Vliv doby zrání na změnu jakosti vybraných sýrů s mazem na povrchu

Bc. Karolina Klimešová

Diplomová práce
2018

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie potravin
akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	**Bc. Karolina Klimešová**
Osobní číslo:	**T16579**
Studijní program:	**N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor:	**Technologie potravin**
Forma studia:	**prezenční**
Téma práce:	**Vliv doby zrání na změnu jakosti vybraných sýrů s mazem na povrchu**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. **Charakteristika sýrů s mazem na povrchu.**
2. **Výroba a zrání sýrů s mazem na povrchu.**
3. **Změny jakosti v průběhu zrání a skladování.**

II. Praktická část

1. **Metodika stanovení vybraných měřených parametrů.**
2. **Vyhodnocení závislosti jakostních změn na době a teplotě skladování.**
3. **Diskuse výsledků a zhodnocení závěrů práce.**

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] DUGAT- BONY, E. SARTHOU, A.-S. PERELLO, M.-C. de REVEL, G. BONNARME, P. HELINCK, S. The effect of reduced sodium chloride content on the microbiological and biochemical properties of a soft surface-ripened cheese. Journal of Dairy Science. Elsevier, 2016. 2502-2511. ISSN 0022-0302.
[2] ADOUARD, N. MAGNE, L. CATTENOZ, T . GUILLEMIN, H . FOLIGNE, B. PICQUE, D . BONNARME, P. Survival of cheese-ripening microorganisms in a dynamic simulator of the gastrointestinal tract. Food Microbiology. Elsevier, 2016. 30-40. ISSN 0740-0020.
[3] MOUNIER, M. REA, MC. O'CONNOR, PM. FITZGERALD, GF. COGAN, TM. Growth characteristics of Brevibacterium, Corynebacterium, Microbacterium, and Staphylococcus spp. isolated from surface-ripened cheese. Applied and environmental microbiology, 2007. 7732-7739. ISSN 0099-2240.
[4] O'FARRELL, Ian P. SHEEHAN, Jeremiah. WILKINSON, Martin. HARRINGTON, Dermot. KELLY, Alan. Influence of addition of plasmin or mastitic milk to cheesemilk on quality of smear-ripened cheese. Le Lait, 2002. 305316. ISSN 0023-7302.
[5] GALAUP, P. SUTTHIWONG, N. LECLERCQ-PERLAT, M.-N. VALLA, A. CARO, Y. FOUILLAUD, M. GUÉRARD, F. DUFOSSÉ, L. First isolation of Brevibacterium sp.pigmentsin the rind of an industrial red-smear-ripened soft cheese. International Journal of Dairy Technology, 2015. 144-147. doi:10.1111/1471- 0307.12211.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. František Buňka, Ph.D.**
Ústav technologie potravin

Datum zadání diplomové práce: **2. února 2018**

Termín odevzdání diplomové práce: **25. dubna 2018**

Ve Zlíně dne 2. února 2018

UNIVERZITA TOMÁŠE BATI VE ZLÍNĚ
Fakulta technologická
L.S.

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

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

Příjmení a jméno: KLIMEŠOVÁ KAROLÍNA Obor: TECHNOLOGIE 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 obhajoby [1)];
- 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. 3 [2)];
- beru na vědomí, že podle § 60 [3)] 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 § 60 [3)] 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 17.5.2018

Klimešová

[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 nevýdělečně 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 vzdělávacího 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). Odpírá-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

Tato diplomová práce je zaměřena na sledování vlivu doby zrání ovlivňující změnu vybraných jakostních parametrů u sýrů s mazem na povrchu. V teoretické části je stručně popsána charakteristika sýrů s mazem na povrchu, jejich výroba, zrání a mikrobiologie mazové kultury. Praktická část je zaměřena na sledování a porovnávání vybraných jakostních parametrů šesti různých sýrů s mazem na povrchu, které byly skladovány po dobu jednoho měsíce při dvou různých teplotách. Byl sledován obsah sušiny, hodnota pH, množství tuku, amoniaku, thiobarbiturového čísla, texturní vlastnosti, stanovení volných aminokyselin a biogenních aminů. Bylo prokázáno, že délka skladování a teplota skladování ovlivňují vybrané jakostní parametry. S delší dobou skladování byly změny jakostních parametrů výraznější. Vyšší skladovací teplota obvykle urychlila procesy probíhající ve vzorcích, zejména rychlejší změnu hodnoty pH, obsah amoniaku, texturní vlastnosti a obsah biogenních aminů.

Klíčová slova: sýr s mazem na povrchu, doba skladování, teplota skladování, zrání

ABSTRACT

The thesis is focused on monitoring effect of ripening time on the quality change of selected smear-ripened cheese. Characteristic of smear-ripened cheese, their production, ripening and microbiology were briefly described in theoretical part. The practical part of this thesis is focused on monitoring and comparing selected quality parameters of six different surface-ripened cheese during a one month ripening in two different temperatures. Dry matter, pH value, fat content, ammonia, thiobarbituric number, textural properties, free amino acids and biogenic amines were also observed. The results show that selected quality parameters were influenced by storage time and temperature. Longer storage time resulted to a bigger changes. Higher storage temperatures resulted to speed up the processes in cheese samples, especially faster change of pH value, ammonia content, textural properties and concentration of biogenic amines in majority of cases.

Keywords: smear-ripened cheese, storage lenght, storage temperature, ripening

Ráda bych poděkovala panu doc. Ing. Františkovi Buňkovi, Ph. D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost a čas, který mi věnoval při zpracovávání této práce. Dále mé poděkování patří paní laborantce Ing. et Ing. Ludmile Zálešákové za její rady, ochotu a čas při zpracovávání praktické části této práce.

V neposlední řadě poděkování patří mému příteli, rodině a přátelům za podporu po celou dobu studia.

,, Ne to, co mám, ale to, co vím, je mým bohatstvím.“

Thomas Carlyle

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

OBSAH

ÚVOD **10**
I TEORETICKÁ ČÁST **11**
1 CHARAKTERISTIKA SÝRŮ S MAZEM NA POVRCHU **12**
1.1 SÝRY S MAZEM NA POVRCHU 12
1.2 VÝROBA SÝRŮ S MAZEM NA POVRCHU 14
2 ZRÁNÍ **19**
2.1 METABOLISMUS LAKTÓZY, LAKTÁTU A CITRÁTU 20
2.2 LIPOLÝZA 21
2.3 PROTEOLÝZA 22
2.4 ROZKLAD AMINOKYSELIN V PRŮBĚHU ZRÁNÍ A SKLADOVÁNÍ 22
2.5 TEXTURNÍ VLASTNOSTI 23
2.6 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ ZRÁNÍ 24
3 MIKROFLÓRA SÝRŮ S MAZEM NA POVRCHU **26**
3.1 *BREVIBACTERIUM LINENS* 27
3.2 KORYNEFORMNÍ BAKTERIE 27
3.3 KVASINKY 28
3.4 NEŽÁDOUCÍ MIKROFLÓRA 28
4 BIOGENNÍ AMINY V SÝRECH S MAZEM NA POVRCHU **29**
VÝZNAMNÉ BIOGENNÍ AMINY V SÝRECH 30
II PRAKTICKÁ ČÁST **34**
5 CÍL PRÁCE **35**
6 METODIKA PRÁCE **36**
6.1 POPIS VZORKŮ 36
6.2 ZÁKLADNÍ CHEMICKÁ ANALÝZA 37
6.2.1 Měření obsahu sušiny 37
6.2.2 Měření hodnoty pH 38
6.2.3 Měření obsahu tuku 38
6.2.4 Měření obsahu amoniaku 39
6.2.5 Měření thiobarbiturového čísla 39
6.3 TEXTURNÍ PROFILOVÁ ANALÝZA 40
6.4 STANOVENÍ OBSAHU VOLNÝCH AMINOKYSELIN 40
6.5 STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ 41
7 VÝSLEDKY A DISKUZE **43**

7.1 STANOVENÍ OBSAHU SUŠINY 43
7.2 STANOVENÍ PH 44
7.3 STANOVENÍ OBSAHU TUKU 50
7.4 STANOVENÍ OBSAHU AMONIAKU 52
7.5 STANOVENÍ THIOBARBITUROVÉHO ČÍSLA 53
7.6 STANOVENÍ TEXTURNÍCH VLASTNOSTÍ 55
7.7 STANOVENÍ VOLNÝCH AMINOKYSELIN 57
7.8 VÝVOJ OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ VE VZORCÍCH SÝRŮ S MAZEM NA POVRCHU 62
8 ZÁVĚR 71
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 73
SEZNAM ZKRATEK 832
SEZNAM OBRÁZKŮ 83
SEZNAM TABULEK 85

ÚVOD

Sýry s mazem na povrchu jsou charakteristická skupina sýrů vyznačující se rozvojem mazové kultury na jejich povrchu. Tato mazová kultura svoji metabolickou aktivitou během zrání sýrů přispívá ke změnám barvy, chutě a vůně typické právě pro tento typ výrobků. Dále mohou produkovat biogenní aminy, které mohou působit na zdraví citlivých konzumentů. Mezi nejznámější sýry s mazem na povrchu patří Tvarůžky, Romadůr, syreček, dále pak ze zahraničních především Limburger, Livarot, Tilsit a další.

Během zrání sýrů má na výsledný produkt vliv zejména doba zrání a teplota. Dochází ke změnám biochemickým i mikrobiologickým, které mohou být žádoucí (vývoj aroma a dalších změn působením mikroorganismů) nebo nežádoucí (kažení v důsledku kontaminující mikroflóry). S prodlužující se dobou zrání se mění parametry výrobků, například pH, texturní vlastnosti, vznik biogenních aminů a dalších. Tyto změny může ovlivňovat teplota, relativní vlhkost prostředí, obalové materiály a další.

Diplomová práce popisuje v teoretické části výrobu, zrání, mikroflóru mazové kultury a vlivy ovlivňující zrání a mikroflóru sýrů. Praktická část je zaměřena na sledování vlivu doby skladování sýrů s mazem na povrchu při dvou různých teplotách a porovnávání změn jakostních parametrů. Dále je stanoven obsah volných aminokyselin, což popisuje hloubku zrání. Jsou detekovány biogenní aminy a jejich vývoj v průběhu měsíčního skladování, které mohou mít vliv na lidský organismus.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERISTIKA SÝRŮ S MAZEM NA POVRCHU

Vyhláška 397/2016 Sb. o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje definuje sýry jako výrobky vyrobené vysrážením mléčné bílkoviny z mléka působením syřidla nebo jiných vhodných koagulačních činidel, oddělením podílu syrovátky a následným prokysáním nebo zráním. Vyhláška stanovuje mimo jiné také označení „zrající sýr“, u kterého po prokysání došlo k dalším biochemickým a fyzikálním procesům. [1.]

Sýry patří do skupiny fermentovaných potravin s velmi dlouhou historií. Jejich výroba pravděpodobně sloužila jako první ochrana mléka před kažením. Již ve starověkém Řecku si jich lidé cenily pro jejich chuť a vůni, v dnešní moderní době hrají roli i jejich vlastnosti s potenciálem probiotik a příznivým účinkem na zdraví, navíc se vyznačují vysokou nutriční hodnotou. Právě fermentace spolu s dalšími konzervačními zákroky jsou klíčem k výrazně delší trvanlivosti v porovnání s čerstvým mlékem. Další výhodou fermentace může být zvýšení stravitelnosti mléka a potlačení nežádoucích škodlivých bakterií. [2, 3]

1.1 Sýry s mazem na povrchu

Podle vyhlášky 397/2016 Sb. o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje jsou sýry s mazem na povrchu přírodní zrající sýry, které jsou řazeny podle konzistence ve vztahu k obsahu vody v tukuprosté hmotě sýra mezi sýry měkké. Mezi tyto výrobky je možné zařadit například Romadúr, Limburský sýr, dezertní sýr, pivní sýr, olomoucké tvarůžky a další, mají povrchu pokryt vrstvou bakterií, kvasinek a jsou známé svou typický intenzivní sirovodíkový nebo amoniakální pach. Pro sýry s mazem na povrchu je typické zrání od povrchu dovnitř, kterého se účastní mikroorganismy povrchové mikroflóry s výraznou proteolytickou funkcí. Povrchová mikroflóra je aerobní, tudíž zrání těchto sýrů je zkráceno spíše na týdny než měsíce a roky. Mazová kultura má vliv na oranžovo-červeno-hnědé zbarvení povrchu, vývoji chuti, vůně a struktury. [1, 3, 4, 5, 6]

V první části zrání se účastní zracích procesů bakterie smetanové kultury. Tyto kultury jsou základními kulturami, složených z diplokoků a streptokoků, používaných pro výrobu různých druhů kysaných mléčných výrobků. V základní smetanové kultuře mohou být obsaženy mikroorganismy *Lactococcus lactis* subsp. *lactis, Lactococcus lactis* subsp. *cremoris, Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris, Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* a další. V následující sekundární fázi se uplatňují hlavně koryneformní bakterie

Brevibacterieum linens, Arthrobacter a Microbacterium, mikrokoky *Kocuria rosea* a kvasinky rodů *Toluropsis* a *Candida*. Působením enzymů těchto mikroorganismů, schopných štěpit bílkoviny vznikají metabolity pronikavé vůně a chuti typické pro tyto sýry. V pozdějším stádiu zrání je možné se setkat až se sirným a amoniakálním zápachem. Při výrobě sýrů s mazem na povrchu je nutné pracovat za velmi hygienických podmínek. [3, 7, 8, 9, 10]

České cechovní normy stanovují kvalitativní parametry a jsou zaměřeny na systém kvality. Jsou vydávány Potravinářskou komorou České republiky a řazeny mezi dobrovolné národní značky kvality. Normy jednoznačně určují, které suroviny může výrobek obsahovat a firma splňující kritéria těchto norem se zavazuje, že bude vyrábět určeným technologickým postupem. Požadavky těchto norem splňuje například výrobek Romadúr a Klášterní sýr. Je žádoucí, aby u přírodních měkkých sýrů zrající pod mazem byly vždy obsaženy složky mléko, jedlá sůl, mlékárenské kultury (směs mezofilních kultur včetně *Brevibacterium linens* a kvasinek) a syřidlo. Mezi přípustné složky norma povoluje pomocnou látku chlorid vápenatý a barvivo rostlinného původu. Nepřípustné je do těchto sýrů přidávat konzervanty, dusičnany, rostlinný tuk, kasein, kaseináty. Barva sýru je na řezu smetanově až sýrově žlutá, povrch od žlutohnědé až po oranžovou nebo červenohnědou. Chuť je mléčně nakyslá, charakteristická pro tento typ výrobku, slaná, jemně až výrazně pikantní. Konzistence by měla být jemná, pružná, měkká, podle stupně zralosti až výrazně měkká. [11]

Tradiční sýry s mazem na povrchu jsou částí kulturního dědictví daného regionu, obsahují bohatou a rozmanitou mikroflóru pocházející především ze surovin a prostředí a mají schopnost bojovat proti patogenům. V tabulce 1 je znázorněn výčet vybraných sýrů s mazem na povrchu, jejich země původu a doba zrání. Každý z těchto sýrů se vyznačuje typickými vlastnostmi, například z měkkých sýrů je známý Chaumes, který má jasně oranžový povrch, dále z měkkých sýrů s mazem na povrchu Tilsit, u kterého jsou typické bílé pruhy na oranžovém povrchu sýru a jsou pro něj typické nepravidelné otvory v těstě. [2., 12]

Tabulka 1: Přehled sýrů s mazem na povrchu [12, 13]

Druh sýru	Země původu	Doba zrání [měsíc]
Měkké sýry s mazem na povrchu		
Limburger	Belgie	<1
Romadur	Německo	<1
Chaumes	Francie	<1
Poloměkké sýry s mazem na povrchu		
Münster	Francie	1
Brick	USA	
Monterey	USA	1-2
Saint Pulin	Francie	1-2
Taleggio	Itálie	2
Havarti	Dánsko	1-3
Tilsit	Německo	1-5
Bel Paesa	Itálie	4-5
Syreček	Česká republika	1-2
Tvrdé sýry s mazem na povrchu		
Danbo	Dánsko	1-2
Comte	Francie	3-6
Kyselé sýry s mazem na povrchu		
HarzerRoller	Německo	<1
Tvarůžky	Česká republika	<1

1.2 Výroba sýrů s mazem na povrchu

Výroba sýrů je řazena mezi jednu z nejnáročnějších mlékařských technologií, jelikož během výroby podléhají téměř všechny složky mléka fyzikálně-chemickým a také biologickým změnám. [14]

Za základní surovinu pro výrobu sýrů je považováno kravské mléko. Syrové mléko je takové, které nebylo zahřáto nad teplotu 40 C a neprošlo žádným jiným ošetřením s rovnocenným účinkem. Mléko jako klíčový zdroj nutrientů mláďat savců hraje klíčovou roli ve výrobě sýrů, výroba sýrů slouží jako konzervační prostředek mléka s příjemnou chutí a výživovými vlastnostmi. [2, 14, 15]

Pro výrobu sýrů s mazem na povrchu je používáno syrové mléko. Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 ze dne 29. dubna 2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu, udává požadavky na syrové mléko. Mezi tyto požadavky patří například:

- mléko musí být získáno od zvířat nevykazující žádný příznak nakažlivé choroby přenosné mlékem na člověka; musí být získáno od zvířat, která jsou v dobrém zdravotním stavu, nevykazují známky choroby, a zejména netrpí žádnou infekcí pohlavního ústrojí doprovázenou výtokem, ani enteritidou s průjmem, doprovázenou horečkou, nebo viditelným zánětem vemena; která nevykazují žádné zranění vemena, jež by mohlo mít vliv na mléko;
- v případě brucelózy, musí pocházet od krav nebo buvolů ze stáda, které je ve smyslu směrnice 64/432/EHS (1) prosté nebo úředně prosté brucelózy;
- v případě tuberkulózy musí pocházet od krav nebo buvolů ze stáda, které je ve smyslu směrnice 64/432/EHS úředně prosté tuberkulózy a další [2, 16, 17]

Úprava mléka před zpracováním

Mimo požadavky dané nařízením mléko musí splňovat technologické vlastnosti (kysací schopnost a syřitelnost), požadavky na zabezpečující zdravotní nezávadnost (obsah mikroorganismů a počet somatických buněk) a také chemické složení ovlivňuje výtěžnost výroby a složení sýra. Syřitelnost znamená schopnost mléka srážet se působením syřidla. Tuto vlastnost ovlivňuje zejména obsah bílkovin a zastoupení jednotlivých kaseinových frakcí, struktura micel, obsah vápenatých iontů,… Správná titrační kyselost, která je v případě mléka pro výrobu sýrů do hodnoty 8° SH, ideálně kolem hodnoty 7,6° SH. Kyselost dle Soxhlet-Henkela je vyjádření potřebného objemu [ml] hydroxidu sodného o koncentraci 0,25 mol/l k neutralizaci 100 ml mléka za použití indikátoru fenolftaleinu). [14]

Po příjmu mléka je nutné odstranit obsažené mechanické nečistoty pomocí filtrace a centrifugace. Hrubé nečistoty jsou odstraněny filtry umístěné v potrubních systémech. K odstranění jemných nečistot v mléce mohou sloužit čistící odstředivky, kde působí na materiál odstředivá síla a oddělení částic je na základě jejich rozdílných hustot, nečistoty se hromadí v kalových prostorech odstředivky. K mechanickému odstranění spor a mikroorganismů se používá baktofugace, u které se využívá odstředivých sil.

Dále se mléko standardizuje na požadovanou tučnost, každý sýr je charakterizován určitým množstvím tuku v sušině. Využívá se odsmetaňovacích odstředivek pro získání odstředěného mléka a smetany. Následná egalizace se provádí většinou šaržovitě, kdy do standardizačního tanku nebo výrobníku je napuštěn vypočítaný objem odstředěného mléka a smetany. Kontinuálně se standardizuje mléko průtokovým standardizačním zařízením. [15, 18]

Sýření mléka

Zahřáté mléko na teplotu vhodnou pro sýření (30-33 ^{o} C) je ve výrobníku promícháno se syřidlem či jiným koagulačním činidlem a nechá se ustát. Při kyselém srážení bílkovin je pH sníženo z přirozeného pH kolem hodnoty 6,6 k izoelektrickému bodu kaseinu (4,6). Snížení pH lze dosáhnout přidáním čistých mlékařských kultur nebo přidáním kyseliny. Tento způsob sýření se používá například u tvarohu, který je základní surovinou pro výrobu tvarůžků. Pokud je použito pro sýření syřidlo, jedná se o tzv. sladké neboli enzymatické srážení. Dříve byl hojně využíván chymozin (rennin) získaný extrakcí a purifikací ze žaludků sajících telat. Chymozin je proteolytický enzym, který štěpí specifické peptidové vazby v kappa kaseinové frakci mezi 105. (Phe) a 106. (Met) aminokyselinou. Později bylo více využíváno živočišných (pepsin) a mikrobiálních (izoláty z plísní *Cryphonectria parasitica* a *Rhizomucor miehei)* koagulačních činidel. V dnešní době jsou převážně využívána syřidla získána metodami genetického inženýrství. Genetické inženýrství nabízí syřidla, která byla upravena vnesením genů do mikroorganismů. Rostlinné enzymy schopné srážet mléko se používají zřídka. [14, 15, 18]

V primární fázi působí syřidlo na kappa kasein, proteolytickým štěpením vzniká hydrofobní para-kappa-kasein (zůstane v sýřenině) a hydrofilní kappa-kaseinmakropeptid (odchází do syrovátky). V sekundární fázi dojde k tvorbě gelu, podmínkou je teplota vyšší než 6 C a také přítomnost vápenatých iontů. V terciární fázi je dále kasein proteolyticky štěpen, tato fáze nastává v průběhu zrání. [14, 15, 18]

Tvoří se sýřenina, která je výsledkem destabilizace proteinů. Sýry s mazem na povrchu mohou být vyrobeny prakticky z jakéhokoliv druhu syřidla nebo kyseliny používaných pro výrobu sýrů. [8, 14, 15]

Zpracování sýřeniny

Cílem zpracování sýřeniny je vytvoření sýrových zrn, která jsou dále použita k formování sýřeniny a oddělení podílu syrovátky. Prvním krokem je krájení gelu o požadované tuhosti, vznikají tzv. sýrová zrna. Vznik sýrových zrn je provázen synerezí (stahování sýřeniny) a vypuzováním vody a v ní rozpustných látek – syrovátky. Sýřenina se vzhledem k její křehkosti opatrně míchá, zrno se vytužuje. Doba míchání je závislá na konečném obsahu sušiny sýru. [14, 15]

Lisování

Lisováním dojde k oddělení syrovátky od sýrového zrna. U měkkých sýrů jako jsou i sýry s mazem na povrchu se využívá lisování vlastní vahou se samovolným odkapáváním syrovátky, pravidelným obrácením odtéká syrovátka rovnoměrně. [14, 15]

Solení

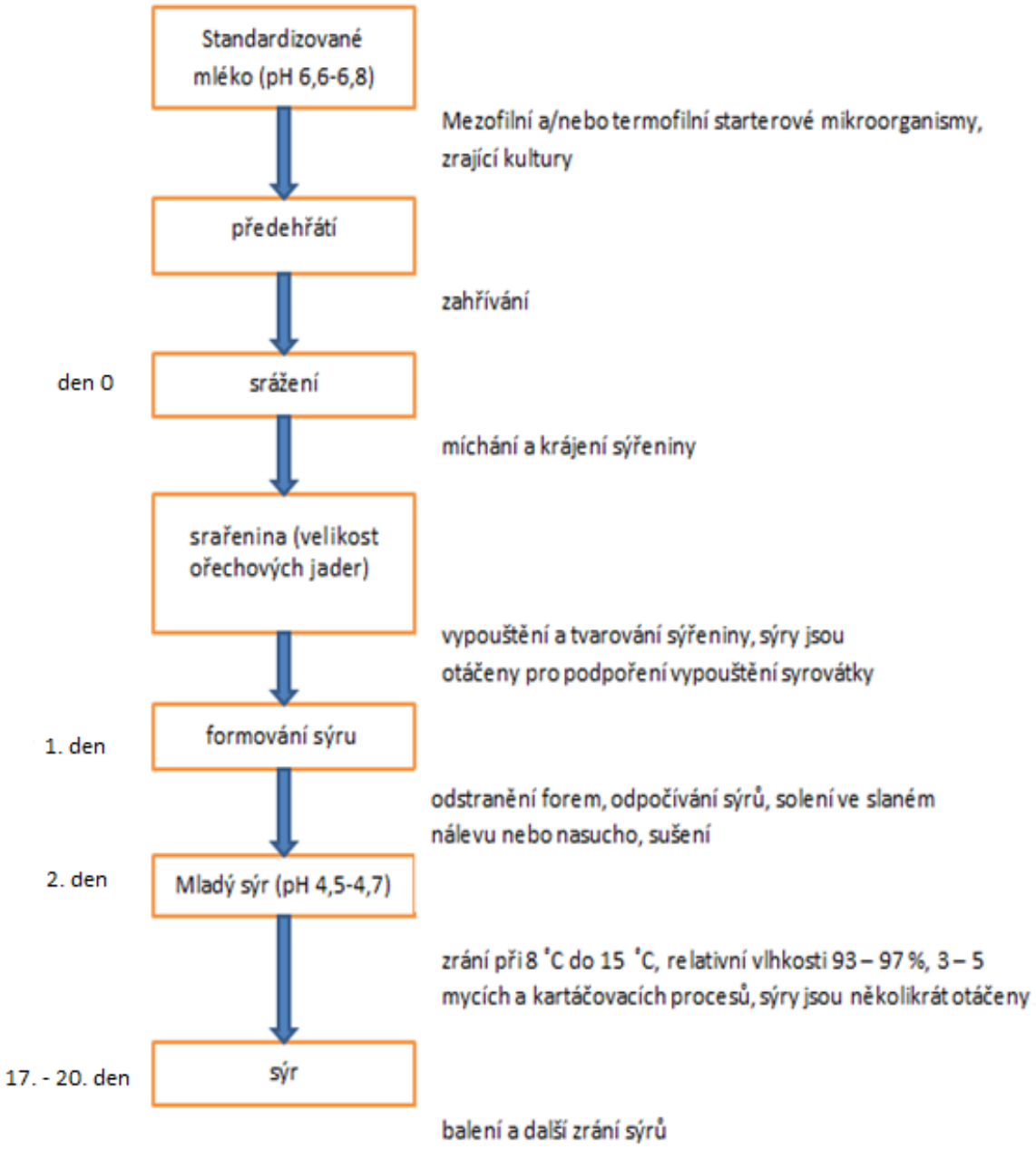
Solení ovlivňuje nejen chuť, ale také zrání. Sýry se zpevní, zreguluje se obsah vody. Sýry jsou soleny v ≥ 18% chloridu sodném. Měkké sýry jako Limburg a Romadůr jsou soleny v roztoku soli po dobu 1,5 - 4 hodin, větší poloměkké a tvrdé sýry po dobu 24 -72 hodin nebo i déle. Alternativní tradiční ruční metody zahrnují otření malých sýrových bloků nebo kol látkami namočenými do slané vody nebo tření povrchu solí. Mnohem novější metodou suchého solení je automatické sprejování sýrů suchými výpary soli. [8, 14]

Aplikace mazové kultury

Po solení následuje nátěr sýrů slanou vodou obsahující kvasinky a bakterie. Tradičně se tento nátěr aplikuje na sýr pomocí rotačních kartáčů, u měkkých sýrů se místo toho používají postřikovače. Nátěr je vyroben z vody obsahující 3% soli nebo více (někdy přidáním části solného roztoku), aby odrážel slanost sýrů.

Nátěry obsahují všechny mikroorganismy nezbytné pro žádoucí sekundární zrání. Často se inokuluje komerčně dostupnými povrchovými kulturami, jako jsou *Debaryomyces hunsenii, Brevibacterium linens* a další. Řadí se mezi tzv. nezákysové kultury, označované také jako sekundární, které jsou záměrně využívány zejména pro zlepšení organoleptických vlastností, typických pro vyráběný druh sýra. Výrobci sýrů se ale nespoléhají jen na tyto kultury a berou v úvahu také s potencioální zdroje typických mikroorganismů z mléka pro výrobu sýrů, solných roztoků, vzduchu z dozrávácích místností, zracích police a lidské kůže. [8, 19]

Na obrázku číslo 1 je schéma výroby sýru s mazem na povrchu Livarot, který je typickým sýrem s mazem na povrchu ve Francii.



Obrázek 1: Výroba sýru s mazem na povrchu Livarot [12, 13]

2 ZRÁNÍ

Zrání sýrů je poslední fází výroby. Je to komplexní soubor změn, které jsou způsobeny aktivitou enzymů mlékařských kultur, enzymů syřidla, nativních enzymů u sýrů z čerstvého mléka,… Hraje klíčovou roli, neboť zahrnuje mnoho biochemických změn, během kterých se mění vzhled, konzistence, chuť, vůně a složení sýru. Jeho průběh je zvlášť významný u sýrů s povrchovým zráním, kvůli rozmanitosti a množství mikroorganismů na povrchu. Povrchy zralých sýrů lze rozdělit na matrici s plísní na povrchu, např. Camembert a Brie a mazem na povrchu, např. Limburger, Tilsit, Brick a Münster. Hlavní reakce zodpovědné za tyto změny jsou glykolýza, proteolýza a lipolýza. Zrání sýrů zahrnuje změny mikroflóry sýrů, mezi primární změny se řadí metabolismus zbytkové laktózy, mléčnanu a citronanu (glykolýza), lipolýza a proteolýza a sekundární biochemické procesy, mezi které se řadí metabolismus a katabolismus volných mastných kyselin. Například podle stádia zrání se množství vzniklých aminokyselin mění, aminokyseliny se mohou dále rozkládat za vzniku aminokyselin, ketokyselin, aldehydů, aminů a dalších. Volné aminokyseliny vznikající v průběhu zrání mají vliv na chuť sýra, slouží jako zdroj energie pro mikroorganismy, jsou důležité ve vztahu k výživě člověka. [14, 15, 20, 21, 22, 23, 24]

Kvalita potravin se mění v průběhu času a tyto změny ovlivňují jejich trvanlivost. Kvalita ve velmi širokém smyslu znamená uspokojit očekávání spotřebitele, jinými slovy kvalitativní zkušenost s potravinami by měla odpovídat kvalitativním očekáváním spotřebitele. Znehodnocení a poškození potravin při skladování souvisí s chemickými, biochemickými, a nebo fyzikálními změnami, jako oxidace lipidů, enzymatické a neenzymatické hnědnutí a absorbování vlhkosti. Tyto reakce mění celkový vzhled potravin, strukturu a vůni a způsobují ztrátu nutrientů, například vitamínů. Potraviny jsou v termodynamickém smyslu nestabilní a mají tendenci se měnit. Trvanlivost má u sýrů obecný význam v souvislosti se zráním sýrů. Existují druhy sýrů, které po čtyřech měsících zrání vyvinuly tolik chutí, že jsou nepřijatelné pro průměrného spotřebitele. Naproti tomu jiný sýr je chuťově přijatelný po 18 měsících zrání a dokonale přijatelnou chuť průměrný spotřebitel zaznamená po několika měsících až letech, například Comte, Limburger, Guyére. [13, 25, 26, 28, 29]

Správná manipulace a skladování sýrů během dozrávání je zásadní. Zrací teploty se pohybují od 12 °C do 18 °C a vlhkost by měla být nejméně 95% pro rychlý vývoj požadované povrchové struktury. Kromě toho je důležité opakované ošetřování sýrů a povrchové úpravy opakovaným rozmazáváním (kartáčováním) pro úspěšné zrání. Typické zrací časy

jsou 2 týdny pro měkké odrůdy typu Limburg / Romadůr (200-500 g), 1-6 měsíců pro poloměkké sýry typu Tilsit (2,5-3,5 kg) a 6-12 měsíců pro tvrdé sýry jako Gruyere (> 2,5 kg). [8]

2.1 Metabolismus laktózy, laktátu a citrátu

Laktóza je hlavní cukr obsažený v mléce a mléčných výrobcích. Jelikož jsou sýry fermentované mléčné výrobky, je metabolismus laktózy na laktát je klíčovým procesem při výrobě všech druhů sýrů. Většina laktózy odchází při výrobě sýrů do syrovátky. Zbylou laktózu metabolizují bakterie mléčného kvašení buď glykolytickou drahou (většina startérových bakterií) nebo fosfoketolázovou drahou (startér *Leuconostoc* spp.). Hlavní produkty metabolismu laktózy jsou L- nebo D-laktát a také racemická směs obou. Některé studie uvádí, že u zrání sýrů ze syrového mléka dochází více k produkci D-laktátu. Některé kmeny bakterií, např. *Leuconostoc* spp., mohou produkovat i jiné produkty, např. ethanol. Vzniklý laktát přispívá k nakyslé chuti sýru v ranné fázi zralosti sýru. Okyselení sýru laktátem zabezpečuje určitou pufrační aktivitu sýru a tím zabezpečuje růst jen určitých mikroorganismů a aktivitu enzymů během zrání. [22, 30, 31, 32, 33, 34]

Laktát je důležitým prekurzorem pro množství reakcí během zrání sýrů. Může být totiž dále metabolizován různými cestami na sloučeniny přispívající k aromatizaci sýra. Například bakterie rodu *Clostridium* metabolizuje laktát na kyselinu máselnou, oxid uhličitý a vodík a to může vést k vadě sýru „pozdní duření“. Laktát může být metabolizován během zrání na propionát, acetát, oxid uhličitý a vodu. Například u sýrů švýcarského typu (například ementál) propionát a acetát přispívají k aromatizaci sýru, oxid uhličitý migruje přes sýřeninu, může se hromadit v určitých místech a tvořit oka, častěji je ale rozpuštěn v hmotě sýru nebo uniká do prostředí. Metabolismus laktátu je možná nejdůležitější při zrání povrchových vrstev u sýrů zrajících na povrchu. Laktát u sýrů s plísní nebo mazem na povrchu je aerobně metabolizován, to má za následek zvýšení pH na povrchu sýru. pH od povrchu do středu sýru potom klesá. Při vyšším pH na povrchu se vysráží fosforečnan vápenatý, ten migruje ze středu sýru na povrch. Vysoké pH a menší podíl fosforečnanu vápenatého vede k měknutí těchto sýrů. [22, 30, 31, 32, 33]

Většina citrátu v mléce se nachází v rozpustné fázi a ztrácí se společně se syrovátkou. Malé množství citrátu, které neuniklo do syrovátky, slouží jako substrát pro metabolismus mikroorganismů, kteří jej metabolizují *(Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Leuconostoc* spp. a

další). Vznikají senzoricky aktivní látky, hlavně diacetyl. Diacetyl může být konvertován na acetoin, 2,3-butandiol a 2-butanon, což jsou také důležité aromatické sloučeniny v některých typech sýru. Pro vývoj aroma některých sýrů je metabolismus citronanu velmi důležitý. [22, 31, 33]

2.2 Lipolýza

Mléčný tuk sestává téměř výhradně z glycerolu s estericky vázanými mastnými kyselinami s nejméně čtyřmi atomy uhlíku. Vlastnosti triacyglyceridů jsou dány obsaženými mastnými kyselinami (například kyselina máselná, kapronová, kaprylová, kaprinová, laurová, myristová, palmitová, stearová, olejová). Obsah a typ mastných kyselin je ovlivňujícím faktorem bodu tání a texturních vlastností tuku. [18]

Mléčný tuk je nezbytný pro vývoj chuti v sýrech během zrání. Tuky v potravinách degradují hydrolytickými nebo oxidativními změnami. Během zrání se uplatňují spíše hydrolytické procesy, vzhledem k nízkému oxidačne-redukčnímu potenciálu sýru a malému množství polynenasycených mastných kyselin v mléčném tuku dochází k oxidaci málo. Mléčný tuk obsahuje vysoké koncentrace mastných kyselin s krátkým a středně dlouhým řetězcem. Triglyceridy podléhají hydrolýze působením přirozených, endogenních a / nebo exogenních lipáz, které vedou k uvolnění mastných kyselin v sýru během dozrávání. Enzymatickou hydrolýzou triacylglyceridů na mastné kyseliny a glycerol při lipolýze je přímo ovlivňován rozvoj chuti sýru.

Lipasy v sýru pocházejí z různých zdrojů - mléka, syřidla (syřidlové pasty), startérových kultur, pomocný startérových kultur, exogenních lipáz,… Mléko obsahuje přirozeně přítomnou lipázu (lipoproteinovou lipázu). Ta uvolňuje mastné kyseliny ze sn-1 a sn-3 polohy mono-, di- nebo triglyceridů (tzn. z 1. a 3. uhlíku mono-, di- nebo triglyceridů) a z polohy sn-1 fosfolipidů. Uplatňuje se hlavně v sýrech z čerstvého mléka, protože pasterací se částečně inaktivuje. [31, 33]

Lipolýza může být různě rozsáhlá. Vysoký stupeň lipolýzy je zaznamenán u sýrů s plísní na povrchu (5-10 % mastných kyselin se nachází ve volné formě), protože sýry mají zdroj lipolytických enzymů ze syřidlové pasty nebo sekundární mikroflóry. Syřidlové pasty se vyrábí macerací žaludku a jeho obsahu mladého mléčného zvířete (tele, jehně nebo kůň) do pasty, která kromě chymosinu obsahuje vysokou hladinu pregastrické esterázy, což je enzym produkovaný žlázami jazyka a je s krmivem dán do žaludku. Komerční syřidla jsou

prosté lipázové aktivity. Vysoký stupeň lipolýzy je i u sýrů s mazem na povrchu kvůli přítomnosti mazové mikroflóry. Dále je vysoký stupeň lipolýzy v sýrech, ve kterých se vyvinula sekundární mikroflóra, často spojena s lipolytickou schopností této mikroflóry. Bakteriální nebo mazové kultury používané k nátěru povrchu jsou často charakterizovány vysokými hladinami lipolýzy. Je dokázáno, že koryneformní mikroorganismy (například *Brevibacterium linens, Arthrobacter*) ve spojení s povrchovým nátěrem jsou poměrně lipolytické. [22, 33]

2.3 Proteolýza

Proteolýza patří k nejsložitější a nejdůležitější biochemické reakci během zrání, která je charakterizována sekvencí jednotlivých kroků, které zahrnují počáteční hydrolýzu kaseinu na peptidy s dlouhým řetězcem působením zbytkového koagulantu a plazminu, hydrolýzu peptidů s dlouhým řetězcem na střední a krátký řetězec peptidů působením bakterií mléčného kvašení a kvasinek a následnou hydrolýzou na dipeptidy, tripeptidy a volné aminokyseliny. [22, 31, 35]

Proteázy a peptidázy hrají důležitou roli při zrání sýra. Proteolýza má ovlivňuje množství peptidů a volných aminokyselin. Proteolýza hraje zásadní roli ve změnách texturních, rozpadá se proteinová síť, zvyšuje se pH (zejména v sýrech s plísní nebo mazem na povrchu), má za následek aromatizaci a pachuť (např. hořkost) sýra vytvářením peptidů a volných aminokyselin, uvolňují se substráty (aminokyseliny) pro sekundární katabolické změny (např. deaminace, dekarboxylace, transaminace, odsíření, katabolismus aromatických látek jako jsou fenylalanin, tyrosin, tryptofan a reakce aminokyselin s jinými. Proteinázy katalyzující proteolýzu pochází z různých zdrojů, například ze syřidla, mléka (plazmin a proteinázy somatických buněk), primární a sekundární zákysové kultury a nezákysové kultury. Rozsáhlá degradace aminokyselin je u sýrů, kde je na povrchu mikroflóra z různých mikroorganismů, například *Brevibacterium linens*, *Penicillium roquefortii.*[22, 31, 35, 36]

2.4 Rozklad aminokyselin v průběhu zrání a skladování

Katabolismus aminokyselin patří k sekundárním reakcím při zrání sýrů a hraje hlavní roli v rozvoji chuti během zrání sýrů. Tyto reakce mohou vést k řadě sloučenin, včetně amoniaku, aminů, aldehydů, fenolů, indolu a alkoholů, které mohou přispět k výsledným vlast-

nostem sýru. Hrají roli ve výsledné chuti mnoha sýrů, avšak významné jsou hlavně u sýrů plísňových sýrů a sýrů s mazem na povrchu.

Ačkoliv je zapotřebí mnohem více objasnit katabolismus aminokyselin, jsou velice dobře známy dvě cesty, které jsou důležité především pro katabolismus aromatických aminokyselin a Met:

1. První série reakcí je iniciována aktivitou aminotransferázy, která přenáší aminoskupinu z aminokyseliny (donor) na alfa-keto kyselinu (obvykle alfa-ketoglutarovou kyselinu) a vede k tvorbě nové alfa-ketokyseliny a aminokyseliny (obvykle Glu). Alfa-ketokyseliny jsou relativně stabilní, ale i tak jsou dále degradovány na jiné senzoricky aktivní sloučeniny (například aldehydy, alkoholy).
2. Druhá série reakcí je iniciována aktivitou aminokyselinových lyzí, dochází k eliminaci, jsou štěpeny postranní řetězce aminokyselin.

Další možná dráha katabolismu aminokyselin zahrnuje dekarboxylaci, deaminaci, transaminaci, odsíření nebo možná hydrolýzu postranních řetězců aminokyselin. Zahrnuje konverzi výsledných sloučenin (aminů a a-ketoacidů) stejně jako samotných aminokyselin na aldehydy, především působením deaminláz na aminy. Některé aminy vedou k vývoji pachů a pachutí a také biogenní aminy s fyziologickým účinkem. Konečným stupněm katabolismu aminokyselin je redukce aldehydů na alkoholy nebo jejich oxidace na kyseliny. Aminokyseliny obsahující síru mohou projít rozsáhlou změnou, vedoucí k tvorbě řady sloučenin, včetně methanthiolu a dalších derivátů síry. [22, 31, 33, 37]

V kontextu mikroorganismů souvisejících se sýry se doposud většina studií zabývala inkubací klidových buněk nebo buněčných extraktů z modelového vzorku sýru nebo v syntetických médiích obsahujících kasein nebo volné aminokyseliny. Pouze malé množství studií ukázalo *in situ* katabolismus aminokyselin. Bakterie mléčného kvašení, koryneformní bakterie, propionické bakerie, plísně, kvasinky a *Geotrichum candidum* jsou schopny produkovat aromatické sloučeniny z aminokyselin, ale tato schopnost je velice závislá na kmeni. [8]

2.5 Texturní vlastnosti

Pro spotřebitele hraje důležitou roli struktura při nákupu sýra. Strukturu ovlivňuje především intenzita proteolýzy, obsah chloridu sodného, sušiny, tuků a pH. Textura sýra a

funkční a smyslové vlastnosti se vyvíjejí během proces dozrávání. Tvrdost sýrů se snižuje během dozrávání více při vyšší teplotě. [21]

2.6 Faktory ovlivňující zrání

Rychlost a rozsah fyzikálních a chemických reakcí závisí na mnoha faktorech, které mohou být rozděleny do vnitřních a vnějších faktorů. Mezi vnější faktory mohou být zařazeny charakteristiky prostředí, například teplota, relativní vlhkost, expozice světla a složení plynné atmosféry v obalu potraviny. Vnitřními faktory jsou myšleny vlastnosti samotné potraviny - vlhkosti a aktivita vody, pH, dostupnost kyslíku, přídatné a konzervační látky. [25]

Mezi vlivy při výrobě sýrů ovlivňující charakter daného výrobku jsou řazeny fyzikální a chemické vlastnosti syrového mléka, zákysové a nezákysové bakterie mléčného kvašení, sekundární kultury, významně přispívají procesu výroby. Je vysoce žádoucí udržování vysoké úrovně hygieny a znalosti vlastností povrchové mikroflóry při zrání, protože sýrové povrchy jsou vystaveny nesterilnímu prostředí. Nežádoucí kontaminující bakterie ihned začnou růst, pokud je narušena rovnováha sýrové mikroflóry. [12, 37]

Senzorické vlastnosti jsou výsledkem složité rovnováhy mezi těkavými a netěkavými chemickými sloučeninami z mléčného tuku, bílkovin a sacharidů během dozrávání. V dnešní době výrobci snižují náklady výroby zkrácením zrací doby, to má za následek odlišně organoleptické vlastnosti v porovnání se sýry dozrávajících za standardních podmínek. Řešením tohoto problému by však mohlo být zrychlení procesu zrání například zvýšením teploty zrání, exogenními enzymy, doplňkovými kulturami a další. [22, 24]

Faktory ovlivňující zrání a senzorické vlastnosti sýrů:

Teplota – jeden z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících trvanlivost potravin, zvýšená teplota obecně zvyšuje rychlost chemických reakcí. Teplota působí přímo na rychlost růstu a biologickou aktivitu sýra dozrávající mikroflóry. Zvyšování teploty je jedním z nejjednodušších způsobů, jak urychlit zrání. Rychlost reakcí a fyzikálních procesů se exponenciálně zvyšují s teplotou. Pokud se zvýšení teploty použije pro urychlení zracích procesů, je nutné dodržet přísné hygienické normy, zamezit výskytu a šíření kontaminujících mikroorganismů, které by mohly zhoršit kvalitu sýra a způsobit alimentární infekce či intoxikace. [20, 21, 25, 27]

Relativní vlhkost – poměr tlaku páry vzduchu k tlaku jeho nasycených par. Rovnovážná relativní vlhkost je relativní vlhkost vzduchu, který obklopuje potravinu, která je v rovnováze se svým prostředím. Pokud je potravina vystavena konstantní vlhkosti, produkt získá nebo ztratí vlhkost, dokud nedosáhne relativní rovnovážné vlhkosti. Tento proces významně ovlivňuje fyzikální a chemické vlastnosti potraviny v průběhu skladování nebo zrání. Teplotě. [25, 38]

Obsah vody – Struktura, konzistence a průběh dozrávání sýrů s mazem na povrchu, které jsou výsledkem vývoje bakteriální mikroflóry na povrchu, jsou do značné míry ovlivněny obsahem vody v sýru. Správný obsah vody, který zajišťuje získání produktu vysoké kvality, závisí na obsahu tuku. Například v sýru Romadůr o tučnosti 20, 30, 40, 45 a 50 % v sušině je obvyklý obsah vody 60 - 61; 57 - 58; 53 - 54; 51 - 52 a 49 - 50 % (čím více tuku, tím méně vody). V sýru typu Limburger s 20 a 40 % obsahu vody v sušině by měl být obsah vody 58 - 59 a 51 - 52 %. Sýry se špatným množstvím vody mají nepravidelnou konzistenci a atypickou, často nečistou vůni. Vysoká kyselost vody a vysoká koncentrace soli na povrchu sýru jsou inhibitory správného vývoje mnoha mikroorganismů. Zrací proces je inhibován a může začít až po neutralizaci části kyselin na úroveň, kdy růst a aktivita enzymů je možná. [39]

pH a celková kyselost - hodnota pH potraviny silně ovlivňuje rozpustnost a funkčnost bílkovin. Rozpustnost bílkovin má přímý vliv na reakční chování a rozpustnost bílkovin je obvykle v blízkosti izoelektrického bodu. Změny pH potraviny také mění vlastnosti tvaru molekul nebo náboje bílkovin a tím významně ovlivňují stabilitu při skladování potravin. pH výrazně ovlivňuje enzymatickou aktivitu a každý enzym má oblast optimálních hodnot pH, přičemž enzymy mohou zcela ztratit aktivitu v prostředí s extrémně vysokým nebo naopak nízkým pH. pH většiny sýrů po výrobě je 5,0 – 5,2; kyselost se zvyšuje během prvních fází dozrávání a dosahuje maximálně přibližně pH 5 třetí den po výrobě. Například ale kyselost sýra Limburger je vyšší a jeho pH dosahuje hodnot mnohem nižších než 5,6. Po krátkém zrání sýrů pH klesá. [25, 29, 39]

Složení potraviny – stabilita potravin v potravinách je dána jejich složením. Například přítomnost tuků, zejména polynenasycených tuků, způsobí, že produkt bude náchylnější k chemickým a fyzikálním změnám. [25]

Dále zrání ovlivní způsob lisování, velikost sýru, vývoj požadované mikroflóry jak na povrchu sýru tak celkové složení kultur.

3 MIKROFLÓRA SÝRŮ S MAZEM NA POVRCHU

Primární kultury, které způsobí prokysání mléka při výrobě sýrů a také se podílí na vývoji chuti a vůně během zrání jsou řazeny nejčastěji bakterie rodů *Lactococcus, Lactobacillus*, a *Streptococcus.* Mezofilní rody bakterií *Lactococcus, Lactobacillus* se používají při výrobě nízkodohřívaných sýrů, například sýry eidamského typu. Termofilní rody bakterií *Streptococcus* jsou využívány při výrobě sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou, například parmezán. [40, 41]

Sýry s mazem na povrchu jsou charakteristické růstem sekundární mazové kultury během zrání na jejich povrchu. V rané fázi zrání se mazová kultura projevuje růstem kolonií, omýváním povrchu je tato kultura rozmístěna po celém povrchu sýru. Mazová kultura je aerobní, její vývoj má vliv na vzhled, chuť, texturu a dobu zrání Je to komplexní mikroflóra složená z bakterií a kvasinek. Tyto mikroorganismy jsou zodpovědné za vývoj chuťových vlastností sýru. Dozrávání těchto typů sýrů začíná vývojem kvasinek, které metabolizují laktát na oxid uhličitý a vodu a vytvářejí alkalické metabolity, jako je amoniak. Tyto metabolity vedou k odkyselení povrchu sýra, což umožňuje růst gram-pozitivních bakterií pozitivních na katalázu, tolerantních vůči soli, ale méně tolerantní kyselému prostředí, jako jsou bakterie *Micrococcaceae* a koryneformní bakterie. U těchto sýrů se vyskytují značné rozdíly v biochemii zrání kvůli aktivitě povrchové mikroflóry. [35, 41, 42, 43]

Mazovou kulturu na povrchu sýru tvoří z velké části bakterie rodu *Brevibacterium linens*. Dříve byly tyto bakterie dokonce považovány za nejdůležitější, ale byly objeveny i další dominantní mikroorganismy, například *Arthrobacter nicotianae, Corynebacterium ammoniagenes, Corynebacterium variabile* a *Rhodococcus fasciana* další. Nátěr použitý při výrobě jako startér nejčastěji obsahuje mikroflóru složenou z *Debaryomyces hansenii, Brevibacterium linens, Arthrobacter nicotianae, Corynebacterium ammoniagenes* a *Staphylococcus sciuri.*

Povrchové zrání začíná nárustem kvasinek, které využívají laktát a zvyšují povrchové pH sýru. Jakmile je pH na povrchu >6, začne nárust mikroorganismů *Brevibacterium linens*, koryneformních bakterií a stafylokoků (mikrokoky), které postupně pokryjí celý povrch sýra.

Za oranžovo-červeno-hnědou barvu povrchu sýru je zodpovědná také mikroflóra na něm obsažená. Červené skvrny na povrchu jsou důsledkem produkce červeného karotenoidu produkovaného těmito bakteriemi. Další studie ukázaly, že červenohnědé nebo oranžové

pigmenty jsou pravděpodobně způsobeny také žlutým pigmentem bakterie *Arthrobacter* sp. v povrchové mikroflóře. [23, 35, 41, 42, 43]

3.1 *Brevibacterium linens*

Bakterie tvaru tyčinek uspořádané samostatně nebo v dvojicích. Jsou přísně aerobní, halotolerantní a kolonie jsou často pigmentovány žlutým nebo fialovým zbarvením. Jejich optimální růstová teplota je 20 až 35 ° C, rozsah růstu 8-37 ° C. Tyto bakterie jsou schopny růst v širokém rozmezí pH od 5,5 do 9,5. Jsou citlivé na kyselé podmínky, při zrání sýra spoléhá na růst kvasinek a plísní, které metabolizují laktát z mléka na CO2 a vodu. Tolerance k soli je různá v rozmezí od 0 do 20 % soli s průměrem přibližně 5%.

Základní používaná bakterie sýrů s mazem na povrchu. Pro potravinářství jsou zajímavé svou produkcí aminokyselin, jako je kyselina glutamová, která je používána při výrobě potravin jako látka zlepšující chuť. Produkují také důležité enzymy, které se používají při dozrávání sýra. V sýrech s mazem na povrchu je žádoucí jejich proteolytická aktivita. Počet proteolytických bakterií, kam jsou řazeny i *Brevibacterium linens*, narůstají až po určité době skladování. Nejdříve kvasinky svoji aktivitou dezaminují aminokyseliny vzniklé proteolýzou, tvoří se ketokyseliny a uvolňuje se amoniak. Amoniak snižuje kyselost sýru a vytvoří se takto vhodné prostředí pro *Brevibacterium linens*, které má optimální hodnotu pH kolem neutrální oblasti. [44, 45, 46]

3.2 Koryneformní bakterie

Literatura vyčleňuje skupinu koryneformích bakterií založenou na morfologických kritériích. Jsou nesporotvorné, gram-pozitivní tyčinky. Jsou fakultativně anaerobní a chemoorganotrofní mikroorganismy. Skupina "koryneformních bakterií" patří do třídy Actinobacteria, zahrnující různé rody bakterií. Většina z nich je známá izolací z klinických vzorků. Aktinobakterie zahrnují také několik aerobních druhů, které jsou přítomny na povrchu zrajících sýrů a již po desetiletí se k tomuto účelu používají. Směsné koryneformní bakterie jsou součástí tradičních bakterií mikroflóru sýra. Koryneformní bakterie rostoucí na sýrech během dozrávání přispívají k vývoji struktury sýra, příchuti a tvorbě barev. [43, 45]

3.3 Kvasinky

Kvasinky jsou eukaryotické mikroorganismy, které mají oxidační i fermentační metabolismus v závislosti na přístupu kyslíku. Svou činností odkyselují a produkují sloučeniny, které tvoří příznivé prostředí pro růst bakterií mazové kultury. Vykazují proteolytickou a lipolytickou aktivitu a tím se účastní zrání sýrů.

Jsou schopny rozkládat kyselinu mléčnou a odbourávají aminokyseliny, tím se zvýší obsah amoniaku. Oba tyto pochody mají za následek zvýšení pH. Proto má střed sýru kyselejší charakter než jeho povrch. S nárustem pH získává sýr také měkčí strukturu. [35, 43, 46, 47]

3.4 Nežádoucí mikroflóra

Zdravotní riziko by mohlo představovat onemocnění listerióza, jehož původcem je bakterie *Listeria monocytogenes*. Gram- pozitivní, fakultativně anaerobní a psychrotrofní tyčinka schopna růst i při nízké teplotě. Bakterie se do mléka dostávají před nakažená zvířata, která se infikují vodou, půdou, senem nebo siláží. Pro člověka může být pak riziko nepasterované mléko. Velmi často mohou růst na povrchu sýru, proto jsou sýry s mazem na povrchu náchylné k těmto bakteriím, důvodem je otírání a omývání povrchu slanou vodou při jejich výrobě a nebezpečí přenosu patogenních mikroorganismů.

Příznaky nakažení jsou různé formy gastroenteritidy či chřipkové symptomy. Infekce touto bakterií vedoucí k onemocnění je pro určité skupiny obyvatelstva vyšší, je možno k nim řadit těhotné ženy, novorozence, imunokompromitovaní dospělí a starší lidé. První zmínka o původu onemocnění ze sýrů je z roku 1985 v USA a bylo způsobeno konzumací právě čerstvých sýrů. Dále byly hlášeny další případy včetně úmrtí, a proto je důležité získávat informace a analyzovat možná rizika k lepšímu porozumění a řízení rizik. [48, 49, 50, 51]

Dále je důležitá ochrana před nežádoucími plísněmi, které mohou být zdroji mykotoxinů. Celá řada z nich mohou mít mutagenní, karcinogenní, teratogenní účinky, mohou ovlivňovat funkci imunitního systému a dráždit zažívací trakt. Mlékem se mohou tyto mikroorganismy dostat až do konečného výrobku, neboť některé přežívají technologické operace v průběhu výroby nebo se do výrobku mohou dostat sekundárně při výrobě a skladování. Sýry s mazem na povrchu jsou náchylné k výskytu těchto mikroorganismů, neboť řada sýrů s mazem na povrchu se vyrábí z čerstvého mléka. Dodržování správné výrobní a hygienické praxe je však tohle riziko minimalizováno. [49]

4 BIOGENNÍ AMINY V SÝRECH S MAZEM NA POVRCHU

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární organické bazické dusíkové látky s biologickou aktivitou, které jsou produkované v potravinách dekarboxylací aminokyselin bakteriemi s dekarboxylázovou aktivitou (*Enterobacteriaceae,* kmeny *Lactobacillus, Streptococcus, Micrococcus, Enterococcus* a *Pseudomonas*). Biogenní aminy výsledkem metabolismu bílkovin. Velké množství volných aminokyselin jako prekurzorů biogenních aminů je tvořeno proteolýzou kaseinů. Za nejvýznamnější biogenní aminy, které se vyskytují v potravinách jsou považovány histamin, putrescin, cadaverin, tyramin, tryptamin, β-fenylethylamin, spermidin a spermin. [52, 53, 54, 55, 56]

Biogenní aminy přítomny ve všech živých organismech, a některé mají při vyšší konzumaci významné fyziologické funkce v lidském organismu (zdroj dusíku, prekurzory hormonů atd.). Nicméně metabolická aktivita některých mikroorganismů může způsobit, že se v potravinách hromadí, což představuje toxikologické riziko. Konzumace potravin obsahujících velké množství těchto aminů může vyvolat toxické účinky, tyto toxické dávky je ale obtížné stanovit, je to závislé na individuálním jedinci. Nejvýznamnější z toxikologického hlediska jsou tyramin a histamin. Jsou-li přítomny v nefermentovaných potravinách, znamená to přítomnost nežádoucí mikroflóry. V současné době jediným biogenním aminem, který je kontrolován právními předpisy v Evropské unii je histamin (horní hranice 100 $mg.kg^{-1}$ u ryb). [52, 53, 54, 55, 57, 58]

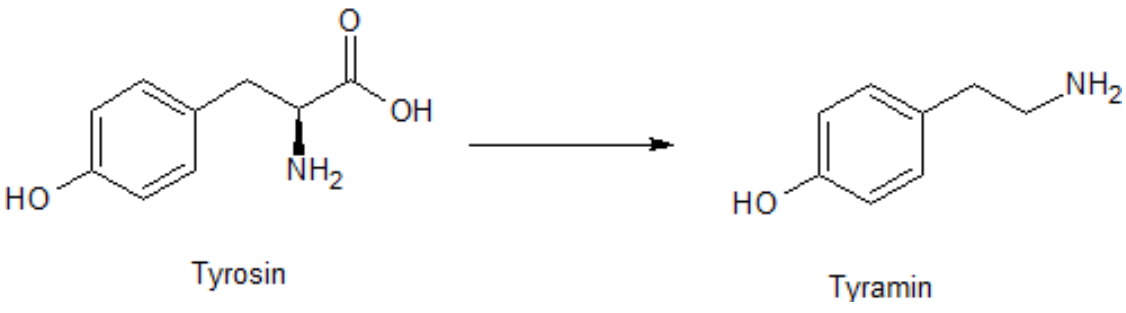
Sýr je fermentovaný mléčný výrobek, který obsahuje potenciálně škodlivé množství biogenní aminy, zejména tyramin, histamin a putrescin. Sýry obsahují velké množství bílkovin a tím tvoří ideální prostředí pro tvorbu biogenních aminů. Tvoří se zde dekarboxylací aminokyselin enzymatickou a mikrobiální aktivitou. Biogenní aminy v sýru vznikají hlavně činností bakterií mléčného kvašení a *Enterobacteriaceae* (*Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium*). Sýry ze syrového mléka, které má horší hygienickou kvalitu a může zapříčinit zvýšenou tvorbu biogenních aminů. Reakce vedoucí k tvorbě biogenních aminů v sýrech závisí na koncentraci volných aminokyselin nebo peptidů, přítomnosti bakterií s dekarboxylázovou aktivitou, pH, koncentraci solí a vodní aktivitě. Nejvíce však ovlivňuje tvorbu biogenních aminů a jejich množství doba skladování a teplota. Je potvrzeno, že s rostoucí dobou skladování se zvyšuje obsah biogenních aminů v sýrech. Skladování při vyšší teplotě taktéž vykazuje vyšší množství biogenních aminů než skladování při teplotách nižších. Znalost vlivů podmínek při skladování na tvorbu biogenních aminů v sýrech

je důležitá pro možné snížení rizika spojeného s konzumací sýrů, které obsahují vysoké koncentrace biogenních aminů. [52, 53, 57, 59, 60]

Sýry s mazem na povrchu obsahují relativně vysoký obsah bílkovin a použité mikrobiální kultury mohou produkovat zvýšené množství biogenních aminů. Také technologie výroby má vliv na množství biogenních aminů v těchto sýrech, konkrétně jejich omývání během zrání. U sýrů, které jsou během zrání omývány je výrazně snížen obsah biogenních aminů. [57]

Významné biogenní aminy v sýrech

Tyramin nebo-li 4-(2-aminoethyl)fenol patří mezi aromatické biogenní aminy. Prekurzorem pro jeho vznik je aminokyselina tyrosin. Mezi jeho producenty patří bakterie rodů *Bacillus, Citrobacter, Clostridium, Escherichia,* bakterie mléčného kvašení rodu *Lactobacillus, Pediococcus* a *Streptococcus* a také zástupci čeledi *Enterobacteriaceae*. Je jedním z nejčastěji identifikovaným biogenním aminem v nežádoucí vysoké koncentraci. Z mléčných výrobků jsou přítomny v jogurtech, sýrech a dalších. Ačkoliv neexistuje žádné legislativní omezení, které by stanovilo povolené množství tyraminu v sýru, je dokázáno, že prahové hodnoty toxicity jsou 100-400 mg/kg sýru. Stanovení obsahu tyraminu v sýru má velký význam nejen kvůli jeho toxickým účinkům, ale také proto, že může být použit jako ukazatel kvality potravin, neboť množství tyraminu se postupně zvyšuje v důsledku mikrobiálních účinků kontaminující mikroflóry, což znamená nepřiměřené podmínky při zpracování potravin a skladování. Při intoxikaci se projeví symptomy jako jsou zvýšený krevní tlak způsobující migrény a dokonce i mozkové krvácení, zejména u citlivých jedinců. Nedávno byl prokázán také jeho cytotoxický účinek. [58, 61, 62, 63]

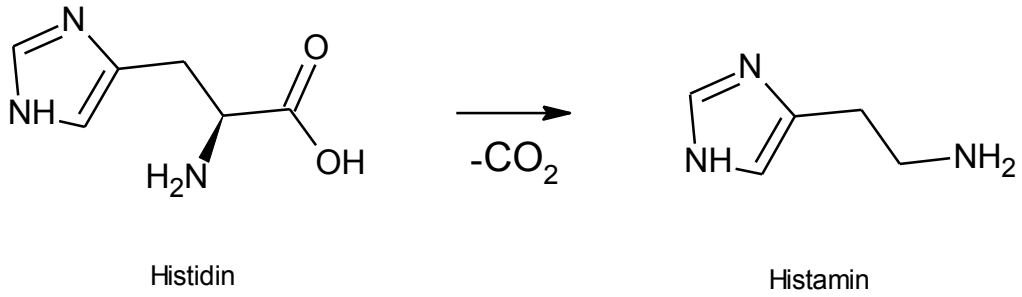


Obrázek 2: Schéma vzniku tyraminu

Histamin je heterocyklický primární amin, jehož prekurzorem je aminokyselina histidin, známý svou složitou fyziologickou rolí v lidském těle. Sloučenina je pro člověka důležitá vzhledem k její roli ve fungování nervového systému, kde působí jako chemický mediátor a neurotransmiter. Je přítomen v žírných buňkách a bazofilních buňkách periferní krve, jeho uvolňování hraje roli při alergické reakci, při zánětlivých procesech, při regulaci spánku a sekreci žaludeční kyseliny. Lidské tělo může syntetizovat histamin ve specializovaných buňkách, také je přítomen v mnoha potravinách a nápojích. [64]

Označuje se jako jeden z nejvíce toxických a nejčastěji se vyskytující biogenní amin v potravinách. Je nejčastěji označován jako původce příznaků otrav jídlem, jako je pocení, bolest hlavy, průjem a zvracení. Za hlavní producenty histaminu v sýru jsou označovány bakterie mléčného kvašení. Vysoké koncentrace histaminu nejvíce obsahují ryby a produkty z ryb, dále sýry a mléčné výrobky, fermentované maso, zelenina jsou potraviny. U produktů z ryb je histamin produkován hlavně Gram-negativními bakteriemi a jeho přítomnost je proto indikující nežádoucí mikrobiální aktivity. Bakterie mléčného kvašení produkující histamin mohou být přítomny v surovinách nebo v použitých výchozích kulturách, mohou se objevit v sekundární mikrobiologii, která se vyvíjí během fermentačních procesů, nebo vstupovat do potravin jako kontaminující látky během výroby a skladování. [65, 66, 67]

Kritická dávka orálně přijatého histaminu byla odhadnuta v rozmezí 100-200 mg. I přes skutečnost, že sýry mohou obsahovat extrémně vysoké hladiny histaminu a dalších biogenních aminů (> 2000 mg / kg), dosud nebyly stanoveny tolerance. Pouze v rybách byla stanovena hranice histaminu Evropskou unií na 50-200 mg / kg rybí tkáně. [66]



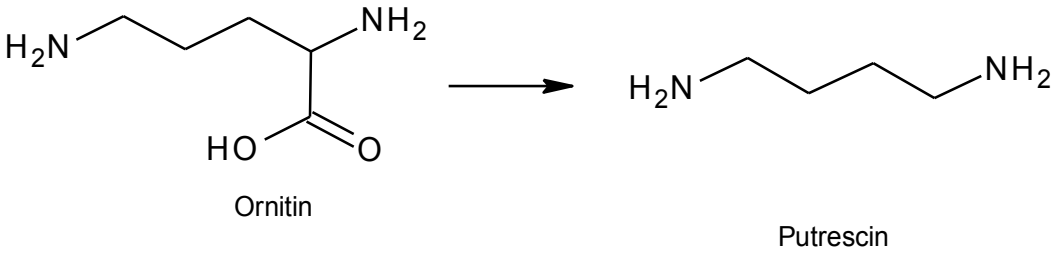
Obrázek 3: Schéma vzniku histaminu

Putrescin neboli 1,4-diaminobutan z hlediska dělení biogenních aminů je to polyamin (v molekule má více než jednu aminoskupinu). V potravinách může být putrescin produkován jak kontaminační mikroflórou, tak startérovými kulturami. Kontaminující mikroorganismy z rodů *Enterobacteriaceae* a *Pseudomonadaceae* patří mezi nejčastěji se vyskytující producenty putrescinu.

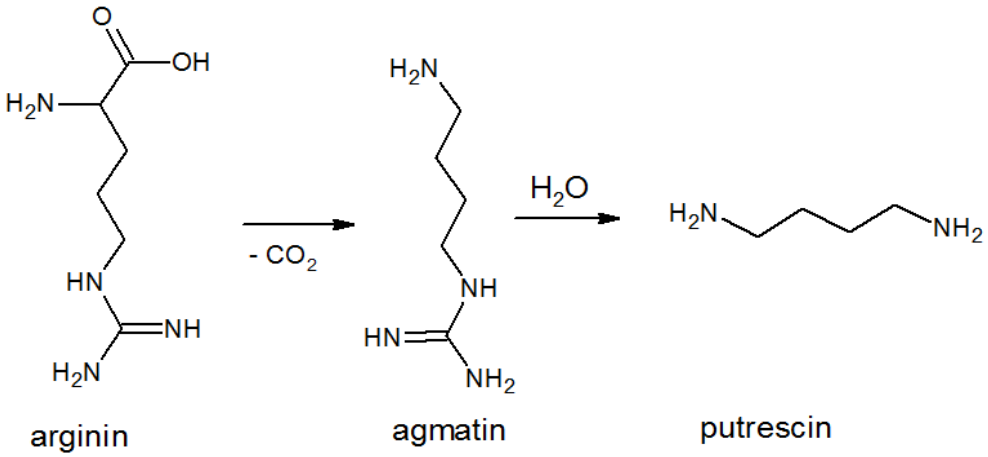
Na rozdíl od jiných biogenních aminů, které jsou tvořeny přímou dekarboxylací odpovídajících aminokyselin, gram-negativní bakterie mohou produkovat putrescin přes tři různé metabolické cesty, kde některé enzymy mohou dokonce existovat ve dvou různých formách, zejména v biosyntetické nebo biodegradační formě. První cesta znamená přímou dekarboxylaci ornitinu ornitin dekarboxylázovým enzymem. Bakterie, které jsou schopny tvořit putrescin touto dráhou jsou *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli, Salmonella,* a *Enterobacter*). Druhá a třetí dráha začíná dekarboxylací argininu arginin dekarboxylázou, která vede k tvorbě agmatinu. V druhé cestě se agmatin konvertuje na putrestin a močovinu agmatinázou. Nejčastěji se účastní bakterie z *Enterobacteriaceae*. Ve třetí cestě se agmatin konvertuje na putrestin prostřednictvím N-karbamoylového putrestinového meziproduktu za účasti dvou enzymů. Prvním enzymem je agmatin deiminasa a druhým N-karbamoyl-putrestin-amidohydrolázou. Třetí cesta je typicky využívané rostlinami. Tato dráha se uplatňuje pouze u některých druhů gram-negativních bakterie, zejména *Pseudomonas* spp. [68, 69, 70, 71]

Tento biogenní amin nejčastěji identifikován ve víně a dále v sýrech a dalších fermentovaných mléčných výrobcích. Jsou označovány jako potenciátory toxických účinků jiných aminů (hlavně histaminu a tyraminu) v důsledku inhibice detoxikačních enzymů. U potravin bohatých na bílkoviny jsou vysoké koncentrace putrescinu indikací hygienických nedostatků v potravinovém řetězci. Putrescin je také známý jako jeden z hlavních ukazatelů kažení masa.

I když je endogenně vytvořen a je důležitý pro některé fyziologické metabolické dráhy, je také prekurzor karcinogenních nitrosaminů při reakci s dusitany. Karcinogenita patří k jeho nejzávažnějším účinkům. Přestože hraje roli při nárustu nádoru, dosud nebylo stanoveno přípustné množství v potravinách. Studie navrhují maximum přípustného množství pro kysané zelí, ryby, sýry, fermentované klobásy a koření na 140, 170, 180, 360 a 510 mg / kg. [68, 69, 70]



Obrázek 4: schéma vzniku putrescinu



Obrázek 5: schéma vzniku putrescinu

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem této diplomové práce byl popis a experimentální změření měnících se jakostních parametrů v závislosti na době zrání sýrů s mazem na povrchu, které byly skladovány při dvou různých teplotách.

Mezi dílčí cíle, které byly v práci řešeny patří:

- charakteristika sýrů s mazem na povrchu
- provedení literární rešerše o vývoji jakostních parametrů sýrů s mazem na povrchu
- založení skladovacího experiment
- provedení měření ve stanovených termínech
- na základě literární rešerše a výsledků z praktické části práce vyvodit závěry

6 METODIKA PRÁCE

Pro experiment bylo koupeno 6 různých vzorků sýrů s mazem na povrchu dostupných v tržní síti. Sýry byly skladování jeden měsíc při dvou různých teplotách 6 ± 2 °C a 12 ± 2 °C. Následovaly odběry a jednotlivé analýzy ihned po nákupu vzorku (výchozí teplota stejná), dále po dvou týdnech a třetí odběr byl po jednom měsíci.

6.1 Popis vzorků

Vzorky A, B, C, D, E a F, odběry v dnech 0 (po nákupu), po 15 dnech skladování, po 34 dnech skladování.

A – poloměkký nízkotučný zrající sýr pod mazem, nízkotučný, tvaru kvádru, světlá krémová barva uvnitř, povrch žlutooranžový

složení: mléko, jedlá sůl, mlékařské kultury, přírodní barvivo annato

sušina 35 %, tuk 1 %, hmotnost balení 90 g

datum spotřeby: 13. 12. 2017

B – měkký zrající sýr pod mazem, tvaru kvádru, světlá krémová barva uvnitř, povrch žlutooranžový, aromatická vůně

složení: mléko, jedlá sůl, mlékařské kultury, přírodní barvivo annato

sušina 44 %, tuk v sušině 40 %, hmotnost balení 100 g

datum spotřeby: 19. 12. 2017

C – měkký zrající sýr pod mazem, vyrábí se z odtučněného mléka, tvar koleček, barva zlatožlutá, na povrchu tmavší, typická aromatická vůně

složení: tvaroh, jedlá sůl nejvýše 5,5 %, regulátory kyselosti E 500, E 170, mléčné kultury

sušina nejméně 34 %, tuk nejvýše 1 %, hmotnost balení 100 g

datum spotřeby: 12. 12. 2017

D – zrající sýr pod mazem s výraznou chutí, tvar větších koleček, barva žlutooranžová na povrchu, těsto světle žluté

složení: mléko, smetana, jedlá sůl, mléčné kultury, přírodní barvivo beta-karoten

sušina nejméně 48 %, tuk nejméně 28 %, hmotnost balení 90 g

datum spotřeby: 27. 2. 2018

E – poloměkký plnotučný zrající sýr pod mazem, tvar kvádru, barva světle hnědá, na povrchu tmavší

složení: mléko, jedlá sůl, mlékařské kultury, syřidlo, barvivo beta karoten

sušina nejméně 48 %, tuk v sušině nejméně 48 %, jedlá sůl nejvíce 5 %, hmotnost baleni 90 g

datum spotřeby: 26. 3. 2018

F - měkký zrající sýr pod mazem, přidána směs koření s chilli, tvaru kvádru, světlá krémová barva uvnitř, povrch žlutooranžový, aromatická vůně

složení: mléko, jedlá sůl, mlékařské kultury, přírodní barvivo annatto, směs koření s chilli (0,2%, obsahuje kouřové aroma)

sušina 44 %, tuk v sušině 40 %, balení 100 g

datum spotřeby: 20. 2. 2018

6.2 Základní chemická analýza

6.2.1 Měření obsahu sušiny

Obsah celkové sušiny je stanoven jako hmotnostní podíl látek, které po úplném vysušení vzorku do konstantní hmotnosti v sušárně zbydou (dle normy ČSN EN ISO 5534). Sušina byla stanovena vážkovou metodou s pískem, kde písek byl jako nasávací hmota. Do vysušených zvážených hliníkových misek s tyčinkou (sušárna Venticell, Brněnská Medicinská Technika a. s., ČR), které obsahovaly asi 20 g křemičitého písku (Lach-Ner, s.r.o.), byly naváženy 3 g písku. Následovalo promíchání písku se sýrem skleněnou tyčinkou a vzorek byl vložen do sušárny. Teplota v sušárně byla 105 ± 1 °C. Vzorky byly v sušárně do konstantního úbytku hmotnosti. Poté byly zváženy. Každý vzorek byl stanovován třikrát a výsledky byly zprůměrovány.

Pro výpočet obsahu sušiny byl použit vzorec:

$$p = \frac{m_3 - m_1}{m_n} \cdot 100 \ [\%]$$

kde: m_1 – hmotnost misky s pískem [g]

m_n – hmotnost vzorku před sušením [g]

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

6.2.2 Měření hodnoty pH

Ke stanovení hodnoty pH byl použit vpichový pH metr (EUTECH INSTRUMENTS pH510, BioTech a.s.). pH bylo měřeno u každého vzorku na povrchu ve středu sýru. Každé měření bylo opakováno třikrát a výsledky byl použit průměr z měření.

6.2.3 Měření obsahu tuku

Ke stanovení obsahu tuku byl použit butyrometr. Na skleněnou lodičku bylo naváženo 3,00 g vzorku sýru a vložen do butyrometru. Otvorem butyrometru bylo nalito asi 14 ml kyseliny sírové (Lach-Ner, s.r.o.), byla vložena zátka a následovalo ponoření do vodní lázně o teplotě 65 °C a mícháno. Jakmile se sýr rozpustil, byl otvorem přidán 1 ml amylalkoholu (Lach-Ner, s.r.o.) a do 2/3 stupnice butyrometru nalita zředěná kyselina sírová. Po zazátkování byl obsah butyrometru promíchán otočením a butyrometr s obsahem byl vytemperován na teplotu 65 °C. Dále se obsah odstřeďoval na odstředivce (MIKRO 200R, Hettich Zentrifugen, Germany) 5 minut a poté byl butyrometr ponechán ve vodní lázni o teplotě 65 °C. Dále bylo možno na stupnici butyrometru přímo odečíst procenta tuku. Na počátku experimentu byl stanoven obsah tuku ve výrobcích a porovnán s tvrzením výrobců na obale (viz. tabulka 2: stanovené množství tuku a obsah tuku deklarovaný výrobcem).

Tuk v sušině v % byl stanoven podle vztahu:

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

Kde: x – tuk v sušině [%]

t – tučnost [%]

s – sušina [%]

6.2.4 Měření obsahu amoniaku

Amoniak byl měřen ve speciálních Conwayových nádobkách, kde byl v určité části nádobky vytěsněn a v jiném oddílu nádobky byl absorbován roztokem kyseliny trihydrogenborité (Lach-Ner, s.r.o.). Množství takto absorbovaného amoniaku se stanoví titrací kyselinou sírovou (Lach-Ner, s.r.o.) a za použití indikátorů bromkresolové zeleně a methylčerveně. Vnější strana Conwayovy nádobky byla potřeba vrstvou vazelíny, homogenizovaný vzorek s vodou v poměru 1:3 (homogenizátor Stomacher) byl odstředěn. Do vnitřního prostoru nádobky byl napipetován 1 ml 1 % kyseliny trihydrogenborité (Lach-Ner, s.r.o.) a přidány 2 kapky indikátoru. Na jednu stranu vnějšího prostoru nádobky se pipetoval 1 ml nasyceného roztoku K_2CO_3 (Lach-Ner, s.r.o.)a na stranu protější 1 ml odstředěného homogenátu. Nádobka byla zavřena skleněnou destičkou a nechala se 2 hodiny stát při pokojové teplotě. Po dvou hodinách se absorbovaný amoniak titroval 0,005 M kyselinou sírovou a zaznamenala se spotřeba. Změna barvy roztoku byla ze zelené do růžové. Byla použita průměrná hodnota ze tří stanovení každého vzorku. [72]

Pro výpočet obsahu amoniaku byl použit vztah:

$$NH_3[mg \cdot kg^{-1}] = \frac{170 \cdot V_{H2SO4} \cdot F_{H2SO4}}{0{,}25}$$

Kde: V_{H2SO4} – objem H_2SO_4

F_{H2SO4} – faktor H_2SO_4

6.2.5 Měření thiobarbiturového čísla

Stanovuje se obsah malondialdehydu, což je sekundární produkt oxidace lipidů. Malonilaldehyd reaguje s kyselinou 2 – thiobarbturovou za vzniku komplexu, který má růžové zbarvení. Naváželo se 5 g homogenizovaného vzorku do 50 ml zkumavky a přidalo se k tomuto množství 15 ml kyseliny chloristé (Lach-Ner, s.r.o.) o koncentraci 3,38 %. Dále se přidalo 0,5 ml 4,2 % etanolového roztoku butylhydroxytoluenu (Lach-Ner, s.r.o.). Zároveň byl prováděn slepý pokus, kdy místo homogenizovaného vzorku bylo přidáno 5 ml destilované vody. Vzorek byl ručně rozmíchán a nechal se 15 minut třepat na třepačce (Laboratorní třepačka LT2), odstředit 5 min při 6000 ot/min a zfiltrován před papírový filtr. Z filtrátu byly odebrány 4 ml do skleněné zkumavky a přidány 4 ml roztoku kyseliny thiobarbiturové (Lach-Ner, s.r.o.) o koncentraci 0,02 mol/l. U slepého pokusu bylo pouze k 4 ml vzorku přidáno 4 ml destilované vody. Zkumavky byly zahřívány ve vodní lázni při teplotě 100 °C

45 minut. Po zchlazení zkumavek byly vzorky přefiltrovány přes stříkačkový filtr a následovalo měření absorbance na spektrofotometru při vlnové délce 450 nm. Obsah kyseliny thiobarbiturové byl vypočítán z kalibrační křivky.

6.3 Texturní profilová analýza

Analýza textury vzorků sýru byla provedena na texturometru TA.XT Plus (Stable Micro Systems Ltd., Godalming, Velká Británie) za použití sondy o průměru x mm. Ze sýru (jeho středu) byl vykrojen válec o průměru 35 mm. Výšku válce určovala výška daného výrobku. Vzorek byl vložen na podložku přístroje a byl proveden kompresní test, kdy byl vzorek 2x stlačen sondou. Z naměřených dat byla určena tvrdost a soudržnost vzorku.

6.4 Stanovení obsahu volných aminokyselin

Jednotlivé vzorky sýra byly homogenizovány v třecí misce s tloučkem a lyofilizovány (lyofilizátor; ALPHA 1-4 LSC, CHRIST, LABICOM s.r.o., ČR). Prvním krokem pro stanovení obsahu volných aminokyselin z lyofilizátu byla třístupňová extrakce lithno-citrátovým pufrem. K 1 g lyofilizátu ve zkumavce bylo přidáno 10 ml lithno-citrátového pufru. Zavřená zkumavka se nechala 30 min třepat na třepačce. Dále byl obsah odstředěn na odstředivce (EBA 21, Hettich ZENTRIFUGEN, Germany, Tuttlingen) při rychlosti 6000 ot/min a době 10 minut. Po přelití odstředěného roztoku do odměrné baňky o objemu 25 ml byl znovu přidán lithno-citrátový pufr (7 ml) a celý postup se opakoval, dále se přidalo posledních 7 ml pufru a naposled se postup opakoval. Odměrná baňka byla doplněna přesně po rysku lithno-citrátovým pufrem. Získaný extrakt byl pipetován do eppendorfkových zkumavek a nechal se odstředit. Přes stříkačkový filtr o porozitě 0,45 μm byly vzorky přefiltrovány a následně analyzovány na HPLC (Binární pumpa Agilent, autosampler LabAlliance, USA, kolona s termostatm; UV/VIS DAD detektor (λ = 254 nm); a degaser 1260 Infinity, Agilent Technologies).

- Použité chemikálie:
    - Acetonitril CHROMASOLV Plus, for HPLC, ≥ 99,9 % - Sigma- Aldrich
    - Metanol CHROMASOLV Plus, for HPLC, ≥ 99,9 % - Sigma- Aldrich
    - Acetátový pufr s 5 % přídavkem acetonitrilu
    - Milli-Q voda upravená přístrojem The aqua MAX Ultra 370 Series
    - Standardy FAA – Sigma- Aldrich

Optimální nastavení HPLC-UV pro analýzu bylo:

- Mobilní fáze 80:20 ACN:metanol (A) a 0,1 mol.l^{-1} acetátový pufr s 5 % ACN pH 5,2 (B) v poměru určeným elučním gradientem:
  - 0,0 průtok = 0,5 [ml/min] %B = 100,0 [%]
  - 5,0 průtok = 0,5 [ml/min] %B = 95,0 [%]
  - 6,0 průtok = 0,5 [ml/min] %B = 95,0 [%]
  - 15,0 průtok = 0,5 [ml/min] %B = 94,0 [%]
  - 19,0 průtok = 0,5 [ml/min] %B = 84,0 [%]
  - 32,0 průtok = 0,5 [ml/min] %B = 65,0 [%]
  - 38,0 průtok = 0,5 [ml/min] %B = 0,0 [%]
  - 42,0 průtok = 0,5 [ml/min] %B = 0,0 [%]
  - 47,0 průtok = 0,5 [ml/min] %B = 100,0 [%]
  - 55,0 průtok = 0,5 [ml/min] %B = 100,0 [%]
  - 60,0 průtok = 0,5 [ml/min] %B = 100,0 [%]

Dávkovaný objem na kolonu byl 5 µl, teplota autosampleru 5 °C, teplota analytické kolony 37 °C, vlnová délka 254 nm

Postup deprivatizace byl následující: 5 µl vzorku + 35 µl borátového pufru (0,2 mol.l^{-1}, pH 7,3) + AQC (1mg/1ml ACN) 10 minut, 55 °C, poté byl vzorek zchlazen a bylo přidáno 170 µl kyseliny mravenčí (20 mmol.l^{-1}) a takto připravený vzorek byl dávkován do systému.

6.5 Stanovení biogenních aminů

Prvním krokem byla derivatizace vzorků. Ke každému vzorku bylo přidáno 100 µl 1,7-heptandiaminu (Sigma-Aldrich) v koncentraci 500 mg/l, který měl fukci interního standardu. Dále byl 1 ml vzorku odpipetován do derivatizační nádobky a bylo přidáno 1,5 ml karbonátového pufru o pH 11,1 – 11,2. Ke vzorkům bylo přidáno 2 ml čerstvě připraveného roztoku dansylchloridu (Sigma-Aldrich), který měl koncentraci 5 g/l v acetonu (Merck). Derivatizační nádobka byla uzavřena a vložena na třepačku, kde v temnu probíhalo třepaní po dobu 20 hodin. Po 20 hodinách třepání bylo ke vzorku přidáno 200 µl prolinu (Sigma-Aldrich), derivatizační nádobka opět uzavřena a byla vložena na třepačku, kde se třepala hodinu. Po uplynutí jedné hodiny byly ke vzorku přidáno 3 ml heptanu a 3 minuty bylo se vzorek protřepával ručně. Následně byl odpipetován 1 ml heptanové vrstvy do

vialky a obsah vialky byl odpařen při teplotě 60 °C do sucha proudem dusíku. Suchý odparek byl zředěn 1,5 ml acetonitrilu (SigmaAldrich). Vialky byly uchovávány v mrazícím zařízení při teplotách -18 °C až do doby analýz, které probíhaly metodou HPLC-UV.

Bezprostředně před analyzováním vzorku byly vzorky přefiltrovány přes stříkačkový filtr (porozita 0,22 µl). Jednotlivé separace byly provedeny gradientovou elucí (voda/acetonitril) na koloně s parametry 50 x 3 mm a pórovitostí 1,8 µl (Agilent, Paolo Alto, USA) při teplotě 30 °C. Průtok kolonou byl 0,453 ml/min. Detekce byla provedena pomocí UV/VIS detektoru, vlnová délka byla nastavena na 254 nm. Chromatogramy byly vyhodnoceny za použití softwaru Chromeleon 6.8.

HPLC systém pro analýzu:

- Vysoce účinný kapalinový chromatograf Dionex HPLC UltiMate 3000, Německo
- Analytická kolona s předkolonou ZORBAC RRHD Eclipse Plus C18 (3 x 50 mm, 1,8 µl), Agilent Technologies, USA

Chemikálie: -Acetonitril CHROMASOLV Plus, for HPLC, ≥ 99,9 % - Sigma- Aldrich

- Milli-Q voda upravená přístrojem The aqua MAX Ultra 370 Series

Optimální nastavení HPLC-UV pro analýzu bylo:

- Mobilní fáze 10 % ACN (A) a 100 % ACN (B) v poměru určeným elučním gradientem
  - 0,010 průtok = 0,453 [ml/min] %B = 64,00 [%]
  - 1,400 průtok = 0,453 [ml/min] %B = 72,00 [%]
  - 3,500 průtok = 0,453 [ml/min] %B = 85,00 [%]
  - 4,000 průtok = 0,453 [ml/min] %B = 100,00 [%]
  - 9,000 průtok = 0,453 [ml/min] %B = 100,00 [%]
  - 11,50 průtok = 0,453 [ml/min] %B = 64,00 [%]
  - 15,50 průtok = 0,453 [ml/min] %B = 64,00 [%]

Dávkovaný objem na kolonu byl 5 µl, teplota autosampleru 5 °C, teplota analytické kolony 37 °C, vlnová délka 254 nm

Za takto daných podmínek byly retenční časy u stanovovaných biogenních aminů: tryptamin 1,46 min, fenyletylamin 1,85 min, putrescin 2,02 min, kadaverin 2,25 min, histamin 2,tyramin 3,58 min, spermin 3,97 min, spermidin 5,28 min.

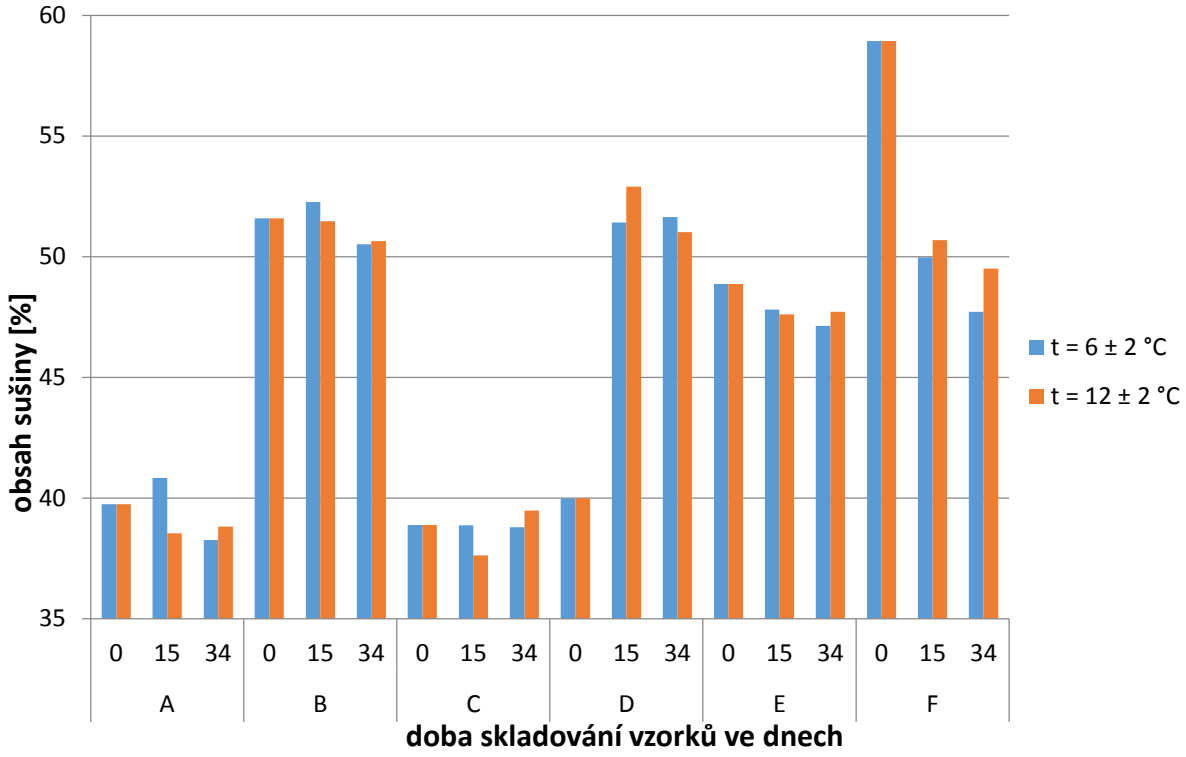
7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Stanovení obsahu sušiny

V průběhu zrání během jednoho měsíce byl sledován obsah sušiny a výsledky jsou znázorněny v grafu 1. Obsah sušiny se měnil u všech vzorků v průběhu skladování, změny v obsahu sušiny nebyly výrazné, u všech vzorků byla změna do 5 %. Pouze u vzorku F byl zaznamenán větší rozdíl mezi obsahem sušiny na počátku experimentu (58,93 %), po dvou týdnech klesla na hodnotu 49,97 % u teploty skladování 6 ± 2 °C a 50,69 % u teploty skladování 12 ± 2 °C, po jednom měsíci byl obsah sušiny stále klesal na hodnotu 47,71 % při teplotě skladování 6 ± 2 °C a 49,5 1% při teplotě skladování 12 ± 2 °C. S dobou skladování obsah sušiny ve vzorcích klesal. U potravin obecně s délkou skladování se zvyšuje obsah sušiny v důsledku odpařování vody. V případě námi provedeného experimentu, kdy se obsah sušiny naopak snižoval s dobou skladování by se dalo přisoudit k smršťování kaseinových bílkovin a vypuzování vody. Zároveň obalové materiály, ve kterých byly vzorky uchovávány měly různé inertní vlastnosti a byly různě propustné, mohlo docházet k zadržování vlhkosti ve výrobku. Tímto tématem se také zabývala Bubelová a kol., která uvádí, že u konzerv byly zaznamenány malé změny v obsahu sušiny, ale výrobky skladované v obalech s horšími bariérovými vlastnostmi vykazovaly vyšší obsah sušiny s prodlužující se dobou skladování a toto zvýšení sušiny bylo výraznější u výrobků skladovaných při vyšších teplotách. [73]

Vzorky A a C obsahovaly nejméně sušiny, tento výsledek je patrný také proto, že obecně platí, že čím méně sušiny, tím méně tuku a vzorky A a B jsou nízkotučné.

Teplota skladování měla vliv na obsah sušiny ve vzorcích, rozmezí rozdílu obsahu sušiny mezi vzorky skladovanými při teplotě 6 ± 2 °C a 12 ± 2 °C byl do 3 %. Konečný obsah sušiny po jednom měsíci skladování byl vždy mírně vyšší u vzorků skladovaných při teplotě 12 ± 2 °C. Stejný výsledek potvrzuje ve své studii Kalhotka a kol., který využíval stejný typ sýru k analýze obsahu sušiny při skladování za různých teplot. [74]



Graf 1: vývoj obsahu sušiny ve vzorcích

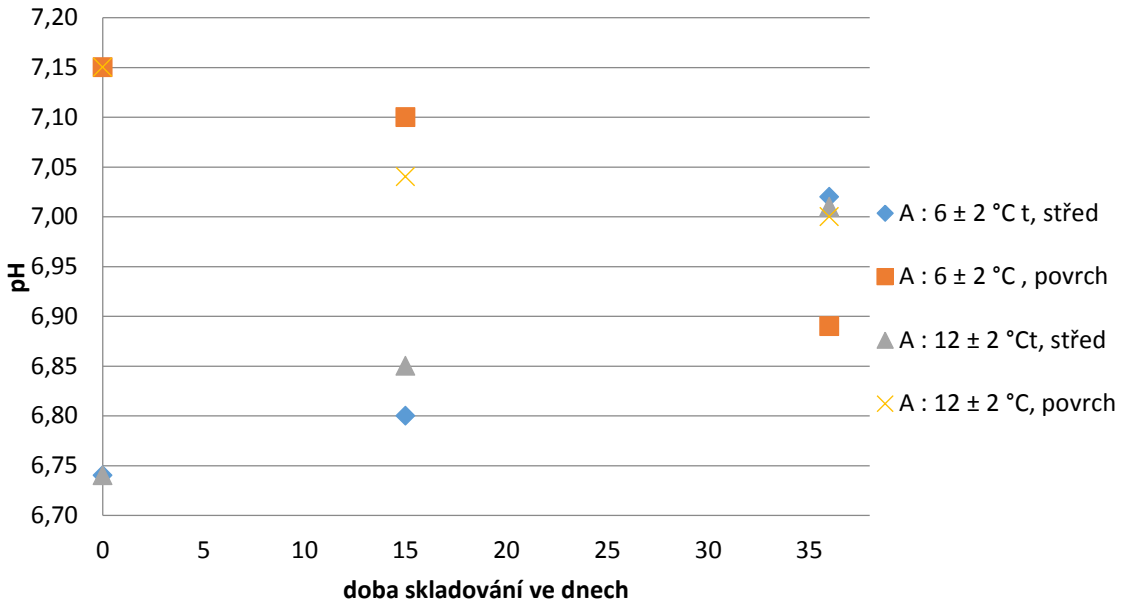
7.2 Stanovení pH

Bylo změřeno pH u všech výrobků ve středu a na povrchu výrobků a sledován vývoj pH v rámci skladování během jednoho měsíce. Měření pH bylo provedeno na počátku experimentu, poté v 15. dni skladování a 34. dni skladování. Byl sledován vliv teploty a doby skladování na pH.

Vývoj pH jak ve středu (v těstě) tak na povrchu výrobku při skladování během jednoho měsíce se pohybovalo v rámci vzorků v rozmezí od 6 do 7,5. Je možné říci, že na počátku skladování bylo pH povrchu a středu sýru odlišné, na konci skladování se byl rozdíl mezi pH povrchu a středu v užším rozmezí, vždy ale bylo pH povrchu vyšší než ve středu výrobku i na konci skladování. To je zapříčiněno povrchovou mazovou kulturou, která je aplikována na povrch těchto sýrů. Nejdříve svou činností kvasinky rozkládají kyselinu mléčnou, odbourávají aminokyseliny za současného uvolňování amoniaku a to má za následek snížení kyselosti sýra. Dále proteolytické bakterie (např. *Brevibacterium linens*) zvyšují pH svojí aktivitou. Přítomnost těchto mikroorganismů pouze na povrchu sýru má také za následek, že střed sýru má zpravidla kyselejší charakter. [22, 31, 35, 36, 46, 75]

Změna pH probíhala rychleji za vyšších teplot.

Na následujících grafech 2-7 pro vzorky A, B, C, D, E, F jsou uvedeny hodnoty pH, které se měnily v průběhu skladování.

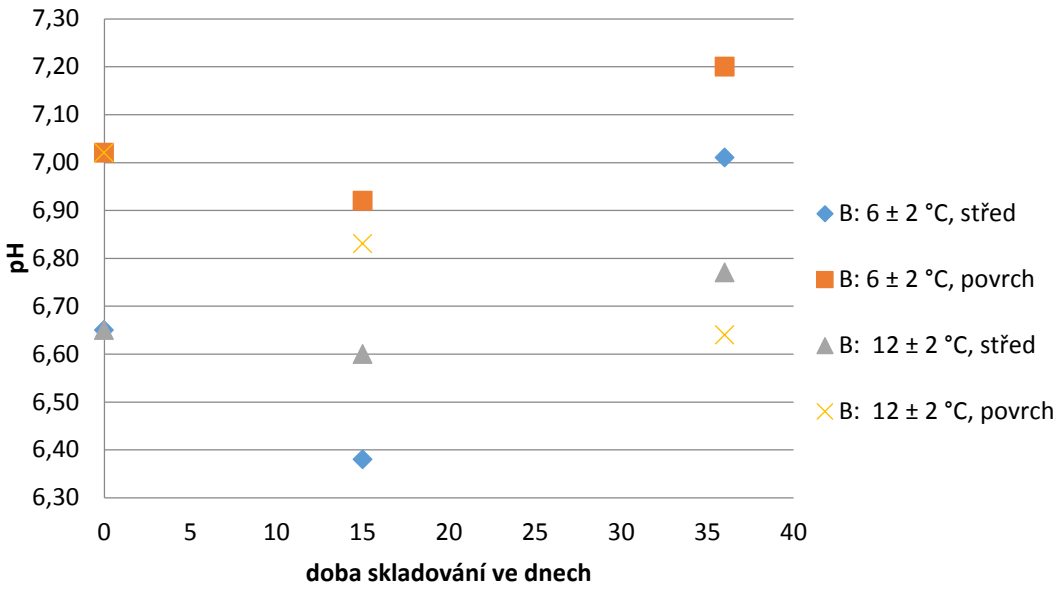


Graf 2: Graf závislosti pH na době skladování při teplotě 6 ± 2 °C a 12 ± 2 °C (vzorek A)

Z grafu 2 je možné usoudit, že v průběhu skladování pH ve středu výrobku roste z kyselejší oblasti do zásaditější, přičemž nárust pH za vyšší teploty je mírně vyšší.

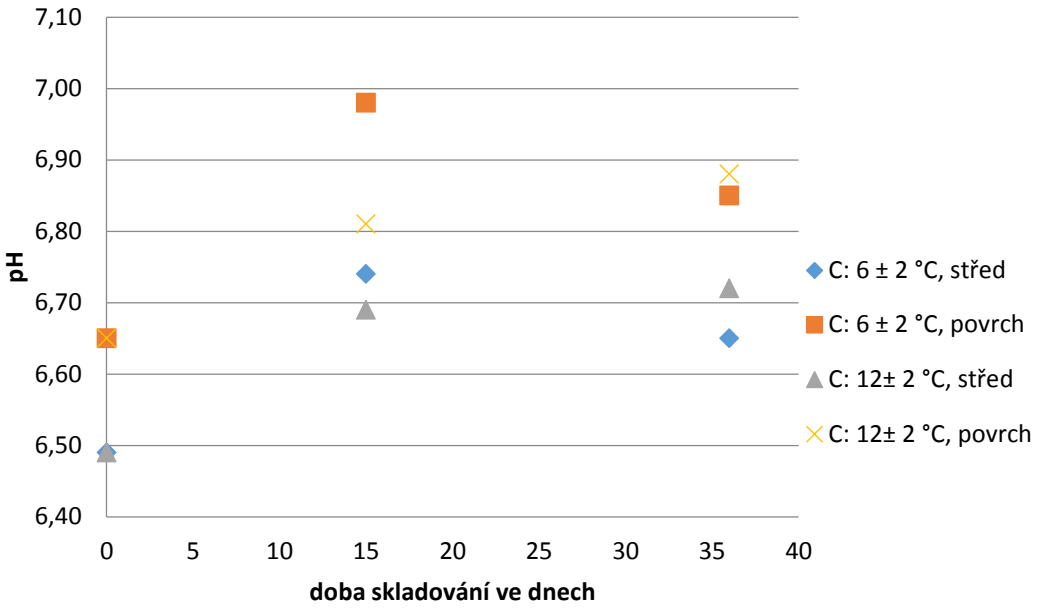
Naopak při měření povrchu sýru bylo výchozí pH vyšší než konečné, povrch sýru byl na konci skladování kyselejší. pH při skladování za vyšší teploty klesalo rychleji.

Na začátku skladování se pH povrchu a středu sýru lišilo, pH povrchu bylo vyšší než pH ve středu sýru. Na konci skladování se pH středu a povrchu sýru přiblížilo k neutrální oblasti.



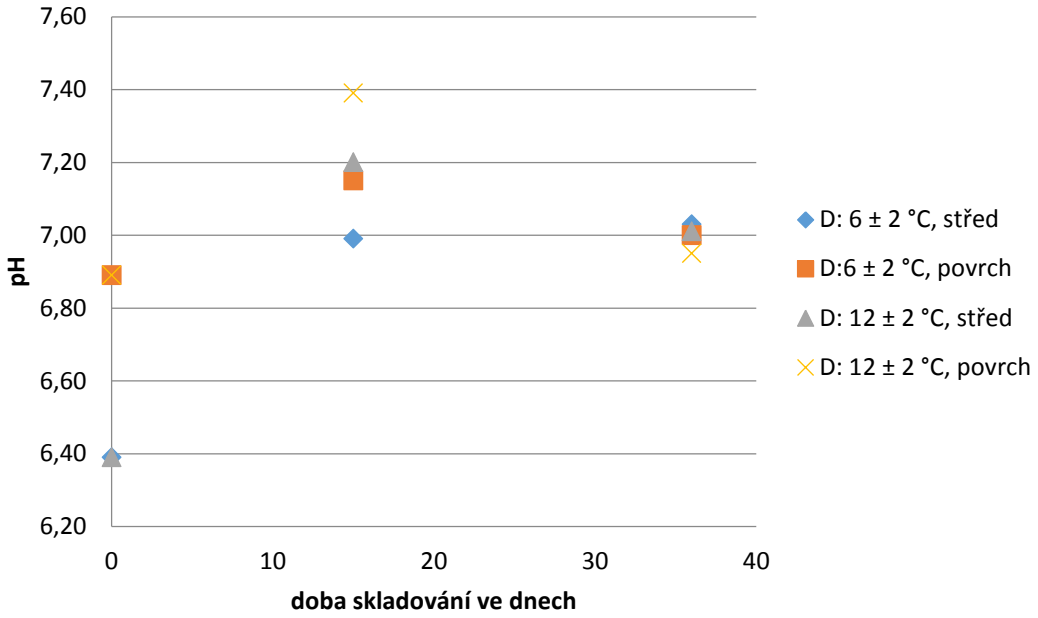
Graf 3: Graf závislosti pH na době skladování při teplotě 6 ± 2 °C a 12 ± 2 °C (vzorek B)

Graf 3 má jiný průběh než v případě vzorku A. U vzorku B pH na začátku skladovacího experimentu bylo nižší než na povrchu sýru. Při skladování při nižší teplotě pH prvních 14 dní klesalo do kyselejší oblasti, poté se zvýšilo nad výchozí pH. Při skladování za vyšší teploty pH na povrchu celou dobu skladování klesalo, ale ve středu výrobku pH během prvních 14 dnů mírně kleslo a v posledních 14 dnech skladování vzrostlo mírně nad výchozí hodnotu pH.



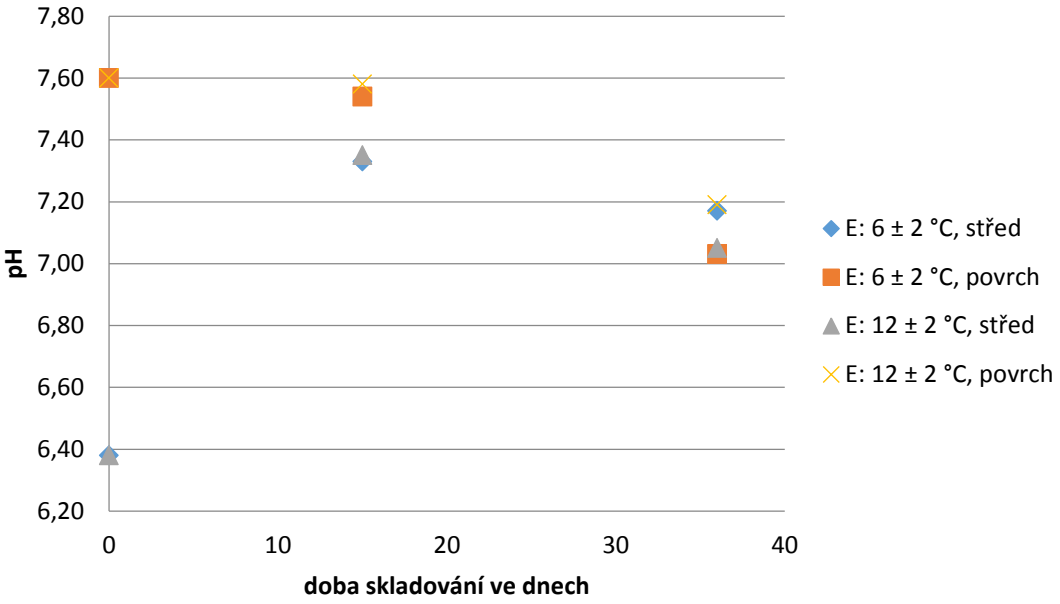
Graf 4: Graf závislosti pH na době skladování při teplotě 6 ± 2 °C a 12 ± 2 °C (vzorek C)

Z grafu 4 je patrné, že při skladování za nižší teploty ve středu i na povrchu sýru pH v prvních 14 dnech stoupalo, po 14 dnech začalo klesat do kyselejší oblasti, nikdy však na původní hodnotu pH. Při skladování za vyšší teploty se pH zvyšovalo po celou dobu skladování, v prvních 14 dnech byl nárust výraznější než v druhé části skladovacího experimentu.



Graf 5: Graf závislosti pH na době skladování při teplotě 6 ± 2 °C a 12 ± 2 °C (vzorek D)

Z grafu č. 5 je možné usoudit, že pH při skladování za teploty 6 ± 2 °C stoupalo k zásaditější oblasti ve středu výrobku, na povrchu pH stoupalo a mírně kleslo, bylo však na konci experimentu vyšší než na počátku. Při teplotě skladování 12 ± 2 °C pH zpočátku experimentu stoupalo k zásaditější oblasti, po dvou týdnech skladování klesalo ke kyselejší oblasti, konečné pH bylo mírně vyšší než počáteční při začátku exprerimentu.

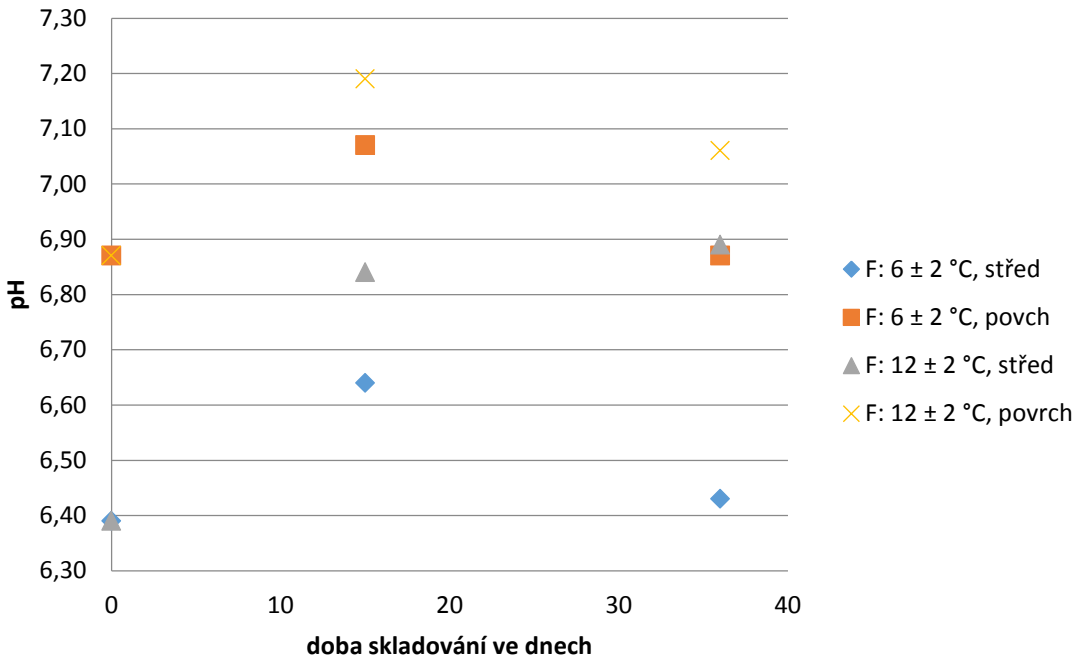


Graf 6: Graf závislosti pH na době skladování při teplotě 6 ± 2 °C a 12 ± 2 °C (vzorek E)

Z grafu 6 je patrné, že pH povrchu klesalo po celou dobu skladování do kyselejší oblasti při obou teplotách, přičemž pH při skladování za vyšší teploty 12 ± 2 °C bylo o celou dobu mírně vyšší než při teplotě na povrchu u výrobku skladovaného při 6 ± 2 °C.

Ve středu výrobku pH prudce vzrostlo v prvních dvou týdnech skladování, na konci skladování v dni 34 bylo pH opět nižší, ale stále nad počáteční hodnotu. Tento trend platil u vzorku sladovaných při obou teplotách 6 ± 2 °C a 12 ± 2 °C.

U tohoto výrobku byl vývoj pH ve středu i na povrchu výrobku velmi podobný a hodnoty se lišily jen nepatrně.



Graf 7: Graf závislosti pH na době skladování při teplotě 6 ± 2 °C a 12 ± 2 °C (vzorek F)

U vzorku F (graf 7) byl vývoj pH ve středu výrobku a teplotě skladování rostoucí po celou dobu skladování. Při 6 ± 2 °C ve středu i povrchu a při teplotě 12 ± 2 °C na povrchu byl vývoj pH stejný – v prvních dvou týdnech prudce vzrostlo pH k zásaditější oblasti, po dvou týdnech skladování kleslo, nikdy však na původní hodnotu.

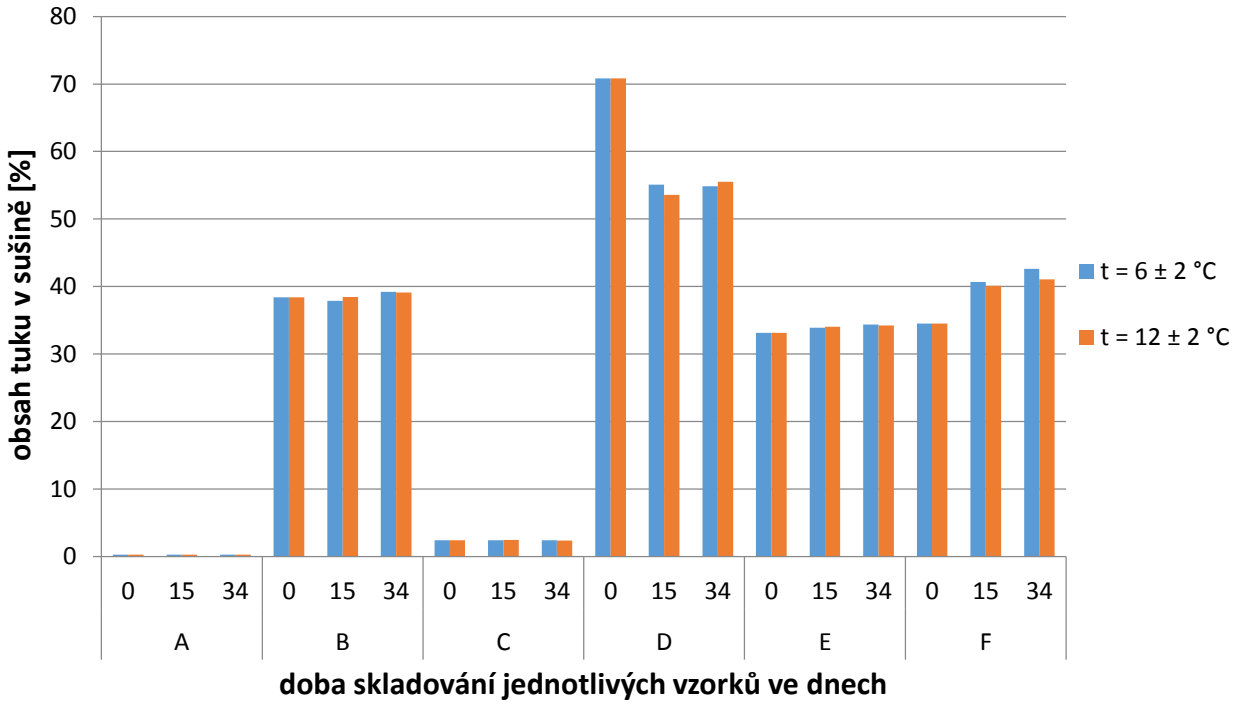
Výsledné pH bylo blízké u měření povrchu sýru skladovaném při nižší teplotě a středu výrobku u sýru skladovaném při vyšší teplotě, zatímco největší rozdíl byl na konci skladování mezi středem výrobku při 6 ± 2 °C a povrchem výrobku skladovaném při 12 ± 2 °C.

7.3 Stanovení obsahu tuku

Obsah tuku ve výrobcích se neměnil po celou dobu skladování a jeho množství odpovídalo tvrzení výrobce na obale. Stanovený obsah tuku na počátku skladování ve vzorcích a porovnání s údaji na obalech výrobků je uveden v tabulce 2. Pro stanovení množství tuku byl použit průměr ze tří stanovení. Ačkoliv se po celou dobu skladování množství tuku neměnilo, měnil se ale obsah tuku v sušině, protože během zrání se obsah sušiny v sýru měnil a tím i obsah tuku přepočtený na sušinu. Zvýšený obsah tuku v sušině během dozrávání uvádí ve své studii také Hasanzadeh a kol. Obsah tuku v sušině byl určen z průměrné hodnoty tuku a sušiny ve vzorcích. Vývoj obsahu tuku v sušině vzorků během skladování jsou uvedeny v grafu 8. [76]

Tabulka 2: stanovené množství tuku a obsah tuku deklarovaný výrobcem

Vzorek	stanovené množství tuku [%]	obsah tuku deklarovaný výrobcem [%]
A	0,12	max 0,5
B	19,8	20
C	0,93	max 0,5
D	28,33	28
E	16,2	neuvádí
F	20,33	20



Graf 8: vývoj obsahu tuku v sušině ve vzorcích v průběhu zrání při teplotě 6 ± 2 °C a 12 ± 2 °C

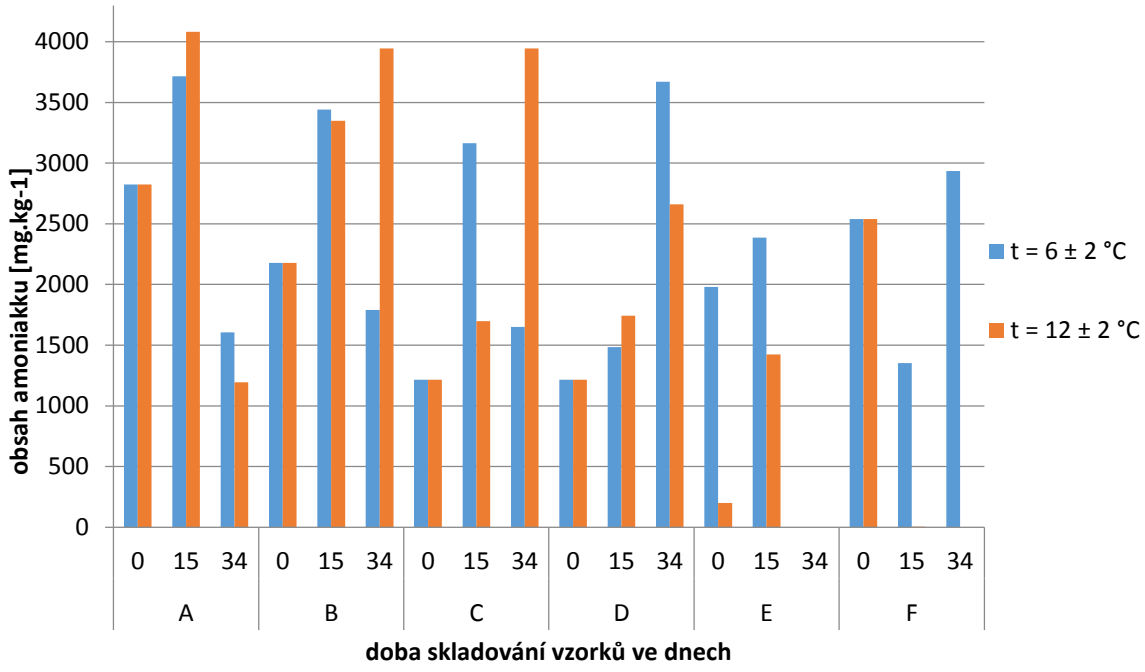
Z grafu 8 je patrné, že ve vzorku A a C nedocházelo ke změnám tuku v sušině v průběhu zrání sýrů, protože tyto sýry obsahují velmi malé procento tuku, zpravidla do 1 %. U vzorku B a E po celou dobu skladování nedocházelo k výraznějším změnám tuku v sušině. U vzorku F se mírně obsah tuku v sušině zvyšoval, zvýšený obsah tuku byl do 10 % v průběhu zrání a více se změna projevila u vzorku skladovaném při nižší teplotě. Největší rozdíl tuku v sušině byl zaznamenán u vzorku D, u kterého s dobou zrání a snižující se

sušinou klesal také obsah tuku v sušině. Na počátku experimentu byl obsah tuku v sušině 70,80 %, na konci skladování byla jeho hodnota 54,9 % (teplota 6 ± 2 °C) a 55,5 % (teplota 12 ± 2 °C). Je možné říci, že teplota skladování neměla vliv na obsah tuku v sušině, protože obsah tuku v sušině při obou teplotách v průběhu experimentu byl ve velmi nízkém rozmezí hodnot a vývoj obsahu tuku v sušině souvisel pouze s kolísáním obsahu sušiny ve vzorcích.

7.4 Stanovení obsahu amoniaku

Amoniak je významný produkt, který vzniká v průběhu skladování potravin jako důsledek Maillardových reakcí, Streckerových degradací aminokyselin a dalších. Bubelová a kol. uvádí, že vyšší teplota a delší doba skladování způsobují výrazné zvyšování obsahu amoniaku v potravinách. Tento trend byl v námi provedeném experimentu potvrzen u vzorků A, B, C, D a E v prvních dvou týdnech skladování, naopak v druhé půlce skladovacího experimentu se obsah amoniaku prudce snižoval. To by mohla zapříčinit propustnost obalů, výrobky byly skladovány v původních balících materiálech, které nejsou dokonale inertní a amoniak mohl unikat právě skrz obaly. [73]

Na následujícím grafu 9 je zobrazena závislost obsahu amoniaku na době skladování při dvou různých teplotách (6 ± 2 °C a 12 ± 2 °C) pro jednotlivé vzorky.



Graf 9: vývoj obsahu amoniaku v průběhu skladování

Z grafu měření lze usoudit, že teplota zrání sýrů měla významný vliv na obsah amoniaku ve vzorcích. Ve vzorku A, B a C v průběhu skladovacího experimentu bylo obsaženo výrazně více amoniaku u vzorků skladovaných při teplotě 12 ± 2 °C. Ve vzorcích E a F na konci skladovacího experimentu bylo velké množství amoniaku a nepodařilo se změřit jeho objem (vylití Conw. nádobek). Maximálně bylo detekováno 4083,08 $mg \cdot kg^{-1}$ obsahu amoniaku (vzorek A).

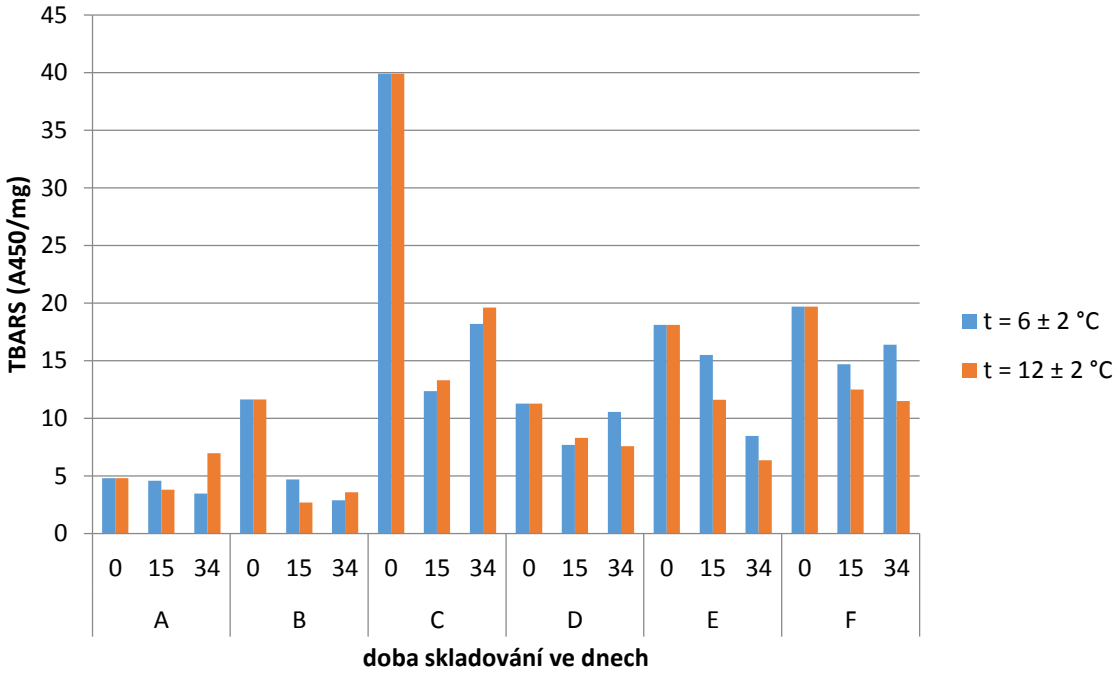
7.5 Stanovení thiobarbiturového čísla

Stanovení thiobarbiturového čísla, které vyjadřuje množství sekundárních produktů (zejména malondialdehydu) vznikajících při oxidaci lipidů je znázorněno na grafu 10. Vzniklé sekundární produkty reagují s kyselinou thiobarbiturovou a výsledné produkty měly žlutou barvu, jejich absorbance se měřila spektrofotometricky při vlnové délce 450 nm. [28]

Trend vývoje množství sekundárních produktů lipidů oxidace neovlivnil výrazně rozdíl teplot skladování, rozdíly v množství sekundárních produktů lipidů oxidace (TBARS) u obou teplot byly v malých rozmezích. Obsah TBARS se výrazně měnil s dobou skladování. Při skladování při teplotě 6 ± 2 °C klesalo množství vznikajících TBARS u vzorků A, B a E po celou dobu skladování, zatímco u vzorku C, D a F v prvních 14 dnech klesalo množství TBARS, v druhé polovině skladovacího experimentu se množství TBARS zvyšovalo. Pokles TBARS v průběhu skladování popisuje Procházková a kol. ve studii sušeného mléka a říká, že úbytek TBARS může nastat vzájemnou interakcí s dalšími složkami vzorku (laktóza, proteiny). Stapelfeldt a kol. [77] říká, že zvyšující se vlhkost může mít za následek zvýšení TBARS. Jeho studie byla provedena jako popis změn skladování sušeného mléka. Jeho tvrzení by mohlo vysvětlit nárust TBARS v posledních dvou týdnech skladování, kdy se sušina zvyšovala a vlhkost výrobku byla vyšší než na počátku skladování. [77, 78]

Stejný trend při skladování při teplotě 12 ± 2 °C vykazovaly vzorky C a E. U ostatních vzorků byl průběh oproti skladování při nižší teplotě rozdílný. U vzorku A a B došlo nejdříve k poklesu obsahu TBARS, v druhé půlce skladovacího experimentu se obsah zvyšoval. U vzorků D, E a F bylo zaznamenáno klesání obsahu TBARS po celou dobu skladování.

Nejvýraznější změny v průběhu skladování byly u vzorku C. Vzorek C obsahoval nejvyšší množství TBARS ze všech vzorků a měření. Nejvyšší množství bylo naměřeno ihned po nákupu vzorku (39,90 m/g), poté začalo prudce klesat.



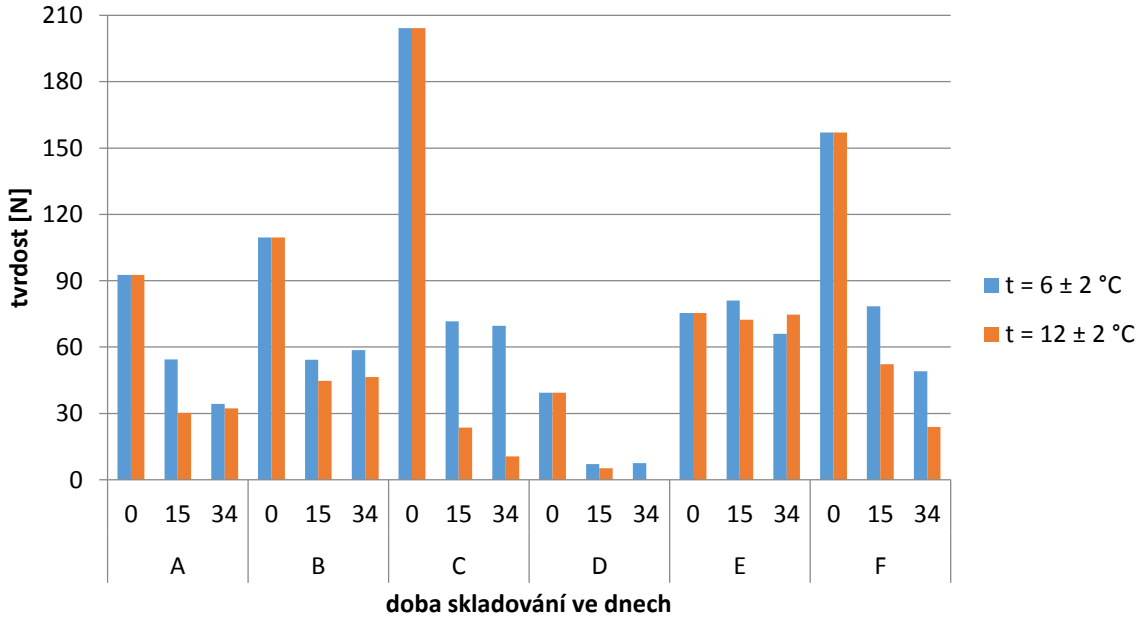
Graf 10: vývoj obsahu tiobarbiturového čísla v průběhu skladování

7.6 Stanovení texturních vlastností

Během zrání sýrů byla měřena jejich tvrdost, přičemž je z grafu 11 patrné, že doba zrání a především teplota zrání ovlivňuje tvrdost vzorku. Nejtvrdším vzorkem na počátku skladovacího experimentu byl vzorek C (204,2 ± 13,8 N), také vykazoval největší pokles tvrdosti (10,5 ± 1,4 N). Nejméně tvrdým vzorkem byl na počátku vzorek D, u kterého se na konci experimentu už nepodařilo jeho tvrdost stanovit.

U všech vzorků byl u skladovací teploty 6 ± 2 °C zaznamenán v průběhu skladování pokles tvrdost. Mírné odchylky vykazoval vzorek B, D a E, přičemž tato odchylka byla dána chybou měření, respektive chyba mohla nastat v přípravě vzorku – jeho nestejnoměrnosti vzniklé při krájení a tím vykazoval jiné hodnoty, než by se dalo očekávat. Při skladování při teplotě 12 ± 2 °C byl trend stejný, s dobou skladování klesala tvrdost. Pokles tvrdost byl výraznější než u teploty 6 ± 2 °C. Největší pokles byl v první půlce skladovacího experimentu (během prvních 14 dnů), poté už tvrdost klesala pomaleji.

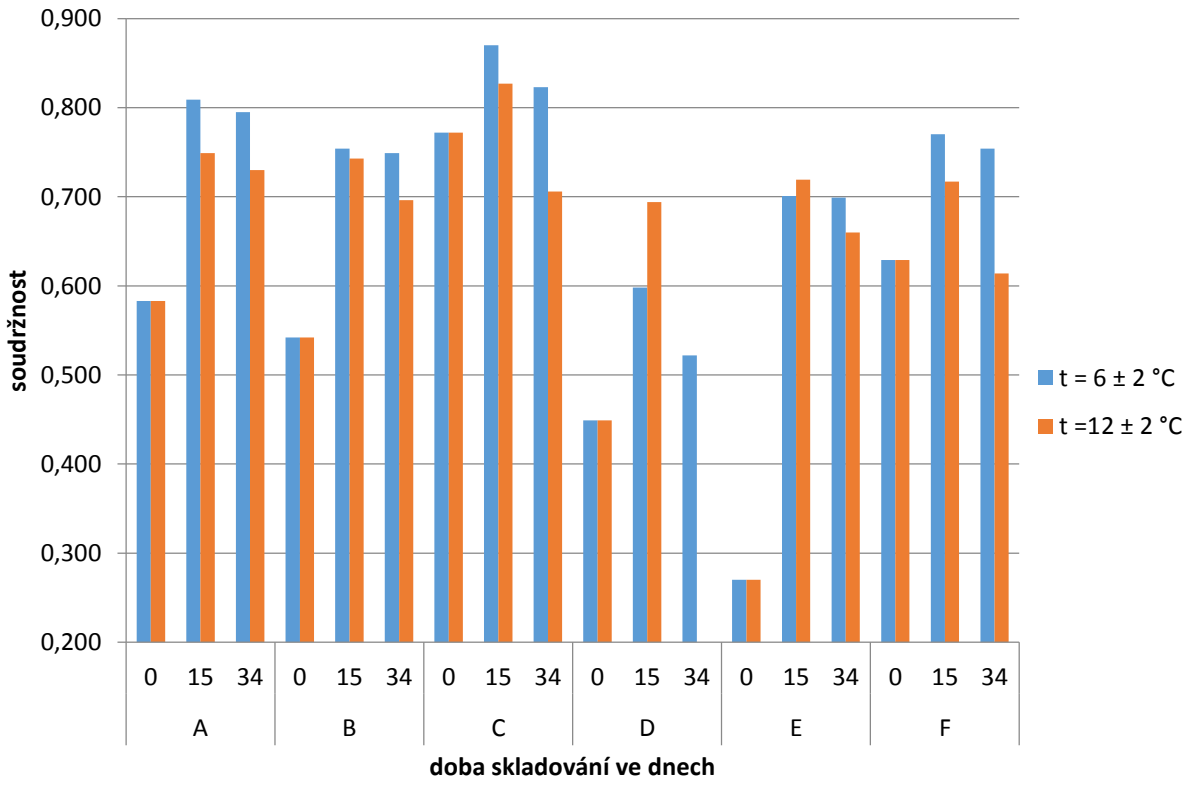
Pachlová a kol. uvádí, že na texturní vlastnosti jsou ovlivňovány zracími procesy a to jak délkou, tak i jeho podmínkami. Říká, že v důsledku hydrolýzy kaseinu se textura stává měkčí. Dále je textura ovlivňována změnami pH, ztrátou vlhkosti, teplotou… V námi provedené analýze se měnilo pH, prodlužovala se doba skladování, sýr se stával měkčím. Jeho tvrdost výrazněji klesala při skladování výrobku při teplotě 12 ± 2 °C. [79]



Graf 11: vývoj tvrdosti v průběhu zrání

Při měření soudržnosti vzorků se prokázalo, že v prvních 14 dnech experimentu soudržnost narůstala, všechny vzorky vykazovaly vyšší kohezivnost než na počátku skladování, po dvou týdnech skladování soudržnost klesala. Tento trend byl zřetelný při obou skladovacích teplotách, přičemž soudržnost byla mírně vyšší u vzorků skladovaných při teplotě 6 ± 2 °C (mimo vzorek D, který měl při 12 ± 2 °C po dvou týdnech skladování soudržnost vyšší než na počátku, po měsíčním skladování se nepodařilo kohezivnost při vyšší skladovací teplotě naměřit a vzorek E, u kterého pravděpodobně vznikla chyba měřením nerovnoměrně nakrájených vzorků). Snižování soudržnosti mohlo být zapříčiněno vzrůstající vlhkostí výrobku a proteolytickými a lipolytickými reakcemi.

Největší rozdíl v soudržnosti byl zaznamenán u vzorku E, u kterého na počátku skladování byla soudržnost 0,270± 0,021 a pak prudce vzrostla na hodnotu 0,701 ± 0,003.

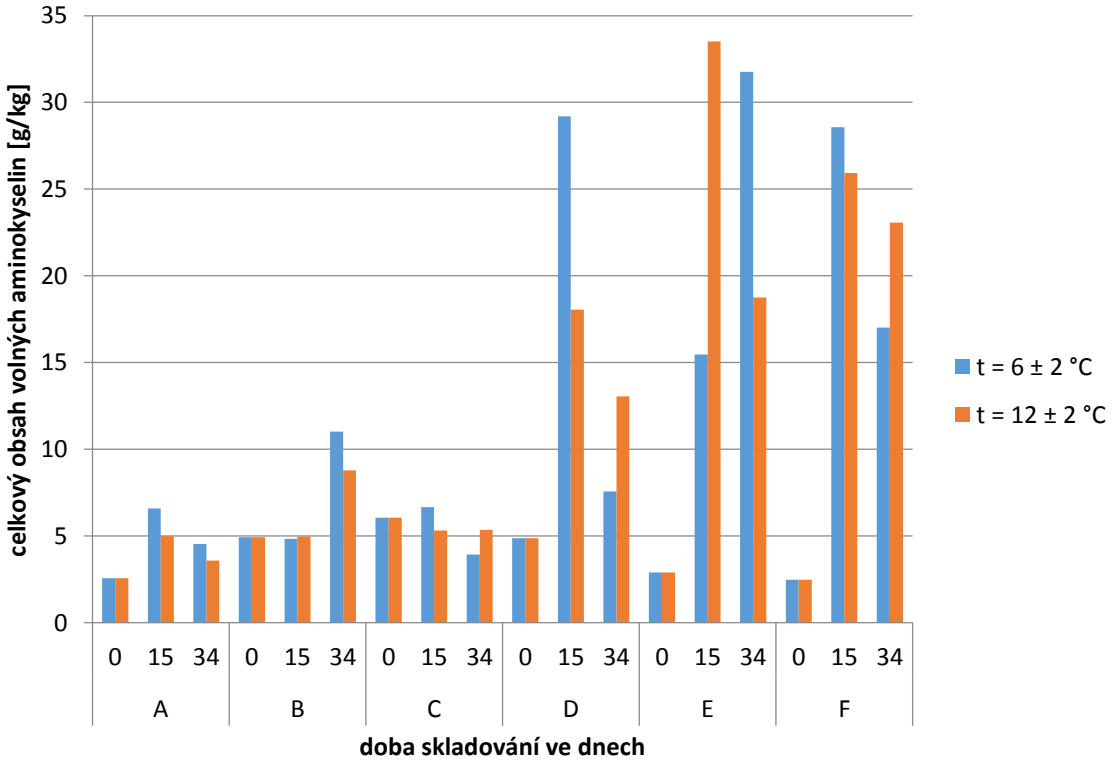


Graf 12: vývoj soudržnosti v průběhu zrání

7.7 Stanovení volných aminokyselin

Ve vzorcích jednotlivých sýrů byl měřen obsah volných aminokyselin a vývoj jejich obsahu v průběhu skladování během 34 dnů při dvou teplotách. V grafu číslo 13 jsou uvedeny výsledky.

S dobou skladování se celkové množství volných aminokyselin měnilo, u vzorků A, C, D, E a F byl trend v prvních dvou týdnech skladování stejný, množství aminokyselin se zvýšilo v porovnání s obsahem volných aminokyselin hned po nákupu vzorků. Po dalších dvou týdnech skladování toto množství opět kleslo. U vzorku B byl zaznamenán nárust volných aminokyselin až po jednom měsíci skladování vzorků. Teplota skladování neměla výrazný vliv na množství volných aminokyselin, většinou bylo množství volných aminokyselin mírně vyšší u vzorků skladovaných při nižší teplotě 6 ± 2 °C. Pouze u vzorku E bylo množství volných aminokyselin výrazně vyšší při skladování při teplotě 12 ± 2 °C. Celkový obsah volných aminokyselin byl nejvyšší u vzorku E (33,521 g/kg). Nejvýraznější změny v obsahu volných aminokyselin byly u vzorků D, E a F, přičemž v prvních dvou týdnech skladování byly tyto uměny největší.



Graf 13: vývoj celkového obsahu aminokyselin v průběhu zrání

V tabulce 3 jsou zaznamenána jednotlivá množství volných aminokyselin v průběhu skladování vzorků A, B a C. Doba skladování měla vliv na vývoj obsahu aminokyselin, teplota příliš neovlivnila jejich množství. U vzorku A byl trend téměř všech aminokyselin u obou teplot stejný, v prvních dvou týdnech došlo k nárustu obsahu aminokyselin, dalším skladováním začalo toto množství klesat nebo se zvýšilo jen nepatrně. Nejvýznamnější rozdíl u vzorku A byl u treoninu, kdy se prudce zvýšilo množství treoninu v prvních dvou týdnech skladování, po jednom měsíci dosáhlo toto množství hodnoty až 1,892 g/kg. Naopak nejmenší rozdíly vlivem skladování byly u metioninu.

Vzorek B taktéž měl nejvýznamnější změny u treoninu, u kterého bylo vysoké množství již na počátku skladování. Dále potom bylo vyšší množství lysinu, jeho vysoké množství bylo zapříčiněno délkou doby skladování. Teplota rovněž neměla velký vliv na obsah volných aminokyselin, většinou bylo mírně více jednotlivých aminokyselin ve vzorcích skladovaných při teplotě 6 ± 2 °C. Množství aminokyselin se měnilo s dobou skladování.

Vzorec C opět vykazoval téměř u všech aminokyselin nárust v množství jednotlivých aminokyselin v prvních dvou týdnech skladování, dalším skladováním množství kleslo, vše téměř neovlivnila teplota. Pouze množství treoninu a lysinu mělo odlišný průběh, vysoké množství těchto aminokyselin bylo již na počátku skladování (2,294 g/kg treoninu a 1,867 g/kg lysinu), s dobou skladování se prudce tato množství snížila, vliv měla i teplota, kdy u treoninu při skladování v 6 ± 2 °C bylo nižší jeho množství (1,434 g/kg) než u teploty 12 ± 2 °C (1,923 g/kg), to znamená, že pokles treoninu byl významnější u vzorků skladovaných při nižší teplotě. Lysin vykazoval stejný trend.

Tabulka 3: vývoj obsahu jednotlivých aminokyselin během skladování vzorků A, B a C

		A [mg/kg]			B [mg/kg]			C [mg/kg]		
	teplota	**den 0**	**den 15**	**den 34**	**den 0**	**den 15**	**den 34**	**den 0**	**den 15**	**den 34**
serin	**6 ± 2 °C**	161,7	166,9	222,8	238,6	252,2	512,2	246,0	322,0	97,2
	12 ± 2 °C		173,8	179,5		240,3	325,5		266,2	121,8
histidin	**6 ± 2 °C**	57,9	61,0	45,4	60,6	61,5	111,7	25,6	49,9	25,7
	12 ± 2 °C		52,1	50,0		61,1	52,9		25,8	56,0
arginin	**6 ± 2 °C**	80,0	68,0	50,2	63,3	64,2	129,0	71,9	62,7	97,2
	12 ± 2 °C		53,8	46,9		63,8	78,4		75,2	82,5
treonin	**6 ± 2 °C**	276,0	2914,8	1891,8	1956,6	1971,1	4198,3	2294,0	2441,2	1434,2
	12 ± 2 °C		2102,5	1459,7		1970,7	3152,5		2210,6	1923,3
alanin	**6 ± 2 °C**	116,7	106,0	96,2	127,3	128,4	167,5	128,2	137,8	85,8
	12 ± 2 °C		105,9	96,0		128,2	170,4		131,3	97,9
prolin	**6 ± 2 °C**	92,3	96,8	70,3	91,3	106,3	228,3	174,7	94,3	89,7
	12 ± 2 °C		94,6	81,9		92,0	192,3		216,0	113,8
tyrosin	**6 ± 2 °C**	53,0	64,4	21,3	29,9	10,9	42,2	32,3	72,9	55,2
	12 ± 2 °C		50,1	20,5		30,2	29,7		41,2	80,9
methionin	**6 ± 2 °C**	2,4	5,1	3,6	8,9	9,8	38,1	17,7	21,7	2,7
	12 ± 2 °C		3,7	2,9		9,0	41,4		10,5	4,1
ornithin	**6 ± 2 °C**	155,7	156,5	123,2	155,8	158,9	111,9	53,2	41,0	68,6
	12 ± 2 °C		134,4	117,6		157,0	71,3		19,2	77,8
lysin	**6 ± 2 °C**	325,4	1340,6	674,9	571,2	568,5	3692,3	1867,0	2296,7	991,8
	12 ± 2 °C		793,0	430,6		575,3	31,850		1317,6	1620,6
isoleucin	**6 ± 2 °C**	281,5	541,3	471,5	375,9	377,8	324,0	146,8	162,1	408,0
	12 ± 2 °C		494,3	276,1		378,6	228,2		117,6	435,6
leucin	**6 ± 2 °C**	165,8	129,5	125,1	180,1	178,8	162,9	124,7	127,1	121,6
	12 ± 2 °C		128,0	132,1		181,4	158,8		148,7	141,6
phenylalanin	**6 ± 2 °C**	363,7	480,8	395,6	561,1	525,9	709,7	485,8	443,5	267,3
	12 ± 2 °C		435,4	399,4		565,2	602,5		434,6	347,9
tryptofan	**6 ± 2 °C**	426,8	457,0	352,1	506,4	430,5	585,1	379,5	396,6	196,5
	12 ± 2 °C		371,0	284,4		510,0	501,4		307,5	244,7

V tabulce 4 jsou uvedena jednotlivá množství volných aminokyselin v průběhu skladování vzorků D, E a F. U vzorku D obsah aminokyselin v prvních dvou týdnech skladování vzrůstal u serinu, histidinu, alaninu, prolinu, metioninu, isoleucinu, a phenylalaninu poté začalo toto množství klesat. U tryptofanu, leucinu, ornitinu, metioninu, tyrosinu a argininu s dobou skladování klesalo množství jednotlivých aminokyselin po celou dobu skladování. Teplota ovlivnila obsah volných aminokyselin tak, že jejich množství bylo nižší při skladování při 6 ± 2 °C než při 12 ± 2 °C, čímž se tento vzorek lišil od ostatních. Histidin nebyl na počátku skladování detekován vůbec, s časem bylo malé množství zaznamenáno. Nejvyšší množství bylo rovněž treoninu a lysinu, u kterých prudce vzrostlo jejich množství skladováním, ale nejvyšší hodnoty vykazovaly po dvou týdnech skladování, kdy toto množství bylo několikrát vyšší než při měření po jednom měsíci skladování.

Vzorek E vykazoval podobný průběh v množství aminokyselin jako vzorky A, B a C. U některých aminokyselin byl trend vzrůstu množství v prvních dvou týdnech, poté začalo množství klesat, u jiných aminokyselin stoupalo jejich množství po celou dobu skladování. Opět nižší teplota skladování vykazovala větší množství jednotlivých aminokyselin. Nejvyšší množství bylo treoninu a ornitinu.

Vzorek F měl podobný průběh jako vzorek D. U většiny aminokyselin bylo jejich množství vyšší při skladování v 12 ± 2 °C. Průběh vývoje jejich množství s časem je uveden v tabulce. Některé aminokyseliny vykazovaly nárust v prvních dvou týdnech skladování, poté pokles v jejich množství, u jiných aminokyselin stoupalo jejich množství po celou dobu skladování. Nejvyšší množství bylo treoninu a ornitinu.

Tabulka 4:vývoj obsahu jednotlivých aminokyselin během skladování vzorků D, E a F

		D [mg/kg]			E [mg/kg]			F [mg/kg]		
	teplota	**den 0**	**den 15**	**den 34**	**den 0**	**den 15**	**den 34**	**den 0**	**den 15**	**den 34**
serin	**6 ± 2 °C**	325,9	563,8	187,1	195,5	644,9	545,9	181,9	386,5	602,8
	12 ± 2 °C		399,2	577,2		938,2	315,1		396,8	385,4
histidin	**6 ± 2 °C**	0,000	310,9	31,2	0,000	197,6	69,7	0,000	385,6	218,2
	12 ± 2 °C		185,0	153,9		75,3	70,6		237,2	250,4
arginin	**6 ± 2 °C**	471,5	144,6	71,9	197,8	255,4	20,6	174,6	400,1	43,3
	12 ± 2 °C		75,1	47,4		33,2	20,1		53,5	42,0
treonin	**6 ± 2 °C**	337,8	11077,3	2632,1	237,1	5059,2	14381,1	84,4	12406,2	6779,1
	12 ± 2 °C		6031,0	4747,3		15616,0	10258,8		10198,4	8603,4
alanin	**6 ± 2 °C**	266,5	267,1	143,7	318,5	342,1	393,2	63,4	390,3	438,3
	12 ± 2 °C		298,6	293,4		460,5	225,3		811,0	800,3
prolin	**6 ± 2 °C**	309,1	397,7	120,6	175,4	541,0	349,7	16,7	289,4	305,0
	12 ± 2 °C		247,7	256,2		359,6	398,6		380,2	233,6
tyrosin	**6 ± 2 °C**	515,4	189,5	93,6	246,3	528,9	585,2	64,5	264,0	240,5
	12 ± 2 °C		245,9	238,6		578,9	292,4		257,8	155,2
methionin	**6 ± 2 °C**	7,7	76,4	12,1	159,8	906,2	1967,4	59,7	684,1	619,3
	12 ± 2 °C		15,6	16,1		2106,8	1252,8		903,4	1046,4
ornithin	**6 ± 2 °C**	469,9	91,7	96,9	747,3	3174,5	8587,2	828,1	9262,4	3646,4
	12 ± 2 °C		143,4	157,1		5874,5	3874,8		8304,9	6703,6
lysin	**6 ± 2 °C**	424,2	14087,4	3042,2	451,1	1631,3	1981,9	521,3	1868,6	2178,4
	12 ± 2 °C		8591,9	4869,9		2853,5	843,8		1583,8	1961,2
isoleucin	**6 ± 2 °C**	374,3	663,9	369,2	110,1	380,3	615,6	139,3	216,7	246,8
	12 ± 2 °C		606,0	640,5		651,9	292,2		338,3	399,8
leucin	**6 ± 2 °C**	356,7	144,1	127,9	189,4	1087,7	1305,9	164,7	785,5	703,7
	12 ± 2 °C		144,8	147,5		1321,9	501,1		1045,3	1185,6
phenylalanin	**6 ± 2 °C**	447,5	680,0	375,8	357,4	554,7	827,3	025,4	1036,1	833,7
	12 ± 2 °C		608,0	482,4		1633,0	317,0		1223,4	1123,0
tryptofan	**6 ± 2 °C**	560,7	503,1	256,3	122,2	166,3	125,1	154,3	201,6	152,7
	12 ± 2 °C		452,7	415,0		1017,8	82,1		202,0	181,3

Palo V. ve své studii říká, že degradace bílkovin je závislá na podmínkách zrání sýrů a také druhu sýrů. V naší studii byl potvrzen rozdíl mezi skladováním při teplotě 6 ± 2 °C a 12 ± 2 °C, také délka skladování měla vliv na obsah volných aminokyselin. Uvádí, že v sýru Romadůr, který má složení jako v naší studii vzorky B, D a F nebyl detekovány histidin, tento výsledek byl shodný s výsledky námi provedené analýzy. [24]

Vysoký obsah volných aminokyselin prokázal hlubokou proteolýzu. Pachlová a kol. popisuje rostoucí trend po celou dobu skladovacích experimentů, které u námi uvedených analýz neplatí, většinou po dvou týdnech začalo množství aminokyselin klesat. Proběhla rozsáhlá proteolýza, při které vznikají volné aminokyseliny. Při proteolýze se měnilo také pH, obsah volných aminokyselin se měnil také. pH po čase stagnovalo, pH povrchu a středu sýra se přiblížilo a tvorba volných aminokyselin také nebyla tolik výrazná. [21, 79]

7.8 Vývoj obsahu biogenních aminů ve vzorcích sýrů s mazem na povrchu

Při stanovení biogenních aminů v průběhu zrání vybraných vzorků sýrů během jednoho měsíce byly detekovány biogenní aminy tryptamin, fenylalanin, putrescin, kadaverin, histamin, tyramin, spermidin a spermin. Vývoj celkového obsahu biogenních aminů ve vzorcích jsou znázorněny na grafu x, jsou použity průměrné hodnoty sumy všech detekovaných biogenních aminů. Vývoj obsahu jednotlivých biogenních aminů ve vzorcích sýrů na grafech 15 - 20.

Celkový obsah biogenních aminů ve vzorcích sýrů

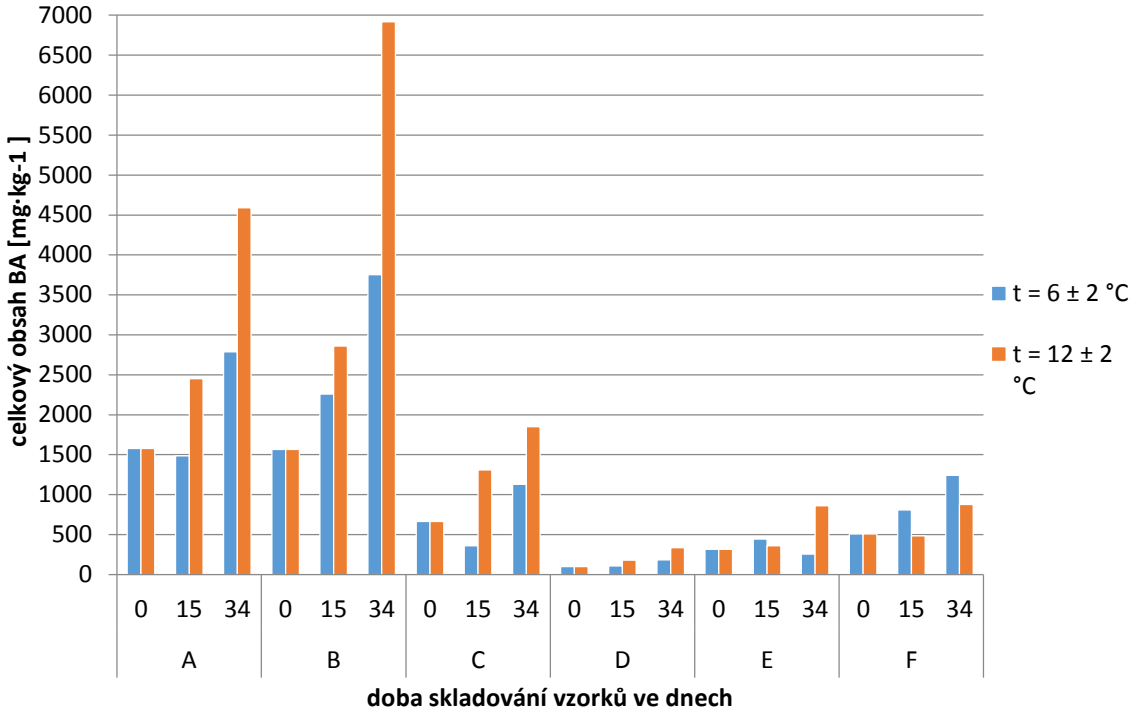
Na grafu 14 je znázorněn vývoj celkového obsahu stanovovaných biogenních aminů během jednoho měsíce skladování při dvou teplotách 6 ± 2 °C a 12 ± 2 °C. Pro grafické znázornění byl použit celkový obsah stanovovaných biogenních aminů. Komprda a kol. uvádí, že teplota a doba skladování má výrazný vliv na obsah biogenních aminů v sýrech. To je možné říci, že v námi provedené studii toto tvrzení platí. Vyšší teplota znamená více biogenních aminů a taktéž zvyšující se doba skladování vykazuje zvyšující se množství biogenních aminů ve vzorcích. Také uvádí, že nejvýznamnější množství ve vzorcích zastupovaly biogenní aminy tyramin, kadaverin a putrescin. Stejného výsledku bylo dosaženo v naší studii, kdy kvantitativně bylo zaznamenáno nejvíce kadaverinu (3761 mg/g), tyraminu (2161,5 mg/kg) a putrescinu (15641,3 mg/kg). Standardová a kol. taktéž uvádí, že v průběhu skladování dochází ke zvyšování množství biogenních aminů v sýrech. [80, 81]

Při skladování vzorků při teplotě 6 ± 2 °C se celkový obsah BA ve vzorcích B, D a F zvyšoval s prodlužující se dobou skladování. U vzorků A a C v 15. dni skladování bylo detekováno méně celkového počtu BA než byl jejich obsah na začátku skladování, avšak při posledním odběru vzorků (den 34) byla naměřená hodnota BA vyšší než původní hodnota stanovena na začátku experimentu. U vzorků B a F bylo množství BA s prodlužující se

dobou skladování vyšší. U vzorku E byla původní hodnota obsahu BA 315,2 $mg \cdot kg^{-1}$, poté se obsah po dvou týdnech mírně zvýšil a při posledním odběru bylo množství BA 265,5 $mg \cdot kg^{-1}$, hodnota tedy byla menší než původní obsah BA na počátku skladování.

Stanovení obsahu BA u vzorků sýrů skladovaných při teplotě 12 ± 2 °C měl u všech vzorků stejný trend, s prodlužující se dobou skladování se zvyšovalo množství celkového obsahu BA. Pouze vzorek F měl vývoj obsahu BA odlišný od ostatních vzorků skladovaných při 12 ± 2 °C. Zatímco výchozí množství BA u tohoto vzorku v dni 0 bylo 509,5 $mg \cdot kg^{-1}$, v 15. dni skladování byla hodnota nižší než na počátku skladování (484,4 $mg \cdot kg^{-1}$), při posledním stanovení v dni 34 se však obsah BA zvýšil na hodnotu 878,4 $mg \cdot kg^{-1}$, což bylo více než na počátku skladování sýrů. Nejvyšší stanovená hodnota BA u sýrů skladovaných při teplotě 12 ± 2 °C byla 6916,2 $mg \cdot kg^{-1}$ u vzorku 3.

Z grafu je patrné, že vzorky A a B obsahovaly výrazně více celkového množství BA než vzorky ostatní. Nejméně BA obsahoval vzorek D. Obecně lze říci, že zvyšující se množství BA bylo výraznější u vzorků skladovaných při teplotě 12 ± 2 °C, tuto skutečnost bylo možné usoudit již při stanovení po dvou týdnech skladování, tato skutečnost platila u všech vzorků mimo vzorek F. Největší vývoj celkového obsahu BA byl zaznamenán u vzorku B, u kterého byl obsah BA na počátku experimentu 1564,8 $mg \cdot kg^{-1}$, při odběru vzorku v dni 34 byla hodnota 6916,2 $mg \cdot kg^{-1}$, dosažená po měsící skladování sýru při teplotě 12 ± 2 °C. Naopak nejméně BA bylo ve vzorku D, u kterého bylo maximální množství po měsíci skladování taktéž při teplotě 12 ± 2 °C pouze 335,2 $mg \cdot kg^{-1}$. Biogenní amin tryptamin nebyl detekován v žádném ze vzorků. To potvrzuje ve své studii také Standardová a kol., která uvádí žádné nebo minimální koncentrace tryptaminu v sýrech.[81]

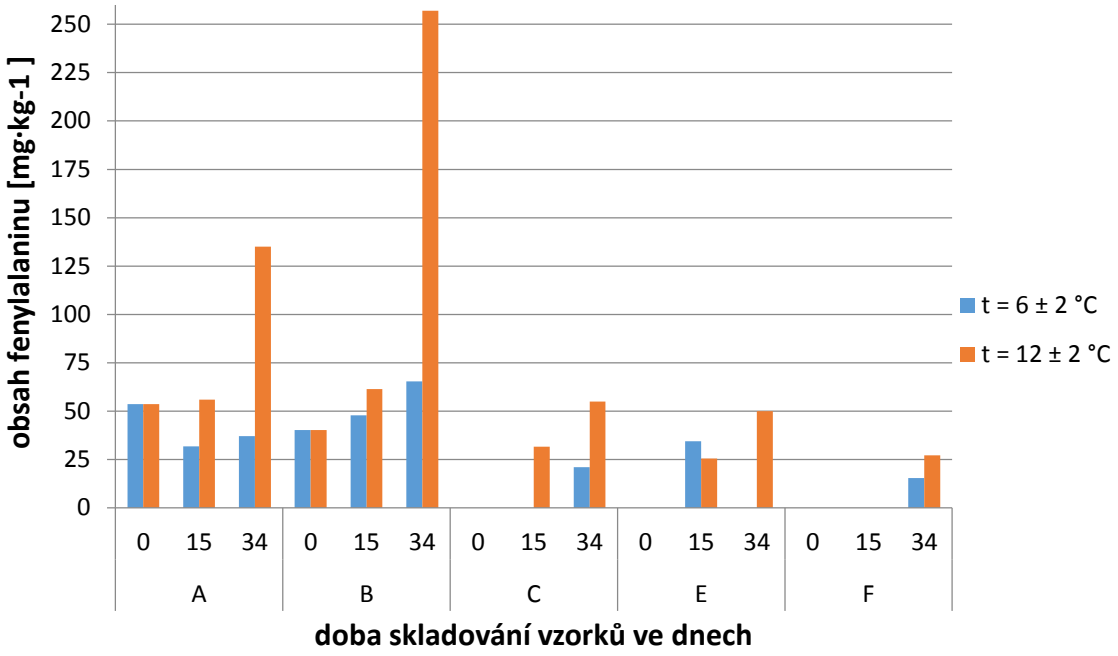


Graf 14: Vývoj obsahu celkového množství biogenních aminů ve vzorcích během skladování po dobu 1 měsíce

Vývoj obsahu **fenylalaninu** je znázorněn na grafu číslo 15. Obsah fenylalaninu byl nízký oproti ostatním biogenním aminům. U vzorku A a B bylo zaznamenáno vyšší množství fenylalaninu při obou teplotách a všech odběrech. U vzorku D nebyl fenylalanin detekován vůbec. Obsah fenylalaninu ve vzorcích se pohyboval v rozmezí 15 $mg \cdot kg^{-1}$ po hodnotu 256,9 $mg \cdot kg^{-1}$. Nejvíce fenylalaninu bylo ve vzorku B.

Při teplotě 6 ± 2 °C byl zaznamenán nárust jeho množství u vzorku B, u vzorku A jeho obsah kolísal a jeho množství po měsíci skladování 37,1 $mg \cdot kg^{-1}$ byla menší než hodnota 53,6 $mg \cdot kg^{-1}$ na počátku experimentu.

Při skladování sýrů při teplotě 12 ± 2 °C stoupalo množství fenylalaninu s časem, byl tvořen při této teplotě výrazně více než při teplotě 6 ± 2 °C. Maximální hodnoty 256,9 $mg \cdot kg^{-1}$ nabyl u vzorku B skladovaném v teplotě 12 ± 2 °C jeden měsíc.

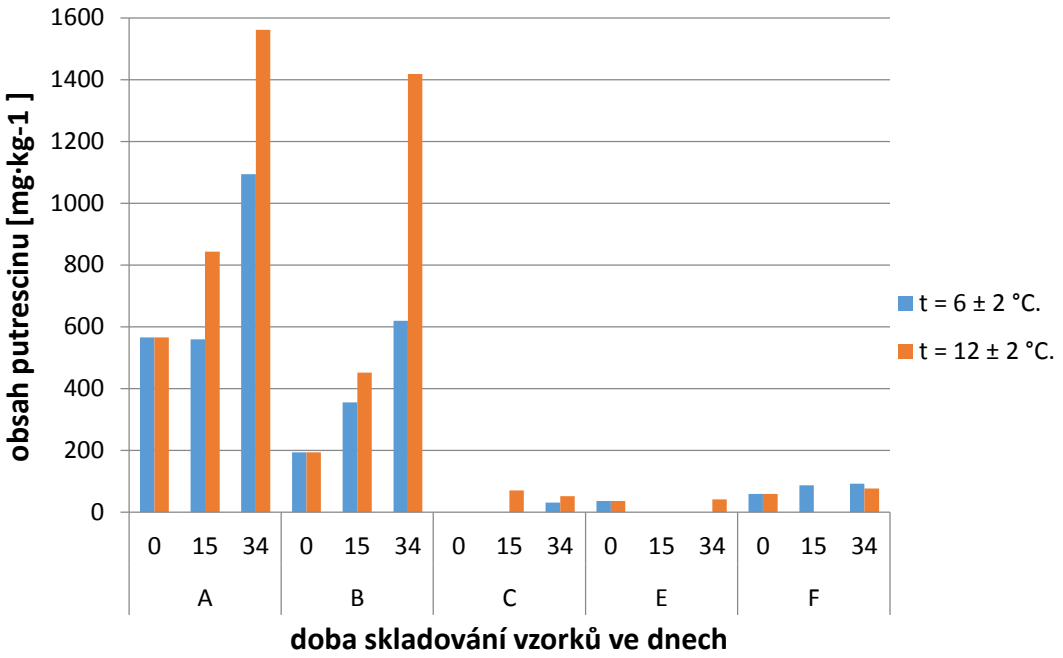


Graf 15: Vývoj obsahu fenylalaninu ve vzorcích během skladování po dobu 1 měsíce

Vývoj obsahu **putrescinu** je znázorněn na grafu číslo 16. Výrazné množství putrescinu bylo stanoveno u vzorků A a B, zejména při skladování v teplotě 12 ± 2 °C. U všech vzorků, u kterých byl stanoven putrescin se jeho množství zvyšovalo s prodlužující se dobou skladování, tento trend byl při skladování v obou teplotách. Výrazný rozdíl ve skladování v nižší a vyšší teplotě je patrný zejména u vzorku B. Po celou dobu skladování se zvyšoval obsah putrescinu v obou teplotách, při třetím odběru ve dni 34 byla hodnota množství putrescinu při skladování v teplotě 6 ± 2 °C 619 $mg \cdot kg^{-1}$, v teplotě skladování 12 ± 2 °C byl obsah putrescinu 1418 $mg \cdot kg^{-1}$, což je oproti teplotě nižší více než dvojnásobné množství. Největší množství putrescinu bylo 1561,3 $mg \cdot kg^{-1}$ ve vzorku A po jednom měsíci skladování v teplotě 12 ± 2 °C. Komprda a kol. uvádí putrescin jako jeden zbiogenních aminů s nejvyšší koncentrací v sýrech. Oproti ostatním vzorků je možné toto tvrzení potvrdit i v naší studii. [80]

Ve vzorcích C, E a F bylo při obou teplotách bylo zaznamenáno velmi malé nebo žádné množství putrescinu. Ve vzorku D nebyl putrescin stanoven.

Obsah putrescinu ve vzorcích se pohyboval v rozmezí 30 $mg \cdot kg^{-1}$po hodnotu 1560 $mg \cdot kg^{-1}$. Nejvíce putrescinu bylo zaznamenáno ve vzorku A.

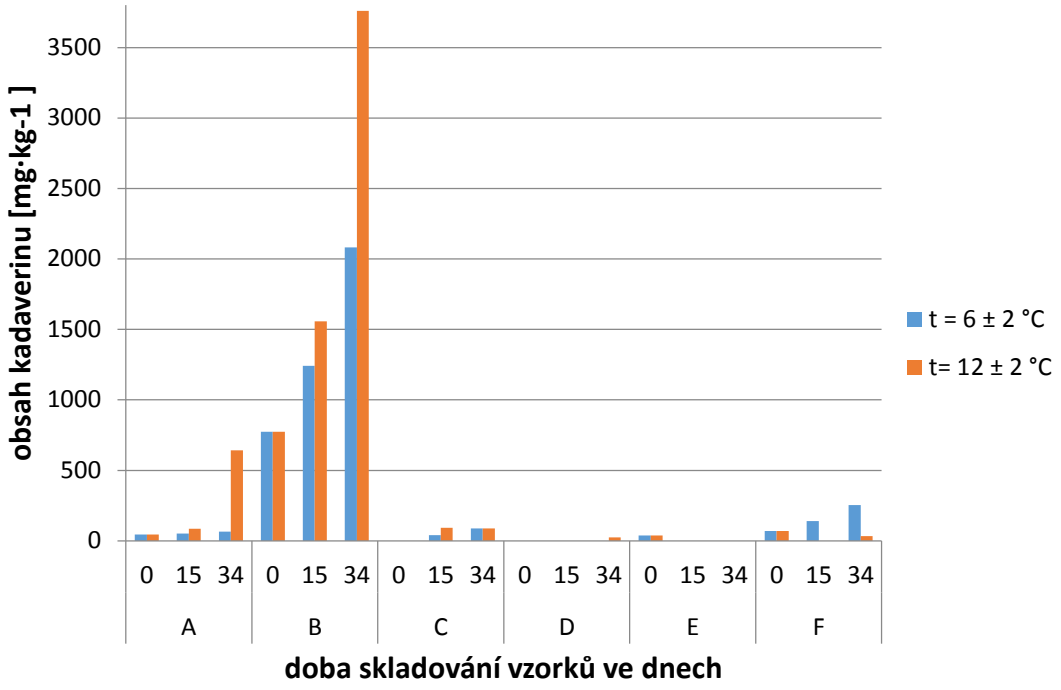


Graf 16: Vývoj obsahu putrescinu ve vzorcích během skladování po dobu 1 měsíce

Vývoj obsahu **kadaverinu** je znázorněn na grafu číslo 17 Obsah kadaverinu v jednotlivých vzorcích se pohybuje v rozmezí od 33 $mg \cdot kg^{-1}$ až do hodnoty 1557,2 $mg \cdot kg^{-1}$. Nejvíce kadaverinu vykazoval vzorek B. U vzorků C, D, E a F bylo stanoveno množství řádově do 150 $mg \cdot kg^{-1}$, pouze u vzorku A byl obsah kadaverinu po jednom měsíci skladování v teplotě 12 ± 2 °C 642,7 $mg \cdot kg^{-1}$. Kadaverin byl biogenní amin, který dosáhl nejvyššího množství.

Nejvýraznější množství kadaverinu bylo zaznamenáno u vzorku B. Při skladování v nižší i vyšší teplotě se obsah tohoto biogenního aminu zvyšoval s prodlužující se dobou skladování. Již hodnota kadaverinu ve vzorku B na počátku experimentu byla 774,8 $mg \cdot kg^{-1}$, což je více než hodnoty u ostatních vzorků po jednom měsíci skladování.

Nárust obsahu kadaverinu byl výrazný již při odběru po dvou týdnech, po jednom měsíci dosáhla hodnota obsahu kadaverinu 2082,2 $mg \cdot kg^{-1}$ při skladování v teplotě 6 ± 2 °C a hodnoty 3761,0 $mg \cdot kg^{-1}$ při skladování v teplotě 12 ± 2 °C.



Graf 17: Vývoj obsahu kadaverinu ve vzorcích během skladování po dobu 1 měsíce

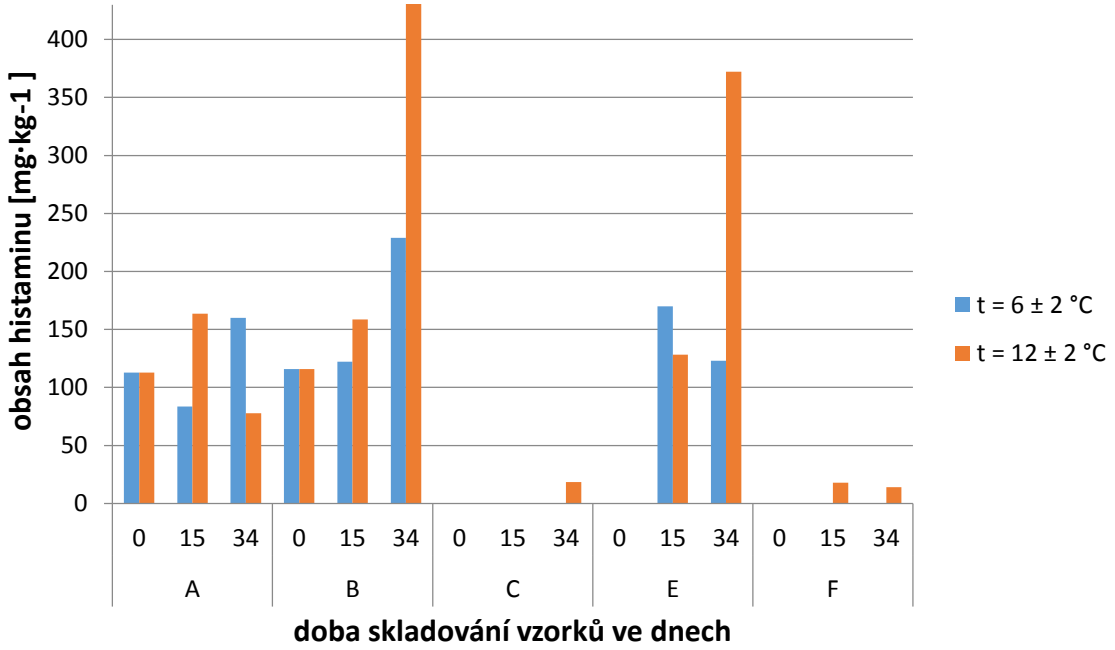
Vývoj obsahu **histaminu** je znázorněn na grafu číslo 18. Jeho množství bylo v rozmezí od 14 mg·kg^{-1} do 451 mg·kg^{-1}. Nejvíce histaminu vykazoval vzorek B. Ve vzorcích A, B a E bylo jeho množství výraznější než u vzorků C a F, kde bylo jeho množství do hodnoty 20 mg·kg^{-1}. Ve vzorku D nebyl stanoven. Vzorky skladované za vyšší teploty vykazovaly větší nárust histaminu.

Při skladování vzorků v teplotě 6 ± 2 °C u vzorku A v prvních dvou týdnech klesl obsah histaminu z počáteční hodnoty 112,8 mg·kg^{-1} na hodnotu 83,6 mg·kg^{-1}, po jednom měsíci skladování byl obsah 160 mg·kg^{-1}. Ve vzorku B obsah stoupal po celou dobu skladování a dosáhl z hodnoty počáteční 115,9 mg·kg^{-1} po jednom měsíci a hodnotu 229,1 mg·kg^{-1}. U vzorku E byl zaznamenán histamin až po dvou týdnech skladování, jeho hodnota byla 170 mg·kg^{-1} a po jednom měsíci klesla na 123,1 mg·kg^{-1}.

Při skladování v teplotě 12 ± 2 °C ve vzorku A po čtrnácti dnech skladování byl zaznamenán nárust v obsahu histaminu na hodnotu 163,6 mg·kg^{-1}, po jednom měsíci byla hodnota pouze 77,7 mg·kg^{-1}. Ve vzorku B byl zaznamenán opět nárust obsahu histaminu po celou dobu skladování, jeho hodnota po jednom měsíci byla 451,8 mg·kg^{-1}. Ve vzorku E byl

stanoven histamin až po dvou týdnech jako za teploty nižší, jeho obsah byl zvětšen z hodnoty 128,4 mg·kg^{-1} na hodnotu po jednom měsíci skladování 372,2 mg·kg^{-1}.

Ve studii Standardová a kol. bylo potvrzeno 283 mg/kg histaminu v pivním sýru, který má stejné složení jako vzorek v naší studii E. V námi provedené studii byl jeho obsah v takové výši detekován až po jednom měsíci skladování při 12 ± 2 °C. Uvádí, že tato hodnota byla výrazně vyšší než u ostatních sýrů ze studie, v námi provedeném experimentu byl vysoký obsah histaminu také ve vzorku B, ale oproti ostatním biogenním aminům nebylo jeho množství tak výrazné. [81]

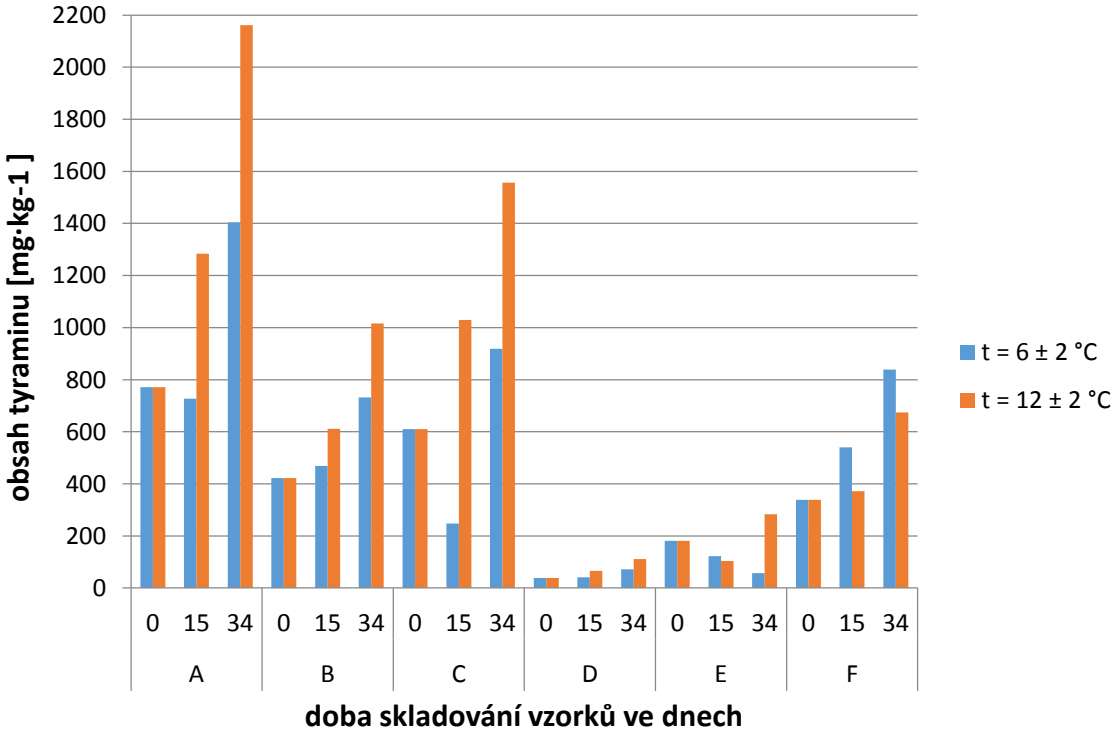


Graf 18: Vývoj obsahu histaminu ve vzorcích během skladování po dobu 1 měsíce

Tyramin byl zaznamenán ve všech vzorcích skladovaných sýrů. Obsah tyraminu ve vzorcích byl v rozmezí od 38,9 mg·kg^{-1} do 2161,5 mg·kg^{-1}. Nejvíce tyraminu bylo zaznamenáno ve vzorku A při skladování v teplotě 12 ± 2 °C. Vzorky skladované za vyšší teploty vykazovaly větší množství tyraminu (mimo F). Standardová a kol uvádí pro měkké zrající sýry hodnotu 417 mg/kg, v našem experimentu byly hodnoty u vzorku A a C vyšší, hodnota ve vzorku a (2161 mg/kg) se přibližovala zahraničním sýrům, například parmazán vykazuje hodnoty tyraminu 2460 mg/kg. [81]

Při skladování v teplotě 6 ± 2 °C u vzorků A a C klesal obsah tyraminu v prvních dvou týdnech skladování, po jednom měsíci se obsah zvýšil nad hodnotu počáteční. U vzorků B, D a E byl trend zvyšujícího se obsahu tyraminu s prodlužujícím se časem skladování. Vzorek E měl odlišný trend oproti všem ostatním vzorků, s prodlužující se dobou skladování se snižovalo množství tyraminu.

Při skladování za teploty 12 ± 2 °C se zvyšoval jeho obsah u všech vzorků (mimo E) s prodlužující se dobou skladování. Největší množství bylo u vzorků A, B a C. Množství, jehož nárust byl nejpatrnější u vzorku A, u kterého na počátku experimentu bylo množství tyraminu 771,2 $mg \cdot kg^{-1}$ a po měsíci skladování 2161,5 $mg \cdot kg^{-1}$. Tento trend vykazoval i vzorek C, obsah tyraminu po měsíci byl 1556,6 $mg \cdot kg^{-1}$, méně pak vzorek B.



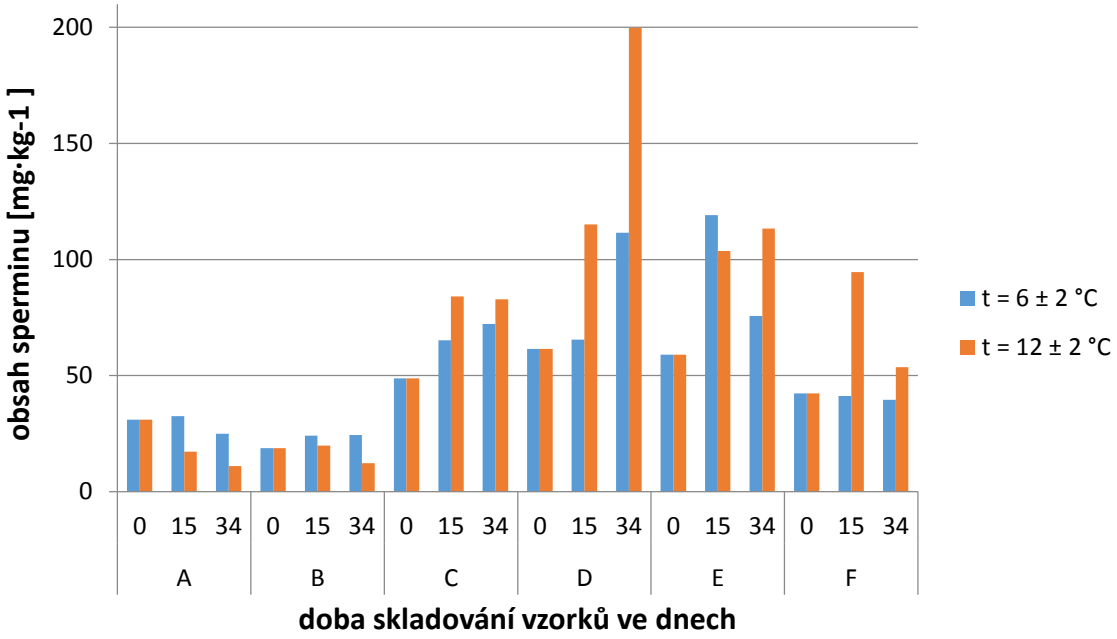
Graf 19: Vývoj obsahu tyraminu ve vzorcích během skladování po dobu 1 měsíce

Obsah **spermidinu** byl ve vzorcích detekován pouze u vzorku C ve velmi malém množství. Na počátku experimentu byl jeho obsah 6,6 $mg \cdot kg^{-1}$, po dvou týdnech skladování byl zaznamenán pouze ve vzorku skladovaném při teplotě 6 ± 2 °C a jeho hodnota byla 7,5 $mg \cdot kg^{-1}$.

Na grafu číslo 20 je znázorněn obsah **sperminu** ve vzorcích. Obsah sperminu ve vzorcích byl v rozmezí od 11 $mg \cdot kg^{-1}$ do hodnoty 199,7 $mg \cdot kg^{-1}$. Největší obsah sperminu byl ve vzorku D.

Při skladování v teplotě 6 ± 2 °C ve vzorcích C a D, u kterých bylo detekováno nejvíce sperminu, byla stoupající tendence obsahu sperminu s prodlužujícím se časem. U vzorku E bylo největší množství sperminu po dvou týdnech skladování. Hodnoty obsahu sperminu oproti ostatním BA nenabývaly velkých hodnot.

Při skladování v teplotě 12 ± 2 °C byl nejvýraznější nárust obsahu sperminu u vzorku D, z počátečního obsahu 61,5 $mg \cdot kg^{-1}$ se jeho obsah zvětšil na 199,7 $mg \cdot kg^{-1}$.



Graf 20: Vývoj obsahu sperminu ve vzorcích během skladování po dobu 1 měsíce

8 ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývala změnami jakostních parametrů u sýrů s mazem na povrchu v průběhu skladování šesti vzorků během jednoho měsíce při dvou různých teplotách. Při každém odběru vzorků byl měřen obsah sušiny, hodnoty pH, obsah amoniaku, obsah thiobarbiturového čísla, texturní vlastnosti, obsah volných aminokyselin a biogenních aminů. Závěrem by se dalo konstatovat, že délka skladování má téměř vždy vliv na změnu jakostních parametrů, skladovací teplota ovlivňuje jen určité parametry výrazně.

Obsah sušiny v průběhu skladování klesal, ačkoliv by se dal čekat opačný efekt a to nárust obsahu sušiny s dobou skladování díky odpařování vody. To mohlo být zapříčiněno synerezí kaseinových bílkovin a vypuzováním vody s dobou skladování, také mohly neinertní obaly zadržovat vlhkost a bránit odpařování vody. Teplota skladování ovlivnila obsah sušiny jen mírně, u většiny vzorků byla sušina nižší u vzorků skladovaných při teplotě 12 ± 2 °C.

pH se během skladování měnilo ve středu výrobku (těstě) i na povrchu. Povrch sýru měl vždy vyšší pH v důsledku proteolytické aktivity mikroorganismů mazové kultury. Střed sýru měl na počátku kyselý charakter a v průběhu skladování se tato hodnota zvyšovala a dosahovala hodnot pH v intervalu 6,4 – 7,2. pH povrchu sýru mělo u většiny vzorků nižší pH na konci skladovacího experimentu než na počátku. pH u sýrů skladovaných při 12 ± 2 °C bylo vždy mírně vyšší než u sýrů skladovaných při teplotě 6 ± 2 °C.

Obsah tuku se v průběhu skladování neměnil, měnil se pouze obsah tuku přepočtený na sušinu, jelikož se měnil obsah sušiny.

Obsah amoniaku jako konečného produktu reakcí probíhajících během skladování vzrůstal v průběhu skladování, při skladování za teploty vyšší (12 ± 2 °C) bylo detekováno více amoniaku než při teplotě 6 ± 2 °C. Pokles jeho obsahu v druhé půlce skladovacího experimentu byl způsoben pravděpodobně únikem amoniaku před obal, který nebyl inertní.

Obsah thiobarbiturového čísla klesal v prvních dvou týdnech skladování, což bylo zapříčiněno pravděpodobně interakcí vzniklých sloučenin s dalšími látkami přítomnými v sýru. Naopak v dalších dvou týdnech skladovacího experimentu se množství sekundárních produktů oxidace lipidů u některých vzorků zvyšovalo (vzorky C, D a F), to zapříčinila zvyšující se vlhkost vzorků. U ostatních vzorků obsah TBARS dále klesal. Teplota skladování neměla vliv na obsah TBARS, některé vzorky vykazovaly vyšší množství TBARS u teplo-

ty vyšší, některé vzorky naopak. Soudržnost vzorků se v průběhu skladování zvýšila, po nějaké době začala mírně klesat.

Při měření texturních vlastností bylo prokázáno, že s délkou skladování výrazně klesá pevnost sýrů v důsledku zracích procesů. Při skladování při teplotě 12 ± 2 °C byl pokles tvrdosti výraznější a rychlejší než u vzorků skladovaných při 6 ± 2 °C.

Obsah volných aminokyselin neměl u všech vzorků stejný trend, u většiny vzorků se zvyšovalo množství FAA s délkou skladování, některé vzorky ale vykazovaly pokles obsahu FAA v druhé půlce skladovacího experimentu. Byla prokázána rozsáhlá proteolýza v důsledku skladování, byl také rozdíl v obsahu FAA při skladování při dvou různých teplotách, ale nelze jednoznačně říci, že vyšší či nižší teplota zrychluje či zpomaluje proteolýzu, z výsledků je patrné, že záleží na daném vzorku.

Při stanovení biogenních aminů byly detekovány fenylalanin, putrescin, kadaverin, histamin, tyramin, spermidin a spermin. Tryptamin nebyl ve vzorcích zaznamenán. Bylo prokázáno, že s prodlužující se dobou skladování se zvyšoval počet biogenních aminů. Při skladování při teplotě 12 ± 2 °C bylo ve vzorku přítomno větší množství biogenních aminů než při teplotě 6 ± 2 °C. V nejvyšších koncentracích se vyskytovaly biogenní aminy tyramin, kadaverin a putrescin.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1.] VYHLÁŠKA 397/2016 ze dne 2. prosince 2016 o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje.

[2.] BORA, N. DODD, CH. DESMASURES, N. Diversity, Dynamics and Functional Role of Actinomycetes on European Smear Ripened Cheeses. Springer International Publishing, 2015. ISBN 978-3-319-10464-5.

[3.] DOLEŽALOVÁ, M. STRATILOVÁ, M. HOLKO, I. Mikrobilologická nezávadnost sýrů zrajících pod mazem. Mlékařské listy č. 136, 2013. ISSN 1212-950X

[4] REPS, A. Bacterial surface-ripened cheeses. 1993. In: FOX P.F. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Springer, Boston, MA, 2012. 137 – 172. ISBN 978-1-4615-2648-4.

[5] FOX, P. F. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. 2. vydání. Springer, 2012. ISBN 1461526485.

[6] PAVELKA, A. Mléčné výrobky pro vaše zdraví. 1. vyd. Brno: Littera, 1996, 105 s. ISBN 80-85763-09-5.

[7] GAJDŮŠEK, S. Mlékařství II. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2002, s. 142. ISBN 80-7157-342-6.

[8] BOCKELMANN, W. Cheeses with secondary cultures: mould-ripened, smear-ripened, and farmhouse cheeses. Federal Research Centre for Nutrition and Food, Germany.. In: WEIMER, B. C. Improving the Flavour of Cheese. Woodhead Publishing, 2007. 494-519. ISBN 9781845690076.

[9] GÖRNER, F. VALÍK, L. Aplikovaná mikrobiológia požívatín: principy mikrobiológie požívatín, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálného povodu, ktorých zárodky sú prenášané poživatinami. Bratislava: Malé Centrum, 2004. 528 stran. ISBN 80-967064-9-7.

[10] DONNELLY, C. W. Cheese and Microbes. Vermont Institute for Artisan Cheese, The University of Vermont, 2014. 219 – 250. ISBN 978-1-55581-586-8.

[11] Přírodní měkký sýr zrající pod mazem. Číslo cechovní normy 2015-12-22-0034, 2017 [online]. Poslední změna 02.10.2017, Dostupné z: https://www.cechovninormy.cz/

[12] BOCKELMANN, W. The production of smear cheeses. In: SMIT, G. Dairy processing. Elsevier, 2003. 470 – 491. ISBN 9781855737075.

[13] GAILLARD, C. MOUGENOT, C. GRANGER, S. PETIT, S. Increasing herd sizes on Franche-Comte daily farms place grazing systems under strain. Fourrages, 2017. 111--114.

[14] JANŠTOVÁ B., P. NAVRÁTILOVÁ. Produkce mléka a technologie mléčných výrobků. VFU Brno, 2014. 108 s. ISBN 978-80-7305-713-8.

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

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

[17] PAVELKA, A. Mléčné výrobky pro vaše zdraví. 1. vyd. Brno: Littera, 1996, 105 s. ISBN 80-85763-09-5.

[18] BUŇKA, F. PACHLOVÁ, V. BUŇKOVÁ, L. ČERNÍKOVÁ, M. Mlékárenská technologie I. Vyd. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2013, 258 s. ISBN 978-80-7454-254-1.

[19] KADLEC, P. MELZOCH, K. VOLDŘICH, M. Co byste měli vědět o výrobě potravin?: technologie potravin. Vyd. 1. Ostrava: Key Publishing, 2009. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-051-4.

[20] CORRIEU, G. PERRET, B. KAKOURI, A. PAPPAS, D. SAMELIS, J. Positive effects of sequential air ventilation on cooked hard Graviera cheeseripening in an industrial ripening room. Journal of Food Engineering, 2018. s. 162 – 168. DOI 10.1016/j.jfoodeng.2017.11.021.

[21] 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, no. 4, p. 1846–1854.

[22] SOUHRN PŘEDNÁŠKY O ZRÁNÍ. PŘÍRODNÍCH SÝRŮ přednesený dne 5. září 2013 na Fakultě technologické. Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně. Paul L.H. McSweeney. School of Food and Nutritional Sciences,. UniversityCollegeCork, College Road, Cork, Ireland.

[23] BRENNAN, N. M. WARD, A.C. BERESFORD, T.P. FOX, P.F. GOODFELLOW, M. COGAN, T. M. Biodiversity of the Bacterial Flora on the Surface of a Smear Cheese. Applied and Environmental Microbiology, 2002. doi:10.1128/AEM.68.2.820-830.2002.

[24] PALO, V. AUFRICHTOVÁ, A. Voĺné aminokyseliny v niektorých trhových druhoch syrov. Chemické zvesti XIII, 5. Bratislava, 1959. S 295 – 303.

[25] KILCAST, D. SUBRAMANIAM, P. Food and Beverage Stability and Shelf Life. Elsevier, 2011. ISBN 0857092545.

[26] SINGH, R. P. ANDERSON, B.A. The major types of food spoilage: an overview. In Woodhead, S.R. (Ed.). Understanding and Measuring the Shelerf-life of Food, 2004. Cambridge: Woodhead Publishing.

[27] BAEZA, R. MIELNICKI, D. ZAMORA, M. C. CHIRIFE, J. Effect of environmental daily temperature fluctuations over one year storage on the prediction of non-enzymatic browning in reduced-moisture foods stored at 'ambient' temperature. Food Control, 2007. 18(12): 1532-1537.

[28.] VAN BOEKEL, M.A.J.S.. Kinetic modeling of food quality: a critical review.

Comprehensive Reviews. Food Science and Food Safety, 2008. s 144-158.

[29] MUIR, D. D. The stability and shelf life of milk and milk products. Food and Beverage Stability and Shelf life, 2011. S 775-778. doi:10.1533/9780857092540.3.755.

[30] 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 & Technology, 2015, vol. 95. s. 587-611. ISSN 1958-5586.

[31] MCSWEENEY, PLH. SOUSA, M. J. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. Lait, 2000, vol. 80. s. 293-324. ISSN 0023-7302.

[32] KOPŘIVA, V. HOSTOVSKÝ, M. NEKVAPIL, T. PECHOVÁ, A. Vybrané kapitoly z biochemie potravin. VFU Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-678-0.

[33] MCSWEENEY, PLH. Biochemistry of cheese ripening. International Journal of Dairy Technology, 2004, vol. 57. s. 127-144. ISSN 1364-727X.

[34] BOHAČENKO, I. PINKROVÁ, J. PEROUTKOVÁ, J. PECHAČOVÁ, M. Fermentace směsí laktosy a laktulosy kmenem Lactobacillus acidophilus. Chemické listy 101, 2007. S. 911-915.

[35] BAPTISTA, D.P. ARAUJO, F. D. D. EBERLIN, M. N. GIGANTE, M. L. Reduction of 25 % salt in Prato cheese does not affect proteolysis and sensory acceptance. International Daily Journal. Elsevier, 2017. S. 101-110. DOI: 10.1016/j.idairyj.2017.08.001.

[36] SMIT, G. VERHEUL, A. KRANENBURG, R. AVAD, E. SIEZEN, R. ENGELS, W. Cheese flavour development by enzymatic conversions of peptides and amino acids. Food Research International. Elsevier, 2000, vol. 33. S. 153-160. DOI: 10.1016/S0963-9969(00)00029-6.

[37] SOODAM, K. ONG, L POWELL, I. B. KENTISH, S. E. GRASS, S. L. Effect of rennet on the composition, proteolysis and microstructure of reduced-fat Cheddar cheese during ripening. Dairy Science & Technology [online]. 2015, vol. 95, no. 5, s. 665-686. ISSN 1958-5586.

[37] BOCKELMANN, W. 'Secondary cheese cultures', v: Technology of Cheesemaking, 1. vydání. B.A. Law, ed., Sheffield Academic Press, Sheffield, 1999. S. 132-162.

[38] KLOUDA, P. Fyzikální chemie. 2. vyd. Praha: Klouda Pavel, 2002. ISBN: 80-86369-06-4.

[39] FOX, P. McSWEENEY, P. COGAN, T. GUINEE, T. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. 3. Vydání. Amsterdam: Elsevier, 2004. 456 s. ISBN 9780080500942.

[40] BŘEZINA, P. KOMÁR, A. HRABĚ, J. Technologie, zbožíznalství a hygiena potravin, Vyškov: 2001.

[41] ŽIŽKA, B. KORBELOVÁ, M. Mikrobiologie I. 1. Vydání. Příbram: Tiskařské závody,1992.

[41] O´FARRELL, P. SHEEHAN, J. J. WILKINSON, M. G. HARRINGTON, D. KELLY, A. L. Influence of addition of plasminor mastitic milk to cheesemilk on quality of smear-ripened cheese. Lait, 2002. Vol 82. S. 305-316. DOI: 10.1051/lait:2002012.

[42] GALAUP, P. SUTTHIWONG, N. Leclercq-Perlat, M. N. VALLA, A. CARO, Y. FOUILLAUD, M. GUÉGARD, F. DUFOSSÉ, L. First isolation of Brevibacterium sp. pigments in the rind of an industrial red-smear-ripened soft cheese. International Journal of Dairy Technology, 2015. DOI: 10.1111/1471-0307.12211.

[43] BOCKELMANN, W. HOPPE-SEYLER, T. The surface flora of bacterial amear-ripened cheeses from cow´s and goat´s milk. International Daily journal, 2001. Vol. 11. S 307-314.

[44] BLACKBURN, C. W. Food Spoilage Microorganisms. Woodhead Publishing, 2006. S. 736. ISBN 1845691415.

[45] DENIS, C. IRLINGER, F. Safety assessment of dairy microorganisms: Aerobic coryneform bacteria isolated from the surface of smear-ripened cheese. International Journal od Food Microbiology, 2008. S 311-315.

[46] GÖRNER, F. VALÍK, L: Aplikovaná mikrobilógia poživatin. Malé Centrum, Bratislava, 2004. ISBN 80-967064-9-7.

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

[48] MONNET, CH., BLEICHER, A. a kol. Assessment of the anti-listerial activity of microfloras from the surface of smear-ripened cheeses. Food Microbiology, 2010, vol. 27, iss.2, s. 302-310.

[49] ANDĚL, M. DOSTÁLOVÁ, J. DLOUHÝ, P. DRBOHLAV, J. Sýry a tvarohy ve výživě. Česká technologická platforma pro potraviny. Potravinářská komora České republiky, 2012. ISBN 978-80-905096-2-7.

[50] FOX, P. F., McSWEENEY, P. L. H., COGAN, T. M., GUINEE, T. P. Cheese: chemistry, physics and mikrobiology. 3. Vydání. Amsterdam: Elsevier, 2004, s. 199-213. ISBN: 0-1226-3653-82.

[51] MARTINEZ-RIOS, V. DALGAARD, P. Prevalence of Listeria monocytogenes in European cheeses: A systematic review and meta-analysis. Food Control. Elsevier, 2018. S. 205-214.

[52] ŞANLI, T. ŞENEL, E. Formation of Biogenic Amines in Cheese. Formation of Biogenic Amines in Cheese. Elsevier, 2015. ISBN: 978-0-12-404699-3.

[53] REJCHRTOVA, E. Zemánek L., Sládková P., Komprda T. The Biogenic Amines Content of Cheese Ripening Under the Smear during Production. Mendelova univerzita Brno, FAC Agronomická fakulta, 2010. 786 s. ISBN 978-80-7375-453-2.

[54] SILLA, Santos. Biogenic amines: their importance in food. International Journal of Food Microbiology, 1996, 213-231. ISSN 0168-1605.

[55] KAROVIČOVÁ, J. KOHAJDOVÁ, Z. Biogenic Amines in Food. Chemical papers, 2005. 70-79. ISSN 0366-6352.

[56] PLEVA, P. BUŇKOVÁ, L. THEIMROVÁ, E. BARTOŠÁKOVÁ, V. BUŇKA, F. PUREVDORJ, K. Biogenic amines in smear and mould-ripened cheeses. Potravinarstvo [online]. 2014, vol. 8, no. 1, s. 321-327. ISSN 1337-0960.

[57] SAMKOVA, E. DADAKOVA, E. PELIKANOVA, T. Changes in biogenic amine and polyamine contents in smear-ripened cheeses during storage. European Food Research and Technology [online]. 2013, vol. 237, no. 3, s. 309-314. ISSN 1438-2377.

[58] LADERO, V. GÓMEZ-SORDO, C. SÁNCHEZ.LIANA, E. RIO, B. REDRUELLO, B. FERNÁNDEZ, M. MARTÍN, M. C. ALVAREZ, M. A. Q69 (an E. faecalis-Infecting Bacteriophage) As a Biocontrol Agent for Reducing Tyramine in Dairy Products. Frontiers in Microbiology. 2016. DOI:10.3389/fmicb.2016.00445.

[59] STANDAROVA, E. VORLOVÁ, L. KORDIOVSKÁ, P. JANŠTOVÁ, B. DRAČKOVÁ, M. BORKOVCOVÁ, I. Biogenic Amine Production in Olomouc Curd Cheese (Olomoucke tvaruzky) at Various Storage Conditions. VFU Brno, 2010, vol. 79, s. 147-156. ISSN 0001-7213.

[60] MOHAMMADI, M. KAMANKSH, M. HADIAN, Z. MORTAZAVIAN, A. M. MOHAMMADI, A. Determination of Biogenic Amines in Cheese Using Simultaneous Derivatization and Microextraction Method Followed by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Chromatographia [online]. 2017, vol. 80, no. 1, s. 119-126. ISSN 0009-5893.

[61] 30 KOMPRDA, T. DOHNAL, V. CWIKOVÁ, O. Chromatografické stanovení biogenních aminů a polyaminů ve zrajících sýrech. Chemické listy, 2014. 1140-1144. ISSN 1213-7103.

[62] BURDYCHOVÁ, R. DOHNAL, V. VyuŽití HPLC ke stanovení produktu ex-prese genu pro mikrobiální tyrosindekarboxylasu. Chemické listy, 2007. 907-910. ISSN 1213-7103.

[63] SANCHÉZ-PANIAGUA LOPÉZ, M. REDONDO-GOMÉZ, E. LÓPEZ-RUIZ, B. Electrochemical enzyme biosensors based on calcium phosphate materials for tyramine detection in food samples. Talanta. Elsevier, 2017. S 209-2016.

[64] ŠVARC-GAJIĆ, J. STOJANOVIĆ, Z. Determination of histamine in cheese by chronopotentiometry on a thin film mercury electrode. Food Chemistry. Elsevier, 2011. S. 1172-1176.

[65] ASCONE, P. MAURER, J. HALDEMANN, J. IRMNLER, S. BERTHOUD, H. PORTMANN, R. FRÖHLICH-WYDER, M. T. WECHSLER, D. Prevalence and diversity of histamine-forming Lactobacillus parabuchneri strains in raw milk and cheese – A case study. International Daily Journal. Elsevier, 2017. S. 26-33.

[66] SCHIEVANO, E., K. GUARDINI a S. MAMMI. Fast Determination of Histamine in Cheese by Nuclear Magnetic Resonance (NMR). Journal of Agricultural and Food Chemistry [online]. 2009, vol. 57, no. 7, s. 2647-2652. ISSN 0021-8561.

[67] DIAZ, M. LADERO, V. REDRUELLO, B. SÁNCHEZ-LIANA, E. RIO, B. FEMANDEZ, M. CRUZ, M. MIGUEL, M. ALVAREZ, A. A PCR-DGGE method for the identification of histamine-producing bacteria in cheese. Food Control. Elsevier, 2016. S. 216-223.

[68] HEATH, R. R. EPSKY, N. D. MIDGARDEN, D. KATSOYANNOS, B. I. Efficacy of 1,4-Diaminobutane (Putrescine) in a Food-Based Synthetic Attractant for Capture of Mediterranean and Mexican Fruit Flies (Diptera: Tephritidae). Journal of Economic Entomology, 2014. DOI: 10.1603/0022-0493.

[69] BUŇKOVÁ, L. BUŇKA, F. MANTLOVÁ, G. CABLOVÁ, A. SEDLÁČEK, I. SVĚC, P. PACHLOVÁ, V. KRÁČMAR, S. The effect of ripening and storage conditions on the distribution of tyramine, putrescine and cadaverine in Edam-cheese. Food mikrobiology. Elsevier, 2010. Vol 27. S 880-888.

[70] RAUSCHER-GABERNIG, E. GABERNIG, R. BRUELLER, W. GROSSGUT, R. BAUER, F. PAULSEN, P.. Dietary exposure assessment of putrescine and cadaverine and derivation of tolerable levels in selected foods consumed in Austria. European Food Research and Technology, 2012, vol. 235. s. 209-220. ISSN 1438-2377.

[71] WUNDERLICHOVÁ, L. BUŇKOVÁ, L. KOUTNÝ, M. VALENTA, T. BUŇKA, F. Novel touchdown-PCR method for the detection of putrescine producing Gram-negative bacteria in food products. Food Microbiology. Elsevier, 2013. S. 268-276.

[72] PIPEK, P. a kol. Návody pro laboratorní cvičení z technologie neúdržných potravin, VŠCHT, Praha 1991.

[73] BUBELOVÁ, Z. ČERNÍKOVÁ, M. BUŇKOVÁ, L. TALÁR, J. ZAJÍČEK, V. FOLTIN, P. BUŇKA, F. Quality Changes of Long-Life Foods During Three-Month Storage at Different Temperatures. Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences, 2017. ISSN 1337-0960.

[74] KALHOTKA, L. JŮZL, M. BUBENÍČKOVÁ, A. HŮLOVÁ, M. KONEČNÁ, H. KRUPKOVÁ, D. KOZELKOVÁ, M. PETIROVÁ, E. Olomoucké tvarůžky- tradice, která zavazuje a inspiruje. Ústav technologie potravin, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně. Výživa a potraviny, 2012. S. 22-24.

[75] OLŠANSKÝ, Č. a kol.: Výzkum výroby olomouckých tvarůžků, IV. část. Kroměříž, 1958.

[76] HASANZADEH, A. AMIRI, Z. R. AMINIFAR, M. Changes in the physicochemical, microstructural and rheological properties of traditional Kope cheese during ripening. International Journal of Dairy Technology, 2017. S. 347-355.

[77] STAPELFELDT, H. NIELSEN, B. R. AND SKIBSTED, L. F. Effect of heat treatment, water activity and storage temperature on the oxidative stability of whole milk powder. International Dairy Journal, 1997. s. 331 – 339.

[78] PROCHÁZKOVÁ, E. HRABĚ, J. KREJČÍ, J. ONIPCHENKO, N. Vliv relativní vlhkosti na změnu primárních a sekundárních oxidačních produktů tuku sušeného plnotučného mléka. Mlékařské listy č. 130, 2012. S 9-13.

[79] PACHLOVÁ, V. WEISEROVÁ, E. ŽALUDEK, M. HLADKÁ, K. KRÁČMAR, S. BUŇKA, F. Změny vybraných jakostních parametrů u přírodních sýrů v průběhu půlročního zrání/skladování za různých teplot. Potravinárstvo, ročník 4, 2010. S 217-223.

[80] KOMPRDA, T. REJCHRTOVÁ, E. SLÁDKOVÁ, P. ZEMÁNEK, L. VYMLÁTILOVÁ, L. Effect of some external factors on the content of biogenic amines and polyamines in a smear-ripened cheese. Dairy science & Technology, 2012. Vol. 92. S. 367-382.

[81] STANDAROVÁ, E. BORKOVCOVÁ, I. VORLOVÁ, L. Obsah biogenních aminů v sýrech z české obchodní sítě. VFU Brno, 2009.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

FAA volné aminokyseliny

TBARS thiobarbiturové číslo

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Výroba sýru s mazem na povrchu Livarot…….18

Obrázek 2: Schéma vzniku tyraminu……...……30

Obrázek 3: Schéma vzniku histaminu ……..……..31

Obrázek 4: schéma vzniku putrescinu …….....……..33

Obrázek 5: schéma vzniku putrescinu …….33

Graf 1: vývoj obsahu sušiny ve vzorcích …….……..44

Graf 2: Graf závislosti pH na době skladování při teplotě 6 ± 2 °C a 12 ± 2 °C (vzorek A)……..45

Graf 3: Graf závislosti pH na době skladování při teplotě 6 ± 2 °C a 12 ± 2 °C (vzorek B)……..46

Graf 4: Graf závislosti pH na době skladování při teplotě 6 ± 2 °C a 12 ± 2 °C (vzorek C)……..47

Graf 5: Graf závislosti pH na době skladování při teplotě 6 ± 2 °C a 12 ± 2 °C (vzorek D)……..48

Graf 6: Graf závislosti pH na době skladování při teplotě 6 ± 2 °C a 12 ± 2 °C (vzorek E)……..49

Graf 7: Graf závislosti pH na době skladování při teplotě 6 ± 2 °C a 12 ± 2 °C (vzorek F)……..50

Graf 8: vývoj obsahu tuku v sušině ve vzorcích v průběhu zrání při teplotě 6 ± 2 °C a 12 ± 2 °C……...…51

Graf 9: vývoj obsahu amoniaku v průběhu skladování……52

Graf 10: vývoj obsahu tiobarbiturového čísla v průběhu skladování……...54

Graf 11: vývoj tvrdosti v průběhu zrání……...55

Graf 12: vývoj soudržnosti v průběhu zrání…….56

Graf 13: vývoj celkového obsahu aminokyselin v průběhu zrání……....57

Graf 14: Vývoj obsahu celkového množství biogenních aminů ve vzorcích během skladování po dobu 1 měsíce……..64

Graf 15: Vývoj obsahu fenylalaninu ve vzorcích během skladování po dobu 1 měsíce…..65

Graf 16: Vývoj obsahu putrescinu ve vzorcích během skladování po dobu 1 měsíce…….66

Graf 17: Vývoj obsahu kadaverinu ve vzorcích během skladování po dobu 1 měsíce…....67

Graf 18: Vývoj obsahu histaminu ve vzorcích během skladování po dobu 1 měsíce……..68

Graf 19: Vývoj obsahu tyraminu ve vzorcích během skladování po dobu 1 měsíce……...69

Graf 20: Vývoj obsahu sperminu ve vzorcích během skladování po dobu 1 měsíce……...70

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Přehled sýrů s mazem na povrchu …….14

Tabulka 2: stanovené množství tuku a obsah tuku deklarovaný výrobcem…….51

Tabulka 3: vývoj obsahu jednotlivých aminokyselin během skladování vzorků A, B a C……..……...59

Tabulka 4: vývoj obsahu jednotlivých aminokyselin během skladování vzorků D, E a F.61