

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Brno, 2024

Tereza Druláková



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

POROVNÁNÍ MIKROBIÁLNÍHO SLOŽENÍ ANGLICKÉHO SÝRU BLUE STILTON S PŘÍBUZNÝMI SÝRY

COMPARISON OF THE MICROBIAL COMPOSITION OF ENGLISH BLUE STILTON CHEESE WITH RELATED
CHEESES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Tereza Druláková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.

BRNO 2024

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1902/2023 Akademický rok: 2023/24
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Tereza Druláková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a technologie
Vedoucí práce: **prof. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Porovnání mikrobiálního složení anglického sýru Blue Stilton s příbuznými sýry

Zadání bakalářské práce:

- Literární rešerše k tématu zaměřená na sýry s modrou plísní
- Identifikace mikrobiálních kultur pomocí molekulárně biologických metod
- Analytické stanovení těkavých látek
- Senzorické hodnocení a srovnání plísňových sýrů

Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2024:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu.
Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Tereza Druláková
studentka

prof. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2024

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá problematikou porovnání anglického sýru s modrou plísní Blue Stiltonu s běžně dostupnými sýry stejného druhu Roquefortem a Nivou, a to z hlediska mikrobiálního složení, obsahu aromatických těkavých látek a také pomocí sensorické analýzy. Těmito metodami je drahý sýr Blue Stilton odlišen od běžných a levnějších sýrů stejného druhu v rámci České republiky.

Metodou RT-PCR byla prověřována přítomnost 15 vybraných druhů mikroorganismů. Pro Blue Stilton se ukázaly být specifické 3 z nich, konkrétně bakterie *Brevibacterium linens* a kvasinky *Geotrichum candidum* a *Kluyveromyces lactis*. Aromatické těkavé látky byly stanoveny metodou HS-SPME-GC-MS. Na aromatickém profilu všech sýrů se nejvíce podílely látky heptan-2-on, nonan-2-on, non-8-en-2-on a kyseliny hexanová a oktanová. Sýry je možné rozlišit na základě podílu těchto látek na jejich aromatickém profilu nebo také dle množství těchto látek v jednotlivých vzorcích. Provedené sensorické hodnocení odhalilo, že ve většině parametrů jako je vzhled, konzistence a chuť je pro české spotřebitele nejpříjemnější sýr Niva, v kategorii vůně byl naopak nejoblíbenější Blue Stilton.

Na základě získaných dat dokážeme díky specifickým mikroorganismům a jedinečnému aromatickému profilu rozlišit Blue Stilton od ostatních sýrů s modrou plísní.

KLÍČOVÁ SLOVA

Blue Stilton, Roquefort, Niva, sýry s modrou plísní, RT-PCR, mikrobiální složení, GC-MS, těkavé aromatické látky, sensorická analýza

ABSTRACT

This bachelor's thesis focuses on the comparison of English blue-veined cheese Blue Stilton with commonly available cheeses of the same type, Roquefort and Niva, in terms of microbial composition, aromatic volatile content and also by sensory analysis. These methods distinguish the expensive Blue Stilton cheese from common and cheaper cheeses of the same type in the Czech Republic.

The presence of 15 selected species of microorganisms was determined by RT-PCR. Three of them proved to be specific for Blue Stilton, specifically bacteria *Brevibacterium linens* and the yeasts *Geotrichum candidum* and *Kluyveromyces lactis*. Aromatic volatile compounds were determined by HS-SPME-GC-MS. Heptan-2-one, nonan-2-one, non-8-en-2-one and hexanoic and octanoic acids were the most important substances contributing to the aromatic profile of all cheeses. The cheeses can be distinguished according to the content of these substances in their aromatic profile or according to the amount of these substances in the individual samples. The sensory evaluation revealed that in most parameters like appearance, consistency and taste, Niva cheese was the most acceptable for Czech consumers while Blue Stilton was the most popular in the aroma category.

On the basis of the obtained data, we are able to distinguish English Blue Stilton from other blue-veined cheeses according to specific microorganisms and the unique aromatic profile.

KEYWORDS

Blue Stilton, Roquefort, Niva, blue-veined cheeses, RT-PCR, microbial composition, GC-MS, volatile aromatical substances, sensory analysis

DRULÁKOVÁ, Tereza. *Porovnání mikrobiálního složení anglického sýru Blue Stilton s příbuznými sýry* [online]. Brno, 2024 [cit. 2024-05-14]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/156569>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Václav Brázda.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych tímto poděkovala vedoucímu mé práce prof. Mgr. Václavu Brázdovi, Ph.D. za odborné a cenné rady a také konzultantce mé práce Ing. Lucii Šislerové za ochotu, laskavost a také za čas, který mé práci věnovala. Dále bych ráda poděkovala zaměstnancům fakulty, kteří mě zaškolili v práci s měřicími přístroji. A v neposlední řadě mé díky patří také všem hodnotitelům za odvalu a ochotu a samozřejmě mé rodině a nejbližším za trpělivost a podporu během studia i při psaní této práce.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1	Definice, druhy a dělení sýrů	9
2.2	Technologie výroby sýrů.....	10
2.2.1	Mléko jako surovina.....	11
2.2.2	Úprava mléka	11
2.2.3	Přídavek čistých mlékařských kultur a předezrání.....	12
2.2.4	Srážení.....	12
2.2.5	Zpracování sýřeniny	12
2.2.6	Formování	13
2.2.7	Solení.....	13
2.2.8	Zrání	13
2.3	Sýr Blue Stilton	13
2.3.1	Charakterizace	13
2.3.2	Druhy.....	14
2.3.3	Výroba.....	14
2.3.4	Mikrobiální složení	14
2.4	Sýr Roquefort	15
2.4.1	Charakterizace	15
2.4.2	Výroba.....	15
2.4.3	Mikrobiální složení	15
2.5	Sýr Niva.....	16
2.5.1	Charakterizace	16
2.5.2	Výroba.....	16
2.5.3	Mikrobiální složení	17
2.6	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	17
2.6.1	Princip metody	17
2.6.2	Real-Time PCR	17
2.6.3	Vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM).....	18
2.7	GC-MS	18
2.7.1	Aplikace vzorku	18
2.7.2	Analýza vzorku	18

3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	20
3.1	Použité přístroje, vybavení a chemikálie.....	20
3.1.1	Přístroje	20
3.1.2	Vybavení	20
3.1.3	Chemikálie	20
3.1.4	Primery	21
3.2	Analyzované vzorky.....	22
3.3	Stanovení mikrobiálního složení.....	23
3.3.1	Izolace DNA ze vzorků sýra	23
3.3.2	Elektroforéza izolované DNA.....	23
3.3.3	Stanovení přítomnosti vybraných mikroorganismů	24
3.4	Stanovení těkavých aromatických látek	24
3.5	Senzorická analýza	25
4	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	26
4.1	Stanovení mikrobiálního složení.....	26
4.2	Stanovení těkavých aromatických látek	30
4.3	Senzorická analýza	35
5	ZÁVĚR.....	39
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	41
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	46
8	PŘÍLOHY	47

1 ÚVOD

Sýry byly původně vyráběny pro prodloužení trvanlivosti mléka, jelikož v sobě koncentrují jeho výživově nejvýznamnější složky. Postupem času se vyvinuly technologie výroby nejrůznějších druhů sýrů a jedním z nich jsou také sýry s modrou plísní, které jsou v současnosti rozšířené po celém světě. V řadě zemí se sýr tohoto typu vyrábí, avšak každý z nich má specifické vlastnosti, byť jsou v základu stejné. Takovými příklady jsou sýr z Velké Británie, Blue Stilton, francouzský sýr Roquefort a český sýr Niva. A právě zjištěním toho, jak moc jsou tyto sýry odlišné, se zabývá tato práce.

Sýry byly porovnány z hlediska obsahu mikroorganismů, jelikož každý z nich se může lišit v technologii výroby, ale zejména v prostředí, ve kterém potom zraje. Mikroflóra každého sýru má poté vliv na jeho vlastnosti. Činností mikroorganismů mohou vznikat specifické produkty, které dodávají sýru typický vzhled, barvu, chuť nebo aroma. Sýry byly srovnány také z hlediska aromatických těkavých látek, které společně vytváří chuť a vůni produktu. Právě poměr těchto látek dokáže vzhledově velmi podobné sýry jednoznačně chuťově rozlišit.

Cílem práce je tedy najít způsoby, jakými je možné rozlišit sýr Blue Stilton, který je nákladný a v České republice téměř nedostupný, od cenově dostupnějších běžných sýrů Roquefortu a Nivy.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Definice, druhy a dělení sýrů

Sýrem se na základě vyhlášky č. 397/2016 Sb. označuje výrobek vyrobený vysrážením mléčné bílkoviny z mléka působením syřidla nebo jiných vhodných koagulačních činidel, oddělením podílu syrovátky a následným prokysáním nebo zráním [1]. Tato vyhláška zahrnuje požadavky na mléko, mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. Upravuje ji vyhláška č. 274/2019 Sb. o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje [2].

Rozmanitost sýrů vyplývá zejména z rozdílných technologií tří hlavních operací při výrobě. Jsou jimi srážení mléka, odkapávání syrovátky a zrání. Tyto procesy potom mohou přímo či nepřímo ovlivňovat a diferencovat tak konečný výrobek od výrobků jiných [3].

Sýry můžeme rozdělit do několika skupin podle nejrůznějších parametrů. Nejzákladnějším z nich je dělení podle toho, z jakého mléka je sýr vyroben, tedy obecně sýry z kravského, ovčího nebo kozího mléka, případně se využívá jejich kombinace. Existují ale také sýry získané ze syrovátky. Specifičtější dělení už se zaměřují na rozdílnost výrobků odvíjející se od technologií výroby jednotlivých sýrů, případně od jejich složení (např. dělení podle obsahu vody nebo tuku) [3].

Podle způsobu srážení (koagulace) mléka rozlišujeme sýry vyrobené:

- sladkým srážením – srážení pomocí syřidlových enzymů,
- kyselým srážením – srážení v blízkosti izoelektrického bodu kaseinové bílkoviny,
- kombinovaným srážením [3].

Podle způsobu zrání rozeznáváme sýry:

- zrající:
 - zrající pod mazem,
 - zrající v chladu,
 - zrající v solném nálevu,
- plísňové:
 - s plísní na povrchu,
 - s plísní v těstě,
 - dvouplísňové,
- nezrající [2].

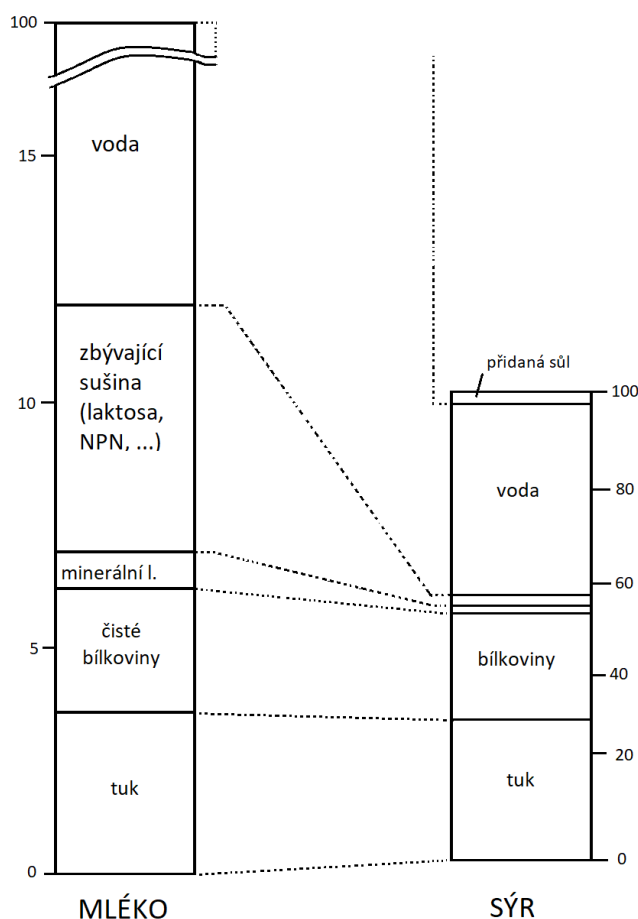
Sýry, na nichž můžeme během zrání pozorovat růst plísně, se dělí do dvou velkých kategorií: sýry zrající na povrchu, pro něž je typický růst plísně *Penicillium camemberti* pouze na jejich povrchu, a modře žilkované druhy, tzv. sýry s plísní v těstě, které se vyznačují růstem *Penicillium roqueforti* v celém objemu produktu. Ačkoli tyto sýry mají jako společný rys nárůst plísně, jejich výroba se v mnoha ohledech liší, a to jak mezi zmíněnými kategoriemi, tak i v rámci konkrétních výrobků. Speciální skupinou jsou sýry s kombinovaným nárůstem plísně, které se vyznačují plísněmi obou zmíněných kategorií [4].

2.2 Technologie výroby sýrů

Jedním z hlavních důvodů, proč mléko zpracováváme na sýry, je prodloužení jeho trvanlivosti. Toho umožňuje docílit proces fermentace mléčného cukru laktosy na kyselinu mléčnou, dále potom snížení pH a vodní aktivity, přidavek soli a další faktory. To vše dopomáhá k získání produktu s delší trvanlivostí a současně i nutriční hodnotou podobnou mléku [4].

Velká výhoda sýrů spočívá v tom, že v sobě koncentrují většinu nutričně nejvýznamnějších složek mléka. Samy o sobě jsou vlastně tvořeny základními složkami mléčné sušiny, především kaseinem a mléčným tukem [4]. Obrázek 1 zobrazuje, jaké složky mléka a v jakém poměru do sýra přechází.

Při výrobě dochází k uvolnění tekutého podílu zvaného syrovátka. Ta obsahuje všechny ostatní složky, které nebyly vysráženy společně s kaseinem a přešly do vodné fáze. Obrázek 1 ukazuje, že sušina mléka, s výjimkou tuku a převážné části bílkovin, se do konečného výrobku dostává jen ve velmi malém množství a uvolňuje se do syrovátky [5]. Její složení je stejně jako složení samotného mléka velmi variabilní a závisí na charakteru použitého mléka, zředění, nebo i technologickém postupu, jímž je získána [3]. Obvykle ale obsahuje kromě syrovátkových bílkovin také laktosu a stopová množství tuku a dusíkatých látek [4].



Obrázek 1: Porovnání složení mléka a sýra [4], upraveno autorem.

2.2.1 Mléko jako surovina

V rámci evropské unie je k výrobě až 92 % sýrů využíváno výhradně kravské mléko. O 4 % se rovným dílem dělí sýry z ovčího a koziho mléka a zbytek tvoří výrobky z mléka dalších zvířat, především z buvolího [6]. Druh mléka je při výrobě zásadní, jelikož jeho složení má velký podíl na kvalitě výsledného produktu. Stejně tak důležité je chemické složení podílející se na výtěžnosti výroby, což udává zejména obsah kaseinu. Poměr tuku a kaseinu ve výsledku ovlivňuje obsah tuku v sušině, jeden z hlavních parametrů. Pro dobrou syřitelnost mléka neboli schopnost srážení za pomoci syřidla, je nezbytná přítomnost rozpustných vápenatých iontů [4].

Sýry podstatně ovlivňuje i mikrobiální kvalita použitého mléka. V převážné většině zemí je povolena výroba pouze z mléka pasterovaného, aby se zamezilo rozvoji mikroorganismů, které by ve výsledku měly negativní dopad na organoleptické a technologické vlastnosti produktu. I přes tepelné ošetření ale přežívají spory některých mikroorganismů, které musí být odstraněny jiným způsobem, např. baktofugací. Hlavním cílem je odstranit z mléka co nejvíce koliformních a termorezistentních bakterií způsobující duření sýrů [7].

2.2.2 Úprava mléka

Po přejímce mléka v mlékárně jsou odstraněny mechanické nečistoty filtrací nebo centrifugací. Před dalším zpracováním musí dojít k tepelnému ošetření a standardizaci. Nejčastější způsob tepelného ošetření je šetrná pasterace [4]. Ohřev na teplotu 72 °C po dobu 15 sekund zajišťuje zničení patogenní mikroflóry a tím pádem i zdravotní nezávadnost výrobku [8]. Přežívají jen sporotvorné mikroorganismy a dochází k částečné inaktivaci enzymů. Za těchto podmínek je pouze minimálně ovlivněna chuť a vlastnosti mléka. U každého typu sýra jsou ovšem parametry pasterace individuální [7].

Tepelné ošetření bývá doplněno o úkon, jehož cílem je odstranění spor patogenních mikroorganismů, které nebyly usmrceny během pasterace. Především se jedná o baktofugaci, resp. mikrofiltraci. Takto získaný koncentrát je po UHT ošetření vrácen zpět do mléka pro výrobu sýrů. Aby byl u konečných výrobků zajištěn stabilní obsah tuku v sušině, je nutno provést standardizaci mléka. Děje se tak z důvodu nestabilního složení mléka v průběhu roku. Je tedy přidávána smetana nebo plnotučné mléko, abychom zajistili poměr tuku a kaseinu typický pro daný sýr [4].

Proces homogenizace umožňuje rovnoměrné rozptýlení tukových kuliček v mléce, ale uplatňuje se také u smetany před jejím použitím ke standardizaci. Je prováděna protlačením mléka úzkou štěrbinou pod tlakem, čímž se dosáhne zmenšení tukových kuliček pod 1 μm. Vlivem homogenizace je urychlen proces syření a do syrovátky potom přechází méně tuku, jenž zůstane v sýru [9]. Tato operace se uskutečňuje zejména u sýrů, které mají vyšší obsah tuku, nebo je při jejich zrání uplatňována lipolýza, kam spadají i sýry s plísní [8].

2.2.3 Přídavek čistých mlékařských kultur a předezení

Základní kulturou pro výrobu většiny tvarohů a sýrů je mezofilní smetanová kultura, která bývá následně doplněna dalšími kulturami charakterizujícími konkrétní výrobek. Smetanová kultura a část kultury určující výrobek [8] jsou přidávány po pasteraci a ochlazení mléka na teplotu 5 až 12 °C a poté se směs nechá do druhého dne tzv. předežrát. Tento krok pomůže obnovit fyzikálně chemické a mikrobiální vlastnosti mléka po tepelném záhřevu a zlepšuje rovněž jeho syřitelnost [4].

Kultury specifické pro daný výrobek se přidávají po zahřátí mléka na teplotu sýření (kolem 30 °C) přibližně 30 minut před samotným sýřením. Mezofilní kultury mimo jiné také fermentují laktosu na kyselinu mléčnou během procesů srážení a zpracování sýřeniny, upravují kyselost mléka před sýřením, podílejí se na tvorbě sensorických vlastností, textury a konzistence výrobku a uplatňuje se také jejich proteolytická a lipolytická aktivita [7].

2.2.4 Srážení

Koagulaci lze provést dvěma způsoby, které je možné kombinovat. Prvním je vysrážení kaseinu poklesem pH na hodnotu blízkou jeho izoelektrickému bodu vlivem tvorby kyseliny mléčné, která vzniká při fermentaci laktosy. Mluvíme o tzv. kyselém srážení, při němž vznikají zejména tvarohy a čerstvé sýry. Druhý a běžnější způsob je enzymové srážení, které se provádí nejčastěji syřidlem obsahujícím chymosin, jenž je izolován z telecích žaludků [9]. Kromě něj jsou ale také využívány jiné enzymové preparáty se stejným účinkem. Mohou být živočišného, rostlinného, a dokonce i mikrobiálního původu, jelikož některé mikroorganismy jsou rovněž schopny produkovat enzym způsobující srážení (např. *Mucor pusillus*) [10].

Enzymové srážení lze rozdělit na tři fáze. V primární fázi dochází k proteolýze tzv. κ -kaseinu, který obaluje ostatní kaseinové frakce a chrání je tak před vysrážením Ca^{2+} ionty [11]. V sekundární neboli koagulační fázi z něj jsou odštěpovány fragmenty zvané glykomakropeptidy, které poté přecházejí do syrovátky. Ze zbytku kaseinu se následně stává para- κ -kasein, který se přemění v gel působením právě Ca^{2+} iontů. V terciální fázi pokračuje proteolýza kaseinu vlivem zbytkové aktivity syřidlových enzymů, což je již děj nežádoucí [7].

Srážení započne přidáním vhodně naředěného syřidla do mléka, důkladným promícháním a ustálením směsi, která je ponechána v klidu, aby nebyl narušen proces tvorby gelu a předešlo se ztrátám. Doba sýření se pohybuje v rozmezí 30 až 120 minut [9].

2.2.5 Zpracování sýřeniny

Při dosažení požadované tuhosti gelu je sýřenina sýrařskými harfami nakrájena na kostky, které se poté rozdrobí až na sýrové zrno. Čím menší částice, tím více syrovátky se uvolní a tím tvrdší sýr získáme [9]. Zrno se dále šetrně míchá, aby nedocházelo ke ztrátám částí, které by potom odcházely do syrovátky a snížil se tak výtěžek. U polotvrdých a tvrdých sýrů jsou navíc zařazeny i operace dohřívání a dosoušení. Při dohřívání je zvýšena teplota nad teplotu sýření a dosoušení spočívá ve výdrži při této teplotě. S rostoucím záhřevem je podpořena syneze neboli uvolňování syrovátky [4].

2.2.6 Formování

V této fázi je sýrové zrno odděleno od syrovátky nalitím do příslušných perforovaných tvořítek, která utvářejí výsledný tvar produktu. Charakter takové formy je silně závislý na druhu vyráběného sýra. U měkkých sýrů poté následuje odkapávání, kdy se za občasného převrácení sýrů ve formách vyloučí syrovátka lisováním vlastní vahou. U tvrdých sýrů následuje lisování na lisech [9].

2.2.7 Solení

Tento krok má velký vliv nejen na chuť výrobku, ale také ovlivňuje mikrobiální aktivitu přítomných kultur a brání nežádoucí kontaminaci [10]. Solení se rovněž podílí na tvorbě výsledné konzistence, jelikož dochází k nahrazení vápenatých iontů v para-kaseinu ionty sodnými, což zpevňuje povrch sýrů. U většiny výrobků se obsah soli pohybuje mezi 0,5 a 2,0 %, nicméně sýry s plísní mívají tyto hodnoty mezi 3,0–7,0 % [7]. Proces se nejčastěji provádí nořením do solné lázně, nicméně výjimkou není ani solení na sucho. U sýrů s plísní v těstě je často aplikována kombinace těchto dvou metod [10].

2.2.8 Zrání

Zrání představuje proces, při němž formované sýry podléhají různým změnám, které dotvářejí jejich výsledný charakter. Pro každý sýr jsou opět typické v závislosti na použité mikrobiální kultuře. Jedním z těchto procesů je rozklad laktosy, který částečně probíhá již po přidání kultur do mléka. Polotvrdé a tvrdé sýry jsou typické rozkladem bílkovin proteolytickými enzymy na nižší peptidy a aminokyseliny, které vytvářejí specifické senzorické látky. U sýrů s plísní je také klíčovým procesem lipolýza, při které se uvolňují mastné kyseliny tvořící specifické aroma produktu. Dalšími reakcemi vznikají také karbonylové sloučeniny, typicky methylketony, které jsou významnou složkou chuti sýrů s plísní. Proces zrání zahrnuje podmínky, které se různí podle výrobku. Jsou jimi doba zrání, teplota, vlhkost a případně i další operace. Pro plísněvé sýry je klíčový přísun kyslíku, který podporuje nárůst samotné plísně, ať už na povrchu nebo v těstě sýra [10].

2.3 Sýr Blue Stilton

Blue Stilton se řadí mezi polotvrdé sýry s plísní v těstě podobně jako světově známé Roquefort, Danish Blue nebo například Gorgonzola. Jejich společným rysem je modré žilkování v těstě sýra způsobené plísní *Penicillium roqueforti* [9].

2.3.1 Charakterizace

Stilton je charakteristický tvarem vysokého válce, výrobou z plnotučného pasterovaného kravského mléka zahrnující lisování bez použití tlaku [12] a je rovněž opatřen chráněným označením původu povolující výrobu pouze ve Velké Británii v oblastech Derbyshire, Nottinghamshire a Leicestershire z tamního mléka. V současné době jej vyrábí pouze sedm uznaných sýráren [13]. Chuť Stiltonu je kyselá, svěží a krémová s drobivou strukturou, kůrka je vlhká a hladká. Je rovněž možnost přidávat do něj další přísady, které hrají významnou roli v senzorických vlastnostech konečného výrobku. To se však provádí zejména u druhu White Stilton. Blue Stilton vyniká čistou, silnou chutí a bohatou krémovou barvou s modrozeleným žilkováním [12].

2.3.2 Druhy

Stilton se obecně vyrábí ve třech variantách a to White, Blue a Mature/Vintage Stilton [12]. Jak název napovídá White Stilton je bílá verze Blue Stiltonu, u níž ještě nedošlo ke vzniku modrého žilkování. Můžeme jej tedy označovat za mladou a nedostatečně vyžralou verzi [13]. Tento sýr je jemný a drobivější a k jeho ochucení je využíváno nejrůznějších přísad jako jsou bylinky nebo čerstvé ovoce, například meruňky, borůvky, brusinky apod. Vintage Stilton je naopak druhem, který zraje podstatně delší dobu, což umožní dostatečné vyvinutí chuti [12].

2.3.3 Výroba

Stilton se vyrábí v uvedených oblastech z pasterovaného mléka produkovaného místními stády. Po pasteraci prováděné nejčastěji při teplotě 71 °C na 15 sekund se mléko ochladí na 26–32 °C a přidá se do něj mezofilní zákys společně s kulturou *P. roqueforti*. Teplota v této fázi výroby má významný vliv na texturu vzniklé sýřeniny. Kvůli kolísání teplot u mléka je nutné upravovat technologický postup, aby bylo docíleno konstantních vlastností výrobku [14].

Následně dochází k zasiření pomocí syřidla. To může být rostlinného původu a sýr tak bude určen i pro vegetariány, nebo se použije chymosinové telecí syřidlo, které dodá výslednému produktu lepší chuťové vlastnosti [13]. Vznikající sýřenina se nechá usadit na dně vany a syrovátka se postupně odebírá v průběhu následujících 12–18 hodin, poté se sýřenina rozřízne k usnadnění odtoku syrovátky a na závěr se úplně rozmělní, nasucho nasolí a vloží do forem [15].

V dalších přibližně sedmi dnech dochází k lisování vlastní vahou, přičemž se sýry musí pravidelně obracet. Během této doby je udržováno prostředí s teplotou 26–30 °C a na zrání se umístí do chladnější místnosti s teplotou 13–15 °C na 6–7 týdnů, během nichž se ochladí a na povrchu se vytvoří kůra. V poslední části výroby se sýry propíchnou ocelovými jehlami a po dostatečném nárůstu plísň (2–3 týdny) se přemístí do chladírny s teplotou 5 °C [15].

2.3.4 Mikrobiální složení

Stilton je vyráběn z pasterovaného kravského mléka, které je okyseleno bakteriemi *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis* nebo *L. lactis subsp. cremoris*. Jednou z nejdůležitějších mikrobiálních složek je plíseň *Penicillium roqueforti*, která zde přispívá k modrému žilkování a také zejména proto, že umožňuje vznik ostré pikantní chuti [16].

Stejně jako ostatní plísňové sýry má Stilton heterogenní mikrobiální prostředí s výraznými gradienty pH, solí a vodní aktivity, což vytváří v různých částech sýra různé podmínky a vyskytuje se v nich tedy rovněž různá mikroflóra. Rozdíly jsou nejvíce patrné v rámci mikrobiálního složení kůrky, modrých žilek a bílého jádra. *Lactobacillus plantarum* je druhem, který se hojně nachází ve všech částech sýra, přičemž v celém sýru lze nalézt mnoho jeho kmenů, které také přispívají k aromatu výrobku. Do sýrů se dostává jako součást mikrobiálních kontaminantů ze syrového mléka. Kromě něj lze ale na různých místech najít také *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus curvatus*, *Leuconostoc mesenteroides* a další bakterie [16].

Z řad kvasinek bývají nejběžněji přítomny druh *Yarrowia lipolytica*, kmeny *Debaryomyces hansenii*, *Trichosporon ovoides* nebo *Kluyveromyces lactis*, které se mohou opět vyskytovat v různých částech sýra. Například *Y. lipolytica* se vyskytuje běžněji ve vnějších částech, zatímco *K. lactis* v modrém žilkování a na povrchu, *T. ovoides* v modré části a *D. hansenii* ve vnějších částech a na povrchu. Na kůře Blue Stiltonu se může také vyskytovat *Candida catenulata* [17].

2.4 Sýr Roquefort

Roquefort je oblíbený francouzský sýr proslulý prakticky po celém světě a lze jej označit jako jeden z nejznámějších sýrů s modrou plísní v těstě. Navíc náleží k poměrně malé skupině plísňových sýrů původně vyráběných z nepasterovaného mléka [15].

2.4.1 Charakterizace

Roquefort je sýr vyráběný pod chráněným označením původu z nepasterovaného ovčího mléka, které je typické velmi nízkým obsahem karotenoidů, jenž se běžně podílí na nažloutlém zbarvení mléka. Výsledný sýr je tedy nezvykle bílý a je možné zde pozorovat výrazný kontrast mezi sýřeninou a plísní nacházející se v celé hmotě sýra [15]. Patří do skupiny takzvaných modrých sýrů kvůli modře zbarveným žilkám tvořených plísní *Penicillium roqueforti* [18]. Proces zrání probíhá pro tento sýr velmi specificky v jeskyních ve vymezené oblasti jihovýchodní Francie. Vydrálý Roquefort se vyznačuje krémovou konzistencí s ostrou, štiplavou a slanou chutí [15].

2.4.2 Výroba

Ovčí mléko, které je výchozí surovinou pro výrobu sýru Roquefort, má schopnost být během srážení okyselováno vlastní mikroflórou. Proto se do něj nepřidává žádná startovací kultura. Jsou zde zastoupeny jak homofermentativní laktokoky, tak heterofermentativní leukonostoky a další bakterie mléčného kvašení, které produkují jako vedlejší produkt CO₂ vytvářející v sýřenině otvory podporující růst plísně během zrání. Mléko se sráží jehněčím syřidlem a přibližně za 2 hodiny se vzniklá sýřenina nakrájí, naočkuje plísní *P. roqueforti* a vloží do perforovaných forem pro odvod syrovátky. Tam se nechá odkapávat 4 až 5 dní, přičemž se sýry pravidelně obrací. Po uplynutí této doby se vyjmou z forem a jeden týden se nasolují za sucha. Poté jsou propíchnuty jehlami, uloží se do vápencových jeskyní a při tamní teplotě 10 °C a relativní vlhkosti 95 % zrají 3–5 měsíců. Během toho je povrch sýrů zbavován nežádoucí povrchové mikroflóry [15].

2.4.3 Mikrobiální složení

Jak bylo zmíněno tento sýr se vyznačuje především růstem plísně *Penicillium roqueforti*, která je poměrně častá i u jiných sýrů podobného typu. Nicméně pro sýr Roquefort se stala natolik charakteristická, že získala označení Roquefortská plíseň [19]. Dalšími významnými mikroorganismy vyskytující se v tomto sýru jsou druhy rodu *Streptococcus*, zejména *S. lactis* a *S. cremoris*. Proteolytické druhy patřící mezi stafylokoky, mikrokoky a enterokoky velmi pravděpodobně zvyšují odolnost bakterií mléčného kvašení vůči solím, což je poměrně důležitý faktor určující výslednou mikroflóru [20].

Během procesu zrání na povrchu sýra vzniká silnější vrstva mazu tvořená kvasinkami, několika druhy bakterií a také plísní *Oidium lactis*. I výrobky, které jsou tohoto mazu na první pohled zbaveny, obsahují jeho zbytky v prasklinách a dutinách. Růst těchto mikroorganismů podmiňují parametry prostředí, které jsou udržovány během zrání. Jde o povrch vyskytující se například i u sýrů Camembert, Brie, Limburg a další. Nicméně studie naznačují, že tato mazovitá vrstva nijak zdatně nepřispívá k tvorbě aromatu sýra, jelikož to vzniká již dříve [19]. Další druhy, které se nachází na povrchu sýra jsou například *Debaromyces hansenii*, v malém množství je možný výskyt i *Kluyveromyces lactis* [20] a ve větší četnosti různé druhy kvasinek rodu *Candida* (zejména *C. famata* a *C. sphaerica*). Nicméně četnost výskytu jednotlivých druhů je závislá na fázi výroby, v níž se zrovna sýr nachází. Bylo zjištěno, že druh *D. hansenii* po fázi solení prakticky vymizel, na rozdíl od kvasinek rodu *Candida*, jimž se naopak v tomto prostředí dařilo lépe [21].

2.5 Sýr Niva

Niva je sýr s modrou plísní vyráběný na území České republiky a Slovenska s tradicí od roku 1948, kdy byl tento sýr poprvé označen názvem Niva [22]. Nicméně sýry s plísní v těstě se u nás vyráběli minimálně o padesát let dříve jakožto česká verze francouzského sýra Roquefort. Po tom, co Roquefort získal ochranné označení původu, musely naše plísněvé sýry dostat jiné jméno a tím bylo právě Niva [23].

2.5.1 Charakterizace

V současné době je Niva vyráběna několika společnostmi. Nejvýznamnějšími z nich jsou Madeta a.s. [24], Niva Dolní Přím s.r.o. [22] a Mlékárna Otinoves s.r.o. [25]. Všechny společnosti nabízejí různé varianty Nivy včetně uzených a odtučněných druhů, nebo druhu Niva Caesar, který má typem připomínat italský sýr s plísní, Gorgonzolu [24]. Nicméně původní Niva je vyráběna z kravského mléka a vyznačuje se krémovou až světle hnědou barvou na povrchu, očištěnou kůrkou a také nárůstem modrozelené plísně. Uvnitř je tento sýr krémově bílý až světle žlutý s viditelnými plísněnými žilkami a stopami po vpichu jehly, k čemuž dochází během technologie výroby. Textura sýru je poloměkká a drobná, chuť je slaná, intenzivně aromatická, ostrá a štiplavá [12].

2.5.2 Výroba

Pro výrobu sýru Niva se využívá mléko místních dojníc, ideálně plemen, z nichž je získáváno mléko s vysokým obsahem bílkovin a tuku. Před samotnou výrobou je mléko vždy pasterováno. Většina mlékáren, které Nivu vyrábí, si zakládá na velkém podílu ruční výroby, který má dle nich vliv na zachování tradiční chuti a vysoké kvality výrobků [25]. Samotná výroba je v mnoha směrech velmi podobná ostatním plísněným sýrům. Po pasteraci mléka dochází k aplikaci startovací kultury i plísněné kultury *P. roqueforti* a následně i k přidávku syřidla [23]. Po koagulaci je sýřenina rozkrájena a rozdrobena na jemné sýrové zrno a plní se do forem válcovitého tvaru. Následuje lisování vlastní vahou za pravidelného otáčení. Poté dochází k solení nořením v solných lázních a propíchnutí sýru jehlami. Na závěr sýry zrají ve zrácím sklepě 3–4 týdny [25].

2.5.3 Mikrobiální složení

Jelikož je Niva sýrem, který se přímo odvíjí od technologie výroby Roquefortu, lze do jisté míry očekávat, že budou mít velmi podobné mikrobiální složení. Stejně jako ostatní sýry s modrou plísní, je i Niva charakteristická nárůstem plísně *P. roqueforti*, která výslednému sýru poskytuje charakteristické aroma způsobovanou alkan-2-ony [15]. Podle dostupných informací byly z Nivy izolovány také druhy bakterií rodů *Enterococcus* a *Lactobacillus*, konkrétně *L. brevis*, *L. buchneri* [26].

2.6 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce neboli PCR je jednoduchá, citlivá, rychlá a poměrně běžná metoda používaná pro analýzu a amplifikaci DNA [27]. Obvykle je prováděna na předem upravených vzorcích, které procházejí několika extrakčními a přípravnými kroky zbavujícími vzorek co nejvíce inhibičních faktorů [28] (především enzymů hydrolyzující nukleové kyseliny), které by ovlivňovaly samotnou analýzu [27]. Tyto metody purifikace DNA jsou většinou časově náročné, a navíc náchylné ke kontaminaci, a ne vždy vzorek dokonale zbaví všech inhibičních látek [28].

2.6.1 Princip metody

Během samotné PCR analýzy je reakční směs vystavena cyklu tří teplotních změn. Prvním krokem je denaturace, kdy teplota dosahuje 95 °C. Tato teplota denaturuje cílovou DNA z dvouřetězcové (dsDNA) na jednořetězcovou (ssDNA) [28]. V dalším kroku se teplota sníží na přibližně 55–65 °C (typicky 5–10 °C pod teplotou tání primeru), aby páry syntetických oligonukleotidů (primery) mohly nasednout na cílovou sekvenci vzniklé ssDNA. V posledním kroku se teplota zvýší na 72 °C, což umožní DNA polymeráze započít syntézu DNA [27]. Po každém cyklu těchto tří teplot se množství amplifikované DNA zdvojnásobí [29]. Celkový počet cyklů se pohybuje v rozmezí přibližně 30–40, což zajistí velké znásobení původní DNA [30]. Detekce při PCR je realizována pomocí různých metod, které spočívají v kvantifikaci nasynthetizované DNA [31].

2.6.2 Real-Time PCR

PCR v reálném čase je charakteristická tím, že celý proces probíhá pouze v jedné zkumavce, kde po přípravě potřebných komponent dochází k amplifikaci a detekci fluorescence, jejíž intenzita je úměrná množství DNA templátu ve vzorku. Podstatný je rovněž fakt, že analýza probíhá v jednom přístroji bez další manipulace se vzorkem, čímž se snižuje riziko kontaminace vzorku. Při tomto druhu PCR amplifikace probíhá opět cyklickým zaváděním daných teplot. Detekce se provádí nejčastěji pomocí fluorescenčních barviv, která se během analýzy vážou na dsDNA a po excitaci zářením vydávají fluorescenční signál, jenž je zaznamenáván detektorem [28]. Tento signál se v průběhu měření exponenciálně zvětšuje spolu s exponenciálním nárůstem dsDNA. Vzniklý signál je detekován buď kontinuálně nebo při prodlužování každého cyklu PCR přístroje. Příkladem používaných fluorescenčních barviv mohou být SYBR®Green nebo SYBR®Gold, která jsou snadno dostupná a využívaná především pro PCR v reálném čase [31].

2.6.3 Vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM)

Teplota tání označuje teplotu, při které je 50 % přítomných molekul DNA ve formě jednovlákně DNA. Je závislá na délce DNA a také na obsahu bází GC (guanin-cytosin) v DNA fragmentu, jelikož ty jsou vzájemně spojovány třemi vodíkovými můstky, zatímco báze AT (adenin-thymin) pouze dvěma. To zapříčiňuje, že vyšší obsah GC párů bází zvyšuje bod tání [32]. Analýzu pro stanovení tohoto parametru bývá možno provést na většině komerčně dostupných přístrojů, obvykle na konci PCR amplifikace [31]. Provádí se často při real-time PCR ke kontrole, zda došlo k vytvoření správných produktů. Princip spočívá v tom, že k amplifikaci dochází v přítomnosti barviva vázající se na dsDNA, které v tomto stavu vykazuje fluorescenci. Při posledním PCR cyklu je zvyšována teplota, čímž dochází k postupné disociaci dsDNA na ssDNA a tím je vyvázáno barvivo, jež samostatně vykazuje velmi nízkou fluorescenci [32].

2.7 GC-MS

Jde o techniku, která spojuje dvě metody, a to plynovou chromatografii (GC) a hmotnostní spektrometrii (MS). V dnešní době je již široce využívána, a to především pro kvantifikaci a identifikaci organických sloučenin v širokém spektru vzorků [33]. Je nepostradatelná v oblastech vědy o životním prostředí, forenzní vědy, lékařského a biologického výzkumu a také v oblasti technologie a bezpečnosti potravin [34].

2.7.1 Aplikace vzorku

Pro aplikaci vzorku na kolonu se využívá metoda SPME neboli mikroextrakce tuhou fází, jelikož většina analytických přístrojů není schopna zpracovat vzorek přímo. Zařízení je tvořeno z držáku, v němž je zabudováno vlákno, které připomíná injekční stříkačku. Princip metody spočívá ve využití vlákna z taveného oxidu křemičitého, které je z vnější strany potaženo tenkým filmem polymerních stacionárních fází. Tento film koncentruje organické analyty z matrice vzorku na svém povrchu [35].

Vzorek se dávkuje do vialky opatřené septem. Jehla SPME je pak schopna propíchnout přepážku, z ní se vysune vlákno, které absorbuje na svůj povrch analyty. V případě pevných vzorků je využíván HS-SPME headspace [35], kdy vlákno absorbuje látky v plynné fázi nad vzorkem do ustálení nebo po určité době [36]. Poté je vlákno vtaženo zpět do jehly a jehla je vložena do injekčního portu přístroje. K desorpci dochází při zahřátí vlákna a analyty se přenesou přímo do kolony k analýze [35].

2.7.2 Analýza vzorku

Princip plynové chromatografie, který se zde uplatňuje, spočívá v těkání vzorku ve vyhříváném vstupu nebo injektoru plynového chromatografu, přičemž uvolněné složky jsou následně separovány v připravené koloně. Klíčový je také fakt, že celý systém je vyhříván oddělenými pecemi pro injektory, kolonu, detektory a cestu k hmotnostnímu spektrometru. Rozhraní plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií se nachází v části přístroje, která začíná na výstupu z kolony chromatografu a pokračuje ke vstupu do iontového zdroje hmotnostního spektrometru [34].

V hmotnostním spektrometru je eluát vycházející z chromatografické kolony ionizován na kladné ionty molekul. Tyto ionty procházejí přes vakuovou oblast, kde jsou děleny na základě poměru hmotnosti a náboje m/z . Separace probíhá v různých typech analyzátorů. Nejběžnějším analyzátozem využívaným v GC-MS je kvadrupól [37], pod který spadají kvadrupólové analyzátory (kvadrupolární filtry) a iontové pasti. Méně častěji ve spojení s plynovou chromatografií nalezneme analyzátor doby letu (TOF). Po rozdělení v analyzátoru jsou částice zaznamenávány detektorem [38]. Během měření získávaná data zpracovává počítač, přičemž na výstupu získáme hmotnostní spektrum píků, které jsou na závěr porovnávány s knihovnou pro identifikaci sloučenin [34].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité přístroje, vybavení a chemikálie

3.1.1 Přístroje

- QuickGene-Mini80, FujiFilm
- Termoblok, Thermo-Shaker 100C, Biosan
- Centrifuga 5430 R, Eppendorf
- Vortex-Genie 2, Mo Bio
- Odstředivka, Hermle Z 100 M
- NanoDrop 2000, Thermo Fisher
- Lednice, Guzzanti
- Laboratorní váhy s přesností na dvě desetinná místa, Scout Pro
- Mikrovlnná trouba, Hyundai
- Zdroj pro elektroforézu, MP-500P, Major Science
- Transiluminátor, Serva
- RT-PCR cycler, LightCycler® Nano, Roche
- Plynový chromatograf TRACE 1310, Thermo Fisher Scientific
- Hmotnostní detektor ISQ LT Single Quadrupole, Thermo Fisher Scientific

3.1.2 Vybavení

- Kit pro izolaci DNA z živočišných tkání (DNA tissue kit S)
- Mikrozkušavky 1,5 ml; 100 µl
- Automatické pipety
- Nůž
- Erlenmeyerova baňka, odměrný válec
- Navažovací lžičky
- Elektroforetická komora, forma na gel, hřebínek
- Vialky se septem o objemu 10 ml
- Nádobí pro senzorické hodnocení vzorků

3.1.3 Chemikálie

- Ethanol 96 %, Honeywell
- Agaróza, Serva
- Tris-acetát EDTA pufr, VWR (50 x koncentrovaný; 242 g Tris, 18,6 g EDTA a 57,1 ml kyseliny octové na 1 litr v Erlenmeyerově baňce)
- Barvivo Midori Green Advance, Nippon genetics
- Velikostní standard pro elektroforézu 100 bp, Nippon genetics
- SYTO-9 qPCR 2x Master Mix, Top-Bio
- PCR Ultra H₂O, Top-Bio
- Plyny pro mobilní fázi
 - Dusík 5.0, SIAD
 - Vzduch syntetický 5.0 (kyslík 21 % + dusík 79 %), SIAD
 - Vodík 5.5, SIAD
 - Helium 4.8, SIAD

3.1.4 Primery

K RT-PCR byly převážně použity primery dostupné na fakultě. Současně ale byly vytvořeny i tři nové primery pomocí online programu Primer-Blast a databáze NCBI.

Tabulka 1: Seznam dostupných použitých primerů.

Mikroorganismus	Sekvence		Délka produktu
<i>Brevibacterium linens</i>	F	TAATGGCCTACCAAGCCGAC	277 bp
	R	GGACAACGCTCGTACCCTAC	
<i>Debaryomyces hansenii</i>	F	GTGCTGCGACTGTTTCGATTC	240 bp
	R	AATCGAACCCACACCTTCC	
<i>Lactococcus lactis</i>	F	TATCATCGCCTTGGTGAGCC	179 bp
	R	TGAGTAACGCGTGGGGAATC	
<i>Streptococcus thermophilus</i>	F	CTTGATGAGTTGCGAACGG	388 bp
	R	ACTTCCACTCTCACACCCG	
<i>Geotrichum candidum</i>	F	GCGTCTACCAATTCGCCAC	210 bp
	R	TCTAGTTCGTAGAACGCGCC	
<i>Arthrobacter arilaitensis</i>	F	ATTAGTGGCGAACGGGTGAG	432 bp
	R	TTGCGCCCTACGTATTACCG	
<i>Penicillium camemberti</i>	F	CGATGGCGATGGACAGTAAG	207 bp
	R	TACTTGTCACCGCTGGCCTA	
<i>Cladosporium herbarum</i>	F	ACGACCATTACGCCAGCATC	197 bp
	R	ATTGCAACCAGACTTGCTCG	
<i>Penicillium fuscoglaucum</i>	F	TGACAAAGCCCCATACGCTC	253 bp
	R	ATCTCTTGGTTCCGGCATCG	
<i>Penicillium caseifulvum</i>	F	GAGTAAGCATTGGCCTCGAC	z literatury
	R	CAAATCGAGGAATCACAAGTCT	
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	F	ACGCAAGTCTGATGGAGCAA	324 bp
	R	ACGCATTACACCGCTACACA	
<i>Penicillium roqueforti</i>	F	CGGCTGGGTAACGGATCTAC	120 bp
	R	GACCGCATTTAACGGCCAAG	

Tabulka 2: Seznam nově vytvořených primerů.

Mikroorganismus	Sekvence		Délka produktu
<i>Yarrowia lipolytica</i>	F	AGTGGCGTTGCTGATGATGA	420 bp
	R	CGTAAACCCAGACCACGTCA	
<i>Kluyveromyces lactis</i>	F	ATGGCAGCTCTGGGATTGAC	478 bp
	R	TGTGACGCAGCCTATACCAT	
<i>Trichosporon ovoides</i>	F	GGTTTTACAATCACAGAAGGGTCA	343 bp
	R	AAGCAACTCGCTCCTTTTGTT	

3.2 Analyzované vzorky

Předmětem zkoumání byly vzorky tří druhů sýrů s modrou plísní v těstě. Konkrétně se jednalo o anglický sýr Blue Stilton od firmy Long Clawson Dairy, francouzský sýr Roquefort od společnosti Vernières Frères a Jihočeskou Nivu vyrobenou v České republice firmou Madeta. Všechny sýry byly zakoupeny v prodejně Makro. Stanovení mikrobiálního složení a aromatických látek bylo provedeno v záruční době výrobků. Vzorky byly vybrány právě díky své mikrobiální podobnosti, na základě předchozího zkoumání.



Obrázek 2: Analyzované vzorky Blue Stilton, Roquefort Vernières a Jihočeská Niva (zleva) v původních obalech.



Obrázek 3: Analyzované vzorky Blue Stilton, Roquefort Vernières a Jihočeská Niva (zleva).

3.3 Stanovení mikrobiálního složení

3.3.1 Izolace DNA ze vzorků sýra

K izolaci DNA ze vzorků sýra byl použit kit pro izolaci DNA z živočišných tkání, Animal Tissue kit S.

Do 1,5 ml mikrozkušavky bylo odebráno přibližně 0,05 g vzorku sýra. Poté bylo přidáno 180 μ l MDT pufru a 20 μ l EDT a obsah zkumavky byl lyzován na termobloku při 55 °C a 250 rpm do úplného rozpuštění vzorku. Následně byly zkumavky s lyzátem stočeny v centrifuze 3 minuty při 10 000 rpm.

Pokud supernatant obsahoval tukovou fázi, byla vodná fáze odebrána do čisté mikrozkušavky a znovu stočena v centrifuze, dokud tuková fáze nevymizela. V opačném případě byl supernatant bez tukové fáze pouze přepipetován do čisté mikrozkušavky. K čistému supernatantu bylo přidáno 180 μ l LDT. Obsah byl 15 sekund míchán na vortexu a ihned krátce stočen na odstředivce. Zkumavky byly inkubovány na termobloku při 70 °C a 250 rpm 10 minut. Dále bylo přidáno 240 μ l 96 % ethanolu, zkumavka byla opět promíchána na vortexu a krátce stočena, čímž byl získán lyzát.

Poté byl lyzát přefiltrován přes kolonu s fritou, která byla umístěna na QuickGene. Tím došlo k zachycení DNA, která byla třikrát promyta 750 μ l WDT do zásobní nádoby. Na závěr byla fritka přemístěna nad čistou 1,5 ml mikrozkušavku. Po přidání 100 μ l elučního pufru CDT a následné inkubaci po 90 sekund byla izolovaná DNA uvolněna do zkumavky.

Koncentrace izolované DNA byla následně změřena na přístroji NanoDrop. Bylo tak možné zjistit nejen koncentraci, ale i čistotu DNA. Na senzor přístroje byla nanášena kapka zvortexovaného izolátu a přístroj vyhodnotil dané údaje. Poměr absorbcí 260/280 ukazuje čistotu nukleové kyseliny, která absorbuje typicky při 260 nm. Při 280 nm naopak absorbují kontaminující látky (typicky proteiny či fenoly). Hodnota 1,8–2,0 bývá uznávána pro DNA bez vyšší koncentrace kontaminujících látek. Dalším parametrem je poměr absorbcí 260/230, kdy při 230 nm absorbují organické látky jako sacharidy, EDTA nebo fenolické látky. Zde očekáváme hodnotu v rozmezí 2,0–2,2. Přítomností kontaminantů se toto číslo snižuje [39].

3.3.2 Elektroforéza izolované DNA

Na základě nízké koncentrace izolované DNA a také nejednoznačných výsledků při stanovení přítomnosti některých z mikroorganismů pomocí PCR byla provedena elektroforéza v agarózovém gelu. Metoda sloužila k ověření přítomnosti DNA v eluátu po izolaci nebo ve druhém případě k tomu, zda došlo k amplifikaci DNA a můžeme tedy výsledky z PCR prohlásit za pozitivní.

Nejprve byl připraven 1,0 % roztok agarózového gelu smísením vypočteného množství agarózy a TAE pufru. Směs byla následně zahřívána v mikrovlnné troubě, dokud nezačala vařit, poté byla promíchána a znovu zahřívána k varu stejným způsobem až do úplného rozpuštění veškeré agarózy. Obsah baňky byl ochlazen přibližně na teplotu 60 °C, bylo přidáno detekční barvivo a směs byla opatrně promíchána.

Vytvořený gel byl nalit do tvořítka, do něhož byl následně vložen hřebínek a po zatuhnutí byl gel přenesen do elektroforetické vany. Gel byl ponořen do TAE pufru a do jamek bylo nanášeno 12 µl směsi tvořené 3 µl loading bufferu a 9 µl vzorku DNA. Vzorky kvůli jejich nízké koncentraci nebyly ředěny (běžně ředěno na koncentraci 100 ng/µl). Kromě vzorků byl na gel nanášen také velikostní standard pro elektroforézu 100 bp od výrobce Nippon genetics. Elektroforetická vana byla připojena ke zdroji a byla zahájena samotná elektroforéza. Ta byla ukončena po uplynutí jedné hodiny. Gel byl následně vyjmut a zobrazen pod transiluminátorem.

3.3.3 Stanovení přítomnosti vybraných mikroorganismů

Do 100 µl zkumavek byla připravena směs na PCR o celkovém objemu 25 µl tvořená 12,5 µl Syto master mix obsahující barvivo SYBR®Green, 2 µl DNA izolovaného ze vzorku sýra, 1 µl forward a 1 µl reversed primeru a 8,5 µl vody pro PCR. Směsi ve zkumavkách byly krátce stočeny a vloženy do přístroje pro Real-Time PCR. Na propojeném počítači byly v programu nastaveny následující podmínky pro 35 cyklů:

Tabulka 3: Podmínky při PCR.

Fáze cyklu	Teplota (°C)	Doba trvání (s)
Denaturace	95	30
Nasedání primerů	58	30
Syntéza DNA	72	60

Současně byla také provedena HRM analýza. Po ukončení měření byly výsledky zpracovány. V případě nejednoznačných výsledků bylo měření doplněno o elektroforézu (viz. 3.3.2).

3.4 Stanovení těkavých aromatických látek

Aromatické látky ve vzorcích sýra byly stanoveny metodou GC-MS. Od každého vzorku byly provedeny dvě měření. Ze vzorku byly vždy odebrány 2 g z vnitřní i vnější části sýra do 10 ml vialek opatřených septem. Po navážení byly vzorky vloženy do přístroje. Na kolonu byly aplikovány pomocí autosampleru.

Podmínky měření:

- HS-SPME: DVB/CAR/PDMS vlákno, 2 g vzorku v 10 ml vialce, doba inkubace: 5 min, teplota inkubace: 40 °C, doba extrakce: 30 min, doba desorpce: 7 min, míchání
- Teplota inletu: 250 °C
- Průtok nosného plynu: 1 ml/min
- Teplotní program: 40 °C (1 min), 2 °C/min do 100 °C (3 min), 5 °C/min do 130 °C (5 min), 2 °C/min do 220 °C (2 min)
- MS detekce: teplota transfer line: 245 °C, iontový zdroj: elektronová ionizace při 70 eV, teplota iontového zdroje: 230 °C, skenovací rozsah 30–300 m/z

3.5 Senzorická analýza

K senzorické analýze byly připraveny všechny tři vzorky tak, že byly vyjmuty z původního obalu a nakrájeny na kousky. Poté byl kousek každého sýru umístěn na papírový tácek a opatřen anonymním třímístným kódem. Hodnocení probíhalo prostřednictvím online formuláře vytvořeného pomocí Google Forms (viz. Příloha 1, Příloha 2 a Příloha 3). Prováděli ho neškolení hodnotitelé z řad naší fakulty, kteří nebyli předem informováni o konkrétních sýrech, které se analýzy účastnily.

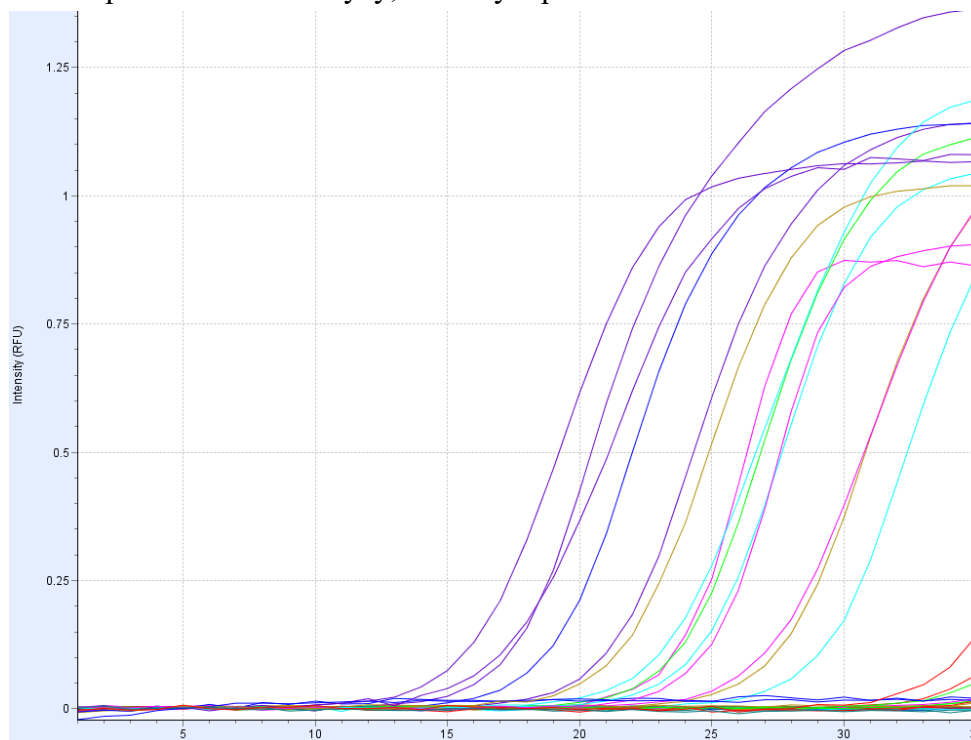
4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Stanovení mikrobiálního složení

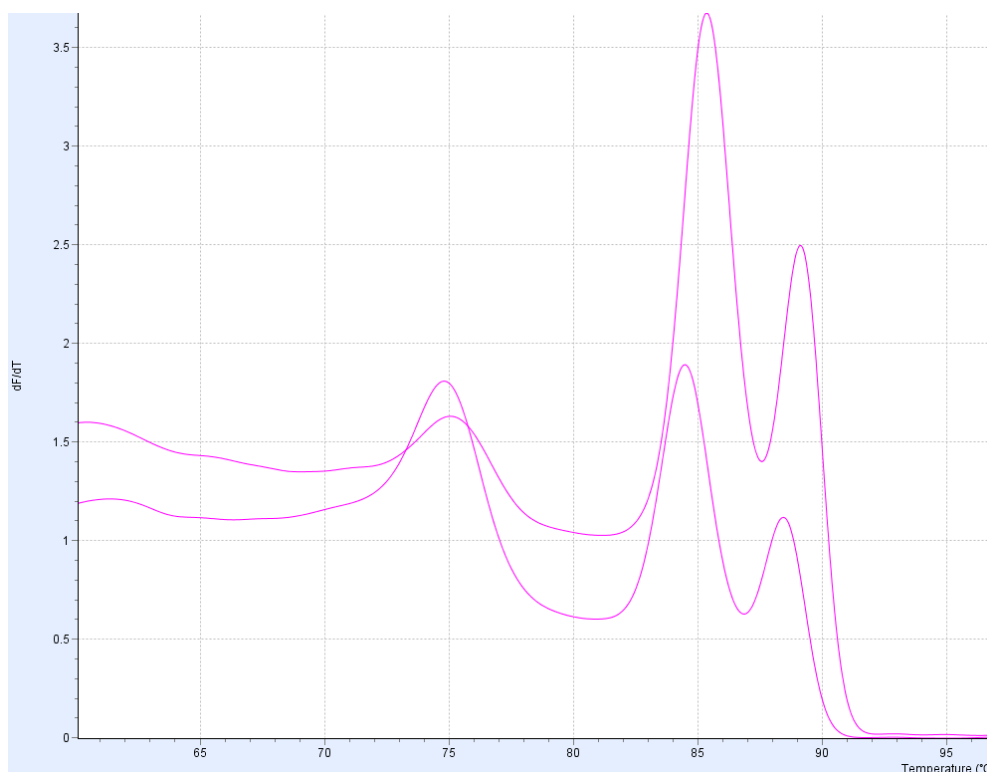
Cílem stanovení mikrobiálního složení bylo zjistit, zda sýr Blue Stilton obsahuje specifické mikroorganismy, které jsou pro něj typické a které by jej dokázaly specificky odlišit od jemu podobných sýrů. K analýze byly použity izoláty DNA získané z jednotlivých vzorků. Ty byly následně testovány na přítomnost 15 druhů mikroorganismů (viz. Tabulka 1 a Tabulka 2). Pro přesnější stanovení byly k analýze použity 2 DNA izoláty jednoho vzorku, a to z důvodu, že stanovované sýry, a především Blue Stilton mají poměrně rozmanitou mikroflóru na povrchu a uvnitř těsta [17]. Izoláty měly navíc poměrně nízkou koncentraci DNA, což bylo způsobeno vysokou tučností vzorků a DNA tudíž přecházela převážně do tukové fáze, zatímco jako izolát sloužila fáze vodná.

Pro samotnou RT-PCR analýzu byly převážně primery, které byly dostupné na fakultě. Vybrány byly zejména primery mikroorganismů, které jsou součástí kultur přidávaných do sýrů nebo se vyskytují v sýrech jako přirozená součást jejich mikroflóry. Cílem bylo ale také prokázat, zda se ve vzorcích vyskytují mikroorganismy *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis* a *Trichosporon ovoides*, které by na základě zdrojů měly být přítomny v Blue Stiltonu [17]. Jejich primery byly proto nově vytvořeny pomocí programu Primer-Blast a databáze NCBI a byly otestovány u všech vzorků stejně jako již dostupné primery.

Měření byla vyhodnocována v programu pro Light Cycler Nano ze záznamu nárůstu fluorescence v závislosti na počtu cyklů. Pokud došlo k dostatečnému nárůstu fluorescence, byl vzorek vyhodnocen jako pozitivní a byla mu připsána příslušná hodnota Ct. Ta potom vypovídá o množství DNA obsažené v původním vzorku. Pokud výsledky nebyly jednoznačné bylo rozhodnuto pomocí HRM analýzy, která byla prováděna současně s PCR.

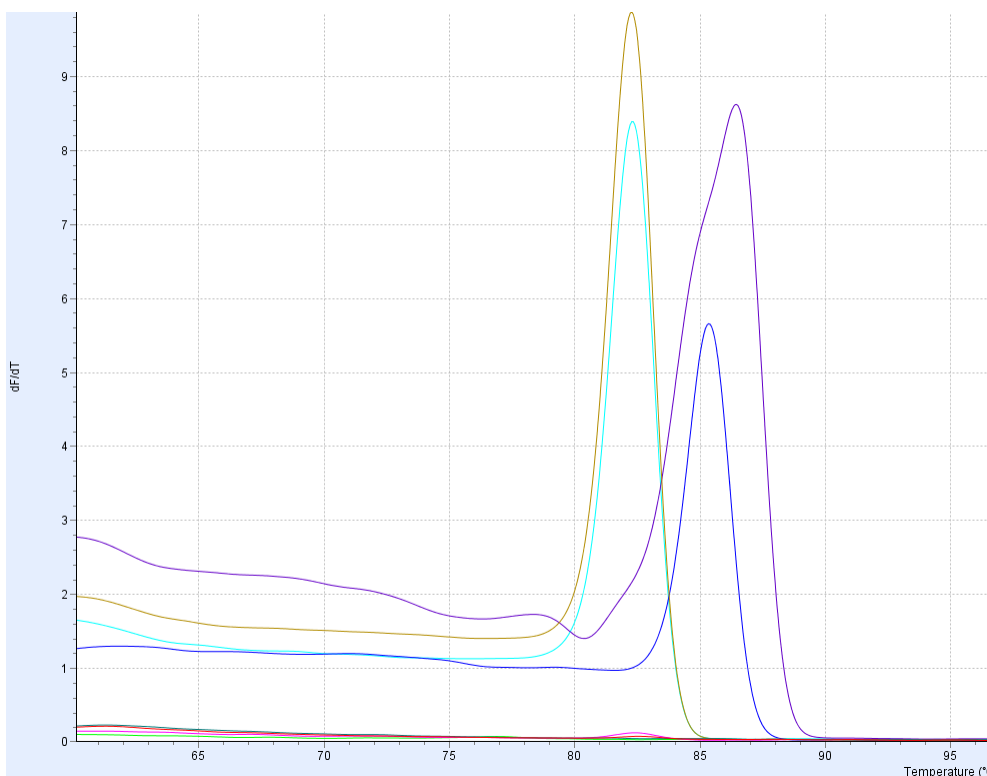


Obrázek 4: Souhrn výsledných křivek z PCR vyjadřující závislost intenzity fluorescenčního záření na počtu cyklů.



Obrázek 5: Příklad výsledných HRM křivek nárůstu fluorescence pro *Streptococcus thermophilus* u vzorků Blue Stilton a Roquefort, závislost integrované veličiny fluorescence na teplotě.

Obrázek 5 ukazuje pozitivní výsledky HRM analýzy při testování vzorků Blue Stilton a Roquefort na přítomnost druhu *Streptococcus thermophilus*. Podobný trend křivek naznačuje, že jde o totožný primer, více píků na křivce zase poukazuje na tvorbu nescifických produktů.



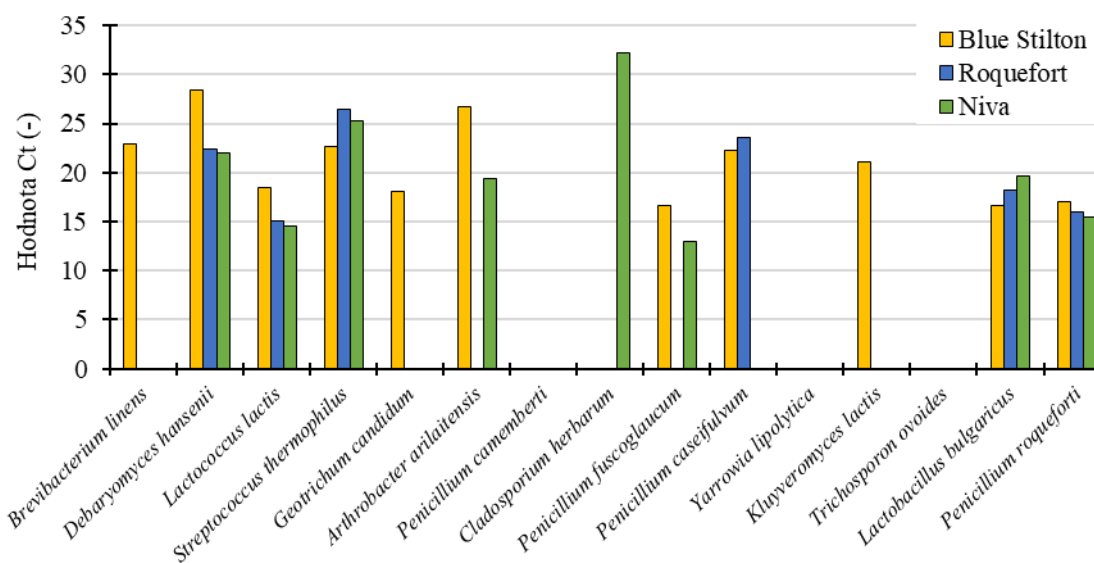
Obrázek 6: Výsledky HRM analýzy při stanovení přítomnosti primerů *P. roqueforti* a *L. bulgaricus* u vzorků Blue Stilton a Roquefort.

Obrázek 6 zobrazuje dva rozdílné primery, což lze poznat podle dvou trendů křivek piků, přičemž od každého primeru byly pozitivní dva vzorky. Z tohoto měření můžeme následně usoudit, že sýry Blue Stilton a Roquefort obsahují mikroorganismy *Penicillium roqueforti* a *Lactobacillus bulgaricus*.

Tabulka 4: souhrnné výsledky stanovení mikrobiálního složení.

Mikroorganismus		Blue Stilton		Roquefort		Niva	
č.	název	p/n	Ct	p/n	Ct	p/n	Ct
1	<i>Brevibacterium linens</i>	p	22,89	n	/	n	/
2	<i>Debaryomyces hansenii</i>	p	28,36	p	22,4	p	21,95
3	<i>Lactococcus lactis</i>	p	18,42	p	15,0	p	14,5
4	<i>Streptococcus thermophilus</i>	p	22,67	p	26,5	p	25,25
5	<i>Geotrichum candidum</i>	p	18,02	n	/	n	/
6	<i>Arthrobacter arilaitensis</i>	p	26,74	n	/	p	19,4
7	<i>Penicillium camemberti</i>	n	/	n	/	n	/
8	<i>Cladosporium herbarum</i>	n	/	n	/	p	32,22
9	<i>Penicillium fuscoglaucum</i>	p	16,57	n	/	p	12,96
10	<i>Penicillium caseifulvum</i>	p	22,31	p	23,6	n	/
11	<i>Yarrowia lipolytica</i>	n	/	n	/	n	/
12	<i>Kluyveromyces lactis</i>	p	21,09	n	/	n	/
13	<i>Trichosporon ovoides</i>	n	/	n	/	n	/
14	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	p	16,58	p	18,23	p	19,59
15	<i>Penicillium roqueforti</i>	p	17,02	p	15,93	p	15,39

Tabulka 4 zahrnuje výsledky všech konkrétních měření. To, zda je přítomnost mikroorganismu ve vzorku pozitivní nebo negativní (p/n) určuje přítomnost Ct hodnoty ve sloupci Ct. Tato hodnota byla vypočtena přímo přístrojem, v němž byla RT-PCR prováděna. V této tabulce lze porovnat všechny vzorky a jejich mikrobiální složení a najít specifické druhy mikroorganismů pro Blue Stilton. Ke stejnému účelu potom můžeme použít Obrázek 7.



Obrázek 7: Srovnání Ct hodnot a zastoupení mikrobiálních druhů ve všech vzorcích.

Jako první je patrné, že se ve vzorku Blue Stiltonu specificky vyskytoval druh bakterie *Brevibacterium linens*. Ta se typicky objevuje na povrchu zrajících sýrů (především u sýrů zrajících pod mazem), kde tvoří oranžový pigment. Je významná díky své proteolytické a lipolytické aktivitě a bude tudíž jedním z mikroorganismů podílejících se na aromatu Blue Stiltonu [40]. Jelikož má Blue Stilton na rozdíl od ostatních vzorků charakteristickou hnědou kůrku, pigment tvořený touto bakterií by mohl přispívat i k tomuto zbarvení.

Dalším specifickým druhem se ukázala být kvasinka *Geotrichum candidum*, která běžně roste na povrchu sýrů typu Camembert, kam se dostává ze syrového mléka nebo jako uměle přidávaná startovací kultura. Kromě proteolytické a lipolytické aktivity se také vyznačuje metabolickými drahami, jejichž produkty významně přispívají při tvorbě sensorických vlastností daného sýru. Pokud však narůstá v nadměrném množství, má to za následek povrchové vady. Je rovněž poměrně citlivá na přítomnost soli, tudíž lze očekávat, že se nebude vyskytovat na sýrech jako je Niva, která je poměrně slaná [41].

Posledním specifickým mikroorganismem je kvasinka *Kluyveromyces lactis*, pro kterou byl vytvořen jeden z nových primerů a která by měla být přítomna v Blue Stiltonu jako charakteristický druh. Vyznačuje se proteolytickou a lipolytickou aktivitou, vysokou odolností k NaCl a také inhibičním účinkem vůči nežádoucím mikroorganismům [42].

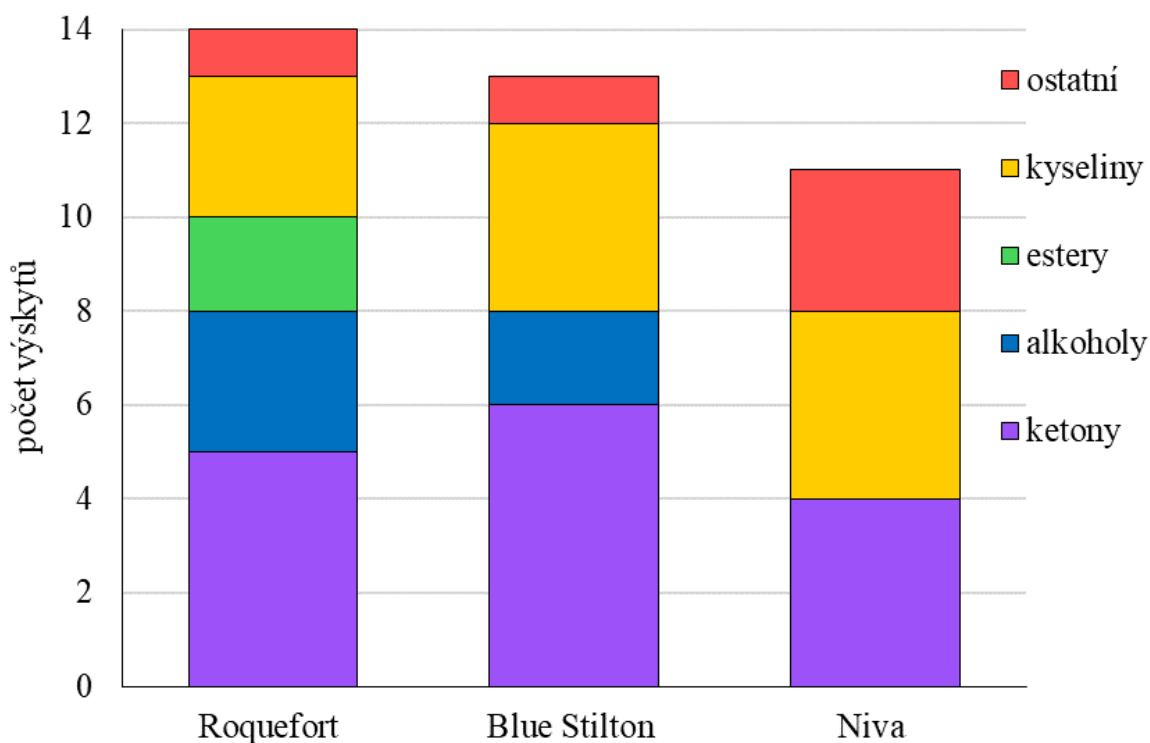
4.2 Stanovení těkavých aromatických látek

Těkavé aromatické látky byly stanoveny pomocí metody HS-SPME-GC-MS a identifikovány srovnáním naměřených hmotnostních spekter s dostupnou knihovnou spekter. V potaz byly brány převážně těkavé látky s faktorem shody (R Match) vyšším než 800. Vzorek každého sýru byl měřen dvakrát. Výsledky téhož vzorku byly následně porovnány a retenční faktory (RT) a integrované procentuální plochy píků (% plocha) byly zprůměrovány. Přehled identifikovaných sloučenin uvádí Tabulka 5.

Množství jednotlivých látek vyjadřuje procentuální zastoupení ploch píků na chromatogramu, získané integrací ploch těchto píků. Procentuální plocha je potom vztažena ke všem látkám, které byly při měření brány v potaz.

Tabulka 5: Těkavé aromatické látky identifikované ve vzorcích sýrů, majoritní složky jsou zvýrazněny.

Vzorek		Roquefort		Blue Stilton		Niva		Zdroj
Sloučenina	Skupina	RT	% plocha	RT	% plocha	RT	% plocha	
pentan-2-on	keton	5,93	1,58	5,93	4,57			[43]
heptan-2-on	keton	13,15	7,91	13,18	23,00	13,08	6,02	[44]
3-methylbutanol	alkohol	14,64	1,87					[44]
oktan-2-on	keton			17,52	1,48			[45]
heptan-2-ol	alkohol	19,42	0,91	19,42	0,95			[44]
2,6-dimethyl-pyrazin	ostatní			19,67	0,36			[46]
nonan-2-on	keton	22,13	27,15	22,16	42,38	21,99	54,66	[47]
dodekamethylpentasiloxan	ostatní					23,67	1,58	[48]
ethylester kyseliny oktanové	ester	23,94	0,72					[49]
1-methoxy-4-methylbenzen	ostatní	24,04	1,47			23,97	6,34	[50]
non-8-en-2-on	keton	24,36	1,43	24,37	10,62	24,29	3,28	[47]
isopentyl-hexanoát	ester	24,87	0,77					[47]
1-ethyl-4-methoxybenzen	ostatní					27,97	6,88	[51]
nonan-2-ol	alkohol	28,10	4,42					[47]
undekan-2-on	keton	32,42	2,00	32,41	4,57	32,31	8,97	[47]
2,6-dimethyl-1,7-Oktadien-3-ol	alkohol			36,54	0,57			[49]
kyselina butanová	kyselina	36,56	5,06	36,70	2,94	37,36	2,93	[52]
kyselina 3-methylbutanová	kyselina					39,72	2,29	[53]
kyselina hexanová	kyselina	45,70	22,01	45,92	4,86	46,28	2,56	[54]
kyselina n-dekanová	kyselina			48,89		49,81	4,49	[44]
kyselina oktanová	kyselina	51,18	22,69	51,40	3,68			[54]

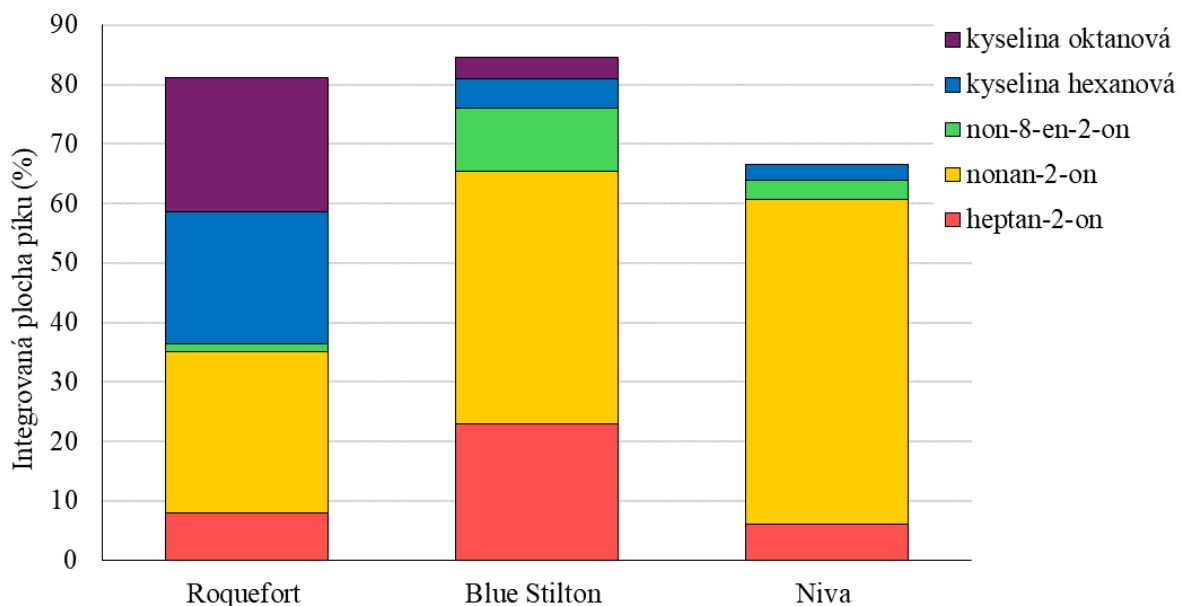


Obrázek 8: Srovnání počtu identifikovaných látek (osa y) ve vzorcích sýrů.

Z integrované plochy všech píků identifikovaných těkavých látek, která byla vypočítána přístrojem, byla pře počítána procentuální plocha pro jednotlivé stanovené látky, která sloužila k porovnání množství stejných aromatických látek v různých vzorcích sýra. Obrázek 8 na první pohled vyjadřuje rozdíly ve složení aromatických látek ve všech vzorcích. Vidíme, že sýr Roquefort obsahuje všechny skupiny identifikovaných látek, u Blue Stiltonu nebyly identifikovány estery a v Nivě, která má nejméně rozmanitý aromatický profil, schází estery i alkoholy. Tento graf ale sám o sobě neposkytne úplný náhled do charakteru aromatických profilů jednotlivých vzorků, proto je důležité se také zaměřit na konkrétní sloučeniny.

Původní záměr pro vyhodnocení tohoto stanovení byl najít ve vzorku Blue Stiltonu specifickou látku, která se nebude vyskytovat v ostatních vzorcích. Takové látky v Tabulce 5 sice nalezneme, ale z integrované procentuální plochy píků je patrné, že nebudou mít velký podíl na aromatickém profilu sýru, jelikož jejich hodnoty se pohybují v průměru pod 1,5 % z celkové procentuální plochy píků v daném vzorku. Proto se vyhodnocení zaměřuje na látky, které mají majoritní podíl na aromatickém profilu některého ze sýrů. Ty jsou v totožné tabulce barevně vyznačeny. Kritérium pro výběr bylo, aby procentuální plocha čítala alespoň u jednoho vzorku více než 10 %.

Obrázek 9 potom ukazuje zastoupení majoritních těkavých látek v jednotlivých sýrech. Vybrány byly kyselina hexanová a oktanová (neboli kapronová a kaprylová), které rozpoznáme v sýrech díky jejich žluklému a štiplavému aromatu, kterým se sýry s plísní vyznačují. Tyto látky měly největší podíl na aromatickém profilu sýru Roquefort, kde jejich procentuální plocha dosahuje hodnot nad 22 %. U Blue Stiltonu je množství těchto látek mnohem nižší a v případě Nivy se kyselina oktanová na aromatickém profilu vůbec nepodílí.



Obrázek 9: Porovnání vlivu klíčových sloučenin (dle integrované plochy píku) na aromatický profil ve všech vzorcích sýrů.

Dalšími aromatickými látkami použitými pro identifikaci vzorků byly sloučeniny s ovocnými tóny non-8-en-2-on, nonan-2-on a heptan-2-on. U prvního zmíněného ketonu si lze všimnout, že v Blue Stiltonu je jeho množství daleko významnější než v ostatních sýrech, ačkoli netvoří nejpodstatnější podíl jeho aromatického profilu. Nonan-2-on je ketonická sloučenina dodávající sýrům ovocnou až květinovou vůni. U vzorku Nivy se na aromatickém profilu podílí z více než 54 %, zatímco u ostatních vzorků je to zřetelně méně. Heptan-2-on má zase největší podíl na aromatickém profilu Blue Stiltonu. Ve zbytku vzorků je jeho podíl poměrně nízký.

Aromatické profily zbylých identifikovaných látek zobrazuje Tabulka 6.

Tabulka 6: Aromatické profily ostatních identifikovaných látek, majoritní složky jsou zvýrazněny.

Sloučenina	Druh sloučeniny	Aroma
pentan-2-on	keton	acetonové
heptan-2-on	keton	ovocné (banán)
3-methylbutanol	alkohol	banánové
oktan-2-on	keton	jablečné
heptan-2-ol	alkohol	dřevité
2,6-dimethyl-pyrazin	ostatní	karamelové
nonan-2-on	keton	ovocné (květinové)
dodekamethylpentasiloxan	ostatní	bez aromatu
ethylester kyseliny oktanové	ester	ovocné (květinové)
1-methoxy-4-methyl-benzen	ostatní	květinové
non-8-en-2-on	keton	ovocné
Isopentyl-hexanoát	ester	ovocné
1-ethyl-4-methoxy-benzen	ostatní	sladké
nonan-2-ol	alkohol	okurkové
undekan-2-on	keton	ovocné (květinové)
2,6-dimethyl-1,7-oktadien-3-ol	alkohol	květinové
kyselina butanová	kyselina	žluklé
kyselina 3-methylbutanová	kyselina	štiplavé
kyselina hexanová	kyselina	žluklé
kyselina n-dekanová	kyselina	hroznové
kyselina oktanová	kyselina	žluklé

Pokud se zaměříme na množství látek, která by nebyla vztažena k aromatickému profilu sýru, lze využít přímo integrované plochy píků (plocha) naměřené přístrojem. Ty byly zprůměrovány v rámci dvou měření stejného vzorku sýra. Na základě těchto hodnot zobrazených v Tabulce 7 můžeme porovnat rozdílná množství jednotlivých aromatických těkavých látek u různých vzorků.

V případě kyselin oktanové a hexanové lze pozorovat řádový rozdíl jejich množství mezi vzorky sýrů. Množství těchto látek se žluklým aromatem dosahují u Roquefortu řádu 10^{10} , u Blue Stiltonu 10^9 a v případě Nivy jen 10^8 nebo nejsou přítomny vůbec. Řádové rozdíly se vyskytují i v případě látky non-8-en-2-on, kdy největší množství je v Blue Stiltonu, o řád méně v Roquefortu a o dva řády méně v Nivě. Rozdíly v množstvích sloučenin heptan-2-onu a nonan-2-onu mezi vzorky sýrů jsou potom menší až na Nivu, kde je množství vždy alespoň o řád nižší než u ostatních vzorků.

Tabulka 7: Množství těkavých aromatických látek vztažených na integrovanou plochu piků, majoritní složky jsou zvýrazněny.

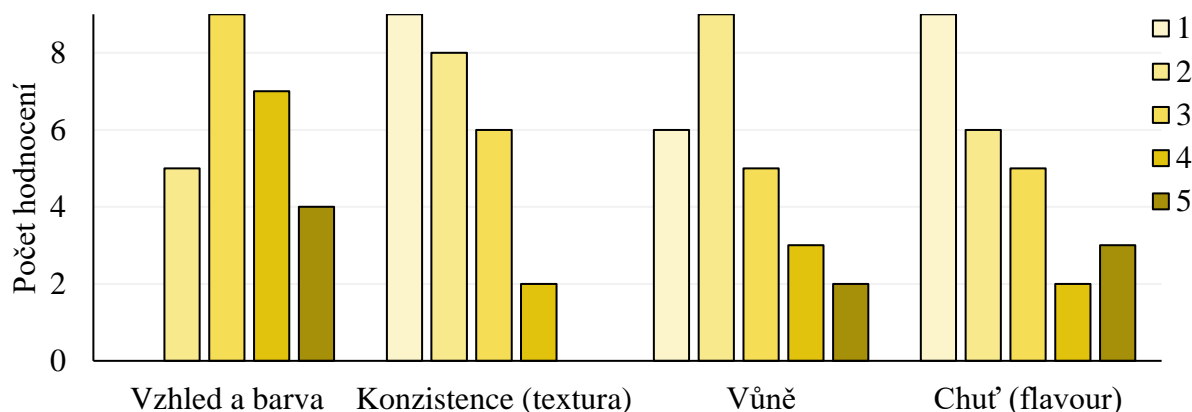
vzorek	Roquefort		Blue Stilton		Niva	
	RT	plocha	RT	plocha	RT	plocha
sloučenina						
pentan-2-on	5,93	$2,43 \cdot 10^9$	5,93	$7,17 \cdot 10^9$		
heptan-2-on	13,15	$1,22 \cdot 10^{10}$	13,18	$3,61 \cdot 10^{10}$	13,075	$2,43 \cdot 10^8$
3-methylbutanol	14,64	$2,88 \cdot 10^9$				
oktan-2-on			17,52	$2,32 \cdot 10^9$		
heptan-2-ol	19,42	$1,40 \cdot 10^9$	19,42	$1,51 \cdot 10^9$		
2,6-dimethyl-pyrazin			19,67	$5,71 \cdot 10^8$		
nonan-2-on	22,13	$4,18 \cdot 10^{10}$	22,16	$6,66 \cdot 10^{10}$	21,985	$2,22 \cdot 10^9$
dodekamethylpentasiloxan					23,67	$6,43 \cdot 10^7$
ethylester kyseliny oktanové	23,94	$1,11 \cdot 10^9$				
1-methoxy-4-methyl-benzen	24,04	$2,26 \cdot 10^9$			23,965	$2,58 \cdot 10^8$
non-8-en-2-on	24,36	$2,20 \cdot 10^9$	24,37	$1,67 \cdot 10^{10}$	24,285	$1,33 \cdot 10^8$
Isopentyl-hexanoát	24,87	$1,18 \cdot 10^9$				
1-ethyl-4-methoxy-benzen					27,965	$2,80 \cdot 10^8$
nonan-2-ol	28,10	$6,81 \cdot 10^9$				
undekan-2-on	32,42	$3,08 \cdot 10^9$	32,41	$7,18 \cdot 10^9$	32,305	$3,65 \cdot 10^8$
2,6-dimethyl-1,7-oktadien-3-ol			36,54	$9,02 \cdot 10^8$		
kyselina butanová	36,56	$7,80 \cdot 10^9$	36,70	$4,63 \cdot 10^9$	37,36	$1,19 \cdot 10^8$
kyselina 3-methylbutanová					39,715	$9,30 \cdot 10^7$
kyselina hexanová	45,70	$3,39 \cdot 10^{10}$	45,92	$7,65 \cdot 10^9$	46,275	$1,04 \cdot 10^8$
kyselina n-dekanová			48,89		49,805	$1,84 \cdot 10^8$
kyselina oktanová	51,18	$3,50 \cdot 10^{10}$	51,40	$5,80 \cdot 10^9$		

Z vyhodnocení výsledků pomocí procentuální integrované plochy (% plocha) a integrované plochy (plocha) piků lze získat úplnější pohled na obsah aromatických látek ve vzorcích. U obou vyhodnocení v případě kyselin oktanové a hexanové lze vyvodit podobné závěry a to, že jejich význam na aromatu sýra klesá v řadě Roquefort, Blue Stilton, Niva. Non-8-en-2-on byl zase nejvýznamnější u Blue Stiltonu, kdežto množství nonan-2-onu a heptan-2-onu dle integrované plochy nebyla tak rozdílná, jako při porovnání aromatických profilů sýrů pomocí procentuální integrované plochy piků.

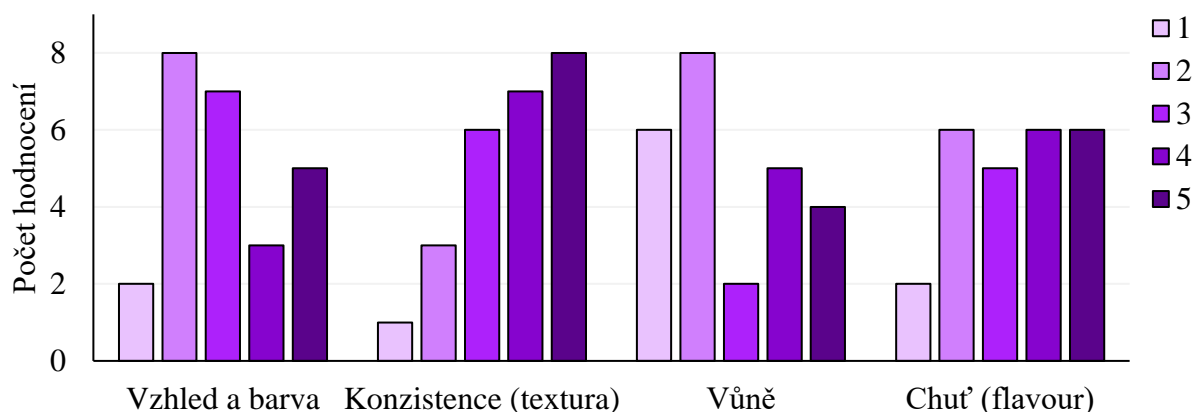
Z toho lze vyvodit, že tyto těkavé látky jsou pro některé ze sýrů významnější vzhledem k aromatickému profilu, protože se na něm může podílet méně látek o méně významných množstvích, a proto výsledná aromatická látka bude mít větší podíl, i když se její množství výrazně neliší od ostatních vzorků sýrů. To se týká zejména vzorku Nivy, kde množství těkavých aromatických látek byla nižší než v ostatních vzorcích, ale vzhledem k aromatickému profilu byla významnější, protože se na něm podílí podstatně méně látek než u zbytku vzorků. Ve výsledku si ale také můžeme všimnout, že integrovaná plocha téměř všech identifikovaných aromatických látek u vzorku Nivy je přibližně o řád nižší než u Blue Stiltonu a Roquefortu, což ukazuje na nižší aromaticčnost tohoto sýra. U zbylých dvou vzorků jsou množství řádově podobná, tudíž budou lépe srovnatelné jejich chuťové profily pomocí senzorké analýzy.

4.3 Senzorická analýza

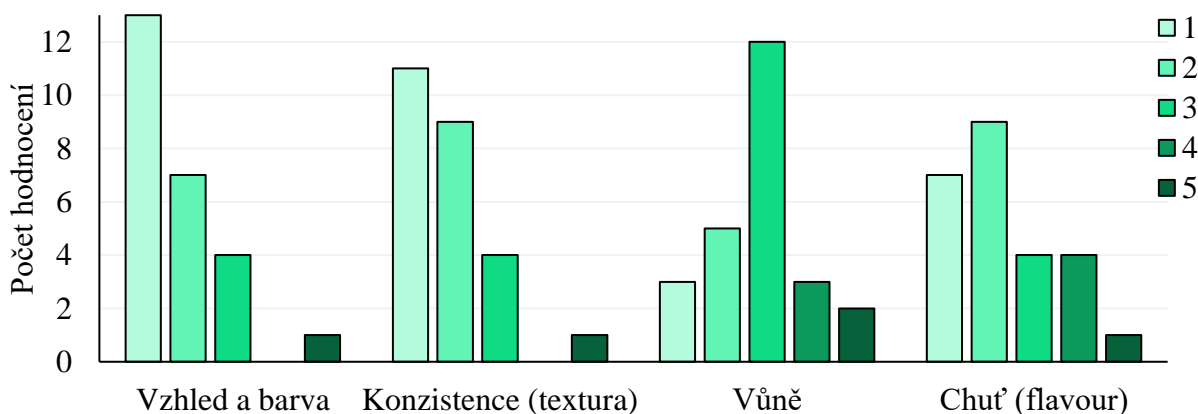
Senzorická analýza byla provedena k doplnění analýzy aromatických látek ve vzorcích sýrů. Hodnocení proběhlo v dotazníku vytvořeném v Google Forms, odkud byla následně převzata a vyhodnocena data od 25 hodnotitelů. Hodnoceny byly základní sensorické znaky jako vzhled a barva, konzistence (textura), vůně a chuť (flavour) pro každý ze vzorků sýrů. Vytvořený dotazník byl také obohacen o otázky, dotazující se na intenzitu vůní jednotlivých těkavých aromatických látek, které byly v GC-MS analýze považovány za látky, jež se majoritně podílí na aromatických profilech jednotlivých vzorků sýrů (viz. 4.2). Šlo konkrétně o vůni ovocnou, květinovou a žluklou.



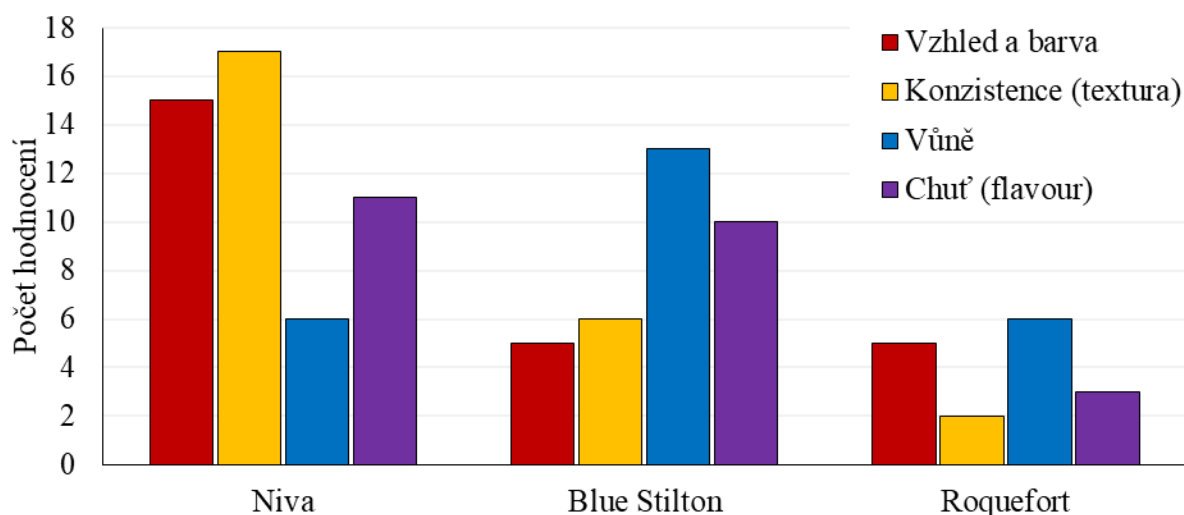
Obrázek 10: hodnocení vlastností vzorku Blue Stilton na bodové stupnici 1→5 (nejlepší→nejhorší).



Obrázek 11: Hodnocení vlastností vzorku Roquefort na bodové stupnici 1→5 (nejlepší→nejhorší).



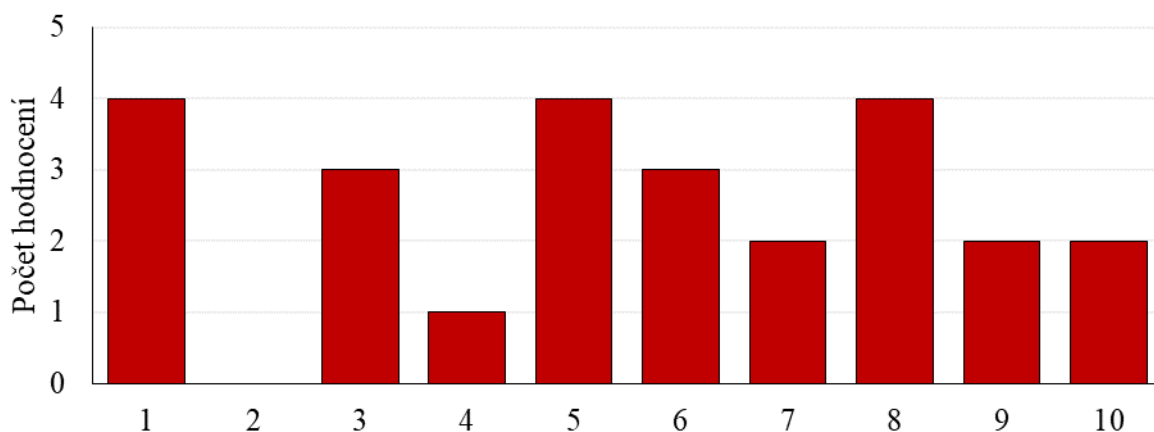
Obrázek 12: Hodnocení vlastností vzorku Niva na bodové stupnici 1→5 (nejlepší→nejhorší).



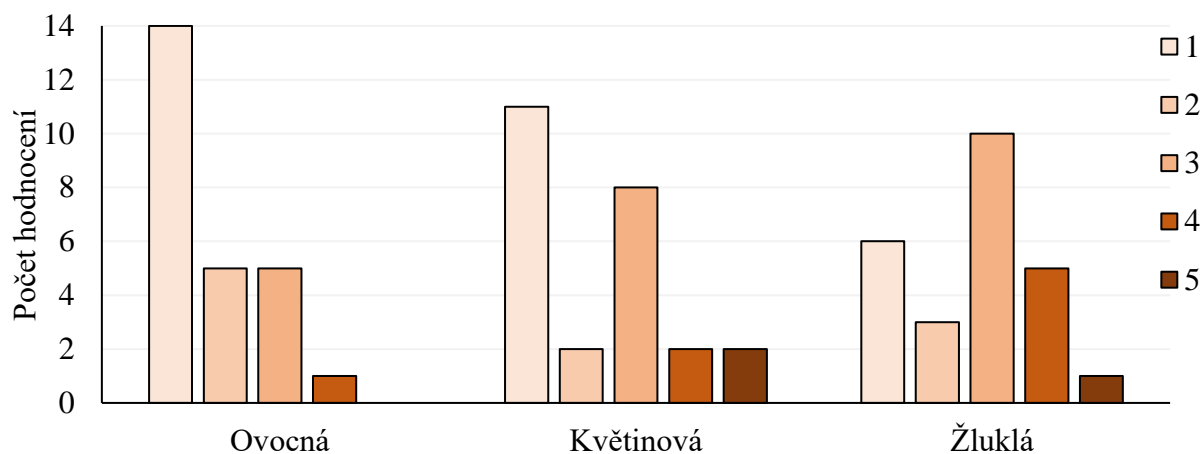
Obrázek 13: Hodnocení nejlepšího ze vzorků pro jednotlivé kategorie.

Pro získání nejlépe hodnoceného vzorku byly výsledky počtu hodnocení u každého ze sýrů v jednotlivých parametrech sečteny a násobeny bodovým ohodnocením pro daný stupeň. Tyto hodnoty pro jednotlivé stupně hodnocení u totožného vzorku sýra byly následně znovu sečteny a tím bylo získáno celkové skóre. Čím byla jeho hodnota nižší, tím lepší byl výsledek.

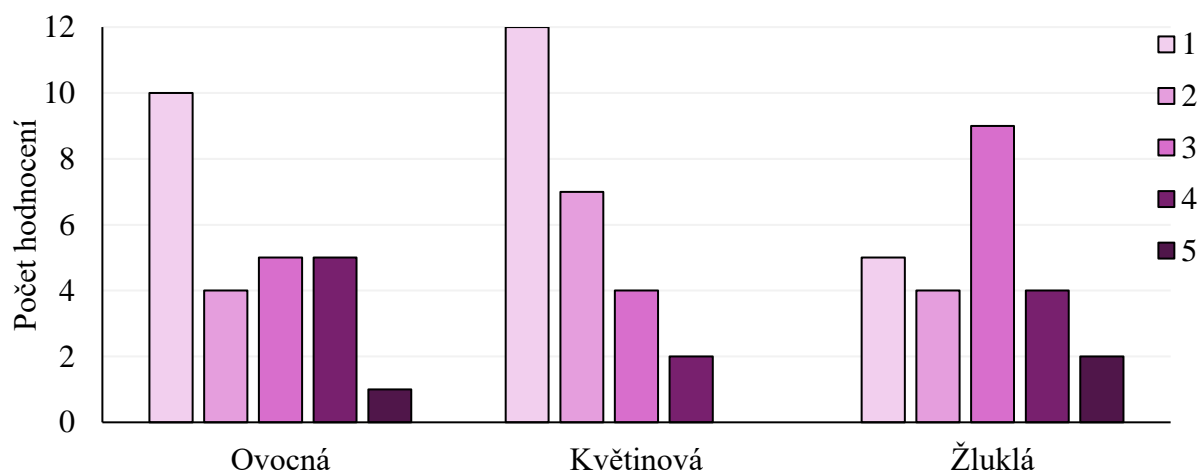
Celková suma vychází nejnižší u vzorku Jihočeské Nivy (219), který byl pro hodnotitele ve většině parametrů nejpříjemnější. Obrázek 13 může tento pohled doplnit o informaci, že v parametru vůně byl naopak nejpříjemnější Blue Stilton, který se zároveň v celkovém hodnocení umístil na druhém místě (256). Celková suma sýru Roquefort byla 320. Dle průměrného hodnocení v jednotlivých parametrech byla pro hodnotitele u tohoto vzorku nejméně přijatelná jeho krémová konzistence a intenzivní chuť, které byly nejčastěji bodovány podprůměrně.



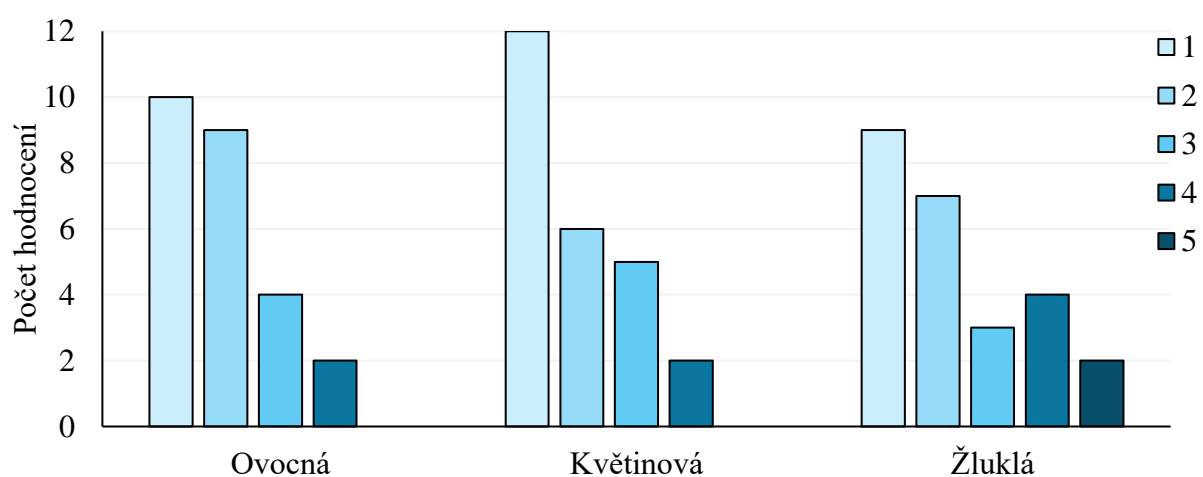
Obrázek 14: Hodnocení oblíbenosti sýrů s modrou plísní (průměrně 5,56) na stupnici od 1 do 10 (1 nejméně, 10 nejvíce).



Obrázek 15: Hodnocení intenzity vůní aromatických těkavých látek u vzorku Blue Stilton na bodové stupnici 1→5 (nejméně intenzivní→ nejvíce intenzivní).



Obrázek 16: Hodnocení intenzity vůní aromatických těkavých látek u vzorku Roquefort na bodové stupnici 1→5 (nejméně intenzivní→ nejvíce intenzivní).



Obrázek 17: Hodnocení intenzity vůní aromatických těkavých látek u vzorku Nivy na bodové stupnici 1→5 (nejméně intenzivní→ nejvíce intenzivní).

V další části sensorického hodnocení byly výsledky stanovení aromatických těkavých látek porovnávány s hodnocením intenzity těchto aromatických látek ve vzorcích hodnotiteli. Ovocná vůně je vázána k aromatickým látkám heptan-2-on, nonan-2-on a non-8-en-2-on a dle aromatického profilu vzorků by měla být nejintenzivnější v Blue Stiltonu, u něhož tyto látky mají majoritní zastoupení. Nejméně intenzivní by měla být naopak v Roquefortu. Z výsledků sensorického hodnocení nicméně vyplývá, že nejintenzivněji hodnotitelé vnímali ovocné aroma právě u Roquefortu, jelikož průměrná hodnota ze všech hodnocení vychází 2,3. U Nivy to bylo 1,9 a v případě Blue Stiltonu 1,7. Výsledky jsou tedy opačné, než bylo předpokládáno.

Druhou hodnocenou vůní byla květinová, která je doplňkovou pro látku nonan-2-on. Ta tvoří majoritní část aromatického profilu u Nivy. V nemalých množstvích se ale nachází ve všech vzorcích. Ze sensorického hodnocení vychází jako vzorek s největší intenzitou květinové vůně Blue Stilton s průměrným hodnocením 2,3. V rámci GC-MS analýzy také bylo zjištěno, že dle integrované plochy píku obsahuje nejvyšší množství nonan-2-onu (viz. Tabulka 7). Niva a Roquefort vyšly z hodnocení velmi podobně s průměrnými hodnoceními 1,9 a 1,8.

Posledním sledovaným aromatem bylo žluklé aroma, které je pro sýry s plísní charakteristické. Projevují se jím těkavé látky kyseliny hexanová a oktanová. Na základě analýzy aromatických těkavých látek by měla být žluklá chuť nejintenzivnější ve vzorku Roquefortu, což sensorická analýza také potvrdila. Průměrné hodnocení vychází 2,8. O řád nižší je množství těchto kyselin v Blue Stiltonu, nicméně v hodnocení vychází hodnota téměř stejná jako u Roquefortu, 2,7. O další řád menší množství se vyskytuje v Nivě, kde je průměrná hodnota sensorického hodnocení nejnižší, a to 2,3.

Tabulka 8: Průměrné hodnoty hodnocení intenzity aromatických látek u jednotlivých vzorků sýrů.

	Ovocná	Květinová	Žluklá
Blue Stilton	1,7	2,3	2,7
Roquefort	2,3	1,8	2,8
Niva	1,9	1,9	2,3

Z porovnání těchto dvou stanovení můžeme usoudit, že k přesnějším výsledkům by bylo třeba zkušených hodnotitelů, kteří by poskytli přesnější data o intenzitě aromatických látek ve vzorcích. Jelikož hodnocení bylo prováděno nezkušenými hodnotiteli, nelze očekávat reprezentativní výsledky, které by bylo možné srovnat s analytickými metodami. Nicméně první část sensorické analýzy přinesla data ohledně preferencí běžného spotřebitele v rámci sýrů s modrou plísní.

5 ZÁVĚR

Cílem první části práce bylo porovnat mikrobiální složení anglického sýru Blue Stilton se sýry Roquefort a Niva a pokusit se pro tento sýr najít specifické mikroorganismy, které by jej odlišovali od ostatních vzorků. Pro tento účel byly ze sýrů pomocí kitu získány DNA izoláty, jež byly následně podrobeny RT-PCR analýze. Testována byla přítomnost mikroorganismů, které jsou běžně součástí mikroflóry sýrů nebo jsou do nich přidávány při výrobě ve formě mlékařských kultur (viz. Tabulka 1 a Tabulka 2). Vyhodnocení následně proběhlo ze záznamu nárůstu fluorescence, čímž byly získány i Ct hodnoty vypovídající o množství DNA mikroorganismů v původních vzorcích.

Z analyzovaných mikroorganismů se ukázaly jako specifické pro Blue Stilton hned 3 druhy. Prvním z nich je *Brevibacterium linens*, bakterie typická pro sýry zrající pod mazem tvořící oranžový pigment. Je také charakteristická proteolytickou a lipolytickou aktivitou. Tou se vyznačuje také kvasinka *Geotrichum candidum*, jež běžně roste na povrchu sýrů s bílou plísní. Její netypické metabolické produkty potom ovlivňují aromatický charakter výrobku. Posledním specifickým mikroorganismem byla kvasinka *Kluyveromyces lactis*, která měla být dle zdrojů v Blue Stiltonu přítomná jako charakteristický druh, což se také potvrdilo.

Zdroje také často uváděly, že se v sýrech s modrou plísní vyskytuje druh kvasinky *Yarrowia lipolytica*, který byl ve výsledku označen jako negativní, což je s největší pravděpodobností způsobeno velmi malým množstvím původní DNA ve vzorcích, která s danou citlivostí nebyla detekována. Totéž by mělo platit i o kvasince *Trichosporon ovoides*. Tyto dva druhy spadaly rovněž mezi ty, které by měly být přítomny v Blue Stiltonu.

Pro francouzský sýr Roquefort nebyl žádný z 15 testovaných mikroorganismů specifický, pro český sýr Niva pouze druh *Cladosporium herbarum* s poměrně vysokou hodnotou Ct, což značí malé množství DNA v původním vzorku.

Druhou částí této práce bylo stanovení těkavých látek, které určují aromatické profily jednotlivých sýrů. Využita byla metoda GC-MS pomocí níž byly stanoveny aromatické látky ve všech třech zkoumaných vzorcích, a to v procentuální integrované ploše píků, která vypovídala o látkovém složení aromatického profilu, a v integrované ploše píků vypovídající o konkrétních množstvích daných látek ve vzorcích.

Bylo vybráno pět nejvýznamnějších látek, konkrétně kyselina oktanová a hexanová tvořící žluklé aroma, non-8-en-2-on, nonan-2-on a heptan-2-on, které zastupují ovocné a květinové vůně. Procentuální plocha a množství těchto látek byly následně porovnány mezi vzorky Blue Stiltonu, Roquefortu a Nivy. Z obou hledisek má nejvyšší obsah zmíněných kyselin sýr Roquefort, který by se tudíž měl vyznačovat intenzivním žluklým aromatem. Blue Stilton má aromatický profil tvořený převážně zmíněnými ketony a měl by tak vynikat ovocnou a potažmo i květinovou vůní. Jihočeská Niva má aromatický profil utvořený aromatickou látkou nonan-2-on. Nicméně množství prakticky všech identifikovaných aromatických látek v Nivě je přibližně o řád až dva nižší, než množství v ostatních vzorcích z čehož vyplývá, že Niva bude mnohem méně aromatická než Blue Stilton a Roquefort.

Poslední částí této práce byla senzorická analýza všech zkoumaných vzorků. V senzorickém dotazníku se vyskytovaly i otázky k prověření výsledků ze stanovení aromatických těkavých látek. Vzhledem k tomu, že hodnocení prováděli nezkušení hodnotitelé, výsledky neodpovídaly předpokladům z předchozího stanovení. Analýza nicméně odhalila preference českého spotřebitele. Co se týká oblíbenosti v rámci sýrů s modrou plísní, v kategorii vůně byl nejpreferovanější Blue Stilton. V kategoriích vzhledu, konzistence a chuti se ale hodnotitelé nejvíce přikláněli k Nivě.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] vyhláška č. 397/2016 Sb. o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje – znění od 01.01.2020
- [2] vyhláška č. 274/2019 Sb. vyhláška, kterou se mění vyhláška č. 397/2016 Sb., o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje – znění od 01.01.2020
- [3] DONNELLY, Catherine W. *Cheese and Microbes*. 1. Washington: American Society for Microbiology (ASM), 2014. ISBN 1555815863.
- [4] KADLEC, Pavel. *Technologie potravin II*. Praha: VŠCHT, 2002. ISBN 80-7080-510-2.
- [5] ČEPIČKA, Jaroslav. *Obecná potravinářská technologie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1995. ISBN 80-7080-239-1.
- [6] EUROPEAN UNION. *FOOD MATCH JAPAN CAMPAIGN EUROPA*. Online. FOOD MATCH JAPAN CAMPAIGN EUROPA. 1995. Dostupné z: <https://food-match-japan.campaign.europa.eu/en>. [cit. 2023-11-06].
- [7] KADLEC, Pavel, Karel MELZUCH a Michal VOLDŘICH, 2012. *Přehled tradičních potravinářských výrob: Technologie potravin*. Ostrava: Key Publishing, 569 s. ISBN 978-80-7418-145-0.
- [8] FOX, Patrick F., Timothy P., Timothy M. COGAN a Timothy P. GUINEE, 2004. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: chemistry, physics and microbiology*. 3rd ed. London ; Oxford ; San Diego: Elsevier Academic Press, 429 s. ISBN 9780122636516.
- [9] DRDÁK, M.; STUDNICKÝ, J.; MÓROVÁ, E. a KAROVIČOVÁ, J. *Základy potravinářských technologií: spracovanie rastlinných a živočišných surovín, cereálne a fermentačné technológie, uchovávanie, hygiena a ekológia potravín*. Bratislava: MALÉ CENTRUM, 1996. ISBN 80-967064-1-1.
- [10] GÖRNER, Fridrich a Lubomír VALÍK, 2004. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých zárodky sú prenášané požívatinami*. Bratislava: Malé centrum, 528 s. ISBN 80-967064-9-7.
- [11] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ, 2009. *Chemie potravin I*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 602 s. ISBN 978-80-86659-15-2.
- [12] *TasteAtlas: Travel Global, Eat Local*. Online. Sofia: AtlasMedia, 2023, 2024. Dostupné z: <https://www.tasteatlas.com>. [cit. 2023-06-15].
- [13] KOPÁČEK, Jiří. *Dobry tip pro fajnsmekry – sýry z Velké Británie a Irsko – Články – Laktos collection - sýrové etikety - cheese labels*. Online. Laktos Collection. Praha. Dostupné z: <http://laktoscollection.cz/view.php?navez=dobry-tip-pro-fajnsmekry-syry-z-velke-britanie-a-irsko&cislocclanku=2018050001>. [cit. 2023-06-15].
- [14] ATKINSON, P. A. Mold-ripened Cheeses: Stilton and Related Varieties. Online. *Agricultural and Food Sciences*. 2003. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00806-3>. [cit. 2024-02-07].
- [15] FOX, Patrick F.; GUINEE, Timothy P.; COGAN, Timothy M. a MCSWEENEY, Paul L. H. *Fundamentals of Cheese Science*. Second Edition. Second Edition. New York, NY: Springer, 2017. ISBN 978-1-4899-7681-9. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9>.

- [16] MUGAMPOZA, Dirriisa; GKATZIONIS, Konstantinos; LINFORTH, Robert S. T. a DODD, Christine E. R. Acid production, growth kinetics and aroma profiles of *Lactobacillus* flora from Stilton cheese. Online. *Elsevier*. 2019, roč. 2019, article 287, s. 222-231. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.082>. [cit. 2024-02-06].
- [17] GKATZIONIS, Konstantinos; YUNITA, Dewi; LINFORTH, Robert S.T.; DICKINSON, Matthew a DODD, Christine E.R. Diversity and activities of yeasts from different parts of a Stilton cheese. Online. *International Journal of Food Microbiology*. Roč. 2014, article 177. ISSN 0168-1605. Dostupné z: <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.016>. [cit. 2024-01-25].
- [18] CABALLERO, Benjamin; FINGLAS, Paul a TOLDRA, Fidel (ed.). *Encyclopedia of Food and Health*. Academic Press, 2015. ISBN 9780123849533.
- [19] THOM, Charles, 1914. *Studies relating to Roquefort and Camembert type of cheese* [online]. 79. Connecticut: Storrs Agricultural Experiment Station, 1914, 2022-04-24, 90 s. [cit. 2024-01-12]. OCLC: 19005366. Dostupné z: <https://babel.hathitrust.org/cgi/pt?id=uiug.30112019465282&seq=85>
- [20] DEVOYOD, J.J.; BRET, G. a AUCLAIR, J.E. La flore microbienne du fromage de Roquefort I. Son évolution au cours de la fabrication et de l'affinage du fromage. Online. *Lait*. Roč. 1968, č. 48, article 48, s. 613–629. Dostupné z: doi.org/10.1051/lait:1968479-48031. [cit. 2024-01-27].
- [21] BESANÇON, X.; SMET, C.; CHABALIER, C.; RIVEMALE, M.; REVERBEL, J.P. et al. Study of surface yeast flora of Roquefort cheese. Online. *International Journal of Food Microbiology*. 1992, roč. 1992, č. 1, article 17, s. 9-18. ISSN 0168-1605. Dostupné z: [https://doi.org/doi.org/10.1016/0168-1605\(92\)90014-T](https://doi.org/doi.org/10.1016/0168-1605(92)90014-T). [cit. 2024-01-27].
- [22] NIVA S.R.O., 2020. O mlékárně. *Niva dolní přím* [online]. [cit. 2024-02-15]. Dostupné z: <https://niva-dolniprim.cz/>
- [23] HADAŠOVÁ, Klára, 2016. Niva. HADAŠOVÁ, Klára. *Domáci mlékař* [online]. [cit. 2024-02-15]. Dostupné z: <https://www.domacimlekar.com/niva/>
- [24] MADETA A.S., 2019. Plísňové sýry. *Madeta* [online]. 2024 [cit. 2024-02-15]. Dostupné z: <https://www.madeta.cz/plisnove-syry>
- [25] *Mlékárna Otinoves: Tradiční výrobce sýru Niva* [online]. [cit. 2024-02-15]. Dostupné z: <https://www.mot.cz>
- [26] STANDAROVÁ, Eva, Ivana BORKOVCOVÁ, Marta DUŠKOVÁ a Lenka VORLOVÁ, 2009. Production of tyramine and histamine by bacteria isolated from Czech blue-veined cheese Niva. *Journal of food and nutrition research* [online]. BRATISLAVA 26: Vup Food Research Inst, Bratislava, **48**(4), 189-194 [cit. 2024-02-16]. ISSN 1336-8672. Dostupné z: <https://web-p-ebsohost-com>
- [27] MACKAY, Ian M., 2007. *Real-Time PCR in Microbiology: From Diagnosis to Characterization*. Norfolk, UK: Caister Academic Press, 454 s. ISBN 978-1-904455-18-9.
- [28] MUSTAFIC, Nedim. *Alkaline preparation of whole blood for direct real-time polymerase chain reaction (PCR)*. Online. ProQuest Dissertations Publishing: The University of Utah, 2020. ISBN 9798351434100. Dostupné také z: <https://www.proquest.com/dissertations-theses/alkaline-preparation-whole-blood-direct-real-time/docview/2718867409/se-2>.

- [29] NOORHAN, Khalid Shafeeq, 2021. Polymer Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. *Ibn Al-Haitham Journal for Pure and Applied Sciences* [online]. Iraq: University of Baghdad, **34**(4), 35-44 [cit. 2024-02-19]. ISSN 2521-3407. Dostupné z: doi:10.30526/34.4.2699
- [30] WITZKE, Monica C., Alexis GULLIC, Peggy YANG, Nathan J. BIVENS, Pamela R.F. ADKINS a Aaron C. ERICSSON, 2020. Influence of PCR cycle number on 16S rRNA gene amplicon sequencing of low biomass samples. *Journal of microbiological methods* [online]. Netherlands: Elsevier B.V, **176**, 106033-106033 [cit. 2024-02-19]. ISSN 0167-7012. Dostupné z: doi:10.1016/j.mimet.2020.106033
- [31] LOGAN, Julie; EDWARDS, Kirstin a SAUNDERS, Nick. *Real-time PCR: Current Technology and Applications*. Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2009. ISBN 978-1-904455-39-4.
- [32] DRUML, Barbara a Margit CICHNA-MARKL, 2014. High resolution melting (HRM) analysis of DNA – Its role and potential in food analysis. *Food chemistry* [online]. OXFORD: Elsevier, **158**, 245-254 [cit. 2024-02-20]. ISSN 0308-8146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2014.02.111
- [33] HITES, Ronald A., 2016. Development of Gas Chromatographic Mass Spectrometry. *Analytical chemistry (Washington)* [online]. WASHINGTON, **88**(14), 6955-6961 [cit. 2024-02-08]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.6b01628
- [34] SPAKMAN, O. David, Zeldá E. PENTON a Fulton G. KITSON, 2011. *Gas chromatography and mass spectrometry: A Practical Guide*. Second edition. Oxford: Elsevier. ISBN 978-0-12-373628-4. Dostupné z: doi:10.1016/C2009-0-17039-3
- [35] KATAOKA, Hiroyuki, Heather L LORD a Janusz PAWLISZYN, 2000. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A* [online]. Amsterdam: Elsevier B.V, **880**(1), 35-62 [cit. 2024-02-23]. ISSN 0021-9673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(00)00309-5
- [36] XU, Chang-hua, Guo-sheng CHEN, Zhen-hai XIONG, Yu-xia FAN, Xi-chang WANG a Yuan LIU, 2016. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *TrAC, Trends in analytical chemistry (Regular ed.)* [online]. OXFORD: Elsevier B.V, **80**, 12-29 [cit. 2024-02-23]. ISSN 0165-9936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2016.02.022
- [37] BARKER, James, 1999. *Mass spectrometry*. 2nd. Chichester: John Wiley, 509 s. Second Edition. ISBN 0-471-96762-9.
- [38] BOUCHONNET, Stephane, 2013. *Introduction to GC-MS Coupling* [online]. 1. United States: CRC Press, 228 s. [cit. 2024-02-08]. ISBN 9781466572522. Dostupné z: doi:10.1201/b13910
- [39] THERMO SCIENTIFIC. 260/280 and 260/230 Ratios. *Cgiar.org* [online]. [cit. 2024-02-29]. Dostupné z: https://hpc.ilri.cgiar.org/beca/training/IMBB_2015/lectures/NanoDrop.pdf
- [40] RATTRAY, Fergal P a Patrick F FOX, 1999. Aspects of Enzymology and Biochemical Properties of *Brevibacterium linens* Relevant to Cheese Ripening: A Review. *Journal of dairy science* [online]. SAVOY: Am Dairy Sci Assoc, **82**(5), 891-909 [cit. 2024-03-21]. ISSN 0022-0302. Dostupné z: doi:10.3168/jds.S0022-0302(99)75308-7

- [41] BOUTROU, R. a M. GUÉGUEN, 2005. Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. *International journal of food microbiology* [online]. AMSTERDAM: Elsevier B.V, **102**(1), 1-20 [cit. 2024-03-21]. ISSN 0168-1605. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.028
- [42] ANDRADE, Gabrielly Carvalho, Rafaela Pereira ANDRADE, Daelen Resende OLIVEIRA, Mônica F. QUINTANILHA, Flaviano S. MARTINS a Whasley Ferreira DUARTE, 2021. *Kluyveromyces lactis* and *Torulaspota delbrueckii*: Probiotic characterization, anti-Salmonella effect, and impact on cheese quality. *Food science & technology* [online]. Elsevier, **151**, 112240 [cit. 2024-03-22]. ISSN 0023-6438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2021.112240
- [43] COMETTO-MUÑIZ, J. Enrique a Michael H. ABRAHAM, 2009. Olfactory psychometric functions for homologous 2-ketones. *Behavioural brain research* [online]. AMSTERDAM: Elsevier B.V, **201**(1), 207-215 [cit. 2024-03-10]. ISSN 0166-4328. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbr.2009.02.014
- [44] KERTH, Chris R, Kade M HODGES, Kayley R WALL, Zena M HICKS, Dylan H TUCKER, Travis R WHITNEY, Wesley S RAMSEY a Dale WOERNER, 2019. 278 Replacing cottonseed meal and sorghum grain with corn dried distillers grains with solubles in lamb feedlot diets: volatile compounds from cooked lamb chops. *Journal of animal science* [online]. US: Oxford University Press (OUP), **97**(Supplement_3), 106-107 [cit. 2024-02-25]. ISSN 0021-8812. Dostupné z: doi:10.1093/jas/skz258.219
- [45] BUROVA, T.V, N.V GRINBERG, I.A GOLUBEVA, A.Ya MASHKEVICH, V.Ya GRINBERG a V.B TOLSTOGUZOV, 1999. Flavour release in model bovine serum albumin/pectin/2-octanone systems. *Food hydrocolloids* [online]. OXFORD: Elsevier, **13**(1), 7-14 [cit. 2024-02-26]. ISSN 0268-005X. Dostupné z: doi:10.1016/S0268-005X(98)00059-9
- [46] XIAO, Zuobing, Dan YU, Yunwei NIU, Feng CHEN, Shiqing SONG, Jiancai ZHU a Guangyong ZHU, 2014. Characterization of aroma compounds of Chinese famous liquors by gas chromatography–mass spectrometry and flash GC electronic-nose. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* [online]. AMSTERDAM: Elsevier B.V, **945-946**, 92-100 [cit. 2024-02-26]. ISSN 1570-0232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2013.11.032
- [47] JIAO, Jingkai, Zhiqiang ZHENG, Zhenmin LIU a Chunping YOU, 2021. Study of the Compositional, Microbiological, Biochemical, and Volatile Profile of Red-Veined Cheese, an Internal *Monascus*-Ripened Variety. *Frontiers in nutrition (Lausanne)* [online]. Switzerland: Frontiers Media, **8**(04), 649611-649611 [cit. 2024-02-18]. ISSN 2296-861X. Dostupné z: doi:10.3389/fnut.2021.649611
- [48] CHATNARIN, Suwannachom a Mongkol THIRABUNYANON, 2023. Potential bioactivities via anticancer, antioxidant, and immunomodulatory properties of cultured mycelial enriched β -D-glucan polysaccharides from a novel fungus *Ophiocordyceps sinensis* OS8. *Frontiers in immunology* [online]. Switzerland: Frontiers Media, **14**, 1150287-1150287 [cit. 2024-03-10]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2023.1150287

- [49] OKORO, E. K., F. J. AMAKU a I. A. OKORO, 2016. Gas Chromatography-Mass Spectrometry determination of bioactive components in *Annona muricata* seed (soursop seed) methanol extract. *Research journal of pharmacognosy and phytochemistry* [online]. Raipur: A&V Publications, **8**(4), 231 [cit. 2024-02-26]. ISSN 0975-2331. Dostupné z: doi:10.5958/0975-4385.2016.00034.0
- [50] FU, Jingjing, Youmei SUN, Mingxian CUI, et al., 2023. Analysis of Volatile Compounds and Flavor Fingerprint Using Gas Chromatography–Ion Mobility Spectrometry (GC-IMS) on *Crassostrea gigas* with Different Ploidy and Gender. *Molecules (Basel, Switzerland)* [online]. Switzerland: MDPI, **28**(11), 4475 [cit. 2024-02-26]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules28114475
- [51] SUBIN, Kunnath, P.A. JOSE, Beenu TOM, Bharath NAIR a Manju C.N., 2021. GC-MS Analysis of a Fragrant Epiphyllous Liverwort *Leptolejeunea balansae* from Western Ghats, India. *Research journal of pharmacognosy and phytochemistry* [online]. Raipur: A&V Publications, **13**(3), 115-118 [cit. 2024-03-10]. ISSN 0975-2331. Dostupné z: doi:10.52711/0975-4385.2021.00019
- [52] LAMICHHANE, Prabin, Anna PIETRZYK, Conor FEEHILY, Paul D. COTTER, David T. MANNION, Kieran N. KILCAWLEY, Alan L. KELLY a Jeremiah J. SHEEHAN, 2018. Effect of milk centrifugation and incorporation of high heat-treated centrifugate on the microbial composition and levels of volatile organic compounds of Maasdam cheese. *Journal of dairy science* [online]. NEW YORK: Elsevier, **101**(7), 5738-5750 [cit. 2024-02-26]. ISSN 0022-0302. Dostupné z: doi:10.3168/jds.2017-14180
- [53] CASTADA, Hardy Z., Clifford PARK, W. James HARPER a Sheryl Ann BARRINGER, 2016. Suppression of propanoic acid, acetic acid and 3-methylbutanoic acid production by other volatiles in a Swiss cheese curd slurry system. *International dairy journal* [online]. OXFORD: Elsevier, **54**, 29-32 [cit. 2024-03-10]. ISSN 0958-6946. Dostupné z: doi:10.1016/j.idairyj.2015.10.007
- [54] ZHAO, Huiyan, Luting REN, Ru SHEN, Shuntang GUO a Xingyun PENG, 2022. Identification of the influential odorants for the unpleasant rancid smell of ripe noni fruit (*Morinda citrifolia*). *International journal of food science & technology* [online]. Oxford: Wiley Subscription Services, **57**(4), 2277-2284 [cit. 2024-02-18]. ISSN 0950-5423. Dostupné z: doi:10.1111/ijfs.15578

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

RT – real time (v reálném čase)

PCR – polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)

HS – headspace

SPME – mikroextrakce tuhou fází

GC – plynová chromatografie

MS – hmotnostní spektrometrie

dsDNA – dvouřetězcová (double stranded) DNA

ssDNA – jednořetězcová (single stranded) DNA

HRM – vysokorozlišovací analýza křivek tání

TOF – analyzátor doby letu

F – forward primer (přímý)

R – reversed primer (zpětný)

bp – párů bází (base-pairs)

Ct – cycle of threshold

8 PŘÍLOHY

Příloha 1: První část sensorického dotazníku.

Příloha 2: Druhá část sensorického dotazníku.

Příloha 3: Třetí část sensorického dotazníku.

Jste kuřák? *

- Ano
 Ne

Věk *

Vaše odpověď

Jaké je vaše pohlaví *

- Žena
 Muž
 Nepřeji si uvádět

Jaká je vaše obliba sýrů s modrou plísní? *

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
minimální velká

Zhodnoťte vlastnosti vzorku S11 (jako ve škole) *

	1	2	3	4	5
Vzhled a barva	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Konzistence (textura)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Vůně	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Chuť (flavour)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Zvolte intenzitu chutí u vzorku S11 (1 =nejméně intenzivní; 5 =velmi intenzivní) *

	1	2	3	4	5
ovocná	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
květinová	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
žluklá	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Zhodnoťte vlastnosti vzorku R22 (jako ve škole) *

	1	2	3	4	5
Vzhled a barva	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Konzistence (textura)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Vůně	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Chuť (flavour)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Zvolte intenzitu chutí u vzorku R22 (1 =nejméně intenzivní; 5 =nejvíce intenzivní)

	1	2	3	4	5
ovocná	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
květinová	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
žluklá	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Zhodnoťte vlastnosti vzorku N33 (jako ve škole) *

	1	2	3	4	5
Vzhled a barva	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Konzistence (textura)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Vůně	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Chuť (flavour)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Zvolte intenzitu chutí u vzorku N33 (1 =nejméně intenzivní; 5 =nejvíce intenzivní) *

	1	2	3	4	5
ovocná	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
květinová	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
žluklá	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Vyhodnoťte nejlepší vzorek v jednotlivých kategoriích (zaškrtněte u každé kategorie jeden nejlepší vzorek)

	Vzhled a barva	Konzistence (textura)	Vůně	Chuť (flavour)
Vzorek S11	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Vzorek R22	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Vzorek N33	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>