

## PROBLEMATIKA HOŘKÝCH PEPTIDŮ VZNIKAJÍCÍCH V PROCESU ZRÁNÍ SÝRŮ

JANA ZEMANOVÁ<sup>a</sup> a KVĚTOSLAVA ŠUSTOVÁ<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Ústav technologie potravin, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, <sup>b</sup> Katedra ekonomie a managementu, AMBIS vysoká škola, a.s., Lindnerova 575/1, 180 00 Praha 8  
jana.zemanova@mendelu.cz

Došlo 10.11.22, přijato 2.2.23.

Hořké peptidy vznikají rozkladem bílkovin a vysokomolekulárních peptidů v průběhu proteolýzy. Jejich tvorba v sýrech souvisí s proteolytickou aktivitou syřidel v rovnováze s peptidasovou aktivitou mikrobiálních enzymů mlékařských kultur. Hořká chuť pak vzniká při disproporcii mezi tvorbou a odbouráváním hořkých peptidů zvýšením jejich koncentrace nad prahovou hodnotu vnímání. Do jaké míry ovlivní hořké peptidy celkovou chuť sýra tak závisí na rovnováze mezi jejich vznikem a rozpadem na nehořké nižší peptidy a aminokyseliny. Pouze dokonale vyvážený proces proteolýzy umožňuje vznik jakostního vyzrálého sýra s charakteristickou chutí a vůní. Proto je žádoucí úplné objasnění mechanismu, a tím i možnost kontroly a regulace tohoto procesu.

**Klíčová slova:** hořké peptidy, zrání sýrů, proteolýza kaseinu, hořká chuť

### Obsah

1. Úvod
2. Proteolýza kaseinu a tvorba hořkých peptidů
3. Hořké peptidy z hlediska senzorické analýzy
4. Složení hořkých peptidů
5. Analýza a stanovení hořkých peptidů v sýrech
6. Možnosti regulace výskytu hořkých peptidů u sýrů a proteinových hydrolyzátů
7. Závěr

### 1. Úvod

Jedním z nejdůležitějších procesů, probíhajících při výrobě a zrání sýrů, je proteolýza, jejíž vyvážený průběh podmiňuje vznik jakostního sýra s typickou chutí, vůní a konzistencí. Zastoupení proteolytických enzymů, které se podílejí na těchto pochodech, mohou představovat v sýrařské technologii přidávaná syřidla, proteolytický systém přidávaných kyselých bakterií mléčného kvašení i přirozeně kontaminujících bakterií mléčného kvašení a také endogenní proteasy mléka<sup>1,2</sup>.

Průběh a produkty proteolýzy mléčné bílkoviny kaseinu jsou dále ovlivňovány nejenom koncentrací a specifitou působících enzymů, ale i fyzikálně-chemickými podmínkami při technologii výroby sýrů (pH, koncentrace solí a obsah vody v sýrech, teplota zrání). Jednotlivé frakce kaseinů jsou totiž odlišně náchylné ke změnám a rozsahu proteolýzy a v různých druzích sýrů mohou probíhat na odlišné úrovni. Současně se změnou textury kaseinové hmoty tak dochází i k tvorbě senzoricky významných lá-

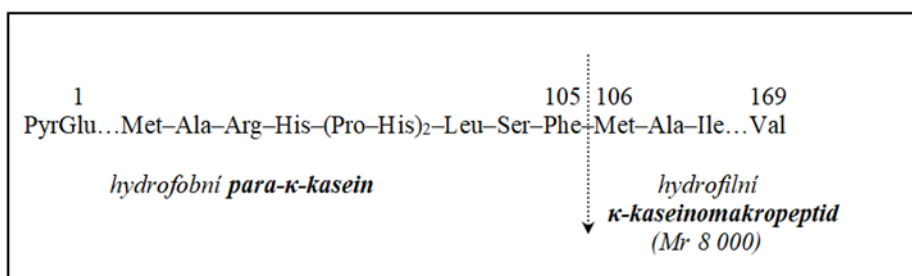
tek, které dávají jednotlivým typům sýrů charakteristickou chuť a vůni. Vedle nich však mohou vznikat nežádoucí hořké peptidy<sup>2-4</sup>.

### 2. Proteolýza kaseinu a tvorba hořkých peptidů

Proteolýza je považována za nejzásadnější biochemický proces při zrání sýrů u většiny druhů sýrů<sup>5,6</sup>. Proteolýza kaseinu začíná u sladkých sýrů při srážení mléka syřidlem (chymozinem), kdy dochází ke štěpení peptidické vazby  $\kappa$ -kaseinu mezi Phe<sub>105</sub> a Met<sub>106</sub> (obr. 1). Prvním z produktů tohoto štěpení je para- $\kappa$ -kasein, jenž obsahuje hydrofobní část molekuly  $\kappa$ -kaseinu, a proto zůstává součástí kaseinových micel. Na rozdíl od nativního  $\kappa$ -kaseinu však nemá pro micelu ochrannou funkci. Druhým produktem je glykomakropeptid ( $\kappa$ -kaseinmakropeptid), složený ze 64 zbytků aminokyselin, který přechází do syrovátky díky obsahu hydrofilní části  $\kappa$ -kaseinu s vázanými oligosacharidy. Para- $\kappa$ -kasein pak koaguluje v přítomnosti Ca<sup>2+</sup> iontů s ostatními složkami kaseinu, přičemž vápník působí ve sraženině jako spojovací element<sup>2,7-10</sup>.

Proteolýza kaseinu obecně probíhá ve třech základních stupních<sup>3,8</sup>. Z kaseinu se syřidlem, příp. proteolytickými enzymy čistých mlékařských kultur vytvoří peptidy o vysoké molekulové hmotnosti, které jsou převážně nehořké (obr. 2 – systém hydrolyzy 1, 1a). Molekulová hmotnost velkých peptidů je blízká hodnotě 20 000 Da.

Vysokomolekulární peptidy jsou hydrolyzovány proteasami čistých mlékařských kultur anebo syřidlem (obr. 2, způsob označený 2, 2a) na nízkomolekulární hořké peptidy. Ty ale mohou také vznikat přímou hydrolyzou



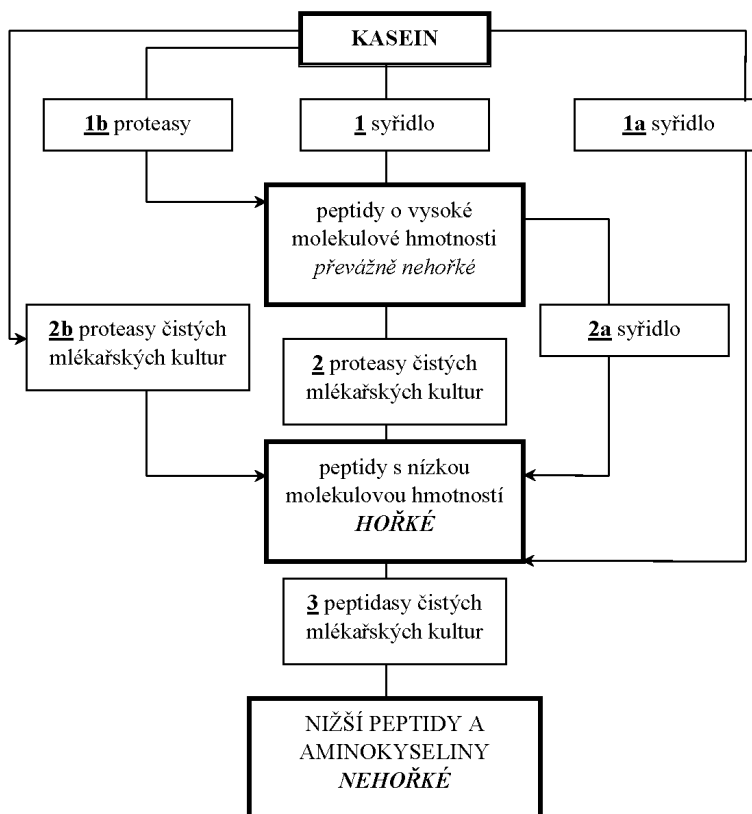
Obr. 1. Schéma specifického štěpení kaseinu účinkem syřidla<sup>5,17,31</sup>

kaseinu proteolytickými systémy čistých kultur (2b) nebo syřidlem (1a).

Následuje třetí stupeň proteolýzy, na kterém se podílejí peptidasy čistých mlékařských kultur, které hydrolyzují hořké peptidy na nižší nebořké peptidy a aminokyseliny. Ze schématu na obr. 2 je zřejmé, že pokud nemá hořkost přesáhnout postřehnutelnou mez, musí existovat rovnováha mezi rychlostí tvorby hořkých peptidů, tj. všech vstupů do druhého stupně proteolýzy, a jejich postupným odbouráváním, tj. rychlostí proteolýzy ve třetím stupni<sup>9</sup>. Je zná-

mo, že čisté mlékařské kultury, resp. jednotlivé druhy bakterií vyznačující se rychlou schopností prokysávání, jsou častou příčinou tvorby hořkých peptidů<sup>5,7,10</sup>.

Procesu degradace se v různých fázích zrání sýrů účastní proteolytické enzymy pocházející z několika zdrojů<sup>1,2,4,11</sup>. Jedná se především o vlastní proteasy mléka, zbytkové enzymy syřidla a proteolytické enzymy bakterií mléčného kvašení přidávaných do mléka ve formě čistých mlékařských kultur neboli zákysu v důsledku podstatného zničení přirozené mikroflóry při pasteraci. U sýrů vyrábě-



Obr. 2. Schéma vzniku hořkých peptidů podle Lawrieho a Lawrence<sup>7,10,34</sup>

ných ze syrového mléka se pak jedná o enzymy původních mikroorganismů mléka. Proteolytické enzymy bakterií mléčného kvašení zahrnují proteasy i peptidasy, takže dlouhé hořké peptidy, které jsou substrátem pro peptidasy zákysových bakterií, jsou právě jimi štěpeny na krátké peptidy a aminokyseliny (obr. 3). Tento proces musí být dokonale vyvážen, protože disproporce mezi tvorbou a odbouráváním dlouhých peptidů vede ke vzniku nežádoucí hořké chuti<sup>3,6,12–17</sup>.

Hlavní role syřidla při tvorbě hořkých peptidů a ve vývoji hořké chuti spočívá v produkci dlouhých peptidů, které jsou následně degradovány na krátké peptidy. Tvorba hořké chuti je vysvětlována tak, že v neporušených globulárních molekulách proteinu mohou být hlavní hydrofobní části řetězce ukryty uvnitř, a nemusí tak interagovat s buňkami chuťových receptorů. Pokud je protein enzymaticky hydrolyzován, dochází k odhalení postranních řetězců hydrofobních aminokyselin, které pak mohou interagovat s chuťovými buňkami receptorů. Současně se mění i velikost peptidů. Hydrofobní postranní řetězce dlouhých peptidů jsou ještě maskovány vůči některým typům hydrofobních interakcí. Nejčastější je struktura  $\alpha$ -helix, která závisí na pH a na charakteru postranních řetězců. Po další hydrolýze je odhalováno stále více hydrofobních postranních řetězců, hořkost se tak vyvíjí a je maximální, jestliže karboxylové skupiny a aminoskupiny hydrofobních aminokyselin jsou součástí peptidové vazby<sup>3,17–20</sup>.

Účinkem syřidla vznikají hořké peptidy jak z  $\alpha$ <sub>s1</sub>-kaseinu, tak z  $\beta$ -kaseinu, zatímco vlivem proteas bakterií mléčného kvašení se hořké peptidy tvoří většinou z  $\beta$ -kaseinu<sup>5,6,22–25</sup>. Vzhledem k tomu, že  $\beta$ -kasein má významnou úlohu i pro soudržnost kaseinových micel, je požadavek jeho regulované proteolýzy oprávněný (cit.<sup>5,12,22,26,27</sup>).

Také různé typy syřidel mohou být příčinou nadměrné tvorby hořkých peptidů, k jejichž odbourávání pak nestačí běžná aktivita přítomných enzymových systémů čistých mlékařských kultur. Vývoj hořké chuti má přímou

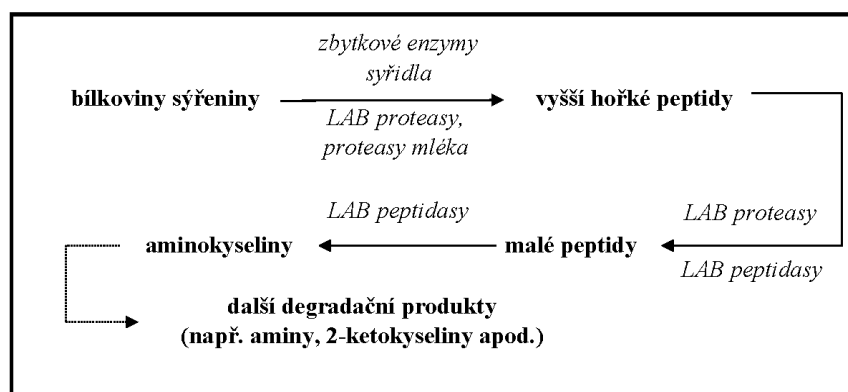
souvislost i se zbytkovou koncentrací syřidla v sýřenině. Vyšší množství syřidla, zachyceného v sýřenině, způsobuje vjem hořkosti sýra<sup>14,17,23</sup>.

### 3. Hořké peptidy z hlediska senzorické analýzy

Některá senzorická hodnocení peptidů poukazují na vztah mezi aminokyselinovým složením, strukturou, velikostí a chutí<sup>28–30</sup>. Mnoho L-aminokyselin chutná hořce, např. tyrosin, arginin, prolin, leucin, fenylalanin, tryptofan, isoleucin, přičemž jako nejvíce hořké jsou uváděny fenylalanin, tryptofan a tyrosin, jiné vyvolávají chuť sladkou, jako například alanin či serin. Peptidy tak mohou vyvolávat chuť hořkou i sladkou, ale také kyselou či umami<sup>10,15,31,32</sup>. Často bývá kyselá chuť spojována právě s chutí hořkou nebo hořkou a svíravou<sup>33</sup>. Ta bývá ovlivněna kaseinovými frakcemi o molekulové hmotnosti 2000–18 000 Da (cit.<sup>34</sup>).

Hořká chuť v sýrech se tak zdá být způsobena akumulací krátkých hořkých peptidů, vznikajících enzymovou hydrolýzou kaseinu, kdy jejich vznik je ovlivněn celou řadou faktorů – kvalitou výchozí suroviny a syřidla, použitou mikroflórou, solením atd. (cit.<sup>17,32,35,36</sup>). Poudel a spol.<sup>37</sup> uvádí, že výskyt hořkých peptidů je častým problémem zejména při urychlování procesu zrání sýra čedar účinkem endoproteas.

Celková hladina hořkosti sýra závisí na relativní rychlosti, jakou jsou hořké peptidy formovány a jakou štěpeny na nehořké produkty. Akumulace hořkých peptidů probíhá velmi pomalu, ale postupně může překonat prahovou hodnotu pro vnímání hořké chuti. Tyto peptidy, pokud jsou v podprahové koncentraci, přispívají k plnějšímu chuťovému profilu sýra, což je potvrzeno skutečností, že byly izolovány jak z hořkých, tak nehořkých sýrů<sup>17,32,33,35</sup>.



Obr. 3. Obecná dráha proteolýzy při zrání sýrů<sup>7,8</sup>; LAB = bakterie mléčného kvašení (*Lactic Acid Bacteria*)

#### 4. Složení hořkých peptidů

Hořké peptidy obsahují různý počet vázaných aminokyselin, obvykle 2–23 (cit.<sup>38</sup>). Více hořkých peptidů bylo izolováno z enzymatických hydrolyzátů kaseinu než ze samotných sýrů (tab. I, cit.<sup>17,22</sup>).

Hořké peptidy pocházejí přednostně z hydrofobních oblastí kaseinu. U  $\alpha_{s1}$ -kaseinu jsou to frakce 14–34, 91–101 a 143–151, zatímco u  $\beta$ -kaseinu se většinou jedná o sekvenci 46–90 nebo potom hydrofobní C-konec řetězce (tj. fragmenty 196–209, 193–209, 202–209). Nejčastěji zmiňovaným hořkým peptidem v sýrech (většinou čedaru) je frakce 193–209 (Val-Pro-Tyr-Pro-Gln-Agr-Asp-Met-Pro-Ile-Gln-Ala-Phe-Leu-Leu-Tyr-Gln) z  $\beta$ -kaseinu<sup>24,25,39–42</sup>.

Hořkost peptidů obvykle klesá spolu se snižující se hodnotou hydrofobicity na C-konci řetězce, zejména, je-li na N-konci peptidu umístěna bazická aminokyselina (např. arginin). Naopak intenzita hořkosti je u peptidů posilována přítomností leucinu, fenylalaninu a tyrosinu<sup>8,20</sup>, obzvláště jsou-li napojeny na C-konci peptidu<sup>8,41</sup>.

Peptidy obsahující ve své struktuře prolin jsou často označovány jako hořké. Pro hořkou chuť je důležité, aby postranní řetězec aminokyseliny obsahoval nejméně 3 atomy uhlíku<sup>3,8,14</sup>.

Z publikovaných výzkumů dále vyplývá, že v hořkých peptidech bývají nejvíce obsaženy hydrofobní L-aminokyseliny leucin, isoleucin, prolin, valin, fenylalanin, tyrosin a tryptofan, často je přítomna i kyselina glutamová, zatímco sirmé aminokyseliny cystein a většinou methionin chybí<sup>24,25,43</sup>.

Na hořkou chuť nemá vliv specifická sekvence aminokyselin<sup>28–30</sup>. Hořké peptidy jsou odštěpovány z určitých oblastí kaseinových řetězců, které se vyznačují zvýšenou

hodnotou hydrofobicity, takže hořkost peptidů často souvisí právě s přítomností vysokého obsahu aminokyselin s hydrofobním postranním řetězcem, popř. aromatických aminokyselin<sup>12,20,44</sup>.

Pro určení, zda je daný peptid hořký či ne, lze aplikovat tzv. Neyovo pravidlo (též značené jako Q-pravidlo), které je definováno následující rovnicí ( $I$ )<sup>10</sup>:

$$Q = \frac{\sum \Delta f_t}{n} \quad [\text{J mol}^{-1}] \quad (1)$$

kde  $Q$  je průměrná hodnota hydrofobicity peptidů,  $\Delta f_t$  volná energie přenosu postranního řetězce aminokyseliny z vody do organického rozpouštědla (tabelováno) a  $n$  počet aminokyselinových zbytků v peptidu. Hodnoty  $\Delta f_t$  pro 17 aminokyselin znázorňuje tab. II (cit.<sup>8,10</sup>).

Jedná se o empirické pravidlo, podle něhož hořké kaseinové peptidy mají průměrnou hydrofobicitu vztahenou na jednu aminokyselinu vyšší než 5860 J mol<sup>-1</sup>, zatímco fragmenty s hodnotou této veličiny nižší než 5440 J mol<sup>-1</sup> hořké nejsou. Platnost tohoto pravidla byla ověřena do molekulové hmotnosti 6000 Da. Peptidy nad touto hodnotou vnímány jako hořké nejsou, neboť nemožou interagovat s chuťovými receptory<sup>3,8,14,21,23</sup>. Mezi chuťovými receptory a hořkou látkou totiž dochází ke dvoubodové interakci, která je realizována velkou a výrazně hydrofobní částí molekuly a polární skupinou, jež mají navzájem určité sterické uspořádání<sup>24,39,41</sup>. Intenzita hořkosti je slabší, jsou-li hydrofobní aminokyseliny lokalizovány v koncových pozicích, a nejslabší, když jsou aminokyseliny volné. Tripeptidy jsou více hořké než dipeptidy a dipeptidy jsou více hořké než odpovídající volné aminokyseliny<sup>25,40,41</sup>.

Tabulka I

Některé hořké peptidy, izolované z enzymatických hydrolyzátů kaseinu<sup>24,25,39–42</sup>

Peptid	Počet aminokyselin
Leu-Trp	2
cyklo-Leu-Trp-Leu-Trp	4
Gly-Pro-Phe-Pro-Val-Ile	6
Arg-Gly-Pro-Pro-Phe-Ile-Val	7
Gln-Asp-Lys-Ile-His-Pro-Phe	7
Pro-Ala-Leu-Pro-Glu-Tyr-Leu-Lys	8
Phe-Ala-Leu-Pro-Gln-Tys-Leu-Lys	8
Arg-Gly-Pro-Phe-Pro-Ile-Ile-Val	8
Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn-Ser	9
Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Pro-Gly-Ile-Asn-His	10
Phe-Phe-Val-Ala-Pro-Phe-Pro-Glu-Val-Phe-Gly-Lys	12
Pro-Gln-Agr-Asp-Met-Pro-Ile-Gln-Ala-Phe-Leu-Leu-Tyr-Gln	14
Tyr-Gln-Gln-Pro-Val-Leu-Gly-Pro-Val-Arg-Gly-Pro-Phe-Pro-Ile	15
Gly-Pro-Phe-Pro-Val-Ile-Pro-Pro-Val-Ala-Pro-Pro-Glu-Val-Pro-Gly-Lys	17
Ala-Gln-Thr-Gln-Ser-Leu-Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn-Ser-Leu-Pro-Gln-Asn-Ile-Pro-Pro-Leu-Thr-Gln	27

Tabulka II  
Hodnoty  $\Delta f_i$  pro jednotlivé aminokyseliny<sup>8,10</sup>

Aminokyselina	$\Delta f_i$ [J mol <sup>-1</sup> ]
Glycin (Gly)	0
Serin (Ser)	167
Threonin (Thr)	1841
Histidin (His)	2092
Kyselina asparagová (Asp)	2260
Kyselina glutamová (Glu)	2302
Arginin (Arg)	3055
Alanin (Ala)	3055
Methionin (Met)	5440
Lysin (Lys)	6277
Valin (Val)	7072
Leucin (Leu)	10 127
Prolin (Pro)	10 964
Fenylalanin (Phe)	11 089
Tyrosin (Tyr)	12 010
Izoleucin (Ile)	12 428
Tryptofan (Trp)	12 554

Samotný kasein vykazuje hodnotu hydrofobicity  $Q = 6697 \text{ J mol}^{-1}$ , hořký není, principiálně však může štěpením na kratší řetězce hořké peptidy poskytovat<sup>24,25</sup>.

## 5. Analýza a stanovení hořkých peptidů v sýrech

Technologická opatření vedoucí k zabránění tvorby hořké chuti v sýrech vycházejí z nezbytného posouzení, zda se vznikající hořký peptid v sýru akumuluje, nebo zda je dále hydrolyzován na nehořké fragmenty.

Pro kontrolu proteolýzy a celého zračního procesu sýrů je důležitý vhodně zvolený postup izolace a stanovení peptidů v jednotlivých stádiích zralosti sýrů. Stanovení peptidů se obecně skládá ze tří hlavních fází: extrakce dusíkatých látek ze sýra, jejich frakcionace a následné analýzy. Hořké peptidy přecházejí do vodného extraktu, který je obvykle frakcionován podle rozpustnosti nebo podle velikosti molekuly<sup>45–47</sup>. Pomocí RP-HPLC jsou separovány jednotlivé peptidy, které jsou finálně identifikovány Edmanovým odbouráváním nebo hmotnostní spektrometrií. Pokud jsou předmětem separace hořké peptidy, je intenzita hořké chuti jednotlivých frakcí porovnávána s chutí standardních roztoků chininu nebo kofeinu<sup>48–51</sup>.

Izolace hořkých peptidů ze sýrů může být prováděna např. chloroform-methanolovou extrakcí a následným dělením peptidové frakce gelovou filtrací na Sephadexu G-25. Jednotlivé frakce se pak senzoričky ohodnotí. Michaelidou a spol.<sup>52</sup> publikovali závěr, kdy v hořké frakci zjistili významně vyšší podíl kyseliny glutamové a fenylalaninu.

Jiným řešením vedle této klasické metody je použití vodné extrakce podle Kuchrooa a Foxe<sup>8,23,52–55</sup> s následným oddělením vysokomolekulárních bílkovin srážením 70% ethanolom. Po odstředění bílkovin a vakuovém odpaření ethanolu lze takto získaný extrakt rozdělit gelovou chromatografií a jednotlivé frakce opět podrobit senzoričkému hodnocení. Nejvyšší intenzitu hořkosti za daných podmínek vykazovala frakce odpovídající molekulové hmotnosti přibližně 1400–2500 Da (cit.<sup>56</sup>).

V rámci jiné studie<sup>57</sup> byla pro identifikaci hořkých peptidů, vznikajících v průběhu zrání sýra Niva, aplikována metoda hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. Vodný extrakt, připravený výše zmíněným postupem podle Kuchrooa a Foxe a rozdělený na 7 frakcí, byl upraven extrakcí pevnou fází (SPE). Už z prvotního vyhodnocení naměřených hmotnostních spekter bylo zřejmé, že všechny peptidy se eluovaly hned na počátku extrakce. Z celkem 76 identifikovaných peptidů ve vodném extraktu sýra Niva bylo dle Neyova pravidla (*I*) vyhodnoceno 13 peptidů o 8–13 aminokyselinových zbytcích v řetězci jako hořkých. Z jednotlivých aminokyselin byly v hořkých peptidech nejčastěji zastoupeny prolin (25 %) a valin (12 %). Častější výskyt oproti ostatním aminokyselinám byl dále ještě zaznamenán u lysinu (10 %) a také u kyseliny glutamové (10 %). Zastoupen naopak vůbec nebyl tryptofan, přestože vykazuje vysokou hodnotu  $\Delta f_i$ , jeho chuť je popisována jako oříškově nahořklá<sup>58</sup> a v kaseinu se vyskytuje, i když v menší míře<sup>10</sup>. Další absentující aminokyselinou byla kyselina asparagová, jejíž chuť je definována jako sýrově nasládlá<sup>58</sup>. Metoda MALDI-TOF-MS je rychlá a vhodná pro analýzu specifických peptidů v sýru a může být efektivně využita pro hodnocení zrání sýra a screening aktivity kultur snižujících hořkost<sup>59</sup>.

Kolektiv autorů Karametsi a spol.<sup>60</sup> při studiu látek odpovědných za hořkou chuť vyzrálého sýra čedar k frakcionaci kromě gelové permeační chromatografie využil též multidimenzionální semipreparativní HPLC na reverzní fázi. Následně bylo tandemovou hmotnostní spektrometrií identifikováno 5 peptidů s nejvyšší vnímanou intenzitou hořkosti, všechny pocházející z  $\beta$ -kaseinu. Senzorická analýza potvrdila, že hlavním přispěvatelem k intenzitě hořkosti studovaného čedaru byl peptid GPVGRGPFPIIV (cit.<sup>60</sup>).

Výskyt nežádoucí hořké chuti byl zkoumán též u sýra Ragusano<sup>61</sup>. Kromě zavedených chromatografických metod byla využita i elektroforetická technika urea-PAGE. Primární proteolýza byla shledána významně vyšší u hořkých sýrů ve srovnání s referenčními vzorky. Peptidy separované RP-HPLC odhalily, že velké a významné rozdíly v peptidových profilech rozpustných frakcí mezi hořkými a referenčními sýry byly způsobeny hlavně mnohem vyšším podílem hydrofobních peptidů u hořkých sýrů. Rozsáhlá degradace kaseinů a primárních peptidů aktivitami proteas vedla k produkci významného množství malých a středně velkých hydrofobních peptidů, které nebyly uspokojivě rozštěpeny peptidasami mikroflóry, a hromadily se v sýru, což přispívalo k jeho hořké chuti. Bylo zjištěno, že přítomnost těchto sloučenin v hořkých sýrech vý-

znamně souvisí s vysokým obsahem soli a nízkou aktivitou vody, které snižují enzymatickou aktivitu mikroflóry, důležitou při sekundární proteolýze<sup>61</sup>.

## 6. Možnosti regulace výskytu hořkých peptidů u sýrů

Peptidasy některých kmenů bakterií mléčného kvašení jsou v rámci této skupiny při degradaci hořkých peptidů významně účinnější<sup>62–66</sup>, čehož lze využít již při prvotní volbě vhodných kultur ovlivňujících průběh zrání.

Do plísňových sýrů byly s úspěchem použity např. bakterie *Brevibacterium linens*, které vykazují vysokou proteolytickou aktivitu a hydrolyzují hořké peptidy<sup>12,67</sup>.

Bakterie rodu *Lactococcus* se vyznačují tím, že produkují enzym laktocepin, který má tři frakce a který – stejně jako plazmin či chymozin – vykazuje hydrolytické vlastnosti. Právě rozdíly v přítomnosti a formě laktocepinů mohou částečně vysvětlit, proč některé laktocepino-pozitivní kyselobakterie mléčného kvašení rodu *Lactococcus* mají vyšší tendence způsobovat hořkost sýra, a je tedy třeba věnovat řádnou pozornost výběru konkrétního kmene<sup>68</sup>. Také ultrafiltrace mléka před výrobou sýrů a použití kultur produkujících exopolysacharidy, s dobrou peptidolytickou aktivitou, vede k efektivnímu odstranění hořkosti ze sýrů<sup>32</sup>.

Rovněž akceptovatelné snížení významného podílu soli v sýru je řešeno, neboť toto hraje klíčovou roli v rozvoji hořké chuti během procesu zrání sýrů. Z práce Khetra a spol.<sup>69</sup> se předpokládá snížení obsahu sodíku v sýru čedar použitím draselné alternativy soli v kombinaci se zvýrazňovací chuti a blokátory hořkosti. V rámci tohoto experimentu byl vyhodnocen sýr s nízkým obsahem sodíku (75% substituce chloridu sodného), 2 g l<sup>-1</sup> hydrolyzovaného rostlinného proteinu a 300 mg l<sup>-1</sup> adenosin-5'-monofosfátu jako nejlepší bez negativního vlivu na jeho senzoryckou kvalitu<sup>69</sup>.

## 7. Závěr

Problematika hořké chuti sýrů je poměrně složitá, a hlavně komplexní záležitost. Tato práce se zaměřila na skupinu tzv. hořkých peptidů jako na jeden ze zásadních faktorů v této oblasti. Hořké peptidy se formují během proteolýzy, která je považována za nejvýznamnější biochemický proces při zrání většiny druhů sýrů. Nelze však opomenout, že hořká chuť sýra může být způsobena a ovlivňována i řadou jiných složek, zejména rozkladnými produkty lipidů. Dokonale technologicky zvládnutý proces zrání je tedy nezbytný pro vznik jakostního sýra s charakteristickými a žádoucími senzoryckými vlastnostmi.

## LITERATURA

1. Pinheiro J. S., Siqueira Souza Sudré B. G., Silveira Alexandre A. C., Campolina G. A., Correia E. F., de

- Souza Costa Sobrinho P.: *Int. J. Gastron. Food Sci.* 24, 100331 (2021).
2. Xia Y., Yuan R., Weng S.: *Food Res. Int.* 137, 109657 (2020).
3. Tekin A., Hayaloglu A. A.: *Int. Dairy J.* 137, 105508 (2022).
4. Khattab A. R., Guirguis H. A., Tawfik S. M., Farag M. A.: *Trends Food Sci. Technol.* 88, 343 (2019).
5. Öztürk H., Akın N.: *J. Dairy Sci.* 104, 3832 (2021).
6. Baptista D. P., Gigante M. L.: *Appl. Food Res.* 2, 100107 (2022).
7. Fox P. F., McSweeney P. L. H.: *Food Rev. Int.* 12, 457 (1996).
8. Ardö Y., McSweeney P. L. H., Magboul A. A. A., Upadhyay V. K., Fox P. F., v knize: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 4. vyd. str. 445. Academic Press, Amsterdam 2017.
9. Priyashantha H., Höjer A., Saedén K. H.: *Food Control* 130, 108316 (2021).
10. McSweeney P. L. H.: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 3 vyd. Elsevier, Amsterdam 2022.
11. Gobetti M., de Angelis M., di Cagno R., Mancini L., Fox P. F.: *Trends Food Sci. Technol.* 45, 167 (2015).
12. Fox P. F., Uniacke-Lowe T., McSweeney P. L. H., O'Mahony J. A.: *Dairy Chemistry and Biochemistry*, 2. vyd. Springer, Cham 2015.
13. Faccia M., Natrella G., Gambacorta G., Trani A.: *J. Dairy Sci.* 105, 140 (2022).
14. Fallico V., McSweeney P. L. H., Horne J.: *J. Dairy Sci.* 88, 1288 (2005).
15. Wilkinson M. G., Doolan I. A., Kilcawley K. N., v knize: *Encyclopedia of Dairy Sciences*, str. 166, Elsevier, Amsterdam 2022.
16. Nuñez M., v knize: *Encyclopedia of Dairy Sciences*, str. 648, Elsevier, Amsterdam 2022.
17. Mayer H. K.: *Int. Dairy J.* 11, 4 (2001).
18. Galli B. D., Baptista D. P., Cavalheiro F. G., Negrão F., Eberlin M. N., Gigante M. L.: *Food Res. Int.* 123, 393 (2019).
19. Alim A., Song H., Raza A., Hua J.: *Int. Dairy J.* 110, 104803 (2020).
20. Broadbent J. R., Strickland M., Weimer B. C., Johnson M. E., Steele J. L.: *J. Dairy Sci.* 81, 327 (1998).
21. Yang W., Hao X., Zhang X.: *LWT* 141, 110866 (2021).
22. Picon A., Gaya P., Nuñez M.: *Int. Dairy J.* 17, 218 (2007).
23. Michaelidou A., Alichanidis E., Urlaub H., Polychroniadou A., Zerfiridis G. K.: *J. Dairy Sci.* 81, 3109 (1998).
24. Murray N. M., O'Riordan D., Jacquier J. C.: *J. Dairy Sci.* 101, 2826 (2018).
25. Charoenkwan P., Yana J., Schaduengrat N., Nantase-namat C., Hasan M. M., Shoombuatong W.: *Genomics* 112, 2813 (2020).
26. Jaros D., Rohm H., v knize: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 4. vyd., str. 53. Academic Press 2017.

27. Li Q., Zhao Z.: *Food Chem.* 291, 231 (2019).
28. Kato H., Rhue M. R., Nishimura T.: *Flavour Chem.* 388, 158 (1989).
29. Roudot-Algaron F.: *Lait* 76, 313 (1996).
30. le Quéré J. L., Septier C., Demaizières D., Salles C.: *Flavour Sci.* 325 (1996).
31. D’Incecco P., Hogenboom J. A., Rosi V., Cabassi G., Pellegrino L.: *Food Chem.* 370, 131043 (2022).
32. Agrawal P., Hassan A. N.: *J. Dairy Sci.* 90, 3110 (2007).
33. Chobert J. M.: *Adv. Food Nutr. Res.* 47, 1 (2003).
34. Pihlanto A., Korhonen H.: *Adv. Food Nutr. Res.* 47, 175 (2003).
35. Khetra Y., Kanawjia S. K., Puri R., Kumar R., Meena G. S.: *Int. Dairy J.* 91, 165 (2019).
36. Rako A., Tudor Kalit M., Rako Z., Zamberlin S., Kalit S.: *LWT* 162, 113506 (2022).
37. Poudel R., Thunell R. K., Oberg C. J.: *J Dairy Sci.* 105, 2069 (2022).
38. Schäfer J., Sebald K., Dunkel A.: *Int. Dairy J.* 93, 72 (2019).
39. Gao Y., Wu X., McClements D. J.: *Food Chem.* 386, 132787 (2022).
40. Fan M., Guo T., Li W.: *Food Sci. Hum. Wellnes* 8, 156 (2019).
41. Rajagopalan A., Aluru V., Omana Sukumaran B.: *Int. Dairy J.* 115, 104934 (2021).
42. Sarabandi K., Sadeghi Mahoonak A., Hamishekar H., Ghorbani M., Jafari S. M.: *J. Food Eng.* 237, 86 (2018).
43. Höhme L., Fischer C., Kleinschmidt T.: *Food Chem.* 404, 134527 (2023).
44. Sutay Kocabaş D., Lyne J., Ustunol Z.: *Trends Food Sci. Technol.* 119, 467 (2022).
45. Salvat-Brunaud D., Maubois J. L., le Graët Y.: *Lait* 75, 239 (1995).
46. Lemieux L., Simard R. E.: *Lait* 72, 335 (1992).
47. Salles C., Septier C., Roudot-Algaron F., Guillot A., Etiévant P. X.: *J. Agric. Food Chem.* 43, 1659 (1995).
48. Bütikofer U., Baumann E., Sieber R., Bosset J. O.: *LWT – Food Sci. Technol.* 31, 297 (1998).
49. Champion H. M., Stanley D. W.: *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 15, 283 (1982).
50. McSweeney P. L. H., Fox P. F.: *Lait* 77, 41 (1997).
51. Gouldsworthy A. M., Leaver J., Banks J. M.: *Int. Dairy J.* 6, 781 (1996).
52. Michaelidou A. M., Alichanidis E., Polychroniadou A., Zerfiridis G.: *Int. Dairy J.* 15, 663 (2005).
53. Březina P., Cikánek D., Pločková M., Schovánková I., Kopečný J.: *Mlékařské Listy* 14, 303.55 (1988).
54. Silva S., Malcata F. X.: *J. Dairy Sci.* 88, 1947 (2005).
55. Silva D. D. da, Lima M. dos S. F. de, Silva M. F. da: *LWT* 108, 97 (2019).
56. Cikánek D., Březina P., Pavlíková Š.: *Mlékařské Listy* 51, 84.6 (1990).
57. Zemanová J.: *Stanovení látek bílkovinné povahy v potravinářských materiálech. Disertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Brno* 2005.
58. Salles C., Hervé C., Septier C.: *Food Chem.* 68, 429 (2000).
59. Soeryapranata E., Powers J. R., Hill H. H., Siems III W. F., Al-Saad K. A., Weller K. M.: *J. Food Sci.* 67, 534 (2006).
60. Karametsi K., Kokkinidou S., Ronningen I., Peterson D. G.: *J. Agric. Food Chem.* 62, 8034 (2014).
61. Fallico V., McSweeney P. L. H., Horne C., Pediliggieri C., Hannon J. A., Carpino S., Licitra G.: *J. Dairy Sci.* 88, 1288 (2005).
62. Bergamini C., Hynes E. R., Candioti M. C., Zalazar C. A.: *J. Dairy Sci.* 92, 2455 (2009).
63. Bergamini C., Hynes E. R., Palma S. B., Sabbag N. G., Zalazar C. A.: *Int. Dairy J.* 19, 467 (2009).
64. Lee B. H., Laleye L. C., Simard R. E., Munsch M.-H., Holley R. A.: *J. Food Sci.* 55, 391 (1990).
65. Arora G., Lee B. H.: *J. Dairy Sci.* 73, 274 (1990).
66. Habibi-Najafi M. B., Lee B. H.: *J. Dairy Sci.* 77, 385 (1994).
67. Croguennec T., Jeantet R., Schuck P.: *Handbook of Food Science and Technology 3: Food Biochemistry and Technology*. J. Wiley, Hoboken 2016.
68. Pillidge C. J., Crow V. L., Coolbear T., Reid J. R.: *Int. Dairy J.* 13, 345 (2003).
69. Khetra Y., Kanawjia S. K., Puri R.: *LWT* 72, 99 (2016).

**J. Zemanová<sup>a</sup> and K. Šustová<sup>b</sup>** (<sup>a</sup> *Department of Food Technology, Faculty of AgriSciences, Mendel University of Brno;* <sup>b</sup> *AMBIS Prague*): **The Problem of Bitter Peptides Formed in the Process of Cheese Ripening**

Bitter peptides are formed by the breakdown of proteins and high-molecular peptides during proteolysis. Their formation in cheeses is related to the proteolytic activity of rennet in balance with the peptidase activity of microbial enzymes of lactic acid bacteria. The bitter taste then arises when there is a disproportion between the formation and degradation of bitter peptides by increasing their concentration above the perception threshold. The extent to which bitter peptides affect the overall taste of cheese depends on the balance between their formation and breakdown to non-bitter lower peptides and amino acids. Only a perfectly balanced proteolysis process enables the creation of quality matured cheese with a characteristic taste and aroma. Therefore, a complete clarification of the mechanism is desirable, and thus also the possibility of control and regulation of this process.

**Keywords:** bitter peptides, cheese ripening, casein proteolysis, bitter taste