

Vliv obsahu tuku na vlastnosti sýru typu gouda

Bc. Kristýna Rojíčková

Diplomová práce
2017



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Kristýna Rojíčková**
Osobní číslo: **T15298**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Vliv obsahu tuku na vlastnosti sýru typu gouda**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Popište výrobu sýrů s dohřívanou sýřeninou.
2. Popište faktory, které ovlivňují vlastnosti sýrů.
3. Charakterizujte důležité skupiny mikroorganismů ovlivňující jakost sýrů.

II. Praktická část

1. Vytvořte modelové vzorky sýrů s různým obsahem tuku a založte skladovací experiment.
2. Porovnejte vlastnosti modelových sýrů v průběhu zrání.
3. Vyhodnoťte výsledky, diskutujte je s literaturou a vyvoďte závěry.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] DONNELLY, Catherine W. Cheese and microbes. Washington, District of Columbia: ASM Press, 2014. ISBN 978-1-55581-859-3.

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

[3] HICKEY, C.D., M.A.E. AUTY, M.G. WILKINSON a J.J. SHEEHAN. The influence of cheese manufacture parameters on cheese microstructure, microbial localisation and their interactions during ripening: A review. Trends in Food Science & Technology. 2015, 41(2), 135-148.

[4] GUNASEKARAN, Sundaram a M. Mehmet. AK. Cheese rheology and texture. Boca Raton, FL: CRC Press, c2003. ISBN 1587160218.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Vendula Pachlová, Ph.D.**
Ústav technologie potravin

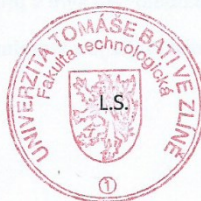
Datum zadání diplomové práce: **3. února 2017**

Termín odevzdání diplomové práce: **28. dubna 2017**

Ve Zlíně dne 3. února 2017



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



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

Příjmení a jméno: ROJČKOVÁ KRISTÝNA

TECHNOLOGIE
Obor: POTRAVIN

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 28.4.2017

Rojčková

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Diplomová práce je zaměřena na studium vlivu obsahu tuku na vlastnosti sýrů holandského typu v průběhu zrání. Pozornost byla věnována především vývoji texturních vlastností, roztékavosti sýrů a intenzitě zrání v závislosti na různém obsahu tuku v sušině sýrů. Dále bylo sledováno zastoupení mikroorganismů v průběhu zrání. Obsah tuku v sušině měl vliv na vývoj tvrdosti, zjištěné výsledky ukazují rostoucí trend tvrdosti sýrů s klesajícím obsahem tuku v sušině a zároveň pokles tvrdosti v průběhu zrání. Rozdílné zastoupení tuku ovlivnilo také roztékavost sýrů, se snižujícím se obsahem tuku v sušině byl pozorován její klesající charakter. Intenzivnější proteolýza byla pozorována u sýrů o nižším obsahu tuku v porovnání se sýry s vyšším obsahem tuku. Na počátku zrání byly zaznamenány nejvyšší počty startérových bakterií mléčného kvašení, v průběhu zrání došlo k jejich snížení. Technologicky nežádoucí mikroorganismy nebyly detekovány.

Klíčová slova: gouda, obsah tuku, zrání sýrů, texturní vlastnosti, mikroorganismy v sýrech

ABSTRACT

The thesis is focused on the effect of fat content on properties of Dutch-type cheeses during ripening. Microflora of milk and cheese, the development of textural properties, cheese meltability and intensity of proteolysis were observed depending on the different fat content during cheese ripening. Cheese texture was changed during storage, the hardness decreased with age of cheese. Textural properties and cheese meltability were influenced by different fat content. The hardness of cheese increased and cheese meltability decreased with the decreasing fat content. More intense proteolysis was observed in low fat cheese compared with full fat cheese. The highest counts of starter lactic acid bacteria were at the beginning of cheese ripening, then the counts decreased. Pathogens and spoilage microorganisms were not detected.

Keywords: gouda-type cheese, fat content, cheese ripening, texture properties, microorganisms in cheese

Děkuji vedoucí diplomové práce doc. Ing. Vendule Pachlové, Ph.D. za její ochotu, trpělivost, odborné vedení, cenné rady a připomínky při zpracování této diplomové práce. Poděkování patří také Ing. et Ing. Ludmile Zálešákové za podporu během chemických a texturních analýz a současně pracovníkům Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí, Fakulty technologické, za výpomoc během mikrobiálního rozboru mléka a sýrů.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 TECHNOLOGIE VÝROBY SÝRŮ S DOHŘÍVANOU SÝŘENINOU	12
1.1 ÚPRAVY MLÉKA PŘED SÝŘENÍM	13
1.2 SÝŘENÍ	16
1.3 ZPRACOVÁNÍ SÝŘENINY.....	18
1.4 ZRÁNÍ.....	21
2 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ VLASTNOSTI SÝRŮ	26
2.1 VNITŘNÍ FAKTORY.....	26
2.1.1 Aktivita mikroorganismů a jejich enzymů	26
2.1.1.1 Technologicky žádoucí a non-startérové mikroorganismy.....	26
2.1.1.2 Technologicky nežádoucí mikroorganismy.....	29
2.1.1.3 Přítomnost patogenů	31
2.1.2 Obsah tuku a obsah sušiny	32
2.1.3 Obsah soli a pH	34
2.2 VNĚJŠÍ FAKTORY	35
II PRAKTICKÁ ČÁST	38
3 CÍL PRÁCE.....	39
4 METODIKA.....	40
4.1 VÝROBA MODELOVÝCH VZORKŮ	40
4.2 ZÁKLADNÍ CHEMICKÁ ANALÝZA	42
4.2.1 Stanovení obsahu sušiny	42
4.2.2 Stanovení obsahu tuku.....	42
4.2.3 Stanovení pH.....	43
4.2.4 Stanovení obsahu soli	43
4.3 MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR.....	43
4.3.1 Stanovení celkového počtu mikroorganismů.....	44
4.3.2 Stanovení enterobakterií	44
4.3.3 Stanovení enterokoků	44
4.3.4 Stanovení bakterií mléčného kvašení	45
4.3.5 Stanovení mezofilních laktokoků a streptokoků	45
4.3.6 Stanovení kvasinek a plísní.....	45
4.4 STANOVENÍ OBSAHU VOLNÝCH AMINOKYSELIN	45
4.5 TEXTURNÍ PROFILOVÁ ANALÝZA.....	46
4.6 STANOVENÍ ROZTÉKAVOSTI.....	46
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	48
5.1 ZÁKLADNÍ CHEMICKÁ ANALÝZA	48
5.1.1 Obsah sušiny	48
5.1.2 Obsah tuku	49
5.1.3 Stanovení pH.....	50
5.1.4 Obsah soli.....	51

5.2	MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR.....	52
5.3	STANOVENÍ OBSAHU VOLNÝCH AMINOKYSELIN.....	58
5.4	TEXTURNÍ PROFILOVÁ ANALÝZA.....	61
5.5	ROZTÉKAVOST	65
ZÁVĚR.....		67
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY		68
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....		74
SEZNAM OBRÁZKŮ.....		75
SEZNAM TABULEK		77
SEZNAM PŘÍLOH.....		78

ÚVOD

Přírodní sýry představují velmi oblíbenou potravinu, kterou není potřeba před konzumací již nijak upravovat. Přesto je možné využívat funkčních vlastností sýrů během výroby jiných potravin a pokrmů jako jsou např. pečivo se sýrovým posypem, pizza či těstoviny. Gouda společně s eidamem jsou charakteristickými zástupci sýrů holandského typu, které jsou preferovány na českém trhu. Jedná se o polotvrdé sýry s nízkodohřívanou sýřeninou, u kterých je možný výskyt drobných ok na řezu.

Vlastnosti přírodních sýrů jsou dány především zráním, během kterého dochází k významným biochemickým a mikrobiologickým změnám. Dochází nejen k tvorbě požadovaného aroma a chuti, ale také ke změnám texturních vlastností. Tyto vlastnosti však mohou být ovlivněny mnoha dalšími faktory, zejména aktivitou mikroorganismů a jejich enzymů, obsahem tuku a obsahem sušiny, obsahem soli a pH. Nelze však opomenout ani podmínky skladování, jako je teplota, délka zrání a volba obalového materiálu, které významně ovlivňují vlastnosti finálních produktů. Diplomová práce se zaměřuje na popis vlivu různého obsahu tuku v sušině na texturní vlastnosti sýrů, především vývoj tvrdosti, soudržnosti a lepivosti a jejich změny v průběhu zrání. Intenzita zrání sýrů byla posouzena prostřednictvím koncentrace volných aminokyselin. Současně se práce zaměřuje na sledování zastoupení mikroorganismů v sýrech v průběhu zrání, zejména pak startérových bakterií mléčného kvašení a non-startérových bakterií mléčného kvašení, které přispívají k požadovaným změnám. Pozornost byla dále věnována technologicky nežádoucím mikroorganismům, které mohou být původci vad finálních výrobků.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 TECHNOLOGIE VÝROBY SÝRŮ S DOHŘÍVANOU SÝŘENINOU

Dle vyhlášky 397/2016 Sb. o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje se rozumí sýrem mléčný výrobek vyrobený vysrážením mléčné bílkoviny z mléka působením syřidla nebo jiných vhodných koagulačních činidel, oddělením podílu syrovátky a následným prokysáním nebo zráním.

Výrobu přírodních sýrů významně ovlivňuje složení mléka, především obsah tuku, bílkovin, hodnota pH a přítomnost vápníku. Tyto parametry jsou ovlivněny pak zejména druhem a plemenem dojnice, jejich výživou, stádiem laktace a také zdravotním stavem. Mléko dojnic v časném nebo pozdním stádiu laktace, nebo mléko dojnic nemocných mastitidou není možné využít pro výrobu sýrů ani jinak zpracovat. Pro posouzení kvality mléka je vhodným ukazatelem počet somatických buněk. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 ze dne 29. dubna 2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu, stanovuje limit somatických buněk v syrovém kravském mléce, a sice méně nebo rovno 400 000 somatických buněk na 1 ml mléka. Hodnota je uváděna jako klouzavý geometrický průměr za tříměsíční období a je nutno odebrat alespoň jeden vzorek za měsíc. Mléko pro výrobu sýrů by mělo být prosté chemických kontaminantů, včetně reziduí antibiotik, které by později zapříčinily inhibici přidávaných bakteriálních kultur (Fox et al., 2000).

Při výrobě sýrů jsou kladeny vysoké požadavky na mikrobiologickou kvalitu mléka. Celkový počet mikroorganismů, počet koliformních bakterií, počet psychrotrofních a termorezistentních bakterií musí být co nejnižší. Koliformní bakterie jsou rizikové z hlediska časněho duření sýrů. Pro pozdní duření je charakteristická přítomnost spor *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium butyricum* a *Clostridium sporogenes*. Psychrotrofní mikroorganismy jsou charakteristické tvorbou proteolytických a lipolytických enzymů (Janštová et al., 2012). Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 ze dne 29. dubna 2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu, stanovuje kromě výše uvedeného limitního množství somatických buněk také limitní hodnoty mikroorganismů pro syrové kravské mléko a mlezivo, kde obsah mikroorganismů při 30 °C musí být $\leq 100\,000$ na ml. Kromě mikrobiologické kvality musí mléko pro výrobu sýrů vykazovat také vhodné technologické vlastnosti, mezi něž patří kysací schopnost a sýřitelnost (Janštová et al., 2012).

1.1 Úpravy mléka před sýřením

Po příjmu mléka se případné mechanické nečistoty odstraňují filtrací nebo centrifugací (Kadlec et al, 2002). Spóry kontaminujících mikroorganismů lze odstranit baktofugací o 95 – 97 %, či mikrofiltrací až o 99,5 % (Janštová et al., 2012; Kadlec et al., 2002).

Obsah bílkovin v mléce je relativně stabilní, zatímco obsah tuku je variabilní. Na variabilitě se podílí řada faktorů, mezi něž se řadí především roční období, krmná dávka a stádium laktace. Standardizace mléka se provádí na základě poměru celkového obsahu bílkovin a tuku nebo obsahu tuku a kaseinu. V malých mlékárnách lze standardizovat mléko přidávkem odstředěného mléka k plnotučnému mléku. Naopak při výrobě vysokotučných sýrů lze do mléka přidávat také smetanu. Velkokapacitní provozy využívají kontinuální odstředivky s automatickou standardizací tuku, kde je odstředěné mléko a smetana smíchána dle předem vypočteného poměru. Standardizace zajišťuje výrobu sýrů s různým obsahem tuku v sušině (McSweeney, 2007).

Tuk může být relativně snadno do mléka přidáván, popřípadě odebírán, to však neplatí u bílkovin mléka. V případě obsahu proteinů není manipulace příliš snadná. Možností úpravy bílkovin v mléce je ultrafiltrace odstředěného mléka, čímž se získá obohacená frakce proteinu, která je zpět přidána do mléka před výrobou sýru. Výhodou této technologie je jednotnost složení mléka a snížení ztrát kaseinu v syrovátce (McSweeney, 2007).

Tepelné ošetření mléka je proces zajišťující zdravotní nezávadnost. Vyhláška 397/2016 Sb. o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje definuje tepelné ošetření jako technologický proces podle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 ze dne 29. dubna 2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu. Pasterací se rozumí tepelné ošetření vysokou teplotou po krátkou dobu (72 °C po dobu 15 sekund), nízkou teplotou po dlouhou dobu (nejméně 63 °C po dobu 30 minut), nebo jakoukoli jinou kombinací času a teploty, která vede k rovnocennému účinku. Pro výrobu sýrů je využívána zejména šetrná pasterace, působení teploty 72 – 75 °C po dobu 15 – 20 s. Vyšší teploty záhřevu by zhoršily syřitelnost a oddělování syrovátky (Kadlec et al., 2002; McSweeney, 2007).

Pasterací dojde k inaktivaci patogenních bakterií přítomných v syrovém mléce, jako je například *Coxiella burnettii* nebo *Mycobacterium tuberculosis* a většiny termorezistentních vegetativních mikroorganismů. Pasterací dochází také k inaktivaci původních enzymů

mléka, například alkalické fosfatázy. Test na přítomnost alkalické fosfatázy je spolehlivým ukazatelem správně provedené pasterace (McSweeney, 2007).

Pasterace však není účinným tepelným ošetřením k inaktivaci spor, a pokud jsou přítomny ve vysokých počtech, dojde k jejich vyklíčení v průběhu zrání (McSweeney, 2007). Nejčastěji se jedná o mikroorganismy *Clostridium butyricum* a *Clostridium tyrobutyricum*. Tomuto jevu říkáme pozdní duření, projevuje se tvorbou velkých ok a je způsoben anaerobním metabolismem laktátu na acetát, butyrát, CO₂ a H₂ (Fox et al., 2004).

Během tepelného ošetření dochází k přeměně rozpustného hydrogenfosforečnanu vápenatého na nerozpustný fosforečnan vápenatý. Pro zlepšení syřitelnosti a zvýšení pevnosti gelu je nezbytné do pasterovaného mléka aplikovat chlorid vápenatý. Množství přidávaného CaCl₂ se nejčastěji pohybuje v rozmezí 5 – 20 g na 100 kg mléka (Kadlec et al., 2002).

Dusičnan draselný je aplikován do mléka pro výrobu sýrů s nižší titrační kyselostí z důvodů ochrany před duřením. Časné duření je způsobeno koliformními bakteriemi a bakteriemi máselného kvašení, pozdní duření způsobují zpravidla anaerobní sporuláty. Dusičnan draselný, popřípadě dusičnan sodný se přidává do mléka v množství 5 g na 100 kg mléka. Vyšší dávky by mohly způsobit inhibici zákysových kultur nebo po redukci na dusitany zreagovat s tyrosinem a způsobit barevné vady (Kadlec et al., 2002).

Pro zlepšení barvy sýrů se přidávají barviva. Nejčastěji používaným barvivem při výrobě sýrů je annato. Annato je získáváno extrakcí z oplodí semen tropické rostliny *Bixa orellana* a skládá se ze dvou apokarotenoidních pigmentů – nor-bixinu a jeho methylesterubixinu. Dalším barvivem využívaným při výrobě sýru může být například karoten (Kadlec et al. 2002; McSweeney, 2007).

Nedílnou součástí při výrobě sýrů tvoří bakteriální kultury. Jsou dodávány jako čisté kultury nebo směsi definovaných živých mikroorganismů. Typ použité kultury závisí na druhu vyráběného sýru (Kadlec et al. 2002; Leroy a DeVuyst, 2004). Podle skupin mikroorganismů existují kultury bakteriální, plísňové, kvasinkové nebo smíšené. Dle druhové a kmenové skladby lze kultury rozdělit na jednokmenové, vícekmenové, směsné vícekmenové a tradiční kultury (Kadlec et al., 2002). Mikroorganismy zákysových kultur zajišťují technologickou zpracovatelnost surovin a získání výrobků požadovaných vlastností, u mlékárenských výrobků se uplatňuje především mikrobiální degradace sacharidů, lipidů a bílkovin. Vykazují ochrannou funkci proti růstu nežádoucích mikroorganismů a nacházejí uplatnění

také jako probiotika s prospěšným působením na stav organismu příjemce (Kadlec et al., 2002).

Při výrobě sýrů se využívají primární a sekundární kultury. Hlavní funkcí primárních kyselých kultur je produkce kyseliny mléčné a v některých případech tvorba aromatických sloučenin, jako je kyselina octová, acetaldehyd a diacetyl. Tyto složky pak zapříčiní charakteristické aroma a chuť finálních výrobků. Startérové neboli kyselové kultury se aplikují do mléka krátce před přidáním syřidla. Tvorba kyseliny mléčné podporuje činnost syřidla, napomáhá oddělení syrovátky a je prevencí proti růstu nežádoucích bakterií (Fox et al., 2004; Fox et al., 2000).

Startérové kultury jsou děleny na mezofilní a termofilní. Mezofilní bakteriální kultury mají optimální teplotu růstu v rozmezí 20 – 30 °C, zatímco pro termofilní bakterie je optimum v rozmezí 40 – 45 °C (Kadlec et al., 2002).

Mezofilní kultury tvoří *Lactococcus* spp. a *Leuconostoc* spp. Mezi nejčastěji využívané zástupce kyselinotvorných koků patří *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Oba zástupci se vyznačují homofermentativním rozkladem laktózy přítomné v mléce. Mezi aromatvorné koky se řadí *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, který se vyznačuje homofermentativním rozkladem laktózy. Heterofermentativní druhy aromatvorných koků jsou *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, které z laktózy tvoří kromě kyseliny mléčné ještě oxid uhličitý, etanol, popřípadě acetát (Kadlec et al., 2002).

Mezi termofilní kultury náleží *Lactobacillus* spp. a *Streptococcus* spp. Zástupci *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* a *Lactobacillus helveticus* se tradičně využívají při výrobě sýrů s vysokodohřívanou syřeninou.

Přídavek kultury upravuje kyselost mléka před syřením, má za následek fermentaci laktózy a tvorbu kyseliny mléčné během prokysání sýrů, uplatňuje se při lipolytické a proteolytické činnosti v době zrání, při tvorbě aromatických sloučenin, které vznikají jako produkty lipolýzy a proteolýzy. Aktivita záměrně přidaných mikroorganismů také ovlivňuje tvorbu ok, texturu a konzistenci zrajících sýrů (Kadlec et al., 2002).

Mléko je nutno před inokulací ohřát na teplotu 30 – 33 °C. Mezofilní kultura je aplikována 30 – 45 minut před syřením v množství 0,5 – 2 % v případě provozního zákysu. Pro přímé zaočkování mléka jsou využívány koncentrované hlubokomražené nebo lyofilizované kultury (Kadlec et al., 2002).

Pro sýry s nízkodohřívanou sýřeninou, konkrétně holandského typu (eidam, gouda) se využívá mezofilní kultura s proteolytickou aktivitou: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbruecki* subsp. *lactis*. Pro sýry čedarového typu se využívá speciální čedarová kultura. Základní kultura sestává z mikroorganismů *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, pro urychlení proteolýzy se využívá *Lactobacillus helveticus*.

Při výrobě sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou se přidává termofilní kultura: *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lactobacillus delbruecki* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbruecki* subsp. *lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei*. U sýrů typu ementál, kde je požadována tvorba velkých ok, se přidává také doplňková kultura propionového kvašení, která sestává nejčastěji z mikroorganismů: *Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*.

U sýrů zrajících pod mazem se kromě mezofilní kultury využívá také doplňková mazová kultura, která sestává z: *Brevibacterium linens*, *Micrococcus roseus*, *Torulopsis candida*, *Kluyveromyces lactis* a *Candida utilis*.

Při výrobě plísňových sýrů se využívá plísňová kultura: *Penicillium roqueforti* pro sýry s plísní v těstě a *Penicillium camemberti* pro sýry s plísní na povrchu (Janštová et al., 2012; Fox et al., 2000).

1.2 Sýření

Sýření je rychlá a nevratná reakce, při níž dochází k destabilizaci bílkovin mléka a následné tvorbě koagulátu. Průběh sýření je závislý zejména na obsahu vápenatých iontů, množství kaseinu, zastoupení kaseinových frakcí v micelle, teplotě, typu a koncentraci syřidla (Janštová et al., 2012).

Při koagulaci mléka syřidlem dochází k enzymovému štěpení peptidové vazby κ -kaseinu mezi 105. a 106. aminokyselinou (fenylalaninem a metioninem). Z κ -kaseinu vznikne štěpením para- κ -kasein a glykomakropeptid. Para- κ -kasein má afinitu ke kaseinovým frakcím, je hydrofobní a sráží se působením vápenatých iontů, zatímco glykomakropeptid ztrácí afinitu ke kaseinovým frakcím, je hydrofilní, neboť obsahuje sacharidickou složku a je rozpustný v roztocích vápenatých solí. Fáze, kdy působí syřidlo na κ -kasein, se označuje

jako primární. Dochází k destabilizaci a snížení negativního náboje kaseinových micel. Micely se disagregují a následně spojují do nových micelárních útvarů.

Sekundární fáze je označována též jako koagulační, neboť v ní dochází k tvorbě gelu. Kaseinové micely se řadí nejprve do řetězců, které následně vytvoří trojrozměrnou síť. Podmínkou vzniku gelu je teplota vyšší než 15 °C a přítomnost vápenatých iontů. Vápenaté ionty snižují negativní náboj micel a urychlují agregaci destabilizovaných micel. Dojde k výměně vodíkových iontů v kaseinu za ionty vápenaté, postupnému poklesu pH a urychlení koagulace. Během sekundární fáze dochází k synerezi. Synereze je definována jako smršťování sýřeniny za současného uvolňování syrovátky. Synerezi lze podpořit krájením, zvýšením teploty, nízkým pH a vápenatými ionty.

Terciární fáze je nežádoucí a zpravidla nastává při sýření, které překračuje dobu 50 minut. Terciární fáze již nesouvisí s koagulací, ale s proteolytickým působením syřidla v průběhu zrání (Janštová et al., 2012; Kadlec et al., 2002).

Syřidla jsou získávána z různých zdrojů a obsahují jednu či více proteináz. Tradičně je však pro koagulaci mléka využíván chymozin, enzym extrahovaný z žaludků sajících telat. Se stářím zvířete produkce chymozinu klesá (McSweeney, 2007).

Dále je možno využívat enzymové preparáty rostlinného, živočišného nebo mikrobiálního původu, které působí podobně jako chymozin. Z živočišných preparátů je využíván pepsin, který se obvykle přidává ve směsi s chymozinem (Kadlec et al., 2002). Z mikrobiálních proteináz jsou široce využívány izoláty přirozeně produkované plísněmi *Rhizomucor meihai*, *Rhizomucor pusillus* a *Cryphonectria parasitica*.

Pro produkci telecího chymozinu je využíváno také geneticky modifikovaných mikroorganismů, které produkují tento enzym fermentací. Takto vzniklý chymozin je nazýván též rekombinantní chymozin. Gen pro produkci telecího chymozinu je vnášen do mikroorganismů, mezi něž patří *Escherichia coli*, *Kluyveromyces lactis* nebo *Aspergillus niger* (McSweeney, 2007).

Syřidlo je přidáváno do mléka ve formě zředěného roztoku. Množství závisí na síle (účinnosti) enzymatického preparátu. Během 2 – 3 minut je nutno syřidlo v mléce pečlivě rozmíchat a během dalších 10 minut uvést mléko do klidu, aby nedošlo k narušení tvorby gelu a následné ztráty syrovátky. Obvykle doba srážení trvá 30 minut (Kadlec et al. 2002). Optimální teplota pro srážení je okolo 40 °C, ale běžně se využívá teplota 30 °C pro správnou

funkci startérových kultur. Koagulace mléka však neprobíhá při teplotách nižších než 18 °C (McSweeney, 2007).

1.3 Zpracování sýřeniny

Při zpracování sýřeniny dochází k tvorbě sýrových zrn a oddělení syrovátky od struktury gelu (Kadlec et al., 2002). Obsah syrovátky v sýřenině významně ovlivňuje zrání sýra (Janštová et al., 2012).

Po dosažení požadované pevnosti gelu je zahájeno krájení sýřeniny, při níž vznikají sýrová zrna o velikosti v rozmezí 3 – 15 mm, u tučnějších sýrů je požadováno zrno menší, naopak u méně tučných sýrů zrno větší (Janštová et al., 2012; Kadlec et al., 2002). Pro čedar a sýry holandského typu se požaduje velikost sýrařského zrna asi 1 cm (Fox et al., 2000). Krájení se provádí v sýrařském výrobníku soustavou strunných nožů uložených v rámu (tzv. harfy). Zrno je dále mícháno v uvolněné syrovátce. Při míchání je potřeba zabránit sedimentaci a slepování zrna a zároveň postupovat šetrně, aby nedocházelo k tříštění zrna a tvorby sýrařského prachu. Sýrařský prach není zadržen v sýru, ale odchází do syrovátky, čímž se snižuje výtěžnost (Janštová et al. 2012; Kadlec et al., 2002).

Další operací je vytužování zrna, kdy je zrno mícháno v uvolněné syrovátce. Následuje vypouštění syrovátky, které je prováděno bez míchání, proto musí být dostatečně rychlé a šetrné, aby nedocházelo ke slepování zrn (Kadlec et al., 2002).

Dohřívání sýřeniny se volí u polotvrdých a tvrdých sýrů. Jedná se o proces podporující synerezi. Podle použité teploty se sýry dělí na sýry s nízkodohřívanou sýřeninou (36 – 42 °C), kde řadíme například gouda, eidam a čedar, a sýry s vysokodohřívanou sýřeninou (48 – 53 °C), kde řadíme ementál či parmezán. Dohřívací teplota se však musí shodovat s tepelnou stabilitou startovací kultury. Produkce kyseliny u některých kmenů rodu *Lactococcus* je zastavena již při teplotě přibližně 35 °C. Některé kmeny však snesou i teploty až okolo 42 °C. Proto je potřeba u sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou použít termofilní kultury, které jsou schopny přežít i při teplotách 55 °C (Fox et al., 2000; Janštová et al. 2012). Dohřívání se zpravidla provádí cirkulací horké vody nebo horké páry v mezistěně výrobníku. Pro lepší řízení teploty je výhodnější použití horké páry.

U sýrů holandského typu je 30 % syrovátky nahrazeno teplou vodou, čímž se docílí požadované teploty. Tento postup byl pravděpodobně vyvinut na malých farmách, kde chyběly prostředky pro cirkulaci horké vody či páry v meziplášti výrobníku. V současnosti je však

tento proces prováděn zejména u sýrů typu gouda a eidam za účelem snížení laktózy v sýřenině a následnou lepší regulaci mikrobiálních procesů (Fox et al., 2000). Teplota přidávané vody se pohybuje okolo 60 °C. Nižší koncentrace laktózy zajistí pokles pH hodnoty pouze na 5,2 – 5,4, v případě vyšší koncentrace by pH pokleslo až k hodnotám 4,6 – 4,8 (Kadlec et al., 2002).

Pokud je dohřívání příliš rychlé, a to zejména v počáteční fázi, dojde k nadměrné dehydrataci povrchu zrn, vytvoří se povlak, který zabrání odstranění syrovátky z vnitřní části a výsledkem je pak vysoká vlhkost sýrového zrna (Fox et al., 2000).

V průběhu dohřívání se zvyšuje teplota z teploty sýření na teplotu dosoušení. Dosoušení pak představuje výdrž při dosažené dohřívací teplotě. Teplota dosoušení se u různých druhů sýrů liší. Pro nízkodohříváné sýry s obsahem tuku v sušině 30 % se aplikuje teplota dosoušení 36 – 37 °C, pro sýry obsahující 45 % tuku v sušině je vhodná teplota dosoušení 39 – 40 °C. U sýrů s vysokodohřívánou sýřeninou se aplikuje teplota dosoušení 48 -56 °C (Kadlec et al., 2002).

Další operací je formování sýřeniny, kdy sýr získává požadovaný tvar a velikost. Tvar a velikost jsou velmi důležitými parametry pro zrání jednotlivých druhů sýrů. Pro sýry s plísní na povrchu je charakteristický tvar malých nízkých válečků, které umožňují zrání od povrchu do středu. V případě, že by velikost těchto sýrů byla větší, povrch by byl přezrálý, zatímco střed nedozrálý. Naopak u sýrů, kde je požadována tvorba velkých ok, například u ementálu, je potřeba formovat sýřeninu do větších tvarů, aby bylo zabráněno nadměrnému úniku CO₂ (Fox et al., 2000).

U polotvrdých a tvrdých sýrů je potřeba při formování zamezit styku se vzduchem, protože by nedošlo k dokonalému spojení zrn. Oddělení syrovátky probíhá v předlisovací vaně, jejíž dno je tvořeno tkaninou, stěny jsou z nerezového perforovaného plechu. Předlisovací vana je naplněna syrovátkou jen zčásti a poté je pod její hladinu vypouštěna zbylá syrovátka se zrnem. Plát sýřeniny je předlisován pomocí víka vany za působení tlaku okolo 0,002 MPa, nakrájen a vkládán do plastových či nerezových forem opatřených otvory pro odtok syrovátky (Kadlec et al., 2002). Lisování tvrdých a polotvrdých sýrů probíhá v lisovacích vanách. Pro měkké sýry je charakteristické lisování vlastní vahou. Lisováním dochází ke ztrátě většiny syrovátky, spojování sýrových zrn a vytvoření sýrové hmoty. Při lisování je působící tlak postupně zvyšován od 0,005 až po 0,04 MPa (Janštová et al., 2012). Doba lisování trvá zpravidla 60 minut (Kadlec et al., 2002). Vysoký počáteční tlak by způsobil

předčasné uzavření sýrů, které by bránilo dalšímu odtoku syrovátky. Naopak u nedolisovaných a neuzavřených povrchů sýrů existuje riziko pronikání kontaminujících mikroorganismů (Janštová et al., 2012).

Solení je nezbytným procesem u všech druhů sýrů. Přispívá ke zlepšení chuti, zpevnění povrchu a regulaci obsahu vody v sýru (Janštová et al., 2012). Sůl však také hraje významnou roli jako konzervační činidlo. Zvyšuje osmotický tlak vodné fáze potravin, čímž dochází k dehydrataci bakteriálních buněk a jejich usmrcení, popřípadě zastavení růstu (McSweeney, 2007). Sůl společně s dalšími parametry, jako je pH, vodní aktivita a redoxní potenciál, může významně minimalizovat kažení a být preventivním opatřením proti růstu patogenních mikroorganismů (Fox et al., 2004).

NaCl dodává sýrům velmi ceněnou slanou chuť. Chuť sýrů bez soli je mdlá a vodnatá (McSweeney, 2007). Sůl se uplatňuje v tvorbě chuti sýrů také nepřímou, má vliv na mikrobiální a enzymatické pochody, metabolismus laktózy, degradaci tuku a kaseinu a tvorbu aromatických sloučenin jako jsou peptidy, volné aminokyseliny a volné mastné kyseliny (McSweeney, 2007).

Existují čtyři metody, kterými lze solení provádět. V prvním případě je sůl přimíchána do těsta ještě před tvarováním a lisováním. Tato metoda je charakteristická pro sýry typu čedar a je označována jako solení do těsta. Druhá metoda je solení na sucho a lze ji provádět u polotvrdých a tvrdých sýrů. Suchá sůl nebo solná kaše se vtírá na povrch lisovaných sýrů. U sýrů typu eidam, gouda, ementál nebo camembert se solení provádí v solné lázni. Sýry se po lisování ponoří do roztoku NaCl o koncentraci 15 – 23 % (Fox et al., 2000). Doba solení se pohybuje od několika hodin až po 1 – 5 dnů. Při solení v solné lázni dochází k difúzi NaCl do sýru, ze sýru pak odchází do solného roztoku syrovátka obsahující syrovátkové bílkoviny a kyselinu mléčnou. pH solné lázně musí odpovídat pH prokysaného sýru, pro měkké sýry se volí hodnoty pH 4,8 – 5,0, pro tvrdé pak hodnota 5,2. Taktéž teplota solné lázně musí být přizpůsobena typu sýru a stupni prokysání. Teplota tzv. teplých lázní se pohybuje v rozmezí 18 – 20 °C, studené lázně mají teplotu 10 – 12 °C. Teplota lázně ovlivňuje rychlost difúze, ale má svá omezení. Solením při příliš vysokých teplotách dochází ke vzrůstání hladiny soli jen do určité hranice, poté je povrch sýrů uzavřen prstencem soli a uvnitř zůstává zadržována syrovátka (Janštová et al., 2012). U sýrů typu mozzarella lze využít čtvrtou metodu solení, která sestává z kombinace metod předchozích. Tyto sýry jsou částečně soleny na sucho před tvarováním, a poté podrobeny solení v solné lázni (Fox et al., 2000).

1.4 Zrání

Během zrání prochází sýry řadou mikrobiologických, biochemických, chemických a fyzikálních procesů. Dochází k vývoji charakteristického aroma, chuťových vlastností, změně textury a vzhledu. Doba zrání je závislá na typu sýru, pohybuje se od 2 týdnů (například mozzarella) až po 2 i více let (například extra zralý čedar či parmezán) (Fox et al., 2004; Janštová et al., 2012). Zráním se mění mikroflóra sýrů, dochází k lýzi startérových kultur a rozvoji sekundární mikroflóry, zodpovědné zejména za vznik charakteristického aroma a chuti sýrů. U sýrů švýcarského typu se jedná především o *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*, u plísňových sýrů rozvoj plísní a u sýrů s mytou kůrou rozvoj grampozitivních bakterií na povrchu. Biochemické procesy probíhající během zrání sýrů jsou rozděleny na (i) metabolismus zbytkové laktózy a katabolismus laktátu a citrátu, (ii) lipolýza a katabolismus volných mastných kyselin a (iii) proteolýza a katabolismus aminokyselin (Fox et al., 2004).

Sýřenina obsahuje velmi malé množství laktózy, která je v časně fázi zrání metabolizována na kyselinu mléčnou (Fox et al., 2004). K rozkladu laktózy dochází již při formování a lisování. Vlivem kyseliny mléčné dochází k uvolnění vápníku z kaseinu a vzniká mléčan vápenatý a kaseinát vápenatý, který bobtná. Slepováním zrn sýřeniny vzniká homogenní hmota (Janštová et al., 2012).

Metabolismus laktózy je významně ovlivňován typem zákysových kultur. Při homofermentativním kvašení je konečným produktem kyselina mléčná, kdy jeden mol laktózy je přeměněn na čtyři moly kyseliny mléčné za uvolnění čtyř molů ATP (adenozintrifosfátu). Štěpení laktózy probíhá cestou glykolýzy. Naopak při heterofermentativním kvašení probíhá štěpení laktózy fosfoketolázovou cestou, kde jsou konečnými produkty kromě kyseliny mléčné také etanol, oxid uhličitý, kyselina octová, diacetyl, acetaldehyd, acetoin (Fox et al., 2004; Janštová et al., 2012).

Kyselina mléčná ovlivňuje pH během zrání, růst sekundární mikroflóry a aktivitu enzymů. Je důležitým substrátem pro řadu dalších reakcí, které jsou pro zrání sýrů přínosné či nikoli. L-laktát racemizuje pomocí non-startérových bakterií mléčného kvašení u sýrů holandského typu na DL-laktát. DL-laktát je méně rozpustný než L-laktát, vzniká D-laktát vápenatý, který způsobuje bílé skvrny na povrchu zrajících sýrů (Fox et al., 2004).

Za přítomnosti spor *Clostridium tyrobutyricum* může dojít k anaerobnímu rozkladu kyseliny mléčné na butyrát a vodík. Tento jev je označován jako pozdní duření a lze mu předejít

přídavkem NaNO_3 , lysozymu či fyzikálním odstraněním baktofugací, popřípadě mikrofiltrací.

U sýrů švýcarského typu je laktát metabolizován *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* na propionát, acetát, vodu a oxid uhličitý. Propionát a acetát zajišťuje chuť a aroma těchto sýrů, oxid uhličitý tvoří charakteristická oka (Fox et al., 2004).

U plísňových sýrů je laktát metabolizován na vodu a oxid uhličitý díky *Penicillium camemberti*.

Mléko obsahuje malé množství citrátu, přibližně kolem $8 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Asi 94 % citrátu je rozpuštěno a odvedeno z mléka syrovátkou. Zbytek citrátu je metabolizován citrát pozitivními kmeny laktokoků (Cit^+), mezi něž patří například *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*. Produkty metabolismu jsou diacetyl, acetát, acetoin a CO_2 . Vzniklý oxid uhličitý se uplatňuje při tvorbě ok u sýrů holandského typu. Diacetyl významně ovlivňuje chuť sýrů typu čedar a také sýrů holandského typu. Produkce diacetylu je poměrně malá, přibližně $0,11 \text{ mmol}$ na jeden litr mléka, zatímco produkce acetoinu je $10 - 50\times$ vyšší (Fox et al., 2004).

Lipolýza je považována za nezbytný proces, během kterého se vyvíjí požadované aroma a chuť sýrů. Oxidace lipidů se při zrání příliš neuplatňuje z důvodů nízkého redoxního potenciálu (-250 mV). Během enzymatické hydrolýzy neboli lipolýzy dochází k degradaci triacylglycerolů za vzniku mastných kyselin a glycerolu. Vzniklé mono- a di-glyceridy jsou považovány za nezbytné pro vývin aroma a chuti sýrů. Volné mastné kyseliny jsou prekurzory těkavých složek utvářejících požadovanou chuť. Lipolýza se uplatňuje především při zrání sýrů s modrou plísní a některých tvrdých italských sýrů. U sýrů typu gouda a čedar je rozsah lipolýzy v průběhu zrání malý (Fox et al., 2004).

Lipolytické enzymy, esterázy nebo lipázy, jsou rozlišovány na základě délky hydrolyzovaného acylového řetězce, fyzikálně-chemické povahy substrátu, zda jsou schopny emulzifikace či nikoli a také enzymatické kinetiky. Lipázy v sýrech pocházejí z mléka, syřidla, startérových bakterií, sekundárních startérových bakterií, non-startérových bakterií mléčného kvašení či exogenních lipázových preparátů (Fox et al., 2004). Lipázy mléka se však při výrobě sýrů z pasterovaného mléka neuplatňují z důvodů jejich termolability (Janštová et al., 2012).

Optimální hodnota pH pro aktivitu lipáz se pohybuje v alkalické oblasti, existují však lipázy, které vykazují vyšší aktivitu v neutrálním či kyselém pH (Fox et al., 2000).

Lipázy bakterií mléčného kvašení vykazují velmi slabou lipolytickou aktivitu. *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* produkuje lipázu, která společně s enzymy produkovanými termofilní kulturou přispívá k lipolýze u sýrů švýcarského typu. *Penicillium roqueforti* produkuje extracelulární lipázy zodpovědné za lipolýzu u sýrů s modrou plísní, stejně tak *Penicillium camemberti* u sýrů s plísní na povrchu (Fox et al., 2004).

Produktem lipolýzy jsou volné mastné kyseliny, které významně ovlivňují aroma a chuť finálních produktů. Silným a charakteristickým aroma se vyznačují zejména mastné kyseliny s krátkým řetězcem. U některých druhů sýrů dochází k dalším přeměnám mastných kyselin na aromatické a chuťové složky, zvláště metylketony a laktony (Fox et al., 2000).

Mezi nejčastější těkavé aromatické sloučeniny v sýrech patří etylestery. Vznikají reakcí mastných kyselin s alkoholem. Tioestery vznikají reakcí mastné kyseliny s tiolovou sloučeninou, která vznikla metabolismem aminokyseliny obsahující síru.

Laktony jsou cyklické estery, které vznikly intramolekulární esterifikací hydroxykyselin ztrátou vody a vytvořením kruhové struktury. α -laktony a β -laktony jsou vysoce reaktivní a jsou využívány jako meziprodukty v organické syntéze. γ -laktony a δ -laktony jsou stabilní a dodávají aroma a chuť mnoha druhům sýrů.

U sýrů s modrou plísní se uplatňují jako těkavé aromatické složky metylketony, které vznikají z mastných kyselin částečnou β -oxidací. Koncentrace metylketonů v sýrech kolísá z důvodů redukce na sekundární alkoholy (Fox et al., 2000; Fox et al., 2004).

Proteolýza je nejsložitějším, ale také nejdůležitějším biochemickým dějem probíhajícím při zrání sýrů (Fox et al., 2004). Průběh proteolýzy v sýrech znázorňuje Obrázek 1 (Janštová et al., 2012). Proteolýza je zodpovědná zejména za změnu struktury sýrů, například změny v pevnosti, pružnosti a roztékavosti (Fox et al., 2000). Během proteolýzy dochází k rozkladu dlouhých řetězců peptidů na kratší řetězce a volné aminokyseliny (Weimer, 2007). Některé hydrofobní peptidy o rozsahu 3 až 27 aminokyselinových zbytků jsou hořké, proto vyšší koncentrace může být příčinou hořkosti finálních výrobků (Fox et al., 2000; Doyle a Buchanan, 2013). Katabolismus aminokyselin je důležitý pro rozvoj chuti sýrů (Weimer, 2007). Aminokyseliny mohou být metabolizovány na řadu aromatických sloučenin, mezi něž patří zejména aminy, kyseliny, karbonylové sloučeniny nebo sloučeniny obsahující síru (Fox et al., 2000). Proteolýza probíhá za přítomnosti proteináz a peptidáz, jejichž zdrojem je syřidlo, mléko, startérové bakterie mléčného kvašení, non-startérové

bakterie mléčného kvašení, sekundární mikroflóra a exogenní proteinázy a peptidázy (Fox et al., 2004).

Chymozin, tradičně využívané syřidlo při výrobě sýrů, je aspartyllová proteináza získávaná z žaludků sajících telat. Primární rolí chymozinu je štěpit κ -kasein mezi 105. a 106. aminokyselinou (fenylalaninem a metioninem) (Fox et al., 2000). Většina přidaného syřidla odchází do syrovátky, avšak až 30 % syřidla může zůstat v sýřenině a podílet se významně na proteolýze během zrání. Množství syřidla v sýřenině je závislé na dohřívací teplotě, vlhkosti a pH sýřeniny. Chymozin dále štěpí α_{s1} -kasein mezi 23. a 24. aminokyselinou (fenylalaninem a fenylalaninem). Krátké peptidy jsou následně rychle hydrolyzovány proteinázami startérových kultur. α_{s1} -kasein je poměrně rezistentní ke štěpení chymozinem, štěpná místa se vyskytují především v hydrofobní oblasti molekuly (Fox et al., 2004).

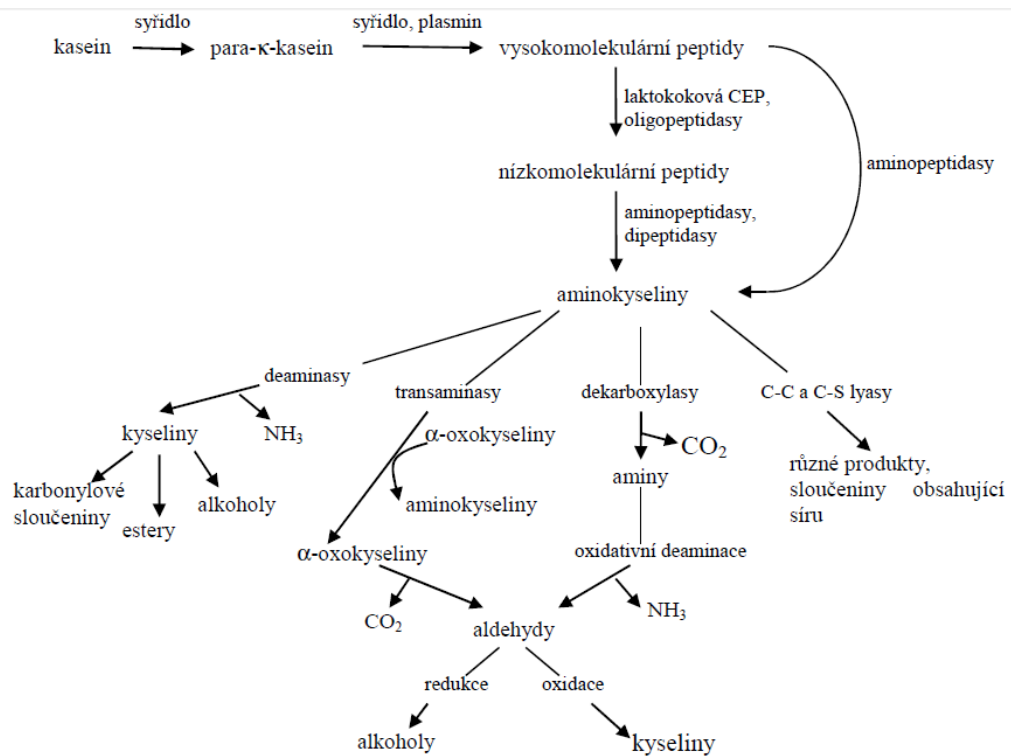
Mezi proteinázy mléka patří plazmin, v menší míře také katepsin D. Plazmin vykazuje optimální aktivitu při teplotě 37 °C a pH 7,5. Je vylučován do krve dojnice jako inaktivní plazminogen, který je díky aktivátorům aktivován na plazmin. Jeho hlavní funkcí v krvi je rozklad fibrinových sraženin. Plazmin, plazminogen a aktivátory plazminu se váží na kaseinové micely. Ke štěpení kaseinů dochází v pořadí β -kasein a α_{s2} -kasein, α_{s1} -kasein. κ -kasein je vůči štěpení plazminem poměrně rezistentní (Fox et al., 2004).

Proteinázy startérových bakterií mléčného kvašení, mezi něž patří laptocepin či PrtP jsou intracelulární proteinázy navázané na buněčnou stěnu. Jejich úlohou je štěpit středně dlouhé a krátké peptidy, které vznikly rozštěpením kaseinu za působení chymozinu nebo plazminu. Nově vzniklé peptidy dále podléhají hydrolyze katalyzované peptidázami, produktem jsou aminokyseliny (Fox et al., 2004).

Aminokyseliny jsou konečnými produkty proteolýzy a společně s krátkými peptidy se podílejí na výsledné chuti a aroma sýrů. Aminokyseliny mohou být kyselé, sladké nebo hořké a mohou se podílet na chuti přímo nebo nepřímo, kdy jsou prekurzorem pro řadu dalších reakcí.

Existují dvě hlavní dráhy, kterými může být zahájen katabolismus aminokyselin. První dráhou je transaminace katalyzovaná aminotransferázami, kdy je přenášena aminoskupina z aminokyseliny na molekulu akceptoru, zpravidla α -ketoglutarovou kyselinu, za vzniku odpovídající α -ketokyseliny. α -ketokyseliny nejsou stálé a rozkládají se na aldehydy, karboxylové kyseliny, alkoholy a hydroxykyseliny. Druhá dráha je eliminační reakce pomocí lyáz, které štěpí postranní řetězce aminokyselin. Tato dráha je zvláště důležitá pro katabo-

lizmus aromatických aminokyselin a metionin, kdy dochází k produkci těkavých sloučenin síry (Eskin a Shahidi, 2013; Fox et al. 2004). Další dráhy, kterými mohou být aminokyseliny katabolizovány jsou dekarboxylace, deaminace či desulfurace (Fox et al., 2000). Dekarboxylační aktivita je přisuzována některým kmenům bakterií mléčného kvašení, karboxylová skupina aminokyselin je odštěpena a vznikají biogenní aminy, které mohou mít při vyšších koncentracích u citlivějších spotřebitelů nežádoucí fyziologické účinky (Eskin a Shahidi, 2013).



Obr. 1: Schéma proteolýzy v sýrech (Janštová et al., 2012)

2 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ VLASTNOSTI SÝRŮ

Zrání sýrů představuje důležitý technologický proces, během kterého dochází k významným biochemickým a mikrobiologickým změnám. Vytváří se požadované vlastnosti sýrů, mezi něž jsou řazeny zejména aroma, chuť a také texturní vlastnosti. Faktory, které ovlivňují vlastnosti sýrů lze rozdělit do dvou skupin (i) vnitřní faktory (především aktivita mikroorganismů, obsah soli, tuku, hodnota pH) a (ii) vnější faktory (podmínky skladování jako teplota a doba zrání, volba obalového materiálu) (Everard et al., 2006; Saint-Eve et al., 2009).

2.1 Vnitřní faktory

Mezi vnitřní faktory ovlivňující vlastnosti sýrů patří především přítomnost mikroorganismů a jejich enzymů, obsah tuku, obsah sušiny, obsah soli a pH.

2.1.1 Aktivita mikroorganismů a jejich enzymů

Mikroflóra zrajících sýrů je velmi bohatá. Mikroorganismy, zahrnující bakterie, kvasinky i plísně, se významně podílejí na procesu zrání, a to buď přímo jejich metabolickou aktivitou, nebo nepřímo prostřednictvím enzymů uvolněných do sýrové matrice po rozpadu buňky. V procesu zrání se uplatňují zejména technologicky žádoucí mikroorganismy jako startérové bakterie mléčného kvašení, ale také sekundární mikroflóra a mikroorganismy, které jsou ve finálním produktu přítomny v důsledku kontaminace. Startérové bakterie mléčného kvašení zahajují svou aktivitu již při výrobě sýrů, kdy zajišťují snížení hodnoty pH mléka produkcí kyseliny mléčné. Naopak sekundární mikroflóra je důležitá zejména v průběhu zrání při vývoji chuťových vlastností charakteristických pro daný typ sýru (Fox et al. 2004).

2.1.1.1 Technologicky žádoucí a non-startérové mikroorganismy

Startérové bakterie mléčného kvašení jsou nepohyblivé, nesporulující, grampozitivní bakterie přidávané do mléka záměrně. Počáteční množství startérových bakterií mléčného kvašení se pohybuje v rozsahu 10^5 až 10^7 KTJ/ml, v závislosti na množství aplikovaného inokula. Do jednoho dne od výroby se počty zvyšují téměř u všech druhů sýrů na počet 10^9 KTJ/g (Donnelly, 2014; Fox et al., 2000). Primární funkcí startérových bakterií mléčného kvašení je produkce kyseliny mléčné a snížení pH mléka na hodnotu nižší než 5,3 během následujících šesti hodin od přidavku inokula. V době zrání většina startérových bakterií

odumírá a nastává lýza jejich buněk, způsobená intracelulární muramidázou, která hydrolyzuje peptidoglykan v buněčné stěně. Z buněk se uvolní intracelulární enzymy, zejména peptidázy, které společně s chymozinem hydrolyzují kasein na peptidy a aminokyseliny, které jsou prekurzorem chuťových složek sýra. Lyze buněk startérových kultur je závislá na kmeni, některé kmeny jsou schopny lyze velmi rychle, zatímco některé nejsou schopny lyze vůbec (Fox et al., 2000). Termofilní laktobacily lyzují velmi rychle a vykazují větší proteolytickou aktivitu než laktokoky. Některé kmeny laktokoků jsou schopny produkovat bakteriociny, které urychlují lyzi startérových kultur, a tím urychlují proces zrání.

Non-startérové bakterie zpravidla nejsou do mléka při výrobě sýrů záměrně přidávány. Přestože se jedná o kontaminující mikroflóru, mohou hrát důležitou roli ve vývoji chutě a vůně. Některé z nich začaly být pro svůj žádoucí přínos během zrání sýrů využívány jako zákysové kultury. Leukonostoky, které jsou široce využívány ve směsných kulturách, produkují diacetyl a acetoin z citrátu a produkce oxidu uhličitého je zodpovědná za vznik ok u sýrů holandského typu. Pediokoky tvoří malou část non-startérových bakterií u některých tvrdých sýrů, ale jejich vliv na chuť je nejasný. Nejčastěji jsou ze sýrů izolovány *Pediococcus acidilactici* a *Pediococcus pentosaceus* (Fox et al. 2000; Fox et al., 2004). Enterokoky se řadí mezi odolné bakterie a jejich výskyt je velmi rozšířený. Primárně však osidlují gastrointestinální trakt zvířat i člověka, z toho důvodu je jejich přítomnost v potravinářských produktech vnímána jako ukazatel špatné hygieny provozu. Enterokoky se považují za nejčastější příčinu nozokomiálních infekcí a vykazují vysokou rezistenci na vankomycin a jiná antibiotika. Některé druhy enterokoků však nacházejí uplatnění v mlékárenství pro jejich proteolytickou aktivitu. Jsou využívány zejména při výrobě sýrů v zemích Středomoří, jako je Itálie, Španělsko, Řecko a Portugalsko. Výhodou použití enterokoků při výrobě sýrů je produkce bakteriocinů, které mohou potlačit růst patogenů, jako je například *Listeria monocytogenes*. Mezi nejčastěji izolované druhy patří *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* a *Enterococcus durans* (Donnelly, 2014; Fox et al., 2000). Zatímco počty startérových bakterií se poměrně rychle snižují, počty non-startérových bakterií se v průběhu zrání zvyšují a dominují ve zrajícím sýru. Non-startérové bakterie tvoří přirozenou mikroflóru mléka a pokud by mléko po nadojení nebylo ihned zchlazeno, jejich počty by se mohly velmi rychle zvýšit až na 10^6 KTJ/ml (Fox et al., 2004). Ačkoliv požadavek na mikrobiologickou kvalitu mléka je vysoký, část non-startérových bakterií mléčného kvašení je schopná přežít pasteraci a další technologické operace. Obvykle pasterované mléko obsahuje méně než 10^3 KTJ/ml non-startérových bak-

terií. Díky nízkému pH, relativně vysokému obsahu soli, nedostatku zkvasitelných cukrů a přítomnosti bakteriocinů produkovaných startérovými bakteriemi mléčného kvašení tvoří sýr nepříznivé podmínky pro růst technologicky nežádoucích mikroorganismů, proto některé druhy bakterií jsou schopny jen přežít, popřípadě jsou schopny jen velmi pomalého růstu. U čedaru a goudy tvoří non-startérovou mikroflóru především mezofilní laktobacily, zejména *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus curvatus* a *Lactobacillus plantarum*. U sýrů vyráběných z mléka velmi dobré mikrobiologické kvality dosahují non-startérové bakterie během dvou až tří měsíců počtu $10^7 - 10^8$ KTJ/g (Fox et al., 2000). Jejich růst v sýrech je obtížně kontrolovatelný, avšak byly sledovány faktory, které jejich růst potlačují (Fox et al., 2004). Velmi efektivně lze inhibovat růst non-startérových bakterií zchlazením sýřeniny ihned po formování a lisování. Některé kmeny jsou však schopny i při teplotě 4 °C dosahovat počtu 10^7 KTJ/g. Spolehlivá inhibice non-startérových bakterií nastává až při teplotě 1 °C. Prakticky tuto teplotu zrání není možné aplikovat, neboť dochází k výraznému zpomalení všech reakcí, které jsou během zrání žádoucí. Chemické složení sýru (obsah soli, obsah vlhkosti nebo hodnota pH) růst non-startérových bakterií významně neovlivňuje (Fox et al., 2000). Růstové substráty pro non-startérové bakterie ve zrajícím sýru nejsou známy. Pravděpodobně získávají energii z cukrů glykoproteinů z membrány tukových kuliček. U sýrů typu čedar se v posledních letech začaly využívat mezofilní laktobacily jako doplňková kultura. Význam spočívá především v zesílení chuťových vlastností, urychlení procesu zrání, zlepšení chuti sýrů s nízkým obsahem tuku a potlačení růstu nežádoucích non-startérových bakterií mléčného kvašení (Fox et al., 2000; Fox et al., 2004).

Sekundární mikroflóra sýrů je tvořena bakteriemi, kvasinkami nebo plísněmi a díky své metabolické aktivitě je zodpovědná za charakteristické změny sýrů v průběhu zrání, vývoj aroma a chuti a tvorbu oka. Přídavek sekundární kultury je závislý na typu vyráběného sýra. Pro tvrdé a polotvrdé sýry se využívají především *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus helveticus*. U sýrů ementálského typu se využívají bakterie propionového kvašení, kde je kyselina mléčná metabolizována na oxid uhličitý a kyselinu propionovou. Oxid uhličitý vytváří charakteristická oka a kyselina propionová je zodpovědná za typickou nasládlou chuť (Fernandes, 2008; Fox et al., 2000). Mazovou kulturu tvoří rod *Brevibacterium* spolu s kvasinkovými kulturami a využívá se u sýrů zrajících pod mazem. Pro sýry s plísní na povrchu se využívá *Penicillium camemberti*, pro sýry s plísní v těstě *Penicillium roqueforti* (Fox et al., 2000).

2.1.1.2 Technologicky nežádoucí mikroorganismy

Požadavek na mikrobiologickou kvalitu mléka pro výrobu sýrů je vysoký, neboť přítomnost technologicky nežádoucích mikroorganismů by mohla být příčinou řady vad finálních výrobků. Mléko ve vemeni zdravých dojnic je prakticky sterilní. Po nadojení se ovšem stává vhodným substrátem pro mikroorganismy, proto je důležité v průběhu získávání mléka dodržovat přísné hygienické podmínky. Bezprostředně po nadojení obsahuje mléko méně než $5 \cdot 10^3$ KTJ/ml, při nesprávném skladování se však mohou počty mikroorganismů podstatně zvýšit. Zchlazením mléka na teplotu 15 – 21 °C je omezen růst většiny bakterií, dominuje mezofilní mikroflóra, zejména rod *Lactococcus* a *Enterobacter*. Růst většiny mikroorganismů je zastaven při zchlazení mléka na teplotu 4 °C, riziko však představují psychrotrofní mikroorganismy, které se vyznačují schopností množení při chladírenských teplotách. Psychrotrofní mikroflóra je tvořena především gramnegativními bakteriemi, mezi něž patří rod *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*. Grampozitivní psychrotrofní bakterie tvoří *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Listeria*, *Streptococcus* (Donnelly, 2014). Pro zajištění zdravotní nezávadnosti se mléko ošetřuje pasterací. Pasterace zajišťuje devitalizaci až 99,9 % přítomných vegetativních bakterií. Riziko však představují spory bakterií rodů *Bacillus* a *Clostridium*, nebo termorezistentní mikroorganismy, mezi něž patří rod *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Enterococcus* či *Microbacterium*, které pasteraci přežívají a mohou významně ovlivnit jakost výsledného výrobku (Fox et al., 2004). Existuje také riziko tzv. postpasterační neboli sekundární kontaminace. V případě, že zařízení mlékárny nejsou dostatečně čištěna, může docházet k ulpívání zbytků mléka, které je vhodným substrátem pro množení mikroorganismů. Psychrotrofní mikroorganismy uvolňují do mléka extracelulární proteázy a lipázy, které jsou vysoce tepelně stabilní a nelze je zničit pasterací. Tyto enzymy pak zapříčiňují vady sýrů jako je změna barvy, nepříjemný zápach nebo vznik hořké či žluklé chuti. Nejčastěji se vyskytujícím zástupcem psychrotrofních mikroorganismů v syrovém mléce je rod *Pseudomonas*, konkrétně *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fragi*, méně často i *Pseudomonas aeruginosa*. Během skladování při chladírenských teplotách produkuje vysoce stabilní proteázy a lipázy, které mění výslednou texturu sýru a zapříčiní jeho mýdlovou chuť (Blackburn, 2006; Donnelly, 2014).

Mezi další rizikové mikroorganismy se řadí koliformní bakterie. Jejich přítomnost v mlékárenských produktech je důsledkem špatně provedené pasterace nebo nedostatečné sanitace provozu. Koliformní bakterie náleží do čeledi *Enterobacteriaceae* a nejběžnějšími

zástupci jsou rody *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* a *Escherichia*. Jedná se o aerobní nebo fakultativně anaerobní, nesporulující, gramnegativní tyčinky, které zkvašují laktózu za produkce kyseliny a plynu. *Escherichia coli* je často považována za indikátor fekální kontaminace. Vysoké počty koliformních bakterií v mléce mohou být ukazatelem onemocnění mastitidou. Při výrobě sýrů je přítomnost koliformních bakterií obávaná z důvodů vzniku defektu nazývaného časné duření (Blackburn, 2006; Donnelly, 2014).

Sporulující bakterie se dostávají do mléka při jeho získávání prostřednictvím struků z půdy a podestýlky. Mohou dlouhodobě přežívat na zařízeních, v potrubích a ventilech a následně kontaminovat mléko. Nejčastěji se jedná o rod *Clostridium* a rod *Bacillus*. *Clostridium* spp. jsou obligátně anaerobní grampozitivní tyčinky. Některé kmeny klostridií jsou schopny psychrotrofního růstu a podílejí se na kažení mléčných produktů. *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium butyricum* a *Clostridium sporogenes* jsou zodpovědné za vadu polotvrdých sýrů zvanou pozdní duření. Pozdní duření se objevuje po 1 – 4 měsících skladování a je charakteristické vznikem zatuchlého zápachu a nadměrné tvorby plynu. Kyselina mléčná je rozložena na butyrát, octovou kyselinu, oxid uhličitý a vodík. I velmi nízká kontaminace může zapříčinit pozdní duření. Jelikož spory vykazují vyšší hustotu než bakterie, lze je odstranit z mléka baktofugací, popřípadě dvojitou baktofugací. *Bacillus* spp. jsou aerobní grampozitivní tyčinky schopné růstu i při chladírenských teplotách. Do mléka se dostávají z půdy, exkrementů, podestýlkového materiálu, krmiva nebo nedostatečně čištěného zařízení. Z pasterovaného mléka jsou nejčastěji izolovány *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis* a *Bacillus mycoides*. *Bacillus cereus* vykazuje silnou proteolytickou a lipolytickou aktivitu, zkracuje trvanlivost mléka, způsobuje vyvločkování smetany, sladké srážení a tvorbu hořké či žluklé chuti (Blackburn, 2006; Donnelly, 2014; Fernandes, 2008).

Výskyt kvasinek a plísní v mléce je zpravidla důsledkem postpasterační kontaminace a může způsobit ovocné či zatuchlé pachy mlékárenských výrobků. V sýrech mohou kontaminující kvasinky a plísně hydrolyzovat proteiny, čímž nepříznivě ovlivní texturní vlastnosti. Proteolytická aktivita kvasinek může vést k tvorbě nepříjemného zápachu po zkažených vejcích, žluklá chuť je následkem lipolytické aktivity. Přítomnost kvasinek však nemusí mít vždy negativní dopad. Například *Debaryomyces hansenii*, *Candida* spp. a *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* jsou kvasinky běžně se vyskytující ve vzduchu a mohou pozitivně přispívat k chuti některých sýrů. Z plísní jsou nejčastějšími kontaminanty rod *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor* a *Penicillium*. U sýrů typu gouda se na po-

vrch aplikují polymerní povlaky, které buď slouží jen jako fyzikální bariéra, nebo navíc obsahují inhibitory plísní, jako jsou sorbáty a natamycin (Blackburn, 2006; Donnelly, 2014).

2.1.1.3 Přítomnost patogenů

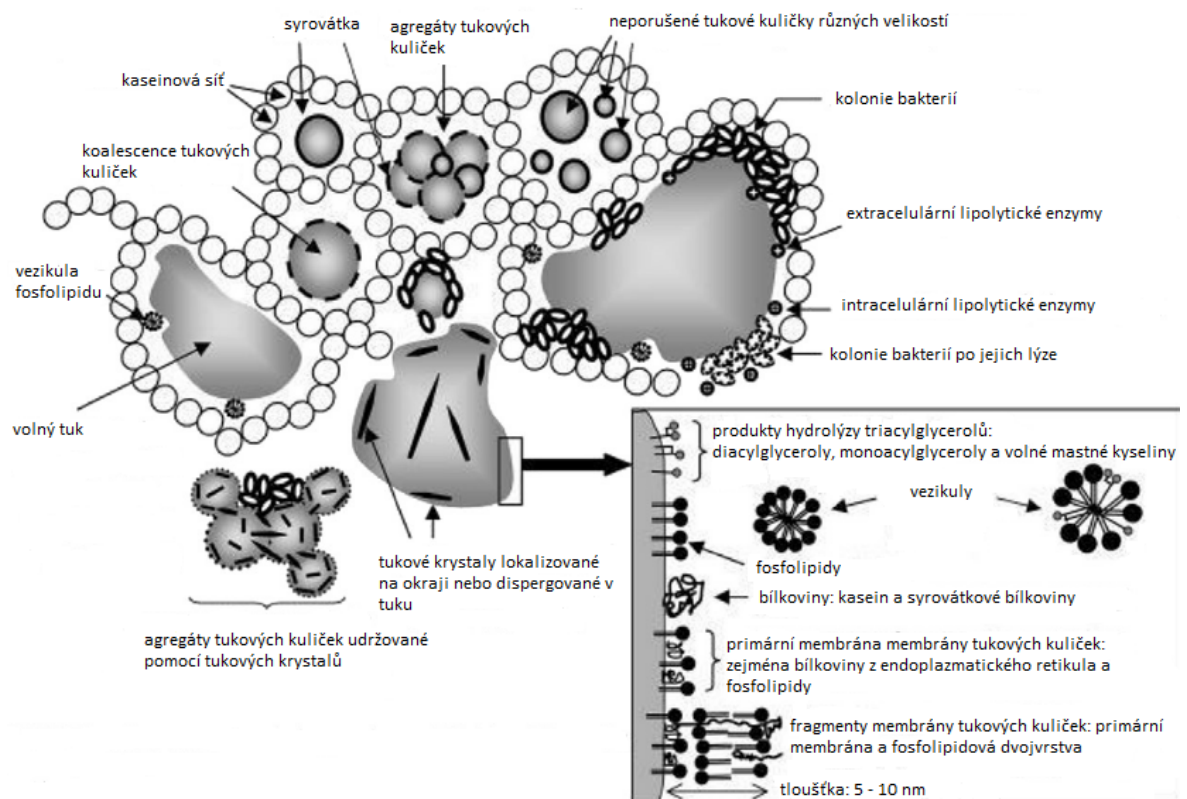
Výskyt alimentárních onemocnění spojených s konzumací sýrů je spíše sporadický, ovšem existují obávané patogeny, mezi něž se řadí zejména *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, enteropatogenní a enterohemoragická *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*. *Listeria monocytogenes* je krátká, pohyblivá, grampozitivní, nesporeující, fakultativně anaerobní tyčinka. Je schopná růstu při chladírenských teplotách a přežívá až 20% koncentrace soli. Teplotní optimum pro růst je 30 – 37 °C. *Listeria monocytogenes* se běžně vyskytuje v přírodě, na rostlinách, v bahně a ve výkalech. Největší riziko představuje pro kojence, těhotné ženy a starší populaci. Výskyt v mléčných produktech může být důsledkem nedostatečně provedené pasterace. Nejčastěji byly listerie izolovány z měkkých sýrů s plísní na povrchu a sýrů zrajících pod mazem, protože tyto sýry se vyznačují vyšším obsahem vody.

Escherichia coli je fakultativně anaerobní, gramnegativní tyčinka náležející do čeledi *Enterobacteriaceae*. Přirozeně se vyskytuje v půdě a v trávicím traktu člověka a ostatních teplotokrevných zvířat. Některé kmeny *E. coli* jsou schopny vyvolat onemocnění člověka. Mezi tyto kmeny se řadí enteroinvazivní *E. coli* (EIEC), enterotoxigenní *E. coli* (ETEC), enteropatogenní *E. coli* (EPEC) a enterohemoragické *E. coli* (EHEC). Enterohemoragické kmeny *E. coli* (EHEC), kde patří *E. coli* O157:H7 může být potenciálním patogenem při výrobě sýrů, neboť je schopná přežít velmi dlouhou dobu při nízkém pH. Enteropatogenní kmeny *E. coli* (EPEC) jsou příčinou gastroenteritid u člověka, ale při výrobě sýrů je jejich růst obvykle inhibován nízkým pH. Jakmile je však oslabena aktivita startérových kultur, počty *E. coli* se mohou rapidně zvýšit a přežít ve finálním produktu. *E. coli* je zpravidla inaktivována pasteračními teplotami, riziko je tedy vyšší u sýrů vyrobených ze syrového mléka. Dalším zástupcem čeledi *Enterobacteriaceae*, který může být potenciálním patogenem vyskytujícím se v sýrech je *Salmonella* spp. Tvoří fakultativně anaerobní, pohyblivé, gramnegativní tyčinky a zahrnuje dva druhy: *Salmonella enterica* a *Salmonella bongori*. Výskyt *Salmonella* spp. je obvykle důsledkem sekundární kontaminace, protože pasterační teploty salmonely spolehlivě inaktivují. Riziko mohou představovat sýry vyrobené z nepasterovaného mléka, kde jsou salmonely schopny přežít celý výrobní proces.

Staphylococcus aureus je obvykle původcem subklinické mastitidy. Ke kontaminaci mléka dojde během jeho získávání prostřednictvím struků. Jedná se o grampozitivní nepohyblivé nesporulující velmi odolné koky. Je schopen přežívat v prostředí o vyšší koncentraci soli a mírně kyselém pH. Množí se při teplotách 7 – 48 °C, ale optimální teplota se pohybuje v rozmezí 30 – 37 °C. *Staphylococcus aureus* je velmi obávaným patogenem z hlediska tvorby vysoce stabilních enterotoxinů. Produkce enterotoxinů začíná obvykle při dosažení počtů *S. aureus* na hodnoty vyšší než 5 log KTJ/ml (g) (Donnelly, 2014; Fox et al., 2004; Fernandes, 2008; Görner a Valík, 2004).

2.1.2 Obsah tuku a obsah sušiny

Struktura a texturní vlastnosti sýru jsou velmi ovlivněny obsahem tuku (Hickey et al., 2015). Při výrobě sýrů část tuku odchází do syrovátky, část zůstává zadržena v sýřenině a je nezbytnou komponentou pro rozvoj charakteristické chuti a textury (Ong, Degastine, Auty et al., 2011). Tuk se vyskytuje v sýru jako tuk volný nebo je zachycen v kaseinové matici. Strukturu mléčného tuku v mléčných výrobcích znázorňuje Obrázek 2 (Lopez et al., 2006).



Obr. 2: Struktura mléčného tuku v mléčných produktech (upraveno podle Lopez et al., 2006)

Množství zadrženého tuku v sýrenině je závislé na jeho počátečním obsahu v mléce ve vztahu k obsahu proteinu, ale také na krájení sýřeniny a velikosti sýrových zrn (Johnston et al., 1998). Tukové kuličky jsou samostatné kulovité útvary, popřípadě shluky dvou nebo více kuliček, na jejichž povrchu je ochranná membrána. Velikost tukových kuliček se pohybuje od 0,2 do 15 μm , přičemž průměrná hodnota se pohybuje okolo 4 μm . Jádru tukové kuličky tvoří z 98 % triacylglyceroly (Lopez, 2005). Membrána je vrstva povrchově aktivních látek, složená především z proteinů, enzymů, glykoproteinů, triacylglycerolů, fosfolipidů, glykolipidů, cholesterolu a je zodpovědná za stabilitu tukových kuliček proti jejich agregaci (Lopez, 2007). Působením vysoké dohřívací teploty dochází ke vzniku agregátů tukových kuliček, praskání membrány a vzniku volného tuku. Volný tuk je tvořen uvolněnými triacylglyceroly, které vyplňují proteinovou matici. Tepelné ošetření mléka a následné působení vysokých dohřívacích teplot má za následek inaktivaci lipáz a podstatně pomalejší proces lipolýzy. Porušením membrány tukových kuliček působením vysokých teplot je snížena fyzikální ochrana před bakteriemi a jejich enzymatickými pochody, což umožní tvorbu těkavých sloučenin a ovlivní tak jakost výsledného výrobku (Lopez, 2006). Vliv na tvar tukových kuliček má do jisté míry také lisování. Působení vysokých tlaků má za následek zmenšování tukových kuliček, které jsou rovnoměrněji rozptýleny v kaseinové matici a umožní tak vznik pevnější a pružnější struktury sýra (Buffa, Trujillo, Pavia a Guamis, 2001). Membrána tukových kuliček je narušena také při homogenizaci mléčného tuku, při které dochází k záměrnému zmenšování průměru tukové kuličky. Uvolněné triacylglyceroly se stávají přístupnější lipolytickým enzymům (Buňka et al., 2013). Toho se však využívá zejména u sýrů, kde je žádoucí rozsáhlejší lipolýza, např. u sýrů s plísni v těstě. Při výrobě tvrdých a polotvrdých sýrů se homogenizace spíše neprovádí, neboť spojením tukových kuliček s kaseinovými micelami dochází k rychlému srážení mléka a vzniku měkčí sýřeniny, která hůře uvolňuje syrovátku (Kadlec et al., 2002). Interakce tuku a proteinu probíhá prostřednictvím membrány tukových kuliček a je nezbytná pro zajištění struktury a pevnosti zrajícího sýra (Lopez, 2007). Záleží na tom, zda se tuk vyskytuje volně, nebo je vázán v kaseinové matici. Tuk vázaný v kaseinové matici má účinek na zvyšování pevnosti proteinové struktury (Cano-Ruiz a Richter, 1997; Everett a Auty, 2008). Díky přítomnosti fosfolipidů v membráně tukových kuliček mají tukové kuličky amfifilní charakter. Vzhledem k hydrofobní povaze většiny startérových bakterií, jsou bakterie lokalizovány na rozhraní protein-tuk (Pereira, 2009). Během zrání se mění texturní vlastnosti sýru, zejména jeho pevnost (McMahon, 2010). U sýrů s nízkým obsahem tuku dochází

k těmto změnám poměrně pomalu, zatímco u sýrů s vyšším obsahem tuku již během prvních třech měsíců zrání, což je přisuzováno proteolýze a rozpustnosti vápníku (Lawrence et al., 1987; Lucey et al., 2005). Během skladování v chladu poskytují pevné tukové kuličky strukturální podporu proteinové matici, proto i během proteolýzy zachovává sýr svůj tvar (Lawrence et al., 1987). Dle vyhlášky 397/2016 Sb. o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje jsou rozděleny přírodní sýry dle konzistence ve vztahu k obsahu vody v tukuprosté hmotě sýra. Extra tvrdým sýrem se dle této vyhlášky rozumí sýr o obsahu vody v tukuprosté hmotě nejvíce 47 %, tvrdý sýr obsahuje 47 – 54,9 %, polotvrdý 55- 61,9 %, poloměkký 62,0 až nejvíce 68,0 % a měkký více než 68 % vody v tukuprosté hmotě sýra.

2.1.3 Obsah soli a pH

Množství NaCl se pohybuje od 0,7 % u sýrů švýcarského typu až po 6 % u sýrů zrajících v solném nálevu, jako je domiati nebo feta. Sůl se přímo podílí na tvorbě chuti sýrů, je zdrojem sodíku ve výživě a ovlivňuje reologické a texturní vlastnosti, čímž se výrazně podílí na kvalitě výsledného produktu. Množství soli má hlavní vliv na složení sýra, růst mikroorganismů, enzymatickou aktivitu a biochemické změny jako je glykolýza, proteolýza a lipolýza (Farkye, 2004; Guinee, 2004).

Konzervační účinek soli spočívá především ve snížení vodní aktivity. Mnohdy však není vodní aktivita dostatečně nízká, aby bylo zabráněno růstu některých odolných bakterií, kvasinek a plísní, proto je vhodné zároveň snížit redoxní potenciál, pH a teplotu zrání (McSweeney, 2007). Obecně vyšší koncentrace soli má zpravidla inhibiční účinky na aktivitu startérových bakterií. Některé kmeny laktokoků jsou nízkým obsahem soli stimulovány, avšak hodnoty vyšší než 5 % působí inhibičně. Uvádí se, že *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* je vůči vyššímu obsahu soli odolnější, je schopen snášet koncentraci NaCl až 4 %, zatímco *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* je schopen se množit při koncentraci soli maximálně 2% (Fox et al., 2000; Kadlec et al., 2002). Non-startérové bakterie mléčného kvašení se vyznačují odolností vůči vyšším koncentracím NaCl. Odolnost je variabilní mezi jednotlivými kmeny, existují kmeny, které jsou schopny růstu v přítomnosti 6 – 8 % NaCl, ale existují i výjimky, které snášejí koncentrace soli do 10 % (Fox et al., 2000). Obsah soli významně ovlivňuje texturní vlastnosti, zejména pevnost sýrů. V případě, že by sýr neobsahoval žádnou sůl, byla by jeho matrice příliš slabá a měkká (Fox et al., 2004). Čím je obsah soli v sýru vyšší, tím větší lze předpokládat pevnost, ale zároveň nižší pružnost

(Mistry a Kasperson, 1998; Stampanoni a Noble, 1991). Vyšší pevnost má za následek další změny ve složení sýrové matrice, mezi něž se řadí zejména redukce vlhkosti (Fox et al., 2004).

Při výrobě sýrů je velmi důležitým parametrem pH mléka. Po přidavku startérových bakterií mléčného kvašení dochází k produkci kyseliny mléčné a snížení pH, které zajistí vyšší aktivitu syřidla a následnou tvorbu gelu. Za několik dní po výrobě se hodnota pH pomalu zvyšuje následkem fermentace citrátu, ztráty CO₂ a proteolýzy. Za hodnotu pH sýra je zodpovědné především množství kyseliny mléčné a komplex para-kasein fosforečnan vápenatý. pH velmi ovlivňuje texturu sýru a je odlišné pro každý druh. Měkké zrající sýry, kde řadíme například camembert, brie nebo sýry s modrou plísní jsou charakteristické pH nižším než 5,0. pH vyšší než 5 je charakteristické pro čedar nebo americké druhy sýrů jako je colby (pro čedar je charakteristické rozmezí pH 4,9 – 5,4; pro colby 5,0 – 5,14) (Watkinson et al., 2001; Weimer, 2007). Právě při poklesu pH z hodnoty 5,4 na 4,9 nastávají zásadní změny ve vlastnostech sýra. To má za následek několik faktorů, mezi něž patří rozpustnost koloidního fosforečnanu vápenatého, změny velikosti proteinových agregátů a změny vazeb v proteinové struktuře. Pravděpodobně největší vliv pH u tvrdých sýrů je na jeho křehkost, pokud pH poklesne na hodnotu nižší než 5,0. Společně s obsahem tuku v sušině pH ovlivňuje meltabilitu (roztékavost) u čedaru (Gunasekaran a Mehmet, 2003).

2.2 Vnější faktory

Významným faktorem ovlivňujícím rychlost zrání a kvalitu sýrů je teplota zrání. Sýry zrají ve zrácích sklepích a každý druh sýru se vyznačuje jinou zrácí teplotou a také dobou zrání. Pro sýry holandského typu je charakteristická délka zrání 6 – 8 týdnů (Fox et al., 2004). Například čedar vyžaduje teplotu 6 – 8 °C, pro goudu je charakteristická teplota 12 – 14 °C. Vývoj chuti a aroma může být řízeno změnami teplot v průběhu zrání, toho se však využívá zejména u sýrů švýcarského typu. Například u ementálu se v prvních dvou týdnech volí teplota 6 °C, v následujících 4 – 6 týdnech se teplota zvyšuje na 22 °C, která je důležitá pro rozvoj bakterií propionového kvašení a tvorbu ok, nakonec se teplota sníží na 4 °C a sýry dozrávají několik měsíců (Fox et al., 2004). Z důvodů výrobních nákladů se výrobci snaží dobu zrání zkracovat (Pachlová et al., 2012). Přestože z ekonomických důvodů dochází ke zkrácení doby zrání, je vhodné zajistit produkt o požadovaných organoleptických, příp. funkčních vlastnostech. Toho může být dosaženo zvýšením zrácích teplot, přidavkem exogenních enzymů či přidavkem doplňkových kultur nebo geneticky modifi-

kovaných mikroorganismů (Fox et al., 2004). V případě enzymových preparátů se zpravidla jedná o komerčně dodávané směsi enzymů, s cílem urychlit reakce probíhající v průběhu zrání. Přídavkem samostatných enzymů do mléka při výrobě sýrů by hrozila jejich ztráta v syrovátce, popřípadě urychlení pouze některých reakcí probíhajících při zrání a vznik nevyvážené chuti finálních výrobků. U mnoha druhů sýrů jsou pro urychlení zrání procesů využívány doplňkové kultury, například *Propionibacterium freudenreichii* při výrobě sýrů švýcarského typu nebo komplex grampozitivních bakterií tvořící povrchovou mikroflóru u sýrů s mytou kůrou. Doplňkové kultury začaly být využívány pro svůj pozitivní přínos i u sýrů, jejichž tradiční receptura neobsahovala přídavek doplňkových kultur. S cílem urychlení zrání procesů se začaly využívat termofilní laktobacily například při výrobě čedaru. Nejeftivnější a zároveň nejjednodušší způsob jak urychlit zrání proces je zvýšení zrání teplot. Vyšší teploty mají dopad na proteolýzu, lipolýzu a ovlivňují mikroflóru zrání sýrů (Weimer, 2007). Nevýhodou této metody může být současné urychlení nežádoucích reakcí, které jsou zodpovědné za vznik nežádoucích pachutí. V první fázi zrání dochází ke zvýšení počtu startérových bakterií mléčného kvašení, tvorbě kyseliny mléčné a okyselení. To je ovlivněno především rychlostí zchlazení syřeniny, neboť u většiny druhů sýrů je sýr tvarován ihned po dohřívání a k okyselení dochází ve formách, dále závisí také na velikosti sýrového bloku a také na teplotě prostředí. Další parametr, který musí být v průběhu zrání kontrolován, je relativní vlhkost vzduchu. Pro většinu sýrů se volí v rozmezí 80 – 90 %. Sýry typu gouda a čedar zrají v obalech, které chrání sýry před ztrátou vlhkosti a nežádoucí bakteriální mikroflórou (Fox et al., 2004). Volba obalového materiálu je důležitým parametrem pro zajištění kvality zrajícího sýru. Faktory, které je potřeba zohlednit při výběru obalového materiálu zahrnují především propustnost pro vodní páru, kyslík, oxid uhličitý, amoniak a světlo. V neposlední řadě je potřeba zohlednit také prostup látek z obalového materiálu do potraviny a naopak za daných podmínek skladování. Pro sýry s bakteriální mikroflórou na povrchu nebo plísňové sýry se volí obaly, které jsou propustné pro vlhkost a plyny. Naopak u tvrdých sýrů, kde je požadováno anaerobní prostředí během zrání, jsou preferovány spíše nepropustné obaly. Bezprostředně po výrobě jsou mnohdy tvrdé sýry baleny do velkých průmyslových obalů po 20 – 25 kg. V závislosti na požadovaném stupni prozrání (jemný, zralý, extrazralý) jsou tyto velké obaly rozbaleny a sýry jsou baleny do malých spotřebitelských balení. Tvrdé sýry jsou zpravidla baleny do polyetylenových či polyamidových vakuových obalů, které chrání sýry před růstem aerobních bakterií způsobujících kažení, či patogenů vyskytujících se v prostředí. Tradičním

obalem pro některé sýry (např. gouda) jsou parafinové vosky, popřípadě dnes velmi využívané plastické potahy (plastic coat) (McSweeney, 2007). Jedná se o kopolymerové disperze, které umožňují zrání sýrů bez fólií, minimalizují ztráty vysycháním a poskytují ochranu před nežádoucí mikroflórou (Anonym, 2017).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo popsat změny v průběhu zrání modelových vzorků sýrů, které se lišily obsahem tuku v sušině. Pro naplnění tohoto cíle byly stanoveny následující úkoly:

- vyrobit modelové šarže sýrů a založit tříměsíční skladovací experiment
- posoudit zastoupení vybraných mikroorganismů v modelových sýrech
- sledovat intenzitu zrání sýrů prostřednictvím koncentrace volných aminokyselin
- posoudit texturní vlastnosti modelových vzorků

4 METODIKA

4.1 Výroba modelových vzorků

Materiál a pomůcky

- syrové kravské mléko
- lyofilizovaná mezofilní kultura Flora Danica (Chr. Hansen, Dánsko)
- chlorid vápenatý 36 % (Milcom a. s., Česká republika)
- syřidlo Chymax M (Chr. Hansen, Dánsko)
- potravinářská sůl (Herold řeznické potřeby s. r. o., Česká republika)
- antimykotický přípravek Delvocid (O.K. Servis BioPro s. r. o., Česká republika)
- kyselina peroctová Divosan Activ (Diversey, Česká republika)
- laboratorní odstředivka FT15 (Armfield Inc., Velká Británie)
- výrobce sýrů (Driml, Česká republika)
- analytické váhy (A&D GH-200 EC, LABICOM s. r. o., Česká republika)
- vakuová balička Mini Jumbo (Henkelman, Nizozemsko)
- zrací komora (Candy, Itálie)
- germicidní UV lampa NBVE 110/55 (Ultra Viol, Polsko)
- termostat Microbiological IL53 (VWR, Evropská unie)
- dále odměrné válce, plastové zkumavky, automatická pipeta, kádinky, naběračka

Postup výroby

Pro účely diplomové práce byly vyrobeny modelové šarže sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou. Syrové mléko pro výrobu sýrů bylo nejdříve předehřáto na teplotu 37 °C v nádobě s mezipláštěm a následně odstředěno. Účinkem odstředivé síly byla získána smetana o obsahu tuku přibližně 35 % a odstředěné mléko o obsahu tuku přibližně 0,02 %. Obsah tuku obou produktů odstředování byl pro každou šarži stanoven. Následně byla provedena standardizace mléka navážením a smícháním odstředěného mléka a smetany dle vypočteného poměru s cílem dosáhnout ve finálním produktu 50, 45, 40, 35, 30, 20, 10 a 1 % tuku v sušině. Celkový objem mléka pro jednotlivé výroby sýrů činil 35 litrů. Dále bylo standardizované mléko pasterováno ve výrobě sýrů při teplotě 74 °C po dobu 30 s. Následně bylo mléko ochlazené na inokulační a sýřící teplotu 32±1 °C. Připravená sýrařská kultura byla aplikována přímo do mléka v množství 0,75±0,05 g (mezofilní koncentrovaná lyo-

filizovaná kultura Chr. Hansen) po dokonalém rozpuštění ve 30 ml pasterovaného mléka o teplotě 32 ± 1 °C. Pro podpoření sýření bylo do mléka přidáno 17,5 ml nasyceného roztoku CaCl_2 . Za současného míchání se nechala kultura 20 minut revitalizovat. Následoval přírůstek syřidla v množství 1 120 μl ředěný v desetinásobku pitné vody. Směs byla intenzivně promíchána během jedné minuty a poté uvedena do klidu a ponechána 30 minut. Po uplynulé době byla sýřenina prokrojena podélně i příčně pomocí sýrařské harfy a ponechána 10 minut v klidu, aby došlo k uvolnění syrovátky. Následně se sýřenina drobila pomocí sýrařské harfy po dobu 5 minut a dalších 30 minut se ručně míchala za současného vytužování sýrařských zrn. Posléze byla sýřenina dohřívána, kdy za stálého míchání byla odebrána část syrovátky o objemu 10,5 l a nahrazena vodou o objemu 7 l a teplotě 60 °C. Teplota systému tak vzrostla na 37 ± 1 °C. Dohřívání zrna trvalo do 5 minut. Dosoušení zrna trvalo 30 minut za stálého míchání v syrovátce při teplotě 37 ± 1 °C. Teplota byla regulována mezipláštěm výrobníku. Následně byla sýřenina slévána do sýrařské vany a předlisována po dobu 20 minut. Po uplynutí této doby byla sýřenina přemístěna do lisovacích forem a lisována pomocí pantografických lisů s rostoucím gradientem zátěže, přičemž lis vyvíjel přibližně 10-ti násobnou sílu oproti použité zátěži. Prvních 15 minut byly sýry lisovány vahou 0,5 kg působící na 2 bloky lisovaných sýrů. Dále byly již lisovány vždy 3 bloky sýrů ve stohu: 30 minut pomocí zátěže 3kg a dalších 30 minut zátěží 4,5 kg. Poté následovalo otočení bloků sýrů pro zabezpečení rovnoměrného lisování. Po otočení byly sýry 30 minut lisovány zátěží 1,5 kg a dalších 30 minut vahou 4,5 kg. Po lisování byly sýry umístěny do zracích komor k prokysání (přes noc). Prokysané sýry byly následně soleny. Solení probíhalo v solném roztoku o koncentraci 20 % (w/v) a teplotě 8 ± 1 °C po dobu tří hodin. Solná lázeň byla připravena ze 4,5 l pitné vody a 1,125 kg soli. V jedné solné lázni byly současně soleny tři bloky sýrů. Poté byly sýry ošetřeny protiplísňovou suspenzí Delvocid, kde byly ponořeny na dobu 4 sekund tak, aby došlo ke smočení celého povrchu. Po oschnutí byly sýry baleny do smrštitelné fólie. Označené bloky sýrů byly uchovávány ve zrací komoře při teplotě 10 ± 2 °C po potřebnou dobu zrání.

Odběry modelových vzorků pro analýzy byly provedeny 1., 14., 28., 56. a 84. den zrání.

4.2 Základní chemická analýza

4.2.1 Stanovení obsahu sušiny

Sušina byla stanovena dle normy ČSN EN ISO 5534. Do předem vysušených misek s křemičitým pískem byly naváženy 3 g vzorku sýra, které byly s pískem promíchány. Připravený vzorek byl umístěn do sušárny (Venticell, Brněnská Medicinská Technika a. s., ČR) a sušen při teplotě 105 ± 1 °C po dobu 5 hodin. Následně byly vzorky umístěny do exsikátoru a po vychladnutí zváženy. Pro každý vzorek byla provedena tři opakování.

Obsah sušiny byl vypočten pomocí vzorce:

$$\text{obsah sušiny [\% hmotnostní]} = \frac{(m_3 - m_1)}{m_2} \cdot 100$$

m_1 – hmotnost misky s pískem [g]

m_2 – hmotnost vzorku před sušením [g]

m_3 – hmotnost misky s pískem a vzorkem po vysušení [g]

4.2.2 Stanovení obsahu tuku

Na skleněnou lodičku zasazenou do butyrometru bylo naváženo 3,00 g vzorku sýru a zasunuto do hrdla tukoměru. Horním otvorem butyrometru bylo vpuštěno asi 14 ml kyseliny sírové. Poté byl butyrometr zazátkován a vložen do vodní lázně o teplotě 65 °C a opatrně promícháván. Po rozpuštění sýru byl přidán amylalkohol v množství 1 ml a zředěná kyselina sírová (tak aby sahala do 2/3 stupnice butyrometru). Pak byl butyrometr zazátkován, několikrát obrácen a vytemperován v lázni o teplotě 65 °C. Po vytemperování následovalo odstředování po dobu 5 minut. Po odstředění se ponechal butyrometr 5 minut ve vodní lázni o teplotě 65 °C a na stupnici butyrometru se přímo odečetly hmotnostní procenta tuku. Procentuální podíl tuku z celé sušiny (tuk v sušině) byl vyjádřen pomocí výpočtu:

$$x = \frac{100 \cdot t}{s}$$

s – sušina v %

t – tučnost v %

x – tuk v sušině v %

4.2.3 Stanovení pH

Hodnota pH byla stanovena pomocí vpichového pH metru (EUTECH INSTRUMENTS The Netherlands). Pro získání přesnějších výsledků byla stanovena průměrná hodnota pH ze tří měření.

4.2.4 Stanovení obsahu soli

Obsah soli byl stanoven potenciometricky dle ČSN EN ISO 5943. Před stanovením bylo potřeba provést standardizaci roztoku dusičnanu stříbrného. Na analytických vahách (A&D GH-200 EC) byl navážen 1 g homogenizovaného vzorku sýra. Vzorek byl následně rozmělněn v třecí misce s 5 – 10 ml destilované vody o teplotě 60 °C. Ke vzorku bylo přidáno 2 ml HNO₃ ředěné 1:4. Poté byl vzorek doplněn destilovanou vodou na objem 120 – 130 ml tak, aby bylo možné ponořit elektrody a teploměr. Kádinka byla umístěna na magnetickou míchačku a titrována roztokem dusičnanu stříbrného o koncentraci $c = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Byla zaznamenána hodnota napětí při 0 ml přídavku dusičnanu stříbrného a následně vždy po 0,5 ml přídavku dusičnanu stříbrného. Titrace byla ukončena po dosažení napětí 400 mV. Objem byl určen výpočtem z druhé derivace. Pro každý vzorek byla provedena tři opakování.

4.3 Mikrobiologický rozbor

Mikrobiologický rozbor byl proveden ve spolupráci s Ústavem inženýrství ochrany životního prostředí, Fakulty technologické. Pro mikrobiologický rozbor bylo sterilně odebráno 5 g vzorku sýru, přidáno devítinásobné množství fyziologického roztoku a homogenizováno. Následně byla připravena desetinásobná ředění a nanášena na povrch půd v množství 0,2 ml metodou roztěru, nebo 1 ml v případě použití metody zalití kultivačním médiem. Stejným způsobem byl proveden i mikrobiologický rozbor syrového a pasterovaného mléka. Objem 1 ml syrového a pasterovaného mléka bylo sterilně odebráno a přidáno devítinásobné množství fyziologického roztoku. Následně byla připravena desetinásobná ředění a nanášena na povrch půd v množství 0,2 ml metodou roztěru, nebo 1 ml v případě použití metody zalití kultivačním médiem. Byly stanoveny následující skupiny mikroorganismů: CPM (celkový počet mikroorganismů), enterobakterie, enterokoky, kvasinky a plísně, mezofilní laktokoky a streptokoky a bakterie mléčného kvašení.

Počet mikroorganismů byl vyjádřen jako KTJ (kolonie tvořící jednotku), z angl. CFU (colony forming unit) a je vztažen na jednotku objemu nebo hmotnosti, podle povahy vzorku, tedy KTJ/ml nebo KTJ/g.

Počet mikroorganismů byl vypočten dle vzorce:

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

$\sum C$ – součet kolonií ze všech ploten vybraných pro výpočet

V – objem inokula v ml

n_1 – počet ploten vybraných k výpočtu z prvního zvoleného ředění

n_2 – počet ploten vybraných k výpočtu z druhého zvoleného ředění

d – faktor ředění odpovídající prvnímu pro výpočet zvolenému ředění

4.3.1 Stanovení celkového počtu mikroorganismů

Celkový počet mikroorganismů byl stanoven dle normy ČSN EN ISO 4833. Objem 1 ml inokula byl přelit sterilním kultivačním médiem PCA (Plate Count Agar). Kultivace probíhala při 30 °C po dobu 72 hodin za aerobních podmínek.

4.3.2 Stanovení enterobakterií

Enterobakterie byly stanoveny dle ČSN EN ISO 4832. Pro kultivaci byly použity dvě kultivační média, a sice Endův agar a VČŽL (angl. VRBL, agar s laktózou, krystalovou violetí, neutrální červení a žlučovými solemi). V případě Endova agaru bylo nanášeno 0,2 ml inokula metodou roztěru, v případě VČŽL byl 1 ml inokula přelit kultivačním médiem. Kultivace probíhala při teplotě 30°C po dobu 48 hodin za aerobních podmínek.

4.3.3 Stanovení enterokoků

Enterokoky byly stanoveny dle ČSN ISO 7899-2. Na povrch kultivační půdy Slanetz-Bartley bylo nanášeno 0,2 ml inokula metodou roztěru. Kultivace probíhala při teplotě 37 °C po dobu 24 - 48 hodin za aerobních podmínek.

4.3.4 Stanovení bakterií mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení byly stanoveny dle ČSN ISO 15214. Na povrch kultivační půdy MRS (de Mann Rogosa a Sharpe agar) bylo nanášeno 0,2 ml inokula metodou roztěru. Kultivace probíhala při 30 °C po dobu 72 hodin za anaerobních podmínek.

4.3.5 Stanovení mezofilních laktokoků a streptokoků

Mezofilní laktokoky a streptokoky byly stanoveny dle ČSN ISO 15214. Na povrch kultivačního média M17 bylo nanášeno 0,2 ml inokula metodou roztěru. Kultivace probíhala při teplotě 30 °C po dobu 72 hodin za anaerobních podmínek.

4.3.6 Stanovení kvasinek a plísní

Kvasinky a plísně byly stanoveny dle ČSN ISO 21527-1. Na povrch kultivační půdy CHYGA (agar s chloramfenikolem, kvasničním extraktem a glukózou) bylo nanášeno 0,1 ml inokula metodou roztěru. Kultivace probíhala při 25 °C po dobu 5 dní za aerobních podmínek.

4.4 Stanovení obsahu volných aminokyselin

Pro stanovení volných aminokyselin byl vzorek nejdříve nastrouhán a lyofilizován (lyofilizátor ALPHA 1-4 LSC, CHRIST, LABICOM s. r. o., ČR). Před samotným stanovením byla provedena třístupňová extrakce ze sušené hmoty sýra pomocí lithno-citrátového pufru. Do zkumavky byl navážen 1 g lyofilizovaného vzorku a přidán lithno-citrátový pufr v množství 10 ml. Vzorek byl nejprve dokonale promíchán na vortexu a následných 30 minut na třepačce (LT2). Následovalo odstředění při 6000 ot./min po dobu 10 min (odstředivka EBA 21, Hettich ZENTRIFUGEN, Germany, Tuttlingen). Supernatant byl přelit do odměrné baňky o objemu 25 ml, přidán lithno-citrátový pufr v množství 7 ml a celý postup byl opakován. Postup byl opakován ještě jednou po opětovném přidavku 7 ml lithno-citrátového pufru. Odměrná baňka byla doplněna po rysku lithno-citrátovým pufrem. Vzorky byly napipetovány do eppendorfových zkumavek a následovalo odstředění při 15000 ot./min po dobu 45 minut (odstředivka MIKRO 200R, Hettich ZENTRIFUGEN, Germany, Tuttlingen). Poté byl vzorek přefiltrován přes stříkačkový filtr o velikosti pórů 0,45 µm. Připravený vzorek byl podroben analýze na automatickém analyzátoru aminokyselin AAA 400 (Ingot, Praha). Jednalo se o iontově výměnnou chromatografii s postkolo-

novou ninhydrinovou derivatizací. U každého vzorku byly provedeny tři extrakce, přičemž každý extrakt byl dvakrát analyzován.

Použité chemikálie:

Chemikálie pro přípravu pufrů

- kyselina citronová, p. a. LACHNER
- citronan lithný, p. a. ZMBD Chemik s. r. o.
- chlorid lithný, p. a. ZMBD Chemik s. r. o.
- hydroxid lithný, p. a. ZMBD Chemik s. r. o.

Chemikálie pro přípravu ninhydrinu

- ninhydrin, pro AAA 400, ZMBD Chemik s. r. o.
- methylcellosolv pro AAA 400, ZMBD Chemik s. r. o.
- acetátový pufr pro AAA 400, ZMBD Chemik s. r. o.

4.5 Texturní profilová analýza

U modelových vzorků sýrů byla provedena analýza texturních vlastností pomocí přístroje TA.XT Plus (Stable Micro Systems Ltd., Godalming, Velká Británie) a sondy o průměru 100 mm. Ze středu vzorku byl vykrojen válec o průměru 35 mm a výšce 20 mm. Byl proveden kompresní test ve dvou cyklech se stlačením vzorku o 25 % jeho původní výšky rychlostí 2 mm/s. Ze zátěžové křivky byla hodnocena především tvrdost jako maximální síla v N dosažená během prvního stlačení. Dále byla posouzena kohezivnost vzorku jako podíl ploch píků druhého a prvního kompresního cyklu. V neposlední řadě byla vyhodnocena lepivost jako práce potřebná k odtržení sondy od povrchu vzorku. U každého vzorku byla provedena čtyři opakování.

4.6 Stanovení roztékavosti

Roztékavost byla stanovena pomocí Schreiberova testu ve 28. a 56. dni zrání. Vzorek o průměru 35 mm a výšce 20 mm byl na skleněné desce vložen do sušárny a zahříván při teplotě 230 °C po dobu 5 minut. Po uplynulé době byly skleněné desky se vzorky vyjmuty ze sušárny a zchlazeny při pokojové teplotě. Následně byly pořízeny fotografie vzorků

sýrů a roztékavost sýrů byla stanovena pomocí počítačového programu Fiji. Roztékavost sýru byla vypočtena dle vzorce (Póltorak et al., 2015):

$$CM = \left(\frac{SA_f}{SA_i} - 1 \right) \cdot 100\%$$

CM – roztékavost sýra

SA_f – vzorek po zahřátí

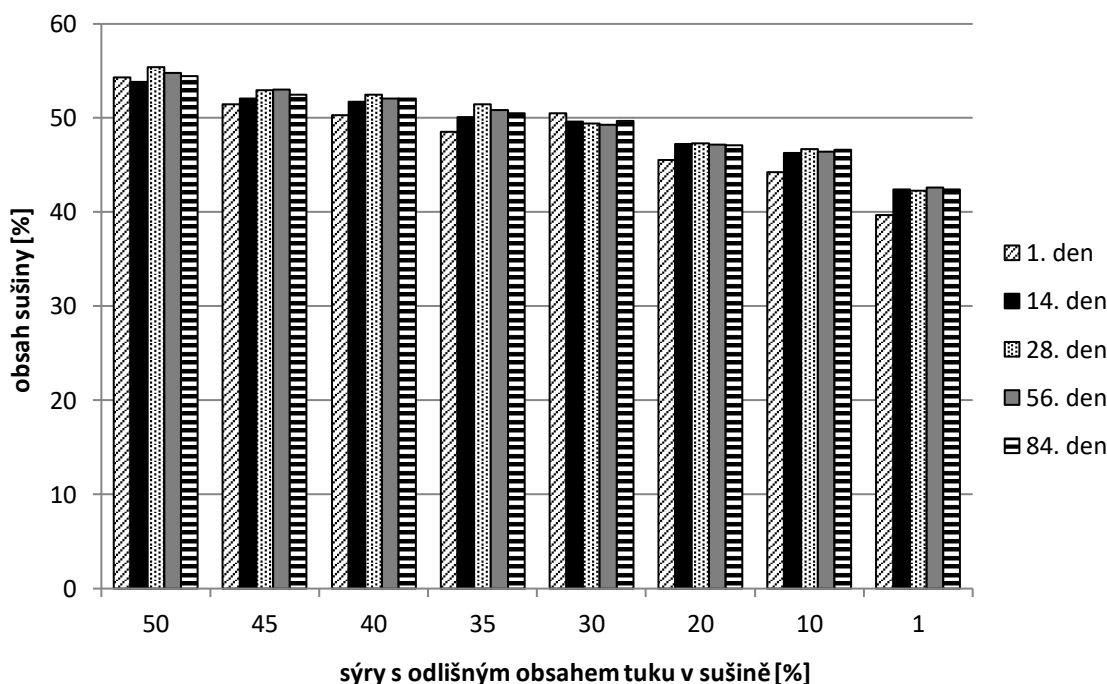
SA_i – vzorek před zahřátím

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Základní chemická analýza

5.1.1 Obsah sušiny

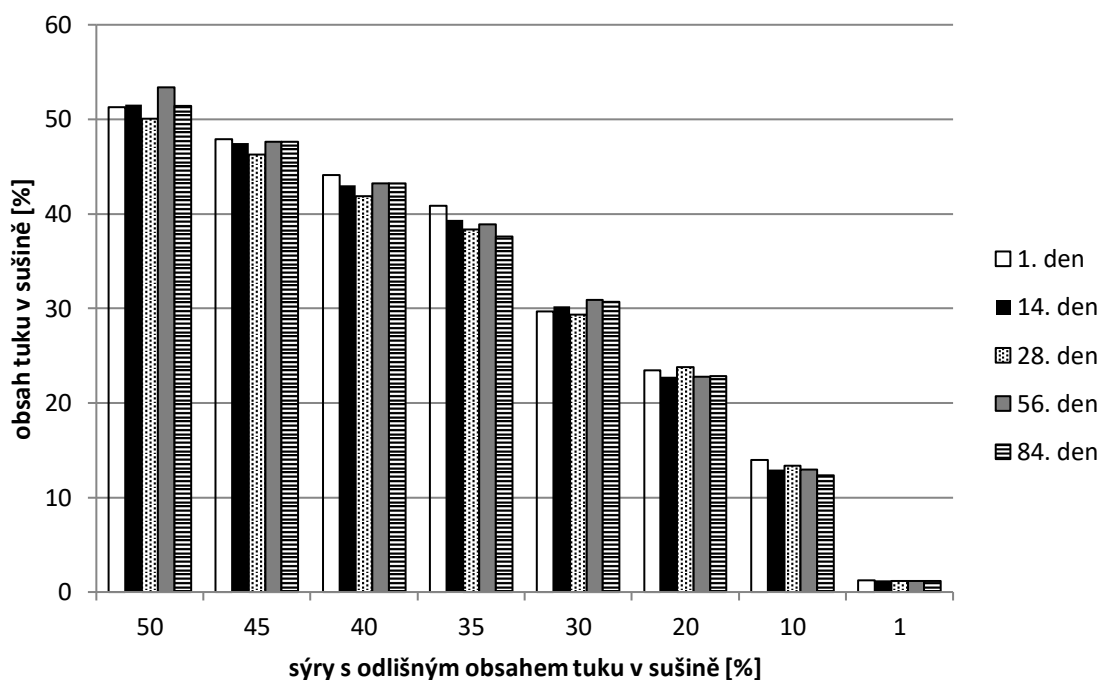
V průběhu zrání byl v modelových vzorcích sýrů stanovován obsah sušiny, výsledky jsou znázorněny na Obrázku 3. Z grafu je zřejmé, že do 28. dne zrání obsah sušiny mírně narůstal. Tento trend nebyl zaznamenán u sýru s obsahem tuku v sušině 30 %, kde bylo dosaženo nejvyššího obsahu sušiny již v prvním odběrovém dni, poté obsah sušiny mírně klesal. U sýrů s obsahem tuku v sušině 20, 10 a 1 % nedocházelo k výrazným změnám obsahu sušiny v průběhu zrání. Zjištěné výsledky však poukazují na závislost obsahu sušiny na obsahu tuku v sušině. Čím nižší byl obsah tuku v sušině, tím nižší byl stanoven obsah sušiny. Vzorky sýrů s nejvyšším obsahem tuku v sušině dosahovaly obsahu sušiny v průměru až $54,63 \pm 0,66$ %, zatímco u vzorků s nejnižším obsahem tuku dosahoval obsah sušiny v průměru $42,41 \pm 0,13$ %.



Obr. 3 Obsah sušiny v průběhu zrání modelových vzorků sýrů s odlišným obsahem tuku v sušině

5.1.2 Obsah tuku

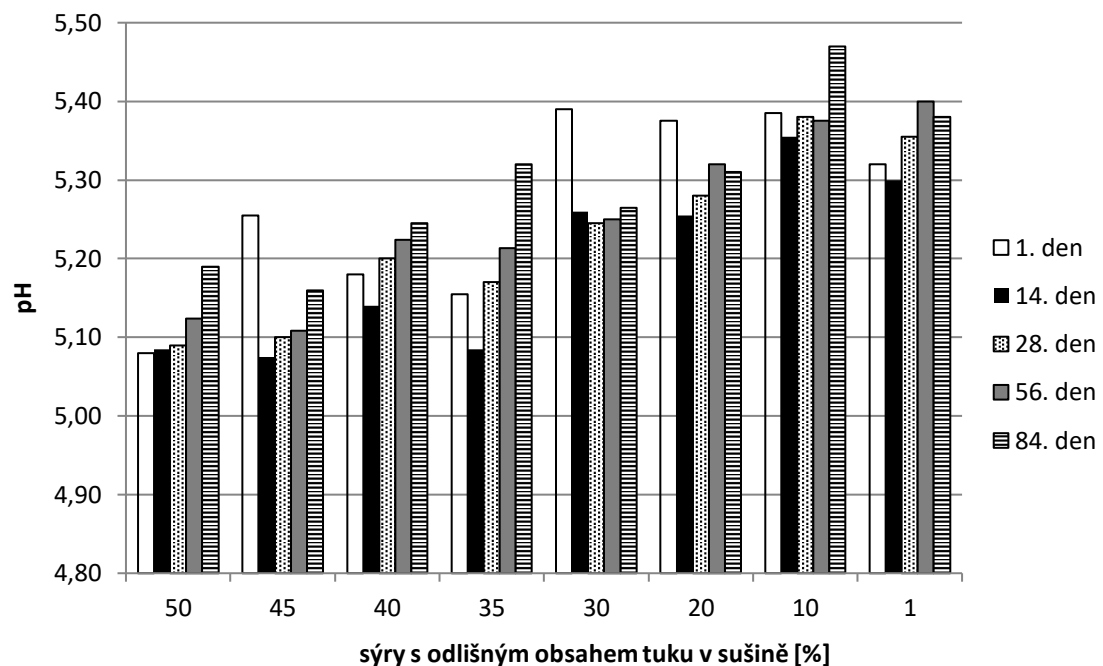
V průběhu zrání modelových vzorků sýrů byla prováděna analýza obsahu tuku, výsledky jsou znázorněny na Obrázku 4. Z grafu je patrné, že v průběhu tříměsíčního zrání nedocházelo k výrazným změnám v obsahu tuku v sušině modelových vzorků sýrů. Výkyv v obsahu tuku byl pozorován pouze u vzorku o nejvyšším obsahu tuku v sušině (50 %), kdy obsah tuku dosahoval v 56. dni hodnoty 53,4 %. Mírné rozdíly v tučnosti byly zaznamenány také u vzorků o obsahu tuku v sušině 40 a 35 %, kde rozdíly mírně přesahují rozdíl 2 %. U ostatních vzorků byly zaznamenány rozdíly v obsahu tuku v průběhu zrání do 1,5 %. Přestože v některých případech přesahuje skutečný obsah tuku v sušině zamýšlené hodnoty modelových šarží, lze obecně říci, že standardizace tučnosti mléka během výroby byla zvolena vhodným způsobem k dosažení požadovaných rozdílů mezi jednotlivými modelovými šaržemi. Během zpracování sýřeniny dochází ke ztrátám mléčného tuku do syrovátky. Ztráta mléčného tuku je mimo jiné závislá na velikosti tukových kuliček a jejich zachycení v proteinové síti. Predikce velikosti tukových kuliček a jejich následná ztráta v syrovátce lze velmi těžko posoudit (Ong, Degastine, Auty et al., 2011).



Obr. 4 Obsah tuku v sušině v průběhu zrání modelových vzorků sýrů s odlišným obsahem tuku v sušině

5.1.3 Stanovení pH

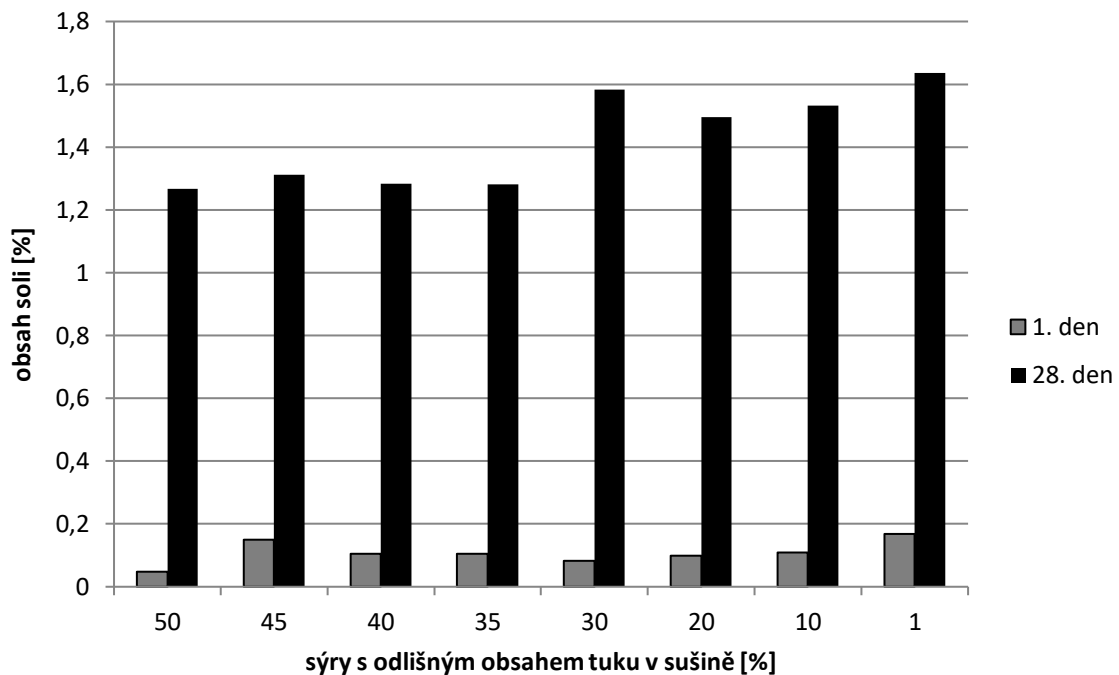
V průběhu zrání 84 dnů byl sledován vývoj pH, výsledky zachycuje Obrázek 5. Z grafu je patrné, že nejnižších hodnot pH bylo dosaženo ve 14. dni, kdy byla průměrná hodnota pH $5,10 \pm 0,03$ v případě vzorků sýrů o obsahu tuku v sušině 50, 45, 40 a 35 %. Vzorky sýrů o obsahu tuku v sušině 30 a 20 % dosáhly ve 14. dni shodné hodnoty pH 5,26, vzorek o obsahu tuku v sušině 1% dosáhl pH hodnoty 5,30. Jednoznačně nejvyšší hodnoty pH dosáhl ve 14. dni vzorek o obsahu tuku v sušině 10 % (5,36). Důvodem nízkých hodnot pH v počátku zrání je fermentace laktózy a produkce kyseliny mléčné startérovými bakteriemi mléčného kvašení (Fox et al., 2000). Od 28. dne byl zaznamenán nárůst hodnot pH, výjimku tvořil vzorek o obsahu tuku v sušině 30 %, kde nebyl růst pH hodnot znatelný. Nárůst hodnot pH v průběhu zrání je přisuzován fermentaci citrátu, ztrátě CO_2 a proteolýze, kdy dochází k tvorbě látek zásadité povahy (Weimer, 2007). Z Obrázku 5 je dále patrné, že pH modelových vzorků sýrů vzrůstalo v závislosti na klesajícím obsahu tuku v sušině jednotlivých sýrů. Ve 14. odběrovém dni byly hodnoty pH u vzorků o obsahu tuku v sušině 50 a 45 % téměř shodné (5,09 a 5,08), u vzorku o obsahu tuku v sušině 40 % byla pozorována již vyšší hodnota pH (5,14). Nižší pH bylo zaznamenáno u vzorku o obsahu tuku v sušině 35 % (5,09), avšak u dalších vzorků (30, 20 a 10 % tuku v sušině) byly pozorovány vyšší hodnoty pH (5,26; 5,26 a 5,36). U vzorku o obsahu tuku v sušině 1 % byl ve 14. dni patrný pokles pH na hodnotu 5,30, v porovnání se vzorkem o obsahu tuku v sušině 10 %. Rostoucí trend pH hodnot se snižujícím se obsahem tuku pozorovali také Fenelon a Guinee (2000) a uvádějí, že zvyšování pH hodnot u sýrů se sníženým obsahem tuku může být přičítáno nízkému obsahu vlhkosti v tukuprosté sušině a tudíž i nižšímu poměru laktátu k proteinu.



Obr. 5 Vývoj pH hodnot v průběhu zrání modelových vzorků sýrů s odlišným obsahem tuku v sušině

5.1.4 Obsah soli

V průběhu zrání byl v modelových vzorcích sýrů analyzován obsah soli, výsledky jsou vyneseny na Obrázku 6. Obsah soli se v průběhu zrání v bloku sýra vyrovnává prostřednictvím difúze, což u sýrů holandského typu (eidamské cihly) může trvat přibližně 4 týdny (Pachlová et al., 2011) a z tohoto důvodu jsou prezentována pouze data z 1. a 28. dne zrání. V 1. odběrovém dni byl zaznamenán u všech modelových vzorků sýrů obsah soli v průměru $0,11 \pm 0,04$ %. Ve 28. dni zrání byl stanoven průměrný obsah soli $1,29 \pm 0,02$ v případě vzorků o obsahu tuku v sušině 50, 45, 40 a 35 %. U vzorků o nižším obsahu tuku v sušině, tedy 30, 20, 10 a 1 % byl stanoven obsah soli vyšší. Vzorek o obsahu tuku v sušině 30 % dosahoval 1,58 % soli, u vzorků o obsahu tuku v sušině 20 a 10 % byl pozorován obsah soli mírně nižší ($1,51 \pm 0,03$). Nejvyššího obsahu soli dosáhl vzorek o nejnižším obsahu tuku v sušině (1 % tuku v sušině), a sice hodnoty 1,64 %.

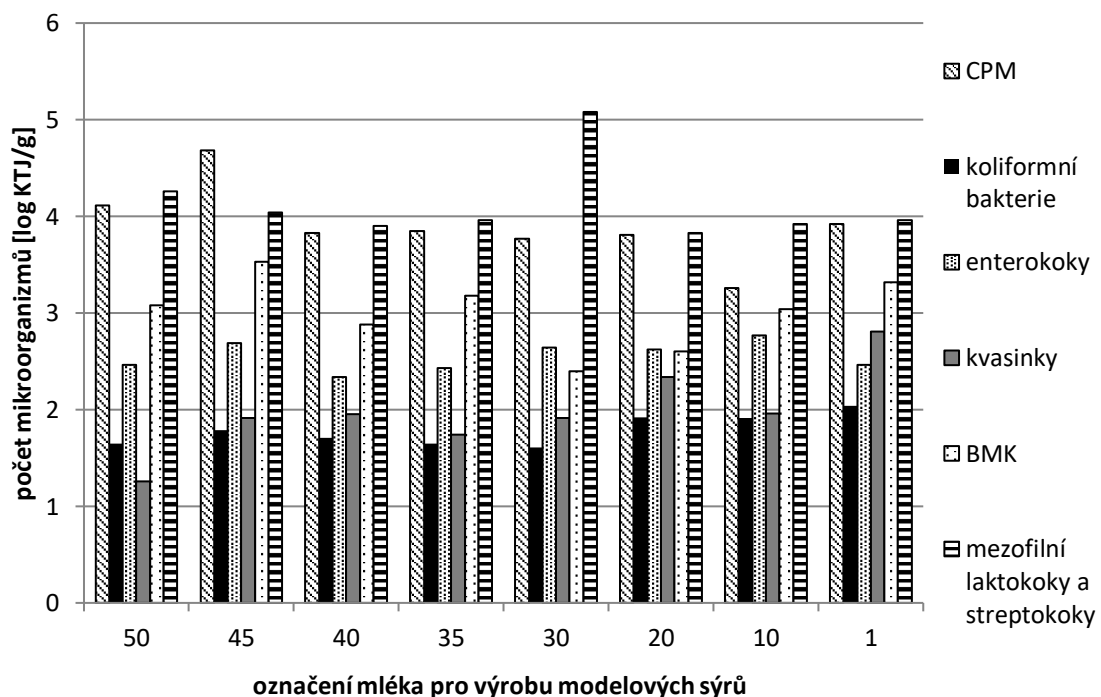


Obr. 6 Obsah soli modelových vzorků sýrů s odlišným obsahem tuku v sušině 1. a 28. den od výroby

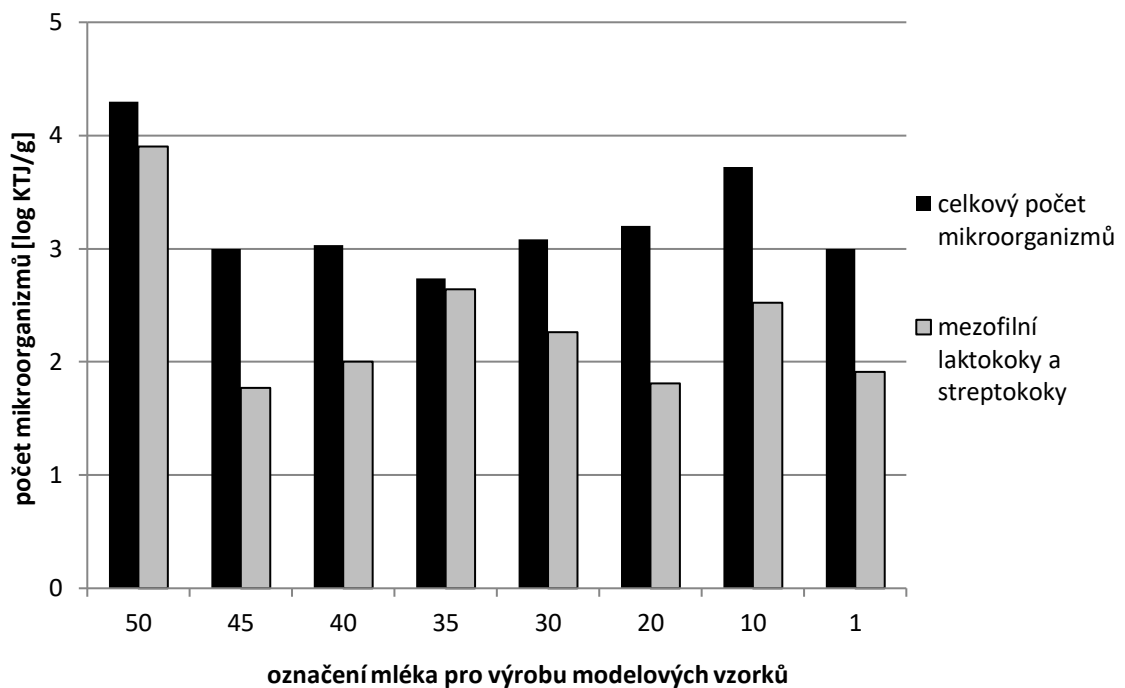
5.2 Mikrobiologický rozbor

Z důvodu požadované vysoké mikrobiologické kvality mléka určeného pro výrobu sýrů bylo mléko podrobeno mikrobiologickému rozboru před tepelným ošetřením a po tepelném ošetření. Stejně jako u sýrů byly stanovovány následující skupiny mikroorganismů: celkový počet mikroorganismů, koliformní bakterie, enterokoky, kvasinky, plísně, bakterie mléčného kvašení a mezofilní laktokoky a streptokoky. Počty mikroorganismů před tepelným ošetřením jsou vyneseny na Obrázku 7. Celkový počet mikroorganismů dosahoval v tepelně neošetřeném mléce hodnot 3,80 log KTJ/ml, u mléka pro výrobu sýrů s obsahem tuku v sušině 10 % byl zaznamenán počet nižší, a sice 3,30 log KTJ/ml. Podobný trend byl zaznamenán u počtu mezofilních laktokoků a streptokoků, kde počty dosahovaly téměř 4,00 log KTJ/ml, u mléka pro výrobu sýrů s obsahem tuku v sušině 50 a 45 % počty mezofilních laktokoků a streptokoků mírně přesahovaly hranici 4,00 log KTJ/ml. Počty enterokoků se v tepelně neošetřeném mléce pohybovaly v rozmezí 2,30 až 2,80 log KTJ/ml. Počty kvasinek mírně kolísaly, u mléka pro výrobu sýrů s nejvyšším obsahem tuku byl zaznamenán počet 1,26 log KTJ/ml, u mléka pro výrobu sýrů s obsahem tuku v sušině 45 až

10 % se pohybovaly okolo 2,00 log KTJ/ml a u mléka pro výrobu sýrů s nejnižším obsahem tuku počty kvasinek dosahovaly téměř 3,00 log KTJ/ml. Plísně u tepelně neošetřeného mléka nebyly detekovány. Počty koliformních bakterií byly pod hranicí 2,00 log KTJ/ml. Koliformní bakterie představují riziko při výrobě sýrů, neboť jejich počty se mohou již během prvních fází výroby rapidně zvýšit a zapříčinit vadu sýrů nazývanou časné duření. Donnelly (2014) uvádí, že i velmi nízké počty (<10 KTJ/ml) mohou být kritickou hranicí pro vznik této vady. Po pasteraci však koliformní bakterie nebyly detekovány, proto z tohoto hlediska nemohla být ovlivněna jakost výsledného produktu. Počty mikroorganismů po tepelném ošetření vyjadřuje Obrázek 8. Jednalo se o non-startérovou mikroflóru, která se běžně vyskytuje v syrovém mléce a přežívá pasterační teploty. Zdrojem těchto mikroorganismů bývá zpravidla povrch struků dojnice, výjimečně i siláž (Montel et al., 2014). Zdrojem kontaminace může být také prostředí mlékárny a výrobní zařízení. Přestože celkový počet mikroorganismů dosahoval u mléka pro výrobu sýrů s obsahem tuku v sušině 50 % stále hodnoty vyšší než 4,00 log KTJ/ml, u dalších lze pozorovat snížení počtů na hodnoty okolo 3,00 log KTJ/ml. Stejně tak lze pozorovat snížení počtů mezofilních laktokoků a streptokoků po tepelném záhřevu. Počty enterokoků a kvasinek nebyly významné a nemohly ovlivnit procesy během výroby sýrů a jejich následného zrání.

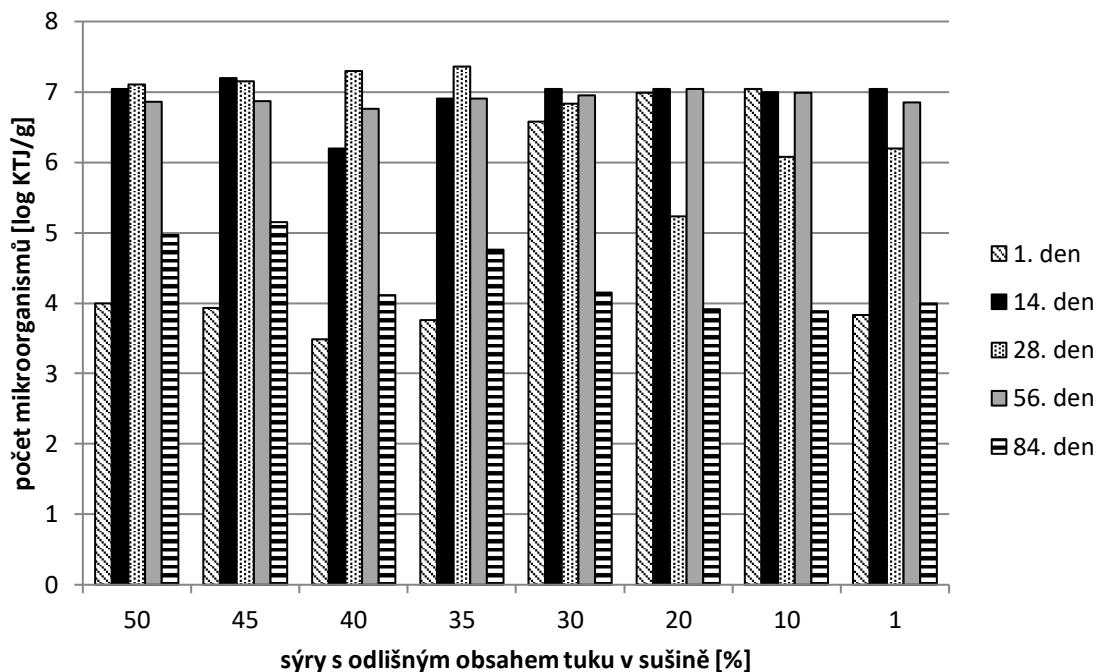


Obr. 7 Počty mikroorganismů v mléce pro výrobu sýrů s odlišným obsahem tuku v sušině před tepelným ošetřením



Obr. 8 Počty bakterií mléčného kvašení v mléce pro výrobu sýrů s odlišným obsahem tuku v sušině po tepelném ošetření

V průběhu zrání 84 dnů byly odebírány vzorky modelových sýrů pro mikrobiologický rozbor. Celkový počet mikroorganismů je vyneseno na Obrázku 9. U sýrů s obsahem tuku v sušině 50 a 45 % bylo dosaženo nejvyšších počtů mikroorganismů 14. a 28. den zrání, poté došlo ke snížení počtů. U vzorků s obsahem tuku v sušině 40 a 35 % bylo dosaženo nejvyššího počtu mikroorganismů 28. den zrání, ve 14. a 56. dni zrání se počty výrazně nelišily. U vzorků s obsahem tuku v sušině 30, 20 a 10 % byl pozorován vyšší nárůst počtů mikroorganismů již v 1. odběrovém dni, ve 14. a 56. dni se počty mikroorganismů výrazně nelišily, výjimku tvoří pouze 28. den zrání. Podobný trend byl pozorován u vzorku s obsahem tuku v sušině 1 %, s tím rozdílem, že počty mikroorganismů byly v 1. odběrovém dni výrazně nižší. U všech vzorků byl v 84. dni zrání zaznamenán rapidní pokles počtů mikroorganismů.

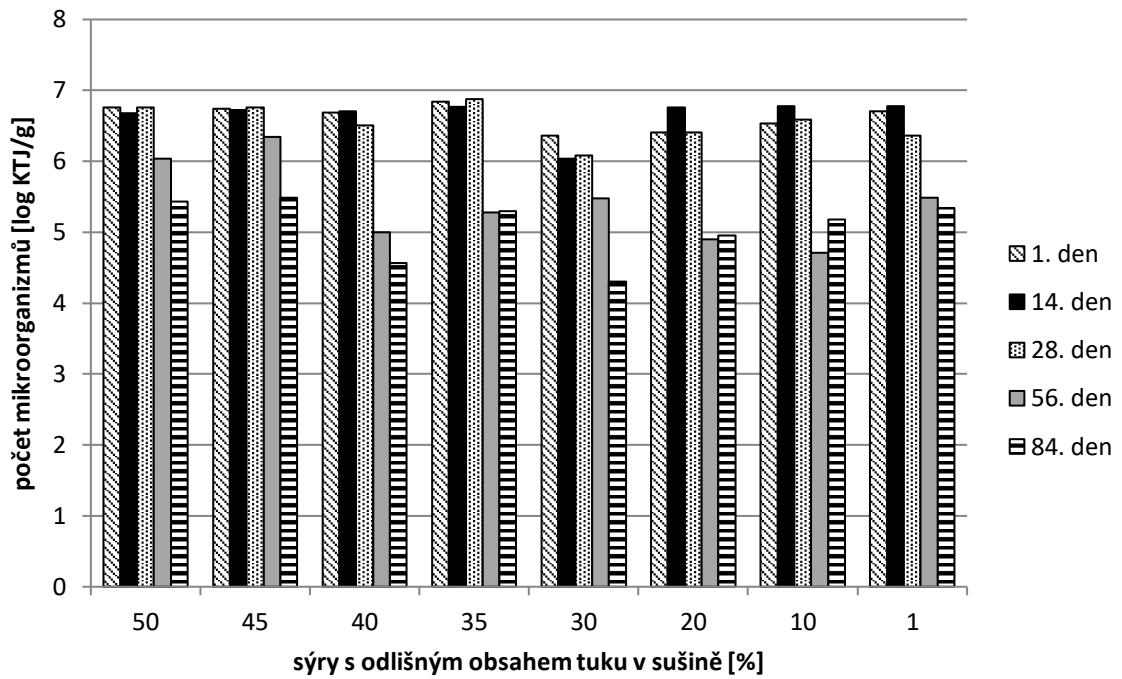


Obr. 9 Celkový počet mikroorganismů v průběhu zrání sýrů s odlišným obsahem tuku v sušině

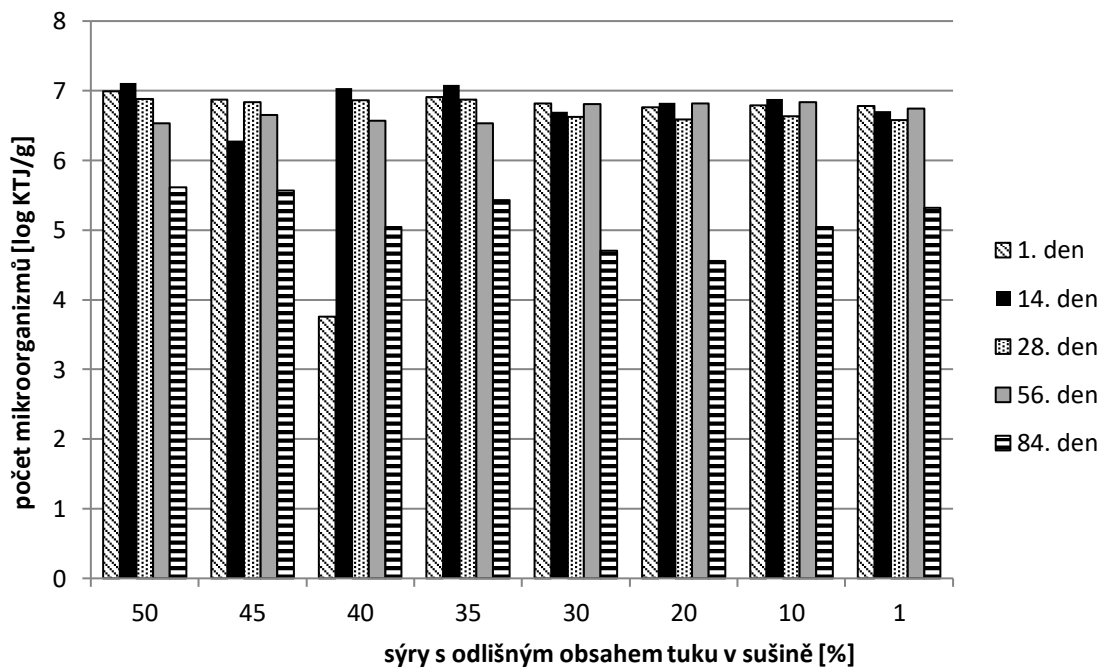
Počet bakterií mléčného kvašení znázorňuje Obrázek 10. Z grafu je patrné, že nejvyšších počtů bylo dosaženo v prvním měsíci zrání, kdy počty dosahovaly až 6,80 log KTJ/g. Od 56. dne zrání počty bakterií mléčného kvašení klesaly. Fox et al. (2000) uvádí, že počty startérových bakterií mléčného kvašení jsou nejvyšší na počátku zrání, přičemž v závislosti na množství aplikovaného inokula mohou dosahovat den po výrobě až 9,00 log KTJ/g. V době zrání většina startérových bakterií odumírá a nastává lýza jejich buněk. Z buněk se uvolňují intracelulární enzymy (např. peptidázy), které společně s chymozinem hydrolyzují kasein na peptidy a aminokyseliny. Tyto složky se pak významně podílejí na výsledné aroma a chuti sýrů. Lze tedy říci, že při zrání sýrů se uplatňují spíše enzymy uvolněné z buněk startérových bakterií, než živé buňky (Fox et al., 2000). V případě vzorků sýrů s obsahem tuku v sušině 35, 20 a 1 % se počty bakterií mléčného kvašení mezi 56. a 84. dnem zrání výrazně nelišily. Naopak v případě vzorku s 10% obsahem tuku v sušině byl zaznamenán vyšší počet bakterií mléčného kvašení v 84. dni v porovnání s 56. dnem zrání. Z Obrázku 10 je zřejmé, že doba zrání ovlivňuje životaschopnost startérových bakterií, vliv obsahu tuku na životaschopnost startérových bakterií není patrný na hladině významnosti 0,05. Nepatrný vliv obsahu tuku na životaschopnost startérových bakterií mléčného kvaše-

ní byl pozorován také v publikaci McCarthy et al. (2015). Autorka dále uvádí, že obsah tuku neměl vliv ani na životaschopnost non-startérové mikroflóry. McMahon (2010) uvádí, že není prokázán přímý vliv obsahu tuku na růst mikrobiální populace sýrů, ale byly zaznamenány značné rozdíly v průběhu zrání mezi sýry s nízkým a s vysokým obsahem tuku. U čedaru s vysokým obsahem tuku bylo pozorováno odumírání populace startérových bakterií během prvních měsíců zrání, zatímco populace non-startérových bakterií nabývá nejvyšších počtů až přibližně po čtyřech měsících zrání. Naopak u čedaru s nízkým obsahem tuku byly zaznamenány přetrvávající vysoké počty životaschopných startérových bakterií a rapidní nárůst non-startérové mikroflóry již během prvních dvou měsíců. Laloy et al. (1996) se zabýval aktivitou startérových bakterií u čedaru s vysokým obsahem tuku, s polovičním obsahem tuku a s nízkým obsahem tuku a uvádí, že obsah tuku ovlivňuje mikrobiální populaci v sýru. Byla pozorována rozdílná množství životaschopných startérových bakterií před lisováním sýrů s odlišným obsahem tuku, přičemž výsledky ukazují, že počty startérových bakterií byly významně vyšší u sýrů s vysokým obsahem tuku, kde dosahovaly počtů 7,00 log KTJ/g, v porovnání se sýry s nízkým obsahem tuku, kde počty dosahovaly pouze 6,00 log KTJ/g (Laloy et al., 1996).

Obrázek 11 znázorňuje počty mezofilních laktokoků a streptokoků. Z grafů je zřejmé, že počty mezofilních laktokoků a streptokoků se v průběhu zrání výrazně neměnily a pohybovaly se v rozmezí 6,20 až 7,10 log KTJ/g. Pravděpodobně se jednalo o non-startérovou mikroflóru, která byla detekována v pasterovaném mléce v počtech okolo 2,50 log KTJ/ml. Do jednoho dne od výroby došlo k rapidnímu navýšení počtů. Fox et al. (2004) uvádí, že počty startérových bakterií se poměrně rychle snižují, zatímco počty non-startérových bakterií se zvyšují a dominují ve zrajícím sýru. K výraznějšímu poklesu došlo až 84. den zrání (5,00 log KTJ/g). Počty non-startérových mikroorganismů se v sýru vyrobeného z mléka velmi dobré mikrobiologické kvality dostávají obvykle k hodnotám až 7,00 – 8,00 log KTJ/g (Fox et al., 2004).



Obr. 10 Počet bakterií mléčného kvašení v průběhu zrání sýrů s odlišným obsahem tuku v sušině



Obr. 11 Počty mezofilních laktokoků a streptokoků v průběhu zrání sýrů s odlišným obsahem tuku v sušině

Počet enterokoků je dokumentován v Tabulce 1. Významnější počty enterokoků byly zaznamenány v 1. odběrovém dni, v průběhu zrání byl jejich výskyt spíše ojedinělý. Enterokoky tvoří non-startérovou mikroflóru, jejíž hlavním zdrojem je syrové mléko. Jejich výskyt v sýrech je přisuzován odolnosti vůči pasteračním teplotám, možností může být také sekundární kontaminace z prostředí či výrobních zařízení (Fox et al., 2004).

Tab. 1 Počet enterokoků (log KTJ/g) v průběhu zrání sýrů s odlišným obsahem tuku v sušince

Sýry s odlišným obsahem tuku v sušince [%]	Počet enterokoků (log KTJ/g)				
	1. den	14. den	28. den	56. den	84. den
50	0,00	0,00	0,00	2,18	0,00
45	0,00	0,00	0,00	1,70	0,00
40	5,96	3,08	1,70	2,23	0,00
35	4,86	0,00	0,00	0,00	0,00
30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
20	3,30	0,00	0,00	0,00	0,00
10	5,40	0,00	0,00	0,00	2,51
1	3,26	0,00	0,00	0,00	2,62

Dále byly v průběhu zrání stanovovány kvasinky, plísně a koliformní bakterie. Jejich počty však nebyly významné (data nejsou uvedena). Vzhledem k velmi ojedinělému výskytu nemohly tyto skupiny ovlivnit procesy během zrání.

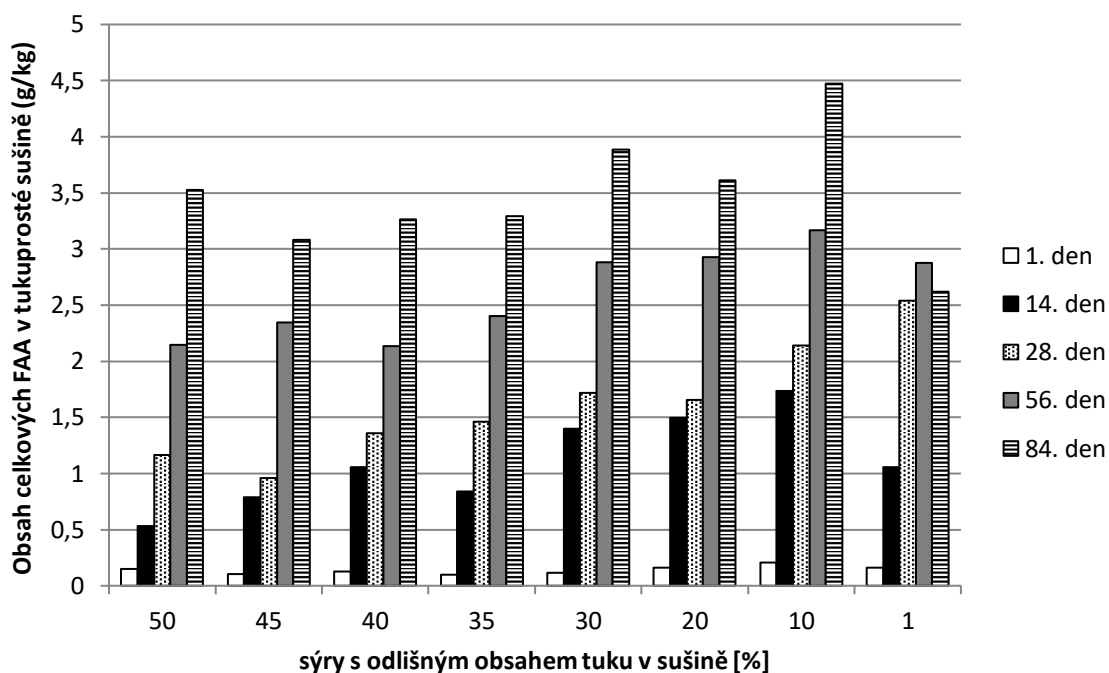
5.3 Stanovení obsahu volných aminokyselin

Pro posouzení intenzity zrání byl stanovován celkový obsah volných aminokyselin, jakožto konečných produktů proteolýzy. V průběhu zrání lze tedy očekávat jejich zvyšující se množství. Vzhledem k odlišnému obsahu sušiny jednotlivých šarží modelových vzorků sýrů byly výsledky vztaženy na tukuprostou sušinu a jejich celkový obsah je znázorněn na Obrázku 12. Z grafu je zřejmé, že s dobou zrání má celkový obsah volných aminokyselin rostoucí charakter u všech modelových šarží sýrů. Nejnížší celkový obsah aminokyselin byl stanoven v 1. odběrovém dni u všech vzorků (0,10 - 0,20 g/kg). Od 14. dne zrání byl zaznamenán rostoucí trend celkového obsahu volných aminokyselin, avšak u vzorku o obsahu tuku v sušince 1 % byl zaznamenán nejvyšší obsah volných aminokyselin již po 56 dnech zrání (2,87 g/kg), v 84. dni byl pozorován pokles (2,62 g/kg). Z Obrázku 12 je dále

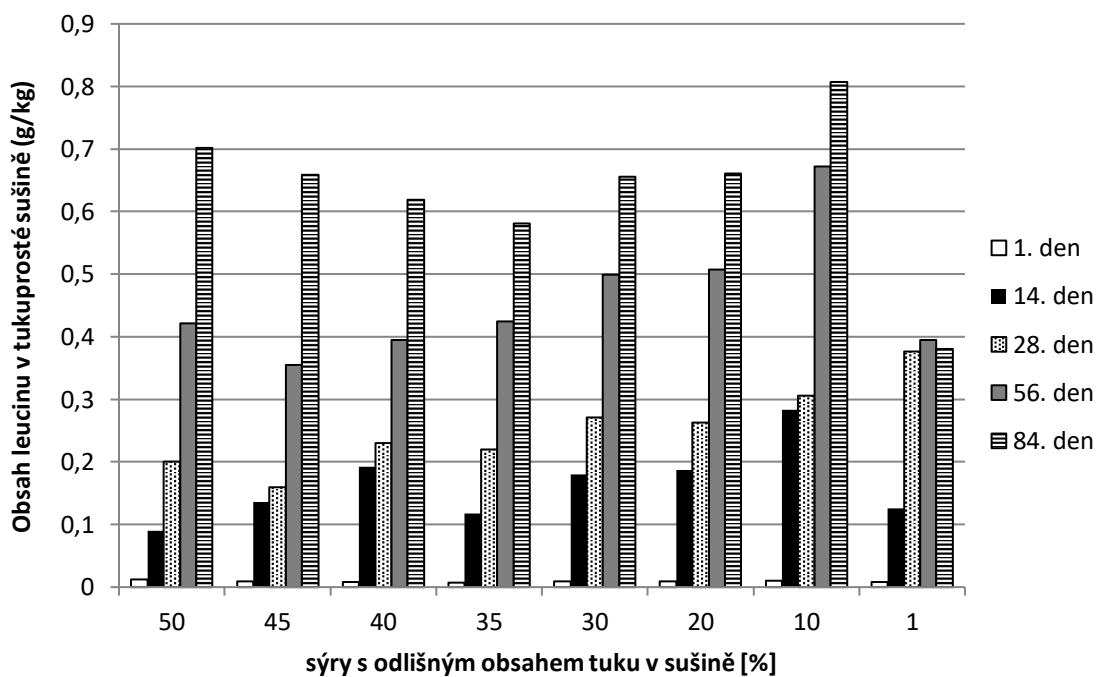
patrné, že celkový obsah volných aminokyselin rostl s klesajícím obsahem tuku. Nejvyššího obsahu volných aminokyselin bylo dosaženo u vzorku o obsahu tuku v sušině 10 % po 84 dnech zrání (4,47 g/kg). Byla však pozorována anomálie v případě vzorku o nejnižší tučnosti (1 % tuku v sušině), kde byl rostoucí trend pozorován pouze do 56. dne. Po 84 dnech zrání došlo k rapidnímu poklesu celkového obsahu volných aminokyselin. Důvod odlišného vývoje celkového obsahu aminokyselin šarže s minimálním obsahem tuku v sušině však nebyl v dostupné odborné literatuře uspokojivě popsán. Vyšší obsahy volných aminokyselin u sýrů s nízkým obsahem tuku pozorovali ve svém experimentu také Fenelon a Guinee (2000); Guinee et al. (2000) a McCarthy et al. (2017). Vysvětlením tohoto jevu je vyšší obsah proteinu v méně tučných sýrech, a tudíž větší rozsah proteolýzy kaseinové matrice (Guinee et al., 2000).

Proteolytické reakce v průběhu zrání se odráží také na vývoji pH sýru, kdy dochází k jeho zvýšení v důsledku tvorby amoniaku a jiných látek zásadité povahy (Fox et al., 2000; Pachlová et al., 2011). V průběhu zrání byl sledován nárůst hodnot pH se současným zvyšujícím se obsahem volných aminokyselin. Také lze pozorovat rostoucí trend pH mezi jednotlivými vzorky, od nejvyššího obsahu tuku v sušině (50 %) po nižší obsah tuku v sušině (10 %), výsledky analýz ukázaly současný rostoucí trend obsahu volných aminokyselin. Zjištěné poznatky vývoje pH lze tedy přičítat intenzitě zrání v sýrové matrici.

Obrázek 13 znázorňuje obsah leucinu, jako reprezentativní aminokyseliny, v průběhu zrání. V 1. odběrovém dni dosahoval obsah leucinu u všech modelových vzorků velmi nízkých hodnot (0,007 – 0,012 g/kg), v dalších odběrových dnech byl pozorován rapidní nárůst jeho množství, což rovněž koresponduje s výsledky stanovení celkového obsahu aminokyselin. Nejvyšší obsah byl zaznamenán po 84 dnech zrání u všech vzorků, s výjimkou vzorku o nejnižší tučnosti (1 % tuku v sušině), kde bylo nejvyššího obsahu dosaženo již 56. den (0,40 g/kg). Po 84 dnech zrání se obsah leucinu u téměř všech vzorků pohyboval v rozmezí 0,60 – 0,70 g/kg, v případě vzorku o obsahu tuku v sušině 10 % byl zjištěn obsah leucinu až 0,81 g/kg.



Obr. 12 Obsah volných aminokyselin (FAA) v tukuprosté sušině v průběhu zrání sýrů s odlišným obsahem tuku v sušině



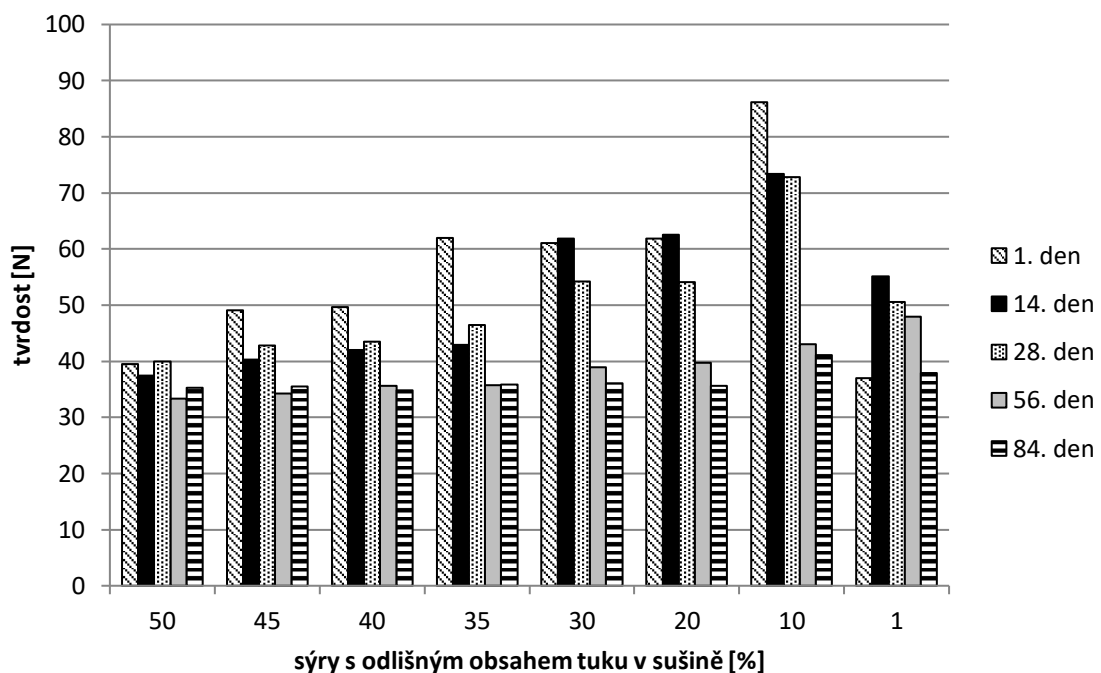
Obr. 13 Obsah leucinu v tukuprosté sušině v průběhu zrání sýrů s odlišným obsahem tuku v sušině

5.4 Texturní profilová analýza

V průběhu tříměsíčního zrání byla u modelových vzorků sýrů prováděna analýza texturních vlastností, výsledky tvrdosti vyjádřené jako maximální síla (N) použitá pro stlačení vzorku o 25 % původní výšky znázorňuje Obrázek 14. Z grafu je patrné, že tvrdost analyzovaných vzorků rostla s klesajícím obsahem tuku v sušině. V 1. odběrovém dni dosahovala tvrdost u vzorku o obsahu tuku v sušině 50 % téměř 40 N. Výraznější nárůst byl zaznamenán u vzorků o obsahu tuku v sušině 45 a 40 %, kde hodnoty dosahovaly 50 N. Další výraznější nárůst tvrdosti byl pozorován u vzorku o obsahu tuku v sušině 35 %, kde byla zaznamenána hodnota tvrdosti 62 N. Téměř shodných hodnot dosahovaly i vzorky o obsahu tuku v sušině 30 a 20 % (61 a 61,8 N). Jednoznačně nejvyšších hodnot dosahovala tvrdost v případě vzorku s 10% obsahem tuku v sušině 1. den po výrobě (86 N). Vyšší hodnoty tvrdosti u sýrů s nižším obsahem tuku v sušině jsou přisuzovány neporušenosti kontinuity proteinové matrice menším zastoupením tukovými kuličkami. Trend však není patrný u vzorku sýru o nejnižším obsahu tuku v sušině (1 % tuku v sušině), který dosahoval nejnižší hodnoty tvrdosti ihned po výrobě (37 N). Možné vysvětlení této anomálie je možné nalézt v extrémně slabé a gumovité textuře sýrů s velmi nízkým obsahem tuku, která snadno podléhá defektům (Kosiowski a Mistry, 1997; Banks et al., 1989). Ty pak mohou mimo jiné být příčinou stanovených nízkých hodnot tvrdosti u modelových vzorků s 1% obsahem tuku v sušině. Naproti tomu mléčný tuk je u sýrů s vysokým obsahem tuku rovnoměrně distribuován v kaseinové matrici a poskytuje sýru charakteristickou vláčnost a sýry vykazují měkčí texturní vlastnosti. U sýrů s nižším obsahem tuku hraje hlavní roli při vývoji textury kasein, proto mají tyto sýry podstatně tvrdší texturu (Mistry, 2001). Stejný trend pozorovala ve svém experimentu také Saint-Eve et al. (2009), kde uvádí, že vzorky sýrů o nižším obsahu tuku byly více tvrdé, drobivé, lámavé a méně lepivé v porovnání se vzorky o vyšším obsahu tuku. Modifikace texturních vlastností jsou ovlivněny změnami funkčních vlastností v matrici sýru, pravděpodobně kvůli ztrátě plastických vlastností, které poskytuje tuk (Gunasekaran a Mehmet, 2003). Ve svém experimentu pozorovali vyšší tvrdost u sýrů s nízkým obsahem tuku také Fenelon a Guinee (2000).

Z Obrázku 14 lze dále vidět, že tvrdost analyzovaných vzorků má v průběhu zrání klesající charakter. Výrazný pokles tvrdosti byl zaznamenán v 56. dni zrání u všech vzorků, s výjimkou vzorku o obsahu 1 % tuku v sušině, kde však byl také pozorován pokles. Výraznější pokles tvrdosti byl pozorován u vzorků sýrů o obsahu 45, 40, 35 a 10 % tuku v sušině již 14. den zrání. V 56. dni byl stále pozorován vliv obsahu tuku na tvrdost, tedy

se snižujícím se obsahem tuku byly sledovány vyšší hodnoty tvrdosti, přičemž po 84 dnech zrání byly zaznamenány srovnatelné hodnoty tvrdosti u všech modelových šarží. Pokles tvrdosti v průběhu zrání je zapříčiněn zejména intenzitou proteolýzy. U všech modelových vzorků byla pozorována rostoucí koncentrace volných aminokyselin, z čehož lze odvodit slábnutí proteinové matrice v důsledku intenzivní proteolýzy. Také Lawrence et al., 1987 uvádí, že vyšší intenzita proteolýzy je příčinou slábnutí proteinové matrice a následného poklesu tvrdosti sýrů. Klesající trend tvrdosti sýrů v průběhu zrání potvrzuje McMahon (2010) a také Fenelon a Guinee (2000). Intenzita proteolýzy v průběhu zrání sýrů má významný dopad na jejich texturní vlastnosti (slábnutí proteinové matrice v důsledku intenzivnější proteolýzy). Zjištěné výsledky ukazují rostoucí trend obsahu volných aminokyselin s dobou zrání sýrů, tedy intenzivnější proteolýzu, což se skutečně odrazilo na jejich texturních vlastnostech, kdy docházelo k měknutí modelových vzorků sýrů s dobou zrání. Na druhou stranu bylo zjištěno vyšší množství volných aminokyselin u sýrů o nižší tučnosti (v porovnání se sýry o vyšší tučnosti), kde však předchozí trend (měknutí sýrů v důsledku intenzivnější proteolýzy) zjištěn nebyl a sýry o nižší tučnosti měly v porovnání se sýry o vyšší tučnosti podstatně tvrdší texturu. Přestože intenzivnější proteolýza byla u sýrů s nižším obsahem tuku (vyjádřeno v tukuprosté sušině sýrů), na tvrdost má významný vliv také přítomnost tukových kuliček zachycených v proteinové matici. Fenomén vývoje tvrdosti, resp. také obsahu volných aminokyselin u vzorku s 1% obsahem tuku v sušině nebyl v současné odborné literatuře popsán.

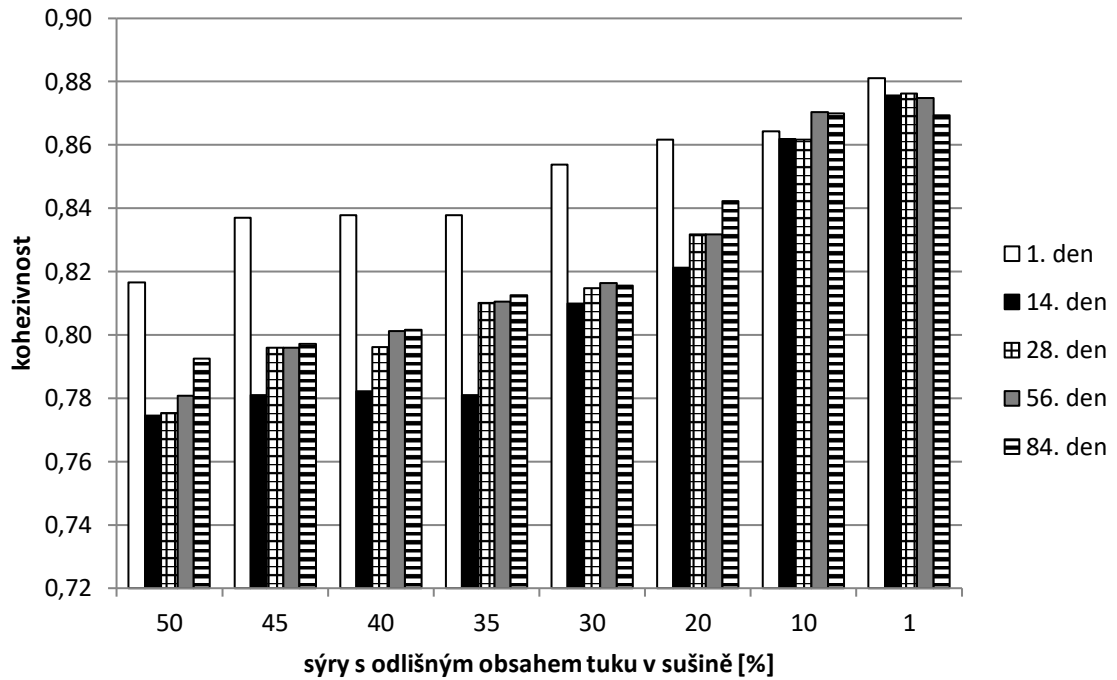


Obr. 14 Vývoj tvrdosti v průběhu zrání sýrů s odlišným obsahem tuku v sušině

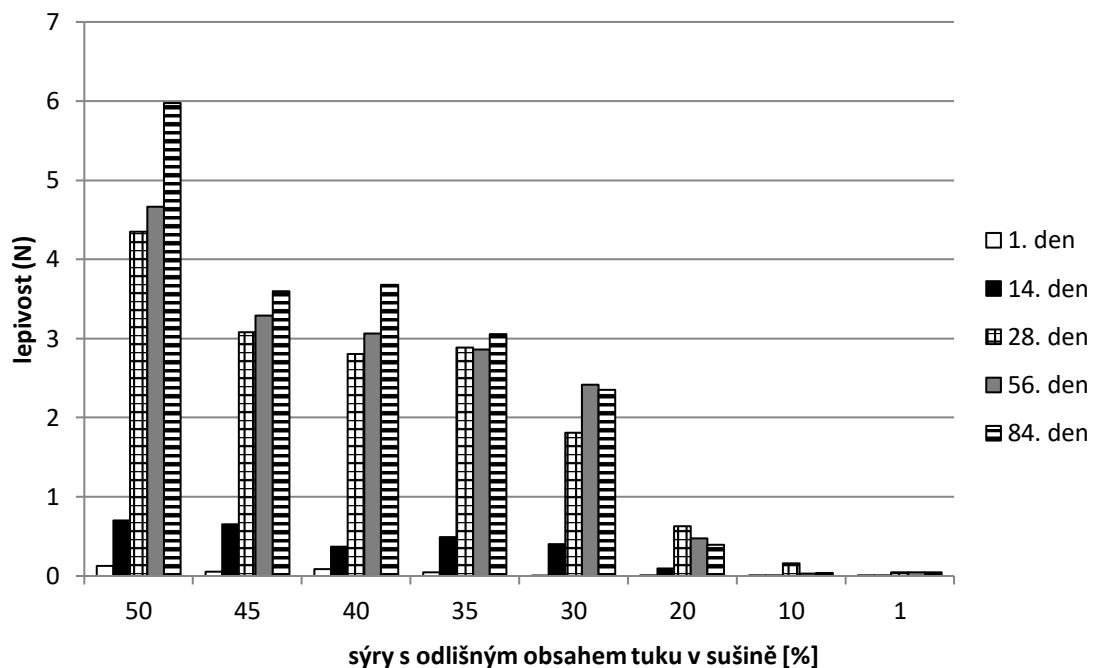
Kohezivnost neboli soudržnost byla dalším parametrem, který byl v průběhu 84denního skladovacího experimentu sledován. Výsledky jsou vyneseny na Obrázku 15. Získané výsledky ukazují, že nejvyšší kohezivnost byla 1. den skladování (před solením sýrů). Z výsledků experimentu lze tedy usuzovat, že na soudržnost vzorku má vliv solení a pravděpodobně také koncentrace soli v daném druhu sýra. V dalších dnech byla kohezivnost nižší, ale na druhou stranu s rostoucí dobou zrání byl sledován rostoucí trend. Tato skutečnost (s výjimkou vzorku s nejnižším obsahem tuku v sušině) není v souladu s Němcová et al. (2001), kde autorka uvádí, že kohezivnost se s dobou zrání snižuje v důsledku proteolýzy. Rostoucí trend v soudržnosti lze pozorovat rovněž mezi jednotlivými vzorky sýrů, které se lišily obsahem tuku v sušině. Nejnižších hodnot bylo dosaženo u modelového vzorku sýru s nejvyšším obsahem tučnosti, naopak méně tučné sýry mají kohezivnost vyšší. S tím souhlasí Banks et al. (2004), kde autor uvádí, že sýry s nižším obsahem tuku vykazují vyšší kohezivnost. Jak již bylo popsáno výše, tuk poskytuje sýru plastické vlastnosti, a tím dochází ke snížení kohezivnosti.

Obrázek 16 zachycuje výsledky lepivosti. Z grafu je zřejmé, že v průběhu zrání má lepivost rostoucí tendenci, přičemž 1. a 14. den dosahuje relativně nízkých hodnot, avšak od 28. dne zrání rapidně vzrůstá. Mezi jednotlivými vzorky byl zaznamenán klesající charak-

ter lepivosti se snižujícím se obsahem tuku v sušině. Sýry s obsahem tuku v sušině nižším jak 30 % dosahovaly velmi nízkých hodnot lepivosti. Také Saint-Eve et al. (2009) potvrzuje ve svém experimentu, že sýry s nižší tučností vykazovaly nižší lepivost.



Obr. 15 Vývoj kohezivnosti v průběhu zrání sýrů s odlišným obsahem tuku v sušině



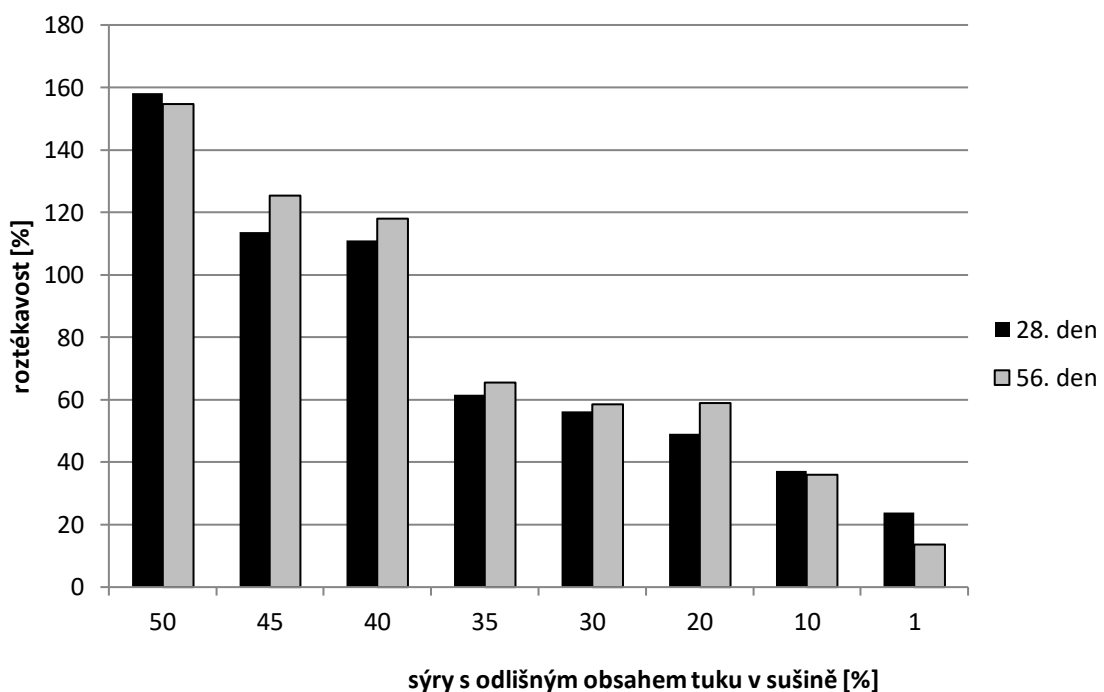
Obr. 16 Vývoj lepivosti v průběhu zrání sýrů s odlišným obsahem tuku v sušině

5.5 Roztékavost

V průběhu zrání byla analyzována roztékavost (meltabilita) ve 28. a 56. dni zrání, jakožto důležitá funkční vlastnost zrajících sýrů. Výsledky jsou vyneseny na Obrázku 17, v Příloze I jsou obsaženy fotografie vzorků sýrů s odlišným obsahem tuku po roztečení. Zjištěné výsledky ukazují, že roztékavost klesala se snižujícím se obsahem tuku v sušině. Nejvyšší roztékavost měly vzorky o nejvyšší tučnosti, kde roztékavost dosahovala téměř 160 %. U vzorků o obsahu tuku v sušině 45 a 40 % se pohybovala roztékavost okolo 120 %, poté následoval rapidní pokles roztékavosti od vzorku s obsahem tuku v sušině 35 % na hodnoty okolo 60 % a nižší. Další výraznější pokles byl pozorován u vzorků o obsahu tuku v sušině 10 a 1 %. Také Kim et al. (2011) a Póltorak et al. (2015) pozorovali ve svých experimentech podstatně vyšší roztékavost u sýrů s vyšším obsahem tuku v porovnání se sýry o nižším obsahu tuku. Ko a Gunasekaran (2014) uvádějí, že stupeň roztékavosti sýru je závislý na jeho složení (obsah soli a poměr obsahu proteinu k tuku) a také na délce zrání. Vysoký obsah soli způsobuje inhibici proteolýzy a sýry získávají tvarohovitou konzistenci, která vykazuje horší meltabilitu. Hodnota pH není hlavním faktorem ovlivňujícím roztékavost sýrů, ale bylo prokázáno, že společně s obsahem tuku v sušině ji může značně ovliv-

nit. Dalším faktorem, který ovlivňuje meltabilitu je obsah vlhkosti. Sýry o vyšším obsahu vlhkosti mají měkčí texturu a vykazují lepší roztékavost (Gunasekaran a Mehmet, 2003).

Z Obrázku 17 je dále patrné, že s dobou zrání se roztékavost zvyšuje u většiny modelových šarží sýrů. Nicméně tento trend není patrný u vzorků sýrů o obsahu tuku v sušině 50 %, u kterého byly stanoveny srovnatelné hodnoty meltability v obou sledovaných odběrových dnech (nejvyšší hodnoty v porovnání s ostatními vzorky sýrů). Výjimku tvoří také nízkotučné sýry (s obsahem 10 a 1 % tuku v sušině), u kterých lze naopak konstatovat, že obecně vykazovaly velmi špatné roztékové vlastnosti. Důvodem navýšení schopnosti sýrů se roztékat prostřednictvím záhřevu jsou jednak strukturální změny v sýru během zrání a současně přítomnost tukových kuliček. Proteolýzou (zejména v důsledku štěpení α_{s1} -kaseinu) kaseinová matrice ztrácí na kontinuitě a stává se slabší se zvyšující se schopností se roztéct (Kuo et al., 2001; Tunick et al., 1993). Tukové kuličky se přímo podílejí na plastických vlastnostech sýra. Současně oslabují proteinovou matici z důvodu narušení její kontinuity. Kombinací těchto faktorů (stupeň zrání a obsah tuku v sušině) získává sýr v průběhu zrání vyšší schopnost se roztéct, což lze využít jako funkční vlastnost během výroby dalších potravin, ve kterých je sýr použit jako jedna ze složek (pečivo se sýrem, pizza atd.).



Obr. 17 Vliv obsahu tuku a doby zrání na roztékavost sýrů s odlišným obsahem tuku v sušině

ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na vliv různého obsahu tuku v sušině na vlastnosti sýrů holandského typu v průběhu 84 dnů zrání. V teoretické části byla popsána technologie výroby sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou a také procesy probíhající v době zrání, podrobnější popis byl věnován faktorům ovlivňujícím zrání a vlastnostem finálních produktů.

Praktická část diplomové práce byla zaměřena na výrobu modelových vzorků sýrů o různém obsahu tuku v sušině a založení tříměsíčního skladovacího experimentu. Během tříměsíčního zrání byly odebírány vzorky a prováděny následující analýzy: základní chemická analýza (obsah sušiny, obsah tuku, stanovení hodnot pH, obsah soli), mikrobiologický rozbor, texturní profilová analýza, stanovení roztékavosti a stanovení koncentrace volných aminokyselin.

Z experimentu byly zjištěny následující výsledky:

- obsah sušiny se u modelových vzorků sýrů snižoval s klesajícím obsahem tuku v sušině
- vyšší hodnoty pH byly stanoveny ve vzorcích s nižším obsahem tuku v sušině, hodnoty pH vykazovaly s dobou zrání rostoucí charakter
- množství bakterií mléčného kvašení bylo nejvyšší v počátku zrání, v průběhu zrání došlo ke snížení počtů mikroorganismů
- technologicky nežádoucí mikroorganismy nebyly v průběhu zrání modelových vzorků sýrů detekovány
- nebyly zaznamenány významné rozdíly v zastoupení mikroorganismů v sýrech vyrobených s odlišným obsahem tuku
- vyšší koncentrace volných aminokyselin byly stanoveny v modelových vzorcích sýrů s nižším obsahem tuku, koncentrace volných aminokyselin rostla s dobou zrání
- se snižujícím se obsahem tuku v sušině rostla tvrdost modelových vzorků sýrů, s dobou zrání však modelové sýry ztrácely na tvrdosti
- roztékavost klesala se snižujícím se obsahem tuku v sušině, v průběhu zrání byl pozorován její rostoucí trend

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Anonym, 2017. Povrchové ošetření sýrů, O.K. SERVIS BioPro s. r. o. [online]. [cit. 2017-03-20]. Dostupné z: <http://www.biopro.cz/ingredience/mlekarensky-prumysl/povrchove-osetreni-syru/>

BANKS, J. M., BRECHANY, E. Y., CHRISTIE, W. W. *The production of low fat Cheddar cheese types. Journal of Society of Dairy Technology*, 1989, 42, s. 6 – 9.

BANKS, J. M. *The technology of low-fat cheese manufacture. International Journal of Dairy Technology*, 2004, 57(4), s. 199- 207.

BUŇKA, F. *Mlékárenská technologie I*. Vyd. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2013, 258 s. ISBN 978-80-7454-254-1.

BLACKBURN, C. DE W. *Food spoilage microorganisms*. Cambridge: Woodhead Pub, 2006. ISBN 9781845691417.

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, s. 927 - 934.

CANO-RUIZ, M. E., RICHTER, R. L. *Effect of homogenization pressure on the milk fat globule membrane proteins. Journal of Dairy Science*, 1997, 80, s. 2732 – 2739.

ČSN EN ISO 5534, Sýry a tavené sýry – Stanovení obsahu sušiny (Referenční metoda)

ČSN EN ISO 5943, Sýry a tavené sýrové výrobky – Stanovení obsahu chloridů – Potenciometrická titrační metoda

ČSN ISO 4833, Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda pro stanovení celkového počtu mikroorganismů – Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C

ČSN ISO 4832, Mikrobiologie. Všeobecné pokyny pro stanovení počtu koliformních bakterií. Technika počítání kolonií

ČSN EN ISO 7899-2, Stanovení intestinálních enterokoků

ČSN ISO 15214, Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda stanovení počtu mezofilních bakterií mléčného kvašení – Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C

ČSN ISO 21527-1, Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda stanovení počtu kvasinek a plísní – část 1: Technika počítání kolonií u výrobků s aktivitou vody nižší nebo rovnou 0,95.

DONNELLY, C. W. *Cheese and microbes*. Washington, District of Columbia: ASM Press, 2014. ISBN 978-1-55581-859-3.

DOYLE, M. P., BUCHANAN, R. *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. 4th ed. Washington, DC: ASM Press, c2013. ISBN 978-1-55581-626-1.

ESKIN, N. A. M. a Fereidoon SHAHIDI. *Biochemistry of foods*. Third edition /. ISBN 978-0-12-242352-9.

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 maturit commercial Cheddar cheese over a range of moisture and pH at the point of manufacture*. *Journal of Texture Studies*, 2006, 37, s. 361 – 382.

EVERETT, D. W., AUTY, M. A. E. *Cheese structure and current methods of analysis*. *International Dairy Journal*, 2008, 18, s. 759 – 773.

FARKYE, N. Y. *Cheese technology*, *International Journal Dairy Technology*, 2004, 57 (2-3), s. 91 -98.

FENELON, M. A., GUINEE, T. P. *Primary proteolysis and textural changes during ripening in Cheddar cheese manufactured to different fat content*. *International Dairy Journal*, 2000, 10(3), s. 151 – 158.

FERNANDES, Rhea. *Microbiology handbook*. Cambridge: Leatherhead Pub., and Royal Society of Chemistry, c2009. ISBN 978-1-905224-62-3.

FOX, P. F., McSWEENEY, P. L. H., GUINEE, T. P, COGAN, T. M. *Fundamentals of cheese science*. Gaithersburg: 2000. 638 s. ISBN 0-83-42-1260-9.

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

GÖRNER, F., VALÍK, L'. *Aplikovaná mikrobiológia potravín*. 1. vyd. Bratislava: Malé Centrum, 2004. 528 s. ISBN 80-967064-9-7.

GUINEE, T. P., AUTY, M. A. E., FENELON, M. A. *The effect of fat content on the rheology, microstructure and heat-induced functional characteristics of Cheddar cheese. International Dairy Journal*, 2000, 10, s. 277 – 288.

GUINEE, T. P. *Salting and the role of salt in cheese. International Journal of Dairy Technology*, 2004, 57 (2-3), s. 99 – 109.

GUNASEKARAN, Sundaram a M. Mehmet. AK. *Cheese rheology and texture*. BocaRaton, FL: CRC Press, c2003. ISBN 1587160218.

HICKEY, C. D., M. A. E. AUTY, M. G. WILKINSON a J. J. SHEEHAN. *The influence of cheese manufacture parameters on cheese microstructure, microbial localisation and their interactions during ripening: A review. Trends in Food Science & Technology*. 2015, 41(2), 135-148.

JANŠTOVÁ, B., VORLOVÁ, L., NAVRÁTILOVÁ, P., KRÁLOVÁ, M., NECIDOVÁ, L., MAŘICOVÁ, E. *Technologie mléka a mléčných výrobků*. 1. vydání. VFU Brno, 2012. 141 s. ISBN 978-807305637-7.

JOHNSTON, K. A., LUCKMAN, M. S., LILLEY, H. G., SMALE, B. M. *Effect of various cutting and stirring conditions on curd particle size and losses of fat to the whey during cheddar cheese manufacture in ost vats. International Dairy Journal*, 1998, 8, s. 281 – 288.

KADLEC, P., ČEPIČKA, J., ČURDA, L., DOSTÁLOVÁ, J., FILIP, V., MELZUCH, K., PLOCKOVÁ, M., RYCHTERA, M., ŠMIDRKAL, J., ŠTĚTINA, J., VOLDŘICH, M. *Technologie potravin II.*, Praha: VŠCHT 2007. ISBN 80-7080-510-2.

KIM, S. Y., LIM, S., GUNASEKARAN, S. *Protein interactions in reduced-fat and full-fat Cheddar cheeses during melting. Food Science and Technology*, 2011, 44, s. 582 – 587.

KO, S., GUNASEKARAN, S. *Evaluation of cheese meltability using convection and conduction melt profilers. International Journal of Dairy Technology*, 2014, 67, s. 194 – 201.

KOSIOWSKI, F. V., MISTRY, V. V. *Cheese and fermented milk fous. Origins and principles*. Westport, CT: F. V. KOSIOWSKI L. L. C. 1997, 1.

KUO, M. I., WANG, Y. C., GUNASEKARAN, S., OLSON, N. F. *Effect of heat treatment on the meltability of cheeses. Journal Dairy Science*, 2001, 84, s. 1937 – 1943.

LALOY, E., VUILLEMARD, J. C., EL SODA, M., SIMARD, R. E. *Influence of the fat content of Cheddar cheese on retention and localization of starters. International Dairy Journal*, 1996, 6, s. 729 – 740.

LAWRENCE, R. C., CREAMER, L. K., GILLES, J. *Texture development during cheese ripening. Journal of Dairy Science*, 1987, 70, 1748 – 1760.

LEROY, F., DE VUYST, L. *Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends in Food Science and Technology*, 2004, 15, 67-78.

LOPEZ, C. *Focus on the supramolecular structure of milk fat. Reproduction Nutrition Development*, 2005, 45, s. 497 -511.

LOPEZ, C., MAILLARD, M. B., BRIARD-BION, V., CAMIER, B., HANNON, J. A. *Lipolysis during ripening of Emmental cheese considering organization of fat and preferential localization of bacteria. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54, s. 5855 – 5867.

LOPEZ, C., CAMIER, B., GASSI, J. Y. *Development of the milk fat microstructure during the manufacture and ripening of Emmental cheese observed by confocal laser scanning microscopy. International Dairy Journal*, 2007, 17, s. 235 – 247.

LUCEY, J. A., MISHRA, R., HASSAN, A., JOHNSON, M. E. *Rheological and calcium equilibrium changes during ripening of Cheddar cheese. International Dairy Journal*, 2005, 15, 645 – 653.

McCARTHY, C. M., WILKINSON, M. G., KELLY, P. M., GUINEE, T. P. *Effect of salt and fat reduction on the composition, lactose metabolism, water activity and microbiology of Cheddar cheese. Dairy Science and Technology*, 2015, 95, s. 587- 611.

McCARTHY, C. M., KELLY, P. M., WILKINSON, M. G., GUINEE, T. P. *Effect of fat and salt reduction on the changes in the concentrations of free amino acids and free fatty acids in Cheddar-style cheeses during maturation. Journal of Food Composition and Analysis*, 2017, 59, s. 132 – 140.

McMAHON, D. J. *Issues with Lower Fat and Lower Salt Cheeses. Australian Journal of Dairy Technology*, 2010, vol. 65, no. 3 s. 200-205. ISSN:0004-9433.

McSWEENEY, P. L. H. *Cheese problems solved*. Cambridge: Woodhead Pub, 2007. ISBN 978-184-5693-534.

MISTRY, V. V., KASPERSON, K. M. *Influence of salt on the quality of reduced fat cheddar cheese. Journal of Dairy Science*, 1998, 81, s. 1214 – 1221.

MISTRY, V. V. *Low fat cheese technology. International Dairy Journal*, 2001, 11, s. 413 – 422.

MONTEL, M.-C., BUCHIN, S., MALLET, A., DELBES-PAUS, C., VUITTON, D. A., DESMASURES, N., BERTHEIR, F. *Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. International Journal of Food Microbiology*, 2014, 177, s. 136 – 154.

Nářízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 ze dne 29. dubna 2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu.

NĚMCOVÁ, L., ŠTĚTINA, J., VALENTOVÁ, H. *Proteolysis and consistency changes of gouda and eidamský blok cheeses during ripening. Czech Journal Food Science*, 2001, 19, s. 67- 72.

ONG, L., DEGASTINE, R., AUTY, M. E., KENTISH, S., GRAS, S. *Coagulation temperature affects the microstructure and composition of full fat Cheddar cheese. Dairy Science and Technology*, 2011, 91, s. 739 – 758.

PACHLOVÁ, V., BUŇKA, F., BUŇKOVÁ, L., WEISEROVÁ, E., BUDINSKÝ, P., ŽALUDEK, M., KRÁČMAR, S. *The effect of three different ripening/storage conditions on the 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. Food Chemistry*. 2012, vol. 132 (4), s. 1846 – 1854.

PEREIRA, C. I., GOMES, A. M. P., XAVIER MALCATA, F. *Microstructure of cheese: processing, technological and microbiological considerations. Trends in Food Science and Technology*, 2009, 20, s. 2013 – 2019.

PÓLTORAK, A., WYRWISZ, J., MOCZKOWSKA, M., MARCINKOWSKA-LESIK, M., STELMASIAK, A., ULANICKA, U., ZALEWSKA, M., WIERZBICKA, A., DA-WEN SUN. *Correlation between instrumental texture and colour quality attributes with sensory analysis with selected cheeses as affected by fat contents. International Journal of Food Science and Technology*, 2015, 50, s. 999 – 1008.

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, (1), s. 167-175. ISSN:0308-8146.

STAMPANONI, C. R., NOBLE, A. C. *The influence of fat, acid and salt on the perception of selected taste and texture attributes of cheese analogs – A scalar study. Journal of Texture Studies*, 1991, 22 (4), s. 367 – 380.

TUNICK, M. H., MACKEY, K. L., SHIEH, J. J., SMITH, P. W., COOKE, P., MALIN, E. L. *Rheology and microstructure of low-fat Mozzarella cheese. International Dairy Journal*, 1993, 3, s. 649 – 662.

Vyhláška 397/2016 Sb. o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jablečtuky a oleje.

WATKINSON, P., COKER, Ch., CRAWFORD, R., DODDS, C., JOHNSTON, K., MCKENNA, A., WHITE, N. *Effect of cheese pH and ripening time on model cheese textural properties and proteolysis. International Dairy Journal*. 2001, 11, s. 455-464. ISSN:0958-6946.

WEIMER, B. C. *Improving the flavour of cheese*. Cambridge: Woodhead publ, 2007. ISBN 9781845690076.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

CPM Celkový počet mikroorganismů

BMK Bakterie mléčného kvašení

KTJ Kolonie tvořící jednotku

FAA Volné aminokyseliny

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1	<i>Schéma proteolýzy v sýrech</i>	25
Obrázek 2	<i>Struktura mléčného tuku v mléčných produktech</i>	32
Obrázek 3	<i>Obsah sušiny v průběhu zrání modelových vzorků sýrů s odlišným obsahem tuku v sušině</i>	48
Obrázek 4	<i>Obsah tuku v sušině v průběhu zrání modelových vzorků sýrů s odlišným obsahem tuku v sušině</i>	49
Obrázek 5	<i>Vývoj pH hodnot v průběhu zrání modelových vzorků sýrů s odlišným obsahem tuku v sušině</i>	51
Obrázek 6	<i>Obsah soli modelových vzorků sýrů s odlišným obsahem tuku v sušině 1. a 28. den od výroby</i>	52
Obrázek 7	<i>Počty mikroorganismů v mléce pro výrobu sýrů s odlišným obsahem tuku v sušině před tepelným ošetřením</i>	53
Obrázek 8	<i>Počty bakterií mléčného kvašení v mléce pro výrobu sýrů s odlišným obsahem tuku v sušině po tepelném ošetření</i>	54
Obrázek 9	<i>Celkový počet mikroorganismů v průběhu zrání sýrů s odlišným obsahem tuku</i>	55
Obrázek 10	<i>Počet bakterií mléčného kvašení v průběhu zrání sýrů s odlišným obsahem tuku v sušině</i>	57
Obrázek 11	<i>Počty mezofilních laktokoků a streptokoků v průběhu zrání sýrů s odlišným obsahem tuku v sušině</i>	57
Obrázek 12	<i>Obsah volných aminokyselin (FAA) v tukuprosté sušině v průběhu zrání sýrů s odlišným obsahem tuku v sušině</i>	60
Obrázek 13	<i>Obsah leucinu v tukuprosté sušině v průběhu zrání sýrů s odlišným obsahem tuku v sušině</i>	60
Obrázek 14	<i>Vývoj tvrdosti v průběhu zrání sýrů s odlišným obsahem tuku v sušině</i>	63

-
- Obrázek 15** *Vývoj kohezivnosti v průběhu zrání sýrů s odlišným obsahem tuku v sušině* 64
- Obrázek 16** *Vývoj lepivosti v průběhu zrání sýrů s odlišným obsahem tuku v sušině* 65
- Obrázek 17** *Vliv obsahu tuku a doby zrání na roztékavost sýrů s odlišným obsahem tuku v sušině* 66

SEZNAM TABULEK

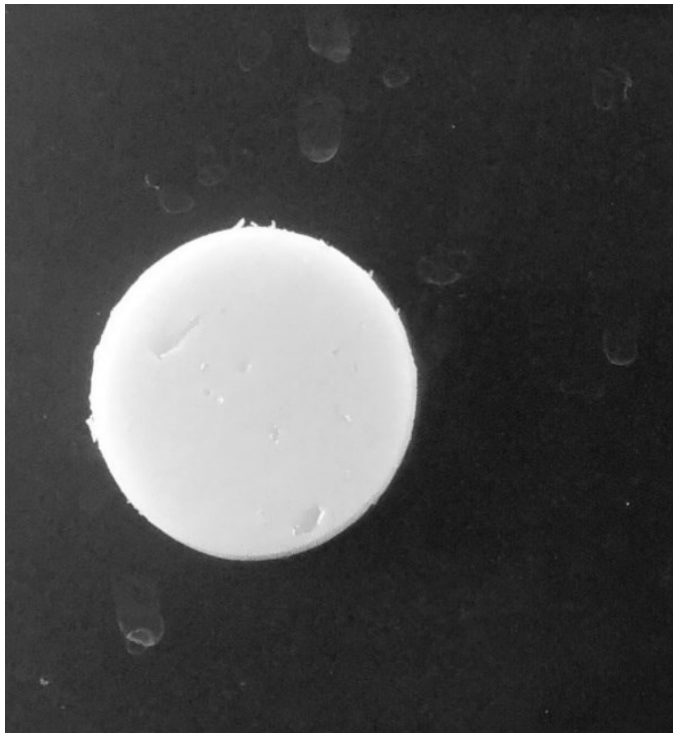
Tabulka 1 *Počet enterokoků (log KTJ/g) v průběhu zrání sýrů s odlišným obsahem tuku v sušině*

58

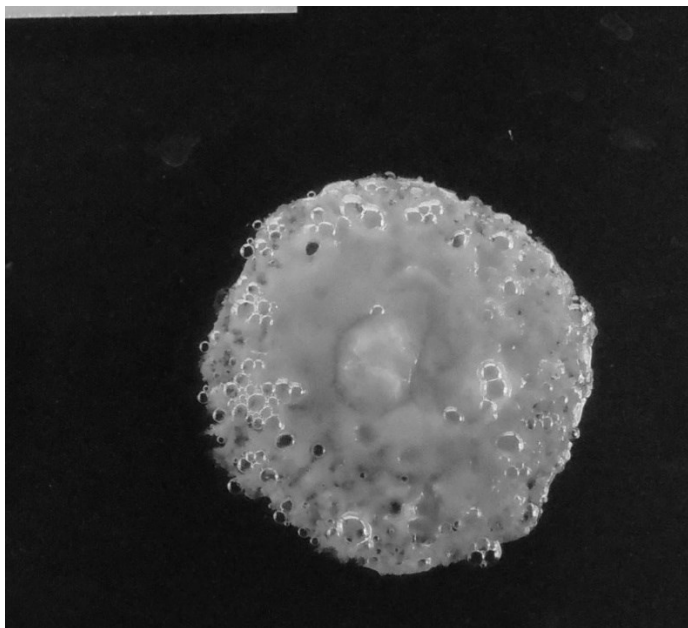
SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA P I: SNÍMKY ROZTEČENÝCH SÝRŮ S ODLIŠNÝM OBSAHEM TUKU
V SUŠINĚ PO 56 DNECH ZRÁNÍ

**PŘÍLOHA P I: SNÍMKY ROZTEČENÝCH SÝRŮ S ODLIŠNÝM
OBSAHEM TUKU V SUŠINĚ PO 56 DNECH ZRÁNÍ**



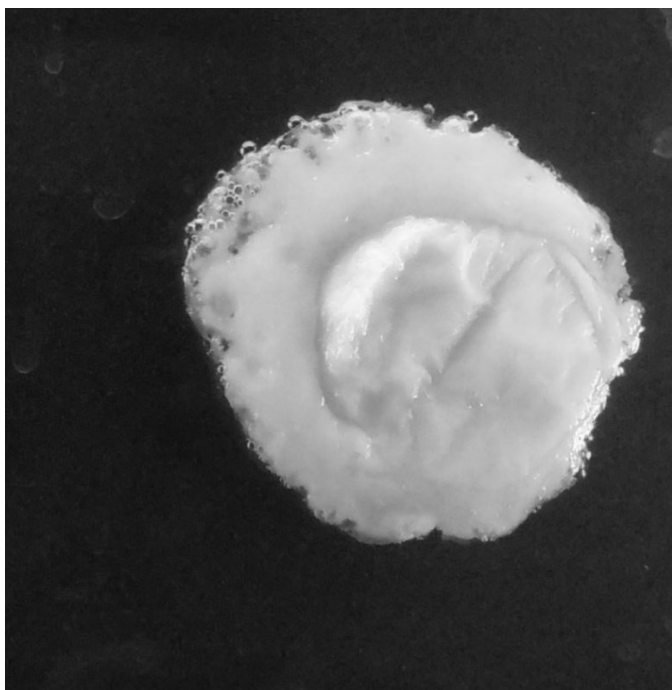
Obr. 1 Modelový vzorek sýru před roztečením



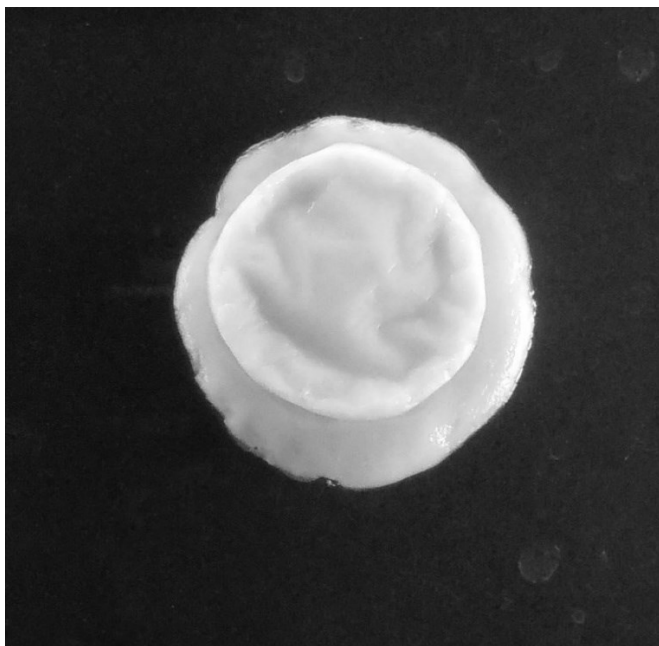
Obr. 2 Modelový vzorek sýru o obsahu tuku v sušině 50 % po roztečení



Obr. 3 Modelový vzorek sýru o obsahu tuku v sušině 45 % po roztečení



Obr. 4 Modelový vzorek sýru o obsahu tuku v sušině 40 % po roztečení



Obr. 5 Modelový vzorek sýru o obsahu tuku v sušině 35 % po roztečení



Obr. 6 Modelový vzorek sýru o obsahu tuku v sušině 30 % po roztečení



Obr. 7 Modelový vzorek sýru o obsahu tuku v sušnině 20 % po roztečení



Obr. 8 Modelový vzorek sýru o obsahu tuku v sušnině 10 % po roztečení



Obr. 9 Modelový vzorek sýru o obsahu tuku v sušině 1 % po roztečení