



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

**CHARAKTERIZACE A PRŮBĚH ZRÁNÍ SÝRŮ
EIDAMSKÉHO TYPU**

CHARACTERISATION AND MATURATION PROCESS OF EDAM TYPE CHEESE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Andrea Dostálková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1290/2018
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Andrea Dostálková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.**
Akademický rok: 2018/19

Název diplomové práce:

Charakterizace a průběh zrání sýrů eidamského typu

Zadání diplomové práce:

1. Zpracujte literární přehled dané problematiky:
 - stručná charakteristika sýrů eidamského typu
 - aromaticky aktivní látky, volné a vázané mastné kyseliny v sýrech eidamského typu – jejich vznik v průběhu zrání
 - možnosti stanovení aromaticky aktivních látek a mastných kyselin v sýrech – princip, provedení, přehled aplikací zaměřených na sýry eidamského typu
2. Pomocí metody HS–SPME–GC–MS identifikujte a kvantifikujte aromaticky aktivní látky ve vzorcích sýrů
3. Pomocí metody GC–FID identifikujte a kvantifikujte mastné kyseliny ve vzorcích sýrů
4. Diskutujte změny uvedených parametrů v průběhu zrání, posuďte vliv použitých mikrobiálních kultur

Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019

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

Bc. Andrea Dostálková
student(ka)

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

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá stanovením aromaticky aktivních látek a volných/vázaných mastných kyselin v modelových sýrech eidamského typu, tj. přírodní polotvrdé sýry s nízkodohřívanou sýřeninou. Pro výrobu sýrů byly použity různé kombinace mikrobiálních kultur; u všech jako základ mezofilní kultura a čtyři vybrané kmeny termofilních kultur *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus plantarum*. Cílem bylo posoudit vliv různých mikrobiálních kultur na obsah měřených parametrů, zároveň byly sledovány jejich změny v průběhu zrání sýrů.

Pro identifikaci a semikvantifikaci aromaticky aktivních látek byla vybrána metoda HS-SPME-GC-MS. Extrakce tuků ze sýrů byla provedena podle ČSN EN ISO 1735:2005 a mastné kyseliny byly identifikovány a kvantifikovány metodou GC-FID po převedení na methylestery kyselou esterifikací methanolickým roztokem bortrifluoridu jako katalyzátoru.

Celkem bylo ve vzorcích sýrů identifikováno 50 těkavých sloučenin, z toho 11 alkoholů, 5 aldehydů, 7 ketonů, 6 karboxylových kyselin, 10 esterů, 3 laktony, 2 sirné sloučeniny a 6 zařazených do skupiny „ostatní“. Všechny lze považovat za prokazatelně aromaticky aktivní. V jednotlivých vzorcích bylo identifikováno 30–40 sloučenin, nejvíce zastoupeny byly alkoholy, karboxylové kyseliny a ketony. Počet i obsah identifikovaných sloučenin během zrání mírně klesal.

Ve všech vzorcích bylo identifikováno 17 mastných kyselin, a to jak ve formě volné, tak esterově vázané, během zrání také došlo ke snižování jejich obsahu. Nejvíce zastoupeny byly kyseliny myristová, palmitová, stearová a olejová.

Mezi vzorky byly nalezeny významné rozdíly ($p < 0,05$); z výsledků PCA vyplývá, že přídavek termofilů má vliv na vývoj těkavých látek i volných/vázaných mastných kyselin v sýrech, zejména v počáteční fázi zrání, ke konci zrání se rozdíly mezi vzorky vyrovnávají.

KLÍČOVÁ SLOVA

eidamské sýry, aromaticky aktivní látky, MK, SPME, GC, MS

ABSTRACT

This diploma thesis deals with the assessment of aroma compounds and free/bound fatty acids in model samples of Edam type cheeses. Various combinations of microbial cultures, basic mesophilic and four selected strains of thermophilic *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*, were used for cheese production

The main aim was to judge the influence of microbial cultures on content of measured parameters, the changes during ripening were also followed.

The HS-SPME-GC-MS method was used for identification and semiquantification of aroma compounds. The lipids from cheese were extracted based on ISO 1735:2004, fatty acids were identified and quantified using GC-FID method after conversion to methyl esters by acid esterification with boron trifluoride in methanol.

In total 50 volatile compounds were identified in samples, 11 alcohols, 5 aldehydes, 7 ketones, 6 acids, 10 esters, 3 lactones, 2 sulphur compounds and 6 „others“; all of them are considered as aroma active. About 30–40 compounds were identified in single samples, alcohols, acids and ketones were the predominant. The number as well as the content of compounds identified decreased slightly during ripening.

In total 17 free/bound fatty acids were identified in samples, their content also decreased during ripening. Myristic, palmitic, stearic and oleic acids were the predominant.

The significant differences ($p < 0.05$) were found between samples; from results of PCA analysis follows that the development of volatile compounds as well as of free/bound fatty acids are influenced by addition of thermophiles, especially in initial phases of ripening, while at the end of ripening these differences are lost.

KEY WORDS

Edam type cheese, aroma compounds, FA, SPME, GC, MS

DOSTÁLKOVÁ, A. *Charakterizace a průběh zrání sýrů eidamského typu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2019. 115 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych poděkovala doc. Ing. Evě Vítové Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, ochotu, laskavost a všestrannou pomoc při vypracování této diplomové práce, Ing. Michalovi Sýkorovi a kolegům v laboratoři za spolupráci a Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně za poskytnuté vzorky. Dále bych chtěla poděkovat rodině a přátelům za velkou podporu nejen během psaní této práce, ale i po celou dobu studia. V neposlední řadě patří velké poděkování mým rodičům za morální a materiální pomoc, čímž mi umožnili studovat na vysoké škole.

OBSAH

1 ÚVOD	9
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
2.1 Sýry eidamského typu.....	10
2.2 Složení eidamských sýrů	11
2.2.1 Mléčný tuk	12
2.2.1.1 <i>Lipidy v sýrech eidamského typu</i>	14
2.3 Technologie výroby eidamských sýrů	14
2.4 Metabolické procesy při procesu zrání sýra	18
2.4.1 Katabolismus residuální laktosy, laktátu a citrátu	18
2.4.2 Lipolýza a katabolismus volných mastných kyselin	22
2.4.3 Proteolýza a katabolismus aminokyselin.....	24
2.5 Aromaticky aktivní látky v sýrech.....	29
2.5.1 Alkoholy	29
2.5.2 Aldehydy	29
2.5.3 Ketony	30
2.5.4 Karboxylové kyseliny	30
2.5.5 Estery	30
2.5.6 Laktony	31
2.5.7 Sírné sloučeniny	31
2.5.8 Aromaticky aktivní látky v eidamských sýrech	31
2.6 Stanovení mastných kyselin a aromaticky aktivních látek	33
2.6.1 Izolace lipidů z matrice sýrů.....	33
2.6.2 Derivatizace mastných kyselin	34
2.6.3 Izolace aromaticky aktivních látek z matrice sýrů	35
2.6.4 Plynová chromatografie.....	37
2.6.4.1 <i>Plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem</i>	39
2.6.4.2 <i>Plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem</i>	39
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	41
3.1 Laboratorní vybavení.....	41
3.1.1 Přístroje.....	41
3.1.2 Plyny	41
3.1.3 Pracovní pomůcky	41

3.1.4	Chemikálie.....	41
3.2	Čisté mlékařské kultury	42
3.3	Analyzované vzorky	42
3.4	Použité metody pro stanovení mastných kyselin.....	44
3.4.1	Extrakce lipidů ze vzorku sýra	44
3.4.2	Příprava methylesterů mastných kyselin	45
3.4.2.1	<i>Metoda kyselé esterifikace pro triacylglyceroly</i>	45
3.4.2.2	<i>Metoda kyselé esterifikace pro volné mastné kyseliny</i>	45
3.4.3	Podmínky stanovení methylesterů mastných kyselin.....	46
3.4.4	Identifikace a kvantifikace mastných kyselin.....	46
3.5	Použité metody pro stanovení aromaticky aktivních látek	49
3.5.1	Příprava vzorku sýra	49
3.5.2	Podmínky SPME extrakce.....	49
3.5.3	Podmínky GC-MS analýzy.....	49
3.5.4	Identifikace a kvantifikace aromaticky aktivních látek	50
3.6	Statistické zpracování výsledků.....	50
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	51
4.1	Identifikace a kvantifikace mastných kyselin v modelových vzorcích sýrů	51
4.2	Srovnání obsahu volných a vázaných mastných kyselin ve vzorcích – použité startovací kultury	55
4.2.1	Srovnání celkového obsahu volných a vázaných mastných kyselin	55
4.2.2	Srovnání vybraných skupin mastných kyselin	58
4.3	Srovnání obsahu volných a vázaných mastných kyselin ve vzorcích – průběh zrání	59
4.3.1	Srovnání celkového obsahu volných a vázaných mastných kyselin	59
4.3.2	Srovnání obsahu volných a vázaných mastných kyselin s krátkým řetězcem .	62
4.3.3	Srovnání obsahu ostatních volných a vázaných mastných kyselin	63
4.4	Identifikace těkavých látek v modelových vzorcích sýrů.....	65
4.4.1	Srovnání identifikovaných látek ve vzorcích – použité startovací kultury	70
4.4.2	Srovnání identifikovaných látek ve vzorcích – průběh zrání	72
4.5	Semikvantifikace těkavých látek v modelových vzorcích sýrů.....	73
4.5.1	Srovnání obsahu identifikovaných látek ve vzorcích – použité startovací kultury.....	73
4.5.2	Srovnání obsahu identifikovaných látek ve vzorcích – průběh zrání	74

4.5.3	Diskuze jednotlivých sloučenin	75
4.5.3.1	<i>Alkoholy</i>	75
4.5.3.2	<i>Aldehydy</i>	75
4.5.3.3	<i>Ketony</i>	76
4.5.3.4	<i>Karboxylové kyseliny</i>	77
4.5.3.5	<i>Estery</i>	78
4.5.3.6	<i>Laktony</i>	79
4.5.3.7	<i>Sírné sloučeniny</i>	79
4.5.3.8	<i>Ostatní sloučeniny</i>	80
4.6	Statistické vyhodnocení výsledků měření pomocí metody PCA.....	81
4.6.1	Vyhodnocení výsledků měření volných/vázaných mastných kyselin	81
4.6.2	Vyhodnocení výsledků měření těkavých látek	83
5	ZÁVĚR	85
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	87
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	97
8	PŘÍLOHY	98

1 ÚVOD

Sýry jsou neodmyslitelnou součástí lidské stravy již tisíce let. Primárním cílem jejich výroby je zachování jedinečných výživových vlastností mléka, které bez tepelného ošetření a skladování při nízkých teplotách má velmi omezenou trvanlivost. Je zajímavé, že pro zakoncentrování hlavních složek mléka za účelem vytvořit stabilní produkt - sýr, jsou využívány současně 3 klasické metody konzervace potravin, tj. fermentace, dehydratace a solení. Vývoj tohoto procesu a modifikace některých jeho základních kroků vedl k existenci rozmanitých druhů těchto fermentovaných mléčných výrobků. Na českém trhu patří k nejoblíbenějším přírodní polotvrdé sýry s nízkodohřivanou sýřeninou eidamského typu, o kterých pojednává tato diplomová práce.

Z výživového hlediska jsou sýry výborným zdrojem živočišných lipidů s širokým spektrem mastných kyselin, z nichž majoritní podíl tvoří kyseliny palmitová, stearová, olejová a myristová. Tuková složka nejenže ovlivňuje texturu a reologii sýrů, ale podílí se také na vývoji jejich dalších sensorických vlastností, např. slouží jako rozpouštědlo a prekurzor syntézy aromaticky aktivních látek. Tato rozmanitá skupina především hydrofobních těkavých sloučenin, podílejících se na flavouru sýrů, vzniká během procesu zrání při fermentaci laktosy, metabolismu citrátu a laktátu, proteolýze, lipolýze a následném katabolismu aminokyselin a mastných kyselin.

Hlavním cílem práce je posoudit vliv různých startovacích mikrobiálních kultur na obsah těkavých látek, volných a vázaných mastných kyselin v modelových vzorcích sýrů eidamského typu a jejich změny v průběhu zrání.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Tato práce je zaměřena na sledování průběhu zrání sýrů eidamského typu, jež patří mezi sýry s významným postavením na tuzemském i světovém trhu. V následujících kapitolách je popsáno složení, technologie výroby a proces zrání eidamských sýrů, hlavní pozornost je věnována mléčným lipidům, mastným kyselinám a tzv. aromaticky aktivním látkám, které jsou důležité pro vznik konečných sensorických vlastností sýrů a byly vybrány a sledovány jako hlavní charakterizující parametry zracího procesu.

2.1 Sýry eidamského typu

Eidamské (holandské) sýry jsou přírodní polotvrdé sýry vyráběné převážně z pasterovaného, částečně odstředěného kravského mléka. Pro jejich výrobu se používají kyselé bakterie rodů *Lactococcus* spp. a *Leuconostoc* spp., pro srážení se využívají klasická syřidla z žaludků telat nebo mikrobiálního původu. Dohřívání a dosoušení sýřeniny se z důvodu přítomnosti mezofilních mikroorganismů provádí při teplotách jen do 40 °C, proto se z hlediska technologie výroby řadí mezi sýry s nízkodohřívanou sýřeninou. K přehřívání sýřeniny na požadovanou teplotu dochází v průběhu praní sýrového zrna, kdy se pro snížení obsahu laktózy za účelem regulace rozsahu acidifikace přidává teplá voda. K hlavním druhům eidamských sýrů, jejichž historický původ spadá na území Nizozemí, patří Gouda a Edam [1–5]. Podle nich se v různých zemích vyrábí jejich „napodobeniny“; u nás je to dlouhodobě nejoblíbenější a nejprodávanější sýr.

Gouda, která dostala název podle stejnojmenného městečka, má původ v holandských provinciích Zuid-Holland a Utrecht. Tradičně se vyrábí v plochem válcovitém nebo obdélníkovém tvaru o hmotnosti obvykle 10–16 kg. V závislosti na ročním období, zralosti a příp. použitím barvivu může mít těsto sýra světle žlutou až žlutooranžovou barvu. Sýr Gouda se vyznačuje polotvrdou konzistencí s hladkou strukturou, která při řezu nelepí a obsahuje jen malé množství menších ok. Při dlouhé době zrání se konzistence stává tvrdší, hlavně pak v oblasti kůry. Chuť tohoto sýra se značně liší podle stadia zralosti, druhu použité startovací kultury, popř. přídavku dalších kultur. Mladý sýr má velmi jemnou chuť a aroma s „čerstvými, kyselými a máslovými“ tóny. Dozráváním se chuť mění na mnohem výraznější a plnější, zatímco „máslové“ tóny jsou méně patrné [6].

Název sýru Edam je odvozen od města Edam, které se nachází v severní části holandské provincie Noord-Holland, odkud tyto sýry pocházejí. Typický a jedinečný tvar tohoto sýru je kulovitý s mírně zploštělou spodní a horní stranou o váze 1–4 kg, ale vyrábí se i ve formě bloků o hmotnosti 16–20 kg nebo bočnicků (2–5 kg). Stejně jako u Goudy je konzistence polotuhá s hladkou strukturou, nelepivým řezem a jen ojediněle s malými oky v těstě. Barva těsta Edamu je obvykle žlutá až oranžová, ale více sytá než u bledší Goudy. Chuť, která také závisí na stupni zralosti a druhu použitých kultur, je u mladších sýrů jemná, lehce kyselá a slaná, dozráváním se stává výraznější s pikantnějšími tóny [6].

Evropská unie schválila nová chráněná zeměpisná označení pro tyto sýry vyráběné v Nizozemsku; ponesou názvy „Edam Holland“ a „Gouda Holland“ [6].

2.2 Složení eidamských sýrů

Kravské mléko je základní surovinou pro výrobu eidamských sýrů. Během ní dochází k zakoncentrování některých složek sušiny mléka, která tvoří cca 12,7 % tohoto polydisperzního systému [7].

I když laktosa, hlavní mléčný sacharid, představuje 4,8 % obsahu kravského mléka, je její převážná většina (96–98 %) odstraněna v syrovátce během procesu výroby sýru. K dalšímu snížení jejího podílu se u holandských sýrů navíc provádí i tzv. praní sýřeniny. Zbytkové množství je fermentováno kyselými kulturami na kyselinu mléčnou, proto se laktosa v sýrech prakticky nevyskytuje [3, 7].

Proteiny mléka (celkem cca 3,4 %) lze rozdělit do 2 kategorií na základě jejich rozpustnosti při teplotě 20 °C a pH 4,6. Syrovátkové bílkoviny (0,6 %), které za těchto podmínek zůstávají rozpustné, jsou nefosforylované globulární proteiny nesenzitivní na vápenaté ionty, které denaturují až při zahřevu a jejichž struktura je stabilizována intramolekulárními disulfidickými vazbami. Přibližně polovinu frakce sérových bílkovin tvoří β -laktoglobulin, pětinu α -laktalbumin, v menší míře jsou pak zastoupeny různé imunoglobuliny, sérový albumin, laktoferin a transferin. Syrovátkové proteiny tvoří jen minimální podíl sušiny eidamských sýrů, protože působením syřidla nedochází k jejich srážení, a jsou proto od sýřeniny oddělovány v syrovátce společně s laktosou a některými dalšími ve vodě rozpustnými látkami [3, 7, 8].

Druhou, z hlediska výroby sýrů důležitější, skupinu mléčných proteinů, které při daných podmínkách precipitují, zastupují kaseiny. Tuto dusíkatou frakci mléka (2,6 %) tvoří 4 bílkoviny: α_{s1} -, α_{s2} -, β - a κ -kasein. Kasein existuje v mléce ve formě micel tvořených řadou submicel společně spojených s koloidním fosforečnanem vápenatým. Na povrchu micely se nacházejí κ -kaseiny s vyčnívajícími řetězci hydrofilní části molekul proteinu pro stabilizaci systému. Jádro micely naopak tvoří hydrofobní, Ca^{2+} -senzitivní α_{s1} -, α_{s2} - a β -kaseiny. Působení syřidla na κ -kasein vede k destabilizaci kaseinové micely a ztrátě vnějšího záporného náboje, který brání agregaci, v důsledku čehož v přítomnosti vápenatých iontů dochází ke koagulaci a vzniku gelu. Kaseiny v sýrech představují 97–98 % celkových proteinů, přičemž v Edamu se obsah bílkovin pohybuje kolem 26,0 g/100 g sýra, u Goudy pak 24,0 g/100 g [3, 7, 9].

Problematika lipidů v mléce a sýrech je, vzhledem k zaměření této práce, probrána podrobněji v následující kapitole.

Sýry jsou také považovány za cenný zdroj některých vitaminů a minerálních látek. Jelikož je převážná většina ve vodě rozpustných vitaminů mléka odstraňována jako součást syrovátky, jsou v sýřenině společně s mléčnými lipidy zadržovány hlavně vitaminy rozpustné v tucích, mezi nimi především vitamin A, popř. jeho provitamin β -karoten [9, 10]. Majoritní podíl minerálních látek sýrů spolu se sodíkem, který se do sýřeniny dostává během solení, tvoří vápník, hořčík a fosfor. V kravském mléce se vápník, jehož obsah činí 120 mg/100 ml, nachází jednak v koloidní formě jako fosforečnan a kaseinát vápenatý, z části pak v rozpustné formě vápenatých iontů a jejich solí, např. citrátů. Eidamské sýry, jako všechny sýry vyrobené sladkým srážením, mají poměrně vysoký obsah tohoto prvku ve srovnání se sýry vyrobenými kyselým srážením, protože čím je pH při oddělování syrovátky nižší, tím více vápníku do ní přechází [7, 9]. Průměrné složení sýrů Edam a Gouda shrnuje Tabulka 1.

Tabulka 1: Průměrné chemické složení eidamských sýrů [7]

Průměrný obsah základních složek v sýrech eidamského typu [g/100 g sýru]							
	Voda	Proteiny	Lipidy	Sacharidy	Cholesterol		
Edam	43,8	26,0	25,4	Stopové množství	0,08		
Gouda	40,1	24,0	31,0	Stopové množství	0,10		
Průměrný obsah vybraných minerálních látek v sýrech eidamského typu [mg/100 g sýru]							
	Sodík	Draslík	Vápník	Hořčík	Fosfor	Železo	Zinek
Edam	1020	97	770	39	530	0,4	2,2
Gouda	910	91	740	38	490	0,1	1,8
Průměrný obsah vitaminů v sýrech eidamského typu [μg/100 g sýru]							
	Retinol	Karoten	Vitamin D	Vitamin E	Thiamin	Riboflavin	
Edam	175	150	0,19	0,48	0,03	0,35	
Gouda	245	145	0,24	0,53	0,03	0,30	
	Niacin	Vitamin B ₆	Vitamin B ₁₂	Folát	Kyselina pantothenová	Biotin	
Edam	0,07	0,09	2,1	40	0,38	1,8	
Gouda	0,05	0,08	1,7	43	0,32	1,4	

2.2.1 Mléčný tuk

Kravné mléko obvykle obsahuje kolem 3,5–5,0 % lipidů ve formě emulgovaných kuliček o průměru 0,1–10 μm dispergovaných v kontinuální sérové fázi. Koncentrace lipidů a zastoupení jednotlivých mastných kyselin (MK) v mléce závisí na faktorech jako: plemeno dobytka, druh výživy, doba laktace, zdraví a způsob chovu zvířat [3, 11].

Hovězí mléčný tuk je považován za jeden z nejkompexnějších přirozeně se vyskytujících tuků a olejů, kvůli vysokému počtu a širokému spektru MK, které obsahuje. Z kvantitativního hlediska jsou dominantními lipidy mléka triacylglyceroly (TAG), které mohou představovat až 98 % celkového obsahu tuku, zbývající 2 % tvoří diacylglyceroly (DAG), monoacylglyceroly (MAG), volné mastné kyseliny (VMK), fosfolipidy a steroly [10, 12].

TAG jsou nepolární sloučeniny s molekulovou hmotností v rozmezí 470–890 Da, jejichž strukturu tvoří glycerolový skelet esterifikovaný 3 molekulami MK. Jejich kompozice je extrémně složitá, jelikož ve 3 polohách (sn-1, sn-2 a sn-3) glycerolového řetězce je možné esterově navázat v různých koncentracích více než 400 různých MK, lišících se v délce řetězce (od 4 do 18 uhlíků), stupni nasycenosti, polohách násobných vazeb a izomerii [10, 12].

Distribuce MK v molekule TAG není náhodná, protože mechanismy podílející se na jejich biosyntéze v mléčné žláze vykazují určitou selektivitu. Jedním z charakteristických rysů mléčného tuku je esterifikace MK s krátkým uhlovodíkovým řetězcem (C4:0–C6:0) v poloze sn-3. Pozice sn-2 je esterifikována kyselinami s delším řetězcem (až 16 uhlíků), C18:0 je obecně umístěna v poloze sn-1, zatímco nenasyčené MK jsou přednostně vázané v pozicích sn-1 a sn-3 [10, 13].

Nasyčené MK v mléce přežvýkavců tvoří 60–70 % všech MK [11]. Nejvýznamnější skupinu nasycených MK reprezentují molekuly s nerozvětvenými uhlovodíkovými řetězci se

sudým počtem (4–18) uhlíků. Zásadní postavení z pohledu kvantity zaujímá kyselina palmitová (C16:0), jejíž obsah se pohybuje kolem 25–30 % z celkového množství, kyseliny myristová (C14:0) a stearová (C18:0) představují každá přibližně 12 % [7, 14]. Mléčný tuk je hlavním zdrojem nasycených MK s krátkým uhlovodíkovým řetězcem v lidské potravě. Především se jedná o kyselinu máselnou (C4:0) a kapronovou (C6:0), každá s relativně vysokým zastoupením od 2 do 4 % [12, 14].

Obecně z nenasyčených MK tvoří největší podíl (17–25 %) kyselina olejová (C18:1^{Δ9}) v konfiguraci *cis*. K dalším mononenasyčeným kyselinám s příspěvkem řádově v jednotkách procent patří kyseliny myristoolejová (C14:1^{Δ9}), palmitoolejová (C16:1^{Δ9}) a vakcenová (C18:1^{Δ11}). Kyselina vakcenová se vytváří v důsledku biohydrogenace v bacheru a její podíl v mléčném tuku je výrazně ovlivněn potravou. U krav krmených převážně senem se koncentrace této kyseliny udržuje na nízké hladině (cca 1,5 %), zatímco konzumace čerstvé trávy u volně se pasoucích zvířat vede ke zvýšení až na 5 %. Biohydrogenační reakce mají za následek i nízké zastoupení polynenasycených MK – linolové a linolenové [11, 14].

Jak již bylo uvedeno, existuje celá řada dalších MK, z nichž mnohé jsou přítomny jen v extrémně nízkých koncentracích. Z dalších skupin tak lze uvést mastné kyseliny s lichým počtem uhlíků, např. kyselina margarová (C17:0), nebo s rozvětveným řetězcem. Monometylované kyseliny jsou poměrně významné, protože představují přibližně 2,5 % z celkového množství MK. Patří k nim 12-methyl- a 13-methyltetradekanová kyselina, které společně zastupují asi 1 %. Ve stopovém množství se v mléčném tuku vyskytují také některé hydroxy- a ketokyseliny [14].

Čerstvé mléko přímo po dojení obsahuje pouze malé množství DAG, MAG a VMK. Při skladování mléka, stejně jako při zrání sýrů, však mohou být TAG podrobeny enzymatické hydrolyze lipasami mléka a přítomných bakterií, což může významně zvýšit množství těchto sloučenin. Fakt, že poloha sn-3 je poslední, která je acylována během biosyntézy TAG, vysvětluje nejvyšší koncentraci 1,2-diacylglycerolů oproti všem ostatním DAG v čerstvém mléce, neboť se jedná o meziprodukty tohoto procesu. Je totiž nepravděpodobné, že by se jednalo o produkty lipolýzy, protože lipasy napadají přednostně nejen sn-3, ale i sn-1 polohu, čímž vzniká směs 1,2- a 2,3-diacylglycerolů. Současně profil VMK v čerstvě nadojeném mléce se poněkud liší od profilu MK esterově vázaných v molekulách TAG [10].

Fosfolipidy jsou malá, ale velmi důležitá třída lipidů mléka, neboť jsou přítomny v membráně tukových kuliček a jejich amfifilní charakter napomáhá stabilizovat polydisperzní systém mléka ve formě emulze olej ve vodě. Strukturně se fosfoglyceridy podobají TAG, liší se však složením na pozici sn-3, kde místo acylu je připojena fosfátová skupina, na níž jsou navázané různé další sloučeniny. V průměru obsahují také delší a více nenasyčené MK, proto jsou náchylnější k oxidaci. K nejvíce zastoupeným patří fosfatidylcholin a fosfatidylethanolamin, v menším množství se v mléce nacházejí i fosfatidylserin a fosfatidylinositol [10, 13].

Amfipatické vlastnosti vykazují i sfingomyelin, nejvýznamnější sfingolipid v mléce, jehož strukturu tvoří fosforylcholinová skupina esterově vázaná na ceramid, který se skládá ze sfingosinu spojeného přes amidovou vazbu s molekulou MK. Ve stopovém množství jsou přítomny i jiné sfingolipidy, jako cerebrosidy a gangliosidy. Převládajícím steroidem mléka

(více než 95 % ze všech) je cholesterol [10]. Průměrné složení lipidů kravského mléka uvádí Tabulka 2.

Tabulka 2: Průměrné složení lipidů kravského mléka [7]

Podíl jednotlivých lipidů v mléce [hmotnostní % celkového lipidu]											
TAG	DAG	MAG	Cholesterol	VMK	Fosfolipidy						
97,5	0,36	0,027	0,31	0,027	0,6						
Obsah hlavních mastných kyselin v mléčném tuku [% w/w]											
C4:0	C6:0	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
3,3	1,6	1,3	3,0	3,1	9,5	26,3	2,3	14,6	29,8	2,4	0,8

TAG - triacylglyceroly, DAG - diacylglyceroly, MAG – monoacylglyceroly, VMK – volné mastné kyseliny

2.2.1.1 Lipidy v sýrech eidamského typu

Většina eidamských sýrů má obsah tuku v sušině alespoň 40 %, ve světě se však vyrábějí také varianty s redukováným množstvím tuku. V České republice je sýr Edam známý pod názvem Eidam a vyrábí se právě i jako nízkotučná forma s 30 % tuku v sušině (tvs.) nebo nižší [4, 15].

Holandské sýry se vyznačují relativně omezeným průběhem lipolýzy, což je způsobeno inaktivací lipoproteinové lipasy mléka při pasteraci a obecně slabou lipolytickou aktivitou bakterií mléčného kvašení. Z tohoto důvodu jsou i koncentrace VMK v eidamských sýrech v porovnání s jinými sýry, jako je např. Camembert, Parmezán nebo Roquefort, výrazně nižší. Majoritní podíl obsahu VMK v sýru Gouda je tvořen kyselinou palmitovou, naproti tomu koncentrace ostatních lineárních nasycených MK (C4–C18) jsou dosti nízké [16]. Profilu VMK sýru Edam také dominuje kyselina palmitová, ve významných množstvích jsou však zastoupeny i další kyseliny, mezi nimi hlavně kyselina máselná, stearová, laurová nebo myristová [13]. Přehled průměrných koncentrací jednotlivých VMK v sýrech Edam a Gouda uvádí Tabulka 3.

Tabulka 3: Průměrný obsah hlavních volných mastných kyselin v sýrech eidamského typu (v mg · kg⁻¹) [upraveno podle: 13, 16]

	C4:0	C6:0	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
Edam	60	8	9	14	47	39	122	57	–	–
Gouda	12	3	2	8	10	27	69	2	–	–

2.3 Technologie výroby eidamských sýrů

Výroba eidamských sýrů začíná výběrem vhodného kravského mléka vysoké kvality. Dobrý zdravotní stav dojníc a vyhovující výživa jsou základními předpoklady pro produkci mléka přijatelné jakosti. Krmení zvířat, např. nevhodnými typy rostlin, ovlivňuje senzorycké vlastnosti mléka a následně i sýrů, nízkokvalitní siláž může být zase zdrojem anaerobních bakterií, které se dostávají do mléka a způsobují tzv. pozdní duření sýrů. Naopak pozitivní vliv na složení má strategie volně se pasoucího dobytka nebo využívání čerstvých krmiv, což vede k nárůstu koncentrace omega-3 MK v mléce a kromě toho zlepšuje i jeho aromatický profil. Mléko musí být také přísně kontrolováno na přítomnost cizorodých látek, především

reziduí antibiotik, která by mohla inhibovat růst mlékařských kultur. K dalším faktorům ovlivňujícím složení a vlastnosti syrového mléka patří např. plemeno a stáří dojníc, genetické faktory, laktační doba nebo roční období [3, 17].

Typy sýrů jsou klasifikovány podle obsahu tvs., proto je potřeba před samotnou výrobou syrové mléko standardizovat. Dosažení požadovaného poměru tuku a bílkovin se nejčastěji provádí smísením odstředěného a plnotučného mléka, čímž se sníží obsah lipidů [3, 6].

Před výrobou Edamu je normalizované mléko pasterováno. Toto tepelné ošetření, s cílem inaktivovat nežádoucí mikroorganismy, se běžně provádí 10–20 sekund při teplotě 70–75 °C. Během pasterace tak dochází k odstranění většiny bakterií mléčného a propionového kvašení, bakterií *Listeria monocytogenes* a jiných mikroorganismů, a současně k inaktivaci některých enzymů, jejichž katalytický účinek by mohl mít negativní vliv při zrání sýrů. Snížení aktivity lipoproteinové lipasy zabraňuje vysokému stupni lipolýzy, která je u eidamských sýrů považována za nežádoucí. Souběžně však mohou být inaktivovány i prospěšné enzymy, zvláště pokud je intenzita tepelného ošetření příliš vysoká. K nejdůležitějším z nich patří xanthinoxidasa, vázaná na membráně tukových globulí, která mimo jiné katalyzuje i redukci dusičnanu na dusitan, jehož přítomnost zabraňuje klíčení spor *Clostridium tyrobutyricum*. Tepelné ošetření mléka vede také k určitému stupni denaturace termolabilních syrovátkových proteinů. Tento vedlejší efekt může být prospěšný, pokud se jen malé množství těchto bílkovin váže na povrchu kaseinových micel, protože se tak zvýší výtěžek syra. Avšak při rozsáhlejší denaturaci dochází k velmi nepříznivému ovlivnění průběhu koagulace, což se projevuje vznikem slabé sýřeniny, špatnou synerezi a celkovým zhoršením kvality syra [6, 16].

Dalším krokem, který se často uplatňuje pro zvýšení mikrobiální stability syrového mléka, je baktofugace, především za účelem odstranění endospor bakterií *Clostridium tyrobutyricum*, které mohou způsobit tzv. pozdní duření sýrů. Příčinou této vady je fermentace kyseliny mléčné až na kyselinu máselnou a octovou za současného nadměrného vývinu oxidu uhličitého a vodíku, v důsledku čehož vznikají velká oka až praskliny poškozující sýr, doprovázené nepříjemným zápachem. Proces je založen na principu centrifugace, kdy se dosahuje separace endospor odstředivou silou v podobě tzv. těžkého kalu s účinností až 98 %, protože převážná většina z nich má vyšší hustotu než mléko [4, 16].

Nutným opatřením při výrobě sýrů z pasterovaného mléka je přidavek čistých mlékařských kultur, označovaných též jako startovací nebo zákysové. Pro výrobu sýrů holandského typu se uplatňují zejména mezofilní bakterie rodů *Lactococcus* spp. a *Leuconostoc* spp., konkrétně *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a *lactis*, *Leuconostoc lactis* a *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. Enzymatickým působením těchto bakterií dochází k rychlé a téměř úplné fermentaci laktosy na kyselinu mléčnou, což má za následek snížení pH prostředí na 5,1–5,2. Tento kritický bod, jakým je právě úprava kyselosti, hraje při výrobě syra důležitou roli, neboť usměrňuje rychlost sýření, kvalitu koagulátu, podporuje synerezi a podmiňuje aktivitu lipolytických a proteolytických enzymů během dozrávání, čímž se vytvářejí podmínky pro správný vývoj syrového flavouru. Rychlost poklesu pH navíc určuje i rozsah rozpouštění koloidního fosforečnanu vápenatého, který upravuje citlivost kaseinů podléhat proteolýze, paralelně s dalšími faktory ovlivňuje i reologické vlastnosti syra a celkově tak jeho výslednou

konzistenci. Současně tyto změny napomáhají inhibici růstu nežádoucích a patogenních mikroorganismů [3, 16, 17].

Jinou variantou, kromě baktofugace, jak předcházet vzniku vad způsobených mikrobiální činností klostridií, je přidavek dusičnanů do mléka. V přítomnosti enzymu xanthinoxidasa jsou dusičnany převáděny na dusitany, které zabraňují klíčivosti spor těchto bakterií, a tak minimalizují riziko tvorby defektů při tzv. duření sýrů [4, 6, 16].

Pro zachování konstantní intenzity zbarvení sýra po celý rok je možné do syrového mléka přidávat karotenoidní barviva: annatto nebo β -karoten. Annatto je žluté až červené přírodní barvivo, získávané extrakcí z vnějších vrstev semen tropického stromu *Bixa orellana*, které obsahuje hlavně žlutooranžový lipofilní pigment bixin a ve vodě rozpustný norbixin. Vhodnější alternativou může být přidavek β -karotenu, který se v nízkých koncentracích přirozeně vyskytuje v mléce [18, 19].

Vzhledem k tomu, že se většina odrůd sýra, včetně Edamu, vyrábí enzymatickou koagulací, je nutné přidat do mléka syřidlo. Při tradiční výrobě se používají syřidla získávaná z žaludků mláďat (obvykle telat), obsahující především enzym chymosin (95 % celkové aktivity při srážení mléka) s malým množstvím pepsinu. Nicméně omezené zásoby tohoto syřidla a narůstající poptávka sýráren vedla k hledání alternativních zdrojů. Z používaných náhrad lze uvést aplikace kuřecího a vepřového pepsinu, mikrobiálních syřidel z *Rhizomucor miehei* a méně často z *Rhizomucor pusillus* nebo *Cryphonectria parasitica*. K velmi široce používaným patří také čistý telecí chymosin produkovaný geneticky modifikovanými organismy (*Kluyveromyces lactis*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger*) [3, 17].

Druhou přísadou, která napomáhá koagulaci mléka vyvolané syřidlem, je chlorid vápenatý. Typický přídavek 10–100 g CaCl_2 na 100 litrů syrového mléka vede ke snížení pH o cca 0,1–0,2 jednotky, čímž nepřímo zvyšuje aktivitu syřidla a podporuje tak enzymatickou hydrolyzu κ -kasienu. Mimo to také značně zvyšuje rychlost agregace parakaseinových micel, čímž nejen že zkracuje dobu potřebnou pro srážení, ale zlepšuje i konzistenci a pevnost syřeniny. Pro získání dostatečně pevného koagulátu za přiměřený čas je potřeba aplikovat vyváženou koncentraci syřidla a chloridu vápenatého [16].

Základním krokem výroby sýrů je tedy koagulace mléka indukovaná přidavkem syřidla, která je založena na odstranění hydrofilního glykomakropeptidu enzymatickým účinkem, tedy štěpení κ -kaseinu. Konkrétně je hydrolyzována peptidová vazba mezi fenylalaninem a methioninem (105. a 106. aminokyselina v peptidovém řetězci) za vzniku parakaseinu (κ -kaseinový fragment 1–105, κ -CN f1–105) a makropeptidů, také nazývaných jako glykomakropeptidy nebo kaseinomakropeptidy (κ -CN f106–169), které difundují do vodné fáze. Jakmile je hydrolytickému štěpení podrobena většina (> 75 %) κ -kaseinu, začíná vápníkem zprostředkovaná agregace parakaseinových micel [3, 16].

Již v letech 1910 a 1912 publikoval J. Alexander [20, 21] ve svých studiích, že kasein v mléce existuje jako nestabilní koloid, který je chráněn a stabilizován syrovátkovým proteinem a navrhl použití syřidla pro jeho hydrolyzu. Wake v roce 1959 [22] dokázal, že syřidlo hydrolyzuje peptidový řetězec κ -kaseinu a o 6 let později Delfour a kol. [23] konkretizovali peptidovou vazbu, která je při reakci štěpena [17].

Enzymatické působení syřidla je primární fází dvoufázového procesu, která aktivuje sekundární neenzymatickou fázi, během níž kaseinové micely postupně ztrácejí schopnost

interagovat s molekulami vody v důsledku snížení stericke a nábojové repulze mezi částicemi, způsobené odštěpením makropeptidu z κ -kaseinu. Jak postupuje koagulace, micelární řetězce začínají vytvářet trojrozměrnou síťovou matici, která zachytává molekuly vody a další hlavní složky mléka (laktosa, lipidy, syrovátkové proteiny, minerály). Tento proces probíhá při teplotě 30–31 °C a koagulace trvá přibližně 20–30 minut. Jakmile je dosaženo dostatečné pevnosti, je mléčný gel, který je za klidových podmínek poměrně stabilní, rozkrájen speciálními noži obvykle na kusy o velikosti 8–15 mm (tzv. sýrové zrno). Velikost sýrového zrna je významným faktorem ovlivňujícím konečný obsah vlhkosti sýru, a proto vyžaduje pečlivou kontrolu. Krájení má za následek zvětšení plochy koagulátu, čímž je podpořena synereze, a tedy vylučování syrovátky. Čím větší je poměr plochy k objemu zrn, tím rozsáhlejší je uvolňování syrovátky a tím nižší je obsah vlhkosti ve výsledném sýru. Rozsah a rychlost synereze jsou kromě velikosti zrn závislé zejména na koncentraci vápenatých iontů a kaseinu, pH, době trvání procesu, rychlosti míchání směsi a samozřejmě teplotě [3, 6, 17].

U polotvrdých a tvrdých sýrů se pro podpoření uvolňování syrovátky sýrové zrno přehřívá. Při výrobě Edamu se tohoto cíle běžně dosahuje přidávkem teplé vody po odpuštění části syrovátky v procesu tzv. praní sýřeniny, který umožňuje upravit obsah laktosu fermentované kyselými bakteriemi, a tím zabránit přílišnému snížení pH sýra. Dohřívání a dosoušení pokračuje po přidávku teplé vody za stálého míchání přibližně dalších 30 minut při teplotách maximálně 40 °C. Použití vyšších teplot by sice dále podpořilo synerezi, ale současně by vedlo k nežádoucímu poškození mezofilních bakterií [3, 16].

Jakmile synereze dosáhne požadovaného stupně, je sýřenina oddělena od syrovátky v perforovaných formách, čímž získáváme potřebný tvar a velikost sýrů. U polotvrdých a tvrdých sýrů se pro urychlení a podporu uvolňování další syrovátky působí na sýřeninu tlakem. Vedle vlivu na synerezi podporuje lisování dokonalejší spojení částic. Výsledný produkt má celistvější strukturu s menším počtem ok a uzavřenější hladký povrch, který zabraňuje dalším ztrátám vlhkosti, zajišťuje mechanickou stabilitu a slouží jako bariéra proti mikrobiální kontaminaci. V průběhu lisování musí tlak narůstat pozvolna, v opačném případě by to vedlo k nežádoucímu zpevnění a uzavření struktury povrchu sýra, čímž by se zamezilo odtoku syrovátky [3, 16].

Posledním krokem před zabalením sýrů a zráním je solení. Tento proces se u eidamských sýrů provádí ponořením do roztoku solanky o koncentraci chloridu sodného 18–20 %, teplotě kolem 13 °C a obsahu vápenatých iontů přibližně 0,2 %. Difuze sodných iontů do hmoty sýra má, kromě pozitivního účinku na výslednou charakteristickou chuť, vliv i na aktivitu přítomných enzymů a reguluje růst a přežívání mikroorganismů. K dalším aspektům se řadí podpora synereze, tedy uvolňování další syrovátky, a tím snížení hodnoty konečné vlhkosti sýra, nebo zlepšení konzistence výměnou vápenatých iontů v parakaseinu za ionty sodné. Nasolené sýry se po vytažení ze solanky nechávají oschnout a poté se balí do vhodných zracích obalů [3, 16, 17].

Vhodný materiál používaný pro balení sýrů by měl splňovat řadu kritérií, mezi nimi např. poskytovat dostatečnou ochranu před mikroorganismy, ale i dalšími nepříznivými vlivy, zabraňovat výrazným ztrátám vlhkosti, disponovat specifickými vlastnostmi pro propustnost vůči plynům a již zmíněné vlhkosti, zlepšovat vzhled nebo být kompatibilní s podmínkami distribuce a prodeje. Tradičním obalovým materiálem bochníků sýrů Edam je červený

parafinový vosk, avšak takto zabalené produkty jsou více náchylné ke vzniku vad kvůli přítomnosti nežádoucích mikrobiálních kultur na syrové kůře. Alternativou, která se stále více používá, je vakuové balení sýrů v plastových fóliích z polyethylenu a polyamidu, které nabízejí lepší ochranu proti mechanickému poškození, ale zároveň zpomalují růst aerobních bakterií, a tím tak účinněji zabraňují kontaminaci [4, 16].

Takto připravené sýry získávají svou výslednou strukturu, vzhled, konzistenci a především složení katalytickým působením enzymů mléka, přítomných mikroorganismů a syřidla během procesu zrání. Jedná se o komplexní složitou sadu biochemických změn, které zahrnují metabolismus zbytkové laktosy, lipolýzu, proteolýzu, popř. přeměnu laktátu a citrátu, a na ně navazující sekundární transformace, jako katabolismus VMK a aminokyselin, s nimi související reakce: esterifikace, laktonizace a mnohé další. Rozsah těchto reakcí a rovnováha vznikajících sloučenin ovlivňuje typický charakter vůně a chuti sýra [3, 16, 17].

Eidamské sýry jsou během zrání uchovávány ve speciálních klimatizovaných místnostech při teplotě 8–15 °C v závislosti na použitém obalovém materiálu a relativní vlhkosti v rozmezí 85–88 % po dobu nejméně 4 týdnů [1, 3, 17].

2.4 Metabolické procesy při procesu zrání sýra

Jedinečná a dobře oceňovaná vyvážená chuť a vůně sýrů je výsledkem komplexního procesu zahrnujícího chemické a biochemické přeměny mléčných složek. Tento proces lze rozdělit na dva podprocesy: generování prekurzorových molekul a jejich následnou konverzi na aromaticky aktivní látky (AAL). Jedná se o lipolýzu mléčného tuku, proteolýzu kaseinů, fermentaci zbytkové laktosy a metabolismus citrátu, na které následně navazuje katabolismus uvolněných MK a aminokyselin. K těmto reakcím dochází při zpracování, ale především při zrání sýřeniny, a podílejí se na nich enzymy a mikroorganismy z různých zdrojů (mléko, startovací kultury, sekundární mikroflóra aj.). V následujících kapitolách jsou jednotlivé biochemické cesty popsány podrobněji [24–26].

2.4.1 Katabolismus residuální laktosy, laktátu a citrátu

Pro výrobu kvalitního sýra je nezbytný rychlý a úplný katabolismus zbytkové laktosy, která nebyla odstraněna společně se syrovátkou, a monosacharidů vzniklých jejím rozkladem, protože přítomnost fermentovatelných sacharidů může vést k rozvoji nežádoucí sekundární mikroflóry. Dráha, kterou je laktosa odbourávána, závisí na typu použitých bakterií mléčného kvašení, které se při výrobě sýrů přidávají do mléka jako startovací kultury. Nejprve dochází k hydrolyze glykosidová vazby v molekule laktosy, přičemž vzniká glukosa a galaktosa, popř. u rodu *Lactococcus* spp. galaktosa-6-fosfát. Glukosa je následně oxidována Embden-Meyerhof-Parnasovou metabolickou dráhou. Pro zabránění kumulace galaktosy v sýřenině při použití galaktosa-negativních startovacích bakterií je nutné, aby společně s nimi rostly i určité kmeny bakterií schopné galaktosu využít. U bakterií rodu *Lactococcus* spp. dochází k přeměně galaktosa-6-fosfátu na tagatosa-6-fosfát a následně přes tagatosa-1,6-bisfosfát až na dihydroxyacetonfosfát, který je glykolytickou dráhou oxidován na pyruvát. U galaktosa-pozitivních startovacích bakterií a *Leuconostoc* spp. je galaktosa převedena Leloir metabolickou dráhou na glukosa-6-fosfát. Na rozdíl od většiny bakterií mléčného kvašení, nemá *Leuconostoc* spp. glykolytické enzymy, a tudíž k metabolizaci laktosy používá fosfoketolasovou dráhu, kde koncovými produkty jsou laktát, ethanol a CO₂ [24, 25, 27–30].

Hlavním produktem metabolismu laktosy je laktát. Ten vzniká konverzí pyruvátu laktátdehydrogenasou a v závislosti na specifitě tohoto enzymu vzniká převážně L-laktát, ale i D-laktát, popř. jejich racemická směs. Kyselina mléčná přispívá k chuti sýru zejména v brzkém stádiu zrání, avšak hlavní účinek okyselení sýra na vývoj chuti je nepřímý, protože společně s pufrovací kapacitou sýra ovlivňuje pH, a tím i růst sekundární mikroflóry a aktivitu enzymů [25, 30].

Během zrání je laktát důležitým substrátem pro celou řadu reakcí, které mají v závislosti na druhu sýra pozitivní nebo negativní vliv na konečný vzhled, chuť a vůni výrobku. Racemizace laktátu je pravděpodobně vyšší u sýrů vyrobených ze syrového mléka než z mléka pasterovaného kvůli vyššímu počtu kolonií nezákysových bakterií mléčného kvašení a rozmanitější původní mikroflóre mléka. Proces konverze, probíhající např. u *Lactococcus* spp. nebo *Pediococcus* spp., které mají L- i D-laktátdehydrogenasu, nejspíše zahrnuje oxidaci L-laktátu na pyruvát a jeho další redukci na D-laktát. Racemizace nemá až takový vliv na chuť a vůni sýra, jako spíše na jeho vzhled. Vápenaté soli D-laktátu mají menší rozpustnost než jeho L-isomeru, to může vést ke krystalizaci a vzniku nežádoucích bílých skvrn na řezu sýra. Katabolismus laktátu je zvláště důležitý v sýrech švýcarského typu a v odrůdách s povrchovou plísní. U prvního typu metabolizuje *Propionibacterium freudenreichii* laktát za vzniku propionátu, acetátu, CO₂ a H₂O. Propionát a acetát se podílejí na flavouru tohoto typu sýra, CO₂ migruje hmotou a je důležitý pro tvorbu jeho charakteristických ok. U sýrů Camembert nebo Brie dochází díky *Geotrichum candidum* nebo *Penicillium camemberti* ke katabolismu laktátu na H₂O a CO₂, což má za následek zvýšení pH na povrchu. Toto odkyselení vede k celé řadě fyzikálně-chemických procesů, v jejichž důsledku dochází ke změkčení struktury sýra, které může ovlivnit syrovou chuť změnou rychlosti migrace a uvolňování AAL. Laktát může být také oxidován při dostatečné dostupnosti O₂ za vzniku acetátu a CO₂ nezákysovémi bakteriemi mléčného kvašení, avšak tato dráha má v sýrech spíše omezený rozsah kvůli nízkému redoxnímu potenciálu. Jak již bylo zmíněno, pozdní duření sýrů doprovázené vznikem nepříjemného off-flavouru je způsobeno kontaminací plynotvornými klostridii, které za anaerobních podmínek metabolizují laktát za vzniku butyrátu, CO₂ a H₂ [25, 27, 31].

I když se většina citrátu obsaženého v mléce ztrácí při výrobě sýra v syrovátce, protože asi 94 % je obsaženo v rozpustné fázi mléka, má i přesto jeho nízká koncentrace v sýrenině (10 mmol · kg⁻¹) velký význam, protože může být metabolizován citrát-pozitivními mezofilními startovacími kulturami (*Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp.) na řadu látek ovlivňujících výsledný flavour mnoha druhů sýrů. Na jeho rozkladu se podílí enzym citrát-lyasa, který ho rozštěpí na oxalacetát a acetát. Oxalacetát je dále převeden za současného uvolnění ekvivalentního množství CO₂ oxalacetát-dekarboxylasou na pyruvát, z něhož se pak tvoří čtyřuhlíkaté AAL. Hlavními látkami vznikajícími při katabolismu citrátu jsou tedy acetát, diacetyl (butan-2,3-dion), acetoin (3-hydroxybutan-2-on) a butan-2,3-diol, popř. butan-2-on. Diacetyl obvykle vzniká jen v malém množství, na rozdíl od acetoinu, jehož koncentrace bývá většinou 10–50 × vyšší. Vedlejším produktem je CO₂, který je u holandských sýrů důležitý pro vznik spíše malých ok v těstě, ale nežádoucí např. u Cheddaru [26, 28, 30, 31].

U eidamských sýrů hraje metabolismus laktátu a citrátu významnou roli, neboť touto cestou vzniká diacetyl, který byl identifikován jako klíčová složka aroma těchto sýrů, a CO₂, zodpovědný za tvorbu charakteristických malých ok [32].

Schéma katabolismu laktosy, citrátu a laktátu znázorňuje Obrázek 1.

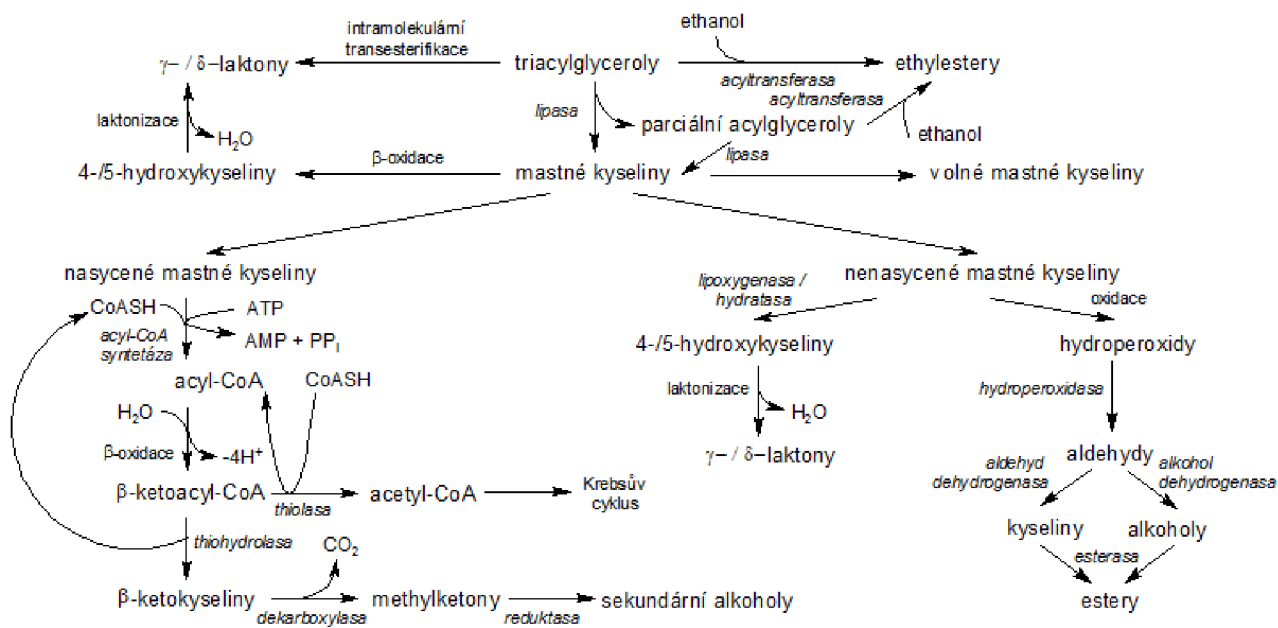
2.4.2 Lipolýza a katabolismus volných mastných kyselin

Obecně lipidy přítomné v potravinách mohou podléhat oxidační nebo hydrolytické degradaci. U sýrů jsou však oxidační mechanismy výrazně omezeny, pravděpodobně kvůli nízkému redoxnímu potenciálu (-250 mV) a přítomnosti přírodních antioxidantů (např. vitamin E). Enzymatická hydrolyza TAG, které tvoří více než 98 % mléčného tuku, je tak hlavní biochemický proces transformace tuků při zrání sýra a je považována za nezbytnou pro vývoj jeho chuti. Lipidy jsou díky hydrofobním vlastnostem vynikající nosiče AAL, ale především hrají důležitou roli jako jejich prekurzory. Lipolýza v sýrech je katalyzována lipolytickými enzymy, které štěpí esterové vazby mezi MK a glycerolem, přičemž dochází k produkci DAG a MAG, VMK a glycerolu. Většina lipas je specifická pro vnější esterové vazby TAG, proto jsou z počátku hydrolyzovány především na 1,2- a 2,3-diacylglyceroly a později na 2-monoacylglyceroly [13, 31, 34].

Lipasy v sýrech mohou pocházet z více zdrojů. Patří mezi ně např. mléko, které obsahuje silnou lipoproteinovou lipasu, která se do mléka dostává přes membránu prsních buněk. Její aktivita je poměrně ovlivnitelná vysokou teplotou, kdy může docházet až k její úplné inaktivaci, proto je lipolýza katalyzovaná tímto enzymem u sýrů vyrobených z pasterovaného mléka méně významná než u sýrů ze syrového mléka. Významný vliv při dozrávání většiny sýrů vyrobených z tepelně ošetřeného mléka tak mají lipasy startovacích kultur. Bakterie mléčného kvašení, zejména *Lactococcus* spp. a *Lactobacillus* spp., jsou sice považovány za slabě lipolytické, avšak díky přítomnosti jejich vyššího počtu během zrání dochází k významné produkci VMK. Dalšími zdroji enzymů s lipolytickou aktivitou mohou být např. některé syřidlové výtažky používané při výrobě některých specifických sýrů nebo sekundární mikrobiální kultury [13, 25, 34].

Rozsah lipolýzy se značně liší mezi jednotlivými odrůdami sýra. Intenzivní lipolýza je u většiny odrůd považována za nežádoucí, protože vysoká hladina VMK může mít nepříznivý vliv na flavour sýra, především kvůli tzv. žluknutí. Jedná se o sýry Cheddar, Gouda, některé švýcarské sýry a další. Naopak mezi sýry, u kterých probíhá rozsáhlá lipolýza významně ovlivňující výslednou chuť a vůni, patří např. tvrdé italské sýry a sýry s plísní uvnitř i na povrchu [30, 34].

Jak již bylo zmíněno, během lipolýzy dochází při hydrolýze esterových vazeb acylglycerolů k uvolňování VMK. Kromě jejich přímého vlivu na chuť mnoha odrůd sýra se jedná o důležité prekurzory pro produkci jiných AAL, především esterů, thioesterů, laktonů, methylketonů, sekundárních alkoholů, popř. aldehydů [25, 28]. Obecné schéma lipolýzy a následného katabolismu VMK znázorňuje Obrázek 2.



Obrázek 2: Schéma lipolýzy a katabolismu volných mastných kyselin v sýrech [upraveno podle: 30, 33, 34]

Estery se v sýrech mohou vytvářet dvěma různými enzymově katalyzovanými reakcemi. Esterifikace je reakce karboxylové skupiny VMK s hydroxylovou skupinou alkoholu, jako produktu fermentace laktosy nebo z katabolismu aminokyselin. Jedná se o reverzibilní reakci, kdy rovnováha mezi syntézou a hydrolýzou esterů závisí na okolních podmínkách. Hlavním faktorem ovlivňujícím syntézu je především dostupnost alkoholu, převážně ethanolu, což vysvětluje převahu ethylesterů v sýrech. Druhou možností je alkoholýza, reakce acylglyceridu a alkoholu, při které transferasy přenášejí acylové skupiny z glyceridů přímo na molekulu alkoholu. Další možností je neenzymatická tvorba esterů, avšak příspěvek spontánní tvorby esterů na flavour sýra není významný v porovnání s enzymatickou syntézou. Podobně jako estery, i thioestery vznikají procesem esterifikace, kdy MK, resp. acyl-CoA s kratším uhlíkatým řetězcem pocházející z lipolýzy a β -oxidace, reaguje se sloučeninou obsahující thiolovou skupinu, které jsou produkovány při katabolismu aminokyselin obsahujících síru [13, 25, 34].

Laktony jsou sloučeniny, které se tvoří intramolekulární esterifikací hydroxykyselin, při které dochází k uvolnění molekuly vody za současného vzniku cyklické struktury. Bylo zjištěno, že mléčná žláza přežvýkavců obsahuje systém δ -oxidace pro katabolismus MK, který může produkovat prekurzorové hydroxykyseliny. Faktory, které v tomto případě ovlivňují tvorbu laktonů, jsou krmivo, roční období, laktace a druh plemene. Další možností tvorby hydroxykyselin je jejich uvolnění z TAG během lipolýzy a/nebo hydroxylace působením lipoxygenas nebo hydratase na nenasycené MK. Laktony mohou být ale také produkovány jednostupňovou neenzymatickou reakcí, kdy při vyšší teplotě je hydroxykyselina navázaná v molekule TAG podrobena transesterifikaci a lakton se tak uvolňuje přímo [13, 30, 31, 34].

Další velmi důležitou skupinou AAL, ve vyšších koncentracích zejména u plísňových sýrů, jsou methylketony (alkan-2-ony). Metabolismus, kterým jsou tyto sloučeniny produkovány z MK enzymy plísní *Penicillium* spp., zahrnuje kroky, z nichž některé odpovídají počátečním

stádiím β -oxidace: nejprve dojde k uvolnění MK z mléčného tuku lipasou, poté dochází k oxidaci kyseliny na β -ketokyselinu s následnou dekarboxylací na alkan-2-ony, které mají o jeden uhlíkový atom méně než původní MK. Vzniklé methylketony mohou být dále redukovány na příslušné sekundární alkoholy (alkan-2-oly), což je za aerobních podmínek reverzibilní reakce. Dále bylo prokázáno, že methylketony mohou být také tvořeny některými plísněmi přímo z ketokyselin, které se přirozeně v nízkých koncentracích vyskytují v mléčném tuku nebo oxidací mono- a polynenasycených MK [13, 30, 34].

Ačkoliv jsou aldehydy především výsledkem katabolismu aminokyselin, některé aldehydy s přímým řetězcem, jako např. butanal, heptanal a nonanal, mohou vznikat i jako výsledek β -oxidace nenasycených MK prostřednictvím aktivity lipoxygenas [13, 34].

Vzhledem k tomu, že sýry vyrobené pouze s přidavkem bakteriálních kultur, k nimž patří i sýry holandského typu, postrádají enzymatické systémy rozkládající tuky a VMK, které se vyskytují u sýrů vyrobených za použití plísní, je rozklad, který se u těchto sýrů vyskytuje, odlišný a méně výrazný, ačkoliv jeho vliv není zanedbatelný. Navíc tuk hraje i fyzickou úlohu při zrání sýrů tím, že působí jako rozpouštědlo AAL a poskytuje také rozhraní vody/bílkovin/tuku, čímž ovlivňuje vnímání chuti [35].

U eidamských sýrů je lipolýza považována spíše za nežádoucí, vysoký obsah vzniklých volných MK by mohl způsobovat nežádoucí žluklý off-flavour, a probíhá pouze v mírném rozsahu. Nicméně nízké koncentrace volných MK přispívají k výsledné chuti, jejich hlavní význam tkví v tvorbě laktonů; k nejběžnějším patří δ -dekalakton a δ -dodekalakton, nezbytné pro charakteristický flavour eidamských sýrů, kde byly nalezeny ve vysokých koncentracích [13, 28].

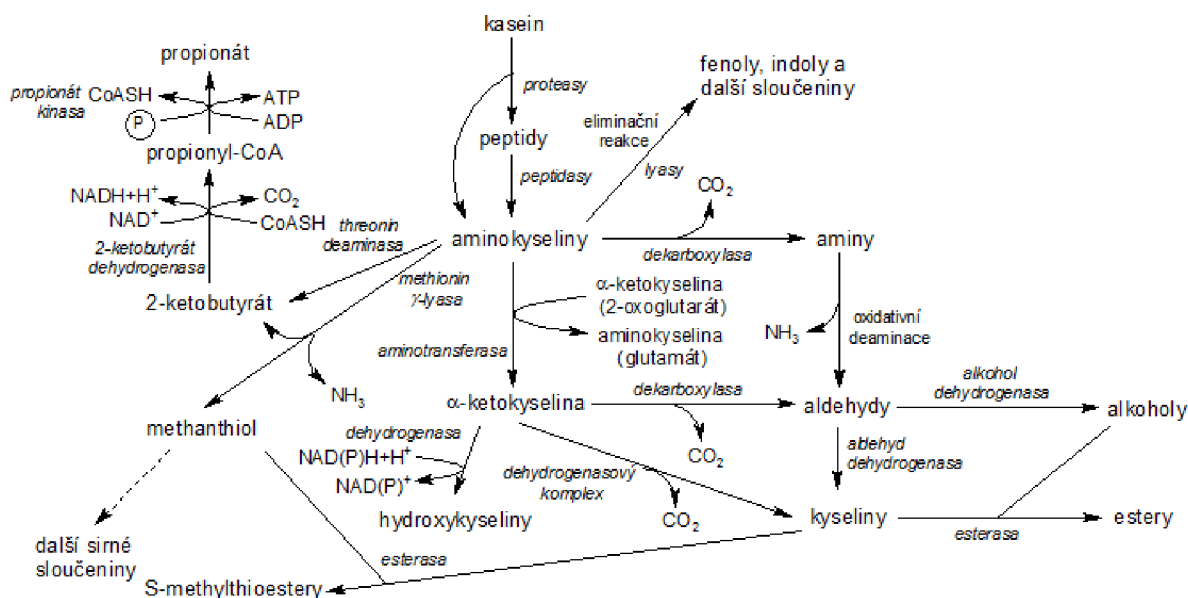
2.4.3 Proteolýza a katabolismus aminokyselin

Proteolýza je nejsložitější a u většiny druhů sýrů i nejdůležitější metabolický proces, který během zrání probíhá. Hraje důležitou roli ve vývoji textury, aroma a chuti, a při nesprávném průběhu také off-flavouru (kyselost, hořkost) [25].

Při výrobě a zrání sýrů dochází k postupnému rozkladu kaseinů v důsledku kombinovaného působení proteolytických enzymů. Zdrojem těchto enzymů jsou: mléko (plasmin, kathepsin D a další proteasy somatických buněk), syřidla (chymosin, pepsin, rostlinné proteasy aj.), zákysové a nezákysové bakterie mléčného kvašení, sekundární mikroflóra a exogenní proteasy a peptidasy používané k urychlení dozrávání. U většiny sýrů je počáteční hydrolýza kaseinové matrice na dlouhé a středně dlouhé peptidy způsobena převážně syřidlem, případně plasminem a proteasami somatických buněk. Oligopeptidy jsou následně hydrolyzovány společně syřidly i proteasami a peptidasami bakterií mléčného kvašení a uvolňují se kratší peptidy a volné aminokyseliny. Tyto konečné produkty jednak u některých typů sýrů přímo přispívají k chuti sýra (především ovlivňují tzv. „pozadí“ chuti), ale uvolněné aminokyseliny jsou především substrátem pro sekundární katabolické procesy, které produkují celou řadu AAL. Kromě toho dochází také ke změnám textury v důsledku rozpadu proteinové sítě, snížení aktivity vody kvůli vazbě vody volnými karboxylovými a aminoskupinami a vzrůstu pH. Změny v síťové matici tak usnadňují uvolňování AAL z hmoty. Postupný rozklad bílkovin tedy vede k tvorbě sýrů s jemnější strukturou a lepší chutí než u původní syřeniny [25, 30, 31].

Význam metabolismu aminokyselin spočívá v buněčné potřebě nejen bakterií mléčného kvašení, které mají potřebnou enzymovou výbavu, získávat energii ve formě ATP při nedostatku jiného snáze užitelného substrátu, ale také se jedná o zdroj uhlíku, síry a dusíku. Volné aminokyseliny, uvolňované při proteolýze z mléčné bílkoviny, jsou tak substráty pro celou řadu enzymově katalyzovaných katabolických reakcí, při nichž vzniká množství sloučenin přispívajících k aroma/flavouru sýra, mezi nimi např. aldehydy, alkoholy, fenoly, indoly, sirné sloučeniny, amoniak aj. Katabolismus aminokyselin má 3 fáze. Na počátku dochází k reakcím jako je dekarboxylace, deaminace a eliminace, katalyzované enzymy ze skupiny dekarboxylas, transaminas, deaminas, lyas a dehydratas. Druhá fáze zahrnuje přeměnu vzniklých produktů první fáze katabolismu a v posledním stádiu podléhají aldehydy oxidačně-redukčním reakcím [25, 30, 36, 37].

Transaminasy, specifické pro různé skupiny aminokyselin, katalyzují přenos aminoskupiny z α -aminokyselin na α -ketokyselinu za vzniku příslušné α -aminokyseliny. Transaminasy bakterií *Lactococcus* spp. a *Lactobacillus* spp. jsou enzymy závislé na pyridoxal-fosfátu, které používají jako akceptor 2-oxoglutarát a tím produkují kyselinu glutamovou. Druhou možností odstranění α -aminoskupin je působení deaminas, při čemž se uvolní amoniak a karboxylové kyseliny. Ty mohou podléhat buď redukčním reakcím produkujícím karboxylové sloučeniny, resp. alkoholy, nebo esterifikačním reakcím za vzniku esterů, popř. thioesterů. Aminokyseliny mohou být také degradovány dekarboxylasami na aminy, které jsou oxidativní deaminací převedeny na aldehydy. Ty vznikají také působením dekarboxylas na α -oxokyseliny z transaminačních reakcí. Aldehydy mohou být následně redukovány na alkoholy a/nebo oxidovány na karboxylové kyseliny. Tyto reakce jsou katalyzovány dehydrogenasami využívajícími jako kofaktor NAD(P)^+ . Kromě alkoholů, aldehydů a karboxylových kyselin mohou být α -ketokyseliny metabolizovány také na hydroxykyseliny, které ale nejsou považovány za příliš významné pro chuť. Rovněž také dochází k odštěpování postranních řetězců aminokyselin působením různých lyas. Z aminokyselin obsahující síru se tak vytváří řada sirných derivátů [25, 26, 30, 37]. Schéma proteolýzy a katabolismu aminokyselin vystihuje Obrázek 3.



Obrázek 3: Schéma proteolýzy a katabolismu aminokyselin [upraveno podle: 28, 37–39]

V posledních letech byla provedena řada studií zaměřujících se na urychlení procesu zrání sýra. Jednou z možností je ovlivnění proteolýzy a následného katabolismu aminokyselin. Byly provedeny pokusy, při nichž byl zvýšen obsah aminokyselin buď přímým přidáním aminokyselin, nebo genetickou modifikací laktokoků s cílem zvýšit aktivitu aminopeptidázy N. Zvýšená koncentrace aminokyselin však neovlivnila rychlost rozvoje chuti, z čehož je možné usoudit, že omezujícím faktorem v biogenezi chuti je spíše konverze aminokyselin na AAL než jejich produkce při proteolýze. Jiné pokusy se zaměřily již na samotný katabolismus aminokyselin, kdy byla v sýrech zvýšena hladina 2-oxoglutarátu s cílem zvýšit transaminasovou aktivitu. To sice vedlo k rychlejšímu odbourávání aminokyselin, avšak docházelo k hromadění α -ketokyselin, z toho vyplývá, že limitujícím krokem by mohla být spíše degradace těchto kyselin na AAL než jejich produkce transaminací aminokyselin [25, 31].

Katabolismus aminokyselin s rozvětveným řetězcem je iniciován transaminasami, čímž vzniká α -ketoisokaproát, α -keto- β -methylvalerát a α -ketoisovalerát z leucinu, isoleucinu a valinu. Reakce odpovědné za přeměnu vzniklých ketokyselin však nebyly ještě důkladně objasněny, produkty totiž závisí na kmeni bakterií. Jedná se o oxidační dekarboxylaci na karboxylové kyseliny, redukci na hydroxykyseliny a dekarboxylaci na aldehydy. Některé enzymy, schopné tyto kyseliny přeměnit, byly detekovány u různých druhů bakterií, mezi nimi např. *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus debrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* nebo *Propionibacterium freudenreichii*. Rozvětvené aminokyseliny jsou tak prekurzory určitých aromatických sloučenin, jako jsou 2- a 3-methylbutanal, 2-methylpropanal, kyselina 2-methylmáslná, isomáslná a isovalerová a další [28, 38].

Těkávé sloučeniny síry odvozené od sírných aminokyselin jsou často považovány za základní sloučeniny pozitivně ovlivňující sýrovou chuť. Vznikají především konverzí methioninu, protože cystein se vyskytuje pouze v omezené míře v α_{s2} - a κ -kaseinu. Katabolismus methioninu iniciovaný transaminačním krokem za přítomnosti pyridoxalfosfát-dependentních aminotrasferas, které vyžadují jako substrát α -ketoglutarát, vede ke vzniku

kyseliny 4-methylthio-2-ketomáselné. Ta je následně metabolizována, pravděpodobně thiaminpyrofosfát-dependentní dekarboxylasou, na 3-methylthiopropenal (methional) a jeho rozkladem se uvolňuje methanthiol. U několika kmenů *Lactococcus* spp. byly zjištěny i enzymy pro přeměnu 4-methylthio-2-oxobutyrátu na 2-hydroxy-4-methylthiomáselnou kyselinu podléhající následné demethiolaci. Přímá demethiolace methioninu na methanthiol, α -ketobutyrát a amoniak, vyžaduje přítomnost pyridoxalfosfát-dependentní methionin- γ -lyasy, která byla nalezena u *Brevibacterium* spp. Methanthiol je dále chemicky nebo enzymaticky oxidován za vzniku organických sulfidů (dimethylsulfid, dimethyldisulfid, a dimethyltrisulfid) nebo se může podílet na esterifikačních reakcích za vzniku thioesterů [26, 28, 36, 38].

Konverze aromatických aminokyselin vede převážně k tvorbě nežádoucích pachutí sýrů. Aromatická část sloučenin zůstává neporušena, zatímco aminoskupina bývá transaminačním krokem odstraněna za vzniku aromatických derivátů pyruvátu (indolpyruvát, fenylpyruvát a *p*-hydroxyfenylpyruvát). Tyto sloučeniny mohou následně podléhat redukci za vzniku odpovídajících hydroxykyselin (deriváty laktátu) nebo oxidační dekarboxylaci za vzniku acetátů. Z indol-3-acetátu a *p*-hydroxyfenylacetátu mohou konverzí některými kmeny laktokoků vznikat skatol a *p*-kresol. Dále se tryptofan a tyrosin také dekarboxylují za vzniku biogenních sloučenin tryptaminu a tyraminu. Dalšími produkty konverze fenylalaninu jsou 2-fenylethanol a benzaldehyd [28, 36, 38].

Alanin je transaminován nebo deaminován na pyruvát, který může být metabolizován na kyselinu mléčnou nebo na jiné meziproducty α -aminokyselin pomocí některých reakcí Krebsova cyklu. Alanin je tak prekurzorem mnoha AAL, mezi nimi např. acetaldehydu, acetonu, butan-2,3-diolu, diacetylu aj. Stejně jako u jiných aminokyselin je iniciace katabolismu aspartátu spojena s odstraněním aminoskupiny, v tomto případě za vzniku oxalacetátu, který se účastní některých reakcí cyklu trikarboxylových kyselin a je podobně jako alanin prekurzorem řady těkavých látek. Asparagin je reverzibilně transformován na aspartát asparaginasami. Glutamát je prekurzorem hlavního akceptoru transaminačních reakcí jiných aminokyselin, α -ketoglutarátu. Existují také jiné alternativní cesty pro degradaci glutamátu mimo jeho působení jako donor/akceptor aminoskupin. V bakteriích mléčného kvašení byly nalezeny geny spojené s katabolismem glutamátu na sukcinát, stejně jako pro jeho metabolismus na produkci argininu za vzniku ATP. Glutamát je také katabolizován na MK bakteriemi *Lactococcus* spp. a *Lactobacillus* spp. [36, 37].

Odbourávání serinu na hydroxypyruvát, resp. až pyruvát je katalyzováno enzymy s dehydrogenasovou aktivitou. Tyto enzymy, aktivní za anaerobních podmínek (např. ve vnitřní hmotě sýra), hydrolyzují aminokyseliny obsahující hydroxy- nebo thiolové skupiny. U bakterií rodu *Lactobacillus* spp. byla zjištěna konverze serinu na acetát, na rozdíl od *Lactococcus* spp., které produkují kyselinu propionovou, isomáselnou a kapronovou. Působením threoninové aldolasy, nalezené u mnoha bakterií (např. *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* aj.), se přímo uvolňuje acetaldehyd, který pak může působit jako AAL, nebo jej lze dále metabolizovat na jiné sloučeniny. Tento enzym současně uvolňuje i nejjednodušší aminokyselinu, glycin, která je spojována především s reakcemi zahrnujícími přenos jednouhlíkatých zbytků. Threonin může

být však také katabolizován na kyselinu octovou, propionovou, isomáselnou a kapronovou [26, 36–38].

Degradace histidinu není dosud podrobně prozkoumána. Histidin může být buď dekarboxylován za vzniku histaminu, který ale souvisí s intoxikací potravin, nebo byly u některých zákysových bakterií objeveny enzymy, které pravděpodobně degradují histidin na glutamát. Aminokyseliny lysin a prolin jsou mimo jiné biosyntetické produkty z metabolismu glutamátu a argininu a za podmínek v sýru jsou katabolizovány na MK. Arginin je důležitý pro bakterie mléčného kvašení pouze za podmínek deficiencie laktosy nebo při nízké hodnotě pH, kdy je okamžitě katabolizován za účelem zvýšení extracelulárního pH nebo produkce ATP arginindeiminasou [36].

Sýry eidamského typu zrají anaerobně tzn. v celé hmotě; vzhledem k jejich výrobě, především v důsledku přídavku prací vody, nízkého obsahu soli (1,5–3,0 %) a poměrně krátké doby zrání (cca 2–5 měsíců podle velikosti) není proteolýza příliš rozsáhlá; textura je proto měkčí a flavour celkově méně výrazný [16, 28].

2.5 Aromaticky aktivní látky v sýrech

Charakteristická chuť a vůně každého typu sýra je způsobena správnou rovnováhou řady specifických látek různých koncentrací a rozmanitých chemických tříd. AAL, které se podílejí na flavouru sýrů, jsou typicky malé hydrofobní těkavé sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností, které během konzumace vnímáme čichovými a/nebo chuťovými receptory [31, 36, 40].

Na téma flavour sýra byla již provedena řada rozsáhlých výzkumů, navzdory tomuto úsilí jsou stále k dispozici pouze omezené informace o chemii AAL. Jejich percepce nezáleží pouze na koncentraci, ale i na množství jiných faktorů. Práh vnímání je např. silně závislý na vlastnostech matrice nebo na současném účinku jiných AAL (synergismus, maskování), které mohou měnit kvalitu sensorického vnímání dané sloučeniny [28, 31].

K nejdůležitějším chemickým skupinám, do kterých řadíme četné sloučeniny přítomné v těkavých frakcích sýrů, patří alkoholy, karbonylové sloučeniny, VMK, jejich estery, laktony a sloučeniny síry. Tyto složky nejvíce ovlivňují výsledné aroma sýrů [39]. Podrobný přehled deskriptorů aroma jednotlivých zástupců dále uvedených chemických skupin je uveden v tabulkách viz Příloha 1.

2.5.1 Alkoholy

Dráhy zodpovědné za biosyntézu alkoholů zahrnují metabolismus laktosy a citrátu, katabolismus aminokyselin a degradační reakce některých MK (kyselina linolová a linolenová). Další možností je redukce odpovídajících prekurzorů. Redukcí methylketonů vznikají sekundární alkoholy, hlavně propan-2-ol, butan-2-ol, oktan-2-ol a nonan-2-ol, jež jsou typickými složkami flavouru sýrů s plísní v těstě, stejně jako jejich příslušné karbonyly [13, 41].

Fenolické látky mají při koncentracích blízkých prahu vnímání také pozitivní vliv na aroma sýrů, avšak jejich zvyšující se obsah většinou vede k nepříjemným pachutím. Sensorický popis vůně/aroma těchto látek obvykle používá výrazy jako „sladký, aromatický, karamelový“, resp. až „ostrý, kouřový a spálený“ [41].

2.5.2 Aldehydy

Biosyntéza aldehydů zahrnuje především β -oxidaci nenasycených MK a katabolismus aminokyselin, acetaldehyd vzniká i z pyruvátu při metabolismu laktosy a citrátu. V sýrech se vyskytují pouze přechodně, protože během zrání dochází k jejich rychlé redukci na alkoholy nebo oxidaci na příslušné kyseliny [41, 42].

Aldehydy s přímým řetězcem (butanal, pentanal, hexanal a nonanal) vykazují aroma po čerstvé zelené trávě a bylinách. Při vyšších koncentracích je ale jejich aroma nepříjemné, a proto je přítomnost těchto látek spíše nežádoucí [13, 34].

K nejvýznamnějším aldehydům s rozvětveným řetězcem patří 2-methylpropanal, 2-methylbutanal a 3-methylbutanal. Tvoří se degradací valinu, isoleucinu a leucinu, a kromě jiných deskriptorů lze pro jejich popis použít pojmy jako „nasládlé aroma“ nebo „vůně zelené trávy a sladu“. Hrají také ústřední roli v oříškové příchuti Cheddaru [31, 41, 43, 44].

2.5.3 Ketony

Tyto karbonylové sloučeniny jsou běžnou složkou flavouru nejen sýrů, ale i většiny mléčných výrobků. Mají velmi nízké prahy vnímání, na typickém aroma a chuti sýrů se podílejí hlavně methylketony, diacetyl, acetoin a okt-1-en-3-on [13, 41].

Methylketony lze považovat za klíčové AAL plísňových sýrů. Pocházejí z β -oxidace VMK a vytvářejí ovocné, květinové, popř. při vyšších koncentracích až nepříjemné a zatuchlé aroma [13, 41].

Nejvíce zastoupeným diketonem v sýrech (především u Camembertu, Cheddaru a Emmentalu) je diacetyl (butan-2,3-dion), který je klasicky spojován s metabolismem laktosy a citrátu. Významně přispívá k máslové chuti a sladkému, karamelovému a oříškovému aroma. Jeho redukce poskytuje další aromatické ketony – acetoin (3-hydroxybutan-2-on) a butan-2-on [36, 41, 42, 45].

2.5.4 Karboxylové kyseliny

Jako AAL se uplatňují i karboxylové kyseliny. Jedná se o produkty hydrolytické aktivity lipas při rozkladu mléčného tuku, katabolismu aminokyselin nebo jiných reakcí (hlavně oxidací) příslušných prekurzorů [41].

U VMK s dlouhým řetězcem (> 12 atomů uhlíku) se má za to, že kvůli vysokým prahům vnímání hrají spíše vedlejší roli při tvorbě sýrového aroma. Naproti tomu kyseliny s krátkými a středně dlouhými řetězci mají podstatně nižší prahové hodnoty, ačkoliv v porovnání s jinými AAL jsou tyto limity stále velmi vysoké. S výjimkou kyseliny valerové nemá žádná z kyselin aroma, které by se podobalo vůni sýru. Při vyšších koncentracích a v izolovaném stavu jsou specifické chutě/vůně těchto kyselin (C4:0–C12:0) často popisovány spíše negativně. Nicméně při nízkých koncentracích a ve správné rovnováze s ostatními AAL se významně podílí na žádoucím flavouru mnoha typů sýrů [13, 34, 36].

Intenzita chuti VMK závisí nejen na koncentraci, ale také na jejich distribuci mezi vodnou a tukovou fází, přítomnosti určitých kationtů (např. Na^+ , Ca^{2+}) a dalších faktorech. Významnou roli má i pH, protože pouze protonovaná forma karboxylové kyseliny je těkává a má tedy přínos k sýrovému flavouru. U sýrů s vysokým pH je tak převážná část kyselin ve formě solí, proto je aromatický efekt MK v důsledku neutralizace značně potlačen [13, 31].

MK odvozené od aminokyselin s rozvětveným řetězcem (2-methylbutanová, isomáselná, isovalerová) jsou charakteristické „zpaceným, shnilým a zatuchlým“ pachem, takže při vyšších koncentracích mohou mít škodlivé účinky na výsledné aroma. Naproti tomu kyseliny, které mají na konci uhlovodíkového řetězce navázán aromatický kruh, jsou zodpovědné za ovocné, květinové a další spíše příjemné vůně [28, 36].

2.5.5 Estery

Běžnými těkávými látkami v sýrech jsou estery, které vznikají esterifikací, tedy reakcí MK s krátkými až středně dlouhými uhlovodíkovými řetězci s primárními a sekundárními alkoholy (nejběžněji ethanolem). Jejich typ a koncentrace se mezi jednotlivými odrůdami sýrů značně liší, u některých (např. Cheddar) je jejich přítomnost dokonce až nežádoucí [25, 31, 41].

Převážná část z nich se vyznačuje nízkým prahem vnímání, takže přestože jsou tyto sloučeniny obecně přítomny v nízkých koncentracích, mohou významně přispívat k celkové aromatické rovnováze sýrů. Tu ovlivňují i synergické interakce mezi různými estery, popř. mezi estery a dalšími těkavými sloučeninami i v koncentracích pod prahem vnímání [34].

Většina esterů identifikovaných v sýrech jsou označovány jako „sladké, ovocné a/nebo květinové“. Zejména ethylestery, které se vyskytují ze všech esterů nejčastěji, jsou známy svou důležitou rolí při formování ovocného charakteru. Estery přispívají k celkovému aroma sýrů také tím, že minimalizují ostrost a hořkost způsobenou přítomností určitých VMK a aminů nebo dokáží potlačovat nepříjemné chutě některých methylketonů [34, 41, 46].

Procesu esterifikace se mohou kromě alkoholů účastnit i thioly (hlavně methanthiol) za vzniku odpovídajících thioesterů. S-methylthioestery vykazují charakteristické sýrové aroma, ale také chuťový nádech vařeného kvěťáku, cibule či česneku [13, 34, 37].

2.5.6 Laktony

Přestože aroma těchto cyklických esterů, vznikajících intramolekulární esterifikací hydroxykyselin, není „sýrové“, mohou přispívat k flavouru většiny sýrů. Některé studie uvádějí, že se podílejí na máslovém charakteru sýrů. Při srovnání s jinými AAL mají laktony velmi nízké prahy vnímání. U γ -laktónů jsou tyto limity nižší než u δ -laktónů, laktony s kratším řetězcem mají tyto hodnoty dokonce ještě nižší (např. u γ -oktalaktonu, γ -dekalaktonu a γ -dodekalaktonu se pohybují od 7 do 11 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ – ve vodě). Obecně se γ - a δ -laktony vyznačují velmi výraznými, především ovocnými tóny („broskvový, meruňkový, kokosový“) [13, 34, 41].

2.5.7 Sirné sloučeniny

Mezi další významné látky s nízkými prahy vnímání, které spolu s jinými sloučeninami poskytují velmi žádoucí, silnou hloubku chuti, patří sirné sloučeniny. Pro jejich vznik je klíčová degradace methioninu. K typickým zástupcům této skupiny patří methional, methanthiol a organické sulfidy, které zodpovídají především za vůně vařených brambor, zelí, kvěťáku, cibule a česneku. Mezi sirné sloučeniny patří i thioestery, o kterých bylo pojednáno již v kapitole 2.5.5 [26, 36, 41, 47].

2.5.8 Aromaticky aktivní látky v eidamských sýrech

Eidamské sýry mají ve srovnání s jinými druhy sýrů spíše velmi mírné, až nevýrazné aroma. To je výsledkem rovnováhy mezi látkami, které vznikají při komplexních biochemických dějích v průběhu zrání, na něž má vliv celá řada faktorů. V důsledku odstranění původní mikroflóry mléka během pasterace dozrávají sýry pomaleji a rozvíjí se méně intenzivní flavour než u sýrů ze syrového mléka [5, 48]. Navíc je výrazně inaktivována i lipoproteinová lipasa, která by jinak přispívala k rozsáhlé lipolýze, a tak tvorbě prekurzorů dalších AAL. Obecně bakterie používané při výrobě eidamských sýrů postrádají enzymatické systémy pro rozsáhlý rozklad tuků a VMK, proto je lipolýza u těchto sýrů odlišná a méně výrazná, i když její vliv není zanedbatelný [32, 49]. Dominantní cestou produkce těkavých AAL je zde katabolická konverze aminokyselin uvolněných při proteolýze mléčných bílkovin [5]. Ke klíčovým AAL, které bývají u eidamských sýrů nejčastěji identifikovány ve významných koncentracích, patří 2-methylpropanal, 2- a 3-methylbutanal, popř. od nich

odvozené alkoholy nebo kyseliny, dále hexanal, methanthiol, dimethylsulfid a dimethyltrisulfid, diacetyl, kyselina octová, kyselina máselná a ethyl-butyrát, δ -dekalakton a D-limonen [32, 49].

Sloučeniny 2-methylpropanal, 2-methylbutanal a 3-methylbutanal, které vznikají jako produkty degradace aminokyselin s rozvětvenými řetězci, jsou spojovány s vůní zeleně a sladu, ale v nižších koncentracích přispívají k příjemným ovocným tónům [28, 43]. Redukcí se z nich tvoří alkoholy (2-methylpropan-1-ol, 2-methylbutan-1-ol a 3-methylbutan-1-ol), které mají vliv na ovocné a alkoholové aroma, naopak jejich kyseliny (isomáselná, 2-methylmáselná a isovalerová) jsou zodpovědné za „zpacené, fekální, hnilobné“ a další nepříjemné pachy [48]. Hexanal, aldehyd s přímým řetězcem charakteristický především vůní zelené trávy a bylin, vzniká pravděpodobně při β -oxidaci nenasycených MK [41]. Odbouráváním sírných aminokyselin, především methioninu, je produkován methanthiol, který může být následně oxidován enzymaticky či chemicky za vzniku organických sulfidů, u Edamu hlavně již zmíněného dimethylsulfidu a dimethyltrisulfidu. Tyto sloučeniny síry bývají spojovány, jak již bylo zmíněno, s výrazným aroma zelí, cibule, česneku nebo kvěťáku [28, 36].

Diacetyl (butan-2,3-dion) je jedním z nejdůležitějších diketonů a zároveň klíčovou AAL holandských sýrů. Tato látka vzniká převážně z pyruvátu pocházejícího z metabolismu laktosy a citrátu, zejména díky aktivitě citrát-pozitivních bakterií mléčného kvašení, a je oceňována pro své máslové, ořechové a karamelové aroma [41, 45, 50]. Diacetyl může být dále redukován na acetoin (3-hydroxybutan-2-on), který má také máslovou, karamelovou, ale i květinovou vůni. Redukce může dále pokračovat až na dvojsytný alkohol, butan-2,3-diol, pro jehož popis lze použít deskriptory jako „ovocný, máslový, ořechový nebo pach kyselého mléka“ [36, 44, 45, 48, 51].

Typickým ostrým, kyselým zápachem se vyznačuje kyselina octová, která je výsledkem metabolismu citrátu, kyseliny mléčné, katabolismu alaninu, serinu nebo threoninu [42, 47, 51]. Kyselina máselná je spojována s velmi nepříjemným zápachem, obvykle popisovaným výrazy jako „zpacený, fekální, hnilobný, zatuchlý“ a mnohé další. V nižších koncentracích je však klíčovou složkou sýrového aroma a současně převládající VMK v sýrech eidamského typu [32, 33, 52, 53]. Proto je v těchto sýrech podle očekávání nejvíce zastoupeným esterem ethyl-butyrát, který je charakteristický svou květinovou, sladkou a ovocnou vůní [32, 45, 54].

δ -dekalakton, který se jako všechny laktony tvoří intramolekulární esterifikací hydroxykyselin, se vyznačuje nejen sladkým, květinovým nebo ovocným aroma připomínajícím např. broskve, ale také je často spojován s kokosovou vůní [41, 51, 55].

K ostatním sloučeninám patří cyklický terpen D-limonen, který se do mléka a následně do sýru dostává jako součást stravy dojníc. Pro jeho popis se používají deskriptory jako „mátová, zelená tráva“ [32, 51].

2.6 Stanovení mastných kyselin a aromaticky aktivních látek

Hlavní náplň této práce tvoří stanovení AAL a MK jako markerů průběhu zrání eidamských sýrů. V obou případech je nejprve nezbytná jejich izolace z matrice sýra a příp. některé další kroky (viz dále) v rámci přípravy vzorku k analýze, analytickou koncovku prakticky vždy tvoří plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem nebo hmotnostní spektrometrií.

2.6.1 Izolace lipidů z matrice sýrů

Dominantní technikou pro rutinní kvantitativní stanovení MK nejen v sýrech, ale i v jiných potravinách, je plynová chromatografie převážně ve spojení s plamenově ionizačním detektorem (GC-FID). Před samotnou analýzou je nutné lipidy nejprve ze vzorku vyextrahovat a následně převést na vhodné těkavé deriváty, obvykle methylestery (MEMK) [13, 56].

Podmínky extrakce se volí především podle složitosti matrice. U sýrů mohou být lipidy poměrně silně navázány na proteinech, navíc mléčný tuk obsahuje jak MK s krátkým řetězcem, které jsou rozpuštěny ve vodné fázi, tak i vyšší MK, nacházející se hlavně v tukové fázi, proto je výběr vhodné metody pro kvantitativní izolaci z obou fází poněkud obtížnější. Nejběžnějším postupem extrakce je použití vhodného organického rozpouštědla [13, 34].

Možným provedením je více než 100 let stará, ověřená, značně rozšířená a především jednoduchá metoda kontinuální extrakce podle Soxhleta, která byla původně navržena k extrakci tuku z mléka. Páry rozpouštědla umístěného ve varné baňce stoupají do chladiče, kde kondenzují, stékají do extrakční komory, a tak přicházejí do kontaktu se vzorkem v extrakční patroně. Následně se využívá tzv. sifonového efektu, čímž dochází k recirkulaci rozpouštědla. Po ukončení procesu se rozpouštědlo od vyextrahovaných látek oddělí destilací. Časová náročnost, velké množství extrahovatelného materiálu a rozklad termolabilních látek jsou hlavními nevýhodami, se kterými se u této metody setkáváme. Většina modifikací konvenční Soxhletovy extrakce (využití vysokého tlaku, mikrovln, ultrazvuku aj.), navržených v posledních desetiletích, byla zaměřena na to, aby se Soxhlet přiblížil novějším technologiím pro přípravu pevných vzorků, ke zkrácení doby extrakce, snížení spotřeby rozpouštědel a automatizaci odsávací sestavy [57, 58].

Jinou možností je extrakce podle Folche využívající směs rozpouštědel chloroform-methanol s následnou homogenizací vzorku za studena. Pro odstranění nerozpustných podílů ze suspenze lze využít centrifugaci nebo filtraci, rozpouštědlo je poté oddestilováno na vakuové odparce [59].

Pro solventní extrakci se mohou používat ale i jiná rozpouštědla nebo jejich směsi. Ze studií zaměřených na sýry je možné uvést v dnešní době běžně používanou metodu De Jonga a Badingse [60], později uplatněnou např. Mannionem a kol. [61], kdy se ke vzorku sýra přidá bezvodý síran sodný a kyselina sírová a extrakce MK se následně provádí směsí diethyletheru a heptanu. Kim Ha a Lindsay [62] do směsi místo heptanu použili hexan, Partidário a kol. [63] petrolether.

V případě stanovení VMK je vhodné tyto složky z extraktu izolovat od TAG, fosfolipidů a dalších lipidických látek, aniž by docházelo k hydrolýze esterových vazeb přítomných

esterů. K tomuto účelu byly navrženy např. různé adsorpční metody, mezi nimi tenkovrstvá chromatografie (TLC) nebo extrakce na pevné fázi (SPE) [34, 64].

Selektivní zadržování skupiny látek na pevné fázi ve formě sloupce nebo membrány v malé kolonce je pro svou univerzálnost a jednoduchost rozšířenou separační metodou. V rámci stanovení MK našla SPE uplatnění hlavně při frakcionaci různých lipidických tříd, izolaci VMK pro jejich následnou derivatizaci či přímou separaci. Výběr vhodného adsorbentu a elučního činidla závisí v první řadě na složení vzorku [65].

V již zmíněné práci De Jonga a Badingse [60] používají autoři aminopropyl-SPE kolonky, přičemž vycházejí z práce Kaluznyho a kol. [66]. Z dalších využití těchto kolonek při analýze mléčných výrobků lze uvést práce např. Chavarriho a kol. [67], Voigta a kol. [68], Kilcawleye a kol. [69] nebo Manniona a kol. [61].

Těkavé MK lze od ostatních lipidů také oddestilovat. Již v roce 1974 Dulley a Grieve [70] publikovali studii, v níž popisují metodu využívající k tomuto účelu parní destilaci. Kim Ha a Lindsay [62] popsali eluci extrahovaných MK adsorbovaných na oxidu hlinitém kyselinou mravenčí v diisopropyletheru za současné destilační extrakce, za účelem oddělení nižších MK od vyšších.

2.6.2 Derivatizace mastných kyselin

Plynová chromatografie (GC) je analytická metoda separující těkavé látky, takže je potřeba vyizolované MK převést na těkavější specifické deriváty. Navíc MK jsou vysoce polární sloučeniny, které mají tendenci vytvářet vodíkové vazby, což může vést k ovlivnění adsorpce. Snížení jejich polarit je tak pro analýzu příznivější. Vhodným derivatizačním postupem je tvorba esterů, obvykle MEMK, které nabízí výbornou stabilitu, nejvyšší těkavost, reakce s nejvyššími reakčními rychlostmi a vysokými výtěžky. I když zvyšování molekulové hmotnosti alkoholu vyžaduje delší reakční doby, pro specifické účely mohou být vhodnější jiné typy esterů, např. Kim Ha a Lindsay [62] stanovovali těkavé VMK v Parmezánu ve formě butylesterů. V zásadě může být použita jakákoliv alkoholická složka, ale v praxi se výběr omezuje na alkoholy, které mohou být z reakčního prostředí vyloučeny selektivním odparem (tj. methanol až po cca pentanol). Stejně jako u jiných analýz neexistuje ani zde jednotný postup využitelný pro všechny typy vzorků. Mezi základní a nejpoužívanější metody derivatizace MK patří kyselá katalyzovaná esterifikace a kyselá nebo bazická katalyzovaná transesterifikace [56, 71].

Metoda využívající kyselý katalyzátor je vhodná pro derivatizaci volných i esterově vázaných MK, v případě sýrů převážně v rámci TAG. VMK jsou tak na estery převáděny esterifikací, u vázaných dochází k tzv. transesterifikaci. Vzhledem k tomu, že všechny kroky u obou procesů jsou reverzibilní, je k posunutí rovnováhy ve směru tvorby produktu nutný velký nadbytek alkoholu. Přítomnost vody, jakožto silnějšího donoru elektronů než alifatické alkoholy, má při tvorbě esterů také negativní efekt. Kritickým bodem je volba vhodného kyselého katalyzátoru, který by měl usnadnit reakci bez nežádoucích vedlejších účinků [64, 71].

Nejčastěji používaným činidlem pro přípravu MEMK je 5% bezvodý chlorovodík v methanolu. Jedná se o relativně mírné reakční činidlo poskytující téměř kvantitativní výtěžky, které se vyrábí probubláváním bezvodého methanolu chlorovodíkem nebo

z acetaldehydu a methanolu. Nicméně tento bezvodý katalyzátor není příliš stabilní, protože HCl reaguje nukleofilně s methanolem za vzniku chlormethanu a vody, v důsledku čehož se koncentrace chlorovodíku během skladování snižuje a vzniklá voda může negativně ovlivňovat samotný proces. Tímto problémem se zabývali Ichihara a Fukubayashi [64], kteří představili alternativní reakční činidlo vhodné pro methanolýzu snadno připravitelné v laboratoři smícháním běžných chemikálií, jako jsou koncentrovaná kyselina chlorovodíková, methanol a toluen. Výťažky MEMK získané použitím této směsi byly téměř shodné s výťažky obvyklých metod využívající kyselé nebo bazické katalyzátory [64, 71].

I když se v některých případech používají mnohem vyšší koncentrace, 1–2% roztok kyseliny sírové v methanolu má téměř identické vlastnosti jako 5% methanolickej chlorovodík a je velmi snadné jej připravit. Dlouhá doba zpětného toku, nadměrná koncentrace kyseliny nebo vysoká teplota však vedou k tvorbě barevných vedlejších produktů a degradaci polynenasycených MK. Hlavní nevýhodou všech výše uvedených katalyzátorů je poměrně dlouhý čas refluxu k dosažení úplné konverze [56, 63].

Naproti tomu použití bortrifluoridu, ve formě koordinačního komplexu s methanolem, vede ke značnému zkrácení doby procesu, takže se tento katalyzátor již řadu let využívá i přes značnou toxicitu a omezenou skladovatelnost. Některé studie navíc upozorňují na tvorbu methoxy artefaktů z nenasycených MK při použití tohoto činidla o vyšší koncentraci (50 % hm.) nebo na významné ztráty při použití vzorků menších než 200 mg. I přes uvedené nevýhody našel tento katalyzátor uplatnění v řadě prací, nejen na téma mléčných výrobků, pro představu např. Partidário a kol. [63], Hauff a Vetter [72] nebo Lashkari a Jensen [73] a používá se i v oficiální AOAC metodě stanovení mastných kyselin – 996.06 (2005). Jistý potenciál mají i jiné Lewisovy kyseliny (chlorid hlinitý, bortrichlorid a další) [61, 64, 71].

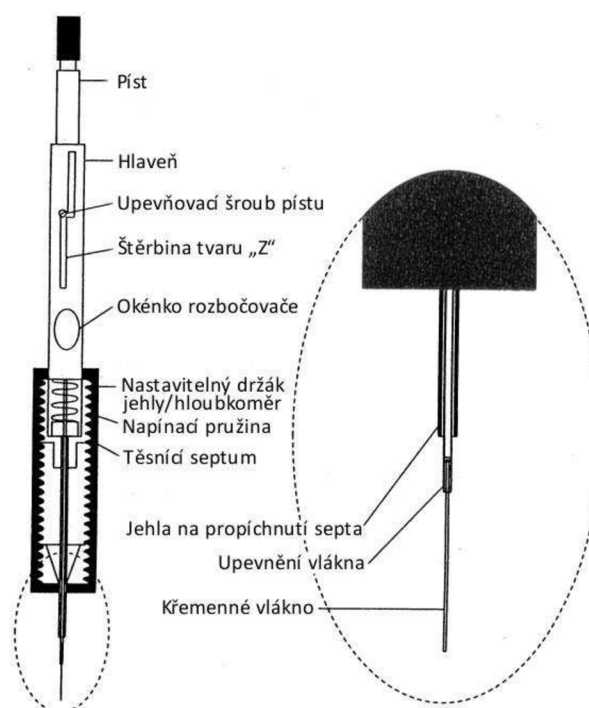
Pro tvorbu těkavých derivátů z esterově vázaných MK je možné aplikovat také bazicky katalyzovanou transesterifikaci. Aby k výměně alkoholové části esteru kvantitativně došlo, je stejně jako u kyselě katalyzované reakce potřeba nadbytek alkoholu. Rovnováha rozpadu aniontového meziprojektu vzniklého z esteru v přítomnosti báze, jako je alkoholátový aniont, je tedy posunuta ke vzniku požadovaného produktu. I při této reakci má voda nepříznivý vliv na její průběh, protože meziprojekt nevratně disperguje na volnou kyselinu. Výhodou využití báze je mnohem rychlejší průběh i při mírných teplotních podmínkách, avšak nelze je aplikovat na esterifikaci VMK. Základními transesterifikačními činidly jsou methoxid sodný nebo draselný v bezvodém methanolu. Aplikace kvartérních amoniových hydroxidů (tetramethylamoniumhydroxidu aj.) vede k tvorbě kvartérních amoniových solí MK, jejichž pyrolýza produkuje žádoucí MEMK [61, 64, 71].

2.6.3 Izolace aromaticky aktivních látek z matrice sýrů

Přestože v dnešní době máme k dispozici nejmodernější separační a detekční metody, převážná většina z nich neumožňuje přímé stanovení některých analytů ve vzorcích potravin bez nutnosti je nejprve z komplexní matrice izolovat a zakoncentrovat. Právě volba metody přípravy vzorku výrazně ovlivňuje spolehlivost a přesnost analýzy. Nejinak je tomu i u AAL, pro jejichž kvalitativní a kvantitativní stanovení se obvykle používá plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) [74–76].

Za účelem dosažení praktické a spolehlivé izolace těchto těkavých sloučenin z matric vzorků heterogenní povahy bylo vyvinuto několik metod (destilace vodní parou, vakuová destilace, simultánní destilace-extrakce, superkritická fluidní extrakce aj.), avšak u většiny z nich se jedná o vícekové postupy náchylné ke ztrátě analytů. Obecně každý další krok v analytickém postupu zvyšuje pravděpodobnost vzniku analytické chyby, je tedy proto žádoucí minimalizovat počet kroků při přípravě vzorku bez snížení kvality analýzy. Relativně novou technikou, při které lze právě extrakce a zakoncentrování analytů dosáhnout v jediném kroku, je mikroextrakce na pevné fázi (SPME) [18, 74, 75].

Tato technika byla poprvé navržena a uvedena do praxe Januszem Pawliszynem a jeho týmem v roce 1990 [77]. Konstrukčně je SPME velmi jednoduché zařízení podobné injekční stříkačce (Obrázek 4), kde nejdůležitější část tvoří samotné vlákno z taveného oxidu křemičitého, na kterém je imobilizována vhodná stacionární fáze [75].



Obrázek 4: Schéma SPME vlákna (upraveno podle: 74)

Princip extrakce požadovaných sloučenin pomocí SPME je založen na rovnovážném procesu fyzikálně-chemické adsorpce sloučenin na exponovaném povrchu vlákna s následnou tepelnou desorcí v injektoru plynového chromatografu [40, 75].

V závislosti na vlastnostech analytů a matrice vzorku se na základě polohy vlákna rozlišují dva nejběžnější módy: přímá (DI-SPME) a headspace extrakce (HS-SPME). U přímé extrakce je SPME vlákno ponořeno přímo do kapalného vzorku, tudíž je vhodná především pro polární a netěkavé sloučeniny. Pro stanovení těkavých a tepelně labilních látek se spíše používá druhý způsob, kdy je vlákno zasunuto v tzv. headspace prostoru (plynná fáze nad kapalným nebo pevným vzorkem), což vzhledem k tomu, že vlákno není v přímém kontaktu se vzorkem, zaručuje jeho delší životnost. V určitých případech se může využívat i modifikace v podobě nepřímé extrakce přes selektivní membránovou bariéru, kdy nejprve musí sloučeniny difundovat membránou a až teprve poté následuje adsorpce na stacionární film, čímž se

proces stává mnohem pomalejší v porovnání s již zmíněnými způsoby. Díky ochranné funkci membrány je životnost vlákna stejně jako u headspace extrakce delší, avšak na rozdíl od ní umožňuje izolovat i málo těkavé sloučeniny [18, 74–76].

Použití SPME poskytuje řadu výhod, mezi něž patří spolehlivost, nízká náročnost, zkrácení doby analýzy a v neposlední řadě snížení nákladů, především kvůli nepotřebnosti organických rozpouštědel a relativně dlouhé životnosti vlákna. Jistá univerzálnost a dostatečná citlivost SPME umožňuje její úspěšné použití pro širokou škálu sloučenin a to i při stopové analýze, navíc ji lze aplikovat na vzorky o velmi malých objemech nebo komplexní heterogenní matrice. Z konstrukčního provedení je výhodné její přímé spojení s GC a možnost automatizace procesu. Na druhou stranu jako každá metoda má i SPME své nevýhody, k nimž patří náročnější optimalizace nebo nízká mechanická odolnost samotného vlákna. Vzhledem k tomu, že se nejedná o kvantitativní extrakci, ale o rovnovážný proces, je nezbytné co nejpřesněji dodržovat jednotlivé experimentální podmínky, jinak by docházelo k podstatnému zhoršení reprodukovatelnosti celé metody [18, 74, 78–82].

Mezi parametry, které je třeba zohlednit a tím ovlivnit selektivitu, efektivitu, rychlost, citlivost a další vlastnosti metody, patří: typ a tloušťka stacionární fáze, teplota, doba a způsob extrakce, pH, míchání, vlastnosti analytů (afinita ke stacionární fázi, těkavost aj.), vlastnosti matrice vzorků (obsah solí, lipidů, organických rozpouštědel, vlhkost aj.), desorpční podmínky (hloubka expozice jehly v injektoru, teplota a doba desorpce aj.), derivatizace atd. [18, 74, 75, 78, 82].

V dnešní době je použití SPME pro rozbor AAL v potravinách velmi rozšířenou technikou, což dokazuje i velké množství uveřejněných publikací na toto téma. Ze studií zabývajících se popisem AAL/flavouru různých druhů sýrů s využitím právě této metody lze uvést např. práci Mondella a kol. [83], kteří při analýze kozích sýrů srovnávali vlákna s různými stacionárními fázemi: 50/30 μm divinylbenzen/carboxen/polydimethylsiloxan, 100 μm polydimethylsiloxan, 75 μm carboxen/polydimethylsiloxan, 85 μm polyakrylát a 70 μm carboxen/divinylbenzen. Vlákno 75 μm carboxen/polydimethylsiloxan bylo použito i při studii tavených sýrů Bertrandem a kol. [52] nebo L. Nataghi [80] na vzorky sýru Cheddar. Pro účely stanovení AAL je ale nejvíce používáno trojfázové SPME vlákno 50/30 μm divinylbenzen/carboxen/polydimethylsiloxan. Uplatněno bylo např. při rozboru těkavých sloučenin brynzý Sádeckou a kol. [55], Cheddaru v práci Hou a kol. [44] polotvrdého ovčího sýra Goméz-Torresem a kol. [42], Goudy v práci Yarlagarddy a kol. [84] nebo Jo a kol. [32].

2.6.4 Plynová chromatografie

Techniky používané ke stanovení těkavých sloučenin bez ohledu na to, jaká metoda byla použita pro jejich získání, jsou převážně založeny na separaci pomocí GC s vysokým rozlišením v kombinaci s vhodným detektorem [39].

GC je jednoduchá a rychlá analytická metoda poskytující vysokou separační účinnost. Prakticky jediným požadavkem na analyty je, aby byly těkavé nebo polotěkavé a co možná nejvíce tepelně stabilní. Pro odpaření polárních molekul je kvůli silným intramolekulárním silám zapotřebí vysokých teplot, které však na koloně způsobují jejich rozklad. Z tohoto důvodu nemohou být malé, vysoce polární sloučeniny stanoveny pomocí GC. Možným

řešením je použití chemických derivatizačních postupů, při kterých se polární skupiny cílových molekul převádějí na méně polární části, což příznivě ovlivňuje tlak par a adsorpční charakteristiky. Derivatizaci lze využít i pro zvýšení těkavosti jinak netěkavých sloučenin [85, 86].

Dělení složek směsi probíhá v chromatografické koloně, kde analyty unášené nosným plynem (mobilní fáze) v závislosti na jejich afinitě interagují se stacionární fází, čímž dochází u jednotlivých složek k různému zdržení při pohybu kolonou a tím k jejich separaci [46].

V minulosti se analýzy prováděly na náplňových GC kolonách, dnes už se však kvůli vyšší účinnosti používají výhradně kapilární kolony z taveného křemene potažené vrstvou polyamidu pro zvýšení jejich pružnosti. Volba stacionární fáze (obvykle na bázi polysiloxanů), nanesené na vnitřní straně kapiláry, závisí hlavně na charakteru vzorku [46, 86, 87].

Většina vzorků pro analýzu GC sestává z purifikovaného rozpouštědla obsahujícího analyty, které jsou předmětem zájmu. Takový typ vzorku se do injektoru chromatografu zavádí pomocí mikrodávkače, který bývá obvykle součástí autosampleru. Nejstarší a nejčastěji používanou konvekční injekční technikou pro kapilární kolony je uplatnění vyhřívaného injektoru umožňujícího jak bezděličové dávkování (splitless), tak dávkování s dělením toku nosného plynu (split). Při těchto režimech isotermického vstřikování se volí teplota dostatečně vysoká, aby odpařila rozpouštědlo i všechny analyty. Výběr vhodného režimu je ovlivněn koncentrací. Při dávkování s dělením toku jen malá část analytů s rozpouštědlem odpařená do proudu mobilní fáze směřuje na kolonu plynového chromatografu, proto se tento režim používá u poměrně koncentrovaných vzorků, aby nedocházelo k zahlcení stacionární fáze. Naproti tomu režim splitless je doporučován pro stopovou analýzu. Mezi další možnosti dávkování je užití injektoru s programovatelnou teplotou, který se zahřívá až po nadávkování vzorku a je vhodný pro směs sloučenin s širokým rozsahem bodu varu nebo pro tepelně labilnější látky [86, 88].

Analyty izolované metodou SPME jsou z vlákna vloženého přes septum přímo do prostoru injektoru tepelně desorbovány a unášeny nosným plynem na kolonu [75, 85].

Mobilní fázi tvoří inertní plyn, nejčastěji helium, dusík, popř. vodík a argon. Jeho čistota musí být dostatečně vysoká, aby se maximalizovala životnost kolony a zabránilo se tvorbě šumu při detekci, proto před vstupem na kolonu prochází odlučovačem vlhkosti, nečistot a ostatních plynů. Moderní plynové chromatografy jsou vybaveny elektronickými regulátory průtoku, aby byl zajištěn stabilní a reprodukovatelný proud mobilní fáze [86].

Po výběru vhodné stacionární fáze je nejkritičtější krokem volba teploty kolony pro separaci všech analytů. Možnosti zahrnují isotermický průběh, kdy je kolona vyhřívána konstantní teplotou po celou dobu analýzy a je tedy vhodný pro vzorky obsahující jen několik látek, které jsou si podobné polaritou a teplotou varu. K oddělení všech složek směsi vzorku obsahující mnoho sloučenin s širokým rozmezím bodu varu je nezbytné programované vyhřívání, kdy je teplota zvyšována postupně, a to různou rychlostí [86].

K dalším faktorům ovlivňujícím výkon systému GC patří již zmíněné módy dávkování vzorku, délka kolony a tloušťka stacionární fáze, průtok a druh nosného plynu a mnohé další parametry [46].

GC pro následnou identifikaci a kvantifikaci těkavých sloučenin disponuje řadou univerzálních či selektivních detektorů, nebo ji lze propojit s jinými analytickými metodami [85].

2.6.4.1 Plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem

Pro stanovení MK, resp. jejich esterů, se nejběžněji používá plamenově ionizační detektor (FID), který kombinuje výhody nízké ceny, univerzálnosti, citlivosti a širokého lineárního rozsahu, takže je vhodný jak pro kvalitativní, tak kvantitativní analýzu. Ke vzniku plamene v tomto destruktivním detektoru je vyžadován přívod směsi vodíku, sloužícího jako palivo, a vzduchu, který se uplatňuje jako oxidovadlo. Analyty eluované z kolony jsou přiváděny do plamene, kde dochází k jejich ionizaci, a tedy zvýšení počtu iontů a elektronů v prostoru detektoru. Mezi tryskou hořáku a protilehlou elektrodou, na které je aplikováno napětí, prochází v důsledku nárůstu vodivosti prostředí elektrický proud, přičemž velikost zaznamenaného signálu závisí na typu a koncentraci detekovaných látek [39, 46, 86].

2.6.4.2 Plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem

Hmotnostní spektrometrie (MS) je dalším silným univerzálním nástrojem plynové chromatografie pro kvantitativní i kvalitativní analýzu a přidává specifickou výhodu identifikace oddělených sloučenin pomocí jejich fragmentační struktury. Využití komplementárních knihoven tisíců referenčních spekter přispívá k významné užitečnosti techniky GC-MS při analýze složitějších směsí organických sloučenin, např. AAL [39, 89].

Technické řešení spojení tlakově nekompatibilních metod GC a MS přímým zavedením křemenné kapiláry do prostoru iontového zdroje bylo umožněno především vývojem kapilárních kolon a konstrukcí výkonných čerpacích zařízení [89].

Pro ionizaci plynné fáze eluované z kolony plynového chromatografu se standardně využívá univerzální metoda elektronové ionizace (EI). Ze žhavené katody jsou směrem k protilehlé anodě do prostoru, kam je přiváděn eluát, emitovány a urychlovány elektrony o kinetické energii 70 eV. Přiblížení těchto subatomárních částic má za následek uvolnění valenčního elektronu z molekuly organické sloučeniny, čímž vzniká molekulový iont s kladným nábojem. Příliš velký přebytek vnitřní energie těchto iontů se projeví jejich následnou fragmentací za produkce fragmentových iontů, které v hmotnostním spektrometru představují více či méně specifický „otisk prstu“ analyzované sloučeniny. U některých molekul je však interpretace omezena, protože jejich molekulové ionty jsou tak energetické, že jejich hmotnostní spektra nevykazují tzv. molekulový pík, ale jen píky příslušných fragmentů. Většina organických molekul má ionizační potenciál přibližně 10 eV, maximální fragmentace probíhá okolo 30 eV. Použití elektronů s energií 70 eV je konvence, která zajišťuje, že EI spektra sloučenin budou stejná i pokud se naměří na různých přístrojích. Tato reprodukovatelnost umožňuje vytvářet hromadné databáze hmotnostních spekter a jejich používání při kvalitativních analýzách. Produkty této tvrdé ionizační techniky jsou z iontového zdroje vypuzeny a urychleny vytěšňovací elektrodou k hmotnostnímu analyzátoru [85, 90].

I když dnes máme k dispozici různé další možnosti separace iontů na základě poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z), stále jsou nejpoužívanějšími hmotnostními spektrometry u GC systémy využívající kvadrupólové analyzátory. Princip kvadrupólového analyzátoru byl

poprvé popsán Wolfgangem Paulem a jeho kolegy na počátku 50. let 20. století [91]. Konstrukci tvoří čtyři stejné kovové tyče, kdy na dvě protilehlé je vloženo kladné stejnosměrné napětí a na zbývající dvě negativní, přičemž polarity těchto tyčí se střídavě mění. Zároveň je na všechny tyče superponováno vysokofrekvenční střídavé napětí. Ionty urychlené z iontového zdroje k detektoru při průletu prostorem kvadrupólu začnou v důsledku přítomnosti vzniklého elektrického pole oscilovat mezi tyčemi. Na stabilní trajektorii se však v daný časový okamžik pohybují jen ionty určitého m/z , které na rozdíl od ostatních iontů procházejí analyzátozem a dopadají na detektor. Plynulou změnou hodnot stejnosměrného napětí a amplitudy radiofrekvenčního napětí, tzv. skenováním, mohou být postupně propouštěny ionty všech poměrů m/z [46, 85, 90].

Jakmile ionty opustí analyzátoz, narážejí na povrch detektoru, který generuje kaskádu elektronů a zaznamenává se signál, jehož intenzita je přímo úměrná množství dopadajících iontů se specifickým poměrem m/z [90].

Aby ionty na dráze z iontového zdroje přes analyzátoz do detektoru nekolidovaly s žádnou jinou částicí, která by mohla způsobit změnu jejich trajektorie, je zapotřebí hmotnostní spektrometr provozovat při velmi nízkých tlacích. Pro udržení tlaku na požadované provozní úrovni musí vakuový systém v rámci GC-MS odvádět i relativně značné množství mobilní fáze, které je do hmotnostního spektrometru plynule přiváděno z plynového chromatografu [90, 92].

V rámci problematiky AAL je GC-MS velmi užitečnou metodou pro jejich identifikaci a kvantifikaci, ale neumožňuje zjistit, zda je daná těkavá látka skutečně aromaticky aktivní či nikoliv, tj. zda vykazuje nějakou vůni/pach. Ideální variantou je tuto techniku kombinovat s olfaktometrickým detektorem, kdy operátor současně provádí i kontinuální čichovou analýzu s individuálním senzorickým popisem pro charakterizaci aroma. Vzhledem ke vzájemnému ovlivňování jednotlivých sloučenin (antagonismus/synergismus) však ani toto spojení nedává přesnou představu o příspěvku jednotlivých těkavých sloučenin k celkovému flavouru [41, 46].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Laboratorní vybavení

3.1.1 Přístroje

- Plynový chromatograf TRACE™ GC 2000 (ThermoQuest Italia S. p. A, Itálie) s plamenově-ionizačním detektorem
- Plynový chromatograf TRACE™ 1310 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Hmotnostní detektor ISQ™ LT Single Quadrupole (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Knihovna spekter NIST/EPA/NIH, Verze 2.0 (Gaithersburg, Maryland, USA)
- Analytické digitální váhy GR-202-EC, HELAGO, Itálie
- Vodní lázeň se stojany, Julabo TW 2, Německo
- Topné hnízdo 100 ml, Brněnská Drutěva v. d., Česká republika
- Vakuová rotační odparka, KIKA®-WERKE-RVO6-ML, Německo
- Počítač PC, Intel Pentium Procesor
- Lednice s mrazákem ERB nerez, Elektrolux, Švédsko

3.1.2 Plyny

- Helium 4.8 v tlakové láhvi s redukčním ventilem (SIAD, Česká republika)
- Dusík 5.0 v tlakové láhvi s redukčním ventilem a kovovou membránou (SIAD, Česká republika)
- Vodík 5.5 v tlakové láhvi s redukčním ventilem (SIAD, Česká republika)
- Vzduch 5.0 v tlakové láhvi s redukčním ventilem pro kyslík (SIAD, Česká republika)

3.1.3 Pracovní pomůcky

- SPME vlákno DVB/CAR/PDMS 50/30 µm (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA)
- Vialky (objem 10 ml) se šroubovacím magnetickým uzávěrem
- Automatická mikropipeta 100-1000 µl, labopette®, Německo
- Běžné laboratorní sklo a pomůcky
- Nůž, struhadlo
- Vialky

3.1.4 Chemikálie

- Kyselina chlorovodíková 35 % p. a., PENTA, Česká republika
- Ethanol 96 % p. a., Lach-Ner, Česká republika
- Diethylether p. a., Lach-Ner, Česká republika
- Petrolether p. a., PENTA, Česká republika
- Hydroxid sodný p. a., Lach-Ner, Česká republika
- Methanol p. a., Lach-Ner, Česká republika
- Bortri fluorid (methanolický roztok 10 %), p. a., SIGMA-ALDRICH, Německo
- Isooktan p. a., PENTA, Česká republika
- Chlorid sodný p. a., Lach-Ner, Česká republika
- Síran sodný (bezvodý) p. a., Lar-Ner, Česká republika

- Hexan p. a., Lach-ner, Česká republika
- Směsný standard methylesterů mastných kyselin, Supelco™ 37 Component FAME Mix, SIGMA-ALDRICH, Německo

3.2 Čisté mlékařské kultury

Pro výrobu modelových sýrů eidamského typu byly použity komerčně dostupné lyofilizované kultury vhodné k přímému zaočkování do mléka (Laktoflora[®], Milcom, Česká republika); CCDM (Česká sbírka mlékárenských mikroorganismů).

- Mezofilní směsná kultura *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*
- *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (kmen CCDM 946)
- *Lactobacillus casei* (kmen CCDM 198)
- *Lactobacillus casei* (kmen CCDM 422)
- *Lactobacillus plantarum* (kmen CCDM 187)
- *Lactobacillus plantarum* (kmen CCDM 189)

3.3 Analyzované vzorky

V experimentální části diplomové práce byly analyzovány modelové vzorky přírodních sýrů eidamského typu (45 % tvs., 50 % sušiny), které byly vyrobeny standardním technologickým postupem [7] během srpna–října 2018 na Univerzitě Tomáši Bati ve Zlíně.

Celkem bylo vyrobeno 5 sérií vzorků, které se lišily kombinací použitých mikrobiálních kultur; u všech byla jako základ použita mezofilní kultura s přídavkem vybraného kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, a dále vybrané kmeny *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus plantarum* (viz Tabulka 4).

U každé série byl odebrán vzorek po 14, 28 a 56 dnech zrání (přehled všech analyzovaných vzorků viz Tabulka 5). Vzorky byly ihned po odběru zmrazeny (−18 °C) a uchovány při těchto podmínkách až do doby analýzy.

Tabulka 4: Přehled a kódování modelových vzorků (použité kultury)

Označení vzorku	CCDM použitých kmenů	
D	946	–
G	946	422
H	946	187
I	946	189
J	946	198

CCDM (Česká sbírka mlékárenských mikroorganismů)

Tabulka 5: Seznam a kódování všech analyzovaných vzorků

Vzorek	Počet dnů zrání	Označení vzorku
D	14	D14
D	28	D28
D	56	D56
G	14	G14
G	28	G28
G	56	G56
H	14	H14
H	28	H28
H	56	H56
I	14	I14
I	28	I28
I	56	I56
J	14	J14
J	28	J28
J	56	J56

3.4 Použité metody pro stanovení mastných kyselin

Pro identifikaci a kvantifikaci volných a esterově vázaných MK v modelových vzorcích sýrů byly MK ve vyzolovaném tuku nejprve převedeny esterifikací na MEMK a následně podrobeny analýze pomocí GC-FID.

3.4.1 Extrakce lipidů ze vzorku sýra

Extrakce lipidů ze vzorku sýra byla provedena podle normy ČSN EN ISO 1735:2005. Na analytických vahách byl s přesností na 4 desetinná místa odvážen do zkumavky 1 g rozmraženého, jemně nastrouhaného vzorku sýra (Obrázek 5a). Po přidavku 5 ml kyseliny chlorovodíkové byla zkumavka vložena do vodní lázně o teplotě 80 °C (Obrázek 5b), kde byla ponechána do doby, než došlo ke změně zbarvení roztoku (Obrázek 5c) na fialovou (přibližně 10 minut). Po ochlazení pod tekoucí vodou byla směs pomocí 5 ml ethanolu kvantitativně převedena do dělicí nálevky. V prvním kroku bylo ke směsi v dělicí nálevce přidáno 9 ml diethyletheru, v druhém kroku 9 ml petroletheru a pokaždé byla směs po přidavku extrakčního činidla protřepávána po dobu asi 1 minuty. Pro oddělení fází se roztok nechal odstát po dobu 30 minut při laboratorních podmínkách (Obrázek 5d). Do předem zvážené destilační baňky byla opatrně odebrána horní vrstva a pro dolní vrstvu byl proces extrakce následně ještě dvakrát zopakován stejným způsobem, ale s polovičním množstvím extrakčních činidel. Z výsledného extraktu (spojení produktů ze všech tří extrakčních kroků) bylo rozpouštědlo odpařeno na vakuové rotační odparce při teplotě 40 °C. Množství vyextrahovaného tuku bylo stanoveno gravimetricky.



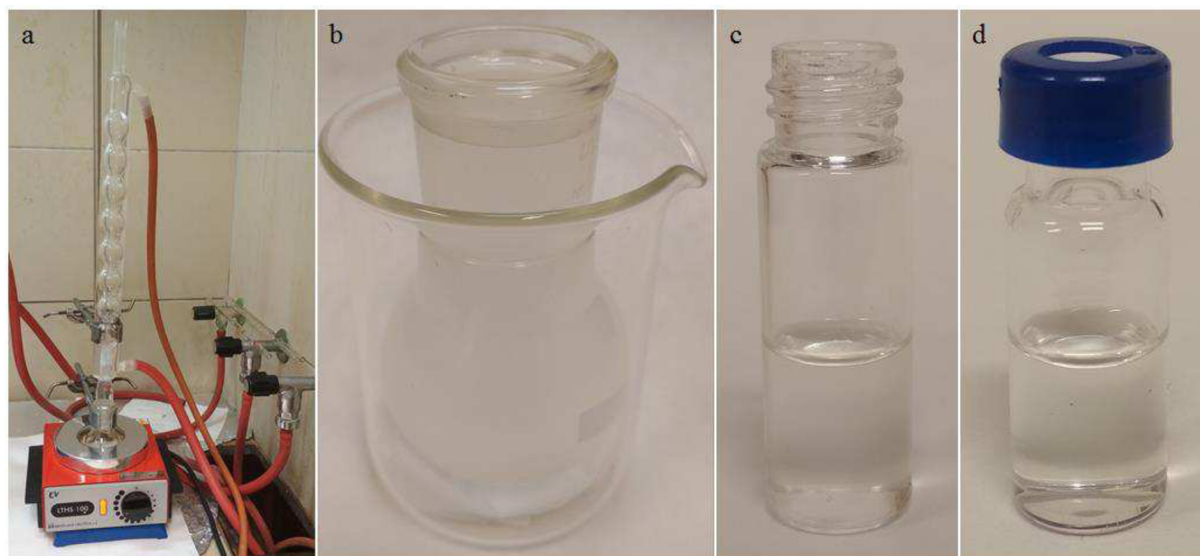
Obrázek 5: a) Zkumavka s navážkou vzorku, b) Zahřívání vzorků ve vodní lázni, c) Změna zbarvení směsi po 10 minutách zahřívání, d) Extrakce tuku organickými rozpouštědly v dělicí nálevce (horní organická fáze)

3.4.2 Příprava methylesterů mastných kyselin

Tuk byl podroben kyselé esterifikaci s bortrifluoridem jako katalyzátorem.

3.4.2.1 Metoda kyselé esterifikace pro triacylglyceroly

Do destilační baňky k vyextrahovanému tuku byl přidán varný kamínek a 4 ml methanolického roztoku hydroxidu sodného ($c = 0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), který byl připraven rozpuštěním 2 g hydroxidu sodného ve 100 ml methanolu při mírném ohřevu, přičemž takto připravený methanolický roztok lze uchovávat v chladu po dobu nejdéle 3 měsíců. Obsah baňky se vařil pod zpětným chladičem do vymizení kapiček tuku (Obrázek 6a), tedy přibližně 10 minut (s baňkou se pravidelně jemně kroužilo, aby nedocházelo k usazování hydroxidu sodného na stěně). Následně bylo přes horní konec chladiče přidáno 5 ml methanolického roztoku bortrifluoridu a směs se vařila ještě dalších 20 minut. Poté byly stejným způsobem přidány 3 ml isooktanu, var byl zastaven a po odstranění chladiče se do směsi přidalo přibližně 20 ml nasyceného vodného roztoku chloridu sodného a obsah baňky byl důkladně protřepán. Po přidavku dalšího množství nasyceného roztoku chloridu sodného, který způsobil zvýšení hladiny kapaliny až po hrdlo baňky, se fáze nechaly oddělit během přibližně 5 minut (Obrázek 6b). Z horní isooktanové vrstvy se odebralo 1–2 ml do 4 ml vialky a pro odstranění stop vlhkosti bylo použito malé množství bezvodého síranu sodného (Obrázek 6c). Pro analýzu na plynovém chromatografu se využil 1 ml připraveného roztoku (Obrázek 6d).



Obrázek 6: a) Esterifikace směsi pod zpětným chladičem, b) Oddělené fáze po přidavku roztoku chloridu sodného (horní isooktanová fáze), c) Odstranění vlhkosti bezvodým síranem sodným, d) Vzorek pro analýzu GC-FID

3.4.2.2 Metoda kyselé esterifikace pro volné mastné kyseliny

Do destilační baňky k vyextrahovanému tuku byl přidán varný kamínek a přes zpětný chladič 5 ml methanolického roztoku bortrifluoridu. Po 3 minutách varu se přidaly opět přes chladič 3 ml isooktanu, var se zastavil a ihned po odstranění chladiče bylo přidáno 20 ml nasyceného vodného roztoku chloridu sodného. Po protřepání této směsi a přidavku většího množství nasyceného roztoku chloridu sodného pro zvýšení hladiny kapaliny až do hrdla baňky byly fáze od sebe odděleny během přibližně 5 minut. Z horní isooktanové vrstvy se odebralo 1–2 ml do 4 ml vialky a pro odstranění stop vlhkosti bylo použito malé množství bezvodého síranu sodného. Pro analýzu na plynovém chromatografu se využil 1 ml připraveného roztoku.

3.4.3 Podmínky stanovení methylesterů mastných kyselin

- Plynový chromatograf: TRACETM GC (ThermoQuest S.p.A, Itálie) (Obrázek 7)
- Autosampler: AI/AS 3000
- Teplota injektoru: 250 °C
- Technika dávkování: splitless (ventil uzavřen 1 minutu)
- Dávkovaný objem vzorku: 1 µl
- Nosný plyn: dusík
- Průtok nosného plynu: 1 ml · min⁻¹
- Kapilární kolona: DB-WAX s vysoce polární stacionární fází
- Parametry kolony: 30 m × 0,32 mm × 0,5 µm
- Teplotní program: 50 °C 1 minut
 - vzestupný gradient 25 °C · min⁻¹ do 200 °C s výdrží 0 minut
 - vzestupný gradient 3 °C · min⁻¹ do 230 °C s výdrží 30 minut
 - Celková doba analýzy: 47 minut
- Detektor: plamenově-ionizační
- Teplota detektoru: 250 °C
- Průtok vzduchu: 350 ml · min⁻¹
- Průtok vodíku: 35 ml · min⁻¹
- Make-up dusíku: 30 ml · min⁻¹



Obrázek 7: Plynový chromatograf TRACETM GC s plamenově ionizačním detektorem

3.4.4 Identifikace a kvantifikace mastných kyselin

MK byly stanoveny ve formě MEMK metodami popsány v kapitole 3.4.2. Identifikace jednotlivých MEMK v modelových vzorcích byla provedena na základě porovnání retenčních časů separovaných sloučenin s retenčními časy standardů.

Kvantifikace byla provedena výpočtem jejich koncentrace z plochy píku MEMK ve vzorku a známé koncentrace a plochy píku standardu. Potřebné parametry standardů uvádí Tabulka 6.

Zastoupení MK je vyjádřeno po přepočtu v mg · g⁻¹ vyextrahovaného tuku – viz rovnice (1) – (3).

Tabulka 6: Standardy použité pro identifikaci a kvantifikaci mastných kyselin v modelových vzorcích

Název MK	Zkrácený zápis 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	5,74	0,04	2767172	130,187	116,160
Kyselina kaprylová	C8:0	6,87	0,04	3310175	158,241	144,214
Kyselina kaprinová	C10:0	8,01	0,04	3760655	186,295	172,268
Kyselina undekanová	C11:0	8,64	0,02	1968818	200,322	186,295
Kyselina laurová	C12:0	9,37	0,04	4302041	214,349	200,322
Kyselina tridekanová	C13:0	10,20	0,02	2181950	228,376	214,349
Kyselina myristová	C14:0	11,19	0,04	4575751	242,403	228,376
Kyselina myristolejová	C14:1 ^{Δ9}	11,67	0,02	2214617	240,387	226,360
Kyselina pentadekanová	C15:0	12,35	0,02	2288453	256,430	242,403
Kyselina <i>cis</i> -10-pentadecenová	C15:1 ^{Δ10}	12,92	0,02	2262521	254,414	240,387
Kyselina palmitová	C16:0	13,72	0,06	7158423	270,457	256,43
Kyselina palmitolejová	C16:1 ^{Δ9}	14,19	0,02	2322445	268,441	254,414
Kyselina heptadekanová	C17:0	15,25	0,02	1589265	284,484	270,457
Kyselina <i>cis</i> -10-heptadecenová	C17:1 ^{Δ10}	15,79	0,02	2356498	282,468	268,441
Kyselina stearová	C18:0	16,99	0,04	4825867	298,511	284,484
Kyselina olejová	C18:1 ^{Δ9}	17,47	0,04	7231723	296,495	282,468
Kyselina linolová	C18:2 ^{Δ9,12}	18,46	0,02	4293902	294,479	280,452
Kyselina γ -linolenová	C18:3 ^{Δ6,9,12}	19,21	0,02	2200645	292,463	278,436
Kyselina α -linolenová	C18:3 ^{Δ9,12,15}	20,02	0,02	2177651	292,463	278,436
Kyselina arachová	C20:0	21,56	0,04	4870180	326,565	312,358
Kyselina <i>cis</i> -11-eikosenová	C20:1 ^{Δ11}	22,30	0,02	2405373	322,533	308,506
Kyselina <i>cis</i> -11,14-eikosadienová	C20:2 ^{Δ11,14}	23,93	0,02	2275580	322,533	308,506
Kyselina heneikosanová	C21:0	24,80	0,02	2396746	340,592	326,565
Kyselina <i>cis</i> -8,11,14-eikosatrienová	C20:3 ^{Δ8,11,14}	25,02	0,02	2033416	320,517	306,490
Kyselina <i>cis</i> -11,14,17-eikosatrienová	C20:3 ^{Δ11,14,17}	25,99	0,02	2092644	316,485	302,458
Kyselina arachidonová	C20:4 ^{Δ5,8,11,14}	26,47	0,02	1697510	318,501	304,474
Kyselina behenová	C22:0	28,96	0,04	6480041	354,619	340,592
Kyselina eruková	C22:1 ^{Δ13}	30,16	0,02	2374777	352,603	338,576
Kyselina <i>cis</i> -13,16-docosadienová	C22:2 ^{Δ13,16}	32,90	0,02	2031932	350,587	336,560
Kyselina trikosanová	C23:0	34,29	0,02	2228815	368,646	354,619
Kyselina lignocerová	C24:0	41,21	0,04	4166992	382,673	368,646
Kyselina nervonová	C24:1 ^{Δ15}	43,29	0,02	1937341	380,657	366,630
Kyselina <i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-dokosahexaenová	C22:6 ^{Δ4,7,10,13,16,19}	43,79	0,02	1553663	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

Vzorce pro výpočet:

- Výpočet koncentrace MEMK (c_{MEMK}) ve vzorku [$\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$]:

$$c_{MEMK} = \frac{c_s \cdot P_{MEMK}}{P_s} \quad (1)$$

kde:

c_s koncentrace standardu [$\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$]
 P_{MEMK} plocha píku MEMK ve vzorku [$\text{mV} \cdot \text{s}$]
 P_s plocha píku standardu [$\text{mV} \cdot \text{s}$]

- Přepočítání koncentrace MEMK na koncentraci MK (c_{MK}) [$\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$]:

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

kde:

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

Platí: $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1} \approx \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ vzorku

- Přepočítání koncentrace MK na 1 g vyextrahovaného tuku (c) [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ tuku]:

$$c = \frac{c_{MK} \cdot V_{iso}}{m_{tuk}} \quad (3)$$

kde:

V_{iso} objem isooktanu (3 ml)
 m_{tuk} hmotnost vyextrahovaného tuku ze vzorku [g]

3.5 Použité metody pro stanovení aromaticky aktivních látek

Pro identifikaci a semikvantifikaci AAL v modelových vzorcích sýrů byla použita metoda headspace mikroextrakce na pevnou fázi ve spojení s plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí (HS-SPME-GC-MS).

3.5.1 Příprava vzorku sýra

Pro rozmrazení byl vzorek ponechán den před analýzou v lednici při teplotě do 6 °C. Na analytických vahách byly tak, aby se při analýze zabránilo kontaktu s SPME vláknem, naváženy s přesností na 4 desetinná místa 2 g vzorku do vialky se šroubovacím magnetickým uzávěrem, čímž bylo zamezeno úniku těkavých sloučenin. Vialka se vzorkem byla následně umístěna do autosampleru pro analýzu.

3.5.2 Podmínky SPME extrakce

- SPME vlákno: Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA
- Stacionární fáze: Divinylbenzen/Carboxen/Polydimethylsiloxan (DVB/CAR/PDMS 50/30 μm)
- Doba inkubace (temperování): 10 minut
- Doba extrakce: 20 minut
- Teplota agitátoru (teplota extrakce a inkubace): 40 °C
- Agitátor zapnutý: 5 s
- Agitátor vypnutý: 60 s
- Množství vzorku: 2,000 g
- Hloubka ponoření vlákna do vialky: 20 mm

3.5.3 Podmínky GC-MS analýzy

- Plynový chromatograf s hmotnostní detekcí: Thermo Scientific™ ISQ™ Series GC-MS System (TRACE™ 1310 Series Gas Chromatograph, ISQ™ LT Single Quadrupole Mass Spectrometer) (Obrázek 8)
- Teplota desorpce (teplota injektoru): 240 °C
- Doba desorpce: 20 minut
- Hloubka ponoření vlákna do injektoru: 40 mm
- Technika dávkování: splitless (ventil uzavřen 10 minut)
- Nosný plyn: helium
- Průtok nosného plynu: 1 ml · min⁻¹
- Kapilární kolona: TG-WaxMS
- Parametry kolony: 30 m × 0,25 mm × 0,5 μm
- Teplotní program: 40 °C s výdrží 2 minuty
vzestupný gradient 3 °C · min⁻¹ do 110 °C s výdrží 10 minut
vzestupný gradient 3 °C · min⁻¹ do 200 °C s výdrží 0 minut
Celková doba analýzy: 65 minut
- Detektor: hmotnostní spektrometr
- Ionizace plynné fáze: elektronová ionizace
- Teplota iontového zdroje: 200 °C
- Typ analyzátoru: kvadrupólový analyzátor
- Skenovací rozsah m/z: 30–370 amu
- Rychlost skenování: 0,2 s



Obrázek 8: Plynový chromatograf s hmotnostní detekcí Thermo Scientific™ ISQ™ Series GC-MS System

3.5.4 Identifikace a kvantifikace aromaticky aktivních látek

Protože nebyly k dispozici všechny standardy těkavých sloučenin, identifikace byla provedena na základě srovnání hmotnostních spekter s dostupnou knihovnou spekter, obsah identifikovaných sloučenin je vyjádřen semikvantitativně pomocí ploch příslušných píků na chromatogramu.

3.6 Statistické zpracování výsledků

Data byla zpracována a vyhodnocena pomocí programu MS Excel 2010. Každý vzorek byl analyzován zvlášť pro vázané MK, VMK a AAL a každá analýza byla provedena ve 3 opakováních ($n = 3$).

Pro zjištění rozdílů mezi vzorky byla použita parametrická jednofaktorová analýza rozptylu (ANOVA – Analysis of Variance) s následným Duncanovým testem. Pro zkoumání korelací mezi obsahem identifikovaných sloučenin byla použita metoda PCA (Principal Component Analysis). Veškeré statistické testování bylo provedeno na hladině statistické významnosti $\alpha = 0,05$, statistický software XLstat a IBM SPSS Statistics 20.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato práce je součástí rozsáhlé studie, která se zabývá sledováním sensorické kvality přírodních sýrů eidamského typu, se zaměřením především na chutnost (flavour) a s ní související obsah AAL. Pozornost je zároveň věnována lipidům a MK jako důležitým prekursorům AAL v sýrech.

Podstatou této práce bylo posouzení vlivu různých mikrobiálních kultur na obsah zmíněných parametrů, zároveň byly sledovány jejich změny v průběhu zrání sýrů. Práce probíhala ve spolupráci s Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně, která disponuje potřebným technologickým vybavením pro výrobu sýrů; modelové vzorky sýrů byly vyrobeny standardním technologickým postupem (viz kap. 3.3).

Pro stanovení volných a vázaných MK byla aplikována izolace lipidů ze vzorků směsí rozpouštědel (diethylether, petrolether), následná esterifikace MK za použití bortrifluoridu jako katalyzátoru a konečná analýza GC-FID (viz kap. 3.4.3). Pro stanovení AAL byla použita metoda HS-SPME-GC-MS (kap. 3.5.2 a 3.5.3).

4.1 Identifikace a kvantifikace mastných kyselin v modelových vzorcích sýrů

MK byly identifikovány na základě srovnání retenčních časů MEMK s příslušnými standardy. Kvantifikace byla provedena srovnáním ploch píků se standardy o známé koncentraci (viz kap. 3.4.4).

V mléce bylo dosud detekováno 437 různých MK, jen malá část z nich však má nutriční význam a z hlediska stanovení je věnována pozornost jen cca 20–30 z nich [7].

V našich vzorcích bylo celkem identifikováno 17 MK, volných i vázaných. V Tabulkách 7–11 je uveden komplexní přehled identifikovaných MK a jejich obsah (v $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ extrahovaného tuku) pro každý vzorek, ukázky chromatogramů jsou součástí Příloh 2–6.

Tabulka 7: Obsah volných a vázaných mastných kyselín identifikovaných ve vzorcích D [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ tuku]

Název masné kyseliny	Vázané mastné kyseliny			Volné mastné kyseliny		
	D14	D28	D56	D14	D28	D56
Kyselina kapronová	18,95 ± 0,54	17,93 ± 0,35	17,3 ± 0,28	1,72 ± 0,08	1,26 ± 0,04	1,40 ± 0,03
Kyselina kaprylová	12,86 ± 0,39	10,86 ± 0,26	9,72 ± 0,17	1,02 ± 0,05	0,32 ± 0,03	0,78 ± 0,02
Kyselina kaprinová	28,74 ± 0,64	25,14 ± 0,56	22,52 ± 0,31	2,13 ± 0,09	1,51 ± 0,05	1,58 ± 0,04
Kyselina undekanová	0,90 ± 0,02	5,17 ± 0,63	0,69 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01
Kyselina laurová	34,32 ± 0,71	196,08 ± 23,92	26,87 ± 0,34	2,36 ± 0,09	1,78 ± 0,07	1,74 ± 0,03
Kyselina tridekanová	1,57 ± 0,03	8,86 ± 1,08	1,23 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01
Kyselina myristová	131,42 ± 4,11	111,96 ± 2,31	97,15 ± 1,46	7,61 ± 0,27	6,22 ± 0,27	5,59 ± 0,11
Kyselina myristoolejová	6,82 ± 0,57	12,08 ± 0,28	10,26 ± 0,15	0,81 ± 0,03	0,67 ± 0,03	0,57 ± 0,01
Kyselina pentadekanová	6,35 ± 0,75	6,19 ± 0,79	12,48 ± 0,22	0,53 ± 0,03	0,88 ± 0,04	0,36 ± 0,04
Kyselina <i>cis</i> -10-pentadecenová	2,72 ± 0,05	2,50 ± 0,05	2,12 ± 0,03	0,15 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,11 ± 0,01
Kyselina palmitová	489,97 ± 44,33	288,29 ± 6,34	305,65 ± 7,79	23,43 ± 0,76	20,85 ± 0,94	17,91 ± 0,30
Kyselina palmitoolejová	15,10 ± 1,31	13,47 ± 1,25	18,83 ± 0,01	1,67 ± 0,04	0,61 ± 0,06	0,63 ± 0,07
Kyselina heptadekanová	14,32 ± 1,21	8,50 ± 0,22	7,85 ± 0,15	0,54 ± 0,02	0,56 ± 0,03	0,42 ± 0,01
Kyselina stearová	108,72 ± 10,50	62,34 ± 1,29	68,67 ± 1,96	4,13 ± 0,12	4,02 ± 0,19	3,22 ± 0,06
Kyselina olejová	180,57 ± 3,53	167,98 ± 2,74	143,56 ± 1,56	7,64 ± 0,20	7,83 ± 0,39	6,34 ± 0,13
Kyselina linolová	6,55 ± 0,88	6,79 ± 0,91	12,71 ± 0,22	0,81 ± 0,02	0,31 ± 0,04	0,71 ± 0,02
Kyselina α -linolenová	5,00 ± 0,11	5,23 ± 0,11	4,18 ± 0,01	0,34 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,23 ± 0,02

Značení vzorků viz Tabulka 5

Tabulka 8: Obsah volných a vázaných mastných kyselín identifikovaných ve vzorcích G [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ tuku]

Název masné kyseliny	Vázané mastné kyseliny			Volné mastné kyseliny		
	G14	G28	G56	G14	G28	G56
Kyselina kapronová	19,29 ± 0,73	17,43 ± 0,47	14,40 ± 0,04	1,79 ± 0,08	1,40 ± 0,03	1,30 ± 0,01
Kyselina kaprylová	13,37 ± 0,57	11,21 ± 0,35	9,19 ± 0,07	1,24 ± 0,07	0,85 ± 0,02	0,75 ± 0,01
Kyselina kaprinová	32,36 ± 1,28	25,77 ± 0,53	22,48 ± 0,16	2,95 ± 0,20	1,96 ± 0,07	1,58 ± 0,01
Kyselina undekanová	0,98 ± 0,04	0,78 ± 0,02	0,67 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,04 ± 0,01
Kyselina laurová	39,56 ± 1,56	30,53 ± 0,56	27,09 ± 0,24	3,53 ± 0,25	2,21 ± 0,06	1,84 ± 0,01
Kyselina tridekanová	1,76 ± 0,07	1,35 ± 0,02	1,19 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01
Kyselina myristová	141,13 ± 6,09	110,58 ± 2,20	97,37 ± 1,16	11,56 ± 0,80	7,31 ± 0,20	6,02 ± 0,01
Kyselina myristoolejová	13,36 ± 0,48	10,91 ± 0,22	9,62 ± 0,09	1,40 ± 0,12	0,78 ± 0,03	0,58 ± 0,01
Kyselina pentadekanová	6,57 ± 0,60	6,21 ± 0,77	12,24 ± 0,21	0,50 ± 0,04	0,98 ± 0,03	0,80 ± 0,01
Kyselina <i>cis</i> -10-pentadecenová	2,99 ± 0,12	2,31 ± 0,04	2,03 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,12 ± 0,01
Kyselina palmitová	387,03 ± 34,09	379,12 ± 16,55	296,29 ± 8,86	36,07 ± 2,48	22,90 ± 0,65	18,85 ± 0,06
Kyselina palmitoolejová	15,17 ± 1,16	24,32 ± 0,43	24,53 ± 0,61	3,32 ± 0,27	2,01 ± 0,09	1,36 ± 0,01
Kyselina heptadekanová	11,87 ± 0,94	11,02 ± 0,47	8,02 ± 0,16	0,97 ± 0,07	0,59 ± 0,02	0,47 ± 0,01
Kyselina stearová	90,51 ± 8,42	94,08 ± 4,45	72,29 ± 2,33	6,74 ± 0,44	4,50 ± 0,13	3,51 ± 0,01
Kyselina olejová	210,24 ± 8,20	168,68 ± 2,81	148,03 ± 1,42	13,28 ± 0,86	8,54 ± 0,24	6,90 ± 0,01
Kyselina linolová	15,95 ± 0,53	14,21 ± 0,34	11,96 ± 0,13	1,29 ± 0,07	0,86 ± 0,02	0,70 ± 0,01
Kyselina α -linolenová	6,16 ± 0,29	5,05 ± 0,09	4,19 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,24 ± 0,01	0,27 ± 0,01

Značení vzorků viz Tabulka 5

Tabulka 9: Obsah volných a vázaných mastných kyselín identifikovaných ve vzorcích H [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ tuku]

Název masné kyseliny	Vázané mastné kyseliny			Volné mastné kyseliny		
	H14	H28	H56	H14	H28	H56
Kyselina kapronová	19,83 ± 0,71	12,64 ± 0,42	15,79 ± 0,16	1,70 ± 0,06	1,35 ± 0,01	1,34 ± 0,02
Kyselina kaprylová	12,95 ± 0,54	8,06 ± 0,19	9,21 ± 0,10	0,44 ± 0,04	0,77 ± 0,01	0,77 ± 0,01
Kyselina kaprinová	29,38 ± 0,95	18,73 ± 0,52	22,68 ± 0,19	2,12 ± 0,08	1,73 ± 0,03	1,74 ± 0,04
Kyselina undekanová	1,27 ± 0,04	0,80 ± 0,02	1,00 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01
Kyselina laurová	34,80 ± 0,99	21,98 ± 0,65	27,53 ± 0,27	2,30 ± 0,08	2,09 ± 0,04	2,01 ± 0,04
Kyselina tridekanová	1,98 ± 0,05	1,25 ± 0,04	1,58 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,01
Kyselina myristová	117,25 ± 3,47	75,78 ± 2,28	96,51 ± 0,97	6,99 ± 0,21	7,02 ± 0,15	6,40 ± 0,13
Kyselina myristoolejová	12,67 ± 0,40	7,79 ± 0,30	10,06 ± 0,08	0,77 ± 0,03	0,73 ± 0,02	0,66 ± 0,01
Kyselina pentadekanová	16,41 ± 0,59	11,34 ± 0,30	14,79 ± 0,09	1,12 ± 0,03	1,13 ± 0,03	1,02 ± 0,02
Kyselina <i>cis</i> -10-pentadecenová	2,22 ± 0,06	1,44 ± 0,04	1,79 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,10 ± 0,01
Kyselina palmitová	267,55 ± 17,09	229,03 ± 4,04	296,26 ± 2,65	22,44 ± 0,67	23,12 ± 0,59	20,07 ± 0,37
Kyselina palmitoolejová	31,11 ± 1,06	18,42 ± 0,61	23,12 ± 0,16	2,14 ± 0,11	1,75 ± 0,05	1,58 ± 0,03
Kyselina heptadekanová	7,69 ± 0,45	7,13 ± 0,12	8,15 ± 0,07	0,45 ± 0,01	0,65 ± 0,02	0,53 ± 0,01
Kyselina stearová	56,24 ± 4,08	50,73 ± 0,75	66,52 ± 0,58	4,02 ± 0,11	4,23 ± 0,14	3,45 ± 0,06
Kyselina olejová	185,38 ± 4,69	117,41 ± 3,91	152,68 ± 1,61	7,93 ± 0,16	8,39 ± 0,19	7,36 ± 0,15
Kyselina linolová	16,27 ± 0,46	9,32 ± 0,39	13,43 ± 0,15	0,86 ± 0,02	0,78 ± 0,01	0,79 ± 0,01
Kyselina α -linolenová	5,16 ± 0,12	3,29 ± 0,11	3,87 ± 0,07	0,25 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,28 ± 0,01

Značení vzorků viz Tabulka 5

Tabulka 10: Obsah volných a vázaných mastných kyselín identifikovaných ve vzorcích I [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ tuku]

Název masné kyseliny	Vázané mastné kyseliny			Volné mastné kyseliny		
	I14	I28	I56	I14	I28	I56
Kyselina kapronová	16,90 ± 0,39	14,26 ± 0,32	15,78 ± 0,08	1,07 ± 0,01	1,06 ± 0,01	1,25 ± 0,03
Kyselina kaprylová	11,00 ± 0,25	9,36 ± 0,28	9,64 ± 0,03	0,59 ± 0,01	0,60 ± 0,01	0,76 ± 0,02
Kyselina kaprinová	25,77 ± 0,44	22,99 ± 0,67	23,17 ± 0,06	1,36 ± 0,01	1,36 ± 0,01	1,68 ± 0,04
Kyselina undekanová	1,11 ± 0,02	0,99 ± 0,03	0,99 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,01
Kyselina laurová	30,96 ± 0,45	27,93 ± 0,80	28,16 ± 0,09	1,60 ± 0,01	1,58 ± 0,01	1,96 ± 0,04
Kyselina tridekanová	1,76 ± 0,02	1,59 ± 0,05	1,63 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,11 ± 0,01
Kyselina myristová	110,50 ± 2,27	99,34 ± 3,03	100,77 ± 0,28	5,29 ± 0,01	5,11 ± 0,02	6,24 ± 0,13
Kyselina myristoolejová	11,47 ± 0,13	10,42 ± 0,26	10,64 ± 0,03	0,58 ± 0,01	0,58 ± 0,01	0,64 ± 0,01
Kyselina pentadekanová	17,38 ± 0,69	15,00 ± 0,52	16,06 ± 0,07	0,88 ± 0,01	0,82 ± 0,01	0,98 ± 0,02
Kyselina <i>cis</i> -10-pentadecenová	1,84 ± 0,01	1,70 ± 0,05	1,75 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,10 ± 0,01
Kyselina palmitová	373,12 ± 30,61	314,91 ± 14,44	357,32 ± 2,87	17,85 ± 0,18	16,09 ± 0,06	19,02 ± 0,38
Kyselina palmitoolejová	24,72 ± 0,15	21,94 ± 0,55	22,31 ± 0,22	1,44 ± 0,02	1,32 ± 0,01	1,50 ± 0,02
Kyselina heptadekanová	10,80 ± 0,86	9,42 ± 0,42	9,49 ± 0,07	0,45 ± 0,01	0,44 ± 0,01	0,49 ± 0,01
Kyselina stearová	84,84 ± 7,66	71,29 ± 3,41	83,15 ± 0,96	3,44 ± 0,06	2,88 ± 0,01	3,31 ± 0,06
Kyselina olejová	158,67 ± 2,02	149,62 ± 4,20	149,90 ± 0,36	6,84 ± 0,09	5,90 ± 0,01	7,05 ± 0,13
Kyselina linolová	14,57 ± 0,30	13,22 ± 0,34	13,65 ± 0,01	0,67 ± 0,01	0,61 ± 0,01	0,82 ± 0,02
Kyselina α -linolenová	3,90 ± 0,03	3,79 ± 0,06	2,75 ± 0,11	0,20 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,25 ± 0,01

Značení vzorků viz Tabulka 5

Tabulka 11: Obsah volných a vázaných mastných kyselin identifikovaných ve vzorcích J [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ tuku]

Název masné kyseliny	Vázané mastné kyseliny			Volné mastné kyseliny		
	J14	J28	J56	J14	J28	J56
Kyselina kapronová	17,93 ± 0,38	14,56 ± 0,40	13,89 ± 0,11	1,42 ± 0,01	1,43 ± 0,02	1,09 ± 0,01
Kyselina kaprylová	11,39 ± 0,34	8,63 ± 0,24	8,84 ± 0,12	0,89 ± 0,01	0,81 ± 0,01	0,63 ± 0,01
Kyselina kaprinová	26,81 ± 0,68	20,27 ± 0,46	21,58 ± 0,26	1,94 ± 0,03	1,71 ± 0,01	1,38 ± 0,01
Kyselina undekanová	1,28 ± 0,04	0,94 ± 0,02	1,02 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,06 ± 0,01
Kyselina laurová	32,59 ± 0,82	24,13 ± 0,52	26,52 ± 0,30	2,30 ± 0,04	1,95 ± 0,01	1,60 ± 0,01
Kyselina tridekanová	2,08 ± 0,06	1,51 ± 0,03	1,66 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0,01
Kyselina myristová	117,54 ± 3,59	86,77 ± 1,97	98,48 ± 1,05	7,60 ± 0,10	6,38 ± 0,03	5,48 ± 0,03
Kyselina myristoolejová	11,40 ± 0,28	8,58 ± 0,13	10,20 ± 0,13	0,75 ± 0,01	0,60 ± 0,01	0,53 ± 0,01
Kyselina pentadekanová	18,71 ± 0,79	13,78 ± 0,34	15,94 ± 0,15	1,27 ± 0,02	1,06 ± 0,01	0,92 ± 0,01
Kyselina <i>cis</i> -10-pentadecenová	2,13 ± 0,07	1,29 ± 0,05	1,61 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01
Kyselina palmitová	356,99 ± 26,07	276,83 ± 8,88	345,98 ± 2,64	23,85 ± 0,31	19,92 ± 0,09	17,53 ± 0,07
Kyselina palmitoolejová	27,23 ± 0,57	19,08 ± 0,38	21,65 ± 0,16	1,85 ± 0,03	1,51 ± 0,01	1,35 ± 0,01
Kyselina heptadekanová	11,77 ± 0,80	8,06 ± 0,20	10,86 ± 0,09	0,62 ± 0,01	0,53 ± 0,01	0,47 ± 0,01
Kyselina stearová	80,82 ± 6,66	61,76 ± 2,11	79,93 ± 0,52	3,97 ± 0,02	3,35 ± 0,02	3,08 ± 0,01
Kyselina olejová	184,46 ± 5,47	133,65 ± 3,18	149,05 ± 1,81	8,32 ± 0,04	7,22 ± 0,04	6,52 ± 0,03
Kyselina linolová	16,27 ± 0,54	11,25 ± 0,43	12,96 ± 0,15	0,83 ± 0,01	0,85 ± 0,01	0,76 ± 0,01
Kyselina α -linolenová	4,79 ± 0,07	3,82 ± 0,08	3,74 ± 0,04	0,30 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,24 ± 0,01

Značení vzorků viz Tabulka 5

Mléčný tuk je charakteristický přítomností především MK s krátkými až středně dlouhými řetězci (4–16 C). Mezi nejdůležitější MK mléčného tuku patří nasycené (máselná, kapronová, kaprylová, kaprinová, laurová, myristová, palmitová, stearová), které tvoří cca 60–70 % všech MK, v menší míře jsou zde zastoupeny mononenasyčené (26–42 %), z nichž nejvýznamnější je kyselina olejová. Polynenasycené (linolová, linolenová, arachidonová) tvoří velmi nízký podíl (2 – 6 %) [7].

Z tabulek 7–11 je patrné, že ve všech vzorcích byly z kvantitativního hlediska nejvíce zastoupeny kyseliny palmitová, olejová, myristová a stearová, což je v souladu s dosavadními znalostmi o složení mléčného tuku [7] (viz Tabulka 2).

Jak již bylo zmíněno, enzymatická hydrolýza TAG (lipolýza) je jedním ze základních procesů, které probíhají během zrání sýrů. Většina takto uvolněných VMK (zvláště MK s kratším a středním řetězcem (< 12 C)) vykazuje určitou charakteristickou vůni/pach, a tak přímo přispívají k vůni daného typu sýra, ostatní jsou pak důležitými prekursory dalších AAL. Na druhou stranu, pokud jejich obsah překročí určitou hranici (cca 3000 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), mohou být příčinou vad sýrů (žluklý off-flavour). Přestože u eidamských sýrů lipolýza probíhá pouze v mírném rozsahu, je žádoucí sledovat nejen celkový obsah MK, ale i obsah VMK; proto byl každý vzorek analyzován zvláště pro stanovení MK vázaných v acylglycerolech a VMK. Tímto způsobem je možné lépe postihnout změny v průběhu zrání sýrů. VMK byly stanoveny jednoduchou metodou jejich přímé esterifikace (viz kap. 3.4.2.2), zásadní je v tomto případě přesné dodržení parametrů metody, především doby esterifikace.

Pro zjednodušení byly při porovnávání vzorků v následujících kapitolách brány v úvahu pouze MK považované za nejvýznamnější pro mléčný tuk, tedy z MK s dlouhým řetězcem palmitová, myristová a stearová, z MK s krátkým řetězcem kapronová, kaprylová a kaprinová a z nenasytených MK olejová, linolová a α -linolenová [7].

Mezi důležité MK mléčného tuku patří také kyselina máselná, která je považována dokonce za klíčovou pro flavour eidamských sýrů [32, 49]. Tuto MK se však nepodařilo ve vzorcích detekovat, neboť pravděpodobně došlo k jejímu vytěkání během přípravy vzorku k analýze. Podařilo se ji však stanovit v rámci těkavých látek metodou HS-SPME-GC-MS a bude diskutována níže (kap. 4.4).

4.2 Srovnání obsahu volných a vázaných mastných kyselin ve vzorcích – použité startovací kultury

Hlavním cílem této práce bylo porovnat různé typy startovacích kultur a jejich vliv na sledované parametry, v této kapitole na obsah MK.

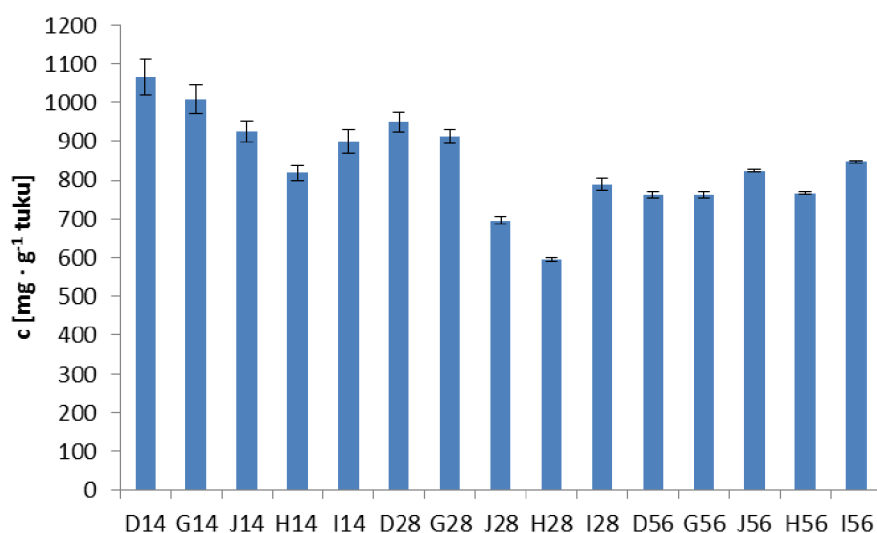
Pro výrobu eidamských sýrů se klasicky používá tzv. smetanová kultura složená z mezofilních bakterií rodů *Lactococcus* spp. a *Leuconostoc* spp., které je možné kombinovat pro dosažení žádoucích sensorických vlastností výrobku. Tato základní kultura je doplněna vhodnou termofilní kulturou (většinou vybrané druhy *Lactobacillus* spp.), která působí během dohřívání sýrů a díky proteolytické a mírné lipolytické aktivitě výrazně přispívá ke vzniku žádoucího flavouru [7].

V našem případě byl použit „aromatický typ“ smetanové kultury ve složení *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* s přídavkem vybraného kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Celkem bylo vyrobeno 5 sérií vzorků (viz Tabulka 4). Vzorek vyrobený bez přídavku termofilních laktobacilů byl označen D, ostatní byly vyrobeny s přídavkem vybraných kmenů *Lactobacillus casei* (vzorky G a J) a *Lactobacillus plantarum* (vzorky H a I).

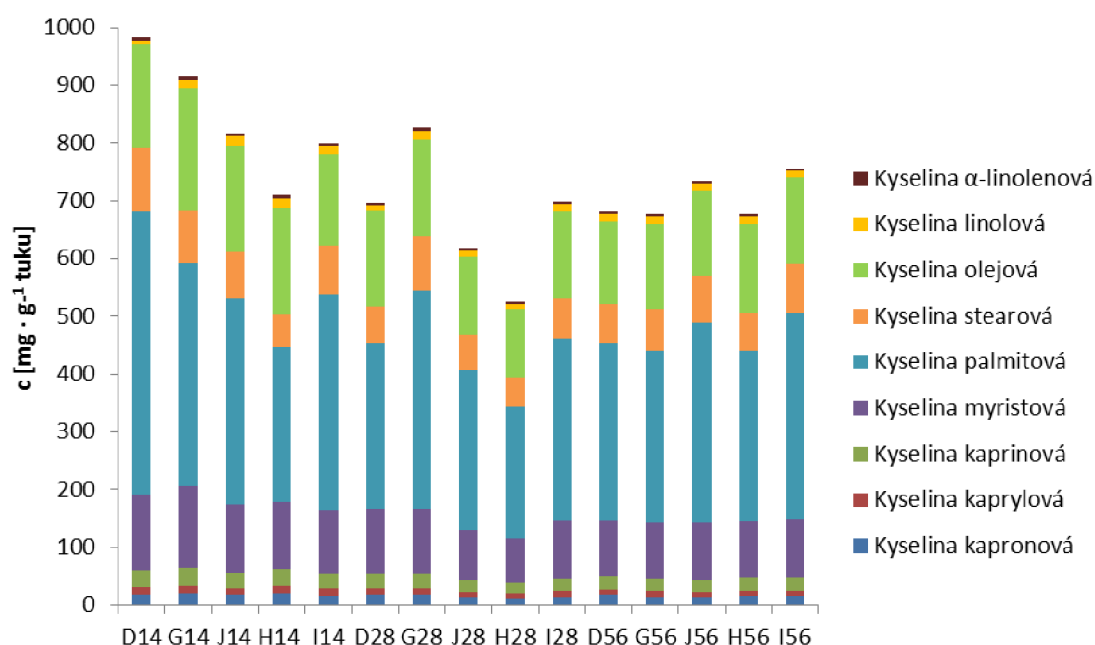
Lipolytická aktivita bakterií *Lactococcus* spp. a *Lactobacillus* spp. se v eidamských sýrech na hydrolýze tuků podílí nejvíce, a přestože jejich lipolytická aktivita je poměrně nízká, v sýrech se nacházejí ve vysokých koncentracích a mohou vyprodukovat významná množství VMK [13].

4.2.1 Srovnání celkového obsahu volných a vázaných mastných kyselin

V grafech na Obrázcích 9 a 11 je uvedeno srovnání celkového obsahu volných/vázaných MK. V grafech na Obrázcích 10 a 12 je poté uvedeno stejné srovnání celkového obsahu pouze vybraných MK. Ze srovnání příslušných grafů (9 vs. 10 a 11 vs. 12) je patrný prakticky totožný průběh změn, a je tedy možné věnovat pozornost pouze vybraným MK důležitým pro mléčný tuk. Význam ostatních MK, vzhledem k velmi nízkým koncentracím, je pravděpodobně zanedbatelný.



Obrázek 9: Celkový obsah vázaných MK ve vzorcích sýrů – použité startovací kultury



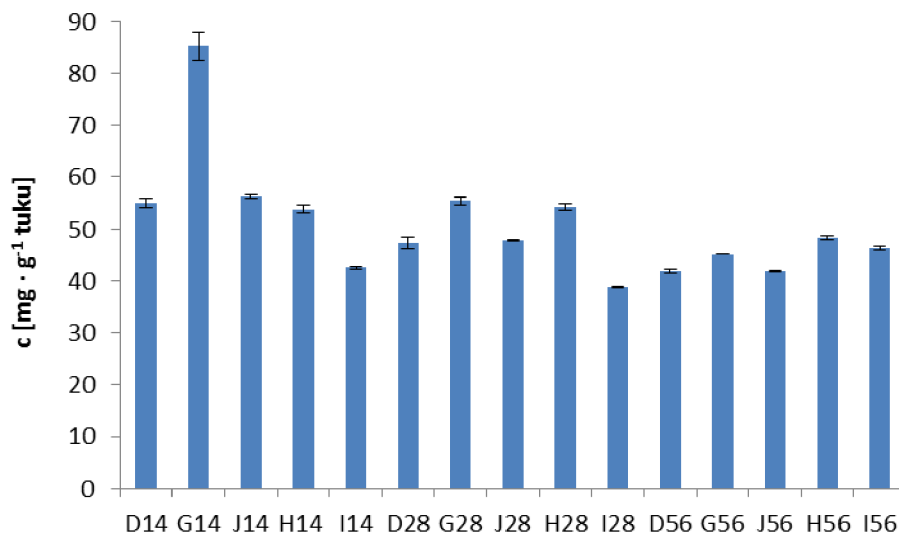
Obrázek 10: Obsah vybraných vázaných MK ve vzorcích sýrů – použité startovací kultury

Pokud srovnáme obsah MK vázaných v acylglycerolech (Obrázek 9 a 10), mezi vzorky (aplikovanými kulturami) jsou patrné významné rozdíly ($p < 0,05$), zvláště v prvních fázích zrání (po 14 a 28 dnech).

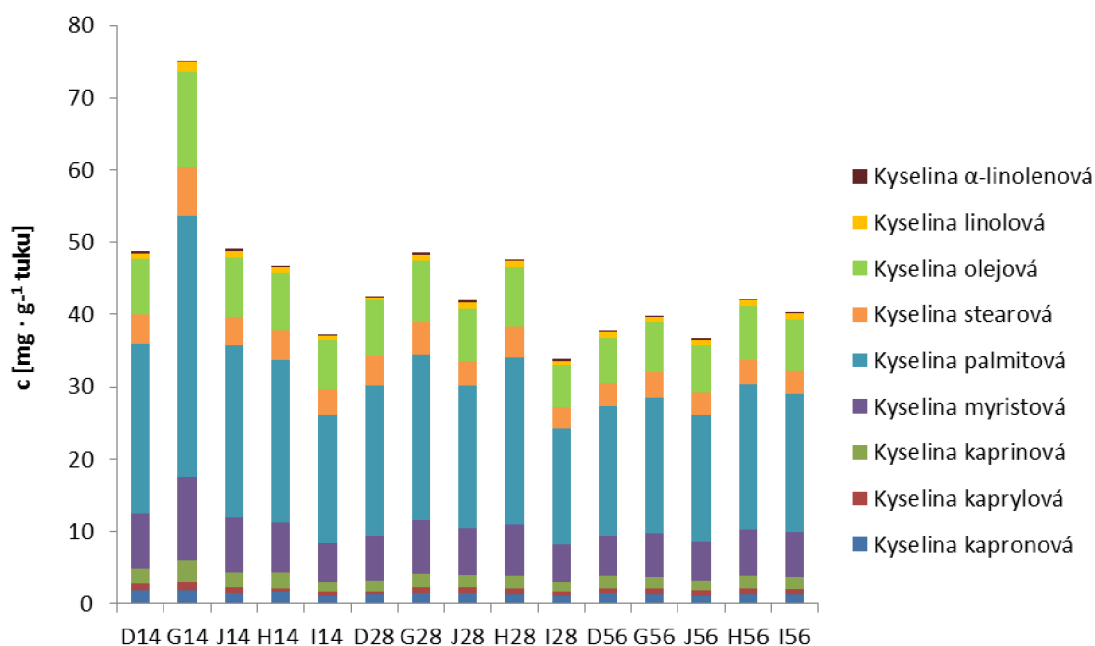
Lze očekávat, že s přidavkem termofilních kultur *Lactobacillus casei* (vzorky G a J) a *Lactobacillus plantarum* (vzorky H a I) se projeví jejich výraznější lipolytická aktivita (tj. výraznější pokles vázaných MK); zjištěné výsledky tomu odpovídají – nejvyšší obsah vázaných MK byl nalezen ve vzorku D (bez přidavku termofilů). Toto však platí pouze na počátku zrání, ke konci (po 56 dnech zrání) už nebyly zaznamenány významné rozdíly, průběh lipolýzy se pravděpodobně ke konci zrání vyrovnává.

Pokud porovnáme použité termofilní bakterie (*Lactobacillus casei* vs. *Lactobacillus plantarum*), jejich lipolytická aktivita je odlišná, liší se dokonce i kmeny téhož bakteriálního druhu. Jak bylo řečeno, v posledních fázích zrání se obsah vázaných MK u všech vzorků

vyrovňuje, což by mohlo naznačovat, že i samotná smetanová kultura (*Lactococcus* spp.) vykazuje dostatečnou lipolytickou aktivitu, ale s pomalejším průběhem.



Obrázek 11: Celkový obsah VMK ve vzorcích sýrů – použité startovací kultury



Obrázek 12: Obsah vybraných VMK ve vzorcích sýrů – použité startovací kultury

Co se týče VMK (Obrázek 11 a 12), mezi vzorky byly nalezeny nevýznamné rozdíly, nicméně vzhledem k tomu, že VMK jsou dále metabolizovány (jak bude diskutováno níže), lze aktivitu použitých kultur lépe posoudit ze změn obsahu vázaných MK. Za kmeny s vyšší lipolytickou aktivitou lze na základě našich výsledků označit *Lactobacillus casei* kmen 422 a *Lactobacillus plantarum* kmen 187.

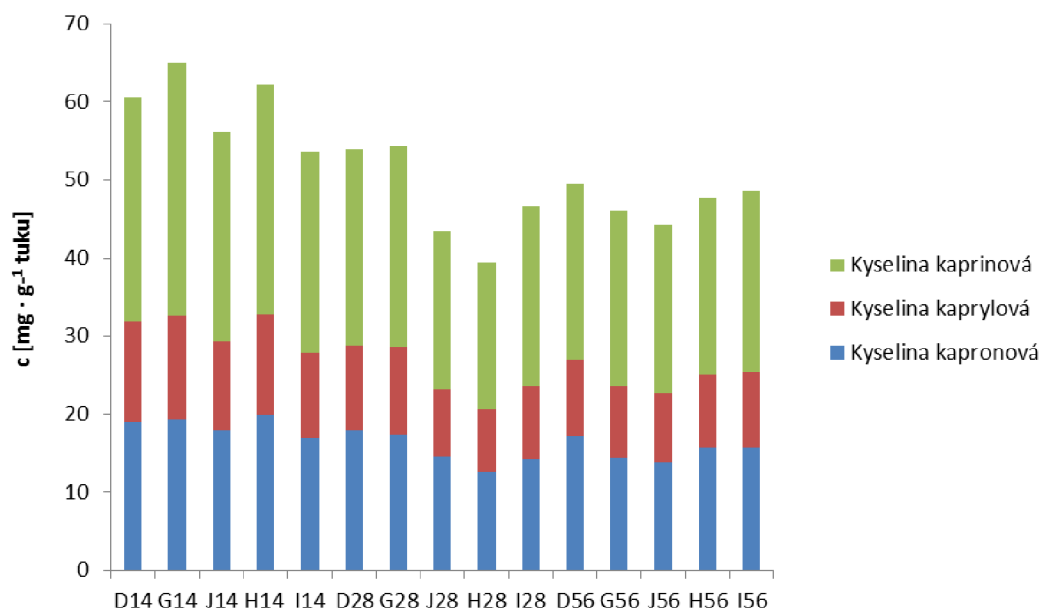
Zajímavý je extrémně vysoký obsah VMK u vzorku G14, protože však nekoreluje s obsahem vázaných MK téhož vzorku (Obrázek 9), lze jej považovat za odlehlý výsledek, který pravděpodobně souvisí s níže diskutovanou nestejnorodostí sýrů.

4.2.2 Srovnání vybraných skupin mastných kyselin

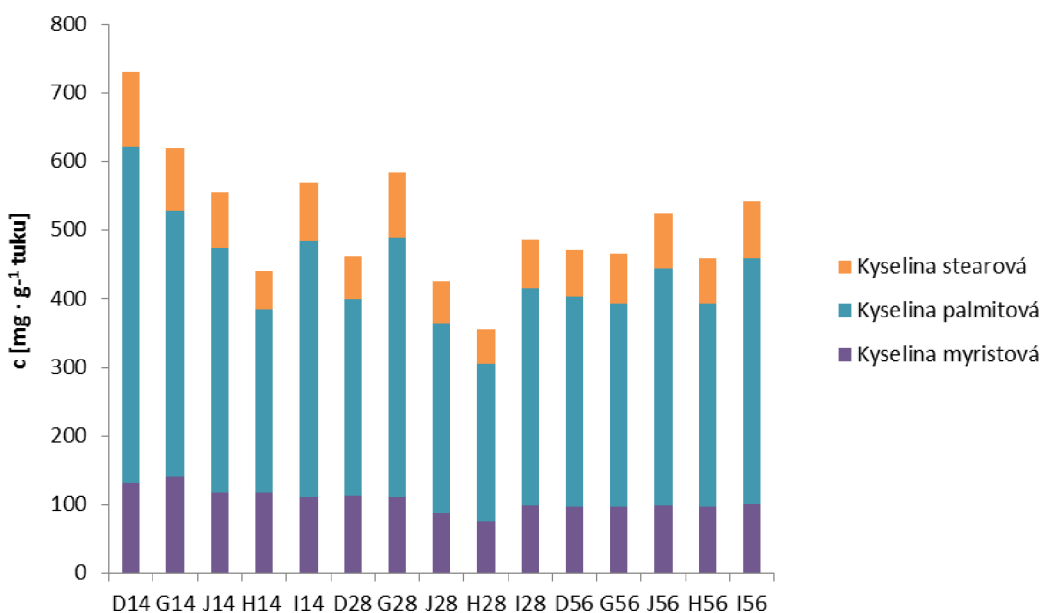
Pro lepší přehlednost jsou v následujících grafech MK rozděleny do skupin.

Pro mléčný tuk je charakteristický vysoký obsah MK s krátkým řetězcem (především kapronová, kaprylová a kaprinová), proto jim byla věnována zvláštní pozornost a v grafu na Obrázku 13 je znázorněn průběh jejich změn. V grafu na Obrázku 14 jsou znázorněny MK s dlouhým řetězcem a v grafu na Obrázku 15 nenasycené MK.

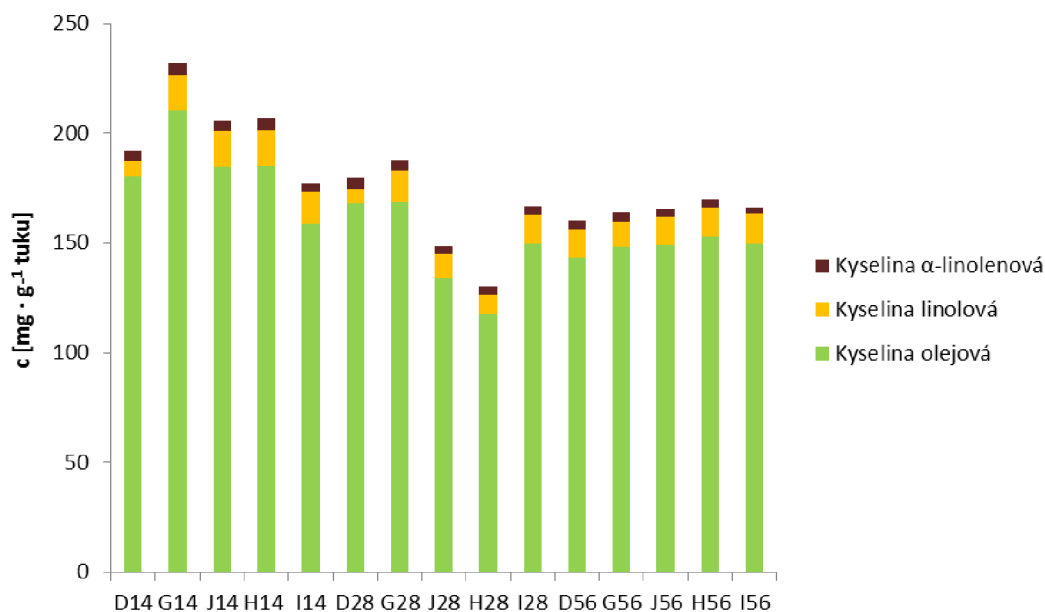
Mezi vzorky byly nalezeny významné rozdíly ($p < 0,05$) a potvrzují tak zjištění, že lipolytická aktivita použitých termofilních bakterií (*Lactobacillus casei* vs. *Lactobacillus plantarum*) je odlišná dokonce i v rámci téhož bakteriálního druhu.



Obrázek 13: Obsah vázaných MK s krátkým řetězcem ve vzorcích sýrů – použité startovací kultury



Obrázek 14: Obsah vázaných MK s dlouhým řetězcem ve vzorcích sýrů – použité startovací kultury



Obrázek 15: Obsah vázaných nenasycených MK ve vzorcích sýrů – použité startovací kultury

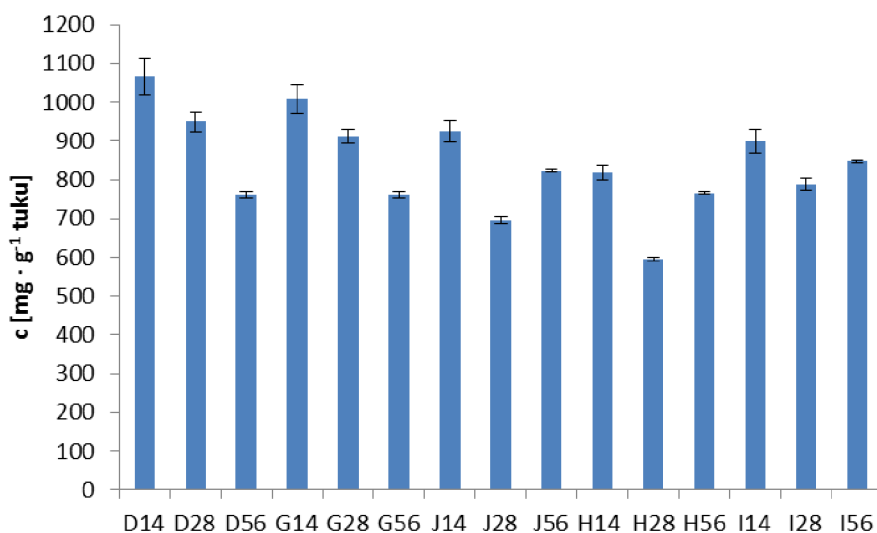
4.3 Srovnání obsahu volných a vázaných mastných kyselin ve vzorcích – průběh zrání

Dalším cílem práce bylo sledovat změny v průběhu zrání sýrů. Eidamské sýry by měly zrát po dobu nejméně 4 týdnů [3, 17]; vzorky byly odebrány a analyzovány po 14, 28 a 56 dnech zrání, po této době už by měla být plně vyvinuta typická chuť a vůně.

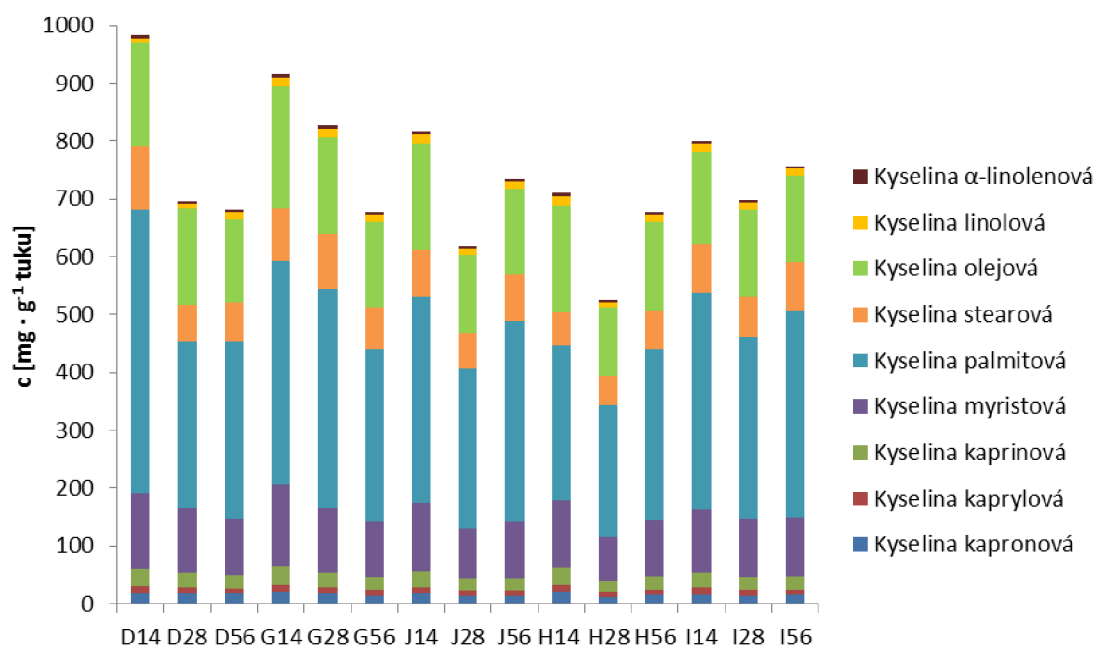
V následujících kapitolách bude diskutováno srovnání obsahu MK ve vzorcích v průběhu zrání, a to jak pro MK vázané, tak volné.

4.3.1 Srovnání celkového obsahu volných a vázaných mastných kyselin

V grafech na Obrázcích 16 a 18 je uvedeno srovnání celkového obsahu volných/vázaných MK, v grafech na Obrázcích 17 a 19 zase srovnání celkového obsahu pouze vybraných volných/vázaných MK.



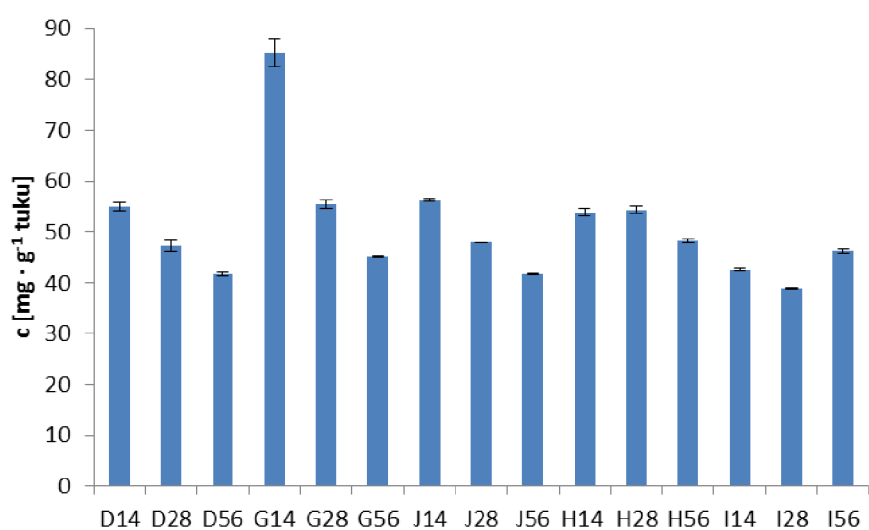
Obrázek 16: Celkový obsah vázaných MK ve vzorcích sýrů – průběh zrání



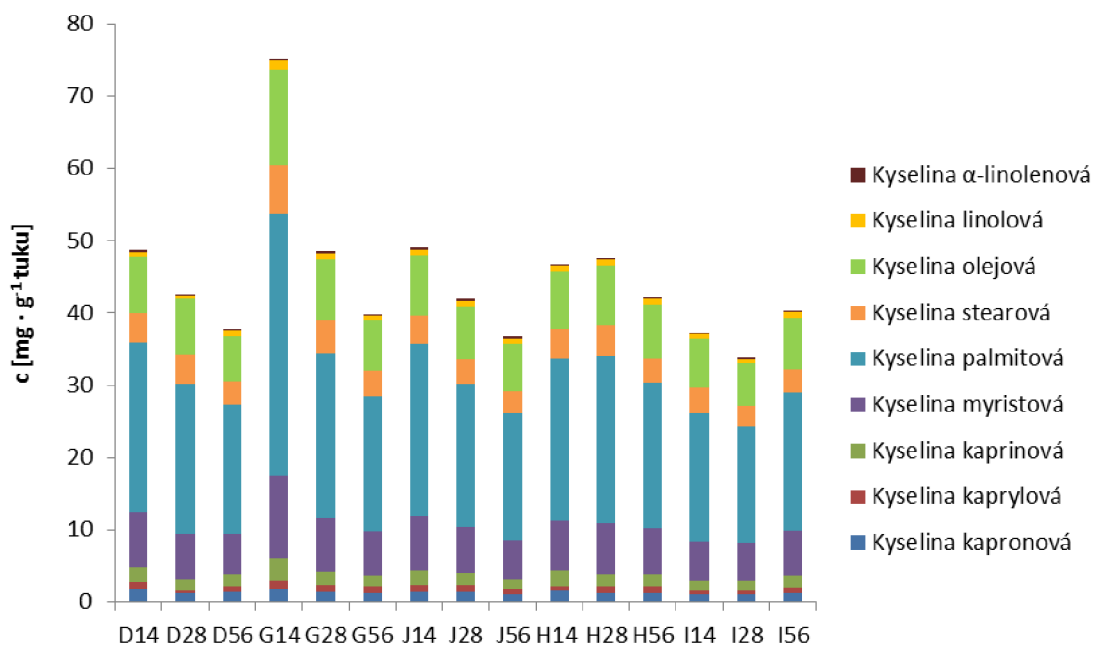
Obrázek 17: Obsah vybraných vázaných MK ve vzorcích sýrů – průběh zrání

Co se týče vázaných MK, v průběhu zrání dochází v důsledku lipolýzy k jejich postupnému odbourávání, a lze tedy očekávat snižování jejich obsahu. Z grafů na Obrázcích 16 a 17 je patrné, že v prvních 14 dnech zrání došlo u všech vzorků k výraznému poklesu ($p < 0,05$), u některých vzorků (H, I, J) však došlo v poslední fázi k mírnému nárůstu celkového obsahu. Tento fakt může být pravděpodobně způsoben nestejným průběhem zrání jednotlivých sýrů. Modelové sýry byly vyrobeny v poloprovozních podmínkách a zrály v jednoduchých zracích boxech, a je tedy obtížné zabezpečit totožný průběh zrání, zvláště v pozdějších fázích zracího procesu, kdy dochází k významným změnám.

Přestože byl sýr vždy pečlivě homogenizován pro zabezpečení reprezentativního vzorku, mohla také analyzovaná část pocházet z mírně odlišných částí sýra.



Obrázek 18: Celkový obsah VMK ve vzorcích sýrů – průběh zrání



Obrázek 19: Obsah vybraných VMK ve vzorcích sýrů – průběh zrání

Obsah VMK by se měl naopak v důsledku lipolýzy v průběhu zrání sýrů zvyšovat. Na druhou stranu řada z nich je důležitými prekurzory pro produkci AAL, dochází tedy zároveň k jejich postupnému odbourávání za vzniku, např. esterů, alkoholů, aldehydů, ketonů a především laktonů, nezbytných pro charakteristický flavour eidamských sýrů [25, 28]. Tomu odpovídá průběh změn VMK v grafech na Obrázcích 18 a 19, u většiny vzorků dochází k jejich mírnému poklesu; to znamená, že degradační procesy převažují nad uvolňováním MK v důsledku lipolýzy, což je žádoucí, neboť nedochází k nahromadění VMK a ke vzniku žluklého off-flavouru.

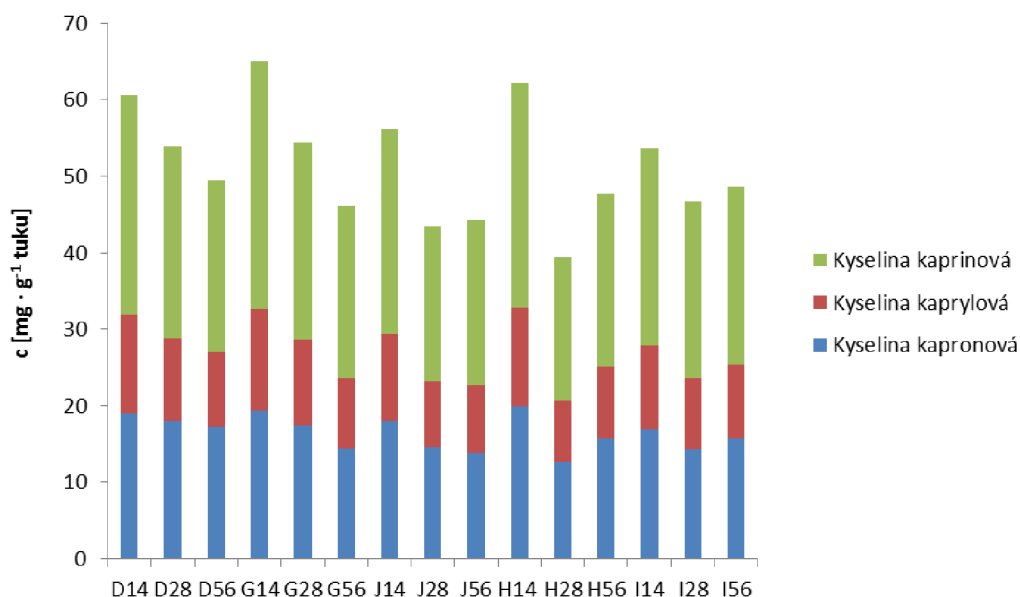
Profilu VMK u všech vzorků dominuje kyselina palmitová, ve významných množstvích jsou zastoupeny dále kyseliny myristová, olejová a stearová, což kromě kyseliny olejové je v souladu s dosavadními studiemi VMK v eidamských sýrech (viz Tabulka 3).

Obsah VMK se po 56 dnech zrání u všech vzorků pohyboval přibližně kolem $40 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ tuku, tzn. že žádná z použitých kombinací kultur ve výsledku nevykazuje vyšší lipolytickou aktivitu, která by mohla mít negativní vliv na výsledné aroma sýru kvůli zvýšenému obsahu VMK. Rozsáhlá lipolýza je obecně u sýrů holandského typu považována za nežádoucí [32].

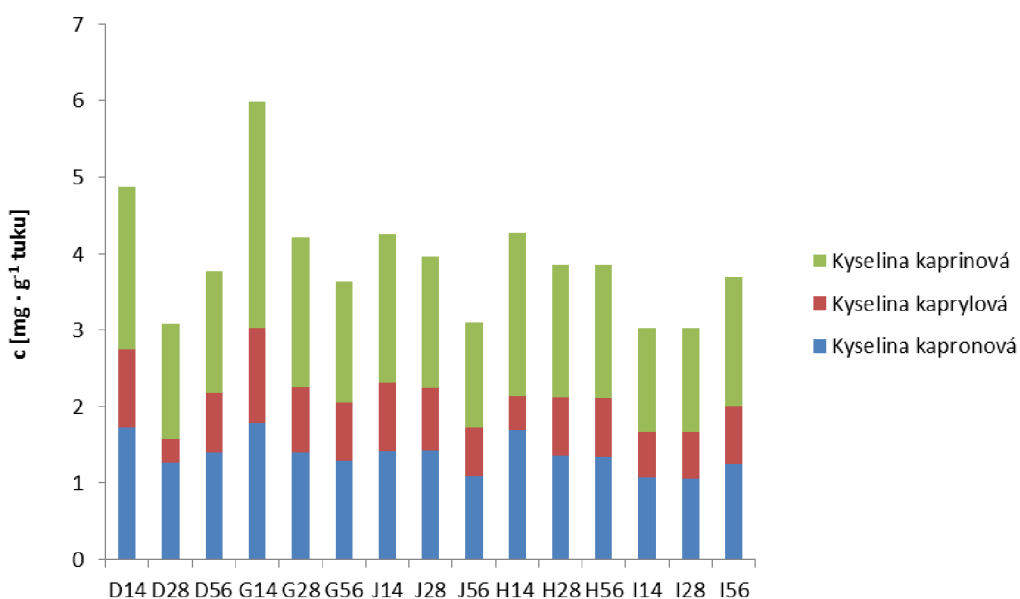
4.3.2 Srovnání obsahu volných a vázaných mastných kyselin s krátkým řetězcem

Pro lepší přehlednost jsou v následujících kapitolách MK opět rozděleny do skupin.

V grafech na Obrázcích 20 a 21 je znázorněn průběh změn MK s krátkým řetězcem. Určitou nevýhodou z hlediska stanovení je vysoká volatilita těchto MK, resp. jejich methylesterů. Je pravděpodobné, že během přípravy MEMK mohlo dojít k určitým ztrátám vytěkáním, a tudíž jsou výsledky do jisté míry zkreslené. Nicméně výsledky jsou v souladu s výše uvedenými, obsah všech těchto MK vázaných v průběhu zrání většinou klesá, mírný nárůst v poslední fázi zrání byl opět zaznamenán u vzorků H, I a J. Obsah VMK je proměnlivý, spíše klesající. Přestože se tyto MK samy o sobě díky své těkavosti podílejí na flavouru sýrů, dochází pravděpodobně v průběhu zrání i k jejich odbourávání za vzniku AAL.



Obrázek 20: Obsah vázaných MK s krátkým řetězcem ve vzorcích sýrů – průběh zrání

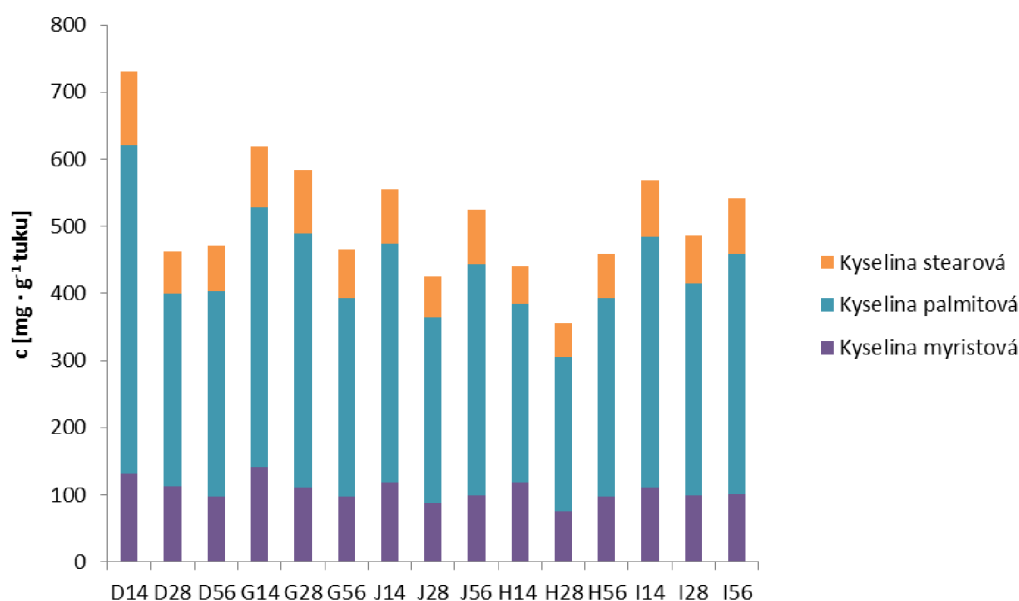


Obrázek 21: Obsah VMK s krátkým řetězcem ve vzorcích sýrů – průběh zrání

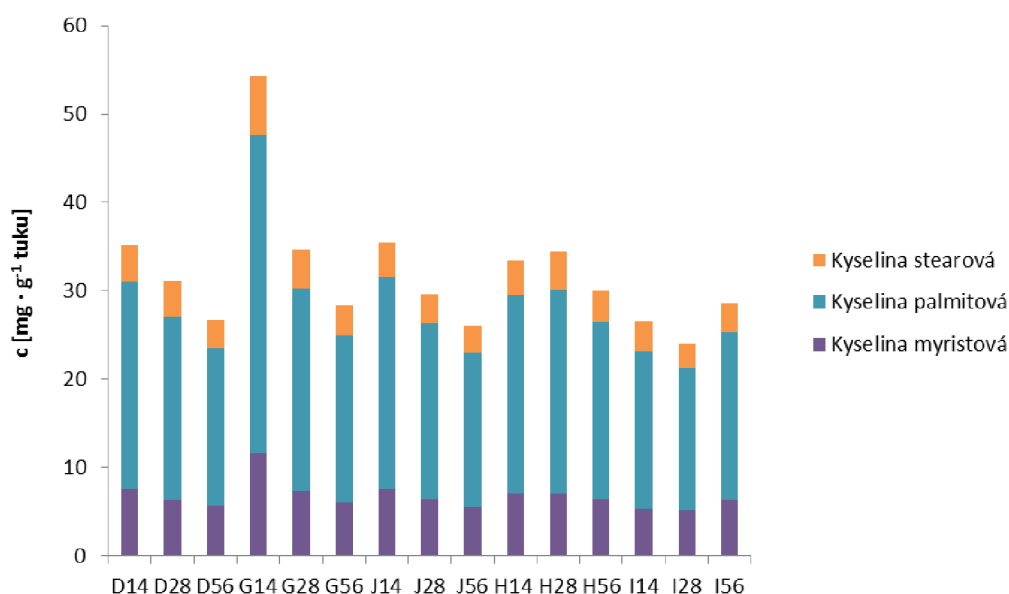
MK s krátkým řetězcem jsou na TAG vázány převážně do polohy sn-3. V řadě studií byl prokázán rychlejší nárůst obsahu VMK s kratším, popř. středním řetězcem, během zrání na úkor MK s dlouhým řetězcem. Tento jev u lipolýzy je určen jak selektivitou mikrobiálních lipolytických enzymů, tak přístupem enzymu k tuku, proto lipasy zpravidla hydrolyzují nejdříve MK v TAG navázané v polohách sn-1 a sn-3. [10, 35] Zvýšená rychlost hydrolyzy těchto kyselin však v našem případě nebyla prokázána. Nejvyšší obsah jak vázaných, tak volných MK s krátkým řetězcem tvoří kyselina kaprinová.

4.3.3 Srovnání obsahu ostatních volných a vázaných mastných kyselin

V této kapitole je uvedeno srovnání MK s dlouhým řetězcem (Obrázky 22 a 23) a MK nenasycených (Obrázky 24 a 25).



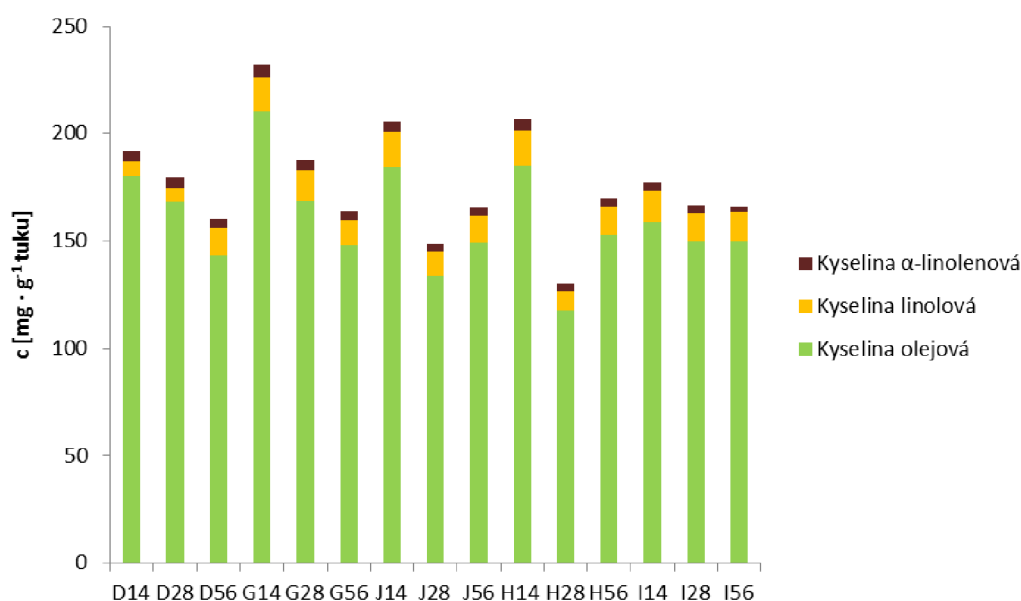
Obrázek 22: Obsah vázaných MK s dlouhým řetězcem ve vzorcích sýrů – průběh zrání



Obrázek 23: Obsah VMK s dlouhým řetězcem ve vzorcích sýrů – průběh zrání

MK s dlouhým řetězcem (> 12 C) pravděpodobně nemají pro flavour sýrů velký význam vzhledem k jejich relativně vysokému prahu vnímání (tj. nejnižší koncentrace, kterou jsme schopni vnímat našimi chuťovými příp. čichovými receptory). Přispívají tedy především jako prekursory dalších AAL [13, 34, 36].

Majoritní podíl MK s dlouhým uhlovodíkovým řetězcem u všech vzorků má ve formě esterově vázané i volné kyselina palmitová, což je v souladu s literaturou [12]. Její změny nejvíce ovlivňují celkový profil MK ve vzorcích. Vysoký obsah v porovnání s ostatními MK má rovněž kyselina myristová a stearová. Obecně jsou MK s dlouhým uhlovodíkovým řetězcem vázány v TAG v poloze sn-2, kromě kyseliny stearové, ta je přednostně vázána spíše v sn-1 [10,13].



Obrázek 24: Obsah vázaných nenasycených MK ve vzorcích sýrů – průběh zrání



Obrázek 25: Obsah nenasycených VMK ve vzorcích sýrů – průběh zrání

Z nenasycených MK je v mléčném tuku nejvýznamnější kyselina olejová, ta byla druhou nejvíce zastoupenou kyselinou i v našich modelových sýrech. Kyselina linolová a α -linolenová se v porovnání s ostatními vybranými MK vyskytují v minoritním množství. Nenasycené MK jsou v molekulách TAG vázány na okrajových polohách, tedy sn-1 a sn-3, tudíž jsou snadno dostupné pro lipasy [10,13]. Celková koncentrace těchto vybraných MK jak ve formě vázané, tak volné, je kvůli nepoměru jejich množství ovlivněna primárně koncentrací kyseliny olejové.

Celkově lze říci, že změny MK v průběhu zrání sýrů odpovídaly očekávání. Vzhledem k tomu, že jsme neměli k dispozici vzorky mléka, ze kterého byly sýry vyrobeny a ani vzorky odběrů na počátku zrání, nelze ze získaných dat průběh lipolýzy posoudit úplně přesně. V čerstvě nadojeném mléce, v závislosti na délce skladování, mohou vznikat VMK působením nativní lipoproteinové lipasy, jejíž aktivita je z velké části inaktivována během pasterace a na dalším průběhu lipolýzy v sýrech se již podílí jen ve velmi malé míře, ale MK uvolněné z TAG jejím působením mohou z mléka do těsta sýra přecházet [35].

Pro lepší posouzení průběhu lipolýzy během zrání a vlivu použitých kultur na změny profilu volných a vázaných MK bude potřeba provést opakování experimentu s větším množstvím odběrů v průběhu zrání s kratšími časovými intervaly mezi odběry, což bude naplní další navazující práce.

4.4 Identifikace těkavých látek v modelových vzorcích sýrů

Identifikace AAL byla provedena na základě srovnání hmotnostních spekter sloučenin s dostupnou knihovnou spekter. Tabulka 12 uvádí přehled všech AAL identifikovaných ve všech vzorcích. Přítomnost dané AAL ve vzorku je v tabulce vyznačena symbolem ✓. Vzhledem k mírným odchylkám retenčních časů je vždy uveden aritmetický průměr – relativní odchylky se obecně pohybovaly v hodnotách $< 1\%$, takže reprodukovatelnost kvalitativní analýzy lze považovat za výbornou.

Tabulka 12b: Přehled těkavých látek identifikovaných ve vzorcích sýrů (pokračování)

Název sloučeniny	T _R [min]	Skupina	D14	D28	D56	G14	G28	G56	H14	H28	H56	I14	I28	I56	J14	J28	J56	Reference
Butan-2,3-diol	28,19	alkohol	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	36
Linalool	28,51	ostatní				✓			✓						✓	✓		41
Methyl-kaprinát	31,15	ester			✓											✓		51
Undekan-2-on	31,36	keton		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	41
Ethyl-kaprinát	34,18	ester														✓		55
Kyselina máslná	35,05	kyselina	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	32
Nonan-1-ol	36,26	alkohol		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	95
Karvon	40,82	ostatní	✓	✓		✓	✓		✓			✓	✓		✓	✓		41
Citral	41,05	ostatní			✓	✓	✓	✓			✓			✓		✓	✓	96
Kyselina valerová	42,68	kyselina									✓		✓	✓			✓	41
Citronellol	43,22	ostatní	✓	✓		✓			✓			✓		✓	✓	✓	✓	96
δ-hexalakton	44,14	lakton	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	96
Methyl-laurát	44,85	ester		✓							✓		✓					45
Tridekan-2-on	45,19	keton			✓	✓		✓								✓		41
Kyselina kapronová	47,88	kyselina	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	32
Benzylalkohol	48,59	alkohol	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	51
Dimethylsulfon	49,70	silná sl.	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	41
δ-oktalakton	52,03	lakton	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	41
Methyl-myristát	53,75	ester				✓			✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		96
Fenol	54,03	alkohol		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	32
Kyselina kaprylová	56,27	kyselina	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	32
Kyselina nonanová	59,84	kyselina			✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	32
δ-dekalakton	60,15	lakton	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	41
Methyl-palmitát	60,83	ester	✓	✓		✓		✓	✓		✓	✓		✓	✓	✓	✓	96

Značení vzorků viz Tabulka 5; T_R – průměrný retenční čas; ✓ látka byla v daném vzorku identifikována

AAL byly rozřazeny pro lepší porovnávání do skupin, které obvykle korelují s typem funkční skupiny v molekule organické látky. Jedná se o alkoholy, aldehydy, ketony, karboxylové kyseliny, estery, laktony a sírné sloučeniny. Do skupiny „ostatní“ bylo zařazeno 6 sloučenin, které jsou charakteristické spíše pro rostlinné materiály a do mléka a následně i do sýřeniny se pravděpodobně dostávají jako součást stravy dojnic, a nejsou tedy výsledkem katabolismu některé z mléčných složek.

Celkem bylo ve všech vzorcích sýrů identifikováno 50 těkavých sloučenin, z toho 11 alkoholů, 5 aldehydů, 7 ketonů, 6 karboxylových kyselin, 10 esterů, 3 laktony, 2 sírné sloučeniny a 6 AAL zařazených do skupiny „ostatní“.

Ukázky chromatogramů jsou v Přílohách 7–11.

Všechny identifikované těkavé látky lze považovat za aromaticky aktivní, tj. vykazují určitou vůni/pach a mohou tak přispívat ke konečnému flavouru sýrů. Problematikou charakterizace aroma těkavých látek nejen v sýrech se v současnosti zabývá celá řada publikací, např. Marilley a Casey [28], Fox a Wallace [29] nebo Hassan a kol. [30]. Identifikované těkavé sloučeniny byly porovnány s několika dostupnými publikacemi, deskriptory pro popis jejich aroma jsou uvedeny v Příloze 1.

Z pohledu jednotlivých chemických skupin byly ve všech vzorcích nejvíce zastoupeny alkoholy, následované karboxylovými kyselinami a ketony. Vysokou četnost výskytu měly i sloučeniny ze skupiny „ostatní“.

Ve všech vzorcích sýrů se nacházely tyto sloučeniny: 4 alkoholy (okt-1-en-3-ol, 2-ethylhexan-1-ol, butan-2,3-diol, benzylalkohol), 3 aldehydy (hexanal, nonanal, benzaldehyd), 3 ketony (acetoin, heptan-2-on, nonan-2-on), 4 karboxylové kyseliny se sudým počtem uhlíků (octová, máselná, kapronová, kaprylová), 1 lakton (δ -oktalakton), 1 sírná sloučenina (dimethylsulfon) a z ostatních sloučenin D-limonen.

Sloučeniny, které se vyskytovaly téměř ve všech vzorcích (kromě jediného případu) jsou: z alkoholů 3-methylbut-2-en-1-ol, hexan-1-ol a fenol, dále undekan-2-on a 2 laktony – δ -hexalakton a δ -dekalakton.

Z klíčových AAL, které bývají obvykle identifikovány v eidamských sýrech (uvedené v kapitole 2.5.8), byl v našich vzorcích nalezen hexanal, kyseliny octová a máselná. Obvykle bývá přítomen i diacetyl, ten však nebyl identifikován v žádném vzorku, byly ale nalezeny jeho redukované formy acetoin a butan-2,3-diol. Podobně nebyl nalezen ani typický dimethylsulfid, ale jeho oxidovaná forma dimethylsulfon. Ze sloučenin typických pro eidamské sýry, které byly identifikovány kromě jediné výjimky u všech vzorků, se pak s literaturou shodují ještě δ -dekalakton a D-limonen.

Šestiuhlíkatý aldehyd s přímým řetězcem, hexanal, vzniká s největší pravděpodobností při β -oxidaci nenasycených MK, konkrétně z kyseliny linolové. Další možností jeho tvorby jsou světlem indukované reakce (žluknutí). Takové reakce v sýrech běžně neprobíhají, proto se může hexanal využívat jako indikátor zhoršení kvality u nesprávně skladovaných produktů [41]. K určitému nárůstu jeho koncentrace v našich vzorcích tak mohlo dojít i během odběru, převozu do laboratoře a skladování. Jedná se o sloučeninu s ovocným (citron, zelené jablko), až spíše bylinným aroma, často se pro popis používá spojení „vůně posekané trávy“ [32, 50–52, 93, 95]. Obecně ale mají aldehydy s přímým řetězcem spíše negativní dopad na flavour sýra, pokud jejich koncentrace překračují určitou hodnotu. U hexanalů se tato hodnota

pohybuje kolem $9 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ [41, 95] a při jejím překročení se vyznačuje spíše „lojovitým“ zápachem [97].

Z dalších aldehydů byl ve všech vzorcích identifikován nonanal a benzaldehyd. Nonanal s vyšší prahovou koncentrací (kolem $40 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ [95]) se svým aroma podobá hexanalu. I tento aldehyd s přímým řetězcem se vyznačuje vůní zeleně a bylin, pro popis off-flavouru, který vzniká v důsledku vyšší koncentrace, se často využívá pojmů jako „špinavý, plastový, mastný, olejovitý“ [41, 51, 52, 93, 95]. Benzaldehyd vznikající při katabolismu aromatické aminokyseliny fenylalaninu, uvolněného z bílkovin při proteolýze, svou vůní typicky připomíná hořké mandle, popř. připálený cukr nebo i chleba [50, 55, 95].

Typickými AAL eidamských sýrů ze skupiny MK jsou kyseliny octová a máselná, které byly rovněž ve všech našich vzorcích detekovány. Kyselina octová, jejíž prahová koncentrace se pohybuje kolem $22 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ [95], se vyznačuje pronikavým, kyselým, až ostrým či drsným zápachem [32, 33, 47, 50, 93]. Tato dvouuhlíkatá kyselina může vznikat jak při metabolismu citrátu nebo laktátu, tak i při katabolismu některých aminokyselin (alanin, serin, threonin) [42, 47, 51]. Zatuchlý, nepříjemný, ostrý a kyselý pach je charakteristický pro nejvíce zastoupenou VMK v sýrech holandského typu – kyselinu máselnou. Tato kyselina (prahová koncentrace $1,4 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ [95]), vzniká převážně jako produkt hydrolytické aktivity lipas [32, 33, 52, 53]. Jak již bylo zmíněno, nadměrná nebo nevyvážená lipolýza však může vést k nadbytku VMK s krátkým řetězcem způsobující tzv. žluklost sýru. K těmto VMK kromě kyseliny máselné patří i kyseliny kapronová a kaprylová. Ani jejich flavour nepatří k příjemným, obvykle jsou spojovány s ostrým, štiplavým a kozím zápachem [47]. Pro popis kyseliny kapronové se dále používají např. deskriptory „zpcený, štiplavý, fekální“, u kyseliny kaprylové např. „zatuchlý, pach čistících prostředků, hnilobný“ [51, 55].

Ke klíčovým sírným sloučeninám v eidamských sýrech patří dimethylsulfid. Tato sloučenina však nebyla v našich vzorcích vůbec identifikována na rozdíl od dimethylsulfonu. Ten vzniká oxidací dimethylsulfidu produkovaného enzymatickou nebo chemickou oxidací methanthiolu, jakožto produktu katabolismu methioninu, případně cysteinu [33]. Je spojován se zápachem síry nebo převařeného mléka [41].

Hlavním ketonem holandských sýrů, produkovaným převážně z pyruvátu při metabolismu laktosy a citrátu, popř. transaminací alaninu, je diacetyl. Ani v jednom z našich vzorků však nebyla přítomnost tohoto diketonu prokázána, naproti tomu jeho redukováná forma acetoin byla zastoupena ve všech vzorcích ve vysokých koncentracích. Tato AAL může mít květinové nebo máslové aroma, připomínající kyselé mléko nebo karamel [44, 45, 50, 51].

Methylketony, které se vyskytovaly ve všech, resp. téměř ve všech vzorcích, jsou heptan-2-on, nonan-2-on a undekan-2-on. Tyto AAL jsou spíše než pro sýry eidamského sýru typické pro plísňové sýry, pro jejichž výrobu se používají plísňové kultury s vysokou aktivitou enzymů β -oxidace, při níž jsou tyto sloučeniny produkovány z VMK [13]. Obvykle vytvářejí typické aroma plísňových sýrů, nízké koncentrace se však mohou nacházet i v jiných typech sýrů; při nižších koncentracích mají příjemné ovocné až květinové aroma, které však při rozsáhlejší průběhu β -oxidace může přejít až v nežádoucí zápach, u heptan-2-onu často popisovaný jako „plastový“ nebo „pach laku“ [32, 41, 47].

Dalším produktem redukce diacetylu, resp. acetoinu, jež se vyskytoval ve všech vzorcích ve vysokých koncentracích, je butan-2,3-diol, který významně přispívá k máslové až

ořechové vůni sýra [36, 44]. Z nenasycených alkoholů byl přítomen okt-1-en-3-ol, prekurzorem této osmiuhlíkaté sloučeniny jsou kyselina linolová a linolenová. Tato AAL s houbovými tóny má velmi nízkou prahovou koncentraci ($10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ [13]). Je spíše klíčovou složkou sýrů typu Camembert, ale jeho přítomnost byla prokázána i u jiných druhů sýrů. Některé studie uvádí, že by mohl mít maskovací účinek na plišňový zápach methylketonů [41].

Benzylalkohol, vznikající redukcí benzaldehydu, má ovocnou až květinovou vůni, především po růžích [51, 54]. Pro 2-ethylhexan-1-ol je naopak typická vůně zeleně, případně až nepříjemný zápach lepenky nebo zvířecí pach [50, 95], pro 3-methylbut-2-en-1-ol zase sýrové nebo ovocné aroma, popř. vůně zeleně [41], která je typická i pro další identifikovaný alkohol, heptan-1-ol [95].

Positivní vliv na aroma sýrů mají při koncentracích blízkých prahovým i fenolické látky, se zvyšujícím se obsahem je však jejich přítomnost nežádoucí, protože vede k tvorbě pachutí. Pro fenol, vznikající degradací tyrosinu, jsou tak pro popis jeho aroma používány výrazy jako „fekální, kouřový, kovový, zatuchlý“ nebo v nižších koncentracích „pikantní“ [32, 51].

Ačkoliv není aroma laktonů typicky „sýrové“, jedná se o významné AAL přispívající k máslovému charakteru sýrů. Jejich aroma je popisováno jako „broskvové, meruňkové, kokosové, máslové“. K nejběžnějším patří δ -dekalakton a δ -dodekalakton, nezbytné pro charakteristický flavour eidamských sýrů. V našich vzorcích byly identifikovány δ -laktony, konkrétně δ -hexalakton, δ -oktalakton a δ -dekalakton. δ -oktalakton a δ -dekalakton se většinou vyznačují sladkými, květinovými, broskvovými nebo kokosovými vůněmi [41, 51, 55].

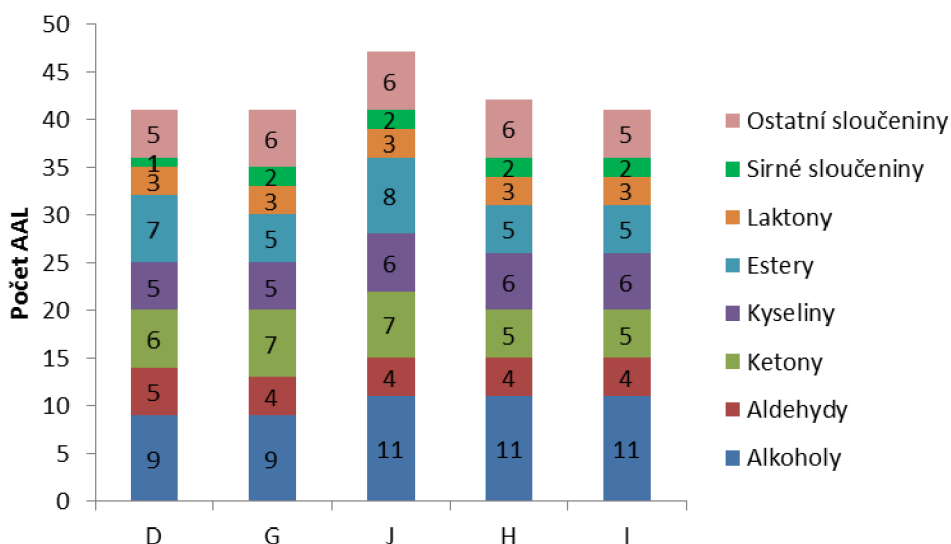
Poslední sloučeninou, která se vyskytovala ve všech vzorcích, je D-limonen. Obsah tohoto cyklického monoterpenu s vůní máty nebo trávy závisí především na složení použitého krmiva [32, 51].

4.4.1 Srovnání identifikovaných látek ve vzorcích – použité startovací kultury

Jak již bylo zmíněno, hlavním cílem této diplomové práce bylo posoudit vliv aplikace různých mikrobiálních kultur použitých pro výrobu modelových sýrů, v této kapitole na přítomnost a následně obsah AAL.

Srovnání celkového počtu identifikovaných sloučenin ve vzorcích rozdělených podle chemických skupin je uvedeno v grafu na Obrázku 26, podrobnější přehled i v jednotlivých fázích zrání v Tabulce 13 a v grafu na Obrázku 27.

Z grafu na Obrázku 26 je patrné, že nejvíce těkavých látek bylo identifikováno ve vzorku J (47), přičemž nejvíce byly zastoupeny alkoholy a estery. Ve vzorku H bylo identifikováno 42 a ve vzorcích D, G a I 41 těkavých látek, nejvyšší počet opět zastupovaly alkoholy, následované ketony nebo karboxylovými kyselinami. Z tohoto hlediska nejsou mezi vzorky významné rozdíly a výrazně se neliší ani zastoupení chemických skupin. Pokud však vezmeme v úvahu i jednotlivé fáze zrání (Obrázek 27), rozdíly mezi jednotlivými vzorky v počtu identifikovaných sloučenin jsou více patrné.

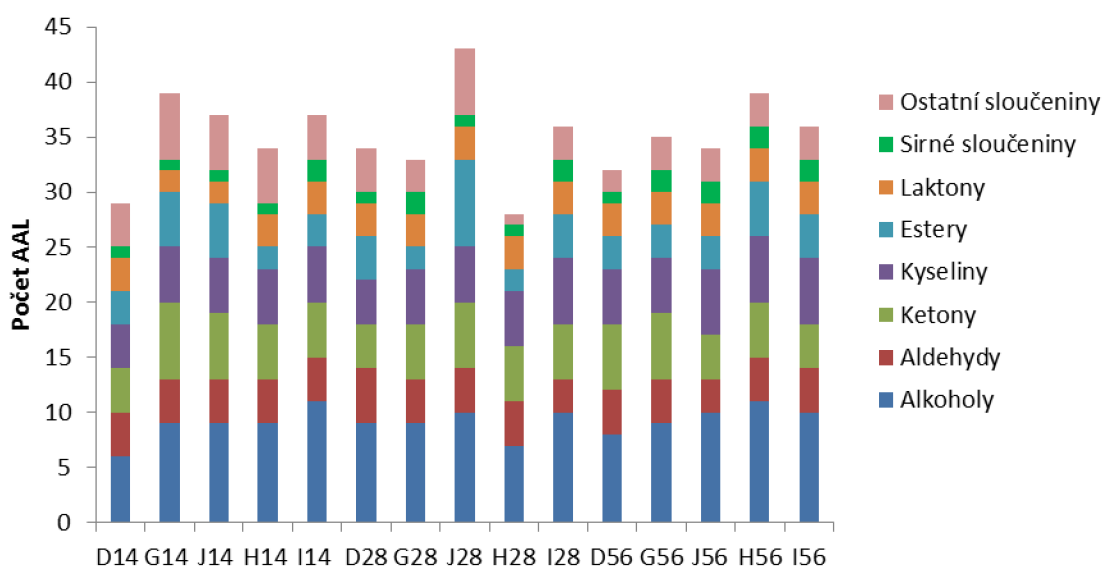


Obrázek 26: Celkový počet těkavých látek podle chemických skupin v jednotlivých sýrech

Tabulka 13: Přehled celkového počtu těkavých látek podle chemických skupin ve vzorcích sýrů

	D14	G14	J14	H14	I14	D28	G28	J28	H28	I28	D56	G56	J56	H56	I56
Alkoholy	6	9	9	9	11	9	9	10	7	10	8	9	10	11	10
Aldehydy	4	4	4	4	4	5	4	4	4	3	4	4	3	4	4
Ketony	4	7	6	5	5	4	5	6	5	5	6	6	4	5	4
Kyseliny	4	5	5	5	5	4	5	5	5	6	5	5	6	6	6
Estery	3	5	5	2	3	4	2	8	2	4	3	3	3	5	4
Laktony	3	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Sirné sloučeniny	1	1	1	1	2	1	2	1	1	2	1	2	2	2	2
Ostatní	4	6	5	5	4	4	3	6	1	3	2	3	3	3	3
Celkem	29	39	37	34	37	34	33	43	28	36	32	35	34	39	36

Značení vzorků viz Tabulka 5



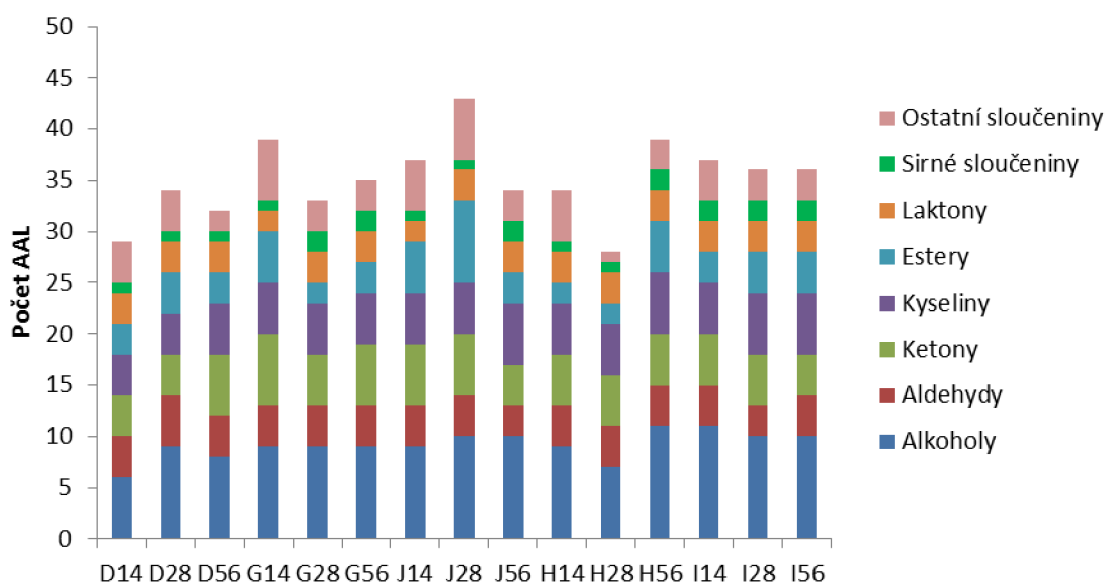
Obrázek 27: Celkový počet těkavých látek podle chemických skupin ve vzorcích sýrů – použité startovací kultury

Hlavní funkcí mezofilní smetanové kultury (*Lactococcus* spp.) při výrobě sýrů je fermentace laktosy, zatímco termofilní laktobacily přispívají spíše svojí proteolytickou a lipolytickou aktivitou [7].

Vzhledem k tomu že u eidamských sýrů je pro vznik AAL během zrání nejdůležitější proteolýza, lze u vzorků s přidavkem termofilních laktobacilů (G, H, I, J) očekávat bohatší a pestřejší spektrum identifikovaných těkavých sloučenin. Z grafu na Obrázku 27 je dobře patrný nejnižší počet identifikovaných sloučenin ve vzorku D (bez přidavku termofilních laktobacilů) v první fázi zrání; v poslední fázi zrání už tento rozdíl není tak jasně patrný. Ve střední fázi zrání je počet identifikovaných sloučenin proměnlivý, tady je pravděpodobně potřeba brát v úvahu změny jednotlivých sloučenin, např. přeměna aldehydů, ketonů nebo kyselin na alkoholy, reakce kyselin a alkoholů za vzniku esterů aj. (viz kap. 2.4). Ve všech vzorcích se počet identifikovaných sloučenin pohybuje cca mezi 30–40.

4.4.2 Srovnání identifikovaných látek ve vzorcích – průběh zrání

Pokud bereme v úvahu průběh zrání sýrů, lze očekávat tvorbu nových sloučenin, a tedy zvyšování jejich počtu. Jak je patrné z grafu na Obrázku 28, tento předpoklad se nepotvrdil. Pouze u vzorku D (bez přidavku termofilních laktobacilů) je patrný mírný nárůst a u vzorku H (*Lactobacillus plantarum*) je v poslední fázi více detekovaných sloučenin; v ostatních vzorcích počet překvapivě spíše klesá, resp. na konci zrání je méně sloučenin než na začátku. Spektrum sloučenin v nezralých sýrech je poněkud odlišné od zralých sýrů a zřejmě se během zrání některé sloučeniny pocházející z mléka, příp. vznikající v prvních fázích výroby při fermentaci laktosy, odbourávají až na jednoduché sloučeniny, které nejsou naší metodou detekovány.



Obrázek 28: Celkový počet těkavých látek podle chemických skupin ve vzorcích sýrů – průběh zrání

4.5 Semikvantifikace těkavých látek v modelových vzorcích sýrů

Zajímavější než porovnávat pouze počet identifikovaných sloučenin je sledování jejich obsahu v jednotlivých vzorcích. Vzhledem k tomu, že nebyly k dispozici veškeré potřebné standardy pro úplnou kvantifikaci, byl obsah AAL ve vzorcích zjišťován pouze semikvantitativní analýzou, kdy byly srovnávány plochy piků jednotlivých sloučenin. Je to sice určité zjednodušení, přesto však lze tímto způsobem poměrně dobře postihnout rozdíly mezi vzorky.

Nehledě k tomu, že podle výsledků nejnovějších výzkumů úplná kvantifikace AAL ve vzorcích není nutná. Výsledný flavour sýra je výsledkem rovnováhy řady sloučenin různých chemických tříd o různých koncentracích. Stanovení celkového aromatického složení sýrů však neodráží jejich sensorický profil při konzumaci, protože stále ještě není přesně známo, jak se různé sloučeniny kombinují, aby vytvořily celkový smyslový dojem potravinové matrice. [39] Při separaci látek nelze vzít v úvahu perceptuální interakce sloučenin ve směsi a jevy jako maskování nebo synergismus. To naznačuje, že chápání vůně/flavouru potravin také vyžaduje smyslovou charakterizaci vůně produktu, tj. kombinaci se sensorickým hodnocením. V důsledku heterogenní povahy sýrů a složitosti jejich matrice nebyl dosud objasněn chemický základ sýrového flavouru; navzdory velkému počtu publikací, z nichž většina kladla důraz na těkavé sloučeniny, je bohužel stále mnoho otázek spojených s touto problematikou nezodpovězeno [46]. Obecně se zdá, že chuť a vůně sýra nezávisí na koncentraci jakékoliv konkrétní sloučeniny, ale na kritické rovnováze nebo „vyváženém poměru“ všech přítomných složek. Tento závěr podporuje teorie rovnováhy složek, kterou uvedli již Kosikowski a Mocquot [98]. Současný přístup rozsáhlých chemických výzkumů především pomocí chromatografické separace a hmotnostní spektrometrie, jež by měly vést k získání popisu žádoucí chuti sýrů, vedl k vypracování rozsáhlých seznamů potenciálních sloučenin bez příčinné souvislosti s jejich produkcí použitými kmeny bakterií pro výrobu sýrů [36]. K tomuto se pokouší přispět tato diplomová práce, jejímž cílem je především posoudit vliv vybraných startovacích kultur na obsah AAL.

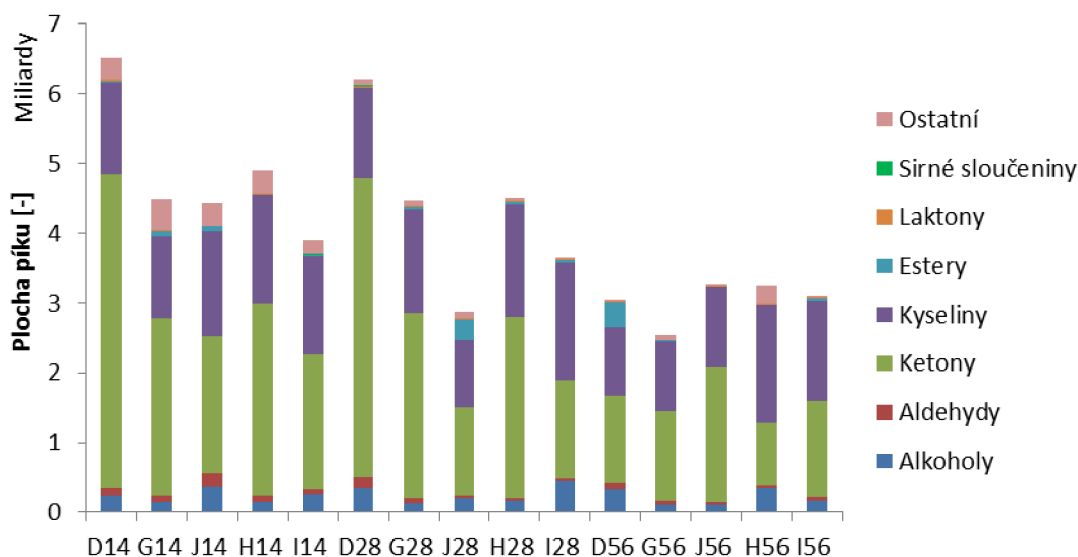
Za účelem dalšího rozvoje výzkumu sýrových příchutí je nezbytné zkoumat jejich interakci se sýrovou maticí, chutí jednotlivých sloučenin, jejich směsí a uvolňování chuti v ústech při maskování s důrazem na smyslové vnímání [39]. Porovnání získaných výsledků se sensorickým hodnocením bude náplní navazujících experimentů.

4.5.1 Srovnání obsahu identifikovaných látek ve vzorcích – použité startovací kultury

V grafu na Obrázku 29 je uvedeno srovnání obsahu identifikovaných sloučenin ve vzorcích, opět rozdělené podle chemických skupin. Z kvantitativního hlediska byly ve všech sýrech nejvíce zastoupeny ketony a karboxylové kyseliny, jejichž celkový procentuální obsah se ve vzorcích pohyboval od 72–94 %.

Jak již bylo uvedeno výše, u eidamských sýrů je pro vznik AAL během zrání nejdůležitější proteolýza, u vzorků s přídavkem termofilních laktobacilů (G, H, I, J) tak lze předpokládat vyšší obsah AAL. Překvapivě v prvních fázích zrání byl nalezen nejvyšší obsah ($p < 0,05$) u vzorku D (bez přídavku termofilních laktobacilů); opět teprve ke konci zrání se rozdíly mezi vzorky vyrovnávají. To potvrzuje vliv laktokoků na obsah těkavých látek v sýrech.

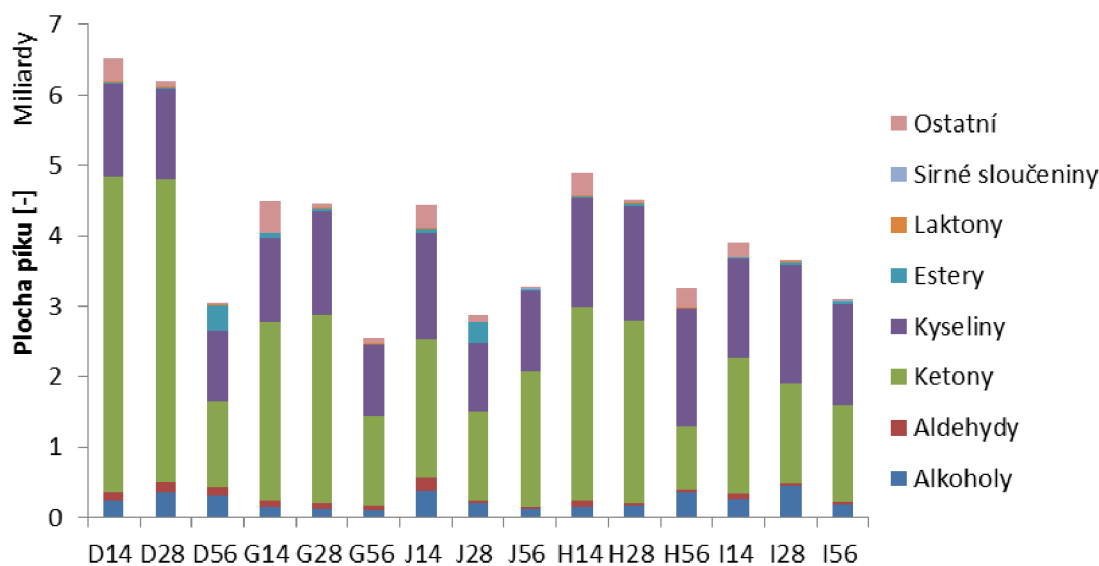
Co se týče různých kmenů *Lactobacillus casei* (vzorky G a J) a *Lactobacillus plantarum* (vzorky H a I), jsou i mezi nimi patrné rozdíly.



Obrázek 29: Obsah těkavých látek podle chemických skupin ve vzorcích sýrů – použité startovací kultury

4.5.2 Srovnání obsahu identifikovaných látek ve vzorcích – průběh zrání

V grafu na Obrázku 30 jsou vyjádřeny změny chemických skupin v průběhu zrání jednotlivých sýrů. Vzhledem k rozsáhlým dějům, které během zrání sýrů probíhají, lze očekávat výrazný nárůst obsahu těkavých látek. Nicméně stejně jako klesal počet identifikovaných sloučenin (viz kap. 4.4.2), klesá kupodivu i jejich obsah. Vysoký obsah některých sloučenin v nezralých sýrech je pravděpodobně odbourán až na jednoduché sloučeniny, které nejsou naší metodou detekovány. Z grafu na Obrázku 30 je patrné, že se jedná především o ketony (viz dále).



Obrázek 30: Obsah těkavých látek podle chemických skupin ve vzorcích sýrů – průběh zrání

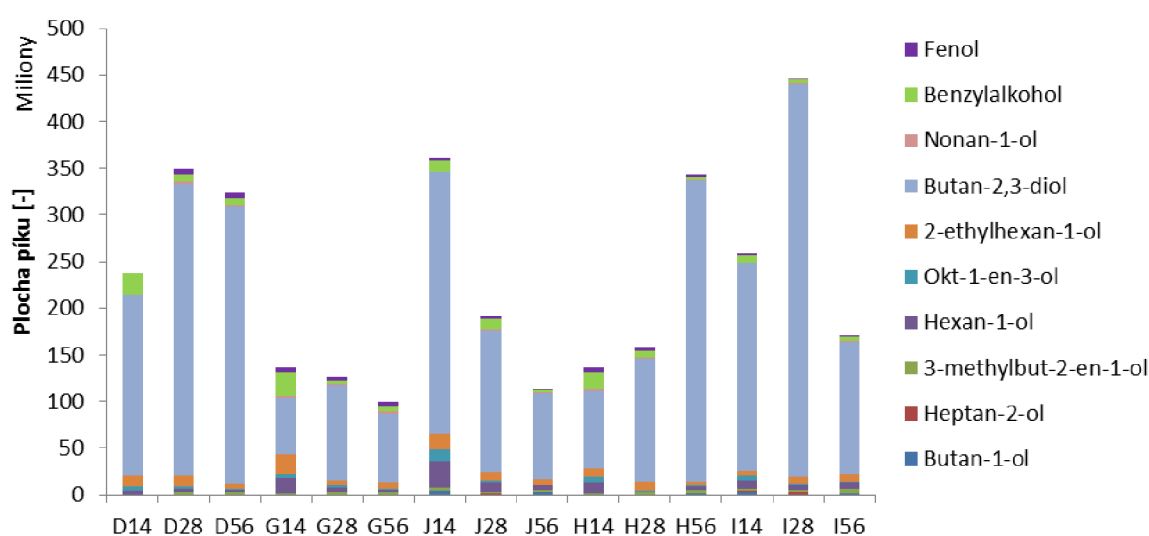
4.5.3 Diskuze jednotlivých sloučenin

V této kapitole jsou podrobněji diskutovány změny chemických skupin AAL i jednotlivých identifikovaných sloučenin.

4.5.3.1 Alkoholy

Dráhy zodpovědné za biosyntézu alkoholů zahrnují metabolismus laktosy a citrátu, katabolismus aminokyselin, redukci methylketonů a degradaci některých MK (linolová, linolenová). Mezi významné reakce patří jejich oxidace na karbonylové sloučeniny a esterifikace [13, 41]. Ve vzorcích sýrů bylo identifikováno celkem 11 alkoholů (butan-1-ol, pentan-1-ol, heptan-2-ol, 3-methylbut-2-en-1-ol, hexan-1-ol, okt-1-en-3-ol, 2-ethylhexan-1-ol, butan-2,3-diol, nonan-1-ol, benzylalkohol a fenol).

Jak je patrné z grafu na Obrázku 31, celkový obsah alkoholů je velmi proměnlivý, ve všech vzorcích byl nejvyšší obsah butan-2,3-diolu; jeho vývoj se mezi vzorky liší. U vzorku D, G a I nejprve dochází k nárůstu a později k jeho poklesu, u vzorku H po celou dobu narůstá, u vzorku J naopak klesá. U většiny ostatních alkoholů byl zjištěn klesající obsah ve všech vzorcích. Pokud vezmeme v úvahu konečnou fázi zrání, nejvyšší obsah alkoholů byl u vzorku H (*Lactobacillus plantarum*), nejnižší u vzorku G (*Lactobacillus casei*). Produkce alkoholů se tedy u jednotlivých druhů i kmenů použitých kultur významně ($p < 0,05$) liší.



Obrázek 31: Obsah jednotlivých alkoholů ve vzorcích sýrů

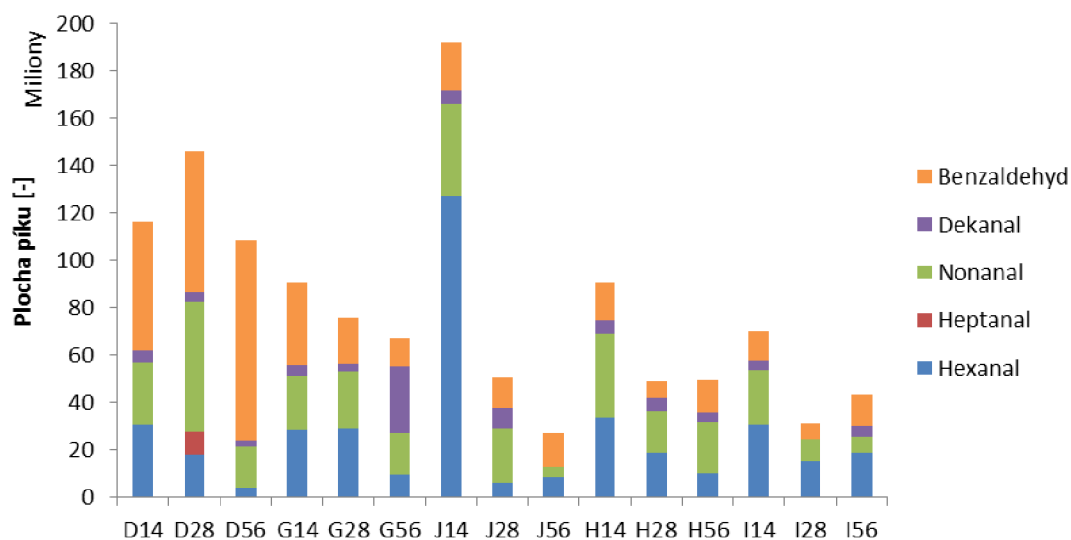
4.5.3.2 Aldehydy

Ve vzorcích bylo identifikováno celkem 5 aldehydů (hexanal, heptanal, nonanal, dekanal a benzaldehyd). Ačkoliv nasycené aldehydy mohou pocházet přímo z mléka, jejich převážná většina vzniká během β -oxidace nenasycených MK, katabolismu aminokyselin, případně z metabolismu citrátu a laktátu. Jejich výskyt v sýrech je obvykle pouze přechodný, protože během zrání podléhají redoxním reakcím za vzniku alkoholů nebo karboxylových kyselin [41, 42, 48].

Tomu odpovídají i změny v průběhu zrání všech sýrů (viz graf na Obrázku 32); jejich celkový obsah většinou klesá, vyšší rychlost degradace byla v počátečních stádiích zrání, stejně je tomu u většiny jednotlivých ketonů. Zvláštní je významně vysoký obsah hexanalů

u vzorku J (*Lactobacillus casei*) na počátku zrání, to by mohlo signalizovat nesprávný průběh zrání, nicméně v dalších fázích byl odbourán.

Pokud vezmeme v úvahu konečnou fázi zrání, nejvyšší obsah aldehydů byl ve vzorku D (bez přídavku termofilů), díky vysokému obsahu benzaldehydu, a nejnižší ve vzorku I (*Lactobacillus plantarum*). Produkce aldehydů se tedy u jednotlivých druhů i kmenů použitých kultur významně ($p < 0,05$) liší.



Obrázek 32: Obsah jednotlivých aldehydů ve vzorcích sýrů

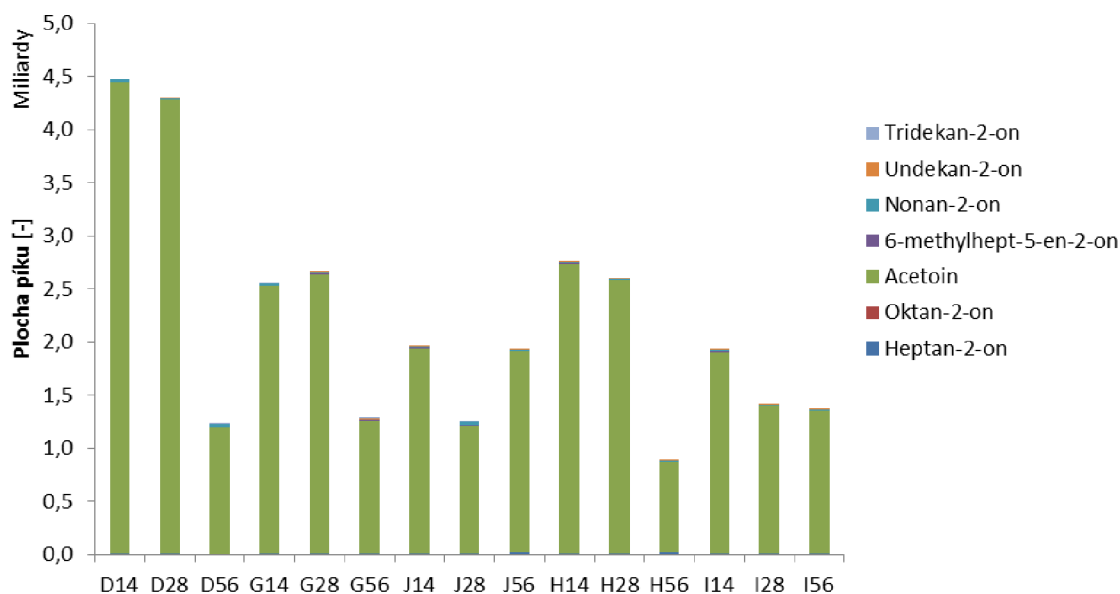
4.5.3.3 Ketony

Ketony v sýrech pocházejí z β -oxidace VMK, případně z metabolismu laktátu a citrátu [36, 41, 42, 45]. Ve vzorcích bylo identifikováno 7 ketonů (heptan-2-on, oktan-2-on, acetoin, 6-methylhept-5-en-2-on, nonan-2-on, undekan-2-on a tridekan-2-on), tvořily kvantitativně nejvýznamnější složku aromatického profilu všech vzorků (viz graf na Obrázku 30).

Nejvyšší celkový obsah ketonů (viz graf na Obrázku 33) byl nalezen u vzorku D (bez přídavku termofilů) na počátku zrání, který se prudce snížil až po více než měsíci zrání, do té doby se významně neměnil. Celkový obsah ketonů se obecně v průběhu zrání snižoval. Nebylo však prokázáno, že dochází k jejich redukci na sekundární alkoholy, protože z těchto sloučenin byl detekován pouze heptan-2-ol. Jak již bylo zmíněno, mohly být pravděpodobně odbourány až na námi nedetekované jednoduché sloučeniny.

Z grafu na Obrázku 33 je jasně patrný převládající obsah acetoinu (redukováná forma diacetylu), což je typický produkt fermentace laktosy a citrátového metabolismu.

Co se týče ostatních ketonů, methylketony se v sýrech eidamského typu vyskytují obecně v mnohem nižších koncentracích než v sýrech plísňových a pravděpodobně tak chuť/flavour těchto sýrů významně neovlivňují. U bakterií mléčného kvašení je nepravděpodobné, že budou schopny provádět β -oxidaci, což je klíčový krok při produkci methylketonů [35]. Alewijn a kol. [35] ve své práci uvádí zvýšení obsahu methylketonů v průběhu zrání u modelových sýrů typu Gouda, podobně jako tomu bylo v našem případě. Předpokládají, že produkce těchto sloučenin by mohla být způsobena pomalou enzymatickou nebo chemickou reakcí, která dosud nebyla popsána.



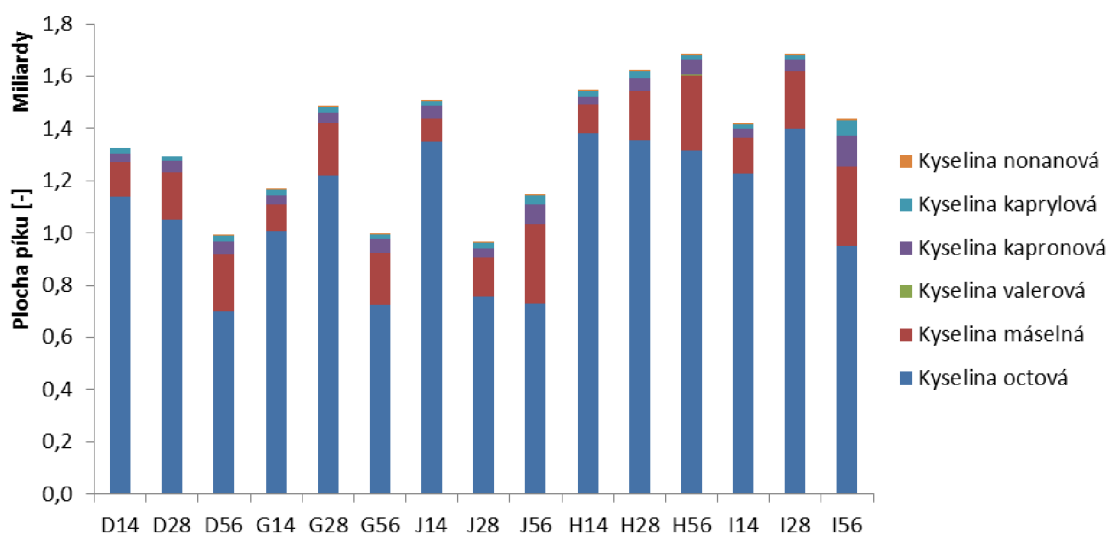
Obrázek 33: Obsah jednotlivých ketonů ve vzorcích sýrů

Pokud vezmeme v úvahu konečnou fázi zrání, nejnižší obsah ketonů byl ve vzorku H (*Lactobacillus plantarum*), naopak nejvyšší u vzorku J (*Lactobacillus casei*), přičemž rozdíl byl téměř dvojnásobný. Produkce ketonů se tedy u jednotlivých druhů i kmenů použitých kultur významně ($p < 0,05$) liší.

4.5.3.4 Karboxylové kyseliny

Zatímco MK s delším řetězcem vznikají lipolýzou mléčného tuku nebo rozkladem aminokyselin, kratší MK pochází z degradace laktosy, aminokyselin, příp. mohou být odvozeny z ketonů, esterů a aldehydů oxidací [41]. V našich vzorcích bylo identifikováno 6 kyselin (octová, máselná, valerová, kapronová, kaprylová a nonanová). Jak je vidět, metodou HS-SPME-GC-MS byly identifikovány pouze VMK s krátkým řetězcem s maximálně 9 uhlíky, protože těkavost VMK se zvyšujícím se počtem uhlíků klesá, tudíž je pro jejich stanovení nutná derivatizace obvykle na MEMK [13]. Ostatní MK jsou diskutovány v kap. 4.2 a 4.3.

Z grafu na Obrázku 34 je jasně patrný převládající obsah kyseliny octové (přibližně 2/3 celkového obsahu nízkouhlíkatých VMK) a dále vysoký obsah kyseliny máselné. Tato zjištění se shodují s výsledky studie Ruggirella a kol. [99], kteří také zjistili nejvyšší hodnoty u zmíněných kyselin v modelových vzorcích sýrů. Kyselina máselná je považována dokonce za klíčovou pro flavour eidamských sýrů [32, 49], její obsah se během zrání u všech sýrů postupně zvyšoval.



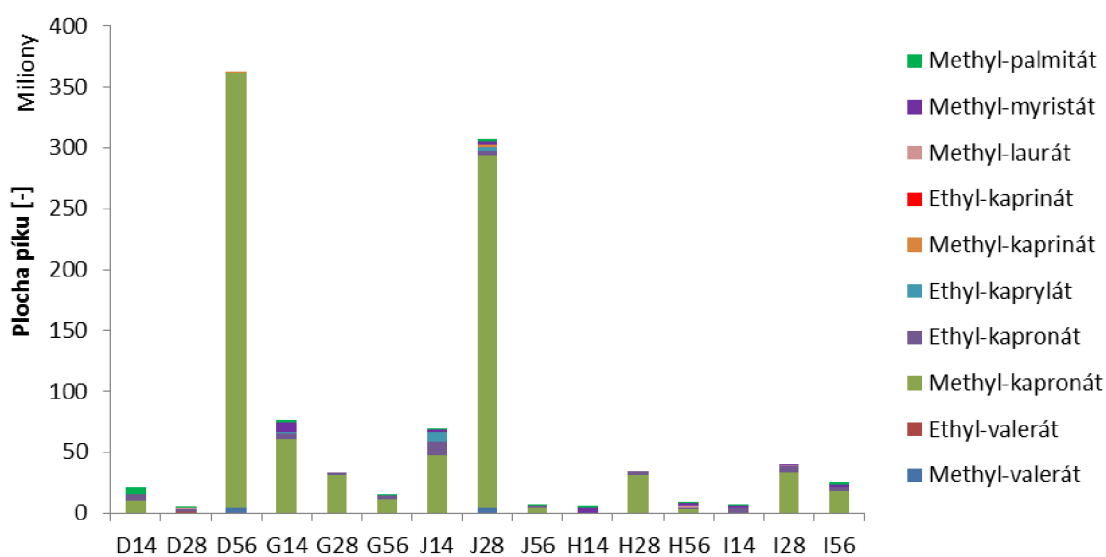
Obrázek 34: Obsah jednotlivých karboxylových kyselin ve vzorcích sýrů

Pokud vezmeme v úvahu konečnou fázi zrání, nejvyšší obsah byl naměřen u vzorku H (*Lactobacillus plantarum*), nejnižší u vzorku D (bez přidavku termofilů) a G (*Lactobacillus casei*). Produkce kyselin se tedy u jednotlivých druhů i kmenů použitých kultur také významně ($p < 0,05$) liší.

4.5.3.5 Estery

Estery vznikají esterifikací MK a primárních a sekundárních alkoholů [41]. Ve vzorcích byly identifikovány pouze methyl- a ethylestery, celkem 10 sloučenin (methyl-valerát, ethyl-valerát, methyl-kapronát, ethyl-kapronát, ethyl-kaprylát, methyl-kaprinát, ethyl-kaprinát, methyl-laurát, methyl-myristát a methyl-palmitát).

Navzdory tomu, že ethanol je převažujícím alkoholem v sýrech, bylo identifikováno více methylesterů než ethylesterů (6 : 4), z grafu na Obrázku 35 je patrný převládající obsah methyl-kapronátu. Ethanol, vzhledem k jeho extrémně vysokému obsahu ve vzorcích, zkresloval píky ostatních detekovaných sloučenin na chromatogramu a nebyl proto při vyhodnocování výsledků brán v úvahu. Samotný methanol nebyl ve vzorcích detekován.



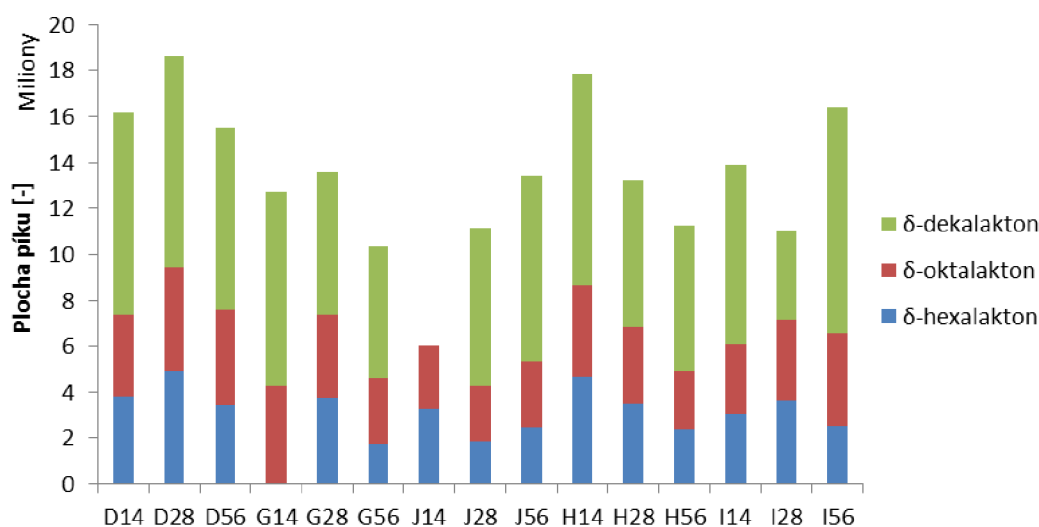
Obrázek 35: Obsah jednotlivých esterů ve vzorcích sýrů

Pokud vezmeme v úvahu konečnou fázi zrání, nejvyšší obsah byl naměřen ve vzorku D (bez přídavku termofilů), z čehož lze usuzovat, že přídavek termofilů vedl pravděpodobně k výraznějšímu odbourávání prekurzorů syntézy esterů. Také produkce esterů se tedy u jednotlivých druhů i kmenů použitých kultur významně ($p < 0,05$) liší.

4.5.3.6 Laktony

Laktony vznikají intramolekulární esterifikací hydroxykyselin [41]. Ačkoliv jsou si γ - a δ -laktony chemicky úzce příbuzné, a je tudíž pravděpodobné, že jsou tvořeny stejným mechanismem [35], nacházely se ve vzorcích sýrů (viz graf na Obrázku 36) pouze δ -laktony (konkrétně δ -hexalakton, δ -oktalakton a δ -dekalakton). Tato skutečnost je pravděpodobně důsledkem nepřítomnosti prekurzorů – hydroxykyselin. Vzhledem k tomu, že v rámci stanovení MK ani AAL nebyly detekovány žádné hydroxykyseliny, a to ani pro δ -laktony, nelze tuto skutečnost ověřit. Navíc mechanismus odpovědný za tvorbu hydroxykyselin a následnou tvorbu laktonů, včetně vlivu teploty a přítomnosti tzv. nestarterových bakterií mléčného kvašení, není znám [35].

Collins a kol. [13] uvádí, že γ -laktony jsou typické spíše pro rostlinné materiály. Na druhou stranu právě δ -laktony jsou klíčové pro flavour eidamských sýrů [13, 28] a jejich přítomnost ve vzorcích byla předpokládána.

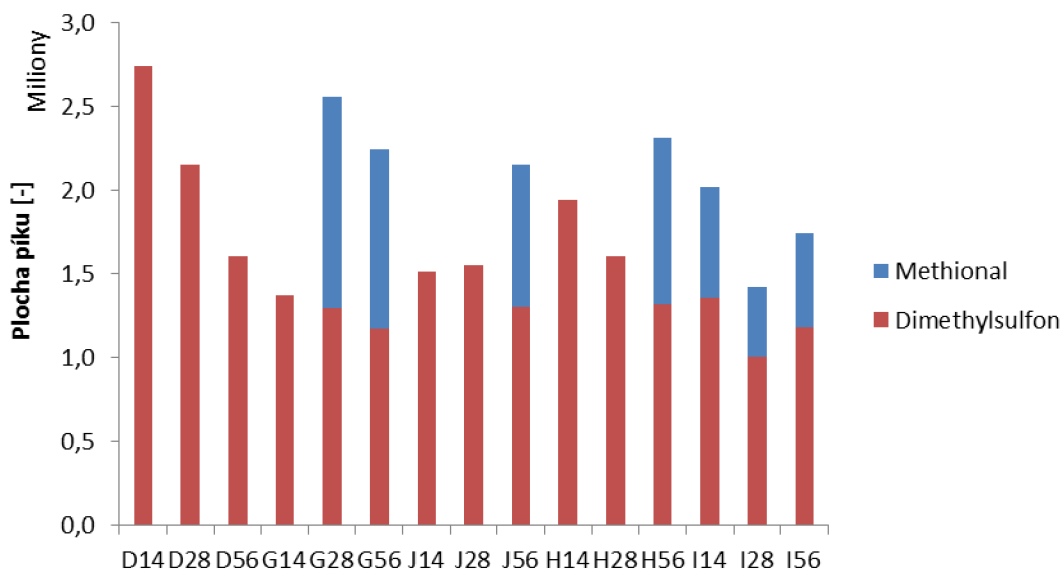


Obrázek 36: Obsah jednotlivých laktonů ve vzorcích sýrů

Pokud vezmeme v úvahu konečnou fázi zrání, nejvyšší obsah laktonů byl ve vzorku I (*Lactobacillus plantarum*) a nejnižší ve vzorku G (*Lactobacillus casei*). Také produkce laktonů se u jednotlivých druhů i kmenů použitých kultur významně ($p < 0,05$) liší.

4.5.3.7 Sirné sloučeniny

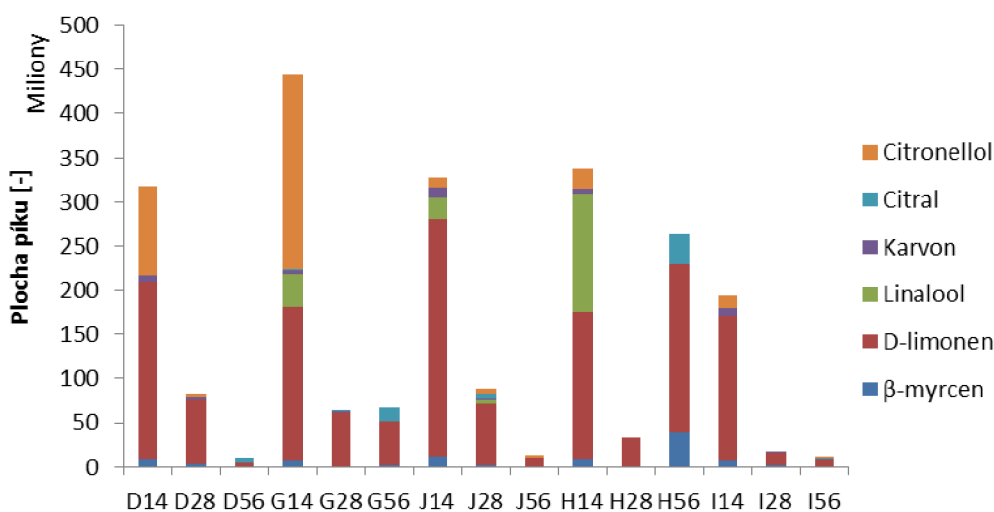
Pro jejich vznik je klíčová degradace methioninu [26]. V našich vzorcích byl detekován methional a dimethylsulfon (viz graf na Obrázku 37). Dimethylsulfon byl přítomen ve všech vzorcích, přičemž jeho koncentrace během zrání klesala. Přítomnost methionalu byla prokázána pouze u sýrů s přídavkem termofilní kultury v pozdějších fázích zrání, pravděpodobně v důsledku výraznější proteolýzy. Jednotlivé druhy a kmeny použitých kultur se významně ($p < 0,05$) liší i v produkci sirných sloučenin.



Obrázek 37: Obsah jednotlivých sirných sloučenin ve vzorcích sýrů

4.5.3.8 Ostatní sloučeniny

Do skupiny „ostatní“ bylo zařazeno 6 sloučenin, konkrétně β -myrcen, D-limonen, linalool, karvon, citral a citronellol.



Obrázek 38: Obsah ostatních sloučenin ve vzorcích sýrů

Nejvyšší obsah ze skupiny „ostatní“ měl prakticky ve všech odběrech vzorků D-limonen, u ostatních látek byl výskyt spíše nepravidelný (viz graf na Obrázku 38). Kromě citralu se obsah těchto látek ve vzorcích v průběhu zrání snižoval, nejspíš v důsledku degradace; jak již bylo zmíněno, tyto látky nevznikají katabolismem mléčných složek.

Zvyšující se obsah citralu je pravděpodobně způsoben chemickou přeměnou citronellolu.

4.6 Statistické vyhodnocení výsledků měření pomocí metody PCA

Výsledky byly na závěr podrobeny statistickému testování s použitím metody PCA. Analýza hlavních komponent (PCA) je vícerozměrná statistická metoda, pomocí níž lze zredukovat počet původních dat, a přesto umožňuje vysvětlit variabilitu a závislost původních proměnných. Cílem PCA je transformace dat z původních znaků či proměnných $x_j, j = 1, \dots, m$, do menšího počtu latentních (skrytých) proměnných y_j . Nové proměnné mají vhodnější vlastnosti, je jich výrazně méně, vystihují téměř celou proměnlivost znaků a jsou vzájemně nekorelované. Tyto latentní proměnné se nazývají hlavní komponenty [100].

Pro statistické zpracování byly použity výsledky měření všech analyzovaných vzorků (5 kombinací kultur, 3 fáze zrání - celkem 15 vzorků). K interpretaci dat bylo využito grafické vyjádření (vždy první dvě komponenty) – tzv. rozptylový diagram komponentního skóre, který zobrazuje objekty (tj. vzorky). Vzorky umístěné blízko sebe jsou si podobné, vzorky vzdálené jsou odlišné [100].

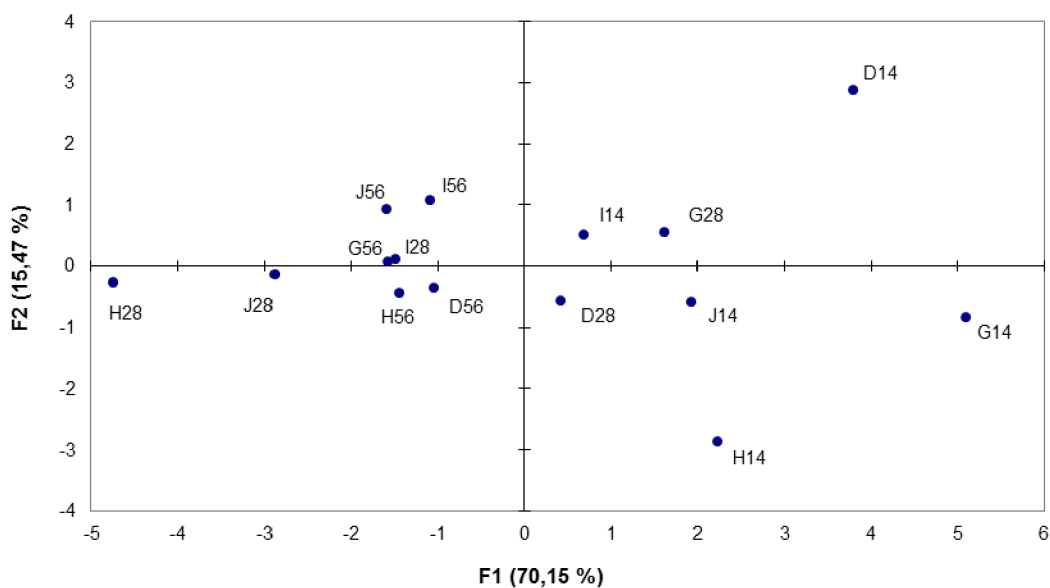
Testovány byly výsledky měření obsahu AAL i volných a vázaných MK, cílem bylo zjistit, zda lze od sebe odlišit jednotlivé vzorky na základě identifikovaných sloučenin; jak podle průběhu zrání, tak i použitých startovacích kultur.

4.6.1 Vyhodnocení výsledků měření volných/vázaných mastných kyselin

V případě MK byly pro zpracování použity průměrné hodnoty ($n = 3$) obsahu všech identifikovaných volných/vázaných MK (celkem 17; v $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$).

Na Obrázku 39 je znázorněna diferenciací jednotlivých vzorků na základě obsahu vázaných MK. Z grafu je patrné rozdělení vzorků podél první hlavní komponenty (F1) podle doby zrání, méně zralé vzorky se nacházejí v pravé části (korelují pozitivně), zralé v levé části grafu (korelují negativně). První dvě komponenty popisují 85,6 % z celkové variability, první tři komponenty kumulativně vysvětlují až 95,8 % celkové variability systému. Všechny identifikované MK pozitivně korelují s první hlavní komponentou – jejich obsah se v průběhu zrání snižuje. Pro konstrukci F1 jsou nejdůležitější kyseliny kapronová (0,90), kaprylová (0,97), kaprinová (0,98), myristová (0,99) a olejová (0,97).

Co se týče použitých kultur, diferenciací vzorků není jednoznačná, z grafu na Obrázku 39 lze vyčíst podobnost všech vzorků v poslední fázi zrání (tvoří shluk v levé části grafu), v počáteční fázi zrání jsou od sebe vzorky více vzdálené (pravá část grafu), jsou tedy mezi nimi rozdíly v obsahu vázaných MK. Vzorek D (bez přídavku termofilů) je umístěn samostatně v pravé horní části; v tomto vzorku byl na počátku zrání nalezen nejvyšší obsah vázaných MK, což by mohlo naznačovat pomalejší nástup lipolýzy.

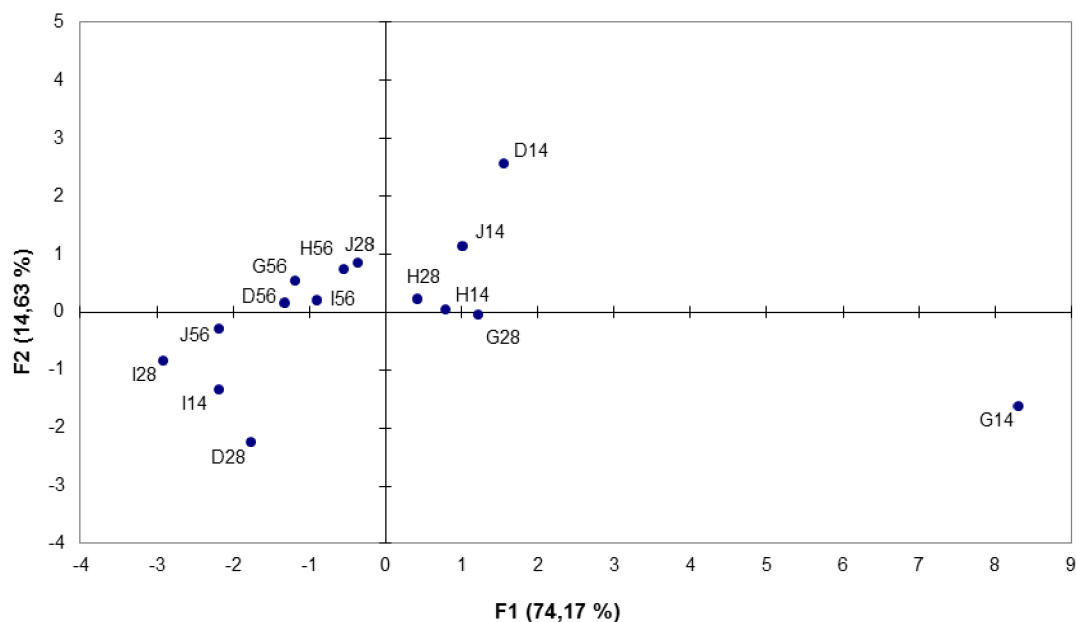


Obrázek 39: Rozptylový diagram komponentního skóre - diference jednotlivých vzorků na základě obsahu vázaných mastných kyselin; značení vzorků viz Tabulka 5

V grafu na Obrázku 40 je znázorněna diference jednotlivých vzorků na základě obsahu VMK. Podobně jako v případě vázaných MK jsou vzorky rozlišeny podél komponenty F1 podle doby zrání, méně zralé vzorky se nacházejí v pravé části (koreluje pozitivně), zralé v levé části grafu (koreluje negativně).

První dvě komponenty popisují 88,8 % z celkové variability, první tři komponenty kumulativně vysvětlují až 95,4 % celkové variability systému. Většina identifikovaných VMK koreluje výrazně pozitivně s F1; i v případě VMK dochází během zrání k jejich mírnému poklesu, jak již bylo zmíněno, díky tomu nedochází ke vzniku žluklého off-flavouru. Nejdůležitější pro konstrukci F1 jsou kyseliny kaprinová (0,98), myristová (0,99), palmitová (0,98), stearová (0,95) a olejová (0,96), kyselina α -linolenová pak významně koreluje s F2 (0,93).

Co se týče použitých kultur, výsledky jsou obdobné jako v případě vázaných MK, v poslední fázi zrání vzorky tvoří shluk v levé části grafu, nejsou tedy mezi nimi významné rozdíly.



Obrázek 40: Rozptylový diagram komponentního skóre - diferenciacie jednotlivých vzorků na základě obsahu volných mastných kyselin; značení vzorků viz Tabulka 5

Z výsledků vyplývá, že je možné na základě obsahu volných/vázaných MK dobře odlišit různé fáze zrání, použité startovací kultury však vykazují podobný průběh lipolýzy a odlišit je takto nelze.

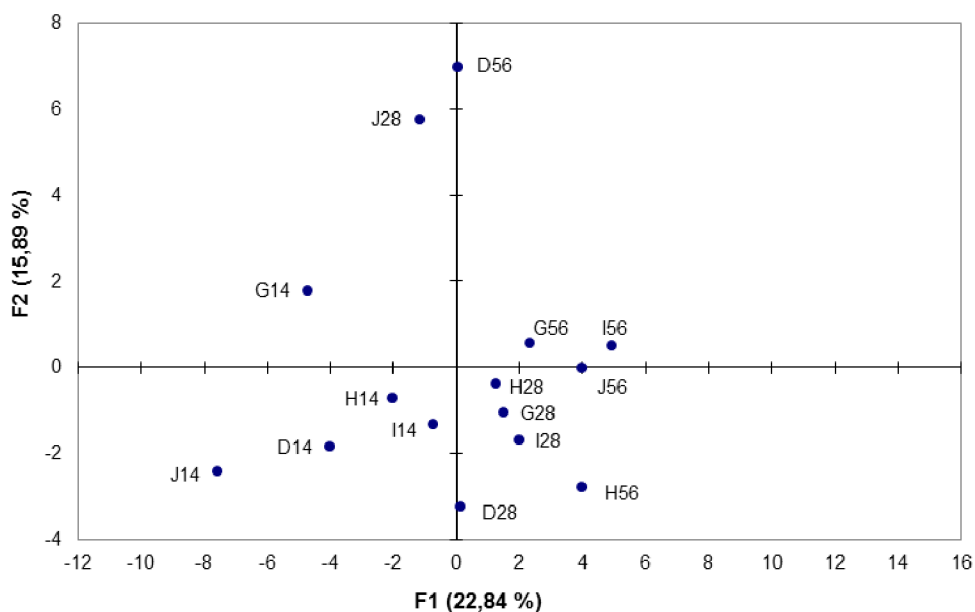
4.6.2 Vyhodnocení výsledků měření těkavých látek

V případě AAL byly pro zpracování použity průměrné plochy píků ($n = 3$) všech identifikovaných sloučenin (celkem 50). Pro vysvětlení 71,5 % variability původního systému je třeba pěti komponent; první tři komponenty vysvětlují 52,8 %, první čtyři 63,4 % proměnlivosti.

V grafu na Obrázku 41 je znázorněna diferenciacie jednotlivých vzorků na základě obsahu všech identifikovaných sloučenin pomocí F1 a F2, první dvě komponenty však vysvětlují pouze 38,7 % celkového rozptylu původních proměnných. Přesto z něj lze vyčíst určité rozdělení vzorků opět podél F1, v tomto případě jsou však zralé vzorky v pravé části grafu (koreluje pozitivně) a nezralé v levé části grafu (koreluje negativně)

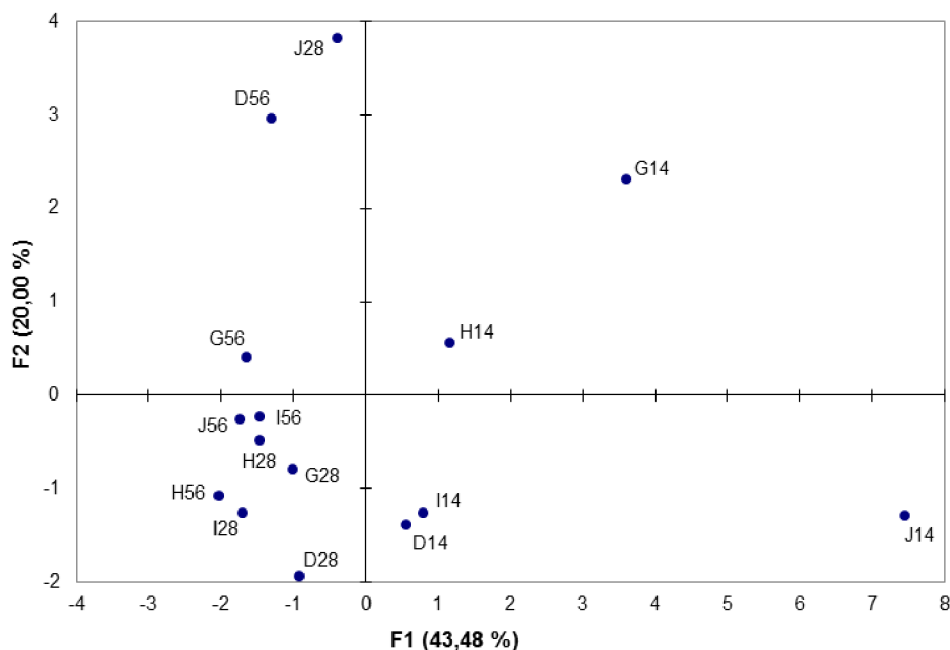
Vzorky s přidavkem termofilů (G, H, I, J) v pozdějších fázích zrání tvoří shluk v pravé části grafu na Obrázku 41. Z grafu na Obrázku 29 je sice patrný obdobný celkový obsah identifikovaných sloučenin, pomocí PCA se však podařilo oddělit vzorek D (bez přidavku termofilů), ten je opět umístěn samostatně v pravé horní části; přidavek termofilů má tedy vliv na vývoj těkavých látek v sýrech.

Pro konstrukci F1 se ukázaly být nejdůležitějšími parametry hexanal (-0,71), oktan-2-on (-0,73), hexan-1-ol (-0,72), ethyl-kaprylát (-0,73), okt-1-en-3-ol (-0,89), kyselina máselná (0,92), karvon (-0,83) a benzylalkohol (-0,71). Pro konstrukci F2 methyl-kaprinát (0,75), tridekan-2-on (0,84) a kyselina nonanová (0,76); pro konstrukci F3 butan-1-ol (-0,71) a acetoin (0,73) a pro F4 butan-2,3-diol (0,71). Těchto 14 sloučenin vykazuje největší proměnlivost a nejlépe tak vyjadřují rozdíly mezi vzorky.



Obrázek 41: Rozptylový diagram komponentního skóre - diferenciacce jednotlivých vzorků na základě obsahu těkavých sloučenin; značení vzorků viz Tabulka 5

Metoda PCA se v tomto případě příliš neosvědčila, proměnlivost celkového obsahu těkavých látek vystihuje pomocí pěti komponent pouze z cca 70 %. V dalším kroku proto byla provedena PCA analýza s využitím pouze výše zmíněných vybraných AAL (viz Obrázek 42). V tomto případě první dvě komponenty popisují 63,5 % z celkové variability, první tři komponenty kumulativně vysvětlují uspokojivých 77,7 % celkové variability systému. Výsledky jsou obdobné jako při zpracování všech AAL, z grafu je vidět velmi dobré rozdělení vzorků podél F1, vzorky na počátku zrání jsou v pravé části grafu a jsou od sebe vzdáleny, zatímco další fáze zrání tvoří shluk v levé části grafu. Zřetelně je oddělen vzorek D (bez přídavku termofilů); přídavek termofilů má tedy vliv na vývoj těkavých látek v sýrech.



Obrázek 42: Rozptylový diagram komponentního skóre - diferenciacce jednotlivých vzorků na základě obsahu vybraných těkavých sloučenin; značení vzorků viz Tabulka 5

5 ZÁVĚR

Hlavním cílem této diplomové práce bylo posoudit vliv různých startovacích mikrobiálních kultur na obsah těkavých látek, volných a vázaných mastných kyselin v modelových vzorcích přírodních polotvrdých sýrů s nízkodohřivanou sýřeninou eidamského typu (45 % tvs., 50 % sušiny). Sýry byly vyrobeny standardním technologickým postupem na Univerzitě Tomáši Bati ve Zlíně.

Celkem bylo vyrobeno 5 variant sýrů, lišily se kombinací použitých mikrobiálních kultur; u všech byla jako základ použita mezofilní kultura ve složení *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* s přídatkem vybraného kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, a dále vybrané kmeny *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus plantarum*. Vzorky byly odebírány ve 3 fázích zrání (po 14, 28 a 56 dnech).

Pro izolaci aromaticky aktivních látek byla použita metoda mikroextrakce na pevnou fázi v módu headspace a sloučeniny byly následně separovány plynovou chromatografií a identifikovány hmotnostní spektrometrií na základě srovnání hmotnostních spekter s dostupnou knihovnou spekter.

Pro extrakci lipidů ze vzorků byla použita metoda podle ČSN EN ISO 1735:2005. Volné a vázané mastné kyseliny z vyizolovaných lipidů byly převedeny na methylestery pomocí kyselých esterifikací methanolickým roztokem bortrifluoridu jako katalyzátoru. Pro jejich kvalitativní a kvantitativní stanovení byla použita plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem.

Celkem bylo ve vzorcích sýrů identifikováno 50 těkavých sloučenin, z toho 11 alkoholů, 5 aldehydů, 7 ketonů, 6 karboxylových kyselin, 10 esterů, 3 laktony a 2 sirné sloučeniny. Do skupiny „ostatní“ bylo zařazeno 6 sloučenin, které nevznikají z mléčných složek a do sýrů se pravděpodobně dostávají jako součást stravy dojníc. Po srovnání s dostupnou literaturou lze všechny identifikované sloučeniny považovat za aromaticky aktivní látky ovlivňující výsledný flavour sýra. V jednotlivých vzorcích bylo identifikováno 30–40 sloučenin, nejvíce zastoupeny byly alkoholy, karboxylové kyseliny a ketony. Počet i obsah identifikovaných sloučenin během zrání mírně klesal. Ze sloučenin, které jsou považovány za klíčové pro eidamské sýry, byl detekován hexanal, kyseliny octová a máselná, δ -dekalakton a D-limonen.

Ve všech vzorcích bylo identifikováno 17 mastných kyselin, a to jak ve formě volné, tak esterově vázané; nejvíce zastoupeny byly kyseliny myristová, palmitová, stearová a olejová. Během zrání také došlo ke snižování jejich obsahu, přiměřeně nízký obsah volných mastných kyselin na konci zrání ($< 40 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) indikuje správný průběh lipolýzy.

Mezi vzorky byly nalezeny významné rozdíly ($p < 0,05$) v počtu i obsahu sledovaných látek; z výsledků PCA vyplývá, že přidavek termofilů má vliv na vývoj těkavých látek i volných/vázaných mastných kyselin v sýrech, zejména v počáteční fázi zrání, ke konci zrání už tento rozdíl není tak jasně patrný.

Co se týče různých kmenů *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus plantarum*, jsou i mezi nimi patrné rozdíly, tyto však nelze přesně specifikovat, nepotvrdil se předpoklad stejného průběhu zrání u různých kmenů téhož mikrobiálního druhu.

Z výsledků PCA také vyplývá, že je možné na základě detekovaných sloučenin velmi dobře odlišit různé fáze zrání, použité startovací kultury však jednoznačně diferencovat nelze.

Výsledky této diplomové práce mohou být považovány za první předběžné údaje použitelné k výběru vhodných mikrobiálních kultur pro výrobu sýrů eidamského typu. Bude zapotřebí dalšího úsilí o lepší interpretaci vlivu použitých kultur na výsledný flavour, ale i další vlastnosti sýra, zopakováním experimentu a analýz i pro další parametry sýra a provedením sensorického hodnocení. Účinek proteolýzy, včetně konverze aminokyselin na aromaticky aktivní látky, je dominantním dějem u sýrů eidamského typu, další výzkum bude zaměřen více na vliv těchto katabolických přeměn.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] ADDA, J., J. C. GRIPON a L. VASSAL. The chemistry of flavour and texture generation in cheese. *Food chemistry*. 1982, vol. 9, pp. 115–129. ISSN 0308-8146. DOI: 0308-8146/82/0009-0115/\$02.75.
- [2] GUINEE, T. P. a P. F. FOX. Salt in Cheese: Physical, Chemical and Biological Aspects. In: FOX, P. F., P. L. H. MCSWEENEY, T. M. COGAN, T. P. GUINEE. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol. 1. Cambridge: Academic Press, 2004, pp. 317–375. ISBN 978-0-12-263652-3. DOI: 10.1016/B978-0-12-417012-4.00013-2.
- [3] BINTSIS, T. a P. PAPADEMAS. An Overview of the Cheesemaking Process. In: *Global Cheesemaking Technology: Cheese Quality and Characteristics*. 1st ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2017, pp. 120–156. ISBN 978-1-119-04615-8.
- [4] DÜSTERHÖFT, E. M. a G. VAN DEN BERG. Dutch-type cheeses. In: P. L. H. MCSWEENEY. *Cheese problems solved*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2007, pp. 230–245. ISBN 978-1-84569-060-1. DOI: 10.1533/9781845693534.230.
- [5] DÜSTERHÖFT, E. M., W. ENGELS a G. VAN DEN BERG. Dutch type cheeses. In: FUGUOY, J. W., P. F. FOX a P. H. L. MCSWEENEY. *Encyclopedia of dairy sciences*. Cambridge: Academic Press, 2011, pp. 721–727. ISBN 978-0-12-374402-9.
- [6] DÜSTERHÖFT, E. M., W. ENGELS a T. HUPPERTZ. Dutch-type cheeses. In: *Global Cheesemaking Technology: Cheese Quality and Characteristics*. 1st ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2017, pp. 326–348. ISBN 978-1-119-04615-8.
- [7] FOX, P. F., T. P. GUINEE, T. M. COGAN a P. L. H. MCSWEENEY. Principal Families of Cheese. In: *Fundamentals of Cheese Science*. 2nd ed. New York: Springer, 2017, pp. 27–70. ISBN 978-1-4899-7679-6. DOI: 10.1007/978-1-4899-7681-9.
- [8] KONGO, J. M. a F. X. MALCATA. Cheese: Chemistry and Microbiology. In: CABALLERO, B., P. M. FINGLAS a F. TOLDRÁ. *Encyclopedia of Food and Health Volume I*. Cambridge: Academic Press, 2015, pp. 735–740. ISBN 978-0-12-384947-2.
- [9] O'CALLAGHAN, Y. C., T. P. O'CONNOR a N. M. O'BRIEN. Nutritional Aspects of Cheese. In: FOX, P. F., T. P. GUINEE, T. M. COGAN a P. L. H. MCSWEENEY. *Fundamentals of Cheese Science*. 2nd ed. New York: Springer, 2017, pp. 715–730. ISBN 978-1-4899-7679-6. DOI: 10.1007/978-1-4899-7681-9.
- [10] TAYLOR, M. W. a A. K. H. MACGIBBON. Milk lipids: General Characteristics. In: FUGUOY, J. W., P. F. FOX a P. H. L. MCSWEENEY. *Encyclopedia of dairy sciences*. 2nd ed. Cambridge: Academic Press, 2011, pp. 649–654. ISBN 978-0-12-374402-9.
- [11] MARKIEWICZ-KESZYCKA, M., G. CZYŻAK-RUNOWSKA, P. LIPÍŃSKA a J. WÓJTOWSKI. Fatty acid profile of milk – a review. *Bulletin-Veterinary Institute in Pulawy*. 2013, vol. 57, no. 2, pp. 135–139. ISSN 0042-4870. DOI: 10.2478/bvip-2013-0026.

- [12] GÓMEZ-CORTÉZ, P., M. JUÁREZ a M. A. DE LA FUENTE. Milk fatty acids and potential health benefits: An updates vision. *Trends in Food Science & Technology*. 2018, vol. 81, pp. 1–9. ISSN 0924-2244. DOI: doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.014.
- [13] COLLINS, Y. F., P. L. H. MCSWEENEY a M. G. WILKINSON. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal*. 2003, vol. 13, no. 11, pp. 841–866. ISSN 0958-6946. DOI: 10.1016/S0958-6946(03)00109-2.
- [14] TAYLOR, M. W. a A. K. H. MACGIBBON. Fatty acids. In: FUGUOY, J. W., P. F. FOX a P. H. L. MCSWEENEY . *Encyclopedia of dairy sciences*. 2nd ed. Cambridge: Academic Press, 2011, pp.655–659. ISBN 978-0-12-374402-9.
- [15] ANDĚL, M. *Sýry a tvarohy ve výživě*. Praha: Česká technologická platforma pro potraviny: Potravinářská komora České republiky, 2012. ISBN 978-80-905096-2-7.
- [16] DÜSTERHÖFT, E. M, W. ENGELS a T. HUPPERTZ. Gouda and Related Cheeses. In: FOX, P. F., P. L. H. MCSWEENEY, T. M. COGAN, T. P. GUINEE. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol. 1. Cambridge: Academic Press, 2004, pp. 865–888. ISBN 978-0-12-263652-3. DOI: 10.1016/B978-0-12-417012-4.00034-X.
- [17] FOX, P. F. a P. L. H. MCSWEENEY. Cheese: An Overview. In: FOX, P. F., P. L. H. MCSWEENEY, T. M. COGAN, T. P. GUINEE. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol. 1. Cambridge: Academic Press, 2004, pp. 5–21. ISBN 978-0-12-263652-3. DOI: 10.1016/B978-0-12-417012-4.00001-6.
- [18] BALASUBRAMANIAN, S. a S. PANIGRAHI. Solid-Phase Microextraction (SPME) Techniques for Quality Characterization of Food Products: A Review. *Food and Bioprocess Technology*. 2011, vol. 4, no. 1, pp. 1–26. ISSN 1935-5130. DOI: 10.1007/s11947-009-0299-3.
- [19] RODRIGUEW-AMAYA, D. B. Carotenes and xanthophylls as antioxidants. In: SHAHIDI, F. *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*. 1st ed. Cambridge: Woodhead Publishing, 2015, pp. 17–50. ISBN 978-1-78242-089-7. DOI: 10.1016/B978-1-78242-089-7.00002-6.
- [20] ALEXANDER, J. Some colloid-chemical aspects of digestion, with ultramicroscopic observations. *Journal of the American Chemical Society*. 1910, vol. 32, no. 5, pp.680–687. ISSN 0002-7863. DOI: 10.1021/ja01923a015.
- [21] ALEXANDER, J. The rennin colagulation of milk from a colloid – chemical standpoint. In: *Eighth International congress of applied chemistry, Washington and New York, September 4 to 13, 1912*. Concord, New Hampshire: The Rumford press, 1912–1913, pp. 12–14. ASIN: B008I3KHCW.
- [22] WAKE, R. G. Studies on Casein V. The Action of Rennin on Casein. *Australian journal of biological sciences*. 1959, vol. 12, no. 4, pp. 479–489. ISSN 0004-9417. DOI: 10.1071/BI9590479.

- [23] DELFOUR, A., J. JOTTES, C. ALAIS a P. JOLLES. Caseino-glycopeptides: characterization of a methionine residue and of the N-terminal sequence. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1965, vol. 19, pp. 452–453. ISSN 0006-291X.
- [24] ANDIÇ, S., Y. TUNÇTÜRK a G. BORAN. Changes in volatile compounds of cheese. In: PREEDY, V. R. *Processing and Impact on Active Components in Food*. Cambridge: Academic Press, 2015, pp. 231–239. ISBN 978-0-12-404699-3. DOI: 10.1016/C2012-0-02526-4.
- [25] MCSWEENEY, P. L. H. Biochemistry of Cheese Ripening: Introduction and Overview. In: FOX, P. F., P. L. H. MCSWEENEY, T. M. COGAN, T. P. GUINEE. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol. 1. Cambridge: Academic Press, 2004, pp. 379–387. ISBN 978-0-12-263652-3. DOI: 10.1016/B978-0-12-417012-4.00014-4.
- [26] SMID, E. J. a M. KLEEREBEZEM. Production of Aroma Compounds in Lactic Fermentations. *Annual Review of Food Science and Technology*. 2014, vol. 5, no. 1, pp. 313–326. ISSN 1941-1413. DOI: 10.1146/annurev-food-030713-092339.
- [27] MCSWEENEY, P. L. H., P. F. FOX a F. CIOCIA. Metabolism of Residual Lactose and of Lactate and Citrate. In: FOX, P. F., P. L. H. MCSWEENEY, T. M. COGAN a T. P. GUINEE. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol. 1. Cambridge: Academic Press, 2004, pp. 411–421. ISBN 978-0-12-263652-3. DOI: 10.1016/B978-0-12-417012-4.00016-8.
- [28] MARILLEY. L. a M. G. CASEY. Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology*. 2004, vol. 90, no. 2, pp. 139–159. ISSN 0168-1605. DOI: 10.1016/S0168-1605(03)00304-0.
- [29] FOX, P. F. a J. M. WALLACE. Formation of flavour compounds in cheese. In: NEIDLEMAN S. a A. LASKIN. *Advances in Applied Microbiology, Volume 45*. 1st ed. Cambridge: Academic Press, 1997, pp. 17–85. ISBN 978-0-12-002645-6. DOI: 10.1016/S0065-2164(08)70261-2.
- [30] HASSAN, F. A. M., M. A. M. ABD EL-GAWARD a A. K. ENAB. Flavour compounds in cheese (review). *International Journal of Academic Research*. 2012, vol. 4, no. 5, pp. 169–181. ISSN 2075–4124. DOI: 10.1007/978-0-387-84865-5.
- [31] CADWALLADER, K. R. a T. K. SINGH. Flavours and off-flavours in milk and dairy products. In: MCSWEENEY, P. a P. F. FOX. *Advanced Dairy Chemistry*. 3rd ed. New York: Springer, 2009, pp. 631–690. ISBN 978-0-387-84864-8. DOI: 10.1007/978-0-387-84865-5.
- [32] JO, Y., D. M. BENOIST, A. AMEERALLY a M. A. DRAKE. Sensory and chemical properties of Gouda cheese. *Journal of Dairy Science*. 2018, vol. 101, no. 3, pp. 1967–1989. ISSN 0022-0302. DOI: 10.3168/jds.2017-13637.

- [33] CHENG, H. Volatile flavour compounds in yogurt: a review. *Critical review in food science and nutrition*. 2010, vol. 50, no. 10, pp 938–950. ISSN 1040-8398. DOI: 10.1080/10408390903044081.
- [34] THIERRY, A., Y. F. COLLINS, M. C. ABEIJÓN MUKDSI, P. L. H. MCSWEENEY, M. G. WILKINSON a H. E. SPINNLER. Lipolysis and Metabolism of Fatty Acids in Cheese. In: FOX, P. F., P. L. H. MCSWEENEY, T. M. COGAN a T. P. GUINEE. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol. 1. Cambridge: Academic Press, 2004, pp. 423–444. ISBN 978-0-12-263652-3. DOI: 10.1016/B978-0-12-417012-4.00017-X.
- [35] ALEWIJN, M., E. L. SLIWINSKI a J. T. M. WOUTERS. Production of fat-derived (flavour) compounds during the ripening of Gouda cheese. *International Dairy Journal*. 2005, vol. 15, no. 6, pp. 733–740. ISSN 0958-6946. DOI: 10.1016/j.idairyj.2004.09.009.
- [36] GANESAN, B. a B. C. WEIMER. Amino Acid Catabolism and Its Relationship to Cheese Flavor Outcomes. In: FOX, P. F., P. L. H. MCSWEENEY, T. M. COGAN, T. P. GUINEE. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol. 1. Cambridge: Academic Press, 2004, pp. 483–516. ISBN 978-0-12-263652-3. DOI: 10.1016/B978-0-12-417012-4.00019-3.
- [37] ARDÖ Y. Flavour formation by amino acid catabolism. *Biotechnology Advances*. 2006, vol. 24, no. 2, pp. 238–242. ISSN 0734-9750. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2005.11.005.
- [38] VAN KRANENBURG, R., M. KLEEREBEZEM, J. VAN HYLCKAMA VLIEG, B. M. URSING, J. BOEKHORST, B. A. SMIT, E. H. E. AYAD, G. SMIT a R. J. SIEZEN. Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: predictions from genome sequence analysis. *International Dairy Journal*. 2012, vol. 12, no. 2, pp. 111–121. ISSN 0958-6946. DOI: 10.1016/S0958-6946(01)00132-7.
- [39] LE QUÉRÉ, J. L. Cheese flavour. In: FUQUAY, J. W., P. F. FOX a P. L. H. MCSWEENEY. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 2nd ed. Cambridge: Academic Press, 2011, pp. 330–340. ISBN 978-0-12-374407-4.
- [40] AMPUERO, S. a J. O. BOSSET. The electronic nose applied to dairy products: a review. *Sensors and Actuators B Chemical*. 2003, vol. 94, no. 1, pp. 1–12. ISSN 0925-4005. DOI: 10.1016/S0925-4005(03)00321-6.
- [41] CURIONI, P. M. G. a J. O. BOSSET. Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *International Dairy Journal*. 2002, vol. 12, no. 12, pp. 959–984. ISSN 0958-6946. DOI: 10.1016/S0958-6946(02)00124-3.
- [42] GÓMEZ-TORRES, N., M. ÁVILA, D. DELGADO a S. GARDE. Effect of reuterin-producing *Lactobacillus reuteri* coupled with glycerol on the volatile fraction, odour and aroma of semi-hard ewe milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 2016, vol. 232, pp. 103–110. ISSN 0168-1605. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.031.

- [43] YVON, M. a L. RIJNEN. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal*. 2001, vol. 11, no. 4–7, pp. 185–201. ISSN 0958-6946. DOI: 10.1016/S0958-6946(01)00049-8.
- [44] HOU, J., J. A. HANNON, P. L. H. MCSWEENEY, T. P. BERESFORD a T. P. GUINEE. Effect of curd washing on cheese proteolysis, texture, volatile compounds, and sensory grading in full fat Cheddar cheese. *International Dairy Journal*. 2014, vol. 34, no. 2, pp. 190–198. ISSN 0958-6946. DOI: 10.1016/j.idairyj.2013.08.008.
- [45] VARMING, C., L. T. ANDERSEN, M. A. PETERSEN a Y. ARDÖ. Flavour compounds and sensory characteristics of cheese powders made from matured cheeses. *International Dairy Journal*. 2013, vol. 30, no. 1, pp. 19–28. ISSN 0958-6946. DOI: 10.1016/j.idairyj.2012.11.002.
- [46] BERTUZZI, S., P. L. H. MCSWEENEY, M. C. REA a K. N. KILCAWLEY. Detection of Volatile Compounds of Cheese and Their Contribution to the Flavor Profile of Surface-Ripened Cheese. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2018, vol. 17, no. 2, pp. 371–390. ISSN 1541-4337. DOI: 10.1111/1541-4337.12332.
- [47] FRANK, D. C., C. M. OWEN a J. PATTERSON. Solid phase microextraction (SPME) combined with gas-chromatography and olfactometry-mass spectrometry for characterization of cheese aroma compounds. *LWT – Food Science and Technology*. 2004, vol. 37, no. 2, pp. 139–154. ISSN 0023-6438. DOI: 10.1016/S0023-6438(03)00144-0.
- [48] VAN LEUVEN, I, T. VAN CAELENBERG a P. DIRINCK. Aroma characterisation of Gouda-type cheeses. *International Dairy Journal*. 2008, vol. 18, no. 8, pp. 790–800. ISSN 0958-6946. DOI: 10.1016/j.idairyj.2008.01.001.
- [49] SMIT, G., B. A. SMIT a W. J. M. ENGELS. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*. 2005, vol. 29, no. 3, pp.591–610. ISSN 0168-6445. DOI: 10.1016/j.femsre.2005.04.002.
- [50] THOMSEN, M., CH. MARTIN, F. MERCIER, P. TOURNAYRE, J. L. BENDAGUÉ, T. THOMAS-DANGUIN a E. GUICHARD. Investigating semi-hard cheese aroma: Relationship between sensory profiles and gas chromatography-olfactometry data. *International Dairy Journal*. 2012, vol. 26, no. 1, pp. 41–49. ISSN 0958-6946. DOI: 10.1016/j.idairyj.2012.04.009.
- [51] ZABALETA, L., K. GOURRAT, L. J. R. BARRON, M. ALBISU a E. GUICHARD. Identification of odour-active compounds in ewes' raw milk commercial cheeses with sensory defects. *International Dairy Journal*. 2016, vol. 58, pp. 23–30. ISSN 0958-6946. DOI: 10.1016/j.idairyj.2016.01.018.
- [52] BERTRAND, E., E. MACHADO-MATURANA, C. CHEVARIN, S. PORTANGUEN, F. MERCIER, P. TOURNAYRE, S. ABOUELKARAM, A. S. GUILLARD, A. KONDIOVAN a J. L. BERAGUÉ. Heat-induced volatiles and odour-active compounds in

a model cheese. *International Dairy Journal*. 2011, vol. 21, no. 10, pp. 806–814. ISSN 0958-6946. DOI: 10.1016/j.idairyj.2011.04.007.

[53] SYMPOURA, F., A. CORNU, P. TOURNAYRE, T. MASSOURAS, J. L. BERDAGUÉ a B. MARTIN. Odor compounds in cheese made from the milk of cows supplemented with extruded linseed and α -tocopherol. *Journal of Dairy Science*. 2009, vol. 92, no. 7, pp. 3040–3048. ISSN 0022-0302. DOI: 10.3168/jds.2008-1802.

[54] BARBA, C., N. BENO, E. GUICHARD a T. THOMAS-DANGUIN. Selecting odorant compounds to enhance sweet flavor perception by gas chromatography/olfactometry-associated taste (GC/O-AT). *Food Chemistry*. 2018, vol. 257, pp. 172–181. ISSN: 0308-8146. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.02.152.

[55] SÁDECKÁ, J., N. ŠAKOVÁ, D. PANGALLO, J. KOREŇOVÁ, E. KOLEK, A. PUŠKÁROVÁ, M. BUČKOVÁ, L. VALÍK a T. KUČHTA. Microbial diversity and volatile odour-active compounds of barrelled ewes' cheese as an intermediate product that determines the quality of winter bryndza cheese. *LWT – Food Science and Technology*. 2016, vol. 70, pp. 237–244. ISSN 0023-6438. DOI: 10.1016/j.lwt.2016.02.048.

[56] NTSOMBOH-NTSEFONG, G., G. F. NGANDO-EBONGUE, J. E. MAHO-YALEN, E. YOUMBI, J. M. BELL, H. NGALLE-BILLE, K. TABI-MBI, B. E. LIKENG-LI-NGUE a A. NSIMI-MVA. GC-FID Method Development and Validation Parameters for Analysis of Palm Oil (*Elaeis guineensis* /iJacq.) Fatty Acids Composition. *Research in Plant Sciences*. 2014, vol. 2, no. 3, pp. 53–66. ISSN 2333-8512. DOI: 10.12691/plant-2-3-2.

[57] SOXHLET, F. Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes. *Dinglers polytechnisches Journal*. 1879, vol. 232, pp. 461–465. ISSN 0366-9572.

[58] LUQUE DE CASTRO, M. D. a F. PRIEGO-CAPOTE. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*. 2010, vol. 1217, no. 16, pp. 2383–2389. ISSN 0021-9673. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.11.027.

[59] FOLCH., J., M. LEES a G. H. SLOANE STANLEY. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*. 1957, vol. 226, no. 1, pp. 497–509. ISSN 0021-9258.

[60] DE JONG, C. a H. T. BADINGS. Determination of free fatty acids in milk and cheese procedures for extraction, clean up, and capillary gas chromatographic analysis. *Journal of High Resolution Chromatography*. 1990, vol. 13, no. 2, pp. 94–98. ISSN 0935-6304. DOI: 10.1002/jhrc.1240130204.

[61] MANNION, D. T., A. FUREY a K. N. KILCAWLEY. Comparison and validation of 2 analytical methods for the determination of free fatty acids in dairy products by gas chromatography with flame ionization detection. *Journal of Dairy Science*. 2016, vol. 99, no. 7, pp. 5047–5063. ISSN 0022-0302. DOI: 10.3168/jds.2015-10795.

[62] KIM HA, J. a R. C. LINDSAY. Method for the Quantitative Analysis of Volatile Free and Total Branched-Chain Fatty Acids in Cheese and Milk Fat. *Journal of Dairy Science*.

1990, vol. 73, no. 8, pp. 1988–1998. ISSN 0022-0302. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(90)78877-7.

[63] PARTIDÁRIO, A. M., M. BARBOSA a L. VILAS BOAS. Free fatty acids, triglycerides and volatile compounds in Serra da Estrela cheese – changes throughout ripening. *International Dairy Journal*. 1998, vol. 8, no. 10, pp. 873–881. ISSN 0958-6946. DOI: 10.1016/S0958-6946(98)00131-9.

[64] ICHIHARA, K. a Y. FUKUBAYASHI. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. *Journal of Lipid Research*. 2010, vol. 51, no. 3, pp. 635–640. ISSN 0022-0299. DOI: 10.1194/jlr.D001065.

[65] SIMPSON, N. J. K. *Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications*. 1st ed. Florida: CRC Press, 2000. ISBN 978-0824700218.

[66] KALUZNY, M. A., L. A. DUNCAN, M. V. MERRITT a D. E. EPPS. Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns. *Journal of Lipid Research*. 1985, vol. 26, no. 1, pp. 135–140. ISSN 0022-0299.

[67] CHAVARRI, F., M. VIRTO, C. MARTIN, A. I. NÁJERA, A. SANTISTEBAN, L. J. R. BARRÓN a M. DE RENOBALLES. Determination of free fatty acids in cheese: comparison of two analytical methods. *Journal of Dairy Research*. 1997, vol. 64, no. 3, pp. 445–452. ISSN 0022-0299.

[68] VOIGT, D. D., F. CHEVALIER, M. C. QIAN a A. L. KELLY. Effect of high-pressure treatment on microbiology, proteolysis, lipolysis and levels of flavour compounds in mature blue-veined cheese. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2010, vol. 11, no. 1, pp. 68–77. ISSN 1466-8564. DOI: 10.1016/j.ifset.2009.10.009.

[69] KILCAWLEY, K. N., A. NONGONIERMA, J. A. HANNON a M. G. WILKINSON. Evaluation of commercial enzyme systems to accelerate Cheddar cheese ripening. *International Dairy Journal*. 2012, vol. 26, no. 1, pp. 50–57. ISSN 0958-6946. DOI: 10.1016/j.idairyj.2012.03.015.

[70] DULLEY, J. R. a P. A. GRIEVE. Volatile fatty acid production in Cheddar cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*. 1974, vol. 29, pp. 120–123. ISSN 0004-9433.

[71] CHRISTIE W. W. Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. In: *Advances in Lipid Methodology*. 2nd ed. Dundee: Oily Press, 1993, pp. 69–111. ISBN 978-0951417133.

[72] HAUFF, S. a W. VETTER. Quantification of fatty acids as methyl esters and phospholipids in cheese samples after separation of triacylglycerides and phospholipids. *Analytica Chimica Acta*. 2009, vol. 636, no. 2, pp. 229–235. ISSN 0003-2670. DOI: 10.1016/j.aca.2009.01.056.

[73] LASHKARI, S. a S. K. JENSEN. Quantitative determination of conjugated linoleic acid and polyunsaturated fatty acids in milk with C17:0 as internal marker - Evaluation of different

methylation procedures. *Data in brief*. 2017, vol. 15, pp. 106–110. ISSN 2352-3409. DOI: 10.1016/j.dib.2017.09.022.

[74] KATAOKA, H., H. L. LORD a J. PAWLISZYN. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A*. 2000, vol. 880, no. 1–2 , pp. 35–62. ISSN 0021-9673. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00309-5.

[75] VAS, G. a K. VÉKEY. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry*. 2004, vol. 39, no. 3, pp. 233–254. ISSN 1076-5174. DOI: 10.1002/jms.606.

[76] TUNICK, M. H., S. K. IANDOLA a D. L. VAN HEKKEN. Comparison of SPME Methods for Determining Volatile Compounds in Milk, Cheese, and Whey Powder. *Foods – Open Access Journal of Food Science*. 2013, vol. 2, no. 4, pp. 534–543. ISSN 2304-8158. DOI: 10.3390/foods2040534.

[77] ARTHUR, C. L. a J. PAWLISZYN. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical chemistry*. 1990, vol. 62, no. 19, pp. 2145–2148. ISSN 0003-2700. DOI: 10.1021/ac00218a019.

[78] WARDENCKI, W., M. MICHULEC a J. CURYŁO. A review of theoretical and practical aspects of solid-phase microextraction in food analysis. *International Journal of Food Science and Technology*. 2004, vol. 39, no. 7, pp. 703–717. ISSN 0950-5423. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2004.00839.x.

[79] BEZERRA, T. K. A., A. R. R. ARAÚJD, N. M. D. ARCANJD, F. L. H. DA SILVA, R. C. R. E. QUEIRDGA a M. S. MADRUGA. Optimization of the HS-SPME-GC/MS technique for the analysis of volatile compounds in caprine Coalho cheese using response surface methodology. *Food Science and Technology*. 2016, vol. 36, no. 1, pp. 103–110. ISSN 0101-2061. DOI: 10.1590/1678-457X.0035.

[80] NATAGHI, L. Identification and Quantification of Key Volatile Flavor Compounds Employing Different Adjunct Starter Cultures in Reduced-fat Cheddar Cheeses by Using GC and GC-MS. *Applied Food Biotechnology*. 2017, vol. 4, no. 1, pp. 43–52. ISSN 2345-5357. DOI: 10.22037/afb.v4i1.13532.

[81] VUCKOVIC, D., X. ZHANG, E. CUDJOE a J. PAWLISZYN. Solid-phase microextraction in bioanalysis: New devices and directions. *Journal of Chromatography A*. 2010, vol. 1217, no. 25, pp. 4041–4060. ISSN 0021-9673. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.11.061.

[82] SPIETELUN, A., M. PILARCZYK, A. KLOSKOWSKI a J. NAMIEŚNIK. Current trends in solid-phase microextraction (SPME) fibre coatings. *Chemical Society Reviews*. 2010, vol. 39, no. 11, pp. 4524–4537. ISSN 0306-0012. DOI: 10.1039/c003335a.

[83] MONDELLO, L., R. COSTA, P. Q. TRANCHIDA, B. CHIOFALO, A. ZUMBO, P. DUGO a G. DUGO. Determination of flavor components in Sicilian goat cheese by

automated HS-SPME-GC. *Flavour and Fragrance Journal*. 2005, vol. 20, no. 6, pp. 659–665. ISSN 1099-1026. DOI: 10.1002/ffj.1529.

[84] YARLAGADDA, A. B., M. G. WILKINSON, M. G. O’SULLIVAN a K. N. KILCAWLEY. Utilisation of microfluidisation to enhance enzymatic and metabolic potential of lactococcal strains as adjuncts in Gouda type cheese. *International Dairy Journal*. 2014, vol. 38, no. 2, pp. 124–132. ISSN 0958-6946. DOI: 10.1016/j.idairyj.2014.01.007.

[85] VAZQUEZ-ROIG, P. a Y. PICO. Gas chromatography and mass spectroscopy techniques for the detection of chemical contaminants and residues in foods. In: SCHRENK, D. a A. CARTUS. *Chemical Contaminants and Residues in Food*. 2nd ed. Cambridge: Woodhead Publishing, 2017, pp. 17–61. ISBN: 978-0-08-100674-0.

[86] SPARKMAN, O. D., Z. PENTON a F. G. KITSON. Gas Chromatography. In: *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide*. 2nd ed. Cambridge: Academic Press, 2011, pp. 15–83. ISBN 978-0-12-373628-4. DOI: 10.1016/B978-0-12-373628-4.00002-2.

[87] ENGEWALD, W., K. DETTER-WILDE a H. ROTZSCHE. Columns and Stationary Phases. In: *Practical Gas Chromatography*. New York: Springer, 2014, pp. 59–116. ISBN 978-3-642-54639-6. DOI: 10.1007/978-3-642-54640-2.

[88] CARBONELL, M., M. NUÑEZ a E. FERNÁNDEZ-GARCÍA. Evolution of the volatile components of ewe raw milk La Serena cheese during ripening. Correlation with flavour characteristics. *Le Lait*. 2002, vol. 82, no. 6, pp. 683–698. ISSN 0023-7302. DOI: 10.1051/lait:2002042.

[89] HITES, R. A. Gas chromatography Mass spectrometry. In: SETTLE, F. A. *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*. Vol. 1. New Jersey: Prentice Hall, 1997, pp. 609–626. ISBN 0-13-177338-0.

[90] SPARKMAN, O. D., Z. PENTON a F. G. KITSON. Mass Spectrometry Instrumentation. In: *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide*. 2nd ed. Cambridge: Academic Press, 2011, pp. 89–148. ISBN 978-0-12-373628-4. DOI: 10.1016/B978-0-12-373628-4.00004-6.

[91] PAUL, W. a H. STEINWEDEL. Ein Neues Massenspektrometer Ohne Magnetfeld. *Zeitschrift für Naturforschung A*. 1953, vol. 8, no. 7, pp. 448–450. ISSN 0340-4811. DOI: 10.1515/zna-1953-0710.

[92] KARASEK, F. W. a R. E. CLEMENT. *Basic Gas Chromatography – Mass Spectrometry*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier, 2012. ISBN 978-0-08-092906-4.

[93] KARAGUL YUCEER, Y., B. TUNCEL, O. GUNESER, B. ENGIN, M. INLETEN, K. YASAR a M. MENDES. Characterization of aroma-active compounds, sensory properties, and proteolysis in Ezine cheese. *Journal of Dairy Science*. 2009, vol. 92, no. 9, pp. 4146–4157. ISSN 0022-0302. DOI: 10.3168/jds.2009-2124.

- [94] QIAN, M. a G. A. REINECCIUS. Quantification of Aroma Compounds in Parmigiano Reggiano Cheese by a Dynamic Headspace Gas Chromatography-Mass Spectrometry Technique and Calculation of Odor Activity Value. *Journal of Dairy Science*. 2003, vol. 86, no. 3, pp. 770–776. ISSN 0022–0302. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(03)73658-3.
- [95] ZHU, J. C., L. Y. WANG, Z. B. XIAO a Y. W. NIU. Characterization of the key aroma compounds in mulberry fruits by application of gas chromatography–olfactometry (GC-O), odor activity value (OAV), gas chromatography-mass spectrometry (GC–MS) and flame photometric detection (FPD). *Food Chemistry*. 2018, vol. 245, pp. 775–785. ISSN 0308–8146. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.11.112.
- [96] BURDOCK, G. A. *Fenaroli's Handbook of Flavour Ingredients*. 6th ed. Florida: CRC Press, 2016. ISBN 978-1420090864.
- [97] VELIŠEK, J. a J. HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin I*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, xxii, 580 s. ISBN 9788086659176.
- [98] KOSIKOWSKI, F. V. a G. MOCQUOT. Le mode de formation de la saveur du fromage. *Progrès de la technologie du fromage. Etudes agricoles de la FAO*. 1958, vol. 38, pp. 151–167.
- [99] RUGGIRELLO, M., M. GIORDANO, M. BERTOLINO, I. FERROCINO, L. COCOLIN a P. DOLCI. Study of *Lactococcus lactis* during advanced ripening stages of model cheeses characterized by GC-MS. *Food Microbiology*. 2018, vol. 74, pp. 132–142. ISSN 0740–0020. DOI: 10.1016/j.fm.2018.03.012.
- [100] MELOUN, M. a J. MILITKÝ. *Kompéndium statistického zpracování dat*. 3. vyd. Praha: Karolinum, 2012, 982 s. ISBN: 978-80-246-2196-8.
- [101] CURNU, A., N. RABIAU, N. KONDJAYAN, I. VERDIER-METZ, P. PRADEL, P. TOURNAYRE, J. L. BERDAGUÉ a B. MARTIN. Odour-active compound profiles in Cantal-type cheese: Effect of cow diet, milk pasteurization and cheese ripening. *International Dairy Journal*. 2009, vol. 19, no. 10, pp. 588–594. ISSN 0958-6946. DOI: 10.1016/j.idairyj.2009.04.008.
- [102] QIAN, M. a G. A. REINECCIUS. Quantification of Aroma Compounds in Parmigiano Reggiano Cheese by a Dynamic Headspace Gas Chromatography-Mass Spectrometry Technique and Calculation of Odor Activity Value. *Journal of Dairy Science*. 2003, vol. 86, no. 3, pp. 770–776. ISSN 0022–0302. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(03)73658-3.
- [103] PERÉZ ELORTONDO, F. J., M. OJEDA, M. ALBISU, J. SALMERÓN, I. ETAYO a M. MOLINA. Food quality certification: An approach for the development of accredited sensory evaluation methods. *Food Quality and Preference*. 2007, vol. 18, no. 2, pp. 425–439. ISSN: 0950-3293. DOI: 10.1016/j.foodqual.2006.05.002.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAL	aromaticky aktivní látky
MK	mastné kyseliny
VMK	volné mastné kyseliny
TAG	triacylglyceroly
DAG	diacylglyceroly
MAG	monoacylglyceroly
MEMK	methylestery mastných kyselin
tvS	tuk v sušině
GC	plynová chromatografie (gas chromatography)
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
FID	plamenově ionizační detektor (flame ionization detector)
GC-FID	plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
TLC	tenkovrstvá chromatografie (thin layer chromatography)
SPE	extrakce na pevné fázi (solid phase extraction)
SPME	mikroextrakce na pevné fázi (solid phase microextraction)
DI-SPME	přímá extrakce na pevné fázi (direct immersing SPME)
HS-SPME	headspace extrakce na pevné fázi (headspace SPME)
EI	elektronová ionizace (electron impact)
m/z	podíl hmotnosti a náboje (mass-to-charge)

8 PŘÍLOHY

Příloha 1	Přehled deskriptorů vůní/zápachů vybraných aromaticky aktivních látek
Příloha 2	Chromatogram methylesterů vázaných a volných MK ve vzorku D po 56 dnech zrání
Příloha 3	Chromatogram methylesterů vázaných a volných MK ve vzorku G po 56 dnech zrání
Příloha 4	Chromatogram methylesterů vázaných a volných MK ve vzorku H po 56 dnech zrání
Příloha 5	Chromatogram methylesterů vázaných a volných MK ve vzorku I po 56 dnech zrání
Příloha 6	Chromatogram methylesterů vázaných a volných MK ve vzorku J po 56 dnech zrání
Příloha 7	Chromatogram těkavých látek ve vzorku D po 56 dnech zrání
Příloha 8	Chromatogram těkavých látek ve vzorku G po 56 dnech zrání
Příloha 9	Chromatogram těkavých látek ve vzorku H po 56 dnech zrání
Příloha 10	Chromatogram těkavých látek ve vzorku I po 56 dnech zrání
Příloha 11	Chromatogram těkavých látek ve vzorku J po 56 dnech zrání

Příloha 1: Přehled deskriptorů vůni/zápachů vybraných aromaticky aktivních látek

Název alkoholu	Deskriptory charakterizující vůni/zápach dané sloučeniny	Reference
Ethanol	Květinová, jemná, suchá, alkoholová	32, 33, 41, 50, 53
Propan-1-ol	Sladká, vínové tóny	41, 46
Propan-2-ol	Ovocná, citrusová, oříšková, alkoholová	41, 101
Propan-1,3-diol	Sýrová	42
2-methylpropan-1-ol	Ovocná, alkoholová, vařivá, čokoládová, vůně whisky, zápach plastu	28, 32, 41, 88
Butan-1-ol	Sladká, zápach rozpouštědla	32
Butan-2-ol	Ovocná, sladká, vínové tóny, zápach plastu	32, 46
Butan-2,3-diol	Ovocná, máslová, ořechová, zápach kyselého mléka	36, 44, 51
2-methylbutan-1-ol	Ovocná, alkoholová, kovový, zápach plastu, zápach rozpouštědla	28, 32, 101
3-methylbutan-1-ol	Ovocná, jemná, květinová, bylinná, alkoholová, čokoládová, vůně whisky, spálený, zápach chodidel	28, 39, 50, 51, 88, 95
3-methylbut-2-en-1-ol	Ovocná, sýrová, vůně zeleně	41
2-methylbut-3-en-2-ol	Mandlová, sladová	32
Pentan-1-ol	Ovocná, jemná, alkoholová, vůně zeleně, vůně Balsamica	33, 41, 95
2-methylpentan-3-ol	Grilovaný, vůně chleba	51
Pent-1-en-3-ol	Sladká	32
Hexan-1-ol	Bylinná, vůně zeleně	41, 95
2-ethylhexan-1-ol	Vůně zeleně, zápach lepenky, zvířecí pach	50, 95
Hex-3-en-1-ol	Vůně trávy	95
Heptan-2-ol	Ovocná, bylinná, vůně zeleně, vůně půdy, suchá, olejovitý, kovový	45, 51, 55, 93, 102
Oktan-2-ol	Vůně zeleně	33
Okt-1-en-3-ol	Houbová, kovový	31, 95
Okta-1,5-dien-3-ol	Vůně půdy	41
Nonan-2-ol	Vůně zeleně, mastný	41
Non-1-en-3-ol	Houbová	52
Benzylalkohol	Ovocná, květinová, vůně růží, vůně sušenek	51, 54
2-fenylethanol	Sladká, ovocná, květinová, vůně růží, vůně fialek, vínové tóny	41, 51, 53–55
Fenol	Pikantní, kouřový, kovový, zatuchlý, fekální	32, 51
3-methylfenol (<i>m</i> -kresol)	Ovčí, grilovaný	51
3-propylfenol	Zápach desinfekce	47
4-methylfenol (<i>p</i> -kresol)	Fenolický, pach kravína, fekální	28, 51
4-ethylfenol	Bylinná, vůně dřeva, vůně slaniny, kouřový	55

Příloha 1: Přehled deskriptorů vůní/zápachů vybraných aromaticky aktivních látek (pokračování)

Název aldehydu	Deskriptory charakterizující vůni/zápach dané sloučeniny	Reference
Methanal	Štiplavá, ostrý	97
Ethanal (Acetaldehyd)	Sladká, jablečná, vůně trávy, vůně zeleně, ostrý, štiplavý, pronikavý	33, 41, 93, 97
Propanal	Štiplavý	97
Prop-2-enal	Sýrová	42
2-methylpropanal (Isobutanal)	Sladká, květinová, čokoládová, oříšková, máslová, sýrová, vůně popcornu, vůně suchého salámu, sladová, vůně zeleně, štiplavý	31, 32, 41, 45, 52, 53, 97, 101
Butanal	Zápach ovčího tuku	101
2-methylbutanal	Ovocná, sladká, čokoládová, oříšková, mandlová, lehce karamelová, sýrová, sladová, vůně zeleně, kyselý	31, 41, 44, 45, 47, 93, 95
3-methylbutanal (Isopentanal)	Ovocná, sladká, jablečná, čokoládová, oříšková, sýrová, sladová, bylinná, vůně zeleně, štiplavý	28, 31, 32, 41, 43, 45, 52, 95
3-methylbut-2-enal	Bylinná, kovový	33
Pentanal	Pomerančová, mandlová, sladová, bylinná, vůně trávy, štiplavý, pronikavý	41, 52, 95, 97
Pent-2-enal	Květinová, vůně zeleně, mastný	97, 101
Hexanal	Ovocná, jablečná, citronová, bylinná, vůně zeleně, vůně trávy, lojovitý	32, 50–52, 93, 95
Hex-2-enal	Květinová, vůně zeleně, mastný	95, 97, 101
Hex-3-enal	Vůně zeleně	97
Hexa-2,4-dienal	Vůně zeleně, tukový	95
Heptanal	Ovocná, sladká, citrusová, bylinná, vůně zeleně, mýdlový, tukový, zatuchlý	33, 41, 52, 93, 95, 101
Hept-2-enal	Olejovitý, mastný	97
Hept-4-enal	Vůně sušenek, zápach žluklého tuku, kovový	32, 41, 93
Hepta-2,4-dienal	Olejovitý, mastný, zápach po smaženém tuku	48, 97
Oktanal	Ovocná, citrusová, pomerančová, citronová, grapefruitová, vůně zeleně, mastný, tukový	41, 50, 52, 93, 95, 101
Okt-2-enal	Ovocná, oříšková, vůně vlašských ořechů, vůně zeleně, jemně cibulový, mastný, tukový	45, 95, 97
Nonanal	Ovocná, sladká, citrusová, hrášková, bylinná, vůně zeleně, vůně trávy, mastný, tukový, kožený, zápach plastu	32, 33, 41, 50–52, 93, 95
Non-2-enal	Okurková, vůně zeleně, vůně dřeva, vůně sena, mastný, tukový, lojovitý, zápach lepenky	47, 53, 93, 95, 103
Nona-2,4-dienal	Ovocná, okurková, lékořicová, tukový, smažený	32, 41, 45, 95
Nona-2,6-dienal	Okurková, máslová, melounová, vůně zeleně, smažený, mastný, mýdlový, voskový	41, 45, 93, 95, 97
Nona-3,6-dienal	Okurková	97
Dekanal	Oříšková, vůně zeleně	41
Deka-2,4-dienal	Sladká, vůně zeleně, grilovaný, smažený, kovový	32, 48, 51, 97
Deka-2,4,7-trienal	Zápach rybího tuku	97

Příloha 1: Přehled deskriptorů vůní/zápachů vybraných aromaticky aktivních látek (pokračování)

Název aldehydu	Deskriptory charakterizující vůni/zápach dané sloučeniny	Reference
Dodeka-2,4-dienal	Mléčná	41
Hexadekanal	Chemický, fekální	51
Benzaldehyd	Třešňová, vůně chleba, hořkomandlová, spálený	46, 50, 55, 95
2-fenylethanal (Fenylacetaldehyd)	Sladká, medová, květinová, vůně růží, vůně sedmikrásky, karamelová, pražená	41, 45, 48, 55

Název ketonu	Deskriptory charakterizující vůni/zápach dané sloučeniny	Reference
Propan-2-on (Aceton)	Ovocná, sladká, vůně sena, zápach kyselého mléka, zápach buničiny	33, 41, 93
Butan-2-on	Ovocná, sladká, máslová, zápach laku, zápach odpadků	32, 33, 55
1-hydroxybutan-2-on	Květinová, bylinná	51
3-hydroxybutan-2-on (Acetoin)	Květinová, máslová, karamelová, zápach kyselého mléka	44, 45, 50, 51
Butan-2,3-dion (Diacetyl)	Sladká, oříšková, máslová, karamelová, vanilková	45, 47, 50, 55, 88, 93
Pentan-2-on	Ovocná, sladká, karamelová, sýrová, vůně pomerančové slupky, zatuchlý	32, 33, 41, 45
3-hydroxypentan-2-on	Bylinná, vůně půdy, vůně lanýže	41
3-methylpentan-2-on	Vůně bonbonů	41
Pentan-2,3-dion	Máslová, krémová, karamelová, vanilková	26, 32, 48, 52
Hexan-2-on	Ovocná, květinová, nemocniční zápach	32, 33
Hex-1-en-3-on	Zápach plastu	52
Heptan-2-on	Sladká, květinová, vůně plísňového sýra, mastný, plesnivý, zápach laku, zápach plastu	32, 41, 47, 51, 93
6-methylhept-5-en-2-on	Vůně dřeva, vůně mechu	53
Oktan-2-on	Ovocná, květinová, vůně trávy	41, 47
6-methyloktan-2-on	Vůně dřeva, vůně mechu	53
Oktan-3-on	Ovocná, houbová, vůně půdy	33, 41
Okt-1-en-3-on	Silná houbová, vůně půdy	33, 41
Okta-1,5-dien-3-on	Zápach plastu, olejovitý, mastný, kovový	52, 97
Nonan-2-on	Ovocná, květinová, čajová, broskvová, sýrová, houbová, vůně půdy, vůně trávy, vůně maggi, vůně plísňového sýra, mastný, zápach shnilého jablka	41, 44–47, 53, 55, 93
Non-1-en-3-on	Houbová	50
Non-8-en-2-on	Pečená, uzená, vůně plísňového sýra	41, 55
Dekan-2-on	Ovocná, květinová	41
Undekan-2-on	Ovocná, květinová, bylinná, vůně růží, plesnivý	33, 41
Tridekan-2-on	Bylinná, kořeněná, kyselý, nepříjemný, kozi	41, 51
Pentadekan-2-on	Vlhká	41
Acetofenon	Vůně vařené rýže	32

Příloha 1: Přehled deskriptorů vůni/zápachů vybraných aromaticky aktivních látek (pokračování)

Název mastné kyseliny	Deskriptory charakterizující vůni/zápach dané sloučeniny	Reference
Kyselina ethanová (Kyselina octová)	Octový, drsný, pronikavý, ostrý, kyselý	32, 33, 47, 50, 93
Kyselina propanová (Kyselina propionová)	Ovocná, květinová, sýrová, zápach kyselého mléka, ostrý, kyselý, pronikavý, spálený, sirný, zápach chodidel, zápach rozpouštědla	33, 36, 41, 50
Kyselina 2-methylpropanová (Kyselina isomáselná)	Ovocná, sladká, sýrová, máslová, karamelová, hořkomandlová, kyselý, štiplavý, zatuchlý, zápach žluklého másla, zápach shnilého ovoce, zápach potu, zápach zvratků	32, 36, 45, 48, 50, 51, 53
Kyselina butanová (Kyselina máselná)	Ovocná, sladká, sýrová, kaštanová, kyselý, nepříjemný, ostrý, zatuchlý, shnilý, fekální, zápach kvašení, zápach potu, zápach chodidel, zápach zvratků	32, 36, 41, 47, 50, 52, 53, 55, 93
Kyselina 2-methylbutanová (Kyselina 2-methylmáselná)	Ovocná, sýrová, ovčí, kozí, voskový, ostrý, kyselý, zatuchlý, fekální, zápach potu, zápach shnilého ovoce	32, 36, 41, 48, 50, 51, 55
Kyselina 3-methylbutanová (Kyselina isovalerová)	Sýrová, mírná, kyselý, nepříjemný, ostrý, zatuchlý, fekální, zápach shnilého ovoce, zápach potu, zápach chodidel, zápach zvratků	33, 41, 45, 50, 55, 101
Kyselina 2-ethylbutanová (Kyselina 2-ethylmáselná)	Ovocná, příjemná	36
Kyselina pentanová (Kyselina valerová)	Ořísková, sýrová, zeleninová, kořeněná, vůně dřeva, vůně obilí, vůně zeleně, nepříjemný, kyselý, zápach potu	36, 41, 47, 50, 51, 54
Kyselina 4-methylpentanová (Kyselina isokapronová)	Sýrová, bylinná, kyselý, štiplavý	45, 51
Kyselina hexanová (Kyselina kapronová)	Sýrová, kyselý, mastný, pronikavý, ostrý, štiplavý, kozí, pach potu, pach chodidel, spálený, fekální	32, 33, 36, 51, 55
Kyselina heptanová (Kyselina enenthová)	Sýrová, mýdlový, kozí, zatuchlý, fekální	36, 47, 51
Kyselina oktanová (Kyselina kaprylová)	Uzená, nepříjemný, mastný, mýdlový, voskový, kaučukový, zatuchlý, kozí, hnilobný, zápach potu, zápach čisticích prostředků, fekální	32, 34, 36, 41, 45, 51, 55
Kyselina 4-methyloktanová (Kyselina 4-methylkaprylová)	Kozí	41
Kyselina 4-ethyloktanová (Kyselina 4-ethylkaprylová)	Kozí	41
Kyselina nonanová (Kyselina pelargonová)	Ovocná, bylinná, mastný, kozí, spálený, zatuchlý, fekální	32, 41, 51, 55
Kyselina dekanová (Kyselina kaprinová)	Vůně trávy, vůně kyselého ovoce, mastný, voskový, kozí, nepříjemný, spálený	32, 41, 45, 51, 55
Kyselina dec-9-enová (Kyselina kaprolejová)	Sladká, květinová, vůně zeleně	36, 51
Kyselina undekanová (Kyselina undecylová)	Mýdlový, voskový	36

Příloha 1: Přehled deskriptorů vůní/zápachů vybraných aromaticky aktivních látek (pokračování)

Název mastné kyseliny	Deskriptory charakterizující vůni/zápach dané sloučeniny	Reference
Kyselina dodekanová (Kyselina laurová)	Vůně horkého mléka, mýdlový, mastný, voskový, kovový	32, 36, 41, 45
Kyselina tetradekanová (Kyselina myristová)	Mastný, hnilobný, zápach potu, zvířecí pach	41, 45
Kyselina fenylethanová (Kyselina fenylactová)	Sladká, medová, vůně růží	32, 41
Kyselina fenylpropanová (Kyselina fenylpropionová)	Květinová	41

Název esteru	Deskriptory charakterizující vůni/zápach dané sloučeniny	Reference
Methyl-butyrát	Ovocná, sladká, jablečná	47, 95
Methyl-2-methylbutyrát	Sladká, květinová, hroznová, karamelová	41, 54, 95
Methyl-3-methylbutyrát	Medová	97
Methyl-hexanoát (Methyl-kapronát)	Ovocná, jablečná, ananasová, lískooříšková, karamelová, vůně horkého mléka	93, 95, 97, 101
Methyl-oktanoát (Methyl-kaprylát)	Karamelová, vůně Balsamica, vůně exotických květů	55
Methyl-dekanoát (Methyl-kaprinát)	Ovocná, květinová, kokosová, bylinná	51
Ethyl-acetát	Ovocná, ananasová, jablečná, spálený	32, 41
Ethyl-2-methylpropionát	Vůně nezralého ovoce, vůně zeleně	41
Ethyl-butyrát	Ovocná, sladká, květinová, jablečná, kokosová, banánová, vůně žvýkačky	33, 45, 47, 51, 54, 93, 95
Ethyl-2-methylbutyrát	Ovocná, sladká	32, 41
Ethyl-3-methylbutyrát	Ovocná, olivová, sýrová	32, 41, 51
Ethyl-pentanoát (Ethyl-valerát)	Ovocná, sladká, melounová	32, 47, 93
Ethyl-hexanoát (Ethyl-kapronát)	Ovocná, sladká, květinová, jahodová, jablečná, melounová, pomerančová, kokosová, ananasová, banánová	32, 33, 45, 47, 51, 53, 101
Ethyl-oktanoát (Ethyl-kaprylát)	Ovocná, sladká, květinová, jablečná, pomerančová, ananasová, hrušková, banánová, karamelová, vůně půdy, mýdlový, spálený	32, 33, 41, 51, 55, 95
Ethyl-nonanoát	Ovocná, sýrová	51
Ethyl-dekanoát (Ethyl-kaprinát)	Ovocná, květinová, jablečná, hroznová, vůně brandy, zápach rozpouštědla	55, 95
Ethyl-dodekanoát (Ethyl-laurát)	Květinová, vanilková	51
Ethyl-benzoát	Květinová, arašídová, grilovaný	41, 51
Ethyl-laktát	Mandarinková	97
Propyl-butyrát	Ovocná, sladká	32, 41
Propyl-oktanoát (Propyl-kaprylát)	Bylinná	54
Butyl-acetát	Citrónová, ananasová, zápach rozpouštědla	33, 54, 97
Butyl-2-methylpropionát	Ananasová	97

Příloha 1: Přehled deskriptorů vůni/zápachů vybraných aromaticky aktivních látek (pokračování)

Název esteru	Deskriptory charakterizující vůni/zápach dané sloučeniny	Reference
Butyl-pentanoát (Butyl-valerát)	Jablečná	97
Butyl-hexanoát (Butyl-kapronát)	Ovocná, květinová	51
Isobutyl-acetát	Vůně žvýkačky	32
Isobutyl-butyřát	Ovocná	41
Isobutyl-oktanoát (Isobutyl-kaprylát)	Ovocná	55
Pentyl-acetát	Ovocná, hrušková	41, 97
Pentyl-oktanoát (Pentyl-kaprylát)	Vůně brandy, vůně whisky	97
Isoamyl-acetát	Ovocná, sladká, banánová	41
Isoamyl-butyřát	Ovocná, sladká, karamelová	55
Isoamyl-hexanoát (Isoamyl-kapronát)	Sladká, medová, mátová, vůně divoké růže	41, 55
Hexyl-acetát	Ovocná, vůně červených bobulí	95
2-fenylethyl-acetát	Sladká, květinová, bylinná, vůně růží	39, 41, 55
2-fenylethyl-butyřát	Květinová	39
S-methyl-thioacetát	Vůně vařeného kvěťáku	36
S-methyl-thiopropionát	Sýrová	36
S-methyl-thiobutyřát	Vůně pažitky	36
Allyl-hexanoát (Allyl-kapronát)	Ananasová	97

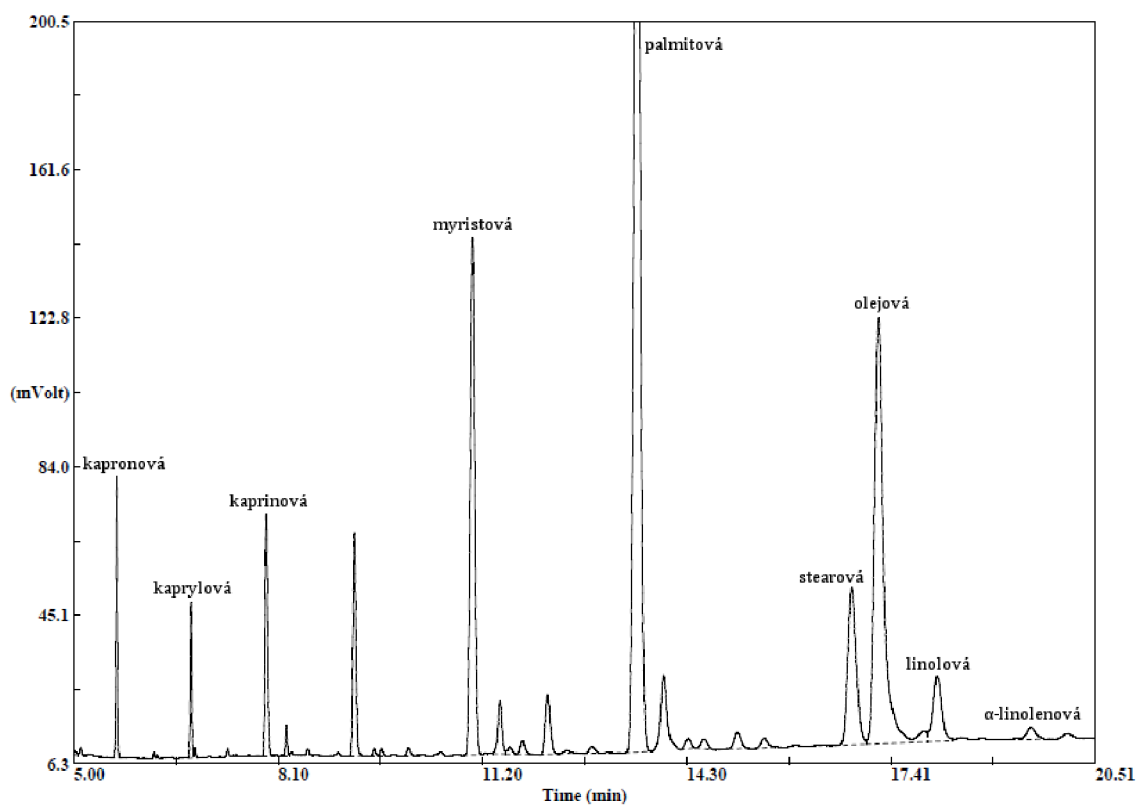
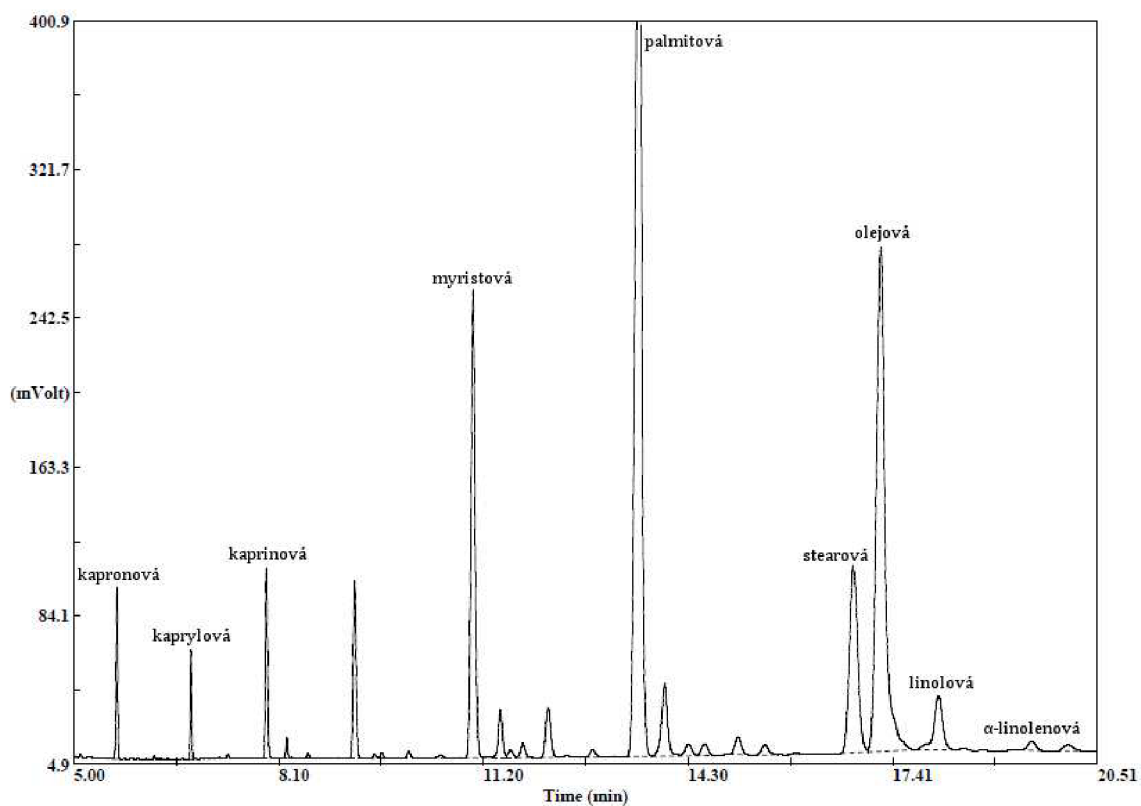
Název laktonu	Deskriptory charakterizující vůni/zápach dané sloučeniny	Reference
γ -butyrolakton	Sladká, lískooříšková, slabě máslová, karamelová, vůně horkého mléka	97, 101
γ -hexalakton	Sladká, kokosová, zeleninová, pečená	32, 47, 51
γ -heptalakton	Ovocná, sladká, vůně zeleně	50, 101
γ -oktalakton	Sladká, kokosová, melounová	47
δ -oktalakton	Ovocná, sladká, květinová, broskvová, kokosová, kozí	41, 51, 54
γ -nonalakton	Ovocná, sladká, květinová, kokosová, bylinná, máslová, karamelová	32, 51, 95
γ -dekalakton	Ovocná, květinová, meruňková, broskvová, jahodová, krémová	32, 51, 97
δ -dekalakton	Sladká, květinová, kokosová, broskvová, máslová, krémová	41, 51, 55
γ -dodekalakton	Ovocná, sladká, broskvová, švestková, kokosová, máslová	33, 51, 93, 97
(Z)- γ -dodek-6-enolakton	Sladká, citrónová, broskvová, karamelová	41
δ -dodekalakton	Ovocná, sladká, bylinná, meruňová, broskvová, mandlová, kokosová, máslová, sýrová	32, 41, 47

Příloha 1: Přehled deskriptorů vůní/zápachů vybraných aromaticky aktivních látek (pokračování)

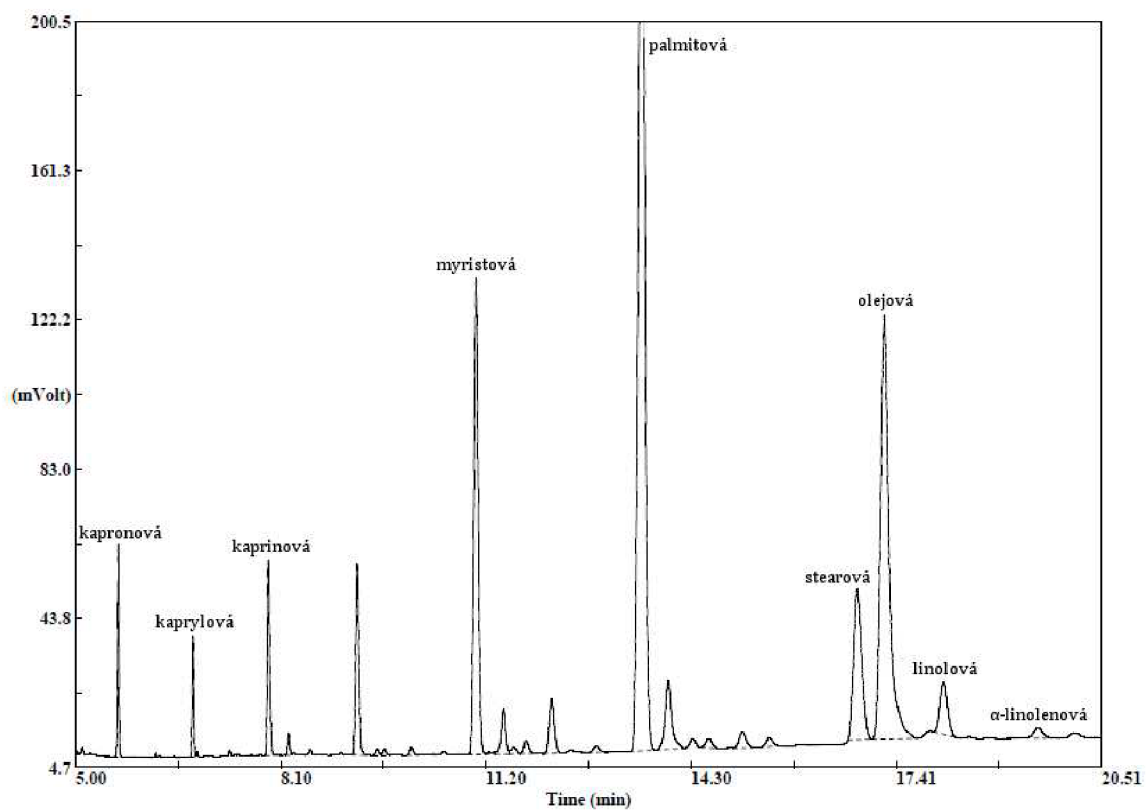
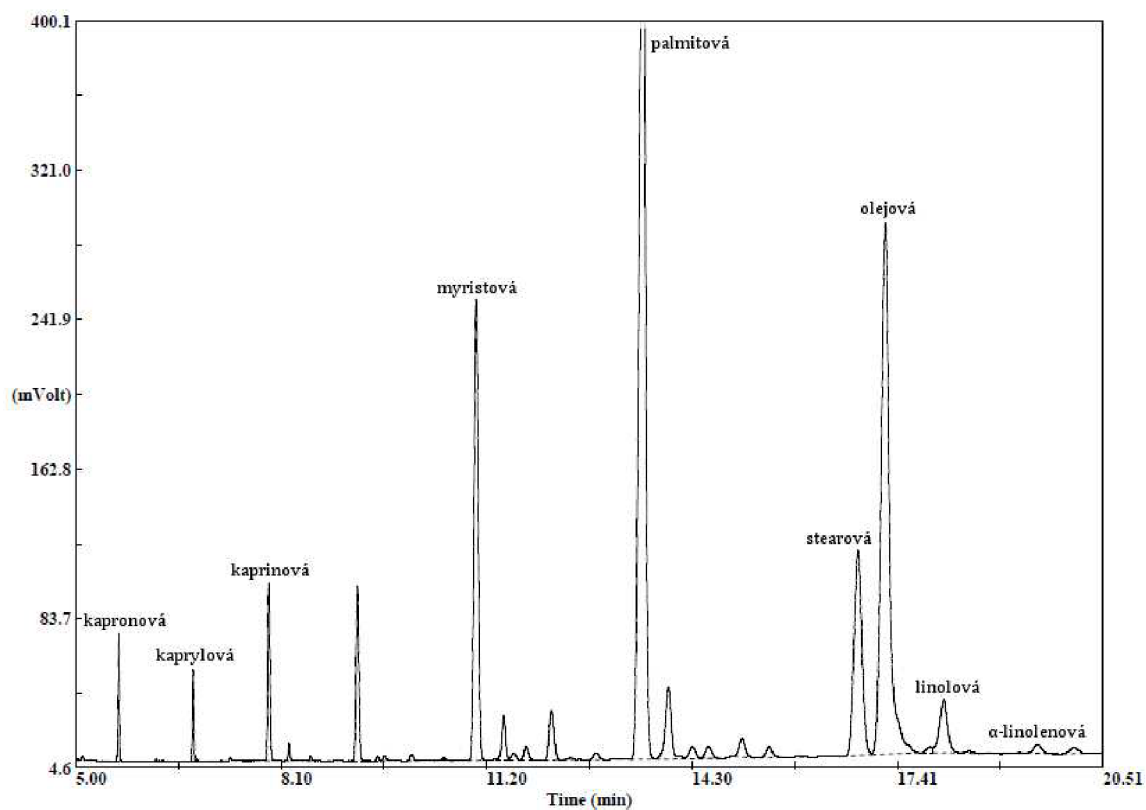
Název sirné sloučeniny	Deskriptory charakterizující vůni/zápach dané sloučeniny	Reference
Methanthiol	Vůně vařeného zelí, sirný, česnekový, výrazný zápach kvašeného zelí, benzínový	36, 47, 93, 95
Ethanthiol	Sirný, česnekový	95
Propanthiol	Sirný, česnekový	95
2-methylthioethanol	Vůně kuřecího vývaru, vůně pečeného kuřete, sirný	47, 95
3-methylthiopropenal (Methional)	Vůně vařených brambor, vůně půdy, cibulový, štiplavý	45, 55, 95
Allylmethylsulfid	Mírně sirný, česnekový, pikantní	47
Dimethylsulfid	Vůně zelí, vůně kukuřice, sirný, zápach zkaženého česneku	36, 41, 93, 95
Diallyldisulfid	Sirný, česnekový	32, 97
Dimethyldisulfid	Vůně vařeného zelí, vůně vařeného kvěťáku, sirný, česnekový, cibulový	33, 36, 41, 47
Dimethyltrisulfid	Zeleninová, vůně trávy, vůně celeru, vůně brokolice, vůně vařeného kvěťáku, vůně vařeného zelí, vůně vařené kukuřice, sirný, česnekový, cibulový, štiplavý, hñijící	32, 36, 41, 45, 47, 52
Dimethyltetrasulfid	Vůně vařeného zelí, česnekový, kvěťákový, hñijící	41, 47
Diethyldisulfid	Vůně dřeva	32
Dimethylsulfon	Vůně horkého mléka, sirný, spálený	41

Název sloučeniny (skupina „ostatní“)	Deskriptory charakterizující vůni/zápach dané sloučeniny	Reference
Linalool	Sladká, kvěťinová, citrusová, pomernačová	41, 54
Isoborneol	Terpenovitý	41
β -damascenon	Ovocná, sladká, kvěťinová, jablečná, broskvová	32, 41, 54
β -ionon	Kvěťinová, vůně dřeva	54
L-karvon	Bylinná, kmínová	41, 97
D-Limonen	Mátová	32
Citral	Citronová, hořkosladká, silný	96
Citronellol	Vůně růží	96

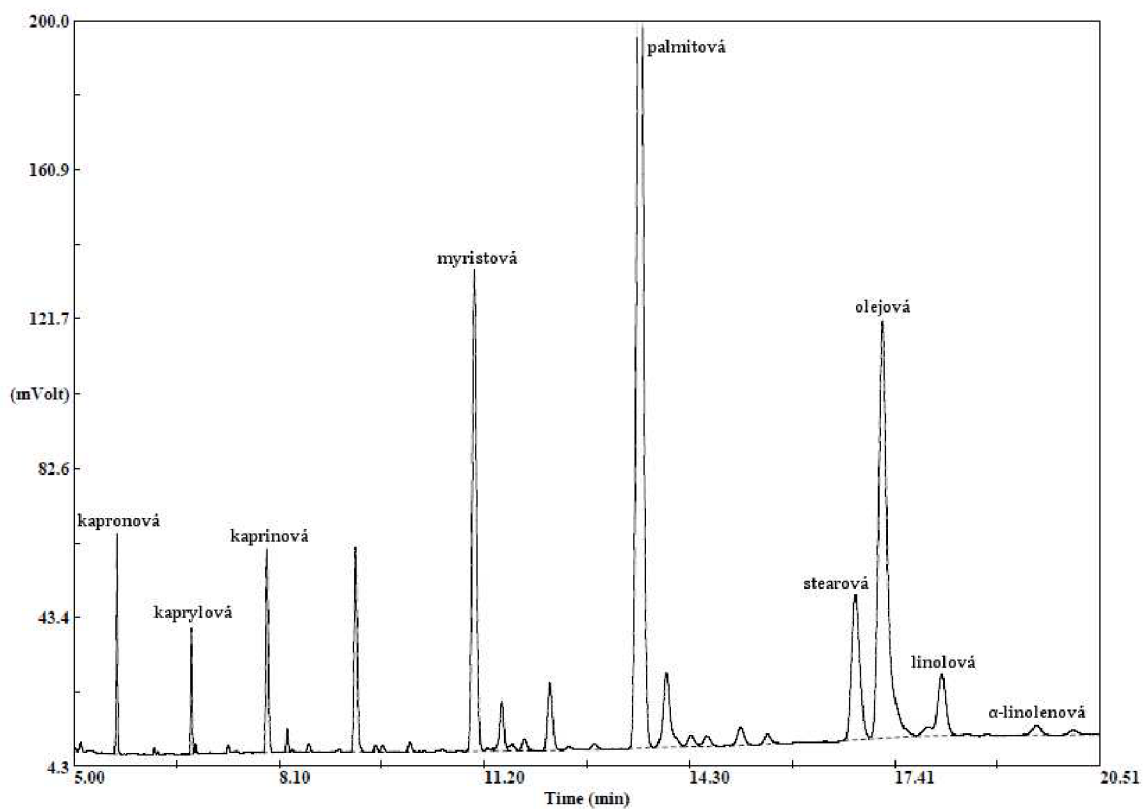
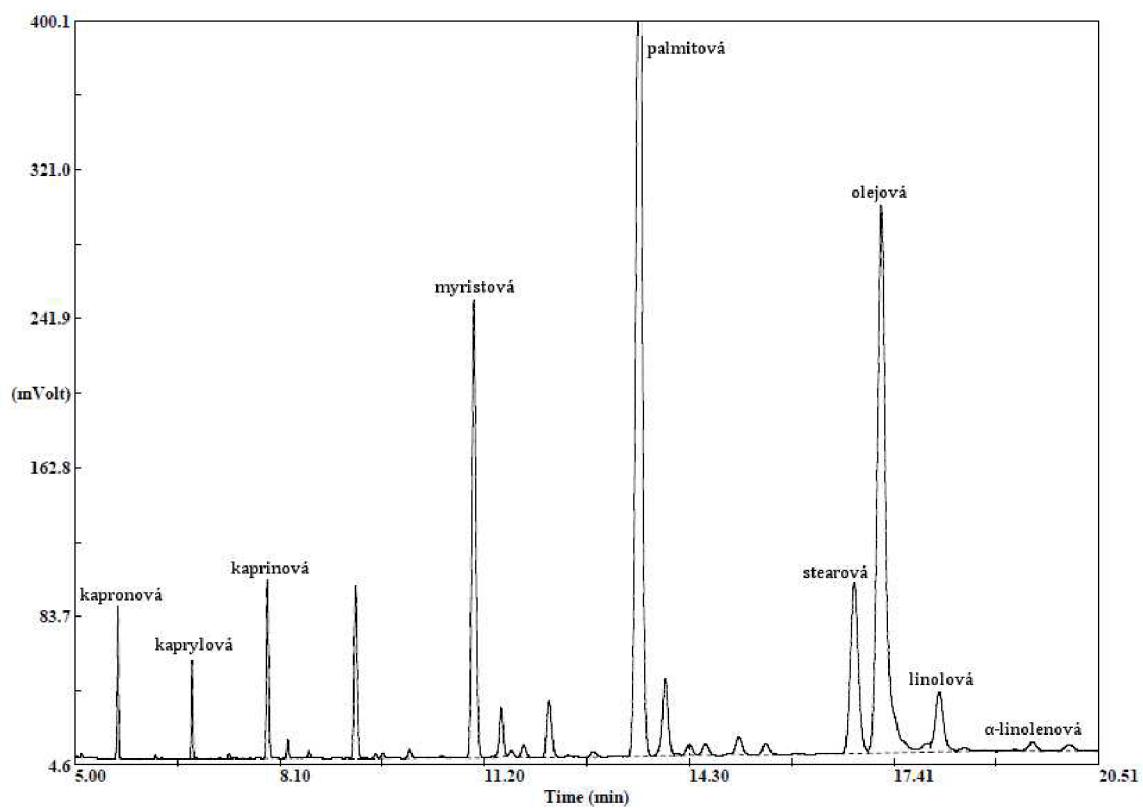
Příloha 2: Chromatogram methylesterů vázaných a volných MK ve vzorku D po 56 dnech zrání; vázané MK – nahoře (100× zředěno); volné MK – dole (10× zředěno); identifikace sloučenin na základě retenčních časů (viz Tabulka 6); vyznačeny MK nejvýznamnější pro mléčný tuk



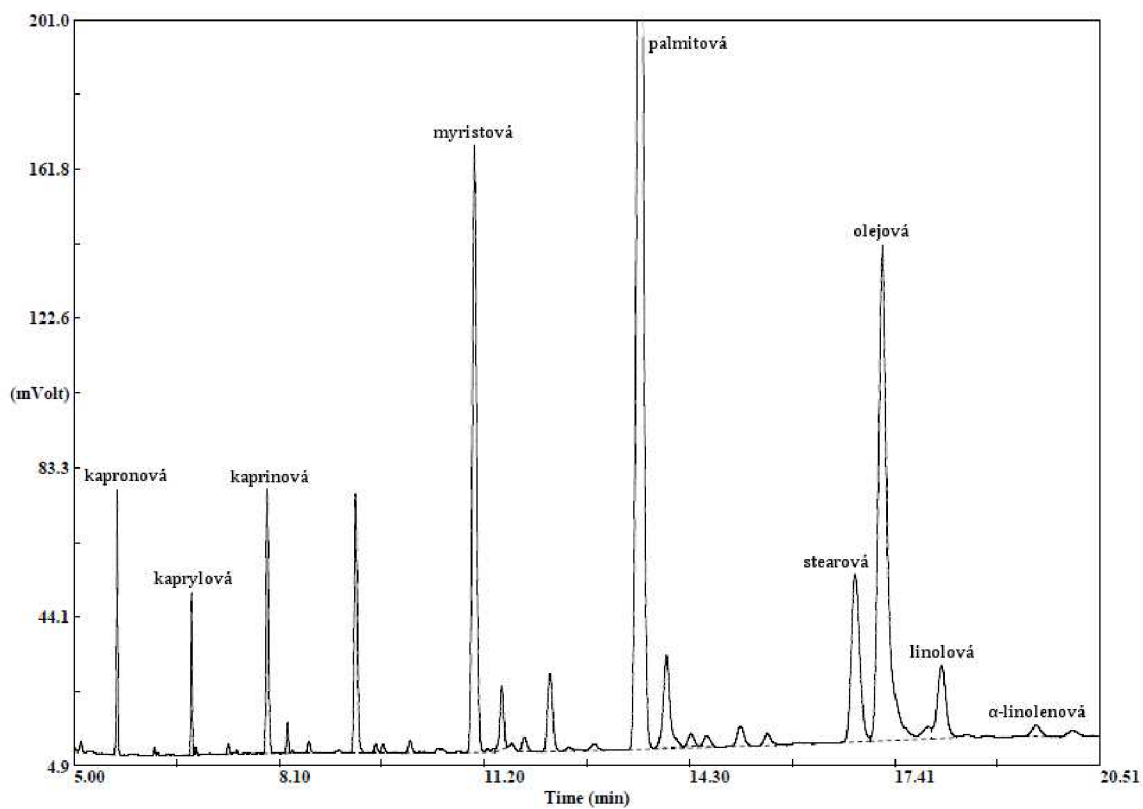
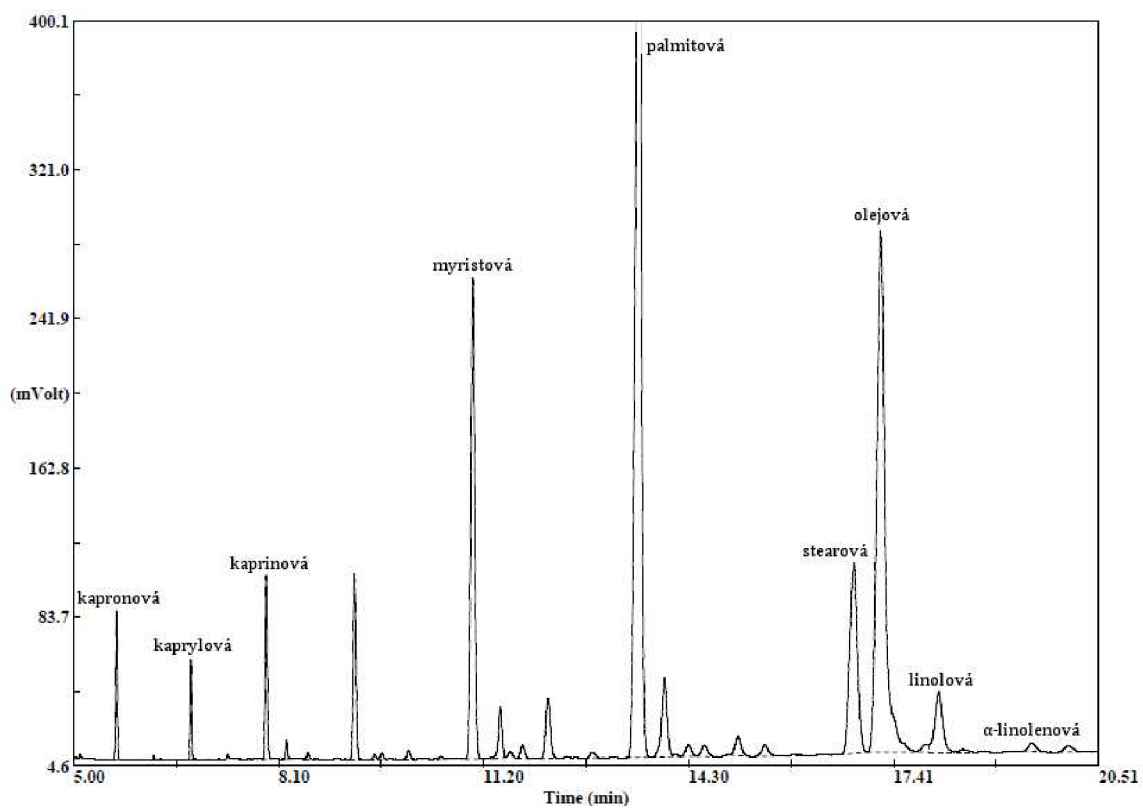
Příloha 3: Chromatogram methylesterů vázaných a volných MK ve vzorku G po 56 dnech zrání; vázané MK – nahoře (100× zředěno); volné MK – dole (10× zředěno); identifikace sloučenin na základě retenčních časů (viz Tabulka 6); vyznačeny MK nejvýznamnější pro mléčný tuk



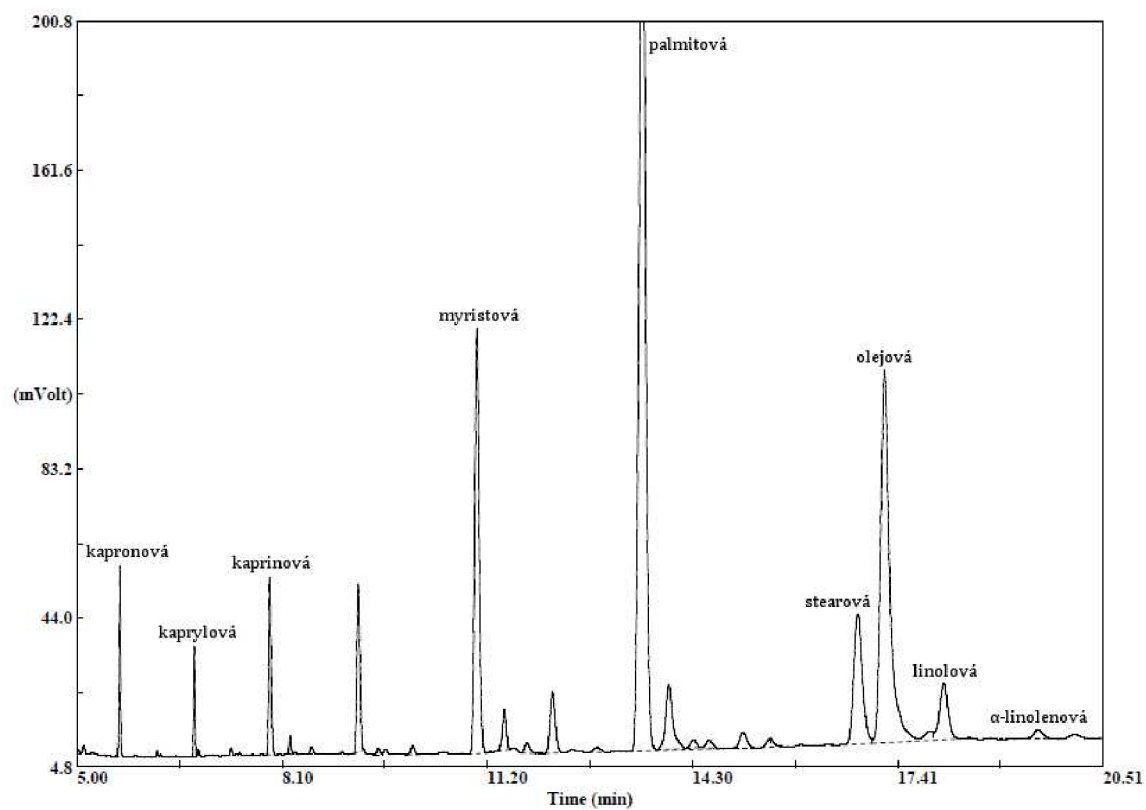
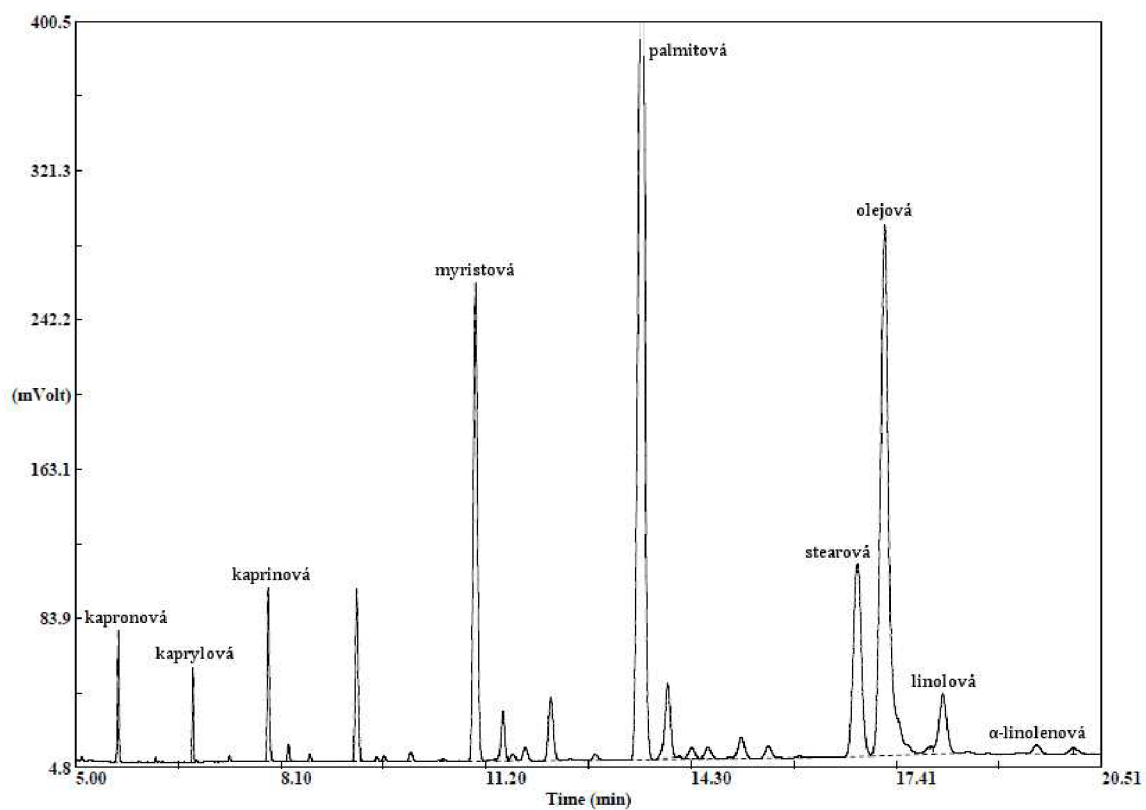
Příloha 4: Chromatogram methylesterů vázaných a volných MK ve vzorku H po 56 dnech zrání; vázané MK – nahoře (100× zředěno); volné MK – dole (10× zředěno); identifikace sloučenin na základě retenčních časů (viz Tabulka 6); vyznačeny MK nejvýznamnější pro mléčný tuk



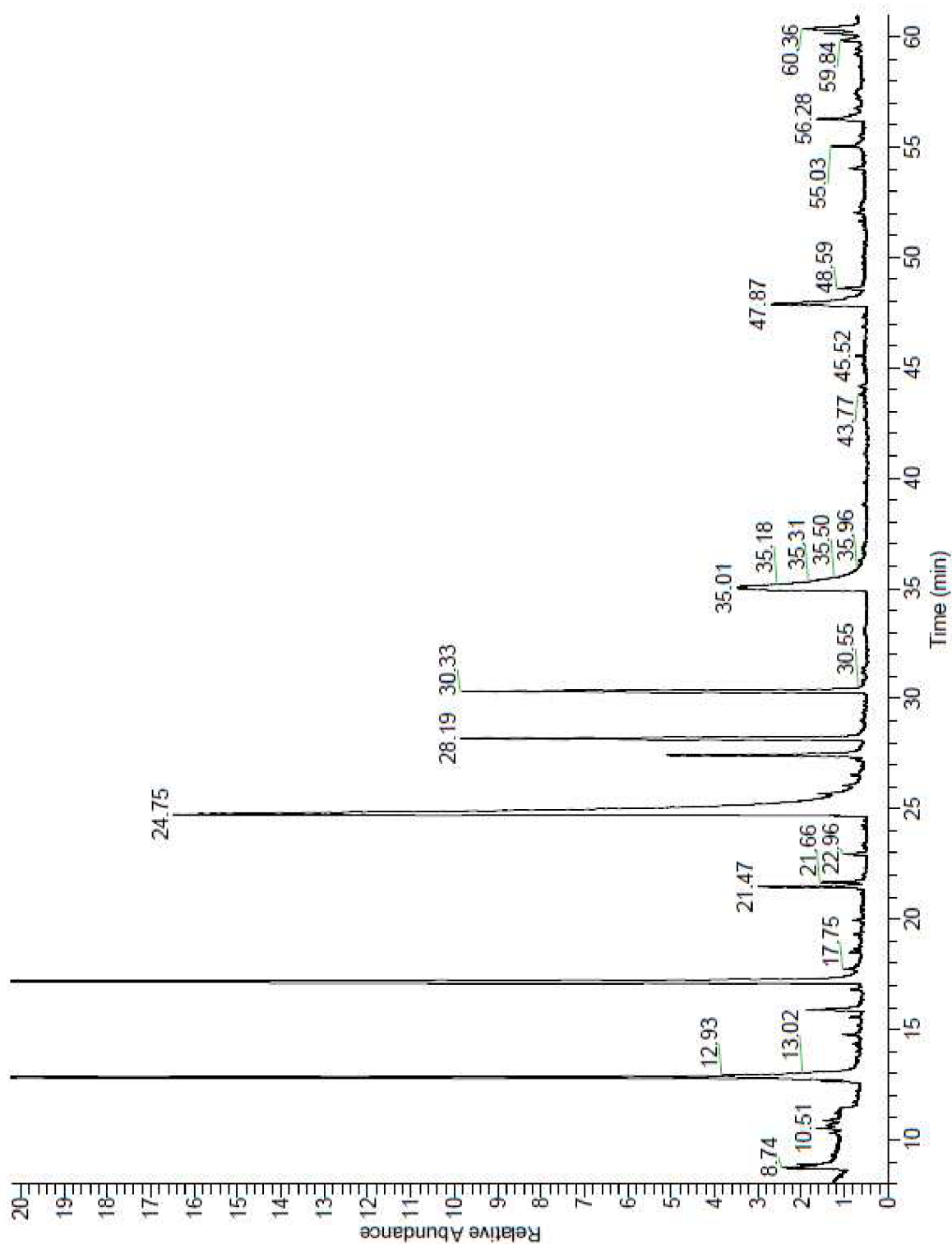
Příloha 5: Chromatogram methylesterů vázaných a volných MK ve vzorku I po 56 dnech zrání; vázané MK – nahoře (100× zředěno); volné MK – dole (10× zředěno); identifikace sloučenin na základě retenčních časů (viz Tabulka 6); vyznačeny MK nejvýznamnější pro mléčný tuk



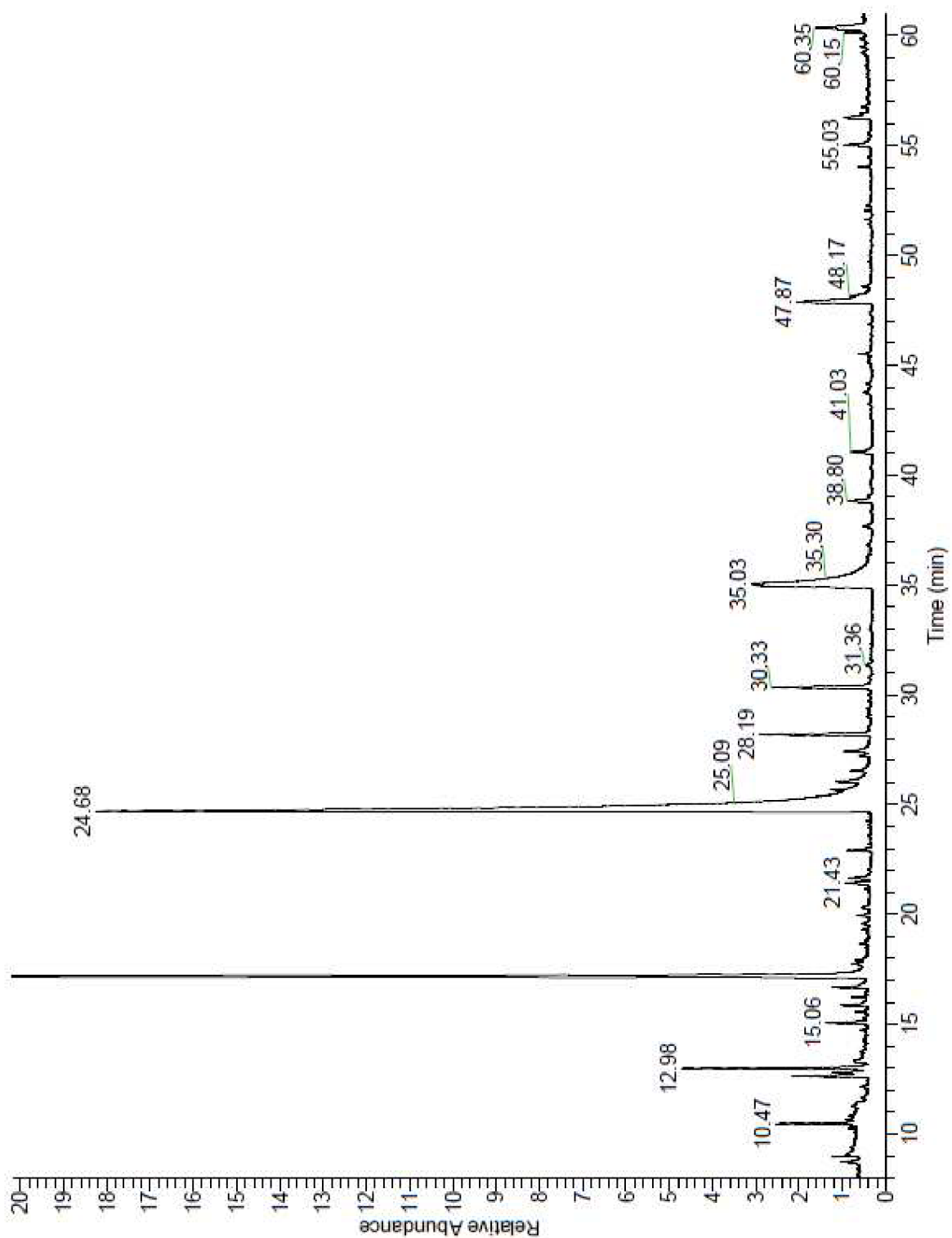
Příloha 6: Chromatogram methylesterů vázaných a volných MK ve vzorku J po 56 dnech zrání; vázané MK – nahoře (100× zředěno); volné MK – dole (10× zředěno); identifikace sloučenin na základě retenčních časů (viz Tabulka 6); vyznačeny MK nejvýznamnější pro mléčný tuk



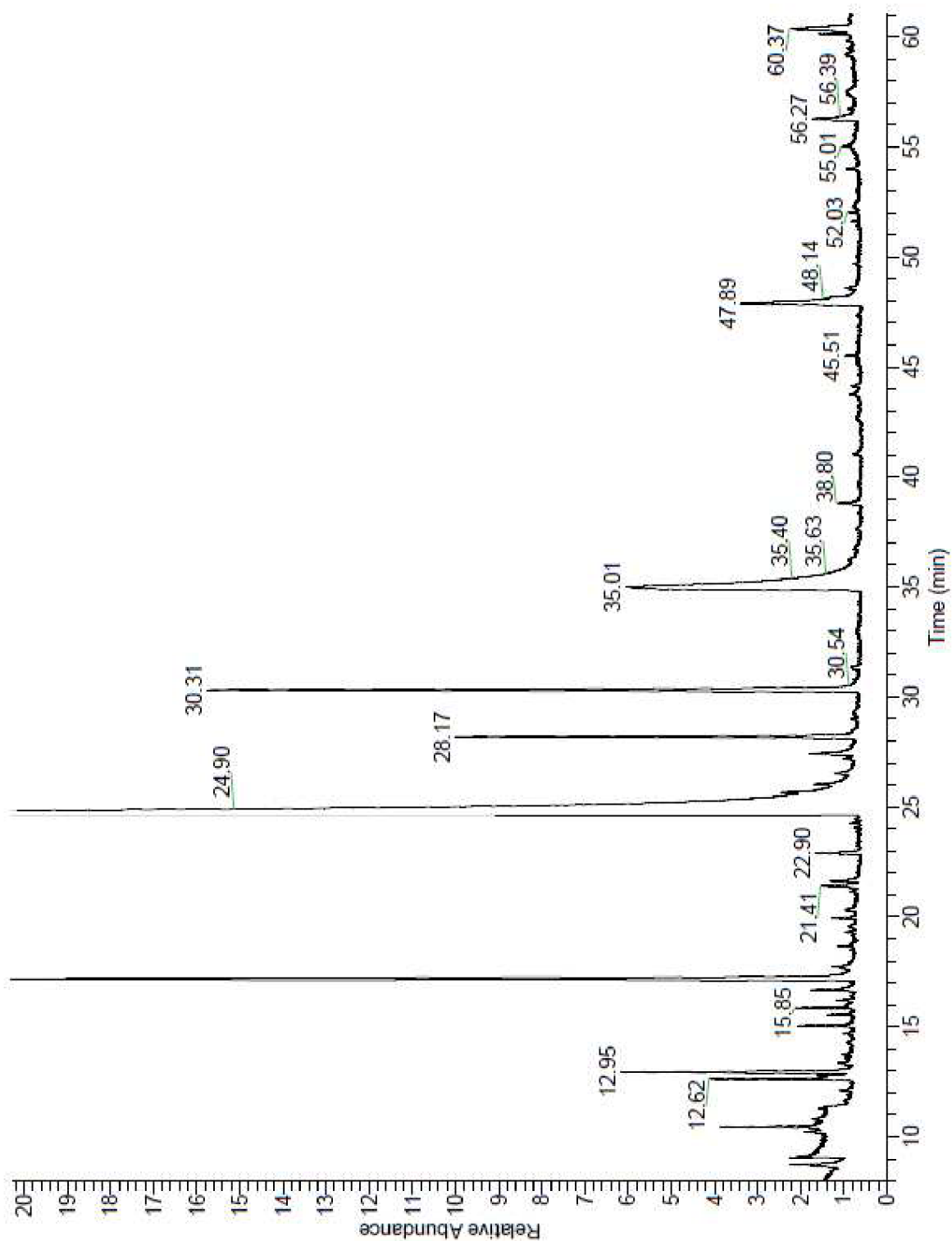
Příloha 7: Chromatogram těkavých látek ve vzorku D po 56 dnech zrání; identifikace sloučenin na základě retenčních časů (viz Tabulka 12)



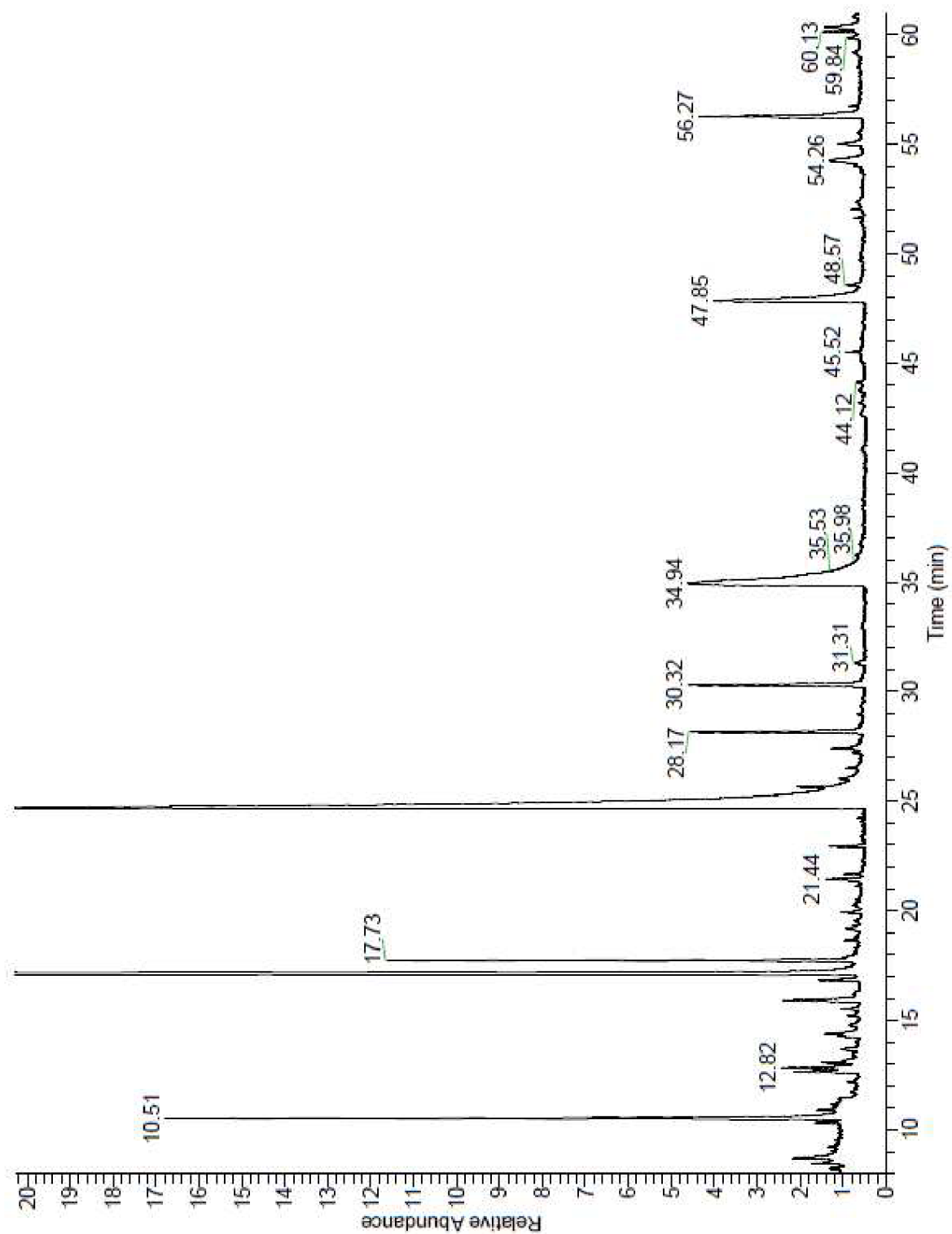
Příloha 8: Chromatogram těkavých látek ve vzorku G po 56 dnech zrání; identifikace sloučenin na základě retenčních časů (viz Tabulka 12)



Příloha 9: Chromatogram těkavých látek ve vzorku H po 56 dnech zrání; identifikace sloučenin na základě retenčních časů (viz Tabulka 12)



Příloha 10: Chromatogram těkavých látek ve vzorku I po 56 dnech zrání; identifikace sloučenin na základě retenčních časů (viz Tabulka 12)



Příloha 11: Chromatogram těkavých látek ve vzorku J po 56 dnech zrání; identifikace sloučenin na základě retenčních časů (viz Tabulka 12)

