

Změny distribuce dusíkatých látek v průběhu zrání eidamských sýrů

Bc. Eva Weiserová

Diplomová práce
2009



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Eva WEISEROVÁ**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Změny distribuce dusíkatých látek v průběhu zrání eidamských sýrů**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

- Popis technologie výroby sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou
- Změny jakostních parametrů v průběhu zrání

II. Praktická část

- Založte zrací pokus a sledujte změny jakosti eidamských sýrů
- Zaměřte se na změnu distribuce dusíkatých látek
- Stanovte obsah volných aminokyselin a proteinový profil polyakrylamidovou elektroforézou

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] FOX, P. F. MCSWEENE, P. L.H. Dairy Chemistry and Biochemistry, SpringeVelag, 1998, ISBN 978-0-412-72000-0.

[2] HRABĚ, J. BŘEZINA, P. VALÁŠEK, P. Technologie výroby potravin živočišného živočišného původu, Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2006.

[3] GAJDŮŠEK, S., Mlékařství II, Brno: Skriptum MZLU, 1998.

[4] GAJDŮŠEK, S., Laktologie, Brno: Skriptum MZLU, 2003.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. František Buňka, Ph.D.

Ústav potravinářského inženýrství

Datum zadání diplomové práce:

18. února 2009

Termín odevzdání diplomové práce:

31. května 2009

Ve Zlíně dne 31. května 2009

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
vedoucí katedry

ABSTRAKT

Teoretická část práce je zaměřena na technologii výroby sýrů eidamského typu a na biochemické procesy, které probíhají v průběhu zrání sýrů.

Praktická část se zabývá zracím pokusem, který simuloval zrání eidamských sýrů za 3 odlišných skladovacích podmínek. Byly provedeny chemické analýzy, které byly zaměřeny zejména na změny distribuce dusíkatých látek v jednotlivých vrstvách vzorků (stanovení obsahu hrubých bílkovin, obsahu volných aminokyselin a SDS-PAGE). Pro doplnění byla provedena senzorická analýza.

Pomocí analýz bylo zjištěno, že rozdílné skladovací podmínky mají výrazný vliv na průběh změn během zrání sýrů. Bylo zjištěno, že čím dříve je sýr vyskladněn ze zracího sklepa, tím více jsou zpomaleny proteolytické procesy. S brzkým vyskladněním také souvisí zpomalení vyrovnávání jednotlivých vrstev.

Klíčová slova: eidam, zrání sýrů, volné aminokyseliny, SDS-PAGE

ABSTRACT

The theoretical part of master thesis is about production technology of Dutch-type cheeses and biochemical processes during the cheeses ripening.

The practical part deals with experiment to simulate Dutch-type cheeses ripening from 3 different storage conditions. Chemical analysis were set up to analyse changes in the distribution of nitrogen compounds in various layers of the sample (to determine the content of crude protein, the content of free amino acids and SDS-PAGE). Sensory analysis was performed to complete the research.

The results of analyses showed that different storage conditions have significant influence on changes during cheese ripening. It was found that the sooner the cheese is taken from the ripening cellar, the more the deceleration proteolytic processes.

Keywords: Dutch-type cheese, ripening, free amino acids, SDS-PAGE

Děkuji vedoucímu své diplomové práce, doc. Ing. Františku Buňkovi, Ph.D., za odborné vedení, trpělivost, podnětné připomínky a cenné rady, které mi poskytl při zpracování mé práce. Touto cestou bych také chtěla poděkovat firmě Kromilk spol. s r.o. za vstřícný přístup a ochotu. Dále bych ráda poděkovala Ing. Vendule Pachlové, Bc. Zuzaně Ciprysové a Bc. Romanu Stojaspalovi.

Prohlašuji, že jsem na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautorka.

Ve Zlíně

.....
Podpis diplomanta

OBSAH

ÚVOD	8
I TEORETICKÁ ČÁST	9
1 PŘÍRODNÍ SÝRY	10
1.1 DĚLENÍ SÝRŮ.....	10
1.2 TECHNOLOGIE VÝROBY SLADKÝCH SÝRŮ.....	12
1.2.1 Úprava mléka před vlastním zpracováním.....	12
1.2.2 Tepelné ošetření	12
1.2.3 Úprava mléka před sýřením	13
1.2.4 Sýření	14
1.2.5 Zpracování sýřeniny	14
1.2.6 Formování a lisování sýrů.....	16
1.2.7 Solení.....	17
1.3 ZRÁNÍ SÝRŮ.....	18
1.3.1 Fáze zrání sýrů.....	18
1.3.2 Zrací sklepy	19
1.3.3 Faktory ovlivňující zrání	20
2 REAKCE A PROCESY V PRŮBEHU ZRÁNÍ SÝRŮ	22
2.1.1 Metabolismus laktózy	23
2.1.2 Metabolismus kyseliny mléčné	23
2.1.3 Proteolýza.....	25
2.1.4 Lipolýza.....	28
2.1.5 Metabolismus volných mastných kyselin	30
2.1.6 Metabolismus volných aminokyselin.....	31
II PRAKTICKÁ ČÁST	34
3 CÍL PRÁCE	35
4 MATERIÁL A METODY	36
4.1 VÝROBA EIDAMSKÉ CIHLY.....	36
4.2 ZRACÍ POKUS.....	37
4.3 METODY CHEMICKÉ ANALÝZY	40
4.3.1 Stanovení pH.....	40
4.3.2 Stanovení sušiny.....	40
4.3.3 Stanovení obsahu hrubých bílkovin	40
4.3.4 Stanovení NaCl	41
4.3.5 Stanovení obsahu volných aminokyselin	41
4.3.6 SDS-PAGE.....	42
4.4 SENZORICKÁ ANALÝZA	43
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	45
5.1 VÝSLEDKY CHEMICKÝCH ANALÝZ.....	45
5.1.1 Výsledky základních chemických analýz.....	45

5.1.2	Stanovení obsahu volných aminokyselin	50
5.1.3	SDS-PAGE.....	62
5.2	VÝSLEDKY SENZORICKÉ ANALÝZY	64
5.3	DISKUZE.....	65
ZÁVĚR		68
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY		70
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK		76
SEZNAM OBRÁZKŮ		77
SEZNAM TABULEK.....		79
SEZNAM PŘÍLOH.....		80

ÚVOD

Výroba sýrů je řazena mezi nejstarší odvětví zpracování mléka, která patří také mezi nejnáročnější. V principu se jedná o koncentraci mléčných bílkovin, které jsou společně s tukem a minerálními látkami, nejdůležitějšími složkami sušiny sýrů.

Sýry jsou bílkovinnou potravinou. Významný je obsah vitaminů, vápenatých solí a jemně rozptýlených bílkovin, což umožňuje jejich lehkou stravitelnost. Sýry obsahují i další cenné složky – zejména vápník, fosfor, vitaminy (retinol, kalciferol, riboflavin či kobalamin).

Teoretická část diplomové práce je zaměřena na výrobu sýrů eidamského typu. Jsou popsány zrací fáze výroby a biochemické procesy, které v průběhu této fáze probíhají.

V praktické části je popsán zrací pokus, ve kterém byly srovnány 3 rozdílné zrací podmínky téže šarže vyrobených eidamských cihel. Část šarže byla skladována pouze ve zracím sklepě (10 ± 2 °C), část šarže byla po 20 dnech ze zracího sklepa vyskladněna do lednice (5 ± 2 °C) a poslední část byla ze zracího sklepa vyskladněna po 34 dnech a dále skladována v lednici (5 ± 2 °C). Tento pokus měl za cíl simulovat brzké vyskladňování sýrů ze zracích sklepů (v době, kdy tyto sýry ještě nejsou dostatečně dozrálé a nevykazují své charakteristické senzorycké znaky) a srovnat je s přírodními sýry, které zrají za optimálních podmínek delší dobu.

Cílem diplomové práce tedy bylo pomocí chemických analýz srovnat jednotlivé skladovací podmínky a to z hlediska průběhu biochemických změn, které probíhají během zrání sýrů v jednotlivých vrstvách vzorků. Tento cíl byl podpořen senzoryckou analýzou, která měla za cíl určit nejvhodnější produkt z hlediska spotřebitele.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 PŘÍRODNÍ SÝRY

Sýry patří mezi základní a tradiční produkty mlékárenského průmyslu. Sýr je dle vyhlášky Ministerstva zemědělství 77/2003 Sb. v platném znění definován jako mléčný výrobek vyrobený vysrážením mléčné bílkoviny z mléka působením syřidla či jiných koagulačních činidel, prokysáním a oddělením podílu syrovátky [59].

Hlavním důvodem zpracování mléka na sýry je především prodloužení trvanlivosti. Toto prodloužení je zapříčiněno fermentací laktózy na kyselinu mléčnou, dále snížením vodní aktivity a pH [45].

1.1 Dělení sýrů

Na našem trhu existuje nepřeberné množství druhů sýrů. Sýry mohou být klasifikovány a následně děleny do různých kategorií z několika hledisek.

Dle použité suroviny rozlišujeme sýry přírodní (vyrobeny z mléka), tavené (vyrobeny z přírodního sýru), syrovátkové (vyrobeny ze syrovátky) a analogy a imitace sýru (v tomto sýru je mléčný protein či mléčný tuk, nebo jejich část, nahrazen rostlinným zdrojem).

Dle obsahu tuku v sušině máme sýr vysokotučný (více než 60 % tuku), plnotučný (45 – 60 % tuku), polotučný sýr (25 – 45 %; možno také rozmezí 20 – 45 % tuku), nízkotučný (10 – 25 %; možno také rozmezí 10 – 20 % tuku) a sýr odtučněný sýr (méně než 10 % tuku).

Dle obsahu vody v tukuprosté hmotě sýra dělíme sýry na extra tvrdý sýr (obsah vody 47 % a méně), tvrdý sýr (47 – 54,9 % vody), polotvrdý sýr (55 – 61,9 % vody), poloměkký sýr (62 – 68 % vody) a měkký sýr (více než 68 % vody) [59].

Obsah vody v tukuprosté hmotě sýra (VVTPH) lze vypočítat dle vzorce:

$$\% VVTPH = \frac{g(\text{vody})}{100 - g(\text{tuku})} \cdot 100$$

Měkké sýry jsou dále děleny podle způsobu zrání (viz tabulka č. 1), polotvrdé a tvrdé sýry jsou děleny zejména dle výše dohřívací teploty při jejich výrobě (viz tabulka č. 2) [11].

Tabulka 1: Měkké sýry dle způsobu zrání

Typ sýra	Způsob zrání	Příklad daného typu sýra
sýr nezrající	---	čerstvý sýr
sýr zrající	v chladu	sýr Blaťácké Zlato
	pod mazem	sýr Romadúr
	s plísní v těstě	sýr Niva
	s plísní na povrchu	sýr Hermelín
	s kombinovaným nárůstem plísně	sýr Vltavín
	pařený	sýr Parenica
sýr zrající v solném nálevu	nelisovaný	Balkánský sýr
	lisovaný	sýr Akawi
	pařený	sýr Jadel

Tabulka 2: Polotvrdé a tvrdé sýry dle výše dohřívací teploty

Typ sýřeniny	Typ sýra	Příklad daného typu sýra
nizkodohříváná sýřenina	eidamského typu	sýr Eidam, Gouda
	hnětená sýřenina	
	mletá sýřenina	sýr Čedar
vysokodohříváná sýřenina	ementálského typu	sýr Ementál, Primátor
	bez tvorby ok	sýr Moravský bochník
	ke strouhání	sýr Parmazán

1.2 Technologie výroby sladkých sýrů

Základní surovinou pro výrobu sýrů je mléko, v našich zeměpisných podmínkách se jedná především o mléko kravské. Četné druhy sýrů jsou ovšem vyráběny také z jiných druhů mlék – ovčí, kozí či buvolí. Tyto výrobky se i na našem území vyskytují stále častěji.

Kvalitní výrobek lze vyrobit jen z kvalitní suroviny. Vliv na složení sýra a výtěžnost výroby má zejména chemické složení mléka.

Velmi důležité jsou také vlastnosti mléka a z nich především:

- syřitelnost mléka - schopnost mléka srážet se syřidlem
- kysací schopnost mléka - významná vlastnost mléka pro růst čistých mlékařských kultur
- mikrobiální čistota

Výroba přírodních sýrů je poměrně složitý a zdlouhavý proces, během kterého je nutné projít mnoha technologickými operacemi. Mezi ty základní patří úprava mléka před zpracováním, tepelné ošetření mléka, úprava mléka před syřením, syření, zpracování syřeniny, formování, solení a zrání sýrů [15, 25]. Celkové schéma výroby sýrů s nízkodohřívanou syřeninou je uvedeno v Příloze I.

1.2.1 Úprava mléka před vlastním zpracováním

Mezi tuto technologickou operaci můžeme zařadit standardizaci obsahu sušiny a tuku. Pro výrobu sýrů se mléko nehomogenizuje, v některých případech lze ovšem zařadit homogenizaci mléčného tuku (pro řízenou lipolýzu, která je žádoucí při výrobě sýrů s plísni v těstě), jenž se přidává při standardizaci do mléka [28, 29]. Homogenizací se nám sníží ztráty mléčného tuku do syrovátky, ale zároveň se nám zvyšuje styčná plocha a tuk se tak stává přístupnějším pro lipolytické enzymy [38].

1.2.2 Tepelné ošetření

Na území naší republiky jsou sýry vyráběny zejména z pasterovaného mléka, i když legislativa EU (a tím i ČR) umožňuje i výrobu sýrů z mléka nepasterovaného. Pro výrobu sýrů je nutno použít šetrnou pasteraci. Legislativa stanovuje hodnotu pasteračního zákroku jako působení teploty 71,7 °C po dobu 15 sekund a jejich ekvivalentů (obvykle vyšší teplota

a kratší čas), které mají stejný účinek [59]. Pokud by byl použit méně šetrný způsob, došlo by k rozsáhlejší denaturaci sérových bílkovin, které by následně neodcházely do syrovátky. Na druhou stranu je zvýšená vazba vody a tím je snížena sušina finálního produktu [5, 18, 38].

1.2.3 Úprava mléka před sýřením

V průběhu pasterace dochází k porušení rovnováhy mezi koloidní a rozpustnou formou vápníku. Proto se do mléka pro obnovení syřitelnosti přidává CaCl_2 – tzv. rozpustný vápník [5, 28, 64]. Přidává se především proto, že přítomnost Ca^{2+} ovlivňuje průběh srážení. Nedostatek Ca^{2+} se projevuje špatnými reologickými vlastnostmi vzniklého gelu, jako je zejména pevnost a homogenita a tím je také ovlivněna zpracovatelnost sýřeniny a jakost finálního výrobku [11, 38].

V některých mlékárnách již byly do výrobního procesu zařazeny baktofugace či membránové separační metody (např. ultrafiltrace) za účelem zlepšení mikrobiologické jakosti [11].

Důležitým a nepostradatelným krokem při výrobě sýrů je přídavek čistých mlékařských kultur, jež mohou být rozděleny z několika hledisek.

V sýrařství jsou používány primární kultury a sekundární kultury.

Primární kultury, respektive základní kultury, zajišťují prokysávání mléka i sýrů, dále uvolňují enzymy, které se podílejí na tvorbě aroma. Tyto kultury svou biochemickou aktivitu zahajují před koagulací mléka. Z mezofilních kultur, používaných zejména do smetanového zákysu, se uplatňují *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* či *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Termofilní kultury jsou využívány při výrobě sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou, např. *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*.

Sekundární kultury (doplňkové) jsou používány k vytvoření typických sensorických znaků a daného druhu sýru. Mezi tyto kultury patří například:

- tvrdé sýry – *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei*,
- sýry ementálského typu – *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii*, *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*,
- sýry s mazem na povrchu – *Brevibacterium linens*,
- sýry s plísní na povrchu - *Penicillium camemberti*,
- sýry s plísní v těstě – *Penicillium roqueforti* [12, 48].

1.2.4 Sýření

Sýření je technologická operace, při které je vytvořen bílkovinný gel, polotuhý koagulát – sýřenina, která vytváří trojrozměrnou síť. Ke srážení mléka může dojít pomocí kyseliny mléčné či působením syřidla. Kyselé srážení kaseinu probíhá optimálně při pH 4,2 – 4,6 (což odpovídá izoelektrickému bodu kaseinu) a teplotě 30 – 40 °C [18].

Sladké srážení spočívá v působení proteolytických enzymů obsažených v syřidle na kasein. Tento proces probíhá v několika fázích:

- primární fáze – dochází k destabilizaci kaseinových micel, které ztrácejí svou soudržnost. K této destabilizaci dochází specifickou hydrolyzou κ -kaseinu (mezi 105. a 106. aminokyselinou), který následně už není schopen plnit funkci ochranného koloidu.
- sekundární fáze – probíhá koagulace destabilizovaného kaseinu za vzniku trojrozměrného gelu. Vznik gelu je ovlivněn přítomností vápenatých iontů a teplotou ($> 15^{\circ}\text{C}$).

Při delším působení syřidla může dojít k tzv. terciální fázi sýření. Během této fáze dochází i k štěpení α - a β -kaseinů [38]. Tato fáze štěpení probíhá pomalu a je nežádoucí, jelikož v jejím průběhu může docházet ke vzniku hořkých peptidů. Také dochází k ovlivnění konzistence finálního výrobku a ke ztrátám do syrovátky.

1.2.5 Zpracování sýřeniny

Zpracování sýřeniny je proces, který se skládá z několika po sobě jdoucích operací. Mezi tyto operace většinou patří: krájení sýřeniny, drobení, vytužování, dohřívání a dosoušení.

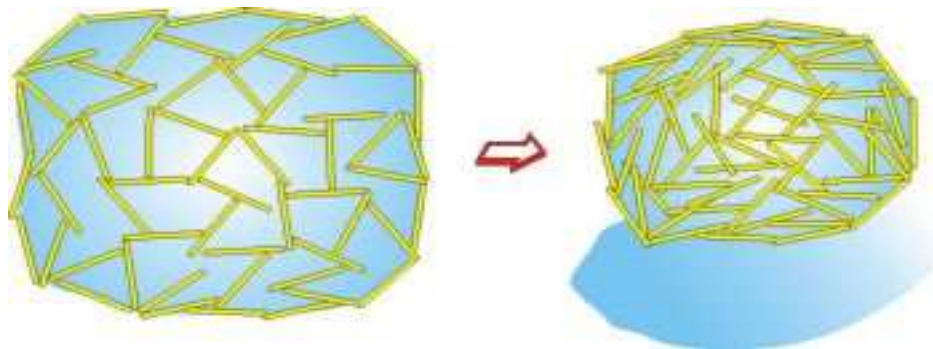
Krájení sýřeniny je prováděno mechanicky a to pomocí systému vodorovných a svislých nožů a ocelových strun, které jsou ukotveny v rámech – tzv. *harfy* (obr. 1).



Obrázek 1: Sýrařská harfa [54]

Krájením dochází k odloučení syrovátky ze sýřeniny, která obsahuje především vodu a laktózu. Oproti tomu sýřenina obsahuje vysráženou mléčnou bílkovinu a tuk. První prokrojení sýřeniny musí být provedeno velmi opatrně, tak aby nedošlo k mechanickému rozbití a následnému uvolnění malých částic, které by odcházely do syrovátky – tzv. *sýrařský prach* [54].

Krájením sýřeniny je podpořena synereze - vytékání kapaliny z gelu (obr. 2), což je proces odstraňování syrovátky ze sýřeniny. Rychlost a rozsah synereze je ovlivněna zejména koncentrací Ca^{2+} , pH syrovátky a také časem [11].



Obrázek 2: Schematické znázornění vytékání kapaliny z gelu [53]

Drobení je proces, při kterém vznikají zárodky zrn, které jsou v průběhu dalšího zpracování zmenšovány a to na požadovanou velikost: vlašského ořechu, lískového ořechu, hrachu nebo obilky. Obecně platí, že větší sýry s vyšší sušinou mají menší zrno a jejich zrání probíhá pomaleji a po delší dobu [38]. Během tohoto procesu je sýřenina vytužována. Vytužo-

vání je operace, kdy je zrno v pohybu (míchá se), probíhá další synereze a roste pevnost pokožky. Je ovšem třeba dát si pozor na vznik shluků a slepenců syrových zrn. Tyto útvary je třeba nutno odstranit, protože mohou být příčinou vzniku vad finálních výrobků.

Dohřívání sýřeniny je prováděno za účelem dalšího vyloučení podílu syrovátky ze sýřeniny. Výše dohřívací teploty je závislá na druhu syra:

- nízkodohřívané sýry – obvykle 38 – 42 °C
- vysokodohřívané sýry – obvykle 48 – 56 °C

Při dohřívání je nutné optimální zvyšování teploty, jelikož při prudkém dohřívání může dojít k uzavření povrchové vrstvy zrna, což má za následek uzavření vyššího podílu zadržené syrovátky uvnitř zrna. Vlastní dohřívání může být provedeno několika způsoby:

- přímý přídavek vody – odpuštění 20 – 30 % syrovátky a připuštění 50 – 70 % vody o teplotě 60 – 90 °C
- nepřímý ohřev mezipláštěm

Přímý přídavek vody je typický pro výrobu sýrů holandského typu, u kterých není kladen požadavek na tvorbu ok (pouze malý počet malých ok). Oproti tomu dohřívání pomocí nepřímého ohřevu je typický pro výrobu syru ementálského typu. Za teplot vyšších než 45 °C dochází k zastavení činnosti mezofilních kultur a převládá činnost termofilních kultur [5].

Dosoušení je operace, kdy syrové zrno, které bylo přihráto, je určitou dobu ještě udržováno na dosažené teplotě a to zejména z důvodu dalšího vyloučení syrovátky. Délka doby dosoušení je řízena především druhem syru a jeho požadovanou sušinou. Čím vyšší je požadovaná sušina, tím delší je doba dosoušení.

1.2.6 Formování a lisování sýrů

Formování sýrů je nedílný proces výroby, během něhož je sýrům dodáván charakteristický tvar a velikost. Během tvarování probíhají nejen mechanické procesy (uvolňování syrovátky, slepování zrn, apod.), ale také pokračují přeměny biochemické (např. prokysávání) [38]. Formování je prováděno ve speciálních tvořítkách. Tato tvořítka mohou být kovová, plastová či s kovovou výztuží a to různorodých velikostí a tvarů. Plášť tvořítek je často perforovaný a to k usnadnění odtoku syrovátky [9]. Do těchto tvořítek se sýřenina nalévá

buď společně se syrovátkou anebo po odtoku syrovátky mimo tvořítka, ale zrna přitom nesmí oschnout.

Lisování sýrů je zařazeno do procesu při výrobě polotvrdých a tvrdých sýrů. Průběh lisování je velmi důležitou operací výroby sýrů. Průběh lisování výrazně ovlivňuje průběh kysání či obsah vody v hmotě sýra.

V průběhu lisování nesmí dojít k výraznějšímu poklesu teploty, protože by došlo k zastavení činnosti kultur, která je nezbytná v dalších technologických operacích (zejména zrání) [29].

Lisování je prováděno pomocí tlaku za účelem rychlejšího odvádění syrovátky. Počáteční tlak je volen na nižších hodnotách a to zejména z důvodu zamezení tvorby silné kůrky, která by bránila dalšímu odtoku syrovátky. Velmi důležitým parametrem je také rovnoměrnost tlaku. Doba lisování je individuální pro jednotlivé druhy sýrů [46].

1.2.7 Solení

Další technologickou operací během výroby sýrů je jejich solení [2]. Solení je hlavním faktorem, který ovlivňuje vodní aktivitu, má také účinek na růst bakterií, aktivitu enzymů v sýru a z tohoto důvodu ovlivňuje zrání sýrů a průběh kysání sýrů [12]. Solení dodává sýrům slanou chuť, zlepšuje konzistenci, umožňuje další odchod syrovátky, zpevňuje povrch sýru, potlačuje činnost nežádoucí mikroflóry, ovlivňuje další průběh zrání atd. [40]. Solení může být prováděno několika způsoby:

- do mléka – NaCl je přidáván do mléčné směsi před vlastním zasyřením, dochází k dokonalému rozptýlení
- do těsta – NaCl je přidáván do zrna před tvarováním, tento způsob využíván zejména při výrobě sýrů s plísní v těstě
- na sucho – NaCl je vtírán do pokožky již vytvarovaného sýru, solení je opakováno po „vstřebání“ dávky
- v solné lázni – NaCl proniká pomocí osmo-difúzních procesů z roztoku NaCl, ve kterém je sýr ponořen [11].

U sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou je nejvíce NaCl obsaženo v pokožce a hmotě pod povrchem sýra – tzv. *solný prstenec*. Ve středu sýru je obsah soli minimální a k vyrovnání obsahu soli dochází až v průběhu zrání pomocí difúze [38].

1.3 Zrání sýrů

Zrání sýrů je nedílnou a velmi důležitou součástí výroby sýrů. Zrání lze definovat jako veškeré biochemické procesy probíhající v sýrech působením mikrobiálních enzymů, případně syřidlových enzymů. Zrání ovlivňuje především vzhled, chuť, vůni a konzistenci sýra [2].

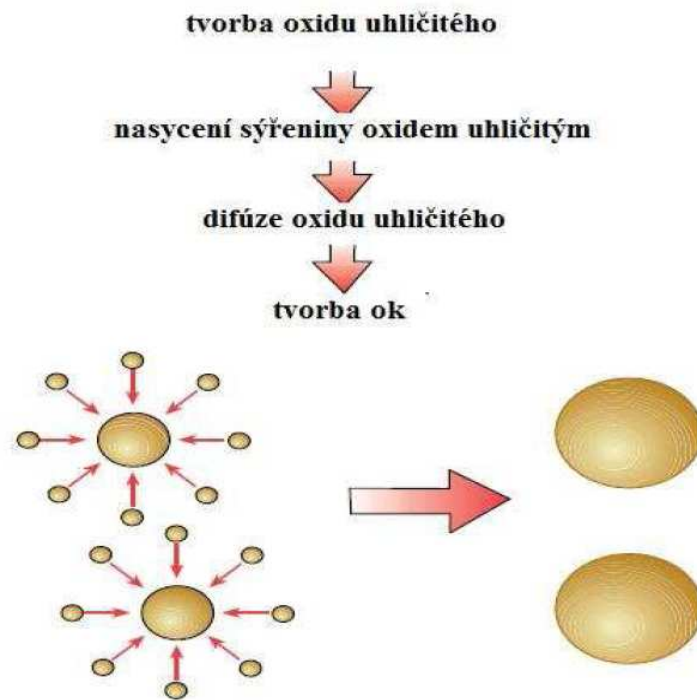
V této kapitole jsou popsány obecné principy, vlastní biochemii zrání je věnována kapitola 2.

1.3.1 Fáze zrání sýrů

Biochemické procesy, které v průběhu zrání v sýrech probíhají, mohou být rozděleny do 3 základních fází, které na sebe plynule navazují, avšak nejsou od sebe výrazně odděleny [5, 25, 38].

V primární fázi této fázi dochází k rozkladu laktózy a to bakteriemi mléčného kvašení zejména za vzniku kyseliny mléčné. Hlavní rozklad laktózy nastává již v průběhu formování sýrů, dále během odkapávání [25]. K úplnému vymizení laktózy u tvrdých sýrů dochází již během prvních dní zračního procesu. Během tohoto procesu je vytvářena kyselina mléčná, která uvolňuje z kaseinu vápník za vzniku mléčnanu vápenatého [5, 25]. Vzniká monokalciumkaseinát, který bobtná ve vodě a roztoku NaCl, čímž dojde ke slepování sýřeninu a vzniku homogenní hmoty.

Během sekundární fáze dochází ke snížení titrační kyselosti sýra přítomností kyseliny mléčné a také jejím mikrobiologickým rozkladem. Kyselina mléčná bývá rozložena na kyselinu octovou (případně propionovou), oxid uhličitý a vodu [11, 25]. Během této fáze dochází k tvorbě ok (obr. 3). Tvorba ok je způsobena uvolňováním oxidu uhličitého a jeho rozpouštění ve vodě. Následně dochází k nasycení sýřeniny a hromadění CO₂ v dutinkách. Poté dochází k difúzi oxidu uhličitého do větších útvarů a tvorbě ok [5].



Obrázek 3: Schematické znázornění tvorby ok [5]

Terciální fáze je charakteristická proteolýzou bílkovin, která může probíhat anaerobním způsobem v celé hmotě anebo aerobním způsobem od povrchu dovnitř. Během toho procesu dochází k rozkladu bílkovin. Jsou vytvářeny vysokomolekulární peptidy (více než 35 aminokyselin) a to působením proteolytických enzymů čistých kultur a syřidla. Tyto enzymy jsou přímo zodpovědné za průběh změn, které nastávají v průběhu zrání. FOX et al. [11] předpokládá, že přidavek exogenních enzymů do sýřeniny by mohl urychlit zrání sýrů. V terciální fázi se uplatňuje také plazmin (enzym mléka). Vzniklé peptidy jsou dále hydrolyzovány na peptidy s nízkou molekulovou hmotností (6 – 15 aminokyselin). Další proteolýzou vznikají kratší peptidy, dipeptidy či aminokyseliny, které mohou být degradovány až na amoniak či sirovodík [25].

1.3.2 Zrací sklepy

Jak již bylo řečeno, tak v průběhu zrání probíhají v sýrech mnohé změny. Aby byly zajištěny ideální podmínky pro průběh samotného zrání, je nutné skladovat sýry v průběhu zrání ve zracích sklepech, ve kterých jsou optimální podmínky vytvořeny. Zrací sklepy jsou definovány jako prostory s vhodnými klimatickými podmínkami pro daný druh sýra - teplota,

relativní vlhkost, atd. Jako zrací sklepy jsou využívány speciálně navrhované stavby či upravené přírodní útvary (štoly, jeskyně,...) [38]. Mezi sledované podmínky řadíme vhodnou teplotu, relativní vlhkost vzduchu a dobu zrání.

Teplota zásadním způsobem ovlivňuje průběh a také intenzitu biochemických přeměn.

- *teplé (kvasné)* – teplota 22 – 26 °C; jsou využívány zejména u sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou
- *zrací* – teplota 8 – 14 °C; za této teploty probíhá především proteolýza a tento typ sklepu je využíván zejména pro sýry tvrdé a polotvrdé; pro sýry zrající pod mazem se používá teplota 16 – 20 °C

Pro výrobu některých druhů sýrů (např. Blaťácké Zlato) se používají ještě tzv. *chladné sklepy*, ve kterých se teplota pohybuje v rozmezí 4 – 8 °C [25].

Relativní vlhkost vzduchu je závislá na teplotě zracího sklepa. Pro sýry, které zrají bez obalů, se používá relativní vlhkost > 90 %. Pokud sýry zrají v obalu, tak je volena relativní vlhkost nižší a to v rozmezí 60 – 80 %.

Doba zrání je velmi individuální a závisí na druhu sýru. Může být velmi krátká – několik dní (sýry zrající pod mazem), týdnů (sýry zrající s plísní v těstě), nebo až několik měsíců (sýry ementálského typu).

Ošetřování sýrů je velmi důležité, jelikož klima ve zracích sklepech podporuje nejen zrání sýrů, ale také umožňuje nárůst kontaminující mikroflóry na povrchu sýrů. Z tohoto důvodu je nutno sýry, které nezrají v obalech, ošetřovat. Existuje mnoho typů ošetření – omývání roztokem NaCl, odstranění nechtěné povrchové mikroflóry, zvlhčování (sýry zrající pod mazem) či pravidelné otáčení (sýry s plísní v těstě) [5, 38].

1.3.3 Faktory ovlivňující zrání

Prvotním cílem výroby sýrů je konzervovat základní nutriční látky přítomné v mléce (např. lipidy, proteiny). Toho je dosaženo kombinací okyselení, dehydratace, nízkého redoxního potenciálu a solením [11].

Podle FOX et al. [14] je proces zrání sýrů z časového hlediska velmi nákladný a drahý. Je odhadováno, že zrání parmazánu „stojí“ okolo 100 \$ na tunu za měsíc (v přepočtu cca 2 100 Kč). Tento sýr zraje obvykle déle než 2 roky čili náklady v průběhu zrání po 2 letech

stoupnou na 50 400 Kč. Zrání sýrů je obtížně kontrolovatelný proces, i přestože při zahrnutí znalostí mikrobiologie a biochemie zrání sýrů lze zvýšit pravděpodobnost produkce kvalitního sýra. Existují ekonomické stimuly, které umožňují proces zrání sýrů urychlit (přičemž celková chuť a texturní vlastnosti jsou téměř nepozměněny), které mohou být v dnešní době poměrně hojně využívány [62].

Mezi často používané metody používané k urychlení procesu zrání sýrů patří zejména zvýšení zrací teploty, přidavek exogenních enzymů, chemicky či fyziologicky modifikované bakteriální buňky či doplňkové kultury. Každá z těchto metod má své výhody i limity.

Sýry eidamského typu zrají obecně za teplot v rozmezí 12 - 14°C. Teploty okolo 20°C jsou horním limitem pro zrání sýrů, pokud jsou použity vyšší teploty, tak dochází k měknutí sýra a poměrně rychle se rozvíjejí různé deformace [11].

Enzymy v syřidle jsou zodpovědné za primární proteolýzu u mnoha druhů sýrů a tak se očekává, že zrání může být urychleno právě dalším přidavkem syřidla k syřenině. Přídavek syřidla má však svůj limit, jelikož extrémním přidavkem by mohla být způsobena nejen hořká chuť během zrání, ale také by mohlo dojít ke vzniku kožovité struktury a k úniku sýrařského prachu do syrovátky. Významným enzymem je plazmin. Ovšem použití tohoto je v komerčním měřítku poměrně finančně náročné.

Aminokyseliny jsou považovány za významné přispivatele (ať už přímo či nepřímo) vzniku celkového aroma sýrů. Jejich produkce v průběhu zrání je poměrně pomalá, je možno předpokládat, že přidavkem aminokyselin do syřeniny dojde k urychlení rozvoji chuťových látek. Za významné aminokyseliny vzhledem k chuti sýra jsou považovány zejména kyselina glutamová, leucin a metionin [11]. Aminokyseliny stimulují proteolýzu, zejména fázi, která zahrnuje rozklad krátkých peptidů na jednotlivé aminokyseliny [60].

Pokud je při výrobě sýrů použita některá z výše uvedených metod, tak se k zákazníkovi dostává výrobek dostatečně dozrálý. V dnešní praxi se spíše setkáváme s tím, že sýry jsou předčasně vyskladňovány a distribuovány k zákazníkovi, ačkoli proces zrání ještě nebyl zdaleka ukončen.

2 REAKCE A PROCESY V PRŮBEHU ZRÁNÍ SÝRŮ

Zrání je velmi důležitou součástí výroby sýrů. Zrání může být považováno za souhrnný komplex změn, které jsou způsobeny syřidlovými enzymy či enzymatickou činností kultur, které jsou při výrobě přidávány. Během zrání sýr získává své typické sensorické vlastnosti – vzhled, konzistenci, chuť a vůni [18, 25].

Pro zrání sýrů byly definovány 2 základní pojmy a to *rozsah zrání* a *hloubka zrání*. Rozsah zrání představuje podíl ve vodě rozpustných dusíkatých látek (tj. albumos a peptonů). Rozsah zrání zaznamenáváme zejména u měkkých sýrů. Hloubka zrání je definována jako množství aminokyselin a jejich produktů k celkovému dusíku. Hloubka zrání je značná především u tvrdých sýrů [11, 25].

Rozkladem bílkovin – kaseinu jsou získávány sýry typických chuťových a do jisté míry i barevných a konzistenčních vlastností. Dále je také zvýšena jejich stravitelnost a dietetická hodnota [52, 61, 64].

Jak už bylo řečeno, v průběhu zrání dochází ke změnám, díky nimž sýr získává své typické vlastnosti. Uplatňují se fyzikální, chemické a biochemické reakce, pomocí kterých dochází k žádoucím změnám. Mezi fyzikální změny může být zařazeno vyrovnaní obsahu NaCl, ale také změna barvy a to z původní bílé až krémové na slámovou (v závislosti na druhu sýra). Díky chemickým reakcím dochází např. k reakci vápníku s kyselinou mléčnou, což má za následek vznik monokalciumpkaseinátu, který se podílí na celistvosti hmoty sýru [38] a to tak, že kyselina mléčná uvolňuje z kaseinu vápník za vzniku mléčnanu vápenatého. [25]. Mezi nejvýznamnější skupinu reakcí patří mikrobiologické a biochemické procesy, které při zrání sýrů probíhají poměrně intenzivně a v širším rozsahu, proto jim bude věnována samostatná kapitola.

Mezi nejvýznamnější reakce patří:

- proces odbourávání glukózy a reakce kyseliny mléčné
- proteolýza – proces rozkladu bílkovinné struktury
- lipolýza – proces štěpení tuků.

Probíhají ovšem i sekundární reakce – např. metabolismus volných mastných kyselin či metabolismus volných aminokyselin [31], což jsou reakce, během nichž vznikají žádoucí aromatické látky.

2.1.1 Metabolismus laktózy

Klíčovým rysem při výrobě sýrů je metabolismus laktózy na kyseliny mléčnou pomocí vybraných kultur bakterií mléčného kvašení (LAB) [31, 32]. Za běžných podmínek je tato metabolická dráha zprostředkována startérovými kulturami již během přípravy sýřeniny nebo v prvních stupních zrání. V případě, kdy metabolismus laktózy není kompletní pomocí startérových kultur, mohou k jejímu proběhnutí přispět také nstartérové bakterie mléčného kvašení (NSLAB) [11]. Rychlost a rozsah okyselení závisí na výchozí textuře sýřeniny [31]. Na rychlosti okyselení v průběhu výroby je také závislá hodnota pH. Hodnota pH ovlivňuje strukturu sýřeniny a má přímý vliv na rozpustnost kaseinů. Bylo zjištěno, že sýry s vyšším pH jsou jemnější než sýry, u kterých je pH v kyselé oblasti [19]. Většina laktózy z mléka odchází jako laktóza či kyselina mléčná v syrovátce [11]. V průběhu lisování sýřenin sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou obsahuje kolem 3 % laktózy, na konci výroby zůstává v sýřenině pouze nízká koncentrace laktózy (0,8 – 1,0 %) [11, 27]. Kompletní fermentace laktózy v sýru je důležitá k zabránění rozvoji kontaminující mikroflóry (plísňe - *Penicillium*, *Aspergillus* či bakterie - *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Bacillus*).

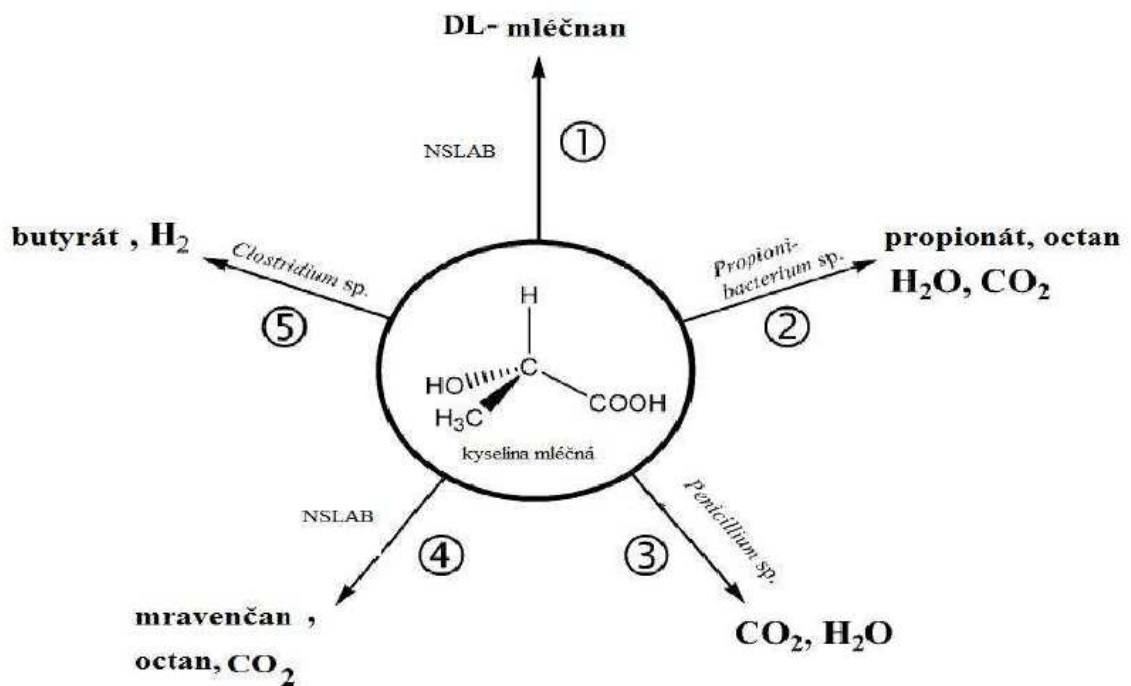
Zbytková laktóza je poměrně rychle metabolizována na L-kyselinu mléčnou a to v průběhu prvních dní zrání v závislosti na teplotě [44]. Přítomnost zbytkové laktózy nebo monosacharidů, ze kterých se laktóza skládá (glukóza a galaktóza), může vést k Maillardově reakci (neenzymové hnědnutí) a to především u sýrů, které byly dohřívány při vyšších teplotách [11]. Zbytková laktóza, která zůstává v sýřenině po formování, je rychle metabolizována přítomnými mikroorganizmem [16, 31].

2.1.2 Metabolismus kyseliny mléčné

Metabolismus kyseliny mléčné v průběhu zrání sýrů má důležitý význam u všech typů sýrů. Kyselina mléčná má přímý efekt na chuť sýrů, zejména u nezrajících, u kterých nejsou vyvinuty ostatní chuťové látky [11]. Kyselina mléčná produkovaná z laktózy, je velmi důležitým substrátem pro reakce probíhající během zrání sýrů. D-kyselina mléčná může být tvořena přímo z laktózy a to startérovými laktobacily či NSLAB [16, 24] nebo může vznikat racemizací L-kyseliny mléčné (obr. č. 4; krok 1). Rychlost, se kterou je L-kyselina mléčná racemizována, závisí na skladbě NSLAB mikroflóry – například pediokoky racemizují kyselinu mléčnou rychleji než laktobacily [55, 56]. Bylo také zjištěno, že racemizace probíhá rychleji v mléce syrovém než pasterovaném [33]. Kyselina mléčná může být v

sýrech oxidována na produkty, mezi které patří mimo jiné kyselina octová, kyselina mravenčí, ethanol či oxid uhličitý (obr. č. 4; krok 4) [11, 16].

Anaerobní metabolismus kyseliny mléčné probíhá např. pomocí *Clostridium tyrobutyricum* na kyselinu máselnou a vodík (obr. č. 4; krok 5). Tyto produkty způsobují vady – tzv. pozdní duření, kdy vznikají v sýru trhliny, které se objevují v průběhu zrání sýrů a vzniká také nepříjemná pachut' [15, 32].



Obrázek 4: Metabolizmus laktózy v průběhu zrání sýrů: 1 - racemizace, 2 – metabolismus způsobený *Propionibacterium* sp., 3 – oxidace, 4 – anaerobní metabolismus pomocí NSLAB, 5 – anaerobní metabolismus způsobený *Clostridium* sp.

[16, 36]

K metabolismu laktózy pomocí kroku 2 dochází při výrobě sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou, při jejichž výrobě je mikroorganismus *Propionibacterium* sp. využíván [5].

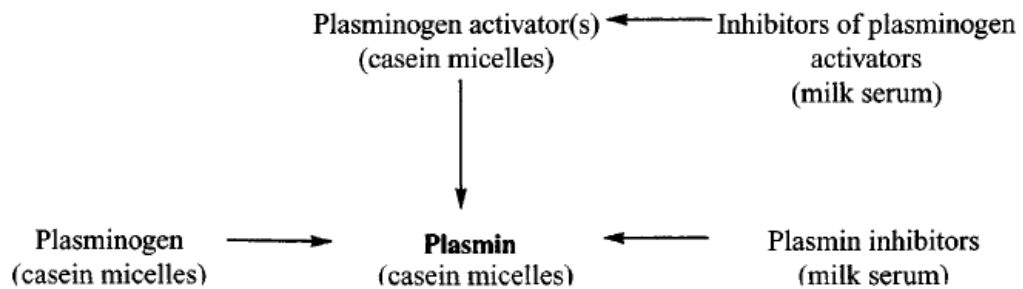
2.1.3 Proteolýza

Proteolýza je nejkompexnější a důležitý biochemický děj, který se vyskytuje u sýrů v průběhu jejich zrání. Proteolýza přispívá zejména k měknutí textury sýrů v průběhu zračního procesu a to v důsledku hydrolýzy kaseinové matrice v syřenině a vlivem snížení hodnoty vodní aktivity (a_w) syřeniny (v důsledku změny ve vazbě vody, kdy v průběhu hydrolýzy byly vytvořeny nové karboxylové kyseliny a aminoskupiny). Proteolýza má dále přímý vliv na chuť a to v průběhu produkce krátkých peptidů a aminokyselin, některé z nich jsou chuťovými látkami (nejen hořkými). Proteinázy a peptidázy katalyzující proteolýzu v průběhu zrání sýrů pocházejí z 6 primárních zdrojů, jmenovitě: zbytková aktivita syřidla, mléko, primární bakterie mléčného kvašení, NSLAB, sekundární kultury (např. *Propionibacterium freudenreichii*, *Penicillium roqueforti*, *Penicillium camemberti*,...) a v určitých případech, exogenní proteinázy či peptidázy přidávané do mléka či syřeniny za účelem urychlení zrání [15].

Významným zdrojem proteolytických enzymů v mnoha druzích sýrů je zbytkové syřidlo, nejčastěji chymozin, který zůstává v syřenině i po odtoku syrovátky. Až 30 % syřicí aktivity, která zůstává v syřenině, závisí na faktorech, jako jsou: typ enzymu či pH při odtoku syrovátky [57]. Specifita chymozinu na všechny typy kaseinů je dobře známa. V roztoku chymozin štěpí β -kasein [58], což může mít za následek produkci krátkých hydrofobních peptidů, které mohou být hořké. Primární aktivita chymozinu na α_{S1} -kasein je zaměřena na místo Phe₂₃ - Phe₂₄ [36], která má za následek produkci krátkých peptidů. α_{S2} -kasein je vůči aktivitě chymozinu odolnější než α_{S1} -kasein – rozštěpení α_{S2} -kaseinu je omezeno pouze na hydrofobní oblasti molekuly [35]. Ačkoliv *para*- κ -kasein obsahuje několik míst, která by mohl chymozin štěpit, tak doposud nebylo zjištěno, že by byl hydrolyzován buď v roztoku, nebo v sýru [21].

Mléko samo o sobě je významným zdrojem proteolytických enzymů. Hlavní původní proteinázou v mléce je plazmin, což je enzym mající původ v krvi a optimální aktivitu vykazuje za přibližných podmínek pH 7,5 a teplota 37°C. Fyziologická role plazminu spočívá v tom, že se účastní degradace sraženin fibrinu v průběhu procesu srážení krve. Z tohoto důvodu musí být aktivita plazminu v krvi pod kontrolou, proto je produkován ve formě neúčinného prekurzoru, plazminogenu, který je na účinnou formu aktivován aktivátory (PAs) [1]. V mléce jsou plazmin, plazminogen a PAs převážně spojovány s kaseinovými micelami, zatímco inhibitory plazminu a inhibitory aktivátoru odcházejí spolu se syrovát-

kou (obr. 6). Plasmin degraduje kaseiny v následujícím pořadí: β -kasein \approx α_{S2} -kasein $>$ α_{S1} -kasein. κ -kasein vykazuje vůči těmto proteinázám rezistenci. α_{S2} -kasein je na činnost *plazminu* poměrně citlivý, což je důvodem vymizení tohoto proteinu, které bylo pozorováno v průběhu zrání sýrů [14].

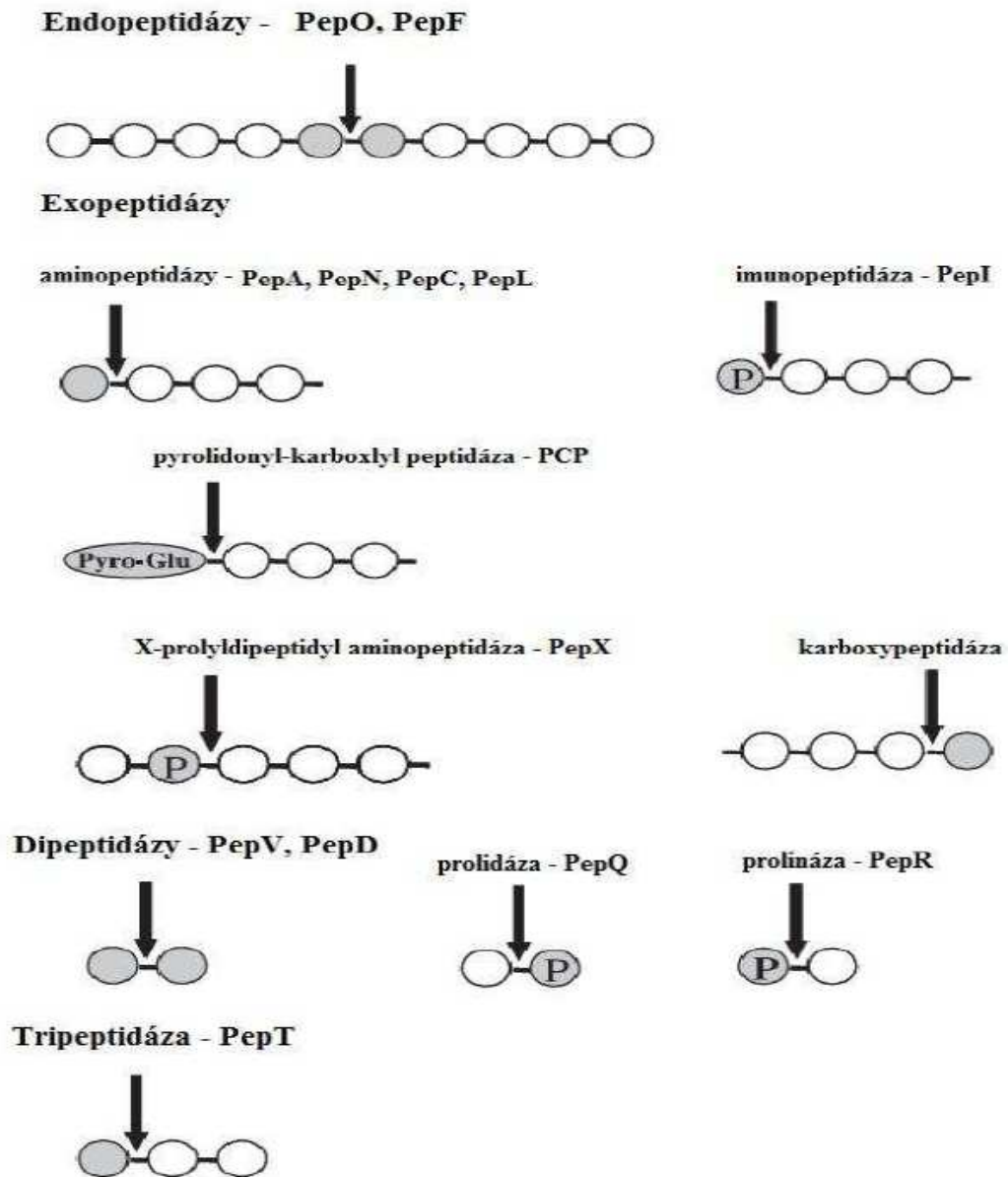


Obrázek 5: Schematické znázornění systému plazminu v mléce [10]

Aktivitu *plazminu* může ovlivnit také pasterace. *Plasmin* a *plazminogen* nejsou ničeny vysokotepeelnou krátkodobou pasterací, stejně jako teplotami při dohřívání sýrů. Jelikož vlivem pasterace dojde k inaktivaci inhibitorů aktivátorů, tak může dojít paradoxně ke zvýšení aktivity *plazminu*, který je odpovědný za průběh proteolýzy u sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou [10, 41].

Bakterie mléčného kvašení vyžadují poměrně značné množství aminokyselin, proto mají proteolytický systém, který uvolňuje aminokyseliny (nezbytné pro jejich růst) z proteinů v prostředí. Tyto bakterie také obsahují intracelulární proteinázy, které jsou velmi důležité pro další stupně proteolýzy v průběhu zrání sýrů [30, 57, 61].

Čisté mlékařské kultury, které jsou používány jako primární kultura při výrobě sýrů (např. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*), obsahují proteolytické enzymy znázorněné na obr. 6.



Obrázek 6: Schematické znázornění systému peptidáz v LAB [57]

Endopeptidázy jsou schopné štěpit peptidy uvnitř molekuly, exopeptidázy na začátku molekuly. Iminopeptidáza je exopeptidáza schopna odštěpit molekulu prolinu, která je na počátku molekuly. Karboxypeptidáza štěpí karboxylový konec molekuly. Dipeptidázy štěpí molekulu dipeptidu. Mezi dipeptidy také patří prolidáza a prolináza [11].

Kaseiny jsou bohaté na prolin. Díky jeho unikátní struktuře je potřeba speciálních peptidáz, které jsou schopny hydrolyzovat peptidy, obsahující prolin. LAB obsahují tyto enzymy ve

značné míře, což jim umožňuje uvolňovat jej a jsou schopny využívat substrát pro svůj růst [17].

Struktura proteolýzy v mnoha případech může být shrnuta do následujících kroků: kaseiny jsou zpočátku hydrolyzovány zbytkovým syřidlem, které je zadržováno v syřenině, a plazminem na řadu velkých a středně velkých peptidů, které jsou následně hydrolyzovány proteinázami a peptidázami startérových LAB a NSLAB na kratší peptidy a aminokyseliny. Profil a stupeň hydrolyzy je rozdílný u jednotlivých druhů sýrů. Tyto rozdíly jsou způsobeny zejména odlišnostmi v průběhu výroby sýrů (obzvláště výše dohřívací teploty) a také průběh zrání (zrací doba, obsah vlhkosti, zbytková aktivity syřidla, aktivace plazminogenu na plazmin,...) [15].

2.1.4 Lipolýza

Lipidy v potravinách podléhají hydrolytickým a oxidačním degradacím, nicméně v sýrech je rozsah oxidačních rozkladů limitován působením nízkého oxidačně-redukčního potenciálu (okolo -250 mV) [6, 13, 34]. Nicméně, triacylglyceroly ve všech typech sýrů podléhají hydrolyze a to pomocí lipáz, ať už původních, endogenních a/nebo exogenních. Výsledkem činnosti těchto lipáz je uvolnění mastných kyselin v průběhu zrání sýrů. Triacylglyceroly obsažené v mléčném tuku z mléka přežvýkavců jsou poměrně bohaté na mastné kyseliny s krátkým řetězcem, které po odštěpení významně přispívají k vytvoření chuti u mnoha druhů sýrů. Ačkoli se lipolýza vyskytuje snad ve všech sýrech, nejrozsáhlejší je zejména u tvrdých italských sýrů a v sýrech s plísní v těstě [6, 7, 34]. Mastné kyseliny mají přímý podíl na aroma sýrů. Mastné kyseliny jsou také významnými prekurzory potřebnými pro produkci těkavých chuťových sloučenin.

Úroveň lipolýzy v sýrech, ve kterých se vyvinula sekundární mikroflóra, je často spojována právě s lipolytickou schopností přidaných kultur, např. *Penicillium roqueforti* (sýry s plísní v těstě).

Lipázy jsou hydrolázy, které katalyzují hydrolyzu esterů z karboxylových kyselin. Lipázy vykazují různé druhy specifity:

- Obvykle tyto lipázy hydrolyzují 1,2- a 2,3-diglyceridy a poté 2-monoglyceridy.
- Lipázy obvykle vykazují specifitu pro mastné kyseliny s určitou délkou svého řetězce.

- Některé lipázy vykazují specifitu pro nasycené nebo nenasycené mastné kyseliny.

Existuje několik druhů lipáz, podle původu jsou to lipázy pocházející přímo z mléka (1.), mikrobiální lipázy (2.) a popřípadě lipázy obsaženy v syřidle (3).

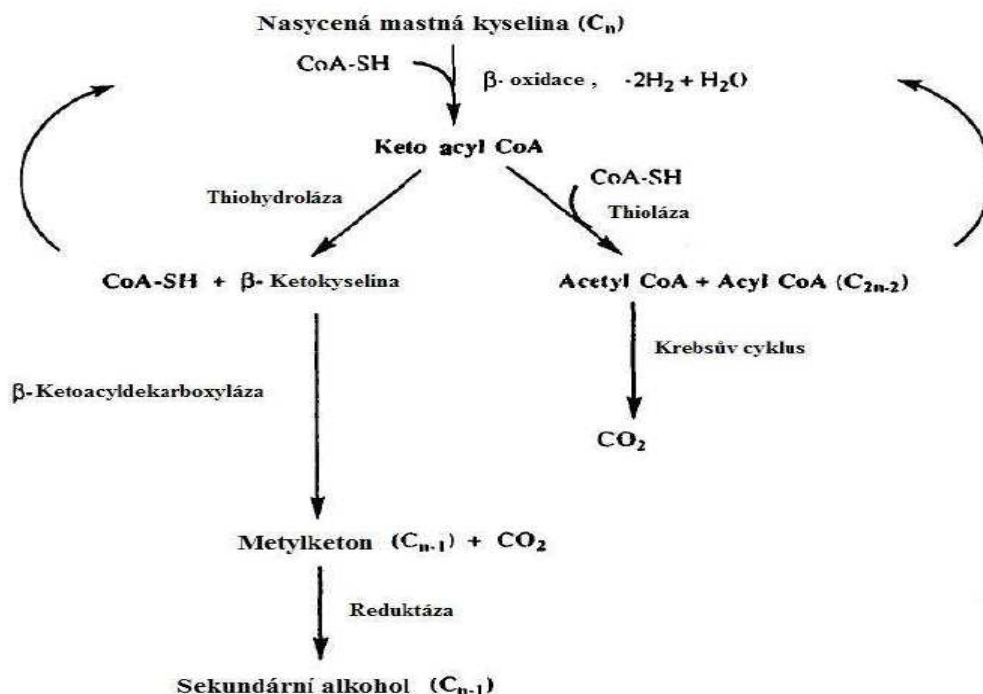
1. Mléko obsahuje účinnou původní lipázu – lipoproteinlipázu (LPL). Fyziologická role tohoto enzymu spočívá v metabolismu triacylglycerolů [60]. Neděje se tak za normálních okolností, jelikož mléčný tuk (ve formě tukových kuliček) je chráněn proti účinnosti LPL membránou a navíc okolo 90 % LPL je spojováno s kaseinovými micelami [11]. LPL se přednostně podílí na hydrolýze triacylglycerolů se středně dlouhým řetězcem ($C_6 - C_{12}$) [6, 42].
2. *Lactococcus* spp. a *Lactobacillus* spp. obsahují nižší hladinu lipolytické aktivity. Nicméně, při nepřítomnosti silných lipolytických činitelů a poměrně dlouhé době, po kterou zrání sýrů probíhá, jsou lipázy a esterázy laktokoků a laktobacilů hlavními lipolytickými činiteli v sýrech s nízkodohřívanou sýřeninou vyráběných z pasterovaného mléka. Psychrotrofní mikroorganismy, které většinou dominují mikroflóře chlazeného mléka, jsou potenciálními zdroji lipáz v sýrech. Zejména tehdy, pokud jejich obsah přesáhne hranici 10^7 CFU/ml [11]. Mnohé psychrotrofní mikroorganismy a především jejich enzymy jsou tepelně stabilní a také mnohé z nich mohou, při delším průběhu zrání, způsobovat žluknutí. Oproti tomu např. *Penicillium roqueforti* používané na výrobu sýrů s plísní v těstě (Niva), má silnou lipolytickou aktivitu spolu s deaminačními procesy a β -oxidací mastných kyselin.
3. Komerční syřidlové extrakty používané k výrobě mnohých druhů sýrů nevykazují aktivitu lipázy. Ale syřidlové pasty používané při výrobě určitých typů zejména italských sýrů (např. Provolone, Pecorino) či řeckého sýru Feta obsahují lipázu ve značném množství. Tyto syřidlové pasty jsou vyráběny nejčastěji na farmách a to vyluhováním žaludků mláďat mléčného dobytka (tele, jehně, kůzle), které kromě chymozinu obsahují obvykle i vysoké koncentrace pregastrické esterázy (PGE). Jedná se o enzym produkovaný žlázou pod jazykem, který je produkován při sání mláďat. PGE je účinná především za teplot $32 - 42$ °C, pH 4,8 – 5,5 v přítomnosti 0,5M NaCl [6, 11].

2.1.5 Metabolismus volných mastných kyselin

Volné mastné kyseliny (FFA) jsou významnými látkami v průběhu procesu zrání sýrů, jejichž obsah v sýrech eidamského typu byl stanoven okolo 356 mg/kg [11]. Mastné kyseliny s krátkým řetězcem přispívají k tvorbě aroma sýrů přímo.

Obvyklým konečným produktem metabolických drah, které v průběhu zrání probíhají, je etanol. Při metabolismu volných mastných kyselin vznikají estery reakcí FAA s alkoholem. Proto se obvykle vyskytuje etylester [5]. Mezi další estery, které se v sýrech nacházejí, patří metylester, propylester a v neposlední řadě také butylester [37]. Etanol je limitujícím reaktantem v produkci esterů – tento alkohol je sekundárním produktem při fermentaci laktózy nebo při katabolismu aminokyselin [32]. HOLLAND et al. [24] navrhli teorii, že tyto estery vznikají během zrání sýrů transesterifikací FFA z parciálních glyceridů na etanol. Thiostery jsou sloučeniny formovány reakcí FFA se sirnými sloučeninami (obvykle s metanthiolem) [5, 6, 34].

Metabolismus FFA je významný zejména u sýrů s modrou plísní (např. Niva), u kterých FFA reagují za vzniku 2-metylketonů (obr. 7) [39].



Obrázek 7: Schematické znázornění β -oxidace mastných kyselin pomocí *Penicilium roqueforti* a následná redukce na sekundární alkohol [11]

Koncentrace metylketonů souvisí s lipolýzou [11]. Rozsah produkce těchto metylketonů je závislý na několika faktorech, mezi které patří zejména teplota, fyziologický stav plísně a v neposlední řadě také koncentrace prekurzorů FFA [22].

Laktony jsou cyklické sloučeniny vznikající z hydroxykyselin, a to intracelulární esterifikací, při které dochází ke ztrátě molekuly vody a tím vzniká cyklická struktura [11]. α -laktony a β -laktony jsou poměrně reaktivní, oproti tomu γ -lakton a δ -lakton jsou poměrně stálé a byly v sýrech objeveny. Laktony mají poměrně silné aroma a podílí se na celkové chuti sýrů. Produkce laktonů v sýrech v průběhu zrání je limitována hladinou obsahu jejich prekurzorů – hydroxykyselin. Mléčná žláza má δ -oxidační systém pro mastné kyseliny nebo také mohou být hydroxykyseliny produkovány pomocí redukce ketonů [6, 7].

2.1.6 Metabolismus volných aminokyselin

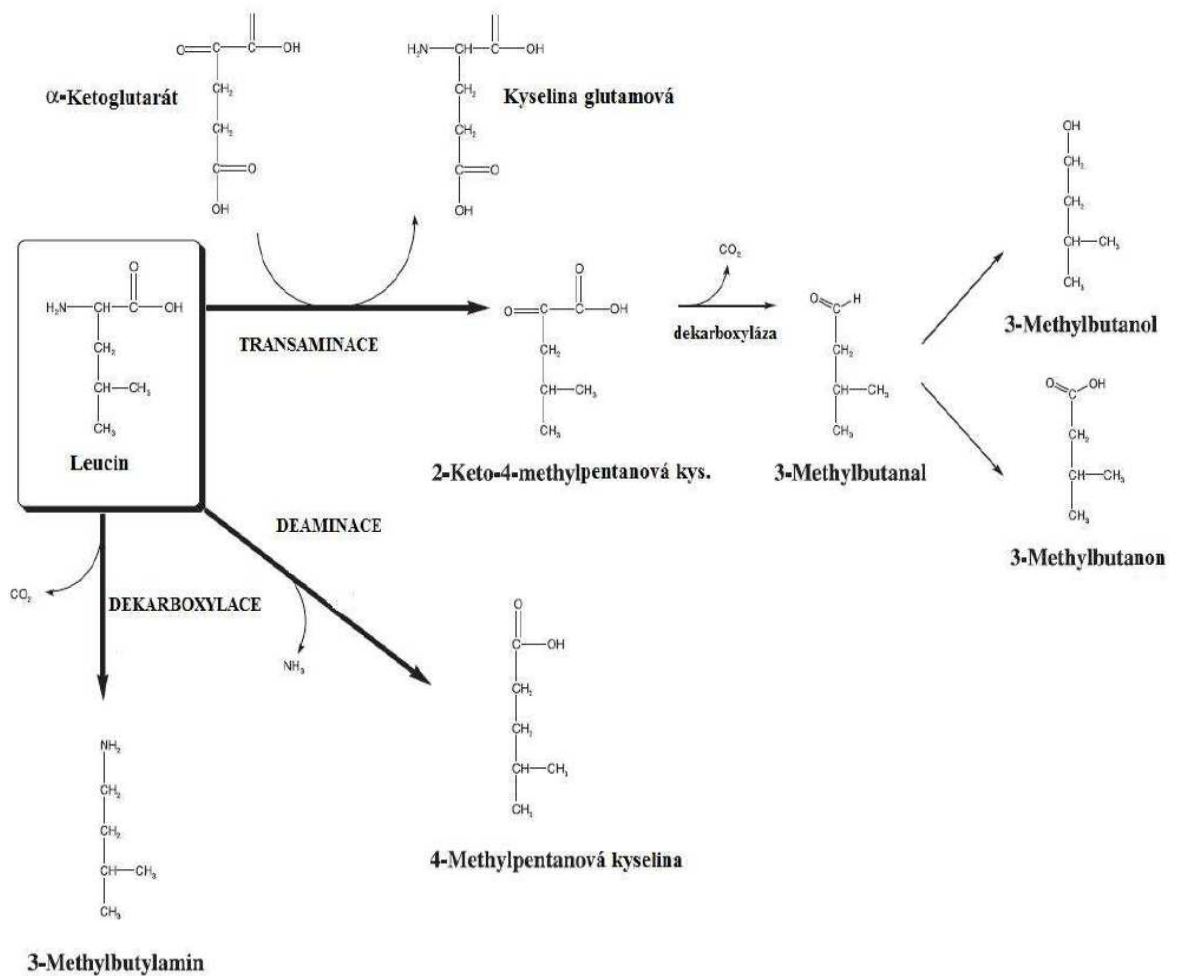
Metabolické dráhy katabolizmu volných aminokyselin v průběhu zrání sýrů nám dávají mnoho chuťových a aromatických látek [8, 34, 63]. Hlavní přínos proteolýzy na rozvoji chuti a aroma sýrů je právě v uvolňování aminokyselin, které hrají roli jako prekurzory katabolických reakcí [63]. Činnost aminotransferázy byla stanovena jako činitel limitující rychlost produkce těkavých sloučenin v průběhu zrání sýrů [7]. A právě první metabolická dráha je zahájena činností aminotransferázy, která přeměňuje aminokyselinu na odpovídající α -ketokyselinu [7]. α -ketokyseliny mohou být redukovány na odpovídající hydroxykyselinu [63]. Velmi významné z hlediska tvorby aroma sýrů se jeví sirné sloučeniny [8, 14, 15, 34]. Mezi tyto sloučeniny patří metanthiol, dimetyldisulfid, dimetyltrisulfid, metional a thioestery [8, 63].

Vyskytují se však i další katabolické dráhy, jako například deaminace (odstranění aminoskupiny) nebo dekarboxylace (odštěpení CO_2 z karboxylové skupiny).

Aminokyseliny mohou být degradovány deaminací, která zahrnuje činnost dehydrogenázy (využívá NAD^+ jako akceptor elektronu a produkuje α -ketokyselinu a amoniak) nebo oxidázy (využívá jako akceptor elektronu kyslík a tvoří aldehydy a amoniak) [8]. Amoniak produkováný deaminací přispívá k tvorbě chuti zejména sýrů zrajících pod mazem, sýrů s plísní na povrchu a/nebo sýrů ementálského typu [34]. Dekarboxylace aminokyselin má zvláštní význam a to v produkci aminosloučenin, které vykazují silný a nepříjemný zápach

a způsobují tak, že nepříjemný fyziologický efekt na citlivější spotřebitele [23]. Touto cestou mohou vznikat i biogenní aminy, které jsou toxickými zplodinami metabolismu aminokyselin. Mezi tyto biogenní aminy mohou patřit histidin, tyramin, kadaverin či putrescin. Biogenní aminy jsou toxické látky, jejichž sledování je zdrojem cenné informace v potravinářských provozech, v nichž stěžejní roli hraje činnost mikroorganismů (výroba piva, vína, kysaného zelí, sýrů, fermentovaných masných výrobků).

Na obrázku č. 8 je schematicky znázorněn katabolismus leucinu, který zahrnuje transaminaci, deaminaci nebo dekarboxylaci.



Obrázek 8: Katabolismus leucinu zahrnující transaminaci, deaminaci nebo dekarboxylaci

Proces zrání sýrů můžeme shrnout jako soubor biochemických reakcí a procesů, které v průběhu zrání probíhají. Díky těmto reakcím a pochodům jsou vytvářeny charakteristické jakostní znaky jednotlivých typů sýrů. Mezi významné procesy patří proteolýza a lipolýza. Proteolýza přispívá zejména k měknutí textury sýrů v průběhu zrajeho procesu. Proteolýza má také přímý vliv na chuť a to produkcí krátkých peptidů a aminokyselin, některé z nich jsou chuťovými látkami (nejen hořkými).

Lipidy v potravinách podléhají hydrolytickým a oxidačním degradacím pomocí lipáz. Výsledkem této činnosti je uvolnění mastných kyselin v průběhu zrání sýrů. Triacylglyceroly obsažené v mléčném tuku z mléka přežvýkavců jsou poměrně bohaté na mastné kyseliny s krátkým řetězcem, které po odštěpení významně přispívají k vytvoření chuti u mnoha druhů sýrů. Mastné kyseliny mají přímý podíl na chuti sýrů. Jak bylo zjištěno později, mastné kyseliny jsou také významnými prekurzory potřebnými pro produkci těkavých chuťových sloučenin.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo založit zrací pokus sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou (sýr Eidam) a zaměřit se na změny jakostních parametrů v průběhu zrání, zejména na distribuci dusíkatých látek v závislosti na odlišných skladovacích podmínkách jednotlivých vzorků.

Pro dosažení cílů bylo třeba:

- Zpracovat literární rešerši týkající se technologie výroby sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou a změn jakostních parametrů v průběhu zrání.

Pro zpracování praktické části diplomové práce bylo nutno naplnit tyto dílčí cíle:

- Založit zrací pokus a sledovat změny jakostních parametrů,
- Zaměřit se na distribuci dusíkatých látek,
- Stanovit obsah volných aminokyselin a proteinový profil polyakrylamidovou elektroforézou.
- Na základě teoretické části a výsledků praktické části formulovat závěry zjištěné během zracího pokusu.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Výroba eidamské cihly

Dne 7. října 2008 byla ve firmě Kromilk spol. s r.o. vyrobena šarže eidamských cihel pro zrací pokus. Na výrobu bylo použito celkové množství 6400 litrů pasterovaného mléka. Aby bylo dosaženo požadované výrobní tučnosti směsi mléka, která činila 1,55 % (mléko odstředěné a mléko plnotučné), bylo použito 2500 litrů pasterovaného mléka plnotučného a 3900 litrů pasterovaného mléka odstředěného. Poté byl přidán smetanový zákys v množství 50 litrů. Teplota při této operaci byla cca 31 °C. Následovala nutná doba potřebná pro prokysání – 45 minut. Po uplynutí doby prokysání byly ke směsi přidány přídatné látky – nasycený roztok chlorid vápenatý (2,5 l), dusičnan draselný (650 g) a barvivo (50 ml). Po odběru vzorku bylo do mléka přidáváno syřidlo Chymax (Ch. Hansen) - 350 ml. Po přidavku syřidla byla směs uvedena do klidu a musí minimálně 30 minut stát. Další operací bylo krájení syřeniny na zrno (15 minut) a odpouštění syrovátky. Bylo vypuštěno celkem 1400 litrů syrovátky. Dalších 15 minut probíhalo vytužování. Následovalo dohřívání, kdy docházelo ke zkrápnění teplou vodou (maximálně 75 °C). Následovalo dosoušení za teplot 39 – 41 °C, k dosažení této teploty je možno si dopomoci párou, která je napouštěna do pláště. Doba, která uplynula od přidavku syřidla po odpouštění, byla 1 hodina 50 minut. Po dosoušení bylo na řadě vypouštění a lisování. Lisování bylo prováděno postupně, zpočátku se volily tlaky nižší, poté postupně vyšší. Přetlaky používané při lisování se postupně pohybovaly v rozmezí 0,5 – 3 atm. Po ukončení lisování byly cihly rozkrojeny na půl. Takto rozkrojené cihly měly délku cca 11 cm a hmotnost cca 1,3 kg. Cihly byly umístěny do solné lázně, ze které byly vytaženy následující den, 2 hodiny se nechaly odkapat a poté byly baleny do cryovackového obalu. Takto zabalené cihly sýru byly uloženy do zracích sklepů, kde byly teploty 10 ± 2 °C.

4.2 Zrací pokus

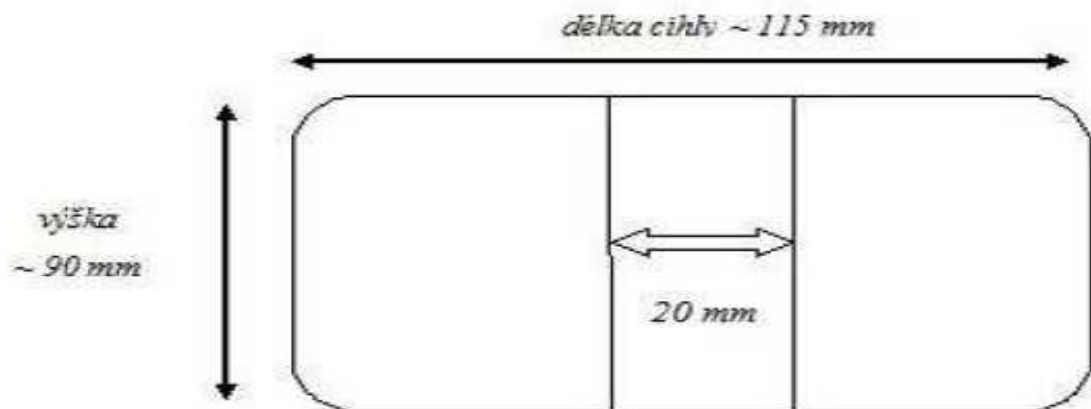
Ve spolupráci s firmou Kromilk spol. s r. o., Kroměříž byl založen zrací pokus sýru s nízkodohřívanou sýřeninou. V této firmě byla vyrobena šarže eidamských cihel v počtu cca 100 kusů a po ukončení výroby byly tyto cihly uskladněny ve zracím sklepě za teplot 10 ± 2 °C (dále označovány jako vzorky A). Po 20 dnech, kdy byly všechny vyrobené cihly skladovány ve zracím sklepě, bylo 25 cihel ze zracího sklepa odebráno a dále skladováno v lednici za teplot 5 ± 2 °C (dále označovány jako vzorky B). 34. den bylo ze zracího sklepa odebráno dalších 20 cihel, které byly dále skladovány v lednici za teplot 5 ± 2 °C (dále označovány jako vzorky C). Tento pokus, podpořen laboratorními analýzami, má za cíl srovnat odlišné skladovací teploty v průběhu zrání sýrů.

Cihly byly k analýzám odebírány postupně. V 0., 1., 2., 3., 6., 9., 13., 16. a 20. byly analyzovány pouze vzorky A, které byly po celou dobu zracího pokusu skladovány ve zracím sklepě. Ve 23., 27., 30. a 34. byly analyzovány nejen vzorky řady A, ale i řady B (po 20 dnech skladování ve zracím sklepě přemístěny do lednice za teplot 5 ± 2 °C). Ve 42., 48., 55., 62., 69., 83., 97., 111., 125. a 147. dni byly analyzovány již všechny tři řady vzorků – vzorky řady A, B i C.

Den 0 označuje vzorky, které byly odebrány k analýze ještě před vstupem do solné lázně.

K vlastní chemické analýze byly ze všech cihel odebírány 2 cm středové plátky (viz obr. 9). Tyto plátky byly odebírány z jednotlivých cihel, které byly po celou dobu pokusu ve zracím sklepě (dále označovány jako vzorky řady A), z cihel, které byly po 20 dnech ze zracího sklepa vytaženy a dále skladovány v lednici (dále označeny jako vzorky řady B) a také z cihel, které byly ze zracího sklepa vytaženy po 34 dnech a dále skladovaných v lednici (dále označeny jako vzorky řady C).

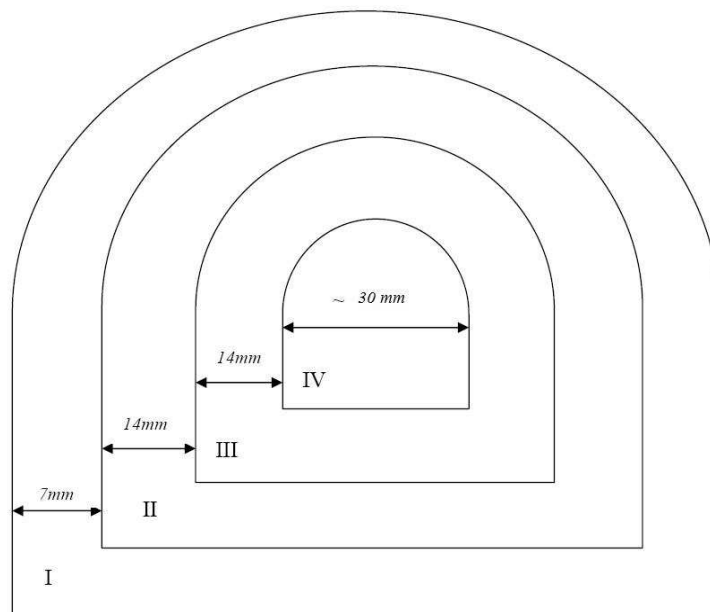
Hmotnost jednotlivých analyzovaných cihel byla $1,33 \pm 0,05$ kg, délka $115 \pm 3,3$ mm.



Obrázek 9: Znázornění odběru 2 cm plátku ze vzorku cihly

Odebrané plátky sýru byly dále rozděleny na jednotlivé vrstvy (viz obr. 10). Od počátku analýz byly tyto vrstvy nadefinovány:

- I. vrstva – šířka 7 mm
- II. vrstva – šířka 14 mm
- III. vrstva – šířka 14 mm
- IV. vrstva – zbytek tvořil cca 30 mm.



Obrázek 10: Znázornění odebíraných vrstev

Po měsíci (34. den), byly vrstvy zredukovány na následující hodnoty:

- I. vrstva – šířka 7 mm
- II. vrstva – šířka 14 mm
- IV. vrstva – zbytek tvořil cca 58 mm.

Ve 34. dni došlo k redukci jednotlivých vrstev – vrstva II. a III. byla spojena v jednu.

Ve 111. dni byly vrstvy opět zredukovány a byly u jednotlivých cihel následující:

- I. vrstva – šířka 7 mm
- IV. vrstva – zbytek tvořil cca 80 mm.

Ve 111. dni došlo k redukci jednotlivých vrstev – vrstva I., II. a III. byly spojeny v jednu.

4.3 Metody chemické analýzy

4.3.1 Stanovení pH

Stanovení pH u vzorků eidamských sýrů bylo provedeno pomocí pH-metru (typ: GRYF 208 L, Havlíčkův Brod, ČR) se skleněnou elektrodou (THETA 90 HC 113, Havlíčkův Brod, ČR)

4.3.2 Stanovení sušiny

Obsah vody byl stanoven z rozdílu hmotnosti vzorku před a po ukončení sušení za podmínek metody. Postup spočívá v důkladném rozmíchání asi 5 g vzorku s 15 g vysušeného křemenného písku. Poté byla miska se vzorkem vložena do sušárny a vysušena při teplotě 103 ± 2 °C do konstantních hmotnostních úbytků.

Obsah sušiny ve vzorku v hmot. % byl vypočten podle vztahu:

$$S = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_3} \cdot 100$$

kde m_1 – hmotnost vysoušecí misky s pískem, vzorkem a tyčinkou před sušením [g],

m_2 – hmotnost vysoušecí misky s pískem, vzorkem a tyčinkou po vysušení [g],

m_3 – hmotnost vysoušecí misky s pískem a tyčinkou [g].

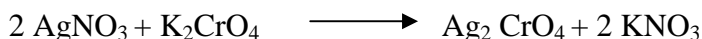
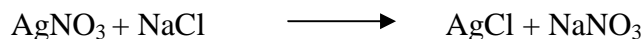
4.3.3 Stanovení obsahu hrubých bílkovin

Stanovení hrubých bílkovin se skládá ze dvou kroků. Nejprve byla provedena mineralizace a poté následovalo vlastní stanovení. Do mineralizační zkumavky bylo naváženo asi 0,5 g vzorku. Ke vzorku bylo přidáno 10 ml kyseliny sírové a katalyzátor (pentahydrát síranu měďnatého a síran sodný v poměru 1:10).

Mineralizační zkumavka byla umístěna do mineralizačního zařízení Bloc Digest 12 s přídatným zařízením umožňujícím odsávání par vznikajících zplodin a mineralizace probíhala asi 60 minut při 460°C. Po zmineralizování vzorku se zkumavky umístily do automatické destilační jednotky Pro-Nitro 1430 (BioPro, s.r.o, Praha, ČR).

4.3.4 Stanovení NaCl

Ke stanovení obsahu chloridu sodného byla použita Mohrova metoda, která je založena na reakci chloridů s roztokem dusičnanu stříbrného za vzniku bílé sraženiny chloridu stříbrného. Jako indikátor je při této reakci použit chroman draselný, který s prvním přebytkem stříbrné soli dává červenohnědou sraženinu. Samotná titrace musí být prováděna v neutrálním prostředí.



Pro stanovení bylo naváženo 10 g vzorku a rozetřeno s teplou vodou v třecí misce. Takto připravený vzorek se nechá 30 minut stát, poté je kvantitativně převeden do odměrné baňky, odkud je 25 ml odpipetováno do titrační baňky k vlastní analýze. Do titrační baňky je ke vzorku přidán 1 ml indikátoru (5% chroman draselný) a je provedena titrace 0,1M dusičnanem stříbrným do červenohnědé barvy.

4.3.5 Stanovení obsahu volných aminokyselin

Pro stanovení FAA byl do zkumavek navážen 1 g vzorku, k němuž bylo přidáno 10 ml dávkovacího Li-pufu. Takto připravené zkumavky byly dány na 1 hodinu na třepačku (BIOSAN Multibio 3D). Poté byly odstředěny při 9000 g po dobu 30 minut. Z každé zkumavky se roztok slije do ependorfky, která je přes noc uskladněna v lednici. Následující den je provedena centrifugace při 12 750 g po dobu 45 minut a filtrace pře mikrofiltry o porozitě 0,45 μ l. Filtrát byl slit do ependorfky, která je určena do analyzátoru. Analýza byla prováděna na analyzátoru Amino Acid Analyzer – AAA400 (INGOS, ČR).



Obrázek 11: Analyzátor AAA400

Stanovovány byly aminokyseliny leucin, kyselina asparagová, treonin, serin, kyselina glutamová, prolin, glycin, alanin, citrulin, metionin, izoleucin, tyrozin, fenylalanin, ornitin, arginin, glutaminu, valin a histidin.

4.3.6 SDS-PAGE

SDS – PAGE (sodium dodecylsulfát polyakrylamidová gelová elektroforéza) je separační metoda, která je používána ke stanovení proteinů na základě odlišné molekulové hmotnosti, při které se uplatňuje elektrické pole. Elektrické pole nám při této metodě zajišťuje migraci nabitých částic v tekutém prostředí a jejich oddělení na gelové matrici podle molekulové hmotnosti.

Vzorky byly připraveny dle metody podle BŮTIKOFER a kol. [4]. Byl navážen 1 g vzorku sýru, který byl následně homogenizován se 4 ml neionizované vody po dobu 5 minut ve stomacheru. Po této homogenizaci byly vzorky inkubovány 1 hodinu při 40 °C. Následovala centrifugace (HERMLE Z 300 K) vzorku – 30 minut při 3000 g. Centrifuga byla vytemperována na teplotu 4 °C. Z takto vychlazeného vzorku byl následně odstraněn tuk. Z takto připraveného vzorku bylo k analýze odpipetováno 250 μ l suspenze do ependorfkové zkumavky, do které bylo přidáno 25 μ l 2-merkaptetanolu, 50 μ l 20% SDS a 175 μ l vzorkového pufru. Vzorky byly následně promíchány a po dobu 10 minut povařeny na suchém blokovém termostatu Bio TDB-100. Vzorky byly uchovávány při chladírenských teplotách.

Pro analýzu byla použita vertikální elektroforetická aparatura (Bio-Rad, PowerPac Universal, USA; Protean II xi Cell, USA) pro dva gely, která se skládá z vlastní vany, víka, dvou tvarovaných skel v párovém uspořádání, teflonového těsnění a hřebínku [43]. Aparatura byla sestavena dle návodu.

Složení roztoků a gelů pro SDS-PAGE je uvedeno v Příloze č. III.

Výsledky SDS-PAGE byly následně vyhodnoceny pomocí shlukové analýzy. Cílem shlukové analýzy je seskupit analyzované vzorky dle příbuznosti stanovené veličiny. Provedením dané analýzy dostaneme z velké skupiny dat několik stejnorodých skupin neboli shluků. Dva objekty z jednoho shluku by si měly být podobné, oproti tomu dva objekty z rozdílných shluků by si podobné býti neměly. Postupuje se tak, že se nejdříve vypočtou korelační koeficienty mezi všemi páry vzorků. Korelační koeficienty mohou být pozitivní i negativní. Mezi těmi vzorky, u nichž je hodnota korelačních koeficientů nejvyšší, se vytvoří první shluk, a pak se postupně tvoří další. Podobně se mohou vytvořit shluky z deskriptorů sensorických profilů podle vzájemné příbuznosti, eventuálně i mezi deskriptory organoleptických vlastností a fyzikálními nebo chemickými ukazateli. Průběh celého procesu shlukování se obvykle znázorňuje ve formě stromového grafu, tzv. dendrogramu [47, 51].

Při vyhodnocování shlukové analýzy byl použit program Unistat 5.5 (Unistat Ltd., Londýn, UK).

4.4 Sensorická analýza

Senzorickou analýzou byly hodnoceny sýry skladované za odlišných podmínek a to pomocí sedmibodové ordinální stupnice viz Příloha IV. Orientace stupnice byla zvolena tak, že první stupeň odpovídá úrovni „vynikající“ a sedmý stupeň úrovni „nevyhovující“. Tímto způsobem bylo hodnoceno 5 sensorických znaků:

- vzhled a barva,
- konzistence,
- chuť a vůně,
- tuhost a
- cizí pachuti.

U zkoumaných vzorků sýru eidamského typu byly použity sensorické metody ke zjištění, zda došlo v průběhu zrání při různých teplotách k prokazatelným změnám základních sensorických znaků. Sensorická analýza byla doplněna pořadovou preferenční zkouškou, jejímž cílem bylo vybrat vzorky sensoricky nejpříjemnější [3, 25].

Sensorická analýza vzorků skladovaných za odlišných podmínek byla provedena 58. den a 128. den po výrobě. Analýza byla statisticky vyhodnocena pomocí dvouvýběrového Wilcoxonova testu, který patří mezi nejsilnější parametrické testy. Tato analýza byla provedena s 95 %-ní spolehlivostí, tzn. na hladině významnosti 5 %.

Vzorky byly rozděleny do tří skupin a to:

A – vzorky skladované po celou dobu zrání ve zracím sklepě

B – vzorky skladované v lednici při 5 ± 2 °C po 20 dnech zrání ve zracím sklepě

C – vzorky skladované v lednici při 5 ± 2 °C po 34 dnech zrání ve zracím sklepě

Dotazník pro sensorické hodnocení sýrů eidamského typu je uveden Příloze č. V.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Chemické analýzy spočívaly ve stanovení pH, obsahu sušiny, obsahu hrubých bílkovin, obsahu NaCl, ve stanovení obsahu volných aminokyselin a SDS-PAGE. Analýzy byly provedeny u vzorků, které byly:

- po celou dobu pokusu ve zracím sklepe (vzorky řady A),
- po 20 dnech ze zracího sklepa vytaženy a dále skladovány v lednici za teplot 5 ± 2 °C (vzorky řady B),
- po 34 dnech ze zracího sklepa vytaženy a dále skladovaných v lednici z teplot 5 ± 2 °C (vzorky řady C).

5.1 Výsledky chemických analýz

Den 0 označuje vzorky, které byly odebrány k analýze ještě před vstupem do solné lázně.

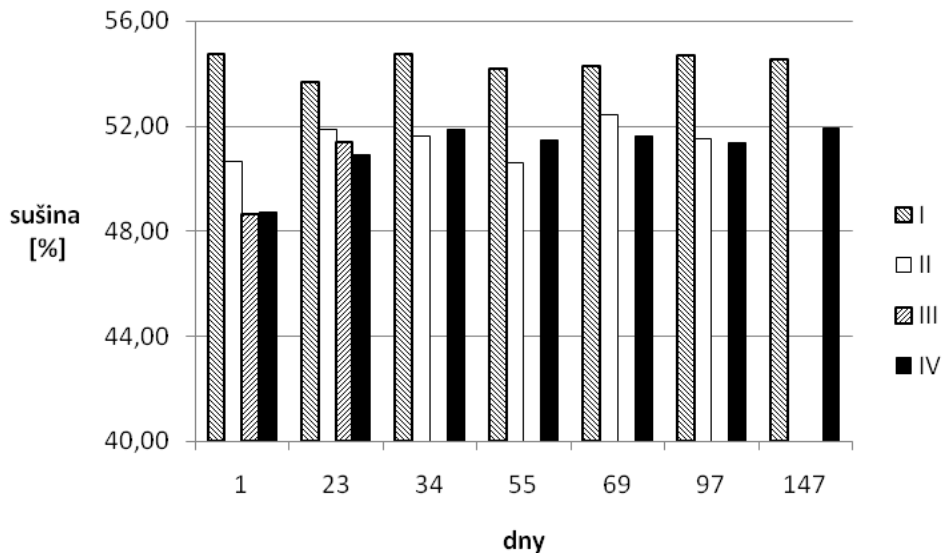
5.1.1 Výsledky základních chemických analýz

Výsledky stanovení hodnoty pH

Při stanovení hodnoty pH u jednotlivých vzorků sýrů bylo zjištěno, že u vzorků, které byly po celou dobu zracího pokusu skladovány ve zracím sklepe (vzorky A), bylo pH v rozmezí hodnot 5,41 – 5,82, s výjimkou dne 0, kdy bylo mělo pH hodnotu 5,20. U vzorků sýrů, které byly během zracího pokusu 20. den vyskladněny a dále skladovány v lednici, bylo pH naměřeno v rozmezí 5,52 – 5,98. Vzorky sýrů, které byly ze zracího sklepa vyskladněny 34. den a následně skladovány v lednici, měly pH v rozmezí 5,57 – 5,92. V průběhu zrání sýrů bylo pozorováno, že hodnota pH vzrůstala.

Můžeme konstatovat, že odlišné skladovací podmínky jednotlivých vzorků, nemají vliv na výši hodnoty pH.

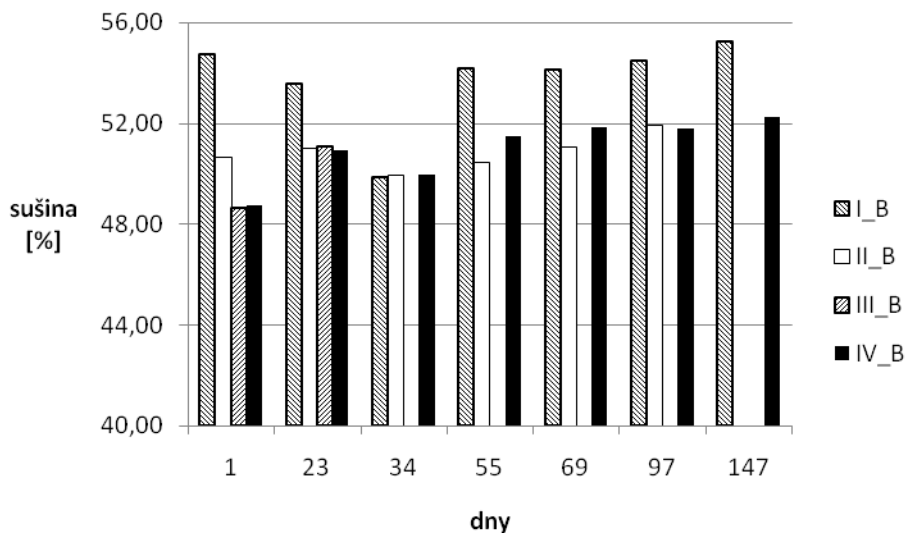
Výsledky stanovení obsahu sušiny



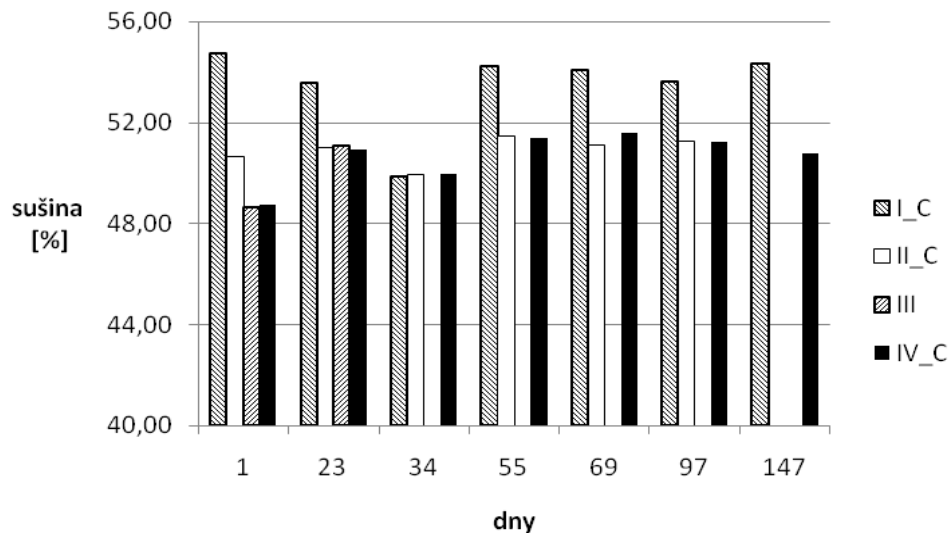
Obrázek 12: Grafické vyjádření stanovení sušiny vzorků eidamských sýrů skladovaných pouze ve zracím sklepě (vzorky A)

U vzorků sýrů skladovaných po celou dobu zracího pokusu ve zracím sklepě (obr. č. 12) lze sledovat vyšší obsah sušiny zejména v I. vrstvě, což je dáno vysokým obsahem chloridu sodného v této vrstvě (obsah chloridu sodného je způsoben solením a jeho postupnou difúzí do dalších vrstev).

U vzorků sýrů, které byly skladovány ve zracím sklepě pouze 20 dní a následně byly skladovány v lednici při chladírenských teplotách (obr. č. 13) lze sledovat obdobný trend jako u vzorků skladovaných pouze ve zracím sklepě, kdy je obsah sušiny v I. vrstvě vyšší než v dalších vrstvách.



Obrázek 13: Grafické vyjádření stanovení sušiny vzorků eidamských sýrů po 20 dnech vyskladněných ze zracího sklepa do lednice (vzorky B); hodnoty 1. dne byly převzaty ze vzorků skladovaných ve zracím sklepě



Obrázek 14: Grafické vyjádření stanovení sušiny vzorků eidamských po 34 dnech vyskladněných ze zracího sklepa do lednice (vzorky C); hodnoty z 1., 23. a 34. dne byly převzaty ze vzorků skladovaných ve zracím sklepě

Obdobný trend vyšší sušiny v I. vrstvě je i u vzorků sýrů, které byly ze zracího sklepa vyskladněny po 34. dnech a dále skladovány v lednici (obr. č. 14).

Z daných hodnot vyplývá, že obsah sušiny se ve vzorcích eidamské cihly pohybuje okolo 50 %, což odpovídá hodnotě obsahu sušiny deklarované výrobcem.

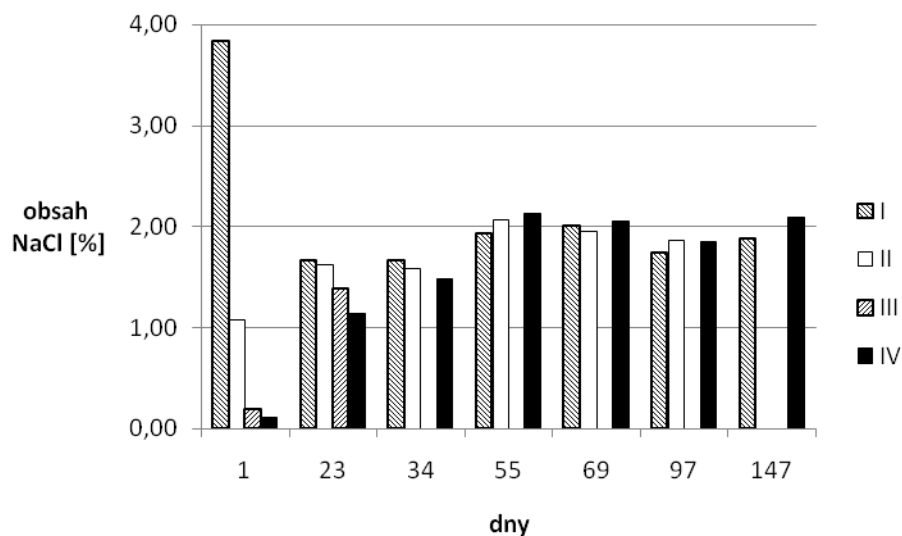
Stanovení obsahu hrubých bílkovin

U vzorků sýrů, které byly skladovány pouze ve zracím sklepě v průběhu celého zracího pokusu, se obsah hrubých bílkovin v I. vrstvě pohyboval v rozmezí 26,18 – 32,18 %; ve II. vrstvě byl tento obsah 26,18 – 30,69 %; ve vrstvě III. 26,18 – 31,52 % a ve IV. vrstvě 28,12 – 30,23 %.

Stejným způsobem byly vyhodnoceny i vzorky skladovány ve zracím sklepě 20 dní a 34 dní. Obsah hrubých bílkovin u vzorků, které byly ze zracího sklepa vytaženy po 20 dnech a následně skladovány v lednici, se pohyboval v rozmezí 26,90 – 30,75 %. U vzorků, které byly ze zracího sklepa vytaženy po 34 dnech, se toto rozmezí pohybovalo v intervalu 25,66 – 30,56 %.

Lze konstatovat, že v průběhu zrání sýrů docházelo k vyrovnávání obsahu hrubých bílkovin v jednotlivých vrstvách.

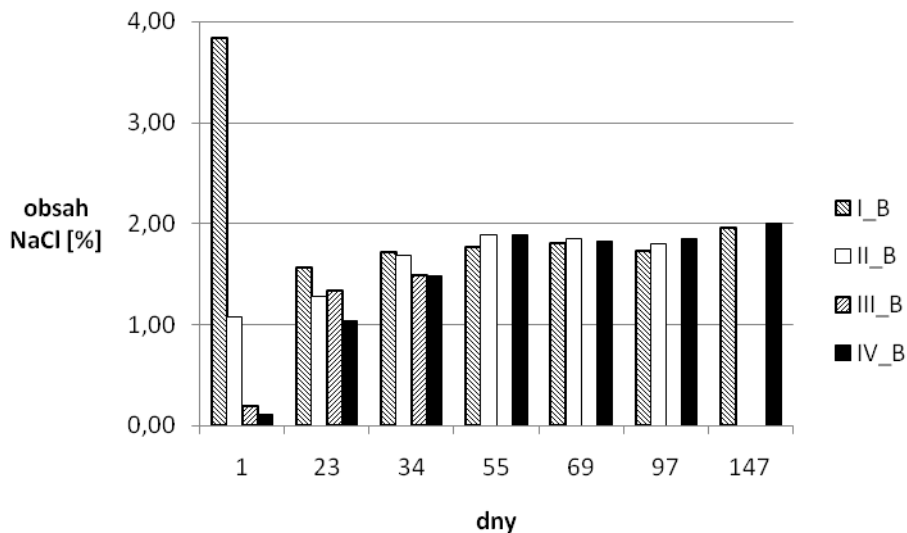
Stanovení obsahu NaCl



Obrázek 15: Grafické vyjádření průběhu difúze NaCl u vzorků eidamských sýrů skladovaných pouze ve zracím sklepě (vzorky A)

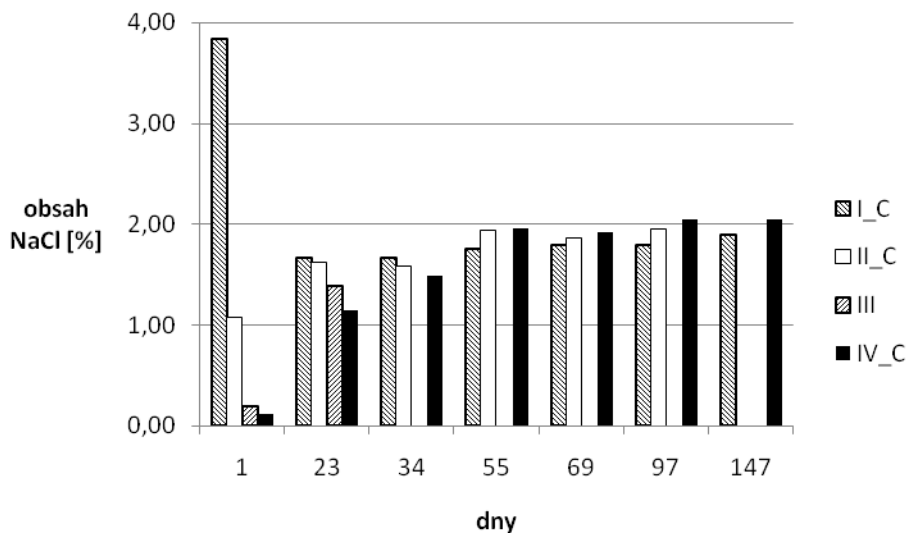
Z výše uvedeného grafu (obr. č. 15) je patrné, jak sůl postupně difundovala z vnější vrstvy do vnitřní. Je zřetelné, že 1.den byl nejvyšší obsah soli (3,83 %) v I. vrstvě. Postupnou dobou zrání docházelo k rozšiřování solného prstence a k vyrovnávání obsahu soli v celé

hmotě sýru. K vyrovnání jednotlivých vrstev došlo kolem 69. dne, kdy byl obsah NaCl okolo 2 % v celé hmotě sýra.



Obrázek 16: Grafické vyjádření průběhu difúze NaCl u vzorků eidamských sýrů skladovaných ve zracím sklepě 20 dní (vzorky B); hodnoty 1. dne byly převzaty ze vzorků skladovaných ve zracím sklepě

Na obr. č. 16 je možno sledovat migraci molekul NaCl do středu eidamské cihly. Vzorky sýrů, které byly skladovány ve zracím sklepě 20 dní a poté byly skladovány v lednici, byly k analýze vzaty až 23. den, proto na tomto grafu nelze zřetelně vidět markantní rozdíl mezi prvními dny a postupující dobou zraní (jako u grafu předcházejícího). K vyrovnání obsahu soli v těchto vzorcích došlo také okolo 69. dne. Obsah chloridu sodného byl stanoven na hodnotu těsně pod 2 %. Proces vyrovnávání obsahu chloridu sodného u vzorků řady B byl pomalejší než u vzorků řady A, tudíž lze říci, že skladovací podmínky mohou ovlivňovat rychlost prostupu solného prstence.



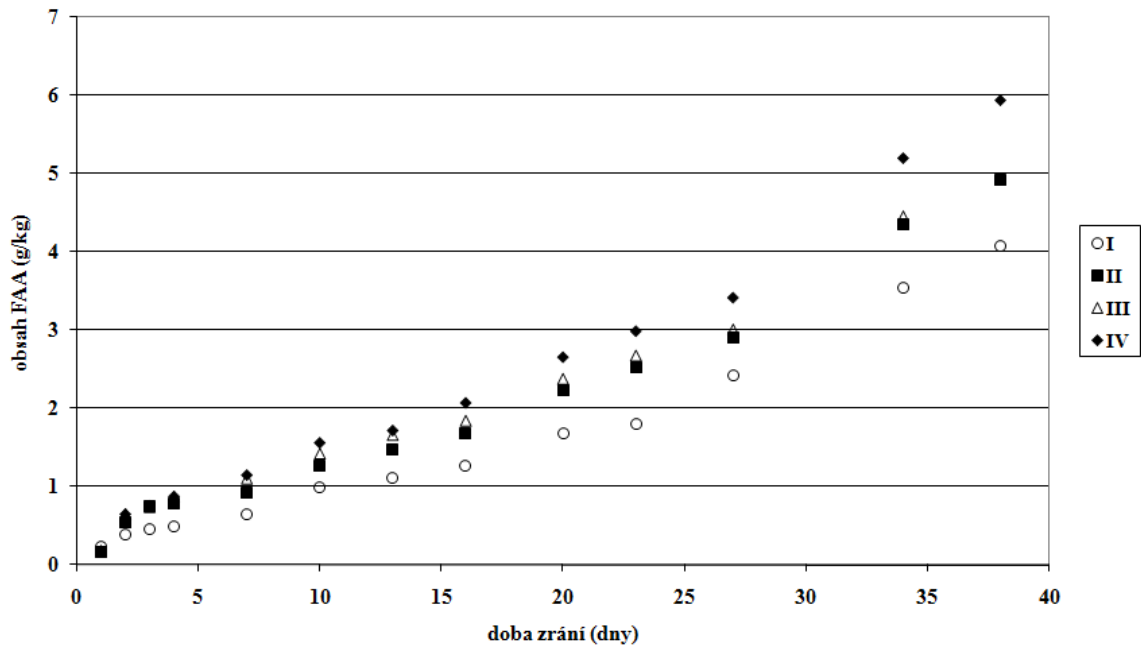
Obrázek 17: Grafické vyjádření průběhu difúze NaCl u vzorků eidamských sýrů skladovaných ve zracím sklepě 34 dní (vzorky C); hodnoty z 1., 23. a 34. dne byly převzaty ze vzorků skladovaných ve zracím sklepě

Obdobně jako na předchozích grafech, tak i na tomto je možno pozorovat, že v době, kdy byly vzorky sýra, které byly ze zracího sklepa po 34 dnech odebrány a skladovány v lednici, odebrány k analýze, byl již obsah NaCl ve všech vrstvách téměř vyrovnaný.

5.1.2 Stanovení obsahu volných aminokyselin

Pomocí analyzátoru AAA400 byly analyzovány vzorky sýrů a byl stanovován obsah jednotlivých aminokyselin.

Obsah jednotlivých volných aminokyseliny (FAA) byl různý, aminokyseliny byly v jednotlivých sýrech obsaženy v rozmezí 0,002 – 2,700 g dané aminokyseliny na kg cihly sýra.

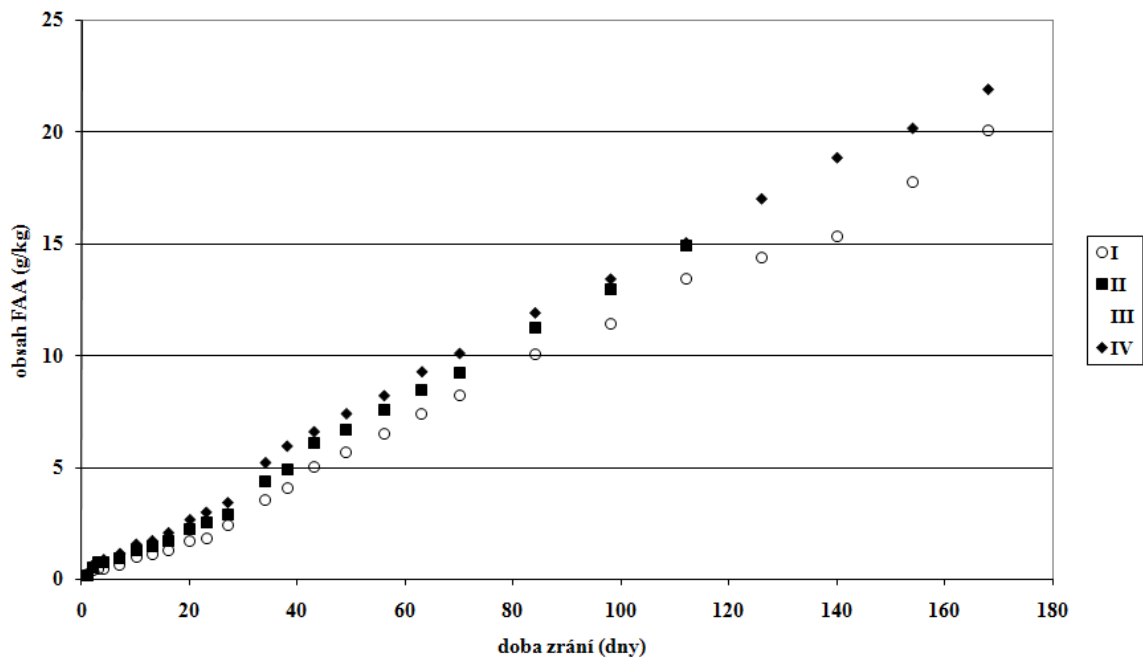


Obrázek 18: Grafické vyjádření celkového vývoje obsahu FAA v jednotlivých vrstvách

Z grafu (obr. č. 18) vyplývá, že v průběhu zrání docházelo postupně k vyrovnání jednotlivých vrstev z hlediska obsahu volných aminokyselin. Je patrné, že došlo k vyrovnání zejména II. a III. vrstvy. K vyrovnávání těchto vrstev docházelo postupně již od počátku.

K vyrovnání došlo 34. den. Od tohoto dne také byly jednotlivé analyzované vrstvy zredukovány na pouhé tři (vrstva II a III byly spojeny v jednu).

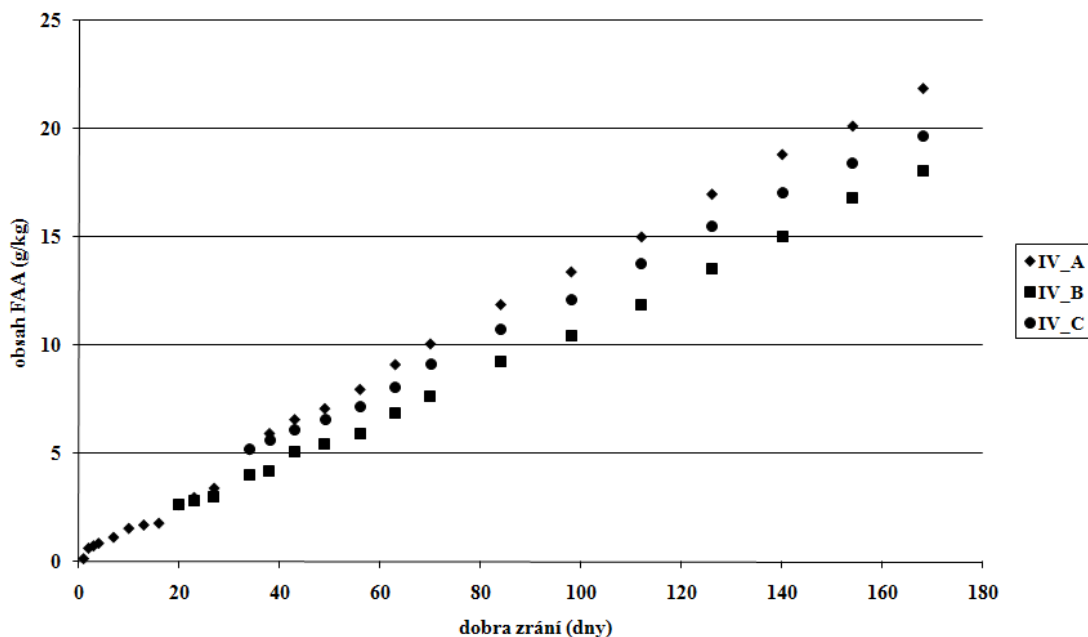
Na grafu (obr. č. 19) je možno sledovat souhrn volných aminokyselin v jednotlivých vrstvách, ovšem bez III. vrstvy. Z grafu je patrné, že i nadále docházelo k vyrovnávání jednotlivých vrstev, a to vrstvy II. a IV. k jejich vyrovnání došlo 111. den. Proto byly tento den vrstvy opět zredukovány a to pouze na I. a IV. vrstvu.



Obrázek 19: Grafické vyjádření celkového vývoje obsahu FAA v jednotlivých vrstvách – bez III. vrstvy

Jako reprezentativní aminokyselina byl vybrán leucín. Tato aminokyselina je v průběhu proteolýzy významná, jelikož je využívána mnohými mikroorganismy, zejména laktokoky [20]. Mnozí autoři proto tuto aminokyselinu využívají jako marker.

Na obr. č. 20 lze vidět, že obsah leucínu je závislý na skladovacích podmínkách. Jeho obsah měl rostoucí tendenci u všech vzorků sýrů. Z grafu je patrné, že nejvyšší obsah leucínu byl stanoven u vzorků, které byly po celou dobu skladovány ve zracím sklepe. Nejnižší obsah leucínu byl stanoven u vzorků, které byly po 20 dnech vytaženy ze zracího sklepa a dále skladovány v lednici za teplot 5 ± 2 °C.



Obrázek 20: Grafické vyjádření celkového vývoje obsahu leucinu ve IV. vrstvě u všech vzorků sýrů (vzorky řady A, B, C)

Pomocí stanovení FAA bylo zjištěno, že rozdílné skladovací podmínky ovlivňují průběh proteolýzy. Nejintenzivněji probíhá tento proces u sýrů, které byly po celou dobu zrání pokusu skladovány ve zracím sklepě, nejméně intenzivněji probíhá ve vzorcích, které byly ze zracího sklepa po 20 dnech vyskladněny a dále skladovány v lednici (5 ± 2 °C).

Pro každou aminokyselinu byly vytvořeny 4 grafy – graf shrnující obsah dané aminokyseliny v řadě A (vzorky, které byly po celou dobu skladovány pouze ve zracím sklepě), další byly vytvořeny pro řadu B (vzorky sýrů byly po 20 dnech vyskladněny ze zracího sklepa a dále skladovány v lednici) a C (vzorky sýrů byly po 34 dnech vyskladněny ze zracího sklepa a dále skladovány v lednici) a poslední, čtvrtý graf (označen písmenem D), znázorňuje srovnání obsahu dané aminokyseliny pouze ve IV. vrstvě, za to u všech 3 typů řad.

Aminokyselina leucin je prezentována dále, grafy vyjadřující průběžný obsah dalších aminokyselin v čase, jsou uvedeny v Příloze č. IV. V této příloze jsou prezentovány pouze některé z aminokyselin, jelikož prezentace všech vyskytujících se aminokyselin by byla poměrně složitá.

Z prezentovaných grafů v Příloze č. IV. lze vyčíst, že v průběhu zracího procesu docházelo k vyrovnávání obsahu aminokyselin v jednotlivých vrstvách.

Od počátku chemických analýz byl vzorek rozdělen na 4 vrstvy. Po měsíci (34. den), byly vrstvy zredukovány na 3 – II. a III. byla spojena v jednu. K další redukci došlo 111. den – vrstva I., II. a III. byly spojeny v jednu.

Pokud jsou porovnávány jednotlivé vrstvy za téže skladovací teploty (v Příloze grafy A, B a C), tak lze konstatovat, že k vyrovnání vrstev dochází okolo 98. dne, kdy jsou hodnoty obsahu jednotlivých aminokyselin na téměř shodné hranici (je to patrné např. u aminokyseliny prolinu, glycinu, alaninu, metioninu, izoleucinu, atd.).

Pokud jsou srovnávány pouze IV. vrstvy a to za odlišných skladovacích podmínek (v Příloze graf označen D), tak je patrné, že IV. vrstvy jsou, co do obsahu dané aminokyseliny, nejvyrovnanější 63. den. Ve 140. dni je na daných grafech (např. u aminokyseliny treonin, kyselina glutamová, prolin, metionin či izoleucin) patrný rozdíl, který nám detekuje rozdíly obsahu jednotlivých aminokyselin za odlišných skladovacích podmínek. Nejvyšší obsah sledované aminokyseliny je obsažen ve vzorku, který byl po celou dobu zracího pokusu skladován ve zracím sklepě (10 ± 2 °C), oproti tomu nejmenší obsah dané aminokyseliny byl stanoven u vzorků, které byly ze zracího sklepa po 20 dnech vyskladněny a dále skladovány v ledničce (5 ± 2 °C).

Těmito výsledky bylo prokázáno, že průběh proteolýzy je jednoznačně závislý na optimálních teplotních podmínkách.

Další stanovované aminokyseliny byly vyhodnocovány pomocí korelační analýzy, což je metoda hledání míry lineární závislosti. Hodnoty stanovené touto metodou jsou shrnuty v tabulce č. 3.

Tabulka 3: Hodnoty korelačních koeficientů pro jednotlivé aminokyseliny

	His	Val	Gln	Arg	Lys	Orn	Phe	Tyr	Ile
Leu	0,9870***	0,9936***	0,8454***	0,0156	0,9876***	0,5561***	0,9965***	0,4379***	0,9891***
Asp	0,0056	-0,1320	0,1838*	0,0024	-0,0059	-0,1041	-0,0452	-0,0642	-0,0211
Thr	0,6763***	0,6999***	0,8006***	0,0648	0,6907	0,5216***	0,7187***	0,4708***	0,6922***
Ser	-0,0505	-0,0453	-0,3528***	0,1547	-0,0412	0,1198	-0,0758	0,1947*	-0,0640
Glu	0,8567***	0,8935***	0,8655***	0,0114	0,8614***	0,5377***	0,8995***	0,4230***	0,8720***
Pro	0,9555***	0,9512***	0,8491***	-0,0799	0,9606***	0,4782***	0,9491	0,3849***	0,9624***
Gly	0,9562***	0,9717***	0,7588***	0,0101	0,9576***	0,5399***	0,9661***	0,4246***	0,9565***
Ala	0,9714***	0,9835	0,8556***	-0,0180	0,9682***	0,4862***	0,9715***	0,3664***	0,9747***
Cit	0,8107***	0,8296***	0,7865***	-0,0683	0,7886***	0,2101*	0,8294***	0,1286	0,8023***
Met	0,9897***	0,9845***	0,8282***	0,0059	0,9909***	0,5634***	0,9872***	0,4552***	0,9937***
Ile	0,9962***	0,9832***	0,8301***	0,0182	0,9937***	0,5492***	0,9814***	0,4554***	
Tyr	0,4070***	0,4379***	0,3601***	0,4012***	0,4686***	0,9436***	0,4479***		
Phe	0,9785***	0,9936***	0,8469***	0,0131	0,9837***	0,5725***			
Orn	0,5049***	0,5565***	0,4627***	0,3152	0,5719***				
Lys	0,9913***	0,9813***	0,8297***	0,0188					
Arg	0,0030	0,0228	-0,0328						
Gln	0,8263***	0,8385							
Val	0,9808***								

*** statisticky významné na 0,1% hladině významnosti

** statisticky významné na 1% hladině významnosti

* statisticky významné na 5% hladině významnosti

bez označení statisticky nevýznamné

	Met	Cit	Ala	Gly	Pro	Glu	Ser	Thr	Asp
Leu	0,9929***	0,8313***	0,9773***	0,9684***	0,9531***	0,8942***	-0,0743	0,7237***	-0,0445
Asp	-0,0315	-0,1546	-0,1629	-0,1567	0,2208*	-0,1605	-0,0305	-0,0435	
Thr	0,6950***	0,6978***	0,7114***	0,6637***	0,7167	0,8034***	-0,3338***		
Ser	-0,0541	-0,2836**	-0,1734	0,1155	-0,2777**	-0,3932***			
Glu	0,8746***	0,8614***	0,9061***	0,8230***	0,8930***				
Pro	0,9555***	0,7777***	0,9670***	0,8994***					
Gly	0,9667***	0,7855***	0,9462***						
Ala	0,9744***	0,8557***							
Cit	0,8015***								
Met									
Ile									
Tyr									
Phe									
Orn									
Lys									
Arg									
Gln									
Val									
His									

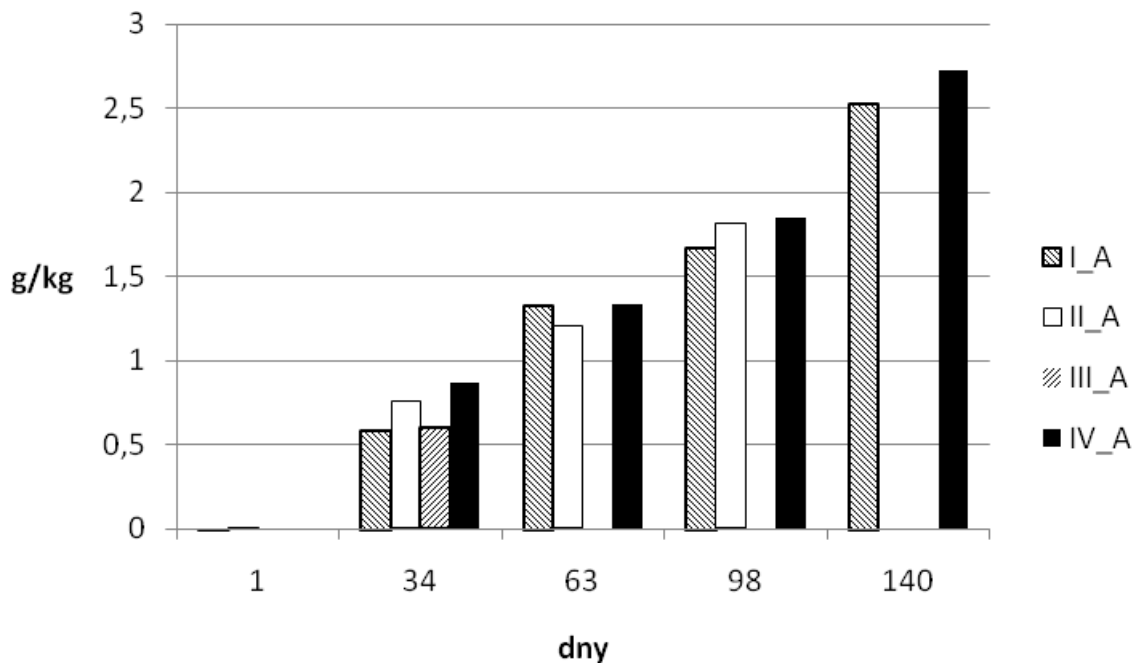
***..... statisticky významné na 0,1% hladině významnosti

**..... statisticky významné na 1% hladině významnosti

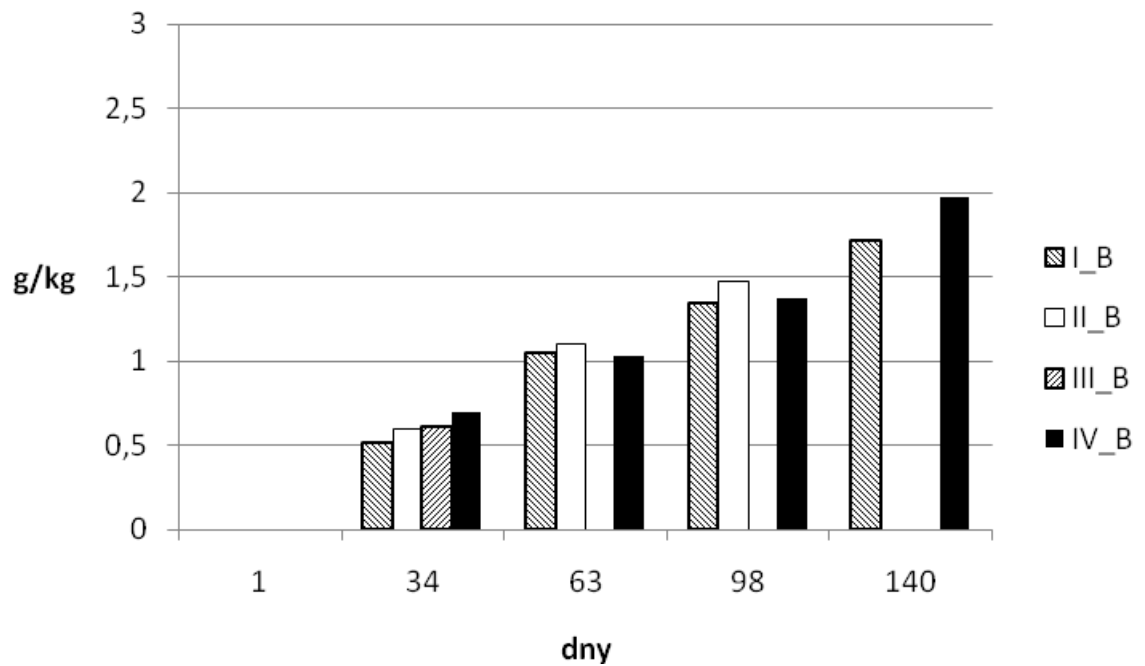
* statisticky významné na 5% hladině významnosti

bez označení statisticky nevýznamné

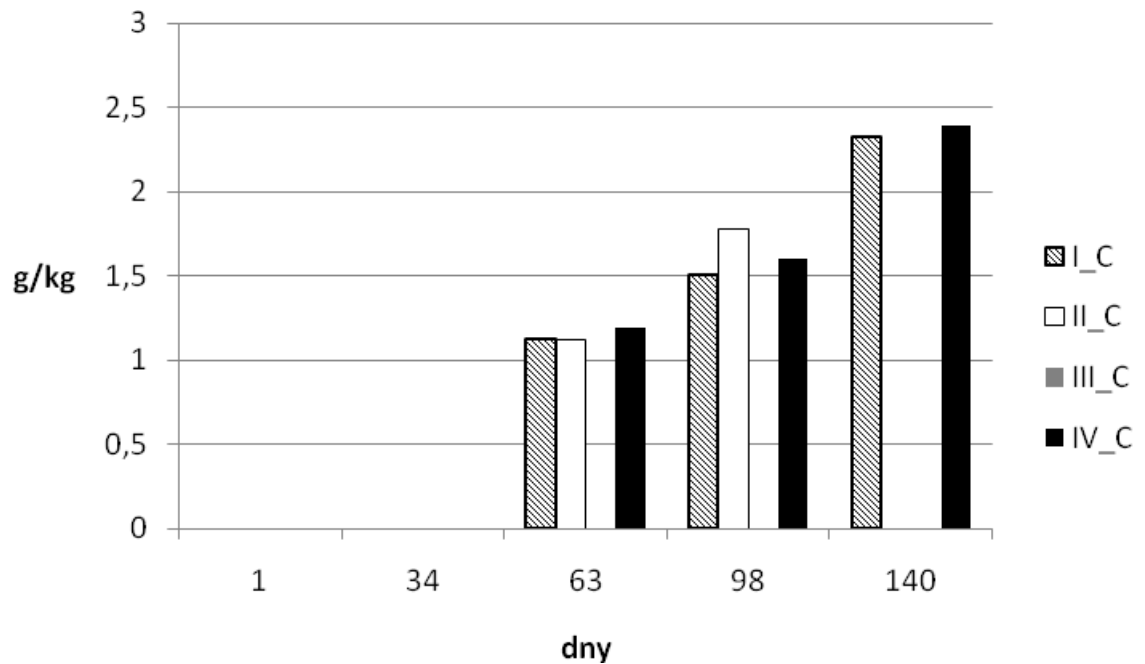
Aminokyselina leucin po celou dobu stanovování jejího obsahu vykazovala stoupající tendenci. Tento trend byl nejmarkantnější u vzorků, které byly po celou dobu skladovány ve zracím sklepe (obr. č. 9) a u vzorků skladovaných ve zracím sklepe 34 dní (obr. č. 11) U vzorků skladovaných ve zracím sklepe 20 dní (obr. č. 10) byl pozorován také rostoucí trend, ale v porovnání s předešlými vzorky nebyl tak výrazný.



Obrázek 21: Grafické vyjádření celkového vývoje obsahu leucinu v jednotlivých vrstvách u vzorků skladovaných ve zracím sklepe



Obrázek 22: Grafické vyjádření celkového obsahu leucinu v jednotlivých vrstvách u vzorků skladovaných ve zracím sklepě 20 dní a poté skladovaných za teplot $5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$



Obrázek 23: Grafické vyjádření celkového obsahu leucinu v jednotlivých vrstvách u vzorků skladovaných ve zracím sklepě 34 dní a poté skladovaných za teplot $5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$

Pomocí korelační analýzy bylo zjištěno, že na 0,1% hladině významnosti byla pozitivní korelace stanovena mezi leucinem a ostatnímu aminokyselinami, s výjimkou argininu, serinu a kyseliny asparagové. Rostoucí tendenci svého obsahu v průběhu zrání v porovnání s leucinem vykazovaly i další aminokyseliny, a to treonin, kyselina glutamová, prolin, glycin, alanin, metionin, izoleucin, fenylalanin, lyzin, glutamin a histidin. Z grafů, které jsou uvedeny v Příloze č. VI., je patrné, že nejvýrazněji obsah dané aminokyseliny rostl u vzorků skladovaných po celou dobu ve zracím sklepe. Nejméně potom u vzorků, které byly po 20 dnech ze zracího sklepa vyskladněny a dále byly skladovány v lednici za teplot 5 ± 2 °C. U kyseliny asparagové je možno také sledovat rostoucí trend, ale ne tak výrazný jako v předešlých případech. Oproti tomu aminokyselina serin v průběhu zrání nevykazuje jednoznačný trend, jeho obsah byl poměrně proměnlivý.

V porovnání s treoninem byla stanovena negativní korelace byla na 0,1% hladině významnosti stanovena u serinu. U kyseliny asparagové byla negativní korelace zjištěna také, ovšem nevýznamná. U zbývajících aminokyselin byla pozitivní korelace zjištěna na 0,1% hladině významnosti.

V porovnání kyseliny glutamové byla negativní korelace zjištěna na 0,1% hladině významnosti u serinu, u kyseliny asparagové byla tato negativní závislost nevýznamná. Pozitivní korelace byla zjištěna u zbývajících sledovaných aminokyselin a to na 0,1% hladině významnosti, s výjimkou argininu.

Pomocí korelační analýzy byla v porovnání s prolinem zjištěna negativní korelace u serinu na 0,1% hladině významnosti a u argininu (tato negativní závislost není významná). U ostatních porovnávaných sledovaných aminokyselin byla zjištěna pozitivní korelace na 0,1% hladině významnosti, pouze u fenylalaninu a treoninu byla závislost nevýznamná. Obsah glycinu v porovnání mezi ostatními aminokyselinami vykazoval nevýznamnou negativní korelaci v porovnání s kyselinou asparagovou a leucinem. U zbývajících aminokyselin byla stanovena na 0,1% hladině významnosti pozitivní korelace, s výjimkou serinu a argininu (nevýznamná pozitivní korelace).

Další stanovovanou aminokyselinou byl alanin. V porovnání alaninu s ostatními aminokyselinami vykazoval nevýznamnou negativní korelaci u argininu, serinu a kyseliny asparagové. U zbývajících aminokyselin byla zjištěna pozitivní korelace na 0,1% hladině významnosti, s výjimkou valinu (nevýznamná pozitivní korelace).

Pomocí korelační analýzy bylo zjištěno, že v porovnání metioninu se serinem a kyselinou asparagovou vykazuje nevýznamnou negativní korelaci. Při srovnání metioninu a argininu byla zjištěna pozitivní nevýznamná korelace pozitivní. U ostatních stanovovaných aminokyselin v porovnání s metioninem byla také zjištěna pozitivní korelace a to na 0,1% hladině významnosti.

Korelační analýzou izoleucinu byla zjištěna negativní korelace mezi serinem, kyselinou asparagovou (nevýznamná) a treoninem (na 0,1% hladině významnosti). U zbývajících aminokyselin v porovnání s izoleucinem byla zjištěna pozitivní korelace a to na 0,1% hladině významnosti, pouze s výjimkou argininu (nevýznamná pozitivní korelace).

Fenylalanin v porovnání s ostatními aminokyselinami vykazoval nevýznamnou negativní korelace u serinu i kyseliny asparagové. Pozitivní nevýznamná korelace byla zjištěna při porovnání fenylalaninu s argininem a prolinem. U ostatních sledovaných aminokyselin ve srovnání s fenylalaninem byla stanovena pozitivní korelace a to na 0,1% hladině významnosti.

Lyzin vykazuje v porovnání se serinem a kyselinou asparagovou nevýznamnou negativní korelaci. Nevýznamná pozitivní korelace byla zjištěna při srovnání lyzinu a argininu. U treoninu byla pozitivní korelace na 5% hladině významnosti v porovnání s lyzinem. U zbývajících aminokyselin byla pozitivní korelace stanovena na 0,1% hladině významnosti. Obsah glutaminu vykazoval negativní korelaci v porovnání s argininem (nevýznamná korelace) a serinem (na 0,1% hladině významnosti). Pozitivní korelace byla zjištěna u valinu (nevýznamná) a kyseliny asparagové (5% hladina významnosti). U zbývajících sledovaných aminokyselin byla pozitivní korelace stanovena na 0,1% hladině významnosti. Valin v průběhu zrání vykazoval nevýznamnou negativní korelaci u kyseliny asparagové a serinu. Oproti tomu pozitivní nevýznamná korelace byla určena pro alanin, arginin a glutaminu. U zbývajících aminokyselin byla pozitivní korelace stanovena na 0,1% hladině významnosti.

Korelační analýzou byl také srovnán histidin a ostatní aminokyseliny. Nevýznamná negativní korelace byla stanovena pro serin a pozitivní pro kyselinu asparagovou a arginin. Zbytek sledovaných aminokyselin vykazoval pozitivní korelační závislost a to na 0,1% hladině významnosti.

Obsah kyseliny asparagové v průběhu zračího pokusu vykazoval nevýrazný rostoucí trend, na rozdíl od výše uvedených komentovaných aminokyselin. Na 5% hladině významnosti

vykazuje kyselina asparagová pozitivní korelaci s glutaminem a prolinem. U histidinu a argininu byl pozitivní korelace nevýznamná. U zbývajících stanovovaných aminokyselin byla zjištěna nevýznamná negativní korelace.

Obsah serinu v průběhu zrání nevykazoval jednoznačný trend, jeho obsah byl poměrně proměnlivý. Pozitivní korelační závislost byla zjištěna u tyrozinu a to na 5% hladině významnosti. Byla zjištěna negativní korelační závislost - na 0,1% hladině významnosti u glutaminu a kyseliny glutamové, na 1% hladině významnosti u prolinu a citrulinu.

U aminokyseliny tyrozinu můžeme sledovat rostoucí trend jejího obsahu, ovšem před koncem zracího pokusu (ve 140. dni) lze pozorovat, že obsah této aminokyseliny klesá. A to u všech typů vzorků, bez rozdílu jejich skladovacích teplot a zracích podmínek. Nevýznamná negativní korelace byla stanovena srovnáním tyrozinu a kyseliny asparagové. Pozitivní korelace byla stanovena u citrulinu (nevýznamná korelace), serinu (5% hladina významnosti) a u zbývajících sledovaných aminokyselin na 0,1% hladině významnosti.

Specifické postavení zaujímají arginin, ornitin a citrulin. Arginin je mnohými LAB spotřebováván za vzniku NH_3 . Nejprve je arginin hydrolyzován právě na NH_3 a citrulin. Poté dochází k fosforylaci citrulinu na ornitin [11]. Distribuci argininu nelze během zracího procesu jednoznačně definovat, jeho obsah byl proměnlivý a také velmi nízký (0,005 – 0,030 g/kg) a to nejen v závislosti na skladovacích a zracích podmínkách. Pomocí korelační analýzy byla nevýznamná negativní korelace zjištěna u glutaminu, citrulinu, alaninu a prolinu. Pozitivní korelace na 0,1% hladině významnosti byla stanovena pro tyrozin. Pro zbývajících sledované aminokyseliny byla zjištěna nevýznamná pozitivní korelace. Citrulin je aminokyselina vznikající v ornitinovém cyklu. V průběhu zrání obsah této aminokyseliny nevykazoval jednoznačný trend. Nevýznamná negativní korelace byla zjištěna u argininu a kyseliny asparagové. U zbývajících stanovovaných aminokyselin byla stanovena pozitivní korelační závislost a to na 0,1% hladině významnosti, s výjimkou ornitinu, jehož hladina významnosti je 5%. Ornitin (diaminokyselina vznikající z argininu) vykazuje rostoucí trend obsahu pouze u vzorků, které byly po celou dobu skladovány ve zracím sklepě. U vzorků, které byly během zracího procesu vyskladněny (ať už po 20 či 34 dnech) a dále skladovány v lednici můžeme rostoucí trend sledovat také, ovšem ke konci zracího pokusu (140. den) dochází k úbytku této sloučeniny. Nevýznamná negativní korelace byla stanovena pro serin a kyselinu asparagovou. Nevýznamná pozitivní korelace byla stanovena u argininu a proli-

nu, na 5% hladině významnosti byla pozitivní korelace stanovena pro citrulin. U zbývajících sledovaných aminokyselin byla hladina významnosti 0,1 %.

5.1.3 SDS-PAGE

U vzorků byla provedena polyakrylamidová elektroforéza, které je schopna použitou metodou zachytit molekuly proteinů o molekulové hmotnosti 3 kDa a vyšší. Výsledky polyakrylamidové elektroforézy byly podrobeny shlukové analýze. Na obrázku č. 24 je vyobrazen dendrogram této analýzy. Cílem shlukové analýzy je seskupit vzorky podle příbuznosti. V našem případě byla sledovaným znakem molekulová hmotnost proteinů v daných vzorcích sýrů.

Při shlukové analýze vzorků sýrů se vytvořily tři základní shluky. V prvním shluku (I.) se nacházejí vzorky zrající pouze ve zracím sklepě, které byly analyzovány 0., 1., 2., 3., 6., 9. a 13. den. V dalším shluku (II.) se již prolínají vzorky, které byly skladovány za odlišných podmínek, což znamená, že proteinové složení daných vzorků je podobné. V tomto shluku jsou obsaženy vzorky zrající pouze ve zracím sklepě (den 16, 20A, 23A, 42A, 48A a 55A), vzorky, které byly po 20 dnech vyskladněny ze zracího sklepa a dále skladovány v lednici za teplot 5 ± 2 °C (den 20B, 23B a 42B) a také vzorky, které byly ze zracího sklepa vyskladněny po 34 dnech a dále skladovány v lednici za teplot 5 ± 2 °C (den 42C). Ve třetím shluku (III.) jsou obsaženy zbývajících analyzované vzorky. I v tomto shluku nalezneme zástupce jednotlivých vzorků, které byly skladovány za odlišných podmínek. Ani zde nedošlo k oddělení vzorků skladovaných za odlišných podmínek skladování dle svého proteinové profilu.

Bylo zjištěno, že proteinové profily jednotlivých vzorků jsou si podobné. Při této analýze nedošlo k oddělení vzorků a jejich odlišení podle rozdílných skladovacích podmínek. Tento jev může být způsoben průběhem proteolýzy, jelikož v lednici probíhá pomaleji (jak již bylo demonstrováno při stanovení FAA).

Metoda SDS-PAGE byla použita pro stanovení proteinového profilu jen do 83. dne z důvodu poškození aparatury pro SDS-PAGE. Jelikož tato aparatura nebyla v provozu, nebylo možno následující vzorky dále analyzovat.

5.2 Výsledky sensorické analýzy

Senzorickou analýzou byly sledovány následující charakteristiky: vzhled a barva, konzistence, chuť a vůně, tuhost a cizí pachuti. Sensorická analýza byla prováděna 58. a 128. den od výroby a to hodnotiteli „laiky“ (konzumenti).

První sensorická analýza byla provedena 58. den, kdy bylo zjištěno, že ve vzhledu a barvě byl nejlépe hodnocen vzorek B. V tuhosti se od sebe statisticky lišily soubory A-B a A-C a to tak, že vzorek B i C měly lepší tuhost než vzorek A. Mezi souborem B-C nebyla pozorována statisticky významná odlišnost. V charakteristice chutě a vůně byl opět jako nejlepší vzorek hodnocen vzorek B. U ostatních znaků nebyly mezi vzorky zjištěny statisticky významné rozdíly.

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

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

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

Z výsledků sensorické analýzy vyplývá, že hodnotitelé bohužel nedokázali rozeznat sýr více vyzrálý (skladovaný po celou dobu zracího pokusu ve zracím sklepě) od sýrů méně vyzrálých (sýry skladované ve zracím sklepě pouze 20 a 34 dní).

5.3 Diskuze

Během zracího pokusu sýrů eidamského typu za 3 odlišných podmínek skladování byly sledovány chemické ukazatele průběhu zrání – pH, obsah sušiny, hrubých bílkovin, NaCl, FAA a byla provedena SDS-PAGE. Chemické analýzy byly doplněny analýzou senzoric-kou.

Během zracího pokusu byly zaznamenány výrazné změny při stanovení hodnoty pH. Před vysolením eidamského sýru byla hodnota pH $5,20 \pm 0,03$. V průběhu zracího procesu byl zaznamenáván postupný nárůst pH. Na konci pokusu (147. den) byla hodnota pH $5,67 \pm 0,03$ u vzorků skladovaných po celou dobu ve zracím sklepě (10 ± 2 °C), $5,66 \pm 0,01$ u vzorků, které byly po 20 dnech ze zracího sklepa vyskladněny a dále skladovány v lednici (5 ± 2 °C) a $5,61 \pm 0,02$ u vzorků, které byly po 34 dnech vyskladněny ze zracího sklepa a dále skladovány v lednici (5 ± 2 °C). Nárůst pH souvisí s odbouráváním kyseliny mléčné (vznikající metabolismem laktózy) bakteriemi mléčného kvašení [31]. Z konečných hodnot také můžeme konstatovat, že rozdílné skladovací podmínky na pH nemají vliv.

Obsah sušiny byl před vstupem do solné lázně stanoven na $48,72 \pm 0,21$ %. Po 147denním skladování obsah sušiny vzrostl na $53,24 \pm 1,31$ % (vzorky A - vzorky skladovány po celou dobu ve zracím sklepě 10 ± 2 °C), dále na hodnotu $53,74 \pm 1,48$ % (vzorky B – vzorky po 20 dnech skladování ve zracím sklepě přesunuty do lednice 5 ± 2 °C) a $52,53 \pm 1,77$ % (vzorky C- vzorky po 34 dnech skladování ve zracím sklepě přesunuty do lednice 5 ± 2 °C). V průběhu zrání sýrů docházelo k vyrovnávání sušiny u jednotlivých vrstev. Obecně lze říci, že rozdílné skladovací podmínky neměly na tuto charakteristiku vliv.

Obsah hrubých bílkovin byl prakticky stejný u všech vzorků, které byly skladovány za odlišných podmínek – $29,78 \pm 0,16$ % (vzorky A), $29,68 \pm 0,68$ % (vzorky B) a $30,07 \pm 0,52$ % (vzorky C). Obsah hrubých bílkovin byl po celou dobu sledování prakticky stejný a neměnil se.

V průběhu zrání eidamských sýrů docházelo k postupnému zvyšování obsahu chloridu sodného v jednotlivých vrstvách. Tento proces je znázorněn na obrázku č. 15, 16 a 17. Došlo k nárůstu z $0,11 \pm 0,01$ % na konečných $1,98 \pm 0,02$ %. Zvyšování obsahu NaCl odpovídá postupné difúzi soli z okrajových částí do středu sýra [10]. V průběhu zrání bylo po-

zorováno prostupování solného prstence z vnější vrstvy do vrstev vnitřních, čímž docházelo k postupnému vyrovnávání obsahu NaCl v jednotlivých vrstvách. Ve 147. dni obsah chloridu sodného činil $1,98 \pm 0,11$ % (vzorky A), $1,98 \pm 0,02$ % (vzorky B) a $1,97 \pm 0,08$ % (vzorky C). Z těchto výsledků je patrné, že na konci zracího pokusu byl obsah chloridu sodného ve všech vzorcích prakticky shodný a vyrovnaný. Rychlost difúze chloridu sodného je pravděpodobně ovlivněna skladovacími podmínkami.

V průběhu zracího pokusu byly dále sledovány změny obsahu volných aminokyselin (obr. 18 a 19, Příloha IV). Mezi sledované aminokyseliny patřily leucin (obr. 20), kyselina asparagová, treonin, serin, kyselina glutamová, prolin, glycin, alanin, citrulin, metionin, izoleucin, tyrozin, fenylalanin, ornitin, arginin, glutaminu, valin a histidin. Průběh distribuce jednotlivých aminokyselin je jednoznačně závislý na skladovacích podmínkách. Proteolýza nejvýrazněji probíhala ve vzorcích, které byly po celou dobu zracího pokusu skladovány ve zracím sklepe. Oproti tomu nejméně intenzivněji probíhala proteolýza u vzorků, které byly po 20 dnech ze zracího sklepa vyskladněny a dále skladovány za teplot 5 ± 2 °C. Tyto výsledky potvrzují, že pro správný průběh proteolýzy je zapotřebí optimálních teplotních podmínek [9, 31]. Obsah jednotlivých FAA byl rozmanitý, aminokyseliny byly v jednotlivých sýrech obsaženy v rozmezí 0,002 – 2,700 g dané aminokyseliny na kg cihly sýra. Nejvíce obsaženou aminokyselinou byl leucin, glutaminu, asparagin a lyzin. Jedinou aminokyselinou, u které v průběhu zrání a to bez ohledu na způsob skladování, nebyl zaznamenán výrazný nárůst, byl arginin. Toto zjištění je popsáno i v dalších pracích, např. McSWEENEY & SOUSA [34]. Vysvětlením pro tento jev je nárůst obsahu ornitinu a citrulinu, pro něž je arginin prekurzorem.

U vzorků byla provedena polyakrylamidová elektroforéza. Výsledky SDS-PAGE byly podrobeny shlukové analýze a byl vytvořen dendrogram. Při shlukové analýze vzorků sýrů se vytvořily tři základní shluky. V prvním shluku (I.) se nacházely vzorky zrající pouze ve zracím sklepe. V dalším shluku (II.) se již prolínaly vzorky, které byly skladovány za odlišných podmínek. Ve třetím shluku (III.) byly obsaženy zbývající analyzované vzorky. I v tomto shluku nalezneme zástupce jednotlivých vzorků, které byly skladovány za odlišných podmínek.

Senzorickou analýzou byly sledovány následující sensorické znaky: vzhled a barva, konzistence, chuť a vůně, tuhost a cizí pachuti. Sensorická analýza byla prováděna 58. a 128. den od výroby hodnotiteli – tzv. „laiky“. Sensorickou analýzou bylo zjištěno, že ve vzhledu a barvě a také v chuti a vůni, byl nejlépe hodnocen vzorek B. Tuhost měly vzorky B a C lepší než vzorek A. Pořadové zkoušky sledovaných vzorků A, B a C byly vyhodnoceny pomocí Friedmanova testu na hladině významnosti 5 %. Hodnocené znaky byly tuhost, intenzita chuti a preference. Ve znaku tuhosti byl preferován vzorek A, u dalších znaků nebyly shledány statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými vzorky.

Z výsledků sensorické analýzy vyplývá, že hodnotitelé bohužel nedokázali rozeznat sýr více vyzrálý (skladovaný po celou dobu zracího pokusu ve zracím sklepě) od sýrů méně vyzrálých (sýry skladované ve zracím sklepě pouze 20 a 34 dní).

ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na sledování změn v distribuci dusíkatých látek (v jednotlivých vrstvách) v průběhu zrání sýrů eidamského typu. V teoretické části byla popsána technologie výroby tohoto typu sýra a biochemické procesy, které probíhají v průběhu zrání.

Praktická část demonstrovala zrací pokus eidamských sýrů za rozdílných podmínek. Šarže vyrobených eidamských cihel byla po ukončení výroby skladována ve zracím sklepe (10 ± 2 °C). Po 20 dnech od ukončení výroby byla část eidamských cihel ze zracího sklepa vyskladněna a dále skladována za teplot 5 ± 2 °C. Po 34 dnech od ukončení výroby byla další část vyrobené šarže ze zracího sklepa vyskladněna a dále skladována za teplot 5 ± 2 °C.

Během zracího pokusu byly použity chemické a senzorické analýzy. Chemické analýzy zahrnovaly stanovení pH, obsah sušiny, obsah hrubých bílkovin, obsah NaCl, volných aminokyselin a stanovení proteinového profilu pomocí SDS-PAGE.

Byly zjištěny následující výsledky:

- pH na počátku nižší, v průběhu zracího procesu pozorován postupný nárůst na konečnou hodnotu (5,65 ± 0,03). Rozdílné skladovací podmínky nemají na pH vliv.
- obsah sušiny po 147denním skladování vzrostl na 53,17 ± 0,50 %. Docházelo k vyrovnávání sušiny u jednotlivých vrstev. Rozdílné skladovací podmínky neměly na tuto charakteristiku vliv.
- obsah hrubých bílkovin byl prakticky stejný u všech vzorků i za odlišných podmínek skladování. Obsah hrubých bílkovin byl po celou dobu sledování stejný a neměnil se.
- obsah chloridu sodného v průběhu zrání rostl - z 0,11 ± 0,01 % na konečných 1,98 ± 0,02 %. (147. den). V průběhu zrání bylo pozorováno prostupování solného prstence z vnější vrstvy do vrstev vnitřních, čímž docházelo k postupnému vyrovnávání obsahu NaCl v jednotlivých vrstvách. Rychlost difúze NaCl je pravděpodobně ovlivněna skladovacími podmínkami. Na konci pokusu byl obsah chloridu sodného ve všech vzorcích shodný a vyrovnaný.

- obsahu volných aminokyselin byl v rozmezí 0,002 – 2,700 g dané aminokyseliny na kg cihly sýra. Průběh distribuce jednotlivých aminokyselin je jednoznačně závislý na skladovacích podmínkách. Proteolýza nejvýrazněji probíhala ve vzorcích, které byly po celou dobu zracího pokusu skladovány ve zracím sklepě. Oproti tomu nejméně intenzivněji probíhala proteolýza u vzorků, které byly po 20 dnech ze zracího sklepa vyskladněny a dále skladovány za teplot 5 ± 2 °C.
- SDS-PAGE bylo zjištěno, že proteinové profily jednotlivých vzorků jsou si podobné a nedošlo k jejich oddělení podle rozdílných skladovacích podmínek.
- z výsledků sensorické analýzy vyplývá, že hodnotitelé bohužel nedokázali rozeznat sýr více vyžralý (skladovaný po celou dobu zracího pokusu ve zracím sklepě) od sýrů méně vyžralých (sýry skladované ve zracím sklepě pouze 20 a 34 dní).

Závěrem lze říci, že průběh a teplota při zracích procesech výrazně ovlivňuje proteolytické procesy a tím i jakost finálních produktů. Pokud je nutno (z ekonomických důvodů) produkty vyskladňovat dříve, tak by do technologického procesu měly být zařazeny prostředky používané k urychlení zrání.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BASTIAN, E.D and BROWN R.J.: Plasmin in milk and dairy products, *International Dairy Journal*, 6, 435 – 457 s., 1996
- [2] BŘEZINA, P., KOMÁR, A., HRABĚ, J.: *Technologie, zbožiznalství a hygiena potravin*, Vyškov 2001
- [3] BUŇKA, F., HRABĚ, J., VOSPĚL, B.: *Senzorická analýza potravin I.*, Zlín, UTB 2008, ISBN 978-80-7318-628-9
- [4] BÜTIKOFER, U., RÜEGG, M., ARDÖ, Y.: Determination of nitrogen fiction in cheese: evaluation of collaborative study, *LWT*, 26, 271 – 275 s., 1993
- [5] BYLUND, G.M.: *Science Dairy processing handbook*, Publisher: TetraPak Processing systems ABS- 22186 Lund, Sweden- Printed in 1995
- [6] COLLINS, Y.F., McSWEENEY, P.L.H., WILKINSON, M.G.: Lipolysis and catabolism of fatty acids in cheese, *In Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol.1: General Aspects*, 3rd edn, 373 – 389 s., 2004
- [7] COLLINS, Y.F., McSWEENEY, P.L.H., WILKINSON, M.G.: Lipolysis and free fatty acid catabolism, *In cheese: a review of curent knowlege, International Dairy Journal*, 13, 841 – 866 s., 2003
- [8] CURTIN, A.C., McSWEENEY, P.L.H.: Catabolism of amino acids in cheese during ripening, *In: Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol 1: General Aspects*, 3rd edn, 435 – 454 s., 2004
- [9] DRDÁK, M., STUDNICKÝ, J., MOROVÁ, E.: *Základy potravinárských technologií*, Bratislava, 1996
- [10] FOX, P. L. et al.: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 1* (3rd edition), 361 – 371 s., 2004
- [11] FOX, P.F., GUINEE, T.P., COGAB, T.M.: *Fundamentals of cheese science*, Aspen Publisher, Inc. Maryland, 2000, ISBN 0-8342-1260-9
- [12] FOX, P.F. McSWEENEY, P.L.H. *Dairy Chemistry and Biochemistry*, SpringeVlag, 1998, ISBN 978-0-412-72000-0

- [13] FOX, P.F., WALLACE, J.M.: Formation of flavor compounds in cheese, *Advances in Applied Microbiology*, 45, 17 – 85 s., 1997
- [14] FOX, P.F., WALLACE, J.M., MORGAN, S.: *Acceleration of cheese ripening*, *Antonie von Leeuwenhoek*, 70, 271 – 297s., 1996
- [15] FOX, P.F., McSWEENEY, P.L.H.: Proteolysis in cheese during ripening, *Food Reviews International*, 12, 457 – 509 s., 1996
- [16] FOX, P.F., LUCEY, J.A, COGAN, T.M.: Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening, *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1990
- [17] GAGNAIRE, V., MOLLÉ, D., LÉONIL, J.: Peptidases of dairy propionic acid bacteria, *Le Lait*, 79, 43 – 57 s., 1999
- [18] GAJDŮŠEK, S.: *Mlékařství II*, Mendlova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 1998, ISBN 80-7157-342-6
- [19] GARNOT, P., MOLLE, D., PIOT, M.: Influence of pH, type of enzyme and ultrafiltration on the retention of milk clotting in Camembert cheese, *Journal of Dairy Research*, 1987
- [20] GOUPIE, N., CORTIER, G., EHRLICH, S.D.: Imbalance of leucine flux in *Lactococcus lactis* and its use for the isolation of diacetyl overproducing strains, *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 2636 – 2640 s., 1996
- [21] GREEN, M.L., FOSTER, P.D.M.: Comparison of the rates of proteolysis during ripening of Cheddar cheeses made with calf rennet and swine pepsine as coagulants, *Journal of Dairy Research*, 42, 269 – 282 s., 1974
- [22] GRIPON, J.C.: Mould-ripened cheese, *In Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol 2: Major Cheese Groups, 2nd edn, 111 – 136 s., 1993
- [23] HEMME, D., BOUILLANE, C., METRO, F.: Microbial catabolism of amino acids during cheese ripening, *Science des Aliments*, 2, 113 – 123 s., 1982
- [24] HOLLAND, R. et al.: Esterase of lactic acid bacteria, *Australian Journal of Dairy Technology*, 57, 116 s. (Abstract), 2002

- [25] HRABĚ, J., BŘEZINA, P., VALÁŠEK, P.: *Technologie výroby potravin živočišného původu*, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2006, ISBN 80-7318-405-2
- [26] HRABĚ, J., BUŇKA, F., V *Statistické metody v senzoričké analýze potravin*. Vyškov: VVŠ PV, 2001, ISBN 80-7231-086-0, 114 s.
- [27] HUFFMAN, L.M., KRISTOFFERSEN, T.: Role of lactose in Cheddar cheese manufacture and ripening, *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 1984
- [28] KNĚZ, V., SEDLÁČKOVÁ, H.: *Sýry a příprava sýrových pokrmů*, Praha: SNTL, 1991
- [29] KNĚZ, V.: *Výroba sýrů*, Praha, SNTL, 1960
- [30] LAW, J., HAANDRIKMAN, A.: Proteolytic enzyme of lactic acid bacteria, *International Dairy Journal*, 7, 1 – 11 s., 1997
- [31] McSWEENEY, P.L.H.: Biochemistry of cheese ripening, *International Journal of Dairy Technology*, Vol.57, no.2/3 May/August, 2004
- [32] McSWEENEY, P.L.H.: Biochemistry of cheese ripening: introduction and overview, *In Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol 1: General Aspects, 3rd edn, 347 – 360 s., 2004
- [33] McSWEENEY, P.L.H., FOX, P.F.: Metabolism of residual lactose of lactate and citrate, *In Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol 1: General aspects, 3rd edn, 2004
- [34] McSWEENEY, P.L.H., SOUSA, M.J.: Biochemical pathway for the production of flavor compounds in cheese during ripening, *Le Lait* 80, 293 – 324 s., 2000
- [35] McSWEENEY, P.L.H., OLSON, N.F., FOX, P.F.: Proteolysis of bovine α_{S2} -casein by chymosin, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 119, 429 – 432 s., 1994
- [36] McSWEENEY, P.L.H., OLSON, N.F., FOX, P.F.: Proteolytic specificity of chymosin on bovine α_{S1} -casein, *Journal of Dairy Research*, 60, 401 – 412 s., 1993
- [37] MEINHART, E., SCHREIER, P.: Study of flavour compounds from Pramgiano Reggiano cheese, *Milchwissenschaft*, 41, 689 – 691 s., 1986

- [38] *Mlékárenská technologie II*; dostupná na Internetu: [cit:2009-02-13] http://utb.cepac.cz/Screens/ContentProvider.aspx/_XN58PfnmmUhGWHSU_TRgcIKsS5Sq285BVJXOV6Bg1/M0029_mlekarenska_tehnologie%5Cdistančni_text_II%5CM0029_mlekarenska_tehnologie_distančni_text_II.pdf
- [39] MOLIMARD, P., SPINLER, H.E.: Compounds involved in the flavor of surface mould-ripened cheeses: origins and properties, *Journal of Dairy Science*, 79, 69 – 184 s., 1996
- [40] MORRIS, A., BARNETT, A., BURROWS, O.J.: Effect of Processing on Nutrient Content of Foods, *Cajanus*, Vol. 37, No. 3, 160 – 165 s., 2004
- [41] O'KEEFFE, R.B., FOX, P.F.: Proteolysis in Cheddar cheese: influence of the rate of acid production during cheese manufacture; *Journal of Dairy Research*, 1975
- [42] OLIVECRONA, T., VILARO, S., OLIVECRONA, G.: Lipases in milk, *In Advanced Dairy Chemistry. I. Proteins*, 3rd edn, 473 – 488 s., 2003
- [43] PACHLOVÁ, V.: *Studium proteinového profilu vybraných mléčných produktů*, diplomová práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2008
- [44] PARENTE, E., COGAN, T.M.: Starter cultures: general aspects, *In Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1, General aspects, 2004
- [45] PAVELKA, A.: *Mléčné výrobky pro Vaše zdraví*, Brno Littera, 1996, ISBN 80-85763-09-5
- [46] PIJANOWSKI, E.: *Základy chemie a technologie mlékárstva*, Bratislava, 1978
- [47] POKORNÝ, J.: *Metody senzorické analýzy potravin a stanovení senzorické jakosti*. 2. vyd. Praha: ÚZPI, 1997. 196 s. ISBN 80-85120-60-7.
- [48] POLONELLI, L. et al.: Antigenic Characterization of *Penicillium camemberti* and Related Common Cheese Contaminants, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 53, No.4, 872 – 878 s., 1987
- [49] POT, B., VANDAMME, P., KERSTERS, K.: Analysis of electrophoretic whole-organism protein fingerprints, p. 439 – 522, *In: Goodfellow, M. and O'Donnel, A.G. (ed.), Modern microbial methods. Chemical methods in procaryotic systematics*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England, 1994

- [50] SDS-PAGE [online]. [cit. 2008-4-17]. Dostupný z WWW:
<<http://en.wikipedia.org/wiki/SDS-PAGE>>
- [51] Shluková analýza [online]. [cit. 2009-03-18]. Dostupný z www:
<<http://www.statsoft.cz/page/index2.php?segmentace>>.
- [52] SWAISGOOD, H.E.: Chemistry of the caseins, *In Advanced Dairy Chemistry. I. Proteins*, 2nd edn, 63 – 110 s., 1992
- [53] Synereze [online]. [cit. 2009-3-15]
<http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/synereze.html>
- [54] TEUBNER, CH., WALDBURG, H., EHLERT, F.: *Sýry – Velká encyklopedie*, 1998, ISBN 80-8046-101-5
- [55] THOMAS, T.D.: Acetate production from lactate and citrate by non-starter bacteria in Cheddar cheese, *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* 22, 25 – 38 s., 1987
- [56] THOMAS, T.D, CROW, V.L.: Mechanism of D(-)-lactic acid formation in Cheddar cheese, *In New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 1983
- [57] UPADHYAY, V.K. et al.: Proteolysis in cheese during ripening, *In Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol.1: General Aspect, 3rd end, 391 – 434 s., 2004
- [58] VISSER, F.M.V, SLANGEN, K.J.: On the specificity of chymozin (rennin) in its action on bovine β -casein, *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 31, 16 – 30 s., 1977
- [59] Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 77/2003 Sb., v platném znění
- [60] WALLACE, J., FOX, P.F.: Effect of adding free amino acids to Cheddar cheese curd on proteolysis and flavour development, *International Dairy Journal*, 7, 157 - 167 s., 1997
- [61] WALSTRA, P., JENNESS, R.: *Dairy Chemistry and Physics*, New York: Wiley, 1984

- [62] WILKINSON, M.G.: Acceleration of cheese ripening, *In P.F. Fox (Ed.), Cheese: Chemistry, physics and mikrobiology* (2d ed., Vol. 1), London: Chapman & Hall, 1993
- [63] YVON, M., RIJNEN, L.: Cheese flavour formation by amino acid catabolism, *International Dairy Journal*, 11, 185 – 201 s., 2001
- [64] ZIMÁK, E.: *Technologie pro 4. ročník SPŠ studijního programu zpracování mléka*, Praha, 1988

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

FAA	volné aminokyseliny
FFA	volné mastné kyseliny
LAB	bakterie mléčného kvašení
LPL	lipoproteinlipáza
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid
NSLAB	nestartérové kultury bakterií mléčného kvašení
PGE	pregastrická esteráza
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfát polyakrylamidová gelová elektroforéza
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylendiamin

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Sýrařská harfa [54]	15
Obrázek 2: Schematické znázornění vytékání kapaliny z gelu [53]	15
Obrázek 3: Schematické znázornění tvorby ok [5].....	19
Obrázek 4: Metabolizmus laktózy v průběhu zrání sýrů: 1 - racemizace, 2 – metabolizmus způsobený <i>Propionibacterium</i> sp., 3 – oxidace, 4 – anaerobní metabolizmus pomocí NSLAB, 5 – anaerobní metabolizmus způsobený <i>Clostridium</i> sp.	24
Obrázek 5: Schematické znázornění systému plazminu v mléce [10].....	26
Obrázek 6: Schematické znázornění systému peptidáz v LAB [57].....	27
Obrázek 7: Schematické znázornění β -oxidace mastných kyselin pomocí <i>Penicilium</i> <i>roqueforti</i> a následná redukce na sekundární alkohol [11]	30
Obrázek 8: Katabolizmus leucinu zahrnující transaminaci, deaminace nebo dekarboxylaci	32
Obrázek 9: Znázornění odběru 2 cm plátku ze vzorku cihly	38
Obrázek 10: Znázornění odebíraných vrstev	39
Obrázek 11: Analyzátor AAA400.....	42
Obrázek 12: Grafické vyjádření stanovení sušiny vzorků eidamských sýrů skladovaných pouze ve zracím sklepě (vzorky A)	46
Obrázek 13: Grafické vyjádření stanovení sušiny vzorků eidamských sýrů po 20 dnech vyskladněných ze zracího sklepa do lednice (vzorky B); hodnoty 1. dne byly převzaty ze vzorků skladovaných ve zracím sklepě	47
Obrázek 14: Grafické vyjádření stanovení sušiny vzorků eidamských po 34 dnech vyskladněných ze zracího sklepa do lednice (vzorky C); hodnoty z 1., 23. a 34. dne byly převzaty ze vzorků skladovaných ve zracím sklepě	47
Obrázek 15: Grafické vyjádření průběhu difúze NaCl u vzorků eidamských sýrů skladovaných pouze ve zracím sklepě (vzorky A)	48
Obrázek 16: Grafické vyjádření průběhu difúze NaCl u vzorků eidamských sýrů skladovaných ve zracím sklepě 20 dní (vzorky B); hodnoty 1. dne byly převzaty ze vzorků skladovaných ve zracím sklepě.....	49

Obrázek 17: Grafické vyjádření průběhu difúze NaCl u vzorků eidamských sýrů skladovaných ve zracím sklepě 34 dní (vzorky C); hodnoty z 1., 23. a 34. dne byly převzaty ze vzorků skladovaných ve zracím sklepě	50
Obrázek 18: Grafické vyjádření celkového vývoje obsahu FAA v jednotlivých vrstvách	51
Obrázek 19: Grafické vyjádření celkového vývoje obsahu FAA v jednotlivých vrstvách – bez III. vrstvy	52
Obrázek 20: Grafické vyjádření celkového vývoje obsahu leucinu ve IV. vrstvě u všech vzorků sýrů (vzorky řady A, B, C)	53
Obrázek 21: Grafické vyjádření celkového vývoje obsahu leucinu v jednotlivých vrstvách u vzorků skladovaných ve zracím sklepě.....	57
Obrázek 22: Grafické vyjádření celkového obsahu leucinu v jednotlivých vrstvách u vzorků skladovaných ve zracím sklepě 20 dní a poté skladovaných za teplot 5 ± 2 °C.....	58
Obrázek 23:Grafické vyjádření celkového obsahu leucinu v jednotlivých vrstvách u vzorků skladovaných ve zracím sklepě 34 dní a poté skladovaných za teplot 5 ± 2 °C.....	58
Obrázek 24: Dendrogram vyjadřující výsledky shlukové analýzy proteinového profilu sledovaných vzorků sýrů	63

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Měkké sýry dle způsobu zrání	11
Tabulka 2: Polotvrdé a tvrdé sýry dle výše dohřívací teploty	11
Tabulka 3: Hodnoty korelačních koeficientů pro jednotlivé aminokyseliny	55

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha I: Obecné schéma výroby sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou

Příloha II: Obrázky vybraných druhů sýrů

Příloha III: Roztoky pro SDS-PAGE

Příloha IV: Grafické vyjádření průběhu distribuce jednotlivých aminokyselin v průběhu zrání

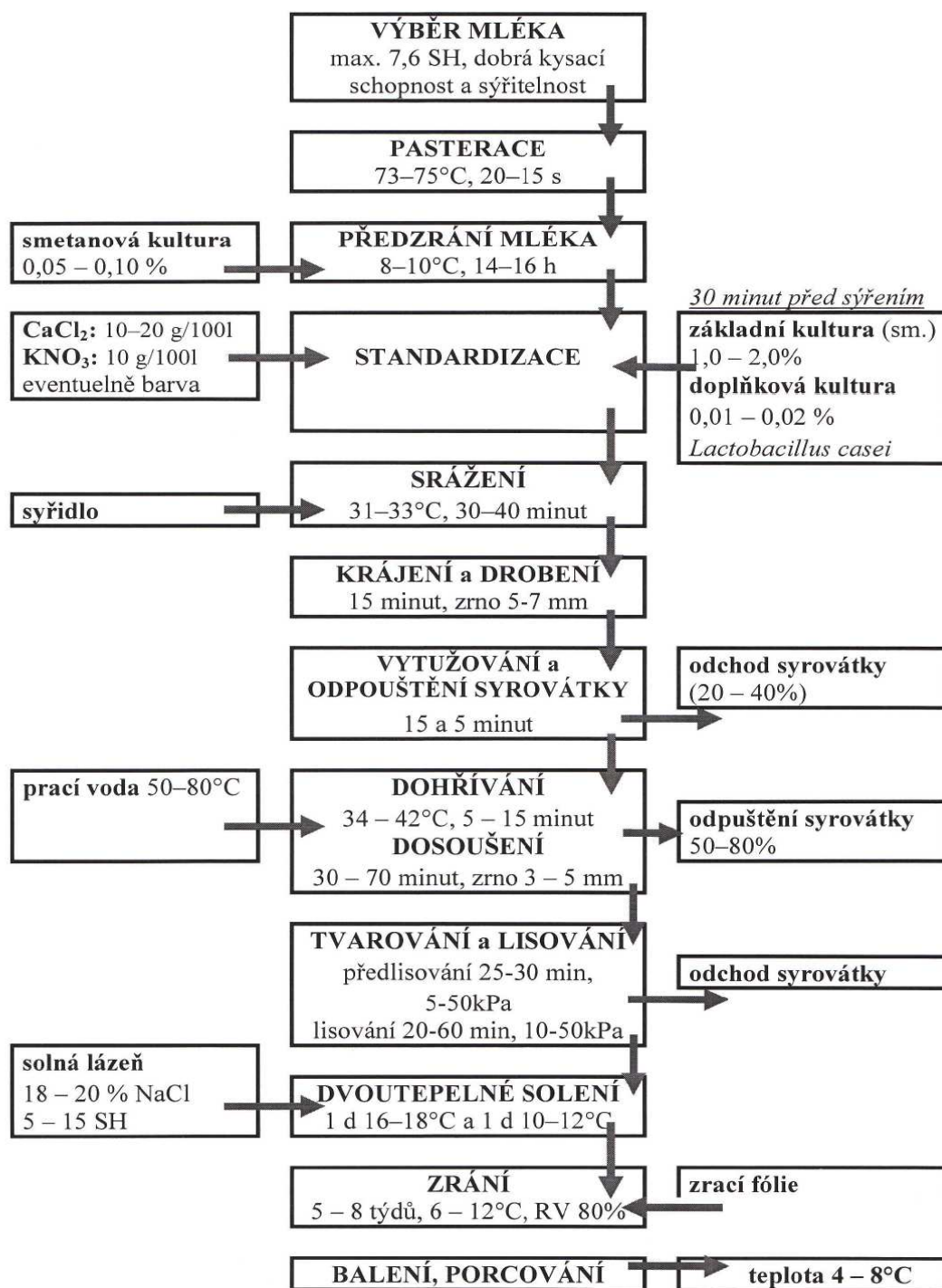
Příloha V: Stupnice pro sensorické hodnocení sýrů eidamského typu

Příloha VI: Dotazník pro sensorické hodnocení sýrů eidamského typu

Příloha VII: Publikovaný článek v časopise *Potravinářstvo*, ročník 3, číslo 1, březen 2009, ISSN 1337-0960 (speciální číslo vědeckými články z VI. Vědecké konference „Bezpečnost a kontrola potravin“ 1. – 2. 4. 2009, Nitra (SK))

PŘÍLOHA I: OBECNÉ SCHÉMA VÝROBY SÝRŮ S NÍZKODOHŘÍVANOU SÝŘENINOU

Výroba sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou



PŘÍLOHA II: OBRÁZKY VYBRANÝCH DRUHŮ SÝRŮ

Měkké sýry



sýr Niva (sýr s plísní v těstě)



*sýr Camembert
(sýr s plísní na povrchu)*

Polotvrdé a tvrdé sýry



*sýr Eidam
(sýr s nízkodohřívanou sýřeninou,
eidamského typu)*



*sýr čedar
(sýr s nízkodohřívanou sýřeninou,
mletá sýřenina)*



*sýr Ementál
(sýr s vysokodohřívanou sýřeninou, ementálského typu)*

PŘÍLOHA III: ROZTOKY PRO SDS-PAGE

Pro SDS-PAGE je nutno připravit roztoky:

Tris pufr pro separační gel – pH 8,8:

Tris (SERVA) 18,15 g

Deinizovaná voda 50 ml

Pomocí koncentrovaná HCl (Lach-Ner) je třeba upravit pH na požadovanou hodnotu 8,8 a poté doplnit deionizovanou vodou do 100 ml a následně uchovávat při teplotě +4 °C.

Tris pufr pro koncentrační gel – pH 6,8:

Tris (SERVA) 6,0 g

Deinizovaná voda 50 ml

Pomocí koncentrovaná HCl (Lach-Ner) je třeba upravit pH na požadovanou hodnotu 6,8 a poté doplnit deionizovanou vodou do 100 ml a následně uchovávat při teplotě +4 °C.

30% roztok akrylamidu – 2,67% C:

Akrylamid (SERVA) 29,2 g

N,N'- metylen-bisakrylamid (SERVA) 0,8 g

Doplnit neionizovanou vodou do 100 ml a uchovávat při teplotě +4 °C v tmavé láhvi.

Vzorkový pufr – 0,062 M Tris-HCl, 5% merkptoetanol, 10% glycerol:

Tris-HCl (SERVA) 0,0977 g

Merkptoetanol (SERVA) 0,5 g

Glycerol (Lach-Ner) 1,0 g

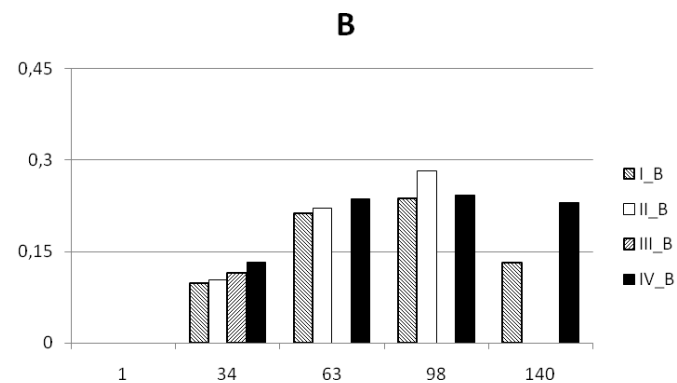
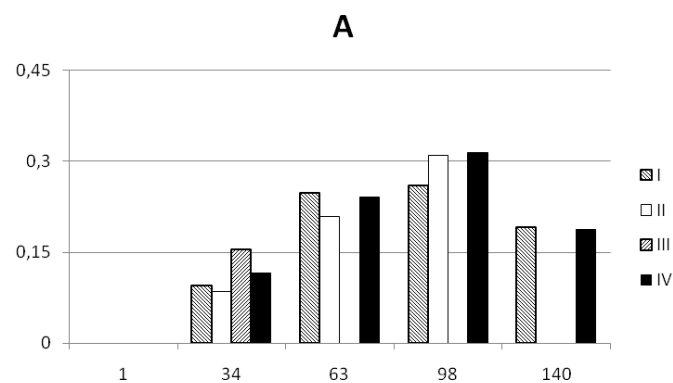
Bromfenolová modř (SERVA) 0,01 g

Upravit pH na hodnotu 6,8 a doplnit do 10 ml neionizovanou vodou [49].

Elektrodový pufr dle Laemliho 10x koncentrovaný (SERVA) – před použitím zředěn deionizovanou vodou v poměru 1:9

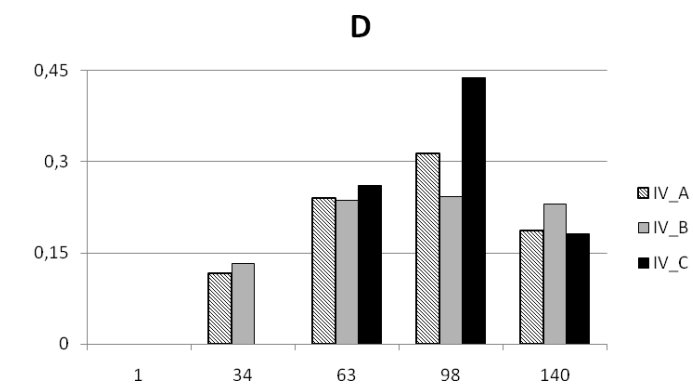
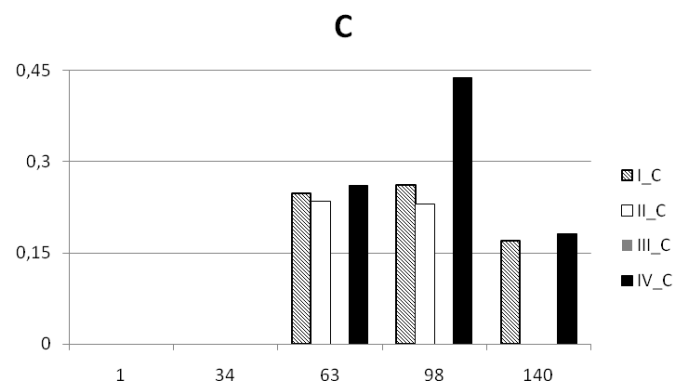
PŘÍLOHA IV: GRAFICKÉ VYJÁDRĚNÍ PRŮBĚHU DISTRIBUCE JEDNOTLIVÝCH AMINOKYSELIN V PRŮBĚHU ZRÁNÍ

Treonin



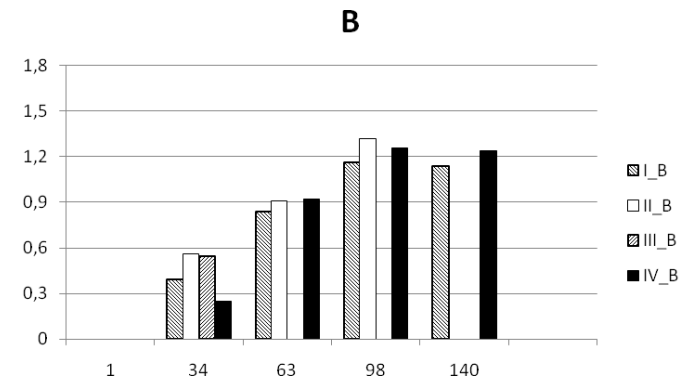
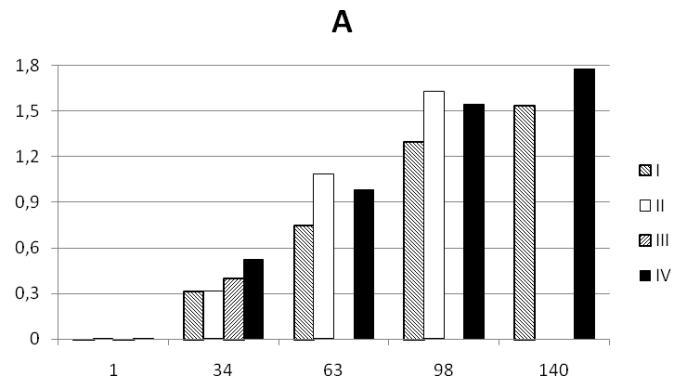
obsah AMK

[g/kg]



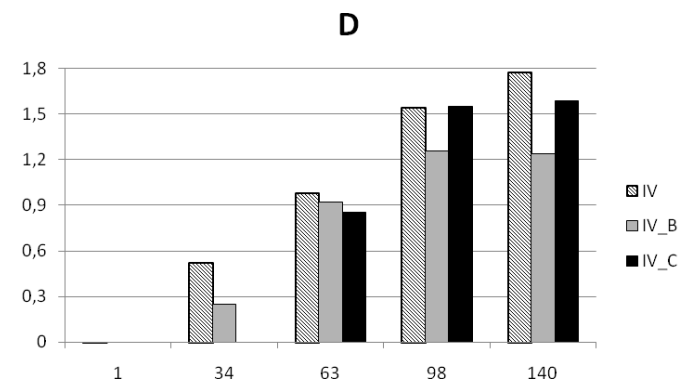
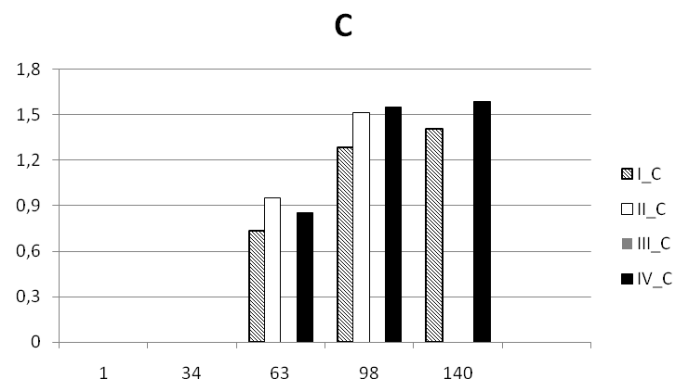
doba zrání [dny]

Kyselina glutamová



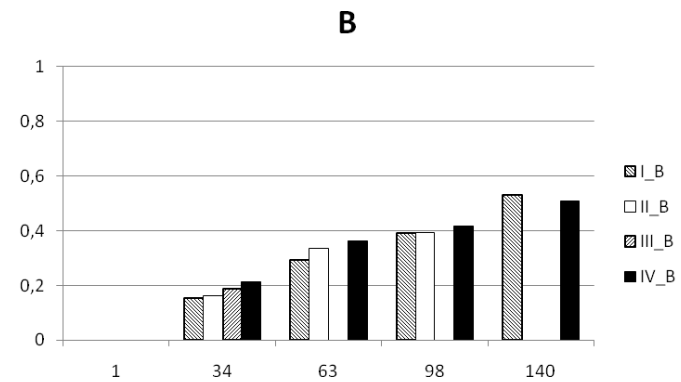
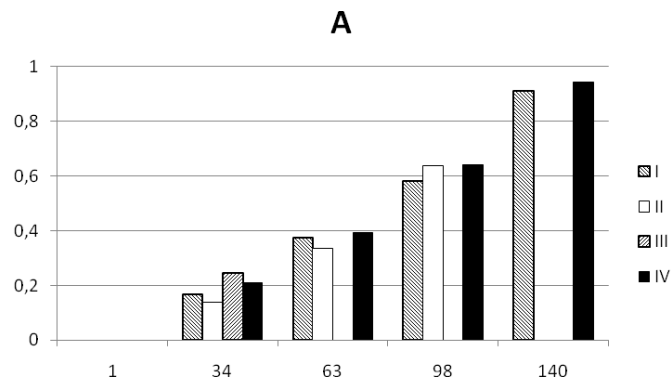
obsah AMK

[g/kg]



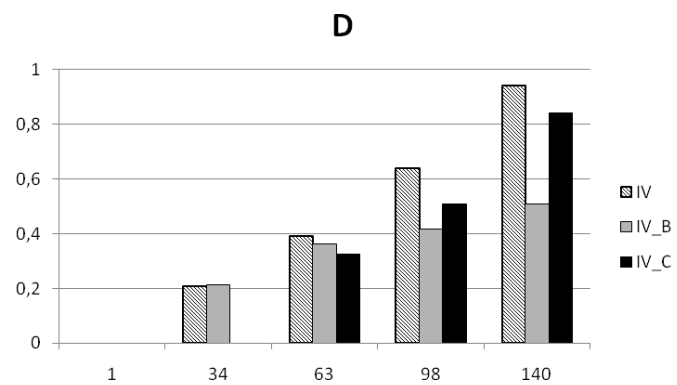
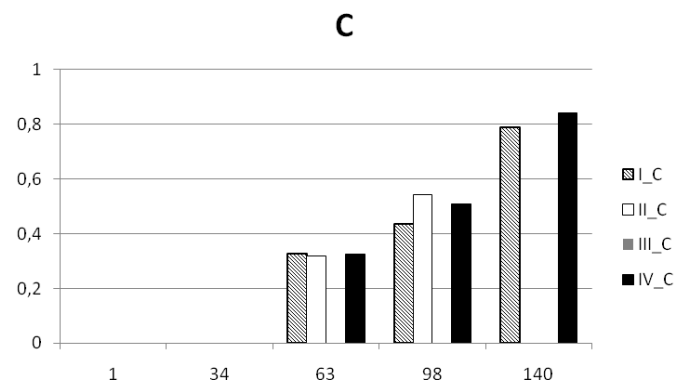
doba zrání [dny]

Prolin



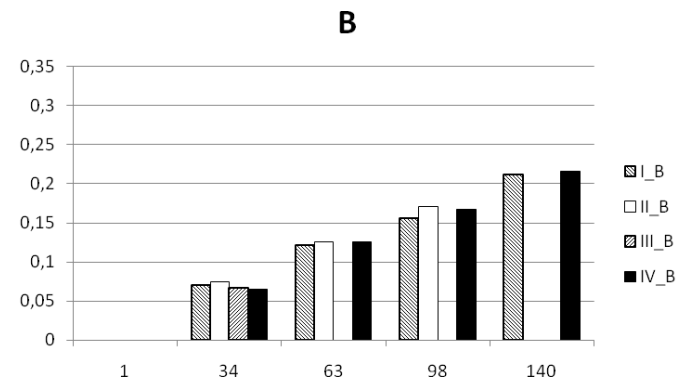
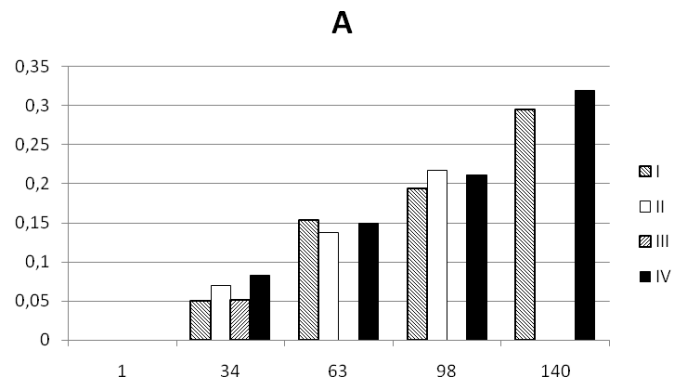
obsah AMK

[g/kg]



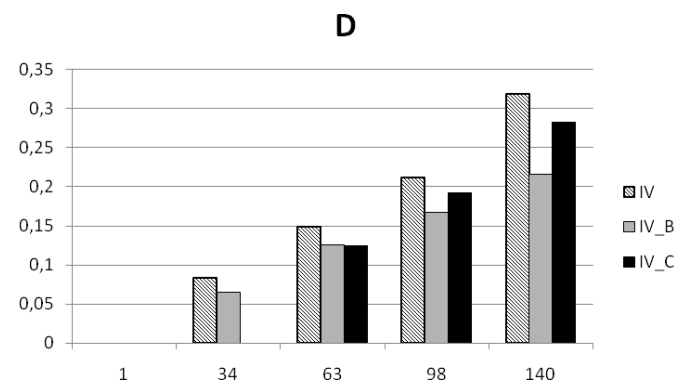
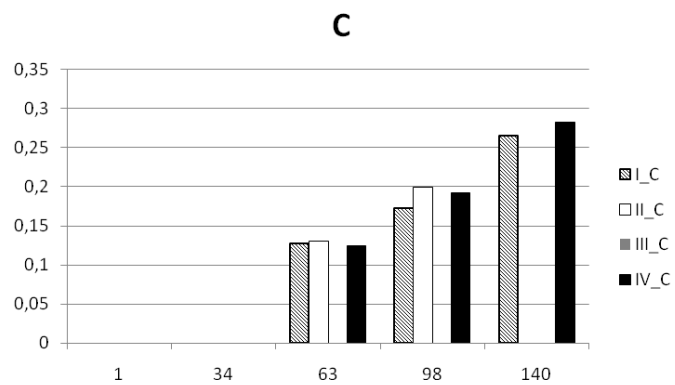
doba zrání [dny]

Glycin



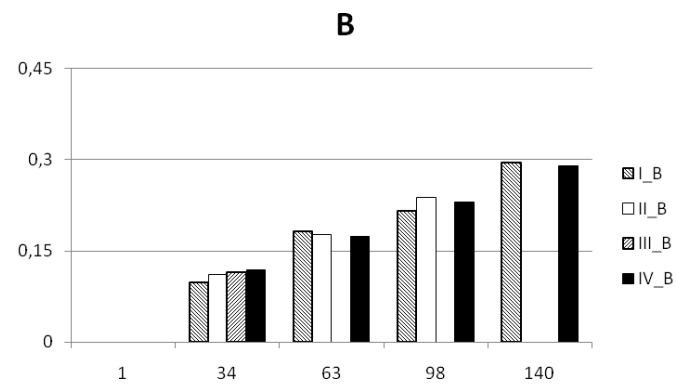
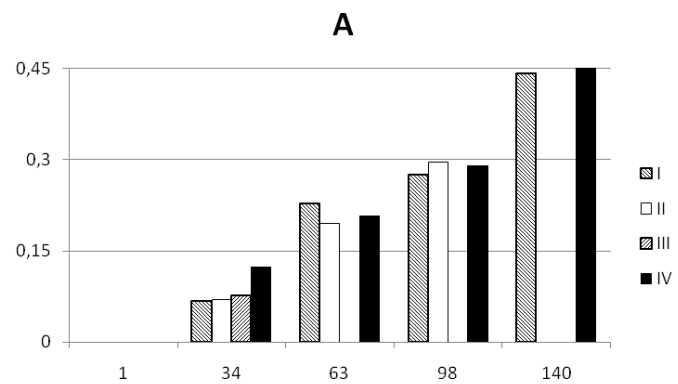
obsah AMK

[g/kg]



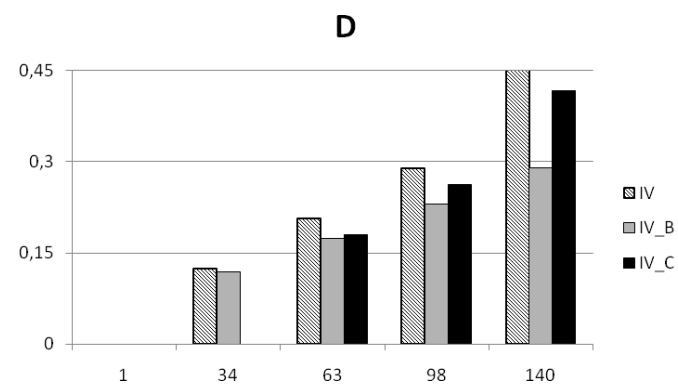
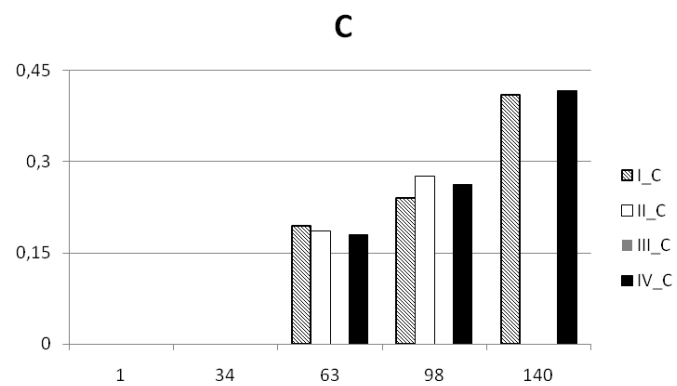
doba zrání [dny]

Alanin



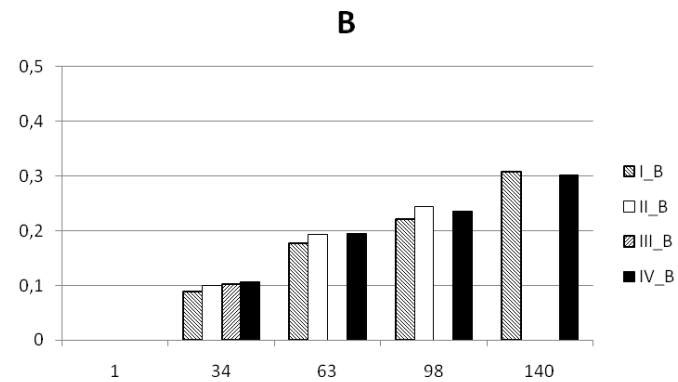
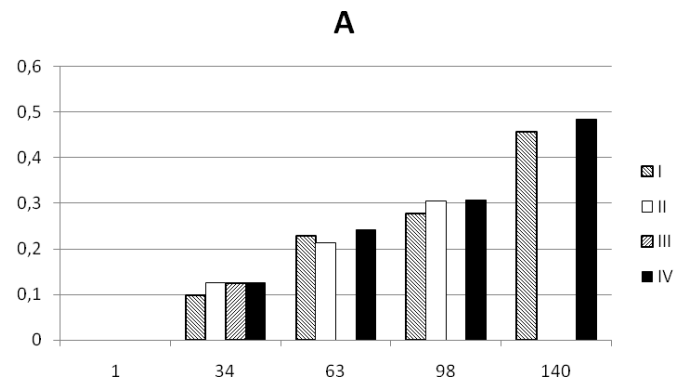
obsah AMK

[g/kg]



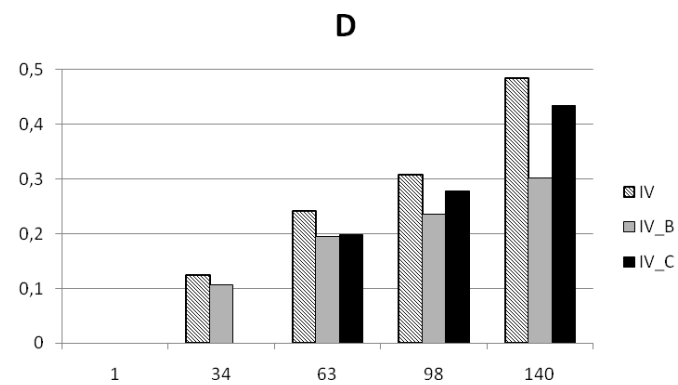
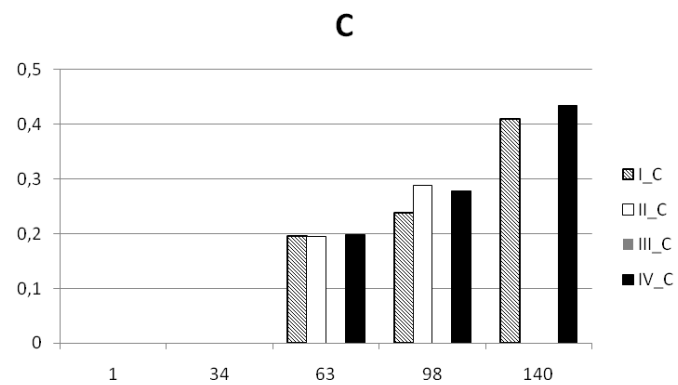
doba zrání [dny]

Methionin



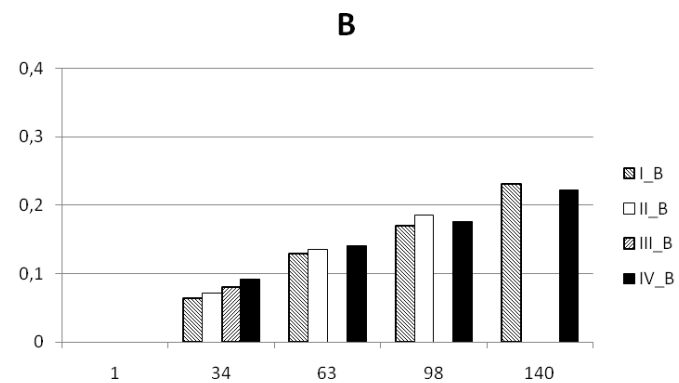
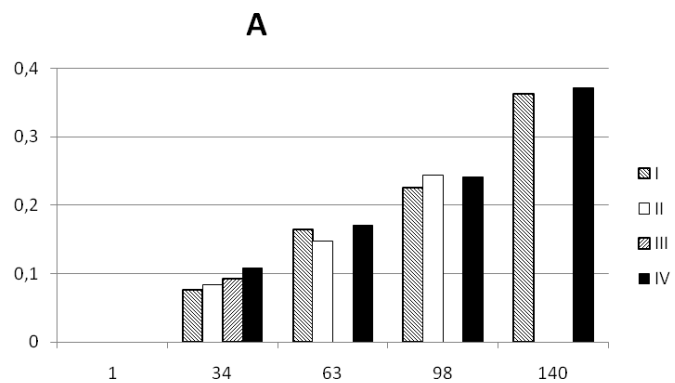
obsah AMK

[g/kg]



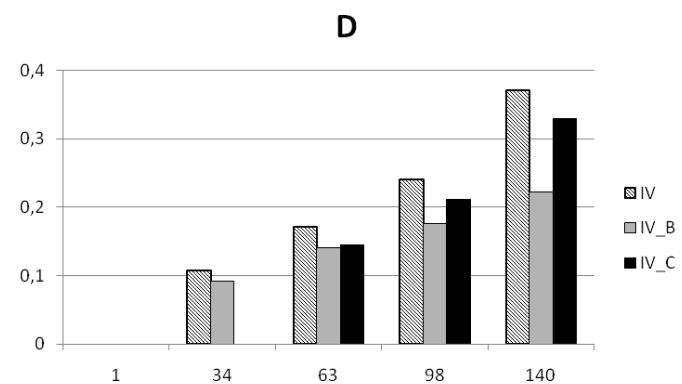
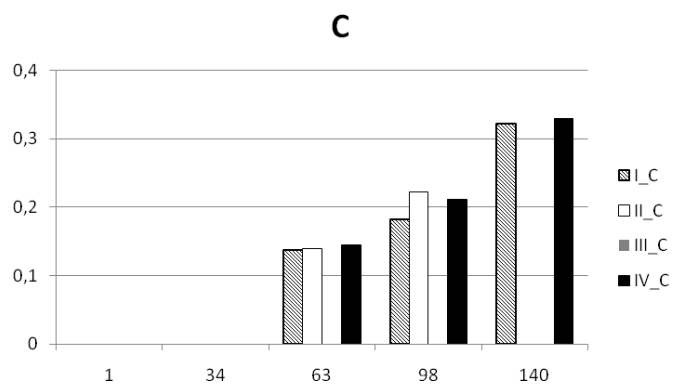
doba zrání [dny]

Izoleucin



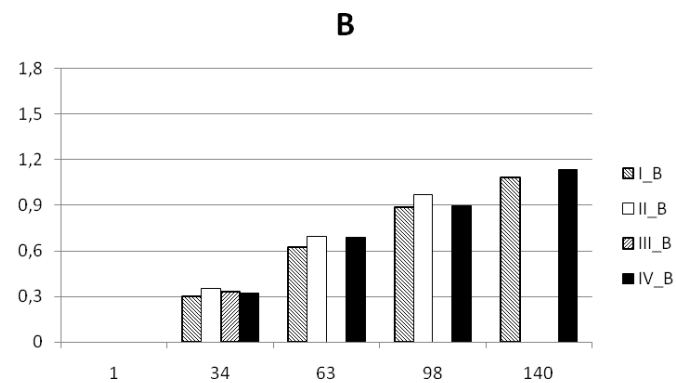
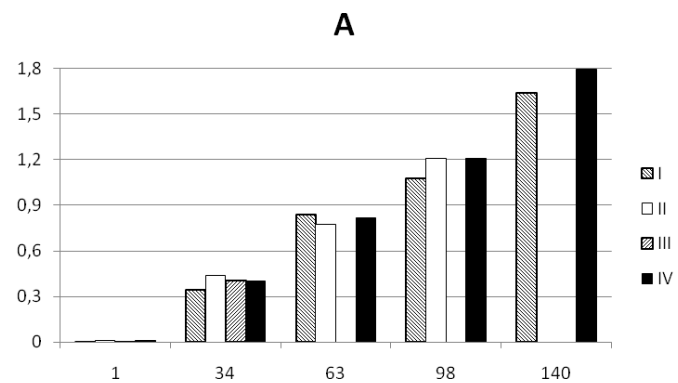
obsah AMK

[g/kg]



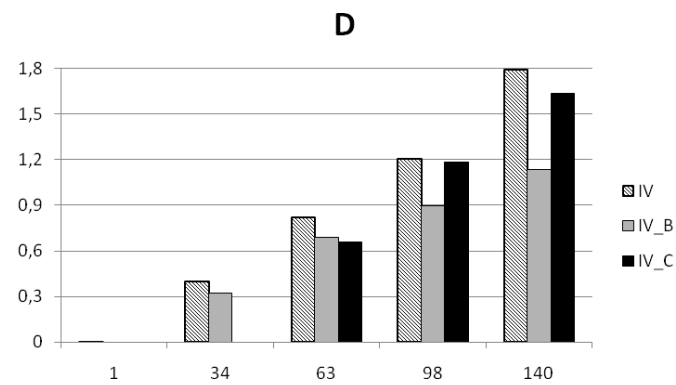
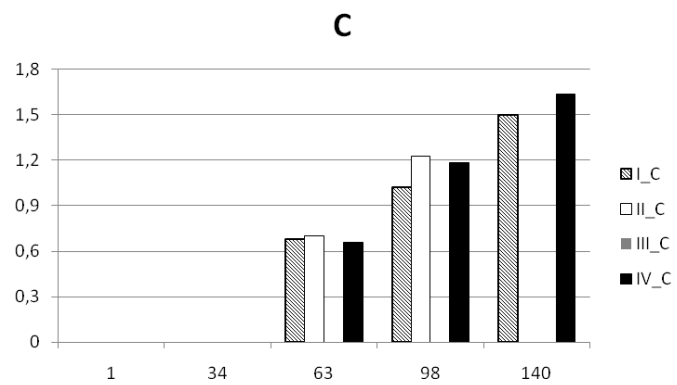
doba zrání [dny]

Fenylalanin



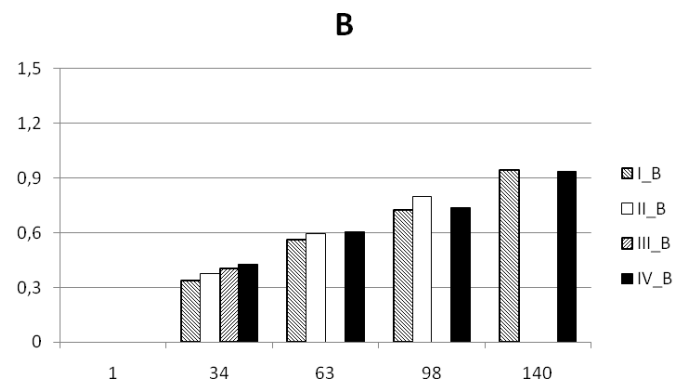
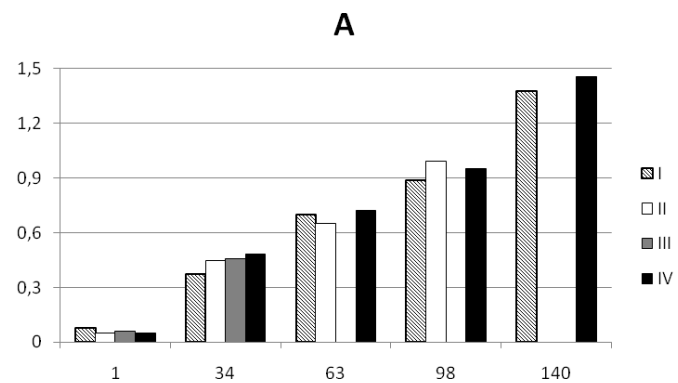
obsah AMK

[g/kg]



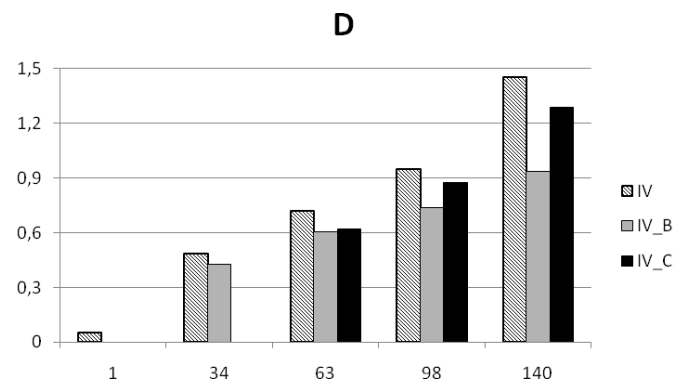
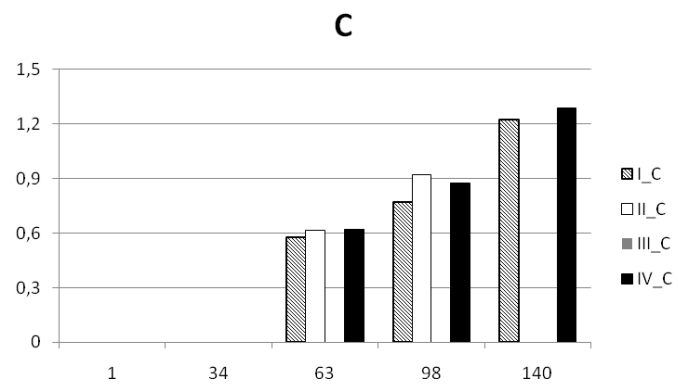
doba zrání [dny]

Lyzin



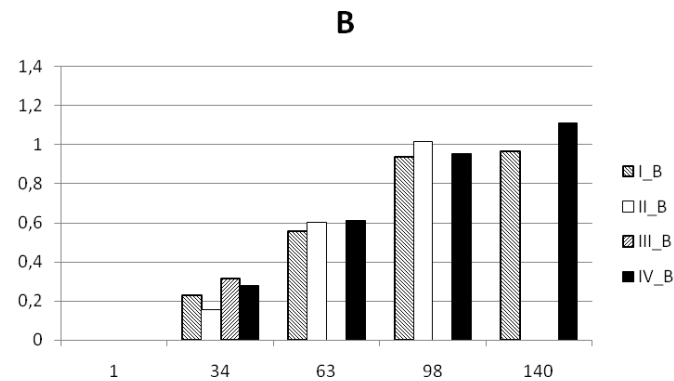
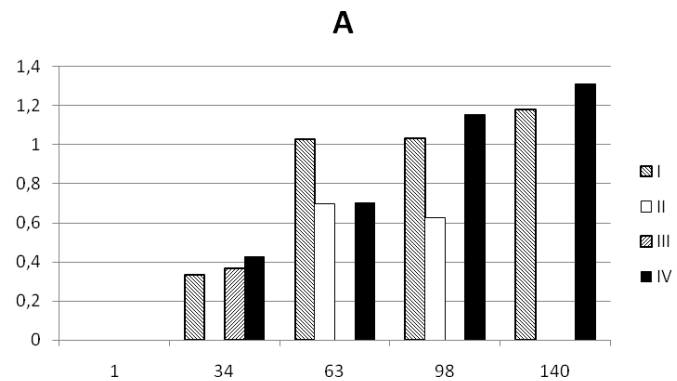
obsah AMK

[g/kg]



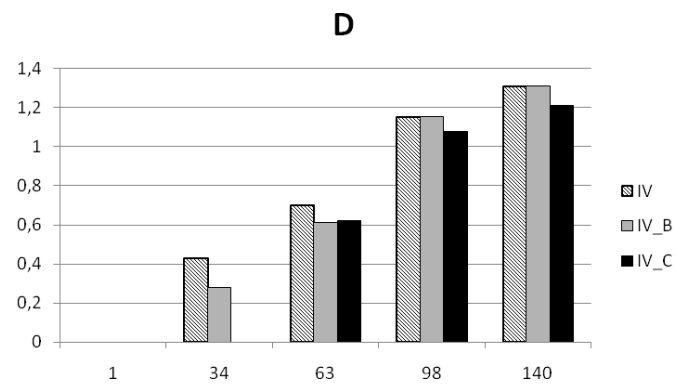
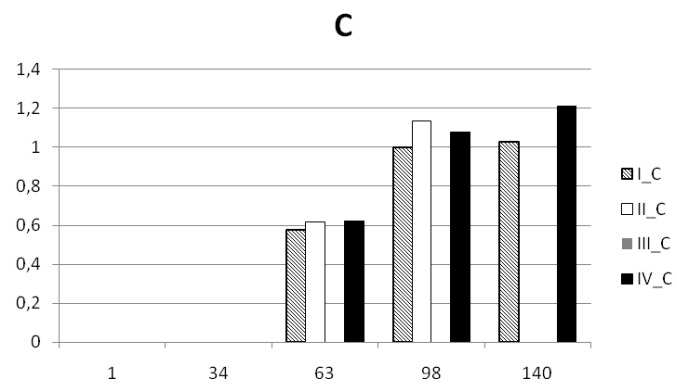
doba zrání [dny]

Glutamin



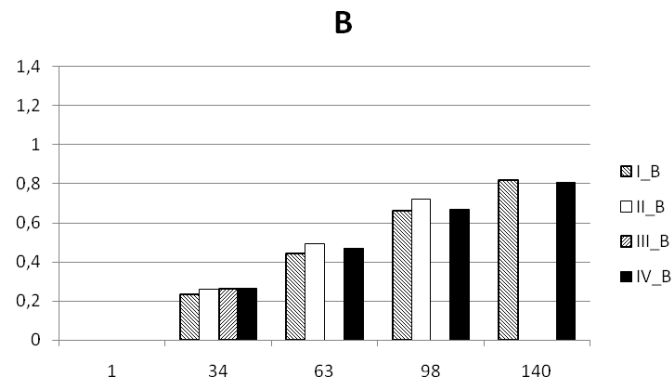
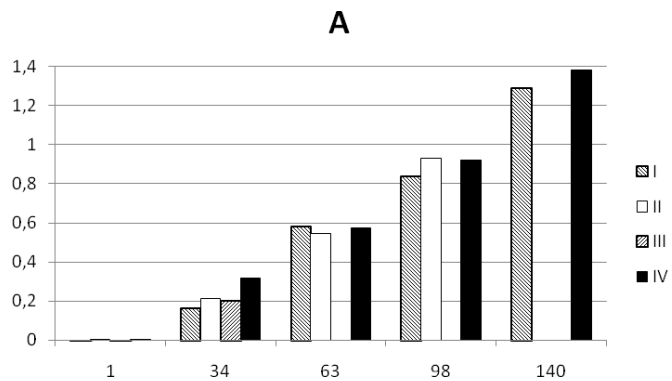
obsah AMK

[g/kg]



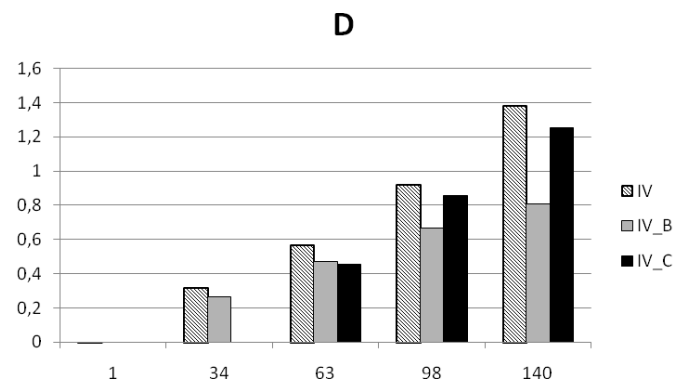
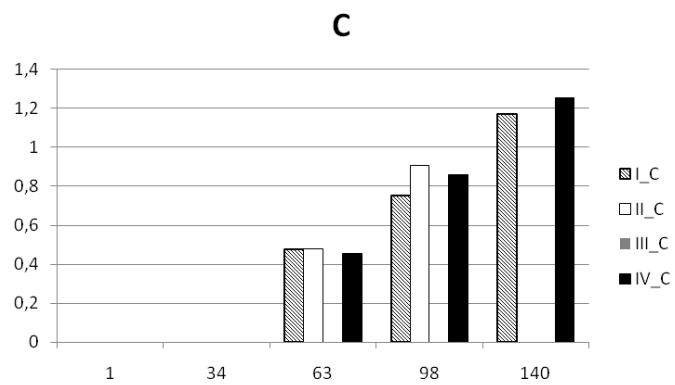
doba zrání [dny]

Valin



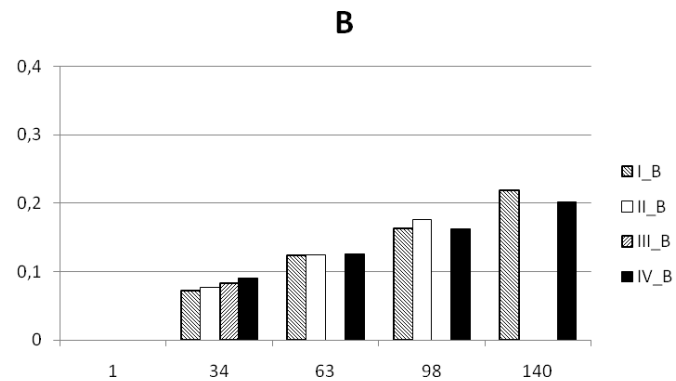
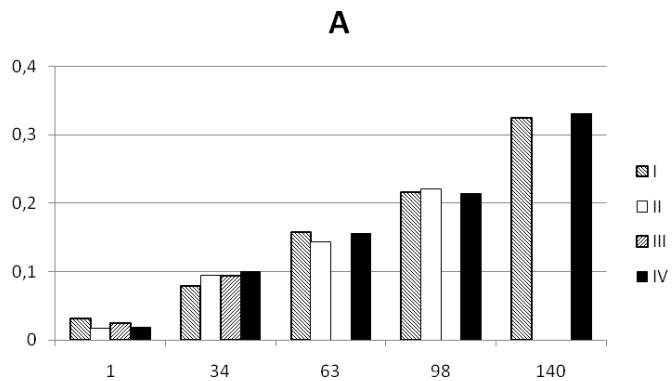
obsah AMK

[g/kg]



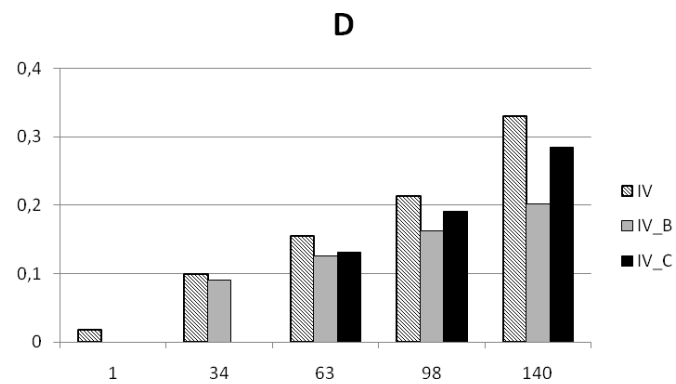
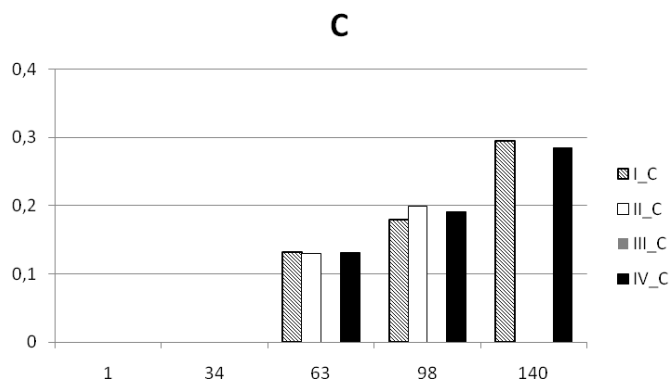
doba zrání [dny]

Histidin



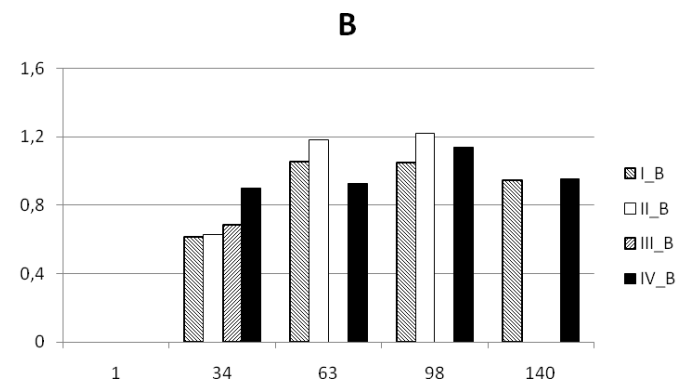
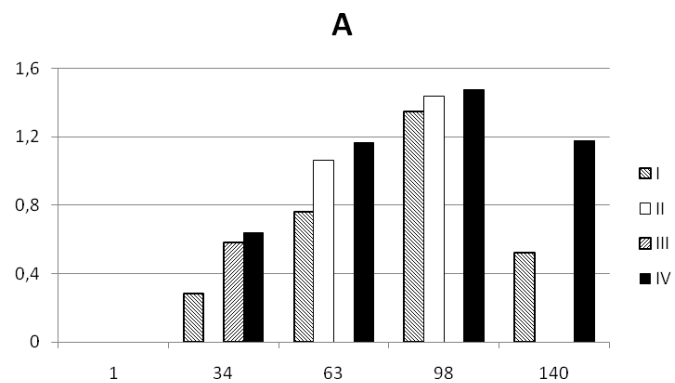
obsah AMK

[g/kg]



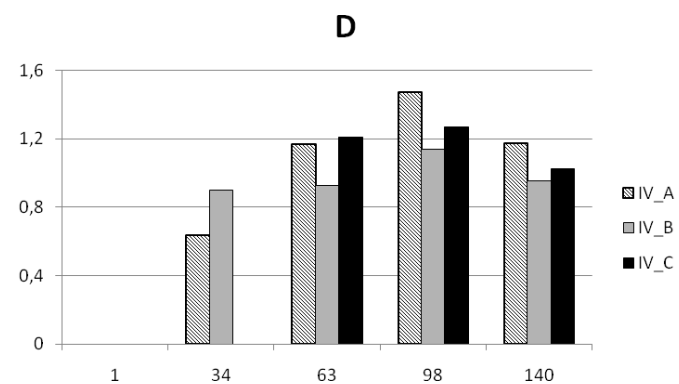
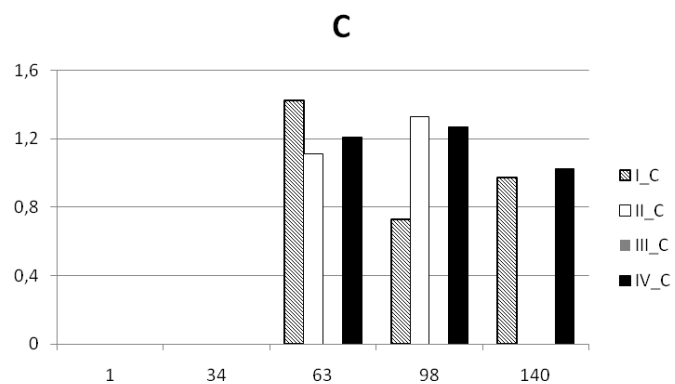
doba zrání [dny]

Kyselina asparagová



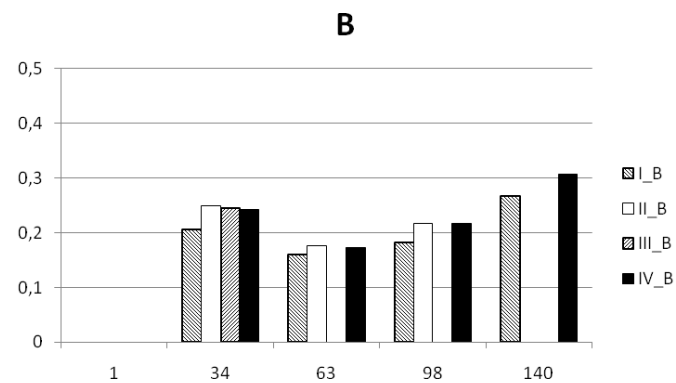
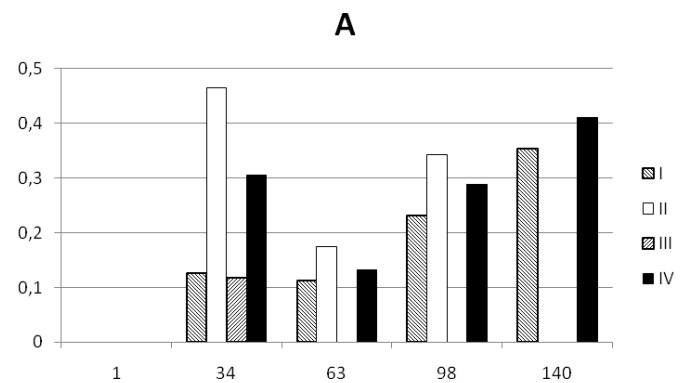
obsah AMK

[g/kg]



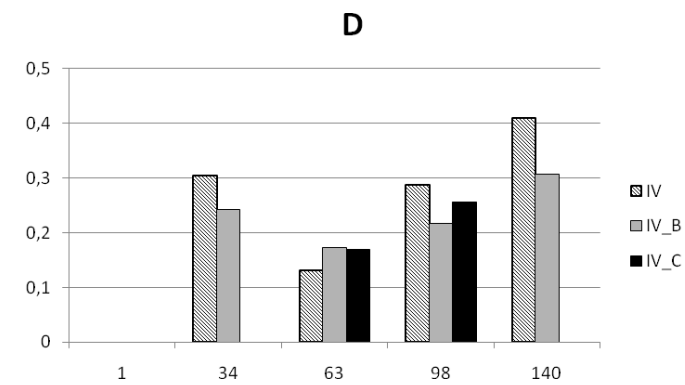
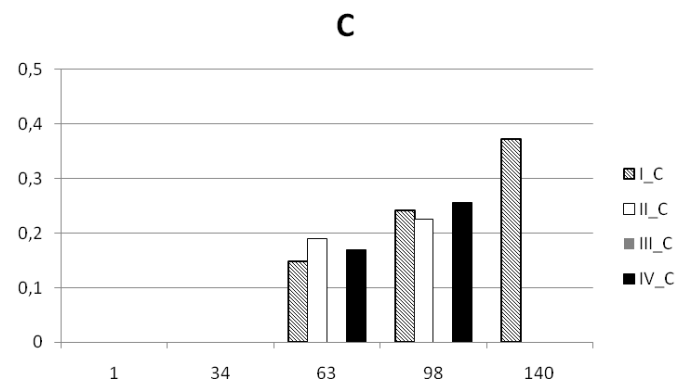
doba zrání [dny]

Serin



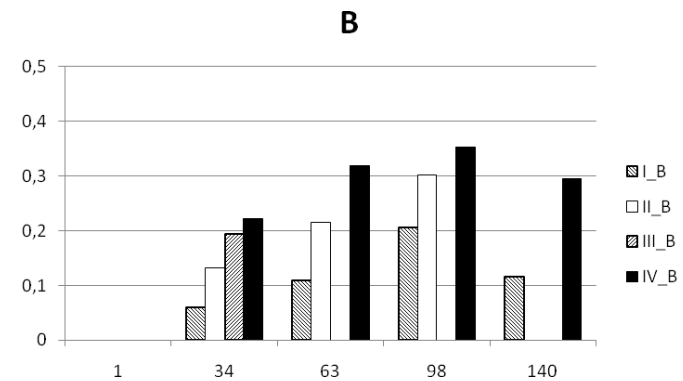
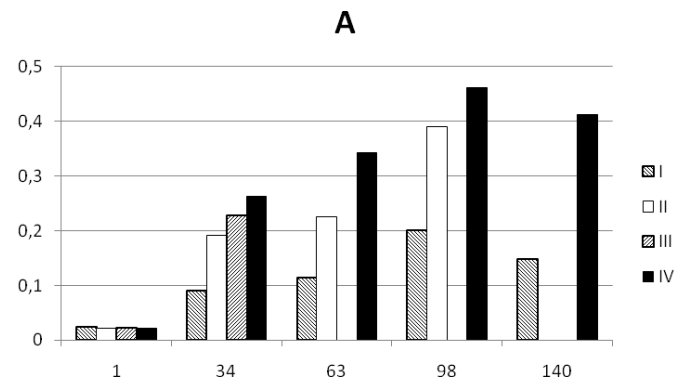
obsah AMK

[g/kg]



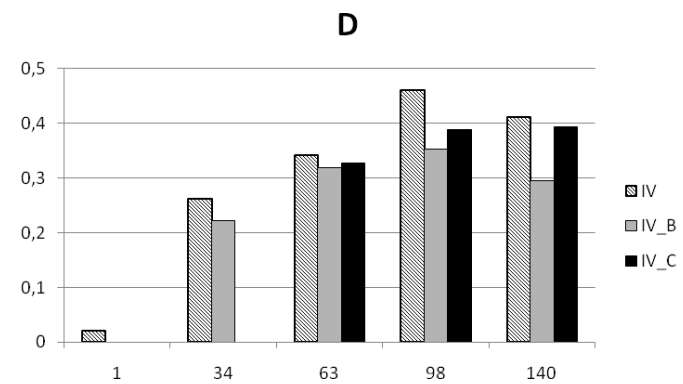
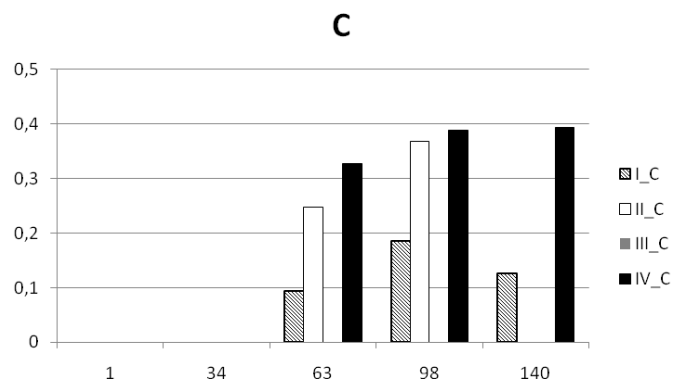
doba zrání [dny]

Tyrozín



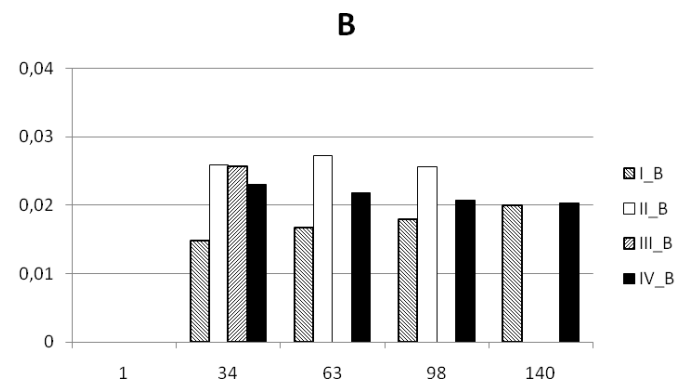
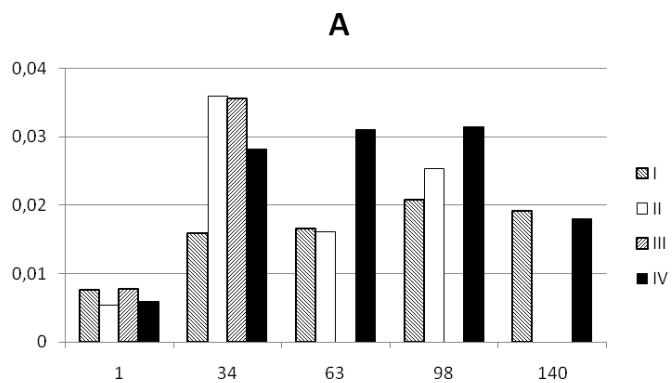
obsah AMK

[g/kg]



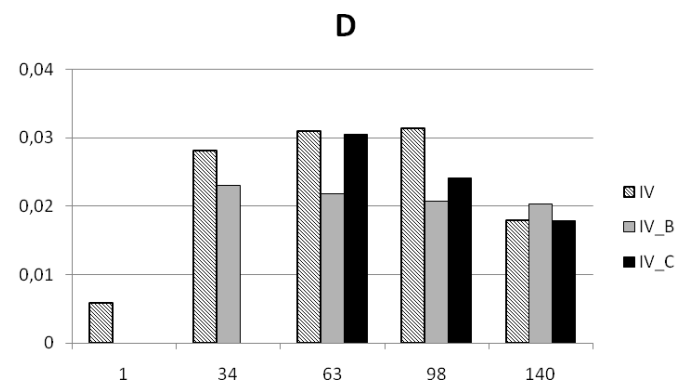
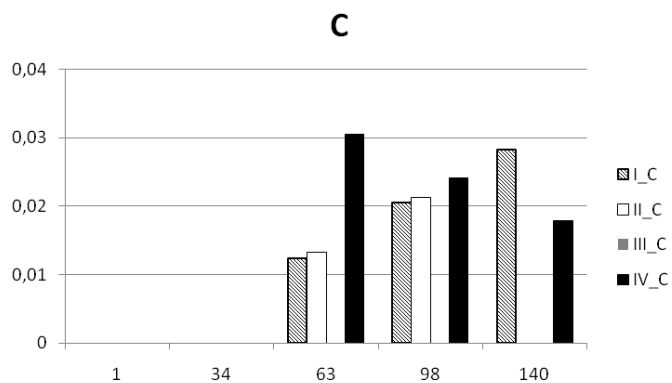
doba zrání [dny]

Arginin



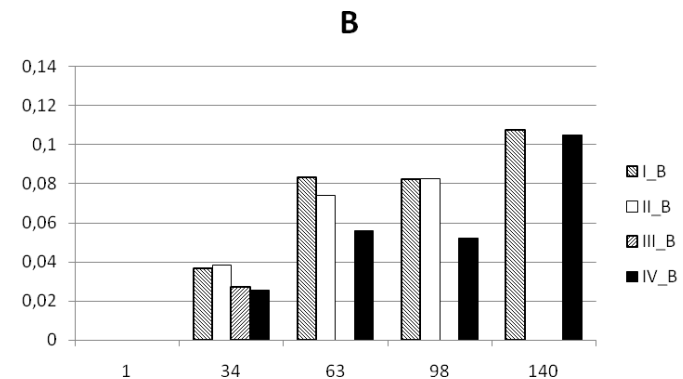
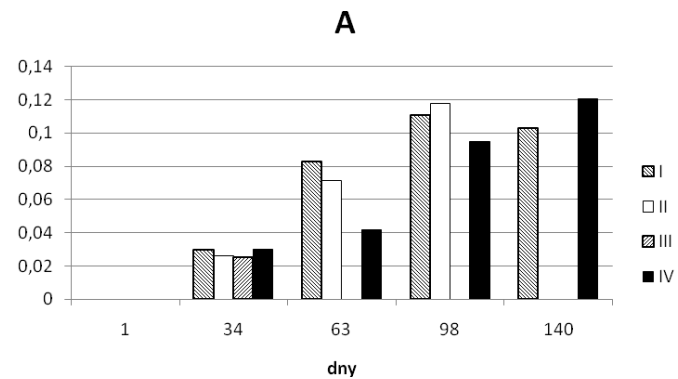
obsah AMK

[g/kg]



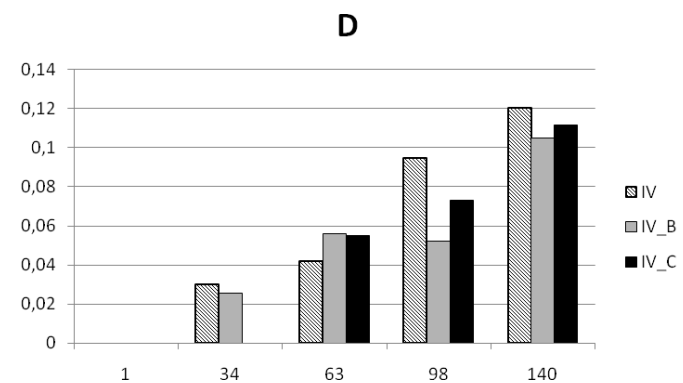
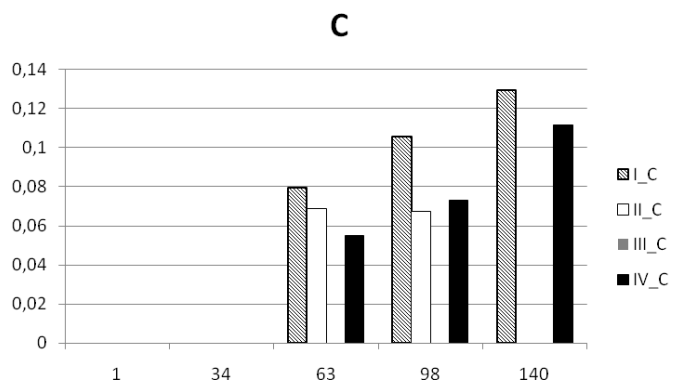
doba zrání [dny]

Citrulin



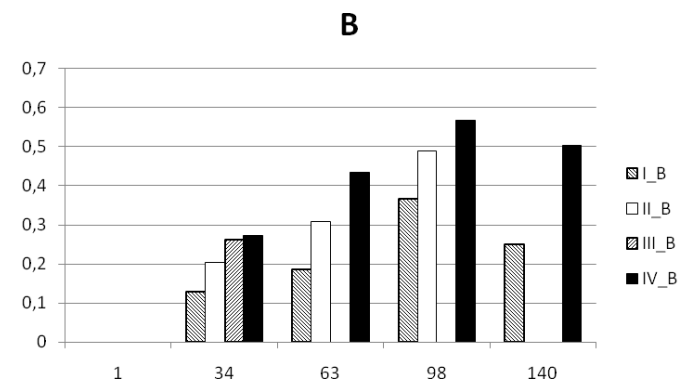
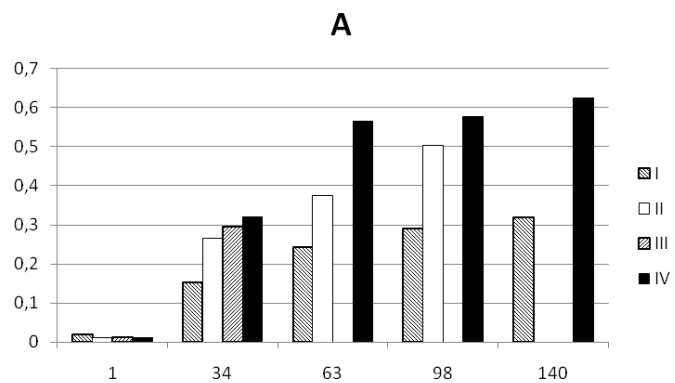
obsah AMK

[g/kg]



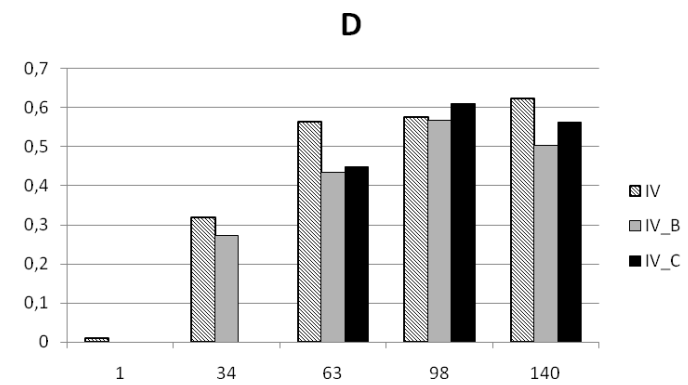
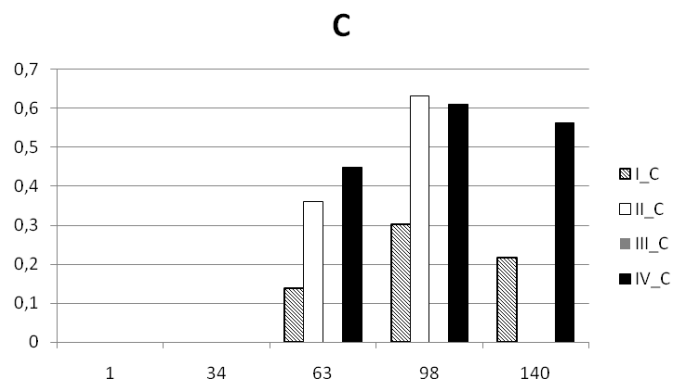
doba zrání [dny]

Ornitin



obsah AMK

[g/kg]



doba zrání [dny]

PŘÍLOHA V: STUPNICE PRO SENZORICKÉ HODNOCENÍ SÝRŮ EIDAMSKÉHO TYPU

Vzhled a barva

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

Konzistence

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

Chut' a vůně

1. **Vynikající** – chuť čistá, typická pro eidamské sýry, jemně mléčná nakyslá, nebo nasládlá, výrazná a plná v důsledku hlubokého prozráním syra, harmonická. Vůně charakteristická, čistá bez jakýchkoliv cizích pachů.
2. **Výborná** – čistá, harmonická, mléčná nakyslá, nebo hořko mandlová po použitých kulturách, stále výrazná a typická v důsledku odpovídajícího prozráním syra. Vůně stále čistá a harmonická.

3. **Velmi dobrá** – vůně čistá, harmonická, chuť s přípustnými mírnými odchylkami v harmonii, např. hořko mandlová, mírně slanější nebo kyselejší.
4. **Dobrá** – stále typická pro eidamské sýry, možné odchylky hořkosti, slanosti nebo kyselosti.
5. **Méně dobrá** – chuť méně harmonická. Výrazně převládá některý z hodnocených deskriptorů vůně např. kyselost, hořkost, cizí příchut', slanost apod. Ve vůni se vyskytují cizí přípachy.
6. **Vyhovující** – chuť neharmonická. Ve vůni se můžou vyskytují přijatelné cizí přípachy (nečistá, netypická, cizí, sladová, nažluklá, nasládlá po duření).
7. **Nevyhovující** – hořká, pálivá, ostře kyselá, zatuchlá, plesnivá, žluklá, hnilobná, nepříjemná cizí chuť po chemikáliích. Ve vůni výrazně nepříjemné cizí přípachy, po chemikáliích, hnilobné, zatuchlé, žluklé apod.

Tuhost

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

Cizí pachuti

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

PŘÍLOHA VI: DOTAZNÍK PRO SENZORICKÉ HODNOCENÍ SÝRŮ EIDAMSKÉHO TYPU

Protokol pro sensorické hodnocení přírodních sýrů holandského (eidamského) typu

Datum:

Čas:

Jméno:

Senzorické hodnocení s použitím stupnic

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

Pořadová zkouška

Porovnejte vzorky sýrů dle tuhosti (1 – nejtušší; 3 – nejměkčí)

Vzorek	A	B	C
Tuhost			

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

Vzorek	A	B	C
Preference			

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

Vzorek	A	B	C
Intenzita chuti			

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

Vzorek	Pachut'
A	
B	
C	

**VLIV PRŮBĚHU ZRÁNÍ NA OBSAH
VYBRANÝCH SLOŽEK
V PŘÍRODNÍM SÝRU EIDAMSKÉHO
TYPU**

**THE EFFECT OF RIPENING
CONDITIONS ON THE
COMPOSITION OF DUTCH-TYPE
CHEESE**

*Vendula Pachlová, František Buňka, Leona
Buňková, Eva Weiserová, Kristýna Hladká,
Petra Vojtišková, Stanislav Kráčmar*

ABSTRAKT

We investigated the effect of ripening conditions on the composition of Dutch-type cheese depending on storage temperature. Samples of cheese were stored at different temperatures. Protein profile, pH, content of dry matter, fat, total protein, NaCl and free amino acid was observed. The effect of storage temperature on proteolysis was evident.

Keywords: nature cheese, SDS-PAGE, free amino acid (FAA), proteolysis

ÚVOD

Přírodní sýry patří v Evropě k nejvíce konzumovaným mléčným výrobkům. Klíčovou částí produkce těchto

výrobků je jejich zrání probíhající zpravidla v tzv. zrácích sklepích. Zrání sýrů zahrnuje mikrobiologické, resp. biochemické změny podmiňující vývoj aroma a textury charakteristické pro určitý typ přírodního sýra. Biochemické reakce probíhající během zrání přírodních sýrů je možné rozdělit na primární a sekundární procesy. K primárním procesům řadíme přeměnu laktózy, proteolýzu a lipolýzu. Sekundární procesy zahrnují reakce, při kterých jsou zejména volné aminokyseliny a volné mastné kyseliny přeměňovány na těkavé složky aroma. Jedná se například o procesy deaminace, dekarboxylace, transaminace, eliminace, desulfurace aj. (McSweeney & Sousa, 1998; McSweeney, 2004).

U většiny přírodních sýrů patří proteolytické reakce k nejrozsáhlejším. Činností proteáz a endopeptidáz vznikají zejména velké polypeptidy a středně dlouhé peptidy, popř. také kratší peptidy. V proteolýze přírodních sýrů jsou dále aktivní exopeptidázy, tripeptidázy a dipeptidázy, jejichž hlavním produktem jsou volné aminokyseliny, které jsou zdrojem výživy bakterií mléčného kvašení (Fox et al. 2000). Koncentrace volných aminokyselin obecně s délkou zrání stoupá (McSweeney & Sousa, 1998).

Malé peptidy a aminokyseliny přímo přispívají k chuti a vůni jejich přeměnou na další látky jako jsou alkoholy, aminy, karboxylové kyseliny, estery, karbonylové sloučeniny a sloučeniny obsahující síru. Procesy přeměny volných aminokyselin a volných mastných kyselin se dějí prostřednictvím několika metabolických drah, kde spolupůsobí celá řada enzymatických systémů (Broome & Limsowtin 1998; Smit et al. 2005; McSweeney et al.,

2006). Během tzv. sekundárních procesů mohou kromě sensoricky aktivních látek vznikat i „netradiční aminokyseliny“, které se nenacházejí v kaseinovém komplexu, příkladem může být γ -aminomáselná kyselina (Nhuch et al., 2008).

Během zrání přírodních sýrů se však mohou vyskytnout i sensorické vady, typickým příkladem je hořkost sýrů. Jedná se zpravidla o peptidy s 2 – 25 aminokyselinami s převážně hydrofobním charakterem. Tyto sekvence existují v kaseinovém komplexu a při jejich odštěpení z příslušné kaseinové frakce se projeví jejich hořkost. Tyto proteolytické reakce mohou být katalyzovány zbytkovou činností syřidla nebo specifickými enzymy starterových, popř. nestarterových mikroorganismů. V některých případech se počáteční hořkost přírodních sýrů při dalším zrání „ztratí“. Důvodem je následná proteolýza, kdy hořké peptidy jsou dále degradovány na menší peptidy, popř. aminokyseliny, které již hořkou chuť nemusí vykazovat (McSweeney & Sousa 1998; McSweeney, 2004).

Intenzita proteolytických změn závisí na celé řadě faktorů, kde důležité místo zaujímá i délka zrání, která se u jednotlivých přírodních sýrů liší, například mozzarella (2-3 týdny), sýry s plísňí v těstě (několik týdnů), sýry eidamského typu (6 – 12 týdnů), sýry ementálského typu (několik měsíců), Parmigiano-Reggiano, čedar (až několik let). Jelikož dlouhá doba zrání zvyšuje náklady na výrobu jednotlivých přírodních sýrů, je snahou výrobců tuto dobu minimalizovat. Může tak dojít k situaci, kdy je spotřebiteli prodán výrobek, který nedosáhl optimálního prozrání a byl do spotřební sítě dodán předčasně. Distribuční síť a konzumenti již však zpravidla nedisponují vhodným skladovacími prostory, kde by příslušné přírodní sýry mohly „dozrát“.

Cílem práce bylo porovnat vliv rozdílného průběhu zrání a skladování na markery zracího procesu přírodního sýra eidamského typu.

MATERIÁL A METODY

Vzorky eidamské cihly (30 % w/w tuku v sušině) byly získány jako část standardní výroby z mlékárny Kromilk, s.r.o. Kroměříž. Eidamské cihly (1,23-1,46 kg) byly po uzavření do cryovacového obalu uloženy do zracího sklepa s teplotou 10 ± 2 °C. Po 23 dnech (od počátku výroby) byla část cihel přemístěna ze sklepa do lednice (4 ± 2 °C), kde probíhalo další skladování. Po 38 dnech zrání (od počátku výroby) byla do lednice přemístěna další část cihel. Poslední část cihel zůstala po celou dobu pokusu ve zracím sklepe (celkem 98 dnů). Odběry vzorků ze sklepa (a později i z lednice) byly realizovány v 1., 2., 3., 4., 7., 10., 13., 16., 20., 23., 27., 34., 38., 43., 49., 56., 63., 70., 84. a 98. dnu od počátku výroby (v den 1 byly sýry vyrobeny, vylišovány a uloženy do solné lázně, v den 2 byly sýry vyjmuty ze solné lázně, zabaleny a uloženy do zracího sklepa). Z každé odebrané cihly (ze zracího sklepa i lednice) byl vykrojen středový útvar vymezený 3,5 cm od vnějších okrajů příčného řezu, o výšce 2 cm (střed podélného řezu).

Odebrané vzorky byly podrobeny analýze obsahu sušiny, tuku, hrubé bílkoviny, NaCl, pH a dále obsahu volných aminokyselin a proteinovému profilu. Obsah sušiny byl určen gravimetricky podle ČSN EN ISO 5534, obsah tuku byl stanoven acidobutyrometricky podle van Gulika, pH bylo zjištěno pomocí pH-metru (Gryf 208 L, Havlíčkův

Brod, ČR) se skleněnou elektrodou (THETA 90 HC 113, Havlíčkův Brod, ČR), hrubá bílkovina ($N \times 6,38$) metodou dle Kjeldahla a obsah NaCl podle Indra, Mizera (1992). Obsah volných aminokyselin byl stanoven iontovým výměnnou kapalinovou chromatografií (AAA 400, Ingos, ČR) pomocí systému litnocitrátových elučních pufrů, ninhydrinové postkolonové derivatizace a spektrofotometrické detekce. Proteinový profil byl získán pomocí denaturační polyakrylamidové elektroforézy (SDS-PAGE). Vzorky byly připraveny podle Bütikofer et al. (1993). Vlastní elektroforetická separace byla provedena pomocí polyakrylamidového gelu (15 % w/v). Gel a systém pufrů byly připraveny podle metodiky Laemmli (1970).

Výsledky byly vyhodnoceny Kruskal-Wallisovým testem a Wilcoxonovým testem, v případě proteinového profilu shlukovou analýzou. K výpočtům byl využit program Unistat verze 5.5.

VÝSLEDKY A DISKUZE

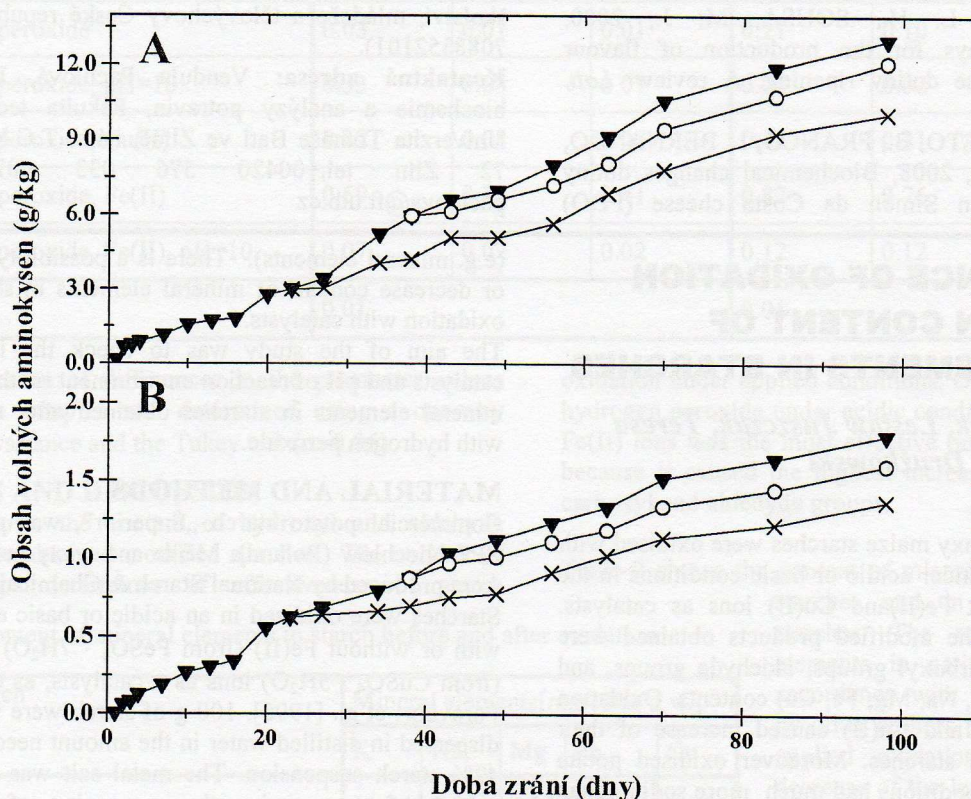
Během zracího, resp. skladovacího procesu byly sledovány jednotlivé markery zrání. Účelem práce bylo poukázat na možnou odlišnost obsahových složek přírodního sýra v případě, že optimální zrací proces je předčasně ukončen a sýr je dále skladován za chladírenských teplot.

Obsah sušiny byl bezprostředně po vyjmutí ze solné lázně a zabalení $48,72 \pm 0,21$ % (w/w) a v průběhu téměř 100denního sledování se zvýšil na $51,64 \pm 0,08$ % (w/w), přičemž rozdílný průběh zrání a skladování neměl na tuto charakteristiku významný vliv. Obsah NaCl v analyzované části eidamských cihel v průběhu sledování všech tří variant narůstal z původních $0,11 \pm 0,01$ % (w/w) bezprostředně po vysolení na $1,90 \pm 0,02$ % (w/w) po 98 dnech sledování. Zvyšování obsahu NaCl odpovídá postupné difúzi soli z okrajových částí do středu sýra (Fox et al., 2000). Podstatná změna byla zaznamenána v případě stanovení pH. Po vysolení přírodních sýrů bylo pH $5,26 \pm 0,03$. Po počátečním mírném poklesu odpovídajícím rozkladu zbytků laktózy na kyselinu mléčnou, byl zaznamenán postupný nárůst pH (po 98 dnech se zvýšilo na $5,71 \pm 0,04$), což koresponduje s odbouráváním kyseliny mléčné bakteriemi mléčného kvašení (McSweeney, 2004). Nepřímým důkazem těchto reakcí je tvorba malých pravidelných ok zaznamenaných ve sledovaných vzorcích eidamské cihly. Obsah tuku ($15,00 \pm 0,41$ % w/w) a obsah hrubých bílkovin ($29,03 \pm 1,15$ % w/w) se v průběhu zrání prakticky neměnil.

Vývoj celkového obsahu volných aminokyselin ve vzorcích eidamských cihel v závislosti na průběhu zrání je uveden na obrázku 1 (část A). Je patrné, že po uložení sýrů do chladírenských podmínek sice obsah volných aminokyselin dále roste avšak pomaleji ve srovnání s výrobky uchovávanými ve zracím sklepe za optimálních podmínek. Z obrázku 1 dále vyplývá, že čím později je přírodní sýr přesunut do chladírenských podmínek, tím hlubší proteolýza proběhne. Zjištěné skutečnosti potvrzují, že pro správný průběh proteolýzy je zapotřebí optimálních teplotních podmínek (Fox et al., 2000; McSweeney, 2004). Rozdíl v proteolytických procesech u vzorků s různým průběhem zrání byl jednoznačně detekován i při analýze proteinového profilu metodou SDS-PAGE.

Obrázek 1

Vývoj sumárního obsahu volných aminokyselin (část A) a obsahu leucinu (část B) během 98denního sledování eidamských cihel: vzorky uložené po celou dobu ve zracím sklepě při $10 \pm 2^\circ\text{C}$ (\blacktriangledown), vzorky skladované od 23. dne v lednici při $4 \pm 2^\circ\text{C}$ (\times) a vzorky skladované od 38. dne v lednici při $4 \pm 2^\circ\text{C}$ (O)



Při porovnání vývoje obsahu jednotlivých volných aminokyselin v průběhu zrání, jsme dospěli k závěru, že k nejvíce obsaženým volným aminokyselinám patří leucin, glutamin, asparagin a lyzin. Nárůst obsahu těchto volných aminokyselin korespondoval s vývojovým trendem celkového obsahu volných aminokyselin. Tuto skutečnost je možné vidět na obrázku 1, kde v části B je zobrazen vývoj obsahu volného leucinu v závislosti na průběhu zrání. Leucin byl vybrán jako reprezentativní aminokyselina, neboť je pro popis zracích procesů velmi často používán (Fenelon et al., 2000; Al-Otaibi, 2004). Kromě 4 výše uvedených aminokyselin byla významnou volnou aminokyselinou i kyselina glutamová, která může vznikat jak při proteolýze kaseinového komplexu, tak i činností aminotrasferáz (z α -ketoglutarátu) během metabolismu samotných volných aminokyselin (McSweeney, 2004). Jediná sledovaná volná aminokyselina, kde bez ohledu na zrací podmínky nebyl zaznamenán signifikantní nárůst v průběhu celého sledování byl arginin. Toto zjištění potvrzují i některé další práce, např. McSweeney & Sousa (2000). Zdůvodnění je možné hledat v detekovaném nárůstu obsahu ornitinu a citrulinu, pro které je arginin prekurzorem.

ZÁVĚR

Průběh a teplotní režim při zracích procesech podstatně ovlivní proteolytické procesy a tím i jakost finálních produktů. Jsou-li výrobci z ekonomických důvodů nuceni vyskladňovat produkty dříve než optimálně vyzrálé, pak by tak měli činit nejdříve za 4 týdny.

LITERATURA

- AL-OTAIBI, M. M., WILBEY, A., 2004. Effect of temperature and salt on the maturation of white-salted cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 2004, 57, p. 57-63.
- BROOME, M. C., LIMSOWTIN, G. K. Y., 1998. Starter peptidase activity in maturing cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 1998, 53.
- BÜTIKOFER, U., RÜEGG, M., ARDÖ Y., 1993. Determination of nitrogen fractions in cheese: evaluation of a collaborative study. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 1993, 26, 271-275.
- ČSN EN ISO 5534. Sýry a tavené sýry – stanovení obsahu celkové sušiny (referentní metoda). Český normalizační institut, 2005.
- FENELON, M. A., O'CONNOR, P., GUINEE, T. T., 2000. The effect of fat content on the microbiology and proteolysis in cheddar cheese during ripening. *Journal of Dairy Science*, 2000, 83, p. 2173-2183.
- FOX, P. F., GUINEE, T. P., COGAN, T. M., MCSWEENEY, P. L. H., 2000. *Fundamentals of Cheese Science*. 1st. ed. Gauthersburg (Maryland, USA): Aspen Publication, 2000, 638 p.
- INDRA, Z., MIZERA, J.: *Chemické kontrolní metody pro obor zpracování mléka*. Učebnice pro střední průmyslové školy potravinářské, Vydání první, 1992.
- LAEMMLI, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227, 680-685.

Potravinářstvo

McSWEENEY, P. L. H., 2004. Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 2004, 57, 127 – 144

McSWEENEY, P. L. H., HAYALOGLU, A. A., O'MAHONY, J. A., BANSAL, N., 2006. Perspectives on cheese ripening. *Australian Journal of Dairy Technology*, 2006, 61.

McSWEENEY, P. L. H., SOUSA, M. J., 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheese dutiny ripening: A review. *Lait*, 2000, 80, 293 – 324.

NHUCH, E. L., PRIETO, B., FRANCO, I., BERNANDO, A., CARBALLO, J., 2008. Biochemical changes dutiny the ripening of San Simón da Costa cheese (PDO)

manufactured from pasteurised milk. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 2008, 63, p. 68-76.

SMIT, G., SMIT, A. G., ENGELS, W. J. M., 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profilig of cheese products. *FEMS Mikrobiology Reviews* 29, 2005, p. 591-610.

Poděkování: Práce vznikla za podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (MSM 7088352101).

Kontaktná adresa: Vendula Pachlová, Ing., Ústav biochemie a analýzy potravin, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, nám. T.G.M. 275, 762 72 Zlín tel.+00420 576 033 007, e-mail: pachlova@ft.utb.cz
