

LIN, H. W., LIU, C. W., YANG, D. J., CHEN, C. C., CHEN, S. Y., TSENG, J. K., CHANG T.-J. & CHANG, Y. Y. (2017). *Dunaliella salina* alga extract inhibits the production of interleukin-6, nitric oxide, and reactive oxygen species by regulating nuclear factor- κ B/Janus kinase/signal transducer and activator of transcription in virus-infected RAW264. 7 cells. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(4), s. 908–918.

“List of GRAS Notices”. US Food and Drug Administration. 25 January 2021. Retrieved 30 January 2021.

MAPELLI-BRAHM, P., BARBA, F. J., REMIZE, F., GARCIA, C., FESSARD, A., KHANEGHAH, A. M., SANT’ANA A. S., LORENZO J. M., MONTE-SANO D. & MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J. (2020). The impact of fermentation processes on the production, retention and bioavailability of carotenoids: An overview. *Trends in Food Science & Technology*, 99, s. 389–401.

PATEL, A. K., ALBARICO, F. P. J. B., PERUMAL, P. K., VADRALE, A. P., NTAN, C. T., CHAU, H. T. B., ANWAR, C., MOHI UD DINWAN, H., PAL, A., SAINI, R., HA, L. H., SENTHILKUMAR, B., TSANG, Y.-S., CHEN, C.-W., DONG, C.-D. & SINGHANIA, R. R. (2022). Algae as an emerging source of bioactive pigments. *Bioresource Technology*, s. 126910.

PÉREZ-ALVA, A., MACINTOSH, A. J., BAIGTS-ALLENDE, D. K., GARCÍA-TORRES, R., & RAMÍREZ-RODRIGUES, M. M. (2022). Fermentation of algae to enhance their bioactive activity: A review. *Algal Research*, 64, s. 102684.

SATHASIVAM, R., RADHAKRISHNAN, R., HASHEM, A., & ABD ALLAH, E. F. (2019). Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(4), s. 709–722.

ŚCIESZKA, S., & KLEWICKA, E. (2019). Algae in food: A general review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(21), s. 3538–3547.

DA SILVA VAZ, B., MOREIRA, J. B., DE MORAIS, M. G., & COSTA, J. A. V. (2016). Microalgae as a new source of bioactive compounds in food supplements. *Current Opinion in Food Science*, 7, s. 73–77.

DA SILVA, M. R. O. B., MOURA, Y. A. S., CONVERTI, A., PORTO, A. L. F., MARQUES, D. D. A. V., & BEZERRA, R. P. (2021). Assessment of the potential of *Dunaliella* microalgae for different biotechnological applications: a systematic review. *Algal Research*, 58, s. 102396.

ŞAHİN, O. I. (2020). Functional and sensorial properties of cookies enriched with *SPIRULINA* and *DUNALIELLA* biomass. *Journal of Food Science and Technology*, 57(10), s. 3639–3646.

TSAI, C. F., LU, F. J., & HSU, Y. W. (2012). Protective effects of *Dunaliella salina*—a carotenoids-rich alga—against ultraviolet B-induced corneal oxidative damage in mice. *Molecular Vision*, 18, s. 1540.

YU, M., CHEN, M., GUI, J., HUANG, S., LIU, Y., SHENTU, H., HE, J., FANG, Z., WANG, W. & ZHANG, Y. (2019). Preparation of *Chlorella vulgaris* polysaccharides and their antioxidant activity in vitro and in vivo. *International Journal of Biological Macromolecules*, 137, s. 139–150.

YUAN, Q., LI, H., WEI, Z., LV, K., GAO, C., LIU, Y., & ZHAO, L. (2020). Isolation, structures and biological activities of polysaccharides from *Chlorella*: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 163, s. 2199–2209.

Korespondující autor: MVDr. Gabriela Krausová, Ph.D.,
Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Ke Dvoru 12a,
160 00 Praha 6, e-mail: krausova@milcom-as.cz

Přijato dne: 8. 11. 2022
Lektorováno: 21. 11. 2022

STANOVENÍ VYBRANÝCH AMINOKYSELIN V NÍZKODOHŘÍVANÝCH SÝRECH BĚHEM PROCESU ZRÁNÍ TECHNIKOU KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY S UV DETEKČÍ

Ladislav Bár, Vladimír Dráb, Miloslava Kavková,
Olga Bazalová, Jaromír Cihlář

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Tábor

Determination of selected amino acids in low-scalded cheeses during the ripening process by capillary electrophoresis technique with UV detection

Abstrakt

Tato práce ověřuje možnost využití kapilární elektroforézy s UV detekcí pro stanovení vybraných volných aminokyselin (AK) během procesu zrání sýrů. Jako základ pro tento účel byla použita modifikovaná metoda stanovení AK kapilární elektroforézou s UV detekcí založená na tvorbě Cu^{2+} komplexů v prostředí acetátového pufru s obsahem (2-Hydroxypropyl)- β -cyclodextrinu pro zlepšení separace jednotlivých AK (Makeeva a kol. 2020). Metoda stanovení AK byla vylepšena především zavedením korekce detekovaných píků na interní standard (k. 2-amino-máselnou, 2-ABA) a o vhodnější kondicionální sekvenci kapiláry. Proces štěpení bílkovin postupně až na volné AK byl sledován během časového období zrání 120 dnů u čtyř vybraných pokusných výrob nízkodohříváných sýrů za využití různých kmenů *Lactobacillus helveticus*, které se lišily sekvencí *slpH* genu a antimikrobiální aktivitou (Roubal a kol. 2021). S prodlužující se dobou zrání obsah všech monitorovaných volných AK v sýrech s výjimkou argininu stoupal. Mezi nejvíce zastoupené AK patřila k. glutamová (5,7-8,3 g/kg), lysin (3,3-5,3), leucin (3,5-5,0), prolin (1,6-3,3), fenylnalanin (1,8-2,5), asparagin (1,7-2,1) a glutamin (1,6-2,2), jejichž množství obsažená v sýrech po 120 dnech zrání jsou uvedena v závorkách.

Klíčová slova: aminokyseliny, nízkodohříváné sýry, kapilární elektroforéza, β -cyclodextrin

Abstract

This work verifies the possibility of using capillary electrophoresis with UV detection for the determination of selected free amino acids (AA) during the cheese ripening process. There was used a modified for AAs determination, which based on the formation of Cu^{2+} complexes in an acetate buffer containing (2-Hydroxypropyl)- β -cyclodextrin to improve the separation of individual AAs

(Makeeva et al. 2020). The AA determination method was improved mainly by introducing the correction of the detected peaks to the internal standard (2-aminobutyric acid, 2-ABA) and by a more suitable conditioning sequence of the capillary. The process of protein degradation to free AA was monitored during 120 days of ripening in four selected trial productions of low-scalded cheeses using different strains of *Lactobacillus helveticus*. The strains were different in the sequence of the *slpH* gene and antimicrobial activity (Roubal et al. 2021). The content of all monitored free AA in cheeses (with the exception of arginine) increased with increasing ripening time. Among the most represented AA in were glutamic acid (5.7-8.3 g/kg), lysine (3.3-5.3), leucine (3.5-5.0), proline (1.6-3.3), phenylalanine (1.8-2.5), asparagine (1.7-2.1) and glutamine (1.6-2.2). The amounts contained in cheeses after 120 days of ripening are listed in brackets.

Key words: amino acids, low-scalded cheeses, capillary electrophoresis, β -cyclodextrin

Úvod

Během procesu zrání sýrů dochází k postupnému štěpení bílkovin postupně až na jednotlivé AK, což má mimo jiné vliv i na sensorické vlastnosti. Chuť sýra je jedno z nejdůležitějších kritérií výběru a celkového přijetí spotřebitele, její vývoj je však časově velmi náročný a drahý proces. Vývoj chuti v sýrech je komplexní proces, při kterém se enzymy z mléka, syřidla, startovacích kultur a sekundární flóry podílejí na degradaci mléčných bílkovin, tuků a sacharidů (proteolýza, lipolýza a glykolýza). Zejména proteolýza je časově nejvíce náročná při zrání mnoha sýrů, zvláště pak polotvrdých, a mnoho výzkumů se ubírá směrem tyto procesy urychlit. V tomto směru mohou být velmi užitečné bakterie mléčného kvašení (LAB), které urychlují peptidolýzu a tedy i uvolňování AK (Christensen a kol. 1995), přičemž jejich katabolické reakce jsou hlavním procesem tvorby chuti v sýru. Schopnost LAB degradovat AK pomocí transaminační reakce na α -ketokyseliny, které jsou pak dále degradovány na další aromatické sloučeniny, je vysoce závislá na kmeni (Yvon a kol. 2001). Vznikající aromatické sloučeniny jsou charakteristické pro každý druh sýra (McSweeney a kol. 2004). Výběr startovacích mlékařských kultur má proto spolu s dobou a teplotou skladování zásadní vliv na vývoj chuti během zrání a dosažení požadovaných organoleptických vlastností (Farkye a kol. 1990). V sýrech eidamského typu jsou z AK nejhodněji zastoupeny k. glutamová, leucin, arginin, lysin, fenylalanin a serin. Druh a množství volných AK přítomných v sýru ovlivňují jeho chuť a udávají stádium zrání. Složení a spektrum volných AK závisí na druhu a stáří sýra. Během zrání sýra jsou koncentrace AK rostoucí s výjimkou argininu, jehož množství ve finální době zrání klesá (McSweeney a kol. 2004). Volné AK samy o sobě rovněž výrazně přispívají k chuti sýra, protože jsou součástí sensorického spektra (Lane a kol. 1997).

Pozornost v této práci byla zaměřena na zhodnocení možnosti využití kapilární elektroforézy s UV detekcí, jakožto velice účinné separační techniky pro stanovení širokého spektra látek, které je v prostředí základního elektrolytu možné zionizovat, pro stanovení volných AK během procesu zrání nízkodohříváných sýrů. Kromě reprodukovatelnosti metody bylo cílem zjistit, zda metoda stanovení AK je dostatečně citlivá pro detekci rozdílů v obsahu volných AK, vznikajících působením aminopeptidáz vybraných kmenů *Lactobacillus helveticus*, v jednotlivých sýrech, během 120denního procesu jejich zrání. A dále, zdali se projeví zvýšený obsah AK v důsledku lyze bakteriálních buněk v případě použití bakteriocin produkujícího kmene. Získané distribuce AK v čase nadále poslouží jako indikátor procesu zrání sýrů. Jako základ pro tento účel byla použita modifikovaná metoda stanovení volných AK kapilární elektroforézou s UV detekcí založená na tvorbě Cu^{2+} komplexů v prostředí acetátového pufru s obsahem (2-Hydroxypropyl)- β -cyclodextrinu pro zlepšení separace jednotlivých AK (Makeeva a kol. 2020). Výchozí metoda byla modifikována z hlediska vhodnosti použití pro stanovení AK v sýrech zejména v oblasti kondicionace kapiláry, přípravy vzorku, použití interního standardu pro zlepšení opakovatelnosti a přesnosti stanovení. Možnou alternativu k metodě stanovení AK pomocí kapilární elektroforézy předkládá instrumentace HPLC, kdy popisované metody jsou často založeny na postkolonové (Moore a kol. 1963) nebo předkolonové (Sarwar a kol. 1993) derivatizaci vzorku s následnou VIS detekcí. Jedná se však o dražší, instrumentálně a i s ohledem na přípravu vzorků také výrazně náročnější možnosti stanovení.

Materiál a metody

Instrumentace

Měření probíhala na přístroji pro kapilární elektroforézu Agilent CE G7100 (Agilent Technologies, USA) s UV detekcí. K přípravě vzorků a rozpouštění chemikálií byla využívána ultrazvuková lázeň VWR B300 (VWR, USA). K úpravám a měření pH byl používán pH-metr WTW 3401 (WTW, Německo). Pro filtrování základního elektrolytu byly použity polypropylenové filtry na injekční stříkačku o porozitě 0,2 μm (WTW, USA). Pro filtrování vzorků byly použity papírové skládané filtry Vitrum V90 (VITRUM, ČR) o průměru 110 mm, typ KA 1.

Činidla a standardní roztoky

Pro přípravu základního elektrolytu byl použit octan sodný (CH_3COONa), pentahydrát síranu měďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$), kyselina octová (CH_3COOH) (vše PENTA s.r.o., ČR) a dále (2-Hydroxypropyl)- β -cyclodextrin ($\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_5)_7 \cdot (\text{C}_3\text{H}_7\text{O})_{4,5}$ (Sigma Aldrich, Merck, Německo). Pro čištění a kondicionaci kapiláry byla používána kyselina chlorovodíková (PENTA s.r.o., ČR), k. ethylendiamintetraoctová (EDTA) (Merck, Německo), hydroxid sodný (PENTA s.r.o., ČR) a deionovaná voda.

Zásobní směs tvořící 19 AK o koncentraci 400 mg dm^{-3} byla připravena za použití zásobních roztoků jednotlivých AK o koncentraci $10\,000 \text{ mg dm}^{-3}$ v $0,1 \text{ M}$ roztoku HCl. Standardní směs AK tvořil lysin (Lys), arginin (Arg), histidin (His), glycin (Gly), asparagin (Asn), alanin (Ala), serin (Ser), threonin (Thr), prolin (Pro), phenylalanin (Phe), methionin (Met), valin (Val), leucin (Leu), isoleucin (Ile), glutamin (Gln), tyrosin (Tyr), tryptofan (Trp), k. glutamová (Glu), k. asparagová (Asp). Jako interní standard (ISTD) byla zvolena k. 2-aminomáselná (2-ABA) (vše Sigma Aldrich, Merck, Německo).

Podmínky stanovení aminokyselin

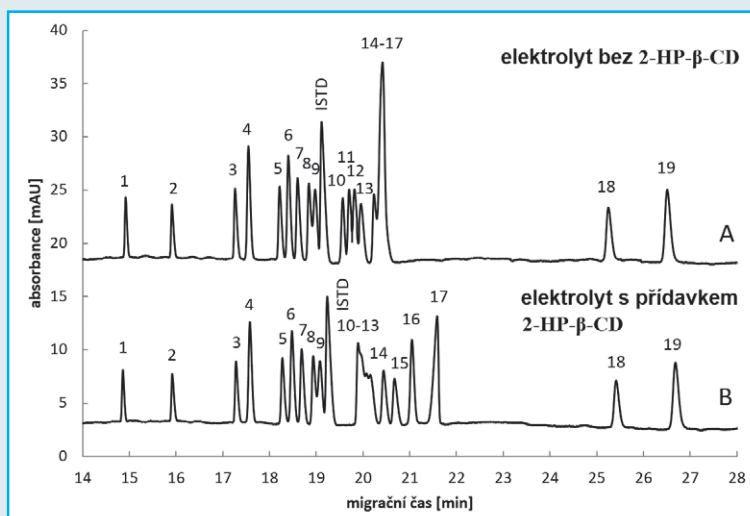
Používaný separační acetátový pufr byl ve variantě A tvořen 20 mM octanem sodným (CH_3COONa) a 50 mM síranem měďnatým (CuSO_4) v deionizované vodě, pH elektrolytu bylo upraveno na hodnotu $4,3$ pomocí 2 M kyseliny octové při $20 \text{ }^\circ\text{C}$. V případě varianty B bylo složení identické s variantou A, pouze byl navíc obsažen (2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin o koncentraci 10 mM . Připravený elektrolyt byl dále filtrován za použití $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ stříkačkového filtru.

Pro vlastní separaci byla používána křemenná nepotažená kapilára o vnitřním průměru $50 \text{ }\mu\text{m}$, celkové délce $80,5 \text{ cm}$ a efektivní délce 72 cm (CM Scientific, USA). Pracovní teplota kapiláry byla nastavena na $20 \text{ }^\circ\text{C}$, na elektrody bylo vkládáno napětí $+25 \text{ kV}$, při kterém proud dosahoval hodnoty kolem $35 \text{ }\mu\text{A}$. Dávkování vzorků probíhalo v hydrodynamickém módu při tlaku 50 mbar po dobu 6 s . Vlnová délka pro přímou detekci AK byla nastavena na 233 nm (šířka spektra 5 nm). Frekvence snímání UV/VIS detektoru byla nastavena na $0,5 \text{ sekundy}$.

Nová kapilára byla kondicionována proplachováním při tlaku 950 mbar $0,2 \text{ M HCl}$ (10 min), deionizovanou vodou (10 min), dále pak 3 M NaOH (20 min) a nakonec základním elektrolytem (20 min). Mezi jednotlivými analýzami byla z důvodu nutnosti obnovení povrchu kapiláry nastavena následující kondicionační sekvence: 3 M NaOH (1 min), deionizovaná voda (1 min), 10 mM EDTA (1 min) a základní elektrolyt (5 min).

Příprava vzorků

Nejprve bylo 5 g najemno nastrohaného a důkladně promíchaného vzorku sýra převedeno do 100 ml odměrné baňky (ředění $1/20$). Baňka byla poté ze dvou třetin doplněna deionizovanou vodou a na 20 minut umístěna do ultrazvukové lázně vytemperované na $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Po zchlazení byly do baňky přidány 2 ml kyseliny 2-ABA o koncentraci $10\,000 \text{ mg dm}^{-3}$ (výsledná koncentrace interního standardu ve vzorku 200 mg dm^{-3}), baňka byla doplněna deionizovanou vodou při $20 \text{ }^\circ\text{C}$ a po promíchání byl její



Obr. 1 Elektroferogram standardní směsi aminokyselin

složení standardní směsi AK (koncentrace 100 mg dm^{-3}): 1 – Lys; 2 – Arg; 3 – His; 4 – Gly; 5 – Asn; 6 – Ala; 7 – Ser; 8 – Thr; 9 – Pro; 10 – Phe; 11 – Met; 12 – Val; 13 – Leu; 14 – Ile; 15 – Gln; 16 – Tyr; 17 – Trp; 18 – Glu; 19 – Asp; ISTD – 2-ABA

složení BGE: $20 \text{ mM CH}_3\text{COONa}$, 50 mM CuSO_4 , pH $4,3$ (záznam A) a varianta elektrolytu s přidavkem $10 \text{ mM 2-HP-}\beta\text{-CD}$ (záznam B); separační napětí: $+25 \text{ kV}$; UV detekce: 233 nm ; efektivní délka a průměr kapiláry: 72 cm , $50 \text{ }\mu\text{m}$; injekce vzorku: hydrodynamická 50 mbar , 6 s ; teplota separace $20 \text{ }^\circ\text{C}$

obsah zfiltrován přes papírový filtr. Filtrát byl pipetován přímo do CE vialek.

Výsledky a diskuse

Charakteristiky CE stanovení aminokyselin

Za optimalizovaných podmínek byly pro jednotlivé AK získány kalibrační závislosti. Pro tento účel byly nařazením zásobní směsi AK připraveny kalibrační standardy v deionizované vodě o koncentracích 1 ; 2 ; 5 ; 10 ; 20 ; 40 ; 60 ; 100 ; 150 ; 200 a 250 mg dm^{-3} vždy s konstantním obsahem interního standardu 200 mg dm^{-3} .

Při vlnové délce 233 nm byly sledovány jak výšky, tak plochy detekovaných píků získaných jak ve variantě základního elektrolytu A (bez β -cyclodextrinu), tak variantě B (s přidavkem β -cyclodextrinu). Každý bod kalibrační úrovně byl získán ze tří následných měření. V případě, že daná varianta elektrolytu umožňovala stanovení stejné AK, byly kalibrační závislosti pro tuto AK vyhodnoceny paralelně, přičemž bylo zjištěno, že kalibrace mají stejné směrnice a nezáleží na tom, který elektrolyt je pro stanovení použit. Obecně ve variantě elektrolytu s přidavkem β -cyclodextrinu (B) byl stanovován pouze isoleucin, glutamin, tyrosin a tryptofan, ve variantě bez β -cyclodextrinu (A) pak všechny ostatní AK. Celková doba jedné analýzy se započtením proplachovacích kroků kapiláry trvá cca 35 minut . Elektroferogramy standardu AK o koncentraci 100 mg dm^{-3} získané pro obě varianty složení základního elektrolytu jsou pro porovnání znázorněny na obrázku 1.

Parametry kalibračních závislostí jednotlivých AK vyhodnocených z ploch píků jsou uvedeny v tabulce 1. Zís-

Tab. 1 Parametry kalibračních závislostí jednotlivých AK, vyhodnoceno z ploch píků korigovaných na ISTD

č.	analyt	rovnice lineární regrese			R ²	LDR [mg dm ⁻³]	LOD [mg dm ⁻³]
1	lysin	y = 0,00280	+	0,0011	0,9997	5,6 - 200	1,7
2	arginin	y = 0,00261	+	0,0047	0,9988	6,3 - 250	1,9
3	histidin	y = 0,00353	+	0,012	0,999	4,8 - 250	1,4
4	glycin	y = 0,00640	+	0,012	0,9976	2,9 - 300	0,9
5	asparagin	y = 0,00439	-	0,0100	0,9936	4,5 - 250	1,4
6	alanin	y = 0,00616	+	0,0052	0,9997	3,2 - 250	0,9
7	serin	y = 0,00494	+	0,0011	0,9993	4,0 - 250	1,2
8	threonin	y = 0,00410	+	0,0118	0,9987	4,2 - 150	1,3
9	prolin	y = 0,00483	-	0,0048	0,9991	4,7 - 250	1,4
10	phenylalanin	y = 0,00281	+	0,02315	0,9912	5,1 - 200	1,5
11	methionin	y = 0,00374	+	0,01164	0,9984	4,5 - 200	1,4
12	valin	y = 0,00432	+	0,02322	0,9982	4,6 - 200	1,4
13	leucin	y = 0,00383	+	0,01141	0,9993	5,8 - 200	1,7
14	isoleucin	y = 0,00375	+	0,0069	0,9997	6,4 - 250	1,9
15	glutamin	y = 0,00342	+	0,0025	0,9989	6,8 - 250	2,1
16	tyrosin	y = 0,00580	+	0,0062	0,9932	3,6 - 250	1,1
17	tryptophan	y = 0,00779	+	0,0111	0,9996	2,7 - 200	0,8
18	k. glutamová	y = 0,00321	+	0,00561	0,9994	6,6 - 250	2,0
19	k. asparagová	y = 0,00492	+	0,01672	0,9993	4,8 - 200	1,4

kané plochy píků AK byly vždy korigovány na plochu ISTD (2-ABA), tedy bylo pracováno s hodnotou podílu plochy analytu a plochy ISTD v daném měření. Lineární dynamické rozsahy (LDR) se pro jednotlivé AK pohybují nejčastěji v rozmezí cca 5 až 250 mg dm⁻³ při dosažení dobrých linearit (R² > 0,99). Meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) byly určeny jako troj a desetinásobek průměrné hodnoty šumu základní linie a přepočteny na koncentrace pomocí kalibračních závislostí pro výšky píků.

Tab. 2 Opakovatelnost jednotlivých parametrů CE stanovení

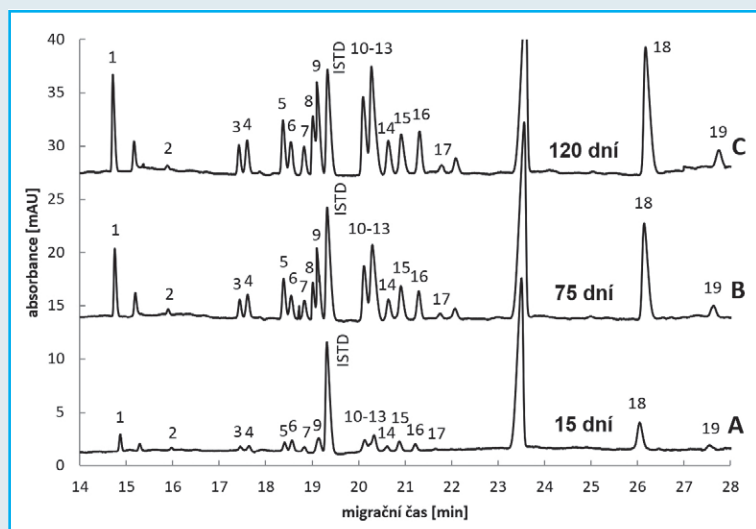
č.	analyt	opakovatelnost n=10 [% RSD]				
		MT	A	h	A/A _{ISTD}	h/h _{ISTD}
1	lysin	3,10	9,37	10,60	6,46	2,31
2	arginin	3,27	9,34	10,63	2,56	1,57
3	histidin	3,52	10,50	11,46	3,90	2,43
4	glycin	3,52	8,89	11,54	3,47	2,11
5	asparagin	3,65	6,02	11,03	4,89	1,76
6	alanin	3,66	7,73	12,19	2,70	1,69
7	serin	3,71	7,66	11,09	3,48	1,59
8	threonin	3,76	6,13	10,87	4,45	1,45
9	prolin	3,74	8,54	13,28	2,74	2,45
10	phenylalanin	3,75	9,29	12,58	3,78	2,16
11	methionin	3,78	10,15	13,25	4,56	2,45
12	valin	3,84	8,56	11,08	3,54	1,86
13	leucin	3,92	9,45	12,69	4,05	2,08
14	isoleucin	3,98	10,07	12,99	6,00	3,21
15	glutamin	4,02	8,96	10,38	4,87	2,21
16	tyrosin	4,06	10,17	12,64	4,71	2,00
17	tryptophan	4,10	9,26	11,07	2,02	0,95
18	k. glutamová	4,77	8,40	12,09	3,86	1,80
19	k. asparagová	4,92	8,33	10,68	4,22	1,16

Pro CE metodu stanovení AK byly dále zjištěny hodnoty opakovatelnosti migračních časů (MT), výšek a ploch detekovaných píků. Pro standard AK o koncentraci 100 mg dm⁻³ a koncentraci ISTD 200 mg dm⁻³ bylo za optimalizovaných podmínek provedeno 10 následných měření, kdy byla pro jednotlivé parametry určena jejich relativní směrodatná odchylka (tabulka 2). Opakovatelnosti migračních časů se napříč jednotlivými AK pohybují mezi 3 až 5 %. Plochy (A) a výšky píků (h) AK často dosahují hodnot horších jak 10 % (vždy pak pro výšky píků). Při použití podílové korekce na interní standard naopak dochází k velmi výraznému zlepšení opakovatelnosti jak ploch, tak výšek detekovaných píků. Příčinou je, že aktuálně získaná plocha či výška píku interního standardu o definované koncentraci z daného měření přímo odráží celkový stav měřicího systému zahrnující výkyvy mnoha parametrů (např. dávkování vzorku, stav kapiláry, „opotřebení“ základního elektrolytu, migrační čas, vlastní opakovatelnost metody).

Aplikace stanovení na reálné vzorky

Modifikovaná metoda stanovení vybraných AK byla použita pro sledování jejich distribuce v čase během procesu zrání nízkodohřívavých sýrů vyrobených za použití smetanové kultury FD (Chr. Hansen's, Dánsko) s přidavkem vybraných kmenů *Lactobacillus helveticus* lišících se sekvencí *slpH* genu a antimikrobiální aktivitou (Roubal a kol. 2021). Výroba NH4 byla kontrolní výroba vyrobená pouze s použitím smetanové kultury FD, výroba NH12 byla vyrobena s použitím kultury FD s přidavkem kmene *L. helveticus* H48, výroba NH19 obsahovala kulturu FD a bakteriocin tvořící kmen *L. helveticus* H09. Poslední sledovaná výroba NH22 pak obsahovala všechny tři výše uvedené kultury zároveň.

Pokusně vyrobené kulaté sýry o průměru cca 25 cm, výšce cca 12 cm a váze cca 4 kg zrály při konstantní teplotě 14 °C ve zrací komoře a vždy v časech 2, 15, 30, 45, 75 a 120 dní byly rozborovány. Pro komplexní rozbor v daném čase byla vždy použita reprezentativní 1/4 výšeč o váze cca 1 kg. Z této části byla odkrojena další cca 1/4 výšeč sýra, která byla nejemno nastrohána a následně použita pro stanovení AK. Ukázka elektroferogramů získaných pro sýr NH19 v časech zrání 15, 75 a 120 dní pro variantu elektrolytu s přidavkem β-cyclodextrinu je znázorněna na obrázku 2. Získané hodnoty množství volných AK pro pokusné výroby sýrů NH4, NH12, NH19 a NH22 monitorované během 120 dní zrání jsou souhrnně uvedeny v tabulkách 3 a 4. Výsledné hodnoty jsou vyjádřeny jako střední hodnoty ze tří opakovaných měření opatřené intervalem spolehlivosti na hladině významnosti 95 %. Z výsledků je obecně

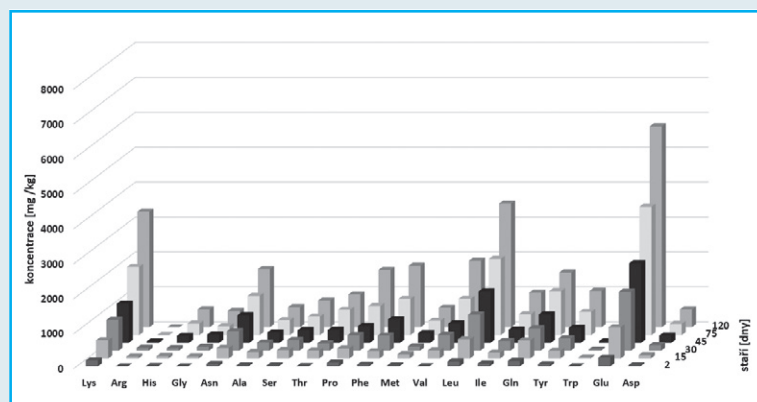


Obr. 2 Elektroferogram obsahu aminokyselin v sýru NH19 starém 15, 75 a 120 dní (elektrolyt s přidavkem β -cyclodextrinu)

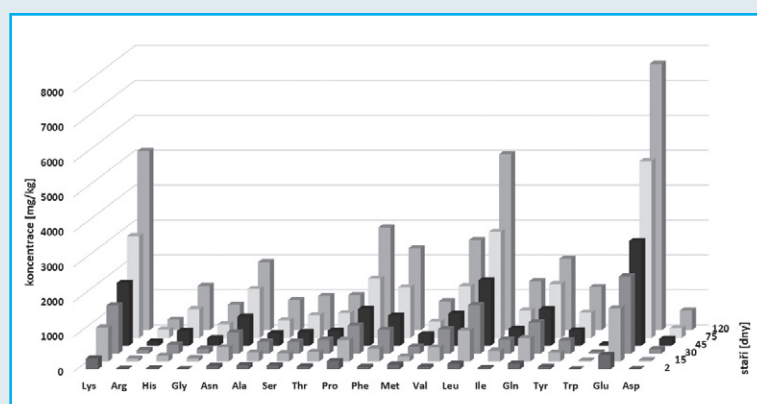
1 – Lys; 2 – Arg; 3 – His; 4 – Gly; 5 – Asn; 6 – Ala; 7 – Ser; 8 – Thr; 9 – Pro; 10 – Phe; 11 – Met; 12 – Val; 13 – Leu; 14 – Ile; 15 – Gln; 16 – Tyr; 17 – Trp; 18 – Glu; 19 – Asp; ISTD – 2-ABA

Doba zrání sýra: 15 dní (záznam A); 75 dní (záznam B); 120 dní (záznam C)

složení BGE: 20 mM CH_3COONa , 50 mM CuSO_4 , 10 mM 2-HP- β -CD, pH 4,3; separační napětí: +25 kV; UV detekce: 233 nm; efektivní délka a průměr kapiláry: 72 cm, 50 μm ; injekce vzorku: hydrodynamická 50 mbar, 6 s; teplota separace 20 °C



Obr. 3 Obsah aminokyselin v sýru NH4 během zrání (kontrolní výroba, kultura FD)



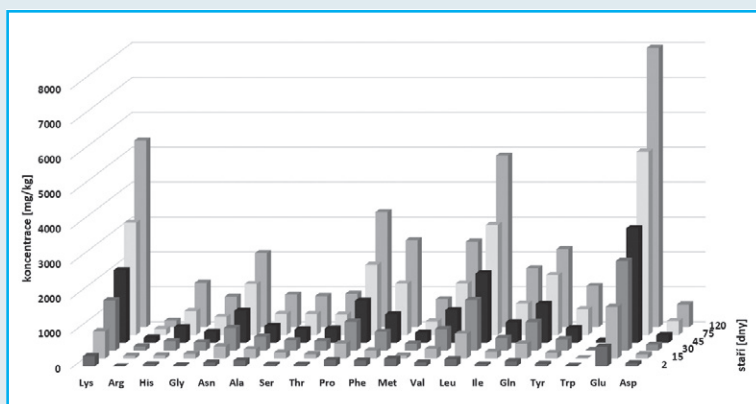
Obr. 4 Obsah aminokyselin v sýru NH12 během zrání (kultura FD + H48)

patrný nárůst koncentrací všech AK s rostoucím časem zrání sýrů s výjimkou argininu. Mezi nejvíce zastoupené AK patřila k. glutamová, lysin, leucin, prolin, fenylalanin, asparagin a glutamin (Obr. 3, 4, 5 a 6). Suma množství volných AK napříč časem zrání byla podle očekávání nejnižší v kontrole NH4, která byla vyrobena pouze za použití smetanové kultury (Obr. 3). V případě výrob NH12 a NH19 vyrobených s přidavkem odlišných kultur *L. helveticus* byly obecně celkové sumy AK vzájemně srovnatelné a pravděpodobně z důvodu působení aminopeptidáz výrazně vyšší než v případě kontrolní výroby NH4 (Obr. 4 a 5). Očekávaná nejvyšší množství vyprodukovaných AK ve výrobě NH22, následkem lyze bakteriálních buněk z důvodu působení bacteriocin produkčního kmene *L. helveticus* H09 na kmen H48 se naopak nepotvrdila a výtěžky jsou druhé nejmenší po kontrole (Obr. 6). Z výše popsaných konstatování nelze vzhledem k počtu provedených výrob dělat postulátní závěry nebo případně statisticky porovnávat distribuce AK v jednotlivých výrobcích a celá věc bude podrobena dalšímu zkoumání. Popsanou metodu lze závěrem zhodnotit jako dostatečně citlivou pro detekci rozdílů v obsahu volných AK, vznikajících působením vybraných kmenů LAB v jednotlivých sýrech, během 120 denního procesu zrání.

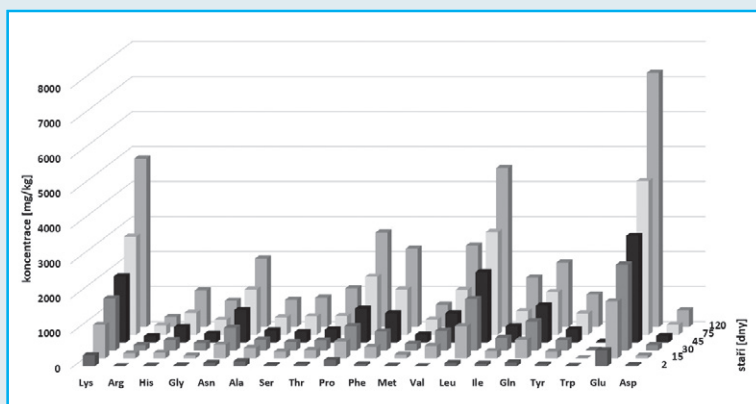
Závěr

Tato práce se zabývá stanovením volných AK v nízkodohříváných sýrech technikou kapilární elektroforézy s UV detekcí. Metoda vyvinutá (Makeeva a kol. 2020) byla dále modifikována a aplikována na sledování distribuce volných AK v sýrech během jejich procesu zrání. Za účelem ověření citlivosti metody byly vybrány sýry ze čtyř pokusných výrob nízkodohříváných sýrů a v časech 2, 15, 30, 45, 75 a 120 dní byly rozborovány. Sýry byly vyrobeny za použití smetanové kultury FD (Chr. Hansen's, Dánsko) s přidavkem vybraných kmenů *Lactobacillus helveticus* lišících se sekvencí *slpH* genu a antimikrobiální aktivitou (Roubal a kol. 2021).

Použitím korekce detekovaných piků na interní standard (2-ABA) byla výrazně zlepšena opakovatelnost a přesnost analýz. Jednotlivé AK lze nejčastěji stanovit v rozmezí cca 5 až 250 mg dm^{-3} při dosažení dobrých linearit kalibračních závislostí ($R^2 > 0,99$). Z dosažených výsledků je obecně patrný nárůst koncentrací všech AK s rostoucím časem zrání sýrů s výjimkou argininu. Mezi nejvíce zastoupené AK patřila k. glutamová, lysin, leucin, prolin, fenylalanin,



Obr. 5 Obsah aminokyselin v sýru NH19 během zrání (kultura FD + H09)



Obr. 6 Obsah aminokyselin v sýru NH22 během zrání (kultura FD + H09 + H48)

Tab. 3 Množství AK v sýrech během procesu zrání v rozmezí 2 až 30 dní (n = 3; p = 95 %)

stáří sýra	2 dny	15 dní	30 dní
AK	NH4/12/19/22 mg/kg	NH4/12/19/22 mg/kg	NH4/12/19/22 mg/kg
1-Lys	168±12/313±25/289±21/312±28	523±44/976±54/789±64/961±35	881±64/1381±97/1443±98/1491±91
2-Arg	<38/<38/<38/<38	54±12/87±15/76±11/143±12	81±9/104±11/124±10/154±11
3-His	<28/36±6/60±7/<28	66±9/165±12/92±10/160±13	72±8/260±20/276±23/299±27
4-Gly	<18/<18/30±5/25±4	57±8/100±9/132±8/80±10	114±8/143±9/240±16/217±12
5-Asn	70±6/98±5/106±8/93±7	303±15/405±26/351±29/392±31	563±39/611±45/650±61/649±36
6-Ala	29±11/119±9/167±10/142±11	185±12/260±20/271±13/190±14/300±21	231±21/345±15/399±28/312±22
7-Ser	27±8/108±9/53±7/29±11	241±17/236±21/172±18/195±19	309±26/339±15/299±18/243±21
8-Thr	<26/82±12/53±8/49±9	229±16/275±18/123±15/239±21	210±19/401±26/278±25/291±23
9-Pro	105±9/239±14/182±15/177±14	291±21/619±45/428±32/487±15	443±29/806±85/828±62/697±68
10-Phe	48±6/76±8/164±9/57±8	208±15/371±29/230±17/325±31	432±18/683±44/544±49/545±28
11-Met	<28/141±13/219±18/<28	120±14/140±13/85±7/110±10	123±8/197±9/199±7/193±11
12-Val	<28/77±8/109±12/<28	233±17/401±29/279±25/358±18	452±25/701±54/621±48/565±58
13-Leu	141±17/158±14/204±15/90±10	551±60/885±75/711±58/918±59	1032±88/1392±105/1456±98/1474±125
14-Ile	80±6/44±7/57±8/74±7	167±12/309±23/194±17/208±11	280±18/402±31/368±28/365±22
15-Gln	153±14/161±10/146±9/101±11	518±32/666±44/426±32/535±44	639±46/896±65/822±71/829±45
16-Tyr	60±8/74±7/72±7/51±8	220±18/257±22/158±14/194±17	356±19/380±29/326±32/298±21
17-Trp	<16/<16/<16/<16	31±8/31±11/<16/<16	36±8/41±12/19±10/<16
18-Glu	248±19/410±35/563±42/455±42	893±65/1523±121/1480±98/1630±115	1686±149/2209±174/2570±180/2455±210
19-Asp	32±11/<28/86±8/35±8	98±10/41±6/120±8/77±5	157±12/129±8/171±11/156±14

asparagin a glutamin. Oproti kontrolní výrobě vyrobené pouze s kulturou FD byl ve výrobcích s obsahem *L. helveticus* potvrzen vyšší obsah volných AK pravděpodobně z důvodu působení aminopeptidáz. Uvedenou metodu lze zhodnotit jako dostatečně citlivou pro detekci rozdílů v obsahu volných AK v jednotlivých sýrech během zrání.

Poděkování

Práce vznikla za podpory projektů QK1910024 a institucionální podpory MZE-RO1422.

Literatura

FARKYE N. Y., FOX P. F. (1990): Objective indices of cheese ripening. *J. Food Sci. and Technol.*, 1, s. 37–40.
 HASSAN A. M., ABD EL-GAWAD A. K. (2012): Flavour compounds in cheese (review). *International Journal of Academic Research*, 4, s. 169–181.
 CHRISTENSEN J. E., JOHNSON M. E., STEELE J. L. (1995): Production of Cheddar cheese using a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SK11 derivative with enhanced aminopeptidase activity. *International Dairy Journal*, 5, s. 367–379.
 LANE C. N., FOX P. F., JOHNSTON D. E., McSWEENEY P. L. H. (1997): Contribution of coagulant to proteolysis and textural changes in Cheddar cheese during ripening. *Int. Dairy J.*, 7, s. 453–464.
 MAKEEVA D., POLIKARPOVA D., DEMYANOVA E., ROSHCINA E., VAKHITOV T., KARTSOVA L. (2020): Determination of native amino acids and lactic acid in *Lactobacillus helveticus* culture media by capillary electrophoresis using Cu²⁺ and β-cyclodextrins as additives. *Journal of Chromatography B*, 1156, s. 122304.

Tab. 4 Množství AK v sýrech během procesu zrání v rozmezí 45 až 120 dní (n = 3; p = 95 %)

stáří sýra	45 dní	75 dní	120 dní
AK	NH ₄ /12/19/22 mg/kg	NH ₄ /12/19/22 mg/kg	NH ₄ /12/19/22 mg/kg
1-Lys	1121 ± 85/1798 ± 118/2081 ± 169/1897 ± 141	1954 ± 121/2921 ± 102/3215 ± 98/2804 ± 145	3309 ± 254/5132 ± 425/5343 ± 369/4812 ± 287
2-Arg	45 ± 7/119 ± 8/154 ± 11/186 ± 14	<38/244 ± 17/179 ± 9/268 ± 24	<38/305 ± 22/188 ± 12/290 ± 18
3-His	203 ± 19/429 ± 32/454 ± 41/452 ± 27	328 ± 21/826 ± 45/686 ± 49/629 ± 56	513 ± 41/1270 ± 101/1271 ± 98/1045 ± 84
4-Gly	541 ± 42/220 ± 17/322 ± 25/260 ± 17	253 ± 25/393 ± 29/525 ± 42/430 ± 37	467 ± 28/733 ± 65/878 ± 71/751 ± 72
5-Asn	791 ± 65/839 ± 47/920 ± 38/937 ± 48	1123 ± 89/1406 ± 112/1465 ± 95/1297 ± 87	1666 ± 115/1952 ± 145/2124 ± 102/1956 ± 98
6-Ala	300 ± 25/358 ± 29/485 ± 35/351 ± 21	424 ± 18/509 ± 38/610 ± 48/501 ± 65	578 ± 44/865 ± 74/934 ± 89/782 ± 61
7-Ser	365 ± 28/400 ± 35/390 ± 17/311 ± 10	531 ± 26/652 ± 39/606 ± 42/532 ± 36	767 ± 58/985 ± 85/896 ± 105/841 ± 61
8-Thr	375 ± 45/436 ± 35/410 ± 21/380 ± 29	724 ± 66/714 ± 54/588 ± 47/542 ± 51	939 ± 69/1009 ± 87/959 ± 74/1104 ± 95
9-Pro	481 ± 29/1059 ± 54/1210 ± 75/975 ± 84	829 ± 78/1703 ± 95/2011 ± 154/1663 ± 121	1642 ± 127/2942 ± 254/3297 ± 198/2703 ± 245
10-Phe	673 ± 45/864 ± 85/818 ± 71/843 ± 65	1038 ± 47/1453 ± 85/1477 ± 96/1300 ± 68	1765 ± 115/2347 ± 178/2492 ± 164/2238 ± 136
11-Met	280 ± 22/333 ± 28/296 ± 11/234 ± 15	410 ± 27/469 ± 31/389 ± 25/434 ± 29	561 ± 51/830 ± 62/805 ± 69/641 ± 54
12-Val	556 ± 45/923 ± 81/941 ± 75/842 ± 66	1041 ± 75/1489 ± 81/1476 ± 115/1285 ± 87	1906 ± 85/2579 ± 135/2453 ± 175/2326 ± 165
13-Leu	1473 ± 98/1881 ± 78/1988 ± 147/2017 ± 112	2182 ± 175/3040 ± 251/3153 ± 178/2938 ± 195	3542 ± 210/5038 ± 415/4912 ± 354/4539 ± 254
14-Ile	383 ± 28/493 ± 41/590 ± 38/468 ± 17	497 ± 47/794 ± 85/901 ± 65/676 ± 58	992 ± 101/1404 ± 110/1687 ± 95/1415 ± 121
15-Gln	815 ± 65/1047 ± 71/1117 ± 88/1063 ± 74	1257 ± 85/1549 ± 113/1721 ± 87/1224 ± 101	1570 ± 131/2046 ± 154/2236 ± 144/1842 ± 132
16-Tyr	432 ± 25/445 ± 36/420 ± 28/382 ± 41	662 ± 48/727 ± 51/742 ± 86/616 ± 54	1040 ± 72/1241 ± 83/1183 ± 58/931 ± 69
17-Trp	50 ± 11/57 ± 13/72 ± 8/28 ± 6	46 ± 9/94 ± 10/98 ± 7/52 ± 6	108 ± 21/171 ± 11/145 ± 13/131 ± 9
18-Glu	2280 ± 175/3002 ± 205/3280 ± 269/3054 ± 154	3674 ± 185/5061 ± 325/5248 ± 251/4391 ± 321	5751 ± 369/7627 ± 547/8321 ± 414/7260 ± 369
19-Asp	211 ± 15/202 ± 21/225 ± 17/196 ± 16	320 ± 25/284 ± 29/398 ± 36/290 ± 14	512 ± 29/569 ± 41/654 ± 38/481 ± 26

McSWEENEY P. L. H. (2004): Biochemistry of cheese ripening. *Inter. Journal of Dairy Technology*, 57, s. 127–144.

MOORE S., STEIN W. H. (1963): Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment. *Methods in Enzymology*, 6, s. 819–831.

ROUBAL P., BAZALOVÁ O., ČURDA L., DRÁB V., HYRŠLOVÁ I., ŠTĚTINA J. (2021): Využití enzymatického a probiotického potenciálu mikroorganismů k vývoji nových a zvýšení kvality a trvanlivosti stávajících mléčných a pekárenských výrobků. *Redakčně upravená zpráva projektu QK1910024*.

SARWAR G., BOTTING H. G. (1993): Evaluation of liquid chromatographic analysis of nutritionally important amino acids in food and physiological samples. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 615, s. 1–22.

MIREILLE Y., RIJNEN L. (2001): Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal*, 11, s. 185–201.

Korespondující autor:

Mgr. Ladislav Bár

Sýrařské oddělení, Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

Soběslavská 841, 390 02 Tábor

e-mail: l.bar@vum-tabor.cz

Přijato dne: 31. 10. 2022

Lektorováno: 24. 11. 2022

ANTIFUNGÁLNÍ AKTIVITA KVASINEK VŮČI KONTAMINANTŮM RODU ASPERGILLUS SPP. A PENICILLIUM SPP.

Miloslava Kavková¹, Šárka Horáčková², Vladimír Dráb¹,
Jaromír Cihlář¹, a Ladislav Bár¹

¹ Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.,

² Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

Antifungal activity of yeast against fungal
contaminants *Aspergillus* spp. and *Penicillium*
spp.

Abstrakt

Testování a aplikace protektivních látek přírodního původu nebo nezávadných a bezpečných mikrobiálních agens a jejich produktů se dostává, v návaznosti na poptávku po potravinách bez chemických konzervantů, do popředí výzkumu. Mezi taková agens patří i druhy kvasinek, které vykazují antifungální aktivitu vůči plísním. V naší studii jsme testovali inhibiční aktivitu pěti izolátů *Wickerhamomyces anomalus*, šesti izolátů