy

Způsobují nitromolekulové přesuny atomů a funkčních skupin, čímž vytvářejí polohové, geometrické nebo prostorové izomery sloučenin. Jedná se o nejméně početní skupinu a do jednotlivých podtříd jsou rozděleny podle typů izomerie (Vodrážka et al., 1991).

- Ligasy (syntetázy)

Podílejí se na syntetických pochodech, katalyzují vznik energetických vazeb za rozkladu látky uvolňující energií. Tato skupina enzymů je poměrně málo početná (Vodrážka et al., 1991).

3.1.4 Vlivy působící na enzymatickou aktivitu

Enzymatické reakce probíhají různou rychlostí v závislosti na podmínkách reakčního prostředí. Základní jednotka pro enzymatické reakce je katal. Tato jednotka udává schopnost enzymu katalyzovat přeměnu 1 molu substrátů na produkt za 1 sekundu. Z praktického hlediska je jednotka příliš velká, proto se využívají zlomky této jednotky (Vodrážka et al., 1991).

Enzymově katalyzované reakce probíhají různou rychlostí a závisí na různých faktorech, jako jsou:

- 1) množství enzymu,
- 2) koncentrace substrátů,
- 3) fyzikálně chemické vlastností prostředí,
- 4) přítomnost efektorů (modifikátorů).

Vliv koncentrace a množství substrátů

Množství substrátů: Rychlost enzymatické reakce se zvyšuje společně s koncentrací substrátu, až do obsazení všech aktivních míst enzymu (Klouda, 2013).

Množství enzymu: Rychlost enzymatické reakce se zvyšuje společně s množstvím enzymů, pouze za předpokladu dostatečného množství substrátů (Klouda, 2013).

Vliv podmínek prostředí na enzymatickou aktivitu:

Regulovat enzymatickou aktivitu lze změněním podmínek vnějšího prostředí (Vodrážka et al., 1991).

Teplota: Při zvyšující teplotě roste rychlost enzymatické reakce. Avšak s rostoucí teplotou se enzym inaktivuje, dochází k denaturaci bílkovinné části a případně odštěpení kofaktoru. Převážná část živočišných enzymů má nejvyšší aktivitu při 37 °C a inaktivuje se při teplotě 50–60 °C (Vodrážka, 1991). V průměru nárůstu teploty o 1 °C, zvýší se rychlost reakce o 10 %.

Hodnota pH: Aktivita enzymů je velmi závislá na pH prostředí. Enzymy jsou aktivní pouze v určitém intervalu pH, mimo interval svou aktivitu ztrácí (Voet and Voetová, 1995). Převážná část enzymů má optimum účinnosti v neutrálním či slabě kyselém prostředí. Extrémně vysoké optimální hodnoty pH mají trávicí enzymy (Kolář et al., 2000).

Přítomnost modifikátorů

Aktivátory: Látky zvyšující rychlost enzymatické reakce.

Inhibitory: Některé látky mohou inhibovat aktivitu enzymů, tyto látky se vážou na aktivní místo enzymu. Snižují rychlost chemické reakce. Mohou enzym zablockovat trvale, pak se jedná o ireverzibilní inhibici, nebo pouze zablockovat – reverzní inhibice (Klouda, 2013).

3.2 ROZDĚLENÍ ENZYMŮ V MLÉCE

Podle původu enzymy dělíme na dvě základní skupiny:

Endogenní – původní neboli nativní, jsou přirozenou složkou mléka.

Exogenní – vytvořené mikrobiální činností (mikrobiální enzymy) a dále enzymy, které mohou být do mléka přidávány během technologického zpracování (syřidla apod.).

Jak již bylo uvedeno, enzymy jsou bílkovinné složky, které katalyzují specifické reakce. V kravském mléce od zdravých dojnic bylo prokázáno až 60 nativních enzymů. Významné navýšení aktivity enzymů je pozorováno v mlezivu a v mléce od dojnic s mastitidou (zánětem mléčné žlázy), (Silanikove, 2006). U většiny nativních enzymů v mléce zatím není známá jejich funkce. Nejvýznamnější nativní enzymy jsou popsány v Tabulce 1 (Buňka, 2013).

Nativní enzymy pocházejí z různých zdrojů:

- dostávají se do mléka z krevního řečiště,
- přecházejí ze somatických buněk (leukocytů) do mléka, vznikají v průběhu imunitní odpovědi organismu s bakteriální infekcí,
- z cytoplazmy sekrečních buněk mléčné žlázy, během procesu exkrece se mohou stát součástí tukových kuliček,
- přímo z membrány tukových kapének, tímto způsobem se do mléka dostává nejvíce enzymů (Fox a McSweeney, 1998; Bosze, 2008).

Mléko není homogenní roztok enzymů. Enzymy jsou navázané na jednotlivé složky v mléce. Většina enzymů je vázána na povrchových vrstvách tukových kuliček, tyto enzymy ve větší míře přecházejí do smetany a výrobků z ní. Jiné jsou vázané na bílkovinné složky mléka a při srážení zůstávají v syřenině (např. plazmin, plazminogen). (Buňka, 2013).

Tabulka 1: Souhrn nativních enzymů a jejich význam v mléce (Buňka, 2013)

Enzym	Reakce	Význam
Lipáza	$\text{Triacylglycerol} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{mastné kyseliny} + \text{parciální acylglycerol} + \text{glycerol}$	Nežádoucí chuť a vůně
Plazmin	Hydrolýza peptidové vazby, zejména β -kaseinu	Gelovatění UHT, zrání sýrů
Kataláza	$2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$	Indikace mastitidy
Xantinoxidáza	$\text{Aldehyd} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2 \rightarrow \text{kyselina} + \text{H}_2\text{O}_2$	Podpora oxidace, zrání sýrů
Laktoperoxidáza	$\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{HA} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + 2\text{A}$	Ověření pasterace, antibakteriální efekt
Alkalická fosfatáza	Hydrolýza esterů kyseliny fosforečné	Ověření pasterace
Laktát dehydrogenáza	Reverzibilní oxidace pyruvátu na laktát	Indikace mastitidy

Dělení enzymů, dle využitelnosti v mlékárenském průmyslu.

- Enzymy závislé na řadě fyzikálně-chemických reakcí, které se používají pro hodnocení jakosti mléka a mléčných výrobků.
- Enzymy používané k hodnocení stupně mechanického, tepelného a jiného působení na mléko (Buňka, 2013).

Nativní enzymy se v mléce nacházejí v nízkých koncentracích, mohou být využity k indikaci řady situací, zejména:

- **K ověření správného tepelného ošetření mléka** – většina enzymů se inaktivuje záhřevem, enzymy se však liší v teplotě a době potřebné k inaktivaci. Pro ověření správnosti tepelného ošetření se využívají enzymy laktoperoxidáza a alkalická fosfatáza. Laktoperoxidáza se využívá k ověření správnosti vysoké pasterace a alkalická fosfatáza k ověření správnosti dlouhodobé nebo šetrné pasterace (Fox and Kelly, 2006).

- **Rozlišení mlék od jednotlivých savců** – v ženském a kobyším mléce byla zjištěna mnohem vyšší aktivita lysozymu, než v mléce kravském (Gajdůšek and Klíčnick, 1993). Dále enzym xantinoxidáza vykazuje vyšší aktivitu v mléce kravském na rozdíl od kozího a mateřského mléka (Fox and McSweeney, 1998). Gothefors and Marklund (1975) uvádí, že enzym laktoperoxidáza v mléce mateřském se nachází v nízkých koncentracích v porovnání s mlékem býložravců.
- **U kravského mléka rozlišení zralého mléka od mleziva** – mlezivo je bohatší na enzymy amylázu a katalázu než zralé mléko (Fox and Kelly, 2006).
- **Ověření hygieny získávání a ošetřování mléka po nadojení.**
- **K diagnostice zdravotního stavu mléčné žlázy, respektive zdraví dojnice** – u dojnic, trpící mastitidou, přechází do mléka vyšší množství enzymů, z leukocytů enzym kataláza, laktoperoxidáza, laktátdehydrogenáza a glutamát-oxalacetát-transamináza, kyselá fosfatáza a lysozym a z krve enzymy lipázy a proteázy (Fox and Kelly, 2006).
- **Zjištění zhoršení kvality mléka** – rozkladu složek mléka působením enzymů, např. plazmin (proteolýza bílkovin), lipáza (rozklad tuků – žluknutí mléka), xantinoxidáza (oxidativní žluknutí).
- **Ochranné účinky** – lysozym, laktoperoxidáza.

V kravském mléce je zastoupení enzymů poměrně konstantní, ale jejich vylučování a zastoupení může být ovlivněno řadou faktorů: plemenem, individualitou zvířete, fází laktace, zdravotním stavem, věkem zvířete, stresem a výživou dojnice.

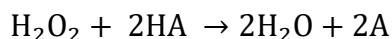
- **Věkem zvířete** – se zvyšujícím věkem dojnice narůstá počet enzymů v mléce. Nárůst je způsoben tím, že s věkem roste degradace mléčné tkáně žlázy. Zvyšuje se počet somatických buněk v mléce, které jsou zdrojem enzymů.
- **Fáze laktace** – během posledních dnů laktace počet enzymů stoupá, což je zapříčiněno změnami membrány sekrečních buněk (Buňka, 2013).

3.2.1 Oxidoreduktázy

Oxidoreduktázy katalyzují redoxní procesy: $A^- + B \rightarrow A + B^-$

3.2.1.1 Laktoperoxidáza

Jedná se o první enzym, který byl v kravském mléce objeven v roce 1943 a následně izolován. Enzym laktoperoxidáza katalyzuje štěpení peroxidů. Při štěpení peroxidů se uvolňuje kyslík a ten se předává na vhodný akceptor:



Vhodným substrátem mohou být například aromatické aminy, fenoly, barviva nebo aromatické kyseliny (Navrátilová et al., 2012). Molekula laktoperoxidázy je tvořena glykoproteinem obsahující hemovou skupinu. Hemová skupina je s peptidovým řetězcem spojena pomocí disulfidických můstků cysteinu. Enzym se skládá z jednoho polypeptidového řetězce, který obsahuje 612 aminokyselin. Molekulová hmotnost enzymu je přibližně 78 kDa a má vysoký isoelektrický bod 9,6 (Campbell et al, 2013). Laktoperoxidáza je syntetizována epitelovými buňkami mléčné žlázy (Toman et al., 2009)

Laktoperoxidáza je přirozenou složkou mléka a nachází se v mléce všech savců. V syrovém kravském mléce se enzym vyskytuje v koncentraci 30–40 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (Walstra et al, 2006). V mlezivu je obsah laktoperoxidázy nižší, aktivita enzymu stoupá 4–5 den po otelení. V ženském mléce je aktivita laktoperoxidázy asi 20×nižší než v mléce býložravců. Případné kolísání koncentrace enzymu závisí na fázi laktace, krmných dávkách, stresu a plemeni (Navrátilová et al., 2012). Koncentrace laktoperoxidázy vzrůstá s rozvojem infekce mléčné žlázy (Toman et al., 2009).

Samková (2012) uvádí, že laktoperoxidáza je charakteristická svou teplotní odolností. K inaktivaci dochází při teplotě 75°C po dobu 30 minut nebo 80°C po dobu 30 sekund. Na základě přítomnosti laktoperoxidázy se posuzuje správnost provedení vysoké pasteurace mléka nebo smetany (tzv. Storchova zkouška).

Antimikrobiální účinnost laktoperoxidázy se využívá také v zubní hygieně. Enzym se přidává jako přísada do zubní pasty a ústní vody, inhibuje růst bakterií v ústní dutině a napomáhá k léčbě kazu, zánětu dásní a paradentóze (Hoogedoorn, 1985).

Laktoperoxidázový systém

Enzym laktoperoxidáza sama o sobě nemá baktericidní účinek, ale společně s thiokyanátem a peroxidem vodíku vytváří laktoperoxidázový systém, který tvoří přirozenou ochranu mléčné žlázy. Enzym má schopnost katalyzovat oxidaci molekul thiokyanátu v přítomnosti peroxidu vodíku (Zeynep et al., 2016). Při této reakci dochází k oxidaci thiokyanátu (CNS^-) na hypothiokyanatový iont (OSCN^-). Hypothiokyanatový iont oxiduje bakteriální enzymy a napadá sulfyhydroylové (SH^-) skupiny v buněčných stěnách bakterií, čímž je poškozuje (Walstra et al, 2006). Laktoperoxidázovým systémem je ničena celá řada bakterií, nejúčinnější je proti gram-negativním psychrotrofním bakteriím (Vlková et al., 2009).

Tabulka 2: Důležité mikroorganismy ovlivňované laktoperoxidázovým systémem (Navrátilová et al., 2012)

G + mikroorganismy	G- mikroorganismy	Ostatní
<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	kvasinky
<i>C. perfringens</i>	<i>Salmonella spp.</i>	plísň
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Shigella spp.</i>	
<i>Streptococcus spp.</i>	<i>Campylobakter spp.</i>	
<i>Bacillus spp.</i>	<i>Pseudomonas spp</i>	
	<i>Serratia spp.</i>	
	<i>Proteus spp.</i>	

Některé bakterie jsou inhibovány jen po určitou dobu, jiné bakterie jsou usmrceny trvale. Limitující faktor pro správnou účinnost systému je přítomnost thiokyanátu a peroxidu vodíku. Určité množství thiokyanátu je v mléce přítomné, ale hladina kolísá. Pro úplnou aktivaci systému se do mléka musí přidat 10 ppm iontů thiokyanátu a 9 ppm peroxidu vodíku (Navrátilová et al., 2012).

Touto technologií může dojít ke zpomalení kažení mléka až o několik hodin. Laktoperoxidázový systém se doporučuje v rozvojových zemích, kde je nedostatečné chladicí vybavení pro uchovávání a svoz mléka ke zpracovatelům. Tato metoda byla odzkoušena v Keni a Pákistánu. Konečné produkty thiokyanátu a peroxidu vodíku jsou oxidovány, tudíž nemají negativní vliv na zdraví konzumenta (Zeynep et al., 2016).

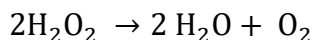
Storchova zkouška (Peroxidázová zkouška)

Storchova zkouška prokazuje, zda bylo mléko pasterované na předepsanou teplotu. Toto hodnocení využíváme k průkazu mléka zahřátého nad 80 °C. Je-li mléko nedostatečně pasterizované nebo kontaminované syrovým mlékem, po přidání peroxidu vodíků a p-fenylendiaminu změní své zbarvení. Protože enzym peroxidáza odštěpuje z peroxidu vodíku kyslík, který vytváří s p-fenylendiaminem modré zbarvení. Storchova zkouška může ukazovat i falešně pozitivní výsledky se správně provedenou pasterací. Při delším skladování mléka, může dojít k regeneraci peroxidázy vlivem mikrobiální činnosti, a proto je tato metoda průkazná pouze v den tepelného ošetření a skladování mléka do 10 °C (Šustová, 2015).

Postup zkoušky: 5 ml vzorku mléka se odpipetuje do zkumavky. Na špičku nože se přidá směs p-fenylendiamin s pískem a intenzivně se promíchá. Po promíchání se přidají 1 až 2 kapky 1% peroxidu vodíku. Obsah se promíchá a po dvou minutách se vyhodnotí vzniklé zbarvení (Šustová, 2005).

3.2.1.2 Kataláza

Kataláza se vyznačuje vysokou schopností rozkládat peroxid vodíku, rozkládá peroxid vodíku na vodu a molekulární kyslík:



Enzym je stabilní při pH 5–10, mimo tyto hodnoty pH svou aktivitu ztrácí. Kataláza obsahuje hemovou skupinu navázanou v aktivním místě. Molekula enzymu se obvykle skládá ze čtyř podjednotek, s celkovou molekulovou hmotností 240 kDa (Linmark-Mansson et al., 2000). Kataláza v mléce může být exogenního nebo endogenního původu. Exogenní kataláza je produkována při výrobě sýrů koryneformními bakteriemi nebo kvasinkami, které byly do mléka přidány či se vyskytovaly přirozeně (Campbell et al, 2013).

Kataláza je poměrně termolabilní enzym, k inaktivaci dochází tepelným ošetřením mléka při teplotě 65–70 °C po dobu 16 sekund (Campbell et al, 2013). Kataláza se hromadí na povrchu tukových globulí a přechází do smetany (Gajdůšek and Klíčnick, 1993). Do smetany přejde až 73 % katalázy. Aktivita enzymu je proto ve smetaně až 12krát vyšší než v odstředěném mléce. Enzym je v mléce obsažen vždy. Jeho aktivita je u zdravého

zvířete nízká. Mírně zvyšující hodnoty se mohou měnit s typem krmiva, stádiem laktace, stresem a krmnou dávkou. Vyšší aktivita katalázy je v mlezivu a při zvýšeném počtu somatických buněk. Při zánětu mléčné žlázy dojde k výraznému navýšení aktivity katalázy (Fox and Kelly, 2006).

Kataláza vstupuje do mléka prostřednictvím somatických buněk. Aktivita enzymu je přímo úměrná množství somatických buněk v mléce, a proto je možné jí využít jako indikátor pro snadnou a rychlou detekci mastitidy (Futo et al., 2012). V kravském mléce se aktivita katalázy pohybuje okolo $2 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ (Silanikova et al., 2009). U krav trpících mastitidou se zvyšuje aktivita katalázy až na $5\text{--}10 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ (Futo et al., 2012). Podle množství uvolněného kyslíků se kdysi zjišťovala aktivita katalázy, pomocí katalázometrů (Gajdůšek and Klíčnick, 1993).

Hlavní fyziologickou úlohou katalázy je ochrana organismů před toxickými produkty. Kataláza rozkládá peroxid vodíku, který je silné oxidační činidlo a je toxický pro buňky. Přidání katalázy do mléka se v některých případech používá místo pasterace, aby se teplotou neinaktivovaly přírodní enzymy mléka, které jsou prospěšné pro aroma a chuť finálního výrobku. Přidání enzymu se používá při výrobě sýrů Swiss.

Schopnost katalázy rozkládat peroxid vodíku na vodu a kyslík, napomáhá předcházet členění hydroxid peroxidu do volných radikálů. Peroxid vodíku působí jako silné oxidační činidlo, které může způsobovat rozklad lipidů, čímž se vytváří pachut' v mléce, která přechází i do mléčných výrobků. V tomto případě může mít kataláza pozitivní vliv na chuť výrobků. Nicméně kataláza působí jako potencionální zdroj špatné chuti v mléce a mléčných výrobcích (Campbell et al, 2013).

3.2.1.3 Xantinoxidáza

Xantinoxidáza má podstatnou roli u metabolismu purinů. Enzym xantinoxidáza je schopný katalyzovat oxidaci xantinu a hypoxantinu až na kyselinu močovou (Vorbach et al, 2003). Xantinoxidáza je nespecifický enzym, který má mnoho funkcí, jeho nejdůležitější funkce je schopnost produkovat peroxid vodíku, který slouží jako substrát v laktoperoxidázovém systému (Campbell et al, 2013).

Stupeň inaktivace enzymu pomocí tepelného opracování je v odborné literatuře konfliktní téma. Nicméně nejnovější studie ukazují, že by mohl být enzym považován za dobrý indikátor mléka, zahřátého na teplotu v rozsahu $80\text{--}90 \text{ }^\circ\text{C}$ (Campbell et al., 2013).

Fox and Kelly (2006) uvádí, že xantinoxidáza má důležitý technologický význam, protože je schopná za určitých podmínek redukovat dusičnany na dusitany, čímž inhibuje růst *Clostridium tyrobutyricum*. Dusičnan sodný se v sýrařství přidává do mléka, aby se zabránilo pozdnímu duření sýru.

Xantinoxidáza může také přispívat k oxidaci lipidů v mléce. Enzym produkuje peroxid vodíku, který dále může reagovat s ostatními sloučeninami za vzniku volných radikálů, a tím zvyšovat oxidaci lipidů a tvorbu nežádoucí chuti. Tyto nežádoucí chuťové změny mohou ovlivňovat finální výrobek a zkracovat dobu použitelnosti (Campbell et al., 2013).

V kravském mléce je tento enzym navázaný na membrány tukových kapének. Aktivita xantinoxidázy je velice proměnlivá. Při procesu zpracování či skladování o teplotě 4 °C po dobu 24 hodin se zvýší aktivita až na dvojnásobnou hodnotu. Dále pak při zahřívání a při homogenizaci se aktivita zvýší. Homogenizace způsobuje přechod xantinoxidázy z tukové do vodní fáze (Harrison, 2006). Tepelná stabilita xantinoxidázy je závislá na tom, zda je součástí tukových kuliček nebo je rozpuštěna ve vodní fázi. Tepelně stabilnější je ve smetaně, než v odtučněném mléku (Fox and McSweeney, 1998; Harrison, 2006).

Aktivita xantinoxidázy v mléce od zdravých dojnic je poměrně malá a dále se snižuje stářím dojnic. U dojnic trpících mastitidou se aktivita xantinoxidázy výrazně zvyšuje (Gajdůšek and Klíčnick, 1993). Xantinoxidáza se může podílet na oxidaci lipidů mléka. Bylo zjištěno, že mléko, ve kterém dochází k samovolnému žluknutí obsahuje až 10ti násobek obvyklé koncentrace xantinoxidázy (Buňka, 2013). Aktivita enzymu se také významně liší podle plemene skotu (Harrison, 2006). Její aktivita se také liší u mlék jednotlivých savců, v kravském mléku je enzym více zastoupený než v mléce mateřském nebo kozím (Buňka, 2013).

3.2.1.4 Laktát dehydrogenáza

Laktát dehydrogenáza je všudypřítomný enzym, který se vyskytuje u obratlovců, bezobratlých, rostlin a u mikrobů. Enzym katalyzuje reverzibilní oxidace pyruvátu na laktát. Enzym se běžně vyskytuje v několika rozdílných isomerech $LD_1 - LD_5$.

Obsah laktát dehydrogenázy se prokazatelně zvyšuje při zánětu mléčné žlázy a působí jako časný ukazatel mastitidy (Welbeck et al., 2011). Enzym se v průběhu imunitní odpovědi může uvolnit z leukocytů a parenchymatických buněk mléčné žlázy (Larsen et al., 2010). Katlous et al. (2010) označili laktát dehydrogenázu jako nejspolehlivější ukazatel pro detekci mastitidy, ze tří analyzovaných enzymů, kterými byly alkalická fosfatáza, aspartátaminotransferáza a laktát dehydrogenáza.

Koncentrace laktát dehydrogenázy přímo koreluje s počtem somatických buněk v mléce, a není tak snadno ovlivnitelná dalšími vlivy, jako je stres, výživa, fáze laktace atd. Zvýšení somatických buněk totiž může, ale nemusí být způsobeno zánětem mléčné žlázy. Čím je závažnější infekce, tím se hladina laktát dehydrogenázy zvyšuje (Friggens et al., 2007). Koncentrace laktát dehydrogenázy v průběhu zánětu mléčné žlázy může být použita jako spolehlivý screeningový test pro včasnou detekci subklinické mastitidy (Kalantari et al., 2014). Zvýšení koncentrace laktát dehydrogenázy nastává ještě před samotným zvýšením počtu somatických buněk v mléce, díky tomu lze odhalit infekci již v ranných fázích. K měření aktivity laktát dehydrogenázy se využívají testy Udder Check (Friggens et al., 2007).



Obrázek 1: Udder Check test, testovací proužky k měření Laktát dehydrogenázy (Portachek, Návody k testům)

Udder Check jsou testovací proužky s reagenčním substrátem, na kterém je imobilizovaný substrát L-laktátu. Prostřednictvím řady enzymatických reakcí je tento substrát oxidován enzymem laktát dehydrogenázou, obsaženým v mléce. Současně je přítomen indikátor nitrotetrazolium modrého zbarvení, který je redukován na formazan, fialového zbarvení. Intenzita fialového zbarvení formazanu je přímo úměrná koncentraci LDH v mléce (Portacheck, Návody k testům).

Provedení testu je velmi jednoduché. Testovací proužek s detekčním polštářkem se ponoří do vzorku mléka. Mléko musí být čerstvě nadojené nebo zchlazené a ohřáté na pokojovou teplotu. Po dvou minutách vyndáme testovací proužek ze vzorku mléka, přiložíme proužek ke škále na ampuli (viz tab. 2). Koncentraci LDH odečteme porovnáním barvy testovacího proužku se stupnicí na ampuli. Čím je tmavší barva, tím je koncentrace LDH vyšší, což ukazuje přítomnost infekce (Portacheck, Návody k testům).

Tabulka 3: Znázornění výsledku testu k pravděpodobnosti infekce a aktivity Laktát dehydrogenázy (Šustová et al. 2015)

Výsledek	Pravděpodobnost infekce	Aktivita LDH
-	nízká	$< 100 U \cdot l^{-1}$
+	střední	$100 - 200 U \cdot l^{-1}$
++	vysoká	$200 - 500 U \cdot l^{-1}$
+++	velmi vysoká	$> 500 U \cdot l^{-1}$

Šustová et al. (2015) uvádí, že na Ústavu technologie potravin byly testy Udder Check odzkoušeny u vzorků mléka, ze kterého byly somatické buňky odstředěny. Výsledky byly pozitivní, to znamená, že testy zachycují i vzorky mléka, ze kterého byly původně somatické buňky odstředěny. Výsledky vědeckých pokusů ukazují, že enzymatické testy by mohly mít velký diagnostický potenciál pro detekci mastitidy.

3.2.2 Hydrolázy

3.2.2.1 Lipázy

Lipázy se v kravském mléce dělí dle původu na přirozeně se vyskytující, tedy nativní a vzniklé mikrobiální činností – mikrobiální lipázy (Ray et al., 2013).

Lipoprotein lipasa – jedná se o mléčnou lipázu nativní, která je syntetizována v sekrečních buňkách mléčné žlázy. Nativní lipázy jsou v mléce z 80 % vázané na kasein α_s , zbylých 20 % jsou navázané na imunoglobuliny a na obaly tukových kuliček. Lipázy navázané na bílkoviny se označují jako plazmatické a lipázy navázané na obaly tukových kuliček se označují jako membránové (Návrátlová et al., 2012).

Lipolytické enzymy mají schopnost katalyzovat hydrolytické štěpení mléčných tuků (Ray et al., 2013). Lipázy rozkládají triacetyl glycerol na glycerol a mastné kyseliny (Roginski, 2003). Kravské mléko obsahuje 1–2 mg/l nativní lipázy. Optimální aktivitu enzym vykazuje při 37 °C, při snížení teploty dojde rovněž ke snížení aktivity lipázy. Lipáza je poměrně termolabilní, pasteračními teplotami je inaktivována. K inaktivaci dochází zahřevem na teplotu 80°C po dobu 20 sekund (Samková, 2012). Lipáza je nestabilní v kyselém prostředí, a tak dochází k její inaktivaci v žaludcích sajících mláďat. Dále dochází k inaktivaci lipázy při zvýšené koncentraci těžkých kovů (Návrátlová et al., 2012). Aktivita lipázy je závislá na plemeni, fázi laktace, stravě a produkci mléka (Chen et al., 2003). Aktivita lipázy se zvyšuje v mlezivu a v mléce od dojnic trpící mastitidou.

Peterkova (2002) uvádí, že pro mlékárenskou praxi jsou důležité tři typy lipolýzy, a to spontánní, indukovaná a mikrobiální. Spontánní lipolýza je způsobena nativní mléčnou lipázou a probíhá i v mléce s neporušenými tukovými kuličkami. Havemose et al., (2006) prokázali, že spontánní lipolýza je ovlivněná složením lipidů v mléce, zejména množství kyseliny linolové. Přesné příčiny jsou zatím neznámé. Faktory ovlivňující složení tuků jsou například mastitida, fáze laktace nebo špatná krmná dávka. Lipolýza probíhá především hned na farmách, může být minimalizována utracením dojnic s vysokým počtem somatických buněk (Campbell et al, 2013). Indukovaná lipolýza je rovněž způsobena nativní mléčnou lipázou, obvykle k ní dochází vystavením mléka mechanickému namáhání a zahřívání, což vede k poškození membrány tukových kuli-

ček. Posledním typem je mikrobiální lipolýza, která je způsobena mikrobiálními psychrotrofními lipázami (Peterkova, 2002).

Přítomnost nativních lipáz v mléce od zdravých dojnic nepředstavuje výraznější nebezpečí pro senzorycké vlastnosti mléka, zvláště když nejsou porušeny membrány tukových kuliček. Výrazně horší je přítomnost exogenních lipáz, které jsou tvořeny mikroorganismy.

Mikrobiální lipázy

Mikrobiální lipázy vznikají činností psychrotrofních mikroorganismů a to zejména bakterií rodu *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, plísní a kvasinek. Tyto lipázy mají vysokou tepelnou stabilitu, přežívají pasterační i sterilizační teploty. Pro výskyt bakteriální lipázy je optimální pH 8,75 (Ray et al., 2013).

Působením mikrobiálních lipáz dochází k hydrolytickému štěpení tuků (Lukášová, 1999). Triacylglyceroly jsou štěpeny na volné mastné kyseliny a glycerol (Samková, 2012). Vzniklé volné mastné kyseliny s krátkým a středně dlouhým řetězcem jsou pro kvalitu mléka nežádoucí i v malém množství. Mohou způsobovat změnu chuti mléka na zatuchlou, mýdlovou, máselnou až žluklou (Roginski et al., 2003). Kyseliny vytvářející smyslové vady jsou s počtem uhlíků C4 až C10, hlavně pak kyselina máselná (Samková, 2012). Lipolytická aktivita je měřitelná v případě, že se mikroorganismy pomnoží na hodnotu 10^6 ml^{-1} (Lukášová, 1999).

Genčurová et al., (2011) uvádí, že se zavedením strojních systémů dojení a potrubním vedením mléka do tanků, za pomoci vakua se zvyšovaly hodnoty volných mastných kyselin v mléce, které vznikaly hydrolyzou mléčného tuku lipázou produkovanou psychrotrofními bakteriemi v mléce. Je-li obal mléčných tukových kuliček narušen mícháním, třepáním nebo homogenizací pak mohou být mastné kyseliny lipázou rychleji odděleny.

Lipázy štěpí tukové kuličky s odlišnou rychlostí. Urychlení reakce může být způsobeno:

- 1) Poškozením tukových kuliček. K poškození kuliček dochází vlivem mechanického namáhání (míchání, homogenizace atd.), nebo opakovanými změnami teplot.
- 2) Řada mikroorganismů produkuje zároveň s lipázou i fosfolipázu, která odbourává fosfolipid, který tvoří membránu tukových kuliček (Lukášová, 1999).

Srovnání lipoproteinové lipázy a bakteriální lipázy

V mlékárenském průmyslu není všechna nežádoucí lipolýza způsobena lipoproteinovou lipázou. Při skladování mléka v chladném prostředí mohou bakterie rodu *Pseudomonas* produkovat enzymy lipázu a proteázu, které mohou negativně ovlivňovat kvalitu mléka a mléčných výrobků. Lipázy produkované bakteriemi mají jiné vlastnosti než nativní lipoproteinové lipázy. Významným rozdílem je jejich tepelná stabilita, pasterací se deaktivují lipoproteinové lipázy, zatím co většina lipáz produkovaných psychrotrofními bakteriemi jsou tepelně odolné a přežívají i UHT záhřevy. I stopová množství bakteriálních enzymů ve výrobcích z mléka, jako je máslo, sýr, UHT mléko, mohou způsobovat nežádoucí sensorické změny, které jsou nepřijatelné pro člověka. Další významný rozdíl je, že pro bakteriální lipázu není membrána tukových kuliček překážkou při vstupu do neporušených tukových kuliček. Tato skutečnost platí pro lipázy produkované psychrotrofními bakteriemi, jiné mikrobiální lipázy tuto schopnost nemají. (Hilton, 2006).

Tabulka 4: Porovnání vlastností lipoproteinové lipázy a lipázy produkované psychrotrofními bakteriemi (Hilton, 2006)

Nativní lipáza	Bakteriální lipáza
Termolabilní, inaktivována pasteračními teplotami	Termostabilní, ani UHT ohřev je neinaktivuje
Vysoké hladiny v syrovém mléce	Stopové množství v syrovém mléce
Nachází se v syrovém mléce nebo smetaně	Především v MV, při delší době skladování
Membrána tukových kuliček představuje překážku pro lipázu	Membrána tukových kuliček nepředstavuje překážku pro lipázu

Lipolytické enzymy při výrobě sýrů

Exogenní neboli, přidané lipázy jsou využívány k srážení a urychlení zrání sýrů. Většina exogenních lipáz v mlékárenské technologii je alternativou k syřidlům.

Mikroorganismy, které jsou zdrojem lipolytických enzymů, jsou kvasinky, laktobacily nebo plísně, příznivě přispívají k výrobě a zrání sýrů. Používají se především při výrobě tvrdých sýrů italského typu (Ray et al., 2013). Například ušlechtilá plíseň *Rhizomucor miehei* vylučuje významnou lipázu, která má komerční název 'Piccantase'. Tato lipáza se využívá například při výrobě sýru feta nebo parmazánu (Ray et al., 2013). Lipolýza společně s proteolýzou jsou základní biochemické kroky při zrání sýrů, které přispívají k tvorbě aroma a typické chuti. Lipolýzou dochází k hydrolýze mléčného tuku a vzniku volných mastných kyselin (Hickey et al., 2006). Při výrobě sýrů se používají další ušlechtilé plísně, např. *Penicillium roqueforti* a *Penicillium candidum*. *Penicillium roqueforti* se využívá při výrobě známého sýru s modrou plísní (Fox and McSweeney, 1998).

Značná lipolýza je u sýrů vyráběných ze syrového mléka, a to v důsledku aktivity nativních lipáz. Většina nativní lipoproteinové lipázy je inaktivována během pasterace, z toho důvodu je enzym významný zejména u sýrů vyráběného ze syrového mléka (McSweeney, 2013).

Fosfolipáza

Mléko kromě lipáz obsahuje také fosfolipázy. Fosfolipázy katalyzují štěpení fosfolipidů. Štěpením fosfolipidů, které jsou součástí tukových kuliček, může dojít ke snížení stability tukové fáze mléka, čímž dochází ke snížení nutriční hodnoty mléka.

3.2.2.2 Fosfatázy

Fosfatázy mají schopnost hydrolyzovat esterovou vazbu, kterou je kyselina fosforečná vázaná na různé substráty. Přirozeně se v mléce vyskytuje alkalická a kyselá fosfatáza (Fox and Kelly, 2006).

3.2.2.3 Alkalická fosfatáza

Alkalická fosfatáza se přirozeně vyskytuje v mléce. Enzym má původ v epitelu mléčné žlázy, v krvi nebo buněčných útvarech, ale může být produkován i mikroorganismy v mléce (Gajdušek and Klíčnick, 1993). Její aktivita se liší u jednotlivých živočišných

druhů, individualitou kusu a stádiem laktace. Nejvyšší aktivitu vykazuje v mlezivu, její hodnota klesá 1 až 2 týdny po otelení (Samková, 2012). Alkalická fosfatáza je navázána v membránách tukových globulí (Fox and McSweeney, 1998).

Aktivita alkalické fosfatázy velmi úzce souvisí s celkovým množstvím mikroorganismů v mléce. Při navýšeném počtu mikroorganismů dochází k nárůstu alkalické fosfatázy, což je důsledkem vniku mikrobiální alkalické fosfatázy v mléce. Zvýšená hladina alkalické fosfatázy je během mastitidy a rovněž vyšší aktivita je i v mlezivu (Chovanec et al., 2008).

Aktivitou alkalické fosfatázy se ověřuje, zda bylo mléko správně pasterizované, a nevznikla možnost kontaminace syrovým mlékem. To z důvodu, že alkalická fosfatáza je rezistentnější k deaktivaci, než *Mycobacterium Tuberculosis*, který patří k tepelně nejstabilnějším patogenům v mléce a k nejnebezpečnějším pro lidské zdraví (Roginski et al., 2003).

Kombinace času a teploty pro inaktivaci alkalické fosfatázy je větší než bakteriálních patogenů *Mycobacterium Tuberculosis*, *Salmonella Senftenberg*, *Listeria monocytogenes* a *Coxiella burnetii* (Rankin et al., 2010). K inaktivaci enzymu dochází záhřevem na teplotu 63–65 °C po dobu 30 minut, nebo na teplotu 72–74 °C po dobu 30–90 sekund (Samková, 2012). Aktivita fosfatázy je navíc dobře detektovatelná, proto se zařadila do běžné výrobní praxe (Fox and McSweeney, 1998).

Metody měření alkalické fosfatázy

Testy, používané pro detekci aktivity alkalické fosfatázy lze rozdělit do čtyř typů. Kolorimetrická, fluorometrická, chemiluminiscenční a imunochemické metody. Avšak pouze kolorimetrické, fluorometrické a chemiluminiscenční metody byly validované pro ověření pasterace v mlékárenském průmyslu (Rankin et al., 2010).

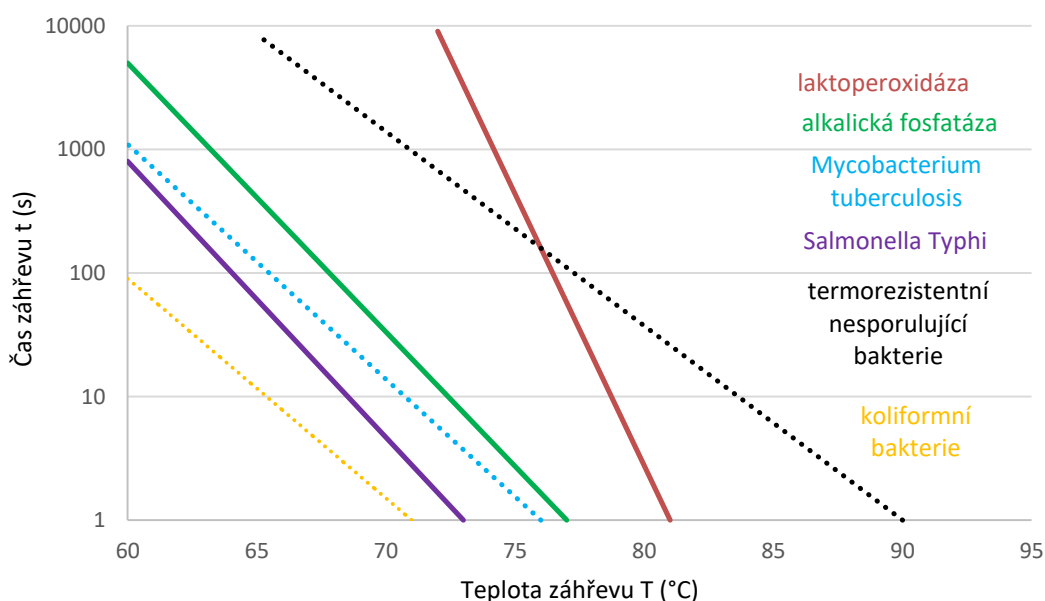
Fosfatázová zkouška

Tento kolorimetrický test je založen na schopnosti enzymu fosfatázy v syrovém mléce odštěpovat z fenylesteru kyseliny fosforečné fenol. Fenol v mléce vytváří barevné změny. Intenzita zbarvení je přímo úměrná aktivitě enzymu. Vlivem činnosti mikroorganismů při delším skladování může dojít k regeneraci alkalické fosfatázy, a proto se za průkaznou zkoušku považuje pouze ten den, kdy mléko bylo tepelně ošetřeno a skladováno

při teplotě do 10 °C. Při kontaminaci pasterovaného mléka syrovým mlékem je fosfátová zkouška schopna detekovat minimálně 1 % příměsi (Šustová, 2015).

Metoda Fluorophus

Jedná se o kvantitativní instrumentální metodu, která je založena na stejném chemickém principu, avšak uvolněné složky jsou detekovány fluorescenčně, nikoli kolorimetricky, jak to bylo u dřívějších metod. Test probíhá pouze 3 minuty. Metoda Fluorophus je velmi citlivá, dokáže změřit příměs syrového mléka až na 0,003% (30×citlivější oproti dřívějším testům). V roce 2006 Evropská unie schválila fluorometrickou metodu (ISO 11819-1), jako oficiální referenční metodu k měření alkalické fosfatázy. Aktivita alkalické fosfatázy se vyjadřuje v milijednotkách enzymové aktivity na litr (mU/l), v těchto jednotkách měří Fluorophus. Výsledek testu se považuje za negativní, pokud naměřená aktivita v kravském mléce nepřesahuje 350 mU/l. Avšak u naměřených hodnot nad 100 mU/l následuje ověření možných příčin a nápravná opatření. Po správně provedené pasteraci naměřené hodnoty alkalické fosfatázy bývají v rozsahu 20–30 mU/l (Návody Fluorophos, Instrument).



Obrázek 2: Schéma termolabilních čas vybraných mikroorganismů a termodestrukčních křivek alkalické fosfatázy a laktoperoxidázy v závislosti na času a teplotě záhřevu (Bylund, 1995)

Veškeré konzumní mléko uváděné na trh musí být tepelně ošetřené, aby byla zaručena zdravotní nezávadnost, trvanlivost surovin nebo výrobků. Podle (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 ve znění Nařízení Komise (ES) č. 1662/2006) musí být mléko ošetřeno tzv. šetrnou nebo dlouhodobou pasterací, anebo ošetřeno na jakoukoliv kombinaci času a teploty, aby bezprostředně po tepelném ošetření mléko vykazovalo negativní reakci na přítomnost alkalické fosfatázy. Pasterace znamená ošetření mléka na teplotu nejméně 72 °C po dobu 15 sekund (tzv. šetrná pasterace), anebo 63 °C po dobu 30 minut (tzv. dlouhodobá pasterace) (Šustová, 2015). Stále více publikací uvádí, že inaktivace enzymu teplem není stálá, při delším skladování se činnosti mikroorganismů alkalická fosfatáza regeneruje (Rankin et al., 2010). Z toho důvodů je nutné provést test na alkalickou fosfatázu bezprostředně po tepelném ošetření, aby nedocházelo k falešně pozitivnímu výsledku (Buňka, 2013).

3.2.2.4 Kyselá fosfatáza

Kyselá fosfatáza je v mléce obsažena v mnohem nižších koncentracích než alkalická fosfatáza, ale za to má lepší tepelnou stabilitu. Enzym je termostabilní, k inaktivaci dochází zahřevem na teplotu 88°C po dobu 30 minut (Samková, 2012; Fox and McSweeney, 1998). Enzym se do mléka dostává výhradně z leukocytů, a proto se její aktivita výrazně zvyšuje při zánětu mléčné žlázy. V mléce od krav trpících mastitidou je aktivita enzymu vyšší až (4 až 10×). Výrazné zvýšení enzymu je také zaznamenáno v mlezivu, po otelení 5. – 6. dnem hodnota klesá a zůstává nízká do konce laktace. Kyselá fosfatáza není na rozdíl od své alkalické formy aktivována Mg^{2+} , mírně je aktivována Mn^{2+} a silně je inhibována fluoridem (Šustová et al., 2015). Enzym je lokalizován v mléčném séru 50–70 %, zbytek je navázán na obaly tukových kuliček. Optimální pH pro její účinnost je 5,5–6 (Samková, 2012).

Fosfatáza je poměrně termostabilní, dlouhodobou pasterací je inaktivováno pouze 10 až 20 % fosfatázy. Aktivní fosfatáza odštěpuje fosforečnan z kaseinu, čímž snižuje schopnost vápenatých iontů vázat se na micely a zhoršuje tepelnou stabilitu mléka, což může vést k technologickým vadám finálního výrobku, zhoršení chuti a vůně (Fox and McSweeney, 1998; Buňka, 2013).

3.2.2.5 Proteázy

Proteázy jsou enzymy, které štěpí proteiny tím, že rozkládají peptidické vazby mezi aminokyselinami (Vodrážka et al., 1991). Proteázy vyskytující se v mléce jsou dvojího původu. Přírozeně se vyskytující, neboli nativní, nebo vytvořené mikrobiální činností z kontaminující mikroflóry (Koutsouli et al, 2015).

Nativní proteázy se při záhřevu inaktivují, zato mikrobiální enzymy jsou termorezistentní. Nativní proteázy jsou přirozenou součástí mléka, jejich aktivita je nízká. Výrazně vyšší proteolytickou aktivitu vykazuje mlezivo nebo mléko od krav trpící mastitidou (Gazi et al, 2014). Výsledkem proteolytického působení enzymů je zvýšení obsahu nebilkovinných dusíkatých látek v mléce. Naproti tomu se sníží obsah bílkovinných složek mléka a sníží se také tepelná stabilita kaseinových micel, což může mít za následek zhoršení technologických vlastností mléka při výrobě mléčných výrobků.

Optimální aktivita nativní proteázy je při teplotě mezi 37 až 42°C, mikrobiální proteázy vykazují značnou aktivitu i při nižších teplotách, z toho důvodu může docházet k rozkladu bílkovin i ve vychlazeném mléce (Gazi et al, 2014).

Mléko obsahuje několik druhů proteáz, mezi nejdůležitější řadíme plazmin (alkalická mléčná proteáza) a katepsin D (kyselá mléčná proteáza). Další jsou například plazminogen, elastáza, trombin a také katepsiny G, S, K, H a L (Samková, 2012).

Bakteriální proteázy

Z kontaminující mikroflóry mohou do mléka pronikat mikrobiální proteázy. Při silné kontaminaci může docházet k rozkladu bílkovin i ve vychlazeném mléce, jedná se o tzv. psychrotrofní mikroorganismy. Řada mikrobiálních proteáz je termorezistentních, působením teploty se neinaktivují.

Bakteriální proteázy produkují bakterie rodu *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Proteus* a některé z rodu *Bacillus*. Nejčastěji se v mléce nachází *Pseudomonas fluorescens*, škodlivý zejména při delší době skladování při teplotě nižší než 10 °C. Proteázy bakteriálního původu mohou vyvolávat nežádoucí změny chuti v mléce a mléčných výrobcích (Návrátlová et al., 2012). Proteázy štěpí mléčnou bílkovinu s odlišnou intenzitou, nejrychleji je štěpen κ -kasein, zatím co β kasein a α_{S1} -kasein jsou štěpeny pomaleji (Aslam and Hurkley, 1998). Proteolytické

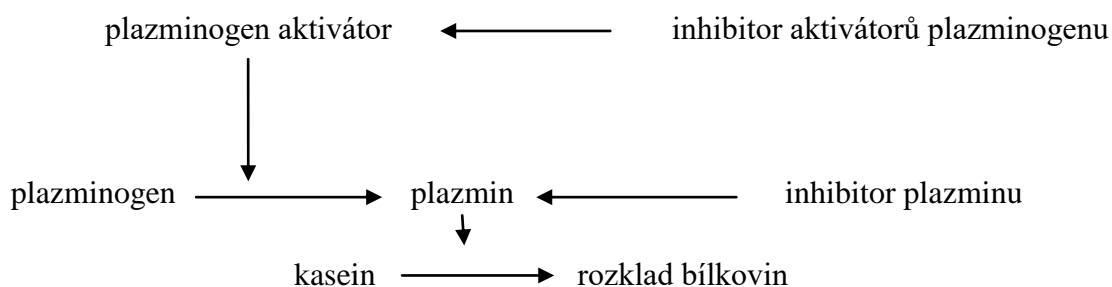
štěpení bílkovin neprobíhá stejně, některé mikroorganismy štěpí celou bílkovinu (*Serratia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*), jiné štěpí pouze nižší bílkovinné složky *Escherichia*, *Proteus* (Fox and McSweeney, 1998).

Průmyslové využití proteáz

Syřidla spadají do skupiny exogenních enzymů. Většina sýrů je vyráběna pomocí živočišného syřidla. V mlékárenském průmyslu se využívá syřidlo chymozin a pepsin (Callec, 2002). Chymozin se získává ze žaludků sajících telat ve stáří 4 dnů až 3 měsíců, u dospělých zvířat chymozin nahrazuje pepsin. Chymozin je vhodný pro výrobu tvrdých sýrů s dlouhou dobou zrání, naproti tomu pepsin je využíván k výrobě čerstvých sýrů a tvarohů (Šustova, 2015). Oba tyto enzymy srážejí mléčnou bílkovinu a oddělují syrovátku (Callec, 2002). Většina syřidla odchází do syrovátky, určité množství zůstává v sýřenině. Zbytkové množství enzymu v sýřenině přispívá k proteolýze bílkovin a vzniku hořkých peptidů při zrání sýrů, což může mít negativní vliv na sensorické vlastnosti výrobků (Campbell et al, 2013).

3.2.2.6 Plazmin

Plazmin je hlavní enzym v mléce s proteolytickou aktivitou. V mléce se vyskytuje společně s neaktivním plazminogenem a aktivátorem plazminogenu (Aslam and Hurkley, 1998). Tyto složky jsou navázané na kaseinové micely nebo na membránách tukových globulí. Obsah plazminu je závislý na aktivátorech plazminogenu, které jej aktivují na plazmin a inhibitech plazminogenu a plazminu (Leitner et al., 2004). Plazmin vykazuje optimální aktivitu při pH 7,5 a teplotě 37 °C. Bovinní plazminogen je jednořetězcový glykoprotein obsahující 786 aminokyselinových zbytků s vysokou molekulovou hmotností (Fox and Kelly, 2006).



Obrázek 3: Schéma znázorňuje vzájemného ovlivnění plazminu, plazminogenu, aktivátoru plazminogenu a inhibitorů aktivátorů plazminogenu (Campbell et al., 2013)

Koncentrace plazminu, plazminogenu a aktivátory plazminogenu jsou nízké v průběhu laktace. U starších dojnic s rostoucím počtem laktací je zaznamenávána mírně zvyšující se aktivita těchto enzymů (Samková, 2012; Aslam and Hurkley, 1998). Značně vyšší aktivitu vykazuje mléko od dojnic trpících mastitidou, dokonce po vyléčení mastitidy se hodnota enzymu nevrátí na původní hladinu, což vysvětluje, že s věkem roste hodnota plazminu v mléce (Bastian et al., 1996). Navýšení počtu somatických buněk přispívá ke zvýšení aktivátoru plazminogenu, které dále štěpí plazminogen na plazmin (Aslam and Hurkley, 1998). Štěpením peptidické vazby mezi 557. a 558. aminokyselinou, konkrétně mezi argininem a izoleucinem, se převede plazminogen na plazmin (Fox and Kelly, 2006).

Obsah plazminu je kromě toho ovlivňován úpravou po nadojení a pasterační teplotou. Plazmin je velmi tepelně stálý, jeho inaktivace nastává při teplotě 120 °C po dobu 15 minut. Při působení pasterační teploty 72 °C po dobu 15 sekund je redukována jeho aktivita pouze z 10–17 % (Aslam and Hurkley, 1998; Ismail and Neilsen, 2016).

Plazmin je nejvýznamnější proteolytický enzym mléka, který má důležitý technologický význam na kvalitu mléka a mléčných výrobků. Plazmin může buď příznivě, nebo negativně ovlivňovat texturu, chuť a vůni mléčných výrobků, a to v závislosti na rozsahu hydrolyzy a druhu produktu. U sýrů pomáhá štěpit bílkovinu během zrání a vytvářet požadovanou chuť, vůni a texturu, zatím co u pasterovaného a UHT mléka způsobuje proteolýza nežádoucí želírování a tvorbu hořké chuti (Ismail et al., 2010).

Odstartování výroby sýřeniny začíná hydrolyzou mléčných bílkovin. Hydrolyza bílkovin je primárně způsobena syřidlem a v menší míře také nativními enzymy, plazminem a katepsinem D, příp. proteinázami somatických buněk. Plazmin při sýření přechází do sýřeniny, kde se následně podílí na primární proteolýze. V sýřenině enzym podporuje zrání a rozvoj vůni a chuti, rozkládá bílkovinu β -kasein tak i $\alpha(S_2)$ -kasein. Aktivita plazminu se zvyšuje v sýrech ošetřených vyšší teplotou, pravděpodobně proto, že jsou inaktivovány inhibitory plazminu a inhibitory aktivátoru plazminogenu. Dále pak je aktivita plazminu ovlivněna pH při zrání sýrů, plazmin je aktivnější v sýrech s vyšším pH, například Camembert, než v sýrech s nižším pH, například Cheshire. Bastian et al., (1996) uvádí, že přídavek plazminu nebo aktivace plazminogenu v mléce, určené k výrobě sýrů, může zkvalitnit a urychlit zrání konečného výrobku.

Vzhledem k tomu, že se plazmin neinaktivuje vysokým tepelným ošetřením, dochází k proteolýze i v mléce nebo mléčných výrobcích ošetřených UHT záhřevem. Při dlouhodobém skladování dochází k rozkladu bílkovin, čímž se vytváří nežádoucí chuť a gelovatění mléka (Ismail and Neilsen, 2016). Vytváří se trojrozměrný gel, který vzniká reakcí mezi syrovátkovou bílkovinou β -laktoglobulinem a κ -kaseinem při zvýšené teplotě. Tato reakce vede k tvorbě β -laktoglobulin- κ -kaseinového komplexu ($\beta\kappa$ komplex).

Datta et al., (2001) uvádějí, že přidáním polyfosforečnanů do mléka před UHT záhřevem, minimalizovali vznik nežádoucího gelovatění v mléce. Gelovatění lze omezit výběrem mléka vysoké kvality s nízkým počtem somatických buněk a mikroorganismů a také vhodným skladováním UHT mléka. Mléko by se nemělo skladovat při teplotě nižší, nebo vyšší, než je pokojová teplota.

Datta et al., (2001) uvádějí, že gelovatění se vyskytuje u různých UHT mlék s rozdílnou dobou skladování. Důvodem této variability je několik faktorů, způsob a teplota zahřátí, proteolýza, mikrobiologická kvalita syrového mléka, skladovací teplota, složení a kvalita mléka, sezónní produkce mléka, aditiva a obsah tuku v mléce.

Cortellino et al., (2006) provedli studii, která se zabývala aktivitou plazminu a plazminogenu v mléce koz. Studie ukázaly, že aktivita plazminu vykazovala vyšší hodnoty než u ostatních přežvýkavců, zatímco aktivita plazminogenu byla výrazně nižší.

3.2.2.7 Katepsin D

Katepsin D je kyselá proteáza produkovaná somatickými buňkami. Molekula je tvořena 346 aminokyselinami a má molekulovou hmotnost 39 kDa. Podobně jako plazmin a další živočišné proteázy je i Katepsin D syntetizována jako inaktivní prekurzor, který je aktivován proteolytickým štěpením. Enzym je syntetizován na drsném endoplazmatickém retikulu jako prokatepsin D. Prokatepsin D má krátkou životnost, působením cysteinproteázy dochází k odštěpení 44 aminokyselin za vzniku katepsinu D (Buňka, 2013).

Koncentrace v kravském mléce je nízká. Optimální aktivitu vykazují při pH 3,0–4,0 a teplotě 37 °C. Katepsin D je poměrně termostabilní, odolává pasterační teplotě, jeho úplná inaktivace je při teplotě 70 °C po dobu 10 minut. Aktivita enzymu je přímo úměrná k množství somatických buněk v mléce. Fyziologická funkce enzymu není zcela

známá, pravděpodobně přispívá k obraně imunitního systému novorozenců (Hurley et al., 2000).

Hurley et al., (2000) dále uvádí, že katepsin D přispívá k proteolýze. Enzym má schopnost rozkládat mléčnou bílkovinu, čímž se uplatňuje při zrání sýrů. Vlastnosti katepsinu jsou velice podobné chymozinu, který se do mléka přidává jako syřidlo. Katepsin D je schopen štěpit všechny typy kaseinů. Katepsin D hydrolyzuje mléčné bílkoviny v pozicích, obsahujících hydrofobní aminokyseliny, podobně jako chymozin a pepsin. Enzym štěpí κ -kasein mezi 105. a 106. aminokyselinou, na stejném místě jako chymozin vzniká para- κ -kasein a κ -kaseinmakropeptid.

3.2.2.8 Amyláza

Amyláza je enzym, který hydrolyzuje rozklad polysacharidů (škrobu nebo glykogenu) na jednodušší cukry (Fox and Kelly, 2006). V mléce se nachází ve dvou základních formách a to α -amyláza a β -amyláza (Samková, 2012). Ve větším množství je zastoupena α -amyláza, která je identická s amylázou produkovanou lidskými slinnými žlázami (Návrátilová et al, 2012).

Značně vyšší aktivita amylázy je v mlezivu, po čtyřech dnech po otelení aktivita amylázy klesá na minimum a opět se navyšuje ke konci laktačního období. Mlezivo a mateřské mléko obsahuje až 30× více amylázy, než zralé kravské mléko (Fox and Kelly, 2006). Aktivita amylázy závisí na druhu zvířete, laktačním období, věku, zdravotním stavu, výživě a individualitě jednotlivého kusu (Šustová et al., 2015). Aktivita je přímo úměrná zvyšujícímu se počtu somatických buněk v mléce a proto se využívá k průkazu mléka od nemocných krav nebo mleziva (Samková, 2012).

Amyláza je navázána na laktoglobulinové frakci syrovátkových bílkovin obsažené v mléce (Samková, 2012). Enzym je poměrně termolabilní, pasteračními teplotami se inaktivuje. Optimální aktivita enzymu je při pH 6,5–7,5. Funkce amylázy je zatím nejasná, vzhledem k tomu, že kravské mléko neobsahuje škrob, pouze nízké množství oligosacharidů. Diskutuje se, že přítomnost amylázy v mléce může napomoci trávit škroby v žaludcích mláďat (Messer et al., 2001).

Amylázová zkouška

Amyláza se stanovuje na základě schopnosti rozkládat škrobový maz. Podle množství rozloženého škrobu v mililitru se vyjadřuje aktivita amylázy. Pro hodnocení se používá zřed'ovací metoda, kterou se dokáže množství nerozloženého škrobového mazu. Tato zkouška se používá pro rozeznání zralého mléka od mleziva, nebo mléka pocházející od nemocných dojnic (Šustová, 2015).

Do šesti zkumavek se odměří 10 ml zkoušeného mléka. Poté se do každé zkumavky napipetuje 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,30 a 0,50 ml škrobového mazu. Promíchá se a nechá se inkubovat při pokojové teplotě 30 minut. Po inkubaci se do každé zkumavky přidá jeden mililitr Lugolova roztoku a zkumavky se protřepou. Mléko (mlezivo) s rozloženým škrobem se zbarví žlutě (vyšší obsah amylázy), modré zbarvení signalizuje přítomnost nerozloženého škrobu (Šustová, 2015).

U zralého mléka od zdravých dojnic amyláza rozloží nanejvýš přídavek 0,15 ml škrobového mazu, u mleziva a mléka od nemocných dojnic je aktivita amylázy daleko vyšší (Šustová, 2015).

3.2.2.9 Lysozym

Lysozym štěpí glykosidické vazby mukoproteinů, které tvoří podstatnou část buněčné stěny gram-pozitivních bakterií. Lysozym společně s laktoperoxidázou, xantinoxidázou a laktoferinem je součástí přirozených imunitních mechanismů (Mallan, 2003).

Lysozym pochází zejména z degradovaných neutrofilních granulocytů, jeho aktivita je nízká 0,13 μ /100ml, avšak vzrůstá během infekce (Toman et al., 2009). Je stabilní i při pH 3–4. Lysozym je tepelně stálý, ponechává si 75 % své aktivity při tepelném ošetření na teplotu 75 °C po dobu 15 minut (Fox and Kelly, 2006).

Byly objeveny dvě formy lysozymu, lysozym c a lysozym g. Oba typy mají jednoduchý polypeptidový řetězec. Lysozym c se skládá ze 129–130 aminokyselinových zbytků, jeho molekulová hmotnost je 14 000 Da. Zatímco lysozym g je tvořen 18 aminokyselinovými zbytky a má vyšší molekulovou hmotnost 19 000–21 000 Da. V kravském mléce se nachází oba typy lysozymu. V mateřském mléce, kobyším mléce a velbloudím mléce se nachází pouze forma lysozymu c (Navrátilová et al, 2012).

Citlivost bakterií na lysozym závisí na řadě faktorů. Gram-pozitivní bakterie jsou citlivější, protože mají jednodušší buněčné stěny, které se skládají z 90 % peptidoglykenu. Gram-negativní bakterie jsou odolnější, zastoupení peptidoglykenu v buněčné stěně je mnohem nižší okolo 5–10% a buněčná stěna je chráněna vnější vrstvou (Mallan, 2003). Působí baktericidně, zamezuje v rozvoji a růstu mikroorganismů.

Mateřské mléko je mnohem bohatší na obsah lysozymu, koncentrace se pohybuje 10–12 mg/100ml. V kobyším mléce se vyskytuje až 79 mg/100ml lysozymu. V kravském mléce je jeho obsah 0,3 mg/100ml. Koncentrace se zvyšuje s nárůstem somatických buněk a při mastitidách až na 1–2 mg/100 ml (Lukášová, 1999).

Lysozym, obsažený v mlezivu, má i několik nutričních významů pro sající mláďata. V přítomnosti lysozymu se v žaludku působením pepsinu a chymozinu nesráží mléčná bílkovina v tuhou sraženinu, sráží se na jemné vločky, které jsou lehce stravitelné. Dále pak působí lysozym ve střevě baktericidně, z buněčných stěn se uvolňují aminosacharidy, které jsou zdrojem pro růst *Lactobacillus bifidus* (Navrátilová et al, 2012).

4 ZÁVĚR

Bakalářská práce je teoretické podstaty, zabývá se enzymy v mléce. Práce je zpracována na základě studia odborné a vědecké literatury. V práci jsou zaznamenány a utříděny informace s důrazem na nejnovější poznatky o enzimech vyskytujících se v mléce.

V mléce se enzymy dělí podle původu na nativní a mikrobiální. Nativní, jsou přirozenou složkou mléka. Mikrobiální enzymy vznikají vlivem mikrobiální činnosti a to z přirozené nebo kontaminující mikroflóry

V práci je konstatováno, že některé enzymy jsou důležité pro kontrolu pasterace a ověření správnosti tepelného ošetření. Pro toto hodnocení se využívají enzymy laktoperoxidáza a alkalická fosfatáza. Alkalická fosfatáza je jako jediný z enzymů zakotvený v legislativě. Podle (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 ve znění Nařízení Komise (ES) č. 1662/2006) musí být mléko ošetřeno tzv. šetrnou nebo dlouhodobou pasterací, anebo ošetřeno na jakoukoliv kombinaci času a teploty, aby bezprostředně po tepelném ošetření mléko vykazovalo negativní reakci na přítomnost alkalické fosfatázy. K inaktivaci enzymu dochází záhřevem na teplotu 72–74 °C po dobu 30–90 sekund a proto se využívá k ověření správnosti dlouhodobé nebo šetrné pasterace.

Enzym laktoperoxidáza je charakteristický svou teplotní odolností. K inaktivaci dochází při teplotě 75°C po dobu 30 minut nebo 80°C po dobu 30 sekund a proto se na základě přítomnosti laktoperoxidázy v praxi posuzuje správnost provedení vysoké pasterace mléka nebo smetany (tzv. Storchova zkouška).

Zvýšená hodnota přirozeně se vyskytujících enzymů může přispívat k diagnostice zdravotního stavu mléčné žlázy, respektive zdraví dojnice. U dojnic, trpících mastitidou, přechází do mléka vyšší množství enzymů a to enzymy kataláza, laktoperoxidáza, laktát dehydrogenáza, kyselá fosfatáza, lysozym, lipázy a proteázy. Do popředí zájmů v současné době vstupuje laktát dehydrogenáza. Z prostudované literatury vyplývá, že laktát dehydrogenáza je nejspolehlivějším ukazatelem pro detekci mastitidy. Je prokázáno, že koncentrace laktát dehydrogenázy přímo koreluje s počtem somatických buněk v mléce. V předešlých letech se stávaly případy, kdy chovatelé na zemědělských farmách pomocí speciálních odstředivek odstředili somatické buňky a takto upravené mléko prodávali do mlékárny. V běžné výrobní praxi se sleduje pouze počet somatických buněk a nikoli obsah enzymů. Mléko s vysokým počtem somatických buněk má jiné vlastnosti, nega-

tivně je ovlivněna technologická kvalita, která se následně promítá do technologických procesů zpracování mléka. Podle enzymu laktát dehydrogenázy lze takto pozměněné mléko odhalit. I po odstředění počtu somatických buněk jsou vzorky na přítomnost laktát dehydrogenázy stále pozitivní.

Dále podle zvýšené hodnoty přirozeně vyskytujících enzymů lze rozeznat mlezivo od mléka zralého. Pro toto hodnocení se využívá enzym amyláza. Aktivita amylázy je v mlezivu až 30× vyšší než ve zralém mléce, po čtyřech dnech od otelení aktivita amylázy klesá na minimum.

Zvýšená hodnota enzymů vzniklých mikrobiální činností poukazuje na zvýšenou kontaminaci mikroorganismů, které přecházejí z kontaminující mikroflóry. Při silné kontaminaci může docházet k rozkladu látek i ve vychlazeném mléce, jedná se o tzv. psychrotrofní mikroorganismy. Řada mikrobiálních enzymů je termorezistentních a působením teploty se neinaktivují. Mezi enzymy vzniklé mikrobiální činností řadíme lipázy a proteázy.

Některé z enzymů mohou příznivě, nebo negativně ovlivňovat texturu, chuť a vůni mléka nebo mléčných výrobků. Například plazmin u sýrů pomáhá štěpit bílkovinu během zrání a vytvářet požadovanou chuť, vůni a texturu, zatím co u pasterovaného a UHT mléka způsobuje proteolýza nežádoucí želírování a tvorbu hořké chuti.

5 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

ASLAM M., HURKLEY L. W., 1998: Proteases in milk, Dairy Cattle illinois livestock trail.

BASTIAN E., D., RODNEY J., R., 1996: Plasmin in Milk and Dairy Products: an Update. *Dairy Journal*, 435-457 s.

BOSZE Z., 2008: *Bioactive components of milk*, ISBN 978-0-387-74087-4.

BUŇKA F., 2013: *Mlékárenské technologie I.*, Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, ISBN 978-80-7454-254-1.

BYLUND G., 1995: *Dairy processing handbook*. Lund: Tetra Pack Processing Systems, 192 s.

CALLEC CH., 2002: *Encyklopedie sýrů*. Čestlice: Rebo Productions, 256 s. ISBN 80-7234-225-8.

CAMPBELL R., E., DRAKE M., A., 2013: Invited review: The effect of native and nonnative enzymes on the flavor of dried ingredients. *Journals of Dairy Sciences*, 96, 4773-4783 s.

CERTELLION G., LOCCI F., RAMPILLI M., 2006: Aninvestigatioj of the plasmin-plasminogen systom in caprine milk and cheese. *International Dairy Journals*, 16 (6), 619-622 s.

DATTA N., DEETH C., H., 2001: Age gelation of UHT milk – a review. *Institution of Chemical Engineers*, 79 (C), 197-210 s.

FLUOROPHOST- NÁVODY, In: De Bruyne Instruments [online]. [vid. 2017-03-25]. Dostupné z: <http://debruyneinstruments.be/fluorophos%C2%AE-alp-test-system.html&sort=type>

FOX P., F., KELLY A., 2006: Indingenous enzymes in milk: Overview and historici aspects. *International Dairy Journal.*, 16(6), 500-532 s.

FOX P., F., MCSWEENEY P., L., H., 1998: *Dairy chemismy and biochemistry*. London: Blackie Academic Professional, 478 s. ISBN 0-412-72000-0.

- FRIGGENS N., C., CHAGUNDA M., G., G., BJERRING M., RIDDER C., HOJSGAARD S., LARSEN T., 2007: Estimating Degree of Mastitis from Time-Series Measurements in Milk: A Test of Model Based on Lactate Dehydrogenase Measurement. *Journal of Dairy Science*, 90 (12), 5415-5427 s.
- FUTO P., MARKUS G., KISS A., ADÁNYI N., 2012: Development of Catalase-Based Amperometric Biosensor for the Determination of Increased Catalase Content in Milk Samples. *Elektroanalysis*, 24(1), 107-1013 s
- GAZI I., VILALVA I., C., HUPPERTZ T., 2014: Plasmin activity and proteolysis in milk protein ingredients. *International Dairy Journal*, 38 (2), 208-212 s.
- GENČUROVA V., HANUŠ O., JEDELSKÁR., KOPECKÝ J., 2011: Creation and development of the calibration model for the indirect determination of milk fat fatty acids and the method of a reference sample preparation. *Original scientific papers*, 10-20 s.
- GOTHEFORS L., MARKLUND S., 1975: Lactoperoxidase Activity in Human Milk and in Saliva of Newborn Infants. *Infection and Immunity*, 11 (6), 1210-1215 s.
- HARRISON R., 2006: Milk xanthine oxidase: Properties and physiological roles. *International Dairy Journal*, 16(6), 546-554 s.
- HAVEMOSE M., A., WEISBJERG M., R., BREDIE W., L., P., POULSEN H., D., NIELSEM J., H., 2006: Oxidative stability of milk influenced by fatty acids, antioxidant and copper derived from feed. *Journal of Dairy Sciences*, 89, 1970-1980 s.
- HICKEY D., K., KILCAWLEY K., N., BERESFORD T., SHEEHAN E., WILKINSON M., G., 2006: The influence of a seasonal milk supply on the biochemical and sensory properties of cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 16(6), 679-690 s.
- HILTON C., D., 2006: Lipoprotein lipase and lipolysis in milk. *International Dairy Journal*, 16, 555-562 s.
- HOOGEDOORN H., 1985: *Activation of the salivary peroxidase system: clinical studies*. New York, ISBN 0—8247-7298-9, 217-228 s.
- HURLEY M. J., LARSEN L. B., KELLY A. L., MCSWEENEY P. L. H., 2000: The milk acid proteinase cathepsin D: a review. *International Dairy Journal*, 10 (10), 673-681 s.

- CHEN L., DANIEL M. R., COOLBEAR T., 2003: Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *International Dairy Journal*, 13(4), 255-275 s.
- CHOVANEC M., GOLIAN J., ŠKARBOVÁ B., SOKOL J., 2008: Vybrané faktory ovlivňující aktivitu alkalické fosfatázy v mléku. *Mliekarstvo*, 39 (3), 46-51 s.
- ISMAIL B., NIELSEN S. S., 2016: Enzymes Indigenous to milk Plasmin System in Milk. *Encyclopedia of Dairy Sciences* (second edition), 308-313 s.
- ISMAIL B., NIELSEN S., S., 2010: Invited review: Plasmin protease in milk: current knowledge and relevance to dairy industry. *Journals of Dairy Sciences*, 93 (11), 5999-5009 s.
- KALANTARI A., SHAHABEDDIN S., FOROUSHANI R. A., 2013: Milk lactate dehydrogenase and alkali phosphatase as biomarkers in detection of bovine subclinical mastitis. *Annals of Biological Research*, 4 (2), 302-307 s.
- KATLOUS P., D., CHRISTODOULOPOULOS G., MINAS A., KARATZIA M., A., POURLIOTIS K., KRITAS S., K., 2010: The role of lactate dehydrogenase, alkaline phosphatase and aspartate aminotransferase in the diagnosis of subclinical intramammary in dairy sheep and goats. *Journal of Dairy Research*, 77, 107-111 s.
- KOLÁŘ K., KODÍČEK M., POSPÍŠIL J., 200: *Chemie pro gymnázia II.*, Státní pedagogické nakladatelství, 128 s, ISBN 80-85937-49-2.
- KOUDA P., 2013: *Základy biochemie*. Ostrava, 220 s, ISBN 978-80-86369-16-7.
- LARSEN T., 2005: Determination of lactate dehydrogenase (LDH) activity in milk by fluorometric assay. *Journal of Dairy Research*, 72, 209-216 s.
- LEITNER G., MERIN U., SILIKONE N., 2004: Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in goats. *International Dairy Journal*, 87 (6), 1719-1726 s.
- LINDMARL-MANSSON H., AKESSON B., 2000: Antioxidative factors in milk. *British Journal of Nutrition*, 84 (1), 130-110 s.
- LUKÁŠOVÁ J., 1999: *Hygiena a technologie produkce mléka*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita. 101 s. ISBN 80-85114-53-4.

MCSWEENEY P., L., H., 2013: Souhrn přednášek o zrání přírodních sýrů. *Mlékařské listy*, 141, 6-10 s.

MESSER M., NAKAMURA T., SIATO T., URASHIMA T., 2001: Oligosaccharide of milk and kolostrum in non-human mammals. *Glycoconjugates Journal*, 18, 357-371 s.

MULLAN W. M. A., 2003: Major antimicrobial proteins in milk. In Dairy Science and Food Technology [online]. [vid. 19. 1. 2017]. Dostupné z: <https://www.dairyscience.info/index.php/exploitation-of-anti-microbial-proteins/52-antimicrobial-proteins.html%20>.

MURRAY R. K., 2012: *Harperova ilustrovaná biochemie*. Nakladatelství Galén, 730 s. ISBN 9788072629077

NÁVODY K TESTŮM, In: Portacheck [online]. [vid. 2017-03-25]. Dostupné z <https://www.portacheck.com/>.

NAVRÁTILOVÁ P., KRÁLOVÁ M., JANŠTOVÁ B., PŘIDALOVÁ H., CUPÁKOVÁ Š., VORLOVÁ L., 2012: *Hygiena produkce mléka*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. 129 s. ISBN 978-80-7305-625-4.

PETERKOVA L., 2002: Free fatty acids ratio in milk, factors which affect their concentration and possibilities their determinativ. *Problematika prvovýroby mléka XXVI*. Medlov, 26-30 s.

RANKIN S., A., CHRISTIANSEN A., LEE W., BANAVARA D., S., LOPEZ-HERANDEZ A., 2010: Invited review: The application of alkalit phosphatase assai for the validation of milk product pasteurization. *Journal of Dairy Science*. 93(12), 5538-5551 s.

RAY R P., CHATTERJEE K., CHAKRABORTY C., GHATAK K. P., 2013: Lipolysis of milk: a review. *International Journal of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine*, 1 (1), 59-74 s.

ROGINSKI H., FUQUAY J., W., 2003: *Encyclopedia of dairy science*. London: Academic Press. 1281 s. ISBN 0-12-227237-42.

- SAMKOVÁ E., 2012: *Mléko: produkce a kvalita : Milk: production and quality : vědecká monografie*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta. 240 s. ISBN 978-80-7394-383-7.
- SILANIKOVE N., MERIN U., LEITNER G., 2006: Physiological role of indigenous milk enzymes: An overview of an evolving picture. *International Dairy Journal*, 16(6), 533-546 s.
- ŠÍPAL Z., ANZENBACHER P., PEČ P., POSPÍŠIL J., RŮŽIČKA I., 1992: *Biochemie*, Státní pedagogické nakladatelství Praha, 480 s, ISBN 80-04-21736-2.
- ŠUSTOVÁ K., 2005: *Laktologie (návody do cvičení)*. Brno: Mendelova univerzita, Agronomická fakulta, 45 s.
- ŠUSTOVÁ K., 2015: *Mlékárenské technologie (návody do cvičení)*. Brno: Mendelova univerzita, Agronomická fakulta, 127 s. ISBN: 978-80-7509-248-9.
- ŠUSTOVÁ K., POLÁČKOVÁ M., KUČHTÍK J., 2015: Možnosti detekce mastitid měřením enzymatické aktivity. *Mlékařské listy-Zpravodaj*, 149, 1-7 s, ISSN 1212-950X.
- TOMAN M., 2009: *Veterinární imunologie – 2., doplněné a aktualizované vydání*. Grada Publishing, 392 s. ISBN 8024724642.
- URECH E., PUHAN Z., SCHALLIBAUM M., 1999: Changes in milk protein fraction as affected by subclinical mastitis. *International Dairy Journal*, 82 (11), 2402-2411 s.
- VLKOVÁ J., RADA V., KILLER J., 2009: *Potravinářská technologie*. Praha: ČZU, 168 s. ISBN 978-80-213-1988-2.
- VODRÁŽKA Z., RAUCH P., KÁŠ J., 1991: *Enzymologie 2. vydání*, Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 245 s. ISBN 80-7080-124-7.
- VOET D., VOETOVÁ J. G., 1995: *Biochemie*. Praha: Victoria Publishing, 1362 s. ISBN 80-85605-44-9.
- VORBACH C., HARRISON R., CAPECCHI R., M., 2003: Xanthine oxidoreductase is central to the evolution and function of the ikate imine systém. *Review Trends in Immunology*, 24 (9), 512-517s.

WALSTRA P., WOUTERS J. T. M., GEURTS T. J., 2006: *Dairy science and technology*. Boca Raton. ISBN 978142002810.

WELBEC K., LEONARD P., GILMARTIN N., BYRNE B., VIGUIER C., ARORA S., KENNEDY R., 2011: Generation on an anti-Nagase single chain antipody and its application in biosensor-based assai for the datectionof Nagase in milk. *Journal of Immunological Method*, 364 (1-2), 14-20 s.

ZEYNEP K., ILHAMI G., HASAN O., 2016: An Imposrtant Milk Enzyme: Lactoperoxidase, 141 – 154 s. In: GIGLI I.: *Milk Proteins – From Structure to Biological Properties And Health Aspect*. InTech, 141 – 154 s. ISBN 978-953-51-2537-2.