

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a bezpečnosti potravin



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

**Využití nukleární magnetické rezonance v sýrařském
odvětví**

Bakalářská práce

Adéla Bozděchová

Výživa a potraviny

Vedoucí práce: Ing. Veronika Legarová, Ph.D.

Konzultant práce: Ing. Lucie Rysová

© 2022 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Využití nukleární magnetické rezonance v sýrařském odvětví" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 22. 4. 2022

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala paní Ing. Veronice Legarové, Ph.D. za odborné vedení mé bakalářské práce. Dále srdečně děkuji konzultantce mé bakalářské práce Ing. Lucii Rysové za věnovaný čas, cenné rady a připomínky, poskytnuté materiály a trpělivost.

Využití nukleární magnetické rezonance v sýrařském odvětví

Souhrn

Sýry jsou na trhu velmi oblíbenou a vyhledávanou potravinou, proto výrobci usilují o zajištění jejich vysoké kvality. V současné době je snaha využívat ke kontrole kvality analytické metody, které jsou méně časově nenáročné. Mezi tyto metody patří i nukleární magnetická rezonance. Nukleární magnetická rezonance poskytuje detailní informace o struktuře a dynamických vlastnostech organických i anorganických látek a biomolekul v kapalném, plynném i pevném stavu. Její velkou výhodou je, že nepoškozuje zkoumaný materiál.

Tato bakalářská práce je zpracována formou literární rešerše a jejím cílem je shrnout, jak je nukleární magnetická využívána v sýrařském odvětví. První část práce se zabývá sýry, jejich složením, výrobou, hodnocením kvality a v neposlední řadě způsoby jejich falšování.

Další část se věnuje nukleární magnetické rezonanci. Je zde popsán historický vývoj i princip této fyzikálně-chemické metody. Jsou zde vyzdvíženy její výhody a je krátce porovnána s dalšími analytickými metodami.

V poslední části práce byla vytvořena přehledová tabulka vědeckých studií zabývajících se identifikací biomarkerů, které jsou klíčové pro hodnocení zrání či skladování některých druhů sýrů nebo ověření jejich geografického původu.

Bylo prokázáno, že nukleární magnetická rezonance je vhodnou metodou k analýze fosfátů a sodných iontů. Pomocí ní lze také analyzovat obsah či mobilitu vody, mastné kyseliny, organické kyseliny, alkoholy i sacharidy ve vzorku. Díky tomu je vhodnou metodou pro hodnocení zrání sýrů, jejich skladování nebo falšování. Tato metoda je poměrně rychlá, poskytuje přesné výsledky a úprava vzorku před analýzou je v porovnání s jinými metodami snazší. Díky tomu je tato metoda vhodná k rutinní analýze.

Klíčová slova: kyselé srážení, mléko, NMR, sladké srážení, sýr

Use of Nuclear Magnetic Resonance in the Cheese Industry

Summary

Cheese is a very popular and sought-after food on the market, so producers strive to ensure its high quality. There is now an effort to use analytical methods for quality control that are less time-consuming. These methods include nuclear magnetic resonance imaging. Nuclear magnetic resonance provides detailed information on the structure and dynamic properties of organic and inorganic substances and biomolecules in liquid, gaseous and solid states. Its great advantage is that it does not damage the material under investigation.

This bachelor thesis is prepared in the form of a literature search and aims to summarize how nuclear magnetic is used in the cheese industry. The first part of the thesis deals with cheeses, their composition, production, quality assessment and last but not least the methods of adulteration.

The next part deals with nuclear magnetic resonance. The historical development and the principle of this physico-chemical method are described. Its advantages are highlighted and it is briefly compared with other analytical methods.

In the last part of the thesis, a review table of scientific studies dealing with the identification of biomarkers that are crucial for the evaluation of the ageing or storage of certain types of cheese or the verification of their geographical origin has been produced.

Nuclear magnetic resonance was shown to be a suitable method to analyse phosphate and sodium ions. It can also be used to analyse the content or mobility of water, fatty acids, organic acids, alcohols and carbohydrates in a sample. This makes it a suitable method for the evaluation of cheese ageing, storage or adulteration. This method is relatively fast, gives accurate results and the sample preparation before analysis is easier compared to other methods. This makes this method suitable for routine analysis.

Keywords: sour curdling, milk, NMR, sweet curdling, cheese

Obsah

1 Úvod	7
2 Cíl práce	8
3 Literární rešerše	9
3.1 Sýry	9
3.1.1 Historie	9
3.1.2 Základní definice v sýrašství	10
3.1.2.1 Definice mléka.....	10
3.1.2.2 Složení mléka.....	10
3.1.2.3 Definice sýra.....	12
3.1.3 Dělení sýrů dle různých parametrů	13
3.1.3.1 Rozdělení sýrů dle obsahu tuku v sušině	13
3.1.3.2 Rozdělení sýrů podle konzistence ve vztahu k obsahu vody v tukuprosté hmotě sýra	13
3.1.3.3 Členění sýrů do skupin a podskupin	13
3.1.3.4 Rozdělení sýrů podle způsobu srážení mléka	14
3.1.4 Základní ošetření mléka pro výrobu sýrů	15
3.1.5 Proces výroby sýrů	17
3.1.5.1 Speciální kultury pro výrobu sýrů	21
3.1.6 Vady sýrů.....	21
3.1.7 Hodnocení kvality sýrů.....	23
3.1.8 Falšování sýrů.....	25
3.1.8.1 Analytické metody užívané k ověření pravosti mléčných výrobků	25
3.2 Nukleární magnetická rezonance (NMR)	27
3.2.1 Historie NMR	27
3.2.2 Princip NMR.....	27
3.2.3 Výhody a limitace NMR v porovnání s dalšími analytickými metodami	30
3.3 Využití NMR v sýrašském odvětví	31
3.3.1 Přehledová tabulka.....	32
4 Závěr	43
5 Literatura	44
6 Seznam použitých zkratk v přehledové tabulce	50

1 Úvod

První sýry byly vyrobeny již během neolitické revoluce. Jejich výroba se postupně zdokonalovala a rozvíjela. V dnešní době je známo přes 3 000 druhů sýrů a stále jsou velmi oblíbenou a vyhledávanou potravinou, proto mají výrobci snahu zajistit jejich vysokou kvalitu. V současné době je snaha využívat ke kontrole jejich kvality analytické metody, které jsou časově nenáročné a lze je použít k rutinní analýze. Mezi tyto metody patří i nukleární magnetická rezonance. Nukleární magnetická rezonance využívá magnetických vlastností atomových jader některých izotopů. Poskytuje detailní informace o struktuře a dynamických vlastnostech organických i anorganických látek a biomolekul v kapalném, plynném i pevném stavu. Její velkou výhodou v porovnání s ostatními metodami, které jsou v dnešní době používány ke kontrole kvality potravin, je, že tato metoda je neinvazivní a neionizující, nepoškozuje tedy zkoumaný materiál. Během zpracování potravin se využívá pro analýzu vody, tuků a proteinů a také k analýze fyzikálních, chemických a strukturních vlastností. Nukleární magnetická rezonance však není používána jen ke kontrole kvality sýrů, ale jak bylo potvrzeno vědeckými studiemi, pomocí ní lze také dokázat například falšování sýrů, hodnotit podmínky skladování i proces zrání sýrů.

2 Cíl práce

Cílem této práce je zpracovat rozsáhlou literární rešerši na využití nukleární magnetické rezonance v sýrařském odvětví. Bude zpracován přehled hlavních vědeckých postupů, účelů a detekovaných metabolitů.

3 Literární rešerše

3.1 Sýry

3.1.1 Historie

Neolitická revoluce začala zhruba před 8000 lety v Mezopotámii (Anděl et al. 2012). Představovala pro lidstvo významnou změnu, během níž se z lovců a sběračů stali chovatelé, pastevci a pěstitelé. V jídelníčku lidí se tak objevily obiloviny a kromě nich, díky chovu ovcí a skotu, také mléko a poté i mléčné výrobky (Potravinářská komora ČR 2017). Kdy vznikl první sýr, není přesně známo, jeho prvotní výroba se však pojí právě s procesem domestikace (Teubner 2003).

Princip výroby sýrů byl nejspíše objeven náhodou. Jedna z hypotéz je, že lidé odevzdávali mléko božstvu jako oběť, a právě díky tomu si všimli, že se mléko po nějaké době srazí. Následně tento proces využili pro svůj prospěch a začali vyrábět první sýr, který vyrobili pomocí kyselého srážení (Teubner 2003). Proces sladkého srážení byl pravděpodobně objeven, když kočovníci ze středního východu uložili mléko do vaků vyráběných ze žaludků zvířat. Mléko se v nich srazilo, protože vaky obsahovaly zbytky enzymů srážejících mléko (Anděl et al. 2012).

První archeologické nálezy související s výrobou sýra se datují 6000 let př. Kr. První zmínky o sýrech pochází z doby Sumerské 4000 let př. Kr. (Anděl et al. 2012). Výroba sýrů byla známa ve starém Egyptě, kde se sýry zavěšovaly do kožených vaků, aby mohly vykapat. Sýr se zmiňuje i ve starém zákoně (Callec 2002). Další rozvoj ve výrobě sýrů nastal v dobách antického Řecka a Říma (Teubner 2003; Anděl et al. 2012). V antickém Římě se začalo experimentovat s délkou doby zrání, a také s kořením (Anděl et al. 2012). Kolem roku 50 n. l. vydal římský gastronom Columella příručku pro výrobu sýrů, kde mimo jiné uvedl, že se má při výrobě používat sůl ke konzervování (Callec 2002). Ve vrcholném středověku se začaly vyrábět sýry, které známe dodnes. Příkladem lze uvést gorgonzolu, grana padano či roquefort. Výroba sýrů probíhala historicky jako malovýroba na menších statcích, zlom přišel v 19. století, kdy objevy vědců, mezi které pařil i Lous Paster, napomohly k rozvoji průmyslové výrobě (Anděl et al. 2012). V současné době je známo asi 3 000 druhů sýrů (Kopáček 2020).

Výroba sýrů v České republice má dlouhou tradici, sahající až do 10. století. Sýry se zde zprvu vyráběly převážně na malých farmách a salaších. Poté se přešlo k manufakturní výrobě a na přelomu 19. a 20. století se přešlo k výrobě průmyslové (Kopáček 2020). Roku 1870 zahájila svou práci první průmyslová mlékárna v Praze – Hostivicích. Postupně se rozvíjely družstevní mlékárny, které ročně zpracovaly 45 mil. litrů mléka. K jeho zpracování byl potřeba kvalifikovaný personál, proto byla roku 1902 zřízena Zemská mlékařská a sýrařská škola v Kroměříži (Keresteš et al. 2016). Jak uvedl Kopáček (2020) složitými etapami ve výrobě sýrů pak byly obě světové války a následná socializace zemědělství a průmyslu.

3.1.2 Základní definice v sýrařství

3.1.2.1 Definice mléka

Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 a Nařízení Komise (ES) č. 1662/2006 uvádí: „*Syrovým mlékem*“ se rozumí mléko produkované sekrecí mléčné žlázy hospodářských zvířat, které nebylo podrobeno ohřevu nad 40 °C a nebylo ani ošetřeno žádným způsobem s rovnocenným účinkem“. Dle vyhlášky č. 274/2019 Sb. o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje se mlékem rozumí: „*mléko podle nařízení o společné organizaci trhů se zemědělskými produkty splňující požadavky právních předpisů upravujících veterinární a hygienické požadavky na živočišné produkty a předpisů Evropské unie upravujících hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu a ošetřené podle právních předpisů upravujících veterinární a hygienické požadavky na veterinární produkty a podle nařízení, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu*“.

3.1.2.2 Složení mléka

Mléko je složitý polydisperzní systém, kde hlavní podíl disperzního prostředí tvoří voda. Lipidy jsou ve formě emulze, koloidní suspenzi tvoří bílkoviny a část minerálních látek, sacharidy se pak nachází ve vodném roztoku (Teplý et al. 1979). Pro výrobu sýrů může být využita široká paleta druhů mléka, které se liší napříč celým světem, příkladem lze uvést buvolí, velbloudí, kobílí, kravské, kozí a ovčí mléko. V západním světě se však nejčastěji používají poslední tři zmíněná (Callec 2002). Jak je patrné z Tabulky č. 1, tyto tři druhy mléka jsou si v rámci některých složek podobné, v některých se významně liší. To je dáno hned několika vnitřními i vnějšími faktory, příkladem lze uvést plemeno, zdravotní stav, stadium a pořadí laktace, dietu či ustájení (Keresteš et al. 2016).

Tabulka č. 1 Porovnání průměrného složení mléka kravského, ovčího a koziho v procentech

mléko	voda (%)	sušina (%)	tuk (%)	bílkoviny (%)	laktóza (%)	minerální látky (%)
kravské	87,0	13,0	4,2	3,2	4,8	0,8
ovčí	80,5	19,5	7,9	6,5	4,3	0,8
kozí	87,1	12,9	4,0	3,7	4,4	0,8

Zdroj: Čejna & Obermaier (2013), upraveno autorem

Mléčný tuk

Lipidy kravského mléka jsou v mléku přítomny ve formě emulze tukových kuliček o průměru asi 3 μm (od 0,1 do 20 i více μm). Velikost tukových kuliček se může lišit dle plemene, stádia laktace či ošetřením mléka (Teplý et al. 1979). Organizace pro výživu a zemědělství Spojených národů (FAO; 2013) uvádí, že velikost tukových kuliček se může lišit i druhem mléka. Kozí mléko má menší tukové kuličky než kravské, což může být důvod, proč je stravitelnější. Konoplev et al. (2020) uvádí, že tukové kuličky se z 97–98 % skládají z esterů trojsytného alkoholu glycerolu a mastných kyselin (triacylglyceroly). Mezi nasycené mastné kyseliny mléčných lipidů patří například kyselina máselná, kyselina kaprylová a

kaprinová (Keresteš 2016). Dále pak kyselina palmitová. Banni et al. (2017) uvádí, že kyselina palmitová je v těle potřebná pro udržení fyzikálních vlastností membrán, zajišťuje palmitoylaci proteinů a účinnou aktivitu surfaktantu v plicích. Kromě zmíněných triacylglycerolů obsahuje tuková kulička i diacylglyceroly (0,4 %), monoacylglyceroly (0,03 %), fosfolipidy (0,6 %), cholesterol (0,3 %), stopy vitamínů rozpustných v tucích a další minoritní látky (Keresteš 2016). Mléčný tuk rovněž obsahuje některé esenciální mastné kyseliny, jako jsou kyselina linolová a arachidonová (Teplý 1979). Ty patří mezi omega-6 nenasycené mastné kyseliny. Dále kyselinu α -linolenovou, která patří mezi esenciální omega-3 nenasycené mastné kyseliny (Keresteš 2016). Skupina polynenasycených mastných kyselin, které jsou polohovými a geometrickými izomery kyseliny linolové, se souhrně nazývá konjugovaná kyselina linolová (CLA). Tyto izomery kyseliny linolové jsou zdraví prospěšné tím, že lidský organismus chrání proti různým typům rakoviny, hypertenzi, ateroskleróze, cukrovce a zlepšují imunitu (FAO 2013). Další nenasycenou mastnou kyselinou mléčných lipidů je například kyselina olejová, která snižuje hladinu LDL-cholesterolu v krvi (Keresteš 2016).

Mléčné bílkoviny

V syrovém mléku se mléčné proteiny podle rozpustnosti při pH 4,6 a teplotě 20 °C dělí do dvou hlavních skupin, a to nerozpustné kaseiny a rozpustné syrovátkové bílkoviny. Mléko dále obsahuje proteiny, které jsou součástí enzymů a hormonů, proteiny tukových kuliček a různé minoritní proteiny. Dále obsahuje i nebílkovinné dusíkaté složky: kyselinu močovou, kreatin, močovinu a kyselinu hippurovou (Keresteš et al. 2016). Poměr kaseinových a syrovátkových bílkovin v kravském mléce je 80:20. Kasein se v mléce vyskytuje ve formě micel a obsahuje 4 frakce: α S1-kasein, α S2-kasein, β -kasein a κ -kasein (Konoplev et al. 2020). Syrovátkové proteiny mají globulární strukturu a jsou spojeny disulfidickými můstky, jejich stabilitu rovněž ovlivňuje pevně vázaný Ca^{2+} (Golian & Šnirc 2015). Porušení disulfidických vazeb vede k denaturaci těchto proteinů. V mléce jsou obsaženy čtyři hlavní syrovátkové proteiny: α -laktalbumin, β -laktoglobulin, sérový albumin a imunoglobuliny. Procentuální zastoupení hlavních mléčných bílkovin je uvedeno v Tabulce č. 2. Na rozdíl od syrovátkových bílkovin jsou kaseiny termostabilnější. Pro syrovátkové bílkoviny byly stanoveny tyto denaturační teploty: α -laktalbumin 63 °C, β -laktoglobulin 74 °C, sérový albumin 87 °C a imunoglobuliny 79 °C (Keresteš et al. 2016). Mléčné bílkoviny se skládají z 18 aminokyselin, z toho 9 je esenciálních (Konoplev et al. 2020). Mezi esenciální aminokyseliny, které se nachází v mléčných bílkovinách patří valin, methionin, izoleucin, leucin, tyrosin, fenylalanin, tryptofan, lysin a histidin (Golian & Šnirc 2015).

Tabulka č. 2 Hlavní kategorie mléčných proteinů kravského mléka

protein	kategorie	% z celkového proteinu
α S1-kasein	kaseiny	30,6
α S2-kasein		8,0
β -kasein		28,4
κ -kasein		10,1
α -laktalbumin	syrovátkové proteiny	3,7
β -laktoglobulin		9,8
sérový albumin		1,2
imunoglobuliny		2,1
celkový mléčný protein		100,0

Zdroj: Keresteš et al. (2016), upraveno autorem

Laktóza

Laktóza je hlavním mléčným sacharidem. Je to disacharid tvořený glukózou a galaktózou. Není obsažena jinde než v mléku a mléčných výrobcích (Teplý et al. 1979). V mléce se laktóza vyskytuje ve dvou formách: α a β . Při 20 °C obsahuje mléko 40 % α -laktózy a 60 % β -laktózy (Keresteš et al. 2016). Berg (1993) uvádí, že při zahřátí mléka dochází k izomeraci laktózy za vzniku laktulózy. Izomerace laktózy probíhá v mléce společně s Maillardovou reakcí. Ta probíhá mezi redukcujícím cukrem (v mléce laktóza) a aminoskupinou (v mléce většinou lysinové zbytky mléčných bílkovin).

Minerální látky a vitamíny

Minerální látky v mléku nacházíme v koloidní formě nebo ve formě roztoku a mohou se účastnit celé řady anabolicko-katabolických procesů. Dělíme je na makroprvky, kam řadíme vápník, hořčík, draslík, sodík, chlór, fosfor a mikroprvky, mezi které patří jód, chrom, měď, železo a další (Keresteš et al. 2016). Jeden litr mléka obsahuje 1170 mg vápníku (Golian & Šnirc 2015). Vápník z mléka je pro lidské tělo lépe využitelný než vápník z rostlinné stravy (Teplý et al. 1979). Koncentrace fosforu v kravském mléce je 890 mg.l⁻¹. Vstřebatelnost dietního fosforu z kravského mléka je vysoká (55–70 %). Fosfor společně s vápníkem vytváří hlavní strukturální složky kostí a zubů. Koncentrace jódu v kravském mléce je asi 0,43 mg v jednom litru, jeho obsah ovlivňuje sezónnost i druh krmiva (Golian & Šnirc 2015).

Mléko obsahuje celou řadu vitamínů. Mezi vitamíny rozpustné ve vodě řadíme vitamín B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₁₂, kyselinu listovou, vitamíny C a H. Vitamíny rozpustné v tucích jsou A, D, E, K. Vitamín B₁₂ je produkován výlučně mikroorganismy v bacheru přežvýkavců, nachází se tedy pouze v živočišných potravinách. Jeho denní potřebu pro člověka pokryjí 4 dcl kravského mléka (Keresteš et al. 2016).

3.1.2.3 Definice sýra

Sýr je dle vyhlášky 274/2019 Sb. definován jako: „mléčný výrobek vyrobený vysrážením mléčné bílkoviny z mléka působením syřidla nebo jiných vhodných koagulačních činidel, oddělením podílu syrovátky a následným prokysáním nebo zráním“.

3.1.3 Dělení sýrů dle různých parametrů

Pro rozdělování sýrů do kategorií neexistuje univerzální systém. Nejčastěji se sýry rozdělují dle obsahu sušiny, obsahu tuku a výrobního postupu (Čejna & Obermaier 2013). Sýry mohou být rozdělovány i dle druhu mléka, ze kterého jsou vyrobeny (Callec 2002). Vyhláška 274/2019 Sb. definuje sýry čerstvé, zrající, tavené, pařené a syrovátkové. „Čerstvý sýr“ označuje: „*nezrající sýr včetně termizovaných nezrajících sýrů*“. Jako „zrající sýr“ lze označit jako „*sýr, u něhož po prokysání došlo k dalším biochemickým a fyzikálním procesům*“. Jako „tavený sýr“ se označí „*sýr, který byl tepelně upraven tavením*“. Jako „pařený sýr“ lze označit „*sýr, který byl po prokysání oštěřený napařením horkou vodou, horkou párou, horkým mlékem nebo smetanou*“. Jako „syrovátkový sýr“ se označí „*mléčný výrobek získaný vysrážením syrovátky nebo směsi syrovátky s mlékem*“.

3.1.3.1 Rozdělení sýrů dle obsahu tuku v sušině

Obsah tuku se u sýrů obvykle vyjadřuje v podobě „tuku v sušině“ (zkratka tvs; Čejna & Obermaier 2013). Rozdělení sýrů dle obsahu tvs uvádí Tabulka č. 3.

Tabulka č. 3 Klasifikace přírodních sýrů podle obsahu tuku v sušině

kategorie sýra	tuk v sušině (v % hmotnostních)
vysokotučný	nejméně 60,0
plnotučný	nejméně 45,0 a méně než 60,0
polotučný	nejméně 25,0 a méně než 45,0
nízkotučný	nejméně 10,0 a méně než 25,0
odtučněný	méně než 10,0

Zdroj: Vyhláška 274/2019 Sb., upraveno autorem

3.1.3.2 Rozdělení sýrů podle konzistence ve vztahu k obsahu vody v tukuprosté hmotě sýra

Konzistenci sýra udává poměr mezi sušinou a vodou. Čím méně vody sýr obsahuje, tím je tvrdší. Poměr se však mění během zrání. Konzistenci určuje také tuk (Callec 2002). Podle vyhlášky 274/2019 Sb. dělíme sýry dle konzistence ve vztahu k obsahu vody v tukuprosté hmotě na sýry extra tvrdé (nejvíce 51 %), tvrdé (49 až 56 %), polotvrdé (54 až 63 %), poloměkké (61 až 69 %) a měkké (nejméně 67 %).

3.1.3.3 Členění sýrů do skupin a podskupin

V Tabulce č. 4 je uvedeno členění sýrů do skupin a podskupin dle platné legislativy ČR.

Tabulka č. 4 Členění sýrů na druh, skupiny a podskupiny

druh	skupina	podskupina
sýr	přírodní	čerstvý zrající zrající pod mazem zrající v celé hmotě s plísní na povrchu s plísní uvnitř hmoty dvouplísňový v solném nálevu, bílý pařený extra tvrdý (ke strouhání) tvrdý polotvrdý poloměkký měkký roztíratelný s lomem
	tavený tavený sýrový výrobek tavený mléčný výrobek syrovátkový	

Zdroj: Vyhláška 274/2019 Sb., upraveno autorem

3.1.3.4 Rozdělení sýrů podle způsobu srážení mléka

Princip výroby sýrů spočívá ve vysrážení mléčné bílkoviny z mléka, převážně kaseinu (Golian & Šnirc 2016). Kasein se z mléka sráží buď při snížení pH na hodnotu blízkou izoelektrickému bodu, kdy mluvíme o kyselém srážení, anebo působením enzymů, kdy hovoříme o sladkém srážení (Kadlec 2008).

Kyselé srážení

Kyselé srážení se uplatňuje především u tvarohů (Kadlec 2008). Okyselením mléka, ať už prokysáváním pomocí kyselinotvorných bakterií za vzniku kyseliny mléčné z laktózy, nebo přidávkem potravinářské kyseliny vzniká při určité kyselosti, vyjádřené hodnotou pH, mléčná sraženina (Kadlec 2008; Golian & Šnirc 2016). Je možné použít kyselinu mléčnou, octovou, citronovou nebo chlorovodíkovou (Kadlec 2008). Kasein patří mezi hydrofobní bílkoviny, při ztrátě vnějšího náboje a solvatačního vodního obalu při pH 4,6 dochází k jeho izoelektrickému srážení. Kyselé srážení je reverzibilní proces (Golian & Šnirc 2016). Současně dochází k přeměně koloidního fosforečnanu vápenatého na rozpustný a jeho uvolnění z kaseinových micel (Kadlec et al. 2012). Při pH 5,7 – 5,8 se dostane do roztoku až 50 % koloidního vápníku a začne proces destabilizace micel, při kterém dojde k vyrovnání nábojů jednotlivých kaseinů. Jejich následnou agregací v izoelektrickém bodě se vytváří síť gelu. Kyselý gel je tužší a vykazuje nízkou synerezi, proto sýry vyrobené kyselým způsobem mají nižší sušinu (Golian & Šnirc 2016).

Sladké srážení

Golian & Šnirc (2016) uvádí, že většina sýrů se vyrábí tzv. sladkým (enzymatickým) srážením, případně kombinací kyselého a sladkého srážení, kdy sladké musí převládat. Ke srážení mléka se používají tři druhy syřidel, a to živočišná (chymosin nebo pepsin živočišného původu), mikrobiální (chymozin mikrobiálního původu) a rostlinná (srážecí enzymy některých rostlin, například artyčoku či ostropeře mariánského). Působením enzymu dochází k vysrážení mléka ve formě pevné kompaktní hmoty. Tento proces je ireverzibilní a můžeme ho rozdělit do tří fází.

- Primární fáze

V primární (enzymatické fázi) dochází k rozštěpení peptidické vazby κ -kaseinu mezi 105. a 106. aminokyselinou (Phe-Met). Působením syřidla se z κ -kaseinu odštěpí vysoce kyselé hydrofilní glykomakropeptidy, které přecházejí do syrovátky. Poté se micely stanou méně negativně nabitě a ztrácí hydratační obal. Peptidická část κ -kaseinu označovaná jako para- κ -kasein, který má hydrofobní charakter se vysráží působením Ca^{2+} iontů s ostatními kaseinovými frakcemi. Takto se rozštěpí 80-90 % κ -kaseinu (Gajdůšek 1998).

- Sekundární fáze

Sekundární fáze probíhá pouze za přítomnosti Ca^{2+} iontů a teplotě nad 20 °C. V jejich přítomnosti dochází k vysrážení všech frakcí kaseinu. Díky nim také dochází ke snížení negativního náboje micel, a tím zrychlují jejich agregaci. Kaseinové micely, které jsou navzájem spojeny fosforečnanem vápenatým, se nejprve řadí do řetězců, které pak přecházejí v trojrozměrnou mřížku, ze které vzniká trojrozměrný gel. Dále dochází ke smršťování gelu sýřeniny a následné synerezi syrovátky (Gajdůšek 1998; Golian & Šnirc 2015).

- Terciální fáze

Jako terciální fáze je označována pokračující proteolýza kaseinu, která může probíhat při tvorbě sýřeniny i působením zbytkové aktivity syřidla v sýřenině a sýrech (Gajdůšek 1998). Synereze vyplývá z dehydratace kaseinu a díky ní se odděluje syrovátka kromě vázané a kapilární vody (Zadrazil 2002).

3.1.4 Základní ošetření mléka pro výrobu sýrů

Pro udržení mikrobiologické kvality mléka a prodloužení jeho skladovatelnosti se čerstvě nadojené mléko chladí. Pokud není mléko svázeno do 2 hodin po nadojení, musí být zchlazeno na teplotu 8 °C nebo nižší při denním svozu, anebo na teplotu 6 °C, pokud není svoz prováděn každý den. Během přepravy mléka do podniku pro ošetření mléka, anebo do zpracovatelského podniku nesmí teplota zchlazeného mléka přesáhnout 10 °C, mimo mléka svázeného do 2 hodin po nadojení (Nařízení Komise ES č. 1662/2006).

Po příjmu mléka je potřeba odstranit případné mechanické nečistoty filtrací či centrifugací. Veškeré mléko zpracovávané v mlékárenském závodě musí být tepelně ošetřeno, aby byla zajištěna jeho zdravotní nezávadnost a trvanlivost. Toto ošetření je prováděno na pasterační stanici společně s dalšími základními operacemi zpracování mléka. Mezi tyto operace mohou patřit deaerace a dezodorace, odstředování, baktofugace, standardizace, homogenizace a pasterace mléka (Kadlec et al. 2012).

Deaerace a dezodorace

Čerstvě nadojené mléko obsahuje přibližně 6 % plynů, z nichž téměř 5 % tvoří CO₂, necelé 1 % N₂ a několik desetin % O₂. Plyny mohou způsobovat technologické problémy, proto je vhodné je z mléka odstranit odvětráním, tento proces se nazývá deaerace. Odstranění těkavých látek, které mohou v mléce způsobovat nepříjemné pachy se nazývá dezodorace. Probíhají tak, že mléko předehřáté nad 60 °C je rozstříkáváno do podtlakové komory (Keresteš 2016).

Odstřed'ování

Dalším ze základních procesů používaných v mlékárenském průmyslu, je oddělování mléčného tuku z mléka. Mléčný tuk se odděluje kontinuálně odstřed'ováním v rotujícím bubnu odstředivky. Díky odstředivému zrychlení se těžší složka mléka soustřeďuje blízko stěny bubnu – mléčná plasma a lehčí část – smetana je vytlačována směrem do středu k ose otáčení. Při odstřed'ování dochází současně i k čištění mléka (Gajdůšek 1998).

Baktofugace a separační membránové procesy

K doplňujícím postupům ošetření mléka zařazujeme baktofugaci a membránové separační procesy (Keresteš 2016). Baktofugaci lze snížit počet bakterií v mléce o 95,3 %. Baktofugace spočívá ve vysokorychlostním odstředění bakterií a bakteriálních spór z mléka (Farkye 2004). Mikrofiltrace, která patří mezi membránové separační procesy, se využívá při redukci počtu mikroorganismů v odstředěném mléce. Obvyklá velikost otvorů při tomto použití je 1 μm. Redukce počtu vegetativních mikroorganismů dosahuje nad 99 % a v případě bakteriálních spór víc než 95 % (Keresteš 2016).

Standardizace tučnosti

Vzhledem k legislativnímu dělení sýrů dle obsahu tuku v sušině, je potřebné obsah tuku v mléku standardizovat. Standardizace mléka na požadovanou hodnotu tuku se obvykle provádí ve standardizačním zařízení, které může, ale nemusí být součástí odstředivky (Golian & Šnirc 2016).

Homogenizace

Aby nedocházelo k oddělování tuku od mléčného plasmatu, provádí se homogenizace. Během homogenizace je mléko protlačováno úzkou štěrbinou pod tlakem 15 až 25 MPa při teplotě 50–70 °C. To zapříčiní mechanické rozbití tukových kuliček na menší a jejich rovnoměrné rozptýlení. Z jedné tukové kuličky se tímto způsobem vytvoří 100 až 1000 nových (Gajdůšek 1998). Homogenizace se neprovádí u všech sýrů. Je vhodná pro výrobu některých čerstvých sýrů. Obvykle se také homogenizuje smetana pro standardizaci mléka pro výrobu sýrů, u kterých je žádoucí lipolýza v průběhu zrání, např. u sýrů v plísni v těstě (Kadlec 2008).

Pasterace

Pasterace se provádí z důvodu snížení počtu patogenních mikroorganismů v mléce a tekutých mléčných výrobcích na úroveň, kdy nepředstavují vážné zdravotní riziko (FAO 2013). Zároveň zvyšuje trvanlivost výrobku zničením většiny vegetativních buněk kontaminujících mikroorganismů a inaktivací, respektive snížením aktivity nativních, případně bakteriálních enzymů (Kadlec 2008). V praxi se pasterace realizuje několika způsoby:

- Dlouhodobá pasterace: 63 °C po dobu 30 min, vzhledem k dlouhé době záhřevu se používá jen výjimečně.

- Šetrná pasterace: 72 °C po dobu 15 s, během ní se inaktivují alkalické fosfatasy a zachovává se aktivita laktoperoxidasy. Pasterační efekt dosahuje nad 99,9 %. Přežívají pouze sporotvorné mikroorganismy a některé termorezistentní bakterie.
- Vysoká pasterace: 85 °C po dobu 5 s, vysokou pasterací je inaktivována laktoperoxidasa a většina ostatních enzymů mléka. Je dosahováno vyššího pasteračního efektu nad 99,99 %. Projevují se změny v chuti, mléko může mít vařivou příchuť (Kadlec 2008).

Při výrobě sýrů se používá zejména šetrná pasterace, protože β -laktoglobulin denaturuje již při teplotách nad 70 °C. Denaturovaný β -laktoglobulin může přes svou volnou thiolovou skupinu (-SH) interagovat s thiolovou skupinou κ -kaseinu. Vznikne disulfidický můstek, kterým je β -laktoglobulin navázán na κ -kasein a tento komplex zhoršuje syřitelnost mléka, protože omezuje přístup syřidlového enzymu ke κ -kaseinu. Pouze při výrobě tvarohů a některých poloměkých a měkkých sýrů se může použít i pasterace při teplotě 84 °C (Golian & Šnirc 2015; Golian & Šnirc 2016).

3.1.5 Proces výroby sýrů

Výroba sýrů je složitý proces zahrnující řadu kroků a biochemických přeměn (Kadlec 2008). Každý druh sýra má specifický výrobní diagram, a právě tento aspekt způsobuje tak velkou diverzitu této skupiny (Golian & Šnirc 2016).

Přídavek vápenatých solí a další úprava mléka určeného pro výrobu sýrů

Při použití šetrné pasterace během výroby sýrů se rozpustné vápenaté soli stávají nerozpustnými. Díky tomu se pasterované mléko hůře sráží, vzniká měkčí sraženina s nižší výtěžností (Golian & Šnirc 2016). Proto se při výrobě sýrů do mléka přidává chlorid vápenatý, který obnoví zhoršenou syřitelnost mléka (Zadrazil 2002). Naopak nadměrné množství vápenatých solí způsobuje křehčí konzistenci sýrů (Golian & Šnirc 2016).

Dusičnan draselný zabrňuje předčasnému duření sýrů vyvolanému koliformními organismy. Jeho množství je limitováno hygienickými předpisy na 100 g/1000 l mléka (Zadrazil 2002). Používá se zejména u sýrů s nižší kyselostí (Kadlec et al. 2012). Časnému duření sýrů však lze předejít také díky baktofugaci a mikrofiltraci namísto přídavku KNO_3 (Golian & Šnirc 2016).

Dalšími možnými aditivami jsou barviva. Používá se například annatto získávané z rostliny *Bixa Orellana*, které se využívá i při dobarvování čedaru (Farkye 2004). Při výrobě některých sýrů se přidávají do mléka další složky pro ochucení – koření, zelenina, ořechy (Kadlec et al. 2012).

Přídavek zákysových kultur

Teplé ošetření mléka nepřežívají v potřebném množství mikroorganismy, které by vytvářely kyseliny pro okyselení mléka, které by následně zabránily nežádoucím, zejména hnilobným mikroorganismům v jejich činnosti (Teplý et al. 1979). Potřebné množství žádoucích mikroorganismů se tedy musí zajistit základní kulturou – smetanovou (Golian & Šnirc 2016). Základní kultura je mezofilní a tvoří ji *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* biovar. *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Cremoris* a *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* (Janštová & Mahdalová 2016). Mezofilní kultura zajišťuje předezráním mléka,

kteře probíhá po šetrné pasteraci do přídavku syřidla. Mléko se ohřeje na teplotu syření, tedy 30–33 °C a přidá se mezofilní kultura v množství 0,5–2 % 30–45 minut před syřením (Kadlec et al. 2012).

Přídavek syřidla

Optimální teplota syření mléka je 35–40 °C, ale běžně je syřidlo aplikováno při teplotě 32 °C. Ke sladkému srážení se používají syřidla, jejichž typy jsou zmíněny v kapitole 3.1.3.4. V praxi se klasická chymosinová syřidla využívají pro svou nízkou proteolytickou schopnost zejména na výrobu tvrdých dlouho zrajících sýrů. Na výrobu sýrů s nízkodohřivanou syřeninou se používají mikrobiální syřidla a na výrobu měkkých a čerstvých sýrů se používají pepsinová syřidla, které mají zvýšenou proteolytickou aktivitu (Golian & Šnirc 2016). Syřidlo se přidává ve formě zředěného roztoku. Celková doba srážení trvá zpravidla od 25 do 120 minut (záleží na výrobci syřidla), obvykle však 30 minut (Kadlec et al. 2012).

Pokud se provádí kyselé srážení, k úpravě pH do izoelektrického bodu slouží nejčastěji kyselina mléčná vznikající činností bakterií mléčného kvašení, popřípadě se přidává kyselina mléčná, citronová, octová nebo chlorovodíková (Kadlec et al. 2012).

Zpracování sraženiny

Nejprve je zkontrolováno, jestli byl proces syření řádně ukončen. Za tímto účelem se provádí zkouška lomu syřeniny nožem, který se ponoří do sraženiny a vytvoří ve sraženém mléce ostrý lom za vzniku uvolněné syrovátky. Sraženina se poté krájí ostrými harfami nebo noži. Při této operaci vzniká sýrové zrno, tj. částice o velikosti 3–15 mm dle vyráběného druhu. Zrno se dále míchá v uvolněné syrovátce (Kadlec et al. 2012; Golian & Šnirc 2016). Platí, že čím menší je velikost zrna, tím více se vyloučí syrovátky. U některých druhů sýrů je žádoucí vzniklou syřeninu dohřívát, a to z toho důvodu, aby se vyloučil další podíl kapilární vody. U sýrů s nízkodohřivanou syřeninou a obsahem tuku v sušině 30 % je syřenina dohřívána na teploty 36–37 °C nebo 39–40 °C u sýrů s obsahem tuku v sušině 45 %. Sýry s vysokodohřivanou syřeninou se dohřívají na teploty 55–56 °C (Zadražil 2002). U sýrů jako například eidam nebo gouda se provádí tzv. praní sýrového zrna, které snižuje obsah laktózy a současně se při něm syřenina dohřívá. Nejprve se odpustí 35 % syrovátky a přidá se 50–80 % jejího objemu vody o teplotě 50–60 °C. Tyto kroky podporují synerezi syřeniny, tedy její smršťování a uvolňování syrovátky (Kadlec et al. 2012). U čerstvých sýrů se syřenina nedohřívá, jen se krátce po vysrážení pokrájí nahrubo a nalévá se do forem. U pařených sýrů se vypracovaná pařená syřenina při teplotě 75–85 °C natahuje do tvaru pařenic, sýrových nití a podobně (Golian & Šnirc 2016).

Formování a lisování

Měkké a nelisované druhy sýrů se po formování syřeniny lisují pouze jejich vahou a otáčením. Dalším způsobem formování je, že se sýrové zrno vypouští spolu se syrovátkou do předlisovací vany vyložené sýrařskou plachtou nebo do sýrařských perforovaných forem. V těchto formách se lisují pod určitým tlakem a určitou dobu dle druhu sýra. Například polotvrdé sýry se lisují tlakem 0,005–0,040 MPa po dobu 60 minut (Golian & Šnirc 2016).

Solení

Solení sýrů ovlivňuje jejich chuť, podporuje další uvolňování syrovátky, zvyšuje jejich sušinu a zpevňuje povrch. Obsah soli v sýrech je obvykle 2–2,5 %, ale může být vyšší například u sýru feta. Sýry se mohou solit do zrna, na sucho nebo v solné lázni, jejíž koncentrace se pohybuje mezi 18–22 % (Golian & Šnirc 2016).

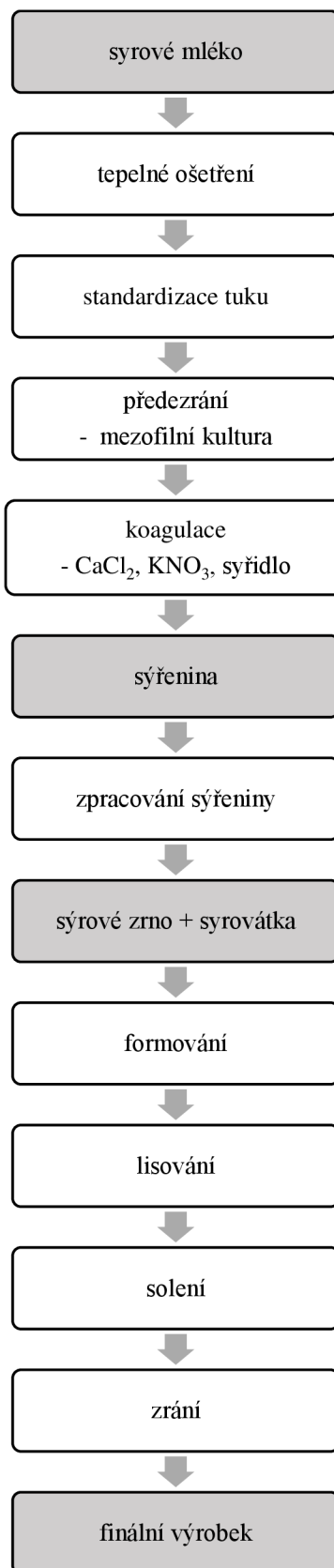
Zrání

Všechny sýry procházejí procesem zrání, výjimkou jsou pouze sýry nezrající (Kadlec 2008). Během zrání dochází k vývoji sensoricky aktivních látek i textury, které se tak stávají charakteristické pro různé druhy sýrů. K hlavním biochemickým dějům probíhajícím během zrání sýrů se řadí glykolýza, lipolýza a proteolýza (Golian & Šnirc 2016). Změny během zrání jsou způsobeny syřidlovými enzymy, nativními enzymy, enzymovou činností kultur nebo činností nezákysových kultur. Fermentace laktózy je rychlá, celkově je metabolizována v prvních dnech zrání. Konečným produktem je laktát, který může být metabolizován prostřednictvím různých skupin mikroorganismů na další karboxylové kyseliny (kyselina octová, propionová, kyselina mravenčí). Během lipolýzy dochází u sýrů k oxidativní či hydrolytické degradaci lipidů. Na tvorbu sensoricky aktivních látek má rozhodující vliv enzymatická hydrolýza triacylglycerolů na mastné kyseliny, glycerol, mono- a diacylglyceroly. Volné mastné kyseliny jsou prekurzorem pro řadu dalších katabolických reakcí, které vedou k tvorbě dalších sensoricky aktivních látek (methylketony, sekundární alkoholy, laktony, estery). Proteolýza je jedním z nejdůležitějších dějů v průběhu zrání. Peptidy vzniklé počáteční hydrolýzou kaseinů jsou dále štěpeny na kratší peptidy a volné aminokyseliny. Konečnými produkty proteolýzy jsou aminy, α -ketokyseliny, aldehydy či alkoholy (Golian & Šnirc 2016).

Balení

Zrání sýrů může probíhat anaerobně (v celé hmotě sýra) nebo aerobně (od povrchu dovnitř). Sýry zrající v celé hmotě se po solení balí do zracích fólií, případně se ošetřují ochranným plastovým nátěrem nebo je jejich povrch ošetřován solným roztokem o koncentraci 2–3 % (Kadlec 2008). Na ochranu sýrů se mohou používat i sýrařské parafíny nebo vosky. Aby se zabezpečil správný průběh zrání sýrů, je třeba zabezpečit vhodnou teplotu, relativní vlhkost vzduchu a vhodné prostory na uložení sýrů. Teplota zrání ve zracích komorách se pohybuje od 10–22 °C, teplota se může měnit během jednotlivých úseků zrání. Regulace vlhkosti vzduchu může usměrňovat zrání sýrů, jejich sušinu a jejich povrch. Samotné prostory na zrání sýrů musí být klimatizované, dobře omyvatelné, s možností zabránění přístupu nežádoucích mikroorganismů (Golian & Šnirc 2016).

Orientační schéma celého procesu výroby sýrů je znázorněno na Obrázku č. 1.



Obrázek č. 1 Schéma výroby sýrů
Zdroj: Kadlec et al. (2012), upraveno autorem

3.1.5.1 Speciální kultury pro výrobu sýrů

Plísňové kultury

K výrobě sýrů s plísňových sýrů se používají kmeny *Penicillium camemberti* a *Penicillium roqueforti*. *Penicillium camemberti* je plíseň na povrchu sýra a vykazuje silnou proteolytickou aktivitu, mléčnou bílkovinu rozkládá až na aminokyseliny. Zároveň má lipolytickou schopnost. Kmeny *Penicillium roqueforti* se používají při výrobě sýrů s plísní v těstě. Protože plíseň potřebuje ke svému růstu kyslík, musí se sýry propichovat. Tyto kmeny mají lipolytickou a proteolytickou aktivitu. Liší se stupněm enzymových aktivit a zbarvením vzdušného mycelia. Tvoří ketony a další aromatické látky (Zadražil 2002).

Propionová kultura

Obsahuje *Propionibacterium freudenreichi* subsp. *Shermanii* (Teplý et al. 1979). Za anaerobních podmínek produkují kyselinu propionovou, octovou a oxid uhličitý (Zadražil 2002). Kyselina propionová dává sýru typickou nasládlou příchut' a oxid uhličitý způsobuje tvorbu ok u sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou (Keresteš 2016).

Mazová kultura

Používá se pro zrání sýrů s mazem na povrchu. Mazová kultura tvoří *Brevibacterium linens* a *Micrococcus roseus* či kvasinky jako *Kluyveromyces lactis*, *Candida utilis*, *Torulopsis candida*. Charakteristické žlutooranžové zbarvení sýry je dáno karotenoidními pigmenty, které jsou produkovány *Brevibacterium linens* (Kadlec 2008).

3.1.6 Vady sýrů

Vady sýrů můžeme rozdělit na vady vnější, zahrnující vady tvaru a povrchu sýrů. Dále vady vnitřní, které zahrnují vady barvy, vzhledu, konzistence a struktury sýrového těsta. A nakonec vady chuti a vůně sýrů.

Nelze posuzovat všechny druhy sýrů stejným způsobem, neboť každý druh sýra má svoje unikátní požadavky na vlastnosti, existují ale určité společné vady, některé z nich jsou uvedeny v Tabulce č. 5 (Golian & Šnirc 2016).

Tabulka č. 5 Vady sýrů

vady vnější	
vada	příčina
nepravidelný povrch	poškození formy, špatná manipulace
porušený povrch	nedostatečné otáčení, špatná manipulace
mazlavý povrch	vysoká vlhkost, přezrálý sýr
červeno-hnědé skvrny na povrchu	vliv dusičnanů, přítomnost kvasinek a vláknitých hub, nedostatečné vakuové balení
tvrdší nebo příliš měkká kůra	nevhodné ošetření sýru, nevhodné skladovací podmínky nebo zrací obal
vady vnitřní	
vada	příčina
netypická oka	mikrobiologicky znečištěné mléko, hodně syřidla, provzdušnění sýrového zrna, nedostatečné lisování
časné duření sýrů (tj. už dva dny po výrobě)	zvýšený obsah kvasinek v mléku, přítomnost koliformních bakterií, nedostatečný záhřev mléka, nedostatečná hygiena a sanitace
pozdní duření nebo máselné kvašení	týká se především sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou, je způsobené sporoformními anaerobními bakteriemi (<i>Clostridium butyricum</i> , <i>Clostridium tyrobutyricum</i>) převážně ze znečištěného krmiva dojníc
propionové kvašení	týká se sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou, kde se neočekává přítomnost ok, je způsobeno bakteriemi propionového kvašení pocházejícími z mléka
nepravidelné praskliny v sýru	přílišné prokysání sýřeniny, silná syneréze sýřeniny, nízký přídavek vody do zrna
příliš tvrdý sýr	vysoká sušina, přílišné vytužení sýrového zrna, vysoký záhřev, nedostatečné prokysání, příliš mladý – nevyzrálý sýr

příliš měkký sýr	nízká sušina, nedostatečné vytužení sýrového zrna, nízký obsah vápníku
příliš plastická konzistence	sýr je příliš měkký a vyzrálý (polotvrdé a měkké sýry)
sýr s hnědými tečkami	nedostatečná hygiena, kontaminace propionovými bakteriemi, vysoké teploty zrání
mramorovaný sýr	nerovnoměrná sýřenina, nerovnoměrně vykysaná, nerovnoměrné rozdělení soli
nesprávné zbarvení sýru	nedostatečná hygiena, přídavek dusičnanů, stopové množství těžkých kovů, znečištění solné koupele

vady chuti a vůně

vada

hořká chuť

příčina

mikrobiologicky znečištěné mléko, nedostatečná aktivita kultur, nevhodný průběh zrání

mýdlová chuť

přezrálý nedostatečně vykysaný sýr, na povrchu převládají alkaligenní mikroorganismy

zatuchlá chuť

mléko od starodojných krav, nešetrné zacházení s mlékem, poškození tuku, vysoká aktivita oxidačních enzymů

kyselá chuť

kysejší mléko, přílišné prokysání sýřeniny, nedostatečné lisování sýrů

Zdroj: Golian & Šnirc (2016), upraveno autorem

3.1.7 Hodnocení kvality sýrů

Podle zákona č. 180/2016 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích ve znění pozdějších předpisů, „*se jakostí rozumí soubor charakteristických vlastností jednotlivých druhů, skupin a podskupin potravin a tabákových výrobků, jejichž limity jsou stanoveny tímto zákonem, prováděcím právním předpisem anebo přímo použitelným předpisem Evropské unie*“.

V praxi má však tento pojem daleko širší význam, protože v sobě zahrnuje celou škálu dalších jakostních znaků a kritérií, které si výrobce může určit sám. O kvalitu výrobku je nutné usilovat během celého procesu jeho výroby, neboť kvalita je jedním ze základních požadavků spotřebitele (Babička 2012). Kvalita sýrů zohledňuje několik aspektů zahrnujících

senzorickou jakost, nutriční hledisko a bezpečnost (McSweeney et al. 2017). Základním předpokladem bezpečné potraviny je, že nepoškodí zdraví konzumenta, musí být tedy hygienicky a zdravotně nezávadná (Babička 2012).

Kvalita vstupní suroviny

Na mikrobiologickou i výslednou kvalitu a konzistenci sýru má zásadní vliv vstupní surovina, a to mléko, které je dodáváno do mlékárny (McSweeney et al. 2017). Jedním z hlavních ukazatelů hygieny a zdravotní nezávadnosti syrového kravského mléka je stanovení celkového počtu mikroorganismů (CPM). V celkovém počtu mikroorganismů jsou zahrnuty všechny mezofilní aerobní a fakultativně anaerobní mikroorganismy, tedy nejen bakterie, ale rovněž mikroskopické houby schopné růst za stanovených podmínek při 30 °C po dobu 72 hodin. Zjištěný počet organismů se vyjadřuje v koloniích tvořící jednotky (KTJ) v jednom mililitru mléka (Kalhotka et al. 2015). Dle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 ve znění pozdějších změn (nařízení 1662/2006) je limit CPM pro syrové kravské mléko $\leq 100\,000$ KTJ v 1 ml mléka při 30 °C (klouzávý geometrický průměr za dva měsíce, dva vzorky za měsíc).

Dalším z jakostních znaků při zpeněžování mléka je počet somatických buněk (PSB). Ten je zásadně ovlivněn zdravotním stavem mléčné žlázy. Somatické buňky jsou v mléce trojího typu: epiteliální buňky, buňky pocházející z krve a cytoplazmatické částice. V EU je stanoven limit PSB v kravském mléce $\leq 400\,000$ v 1 ml mléka. Je prokázáno, že vysoké hodnoty CPM i PSB narušují kvalitu mléka a jeho technologické vlastnosti (Kalhotka et al. 2015).

Nutri-Score

Pro hodnocení sýrů z nutričního hlediska se využívá například systém označování potravin Nutri-Score, který můžeme nalézt na obale některých produktů. Ten hodnotí základní parametry složení potravin a slouží k jednodušší orientaci spotřebitele při výběru potravin. Potraviny rozděluje do pěti tříd (A-E) a používá logo s barevnou škálou od zelené do červené, kde zelená označuje potraviny s vysokou výživovou hodnotou a červená označuje výrobky, které by se měly konzumovat méně často (Ruprich et al. 2020).

Ruprich et al. (2020) provedli hodnocení 129 druhů sýrů a propočítali u nich Nutri-Score. Zjistili, že jen 7 % sýrů by bylo označeno zeleně (A-B), 16 % žlutě (třída C) a většina 77 % oranžově a 6 % červeně (třída D-E). Ke zlepšení nutriční hodnoty sýrů doporučují snížit jejich obsah soli a tuku. Doporučují též denní příjem sýrů 20 g na den, toto množství dodá tělu významné množství vápníku.

Senzorické hodnocení

Součástí celkové jakosti je i senzorická jakost. Její hodnocení patří mezi nejstarší způsoby hodnocení kvality a dodnes má nezastupitelnou úlohu (Blechová et al. 2015). Kvalita sýrů se v sýrařském průmyslu obvykle posuzuje právě senzorickým hodnocením prováděným odbornými hodnotiteli, kteří mají podrobné znalosti o produktu. K senzorickému hodnocení se nejčastěji používá bodovací systém. Například bodovací systém IDF (International Dairy Federation, Mezinárodní mlékařská federace) hodnotí sýry na stupnici 0-5, kde 5 představuje nejvyšší možnou kvalitu a 0 představuje nejnižší možnou kvalitu. Body se odečítají za konkrétní vady daného sýru. Hodnotí se zejména vzhled, chuť, textura a funkční vlastnosti sýrů. U vzhledu jsou hodnoceny vlastnosti jako intenzita a homogenita barvy, přítomnost plísni, přítomnost ok či jiných otvorů (McSweeney et al. 2017).

Dalším způsobem sensorického hodnocení je provedení preferenční pořadové zkoušky. Hodnotitel tedy provede seřazení vzorků na základě chuti od nejlepšího po nejhorší. Sensorické posouzení je provedeno dle podmínek a zásad ČSN ISO 8587 (Blechová et al. 2015).

Chemická a fyzikální analýza

Kozelková et al. (2012) prováděli rozbory mléka a sýrů pomocí standardních chemických a fyzikálních metod. Metody, které se používají při rozbořích vstupní suroviny jsou například stanovení měrné hmotnosti dle ČSN 57 0530, stanovení obsahu tuku acidobutirometrickou metodou dle ISO 2446 či stanovení obsahu vápníku titrací roztokem chelatonu III dle ISO 12081. Metody, které se používají při analýze sýrů jsou: stanovení titrační kyselosti dle ČSN 57 0107, stanovení sušiny vysoušením sýrů při 102 ± 2 °C dle ČSN 57 0107, stanovení obsahu tuku dle van Gulika podle ČSN 57 0107 a stanovení obsahu chloridů titrací dle ČSN 57 0107. Tyto klasické metody jsou přesné a reprodukovatelné, ale povětšinou i časově náročné. Nelze je však opomenout, protože jsou používány jako standardizační metody ke kontrole správnosti a přesnosti výsledků získaných instrumentálními metodami nebo se jimi doplňují (Dvořák et al. 2016).

V současné době se využívá při hodnocení kvality sýrů například také plynová chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (McSweeney et al. 2017). Dále se ke kontrole kvality potravin využívá i nukleární magnetická rezonance, hmotnostní spektrometrie v kombinaci s kapalinovou chromatografií a blízká infračervená spektroskopie (Ezeanaka et al. 2019). Tyto metody budou zmiňovány v dalších kapitolách.

3.1.8 Falšování sýrů

Sýry jsou na trhu oblíbenou potravinou, to nejspíše vedlo k tomu, že se staly předmětem falšování. Nejčastějším cílem podvodů jsou výrobky z ovčího či kozího mléka. Tato mléka jsou ve světě považována za drahou surovinu, při jejich falšování jsou tedy částečně nebo úplně nahrazena levnějším druhem mléka, například kravským. Dalším případem falšování je nahrazení živočišné bílkoviny za rostlinnou (Kuckova et al. 2019). Případy falšování sýrů byly zaznamenány i v České republice. Státní zemědělská a potravinářská inspekce (2019) například uvádí případ, kdy sýr mozzarella obsahoval nižší obsah tuku v sušině, než bylo uvedeno na obale. Dalším případem bylo špatné označení výrobku, kdy na etiketě bylo napsáno, že se jedná o sýr. Výrobek byl však vyroben z mléka a rostlinného tuku.

Falšování sýrů nese velmi nežádoucí důsledky. Výrobek není správně označen a liší se jeho složením. To může pro spotřebitele představovat zdravotní riziko (Kuckova et al. 2019).

3.1.8.1 Analytické metody užívané k ověření pravosti mléčných výrobků

Většina metod k ověření pravosti mléčných výrobků analyzuje profil mastných kyselin nebo mléčné bílkoviny ve výrobku. K identifikaci bílkovin se používají různé analytické metody včetně imunologických, elektroforetických, chromatografických, spektroskopických technik nebo technik založených na DNA.

Jednou z metod používaných k detekci falšování je kapalinová chromatografie (LC), konkrétně vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), kterou se stanoví proteinový profil použitého mléka či mléčného výrobku. LC se také používá ve spojení s hmotnostní

spektrometrií (MC). Poprvé byla tato kombinace využita k odhalení falšované bůvolí mozzarely, do které bylo přidáváno kravské mléko. V dnešní době je tato metoda stále používanější. Jako markery falšování se používají syrovátkové bílkoviny.

V posledních letech se k identifikaci potravin živočišného původu používají metody molekulární biologie. Tyto techniky využívají vysokou specifitu a citlivost metod polymerázové řetězové reakce (PCR) k detekci i velmi nízkých koncentrací kravského mléka. Nejprve byla použita duplexní PCR k detekci částečné nebo úplné záměny bůvolího mléka za mléko kravské u sýru mozzarella. Použité primery prokázaly absolutní specifitu pro tyto dva druhy a také vysokou citlivost na nízké koncentrace DNA. PCR byla postupně rozšířena na další živočišné druhy mléka (Kuckova et al. 2019).

V poslední době se stále více rozvíjí použití metod, které jsou časově nenáročné a lze je použít pro rutinní analýzy. K těmto metodám patří metoda blízké infračervené spektroskopie (NIR), kterou lze použít v potravinářských provozech on-line. Začala se používat například k analýze mastných kyselin v mléce různých druhů, sledování obsahu kaseinu a jeho frakcí, titrační kyselosti, kolagenních částic, pH či obsahu somatických buněk. Tato metoda je schopna detekovat např. přídavek kravského mléka do kozího při výrobě kozích sýrů a je natolik citlivá, že odhalí i pouhé 1 % přídavku kravského mléka (Dvořák et al. 2016).

3.2 Nukleární magnetická rezonance (NMR)

3.2.1 Historie NMR

Nukleární magnetická rezonance je v současné době běžně používanou metodou v mnoha vědeckých disciplínách jako je fyzika, chemie, biologie a medicína. Její vývoj do dnešní podoby však zabral více než 60 let (Marion 2013).

Americký fyzik Isidor Isaac Rabi se od roku 1930 zabýval studiem magnetických vlastností atomových jader. Objevil rezonanční metodu, pomocí které v roce 1939 provedl měření magnetických momentů mnoha atomových jader, protonu a deuteronu. Roku 1940 provedl přesné měření superjemné struktury spekter. V roce 1944 dostal Nobelovu cenu za fyziku za vypracování rezonanční metody pro registraci magnetických vlastností atomových jader (Králová 2007).

Objev nukleární magnetické byl uskutečněn roku 1945 dvěma na sobě nezávislými skupinami vědců, Felixem Blochem a Edwardem Purcellem, kteří poprvé detekovali signály jader vodíku ve vodě a v parafínu (Marion 2013; Goldenberg 2016). V roce 1952 dostali oba Nobelovu cenu za fyziku za rozvoj nových metod pro přesná měření jaderného magnetismu a první detekci NMR signálu (Marion 2013; Dračínský 2021).

V padesátých letech 20. století se začaly vyrábět první sériové NMR spektrometry, kterými byla měřena jádra vodíku ^1H . Poté se objevují i první ^{13}C NMR spektra a širokopásmový dekapling vodíků, od té doby se NMR spektroskopie stala nezbytnou součástí strukturní analýzy. Objev dvojdimenzionálních experimentů umožňoval podat kompletní informaci o skeletu molekuly a prostorovém uspořádání atomů. Richard R. Ernst získal v roce 1991 Nobelovu cenu za chemii za příspěvek k rozvoji nukleární magnetické rezonance s vysokým rozlišením, zavedení pulsních technik a použití Fourierovy transformace a zavedení dvoudimenzionálních NMR technik (Dračínský 2021).

V roce 2002 byla udělena Nobelova cena za chemii Kurtu Wüthrichovi za jeho vývoj nukleární magnetické rezonanční spektroskopie, pro stanovení trojrozměrné struktury biologických makromolekul v roztoku (Marion 2013).

Díky metodám umožňujícím snímat spektra nebo získat informace o jádrech atomů vznikla NMR zobrazování (NMR imaging, MR tomografie, MRT). Paul C. Lauterbur a Peter Mansfield vypracovali metodu zobrazování magnetickou rezonancí. V roce 2003 za to byli oceněni Nobelovou cenou za fyziologii a medicínu (Dračínský 2021).

3.2.2 Princip NMR

Spektroskopie NMR využívá magnetických vlastností atomových jader některých izotopů (Dračínský 2021). Tato analytická metoda poskytuje detailní informace o struktuře a dynamických vlastnostech organických i anorganických látek a biomolekul v kapalném, plynném i pevném stavu (Buděšinský & Pelnař 2000). Až do sedmdesátých let minulého století se vyráběly tzv. CW (z anglického continuous wave) NMR spektrometry (Dračínský 2021). Bylo pro ně charakteristické získávání spektra postupně. Pomalu se přizpůsobovala frekvence a síla magnetického pole, tak aby bylo možné monitorovat absorpci energie. Daly

se využít pouze pro jádra s vysokou citlivostí a získání spektra vyžadovalo poměrně dost času (Goldenberg 2016). V dnešní době se výhradně využívá pulzní NMR spektroskopie (nazývaná též FT NMR spektroskopie), využívající Fourierovu transformaci. Namísto získávání spektra postupně jsou všechna jádra jednoho izotopu excitována najednou radiofrekvenčním pulzem trvajícím několik milisekund, který pokryje frekvenční oblast všech jader jednoho izotopu zastoupením (Dračínský 2021). Princip této metody bude popsán níže.

Protony, elektrony a neutrony rotují okolo vlastní osy, mají tedy moment hybnosti \mathbf{p} , který označujeme jako spin (Buděšínský & Pelnář 2000). Protony a neutrony v jádře rozhodují o výsledném spinu jádra (Lambert et al. 2019). Pokud mají jádra izotopů sudý počet protonů i neutronů, jsou spiny částic spárovány, jádro nemá magnetické vlastnosti a jeho spinové kvantové číslo I se vyznačuje nulovou hodnotou ($I=0$; Buděšínský & Pelnář 2000; Lambert et al. 2019). Jádra s nulovým spinovým kvantovým číslem jsou například ^{12}C a ^{16}O , ta jsou pomocí NMR experimentů nepozorovatelná (Dračínský 2021).

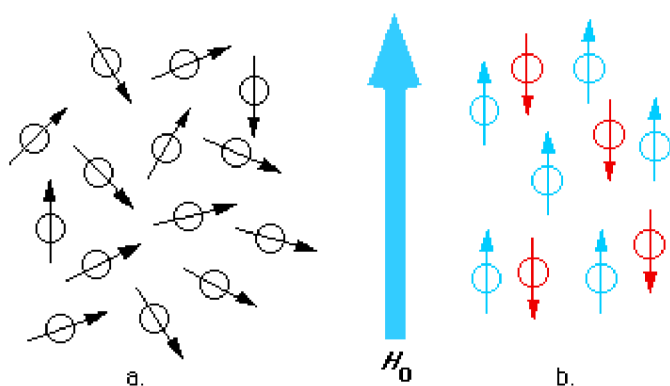
Pokud je atomové číslo nebo atomová hmotnost nebo obojí liché, disponuje jádro magnetickými vlastnostmi a vlastním jaderným magnetickým momentem $\boldsymbol{\mu}$ (Lambert et al. 2019; Dračínský 2021). Spinové kvantové číslo rotujících jader může dosahovat určité hodnoty. Jádra ve tvaru rotující koule mají spinové kvantové číslo $I = 1/2$. Tato jádra jsou vhodná pro NMR experimenty, zahrnují ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{29}Si a ^{31}P (Lambert et al. 2019). Výskyt protonu ^1H v přírodě je vysoký a je to nejběžněji měřený izotop. Oproti dalšímu často měřenému jádru ^{13}C je pro NMR spektroskopii citlivější a jeho signály jsou až 5700krát silnější než jádro ^{13}C (Dračínský 2021). Většina prvků běžně se vyskytujících v organických molekulách (H, C, N, P) má alespoň jeden izotop s $I=1/2$ (pouze kyslík ne). Jádra ve tvaru rotujícího elipsoidu mají spinové kvantové číslo 1 nebo větší ($I > 1/2$). Tato jádra mají kromě jaderného magnetického momentu $\boldsymbol{\mu}$ také kvadrupolový moment a jsou často obtížně měřitelná. Mezi tato jádra řadíme ^2H , ^{11}B , ^{14}N , ^{17}O , ^{33}S a ^{35}Cl (Novotná & Popa 2012; Dračínský 2021).

Velikost magnetického momentu ($\boldsymbol{\mu}$) vytvářeného rotujícím jádrem se liší atom od atomu a je dána spinem (\mathbf{p}) a gyromagnetickým poměrem γ měřeného izotopu:

$$\boldsymbol{\mu} = \gamma \cdot \mathbf{p}$$

Gyromagnetický poměr γ je konstanta charakteristická pro daný izotop. Čím větší je gyromagnetický poměr, tím větší je magnetický moment jádra (Buděšínský & Pelnář 2000; Lambert et al. 2019). V nepřítomnosti magnetického pole, tedy v základním stavu, spiny nemají žádnou orientaci, pokud však rotující jádra umístíme do konstantního magnetického pole \mathbf{B}_0 , dochází k uspořádání magnetických momentů ve směru (+z) a proti směru (-z) osy magnetického pole (z), jak je znázorněno na Obrázku č. 2, hovoříme o tzv. Zeemanově jevu (Novotná & Popa 2012; Lambert et al. 2019). Mírný přebytek jader na nižší energetické hladině má za následek, že celková magnetizace \mathbf{M} (vektorový součet magnetických momentů všech jader) směřuje ve směru osy z (Dračínský 2021). Díky působení magnetického pole navíc všechny magnetické momenty začnou konat precesní pohyb s kruhovou frekvencí, která se označuje jako Larmorova precesní frekvence ω_0 (Buděšínský & Pelnář 2000). Ta je dána vztahem:

$$\omega_0 = \gamma \cdot B_0$$



Na obrázku vlevo (a.) vidíme jádra s nenulovým spinem v základním stavu, kdy nemají žádnou orientaci. Vpravo (b.) pak vidíme jádra po umístění do magnetického pole B_0 , kdy dochází k jejich srovnání ve směru a proti směru osy tohoto pole.

Obrázek č. 2 Uspořádání spinů

Zdroj: Young (1995)

Aby jádra mohla přecházet z jedné energetické hladiny do druhé, je třeba druhého magnetického pole B_1 . Toto druhé magnetické pole je dodáno pomocí krátkého radiofrekvenčního pulzu, které pokryje frekvenční oblast všech jader měřeného izotopu. Když je frekvence radiofrekvenčního pulzu stejná jako Larmorova frekvence jader, nastane excitace či deexcitace energie právě mezi jádry a polem B_1 . Excitace nastává, pokud jádro přechází z nižší hladiny do vyšší, deexcitace naopak, pokud jádro přechází z vyšší hladiny do nižší. Tento proces se nazývá rezonance (Lambert et al. 2019). Rezonance způsobí, že vektor magnetizace se vychýlí z osy z . Larmorova precese jednotlivých jaderných magnetických momentů vede k precesi makroskopické magnetizace se stejnou frekvencí. Po ukončení radiofrekvenčního pulzu se vychýlený vektor magnetizace postupně vrací do rovnovážného stavu, tento proces nazýváme relaxace (Novotná & Popa 2012). Během relaxace precesní pohyb magnetizace indukuje v měřicí cínce elektrický proud. Záznam tohoto indukovaného proudu (NMR signál) se označuje jako FID (free induction decay, signál volného doznívání indukce). Má tvar exponenciálně tlumené funkce, která značí součet sinusoid s frekvencemi příslušejícími jednotlivým signálům a vyjadřuje závislost elektrického proudu indukovaného ve snímací cínce na čase. Je uložen do počítače, kde prochází Fourierovou transformací, která umožňuje z časového záznamu získat spektrum. Měření je možné opakovat rychle po sobě a lze měřit i jádra s malým gyromagnetickým poměrem či malým izotopovým zastoupením (Dračínský 2021).

Chemický posun

Pokud vložíme jádra identického izotopu do stejného magnetického pole, nebudou mít vždy stejnou rezonanční frekvenci. Na tomto jevu, jež nazýváme chemický posun, se podílí umístění jader v molekule, respektive lokální rozdělení elektronů, které může vykazovat různou intenzitu stínění jader (Hore 1995). Orbitální pohyby elektronů jsou ovlivněny vnějším magnetickým polem B_0 , které zvyšuje pravděpodobnost, že elektron se bude pohybovat určitým směrem a tento pohyb vytváří magnetické pole, které je obvykle, ne však vždy, opačného směru než vnější magnetické pole B_0 (Goldenberg 2016). Chemicky ekvivalentní jádra izotopů jsou taková jádra, která mají stejné rozložení elektronů ve svém

okolí, tudíž mají stejné stínění i stejnou rezonanční frekvenci (Dračínský 2021). Naopak jádra chemicky neekvivalentní se v rozložení elektronů ve svém okolí liší a vykazují tak rozdílné rezonanční frekvence.

Kvůli obtížnosti měřit a poté udávat rezonanční frekvence v absolutních hodnotách, se vyjadřují jako rozdíly vůči frekvenci signálu zvoleného standardu, jímž může být například benzen nebo TMS (tetramethylsilan). Rezonanční frekvence jsou vyjadřovány na stupnici chemického posunu s bezrozměrnou jednotkou ppm (parts per milion), která umožňuje snadné porovnávání dat naměřených na různých přístrojích (Buděšínský & Pelnař 2000; Dračínský 2021).

3.2.3 Výhody a limitace NMR v porovnání s dalšími analytickými metodami

Největší výhodou nukleární magnetické rezonance v porovnání s ostatními metodami, které jsou v dnešní době používány ke kontrole kvality potravin, je, že tato metoda je neinvazivní a neionizující, nepoškozuje tedy zkoumaný materiál. Další klíčovou výhodou je fungování v reálném čase bez nutnosti další kalibrace. Navíc je tato metoda poměrně rychlá, úpravu vzorku před analýzou je snazší a poskytuje přesné výsledky (Ezeanaka et al. 2019). NMR rovněž přináší komplexní informace o struktuře, které by jinak byly těžko dostupné a vyžadovaly by použití kombinace jiných chemických a analytických metod (Dračínský 2021). Při používání NMR spektroskopie je zapotřebí technických dovedností na vysoké úrovni, což je určitým omezením. Další nevýhodou je vysoká pořizovací cena (Ezeanaka et al. 2019). Nejvíce je však NMR spektroskopie limitována svou citlivostí, která je dána rozdílem populací jader na energetických hladinách. Čím větší je indukce magnetického pole, tím větší je energetický rozdíl mezi energetickými hladinami, a tím větší je rozdíl v populacích jednotlivých spinových stavů. Větší rozdíl v populacích stavů vede k větší citlivosti NMR metody (Dračínský 2021).

Níže je NMR spektroskopie krátce porovnána s dalšími analytickými metodami.

- Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie se obvykle kombinuje s kapalinovou chromatografií a využívá se pro určení hmotnosti částic a určování chemické struktury. Tato metoda je na rozdíl od NMR spektroskopie destruktivní a nedokáže poskytnout informace o struktuře bez použití standardu (Bird et al. 2018). K analýze pomocí NMR je však potřebné větší množství látky než při použití hmotnostní spektrometrie. Například pro rutinní měření organických látek jsou to řádově miligramy (Dračínský 2021).

- Blízká infračervená spektrometrie

Blízká infračervená spektroskopie potřebuje k ustálení další kalibrační model a není tak spolehlivá a dostatečně stabilní během používání jako nukleární magnetická rezonance, která je robustní a tím pádem dostatečně stabilní (Ezeanaka et al. 2019).

- Plynová chromatografie

Plynová chromatografie není zcela neinvazivní, tak jako nukleární magnetická rezonance a také na rozdíl od ní vyžaduje časově náročnou přípravu vzorků (Ezeanaka et al. 2019).

- PCR

Nevýhodou PCR metod je jejich časová i pracovní náročnost s omezenou použitelností při rutinním screeningu mléka pro mlékárenský průmysl (Kuckova et al. 2019). Naproti tomu NMR je rychlá metoda, vhodná k rutinním screeningům.

3.3 Využití NMR v sýrařském odvětví

Použití NMR v potravinářství

Během zpracování potravin se NMR spektroskopie využívá pro analýzu vody, tuků a proteinů a také k analýze fyzikálních, chemických a strukturních vlastností. Její výhodou je, že může analyzovat změnu kvality potraviny, aniž by došlo k jejímu poškození. Výsledky získané touto analytickou metodou mohou pomoci vylepšit konečný produkt, protože díky průběžnému monitorování kvality, je možné provést určité vylepšení ještě předtím, než je dokončen proces výroby. Obsah a aktivita vody jsou u některých produktů důležitými ukazateli pro zajištění bezpečnosti a kvality produktu (Ezeanaka et al. 2019).

NMR, konkrétně ^1H NMR byla aplikována při zkoumání profilu metabolitů mléčných výrobků. Tyto profily se vztahovaly k různým aspektům, jako například krmivo zvířat, kvalita mléka, geografický původ či proces zrání sýrů. Metabolitem rozumíme molekulu s nízkou molekulovou hmotností jako jsou volné aminokyseliny, organické kyseliny, cukry, polyoly, nukleotidy a další. V případě mléka jsou to produkty metabolismu zvířete závisující na druhu zvířete, podmínkách chovu, krmivu atd., zatímco u sýrů profil metabolitů závisí spíše na technologii výroby a procesu zrání. Většina detekovatelných metabolitů v sýru jsou totiž produkty enzymů nebo aktivity mikroorganismů, protože většina metabolitů mléka odchází spolu se syrovátkou (Scano et al. 2019).

NMR experimenty

Pro zkoumání profilu metabolitů sýrů se nejčastěji používá ^1H NMR, která je schopná detekovat současně, dokonce i ve složitých biologických maticích, všechny malé molekuly, které mají atom vodíku.

Pro jednorozměrnou (1D) NMR s vysokým rozlišením (HR) se nejčastěji používají kapalné extrakty vzorků. Typicky 1D protonové spektrum obsahuje několik překrývajících se signálů kvůli složitosti zkoumané matrice. Použití „multidimenzionálních“ a/ nebo „mnohojaderných“ experimentů může pomoci od tohoto problému.

Homonukleární experimenty aplikované ke studiu mléčných výrobků jsou především korelační spektroskopie (COSY) a totální korelační spektroskopie (TOCSY). Dále se využívají vícejaderné experimenty. Tedy heteronukleární vícenásobná kvantová koherenční spektroskopie (HMQC), heteronukleární jednoduchá kvantová koherenční spektroskopie (HSQC) a heteronukleární vícenásobná vazba korelační spektroskopie (HMBC).

Snímání magického úhlu s vysokým rozlišením (HR-MAS) je platným nástrojem v NMR spektroskopii pro studium neporušených biologických matic, suspendovaných nebo nabobtnalých v deuterovaném rozpouštědle (Scano et al. 2019).

Provedené experimenty

Charakterizace suroviny nebo potraviny představuje pro potravinářský průmysl důležitou strategickou otázku. Obecným cílem při ověřování pravosti potravin je identifikovat jedinečné markery nebo skupiny markerů pro charakterizaci kvality potravin (Marseglia et al. 2013). Byly provedeny experimenty, kdy pomocí NMR byly zjišťovány markery k přiřazení

vzorku sýru ke krmivu krav, od kterých pocházelo mléko na výrobu sýra. První skupina krav byla krmena ve vnitřních prostorách celkovou směsnou krmnou dávkou, druhá skupina krav byla krmena venku na pastvině výhradně travním porostem a třetí skupina byla krmena na pastvině travním porostem a bílým jetelem. V obsahu metabolitů souvisejícím s krmivem však byly zaznamenány jen malé změny. Hladiny citrátu a toluenu byly základem pro rozlišení sýrů vyrobených z mléka krav krmenných venku na pastvině či krmnou směsí ve vnitřních prostorách. Větší změny v obsahu metabolitů byly totiž způsobeny biochemickými procesy během zrání sýra (Panthi et al. 2019).

Stav a dynamika vody do značné míry určují makroskopické vlastnosti sýra, proto byly pomocí ^1H NMR spektroskopie učiněny pokusy, které odhalily mechanismy mobility vody ve strukturách sýra (Kruk et al. 2021). Dále bylo zjištěno, že pomocí time domain NMR (česky časová oblast, zkratka TD NMR), které se zaměřuje na měření časové oblasti namísto frekvence, lze určit obsah vody v sýru stejně přesně, bezpečněji a rychleji než pomocí gravimetrických metod (Castell-Palou et al. 2013).

Pomocí NMR byly objeveny biomarkry pro hodnocení zrání některých druhů sýrů. Například pro čedar to jsou citrulin a arginin, které se během zrání snižují (Chen et al. 2021). U sýru Fiore Sardo byly hodnoceny fáze zrání v závislosti na obsahu organických kyselin, konkrétně kyseliny mléčné, octové, glutamové a gama-aminomáselné (Piras et al. 2013).

NMR se v sýrařském odvětví také využívá k ověření geografického původu. Consonni & Cagliani (2008) provedli experiment, kdy srovnávali italský Parmigiano Reggiano se vzorky sýrů typu Grana pocházejících ze zemí východní Evropy. Sýry z východní Evropy se vyznačovaly vyšším obsahem leucinu a isoleucinu, které byly jinak typické pouze u nevyzrálých italských vzorků Parmigiano Reggiano a rovněž vyšším obsahem laktátu, butanoátu a acetátu, jež také svědčí o krátkém zrání sýrů. Naproti tomu pro italský Parmigiano Reggiano zrající 30 měsíců byl typický vyšší obsah threoninu.

U sýrů byly hodnoceny i podmínky skladování. Pomocí NMR lze totiž klasifikovat metabolity, díky nimž je možno doložit rozdíly v degradačních procesech probíhajících během skladování (Lamanna et al. 2008).

3.3.1 Přehledová tabulka

Na základě vědeckých článků byla vypracována přehledová tabulka dvaceti studií zabývajících se využitím NMR v sýrařském odvětví.

Autor a rok studie	Počet vzorků	Příprava vzorku a kalibrace	NMR spektrometr	Kvantifikace a kvalifikace	Analýza	Statistické metody, software	Výsledky
Gonçalves et al. 2022	22 vzorků komerčně vyrobených sýrů mozzarella v různých podmínkách skladování	1 g vzorku smíchán s 2 ml D ₂ O, centrifugováno, kapalná fáze znovu odstředěna, 400 µl vloženo do 5 mm NMR sondy spolu s 200 µl rozotoku TSP v D ₂ O	Bruker Avance III 500 vybavený trojitou 5 mm rezonanční širokopásmovou inverzní sondou (TBI)	Mastné kyseliny, aminokyseliny, sacharidy	¹ H NMR	SAS GLM, PRC, ANOVA	Hlavní markery pro rozlišení sýra mozzarella vystaveného různým podmínkám chlazení: sukcinát, acetát, laktát.
Kruk et al. 2021	7 vzorků různých druhů sýrů (boryna uzená, edamer, hit, gouda light, gouda uzená, gouda grand, tavená gouda)	Neošřené vzorky, extrudáty válcového tvaru (7 mm v průměru - 10 mm vysoké)	FFC relaxometr (Stelar S. rl, Spinmaster, 2000; Mede, Itálie); frekvenční rozsah 4 kHz-40	Aktivita volné vody, vázané vody (pomalejší dynamika)	¹ H NMR	Korelační analýza	Uvnitř frakce vázané vody identifikovány molekuly vody dočasně vázané na proteiny, procházející dynamikou změny orientace a molekuly vody procházející translační difúzí v ohraničeném prostoru.

Autor a rok studie	Počet vzorků	Příprava vzorku a kalibrace	NMR spektrometr	Kvantifikace a kvalifikace	Analýza	Statistické metody, software	Výsledky
Chen et al. 2021	6 různých vzorků komerčně prodávaných sýru čedar	20 g sýru čedar rozemleto v kapalném dusíku, extrahováno 60 ml roztokem chloroform, methanol 1:2 a bylo přidáno 30 ml destilované vody, poté přefiltrováno, lyofilizováno a přidán fosfátový pufr, obsahující 0,1 mmol/l DSS, v poměru 0,028 ml na 1 mg vzorku	Bruker 800 MHz Avance III vybavený 5 mm QCI kryogenní sondou	4 organické kyseliny, 19 aminokyselin, 2 cukry, 1 amin a glycerol	¹ H NMR, TOCSY NMR, HSQC NMR	Bruker Topspin Software, PCA v XLSTAT, ANOVA	Poměr citrulinu a argininu ve vodných extraktech byl nejdůležitějším ukazatelem pro hodnocení zrání sýru čedar, oba metabolity se během zrání snížily. Tyrosin, tyramin a lysin jsou vysoce korelovány se senzoricými atributy zralého sýra, zatímco β-galaktóza a glycerol jsou v korelaci s mladými senzoricými atributy.
Kandasamy et al. 2020	52 vzorků (celkem 11 druhů sýrů získaných z mléčných farem v Jižní Korei)	Do 4 mm nanosondy bylo dáno 20 mg vzorku a 20 μL 2mM TSP-d4 roztoku v D ₂ O	600 MHz Agilent HR-MAS, 599,93 MHz, vybavený 4 mm gHX nanosondou s rychlostí rotace 2000 Hz	16 aminokyselin, 5 organických kyselin, 2 cukry, 3 deriváty aminokyselin, 2 fosfolipidy a alkohol z glycerolu	¹ H HRMAS NMR	PCA, PLS-DA, OPLS-DA	Profily metabolitů korejských sýrů založených na NMR byly v souladu s jejich senzoricými vlastnostmi. Aminokyseliny, laktát, citrát a fosfolipidy – nejdůležitější proměnné související se senzoricou kvalitou. Změny metabolitů souvisejí s proteolytickými ději během zrání.

Autor a rok studie	Počet vzorků	Příprava vzorku a kalibrace	NMR spektrometr	Kvantifikace a kvalifikace	Analýza	Statistické metody, software	Výsledky
Panthei et al. 2019	18 vzorků sýra Maasdam, připravených duplicitně (n=36), vyrobených z mléka krav, které byly krmeny třemi pokusnými, předem danými systémy	30 g vzorku lyofilizováno, rozdrceno, 50 mg dáno do 1,5 ml Eppendorfových zkumavek, extrakce methanol-chloroform-voda (4:3:3), centrifugace, rozpustný extrakt smíchán s 700 µl D ₂ O obsahující 0,025% TSP, dáno do 5 mm NMR sondy a uzavřeno	Bruker Avance III 600 vybavený sondou TXI, relaxační zpoždění 5 s, 64 skenů, 32 K bodů, spektrální šířka 12,15 ppm; Bruker Avance III 600	Aminokyseliny, organické kyseliny, mastné kyseliny, těkavé sloučeniny	¹ H NMR, ¹ H HRMAS NMR, HS GC-MS	Software Topspin 3.0, Matlab, PCA, OPLS-DA, ANOVA	Nízké změny v obsahu metabolitů způsobené skladbou krmiva, větší změny v obsahu metabolitů díky startovacím a sekundárním kulturám během zrání. Hladiny citátu a toluenu-základ pro rozlišení sýrů vyrobených z mléka krav krmenných pastvou či krmnou směsí.
Segato et al. 2019	6 vzorků sýra Asiago vyrobených z mléka krav, které byly krmeny dvěma danými pokusnými systémy	200 mg vzorku rozemleto, smícháno s 1 ml D ₂ O, 100 µL 3-trimethylsilyl) - propionát-d4 (Sigma Aldrich) použito jako vnitřní standard	VARIAN INOVA- 600 MHz vybavený 5 mm trojitou rezonanční, inverzní sondou	Ve vodě rozpustné NMR metabolomické profily sýrů Asiago; cholin, 2,3-butandiol, lysin, tyrosin	¹ H NMR, TOCSY NMR	Software MestReNova 6.0.2, ANOVA, vícerozměrná kanoická diskriminační analýza (CDA), software SAS 9.4, XLStat, Statistica	¹ H NMR profil byl výkonný metabolomický otisk pro správnou identifikaci pouze u vzorků s nejkratší dobou zrání, u zralejších vzorků chybně přiřazoval sýr k systému krmení díky biochemickým změnám v procesu zrání.

Autor a rok studie	Počet vzorků	Příprava vzorku a kalibrace	NMR spektrometr	Kvantifikace a kvalifikace	Analýza	Statistické metody, software	Výsledky
Prema et al. 2015	28 kanadských sýrů čtyřech různých druhů	150 mg vzorku smícháno s 1,5 ml CDCl ₃ , poté přefiltrováno přímo do NMR zkumavky	Bruker Avance III Ultrashield 500 Mhz, 65536 bodů, 128 skenů, spektrální šířka 5000 Hz	Konjugovaná kyselina linolová (CLA)	¹ H NMR, GC, Folchova extrakční metoda	Lineární regrese, korelační analýzy	Celkové koncentrace CLA získané pomocí ¹ H NMR byly v souladu s údaji získanými pomocí GC a Folchovy extrakce, NMR však byla vyhodnocena jako rychlejší metoda. Dále se zjistilo, že sýry z mléka dojnic krmenných výhradně trávou vykazovaly vyšší obsah CLA než konvenční vzorky.
Castell-Palou et al. 2013	40 vzorků různých druhů sýrů	Vzorky rozemlety, sušeny při 4 °C, umístěny do sondy o průměru 18 mm a výšce 40 mm, tepelně ekvilibrovány při 40 °C 30 minut	Bruker Minispec mq20 NMR	Obsah lipidů a vody	TD NMR	Software Quant pro OPUS 5.5. PLS, křížová validace, Matlab	Pomocí TD NMR lze zjistit obsah vody v sýru stejně přesně, bezpečněji a rychleji než pomocí gravimetrických metod. Lze ji využít i pro predikci obsahu vody a tuku v sýru.

Autor a rok studie	Počet vzorků	Příprava vzorku a kalibrace	NMR spektrometr	Kvantifikace a kvalifikace	Analýza	Statistické metody, software	Výsledky
Gobet et al. 2013	8 čtyřdenních sýrů – jako referenční vzorky, 16 polotvrdých zralých sýrů	4mm rotor CP-MAS byl naplněn válcovou částí (vnější průměr 3–4 mm; délka 1,6 cm) odebranou z jádra sýrů	Bruker AVIII 400 (9.4 T), 161,98 MHz, vybavený dvojitou 4 mm rezonanční sondou H/X CP-MAS, rychlost MAS 2 kHz, sekvence SPE s dipolárním dicouplingem 45 kHz	Fosforečnany- mobilní nerozpustné fosfáty, imobilní nerozpustné fosfáty, vysoce mobilní rozpustné fosfáty	³¹ P NMR	Spektra rozložena na Lorentzovy čáry různých šířek a intenzit pomocí softwaru Dmfit, ANOVA, Pearsonova korelace, software Systat	Prokázání vhodnosti ³¹ P NMR ke stanovení různých frakcí fosforečnanů v sýrech in-situ. Podíly: 10 % vysoce mobilní rozpustný fosfát z anorganického P (Pi), 70 % mobilní nerozpustný fosfát z koloidního fosforečnanu vápenatého a části fosforylovaných serinových reziduí (Pser) z volné struktury, 20 % imobilní nerozpustné fosfáty z Pser vázané struktury.
Marseglia et al. 2013	200 vzorků mléka od krav krmenných senem nebo siláží, vzorky píce, vzorky strouhaných sýrů Parmigiano Regiano a Grana Padano	50 mg tukového extraktu (sýra či mléka) rozpuštěno v 1 ml CDCl ₃	VARIAN INOVA-600 MHz vybavený 5 mm inverzní trojitou rezonanční sondou	Cyklopropyl a ω-cyklohexyl mastné kyseliny	¹ H NMR, GC-MS	MestReC 6.0.2. software, PCA, CT	Detekovány nové cyklické mastné kyseliny, díky cyklopropyl mastným kyselinám a kyselině laktobacilové lze odlišit mléko od krav krmenných senem a siláží, to může pomoci u kontroly autenticity Parmigiano Regianno, přítomnost alicyklických mastných kyselin koreluje s obsahem obilné moučky v pici.

Autor a rok studie	Počet vzorků	Příprava vzorku a kalibrace	NMR spektrometr	Kvantifikace a kvalifikace	Analýza	Statistické metody, software	Výsledky
Mulas et al. 2013	36 vzorků ovčích sýrů ze Sardinie (18 ze syrového mléka, 18 z tepelně ošetřeného)	Před analýzou vzorky ekvilibrovány v chladné místnosti při 20 °C po dobu 1 h	Bruker Avance 300 MHz vybavený mikrozobrazovací sondou Micro 2,5	Vizuální kontrola textury pomocí snímků MRI, protony vody a tuku	MRI, bi-exponenciální analýza rozpadu	AnalyzeNNLS softwarový balíček, Matlab software verze R2013b, statická analýza pomocí softwaru GraphPad Prism 5.03, ANOVA	Vzorky lze rozlišit díky transverzální relaxační časové konstantě T ₂ sýry z tepelně ošetřeného mléka vyšší podíl T ₂ díky rychle relaxujícím protonům vody, také méně ok a jemnější struktura.
Piras et al. 2013	40 vzorků (4x sýr Fiore Sardo – 3x vyroben z izolovaných autochtonních kultur, 1x z komerčních kultur)	130 mg vzorku lyofilizováno, rozdrceno, extrakce methanol-chloroform-voda extrakt rozpuštěn v 1 ml D ₂ O; 600 µl vloženo do 5 mm NMR sondy, přidáno 50 µl roztoku TSP v D ₂ O (0,8 mM výsledná koncentrace)	Varian UNITY INOVA 400, pracující při 399,95 MHz	40 metabolitů-sacharidy, organické kyseliny, aminokyseliny, fenolické sloučeniny	¹ H NMR, ¹ H- ¹ H COSY a ¹ H- ¹ H TOCSY 2D NMR, chemometrie	Matlab, Simca 13.0, PCA, PLS regrese, RMSEC, RMSEP	K. mléčná – do 6. dne postupný nárůst, poté se obsah snižuje; zvyšující se nárůst k. octové během zrání; v pozdní fázi zrání snížené množství k. glutamové, zvýšený obsah k. gama-aminomáselné; ¹ H NMR je vhodná technika k hodnocení zráního procesu i ověření specifik CHOP sýra Fiore Sardo, při jehož výrobě mohou být použity autochtonní kultury.

Autor a rok studie	Počet vzorků	Příprava vzorku a kalibrace	NMR spektrometr	Kvantifikace a kvalifikace	Analýza	Statistické metody, software	Výsledky
Mazzei & Piccolo 2012	37 vzorků Mozzarella di Bufala Campana dodaných mlékárnou La perla del Mediterraneo, 12 komerčních vzorků Mozzarella di Bufala Campana	30 mg vzorku vloženo do 4 mm zirkonového HRMAS rotoru s perforovanou teflonovou vložkou napuštěnou 15 µl roztoku D ₂ O (99.8% D ₂ O/H ₂ O); NMR analýza v kapalném stavu: vzorek lyofilizován, vložen do 5 mm NMR sondy s 1 ml D ₂ O	Bruker Avance 400 MHz vybavený ¹ H- ¹³ C HRMAS sondou schopnou rotace rotoru při 5 kHz	Aminokyseliny, organické kyseliny, mastné kyseliny, sacharidy, alkoholy	¹ H HRMAS NMR, ¹ H- ¹ H COZY a TOCSY NMR, ¹ H- ¹³ C HSQC NMR	Bruker Topspin (v.1.3) a MestReC NMR Processing Software (v.4.9.9.9, PCA, DA, HCA, ANOVA	Získána databáze spekter (37), které lze využít k prokázání kvality a geografického původu Mozzarella di Bufala Campana, komerční vzorky nižší obsah β-laktózy a β-galaktózy, větší množství kyseliny octové, nižší obsah kyseliny linolové a linolenové.
Anedda et al. 2011	6 vzorků sýru Pecorino Sardo	Lipidový extrakt rozpuštěn v 0,8 ml deuterovaného chloroformu a roztok vložen do 5 mm NMR sondy	Bruker Avance 600 MHz vybavený 5 mm BBO sondou a 5 mm čtyřnásobnou rezonanční QXI inverzní detekcí s xyz gradienty	Mastné kyseliny, triacylglyceroly, diacylglyceroly	¹³ C NMR, ¹ H NMR, HPLC	Software MestReNova 5.2.4.	Charakteristika molekulárních tukových složek sýru Pecorino Sardo. Jednoznačně detekovány například kyselina olejová, linolová, linolenová, máselná, kapronová, kaprylová nebo CLA.

Autor a rok studie	Počet vzorků	Příprava vzorku a kalibrace	NMR spektrometr	Kvantifikace a kvalifikace	Analýza	Statistické metody, software	Výsledky
Bordoni et al. 2011	5 vzorků v různých fázích trávení (sýr Parmigiano Reggiano starý 15 a 30 měsíců)	LF-NMR: vzorky bez úpravy umístěny do NMR sondy o průměru 10 mm; ¹ H-NMR: k 1 ml vzorku přidáno 160 μl fosfátového pufru v D ₂ O, obsahující TSP jako vnitřní standard, centrifugace, skladování při -80 °C	Bruker US+ Avance III, 400 MHz, vybavený BBI-z sondou a vzorkovačem SampleCase	Volné aminokyseliny, peptidy, proteiny	LF NMR, ¹ H NMR	TopSpin 3.0, analýza SDS-PAGE	Hydrolytická aktivita bakterií během zrání sýrů usnadňuje jejich trávení v lidském gastrointestinálním systému. Z hlediska volných aminokyselin je však trávení sýrů s různou dobou zrání ukončeno podobně.
Gobet et al. 2010	2 vzorky polotvrdých sýrů	³¹ P NMR: vzorek o průměru 3,5 mm a délce 1 cm a vložen do 4 mm NMR rotoru; ²³ Na-NMR: vzorek o průměru 10 mm a délce 5 cm vložen do 10 mm NMR sondy; kalibrovaný (0,4M) vodný roztok Na ⁷ Dy (PPP) ₂ v D ₂ O použit jako externí referenční vzorek	Bruker DMX-400 vybavený dvojitou rezonanční sondou H/X CP-MAS 4 mm	Fosfáty, sodné ionty	³¹ P NMR, ²³ Na NMR	PeakFit software 4.12, Gaussův-Lorentzův součet	Přímá kvantifikace všech sodných iontů v sýru, důkaz mobilní frakce koloidních fosfátů, výsledky také dokázaly určité korelace mezi distribucí a kvantifikací fosforečnanů a sodných iontů přímo závislých na obsahu soli v různých fázích sýrů.

Autor a rok studie	Počet vzorků	Příprava vzorku a kalibrace	NMR spektrometr	Kvantifikace a kvalifikace	Analýza	Statistické metody, software	Výsledky
Schievano et al. 2009	10 vzorků různých druhů sýrů	Vzorek zmražen v kapalném dusíku, rozemlety, 0,5 g vzorku extrahováno 2 ml roztoku 0,25HClO ₄ v D ₂ O, 0,5 ml extraktu dáno do 5 mm NMR zkumavky, aldehydický proton DMF jako externí standard	Bruker Avance DMX600 vybavený 5 mm TXI xyz gradientní reverzní sondou	Histamin	¹ H NMR, ¹ H- ¹ H TOCSY NMR, HMQC NMR	Advanced Chemistry Development software, instrumentální linearita, relativní směrodatná odchylka, LOD, LOQ	Popsána rychlá metoda ke kvantifikaci histaminu, pro hladiny vyšší než 100 mg/kg trvá doba experimentu 16 minut, od 30 do 100 mg/kg je doba experimentu asi 30 minut, koncentrace nižší než 30 mg/kg (až do 4 mg/kg) je nutná 1 hodina a 20 minut.
Consonni & Cagliani 2008	Celkem 33 vzorků (25 italských sýrů Parmigiano Reggiano, 8 sýrů typu Grana ze zemí východní Evropy)	100 mg vzorku rozpuštěno v 600 μl D ₂ O, centrifugováno a poté použito 500 μl supernantu, TSP využito jako referenční látka	Bruker DMX 500 pracující při 500.13 MHz	Aminokyseliny, mastné kyseliny, organické kyseliny	¹ H NMR, TOCSY, HSQC, HMBC	Software Topspin 1.3, Simca-P, PLS, O-PLS, PCA, software ACD/Spec Manager	Zahraniční vzorky-vyšší obsah leucinu a isoleucinu (ten je rovněž typický pro nevyzrálé italské vzorky), laktátu, butanoátu a acetátu (svědčí o krátkém zrání). Italský Parmigiano Reggiano-vyšší obsah threoninu (30 měsíců zralé vzorky).

Autor a rok studie	Počet vzorků	Příprava vzorku a kalibrace	NMR spektrometr	Kvantifikace a kvalifikace	Analýza	Statistické metody, software	Výsledky
Lamanna et al. 2008	5 vzorků komerčně vyráběného sýru Ribola, jejich balení bylo otevřeno v různé dny od zakoupení	1 g vzorku suspendován ve 2 ml D ₂ O, odstředění, vodná fáze opět odstředěna a přefiltrována; pro 2D experimenty-speciální vzorky s přídavkem DDS; vzorek v pevném stavu: 60 mg sýra navlhčeno 6 μl D ₂ O	Bruker Avance 600 pracující při 600.13 MHz. K přechodných jevů, kapalný vzorek získán inverzní trojitou sondou, pevný vzorek sondou s vysokým rozlišením HR-MAS	Aminokyseliny, sacharidy, lipidy	¹ H NMR, ¹ H- ¹ H COSY NMR, ¹ H- ¹ H TOCSY, ¹ H- ¹³ C HSQC NMR, ¹ H- ¹³ C CHMBC NMR	PCA	Kvantifikováno 15 metabolitů, díky nimž je možno doložit rozdíly v degračních procesech probíhajících během skladování.
de Angelis Curtis et al. 2000	30 vzorků sýrů Grana Padano	U NMR s nízkým rozlišením: extrudáty válcového tvaru (7 mm v průměru - 10 mm vysoké) u NMR s vysokým rozlišením: extrakce vzorku methanolem, chloroformem a vodou, fáze odstředěny a sušeny pod proudem dusíku, extrakty rozpuštěny v 0,4 ml D ₂ O	NMR s nízkým rozlišením: Bruker Minispec PC120, 20 MHz, filtr 100 kHz, útlum 30 dB. NMR s vysokým rozlišením: Bruker AM-500, 500,137 MHz.	Distribuce vody, aminokyseliny	¹ H NMR, 2D NMR COSY, termogravimetrické techniky TG a DTG	neuveдено	Množství vody v sýru Grana Padano se během zrání mění v závislosti na proteolýze a lipolýze, obsahu soli a mobilitě vody. V závislosti na vzdálenosti středu sýru se zvýšil obsah asparátu, glutamátu, histidinu, snížil se asparagin, valin a leucin.

4 Závěr

Ke kontrole kvality sýrů se v dnešní době využívají metody, jako například hmotnostní spektrometrie, metoda blízké infračervené spektroskopie či plynová chromatografie. Stále častěji se však také využívá nukleární magnetická rezonance. Díky vědeckým studiím bylo zjištěno, že nukleární magnetická rezonance má v sýrařském odvětví široké využití. Pomocí této analytické metody byly provedeny experimenty, které mohou být nápomocny při hodnocení zrání sýrů, skladování či falšování. Tato metoda navíc nepoškozuje zkoumaný materiál a je rychlá, proto může být použita pro rutinní analýzu a může nahradit dosud používané klasické metody, které jsou mnohdy časově náročné. Nukleární magnetická rezonance může být použita například k analýze obsahu či mobility vody, což může být využito pro zajištění kvality sýrů.

Dále byly pomocí této metody objeveny biomarkery k hodnocení některých druhů sýrů. Pro sýr čedar to byl například citrulin a arginin. Byly také zjištěny biomarkery vypovídající o různých podmínkách skladování sýrů. Těmito biomarkery byly sukcinát, acetát a laktát.

V neposlední řadě se ukázalo, že pomocí této metody lze poměrně rychle stanovit mastné kyseliny v lipidech či kvantifikovat pouze jednu určitou mastnou kyselinu, například konjugovanou kyselinu linolovou.

5 Literatura

1. Anděl M, Dostálová J, Dlouhý P, Drbohlav J. 2012. Sýry a tvarohy ve výživě. Česká technologická platforma pro potraviny, Praha.
2. Anedda R, Dessi MA, Lai A, Melis MP, Roggio T, Scano P. 2011. ^1H - and ^{13}C -NMR Characterization of the Molecular Components of the Lipid Fraction of Pecorino Sardo Cheese. *Journal of the American Oil Chemists Society* **88**:1305–1316.
3. Babička L. 2012. Průvodce světem potravin. Ministerstvo zemědělství. Praha.
4. Banni S, Carta G, Manca C, Murru E. 2017. Palmitic Acid: Physiological Role, Metabolism and Nutritional Implications. *Front. Physiol* **8**:902
5. Berg HE. 1993. Reaction of lactose during heat treatment of milk: a quantitative study. Agricultural University. Wageningen.
6. Bird SS, Gathungu RM, Kautz R, Kristal BS, Vouros P. 2018. The integration of LC-MS and NMR for the analysis of low molecular weight trace analytes in complex matrices. *Wiley Mass Spectrometry Reviews* **39**:35–54.
7. Blechová R, Hasoňová L, Kala R, Samková E. 2015. SENZORICKÉ HODNOCENÍ SÝRŮ S PLÍSNÍ NA POVRCHU V ZÁVISLOSTI NA STADIU ZRALOSTI. *MLEKÁŘSKÉ LISTY*. **150**:8-11.
8. Bordoni A, Picone G, Babini E, Vignali M, Danesi F, Valli V, di Nunzio M, Laghi L, Capozzi F. 2011. NMR comparison of in vitro digestion of Parmigiano Reggiano cheese aged 15 and 30 months. *Magnetic Resonance in Chemistry* **49**:S61–S70.
9. Buděšínský M, Pelnař J. 2000. Fyzikálně-chemické metody (Nukleární magnetická rezonance). Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Praha.
10. Callec Ch. 2002. Encyklopedie sýrů. Rebo, Čestlice
11. Castell-Palou A, Rosselló C, Femenia A, Simal S. 2013. Simultaneous Quantification of Fat and Water Content in Cheese by TD-NMR. *Food and Bioprocess Technology* **6**:2685–2694.
12. Čejna V, Obermaier O. 2013. Jak poznáme kvalitu? Sýry a tvarohy. Sdružení českých spotřebitelů, o.s. pro Českou technologickou platformu pro potraviny, Praha.

13. Chen Y, MacNaughtan W, Jones P, Yang Q, Williams H, Foster T. 2021. Selection of potential molecular markers for cheese ripening and quality prediction by NMR spectroscopy. *Food Science and Technology* **136**:110306.
14. Consonni R, Cagliani LR. 2008. Ripening and geographical characterization of Parmigiano Reggiano cheese by ¹H NMR spectroscopy. *Talanta* **76**:200–205.
15. de Angelis Curtis S, Curini R, Delfini M, Brosio E, D'Ascenzo F, Bocca B. 2000. Amino acid profile in the ripening of Grana Padano cheese: A NMR study. *Food Chemistry* **71**:495–502.
16. Dračínský M. 2021. NMR spektroskopie pro chemiky. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Praha.
17. Dvořák L, Šustová K, Mlček J. 2016. Blízká infračervená spektroskopie jako pomocník při kontrole kvality potravin. *Chemické Listy* **110**:868–873.
18. Evropská komise. 2006. Nařízení Komise (ES) č. 1662/2006 ze dne 6. listopadu 2006, kterým se mění nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu. Brusel.
19. Evropský parlament, Rada Evropské Unie. 2004. Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 ze dne 29. dubna 2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu. Brusel.
20. Ezeanaka MC, Nsor-Atindana J, Zhang M. 2019. Online Low-field Nuclear Magnetic Resonance (LF-NMR) and Magnetic Resonance Imaging (MRI) for Food Quality Optimization in Food Processing. *Food and Bioprocess Technology* **12**:1435–1451.
21. FAO. 2013. Milk and dairy products in human nutrition. FAO, Rome.
22. Farkye NY. 2004. Cheese technology. *International Journal of Dairy Technology* **57**:91–98.
23. Gajdůšek S. 1998. Mlékařství II. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno.
24. Gobet M, Buchin S, Rondeau-Mouro C, Mietton B, Guichard E, Moreau C, le Quéré JL. 2013. Solid-State ³¹P NMR, a Relevant Method to Evaluate the Distribution of Phosphates in Semi-hard Cheeses. *Food Analytical Methods* **6**:1544–1550.

25. Gobet M, Rondeau-Mouro C, Buchin S, le Quéré JL, Guichard E, Foucat L, Moreau C. 2010. Distribution and mobility of phosphates and sodium ions in cheese by solid-state ^{31}P and double-quantum filtered ^{23}Na NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry* **48**:297–303.
26. Goldenberg DP. 2016. *Principles of NMR Spectroscopy: An Illustrated Guide*. University Science Books, Mill Valley.
27. Golian J, Šnirc J. 2015. *Mlieko a mliečné výrobky I. diel*. Slovenská poľnohospodárska univerzita, Nitra.
28. Golian J, Šnirc J. 2016. *Mlieko a mliečné výrobky II. diel- Technológia výroby mliečných výrobkov*. Slovenská poľnohospodárska univerzita, Nitra.
29. Gonçalves FC, de Oliveira VM, Martins FT, Lião LM, Ferri PH, Queiroz Júnior LHK. 2022. Predicting chemical shelf life of mozzarella cheese submitted to irregular refrigeration practices by Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy and statistical analysis. *Journal of Food Composition and Analysis* **105**:104229.
30. Hore P. J. 1995. *Nuclear Magnetic Resonance*. Oxford University Press Inc., New York.
31. Janštová & Mahdalová. 2016. *Mlékařské mikrobiální kultury*. Veterinární univerzita Brno. Brno. Available from https://www.vfu.cz/files/2340_56_mlekarske-mikrobialni-kultury.pdf (accessed March 2022)
32. Kadlec P. 2008. *Technologie potravin II*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha.
33. Kadlec P, Melzoch K, Voldřich M. 2012. *Technologie potravin Přehled tradičních potravinářských výrob*. KEY Publishing s.r.o., Ostrava.
34. Kandasamy S, Yoo J, Yun J, Kang HB, Seol KH, Ham JS. 2020. ^1H HRMAS-NMR based metabolic fingerprints for discrimination of cheeses based on sensory qualities. *Saudi Journal of Biological Sciences* **27**:1446–1461.
35. Keresteš J. 2016. *Mlieko vo výžive ľudí*. CAD Press, Bratislava.
36. Kozelková M, Kuchtík J, Lužová T, Šustová K, Vyskočil I. 2012. VLIV STÁDIA LAKTACE NA SLOŽENÍ A VLASTNOSTI KOZÍHO MLÉKA A KVALITU SÝRŮ VYRÁBĚNÝCH NA FARMĚ. *MLÉKAŘSKÉ LISTY* **151**:5-10.

37. Konoplev N, Mukhin N, Smirnova A, Steinamnn U, Stepanova O. 2020. Milk as a Complex Multiphase Polydisperse System: Approaches for the Quantitative and Qualitative Analysis. *Journal of Composites Science* **4**: 151
38. Kopáček J. 2020. Současný stav světového trhu se sýry. *MLÉKAŘSKÉ LISTY* **174**:4-13.
39. Králová M. 2007. ISIDOR RABI. Techmania, Plzeň. Available from <http://edu.techmania.cz/encyklopedie/vedec/1295/rabi> (accessed March 2022).
40. Kruk D, Florek – Wojciechowska M, Masiewicz E, Oztop M, Ploch-Jankowska A, Duda P, Wilczynski S. 2021. Water mobility in cheese by means of Nuclear Magnetic Resonance relaxometry. *Journal of Food Engineering* **298**:110483.
41. Kalhotka L, Kuchtík J, Pavlata L, Šustová, K. 2015. Celkový počet mikroorganismů a počet somatických buněk v kozím mléce a jejich korelace. *MLÉKAŘSKÉ LISTY* **152**:19-24.
42. Kuckova S, Zitkova K, Novotny O, Smirnova T. 2019. Verification of cheeses authenticity by mass spectrometry. *Journal of Separation Science* **42**:3487–3496.
43. Lamanna R, Piscioneri I, Romanelli V, Sharma N. 2008. A preliminary study of soft cheese degradation in different packaging conditions by ¹H-NMR. *Magnetic Resonance in Chemistry* **46**:828–831.
44. Lambert JB, Mazzola EP, Ridge CD. 2019. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy : an introduction to principles, applications, and experimental methods. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ.
45. Marion D. 2013. An introduction to biological NMR spectroscopy. *Molecular and Cellular Proteomics*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology **12**:3006–3025.
46. Marseglia A, Caligiani A, Comino L, Righi F, Quarantelli A, Palla G. 2013. Cyclopropyl and ω-cyclohexyl fatty acids as quality markers of cow milk and cheese. *Food Chemistry* **140**:711–716.
47. Mazzei P, Piccolo A. 2012. ¹H HRMAS-NMR metabolomic to assess quality and traceability of mozzarella cheese from Campania buffalo milk. *Food Chemistry* **132**:1620–1627.
48. McSweeney PLH, Fox PF, Cotter P, Everett D. 2017. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Elsevier Science & Technology. Available from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/techlib-ebooks/reader.action?docID=4857615> (accessed March 2022).

49. Ministerstvo zemědělství. 2019. Vyhláška č. 274 ze dne 25. října 2019, kterou se mění vyhláška č. 397/2016 Sb., o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. Page 2795 in Sbíрка zákonů České republiky, 2019, částka 119. Česká republika.
50. Mulas G, Roggio T, Uzzau S, Anedda R. 2013. A new magnetic resonance imaging approach for discriminating Sardinian sheep milk cheese made from heat-treated or raw milk. *Journal of Dairy Science* **96**:7393–7403.
51. Novotná R, Popa I. 2012. *Základy NMR spektroskopie*. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Olomouc.
52. Panthi RR, Sundekilde UK, Kelly AL, Hennessy D, Kilcawley KN, Mannion DT, Fenelon MA, Sheehan JJ. 2019. Influence of herd diet on the metabolome of Maasdam cheeses. *Food Research International* **123**:722–731.
53. Parlament České republiky. 2016. Zákon č. 180 ze dne 27. dubna 2016, kterým se mění zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů, a další související zákony. Page 2898 in Sbíрка zákonů České republiky, 2016, částka 69. Česká republika.
54. Piras C, Marincola FC, Savorani F, Engelsen SB, Cosentino S, Viale S, Pisano MB. 2013. A NMR metabolomics study of the ripening process of the Fiore Sardo cheese produced with autochthonous adjunct cultures. *Food Chemistry* **141**:2137–2147.
55. Potravinářská komora ČR. 2017. Mléko a mléčné výrobky ve výživě II. Potravinářská komora ČR, Praha. Available from <http://ctpp.cz/data/files/mleko.pdf> (accessed March 2022).
56. Prema D, Turner TD, Jensen J, Pilfold JL, Church JS, Donkor KK, Cinel B. 2015. Rapid determination of total conjugated linoleic acid concentrations in beef by ¹H NMR spectroscopy. *Journal of Food Composition and Analysis* **41**:54–57.
57. Ruprich J. et al. 2020. Nutri-Score: hodnocení sýrů – jaké nutričně-zdravotní logo by měly na přední straně obalu?. Státní zdravotní ústav. Praha. Available from <http://www.szu.cz/tema/bezpecnost-potravin/nutri-score-hodnoceni-syru-jake-nutricne-zdravotni-logo-by> (accessed March 2022)
58. Scano P, Cusano E, Caboni P, Consonni R. 2019. NMR metabolite profiles of dairy: A review. *International Dairy Journal* **90**:56–67.

59. Schievano E, Guardini K, Mammi S. 2009. Fast Determination of Histamine in Cheese by Nuclear Magnetic Resonance (NMR). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**:2647–2652.
60. Segato S, Caligiani A, Contiero B, Galaverna G, Bisutti V, Cozzi G. 2019. ¹H NMR metabolic profile to discriminate pasture based alpine asiago PDO cheeses. *Animals* **9**:1–11.
61. Státní zemědělská a potravinářská inspekce. 2019. Potraviny na pranýři. Státní zemědělská a potravinářská inspekce. Available from <https://www.potravinynapranryri.cz/Detail.aspx?id=57091&lang=cs&design=default&archive=archive&listtype=tiles> (accessed March 2022)
62. Teplý M, Černá E, Havel F, Hladíková Z, Kopecký J, Mergl M, Suchánek B, Výmola J. 1979. Mléko a jeho produkce k průmyslovému zpracování. SZN, Praha.
63. Teubner. 2003. Syry-vel'ká encyklopédia. Trio Publishing, Bratislava.
64. Young PR. 1996. Organic Chemistry OnLine. University of Illionois, Chicago. Available from <https://people.stfx.ca/tsmithpa/chem361/labs/spec/NMR1.htm> (accesssed March 2022).
65. Zadražil K. 2002. Mlékařství. Česká zemědělská univerzita v Praze a ISV Praha, Praha.

6 Seznam použitých zkratk v přehledové tabulce

ANOVA–analýza rozptylu

DA-diskriminační analýza

HCA–hierarchické shlukování

LOD-limity detekce

LOQ-limity kvantifikace

OPLS-metoda nejmenších čtverců

OPLS-DA-ortogonální projekce latentních struktur

PCA-analýza hlavních komponent

PLS-částečná regrese nejmenších čtverců

PRC-metoda hlavní reakční křivky

SDS-PAGE-analýza proteinového gelu

RMSEC-střední kvadratická chyba kalibrace

RMSEP-střední kvadratická chyba predikce

