

Vliv obsahu NaCl na zrání sýrů

Bc. Kateřina Moudrá

Diplomová práce
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie potravin
akademický rok: 2014/2015

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

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina Moudrá**
Osobní číslo: **T13448**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Vliv obsahu NaCl na zrání sýrů**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakterizujte proteolýzu a její vliv na zrání sýrů.
2. Popište a charakterizujte způsoby solení sýrů.
3. Popište vliv soli na vlastnosti sýrů.

II. Praktická část

1. Založte skladovací pokusu modelových vzorků sýrů s různým obsahem soli.
2. Porovnejte změny v průběhu zrání mezi vzorky.
3. Vyhodnoťte výsledky, diskutujte je s literaturou a vyvodte závěry.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] Cheese: chemistry, physics and microbiology. 3rd ed. Editor Patrick F Fox. Amsterdam: Elsevier, 2004, xi, 617 s. ISBN 0-1226-3652-X1.

[2] GUINEE, T.P. Salting and the role of salt in cheese. International Journal of Dairy Technology. 2004. DOI: 57, 99-109.

[3] LAW, Barry A a A TAMIME. Technology of cheesemaking. 2nd ed. Malden, MA: Blackwell, 2010, xxv, 482 p. ISBN 978-140-5182-980.

[4] SOUSA, M.J., Y. ARDÖ a P.L.H. MCSWEENEY. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. International Dairy Journal. 2001. DOI: 11, 327-345.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Vendula Pachlová, Ph.D.

Ústav technologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

2. února 2015

Termín odevzdání diplomové práce:

22. dubna 2015

Ve Zlíně dne 2. února 2015


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




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

Příjmení a jméno: Bc. Kateřina Moudrá

Obor: Technologie
počítačů

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 22.4.2015

Moudrá

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá zráním přírodních sýrů holandského typu a vlivem soli na jeho průběh. Zrání je jedním z nejdůležitějších faktorů, které ovlivňují senzorickou jakost sýra, proto je třeba studovat jeho význam ve výrobě sýrů. Právě obsah soli do značné míry ovlivňuje intenzitu procesů zrání, ale také ostatní parametry sýra jako jsou obsah sušiny a tvrdost. V průběhu tří měsíců zrání modelových sýrů s různým obsahem soli byl sledován vliv soli na pH, obsah sušiny, proteinový profil, obsah volných aminokyselin a biogenních aminů, ale také na tvrdost vzorků. Délka solení měla vliv na obsah sušiny a tvrdost vzorků. Zvýšený obsah soli inhiboval produkci volných aminokyselin a biogenních aminů.

Klíčová slova: sýr holandského typu, zrání sýrů, proteolýza, obsah soli

ABSTRACT

This thesis deals with a Dutch-type cheese ripening and the influence of salt content on it. The ripening process is one of the most important factors that influence sensory quality of cheese. Therefore, it is necessary to study its importance in cheese production. Salt content largely influences the ripening process but also other parameters as dry matter content and hardness. In the course of 3 months of ripening model cheese with different contents of salt, the following observations were made: The influence of salt on pH, dry matter content, protein profile, contents of free amino acids and biogenic amines but also the hardness of samples. Time of brining had influence on dry matter content and the hardness of samples. Higher salt content inhibited the production of free amino acids and biogenic amines.

Keywords: Dutch - type cheese, cheese ripening, proteolysis, salt content

Moje poděkování patří především Ing. Vendule Pachlové, Ph.D., za odborné vedení této diplomové práce. Vážím si především času, který mi a této diplomové práci věnovala, jejích cenných rad a v neposlední řadě její trpělivosti. Poděkování patří Ing. Ludmile Zálešákové za čas věnovaný analýzám a za pomoc, kterou mi v průběhu zpracování diplomové práce poskytla. Děkuji také rodině, která mi umožnila studium a přátelům, kteří mi dodávali optimismus.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 VÝROBA SÝRŮ HOLANDSKÉHO TYPU.....	12
1.1 KVALITA MLÉKA PRO VÝROBU SÝRŮ	12
1.2 ÚPRAVY MLÉKA PŘED SÝŘENÍM	13
1.2.1 Standardizace mléka	13
1.2.2 Pasterace mléka	13
1.2.3 Ostatní úpravy mléka před sýřením.....	14
1.3 INOKULACE MLÉKA	14
1.4 SÝŘENÍ	15
1.5 ZPRACOVÁNÍ SÝŘENINY.....	16
1.6 FORMOVÁNÍ SÝŘENINY	17
2 SOLENÍ SÝRŮ.....	18
2.1 ZPŮSOBY SOLENÍ SÝRŮ	18
<i>SOLENÍ PONOŘENÍM DO SOLNÉ LÁZNĚ</i>	<i>18</i>
<i>VTÍRÁNÍ SOLI DO POVRCHU SÝRA</i>	<i>20</i>
<i>SOLENÍ DO TĚSTA.....</i>	<i>21</i>
<i>SOLENÍ DO MLÉKA.....</i>	<i>22</i>
2.2 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ ABSORPCI SOLI	22
3 ZRÁNÍ SÝRŮ.....	24
3.1 BALENÍ SÝRŮ	25
3.2 VÝVOJ MIKROFLÓRY	26
3.3 METABOLISMUS LAKTÓZY, LAKTÁTU A CITRONANU	26
3.4 PROTEOLÝZA	27
3.5 KATABOLISMUS AMINOKYSELIN	30
3.6 LIPOLÝZA	31
3.7 KATABOLISMUS MASTNÝCH KYSELIN.....	32
3.8 ZKRÁCENÍ DOBY ZRÁNÍ	32
4 VLIV SOLI NA VLASTNOSTI A ZRÁNÍ SÝRŮ	35
4.1 VLIV SOLI NA AKTIVITU PŘÍTOMNÉ MIKROFLÓRY A HODNOTU pH.....	36
4.2 VLIV SOLI NA OBSAH VODY A TEXTURU SÝRŮ.....	36
4.3 VLIV SOLI NA RYCHLOST PROTEOLÝZY	37
II PRAKTICKÁ ČÁST	40
5 CÍL PRÁCE.....	41
6 METODIKA.....	42
6.1 VÝROBA MODELOVÝCH VZORKŮ	42
6.2 ZÁKLADNÍ CHEMICKÁ ANALÝZA	44
6.2.1 Stanovení pH	45
6.2.2 Stanovení obsahu sušiny	45
6.2.3 Stanovení obsahu soli	45

6.3	TEXTURNÍ PROFILOVÁ ANALÝZA.....	46
6.4	STANOVENÍ OBSAHU VOLNÝCH AMINOKYSELIN.....	47
6.5	STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ.....	48
6.6	STANOVENÍ PROTEINOVÉHO PROFILU.....	49
7	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	52
7.1	ZÁKLADNÍ CHEMICKÁ ANALÝZA.....	52
7.2	TEXTURNÍ PROFILOVÁ ANALÝZA.....	57
7.3	STANOVENÍ OBSAHU VOLNÝCH AMINOKYSELIN.....	60
7.4	STANOVENÍ OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ.....	64
7.5	PROTEINOVÝ PROFIL.....	68
	ZÁVĚR.....	79
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	81
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	87
	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	88
	SEZNAM TABULEK.....	90
	SEZNAM PŘÍLOH.....	91

ÚVOD

Polotvrdé sýry holandského typu jsou nejen v České republice velmi oblíbenou skupinou přírodních sýrů. Z důvodu snižování výrobních nákladů zkracováním doby zrání však často sýry nespĺňují sensorické charakteristiky dostatečně vyzrálých sýrů. Je to dáno především konkurenčním tlakem na cenu výrobku v distribuční síti. Na druhou stranu zrání sýrů je nedílnou a bezesporu významnou součástí technologie výroby přírodních sýrů, prostřednictvím kterého dochází k dosažení charakteristické textury, chuti a vůně typické pro daný druh sýra.

Rychlost zrácích procesů je však ovlivněna různými faktory, především syřidlem, plazminem, sýrařskou kulturou, non-starterovými bakteriemi mléčného kvašení, obsahem vody, teplotou zrácí komory, ale i dalšími faktory, jako je např. obsah soli v sýrové matici. Tato práce je zaměřena zejména na biochemické procesy probíhající během zrání sýrů a jejich ovlivnění koncentrací soli. Pozornost byla věnována především proteolýze, která má na charakter sýrů holandského typu velký vliv. Stupeň proteolýzy byl sledován pomocí proteinových profilů, získaných metodou SDS-PAGE a obsahem volných aminokyselin. Dále byly také sledovány sekundární metabolity biogenní aminy. Biogenní aminy jako sekundární produkty proteolýzy je vhodné stanovovat pro jejich potenciální negativní účinek na lidské zdraví.

Kromě vlivu obsahu soli na stupeň proteolýzy byl taktéž zkoumán její účinek na vývoj tvrdosti sýrů jako dalšího významného sensorického ukazatele sýrů.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 VÝROBA SÝRŮ HOLANDSKÉHO TYPU

Sýry holandského typu jsou polotvrdé až tvrdé sýry původem z Nizozemska. Obsah tuku může být různý, zpravidla se pohybuje v rozmezí od 20 % (nízkotučné varianty) až po 50 % tuku v sušině. Obvykle se rozlišují dva typy, a to Eidam a Gouda. Jedná se o sýry s nízkodohřívanou sýřeninou. Základní surovinou pro výrobu sýrů holandského typu je kravské mléko. Principem výroby sýrů je koagulace mléčných bílkovin do podoby polotuhého gelu, který ve své struktuře zadržuje mléčný tuk. Jednotlivé sýry se pak mohou lišit stupněm prokysání, použitou kulturou, stupněm synereze, obsahem soli a podmínkami zrání [1].

1.1 Kvalita mléka pro výrobu sýrů

U mléka určeného pro výrobu sýrů je sledována především mikrobiologická jakost, syřitelnost, kyselost a kysací schopnost. Pro výtěžnost sýrů je pak nejdůležitější obsah bílkovin, tudíž zpracovatel požaduje co možná nejvyšší obsah bílkovin v dodávaném mléce [4].

Z technologických důvodů je pro výrobu polotvrdých a tvrdých sýrů používáno mléko šetrně pasterované či syrové. Lze proto zpracovávat pouze mikrobiologicky kvalitní mléko. Závažný je výskyt především patogenních, koliformních a sporulujících mikroorganismů, které by mohly ohrožovat zdravotní nezávadnost výrobků či způsobovat jiné mikrobiologické vady (např. duření) [4].

Kromě mikrobiální jakosti by mělo mléko splňovat některé další parametry jako je např. syřitelnost. Jedná se o schopnost mléka srážet se přidavkem syřidla a tvořit sýřeninu požadovaných vlastností. Syřitelnost je ovlivňována obsahem bílkovin (především kaseinů), zastoupení jednotlivých frakcí kaseinů, neporušeností kaseinových micel, obsahem vápenatých iontů, kyselostí mléka a tepelným namáháním mléka v průběhu zpracování [4].

Mléko musí dále splňovat požadavky na titrační kyselost, která by se měla pohybovat do 7,6 SH (stupnice Soxhlet-Henkela, vyjadřuje počet ml NaOH o $c=0,25$ mol/l potřebných k neutralizaci 100 ml mléka na indikátor fenolftalein) [4].

Od mléka je taktéž vyžadována dobrá kysací schopnost, tzn. schopnost vytvářet bakteriím mléčného kvašení vhodné prostředí pro růst a umožnit jim metabolizovat přítomnou laktózu na kyselinu mléčnou. Kysací schopnost je nízká v prvních hodinách po nadojení, kdy je aktivní antibakteriální systém mléka (imunoglobuliny, lysozym, laktoperoxidázový systém

apod.). Tato inhibiční aktivita mléka však brzy vymizí. Závažnější je obsah RIL (reziduí inhibičních látek) a kontaminující mikroflóry, které jsou schopny bránit růstu bakterií mléčného kvašení [4].

1.2 Úpravy mléka před sýřením

1.2.1 Standardizace mléka

Od jednotlivých druhů sýrů je vyžadována různá tučnost a různý obsah sušiny, z těchto důvodů je třeba obsah sušiny a tuku v mléce (tedy i ve výsledném sýru standardizovat). Standardizace obsahu tuku v mléce se nejčastěji provádí odstředěním smetany z mléka na odsmetaňovací odstředivce a následně smísením odstředěného mléka se smetanou v požadovaném poměru.

V některých případech se standardizuje kromě obsahu tuku i obsah bílkovin. Obsah bílkovin je možné upravit přidávkem kaseinátů nebo pomocí membránových separačních procesů (např. ultrafiltrací) [4].

1.2.2 Pasterace mléka

Sýry je možné vyrábět přímo ze syrového mléka bez použití tepelného záhřevu nebo z tepelně ošetřeného mléka. Oba způsoby mají své výhody i nevýhody, a proto je třeba hledat optimální řešení nejčastěji použitím šetrné pasterace. Šetrná pasterace by měla být dostatečně účinná pro inaktivaci většiny vegetativních forem mikroorganismů (především patogenních) a zároveň dostatečně šetrná pro tepelně labilní složky mléka. Cíle tepelného ošetření spočívají v inaktivaci nežádoucích mikroorganismů, inaktivaci enzymů, prodloužení údržnosti produktů a standardizaci podmínek při výrobě mléčných výrobků. Pasterace je nejvhodnější šetrná při použití vyšší teploty po krátký čas, a to v kombinaci minimálně 72°C s výdrží 15 s [1, 4].

Použití vysoké a dlouhodobé pasterace je pro výrobu polotvrdých a tvrdých sýrů problematické především z důvodu denaturace sérových bílkovin. Zdenaturované sérové bílkoviny se váží na κ -kasein a zůstávají zachyceny ve sraženině, kde zvyšují vaznost vody, což je vhodné při výrobě produktů s vyšším obsahem vlhkosti (tvarohy či měkké sýry), ale u polotvrdých či tvrdých sýrů nežádoucí, z důvodu komplikovaného dosahování požadovaného obsahu sušiny [4].

1.2.3 Ostatní úpravy mléka před sýřením

Před vlastním sýřením se do mléka dávkuje chlorid vápenatý (lze také použít mléčnan vápenatý), který má napomoci sýření dodáním vápenatých iontů, které mohly být v procesu pasterace navázány do nerozpustných forem. Právě dostatek vápenatých iontů má zcela zásadní vliv na vytvoření sraženiny. Pro standardizaci barvy sýrů se přidávají do mléka barviva. Nejčastěji využívané je přírodní oranžovo-žluté barvivo annatto získávané ze semen stromů *Bixa orellana* [5].

Polotvrdé a tvrdé sýry jsou vyráběny ze syrového či pasterovaného mléka, což je rizikové vzhledem k možnému výskytu bakteriálních spor ve mléce. Pasterace nepředstavuje dostatečné tepelné ošetření pro devitalizaci bakteriálních spor (jedná se především o spory rodu *Clostridium*). Tyto spory mají schopnost vyklíčit a způsobit mikrobiální vadu nazvanou pozdní duření sýrů. Zduřelé sýry jsou zdravotně závadné, proto je třeba přijmout bezpečnostní opatření pro zamezení klíčení bakteriálních spor. Nejčastěji se do mléka před sýřením preventivně dávkuje nízké množství dusičnanů, které potlačí případné klíčení spor. Nevýhodou aplikace dusičnanů je jejich potenciální negativní působení na zdraví spotřebitele. Možnou alternativou je přidavek enzymu lysozymu či bakteriocinu nisinu. V současné době lze spory z mléka odstranit také pomocí moderních technologií, jako jsou baktofugace a mikrofiltrace [1].

1.3 Inokulace mléka

Mléko se očkuje různými sýrašskými kulturami dle vyráběného druhu sýra. Čisté mlékařské kultury je možné přidávat v různých formách. Tradiční bylo dávkování tekutých zákysů, které se před inokulací výrobníku musely v několika krocích pomnožovat pro získání velkého množství tzv. provozního zákysu. Inokulace mléka tímto zdlouhavým způsobem však nese svá rizika v podobě kontaminace kultur a pomnožení bakteriofágů v zákysech. Proto se moderněji používají spíše koncentráty kultur pro přímé zaočkování mléka v podobě zmrazené či lyofilizované [7].

Před inokulací se provádí temperace mléka na požadovanou teplotu, která se liší dle používané sýrašské kultury. Pro sýry s nízkodohříváním sýřeninou se očkuje mléko pomocí mezofilní kultury tzv. primární kultury, pro které se mléko temperuje přibližně na teploty 30-35 °C. Primární kultury mají za úkol především prokysání mléka a sýřeniny, což způsobí

pokles pH a ovlivní proces srážení. Jejich aktivita však pokračuje v průběhu ostatních technologických operací a podílí se tak zásadním způsobem i na procesu zrání [6].

Při výrobě sýrů typu Gouda je mléko primárně zaočkováno mezofilní aromatickou LD kulturou s citrát-pozitivními koky, tato kultura obsahuje jak kyselinotvorné koky (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*), tak aromatvorné koky (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*). Z důvodu produkce CO₂ se v sýru v průběhu dostatečně intenzivního zrání objevuje několik menších ok ve velikosti hrášku. Kromě primárních kultur se mohou aplikovat také sekundární sýrařské kultury. Sekundární kultury se vyznačují tvorbou charakteristického aroma sýra, proteolytickou aktivitou a je-li to žádoucí také tvorbou ok. Pro sýry holandského typu je možné využít např. *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus helveticus* [6].

Po přidavku kultury je nutné mléko důkladně zamíchat pro dokonalé rozptýlení granulí lyofilizované kultury. Před vlastním sýřením se nechá kultura několik minut či desítek minut za občasného promíchání aktivovat.

1.4 Sýření

Cílem sýření je získání sraženiny, která je tvořena bílkovinnou sítí zadržující tuk, vodu a látky hydrofilní povahy. Sladké sýry jsou vyráběny sýřením pomocí syřidlových enzymatických preparátů. Tradičním syřidlovým enzymem je chymozin (rennin). Avšak v současné době na trhu dominují alternativní enzymy produkované mikroorganismy a geneticky modifikovanými mikroorganismy. Využívány mohou být i pepsin a enzymy rostlin. Úkolem syřidlových preparátů je štěpení κ -kaseinu, jehož štěpy již nejsou schopny plnit funkci ochranného koloidu. Ostatní kaseinové frakce, které již nejsou stabilizovány κ -kaseinem, se pomocí vápenatých iontů propojují do řetězců a následně do složitějších struktur. Tímto způsobem vzniká trojrozměrná bílkovinná síť zadržující tuk (koagulát, sýřenina) [7].

Chymozin je proteáza specificky štěpící peptidovou vazbu v molekule κ -kaseinu mezi 105. a 106. aminokyselinou (mezi fenylyalaninem a metioninem). Rozštěpením v tomto místě vznikají dva úseky, hydrofobní para- κ -kasein a hydrofilní κ -kaseinmakropeptid. Odštěpením hydrofilního úseku κ -kaseinu ztratí kaseinové micely stabilizační vrstvu. Jiné syřidlové enzymy však mohou štěpit i jiné vazby κ -kaseinu. Je žádoucí, aby syřidlo štěpilo speci-

ficky κ -kasein. V případě rozsáhlé proteolýzy kaseinů by se snižovala výtěžnost sýrů a hrozily by senzorické vady při vzniku hořkých peptidů [4].

Po přidavku syřidla se mléko promíchá pro dokonalé rozptýlení enzymu a ustálí se hladina mléka. Pro vlastní sýření je nutné ponechat mléko v klidu bez míchání. Syřidlo se dávkuje tak, aby srážení trvalo zhruba 20-40 minut. Pokud by sýření probíhalo výrazně déle, zvýšila by se pravděpodobnost rozsáhlejší proteolýzy nejen κ -kaseinu, ale i ostatních frakcí kaseinů, což je nežádoucí. Vliv na správný průběh koagulace má také správná teplota, která by neměla klesnout pod 15 °C (běžně využívané jsou teploty kolem 30 °C), pH sýřeného mléka a koncentrace vápenatých iontů [4].

1.5 Zpracování sýřeniny

Pro vytužení sraženiny a vypuzení syrovátky se sýřenina opatrně prokrojí a následně drobí, míchá a dohřívá. Všechny tyto operace jsou silně závislé na druhu vyráběného sýra. Pro prokrojení, drobení a míchání se používá systém ocelových nožů a strun (tzv. harf) [12].

➤ Prokrojení a drobení

První prokrojení by mělo být opatrné, aby se omezil vznik tzv. sýrařského prachu (drobné částičky sraženiny unikající do syrovátky). Po opatrném prokrojení se rychlost harf zvýší a částice sýřeniny jsou zmenšovány do podoby sýrařských zrn, jejichž velikost se odvíjí od druhu vyráběného sýra. Drobnější zrna zadrží méně syrovátky (výroba tvrdých sýrů) než velká zrna (výroba poloměkčích a měkkých sýrů) [7, 12].

➤ Vytužování zrna

Vytužování se provádí mícháním sýrařských zrn ve vypuzené syrovátce. Zrna se nesmí nechat sedimentovat, jinak hrozí jejich slepování a tvorba syrovátkových hnízd (místa, kde se zadržuje syrovátka). Míchání je obvykle zajišťováno systémem harf. Vytužováním je podpořena synereze sýrařských zrn (smršťování), čímž je vypuzen další podíl syrovátky [12].

➤ Dohřívání

Sýry holandského typu patří do skupiny sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou. U těchto sýrů se k lepšímu vypuzení syrovátky aplikuje během míchání záhřev. Zvýšená teplota ovlivňuje nejen rychlost vypuzování syrovátky, ale i rozvoj kyselých kultur, a tím i rychlost okyselování sýřeniny. Teplota dohřívání se u sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou pohybuje

okolo 36-42 °C. Před dohříváním je část syrovátky odpuštěna (obvykle v rozsahu 20-30 % syrovátky) a následuje přidavek teplé prací vody o teplotě 60-90 °C a o objemu 50-80 % odebraného objemu syrovátky. Přídavek teplé vody by měl být pomalý, jinak hrozí zadržení části syrovátky pod pokožkou zrn. Do prací vody jsou vyluhovány některé složky (především laktóza), což ovlivní biochemickou aktivitu kultur. Poměr odpuštěné syrovátky a přidané prací vody je nazýván pracím poměrem. K následné regulaci teploty (během dosoušení) se využívá mezipláště výrobniku [7, 12].

➤ **Dosoušení**

Dosoušení je míchání sýrařských zrn v syrovátce po dosažení teploty dohřívání. Provádí se obvykle po dobu desítek minut. Dosoušení se ukončí v okamžiku, kdy mají sýrařská zrna požadované vlastnosti. Zrna mají správnou velikost. Při stisku v dlani se slepují do kompaktního válce, který se mírným tlakem opět rozpadne na jednotlivá zrna [8].

➤ **Vypouštění**

Dosušená sýrařská zrna jsou dopravena do tvořitek v proudu syrovátky, která zamezí osychání sýřeniny. Vypouštění se provádí samospádem či pomocí čerpadel. Tuto operaci je třeba provádět šetrně [8, 12].

1.6 Formování sýřeniny

Formování sýřeniny zajišťuje přeměnu zrnité struktury na kompaktní blok požadované velikosti a tvaru. Formování se provádí většinou v plastových či kovových tvořítkách, které jsou perforované pro lepší odtok syrovátky. Formování se liší podle druhu vyráběného sýra. Sýry holandského typu se formují lisováním za použití značného tlaku, který má za úkol vytěsnit jak syrovátku, tak i přítomný vzduch a vytvořit kompaktní blok [8].

Zpočátku je aplikován slabší tlak tak, aby kůra vytvořená na lisovaném bloku byla celistvá, ale zároveň do jisté míry slabá, aby nebránila odchodu dalšího podílu syrovátky. Celistvá kůra bez otvorů slouží jako částečná bariéra vůči průniku mikroorganismů do sýra. Tlak vyvíjený na formy je postupně zvyšován, čímž je odstraněn další podíl syrovátky a je vytvořena pevnější kůra. Aplikovaný tlak by měl být rovnoměrný pro vyrovnaný obsah vlhkosti v hmotě sýra. Doba lisování se obvykle pohybuje kolem 2-4 hodin. Taktéž je během lisování důležitá teplota okolí, která zásadním způsobem ovlivňuje rychlost prokysání [8].

2 SOLENÍ SÝRŮ

Obsah soli významně mění fyzikální, chemické a mikrobiologické charakteristiky sýrů. Sůl udílí sýrům slanou chuť, podněcuje další vypuzení syrovátky, upravuje konzistenci sýrů a zpevňuje povrch sýrů, ovlivňuje zrání sýrů a inhibuje kontaminující mikroflóru. Způsob solení a konečný obsah soli se odvíjí od druhu vyráběného sýra. Odlišné způsoby solení mají zásadní vliv na konzistenci a průběh zrání vyráběného sýra [8].

Obsah soli v sýrech se může pohybovat v rozmezí:

- **nízký obsah soli** do 1,5 % – zejména u čerstvých sýrů
- **střední obsah soli** v rozmezí 1,5 až 3 % – u sýrů holandského a ementálského typu
- **vyšší obsah soli** až do 6 % – u sýrů s plísní v těstě
- **vysoký obsah soli** nad 6 % – u sýrů zrajících v solném nálevu

Sýry mohou být soleny několika způsoby. Níže uvedené způsoby solení se dají kombinovat. Jednotlivé způsoby solení nacházejí uplatnění u různých druhů sýrů.

2.1 Způsoby solení sýrů

Solení ponořením do solné lázně

Jedná se o nejčastěji používaný způsob solení sýrů na území ČR, využívaný např. k solení sýrů holandského typu. Sýry se solí ponořením do roztoku soli, jehož koncentrace se liší podle požadovaného obsahu soli v prosoleném sýru a v závislosti na délce solení. Na základě rozdílného osmotického tlaku uvnitř sýra a v solance začnou ionty Na^+ a Cl^- difundovat do povrchových vrstev sýra a následně (v průběhu zrání) až do jádra, zatímco molekuly vody putují do vnějších vrstev, kde je vysoká koncentrace soli a následně ven do solného roztoku [8, 12].

Solná lázeň obsahuje přibližně 23 g soli/100 g roztoku, koncentrace soli však může být i výrazně nižší okolo 15 g/100 g. pH solné lázně by mělo být udržované na podobných hodnotách jako je pH soleného sýra, což je zhruba 4,8-5,4. Pro zabránění uvolňování vápenatých iontů z proteinové matrice sýra, se do solné lázně přidává malé množství CaCl_2 (0,3 g/100 g). Pokud by se vápenaté ionty uvolňovaly z vazeb s kaseiny, začaly by kaseiny absorbovat další množství vody a zvýšila by se jejich rozpustnost. Takový sýr by byl měkký

a na povrchu by se nevytvořila kůra, což by umožnilo rychlejší mikrobiální kažení. Teplota solné lázně je obvykle udržována kolem 12-22 °C [12].

Koncentrace soli a obsah vody se v sýrech solených v solných roztocích značně liší na různých místech v jednom bloku (okrajové části x střed). Tyto diference mohou způsobit velké rozdíly v činnosti sýrařských kultur a ve stupni zrání v rámci jediného bloku sýra. Poměr sůl/voda a především aktivita vody a_w mají největší vliv na enzymatickou a mikrobiologickou činnost v daném místě hmoty sýra. Vyrovnávání obsahu vody, soli i ostatních složek v celém objemu může trvat v závislosti na velikosti bloku i měsíce [12].

Ponoření sýru do solného roztoku však nezpůsobí v sýru pouze zvýšení slanosti a snížení obsahu vody. Mezi sýrem a solnou lázní probíhá i výměna ostatních nízkomolekulárních látek jako jsou laktát, volné aminokyseliny, krátké peptidy, minerální látky apod. Důsledkem je taktéž ovlivnění pH solného sýra, což má významný vliv na jeho konzistenci.

Rychlost difuze částic je ovlivněna především koncentrací solného roztoku a teplotou. Dobu prosolení lze zkrátit použitím vyšší teploty a vyšší koncentrací soli v roztoku. Avšak teplota a koncentrace solné lázně nesmí být příliš vysoká, aby nedošlo k velmi rychlému poklesu vlhkosti sýra (vytužení gelu), a tím snížení prostupu soli do sýra. Teplotu je potřeba volit také na základě aktivity kyselých kultur, které okyselují sýrovou hmotu. Relativně vysoká viskozita syrovátky oproti viskozitě čisté vody taktéž brzdí průchod iontů NaCl do sýra. Difuzní pohyb je zpomalen přítomností tukových kuliček a proteinové matrice sýra, které působí jako překážky v pohybu iontů Na^+ a Cl^- . Z těchto důvodů je složité přesně určit čas potřebný k prosolení sýrů na požadovaný obsah soli [8].

Sůl difunduje ze solného roztoku do povrchu sýra a následně až do jeho středu. Při vyjmutí ze solné lázně je vytvořen solný prstenec v povrchových vrstvách. Obsah soli se postupně snižuje směrem ke středu sýra, kde je nejnižší. Naopak obsah vody je ve středu nejvyšší a směrem k povrchu klesá. K vyrovnávání obsahu soli a vlhkosti v celé hmotě sýra dochází až v průběhu zrání. Jde o velmi pomalý proces, který v závislosti na velikosti sýrových bloků, teplotě apod., může trvat i 12 týdnů. Vzhledem k pomalému prostupu soli do středu sýra mohou být sýry náchylné k pomnožení bakterií máselného kvašení a k duření. Z tohoto důvodu se jako prevence duření do sýrů během jejich výroby obvykle aplikuje malé množství dusičnanů. Vhodnější alternativou vzhledem k nepříznivým účinkům dusičnanů na lidské zdraví je využití baktofugace [1, 8].

Významným problémem při aplikaci tohoto způsobu solení je pomnožování kontaminujících mikroorganismů v solných lázních. Během solení se do solných lázní ze sýrů vyluhují krátké peptidy a volné aminokyseliny, které jsou pro mikroorganismy vhodným substrátem. Z tohoto důvodu je zásadní častá obměna solných lázní a udržování koncentrace soli, pH a teploty solných lázní na předepsaných hodnotách. I přes vysokou koncentraci soli v solných lázních a udržování jejich nízké teploty hrozí pomnožování především osmotolerantních a psychrotrofních mikroorganismů (př. *Pseudomonas*, ale i mezofilní *Listeria*). Kvůli vysokým nákladům na udržování a likvidaci solných lázní je trendem tzv. suché solení [12].

Vtírání soli do povrchu sýra

V počátcích výroby sýrů se vylisovaný blok sýru rovnoměrně pokrýval vrstvou soli pro prodloužení údržnosti. Tento způsob solení sýrů je tedy tradiční a velmi starý. Je často využíván drobnými farmáři, ale i velké podniky se k tomuto způsobu solení vrací. Velkou výhodou tohoto způsobu je vysoká hygieničnost, kdy nedochází k pomnožování kontaminujících mikroorganismů, jako je tomu při používání solných lázní. Výhodou je bezesporu i úspora pitné vody. Vtírání soli nasucho je však pracné a problematické z hlediska rovnoměrného nanášení soli na povrch. Důležitá je volba optimální velikosti krystalů soli. Příliš malé krystalky soli se rychle vstřebávají a vedou k tvorbě pevné kůry, přes kterou se špatně vstřebávají další dávky soli. Použití velkých krystalů soli je však značně zdlouhavé [8].

Tento způsob solení spočívá v aplikaci soli (často prováděná ručně) na povrch sýrových bloků. V okamžiku, kdy je blok sýra pokryt vrstvou soli, se sůl začne rozpouštět ve vlhkosti na povrchu sýra a vytvoří se tenká vrstva velmi koncentrovaného solného roztoku. Stykem sýra s velmi koncentrovaným roztokem dojde k difuzi vody z povrchu sýra do solného roztoku a k rozpuštění dalšího podílu soli. Tímto způsobem se na povrchu sýra vytvoří suchá, velmi prosolená kůra, která sýry částečně chrání před průnikem kontaminujících mikroorganismů. Kůra má velmi nízký obsah vody, vysoký obsah soli a kaseiny v ní tvoří velmi hustou síť. Tukové kuličky mohou být vytlačeny, čímž může vzniknout na povrchu sýrů mastný film. Tvorba pevné kůry je dále podpořena odpařováním, pokud jsou povrchově solené sýry skladovány v prostorách s nízkou relativní vlhkostí vzduchu. Pevná kůra na povrchu však zpomaluje vysušování vnitřního obsahu sýra, tudíž si střed sýra uchovává vlhkost. Sýry solené na povrch mohou být předem solené v solné lázni či mohou být před

lisováním solené do těsta, což napomůže rychlejšímu prosolení celého objemu sýra. Následně se do povrchu vtírá sůl pro vytvoření pevné kůry [8, 12].

Vtírání soli do povrchu sýra obvykle inhibuje pomnožení bakterií v suché prosolené kůře sýra, avšak nárůst plísní a kvasinek na povrchu je možný vzhledem k vyšší odolnosti plísní a kvasinek vůči soli a nízké aktivitě vody. Tato skutečnost je významná především při výrobě plísňových sýrů. Pokud je však nárůst plísní a kvasinek nežádoucí, je třeba sýry chránit i jiným způsobem než prosolením povrchu (např. aplikací disperze s účinnou látkou - natamycinem) [12].

Solení do těsta

Tento způsob solení je typický pro výrobu čedaru při tzv. čedarizaci, kdy se sýřenina mele, solí a až následně lisuje. Čedar má odlišnou texturu než většina polotvrdých a tvrdých sýrů např. holandských či švýcarských sýrů, tyto rozdíly však nejsou způsobeny jen solením, ale také lišícím se pH a obsahem vlhkosti [8].

Při výrobě čedaru je vyrobená sýřenina mleta a pomocí pásového dopravníku unášena k násypce, kde je senzorem snímána výška vrstvy rozemleté sýřeniny a dle získaných údajů dávkována sůl. Pro dokonalé rozptýlení soli je sýřenina dále promíchávána, než je umístěna do forem pro lisování [12].

Kromě výroby čedaru lze tento způsob solení uplatnit při výrobě sýrů s plísní v těstě, kde napomáhá vytužení a oklihnutí sýrařských zrn před lisováním. Vytužená a oklihnutá zrna mají sníženou lepivost, což zapříčiní vznik vzduchových kaveren ve hmotě sýra, které jsou nezbytné pro nárůst aerobních plísní. Solení do těsta je taktéž využíváno při výrobě sýrů na pizzu, kde je možné jej kombinovat se zkráceným solením v solné lázni [12].

Suché solení řeší hlavní problém vznikající při solení solankou, kdy se častěji objevuje duření sýrů v důsledku pomnožení koliformních bakterií či klostridií. Suchý způsob však přináší i jisté nevýhody, kromě nežádoucích bakterií jsou inhibovány i starterové kultury, a tudíž i tvorba kyseliny mléčné, což není na závadu, pokud je pH sýřeniny dostatečně nízké již před aplikací soli. Časné prosolení do těsta však vede k zachování podílu laktózy a galaktózy v sýru, což může vést k neenzymatickému hnědnutí sýra a zhoršené chuti sýra. K tomuto problému při solení v solných lázních nedochází vzhledem k tomu, že sůl proniká do středu sýra pomalu a postupně [8, 12].

Výše uvedené způsoby solení sýrů je možné kombinovat. Např. Niva může být solena kombinovaně, část soli je dávkována do těsta a část soli je vtírána do povrchu sýra [14].

Solení do mléka

Solení do mléka je využíváno spíše výjimečně, přesto však existují sýry, pro jejichž výrobu je tento způsob solení typický. Tradičně se takto solí Domiati, vyráběné především v Egyptě. Sůl se dávkuje do mléka již před aplikací syřidla a vlastní koagulací, což zajistí rovnoměrné rozptýlení soli v celém objemu sýra již během výroby [13].

Tento způsob solení sýrů umožní vyrovnané zrání bez rozdílů mezi prosolenou kůrou a neprosoleným jádrem, avšak nezajistí tvorbu pevné kůry jako je tomu při vtírání soli do povrchu sýrů. Velmi problematické je srážení slaného mléka a to již při velmi malých dávkách soli do mléka ($> 1\%$). Sůl taktéž narušuje synerezi vzniklé sraženiny. Nevýhodami tohoto způsobu solení jsou také velké ztráty soli do syrovátky a špatná využitelnost slané syrovátky.

Při výrobě Domiati je zhoršená syřitelnost slaného mléka kompenzována použitím bůvolího mléka, které má vyšší obsah kaseinů ve srovnání s kravským mlékem či přidavkem sušeného mléka do mléka určeného k výrobě Domiati [13].

2.2 Faktory ovlivňující absorpci soli

Rychlost absorpce soli a množství absorbované soli při solení v solném nálevu a při vtírání soli na povrch sýrů ovlivňuje celá řada faktorů. Absorpce soli nezávisí pouze na době solení a parametrech solné lázně (teplota, koncentrace, pH), ale také se odvíjí od vlastností sýra (pH, vlhkost, velikost a tvar). Jeden z hlavních faktorů je koncentrační gradient. Při zvýšení koncentrace soli v solné lázni se zvýší množství absorbované soli do sýra. Tohle pravidlo však platí pouze do dosažení určité koncentrace solné lázně (zhruba 25% roztok NaCl). Pokud je solná lázeň více koncentrovaná, může dojít ke snížení množství přijaté soli, což je pravděpodobně způsobeno rychlou dehydratací povrchové vrstvy sýra, která zpomalí další difuzi soli do sýra [13].

Dalšími důležitými faktory jsou doba solení a teplota solné lázně. S prodlužující se dobou solení roste množství absorbované soli. Koncentrační gradienty solné lázně a vlhkostí v sýru se však časem vyrovnávají, tudíž rychlost absorpce soli časem klesá. Kromě doby solení se projevuje také teplota. Se zvyšující se teplotou vzrůstá jak rychlost difuze soli, tak množství absorbované soli [13].

Velký význam na rychlost solení má také velikost a tvar solených sýrových bloků. Absorpce soli se zvýší zvětšením povrchu sýrů (vzhledem k jejich objemu). Z tohoto důvodu se sýry tvaru obdélníku nasolí rychleji než kulaté a válcovité sýry. K dalším faktorům ovlivňujícím absorpci soli patří vlhkost sýra před solením, pH sýra a solné lázně [13].

3 ZRÁNÍ SÝRŮ

Většina sýrů, s výjimkou čerstvých sýrů, je po výrobě uložena do zracích sklepů, kde po různě dlouhou dobu zrají. Zatímco u čerstvých sýrů obvykle převažuje pouze nakyslá chuť, způsobená kyselinou mléčnou, u zrajících sýrů je chuťový profil podstatně rozmanitější. Sýr je po celou dobu výroby, zrání a skladování mikrobiologicky a biochemicky dynamickým systémem, u kterého je třeba průběh změn regulovat s cílem vyrobit produkt požadovaných vlastností. Jakékoliv změny ve složení mléka, odchylky ve výrobním procesu a lišící se podmínky zrání mohou mít významný vliv na vlastnosti a kvalitu vyrobeného sýra [16].

Během zrání sýrů se nevytváří pouze aroma sýrů. Zráním jsou ovlivněny také textura a vzhled sýrů. Textura je ovlivněna především úbytkem obsahu vody způsobeným vysycháním, proteolýzou kaseinů a změnami forem vápníku (vázaný či nevázaný s kaseiny). Změny vzhledu nastávají v důsledku porůstání sýrů plísněmi či nárůstem mazových kultur, ale také vytvářením kůry na povrchu sýrů. Pokud nejsou sýry chráněny proti osychání vhodnými obalovými materiály, dochází k odpařování vlhkosti z jejich povrchu, čímž se vytváří na jejich povrchu pevná kůra. Odpařem vlhkosti také dochází ke změně textury z měkké gumovité ke tvrdé až křehké.

Biochemické reakce, které se uskutečňují během zrání sýrů, jsou katalyzovány řadou enzymů. Enzymy se dostávají do sýrů z pěti zdrojů, jimiž jsou mléko, syřidlo, primární kyselkové kultury, sekundární kyselkové kultury a nezákysové bakterie mléčného kvašení [17].

Zrání sýrů probíhá různě dlouhou dobu v závislosti na typu vyráběného sýra. Krátkou dobu zrání má např. Mozzarella, která zraje pouze dva týdny. Naopak velmi dlouhou dobu zrání potřebují extra tvrdé sýry typu parmezán (např. Parmigiano-Reggiano, Grana Padano), u kterých se dosáhne správného aroma a textury až v průběhu dvou a více let. Sýry holandského typu obvykle zrají přibližně dva až tři měsíce, ale tato doba se může lišit [17].

Pro zrání sýrů je třeba zajistit odpovídající prostory, kde je třeba dodržovat optimální teplotu, relativní vlhkost vzduchu a také hygienu veškerých prostor a vybavení. Z tohoto důvodu se stává zrání sýrů velmi nákladnou operací, kterou mohou výrobci omezovat, a tím snižovat náklady na výrobu, resp. cenu finálního produktu. Z těchto důvodů se v současné době objevují snahy o urychlení (akceleraci) zracích procesů.

3.1 Balení sýrů

Sýry holandského typu se mohou před zráním balit do různých obalů. Použitím vhodných obalových materiálů lze zabránit kontaminaci sýrů během zrání a skladování nejružnějšími mikroorganismy, potlačit nárůst plísní na povrchu sýrů (tzv. rakovina kůry) a je možné také upravit podmínky během zrání sýru (přístup kyslíku k sýrům, prostup vlhkosti přes obalový materiál apod.). Obaly jsou využívány taktéž z ekonomických důvodů, jelikož chrání sýry před nežádoucím vysycháním (ztrátami hmotnosti).

Obalové materiály:

➤ **Kryovak a smrštitelné folie**

Sýry jsou vakuově baleny do bariérové smrštitelné folie o definované propustnosti pro plyny. Vakuově zabalené sýry jsou krátce ponořeny do horké vody, což způsobí smrštění folie. Následně jsou zabalené sýry osušeny a putují do zracích komor. Takto zabalené sýry nevyžadují během zrání žádné ošetřování s výjimkou sýrů s oky (ementálského typu), které je nutné obracet pro rovnoměrné rozmístění ok. Obal chrání sýry před vysycháním (není propustný pro vodu) a před přístupem kyslíku (je potlačen nárůst plísní). Pro vznikající oxid uhličitý je obal propustný. Vzhledem k nepropustnosti obalu pro vodu je nutné, aby bylo dosaženo požadované sušiny sýra již před zabalením [9].

➤ **vosk**

Sýry je možné potahovat speciálním potravinářským voskem. Vosk je potřeba zahřát na vhodnou nanášecí teplotu, která má zásadní vliv na tloušťku ulpělé vrstvy na sýru. Vrstva vosku na povrchu sýrů taktéž chrání sýr před vysycháním a nárůstem plísní [10].

➤ **polymerní nátěrové hmoty**

Sýry je možné natírat polymerními hmotami. Nátěrové hmoty mohou obsahovat různé koncentrace natamycinu pro prevenci rozvoje plísní a kvasinek. Tyto hmoty by měly umožňovat zrací podmínky blízké se tradičním zracím podmínkám bez použití folií. Podle výrobců je dosaženo vyšší sensorické kvality sýrů ve srovnání s použitím kryovakových (smrštitelných) folií. Nátěrové hmoty chrání sýr před rozvojem plísní a omezuje hmotnostní ztráty vysycháním. Při zrání je nutno zajistit požadovanou relativní vlhkost vzduchu v zracích komorách [11].

3.2 Vývoj mikroflóry

V průběhu solení mohou zákysové kultury dosáhnout počtu 10^7 - 10^9 CFU/g (kolonie tvořících jednotek na gram). Obvykle však tento počet během prvních týdnů zrání výrazně klesá. Důvodem rychlého poklesu počtu zákysových bakterií jsou relativně nepříznivé podmínky uvnitř sýrů. Hmota sýrů vykazuje nízké pH, nedostatek zkvasitelných sacharidů a poměrně vysokou koncentraci soli. Po odumření nastává lýze bakteriálních buněk, ze kterých se uvolňují intracelulární enzymy, jež mají významnou roli při zrání sýrů.

V průběhu zrání (po přibližně 2 měsících) převládnu nezákysové bakterie mléčného kvašení (NSLAB), které přežily pasteraci nebo přešly do sýra z prostředí. Tyto bakterie jsou schopné lépe se adaptovat na nepříznivé podmínky uvnitř zrajícího sýra, a tudíž v průběhu zrání převládnu. Kromě zbytkové laktózy jsou schopny využít sacharidy uvolněné z glykoproteinů, heterofermentativní NSLAB mohou fermentovat pentózy uvolněné při lýze starterových bakterií. Citrát bývá přítomen pouze v nízkých koncentracích a tuky nepředstavují vhodné nutriční zdroje, z těchto důvodů jsou peptidy a aminokyseliny, přítomné ve vysokých koncentracích, hlavními zdroji výživy pro NSLAB. Na počátku zrání jsou jejich počty nízké obvykle pod 10^2 CFU/g, následně však dochází k jejich pomnožování a mohou dosáhnout až počtů 10^8 CFU/g. Jejich růst je ovlivněn především rychlostí chlazení a teplotou zrání. Jde především o heterofermentativní laktobacily, např. *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* a *Lactobacillus curvatus*. Tyto bakterie jsou taktéž důležité při zrání sýrů a ovlivňují jejich celkovou kvalitu [17, 25].

Množství bakterií jak starterových, tak non-starterových je značně ovlivněno obsahem soli. Jaký obsah soli zákysové kultury inhibuje, však nelze jednoznačně uvést. Vzhledem k tomu, že citlivost různých rodů, druhů i kmenů bakterií se výrazně liší. Obecně lze říci, že NSLAB jsou vůči zvýšenému obsahu soli tolerantnější než zákysové kultury. Bylo prokázáno, že většina NSLAB je schopna růst i v sýru se 6 % soli [8].

3.3 Metabolismus laktózy, laktátu a citronanu

Laktóza, která neunikla do syrovátky a zůstala tedy zachycena v sýrové hmotě, je pomocí bakterií mléčného kvašení velmi rychle fermentována na kyselinu mléčnou. Rychlý pokles obsahu laktózy za současného snížení hodnoty pH brání pomnožování nežádoucí mikroflóry (např. enterobakterií). Vznikající kyselina mléčná uvolní z kaseinů vápenaté ionty na vzniku mléčnanu vápenatého a monokalciumkaseinátu. Kaseiny v podobě monokalcium-

kaseinátu bobtnají ve vodě nebo roztoku soli, tím podpoří slevování sýrařských zrn a vznik homogenní sýrové hmoty. Zásadním faktorem pro rychlost štěpení laktózy je obsah soli. Již 1,5 % soli může inhibovat aktivitu startérových kultur, čehož se využívá např. při výrobě čedaru. Při jeho výrobě je výsledné pH regulováno aplikací soli do rozemleté sýřeniny. Z laktózy vznikající kyselina mléčná je dále metabolizována za vzniku rozmanitých produktů (v závislosti na použitých kulturách). V sýrech holandského typu může být část kyseliny mléčné oxidována na kyselinu octovou pomocí bakterií rodu *Pediococcus* (spolu s laktobacily častým zástupcem NSLAB). L-kyselina mléčná často podléhá racemizaci působením NSLAB na DL-kyselinu mléčnou, což podporuje krystalizaci pentahydrátu mléčnanu vápenatého na povrchu sýrů. Tyto krystaly mohou být negativně vnímány spotřebitelem, a proto je jejich tvorba nežádoucí [8, 16, 17, 21].

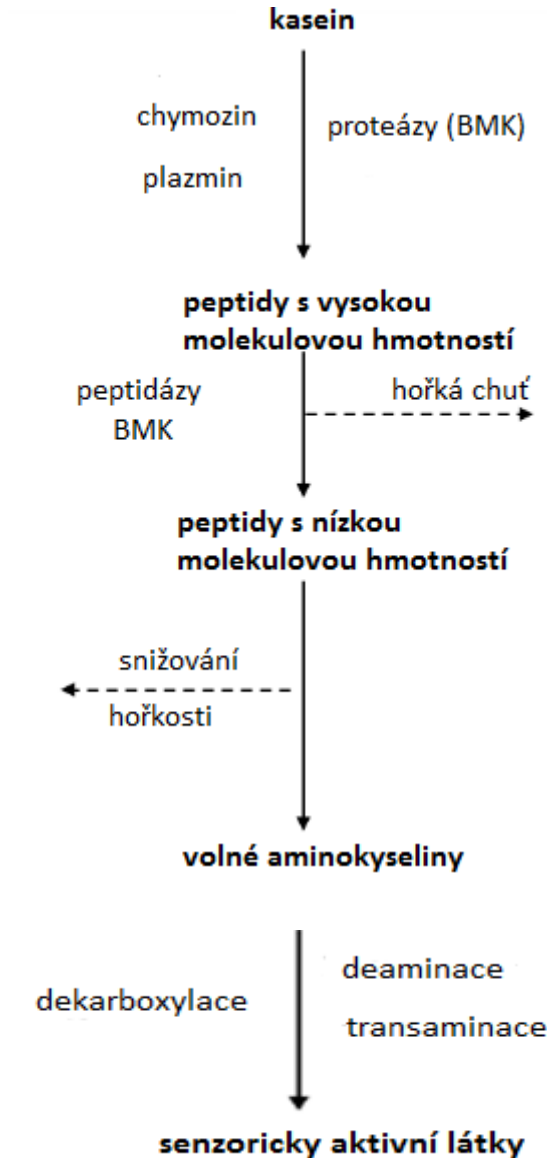
Mléko obsahuje pouze nízkou koncentraci citronanu, z níž většina odchází při výrobě sýrů do syrovátky, přesto má citronan ve vývoji aroma sýrů svou roli. Některé mikroorganismy používané pro výrobu sýrů holandského typu (citronan-pozitivní kmeny rodů *Lactococcus* a *Leuconostoc*) využívají citronan za vzniku důležitých sensoricky aktivních látek. Citronan je prekurzorem pro vznik acetoinu, diacetylu, 2,3-butandiolu a malé množství CO₂, který je spolupůvodcem sýrových ok v těchto sýrech [17].

3.4 Proteolýza

Proteolýzou je označován děj, při kterém dochází ke štěpení proteinů za vzniku proteinů s menší molekulovou hmotností, peptidů a volných aminokyselin (AMK). Vznikající volné AMK mohou vstupovat do dalších biochemických reakcí a sloužit jako prekurzory vzniku sensoricky aktivních látek. Schéma proteolýzy je shrnuto na Obr. 1. Tyto reakce mají zásadní vliv na sensorické vlastnosti a texturu zrajícího sýra. Proteolýza kaseinové matrice vede ke měkčímu produktu s výraznějším aroma [16].

Rychlost proteolýzy je určována přítomností proteolytických enzymů, které v sýru pocházejí z několika zdrojů. Obvykle je hlavním zdrojem proteolytických enzymů syřidlo, resp. koagulační činidlo. Většina syřidla však odchází do syrovátky a pouhých 0-15 % z aktivity syřidla je uplatněno ve sraženině během primární proteolýzy (proteolýza uskutečňovaná pomocí zbytků syřidlových preparátů). Množství zadrženého syřidla v sýřenině je ovlivňováno různými faktory, především se jedná o množství přidaného syřidla, pH během zpracování sýřeniny, iontovou sílu, množství kaseinů v mléce a velikost kaseinových micel. Dalšími významnými zdroji proteolytických enzymů jsou mléko, zákysové kultury a takéž

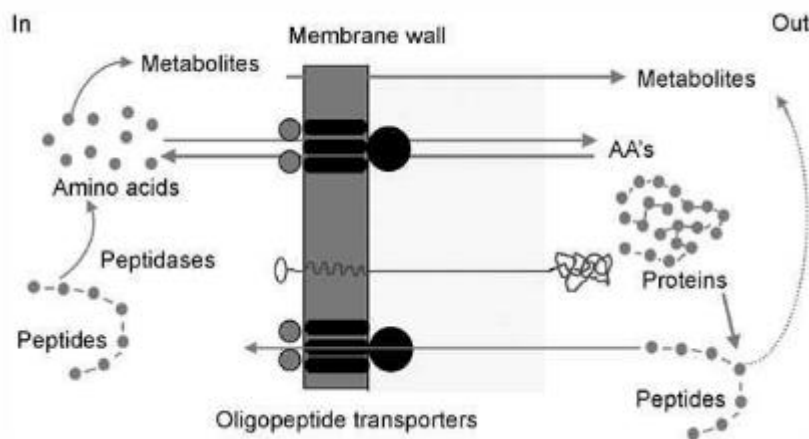
non-starterové bakterie mléčného kvašení. Odhaduje se, že až 25 % proteinů může podléhat během zrání proteolýze na peptidy a volné AMK [16, 17, 25].



Obr.1 Schéma proteolýzy a vzniku sensoricky aktivních látek [7]

Zpočátku jsou kaseiny štěpeny zbytkovou aktivitou syřidla, v menší míře plazminem na velké, ve vodě nerozpustné a středně dlouhé (ve vodě rozpustné) peptidy. Ty jsou dále degradovány opět pomocí syřidla, popř. plazminu a proteáz BMK na kratší řetězce, které mohou být dále hydrolyzovány prostřednictvím peptidáz BMK na krátké peptidy až volné AMK. Enzymatický aparát BMK zaujímá řadu enzymů s rozličnou úlohou. Extracelulární proteázy BMK štěpí velké peptidy, které nemohou procházet buněčnou membránou, na

malé. Zatímco intracelulární peptidázy BMK štěpí krátké peptidy přímo uvnitř buněk. Transport peptidů do buněk je však pomalý, a tak se tyto enzymy více projeví po uvolnění při lýze buněk a způsobí degradaci krátkých peptidů a produkci volných AMK ve větší míře. BMK jsou také zdrojem řady dalších enzymů, které mohou volné AMK přeměňovat na sensoricky aktivní látky. Schéma proteolýzy pomocí enzymatického aparátu BMK lze vidět na Obr. 2. Během klasického zrání goudy či eidamu nastává proteolýza pozvolna. Kvantitativně se hloubka zrání obvykle popisuje vývojem množství volných aminokyselin a produktů jejich rozkladu k celkovému obsahu dusíkatých látek. Degradací AMK mohou vznikat alkoholy, kyseliny, aldehydy, estery a sloučeniny síry, poskytující sýru specifické aroma. Ve středu sýrových bloků je stupeň proteolýzy obvykle vyšší vzhledem k vyššímu obsahu vody a nižšímu obsahu soli. Rozdíly ve složení sýrových bloků jsou výrazné zejména na počátku zrání. V kůře sýra je proteolýza obvykle utlumena během tří měsíců zrání v důsledku nízké vlhkosti [22].



Obr.2 Schéma proteolýzy a transportu aminokyselin a peptidů buněčnou membránou bakterií mléčného kvašení [16]

Právě proteolytické reakce mají na zrání sýrů holandského typu zásadní vliv. Ze sensorického hlediska jsou důležité zejména vznikající peptidy, AMK a degradační produkty AMK. Velké nerozpustné peptidy nepřispívají k aroma sýra, ale účastní se tvorby výsledné textury. Oproti tomu malé peptidy, volné AMK a degradační produkty AMK, které jsou těkavější a lépe rozpustné, tvoří velký podíl charakteristického sýrového aroma [30].

Proteolýza je zásadním faktorem pro vývoj textury sýrové hmoty, která je tvořena bílkovinou sítí. Nativní kaseiny provázané v trojrozměrné síti tvoří pevnou hmotu, zatímco jejich hydrolyzou vznikají kratší řetězce (peptidy), které již nejsou schopny vytvářet dostatečně pevnou síť. Tato síť je spíše méně pevná, méně soudržná až mazlavá. Měknutí sýra je způ-

sobeno hydrolýzou kaseinové matrice na kratší proteiny, peptidy a AMK. Při tomto ději se také vytvářejí nové hydrofilní skupiny (karboxylové skupiny a aminoskupiny), které váží přítomnou vodu, čímž klesá aktivita vody v prostředí sýra [12, 28].

Proteolýza je nezbytná pro vývoj požadované chuti a aroma sýra, avšak pokud je proteolýza nevyvážená (např. hromaděním některých peptidů, které nejsou dále odbourávány), může docházet ke vzniku nežádoucích pachutí sýra. Poměrně často se lze setkat s nahořklou chutí sýrů, která je způsobena zvýšeným obsahem hořkých hydrofobních peptidů s délkou řetězce 3 až 27 aminokyselinových zbytků. Hořké peptidy mohou vznikat v případě, že je doba sýření příliš dlouhá a chymozin začne štěpit i jiné peptidové vazby než mezi 105. a 106. AMK v κ -kaseinu. Avšak mohou být produktem i jiných proteáz, tvořených jak zákysovými, tak i nezákysovými bakteriemi mléčného kvašení. Výběrem rychle lyzujících starterových kultur lze snížit pravděpodobnost hromadění hořkých peptidů. Z buněk těchto bakterií se důsledkem brzké lýzy uvolní enzymy, které umožní jejich štěpení. Nedochozí tedy k nadměrnému hromadění těchto peptidů. Taktéž obsah soli silně ovlivňuje rychlost tvorby a degradace hořkých peptidů starterovými kulturami. Nečistá chuť je pak důsledkem degradace aromatických AMK a vznikem látek, jako jsou indol a skatol [12, 26].

3.5 Katabolismus aminokyselin

Aminokyseliny jsou konečným produktem proteolýzy, společně s krátkými peptidy přímo přispívají k pikantní chuti vyztálých sýrů, ale mohou také vstupovat do dalších reakcí a posloužit jako prekurzory vzniku sensoricky aktivních látek. Některé aminokyseliny mohou mít sladkou, kyselou nebo hořkou chuť. Aminokyseliny mohou vstupovat do dalších reakcí, kdy z nich vznikají aminy, kyseliny, amoniak, karboxylové sloučeniny či sloučeniny síry. Právě sloučeniny síry jsou považovány za důležité původce vzniku sýrového aroma. Lze jmenovat např. methanthiol, methional a z nich vznikající dimethyldisulfid, což jsou degradační produkty vznikající z methioninu. Zatímco kyselina isovalerová a 3-methylbutanal jsou látky vznikající z leucinu. Odhaduje se, že až polovina vonných látek jsou produkty katabolismu methioninu a leucinu. Přestože je katabolismus aminokyselin docela složitý děj, kdy produkty jedné reakce mohou sloužit jako výchozí látky pro druhou reakci, což může vést ke vzniku rozmanitých produktů (např. esterů), lze zmínit dva hlavní způsoby katabolismu aminokyselin. V prvním případě je z aminokyseliny pomocí aminotransferáz odštěpena aminoskupina, která je přenesena na vhodný akceptor. Touto cestou vznikají α -keto-kyseliny, které vstupují do dalších reakcí (dehydrogenace, dekarboxylace).

V druhém případě je aminokyselina štěpena pomocí lyáz, tímto způsobem vznikají např. sírné sloučeniny z methioninu. Aminokyseliny mohou být dále dekarboxylovány odštěpením karboxylové skupiny za vzniku aminu. Tímto způsobem mohou vznikat z aminokyselin biogenní aminy, které ve vyšších koncentracích mohou způsobit u citlivých jedinců nežádoucí fyziologické reakce. Z možných nežádoucích účinků biogenních aminů lze jmenovat migrénu, dýchací obtíže, pocení, hypotenzi a hypertenzi [24, 37, 38, 39, 40].

3.6 Lipolýza

Obsah tuku má zásadní význam pro aroma a texturu sýrů. Tuk je zdrojem volných mastných kyselin, a tím i jejich derivátů, které se z nich vytvářejí v průběhu zrání. Je také rozpouštědlem pro další sensoricky aktivní látky (uhlovodíky, ethery, estery,...). Lipolýza mléčného tuku je další biochemickou změnou, ke které dochází během zrání sýru. Lipolýzou se označuje degradace tuku, hydrolytická či oxidativní. Vzhledem k nízkému redoxnímu potenciálu sýrů, se povětšinou uplatňuje hydrolyza triacylglycerolů za vzniku volných mastných kyselin a mono- či diacylglycerolů. Tyto reakce jsou katalyzovány lipázami a esterázami různého původu (zákyslové kultury, non-starterové bakterie, mléko). Lipolýza je také velmi podstatná pro vývoj aroma sýrů během jejich zrání a může jej ovlivňovat jak žádoucím, tak i nežádoucím způsobem. Sensoricky aktivní mohou být samotné mastné kyseliny nebo jejich deriváty. Aroma mastných kyselin se odvíjí od délky jejich řetězce. Mastné kyseliny s kratším řetězcem do 6 atomů uhlíku) obvykle vykazují štiplavou, kyselou chuť a vůni. Pro mastné kyseliny se středním řetězcem (6 až 12 atomů uhlíku) je obvyklé mýdlové aroma. Kdežto mastné kyseliny obsahující ve své molekule dlouhý uhlovodíkový řetězec nevykazují žádnou chuť ani vůni. Mastné kyseliny jsou také důležitými prekurzory pro vznik dalších sensoricky aktivních látek (acetátů, metyl-keetonů, esterů, laktonů a dalších organických sloučenin) [17, 23].

Lipolýza se nejvíce uplatňuje u sýrů, do kterých se přidávají silně lipolytické sekundární kultury (např. sýry s plísní v těstě - Niva). Dalším možným zdrojem lipáz je syřidlová pasta (směs chymozinu s lipázou), využívaná např. při výrobě sýrů typu Pecorino či u sýrů ze syrového mléka. Vysoký obsah volných mastných kyselin je obvyklý zejména pro plísněvé sýry a sýry s mazem na povrchu. Naopak sýry typu Gouda mají nízkou hladinu volných mastných kyselin, nepodléhají tedy v průběhu zrání silné lipolýze. Pokud jsou tyto sýry vyráběny z mléka pasterovaného, ve kterém jsou nativní lipázy inaktivovány záhřevem, jsou iniciátory lipolýzy bakterie mléčného kvašení, které však vykazují významnější lipo-

lytickou aktivitu až v průběhu dlouhodobějšího zrání. U sýrů typu Gouda se příliš silná lipolýza považuje spíše za vadu označovanou jako žluknutí [12, 17].

3.7 Katabolismus mastných kyselin

V sýrech slouží volné mastné kyseliny jako důležité prekurzory sensoricky aktivních látek jako jsou methyl-ketony, laktony, estery, alkany a sekundární alkoholy. Methyl-ketony jsou nejdůležitější sensoricky aktivní látky v sýrech typu Niva a jsou zde přítomny ve vysokých koncentracích. Jsou tvořeny především pomocí ušlechtilých plísní (*Penicillium roqueforti*, *P. camemberti*) [8].

Po uvolnění MK z triacylglycerolů pomocí lipáz, dochází k jejich oxidaci na β -ketokyseliny a dekarboxylaci na alkan-2-ony, které mohou být dále redukovány na odpovídající sekundární alkohol. Reakcí volných mastných kyselin s alkoholy mohou vznikat v sýrech rozmanité estery, z nichž převládají ethyl-estery [8].

3.8 Zkrácení doby zrání

Z ekonomických důvodů je zájmem producentů sýrů zkrátit dobu zrání na minimum při zachování jakostních ukazatelů typických pro plně vyzrálé sýry. Některé druhy sýrů zrají při nízké teplotě měsíce až roky, což je finančně nákladné a projevuje se to v ceně výrobku. Objevují se tedy snahy zrací proces akcelarovat se současným zkrácením doby potřebné k vyzrání sýrů. Možnými způsoby jsou např. použití enzymových přípravků urychlujících biochemické změny během zrání sýrů, vyšší teplota zrání, působení zvýšeného tlaku, zaočkování startérovými kulturami se sníženou schopností produkovat laktát či přídavek doplňkových a geneticky modifikovaných kultur [8, 24, 41].

Zrání při zvýšené teplotě

Jedná se o poměrně levný, jednoduchý a často aplikovaný způsob, jak urychlit zrání sýrů. Nevýhodou je možnost zrychleného pomnožování nežádoucích a patogenních mikroorganismů, proto není vhodné aplikovat zvýšené teploty zrání na sýry vyrobené ze syrového mléka. Zvýšené teploty lze dobře využít u polotvrdých a tvrdých sýrů (např. Eidam, Gouda, Čedar), které jsou poměrně stabilní z důvodu nižšího obsahu vlhkosti. Při zvýšení skladovací teploty nižší než 10 °C, běžně používané pro skladování sýrů v obchodních řetězcích, na 12 °C, lze výrazně zkrátit dobu zrání. Eskin et al (2013) tvrdí, že lze teplotou

12 °C dobu zrání zkrátit až o 60 % bez změny textury či aroma (experiment prováděn na sýru typu Čedar) [8, 24, 41].

Aplikace vysokého tlaku

Urychlení zrání pomocí vysokého tlaku spočívá ve změnách proteinové matrice sýra a v urychlení lýze buněk. Bakterie jsou usmrceny, aniž by byly důležité enzymy denaturovány. Účinnost je však závislá na typu, velikosti, stáří sýra a také na teplotě, při které je sýr ošetřován, délce ošetření a velikosti použitého tlaku. Kromě urychlení zráního procesu zajistí ošetření vysokým tlakem zničení ostatním mikroorganismů, včetně patogenních a podmíněně patogenních, pokud jsou přítomny. Podle Smit (2003) ošetření Goudy a Eidamu tlakem 500 MPa po dobu 15 min vedlo ke snížení kontaminace *L. monocytogenes* o 6 log jednotek [24, 41].

Přídavek vybraných enzymů

Problém této metody spočívá v potřebě rozptýlit několik gramů enzymu do několika tun sýra. Přídavek enzymu do mléka před vlastním zahájením výroby sýra není žádoucí z důvodu ztráty většiny enzymu do syrovátky. Pro zachycení do matrice sýra lze použít enkapsulaci enzymu do fosfolipidového pouzdra, což je však nákladné, a proto v průmyslovém měřítku nepoužitelné. Vhodnou alternativou by mohla být enkapsulace do rostlinných gum. Při výrobě Čedaru je možné rozptýlit enzymy společně se solí v rozeleté sýřenině. Využití této metody pro sýry s pranou sýřeninou jako je Eidam a Gouda je však problematické. Enzymy je možné rozptýlit pomocí prací vody, což je ovšem spojeno se sníženou výtěžností a opět se ztrátami enzymu odplavením prací vodou. Možným způsobem je také injekce enzymů do zformovaného sýra. Aplikována je obvykle směs exo- a endopeptidáz, případně lipáz. Směs enzymů je třeba pečlivě zvážit pro zabránění vzniku netypického nevyváženého aroma. Dostupné komerční preparáty jsou např. AccelaseTM, FlavorAge (výrobce Chr Hansen) a Flavorpro 192 [8, 24, 41].

Přídavek kultur se sníženou schopností produkovat laktát

Primární funkcí kyselých kultur je fermentace laktózy a snižování pH tvorbou kyseliny mléčné, z tohoto důvodu není možné jednoduše aplikovat větší množství kultury. Pro urychlení zráního procesu byly vyvinuty kultury, jejichž schopnost fermentace laktózy je potlačena. Tyto kultury tedy neslouží k okyselení, ale jejich funkce spočívá v dodání enzymů pro biochemické reakce během zrání sýrů. Ošetření buněk lze provést různými způsoby, obvykle tepelným zákrokem, šokovým zmrazením, sprejovým sušením, působením

vysokého tlaku, dále mohou být buňky vystaveny subletálnímu působení lysozymu nebo povrchově aktivních látek či mohou být vybrány laktóza negativní mutanti. Laktóza negativní mutanti se přirozeně vyskytují v zákysových kulturách a jejich použití pro urychlení zrání sýrů se jeví jako praktická a ekonomická varianta. Výhodou je, že neexistují žádná omezení jejich používání, jako je tomu v případě používání geneticky modifikovaných zákysových kultur [24, 41].

Doplňkové kultury

Populárními doplňkovými kulturami mohou být *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. helveticus*. Jejich funkce taktéž spočívá v urychlení biochemických procesů během zrání. Vhodnými doplňkovými kulturami mohou být také některé kmeny probiotických kultur (někteří zástupci rodů *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*), které mohou taktéž podpořit vývoj aroma [24].

Geneticky modifikované kultury

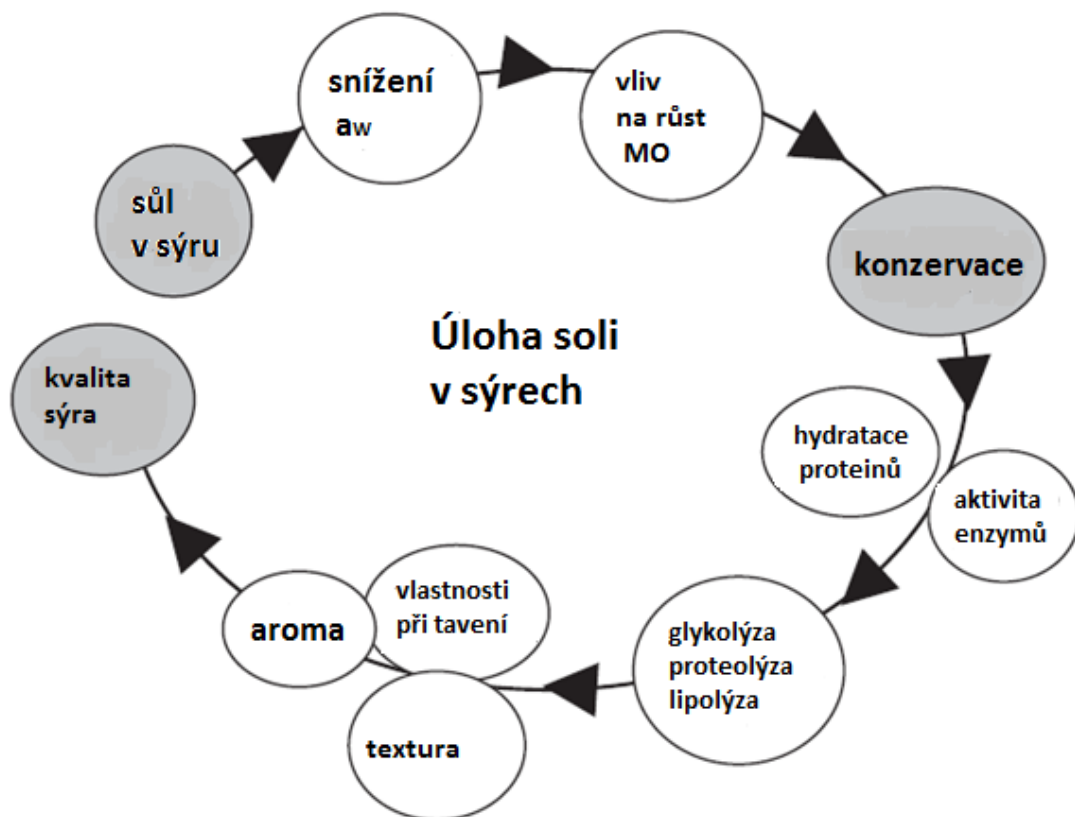
Genetické modifikace bakterií mléčného kvašení slouží ke třem účelům. Modifikuje se metabolismus laktózy, zvyšuje se aktivita peptidázy a urychluje se lýze bakteriálních buněk. U geneticky modifikovaných bakterií může být upraven způsob přeměny laktózy na klíčové meziprodukty, což může vést k jejich hromadění na vyšší než obvyklou koncentraci. Na trhu jsou taktéž dostupné geneticky modifikované kmeny *Lactococcus lactis* se zvýšenou produkcí aminopeptidáz, které mohou být použity ke zvýšení kvality a intenzity aroma holandských sýrů a čedaru. Peptidázy mohou sloužit jako prevence hromadění hořkých peptidů, které mohou způsobovat defekty v chuti sýrů. Současné výzkumy dokazují, že vývoj aroma je spojen s rychlostí a rozsahem lýze bakteriálních buněk a následným uvolněním jejich enzymů. Použití geneticky modifikovaných organismů (GMO) je však kontroverzní a v ČR je upraveno jak evropsku, tak i národní legislativou. V ČR je třeba řídit se především Zákonem č. 78/2004 Sb., o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty. V celé EU je pak platné Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1829/2003 o geneticky modifikovaných potravinách a krmivech. Častým problémem jsou také obavy spotřebitelů z GMO [8, 24, 45, 46].

4 VLIV SOLI NA VLASTNOSTI A ZRÁNÍ SÝRŮ

Sůl je jedním z nejstarších konzervačních prostředků na světě. Pokud je povrch potravin pokryt vrstvou soli, začne se sůl rozpouštět ve vodě, kterou potravina ve svém povrchu obsahuje, čímž na povrchu potravin vznikne velmi koncentrovaný solný roztok. Tento solný roztok vykazuje vysoký osmotický tlak, který inhibuje pomnožování bakterií a způsobuje migraci vody ze středu soleného sýra na jeho povrch a následně do roztoku. Tímto mechanismem dochází ke snižování obsahu vlhkosti v sýrech. Naopak sůl difunduje z povrchu potravin do jejího středu. Sled těchto dějů má na potraviny a na její trvanlivost zásadní význam. Význam soli v sýrech přehledně shrnuje Obr. 3 [13, 18].

Během solení je z potravin odnímána voda a do potravin difundují ionty Na^+ a Cl^- , což způsobí pokles aktivity vody v potravinech. Bakterie obsažené v potravinech trpí osmotickým stresem, což se projeví poklesem jejich aktivity (rozmnožování) až jejich smrtí. Pokles životaschopnosti některých buněk by se měl projevit pomalejším průběhem zrání více prosolených sýrů, avšak existují studie o zvýšení proteolytické aktivity při zvýšení koncentrace soli. Gandhi et al (2014) sledoval proteolytickou aktivitu *Lactobacillus acidophilus* v mléku s různou koncentrací soli a při různém pH. Životaschopnost buněk s rostoucím obsahem soli klesala. Avšak proteolytická aktivita se zvyšující se koncentrací soli (z 0 % soli na 2 %) rostla ve vzorcích při pH 5 a 6. Největší proteolytická aktivita však byla pozorována při pH 4 s 0 % NaCl [18, 29].

Obsah soli v sýrech se pohybuje v širokém rozmezí. Přibližně 0,5 % soli obsahují kyselé tvarohy. Kolem 6 % soli mají slané sýry typu Feta. Sůl se výrazně podílí na sensorických vlastnostech sýra, avšak má i řadu dalších funkcí. Sůl je jedním z hlavních faktorů určujících aktivitu vody, čímž ovlivňuje rozvoj mikroorganismů, aktivitu enzymů a rychlost biochemických změn v průběhu zrání sýrů, což má zásadní význam pro vývoj chuti a aroma sýru. Společně s hodnotou pH a obsahem vápenatých iontů sůl řídí stupeň hydratace či agregace kaseinů, což se odráží ve schopnosti vázat vodu či podléhat synerezi. Sůl je tedy významným faktorem působícím na reologické a texturní charakteristiky sýra. Slané sýry typu Feta či sýry s plísní v těstě mohou být zdrojem velkého množství sodíku. Ve vyspělých zemích, kde je doporučováno příjem sodíku z důvodu vzniku civilizačních chorob omezovat, může být nadměrná konzumace velmi slaných sýrů nežádoucí. Z tohoto důvodu se objevují snahy nahradit část NaCl v sýrech jinými solemi např. KCl. Ve vyšších koncentracích však KCl způsobuje hořkost, tudíž lze NaCl nahradit pouze z části [13].



Obr.3 Vliv soli na vlastnosti a kvalitu sýrů [13]

4.1 Vliv soli na aktivitu přítomné mikroflóry a hodnotu pH

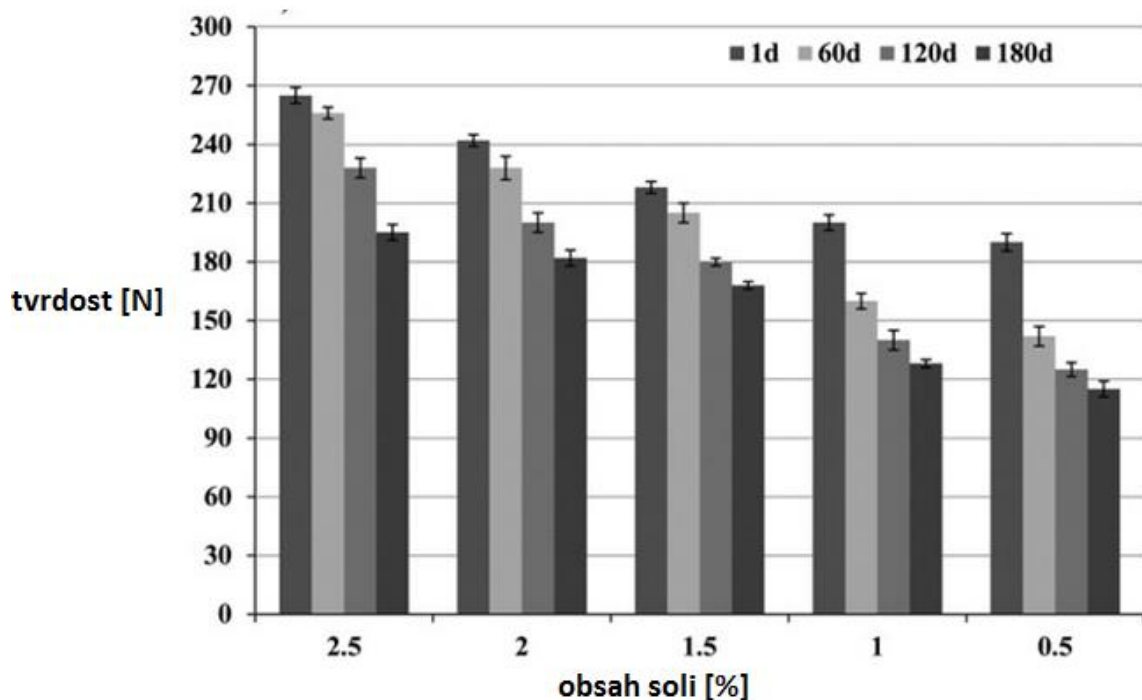
Vliv soli na hodnotu pH úzce souvisí s inhibicí mikroorganismů, především sýrařských kultur. Inhibice bakterií mléčného kvašení vyšší koncentrací soli vede ke snížení jejich metabolické aktivity a nižší produkci kyseliny mléčné, tudíž je pH slanějších sýrů vyšší. Více solené sýry mají také v porovnání s méně nasolenými sýry nižší vlhkost a menší zbytkové množství laktózy, což se také projeví zpomalením poklesu pH. Po delší době zrání však obvykle dochází k vyrovnávání rozdílů mezi hodnotami pH. Sýry holandského typu neobsahují po výrobním procesu mnoho laktózy, a proto je již po prvních dnech zrání veškerá laktóza přeměněna na kyselinu mléčnou [15,19,20, 32].

4.2 Vliv soli na obsah vody a texturu sýrů

Intenzita prosolení zásadně ovlivňuje obsah zadržené vody v sýru, což se projeví na textuře sýrů. S délkou solení a koncentrací solné lázně klesá obsah vlhkosti v sýru [15].

Vyšší poměr obsah soli/vlhkosti způsobí zvýšení pevnosti sýrů. Tuhle skutečnost lze přičíst různým faktorům, na které má obsah soli vliv. Reologické vlastnosti sýrů souvisejí především s obsahem vody, stupněm hydratace kaseinů a stupněm synerexe, které mohou být mimo jiné ovlivněny obsahem soli v matici sýrového bloku. Texturní vlastnosti sýrů jsou dále ovlivněny také intenzitou hydrolyzy proteinové sítě, jejíž intenzita může být ovlivněna obsahem soli, resp. částečnou inhibicí zástupců přítomné mikroflóry a jejich enzymů. Vliv obsahu soli na tvrdost sýrů vystihuje graf na Obrázku 4. Je patrné, že čím je obsah soli nižší a doba zrání delší, tím jsou sýry méně tvrdé [13, 15, 27].

Dosud není k dispozici dostatek informací o potenciálním vlivu soli na stupeň hydratace kaseinů. Malé přídavky soli (do 1,4 %) zvyšují schopnost kaseinů vázat vodu, čímž ovlivní reologické vlastnosti sýra, a to může mít pozitivní i negativní dopad na kvalitu sýrů [13].



Obr.4 Vliv obsahu soli a doby zrání na tvrdost sýrů [27]

4.3 Vliv soli na rychlost proteolýzy

Vědecké zdroje poskytují lišící se výsledky, zda zvyšující se obsah soli ovlivňuje rychlost proteolýzy pozitivně či negativně. Jak již bylo uvedeno výše, rychlost proteolýzy ovlivňují především tyto činitele: množství zadržného syřidla a plazminu v sýřenině, proteolytická aktivita startérových kultur a non-starterových bakterií mléčného kvašení, rychlost lýzy bakteriálních buněk a aktivita proteolytických enzymů. Všechny tyto činitele může obsah

soli v sýru ovlivnit, a tudíž je těžké určit, který z těchto vlivů převládne. Také způsob solení může mít významný dopad na vliv soli během zrání sýrů. Solení do mléka před vlastním sýřením (tradiční např. pro egyptský sýr Domiati) způsobí uvolňování plazminu z kaseinových micel. Ten je pak zadržen v sýřenině v menším množství a vzhledem k tomu, že se jedná o jeden z významných činitelů proteolýzy, může být její rychlost podstatně snížena [33].

Se zvyšující se koncentrací soli může rychlost proteolýzy klesat v důsledku poklesu životaschopnosti startérových a non-starterových bakterií mléčného kvašení. Činnost bakterií a jejich enzymů je inhibována sníženým obsahem vlhkosti a sníženou aktivitou vody (a_w) ve slanějších sýrech. Rychlost proteolýzy však nezávisí pouze na počtu životaschopných buněk. Samotná proteolytická aktivita živých buněk může být s nárůstem koncentrace soli vyšší. Např. *Lactobacillus acidophilus* vykazuje různou proteolytickou aktivitu v závislosti na kmeni a různých růstových podmínkách (pH, koncentrace soli,...), přičemž při nižším pH a vyšší koncentraci soli je jeho proteolytická aktivita vyšší. Jiná studie zveřejňuje výsledky, kde celkový obsah volných aminokyselin (jeden z ukazatelů stupně proteolýzy) roste se zvyšujícím se obsahem soli v sýru [27, 29, 31].

Navíc sůl také ovlivňuje rychlost lýzy bakterií mléčného kvašení, což je důležitý krok při zrání sýrů, při kterém se z buněk uvolní enzymy a dostanou se do kontaktu se substrátem (sýrovou hmotou). Autolýza buněk *Lactococcus lactis* je kmenově specifická, ale obecně je rychlejší v prostředí s nízkou koncentrací soli v kyselém pH. Oddálením autolýzy může sůl zpomalit průběh zrání, včetně proteolýzy [35].

Solení jak suché, tak i v solance, významně zvyšuje dehydrataci povrchu sýra a vznik kůry. Právě dehydratace povrchových částí sýra zpomaluje rychlost proteolýzy. Stejný výzkum také sledoval inhibici vzniku rozpustných dusíkatých látek ve v různých vrstvách sýra v průběhu zrání, kdy sůl difundovala z povrchových vrstev dovnitř [34].

Murtaza et al. (2014) zveřejňuje výsledky svých experimentů, ve kterých sledoval vývoj obsahu volných aminokyselin (FAA) a ve vodě rozpustných dusíkatých látek v průběhu zrání Čedaru v závislosti na obsahu soli. V této studii bylo popsáno, že více solené vzorky obsahovaly menší množství volných aminokyselin a ve vodě rozpustných dusíkatých látek (ukazatelé stupně proteolýzy) ve všech odběrech po celou dobu zrání. Vzhledem k faktu, že Čedar je sýr solený do těsta a koncentrace soli je vyrovnaná v celé hmotě sýra během

velmi krátkého časového intervalu, budou se výsledky sýrů solených v solné lázni pravděpodobně lišit [27].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo sledovat vliv různého obsahu NaCl na průběh zrání přírodních sýrů holandského typu. Pro naplnění tohoto cíle byly provedeny tyto kroky:

- zavedení výrobního postupu přírodních sýrů, a to se zaměřením na optimalizaci základních mlékárenských ošetření mléka,
- výroba modelových vzorků sýrů s různou kulturou a o různé velikosti bloku sýrů,
- úprava obsahu NaCl modelových vzorků sýrů v daných šaržích na dvě slanosti prostřednictvím rozdílného způsobu solení v solné lázni,
- porovnání proteolytických změn modelových vzorků v průběhu skladovacího experimentu v závislosti na obsahu NaCl a velikosti sýrů,
- sledování produkce sekundárních metabolitů proteolýzy v závislosti na množství soli v modelových vzorcích sýrů,
- sledování různé koncentrace NaCl na texturní vlastnosti modelových vzorků.

6 METODIKA

6.1 Výroba modelových vzorků

Materiál a pomůcky:

- Syrové kravské mléko od místního producenta
- Lyofilizované mezofilní kultury CHN19, Flora Danica (Chr Hansen, ČR)
- Chlorid vápenatý 36% (Milcom a.s., ČR)
- Syřidlo Chymax (Chr Hansen, ČR)
- Potravinářská sůl (Herold řeznické potřeby s.r.o., ČR)
- Antimykotikum Delvocid (O.K. Servis BioPro s.r.o., ČR)
- Dezinfekce kyselina peroctová - Divosan Activ (Diversey, ČR)
- Termostat Microbiological IL53 (VWR, EU)
- Laboratorní odstředivka FT15 (Armfield Inc., UK)
- Laboratorní pastér FT75 (Armfield Inc., UK)
- Výrobník (Driml, ČR)
- Analytické váhy (A&D GH-200 EC, LABICOM s. r. o., ČR)
- Vakuová balička Mini Jumbo (Henkelman, NL)
- Zrací komora (Candy, IT)
- Germicidní UV-lampa NBVE 110/55 (Ultra Viol, Polsko)

Výrobní postup:

Byly vyráběny modelové vzorky sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou. Celkem byly vyrobeny čtyři šarže malých bloků a dvě šarže velkých bloků. Všechny pomůcky byly před použitím řádně dezinfikovány kyselinou peroctovou. Prostory a plochy byly přes noc ošetřeny UV zářením. Nejprve bylo syrové mléko o objemu 20 l při výrobě malých bloků nebo 15 l při výrobě velkých bloků přehřáto na 35 °C. Následovalo odstředění mléka (laboratorní odstředivka FT15, Armfield Inc., UK) a jeho standardizace na obsah tuku 2,5 %. Pomocí laboratorního pastéru (FT75, Armfield Inc., UK) byla provedena šetrná pasterace (74 °C po dobu 30 s). Po pasteraci byla upravena teplota mléka na inokulační teplotu (32 °C) a mléko bylo zaočkováno 0,5 g mezofilní kultury do 20 l mléka nebo 0,38 g kultury do 15 l mléka (specifikace použitých kultur je uvedena v Příloze PI). Použité kultury a vyrobené šarže modelových vzorků jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tab.1 Kódování vyrobených šarží

kultura CHN19		kultura Flora Danica	
Výroba dne:	Kód šarže:	Výroba dne:	Kód šarže:
22.7.2014	šarže A , malé bloky	28.7.2014	šarže C , malé bloky
24.7.2014	šarže B , malé bloky	31.7.2014	šarže D , malé bloky
23.7.2014	šarže V1 , velké bloky	29.7.2014	šarže V2 , velké bloky

Do zaočkovaného mléka bylo aplikováno 10 ml CaCl_2 (do 20 l mléka) či 7,5 ml CaCl_2 (do 15 l mléka) a mléko bylo důkladně promícháno. Po dobu 30 minut probíhala za občasného promíchání mléka aktivace kultury. Pro sýření bylo použito 640 μl (do 20 l mléka) či 480 μl (do 15 l mléka) syřidla (Chymax M, Chr Hansen, ČR) zředěného přibližně 6,5 ml vody. Syřidlo bylo rozptýleno v mléce, hladina byla ustálena a mléko bylo ponecháno v klidu po dobu 30 minut. Po sýření byla sraženina opatrně prokrojena na hranoly 5x5 cm. Následovalo vytužení 10 minut v klidu, následovalo 20 minut pomalého míchání v syrovátce, při kterém došlo k drobení zrna. Před dohříváním bylo odebráno přibližně 5 l syrovátky, následně byla přidána prací voda o teplotě 80 °C pro dosažení dohřívací teploty 42 °C. Dosození probíhalo za stálého míchání po dobu 90 minut. Následovalo slítí sýřeniny do forem vyložených plachetkou, kde probíhalo předlisování po dobu 30 minut. Vždy po 10 minutách byla sýřenina ve formě přetočena pro rovnoměrnější odtok syrovátky.

➤ Výroba malých bloků

Po předlisování ve dvou velkých formách byla sýřenina z každé formy rozkrájena na 12 částí. Rozkrájená sýřenina byla napěchována do celkem 24 formiček, v nichž probíhalo konečné formování a lisování. Po napěchování se na formičky umístilo závaží, které bylo vždy po 30 minutách navyšováno tak, aby výsledná zátěž činila přibližně 70 kg na 1 kg syra. Celková doba lisování činila 90 minut. Tímto způsobem se získalo v každé šarži 24 bloků o přibližné hmotnosti 90 g.

➤ Výroba velkých bloků

Po předlisování ve velké formě byla sýřenina rozkrájena na 3 části, které byly napěchovány do forem, ve kterých probíhalo formování a lisování. Na formy bylo postupně umístováno závaží až do zátěže přibližně 40 kg na 1 kg syra, která působila 60 minut. Následně

byla zátěž odstraněna a sýry byly ve formách obráceny pro podpoření rovnoměrného lisování. Sýry byly opět postupně lisovány s konečnou zátěží přibližně 70 kg na 1 kg sýra po dobu 70 minut. Celková doba lisování tedy byla 3 hodiny. Tímto způsobem se získalo celkem 3 bloky sýrů o hmotnosti přibližně 450 g.

Vylisované sýrové bloky (bez ohledu na jejich velikost) byly vyjmuty z forem a umístěny do vydezinfikovaných zracích nádob. Takto připravené sýrové bloky byly umístěny do zrací komory, kde byly ponechány k prokysání (při 16 °C, po dobu 12 hodin). Na závěr byly prokysané sýrové bloky soleny pomocí solných lázní.

Solení probíhalo (při chladírenských teplotách 8 ± 2 °C) různými způsoby podle velikosti sýrových bloků a podle požadovaného obsahu soli v solném roztoku o koncentraci 20 % (w/w):

➤ Malé bloky

- Nižší slanost (cílený obsah soli 2 %) – 30 minut ve 20% solném roztoku
- Vyšší slanost (cílený obsah soli 3 %) – 3 hodiny ve 20% solném roztoku (po 30 a 90 minutách solení byla solná lázeň zaměněna za novou pro udržení optimální koncentrace solné lázně a podpoření koncentračního gradientu)

➤ Velké bloky

- Nižší slanost (cílený obsah soli 1,5 %) – 5 hodin ve 20% solném roztoku
- Vyšší slanost (cílený obsah soli 2,5 %) – 24 hodin ve 20% solném roztoku

Nasolené sýrové bloky byly vyjmuty ze solné lázně a ponechány 30 minut oschnout. Následně byly po dobu 4 s ponořeny do antimykotického roztoku Delvocidu o koncentraci 0,3 % a opět ponechány oschnout. Vyrobené sýrové bloky byly posléze zabaleny do smrštivé folie a umístěny do zrací komory (12 ± 1 °C). Vzorčky malých bloků sýrů byly odebírány k analýzám po 14, 28, 56 a 84 dnech zrání, přičemž v každém odběrovém dni byly analýzám podrobeny vždy 2 bloky sýrů. V případě velkých bloků byly odběry vzorků provedeny po 56 dnech zrání, přičemž u těchto bloků sýrů byl odkrojen okraj o tloušťce 1 cm, který byl analyzován zvlášť pro posouzení změn v různých segmentech sýra.

6.2 Základní chemická analýza

Pomůcky a chemikálie:

- Vpichový pH-metr (EUTECH INSTRUMENTS, The Netherlands)
- Sušárna (Venticell, Brněnská Medicinská Technika a. s., ČR)

- Analytické váhy (A&D GH-200 EC, LABICOM s. r. o., ČR)
- 5% roztok chromanu draselného
- dusičnan stříbrný o koncentraci 0,1 mol/l

6.2.1 Stanovení pH

Hodnota pH byla měřena vpichovým pH metrem (EUTECH INSTRUMENTS The Netherlands). Pro přesnější výsledky bylo pH stanoveno jako průměrná hodnota ze tří měření na různých místech sýrového bloku (n=6).

6.2.2 Stanovení obsahu sušiny

Obsah sušiny byl ve vzorcích stanovován sušením do konstantního úbytku hmotnosti (dle normy ČSN EN ISO 5534). Sušící misky s křemičitým místem byly předem vysušeny pomocí sušárny (Venticell, Brněnská Medicinská Technika a. s., ČR) a zváženy. Následně do nich byly naváženy 3 g vzorku sýra, které byly promíchány s pískem. Takto připravený vzorek byl umístěn do sušárny a sušen při 105 ± 1 °C do konstantního úbytku hmotnosti. Vysušené vzorky byly umístěny do exsikátoru pro vychladnutí a poté zváženy. V každém sýrovém bloku byl obsah sušiny stanoven ve dvou opakováních (n=4).

Výpočet obsahu sušiny byl proveden pomocí vzorce:

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

kde:

m_1 – hmotnost misky s pískem [g]

m_2 – hmotnost vzorku před sušením [g]

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

6.2.3 Stanovení obsahu soli

Obsah soli byl stanovován titračně podle Mohra. Z důvodu menšího množství vzorků byl postup následovně modifikován: pro analýzu byl navážen 1 g vzorku sýra (analytické váhy A&D GH-200 EC), který byl rozmělněn v třecí misce s 10 ml teplé destilované vody (60 °C). Takto připravený vzorek byl kvantitativně převeden do titrační baňky. Posléze byl přidán indikátor (2 ml 5% roztoku chromanu draselného (IPL, Ing. Petr Lukeš, ČR). Jako

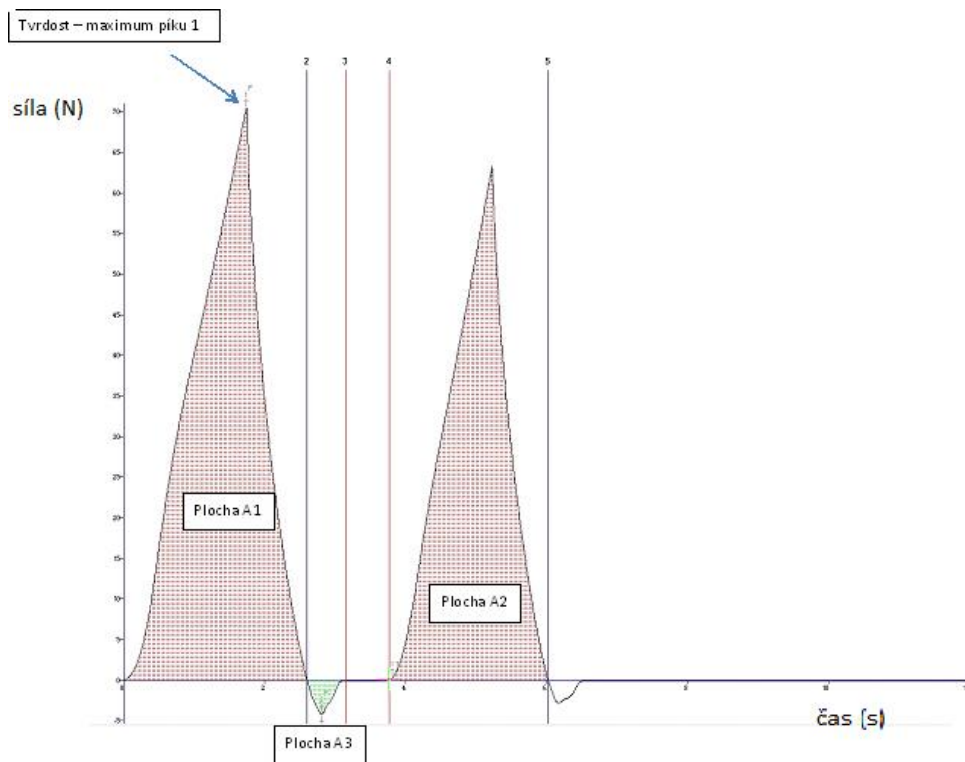
odměrný roztok byl použit dusičnan stříbrný o koncentraci 0,1 mol/l (Lach-Ner, s.r.o., ČR), jehož přesná koncentrace byla určena standardizací. Titrace probíhala do dosažení bodu ekvivalence (indikace vizuálně, oranžové zbarvení s výdrží 30 s). V každém sýrovém bloku byl obsah soli stanoven ve dvou opakováních (n=4).

6.3 Texturní profilová analýza

U modelových vzorků byly analyzovány texturní charakteristiky, především tvrdost. Hodnocení textury bylo prováděno instrumentálně pomocí texturometru TA.XT Plus (Stable Micro Systems, UK), který je zobrazen na Obrázku 5. Ze vzorku sýra byl vykrojen středový váleček o průměru 35 mm a výšce 20 mm, který byl umístěn na podložku analyzátoru. Textura polotvrdého sýru byla hodnocena kompresním testem, který spočíval v dvojnásobném stlačení vzorku sondou o průměru 50 mm. Vzorek byl stlačen o 25 % původní výšky rychlostí 2 mm/s. Výstupem tohoto měření je křivka zobrazená na Obrázku 6. Tvrdost je definována jako maximální síla v N dosažená během prvního stlačení.



Obr.5 Texturometr TA.XT Plus [36]



Obr.6 Křivka texturní profilové analýzy (závislost síly [N] na čase [s])

6.4 Stanovení obsahu volných aminokyselin

Vzorek sýra byl po stanovené době zrání nastrouhán a lyofilizován (lyofilizátor; ALPHA 1-4 LSC, CHRIST, LABICOM s.r.o., ČR), aby bylo možné jej skladovat do okamžiku analýzy. Před samotnou analýzou bylo třeba provést extrakci ze sušené hmoty sýra. Extrahováno bylo třístupňově lithno-citrátovým pufrem. Do zkumavky byl navážen 1 g lyofilizovaného vzorku a k němu bylo přidáno 10 ml lithno-citrátového pufru. Následovalo dokonalé protřepání ručně a následně 30 minut na třepačce (LT2). Pro snadnější slití supernatantu byla disperze odstředěna 10 minut při rychlosti 6 000ot/min (odstředivka; EBA 21, Hettich ZENTRIFUGEN, Germany, Tuttlingen). Po usazení sýrové hmoty byl supernatant přelit do 25ml odměrné baňky. Ke vzorku byl do zkumavky opět přidán lithno-citrátový pufr v množství 7 ml a postup byl opakován. Poté bylo přidáno posledních 7 ml lithno-citrátového pufru a postup byl potřetí zopakován (trojnásobná extrakce). Získaný supernatant v odměrné baňce byl doplněn po rysku lithno-citrátovým pufrem. Pro přichystání k chromatografii byl extrakt rozpipetován do ependorfeček a odstředěn při 15 000ot/min po dobu 45 minut (odstředivka MIKRO 200R, Hettich ZENTRIFUGEN, Germany, Tuttlingen). Dále byl extrakt zfiltrován přes stříkačkový filtr o porozitě 0,45 μm . Takto připravený vzorek byl analyzován na automatickém analyzátoru aminokyselin AAA 400 (Ingot,

Praha). Jedná se o iontově výměnnou chromatografii s postkolonovou ninhydrinovou derivatizací. Eluční program je zaznamenán v Příloze II.

Seznam chemikálií pro přípravu pufrů:

- Kyselina citronová, p.a. LACHNER
- Citronan litný, p.a. ZMBD Chemik s.r.o
- Chlorid litný, p.a. ZMBD Chemik s.r.o
- Hydroxid litný, p.a. ZMBD Chemik s.r.o

Seznam chemikálií pro přípravu ninhydrinu:

- Ninhydrin, pro AAA400, ZMBD Chemik s.r.o
- Methylcellosolv pro AAA400, ZMBD Chemik s.r.o
- Acetátový pufr pro AAA400, ZMBD Chemik s.r.o

6.5 Stanovení biogenních aminů

Stejně jako při analýze volných AMK byly vzorky po stanovené době zrání nastrouhány a lyofilizovány. Opět bylo před vlastním stanovením nutné provést extrakci. Extrakce byla třístupňová pomocí 0,6M kyseliny chloristé (MERCK). Do zkumavky byl navážen 1 g lyofilizované sýrové hmoty (na analytických vahách; A&D GH-200 EC, prodejce LABICOM s.r.o., ČR, Olomouc) a bylo přidáno 10 ml kyseliny chloristé (MERCK). Disperze byla nejprve řádně protřepána ručně a posléze 30 minut na třepačce (LT2). Následovalo odstředění 10 minut při 6 000 ot/min (odstředivka; EBA 21, Hettich ZENTRIFUGEN, Germany). Supernatant byl slit do 25ml odměrné baňky. Celý postup proveden 3x (trojnásobná extrakce), druhá a třetí extrakce byla provedena 7 ml kyseliny chloristé (MERCK). Supernatant byl v odměrné baňce doplněn po rysku kyselinou chloristou (MERCK). Následně byl roztok rozpipetován do endorfeček. Ze střední vrstvy (tak aby nebyla přenesena případná tuková vrstva na povrchu) roztoku byl odebrán 1 ml, který byl převeden do derivatizační nádoby, kam bylo přidáno 100 µl vnitřního standardu (1,7-heptandiamin v koncentraci 500 mg/l; SIGMA - ALDRICH), 1,5 ml karbonátového pufru o pH 11,0-11,1 a 2 ml čerstvě připraveného roztoku dansylchloridu o koncentraci 5 g/l v acetonu (SIGMA - ALDRICH). Následně byla derivatizační nádoba uzavřena a třepána 20 hodin na třepačce v temnu. Druhý den bylo přidáno 200 µl roztoku prolinu (MERCK) a opětovně třepáno na třepačce po dobu 1 hodiny. Posléze bylo přidáno 3 ml heptanu (CHROMASOLV®, for

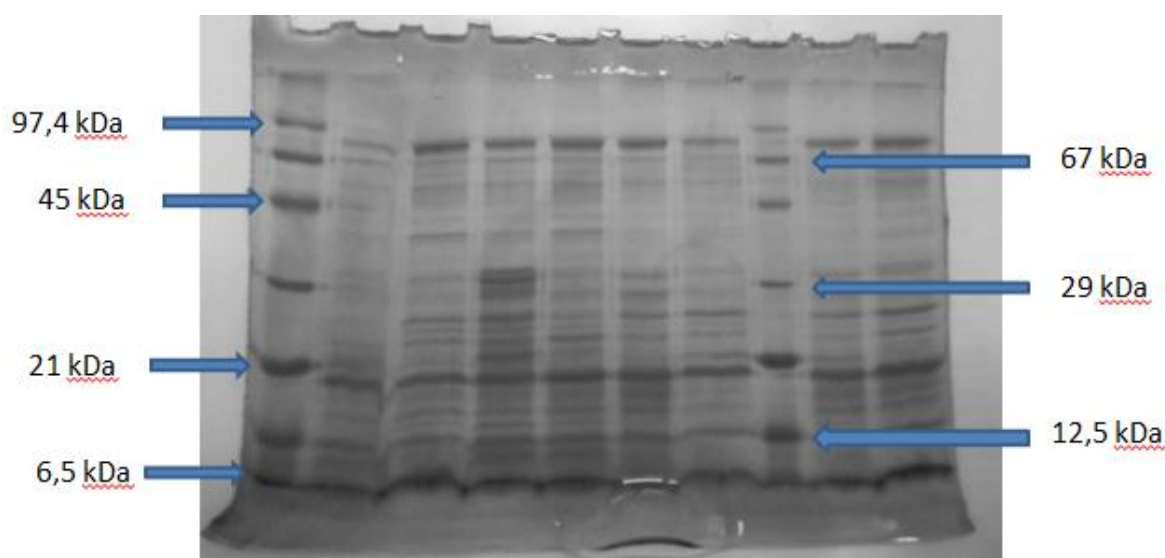
HPLC, $\geq 99\%$ - SIGMA – ALDRICH) a 3 minuty bylo se vzorky třepáno ručně. Po oddělení vrstev byl z heptanové vrstvy odebrán 1 ml, který byl přemístěn do vialky. Heptan byl odpařen při 60 °C v termobloku (EVATERM) pod proudem dusíku (tlaková lahev, Linde Gas a.s., Otrokovice). Suchý odparek byl ve vialce zředěn 1,5 ml acetonitrilu (CHROMASOLV® Plus, for HPLC, $\geq 99.9\%$, SIGMA – ALDRICH). Do okamžiku analýzy byl takto připravený vzorek uchovávan v mrazícím zařízení při -18 °C. Před vlastní analýzou byl vzorek zfiltrován přes stříkačkový filtr s porozitou 0,22 μm . Vzorky byly analyzovány metodou HPLC (binární pumpa LabAlliance, USA, autosampler LabAlliance, USA, kolona s termostatem; UV/VIS DAD detektor ($\lambda = 254 \text{ nm}$); a degaser 1260 Infinity, Agilent Technologies). Jako standardy byly použity histamine, approx.97%, 2-phenethylamine, tyramine 99%, putrescine dihydrochloride, cadaverine, agmatine sulfate, spermidine, spermine, tryptamine, 1,7-diaminoheptane (vše od Sigma – Aldrich).

6.6 Stanovení proteinového profilu

Proteinový profil byl sledován metodou SDS-PAGE, tedy sodium dodecylsulfát polyakrylamidovou gelovou elektroforézou. Nejprve bylo třeba provést extrakci. Byl navážen 1 g nastrouhaného lyofilizovaného vzorku sýra, který byl ve zkumavce extrahován 3 ml destilované vody při 40 °C po dobu 3 hodin. Následně bylo odebráno 100 μl supernatantu, ke kterému bylo přidáno 25 μl 20% roztoku SDS (SERVA Electrophoresis GmbH, Německo), 12,5 μl merkaptoetanolu (SERVA Electrophoresis GmbH, Německo) a 115 μl vzorkového pufru. Takto připravený vzorek byl promíchán na Vortexu a následně ponechán 10 minut při 100 °C inkubovat, aby byla zajištěna denaturace proteinů. Připravené vzorky byly do okamžiku analýzy uchovávány při mrazírenských teplotách.

Pro stanovení proteinového profilu byla použita vertikální elektroforetická aparatura (Bio-Rad, USA), která umožňuje zapojení dvou gelů současně. Pro separaci byly použity 17% polyakrylamidové gely, které byly připraveny smísením 14,17 ml 30% roztoku akrylamidu, 6,25 ml Tris pufru (o pH 8,8), 4,08 ml deionizované vody, 250 μl 10% roztoku SDS (SERVA Electrophoresis GmbH, Německo), 10 μl N,N,N,N – tetra-metylendiamin (SERVA Electrophoresis GmbH, Německo) a 250 μl 10% persíranu amonného (SERVA Electrophoresis GmbH, Německo). Ihned po promíchání byla připravená směs nadávkována mezi elektroforetická skla a byla přelita malým množstvím vody pro zabránění vysychání. Po ztuhnutí byly gely pomocí filtračního papíru osušeny pro odstranění přebytečného množství vody a převrstveny 5% koncentračním gelem (2,04 ml 30% roztoku akryla-

midu, 3 ml tris pufru o pH 6,8, 6,9 ml deionizované vody, 120 μ l 10% roztoku SDS, 60 μ l 10% persíranu amonného a 15 μ l N,N,N,N – tetrametylendiaminu), do kterého byly před ztuhnutím umístěny hřebínky pro vytvoření jamek. Polymerace probíhala při pokojové teplotě do druhého dne, kdy byly hřebínky opatrně vyjmuty a do jamek byly nadávkovány vzorky v objemu 30 μ l (vzorky z 1. odběru neřaděné, od druhého odběru vzorky naředěné 1:2 (vzorek : vzorkový pufr)) spolu s hmotnostními standardy (SERVA Electrophoresis GmbH, Německo). Takto připravené gely byly ve sklech umístěny do rámu s elektrodami, který byl následně umístěn do elektroforetické vany. Do prostoru mezi skla a do prostoru elektroforetické vany byl nalit žlutý elektrodotový pufr dle Laemliho – specifikace je uvedena v příloze PIV (SERVA Electrophoresis GmbH, Německo). Dále byla celá vana překryta víkem, které bylo připojeno ke zdroji stejnosměrného proudu. Z počátku, kdy vzorky putovaly koncentračním gelem, byl zvolen proud 25 mA. Po průchodu koncentračním gelem byla velikost proudu navýšena na 40 mA. V okamžiku, kdy čelo elektroforézy dosáhlo spodního okraje separačního gelu, byl zdroj proudu odpojen a gely ve sklech vyjmuty. Poté byly od sebe odděleny skla, ze separačního gelu byl odstraněn koncentrační gel a získaný separační gel byl umístěn na 30 minut do fixačního roztoku (Příloha III). Po zafixování byl gel opláchnut vodou a vložen na 1 hodinu do barvicího roztoku (Příloha III). Po vyjmutí byly zbytky barvicího roztoku z gelu spláchnuty vodou a gel byl přelit odbarvovacím roztokem (Příloha III). V okamžiku, kdy byly jednotlivé bandy viditelné a zbytek gelu byl dostatečně odbarvený, byly gely z odbarvovacího roztoku vyjmuty a vyfoceny. Získané fotky byly podle potřeby upraveny a vyhodnoceny pomocí programu Bio-1D.



Obr.7 Ukázka proteinových profilů stanovených metodou SDS-PAGE s vyznačenými molekulovými hmotnostmi standardu

Seznam chemikálií pro SDS-PAGE

- **30% roztok akrylamidu**

Akrylamid research grade (SERVA Electrophoresis GmbH, Německo)

N,N'-metylen-bisakrylamid research grade (SERVA Electrophoresis GmbH, Německo)

- **Tris pufr pro separační gel, pH 8,8**

Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Duchefa Biochemie, B. V, Nizozemí)

Pomocí koncentrované HCl (Lach-Ner, s.r.o., Česká republika) upravit pH

- **Tris pufr pro koncentrační gel, pH 6,8**

Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Duchefa Biochemie B. V, Nizozemí)

Pomocí koncentrované HCl (Lach-Ner, s.r.o., Česká republika) upravit pH

- **Chemikálie pro vzorkový pufr**

Tris-HCl research grade (SERVA Electrophoresis GmbH, Německo)

2-Merkaptoetanol research grade (SERVA Electrophoresis GmbH, Německo)

Glycerol p.a. (Lach-Ner, s.r.o., Česká republika)

Bromfenolová modř (SERVA Electrophoresis GmbH, Německo)

- **Chemikálie pro fixační roztok**

Etanol, 96% (Lach-Ner, s.r.o., Česká republika)

Kyselina octová, (IPL, Ing. Petr Lukeš, Česká republika)

Doplnit do 100 ml deionizovanou vodou.

- **Barvicí roztok**

Coomassie Blue R-250 p.a. (SERVA Electrophoresis GmbH, Německo)

Methanol p.a. (IPL, Ing. Petr Lukeš, Česká republika)

Kyselina octová p.a. (IPL, Ing. Petr Lukeš, Česká republika)

- **Odbarvovací roztok**

Methanol p.a. (IPL, Ing. Petr Lukeš, Česká republika)

Kyselina octová p.a. (IPL, Ing. Petr Lukeš, Česká republika)

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Základní chemická analýza

Stanovení pH

U modelových vzorků bylo v průběhu zrání měřeno pH vpichovým pH-metrem. Vývoj pH u malých bloků dokumentuje Tabulka 2. Po 14 dnech zrání bylo pH vzorků inokulovaných kulturou CHN19 v rozmezí 4,91 až 5,01. Následně pH rostlo až na hodnoty 5,32 až 5,51, kterých dosáhlo v 56. dni zrání. Při posledním odběru (84 den zrání) byl sledován mírný pokles na hodnoty v rozmezí 5,28 až 5,38. Mezi vzorky s rozdílnou slaností nebyly sledovány významné rozdíly.

Vývoj pH v malých blocích inokulovaných kulturou Flora Danica zachycuje opět Tabulka 2. Po 14 dnech zrání bylo pH šarže C 5,41. Následně pH mírně pokleslo na hodnoty 5,35 až 5,38 (28 den zrání). Po 56 dnech zrání pH vzrostlo na 5,46 a po 84 dnech zrání dosáhlo hodnot 5,30 až 5,47. V případě šarže D pH zůstávalo po celou dobu zrání poměrně nízké, na hodnotách kolem 5,07 až 5,23. Rozdíly mezi jednotlivými šaržemi mohly vzniknout v důsledku výskytu non-starterových bakterií mléčného kvašení, které během zrání postupně převládnu nad sýrařskými kulturami a významně se tak podílí na změnách v matrici zrajícího sýra [17].

Tab.2 Vývoj průměrných hodnot pH v průběhu zrání modelových vzorků, NS (nižší solení), VS (vyšší solení)

Vzorek			Doba zrání (dny)			
			14	28	56	84
CHN19	šarže A	NS	4,99±0,03	5,18±0,02	5,51±0,07	5,28±0,09
		VS	4,91±0,09	5,33±0,05	5,46±0,01	5,38±0,08
	šarže B	NS	5,01±0,04	5,32±0,10	5,40±0,08	5,30±0,04
		VS	4,94±0,05	5,32±0,03	5,32±0,09	5,30±0,01
F. Danica	šarže C	NS	5,41±0,08	5,35±0,03	5,46±0,06	5,47±0,12
		VS	5,41±0,08	5,38±0,03	5,46±0,02	5,30±0,03
	šarže D	NS	5,23±0,04	5,15±0,06	5,20±0,02	5,13±0,01
		VS	5,15±0,05	5,08±0,03	5,09±0,05	5,07±0,04

Hodnoty pH velkých bloků po 56 dnech zrání jsou zaznamenány v Tabulce 3. Hodnoty pH všech vzorků byly po 56 dnech zrání poměrně vysoké a pohybovalo se v rozpětí hodnot

5,40 až 5,51. V případě více solených vzorků se pH udrželo mírně nižší než u méně solených vzorků, což může být způsobeno inhibicí proteolýzy, nižší intenzitou tvorby zásaditých látek (např. NH_3) a inhibicí rozkladu kyseliny mléčné v důsledku zvýšeného obsahu soli [27]. Mezi středem a okrajem velkých bloků nebyl po 56 dnech zrání pozorován v hodnotách pH významný rozdíl, což lze přičíst mimo jiné vyrovnání obsahu soli v celém sýrovém bloku, což je zřejmé ze stanovení obsahu soli v jádru a okrajových vrstvách (viz níže).

Tab.3 Průměrné hodnoty pH ve velkých blocích po 56 dnech zrání, NS (nižší solení), VS (vyšší solení)

			pH
CHN19 (V1)	NS	STŘED	5,52±0,04
		OKRAJ	5,48±0,03
	VS	STŘED	5,42±0,02
		OKRAJ	5,35±0,03
F.Danica (V2)	NS	STŘED	5,55±0,01
		OKRAJ	5,57±0,08
	VS	STŘED	5,41±0,05
		OKRAJ	5,45±0,04

Vývoj hodnot pH, tedy nízké pH z počátku zrání v důsledku produkce kyseliny mléčné z laktózy a následný růst hodnot pH v důsledku rozkladu kyseliny mléčné a produkce látek zásadité povahy je v souladu s Pachlová et al [42]. McMahon et al [19] však pozoroval nižší hodnoty pH (rychlejší okyselení) u méně solených vzorků v porovnání se vzorky s vyšší koncentrací soli. Tento trend však nebyl prokázán, což může být způsobeno skutečností, že hodnoty pH byly stanoveny až po 14 dnech zrání. Z tohoto důvodu může být v následných studiích vhodnější sledovat vývoj pH v závislosti na obsahu soli již v průběhu prvních dní po výrobě. Pro tento účel jsou vhodné malé bloky, ve kterých se obsah soli v celém objemu vyrovná rychleji ve srovnání s většími bloky, což může být doporučením pro budoucí experimenty.

Stanovení obsahu sušiny

V průběhu zrání byl v modelových vzorcích sledován obsah sušiny, výsledky jsou vyneseny do Tabulky 4. Obsah sušiny v průběhu zrání mírně kolísal. Ze zjištěných hodnot obsahu

sušiny lze konstatovat, že v případě více prosolených vzorků byly hodnoty v průměru o více než 2 % vyšší, než tomu bylo u méně prosolených vzorků. Obsah sušiny méně solených vzorků šarže A fluktoval kolem hodnoty 56,4 %, kdežto více solené vzorky z téhož dne měly v průměru 58,4 % sušiny. Obsah sušiny méně solených vzorků šarže B byl v průměru 55,9 %, více solené vzorky měly kolem 58,5 % sušiny.

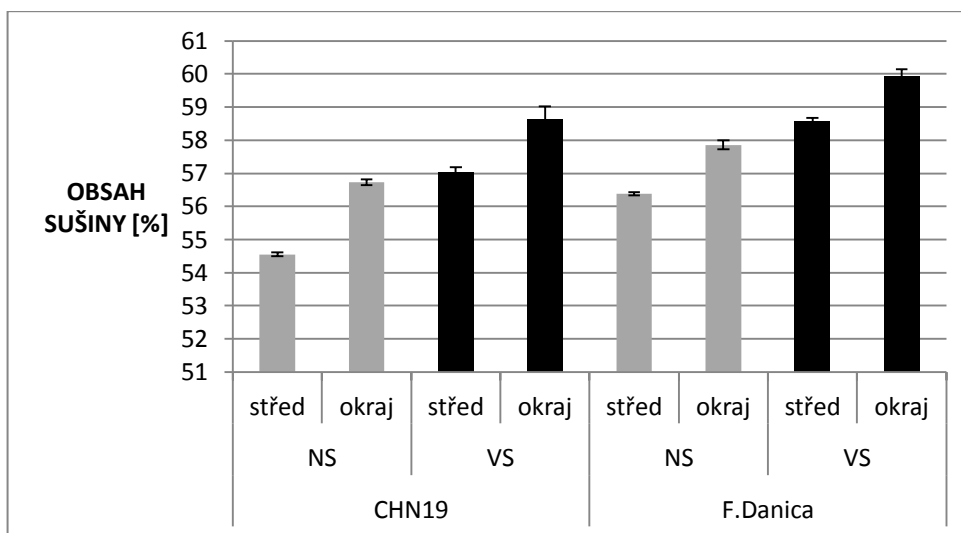
Obsah sušiny v malých blocích inokulovaných kulturou F. Danica je taktéž zaznamenán v Tabulce 4. Tyto výsledky byly vyrovnanější než v případě vzorků s kulturou CHN19 a byl pozorován obdobný rozdíl v obsahu sušiny mezi méně a více prosolenými sýry. Hodnoty obsahu sušiny vzorků s nižším obsahem soli (průměrný obsah 55,3 %) byly přibližně o 2 % nižší ve srovnání se vzorky solenými delší dobu (průměrný obsah sušiny 57,6 %). Nebyl pozorován významný trend v obsahu sušiny v průběhu 3 měsíčního skladovacího pokusu.

Tab.4 Vývoj obsahu sušiny v průběhu zrání [%]

Vzorek			Doba zrání (dny)			
			14	28	56	84
CHN19	šarže A	NS	57,5±0,1	56,2±0,1	54,9±0,4	57,0±0,6
		VS	59,7±0,5	56,5±1,6	58,2±0,5	59,1±0,4
	šarže B	NS	57,1±0,3	53,9±1,6	54,4±1,3	57,1±1,2
		VS	61,0±0,3	57,7±1,3	56,4±0,1	60,2±0,3
F. Danica	šarže C	NS	57,5±0,6	55,3±1,5	53,1±1,5	55,2±1,3
		VS	58,2±0,1	57,6±0,2	57,4±1,3	57,4±1,6
	šarže D	NS	56,3±0,1	56,3±0,2	56,2±0,5	57,1±0,2
		VS	57,8±0,2	57,6±0,3	59,0±0,5	58,9±0,3

Trend v obsahu sušiny mezi středem a okraji sýrových bloků je patrný z grafu (Obrázek 8), na kterém je vyneseno množství sušiny ve velkých sýrových blocích po 56 dnech zrání. Z grafu je možné vyčíst, že obsah sušiny závisí nejen na obsahu soli, ale také na segmentu sýrového bloku, ze kterého byl reprezentativní vzorek odebrán. Nejnižší obsah sušiny byl ve středu méně solených vzorků, a to 54,6 % u vzorku s kulturou CHN19 a 56,4 % v bloku s F. Danica. Naopak nejvyšší obsah sušiny byl stanoven v okrajových vrstvách více prosolených vzorků, 58,6 % (vzorky s CHN19) a 59,9 % (vzorky s F. Danica). Výsledky analýzy obsahu sušiny jsou v souladu s Prasad et al [15], který sledoval nárůst obsahu sušiny u více solených sýrů. Taktéž Messens et al [43] dokumentuje pokles obsahu vody ve hmotě sýra s nárůstem délky solení v solné lázni.

Tyto rozdíly se mohou odrazit ve stupni proteolýzy, resp. v aktivitě vody, která významně ovlivňuje aktivitu bakterií mléčného kvašení a enzymů (jak bakteriálních, tak syřidla a enzymů mléka), které se podílí na změnách v proteinové matici sýra. Tento trend je tedy třeba zohlednit ve výsledcích proteinového profilu, obsahu volných aminokyselin a obsahu biogenních aminů. V neposlední řadě se tento trend odráží ve výsledcích texturní profilové analýzy.



Obr.8 Obsah sušiny ve velkých blocích po 56 dnech zrání [%], NS (nižší solení), VS (vyšší solení)

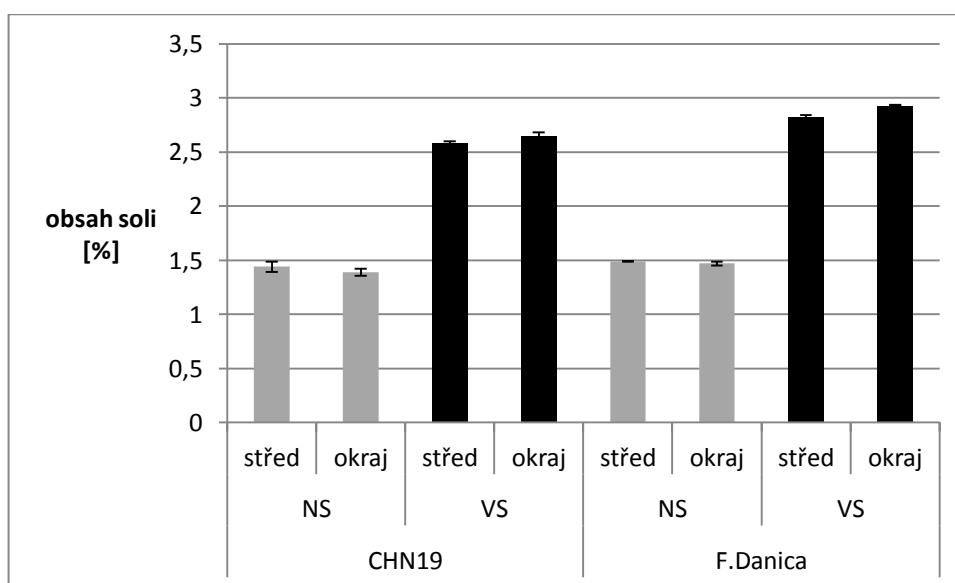
Stanovení obsahu soli

Modelové vzorky byly v průběhu zrání analyzovány na obsah soli, výsledky stanovení obsahu soli v malých blocích jsou zaznamenány v Tabulce 5, ze které je patrné, že obsah soli se mezi modelovými vzorky ze stejné šarže s odlišným způsobem solení lišil přibližně o 1 %. Toto lze posoudit velmi pozitivně v rámci optimalizace způsobu solení a v následném posouzení vlivu obsahu NaCl na biochemické změny v průběhu zrání sýrových bloků. Průměrný obsah soli v méně solených vzorcích šarže A byl 1,7 %, více solené vzorky téže šarže obsahovaly kolem 2,7 % soli. Šarže B obsahovala průměrně 1,8 % soli v méně solených vzorcích a kolem 2,9 % soli ve více prosolených vzorcích. Je patrné, že obsah soli nezaznamenal v průběhu zrání významný trend (např. způsobený vysycháním vzorků, čímž by došlo ke zvyšování obsahu soli). Obsah soli v méně solených vzorcích šarže D byl průměrně 1,7 %, ve více slaných vzorcích 2,7 %. Šarže D obsahovala přibližně 1,3 % soli v méně solených vzorcích a 2,7 % soli ve více solených vzorcích.

Tab.5 Obsah soli v malých blocích [%]

Vzorek			Doba zrání (dny)			
			14	28	56	84
CHN19	šarže A	NS	1,67±0,02	1,54±0,15	1,83±0,11	1,68±0,5
		VS	2,95±0,16	2,86±0,59	2,81±0,67	2,28±0,07
	šarže B	NS	1,38±0,01	2,18±0,38	2,21±0,35	1,50±0,24
		VS	2,64±0,29	3,38±0,21	3,42±0,11	2,31±0,08
F. Danica	šarže C	NS	1,68±0,16	1,69±0,17	1,88±0,21	1,44±0,04
		VS	2,72±0,09	3,03±0,04	2,40±0,02	2,56±0,22
	šarže D	NS	1,36±0,02	1,34±0,03	1,31±0,07	1,25±0,10
		VS	3,01±0,05	3,04±0,03	2,63±0,25	2,25±0,22

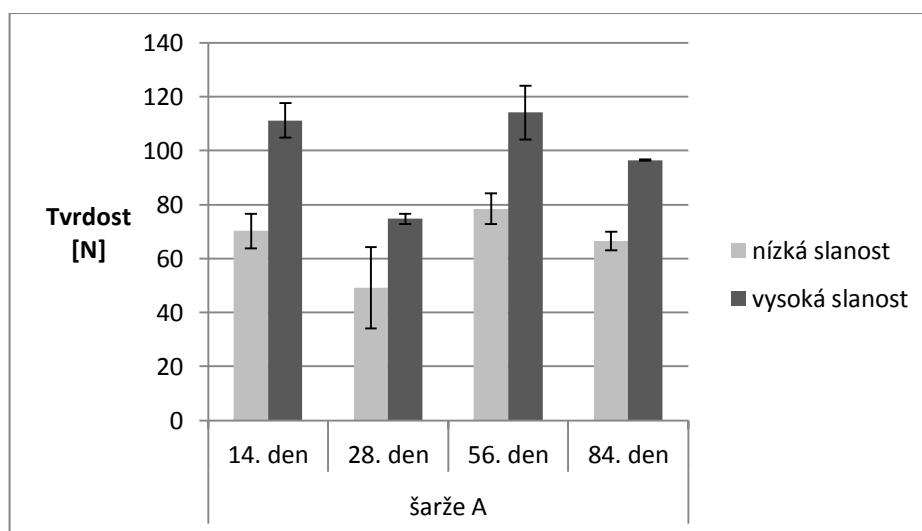
Obsah soli ve velkých blocích po 2 měsících zrání je vyneseno do grafu (Obrázek 9). Z grafu je možné vyčíst, že po 2 měsících zrání se obsah soli na povrchu a ve středu bloků příliš nelišil, tudíž se prostřednictvím difuze koncentrace soli vyrovnala. Z tohoto pohledu lze posoudit termín odběru vzorků velkých bloků jako vhodně zvolený, neboť koncentrace soli byla v bloku vyrovnaná. Obsah soli byl v méně solených blocích přibližně 1,42 % (CHN19) a 1,48 % (F.Danica). Ve více solených vzorcích byly stanoveny hodnoty 2,62 % (CHN19) a 2,87 % (F.Danica).



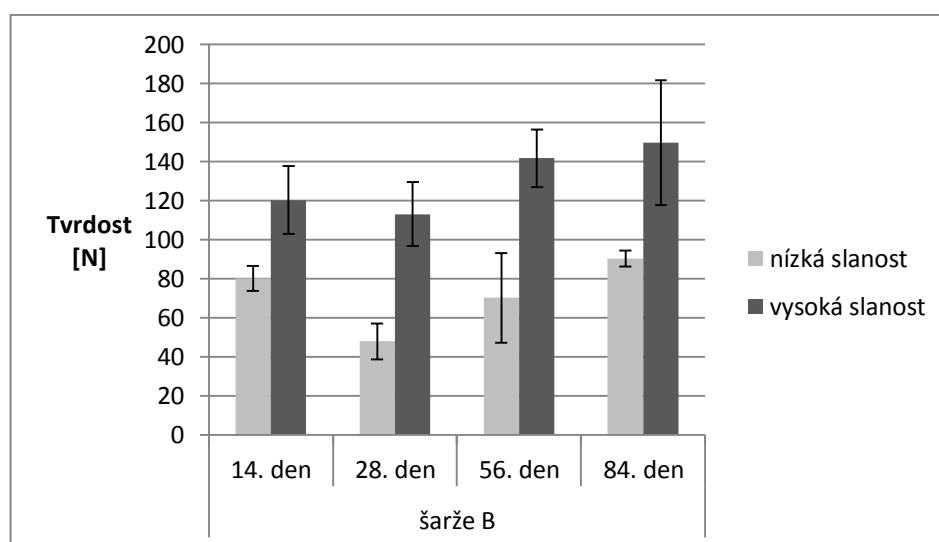
Obr.9 Obsah soli ve velkých blocích po 56 dnech zrání [%]

7.2 Texturní profilová analýza

V průběhu 84 dnů zrání byla analyzována tvrdost vzorků, která je vynesena v grafech (Obrázky 10, 11). Tvrdost závisela především na obsahu soli a s ním souvisejícím obsahem sušiny, kdy více solené vzorky měly vyšší obsah sušiny a vyšší tvrdost. V průběhu zrání nebyl u vzorků šarže A pozorován výrazný trend v tvrdosti. Tvrdost méně solených vzorků šarže A byla v průměru 66 N, tvrdost více solených vzorků téže šarže byla v průměru 99 N. U vzorků šarže B byl sledován v hodnotách tvrdosti od 2. odběru do konce zrání nárůst, z 50 N na 90 N u méně solených vzorků a ze 110 N na 149 N u více solených vzorků. U ostatních šarží však tento trend pozorován nebyl.

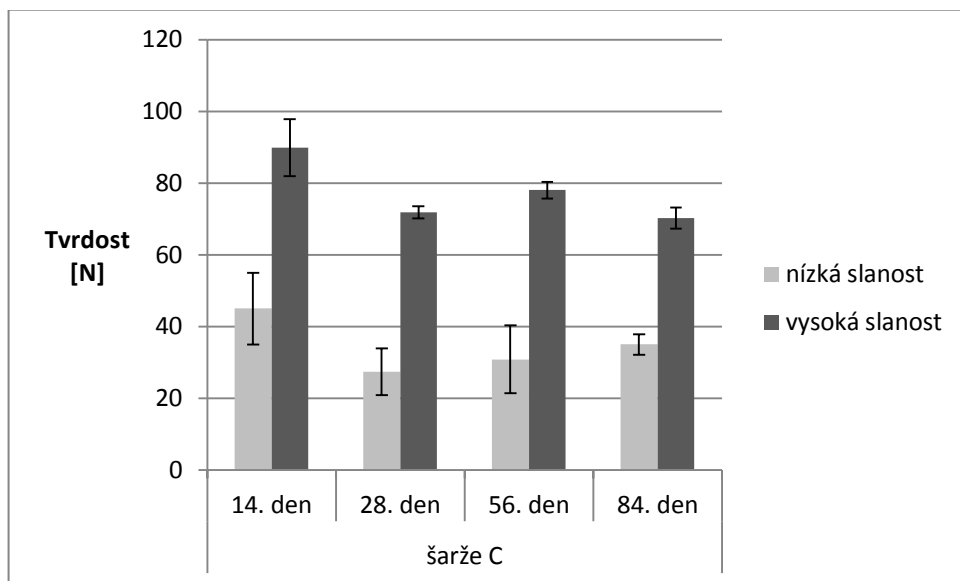


Obr.10 Tvrdost vzorků šarže A

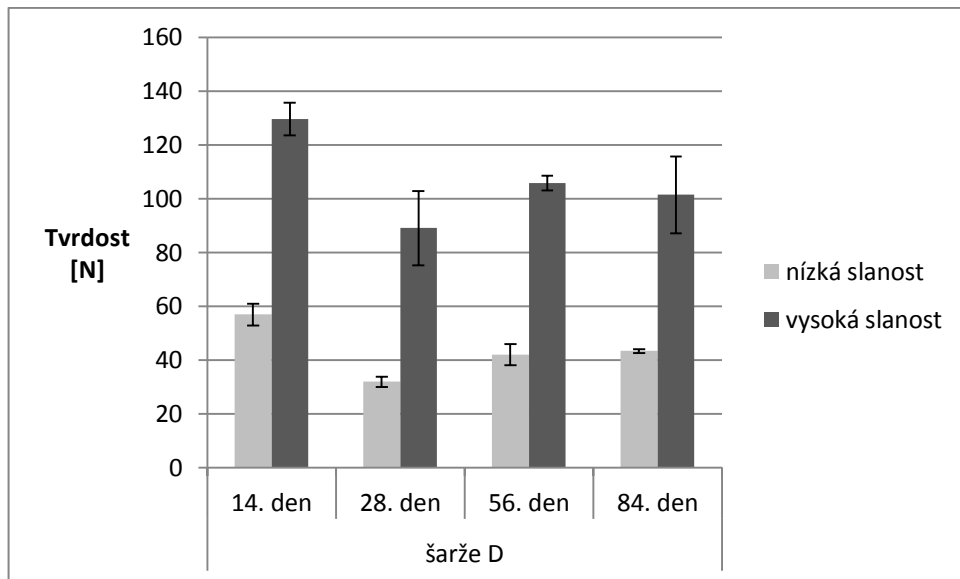


Obr.11 Tvrdost vzorků šarže B

Tvrlosti vzorků s kulturou F. Danica byly vyneseny do grafů na Obrázcích 12, 13. Z grafů je patrné, že výrazný trend v hodnotách tvrdosti v průběhu zrání zaznamenán nebyl. Obecně byla tvrdost vzorků s kulturou F. Danica nižší, než tomu bylo u vzorků s kulturou CHN19. Tvrdest méně solených vzorků se pohybovala kolem 35 N u šarže C a kolem 44 N v případě šarže D. Tvrdest více solených vzorků byla v průměru 77 N u šarže C a 97 N u vzorků šarže D. Rozdíly v tvrdosti obou šarží i jednotlivých vzorků navzájem je možné přisoudit dutinkám ve vzorcích, které vznikaly pravděpodobně z důvodu tvorby plynu přítomnou mikroflórou. U všech šarží malých bloků sýrů byl zaznamenán pokles tvrdosti ve 28. den zrání, který se vymyká pozorovanému trendu. Tento pokles lze pravděpodobně přisoudit vnějším vlivům. Jedním z možných vysvětlení je nesnadná regulace teploty v laboratoři, kde bylo provedeno měření texturních vlastností. Z tohoto pohledu lze pro následné studie doporučit vhodnou regulaci teplotních podmínek v laboratoři např. prostřednictvím klimatizace.

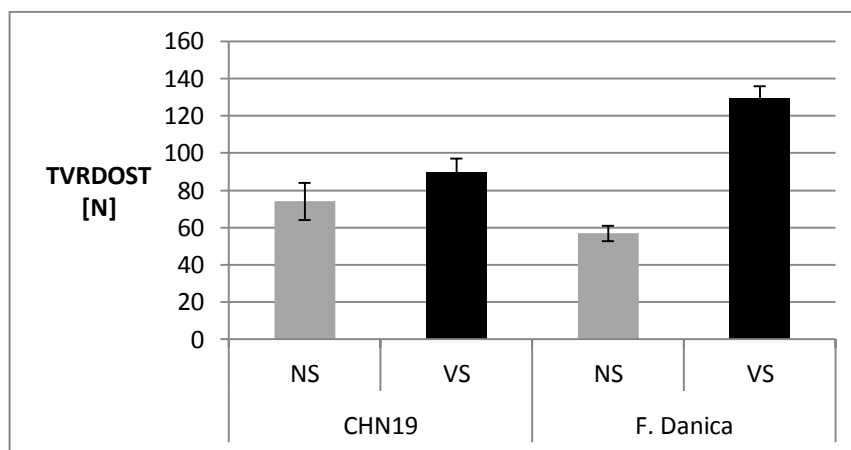


Obr.12 Tvrlost vzorků šarže C



Obr.13 Tvrdość vzorků šarže D

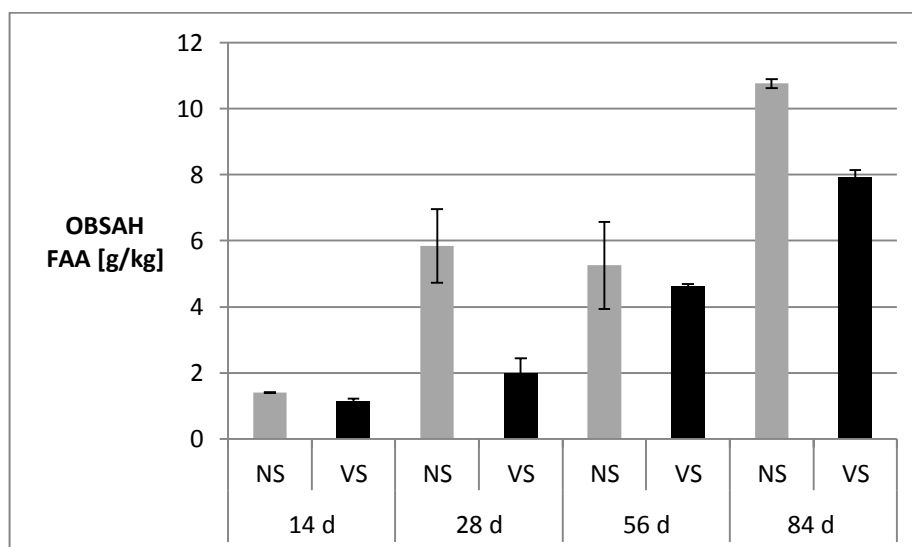
U velkých bloků byla tvrdość analyzována po 2 měsících zrání (Obrázek 14). Z grafu lze opět vidět, že tvrdość více solených vzorků byla vyšší. Zvýšení tvrdości více solených vzorků souvisí také s nárůstem obsahu sušiny u těchto vzorků. Zjištěný trend je v souladu s Guinee [13] a s Murtaza et al [27], kteří také pozorovali nárůst tvrdości v souvislosti s vyšším obsahem soli u různých druhů sýrů. Naměřená data však nejsou v souladu s Murtaza et al [27] v tom ohledu, že autor sledoval u vzorků v průběhu zrání pokles tvrdości v důsledku proteolýzy. Autor také uvádí, že proteolýza je inhibována zvýšeným obsahem soli, tudíž tvrdość více solených vzorků klesá v průběhu zrání pomaleji. Autor ve své práci zmiňuje účinek soli na hydrataci a rozpustnost kaseinů, kde vápenaté ionty jsou v kaseinové matici nahrazeny jednomocnými sodnými ionty, což v důsledku zvýší hydrataci a rozpustnost kaseinů. Také tyto interakce soli mají na texturní vlastnosti sýrů zásadní vliv.



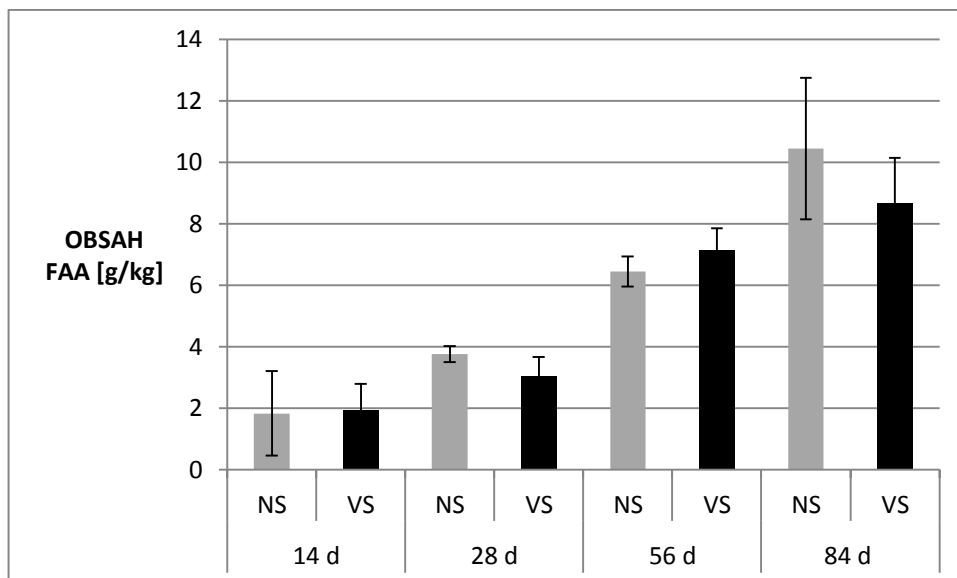
Obr.14 Tvrdość velkých bloků po 56 dnech zrání [N]

7.3 Stanovení obsahu volných aminokyselin

Celkový obsah volných aminokyselin v malých sýrových blocích šarže A a B (vzorky s kulturou CHN19) je vyneseno do grafů na Obrázcích 15 a 16. Z grafů je zřejmé, že obsah FAA v průběhu zrání roste, což je důsledkem proteolýzy kaseinové matrice. Obecně lze konstatovat, že obsahy volných aminokyselin ve vzorcích s vyšším obsahem soli byly nižší. Tento trend může být důsledkem snížení intenzity proteolýzy inhibicí BMK a jejich enzymů zvýšeným obsahem soli. Také Murtaza et al. [27] ve své práci pozoroval nižší obsahy volných FAA ve vzorcích s vyšším obsahem soli. Exterkate et al. [34] uvádí, že koncentrace soli nemá vliv na primární proteolytické reakce (hydrolyza α_{s1} -kaseinu), ale po rozštěpení dlouhých proteinových řetězců inhibuje vznik kratších peptidů a volných aminokyselin.

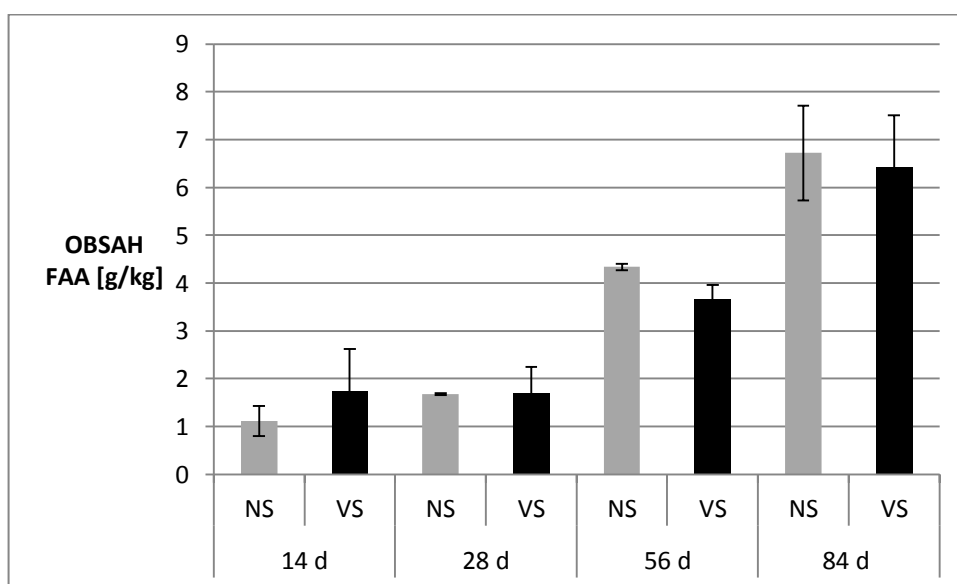


Obr.15 Celkový obsah volných aminokyselin ve vzorcích šarže A



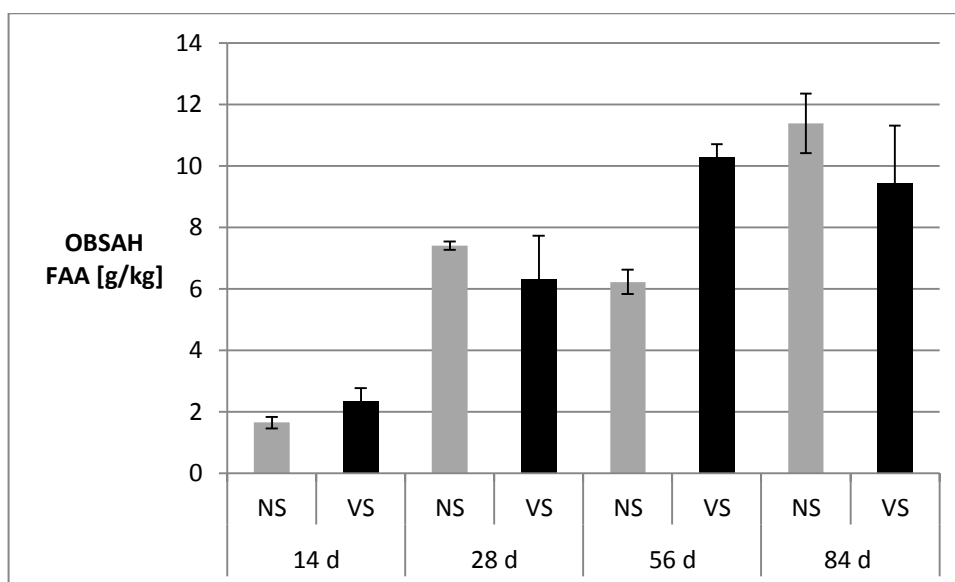
Obr.16 Celkový obsah volných aminokyselin ve vzorcích šarže B

Grafy na Obrázcích 17 a 18 znázorňují obsahy volných aminokyselin u vzorků šarží C a D, které byly inokulovány kulturou *F. Danica*. Z výsledků vyplývá, že k inhibici produkce FAA u vysoce solených sýrů dochází až po uplynutí měsíce zrání, což může být způsobeno pomalejší difuzí soli do středových částí bloků. Počátek proteolýzy je navíc iniciován chymozinem a plazminem, na jejichž aktivitu nemá obsah soli tak výrazný vliv jako na pomnožování a aktivitu BMK [34]. Ale i v případě vzorků s kulturou *F. Danica* lze říci, že vývoj obsahu FAA je ovlivněn koncentrací soli v modelových vzorcích sýrů.



Obr.17 Celkový obsah volných aminokyselin ve vzorcích šarže C

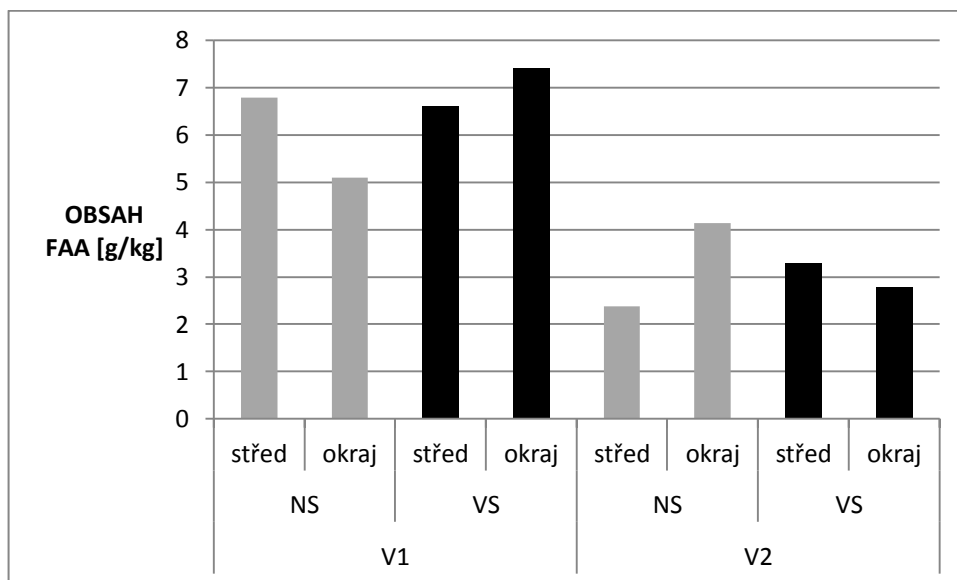
Na druhou stranu po 56 dnech zrání došlo k prudkému nárůstu obsahu FAA v případě vzorků s vyšší koncentrací soli v šarži D a naopak k poklesu hodnot u vzorků s nižším obsahem soli. Ve srovnání s ostatními odběrovými dny jsou tyto hodnoty v rozporu s trendem vývoje obsahu FAA, což mohlo být způsobeno např. intenzivní konverzí FAA na senzoric-ky aktivní látky (úbytek obsahu FAA u méně solených sýrů). Strmý nárůst obsahu FAA u vzorků s vyšší slaností by mohl být také způsoben rozsáhlou lýzí buněk a podpořením aktivity proteolytických enzymů mimo mechanismy bakteriální buňky, příp. adaptací NSLAB na prostředí s vyšší slaností. Gobbetti et al. [50] uvádí, že aktivita některých peptidáz NSLAB je podpořena zvýšeným obsahem soli. Optimální aktivita některých proteolytických enzymů NSLAB je dosažena až při 3% koncentraci soli. Je však nutné zmínit, že tato domněnka nebyla podpořena v ostatních sledovaných šaržích.



Obr.18 Obsah volných aminokyselin ve vzorcích šarže D

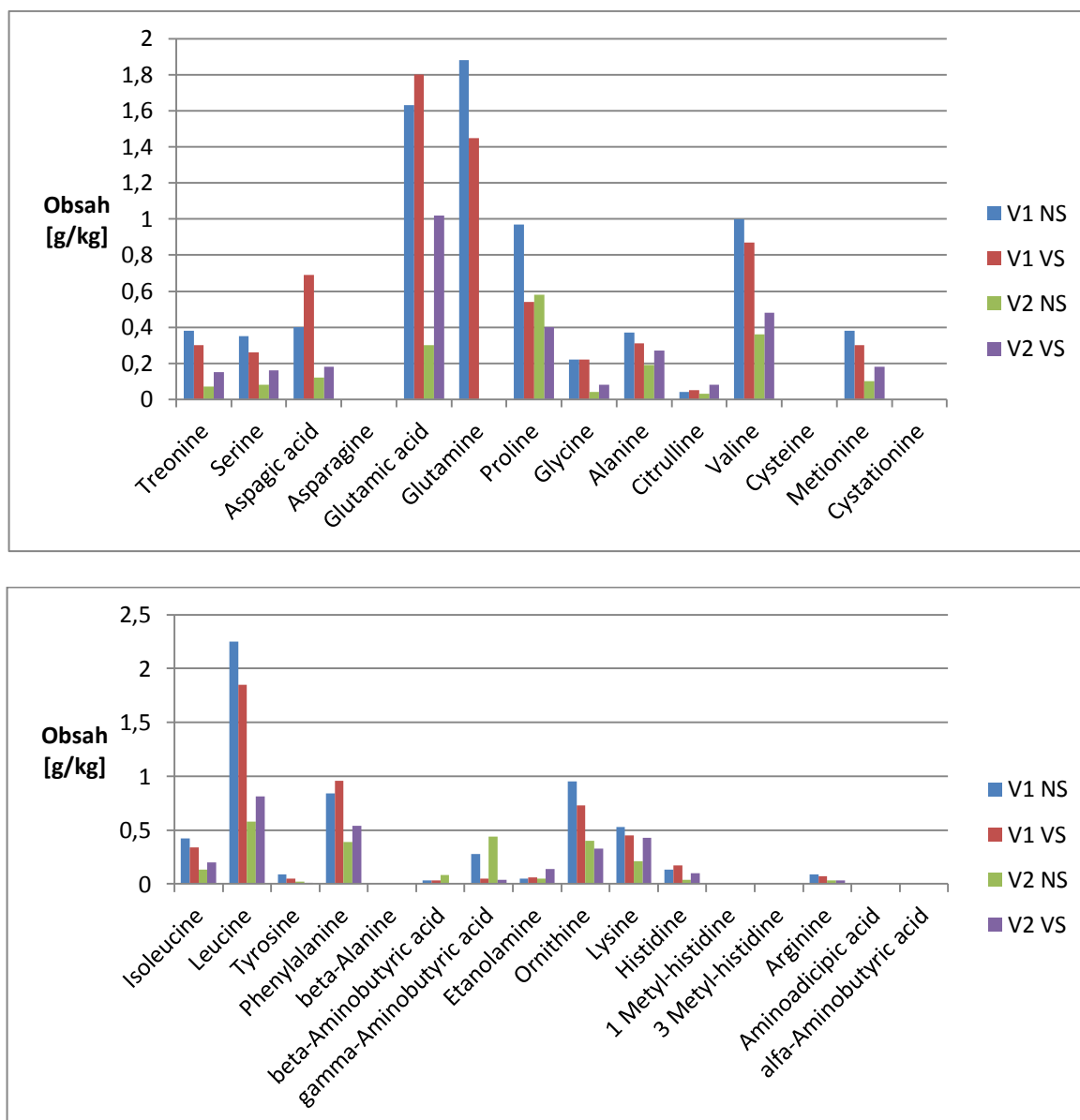
Obsahy volných aminokyselin ve velkých blocích po 56 dnech zrání jsou vyneseny do grafu na Obrázku 19. Z grafu je možné vidět, že obsah FAA v blocích šarže V1 je vyšší než obsah FAA v blocích šarže V2, což je důsledkem nižší proteolytické aktivity kultury F. Danica. Trend, kdy proteolýza kaseinové matrice sýrů s vyšším obsahem soli by měla být inhibována zvýšeným obsahem soli a nižší a_w , který ve své práci sledují Murtaza et al. [27] a Exterkate et al. [34], nebyl potvrzen zcela. Z grafu je zřejmé, že obsah FAA ve středu více prosoleného vzorku šarže V1 je mírně nižší než je obsah FAA ve středu méně soleného vzorku. Stejně jako je obsah FAA v okraji více soleného vzorku šarže V2 nižší než v okraji méně soleného vzorku téže šarže. Ovšem tento trend není shodný mezi ostatními

hodnotami. Taktéž trend sledovaný v práci Pachlová et al. [49], kdy obsah FAA je nejvyšší ve středu sýrových bloků, je z výsledků patrný pouze částečně. Příčinu lze pravděpodobně nalézt v komplikovaných mikroenvironmentálních vztazích v přírodních sýrech.



Obr.19 Obsah volných aminokyselin ve velkých blocích šarže V1 (kultura CHN19) a V2 (kultura F. Danica) po 56 dnech zrání

Do grafů na Obrázcích 20, 21 jsou vyneseny obsahy jednotlivých FAA ve středech velkých bloků. Je patrné, že nejvyšší bylo zastoupení kyseliny glutamové, glutaminu a leucinu, jejichž obsahy dosáhly až ke 2 g v kg čerstvé sýrové hmoty. Např. cystein, asparagin a β -alanin nebyly detekovány vůbec.

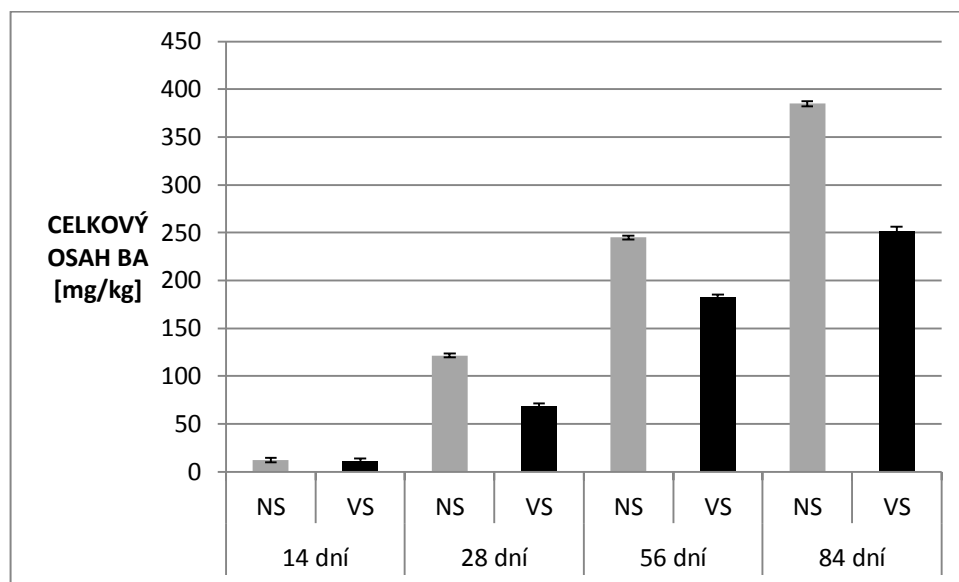


Obr.20, 21 Obsahy jednotlivých volných aminokyselin ve středových segmentech velkých bloků po 56 dnech zrání

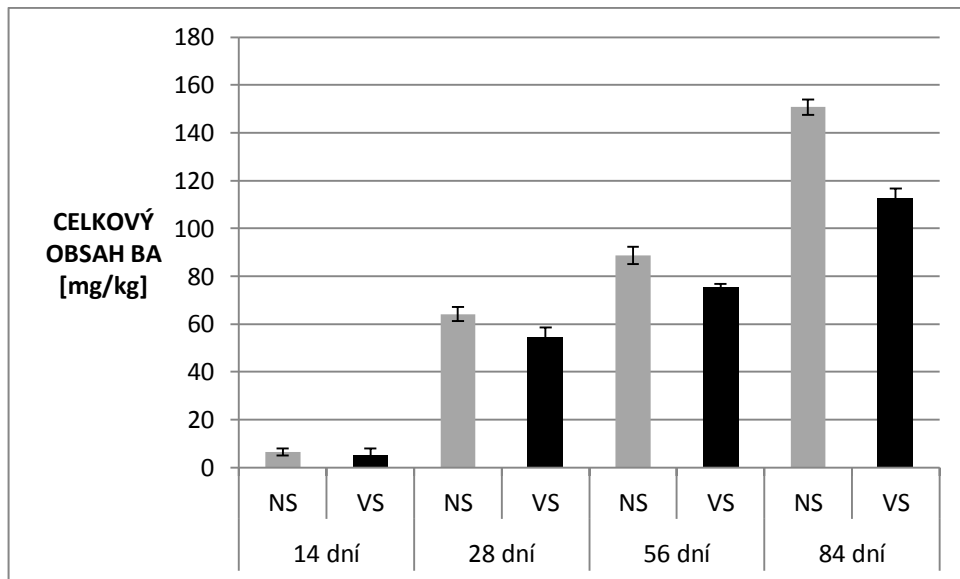
7.4 Stanovení obsahu biogenních aminů

Z výsledků stanovení obsahů sekundárních metabolitů proteolýzy (Grafy na Obrázcích 22, 23, 24, 25) - biogenních aminů v průběhu zrání vyrobených bloků jsou patrné dva trendy. Obsah biogenních aminů ve vzorcích roste s prodlužující se délkou zrání, z čehož je možné usoudit, že obsah biogenních aminů ve vzorcích roste se stupněm proteolýzy kaseinové sítě, resp. uvolňováním jejich prekurzorů – volných aminokyselin. Druhý pozorovaný trend souvisí s obsahem soli v sýrových blocích, kde byl pozorován nižší celkový obsah biogenních aminů ve vzorcích s vyšší koncentrací soli. Toto může být vysvětleno částeč-

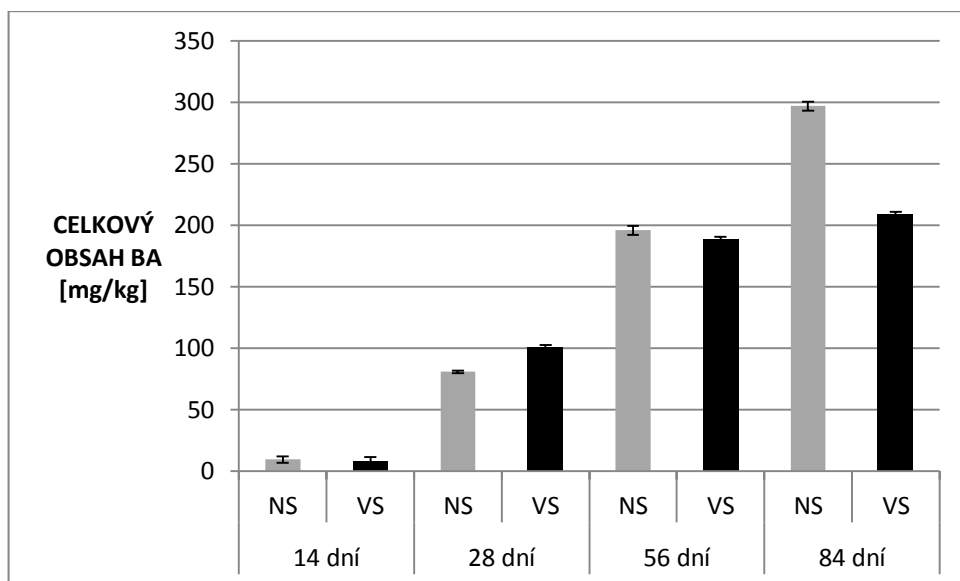
nou inhibicí proteolýzy a zejména dekarboxyláza pozitivních bakterií v důsledku zvýšeného obsahu NaCl. Po 14 dnech zrání byl obsah biogenních aminů ve všech šaržích poměrně nízký a pohyboval se v rozmezí 6,42 až 12,23 mg/kg (vzorky s CHN19), 5,32 až 9,42 mg/kg u vzorků s F. Danica. V případě vzorků s vyšším obsahem soli byly hodnoty nižší, a to 5,29 až 10,85 mg/kg u vzorků inokulovaných CHN19 a 3,42 až 7,76 mg/kg u vzorků s kulturou F. Danica. Po 28 dnech zrání však došlo u všech šarží k prudkému nárůstu obsahu biogenních aminů pravděpodobně v důsledku pomnožení a aktivity NSLAB, které v průběhu zrání převládnu nad SLAB (starterové bakterie mléčného kvašení) [17]. Jedním z problematických úseků výroby sýrů v technologické laboratoři z hlediska případného pomnožování NSLAB je nezajištění chlazení již pasterovaného mléka do okamžiku, než bude zpasterován objem mléka potřebný pro výrobu celé šarže sýrových bloků. Šarže A překročila toxikologicky významnou hladinu biogenních aminů 100 mg/kg již po 28 dnech zrání, což může představovat zdravotní riziko pro spotřebitele. Obsah biogenních aminů 100 mg/kg je toxikologicky významná hladina, která je zakotvená v Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny, kde upravuje přípustný obsah histaminu v produktech rybolovu. Ze stanovených hodnot lze usoudit, že obsah soli má výrazný dopad na snižování hladiny biogenních aminů [47, 48].



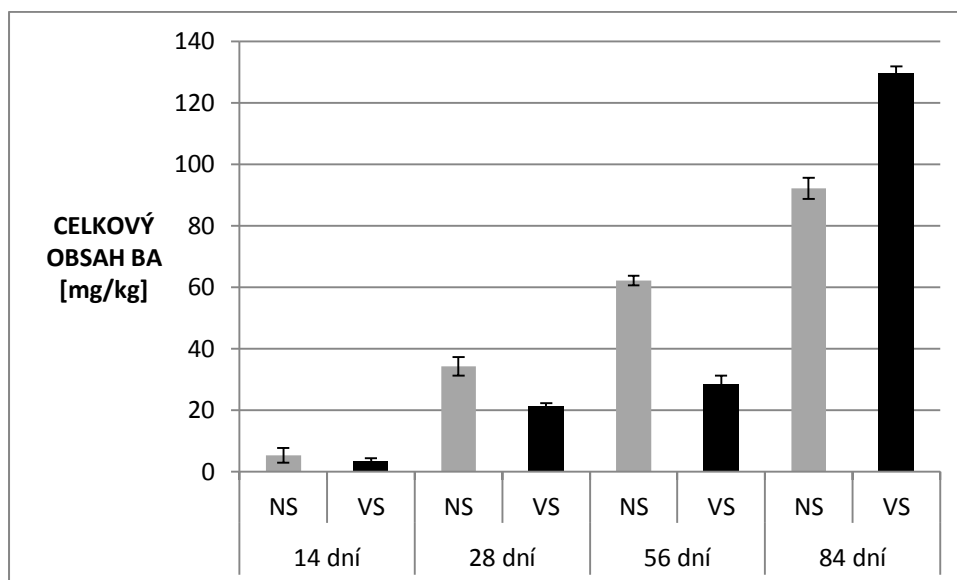
Obr.22 Celkový obsah biogenních aminů v čerstvé hmotě sýrů [mg/kg] v malých blocích šarže A s kulturou CHN19



Obr.23 Celkový obsah biogenních aminů v čerstvé hmotě [mg/kg] v malých blocích šarže B s kulturou CHN19



Obr. 24 Celkový obsah biogenních aminů v čerstvé hmotě [mg/kg] v malých blocích šarže C s kulturou F. Danica

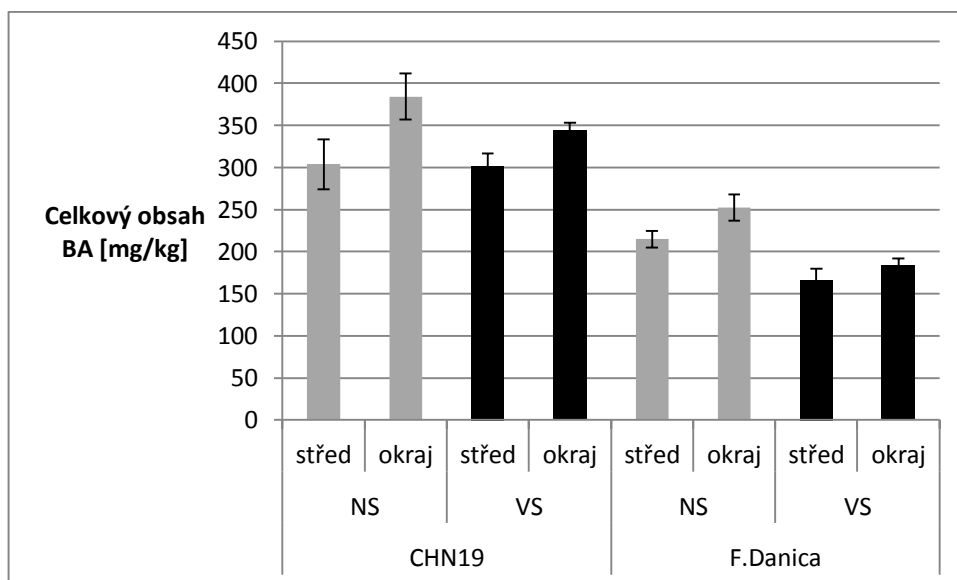


Obr.25 Celkový obsah biogenních aminů v čerstvé hmotě [mg/kg] v malých blocích šarže *D* s kulturou *F. Danica*

Z výsledků prezentovaných na výše uvedených Obrázcích 22 - 25 lze usuzovat významnou souvislost s produkcí biogenních aminů a přítomností rozličné mikroflóry. Přestože popsané trendy byly obdobné ve všech modelových vzorcích, byly pozorovány významné difference mezi jednotlivými šaržemi vyrobenými v laboratorních podmínkách. Rozdíl v produkci biogenních aminů mezi šaržemi A a B (sýry s kulturou CHN19) po 84 dnech zrání činil více jak 200 mg/kg v případě vzorků s nižší slaností. Tyto odlišnosti je možné přisuzovat přítomnosti rozličné mikroflóry v přírodním sýru, která (jak již bylo zmíněno dříve) se může významně podílet na biochemických změnách probíhajících během zrání sýrů [17, 25].

Celkové obsahy biogenních aminů stanovené po 56 dnech zrání ve velkých blocích jsou vyneseny do Grafu na Obrázku 26. Z grafu jsou patrné dva trendy. Obsah biogenních aminů v okrajových částech sýrových bloků je vyšší než ve středových částech. Druhý trend, který byl sledovaný také u malých sýrových bloků, souvisí s inhibicí produkce biogenních aminů v důsledku zvýšeného obsahu soli.

Trend pozorovaný u velkých bloků, kdy střed sýrových bloků obsahoval menší množství biogenních aminů než okrajové vrstvy, je v souladu s Pachlová et al [42]. Nižší obsah biogenních aminů ve více solených vzorcích byl pozorován také v experimentech Loizzo et al [44]. Autor uvádí, že snížení obsahu biogenních aminů ve více solených vzorcích pravděpodobně souvisí s inhibicí růstu dekarboxyláza-pozitivních BMK zvýšeným obsahem soli či s inhibicí jejich dekarboxylázové aktivity.



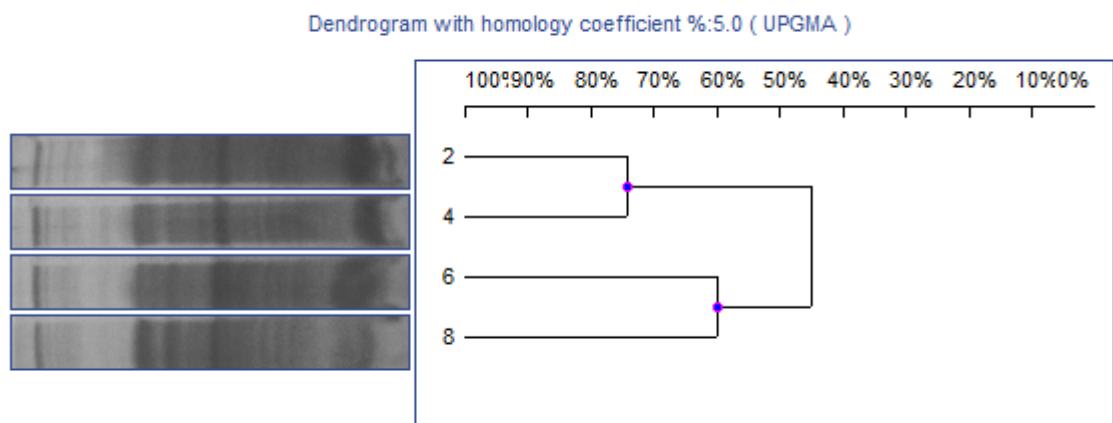
Obr. 26 Celkový obsah biogenních aminů v čerstvé hmotě [mg/kg] ve velkých blocích po 56 dnech zrání

7.5 Proteinový profil

Tab.6 Proteinové profily malých bloků po 14 dnech zrání, molekulová hmotnost v kDa

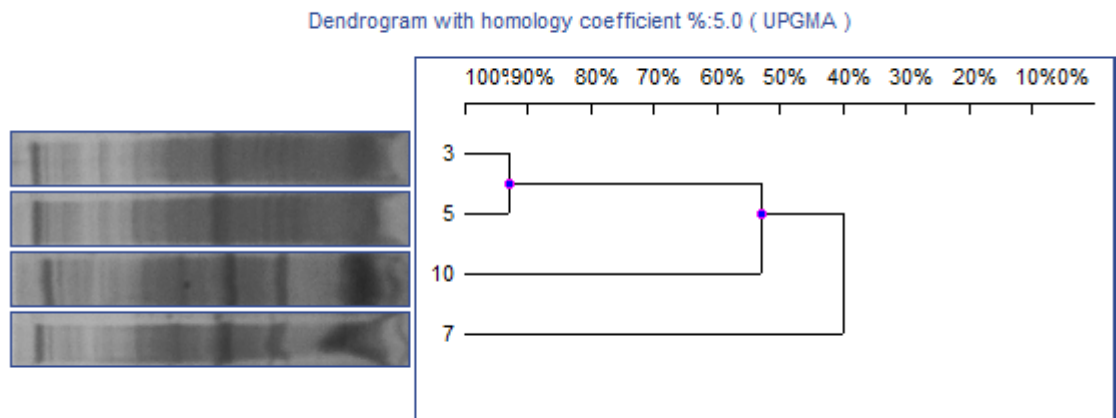
Šarže A NS	Šarže B NS	Šarže A VS	Šarže B VS	Šarže C NS	Šarže D NS	Šarže C VS	Šarže D VS
95,93	97,40	97,85	94,47	98,74	90,10	91,55	81,60
77,99	82,98	81,14	82,06	83,45	76,23	79,78	65,71
60,57	63,90	63,13	63,90	64,16	60,83	69,25	55,36
53,00	45,75	45,00	44,69	31,83	52,76	31,36	46,92
41,23	42,04	42,14	42,45	29,07	43,47	26,42	41,54
30,31	36,35	40,63	40,73	26,55	39,63	24,28	38,36
26,34	32,64	32,07	36,26	21,00	31,91	21,39	30,82
22,76	27,00	26,59	33,06	14,58	28,50	14,93	27,05
20,26	24,20	22,97	29,33	12,85	25,84	13,07	25,38
15,77	20,61	20,48	26,80	10,92	19,83	11,54	22,76
14,13	16,13	17,45	24,12		13,73		19,00
12,02	14,62	15,86	20,87				12,63
	12,85	14,22	16,30				
	10,75	12,54	14,58				
		10,62	12,81				
			11,10				

V tabulce 6 jsou výsledky proteinových profilů malých sýrových bloků po 1. odběru (14 dnech zrání) stanovené metodou SDS-PAGE. U vzorků bylo identifikováno 10 – 16 různě dlouhých proteinů o velikosti 10,62 – 98,74 kDa. Vzorky jsou kódovány šarží a obsahem soli (NS – nižší slanost; VS – vyšší slanost). Do šarží A, B byla pro výrobu použita kultura CHN19. Do šarží C, D byla aplikována Flora Danica. Ve vzorcích s kulturou CHN19 bylo identifikováno 12 – 16 proteinových fragmentů o velikosti 10,62 – 97,85 kDa. Ve vzorcích s kulturou F. Danica bylo rozpoznáno menší množství štěpů (10 – 12) o molekulové hmotnosti 10,92 – 98,74 kDa. Proteinové fragmenty o vysoké molekulové hmotnosti budou pravděpodobně štěpy kaseinové matrice sýra obsahující více kaseinových frakcí.



Obr.27 Dendrogram shlukové analýzy proteinových profilů vzorků po 14 dnech zrání, 2 (šarže A NS), 4 (šarže A VS), 6 (šarže C NS), 8 (šarže C VS)

Dendrogram zobrazený na Obrázku 27 vyjadřuje míru shody mezi různě prosolenými vzorky v závislosti na použité kultuře. Z dendrogramu jde vidět, že proteinový profil jednotlivých vzorků se liší. Vliv na proteinový profil má jak kultura, tak i obsah soli. Větší podobnost je mezi vzorky téže šarže a rozdílného obsahu soli než mezi kulturami navzájem, z čehož lze usuzovat na rozdílnou intenzitu proteolýzy prostřednictvím odlišných kultur.



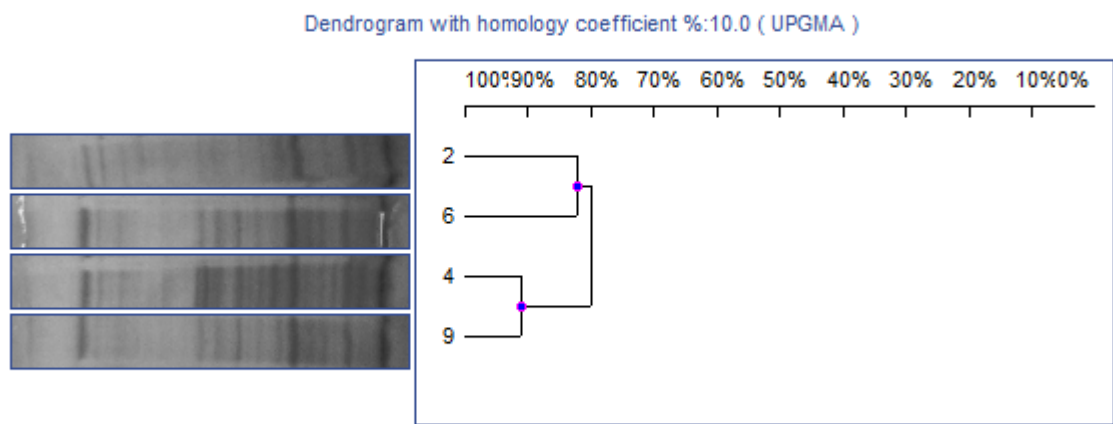
Obr.28 Dendrogram shlukové analýzy proteinového profilu vzorků po 14 dnech zrání, 3 (šarže B NS), 5 (šarže B VS), 7 (šarže D NS), 10 (šarže D VS)

V dendrogramu na Obrázku 28 je zaznamenána podobnost proteinových profilů mezi vzorky šarže B a D s různým obsahem soli. Vzorky šarže B s odlišným obsahem soli vytvořily samostatný shluk s podobností vyšší jak 90 %. Na druhou stranu vzorky šarže D s různým obsahem soli si podobné nejsou. V tomto případě se významně liší také proteinové profily jednotlivých kultur. Vzhledem k tomu, že se jedná o proteinové profily vzorků po pouhých 14 dnech zrání, je možné, že koncentrace soli nebyla v celém objemu sýrového bloku vyrovnaná. Rozdílná koncentrace soli v různých segmentech sýrového bloku může způsobit rozdílnou intenzitu proteolytických reakcí na různých místech sýrového bloku, a tím ovlivnit proteinový profil.

Tabulka 7 znázorňuje proteinové profily malých sýrových bloků po 28 dnech zrání. Byly identifikovány proteiny o velikostech v rozmezí 5,46 – 93,16 kDa v 9 – 14 bandech. Kvůli vyšší koncentraci rozštěpených proteinů po 1 měsíci zrání byly vzorky před nanesením na gel zředěny 1:2 vzorkovým pufrem. U vzorků vyrobených s použitím kultury CHN19 (šarže A, B) bylo stanoveno 9 – 12 bandů o velikostech 5,46 – 93,16 kDa. U vzorků vyrobených s kulturou F. Danica bylo rozpoznáno 11 – 14 bandů o molekulové hmotnosti 8,61 – 88,96 kDa.

Tab.7 Proteinové profily malých bloků po 28 dnech zrání, molekulová hmotnost v kDa

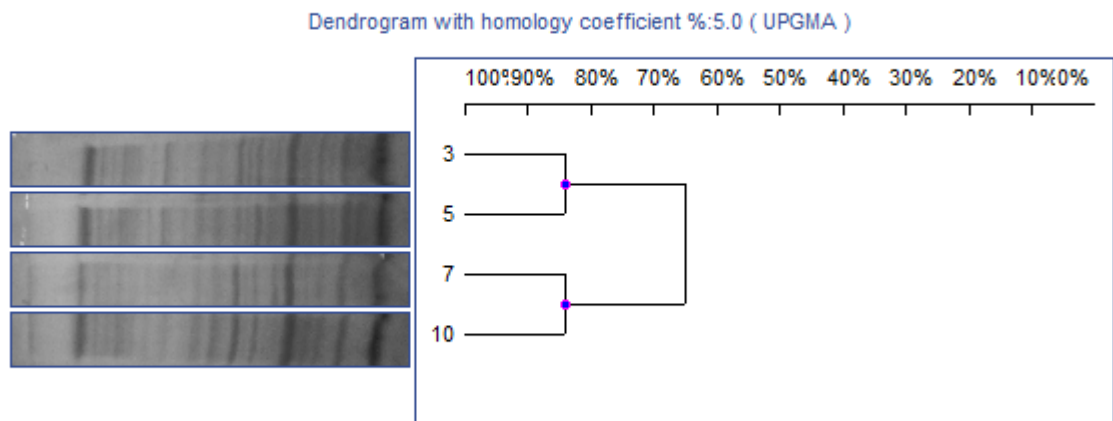
Šarže A NS	Šarže B NS	Šarže A VS	Šarže B VS	Šarže C NS	Šarže D NS	Šarže C VS	Šarže D VS
91,36	91,36	93,16	89,56	89,56	88,96	88,96	84,26
75,34	74,81	76,94	76,41	76,41	76,94	67,00	70,26
61,25	60,95	61,55	59,46	62,15	65,48	57,99	56,54
53,44	40,90	41,01	43,94	60,35	60,35	41,48	42,76
43,35	34,10	30,53	41,24	41,36	43,70	30,11	38,61
40,66	30,45	28,29	34,50	38,38	39,40	27,98	29,78
31,05	27,73	20,29	30,79	34,81	30,62	26,46	28,19
28,19	20,29	16,38	20,35	30,62	28,24	20,29	26,30
20,46	11,34	13,28	16,94	28,24	26,20	16,38	23,51
17,00	7,80			23,77	23,61	13,56	20,13
8,83				20,51	20,62	8,61	18,24
5,46				17,06	17,23		16,27
				15,59	13,62		14,29
				9,26			



Obr.29 Dendrogram shlukové analýzy proteinových profilů vzorků po 28 dnech zrání, 2 (šarže A NS), 4 (šarže A VS), 6 (šarže C NS), 9 (šarže C VS)

Z dendrogramu na Obrázku 29 je patrné, že mezi vzorky šarže A s kulturou CHN19 a mezi vzorky šarže C s kulturou F. Danica jsou určité rozdíly. Na rozdíl od vzorků analyzovaných po 14 dnech zrání vytvořily šarže A a C se stejnými obsahy soli samostatné shluky. Lze tedy usuzovat, že po 28 dnech zrání byla intenzita proteolýzy ovlivněna obsahem soli

v sýrové matrici. Podobnost proteinových profilů vzorků sýrů s kulturami CHN19 a F. Danica však byla přibližně 80%.



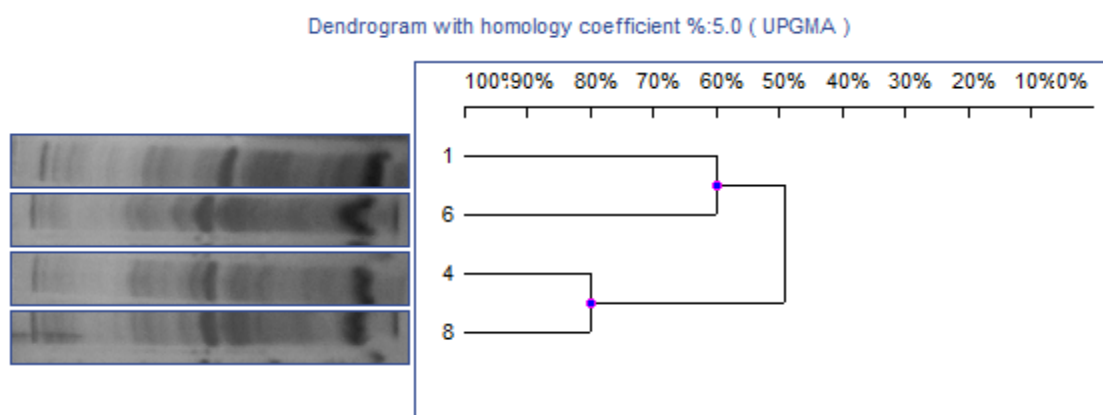
Obr.30 Dendrogram shlukové analýzy proteinových profilů vzorků po 28 dnech zrání, 3 (šarže B NS), 5 (šarže B VS), 7 (šarže D NS), 10 (šarže D VS)

Z Obrázku 30 vyplývá, že vzorky téže šarže s různým obsahem soli jsou více než z 80 % podobné. Proteinové profily vzorků s odlišnou kulturou jsou si podobné podstatně méně (přibližně z 65 %). Je však nutné zmínit, že na proteinové profily mohou mít významný vliv také přítomní zástupci NSLAB, jejichž množství v průběhu zrání přírodních sýrů roste na rozdíl od životaschopných buněk pocházejících z čistých mlékařských kultur. Tím se také navyšuje množství proteolytických enzymů, které jsou schopny hydrolyzovat proteinovou síť [30].

Z Tabulky 8 je zřejmé, že po 2 měsících zrání bylo u malých sýrových bloků identifikováno 12 – 16 bandů s velikostí 5,89 – 102,83 kDa. Profil vzorků šarží A, B (kultura CHN19) obsahoval 17 – 18 bandů v rozmezí 6,11 – 102,83 kDa. Profil vzorků šarží C, D obsahoval 14 – 15 bandů s velikostí 5,89 – 101,02 kDa.

Tab.8 Proteinové profily malých bloků po 56 dnech zrání, molekulová hmotnost v kDa

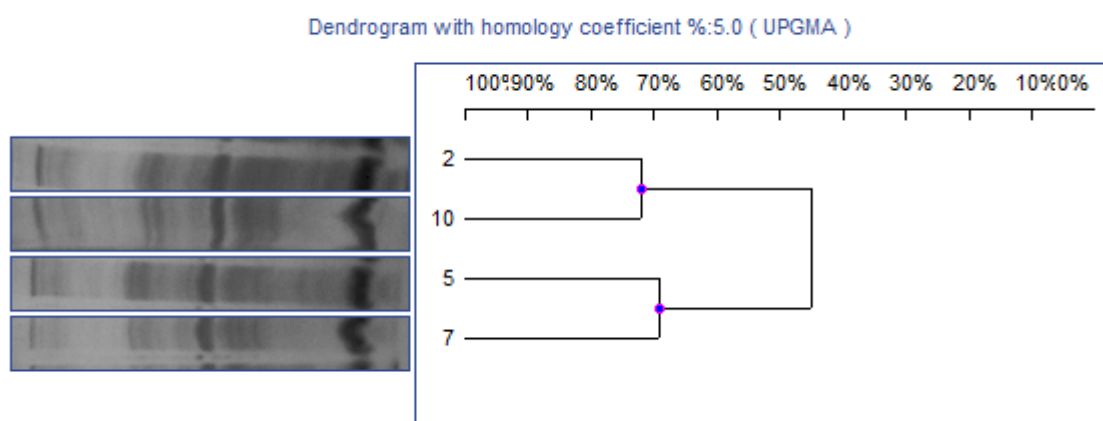
Šarže A NS	Šarže B NS	Šarže A VS	Šarže B VS	Šarže C NS	Šarže D NS	Šarže C VS	Šarže D VS
102,83	83,77	84,14	83,77	83,01	81,15	91,88	101,02
84,52	70,06	69,75	69,75	69,43	73,34	78,22	82,26
69,43	61,53	61,74	61,74	61,53	68,50	64,68	68,50
55,43	55,23	55,23	55,63	56,02	61,32	46,89	62,16
50,32	52,35	49,79	55,03	54,64	53,10	31,25	55,82
46,08	49,08	42,73	42,54	38,62	49,96	29,36	47,38
43,00	42,63	38,89	38,97	30,24	42,09	27,94	32,83
39,06	38,89	30,31	33,67	27,47	29,86	25,47	31,18
30,31	31,25	27,57	30,24	25,55	26,98	23,10	29,12
28,83	30,11	25,34	27,42	22,95	25,14	21,19	26,19
27,99	27,47	22,99	25,43	19,31	22,85	19,48	20,69
22,92	25,47	21,89	23,10	17,88	19,40	19,10	18,84
20,85	22,46	19,27	19,61	15,76	15,01	17,16	17,43
19,14	19,10	17,20	17,52	11,02	11,11	15,39	16,14
15,10	17,02	15,34	15,53		5,89	11,06	14,00
11,42	15,10	11,56	11,60				
9,17	11,24	9,17	6,11				
	9,40						



Obr.31 Dendrogram shlukové analýzy proteinových profilů vzorků po 56 dnech zrání, 1 (šarže A NS), 4 (šarže A VS), 6 (šarže C NS), 8 (šarže C VS)

Z dendrogramu (Obrázek 31) vyplývá, že po 2 měsících zrání byl zachován trend v intenzitě proteolýzy v závislosti na koncentraci soli v proteinové matici. Opět byla pozorována vyšší podobnost mezi vzorky s odlišnou kulturou a stejným obsahem soli. Podobnost pro-

teinových profilů vzorků se však ve srovnání s odběrem po 28 dnech zrání snížila. Zajímavé výsledky představuje shluk vytvořený ze vzorků s nižší slaností a odlišných kultur (na Obr. XX vzorky s čísly 1 a 6). Přestože vzorky vytvořily samostatný shluk, jejich proteinové profily jsou si podobné přibližně ze 60 %. Diference mezi vzorky pravděpodobně vyplývá ze skutečnosti, že odlišné kultury obsahují kmenově, příp. také druhově odlišné zástupce a dají se tedy charakterizovat rozdílnou proteolytickou aktivitou [29].



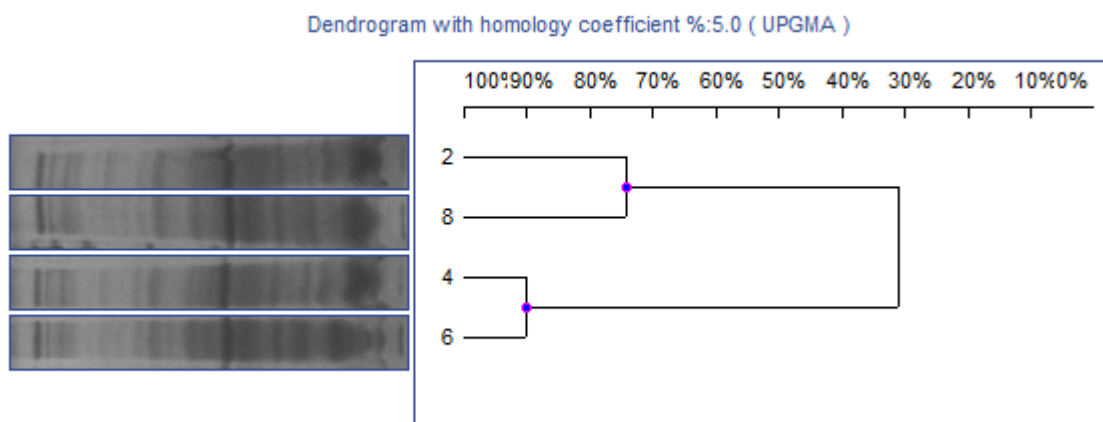
Obr.32 Dendrogram shlukové analýzy proteinových profilů vzorků po 56 dnech zrání, 2 (šarže B NS), 5 (šarže B VS), 7 (šarže D NS), 10 (šarže D VS)

I na druhém dendrogramu proteinových profilů po 56 dnech zrání (Obrázek 32) jsou proteinové profily jednotlivých vzorků rozdílné. Z dendrogramu vyplývají zajímavé výsledky, kdy vzorky s odlišnou kulturou a slaností vytvořily samostatné shluky. Vzhledem k tomu, že se jedná o proteinové profily po 56 dnech zrání je pravděpodobné, že NSLAB již převládly nad SLAB a způsobily rozsáhlou proteolýzu. Podle Fox et al. [8] jsou NSLAB tolerantnější ke zvýšenému obsahu soli, a tudíž mohou způsobovat intenzivní proteolýzu i ve vzorcích se zvýšeným obsahem soli.

V Tabulce 9 jsou zaznamenány proteinové profily vzorků po 3 měsících zrání. Proteinové profily obsahovaly 13 – 18 bandů o molekulové hmotnosti 6,09 – 93,75 kDa. U vzorků šarží A, B (kultura CHN19) bylo identifikováno 13 – 17 bandů s molekulovou hmotností od 6,09 – 93,15 kDa. U vzorků šarží C, D (F.Danica) bylo rozpoznáno 14 – 18 bandů o velikostech 7,84 – 93,75 kDa.

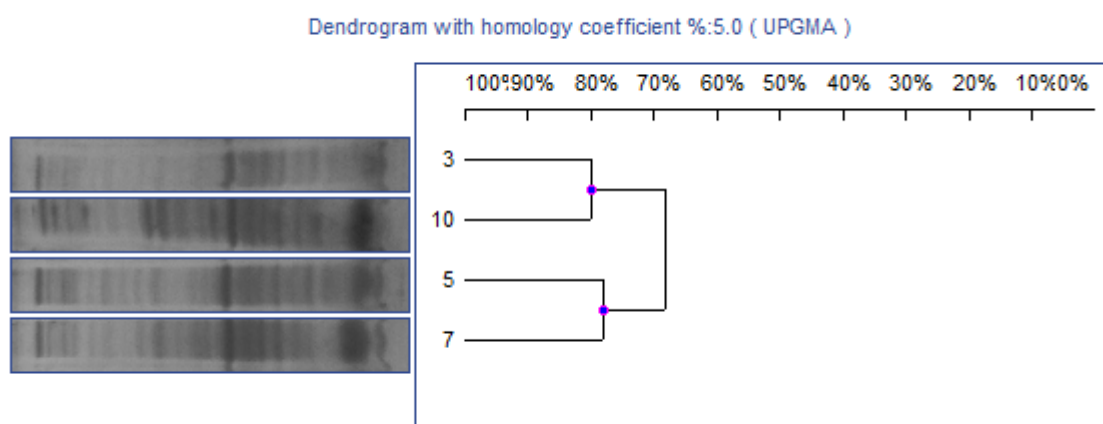
Tab.9 Proteinové profily malých bloků po 84 dnech zrání, molekulová hmotnost v kDa

Šarže A NS	Šarže B NS	Šarže A VS	Šarže B VS	Šarže C NS	Šarže D NS	Šarže C VS	Šarže D VS
87,74	92,54	93,15	92,54	92,54	93,75	87,74	88,33
71,70	75,82	78,53	77,43	78,53	78,53	74,76	73,72
59,53	61,17	62,82	61,44	63,10	62,55	60,07	58,18
52,47	43,80	45,40	46,23	47,31	54,75	43,68	50,28
43,92	40,37	41,90	41,19	42,02	46,23	40,25	42,49
39,79	34,39	36,84	36,84	37,07	41,07	34,91	39,10
31,30	31,21	32,41	32,41	32,22	32,13	31,21	30,18
28,51	28,28	28,73	28,69	29,00	28,24	28,01	27,47
19,94	25,69	25,08	24,38	24,33	26,06	23,71	25,60
14,85	23,85	22,48	23,07	22,13	24,23	19,99	23,37
12,34	19,78	20,37	20,47	20,10	22,97	16,41	22,13
8,69	16,80	17,81	17,42	17,92	20,16	12,72	19,73
6,70	14,96	15,63	15,58	12,98	17,97	9,64	18,14
	12,55	13,26	13,15	10,72	15,30	8,34	16,75
	10,25	9,24	10,87	9,39	12,88		15,30
	8,34	6,80	8,94		10,20		12,93
	6,09		6,80				10,20
							7,84



Obr.33 Dendrogram shlukové analýzy proteinových profilů vzorků po 84 dnech zrání, 2 (šarže A NS), 4 (šarže A VS), 6 (šarže C NS), 8 (šarže C VS)

Také po třech měsících zrání je viditelný rozdíl v proteinových profilech jednotlivých vzorků sýrů, jak je zobrazeno na Obrázcích 33, 34. Vyšší podobnost byla zaznamenána mezi vzorky s odlišnými kulturami a odlišným obsahem soli, což do jisté míry potvrzuje hypotézu o významném vlivu přítomnosti zástupců NSLAB, kteří jsou ve srovnání s SLAB mnohem více schopni adaptace na zhoršené podmínky ve zrajícím sýrů a mohou se tak v pozdějších stádiích skladování významně podílet na procesech zrání. Jejich přítomnost a zejména také aktivita tak může zásadně přispět také k rozvoji organoleptických vlastností sýrů.



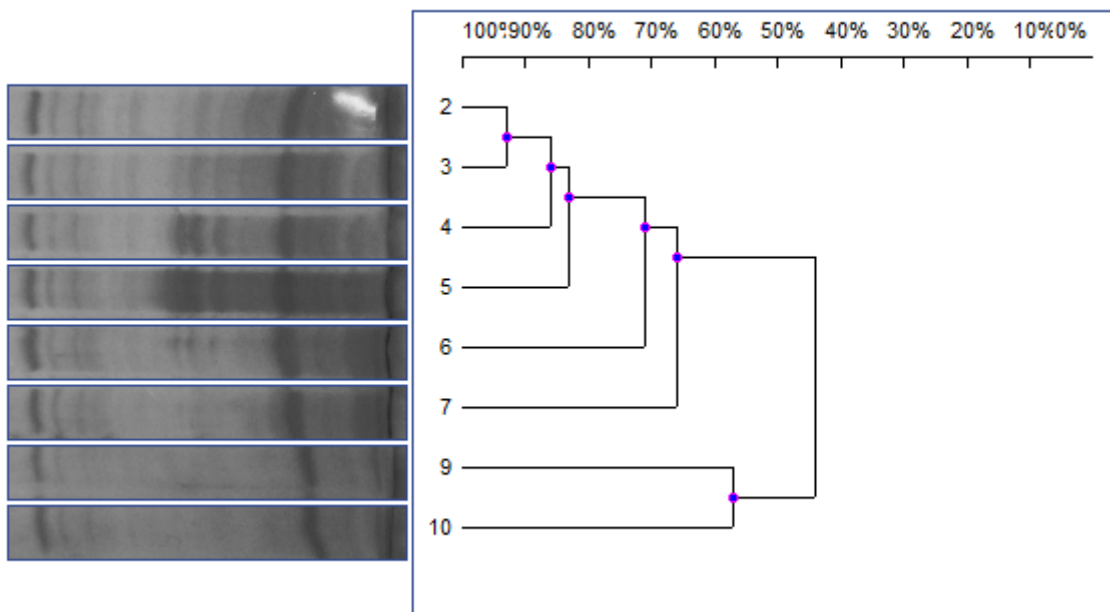
Obr.34 Dendrogram shlukové analýzy proteinových profilů vzorků po 84 dnech zrání, 3 (šarže B NS), 5 (šarže B VS), 7 (šarže D NS), 10 (šarže D VS)

V Tabulce 10 jsou zaznamenány proteinové profily velkých sýrových bloků, které byly analyzovány po 2 měsících zrání. V případě velkých sýrových bloků byl stanoven proteinový profil pro povrchové vrstvy (okraje) a střed bloku zvlášť (ST – střed x OK – okraj). V případě bloků šarže V1 (CHN19) bylo identifikováno 14 – 17 bandů s molekulovou hmotností 8,32 až 97,40 kDa. U bloků šarže V2 (F.Danica) bylo identifikováno menší množství bandů (10 – 14) s molekulovou hmotností 6,96 až 94, 81 kDa.

Tab.10 Proteinové profily velkých bloků po 56 dnech zrání, molekulová hmotnost v kDa

V1 NS ST	V1 NS OK	V1 VS ST	V1 VS OK	V2 NS ST	V2 NS OK	V2 VS ST	V2 VS OK
93,20	97,40	96,75	97,08	94,81	92,88	93,52	89,03
76,68	78,77	78,17	79,37	78,47	75,51	73,78	70,44
61,41	64,30	65,13	64,30	63,88	61,82	58,17	57,77
54,44	55,21	58,97	45,91	57,77	53,68	54,06	48,32
44,36	45,30	55,21	43,55	45,30	29,56	34,07	42,83
41,40	42,51	45,45	42,43	42,91	24,34	29,99	22,70
32,94	41,56	42,27	35,26	33,46	21,27	27,51	20,15
29,67	33,46	32,87	33,40	31,19	19,21	20,53	16,76
27,47	30,66	30,15	30,78	28,19	14,11	17,07	15,53
25,05	27,93	27,47	28,00	25,45	9,33	15,73	8,77
21,47	25,27	25,52	25,30	21,81		6,96	
20,25	21,96	21,84	21,90	20,02			
18,73	20,59	20,71	20,51	17,02			
8,77	19,45	19,45	19,48	10,52			
	16,03	16,21	18,37				
	8,55	8,32	16,60				
			8,44				

Dendrogram with homology coefficient %:5.0 (UPGMA)



Obr.35 Dendrogram shlukové analýzy proteinových profilů velkých bloků po 56 dnech zrání, 2 (CHN19 NS okraj) 3 (CHN19 NS střed), 4 (CHN19 VS okraj) 5 (CHN19 VS střed), 6 (F.Danica NS okraj), 7 (F.Danica NS střed), 9 (F.Danica VS okraj), 10 (F.Danica VS střed)

Dendrogram na Obrázek 35 vyjadřuje podobnost proteinových profilů velkých bloků po 56 dnech zrání. Samostatný shluk vytvořily vzorky s kulturou CHN19. Nebyly pozorovány významné odlišnosti v proteinových profilech mezi středovou a okrajovou částí vzorků s kulturou CH19 pocházejících ze stejného bloku sýra (v dendrogramu pod čísly 2 a 3, míra podobnosti více jak 90 %). Vyšší odlišnosti byly pozorovány u vzorků vysolených na vyšší slanost se stejnou kulturou (pod čísly 4 a 5), avšak proteinové profily vzorků v závislosti na sledovaném segmentu sýra a rozdílné slanosti nebyly v případě kultury CH19 významně odlišné (vzájemná podobnost proteinových profilů z 85 %). Proteinové profily vzorků s kulturou F. Danica se od sebe odlišovaly. Zcela samostatný shluk vytvořily vzorky z okraje a středu bloku vysoleného na vyšší slanost. Naopak vzorky s nižší slaností byly svými proteinovými profily více příbuzné k profilům s kulturou CH19.

Ze stanovených proteinových profilů vyplývá, že intenzita proteolýzy se liší nejen v závislosti na použité kultuře, obsahu soli a dni odběru, ale také mezi šaržemi, mezi bloky téže šarže, a dokonce mezi různými segmenty téhož sýrového bloku. Různá intenzita proteolýzy mezi segmenty téhož sýrového bloku je způsobená především rozdílným složením těchto segmentů. Jak lze vidět z výsledků obsahu sušiny, okrajové vrstvy měly vyšší obsah sušiny než jádro sýrového bloku a ze způsobu solení (solení v solné lázni) lze předpokládat, že zpočátku zrání mají okrajové vrstvy i vyšší obsah soli než střed. Tyto rozdíly způsobují různou intenzitu proteolýzy, a tím i rozdílné proteinové profily. Tato skutečnost je v souladu s Pachlová et al. [49], autorka ve své práci sleduje intenzitu proteolýzy mezi různými segmenty téhož sýrového bloku. Ze zjištěných výsledků lze tedy konstatovat, že obsah soli může mít zásadní vliv na probíhající proteolýzu a to pravděpodobně také v závislosti na sledovaném segmentu sýra.

ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřená na vliv obsahu soli na vlastnosti a zrání přírodních sýrů v průběhu 84denního skladovacího experimentu. Z tohoto důvodu byla v teoretické části věnována pozornost výrobě polotvrdých sýrů holandského typu s důrazem na solení a zrání sýrů. Podrobněji je rozveden vliv soli na vlastnosti sýrů a především na biochemické procesy během zrání sýrů.

Praktická část práce zahrnovala výrobu modelových vzorků polotvrdých sýrů s různým obsahem soli. Dílčím úkolem bylo optimalizovat použití nově zakoupené odstředivky a pasteračního zařízení. Posléze byl založen tříměsíční zrací experiment, během něhož byly vzorky postupně odebírány k analýzám. V průběhu zrání byla prováděna základní chemická analýza (pH, obsah sušiny, obsah soli), texturní profilová analýza, analýza obsahu volných aminokyselin a biogenních aminů a pomocí SDS-PAGE byly stanovovány proteinové profily vzorků.

Z výsledků získaných během skladovacího experimentu lze usoudit, že obsah soli má významný vliv na průběh biochemických pochodů během zrání sýrů, kde u sýrů holandského typu se jedná především o proteolýzu.

Z experimentu vplynuly tyto výsledky:

- solení v solné lázni má významný vliv na obsah sušiny v sýrových blocích a v jejich lokalizovaných segmentech (rozdíly jsou patrné zejména mezi okrajovými a středovými částmi sýrových bloků),
- solení a s ním související obsah sušiny se projeví v tvrdosti sýrových bloků,
- mezi hodnotami pH ve vzorcích s různým obsahem soli nebyl pozorován jednoznačný trend,
- byla sledována inhibice vzniku volných aminokyselin ve vzorcích se zvýšeným obsahem soli,
- ve vzorcích se zvýšeným obsahem soli byla inhibována také produkce biogenních aminů,
- u velkých bloků byl prokázán vyšší obsah biogenních aminů v okrajových částech sýrového bloku.

Z průběhu a výsledků experimentu je možné vyvodit následující doporučení:

- Vzhledem k poměrně dlouhé době pasterace většího objemu mléka pomocí laboratorního pasteračního zařízení je třeba zajistit okamžité zchlazení a uchování pasteurovaného mléka při nízkých teplotách.
- Pro zevrubnější sledování vlivu obsahu soli na hodnoty pH by bylo vhodné použít malé sýrové bloky (modelové vzorky), jejichž pH by bylo sledováno v krátkých časových intervalech v průběhu prvních několika dnů zrání.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ROBINSON, Richard K. (2000). *Encyclopedia of Food Microbiology*, Volumes 1-3. Elsevier. Dostupné z: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpEFMV0004/encyclopedia-food-microbiology>
- [2] FERNANDES, Rhea (2009). *Microbiology Handbook – Dairy Products* (3rd Edition). Royal Society of Chemistry. Dostupné z: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpMHDPE001/microbiology-handbook-3>
- [3] Česká republika. Vyhláška č. 77/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. In: 2003. 2003. Dostupné z: <http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1006126&nid=11816&hl=77/2003>
- [4] BUŇKA, František. *Mlékárenská technologie I*. Vyd. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2013, 258 s. ISBN 978-80-7454-254-1.
- [5] AUTTACHOAT, Wimolnut, Dori R. GERMOLEC, Matthew J. SMITH, Kimber L. WHITE a Tai L. GUO. Contact sensitizing potential of annatto extract and its two primary color components, cis-bixin and norbixin, in female BALB/c mice. *Food and Chemical Toxicology*. 2011, vol. 49, issue 10, s. 2638-2644. DOI: 10.1016/j.fct.2011.07.009. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691511003322>
- [6] ESKIN, N.A. Michael SHAHIDI, Fereidoon (2013). *Biochemistry of Foods* (3rd Edition). Elsevier. Dostupné z: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpBFE00012/biochemistry-foods-3rd>
- [7] DONNELLY, Catherine W. (2014). *Cheese and Microbes*. American Society for Microbiology (ASM). Dostupné z: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpCM000021/cheese-and-microbes>
- [8] FOX, Patrick F. MCSWEENEY, Paul L.H. COGAN, Timothy M. GUINEE, Timothy P. (2004). *Cheese – Chemistry, Physics and Microbiology* (3rd Edition). Elsevier. Dostupné z: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpCCPME001/cheese-chemistry-physics>
- [9] NOVINKY V BALENÍ SÝRŮ [online]. 1. Listopad 2012. 2012 [cit. 2014-08-25]. Dostupné z: <http://www.svetbaleni.cz/novinky-v-baleni-syru/>
- [10] *E-learningová výuka studijního programu Chemie a technologie potravin* [online].

- [cit.2014-08-25]. Dostupné z: <http://chepo.ft.utb.cz/Module.aspx?id=39>
- [11] *BioPro* [online]. [cit. 2014-08-25]. Dostupné z: <http://www.biopro.cz/Ingredience/Mlekarensky-prumysl/Povrchove-osetreni-syru/>
- [12] LAW, Barry A a A TAMIME. *Technology of cheesemaking*. 2nd ed. Malden, MA: Blackwell, xxv, 482 p. ISBN 978-140-5182-980.
- [13] GUINEE, T.P. (2004). *Salting and the role of salt in cheese*. *International Journal of Dairy Technology*, 57, 99-109.
- [14] SELECKÝ, Ján. *Slovenské syry: syry slovenského pôvodu*. 2013. ISBN 978-808-0791-681.
- [15] PRASAD, N. a V.B. ALVAREZ. Effect of Salt and Chymosin on the Physico-Chemical Properties of Feta Cheese During Ripening. *Journal of Dairy Science*. 1999, vol. 82, issue 6, s. 1061-1067. DOI: 10.3168/jds.s0022-0302(99)75327-0
- [16] WEIMER, Bart C. (2007). *Improving the Flavour of Cheese*. Woodhead Publishing. Dostupné z: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpIFC00002/improving-flavour-cheese/improving-flavour-cheese>
- [17] *Potravinářská revue*. 1/2014. Praha: Agral s.r.o., 2014. ISSN 1801-9102.
- [18] GANDHI, Akanksha a Nagendra P. SHAH. Effects of salt concentration and pH on structural and functional properties of *Lactobacillus acidophilus*: FT-IR spectroscopic analysis. *International Journal of Food Microbiology*. 2014, vol. 173, s. 41-47. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.015.
- [19] MCMAHON, D.J., C.J. OBERG, M.A. DRAKE, N. FARKYE, L.V. MOYES, M.R. ARNOLD, B. GANESAN, J. STEELE a J.R. BROADBENT. Effect of sodium, potassium, magnesium, and calcium salt cations on pH, proteolysis, organic acids, and microbial populations during storage of full-fat Cheddar cheese1. *Journal of Dairy Science*. 2014, vol. 97, issue 8, s. 4780-4798. DOI: 10.3168/jds.2014-8071
- [20] GANESAN, Balasubramanian, Kelly BROWN, David A. IRISH, Carl BROTHENSEN a Donald J. MCMAHON. Manufacture and sensory analysis of reduced- and low-sodium Cheddar and Mozzarella cheeses. *Journal of Dairy Science*. 2014, vol. 97, issue 4, s. 1970-1982. DOI: 10.3168/jds.2013-7443.
- [21] FOX, P. F., J. A. LUCEY a T. M. COGAN. Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1990, vol. 29, issue 4, s. 237-253. DOI: 10.1080/10408399009527526.

- [22] EDITOR-IN-CHIEF, John W a Patrick J EDITORS. *Encyclopedia of dairy sciences*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2011. ISBN 978-012-3744-074.
- [23] PROCHÁZKOVÁ, ing. Eva. Studium hydrolytických a oxidačních změn tuku u válcově sušeného plnotučného mléka [online]. Zlín, 2012 [cit. 2015-02-01]. Dostupné z: https://dspace.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/21968/proch%C3%A1zkov%C3%A1_2012_dp.pdf?sequence=1. Disertační. UTB.
- [24] ESKIN, N.A. Michael Shahidi, FERREDOON.(2013). *Biochemistry of Foods* (3rd Edition). Elsevier. Dostupné z: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpBFE00012/biochemistry-foods-3rd/biochemistry-foods-3rd>
- [25] SETTANNI, Luca, Giancarlo MOSCHETTI, T.P. BERESFORD, T BERESFORD, J.R. BROADBENT, M.F. BUDINICH, J.L. STEELE a J. MARCELINO. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits: Past, Present and Future Developments. *Food Microbiology* [online]. 2010, vol. 27, issue 6, s. 639-644 [cit. 2015-02-23]. DOI: 10.5772/55937.
- [26] DOYLE, Michael P. BUCHANAN, Robert L.. (2013). *Food Microbiology - Fundamentals and Frontiers* (4th Edition). American Society for Microbiology (ASM). Dostupné z: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpFMFFE001/food-microbiology-fundamentals/food-microbiology-fundamentals>
- [27] MURTAZA, M.A., N. HUMA, A. SAMEEN, M.S. MURTAZA, S. MAHMOOD, G. MUEEN-UD-DIN a A. MERAJ. Texture, flavor, and sensory quality of buffalo milk Cheddar cheese as influenced by reducing sodium salt content. *Journal of Dairy Science* [online]. 2014, vol. 97, issue 11, s. 6700-6707 [cit. 2015-02-27]. DOI: 10.3168/jds.2014-8046.
- [28] SKIBSTED, Leif H. Risbo, Jens ANDERSEN, MOGENS L.. (2010). *Chemical Deterioration and Physical Instability of Food and Beverages*. Woodhead Publishing. Dostupné z: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpCDPIFB02/chemical-deterioration/chemical-deterioration>
- [29] GANDHI, Akanksha a Nagendra P. SHAH. Effects of salt concentration and pH on structural and functional properties of *Lactobacillus acidophilus*: FT-IR spectroscopic analysis. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2014, vol. 173, s. 41-47 [cit. 2015-03-01]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.015.
- [30] SOUSA, M.J, Y ARDÖ a P.L.H MCSWEENEY. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening: FT-IR spectroscopic analysis. *International Dairy Journal* [online]. 2001, vol. 11, 4-7, s. 327-345 [cit. 2015-03-01]. DOI: 10.1016/s0958-

6946(01)00062-0.

- [31] MØLLER, K. K., F. P. RATTRAY, W. L. P. BREDIE, E. HØIER a Y. ARDÖ. Physicochemical and sensory characterization of Cheddar cheese with variable NaCl levels and equal moisture content. *Journal of Dairy Science* [online]. 2013, vol. 96, issue 4, s. 1953-1971 [cit. 2015-03-12]. DOI: 10.3168/jds.2012-5524.
- [32] MURTAZA, M.A., S.U. REHMAN, F.M. ANJUM, N. HUMA, O.M. TARAR A G. MUEEN-UD-DIN. Organic acid contents of buffalo milk Cheddar cheese as influenced by accelerated ripening and sodium salt. *Journal of Food Biochemistry* [online]. 2012, vol. 36, issue 1, s. 99-106 [cit. 2015-03-12]. DOI: 10.1111/j.1745-4514.2010.00517.x.
- [33] BISWAS, Ananya C, Kasiviswanathan MUTHUKUMARAPPAN, Chenchaiiah MARELLA a Lloyd E METZGER. Understanding the role of natural cheese calcium and phosphorous content, residual lactose and salt-in-moisture content on block-type processed cheese functional properties: Cheese hardness and flowability/meltability. *International Journal of Dairy Technology* [online]. 2014, vol. 68, issue 1, s. 44-53 [cit. 2015-03-13]. DOI: 10.1111/1471-0307.12167.
- [34] EXTERKATE, Fred A. a Arno C. ALTING. The role of starter peptidases in the initial proteolytic events leading to amino acids in Gouda cheese. *International Dairy Journal* [online]. 1995, vol. 5, issue 1, s. 15-28 [cit. 2015-03-13]. DOI: 10.1016/0958-6946(94)p1596-6.
- [35] RAMÍREZ-NUÑEZ, J., ROMERO-MEDRANO, R., NEVAREZ-MOORILLÓN, G., V., & GUTIERREZ-MENDEZ, N. (2011). Effect of pH and salt gradient on the autolysis of *Lactococcus lactis* strains. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(4), 1495-n/a. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822011000400036>
- [36] Google: *obrázky* [online]. [cit. 2015-03-16]. Dostupné z: https://www.google.cz/search?q=TA.XT&biw=1366&bih=643&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ei=pgUHVd2fBc_baKmsgPgB&ved=0CAYQ_AUoAQ
- [37] ARDO, Y., THAGE, B. V., & MADSEN, J. S. (2002). Dynamics of free amino acid composition in cheese ripening. *Australian Journal of Dairy Technology*, 57(2), 109. Dostupné z: <http://search.proquest.com/docview/199357415?accountid=15518>
- [38] WILLIAMS, A.G, J NOBLE, J TAMMAM, D LLOYD a J.M BANKS. Factors affecting the activity of enzymes involved in peptide and amino acid catabolism in non-starter lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. *International Dairy Journal*. 2002, vol. 12, issue 10, s. 841-852. DOI: 10.1016/s0958-6946(02)00063-8.

- [39] CURTIN, Á. C., & MCSWEENEY, P. L. H. (2003). Catabolism of aromatic amino acids in cheese-related bacteria: Aminotransferase and decarboxylase activities. *The Journal of Dairy Research*, 70(2), 249-52. Dostupné z: <http://search.proquest.com/docview/228058911?accountid=15518>
- [40] YVON, Mireille a Liesbeth RIJNEN. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal*. 2001, vol. 11, 4-7, s. 185-201. DOI: 10.1016/s0958-6946(01)00049-8.
- [41] SMIT, Gerrit. (2003). Dairy Processing - Improving Quality. Woodhead Publishing. Dostupné z: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpDPIQ0003/dairy-processing-improving/dairy-processing-improving>
- [42] PACHLOVÁ, Vendula, František BUŇKA, Radka FLASAROVÁ, Petra VÁLKOVÁ a Leona BUŇKOVÁ. The effect of elevated temperature on ripening of Dutch type cheese. *Food Chemistry*. 2012, vol. 132, issue 4, s. 1846-1854. DOI:10.1016/j.foodchem.2011.12.017. Dostupné z:<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814611017729>
- [43] MESSENS, Winy, Koen DEWETTINCK a André HUYGHEBAERT. Transport of sodium chloride and water in Gouda cheese as affected by high-pressure brining. *International Dairy Journal*. 1999, vol. 9, issue 8, s. 569-576. DOI: 10.1016/s0958-6946(99)00126-0.
- [44] LOIZZO, Monica Rosa, Francesco MENICHINI, Nevio PICCI, Francesco PUOCI, Umile Gianfranco SPIZZIRRI a Donatella RESTUCCIA. Technological aspects and analytical determination of biogenic amines in cheese. *Trends in Food Science*. 2013, vol. 30, issue 1, s. 38-55. DOI: 10.1016/j.tifs.2012.11.005.
- [45] Česká republika. Zákon č. 78/2004 Sb., o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty. In: 2004. Dostupné z: <http://eagri.cz/public/web/mze/potraviny/legislativa/legislativa-gmo/legislativa-cr/>
- [46] Evropská unie. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1829/2003 ze dne 22. září 2003 o geneticky modifikovaných potravinách a krmivech. In: 2003. Dostupné z: <http://eagri.cz/public/web/mze/potraviny/legislativa/legislativa-gmo/legislativa-cr/>
- [47] EU. NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. In: 2005.
- [48] KOŁAKOWSKI, Piotr, Richard PODOLAK a Marta KOWALSKA. Microbial Profile

of Gouda Cheese During Ripening in Two Independent Chambers - a Short Report.

Polish Journal of Food and Nutrition Sciences. 2012, vol. 62, issue 3. DOI:

10.2478/v10222-012-0051-y.

- [49] PACHLOVÁ, Vendula, František BUŇKA, Leona BUŇKOVÁ, Eva WEISEROVÁ, Pavel BUDINSKÝ, Milan ŽALUDEK a Stanislav KRÁČMAR. The effect of three different ripening/storage conditions on the distribution of selected parameters in individual parts of Dutch-type cheese. *International Journal of Food Science*. 2011, vol. 46, issue 1, s. 101-108. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2010.02460.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2010.02460.x>
- [50] GOBBETTI, Marco, Rosalba LANCIOTTI, Maria DE ANGELIS, Maria ROSARIA CORBO, Roberto MASSINI a Patrick F. FOX. Study of the effects of temperature, pH and NaCl on the peptidase activities of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) by quadratic response surface methodology. *International Dairy Journal*. 1999, vol. 9, issue 12, s. 865-875. DOI: 10.1016/S0958-6946(99)00156-9. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694699001569>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AMK	Aminokyseliny
BMK	Bakterie mléčného kvašení
FAA	Free amino acids (volné aminokyseliny)
GMO	Geneticky modifikovaný organismus
MK	Mastné kyseliny
NS	Nižší slanost
NSLAB	Non-starterové bakterie mléčného kvašení
SLAB	Starterové bakterie mléčného kvašení
VS	Vyšší slanost

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1:	<i>Schéma proteolýzy a vzniku sensoricky aktivních látek</i>	28
Obrázek 2:	<i>Schéma proteolýzy a transportu aminokyselin a peptidů buněčnou membránou bakterií mléčného kvašení</i>	29
Obrázek 3:	<i>Vliv soli na vlastnosti a kvalitu sýrů</i>	36
Obrázek 4:	<i>Vliv obsahu soli a doby zrání na tvrdost sýrů</i>	37
Obrázek 5:	<i>Texturometr TA.XT Plus</i>	46
Obrázek 6:	<i>Křivka texturní profilové analýzy</i>	47
Obrázek 7:	<i>Ukázka proteinových profilů stanovených metodou SDS-PAGE</i>	50
Obrázek 8:	<i>Obsah sušiny ve velkých blocích po 56 dnech zrání</i>	55
Obrázek 9:	<i>Obsah soli ve velkých blocích</i>	56
Obrázek 10:	<i>Tvrdost vzorků šarže A</i>	57
Obrázek 11:	<i>Tvrdost vzorků šarže B</i>	57
Obrázek 12:	<i>Tvrdost vzorků šarže C</i>	58
Obrázek 13:	<i>Tvrdost vzorků šarže D</i>	59
Obrázek 14:	<i>Tvrdost velkých bloků po 56 dnech zrání</i>	60
Obrázek 15:	<i>Celkový obsah volných aminokyselin ve vzorcích šarže A</i>	60
Obrázek 16:	<i>Celkový obsah volných aminokyselin ve vzorcích šarže B</i>	61
Obrázek 17:	<i>Celkový obsah volných aminokyselin ve vzorcích šarže C</i>	61
Obrázek 18:	<i>Celkový obsah volných aminokyselin ve vzorcích šarže D</i>	62
Obrázek 19:	<i>Obsah volných aminokyselin ve velkých blocích</i>	63
Obrázek 20, 21:	<i>Obsahy jednotlivých volných aminokyselin ve středových segmentech velkých bloků po 56 dnech zrání</i>	64
Obrázek 22:	<i>Celkový obsah biogenních aminů v blocích šarže A</i>	65
Obrázek 23:	<i>Celkový obsah biogenních aminů v blocích šarže B</i>	66
Obrázek 24:	<i>Celkový obsah biogenních aminů v blocích šarže C</i>	66

Obrázek 25:	<i>Celkový obsah biogenních aminů v blocích šarže D</i>	67
Obrázek 26:	<i>Celkový obsah biogenních aminů ve velkých blocích</i>	68
Obrázek 27:	<i>Dendrogram shlukové analýzy proteinových profilů šarží A, C po 14 dnech zrání</i>	69
Obrázek 28:	<i>Dendrogram shlukové analýzy proteinových profilů šarží B, D po 14 dnech zrání</i>	70
Obrázek 29:	<i>Dendrogram shlukové analýzy proteinových profilů šarží A, C po 28 dnech zrání</i>	71
Obrázek 30:	<i>Dendrogram shlukové analýzy proteinových profilů šarží B, D po 28 dnech zrání</i>	72
Obrázek 31:	<i>Dendrogram shlukové analýzy proteinových profilů šarží A, C po 56 dnech zrání</i>	73
Obrázek 32:	<i>Dendrogram shlukové analýzy proteinových profilů šarží B, D po 56 dnech zrání</i>	74
Obrázek 33:	<i>Dendrogram shlukové analýzy proteinových profilů šarží A, C po 84 dnech zrání</i>	75
Obrázek 34:	<i>Dendrogram shlukové analýzy proteinových profilů šarží B, D po 84 dnech zrání</i>	76
Obrázek 35:	<i>Dendrogram shlukové analýzy proteinových profilů velkých bloků po 56 dnech zrání</i>	77

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1:	<i>Kódování vyrobených šarží</i>	43
Tabulka 2:	<i>Vývoj průměrných hodnot pH v průběhu zrání modelových vzorků</i>	52
Tabulka 3:	<i>Průměrné hodnoty pH ve velkých blocích</i>	53
Tabulka 4:	<i>Vývoj obsahu sušiny v průběhu zrání</i>	54
Tabulka 5:	<i>Obsah soli v malých blocích</i>	56
Tabulka 6:	<i>Proteinové profily malých bloků po 14 dnech zrání</i>	68
Tabulka 7:	<i>Proteinové profily malých bloků po 28 dnech zrání</i>	71
Tabulka 8:	<i>Proteinové profily malých bloků po 56 dnech zrání</i>	72
Tabulka 9:	<i>Proteinové profily malých bloků po 84 dnech zrání</i>	75
Tabulka 10:	<i>Proteinové profily velkých bloků po 56 dnech zrání</i>	77

SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA P I: SPECIFIKACE POUŽITÝCH KULTUR	88
PŘÍLOHA P II: ELUČNÍ PROGRAMY, STANOVENÍ FAA A BA	89
PŘÍLOHA P III: ROZTOKY POUŽITÉ PŘI SDS-PAGE	90
PŘÍLOHA P IV: SPECIFIKACE LAEMMLIHO PUFRU	92

PŘÍLOHA P I: SPECIFIKACE POUŽITÝCH KULTUR

Obě kultury pochází od dodavatele CHR HANSEN.

CHN19

Mezofilní aromatická kultura, typ LD.

Kultura obsahuje směs kmenů: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* a *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. Kultura vytváří aroma a oxid uhličitý CO₂.

Kultura je dodávána lyofilizovaná, v granulované formě.

Flora Danica

Mezofilní aromatická kultura, typ LD.

Kulturu tvoří směs kmenů: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*. Kultura vytváří aroma a CO₂.

Kultura je dodávána lyofilizovaná, v granulované formě.

PŘÍLOHA P II: ELUČNÍ PROGRAMY

Stanovení FAA

(vlnová délka 254nm, t = 30 °C, průtok 0,45 ml/ min., kolona Agilent Eclipse Plus C18 RRHD o rozměrech 3 x 50 mm)

Time [min]	Column T[°C]	Buffer Nr.	AA Command	Note	State	Duration [min]
0.00	40	1	Inject	2,85	Running	3.00
3.00	40	2	Zero		Waiting	3.00
6.00	40	2	None	2,95	Waiting	25.00
31.00	40	2	None		Waiting	16.00
47.00	65	3	None	3,50	Waiting	18.00
65.00	65	3	None		Waiting	19.00
84.00	74	4	None	4,05	Waiting	18.00
102.00	74	5	None	4,65	Waiting	2.00
104.00	74	5	Zero		Waiting	23.00
127.00	74	5	None		Waiting	33.00
160.00	74	5	StartEquil		Waiting	19.00
179.00	74	6	None	0,3M NaCl	Waiting	6.00
185.00	74	6	H2O		Waiting	12.00
197.00	60	1	None		Waiting	0.20
197.20	60	1	H2O		Waiting	14.80
212.00	45	1	NHD		Waiting	2.00
214.00	60	1	None		Waiting	11.00

Stanovení biogenních aminů

(vln. délka= 254 nm, t=30°C, průtok = 0,45ml/min, kolona: Agilent Eclipse Plus C18 RRHD a rozměry 3,0 x 50 mm)

čas [min]	10% ACN	100% ACN
0	39	61
0,1	39	61
1,4	30	70
3,5	17	83
4	0	100
9,5	0	100
11,5	39	61
15,5	39	61

PŘÍLOHA P III: ROZTOKY POUŽITÉ PŘI SDS-PAGE

Tris pufr pro separační gel (pH 8,8)

- Tris 18,15 g
- Deionizovaná voda 50 ml

Pomocí koncentrované HCl upravit pH na hodnotu 8,8 a doplnit deionizovanou vodou do 100 ml. Uchovávat při teplotě 4 °C.

Tris pufr pro koncentrační gel (pH 6,8)

- Tris 6,0 g
- Deionizovaná voda 50 ml

Pomocí koncentrované HCl (Sigma) upravit pH na hodnotu 6,8 a doplnit deionizovanou vodou do 100 ml. Uchovávat při teplotě 4 °C.

Elektrodový pufr

- El. pufr dle Laemliho 100 ml
- Deionizovaná voda 900 ml

Elektrodový pufr dle Laemliho 10x koncentrovaný (SERVA) před použitím doplnit deionizovanou vodou do požadovaného objemu v poměru 1:9.

30% roztok akrylamidu

- Akrylamid 29,2 g
- N,N'-metylen-bisakrylamid 0,8 g

Doplnit do 100 ml deionizovanou vodou. Uchovávat při 4 °C v tmavé láhvi. Obě látky jsou toxické, při přípravě roztoku je nutno použít rukavice.

Vzorkový pufr

- 0,062 M Tris-HCl 0,0977 g
- 5% Merkaptoetanol 0,5 g
- 10% Glycerol 1,0 g
- Bromfenolová modř 0,01 g

Upravit pH na 6,8 a doplnit deionizovanou vodou do 100 ml.

Fixační roztok

- 10% kyselina trichloroctová 50 g
- Deionizovaná voda 100 ml

Rozpustit a doplnit deionizovanou vodou do 1 l.

Barvicí roztok

- 0,25% Coomassie Blue R-250 v 50% (v/v) metanolu a 10% (v/v) kyselině octové
- 0,25% Coomassie Blue R-250 1,25 g
- Metanol 250 ml
- Kyselina octová 50 ml

Doplnit deionizovanou vodou do 500 ml.

Odbarvovací roztok

- 25% (v/v) metanol a 10% (v/v) kyselina octová
- Metanol 250 ml
- Kyselina octová 100 ml

Doplnit deionizovanou vodou do 1 l.

PŘÍLOHA P IV: SPECIFIKACE LAEMMLIHO PUFERU



ANALYSENZERTIFIKAT CERTIFICATE OF ANALYSIS

„Laemmli“ Puffer 10x	Kat.Nr./Cat.No. :	42556
„Laemmli“ Buffer 10x	Lot/Contr.No. :	P120359

Parameter parameter	Spezifikation specification	Ergebnis result
Aussehen appearance	klare farblose Lösung clear colorless solution	entspricht corresponds
pH	8.4 – 8.9	8.7

Zusammensetzung composition

TRIS (# 37180)	0.25 M	entspricht corresponds
Glycin / Glycine (# 23390)	1.92 M	entspricht corresponds
SDS (# 20763)	1 %	entspricht corresponds

Mindesthaltbarkeit
minimum shelf life

10/ 2013

Lagerung (°C)
storage

+15 bis/ to +30

Die Eignung des Produktes für spezielle Anwendungszwecke wird nicht zugesichert.
Dieses Dokument entbindet nicht von einer branchenüblichen Eingangskontrolle.
We do not guarantee that the product can be used for a special application.
This document does not release you from performing the standard control upon receipt of incoming goods.

SERVA Electrophoresis GmbH
Qualitätskontrolle/ Quality Control

Druckdatum/ printing date: 14.09.2012

Dipl.-Ing. (FH) Bernhard Göckel

Patricia Steinmann

Dieses Dokument ist ein Computerausdruck und deshalb ohne Unterschrift gültig.
This report has been computer-generated and does not contain a signature.