



**Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně**  
**Fakulta technologická**

Ing. Vendula Pachlová

**DISTRIBUCE VYBRANÝCH SLOŽEK  
V PŘÍRODNÍM SÝRU V PRŮBĚHU JEHO ZRÁNÍ**

**THE DISTRIBUTION OF SELECTED COMPONENTS IN CHEESE  
DURING RIPENING**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Program: P2901 Chemie a technologie potravin

Obor: 2901V013 Technologie potravin

Školitel: doc. Ing. František Buňka, Ph.D.

Konzultant: doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Zlín, 2011

*Motto:*

„Základem charakteru je vůle.“

Oscar Wilde

*Poděkování:*

Na tomto místě bych ráda poděkovala mému školiteli doc. Ing. Františkovi Buňkovi, Ph.D. a také své konzultantce doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za cenné rady a připomínky, odborné vedení, trpělivost a čas, které mi věnovali. Dále chci poděkovat mým kolegům, kteří se podíleli na některých analýzách, nebo mi poskytli významné poznatky a zkušenosti ze svých výzkumů. Děkuji také doc. RNDr. Ivu Sedláčkovi, CSc. a RNDr. Pavlovi Švecovi, Ph.D. z České sbírky mikroorganismů v Brně za spolupráci při identifikaci mikroorganismů. Mé díky patří i mým blízkým a přátelům, kteří mi důvěřovali a po celou dobu studia mi vyjadřovali svoji morální podporu.

Tato práce byla finančně podpořena Výzkumným záměrem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky „Multifunkční kompozitní soustavy na bázi přírodních a syntetických polymerů“ (MSM 7088352101).

## ABSTRAKT

Předložená práce se zabývá problematikou zrání přírodních sýrů eidamského typu. Cílem práce bylo sledovat distribuci vybraných složek v přírodním sýru v průběhu zrání. Byly srovnány účinky různých teplot zrání/skladování na průběh zracích procesů. Experimenty byly zaměřené na (i) studium vlivu snížené teploty na průběh zrání přírodních sýrů; (ii) vývoj vybraných texturních vlastností v různých částech eidamské cihly zrající při optimálních podmínkách; (iii) průběh zrání sýrů holandského typu akcelerovaného zvýšenou teplotou. Pro analýzy byly použity chemické (obsah sušiny, NaCl, volných aminokyselin, vybraných biogenních aminů, SDS-PAGE analýza, pH), texturní a mikrobiologické metody a rovněž sensorická analýza (hodnocení pomocí stupnice, pořadová zkouška). Z výsledků vyplynulo, že teplota zrání má přímý dopad na proteolytickou aktivitu (uvolňování jednotlivých aminokyselin z proteinů jako významných prekurzorů sensoriky aktivních látek) a také vývoj texturních vlastností sýra. Práce dále prokázala rozdílnou intenzitu zracích procesů v různých částech sýra. Předmětem práce bylo také sledování produkce biogenních aminů ve zrajících sýrech eidamského typu, kde byly detekovány tyramin, putrescin a kadaverin. Histamin jako nejběžnější biogenní amin nebyl prokázán v žádném ze sledovaných skupin vzorků. Jako původci biogenních aminů byly označeny fakultativně anaerobní zástupci nezákysových kultur z rodu *Lactobacillus* (zejména *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum* a *Lactobacillus curvatus*). Obsah biogenních aminů rostl se zvyšující se teplotou zrání/skladování a naopak.

Klíčová slova: přírodní sýr; zrání; chemická; texturní; mikrobiální a sensorická analýza

## ABSTRACT

The thesis is focused on ripening of Dutch-type cheese. The aim of the work was to observe distribution of selected components in cheese during ripening. The selected storage temperature conditions which can affect the distribution of selected components were compared. Performed experiments were focused on (i) effect of lower storage temperature on cheese quality; (ii) development of textural properties in different cheese parts during ripening under optimal temperature condition; (iii) ripening process of Dutch-type cheese after acceleration with elevated temperature. The chemical (contents of dry matter, NaCl, free amino acids, biogenic amines, SDS-PAGE, pH), textural, microbiological and sensory analyses (scale assessment, and ranking test) were applied. The result showed that ripening temperature has direct impact on proteolytic activity (release of individual amino acids from proteins as important precursors of flavour compounds) and also progress of textural properties of cheese. The thesis established different intensity of ripening process in various parts of the cheese. The work has also dealt with observation of biogenic amines production in ripening Dutch-type cheese. Tyramine, putrescine and cadaverine were detected during this observation. Histamine, the most common biogenic amine, was not found in any of the investigated groups of samples. As the producers of biogenic amines have been indicated non starters facultative anaerobic cultures of genus *Lactobacillus* (especially *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus curvatus*). Content of biogenic amines increased with increasing temperature of ripening/storage and vice versa.

**Keywords:** Dutch-type cheese; ripening; chemical; textural; microbiological and sensory analysis

# OBSAH

<b>OBSAH .....</b>	<b>4</b>
<b>SEZNAM ILUSTRACÍ.....</b>	<b>6</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>9</b>
<b>POUŽITÉ SYMBOLY A ZKRATKY .....</b>	<b>10</b>
<b>1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....</b>	<b>11</b>
1.1. Technologie výroby přírodních sýrů .....	11
1.2. Zrání sýrů .....	15
1.2.1. Hlavní procesy probíhající během zrání sýrů .....	15
1.2.2. Stručná charakteristika biogenních aminů v přírodních sýrech.....	27
1.2.3. Vliv procesů probíhajících při zrání na vývoj vybraných vlastností sýru .....	28
1.3. Metody akcelerace zrání sýrů.....	31
<b>2. CÍL PRÁCE .....</b>	<b>34</b>
<b>3. ZVOLENÉ METODY ZPRACOVÁNÍ .....</b>	<b>35</b>
3.1. Popis experimentů .....	35
3.1.1. Experiment 1 .....	35
3.1.2. Experiment 2.....	36
3.1.3. Experiment 3.....	37
3.2. Mikrobiologický rozbor .....	37
3.3. Chemická analýza.....	38
3.4. Stanovení obsahu volných aminokyselin .....	38
3.5. Stanovení obsahu biogenních aminů.....	39
3.6. SDS-PAGE analýza.....	39
3.7. Analýza texturních vlastností .....	40
3.8. Sensorická analýza .....	42
3.9. Statistické vyhodnocení výsledků .....	43
<b>4. VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>44</b>
4.1. Výsledky a diskuze experimentu 1 .....	44
4.1.1. Mikrobiální analýza .....	44
4.1.2. Základní chemická analýza.....	49
4.1.3. Stanovení obsahu volných aminokyselin.....	51
4.1.4. Stanovení obsahu biogenních aminů .....	56
4.1.5. SDS-PAGE analýza .....	61
4.1.6. Analýza texturních vlastností.....	64
4.1.7. Sensorická analýza .....	65
4.2. Výsledky a diskuze k experimentu 2.....	66
4.2.1. Základní chemická analýza.....	66

4.2.2. Stanovení texturních vlastností.....	68
4.3. Výsledky a diskuze experimentu 3.....	74
4.3.1. Mikrobiologická analýza .....	75
4.3.2. Základní chemická analýza.....	76
4.3.3. Stanovení obsahu volných aminokyselin.....	77
4.3.4. Stanovení obsahu biogenních aminů .....	80
4.3.5. Stanovení texturních vlastností.....	84
4.3.6. Senzorická analýza .....	92
<b>5. PŘÍNOS PRÁCE PRO VĚDU A PRAXI.....</b>	<b>93</b>
<b>6. ZÁVĚR .....</b>	<b>95</b>
<b>7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>97</b>
<b>8. SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA .....</b>	<b>110</b>
<b>9. CURRICULUM VITAE .....</b>	<b>112</b>
<b>10. SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>113</b>

## SEZNAM ILUSTRACÍ

Obr. 1.1	Obecné znázornění metabolismů, které působí během zrání sýrů .....17
Obr. 1.2	Schématicky znázorněný metabolismus laktátu během zrání sýrů .....18
Obr. 1.3	Schématicky znázorněný katabolizmus volných mastných kyselin .....20
Obr. 1.4	Schématické znázornění metabolismu dusíku prostřednictvím bakterií mléčného kvašení .....22
Obr. 1.5	Schématické znázornění peptidáz nalezených v bakteriích mléčného kvašení .....23
Obr. 1.6	Souhrn biochemických dějů vedoucích k vytváření sensoricky aktivních látek prostřednictvím metabolismu aminokyselin .....26
Obr. 1.7	Aminokyseliny jako prekurzory biogenních aminů .....27
Obr. 3.1	Schématické znázornění odběru středového pásu a jeho rozdělení na 4 vrstvy Experimentu 1 .....36
Obr. 3.2	Schématické znázornění odběru tří pásů (S1, S2 a S3) a jeho rozdělení na 3 vrstvy Experimentu 2 a 3 .....37
Obr. 3.3	Schématické znázornění 13 míst, kde byl proveden stress test .....41
Obr. 3.4	Typická zátěžová křivka závislosti síly $F_t$ na čase $t$ získaná ze stress testu .....41
Obr. 3.5	Grafické znázornění transformací prováděných v rámci Pelegova modelu .....42
Obr. 4.1	Vývoj obsahu sušiny (část A) a difúze NaCl (část B) ve vzorku uloženém ve zracím sklepě při $10 \pm 2$ °C .....50
Obr. 4.2	Obsah volných aminokyselin ( $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) v jednotlivých vrstvách eidamské cihly v závislosti na době zrání (dny) .....52
Obr. 4.3	Obsah tyraminu ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) v eidamské cihle v závislosti na době zrání (dny) .....58

Obr. 4.4	Obsah putrescinu ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) v eidamské cihle v závislosti na době zrání (dny) .....	59
Obr. 4.5	Obsah kadaverinu ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) v eidamské cihle v závislosti na době zrání (dny) .....	60
Obr. 4.6	Dendrogram shlukové analýzy výsledků proteinového profilu I. a IV. vrstvy sýrů eidamského typu skladovaného po celou dobu zrání ve zracím slepě při $10\pm 2$ °C.....	62
Obr. 4.7	Dendrogram shlukové analýzy výsledků proteinového profilu IV. vrstev sýrů eidamského typu .....	63
Obr. 4.8	Vývoj tvrdosti vzorků eidamských cihel skladovaných za odlišných teplot v časovém intervalu 174 dnů .....	64
Obr. 4.9	Vývoj obsahu sušiny (% w/w; část A–C) a NaCl (% w/w; část D) v jednotlivých plátech (S1 – části A a D; S2 – části B a E; S3 – části C a F) a vrstvách eidamské cihly v průběhu zrací periody (dny) .....	67
Obr. 4.10	Diagram zobrazující hodnoty tvrdosti (N) pro každou ze 13 pozic v plátech S1, S2 a S3 testovaných v průběhu zrání .....	70
Obr. 4.11	Vývoj hodnot pH kontrolních vzorků (plné symboly) a vzorků skladovaných za zvýšené teploty (prázdné symboly) v jednotlivých vrstvách středového plátu S3 v závislosti na době zrání (dny) .....	77
Obr. 4.12	Celkový obsah FAA ( $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) kontrolních vzorků (plné symboly) a vzorků zrajících za zvýšené teploty (prázdné symboly) sýrů eidamského typu v jednotlivých vrstvách plátu S1 (část A), S2 (část B) a S3 (část C) v průběhu zrání (dny) .....	79
Obr. 4.13	Obsah tyraminu ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) kontrolních vzorků (plné symboly) a akcelerovaných (prázdné symboly) sýrů eidamského typu v jednotlivých vrstvách plátu S1 (část A), S2 (část B) a S3 (část C) v průběhu zrání (dny) .....	81
Obr. 4.14	Obsah putrescinu ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) kontrolních vzorků (plné symboly) a akcelerovaných (prázdné symboly) sýrů eidamského typu v jednotlivých vrstvách plátu S1 (část A), S2 (část B) a S3 (část C) v průběhu zrání (dny) .....	82
Obr. 4.15	Obsah kadaverinu ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) kontrolních vzorků (plné symboly) a akcelerovaných (prázdné symboly) sýrů eidamského typu	



v jednotlivých vrstvách plátu S1 (část A), S2 (část B) a S3 (část C)  
v průběhu zrání (dny) .....83

Obr. 4.16 Diagram znázorňující hodnoty tvrdosti (N) pro každou ze 13 pizic  
v plátech S1, S2 a S3, které byly testovány během zrání .....87

## SEZNAM TABULEK

Tab. 1	Počet mezofilních aerobních a fakultativně anaerobních bakterií (TC) a bakterií mléčného kvašení (LAB) ve vrstvách středového plátu eidamské cihly v průběhu Experimentu 1 .....45
Tab. 2	Produkce biogenních aminů (tyramin, putrescin a kadaverin) izolovanými a identifikovanými mikroorganismy .....47
Tab. 3	Obsah volných aminokyselin ( $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) v jednotlivých vrstvách eidamské cihly skladované za 3 odlišných teplotních režimů – výsledky získané ze 49. a 168. dne .....54
Tab. 4	Hodnoty $k_1$ a $k_2$ parameterů získaných ze zátěžové křivky 13 pozic .....71
Tab. 5	Hodnoty $k_2$ parameterů získaných ze zátěžové křivky 13 pozic ( $n = 6$ ; průměr $\pm$ SD) v jednotlivých plátech sýra zrajícího při 10 °C a 16 °C (S1, S2 a S3) pomocí Pelegova modelu .....88

## POUŽITÉ SYMBOLY A ZKRATKY

ATP	Adenosintrifosfát
CFU	Colony forming unit (kolonie tvořící jednotky)
CoA	koenzym A
DAO	diaminooxidáza
EC	The Enzyme Commission number (klasifikační číslo enzymu)
FAA	Free amino acid (volné aminokyseliny)
FFA	Free fatty acid (volné mastné kyseliny)
LAB	Lactic acid bacteria (bakterie mléčného kvašení)
MAO	monoaminooxidáza
NAD(P)H	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NSLAB	Non-starter lactic acid bacteria (non-startérové bakterie mléčného kvašení)
PAO	polyaminooxidáza
SD	Standard deviation (standardní odchylka)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného)
TC	Total count (počet aerobních mezofilních a fakultativně anaerobních bakterií)
TVS	Tuk v sušině

# 1.SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Přírodní sýry patří k potravinám s vysokou nutriční hodnotou. Jsou významným zdrojem bílkovin, vápníku, fosforu, vitaminů rozpustných ve vodě a u sýrů s vyšším obsahem tuku i vitaminů rozpustných v tuku [1]. Sýr je dle vyhlášky Ministerstva zemědělství 77/2003 Sb., v platném znění, definován jako mléčný výrobek vyrobený vysrážením mléčné bílkoviny z mléka působením syřidla či jiných koagulačních činidel, prokysáním a oddělením podílu syrovátky [2].

Tradičně lze dělit sýry podle typu srážení na sladké (srážení proteinů převážně pomocí syřidel enzymatického charakteru), kyselé (kyselé srážení proteinů snížením pH k jejich izoelektrickému bodu) a smíšené (využívány jsou oba principy srážení). Sýry jsou následně charakterizovány podle obsahu vody v tukuprosté hmotě, dále obsahem tuku v sušině a způsobem zrání [2, 3]. Požadovaný obsah vody v tukuprosté hmotě sýra se dosahuje především vhodným zpracováním sýřeniny a lisováním. Obsah tuku v sušině je dán především standardizací suroviny (mléka). Oba parametry do značné míry určují výslednou konzistenci produktu [4].

## 1.1. Technologie výroby přírodních sýrů

Základní technologické operace všech sladkých přírodních sýrů jsou prakticky obdobné. Relativně malé změny parametrů ve výrobě (např. v teplotách, délkách jednotlivých operací, ve výběru čistých mlékárenských kultur aj.) mohou zapříčinit významné rozdíly v charakteru finálních výrobků. Kvalita výchozí suroviny je rozhodující pro správný vývoj mikrobiálních a biochemických procesů a použité mléko pro výrobu sýrů musí splňovat přísné hygienické normy (Nařízení EP a Rady ES 178/2002, 852 a 853/2004) [5 – 7].

Mléko je zpravidla podrobena filtraci a centrifugaci za účelem odstranění případných mechanických nečistot. Další operace, jako tepelné ošetření, použití membránových separačních metod, baktofugace a přidavek látek s antibakteriálními účinky (např. dusičnan draselný, lysozym, bakteriociny), ovlivňují mikroflóru a aktivitu nativních enzymů přítomných v syrovém mléce [4]. Pro výrobu přírodních sýrů se nejčastěji používá šetrná pasterace. Vyšší pasterační záhřevy (z hlediska teploty anebo doby její výdrže) jsou nevhodné z důvodu zhoršení syřitelnosti mléka a oddělování syrovátky, což činí problémy zejména při dosahování požadovaného obsahu sušiny.

Pro získání předepsaného obsahu sušiny, tuku, resp. tuku v sušině, se musí mléko před vlastním sýřením standardizovat [8]. Homogenizace tuku se při výrobě přírodních sýrů příliš nepoužívá. Výjimku představují sýry

s plísní v těstě, kde je vyžadována řízená lipolýza a kde homogenizace tuto lipolýzu podporuje. V důsledku této operace dochází také ke snížení ztrát tuku do syrovátky a zvyšuje se výtěžnost sýrů [9]. Důležitým krokem úpravy mléka před sýřením je přidavek čistých mlékárenských kultur (tzv. zákysových neboli startérových kultur), které svým metabolismem ovlivňují biochemické změny ve zrajícím sýru a přímo přispívají k vývoji aroma sýra [10]. Mezi primární (základní) kultury řadíme mezofilní kultury, a to například *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, které jsou součástí tzv. smetanového zákysu. Přidavek zákysových kultur bakterií mléčného kvašení je nezbytným předpokladem průmyslové výroby sýrů a ovlivňuje řadu faktorů ve výrobě. Účinek aktivity a metabolismu bakterií označovaných jako primární lze shrnout následovně [8, 11]:

- úprava kyselosti mléka a následně sýřeniny prostřednictvím fermentace laktózy na kyselinu mléčnou. Při tomto procesu dochází také ke změnám v poměru ionizovaného a koloidního vápníku, což ovlivní mimo jiné také kaseinové bílkoviny a aktivitu proteolytických enzymů,
- zabránění rozvoje nežádoucí mikroflóry (zejména hnilobných bakterií) a omezení aktivity některých enzymů účinkem kyseliny mléčné,
- zlepšení synereze,
- uplatnění proteolytické a lipolytické aktivity primárních kultur během zrání sýrů,
- utváření organoleptických vlastností prostřednictvím tvorby sensoricky aktivních sloučenin jako např. diacetyl, produkty proteolýzy a lipolýzy, resp. následných reakcí volných aminokyselin a mastných kyselin,
- vliv na texturu a konzistenci (především bobtnání kaseinové struktury, tvorba ok a proteolytické změny bílkovin).

U sýrů s vysokodohřivanou sýřeninou se jako primární kultury využívají termofilní bakterie (např. *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*). Sekundární (doplňkové) kultury jsou voleny v závislosti na druhu požadovaného výrobku. Patří sem například [8, 14]:

- *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei* – zejména u tvrdých a polotvrdých sýrů,
- *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*,
- *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*, *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* – ementálské typy sýrů,
- *Brevibacterium linens* spolu s kvasinkovými kulturami (např. zástupci rodu *Mycoderma*) – sýry s mazem na povrchu,
- *Penicillium camemberti*, *Penicillium caseicolum* – sýry s plísní na povrchu,
- *Penicillium roqueforti* – sýry s plísní v těstě.

Další skupinou mikroorganismů, které ovlivňují procesy zrání, jsou tzv. non-startérové bakterie mléčného kvašení (NSLAB; nezákysové kultury). Zdrojem NSLAB může být mléko nebo prostředí mlékárny. NSLAB významně přispívají k vývoji sensoricky aktivních látek během zrání sýru. Mezi NSLAB charakteristické pro jednotlivé typy sýrů patří například [12]:

- non-startérové laktobacily – obligátně homofermentativní laktobacily (*Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus*), fakultativně heterofermentativní laktobacily (např. *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus*), obligátně heterofermentativní druhy rodu *Lactobacillus* (např. *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*),
- rod *Pediococcus* – mezi nejčastější zástupce izolované ze sýrů patří *Pediococcus acidilactici* a *Pediococcus pentosaceus*,
- rod *Leuconostoc* spp.,
- rod *Enterococcus* – zástupci tohoto rodu jsou často považovány i za indikátory nedostatečné hygieny z důvodu jejich osídlení v gastrointestinálním traktu.

NSLAB ovlivňují jak proteolytické tak lipolytické procesy. Četnost a zastoupení NSLAB je více heterogenní u sýrů které jsou vyráběny ze syrového mléka. Růst těchto bakterií v prostředí sýru je velmi rychlý, i když počáteční množství bývá výrazně nižší (za dobrých hygienických podmínek) ve srovnání se startérovými kulturami. Rychlost vývoje NSLAB však závisí na teplotě zrání [8, 13, 31].

Vlastní syření představuje základní výrobní proces společný pro všechny druhy přírodních sýrů. Jeho účelem je získání pevné sraženiny (syřeniny) působením syřidla. Aktivní složkou syřidla je chymozin (EC 3.4.23.4), který (zejména po dobu prvních 50 – 60 minut) specificky štěpí peptidovou vazbu mezi 105. a 106. aminokyselinou (fenylalaninem a metioninem) v polypeptidovém řetězci  $\kappa$ -kaseinu. Následkem této specifické hydrolýzy již  $\kappa$ -kasein není schopen chránit ostatní kaseinové frakce, které jsou citlivé na srážení v přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  iontů. Klasické syřidlo se získávalo extrakcí žaludků sajících telat [15]. Vzhledem k omezeným zdrojům této suroviny se používají další enzymové preparáty s obdobným působením živočišného, mikrobiálního nebo rostlinného původu. K nejvyužívanějším syřidlům dnešní doby patří zejména chymozin produkovaný geneticky modifikovanými mikroorganismy *Aspergillus niger* a *Escherichia coli*, popř. *Bacillus subtilis* [8, 11]. Vznikající syřenina je zprvu velmi měkká, rychle však agreguje za přispění vápenatých iontů v jednotnou kompaktní hmotu (gel) [16]. Za účelem zlepšení syřitelnosti a kvality syřeniny se do mléka přidává chlorid vápenatý (zpravidla ve formě nasyceného roztoku) [1]. Tvorbu gelu lze urychlit zvýšením množství syřidla, zvýšeným přídatkem chloridu vápenatého (popř. dříve mléčnanu vápenatého), zvýšenou teplotou

zpracovávané sýřeniny, mechanickými operacemi a rychlostí tvorby kyselin bakteriemi mléčného kvašení (snížením pH) [17].

Zpracování sýřeniny představuje řadu operací zajišťující tvorbu sýrového zrna a slouží k oddělení požadovaného množství syrovátky ze struktury gelu v procesu tzv. synereze. Po dosažení vhodné pevnosti je celistvá sýřenina krájena pomocí soustavy plochých nebo strunných nožů (tzv. harf) za vzniku zrn o prakticky stejné velikosti [3]. Zrno se dále šetrně míchá (tzv. vytužuje) v uvolněné syrovátce. Doba vytužování ovlivňuje konečný obsah sušiny [14]. U polotvrdých a tvrdých sýrů jsou dále zařazeny operace dohřívání a dosoušení a podle dosažené dohřívací teploty je dělíme na sýry s nízkodohřívanou sýřeninou (teplota dohřívání obvykle do 40 °C) a sýry s vysokodohřívanou sýřeninou (dohřívání na 48 – 56 °C). Prání sýrového zrna se provádí u některých typů sýrů (gouda, eidam). Při této operaci dochází ke snižování obsahu laktózy v sýrových zrnech, což má za následek omezení poklesu pH a snížení intenzity některých mikrobiologických a biochemických reakcí [4]. Účelem dosoušení (vytužování při dohřívací teplotě) je další zvýšení sušiny a také ovlivnění probíhajícího mléčného kysání, které upravuje konzistenci a jakost sýra.

Při lisování sýrů dochází k odstranění volné vody (syrovátky) a sýrová zrna se spojují v kompaktní hmotu. U většiny sýrů je důležité, aby zrno při formování nepřišlo do styku se vzduchem, protože zrno by se pak úplně nespojila. Lisováním sýry získají pevný a rovný povrch, který je důležitý z důvodu omezení pronikání kontaminující mikroflóry ze solné lázně (např. halofilní heterofermentativní laktobacily). Výše tlaků závisí na druhu, velikosti a tučnosti sýrů [1, 16]. Tvrdé a polotvrdé sýry se obvykle lisují postupně narůstajícím tlakem 0,005 – 0,05 MPa, po dobu několika desítek nebo stovek minut. Rychlé zvýšení tlaku by vedlo k uzavření povrchu sýra a znemožnění odtoku syrovátky. Při lisování probíhá další prokysávání sýrů. Lisování nejen napomáhá oddělování syrovátky, ale dává sýrům finální tvar a ovlivňuje texturu sýra [8, 11].

Solením se sýru dodává slaná chuť, upevňuje se jeho tvar a pokožka. Při pronikání soli do těla sýra dochází k dalšímu uvolňování syrovátky [18]. Po tomto technologickém kroku se jednotlivé části hmoty sýra diferencují a vzniká tzv. solný prstenec. Postupnou difúzí se koncentrace soli v hmotě v průběhu zrání vyrovnává. Rychlost difúze soli je podporována vlhkostí sýru. Význam solení dále spočívá v konzervaci, regulování růstu startérových mikroorganismů a NSLAB, omezení růstu kontaminující mikroflóry a modifikaci aktivity enzymů. Podílí se také na změně proteinové struktury (zejména bobtnání), čímž ovlivňuje texturu sýru. Všechny výše uvedené procesy mají potenciál ovlivnit také výsledné aroma [19, 20]. Jako nejběžnější způsob solení sýru se používá solení v solné lázni. Koncentrace NaCl se pohybuje nejčastěji v rozmezí 18 – 22 % a její pH je pro tvrdé a polotvrdé sýry obvykle ~ 5,2. Teplota solení se většinou pohybuje okolo 10 až 14 °C,

přičemž doba solení je závislá na velikosti a tvaru sýrových bloků a samozřejmě na požadovaném výsledném obsahu soli. Sýry by měly být před vkládáním do solné lázně částečně prokysané. Nedostatečné prokysání by mělo za následek nižší absorpci soli a sýry by byly příliš měkké. Naopak u sýrů s příliš nízkým pH by byla konzistence velmi tuhá a také křehká [11].

Poslední, ale také jednou z nejdůležitější a nejnákladnější fází výroby přírodních sýrů, je proces zrání. Tento děj lze označit jako soubor mikrobiálních a biochemických změn napomáhající přeměnit čerstvou sýřeninu na zralý sýr. Proces zrání značně ovlivňuje také texturní a funkční vlastnosti a rovněž chuť a vůni sýru. Proto je pro dosažení plného a vyváženého produktu žádoucí dostatečná délka zrání u všech přírodních sýrů (prakticky vyjma tzv. čerstvých sýrů) [8, 21].

## **1.2. Zrání sýrů**

Zrání sýrů představuje složitý proces, který zahrnuje jak mikrobiologické tak biochemické děje a podílí se na vývoji sensoricky aktivních látek ale i textury sýru. Délka a podmínky zrání jsou důležitými faktory, které tyto změny ovlivňují a jsou charakteristické pro daný typ produktu [22, 23]. Zvýšená teplota při skladování může urychlit biochemické děje [24, 25]. Naopak snížení teploty zrání může tyto procesy zpomalit [26, 27]. Svou roli při zrání hraje i úprava mléka před vlastní výrobou sýrů (tepelné ošetření, standardizace tuku), což může ovlivnit zejména přítomnost a aktivitu mikroorganismů, enzymů a rovněž dostupnost substrátů, resp. katalyzátorů pro biochemické reakce [28 – 33].

### **1.2.1. Hlavní procesy probíhající během zrání sýrů**

Bakterie mléčného kvašení (LAB – lactic acid bacteria) je početná, morfologicky heterogenní skupina mikroorganismů s komplexními nároky na výživu. Jsou to fermentující mikroorganismy, které získávají energii na výrobu ATP procesem substrátové fosforylace za částečné oxidace substrátu (sacharidy, organické kyseliny, uhlovodíky aj.). Oxidovaný uhlík se vyloučí ve formě  $\text{CO}_2$  a vodíky redukovaných koenzymů NAD(P)H se v rámci jejich regenerace přenášejí na zbytek substrátu vzniklého jeho částečnou oxidací (např. pyruvát, acetaldehyd). Vytvořený redukovaný produkt (např. laktát) se vyloučí do prostředí [34].

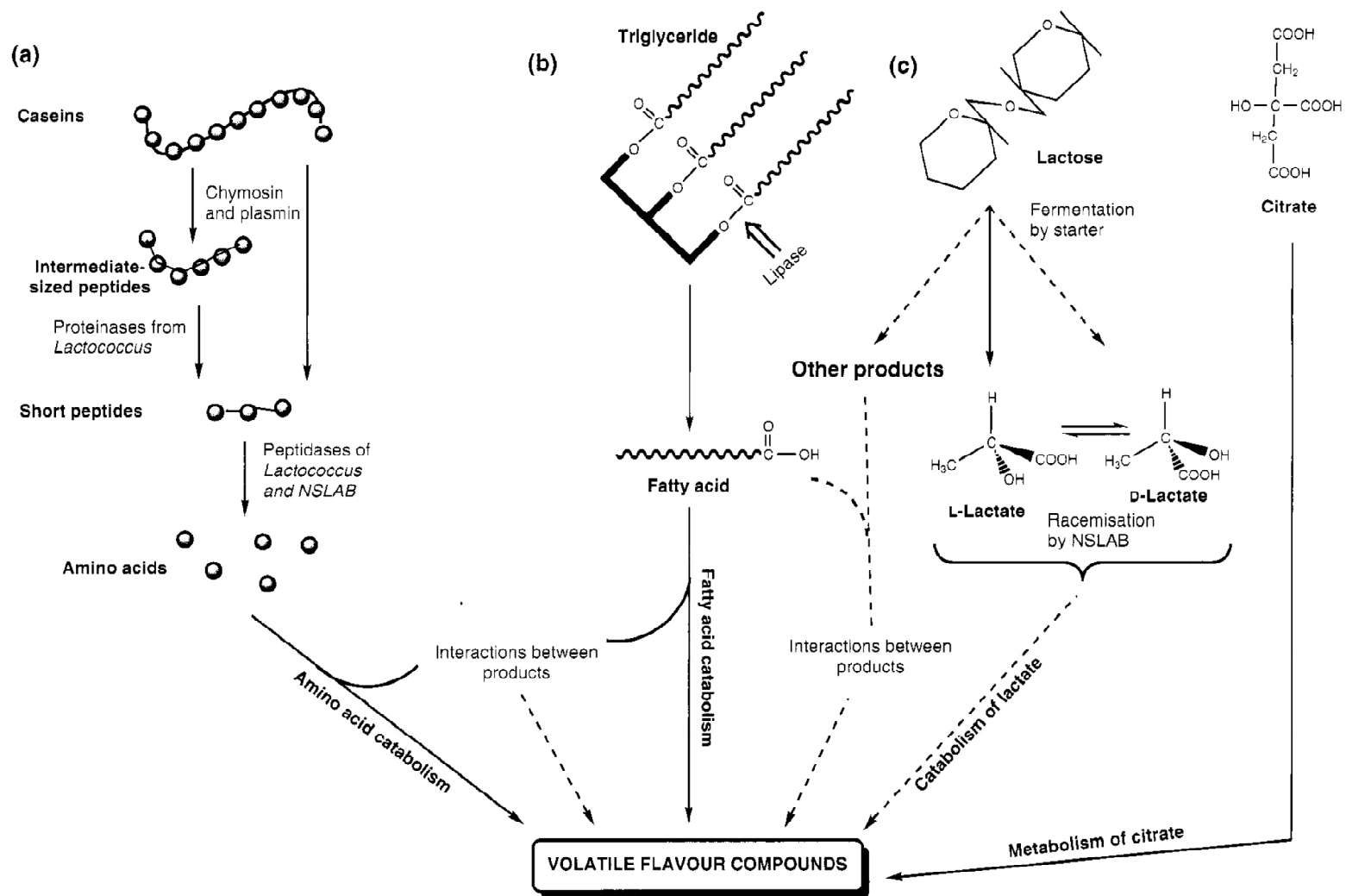
LAB disponují intracelulárními enzymy (peptidázy, lipázy a enzymy ovlivňující katabolismus aminokyselin) i extracelulárními enzymy např. endopeptidázami. Enzymy LAB hrají klíčovou roli při zrání sýrů, včetně vývoje sensoricky aktivních látek [35 – 37]. LAB se ve hmotě sýru pomnožují, ale také relativně rychle dochází k jejich lyzi. Autolýza buněk LAB ovlivňuje zrání přírodních sýrů prostřednictvím uvolnění vnitřního



obsahu buňky včetně aktivních intracelulárních enzymů do prostředí hmoty sýru [10, 38]. K lyzi buňky dochází z různých důvodů a je často způsobena intracelulární muramázou, která hydrolyzuje buněčnou stěnu bakterií [8].

Hlavní biochemické procesy doprovázející zrání sýru lze rozdělit na primární děje, které zahrnují metabolismus laktózy, laktátu a citrátu, lipolýzu (konečným produktem jsou volné mastné kyseliny) a proteolýzu (konečným produktem jsou volné aminokyseliny). Následně probíhají sekundární biochemické děje, které jsou důležité pro vlastní vývoj sensoricky aktivních sloučenin, a zahrnují zejména metabolismus volných mastných kyselin a volných aminokyselin [39, 41]. Velmi zjednodušeně je mechanismus působení jednotlivých metabolizmů znázorněn na Obr. 1.1.

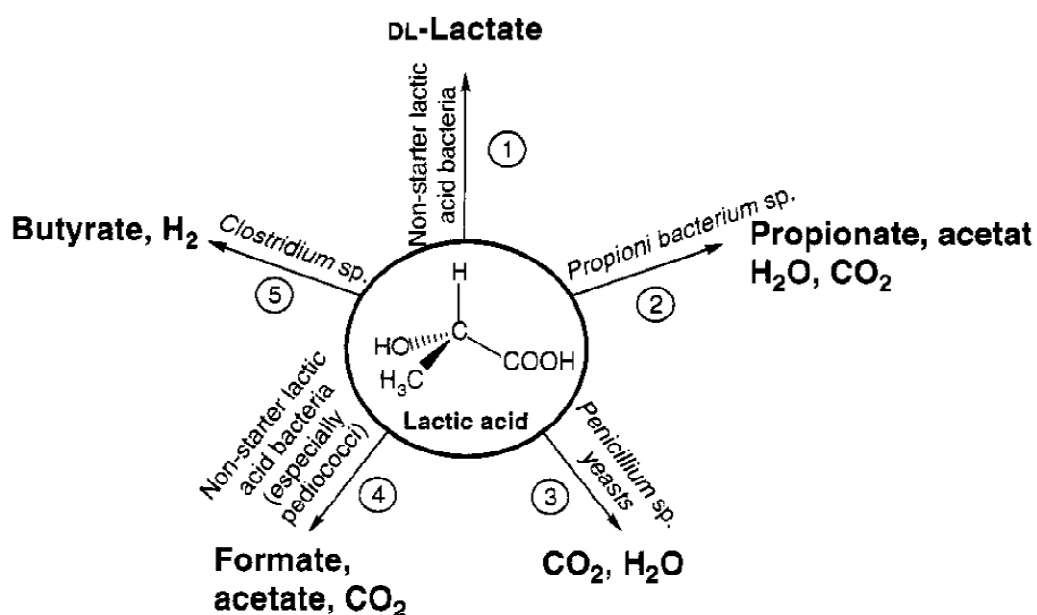
Převážný podíl laktózy odchází při technologickém zpracování syrovátkou. Zbylé množství je metabolizováno glykolyticky převážně prostřednictvím startérových bakterií nebo fosfoketolázovou cestou (například *Leuconostoc* spp.) [21]. Základním produktem laktózového metabolismu je pyruvát, který je následně působením mikrobiální NAD-laktátdehydrogenázy přeměněn na L-laktát nebo D-laktát, popřípadě jejich racemickou směs (Obr. 1.1, část c) [42]. Non-startérová mikroflóra přítomná v sýrech holandského typu a čedar izomeruje D-laktát z L-laktátu, který produkuje rod *Lactococcus*. Racemizace laktátu výrazně neovlivňuje organoleptické vlastnosti sýru, ale mohla by mít negativní nutriční následky. D-laktát vápenatý je hůře rozpustný než jeho L-forma a tím by mohlo dojít ke krystalizaci a následnému vzniku bílých skvrn zejména při řezu sýru [21]. Fermentace laktózy je rychlá a prakticky je celkově metabolizována v prvních dnech zrání. Na Obr. 1.2 je znázorněn metabolismus přeměny laktátu na další produkty prostřednictvím různých skupin mikroorganismů. Míra okyselení inhibuje růst nežádoucí mikroflóry, ovlivňuje počáteční texturu sýřeniny a zastoupení solí v sýru (uvolnění vápníku z kaseinu za vzniku mléčnanu vápenatého; tvorba monokalciumpkaseinátu) [23]. V závislosti na druhu sýru může být laktát dále metabolizován (Obr. 1.2) mnoha cestami na další karboxylové kyseliny (kyseliny octovou a propionovou například účinkem *Propionibacterium* spp., kyselinu mravenčí metabolismem pediokoků aj.), které se mohou podílet na chuti a vůni [21]. Meziprodukt metabolismu laktózy, pyruvát, je substrátem pro vytváření řady sensoricky aktivních látek s krátkým řetězcem (diacetyl, acetoin, acetaldehyd, ethanol) vykazujících typickou jogurtovou a máselnou chuť a vůni [39, 43]. Účinkem NSLAB může být v sýrech laktát oxidován na kyselinu octovou a CO<sub>2</sub> [21]. *Clostridium* spp. může za anaerobních podmínek metabolizovat laktát na kyselinu máselnou a vodík, čímž dochází k nežádoucímu, tzv. pozdnímu duření sýrů [42].



**Obr. 1.1:** Obecné znázornění metabolismů, které působí během zrání sýrů: (a) proteolýza a reakce volných aminokyselin, (b) lipolýza a reakce volných mastných kyselin a (c) metabolismus laktózy, laktátu a citrátu [12]

Mléko přirozeně obsahuje malé množství citrátu, který je převážně odváděn syrovátkou. Zbylý podíl citrátu je metabolizován určitými startérovými LAB i NSLAB (*Leuconostoc* spp. a citrát–pozitivní kmeny *Lactococcus*) na sloučeniny (např. diacetyl, acetoin a 2,3-butandiol), které přispívají k chuti a vůni sýrů [42, 44]. Produktem citrátového metabolismu je i CO<sub>2</sub>, který se podílí na tvorbě malých ok charakteristických pro sýry holandského typu [23].

Lipolýza je důležitý biochemický děj, který intenzivně probíhá během zrání sýrů s modrou plísní uvnitř hmoty a tvrdých italských sýrů. U těchto sýrů je hlavním procesem vytváření charakteristické chuti a vůně. V případech sýrů jako jsou čedar nebo gouda je průběh lipolýzy mírný, nadměrná intenzita lipolytických reakcí je u těchto sýrů nežádoucí a vede k defektům projevujícím se např. jako žluklost [21]. Lipidy v potravinách jsou podrobeny hydrolytickým a oxidačním degradacím, i když v sýrech jsou oxidační změny velmi limitovány nízkým redoxním potenciálem (–250 mV) [23, 39, 42] a přítomností přirozených antioxidantů (vitamin E) [40].



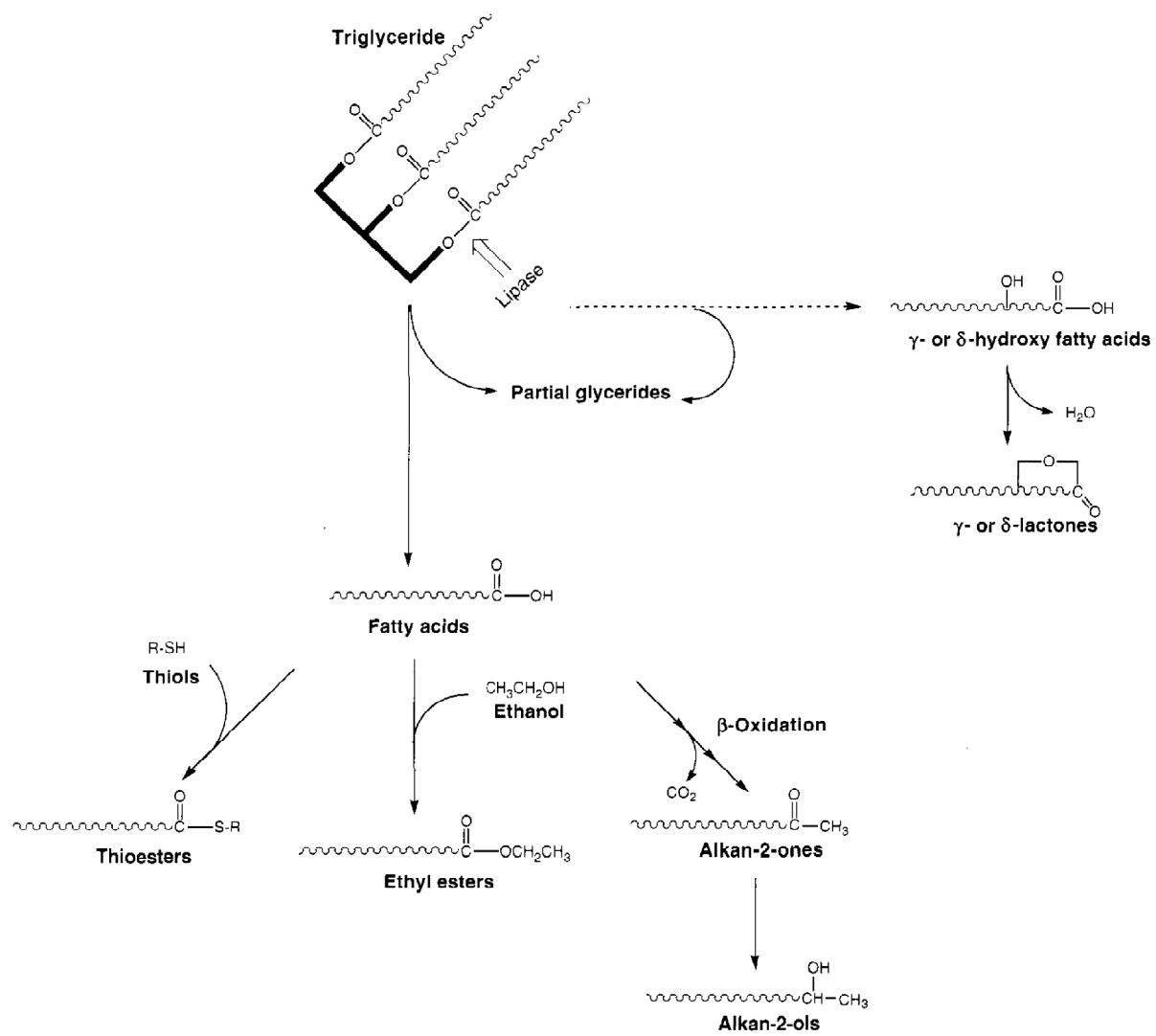
**Obr. 1.2:** Schematicky znázorněný metabolismus laktátu během zrání sýrů: (1) racemizace, (2) přeměna zejména prostřednictvím *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* a *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* v sýrech švýcarského typu, (3) oxidační metabolismus laktátu zejména působením kvasinek a plísní, (4) konverze na sůl kyseliny mravenčí, octové a ethanol a (5) anaerobní metabolismus laktátu na sůl kyseliny máselné a H<sub>2</sub>, který vede k tzv. pozdnímu duření sýrů [12].

Lipolýza v sýrech (Obr. 1.3) probíhá v důsledku přítomnosti lipolytických enzymů – lipáz, které štěpí esterovou vazbu mezi mastnými kyselinami a glycerolem. Jejich zdrojem je obecně mléko, startérové bakterie, sekundární

startérové mikroorganismy, NSLAB a popřípadě exogenní lipázové preparáty [12, 23]. Volné mastné kyseliny (FFA), primárními produkty lipolýzy, jsou důležitými prekurzory katabolických reakcí, které produkují sensoricky aktivní sloučeniny [40].  $\beta$ -oxidací a dekarboxylací vznikají metylketony, sekundární alkoholy a aldehydy. Při esterifikačních reakcích FFA se vytvoří laktony. FFA dále reagují s alkoholovými skupinami za vzniku esterů (např. etylester kyseliny máselné, etylester kyseliny hexanové, etylester kyseliny octové aj.). Koncentrace kyseliny máselné je částečně důsledkem hydrolytické aktivity lipáz [39].

Také NSLAB disponují lipázami a esterázami, avšak jejich aktivita je druhově specifická a také závislá na obsahu soli, teplotě a pH. Udržení této aktivity je však důležité pro tvorbu esterů a také pro vývoj chuti a vůně výsledného produktu [12].

Proteolýza je složitým a ve své podstatě jedním z nejdůležitějších dějů v průběhu zrání většiny sýrů. Tento proces začíná hydrolyzou kaseinů ( $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ -kaseinů a para- $\kappa$ -kaseinu), které utvářejí matici sýru [46]. Zdrojem proteáz je syřidlo, extracelulární enzymy LAB (jako např. Prt, lactocepin) a přirozeně se v mléce vyskytující proteázy, z nichž v literatuře je nejpopisovanějším plazmin (EC 3.4.21.7) [22, 47, 48]. Hlavním úkolem lactocepinu v mléce je hydrolyza kaseinu na krátké peptidy, které se stávají substrátem pro laktokoky. Během zrání sýrů je však jeho úloha odlišná. Kasein je štěpen chymozinem a plazminem a až následně lactocepin hydrolyzuje vzniklé středně dlouhé řetězce polypeptidů [12]. Vzniklé kratší proteiny a peptidy mohou být dále intracelulárně hydrolyzovány pomocí endopeptidáz a exopeptidáz (např. aminopeptidázy, dipeptidázy nebo tripeptidázy) primárních a sekundárních startérových kultur a NSLAB. Endopeptidázy katalyzují hydrolyzu vazby uvnitř řetězce za vzniku peptidů různé velikosti a exopeptidázy katalyzují odštěpení pouze koncových aminokyselin z polypeptidového řetězce. Přehled hydrolytických změn proteinů sýru v důsledku metabolismu LAB je znázorněn na Obr. 1.4. Intracelulární peptidázy štěpí peptidový řetězec za vzniku konečného produktu, a to volných aminokyselin. Pomocí dalšího enzymatického aparátu mohou být aminokyseliny dále katabolizovány za vzniku nejrozličnějších sensoricky aktivních látek. Druhou cestou, kde mohou být aminokyseliny využity, je syntéza proteinů, avšak biosyntéza je možná pouze u vitálních buněk.



*Obr. 1.3: Schematicky znázorněný katabolizmus volných mastných kyselin [12]*

Intracelulární proteolytické enzymy LAB můžeme charakterizovat jako [49]:

- aminopeptidázy – uvolňující volné aminokyseliny (FAA) a dipeptidy z N-konce peptidového řetězce neobsahující více jak 5–7 residuí aminokyselin;
- karboxidázy – uvolňující aminokyseliny z C-konce peptidového řetězce;
- dipeptidázy a tripeptidázy – hydrolyzující di- a tripeptidy;
- oligopeptidázy neštěpící kasein – hydrolyzují peptidy, které obsahují obvykle 5–30 aminokyselin.

LAB tedy produkují peptidázy s úzkou či širokou specifičností, která je determinována zejména aminokyselinou a/nebo její pozicí v peptidu. Peptidázy jsou také schopny pomalu degradovat některé nespecifické substráty

a u mnohých aminopeptidáz byla prokázána i dipeptidová aktivita.

Kaseiny obsahují velké množství prolinu. Iminová skupina prolinu způsobuje jeho jedinečnou strukturu, a proto hydrolyza vazby mezi prolinem a peptidovým řetězcem je striktně katalyzována specifickými prolinovými peptidázami za uvolnění prolinu. Vzniklé peptidy jsou zpřístupněny účinku jiných peptidáz. Proteolytický aparát LAB je znázorněn na Obr. 1.4. a 1.5. Některé prolin-specifické peptidázy byly nalezeny v LAB [12, 45]:

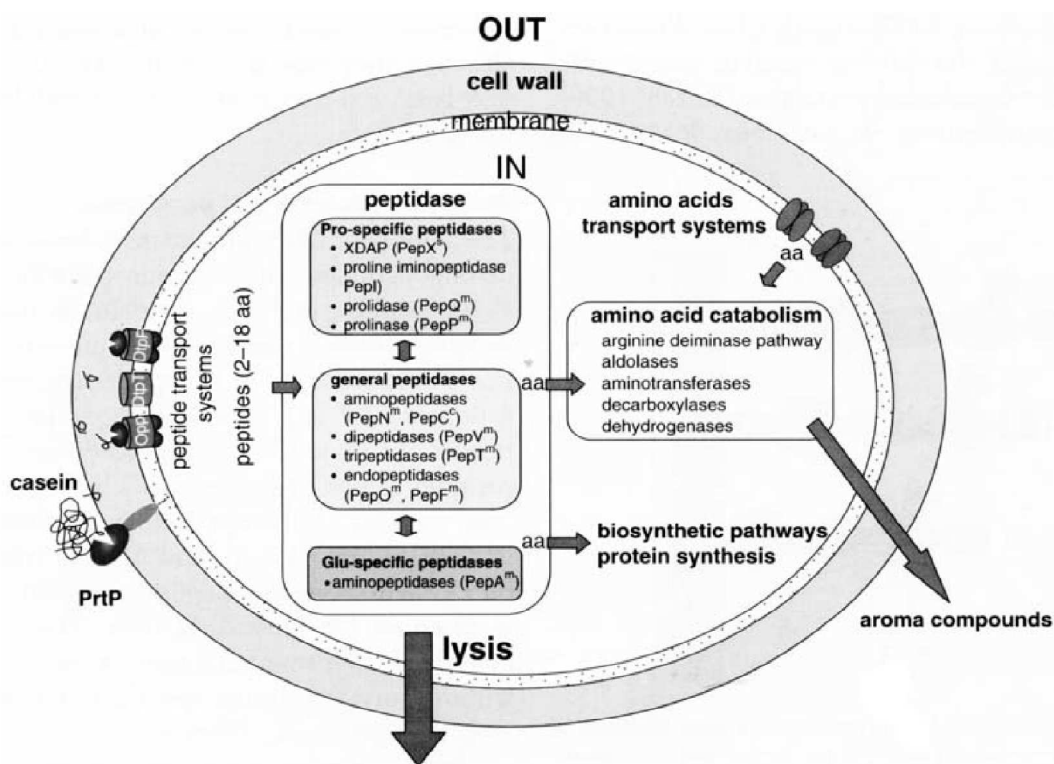
- X-Prolyl dipeptidyl aminopeptidáza (PepX) – uvolňující peptidy z N-konce řetězce oligopeptidů,
- Prolin iminopeptidáza (PepI) – katalyzující uvolňování prolinových reziduí z di-, tri- a oligopeptidů,
- Prolináza (PepR) – je specifická dipeptidáza, která hydrolyzuje dipeptidy se sekvencí ProX,
- Prolidáza (PepQ) – je X-Pro specifická dipeptidáza,
- Aminopeptidáza P (PepP) – katalyzující odstranění N-terminální aminokyseliny z oligopeptidu mající sekvenci X-Pro-Pro-(X)<sub>n</sub> nebo X-Pro-(X)<sub>n</sub>

Mezi další peptidázy, které jsou součástí proteolytických enzymů LAB, patří [12]:

- aminopeptidázy (PepN<sup>m</sup>, PepC<sup>c</sup>)
- dipeptidázy (PepV<sup>m</sup>)
- tripeptidázy (PepT<sup>m</sup>)
- endopeptidázy (PepO<sup>m</sup>, PepF<sup>m</sup>)
- Glu-specifická peptidáza (PepA<sup>m</sup>)

Oligopeptidázy naopak specificky hydrolyzují substrát podle délky peptidového řetězce. Peptidázy jsou zodpovědné za sekundární proteolýzu

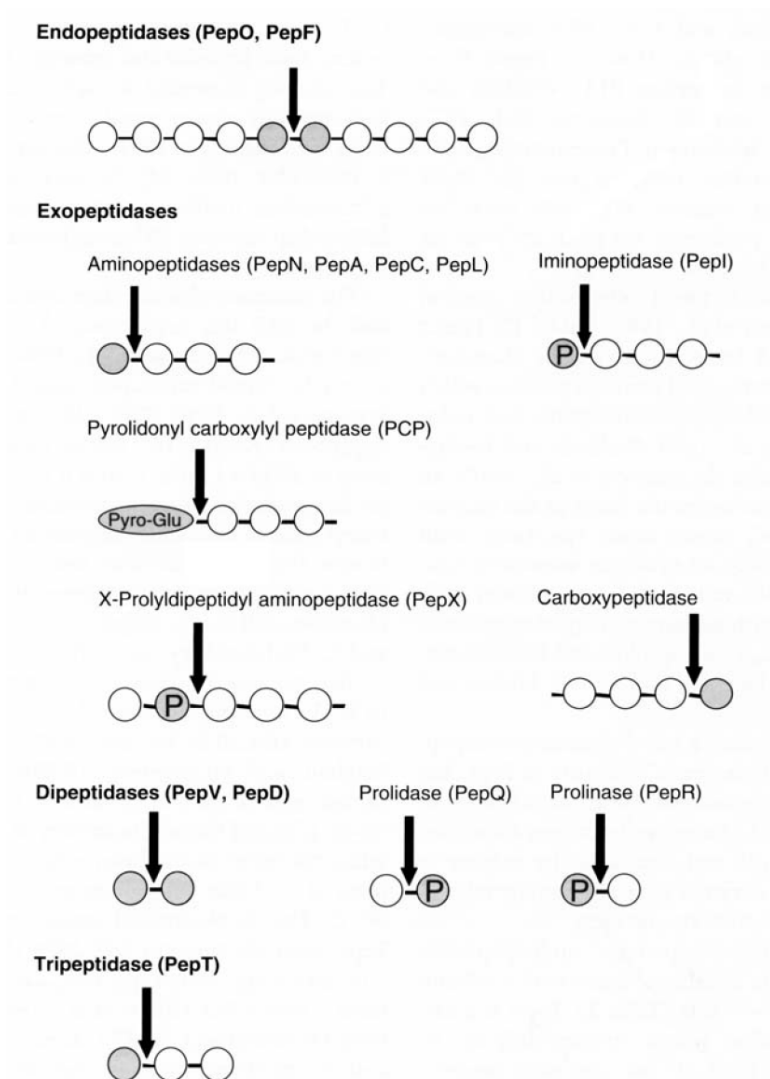
během zrání sýrů (např. hydrolýzu peptidů uvolněných plazminem nebo chymozinem, odstranění hořkosti a produkci volných aminokyselin) [49]. V důsledku různých vlastností jsou peptidázy klasifikovány do odlišných skupin, jak je znázorněno na Obr. 1.5.



**Obr. 1.4:** Schematické znázornění metabolismu dusíku prostřednictvím bakterií mléčného kvašení [12].

Současně však mohou vznikat také hydrofobní peptidy, z nichž některé mohou způsobit nahořklou chuť sýru [51, 52]. Proto je rovnováha mezi produkcí peptidů a jejich následnou degradací na aminokyseliny velmi důležitá [45]. Podle Forde a Fitzgerald [46] tyto tzv. hořké peptidy obsahují značný podíl hydrofobních aminokyselin jako leucin, fenylalanin a prolin a vznikají hlavně z  $\alpha_{s1}$ -kaseinu. Intracelulární enzymy LAB, které jsou z jednotlivých buněk uvolněny po jejich autolýze, urychlují samotnou proteolýzu. Aktivita těchto enzymů může přítomnost hořkých peptidů omezit jejich rozštěpením na kratší peptidy, které již nemusí vykazovat hořkou chuť [10]. Množství startérových LAB a NSLAB dosahuje během zrání srovnatelných hodnot ( $10^8 - 10^9$  cfu  $\cdot$  g<sup>-1</sup> u startérových LAB a  $10^7$  cfu  $\cdot$  g<sup>-1</sup> u NSLAB), avšak rychlá autolýza buněk NSLAB naznačuje, že by jejich proteolytická aktivita pro vývoj vlastností sýru mohla být významnější, než je tomu u startérových LAB [37]. V průběhu zrání je tedy proteolýza katalyzována enzymy pocházejícími ze (i) syřidla; (ii) mléka; (iii) primárních

startérů; (iv) NSLAB; (v) sekundárních starterů a (vi) exogenními proteázami a/nebo peptidázami používanými k akceleraci zrání [53, 54].



**Obr. 1.5:** Schematické znázornění peptidáz nalezených v bakteriích mléčného kvašení [12].

Konečným produktem proteolýzy jsou volné aminokyseliny (FAA). Jejich koncentrace závisí na druhu sýru, použité výrobní technologii a podmínkách zrání [55, 56]. Některé FAA přímo ovlivňují sensorické vlastnosti (kyselina glutamová zintenzivňuje chuť – tzv. faktor „umami“, prolin a lyzin jsou hořko-sladké, zatímco alanin, glycin, serin a treonin jsou spíše sladké) [57].

Ve většině případů však FAA neovlivňují vývoj aroma sýru přímo. Mnohem významnější z hlediska vlivu na organoleptické vlastnosti sýra je konverze FAA na sensoricky aktivní látky (amoniak, aminy, karbonylové sloučeniny, fenoly, indol a alkoholy), a to prostřednictvím intracelulárních



enzymů mikroorganismů [58 – 60]. Schopnost produkovat senzory aktivní sloučeniny z aminokyselin je silně druhově a dokonce i kmenově závislá [61 – 64]. Kyselina glutamová, leucin a metionin patří mezi nejvyužívanější prekurzory ve vytváření těchto látek. Řada důležitých sírných sloučenin vzniká právě z metioninu. Enzymatický aparát laktokoků a laktobacilů je schopen produkovat senzory aktivní sírné sloučeniny jako např. methanethiol, dimethyldisulfid nebo dimethyltrisulfid. Přídavek některých volných aminokyselin jako prekurzorů může urychlit vývoj požadované chuti sýru [8, 12].

Metabolismus aminokyselin je velmi složitý proces (Obr. 1.6) a hraje významnou roli během zrání sýrů. Ze složitého komplexu reakcí aminokyselin lze jmenovat například tyto:

- (i) Transaminace – jako reverzibilní reakce. Tvoří první krok degradace aminokyselin za využití pyridoxal-5'-fosfátu jako kofaktoru pro enzymatickou katalýzu. Enzymatická katalýza je zprostředkována aminotransferázami (EC 2.6.1.x) za vzniku  $\alpha$ -ketokyselin, které slouží jako prekurzory pro senzory aktivní látky. Z tohoto důvodu je pravděpodobně limitním krokem ve vývoji chuti a vůně. Katabolismus aromatických aminokyselin, dále aminokyselin s rozvětveným řetězcem a metioninu je inicializován právě transaminací, protože k jejich degradaci dochází pouze v přítomnosti  $\alpha$ -ketokyselin (akceptor aminoskupiny) [62, 84].
- (ii) Deaminace – aminokyseliny mohou být také degradovány aktivitou dehydrogenáz využívající  $\text{NAD}^+$  jako akceptoru elektronu a produkující  $\alpha$ -ketokyselinu a  $\text{NH}_3$ . Další možným činitelem deaminace jsou oxidázy, které využívají jako akceptor elektronu kyslík a za vzniku aldehydů a  $\text{NH}_3$  [23]. Kultury jako *Geotrichum candidum* a *Brevibacterium linens* mají velmi aktivní deaminázy a vytvářejí velké množství amoniaku prostřednictvím katabolizmu zejména serinu, glutaminu, asparaginu a treoninu. Oxidativní deaminací mohou vznikat kromě amoniaku a aldehydů (Streckerovou reakcí) také mastné kyseliny (např. isovalerová nebo isomáselná) [57, 79, 80, 82, 83].
- (iii) Dekarboxylace – konverze aminokyselin na korespondující aminy odštěpením  $\text{CO}_2$ . Tyto metabolity jsou ve vyšších koncentracích nežádoucí pro jejich potenciální toxikologické účinky. Dále mohou vznikat diamin kadaverin (z lyzinu) a polyamin putrescin (z ornitinu nebo argininu) ovlivňující detoxikační reakce histaminu a tyraminu, čímž prakticky zvyšují jejich toxicitu. Sekundární aminy (spermin a spermidin vznikající z putrescinu) navíc mohou také reagovat s dusitany za vzniku heterocyklických karcinogenních nitrosaminů při záhřevu [65 – 70]. Dekarboxylací mohou být také  $\alpha$ -ketokyseliny metabolizovány na aldehydy.

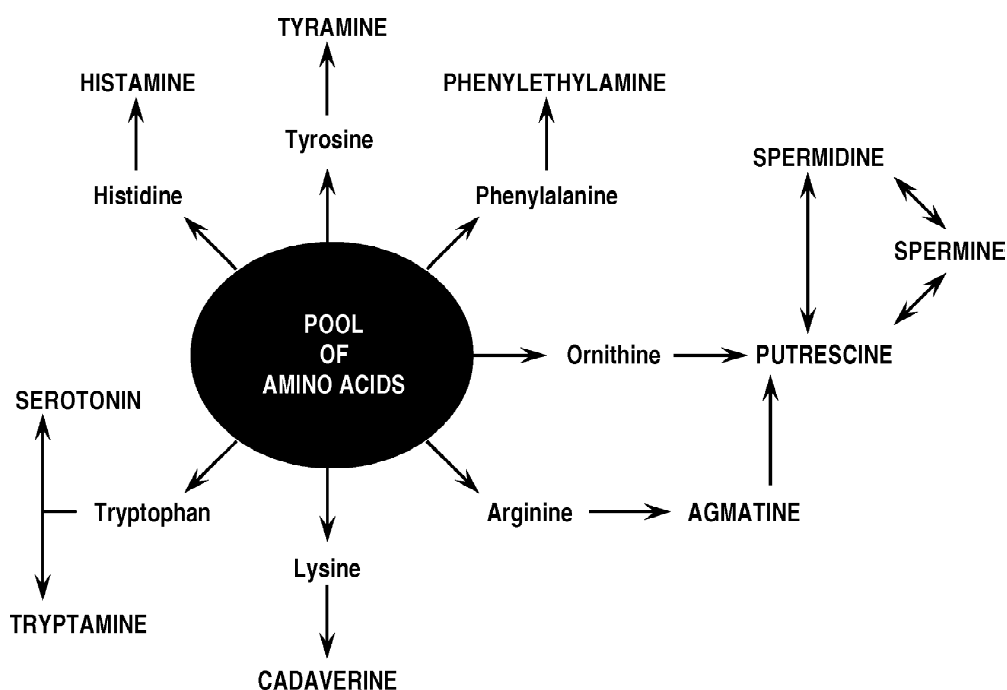
- (iv) Eliminace – katalyzována prostřednictvím aminokyselinových lyáz. Tato konverze je typická pro aromatické aminokyseliny (tyrozin a tryptofan) a metionin za vzniku fenolu, indolu, resp. metanethiolu. Ačkoliv eliminace není hlavní reakcí katabolizmu aminokyselin, aktivita byla detekována u kvasinek, mikrokoků a *Brevibacterium linens*. U LAB obecně nebyl pozorován tento katabolický cyklus aminokyselin [63].
- (v) Dehydrogenace – konverze  $\alpha$ -ketokyselin na příslušné hydroxy-kyseliny, které nejsou významnými činiteli ve vývoji sensoricky aktivních látek. Naopak příliš intenzivní aktivita by mohla mít negativní efekt prostřednictvím snížení koncentrace  $\alpha$ -ketokyselin jako prekurzorů pro látky s organoleptickými vlastnostmi (např. aldehydů). Vysoká aktivita dehydrogenace za současné produkce hydroxy-kyselin byla pozorována u laktokoků v polotvrdých sýrech. Dále také aldehydy mohou být dehydrogenovány na karboxylové kyseliny, alkoholy popřípadě thioly [62].
- (vi) Transfer acylové skupiny – prostřednictvím acyltransferáz a esteráz za vzniku esterů jako např. etylesteru kyseliny máselné, které často přispívají k organoleptickým vlastnostem sýrů. Estery jsou tvořeny reakcí mezi alkoholem a organickou kyselinou, kde vazba může být zprostředkována pomocí koenzymu A (CoA) [62].



### 1.2.2. Stručná charakteristika biogenních aminů v přírodních sýrech

Biogenní aminy jsou přirozenou součástí fermentovaných potravin jako metabolity vznikající účinkem specifických mikroorganismů. Vznik nejvýznamnějších biogenních aminů z jednotlivých prekurzorů je znázorněn na Obr. 1.7.

Množství biogenních aminů se liší s varietou sýrů a je odvislé od přítomných startérových LAB a NSLAB, ale také od doby zrání. Mezi nejvýznamnější původce biogenních aminů mohou patřit zástupci bakterií rodů *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* nebo čeledi *Enterobacteriaceae*. U sýrů holandského typu jsou nejdůležitějšími zástupci s dekarboxylázovou aktivitou laktobacily, protože mohou být přidávány během výroby jako sekundární kultury, ale mohou být v sýrech přítomny i jako NSLAB. Avšak jejich dekarboxylázová aktivita je nejen druhově, ale i kmenově závislá. Vznik biogenních aminů je také závislý na teplotě zrání, koncentrace NaCl a pH [12]. Koncentrace biogenních aminů se také liší v závislosti na poloze v sýru. Byly pozorovány signifikantně odlišné v okrajových částech ve srovnání se středem sýru holandského typu [67, 71].



**Obr. 1.7:** Aminokyseliny jako prekurzory biogenních aminů [72]

Fyziologické účinky biogenních aminů se liší podle jednotlivých zástupců. Důležité je podotknout, že v jistých koncentracích je jejich výskyt přirozený a mají důležitou biologickou funkci, mohou sloužit např. jako zdroj dusíku pro buňky, dále jako prekurzory v syntéze hormonů, alkaloidů, nukleových

kyselin a proteinů [70]. Biogenní aminy dále hrají důležitou roli v regulaci tělesné teploty, pH žaludku, a nebo také v mozkové aktivitě. Některé biogenní aminy mohou v určitých koncentracích působit jako neurotransmitery centrální nervové soustavy nebo vaskulárního systému [72]. Avšak pro spotřebitele je daleko závažnější jejich toxikologický efekt v důsledku zvýšeného množství v konzumované potravíně. Mezi nejvýznamnější biogenní aminy způsobující alimentární otravy patří zejména histamin, tyramin, putrescin, kadaverin, fenyletylamin a tryptamin. Otravy se často projevují účinkem biogenních aminů na hladké svalstvo, kardiovaskulární systém, křečemi v břiše, průjmem a zvracením. Nejvíce s těmito otravami je spojován histamin [70]. Obecně však lze tvrdit, že celkový obsah biogenních aminů nad  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  dané potraviny je toxikologicky významný [65]. Tato hraniční koncentrace je odvozená od alimentárních intoxikací způsobených histaminem.

Přestože vysoká koncentrace biogenních aminů má za následek intoxikaci, gastrointestinální trakt savců je vybaven poměrně účinným detoxikačním systémem. Exogenní biogenní aminy jsou rychle metabolizovány na fyziologicky méně aktivní produkty účinkem aminooxidáz. Tato detoxikace však poskytuje pouze omezenou ochranu a to u malých množství biogenních aminů přijatých v běžně konzumované stravě. Mezi specificky aktivní enzymy metabolizující biogenní aminy řadíme monoaminoxidázu (MAO, EC 1.5.3.11), diaminoxidázu (DAO, EC 1.4.3.6) a polyaminoxidázu (PAO, EC 1.5.3.11) [73]. Polyaminy jsou nejdříve acetylovány a až následně oxidovány DAO a PAO. MAO a DAO působí ve střevním epitelu, tudíž se do krevního oběhu dostávají oxidační produkty biogenních aminů (za běžných podmínek) [74]. Některé aminy (např. putrescin, kadaverin) mohou inhibovat detoxikační aktivitu aminooxidáz (např. histamin metabolizující enzymy) [70]. U jedinců s chorobami trávicího traktu, jako např. gastritida a žaludeční vředy, je aktivita aminooxidáz nižší v porovnání se zdravými jedinci. Také některé léky (jako antihistaminika, tuberkulostatika, antimalarika, psychofarmaka s antidepresivním účinkem aj.) mohou ovlivnit metabolismus biogenních aminů. Z tohoto důvodu by mohlo dojít k nahromadění biogenních aminů v lidském těle a následným zdravotním problémům [70, 74]. Obdobně i ethanol může působit jako inhibitor MAO a DAO [72].

### **1.2.3. Vliv procesů probíhajících při zrání na vývoj vybraných vlastností sýru**

Podmínky a délka zrání hrají důležitou roli ve vývoji texturních, funkčních a senzorických vlastností přírodních sýrů. Sýr má velmi heterogenní fyzikálně-chemickou stavbu, která dovoluje současný průběh různých enzymatických i neenzymatických reakcí. Zrání je také ovlivněno procesem solení sýrů. Zvýšené množství soli v různých částech (např. solný prsteneček

a postupná difúze soli do středu sýru) může inhibovat produkci rozpustných peptidů z kaseinových frakcí [54]. Sůl zvyšuje iontovou sílu, kterou se dále snižuje rozpustnost proteinů. Koncentrace iontů neovlivňuje pouze interakce mezi proteiny samotnými, ale také reakce s vodou, tukem a solemi [19]. Množství soli tedy následně ovlivňuje i texturní vlastnosti sýrů [86]. Sůl také může inhibovat mikroflóru sýru a tím brzdit enzymatické reakce [26], což se může odrážet na nejednotném zrání v různých místech v bloku sýru. Pouze omezené množství studií se však zabývalo mikrobiologickými a biochemickými změnami v závislosti na čase a umístění v bloku sýru. Byly pozorovány rozdíly ve vnější a vnitřní části sýru [87, 88]. Tento jev může souviset s autolýzou LAB, která je ovlivněna několika faktory jako teplota, koncentrace sodných iontů a pH [89]. Hodnoty řady z těchto parametrů však mohou být v různých částech sýru v průběhu zrání odlišné.

Chemické složení sýru má významný vliv na jeho texturní vlastnosti [90]. Textura je sensorický a funkční projev strukturálních, mechanických a povrchových vlastností potraviny, které jsou rozpoznatelné pomocí smyslů zrakového, sluchového, chuťového, taktilního a kinestetického. Strukturální vlastnosti zahrnují makroskopické, mikroskopické i molekulární rysy dané potraviny. Textura je tedy projevem konkrétní fyzikální struktury sýru [81] a je bezprostředně ovlivňována počátečním složením mléka, výrobním postupem a procesem zrání [32, 41], jak jeho délkou, tak i podmínkami ve zrácím sklepe [90]. Mezi nejdůležitější faktory přispívající k texturním změnám řadíme interakce kaseinových částic a rozsah proteolýzy. Naopak různorodost environmentálních podmínek, jako např. vývoj pH, teplota a iontová síla ovlivňují zmíněné faktory. Proteinová matrice sýru vzniká spojováním kaseinových částic pomocí fyzikálně-chemických reakcí, které jsou v přírodních sýrech pravděpodobně zprostředkovány prostřednictvím elektrostatických a hydrofobních interakcí. Proteiny jsou propojovány zejména pomocí koloidního kalcium fosfátu, přičemž dochází k zesíťování proteinové matrice prostřednictvím vzniklého parakaseinu vápenatého. Síla a podíl každého typu interakce je řízen residuálním nábojem kaseinové molekuly, typem kaseinu a teplotou sýru [90].

Se snižující se vlhkostí dochází ke zvyšování tvrdosti sýru [19]. Sýr přirozeně ztrácí vodu odpařováním a vyšší úbytky jsou pozorovány ve vrchních vrstvách, kde tedy lze očekávat i rozdílné texturní vlastnosti [8]. Částečně lze odpařování zabránit použitím obalových materiálů s definovanými vlastnostmi. Samotná proteolýza má přímý vliv na vývoj textury sýru, který se stává měkčím v důsledku těchto reakcí [91]. Rovněž pH ovlivňuje reologické vlastnosti přírodních sýrů [92, 93], protože změny v kyselosti přímo souvisí s chemickými procesy v proteinové matici sýru [94]. V přítomnosti nižšího pH je degradace proteinů pomalejší, a proto i texturní změny mohou probíhat pozvolněji [92].

Jako organoleptická charakteristika je textura přímo měřitelná senzoricou analýzou. Senzorický panel představuje „měřicí přístroj“ a výsledky každé prováděné analýzy závisí na jeho členech. Výběr a školení senzorických posuzovatelů musí být vedeno dle příslušných českých technických norem odvíjejících se od mezinárodních standardů [125].

K hodnocení textury se mohou používat rovněž sofistikované instrumentální metody. Jednou z těchto technik je i texturní profilová analýza, jejíž provedení je např. založeno na penetračních testech (kuželovitá nebo cylindrická sonda je vsunuta do určité hloubky sýru), a kompresních testech [25, 92], které jsou konstruovány k simulaci stlačení sýru mezi stoličkami během žvýkání [85]. Mezi základní parametry, které nám mohou poskytnout ucelenější pohled na soudržnost materiálu a jsou měřitelnými těmito technikami řadíme mechanické texturní vlastnosti jako:

- tvrdost neboli pevnost (hardness) – vztahující se k síle potřebné k dosažení deformace nebo penetrace výrobkem,
- přilnavost (adhesiveness) – vztahující se k síle požadované k odstranění materiálu, který se přilepí k ústům nebo k povrchu,
- soudržnost (cohesiveness) – vztahující se ke stupni, na který může být látka deformována, než se rozpadne, včetně vlastností křehkosti, žvýkatelnosti a gumovitosti,
- lámavost/křehkost (fracturability) – vztahující se k soudržnosti a tvrdosti a k síle potřebné k rozbití výrobku na drošky nebo kousky,
- žvýkatelnost (chewiness) – vztahující se k množství práce potřebné k rozkousání pevného výrobku do stavu vhodného k polknutí,
- gumovistost (gumminess) – vztahující se k soudržnosti a křehkosti výrobku.

Jak už bylo výše zmíněno, zrání sýrů je složitý proces, který často vyžaduje delší dobu uchovávání za optimálních podmínek, tzn. za vhodné teploty, vlhkosti vzduchu aj. Z důvodu omezených skladovacích prostorů a finančních nákladů existuje tlak na producenty, kteří pak záměrně zkracují dobu zrání sýrů a dříve expedují výrobky do distribuční sítě. Za těchto podmínek přírodní sýry nedosáhnou požadovaného stupně prozrání v době konzumace, neboť následné skladování za chladírenských teplot zpomalí probíhající biochemické a mikrobiologické reakce. Lze očekávat, že výsledný produkt může mít jiné vlastnosti ve srovnání s výrobkem, který zraje ve zracích sklepech požadovanou dobu [95]. Problematikou předčasného zpomalení nebo dokonce ukončení procesu zrání se mnoho publikací nezabývalo, přestože děje probíhající při zrání přímo ovlivňují texturní i jiné organoleptické charakteristiky (chuť a vůni) přírodních sýrů. Spotřebitel tedy může být do jisté míry zklamán, protože produkt jím zakoupený nemusí mít odpovídající vlastnosti.

### 1.3. Metody akcelerace zrání sýrů

Zrání sýrů je často dlouhá a nákladná operace, kterou jsou výrobci pod tlakem trhu nuceni omezit z důvodu snížení nákladů na výrobu produktů. Z tohoto důvodu se můžeme v distribuční síti setkat se sýry nedostatečně zralými, u kterých lze předpokládat odlišné organoleptické vlastnosti ve srovnání s kvalitně vyzrálými sýry [1]. Problematikou kvality sýrů v souvislosti s vývojem organoleptických vlastností při skladování za snížené teploty se však doposud mnoho prací nezabývalo. Možným řešením by mohla být akcelerace zrání, kterou lze docílit požadovaného zkrácení doby zrání a současně dostatečné prozrálosti. Je však nutné zajistit správný vývoj všech znaků bez organoleptických defektů (např. ve struktuře, chuti) a snížení kvality. Metody akcelerace zrání sýrů tradičně zahrnují využití enzymů jako proteáz, peptidáz, lipáz a  $\beta$ -galaktosidázy, případně enzymů, které katalyzují reakce FAA. Obecně metody akcelerace zrání sýrů můžeme rozdělit do několika skupin: (i) změnu (především zvýšení) teploty zrání; (ii) přídavek vybraných enzymů; (iii) přídavek mikroorganismů s chemicky anebo fyzikálně narušenou buněčnou stěnou (pro rychlejší lyzi); (iv) přídavek geneticky modifikovaných mikroorganismů; (v) přídavek dalších (doplňkových) kultur; a (vi) přídavek "extraktu" ze zralých sýrů [96].

Teplota zrání vedle použitého typu startérových kultur a množství přítomných NSLAB patří mezi nejdůležitější faktory ovlivňující průběh mikrobiologických, resp. biochemických, procesů. Proteolytické a lipolytické procesy jsou výrazně urychleny použitím zvýšené teploty během zrání sýrů, i když na celkový počet NSLAB nemá až tak výrazný vliv [27]. Akcelerace těchto procesů je pravděpodobně způsobena přiblížením se k optimální teplotě aktivity proteolytických enzymů, které katalyzují přeměnu proteinové matrice a konverzi FAA na sensoricky aktivní látky. Podobně tomu může být i u lipolytických enzymů. Využití skladování při zvýšené teplotě má však uplatnění zejména u sýrů, které byly vyrobeny za vysoce hygienických podmínek [97]. Při aplikaci této metody hrozí nebezpečí rychlejšího růstu a množení nežádoucích mikroorganismů a mikroorganismů způsobujících alimentární nákazy, a to v případě, že tyto mikroorganismy jsou přítomny [98]. Její hlavní výhodou je však jednoduchost provedení. Dále významně ovlivňuje vývoj chuti bez ohledu na použité druhy startérů či počet NSLAB [96]. Práce Sihufe *et al.* [24] se jako jedna z mála zabývala pozorováním změn při zrání sýru za zvýšené teploty 18 °C (sýr typu Reggianito Argentino). Vývoj sledovaných charakteristik (difúze soli, rychlost proteolýzy, vývoj organoleptických vlastností) byl signifikantně urychlen vyšší teplotou (18 °C) ve srovnání se sýry zrajícími za běžné teploty (12 °C). Přestože optimální doba zrání sýru tohoto typu je při 12 °C minimálně 6 měsíců, autoři navrhli omezit délku zrání za zvýšené teploty (18 °C) na pouhé 2 až 3 měsíce. Podobný trend byl sledován i u čedaru, kde Law *et al.* [99] nastínili možnost až 75% zkrácení doby zrání zvýšením teploty na 12 °C. Běžná teplota zrání



u těchto sýrů se pohybuje pod 10 °C. Autoři dále uvádějí, že sýr zrající za akcelerační teploty byl bez defektů ve struktuře. Na druhou stranu autoři upozorňují, že při zvýšených teplotách existuje vyšší riziko vzniku těchto vad [99]. Při akceleraci zrání zvýšenou teplotou je nutné zvolit takový teplotní režim, který zajistí požadované zkrácení doby zrání, ale zároveň se musí zabránit vývoji pachutí nebo jiných sensoricky nežádoucích vad [100].

Přídavek klíčových enzymů zodpovědných za žádoucí biochemické změny vede také k akceleraci zrání. Mezi tyto enzymy řadíme lipázy (živočišného i plíšňového původu), proteázy a peptidázy a  $\beta$ -galaktosidázu. Lipolýza je u sýrů typu holandského, švýcarského a čedaru limitována, avšak může přispívat k reziduální chuti [40]. Enzymatický preparát zvaný FlavorAge (Chr. Hansen, Inc., US) specificky hydrolyzuje triacylglyceroly se středně dlouhými řetězci ( $C_6$ - $C_{10}$ ). Lipáza byla izolována z *Aspergillus oryzae*. Součástí tohoto preparátu je i proteáza. FlavorAge je zodpovědný za smetanové aroma čedaru [99 – 101]. Komerčně jsou používány i další lipolytické a proteolytické enzymy, avšak jejich aplikace není jednoduchá z důvodu tvorby defektů jako hořkost, žluklost, netypická příchut' nebo texturních vad [99, 100, 105]. Pro redukci hořkosti je možné využít enzymů jako Accelase<sup>®</sup> (LAB exopeptidáza). Neutrase<sup>®</sup> (neutrální proteáza) je používána pro podporu požadované chutě [100]. Aktivace plazminogenu na plazmin pomocí exogenních enzymů je další způsob podpoření proteolýzy [99]. Problém, kterému výrobci čelí, je dosažení odpovídajícího zadržetí přidávaných enzymů v sýřenině. Přirozeně se vyskytující mléčné enzymy jsou asociovány s kaseiny a mléčným tukem. V případě startérových kultur a NSLAB jsou mikroorganismy zachycovány na rozhraní mléčného tuku a kaseinové matrice [8]. Většina přidávaných enzymů však odchází do syrovátky. Jedno z možných řešení je mikroenkapsulace těchto enzymů do vhodných materiálů, které budou rovněž asociovat se složkami sýřeniny. Rozmístění a správné načasování jejich uvolnění je důležitým faktorem pro správný průběh zrání. V opačném případě může docházet k proteolýze příliš brzy a následně k texturním anebo chuťovým defektům [100]. Příliš intenzivní proteolýza během technologických operací by mohla také způsobit uvolňování krátkých peptidů do syrovátky a tím snížení výtěžnosti sýru.

Jak už bylo zmíněno výše, bakteriální enzymy přímo ovlivňují rychlost zrání. Jednou z efektivních cest ke zvýšení množství bakteriálních enzymů (bez změny primárních startérů a podmínek výroby) je přídavek mikroorganismů s chemicky anebo fyzikálně narušenou buněčnou stěnou. Využití takto modifikovaných mikroorganismů spočívá v redukci jejich schopnosti produkovat kyseliny (prevence možného překyselení sýřeniny a s tím spojených technologických problémů), současně se zachováním aktivity jejich intracelulárních enzymů [99]. Existuje mnoho způsobů jejich přípravy (tepelné ošetření, zmrazení, sprejové sušení, lyofilizace atd.) [102].

Přídavek doplňkových kultur přispívá k regulaci zračního procesu a může ho dokonce urychlit. Doplňkové kultury hrají důležitou roli v průběhu proteolýzy a tvorbě chutě sýru [103]. Celá řada doplňkových kultur byla dříve vyizolována jako NSLAB ze sýrů, byly zjištěny jejich vlastnosti a následně jsou využívány jako sekundární kultury [104].

Využití geneticky upravených LAB skýtá nové možnosti k akceleraci zrání sýrů. Cílem modifikací mohou být například (i) mikroorganismy, které produkují mnohem větší koncentrace vybraných enzymů (peptidáz, esteráz a enzymů katalyzujících katabolismus aminokyselin) než běžné LAB; (ii) geneticky upravené startéry produkující další vybrané enzymy; (iii) rychlejší lyze buněk startérových LAB (prostřednictvím klonování autolyzinu (hydrolázy) do startérů) a (iv) startéry s upraveným metabolismem [100]. Využití těchto aplikací je však na začátku a čelí překážkám ze strany akceptace geneticky modifikovaných organismů většinovou společností.

Přídavek „extraktu“ ze zralých sýrů má rozličné použití např. u výroby suroviny pro produkci tavených sýrů, výrobků typu snack či cracker a také u imitací mléčných produktů. Problémem při použití této metody je obtížná kontrolovatelnost probíhajících procesů. Extrakt je za neustálého míchání inkubován při 30 °C po dobu 4–5 dnů, přičemž hrozí riziko růstu kontaminující mikroflóry [89].

## 2. CÍL PRÁCE

Základním cílem disertační práce bylo sledovat distribuci vybraných složek v přírodním sýru v průběhu zrání a rovněž vybrané teplotní podmínky zrání, resp. skladování, které tuto distribuci mohou ovlivnit. Základní cíl lze rozdělit na dílčí cíle:

1. sledovat vliv délky zrání, resp. skladování, na distribuci vybraných složek v přírodním sýru holandského typu,
2. srovnat distribuci vybraných složek v sýru, který zral, resp. byl skladován, za tří zracích/skladovacích teplot se zaměřením na teploty  $<10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,
3. studovat distribuci vybraných složek v sýru, který byl podroben akceleraci zrání v důsledku zvýšené teploty,
4. zabývat se texturou přírodního sýra v jeho různých částech a sledovat vliv změn v průběhu zrání za různých podmínek na vybrané texturní parametry.

Pro dosažení výše zmíněných cílů byly stanoveny následující úkoly:

1. provést literární rešerši týkající se přírodních sýrů, procesů zrání a možností jejich akcelerace,
2. založit zrací/skladovací pokusy v délce šesti, resp. čtyř, měsíců a v určených intervalech provést příslušné analýzy,
3. sledovat změny v distribuci vybraných složek v jednotlivých vrstvách středového pásu sýra v průběhu šestiměsíčního zrání/skladování ve třech různých teplotách (2 chladírenské a 1 optimální pro daný typ sýra),
4. podrobněji sledovat změny v distribuci vybraných složek v jednotlivých vrstvách několika pásů v průběhu čtyřměsíčního zrání při optimální teplotě a během zvýšené teploty mající potenciál akcelerovat procesy zrání,
5. v jednotlivých částech přírodních sýrů se zaměřit především na sledování obsahu volných aminokyselin a biogenních aminů a dále sledovat proteinový profil,
6. provést texturní analýzu vybraných částí přírodních sýrů,
7. provést mikrobiologické rozborů jednotlivých vrstev sledovaných pásů přírodního sýra,
8. pokusit se poukázat na přítomné mikroorganismy, které mají potenciál přispívat k produkci biogenních aminů,
9. senzorycky hodnotit testované přírodní sýry v průběhu zrání, resp. skladování.

## 3. ZVOLENÉ METODY ZPRACOVÁNÍ

Experimentální část disertační práce lze rozdělit na tři experimenty. V prvním experimentu byl proveden šestiměsíční zrací, resp. skladovací, pokus se třemi různými teplotami zrání/skladování. Druhý experiment byl zaměřen na vývoj texturních vlastností v různých částech eidamské cihly v průběhu čtyřměsíčního zrání při optimálních podmínkách. Ve třetím experimentu bylo zrání sýrů holandského typu akcelerováno zvýšenou teplotou.

### 3.1. Popis experimentů

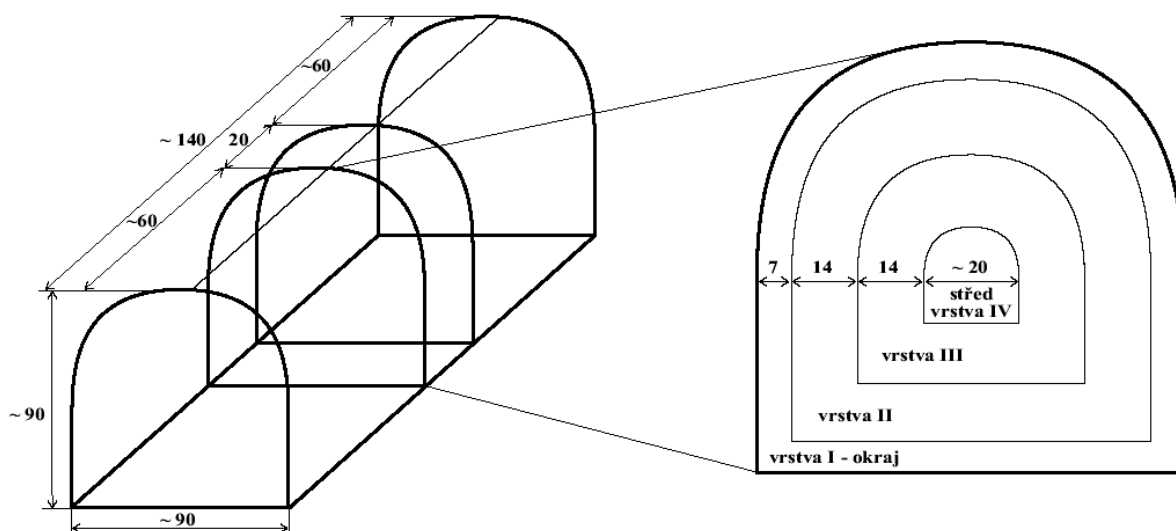
#### 3.1.1. Experiment 1

Ve spolupráci s výrobcem přírodních sýrů byl založen zrací pokus se sýrem s nízkodohřívanou sýřeninou (eidamský typ) o obsahu tuku v sušině 30 %. Z dané šarže bylo odebráno 258 cihel. Cihly ( $1,33 \pm 0,05$  kg) byly po uzavření do cryovacového obalu uloženy do zracího sklepa s teplotou  $10 \pm 2$  °C. Po 23 dnech (od počátku výroby) bylo 78 cihel z každé šarže přemístěno ze sklepa do lednice ( $5 \pm 1$  °C), kde probíhalo další skladování (vzorky A). Po 38 dnech zrání (od počátku výroby) bylo do lednice přemístěno dalších 60 cihel z každé šarže (vzorky B). Zbývá část cihel z každé šarže (kontrolní vzorky; vzorky C) zůstala po celou dobu pokusu ve zracím sklepě (celkem 168 dnů). Odběry vzorků ze sklepa (a později i z lednice) byly realizovány v 1., 2., 3., 4., 7., 10., 13., 16., 20., 23., 27., 30., 34., 38., 43., 49., 56., 63., 70., 84., 98., 112., 126., 140., 154. a 168. dnu od počátku výroby (v den 1 byly sýry vyrobeny, vylisovány a uloženy do solné lázně, v den 2 byly sýry vyjmuty ze solné lázně, zabaleny do cryovacového obalu a uloženy do zracího sklepa).

Pro chemické analýzy byly z každé šarže a každého režimu zrání/skladování odebrány vždy 2 paralelní cihly. Další 2 paralelní cihly byly vždy odebrány pro texturní analýzu. V 1., 23., 38., 63., 98., 126. a 168. den zracího/skladovacího pokusu byla provedena i mikrobiologická analýza pro kterou byly odebrány rovněž 2 paralelní cihly z každé šarže a každého režimu zrání/skladování.

Z každé odebrané cihly byl asepticky příčně vykrojen 20mm středový pás, který byl rozdělen na 4 vrstvy: 7 mm od okraje (okraj, vrstva I), dalších 14 mm (vrstva II), dalších 14 mm (vrstva III) a zbylý střed (vrstva IV). Každá z těchto vrstev byla v jednotlivých odběrových dnech analyzována. Odběr vzorků a označení vrstev je schematicky zobrazeno na Obr. 3.1.

Vzorky byly podrobeny základnímu mikrobiálnímu rozboru, základní chemické analýze (sušina, pH a NaCl), analýze obsahu volných aminokyselin, biogenních aminů, proteinového profilu, texturní analýze střední vrstvy (její tvrdosti) a sensorické analýze. V tomto experimentu byly rovněž z analyzovaných sýrů izolovány a identifikovány mikroorganismy, které patří mezi producenty biogenních aminů.

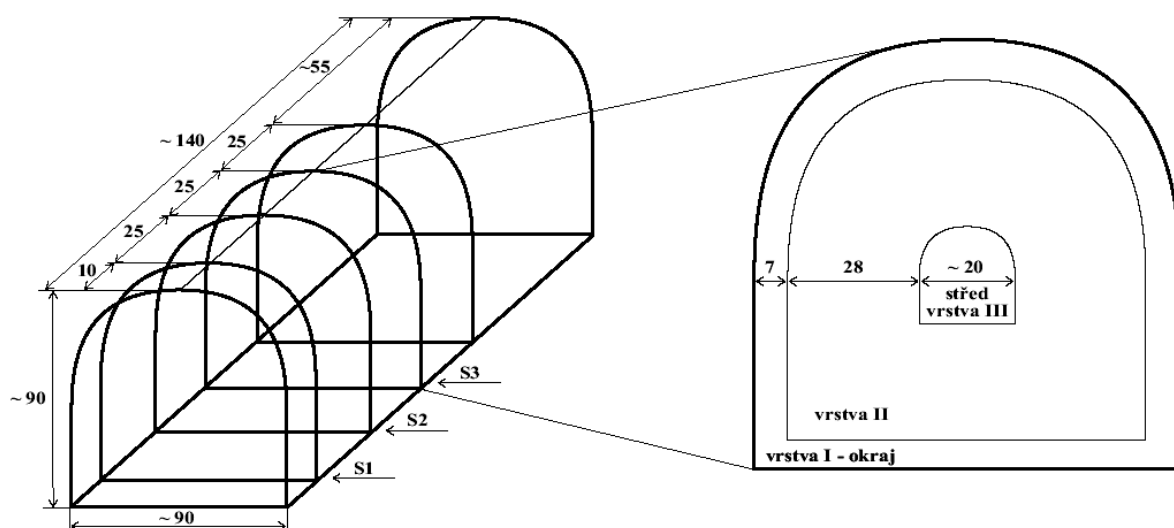


**Obr. 3.1:** Schematické znázornění odběru středového pásu a jeho rozdělení na 4 vrstvy Experimentu 1 (rozměry jsou uvedeny v mm)

### 3.1.2. Experiment 2

U stejného výrobce jako v Experimentu 1 bylo v rámci dalšího experimentu z jedné šarže odebráno 28 cihel (eidamská cihla, 30 % tuku v sušině;  $1,42 \pm 0,17$  kg), které zrály po dobu 126 dnů při optimální zrací teplotě  $10 \pm 2$  °C. Odběry vzorků ze zracího sklepa byly realizovány v 1., 4., 7., 14., 42., 84. a 112. dnu od počátku výroby (v den 1 byly sýry vyrobeny, vylisovány a uloženy do solné lázně, v den 2 byly sýry vyjmuty ze solné lázně, zabaleny a uloženy do zracího sklepa). Z každé cihly byl nejprve odkrojen 10mm plát a následně byly odebrány 3 pláty (tloušťka 25 mm) označené S1, S2 a S3, které byly dále rozděleny na 3 vrstvy: I. vrstva 7 mm, II. vrstva 28 mm a III. vrstvu tvořil střed sýra o rozměrech přibližně 20 x 20 mm. Návrh vzorkování je uveden na Obr. 3.2. Pro chemické a texturní analýzy byly odebrány vždy dvě různé cihly. Celý pokus byl třikrát zopakován. Experiment 2 byl zvolen jako předexperiment experimentu 3. Záměrem bylo sledovat zejména vývoj texturních vlastností napříč blokem sýra.

Vzorky byly podrobeny základní chemické analýze (stanovení pH, obsahu sušiny a NaCl) a texturní analýze (tzv. stress testy – viz dále).



**Obr. 3.2:** Schematické znázornění odběru tří pásů (S1, S2 a S3) a jeho rozdělení na 3 vrstvy Experimentu 2 a 3 (rozměry jsou uvedeny v mm)

### 3.1.3. Experiment 3

U stejného výrobce jako v Experimentech 1 a 2 bylo z jedné šarže odebráno 112 cihel (eidamská cihla, 30 % tuku v sušině;  $1,38 \pm 0,12$  kg) a uloženo do zracího sklepa na  $10 \pm 2$  °C. Čtvrtý den po výrobě bylo 54 cihel z dané šarže přesunuto do temperované komory ( $16 \pm 2$  °C) pro akceleraci zrání (vzorky E). Zbývající sýry zrály při teplotě  $10 \pm 2$  °C a sloužily pro srovnání jako kontrolní vzorky (vzorky D). Odběry vzorků ze zracího sklepa byly realizovány v 1., 4., 7., 14., 28., 42., 56., 70., 84. a 126. dni od počátku výroby. Vzorkování (rozdělení na pláty, resp. vrstvy) bylo shodné s Experimentem 2 (náčrt na Obr. 3.2). Pro chemické, texturní, sensorické i mikrobiologické analýzy byly odebrány vždy různé 2 cihly (tedy celkem 8 cihel, pokud se v daný čas prováděly všechny analýzy). Mikrobiální stanovení bylo realizováno 1., 4., 14., 28., 56., 70. a 126. den a sensorická analýza byla uskutečněna 42. a 126. den. Celý pokus byl třikrát zopakován.

Vzorky byly obdobně jako v Experimentu 1 podrobeny základnímu mikrobiálnímu rozboru, základní chemické analýze, analýze obsahu volných aminokyselin, biogenních aminů, texturní analýze (tzv. stress testy) a sensorické analýze.

## 3.2. Mikrobiologický rozbor

Mikrobiální jakost eidamské cihly byla v Experimentech 1 a 2 posouzena stanovením celkového počtu mezofilních aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů (Plate Count Agar (PCA) – kultivace 48 hodin při 30 °C) [106], enterobakterií (Endo Agar – kultivace 24 hodin při 37 °C) [107, 108]

a bakterií mléčného kvašení (M17 Agar obohacený o 0,5% (w/v) laktózy, inkubace 48 hodin při 30 °C) [109]. V Experimentu 3 bylo provedeno stanovení celkového počtu mezofilních aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů [106], enterobakterií [107, 108], mezofilních laktobacilů (MRS Agar, 48 hodin při 30 °C) [110], mezofilních laktokoků a streptokoků (M17 Agar s přidavkem 0,5% laktózy, 48 hodin při 30 °C). Navíc bylo provedeno v 70. dni u vzorků s akcelerací zráního procesu stanovení počtu aerobních sporulujících bakterií (PCA, 48 hodin při 30 °C), počtu anaerobních sporulujících bakterií (Reinforced Clostridial Agar (RCA), 72 hodin při 30 °C za anaerobních podmínek) a stanovení enterokoků (Slanetz and Bartley Agar, 48 hodin při 37 °C) [111].

U Experimentu 1 byly v 98. dnu zrání z Petriho misek náhodně vybrány a izolovány kolonie bakterií, které měly na příslušných kultivačních půdách odlišnou morfologii. Vyizolované a přečištěné bakterie byly podrobeny screeningové kultivační metodě detekující produkci biogenních aminů (histaminu, tyraminu, putrescinu a kadaverinu), ke které bylo využito dekarboxylační médium (agar) podle Bover-Cid & Holzapfel [112]. Agar obsahoval prekurzory testovaných biogenních aminů (aminokyseliny histidin, tyrozin, lyzin, ornitin a arginin) v koncentraci 1 % w/v a pH-indikátor (bromkresolová červeň). Izolované bakterie byly inkubovány při  $37 \pm 1$  °C a změna pH-indikátoru byla sledována po 24, 48 a 72 hodinách. Izoláty, které byly pomocí screeningové metody označeny jako potenciální producenty biogenních aminů, byly identifikovány na České sbírce mikroorganismů v Brně (vlastní průběh identifikace není předmětem této práce). Následně byla produkce biogenních aminů danými izoláty hodnocena také chromatograficky. V tomto experimentu byl rovněž analyzován provozní zákys použitý k výrobě sýrů. Bakterie byly vyizolovány a kultivovány screeningovou metodou detekující produkci biogenních aminů. Obdobně jako u izolátů ze sýrů byla produkce biogenních aminů hodnocena také chromatograficky. Analýza provozního zákysu sloužila k rozlišení producentů biogenních aminů pocházejících ze startérových kultur a z non-startérových kultur (NSLAB).

### **3.3. Chemická analýza**

Základní chemická analýza zahrnovala stanovení obsahu sušiny [113], pH (vpichový pH-metr, pH Spear for food testing, Eutech instruments), a NaCl (Mohrovou metodou) [114].

### **3.4. Stanovení obsahu volných aminokyselin**

Před samotnou analýzou obsahu volných aminokyselin byly vzorky z jednotlivých vrstev lyofilizovány použitím zařízení Chris Alpha 1-4 (Christ,

Osterode, Německo) a skladovány při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Lyofilizované vzorky (1 g) byly extrahovány při pokojové teplotě  $22 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  pomocí litno-citrátového pufru po dobu 1 hodiny. Následně byla směs centrifugována (6 000 g po 15 min při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), supernatant byl slit a pelet byl reextrahován opět pomocí litno-citrátového pufru. Po druhé extrakci byla směs znovu centrifugována (6 000 g po 15 min při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) a druhý supernatant byl slit s prvním supernatantem. Vzniklý supernatant byl filtrován přes  $0,45\mu\text{m}$  filtr. Každý vzorek z jednotlivých vrstev, paralelní eidamské cihly a zracího/skladovacího režimu byl extrahován dvakrát. Obsah volných aminokyselin byl analyzován pomocí iontově výměnné kapalinové chromatografie s postkolonovou ninhydrinovou derivatizací a fotometrickou detekcí (AAA 400, Ingos, Praha, ČR). Stanovovány byly aminokyseliny kyselina asparagová, treonin, serin, asparagin, kyselina glutamová, glutamin, prolin, glycin, alanin, valin, metionin, cystein, izoleucin, leucin, tyrozin, fenylalanin, lyzin, histidin, arginin, ornitin, citrulin a kyselina  $\gamma$ -aminomáselná [115].

### **3.5. Stanovení obsahu biogenních aminů**

Před samotnou analýzou obsahu biogenních aminů byly vzorky z jednotlivých vrstev lyofilizovány použitím zařízení Chris Alpha 1-4 (Christ, Osterode, Německo) a skladovány při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Lyofilizované vzorky byly eluovány po dobu 1 hodiny pomocí sodno-citrátového pufru (pH 2,2). Následně byla směs centrifugována (6 000 g po 15 min při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), supernatant byl slit a pelet byl reextrahován opět pomocí sodno-citrátového pufru. Po druhé extrakci byla směs znovu centrifugována (6 000 g po 15 min při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) a druhý supernatant byl slit s prvním supernatantem. Vzniklý supernatant byl filtrován přes  $0,45\mu\text{m}$  filtr. Každý vzorek z jednotlivých vrstev, paralelní eidamské cihly a zracího/skladovacího režimu byl extrahován dvakrát. Následně byly vzorky filtrovány přes  $0,45\mu\text{m}$  filtr. Obsah biogenních aminů (histamin, tyramin, putrescin a kadaverin) byl rovněž analyzován pomocí iontově výměnné kapalinové chromatografie s postkolonovou ninhydrinovou derivatizací a fotometrickou detekcí (AAA 400, Ingos, Praha, ČR). Postup analýzy vzorků sýrů je popsán v publikaci Buňková et al. [87]. Analýza bujónu po inkubaci testovaných mikroorganismů je popsána v práci [115].

### **3.6. SDS-PAGE analýza**

SDS-PAGE analýza byla použita pouze u experimentu 1. Vzorky byly připraveny dle metody popsané v [116]. Ke vzorku byl přidán 2-merkптоethanol, SDS a vzorkový pufr a vzorky byly 10 minut povařeny



(termoblok Bio TDB-100, Biosan, Riga, Litva). Polyakrylamidový gel (15%) a systém pufrů byl připraven podle [117] s použitím vertikální elektroforetické aparatury (Bio-Rad, PowerPac Universal, USA; Protean II xi Cell, USA). Pro určení molekulové hmotnosti separovaných proteinů byl využit molekulový hmotnostní standard Protein Test Mixture 5 (Serva, Heidelberg, Německo) s proteiny o definovaných molekulových hmotnostech 29,0; 21,0; 12,5 a 6,5 kDa. Snímky gelů byly analyzovány pomocí programu UltraQuant™ 6.0 (Ultra-Lum. Inc., Claremont, USA).

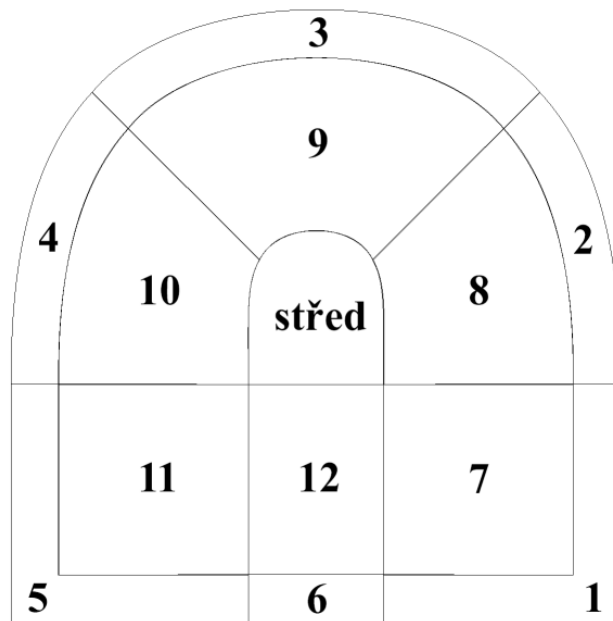
### 3.7. Analýza texturních vlastností

Pro texturní analýzu byl použit analyzátor textury TA.XT Plus (Stable Micro Systems, Velká Británie) vybavený 30 kg měřící celou. Vzorky (zabalené v plastové fólii jako prevence ztráty vlhkosti) byly před měřením 3 hodiny temperovány na 20 °C v temperační komoře. V Experimentu 1 byl použit kompresní test. Ze středu vytemperovaného plátu byl vykrojen válcový vzorek o průměru 40 mm a výšce 20 mm, vložen mezi desky analyzátoru textury (průměr 100 mm) a stlačen o 20 % (vztaženo k původní výšce vzorku; rychlost desky 1 mm·s<sup>-1</sup>). Hodnota tvrdosti (N) byla získána jako maximální síla naměřená během kompresního testu [118].

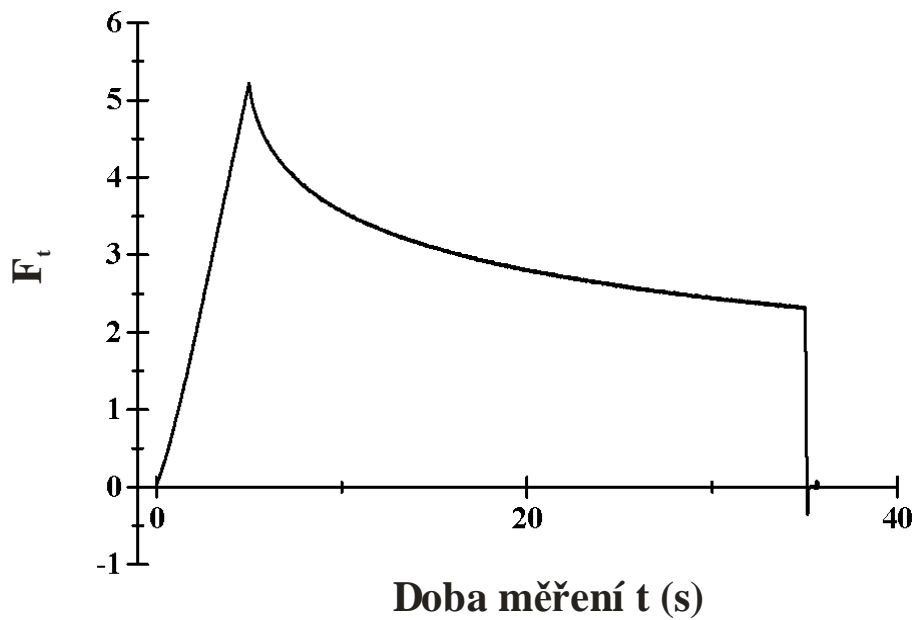
V Experimentech 2 a 3 byly pro detailnější texturní analýzu každého testovaného plátu provedeny tzv. stress testy s použitím sférické sondy o průměru 5 mm (P5S). Stress testy byly aplikovány na celkem 13 míst v rámci jednoho testovaného plátu (schematický znázorněno na Obr. 4). Při stress testu byl vzorek stlačen výše popsanou sondou rychlostí 1 mm·s<sup>-1</sup> do hloubky 5 mm (zahájení měření při síle odpovídající 5 g), následovala 30s výdrž a uvolnění sondy (rychlost sondy 1 mm·s<sup>-1</sup>). Grafické znázornění závislosti síly  $F_t$  na čase  $t$  odpovídá tzv. zátěžové křivce, jejíž příklad je na Obr. 3.3. Ze zátěžové křivky byla odečtena maximální síla  $F_{\max}$  (N), která je považována za ukazatel tvrdosti [119, 120].

Data ze stress testu je možné podrobit další analýze, ke které se však použila pouze část zátěžové křivky počínaje maximální silou ( $F_{\max}$ ) a konče okamžikem zahájení vytahování sondy ze vzorku (tedy cca 30 s analýzy) – viz Obr. 3.4 a 3.5, část A. Ze stress testu lze rovněž usuzovat na viskoelastické vlastnosti analyzovaných vzorků, a to způsobem podle Peleg [123, 124]. Hodnoty sil  $F_t$  v čase  $t$  se nejprve normalizují (Obr. 3.5, část A) podle vztahu (1):

$$Y_t = \frac{F_{\max} - F_t}{F_{\max}} \quad (1)$$



**Obr. 3.3:** Schematické znázornění 13 míst, kde byl proveden stress test

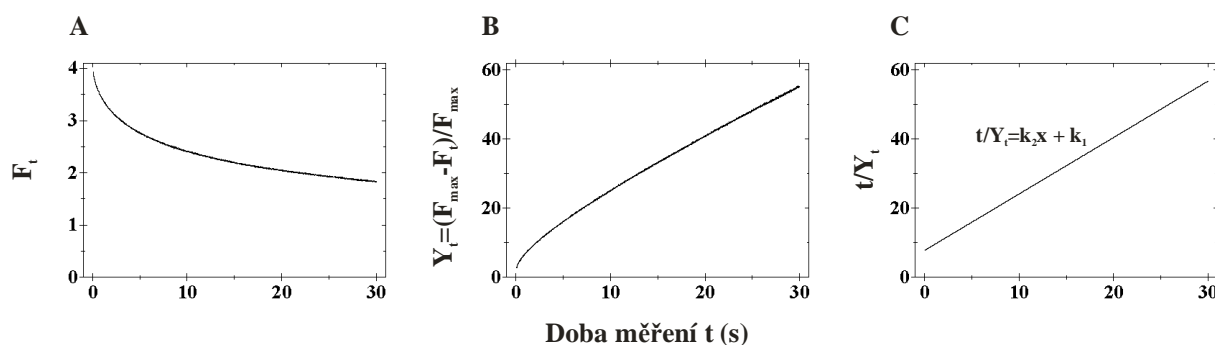


**Obr. 3.4:** Typická zátěžová křivka závislosti síly  $F_t$  na čase  $t$  získaná ze stress testu

Normalizovaná zátěžová křivka (Obr. 3.5, část B) se dále převede do linearizované podoby podle vztahu (2). V pravé části vztahu (2) je regresní křivka, jejíž parametry  $k_1$  a  $k_2$  se odhadnou metodou nelineární regresní analýzy (Marquardt-Levenburgova metoda). Pro výpočty byl využit statistický software Unistat 5.5.

$$\frac{t}{Y_t} = k_2 x + k_1 \quad (2)$$

Hodnocen je především parametr  $k_2$ , který indikuje rozsah relaxace materiálu. Hodnoty  $k_2 = 1$  odpovídají ideálně viskóznímu materiálu, při zvyšujícím se  $k_2$  narůstá podíl elastické složky [121].



**Obr. 3.5:** Grafické znázornění transformací prováděných v rámci Pelegova modelu: A – část zátěžové křivky použitá pro výpočet Pelegova modelu; B – normalizace hodnot  $F_t$  na  $Y_t$  (pomocí  $F_{\max}$ ); C – proložení linearizovaných hodnot  $t/Y_t$  regresní přímkou

### 3.8. Senzorická analýza

Senzorická analýza byla provedena pomocí stupnicových metod a pořadového testu. V případě hodnocení s použitím stupnic byly využity sedmibodové ordinální stupnice s charakteristikou každého stupně. Orientace hedonických škál byla volena tak, že 1. stupeň byl vyhrazen úrovni „vynikající“ a 7. stupeň úrovni „nepřijatelný“. V případě intenzitních stupnic odpovídal 1. stupeň minimální intenzitě a 7. stupeň maximální hladině. Takto bylo v případě Experimentu 1 posuzováno 5 sensorických znaků: vzhled

a barva, konzistence, chuť a vůně, tuhost a cizí pachuti. V Experimentu 3 byla sledována chuť a vůně spolu s intenzitou pachutí.

Senzorického hodnocení se účastnili studenti a zaměstnanci Ústavu biochemie a analýzy potravin a Ústavu technologie a mikrobiologie potravin (vybraní posuzovatelé podle ČSN ISO 8586-1 [125]). Hodnocení probíhalo v sensorické laboratoři vybavené kóji, vzorky označené kódy byly podávány při teplotě  $22 \pm 2$  °C [126].

### **3.9. Statistické vyhodnocení výsledků**

Výsledky chemických, mikrobiologických, texturních a sensorických analýz byly statisticky vyhodnoceny použitím Kruskal-Wallisova a Wilcoxonova testu. Využita byla rovněž vícerozměrná parametrická analýza rozptylu (ANOVA) a výpočet Pearsonových korelačních koeficientů. Výsledky proteinového profilu byly podrobeny shlukové analýze. K výpočtům byl využíván statistický software Unistat 5.5.

## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1. Výsledky a diskuze experimentu 1

V rámci tohoto pokusu byla sledována distribuce vybraných složek v závislosti na teplotním režimu skladování ve čtyřech vrstvách středového plátu eidamské cihly. V průběhu experimentu byl také pozorován vývoj tvrdosti pomocí kompresního testu.

#### 4.1.1. Mikrobiální analýza

Výsledky počtu aerobních mezofilních a fakultativně anaerobních bakterií (TC) a bakterií mléčného kvašení (LAB) v jednotlivých vrstvách přírodních sýrů v průběhu 168denního sledování jsou uvedeny v Tab. 1. V 1., 23. a 38. dnu analýzy byly počty TC i LAB u sýrů zrajících při 10 °C nejvyšší v I. vrstvě a nejnižší ve IV. vrstvě. Nicméně zmíněné rozdíly nebyly ani u jednoho analyzovaného režimu zrání/skladování signifikantní ( $P \geq 0,05$ ). Po 63, 126 a 168 dnech zrání se situace změnila a počty TC i LAB byly v I. vrstvě signifikantně vyšší ve srovnání s IV. vrstvou ( $P < 0,05$ ), a to u všech 3 testovaných režimů zrání/skladování. Komprda *et al.* [66, 67] došli ve svých experimentech k obdobnému závěru o rozdílnosti vývoje počtu mikroorganismů v jednotlivých vrstvách, který vysvětlují odlišnými podmínkami pro růst a průběh metabolismu mikroorganismů v jednotlivých částech sýrů. Novella-Rodríguez *et al.* [71] a Komprda *et al.* [67] za tyto podmínky považují především mikroenvironmentální podmínky, obsah  $O_2$  a vodní aktivitu.

Do 38. dne (včetně) nebyly zaznamenány signifikantní rozdíly v počtu sledovaných mikroorganismů (TC a LAB) mezi odpovídajícími si vrstvami vzorků A a kontrolními vzorky. Od 63. dne byly počty TC a LAB v jednotlivých vrstvách vzorků A signifikantně nižší ( $P < 0,05$ ) ve srovnání s odpovídajícími si vrstvami produktů B i kontrolními vzorky. Na druhou stranu v 63. dnu nebyly ještě shledány signifikantní rozdíly ( $P \geq 0,05$ ) v počtech TC a LAB mezi vzorky B a kontrolními vzorky (v příslušných vrstvách). Od 126. dne analýzy byly počty TC i LAB v odpovídajících si vrstvách nejvyšší u kontrolních vzorků, následovaly vzorky B a nejnižší počty byly zjištěny u produktů A. Tyto rozdíly byly na základě statistické analýzy u většiny vrstev klasifikovány jako signifikantní ( $P < 0,05$ ). Na rychleji snižující se počty TC a LAB v důsledku nižších teplot zrání/skladování upozorňují ve své studii Al-Otaibi & Wilbey [26].

**Tab. 1:** Počet mezofilních aerobních a fakultativně anaerobních bakterií (TC) a bakterií mléčného kvašení (LAB) ve vrstvách středového plátu eidamské cihly v průběhu experimentu 1 ( $\log \text{cfu g}^{-1}$ ;  $n = 24$ ; median  $\pm$  SD)

Den analýzy	Režim zrání/skladování	Vrstva	TC ( $\log \text{cfu g}^{-1}$ )	LAB ( $\log \text{cfu g}^{-1}$ )	
1	Kontrola	I	$6,26 \pm 0,35^a$ A	$5,92 \pm 0,37^a$ A	
		II	$5,95 \pm 0,51^a$ A	$5,35 \pm 0,50^a$ A	
		III	$5,86 \pm 0,36^a$ A	$5,48 \pm 0,38^a$ A	
		IV	$5,85 \pm 0,45^a$ A	$5,28 \pm 0,47^a$ A	
23	Kontrola	I	$8,17 \pm 0,48^a$ B	$7,61 \pm 0,44^a$ B	
		II	$7,88 \pm 0,49^a$ B	$7,50 \pm 0,50^a$ B	
		III	$7,59 \pm 0,34^a$ B	$7,31 \pm 0,34^a$ B	
		IV	$7,87 \pm 0,41^a$ B	$7,11 \pm 0,38^a$ B	
38	Kontrola	I	$8,06 \pm 0,34^a$ B	$7,40 \pm 0,34^a$ B	
		II	$8,19 \pm 0,22^a$ B	$7,28 \pm 0,22^a$ B	
		III	$7,87 \pm 0,34^a$ B	$7,24 \pm 0,35^a$ B	
		IV	$7,92 \pm 0,29^a$ B	$7,17 \pm 0,29^a$ B	
	A	I	$7,84 \pm 0,28^a$ A	$7,29 \pm 0,25^a$ A	
		II	$7,54 \pm 0,26^a$ A	$7,02 \pm 0,24^a$ A	
		III	$7,48 \pm 0,20^a$	$7,08 \pm 0,21^a$	
		IV	$7,43 \pm 0,43^a$ A	$6,91 \pm 0,47^a$ A	
63	Kontrola	I	$7,28 \pm 0,49^a$ C	$6,83 \pm 0,25^a$ C	
		II	$7,10 \pm 0,28^a$ C	$6,43 \pm 0,32^{a,b}$ C	
		IV	$6,46 \pm 0,40^b$ C	$6,24 \pm 0,39^{b,c}$ C	
	A	I	$6,50 \pm 0,42^b$ B	$6,02 \pm 0,40^c$ B	
		II	$5,81 \pm 0,37^c$ B	$5,47 \pm 0,35^d$ B	
		IV	$5,64 \pm 0,29^c$ B	$5,32 \pm 0,30^d$ B	
	B	I	$7,21 \pm 0,25^a$ A	$6,54 \pm 0,22^{a,b}$ A	
		II	$6,87 \pm 0,50^{a,b}$ A	$6,39 \pm 0,28^b$ A	
		IV	$6,19 \pm 0,31^b$ A	$6,12 \pm 0,30^c$ A	
	126	Kontrola	I	$7,16 \pm 0,33^a$ C	$6,79 \pm 0,25^a$ C
			II	$7,14 \pm 0,23^a$ C	$6,36 \pm 0,36^b$ C
			IV	$6,53 \pm 0,31^b$ C	$6,27 \pm 0,31^b$ C
A		I	$6,42 \pm 0,28^b$ B	$5,89 \pm 0,25^c$ B	
		II	$5,79 \pm 0,25^c$ B	$5,37 \pm 0,23^d$ B	
		IV	$5,10 \pm 0,32^d$ C	$5,10 \pm 0,32^d$ B	
B		I	$7,06 \pm 0,34^a$ A	$6,41 \pm 0,22^b$ A	
		II	$6,51 \pm 0,21^b$ A	$5,81 \pm 0,38^c$ A	
		IV	$6,30 \pm 0,31^b$ A	$5,66 \pm 0,21^c$ B	
168		Kontrola	I	$6,89 \pm 0,32^a$ C	$6,42 \pm 0,32^a$ D
			IV	$6,39 \pm 0,28^b$ C	$6,03 \pm 0,24^b$ D
		A	I	$5,77 \pm 0,18^c$ C	$5,65 \pm 0,20^c$ C
	IV		$5,27 \pm 0,42^d$ C	$5,15 \pm 0,23^d$ B	
	B	I	$6,61 \pm 0,25^b$ B	$6,12 \pm 0,33^b$ B	
		IV	$5,70 \pm 0,30^c$ B	$5,46 \pm 0,32^c$ B	

Mediány ve sloupci (rozdíly mezi vrstvami a zracími/skladovacími podmínkami) s rozdílnými horními indexy se statisticky odlišují ( $P < 0,5$ ); hodnoty v jednotlivých dnech byly vyhodnoceny odděleně. Mediány ve sloupci (rozdíly hodnot v závislosti na čase) s rozdílnými velkými písmeny se statisticky odlišují ( $P < 0,05$ ); jednotlivé vrstvy i režimy zrání/skladování byly hodnoceny samostatně.

V 1. dnu analýzy byly počty TC i LAB v odpovídajících si vrstvách signifikantně nižší ( $P < 0,05$ ) ve srovnání s 23. dnem, což lze vysvětlit velmi krátkou dobou mezi inokulací hlavního podílu startérových kultur a odběrem vylišovaných bloků (cca 3–4 hodiny), za kterou se nestačily startérové, popř. non-startérové, kultury pomnožit do svých maximálních počtů. Počty TC a LAB zjištěné po 23. a 38. dnech zrání/skladování byly signifikantně vyšší ( $P < 0,05$ ) ve srovnání s počty stanovenými po 126 a 168 dnech zrání/skladování (srovnány byly odpovídající si vrstvy a režimy zrání/skladování). Obdobný trend, tedy kontinuální pokles počtů TC i LAB v průběhu zračího pokusu, publikovali i Felon et al. [33], Al-Otaibi & Wilbey [26], Bergamini *et al.* [103], Komprda *et al.* [66].

Koliformní bakterie ani aerobní a anaerobní sporulující mikroorganismy nebyly v průběhu celého experimentu detekovány ani u jednoho režimu zrání/skladování.

Izolace mikroorganismů z přírodních sýrů (za účelem zjištění produkce vybraných biogenních aminů – histaminu, tyraminu, putrescinu anebo kadaverinu) byla prováděna pouze po 98. dnu zrání/skladování. Celkem bylo využitím De Man-Rogosa-Sharpe media vyizolováno 58 mikroorganismů, jejich dekarboxylační aktivita byla screeningově testována pomocí kultivační metody dle Bover-Cid & Holzapfel [112]. Kultivační metoda označila 11 izolátů (změna barvy pH-indikátoru) jako potenciálně produkující tyramin, putrescin a nebo kadaverin, přičemž z I. vrstvy pocházely 4 kmeny a z IV. vrstvy 7 kmenů. Ve spolupráci s Českou sbírkou mikroorganismů v Brně byly kmeny identifikovány jako *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* (3 kmeny), *Lactobacillus plantarum* (1 kmen), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (1 kmen) a *Lactobacillus casei/paracasei* (6 kmenů) (Tab. 2). Kromě vyšetření přírodních sýrů byl stejné analýze podroben i provozní zákys, který byl použit k inokulaci mléka při výrobě testovaných přírodních sýrů. Z provozního zákysu bylo celkem vyizolováno 15 mikroorganismů, z nichž kultivační metoda dle Bover-Cid & Holzapfel [112] označila 3 kmeny jako potenciálně produkující biogenní aminy. Tři izoláty (BS-2, BS-3, BS-6) byly identifikovány jako zástupci druhu *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Tab. 2).

Tvorba biogenních aminů vyizolovanými a identifikovanými bakteriemi, které screeningová metoda označila jako potenciálně produkující některý z testovaných biogenních aminů (histamin, tyramin, putrescin anebo kadaverin), byla kvantifikována pomocí chromatografického stanovení obsahu těchto sekundárních metabolitů v dekarboxylačním médiu. Obsah biogenních aminů byl zhodnocen a rozdělen do 4 skupin: (i) produkce biogenního aminu nebyla zjištěna; (ii) slabá produkce ( $< 10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ); (iii) střední produkce ( $10 - 100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ); a (iv) silná produkce ( $> 100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) biogenních aminů. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 2.

U žádného ze tří kmenů *L. lactis* (BS-2, BS-3, BS-6) vyizolovaných z provozního zákysu nebyla chromatografickou metodou zjištěna produkce sledovaných biogenních aminů (histaminu, tyraminu, putrescinu ani kadaverinu). U jednoho izolátu z I. vrstvy identifikovaného jako *Lb. casei/paracasei* (LI-5) nebyla chromatografickou metodou zjištěna produkce žádného z testovaných biogenních aminů. Dva kmeny *Lb. curvatus* (LI-2, LI-3) získané z I. vrstvy testovaných přírodních sýrů vykazovaly silnou až velmi silnou produkci tyraminu a putrescinu, přičemž jeden z těchto kmenů (LI-3) slabě produkoval i kadaverin. K produkci tyraminu v I. vrstvě pravděpodobně přispíval i *Lb. plantarum* (LI-7) středně silnou produkcí tohoto sekundárního metabolitu.

**Tab.2:** Produkce biogenních aminů (tyramin, putrescin a kadaverin) izolovanými a identifikovanými mikroorganismy.

Zdroj izolátu	Číslo kmenu	Druh <sup>a</sup>	Produkce biogenních aminů <sup>b</sup>		
			Tyramin	Putrescin	Kadaverin
Provozní zákys	BS-2	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	ND	ND	ND
	BS-3	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	ND	ND	ND
	BS-6	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	ND	ND	ND
I. vrstva sýra	LI-2	<i>Lb. curvatus</i>	+++	++	+
	LI-3	<i>Lb. curvatus</i>	+++	+++	ND
	LI-5	<i>Lb. casei/paracasei</i>	ND	ND	ND
	LI-7	<i>Lb. plantarum</i>	++	ND	ND
IV. vrstva sýra	LIV-1	<i>Lb. casei/paracasei</i>	ND	ND	ND
	LIV-3	<i>Lb. casei/paracasei</i>	ND	ND	ND
	LIV-9	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	ND	ND	ND
	LIV-11	<i>Lb. casei/paracasei</i>	++	ND	+
	LIV-13	<i>Lb. casei/paracasei</i>	++	ND	+
	LIV-15	<i>Lb. curvatus</i>	+++	+++	ND
LIV-18	<i>Lb. casei/paracasei</i>	ND	ND	ND	

<sup>a</sup> *Lactobacillus* – *Lb.*, *Lactococcus* – *Lc.*

<sup>b</sup> Rozmezí koncentrací: biogenní aminy nedetekovány (ND); < 10 mg·l<sup>-1</sup> (+); 10 - 100 mg·l<sup>-1</sup> (++); > 100 mg·l<sup>-1</sup> (+++); n = 12; všechny kmeny byly negativní na produkci histaminu.

Ve IV. vrstvě bylo 5 izolátů (LIV-1, LIV-3, LIV-11, LIV-13, LIV-18) identifikováno jako *Lb. casei/paracasei*, přičemž u tří z nich (LIV-1, LIV-3, LIV-18) nebyla chromatografickou metodou zjištěna produkce testovaných sekundárních metabolitů. Na druhou stranu zbývající 2 izoláty (LIV-11, LIV-13) produkovaly středně silně tyramin a slabě i kadaverin. Ve výše zmíněné vrstvě byl identifikován i jeden kmen *Lb. curvatus* (LIV-15) s velmi



silnou produkcí tyraminu a putrescinu. Poslední kmen (LIV-9) izolovaný ze IV. vrstvy, označený kultivační metodou jako potenciálně pozitivní na produkci biogenních aminů, byl identifikován jako *L. lactis* subsp. *lactis*, který pravděpodobně pocházel z provozního zákysu. U posledně jmenovaného izolátu (LIV-9) však produkce biogenních aminů nebyla pomocí chromatografické metody detekována.

Z mikrobiologické analýzy přírodních sýrů a provozního zákysu a základního screeningu izolovaných bakterií bylo pomocí kultivační metody označeno 14 bakterií jako potenciálních původců biogenních aminů. Dalšími testy bylo prokázáno, že kultivační test byl v 8 případech falešně pozitivní. Nebezpečí falešně pozitivních určení produkce biogenních aminů již publikovali např. Actis *et al.* [128] a Buňková *et al.* [115]. Buňková *et al.* [115] toto vysvětluje tím, že kultivované bakterie mohou produkovat látky s alkalickou reakcí (jiné než biogenní aminy), čímž se ruší účinky testu, který je založen na barevné změně pH indikátoru.

Jako producenti biogenních aminů byli v okrajové vrstvě identifikováni *Lb. curvatus* jako dominantní původce a dále *Lb. plantarum*. Ve středu sýra byli jako původci biogenních aminů označeni *Lb. curvatus* (silný producent) a *Lb. casei/paracasei*. Podle Wouters *et al.* [129] patří všechny výše jmenované druhy k obvyklým zástupcům, kteří bývají izolováni z přírodních sýrů. Sem pravděpodobně přecházejí z mléka anebo z prostředí. Burdychová & Komprda [130] v souladu s touto prací rovněž vyizolovali kmen *Lb. curvatus* z přírodních sýrů holandského typu a označili jej za jednoho z původců biogenních aminů. Kromě laktobacilů bývají jako producenti biogenních aminů v přírodních sýrech rovněž identifikováni zástupci rodů *Lactococcus* a *Enterococcus* [120, 130].

Podle Arena *et al.* [131] patří některé kmeny *Lb. plantarum* k producentům tyraminu, což je v souladu s našimi výsledky. Arena *et al.* [132] dále dodávají, že určité kmeny *Lb. plantarum* jsou schopny produkovat i putrescin. V naší studii však produkce putrescinu u výše jmenovaného izolátu detekována nebyla. Kmeny *Lb. curvatus* jsou v literatuře rovněž popisovány jako producenti tyraminu a putrescinu [133, 134], což koresponduje s výsledky této studie. Kmeny *Lb. curvatus* (izolované a identifikované v této studii) byly detekovány jako výhradní producenti putrescinu u sledovaných přírodních sýrů. Jeden kmen *Lb. curvatus* izolovaný v rámci této práce produkoval také kadaverin, což podle dostupné literatury není obvykle popisováno. *Lb. curvatus* se jako spontánní mikroflóra vyskytuje nejen v mléčných výrobcích, ale také ve fermentovaných masných výrobcích, kde rovněž vykazuje silnou dekarboxylační aktivitu [135, 136]. U dvou z šesti vyizolovaných a identifikovaných kmenů *Lb. casei/paracasei* (LIV-11, LIV-13) byla detekována dekarboxylační aktivita vedoucí k produkci tyraminu a kadaverinu. Kmeny *Lb. casei* a *Lb. paracasei* jsou sice dle Wouters *et al.* [129] a Öner *et al.* [137] častými zástupci NSLAB

v přírodních sýrech, na druhou stranu podle Landete *et al.* [138] nepatří k obvyklým producentům biogenních aminů.

Řada publikací (např. Komprda *et al.*, [66, 67] Burdychová & Komprda [130] popisuje histamin jako biogenní amin, jehož incidence je v přírodních sýrech vysoká. Během této studie však histamin detekován nebyl, a to ani v přírodních sýrech ani u vyzolovaných bakterií.

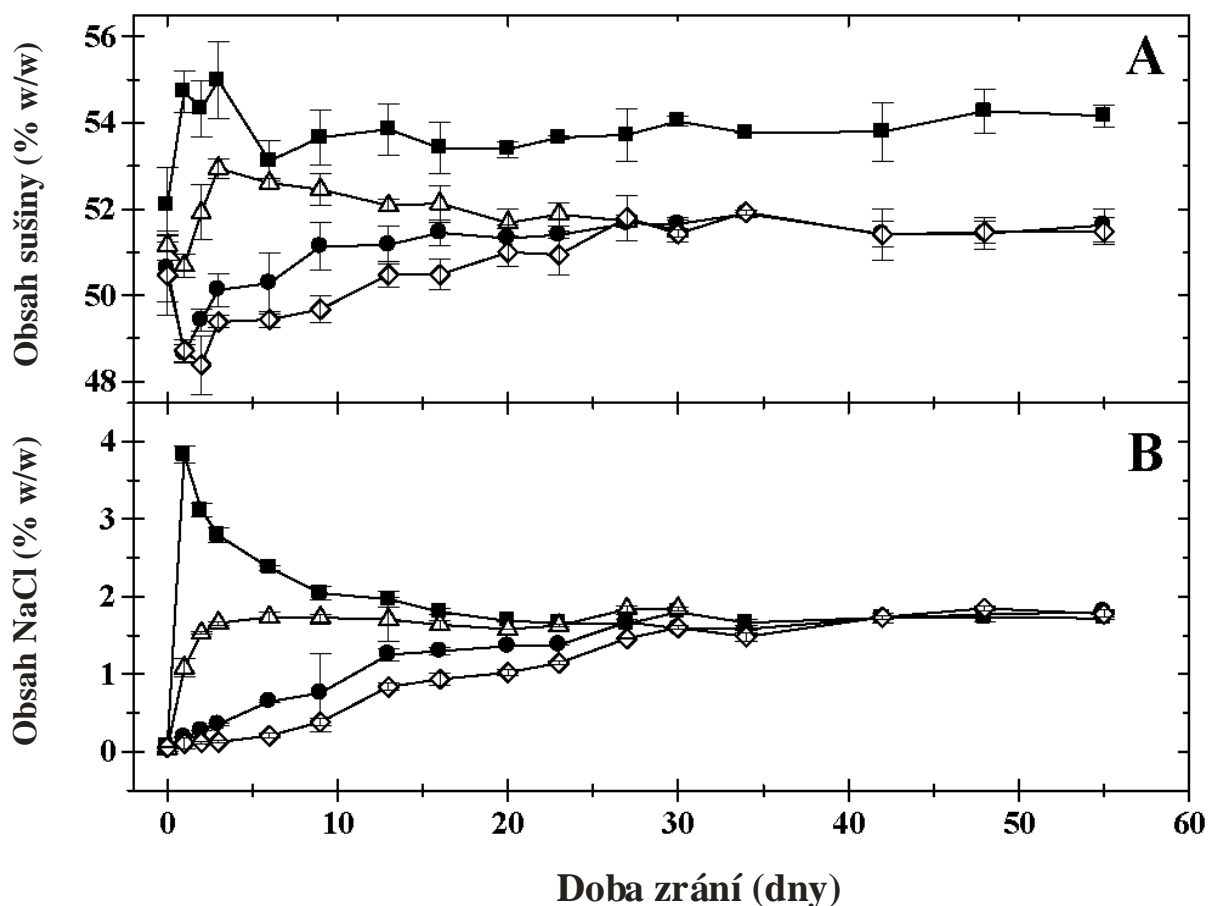
#### 4.1.2. Základní chemická analýza

V první den analýzy (sýřenina bezprostředně po vylisování před uložením do solné lázně) nebyly zjištěny výrazné rozdíly ( $P \geq 0,05$ ) v průměrném obsahu NaCl ve všech analyzovaných vrstvách. Hodnoty NaCl se pohybovaly v rozmezí 0,04–0,06 % (w/w). Obsah sušiny se u I. vrstvy (okraj plátu) pohyboval na úrovni  $52,09 \pm 0,46$  % (w/w) a byl signifikantně vyšší ( $P < 0,05$ ) ve srovnání s ostatními třemi vrstvami s průměrným obsahem sušiny v rozmezí 50,46–51,16 % (w/w).

Druhý den analýzy (po vyjmutí sýřeniny ze solné lázně a jejím okapání) obsah sušiny a NaCl vzrostl u první vrstvy (okraj plátu) na  $54,72 \pm 0,48$  % (w/w), respektive na  $3,83 \pm 0,11$  % (w/w). Obsahy sušiny a NaCl v I. vrstvě byly signifikantně vyšší ( $P < 0,01$ ) ve srovnání s ostatními vrstvami. Naopak průměrný obsah sušiny u III. a IV. vrstvy (střed plátu) se snížil a pohyboval se v intervalu 48,64–48,72 % (w/w). Ke zvýšení koncentrace NaCl v okrajové vrstvě dochází v důsledku difúzně-osmotických procesů probíhajících při solení sýrů v solné lázni [8, 23]. Vývoj obsahu sušiny a NaCl ve 4 analyzovaných vrstvách eidamské cihly v průběhu prvních 50 dnů zrání při 10 °C zobrazuje Obr. 4.1 (po 50. dnu již změny nebyly signifikantní – viz dále).

Obr. 4.1, část A znázorňuje vyrovnávání obsahu sušiny u II., III. a IV. vrstvy v průběhu prvních 30 dnů ( $P \geq 0,05$ ) a po následující období (až do 168. dne) obsah sušiny osciloval mezi 51–52 % (w/w). Naopak u I. vrstvy zůstal obsah sušiny signifikantně vyšší ( $P < 0,01$ ) po celou dobu sledování (168 dnů) ve srovnání s ostatními vrstvami, a to bez ohledu na podmínky zrání/skladování. Rozdíl mezi okrajovou vrstvou a zbytkem sýra činil přibližně 2 % (w/w). Uspokojivé vysvětlení tohoto jevu nebylo v dostupné literatuře nalezeno. Pravděpodobně se může jednat o důsledky povrchových interakcí mezi okrajem sýra a cryovacovým obalem [8].

Jak je patrné z Obr. 4.1, část B, obsah NaCl se ve všech 4 analyzovaných vrstvách postupně vyrovnal a od 30. dne zrání se obsahy NaCl ve vrstvách I–IV signifikantně ( $P \geq 0,05$ ) nelišily. Průměrné hodnoty NaCl se v jednotlivých vrstvách (I–IV) až do ukončení zračního pokusu (168. den) pohybovaly v intervalu 1,70–1,80 % (w/w). Různé podmínky zrání/skladování neměly podstatný vliv ( $P \geq 0,05$ ) na obsah sušiny a NaCl v jednotlivých vrstvách.



**Obr. 4.1:** Vývoj obsahu sušiny (část A) a difúze NaCl (část B) ve vzorku uloženém ve zracím sklepě při  $10 \pm 2$  °C: I. vrstva (■); II. vrstva ( $\Delta$ ); III. vrstva (●) a IV. vrstva ( $\diamond$ )

Hodnoty pH nebyly v experimentu 1 měřeny po jednotlivých vrstvách. Měřicí sonda byla vložena do šesti míst ve středovém pásu cihly reprezentujícím všechny vrstvy přírodního sýra. V první den analýzy bylo pH  $5,42 \pm 0,03$ , které se v následujících dvou dnech signifikantně ( $P < 0,05$ ) snížilo až na hodnotu  $5,26 \pm 0,04$ . Od 4. dne se začaly hodnoty pH znovu zvyšovat a od 43. dne analýzy až do ukončení experimentu se již pohybovaly v intervalu pH 5,65–5,80, a to bez ohledu na režim zrání/skladování ( $P \geq 0,05$ ). Vývoj pH odpovídal běžným biochemickým procesům probíhajícím v polotvrdých sýrech eidamského typu [8, 23]. Prvotní snižování pH lze vysvětlit dokončením mikrobiologického rozkladu laktózy především za vzniku kyseliny mléčné, která byla v následujících dnech dále metabolizována, například za vzniku acetátu,  $\text{CO}_2$ , diacetylu a jiných sloučenin [21, 23, 62].

### 4.1.3. Stanovení obsahu volných aminokyselin

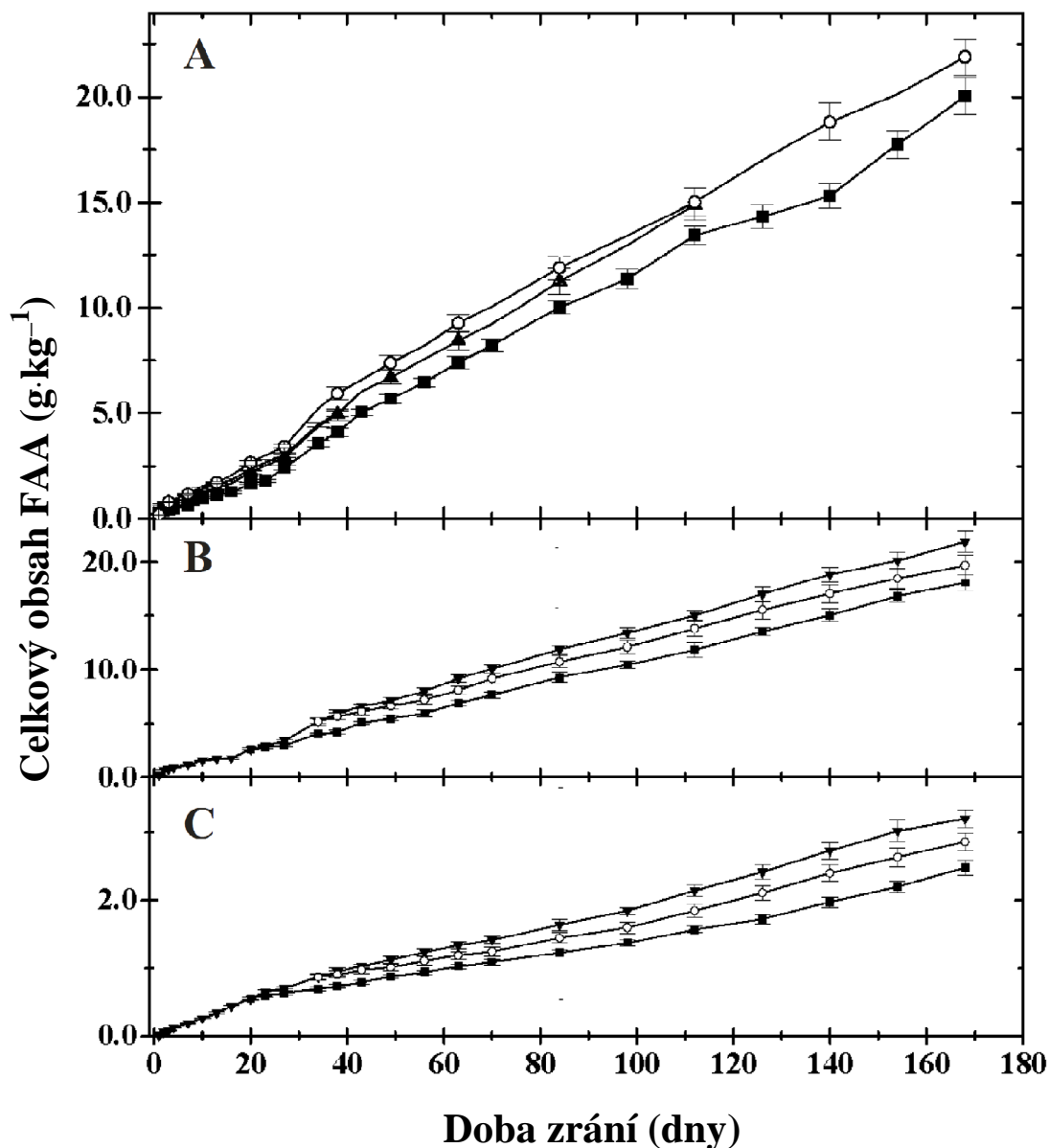
Vývoj celkového obsahu analyzovaných volných aminokyselin v jednotlivých vrstvách u všech vzorků, včetně kontrolních, v průběhu 168 dnů zrání je prezentován na Obr. 4.2. Z výsledků vyplynulo, že celkový obsah volných aminokyselin v II. a III. vrstvě se u kontrolních vzorků od 20. dne prakticky nelišil ( $P \geq 0,05$ ) a tento stav byl následující 4 odběrové dny znovu potvrzován (23., 27., 34. a 38. den). Od 27. dne bylo vyrovnání II. a III. vrstvy pozorováno i u vzorků A. Od 98. dne analýz bylo možné pozorovat vyrovnávání celkového obsahu volných aminokyselin ( $P \geq 0,05$ ) také mezi II. vrstvou (vzniklou od 43. dne spojením II. a III. vrstvy) a IV. vrstvou, a to jak u kontrolních vzorků, tak také u vzorků A a B (data nejsou prezentována). Již od 2. dne analýz (až do konce experimentu – 168 dne) byl u kontrolních vzorků ve IV. vrstvě detekován signifikantně vyšší celkový obsah volných aminokyselin ( $P < 0,01$ ) ve srovnání s I. vrstvou. Tento rozdíl ( $P < 0,01$ ) byl zaznamenán také u vzorků A a B od 27. resp. 43. dne analýz (rovněž až do konce experimentu ve 168. dnu; data nejsou prezentována). U všech režimů zrání/skladování platilo, že s narůstající dobou zrání/skladování se celkový obsah volných aminokyselin v jednotlivých vrstvách zvyšoval ( $P < 0,01$ ).

Nárůst obsahu volných aminokyselin v průběhu zracích procesů popisují ve svých studiích Felon *et al.* [33], Pinho *et al.* [69], Gorostiza *et al.* [139], Bergamini *et al.* [103] nebo Topcu *et al.* [118]. Tyto změny souvisí s rozsáhlým extra- i intracelulárním proteolytickým aparátem (enzymy) startérových a non-startérových LAB [8, 21, 23, 60, 62]. Některé volné aminokyseliny však mohou vznikat i při sekundárních biochemických procesech, např. kyselina glutamová z  $\alpha$ -ketoglutarátu činností mikrobiálních aminotransferáz [21, 23, 60, 62]. Rozdíly v intenzitě proteolytických procesů pravděpodobně souvisí s různými mikroenvironmentálními podmínkami v jednotlivých vrstvách, čímž dochází k ovlivnění metabolismu LAB [66, 67, 71].

Ze srovnání vývoje celkového obsahu volných aminokyselin u jednotlivých režimů zrání/skladování vyplynulo, že v odpovídajících si vrstvách byl signifikantně nejvyšší obsah ( $P < 0,01$ ) detekován u kontrolních vzorků, následovaly vzorky B a nejnižší obsah byl ve vzorcích A. Pro IV. vrstvy je výše zmíněný vývoj prezentován na Obr. 4.2, část B (pro ostatní vrstvy data nejsou prezentována). Pomalejší nárůst obsahu volných aminokyselin v důsledku nižších teplot zrání/skladování a tím pomalejší činnosti mikroorganismů popisují i Al-Otaibi & Wilbey [26].

Celkový obsah volných aminokyselin byl vypočten jako součet 22 testovaných aminokyselin a jejich derivátů, jejichž koncentrace v jednotlivých vrstvách u vzorků A, B a kontrolních vzorků je pro 49. a 168. den prezentována v Tab. 3. Z hlediska obsahu byl nejvýznamnější volnou aminokyselinou leucin, a to v průběhu celého

168denního experimentu. Tuto volnou aminokyselinu je možné podle Fenelon *et al.* [33], Pinho *et al.* [69] a Gorostiza *et al.* [139] považovat za indikátorovou a reprezentativní volnou aminokyselinu. Proto je vývoj obsahu leucinu ve IV. vrstvě u výrobků uchovávaných v režimu A, B a kontrolních vzorcích zobrazen na Obr. 4.2, část C.



**Obr. 4.2:** Obsah volných aminokyselin ( $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) v jednotlivých vrstvách eidamské cihly v závislosti na době zrání (dny): A – celkový obsah volných aminokyselin během zrání ve sklepě při  $10 \pm 2$  °C (kontrolní vzorky); ■ – vrstva I; ▲ – vrstva II; ◇ – vrstva III; ○ – vrstva IV. B – celkový obsah volných aminokyselin ve vrstvě IV; ● – vzorky A; ▽ – vzorky B; ◆ – kontrolní vzorky. C – obsah volného leucinu ve vrstvě IV; ● – vzorky A; ▽ – vzorky B; ◆ – kontrolní vzorky. Obsah volných aminokyselin byl vyjádřen jako průměr; chybové úsečky reprezentují směrodatnou odchylku průměrné hodnoty. ( $n = 16$ ).

Nejvyšší obsahy volného leucinu byly v jednotlivé dny analýz zaznamenávány u kontrolních vzorků ve IV. vrstvě (Obr. 4.2, část C;  $P < 0,01$ ), naopak nejnižší koncentrace byly detekovány v I. vrstvě u vzorků A (data nejsou prezentována;  $P < 0,01$ ). Vývoj obsahu většiny ostatních aminokyselin a některých jejich derivátů (treonin, serin, kyselina asparagová, asparagin, kyselina glutamová, glutamin, prolin, glycin, alanin, valin, metionin, cystein, izoleucin, fenylalanin, lyzin, histidin,  $\gamma$ -aminomáselná kyselina) měl obdobný trend a pozitivně koreloval s vývojem obsahu leucinu, což vyplývá z vysokých korelačních koeficientů ( $P < 0,001$ ) pohybujících se v intervalu 0,8454–0,9929. Výjimku tvořily aminokyseliny: arginin (korelační koeficient 0,0156;  $P \geq 0,05$ ), ornitin a citrulin (korelační koeficienty 0,8313, respektive 0,5561;  $P < 0,01$ ) a dále tyrozin (korelační koeficient 0,2379;  $P \geq 0,05$ ).

Arginin a jeho katabolismus má poměrně důležité postavení mezi ostatními volnými aminokyselinami. Podle Christensen *et al.* [60] využívají LAB volný arginin nejen k syntéze svých proteinů a peptidů (jako ostatní aminokyseliny), ale také k získávání energie. Dochází zde ke konverzi volného argininu za vzniku amoniaku, ornitinu (s meziproductem – citrulinem),  $\text{CO}_2$  a adenosin trifosfátu. Obsah argininu v naší studii byl po celou dobu experimentu velmi malý ( $< 0,03 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), a to bez ohledu na režim zrání/skladování. Pravděpodobně docházelo k tomu, že uvolněný arginin byl prakticky ihned použit k syntéze nových proteinů nebo k produkci energie. Průběh posledně zmíněné možnosti podporuje i narůstající obsah ornitinu a citrulinu v průběhu zrání. Na nízké obsahy volného argininu v průběhu 180denního zrání poukazuje také Felon *et al.* [33].

Rovněž tyrozin patří k volným aminokyselinám, které jsou v rámci sekundárních biochemických procesů poměrně rychle metabolizovány za vzniku řady senzorycky aktivních látek [60, 62]. Tyrozin je rovněž prekurzorem pro vznik biogenního aminu tyraminu, jehož vysoké obsahy (cca  $\geq 100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) se v přírodních sýrech mohou vyskytovat a ohrozit tak jejich bezpečnost pro konzumenta [21, 23, 115].

Výskyt  $\gamma$ -aminomáselné kyseliny v přírodních sýrech byl publikován řadou autorů (např. Christensen *et al.* [60]; McSweeney & Sousa [21]; Smit *et al.* [62]). Její vznik je spojován především s dekarboxylací kyseliny glutamové. Zoon & Allersma [140] její přítomnost dokonce spojuje se vznikem ok v sýru. Podle této publikace existuje pozitivní korelace mezi produkcí  $\text{CO}_2$  a  $\gamma$ -aminomáselnou kyselinou a počtem a velikostí ok.

**Tab. 3:** Obsah volných aminokyselin ( $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) v jednotlivých vrstvách eidamské cihly skladované za 3 odlišných teplotních režimů – výsledky získané ze 49. a 168. dne ( $n = 16$ ; průměr  $\pm$  SD)

Den	Aminokyselina	Zrací/skladovací podmínky								
		Kontrolní vzorek			vzorek A			vzorek B		
		I. vrstva	II. vrstva	IV. vrstva	I. vrstva	II. vrstva	IV. vrstva	I. vrstva	II. vrstva	IV. vrstva
49	Kyselina asparagová	$0,10 \pm 0,00^a$ K	$0,11 \pm 0,00^a$ K	$0,13 \pm 0,00^b$ K	$0,07 \pm 0,01^a$ L	$0,07 \pm 0,00^a$ L	$0,10 \pm 0,01^b$ L	$0,10 \pm 0,01^a$ K	$0,10 \pm 0,01^a$ K	$0,11 \pm 0,01^a$ L
	Threonin	$0,35 \pm 0,02^a$ K	$0,38 \pm 0,05^{ab}$ K	$0,42 \pm 0,01^b$ K	$0,22 \pm 0,02^a$ L	$0,24 \pm 0,00^a$ L	$0,30 \pm 0,02^b$ L	$0,30 \pm 0,02^a$ M	$0,30 \pm 0,05^a$ K	$0,34 \pm 0,05^a$ L
	Serin	$0,12 \pm 0,00^a$ K	$0,15 \pm 0,01^b$ K	$0,15 \pm 0,01^b$ K	$0,10 \pm 0,01^a$ L	$0,10 \pm 0,01^a$ L	$0,12 \pm 0,01^b$ L	$0,11 \pm 0,01^a$ KL	$0,13 \pm 0,01^b$ K	$0,13 \pm 0,01^b$ KL
	Asparagin	ND ‡	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Kyselina glutamová	$0,46 \pm 0,02^a$ K	$0,53 \pm 0,03^b$ K	$0,58 \pm 0,01^c$ K	$0,32 \pm 0,00^a$ L	$0,42 \pm 0,02^b$ L	$0,46 \pm 0,01^c$ L	$0,43 \pm 0,04^a$ K	$0,50 \pm 0,05^b$ K	$0,53 \pm 0,03^b$ M
	Glutamin	$0,21 \pm 0,01^a$ K	$0,23 \pm 0,01^a$ K	$0,29 \pm 0,00^b$ K	$0,18 \pm 0,01^a$ L	$0,20 \pm 0,01^b$ L	$0,26 \pm 0,03^c$ L	$0,22 \pm 0,03^a$ K	$0,22 \pm 0,03^a$ K	$0,27 \pm 0,01^b$ L
	Prolin	$0,22 \pm 0,02^a$ K	$0,26 \pm 0,00^b$ K	$0,23 \pm 0,02^{ab}$ K	$0,16 \pm 0,00^a$ L	$0,19 \pm 0,00^b$ L	$0,17 \pm 0,01^{ab}$ L	$0,18 \pm 0,01^a$ M	$0,23 \pm 0,02^b$ M	$0,22 \pm 0,02^b$ K
	Glycin	$0,14 \pm 0,01^a$ K	$0,15 \pm 0,01^a$ K	$0,15 \pm 0,00^a$ K	$0,10 \pm 0,00^a$ L	$0,09 \pm 0,00^a$ L	$0,09 \pm 0,01^a$ L	$0,13 \pm 0,01^a$ K	$0,15 \pm 0,00^b$ K	$0,15 \pm 0,01^b$ K
	Alanin	$0,16 \pm 0,01^a$ K	$0,16 \pm 0,01^a$ K	$0,17 \pm 0,01^a$ K	$0,11 \pm 0,00^a$ L	$0,15 \pm 0,01^b$ K	$0,17 \pm 0,01^c$ K	$0,13 \pm 0,01^a$ M	$0,15 \pm 0,01^{ab}$ K	$0,17 \pm 0,01^b$ K
	Valin	$0,46 \pm 0,00^a$ K	$0,50 \pm 0,01^b$ K	$0,51 \pm 0,00^b$ K	$0,30 \pm 0,02^a$ L	$0,33 \pm 0,02^a$ L	$0,36 \pm 0,02^b$ L	$0,45 \pm 0,05^a$ K	$0,49 \pm 0,04^{ab}$ M	$0,50 \pm 0,02^b$ K
	Metionin	$0,18 \pm 0,01^a$ K	$0,20 \pm 0,01^b$ K	$0,20 \pm 0,00^b$ K	$0,12 \pm 0,01^a$ L	$0,14 \pm 0,00^b$ L	$0,15 \pm 0,01^b$ L	$0,16 \pm 0,01^a$ K	$0,18 \pm 0,01^b$ M	$0,19 \pm 0,01^b$ K
	Cystein	$0,06 \pm 0,00^a$ K	$0,09 \pm 0,00^b$ K	$0,09 \pm 0,00^b$ K	$0,05 \pm 0,00^a$ L	$0,07 \pm 0,00^b$ L	$0,10 \pm 0,01^c$ K	$0,07 \pm 0,01^a$ K	$0,08 \pm 0,01^a$ KL	$0,09 \pm 0,00^b$ K
	Isoleucin	$0,13 \pm 0,00^a$ K	$0,14 \pm 0,01^a$ K	$0,16 \pm 0,00^b$ K	$0,08 \pm 0,01^a$ L	$0,10 \pm 0,00^b$ L	$0,12 \pm 0,01^c$ L	$0,11 \pm 0,01^a$ M	$0,13 \pm 0,01^b$ K	$0,14 \pm 0,00^b$ M
	Leucin	$1,00 \pm 0,01^a$ K	$1,09 \pm 0,03^b$ K	$1,12 \pm 0,01^b$ K	$0,68 \pm 0,04^a$ L	$0,75 \pm 0,03^b$ L	$0,78 \pm 0,03^b$ L	$0,97 \pm 0,09^a$ K	$1,03 \pm 0,08^{ab}$ K	$1,09 \pm 0,04^b$ M
	Tyrosin	$0,17 \pm 0,00^a$ K	$0,29 \pm 0,01^b$ K	$0,36 \pm 0,01^c$ K	$0,07 \pm 0,01^a$ L	$0,19 \pm 0,00^b$ L	$0,23 \pm 0,02^c$ L	$0,15 \pm 0,01^a$ M	$0,27 \pm 0,02^b$ K	$0,33 \pm 0,01^c$ M
	Phenylalanin	$0,63 \pm 0,02^a$ K	$0,70 \pm 0,01^b$ K	$0,74 \pm 0,00^c$ K	$0,41 \pm 0,02^a$ L	$0,46 \pm 0,02^b$ L	$0,49 \pm 0,03^b$ L	$0,63 \pm 0,05^a$ K	$0,69 \pm 0,05^{ab}$ K	$0,69 \pm 0,02^b$ M
	Lysin	$0,57 \pm 0,01^a$ K	$0,64 \pm 0,01^b$ K	$0,66 \pm 0,01^b$ K	$0,40 \pm 0,02^a$ L	$0,47 \pm 0,02^b$ L	$0,53 \pm 0,04^c$ L	$0,53 \pm 0,06^a$ K	$0,58 \pm 0,04^{ab}$ M	$0,63 \pm 0,02^b$ M
	Histidin	$0,13 \pm 0,00^a$ K	$0,14 \pm 0,00^a$ K	$0,14 \pm 0,00^a$ K	$0,09 \pm 0,01^a$ L	$0,10 \pm 0,00^a$ L	$0,12 \pm 0,01^b$ L	$0,12 \pm 0,01^a$ K	$0,12 \pm 0,01^a$ M	$0,13 \pm 0,00^a$ LM
	Arginin	$0,02 \pm 0,00^a$ K	$0,02 \pm 0,00^a$ K	$0,03 \pm 0,00^a$ K	$0,01 \pm 0,00^a$ L	$0,02 \pm 0,00^b$ K	$0,02 \pm 0,00^b$ L	$0,02 \pm 0,00^a$ K	$0,02 \pm 0,00^a$ K	$0,02 \pm 0,00^a$ L
	Ornithin	$0,26 \pm 0,01^a$ K	$0,42 \pm 0,01^b$ K	$0,50 \pm 0,01^c$ K	$0,12 \pm 0,01^a$ L	$0,26 \pm 0,01^b$ L	$0,36 \pm 0,02^c$ L	$0,24 \pm 0,02^a$ K	$0,43 \pm 0,04^b$ K	$0,50 \pm 0,02^c$ K
	Citrullin	$0,05 \pm 0,00^a$ K	$0,06 \pm 0,00^a$ K	$0,03 \pm 0,00^b$ K	$0,04 \pm 0,00^a$ L	$0,04 \pm 0,00^a$ L	$0,03 \pm 0,00^a$ K	$0,05 \pm 0,00^a$ K	$0,04 \pm 0,00^a$ L	$0,05 \pm 0,01^a$ L
	$\gamma$ -aminomáselná kyselina	$0,07 \pm 0,00^a$ K	$0,03 \pm 0,00^b$ K	$0,03 \pm 0,00^b$ K	$0,03 \pm 0,00^a$ L	$0,02 \pm 0,00^a$ L	$0,02 \pm 0,00^a$ L	$0,04 \pm 0,00^a$ L	$0,03 \pm 0,00^a$ K	$0,03 \pm 0,00^a$ K

(Tab. 3: pokračování)

Den	Aminokyselina	Zrací/skladovací podmínky								
		Kontrolní vzorek			vzorek A			vzorek B		
		I. vrstva	II. vrstva	IV. vrstva	I. vrstva	II. vrstva	IV. vrstva	I. vrstva	II. vrstva	IV. vrstva
168	Kyselina asparagová	0,19 ± 0,01 <sup>a</sup> K	NA <sup>†</sup>	0,26 ± 0,01 <sup>b</sup> K	0,16 ± 0,01 <sup>a</sup> L	NA	0,20 ± 0,01 <sup>b</sup> L	0,18 ± 0,00 <sup>a</sup> K	NA	0,22 ± 0,00 <sup>b</sup> L
	Threonin	0,50 ± 0,01 <sup>a</sup> K	NA	0,55 ± 0,02 <sup>b</sup> K	0,40 ± 0,02 <sup>a</sup> L	NA	0,50 ± 0,00 <sup>b</sup> L	0,46 ± 0,01 <sup>a</sup> M	NA	0,51 ± 0,01 <sup>b</sup> L
	Serin	0,43 ± 0,02 <sup>a</sup> K	NA	0,47 ± 0,00 <sup>b</sup> K	0,16 ± 0,01 <sup>a</sup> L	NA	0,21 ± 0,00 <sup>b</sup> L	0,29 ± 0,03 <sup>a</sup> M	NA	0,37 ± 0,00 <sup>b</sup> M
	Asparagin	1,19 ± 0,03 <sup>a</sup> K	NA	1,41 ± 0,08 <sup>b</sup> K	1,16 ± 0,05 <sup>a</sup> KL	NA	1,25 ± 0,02 <sup>b</sup> L	1,14 ± 0,04 <sup>a</sup> L	NA	1,22 ± 0,04 <sup>b</sup> M
	Kyselina glutamová	2,59 ± 0,02 <sup>a</sup> K	NA	2,90 ± 0,09 <sup>b</sup> K	2,03 ± 0,08 <sup>a</sup> L	NA	2,52 ± 0,04 <sup>b</sup> L	2,45 ± 0,08 <sup>a</sup> M	NA	2,72 ± 0,07 <sup>b</sup> M
	Glutamin	1,63 ± 0,02 <sup>a</sup> K	NA	1,72 ± 0,06 <sup>b</sup> K	1,38 ± 0,07 <sup>a</sup> L	NA	1,55 ± 0,02 <sup>b</sup> L	1,48 ± 0,03 <sup>a</sup> M	NA	1,58 ± 0,05 <sup>b</sup> L
	Prolin	1,22 ± 0,01 <sup>a</sup> K	NA	1,26 ± 0,03 <sup>b</sup> K	0,95 ± 0,04 <sup>a</sup> L	NA	0,97 ± 0,01 <sup>b</sup> L	0,87 ± 0,09 <sup>a</sup> L	NA	1,00 ± 0,02 <sup>b</sup> L
	Glycin	0,35 ± 0,01 <sup>a</sup> K	NA	0,36 ± 0,01 <sup>a</sup> K	0,29 ± 0,01 <sup>a</sup> L	NA	0,31 ± 0,00 <sup>b</sup> L	0,30 ± 0,01 <sup>a</sup> L	NA	0,32 ± 0,01 <sup>a</sup> L
	Alanin	0,57 ± 0,02 <sup>a</sup> K	NA	0,57 ± 0,01 <sup>a</sup> K	0,44 ± 0,02 <sup>a</sup> L	NA	0,46 ± 0,01 <sup>a</sup> L	0,42 ± 0,01 <sup>a</sup> L	NA	0,45 ± 0,01 <sup>b</sup> L
	Valin	1,56 ± 0,02 <sup>a</sup> K	NA	1,63 ± 0,06 <sup>b</sup> K	1,23 ± 0,06 <sup>a</sup> L	NA	1,30 ± 0,02 <sup>b</sup> L	1,22 ± 0,02 <sup>a</sup> L	NA	1,30 ± 0,02 <sup>b</sup> L
	Metionin	1,99 ± 0,00 <sup>a</sup> K	NA	2,11 ± 0,08 <sup>b</sup> K	1,64 ± 0,10 <sup>a</sup> L	NA	1,73 ± 0,07 <sup>a</sup> L	1,63 ± 0,00 <sup>a</sup> L	NA	1,75 ± 0,02 <sup>b</sup> L
	Cystein	0,23 ± 0,01 <sup>a</sup> K	NA	0,24 ± 0,01 <sup>a</sup> K	0,18 ± 0,01 <sup>a</sup> L	NA	0,19 ± 0,00 <sup>a</sup> L	0,18 ± 0,00 <sup>a</sup> L	NA	0,20 ± 0,01 <sup>b</sup> L
	Isoleucin	0,46 ± 0,00 <sup>a</sup> K	NA	0,52 ± 0,02 <sup>b</sup> K	0,36 ± 0,02 <sup>a</sup> L	NA	0,37 ± 0,01 <sup>a</sup> L	0,37 ± 0,01 <sup>a</sup> L	NA	0,38 ± 0,01 <sup>a</sup> L
	Leucin	2,99 ± 0,03 <sup>a</sup> K	NA	3,10 ± 0,12 <sup>b</sup> K	2,49 ± 0,12 <sup>a</sup> L	NA	2,57 ± 0,03 <sup>b</sup> L	2,76 ± 0,02 <sup>a</sup> M	NA	2,59 ± 0,04 <sup>b</sup> L
	Tyrosin	0,10 ± 0,02 <sup>a</sup> K	NA	0,23 ± 0,02 <sup>b</sup> K	0,15 ± 0,01 <sup>a</sup> L	NA	0,46 ± 0,01 <sup>b</sup> L	0,16 ± 0,02 <sup>a</sup> L	NA	0,38 ± 0,01 <sup>b</sup> M
	Phenylalanin	1,92 ± 0,01 <sup>a</sup> K	NA	2,02 ± 0,09 <sup>b</sup> K	1,52 ± 0,06 <sup>a</sup> L	NA	1,66 ± 0,02 <sup>b</sup> L	1,54 ± 0,03 <sup>a</sup> L	NA	1,63 ± 0,02 <sup>b</sup> L
	Lysin	1,51 ± 0,01 <sup>a</sup> K	NA	1,59 ± 0,06 <sup>b</sup> K	1,27 ± 0,06 <sup>a</sup> L	NA	1,31 ± 0,02 <sup>a</sup> L	1,28 ± 0,02 <sup>a</sup> L	NA	1,36 ± 0,03 <sup>b</sup> M
	Histidin	0,35 ± 0,00 <sup>a</sup> K	NA	0,33 ± 0,02 <sup>a</sup> K	0,33 ± 0,03 <sup>a</sup> K	NA	0,32 ± 0,01 <sup>a</sup> K	0,32 ± 0,01 <sup>a</sup> K	NA	0,33 ± 0,01 <sup>a</sup> K
	Arginin	0,02 ± 0,00 <sup>a</sup> K	NA	0,01 ± 0,00 <sup>a</sup> K	0,02 ± 0,00 <sup>a</sup> K	NA	0,03 ± 0,00 <sup>b</sup> L	0,01 ± 0,00 <sup>a</sup> L	NA	0,03 ± 0,00 <sup>b</sup> L
	Ornithin	0,24 ± 0,01 <sup>a</sup> K	NA	0,67 ± 0,03 <sup>b</sup> K	0,22 ± 0,02 <sup>a</sup> K	NA	0,54 ± 0,00 <sup>b</sup> L	0,39 ± 0,00 <sup>a</sup> L	NA	0,61 ± 0,02 <sup>b</sup> M
	Citrullin	0,05 ± 0,00 <sup>a</sup> K	NA	0,01 ± 0,00 <sup>b</sup> K	0,07 ± 0,00 <sup>a</sup> L	NA	0,17 ± 0,00 <sup>b</sup> L	0,12 ± 0,01 <sup>a</sup> M	NA	0,13 ± 0,01 <sup>a</sup> M
	γ-aminomáselná kyselina	0,47 ± 0,01 <sup>a</sup> K	NA	0,40 ± 0,01 <sup>b</sup> K	0,40 ± 0,02 <sup>a</sup> L	NA	0,42 ± 0,00 <sup>b</sup> L	0,10 ± 0,01 <sup>a</sup> M	NA	0,06 ± 0,00 <sup>b</sup> M

\* Průměry v řádcích (rozdíly mezi jednotlivými vrstvami) s odlišnými písmeny v horním indexu se statisticky odlišují (P < 0,05); hodnoty jednotlivých zracích/skladovacích podmínek byly posuzovány samostatně. Průměry v řádcích (rozdíly mezi zracími/skladovacími podmínkami v jednotlivé vrstvě) s odlišnými velkými písmeny se statisticky odlišují (P < 0,05)

‡ ND – nedetekováno

† NA – neanalyzováno



#### 4.1.4. Stanovení obsahu biogenních aminů

Během 168-denního zrání/skladování testovaných přírodních sýrů eidamského typu byla zjištěna přítomnost tyraminu, putrescinu a kadaverinu. Naopak, histamin nebyl detekován v průběhu celého experimentu u žádného ze 3 testovaných režimů zrání/skladování.

Vývoj obsahu tyraminu, putrescinu a kadaverinu ve 4 testovaných vrstvách eidamské cihly v průběhu jednotlivých režimů zrání/skladování je zobrazen na Obr. 4.3–4.5 (části A–C). Nejvyšší obsahy výše zmíněných sekundárních metabolitů byly zjišťovány po celou 168denní dobu sledování v 0,7 mm široké svrchní vrstvě ve všech režimech zrání/skladování. Naopak, nejmenší obsahy byly detekovány ve středu sýrů (vrstva IV). Tento signifikantní rozdíl ( $P < 0,01$ ) obsahů tyraminu, putrescinu a kadaverinu ve vrstvě I a IV je patrný zejména od 30. dne, a to bez ohledu na režim zrání/skladování. Od počátku zrání/skladování byly obsahy tyraminu, putrescinu a kadaverinu ve II. a III. vrstvě velmi obdobné ( $P \geq 0,05$ ), a proto byly od 56. dne tyto vrstvy spojeny a analyzovány jako jedna vrstva. Hodnoty obsahu tyraminu, putrescinu a kadaverinu ve II. a III. vrstvě ležely vždy mezi hodnotami těchto biogenních aminů v okrajové vrstvě a středu sýra. Ve většině případů byl rozdíl II. a III. vrstvy od okraje a středu signifikantní ( $P < 0,01$ ). Ke stejnému závěru, tedy že v okraji jsou zjišťovány vyšší koncentrace biogenních aminů než ve středu sýra, došli i Komprda *et al.* [66, 67]. Z komparace prací Komprda *et al.* [66, 67] a této studie tak vyplývá, že distribuce biogenních aminů je u přírodních sýrů eidamského typu ekvivalentní jak u velkých bloků sýrů ( $> 10$  kg) tak i u menších spotřebitelských balení ( $< 1,5$  kg). Distribuce biogenních aminů tedy pravděpodobně není závislá na velikosti bloků sýra.

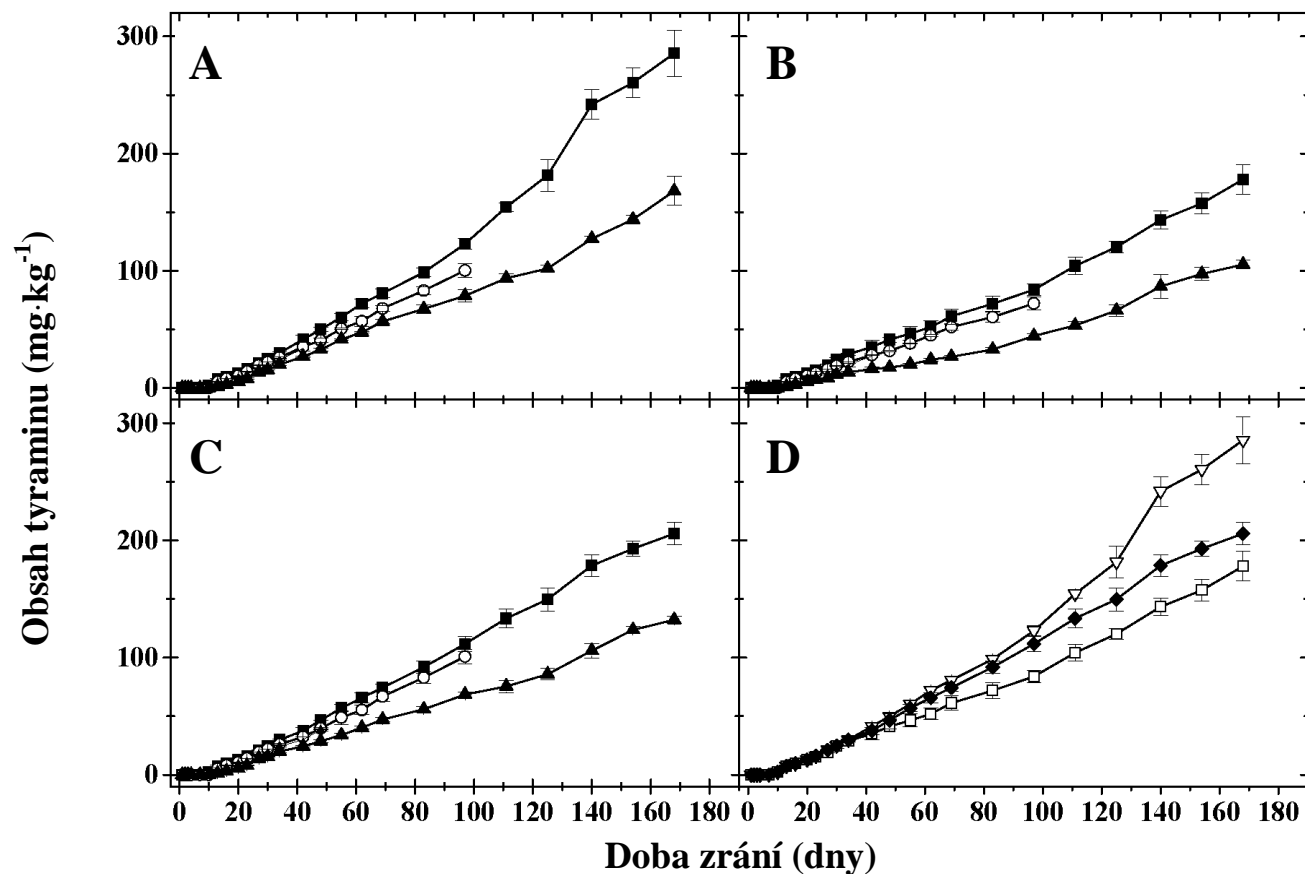
V jednotlivých vrstvách byly jako producenti biogenních aminů identifikovány *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum* a *Lb. casei/paracasei* (Tab. 2). Zdůvodnění různého obsahu biogenních aminů v jednotlivých vrstvách je tak nutné hledat zejména v rozdílných podmínkách prostředí ovlivňujících růst a metabolismus mikroorganismů. K těmto podmínkám patří zejména různá vodní aktivita, obsah  $O_2$  a proteolytická aktivita [66, 71]. Navržené zdůvodnění lze podpořit i různým počtem bakterií mléčného kvašení v jednotlivých vrstvách testovaných přírodních sýrů (Tab. 1), kdy ve středu sýra byly zjišťovány nižší počty bakterií mléčného kvašení než ve vrstvách bližších k okraji.

Z Obr. 4.3–4.5 rovněž vyplývá závislost obsahu tyraminu, putrescinu a kadaverinu v testovaných eidamských sýrech na režimu zrání/skladování. Nejvyšší obsahy biogenních aminů byly zjišťovány u vzorků zrajících celou dobu sledování ve zracím sklepě při  $10$  °C. Nejnižší obsahy tyraminu, putrescinu i kadaverinu byly v průběhu celého experimentu detekovány u vzorků, které byly již po 23 dnech zrání při  $10$  °C skladovány při chladírenské teplotě  $5$  °C ( $P < 0,01$ ). Obsahy tyraminu, putrescinu

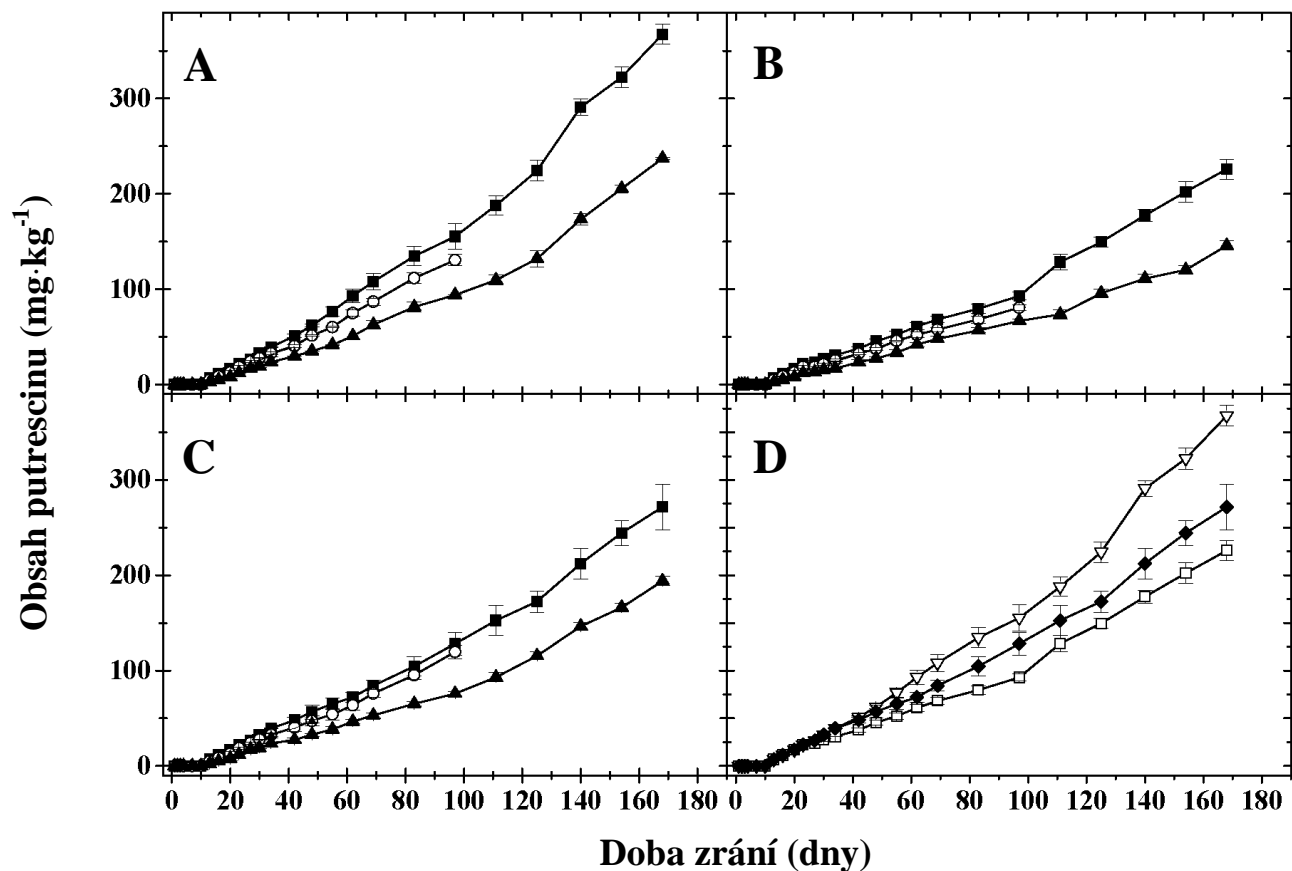
a kadaverinu u vzorků uchovávaných prvních 38 dnů ve zracím sklepe a následně za chladírenských teplot (vzorky B) ležely mezi hodnotami testovaných biogenních aminů v příslušných vrstvách kontrolního vzorku a sýrů A. Ve většině případů byl tento rozdíl signifikantní ( $P < 0,05$ ). Při všech těchto režimech zrání/skladování však docházelo k postupnému nárůstu obsahu tyraminu, putrescinu i kadaverinu. Srovnání obsahů výše zmíněných sekundárních metabolitů v okrajové vrstvě u sýrů ze 3 testovaných režimů zrání/skladování je uvedeno na Obr. 4.3–4.5, části D.

Výše popsaná zjištění korespondují s pracemi Gardini *et al.* [76] a Santos *et al.* [77], podle kterých se nárůst koncentrace biogenních aminů zpomaluje při poklesu teploty kultivace modelových bakterií mléčného kvašení. Zmíněné studie rovněž uvádějí, že podstatný vliv na produkci biogenních aminů mají také hodnoty pH a koncentrace NaCl.

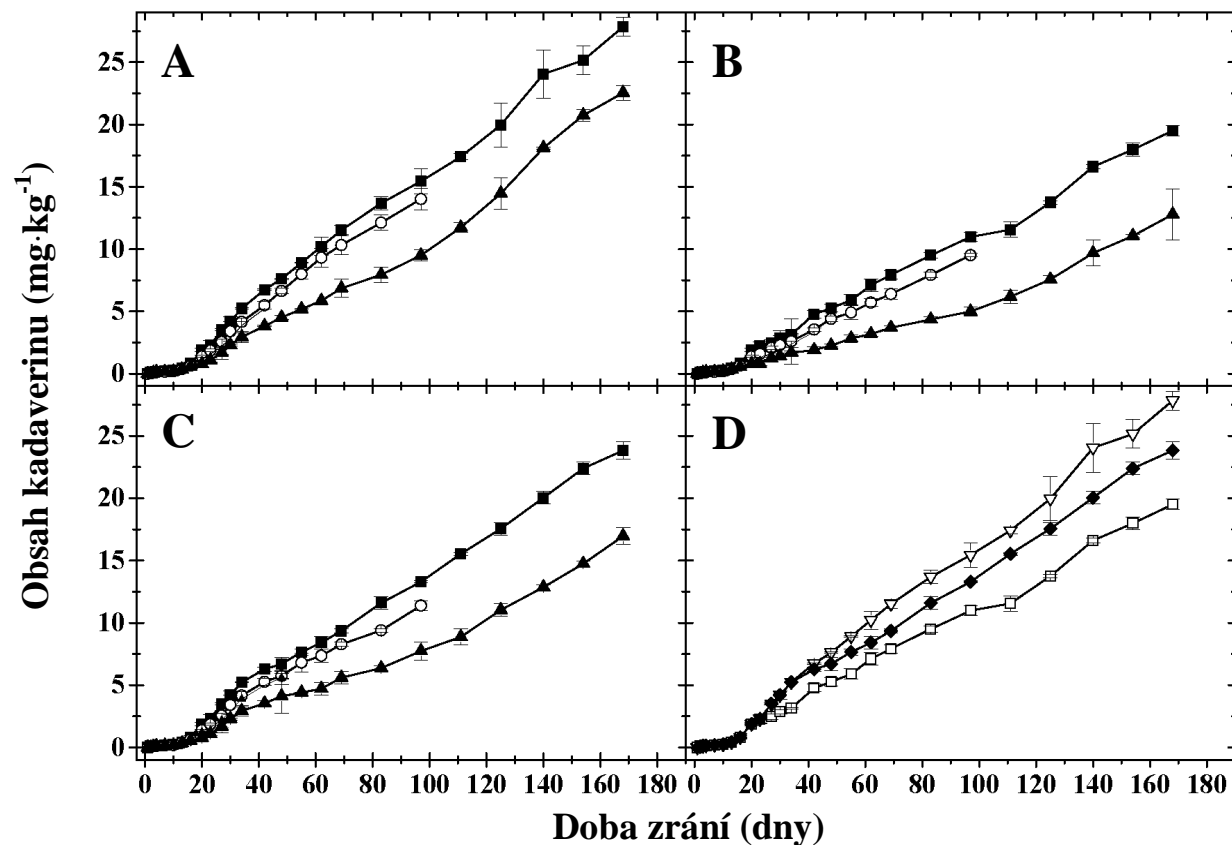
Posoudíme-li obsah biogenních aminů v absolutních číslech, tak jejich součet ve všech režimech zrání/skladování převyšuje po 168 dnech koncentraci  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , která je podle Halász *et al.* [78] a Silla Santos [70] považována za limit z hlediska bezpečnosti potravin. Ani chladírenské teploty okolo  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  tak nezabrání zvyšování obsahu biogenních aminů v přírodních sýrech nad toxikologicky významné hladiny.



**Obr. 4.3:** Obsah tyraminu ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) v eidamské cihle v závislosti na době zrání (dny): A – vzorky skladované ve zracím sklepě při  $12 \pm 2$  °C po celou dobu zrání; B – vzorky přemístěné po 23 dnech ze sklepa ( $12 \pm 2$  °C) do lednice ( $5 \pm 2$  °C); C – vzorky přemístěné po 38 dnech ze sklepa ( $12 \pm 2$  °C) do lednice ( $5 \pm 2$  °C); ■ – vrstva I (okraj); ○ – vrstva II; bez symbolů – vrstva III; ▲ – vrstva IV. V části D je zobrazen obsah tyraminu ve vrstvě I (okraj) ve třech skladovacích režimech: ▽ – vzorky skladované po celou dobu experimentu ve zracím sklepě při  $12 \pm 2$  °C; □ – vzorky přemístěné po 23 dnech ze sklepa ( $12 \pm 2$  °C) do lednice ( $5 \pm 2$  °C); ◆ – vzorky přemístěné po 38 dnech ze sklepa ( $12 \pm 2$  °C) do lednice ( $5 \pm 2$  °C). Obsah tyraminu byl vyjádřen jako průměr; chybové úsečky reprezentují směrodatnou odchylku průměrné hodnoty. ( $n = 24$ ).



**Obr. 4.4:** Obsah putrescinu ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) v eidamské cihle v závislosti na době zrání (dny): A – vzorky skladované ve zracím sklepě při  $12 \pm 2$  °C po celou dobu zrání; B – vzorky přemístěné po 23 dnech ze sklepa ( $12 \pm 2$  °C) do lednice ( $5 \pm 2$  °C); C – vzorky přemístěné po 38 dnech ze sklepa ( $12 \pm 2$  °C) do lednice ( $5 \pm 2$  °C); ■ – vrstva I (okraj); ○ – vrstva II; bez symbolů – vrstva III; ▲ – vrstva IV. V části D je zobrazen obsah putrescinu ve vrstvě I (okraj) ve třech skladovacích režimech: ▽ – vzorky skladované po celou dobu experimentu ve zracím sklepě při  $12 \pm 2$  °C; □ – vzorky přemístěné po 23 dnech ze sklepa ( $12 \pm 2$  °C) do lednice ( $5 \pm 2$  °C); ◆ – vzorky přemístěné po 38 dnech ze sklepa ( $12 \pm 2$  °C) do lednice ( $5 \pm 2$  °C). Obsah putrescinu byl vyjádřen jako průměr; chybové úsečky reprezentují směrodatnou odchylku průměrné hodnoty. ( $n = 24$ ).



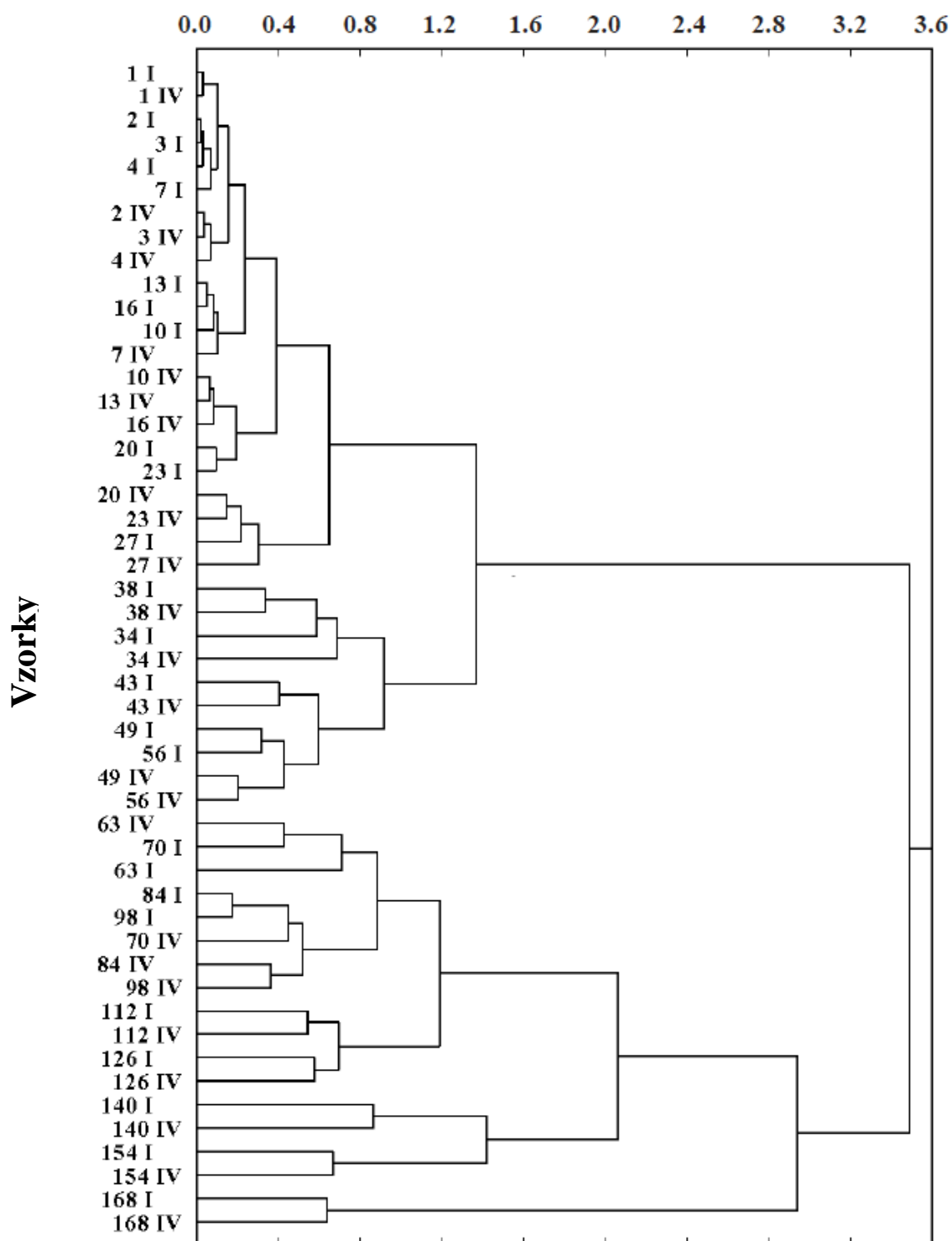
**Obr. 4.5:** Obsah kadaverinu ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) v eidamské cihle v závislosti na době zrání (dny): A – vzorky skladované ve zracím sklepě při  $12 \pm 2$  °C po celou dobu zrání; B – vzorky přemístěné po 23 dnech ze sklepa ( $12 \pm 2$  °C) do lednice ( $5 \pm 2$  °C); C – vzorky přemístěné po 38 dnech ze sklepa ( $12 \pm 2$  °C) do lednice ( $5 \pm 2$  °C); ■ – vrstva I (okraj); ○ – vrstva II; bez symbolů – vrstva III; ▲ – vrstva IV. V části D je zobrazen obsah kadaverinu ve vrstvě I (okraj) ve třech skladovacích režimech: ▽ – vzorky skladované po celou dobu experimentu ve zracím sklepě při  $12 \pm 2$  °C; □ – vzorky přemístěné po 23 dnech ze sklepa ( $12 \pm 2$  °C) do lednice ( $5 \pm 2$  °C); ◆ – vzorky přemístěné po 38 dnech ze sklepa ( $12 \pm 2$  °C) do lednice ( $5 \pm 2$  °C). Obsah kadaverinu byl vyjádřen jako průměr; chybové úsečky reprezentují směrodatnou odchylku průměrné hodnoty. ( $n = 24$ ).

#### 4.1.5. SDS-PAGE analýza

SDS-PAGE analýzou byly v průběhu 168denního experimentu detekovány proteiny o velikosti 3–31kDa, přičemž počet detekovaných proteinů se s narůstající dobou zrání/skladování zvyšoval (z původních cca 14 bandů pro 1. den a I. vrstvu na finálních 26, 31 a 34 bandů pro 168. den a IV. vrstvu u přírodních sýrů A, B a kontrolních vzorků). Výsledky stanovení proteinového profilu vzorků sýrů v jednotlivých vrstvách byly zpracovány pomocí shlukové analýzy, jejíž dendrogramy jsou prezentovány na Obr. 4.6 a 4.7. Pro Obr. 4.6 byly použity I. a IV. vrstvy kontrolních vzorků v průběhu 168denního experimentu. Z dendrogramu jednoznačně vyplývá, že se proteinový profil v jednotlivých vrstvách odlišuje a významně se mění rovněž s narůstající dobou zrání.

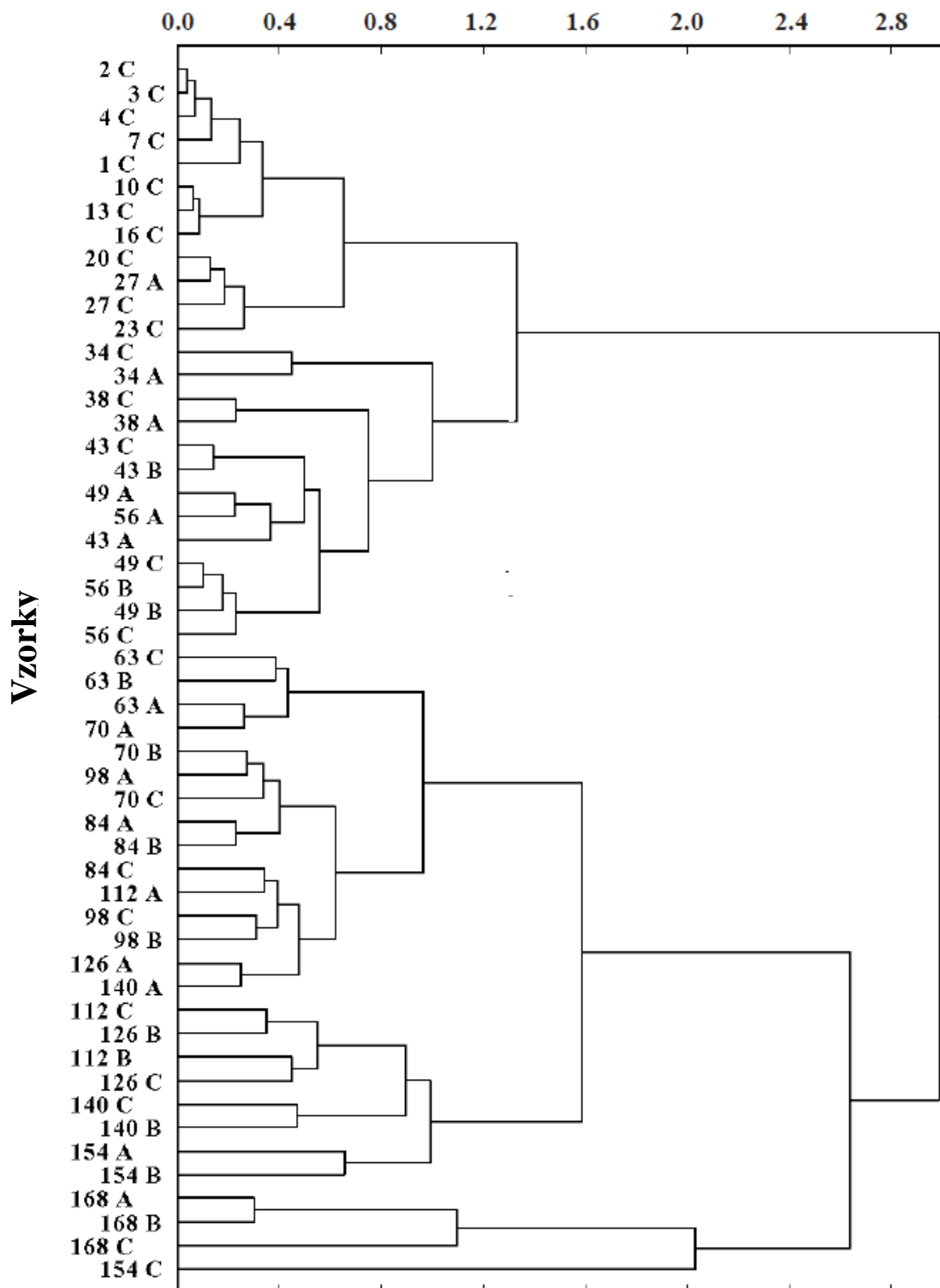
Na Obr. 4.7 jsou zobrazeny výsledky proteinového profilu IV. vrstev vzorků sýrů skladovaných v různých režimech zrání/skladování (A, B a kontrolní vzorky). Rovněž z tohoto dendrogramu vyplynulo, že dochází k významným změnám proteinových profilů vzorků s narůstající dobou zrání/skladování. Obr. 4.7 rovněž ukazuje na odlišný proteinový profil IV. vrstev vzorků, které jsou uchovávány v různých režimech zrání/skladování.

## Vzdálenost



**Obr. 4.6:** Dendrogram shlukové analýzy výsledků proteinového profilu I. a IV. vrstvy sýrů eidamského typu skladovaného po celou dobu zrání ve zracím sklepe při  $10 \pm 2$  °C. Čísla v ose Y reprezentují dobu zrání/skladování a vrstvu sýra.

## Vzdálenost

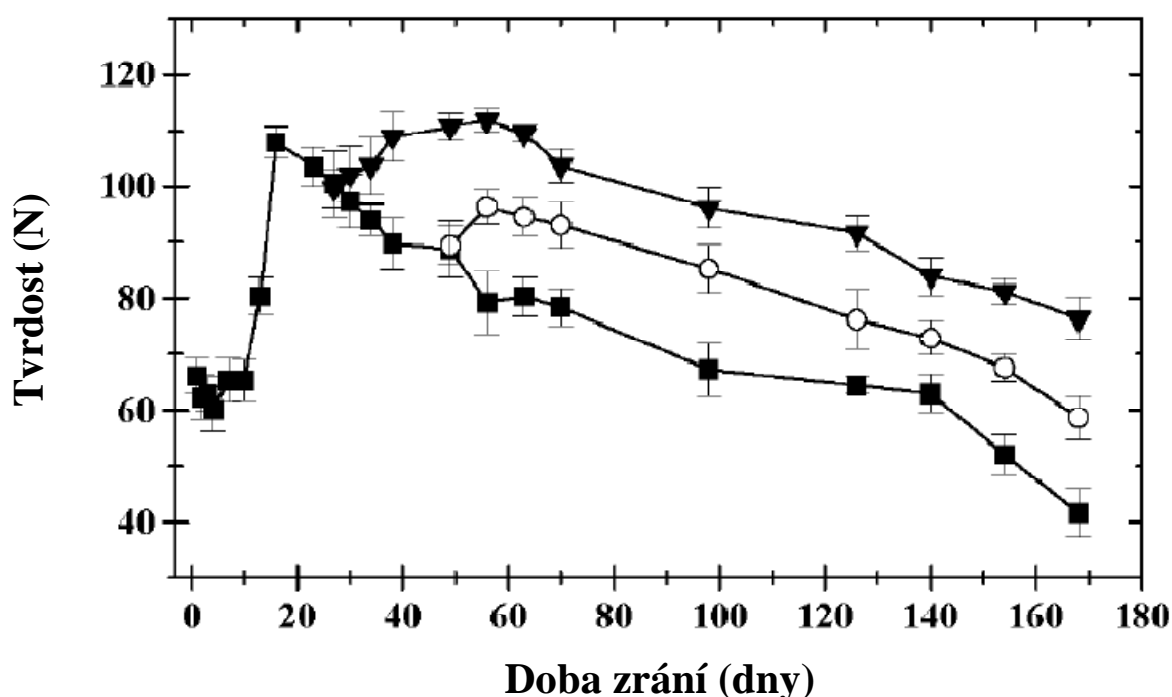


**Obr. 4.7:** Dendrogram shlukové analýzy výsledků proteinového profilu IV. vrstev sýrů eidamského typu. Čísla v ose Y reprezentují dobu zrání/skladování a písmena režim zrání/skladování (A – vzorky přesunutá po 23 dnech do lednice (5 °C); B – vzorky přesunutá po 38 dnech do lednice (5 °C); C – vzorky uchovávané po celou dobu ve zrácím sklepě (10 °C)).



#### 4.1.6. Analýza texturních vlastností

Měření tvrdosti vykrojeného válce bylo prováděno na základě kompresního testu střední vrstvy a výsledky této analýzy jsou zobrazeny na Obr. 4.8. Z obrázku vyplývá, že přibližně od 3. dne se tvrdost sýra začíná z cca 60 N zvyšovat a dosahuje svého maxima 16. den (cca 107 N). Tento nárůst lze pravděpodobně vysvětlit procesy bobtnání proteinové matrice, v důsledku čehož je možné i očekávat nárůst tvrdosti [8]. Následně se tvrdost začíná snižovat. Tento trend již pro kontrolní vzorky nebyl přerušen ( $P < 0,01$ ), což lze vysvětlit zejména proteolytickou činností přítomných LAB [23, 42, 46]. Pokles tvrdosti v průběhu zrání procesů popisují ve svých studiích také Bertola *et al.* [25], Al-Otaibi & Wilbey [26] a Topcu *et al.* [118].



**Obr. 4.8:** Vývoj tvrdosti vzorků eidamských cihel skladovaných za odlišných teplot v časovém intervalu 174 dnů: vzorky uložené po celou dobu ve zrácím sklepě při  $10 \pm 2$  °C (■), vzorky skladované od 23. dne v lednici při  $4 \pm 2$  °C (▲) a vzorky skladované od 38. dne v lednici při  $4 \pm 2$  °C (○).

U vzorků A i B můžeme znovu pozorovat mírný nárůst tvrdosti bezprostředně po vyjmutí přírodních sýrů z optimálních zrácích podmínek a jejich přemístění do chladírenských teplot ( $5$  °C). Vysvětlení mírného nárůstu tvrdosti bezprostředně po přesunu do chladírenských teplot nebylo v dostupné literatuře uspokojivě vysvětleno. Tento jev však může souviset s časem nutným pro přizpůsobení přítomné mikroflóry novým teplotním podmínkám, se zpomalením proteolytických procesů a procesy hydratace proteinové matrice. Po úvodním nárůstu tvrdosti však po několika dnech i u vzorků A a B dochází k postupnému snižování tvrdosti ( $P < 0,01$ ).

Ze srovnání tvrdosti vzorků uchovávaných v různých podmínkách zrání/skladování vyplynulo, že nejnižší tvrdost vykazují kontrolní vzorky, následují vzorky B a jako nejtvrďší byly shledány vzorky A ( $P < 0,01$ ). Pomalejší pokles tvrdosti u vzorků zraných/skladovaných při nižších teplotách publikovali také Bertola *et al.* [25] a Al-Otaibi & Wilbey [26].

#### 4.1.7. Senzorická analýza

V rámci experimentu 1 byla dále realizována senzorická analýza sýrů eidamského typu, které byly skladovány za odlišných teplotních režimů. U vzorků se sledovaly následující charakteristiky: vzhled a barva, konzistence, chuť a vůně, tuhost a cizí pachuti. Senzorická analýza byla prováděna 58. a 128. den od výroby, a to vybranými hodnotiteli. Hodnocení znaků bylo provedeno pomocí sedmibodové ordinální stupnice II. druhu s výjimkou znaku cizí pachuti, kde byla použita stupnice I. druhu (klasifikace dle Kříž *et al.* [127]).

Kontrolní vzorek (vzorky C) byl 58. den zrání ohodnocen jako nejlepší ve sledovaném znaku vzhled a barva. V tuhosti se od sebe statisticky lišily vzorky A–C a B–C a to tak, že vzorky A i B vykazovaly přijatelnější tuhost než kontrolní vzorek. Mezi vzorky A–B nebyla pozorována statisticky významná odlišnost. V charakteristice chutě a vůně byl jako nejlepší vzorek hodnocen vzorek A. U ostatních znaků nebyly mezi vzorky zjištěny statisticky významné rozdíly.

Pořadové zkoušky sledovaných vzorků A, B a C byly vyhodnoceny pomocí Friedmanova testu na hladině významnosti 5 %. Hodnocené znaky byly tuhost, intenzita chuti a preference. Výsledek testu poukázal na statisticky významné rozdíly v tuhosti mezi vzorky A–C a B–C ve zkoumaném znaku tuhosti, kdy vzorek C byl preferován před ostatními vzorky. U obou dalších znaků nebyl shledán statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými vzorky.

Další senzorická analýza byla provedena 128. den od výroby. Ve znaku vzhled a barva byl opět nejlépe hodnocen vzorek C. V tuhosti a v chuti a vůni se od sebe statisticky lišily výrobky B–C. Vzorek A byl tužší a chutnější než vzorek C. U ostatních znaků nebyly mezi vzorky zjištěny statisticky významné rozdíly.

Pomocí pořadové zkoušky byl opět prokázán statisticky významný rozdíl v pozorovaném znaku tuhosti mezi vzorky A–C a B–C. U dvou dalších znaků nebyl shledán statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými vzorky.

Z výsledků senzorické analýzy vyplývá, že hodnotitelé bohužel nepreferovali sýr více vyztřelý (skladovaný po celou dobu zracího pokusu ve zracím sklepě) před sýry méně vyztřelými (sýry skladované ve zracím sklepě pouze 23 a 38 dní). Příčinu lze pravděpodobně hledat ve zvyklosti spotřebitelů konzumovat sýry zakoupené v distribuční síti, které jsou v řadě případů nevyztřelé. Přítomnost vyztřelé intenzivnější chuti a vůně mohou

spotřebitelé dokonce považovat za neobvyklé. Této skutečnosti by bylo vhodné se dále věnovat v rámci propagačních osvětových akcí.

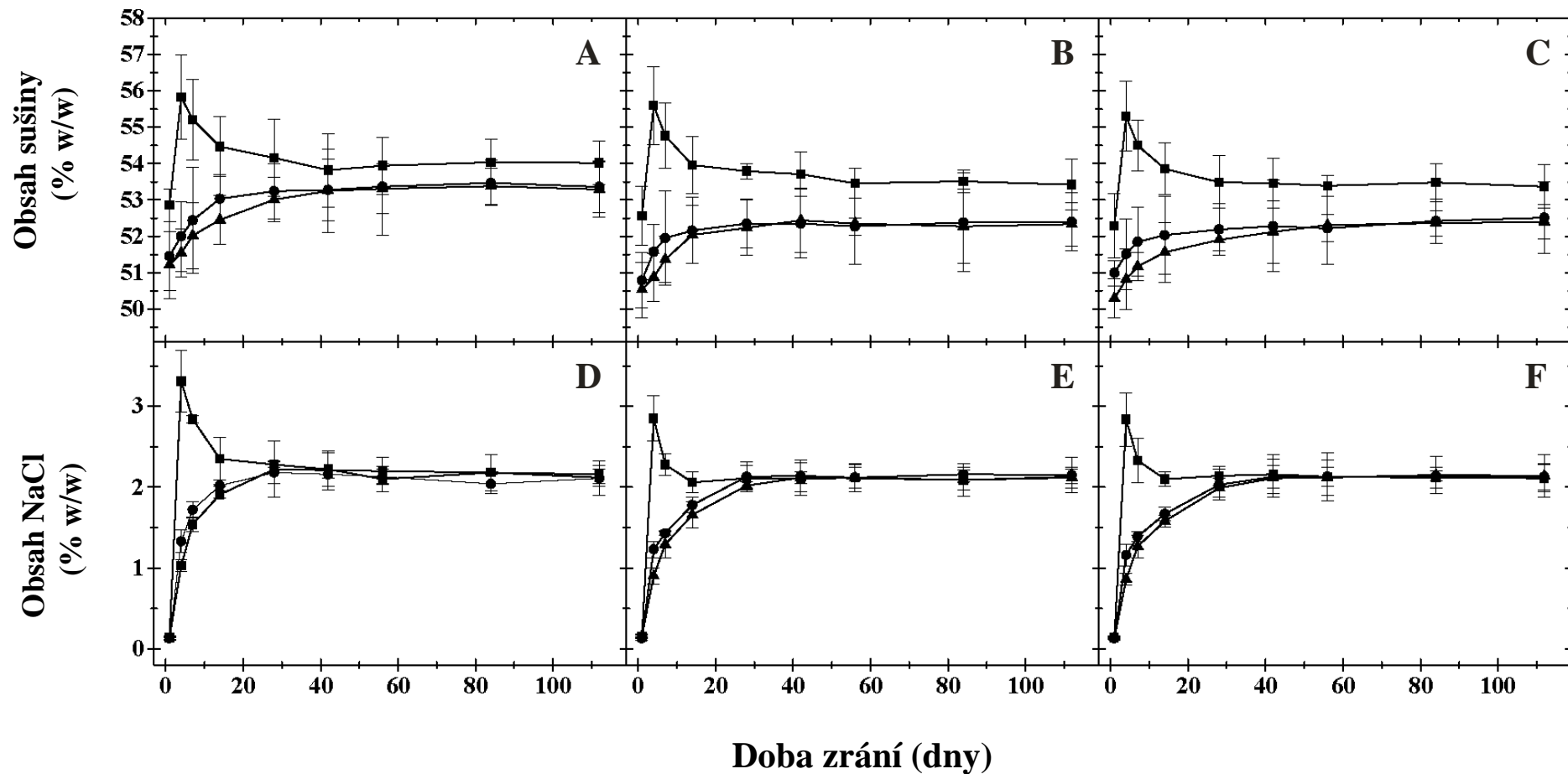
## 4.2. Výsledky a diskuze k experimentu 2

Tento pokus byl zrealizován jako pilotní pokus (pro experiment 3), kde byly zejména sledovány možné rozdíly v intenzitě vývoje texturních vlastností napříč blokem sýra pomocí tzv. stress testu. V rámci tohoto pokusu byla také pozorována distribuce vybraných složek v závislosti na vrstvě daného plátu a jeho poloze v sýrovém bloku eidamské cihly.

### 4.2.1. Základní chemická analýza

V den výroby (den 1) nebyly zaznamenány rozdíly v obsahu NaCl mezi vrstvami jednotlivých plátů (vzorky bezprostředně po vylisování a před vložením do solné lázně). Obsah NaCl se pohyboval v rozmezí 0,13–0,18 % (w/w) ve všech analyzovaných vzorcích ( $P \geq 0,05$ ). Naproti tomu obsah sušiny byl v den výroby v první vrstvě všech plátů vyšší a to přibližně o 1 až 2 % než ve zbylých vrstvách (vrstvy II a III) ( $P < 0,05$ ). Po vysolení se obsah sušiny ve vrstvách I rapidně zvýšil, což by mohlo být převážně způsobeno difúzí NaCl do povrchu sýra. Bloky sýra byly po celou dobu zrání uchovávány v cryovacovém obalu, tudíž tak rychlý nárůst sušiny prostřednictvím odparu vody je vyloučen. Toto tvrzení potvrzuje i strmý nárůst koncentrace NaCl ve vrstvách I právě po vysolení. Ačkoliv obsah NaCl ve vrstvách všech plátů byl 4. den analýz srovnatelný, plát S1 vykazoval mírně vyšší hodnoty. Během dalšího zrání se postupně obsah NaCl v jednotlivých vrstvách všech plátů vyrovnával pomocí koncentračního gradientu. Obr. 4.9 znázorňuje vývoj obsahu sušiny a NaCl v plátech S1, S2 a S3 v průběhu experimentu 2. K úplnému sjednocení obsahu NaCl v jednotlivých vrstvách došlo během prvního měsíce zrání, přičemž umístění plátu v bloku sýra nemělo významný vliv na difúzi do středu sýra.

Odlišný trend byl pozorován ve vyrovnání obsahu sušiny napříč jednotlivými pláty. Obsah sušiny ve vrstvách II a III se sjednotil během 42 dnů ( $P \geq 0,05$ ) a pohyboval se v rozpětí 52 až 53 % (w/w), avšak v okraji sýra (vrstva I) byl sledován signifikantně vyšší obsah sušiny ( $P < 0,05$ ) a to až do konce experimentu. Obsah sušiny ve vrstvách I se v průběhu prvních týdnů zrání mírně snižoval, ale ve srovnání se zbylými vrstvami byl stále vyšší (před ukončení experimentu činil rozdíl 1–2 % (w/w)).



**Obr. 4.9:** Vývoj obsahu sušiny (% w/w; část A–C) a NaCl (% w/w; část D) v jednotlivých plátech (S1 – části A a D; S2 – části B a E; S3 – části C a F) a vrstvách eidamské cihly v průběhu zrání (dny): ■ - vrstva I (okraj); ● - vrstva II; ▲ - vrstva III (střed). Obsah sušiny a NaCl byl vyjádřen jako průměr; chybové úsečky reprezentují směrodatnou odchylku průměrné hodnoty. ( $n = 18$ ).

Během prvního týdne zrání hodnoty pH výrazně klesly v jednotlivých vrstvách všech sledovaných plátů z průměrné hodnoty  $6,40 \pm 0,05$  na  $5,25 \pm 0,03$ . Pokles pH lze vysvětlit činností přítomné mikroflóry (zejména startérovými kulturami), která využívá laktózu jako substrát pro svůj energetický metabolismus. Homofermentativní LAB pak jako nejčastější metabolit produkují kyselinu mléčnou. Konverze laktózy je u přírodních sýrů žádoucí. Míra okyselení inhibuje růst nežádoucí mikroflóry, ovlivňuje počáteční texturu sýřeniny a zastoupení solí v sýru [23]. Naopak příliš vysoké koncentrace reziduí mléčného cukru by mohly mít negativní vliv na kvalitu sýra např. prostřednictvím nežádoucího hnědnutí při dalším tepelném zpracování výsledného produktu (Maillardova reakce) [8].

V průběhu dalšího zrání pH postupně stoupalo. Vývoj pH v jednotlivých plátech a sobě si odpovídajících vrstvách byl podobný ( $P \geq 0,05$ ). Zvyšování pH v další fázi zrání je pravděpodobně způsobeno účinkem NSLAB, které mohou oxidovat laktát na acetát a  $\text{CO}_2$  [21]. Ke zvýšení pH přispívá také proteolýza prostřednictvím uvolňování látek zásadité povahy [8].

#### 4.2.2. Stanovení texturních vlastností

Hodnoty tvrdosti získané v jednotlivých pozicích reprezentující úseky ve 3 testovaných plátech v průběhu 126denního zrání při  $10\text{ }^\circ\text{C}$  jsou graficky znázorněny na Obr. 4.10. V den výroby přírodních sýrů byla tvrdost sýrů před vložením do solné lázně v jednotlivých pozicích na všech plátech obdobná a odpovídala hodnotám v intervalu 4–5 N ( $P \geq 0,05$ ).

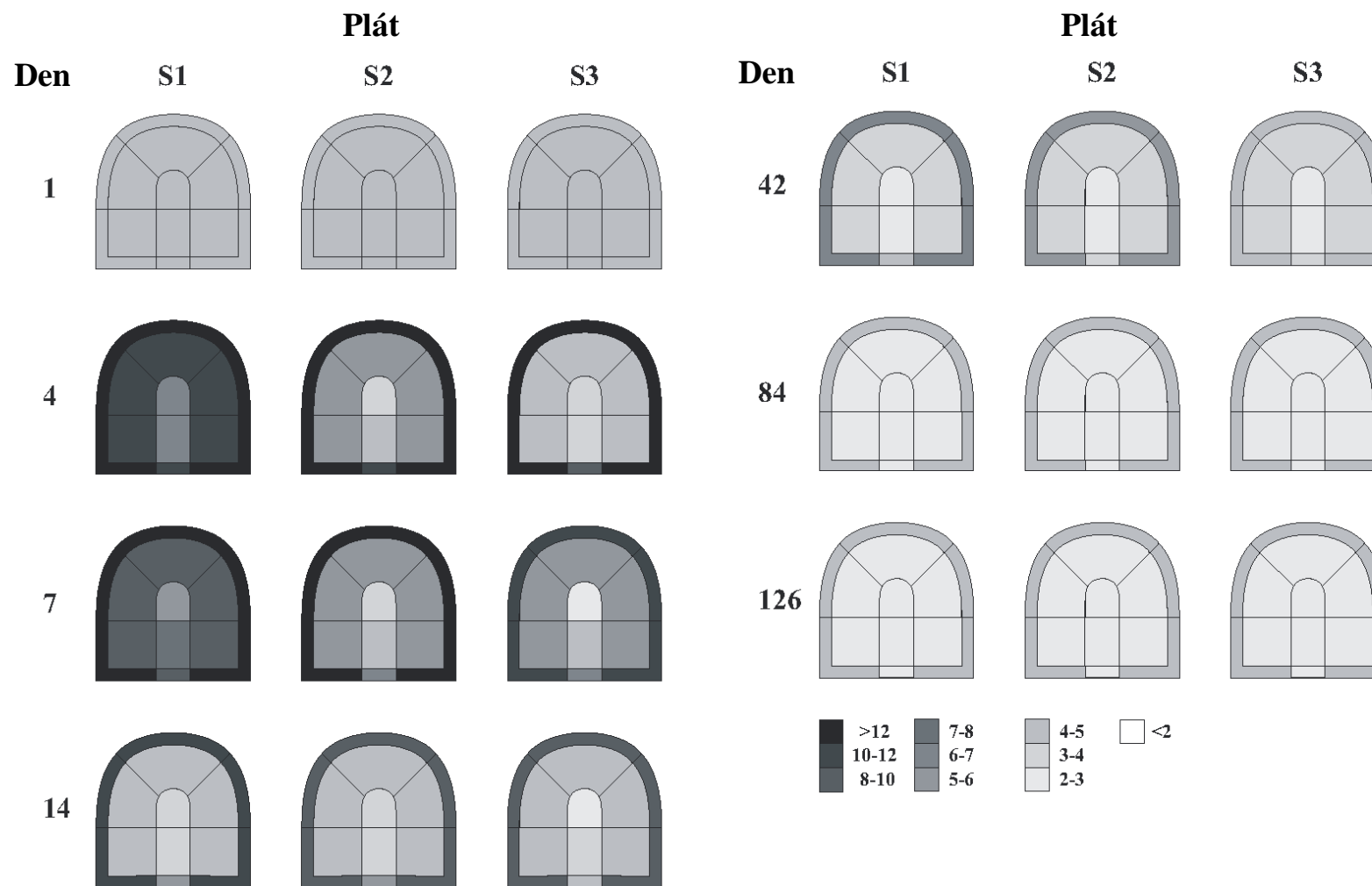
Čtvrtý den po výrobě, kdy byly sýry již vysoleny, se tvrdost 1. až 5. pozice na všech testovaných plátech rapidně zvýšila (ve srovnání s 1. dnem;  $P < 0,001$ ) na hodnoty převyšující 12 N. Mezi 1. až 5. pozicemi nebyly detekovány signifikantní rozdíly ( $P \geq 0,05$ ), a to u všech testovaných plátů. U plátu S1 (nejblíže čelnímu okraji) významně narostla i tvrdost 7. až 11. pozice na hodnoty mezi 10 a 11 N ( $P < 0,001$ ). U plátu S2 tento nárůst byl sice také signifikantní ( $P < 0,01$ ), ale jeho hodnoty dosahovaly pouze 5–6 N. U plátu S3 nedošlo v pozicích 7–11 k signifikantnímu nárůstu tvrdosti ( $P \geq 0,05$ ) ve srovnání se stejnými pozicemi v den 1 (před solením). Pozice 6 u všech testovaných plátů a pozice 12 a 13 (střed plátu) pouze u plátu S1 vykazovaly ve 4. dnu sice vyšší tvrdost než v 1. dnu ( $P < 0,001$ ), na druhou stranu však tyto pozice byly měkčí než ostatní pozice v odpovídajících vrstvách I a II ( $P < 0,01$ ). U plátu S2 nedošlo v pozici 12 během prvních 4 dnů k signifikantní změně tvrdosti ( $P \geq 0,05$ ). U pozice 13 (střed) v plátech S2 a S3 a u pozice 12 v plátu S3 došlo dokonce ke snížení tvrdosti ( $P < 0,05$ ) ve srovnání s 1. dnem, a to na hodnoty 3–4 N.

Během dalších 3 dnů (den 7) se tvrdost 1. – 5. pozice v plátech S1 a S2 a rovněž pozice 7–12 u plátu S2 signifikantně nezměnila ( $P \geq 0,05$ ). U středového plátu S3 a pozice 6 plátů S1 a S2 byl pozorován pokles tvrdosti

( $P < 0,01$ ). Tvrdost pozice 12 v S1 se oproti 4. dnu zvýšila, a to na 7–8 N ( $P < 0,05$ ). U plátu S3 došlo ke snížení tvrdosti ( $P < 0,05$ ) v pozicích 1–6 a 13 (střed plátu). Naopak pozice 7–12 vykazovaly nárůst tvrdosti ( $P < 0,05$ ).

Do 42. dne docházelo k postupnému snižování tvrdosti ve všech pozicích i plátech ( $P < 0,05$ ), pouze u středu plátu S3 již nedošlo k signifikantním změnám ( $P \geq 0,05$ ). Od 84. dne bylo pozorováno ustálení tvrdosti u pozic 1–5 na hodnotách 4–5 N a u pozic 6–13 na hodnotách 2–3 N. Tyto hodnoty se při srovnání se 126. dnem již signifikantně neměnily ( $P \geq 0,05$ ).

Tab. 4 obsahuje hodnoty koeficientů  $k_1$  a  $k_2$  vypočtené metodou nelineární regrese s využitím Pelegova modelu. Z hodnocení parametru  $k_2$  jednoznačně vyplývá, že v důsledku solení (srovnány hodnoty 1. a 4. dne) dojde k signifikantnímu zvýšení elasticity testovaných sýrů, a to ve všech pozicích i plátech ( $P < 0,05$ ). V následujících dnech zrání došlo při posuzování jednotlivých pozic v plátech k postupnému snižování elastické složky eidamské cihly ( $P < 0,05$ ). K tomuto snižování docházelo ( $P < 0,05$ ) i mezi 84. a 126. dnem, kdy již hodnoty tvrdosti nevykazovaly signifikantní změny (viz výše). Pozice vrstvy I (1–5) vykazovaly v jednotlivých plátech vyšší hodnoty elasticity ( $P < 0,05$ ) ve srovnání s ostatními pozicemi, a to v průběhu celého zracího pokusu. Naopak střed sýra měl po celou dobu experimentu nižší hodnoty elastické složky ( $P < 0,05$ ) ve srovnání s ostatními pozicemi v jednotlivých plátech (vyjma 1. dne). Obdobně jako u tvrdosti, pozice 6 a 12 vykazovaly signifikantně nižší hodnoty elastické složky ( $P < 0,05$ ) ve srovnání s ostatními pozicemi v příslušné vrstvě I a II. Z analýzy rozptylu (ANOVA) rovněž vyplynulo, že se vývoj elasticity v jednotlivých plátech v průběhu zrání odlišoval ( $P < 0,05$ ). Vývoj hodnot parametru  $k_1$  do jisté míry korespondoval se změnami  $k_2$  ( $r = 0,3719$ ), avšak jeho interpretace je podle Peleg [123], Singh *et al.* [121] a Hatcher *et al.* [122] obtížná a nejednoznačná. Rovněž závislost hodnot  $k_1$  a tvrdosti, posuzovaná Pearsonovým korelačním koeficientem, je nižší ( $r = 0,4888$ ) než závislost mezi  $k_2$  a tvrdostí ( $r = 0,7662$ ).



**Obr. 4.10:** Diagram zobrazující hodnoty tvrdosti (N) pro každou ze 13 pozic v plátech S1, S2 a S3 testovaných v průběhu zrání (průměr; n = 6)

**Tab. 4:** Hodnoty parametrů  $k_1$  a  $k_2$  získaných ze zátěžové křivky 13 pozic ( $n = 6$ ; průměr  $\pm$  SD) v jednotlivých plátech sýra (S1, S2 a S3) pomocí Pelegova modelu \*

Den	Plát	Pozice **	Hodnoty $k_2$	Hodnoty $k_1$
1	S1	1–5	$1,61 \pm 0,02^a A_a$	$7,69 \pm 0,26^a A_a$
		6	$1,58 \pm 0,01^{a,b} A_a$	$7,60 \pm 0,11^a A_a$
		7–11	$1,56 \pm 0,01^b A_a$	$7,45 \pm 0,14^a A_a$
		12	$1,54 \pm 0,01^b A_a$	$7,27 \pm 0,09^{a,b} A_a$
		střed	$1,56 \pm 0,01^b A_a$	$7,12 \pm 0,15^b A_a$
	S2	1–5	$1,58 \pm 0,02^a A_a$	$7,50 \pm 0,50^a A_a$
		6	$1,56 \pm 0,01^{a,b} A_a$	$7,41 \pm 0,13^a A_a$
		7–11	$1,54 \pm 0,01^b A_a$	$7,31 \pm 0,21^{a,b} A_a$
		12	$1,53 \pm 0,01^b A_a$	$7,27 \pm 0,23^{a,b} A_a$
		střed	$1,53 \pm 0,01^b A_b$	$7,10 \pm 0,15^b A_a$
	S3	1–5	$1,59 \pm 0,02^a A_a$	$7,71 \pm 0,26^a A_a$
		6	$1,57 \pm 0,01^a A_a$	$7,24 \pm 0,08^b A_b$
		7–11	$1,55 \pm 0,01^b A_a$	$7,31 \pm 0,13^b A_a$
		12	$1,51 \pm 0,02^c A_a$	$6,99 \pm 0,10^c A_b$
		střed	$1,53 \pm 0,01^{b,c} A_b$	$7,00 \pm 0,08^c A_a$
4	S1	1–5	$1,89 \pm 0,02^a B_a$	$7,03 \pm 0,43^a B_a$
		6	$1,82 \pm 0,01^b B_a$	$6,63 \pm 0,09^b B_a$
		7–11	$1,83 \pm 0,01^b B_a$	$7,06 \pm 0,07^a B_a$
		12	$1,80 \pm 0,02^c B_a$	$6,97 \pm 0,19^a B_a$
		střed	$1,80 \pm 0,01^c B_a$	$7,06 \pm 0,11^a A_a$
	S2	1–5	$1,84 \pm 0,02^a B_b$	$6,71 \pm 0,21^a B_a$
		6	$1,80 \pm 0,01^b B_a$	$7,18 \pm 0,24^b A_b$
		7–11	$1,73 \pm 0,01^c B_b$	$6,61 \pm 0,21^a B_b$
		12	$1,72 \pm 0,02^c B_b$	$6,62 \pm 0,19^a B_b$
		střed	$1,69 \pm 0,02^c B_b$	$6,53 \pm 0,17^a B_b$
	S3	1–5	$1,82 \pm 0,03^a B_b$	$6,78 \pm 0,37^{a,b} B,C_a$
		6	$1,75 \pm 0,01^b B_b$	$6,51 \pm 0,22^a B_a$
		7–11	$1,73 \pm 0,01^b B_b$	$6,85 \pm 0,13^b B_b$
		12	$1,68 \pm 0,01^c B_c$	$6,55 \pm 0,29^{a,b} B_b$
		střed	$1,67 \pm 0,01^c B_b$	$6,50 \pm 0,10^a B_b$
7	S1	1–5	$1,91 \pm 0,02^a B_a$	$7,17 \pm 0,25^a B_a$
		6	$1,82 \pm 0,01^b B_a$	$7,05 \pm 0,24^a C_a$
		7–11	$1,81 \pm 0,02^b B_a$	$6,60 \pm 0,29^b C_a$
		12	$1,78 \pm 0,01^c B_a$	$6,52 \pm 0,27^b C_a$
		střed	$1,74 \pm 0,02^c C_a$	$6,39 \pm 0,25^b B_a$
	S2	1–5	$1,92 \pm 0,02^a C_a$	$7,60 \pm 0,39^a A_b$
		6	$1,82 \pm 0,01^b B_a$	$7,13 \pm 0,21^a A_a$
		7–11	$1,72 \pm 0,02^c B_b$	$6,46 \pm 0,19^b B,C_{a,b}$
		12	$1,67 \pm 0,01^d C_b$	$6,21 \pm 0,16^b C_b$
		střed	$1,60 \pm 0,01^e C,D_b$	$6,10 \pm 0,27^b B_{a,b}$
	S3	1–5	$1,84 \pm 0,01^a B_b$	$7,32 \pm 0,23^a A,C_a$
		6	$1,81 \pm 0,01^b C_a$	$7,00 \pm 0,24^a A_a$
		7–11	$1,70 \pm 0,02^c B,C_b$	$6,37 \pm 0,22^b C_b$
		12	$1,66 \pm 0,01^d B,C_b$	$6,08 \pm 0,30^{b,c} B_b$
		střed	$1,60 \pm 0,01^e C,D_b$	$6,05 \pm 0,10^c C_b$



(Tab. 4: pokračování)

Den	Plát	Pozice **	Hodnoty $k_2$	Hodnoty $k_1$
14	S1	1-5	$1,78 \pm 0,03^a$ C <sub>a</sub>	$7,02 \pm 0,27^a$ B <sub>a</sub>
		6	$1,72 \pm 0,01^b$ C <sub>a</sub>	$6,85 \pm 0,16^a$ B,C <sub>a</sub>
		7-11	$1,66 \pm 0,01^c$ C <sub>a</sub>	$6,02 \pm 0,26^{b,c}$ D <sub>a</sub>
		12	$1,61 \pm 0,02^d$ C <sub>a</sub>	$5,91 \pm 0,24^b$ D <sub>a</sub>
		střed	$1,57 \pm 0,02^d$ D <sub>a</sub>	$6,08 \pm 0,11^c$ B,C <sub>a</sub>
	S2	1-5	$1,88 \pm 0,03^a$ B,C <sub>b</sub>	$7,50 \pm 0,35^a$ A <sub>b</sub>
		6	$1,80 \pm 0,01^b$ B <sub>b</sub>	$6,26 \pm 0,24^b$ B <sub>b</sub>
		7-11	$1,73 \pm 0,02^c$ B <sub>b</sub>	$6,64 \pm 0,17^c$ B <sub>b</sub>
		12	$1,67 \pm 0,01^d$ C <sub>b</sub>	$6,33 \pm 0,18^b$ C <sub>b</sub>
		střed	$1,58 \pm 0,02^e$ C,E <sub>a</sub>	$5,64 \pm 0,34^c$ C <sub>b</sub>
	S3	1-5	$1,85 \pm 0,02^a$ B <sub>b</sub>	$7,51 \pm 0,21^a$ A <sub>b</sub>
		6	$1,78 \pm 0,02^b$ B,C <sub>b</sub>	$7,39 \pm 0,25^a$ A <sub>c</sub>
		7-11	$1,67 \pm 0,01^c$ C <sub>a</sub>	$6,44 \pm 0,18^b$ C <sub>b</sub>
		12	$1,63 \pm 0,02^d$ C <sub>a</sub>	$6,17 \pm 0,15^{b,c}$ B <sub>a,b</sub>
		střed	$1,58 \pm 0,01^e$ C <sub>a</sub>	$5,96 \pm 0,37^c$ C <sub>a,b</sub>
42	S1	1-5	$1,74 \pm 0,02^a$ C <sub>a</sub>	$6,63 \pm 0,26^a$ C <sub>a</sub>
		6	$1,70 \pm 0,01^b$ C <sub>a</sub>	$6,50 \pm 0,24^a$ B,D <sub>a</sub>
		7-11	$1,68 \pm 0,02^b$ C <sub>a</sub>	$6,36 \pm 0,21^{a,c}$ C,D <sub>a</sub>
		12	$1,63 \pm 0,01^c$ C,D <sub>a</sub>	$7,78 \pm 0,23^b$ E <sub>a</sub>
		střed	$1,59 \pm 0,01^d$ D,E <sub>a</sub>	$6,08 \pm 0,17^c$ B,C <sub>a</sub>
	S2	1-5	$1,75 \pm 0,02^a$ D <sub>b</sub>	$6,84 \pm 0,19^a$ B <sub>a</sub>
		6	$1,73 \pm 0,02^{a,b}$ C <sub>a</sub>	$6,75 \pm 0,20^b$ C <sub>b</sub>
		7-11	$1,70 \pm 0,02^b$ B <sub>a</sub>	$6,35 \pm 0,13^c$ C <sub>a</sub>
		12	$1,63 \pm 0,01^c$ D <sub>a</sub>	$5,84 \pm 0,31^d$ D <sub>b</sub>
		střed	$1,62 \pm 0,01^c$ D <sub>b</sub>	$6,05 \pm 0,36^c$ B <sub>a</sub>
	S3	1-5	$1,73 \pm 0,02^a$ D <sub>a</sub>	$6,85 \pm 0,15^a$ B <sub>a</sub>
		6	$1,65 \pm 0,01^b$ D <sub>b</sub>	$6,33 \pm 0,19^b$ B <sub>c</sub>
		7-11	$1,63 \pm 0,02^b$ D <sub>b</sub>	$6,07 \pm 0,16^b$ D <sub>b</sub>
		12	$1,66 \pm 0,01^b$ B,C <sub>b</sub>	$5,66 \pm 0,18^c$ C <sub>b</sub>
		střed	$1,60 \pm 0,01^c$ C,D <sub>b</sub>	$5,88 \pm 0,19^c$ C,D <sub>a</sub>
84	S1	1-5	$1,76 \pm 0,02^a$ C <sub>a</sub>	$6,74 \pm 0,27^a$ C <sub>a</sub>
		6	$1,67 \pm 0,01^b$ D <sub>a</sub>	$6,25 \pm 0,22^b$ D <sub>a</sub>
		7-11	$1,64 \pm 0,02^b$ C <sub>a</sub>	$5,97 \pm 0,21^b$ D <sub>a</sub>
		12	$1,64 \pm 0,01^b$ D <sub>a</sub>	$5,47 \pm 0,19^c$ F <sub>a</sub>
		střed	$1,60 \pm 0,01^c$ E <sub>a</sub>	$5,96 \pm 0,26^b$ C <sub>a</sub>
	S2	1-5	$1,76 \pm 0,02^a$ D <sub>a</sub>	$6,72 \pm 0,14^a$ B <sub>a</sub>
		6	$1,66 \pm 0,01^b$ D <sub>a</sub>	$5,96 \pm 0,20^b$ B <sub>a,b</sub>
		7-11	$1,64 \pm 0,02^b$ C <sub>a</sub>	$5,86 \pm 0,13^b$ D <sub>a</sub>
		12	$1,65 \pm 0,02^b$ C,D <sub>a,b</sub>	$5,33 \pm 0,21^c$ D,E <sub>a,b</sub>
		střed	$1,63 \pm 0,02^b$ D <sub>a</sub>	$5,86 \pm 0,31^b$ B,C <sub>a</sub>
	S3	1-5	$1,73 \pm 0,02^a$ D <sub>a</sub>	$6,48 \pm 0,24^a$ B <sub>b</sub>
		6	$1,62 \pm 0,01^b$ E <sub>b</sub>	$5,90 \pm 0,22^b$ C <sub>b</sub>
		7-11	$1,60 \pm 0,03^b$ D,E <sub>a</sub>	$5,55 \pm 0,18^c$ E <sub>b</sub>
		12	$1,62 \pm 0,01^b$ C <sub>b</sub>	$5,07 \pm 0,25^d$ D <sub>b</sub>
		střed	$1,61 \pm 0,01^b$ D <sub>b</sub>	$5,57 \pm 0,28^c$ D <sub>b</sub>

(Tab. 4: pokračování)

Den	Plát	Pozice **	Hodnoty $k_2$	Hodnoty $k_1$
126	S1	1–5	$1,73 \pm 0,03^a$ C <sub>a</sub>	$6,49 \pm 0,33^a$ C <sub>a</sub>
		6	$1,58 \pm 0,02^b$ A <sub>a</sub>	$5,97 \pm 0,20^b$ D <sub>a</sub>
		7–11	$1,56 \pm 0,03^b$ A <sub>a</sub>	$4,37 \pm 0,34^c$ E <sub>a</sub>
		12	$1,57 \pm 0,02^b$ A <sub>a</sub>	$4,89 \pm 0,21^{c,d}$ G <sub>a</sub>
		střed	$1,54 \pm 0,02^b$ A <sub>a</sub>	$5,18 \pm 0,25^d$ D <sub>a</sub>
	S2	1–5	$1,72 \pm 0,02^a$ D <sub>a</sub>	$6,23 \pm 0,11^a$ C <sub>a</sub>
		6	$1,61 \pm 0,03^b$ D <sub>a</sub>	$6,03 \pm 0,21^a$ B <sub>a</sub>
		7–11	$1,60 \pm 0,02^b$ C <sub>a</sub>	$5,41 \pm 0,27^b$ E <sub>b</sub>
		12	$1,57 \pm 0,01^b$ E <sub>a</sub>	$5,09 \pm 0,30^b$ E <sub>a</sub>
		střed	$1,56 \pm 0,02^b$ A,E <sub>a</sub>	$5,13 \pm 0,23^b$ D <sub>a</sub>
	S3	1–5	$1,70 \pm 0,02^a$ D <sub>a</sub>	$5,97 \pm 0,15^a$ D <sub>a</sub>
		6	$1,55 \pm 0,01^b$ A <sub>a</sub>	$5,83 \pm 0,20^a$ C <sub>a</sub>
		7–11	$1,58 \pm 0,02^b$ A,E <sub>a</sub>	$5,31 \pm 0,18^b$ E <sub>b</sub>
		12	$1,56 \pm 0,01^b$ D <sub>a</sub>	$5,20 \pm 0,24^b$ D <sub>a</sub>
		střed	$1,53 \pm 0,03^b$ A <sub>a</sub>	$5,04 \pm 0,20^b$ E <sub>a</sub>

\* Průměry ve sloupci (rozdíly mezi pozicemi v jednotlivých plátech) s odlišnými písmeny v horním indexu se statisticky odlišují ( $P < 0,05$ ); hodnoty v jednotlivých plátech a dnech byly hodnoceny samostatně. Průměry ve sloupci (rozdíly mezi pláty u jednotlivých pozic) s odlišnými písmeny v dolním indexu se statisticky odlišují ( $P < 0,05$ ); jednotlivé pozice v daném dnu byly hodnoceny samostatně. Průměry ve sloupci (rozdíly v době zrání) s odlišnými velkými písmeny se statisticky odlišují ( $P < 0,05$ ); hodnoty jednotlivých pozic v jednotlivých plátech byly posuzovány samostatně.

\*\* Výsledky pozic 1–5 byly sloučeny do jedné hodnoty, protože hodnoty naměřené v 1., 2., 3., 4. a 5. pozici se statisticky neodlišovaly ( $P \geq 0,05$ ). Na stejném principu je tvrdost pozic 7–11 také reprezentována jedním výsledkem.

Před vložením sýrových bloků do solné lázně byly hodnoty tvrdosti vyrovnané v jednotlivých pozicích i plátech. Na druhou stranu, parametr  $k_2$  (ukazatel elastické složky materiálu) naznačuje, že pozice 1–5 vykazovaly mírně vyšší elastickou složku, což může souviset s procesem lisování a s mírnou heterogenitou materiálu ve vrstvě I bezprostředně po vylisování [8]. V průběhu solení v důsledku difúze NaCl do hmoty sýra došlo k rapidnímu nárůstu tvrdosti i parametru  $k_2$  v segmentech sýra, které jsou v bezprostředním styku se solnou lázní (zejména pozice 1–5 ve všech testovaných plátech). Pozice 6–13 v plátu S1 vykazovaly signifikantně vyšší tvrdost i elastickou složku ve srovnání s odpovídajícími pozicemi v plátech S2 a S3. Toto je možné vysvětlit rychlejší difúzí NaCl do plátu S1, neboť sem nepronikala pouze sůl z okraje sýra (z vrstvy I), ale také z čelní strany cihly, ke které má plát S1 nejbližší. Tyto poznatky jsou v souladu s Fox *et al.* [8] i Chevanan & Muthukumarappan [141], kteří uvádí, že obsah NaCl a poměr soli k vlhkosti podstatně ovlivní texturní vlastnosti sýra.

V průběhu zracího pokusu je možné očekávat dva základní procesy, které ovlivňují texturní vlastnosti sýra: (i) difúze NaCl (se zvyšujícím se obsahem NaCl se zvyšuje tvrdost i elastická složka a naopak); a (ii) proteolytické změny kaseinových proteinů zapříčínující snižování tvrdosti i elastickou složku. Intenzita proteolytických změn v jednotlivých částech sýrů je pak ovlivňována především v důsledku různých mikroenvironmentálních podmínek pro metabolismus přítomných bakterií mléčného kvašení, resp. aktivitu příslušných enzymů [8, 23, 118, 120]. V prvních 7–14 dnech docházelo k intenzivní difúzi NaCl do vrstev II a III v jednotlivých plátech (ve směru koncentračního spádu), což mělo za následek snižování tvrdosti a elastické komponenty ve vrstvě I a naopak zvyšování těchto parametrů ve vrstvách II a III. Určitou výjimkou byl zejména střed plátu S3, kam byla difúze NaCl pravděpodobně pomalejší a kde v prvních dnech měly na texturní parametry vyšší efekt proteolytické reakce. Na druhé straně od 14. dne je možné pozorovat kontinuální snižování tvrdosti i elastické složky, což je pravděpodobně zapříčíněno proteolytickými procesy. Tento závěr je možné podpořit i řadou jiných prací, jako například Delgado *et. al.* [120], Topçu & Saldamli [118] a Chevanan & Muthukumarappan [141]. I po 126 dnech zrání byly pozorovány signifikantně vyšší hodnoty tvrdosti a elastické komponenty ve vrstvě I (u pozic 1–5) ve srovnání s vrstvami II a III, a to ve všech testovaných plátech. Z výsledků základní chemické analýzy je toto pravděpodobně způsobeno především mírně vyšším obsahem sušiny ve vrstvě I (cca o 2 % w/w) ve srovnání s ostatními částmi sýra.

Zajímavý je vývoj pozice 6 (a do 42. dne i pozice 12) v testovaných plátech v průběhu zracího pokusu. Tvrdost i elastická komponenta  $k_2$  výše zmíněných pozic vykazovaly signifikantně nižší hodnoty než ostatní pozice vrstvy I, resp. vrstvy II (v případě pozice 12). Pro vysvětlení tohoto jevu nebyl v literatuře nalezen dostatek informací. Lze to pravděpodobně přisoudit faktu, že jsou bloky sýra v solné lázni položené na desku. Do oblasti reprezentované pozicí 6 pak nemůže pronikat NaCl přímo (není přímý styk této oblasti se solným roztokem), ale pouze difundovat ze „sousedních“ oblastí reprezentovaných zejména pozicemi 1 a 5. Pravděpodobně nižší obsah NaCl pak může ovlivnit růst a metabolismus bakterií mléčného kvašení, včetně proteolytických procesů [67, 71].

### 4.3. Výsledky a diskuze experimentu 3

Hlavním záměrem tohoto experimentu bylo pozorovat vývoj textury přírodního sýra v jeho různých částech a sledovat vliv mikrobiologických a biochemických změn v průběhu zrání za zvýšené teploty na vybrané texturní parametry.

### 4.3.1. Mikrobiologická analýza

V den výroby sýrů (před vložením do solné lázně) byly stanoveny následující počty TC a LAB  $5,9 \pm 0,4 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$ , resp.  $4,7 \pm 0,6 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$ . Rozdíly mezi jednotlivými pláty a vrstvami nebyly signifikantní ( $P \geq 0,05$ ). Během prvních 14 dnů zrání došlo ke zvýšení počtu TC i LAB ( $P < 0,05$ ), přičemž ve vzorcích E byl zaznamenán rychlejší nárůst než v kontrolním vzorku ( $P < 0,05$ ). Okrajové části jednotlivých plátů vykazovaly mírně vyšší ( $P < 0,05$ ) počty TC ( $7,1 \pm 0,5 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$  a  $7,8 \pm 0,7 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$  pro vzorky D, resp. vzorky E) ve srovnání se zbytkem sýrů ( $6,7 \pm 0,6 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$  a  $7,2 \pm 0,5 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$  pro vzorky D, resp. vzorky E). Jednotlivé vrstvy ani pláty se nelišily ( $P \geq 0,05$ ) v počtech LAB, které se pohybovaly na úrovni  $6,2 \pm 0,3 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$  a  $5,7 \pm 0,4 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$  pro vzorky E, resp. vzorky D. Ve 28. dnu se obsah TC kontrolních vzorků ve srovnání s akcelerovanými změnil. Významně vyšší počty TC byly pozorovány v okrajových vrstvách kontrolního vzorku bez ohledu na různé pláty ( $7,2 \pm 0,5 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$ ), zatímco množství TC ve vzorku zrajícím za zvýšené teploty (ve vrstvách I jednotlivých plátů) se výrazně snížilo ( $6,3 \pm 0,8 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$ ;  $P < 0,05$ ). Tento jev lze pravděpodobně vysvětlit rychlejší lyzí buněk [10, 142] u vzorků E. Na druhou stranu u LAB nebyl tento jev v 28. dnu pozorován. Počty LAB se ve srovnání s 14. dnem prakticky nelišily ( $P \geq 0,05$ ).

V průběhu dalšího zrání se množství TC i LAB postupně snižovalo ( $P < 0,05$ ). Ve 112. dnu dosáhly hodnoty TC pro kontrolní vzorky u okrajových vrstev  $5,8 \pm 0,4 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$ , resp. pro vrstvy II a III  $5,3 \pm 0,5 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$  ( $P < 0,05$ ). Ve stejný den byly pozorovány počty LAB pro vrstvy I jednotlivých plátů mírně vyšší  $4,9 \pm 0,3 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$  ve srovnání s příslušnými vrstvami II a III  $4,5 \pm 0,4 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$ . Na konci zrajícího experimentu s akcelerujícími teplotami (56. den) byly počty TC v okrajových vrstvách vzorků  $5,2 \pm 0,5 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$  a pro vrstvy II a III  $4,7 \pm 0,4 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$ . Počty LAB byly ve srovnání se 112. dnem zrání kontrolních vzorků vyšší ( $P < 0,05$ ), a to pro všechny sledované vrstvy ( $5,4 \pm 0,3 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$  a  $5,0 \pm 0,3 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$  pro vzorky C, resp. pro vzorky A). V průběhu celého experimentu (u obou zrajících teplot) nebyly pozorovány signifikantní rozdíly v hodnotách LAB mezi jednotlivými pláty v počtech TC a LAB (u příslušných vrstev;  $P \geq 0,05$ ). Rovněž rozdíly mezi vrstvami II and III v jednotlivých plátech, resp. dnech zrání, byly minimální.

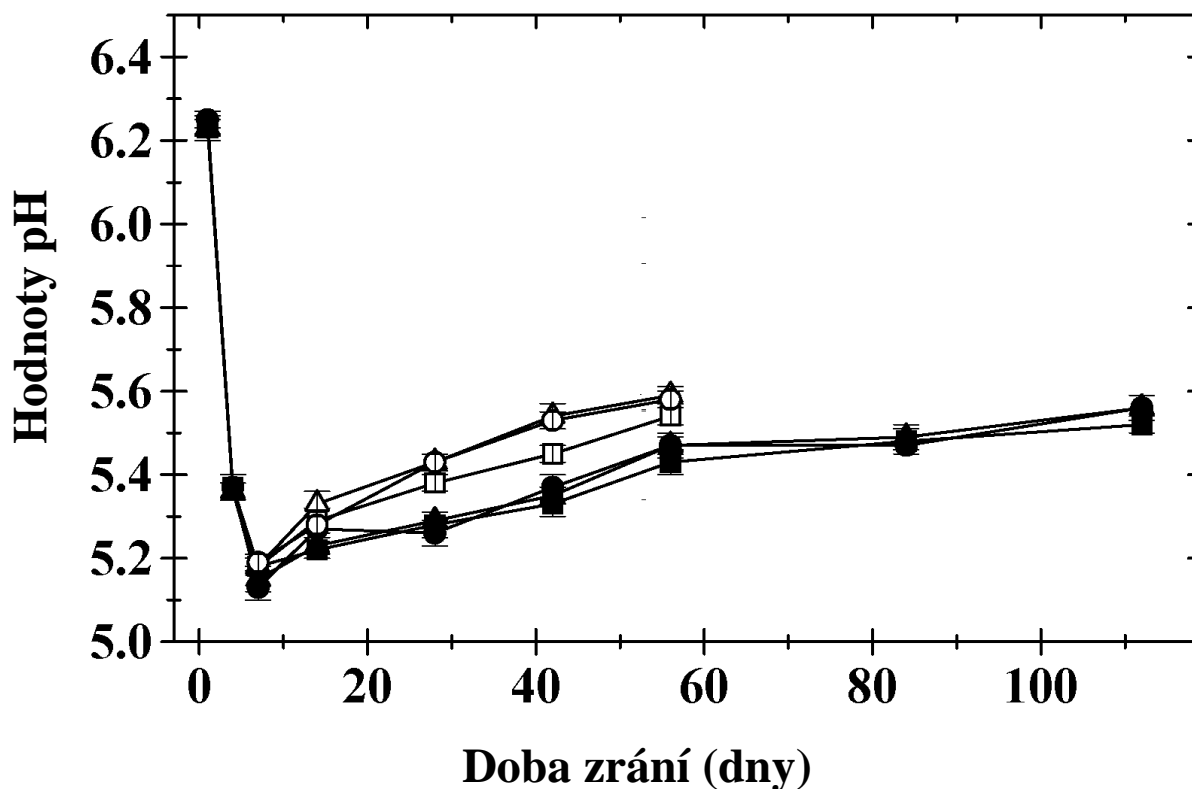
Vyšší počty mikroorganismů byly pozorovány v okrajových vrstvách sýrů holandského typu také Komprdou *et al.* [67]. Možné vysvětlení zvýšeného množství mikroorganismů v okrajových vrstvách je možné hledat v rozdílných mikroenvironmentálních podmínkách v jednotlivých částech sýrů, kam lze řadit např. přístup k  $\text{O}_2$  a hodnoty  $a_w$  [8, 71].

### 4.3.2. Základní chemická analýza

Bezprostředně po vylisování sýřeniny a před vložením bloků do solné lázně se obsah NaCl významně nelišil jak mezi jednotlivými vrstvami tak ani ve sledovaných plátech. Obsah NaCl se pohyboval v rozmezí 0,12–0,16 % (w/w) ve všech analyzovaných vzorcích ( $P \geq 0,05$ ). Obsah sušiny byl významně vyšší (asi o 1–2 % w/w) ve vrstvě I (okraj) než ve zbylých vrstvách u všech třech plátů ( $P < 0,05$ ). Do čtvrtého dne (vysolená a zabalená sýřenina) se obsah sušiny i NaCl zvýšil ve všech testovaných vrstvách nezávisle na jednotlivých plátech ( $P < 0,05$ ). Nejrapidnější nárůst sledovaných parametrů ve srovnání s vrstvou II a III (střed sýra) byl v okrajové vrstvě u všech plátů. Během 28 dnů se obsah NaCl v jednotlivých plátech postupně vyrovnával, až byl prakticky totožný ve sledovaných částech bloku sýra ( $P \geq 0,05$ ). K rovnováze obsahu NaCl mezi vrstvami jednotlivých plátů docházelo v průběhu doby zrání bez ohledu na polohu plátu i zrací teplotu. Průběh vyrovnávání koncentrace NaCl mezi vrstvami plátů byl u všech vzorků obdobný jako v experimentu 2. Z tohoto důvodu nejsou data prezentována.

Obsah sušiny ve vrstvách II a III se sjednotil během 42 dnů ( $P \geq 0,05$ ). Rozpětí obsahu sušiny v těchto vrstvách dále oscillovalo v jednotlivých plátech okolo 52–53% (w/w). Ačkoliv v prvních šesti týdnech obsah sušiny v okrajové části (vrstva I) významně klesl, byl bez ohledu na skladovací teplotu u všech třech plátů signifikantně vyšší než ve zbylých částech (vrstva II a III) a to až do konce experimentu ( $P < 0,05$ ). Rozdíl mezi vrstvou I a zbytkem plátu (ve všech sledovaných plátech) byl přibližně 1–2% w/w. Uspokojivé vysvětlení vyššího obsahu sušiny v okrajových částech sýra nebylo v dostupné literatuře nalezeno. Pravděpodobně lze očekávat existenci povrchových interakcí obalového materiálu, možnou částečnou propustnost obalového materiálu a interakce mezi okrajem a zbytkem sýra [8]. Odlišná teplota, obdobně jako u experimentu 1, neměla významný vliv na vývoj obsahu sušiny v jednotlivých plátech.

Do 7. dne zrání hodnoty pH výrazně klesly ve všech vzorcích, vrstvách a plátech z průměrné hodnoty  $6,25 \pm 0,05$  na  $5,12 \pm 0,03$  u kontrolních vzorků a na  $5,20 \pm 0,02$  u vzorků skladovaných za vyšší teploty ( $P < 0,05$ ), jak je ukázáno na Obr. 4.11. V průběhu dalšího zrání pH postupně stoupalo, přičemž mírně rychlejší růst nastal u vzorků skladovaných za vyšší teploty ( $P < 0,05$ ). Vývoj pH v jednotlivých plátech a sobě si odpovídajících vrstvách byl podobný ( $P \geq 0,05$ ; proto je na Obr. 4.11 ukázán pouze středový plát S3 pro kontrolní vorky i vzorky zrající za zvýšené teploty; hodnoty pH ostatních plátů nejsou prezentovány). Pokles pH v prvních dnech zrání může být způsoben mikrobiální fermentací laktózy na kyselinu mléčnou [21, 23]. Následný vzrůst pak může být pravděpodobně ovlivněn tvorbou sloučenin zásadité povahy (např. proteolýzou a vznikem  $\text{NH}_3$ ) a degradací kyseliny mléčné na jiné látky apod. [12].



**Obr. 4.11:** Vývoj hodnot pH kontrolních vzorků (plné symboly) a vzorků skladovaných za zvýšené teploty (prázdné symboly) v jednotlivých vrstvách středového plátu S3 v závislosti na době zrání (dny): ■ □ – vrstva I (okraj); ● ○ – vrstva II; ▲ △ – vrstva III (střed). Hodnoty pH byly vyjádřeny jako průměr; chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku. ( $n = 18$ ).

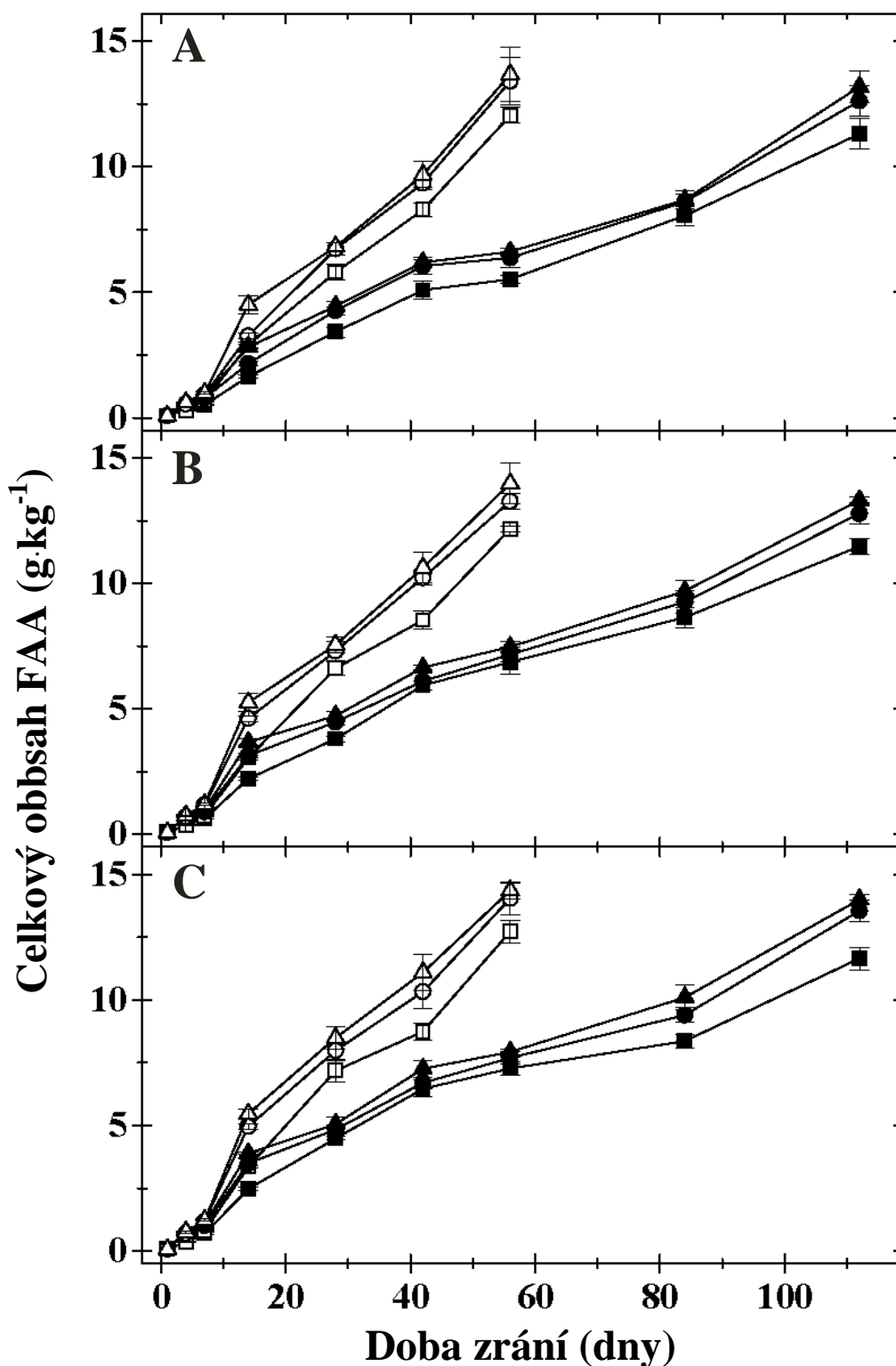
### 4.3.3. Stanovení obsahu volných aminokyselin

Obr. 4.12 znázorňuje vývoj celkového obsahu volných aminokyselin v jednotlivých vrstvách a plátech v průběhu zracího pokusu. Již od 14. dne byla pozorována mírně rychlejší proteolýza ve vzorcích zrajících za vyšší teploty ( $P < 0,05$ ). V průběhu dalšího zrání za zvýšené teploty se intenzita uvolňování aminokyselin z proteinové matrice u těchto vzorků zvyšovala, až v 56. dnu od výroby byla téměř dvojnásobná v porovnání s kontrolními vzorky zrajícími uvedenou dobu ve zracích sklepech ( $P < 0,05$ ). Prakticky až na konci experimentu (112. den) se celkový obsah aminokyselin v kontrolních vzorcích vyrovnal se vzorky zrajícími za vyšší teploty, jejichž doba zrání byla pouze 56 dní. Intenzitu proteolýzy sýrů holandského typu lze tedy až zdvojnásobit zvýšením teploty skladování o 6 °C nad běžnou teplotu zrání. Urychlení proteolytických změn matrice sýrů lze vysvětlit zejména zvýšeným množstvím LAB disponujícími mimo jiné intracelulárními peptidázami a rovněž jejich rychlejším metabolismem za vyšší teploty [26]. Jak urychlení metabolických dějů tak zvýšenou rychlost pomnožení

mikroorganismů ve vzorcích zrajících za zvýšené teploty lze pravděpodobně zdůvodnit vhodnější teplotou pro jejich růst, protože se jedná v případě sýrů holandského typu o mezofilní kultury (optimum teploty růstu ~ 30 °C) [142]. Intenzivnější metabolismus pravděpodobně indukuje také rychlejší lyzi buněk LAB, čímž dojde k vylití intracelulární tekutiny s enzymy do prostředí sýrů, které zde pokračují ve své hydrolytické aktivitě [53, 58].

Z Obr. 4.12 je patrné, že ve všech studovaných plátech (S1–S3) byl nejvyšší obsah FAA pozorován ve středových částech (vrstvy III), a to v obou použitých zrajících teplotách ( $P < 0,05$ ). Naopak nejnižší obsah FAA byl po celou dobu zrání zaznamenáván v okrajových částech ( $P < 0,05$ ), a to již od 4. dne po výrobě u kontrolních vzorků, resp. 7. dne u sýrů skladovaných za vyšší teploty. Ačkoliv během doby zrání u obou skupin vzorků obsah FAA v jednotlivých vrstvách postupně narůstal ( $P < 0,05$ ), signifikantní rozdíl mezi vrstvami I a III však přetrvával až do konce experimentu ( $P < 0,05$ ). Celkový obsah FAA ve vrstvě II se v průběhu zrání postupně přibližoval hodnotám sledovaného parametru ve středové části sýra. Zjištěné výsledky o vyrovnávání obsahu volných aminokyselin mezi okrajovou vrstvou a okrajem se shodují s experimentem 1.

Na průběh proteolýzy mělo také vliv umístění jednotlivých plátů v bloku sýra. Pláty S1 a S3 se nezávisle na teplotě zrání po měsíci zrání signifikantně lišily v celkovém obsahu FAA ( $P < 0,05$ ) v sobě odpovídajících si vrstvách (části A a C na Obr. 4.12). Přičemž nejvyšší množství volných aminokyselin bylo pozorováno ve vrstvách středového plátu (S3). Koncentrace celkového obsahu v plátu S2 (v odpovídajících si vrstvách) se po celou dobu experimentu pohybovaly mezi hodnotami sledovaného parametru u plátů S1 a S3. Intenzita proteolýzy se tedy liší napříč celým blokem sýra. Primární proteolytické děje (uvolňování aminokyselin z proteinů a peptidů) probíhají nejrychleji ve středové části sýra a směrem k okraji jejich rychlost slábne. Odlišnost proteolytických změn může souviset s různorodostí mikroenvironmentálního prostředí, které ovlivňuje metabolismus LAB a intenzitu jejich hydrolytických enzymů [66, 67, 71].

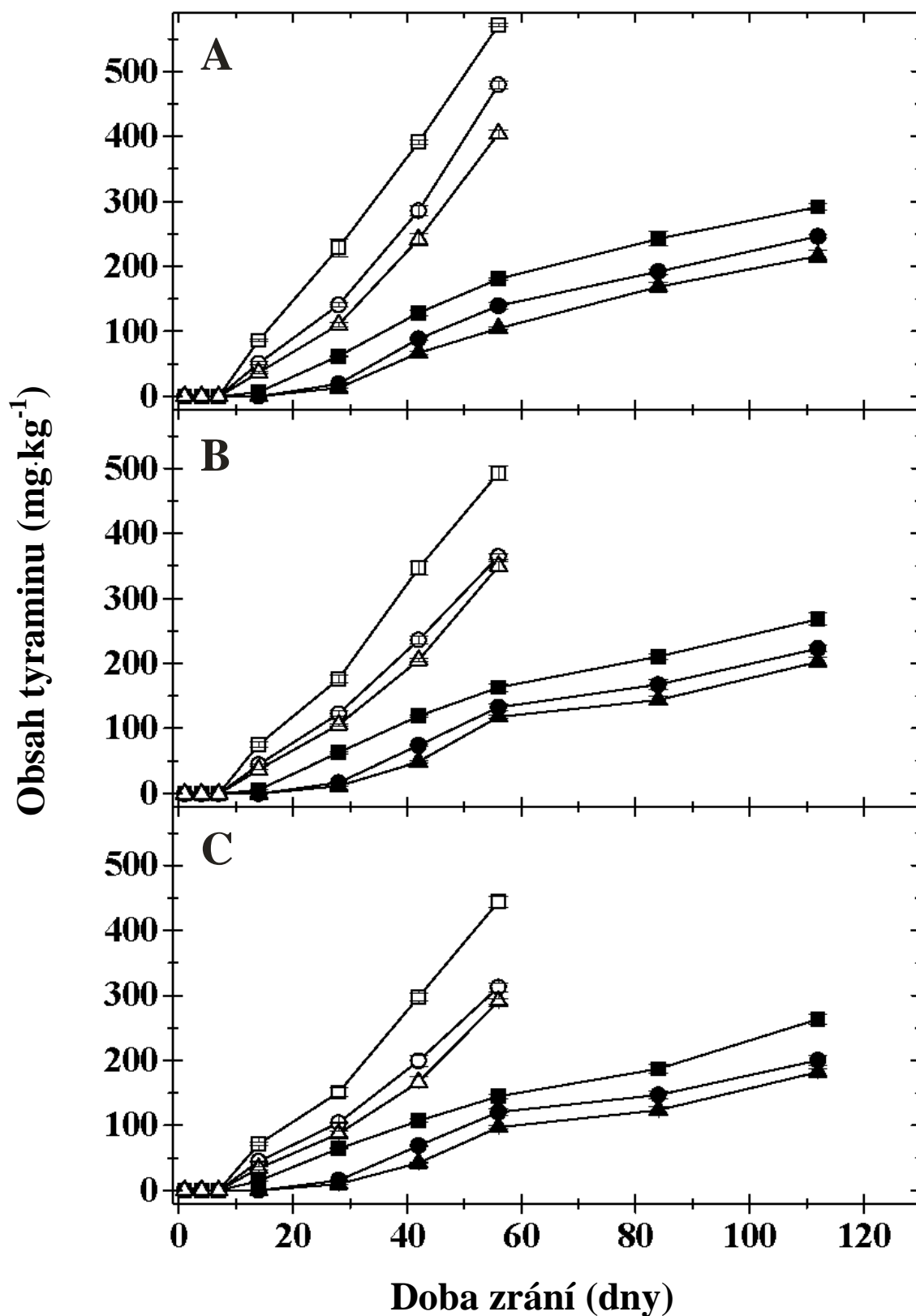


**Obr. 4.12:** Celkový obsah FAA (g.kg<sup>-1</sup>) kontrolních vzorků (plné symboly) a vzorků zrajících za zvýšené teploty (prázdné symboly) sýrů eidamského typu v jednotlivých vrstvách plátu S1 (část A), S2 (část B) a S3 (část C) v průběhu zrání (dny): ■ □ – vrstva I (okraj); ● ○ – vrstva II; ▲ △ – vrstva III (střed). Hodnoty obsahu aminokyselin byly vyjádřeny jako průměr; chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku. (n = 36).

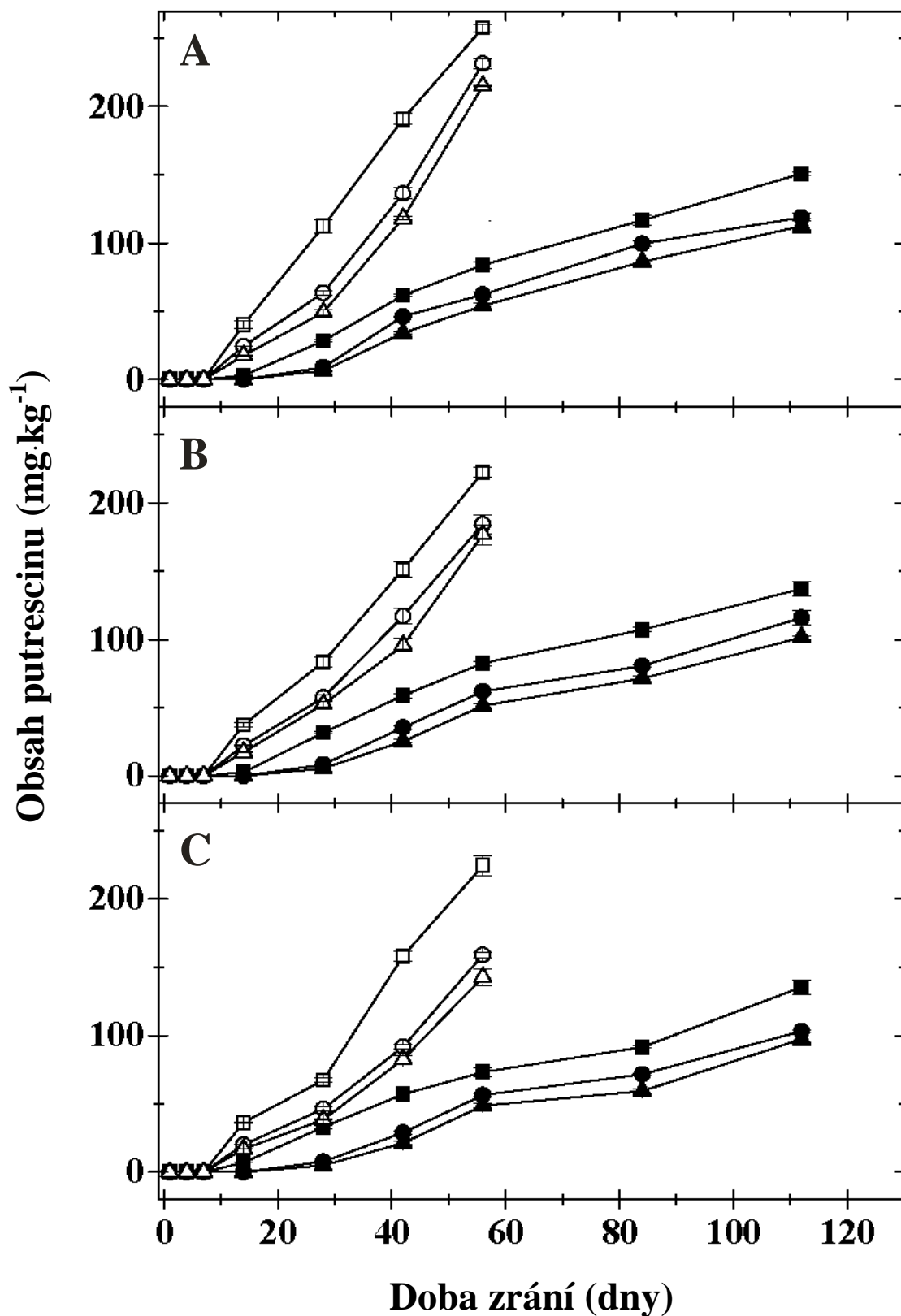


#### 4.3.4. Stanovení obsahu biogenních aminů

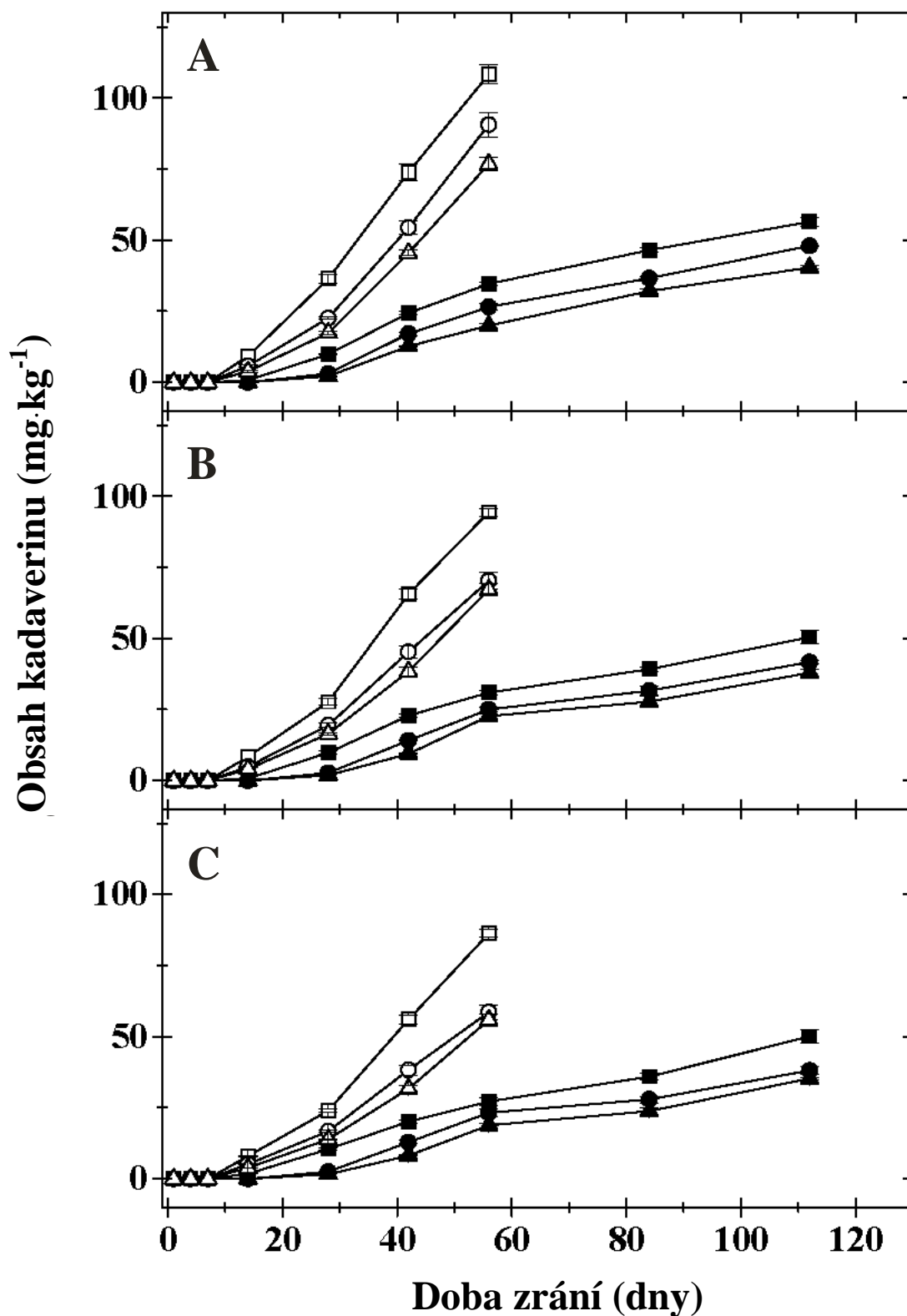
Jeden z nejběžnějších biogenních aminů vyskytující se v potravinách – histamin [143] – nebyl v průběhu celého experimentu za obou zracích teplot detekován. Během 112-ti denního pokusu byl sledován vývoj koncentrací tří biogenních aminů – tyraminu, putrescinu a kadaverinu, který je znázorněn na Obr. 4.13–4.15. Produkce biogenních aminů (tyraminu, putrescinu a kadaverinu) byla po celou dobu sledování intenzivnější u vzorků zrajících za zvýšené teploty ( $P < 0,05$ ). Obsahy tyraminu, putrescinu a kadaverinu byly u vzorků zrajících za zvýšené teploty 56. den zrání prakticky dvojnásobné ve srovnání odpovídajících si vrstev a plátů kontrolních vzorků 112. den zrání ( $P < 0,05$ ). Podle výsledků z experimentu 1 je dekarboxylázová aktivita mikroorganismů mnohem intenzivnější při vyšší teplotě inkubace, což také potvrzuje i Pinho [69]. Nejvyšší koncentrace byly zaznamenány u tyraminu, což je pro tento typ sýra v souladu s Komprda *et al.* [67]. Nalezené hodnoty biogenních aminů (jejich součty) dosahovaly v některých částech ke konci experimentu  $\sim 800 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (56. den pro vzorky zrající za zvýšené teploty) a  $\sim 350 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (112. den pro kontrolní vzorky). Takto vysoké koncentrace (zvláště u vzorku zrajících za zvýšené teploty) již nejsou dle Silla Santos [70] považovány za bezpečné, a to i pro člověka s normálně fungujícím metabolismem. Hodnoty obsahu tyraminu v rozpětí  $100\text{--}800 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  jsou považovány v potravinách jako toxické, přičemž během 56 dnů obsah tyraminu ve všech vrstvách sledovaných plátů se významně přiblížil (v případě okraje dokonce přesáhl) hranici  $500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ .



**Obr. 4.13:** Obsah tyraminu ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) kontrolních vzorků (plné symboly) a akcelerovaných (prázdné symboly) sýrů eidamského typu v jednotlivých vrstvách plátu S1 (část A), S2 (část B) a S3 (část C) v průběhu zrání (dny): ■ □ – vrstva I (okraj); ● ○ – vrstva II; ▲ △ – vrstva III (střed). Hodnoty obsahu tyraminu byly vyjádřeny jako průměr; chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku. ( $n = 36$ ).



**Obr. 4.14:** Obsah putrescinu ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) kontrolních vzorků (plné symboly) a akcelerovaných (prázdné symboly) sýrů eidamského typu v jednotlivých vrstvách plátu S1 (část A), S2 (část B) a S3 (část C) v průběhu zrání (dny): ■ □ – vrstva I (okraj); ● ○ – vrstva II; ▲ △ – vrstva III (střed). Hodnoty obsahu tyraminu byly vyjádřeny jako průměr; chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku. ( $n = 36$ ).



**Obr. 4.15:** Obsah kadaverinu ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) kontrolních vzorků (plné symboly) a akcelerovaných (prázdné symboly) sýrů eidamského typu v jednotlivých vrstvách plátu S1 (část A), S2 (část B) a S3 (část C) v průběhu zrání (dny): ■ □ – vrstva I (okraj); ● ○ – vrstva II; ▲ △ – vrstva III (střed). Hodnoty obsahu tyraminu byly vyjádřeny jako průměr; chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku. ( $n = 36$ ).

Podobně jako u experimentu 1 bylo nejvyšší množství biogenních aminů pozorováno v okrajové vrstvě bez ohledu na polohu plátu i teplotu zrání ( $P < 0,05$ ). Naopak nejnižší obsah tyraminu, putrescinu a kadaverinu byl po celou dobu experimentu zaznamenáván ve středu sýrů ( $P < 0,05$ ). K obdobným závěrům dospěli také Komprda *et al.* [67]. Obsahy jednotlivých biogenních aminů se lišily také v závislosti na poloze plátu, kdy krajní plát vykazoval vyšší obsahy odpovídajících si vrstev než plát středový ( $P < 0,05$ ). Různé intenzity dekarboxylačních procesů v rámci sledovaných bloků sýrů mohly být způsobeny rozdílnými mikroenvironmentálními podmínkami uvnitř sýrů, které jsou schopny ovlivnit metabolismus LAB [67, 71]. V experimentu 1 byli za hlavní producenty biogenních aminů označeni fakultativně anaerobní zástupci NSLAB z rodu *Lactobacillus* (zejména *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum* a *Lactobacillus curvatus*).

#### 4.3.5. Stanovení texturních vlastností

Grafické vyjádření vývoje tvrdosti měřených pozic v jednotlivých plátech a vrstvách kontrolních sýrů a sýrů skladovaných za vyšší teploty je znázorněno na Obr. 4.16. V den 1 (ihned po vylisování sýřeniny před vložením do solné lázně) nebyly zaznamenány významné rozdíly mezi jednotlivými vrstvami v žádném sledovaném plátu DS1–DS3 ( $P \geq 0,05$ ). Hodnota tvrdosti se pohybovala přibližně v rozpětí 4–5 N. Po vysolení sýrů (4. den) byly jasně viditelné difference mezi okrajovou vrstvou a zbytkem sýra ( $P < 0,05$ ). V okrajových vrstvách (pozice 1–5) u všech sledovaných plátů DS1–DS3 tvrdost vzrostla na hodnotu převyšující 12 N ( $P < 0,05$ ), přičemž pozice 1–5 se v jednotlivých plátech nelišily ( $P \geq 0,05$ ). Pozice 6 však vykazovala mírně menší tvrdost než ostatní pozice ve vrstvě I ( $P < 0,05$ ), a to u všech testovaných plátů DS1–DS3. Při porovnání vrstev II a III byl plát DS1 signifikantně tvrdší ( $P < 0,05$ ) než odpovídající si vrstvy plátů DS2 a DS3, které se v tvrdosti prakticky nelišily ( $P \geq 0,05$ ). Pozice 12 byla u všech testovaných plátů DS1–DS3 měkkší než zbylé pozice ve vrstvě II ( $P < 0,05$ ) a byla srovnatelná ( $P \geq 0,05$ ) se středem jednotlivých plátů. Rozdílnost v tvrdosti sledovaných pozic lze vysvětlit vlivem solení, kdy dochází k dehydrataci povrchové vrstvy sýra. V okrajové části cihly dochází ke snížení vodní aktivity z důvodu přestupu volné vody (syrovátky) ze sýřeniny do solné lázně v průběhu solení [8, 20]. Navíc, sodné ionty značně zvyšují iontovou sílu a omezují tím rozpustnost proteinů [54]. Vyšší koncentrace soli také může inhibovat mikroflóru sýra a tím brzdí enzymatické reakce, včetně proteolýzy kaseinových frakcí [26], což podporují výsledky obsahu volných aminokyselin. Všechny výše zmíněné děje přispívají k vyšší tvrdosti okrajové vrstvy jednotlivých plátů. Obdobně se chová také plát DS1, do jehož celé hmoty difunduje NaCl rychleji než do vrstev II a III u plátů DS2 a DS3.

Mezi 4. a 7. dnem došlo u pozic 7–11 plátů S2 a S3 kontrolních vzorků i vzorků zrajících za zvýšené teploty ke zvýšení tvrdosti ze 4 na 6 N ( $P < 0,05$ ). Tento proces lze vysvětlit průnikem NaCl do těchto částí sýra z vrstev I a následným bobtnáním proteinové matrice [8]. Jedinou výjimkou byla pozice 12, u které nedošlo k signifikantní změně tvrdosti ( $P \geq 0,05$ ) a která byla stále mírně měkčí než ostatní pozice vrstvy II plátů DS2 a DS3 stejně jako ES2 a ES3 ( $P < 0,05$ ). V plátech DS1 a ES1 se tvrdost pozic 7–11 ve srovnání se situací 4. dne prakticky nezměnila ( $P \geq 0,05$ ). Naopak středy plátů S2 a S3 vykazovaly nadále nižší tvrdost ve srovnání s ostatními vrstvami. Sobě si odpovídající pláty kontrolního vzorku a vzorku zrajícího za zvýšené teploty nevykazovaly 3 dny po zahájení akcelerace zrání mezi sebou významné odchylky v tvrdosti ( $P \geq 0,05$ ). Nevýznamný rozdíl obsahu volných aminokyselin a biogenních aminů odpovídajících si vrstev a plátů kontrolních vzorků a vzorků zrajících za zvýšené teploty v 7. dnu ( $P \geq 0,05$ ) poukazuje na prozatím obdobnou intenzitu metabolismu přítomné mikroflóry.

Během dalšího týdne bylo zaznamenáno významné snižování tvrdosti sledovaných plátů i vrstev ( $P < 0,05$ ). V případě vrstev I všech testovaných plátů a vrstev II plátů S2 a S3 byly popisované změny intenzivnější u sýrů zrajících za zvýšené teploty ve srovnání s kontrolními vzorky ( $P < 0,05$ ). Pokles tvrdosti lze vysvětlit především probíhající proteolýzou přítomných kaseinů. Rychlejší snižování parametru tvrdosti u sýrů zrajících za zvýšené teploty lze připsat intenzivnějšímu metabolismu přítomných mikroorganismů a aktivitě proteolytických enzymů [8, 91], což dokládají výsledky mikrobiologické analýzy a stanovení obsahu volných aminokyselin.

Vývoj tvrdosti pozice 6 v jednotlivých plátech byl v průběhu zrání při obou teplotách odlišný od ostatních pozic vrstev I (1–5). Tvrdost výše zmíněné pozice vykazovala signifikantně nižší hodnoty než ostatní pozice vrstvy I (Obr. 4.16). Vysvětlení této skutečnosti není jednoduché a ani dostupná literatura neposkytuje dostatečnou oporu. Objasnění lze obdobně jako u experimentu 2 hledat ve faktu, že bloky sýra byly v solné lázni položeny na podložku. Do pozice 6 pak nemůže difundovat NaCl přímo (není přímý styk této oblasti se solným roztokem), ale pouze pronikat z přilehlých oblastí vrstvy I. Pravděpodobně nižší obsah NaCl pak může ovlivnit růst a metabolismus bakterií mléčného kvašení, včetně proteolytických procesů [67, 71]. Jistý anomální vývoj tvrdosti byl do 42. dne u kontrolních vzorků a do 28. dne u akcelerovaných vzorků pozorován i u pozice 12 ve srovnání s ostatními pozicemi vrstvy II (7–11) pro jednotlivé analyzované pláty (Obr. 4.16). Vysvětlení může být obdobné jako pro pozici 6.

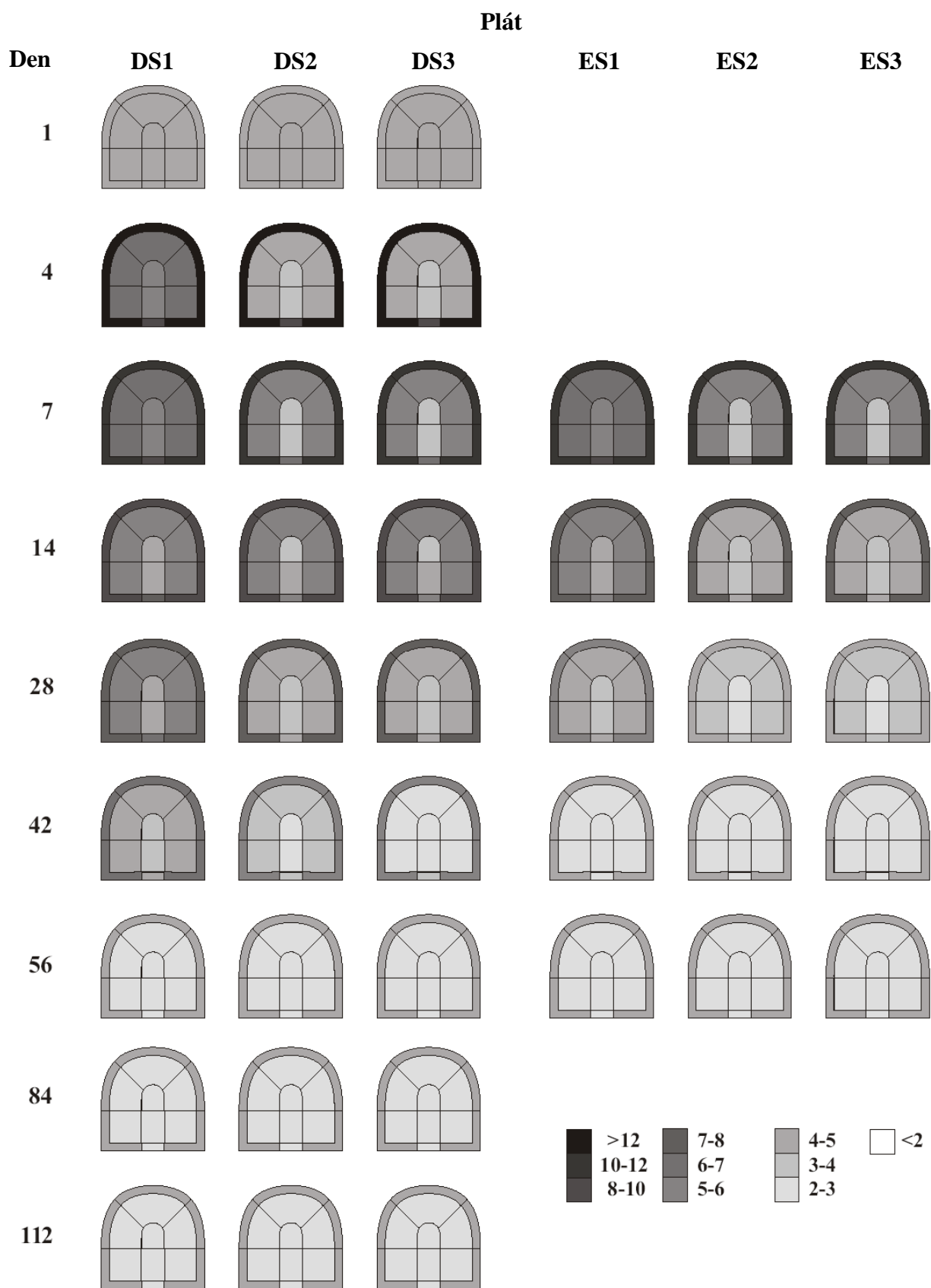
Do 42. dne došlo u akcelerovaných vzorků k postupnému snižování tvrdosti ( $P < 0,05$ ) v jednotlivých pozicích. Rovněž lze tento den pozorovat vyrovnaní tvrdosti jednotlivých plátů ( $P \geq 0,05$ ), a to pro většinu pozic na hodnotách 2–3 N. Výjimku tvořily pozice 1–5, které u všech plátů vykazovaly vyšší hodnoty tvrdosti 4–5 N ( $P < 0,05$ ). Během následujících

14 dnů (56. den) již nedošlo k signifikantním změnám tvrdosti ve sledovaných pozicích, resp. plátech ( $P \geq 0,05$ ) u akcelerovaných sýrů.

U kontrolních vzorků docházelo k postupnému snižování tvrdosti většiny analyzovaných vrstev a plátů do 56. dne zrání ( $P < 0,05$ ). 56. den zrání byly u kontrolních vzorků pozorovány obdobné hodnoty tvrdosti ( $P \geq 0,05$ ) při srovnání odpovídajících si plátů a vrstev vzorků zrajících za zvýšené teploty ve 42. a 56. dnu zrání. Do 112. dne zrání již nedošlo k signifikantním změnám tvrdosti kontrolních vzorků ( $P \geq 0,05$ ). Rychlejší vyrovnání texturních parametrů sýrů zrajících za zvýšené teploty lze opět připsat intenzivnějšímu průběhu proteolytických reakcí v matici za vyšších zrajících teplot [99]. U obou teplot zrání byla pozorována vyšší tvrdost pozic 1–5 (u vrstev I) ve srovnání s ostatními pozicemi, resp. vrstvami, a to bez ohledu na polohu plátu.

Významně vyšší tvrdost ve vrstvě I u všech pozorovaných plátů lze pravděpodobně přisoudit vyššímu obsahu sušiny v okrajové vrstvě, která mohla ovlivnit rychlost proteolýzy, na kterou poukazuje ve své práci Fox *et al.* [8].

Tab. 5 znázorňuje hodnoty  $k_2$  koeficientu (indikátor elastické složky materiálu), který byl vypočten pomocí metody nelineární regrese s využitím Pelegova modelu. Po vysolení sýrů významně vzrostla elasticita ve všech sledovaných pozicích a plátech ( $P < 0,05$ ). Během čtyř týdnů elasticita vzorků klesala jak u kontrolního, tak i u sýra, který zrál za zvýšené teploty ( $P < 0,05$ ). Pokles elasticity byl mírně intenzivnější u vzorků zrajících za zvýšené teploty ( $P < 0,05$ ). Po dobu celého experimentu vykazovaly pozice 1–5 nejvyšší hodnoty koeficientu  $k_2$  ve srovnání s ostatními pozicemi. Hodnoty pozic 6 a 12 byly mírně nižší než ostatní pozice v příslušných vrstvách (vrstvy I a II), což koreluje s poznatkami vývoje tvrdosti v těchto úsecích. Ze zjištěných výsledků lze tedy usuzovat vliv difúze NaCl na elasticitu sýra. V průběhu zrání docházelo k mírnému poklesu hodnot  $k_2$  ( $P < 0,05$ ). Elasticita vzorků se u většiny pozic a plátů ustálila obdobně jako u analýzy tvrdosti 56. den u kontrolních vzorků, resp. 42. den u vzorků zrajících za zvýšené teploty. Výsledky tvrdosti dobře korelují s parametrem  $k_2$  ( $r = 0,8377$ ) který je považován za míru elasticity polotuhých potravin. Analýza pomocí stress testů a následné vyhodnocení Pelegovým modelem je vhodným doplňkem ukazatele tvrdosti a v některých případech citlivěji odhaluje rozdíly v texturních vlastnostech přírodních sýrů.



**Obr. 4.16:** Diagram znázorňující hodnoty tvrdosti ( $N$ ) pro každou ze 13 pozic v plátech S1, S2 a S3, které byly testovány během zrání (průměr;  $n = 6$ ).



**Tab. 5:** Hodnoty parametru  $k_2$  získaných ze zátěžové křivky 13 pozic ( $n = 6$ ; průměr  $\pm$  SD) v jednotlivých plátech sýra zrajícího při 10 °C a 16 °C (S1, S2 a S3) pomocí Pelegova modelu \*

Den	Plát	Pozice **	$k_2$ – hodnota	
			10 °C	16 °C
1	S1	1–5	1,62 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup> A <sub>a</sub>	ND <sup>***</sup>
		6	1,59 $\pm$ 0,00 <sup>b,c</sup> A <sub>a</sub>	ND
		7–11	1,57 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup> A <sub>a</sub>	ND
		12	1,56 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup> A <sub>a</sub>	ND
		střed	1,55 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup> A <sub>a</sub>	ND
	S2	1–5	1,58 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup> A <sub>a</sub>	ND
		6	1,54 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup> A <sub>b</sub>	ND
		7–11	1,55 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup> A <sub>a</sub>	ND
		12	1,53 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup> A <sub>b</sub>	ND
		střed	1,53 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup> A <sub>a</sub>	ND
	S3	1–5	1,59 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup> A <sub>a</sub>	ND
		6	1,53 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup> A <sub>b</sub>	ND
		7–11	1,55 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup> A <sub>a</sub>	ND
		12	1,51 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup> A <sub>b</sub>	ND
		střed	1,53 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup> A <sub>a</sub>	ND
4	S1	1–5	1,83 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup> B <sub>a</sub>	ND
		6	1,79 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup> B <sub>a</sub>	ND
		7–11	1,75 $\pm$ 0,04 <sup>c</sup> B <sub>a</sub>	ND
		12	1,75 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup> B <sub>a</sub>	ND
		střed	1,74 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup> B <sub>a</sub>	ND
	S2	1–5	1,84 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup> B <sub>a</sub>	ND
		6	1,72 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup> B <sub>b</sub>	ND
		7–11	1,73 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup> B <sub>a</sub>	ND
		12	1,72 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup> B <sub>b</sub>	ND
		střed	1,69 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup> B <sub>b</sub>	ND
	S3	1–5	1,82 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup> B <sub>a</sub>	ND
		6	1,75 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup> B <sub>b</sub>	ND
		7–11	1,73 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup> B <sub>a</sub>	ND
		12	1,68 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup> B <sub>c</sub>	ND
		střed	1,67 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup> B <sub>b</sub>	ND
7	S1	1–5	1,83 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup> B <sub>a</sub>	1,80 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup> A <sub>a</sub>
		6	1,74 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup> C <sub>a</sub>	1,71 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup> A <sub>a</sub>
		7–11	1,74 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup> B <sub>a</sub>	1,71 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup> A <sub>a</sub>
		12	1,70 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup> C <sub>a</sub>	1,73 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup> A <sub>a</sub>
		střed	1,63 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup> C <sub>a</sub>	1,65 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup> A <sub>a</sub>
	S2	1–5	1,82 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup> B <sub>a</sub>	1,82 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup> A <sub>a</sub>
		6	1,72 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup> B <sub>a</sub>	1,73 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup> A <sub>a</sub>
		7–11	1,72 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup> B <sub>a</sub>	1,74 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup> A <sub>a</sub>
		12	1,67 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup> C <sub>a,b</sub>	1,68 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup> A <sub>b</sub>
		střed	1,60 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup> C <sub>a</sub>	1,63 $\pm$ 0,01 <sup>d</sup> A <sub>a</sub>
	S3	1–5	1,79 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup> B <sub>a</sub>	1,79 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup> A <sub>a</sub>
		6	1,71 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup> C <sub>a</sub>	1,70 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup> A <sub>a</sub>
		7–11	1,70 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup> B <sub>a</sub>	1,73 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup> A <sub>a</sub>
		12	1,66 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup> B <sub>b</sub>	1,67 $\pm$ 0,00 <sup>d</sup> A <sub>b</sub>
		střed	1,67 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup> B <sub>b</sub> †	1,65 $\pm$ 0,01 <sup>d</sup> A <sub>a</sub> †

(Tab. 5: pokračování)

Den	Plát	Pozice **	k <sub>2</sub> – hodnota	
			10 °C	16 °C
14	S1	1–5	1,88 ± 0,02 <sup>a</sup> C <sub>a</sub>	1,90 ± 0,02 <sup>a</sup> B <sub>a</sub>
		6	1,83 ± 0,00 <sup>b</sup> D <sub>a</sub>	1,81 ± 0,00 <sup>b</sup> B <sub>a</sub>
		7–11	1,72 ± 0,05 <sup>c</sup> B <sub>a</sub>	1,71 ± 0,05 <sup>c</sup> A <sub>a</sub>
		12	1,67 ± 0,00 <sup>d</sup> D <sub>a</sub>	1,69 ± 0,00 <sup>c</sup> B <sub>a</sub>
		střed	1,67 ± 0,01 <sup>d</sup> D <sub>a</sub>	1,67 ± 0,03 <sup>c</sup> A <sub>a</sub>
	S2	1–5	1,93 ± 0,02 <sup>a</sup> C <sub>b</sub>	1,90 ± 0,04 <sup>a</sup> B <sub>a</sub>
		6	1,86 ± 0,01 <sup>b</sup> C <sub>b</sub> †	1,83 ± 0,01 <sup>b</sup> B <sub>b</sub> †
		7–11	1,75 ± 0,03 <sup>c</sup> B <sub>a</sub>	1,74 ± 0,04 <sup>c</sup> A <sub>a</sub>
		12	1,67 ± 0,02 <sup>d</sup> C <sub>a</sub>	1,66 ± 0,01 <sup>d</sup> A <sub>b</sub>
		střed	1,68 ± 0,01 <sup>d</sup> B <sub>a</sub> †	1,65 ± 0,01 <sup>d</sup> A <sub>a</sub> †
	S3	1–5	1,93 ± 0,04 <sup>a</sup> C <sub>b</sub>	1,89 ± 0,02 <sup>a</sup> B <sub>a</sub>
		6	1,84 ± 0,00 <sup>b</sup> D <sub>a,b</sub> †	1,81 ± 0,00 <sup>b</sup> B <sub>a</sub> †
		7–11	1,74 ± 0,03 <sup>c</sup> B <sub>a</sub>	1,70 ± 0,03 <sup>c</sup> A <sub>a</sub>
		12	1,65 ± 0,00 <sup>d</sup> B <sub>b</sub> †	1,63 ± 0,00 <sup>d</sup> B <sub>b</sub> †
		střed	1,64 ± 0,02 <sup>d</sup> B <sub>b</sub> †	1,62 ± 0,00 <sup>d</sup> B <sub>b</sub> †
28	S1	1–5	1,81 ± 0,02 <sup>a</sup> B <sub>a</sub>	1,78 ± 0,03 <sup>a</sup> A <sub>a</sub>
		6	1,75 ± 0,00 <sup>b</sup> C <sub>a</sub>	1,74 ± 0,00 <sup>b</sup> A <sub>a</sub>
		7–11	1,71 ± 0,02 <sup>b</sup> B <sub>a</sub> †	1,67 ± 0,03 <sup>c</sup> A <sub>a</sub> †
		12	1,64 ± 0,00 <sup>c</sup> D <sub>a</sub> †	1,60 ± 0,00 <sup>d</sup> C <sub>a</sub> †
		střed	1,65 ± 0,02 <sup>c</sup> C,D <sub>a</sub> †	1,61 ± 0,02 <sup>d</sup> B <sub>a</sub> †
	S2	1–5	1,79 ± 0,03 <sup>a</sup> B <sub>a,b</sub>	1,75 ± 0,03 <sup>a</sup> C <sub>a</sub>
		6	1,72 ± 0,00 <sup>b</sup> B <sub>b</sub>	1,70 ± 0,01 <sup>b</sup> A <sub>b</sub>
		7–11	1,70 ± 0,03 <sup>b</sup> B <sub>a</sub>	1,69 ± 0,02 <sup>b</sup> B <sub>b</sub>
		12	1,66 ± 0,01 <sup>c</sup> C <sub>a</sub> †	1,63 ± 0,00 <sup>c</sup> B <sub>a</sub> †
		střed	1,63 ± 0,01 <sup>c</sup> C <sub>a</sub> †	1,60 ± 0,01 <sup>c</sup> B <sub>a</sub> †
	S3	1–5	1,77 ± 0,04 <sup>a</sup> B <sub>b</sub>	1,75 ± 0,03 <sup>a</sup> A,C <sub>a</sub>
		6	1,72 ± 0,00 <sup>b</sup> B <sub>b</sub> †	1,70 ± 0,00 <sup>b</sup> A <sub>b</sub> †
		7–11	1,68 ± 0,03 <sup>b</sup> B <sub>b</sub>	1,65 ± 0,02 <sup>c</sup> B <sub>b</sub>
		12	1,53 ± 0,00 <sup>c</sup> A <sub>b</sub> †	1,50 ± 0,00 <sup>d</sup> C <sub>c</sub> †
		střed	1,53 ± 0,01 <sup>c</sup> A <sub>b</sub> †	1,51 ± 0,01 <sup>d</sup> C <sub>b</sub> †
42	S1	1–5	1,78 ± 0,02 <sup>a</sup> C <sub>a</sub> †	1,70 ± 0,02 <sup>a</sup> C <sub>a</sub> †
		6	1,64 ± 0,00 <sup>b</sup> D <sub>a</sub> †	1,59 ± 0,01 <sup>b</sup> C <sub>a</sub> †
		7–11	1,59 ± 0,02 <sup>c</sup> A <sub>a</sub> †	1,54 ± 0,02 <sup>b</sup> C <sub>a</sub> †
		12	1,55 ± 0,00 <sup>d</sup> A <sub>a</sub> †	1,50 ± 0,00 <sup>c</sup> D <sub>a</sub> †
		střed	1,53 ± 0,00 <sup>d</sup> A <sub>a</sub> †	1,49 ± 0,03 <sup>c</sup> C <sub>a</sub> †
	S2	1–5	1,79 ± 0,02 <sup>a</sup> B <sub>a</sub> †	1,68 ± 0,02 <sup>a</sup> D <sub>a</sub> †
		6	1,63 ± 0,00 <sup>b</sup> C <sub>a</sub> †	1,53 ± 0,00 <sup>b</sup> D <sub>b</sub> †
		7–11	1,62 ± 0,02 <sup>b</sup> C <sub>a</sub> †	1,56 ± 0,03 <sup>b</sup> C <sub>a</sub> †
		12	1,51 ± 0,00 <sup>c</sup> A <sub>a</sub> †	1,48 ± 0,00 <sup>c</sup> C <sub>a</sub> †
		střed	1,53 ± 0,01 <sup>c</sup> A <sub>a</sub> †	1,40 ± 0,03 <sup>d</sup> C <sub>b</sub> †
	S3	1–5	1,76 ± 0,02 <sup>a</sup> B <sub>b</sub> †	1,71 ± 0,04 <sup>a</sup> C <sub>a</sub> †
		6	1,60 ± 0,00 <sup>b</sup> C <sub>b</sub> †	1,56 ± 0,00 <sup>b</sup> C <sub>c</sub> †
		7–11	1,60 ± 0,03 <sup>b</sup> C <sub>a</sub> †	1,56 ± 0,02 <sup>b</sup> C <sub>a</sub> †
		12	1,51 ± 0,00 <sup>c</sup> A <sub>b</sub> †	1,45 ± 0,00 <sup>c</sup> D <sub>b</sub> †
		střed	1,53 ± 0,01 <sup>c</sup> A <sub>a</sub> †	1,46 ± 0,01 <sup>c</sup> D <sub>c</sub> †

*(Tab. 5: pokračování)*

Den	Plát	Pozice**	$k_2$ – hodnota	
			10°C	16°C
56	S1	1–5	1,72 ± 0,02 <sup>a</sup> D <sub>a</sub>	1,71 ± 0,02 <sup>a</sup> C <sub>a</sub>
		6	1,58 ± 0,00 <sup>b</sup> A <sub>a</sub>	1,57 ± 0,01 <sup>b</sup> C <sub>a</sub>
		7–11	1,56 ± 0,02 <sup>c</sup> A <sub>a</sub>	1,55 ± 0,02 <sup>b</sup> C <sub>a</sub>
		12	1,47 ± 0,00 <sup>d</sup> E <sub>a</sub>	1,46 ± 0,02 <sup>c</sup> E <sub>a</sub>
		střed	1,46 ± 0,02 <sup>d</sup> E <sub>a</sub>	1,47 ± 0,01 <sup>c</sup> C <sub>a</sub>
	S2	1–5	1,69 ± 0,02 <sup>a</sup> C <sub>a</sub>	1,68 ± 0,02 <sup>a</sup> D <sub>a</sub>
		6	1,54 ± 0,01 <sup>b</sup> A <sub>b</sub>	1,52 ± 0,01 <sup>b</sup> D <sub>b</sub>
		7–11	1,58 ± 0,02 <sup>b</sup> A <sub>a</sub>	1,56 ± 0,02 <sup>b</sup> C <sub>a</sub>
		12	1,51 ± 0,01 <sup>c</sup> A <sub>b</sub>	1,49 ± 0,02 <sup>c</sup> C <sub>a</sub>
		střed	1,41 ± 0,02 <sup>c</sup> D <sub>b</sub>	1,40 ± 0,05 <sup>d</sup> C <sub>b</sub>
	S3	1–5	1,70 ± 0,02 <sup>a</sup> D <sub>a</sub>	1,69 ± 0,01 <sup>a</sup> C <sub>a</sub>
		6	1,55 ± 0,00 <sup>b</sup> A <sub>b</sub>	1,54 ± 0,01 <sup>b</sup> C <sub>b</sub>
		7–11	1,52 ± 0,02 <sup>b</sup> A <sub>b</sub>	1,50 ± 0,03 <sup>b</sup> C <sub>b</sub>
		12	1,46 ± 0,00 <sup>c</sup> C <sub>c</sub>	1,45 ± 0,02 <sup>c</sup> D <sub>a</sub>
		střed	1,47 ± 0,01 <sup>c</sup> C <sub>b</sub>	1,44 ± 0,03 <sup>c</sup> D <sub>a,b</sub>
84	S1	1–5	1,71 ± 0,02 <sup>a</sup> D <sub>a</sub>	ND
		6	1,57 ± 0,00 <sup>b</sup> A <sub>a</sub>	ND
		7–11	1,55 ± 0,02 <sup>b,c</sup> A <sub>a</sub>	ND
		12	1,55 ± 0,00 <sup>c</sup> A <sub>a</sub>	ND
		střed	1,53 ± 0,02 <sup>c</sup> A <sub>a</sub>	ND
	S2	1–5	1,70 ± 0,02 <sup>a</sup> C <sub>a</sub>	ND
		6	1,56 ± 0,00 <sup>b</sup> A <sub>a</sub>	ND
		7–11	1,55 ± 0,04 <sup>b</sup> A <sub>a</sub>	ND
		12	1,48 ± 0,00 <sup>c</sup> A <sub>b</sub>	ND
		střed	1,44 ± 0,01 <sup>c</sup> D <sub>b</sub>	ND
	S3	1–5	1,70 ± 0,02 <sup>a</sup> D <sub>a</sub>	ND
		6	1,55 ± 0,00 <sup>b</sup> A <sub>a</sub>	ND
		7–11	1,57 ± 0,01 <sup>b</sup> C <sub>a</sub>	ND
		12	1,50 ± 0,00 <sup>c</sup> A <sub>b</sub>	ND
		střed	1,49 ± 0,02 <sup>c</sup> C <sub>c</sub>	ND
112	S1	1–5	1,69 ± 0,02 <sup>a</sup> A <sub>a</sub>	ND
		6	1,57 ± 0,01 <sup>b</sup> A <sub>a</sub>	ND
		7–11	1,54 ± 0,02 <sup>b</sup> A <sub>a</sub>	ND
		12	1,52 ± 0,02 <sup>b,c</sup> A <sub>a</sub>	ND
		střed	1,51 ± 0,02 <sup>c</sup> A <sub>a</sub>	ND
	S2	1–5	1,68 ± 0,02 <sup>a</sup> C <sub>a</sub>	ND
		6	1,56 ± 0,02 <sup>b</sup> A <sub>a</sub>	ND
		7–11	1,55 ± 0,02 <sup>b</sup> A <sub>a</sub>	ND
		12	1,47 ± 0,02 <sup>c</sup> A <sub>a</sub>	ND
		střed	1,47 ± 0,01 <sup>c</sup> D <sub>a</sub>	ND
	S3	1–5	1,68 ± 0,09 <sup>a</sup> D <sub>a</sub>	ND
		6	1,57 ± 0,00 <sup>b</sup> A <sub>a</sub>	ND
		7–11	1,56 ± 0,05 <sup>b</sup> C <sub>a</sub>	ND
		12	1,51 ± 0,02 <sup>c</sup> A <sub>a</sub>	ND
		střed	1,49 ± 0,02 <sup>c</sup> C <sub>a</sub>	ND

\* Průměry ve sloupci (rozdíly mezi pozicemi v jednotlivých plátech) s odlišnými písmeny v horním indexu se statisticky odlišují ( $P < 0,05$ ); hodnoty v jednotlivých plátech a dnech byly hodnoceny samostatně. Průměry ve sloupci (rozdíly mezi pláty u jednotlivých pozic) s odlišnými písmeny v dolním indexu se statisticky odlišují ( $P < 0,05$ ); jednotlivé pozice v daném dnu byly hodnoceny samostatně. Průměry ve sloupci (rozdíly v době zrání) s odlišnými velkými písmeny se statisticky odlišují ( $P < 0,05$ ); hodnoty jednotlivých pozic v jednotlivých plátech byly posuzovány samostatně. Průměry v řádku (rozdíly mezi teplotou zrání – kontrola a vzorek zrající za zvýšené teploty) s křížem (†) ( $P < 0,05$ ) se statisticky liší.

\*\* Výsledky pozic 1–5 byly sloučeny do jedné hodnoty, protože hodnoty naměřené v 1., 2., 3., 4. a 5. pozici se statisticky neodlišovaly ( $P \geq 0,05$ ). Na stejném principu je tvrdost pozic 7–11 také reprezentována jedním výsledkem.

\*\*\* ND – hodnoty nebyly měřeny.

#### **4.3.6. Senzorická analýza**

Z hlediska senzorické analýzy nebyla v průběhu zrání kontrolních ani akcelerovaných vzorků zaznamenána signifikantní intenzita pachutí (sýry byly hodnoceny stupni 1 nebo 2). Na konci zrání kontrolních vzorků (112. den) i produktů, které byly podrobeny akceleraci zrání (56. den), byla chuť a vůně sýrů posuzovateli hodnocena kladně bez defektů (stupeň 2).

## 5. PŘÍNOS PRÁCE PRO VĚDU A PRAXI

Zrání sýrů představuje složitý proces, který zahrnuje jak mikrobiologické tak biochemické děje a podílí se na vývoji senzoryicky aktivních látek ale i konzistence sýru. Délka a podmínky zrání jsou důležitými faktory, které tyto změny ovlivňují a jsou charakteristické pro daný typ produktu. K velmi oblíbeným přírodním sýrům v České republice patří již tradičně sýry eidamského typu, které řadíme mezi sýry s nízkodohřívanou sýřeninou. U těchto sýrů se teploty zrání pohybují obvykle v intervalu 8–12 °C a doporučená doba zrání se uvádí v rozmezí 6–8 týdnů. Náklady spojené s uskladněním ve zracích sklepech však často nutí producenty k dřívější expedici svých výrobků a následnému skladování za chladírenské teploty. Snížení teploty má za následek zpomalení probíhajících procesů, které mají přímý vliv na jakost produktu. K přínosům této práce je možné přiřadit zejména popis dopadu odlišných zracích/skladovacích režimů na distribuci vybraných složek v přírodním sýru holandského typu a porovnání vlivu chladírenské a zvýšené teploty na vývoj kvalitativních znaků.

Z předložené práce vyplývají následující přínosy v oblasti vědy:

- byl popsán vývoj distribuce vybraných složek (zejména obsah sušiny, NaCl, volných aminokyselin a vybraných biogenních aminů) a vybraných texturních parametrů v průběhu zrání za různých skladovacích režimů,
- byl zdokumentován odlišný vývoj obsahu sušiny, NaCl, volných aminokyselin a vybraných biogenních aminů v jednotlivých částech bloku sýra, a to u všech aplikovaných teplotních režimů zrání/skladování; současně byl také sledován proces vyrovnávání obsahů některých složek v bloku,
- byl popsán vývoj texturních parametrů v průběhu procesů zrání za různých teplotních podmínek,
- bylo potvrzeno, že teplota zrání je jedním z klíčových parametrů ovlivňujících průběh zracích procesů,
- byla aplikována metoda texturní analýzy s využitím stress testů a následného vyhodnocení pomocí Pelegova modelu; tato metoda je použitelná pro podmínky sledování zracích procesů u přírodních sýrů,
- bylo zjištěno, že obsah biogenních aminů v sýrech eidamského typu může být významný z toxikologického hlediska, což evokuje nutnost dalších studií v této oblasti,
- významnými producenty biogenních aminů ve sledovaných vzorcích byly nezákysové bakterie mléčného kvašení řadící se zejména do rodu *Lactobacillus*.

Z předložené práce vyplývají následující přínosy v oblasti praxe:

- bylo prokázáno zpomalení zrácích procesů a ovlivnění jakosti sýrů, které byly předčasně vyskladněny do chladírenských teplot,
- z hlediska sensorické analýzy spotřebitelé bohužel nepreferovali dobře vyzrálé sýry před méně zralými, které byly předčasně vyskladněny do chladírenských teplot. Tento závěr je alarmující a zasloužil by si pozornost ze strany průmyslu i státních institucí,
- bylo ověřeno, že zvýšení teploty o 6 °C urychlí zrácí procesy probíhající v matrici sýra a mohou zkrátit potřebnou dobu zrání přibližně na polovinu,
- produkty, které zrály při zvýšené teplotě, byly sensoricky přijatelné,
- analyzované sýry eidamského typu obsahovaly relativně vysoké obsahy biogenních aminů; v budoucnu lze předpokládat regulaci obsahu těchto sloučen ze strany legislativy;
- byla ověřena použitelnost metodiky dělení bloku sýra do dílčích součástí (jednotlivých plátů a vrstev).

## 6. ZÁVĚR

Cílem disertační práce bylo sledovat distribuci vybraných složek v přírodním sýru holandského typu v průběhu zrání a rovněž vybrané teplotní podmínky pro zrání, resp. skladování, které tuto distribuci mohou ovlivnit. Pro naplnění výše zmíněného cíle byly realizovány 3 skladovací experimenty (experiment 1 se 3 zracími/skladovacími režimy, experiment 2 zaměřený zejména na vývoj texturních vlastností napříč blokem sýra, experiment 3 využívající zvýšenou teplotu skladování pro akceleraci zracích procesů). Probíhající změny byly sledovány pomocí mikrobiologických, chemických a texturních metod a dále metod senzorické analýzy. Na základě výsledků předložené disertační práce je možné vyvodit následující závěry:

- intenzita mikrobiálních a biochemických změn se lišila v závislosti na pozici v bloku sýra,
- byly shledány signifikantní rozdíly v počtu mikroorganismů mezi vzorky skladovanými za různých teplotních režimů,
- významné rozdíly v počtu mikroorganismů byly pozorovány také mezi okrajovou vrstvou a středem sýra, přičemž vyšší počty byly pozorovány v okraji,
- použité zrací/skladovací režimy neměly významný vliv na vyrovnávání obsahu sušiny a NaCl ve vrstvách jednotlivých plátů; ekvibrace obsahu NaCl v jednotlivých vrstvách plátů bylo dosaženo v průběhu 30 dnů zrání,
- obsah sušiny ve vrstvě I byl přibližně o 1–2 % vyšší ve srovnání se zbytkem sýra bez ohledu na režim zrání/skladování,
- uvolňování FAA, které jsou významnými prekurzory sensoricky aktivních látek, z proteinové matrice bylo zpomalené předčasným vyskladněním do chladírenské teploty; nižší proteolytickou aktivitu za nižší teploty zrání/skladování potvrdila také SDS-PAGE analýza,
- naopak skladováním za zvýšené teploty (o 6 °C) byla proteolytická aktivita výrazně urychlena; pozorovány byly prakticky dvojnásobné hodnoty obsahů FAA u vzorků, kde byla provedena akcelerace zrání, ve srovnání s kontrolními vzorky,
- ve vzorcích sýrů byly v průběhu zrání detekovány tyramin, putrescin a kadaverin; histamin nebyl prokázán v žádném ze vzorků,
- obsah celkového obsahu biogenních aminů rostl intenzivněji se stoupající teplotou zrání a naopak,
- vyšší množství biogenních aminů bylo detekováno v okrajových vrstvách plátů bez ohledu na režim zrání/skladování,



- za hlavní producenty biogenních aminů byli označeni fakultativně anaerobní zástupci NSLAB z rodu *Lactobacillus* (zejména *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum* a *Lactobacillus curvatus*),
- k rychlejšímu snižování hodnot tvrdosti docházelo během zrání/skladování za vyšších teplot, přičemž byly pozorovány signifikantní rozdíly mezi okrajem a středem sýru.

Disertační práce upozorňuje na důležitost zachování vhodných podmínek a zejména dostatečné doby zrání pro optimální vývoj organoleptických ale také funkčních vlastností výsledného produktu. Zrání procesy mohou být relativně snadno ovlivněny teplotní režimem zrání/skladování, který má přímý dopad na intenzitu mikrobiální a biochemických dějů. Kombinace vhodné teploty a doby zrání je důležitým předmětem výzkumu, který by mohl napomoci ke zlepšení organoleptické jakosti zrajících přírodních sýrů.

## 7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] LUKÁŠKOVÁ, J., BURDOVÁ, O., HOLEC, J., LINHARTOVÁ, E., VEČEŘEK, V. *Hygiena a technologie mléčných výrobků*. 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2001. 180 s. ISBN 80-7305-415-9.
- [2] Vyhláška 77/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje, v platném znění. *Sbírka zákonů*, 2003.
- [3] GAJDŮŠEK, S. *Mlékářství II*. 1. vyd. Brno: MZLU v Brně, 1998. 142 s. ISBN 80-7157-342-6.
- [4] KADLEC, P. *Technologie potravin II*. 1. vyd. Praha: VŠCHT v Praze, 2002. 236 s. ISBN 80-7080-510-2.
- [5] Nařízení EP a Rady ES 178/2002 ze dne 28. ledna 2002, kterým se stanoví obecné zásady a požadavky obecného práva, zryzuje se Evropský úřad pro bezpečnost potravin a stanoví postupy týkající se bezpečnosti potravin, v platném znění.
- [6] Nařízení EP a Rady ES 852/2004 ze dne 29. dubna 2004 o hygieně potravin, v platném znění.
- [7] Nařízení EP a Rady ES 853/2004 ze dne 29. dubna 2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu, v platném znění.
- [8] FOX, P. F., GUINEE, T.P., COGAN, T.M., McSWEENEY, P.L.H. *Fundamentals of cheese science*. Gaithersburg: 2000. 638 p. ISBN 0-83-42-1260-9.
- [9] PIJANOWSKI, E. *Základy chemie a technologie mlékářstva*. 1. vyd. Bratislava: Příroda, vydavateľstvo kníh a časopisov, n. p., 1978. 632 s.
- [10] LORTAL, S., CHAPOT-CHARTIER, M.-P. Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. *International Dairy Journal*, 2005, 15, 857-871.
- [11] KADLEC, P., MELZUCH, K., VOLDŘICH, M. *Co by jste měli vědět o výrobě potravin? Technologie potravin*. 1. vyd. Ostrava-Přívoz: KEY PUBLISHING s.r.o., 2009. 534 s. ISBN 978-80-7418-060-6
- [12] FOX, P.F., McSWEENEY, P.L.H., COGAN, T.M. GUINEE, T.P. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology Volume 1 General Aspects*. 3<sup>rd</sup> edition. London: Elsevier Academia Press. 2004. ISBN0-1226-3652-X

- [13] SETTANNI, L., MOSCHETTI, G. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*, 2010, 27, 691-697.
- [14] HUI, Y.H. *Dairy Science and Technology Handbook*, Willey-VCH, Inc., 1993, ISBN 1-56081-078-5.
- [15] GAJDŮŠEK, S. *Laktologie*. 1. vyd. Brno: MZLU v Brně, 2003. 84 s. ISBN 80-7157-657-3.
- [16] OLŠANSKÝ, Č., KNĚZ, V. *Výroba tvrdých sýrů eidamského a ementálského typu*. 1. vyd. Praha: Česká akademie zemědělská v Praze, 1971. 289 s.
- [17] WONG, N.P., JENNESS, R., KEENEZ, M., MARTH, E.H. *Fundamentals of Dairy Chemistry*. 3rd edition. Gaithersburg: An Aspen Publication®, 1999. ISBN 0-8342-1360-5.
- [18] KERESTEŠ, J., SELECKÝ, J. *Sýrarstvo na Slovensku: história a technológia*. 1. vyd. Povážská Bystrica: 2005. 368 s. ISBN 80-969387-9-7.
- [19] FLOURY, J., CAMIER, B., ROUSSEAU, F., LOPEZ, CH., TISSIER, J.-P. Reducing salt level in food: Part 1. Factors affecting the manufacture of model cheese systems and their structure-texture relationships. *LWT – Food Science and Technology*, 2009, 42, 1611-1620.
- [20] FLOURLY, J., ROUAUD, O., LE POULLENNEC, M., FAMELART, M.-H. Reducing salt level in food: Part 2. Modeling salt diffusion in model cheese system with regards to their composition. *LWT – Food Science and Technology*. 2009, 42, 1621-1628.
- [21] McSWEENEY, P.L.H., SOUSA, M.J. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheese during ripening: A review. *Lait*. 2000, 80, 293-324.
- [22] COKER, C.J., CRAWFORD, R.A., JOHNSTON, K.A., SINGH, H., CREAMER, L.K. Towards the classification of cheese variety and maturity on the basis of statistical analysis of proteolysis data – a review. *International Dairy Journal*. 2005, 15, 631-643.
- [23] McSWEENEY, P.L.H. Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*. 2004, 57, 127-144.
- [24] SIHUFÉ, G.A., ZORRILLA, S.E., PEROTTI, M.C., WOLF, I.V., ZALAZAR, C.A., SABBAG, M.G., COSTA, S.C., RUBIOLO, A.C. Acceleration of cheese ripening at elevated temperature. An estimation of the optimal ripening time of a traditional Argentinean hard cheese. *Food Chemistry*. 2010, 119, 101-107.

- [25] BERTOLA, N.C., CALIFANO, A.N., BEVILACQUA, A.E., ZARITZKY, N.E. Effect of ripening conditions on the texture of Gouda cheese. *International Journal of Science and Technology*. 2000, 35, 207-214.
- [26] AL-OTAIBI, M.M., WILBEY, A. Effect of temperature and salt on the maturation of white salted cheese. *International Journal of Dairy Technology*. 2004, 57, 57-63.
- [27] FOLKERTSMA, B., FOX, P.F., McSWEENEY, P.L.H. Accelerated ripening of Cheddar cheese at elevated temperature. *International Dairy Journal*. 1996, 6, 1117-1134.
- [28] O'REILLY, C.E., KELLY, A.L., MURPHY, P.M., BERESFORD, T.P. High pressure treatment: applications in cheese manufacture and ripening. *Trends in Foods Science & Technology*. 2001, 12, 51-59.
- [29] BUFFA, M.N., TRUJILLO, A.J., PAVIA, M., GUAMIS, B. Changes in textural, microstructural, and colour characteristics during ripening of cheese made from raw, pasteurized or high-pressure-treated goats' milk. *International Dairy Journal*. 2001, 11, 927-934.
- [30] SHAKEEL-UR-REHMAN, McSWEENEY, P.L.H., BANKS, J.M., BRECHANY, E.Y. Ripening of Cheddar cheese made from blends of raw and pasteurized milk. *International Dairy Journal*. 2000, 10, 33-44.
- [31] SHAKEEL-UR-REHMAN, BANKS, J.M., McSWEENEY, P.L.H., FOX, P.F. Effect of ripening temperature on the growth and significance of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese made from raw or pasteurised milk. *International Dairy Journal*. 2000. 10, 45-53.
- [32] FENELON, M.A., O'CONNOR, P., GUINEE, T.P. The effect of fat content on the microbiology and proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *Journal Dairy Science*. 2000, 83, 2173-2183.
- [33] FENELON, M.A., GUINEE, T.P. Primary proteolysis and textural changes during ripening in Cheddar cheeses manufactured to different fat contents. *International Dairy Journal*. 2000, 10, 151-158.
- [34] VODRÁŽKA, Z. *Biochemie*. 2. opravné vydání, Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-0600-1.
- [35] IRLINGER, F., MOUNIER, J. Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology*. 2009, 20, 142-148.
- [36] ZAMBONELLI, C., CHIAVARI, C., BENEVELLI, M., COLORETTI, F. Effects of lactic acid bacteria autolysis on sensorial characteristics of fermented foods. *Food Technology and Biotechnology*. 2002, 40, 347-351.

- [37] BROOME, M.C., LIMSOWTIN, G.K.Y. Starter peptidase activity in maturing cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*. 1998, 53, 79-73.
- [38] GAGNAIRE, V., BOUTROU, R., LÉONIL, J. How can the peptides produced from Emmental cheese give some insights on the structural features of the paracasein matrix? *International Dairy Journal*. 2001, 11, 449-454.
- [39] MARILLEY, L., CASEY, M.G. Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology*. 2004, 90, 139-159.
- [40] COLLINS, Y.F., McSWEENEY, P.L.H., WILKINSON, M.G. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal*. 2003, 13, 841-866.
- [41] SOUSA, M.J., ARDÖ, Y., McSWEENEY, P.L.H. Advance in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*. 2001, 11, 327-345.
- [42] McSWEENEY, P.L.H., HAYALOGLU, A.A., O'MAHONY, J.A., BANSAL, N. Perspectives on cheese ripening. *Australian Journal of Dairy Technology*. 2006, 61, 69-78.
- [43] KRANENBURG, R., KLEEREBEZEM, M., HYLCKAMA Vlieg, J., URSING, B.M., BOEKHORST, J., SMITH, B.A., AYAD, E.H.E., SMITH, G., SIEZEN, R.J. Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: predictions from genome sequence analysis. *International Dairy Journal*. 2002, 12, 111-121.
- [44] HUGENHOLTZ, J. Citrate metabolisms in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiological Societies*. 1993, 13, 165-178.
- [45] WEIMER, B.C. *Improving the flavour of cheese*. 1st edition. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2007. ISBN 978-1-84569-305-3.
- [46] FORDE, A., FITZGERALD, G.F. Biotechnological approaches to the understanding and improvement of mature cheese flavour. *Current Opinion in Biotechnology*. 2000, 11, 484-489.
- [47] LIEBER, F., NIGG, D., KUNZ, C., SCHEEDER, M.R.L., WETTSTEIN, H.R, KREUZER, M. Protein composition, plasmin activity and cheesemaking properties of cow's milk produced at two altitudes from hay of lowland and high-alpine origins. *Journal of Dairy Research*, 2005, 72, 65-74.
- [48] BASTIAN, E.D., BROWN, R.J. Plasmin in milk and dairy products: an Update. *International Dairy Journal*. 1996, 6, 435-457.

- [49] STEPANIAK, L. Dairy enzymology. *International Journal of Dairy Technology*. 2004, 57, 153-171.
- [50] LANE, C.N., FOX, P.F. Role of starter enzymes during ripening of Cheddar cheese made from pasteurized milk under controlled microbiological conditions. *International Dairy Journal*. 1997, 7, 55-63.
- [51] LEE, K.D., LO, C.G., WARTHESEN, J.J. Removal of Bitterness from the Bitter Peptides Extracted from Cheddar Cheese with Peptidases from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SK11. *Journal of Dairy Science*. 1996, 79, 1521-1528.
- [52] HABIBI-NAJAFI, M.B., LEE, B.H. Bitterness of cheese: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1996, 36, 397-411.
- [53] WILKINSON, M.G., KILCAWLEY, K.N. Mechanisms of incorporation and release of enzymes into cheese during ripening. *International Dairy Journal*. 2005, 15, 817-830.
- [54] EXTERKATE, F.A., ALTING, A.C. The role of starter peptidase in the initial proteolytic events leading to amino acids in gouda cheese. *International Dairy Journal*. 1995, 5, 15-28.
- [55] PINO, A., PRADOS, F., GALÁN, E., VIVO, R., FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. Amino acids evolution during ripening of goats' milk cheese manufactured with different coagulants. *International Journal of Food Science and Technology*. 2009, 44, 2062-2069.
- [56] KABELOVÁ, I., DVOŘÁKOVÁ, M., ČÍŽKOVÁ, H., DOSTÁLEK, P., MELZOCH, K. Determination of free amino acids in cheeses from the Czech market. *Czech Journal of Food Science*. 2009, 27, 143-150.
- [57] HOLLAND, R., CROW, V., NORRIS, G., BENNETT, M., COOLBEAR, T. Cheese flavour for the future – using traditional tools to deliver new flavours in new ways. *The Australian Journal of Dairy Technology*. 2006, 61, 97-104.
- [58] WILLIAMS, A.G., NOBLE, J., TAMMAM, J, LLOYD, D., BANKS, J.M. Factors affecting the activity of enzymes involved in peptide and amino acid catabolism in non-starter lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. *International Dairy Journal*. 2002, 12, 841-852.
- [59] WALLANCE, J.M., FOX, P.F. Effect of adding free amino acids to Cheddar cheese curd on proteolysis, flavour and texture development. *International Dairy Journal*. 1997, 7, 157-167.
- [60] CHRISTENSEN, J.E., JOHNSON, M.E., STEELE, J.L. Production of Cheddar cheese using a *Lactococcus lactis* ssp. *Cremoris* SK11 derivative with enhanced aminopeptidase activity. *International Dairy Journal*. 1995, 5, 367-379.

- [61] HANNIFFY, S.B., PALÁEZ, C., MARTÍNEZ-BARTOLOMÉ, M.A., REQUENA, T., MARTÍNEZ-CUESTA, M.C. Key enzymes involved in methionine catabolism by cheese lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 2009, 135, 223-230.
- [62] SMITH, G., SMITH, B.A., ENGELS, W. J.M. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*. 2005, 29, 591-610.
- [63] YVON, M., RIJNEN, L. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal*. 2001, 11, 185-201.
- [64] SMITH, G., VERHEUL, A., KRANENBURG, R., AYAD, E., SIEZEN, R., ENGELS, W. Cheese flavour development by enzymatic conversions of peptides and amino acids. *Food Research International*. 2000, 33, 153-160.
- [65] LADERO, V., FERNÁNDEZ, M., ALVAREZ, M.A. Effect of post-ripening processing on the histamine and histamine-producing bacteria contents of different cheese. *International Dairy Journal*. 2009, 19, 759-762.
- [66] KOMPRDA, T., BURDYCHOVÁ, R., DOHNAL, V., CWIKOVÁ, O., SLÁDKOVÁ, P. Some factors influencing biogenic amines and polyamines content in Dutch-type semi-hard cheese. *European Food Research and Technology*. 2008, 227, 29-36.
- [67] KOMPRDA, T., SMĚLÁ, D., NOVICKÁ, K., KALHOTKA, L., ŠUSTKOVÁ, ., PECHOVÁ, P. Content and distribution of biogenic amines in Dutch-type hard cheese. *Food Chemistry*. 2007, 102, 129-137.
- [68] KALAČ, P., KRAUSOVÁ, P. A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chemistry*. 2005, 90, 219-230.
- [69] PINHO, O., FERREIRA, I.M.P.L.V.O., MENDES, E., OLIVEIRA, B.M., FERREIRA, M. Effect of temperature on evolution of free amino acid and biogenic amine contents during storage of Azeitão cheese. *Food Chemistry*. 2001, 75, 287-291.
- [70] SILLA SANTOS, M.H. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 1996, 29, 213-231.
- [71] NOVELLA-RODRÍGUES, S., VECIANA-NOGUÉS, M.T., IZQUERDO-POLIDO, M., VIDAL-CAROU, M.C. Distribution of biogenic amines and polyamines in cheese. *Journal of Food Science*. 2003, 68, 750-755.

- [72] ANCÍN-AZPILICUETA, C., GONZÁLEZ-MARCO, A., JIMENÉZ-MORENO, J. Current knowledge about the presence of amines in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2008, 48, 257-275.
- [73] STADNIK, J., DOLATOWSKI, Z.J. Biogenic amines in meat and fermented meat products. *Acta Scientiarum Polonorum*. 2010, 9, 251-263.
- [74] KOHAJDOVÁ, Z., KAROVIČOVÁ, J., GREIF, G. Biogénne amíny v potravinách. *Potravinárstvo*. Február 2008, 2, 30-49.
- [75] ANCÍN-AZPILICUETA, C., GONZÁLEZ-MARCO, A., JIMÉNEZ-MORENO, N. Current knowledge about the presence of amines in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2008, 48, 257-275.
- [76] GARDINI, F., MARTUSCELLI, M., CARUSO, M.C., CALGANO, F., CRUDELE, M.A., FAVATI, F., GUERZONI, M.E., SUZZI, G. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, 64, 105-117.
- [77] SANTOS, W.C., SOUZA, M.R., CERQUIRA, M.M.O.P., GLÓRIA, M.B.A. Bioactive amines formation in milk by *Lactococcus* in the presence of not of rennet and NaCl at 20 °C and 32 °C. *Food chemistry*. 2003, 81, 595-606.
- [78] HALÁSZ, A., BARÁTH, Á., SIMON-SARKADI, L., HOLZAPFEL, W., Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science and Technology*. 1994, 51, 42-49.
- [79] BOUTROU, R., GUÉGUEN, M. Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. *International Journal of Food Microbiology*. 2005, 102, 1-20.
- [80] WILLIAMS, A.G., NOBLE, J., BANKS, J.M. The effect of  $\alpha$ -ketoglutaric acid on amino acid utilization by nonstarter *Lactobacillus* spp. isolated from Cheddar cheese. *Letters in Applied Microbiology*. 2004, 38, 289-295.
- [81] HORT, J., GRYS, G.L. Developments in the textural and rheological properties of UK Cheddar cheese during ripening. *International Dairy Journal*. 2001, 11, 475-481.
- [82] CHRISTENSEN, J.E., DUDLEY, E.D., PEDERSON, J.A., STEELE, J.L. Peptidase and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1999, 76, 217-246.
- [83] RATTRAY, F.P., FOX, P.F. Aspects of enzymology and biochemical properties of *Brevibacterium linens* relevant to cheese ripening: A review. *Journal of Dairy Science*. 1999, 82, 891-909.



- [84] YVON, M., THIROUIN, S., RIJNEN, L., FROMENTIER, D., GRIPON, J.C. An aminotransferase from *Latococcus lactis* initiates conversion of amino acids to cheese flavour compounds. *Applied and Environmental Microbiology*. 1997, 63, 414-419.
- [85] ŠTĚTINA, J., NĚMCOVÁ, L., PISKA, I. Konzistence a reologické vlastnosti polotvrdých sýrů hodnocených na celostátních přehlídkách sýrů 2000. In *Celostátní přehlídky sýrů*. Praha: Česká společnost chemická, Odborná skupina pro potravinářskou a agrikulturní chemii, 2001, s. 54-59.
- [86] SAINT-EVE, A., LAUVERJAT, C., MAGNAN, C., DÉLÉRIS, I., SOUCHON, I. Reducing salt and fat content: Impact of composition, texture and cognitive interactions on the perception of flavoured model cheeses. *Food Chemistry*. 2009, 116, 167-175.
- [87] BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., MANTLOVÁ, G., ČABLOVÁ, A., SEDLÁČEK, I., ŠVEC, P., PACHLOVÁ, V., KRÁČMAR, S. The effect of ripening and storage conditions on the distribution of tyramine, putrescine and cadaverine in Edam-cheese. *Food Microbiology*. 2010, 27, 880-888.
- [88] SIHUFÉ, G.A., ZORRILLA, S., RUBIOLLO, A.C. The influence of ripening temperature and sampling site on the proteolysis in Reggiano Argentino cheese. *LWT – Food Science and Technology*. 2010, 43, 247-253.
- [89] EL SODA, M.A. The role of lactic acid bacteria in accelerated cheese ripening. *FEMS Microbiology Reviews*. 1993, 12, 239-252.
- [90] LUCEY, J.A., JOHNSON, M.E., HORNE, D.S. Invited Review: Perspectives on the basic of the rheology and texture properties of cheese. *Journal of Dairy Science*. 2003, 86, 2725-2743.
- [91] LAWRENCE, R.C., CREAMER, L.K., GILLES, J. Symposium: Cheese ripening technology. *Journal of Dairy Science*. 1987, 70, 1748-1760.
- [92] DEL NOBILE, M.A., CHILLO, S., FALCONE, P.M., LAVERSE, J., PATI, S., BAIANO, A. Textural changes of Canestrello Pugliese cheese measured during storage. *Journal of Food Science*. 2007, 83, 621-628.
- [93] EVERARD, C.D., O'CALLAGAN, D.J., HOWARD, T.V., O'DONNELL, C.P., SHEEHAN, E.M., DELAHUNTY, C.M. Relationships between sensory and rheological measurements of texture in maturing commercial Cheddar cheese over a range of moisture and pH at the point of manufacture. *Journal of Texture Studies*. 2006, 37, 361-382.
- [94] PINHO, O., MENDES, E., ALVES, M.M., FERREIRA, I.M.P.L.V.O. Chemical, physical, and sensorial characteristics of „Terrincho“ ewe

- cheese: Changes ripening and intravarietal composition. *Journal of Dairy Science*. 2004, 87, 249-257.
- [95] PACHLOVÁ, V., BUŇKA, F., BUŇKOVÁ, L., WEISEROVÁ, E., HLADKÁ, K., VOJTÍŠKOVÁ, P., KRÁČMAR, S. Vliv průběhu zrání na obsah vybraných složek v přírodním sýru eidamského typu. *Potravinářstvo*. 2009, 1, 33–36. ISSN 1337-0960.
- [96] FOX, P.F., WALLACE, J.M., MORGAN, S., LYNCH, C.M., NILAND, E.J., TOBIN, J. Acceleration of cheese ripening. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1996, 70, 271-297.
- [97] KOUSTA, M., MATARAGAS, M., SKANDAMIS, P., DROSINOS, E.H. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogenes at farm and processing leveles. *Food Control*. 2010, 21, 805-815.
- [98] IURLINA, M.O., FRITZ, R. Microbiological quality of Port Salut Argentino cheese stored at two temperature treatments. *LWT – Food Science and Technology*. 2004, 37, 739-748.
- [99] LAW, B.A. Controlled and accelerated cheese ripening: the research base for new technologies. *International Dairy Journal*. 2001, 11, 383-398.
- [100] SORAYYA, A., NORMAND, R., BYONG, L. Biotechnological methods to accelerate Cheddar cheese ripening. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2006, 26, 121-143.
- [101] KANAWJIA, S.K., RAJESH, P., SABIKHI, L., SINGH, S. Flavour, chemical and textural profile changes in accelerated ripened gouda cheese. *LWT*. 1995, 28, 577-583.
- [102] KLEIN, N., LORTAL, S. Attenuated starters: an efficient means to influence cheese ripening – a riview. *International Dairy Journal*. 1999, 9, 751-762.
- [103] BERGAMINI, C.V., HYNES, E.R., ZALAZAR, C.A. Influence of probiotic bacteria on the proteolysis profile of a semi-hard cheese. *International Dairy Journal*. 2006, 16, 856-866.
- [104] GOBBETTI, M., LANCIOTT, R., DE ANGELIS, M., CORBO, M.R., MASSINI, R., FOX, P.F. Study of the effects of temperature, pH and NaCl on the peptidase activities of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) by quadratic response surface methodology. *International Dairy Journal*. 1999, 9, 865-875.
- [105] IZCO, J.M., IRIGOYEN, A., TORRE, P., BARCINA, Y. Effect of added enzymes on the free amino acids and sensory characteristics in Ossau-Iraty cheese. *Food Control*. 2000, 11, 201-207.
- [106] ČSN EN ISO 4833, Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda pro stanovení celkového počtu mikroorganismů – Technika

- počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C, Český normalizační institut, Praha 2003.
- [107] ČSN ISO 4832, Mikrobiologie. Všeobecné pokyny pro stanovení počtu koliformních bakterií. Technika počítání kolonií, Český normalizační institut, Praha 1994.
- [108] ČSN ISO 21528-2, Mikrobiologie potravin – Horizontální metody pro průkaz a stanovení počtu bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* – Část 2: Technika počítání kolonií, Český normalizační institut, Praha 2006.
- [109] ČSN ISO 15214, Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda stanovení počtu mezofilních bakterií mléčného kvašení – Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C, Český normalizační institut, Praha 2000.
- [110] ČSN 560094, Potravinářské výrobky. Stanovení počtu bakterií rodu *Lactobacillus*, Český normalizační institut, Praha 1988.
- [111] HARRIGAN, W.F. *Laboratory methods in food microbiology*. 3rd ed., Academic Press London, 1998. 532p.
- [112] BOVER-CID, S., HOLZAPFEL, W.H. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 1999, 53, 33-41.
- [113] ČSN EN ISO 5534, Sýry a tavené sýry – Stanovení obsahu sušiny (Referenční metoda), Český normalizační institut, Praha, 2005.
- [114] INDRA, Z., MIZERA, J. *Chemické kontrolní metody pro obor zpracování mléka*. 1. vyd., 1992. 273.
- [115] BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., HLOBILOVÁ, M., VAŇÁTKOVÁ, Z., NOVÁKOVÁ, D., DRÁB, V. Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. *European Food Research and Technology*. 2009, 229. 533-538.
- [116] BÜTIKOFER, U., RÜEGG, M., ARDÖ, Y. Determination of nitrogen fractions in cheese: evaluation of a collaborative study. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*. 1993, 26, 271-275.
- [117] LAEMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970, 227, 680-685.
- [118] TOPÇU, A., SALDAMLI, I. Proteolytical, chemical, textural and sensorial changes during the ripening of turkish white cheese made of pasteurized cow's milk. *International Journal of Food Properties*. 2006, 9, 665-678.

- [119] FISZMAN, S.M., DAMÁSIO, M.H. Instrumental measurement of adhesiveness in solid and semi-solid foods. A survey. *Journal of Texture Studies*. 2000, 31, 69-91.
- [120] DELGADO, F-J., RODRÍGUEZ-PINILLA, J., GONZÁLEZ-CRESPO, J., RAMÍREZ, R., ROA, I. Proteolysis and texture changes of a Spanish soft cheese ('Torta del Casar') manufactured with raw milk and vegetable rennet during ripening. *International Journal of Food Science and Technology*. 2010, 45, 512-519.
- [121] SINGH, H., ROCKALL, A., MARTIN, C.R., CHUNG, O.K., LOOKHART, G.L. The analysis of stress relaxation data of some viscoelastic foods using a texture analyzer. *Journal of Texture Studies*. 2006, 37, 383-392.
- [122] HATCHER, D.W., BELLIDO, G.G., DEXTER, J.E., ANDERSON, M.J., FU, B.X. Investigation of uniaxial stress relaxation parameters to characterize the texture of yellow alkaline noodles made from durum and common wheats. *Journal of Texture Studies*. 2008, 39, 695-708.
- [123] PELEG, M. Characterization of the stress relaxation curves of solid foods. *Journal of Food Science*. 1979, 44, 277-281.
- [124] PELEG, M. Linearization of relaxation and creep curves of solid biological materials. *Journal of Rheology*. 1980, 24, 451-463.
- [125] ČSN ISO 8586-1, Senzorická analýza – Obecná směrnice pro výběr, výcvik a sledování činnosti posuzovatelů – Část 1: Vybraní posuzovatelé. Český normalizační institut, Praha, 2003.
- [126] ČSN ISO 8589, Senzorická analýza. Obecná směrnice pro uspořádání senzorického pracoviště. Český normalizační institut, Praha, 2008.
- [127] KRÍŽ, O., BUŇKA, F., HRABĚ, J. Senzorická analýzy potravin II. Statistické metody. Zlín: UTB, Fakulta technologická, 2006, 127 s.
- [128] ACTIS, L.A., SMOOT, J.C., BARANCIN, C.E., FINDLAY, R.H. Comparison of differential plating media and two chromatography techniques for the detection of histamine production in bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 1999, 39, 79-90.
- [129] WOUTERS, J.T.M., AYAD, E.H.E., HUGENHOLTZ, J., SMITH, G. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*. 2002, 12, 91-109.
- [130] BURDYCHOVÁ, R., KOMPRDA, T. Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiology Letters*. 2007, 276, 149-155.
- [131] ARENA, M.E., FIOCCO, D., MANCA DE NADRA, M.C., PARDO, I., SPANO, G. Characterization of a *Lactobacillus plantarum* strain able to

- produce tyramine and partial cloning of a putative tyrosine decarboxylase gene. *Current Microbiology*. 2007, 55, 205-210.
- [132] ARENA, M.E., MANCA DE NADRA, M.C. Biogenic amine production by *Lactobacillus*. *Journal of Applied Microbiology*. 2001, 90, 158-162.
- [133] PEREIRA, C.I., BARRETO CRESPO, M.T., SAN ROMAO, M.V. Evidence for proteolytic activity and biogenic amines production in *Lactobacillus curvatus* and *L. homohiochii*. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, 68, 211-216.
- [134] BOVER-CID, S., MIGUÉLEZ-ARRIZADO, M.J., BECKER, B., HOLZAPFEL, W.H., VIDAL-CAROU, M.C. Amino acid decarboxylation by *Lactobacillus curvatus* CTC273 affected by the pH and glucose availability. *Food Microbiology*. 2008, 25, 269-277.
- [135] BOVER-CID, S., IZQUIERDO-PULIDO, M., VIDAL-CAROU, M.C. Effectiveness of a *Lactobacillus sakei* starter culture in the reduction of biogenic amine accumulation as a function of the raw material quality. *Journal of Food Properties*. 2001, 64, 367-373.
- [136] AYMERICH, T., MARTIN, B., GARRIGA, M., VIDAL-CAROU, M.C., BOVER-CID, S., HUGAS, M. Safety properties and molecular strain typing of lactic acid bacteria from slightly fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology*. 2006, 100, 40-49.
- [137] ÖNER, Z., SAGDIC, O., SIMSEK, B. Lactic acid bacteria profiles and tyramine and tryptamine contents of Turkish tulum cheese. *European Food Research and Technology*. 2004, 219, 455-459.
- [138] LANDETE, J.M., FERRER, S., PARDO, I. Biogenic amine production by lactic acid bacteria, acetic bacteria and yeast isolated from wine. *Food Control*. 2007, 18, 1569-1574.
- [139] GOROSTIZA, A., CICHOSKI, J., VALDUGA, A.T., VALDUGA, E., BERNARDO, A., FRESNO, J.M. Changes in soluble nitrogenous compounds, caseins and free amino acids during ripening of artisanal prato cheese; a Brazilian semi-hard cows variety. *Food Chemistry*. 2004, 85, 407-414.
- [140] ZOON, P., ALLERSMA, D. Eye and crack formation in cheese by carbon dioxide from decarboxylation of glutamic acid. *Netherlands Milk and Dairy Journal*. 1996, 50, 309-318.
- [141] CHEVANAN, N., MUTHUKUMARAPPAN, K. Viscoelastic properties of Cheddar cheese: Effect of calcium and phosphorus, residual lactose, salt-to-moisture ratio and ripening time. *International Journal of Food Properties*. 2008, 11, 624-637.

- [142] BERESFORD, T.P., FITZSIMONS, N.A., BRENNAN, N.L., COGAN, T.M. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*. 2001, 11, 259-274.
- [143] SHALABY A.R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*. 1996, 29, 675-690.

## 8. SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA

### **Příspěvky v mezinárodních časopisech s impact faktorem**

PACHLOVÁ, V., BUŇKA, F., BUŇKOVÁ, L., WEISEROVÁ, E., ŽALUDEK, M., KRÁČMAR, S. The effect of three different ripening/storage conditions on distribution of selected parameters in individual parts of Dutch-type cheese. *International Journal of Food Science and Technology*. 2011, 46, s. 101–108.

PACHLOVÁ, V., BUŇKA, F., FLASAROVÁ, R., VÁLKOVÁ, P., BUŇKOVÁ, L. The effect of elevated temperature on ripening of Dutch type cheese – submitted in scientific journal.

BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., MANTLOVÁ, G., ČABLOVÁ, A., SEDLÁČEK, I., ŠVEC, P., PACHLOVÁ, V., KRÁČMAR, S. The effect of ripening and storage conditions on the distribution of tyramine, putrescine and cadaverine in Edam-cheese. *Food Microbiology*. 2010, 27, 880-888.

BUŇKA, F., PACHLOVÁ, V., NENUTILOVÁ, L. Texture properties of Dutch-type cheese as a function of its location and ripening *International Journal of Food Properties* – accepted for publication.

### **Příspěvky v časopisech bez impact faktoru**

PACHLOVÁ, V., WEISEROVÁ, E., ŽALUDEK, M., HLADKÁ, K., KRÁČMAR, S., BUŇKA, F. Změny vybraných jakostních parametrů u přírodních sýrů v průběhu půlročního zrání/skladování za různých podmínek. *Potravinářstvo*. 2010, 4, 217-223.

PACHLOVÁ, V., BUŇKA, F., BUŇKOVÁ, L., WEISEROVÁ, E., HLADKÁ, K., VOJTÍŠKOVÁ, P., KRÁČMAR, S. Vliv průběhu zrání na obsah vybraných složek v přírodním sýru eidamského typu. *Potravinářstvo*. 2009, 1, 33 – 36. ISSN 1337-0960.

BUŇKA, F., PACHLOVÁ, V., BUŇKOVÁ, L., WEISEROVÁ, E. Je každý kousek sýra stejný? *Potravinářská revue*. 2011, 1, 29–32.

HLADKÁ, K., BUŇKA, F., JEDLIČKOVÁ, L., PACHLOVÁ, V., KRÁČMAR, S. Kyselina adipová a její sůl při produkci tavených sýrových výrobků. *Potravinářstvo*. 2010, 4, 152–157.

HLADKÁ, K., BUŇKA, F., PACHLOVÁ, V., VOJTÍŠKOVÁ, P., KOSIBOVÁ, N., KRÁČMAR, S. Možnosti využití dikarboxylových kyselin jako náhrady tavicích solí při výrobě tavených sýrů. *Potravinarstvo*. 2009, 1, 13 – 15. ISSN 1337-0960.

#### **Příspěvky ve sbornících z konferencí v cizím jazyce**

VOJTÍŠKOVÁ, P., HLADKÁ, K., PACHLOVÁ, V., ŠÍPALOVÁ, M., HOZA, I., KRÁČMAR, S. Dynamics of changes in the content of macro- and microelements in sheep colostrum during 72 hours after parturition. In. *Zborník prací z mezinárodní vědecké konference Bezpečnost a kontrola potravin*. 1.–2.4.2009, SPU Nitra, SR, 2009, s. 140-143. ISBN 978-80-552-0193-1.

ŠÍPALOVÁ, M., PACHLOVÁ, V., BUŇKOVÁ, L., KRÁČMAR, S., BUŇKA, F. The low molecular proteins like the allergens of the bovine milk. In. *Dni výživy a veterinárnej dietetiky VIII.*, UVL Košice, 2008. ISBN 978-80-8077-080-8.

#### **Příspěvky ve sbornících z konferencí v českém jazyce**

PACHLOVÁ, V., BUŇKA, F., BUŇKOVÁ, L., WEISEROVÁ, E., HLADKÁ, K., KRÁČMAR, S. Změny dusíkatých látek v přírodních sýrech v závislosti na podmínkách zrání a skladování. In *Sborník Celostátní přehlídky sýrů 2010*. Praha: Česká společnost chemická, Praha: Česká společnost chemická, 21. – 22. ledna 2010, s. 187 – 193. ISBN 978-80-7080-760-6.

PACHLOVÁ, V., BUŇKA, F. Změny tvrdosti sýru holandského typu v průběhu zrání. In. *Food Hygiene and Technology: 40<sup>th</sup> Lenfeld's and Hökl's Days*. VFU Brno, 2010, s. 135–138. ISBN 978-80-7305-121-1.

ŠÍPALOVÁ, M., BUŇKOVÁ, L., PACHLOVÁ, V., KRÁČMAR, S. Alergeny kravského mléka a mléka stanovené metodou SDS-PAGE. In. *Dni výživy zvířat. Zborník príspevkov z vedeckej konferencie s medzinárodnou účasťou*. SPU Nitra, 2008, s. 216-220. ISBN 978-80-552-0072-9.



## 9. CURRICULUM VITAE

### Osobní údaje

Jméno a příjmení: Ing. Vendula Pachlová  
Datum narození: 21. 3. 1984  
Adresa: Mlýnská 817, 763 02 Zlín 4  
E-mail: pachlova@ft.utb.cz

### Vzdělání:

1999-2003 **Střední průmyslová škola Otrokovice**  
2003-2006 **UTB ve Zlíně, Fakulta technologická**  
Bakalářské studium – prezenční forma  
Obor: Chemie a technologie potravin  
2006-2008 **UTB ve Zlíně, Fakulta technologická**  
Navazující magisterské studium – prezenční forma  
Obor: Technologie, hygiena a ekonomika výroby  
potravin  
2008-dosud **UTB ve Zlíně, Fakulta technologická**  
Doktorské prezenční/kombinované studium  
Obor: Technologie potravin

### Praxe:

2/2011-dosud  
**UTB ve Zlíně, Fakulta technologická,**  
**Ústav technologie a mikrobiologie potravin**  
Asistent

### Jazykové znalosti:

Angličtina aktivně středně pokročile

### Ostatní dovednosti

Práce s PC OS Windows, MS Office  
Řidičský průkaz Skupina B

## 10. SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha A:** Dotazník pro sensorické hodnocení sýrů holandského typu skladovaných za 3 různých teplotních režimů (experiment 1)
- Příloha B:** Stupnice pro sensorické hodnocení sýrů holandského typu skladovaných za 3 různých teplotních režimů (experiment 1)
- Příloha C:** Dotazník pro sensorické hodnocení sýrů holandského typu skladovaných za zvýšené teploty (experiment 3)
- Příloha D:** Stupnice pro sensorické hodnocení sýrů holandského typu skladovaných za zvýšené teploty (experiment 3)

**Příloha A:** Dotazník pro sensorické hodnocení sýrů holandského typu skladovaných za 3 různých teplotních režimů (experiment 1)

**Protokol pro sensorické hodnocení přírodních sýrů holandského (eidamského) typu**

**Datum:**

**Čas:**

**Jméno:**

**Senzorické hodnocení s použitím stupnic**

Vzorek	Ukazatel				
	Vzhled a barva	Konzistence	Chuť a vůně	Tuhost	Cizí pachuti
A					
B					
C					

**Pořadová zkouška**

Porovnejte vzorky sýrů dle tuhosti (1 – nejtužší; 3 – nejméně tuhý)

Vzorek	A	B	C
Tuhost			

Porovnejte vzorky sýrů dle intenzivní sýrové chuti (1 – nejintenzivnější; 3 – nejméně intenzivní)

Vzorek	A	B	C
Intenzita chuti			

Porovnejte vzorky sýrů dle preferencí (1 – nejlepší; 3 – nejhorší)

<b>Vzorek</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
<b>Preference</b>			

Vnímáte-li v některém ze vzorků cizí příchut' či pachut' charakterizujte ji

<b>Vzorek</b>	<b>Pachut'</b>
<b>A</b>	
<b>B</b>	
<b>C</b>	

**Příloha B:** Stupnice pro senzorické hodnocení sýrů holandského typu skladovaných za 3 různých teplotních režimů (experiment 1). Dotazník převzat a upraven dle Kříž *et al.* [127].

## Hodnocení přírodních sýrů holandského typu

### Vzhled a barva

1. **Vynikající** – povrch sýrů suchý, jemná a neporušená pokožka, hladká, jemně zrnitá po lisování na perfoře, vzhled a tvar sýra pravidelný bez vlisů, nerovností, barva sýrového těsta smetanová, u zralých sýrů smetanově nažloutlá, homogenní na celém řezu.
2. **Výborná** – povrch sýra suchý, neporušený, hladký s málo patrnými nerovnostmi (vlisy), tvar sýra pravidelný, odpovídající deklarovanému vzhledu, barva sýrového těsta homogenní v celé hmotě s odstínem smetanovým až žlutým.
3. **Velmi dobrá** – povrch sýra suchý, případně jemně vlhčí, neporušený, hladký, vzhled sýra pravidelný s menšími nepravidelnostmi, mírné odchylky od homogenní smetanové, resp. nažloutlé barvy u těsta jsou přípustné. Tvar sýra celistvý.
4. **Dobrá** – povrch sýra čistý, suchý, příp. jemně zmazovatělý na povrchu v důsledku vypoceního tuku, resp. vlhkosti, vzhled sýra pravidelný, připouští se menší počet patrných vlisů na povrchu cihly, malé odchylky od homogenní smetanové, resp. nažloutlé barvy. Výskyt barevných skvrn nepřipustný.
5. **Méně dobrá** - povrch sýra vlhký, na povrchu omezený výskyt cizích barevných skvrn a odstínů (skvrnitost), znatelné vlisy na povrchu, mírné deformace tvaru sýra, barva sýra mírně mramorovitá, nehomogenní.
6. **Vyhovující** – povrch sýra mazlavý, na povrchu výskyt cizích barevných skvrn a odstínů, silnější vlisy na povrchu, deformace tvaru sýra, barva sýra mramorovitá, nehomogenní, solný prstenec pod povrchem. Barva těsta sýra nepřírozně bílá.
7. **Nevyhovující** – povrch a tvar sýra deformovaný, nepravidelný, povrch silně narušený, barva sýra netypická s cizími odstíny, např. v důsledku plísní. Barva sýrového těsta nehomogenní, bílé neprozrálé těsto, v těstě silná mramorovitost, cizí barevné odstíny, hnilobná hnízda.

## Konzistence

1. **Vynikající** – těsto sýra vláčné, celistvé, jemné na skusu, mírně roztíratelné, lehce polikatelné. Na řezu v těstě sýra malý počet ok velikosti hrášku, oka čistá, hladká, pokud možno rovnoměrně rozložená. Nevyskytuje se provzdušnění těsta, syrovátková hnízda, trhlinky apod.
2. **Výborná** - těsto celistvé, vláčné až roztíratelné, jemné na skusu. Na řezu větší počet typických ok velikosti hrášku. V těstě sýra přípustné mírné provzdušnění, nevyskytuje se syrovátkové hnízdo.
3. **Velmi dobrá** – těsto celistvé, vláčné až roztíratelné. Pod povrchem sýra se připouští mírně tužší. Připouští se „slepý“ sýr (bez ok). Těsto může být slabě provzdušněné, ojediněle se vyskytuje syrovátkové hnízdo.
4. **Dobrá** – těsto celistvé, mírně tužší, resp. měkčí. Pod povrchem nebo v těstě se připouští ojedinělé trhlinky nebo mírná ořechovitost ok. Připouští se „slepý sýr“, slabší provzdušnění a menší výskyt syrovátkových hnízd.
5. **Méně dobrá** – konzistence méně celistvá, nehomogenní, tužší, mírně viditelný solný prstenec pod povrchem sýra, oka ořechovitá, častější trhlinky v těstě sýra, provzdušnění a výskyt syrovátkových hnízd.
6. **Vyhovující** – konzistence málo celistvá, těsto tuhé nebo příliš měkké až mazlavé, patrný solný prstenec způsobený nedostatečným prozráním sýra, oka ořechovitá nepravidelná, netypická, nadměrné trhlinky v těstě sýra, časté provzdušnění a hojný výskyt syrovátkových hnízd.
7. **Nevyhovující** – konzistence není celistvá, trhliny v těstě po duření, těsto tuhé, gumovité, rozpadavé, potrhané, drobivé. Síťovitá, provzdušněná oka, netypická, ořechovitá.

## Chuť a vůně

1. **Vynikající** – chuť čistá, typická pro eidamské sýry, jemně mléčná nakyslá, nebo nasládlá, výrazná a plná v důsledku hlubokého prozrání sýra, harmonická. Vůně charakteristická, čistá bez jakýchkoliv cizích pachů.
2. **Výborná** – čistá, harmonická, mléčná nakyslá, nebo hořko mandlová po použitých kulturách, stále výrazná a typická v důsledku odpovídajícího prozrání sýra. Vůně stále čistá a harmonická.
3. **Velmi dobrá** – vůně čistá, harmonická, chuť s přípustnými mírnými odchylkami v harmonii, např. hořko mandlová, mírně slanější nebo kyselejší.
4. **Dobrá** – stále typická pro eidamské sýry, možné odchylky hořkosti, slanosti nebo kyselosti.

5. **Méně dobrá** – chuť méně harmonická. Výrazně převládá některý z hodnocených deskriptorů vůně např. kyselost, hořkost, cizí příchut', slanost apod. Ve vůni se vyskytují cizí přípachy.
6. **Vyhovující** – chuť neharmonická. Ve vůni se mohou vyskytovat přijatelné cizí přípachy (nečistá, netypická, cizí, sladová, nažluklá, nasládlá po duření).
7. **Nevyhovující** – hořká, pálivá, ostře kyselá, zatuchlá, plesnivá, žluklá, hnilobná, nepříjemná cizí chuť po chemikáliích. Ve vůni výrazně nepříjemné cizí přípachy, po chemikáliích, hnilobné, zatuchlé, žluklé apod.

### **Tuhost**

1. **Sýr velmi tuhý** – tuhost sýra je příliš vysoká, sýr je špatně žvýkatelný
- 2.
- 3.
4. **Optimální tuhost sýra**
- 5.
- 6.
7. **Sýr měkký až rozbředlý** – sýr je rozpadavý až rozbředlý

### **Cizí pachuti**

1. **Sýr je bez cizích pachutí**
- 2.
- 3.
4. **Pachuti akceptovatelné** – sýr obsahuje cizí příchuti a nebo pachuti – stále však akceptovatelné pro konzumaci
- 5.
- 6.
7. **Odporné pachuti** – naprosto nepříjemné, koncentrace pachutí naprosto odporná

**Příloha C:** Dotazník pro senzorické hodnocení sýrů holandského typu skladovaných za zvýšené teploty (experiment 3)

**Protokol pro senzorické hodnocení přírodních sýrů holandského (eidamského) typu**

**Datum:**

**Čas:**

**Jméno:**

**Senzorické hodnocení s použitím stupnic**

Vzorek	UKAZATEL	
	Chuť a vůně	Cizí pachuti
A		
B		

**Vnímáte-li v některém ze vzorků cizí příchut' či pachut' charakterizujte ji**

Vzorek	Pachut'
A	
B	



**Příloha D:** Stupnice pro sensorické hodnocení sýrů holandského typu skladovaných za zvýšené teploty (experiment 3)

**Hodnocení přírodních sýrů holandského typu**

**Chuť a vůně**

1. **Vynikající** – chuť čistá, typická pro eidamské sýry, jemně mléčná nakyslá, nebo nasládlá, výrazná a plná v důsledku hlubokého prozrání sýra, harmonická. Vůně charakteristická, čistá bez jakýchkoliv cizích pachů.
2. **Výborná** – čistá, harmonická, mléčná nakyslá, nebo hořko mandlová po použitých kulturách, stále výrazná a typická v důsledku odpovídajícího prozrání sýra. Vůně stále čistá a harmonická.
3. **Velmi dobrá** – vůně čistá, harmonická, chuť s přípustnými mírnými odchylkami v harmonii, např. hořko mandlová, mírně slanější nebo kyselejší.
4. **Dobrá** – stále typická pro eidamské sýry, možné odchylky hořkosti, slanosti nebo kyselosti.
5. **Méně dobrá** – chuť méně harmonická. Výrazně převládá některý z hodnocených deskriptorů vůně např. kyselost, hořkost, cizí příchut', slanost apod. Ve vůni se vyskytují cizí přípachy.
6. **Vyhovující** – chuť neharmonická. Ve vůni se mohou vyskytovat přijatelné cizí přípachy (nečistá, netypická, cizí, sladová, nažluklá, nasládlá po duření).
7. **Nevyhovující** – hořká, pálivá, ostře kyselá, zatuchlá, plesnivá, žluklá, hnilobná, nepříjemná cizí chuť po chemikáliích. Ve vůni výrazně nepříjemné cizí přípachy, po chemikáliích, hnilobné, zatuchlé, žluklé apod.

**Cizí pachuti**

1. **Sýr je bez cizích pachutí**
- 2.
- 3.
4. **Pachuti akceptovatelné** – sýr obsahuje cizí příchuti a nebo pachuti – stále však akceptovatelné pro konzumaci
- 5.
- 6.
7. **Odporné pachuti** – naprosto nepříjemné, koncentrace pachutí naprosto odporná