



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

SENZORICKÁ KVALITA FRANCOUZSKÉHO PLÍSŇOVÉHO SÝRA BRIE DE MEAUX V SOUVISLOSTI S JEHO CHEMICKÝM A MIKROBIÁLNÍM SLOŽENÍM

SENSORY QUALITY OF FRENCH CHEESE BRIE DE MEAUX IN CONNECTION WITH CHEMICAL AND MICROBIAL
COMPOSITION

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Monika Májková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1710/2021 Akademický rok: 2021/22
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Monika Májková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Senzorická kvalita francouzského plísňového sýra Brie de Meaux v souvislosti s jeho chemickým a mikrobiálním složením

Zadání diplomové práce:

1. Zpracujte literární přehled dané problematiky:
– sýry s bílou plísní – mikrobiální profil, sensorická kvalita, těkavé (aromatické) látky, mastné kyseliny a jejich stanovení
2. Pomocí metody HS–SPME–GC–MS identifikujte a kvantifikujte těkavé látky ve vybraných vzorcích komerčních sýrů.
3. Pomocí metody GC–FID identifikujte a kvantifikujte volné a vázané mastné kyseliny ve vzorcích.
4. Pomocí vybraných sensorických metod zhodnoťte jejich sensorickou kvalitu.
5. Pomocí vhodných metod (PCR) stanovte jejich mikrobiální profil.
6. Posuďte vliv skladování na uvedené parametry.

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2022:

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

Bc. Monika Májková
studentka

doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá posouzením vlivu skladování francouzského plísňového sýra Brie de Meaux (AOC) na jeho obsah těkavých (aromatických) sloučenin, volných a vázaných mastných kyselin a mikrobiální složení, v souvislosti s jeho sensorickou kvalitou.

Teoretická část je věnována sýrům s bílou plísní na povrchu. V části experimentální je posouzen vliv teploty a doby skladování na sensorickou kvalitu a bezpečnost sýrů. V rámci skladovacího experimentu byly sýry uchovávány po dobu 21 dní v 5 °C (jeden volně ložený, druhý vakuovaný) a při 20 °C. Vzorky byly hodnoceny pomocí SPME-GC-MS z pohledu těkavých (aromatických) látek. Mastné kyseliny byly identifikovány a kvantifikovány pomocí GC-FID po převedení na methylestery pomocí BF₃. Pro mikrobiální profil byla využita metoda RT-PCR.

Ve vzorcích bylo identifikováno 59 těkavých sloučenin, které přispívají k chuťovým vlastnostem sýra. Mezi mastnými kyselinami byly v majoritním množství zastoupeny kyseliny palmitová, olejová, myristová a stearová. Mikrobiální profil potvrdil v sýru uchovávaném při 20°C kontaminant *Micrococcus luteus*, ostatní kontaminanty nebyly detekovány pozitivně. Ze sensorického hlediska byl nejlépe hodnocen sýr standardní (analyzován ihned po zakoupení) společně se sýrem uchovávaným při 5 °C ve vakuované formě po dobu 21 dní.

Klíčová slova

Plísňové sýry, těkavé látky, sensorická kvalita, MK, SPME, GC-FID/MS

ABSTRACT

This thesis deals with the assessment of the effect of storage of French Brie de Meaux (AOC) on its volatile (aromatic) compounds, free and bound fatty acids and microbial composition, in relation to its sensory quality.

The theoretical part is devoted to cheeses with white mould on the surface. In the experimental part, the influence of temperature and storage time on the sensory quality and safety of cheese is assessed. In the storage experiment, the cheeses were stored for 21 days at 5 °C (one bulk, one vacuumed) and at 20 °C. The samples were evaluated by SPME-GC-MS for volatile (aromatic) compounds. Fatty acids were identified and quantified by GC-FID after conversion to methyl esters using BF₃. RT-PCR method was used for microbial profile.

Fifty-nine volatile compounds were identified in the samples and contribute to the flavour characteristics of the cheese. Among the fatty acids, palmitic, oleic, myristic and stearic acids were predominant. The microbial profile confirmed *Micrococcus luteus* as a contaminant in cheese stored at 20°C, while the other contaminants were not detected positively. From a sensory point of view, the standard cheese (analysed immediately after purchase) together with cheese stored at 5 °C in vacuum form for 21 days was the best performing cheese.

Key words

mould cheese, volatile compounds, sensory quality, FA, SPME, GC-FID/MS

MÁJKOVÁ, Monika. *Senzorická kvalita francouzského plísňového sýra Brie de Meaux v souvislosti s jeho chemickým a mikrobiálním složením*. Brno, 2022. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131337>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Eva Vítová.

Prohlášení

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

.....
podpis studenta

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí diplomové práce doc. Ing. Evě Vítové, Ph.D. za vedení, rady a podnětné připomínky při zpracování práce. Za odborné konzultace děkuji též mému konzultantovi doc. Mgr. Václavu Brázdovi, Ph.D.

Dále bych ráda poděkovala kolegyni Bc. Lucii Šislerové, Mgr. Martině Sittové, Ph.D. a RNDr. Pavlu Hložkovi za jejich ochotu a konzultaci.

V neposlední řadě chci ze srdce poděkovat manželu Pavlovi a své nejbližší rodině za podporu nejen při zpracování této práce, ale také po dobu celého studia.

OBSAH

Úvod	8
1 Teoretická část	9
1.1 Sýry s bílou plísní	9
1.1.1 Camembert	9
1.1.2 Brie de Meaux	10
1.2 Technologie výroby sýrů s bílou plísní	11
1.3 Mikrobiální profil sýrů s bílou plísní.....	11
1.4 Těkavé látky a mastné kyseliny v sýrech s bílou plísní.....	13
1.4.1 Mastné kyseliny	13
1.4.2 Ketony a methylketony.....	14
1.4.3 Alkoholy	14
1.4.4 Estery	15
1.4.5 Sloučeniny síry	15
1.5 Biochemické dráhy probíhající v sýrech v průběhu zrání	18
1.5.1 Glykolýza	18
1.5.2 Proteolýza.....	19
1.5.3 Lipolýza.....	19
1.6 Možnosti stanovení těkavých látek a mastných kyselin v sýrech	20
1.6.1 Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií.....	20
1.6.2 Plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem.....	20
1.7 Možnosti identifikace mikrobiálních kultur	21
1.7.1 Polymerázová řetězová reakce	21
1.7.2 Vysokorozlišovací analýza křivek tání.....	22
1.8 Senzorické hodnocení sýrů	22
2 Experimentální část.....	24
2.1 Analyzované vzorky	24
2.1.1 Skladovací experiment	25
2.1.2 Laboratorní vybavení a použité pracovní pomůcky	25
2.2 Analytická část	26
2.2.1 Identifikace a kvantifikace těkavých látek	26
2.2.2 Identifikace a kvantifikace vázaných a volných mastných kyselin.....	28

2.3	Mikrobiální část.....	32
2.3.1	Přístroje, laboratorní vybavení a použité pracovní pomůcky	32
2.3.2	Komponenty k RT-PCR	32
2.3.3	Izolace DNA ze vzorků	32
2.3.4	Výběr primerů	32
2.3.5	RT-PCR reakce.....	34
2.4	Senzorické hodnocení	34
2.5	Statistické zpracování výsledků.....	35
3	Výsledky a Diskuze	36
3.1	Analytická část	36
3.1.1	Identifikace a kvantifikace těkavých látek v sýrech.....	36
3.1.2	Identifikace a kvantifikace vázaných a volných MK v sýrech.....	42
3.2	Mikrobiální část.....	47
3.2.1	Izolace DNA ze vzorků	47
3.2.2	Stanovení vybraných mikroorganismů pomocí RT-PCR.....	47
3.3	Senzorické hodnocení sýrů.....	50
3.3.1	Pořadový test celkové přijatelnosti.....	53
4	Závěr	55
5	Seznam použitých zdrojů	56
	Seznam použitých zkratk	60
	Přílohy	61

ÚVOD

Sýry s bílou plísní na povrchu jsou u spotřebitelů stále oblíbenější. Poptávka po nich roste a jsou široce konzumovány po celém světě. Konkrétně francouzské sýry jsou často vyhledávanou specialitou. Jsou známy svojí kvalitou, která však, zejména u plísňových sýrů, může být v průběhu zrání proměnlivá.

Kvalita těchto sýrů souvisí nejen s kvalitou použitého mléka, ale i mléčnými bakteriemi, plísňovou kulturou a technologií zpracování. V průběhu zrání dochází k biochemickým změnám a produkci těkavých sloučenin, které jsou důležité pro aroma i chuť sýrů.

Hlavním cílem práce bylo posouzení vlivu a bezpečnosti skladování francouzského plísňového sýra Brie de Meaux (AOC) na jeho obsah těkavých (aromatických) sloučenin, volných a vázaných mastných kyselin a mikrobiální složení, v souvislosti s jeho sensorickou kvalitou. Sýr byl skladován při chladírenské teplotě (5 °C) a při teplotě pokojové (20 °C) v časovém úseku 21 dní. Analýza těkavých sloučenin byla provedena pomocí GC-MS, která kombinuje vysokou citlivost, dobrou separaci a reprodukovatelnost. Profil mastných kyselin byl využit GC-FID. Mikrobiální přítomnost byla ověřena vysoce specifickou metodou RT-PCR. Závěrem bylo provedeno sensorické hodnocení pro zjištění spotřebitelského optima konzumentů.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Sýry s bílou plísní

Vyhláška č. 397/2016 Sb. definuje zrající sýr takto: „jako „zrající sýr“ lze označit sýr, u kterého po prokysání došlo k dalším biochemickým a fyzikálním procesům“¹.

Zrající sýry s bílou plísní na povrchu se řadí mezi sýry přírodní¹. Zrání sýrů je komplexní proces, který zahrnuje enzymaticky katalyzované reakce, které způsobují nejen chuťové, ale i texturní změny². Kombinace startovacích bakteriálních kultur a hub bílé plísně, které na povrchu sýrů tvoří povlak bíle zbarvených mycelií, vytváří charakteristické aroma, vzhled i chuť^{2,3}. K chuti měkkých nebo tvrdých sýrů přispívají sloučeniny s nižší molekulovou hmotností, zejména sloučeniny těkavé². Mezi nejčastější povrchově zrající bílé plísně sýry se řadí Camembert a Brie⁴.

1.1.1 Camembert

Typickým příkladem povrchově zrajícího sýru s bílou plísní na povrchu je Camembert⁵. Tradiční Camembert, chráněný značkou původu AOC (*Appellation d'origine contrôlée*), pochází z Normandie (Camembert de Normandie) (viz Obrázek 1), vyrábí se ze syrového mléka, což je důležitým aspektem při jeho produkci, a splňuje určité výrobní normy. Zraje minimálně 21 dní při 11–13 °C a relativní vlhkosti 90 %⁵.

I když jsou výrobní procesy chráněny značkou původu, název Camembert tímto zeměpisným označením chráněn není, proto lze tento název použít pro jiné sýry tohoto typu vyrobené v jiných částech Francie či světa⁵.

Camembert má v průměru 11 cm a tloušťkou 2,5 cm. Jeho historie vzniku spadá do období kolem roku 1790, kdy byl ve vesnici Camembert poprvé vyroben. Původně se tento sýr vyráběl v místních farmách, od počátku 20. století se vyrábí průmyslově. Jeho výroba se z Normandie postupně rozšířila do celé Francie a posléze i do ostatních zemí světa⁵.



Obrázek 1: Zeměpisná oblast AOC Camembert de Normandie⁷

1.1.2 Brie de Meaux

Francouzský sýr Brie de Meaux nese též certifikované označení AOC, tedy kontrolované označení původu. Jeho název pochází z města Meaux, které se nachází východně od Paříže a je centrem výroby tohoto sýra⁸. Aby tento sýr mohl nést označení AOC musí být vyroben výhradně ze syrového kravského mléka, které mu dodává výraznou chuť i vůni. Pasterovaná verze Brie de Meaux se nazývá Fromage de Meaux.

Brie de Meaux se odlišuje od ostatních zrajících sýrů svým tvarem a velikostí. Sýr má tvar nízkého válce s výškou 2,5 cm a průměrem 35–36 cm (viz Obrázek 2), jeho hmotnost je zhruba půl třetího kilogramu^{5,9}. Na jeho povrchu se nachází plstěný povlak bílého mycelia, který vzniká v důsledku růstu *Penicillium camemberti*. Vnitřek je měkký a krémovitý. Obsah tuku v sušině se pohybuje v rozmezí 45–60 %^{4,10}.



Obrázek 2: Sýr Brie de Meaux – výrobek a balení¹¹

Mezi ostatní jemné fermentované sýry s bílou plísní patří Coulommier či Carré de l'Est⁵.

1.2 Technologie výroby sýrů s bílou plísní

Technologie výroby povrchově zrajících sýrů s bílou plísní jsou velmi podobné. Stejně tak jevy probíhající v průběhu zrání⁵.

Tradiční sýry jako Camembert de Normandie či Brie de Meaux se vyrábí ze syrového kravského mléka, díky němuž je dosaženo vyššího podílu těkavých aromatických látek. Existují i jejich pasterované varianty, které jsou sice lépe skladovatelné než povrchově zrající sýry vyrobené tradiční technologií, avšak zahřívání může inaktivovat enzymy a redukovat mikroorganismy přítomné v mléce zodpovědné za vznik aromatických sloučeniny během fermentace⁵.

Při výrobě tradičního sýru Brie de Meaux se nechává nadojené syrové mléko odstát, během této doby jsou do mléka přidány přírodní mikrobiální kultury. Jedná se zejména o mikroorganismy *Penicillium camemberti* a *Geotrichum candidum*, které tvoří charakteristické vlastnosti tohoto sýra¹².

V průběhu výroby je důležité, aby postupně s časem klesala teplota. Výroba začíná při 30 °C srážením mléka, které se provádí zhruba 1–2 hodiny syřidlem hovězího původu. V průběhu procesu postupně dochází ke snižování teploty až na 6 °C.

Po srážení je následně koagulum přeneseno do forem, kde přes perforované stěny odtéká syrovátka. Sýr odpočívá ve formách 24 hodin. Během této doby vypustí veškerou tekutinu. Tímto je získána sýřenina s nízkým obsahem minerálních látek, jejíž pH se na konci odkapávání pohybuje mezi 4,6–4,7. Následně je sýr solen na sucho. Koláče sýra jsou poté přesunuty do místnosti, kde zůstávají pět až sedm dní, během kterých se pravidelně otáčejí.

Na začátku zrání je hodnota pH přibližně 5, díky bakteriím mléčného kvašení. Nízké pH čerstvě vyrobeného sýra je dobrým předpokladem růstu acidofilních mikroorganismů jako jsou plísně a kvasinky. Navíc je nízké pH částečně selektivní pro růst běžných plísňových kontaminantů sýra^{13,14}. Hodnota pH se v průběhu zrání díky těmto mikroorganismům, které oxidačně metabolizují kyselinu mléčnou ze sýřeniny pro svůj růst na CO₂ a H₂O a produkují alkalické metabolity jako je NH₃ z aminokyselin v sýrech, zvyšuje. Po dosažení hodnoty pH 5,8 je umožněn růst bakterií (tato hodnota pH je pro růst bakterií prahová)⁵. Na konci zrání dosahuje pH neutrální hodnoty. K vzestupu pH dochází nejdříve na povrchu sýra a postupně dochází ke zvyšování pH až do jeho středu. Vzniká tak gradient pH, se kterým je u povrchově plísňových sýrů spojena migrace vápníku a fosfátu ze středu sýra k jeho povrchu. Tento jev má vliv na texturu, kdy sýr dozrává směrem k jádru. Zvyšování pH však nese riziko růstu nežádoucích bakterií jako je např. *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* aj.^{13–15}.

Sýr zraje minimálně čtyři týdny při teplotě 11–13 °C a relativní vlhkosti 90 %, většinou je však doba zrání ještě delší, tj. 7–8 týdnů¹⁶.

1.3 Mikrobiální profil sýrů s bílou plísní

Přeměnu mléka na sýr zajišťuje mikrobiální populace, která tvoří komplexní a dynamický ekosystém, díky němuž dochází k četným biochemickým reakcím¹⁷. První skupina, která se podílí na výrobě a zrání sýra, jsou startovací bakterie, které jsou tvořeny bakteriemi mléčného kvašení – především *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*. Tyto kultury dominují během rané fáze výroby sýra a i když jsou postupně nahrazovány sekundární mikrobiotou, přetrvávají během celého procesu zrání¹⁸.

Proces působení startovací mikroflóry způsobuje rychlou tvorbu kyseliny mléčné, přispívá k tvorbě sýřeniny, zabraňuje růstu patogenních bakterií a vytváří, zejména produkcí enzymů, optimální biochemické podmínky pro zrání. Ovlivňuje tak sensorické vlastnosti produktů^{17,18}.

Zrající sýry s bílou plísní na povrchu jsou záměrně ovlivněny různými mikroorganismy, které se podílejí na technologických a sensorických vlastnostech sýrů. Interakce mezi mikroorganismy ve fermentovaných potravinách jsou důležitými faktory, které dodávají sýrům charakteristickou chuť, vzhled, texturu i vůni. Sýry zrající na povrchu, bez ohledu na odrůdu sýra, vykazují podobnou mikroflóru^{16,19,20}. Složení a vývoj této mikroflóry je složitý, o to víc při použití syrového mléka při výrobě⁵. Nepasterizované mléko obsahuje velkou diverzitu bakterií pocházejících z živočišných, lidských i environmentálních zdrojů²¹.

Plísně, které jsou používány ke zrání měkkých sýrů, prošly postupnou domestikací²². Nejběžnější mléčné kvasinky a plísně, které se využívají při zrání sýrů, jsou *Penicillium camemberti*, *Geotrichum candidum*, *Debaryomyces hansenii* a *Kluyveromyces lactis*^{19,20}.

V povrchově zrajících sýrech dominuje kultura *Penicillium camemberti*, která je považována za domestikovanou formu *Penicillium commune*²³. K výrobě sýra se používají pouze bílé formy této kultury, které se komerčně liší především rychlostí růstu na povrchu sýra a hustotou mycelia⁵. *P. camemberti* roste kompaktně a vytváří tak bílý a květový vzhled kůry²⁰. Navíc má *P. camemberti* vysoký proteolytický i lipolytický potenciál. Produkuje extracelulární exopeptidázy, díky kterým se tvoří velké množství aminokyselin v sýrech^{5,24}. Při produkci enzymů společně se spotřebou kyseliny mléčné dochází k současnému zvýšení hodnoty pH. Růst *P. camemberti* je pozorován po 6–7 dnech zrání. Ve srovnání s ostatními mikroorganismy dozrávající flory je růst extrémně rychlý. Konec růstu je ukončen za 2–3 dny. Za tu dobu je změněno povrchové pH, vyčerpán laktát a produkuje velké množství CO₂, který může urychlit proces zrání⁵.

Druhým důležitým sekundárním startérem, podílejícím se na zrání těchto sýrů, je kvasinka *Geotrichum candidum*, která snižuje hořkost a hraje důležitou roli v konkurenci s nežádoucími mikroorganismy. Společně s *Debaryomyces hansenii* přispívá k chuti a textuře díky jejich lipolytické a proteolytické aktivitě²⁵. *G. candidum*, stejně jako *P. camemberti* syntetizuje intra a extracelulární proteinázy (pH blízko 6,0). Dokáže odstranit hořkost pravděpodobně proto, že má velmi účinnou peptidázovou aktivitu^{5,24}.

G. candidum je velmi citlivá na sůl, a proto může suché solení, které se při výrobě zejména sýrů typu Camembert a Brie používá, na určitou dobu zastavit růst.

Vitalita *P. camemberti* a *G. candidum* je podstatná pro konkurenceschopnost vůči případným kontaminantům²³. Podle publikace Decker a Nielsen²³ má *P. camemberti* největší inhibiční účinek na *C. herbarum*. Dieuleveux a kol.²⁶ uvedli, že *G. candidum* vylučuje 2-hydroxy-3-fenyl propanovou kyselinu, která je známa svým širokým antimikrobiálním účinkem. Díky rychlé kolonizaci povrchu sýra myceliem v začátcích výroby se omezuje rozvoj mikroorganismů způsobujících kažení⁴. K inhibici nežádoucího růstu kontaminantů přispívají i startovací kultury. Růst plísnových kontaminantů na sýru může způsobit nežádoucí pachutě, mykotoxiny nebo změnu barvy povrchu. Mezi nejčastější sýrové kontaminanty, které způsobují alimentární onemocnění způsobené konzumací sýra patří *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*²⁵.

Po 2–3 týdnech, kdy je *P. camemberti* a ostatními kvasinkami katabolizována kyselina mléčná, dojde ke zvýšení pH (přibližně na hodnotu 5,8). Tyto podmínky jsou dobré pro růst bakterií, jedna z nejdůležitějších a nejčastěji citovaná je např. *Brevibacterium linens*⁵.

Mikrobiota v bílých plísňových sýrech je považována za klíčovou při produkci těkavých aromatických sloučenin. Pokud však dojde k nerovnováze chuťových sloučenin, jsou pozorovány chuťové defekty, které jsou nežádoucí. Mezi tyto vady patří odchylky vůně a chuti, tvorba biogenních aminů, tvorba plynu, usazování minerálů atp¹⁷.

1.4 Těkavé látky a mastné kyseliny v sýrech s bílou plísní

Zrání sýrů je složitý a komplexní proces, který vede ke vzniku velkého množství těkavých látek, tvořící aroma, vůni i chuť bílých plísňových sýrů. Aroma a vůně těchto sýrů je výsledkem jemné rovnováhy mezi všemi těkavými sloučeninami, které se v sýrech vyskytují²⁷. Každá sloučenina nese charakteristický pachový tón, který se do určitého množství podílí na sýrovém aroma. V případě větších koncentrací může nastat ve vůni defekt².

Charakteristická chuť sýrů je jednou z kvalitativních složek, kdy přítomnost, obsah a složení těkavých látek v sýru má podstatný vliv na jeho kvalitu²⁸. Rozvoj charakteristické sýrové chuti ovlivňuje i zrající mikrobiota².

K chuti sýrů přispívají zejména sloučeniny s nižší molekulovou hmotností. Na rozdíl od sloučenin s dlouhým řetězcem (tj. > 12 atomů uhlíku), které se v sýrech sice nacházejí ve větších koncentracích, avšak v chuti sýra hrají pouze malou roli².

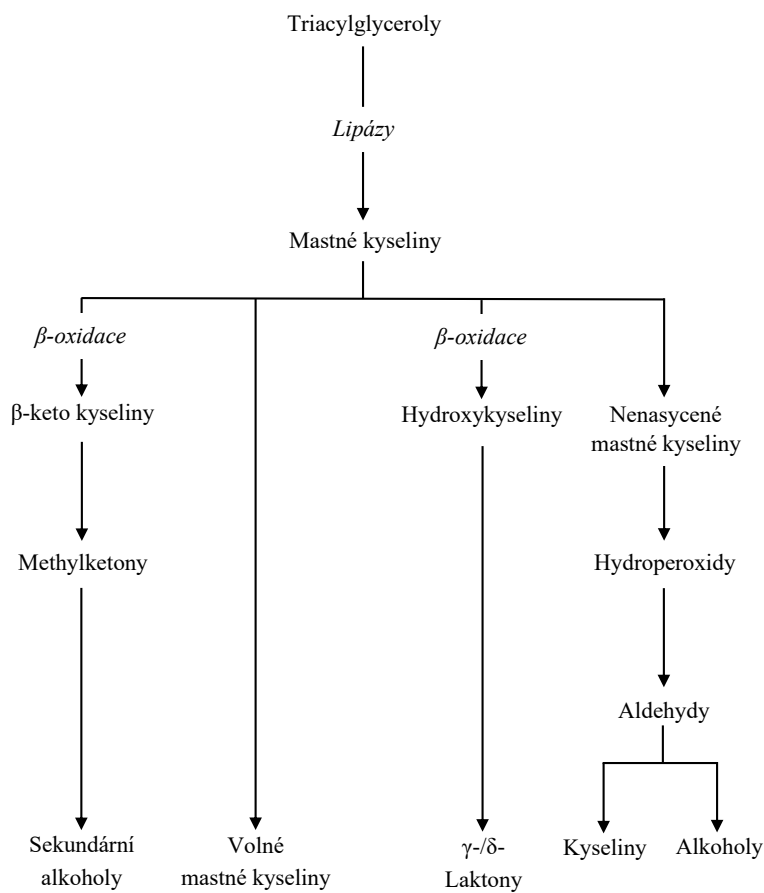
Většina těchto těkavých sloučenin jsou produkty metabolismu tuků, bílkovin a sacharidů. Obzvláště metabolismus tuků tvoří hlavní zdroj chutí v sýrech s bílou plísní. Molekuly pocházející z těchto metabolických cest jsou především mastné kyseliny (MK), ketony, methylketony, alkoholy, laktony, estery, aldehydy, sirné sloučeniny a aminy (viz Obrázek 3)^{2,27}.

1.4.1 Mastné kyseliny

Bílé plísňové sýry obsahují velkou škálu volných MK, které vznikají v sýrech vyráběných ze syrového mléka z hydrolýzy glyceridů přirozenou mléčnou lipázou. Tyto lipázy neboli hydrolázy esterů glycerolu, hydrolyzují triglyceridy za vzniku volných MK, mono- či diacylglycerolů²⁴.

K lipolýze přispívají lipázy produkované mikroorganismy. Lipázy *G. candidum* uvolňují přednostně kyselinu olejovou a ostatní nenasycené MK. *P. camemberti* je naopak zacílen na triglyceridy složené z MK s nízkou molekulovou hmotností²⁷. Nižší podíl volných MK, které mají zpravidla 2–6 C, pochází zejména z rozkladu laktosy a aminokyslein. Koncentrace těkavých molekul MK ovlivňuje pH sýra²⁴.

Mezi kyseliny, které se nachází v měkkých sýrech, patří: octová, propionová, 2-methylpropionová, butanová, 2-methylbutanová, 3-methylbutanová, pentanová, 4-methylpentanová, hexanová, oktanová, dekanová, undekanová, dodekanová, tetradekanová, oktadekanová, olejová, linolová a linolenová².



Obrázek 3: Tvorba aromatických sloučenin z lipidů (upraveno)²⁷

1.4.2 Ketony a methylketony

V bílých plísňových sýrech jsou nejhojněji zastoupenými sloučeninami methylketony, jejichž společnými prekurzory jsou MK. V těkavých frakcích jsou nejzastoupenější nonan-2-on a heptan-2-on. Methylketony mohou být redukovány reduktázovou aktivitou na odpovídající sekundární alkoholy^{2,24}.

1.4.3 Alkoholy

Primární a sekundární alkoholy spolu s ketony jsou považovány za nejdůležitější sloučeniny ve vůni měkkých plísňových sýrů. Důležitou sloučeninou ze skupiny alkoholů je okt-1-en-3-ol, který se vyznačuje charakteristickým houbovým tónem. Pokud se však vyskytuje ve vyšších koncentracích způsobuje ve vůni vady. Dalším důležitým odorantem ze skupiny primárních alkoholů je 3-methylbutan-1-ol, který má květinový nádech. Hlavními sekundárními alkoholy jsou heptan-2-ol a nonan-2-ol, které jsou odvozeny od methylketonů. V sýrech se objevuje i ethanol, který má pouze omezenou aromatickou roli, avšak je prekurzorem esterů^{2,24}.

1.4.4 Estery

Aroma většiny esterů, které se vyskytují v sýrech, je klasifikováno jako ovocné a květinové. Mezi konkrétními tony, které jsou v odborných publikacích citované, jsou ananasové, banánové, meruňkové, hruškové, medové atd²⁷.

Estery jsou velice rozmanité. V sýrech camembertového typu jsou kvantitativně významné 2-fenylethylacetát a 2-fenylethylpropanoát. Esterifikační reakce probíhají mezi krátkými až středně dlouhými řetězci MK a alkoholy (ethanolem) získanými při reakci z fermentace laktózy nebo z katabolismu aminokyselin. Estery také mohou minimalizovat ostrost a hořkost dodávanou MK či aminy².

1.4.5 Sloučeniny síry

Mezi nejzastoupenější sloučeniny síry patří dimetyldisulfid a dimethyltrisulfid, které se vyskytují ve vyzrálějších sýrech. Za klíčové producenty sloučenin síry v sýrech jsou považovány koryneformní bakterie, zejména pak *Brevibacterium linens*. Sloučeniny síry jsou popisovány se silným česnekovým tónem².

Tabulka 1: Sloučeniny vyskytující se bílých plísňových sýrech^{2,27}

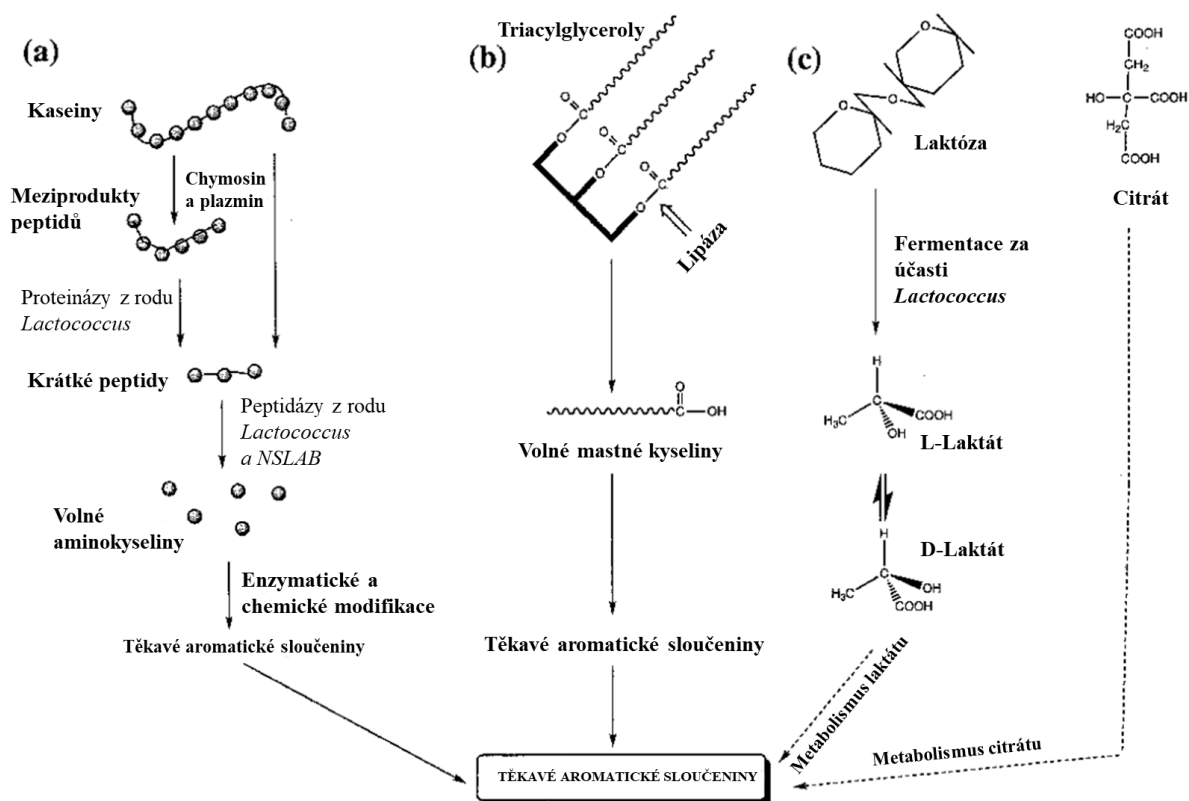
	Sloučenina	Deskriptory charakterizující chuť/aroma
Kyselá sloučeniny	Kyselina octová	octová, štiplavá
	Kyselina propionová	octová, štiplavá
	Kyselina 2-methylpropionová	sladká, jablečná, máslová, žluklá
	Kyselina butanová (máselná)	sýrová, tvarohová, žluklá, hnilobná
	Kyselina izobutanová	aroma shnilého jablka
	Kyselina izovalerová	ovocná, aroma shnilého ovoce, aroma potu
	Kyselina 3-methylbutanová	aroma shnilého ovoce, aroma potu
	Kyselina 4-methylpentanová	štiplavá, sýrová
	Kyselina hexanová (kapronová)	pálivá, štiplavá, kyselá, aroma sýru s modrou plísní
	Kyselina oktanová (kaprylová)	zatučlá, ovocná, žluklá aroma vosku, mýdla, kozí aroma
	Kyselina 4-methyloktanová	ovocná, aroma vosku, kozí aroma
	Kyselina 4-ethyloktanová	kozí aroma
	Kyselina dekanová	žluklá, mastná
	Kyselina dodekanová	mastná
	Kyselina tetradekanová	aroma vosku, mastná
	Kyselina hexadekanová	
	Kyselina oktadekanová	
	Kyselina olejová	
	Kyselina linolová	
Kyselina linolenová		
Alkoholy	Ethanol	jemné etherové aroma
	Pentan-2-ol	aroma fuselového oleje
	Heptan-2-ol	zemitá, mastná, nasládlá
	Nonan-2-ol	melounová, tučná
	Undekan-2-ol	
	Okten-3-ol	houbová
	Okt-1-en-3-ol	houbová
	3-methylbutanol	ovocná, alkoholová
	2-fenylethanol	květinová, aroma růží

Ketony	Propan-2-on	aroma acetonu
	Butan-2-on	aroma acetonu
	Pentan-2-on	ovocná, aroma acetonů
	Hexan-2-on	květinová, ovocná
	Heptan-2-on	zatuchlá, aroma sýru s modrou plísní
	Oktan-2-on	ovocná, zatuchlá, květinová, bylinná
	Nonan-2-on	ovocná, zatuchlá, květinová
	Dekan-2-on	ovocná, zatuchlá
	Undekan-2-on	květinová, bylinná, aroma růží
	Tridekan-2-on	ovocná, lehce kořeněná
	Oktan-3-on	houbová, ovocná, kořeněná
	Okt-1,5-dien-3-on	aroma listu pelargonie, půdní
	4-methylpentan-2-on	
	Methylhexan-2-on	
	Okt-1-en-3-on	houbová
	Acetoin	máslová
Diacetyl	máslová	
Acetofenon	aroma pomerančového květu	
Estery	Ethylacetát	ananasová, aroma rozpouštědla
	Ethylpropanoát	ananasová
	Ethyl butanoát	ananasová, sladká, banánová, voňavá
	Ethylhexanoát	ananasová, banánová, jablečná
	Ethyl oktanoát	meruňková, vinná, květinová
	Ethyldekanoát	ovocná, hroznová
	2-fenylethylacetát	květinová, aroma růží
fenylethylbutyrát	květinová, medová, aroma růží	
Sírné sl.	dimethylsulfid	česneková
	dimethyldisulfid	česneková, aroma kvěťáku, aroma velmi zralého sýru
	2,3,4-trithiapentan	aroma zrajícího sýru

1.5 Biochemické dráhy probíhající v sýrech v průběhu zrání

Za aroma a chuť sýrů je zodpovědná biochemická aktivita společně s mikrobiální florou, která k rozvoji charakteristické sýrové chuti přispívá². Sýrová chuť je způsobena řadou chemických změn, které probíhají ve fázi zrání sýrů. Většina sloučenin, která ovlivňuje chuť sýra, jsou produkty metabolismu tuků, bílkovin a sacharidů.

Biochemické procesy během zrání sýra lze rozdělit na primární (lipolýza, proteolýza a metabolismus zbytkové laktózy, laktátu a citrátu) a sekundární proces (metabolismus MK a aminokyselin) (viz Obrázek 4)^{29,30}.



Obrázek 4: Obecné biochemické dráhy zrání sýrů: (a) proteolýza, (b) lipolýza a (c) metabolismus laktózy, laktátu a citrátu³¹

1.5.1 Glykolýza

Za glykolýzu jsou zodpovědné startérové bakterie mléčného kvašení, které přeměňují laktózu na kyselinu mléčnou. Jedná se zejména o homofermentativní mezofilní laktokoky *Lactococcus* (zejména rody *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*)^{5,24}.

Po předezrání, kdy je pH přibližně 6,3–6,4, se přidává syřidlo. K intenzivnímu okyselení dochází hlavně během formování (pH asi 4,6–4,8). Po zpracování osidluje povrch sýra mikroflóra (plíseň *P. camemberti*, kvasinka *G. candidum*), které zpracovávají kyselinu mléčnou pro svůj růst. Díky tomu dochází k výraznému zvýšení pH na povrchu, které se na konci zrání udržuje přibližně na pH 7. Uvnitř sýra je nárůst pH pomalejší. Zde je konečné pH zhruba 6,0^{5,29}.

Tato neutralizace např. podporuje aktivitu zracích enzymů, jejichž pH optimum je často blízké neutrálnímu, dále pomáhá v usazování acid-senzitivních bakterií na povrchu sýra, které přispívají ke kvalitě a tradičním chuťovým vlastnostem měkkého sýra či způsobuje migraci minerálu směrem k povrchu sýra⁵.

1.5.2 Proteolýza

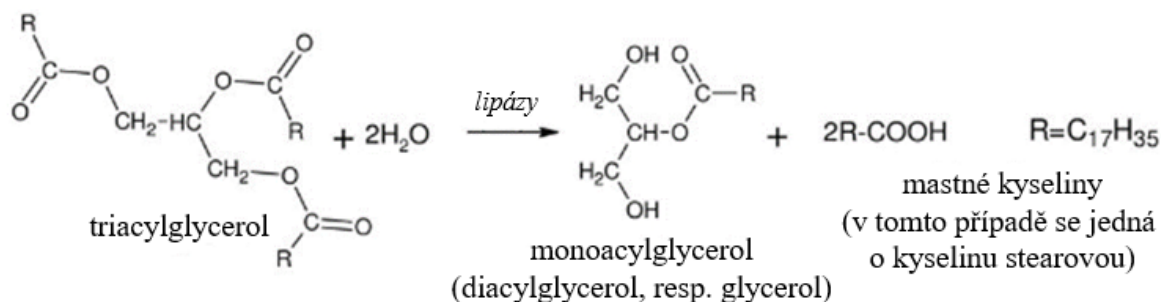
Výsledkem proteolýzy jsou peptidy a aminokyseliny, které vedou prostřednictvím enzymatických a chemických sekundárních reakcí k aromatickým sloučeninám²⁷.

Proteolýza je katalyzovaná proteinázami a peptidázami pocházejícími z bakterií mléčného kvašení, ze zbytkové aktivity syřidla (chymosin), mléka (zejména plasmin) či jiné mikrobiální kultury (*G. candidum*, *P. camemberti* aj.)¹⁵.

1.5.3 Lipolýza

Zdrojem chuti v sýrech s bílou plísní jsou produkty zejména z metabolismu tuků, jelikož většina aromatických sloučenin je hydrofobní a jsou tedy rozpustnější a více vnímány v tuku. Tuk se též podílí na určování textury⁵.

Důležitým biochemickým procesem, ke kterému dochází během zrání sýra, je odbourávání tuků neboli lipolýza, která vede k volným MK (viz Obrázek 5), jež jsou dále substráty pro navazující reakce. Je způsobena lipázovou aktivitou somatických buněk a mikroorganismů, zejména plísněmi, které jsou schopny vylučovat velké množství lipáz^{5,24}. Lipolýza je enzymatická hydrolyza triacylglycerolů na MK, glycerol, mono- či diacylglyceroly. Právě volné MK, zejména s krátkým a středním řetězcem, jsou důležitými prekurzory katabolických reakcí, které jsou dále metabolizovány na těkavé aromatické sloučeniny (alkan-2-ony, laktony, methylketony), které dávají sýru charakteristickou chuť.



Obrázek 5: Degradace triacylglycerolů³²

Lipolytické enzymy štěpí esterovou vazbu mezi mastnou kyselinou a glycerovým jádrem triacylglycerolů za vzniku volných mastných kyselin, mono či diacylglycerolů.

Lipolýza není v celém sýrů homogenní, vyskytuje se zejména pod slupkou. Typická textura měkké části povrchově zrajících sýrů s bílou plísní je dána spojením lipolýzy s proteolýzou při relativně vysoké hodnotě pH a dlouhém procesu zrání⁵.

1.6 Možnosti stanovení těkavých látek a mastných kyselin v sýrech

1.6.1 Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

Nejčastější metodou pro stanovení těkavých sloučenin v sýrech je plynová chromatografie (GC) spojená s hmotnostní spektrometrií (MS) (GC-MS).

Při GC dochází k separaci sloučenin, které následně přechází do MS, kde jsou detekovány. Spojení GC-MS kombinuje vysokou citlivost, dobrou separaci a reprodukovatelnost³³. Tomuto stanovení však předchází extrakce těkavé frakce. Dříve probíhala extrakce pomocí rozpouštědel. Později se však vyvinula technika mikroextrakce na pevné fázi (SPME). SPME umožňuje jednoduše a rychle izolovat těkavé analyty jak z pevných, tak i kapalných matric, proto se začala používat běžně ve spojení s GC-MS pro extrakci aromatických látek v sýrech. SPME je levná, bezrozpouštědlová a spolehlivá technika s vynikající citlivostí a dobrou selektivitou²⁸.

Tato technika se objevuje i v odborných publikacích, které jsou zaměřeny zejména na sledování profilu těkavých aromaticky aktivních látek během zrání sýrů. Vítová a kol.³³ ve své práci srovnávali profil zrání bílých plísňových sýrů vyrobených v České republice. Identifikace byla provedena na základě porovnání retenčních časů standardních látek a srovnáním s knihovnou spekter. V práci bylo identifikováno 7 ketonů, 1 diketon, 11 alkoholů, 5 MK, 2 estery, 3 aldehydy, 2 sloučeniny síry, uhlovodík a amoniak³³.

Techniku SPME-GC-MS pro identifikaci aromatických sloučenin a jejich potenciálních prekurzorů využil ve své práci také Suzuki-Iwashima a kol.³. V jejich práci byla sledována tvorba metabolitů během procesu zrání na třech typech modelových sýrů připravených fermentací jednak všech využívaných mikroorganismů, sýrů fermentovaných pouze s plísní či pouze s bakteriemi mléčného kvašení. V práci byla provedena komplexní analýza těkavých sloučenin od prekurzorů až po aroma související s charakteristickou chutí sýra s bílou plísní. Bylo identifikováno celkem 66 těkavých látek, ze kterých byly vybrány látky důležité pro přírodní aroma, u nichž byly sledovány změny jejich koncentrací v průběhu zrání. Tímto testem a přípravou sýrů objasnili účinky bakterií mléčného kvašení a *Penicillium camemberti* na vznik aromatických sloučenin v sýru s bílou plísní a docílili tak identifikace mikrobiálního základu chuti³.

1.6.2 Plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem

GC je metoda, která se v současné době nejčastěji používá ke kvantifikaci hladin jednotlivých MK v sýru. Skládá se ze zdroje nosného plynu, systému zavádění vzorku a kolony. Běžným detektorem pro GC je plamenově-ionizační detektor (FID), který je robustní s velkým rozsahem. GC-FID se široce používá v potravinářském průmyslu⁵. Předností je vysoké rozlišení, rychlost, citlivost a přesnost analýzy. Nedostatkem naopak nutnost pomocného spektroskopického systému pro potvrzení identity píku, navíc je analýza použitelná pouze pro tepelně stabilní těkavé sloučeniny⁵.

FID využívá plamen vzniklý spalováním vodíku a vzduchu. Eluované sloučeniny se spalují plamenem. Pod plamenem je umístěna sběrná elektroda detekující vzniklé ionty. Velikost proudu, který je generován těmito ionty, souvisí s hmotností^{5,24,34}.

Složení MK a změny jejich profilu během výroby sýra studovala Eisenstecken a kol.³⁵. V jejich práci srovnávali vzorky mléka ze šesti geografických oblastí Evropy. Jejich hlavním cílem bylo prostudovat možnosti rozlišení vzorků pro případné potvrzení pravosti a geografického původu mj. prostudováním změn profilu MK během výroby sýra. Výskyt MK ve vzorcích mléka a sýrů souvisí především s krmením a chovem hospodářských zvířat. Výsledky ukazují, že se profily významně liší podle místa odběru vzorků. Metoda GC-FID tedy může být použita pro ověřování a kontrolu kvality mléčných výrobků geografického původu³⁵.

1.7 Možnosti identifikace mikrobiálních kultur

Výroba potravin k zajištění jejich kvality a bezpečnosti zahrnuje několik kontrolních bodů pro mikroorganismy. Pro možnost jejich detekce, identifikace a kvantifikace bylo vyvinuto několik molekulárně-biologických a mikrobiologických metod. Tyto techniky se používají nejen pro kontrolování případných patogenů vyskytujících se v sýrech, ale i k posouzení dynamiky růstu během jejich zrání^{21,36}. Znalost mikrobiálních kmenů přítomných ve zrajících sýrech přispívá k lepšímu pochopení měnících se vlastností sýra s ohledem na mikrobiální růst a aktivitu³⁷.

Metody identifikace mikrobiálních kultur jsou založeny zejména na přímé analýze DNA, jež nevyžadují kultivaci buněk. Tyto techniky jsou rychlé, reprodukovatelné a přesné. Naopak od metod závislých na kultivaci se postupně upouští. Tyto přístupy jsou sice levné, ale neefektivní a časově náročné. Navíc mnoho bakteriálních druhů nelze snadno nebo vůbec kultivovat na standardních agarových plotnách, což může způsobovat problémy³⁸.

Nejčastější metodou pro posouzení přítomnosti mikroorganismů, vyskytujících se v sýru, je technika polymerázové řetězové reakce v reálném čase (RT-PCR), která je vysoce citlivá, přesná a zajišťuje komplexní hodnocení mikrobiálních kultur či umožňuje hledání konkrétních genů kódujících enzymy^{21,36,38}.

V publikaci Monnet a kol.³⁹ vyvinuli spolehlivou a specifickou metodu pro kvantifikaci bakterií z povrchu sýrů pomocí RT PCR a barviva SYBR green I, konkrétně pro kvantifikaci *Corynebacterium casei*³⁹. Skupina Roggirello a kol.¹⁸ optimalizovala protokol reverzní transkripce kvantitativní PCR k selektivní detekci živé *L. lactis* v komplexních sýrových maticích¹⁸.

1.7.1 Polymerázová řetězová reakce

Prvním krokem k provedení PCR je extrakce nukleové kyseliny z potravinové matrice. To se děje mechanickou homogenizací vzorku společně s přidavkem roztoku lytických enzymů (např. lysozym, proteináza K). Při následné extrakci, která může být provedena např. využitím fenol-chloroformové extrakce či extrakce na kolonkách, je získána nukleová kyselina, sloužící jako templát, který je v PCR reakci amplifikován pomocí specifických primerů^{38,39}.

Po provedení konvenční PCR mohou být amplifikované úseky detekovány pomocí elektroforetických metod. Příkladem je gelová elektroforéza, denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE) či gelová elektroforéza s časovým teplotním gradientem (TTGE).

RT-PCR se od konvenční PCR liší tím, že je prováděna v reálném čase za přítomnosti fluorescenčních sond nebo barviv. Tato barviva mohou být specifická a nasedat na konkrétní úseky či interkalační, která se vmezerují do dvoušroubovice DNA. Interkalační metody poskytují relativně levnou a poměrně citlivou metodu pro detekci dvouvláknové DNA. Nevyžadují vývoj specifických sond, avšak detekční specifita těchto testů zcela závislí na primerech³⁹.

RT-PCR se využívá ke stanovení počtu kopií cílové DNA ve vzorku. Je možné ji tak použít při posouzení bezpečnosti potravin či ke zkoumání kvality potravin³⁹.

Identifikace a kvantifikace mikroorganismů na povrchu sýra je velmi obtížná. Při PCR mohou vznikat problémy, jež ovlivňují přesnost a reprodukovatelnost metody. Prvním z nich je extrakce kvalitní nukleové kyseliny ze sýrové matrice. Tento problém je způsoben inhibitory (soli, tuk a sacharidy), které je nutné redukovat. Dalším důležitým aspektem je výběr správných primerů, které zajišťují specifčnost reakce, jelikož povrch sýra často obsahuje četné bakteriální druhy, z nichž některé jsou úzké příbuzné^{38,40}.

Důležitým hodnotícím kritériem je hodnota Ct (cycle of threshold) neboli prahový cyklus. Tato hodnota označuje cyklus, kdy dochází k nárustu fluorescence nad práh pozadí. Čím nižší Ct, tím se ve vzorku vyskytuje větší koncentrace templátové DNA a naopak^{39,40}.

1.7.2 Vysokorozlišovací analýza křivek tání

Analýza tání s vysokým rozlišením (HRM, High Resoluting Melt) se využívá, zejména po RT-PCR, pro ověření správnosti produktů (amplikonů) PCR. Jedná se o pokročilou formu analýzy křivky tání. Principem analýzy křivky tání je navázání barviva na dsDNA. Toto navázání má za následek nárůst fluorescence. Po skončení amplifikace dochází ke zvyšování teploty a následné disociaci produktů. Navázané barvivo se postupně z disociující dsDNA uvolňuje a je pozorován pokles fluorescenčního signálu⁴¹.

Předpokladem analýzy HRM je použití vysoce koncentrovaného saturačního barviva (např. LC Green PLUS, SYTO9, ResoLight), které umožňuje označit amplikony po celé délce, tím mohou být detekovány všechny domény tání. Pro HRM je důležité mít dobře navržené primery, aby byla zachována specifita reakce. Ideální velikost amplikonu je 300 bp⁴¹.

1.8 Senzorické hodnocení sýrů

Sýry jsou celosvětově oblíbeny. Jejich výrobní technologie i vlastnosti jsou rozmanité a jsou konzumovány nejen pro svoji nutriční hodnotu. Senzorické vlastnosti jsou vnímány lidskými smysly převážně při konzumaci a určují stravovací kvalitu sýrů. Jedná se o charakteristiky vzhledové, chuťové a texturní⁴².

Senzorické hodnocení je potřebné nejen k určení vlivu sensorických vlastností na konzumní kvalitu sýra a jeho spotřebitelskou přijatelnost, ale také pro stanovení relativních předností sýrařských postupů a vlivu složení na specifické sensorické vlastnosti sýra⁴².

Výzkumem, který by mohl přispět ke zlepšení výroby sýra s bílou plísní v různých regionech světa, tak aby byla zachována jeho identita a zároveň došlo ke zlepšení sensorických vlastností, se zabýval Galli a kol.⁴³ Cílem jeho studie bylo zhodnotit vliv

proměnných (typ mléčných bakterií, typ dozrávající plísně a způsob očkování) sýra camembert na vnímání jeho sensorických vlastností⁴³.

Senzorické hodnocení bylo provedeno pomocí kvantitativní popisné analýzy. Pro hodnocení bylo vybráno devět hodnotitelů, kteří v průběhu tří školení definovali terminologii pro sensorické vlastnosti sýra s bílou plísní na povrchu a byli proškolení v sensorické analýze sýra Camembert v různých fázích zrání. Samotné sensorické hodnocení bylo provedeno ve třech sezeních, kde bylo hodnoceno šest vzorků. Degustátoři hodnotili vnímané pocity týkající se vzhledu, vůně, chuti a textury pomocí 10-ti bodové stupnice intenzity.

Pro statistické hodnocení kvantitativní popisné analýzy byla použita vícerozměrná analýza pomocí korelační analýzy, analýza hlavních komponent a analýza shluková⁴³.

Výsledky prokazují, že kombinace startovacích kultur, dozrávajících forem a způsobu očkování výrazně mění vzhled, texturu, vůni i chuť. Přímou tak ovlivňují sensorickou kvalitu sýra⁴³.

Senzorické analýze bílých plísňových sýrů se ve své práci věnoval i Judacewski a kol.⁴⁴. Jeden z jeho cílů byl vyhodnotit vliv mezofilních a termofilních startovacích kultur na fyzikálně-chemické složení a sensorické vlastnosti po definovaných úpravách ve zpracování zrajícího sýra s bílou plísní na povrchu⁴⁴.

K sensorickému hodnocení bylo přijato 17 výzkumných pracovníků, studentů a techniků, ze kterých následně bylo vybráno 10, kteří byli schopni kvalitativně i kvantitativně popsat a rozlišit rozdíly mezi vzorky sýra. Byly vybrány jednotné popisy pro vzhled, zápach, texturu, chuť a doznívající chuť. Hodnotitelé se společně dohodli na referenčním rámci obsahujícím popis každé vlastnosti a její intenzity z důvodu vytvoření smyslové paměti extrémů měřítka a pro standardizaci jazyka pro popis produktů⁴⁴.

Pro školení hodnocení byl předložen sýr v různých fázích zrání. Hodnotitelé porovnávali a označovali vzorky na 9 cm nestrukturované škále s ohledem na intenzitu dříve diskutovaných atributů. Vzorky byly hodnoceny ve třech sezeních, každý vzorek byl hodnocen 5×⁴⁴. Data byla vyhodnocena pomocí jednorozměrných a vícerozměrných matematicko-statistických metod⁴⁴.

I přes velkou rozmanitost druhů sýrů, které potenciálně vykazují širokou škálu sensorických charakteristik, bývají často při sensorickém hodnocení k popisu dominantních vlastností odlišných typů sýrů použity podobné výrazy⁴².

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část práce se zabývá posouzením vlivu teploty a doby skladování na senzorickou kvalitu a další vybrané parametry komerčního sýra Brie de Meaux. Sýr byl hodnocen z pohledu těkavých (aromatických) látek, vázaných a volných MK, mikrobiálního složení a senzorické kvality.

2.1 Analyzované vzorky

Pro veškeré analýzy byl zakoupen sýr Brie de Meaux z potravního řetězce MAKRO v obchodní zralosti (viz Obrázek 6).



Obrázek 6: Sýr Brie de Meaux

Brie de Meaux AOC, 175 g, zrající, měkký, sýr z nepasterizovaného mléka s plísní na povrchu, T.V.S. 45 %. Složení: nepasterované kravské mléko, jedlá sůl, mléčné kultury, barvivo: annatto. Výrobce: Fromagerie les Courtenay, 453 20 Courtenay, Francie.

2.1.1 Skladovací experiment

Sýry byly uloženy ve speciálních nádobách (viz Obrázek 7) při teplotě 5 °C (chladírenská) a 20 °C (pokojová) po dobu 21 dní. Analýzy byly provedeny na začátku (tj. v čase T0 – standard) a po 21 dnech skladování (dozrávání) (tj. T21) (viz Tabulka 2).

2.1.2 Laboratorní vybavení a použité pracovní pomůcky

Lednice (Guzzanti GZ 117A, Česká republika)

Termostat (MYTEMP™ Mini, model H2200-HC; Benchmark Scientific, Inc., USA)

Nádoba na zrání a skladování sýrů (Serowar, Polsko)

Vakuovačka potravin (SilvercrestKitche Tools Vakuová svářečka fólií SV 125 C3, LIDL) a folie na vakuování



Obrázek 7: Nádoba na zrání a skladování sýrů^{8,45}

Tabulka 2: Schéma skladovacího experimentu

	Označení	Teplota skladování [°C]	Doba skladování	Analýza
1. série (T0), standard	T0_STD	5 ± 2	–	SPME-GC-MS
				GC-FID
				RT-PCR
2. série (T21)	T21_5°Cvac	5 ± 2 vakuovaný	21 dní	SPME-GC-MS
				GC-FID
				RT-PCR
	T21_5°C	5 ± 2	21 dní	SPME-GC-MS
				GC-FID
				RT-PCR
T21_20°C	20 ± 2	21 dní	SPME-GC-MS	
			GC-FID	
			RT-PCR	

2.2 Analytická část

2.2.1 Identifikace a kvantifikace těkavých látek

Těkavé (aromatické) látky byly extrahovány ze vzorků sýrů pomocí SPME a poté stanoveny pomocí GC-MS. Použitá metoda byla optimalizována a validována v rámci bakalářské práce Miroslava Koubka, 2016⁴⁶.

2.2.1.1 *Přístroje, laboratorní vybavení a použité pracovní pomůcky*

Plynový chromatograf Trace 1310 se split/splitless injektorem (ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)

Hmotnostní detektor ISQ™ LT Single Quadrupole (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

SPME vlákno DVB/CAR/PDMS 50/30 µm (Supelco, Bellefonte-Pensylvania, USA)

Počítač se softwarem X-calibur

Knihovna spekter NIST/EPA/NIH, verze 2.0 (Gaithersburg, Maryland, USA)

Kompaktní váhy (EK-1200i, A&D, UK)

Vialky o objemu 10 ml se šroubovacím magnetickým uzávěrem

2.2.1.2 *Plyny*

Helium 4.8, v tlakové lahvi s redukčním ventilem (SIAD, Česká republika)

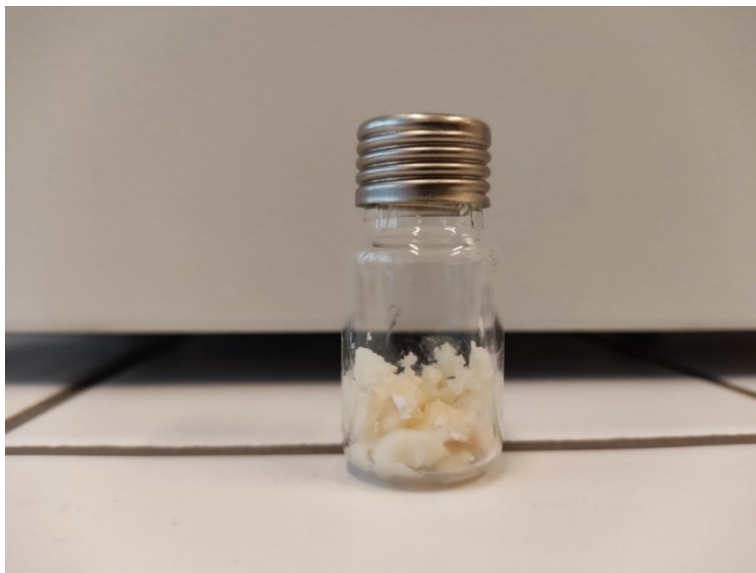
Dusík 5.0, v tlakové lahvi s redukčním ventilem a kovovou membránou (SIAD, Česká republika)

Vodík 5.5, v tlakové lahvi s redukčním ventilem (SIAD, Česká republika)

Vzduch 5.0, v lahvi s redukčním ventilem pro kyslík (SIAD, Česká republika)

2.2.1.3 Postup přípravy vzorků

Ze vzorku sýra byl odebrán reprezentativní vzorek o hmotnosti 2,0 g a vložen do vialky (viz Obrázek 8). Vialka byla vložena do autosampleru plynového chromatografu a spuštěna analýza.



Obrázek 8: Vialka se vzorkem sýru (2,0 g)

Výsledky byly vyhodnoceny na základě srovnání hmotnostních spekter sloučenin s dostupnou knihovnou spekter, obsah sloučenin je vyjádřen semikvantitativně na základě ploch píků.

2.2.1.4 Podmínky SPME-GC-MS analýzy

Podmínky SPME extrakce:

- Doba inkubace (temperování): 10 minut
- Doba extrakce: 20 minut
- Teplota agitátoru (teplota extrakce a inkubace): 40 °C
- Agitátor zapnutý: 5s
- Agitátor vypnutý: 60 s
- Hloubka ponoření vlákna do vialky: 20 mm
- Množství vzorku: 2 g

Podmínky GC-MS analýzy:

- Kapilární kolona ZB-Wax (30m × 0,25 mm × 0,5 μm)
- Teplota injektoru (desorpce): 240 °C
- Doba desorpce: 20 min
- Dávkování: splitless, ventil uzavřený 10 min
- Hloubka ponoření vlákna do injektoru: 40 mm
- Nosný plyn: helium, průtok 1 ml·min⁻¹
- Teplotní program: 40 °C s výdrží 2 min, vzestupný gradient 3 °C/min, do 110 °C s výdrží 10 min, vzestupný gradient 3 °C/min do 200 °C s výdrží 0 min
- celková doba analýzy: 65 min

2.2.2 Identifikace a kvantifikace vázaných a volných mastných kyselin

Pro měření vázaných a volných MK v sýrech byla použita plynová chromatografie s detekcí plamenově ionizačním detektorem (GC-FID).

2.2.2.1 Přístroje, laboratorní vybavení a použité pracovní pomůcky

Plynový chromatograf TRACE™ GC 2000 (ThermoQuest Itálie S. p. A, Itálie)
s plamenově-ionizačním detektorem

Kapilární kolona: DB-WAX s vysoce polární stacionární fází (PEG); (30 m × 0,32 mm × 0,5 μm)

Analytické laboratorní váhy (GR-202-ED, A&D, UK)

Vakuová rotační odparka (RV06-ML, IKA WERKE, Německo)

Běžné laboratorní sklo a pomůcky, dělicí nálevka, digestoř, nůž, prkénko, zpětný chladič, vodní lázeň, topné hnízdo

2.2.2.2 Chemikálie

Ethanol 96 % (PENTA, Česká republika)

Methanol 99,9 % (Merck, Německo)

Diethylether p.a. (Lach-Ner, Česká republika)

Kyselina chlorovodíková 35% p.a. (Lach-Ner, Česká republika)

Petrolether p.a. (PENTA, Česká republika)

Methanolický roztok hydroxidu sodného (0,5 mol·l⁻¹)

Fluorid boritý (10% methanolický roztok) (Merck, Německo)

Izooktan p.a. (PENTA, Česká republika)

Chlorid sodný p.a. (nasycený roztok)

2.2.2.3 Postup přípravy vzorků

Extrakce lipidů ze vzorku sýra

Extrakce lipidů ze vzorku sýra Brie de Meaux byla provedena podle normy ČSN EN ISO 1735:2005. Jednotlivé kroky kopírovaly postup, který je uveden v diplomové práci Štefana Kučerky (2021)⁴⁷.

Vzorek sýru byl jemně nakrájen a odvážen na analytické váze do zkumavky v množství 1 g s přesností na čtyři desetinná místa. Následně bylo k vzorku přidáno 5 ml 35% HCl a směs byla zahřívána při 80 °C ve vodní lázni až do úplného rozpuštění sýru. Následně byla směs ochlazená pod tekoucí vodou a pomocí ethanolu (5 ml) převedená do dělicí nálevky. Poté bylo ke směsi do dělicí nálevky přidáno 9 ml diethyletheru a 9 ml petroletheru. Po přidavcích byla směs protřepána a následně se nechala 30 minut odstát pro ustálení fází. Horní fáze byla odebrána skleněnou pipetou a vložena do baňky s kulatým dnem (50 ml). Tato extrakce pomocí diethyletheru a petroletheru se opakovala poté ještě 2× avšak s polovičním množstvím rozpouštědel (tj. 4,5 ml). Další dva extrakty byly přidány do baňky s prvním extraktem a promíchány. Následně bylo rozpouštědlo odpařené ve vakuové rotační odparce při teplotě 40 °C.

Příprava metylesterů mastných kyselin

Na přípravu methylesterů MK (MEMK) byla použita kyselá esterifikace s katalyzátorem bortrifluoridem (BF_3).

Pro tento postup byl využit již vyextrahovaný tuk (viz výše) v baňce s kulatým dnem. Do baňky byly společně s varným kamínkem přidány 4 ml methanolického roztoku NaOH ($c = 0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Baňka byla následně připevněna ke zpětnému chladiči a vložena do topného hnízda. Obsah baňky se vařil do doby, než nevymizely kapky tuku (5–10 min). Poté bylo do baňky přidáno 5 ml 10% BF_3 . Var se následně udržoval 30 minut. Do vroucí směsi bylo nakonec přidáno 3 ml izooktanu a baňka byla ihned odebrána z tepelného hnízda. Bez jakéhokoli chlazení bylo přidáno 20 ml nasyceného vodního roztoku NaCl a celý obsah baňky byl protřepán. Poté bylo přidáno větší množství nasyceného roztoku NaCl tak, aby hladina dosahovala hrdla baňky a byla tak lépe zřetelná pro odebrání horní fáze.

Z horní izooktanové vrstvy byl pipetou odebrán cca 1 ml do vialky pro analýzu vázaných MK pomocí GC-FID.

Kyselá esterifikace volných mastných kyselin

Pro tento postup byl též využit již vyextrahovaný tuk (viz výše) v baňce s kulatým dnem. Do baňky, která byla připevněna ke zpětnému chladiči a vložena do topného hnízda, se přidal varný kamínek a 5 ml methanolického roztoku BF_3 . Směs se přivedla k varu. Přesně po 3 minutách varu byly přidány 3 ml izooktanu, destilační baňka byla vyjmuta z tepelného hnízda a var byl zastaven.

Následný postup byl stejný jako při postupu kyselé esterifikace vázaných MK.

2.2.2.4 Podmínky stanovení GC-FID

Termostat – teplotní program

Teplota $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min.

Vzestupný gradient $25 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ do $200 \text{ }^\circ\text{C}$ s výdrží 0 min;

Vzestupný gradient $3 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ do $230 \text{ }^\circ\text{C}$ se zdržením 30 min

Inlet

Teplota injektoru: $250 \text{ }^\circ\text{C}$

Technika dávkování: splitless (ventil zavřen 1 min), split flow $10 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$

Nosný plyn: dusík (průtok nosného plynu: $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$)

Detektor: plaměnově-ionizační

Teplota detektoru: $250 \text{ }^\circ\text{C}$

Průtok vzduchu: $350 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$

Průtok vodíku: $35 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$

Make-up dusíku: $30 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$

Celková doba analýzy: 47 min

2.2.2.5 Parametry pro identifikaci a výpočet kvantifikace mastných kyselin

MK byly stanoveny ve formě MEMK na základě srovnání retenčních časů s retenčními časy standardů. Kvantifikace byla vypočítána z ploch píků MEMK ve srovnání se známou koncentrací a plochou píku standardu. Příslušné hodnoty standardů jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 3: Standardy MEMK použité pro identifikaci a kvantifikaci

Název MK		T_R [min]	c_s [mg · ml ⁻¹]	P_s [mV · s]	Mr_{MEMK} [g · mol ⁻¹]	Mr_{MK} [g · mol ⁻¹]
Kyselina kapronová	C6:0	5,33	0,4	24816103	130,187	116,160
Kyselina kaprylová	C8:0	6,50	0,4	23945147	158,241	144,214
Kyselina kaprinová	C10:0	7,61	0,4	24768160	186,295	172,268
Kyselina laurová	C12:0	8,88	0,4	23847200	214,349	200,322
Kyselina tridekanová	C13:0	9,65	0,2	10843620	228,376	214,349
Kyselina myristová	C14:0	10,57	0,4	19750867	242,403	228,376
Kyselina myristoolejová	C14:1 ^{Δ9}	10,96	0,2	10132703	240,387	226,360
Kyselina pentadekanová	C15:0	11,64	0,2	8900266	256,430	242,403
Kyselina palmitová	C16:0	12,94	0,6	24202520	270,457	256,43
Kyselina palmitoolejová	C16:1 ^{Δ9}	13,32	0,2	8184814	268,441	254,414
Kyselina heptadekanová	C17:0	14,39	0,2	7185718	284,484	270,457
Kyselina stearová	C18:0	16,09	0,4	13172497	298,511	284,484
Kyselina olejová	C18:1 ^{Δ9}	16,49	0,4	20584343	296,495	282,468
Kyselina linolová	C18:2 ^{Δ9,12}	17,32	0,2	13376777	294,479	280,452
Kyselina α-linolenová	C18:3 ^{Δ9,12,15}	18,62	0,2	6215424	292,463	278,436
Kyselina arachová	C20:0	20,29	0,4	11990880	326,565	312,358
Kyselina eikosapentaenová	C20:5	27,06	0,2	11172675	316,477	302,451
Kyselina eruková	C22:1 ^{Δ13}	27,99	0,2	3818453	352,603	338,576
Kyselina cis-4,7,10,13,16,19-dokosahexaenová	C22:6 ^{Δ4,7,10,13,16,19}	39,97	0,2	4166824	342,523	328,496

T_R – retenční čas MEMK, c_s – koncentrace standardů MEMK, P_s – plocha standardů MEMK, Mr_{MEMK} – molekulová hmotnost MEMK, Mr_{MK} – molekulová hmotnost MK

2.2.2.6 Vzorce pro výpočet množství MK v sýru

- 1) Výpočet koncentrace MEMK (c_{MEMK}) v extraktu vzorku sýra

$$c_{\text{MEMK}} = \frac{c_{\text{S}} \cdot P_{\text{MEMK}}}{P_{\text{S}}} \quad (1)$$

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

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

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

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

- 2) Výpočet koncentrace MK přepočtem z koncentrace MEMK

$$c_{\text{MK}} = \frac{c_{\text{MEMK}} \cdot Mr_{\text{MK}}}{Mr_{\text{MEMK}}} \quad (2)$$

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

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

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

Mr_{MEMK} molární hmotnost MEMK [$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$]

- 3) Výpočet množství v původním objemu v baňce

$$m_{\text{MK}} = c_{\text{MK}} \cdot V \quad (3)$$

m_{MK} celková hmotnost MK v baňce [mg]

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

V objem izooktanu (3 ml)

- 4) Výpočet koncentrace MK v sýru

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

$c_{\text{sýr}}$ [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$]

$m_{\text{sýr}}$ navážka sýra [g]

2.3 Mikrobiální část

2.3.1 Přístroje, laboratorní vybavení a použité pracovní pomůcky

Automatický izolátor QuickGene-Mini80 (FUJIFILM Corporation, Japonsko)
Cenrifuga 5430R (Eppendorf, Německo)
Minicentrifuga HERMLE Z100 (Hermle LaborTechnik GmbH, Německo)
My Cycler™ Thermal cycler (Bio-Rad, USA)
Spektrofotometr NanoDrop™ 2000 (ThermoScientific, USA)
Třepačka temperovaná TS-100C a termoblok SC-18/02C (Biosan, Lotyšsko)
Vortex-Genie 2 (Mo Bio Laboratories, Inc., QIAGEN, Německo)

2.3.2 Komponenty k RT-PCR

Kit pro izolaci QuickGene DNA tissue kit S (Kurabo, Japonsko)
qPCR 2x SYTO-9 Master Mix (Top-Bio s.r.o., Česká republika)
Pozitivní kontroly MO (Česká sbírka mikroorganismů, Česká republika;
Merc KGaA, Německo)
Primery (Merc KGaA, Německo)

2.3.3 Izolace DNA ze vzorků

Izolace DNA ze vzorků sýrů Brie de Meaux byla provedena pomocí soupravy kitu QuickGene. Izolace probíhala podle návodu a pokynů výrobce.

K izolaci celkové genomové DNA bylo naváženo do eppendorfovy zkumavky (1,5 ml) pomocí analytické váhy 50 mg vzorku. Před inkubací bylo ke vzorku přidáno 180 μ l tkáňového lyzačního pufru (MDT) a proteináza K (20 μ l). Vzorek byl inkubován nejméně 3 hodiny v 55 °C s jemným mícháním.

Po uplynutí doby inkubace byly vzorky zcentrifugovány (10 000 $\text{ot} \cdot \text{min}^{-1}$, 3 minuty) a vzniklý supernatant byl přepipetován do čistých eppendorfových zkumavek. Následně bylo do zkumavky přidáno 180 μ l lyzačního pufru (LDT) a zkumavka byla vortexována (15 s) a stočena. Následovala inkubace při 70 °C, 10 minut. Poté byly zkumavky stočeny a bylo přidáno 240 μ l 99,8% ethanolu, opět byl celý objem vortexován a stočen.

Samotná izolace probíhala na přístroji GC-Mini80 za využití kolonky s fritou. DNA z lyzátu se zachytila na kolonce, která byla následně 3 \times promyta promývacím pufrem. Následně byla DNA eluována elučním roztokem (CDT).

Koncentrace a čistota vyizolované DNA byla stanovena na NanoDrop™ 2000.

2.3.4 Výběr primerů

Pro analýzu RT-PCR byly na základě odborné literatury^{19,20,23,25,36} vybrány mikroorganismy, vyskytující se v bílých plísňových sýrech, zejména Brie de Meaux, mikroorganismy přítomné ve startovacích kulturách a případné kontaminanty mléčných výrobků (viz Tabulka 4).

Primery byly navrženy pomocí volně dostupného softwaru Primer-BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) dostupné z databáze NCBI, popř. byly dohledány v literatuře³⁶.

Tabulka 4: Seznam mikroorganismů s jejich sekvencí primerů pro RT-PCR

Mikroorganismus	Zařazení	Délka produktu		Sekvence primerů
<i>Penicillium camemberti</i>	Povrchově zrající sýry	207 bp	FW	CGATGGCGATGGACAGTAAG
			RV	TACTTGTACCGCTGGCCTA
<i>Penicillium commune</i>	Povrchově zrající sýry	283 bp	FW	GGCATCGATGAAGAACGCAG
			RV	ATTTGGGTTGATCGGCAAGC
<i>Geotrichum candidum</i>	Povrchově zrající sýry	210 bp	FW	TCTAGTTCGTAGAACGCGCC
			RV	GCGTCTACCAATTCGCCAC
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Povrchově zrající sýry	240 bp	FW	AATCGAACCCACACCTTCC
			RV	GTGCTGCGACTGTTTCGATTC
<i>Brevibacterium linens</i>	Bakterie na povrchu	277 bp	FW	TAATGGCCTACCAAGCCGAC
			RV	GGACAACGCTCGTACCCTAC
<i>Lactococcus lactis</i>	Bakterie mléčného kvašení	179 bp	FW	TGAGTAACGCGTGGGGAATC
			RV	TATCATCGCCTTGGTGAGCC
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Bakterie mléčného kvašení	324 bp	FW	ACGCAAGTCTGATGGAGCAA
			RV	ACGCATTACACCGCTACACA
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Bakterie mléčného kvašení	388 bp	FW	CTTGATGAGTTGCGAACGG
			RV	ACTTCCACTCTCACACCCG
<i>Salmonella enterica</i>	Kontaminant	338 bp	FW	CTGGAAGTGGAGACACGGTCC
			RV	CAGCCTGCCAGTTTCGAATG
<i>Staphylococcus aureus</i>	Kontaminant	447 bp	FW	CGAAGGCGACTTTCTGGTCT
			RV	TTGTCACCGGCAGTCAACTT
<i>Listeria monocytogenes</i>	Kontaminant	357 bp	FW	AACCAGAAAGCCACGGCTAA
			RV	GCGGAAACCCCTAACACTT
<i>Micrococcus luteus</i>	Kontaminant	383 bp	FW	TGGGTGGATTAGTGGCGAAC
			RV	CAGGTACCGTCACTTTCGCT

FW – přední primer (forward primer), RV – zadní primer (reverse primer)

2.3.5 RT-PCR reakce

Jako DNA matrice byly použity izoláty daných vzorků či pozitivní kontroly naředěné na koncentraci 10 ng/μl. Celkový objem směsi byl 25 μl (viz Tabulka 5).

Tabulka 5: Množství komponent na 1 reakci PCR

	1 reakce
SYTO PCR SYBR Mastermix (Top Bio)	12,5 μl
Primer FW (10 pmol/μl)	1 μl
Primer RV (10 pmol/μl)	1 μl
Voda pro PCR	9,5 μl
DNA matrice (10 ng)	1 μl

Amplifikace byla provedena pomocí přístroje My Cycler™ (BioRad). Amplifikační profil je uveden v Tabulce 6.

Tabulka 6: Amplifikační profil RT-PCR

	Teplota [°C]	Čas [s]	
Iniciační denaturace	98	180	
Denaturace	95	30	35 cyklů
Přisedání primerů	58	30	
Extenze	72	60	
Finální extenze	72	300	

Pro následnou HRM analýzu byla teplota navyšována postupně po 5 s o 0,1 °C v teplotním intervalu 50–99 °C.

Vyhodnocení bylo provedeno pomocí softwaru Analysis-Only Rotor-Gene 6000 Series Software, kde byly analyzovány křivky tání a prahový cyklus (Ct).

2.4 Senzorické hodnocení

Senzorické hodnocení proběhlo jednorázově a účastnilo se ho 17 osob, které hodnotily vzhled a barvu, konzistenci (texturu), vůni a chuť (flavour) pomocí 5-ti stupňové kategorové ordinální stupnice (výborný → nevyhovující); celková přijatelnost vzorků byla hodnocena pomocí pořadového testu. Jako chuťový neutralizátor byla použita voda a bílé pečivo.

Dotazník pro senzorické hodnocení je uveden v Příloze 4. Ukázka senzorické analýzy vzorků Brie de Meaux je uvedena na Obrázku 9.



Obrázek 9: Senzorická analýza sýrů Brie de Meaux

Uvedené označení vzorků na obrázku j kvůli anonymitě při sensorickém hodnocení. Standardní vzorek (NM23), vzorek uchovávaný po dobu 21 dní při 5 °C, volně ložený (L5Z0) a vzorek vakuovaný (V210), vzorek uchovávaný 21 dní ve 20 °C nebyl při sensorickém hodnocení nabídnut kvůli detekovaným kontaminantům (viz kapitola 3.2).

2.5 Statistické zpracování výsledků

Všechny statistické analýzy byly provedeny pomocí softwaru Statistica (verze 13.3; TIBCO) či programu Excel (Microsoft 365). Analýzy byly zpracované na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Těkavé (aromatické) látky byly identifikovány porovnáním hmotnostních spekter s knihovnou spekter pomocí programu Xcalibur v2.2. Výsledky jsou prezentovány v tabulce či semikvantitativně pomocí ploch příslušných píků v chromatogramu ve formě sloupcových grafů. Veškeré analýzy byly provedeny ve dvou opakováních ($n = 2$). Retenční čas (T_R) je uveden jako aritmetický průměr.

Výsledky vázaných a volných MK jsou uvedeny ve tvaru $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ sýra \pm směrodatná odchylka. Analýza byla provedena ve dvou opakováních ($n = 2$). Celkový počet identifikovaných vázaných i volných MK je znázorněn pomocí sloupcového grafu.

RT-PCR byla hodnocena pozitivně či negativně na daný patogen, popř. semikvantitativně pomocí Ct hodnot.

Výsledky sensorické analýzy jsou vyjádřeny jako medián datového setu a zpracovány pomocí neparametrické statistiky (Kruskal-Wallisův test), jelikož data nebyla distribuována rovnoměrně.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

Práce se zabývá sledováním a porovnáním změn jak chemických, tak mikrobiologických v průběhu dozrávání sýra Brie de Meaux. Změny byly sledovány během skladovacího experimentu, kdy byl sýr uchovávan při chladírenské teplotě (5 °C) bez obalu, popř. zavakuovaný (jako imitace nerozbaleného sýra uchovávaného delší dobu v lednici) a při teplotě pokojové (20 °C) po dobu 21 dní. V den nákupu (T0) byly provedeny analýzy těkavých (aromatických) látek, vázaných a volných MK a mikrobiálního složení. Tyto výsledky byly brány jako standard (T0_STD), se kterým byly následně srovnávány výsledky po době 21 dní skladování sýra (T21).

Pro stanovení těkavých (aromatických) látek byla použita metoda SPME-GC-MS. Vzorky pro identifikaci vázaných a volných MK byly změřeny na GC-FID. Mikrobiální kultura byla sledována pomocí RT-PCR za využití interkalačního barviva.

Na závěr byly vzorky hodnoceny sensoricky. Cílem práce bylo posoudit vliv skladovací teploty na uvedené chemické a mikrobiologické parametry a sensorickou přijatelnost sýra.

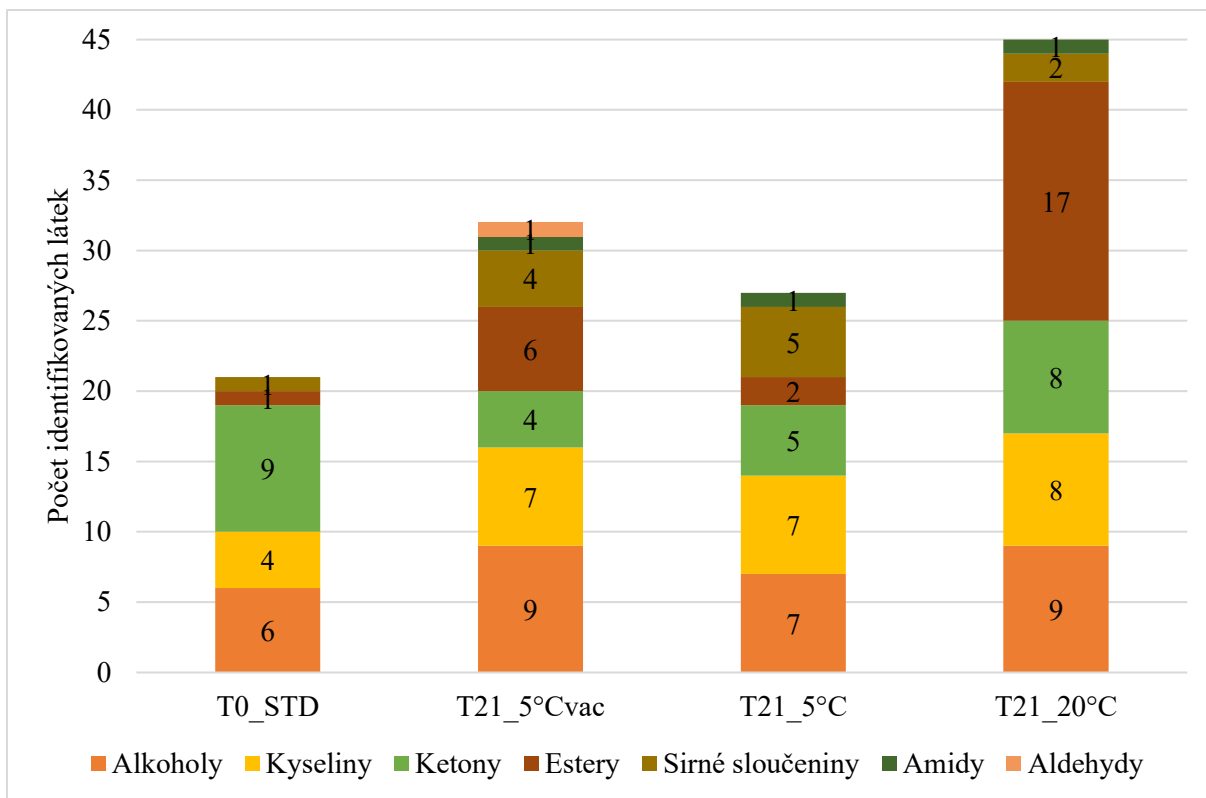
3.1 Analytická část

3.1.1 Identifikace a kvantifikace těkavých látek v sýrech

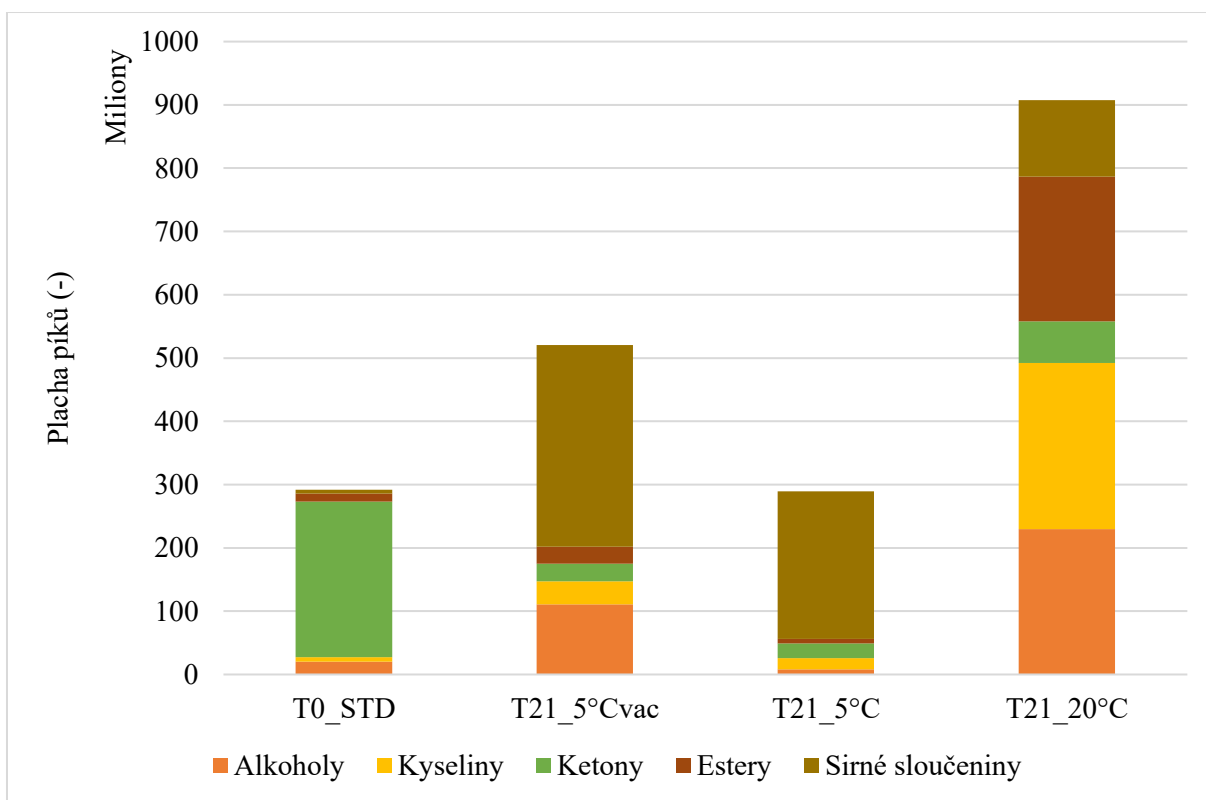
Dle změřených dat bylo na chromatogramech všech vzorků sýrů identifikováno celkem 59 sloučenin, z toho 13 alkoholů, 8 karboxylových kyselin, 12 ketonů, 17 esterů, 5 sirných sloučenin, 2 amidy, 1 aldehyd a 1 sloučenina zařazená do skupiny ostatních. Těkavé (aromatické) látky byly identifikovány pomocí knihovny spekter a jejich retenčních časů.

V Grafu 1 níže je uvedeno porovnání počtu identifikovaných těkavých látek ve vzorcích sýrů. Tyto údaje jsou též porovnány pomocí relativního obsahu pro jednotlivé skupiny látek (viz Graf 2).

V následující Tabulce 7 je uveden celkový přehled všech identifikovaných sloučenin. Přítomnost ve vzorku je označena ✓, nepřítomnost ×. Reprezentativní chromatogramy jsou uvedeny v Příloze 1 a 2.



Graf 1: Porovnání počtu identifikovaných těkavých (aromatických) látek ve vzorcích sýrů; značení vzorků viz Tabulka 2.



Graf 2: Porovnání relativního obsahu identifikovaných látek ve vzorcích sýrů; značení vzorků viz Tabulka 2

Tabulka 7: Přehled těkavých (aromatických) látek identifikovaných ve vzorcích sýra Brie de Meaux

Název sloučeniny	Skupina	Tr [min]	T0_STD	T21_5°Cvac	T21_5°C	T21_20°C	Reference
Ethanol	alkohol	4,63	×	×	×	✓	2,27
Pentan-2-on	keton	5,6	✓	×	×	✓	27,33
Acetaldehyd	aldehyd	5,59	×	✓	×	×	
Acetamid	amid	6,51	×	✓	✓	×	
Aceton	keton	6,96	✓	×	×	×	27,33
Ethylbutanoát	ester	7,28	×	×	×	✓	27,48
Ethyl 2-methylbutanoát	ester	7,73	×	×	×	✓	2
Ethyl 3-methylbutanoát	ester	8,25	×	×	×	✓	2
2,4-dinitrofenyl 2,2-dimethylpropanoát	ester	8,36	✓	×	×	✓	
Dimethyldisulfid	sírná sloučenina	8,50	✓	✓	✓	✓	48
Hexan-2-on	keton	8,77	✓	×	×	×	27
Pentyl 2-methylpropanoát	ester	10,26	×	×	×	✓	
Butan-2-ol	alkohol	10,29	×	✓	✓	×	27,48,49
Pentan-2-ol	alkohol	10,3	✓	✓	×	×	27,48
3-methylbutan-2-ol	alkohol	10,32	×	✓	✓	×	49
Cyklobutan	ostatní	11,78	✓	×	×	✓	
Heptan-2-on	keton	12,67	✓	✓	✓	✓	27,48
3-methylbutan-1-ol	alkohol	13,76	×	✓	×	✓	48,49
Pentan-1-ol	alkohol	13,79	✓	×	✓	×	48
3-methylbutanoát	ester	14,47	×	✓	✓	✓	2
Ethylhexanoát	ester	14,84	×	✓	×	✓	27
Kyselina jantarová	kyselina	15,95	×	×	✓	✓	48
3-methylbutylbutanoát	ester	16,15	×	✓	×	✓	
Oktan-2-on	keton	17,06	✓	×	×	×	27,48

Acetoin	keton	17,21	✓	×	×	✓	
2,4-dithiapentan	sírná sloučenina	17,2	×	✓	✓	×	
Propyl hexanoát	ester	18,44	×	×	×	✓	
Heptan-2-ol	alkohol	18,56	✓	✓	✓	✓	27,33,48
Ethylheptanoát	ester	19,1	×	×	×	✓	
Butan-1,2-diol	alkohol	19,58	×	×	×	✓	33
Hexan-1-ol	alkohol	19,98	×	×	×	✓	27
2-hydroxy-3-pentanon	keton	20,3	×	×	×	✓	
Dimethyltrisulfid	sírná sloučenina	21,14	×	✓	✓	✓	48
Nonan-2-on	keton	21,48	✓	✓	✓	✓	27,33,48
Methyl hexanthioát	ester	22,02	×	✓	×	✓	
Ethyl oktanoát	ester	23,38	×	×	×	✓	27,48
Non-8-en-2-on	keton	23,82	✓	✓	✓	✓	27,48
Isopentylhexanoát	ester	24,31	×	×	×	✓	
Kyselina octová	kyselina	24,86	×	✓	✓	✓	27
Cyclohept-4-en-1-on	keton	25,29	×	×	✓	×	
Nonan-2-ol	alkohol	27,06	✓	✓	✓	✓	27,48
Butan-2,3-diol	alkohol	29,39	✓	✓	×	✓	33
Kyselina propionová	kyselina	28,77	×	✓	×	✓	27
Undecan-2-on	keton	31,38	✓	×	×	✓	27,33,48
Propyl oktanthioát	ester	32,33	×	✓	×	✓	
Ethyldekanoát	ester	34,33	×	×	×	✓	27,48
Kyselina máselná	kyselina	34,87	✓	✓	✓	✓	27,48
Methyl methylthiomethyl disulfid	sírná sloučenina	36,03	×	✓	✓	×	
Kyselina 3-methylbutanová	kyselina	38,04	✓	✓	✓	✓	2,27
Fenylaceton	keton	40,72	×	✓	✓	✓	
Ethylfenylacetát	ester	44,18	×	×	×	✓	
1-(4-methylfenyl)-ethanol	alkohol	46,05	×	✓	✓	✓	
Kyselina kapronová	kyselina	47,69	✓	✓	✓	✓	27,48

Dimethylsulfon	sírná sloučenina	49,74	×	×	✓	×	
Fenylethylalcohol	alkohol	50,07	✓	✓	✓	✓	48
Methyl thiooktanoát	ester	54,10	×	✓	✓	✓	
Kyselina kaprylová	kyselina	56,17	✓	✓	✓	✓	27,48
Hexanamid	amid	57,46	×	×	×	✓	
Kyselina kaprinová	kyselina	63,03	×	✓	✓	✓	27,48

T_R – retenční čas; označení vzorků viz Tabulka 2

Z uvedených výsledků je patrné, že největší počet těkavých látek byl podle očekávání identifikován v sýru T21_20°C, který byl uchováván po dobu 21 dní při 20 °C. Tento výsledek pravděpodobně spojuje předpoklad delší doby zrání a též i vhodnější teploty pro růst mikroorganismů, které se v tomto vzorku vyskytovaly v signifikantním množství – zejména *P. camemberti*, *P. commune*, *Debaryomyces hansenii* a bakterie mléčného kvašení (viz kapitola 3.2), které přispívají k rozvoji aroma sýrů^{18,20,50}.

Nejnižší počet látek byl dle našich předpokladů nalezen ve vzorku standardního sýra (T0_STD). Standardní sýr byl zakoupen v obchodní zralosti a nebylo tak možné pozorovat změny ve zrání v průběhu samotné výroby sýra. Můžeme však i zde pozorovat vývoj těkavých aromatických látek ve srovnání se vzorky po 21 dnech skladování.

Při srovnání vzorků Brie de Meaux, které byly uchovávány po dobu 21 dní při teplotě 5 °C (volně ložený vs. vakuovaná forma, tj. simulace nerozbaleného produktu), měl mírně vyšší počet těkavých látek sýr vakuovaný. Vyšší počet aromaticky aktivních látek je vítaný do doby, než je překročen práh rovnováhy, a tyto látky mohou být ve vyšších koncentracích důvodem defektů ve vůni i chuti^{2,17}. V našem případě byl vzorek sýru T21_5°Cvac hodnocen při sensorickém hodnocení kladně.

Výsledky v identifikovaných počtech do určité míry korespondují s porovnáním relativního obsahu identifikovaných látek (Graf 2). V grafu 2 jsou uvedeny pouze hlavní skupiny látek (alkoholy, kyseliny, ketony, estery a sirné sloučeniny). Amidy a aldehydy se ve vzorcích, pokud vůbec, vyskytovaly ve velmi malých množstvích. Nejvíce zastoupenými sloučeninami z hlediska množství byly sloučeniny síry, které bílým plísňovým sýrům dodávají výrazně česnekový tón^{2,27}. I když nebylo detekováno těchto sloučenin mnoho (viz Graf 1), jejich celkové množství a koncentrace je ve vzorcích majoritní. Jako nejzastoupenější sloučenina síry je v odborné literatuře citován dimethyldisulfid², který se v největším množství vyskytuje i v našich vzorcích. Jeho velký nepoměr k ostatním látkám lze srovnat na chromatogramu v Příloze 1, kde jsou uvedeny výsledky vzorku T21_5°C (nejvyšší pík – dimethyldisulfid s Rt 8,51 min). Další sirnou sloučeninu, která byla identifikována ve většině vzorků byl dimethytrisulfid. Dle odborných publikací² se sirné sloučeniny vyskytují ve vyzrálých sýrech, což též dokazují i naše výsledky, kdy jsou sirné sloučeniny detekovány výhradně u sýrů po 21 dnech dozrání na rozdíl od vzorku standardního. Za klíčové producenty sirných sloučenin v bílých plísňových sýrech je považován především *Brevibacterium linens* či koryneformní bakterie⁴⁸. V našich výsledcích pomocí RT-PCR byl však *B. linens* detekován ve stopových množstvích (viz kapitola 3.2). Jelikož sirné sloučeniny vznikají rozpadem methioninu²⁴, můžeme předpokládat, že v sýrech probíhala významná proteolýza.

Při srovnání s ostatními vzorky mají jednotlivé skupiny (alkoholy, kyseliny a estery) největší zastoupení ve vzorku T21_20°C. Výjimkou jsou ketony, kde je největší podíl ve standardním sýru (T0_STD). Ketony a methylketony jsou produkty degradace MK. Jsou důležité nejen svým aroma, ale jsou též prekurzory pro další aromaticky aktivní látky – zejména alkoholy a estery^{2,24}. V průběhu experimentu lze pozorovat trend, kdy se ketony nacházejí z našeho hlediska v nejméně vyzrálém sýru a postupně jejich množství klesá a stoupá množství esterů a alkoholů.

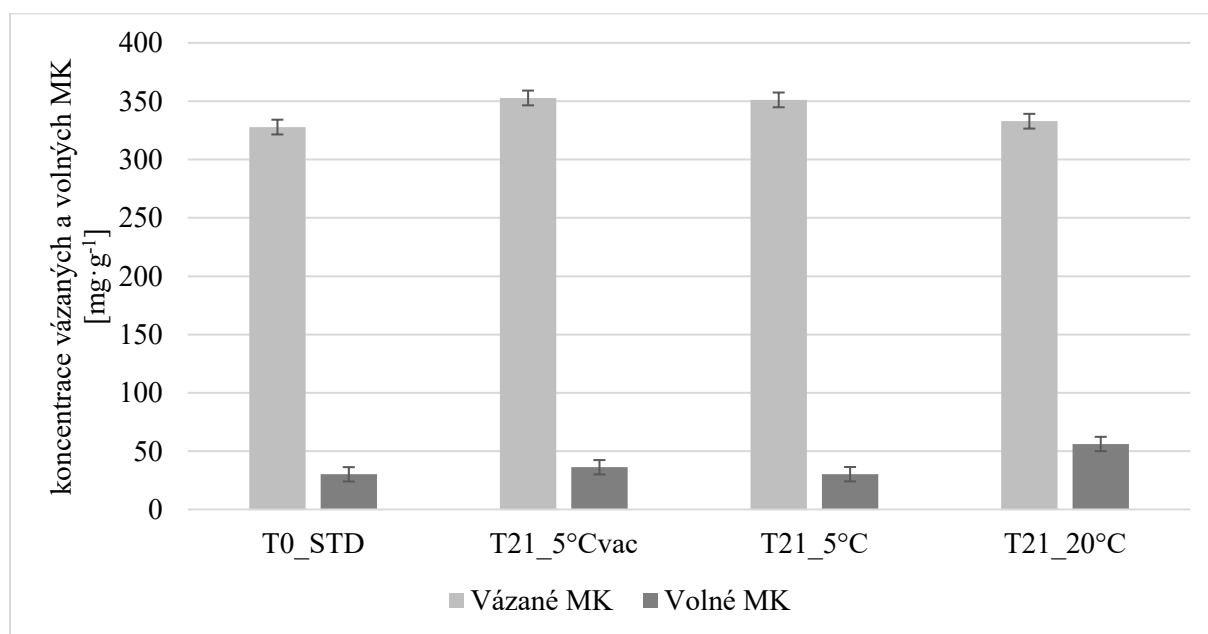
Skupina esterů, které dávají sýrům příjemné květinové aroma, je v sýrech velmi rozmanitá². Tato rozmanitost je zřejmá zejména u sýra T21_20°C, kdy počet esterů je dvojnásobný ve srovnání s alkoholy či kyselinami (viz Graf 1), avšak jejich množství jsou srovnatelná (viz Graf 2).

Sloučeniny, které byly identifikované ve všech vzorcích jsou: heptan-2-on, heptan-2-ol, dimetyldisulfid, nonan-2-on, non-8-en-2-on, nonan-2-ol, kyselina máselná, kyselina 3-methylbutanová, kyselina kapronová a kaprylová. Konkrétně heptan-2-on a nonan-2-on jsou nejhodněji zastoupenými ketony v těkavé frakci, což potvrzuje i odborná literatura^{2,24}.

3.1.2 Identifikace a kvantifikace vázaných a volných mastných kyselin v sýrech

Ve vzorcích bylo identifikováno celkem 15 MK, vázaných i volných. MK byly identifikovány na základě srovnání retenčních časů MEMK s příslušnými standardy. Případné další MK nebylo možné s jistotou identifikovat, jelikož nebyly k dispozici příslušné standardy. Kvantifikace byla provedena pomocí srovnání ploch píků se standardy o známé koncentraci (viz kapitola 2.2.2.5).

Výsledky identifikace a kvantifikace vázaných a volných MK jsou uvedeny v Tabulkách 8 a 9 níže. Ukázka chromatogramu je ukázána v Příloze 3. V Grafu 3 je uvedeno grafické znázornění celkového obsahu vázaných a volných MK.



Graf 3: Celkový obsah vázaných a volných mastných kyselin ve vzorcích sýrů; značení vzorků viz Tabulka 2

Z výsledků je patrné, že nejvyšší množství celkových volných MK bylo detekováno podle očekávání ve vzorku T21_20°C, tedy sýru, který byl skladován 21 dní při 20 °C (56,12 mg·g⁻¹). U vzorků skladovaných při 5 °C byl obsah volných MK zhruba stejný, jako ve standardu, z čeho lze usuzovat, že při nízké skladovací teplotě probíhá lipolýza podstatně pomaleji, než při 20 °C.

Tabulka 8: Obsah vázaných mastných kyselin ve vzorcích sýrů

		Vázané MK [mg·g ⁻¹ sýra]			
Název MK		T0_STD	T21_5°Cvac	T21_5°C	T21_20°C
Kyselina kapronová	C6:0	2,77 ± 0,28	3,05 ± 0,59	2,98 ± 0,54	2,46 ± 0,09
Kyselina kaprylová	C8:0	2,33 ± 0,28	2,64 ± 0,54	2,68 ± 0,43	2,20 ± 0,11
Kyselina kaprinová	C10:0	6,91 ± 0,49	7,55 ± 0,80	7,60 ± 0,63	6,61 ± 0,33
Kyselina laurová	C12:0	10,37 ± 1,98	11,31 ± 2,31	11,34 ± 1,79	10,46 ± 1,37
Kyselina tridekanová	C13:0	0,44 ± 0,01	0,42 ± < 0,01	0,46 ± 0,02	0,40 ± 0,01
Kyselina myristová	C14:0	43,38 ± 9,16	48,60 ± 9,10	49,11 ± 7,10	45,88 ± 7,04
Kyselina myristoolejová	C14:1 ^{Δ9}	3,95 ± 0,50	4,79 ± 0,21	3,95 ± 0,34	3,89 ± 0,38
Kyselina pentadekanová	C15:0	5,52 ± 0,43	1,61 ± 0,04	1,99 ± 0,01	1,73 ± 0,04
Kyselina palmitová	C16:0	163,94 ± 11,75	175,53 ± 11,17	173,92 ± 8,37	165,95 ± 8,69
Kyselina palmitoolejová	C16:1 ^{Δ9}	9,36 ± 0,62	9,01 ± 1,05	8,04 ± 0,98	8,54 ± 0,44
Kyselina heptadekanová	C17:0	2,51 ± 0,17	2,24 ± 0,09	2,36 ± 0,06	2,18 ± 0,11
Kyselina stearová	C18:0	1,65 ± 0,08	1,45 ± 0,05	1,68 ± 0,01	1,43 ± 0,05
Kyselina olejová	C18:1 ^{Δ9}	67,47 ± 9,12	76,88 ± 8,66	75,99 ± 10,40	73,23 ± 12,18
Kyselina linolová	C18:2 ^{Δ9,12}	4,94 ± 0,65	4,91 ± 0,18	5,87 ± 0,34	5,06 ± 0,63
Kyselina α-linolenová	C18:3 ^{Δ9,12,15}	2,30 ± 0,21	2,81 ± 0,21	3,19 ± 0,22	2,85 ± 0,44

Značení vzorků viz Tabulka 2

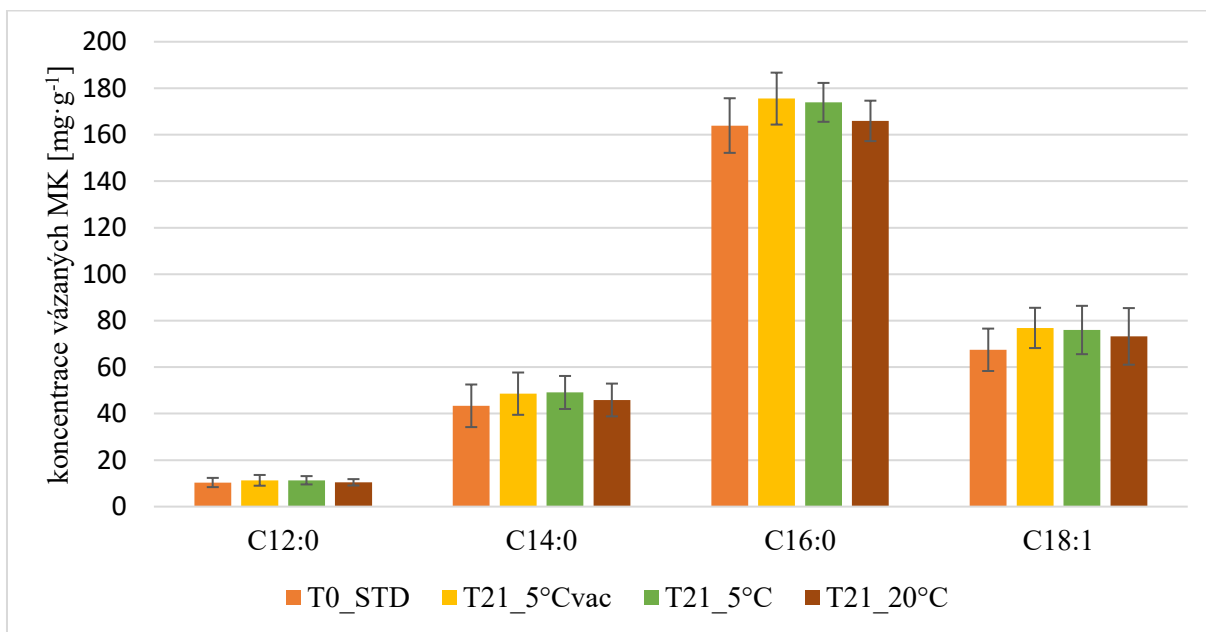
Tabulka 9: Obsah volných mastných kyselin ve vzorcích sýrů

		Volné MK [mg·g ⁻¹ sýra]			
Název MK		T0_STD	T21_5°Cvac	T21_5°C	T21_20°C
Kyselina kapronová	C6:0	0,46 ± 0,02	0,40 ± 0,01	0,42 ± 0,04	0,45 ± < 0,01
Kyselina kaprylová	C8:0	0,41 ± 0,01	0,37 ± < 0,01	0,37 ± 0,03	0,44 ± < 0,01
Kyselina kaprinová	C10:0	1,03 ± 0,02	1,00 ± < 0,01	0,92 ± 0,05	1,36 ± 0,01
Kyselina laurová	C12:0	1,40 ± 0,01	1,43 ± 0,06	1,25 ± 0,04	1,96 ± 0,03
Kyselina tridekanová	C13:0	0,05 ± 0,00	0,05 ± < 0,01	0,04 ± < 0,01	0,07 ± < 0,01
Kyselina myristová	C14:0	3,94 ± 0,13	4,59 ± 0,35	3,87 ± 0,25	7,00 ± 0,19
Kyselina myristoolejová	C14:1 ^{Δ9}	0,46 ± 0,01	0,47 ± 0,01	0,47 ± 0,01	1,02 ± 0,05
Kyselina pentadekanová	C15:0	0,65 ± 0,01	0,21 ± < 0,01	0,41 ± < 0,01	0,46 ± 0,04
Kyselina palmitová	C16:0	11,91 ± 0,73	15,29 ± 0,94	12,35 ± 0,53	22,82 ± 0,48
Kyselina palmitoolejová	C16:1 ^{Δ9}	0,47 ± 0,01	0,85 ± 0,20	0,90 ± 0,05	2,07 ± 0,04
Kyselina heptadekanová	C17:0	0,28 ± 0,00	0,19 ± 0,03	0,20 ± 0,01	0,33 ± 0,02
Kyselina stearová	C18:0	2,56 ± 0,07	3,10 ± 0,60	2,46 ± 0,23	6,07 ± 0,55
Kyselina olejová	C18:1 ^{Δ9}	4,82 ± 0,21	6,67 ± 1,11	5,40 ± 0,28	9,89 ± 0,33
Kyselina linolová	C18:2 ^{Δ9,12}	0,52 ± 0,04	0,97 ± 0,14	0,70 ± 0,04	1,35 ± 0,09
Kyselina α-linolenová	C18:3 ^{Δ9,12,15}	0,44 ± 0,02	0,60 ± 0,05	0,48 ± 0,03	0,83 ± 0,06

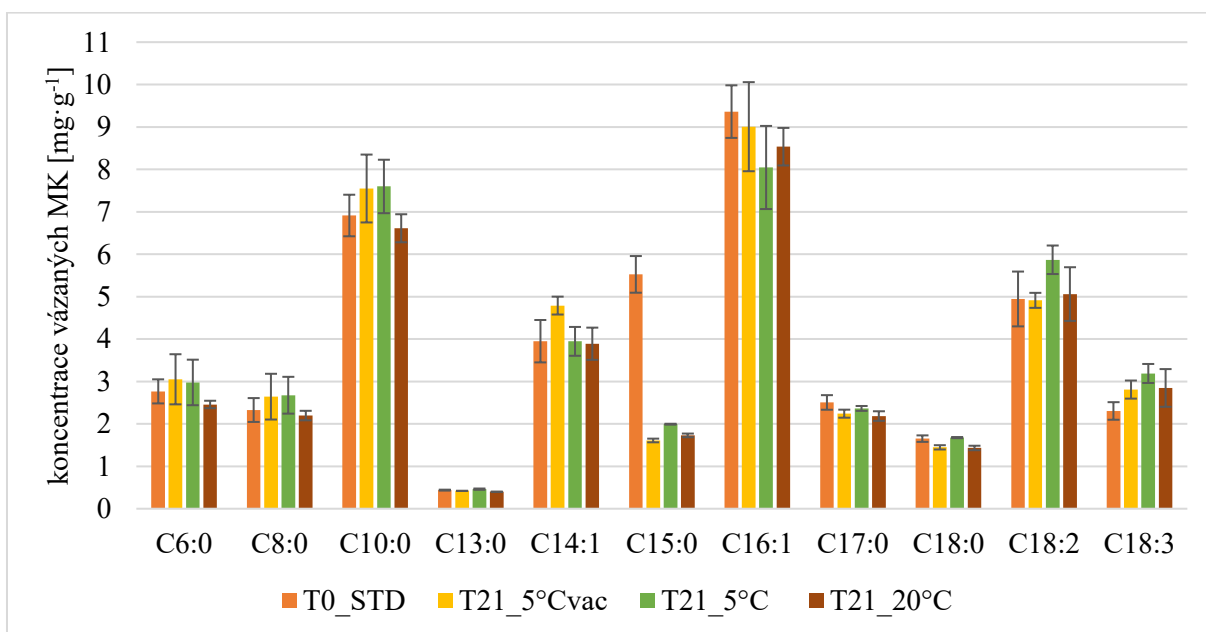
Značení vzorků viz Tabulka 2

Kromě MK uvedených v Tabulkách 8 a 9 byly ve vzorcích sýrů detekovány kyselina arachidová (C20:0), eikosapentaenová (C20:5) a eruková (C22:1), ale pouze v zanedbatelném množství.

V Grafech 4 a 5 je uveden přehled vázaných MK v průběhu zrání v rámci jednotlivých MK. Z výsledných dat je patrné, že nejvyšší koncentrace ve všech vzorcích dosahuje kyselina palmitová (C16:0). Ve vyšších podílech jsou též kyseliny olejová (C18:1^{Δ9}), myristová (C14:0) a laurová (C12:0). Ostatní vázané MK (viz Graf 4) nedosahují množství nad 10 mg·g⁻¹ sýra.



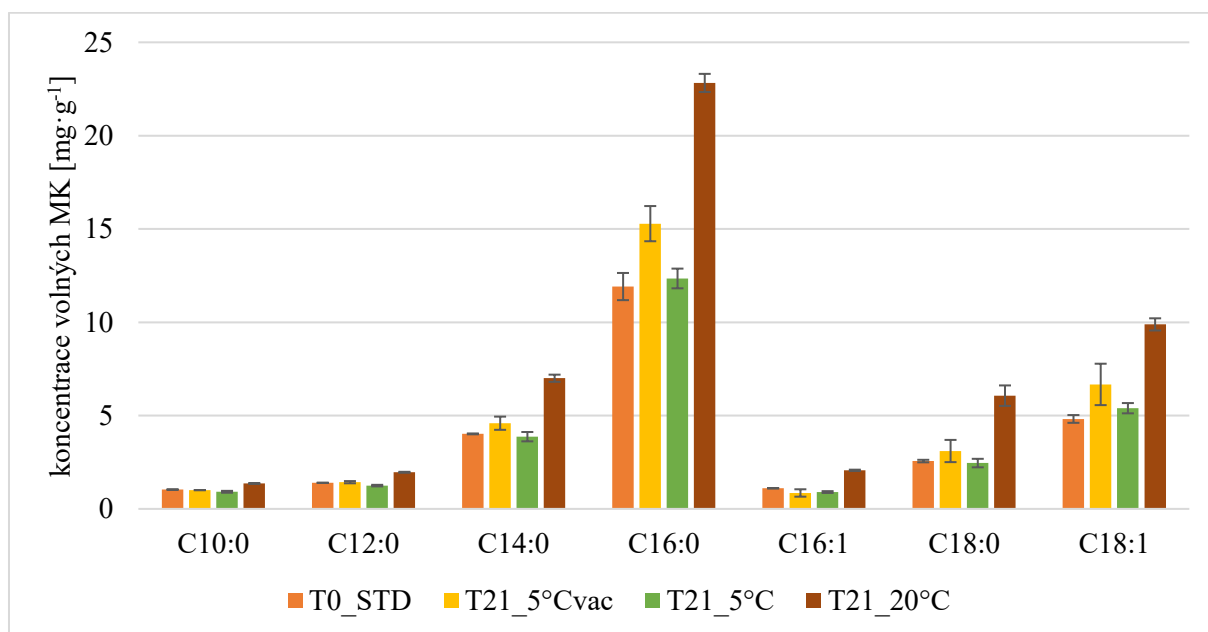
Graf 4: Přehled vybraných vázaných mastných kyselin v průběhu zrání v koncentraci nad 10 mg·g⁻¹ sýra; značení vzorků viz Tabulka 2; chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku.



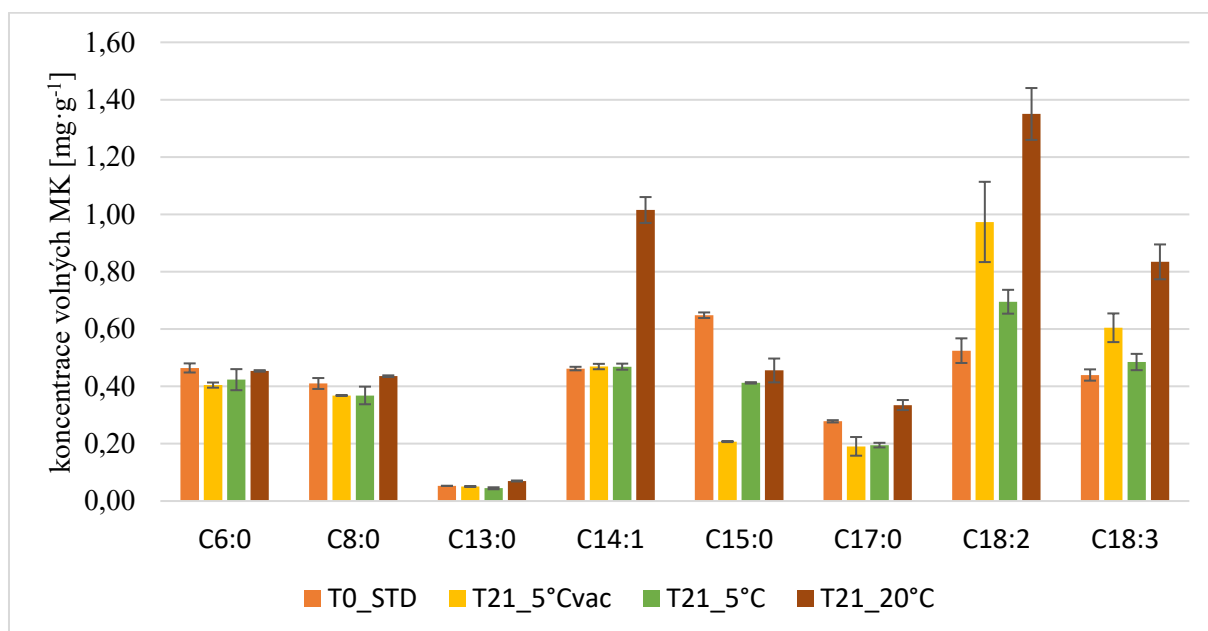
Graf 5: Přehled vybraných vázaných mastných kyselin v průběhu zrání v koncentraci do 10 mg·g⁻¹ sýra; značení vzorků viz Tabulka 2; chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku.

Na Grafech 6 a 7 jsou uvedeny výsledky volných MK. Jejich koncentrace v sýru je menší, avšak jejich podíly v rámci jednotlivých MK korelují s množstvím vázaných MK.

Vývoj volných MK je nejzřetelnější zejména u vzorku sýru T21_20°C, tedy vzorku, který byl uložen po dobu 21 dní při 20 °C.



Graf 6: Přehled volných MK v průběhu zrání v koncentraci nad 1 mg·g⁻¹ sýra; značení vzorků viz Tabulka 2; chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku.



Graf 7: Přehled volných MK v průběhu zrání v koncentraci do 1 mg·g⁻¹ sýra; značení vzorků viz Tabulka 2; chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku.

Volné MK, zejména ty s krátkým a středně dlouhým řetězcem, jsou uvolňovány v průběhu lipolýzy a dále metabolizovány na methylketony a laktony²⁴.

V našich výsledcích, které se shodují s publikacemi zabývajícími se detekcí a identifikací MK pomocí CG-FID v mléce a sýrech³⁵, zaujímá nejvyšší koncentraci kyselina

palmitová (C16:0), mezi ostatní majoritně zastoupené kyseliny patří: olejová (C18:1^{Δ9}), myristová (C14:0), stearová (C18:0)³⁵.

Obecně lze říci, že majoritní skupinou jsou nasycené MK, který tvoří zhruba $\frac{2}{3}$ podíl oproti MK nenasyčeným³⁵. Hlavním zdrojem MK je krmivo a mikrobiální aktivita v bachoru, profil MK ale též ovlivňují i genetické predispozice zvířat a v neposlední řadě i samotný proces výroby mléčných výrobků³⁵.

3.2 Mikrobiální část

3.2.1 Izolace DNA ze vzorků

Izolace byla provedena pomocí komerčního kitu. Výsledky koncentrace vzorků jsou uvedeny v Tabulce 10 níže.

Tabulka 10: Výsledná koncentrace DNA v izolovaných vzorcích

T0_STD	6,1 ng/μl
T21_5°Cvac	5,4 ng/μl
T21_5°C	17,8 ng/μl
T21_20°C	76,9 ng/μl

Značení vzorků viz Tabulka 2

Celkovou izolaci provázely problémy, které byly pravděpodobně spojené s větším obsahem tuku ve vzorcích, který bránil izolaci. Z toho důvodu byl také vyzkoušen postup s využitím citrátu trojsodného na odstranění tuků dle publikace Unno a kol.⁵¹. Tento postup se však neujal. Proto byl využit původní postup z komerčního kitu s drobnými obměnami (různé množství materiálu sýra, mechanické rozmělnění atd.), díky nimž byla DNA z matrice sýra vyizolována v přijatelné koncentraci a čistotě.

3.2.2 Stanovení vybraných mikroorganismů pomocí RT-PCR

Pro RT-PCR byly použity izolované vzorky, které byly naředěny na koncentraci 10 ng/μl (kromě vzorku T0_STD a T21_5°Cvac, které byly použity v koncentraci původní, viz Tabulka 10).

Výsledky, které jsou uvedeny v Tabulce 11, byly hodnoceny pomocí hodnot Ct, díky kterým lze porovnat množství DNA ve vzorcích. Ct hodnota byla nastavena vždy pro trojici vzorků daného mikroorganismu.

Výsledky T0_STD nebyly správně amplifikovány, proto nejsou v práci uvedeny. Reprezentativní výsledky z RT-PCR a analýzy HRM jsou zobrazeny na Obrázcích 10 a 11.

Tabulka 11: Hodnoty Ct, srovnání průběhu zrání u jednotlivých mikroorganismů

	T21_5°Cvac	T21_5°C	T21_20°C
<i>Penicillium camemberti</i>	Ct 28,28	Ct 29,90	Ct 28,49
<i>Penicillium commune</i>	Ct 22,51	Ct 21,87	Ct 27,43
<i>Geotrichum candidum</i>	Ct 28,91	Ct 22,18	Ct 30,95
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Ct 24,19	Ct 22,87	Ct 25,97
<i>Brevibacterium linens</i>	–	Ct 31,09	Ct 30,72
<i>Lactococcus lactis</i>	Ct 18,04	Ct 17,79	Ct 26,94
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Ct 24,04	Ct 23,54	Ct 24,13
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Ct 24,16	Ct 28,53	Ct 22,46
<i>Salmonella enterica</i>	–		–
<i>Listeria monocytogenes</i>	–		–
<i>Micrococcus luteus</i>	–		Ct 25,06

V Tabulce 11 jsou uvedeny Ct hodnoty u vzorků, které byly hodnoceny pozitivně. Červeně označená pole značí negativní výsledek RT-PCR. Čím nižší hodnota Ct, tím se předpokládá vyšší koncentrace vstupní matrice ve vzorku. Značení vzorků viz Tabulka 2.

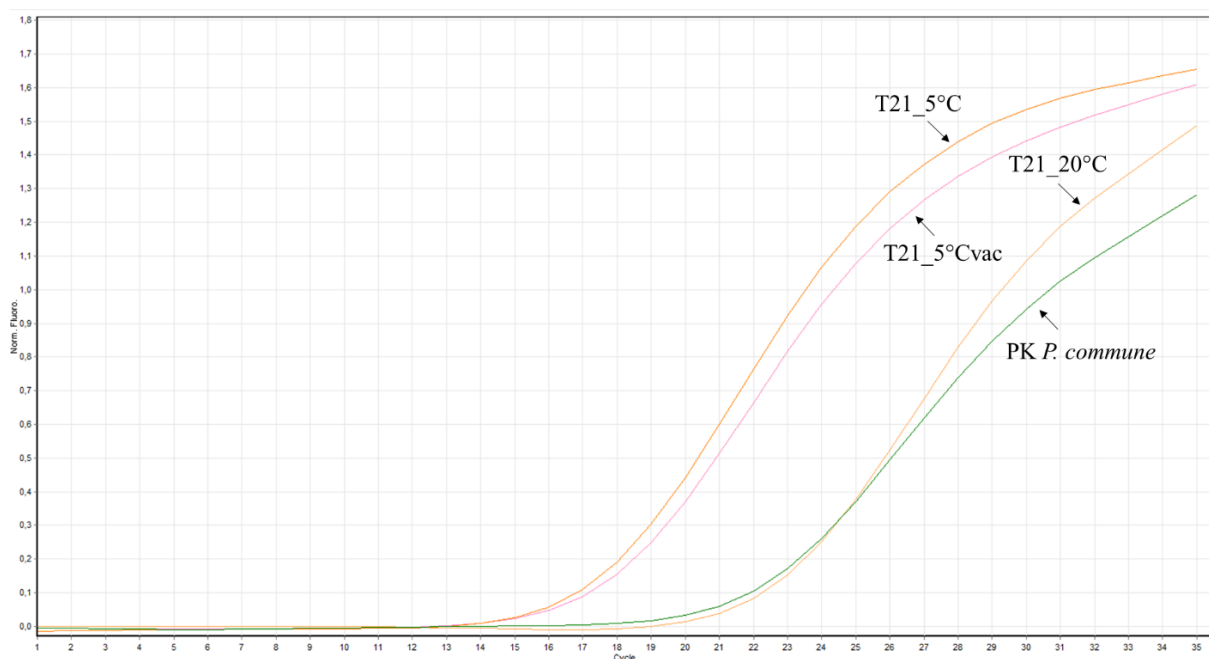
Většina analyzovaných mikroorganismů se vyskytuje ve všech třech vzorcích sýra i po 21 dnech dozrávání. Množství mikroorganismu *P. camemberti* se v jednotlivých vzorcích neliší. Větší rozdíly však můžeme pozorovat u *P. commune*, který je ve vzorcích uchovávaných v lednici větší než ve vzorku, který byl 21 dní při 20 °C (amplifikační křivky viz Obrázek 10).

U mikroorganismů *Geotrichum candidum* a *Debaryomyces hansenii* je patrné, že nejvyšší množství se nacházelo ve vzorku T21_5°C, který byl volně ložený po dobu 21 dní při 5 °C. U ostatních vzorků je jejich množství menší. V dostupné literatuře⁵ je uvedeno, že kvasinka *Geotrichum candidum* snižuje hořkost, tento fakt se u našich vzorků nepotvrdil, jelikož vzorek T21_5°C, kde bylo detekováno nejvyšší množství *Geotrichum candidum* byl hodnocen jako velice hořký.

Vakuovaný vzorek byl na *Brevibacterium linens* negativní, v ostatních vzorcích byl tento mikroorganismus detekován ve stopových množstvích (Ct > 30). Tento výsledek může být způsoben vyšším pH sýra, než je pro *Brevibacterium linens* optimální⁵.

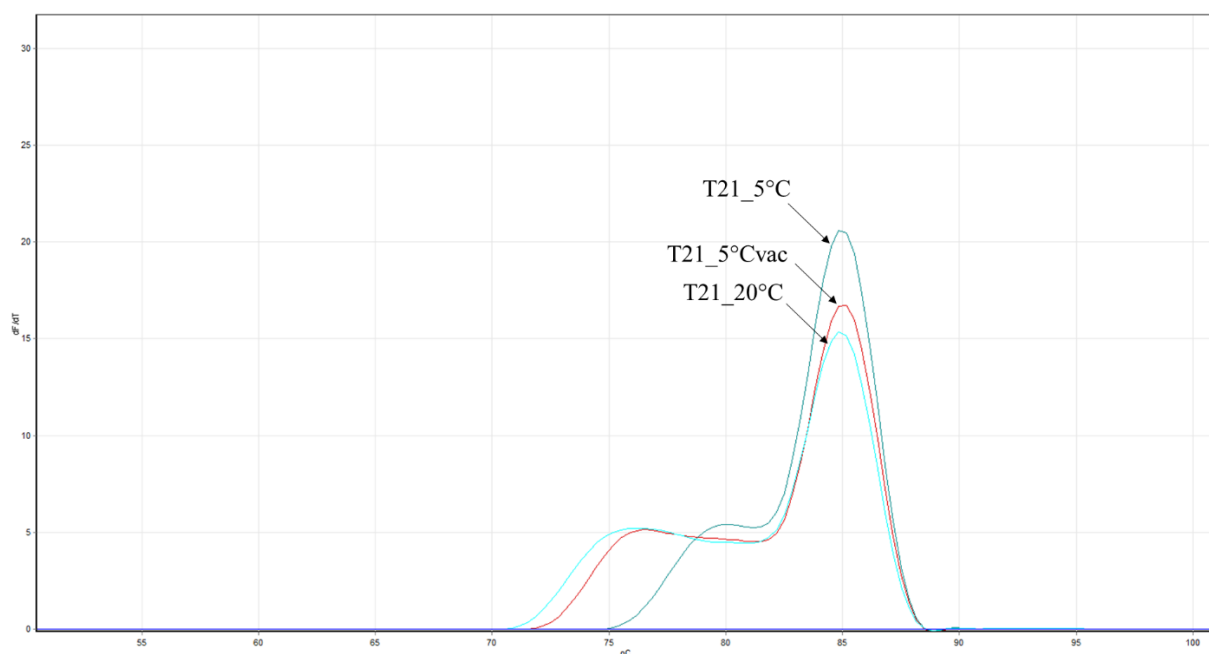
Největší množství mikroorganismů bylo obecně detekováno ve skupině bakterií mléčného kvašení (*Lactococcus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*). Je patrné, že se toto množství drží na určité hladině i po 21 dnech dozrávání, ačkoli postupem zrání začíná dominovat sekundární kultura. Kolonie *L. lactis* během pozdního zrání sýra zkoumali Ruggirello a kol.¹⁸, kteří ve své práci potvrdili perzistenci a životaschopnost těchto mikroorganismů během celého procesu zrání, včetně pozdních fází¹⁸.

Z kontaminantů byl vyhodnocen jako pozitivní pouze vzorek T21_20°C, a to konkrétně na *Micrococcus luteus*. Vzorek uchovávaný v lednici byl na kontaminanty negativní, proto lze předpokládat bezpečnost tohoto výrobku i po uchovávaní delší dobu při chladírenské teplotě.



Obrázek 10: Ukázka křivek RT-PCR *P. commune*

Současně s RT-PCR byla provedena HRM analýza (viz Obrázek 11), díky níž můžeme určit specifitu reakce. U vzorků *Geotrichum candidum* a *Lactobacillus bulgaricus* bylo detekováno v rámci HRM analýzy více píků, což může značit nespecifické produkty, dimery primerů či kontaminaci cizí DNA. Tyto problémy jsou způsobené zřejmě nespecifickým nasedáním primerů. Tento nedostatek lze zlepšit např. zvýšením teploty nasedání primerů či upravením sekvence primerů. Vhodné by bylo též použití špiček s filtrem⁵².



Obrázek 11: Ukázka záznamu HRM analýzy mikroorganismu *Debaryomyces hansenii*

3.3 Senzorické hodnocení sýrů

Cílem sensorického hodnocení bylo posoudit jednotlivé vzorky z hlediska konzumentů. Sensorického hodnocení, které se uskutečnilo na konci skladovacího experimentu, se účastnilo 17 hodnotitelů.

Hodnotitelé ve většině případů uvedli, že mají měkké sýry s bílou plísní na povrchu velmi rádi a konzumují je pravidelně, pouze jeden hodnotitel uvedl, že tento druh sýrů nemá příliš rád, ale nevádí mu. Dva hodnotitelé se v této otázce nevyjádřili. Všichni zúčastnění byly nekuřáci.

Byly hodnoceny celkem 3 vzorky sýrů skladované za různých podmínek. Vzorek standardní (T0_STD), vzorek vakuovaný skladovaný při 5 °C po dobu 21 dní (T21_5°Cvac; imitace nerozbaleného sýra uchovávaného delší dobu v lednici) a vzorek uchovávaný volně ložený po dobu 21 dní též při teplotě 5 °C (T21_5°C). Sensorický dotazník je uveden v Příloze 4.

Vzorek T21_20°C uchovávaný po dobu 3 týdnů ve 20 °C, nebyl k sensorickému hodnocení nabídnut z důvodu rizika ohrožení bezpečnosti, resp. výskytu kontaminanta, konkrétně *Micrococcus luteus*, který byly detekovány metodou RT-PCR (viz kapitola 3.2).

Senzorické vlastnosti, vzhled a barva, konzistence (textura), vůně a chuť (flavour) byly hodnoceny pomocí 5-ti stupňové kategorové stupnice a pořadového testu. V Tabulce 12 jsou uvedeny mediány jednotlivých sledovaných parametrů, kde nejlepší je hodnocen číslem 1, nejhorší číslem 5.

Tabulka 12: Výsledky sensorického hodnocení sýrů

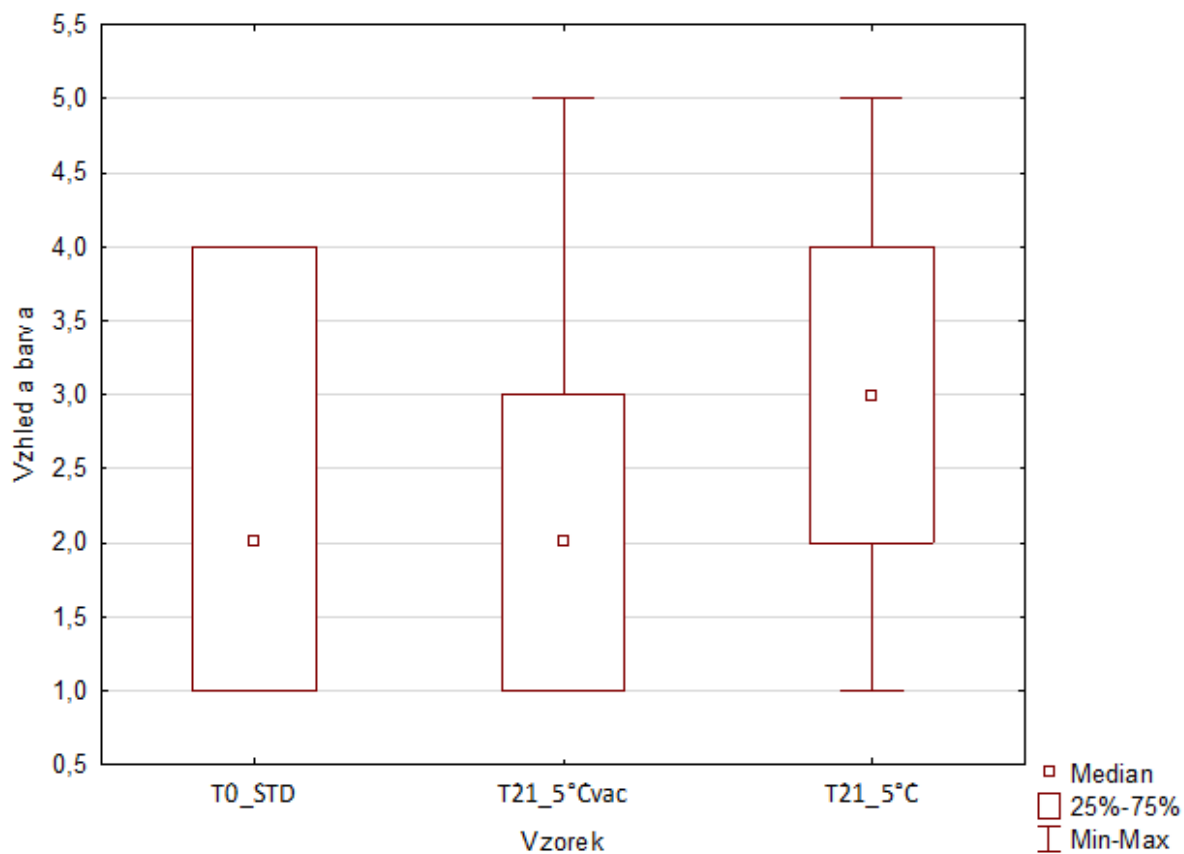
	Barva a vzhled	Konzistence (textura)	Vůně	Chuť
T0_STD	2	4	1	2
T21_5°Cvac	2	1	1	2
T21_5°C	3	2	2	3

Výsledky jsou uvedeny jako medián, použitá stupnice 1 – nejlepší → 5 – nejhorší; značení vzorků viz Tabulka 2.

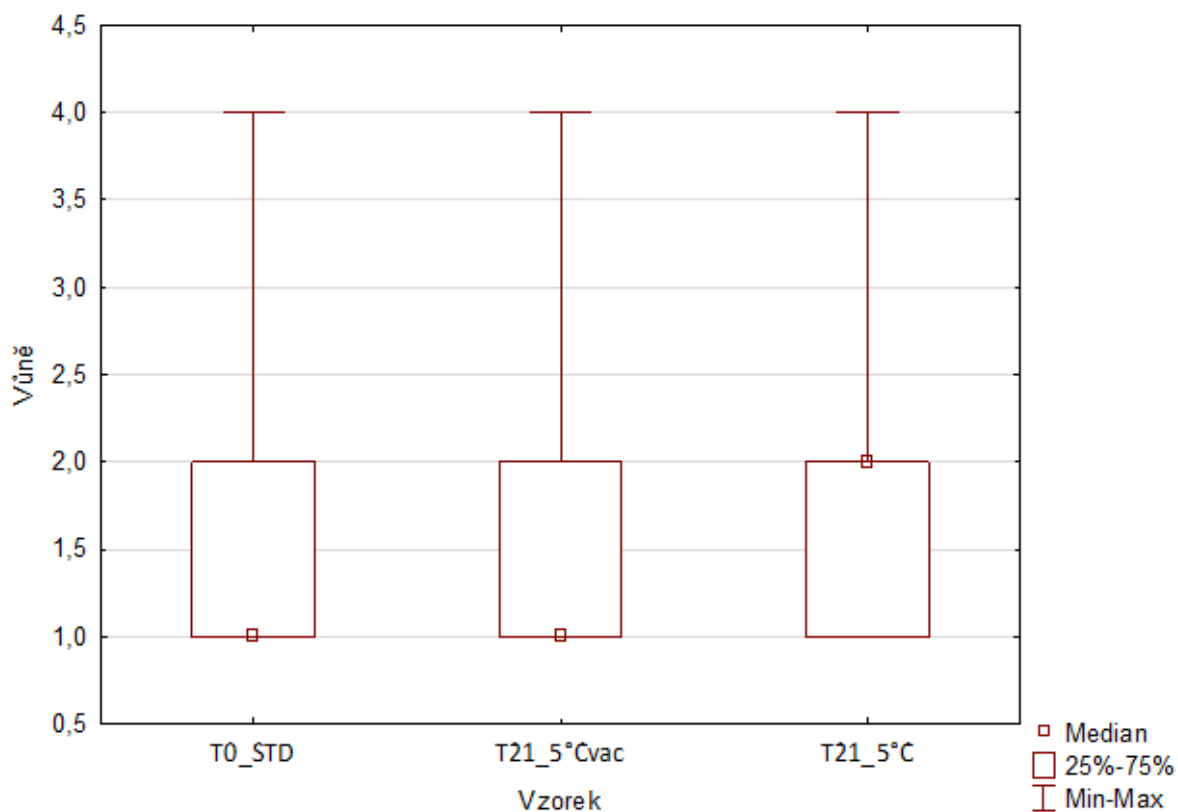
Pro srovnání jednotlivých parametrů byl použit Kruskalův-Wallisův test, jelikož nasbíraná data nepocházela, dle Shapiro-Wilkova testu, z populace s normální distribucí. Vzorky byly hodnoceny na hladině významnosti 0,05.

Dle výsledků se vzorky z hlediska vzhledu a barvy statisticky významně nelišily. Avšak z výsledků hodnocení i ve vizuálním porovnání boxových grafů (Graf 8) je patrné, že byl nejhůře hodnocen sýr T21_5°C, kde se plíseň nevyskytovala rovnoměrně, navíc zde byly náznaky defektu vzhledu ve formě skvrn či mramorování barvy.

Ve vůni byly vzorky hodnoceny velice podobně, ani zde nebyla statistická významnost potvrzena. Vzorky T0_STD a T21_5°Cvac byly hodnoceny na výbornou, vzorek T21_5°C o stupeň níže (viz Graf 9).

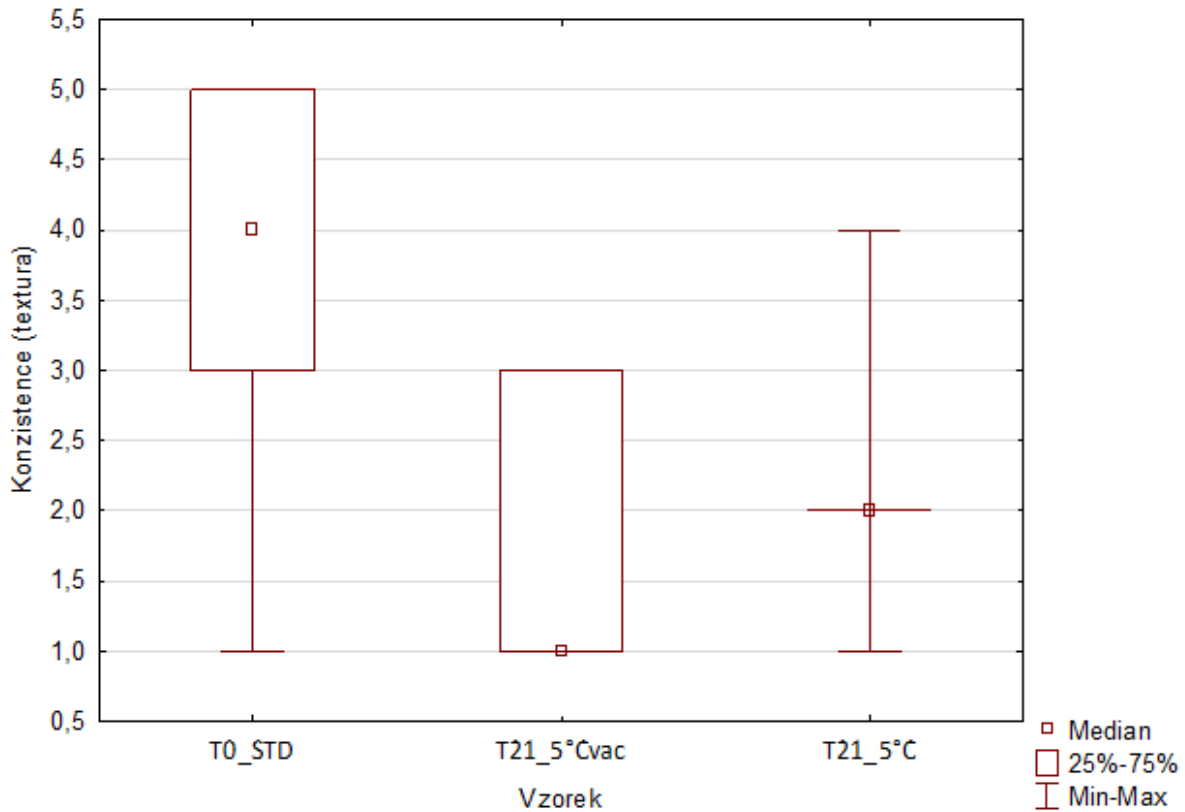


Graf 8: Boxový graf porovnání vzhledu a barvy vzorků;
(1 – nejlepší → 5 – nejhorší); značení vzorků viz Tabulka 2



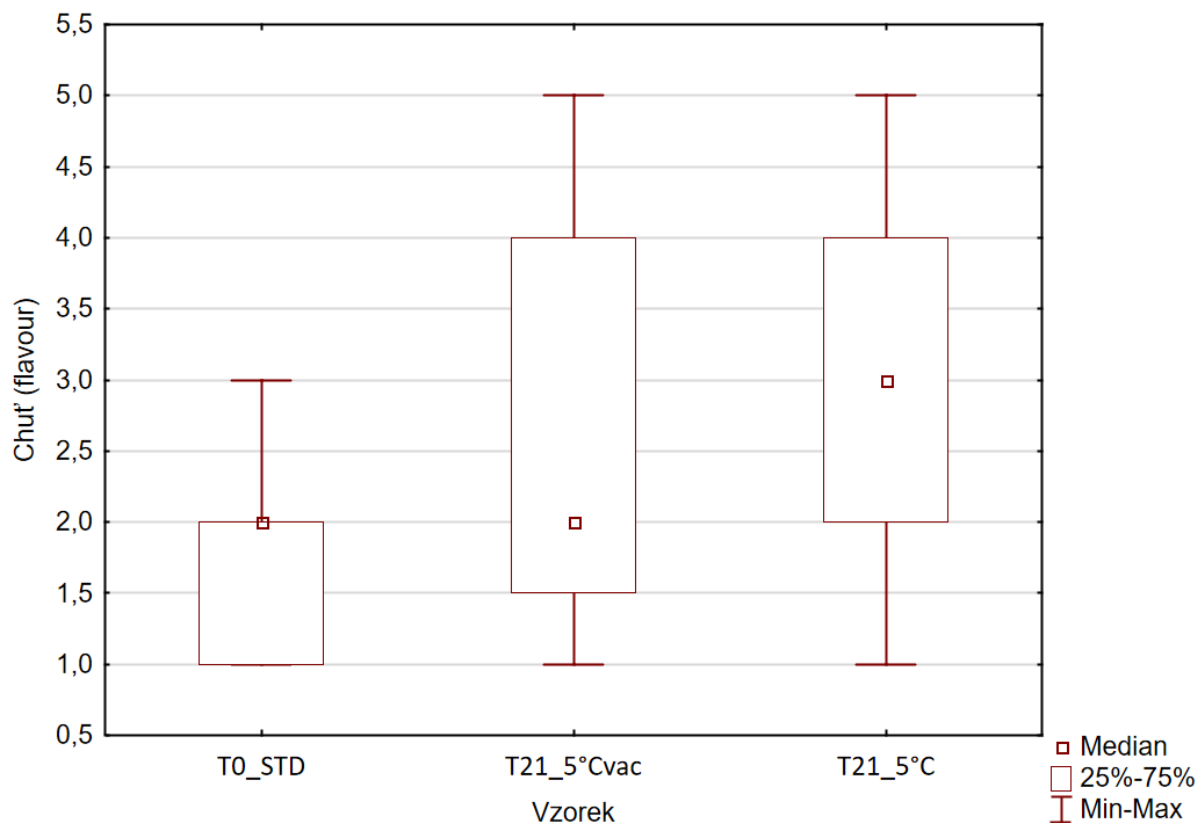
Graf 9: Boxový graf porovnání vůně vzorků;
(1 – nejlepší → 5 – nejhorší); značení vzorků viz Tabulka 2

Největší rozdíly mezi vzorky byly pozorovány u konzistence neboli textury (viz Graf 10). Nejhůře byl hodnocen vzorek standardu (T0_STD), který nadržel kompaktně a roztékal se. Zde vyšel statisticky významný rozdíl mezi vzorkem STD a vzorky uchovávanými v lednici. Mezi oběma vzorky z lednice statisticky významný rozdíl nebyl.



Graf 10: Boxový graf porovnání konzistence (textury) vzorků;
(1 – nejlepší → 5 – nejhorší); značení vzorků viz Tabulka 2

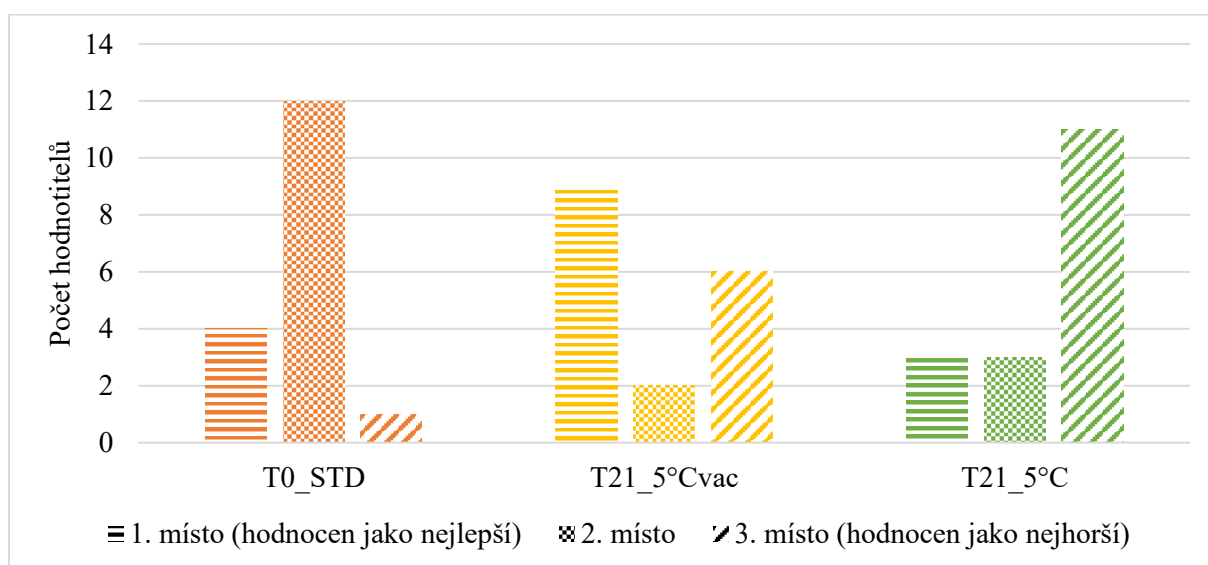
V posledním parametru, hodnocení chuti (flavouru), vyšel statisticky významný rozdíl na hladině významnosti 0,05 mezi vzorky T0_STD a T21_5°C. Vzorek T21_5°C byl hodnocen jako hořký, slaný, po soustu drobný v ústech. Vzorky z lednice se mezi sebou statisticky významně neliší. Boxové grafy parametru chuti jsou ukázány na Grafu 11.



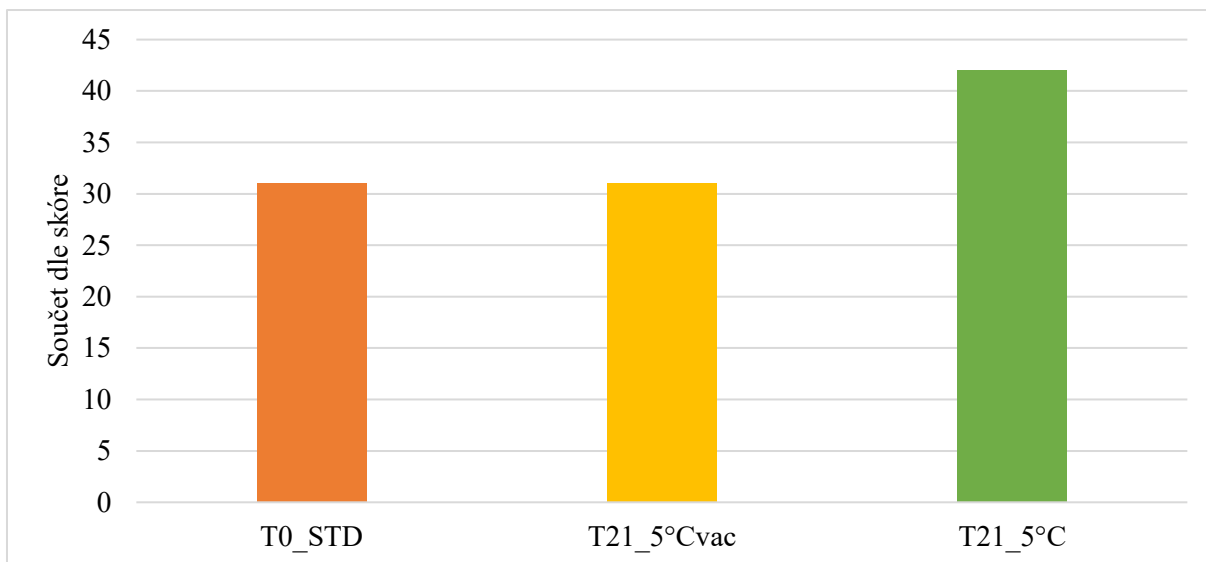
Graf 11: Boxový graf porovnání chuti (flavour) vzorků; (1 – nejlepší → 5 – nejhorší); značení vzorků viz Tabulka 2

3.3.1 Pořadový test celkové přijatelnosti

Výsledky pořadového testu celkové přijatelnosti jsou vyjádřeny jednak v Grafu 12, kde jsou uvedeny jednotlivé počty hodnotitelů, kteří měli poskládat vzorky od nejlepšího (1. místo) po nejhorší (3. místo), též i ve tvaru součtu pořadí jednotlivých vzorků (Graf 13 níže).



Graf 12: Výsledky pořadového testu – jednotlivé hodnocení posuzovatelů (1 – nejlepší → 3 – nejhorší); značení vzorků viz Tabulka 2.



Graf 13: Pořadový test celkové přijatelnosti (součet pořadí)
 1 – nejlepší → 3 – nejhorší; značení vzorků viz Tabulka 2.

V hodnocení pořadového testu vyšel sýr standardní (T0_STD) společně se sýrem uchovávaným ve vakuované formě při 5 °C po dobu 21 dní (T21_5°Cvac) se stejným skóre.

I když mnoho hodnotitelů popisovalo chuť i vůni vzorku standardního (T0_STD) jako nejlepší, většina dala přednost celkovému dojmu, proto na první místo volili vzorek vakuovaný (T21_5°Cvac). Část hodnotitelů, kteří hodnotili vzorek standardní na první místo doplňovali připomínky, že je sice vzhledem rozteklý, ale chutí a vůní je nejjemnější a nejpříjemnější.

Sýr, který byl po dobu 21 dní uchováván rozbalený v lednici (T21_5°C) byl hodnocen, dle očekávání, nejhůře. Tento vzorek byl hodnocen jako tvrdší s barevnými změnami, chuťově hořký či suchý.

4 ZÁVĚR

Mléko a mléčné výrobky, zejména zrající plísňové sýry, jsou biochemicky i mikrobiologicky dynamické. Výzkum v této oblasti je významnou měrou věnován analýze jejich kvality.

Cílem této práce bylo sledování a porovnání změn aromatického profilu těkavých sloučenin, analýza vázaných a volných MK a též sledování vývoje mikroorganismů včetně ověření bezpečnosti při skladování francouzského sýra Brie de Meaux. Závěrem byla provedena senzorická analýza pro posouzení spotřebitelského optima.

Změny byly sledovány během skladovacího experimentu, kdy byl sýr skladován při chladírenské teplotě (5 °C), jak volně ložený, tak zavakuovaný (jako imitace nerozbaleného sýra uchovávaného delší dobu v lednici) a při teplotě pokojové (20 °C) po dobu 21 dní.

Ve všech vzorcích bylo identifikováno téměř šest desítek aromatických látek, z toho 13 alkoholů, 8 karboxylových kyselin, 12 ketonů, 17 esterů, 5 sirných sloučenin, 2 amidy a 1 aldehyd. Tělavé aromatické látky byly stanoveny metodou SPME-GC-MS. Největší počet těkavých aromatických látek byl identifikován v sýru, který byl uchovávan po dobu 21 dní při 20 °C. V tomto vzorku se nejhojněji vyskytovaly sloučeniny ze skupiny alkoholů, kyselin i esterů. Výjimkou zůstává skupina ketonů, u nichž byl největší podíl detekován v sýru standardním.

Stanovení vázaných a volných MK pomocí GC-FID předcházela izolace lipidů ze vzorků pomocí směsi rozpouštědel (diethylether, petrolether). Pro esterifikaci MK byl využit jako katalyzátor BF₃. Celkový obsah vázaných a volných MK ve vzorcích sýrů se příliš neměnil. Z výsledků je patrné, že nejvyšší množství celkových volných MK bylo detekováno podle očekávání v sýru, který byl skladován 21 dní při 20 °C (56,12 mg·g⁻¹). U vzorků skladovaných při 5 °C byl obsah volných MK zhruba stejný, jako ve standardu, z čeho lze usuzovat, že při nízké skladovací teplotě probíhá lipolýza podstatně pomaleji, než při 20 °C. Ve vzorcích tvořila největší podíl kyselina palmitová (C16:0), mezi ostatní majoritně zastoupené kyseliny patří: olejová (C18:1^{Δ9}), myristová (C14:0), stearová (C18:0). Na profil MK má vliv zejména krmivo hospodářských zvířat i způsob zpracování sýra.

Mikrobiální profil byl sledován pomocí RT-PCR za využití interkalačního barviva. Většina mikroorganismů se vyskytovala ve všech analyzovaných vzorcích. Množství mikroorganismu *Penicillium camemberti*, který je pro tento typ sýrů charakteristický, se při dozrávání v chladírenské teplotě a při teplotě pokojové, nelišilo. Největší množství mikroorganismů bylo detekováno ve skupině bakterií mléčného kvašení, což dokazuje perzistenci a životaschopnost těchto mikroorganismů i v pozdních fázích zrání.

Největší počet aromatických látek i volných MK byl identifikován v sýru 20 °C, bohužel celkový rozvoj aroma při pokojové teplotě nese nebezpečí výskytu kontaminantů, které byly v tomto sýru detekovány, proto nemohl být srovnán v senzorickém hodnocení.

Z hlediska senzorického hodnocení byl stejně hodnocen sýr vakuovaný a standardní. V chuti byl lépe hodnocen sýr standardní, špatné hodnocení textury však tomuto sýru ubralo na přijatelnosti. Přijatelné a bezpečné je konzumovat i sýr vakuovaný, pokud se vyskytuje určitou dobu v lednici. Avšak po rozbalení je vhodné sýr co nejdříve spotřebovat, aby nedocházelo k negativním ovlivňováním jeho senzorických vlastností.

5 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1. 397/2016 Sb. Vyhláška o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jable tuku a oleje.
2. Sablé, S. & Cottenceau, G. Current Knowledge of Soft Cheeses Flavor and Related Compounds. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 4825–4836 (1999).
3. Suzuki-Iwashima, A., Matsuura, H., Iwasawa, A. & Shiota, M. Metabolomics analyses of the combined effects of lactic acid bacteria and *Penicillium camemberti* on the generation of volatile compounds in model mold-surface-ripened cheeses. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **129**, 333–347 (2020).
4. Leclercq-Perlat, M.-N., Picque, D., Martin del Campo Barba, S. T. & Monnet, C. Dynamics of *Penicillium camemberti* growth quantified by real-time PCR on Camembert-type cheeses under different conditions of temperature and relative humidity. *Journal of Dairy Science* **96**, 4031–4040 (2013).
5. Spinnler, H.-E. Chapter 36 - Surface Mold–Ripened Cheeses. in *Cheese (Fourth Edition)* (eds. McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Cotter, P. D. & Everett, D. W.) 911–928 (Academic Press, 2017). doi:10.1016/B978-0-12-417012-4.00036-3.
7. PDO Camembert de Normandie Made with unpasteurized cow milk. *La Boutique de Philippe* <https://laboutiquedephilippe.com/en/cheeses/133-pdo-camembert-de-normandie.html>.
8. Brie de Meaux – Nepasterizovaný | U Sýráku. Dostupné z: <https://www.usyraku.cz/cs/product/brie-de-maux/>.
9. LÀ, S. D. Brie de Meaux (AOP). *Le Guide du Fromage*. Dostupné z: <https://www.leguitedufromage.com/brie-de-meaux-io16.html>.
10. White-mould cheese. in *Cheese Problems Solved* (ed. McSweeney, P. L. H.) 268–283 (Woodhead Publishing, 2007). doi:10.1533/9781845693534.268.
11. Brie de Meaux - Picture of Dom Queijo Cheese House, Lisbon - Tripadvisor. https://www.tripadvisor.com/LocationPhotoDirectLink-g189158-d12381381-i354899394-Dom_Queijo_Cheese_House-Lisbon_Lisbon_District_Central_Portugal.html.
12. Romeo, C. Brie de Meaux can only be produced by a handful of farms in France. We went behind the scenes to see how it's made. *Insider* <https://www.insider.com/how-brie-de-meaux-is-made-france-ferme-30-arpents-2020-5>.
13. Abbas, A. & Dobson, A. D. W. Yeasts and Molds | *Penicillium camemberti*. in *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)* (ed. Fuquay, J. W.) 776–779 (Academic Press, 2011). doi:10.1016/B978-0-12-374407-4.00364-2.
14. Hayaloglu, A. A. Cheese: Microbiology of Cheese. in *Reference Module in Food Science* (Elsevier, 2016). doi:10.1016/B978-0-08-100596-5.00675-2.
15. Calzada, J., del Olmo, A., Picon, A., Gaya, P. & Nuñez, M. Effect of high-pressure-processing on the microbiology, proteolysis, texture and flavour of Brie cheese during ripening and refrigerated storage. *International Dairy Journal* **37**, 64–73 (2014).

16. Unno, R., Suzuki, T., Matsutani, M. & Ishikawa, M. Evaluation of the Relationships Between Microbiota and Metabolites in Soft-Type Ripened Cheese Using an Integrated Omics Approach. *Front Microbiol* **12**, 681185 (2021).
17. Ogier, J.-C., Son, O., Gruss, A., Tailliez, P. & Delacroix-Buchet, A. Identification of the Bacterial Microflora in Dairy Products by Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* **68**, 3691–3701 (2002).
18. Ruggirello, M., Cocolin, L. & Dolci, P. Fate of *Lactococcus lactis* starter cultures during late ripening in cheese models. *Food Microbiology* **59**, 112–118 (2016).
19. Lessard, M.-H., Bélanger, G., St-Gelais, D. & Labrie, S. The Composition of Camembert Cheese-Ripening Cultures Modulates both Mycelial Growth and Appearance. *Applied and Environmental Microbiology* (2012) doi:10.1128/AEM.06645-11.
20. Lessard, M.-H., Viel, C., Boyle, B., St-Gelais, D. & Labrie, S. Metatranscriptome analysis of fungal strains *Penicillium camemberti* and *Geotrichum candidum* reveal cheese matrix breakdown and potential development of sensory properties of ripened Camembert-type cheese. *BMC Genomics* **15**, 235 (2014).
21. Xue, Z. *et al.* Microbiota Assessments for the Identification and Confirmation of Slit Defect-Causing Bacteria in Milk and Cheddar Cheese. *mSystems* (2021) doi:10.1128/mSystems.01114-20.
22. Ropars, J. *et al.* Domestication of the Emblematic White Cheese-Making Fungus *Penicillium camemberti* and Its Diversification into Two Varieties. *Current Biology* **30**, 4441-4453.e4 (2020).
23. Decker, M. & Nielsen, P. V. The inhibitory effect of *Penicillium camemberti* and *Geotrichum candidum* on the associated fungi of white mould cheese. *International Journal of Food Microbiology* **104**, 51–60 (2005).
24. Collins, Y. F., McSweeney, P. L. H. & Wilkinson, M. G. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal* **13**, 841–866 (2003).
25. Nielsen, M. S., Frisvad, J. C. & Nielsen, P. V. Protection by fungal starters against growth and secondary metabolite production of fungal spoilers of cheese. *International Journal of Food Microbiology* **42**, 91–99 (1998).
26. Dieuleveux, V., Pyl, D. V. D., Chataud, J. & Gueguen, M. Purification and Characterization of Anti-*Listeria* Compounds Produced by *Geotrichum candidum*. *Applied and Environmental Microbiology* (1998) doi:10.1128/AEM.64.2.800-803.1998.
27. Molimard, P. & Spinnler, H. E. Review: Compounds Involved in the Flavor of Surface Mold-Ripened Cheeses: Origins and Properties. *Journal of Dairy Science* **79**, 169–184 (1996).
28. Delgado, F. J., González-Crespo, J., Cava, R. & Ramírez, R. Formation of the aroma of a raw goat milk cheese during maturation analysed by SPME–GC–MS. *Food Chemistry* **129**, 1156–1163 (2011).
29. McSweeney, P. L. H. Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology* **57**, 127–144 (2004).

30. Shiota, M., Iwasawa, A., Suzuki-Iwashima, A. & Iida, F. Effects of Flavor and Texture on the Sensory Perception of Gouda-Type Cheese Varieties during Ripening Using Multivariate Analysis. *Journal of Food Science* **80**, C2740–C2750 (2015).
31. McSweeney, P. L. H. & Sousa, M. J. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait* **80**, 293–324 (2000).
32. Trávení a metabolismus přírodních látek (základní metabolické procesy) - ppt Dostupné z: <https://slideplayer.cz/slide/14967902/>.
33. Vítová, E., Loupancová, B., Štoudková, H. & Zemanová, J. Application of SPME-GC method for analysis of the aroma of white surface mould cheeses. *Journal of Food and Nutrition Research (Slovak Republic)* (2007).
34. Wang, Z. & Jocelyn Paré, J. R. Chapter 3 Gas chromatography (GC): Principles and applications. in *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry* (eds. Paré, J. R. J. & Bélanger, J. M. R.) vol. 18 61–91 (Elsevier, 1997).
35. Eisenstecken, D., Stanstrup, J., Robatscher, P., Huck, C. W. & Oberhuber, M. Fatty acid profiling of bovine milk and cheese from six European areas by GC-FID and GC-MS. *International Journal of Dairy Technology* **74**, 215–224 (2021).
36. Le Dréan, G. *et al.* Quantification of *Penicillium camemberti* and *P. roqueforti* mycelium by real-time PCR to assess their growth dynamics during ripening cheese. *International Journal of Food Microbiology* **138**, 100–107 (2010).
37. Dolci, P., Alessandria, V., Rantsiou, K., Bertolino, M. & Cocolin, L. Microbial diversity, dynamics and activity throughout manufacturing and ripening of Castelmagno PDO cheese. *International Journal of Food Microbiology* **143**, 71–75 (2010).
38. O Sullivan, D., Cotter, P., Giblin, L., Sheehan, J. & McSweeney, P. Nucleic acid-based approaches to investigate microbial-related cheese quality defects. *Frontiers in Microbiology* **4**, (2013).
39. Monnet, C., Correia, K., Sarthou, A.-S. & Irlinger, F. Quantitative Detection of *Corynebacterium casei* in Cheese by Real-Time PCR. *Appl Environ Microbiol* **72**, 6972–6979 (2006).
40. Bonaïti, C., Parayre, S. & Irlinger, F. Novel extraction strategy of ribosomal RNA and genomic DNA from cheese for PCR-based investigations. *International Journal of Food Microbiology* **107**, 171–179 (2006).
41. Druml, B. & Cichna-Markl, M. High resolution melting (HRM) analysis of DNA – Its role and potential in food analysis. *Food Chemistry* **158**, 245–254 (2014).
42. Drake, M. A. & Delahunty, C. M. Chapter 20 - Sensory Character of Cheese and Its Evaluation. in *Cheese (Fourth Edition)* (eds. McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Cotter, P. D. & Everett, D. W.) 517–545 (Academic Press, 2017). doi:10.1016/B978-0-12-417012-4.00020-X.
43. Galli, B. D., Martin, J. G. P., da Silva, P. P. M., Porto, E. & Spoto, M. H. F. Sensory quality of Camembert-type cheese: Relationship between starter cultures and ripening molds. *International Journal of Food Microbiology* **234**, 71–75 (2016).

44. Judacewski, P. *et al.* Quality assessment of white mold-ripened cheeses manufactured with different lactic cultures. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **96**, 3831–3837 (2016).
45. Nádoba na zrání a skladování sýrů. *Serowar*. Dostupné z: https://serowar.cz/cs_CZ/p/Nadoba-na-zrani-a-skladovani-syru/582.
46. KOUBEK, Miroslav. Optimalizace a validace GC-MS metody pro stanovení těkavých aromatických látek v sýrech [online]. Brno, 2016 [cit. 2022-04-29]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/11012/58658>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická. Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Eva Vítová.
47. KUČERKA, Štefan. Výroba a charakterizace sýrů s přidavkem rostlinného extraktu [online]. Brno, 2021 [cit. 2022-04-29]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/11012/201536>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická. Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Eva Vítová.
48. Karahadian, C., Josephson, D. B. & Lindsay, R. C. Contribution of *Penicillium* sp. to the Flavors of Brie and Camembert Cheese¹. *Journal of Dairy Science* **68**, 1865–1877 (1985).
49. Karahadian, C., Josephson, D. B. & Lindsay, R. C. Volatile compounds from *Penicillium* sp. contributing musty-earthy notes to Brie and Camembert cheese flavors. *J. Agric. Food Chem.* **33**, 339–343 (1985).
50. Unno, R., Suzuki, T., Matsutani, M. & Ishikawa, M. Evaluation of the Relationships Between Microbiota and Metabolites in Soft-Type Ripened Cheese Using an Integrated Omics Approach. *Front Microbiol* **12**, 681185 (2021).
51. Unno, R. *et al.* Lactic acid bacterial diversity in Brie cheese focusing on salt concentration and pH of isolation medium and characterisation of halophilic and alkaliphilic lactic acid bacterial isolates. *International Dairy Journal* **109**, 104757 (2020).
52. Real-time PCR | LabGuide.cz – Průvodce laboratoří. Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/real-time-pcr/>.

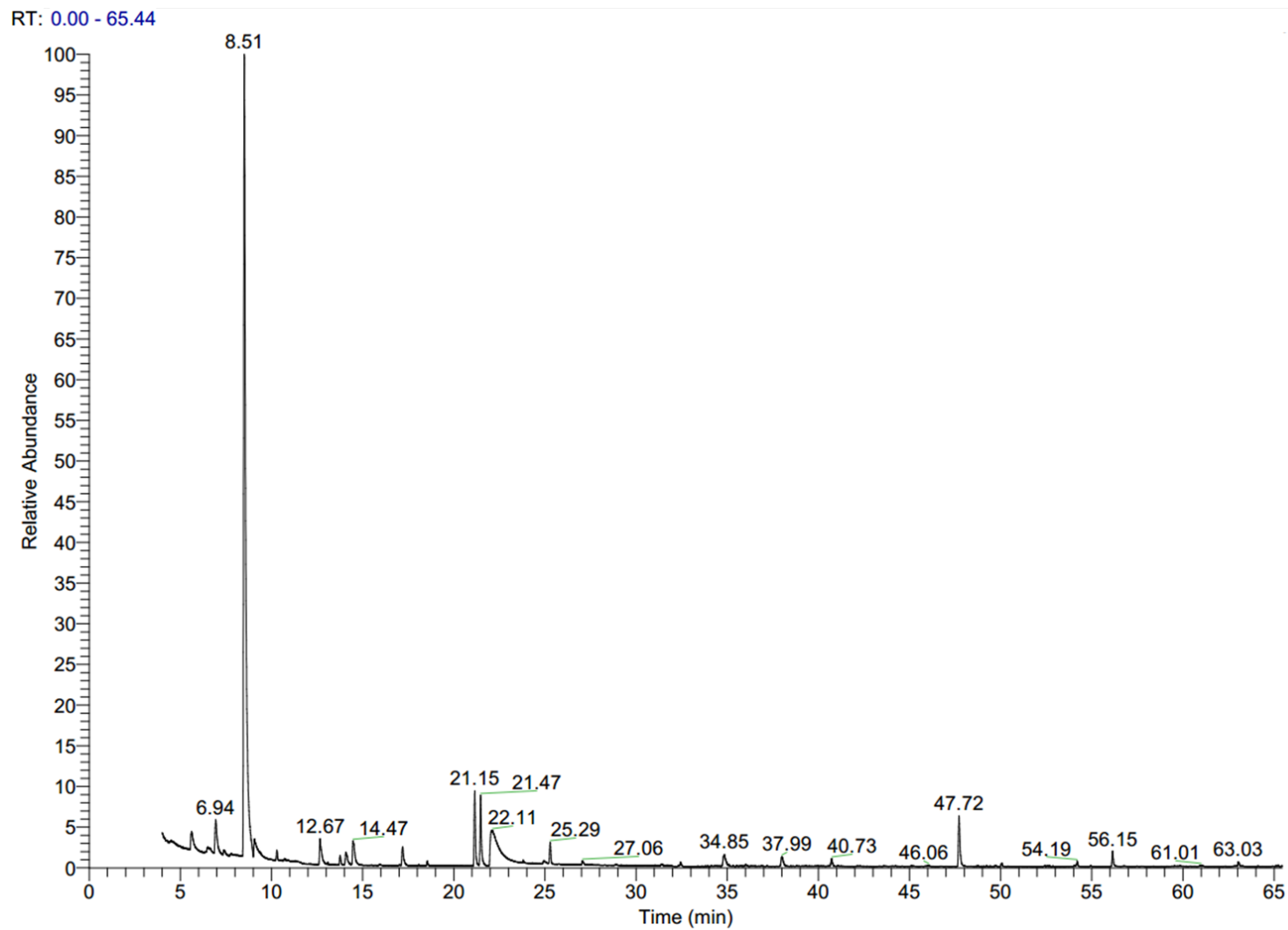
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AOC	Chráněná značka původu (Appellation d'origine contrôlée)
bp	Komplementární pár bází (base pair)
Ct	Prahová hodnota (cycle threshold)
FW	Přední primer (forward primer)
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (Gas chromatography – mass spectrometry)
GC-FID	Plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem (Gas chromatography – Flame ionization detector)
HRM	Analýza tání s vysokým rozlišením (High Resoluting Melt)
MEMK	Methylester mastné kyseliny
MK	Mastné kyseliny
RV	Zadní primer (Reverse primer)
SPME	Mikroextrakce pevnou fází (Solid Phase Microextraction)

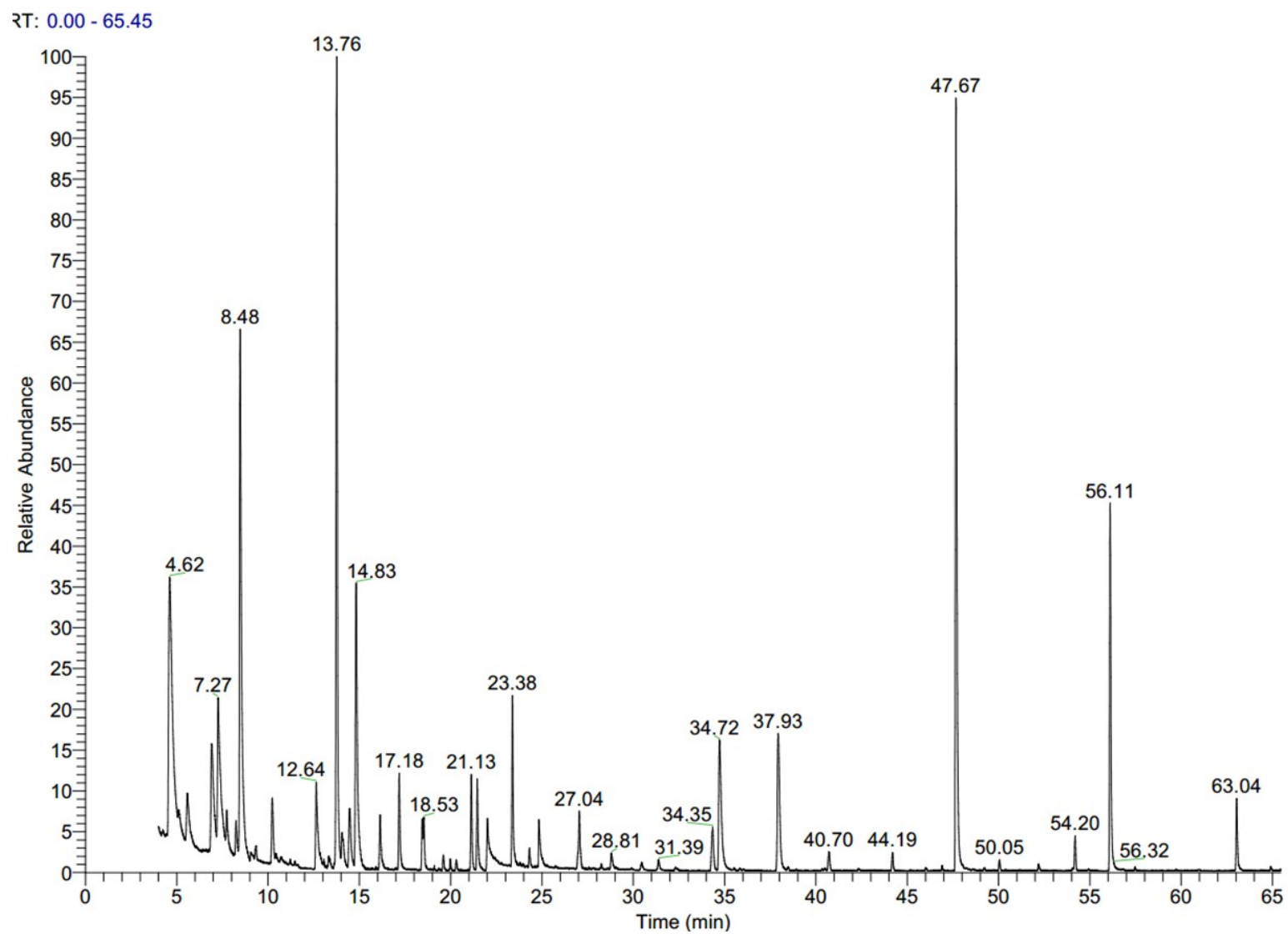
PŘÍLOHY

Příloha 1: Reprezentativní chromatogram – těkavé (aromatické) sloučeniny; vzorek uchovávaný po dobu 21 dní při 5 °C (volně ložený).....	62
Příloha 2: Reprezentativní chromatogram – těkavé (aromatické) sloučeniny; vzorek uchovávaný po dobu 21 dní při 20 °C.....	63
Příloha 3: Reprezentativní chromatogram – volné mastné kyseliny; vzorek standardu	64
Příloha 4: Dotazník pro sensorické hodnocení sýru Brie de Meaux	65

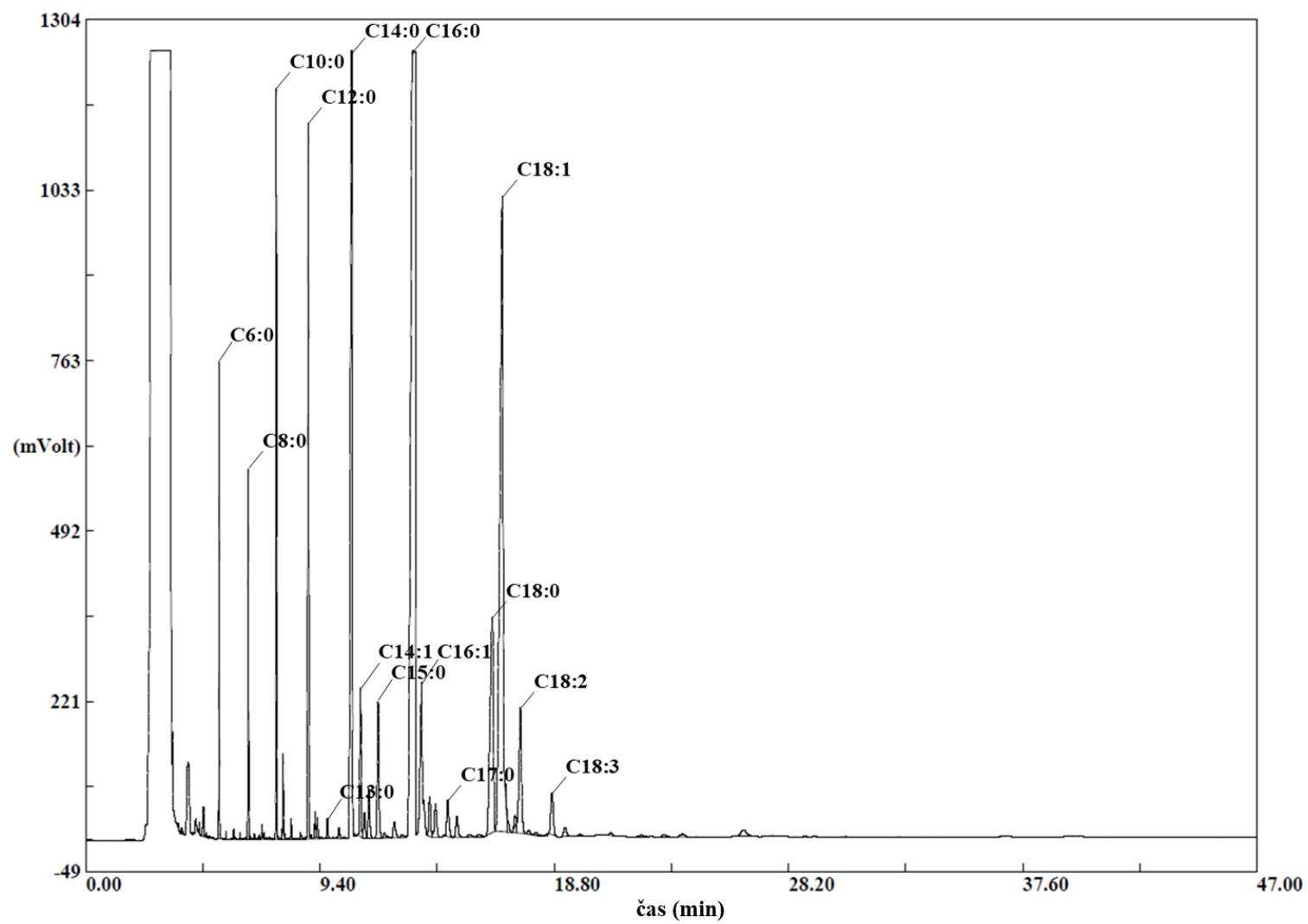
Příloha 1: Reprezentativní chromatogram – těkavé (aromatické) sloučeniny; vzorek uchovávaný po dobu 21 dní při 5 °C (volně ložený); *identifikace piků viz Tabulka 7*



Příloha 2: Reprezentativní chromatogram – těkavé (aromatické) sloučeniny; vzorek uchovávaný po dobu 21 dní při 20 °C; *identifikace piků viz Tabulka 7*



Příloha 3: Reprezentativní chromatogram – volné mastné kyseliny; vzorek standardu



Dotazník pro senzoričké hodnocení sýru Brie de Meaux

DP Monika Májková

Vážení hodnotitelé,

zhodnoťte, prosím, předložené vzorky sýrů. Předem děkuji za spolupráci a svědomité vyplnění formuláře. Pro případné připomínky k hodnocení či vzorkům je prostor na druhé straně formuláře. Děkuji!

Hodnotitel: _____

kuřák / nekuřák

Datum a čas: _____

žena / muž

Jaké je Vaše stanovisko před ochutnáváním?

- Měkké sýry s bílou plísní na povrchu mám velmi rád/a, konzumuji je pravidelně.
- Měkké sýry s bílou plísní na povrchu nemám příliš rád/a, ale nevadí mi.
- Měkké sýry s bílou plísní na povrchu nemám vůbec rád/a, nekonzumuji je.

Senzoričké hodnocení pomocí stupnice

Zhodnoťte předložené vzorky v následujících znacích, použijte uvedené stupnice níže, svá hodnocení zapište do uvedené tabulky pod čísly.

Kód vzorku	Vzhled a barva	Konzistence (textura)	Vůně	Chuť (flavour)

Vzhled a barva

1 Výborný	–	jemná kůra s jemným porostem bílé plísně; na řezu měkké, krémové, kompaktní sýrové těsto slámově žluté barvy, občasné dutinky nejsou na závadu
2 Velmi dobrý	–	nepatrné odchylky od deklarovaného vzhledu a barvy (viz bod 1)
3 Dobrý	–	mírné odchylky od deklarovaného vzhledu a barvy; tvar mírně deformovaný, barva těsta méně výrazná, drobnější závady v hladkosti povrchu
4 Méně dobrý	–	velké odchylky od deklarovaného vzhledu a barvy, tvar deformovaný, náznaky mramorování barvy, mírné odchylky v hladkosti povrchu
5 Nevyhovující	–	výrazné odchylky od deklarovaného vzhledu a barvy (viz bod 1); deformovaný vzhled, roztékání povrchu; skvrny netypické barvy (červené, hnědé aj.), výrazný porost plísně netypické barvy (černá, zelená aj.). Netypická barva na řezu, těsto popraskané, zduřelé aj. vady

Konzistence (textura)

1	Výborná	–	konzistence měkká, hladká, krémová a jemná
2	Velmi dobrá	–	nepatrné odchylky od deklarované konzistence (viz bod 1)
3	Dobrá	–	mírné odchylky od deklarované konzistence, příliš měkká
4	Méně dobrá	–	velké odchylky od deklarované konzistence
5	Nevyhovující	–	výrazné odchylky od deklarované konzistence (viz bod 1); příliš měkká až roztékavá, řídká, lepivá, nehomogenní aj. vady

Vůně

1	Výborná	–	výrazná aromatická sýrová
2	Velmi dobrá	–	nepatrné odchylky od deklarované vůně (viz bod 1)
3	Dobrá	–	mírné odchylky od deklarované vůně, vůně příliš výrazná
4	Méně dobrá	–	velké odchylky od deklarované vůně, vůně příliš ostrá až nepříjemná
5	Nevyhovující	–	výrazné odchylky od deklarované vůně (viz bod 1); vůně nečistá, netypická, nepříjemná příp. jiné vady

Chuť (flavour = komplexní pocit v ústech při konzumaci)

1	Výborná	–	výrazná, mléčně smetanová, máslová, nasládlá s mírnou příchutí hub, lískových oříšků nebo mandlí; vůně čistá, harmonická, cizí příchutě jsou vyloučeny
2	Velmi dobrá	–	nepatrné odchylky od deklarované chuti (viz bod 1)
3	Dobrá	–	mírné odchylky od deklarované chuti, chuť příliš výrazná či naopak nevýrazná, bez cizí příchutě
4	Méně dobrá	–	velké odchylky od deklarované chuti, příliš ostrá až nepříjemná, výskyt cizích příchutí ve velmi malé intenzitě
5	Nevyhovující	–	výrazné odchylky od deklarované chuti (viz bod 1); netypická, nahořklá, nečistá, žluklá, cizí příchutě příp. jiné vady

Hodnocení celkové přijatelnosti vzorku – pořadový test

Seřaďte předložené vzorky podle přijatelnosti (berte v úvahu všechny výše zmíněné vlastnosti)

	Kód vzorku	Celkově byste vzorek hodnotili jako ... (a proč ?)
1 (nejlepší)		
2		
3 (nejhorší)		

Děkuji za vyplnění formuláře. Případné připomínky k hodnocení nebo vzorkům napište zde: