



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

VLIV SKLADOVÁNÍ NA MIKROBIÁLNÍ SLOŽENÍ FRANCOUZSKÉHO SÝRU SAINT-NECTAIRE

INFLUENCE OF STORAGE ON THE MICROBIAL COMPOSITION OF FRENCH SAINT-NECTAIRE CHEESE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Lucie Šislerová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1728/2021 Akademický rok: 2021/22
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Lucie Šislerová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Vliv skladování na mikrobiální složení francouzského sýru Saint-nectaire

Zadání diplomové práce:

Literární rešerše k tématu zaměřená na francouzské sýry
Identifikace mikrobiálních kultur
Analytické stanovení obsahu (kvantitativní i kvalitativní) aromatických látek a mastných kyselin
Senzorické hodnocení

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2022:

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

Bc. Lucie Šislerová
studentka

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

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Předmětem mé práce je porovnání mikrobiálního složení mezi farmářským a mlékárenským typem sýru Saint-nectaire a vliv doby a teploty skladování na vývoj mikrobiálního složení, obsah mastných kyselin a aromatických látek.

Pomocí RT-PCR byly identifikovány vybrané mikroorganismy. U farmářského typu Saint-nectaire byly oproti mlékárenskému typu navíc identifikovány *Penicillium roqueforti* a *fuscoglaucum*. U obou typů sýru bylo detekováno nejvyšší množství vybraných mikroorganismů u sýru čerstvého. Při skladování při 20 °C se objevil nárůst oproti sýru čerstvému u těchto mikroorganismů: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Cladosporium herbarum* a *Penicillium commune* a *camemberti*, a dále byla zaznamenána přítomnost kontaminantů a patogenních organismů. Po týdnu skladování při 20 °C šlo o *Micrococcus luteus*, *Salmonella enterica* a *Staphylococcus aureus* a po dalších dvou týdnech skladování byla navíc identifikována *Listeria monocytogenes*.

Obsah mastných kyselin a těkavých látek byl porovnán u pěti vzorků: sýr čerstvý, sýr skladovaný v lednici po dobu jednoho týdne a tří týdnů a sýr skladovaný při 20 °C po dobu jednoho týdne a tří týdnů. Byl změřen obsah vázaných a volných mastných kyselin, obojí pomocí GC-FID. Obsah vázaných mastných kyselin byl srovnatelný u všech měřených vzorků. Nejvyšší obsah volných mastných kyselin byl u sýru po třech týdnech skladování při 20 °C. Nejvíce zastoupenou mastnou kyselinou je kyselina palmitová. Těkavé látky byly stanoveny pomocí metody HS-SPME-GC-MS. Nejvíce těkavých látek bylo identifikováno v sýru po třech týdnech při 20 °C a v sýru po týdnu v lednici. Nejvíce zastoupenými skupinami byly alkoholy, ketony a kyseliny.

ABSTRACT

The aim of my work is the comparison of microbial composition between farmtype and dairytype of Saint-nectaire cheese and the influence of storage time and temperature on the development of microbial composition, content of fatty acids and aromatic substances.

Selected microorganisms were identified by RT-PCR. In addition, *Penicillium roqueforti* and *fuscoglaucum* have been identified in the Saint-nectaire farm type compared to the dairy type. In both types of cheese, the highest amount of selected microorganisms was detected in fresh cheese. When stored at 20 °C, an increase over fresh cheese occurred in the following microorganisms: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Cladosporium herbarum* and *Penicillium commune* and *camemberti*, and the presence of contaminants and pathogens was noted. After one week of storage at 20 °C, they were *Micrococcus luteus*, *Salmonella enterica* and *Staphylococcus aureus*, and after another two weeks of storage, *Listeria monocytogenes* was identified.

The fatty acid and volatile compounds were compared for five samples: fresh cheese, cheese stored in the refrigerator for one week and three weeks and cheese stored at 20 °C for one week and three weeks. The content of bound and free fatty acids was measured, both by GC-FID. The content of bound fatty acids was comparable in all measured samples. The highest content of free fatty acids was in the cheese after three weeks of storage at 20 °C. The most common fatty acid is palmitic acid. Volatiles were determined by HS-SPME-GC-MS. The most volatiles were identified in the cheese after three weeks at 20 °C and in the cheese after one week in the refrigerator. The most represented groups were alcohols, ketones and acids.

KLÍČOVÁ SLOVA

Saint-nectaire, mikrobiální složení, RT-PCR, senzorická analýza, mastné kyseliny, GC-FID, těkavé látky, SPME-GC-MS

KEYWORDS

Saint-nectaire, microbial composition, RT-PCR, sensory analysis, fatty acids, GC-FID, volatile substances, SPME-GC-MS

ŠISLEROVÁ, Lucie. Vliv skladování na mikrobiální složení francouzského sýru Saint-nectaire. Brno, 2022. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/139028>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

V první řadě bych tímto ráda poděkovala vedoucímu mé práce doc. Mgr. Václavu Brázdovi, Ph.D. za odborné vedení, pozitivní přístup, a především za příležitosti a prostor k pokrokům. Můj velký dík patří i mé konzultantce doc. Ing. Evě Vítové, Ph.D., bez jejíhož vedení by byla má práce o velkou část chudší a měření výrazně chaotičtější.

Jako další bych ráda poděkovala „brzydoktorce“ Otilii Porubiákové za čas a péči, které mi věnovala a za veškeré know-how, které mi předala nejen k dokončení této práce.

A v neposlední řadě můj vděk patří Matějovi, Zuzce, Kristínce a Kristince (pořadí je náhodné), bez kterých bych si nedokázala svoji diplomku představit.

OBSAH

Úvod.....	8
1 Teoretická část	9
1.1 Charakterizace a rozdělení sýrů.....	9
1.2 Obecná technologie výroby sýra	9
1.2.1 Úprava mléka	9
1.2.2 Přídavek mlékárenských kultur.....	10
1.2.3 Sýření	10
1.2.4 Zpracování sraženiny	10
1.2.5 Formování a solení	10
1.2.6 Proces zrání	11
1.3 Saint-nectaire	12
1.3.1 Historie výroby.....	12
1.3.2 Charakterizace sýru a jeho výroby	12
1.3.3 Druhy Saint-nectaire	13
1.3.4 Mikrobiologické složení.....	13
1.4 Aromatické látky	13
1.4.1 Alkoholy.....	14
1.4.2 Estery.....	14
1.4.3 Furany.....	14
1.4.4 Aldehydy a ketony	15
1.4.5 Sírné sloučeniny	15
1.5 Mastné kyseliny.....	16
1.5.1 Rozdělení mastných kyselin.....	16
1.5.2 Esterifikace mastných kyselin.....	17
1.6 Plynová chromatografie.....	17
1.6.1 Instrumentace plynového chromatografu.....	18
1.6.2 Mikroextrakce tuhou fází	19
1.7 Hmotnostní spektrometrie	20
1.7.1 Spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií	20
1.8 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	20
1.8.1 Průběh PCR.....	20
1.8.2 Real-time PCR (RT-PCR).....	21
1.9 Gelová elektroforéza.....	22

2	Experimentální část.....	23
2.1	Seznam použitých přístrojů, vybavení a chemikálií.....	23
2.1.1	Přístroje	23
2.1.2	Vybavení	23
2.1.3	Chemikálie	24
2.1.4	PCR komponenty	24
2.1.5	Plyny.....	24
2.1.6	Použitá média a gely	25
2.1.7	Primery	26
2.2	Analyzované vzorky	27
2.3	Mikrobiální složení.....	29
2.3.1	Izolace DNA ze vzorků sýra	29
2.3.2	Ověření přítomnosti vybraných mikroorganismů pomocí RT-PCR	29
2.3.3	Příprava pozitivních kontrol pro PCR.....	30
2.4	Stanovení obsahu mastných kyselin.....	31
2.4.1	Extrakce tuků ze sýrů a gravimetrické stanovení procentuálního obsahu mastných kyselin.....	31
2.5	Esterifikace mastných kyselin	31
2.5.1	Izolace volných mastných kyselin.....	31
2.5.2	Izolace vázaných mastných kyselin	32
2.5.3	Podmínky měření methylesterů mastných kyselin pomocí GC-FID	32
2.5.4	Výpočty pro stanovení obsahu mastných kyselin ve vzorku	33
2.6	Stanovení aromatických látek pomocí GC-MS	34
2.7	Senzorická analýza	34
3	Výsledky a diskuze	35
3.1	Stanovení přítomnosti vybraných mikroorganismů pomocí RT-PCR	35
3.2	Obsah mastných kyselin	41
3.2.1	Volné mastné kyseliny	41
3.2.2	Vázané mastné kyseliny	45
3.3	Stanovení těkavých aromatických látek	49
3.4	Senzorická analýza	54
4	Závěr	56
5	Seznam použitých zdrojů.....	58
6	Přílohy.....	64

ÚVOD

Francouzské sýry patří k nevyhlášenějším a zároveň nevýraznějším sýrům na světě. Klíčem jejich úspěchu je důraz na kvalitní suroviny a tradiční výroba předávající se po staletí.

Jedním z těchto sýrů je i Saint-nectaire, jehož název v překladu znamená svatý nektar, vyrábějící se od 17. století ve francouzském regionu Auvergne. Pro jeho velkou oblibu se jeho výroba v polovině 20. století rozdělila na dvě části. První způsob výroby zůstává striktně tradiční, kdy se sýr vyrábí z nepasterizovaného mléka, díky čemuž je každý sýr originál. Druhý způsob je modernizovaná, velkoobjemová výroba z pasterizovaného mléka, díky které je výsledný produkt vždy více méně stejný. Hlavním rozdílem mezi těmito výrobami je počáteční úprava mléka, ze které se odvíjí především mikrobiální složení výsledných sýrů.

Důležitými parametry pro sýr jsou samozřejmě chuť a vůně. Největší vliv na tyto senzorycké vlastnosti mají mastné kyseliny a aromatické látky, které se mění se stárnutím sýra. Ve Francii není nezvyklé skladovat sýry i při pokojové teplotě, díky čemuž se plnohodnotně rozvine jeho chuť a vůně. Takové skladování ale může být nebezpečné z hlediska mikrobiální kontaminace patogenními organismy.

Najít tedy vhodné skladování pro nejlepší senzorycký zážitek bez otravy jídlem není nejjednodušší. Byly použity nástroje moderní analytické chemie a molekulární genetiky abychom porovnali data z přístrojů s hodnocením samotných konzumentů.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Charakterizace a rozdělení sýrů

Vyhláška č. 397/2016 Sb., zabývající se požadavky na mléko, mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje, definuje sýr jako mléčný výrobek vyrobený vysrážením mléčné bílkoviny z mléka působením syřidla nebo jiných vhodných koagulačních činidel. Tento vysrážený podíl syrovátky je oddělen a následně se nechá prokysat nebo zrát [1].

Sýry můžeme dělit dle několika různých kritérií.

Mezi základní rozdělení sýrů patří dělení podle výše zmíněného typu srážení mléka na:

- sladké,
- kyselé [2].

Dle druhu použitého mléka můžeme sýry dělit na kravské, ovčí, kozí nebo sýry získané ze syrovátky [2].

Podle způsobu zrání rozeznáváme sýry:

- nezrající včetně tvarohů:
 - čerstvé,
 - termizované,
- zrající:
 - od povrchu do vnitřní hmoty sýra (sýry s mazem),
 - převážně v celé hmotě,
- plísňové:
 - s plísní na povrchu a speciality s plísní na povrchu i uvnitř těsta,
 - s plísní uvnitř těsta [3].

Podle obsahu sušiny:

- tvrdé,
- měkké.

Hlavním rozdílem mezi těmito skupinami je procentuální obsah vody. Tvrdé sýry mohou obsahovat maximálně 45 % vody, naopak měkké sýry minimálně 45 % vody [2].

1.2 Obecná technologie výroby sýra

Při výrobě dochází k velkému množství fyzikálně-chemických a biochemických změn. Sýry vznikají oddělením syrovátky po koagulaci mléka. V sýru jsou soustředěny hlavní složky mléčné sušiny, hlavně kasein a mléčný tuk. Naopak v syrovátce se nachází většina vody, laktózy, bílkovin a solí [4, 5]. Technologické operace a další výrobní postupy jsou u většiny sýrů obdobné. Odlišnosti konečných výrobků se projevují už nepatrnou změnou v procesu. Výroba zrajících sýrů je časově i technologicky složitější než u sýrů nezrajících [6]. Hlavní kritéria z hlediska konečného složení jsou: obsah tuku, obsah vody, hodnota pH sýru, množství fosforečnanu vápenatého, který zůstane v sýru a množství syřidla zachovaného v sýřenině [7].

1.2.1 Úprava mléka

Prvním krokem je odstranění hrubých nečistot pomocí filtrace a centrifugace. K redukci mikroorganismů v mléce se využívá pasterace. Pro mléko využívané v sýrařském průmyslu se používá šetrná pasterace, aby nedocházelo k denaturaci bílkovin a tvorbě komplexu s kaseinem, takže κ -kasein je přístupný pro působení syřidla [6, 8]. Šetrná pasterace, se provádí

při cca 75 °C po dobu 15 až 30 s. Během tepelného ošetření se provádí i tzv. standardizace mléka, která upravuje obsah tuku tak, aby byl dosažen u hotových sýrů požadovaný obsah tuku v sušině [4, 5].

1.2.2 Přídavek mlékářenských kultur

Dalším důležitým krokem je očkování pasterovaného mléka čistými mlékařskými kulturami, které zajistí správný průběh sýření a zrání. Základní kulturou pro všechny druhy sladkých sýrů je smetanový zákys. Přídavek kyselých kultur je důležitý pro úpravu kyselosti mléka před sýřením, pro fermentaci laktózy a tvorbu kyseliny mléčné, nebo se uplatňuje při proteolytické a lipolytické aktivitě během zrání a má rovněž vliv na senzorycké vlastnosti (sýrového výrobku). Plísňové sýry využívají kromě smetanového zákysu plísňovou kulturu *Penicillium roqueforti* (sýry s plísní v těstě) nebo kulturu *Penicillium camemberti* (sýry s plísní na povrchu) [5, 9].

1.2.3 Sýření

Sýření neboli srážení kaseinu je fyzikálně-chemický proces, který představuje základní technologický krok při výrobě sýrů. Kasein se z mléka může koagulovat při srážení kyselým, kdy se hodnota pH sníží na hodnotu blízkou jeho izoelektrickému bodu (pH = 4,6). Dalším typem koagulace, která se používá pro většinu typů sýrů, je (sladké) srážení působením syřidla [4, 8,10].

Sladké srážení je založeno na štěpení specifické peptidové vazby. Podstatou primární (enzymatické) fáze je štěpení peptidové vazby tvořené aminokyselinami ve frakci κ -kaseinu pomocí enzymů za vzniku para- κ -kaseinu a glykomakropeptidu. Dochází k destabilizaci kaseinových micel, které jsou citlivé na přítomnost vápenatých iontů. Viskozita mléka klesá a vznikají nové micelární útvary spojené hydrofobními vazbami. V sekundární (koagulační) fázi dochází k seskupování parakaseinových micel a k tvorbě gelové struktury za přítomnosti Ca^{2+} iontů. Micely se nejdříve zařadí do řetězců a poté vytvoří trojrozměrnou gelovou síť. Následuje synerese neboli smršťování gelu do sebe za uvolňování syrovátky a utužení sraženiny. Poslední terciární fáze ovlivňuje zrání sýrů proteolytickým působením zbytků syřidla [3, 4].

Celková doba sýření se obvykle pohybuje kolem 30 minut. Na kvalitu sýřeniny má vliv teplota, koncentrace syřidlového enzymu a kyselost mléka [10]. Aktivní složkou klasického syřidla, které se získává extrakcí telecích žaludků, je enzym chymosin (rennin). V důsledku omezených zdrojů jsou místo něj používány další enzymové preparáty živočišného, rostlinného nebo mikrobiálního původu [5, 10].

1.2.4 Zpracování sraženiny

Prvním krokem zpracování je krájení gelu, který má potřebnou tuhost. Po rozdrobení vzniká sýrařské zrno. Čím jemnější zrno, tím tvrdší sýr se vyrobí, protože se uvolní více syrovátky. Provádí se pomocí soustavy plochých nebo strunných nožů uložených v rámu, tzv. sýrařských harf, otáčejících se v různých výškových rovinách po dobu asi 20 minut. Vzniklé sýrové zrno o velikostech 3–15 mm se následně opatrně míchá, aby nedošlo k roztržení částic na tzv. sýrařský prach, který by byl odváděn společně se syrovátkou, čímž by se snížila výtěžnost [3, 5].

1.2.5 Formování a solení

Sýry, které se dostávají k běžnému spotřebiteli, mají až na výjimky svůj typický tvar a velikost. Ty se získávají formováním do různých tvořítek. Jejich úkolem není pouze dodat sýrovým zrnům požadovaný tvar, ale také je oddělit od zbytku syrovátky. Měkké sýry se lisují vlastní

vahou, je nutné je otáčet. Polotvrdé a tvrdé sýry se lisují narůstajícím tlakem o 0,005–0,04 MPa po dobu 60 minut a déle. Zvyšování tlaku vede k uzavření povrchu sýru a zamezení odtékání syrovátky. Během lisování probíhá další prokysávání. Na rozdíl od volného uvolňování syrovátky, kdy na povrchu vzniká jemná, hladká, celistvá vrstvička, se působením tlaku vytváří pevná, tuhá kůrka [4, 5].

Existuje několik různých postupů solení sýra: solení do zrna, solení na sucho a solení v solné lázni. Nejčastěji se využívá solení v solné lázni o koncentraci 18–22% chloridu sodného při teplotě 10–15 °C přibližně hodinu po lisování. Doba solení je závislá na požadovaném obsahu soli, velikosti a tvaru sýra [3]. Solení sýrů je důležitý krok ovlivňující celou řadu vlastností. Významně zlepšuje chuť konečného výrobku, reguluje obsah vody, zpevňuje texturu, tvar a má vliv na aktivitu enzymů a kultur v poslední fázi výroby. Obsah soli v sýrech je v rozmezí 0,5–2 % [5].

1.2.6 Proces zrání

Všechny sýry s výjimkou těch, které se konzumují čerstvé, podléhají poslednímu procesu v sýrařské výrobní technologii, zrání. Během zrání sýru dochází k významným změnám ve struktuře i složení, které ve výsledku dávají sýru jeho specifické sensorické vlastnosti jako chuť, aroma, texturu a vzhled. Zráním dochází rovněž k mikrobiologickým změnám, především k rozvoji sekundární mikroflóry, zodpovědné zejména za vznik charakteristického aroma a chuti sýrů [4, 7].

Tvrdé sýry zrají současně v celé hmotě, jedná se o tzv. anaerobní zrání, kdy se bílkoviny rozkládají velmi pomalu pouze na aminokyseliny. Po určitém čase se enzymové a mikrobiologické změny zastaví, zatímco vypařování vody pokračuje. Tvrdé sýry mají proto vysokou trvanlivost. Původci tohoto zrání jsou především syřidla, mikrobiální proteolytické enzymy a plazmin [5, 11].

V sekundárním (aerobním) zrání se štěpí aerobními mikroorganismy rychle na amoniak, oxid uhličitý a vodu. Prochází pomalu od povrchu dovnitř a vytváří charakteristický maz [5].

Vznik charakteristických sensorických vlastností způsobuje přeměna tří základních složek mléka – laktózy, mléčného tuku (lipolýza) a bílkovin (proteolýza). Za všechny procesy jsou zodpovědné enzymy, mezi které řadíme proteolytické enzymy, lipázy štěpící triglyceridy a enzymy rozkládající aminokyseliny a mastné kyseliny včetně jejich derivátů [4].

Výrazné změny při zrání jsou především u konzistence sýrů. Ta je závislá na bobtnání parakaseinu, na které má vliv obsah kyseliny mléčné. Při optimálním množství kyseliny mléčné vytváří parakasein laktát. Ten je rozpustný v 5% roztoku chloridu sodného při pH 5,2. Sodné ionty v parakaseinu vytěsní vápenaté ionty, čímž se sýr zvláční a nabobtná. Pokud je však přebytek kyseliny mléčné, netvoří se laktát, ale nerozpustný bilaktát. Konzistence je tuhá, protože jsou vápenaté ionty vytěsněny kyselinou [5].

1.3 Saint-nectaire

1.3.1 Historie výroby

Tento sýr se po staletí vyrábí v regionu Auvergne ve Francii. První zmínka o sýru Saint-nectaire (v překladu svatý nektar) pochází z let 1650–1670, kdy byl považován za venkovský sýr, jelikož zrání probíhalo na slámě. Na konci 17. století se dostal až na stůl francouzského krále Ludvíka XIV, čímž si získal oblibu i ve vyšších vrstvách.

Do první poloviny 20. století byla výroba Saint-nectaire výhradně farmářská. V roce 1947 byl uznán Unií pro šlechtění a zušlechťování mléčných výrobků a roku 1955 získal sýr kontrolované označení původu AOP (v češtině CHOP). Od tohoto roku produkce prudce vzrostla a roku 1964 se produkce rozdělila na dva typy sýru: „fermier“ (farmářský) a „laitier“ (mlékárenský, vyráběný velkoobjemově).

V roce 2017 se prodalo 14 000 tun sýru Saint-nectaire, čímž se stal nejprodávanějším AOP farmářským sýrem v Evropě [12].

1.3.2 Charakterizace sýru a jeho výroby

Saint-nectaire je poloměkký, lisovaný sýr, s plísní na povrchu kůry, která je v procesu zrání pravidelně omývána [13]. Jeho chuť a textura závisí hlavně na biochemické aktivitě mikroorganismů, které se v sýru během procesu zrání vyvíjejí [14].

Striktně se vyrábí pouze z mléka krav chovaných v 69 obcích ležících v horské oblasti Puy-de-Dôme. Na těchto farmách je omezen počet krav na hektar, krávy musí být na pastvě minimálně 160 dní v roce a zimní krmivo musí obsahovat alespoň 50 % sena [12].

Startovacími kulturami jsou *Streptococcus thermophilus* a *Lactococcus lactis*, sýření probíhá hodinu pomocí sladkého sražení. Sraženina je poté nakrájena na zrna o velikosti odpovídající zrnu pšenice až kukuřice. V další fázi je zrno odděleno od syrovátky a umístěno do formy, kde je sýr nasolen hrubou solí z obou stran a zabalen do vlhké lněné látky. Dále je sýr po dobu 10 hodin lisován a následně přesunut ke skladování na maximálně jeden týden při teplotě 8–10 °C [15].

Ke zrání jsou sýry převezeny do sklepů. Tato fáze je nejdůležitější v celé výrobě, sýr zde získává své specifické sensorické vlastnosti. Hlavní jsou tři podmínky: teplota 8–12 °C, vlhkost vyšší než 90 % a pravidelné větrání. Sýry se v průběhu prvních tří týdnů dvakrát omývají v osolené vodě a týdně se obračejí a potírají. Minimální doba zrání pro klasický Saint-nectaire je 28 dní, pro menší La petit Saint-nectaire je to 21 dnů [12].

Těsně po formování a prvních dnech zrání má sýr světle žlutou barvu a je bez známek mikrobiálního růstu. Od čtvrtého dne lze pozorovat na povrchu bílou krustu a od šestého dne lze na povrchu pozorovat bílá vlákna plísní. Devátý den se barva začíná měnit na šedo/hnědou. Ke konci zrání (25.–30. den) lze na povrchu pozorovat oranžovo/růžová místa. Od šedesátého dne začíná kůra sýru tvrdnout, zatímco uvnitř se stává tekutější, a barva se mění na tmavší žlutou [13].

1.3.3 Druhy Saint-nectaire

Od roku 1964 rozlišujeme dva druhy: farmářský a mlékárenský.

1.3.3.1 *Saint-nectaire fermier*

Vyrábí se pouze na farmách, dvakrát denně, po ranním a večerním dojení. K výrobě se používá nepasterizované mléko, díky čemuž je každý sýr sensoricky i mikrobiálním složením originál, na druhou stranu ale může sýr obsahovat nevýznamné množství patogenů jako jsou *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* nebo *Escherichia coli*. Vědci však tvrdí, že velké množství mikroorganismů z mléka na povrchu chrání sýr před vstupem těchto patogenů. Farmářský Saint-nectaire má výrazně šedou kůru [16].

1.3.3.2 *Saint-nectaire laitier*

Je vyráběn z šetrně pasterizovaného mléka. Toto ošetření umožňuje standardizaci obsahu tuku, homogenitu vyrobených produktů po celý rok a vyšší bezpečnost z hlediska bakteriologických rizik. Aktuálně veškerá produkce mlékárenského typu Saint-nectaire pochází pouze ze čtyř mlékáren. Sýr vyrobený tímto způsobem má bílo/oranžovou až narůžovělou kůru [12].

1.3.4 Mikrobiologické složení

Hlavními a startovacími mlékárenskými kulturami jsou *Streptococcus thermophilus* a *Lactococcus lactis*. V průběhu zrání sýru se složení mikroorganismů velmi liší.

Na zrání sýru Saint-nectaire mají rozhodující vliv tyto kvasinky: *Torulopsis sphaerica*, *Torulopsis candida*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida sake*, *Candida intermedia*, *Yarrowia lipolytica* a *Debaryomyces hansenii*, která je nejzastoupenější kvasinkou v tomto sýru [17, 18, 19].

Šedá barva sýru je připisována kvasinkové houbě *Geotrichum candidum*, která současně svými enzymy podporuje lipolytické a proteolytické reakce. Dalšími plísněmi na povrchu mohou být *Cladosporium herbarum*, *Penicillium mucor* nebo *Penicillium camemberti* [17, 20].

První dva dny jsou dominantní hlavně bakterie mléčného kvašení *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* a *Streptococcus cremoris* a dále kvasinky druhů *Debaryomyces* a *Torulopsis*. Čtvrtý den se začínají objevovat *Geotrichum candidum* a *Penicillium mucor*. Od dvacátého dne se začínají hojně vyskytovat *Brevibacterium linens* a *Arthrobacter arilaitensis* [13].

1.4 Aromatické látky

Aromatické látky jsou těkavé sensoricky aktivní složky, které ovlivňují vůni a chuť potravin. Tyto parametry jsou nejdůležitějšími při výběru spotřebitelem.

Chuť a vůni tvoří směs různých skupin organických těkavých látek, které jsou přirozenou součástí potravin nebo vznikají během zpracování enzymovými nebo chemickými reakcemi. Termín aromatické látky zahrnuje veškeré vonné a chuťové látky, jež působí na čichové a chuťové receptory, látky, které vytváří dojem vůně a chuti, tzv. flavour [21, 22].

Tyto vonné a chuťové látky řadíme do různých chemických skupin, jako jsou např. aldehydy a ketony, karboxylové kyseliny a jejich deriváty atd. Jen výjimečně se u potravin setkáme s tím, že by jejich výslednou chuť, barvu a vůni určovala přítomnost jen jediné substance či několika málo látek. Většinou se jedná o složitou směs více sloučenin [10].

Aromatické látky v sýrech vznikají během zrání, zejména základními metabolickými procesy: proteolýzou, lipolýzou a metabolismem laktózy, laktátu a citrátu. Unikátní chuť různých typů sýru je výsledkem rovnováhy mezi těkavými a netěkavými chemickými sloučeninami a každý výrobek má jedinečné složení těkavých sloučenin [23].

Dosud bylo identifikováno více než 600 těkavých látek zjištěných v sýru. Ovšem jen malá část z těchto látek je opravdu odpovědná za chuť či aroma sýru [24].

1.4.1 Alkoholy

Jako aromatické látky se hlavně uplatňují volné primární alkoholy a jejich estery. S biosyntézou alkoholů jsou spojeny různé metabolické dráhy jako metabolismus laktózy a aminokyselin, methyl-keťonová redukce a degradace mastných kyselin hlavně linolové a linolenové [23, 25].

Nejčastější alkohol, který je označen jako klíčový odorant ve většině sýrů, je 1-okten-3-ol. Tento alkohol je hlavní aroma aktivní sloučeninou měkkých sýrů, jako je Camembert, přírodní a krémová Gorgonzola a Mozzarella, ale je také klíčovým odorantem tvrdého sýru [24].

Mezi alkoholy s rozvětveným řetězcem v sýrech (např. Mozzarella) patří 3-methylbutan-1-ol, který způsobuje příjemnou vůni čerstvých sýrů. K sekundárním alkoholům, které vznikají enzymatickou redukcí methylketonů, se řadí heptan-2-ol, který má krémovou příchut' [23, 24].

1.4.2 Estery

Estery patří k nejrozšířenějším sloučeninám v potravinách. Vznikají esterifikací, tj. reakcí mastných kyselin s primárními nebo sekundárními alkoholy. Většina esterů nalezených v sýru má sladké a květinové aroma. Hrají důležitou roli při formování ovocného charakteru sýru. Zvýšená koncentrace ethanolu způsobuje broskvo/meruňkové, karamelové, hruškové nebo paprikové aroma a snížené vnímání mýdlového aroma nebo chuti po vařeném zelí [24, 26].

Významným typem esterů, vyskytujícím se v potravinách jako vonné látky, jsou laktony. Jedná se o cyklické sloučeniny vznikající esterifikací hydroxykarboxylových kyselin. Podle počtu atomů uhlíků mezi uhlíkem s navázanou hydroxylovou skupinou a karboxylovou funkční skupinou jsou děleny na β -laktony, γ -laktony a δ -laktony. γ -laktony a δ -laktony, vznikající dehydratací příslušných hydroxykyselin se často vyskytují jako vonné látky v potravinách. Laktony přispívají k máslovému charakteru sýru. Také jsou obvykle spojeny s výraznými vůněmi broskve, meruňky nebo s kokosovými vůněmi. Jedním z nejčastějších a důležitých laktonů přítomných v sýru je δ -dekalakton. Tato látka je klíčový odorant pro Hermelín a sýr ementálského typu [8, 27, 28].

1.4.3 Furany

Furany jsou známé jako výrazné aromatické sloučeniny, které vznikají v průběhu zpracování jako produkty Maillardových reakcí. Díky své příjemné chuti a vůni jsou vyráběny synteticky v průmyslovém měřítku a jsou široce používány jako aromatické látky pro potraviny a nápoje. Nejvýznamnější sloučeninou je 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furan (furaneol), který se pravděpodobně tvoří v průběhu vaření a dává sýrům oříškové aroma. Další významný furan je 5-ethyl-4-hydroxy-2-methyl-3(2H)-furan (homofuraneol), který přispívá ke karamelové a sladké vůni [24, 29].

1.4.4 Aldehydy a ketony

Těkavé aldehydy a ketony patří k nejdůležitějším vonným a chuťovým látkám. V potravinách se vyskytují buď jako primární nebo sekundární látky enzymových a chemických reakcí. Mohou být jak žádoucí, tak i nežádoucí nositelé vůně a chutě potravin. A tak často slouží jako indikátory nežádoucích senzoričkových změn či změn výživové hodnoty potravin [10].

Ketony mají charakteristickou ovocnou, květinovou nebo houbovou plesnivou vůni, proto hrají významnou roli jako žádoucí i nežádoucí aromatické složky potravin. Ketony jsou hlavní složkou mléčných produktů [24].

Mezi ketony nacházející se v sýrech (např. Gouda nebo Camembert) patří nonan-2-on, oktan-3-on, dekan-2-on a undekan-2-on, které mají charakteristické ovocné, květinové ale i plísňové aroma. Důležitým ketonem je okt-1-en-3-on, který má charakteristické houbové aroma a pochází z drah kyseliny linolové a linolenové [24, 27, 30].

Jedním z nejdůležitějších diketonů je 2,3-butandion (diacetyl). Produkce 2,3-butandionu je především v důsledku činnosti bakterií mléčného kvašení, především *Lactococcus lactis*. Tato těkavá látka je oceňována pro svou máslovou a ořechovou vůni a byla identifikována jako klíčový prvek aroma Hermelínu, Ementálu a čedaru, stejně jako 1-okten-3-on [24].

Aldehydy vznikají z aminokyselin buď transaminací, což vede k přechodným imidům, které mohou být dekarboxylovány, nebo Streckerovou degradací. Aldehydy jsou považovány za přechodné a nestabilní látky sýrů, protože se silně štěpí na primární alkoholy nebo dokonce oxidují na odpovídající kyseliny. Tyto sloučeniny propůjčují sýrům charakteristické květinové aroma. Téměř všechny nasycené alifatické aldehydy mají význam jako aromaticky aktivní látky [24, 26].

Mezi aromatické aldehydy vyskytující se v sýrech řadíme fenylethanal, který vzniká degradací fenyllalaninu. Lineární aldehydy, jako jsou n-butanal, n-pentanal, n-hexanal a n-nonanal jsou poměrně běžné v sýrech. Lineární aldehydy jsou velmi nepříjemné, když jejich koncentrace překročí určitou hranici. Jsou charakterizovány jako aroma zelené trávy a bylin. Hexanal je jeden z nejhodnějších aldehydů a dává aroma pažitkové nebo po nezralém ovoci. Nonanal můžeme popsat také jako aroma po růžích. 2-nonenal dává stejně jako hexanal pažitkovou chuť [23, 24, 26].

1.4.5 Sírné sloučeniny

Těkavé sirné sloučeniny mají důležitý vliv na chuť sýrů. Sírné sloučeniny vznikají nejčastěji degradací methioninu a jsou výsledkem štěpení vazeb mezi uhlíkem a sírou. Tyto sloučeniny jsou známé silným česnekovým aroma. Jejich vůně je také označována jako kvěťáková, typická chuť po zelí a brokolici.

Nejčastější složkou sýru je methional (3-methylthiopropenal). Vyznačuje se také štiplavým, dráždivým aroma a hraje důležitou roli ve vonném profilu typů sýrů jako Hermelín, čedar, Ementál, kozí sýr a dalších. Přispívá pozitivně k chuti sýru v nízkých koncentracích, ale při vysoké koncentraci byl zjištěn bramborový off-flavour [24, 31].

Methanthiol je další důležitá sloučenina obsahující síru. Mnoho mikroorganismů je schopno vyrábět methanthiol z methioninu, obzvláště *Penicillium camemberti*, *Geotrichum candidum*. Methanthiol je jedním z charakteristických aroma sloučenin Camembertu a čedaru [24].

1.5 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny (MK), organické karboxylové kyseliny s alifatickými uhlovodíkovými řetězci dlouhými 4 až 24 uhlíků, jsou významnými výživovými složkami lipidů a vyskytují se ve všech jejich druzích [10, 32].

Většina přirozeně se vyskytujících MK má sudý počet uhlíků v řetězci, který se skládá typicky z 12 až 24 uhlíků. Sudý počet uhlíků v řetězci je způsoben biosyntézou z dvouuhlíkatého prekurzoru ve formě kyseliny octové. Ve většině z nich se vyskytuje lineární uhlovodíkový řetězec. Výjimku tvoří MK v bakteriích, které obsahují rozvětvené nebo dokonce cyklické struktury [32, 33].

Neesterifikované mastné kyseliny se označují jako volné mastné kyseliny (VMK), pro něž je typická výrazně amfipatická povaha a velmi nízké zastoupení v živých systémech. V tukích a lipidech membrán jsou mastné kyseliny esterifikovány alkoholy (glycerolem, sfingosinem nebo cholesterolem) [34].

Triacylglyceroly (TAG) jsou tvořeny glycerolem esterifikovaným třemi mastnými kyselinami. Pokud obsahují stejné mastné kyseliny, nazývá se molekula jednoduchý TAG. Složený TAG obsahuje dvě nebo tři různé mastné kyseliny. Tuky ve stravě obsahují především kyselinu palmitovou, stearovou, olejovou a linolovou. Nenasycené mastné kyseliny se nejčastěji váží na prostřední atom uhlíku v molekule glycerolu. [34, 35].

Obecně je známo, že mastné kyseliny s počtem uhlíků větším jak 12 nehrají tak velkou roli v chuti vzhledem k jejich vysokému prahu vnímání. Mastné kyseliny s řetězcem krátkým nebo středně dlouhým se sudým počtem uhlíků (C4–C12) mají mnohem nižší práh vnímání, a proto charakteristické aroma. Například kyselina ethanová a propanová mají typickou octovou vůni. Kyselina butanová přichutí po žluklém sýru [24, 27].

1.5.1 Rozdělení mastných kyselin

Mastné kyseliny je možné rozdělit podle délky řetězce na MK s krátkým řetězcem (C3–C6), se středně dlouhým řetězcem (C8–C10), s dlouhým řetězcem (C12–C18) a s velmi dlouhým řetězcem (>C18). Dále lze dělit podle přítomnosti dvojně vazby na nasycené a nenasycené, které se dále dělí na mononenasycené a polynenasycené mastné kyseliny podle počtu dvojných vazeb [32, 34].

1.5.1.1 Nasycené mastné kyseliny

Jsou běžně obsaženy v přírodních lipidech s rovným, nerozvětveným řetězcem o sudém počtu uhlíků. MK s nižším počtem uhlíků, například kyselina máselná nebo kapronová, se typicky objevují v mléčném tuku.

Další hojně se vyskytující MK v mléčném tuku je kyselina myristová, která se na složení jiných lipidů podílí jen z 1–2 %, zatímco v tuku mléčném, kokosovém nebo palmojádrovém tvoří až 10 %.

Palmitová kyselina je nejrozšířenější nasycenou MK, vyskytuje se jak v lipidech živočišných tkání (20–30 %), tak v rostlinných olejích ze semen (5–30 %) a v palmovém oleji (> 40 %) [10, 36].

1.5.1.2 Mononenasyčené mastné kyseliny

Vzájemně se od sebe liší jak počtem atomů uhlíků, tak i polohou dvojně vazby a její prostorovou orientací. U přírodních mononenasyčených MK nalezneme konfiguraci zpravidla cis, málokdy pak trans, ke které dochází při ztužování tuků (hydrogenaci).

Nejrozšířenější je kyselina olejová, která se alespoň v malém množství vyskytuje v téměř všech rostlinných i živočišných lipidech [10, 33].

1.5.1.3 Polynenasycené mastné kyseliny

V přírodních lipidech se vyskytují spíše zřídka. Nejběžnější polynenasycenou MK je kyselina linolová, která například ve slunečnicovém oleji tvoří až 60 % složení. Další důležitou MK je kyselina linolenová vyskytující v pletivech rostlin, nejvíce pak v semenech lnu. Kyselina linolová i linolenová jsou pro člověka esenciální, tzn. musí je přijímat v potravě, protože je nedokáže syntetizovat *de novo* [10, 33].

1.5.2 Esterifikace mastných kyselin

Esterifikace patří mezi hlavní reakce mastných kyselin, při níž karboxylová kyselina reagující s alkoholem poskytuje ester. Pro estery a pro přírodní tuky jsou charakteristické inter-esterifikační reakce katalyzované acidobazickými katalyzátory nebo enzymy.

Při alkoholýze dochází k reakci triacylglycerolu s alkoholem, která dává vzniknout esterům mastných kyselin (MK) za odlučování glycerolu. Nejčastěji se využívá methanol, se kterým vznikají methylestery MK. Protože MK, nejsou těkavé je potřeba je pro analýzu pomocí plynové chromatografie (GC) převést na těkavé methylestery. Esterifikaci lze provést za bazické či kyselé katalýzy [10, 34].

1.6 Plynová chromatografie

Chromatografie je separační proces založený na rozdělování sloučenin mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze – pohyblivou (tzv. mobilní) a nepohyblivou (tzv. stacionární). U plynové chromatografie je mobilní fází plyn (tzv. nosný plyn), který musí být inertní. Nejčastěji se jako nosný plyn využívá dusík, vodík nebo helium. Aby byl zajištěn optimální průtok plynu kolonou, je nutné, aby tlak na začátku kolony byl vyšší než na konci.

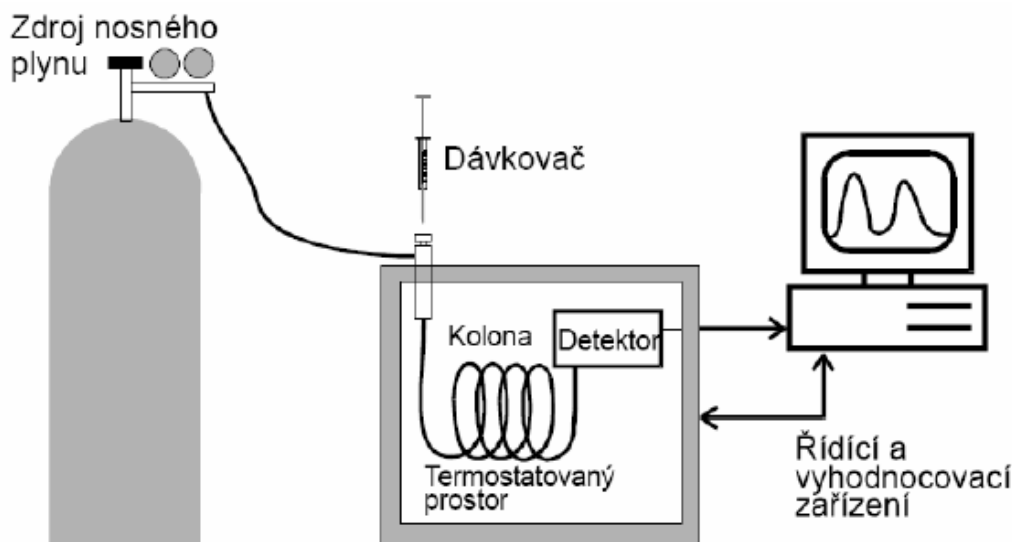
Plynová chromatografie se uplatňuje při dělení, identifikaci a stanovení všech složek, které lze převést bez rozkladu do plynné fáze. Separace složek analytu probíhá na koloně podle velikosti afinity ke stacionární fázi. V porovnání s kapalinovou chromatografií má v komplexním uspořádání větší separační účinnost, selektivitu, rozlišení a citlivost [38, 39, 40, 41].

Princip této metody spočívá v aplikaci vzorku obsahujícího analyt do vyhřívaného prostoru injektoru, kde dojde k odpaření. Stanovované látky musí být proto těkavé a teplotně stabilní. Jejich bod varu by při atmosférickém tlaku neměl být vyšší než 360 °C [38, 40]. Molekuly vzorku jsou poté unášeny nosným plynem na kolonu podle bodu varu a jejich volatility [39].

V koloně se analyty sorbují na stacionární fázi (buď se rozpouštějí v zakotvené fázi (GLC) nebo se adsorbují na pevný sorbent (GSC). Zdržení ve stacionární fázi je řízeno hodnotami tlaku par a afinitou dané látky ke stacionární fázi, přičemž mobilní fáze nemá přímý vliv na separaci. Z kolony nakonec vystupují jednotlivé separované látky. Látky, které se sorbují málo, vystupují z kolony nejdříve a mají nejkratší retenční časy. Z kolony vstupují látky do detektoru, jehož signál odpovídá změnám jejich koncentrace v nosném plynu vystupujícím z kolony [38, 39].

1.6.1 Instrumentace plynového chromatografu

Hlavními částmi plynového chromatografu jsou: zdroj nosného plynu, regulátor průtoku, injektor, kolona, termostat, detektor a řídicí a vyhodnocovací zařízení které je schopné zpracovat signál z detektoru (obvykle počítač). Obecné schéma plynového chromatografu je znázorněno na obrázku 1.



Obrázek 1: Obecné schéma plynového chromatografu [42]

1.6.1.1 Injektory

Pro zajištění optimální účinnosti separace je třeba vnést vzorek do chromatografického systému v co možná nejmenším množství. Vzorek je nastříkán do injektoru přes pryžové septum, ručně injekční stříkačkou, nebo automaticky pomocí autosampleru. Obvyklé množství nastříkaného vzorku je 1 μ l.

Jsou možné dva typy nástřiku na kolonu: s děličem (split) a bez děliče toku (splitless). Při dávkování bez děliče toku (splitless injection) je celý nastříknutý vzorek odpařen a unášen proudem nosného plynu do kolony [40].

Dávkování s děličem toku (split injection) se používá v případě, pokud je vzorek koncentrovanější, případně pokud existuje obava z kontaminace nebo přetížení kolony. V tomto módu je vzorek v lineru bleskově odpařen a smísen s nosným plynem. Převážná část této směsi je uvolněna do atmosféry a pouze její zlomek je transportován do kolony [43].

1.6.1.2 Kolony

V současnosti se v plynové chromatografii nejčastěji používají kapilární kolony. Tyto kolony jsou tvořeny kapilárou z taveného křemene, skla nebo nerez, která je z venku potažena filmem polymeru, který ji chrání před zlomením nebo jiným mechanickým poškozením. Délka bývá nejčastěji v rozmezí 10–100 m. Vnitřní průměr 0,1–1,0 mm, nejčastěji 0,25 mm. Běžně využívané jsou tyto typy kapilárních kolon:

- PLOT – vrstvička pevného sorbentu je na vnitřní straně kolony,
- SCOT – vrstvička nosiče na vnitřní stěně kapiláry smočená stacionární fází,
- WCOT – tenký film stacionární fáze vytvořený přímo na vnitřním povrchu kolony [44, 39].

V minulosti byly využívány kolony náplňové, které se v dnešní době vzhledem k účinnosti separace příliš nevyužívají. Jsou zhotoveny např. z nerezové oceli, skla, Al, Cu, Ni. Jejich délka je 1 až 5 m a průměr 2 až 6 mm. Stacionární fáze tvoří 1–10 hm. % nosiče a může být nepolární i polární. Pro adsorpční chromatografii se jako stacionární fáze používá například silikagel, alumina nebo adsorbenty na bázi polymerů [39].

1.6.1.3 Detektory

Hlavním úkolem detektoru je poskytnout odlišný signál při průchodu nosného plynu obsahujícího eluovanou složku oproti průchodu nosného plynu samotného. Detektor by měl poskytovat maximální rychlost odezvy, stabilní signál, co nejnižší meze detekce, selektivitu a citlivost. Mezi základní typy detektorů patří plamenový ionizační detektor (FID), detektor elektronového zachytu (ECD), plamenový fotometrický detektor (FPD), fotoionizační detektor (PID), termoionizační detektor (AFID) a hmotnostní spektrometr (MS) [44].

1.6.1.4 Plamenově ionizační detektor (FID)

Je nejvhodnějším detektorem pro stanovení organických látek v potravinách, díky své univerzálnosti a nízkému limitu detekce [45].

K ionizaci dochází ve vodíkovém plameni hořícím teplotou kolem 2 200 °C, který vzniká exotermickou reakcí plynného vodíku se vzdušným kyslíkem za vzniku vody. Plyn vycházející z kolony je veden do plamene, kde dojde ke spálení organických látek v něm přítomných a ke vzniku iontů.

Sběrná elektroda je umístěná nad plamenem a mezi ní a tryskou se vytvoří elektrické pole. Generovaný slabý elektrický proud je detekován a znamená, přičemž odezva detektoru FID je obecně úměrná počtu uhlíků v molekule analytu. Složky vzorku jsou následně identifikovány porovnáním s retenčními časy standardů a kvantifikovány zpravidla metodou absolutní kalibrace [46, 47].

1.6.2 Mikroextrakce tuhou fází

Mikroextrakce tuhou fází (SPME – Solid Phase Micro Extraction), je jednoduchá sorpční metoda často využívaná v plynové chromatografii. Je vhodná pro kapalné i tuhé vzorky. Výhodou této techniky je časová nenáročnost a nepřítomnost organických rozpouštědel během sorpce [48].

Principem metody je, že se vzorek zahřívá ve vialce, ve které následně dochází k sorpci analyzovaných aromatických látek na křemenné vlákno pokryté vrstvou polymeru. Analyt je na vlákno sorbován, dokud není dosaženo rovnováhy. Poté je vlákno přesunuto do přístroje, kde je vystaveno vysoké teplotě, při čemž dochází k desorpci analytů. Vystavením vysoké teplotě také současně dochází k vypálení vlákna, které je připraveno k další analýze [49].

SPME může probíhat třemi způsoby podle umístění vlákna. Může jít o přímou extrakci, kde je vlákno ponořeno přímo do vzorku, o extrakci z prostoru nad vzorkem (HS – Headspace) nebo o extrakci přímo ze vzorku, ale s vláknem odděleným membránou. Výhodou HS extrakce je snadná příprava vzorku k analýze [50].

1.7 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je separační technika založená na interakci iontů v plynné fázi na základě poměru hmotnosti a náboje (m/z).

Nejprve je vzorek převeden do plynné fáze a následně je ionizován v iontovém zdroji. Ionty jsou následně elektrostaticky urychlovány a poté vylétají z iontového zdroje do hmotnostního analyzátoru. Separace iontů v hmotnostním analyzátoru může podle aplikace rovněž probíhat pomocí různých technik. Nejvíce využívané jsou kvadrupóly, iontová past nebo průletový analyzátor (TOF). Po separaci žádoucích iontů podle poměru m/z jsou ionty detekovány na detektoru, obvykle se využívá elektronový násobič nebo Faradayův detektor.

Výstupem je tzv. hmotnostní spektrum, což je záznam, který popisuje závislost intenzity signálu (osa y) na poměru m/z [51].

1.7.1 Spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií

Tato technika slouží k identifikaci a kvantifikaci těkavých látek, které jsou přítomny v komplexnějších směsích. Spojení těchto dvou metod nám dává vysokou separační účinnost a možnost stanovit neznámé sloučeniny. Každý analyzovaný vzorek získá jako výstup chromatograf z GC a hmotnostní spektrum, které nám umožní jednotlivé složky identifikovat a porovnat s knihovnou spekter [39].

Největším problémem pro správnou funkčnost techniky je pracovní tlak, který se mezi GC a MS liší až o 9 řádů, proto je nutný výkonný vakuový systém. V současnosti se využívají úzké kapilární kolony s malým průtokem, které se zavádí přímo do iontového zdroje [52].

1.8 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Metoda je založená na amplifikaci požadovaných sekvencí nukleových kyselin. Její specifická je založena na použití dvou výchozích nukleotidových jednotek (primerů), které hybridizují do komplementárních sekvencí opačných vláken DNA a ohraničují žádanou sekvenci. Proces probíhá v termocykleru, který umožňuje cyklicky měnit teplotu až o několik desítek stupňů během pár sekund. Výsledkem polymerázové řetězové reakce je obrovské množství kopií vybrané sekvence DNA.

V tradiční PCR se detekce a kvantifikace amplifikované sekvence provádí na konci reakce po posledním cyklu PCR a zahrnuje post-PCR analýzu, jako je gelová elektroforéza a analýza obrazu. V kvantitativní PCR v reálném čase (často zkrácené na Real-time PCR nebo RT qPCR) se produkt PCR měří v každém cyklu [53, 54, 55].

1.8.1 Průběh PCR

Běžně amplifikace probíhá při 25–40 cyklech, množství cyklů se odvíjí od počáteční koncentrace DNA templátu a požadovaného množství výsledných amplikonů. Každý cyklus se obecně skládá ze tří kroků: denaturace, hybridizace primerů a syntézy DNA. Cyklické amplifikaci předchází počáteční iniciace při teplotě denaturačního kroku a po ukončení všech cyklů probíhá finální elongace, při které dochází k dosyntetizování DNA [56, 57].

Fáze jednoho amplifikačního cyklu tedy jsou:

Denaturace – probíhá 10–30 sekund při teplotě 94–98 °C, při této teplotě dochází k rozrušení vodíkových můstků a tím k rozdělení dvouvláknové DNA.

Hybridizace primerů – probíhá 30–60 sekund při 50–68 °C. V tomto kroku nasedají na jednovláknovou DNA specifické primery. Teplota hybridizace primerů závisí na jejich teplotě tání, přičemž teplota hybridizace by měla být o 2–5 °C nižší.

Syntéza DNA – probíhá běžně při 72 °C a přibližně 15 sekund na 1 kbp. V tomto kroku dochází pomocí DNA polymerázy k syntéze DNA ve směru 5'→ 3' od místa nasednutí primerů [53, 58].

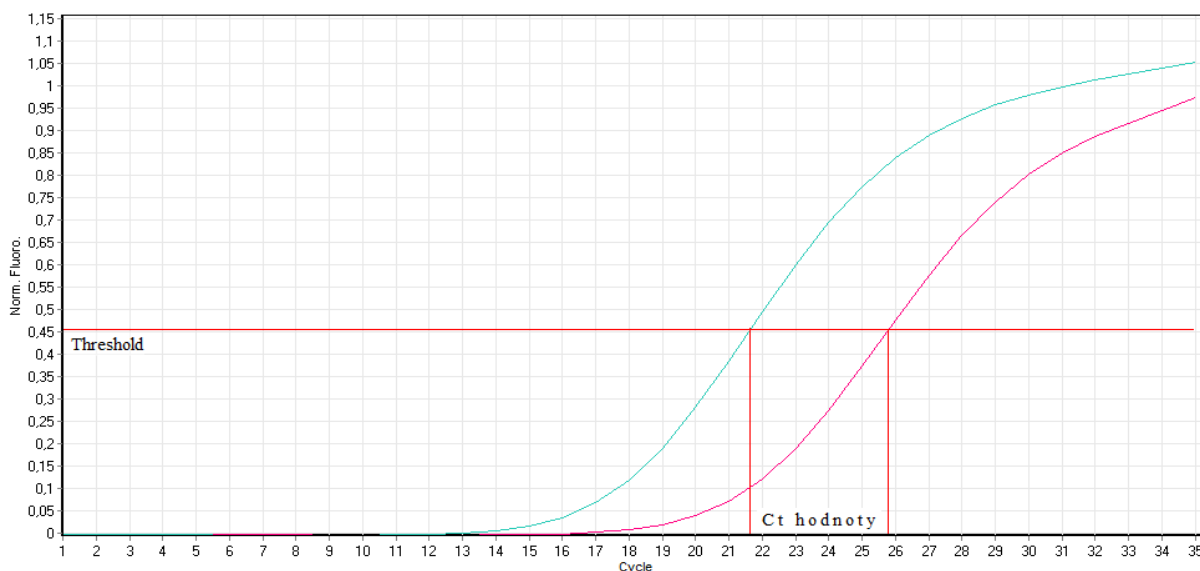
1.8.2 Real-time PCR (RT-PCR)

Rozdíl mezi běžnou PCR a RT-PCR je v použití fluorescenčních sond či interkalačních barviv, díky kterým je možné měřit množství naaplikované DNA po každém cyklu. Pokud je ve vzorku častá určitá sekvence (DNA nebo RNA), je pozorován její signál v dřívějších cyklech; pokud je sekvence vzácná, je amplifikace pozorována v pozdějších cyklech. Pro RT qPCR je optimální počet cyklů 25–35, protože při příliš vysokém počtu cyklů se také zvyšuje počet nespecifických produktů PCR [53].

Sondy jsou navrženy tak, aby hybridizovaly s templátem mezi dvěma primery. Použití sond označených různými barvivy umožňuje současnou detekci a kvantifikaci více cílových úseků v jedné tzv. multiplexní reakci. Pro detekci se používají dva typy sond, a to buď dsDNA s navázaným fluorochorem, anebo ty, které detekují specifické PCR produkty prostřednictvím použití fluorochorů vázaných na oligonukleotidech.

Pro detekci máme možnost využít širokou škálu komerčně dostupných fluorescenčních DNA barviv jako například ethidium bromid, YO-PRO-1, SYBR® Green nebo SYBR® GOLD. Nejvíce používané barvivo je SYBR® Green. Toto barvivo během reakce absorbuje modré světlo ($\lambda_{\max} = 497 \text{ nm}$) a emituje zelené světlo ($\lambda_{\max} = 520 \text{ nm}$) [59].

Výstupem z měření metodou PCR je amplifikační křivka. Jedná se o závislost intenzity fluorescence na počtu cyklů. Křivka nabývá esovitěho tvaru (obrázek 2).



Obrázek 2: Amplifikační křivka, která je výstupem měření RT-PCR

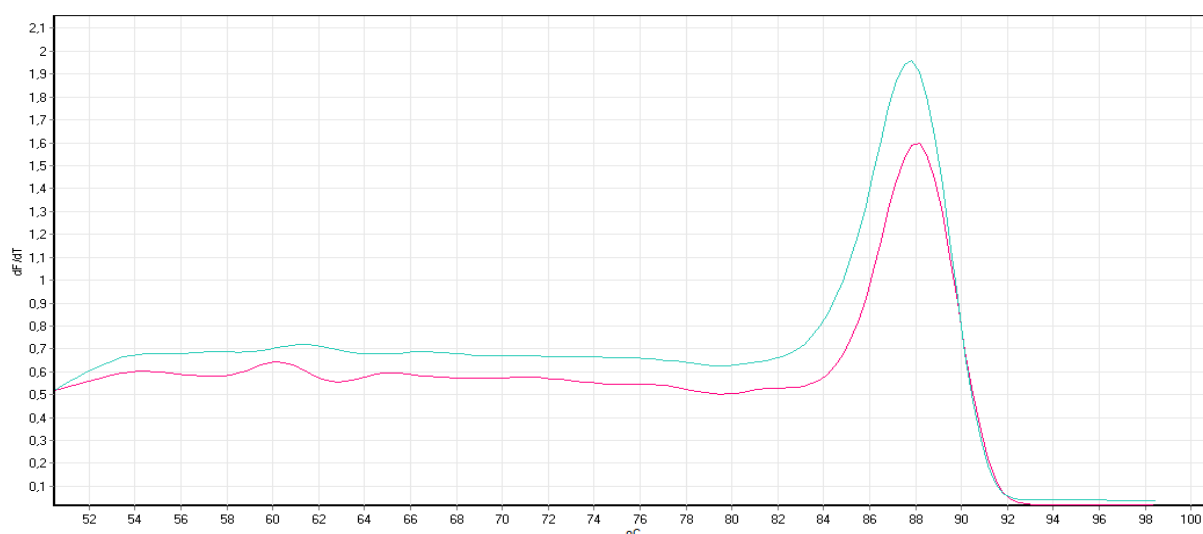
Nejdůležitějším bodem amplifikační křivky i celé RT-PCR je Ct („threshold cycle“). V tomto bodu intenzita fluorescence překročí prahovou hodnotu detekce. Čím vyšší je počáteční koncentrace templátu v reakční směsi, tím dříve fluorescenční signál překročí práh detekce a tím nižší je hodnota Ct [58, 59].

1.8.2.1 Vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM)

Analýza křivek tání je metoda využívaná ke zjištění nukleotidového složení produktu po skončení RT-PCR. Je založena na postupném zvyšování teploty po posledním cyklu PCR. HRM sleduje malé rozdíly v profilech křivek tání a hodnotách teplot tání analyzovaných vzorků. Pomocí této metody je také možné identifikovat nespecifické produkty PCR nebo dimery primerů [60].

Teplota tání (T_m) je teplota, při které je 50 % přítomných dvoušroubovic DNA denaturováno. T_m závisí na délce řetězce DNA a v něm přítomném množství bází guaninu (G) a cytosinu (C). Ty jsou navzájem spojeny třemi vodíkovými vazbami, díky kterým jsou stabilnější než AT [61].

Vysokého rozlišení je dosahováno použitím tzv. DNA saturujících barviv, to znamená, že dochází k plné saturaci (zaplnění) všech míst na dvouřetězcových molekulách DNA. Během postupného zahřívání dochází k tavení dvoušroubovice DNA, čímž se z ní barvivo uvolňuje a dochází k poklesu fluorescence [62, 63].



Obrázek 3: Příklad HRM křivky

1.9 Gelová elektroforéza

Nejběžnější metodou používanou k detekci produktů PCR je gelová elektroforéza. Jedná se o separační metodu, která je založená na migraci nabitých iontů a molekul nesoucích náboj v elektrickém poli. Rychlost pohybu, resp. dráha, kterou za určitý čas molekula urazí, je přímo úměrná intenzitě vloženého elektrického pole a celkovému náboji molekuly [55].

Pro detekci DNA se nejběžněji používá agarózový gel, který je následně umístěn do elektroforetické komory, která je poté připojena ke zdroji napětí. Díky uniformnímu negativnímu náboji DNA putují všechny vzorky k anodě a není potřeba předešlá úprava [64].

Pro posouzení velikosti jednotlivých produktů jsou využívány markery molekulových hmotností. Jsou to komerčně dostupné směsi fragmentů DNA o definované velikosti. Porovnání polohy získaných produktů PCR s odpovídajícím fragmentem markeru slouží k odhadu jeho velikosti [55].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Seznam použitých přístrojů, vybavení a chemikálií

2.1.1 Přístroje

- Centrifuga 5430 R, Eppendorf
- Automatický izolátor QuickGene80
- NanoDrop 2000, Thermo Fisher
- PCR cycler, MyCycler, Bio Rad
- RT-PCR cycler, Rotor-gene Q, Qiagen
- Plynový chromatograf TRACE GC, ThermoQuest, plameno-ionizační detektor, split/splitless injektor, kapilární kolona DB WAX (30 m × 0,32 mm × 0,5 μm)
- Plynový chromatograf Trace™ 1310 se split/splitless injektorem Thermo Fisher Scientific
- Hmotnostní detektor ISQ™ LT Single Quadrupole, Thermo Fisher Scientific
- Inkubátor Incucell
- Inkubátor myTEMP Miny, Digital Incubators
- Lednice, Guzzanti
- Laboratorní váhy s přesností na 2 desetinná místa, Scout Pro
- Analytické váhy s přesností na 4 desetinná místa, GR-202, AND A&D INSTRUMENT LTD
- Vodní lázeň, LGH W16
- Vortex-Genie 2, Mo Bio
- Odstředivka, Hermle Z 100 M
- Digestoř
- Topné hnízdo, Brněnská Drutěva
- Vakuová rotační odparka
- Zdroj pro elektroforézu
- Mikrovlnný autokláv, Microjet
- Box aura miny, Bioair instruments
- Termoblok, thermo-shaker 100C, Biosan
- Mikrovlnná trouba, Hyundai

2.1.2 Vybavení

- Kit pro izolaci DNA sýrů, QuickGene, DNA tissue kit S
- Kit pro izolaci DNA pozitivních kontrol, Qiagen, DNeasy UltraClean Microbial Kit
- Boxy pro skladování sýrů
- Elektroforetická komora, hřebínek, forma na gel
- Automatické pipety s rozsahy 0-2 μl, 1-10 μl, 1-20 μl, 10-100 μl, 100-1000 μl
- Mikrozkušavky 1,5 ml; 500 μl a 100 μl
- Centrifugační zkumavky 10 ml
- Petriho misky
- Dělicí nálevka
- Destilační baňka 50 ml
- Skleněná pipeta 5 ml; 10ml; 20 ml
- Zkušavka
- Navažovací lžičky

- Kádinka
- Chladič pro extrakci dle Soxhleta

2.1.3 Chemikálie

- Ethanol 99,8 %, Honeywell
- Ethanol 96 %, Lach:ner
- Methanol, Lach:ner
- HCl, Lach:ner
- Diethylether, Lach:ner
- Petrolether, Penta
- Isooktan, Penta
- NaOH, Lach:ner
- Methanolický roztok bortrifluoridu, Sigma-aldrich
- NaCl
- Agar se sladivým extraktem, Sigma-aldrich
- Tryptic soya agar, Sigma-aldrich
- Základ pro krevní agar, Sigma-aldrich
- Agaróza, Serva
- Kasničný extrakt, Himedia
- Trypton, Serva
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), VWR chemicals
- Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), Sigma-aldrich
- Kyselina octová 99,8 %, Lach:ner
- Velikostní standard pro elektroforézu 100 bp, Nippon genetics
- GelRed[®] Nucleic Acid Stain 10000X Water, Sigma-aldrich

2.1.4 PCR komponenty

Phusion[®] High-Fidelity DNA Polymerase, BioLabs

- PCR voda
- 5X Phusion HF pufr
- 10 mM dNTPs
- Phusion DNA polymeráza

qPCR 2x SYTO-9 Master Mix

2.1.5 Plyny

- Helium 4.8, SIAD
- Vodík 5.5, SAID
- Vzduch 5.0, SAID
- Dusík 5.0, SAID

2.1.6 Použitá média a gely

Pro všechna média byla použita ultračistá (tzv. milliQ) voda. Média byla sterilována v mikrovlnném autoklávu. Gel pro elektroforézu byl připraven v mikrovlnné troubě.

- F1: Pět gramů agarů se sladidovým extraktem bylo naváženo na 100 ml vody.
- B2: Byly naváženy 4 gramy základu pro krevní agar na 100 ml vody a po vychladnutí na 50 °C bylo přidáno 10 ml defibrinované krve.
- B71: Čtyři gramy komerčně prodávané směsi Tryptic soya agarů byly naváženy na 100 ml vody.
- LB: Na 100 ml vody byl navážen 1 g NaCl, 1 g tryptonu a 0,5 g kvasničného extraktu. V případě přípravy tuhého LB média bylo přidáno ještě 1,4 g agarózy.
- 50x koncentrovaný TEA pufr: Na jeden litr bylo naváženo 242 g Tris, 18,6 g EDTA a odměřeno 57,1 ml kyseliny octové.
- Agarózový gel na elektroforézu: Byl připravován 1,2% gel, tedy 1,2 g agarózy na 100 ml 1x koncentrovaného TEA pufru.

2.1.7 Primery

Pro návržení primerů byl použit online program Primer-Blast a sekvence DNA přístupné z databáze NCBI

Tabulka 1: Seznam použitých primerů

Mikroorganismus		Sekvence	Délka produktu
<i>Streptococcus thermophilus</i>	F	CTTGGATGAGTTGCGAACGG	388 bp
	R	ACTTTCCTACTCTCACACCCG	
<i>Brevibacterium linens</i>	F	TAATGGCCTACCAAGCCGAC	277 bp
	R	GGACAACGCTCGTACCCTAC	
<i>Arthrobacter arilaitensis</i>	F	ATTAGTGGCGAACGGGTGAG	432 bp
	R	TTGCGCCCTACGTATTACCG	
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	F	ACGCAAGTCTGATGGAGCAA	324 bp
	R	ACGCATTACACCGCTACACA	
<i>Salmonella enterica</i>	F	CTGGAAGTCTGATGGAGCAA	338 bp
	R	CAGCCTGCCAGTTTCGAATG	
<i>Staphylococcus aureus</i>	F	CGAAGGCGACTTTCTGGTCT	447 bp
	R	TTGTCACCGGCAGTCAACTT	
<i>Listeria monocytogenes</i>	F	AACCAGAAAGCCACGGCTAA	357 bp
	R	GCGGAAACCCCTAACACTT	
<i>Mikrococcus luteus</i>	F	TGGGTGGATTAGTGGCGAAC	383 bp
	R	CAGGTACCGTCACTTTCGCT	
<i>Penicillium camemberti</i>	F	CGATGGCGATGGACAGTAAG	207 bp
	R	TACTTGTCACCGCTGGCCTA	
<i>Geotrichum candidum</i>	R	TCTAGTTCGTAGAACGCGCC	210 bp
	F	GCGTCTACCAATTCGCCAC	
<i>Debaryomyces hansenii</i>	R	AATCGAACCCACACCTTCC	240 bp
	F	GTGCTGCGACTGTTTCGATTC	
<i>Penicillium caseifulvum</i>	R	CAAATCGAGGAATCACAAGTCT	z literatury
	F	GAGTAAGCATTGGCCTCGAC	
<i>Penicillium commune</i>	R	GGCATCGATGAAGAACGCAG	283 bp
	F	ATTTGGGTTGATCGGCAAGC	
<i>Penicillium fuscoglaucum</i>	R	ATCTCTTGGTTCCGGCATCG	253 bp
	F	TGACAAAGCCCCATACGCTC	
<i>Cladosporium herbarum</i>	R	ATTGCAACCAGACTTGCTCG	197 bp
	F	ACGACCATTACGCCAGCATC	
<i>Penicillium roqueforti</i>	R	GACCGCATTTAACGGCCAAG	120 bp
	F	CGGCTGGGTAACGGATCTAC	
<i>Lactococcus lactis</i>	R	TGAGTAACGCGTGGGGAATC	179 bp
	F	TATCATCGCCTTGGTGAGCC	
<i>Fusarium domesticum</i>	R	AGTTTCGGGAATGTGGCTCC	229 bp
	F	CAGGATCGGTCGATGATGCG	

2.2 Analyzované vzorky

Byly analyzovány dva typy sýru Saint-nectaire jejichž hlavním rozdílem je právě mikrobiální složení, které se liší díky použití pasterizovaného a nepasterizovaného mléka.

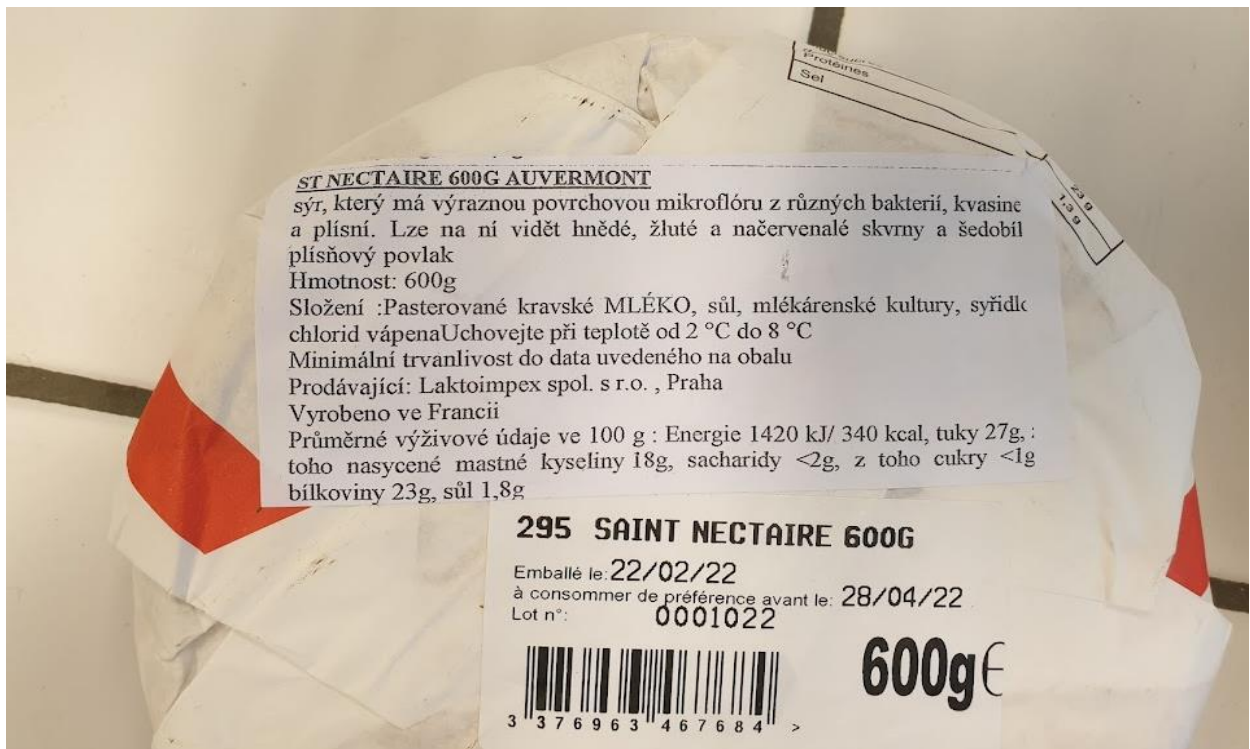
Prvním byl farmářský Saint-nectaire zakoupený nebalený v prodejně francouzských sýrů v Praze. K tomuto sýru není známo datum výroby ani spotřeby. I z tohoto důvodu byl sýr využit pouze pro analýzu mikrobiálního složení. Vzorky tohoto sýru byly měřeny po zakoupení a po třech týdnech skladování v lednici.

Hlavním předmětem zkoumání byl mlékárenský typ sýru La petit Saint-nectaire. Vzorky tohoto sýru byly měřeny po koupi, po týdnu a třech týdnech v lednici a po týdnu a po třech týdnech při 20 °C.

Všechny sýry mlékárenského typu byly zakoupeny v prodejně Makro a celé měření včetně sensorické analýzy proběhlo v udávané době trvanlivosti, která byla pro sýr po třech týdnech skladování do dne 14. 4. 2022.



Obrázek 4: Přední strana obalu mlékárenského typu (laitier=mlékárenský) Saint-nectaire



Obrázek 5: Složení a popis mlékárenského typu Saint-Nectaire



Obrázek 6: Skladování obou typů sýrů. Celé světle žluté bochníky jsou mlékárenský typ a šedý výřez je farmářský typ

2.3 Mikrobiální složení

2.3.1 Izolace DNA ze vzorků sýra

Pro izolaci DNA ze vzorků sýrů byl použit kit DNA tissue kit S (Quick-Gene) pro izolaci DNA z živočišných tkání.

Do 1,5 ml mikrozkušavky bylo naváženo 0,05 g sýru, bylo přidáno 180 μ l MDT pufru a 20 μ l EDT a obsah byl ponechán lýze při 55 °C a 250 rpm tři hodiny. Zkušavky byly následně centrifugovány tři minuty při laboratorní teplotě a 10 000 rpm.

Supernatant byl přepipetován do čistých 1,5 ml mikrozkušavek a bylo přidáno 180 μ l LDT. Obsah zkušavek byl promíchán vortexem, stočen a dále inkubován při 70 °C a 250 rpm 10 minut. Následně bylo přidáno 240 μ l 99,8% ethanolu a zkušavky byly opět promíchány na vortexu a stočeny, čímž vzniká hotový lyzát.

V dalším kroku byl celý obsah přenesen a přefiltrován pomocí kolony s fritou, kde došlo k zachycení DNA. Frita byla třikrát opakovaně promyta 750 μ l WDT do zásobní nádoby. V posledním kroku byly kolony přeneseny nad nové 1,5 ml mikrozkušavky a na fritu bylo nanášeno 200 μ l elučního pufru, který byl po 90 sekundách inkubace přes fritu přefiltrován.

Výsledná koncentrace a čistota byla změřena na přístroji NanoDrop. Pro měření bylo nanášeno 1,5 μ l vzorku, který byl změřen při 220-350 nm. Typický pík pro DNA se objevuje při 260 nm a pro určení čistoty se používá poměr absorbancí 260/280 nm, který nám určuje případnou přítomnost RNA nebo proteinů v našem vzorku. Ideální hodnota tohoto poměru při měření DNA je 1,8-2,0. Jako druhý se používá poměr 260/230, který vypovídá o přítomnosti nežádoucích organických sloučenin. Ideální hodnota tohoto poměru je 2,0-2,2.

2.3.2 Ověření přítomnosti vybraných mikroorganismů pomocí RT-PCR

Kvůli velkému množství vzorků a pro přesnější stanovení obsahu DNA jednotlivých mikroorganismů, byla použita RT-PCR s následnou HRM analýzou.

Pro tuto analýzu byla vyizolovaná DNA ředěna na koncentraci 10 ng/ μ l a byl použit stejný teplotní program jako v případě stanovení patogenů (viz. tabulka 2).

Vše bylo připravováno na ledu, aby se předešlo degradaci komponentů či DNA matrice. Použitý reakční objem byl 25 μ l. Objemy jednotlivých komponentů jsou uvedeny v tabulce č.3. Použitá master mix již obsahoval fluorescenční barvivo SYBR, díky němuž je možné sledovat nárůst amplifikované DNA v jednotlivých cyklech a později bod tání produktů při HRM analýze. Pro stanovení bodu tání byl použit program, kdy byla teplota navyšována postupně o 0,1 °C od 50 °C do 99 °C vždy po pěti sekundách.

Tabulka 2: Složení směsi pro RT-PCR

Komponenty	Objem [μ l]
PCR voda	9,5
SYTO PCR SYBR Master mix	12,5
Foward primer	1
Reverse primer	1
Temlát DNA	1

2.3.3 Příprava pozitivních kontrol pro PCR

Z navržených primerů byly vybrány organismy dostupné v České sbírce organismů. Tyto organismy byly doručeny v lyofilizované formě, vhodně rozkultivovány a následně byla vyizolovaná jejich DNA, která při PCR sloužila jako pozitivní kontrola reakcí.

Pro patogenní organismy byl objednan standard již vyizolované DNA.

Tabulka 3: Seznam organismů z České sbírky mikroorganismů s potřebnými teplotami a médii pro kultivaci

Název organismu	CCM číslo	Teplota kultivace [$^{\circ}$ C]	Médium
Cladosporium herbarum	F-455	25	F1
Arthrobacter sp.	4474	20-25	B2
Brevibacterium linens	2782	30	B71
Penicillium camemberti	F-378	25	F1
Penicillium commune	F-327T	25	F1

Dále byly použity kultury z laboratoře mikrobiologie, konkrétně *Micrococcus luteus* a *Penicillium roqueforti*.

2.3.3.1 Izolace DNA pozitivních kontrol

Aby mohly být jednotlivé organismy použity jako pozitivní kontroly, bylo nutné vyizolovat jejich DNA. Pro tuto izolaci byl použit kit DNeasy UltraClean Microbial Kit (Qiagen). Izolace tímto kitem má více a hrubší lyzační kroky, a proto se hodí pro izolaci DNA i z čistých plísňových kultur, které mají odolnější buněčné stěny.

Kultury byly kultivovány 12 hodin před izolací v tekutém médiu. 1,8 ml narostlé kultury bylo centrifugováno 30 s při 10 000 x g, supernatant byl vylit a pelet rozsuspendován 300 μ l PowerBead roztoku, vortexován a celý objem byl přesunut do PowerBead zkumavky. Do zkumavky bylo přidáno 50 μ l SL roztoku, 10 minut byla vortexována na maximální výkon a následně centrifugována 30 s při 10 000 x g. Supernatant byl přesunut do nové zkumavky a bylo přidáno 100 μ l IRS roztoku. Obsah byl vortexován, inkubován 5 minut při 4 $^{\circ}$ C a následně centrifugován 60 s při 10 000 x g.

Supernatant byl opět přesunut do nové zkumavky a bylo přidáno 900 µl SB roztoku, obsah byl krátce zvortexován a dále přesunut do zkumavky s fritou (pro zachycení DNA) a centrifugován 30 s při 10 000 x g. Prošlý supernatant byl vylit a do zkumavky bylo napipetováno 300 µl roztoku SB a centrifugováno 30 s při 10 000 x g, supernatant byl opět vylit a pro vysušení frity byla zkumavka centrifugována dalších 60 s při 10 000 x g.

Frita byla přesunuta do nové sběrné zkumavky, na její povrch bylo naneseo 50 µl elučního pufru a následovala centrifugace 30 s při 10 000 x g. Koncentrace vyizolované DNA byla změřena spektrofotometricky na NanoDropu.

2.4 Stanovení obsahu mastných kyselin

2.4.1 Extrakce tuků ze sýrů a gravimetrické stanovení procentuálního obsahu mastných kyselin

Sýr byl nakrájen na malé kousky a na analytických vahách byl navážen 1 g do zkumavky, do které bylo následně napipetováno 5 ml 35% HCl. Směs ve zkumavce byla zahřívána ve vodní lázni při 80 °C do rozpuštění. Obsah zkumavky byl pomocí 5 ml ethanolu kvantitativně převeden do dělicí nálevky, do které bylo dále přidáno 9 ml diethyletheru a 9 ml petroletheru. Směs byla promíchána a inkubována 30 minut pro oddělení fází.

Následně byla odebrána horní čirá fáze do předem zvážené destilační baňky s kulatým dnem a do dělicí nálevky bylo přidáno 4,5 ml diethyletheru i petroletheru, vše bylo promícháno a opět inkubováno 30 minut. Po inkubaci byla odebrána čirá horní fáze do stejné baňky. Tento postup byl proveden celkem dvakrát.

Po celkem třech extrakcích byl obsah destilační baňky odpařen pomocí vakuové odparky při 40 °C. V destilační baňce poté zůstal pouze čistý tuk. Baňka byla zvážena a gravimetricky (dle vzorce 1) byl určen procentuální obsah tuku v měřeném vzorku sýra.

$$w_{tuk} = \frac{m_{tuk} \cdot 100 \%}{m_{syr}}$$

w_{tuk}	procentuální obsah tuku	[%]
m_{tuk}	hmotnost vyextrahovaného tuku ze vzorku	[g]
m_{syr}	navážka sýru	[g]

2.5 Esterifikace mastných kyselin

Převedení MK na methylestery masných kyselin (MeMK) za kyselých katalýz se provádí použitím methanolu v přítomnosti kyseliny sírové nebo toxického fluoridu boritého jako katalyzátorů. Mechanismus spočívá v protonaci kyseliny methanolem za tvorby meziprojektu, který následně ztrácí proton a vzniká MeMK. Reakce je vratná, ale zároveň je zapotřebí methanol v přebytku a bezvodé prostředí. Voda je silnějším donorem elektronu než methanol a nevznikal by potřebný meziprojekt [37].

2.5.1 Izolace volných mastných kyselin

Pro tuto izolaci byla zvolena kyselá esterifikace s bortrifluoridem jako katalyzátorem. Volné mastné kyseliny jsou esterifikovány zahříváním v přebytku bezvodého methanolu.

Do baňky s tukem byl přidán varný kamínek a 5 ml 10% methanolického roztoku bortrifluoridu. Baňka byla vložena do aparatury s topným hnízdem a připojena ke zpětnému chladiči.

Po třech minutách varu byly do baňky přes chladič napipetovány 3 ml isooktanu. Poté byl var bezprodluženě ukončen a baňka z aparatury vyjmuta.

Ke směsi bylo přidáno 20 ml nasyceného roztoku NaCl, vše bylo důkladně promícháno a baňka byla doplněna po hrdlo stejným roztokem NaCl. Po 5 minutách stání a ustálení fází byly automatickou pipetou odebrány 2 ml z horní čiré fáze do 2 ml vialky.

Takto připravený roztok byl měřen pomocí GC-FID neředěný a desetkrát ředěný pomocí isooktanu.

2.5.2 Izolace vázaných mastných kyselin

Glyceroly jsou v prvním kroku transmetylovány pomocí methanolického roztoku NaOH na methylestery a přítomné volné mastné kyseliny jsou převedeny na soli. V druhém kroku jsou soli mastných kyselin převedeny na methylestery reakcí s methanolickým roztokem bortrifluoridu.

Do baňky s tukem byl přidán varný kamínek a 4 ml $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ methanolického roztoku NaOH. Baňka byla vložena do aparatury s topným hnízdem a připojena ke zpětnému chladiči.

Po deseti minutách varu bylo do baňky přes chladič napipetováno 5 ml methanolického roztoku bortrifluoridu. Po dalších dvaceti minutách varu byla esterifikace ukončena 3 ml isooktanu a baňka byla vyjmuta z aparatury.

Ke směsi bylo přidáno 20 ml nasyceného roztoku NaCl, vše bylo důkladně promícháno a baňka byla doplněna po hrdlo stejným roztokem NaCl. Po 5 minutách stání a ustálení fází byly automatickou pipetou odebrány 2 ml z horní čiré fáze do 2 ml vialky.

Takto připravený roztok byl měřen pomocí GC-FID neředěný a stokrát ředěný pomocí isooktanu.

2.5.3 Podmínky měření methylesterů mastných kyselin pomocí GC-FID

Každý vzorek ředěný i neředěný byl změřen dvakrát.

- Plynový chromatograf, TRACE GC, ThermoQuest Italia S. p. A., Itálie
- Autosampler AI/AS 3000
- Kapilární kolona DB WAX (30 m × 0,32 mm × 0,5 μm)
- Teplotní program
 - 50 °C 1 min
 - Vzestupný gradient $25 \text{ °C} \cdot \text{min}^{-1}$ do 200 °C se zadržením 0 min
 - Vzestupný gradient $3 \text{ °C} \cdot \text{min}^{-1}$ do 230 °C se zadržením 30 min
 - Celková doba analýzy: 47 min

- Vstup
 - Teplota injektoru: 250 °C
 - Splitless time: 1 min
 - Dávkování: 1 µl, splitless autosampler
- Nosný plyn
 - Průtok dusíku: 1 ml·min⁻¹
- Plamenově-ionizační detektor (FID)
 - Teplota detektoru: 250 °C
 - Průtok vzduchu: 350 ml·min⁻¹
 - Průtok vodíku: 35 ml·min⁻¹
 - Make-up dusíku: 30 ml·min⁻¹

2.5.4 Výpočty pro stanovení obsahu mastných kyselin ve vzorku

Pomocí GC-FID byly zaznamenány methylestery mastných kyselin, které byly porovnány se standardy (viz. tabulka 4) pomocí jejich retenčních časů. Pomocí plochy jednotlivých píků standardů a naměřených vzorků byla vypočítána koncentrace jednotlivých mastných kyselin.

Tabulka 4: Seznam použitých standardů mastných kyselin a jejich retenční časy, plochy píků a koncentrace

		Rt [min]	c _{st} [mg·g ⁻¹]	P _{st} [mV·s]	M _{FMEMK} [g/mol]	M _{FMK} [g/mol]
Kyselina kapronová	C6:0	5,330	0,4	24816103	130,187	116,160
Kyselina kaprylová	C8:0	6,500	0,4	23945147	158,241	144,214
Kyselina kaprinová	C10:0	7,610	0,4	24768160	186,295	172,268
Kyselina laurová	C12:0	8,880	0,4	23847200	214,349	200,322
Kyselina tridekanová	C13:0	9,650	0,2	10843620	228,376	214,349
Kyselina myristová	C14:0	10,570	0,4	19750867	242,403	228,376
Kyselina myristoolejová	C14:1	10,960	0,2	10132703	240,387	226,360
Kyselina pentadekanová	C15:0	11,640	0,2	8900266	256,430	242,403
Kyselina palmitová	C16:0	12,940	0,6	24202520	270,457	256,430
Kyselina palmitoolejová	C16:1	13,320	0,2	8184814	268,441	254,414
Kyselina heptadekanová	C17:0	14,390	0,2	7185718	284,484	270,457
Kyselina stearová	C18:0	16,090	0,4	13172497	298,511	284,484
Kyselina olejová	C18:1	16,490	0,4	20584343	296,495	282,468
Kyselina linolová	C18:2	17,320	0,2	13376777	294,479	280,452
Kyselina α-linolenová	C18:3	18,620	0,2	6215424	292,463	278,436
Kyselina arachová	C20:0	20,290	0,4	11990880	326,565	312,358
Kyselina eikosapentaenová	C20:5	27,060	0,2	11172675	316,477	302,451
Kyselina eruková	C22:1	27,990	0,2	3818453	352,603	338,576

Vztahy pro výpočet koncentrace MK:

$$c_{MeMK} = \frac{P_{MeMK}}{P_{st}} \cdot c_{st} \quad (1)$$

$$c_{MK} = \frac{M_{rMK}}{M_{rMeMK}} \cdot c_{MeMK} \quad (2)$$

$$m_{MK} = c_{MK} \cdot V_{io} \quad (3)$$

$$c_{vz} = \frac{m_{MK}}{m_{vz}} \quad (4)$$

c_{MeMK} koncentrace MeMK v extraktu [$\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$]

c_{st} koncentrace standardu [$\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$]

P_{MeMK} plocha píku MeMK extraktu [$\text{mV} \cdot \text{s}$]

P_{st} plocha píku standardu [$\text{mV} \cdot \text{s}$]

c_{MK} koncentrace MK v extraktu [$\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$]

$M_{r,MK}$ molární hmotnost MK [$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$]

$M_{r,MeMK}$ molární hmotnost MeMK [$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$]

m_{MK} hmotnost MK v baňce [mg]

V_{io} objem isooktanu (3 ml)

c_{vz} koncentrace MK ve vzorku [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$]

m_{vz} navážka vzorku [g]

2.6 Stanovení aromatických látek pomocí GC-MS

Do 10 ml vialek byly naváženy 2 g z každého vzorku sýru tak, aby vzorek obsahoval vnitřní i vnější část sýru. Každý vzorek byl změřen dvakrát.

Podmínky stanovení pomocí HS-SPME-GC-MS:

- 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

2.7 Senzorická analýza

Pro senzorickou analýzu byly vybrány tři vzorky sýru: čerstvý, skladovaný v lednici týden a tři týdny. Sýr byl nachystán přibližně na 15 g kousky a hodnocení podávali neškolení hodnotitelé z řad naší fakulty. Hodnocení probíhalo online na vlastních zařízeních hodnotitelů pomocí Google Formuláře (viz příloha 1 a 2).

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Stanovení přítomnosti vybraných mikroorganismů pomocí RT-PCR

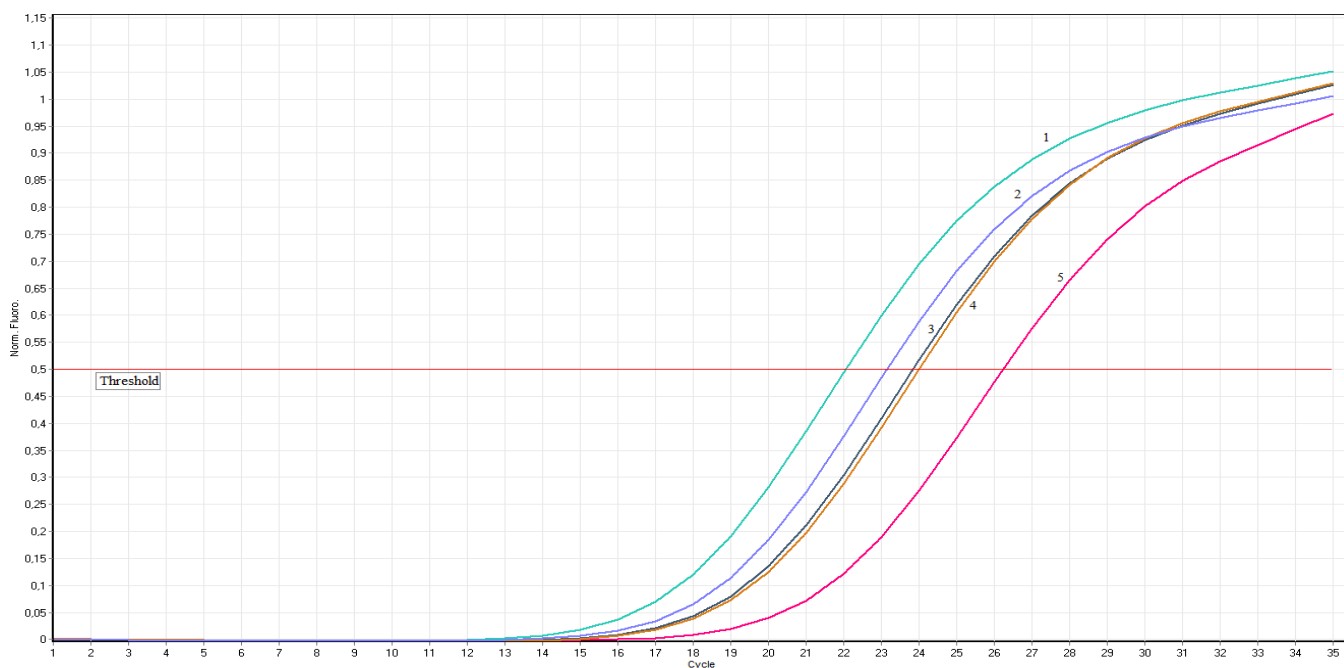
Pro RT-PCR byly použity vzorky vyizolované DNA, celkem šlo o sedm vzorků: sýru La petit Saint-nectaire mlékárenského typu čerstvý, skladovaný týden při 4 a 20 °C a skladovaný tři týdny při 4 a 20 °C a dále Saint-nectaire farmářského typu čerstvý a skladovaný týden při 4 °C. Použité primery jsou v tabulce 1.

Pro ověření přítomnosti byly v první řadě vybrány startovní mlékárenské kultury *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* a *Lactococcus lactis* [13]. Dále organismy hojně se vyskytující po 20. dni zrání (platí pro všechny použité sýry) *Brevibacterium linens*, *Arthrobacter arilaitensis* a *Debaryomyces hansenii* [13,15]. Další skupinou jsou patogenní mikroorganismy nejčastěji napadající mléčné výrobky a sýry: *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* [65,66]. Jejich přítomnost byla ověřena pro stanovení bezpečných podmínek skladování sýru Saint-nectaire. Poslední skupinou jsou plísňe běžně se vyskytující v sýrech s povrchovou plísní *Penicillium camemberti*, *caseifulvum*, *commune*, *roqueforti* a *fuscoglaucum*, dále *Cladosporium herbarum*, *Fusarium domesticum* a *Geotrichum candidum* (kvasinková houba) [17, 20].

Výstupem měření je především záznam případného nárůstu intenzity fluorescence v závislosti na počtu uběhlých cyklů. Z tohoto záznamu bylo pomocí programu Rotor-Gene 6000 vypočítána hodnota Ct, díky které můžeme porovnat původní množství přítomné DNA ve vzorcích. Threshold hodnota byla volena tak, aby všechny křivky byly v daný okamžik rovnoběžné.

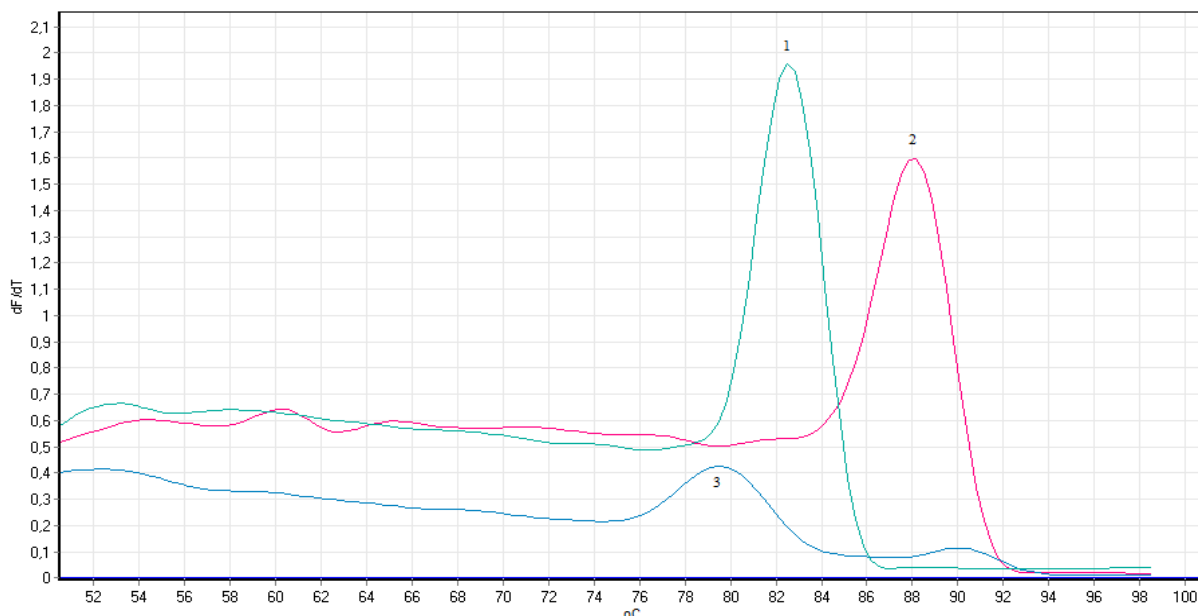
Dále byla provedena HRM analýza, která nám potvrzuje přítomnost dané DNA a dokáže odhalit případné dimery primerů či nespecifické produkty.

Všechny vzorky byly vyhodnoceny způsoby, které jsou vysvětleny na obrázcích 7-11 a souhrnné výsledky jsou zaznamenány v tabulce 5.

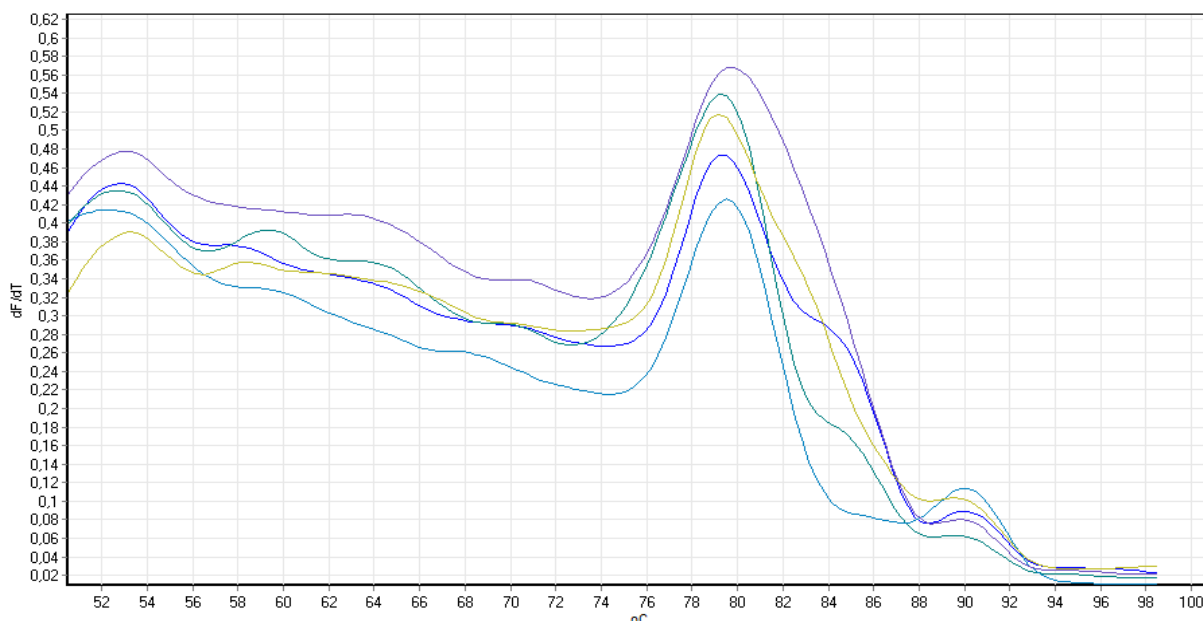


Obrázek 7: Příklad výsledných křivek zaznamenávající průběh nárůstu fluorescence pro *Arthrobacter arilaitensis* v pěti vzorcích mlékárenského typu Saint-nectaiere. Vzorek 1 je sýr čerstvý, 2 po třech týdnech při 20 °C, 3 po týdnu při 20 °C, 4 po třech týdnech v lednici a vzorek 5 je po týdnu skladování v lednici.

Na obrázku 7 můžeme porovnat množství DNA *Arthrobacter arilaitensis* v původních vzorcích. Nejvíce DNA bylo ve vzorku čerstvého sýra a nejméně ve vzorku po týdenním skladování v lednici.

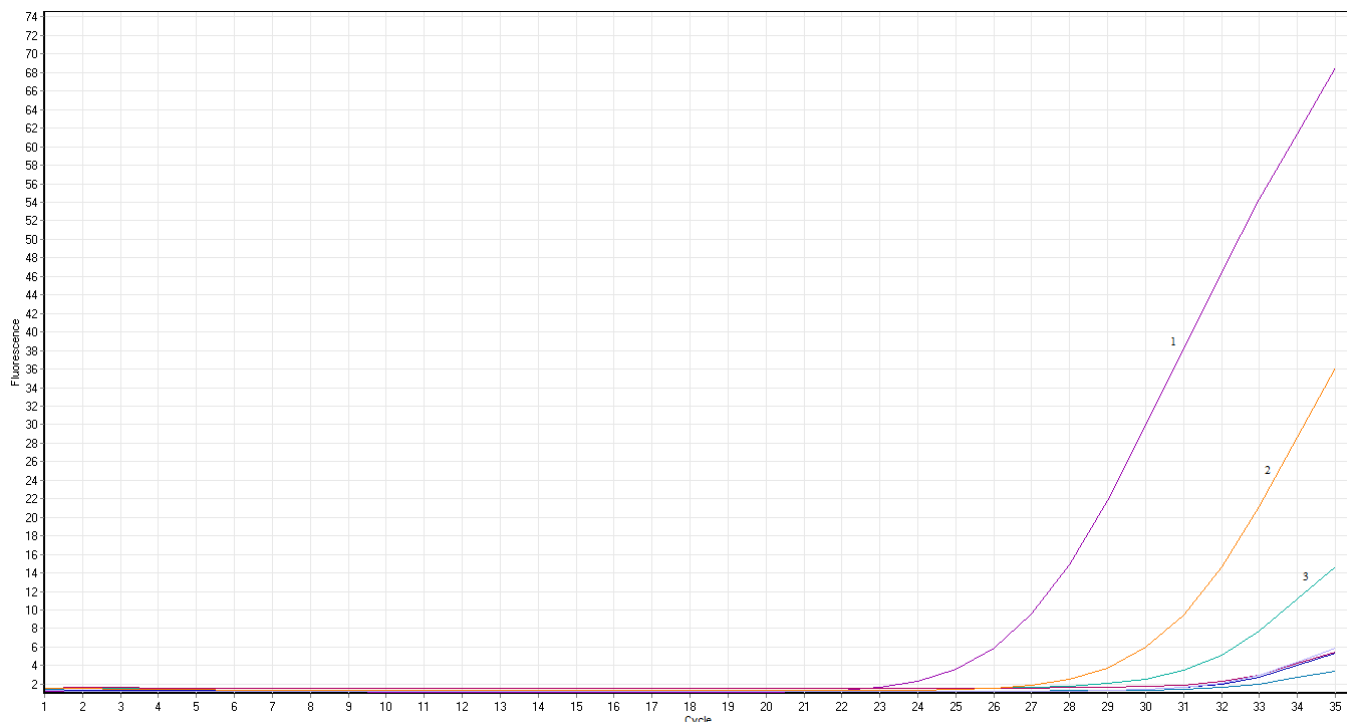


Obrázek 8: Příklad záznamu z HRM analýzy DNA tří různých mikroorganismů

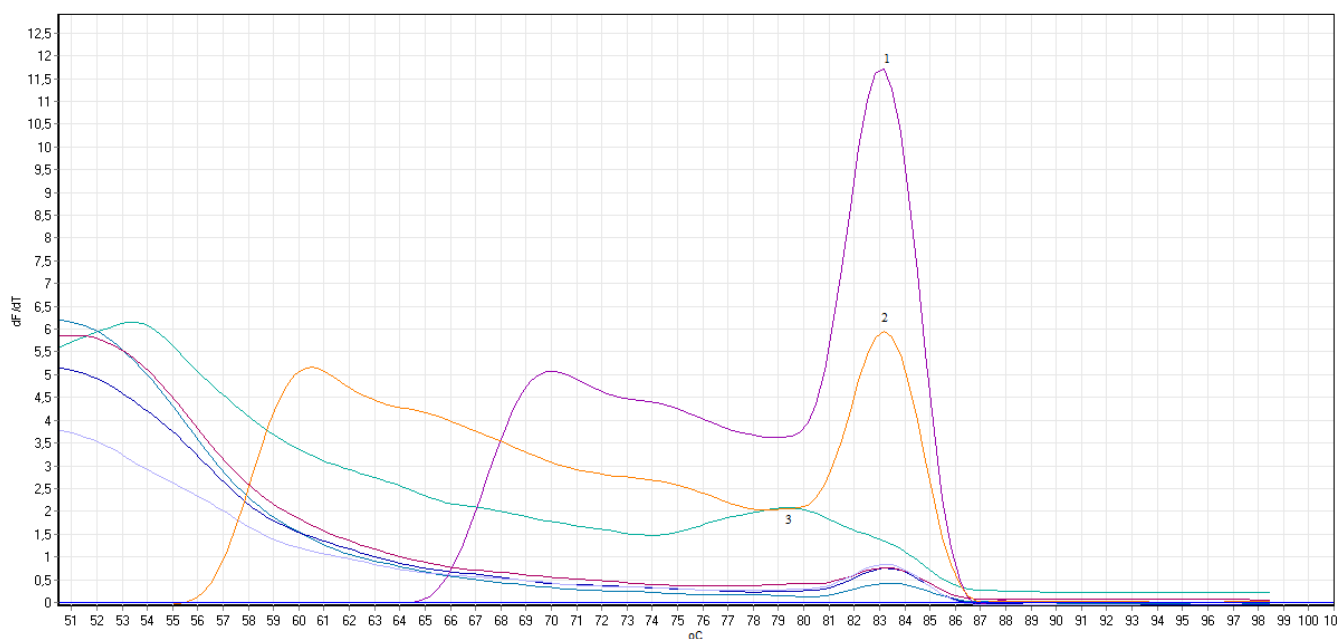


Obrázek 9: Záznam z HRM analýzy *Cladosporium herbarum*, je patrné, že přítomnost DNA je pozitivní ve všech vzorcích

Na obrázku 8 můžeme vidět, že výsledný pík se objevuje na různých místech, která jsou pro dané primery. Mohlo by být pochyb o přítomnosti DNA ve vzorku 3, když se ale podíváme na záznam pouze pro tento primer (obrázek 9) lze s jistotou určit přítomnost DNA tohoto mikroorganismu v původním vzorku.



Obrázek 10: Ze záznamu nárůstu fluorescence pro *Penicillium fuscogluoucum*. Vzorek 1 je pozitivní kontrola, vzorky 2 a 3 jsou z farmářského typu Saint-nectaire, 2 po třech týdnech v lednici a 3 čerstvý.

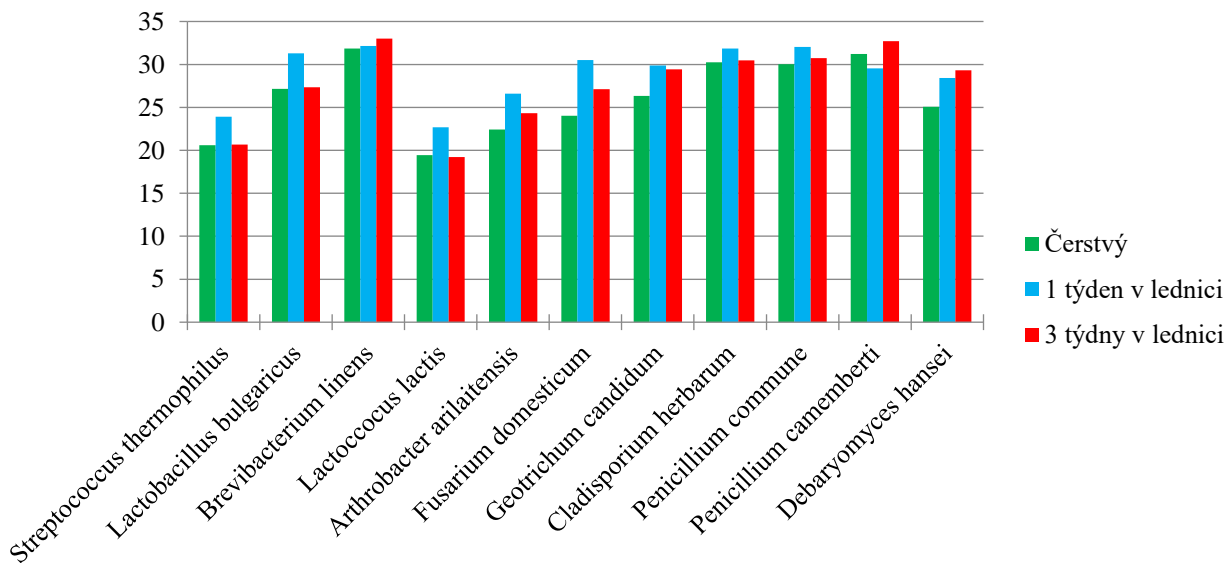


Obrázek 11: HRM analýza pro stejné vzorky jako jsou na obrázku 10

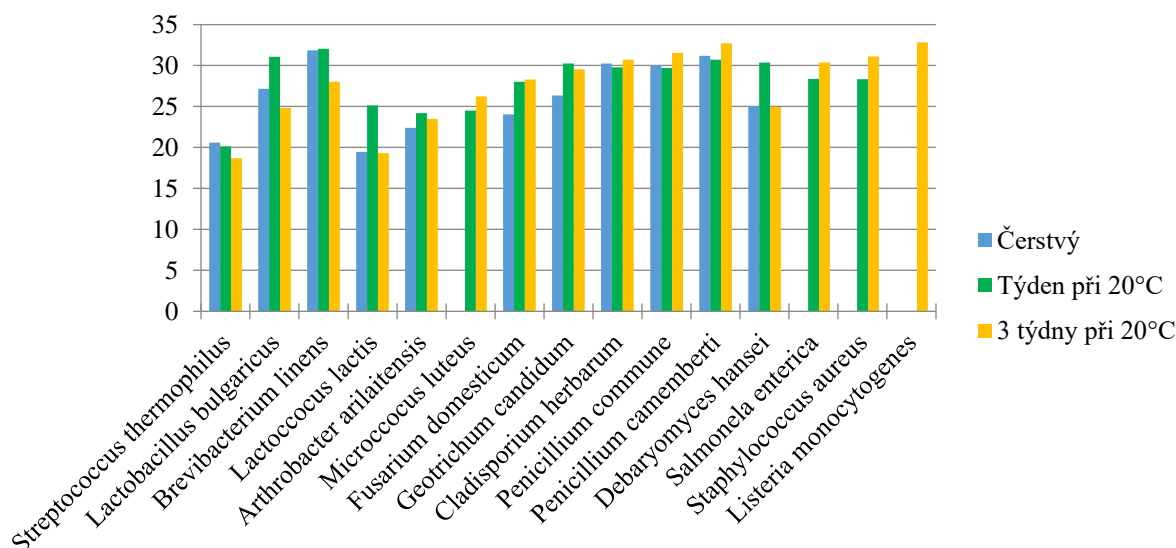
Podle křivek fluorescence zaznamenaných na obrázku 10 můžeme teoreticky uvažovat o třech pozitivních vzorcích (označených 1–3). Díky HRM analýze, zaznamenané na obrázku 11, můžeme se spolehlivostí říct, že pozitivní jsou pouze vzorky 1 a 2.

Tabulka 5: Souhrnný záznam o přítomnosti vybraných mikroorganismů ve vzorcích sýru La petit Saint-nectaire, mlékárenský typ, důležitým ukazatelem je hodnota Ct a dále zda-li je přítomnost mikroorganismu ve vzorku pozitivní/negativní

Mikroorganismus	La petit Saint-nectaire, mlékárenský typ									
	Čerstvý		Týden v lednici		3 týdny v lednici		Týden při 20 °C		3 týdny při 20 °C	
	p/n	hodnota Ct	p/n	hodnota Ct	p/n	hodnota Ct	p/n	hodnota Ct	p/n	hodnota Ct
<i>Streptococcus thermophilus</i>	p	20,59	p	23,9	p	20,69	p	20,15	p	18,69
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	p	27,15	p	31,31	p	27,35	p	31,07	p	24,82
<i>Brevibacterium linens</i>	p	31,85	p	32,14	p	32,99	p	32,05	p	28,03
<i>Lactococcus lactis</i>	p	19,45	p	22,69	p	19,21	p	25,12	p	19,33
<i>Arthrobacter arilaitensis</i>	p	22,41	p	26,61	p	24,32	p	24,19	p	23,49
<i>Micrococcus luteus</i>	n	-	n	-	n	-	p	24,52	p	26,24
<i>Fusarium domesticum</i>	p	24,03	p	30,51	p	27,11	p	28,01	p	28,31
<i>Geotrichum candidum</i>	p	26,34	p	29,86	p	29,42	p	30,26	p	29,56
<i>Cladisporium herbarum</i>	n	30,25	p	31,87	p	30,49	p	29,78	p	30,73
<i>Penicillium commune</i>	p	30,04	p	32,04	p	30,75	p	29,72	p	31,53
<i>Penicillium camemberti</i>	p	31,20	p	29,53	p	32,69	p	30,71	p	32,72
<i>Debaryomyces hansenii</i>	p	25,07	p	28,43	p	29,32	p	30,36	p	24,94
<i>Penicillium caseifulvum</i>	n	-	n	-	n	-	n	-	n	-
<i>Penicillium roqueforti</i>	n	-	n	-	n	-	n	-	n	-
<i>Penicillium fuscoglaucum</i>	n	-	n	-	n	-	n	-	n	-
<i>Salmonella enterica</i>	n	-	n	-	n	-	p	28,37	p	30,37
<i>Staphylococcus aureus</i>	n	-	n	-	n	-	p	28,33	p	31,10
<i>Listeria monocytogenes</i>	n	-	n	-	n	-	n	-	p	32,82



Graf 1: Srovnání Ct hodnot pro tři vzorky (čerstvý, 1 a 3 týdny v lednici) mlékárenského typu Saint-nectaire, můžeme říci, že čím nižší je hodnota Ct v porovnání s ostatními (pouze pro jeden mikroorganismus), tím vyšší bylo množství dané DNA ve vzorku

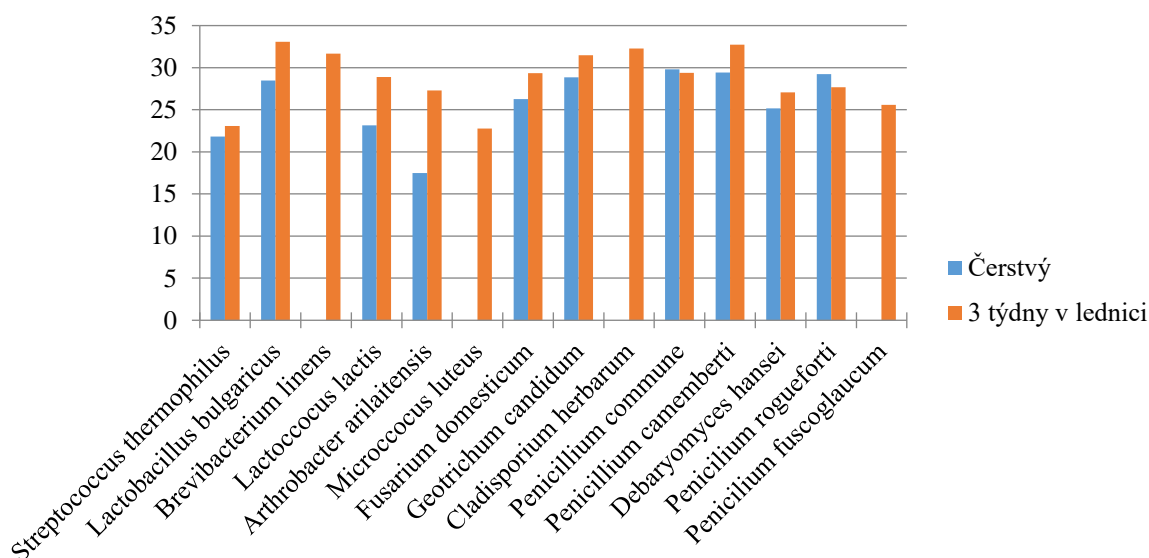


Graf 2: Srovnání Ct hodnot pro tři vzorky (čerstvý, 1 a 3 týdny při 20 °C) mlékárenského typu Saint-nectaire, můžeme říci, že čím nižší je hodnota Ct v porovnání s ostatními (pouze pro jeden mikroorganismus), tím vyšší bylo množství dané DNA ve vzorku

U většiny vybraných mikroorganismů můžeme sledovat, že nejnižší hodnota Ct, a tedy největší obsah DNA, byl u sýru čerstvého. Výjimkou v obou srovnáních je *Penicillium camemberti*, v grafu 2 dále: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Cladysporium herbarum* a *Penicillium commune*. V grafu 2 dále vidíme, že s přibývajícím časem při 20 °C narůstá také počet patogenních organismů a kontaminantů jako: *Micrococcus luteus*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* a *Staphylococcus aureus*.

Tabulka 6: Souhrnný záznam o přítomnosti vybraných mikroorganismů ve vzorcích sýru Saint-nectaire, farmářský typ

Mikroorganismus	Saint-nectaire, farmářský typ			
	Čerstvý		3 týdny v lednici	
	p/n	hodnota Ct	p/n	hodnota Ct
<i>Streptococcus thermophilus</i>	p	21,83	p	23,09
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	p	28,47	p	33,09
<i>Brevibacterium linens</i>	n	-	p	31,67
<i>Lactococcus lactis</i>	p	23,16	p	28,88
<i>Arthrobacter arilaitensis</i>	p	17,49	p	27,31
<i>Micrococcus luteus</i>	n	-	p	22,77
<i>Fusarium domesticum</i>	p	26,28	p	29,34
<i>Geotrichum candidum</i>	p	28,84	p	31,47
<i>Cladysporium herbarum</i>	n	-	p	32,29
<i>Penicillium commune</i>	p	29,80	p	29,37
<i>Penicillium camemberti</i>	p	29,41	p	32,72
<i>Debaryomyces hansenii</i>	p	25,18	p	27,06
<i>Penicillium caseifulvum</i>	n	-	n	-
<i>Penicillium roqueforti</i>	p	29,22	p	27,67
<i>Penicillium fuscoglaucum</i>	n	-	p	25,58
<i>Salmonella enterica</i>	n	-	n	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	n	-	n	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	n	-	n	-



Graf 3: Srovnání Ct hodnot pro dva vzorky farmářského typu Saint-nectaire

I u tohoto typu sýra můžeme vidět, že nejnižší hodnoty Ct má až na výjimky (*Penicillium commune* a *Penicillium roqueforti*) sýr čerstvý. U sýru po třech týdnech v lednici je opět viditelný přírůstek nových mikroorganismů: *Brevibacterium linens*, *Micrococcus luteus*, *Cladysporium herbarum* a *Penicillium fuscoglaucum*.

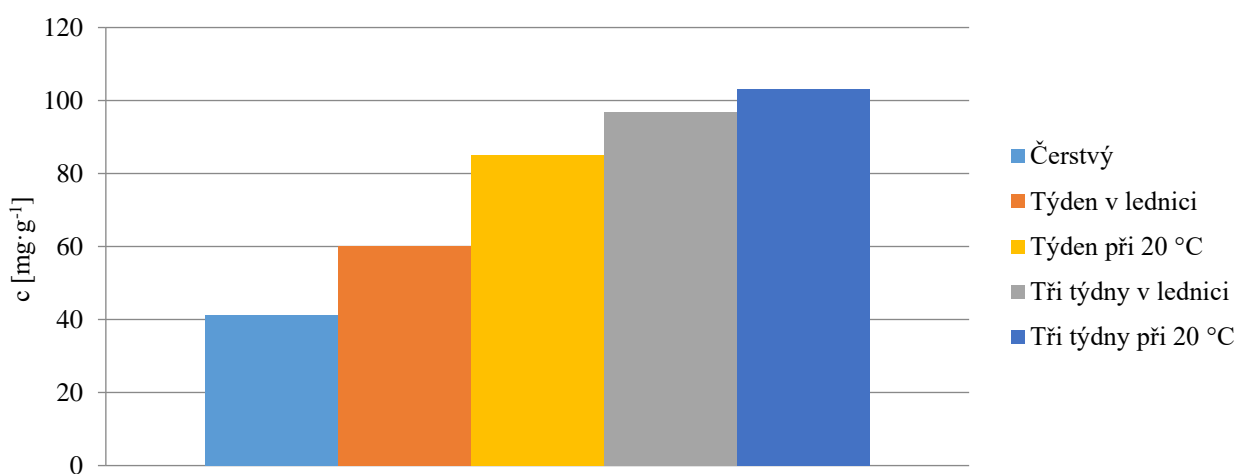
3.2 Obsah mastných kyselin

Lipidy byly ze vzorků izolovány extrakcí směsí diethyletheru a petroletheru, následně byla provedena esterifikace MK za použití bortri-fluoridu jako katalyzátoru a volné a vázané mastné kyseliny byly podrobeny analýze za použití GC-FID (viz kap. 2.4). Mastné kyseliny byly identifikovány na základě srovnání retenčních časů s příslušnými standardy, kvantifikace byla provedena srovnáním ploch píků se standardy o známé koncentraci (tabulka 4).

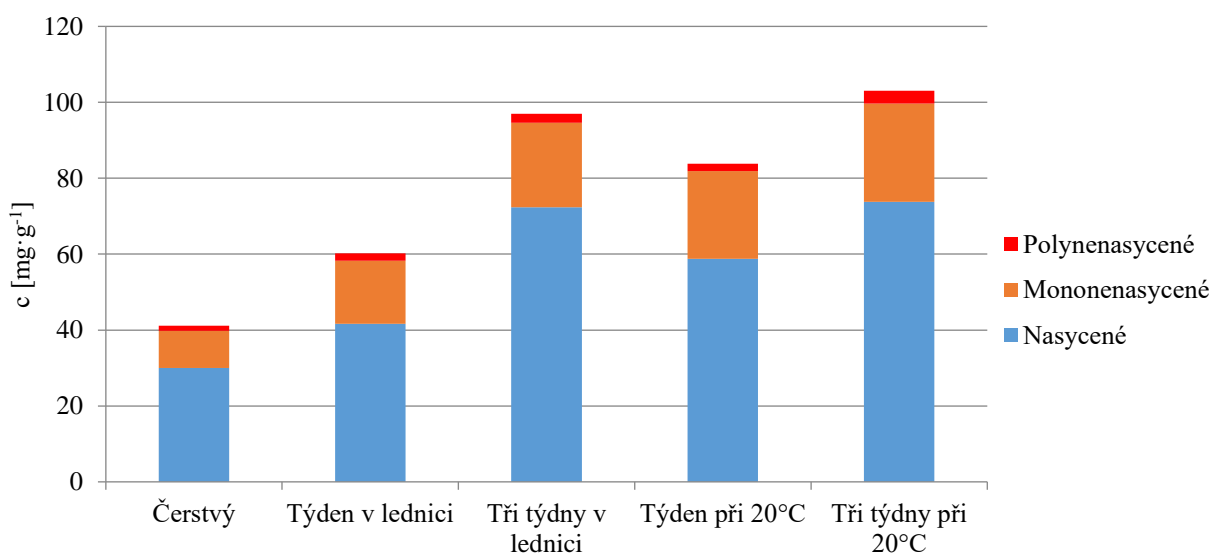
Bylo změřeno pět vzorků mléčárského typu sýru La petit Saint-nectaire. Pro každý vzorek byly měřeny vázané a volné mastné kyseliny ve dvou opakováních.

3.2.1 Volné mastné kyseliny

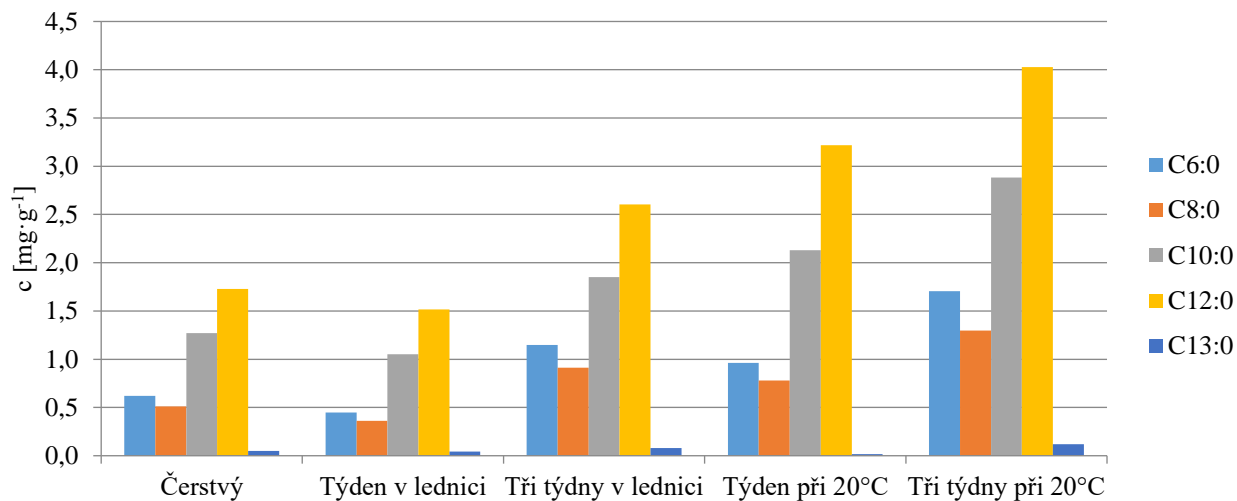
Přesné koncentrace všech identifikovaných mastných kyselin včetně směrodatné odchylky a relativní směrodatné odchylky jsou zaznamenány v tabulce 7, a znázorněny graficky v grafech 4-8.



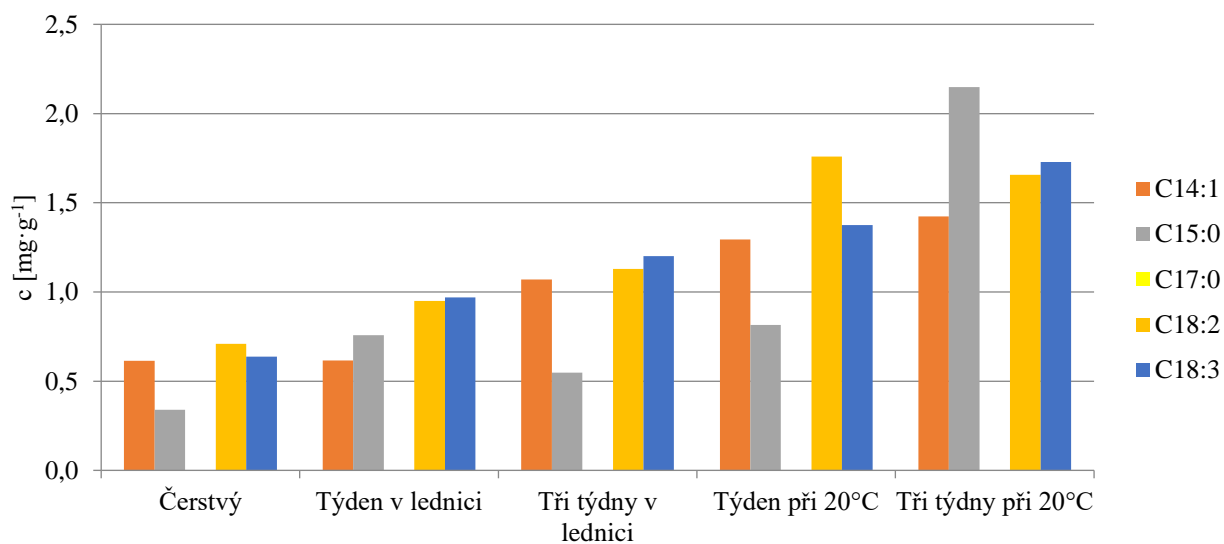
Graf 4: Srovnání celkového obsahu volných mastných kyselin



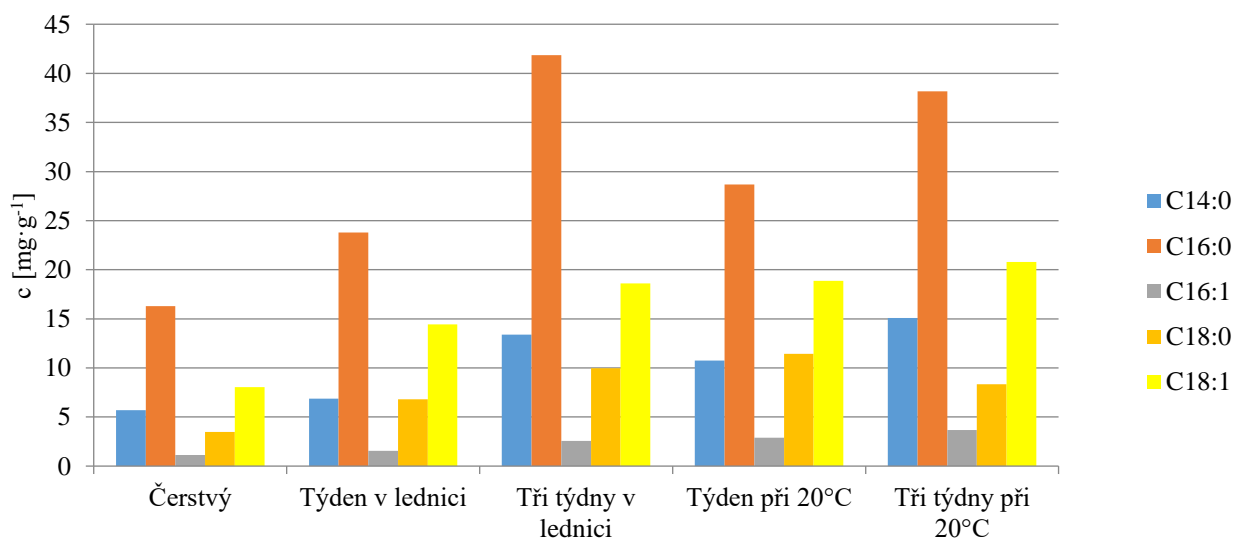
Graf 5: Srovnání obsahu nasycených, mononenasycených a polynenasycených mastných kyselin v jednotlivých vzorcích



Graf 6: Srovnání obsahu jednotlivých mastných kyselin



Graf 7: Srovnání obsahu jednotlivých mastných kyselin



Graf 8: Srovnání obsahu jednotlivých mastných kyselin

V grafu 4 vidíme postupný nárůst celkového obsahu volných mastných kyselin s nárůstem doby skladování v lednici i při 20 °C.

Z grafu 5 můžeme říct, že poměr nasycených, mononenasycených a polynenasycených volných mastných kyselin zůstává ve všech vzorcích přibližně stejný.

Nejvíce zastoupené VMK jsou porovnány v grafu 8. Ve všech vzorcích převažovala kyselina palmitová dosahující v maximální koncentraci 41,87 mg·g⁻¹.

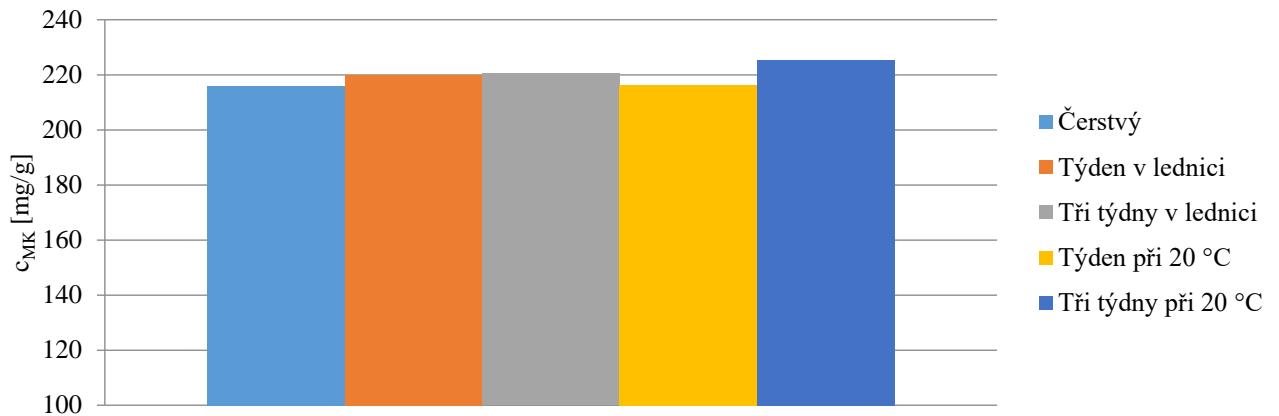
Celkový obsah volných mastných kyselin byl pro čerstvý sýr 41,12 mg·g⁻¹, pro sýr po jednom týdnu v lednici 60,16 mg·g⁻¹, pro sýr po třech týdnech v lednici 96,93 mg·g⁻¹, pro sýr po týdnu při 20 °C 84,99 mg·g⁻¹ a pro sýr po třech týdnech při 20 °C 103,05 mg·g⁻¹.

Tabulka 7: Obsah jednotlivých volných mastných kyselin ve vzorcích mlékárenského typu Saint-nectaire

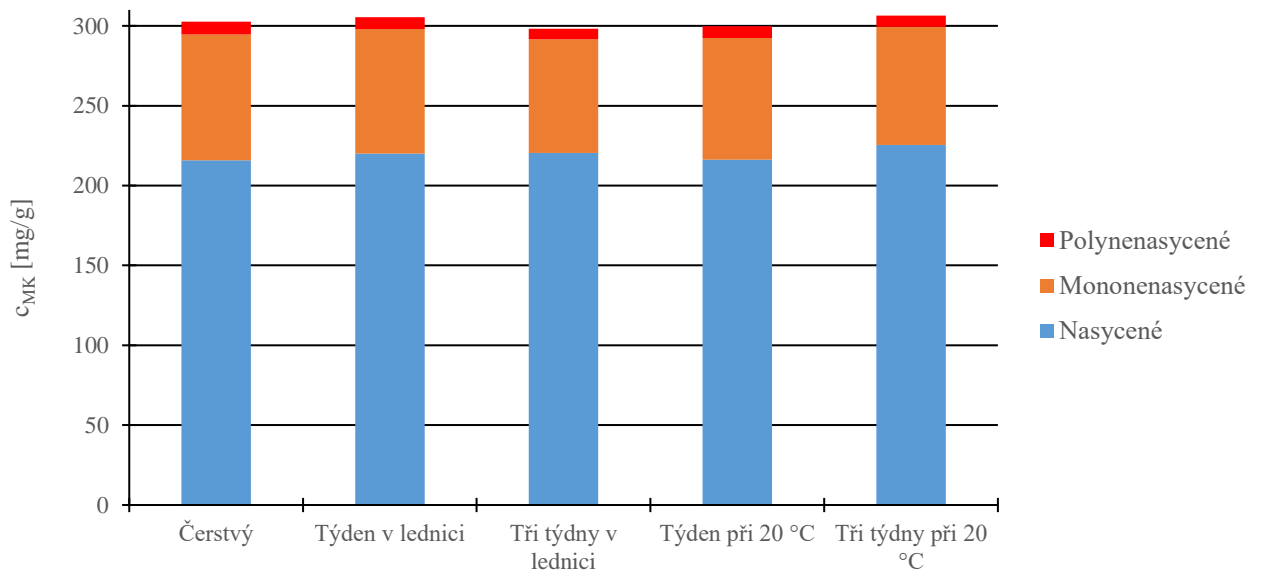
MK	Čerstvý			Týden v lednici			Tři týdny v lednici			Týden při 20 °C			Tři týdny při 20 °C		
	c_{MK} [mg·g ⁻¹]	směrodatná odchylka	relativní směrodatná odchylka	c_{MK} [mg·g ⁻¹]	směrodatná odchylka	relativní směrodatná odchylka	c_{MK} [mg·g ⁻¹]	směrodatná odchylka	relativní směrodatná odchylka	c_{MK} [mg·g ⁻¹]	směrodatná odchylka	relativní směrodatná odchylka	c_{MK} [mg·g ⁻¹]	směrodatná odchylka	relativní směrodatná odchylka
C6:0	0,62	0,02	3,6	0,45	0,01	2,4	1,15	0,01	0,9	0,96	0,01	0,8	1,71	0,01	0,5
C8:0	0,51	0,01	2,3	0,36	0,01	2,3	0,91	0,02	2,7	0,78	0,01	0,9	1,30	0,01	0,8
C10:0	1,27	0,01	0,8	1,05	0,01	1,4	1,85	0,03	1,4	2,13	0,01	0,5	2,88	0,03	1,0
C12:0	1,73	0,04	2,2	1,52	0,02	1,5	2,60	0,03	1,2	3,22	0,02	0,6	4,03	0,05	1,2
C13:0	0,05	>0,01	1,0	0,04	>0,01	1,1	0,08	>0,01	3,1	0,02	>0,01	8,4	0,12	>0,01	1,4
C14:0	5,68	0,29	5,2	6,86	0,24	3,5	13,38	0,39	2,9	10,75	0,27	2,5	15,08	0,92	6,1
C14:1	0,61	>0,01	0,8	0,62	0,04	6,8	1,07	0,04	3,3	1,30	0,04	2,7	1,42	0,02	1,1
C15:0	0,34	>0,01	1,1	0,76	0,01	0,8	0,55	0,02	4,1	0,82	>0,01	0,2	2,15	0,09	4,2
C16:0	16,30	0,67	4,1	23,80	0,15	0,6	41,87	1,03	2,5	28,67	0,43	1,5	38,18	2,76	7,2
C16:1	1,14	0,01	0,9	1,56	0,24	15,5	2,55	0,14	5,6	2,90	0,02	0,6	3,66	0,03	0,8
C17:0															
C18:0	3,49	0,59	16,9	6,80	0,01	0,2	9,97	0,80	8,0	11,43	0,77	6,7	8,33	1,08	12,9
C18:1	8,03	1,17	14,6	14,44	0,29	2,0	18,61	1,26	6,8	18,87	0,18	1,0	20,79	0,48	2,3
C18:2	0,71	0,01	0,9	0,95	0,03	3,7	1,13	0,06	5,5	1,76	0,05	2,8	1,66	0,05	3,0
C18:3	0,64	0,03	5,4	0,97	>0,01	>0,1	1,20	0,05	4,2	1,38	0,04	2,7	1,73	0,02	1,0
C20:0							0,01	>0,01	7,2	0,01	>0,01	6,1			
C20:5															
C22:1															

3.2.2 Vázané mastné kyseliny

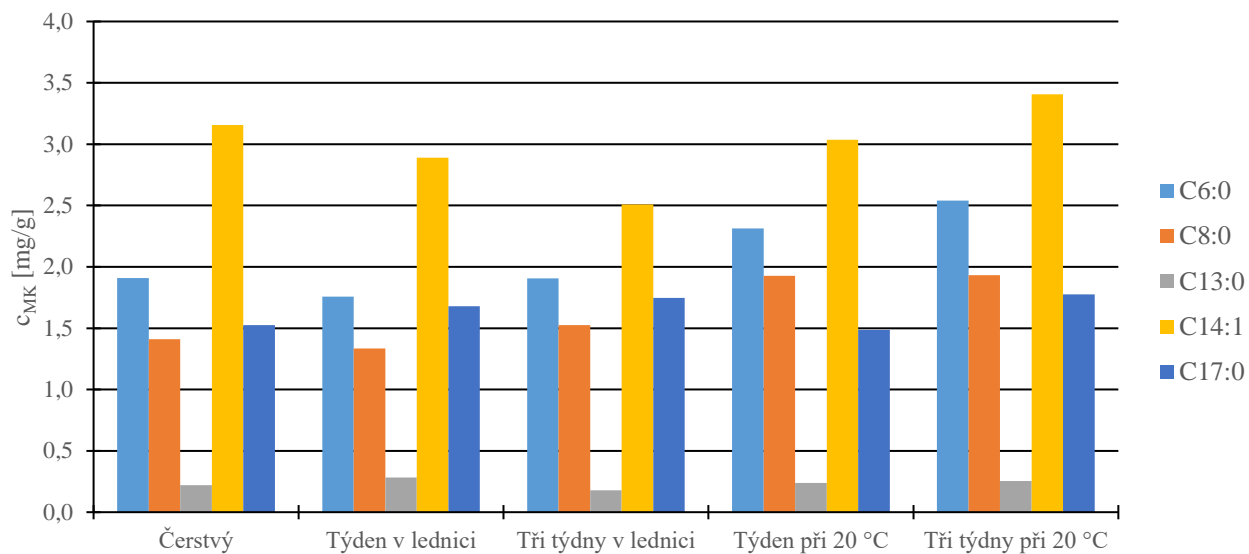
Přesné koncentrace všech identifikovaných mastných kyselin včetně směrodatné odchylky a relativní směrodatné odchylky jsou zaznamenány v tabulce 8 a znázorněny graficky v grafech 9-14.



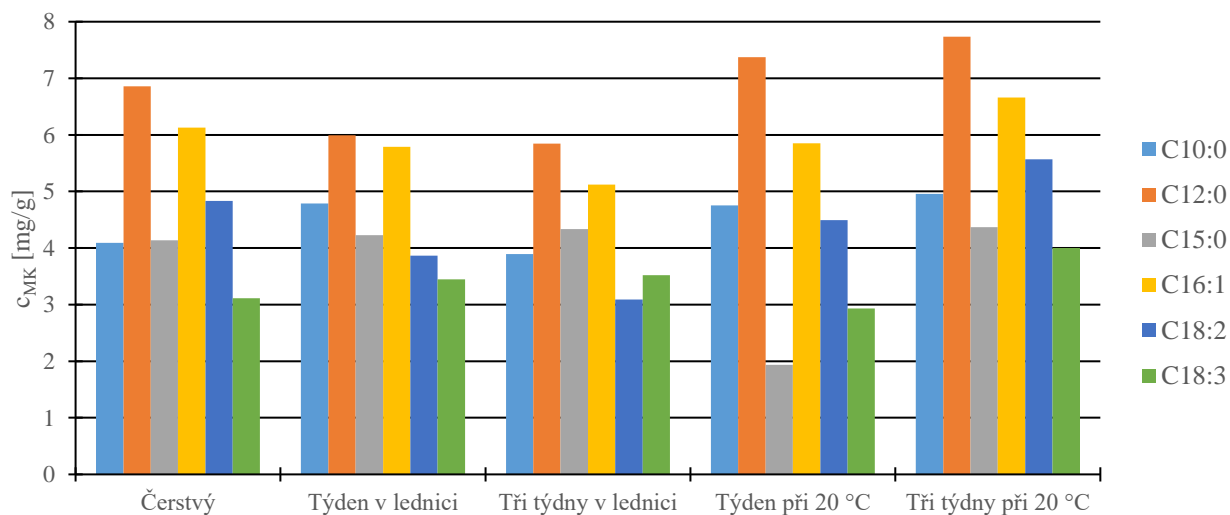
Graf 9: Srovnání celkového obsahu vázaných mastných kyselin



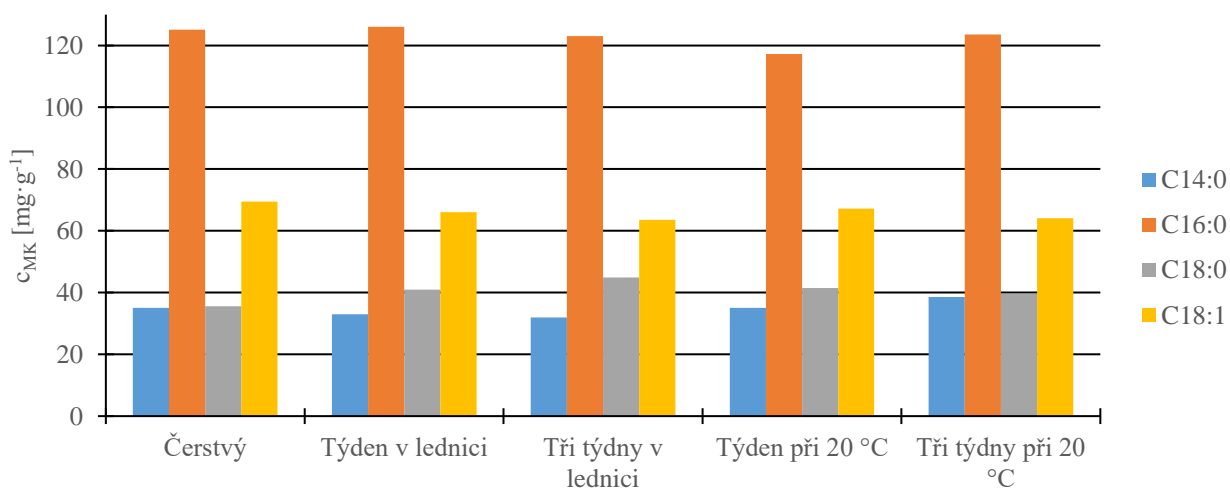
Graf 10: Srovnání obsahu nasycených, mononenasycených a polynenasycených mastných kyselin v jednotlivých vzorcích



Graf 11: Srovnání obsahu jednotlivých mastných kyselin



Graf 12: Srovnání obsahu jednotlivých mastných kyselin



Graf 13: Srovnání obsahu jednotlivých mastných kyselin

V grafu 9 vidíme, že celkový obsah vázaných mastných kyselin se markantně neměnil a pro všechny měřené sýry je koncentrace okolo $300 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$.

Celkový obsah vázaných mastných kyselin byl pro čerstvý sýr $302,57 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, pro sýr po jednom týdnu v lednici $305,41 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, pro sýr po třech týdnech v lednici $298,22 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, pro sýr po týdnu při $20 \text{ }^\circ\text{C}$ $299,80 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ a pro sýr po třech týdnech při $20 \text{ }^\circ\text{C}$ $306,33 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$.

V grafu 10 můžeme usoudit, že poměr nasycených, mononenasycených a polynenasycených vázaných mastných kyselin zůstává ve všech vzorcích přibližně stejný.

Nejvíce zastoupené vázané mastné kyseliny jsou porovnávány v grafu 8. Ve všech vzorcích opět převažovala kyselina palmitová dosahující v maximální koncentraci $126,04 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$.

Tabulka 8: Obsah jednotlivých vázaných mastných kyselin v mlékárenském typu Saint-nectaire

MK	Čerstvý			Týden v lednici			Tři týdny v lednici			Týden při 20 °C			Tři týdny při 20 °C		
	c_{MK} [mg·g ⁻¹]	směrodatná odchylka [mg·g ⁻¹]	relativní směrodatná odchylka [%]	c_{MK} [mg·g ⁻¹]	směrodatná odchylka [mg·g ⁻¹]	relativní směrodatná odchylka [%]	c_{MK} [mg·g ⁻¹]	směrodatná odchylka [mg·g ⁻¹]	relativní směrodatná odchylka [%]	c_{MK} [mg·g ⁻¹]	směrodatná odchylka [mg·g ⁻¹]	relativní směrodatná odchylka [%]	c_{MK} [mg·g ⁻¹]	směrodatná odchylka [mg·g ⁻¹]	relativní směrodatná odchylka [%]
C6:0	1,91	0,07	3,6	1,76	0,03	1,8	1,91	0,21	11,1	2,31	0,21	8,9	2,54	0,23	9,2
C8:0	1,41	0,03	2,0	1,33	0,02	1,2	1,52	0,26	17,4	1,93	0,22	11,6	1,93	0,02	1,0
C10:0	4,09	0,11	2,6	4,79	0,19	4,0	3,89	0,96	24,7	4,75	0,69	14,5	4,96	0,42	8,5
C12:0	6,86	0,10	1,5	5,99	0,01	0,1	5,85	1,15	19,6	7,37	1,13	15,4	7,73	0,51	6,6
C13:0	0,22	0,01	4,6	0,28	0,01	2,5	0,18	0,05	30,2	0,24	0,03	14,6	0,25	0,02	7,4
C14:0	35,05	0,39	1,1	32,95	0,45	1,4	31,98	8,05	25,2	35,06	5,90	16,8	38,58	3,52	9,1
C14:1	3,16	0,07	2,3	2,89	0,04	1,2	2,51	0,71	28,3	3,04	0,52	17,0	3,41	0,32	9,3
C15:0	4,14	0,07	1,6	4,23	0,01	0,2	4,33	0,97	22,5	1,93	0,69	35,7	4,37	0,42	9,7
C16:0	125,17	0,02	0,0	126,04	1,20	0,9	123,07	28,41	23,1	117,30	17,56	15,0	123,57	10,52	8,5
C16:1	6,13	0,05	0,9	5,79	0,11	1,9	5,12	1,65	32,3	5,85	0,05	0,8	6,66	0,16	2,5
C17:0	1,52	0,02	1,6	1,68	0,05	3,2	1,75	0,04	2,0	1,49	0,07	4,7	1,78	0,05	2,6
C18:0	35,54	0,40	1,1	40,94	0,78	1,9	44,88	13,93	31,0	41,46	5,31	12,8	39,66	9,46	23,9
C18:1	69,45	0,64	0,9	66,01	0,68	1,0	63,51	24,54	38,6	67,16	8,80	13,1	64,08	11,60	18,1
C18:2	4,83	0,05	1,0	3,87	0,01	0,3	3,09	0,29	9,3	4,49	0,25	5,6	2,82	0,33	11,7
C18:3	3,11	0,01	0,3	3,45	0,05	1,3	3,52	0,86	24,5	2,93	1,05	35,8	4,00	0,29	7,3
C20:0							1,10	0,01	0,7	2,48	0,01	0,4			
C20:5													0,11	0,01	5,7
C22:1				3,41	0,13	3,9									

3.3 Stanovení těkavých aromatických látek

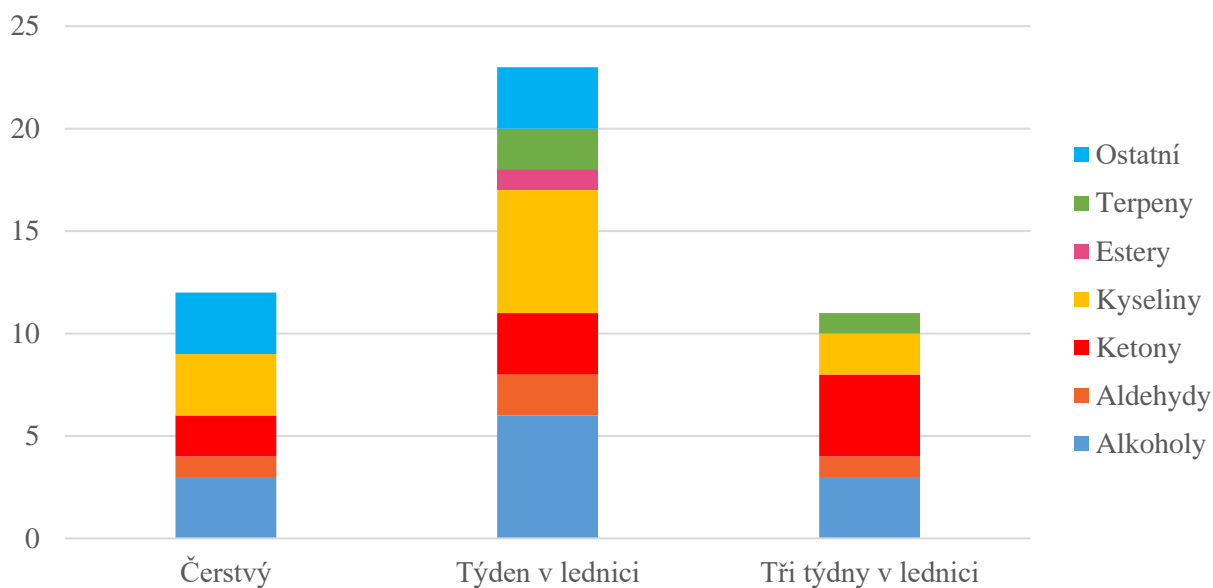
Těkavé aromatické látky byly stanoveny pomocí metody HS-SPME-GC-MS a identifikovány na základě srovnání hmotnostních spekter s dostupnou knihovnou spekter. Při identifikaci byly brány v úvahu pouze sloučeniny s faktorem shody vyšším než 800. Obsah je vyjádřen semikvantitativně pomocí procentuálního zastoupení ploch příslušných píků na chromatogramu. Každý vzorek byl měřen dvakrát.

Bylo změřeno celkem pět vzorků sýrů La petit Saint-nectaire: čerstvý, skladovaný týden a tři týdny v lednici a skladovaný týden a tři týdny při 20 °C.

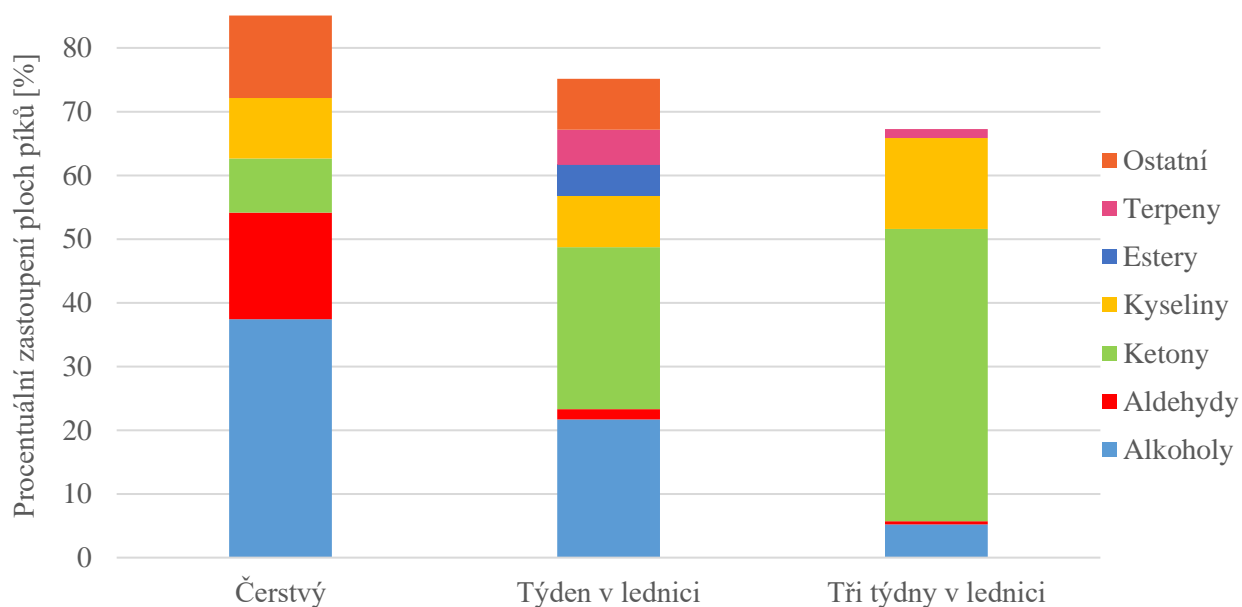
Přehled identifikovaných sloučenin je uveden v tabulkách 9 a 10, graficky znázorněn v grafech 15-18.

Tabulka 9: Aromatické látky identifikované v sýru čerstvém a skladovaném týden a tři týdny v lednici

Název	Skupina	Čerstvý		Týden v lednici		Tři týdny v lednici		Zdroj
		Rt	%plocha	Rt	%plocha	Rt	%plocha	
acetylaceton	aldehyd	5,64	16,76	5,63	1,47			[67]
2-kyanoacetamid	ostatní			6,53	0,86			
dimethyldisulfid	ostatní	8,53	10,58					
dekamethylcyklopentasiloxan	ostatní	10,76	1,40	10,76	0,63			
heptan-2-on	keton	12,66	5,17	12,66	11,81	12,66	27,31	[72]
D-limonen	terpen			13,00	4,31	13,10	1,37	[68]
L-limonen	terpen			13,31	1,20			[68]
pentanol/amyalkohol	alkohol					13,78	1,70	[67]
isoamylalkohol	alkohol	13,86	28,37	13,82	11,80			[72]
kyselina propionová	kyselina			16,09	0,48			[69]
2,4-dithiapentan	ostatní	17,17	0,95	17,15	6,49			
heptan-2-ol	alkohol	18,58	0,32	18,56	6,10	18,54	1,67	[69]
nonan-2-on	keton	21,45	3,33	21,46	12,35	21,46	15,82	[72]
non-8-en-2-on	keton			23,81	1,24	23,81	2,66	[67]
kyselina octová	kyselina			24,90	0,74			[70]
2-ethylhexanol	alkohol			25,74	0,88			[72]
nonan-2-ol	alkohol			27,06	1,47			[72]
batan-2,3-diol	alkohol			28,27	0,80			
kyselina isomáselná	kyselina	30,65	1,08	30,48	1,29	30,45	1,50	[69]
kyselina máselná	kyselina	38,15	8,01	34,82	2,17	37,92	12,81	[69]
2-methyl oktanoát	ester			35,54	4,87			[69]
fenylaceton	keton					40,71	0,08	
formamid	aldehyd					44,53	0,50	
kyselina mléčná	kyselina	44,67	0,40					[71]
kyselina kapronová	kyselina			47,72	2,86			[67]
2-fenylethylalkohol	alkohol	50,10	8,71	50,06	0,66	50,03	1,83	[72]
hexylcinnamaldehyd	aldehyd			54,92	0,13			
kyselina kaprylová	kyselina			56,15	0,53			[67]



Graf 14: Srovnání počtu (na ose y) identifikovaných látek jednotlivých skupin

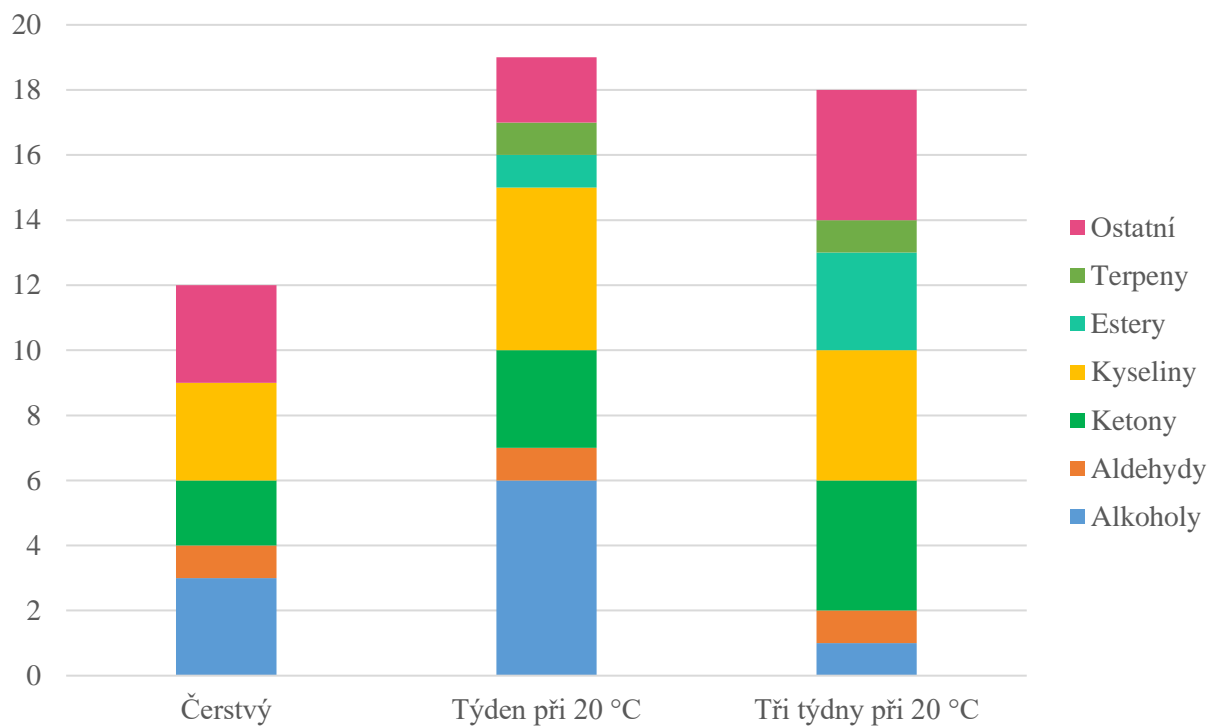


Graf 15: Srovnání procentuální plochy píku jednotlivých skupin ve vzorcích

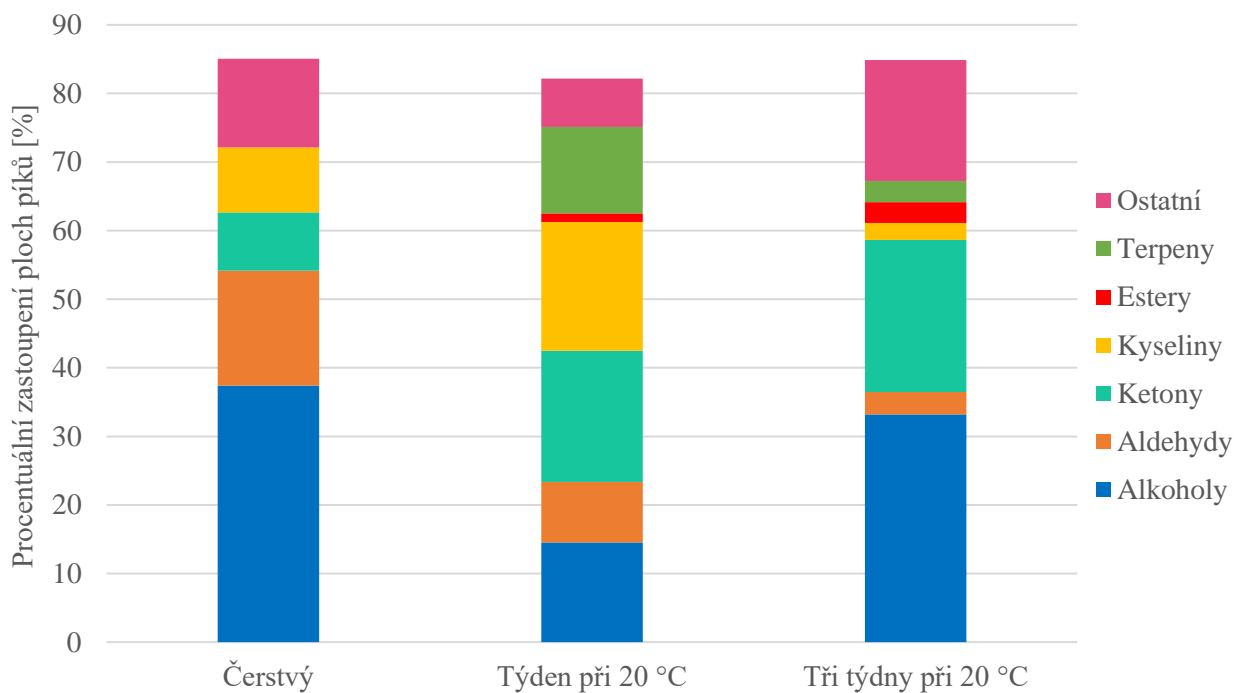
Byla stanovena procentuální plocha píku (z plochy všech označených píků), díky tomuto údaji můžeme semikvantitativně určit množství přítomné těkavé látky. U sýru čerstvého největší část tvořily alkoholy zabírající 37,4 % celkové plochy píků. U sýru po týdnu skladování v lednici téměř vyrovnaně dominovaly alkoholy s 21,71 % a ketony s 25,4 %. Po třech týdnech v lednici tvořily alkoholy menšinu a naprosto převládly ketony s 45,87 % celkové plochy píků.

Tabulka 10: Aromatické látky identifikované v sýru čerstvém a skladovaném týden a tři týdny při 20 °C

Název	Skupina	Čerstvý		Týden při 20 °C		Tři týdny při 20 °C		Zdroje
		Rt [s]	% plocha	Rt [s]	% plocha	Rt [s]	% plocha	
3-methylbutanal	aldehyd					4,27	3,84	[70]
ethanol	alkohol					4,65	6,52	[72]
acetylaceton	aldehyd	5,64	16,76	5,61	8,84	5,62	3,26	[67]
trimethylsilanol	ostatní					6,95	0,53	
buthylether	ester					7,30	1,93	[72]
dimethyl disulfid	ostatní	8,53	10,58			8,51	16,25	
isoamyl acetát	ester					10,18	0,39	
3-methyl-butan-2-ol	alkohol			10,49	3,38			[70]
dekamethylcyklopentasiloxan	ostatní	10,76	1,40					
heptylcyklohexan	ostatní			11,86	0,57			
heptan-2-on	keton	12,66	5,17	12,63	12,40	12,63	9,94	[70]
D-limonen	terpen			12,92	12,57	12,94	3,05	[68]
pentanol/amyalkohol	alkohol			13,85	5,06			[67]
isoamylalkohol	alkohol	13,86	28,37					[72]
ethyl kapronát	ester					14,76	0,71	[72]
2,4-dithiapentan	ostaní	17,17	0,95	17,12	6,50	17,13	0,31	
heptan-2-ol	alkohol	18,58	0,32	18,56	3,19	18,55	1,89	[70]
dimethyl trisulfid	ostaní					21,09	0,56	
nonan-2-on	keton	21,45	3,33	21,42	6,53	21,43	10,48	[70]
non-8-en-2-on	keton					23,77	1,29	[67]
kyselina octová	kyselina			24,87	1,78			[70]
nonan-2-ol	alkohol			27,03	0,56	27,03	0,51	[72]
kyselina isomáselná	kyselina	30,65	1,08	30,49	1,30	30,47	0,10	[69]
udekan-2-on	keton					31,37	0,43	[72]
methyl ester kyseliny oktytové	ester			35,51	1,28			
kyselina isovalerová	kyselina			37,93	14,20	37,96	1,43	[70]
kyselina máselná	kyselina	38,15	8,01	34,84	0,90	34,82	0,36	[69]
2-methyl oktanoát	ester							[69]
fenylaceton	keton			40,71	0,20			
kyselina mléčná	kyselina	44,67	0,40					[71]
kyselina kapronová	kyselina							[67]
kyselina valerová	kyselina			47,73	0,59	47,92	0,62	[71]
2-fenylethylalkohol	alkohol	50,10	8,71	50,04	0,82	50,04	3,86	[72]
hexylcinnamaldehyd	aldehyd							
kyselina kaprylová	kyselina							[67]
fenol	alkohol			54,10	1,50	54,09	16,60	[72]



Graf 16: Srovnání počtu (na ose y) identifikovaných látek jednotlivých skupin



Graf 17: Srovnání procentuální plochy píku jednotlivých skupin ve vzorcích

Po týdny skladování při 20 °C (viz graf 18) klesl obsah alkoholů na 14,51 % (oproti 37,4 % u sýru čerstvého) a narostl obsah ketonů na 19,13 % a kyselin na 18,77 %, jejich obsah byl v tomto vzorku celkově nejvyšší. U sýru skladovaného tři týdny při 20 °C opět vzrostl obsah alkoholů na 33,22 %, jak ale můžeme vidět v tabulce 10, ve většině případů se jednalo především o alkoholy, které v čerstvém sýru nebyly identifikovány. Druhou nejzastoupenější skupinou u tohoto vzorku byly ketony s 22,14 %.

Kompletní přehled chemických skupin identifikovaných sloučenin je znázorněn v tabulce 11.

Maximální počet identifikovaných těkavých látek bylo v sýru po třech týdnech při 20 °C a v sýru po týdnu v lednici, a to 23. V sýru po týdnu při 20 °C bylo identifikováno 19 těkavých látek, v sýru čerstvém 12 a v sýru po třech týdnech v lednici bylo identifikováno nejméně těkavých látek, konkrétně 11.

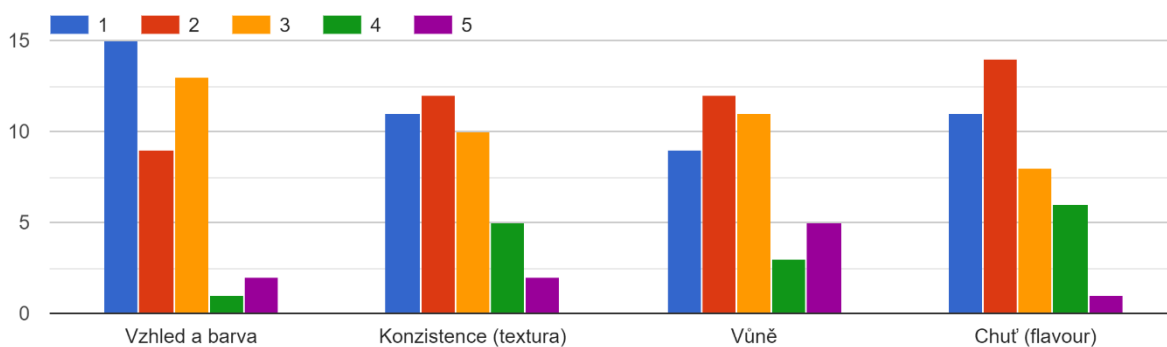
Tabulka 11: Záznam počtu identifikovaných látek z jednotlivých skupin a jejich procentuální zastoupení (kde 100 % je plocha všech označených píků).

	Čerstvý		Týden v lednici		Tři týdny v lednici		Týden při 20 °C		Tři týdny při 20 °C	
	počet	%plocha	počet	%plocha	počet	%plocha	počet	%plocha	počet	%plocha
alkohol	3	37,40	6	21,71	3	5,20	6	14,51	6	33,22
aldehyd	1	16,76	2	1,60	1	0,50	1	8,84	1	3,26
keton	2	8,50	3	25,40	4	45,87	3	19,13	4	22,14
kyselina	3	9,49	6	8,07	2	14,31	1	12,57	1	3,05
ester			1	4,87			1	1,28	3	3,03
terpen			2	5,51	1	1,37	5	18,77	4	2,51
ostatní	3	12,93	3	7,98			2	7,07	4	17,65

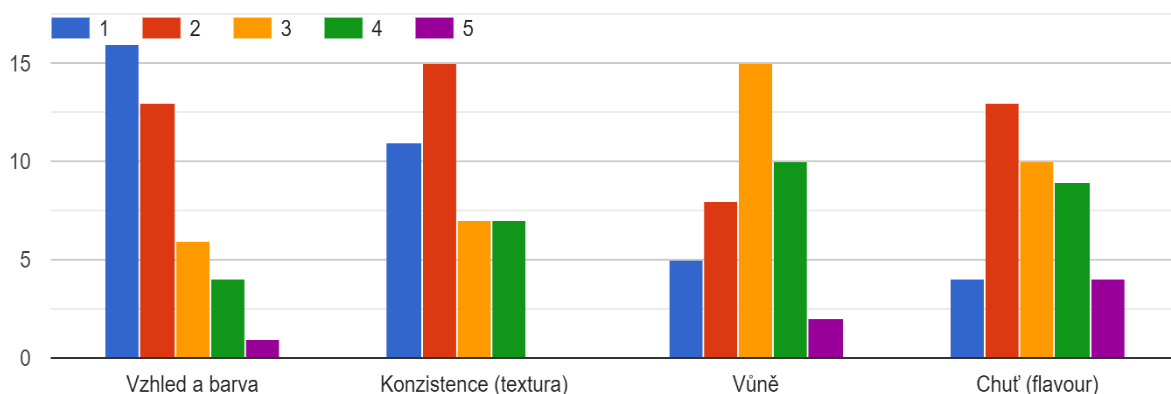
Identifikované těkavé látky byly porovnány s články používající metodu HS-SPME-GC-MS na jiných druzích sýrů. Nejbližším příbuzným je sýr Cantal pocházející také z oblasti Auvergne [67-70]. Pro další srovnání byl vybrán portugalský sýr Queijo de Azeitão, který má podobné těsto jako Saint-nectaire a jako poslední sýr Red-Veined [71, 72].

3.4 Senzorická analýza

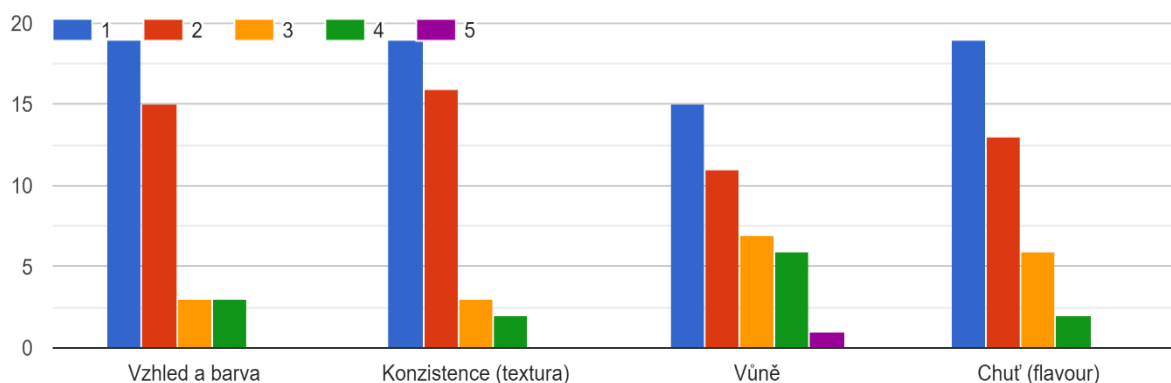
Hodnotitelé vyplňovali své hodnocení do online formulářů Google Forms, kde automaticky došlo i k vyhodnocení dat a tvorbě grafů. Hodnotily se vzhled a barva, konzistence, vůně a chuť (flavour) nejprve jednotlivých vzorků na bodové stupnici 1 ⇒ 5 (nejlepší ⇒ nejhorší vzorek). Po vyřazení sýrů kontaminovaných patogenními organismy byly hodnoceny pouze tři vzorky: Sýr čerstvý a skladovaný v lednici týden a tři týdny.



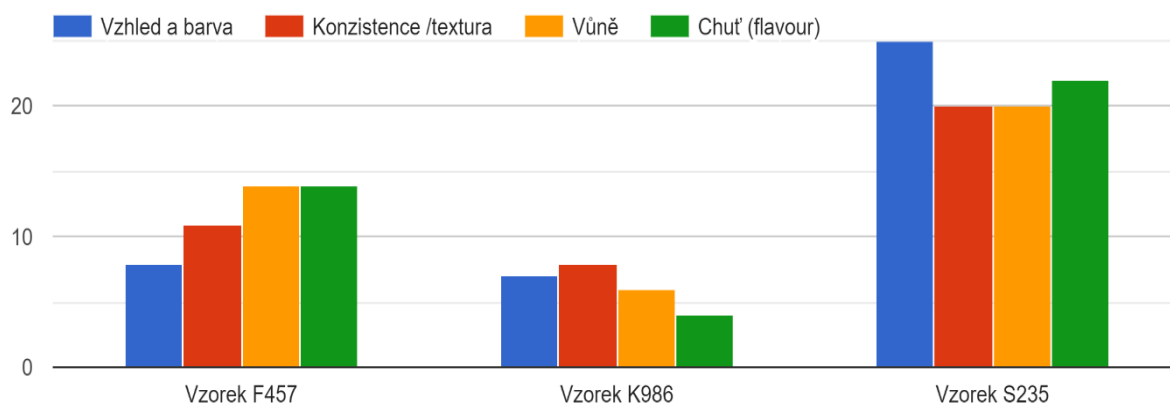
Obrázek 12: Hodnocení jednotlivých aspektů čerstvého sýru, na ose y je zaznamenána četnost hodnocení na bodové stupnici 1 ⇒ 5 (nejlepší ⇒ nejhorší vzorek)



Obrázek 13: Hodnocení jednotlivých aspektů sýru skladovaného jeden týden v lednici, na ose y je zaznamenána četnost hodnocení na bodové stupnici 1 ⇒ 5 (nejlepší ⇒ nejhorší vzorek)



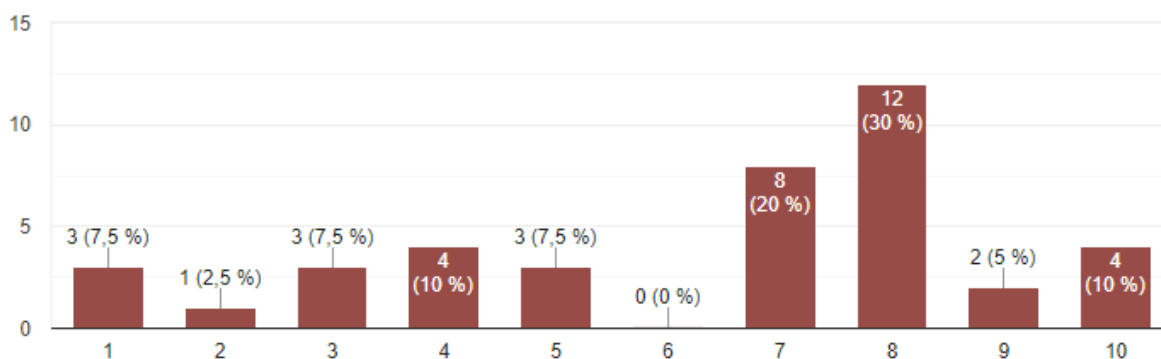
Obrázek 14: Hodnocení jednotlivých aspektů sýru skladovaného tři týdny v lednici, na ose y je zaznamenána četnost hodnocení na bodové stupnici 1 ⇒ 5 (nejlepší ⇒ nejhorší vzorek)



Obrázek 15: Vyhodnocení nejlepšího vzorku pro jednotlivé hodnocené aspekty, vzorek F457 je sýr čerstvý, K986 po týdnu skladování v lednici a S235 po třech týdnech skladování v lednici

Pro jednoduché srovnání skóre jednotlivých sýrů byla provedena suma celkového hodnocení všech hodnocených parametrů. Jelikož nejlepší hodnocení mělo hodnotu 1, znamená nižší skóre lepší výsledek. Celková suma pro čerstvý sýr byla 376, pro sýr skladovaný týden v lednici 403 a pro sýr po třech týdnech v lednici 296. Nejlépe tedy dopadl tři týdny skladovaný sýr.

Toto hodnocení se dále potvrdilo při posledním hodnocení (viz. obrázek 15), kde byl pro jednotlivé parametry vybírán nejlepší vzorek sýra a tři týdny skladovaný sýr byl nejčastěji označován jako nejlepší, poté sýr čerstvý a jako poslední sýr skladovaný týden v lednici.



Obrázek 16: Oblíbenost plísňových sýrů, průměrná oblíbenost plísňových sýrů byla 6,375 na stupnici od 1 do 10 (1 bylo nejméně a 10 nejvíce)

4 ZÁVĚR

První částí práce bylo srovnání mikrobiálního složení mezi farmářským a mlékárenským typem sýru Saint-nectaire a dále srovnání množství přítomných mikroorganismů v závislosti na době a teplotě skladování. Pro tuto analýzu byla pomocí kitu izolována DNA z pěti exemplářů mlékárenského typu La petit Saint-nectaire: čerstvého, skladovaného v lednici po dobu jednoho a tří týdnů a skladovaného při 20 °C po dobu jednoho a tří týdnů. Dále z farmářského typu Saint-nectaire: čerstvého a po třech týdnech skladování v lednici.

Zvolené mikroorganismy (viz. tabulka 1) byly identifikovány pomocí RT-PCR a díky záznamu nárůstu fluorescence a tím získaným Ct časům bylo porovnáno množství DNA jednotlivých mikroorganismů v původních vzorcích.

Z naměřených dat vyplývá, že nejvyšší obsah mikroorganismů je v sýru ihned po koupi. Výjimkou je *Streptococcus thermophilus*, u kterého bylo detekováno větší množství u sýru skladovaných v lednici než u sýru čerstvého.

Při skladování při 20 °C je situace podobná, zvyšuje se ale obsah mikroorganismů *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Cladosporium herbarum* a *Penicillium commune*. Již po prvním týdnu se objevily některé kontaminanty *Micrococcus luteus* a patogenní organismy *Salmonella enterica* a *Staphylococcus aureus*. Ve třetím týdny mimo lednici jsme poté detekovali ve vzorku i patogen *Listeria monocytogenes*.

Z výsledků je patrné, že ani jeden ze způsobů skladování není pro vývoj mikroorganismů ideální. Udávanou teplotou pro vhodné skladování jsou 4 °C (přibližně odpovídající teplotě v lednici), které jsou standartní teplotou pro uchovávání mléčných výrobků. Z technologie výroby Saint-nectaire víme, že zrání probíhá při 8-12 °C, což by byla pravděpodobně ideální teplota skladování.

Ze senzorké analýzy ale vyplývá, že obsah mikroorganismů se významně nepodepisuje na senzorkých vlastnostech sýru. Nejlépe hodnoceným sýrem byl sýr po třech týdnech skladování v lednici, který dosahoval středních hodnot při porovnávání obsahu mikroorganismů.

Rozdíl v mikrobiálním složení mezi mlékárenským a farmářským typem je patrný na první pohled. Z vybraných mikroorganismů byly *Penicillium roqueforti* a *fuscoglaucum* identifikovány pouze u farmářského typu. Dále je pravděpodobné, že u farmářského typu nebyl přítomen *Brevibacterium linens*, který byl identifikován v malém množství až po třech týdnech skladování. Jeho přítomnost ale může být způsobena skladováním s mlékárenským typem. Stejným způsobem mohlo dojít ke kontaminaci *Cladosporium herbarum*.

Po třech týdnech se u farmářského typu jako u jediného ze vzorků v lednici objevil kontaminant *Micrococcus luteus*, což může být způsobeno výrobou z nepasterizovaného mléka.

Celkově se množství identifikovaných mikroorganismů v jednotlivých typech výrazně nelišil. Dle zdrojů 17 a 20 by měla být výrazná šedá barva připisována kvasinkové houbě *Geotrichum candidum*. Ta ale nebyla ve farmářském druhu přítomna ve větším množství než v mlékárenském. Za šedou barvu tedy pravděpodobně zodpovídají jiné mikroorganismy, které nebyly vybrány pro tuto analýzu.

Důležitý vliv na sensorické vlastnosti sýru mají mastné kyseliny. V této části byl porovnáván obsah volných a vázaných mastných kyselin v sýru La petit Saint-nectaire: čerstvého, skladovaného v lednici po dobu jednoho a tří týdnů a skladovaného při 20 °C po dobu jednoho a tří týdnů. V první řadě byl vyextrahován tuk ze vzorku sýra, ze kterého byly dále pomocí esterifikace získané methylestery. Jejich složení bylo změřeno pomocí GC-FID.

Obsah vázaných mastných kyselin se během skladování významně neměnil a byl srovnatelný u všech měřených vzorků (přibližně 300 mg·g⁻¹). Obsah volných mastných kyselin s časem skladování vzrůstal, vyšší obsah byl naměřen u sýrů skladovaných při 20 °C. Nejvyšší obsah volných mastných kyselin byl naměřen u sýru po třech týdnech skladování při 20 °C s hodnotou 103,05 mg mastných kyselin na 1 g vzorku.

Poměr nasycených, mononenasycených a polynenasycených mastných kyselin zůstal ve všech případech velmi podobný.

Nejvíce zastoupenou mastnou kyselinou (u vázaných i volných) ve všech vzorcích byla kyselina palmitová dosahující ve vázané formě 126,04 mg·g⁻¹ a ve volné 41,87 mg·g⁻¹.

Senzorické analýze byly podrobeny jen vzorky sýru z lednice, u kterých byl zřetelný vývoj volných mastných kyselin (postupně stoupající obsah). Dalo by se tedy předpokládat, že sensorické hodnocení bude mít s časem skladování stoupající nebo klesající tendenci ale nemělo. Obsah mastných kyselin pravděpodobně nebyl nejdůležitějším parametrem ovlivňujícím výsledné sensorické vlastnosti sýrů.

Poslední částí této práce bylo stanovení těkavých látek, které významně ovlivňují sensorické vlastnosti daného pokrmu. Těkavé látky byly stanoveny pomocí SPME-GC-MS z pěti vzorků La petit Saint-nectaire: čerstvého, skladovaného v lednici po dobu jednoho a tří týdnů a skladovaného při 20 °C po dobu jednoho a tří týdnů.

Nejzastoupenějšími skupinami byly alkoholy, ketony a u sýru týden skladovaného mimo lednici kyseliny.

U sýrů skladovaných v lednici (které byly předmětem sensorické analýzy) došlo k výrazné změně u skupin alkoholy, aldehydy a ketony. U čerstvého sýru byla absolutně nejzastoupenější skupina alkoholů a dále aldehydů. Po týdnu skladování klesá obsah alkoholů i aldehydů a výrazně stoupá obsah ketonů. Po třech týdnech skladování jsou nejzastoupenější skupinou ketony a druhou kyseliny.

I přesto, že složení a množství těkavých látek se u čerstvého a tří týdnů skladovaného sýra výrazně liší, byly hodnotiteli vyhodnoceny jako sensoricky podobně příjemné, zatímco týden skladovaný sýr, který je téměř průměrem ostatních vzorků byl vyhodnocen jako sensoricky nejméně přívětivý.

Výstupem spojení sensorické analýzy s ostatními měřeními je, že i přes naměřená data a předpokládané trendy je mnoho dalších parametrů, které zodpovídají za celkový dojem z potravin a sensorické hodnocení, obzvláště neškoleného panelu, je tedy vzhledem k výsledkům analýz zcela subjektivní.

5 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Vyhláška č. 397/2016 Sb., o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje.
- [2] ČEPIČKA, Jaroslav. *Obecná potravinářská technologie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1995. ISBN 80-7080-239-1.
- [3] KADLEC, Pavel, Karel MELZOCH a Michal VOLDŘICH. *Co byste měli vědět o výrobě potravin: technologie potravin*. Ostrava: KeyPublishing, 2009. Monografie (KeyPublishing). ISBN 978-80-7418-051-4.
- [4] JANŠTOVÁ, Bohumíra a Pavlína NAVRÁTILOVÁ, 2014. *Produkce mléka a technologie mléčných výrobků*. Brno: VFU Brno. ISBN 978-80-7305-712-1.
- [5] KADLEC, Pavel, Karel MELZOCH a Michal VOLDŘICH, 2012. *Přehled tradičních potravinářských výrob: technologie potravin*. Ostrava: KeyPublishing. Monografie (KeyPublishing). ISBN 978-80-7418-145-0.
- [6] KAMENÍK, Josef, Bohumíra JANŠTOVÁ a Alena SALÁKOVÁ. *Technologie a hygiena potravin živočišného původu*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-722-0.
- [7] FOX, Patrick, Paul McSWEENEY, Timothy COGAN a Timothy GUINEE. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Third edition - Volume 1: General Aspects*. Amsterdam: London Elsevier, 2004a. ISBN 0-1226-3651-1.
- [8] HASSAN, F. A. M., M. A.M. ABD EL-GAWAD a A.K. ENAB. *Flavour compounds in cheese (review)*. *International Journal of Academic Research*. 2012, vol. 4, no. 5, pp. 169-181. ISSN 20754124. DOI: 10.7813/2075-4124.2012/4-5/A.20.
- [9] GÖRNER, Fridrich a Ľubomír 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. ISBN 80-967064-9-7.
- [10] VELÍŠEK, J. a J. HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin. I. Rozš. a přeprac. 3. vyd.* Tábor: OSSIS, 2009, xxii, 580 s. ISBN 9788086659176.
- [11] DRDÁK, M., J. STUDENICKÝ, E. MÓROVÁ a J. KAROVIČOVÁ. *Základy potravinářských technologií: spracovanie rastlinných a živočišných surovín cereálne a fermentačné technológie uchovávanie, hygiena a ekológia potravín*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 1996. ISBN 8096706411.
- [12] *Oficiální webová stránka Interprofession du fromage AOP Saint-nectaire (meziprofesionální organizace pro sýr CHOP Saint-nectaire)*. Dostupný z: <https://www.aop-saintnectaire.com/>
- [13] MARCELLINO, S N, and D R Benson. "Scanning electron and light microscopic study of microbial succession on bethlehem st. Nectaire cheese." *Applied and environmental microbiology* vol. 58,11 (1992): 3448-54. doi:10.1128/aem.58.11.3448-3454.1992
- [14] GRIPON, J. C. 1987. *Mould-ripened cheeses*, p. 121-149. In P. F. Fox (ed.), *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. Elsevier Applied Science, New York.

- [15] DELBES, Céline et al. "Monitoring bacterial communities in raw milk and cheese by culture-dependent and independent 16S rRNA gene-based analyses." *Applied and environmental microbiology* vol. 73,6 (2007): 1882-91. doi:10.1128/AEM.01716-06
- [16] MONTEL, Marie-Christine, Solange Buchin, Adrien Mallet, Céline Delbes-Paus, Dominique A. Vuitton, Nathalie Desmasures, Françoise Berthier, Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits, *International Journal of Food Microbiology*, Volume 177, 2014, Pages 136-154, ISSN 0168-1605, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019>.
- [17] DALE, G. 1972. Moisissures et levures de la flore du fromage de Saint-Nectaire. *Rev. Lait. Fran. (Ind. Lait)* 296:199-203.
- [18] SCHMIDT, J. L., and J. Lenoir. 1978. Contribution à l'étude de la flore levure du fromage de Camembert. Son évolution au cours de la maturation. *Lait* 58:355-370.
- [19] VERGEADE, J., J. Guiraud, J. P. Larpent, and P. Galzy. 1976. Etude de la flore de levure du Saint-Nectaire. *Lait* 56:275-285
- [20] GUEGUEN, M., and J. Lenoir. 1975. Aptitude de l'espèce *Geotrichum candidum* à la production d'enzymes protéolytiques. *Lait* 55:145-162.
- [21] LE QUÉRÉ, J.-L. Cheese flavour: Instrumental techniques. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 2006, vol. 1, pp. 489-510.
- [22] KUBÁŇ, V. *Analýza potravin*. 1. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007. 202 s. ISBN 978-80-7375-036-7.
- [23] DELGADO, F. J., et al. Characterisation by SPME–GC–MS of the volatile profile of a Spanish soft cheese P.D.O. Torta del Casar during ripening. *Food Chemistry*. 1 January 2010, vol. 118, no. 1, pp. 182-189. ISSN 0308-8146.
- [24] CURIONI, P.M.G., BOSSET, J.O. Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *International Dairy Journal*. 2002, vol. 12, no. 12, pp. 959-984. ISSN 0958-6946
- [25] ALEWIJN, M., SLIWINSKI, F. L., WOUTERS, J. T. M. Production of fat-derived (flavour) compounds during the ripening of Gouda cheese. *International Dairy Journal*, 2005, vol. 15, no. 6-9, pp. 733-740.
- [26] PANSERI, S., et al. Determination of flavour compounds in a mountain cheese by headspace sorptive extraction-thermal desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry. *LWT - Food Science and Technology*. March 2008, vol. 41, no. 2, pp. 185-192. ISSN 0023-6438.
- [27] DIRINCK, P. a A. DE WINNE. Flavour characterisation and classification of cheeses by gas chromatographic–mass spectrometric profiling. *Journal of Chromatography A*. Elsevier B.V, 1999, vol. 847, no. 1, pp. 203-208. ISSN 00219673. DOI: 10.1016/S0021-9673(99)00193-4.

- [28] COLLINS, Y. F., P. L. H., MCSWEENEY a M.G. WILKINSON. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal*. 2003, vol. 13, no. 11, pp. 841-866. ISSN 09586946. DOI: 10.1016/S0958-6946(03)00109-2.
- [29] JAILLAIS, B., BERTRAND, V., AUGER, J. Cryo-trapping: SPME: GC analysis of cheese aroma. *Talanta*, 1999, vol. 48, no. 4, pp. 747-753.
- [30] TARREGA, A., YVEN, C., SÉMON, E., SALLES, C. Aroma release and chewing activity during eating different model cheeses. *International Dairy Journal*, vol. 18, no. 8, pp. 849-857.
- [31] MARILLEY, L., CASEY, M. G. Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology*. 15 January 2005, vol. 90, no. 2, pp. 139-159. ISSN 0168-1605.
- [32] ODSTRČIL, Jaroslav. *Biochemie*. Vyd. 2., upr. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2005. ISBN 80-7013-425-9. Dostupné z: <http://www.digitalniknihovna.cz/mzk/uuid/uuid:cabb5600-38d2-11e4-8e0d-005056827e51>
- [33] MATHEWS, Christopher K. *Biochemistry*. 4th ed. Toronto: Pearson, c2013. ISBN 978-0-13-800464-4.
- [34] KOOLMAN, J. a K.-H. RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0
- [35] MCMURRY, J. *Organická chemie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, nakladatelství VUTIUM, 2015. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 978-80-7080-930-3.
- [36] HOLM, T. Aspects of the mechanism of the flame ionization detector. *Journal of Chromatography A*. 1999, 842(1-2), 221-227. DOI: 10.1016/S0021-9673(98)00706-7. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967398007067>
- [37] MANNION, David T, Ambrose FUREY a Kieran N KILCAWLEY. Free fatty acids quantification in dairy products. *Society of Dairy Technology* [online]. 2016, 2016(69) DOI: 10.1111/1471-0307.12301. ISSN 1471-0307. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1471-0307.12301/pdf>
- [38] KARLÍČEK, R. a kol.: *Analytická chemie pro farmaceuty*. Praha: Karolinum, 2005. 281 s. ISBN 80-246-0348-9.
- [39] SKOOG, D. A. *Analytická chemie*. VŠCHT Praha (1. vydání, 2019), ISBN 978-80-7592-043-0
- [40] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 9788086369075.
- [41] SHELLIE, R.A. Gas Chromatography. *Encyclopedia of Forensic Sciences* [online]. Austrálie: Elsevier, 2013, 2013, s. 579-585. ISBN 9780123821669. DOI: 10.1016/B978-0-12-382165-2.00245-2
- [42] OPEKAR, František et al. *Základní analytická chemie*. 1. vyd. Univerzita Karlova v Praze: Nakladatelství Karolinum, 2002, 201 s. ISBN 80-246-0553-8.
- [43] FIFIELD, F a D KEALEY. *Principles and Practice of Analytical Chemistry*. 4th Ed. London: Blackie Academic and Professional, 1995, 560 s. ISBN 07-514-0226-5.

- [44] ŠTULÍK, K. a kol.: Analytické separační metody. Praha: Karolinum, 2004. 264 s. ISBN 80-246-0852-9.
- [45] MCNAIR, Harold Monroe a James M. MILLER. Basic gas chromatography. 2nd ed. Hoboken, N. J.: John Wiley, 2009. ISBN 978-047-0439-548. <https://toaz.info/doc-view>
- [46] HOLM, T. Aspects of the mechanism of the flame ionization detector. *Journal of Chromatography A*. 1999, 842(1-2), 221-227. DOI: 10.1016/S0021-9673(98)00706-7. ISSN 00219673. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967398007067>
- [47] NOLLET, L. M. Chromatographic analysis of the environment. 3rd ed. /. Boca Raton: CRC/Taylor, 2006, xx, 1297 p. Chromatographic science, v. 93. ISBN 08-247-2629-4.
- [48] TRANCHIDA, Peter Q, 2020. *Advanced Gas Chromatography in Food Analysis* [online]. Food Chemistry, Function and Analysis No 17. United Kingdom: The Royal Society of Chemistry. ISBN 978-1-78801-575-2. Dostupné z: <https://books.google.sk/books?id=cB-7DwAAQBAJ&pg=PA434&dq=spme%20gcms&hl=sk&sa=X&ved=0ahUKEwjuz-nD3M7nAhUgysQBHXmOCIEQ6AEIVDAE&fbclid=IwAR27ZCFKOYal9Uwh0tnOngySzff1ZM24QpYKivUFdx4gHAtPfGsm05VWo8w#v=onepage&q&f=true>
- [49] PAWLISZYN, J. *Solid phase microextraction: theory and practice*. [online]. 1997, vol 2, no. 4, pp. 1-7. Dostupný z: https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=314NFMn6WQ8C&oi=fnd&pg=PA1&dq=Pawliszyn,+J.+Solid+phase+microextraction:+theory+and+practice.+%5Bonline%5D.&ots=_BIHnsoqAJ&sig=wnKDv9rsCsbTcqPDHTtmlBqS3hA&redir_esc=y#v=onepage&q=Pawliszyn%2C%20J.%20Solid%20phase%20microextraction%3A%20theory%20and%20practice.%20%5Bonline%5D.&f=false
- [50] LORD, Heather a Janusz PAWLISZYN, 2000. Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A* [online]. **885**(1-2), 153-193. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00535-5. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967300005355>
- [51] ZÁRUBA, Kamil. Analytická chemie. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2016. ISBN 978-80-7080-950-1.
- [52] VOLKA, Karel. Analytická chemie I. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1995. ISBN 80-7080-245-6.
- [53] VILJOEN, Gerrit J., L. H. NEL a J. R. CROWTHER. Molecular diagnostic PCR handbook. Dordrecht: Springer, c2005. ISBN 978-1-4020-3403-9.
- [54] MURRAY, R. K. Harper's illustrated biochemistry. 26th ed. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill, c2003. Lange medical book. ISBN 00-713-8901-6.
- [55] ŠPANOVÁ, A., RITTICH, B. Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie. 1. vyd. Brno: VUT v Brně, Fakulta chemická, 2010. 86 s. ISBN 978-80.214-4004-3
- [56] RYCHLIK W., SPENCER W.J., RHOADS R.E. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic acids research* 1990;18:6409-12.

- [57] LORENZ, TC. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Vis Exp.* 2012;(63):e3998. Published 2012 May 22. doi:10.3791/3998
- [58] ŠMARDÁ, Jan. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3841-1.
- [59] NAVARRO, E., G. SERRANO-HERAS, M.J. CASTAÑO a J. SOLERA. Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta* [online]. Elsevier B.V, 2015, 439, 231-250. DOI: 10.1016/j.cca.2014.10.017. ISSN 0009-8981. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898114004483>
- [60] HJELMSOE, Mathis, Lars HANSEN, Jacob BAELUM, Louise FELD, William HOLBEN, Carsten JACOBSEN a Mathis HJELMSOE. High-Resolution Melt Analysis for Rapid Comparison of Bacterial Community Compositions. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2014, 80(12), 3568-3575. DOI: 10.1128/AEM.03923-13. ISSN 0099-2240.
- [61] SIBLEY, C. D., G. PEIRANO a D. L. CHURCH. Molecular methods for pathogen and microbial community detection and characterization: Current and potential application in diagnostic microbiology. *Infection, Genetics and Evolution.* 2012, roč. 12, č. 3, s. 505-521. ISSN 15671348.
- [62] DRUML, B. et al. High resolution melting (HRM) analysis of DNA – Its role and potential in food analysis. *Food Chemistry.* [online] 2014. 158, 245-254. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.02.111. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614002969>
- [63] WITTEWERT, T. C. et al. High-Resolution Genotyping by Amplicon Melting Analysis Using LCGreen. *Clinical Chemistry* 49:6 853–860 (2003), [online]. *Molecular Diagnostics and Genetics.* Dostupné z: <http://hrm-dyes.gene-quantification.info/>
- [64] SAMBROOK J., RUSSEL D. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* 3rd ed.: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001.
- [65] Retureau, É., Callon, C., Didiene, R. et al. Is microbial diversity an asset for inhibiting *Listeria monocytogenes* in raw milk cheeses?. *Dairy Sci. Technol.* 90, 375–398 (2010). <https://doi.org/10.1051/dst/2010010>
- [66] Šilhánková Ludmila (2002): *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Academia 2002
- [67] FRÉTIN M, Gérard A, Ferlay A, Martin B, Buchin S, Theil S, Rifa E, Loux V, Rué O, Chassard C, Delbès C. Integration of Multiomic Data to Characterize the Influence of Milk Fat Composition on Cantal-Type Cheese Microbiota. *Microorganisms.* 2022 Feb 1;10(2):334. doi: 10.3390/microorganisms10020334. PMID: 35208788; PMCID: PMC8879305.
- [68] Cornu, A., Kondjoyan, N., Martin, B., Verdier-Metz, I., Pradel, P., Berdagué, J.-L. and Coulon, J.-B. (2005), Terpene profiles in Cantal and Saint-Nectaire-type cheese made from raw or pasteurised milk. *J. Sci. Food Agric.*, 85: 2040-2046. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2214>

- [69] FRÉTIN M, Martin B, Buchin S, Desserre B, Lavigne R, Tixier E, Cirié C, Bord C, Montel MC, Delbès C, Ferlay A. Milk fat composition modifies the texture and appearance of Cantal-type cheeses but not their flavor. *J Dairy Sci.* 2019 Feb;102(2):1131-1143. doi: 10.3168/jds.2018-15534. Epub 2018 Dec 24. PMID: 30591341.
- [70] CARDINALI F, Ferrocino I, Milanović V, Belleggia L, Corvaglia MR, Garofalo C, Foligni R, Mannozi C, Mozzon M, Cocolin L, Osimani A, Aquilanti L. Microbial communities and volatile profile of Queijo de Azeitão PDO cheese, a traditional Mediterranean thistle-curdled cheese from Portugal. *Food Res Int.* 2021 Sep;147:110537. doi: 10.1016/j.foodres.2021.110537. Epub 2021 Jun 17. PMID: 34399514.
- [71] UNNO R, Suzuki T, Matsutani M, Ishikawa M. Evaluation of the Relationships Between Microbiota and Metabolites in Soft-Type Ripened Cheese Using an Integrated Omics Approach. *Front Microbiol.* 2021 Jun 8;12:681185. doi: 10.3389/fmicb.2021.681185. PMID: 34168634; PMCID: PMC8219077.
- [72] JIAOJ, Zheng Z, Liu Z, You C. Study of the Compositional, Microbiological, Biochemical, and Volatile Profile of Red-Veined Cheese, an Internal *Monascus*-Ripened Variety. *Front Nutr.* 2021 Apr 16;8:649611. doi: 10.3389/fnut.2021.649611. PMID: 33937306; PMCID: PMC8085271.

6 PŘÍLOHY

Jste kuřák? *									
<input type="radio"/> Ano									
<input type="radio"/> Ne									
Věk *									
Text stručné odpovědi									
Jaké je vaše pohlaví? *									
<input type="radio"/> Žena									
<input type="radio"/> Muž									
<input type="radio"/> Nepřeji si uvádět									
Jaká je vaše obliba plisňových sýrů? *									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Zhodnoťte vlastnosti vzorku F457 (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 (te...	<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"/>				

Příloha 1: První část dotazníku pro senzorické hodnocení

Zhodnoťte vlastnosti vzorku K986 (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 (te...	<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"/>

Zhodnoťte vlastnosti vzorku S235 (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 (te...	<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"/>

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

	Vzhled a barva	Konzistence /textu...	Vůně	Chuť (flavour)
Vzorek F457	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Vzorek K986	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Vzorek S235	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Příloha 2: Druhá část dotazníku pro senzorní hodnocení